

ホウ素中性子捕捉療法のための
リポペプチド結合型膜透過性ホウ素キャリアの開発

2019

磯野 蒼

目次

理論の部

序章	1
著者の研究方針	6
第一章 リポペプチド型膜透過性ホウ素キャリア分子の設計	8
第二章 リポペプチド型膜透過性ホウ素キャリアの合成	11
第一節 合成戦略	11
第二節 Lys 誘導体、Fmoc-L-Lys(COC ₂ H ₄ STrt)-OH (3) 及び Fmoc-L-Lys(CO ₂ C ₂ H ₄ SDmt)-OH (4)の合成	12
第三節 Normal linker 及び palmitoyl 基から構成されるリポペプチド結合型ホウ素キャリア (9a-9j , 10a)の合成	13
第四節 Normal linker 及び palmitoyl 基以外の脂質分子から構成されるリポペプチド結合型ホウ素キャリア (12a-12e)の合成	15
第五節 Amine linker (piperazine linker/liner amine linker)を有するリポペプチド結合型ホウ素キャリア (18/28)の合成	17
第三章 細胞内取り込み能を指標とするリポペプチド型膜透過ホウ素キャリアの構造-機能相関	20
第一節 9a 及び 9b の経時的細胞内取り込み量の評価	21
第二節 ペプチド配列、脂質分子、リンカーによる効果の検討	22
第四章 9a 及び 18 の機能評価	25
第一節 リポペプチド結合型ホウ素キャリア 9a の血清培地中での安定性評価	25
第二節 PAR1 発現の有無とリポペプチド結合型ホウ素キャリアの細胞取り込みの関係性	27
第一項 T98G 細胞の PAR1 発現の有無について	27
第二項 T98G 細胞を用いた競合阻害実験とジスルフィド還元試薬での処理による BSH 細胞内取り込みへ与える影響について	28
第三項 PAR1 発現細胞と非発現細胞におけるホウ素キャリアの取り込み様式について	30
第三節 9a 及び 18 の毒性試験	31
第四節 中性子照射下の 9a および 18 の放射線増感効果	32
第五章 総括及び展望	34
謝辞	37
略語一覧	38

実験の部

第二章 第二節に関する実験	40
第二章 第三節に関する実験	42
第二章 第四節に関する実験	52
第二章 第五節に関する実験	56
第三章 第一節に関する実験	65
第三章 第二節に関する実験	66
第四章 第一節に関する実験	66
第四章 第二節に関する実験	67
第四章 第三節に関する実験	68
第四章 第四節に関する実験	68
化合物 4, 8-12, 16, 18, 27 及び 28 の HPLC チャート	70
参考論文	82
主論文目録	89

理論の部

序章

日本では 1980 年代以降、がんは死因別死亡率では第一位であり、年間 30 万人以上の患者ががんで亡くなっている。分子標的薬の発見や検査精度の改善による早期発見により膵臓がんを除く消化器系のがんや血液系のがん等、一部のがんでは 5 年生存率が高まってきている。一方で、膵臓がん、脳腫瘍、黒色腫等のがんが依然として 5 年生存率が低い¹。

そのような中で近年、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT; Boron Neutron Capture Therapy)²⁻⁴ への期待が高まっている。

BNCT は二次粒子線治療法であり、¹⁰B 原子と熱外中性子が反応し、細胞傷害性の α 粒子と Li 反跳原子を生成することを利用している (式 1)。生じた α 線と Li 粒子の飛程は約 5-9 μm とがん細胞一つ分の直径に相当し、細胞内で全エネルギーを失う。重粒子線治療法等の一次粒子線治療法とは異なり、熱外中性子単体では細胞傷害性が低く、¹⁰B 原子が蓄積した細胞のみを傷害することから、ホウ素薬剤をがん細胞のみに送達することができれば、隣接する正常細胞を傷害せず、がん細胞のみを傷害する細胞選択的治療法となりうる。



また民間企業と京都大学原子炉実験所との共同実験により、原子炉の代わりに病院設置型の小型加速器での中性子照射が実用可能となりつつある⁵。現在、BNCT は黒色腫⁶、神経膠腫⁷、頭頸部がん⁸⁻¹⁰の局所的な浸潤性の悪性がんを適用とした臨床試験が行なわれている。これらのがんはその浸潤性から完全な外科的切除が難しく、再発しやすいといった特徴をもっており、BNCT での細胞選択的治療が期待されている。臨床試験段階にあるホウ素薬剤は sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) 及び *p*-bromophenylalanine (BPA) の 2 剤のみである (Figure 1)。

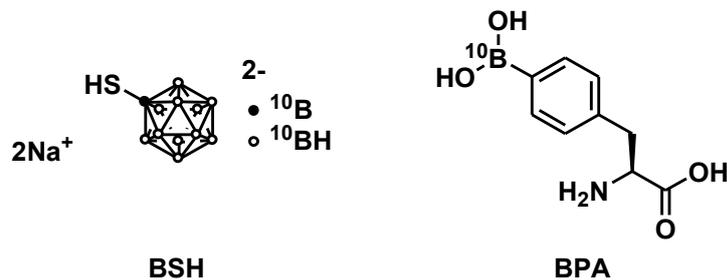


Figure 1 BSH と BPA の構造

BPA はチロシンのフェノール性水酸基をホウ酸へと変換した化合物で、黒色腫を標的として開発されたが、アミノ酸トランスポーター (ATB⁰⁺, LAT1, LAT2)¹¹ を介して細胞内へと取り込まれ、他のがんへの取り込みも良好であったため、現在 BNCT では主に BPA が用いられている。しかし正常細胞へも取り込まれ、その腫瘍/正常組織におけるホウ素濃度比 (T/N 比) は 4.4 と低い。腫瘍への集積性は高く、19.7 ppm で腫瘍組織/血中におけるホウ素濃度比 (T/B 比) は 7.5 である¹²。

一方、BSH は正十二面体の 2 価の陰イオン性クラスターで化学的、熱的に安定であり、BNCT へのホウ素送達に有用な骨格である^{13,14}。特に 1 分子中にホウ素原子を 12 個含むことから、効率的なホウ素送達を可能とする。低毒性であり、臨床適用されている点で有望な候補化合物である。しかしながら、その高い極性と陰イオン性のため直接膜透過できないという欠点を有している。脳腫瘍への適応が研究されており、正常組織の血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) は透過できないが、腫瘍組織の脆弱な血液脳腫瘍関門 (BBTB) のみ透過し、その T/N 比は 81.7 と高いが、集積性は 5 ppm と低く、現在では BPA との併用使用での研究が進められている¹²。

BNCT はいかにがん細胞選択的に高濃度で ¹⁰B 原子を送りこめるかがカギとなっており、現在 BNCT では腫瘍ホウ素濃度 30 ppm 以上、T/N 比及び T/B 比が 5 以上が目標値となっている。また大量投与が必要となるため、水溶性が高くなおかつ低毒性であることが求められる。しかしながら、上述のホウ素薬剤は、腫瘍へ蓄積性や選択性

といった点で改善の余地があり、BNCTの優位性を十分に発揮できていない。

この目標を達成するべく、これまで多くのホウ素薬剤が開発されてきた。以下にこれまでに開発されてきたホウ素キャリアをまとめた^{3,15}。

1. アミノ酸型ホウ素キャリア

BPAを代表として、天然、非天然のアミノ酸誘導体が開発されている。がん細胞で代謝が亢進し、アミノ酸の取り込みが亢進していることを利用した腫瘍標的化である。現在、環状型非天然アミノ酸誘導体である *cis*-ABCPC が BPA と比較して T/N 比を向上したとして期待を集めている¹⁶。

2. ポルフィリン型ホウ素キャリア¹⁷

一般的にポルフィリン化合物は腫瘍細胞選択的に取り込まれることが知られている。ポルフィリン誘導体の一つである BOPP はカルボランを用いており、90 ppm 腫瘍に蓄積することが報告され、BPA を上回る集積効果を見せた。臨床第 1 相試験に進んだものの、血小板減少などの副作用が見られたため臨床応用研究が断念された。現在は毒性を低減するためイオン性ホウ素クラスターを導入した水溶性ホウ素クラスターが開発、検討されている。ポルフィリンは光増感剤でもあるので、光線力学療法との併用治療が可能である。

3. ヌクレオチド型ホウ素キャリア^{18,19}

チミジン誘導体として開発され、細胞内に取り込まれた後、細胞質でリン酸化されることによって細胞内にトラップされ、蓄積する。核酸の種類としてチミジンが選択されたのは、thymidine kinase 1 (TK1) が正常細胞では細胞周期の合成期のみ活性化されるのに対し、がん細胞では G2 や分裂期等、他の細胞周期中でも高い活性を保っていることを利用したことによる。代表化合物としてチミジンの 3 位にリン

カーを介してカルボランを結合させた N5-2OH があり、様々な誘導体が開発されている。

4. リポソーム型ホウ素キャリア²⁰

BSH をリポソームに封入し、EPR (enhanced permeability and retention) 効果により腫瘍への標的を期待して開発された。極性基をリン酸からホウ素クラスターに変換したリン脂質誘導体をリポソームに混合したり²¹、ホウ素クラスターにスペルミン等のアミン修飾を行なうことで封入率を改善したりホウ素の高濃度化の研究が進められている。またトランスフェリンや抗体を結合させ、能動的に腫瘍細胞へ取り込ませる方針も取られている。

5. 糖型ホウ素キャリア

グリコシド、ラクトースにホウ素クラスターを結合した誘導体等が開発され、腫瘍への高い蓄積 (65.7 ppm) が認められたが、血中濃度が高く BNCT に用いることが不可能であった。その後二糖系の誘導体の開発を試み、水溶性及び毒性の低減には成功したが、極性が増大しがん細胞へ取り込まれなかった²²。また近年、糖の 6 位のヒドロキシ基をホウ酸へ変換することに成功し、新たなホウ素キャリアが排出されることが期待されている²³。

6. ペプチド結合型ホウ素キャリア

膜透過性ペプチドであるポリアルギニンと BSH のコンジュゲートである BSH-3R がマウスを用いた *in vivo* 実験で脳腫瘍への蓄積が認められた²⁴。またがん細胞に高発現しているインテグリンを標的とした RGD ペプチドをホウ素クラスターに結合させたペプチド結合型ホウ素キャリアも開発された。腫瘍への選択性が見られたものの、BSHの方が蓄積性という点で勝った²⁵。

7. タンパク質結合型ホウ素キャリア

多くのがん細胞で高発現している上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) の抗体であるセツキシマブにホウ素源を導入した dendrimer を結合した抗体型誘導体が開発された。高い T/N 比及び T/B 比を示したが、脳腫瘍へは BBB のため送達できなかつた²⁶。また血中でアルブミンと結合する MID-AC が開発され、EPR 効果によって腫瘍組織に 20 ppm 蓄積し、担癌マウスでがんの成長を抑制し良好な結果を残した²⁷。

Table 1. これまでに開発されてきたホウ素キャリア

種類	代表例	特徴	参考文献
アミノ酸誘導体	ABCPC	・非天然型のアミノ酸誘導体であり、がん細胞でアミノ酸の取り込みが向上していることを利用して開発された ・BBBを透過できる	16
ポルフィリン誘導体	BOPP	・がん細胞でポルフィリンが蓄積することを利用して開発された ・光線力学療法との併用も可能	17
ヌクレオチド誘導体	N5-2OH	・ヌクレオチドとして細胞内に取り込まれ、リン酸化されることで細胞内にトラップされる	18,19
リポソーム	DSBL	・BSHを中に封入するだけでなく、リン酸基をホウ素クラスターに変換した脂質でリポソームに混合し、リポソームのホウ素高濃度を行なっている	20
糖誘導体	-	・近年糖の6位の水酸基のホウ酸化に成功した	23
ペプチド結合型	BSH-3R RGD-boron	・マウスを用いた実験で脳腫瘍に送達達成した ・インテグリンを標的とした環状ペプチドとのコンジュゲート	24 25
抗体結合型	BD-C225	・セツキシマブを結合させ、EGFRを標的として開発された	26
アルブミン結合型	MID-AC	・EPR効果を期待して開発された	27

以上のように様々なホウ素キャリアが開発されてきた。しかしながら、いずれのホウ素薬剤についても臨床応用に至っていない。このことから、有用なホウ素キャリアが開発されれば、これまで治療困難であった悪性度の高い腫瘍においても BNCT を用いた効果的な治療方法を提示でき、人々の QOL 改善に大きく貢献できると考えられる。

著者の研究方針

BNCTのためのホウ素キャリアとして、まず①腫瘍組織へ特異的に送達され、続いて②細胞内へ移行する、ということが理想的である。一方、上述のように現在臨床適用されているホウ素クラスターの BSH は一分子中に複数の ^{10}B 原子を含み、毒性も低く有望なホウ素キャリアであるが、ほとんど細胞膜透過性を持たないことが問題となっている。そこで、本研究において著者は、BSH のような陰イオン性をもつ薬剤に膜透過性を付与するような分子送達キャリアを開発し、細胞内に効率的にホウ素源を送達することのできる膜透過性ホウ素キャリアの開発を行なうことを計画した。

本研究では第一段階の膜透過性ホウ素キャリアの開発を目指し、その細胞内送達ツールとしてリポペプチド *pepducin* を用いることを計画した。

Pepducin は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) モジュレーターとして開発されたリポペプチドで²⁸、現在 PZ-128²⁹をはじめ、種々の *pepducin* の前臨床試験が行われている³⁰。著者らは予てより、この分子の細胞内移行メカニズムに興味を抱き、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) システムを用いた *pepducin* プローブを開発し、脂質分子のフリップ運動による膜透過の可視化に成功した (Figure 2)³¹。従来の膜透過ペプチド³²はエンドサイトーシスによって細胞内へ移行するものが多く、その後の小胞からの脱出等、課題点が残る^{33,34}。一方、*pepducin* の膜透過機構は脂質分子によるフリップ運動による直接的なものであり、他とは一線を画する。また *pepducin* は静注による全身投与で効果が認められていることから²⁹、*in vivo* においてもホウ素送達キャリアとして十分通用すると考えた。

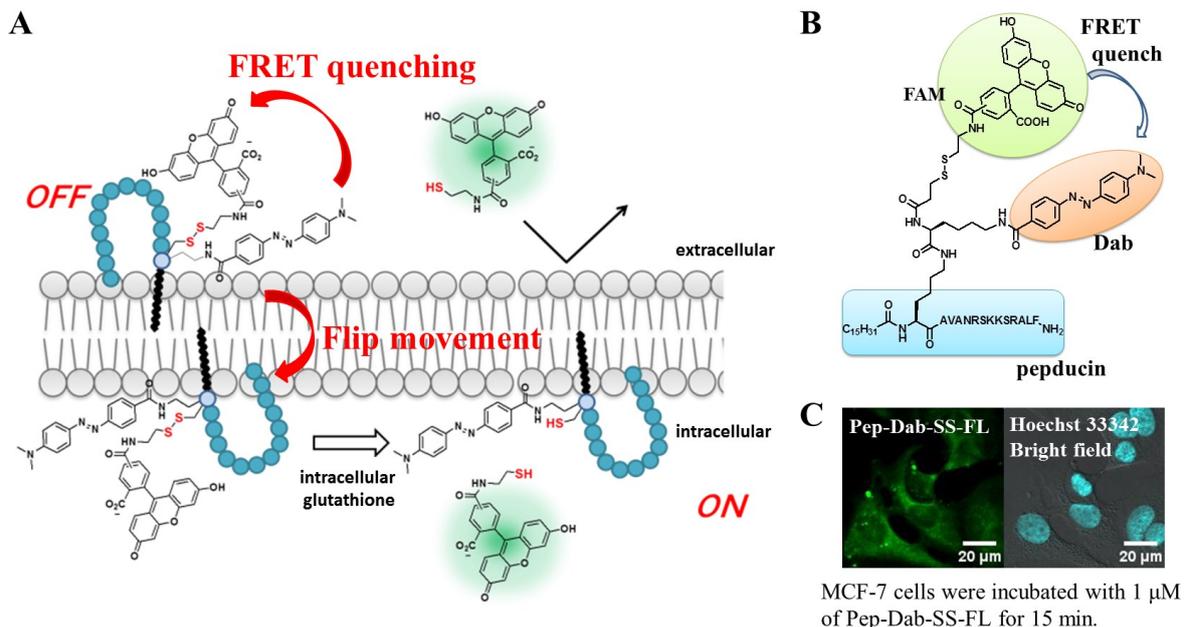


Figure 2 FRET システムを用いた pepducin プローブの膜透過機構 (A)、分子構造 (B) 及び細胞の染色図 (C) (参考文献 31 より改編)

Pepducin とホウ素を含むユニット (積荷) を細胞内グルタチオン (GSH) にて切断されるジスルフィド結合を含むリンカーを介して結合させることにより、細胞内へと移行した後にジスルフィド結合が切断されることで、送達ユニットである pepducin と積荷部位が切り離され、効率よく細胞内へとホウ素ユニットが蓄積することを期待した。

本研究ではリポペプチドである pepducin の構造最適化としてペプチド部位及び脂質部位の検討を行ない、ついでリンカー部位の最適化を図ることで有用な誘導体へと導く。各誘導体の膜透過能は細胞内ホウ素量で評価し、有望な誘導体は照射実験によって放射線増感効果を求めることとした。

第一章 リポペプチド型膜透過性ホウ素キャリアの分子設計

著者らはこれまでに FRET 機構を用いた pepducin プローブを用いて pepducin の細胞内移行の可視化に成功した。さらにその細胞内移行機序について解析を行ない、脂質部分が細胞膜にアンカリングした後にペプチド部分が細胞内に反転するというユニークな機構であることを示唆した³¹。ここで用いた pepducin プローブは Covic らが開発した protease-activated receptor 1 (PAR1) を標的とする P1pal-13 (*N-pal-AVANRSKKSRALF-NH₂*)²⁸ を基に設計した。PAR1 はトロンビンによって細胞外領域の N 末端ペプチド配列が切断されて活性化し、血液凝固作用を示す。しかし前述の pepducin プローブの細胞内移行は PAR1 を発現していない MCF-7 細胞株³⁵でも見られたことから、pepducin の細胞内移行は標的とする GPCR の有無に依存しないと考えられる。また pepducin がフルオレセインのような陰イオン性色素を直接細胞内に送達させることから、陰イオン性ホウ素クラスター-BSH の細胞内送達に応用することを着想した。Figure 3A に示すように、BSH、リンカー、pepducin 由来のリポペプチドによって構成されるホウ素キャリアを設計した。Pepducin のペプチド配列の N 末端に Lys を結合させ、Lys の α 位に脂質分子を、 ϵ 位にリンカーを介して BSH を結合させることを計画した。

BSH の細胞内蓄積性を向上させるために、ジスルフィド結合を含むリンカーを用いることとした。ジスルフィド結合は、細胞内に高濃度で存在する GSH (細胞内: 1–10 mM³⁶、血液中・細胞間隙: 数 μ M³⁷) による還元的切断を受けることが多くのプロドラッグやケージド化合物で報告されている^{38,39}。このことに着目し、今回設計したキャリアが細胞内へと移行すれば、ジスルフィド結合が切断され積荷部位である BSH がリポペプチドから切り離されることによって、膜透過能を有しない BSH が細胞内へ蓄積されることを期待した (Figure 3B)。また、リンカー部位には normal linker の他

に物性の向上やカチオン性の付与を目的とした amine linker (piperazine linker 及び linear amine linker)についても検討を行うこととした。脂質部位とペプチド部位で構成される pepducin 部分については、PAR1 アゴニスト活性が報告されている P1pal-13²⁸ 及び虚血性心疾患への適用で臨床試験段階のアンタゴニスト P1pal-7 (PZ-128)²⁹ を基に設計した (Figure 3C)。脂質部分の役割を評価するために、脂質部分については、palmitoyl 基だけでなく、脂質分子の構造や不飽和度、長さに着目し、docosahexanoyl 基、myristoyl 基、lithocholyl 基、acetyl 基についても検討をすることにした。ペプチド部分については、pepducin である P1pal-13 や P1pal-7 を基本とし、そのアミノ酸配列の重要性についてアミノ酸の並ぶ順番や構成要素、ペプチド部分の二次構造についても合わせて検討を行なうこととした。

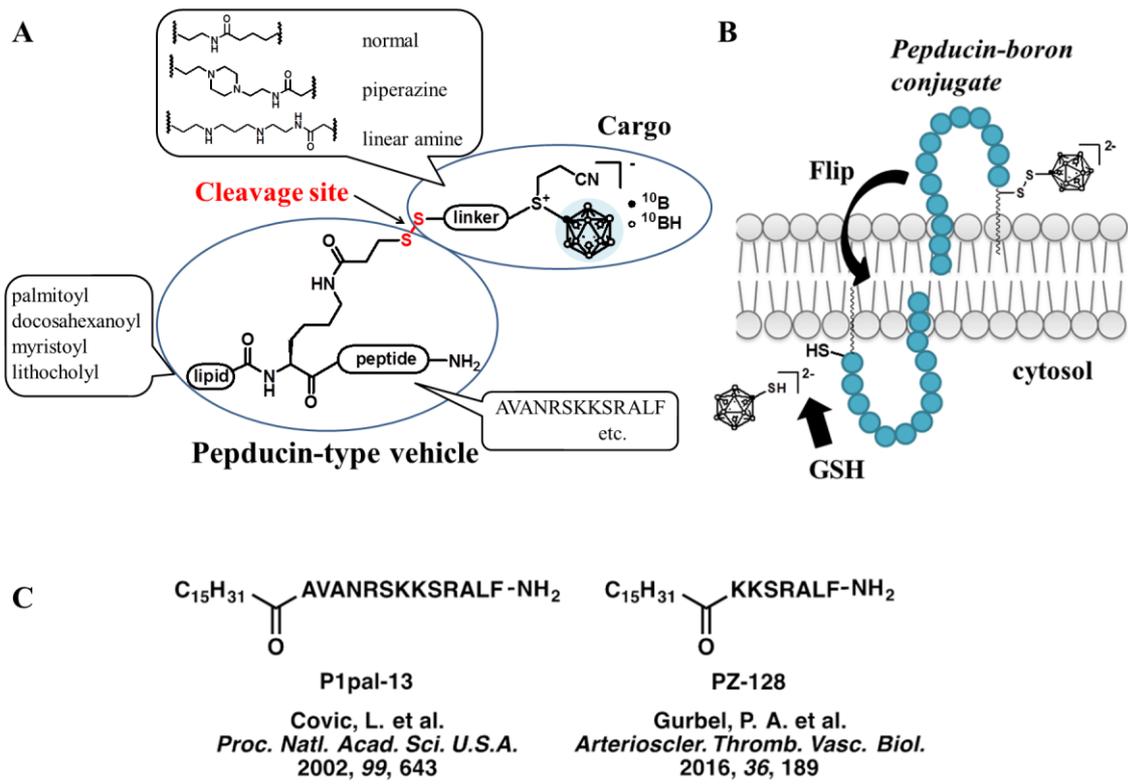
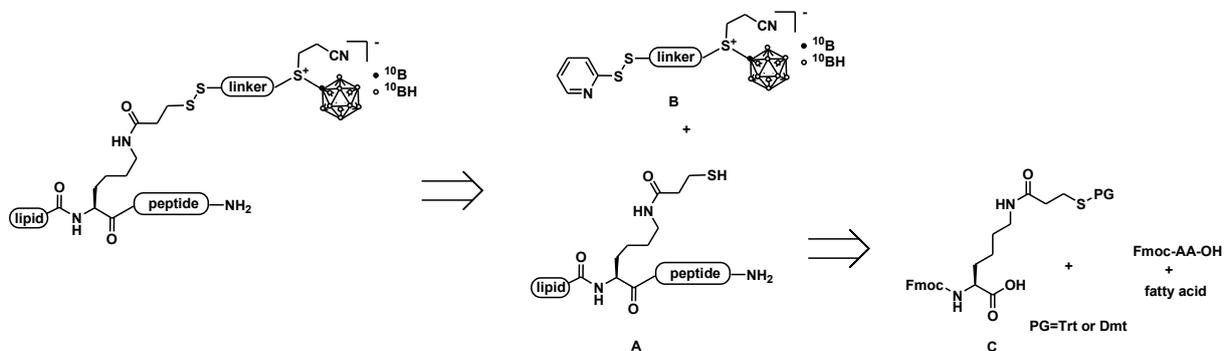


Figure 3 膜透過性ホウ素キャリアの分子設計 (A)、フリップ運動による膜透過メカニズム (B) 及び peptiducin の構造 (C).

第二章 リポペプチド型膜透過性ホウ素キャリアの合成

第一節 合成戦略

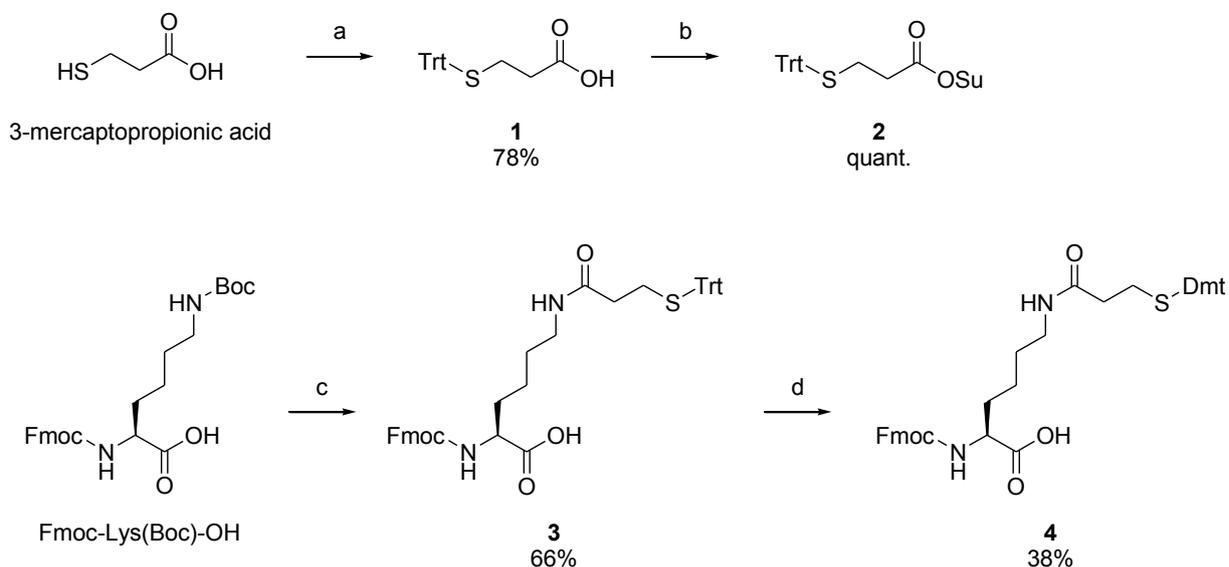


Scheme 1 リポペプチド結合型ホウ素キャリアの合成戦略.

リポペプチド結合型ホウ素キャリアの合成にあたり、合成計画を立てた (Scheme 1)。リポペプチド結合型ホウ素キャリアは固相合成で構築したスルフヒドリル基を有するリポペプチド **A** とホウ素クラスター及びリンカーを含む積荷分子 **B** とジスルフィド交換反応によって、合成することとした。これによってリポペプチド及び積荷部位を付け替え可能となり、それぞれの検討が容易になるように計画した。また、スルフヒドリル基を有するリポペプチドの合成において必要となる Lys 誘導体 **C** については、市販品である Fmoc-L-Lys から別途合成した。

第二節 Lys 誘導体、Fmoc-L-Lys(COC₂H₄STrt)-OH (**3**)及び

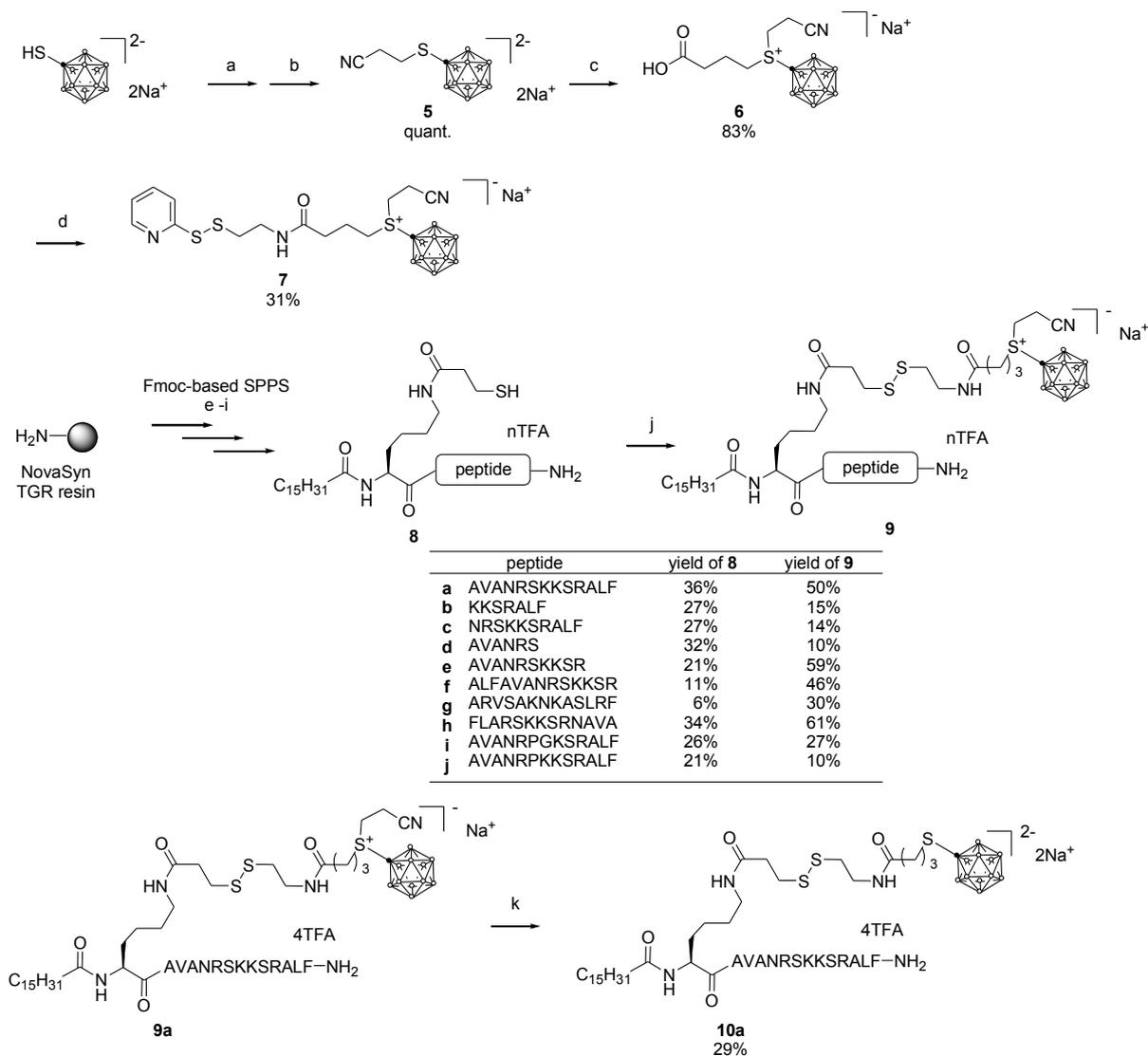
Fmoc-L-Lys(COC₂H₄SDmt)-OH (**4**)の合成



Scheme 2 Synthesis of compound **3** and **4**. Reagents and conditions: (a) TrtCl in CH₂Cl₂, rt, overnight; (b) HOSu, DCC in EtOAc/dioxane (1:1), rt, overnight; (c) (i) 2M HCl in EtOAc, rt, 2 h; (ii) **2**, DIPEA in DMF, rt, overnight; (d) (i) TFA, TIPS in CH₂Cl₂, rt, overnight; (ii) DmtCl, Et₃N in CH₂Cl₂, rt, 1 h.

リポペプチド合成のための固相合成用に Lys 誘導体、Fmoc-L-Lys(COC₂H₄STrt)-OH (**3**)及び Fmoc-L-Lys(COC₂H₄SDmt)-OH (**4**) を合成した (Scheme 2)。3-Mercaptopropionic acid を出発原料とし、スルフヒドリル基を Trt 基で保護し、続いてスクシンイミドエステルへと変換し、化合物 **2** を得た。Fmoc-L-Lys(Boc)-OH を酸条件にて脱 Boc 化を行ない、続いて化合物 **2** と縮合反応を行なうことで、Lys 誘導体 **3** を得た。Trt 除去し、Dmt に変換した Lys 誘導体 **4** も合成した。

第三節 Normal linker 及び palmitoyl 基から構成される
リポペプチド結合型ホウ素キャリア(**9a–9j**, **10a**)の合成



Scheme 3 Synthesis of compound **9a–9j** and **10a**. Reagents and conditions: (a) 3-bromopropionitrile, Na_2CO_3 in MeCN, 65 °C, 1 day; (b) NaOH in $\text{H}_2\text{O}/\text{acetone}$ (85:15), rt, 2 h; (c) 4-bromobutyric acid in DMF, rt, 5 h then 40 °C, 1.5 h; (d) 2-(pyridyldithio)ethylamine hydrochloride, HBTU, DIPEA in DMF, rt, 1 day; (e) i) Fmoc-AA-OH, HOBT· H_2O , DIPC1 in DMF, 75 °C, 5 min, μW ; ii) 20% piperidine in DMF, 40 °C, 10 min, μW ; i), ii) repeat; (f) compound **3**, HBTU, DIPEA in DMF, 40 °C, 10 min, μW ; (g) 20% piperidine in DMF, 40 °C, 10 min, μW ; (h) palmitic acid, HBTU, DIPEA in DMF, 40 °C, 10 min, μW ; (i)

TFA/thioanisole/*m*-cresol/EDT/H₂O (80:5:5:5:5), rt, 3 h; (j) compound **7** in MeCN/H₂O/CH₃COOH (2:1:0.15), rt, 8 h; (k) NaOH in MeCN/H₂O (1:2), rt, 5 h.

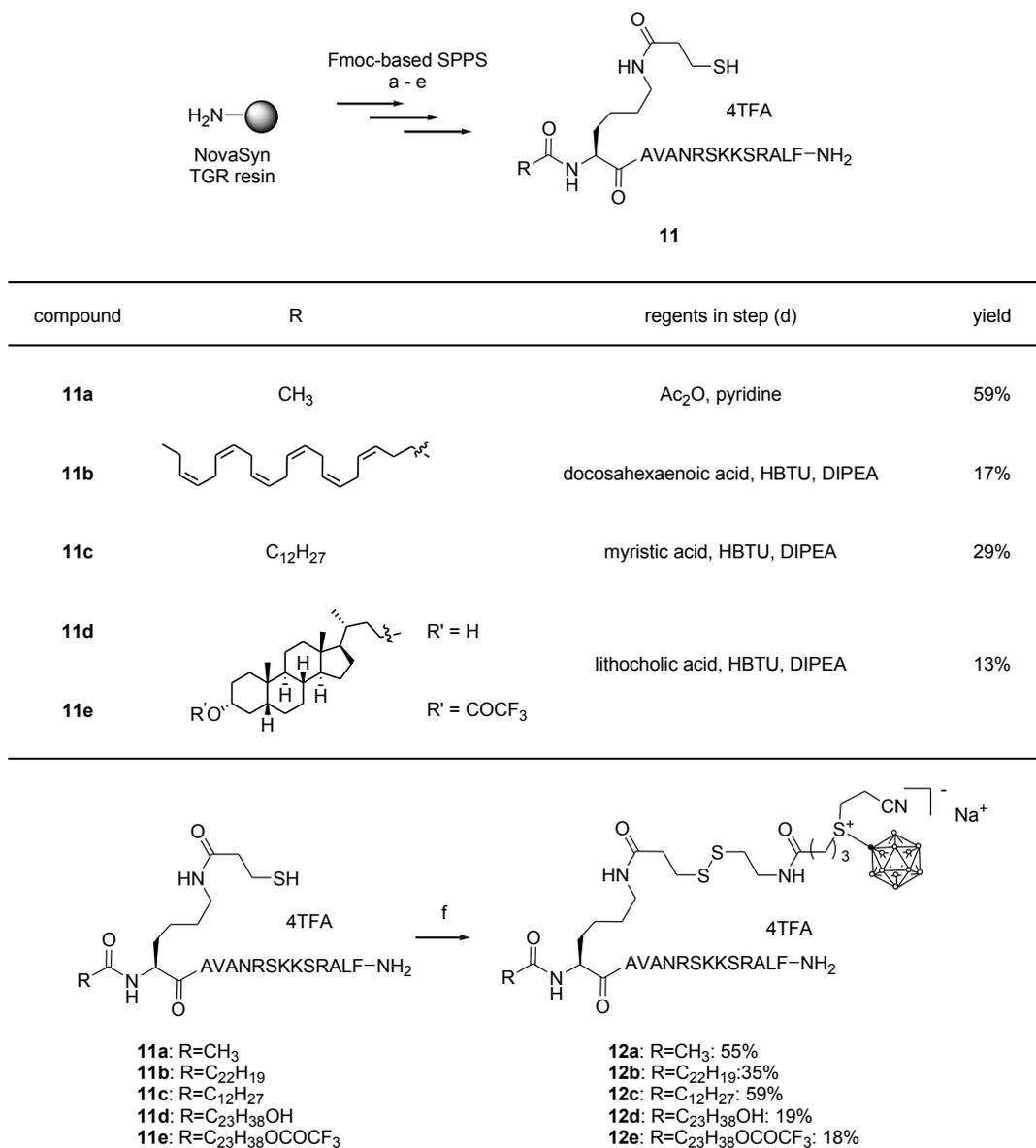
分子設計で示したように、P1pal-13 から設計された **9a**, P1pal-7 (PZ-128) から設計された **9b** の合成を行なった。**9a–9j** については、ペプチド部分のアミノ酸配列に着目し、合成を行なった。**10a** は **9a** に含まれるシアノエチル基の影響について調べるために合成を行なった。

Scheme 3 に示すように BSH を出発原料とし、BSH の S のアルキル化を行なう際にジアルキル化されないようにシアノエチル基で保護を行ない、4-bromobutyric acid と反応させることで、炭素数 3 のスペーサーを挿入した化合物 **6** を合成した。続いて 2-(pyridyldithio)ethylamine hydrochloride との縮合反応によりジスルフィド結合を形成するためのピリジルジスルフィドを導入した化合物 **7** を得た。

合成戦略でも述べたようにリポペプチドは Fmoc 法による固相合成によって構築した。樹脂として NovaSyn TGR resin、縮合剤として HOBt/DIPCI を使い、マイクロウェーブを用いて反応を行なった。ペプチドの C 末端をアミドにする必要があったため、NovaSyn TGR resin を使用した。各アミノ酸は、Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Ser(*t*-Bu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Lys(COC₂H₄S₂Trt)-OH (**3**)を用い、それぞれの配列を構築した。ペプチド配列構築後に N 末端側にパルミチン酸を HBTU/DIPEA によって縮合させ、TFA/thioanisole/*m*-cresol/EDT/H₂O で処理し、樹脂からの切り出し及び脱保護を行なった。その後 RP-HPLC 及び RP 中圧分取による精製を行ない、リポペプチド **8a–8j** を得た。なお各縮合反応の進行は Kaiser test 又は TNBS test によって確認した。得られた **8a–8j** をそれぞれ化合物 **7** と反応させ、化合物 **9a–9j** を得た。また塩基で処理することによってシアノエチル基を除去し、**10a** を得た。

第四節 Normal linker 及び palmitoyl 基以外の脂質分子から構成される

リポペプチド結合型ホウ素キャリア(12a–12e)の合成



Scheme 4 Synthesis of compound **12a–e**. Reagents and conditions: (a) i) Fmoc-AA-OH, HOBt·H₂O, DIPICl in DMF, 75 °C, 5 min, μW; ii) 20% piperidine in DMF, 40 °C, 10 min, μW; i), ii) repeat; (b) compound **3**, HBTU, DIPEA in DMF, 40 °C, 10 min, μW; (c) 20% piperidine in DMF, 40 °C, 10 min, μW; (d) reagents in DMF, 40 °C, 10 min, μW; (e) TFA/thioanisole/*m*-cresol/EDT/H₂O (80:5:5:5:5), rt, 3 h; (f) compound **7** in

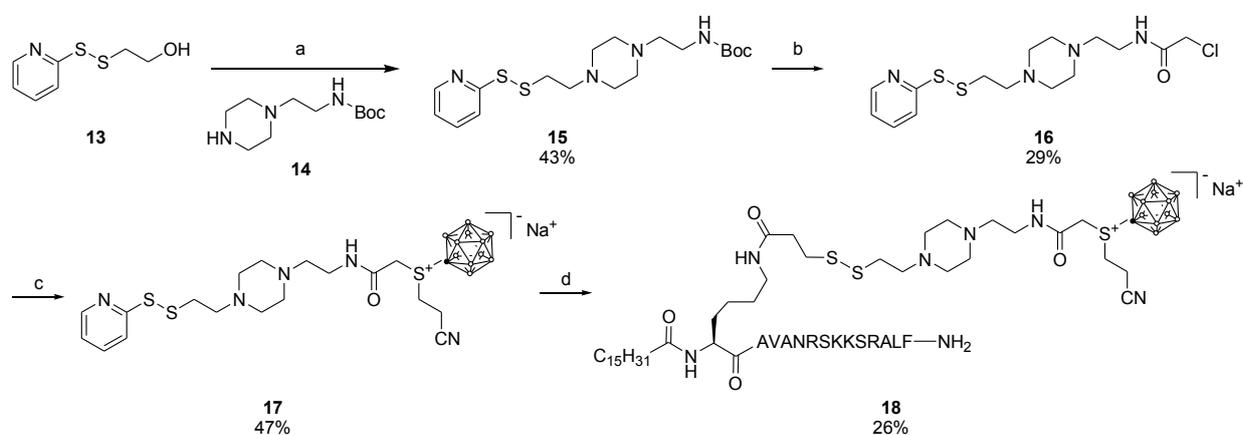
MeCN/H₂O/CH₃COOH (2:1:0.15), rt, 3–12 h.

9a の脂質部位を変更した誘導体 **12a–12e** の合成を行なった(Scheme 4)。Scheme 4 に示すように、**9a** の合成時と同様の方法にてペプチド配列を構築し、最後に N 末端側に各脂質を HBTU/DIPEA によって縮合させ、リポペプチド **11b–11e** を得た。アセチル化のみ無水酢酸/ピリジンを用いて、**11a** を得た。またリトコール酸を用いた場合、TFA を用いた樹脂からの切り出し及び脱保護の際に目的とするリポペプチド **11d** の他に、3 位のヒドロキシ基がトリフルオロアセチル化⁴⁰されたリポペプチド **11e** も得られた。これらは分離せず化合物 **7** と反応し、**12d** と **12e** を得た。

第五節 Amine linker (piperazine linker/linear amine linker)を有する

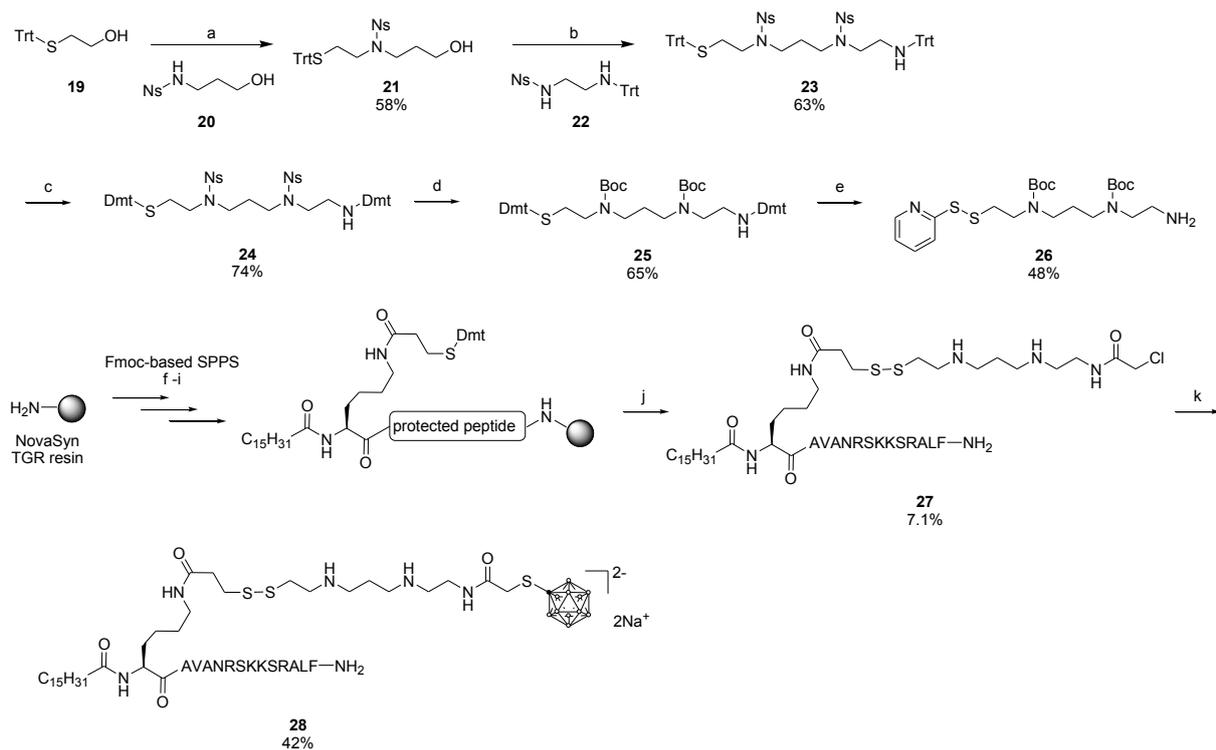
リポペプチド結合型ホウ素キャリア(**18/28**)の合成

細胞膜は主にリン脂質から構成されており、その表面は負電荷を帯びている。生体内条件下でカチオンになることにより細胞膜との親和性を向上させ、効果的な細胞内送達を可能するために **9a** の normal linker 部位を amine linker である piperazine linker 及び linear amine linker に置き換えたホウ素キャリア **18** 及び **28** を設計し、合成を行った。



Scheme 5 Synthesis of compound **18**. Reagents and conditions: (a) (i) MsCl, Et₃N in CH₂Cl₂, 0 °C, 30 min; (ii) compound **14**, DIPEA in MeCN, rt, overnight; (b) (i) 2 M HCl in MeOH, rt, 1.5 h; (ii) 2-chloroacetylchloride, Et₃N in CH₂Cl₂, 0 °C, 15 min; (c) compound **5** in DMF, 50 °C, 1 h; (d) compound **8a** in MeCN/H₂O/CH₃COOH (2:1:0.15), rt, 9 h.

化合物 **18** の合成経路は Scheme 5 に示した。化合物 **13** を出発原料として、ピペラジンを導入後、BSH を導入し、ピペラジンリンカー**17** を得た。このリンカー**17** とリポペプチド **8a** を反応させることにより、ピペラジンリンカー型キャリア **18** を得た。



Scheme 6 Synthesis of compound **28**. Reagents and conditions: (a) i) MsCl, Et₃N in CH₂Cl₂, 0 °C, 15 min; ii) compound **20**, Cs₂CO₃ in DMF, 50 °C, 1 day; (b) i) MsCl, Et₃N in CH₂Cl₂, 0 °C, 30 min; ii) compound **22**, Cs₂CO₃ in DMF, 50 °C, overnight; (c) i) TFA, TIPS in CH₂Cl₂, rt, 3 h; ii) Dmt-Cl, Et₃N in CH₂Cl₂, rt, 1 h; (d) i) thiophenol, K₂CO₃ in MeCN, rt, overnight; ii) Boc₂O, Et₃N in CH₂Cl₂, rt, 3 h; (e) 2,2'-dipyridyl disulfide, TFA, TIPS in CH₂Cl₂ rt, 3 h; (f) i) Fmoc-AA-OH, HOBT·H₂O, DIPEA in DMF, 75 °C, 5 min, μW; ii) 20% piperidine in DMF, 40 °C, 10 min, μW; i), ii) repeat; (g) compound **4**, HBTU, DIPEA in DMF, 40 °C, 10 min, μW; (h) 20% piperidine in DMF, 40 °C, 10 min, μW; (i) palmitic acid, HBTU, DIPEA in DMF, 40 °C, 10 min, μW; (j) i) TFA/TIPS/CH₂Cl₂ (10:5:85), rt, 5 min × 3; ii) compound **26** in 1% CH₃COOH in MeOH, rt, overnight; iii) 2-chloroacetyl chloride, DIPEA in DMF, 40 °C, μW; iv) *m*-cresol/H₂O/TFA (5:5:90), rt, 3 h; (k) BSH·2Na in DMF, 50 °C, 2 h.

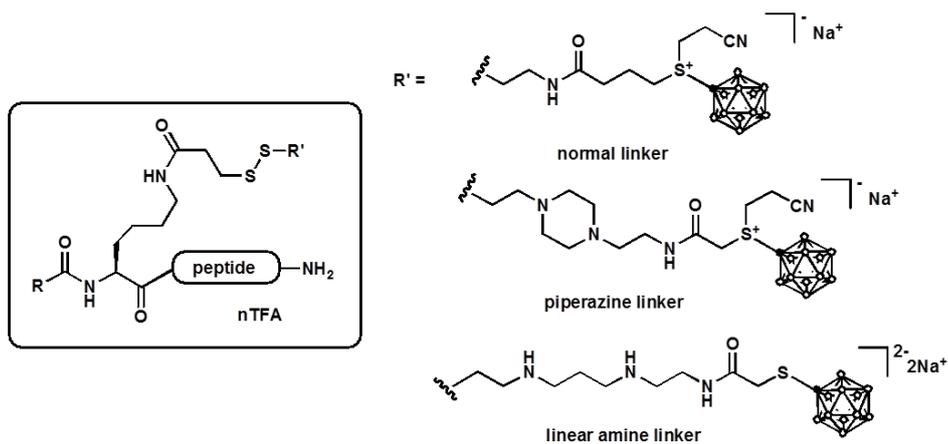
リニア型アミンリンカー型誘導体 **28** の合成は先に示した合成戦略によって構築することが困難であったため、先にリポペプチドとリンカーを結合させ、最後にホウ素ク

ラスターを導入する経路にて合成した (Scheme 6)。化合物 **19** を出発原料とし、ノシル基を利用した福山アミン合成^{41,42}によって伸長した。伸長後、ノシル基を Boc 基へと変換し、Dmt 基を除去した。S に結合した Mmt はスカベンジャー存在下で温和な酸性条件下、脱保護できることが報告されており⁴³、また N に結合したトリチル系保護基は S に結合したものより容易に脱保護され、容易に除去することが可能である。ここでさらに容易に脱保護の可能な Dmt を用いることによって Boc 基との選択的脱保護を可能とした。続いてスルフヒドリル基をジチオピリジル化することによって活性化を行ない、リニア型アミンリンカー**26**を得た。ペプチド固相合成法により、**8a**の合成と同様の方法でリポペプチドを合成し、**4**と縮合を行なうことで Dmt 保護体として固相担持ペプチドを得た。固相上で Dmt 基の選択的脱保護をスカベンジャー存在下の 10%の TFA 処理で行なった。反応は反応液中の Dmt 基 (500 nm 付近) の吸収が消失するまで繰り返した。Dmt 基の脱保護の後、リンカー**26**で処理し、ジスルフィドを形成した。続いてリンカー末端の無保護の一級アミンとクロロアセチルクロライドを反応後、樹脂からの切り出し及び脱保護を行なうことで、リポペプチド **27**を得た。最後に BSH で処理し、リニアアミンリンカー型誘導体 **28**を得た。この際、BSH を 10 当量用いることで BSH がジアルキル化されることを防いだ。

第三章 細胞内取り込み能を指標とする

リポペプチド型膜透過性ホウ素キャリアの構造-機能相関

Table 2 合成したホウ素キャリアの構造.



Boron carrier	R	Sequence of peptide	linker
9a^a	C ₁₅ H ₃₁	AVANRSKKSRALF	normal
9b	C ₁₅ H ₃₁	KKSRALF	
9c	C ₁₅ H ₃₁	NRSKKSRALF	
9d	C ₁₅ H ₃₁	AVANRSK	
9e	C ₁₅ H ₃₁	AVANRSKKS	
9f	C ₁₅ H ₃₁	ALFVANRSKKS	
9g	C ₁₅ H ₃₁	ARVSAKNKASLR	
9h	C ₁₅ H ₃₁	FLARSKKSRNAVA	
9i	C ₁₅ H ₃₁	AVANRPGKSRALF	
9j	C ₁₅ H ₃₁	AVANRPPKSRALF	
10a^{a, b}	C ₁₅ H ₃₁	AVANRSKKSRALF	piperazine
12a	CH ₃		
12b	C ₂₂ H ₁₉		
12c	C ₁₃ H ₂₇		
12d	C ₂₃ H ₃₈ OH		
12e	C ₂₃ H ₃₈ OCOCF ₃		
18^a	C ₁₅ H ₃₁	linear amine	
28^{a, b}	C ₁₅ H ₃₁		

^a Lipopeptide moiety is derived from P1pal-13.[14]

^b No cyanoethyl group.

第一節 9a 及び 9b の経時的細胞内取り込み量の評価

まず、P1pal-13 由来のキャリアである 9a 及び PZ-128 由来の 9b の細胞内送達能を調べた。9a 及び 9b で処理した神経膠芽腫細胞 T98G の細胞内ホウ素濃度を測定した。T98G 細胞を 10 又は 20 μM のホウ素キャリア 9a 及び 9b で各時間処理した後、PBS で洗浄し、細胞を集めた。集めた細胞を硝酸で溶解させ、水で希釈後、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES: inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy) によってホウ素濃度を測定した (Figure 4)。

13 残基のアミノ酸配列を有する 9a によるホウ素の取り込み量は処理時間が長くなるほど増え、24 時間後まで増え続けた。また濃度を 2 倍にすると取り込み量も約 2 倍に増え (最大 544 ngB/ 10^6 cells)、濃度依存性があることが明らかとなった。

一方 9a の N 末端側の 6 残基のアミノ酸を欠損し、C 末端側の 7 残基のみを有する 9b は 12 時間処理しても取り込み量は増加せず、細胞内への取り込みは見られなかった。

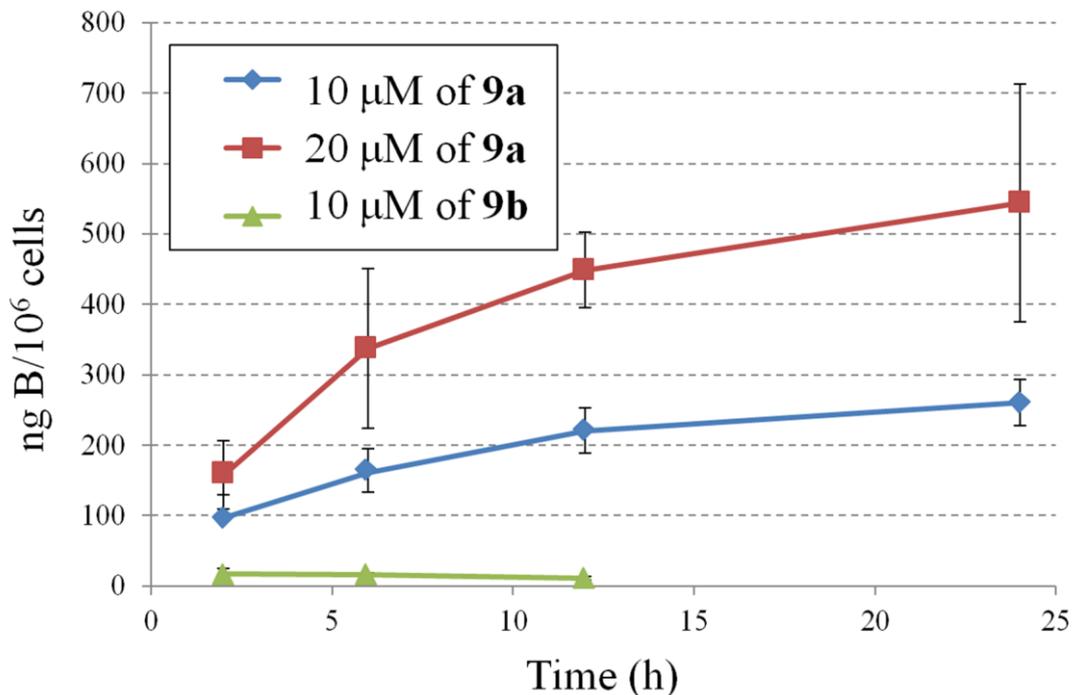


Figure 4 9a 及び 9b で処理した T98G 細胞内ホウ素濃度の経時変化

第二節 ペプチド配列、脂質分子、リンカーによる効果の検討

続いて良好な取り込みが見られた **9a** を基として pepducin 部位の最適化を図るためにペプチド配列を変更した誘導体及び脂質分子を変更した誘導体の細胞内取り込みをそれぞれ評価した。評価方法は **9a**、**9b** の評価と同様に細胞内ホウ素濃度を測定した。ホウ素キャリアの処理時間は 12 時間とした (Figure 5)。

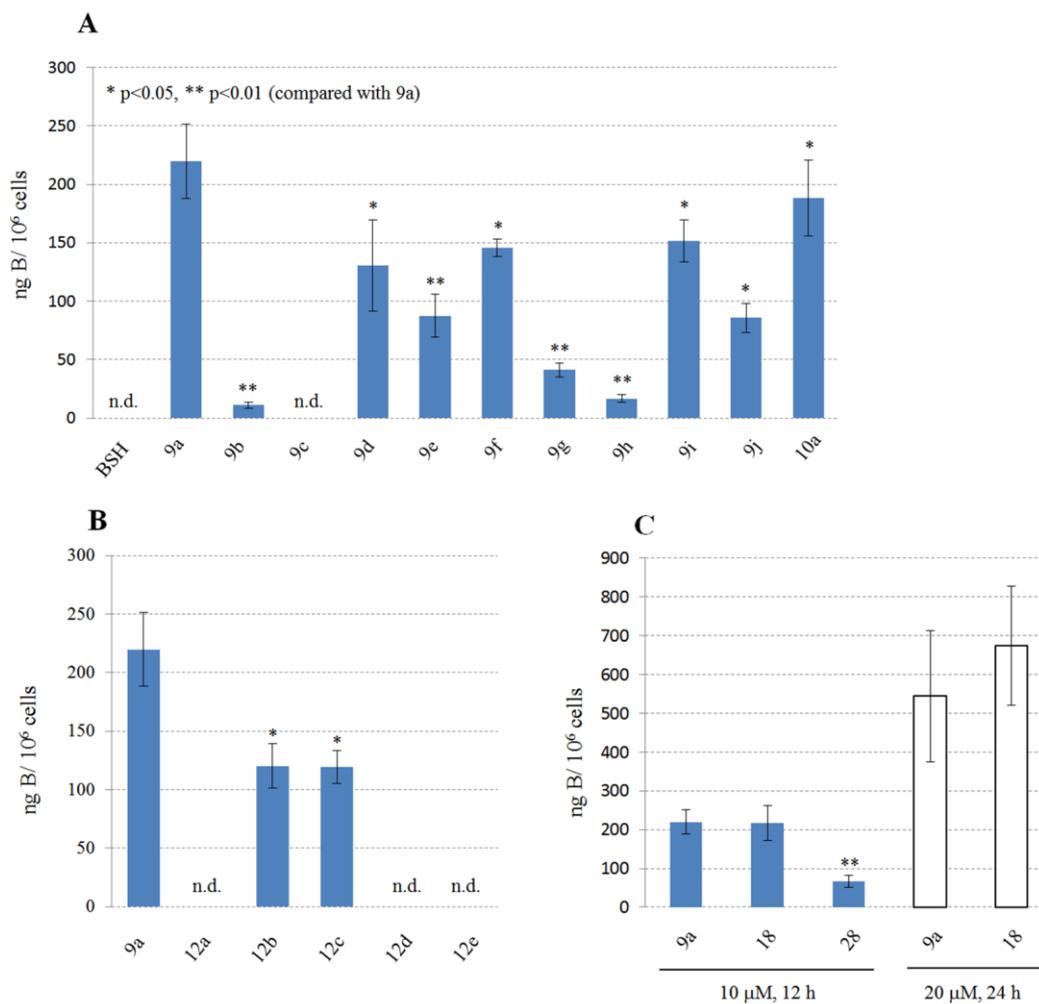


Figure 5 T98G 細胞株を用いた各種ペプチド配列 (A) 及び脂質分子 (B) を有するホウ素キャリアで処理した細胞内ホウ素濃度及び 10 又は 20 μM の各種リンカーを有するホウ素キャリアで処理した細胞内ホウ素濃度 (C).

まずペプチド配列について比較検討を行なった (Figure 5A)。C 末端側の 10 残基のみを有する **9c** は **9b** と比較して取り込み量がより低く、検出不可であった。N 末端側の 7 及び 10 残基を有する **9d** 及び **9e** は中程度の取り込み量を示し、**9e** は **9d** より低かった。これらの結果から N 末端側の配列が細胞内取り込みには重要であることが推測される。

C 末端側の 3 つの疎水性残基を N 末端側に移動した **9f** でも中程度の取り込み量を示した。またペプチド配列を無秩序に並び替えた **9g** 及びペプチド配列が C 末端側と N 末端側を逆にした逆向き配列の **9h** はほとんど取り込まれなかった。

配列の中心付近で折り曲げるための β -turn 構造を導入した誘導体も評価した。 β -turn 構造は Pro によって導入することが可能⁴⁴で、Pro-Gly はより効果的である⁴⁵。Lys-Ser を Pro-Gly に変更した **9i**、Lys を Pro に変更した **9j** は中程度の取り込みを示した。これらの誘導体は **9a** と比較して取り込み量の向上は見込めなかったが、水への溶解性を向上させた。

9a の合成過程で必要となっていたシアノエチル基を除去した **10a** についても評価した。シアノエチル基を除去することによってホウ素クラスターを含む積荷部位の電荷が -1 から -2 へと増加する。**10a** の取り込み量は **9a** の取り込み量と比較して、若干だが有意に低下した。

結果として Plpal-13 由来のオリジナルの 13 残基を有する **9a** が最大の取り込み量を示した。

次に脂質部位の検討を行なった (Figure 5B)。アセチル基を有する **12a** やステロイド骨格を有する **12d** 及び **12e** では、細胞内への取り込みは見られなかった。直鎖不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸を有する **12b** 及び直鎖飽和脂肪酸であるミリストイル基を有する **12c** は中程度の取り込みを示した。結果としてパルミトイル基を有する **9a** が最大の取り込み量を示し、傾向として直鎖の脂肪酸が良好な取り込み量を示すことが明らかとなった。

より効率的な細胞内送達を行なうため、生体内条件下でカチオンとなって細胞膜への親和性を向上させるアミンリンカーを導入した誘導体 **18** 及び **28** の評価を行なった。10 μM , 12 時間処理の場合、**9a** と比較してピペラジン型誘導体 **18** は同程度の取り込みを示した。一方、リニアアミン型誘導体 **28** の取り込み量は有意に低かった。20 μM , 24 時間処理の場合、**9a** と比較して **18** は若干高い傾向が見られた (Figure 5C)。

以上の結果から、**9a** 及び **18** を有望化合物として、中性子照射実験に用いることとした。

第四章 9a 及び 18 の機能評価

第一節 リポペプチド結合型ホウ素キャリア 9a の血清培地中での安定性評価

血清中にはプロテアーゼが含まれており、さらにホウ素キャリアの細胞への処理時間が長いためにホウ素キャリアのペプチド部位が分解する可能性があった。そこで血清を含む培地中での 9a の安定性を評価した。

9a が 10 μ M になるように 10%FBS を含む EMEM 培地に添加し、37 $^{\circ}$ C で各時間インキュベートした。*n*-Butyl-4-hydroxybenzoate を HPLC の内部標準物質として加えた後、2 倍量の MeCN を加え、冷却後遠心操作を行ない、メンブランフィルターでろ過することで、血清タンパク質を除いた。得られたろ液をそのまま HPLC で分析し、検量線を用いて定量を行なった。結果は 24 時間経過しても 70%程度残留しており、直鎖のペプチドとしては安定であった (Figure 6)。その理由としてパルミトイル化の効果が考えられる。一般的に長鎖脂肪酸によって修飾されたペプチドは自己凝集やアルブミンに結合することによって、生体内での安定性を増すことが知られている⁴⁶⁻⁴⁸。実際に pepducin の一種である P4pal-10 (*N*-pal-SGRRYGHALF-NH₂) は、ヒトアルブミンに弱く結合する ($K_d = 0.3-0.7$ mM)⁴⁰ ことが報告されている。このような脂質の効果によって安定化したことで、長時間の細胞処理にも関わらず、分解せずに細胞内に BSH を送達でき、結果蓄積し続けたと考えられる。

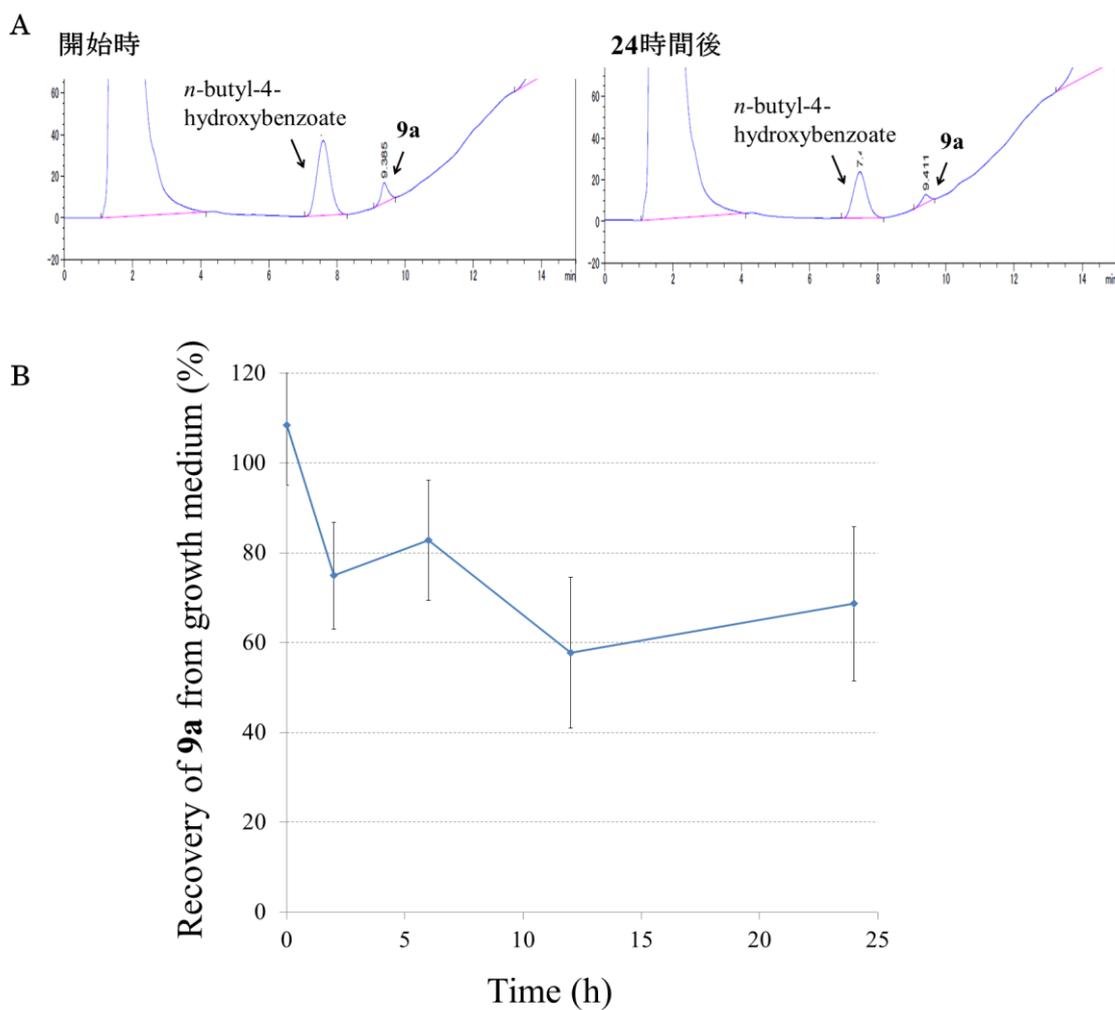


Figure 6 血清を含む培地中での **9a** の安定性.

開始時及び 24 時間後の HPLC チャート (A)と時間経過による変化 (B).

第二節 PAR1 発現の有無とリポペプチド結合型ホウ素キャリアの 細胞取り込みの関係性

第一項 T98G 細胞の PAR1 発現の有無について

今回採用した **9a** 及び **18** は基本骨格とした pepducin、P1pal-13 と同じペプチド配列を有する。先にも述べたが P1pal-13 は PAR1 に対するアゴニストであることから、PAR1 の有無によって化合物の細胞膜上での挙動が異なる可能性がある。多くの神経膠芽腫細胞では PAR1 は高発現していることが報告されている⁴⁹。今回使用した T98G 細胞も神経膠芽腫であるため PAR1 が高発現している可能性があったが、これまでのところ PAR1 の発現について報告されていなかった。そこでまず、T98G 細胞の PAR1 発現の有無について、抗 PAR1 抗体で処理し、FITC で標識を行ない、フローサイトメトリーにて測定することで調べた。Figure 7A に示したように、T98G 細胞は PAR1 が発現していることが確認できた。一方、コントロールとして使用した MCF-7 細胞は PAR-1 の発現は見られず、既報のデータに一致していた³⁵ (Figure 7B)。

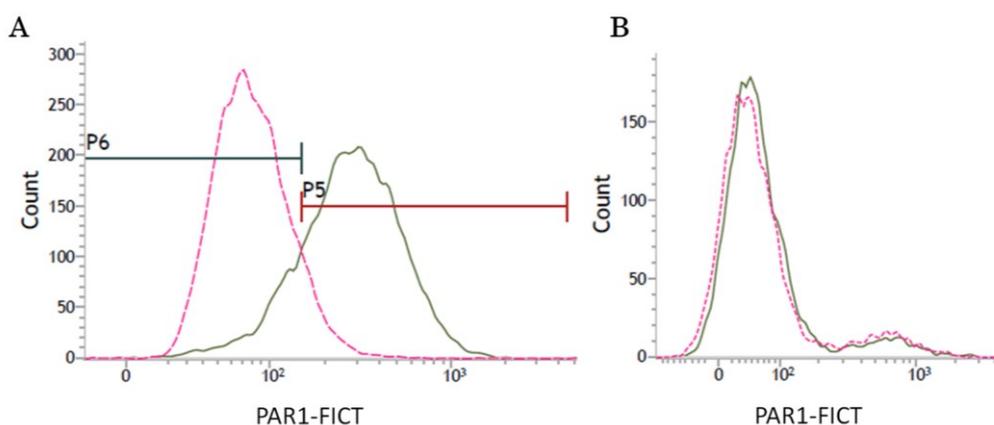


Figure 7 フローサイトメトリーによる T98G 細胞 (A) 及び MCF-7 細胞 (B) における PAR1 発現 (実線: サンプル、点線: コントロール).

第二項 T98G 細胞を用いた競合阻害実験とジスルフィド還元試薬での処理による BSH 細胞内取り込みへ与える影響について

T98G 細胞が PAR1 を発現していることが明らかになったため、PAR1 が取り込みに与える影響を調べるため、PAR1 アゴニストである P1pal-13 存在下で **9a** の取り込み実験を行なった (Figure 8)。それぞれの濃度は 10 μM であり、この濃度は十分に PAR1 を活性化することができる²⁸。PAR1 はアゴニストによって活性化されるとエンドサイトーシスによって細胞内へと内在化することが報告されている⁵⁰。P1pal-13 は PAR1 のインナーループドメインと相互作用してアゴニスト作用を示すとともに、PAR1 の内在化、リサイクリングを活性化する。もし **9a** がこのルートに乗って、PAR1 と結合して細胞内に移行しているのであれば、P1pal-13 との競合により細胞内への取り込みが抑制され、細胞内ホウ素量が低下するはずである。しかし、競合実験の結果では、**9a** 単独で処理した場合と比較して、P1pal-13 共存下でも有意な変化は認められなかった。このことから **9a** の細胞内移行機構は、PAR1 との結合を介さない直接膜透過によるものであることが示唆された。Pepducin vehicle の最適構造が P1pal-13 と一致したのは、その構造が膜上でのフリップ運動に適したものであったことによると予想される。また、**9a** の場合は、細胞質側にフリップして内膜にアンカリングした状態になったとき、リンカー及び BSH 積荷部位が立体障害となるため、PAR1 と相互作用することは困難であると考えられた。

続いて **9a** が細胞内へと移行せず、細胞膜の外側に脂質分子によってアンカリングのみしている可能性を否定するため、ジスルフィド還元剤である DTT 処理による細胞膜上での切断実験を行なった **9a** を T98G 細胞に 12 時間処理し、PBS で洗浄後、DTT 処理を行なった。続いて PBS で洗浄を行ない、細胞内ホウ素量を測定した (Figure 8)。この実験で **9a** が細胞内に移行せず、細胞外膜にアンカリングして存在している場合には、DTT によってジスルフィドが切断されると積荷部位が切り離されて細胞外に拡

散し、洗浄で除去されるため、ホウ素取り込み量が減少するはずである。実験結果は DTT 処理による有意な低下は見られなかったことから、**9a** は予想通り、細部内まで移行していることが示唆された。

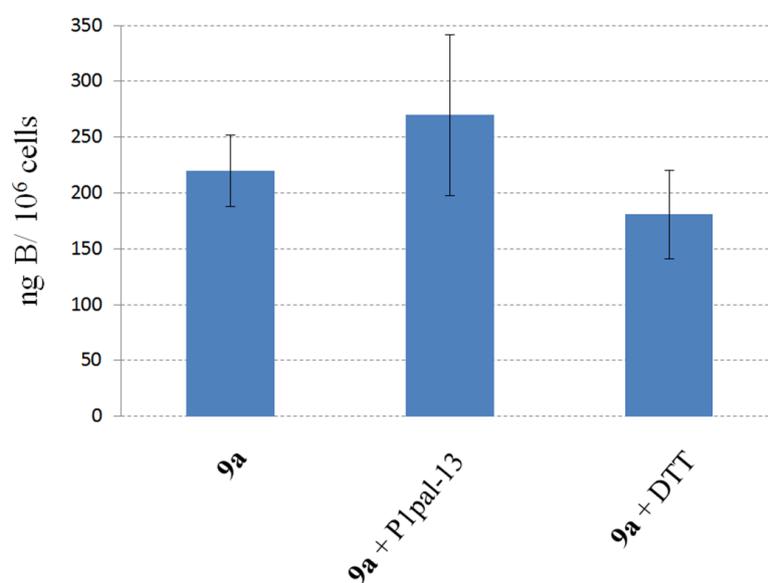


Figure 8 T98G 細胞を用いた P1pal-13 と **9a** の競合実験及び DTT 処理による BSH 細胞内取り込みへ与える影響.

第三項 PAR1 発現細胞と非発現細胞における ホウ素キャリアの取り込み様式について

PAR1 非発現の乳がん細胞である MCF-7 と PAR1 発現率の高い乳がん細胞 MDA-MB-231^{35,51} を用いて **9a**, **9f**, **9h** について取り込み量の違いについて評価した (Figure 9)。取り込みの傾向としては、どの細胞株でも **9a** が最大で、逆向き配列の **9h** は低いといった同様の傾向を示している。また、細胞数あたりの取り込みの絶対量は MDA-MB-231 細胞の方が MCF-7 細胞より 2 倍以上高かった。一つあたりの細胞の体積、表面積、膜脂質の成分組成等が異なるため、取り込み量の差が PAR1 発現の有無に由来するかどうかは、この結果からは解明できなかった。

以上より、異なる細胞間でもホウ素キャリアは機能し、取り込みの傾向は同様であることが明らかとなった。今回用いたホウ素キャリアはがん組織への標的を行なっておらず、正常細胞を用いた場合も同様の取り込みを示すと推測される。がん組織へと送達し、がん細胞のみに蓄積させる機能を付与することが今後の課題である。

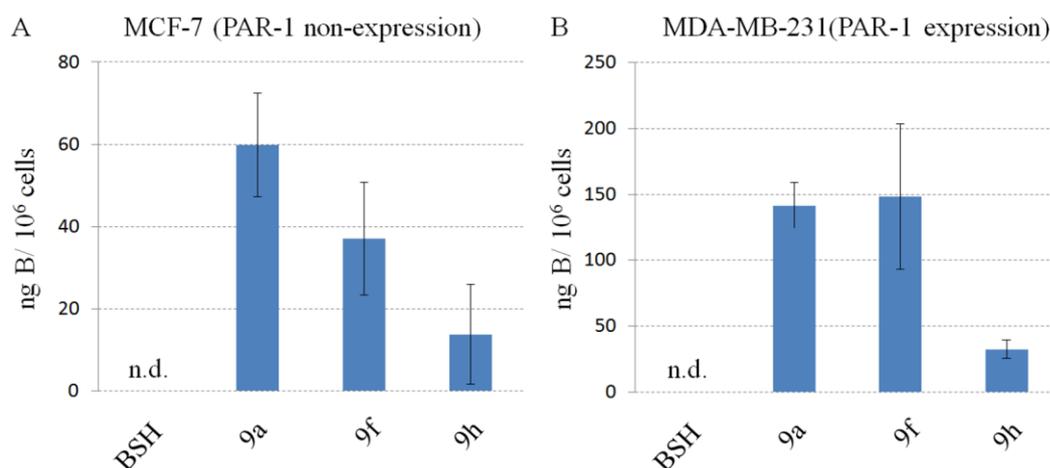


Figure 9 各ホウ素キャリア処理後の MCF-7 細胞 (A) 及び MDA-MB-231 細胞 (B) の細胞内ホウ素濃度.

第三節 9a 及び 18 の毒性試験

有望なホウ素キャリアであった **9a** 及び **18** をコロニー形成アッセイを用い、毒性試験を行なった。T98G 細胞に 20 μ M の BSH、**9a** 及び **18** を 24 時間処理し、PBS で洗浄後、細胞を集めチューブに移した。1.5 時間静置した後、コロニー形成アッセイでコロニー形成率を求めた (Figure 10)。ホウ素キャリア **9a** 及び **18** での処理細胞のコロニー形成率はそれぞれ 0.15 及び 0.19 と BSH (0.20) やコントロール (0.14) と比較して有意な差は認められず、毒性は低いと判断した。

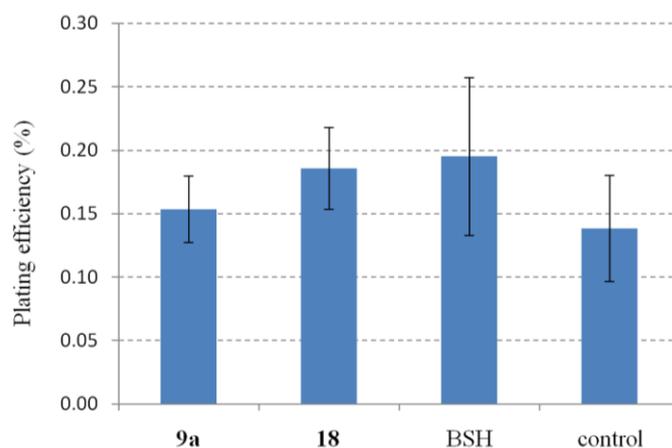


Figure 10 ホウ素キャリア処理 T98G 細胞のコロニー形成率.

第四節 中性子照射下の **9a** 及び **18** の放射線増感効果

有望なホウ素キャリアであった **9a** 及び **18** を用いた中性子照射実験によって、放射線増感効果を評価した。T98G 細胞に 20 μM の BSH、**9a** 及び **18** を 24 時間処理し、PBS で洗浄後、細胞を集めチューブに移した。原子炉で中性子を照射した後、コロニー形成アッセイで生存率を求めた。これより線形回帰分析により生存曲線を求めて、Figure 11 に示した。10%生存率を与える物理照射線量の D_{10} 値を求めた。Table 3 には非照射でのコロニー形成率、 D_{10} 値及び増感率を記した。本実験条件では、照射前に細胞を洗浄して培地を交換しているため、BSH 処理の D_{10} 値及びコロニー形成率が、コントロールとほぼ同等であったことは、BSH が細胞内にはほとんど移行していないことを示す。一方、増感率として、コントロールの D_{10} 値に対するホウ素キャリア処理群の D_{10} 値の比を求めると、**9a** 及び **18** の増感率はそれぞれ 7.60 と 5.79 であり、強い増感効果が得られた。また **9a** 及び **18** の生存曲線と細胞内ホウ素濃度において normal linker に対する piperazine linker の有意な効果は認められなかった。

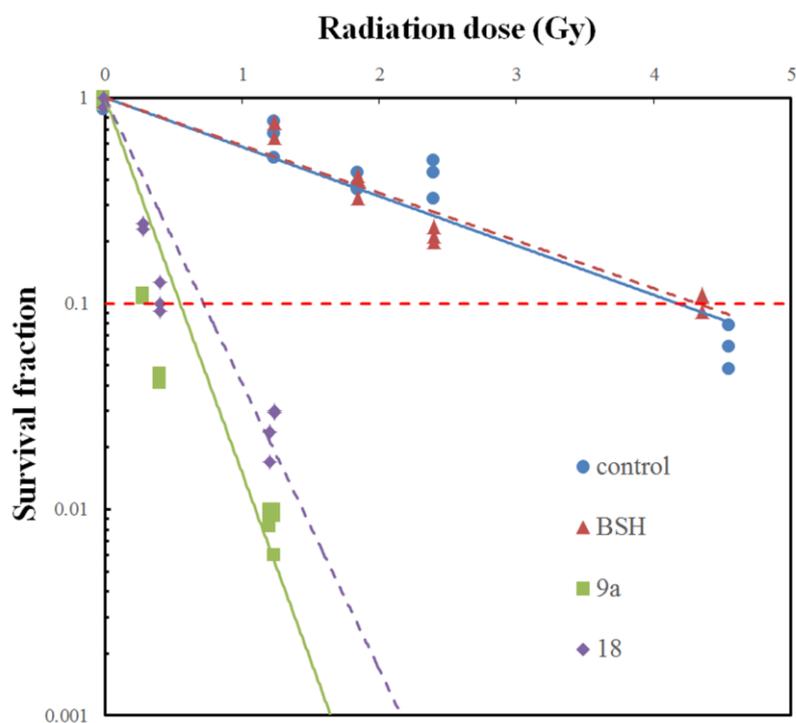


Figure 11 中性子照射によるホウ素キャリア処理 T98G 細胞の生存率.

Table 3 非照射時のコロニー形成率、 D_{10} 値及び増感率

	PE ^a without irradiation (%)	D_{10} value (Gy) ^c	The enhancing effect ^d
control	19.0±4.4 ^b	4.17	-
BSH	32.9±3.6 ^b	4.32	0.97
9a	51.2±5.6 ^b	0.55	7.60
18	20.0±4.5 ^b	0.72	5.79

^aPE without irradiation is plating efficiencies at 0 Gy.

^b95% confidence limits determined using mean values, standard deviations and the numbers of observations on which the means and standard deviations were based.

^cEach D_{10} calculated from a survival curve shows in Figure 4.

^dEnhancing effect is D_{10} for control/ D_{10} for tested compound.

第五章 総括及び展望

BNCT は原理的には理想的な治療法となりうるが、現在のところ、満足はいくホウ素薬剤は開発されておらず、よりよいホウ素薬剤が求められている。著者は pepducin 由来のリポペプチドを膜透過ユニットとして用い、ホウ素クラスターを積荷部位としたリポペプチド結合型ホウ素キャリアの開発を行ない、種々の機能評価を行なった。

以下に得られた知見を要約する。

1. GPCR の一つである PAR1 を標的とする pepducin である P1pal-13 にホウ素クラスターを積荷分子として結合させた分子設計を行ない、P1pal-13 のペプチド配列をもとに、種々変換した誘導体 **9a–9h**, **10a** 及び脂質部分を変換させた誘導体 **12a–12e** を合成した。またリンカー部位にアミンを組み込んだ **18** 及び **28** も合成した。
2. これらの化合物について T98G 細胞への取り込みを比較したところ、P1pal-13 と同じペプチド配列 (AVANRSKKSRALF) とパルミチン酸を有する **9a** が最大の取り込みを示した。リンカー部位は normal linker と piperazine linker では同程度の取り込みを示した。
3. **9a** で処理した T98G 細胞は細胞内ホウ素濃度が時間、濃度依存的に増加した。
4. **9a** は血清を含む培地中で安定であり、24 時間経過後も約 70%の残存率であった。**9a** の取り込みは PAR1 アゴニストである P1pal-13 に阻害されず、DTT 処理によっても低下しないことから、**9a** は PAR1 との相互作用を介せずに直接細胞内に移行し、フリップ運動によって細胞内へと移行することが示唆された。
5. **9a** 及び **18** で処理した T98G 細胞を中性子非照射条件下で生存率を求めた結果、コントロール及び BSH と比較して生存率の低下は見られず、低毒性であることが確認できた。

6. **9a, 18** 及び BSH で処理した T98G 細胞を中性子ビームで照射し、生存率を求めた。

本実験条件下では放射線増感効果は既存ホウ素薬剤 BSH と比較して、**9a, 18** それぞれが約 8 倍と 6 倍であり、劇的な効果を示した。

以上、本研究において、BNCT のためのリポペプチド結合型膜透過性ホウ素キャリア **9a** 及び **18** の開発を行なって、臨床試験されている陰イオンホウ素クラスター BSH の細胞膜透過性を大きく向上させることに成功した。

今後、さらにペプチド部位を拡張し、腫瘍送達能を付与することによって新規ホウ素キャリアとして有望な分子設計は可能である。例えば、今回得られた膜透過性ホウ素キャリアに①matrix metalloproteinase (MMP)等⁵²の腫瘍の細胞間質や膜上で高発現している特定のプロテアーゼ認識配列を介してマレイミドを結合させる、②上記のプロテアーゼ認識配列⁵³を介してBBTBの選択的なトランスサイトosisを誘起するペプチドとして知られる Angiopep⁵⁴と結合させる等の展開が考えられる。①では、まず血中でホウ素キャリアのマレイミドがアルブミンと結合し、EPR 効果によって腫瘍組織に移行すると細胞間質で高発現している MMP によってプロテアーゼ認識配列で切断され、膜透過性ホウ素キャリアが放出され、アルブミンから切り離されることによってはじめて細胞膜透過性を発揮し、細胞内へと BSH を送達することが期待される。一方、②は特に脳腫瘍選択的に BSH を送達するシステムとして考案した。ホウ素キャリアが BBTB 選択的にトランスサイトosisを起こし、脳腫瘍間質に到達する。以下は①と同様の方法にて細胞内へと BSH を送達することで、脳腫瘍選択的送達を可能とする。

今回開発したリポペプチド結合型膜透過性薬剤の方法論は、他の膜非透過性薬剤にも応用でき、薬剤の細胞内送達のための汎用性の高い方法論となるものと期待される。

以上により、本研究は今後の BNCT のためのホウ素キャリアの開発やドラッグデリバリーシステムの研究において、有用な知見を与えるものと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究に対して終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・永澤秀子教授に深甚なる敬意を表します。本研究にあたり直接御指導、御討論、並びに御激励を頂きました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・奥田健介元准教授 (現、神戸薬科大学薬化学研究室・教授)、平山祐准教授、辻美恵子助教に感謝致します。ICP-AES の測定にあたり直接御指導、御助言、並びに御激励を頂きました岐阜大学工学部・櫻田修教授に感謝致します。フローサイトメトリーの実験実施にあたり、直接御指導、御討論、並びに御激励を頂きました岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室・田中宏幸准教授に感謝致します。中性子照射実験に実施にあたり、直接御指導、御助言、並びに御激励を頂きました京都大学複合原子力科学研究所・増永慎一郎教授、真田悠生助教に感謝致します。尚、放射線量の計算を実施して頂きました京都大学複合原子力科学研究所・高田卓志助教に感謝致します。

本研究の推進にあたり御協力頂きました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・因幡栄美氏 (退職) に感謝致します。実験に際して御協力頂きました寺嶋宏明修士、松下明香里氏、及び研究室諸氏に感謝致します。

本研究の一部は JSPS 科研費 挑戦的萌芽研究 (26670059 for H.N.) による助成を得て遂行されたものであり、ここにこの助成に対して心より感謝致します。

略号一覧

Fmoc: 9-fluorenylmethyloxycarbonyl

Trt: trityl

Mmt: 4-methoxytrityl

Dmt: 4,4'-dimethoxytrityl

Boc: *tert*-butoxycarbonyl

Pbf: 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

t-Bu: *tert*-butyl

Ac: acetyl

Ms: methanesulfonyl

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

EtOAc: ethyl acetate

THF: tetrahydrofuran

HBTU: 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-benzotriazolium 3-oxide Hexafluorophosphate

DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine

Et₃N: triethylamine

HOBt·H₂O: 1-hydroxybenzotriazole monohydrate

DIPCI: *N,N'*-diisopropylcarbodiimide

DCC: *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

TFA: trifluoroacetic acid

TIPS: triisopropylsilane

EDT: 1,2-ethanedithiol

DTT: dithiothreitol

PBS: phosphate buffered saline

EMEM: Eagle's minimal essential medium

RP-HPLC: reverse-phase high-performance liquid chromatography

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic

実験の部

実験の部

¹⁰B-enriched BSH は KatChem から購入した。NovaSyn TGR resin は Novabiochem (Merck)から購入した。他の市販試薬はシグマ アルドリッチ、和光純薬工業、東京化成工業、渡辺化学工業、関東化学、キシダ化学から購入した。HPLC 用 MeCN は和光純薬工業またはシグマ アルドリッチから購入した。カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは AP-300 (大興商事)、ジオールシリカゲルは CHROMATOREX DIOL MB 100-75/200 (富士シリシア) を使用した。自動中圧分取用シリカゲルは CHROMATOREX FL60D (富士シリシア) を使用した。

¹H-NMR スペクトルは JEOL ECA-500 (500 MHz) または JEOL JNM AL-400 (400 MHz) を用いて測定した。¹³C-NMR スペクトルは JEOL ECA-500 (125 MHz) または JEOL JNM AL-400 (100 MHz)、Bruker Avance500 (125 MHz) を用いて測定した。

¹H-NMR スペクトルは、CD₃CN, CDCl₃, *d*₆-DMSO もしくは CD₃OD で測定を行なった。¹H-NMR の化学シフト値は tetramethylsilane (0.00 ppm) を内部標準物質として ppm 単位で表示した。¹³C-NMR の化学シフト値は CD₃CN (118.26 ppm)、CDCl₃ (77.0 ppm)、*d*₆-DMSO (39.5 ppm) もしくは CD₃OD (49.0 ppm) を内部標準物質として ppm 単位で表示した。

RP-HPLC は 20-AD series (Shimadzu) もしくは 1260 infinity series (Agilent)を用いた。分析用カラムは Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm, flow rate 0.5 mL/min)を用いた。分析のための HPLC 溶出溶媒は、0.05% formic acid in ultra-pure water (v/v, solvent A)/ 0.05% formic acid in MeCN (v/v, solvent B)もしくは 0.1% TFA in ultra-pure water (v/v, solvent C)/ 0.1% TFA in MeCN (v/v, solvent D)を用いた。吸収波長は 190、195 もしくは 220 nm により溶出物を検出した。分取 HPLC の際にはカラムとして Bensil 5-C18 preparative column (Bentech, 20 × 250 mm, flow rate 5 mL/min) もしくは

Cosmosil 5C18-AR II preparative column (Nacalai Tesque, 10 × 250 mm, flow rate 3 mL/min) を用いた。RP-中圧分取は YFLC W-Prep 2XY (YAMAZEN) もしくは Isolera One 3.0 (Biotage)を用いた。 RP-中圧分取の際にはカラムとして C18 Ultrapack column (YAMAZEN)、SNAP Bio C18 (Biotage)もしくは SNAP Bio C4 column (Biotage)を用いた。分取HPLCの際にはHPLC溶出溶媒は0.1% TFA in ultra-pure water (v/v, solvent C)/ 0.1% TFA in MeCN (v/v, solvent D)を用いた。吸収波長は 190 もしくは 220 nm により溶出物を検出した。NP-中圧分取の際は Isolera One 3.0 (Biotage)を用い、溶出溶媒は Hexane/EtOAc もしくは CHCl₃/MeOH を用いた。吸収波長は 220 もしくは 254 nm により溶出物を検出した。

高分解能マスペクトルは JMS-SX102A (JEOL) もしくは LCMS-IT-TOF (Shimadzu)を用いた。マイクロ波照射装置は Initiator 2.5 (Biotage) を用いた。ICP-AES 分析は ULTIMA2 (HORIBA-Jobin-Yvon) を用い、249.773 nm (ホウ素の発光スペクトル) を測定した。中性子照射は京都大学原子炉 (KUR) の重水熱中性子設備で行なった。

第二章 第二節に関する実験

3-(Triphenylmethyl thio)propionic acid (1) の合成

3-Mercaptopropionic acid (10.0 g, 94.2 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (150 mL)に Trt-Cl (26.3 g, 94.2 mmol)の CH₂Cl₂ 溶液 (100 mL)を 15 分間かけて滴下し、その後室温で終夜攪拌した。反応液中に生じた沈殿を濾取し、CH₂Cl₂ で洗浄することによって、化合物 **1** (25.5 g, 78% yield)を白色固体として得た。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD/CDCl₃) δ: 7.38–7.25 (15H, m), 2.44 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 2.22 (2H, t, *J* = 7.4 Hz). 本化合物は文献既知⁵⁵であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

3-(Triphenylmethyl thio)propionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (2) の合成

化合物 **1** (25.5 g, 73.0 mmol) と *N*-hydroxysuccinimide (8.41 g, 73.0 mmol) を EtOAc/1,4-dioxane (600 mL, 1:1) に溶解させた後、DCC (15.1 g, 73.0 mmol) を加え、室温で終夜攪拌した。反応液をろ過した後、溶媒を減圧留去し、化合物 **1** (33.4 g, quant.) を白色固体として得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.20–7.44 (m, 15H, overlapped with solvent peak), 2.79 (s, 4H), 2.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H). 本化合物は文献既知⁵⁵であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

^αN-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-^εN-[3-(triphenylmethylsulfanyl)propionyl]-L-lysine (3) の合成

Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (16.4 g, 35.0 mmol) を 2 M HCl/ EtOAc (200 mL) に溶解させ、室温で 2 時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去した後、得られた残渣を Et₂O で洗浄し、脱 Boc 体 (14.1 g) を得た。この脱 Boc 体を DIPEA (6.6 mL, 1.1 mmol) を含む DMF (100 mL) で溶解させ、そこに化合物 **2** (16.0 g, 35.0 mmol) の DMF 溶液 (20 mL) を加え、さらに DIPEA を加えて pH を 8–9 に調製した。反応液を室温で終夜攪拌した後、溶媒を減圧留去した。得られたオイルを EtOAc (200 mL) で抽出し、10%クエン酸水溶液 (150 mL × 2)、水 (80 mL) で洗浄した後、有機層を飽和食塩水で処理し、MgSO₄ で乾燥させた。得られた残渣を CH₂Cl₂/ hexane で晶析することによって、化合物 **3** (16.2 g, 66% yield) を白色固体として得た。本化合物は文献既知⁵⁵であり、その操作を参考にした。

^αN-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-^εN-{3-bis[(4-methoxyphenyl)phenylmethyl-thio]propionyl}-L-lysine (4) の合成

化合物 **3** (1.0 g, 1.43 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (13 mL) に TIPS (0.75 mL) と TFA (1.5 mL) を加え、室温で終夜攪拌した後、反応液の溶媒を減圧留去した。得られた残渣を

hexane と Et₂O で洗浄し、脱 Trt 体 (466 mg) を得た。得られた脱 Trt 体 (466 mg) を CH₂Cl₂ (15 mL) で溶解し、そこに Et₃N (239 μL, 1.72 mmol) と DmtCl (581 mg, 1.72 mmol) を加えた。反応液を室温で 1 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH 100:0, 50:1 then 30:1) で精製し、化合物 **4** (415 mg, 38%) を無色アモルファスとして得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.56–7.59 (m, 2H), 6.76–7.39 (m, 18H), 5.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.65 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.31–4.38 (m, 3H), 4.17 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.12–3.18 (m, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.73–1.85 (m, 2H), 1.33–1.47 (m, 4H); HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₄₅H₄₅N₂O₇S [M-H]⁻ 757.2953, found 757.2942. 本化合物は新規化合物である。

第二章 第三節に関する実験

S-Cyanoethyl-thioundecahydro-closo-dodecaborate (2-) disodium salt (5) の合成

¹⁰BSH·2Na (500 mg, 2.38 mmol) と炭酸ナトリウム (267 mg, 2.52 mmol) を MeCN に懸濁させ、3-bromopropionitrile (990 μL, 11.9 mmol) を加え、65 °C で一日攪拌した。ろ過操作より反応液から炭酸ナトリウムを除去し、溶媒を減圧留去しジシアノエチル体 (675 mg) を得た。¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 3.22–3.26 (m, 4H), 2.98 (td, *J* = 7.0, 3.4 Hz, 4H), 0.91–1.94 (br, 11H).

ジシアノエチル体 (675 mg) を 15% アセトン水溶液 (10 mL) に溶解させ、攪拌下水酸化ナトリウム水溶液 (2 M, 2.5 mL) を滴下した。2 時間攪拌した後、1 M 塩酸を用いて pH を約 7 に調製した。溶媒を減圧留去した後、凍結乾燥を行ない乾燥させ、粗生成物を得た。得られた粗生成物をエタノールに溶解させ、ろ過をすることによって無機塩を除去し、溶媒を減圧留去することで化合物 **5** (606 mg, quant.) をベージュ固体

として得た。¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 2.64–2.68 (m, 2H), 2.51–2.58 (m, 2H), 0.69–1.47 (br, 11H). 本化合物のテトラメチルアンモニウム塩は文献既知⁵⁶であり、その操作を参考にした。

**S-(3-Carboxypropyl)-S-(2-cyanoethyl)-sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-)
sodium salt (6) の合成**

化合物 **5** (327 mg, 1.24 mmol) と 4-bromobutyric acid (252 mg, 1.24 mmol) を DMF (4 mL) に溶解させ、室温で 5 時間攪拌した。続けて 40 °C で 1.5 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH 7:3) で精製し、化合物 **6** (338 mg, 83% yield) を白色固体として得た。¹H-NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 3.11–3.30 (m, 2H), 2.95–3.00 (m, 2H), 2.41–2.47 (m, 2H), 2.00–2.06 (m, 2H), 1.07–1.46 (m, 12H), 1.13 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃CN) δ 173.99, 118.26 (overlapped with solvent peak), 41.23, 36.79, 32.39, 22.43, 16.25; HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₇H₂₂¹⁰B₁₂NO₂S⁻ [M-Na]⁻ 304.2929, found 304.2931; m.p. 174.0–175.5 °C. 本化合物は新規化合物である。

2-(Pyridyldithio)ethylamine hydrochloride の合成

2,2-Dipyridyldisulfide (4.42 g, 20.0 mmol) を酢酸 (1.6 mL) を含む MeOH (60 mL) に溶解させた。2-Aminoethanethiol hydrochloride (1.14 g, 10.0 mmol) を MeOH (20 mL) に溶解させたものを 30 分以内に加えた。反応液を窒素雰囲気下で 1 日攪拌した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を Et₂O で 2 回洗浄し、MeOH に溶解させた。そこに過剰の Et₃O を加え、生じた沈殿を集めることで 2-(pyridyldithio)ethylamine hydrochloride (1.51 g, 67% yield) を白色固体として得た。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.54 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.77–7.82 (m, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.30–7.33 (m, 1H), 3.29 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 3.13 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H) 本化合物は文献既知⁵⁷であり、上記スペクト

ルが一致したことにより構造を決定した。

S-(2-Cyanoethyl)-S-{4-oxo-[2-(2-pyridinyldithio)ethylamino]butyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) sodium salt (7) の合成

化合物 **6** (20 mg, 61.1 μmol) と HBTU (23 mg, 61.1 μmol) の DMF 溶液 (1 mL) に 2-(pyridyldithio)ethylamine hydrochloride (13.6 mg, 61.1 μmol) と DIPEA (10.5 μL , 61.1 μmol) を加え、室温で一日攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去することによって得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:1) で精製した後、Sep-Pak® (0.1% TFA in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 4:1 to 2:1) で再精製することによって、化合物 **7** (9.0 mg, 30% yield) を凍結乾燥品として得た。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN) δ 8.72 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.24–8.28 (m, 1H), 7.95 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.71–7.74 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 3.54 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.22–3.33 (m, 2H), 2.93–3.20 (m, 6H), 2.38–2.47 (m, 2H), 2.10–2.17 (m, 2H), 1.05–1.51 (m, 12H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN) δ 174.83, 145.56, 144.69, 125.57, 124.75, 118.90, 43.34, 41.69, 40.08, 37.15, 34.71, 23.14, 16.46; HRMS (ESI) m/z : calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{30}^{10}\text{B}_{12}\text{N}_3\text{OS}_3$ [M-Na] $^+$ 472.3109, found 472.3122. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド 8a–8i の合成

ペプチド合成は Fmoc 固相合成 (Solid-phase peptide synthesis) によって行なった。Fmoc アミノ酸は Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH を用いた。保護ペプチド鎖は、NovaSyn TGR resin (0.24 mmol/g) を用い、0.05–0.5 mmol スケールで構築した。アミノ酸の縮合は、Fmoc アミノ酸 (5.0 eq.), DIPCI (5.0 eq.), HOBt· H_2O (5.0 eq.)を含む DMF (2 mL) 溶液を加え、75 °C で 5 分間、マイクロウェーブを照射することで行なった。化合物 **3** 及びパルミチン酸の縮合は各化合物 (3.0 eq.), HBTU (2.9 eq.), DIPEA (10 eq.) を含む DMF (2 mL) 溶液を加え、40 °C で 10 分間、マ

マイクロウェーブを照射することで行なった。Fmoc 脱保護は、20%ピペラジン/ DMF 溶液 (v/v) で 40 °C で 10 分間、マイクロウェーブを照射することで行なった。保護ペプチド鎖を thioanisole/*m*-cresol/EDT/H₂O/TFA (5: 5: 5: 5: 80 (v/v), 0.2 mL/20 mg resin) を用いて室温で 3 時間、攪拌することで樹脂からの切り出しと脱保護を行なった。濾過後冷やした Et₂O を加えて生じた沈殿を遠心で集め、その沈殿を Et₂O で 3 回洗浄した。分取用 HPLC 又は中圧分取装置にて精製し、凍結乾燥することで目的とする各ペプチドを得た。

ペプチド **8a** の合成

ペプチド **8a** (85.2 mg, 36% yield from 0.1 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。 Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 10 to 80% D over 20 min, r.t. = 14.4 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₉₇H₁₈₃N₂₇O₂₀S [M+2H]²⁺ 1132.2496, found 1132.2520. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8b** の合成

ペプチド **8b** (218 mg, 27% yield from 0.5 mmol scale resin) を 3TFA 塩として白色粉体で得た。 Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min, r.t. = 18.8 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₆₄H₁₁₇N₁₅O₁₁S [M+2H]²⁺ 651.9383, found 651.9413. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8c** の合成

ペプチド **8c** (29.0 mg, 27% yield from 0.05 mmol scale resin) を 3TFA 塩として白色粉体で得た。 Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min, r.t. = 13.0 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₇₇H₁₄₁N₂₂O₁₆S [M+3H]³⁺ 830.5264, found 830.5241. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8d** の合成

ペプチド **8d** (22.5 mg, 32% yield from 0.05 mmol scale resin) を 2TFA 塩として白色粉末で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.5 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{55}H_{105}N_{15}O_{12}S$ $[M+2H]^{2+}$ 599.8888, found 599.8862. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8e** の合成

ペプチド **8e** (20.9 mg, 21% yield from 0.05 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉末で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min. r.t. = 12.3 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{70}H_{134}N_{22}O_{16}S$ $[M+2H]^{2+}$ 785.5029, found 785.5029. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8f** の合成

ペプチド **8f** (12.6 mg, 11% yield from 0.05 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉末で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min. r.t. = 14.6 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{97}H_{183}N_{27}O_{20}S$ $[M+3H]^{3+}$ 634.4009, found 634.3983. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8g** の合成

ペプチド **8g** (6.8 mg, 5.8% yield from 0.05 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉末で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 13.8 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{97}H_{183}N_{27}O_{20}S$ $[M+3H]^{3+}$ 634.4009, found 634.3985. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8h** の合成

ペプチド **8h** (40.1 mg, 34% yield from 0.05 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.3 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{97}H_{182}N_{27}O_{20}S$ $[M+2H]^{2+}$ 951.0977, found 951.0965. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8i** の合成

ペプチド **8i** (27.9 mg, 26% yield from 0.05 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.4 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{86}H_{152}N_{24}O_{18}S$ $[M+3H]^{3+}$ 920.5713, found 920.5690. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **8j** の合成

ペプチド **8j** (24.5 mg, 21% yield from 0.05 mmol scale resin) を 3TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 14.5 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{90}H_{162}N_{25}O_{18}S$ $[M+H]^{2+}$ 951.0977, found 951.0965. 本化合物は新規化合物である。

リポペプチド結合型ホウ素キャリア **9a-9j** の合成

ペプチド(5–50 μ mol) と化合物 **7** (1.0 eq.) を MeCN/H₂O (2:1, 0.5–1 mL) に溶解させ、5% (v/v)となるように酢酸を添加した。反応液を室温、窒素雰囲気下で 3–12 時間攪拌した後、分取 HPLC 又は中圧分取装置を用いて精製を行なった。純度は HPLC で評価し、LCMS-IT-TOF 又は direct infusion ESI-MS によって同定した。全てのリポペプチド結合型ホウ素キャリアは凍結乾燥品として得た。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{[6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino]hexylamino}propylidithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (9a) の合成

8a (24 mg, 10.0 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ハウ素キャリア**9a** (13.5 mg, 50% yield) を4TFA塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 16.6 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $\text{C}_{97}\text{H}_{184}^{10}\text{B}_{12}\text{N}_{27}\text{O}_{20}\text{S}_3$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1132.2496, found 1132.2520. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{[6-oxo-(L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino]hexylamino}propylidithio}ethylamino}butyl}sulfonio undecahydro-closo-dodecaborate (1-) tritrifluorate sodium salt (9b) の合成

8b (52.8 mg, 32.1 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ハウ素キャリア**9b** (12.4 mg, 15% yield) を3TFA塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min, r.t. = 18.6 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $\text{C}_{73}\text{H}_{143}^{10}\text{B}_{12}\text{N}_{17}\text{O}_{12}\text{S}_3$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 833.0903, found 833.0918. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{[6-oxo-(L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino]hexylamino}propylidithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (9c) の合成

8c (9.8 mg, 4.6 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ハウ素キャリア**9c** (1.6 mg, 14% yield) を4TFA塩とし白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient

of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 14.9 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{86}H_{167}^{10}B_{12}N_{24}O_{17}S_3$ $[M+3H]^{3+}$ 674.7880, found 674.7861. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cvanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-NH₂)-5-N-palmitoylamino}hexylaminopropyl}dithio}ethylamino}butyl}sulfonylundecahydro-closo-dodecaborate (1-) ditrifluorate sodium salt (9d) の合成

8d (9.9 mg, 6.9 μ mol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア **9d** (1.3 mg, 10% yield) を 2TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 18.8 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{64}H_{131}^{10}B_{12}N_{17}O_{13}S_3$ $[M+2H]^{2+}$ 781.0408, found 781.0395. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cvanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-NH₂)-5-N-palmitoylamino}hexylamino}propyl}dithio}ethylamino}butyl}sulfonylundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (9e) の合成

8e (15 mg, 7.4 μ mol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア **9e** (10.4 mg, 59% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min. r.t. = 14.3 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{79}H_{161}^{10}B_{12}N_{24}O_{17}S_3$ $[M+3H]^{3+}$ 644.7723, found 644.7722. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{6-oxo-(L-Ala-L-Leu-L-Phe-L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-NH₂)-5-N-palmitoylamino}hexylamino}propyl dithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (9f) の合成

8f (8.0 mg, 3.4 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア **9f** (4.3 mg, 46% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min. r.t. = 16.6 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $\text{C}_{97}\text{H}_{186}^{10}\text{B}_{12}\text{N}_{27}\text{O}_{20}\text{S}_3$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 755.1689, found 755.1721. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{6-oxo-(L-Ala-L-Arg-L-Val-L-Ser-L-Ala-L-Lys-L-Asn-L-Lys-L-Ala-L-Ser-L-Leu-L-Arg-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino}hexylamino}propyl dithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (9g) の合成

8g (4.9 mg, 1.8 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア **9g** (1.4 mg, 30% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 17.4 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $\text{C}_{97}\text{H}_{185}^{10}\text{B}_{12}\text{N}_{27}\text{O}_{20}\text{S}_{32}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1132.2496, found 1132.2471. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{6-oxo-(L-Phe-L-Leu-L-Ala-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Asn-L-Ala-L-Val-L-Ala-NH₂)-5-N-palmitoylamino}hexylamino}propyl dithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (9h) の合成

8h (13.8 mg, 3.4 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア **9h** (9.9 mg,

61% yield) を4TFA塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.8 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{97}H_{186}^{10}B_{12}N_{27}O_{20}S_3$ $[M+3H]^{3+}$ 755.1689, found 755.1791. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cvanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{[6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Pro-L-Gly-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino]hexylaminopropylidithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-*cl*oso-dodecaborate (1-) tritri-fluorate sodium salt (9i) の合成

8i (10.2 mg, 4.7 μ mol) を原料としてリポペプチド結合型ハウ素キャリア**9i** (3.2 mg, 27% yield) を3TFA塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min. r.t. = 17.9 min. O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{95}H_{179}^{10}B_{12}N_{26}O_{19}S_3$ $[M+3H]^{3+}$ 734.8179, found 734.8163. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cvanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{[6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Pro-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino]hexylamino}propylidithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-*cl*oso-dodecaborate (1-) tetratri-fluorate sodium salt (9j) の合成

8j (11.8 mg, 5.0 μ mol) を原料としてリポペプチド結合型ハウ素キャリア**9j** (1.3 mg, 10% yield) を4TFA塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 16.6 min. O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{99}H_{188}^{10}B_{12}N_{27}O_{19}S_3$ $[M+3H]^{3+}$ 758.5091, found 758.5065. 本化合物は新規化合物である。

**S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino}hexylamino}propylidithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-cislo-dodecaborate (1-)
tetratrifluorate sodium salt (10a) の合成**

9a (3.7 mg, 1.58 μmol) の acetone/ H₂O (50 μL / 110 μL) 溶液に 2 M 水酸化ナトリウム水溶液(87 μL) を加えた。反応液を 5 時間攪拌した後に TFA を加えて酸性にし、中圧分取 (column Ultra Pack AM, 11 \times 100 mm, flow rate 10 mL min⁻¹, linear gradient of solvent D into C, 10 to 80% D over 20 min, then 80% over 10 min) で精製を行ない、リポペプチド結合型ホウ素キャリア **10a** (1.2 mg, 29% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% over 20 min. r.t. = 16.8 min. O.D. 220 nm; HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₉₄H₁₈₀10B₁₂N₂₆O₂₀S₃ [M-Na+3H]²⁺ 1105.7364, found 1105.7376. 本化合物は新規化合物である。

第二章 第四節に関する実験

ペプチド **11a–11j** の合成

第二章第三節で示したペプチド **8a–8i** の合成と同様の方法で行なった。アセチル化は無水酢酸 (5.0 eq.), pyridine (5.0 eq.) を含む DMF (2 mL) 溶液を加え、40 °C で 5 分間、マイクロウェーブを照射することで行なった。

ペプチド **11a** の合成

ペプチド **11a** (128 mg, 59% yield from 0.10 mmol scale resine) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 15 to 60% D over 20 min. r.t. = 8.2 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₇₄H₁₃₂N₂₅O₁₉S

$[M+3H]^{3+}$ 568.9945, found 568.9922. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **11b** の合成

ペプチド **11b** (10.6 mg, 17% yield from 0.05 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 10 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.6 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{94}H_{159}N_{25}O_{19}S$ $[M+2H]^{2+}$ 987.0977, found 987.0966. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **11c** の合成

11c (34.0 mg, 29% yield from 0.05 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 12.9 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{86}H_{155}N_{25}O_{19}S$ $[M+2H]^{2+}$ 937.082, found 937.0812. 本化合物は新規化合物である。

ペプチド **11d** 及び **11e** の合成

ペプチド **11d** と **11e** の混合物 (19.0 mg, 15% yield from 0.05 mmol scale resin) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 11.9 min (**11d**), 15.1 min (**11e**). O.D. 220 nm. HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{96}H_{167}N_{25}O_{20}S$ $[M+2H]^{2+}$ 1011.1264, found 1011.1271 (**11d**), calcd. for $C_{98}H_{166}F_3N_{25}O_{21}S$ $[M+2H]^{2+}$ 1059.1176, found 1059.1167 (**11e**). 本化合物は新規化合物である。

リポペプチド結合型ホウ素キャリア **12a–12e** の合成

第二章第三節で示したリポペプチド結合型ホウ素キャリア **9a–9i** の合成と同様の方法で行なった。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{[5-N-acetylamino-6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)]hexylamino}propyl dithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-*closo*-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (12a) の合成

11a (10.0 mg, 4.6 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア 12a (6.3 mg, 55% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 15 to 60% D over 20 min. r.t. = 13.4 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₈₃H₁₅₈¹⁰B₁₂N₂₇O₂₀S₃ [M+3H]³⁺ 689.7625, found 689.7612. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{[5-N-docosaheptaenoylamino-6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)]hexyl amino}propyl dithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-*closo*-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (12b) の合成

11b (10.6 mg, 4.4 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア 12b (4.2 mg, 35% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 10 to 80% D over 20 min. r.t. = 17.3 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₁₀₃H₁₈₆¹⁰B₁₂N₂₇O₂₀S₃ [M+3H]³⁺ 779.1689, found 779.1671. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{[5-N-myristoylamino-6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)]hexylamino}propyl dithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-*closo*-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (12c) の合成

11c (10.0 mg, 4.3 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア 12c (6.9

mg, 59% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.3 min; O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{95}H_{182}^{10}B_{12}N_{27}O_{20}S_3$ $[M+3H]^{3+}$ 745.8251, found 745.8253. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cvanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{5-N-(3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oyl)amino-6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)}hexylamino}propyldithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (12d) 及 び

S-(cyanoethyl)-S-{4-oxo-{2-{3-oxo-{6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-[3 α -(2,2,2-trifluoro-acetoxy)-5 β -cholan-24-oyl]amino-hexylamino}propyldithio}ethylamino}butyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (12e) の合成

11d と **11e** の混合物 (10.0 mg, 4.0 μ mol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア **12d** (4.7 mg, 41% yield) 及び **12e** (2.2 mg, 18% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% over 20 min. r.t. = 14.2 min (**12d**) and r.t. = 17.3 min (**12e**). O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{105}H_{193}^{10}B_{12}N_{27}O_{21}S_3$ $[M+2H]^{2+}$ 1192.2784, found 1192.2786 (**12d**) and calcd. for $C_{107}H_{193}^{10}B_{12}F_3N_{27}O_{22}S_3$ $[M+3H]^{3+}$ 827.1821, found 827.1821 (**12e**). 本化合物は新規化合物である。

第二章 第五節に関する実験

(2-Hydroxyethyl)pyridyl disulfide (13) の合成

2,2'-dithiodipyridine (10.1 g, 45.7 mmol) の 2 mL の酢酸を含む MeOH 溶液 (50 mL) に mercaptoethanol (3.0 mL, 45.7 mmol) を加えた。反応液を室温、窒素雰囲気下で一日攪拌を行なった後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を CHCl₃ (200 mL) で溶解させ、飽和食塩水溶液で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥させ、溶媒を減圧留去し、得られた残渣に Et₂O を加え、沈殿物を除き、濾液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane/EtOAc 1:3) で精製を行ない、化合物 **13** (5.31 g, 62% yield) をクリアオイルとして得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.51 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.57–7.60 (m, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.15–7.17 (m, 1H), 5.76 (s, 1H), 3.81 (s, 2H), 2.96 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H). 本化合物は文献既知⁵⁸である。

(2-Piperidin-4-yl-ethyl)carbamic acid *tert*-butyl ester (14) の合成

2-(Aminoethyl)piperazine (6.56 mL, 50.0 mmol) の toluene 溶液 (40 mL) に benzaldehyde (5.10 mL, 50.0 mmol) を加え、還流条件下で 3 時間攪拌した。その後、氷浴下で benzyl chloroformate (7.60 mL, 50.0 mmol) を加えた。反応液を室温に戻し、終夜攪拌後、MeOH (100 mL) に溶解させ、2 M 塩酸水溶液 (125 mL) を氷浴下で加えた。この反応液の溶媒を減圧留去し、残った水層を CH₂Cl₂ (100 mL) で洗浄した後、28%アンモニア水溶液を加えて pH を約 10 に調製した。塩基性にした水層を CH₂Cl₂ (100 mL × 3) で抽出し、集めた有機層を飽和食塩水で処理した後、Na₂SO₄ で乾燥させた。減圧留去によって溶媒を除き、benzyl 4-(2-aminoethyl)piperazine-1-carboxylate (6.64 g, 50% yield) を黄色オイルとして得た。

得られた benzyl 4-(2-aminoethyl)piperazine-1-carboxylate (6.64 g, 25.2 mmol) を THF (50 mL) に溶解させ、そこに Boc₂O (6.60 g, 30.2 mmol) の THF 溶液 (50 mL) を氷冷下

で加えた。反応液を室温で 10 時間攪拌を行なった後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH 100: 0, 100: 1 then 50:1) によって精製し、benzyl 4-{2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]ethyl}piperazine-1-carboxylate (6.13 g, 69% yield) をクリアオイルで得た。

得られた benzyl 4-{2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]ethyl}piperazine-1-carboxylate (6.13 g, 17.5 mmol) を MeOH (80 mL) に溶解させ、そこに 10wt% Pd/C (550 mg) を加えた。反応液は室温、水素雰囲気下で一日攪拌した後、セライト濾過を行なった。得られた濾液の溶媒を減圧留去することで、化合物 **14** (5.17 g, quant.) を茶色オイルとして得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.32 (br s, 4H), 3.26 (m, 2H), 2.92 (br s, 4H), 2.65 (br s, 2H), 1.43 (br s, 9H). 本化合物は文献既知⁵⁹である。

N-(2-{4-[2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl]ethyl}piperazin-1-yl)ethyl)carbamic acid *tert*-butyl ester (**15**) の合成

化合物 **13** (2.19 g, 11.7 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (40 mL) に Et₃N (2.44 mL, 17.5 mmol) と MsCl (1.35 mL, 17.5 mmol) を氷冷下で加えた。反応液を氷冷下で 30 分間攪拌を行なった後、CHCl₃ (600 mL) で希釈し、水 (200 mL × 3) で洗浄した。この有機層を飽和食塩水で処理し、MgSO₄ で乾燥させた後、減圧留去し、溶媒を除去し Ms 体とした。

得られた Ms 体を MeCN (40 mL) で溶解し、化合物 **14** (3.21 g, 14.0 mmol) と DIPEA (4.00 mL, 23.4 mmol) を加え、室温で終夜攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去した後、得られた残渣を CHCl₃ (800 mL) に溶解させ、飽和食塩水 (200 mL × 3) で洗浄し、有機層を MgSO₄ で乾燥させた。減圧留去によって溶媒を除去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH 100: 0, 50: 1 then 20: 1) によって精製し、化合物 **15** (1.66 g, 36% yield) を黄色オイルとして得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.63–7.66 (m, 1H), 7.07–7.10 (m, 1H), 5.00 (s, 1H), 3.21–3.24 (m, 4H), 2.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.70 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.44–

2.57 (m, 8H), 1.45 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 160.30, 155.85, 149.46, 136.87, 120.47, 119.53, 79.03, 57.01, 56.97, 52.79, 52.64, 52.05, 45.73, 36.98, 36.01, 28.35; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{NaO}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 421.1702, found 421.1679. 本化合物は新規化合物である。

2-Chloro-*N*-(2-{4-[2-(pyridin-2-yl)disulfanyl]-ethyl}piperazin-1-yl)ethyl)acetamide (16)

の合成

化合物 **15** (78 mg, 0.195 mmol) を 2 M HCl/ MeOH (5 mL) で溶解させ、室温で 1.5 時間攪拌し、減圧留去によって溶媒を除去した。得られた残渣を CH_2Cl_2 (1 mL) に懸濁させ、 Et_3N (82 μL , 0.585 mmol) と 2-chloroacetyl chloride (31 μL , 0.195 mmol) を 2-chloroacetyl chloride (31 μL , 0.195 mmol) を加えた。反応液を室温で 15 分間攪拌した後、減圧留去によって溶媒を除去し、得られた残渣を Et_2O (5 mL) と CHCl_3 (1 mL \times 2) で洗浄した。集めた固体をジオールシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:0 then 50:1) によって精製し、化合物 **16** (21 mg, 29% yield) をクリアオイルとして得た。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.46 (dd, $J = 4.6, 1.1$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.63–7.67 (m, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.08–7.11 (m, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.38 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.71 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.50–2.54 (m, 10H); LRMS (ESI) m/z . calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{OS}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 375.1, found. 375.0. 本化合物は新規化合物である。本化合物は不安定であり、速やかに次の反応に用いた。

***S*-(2-Cyanoethyl)-*S*-(2-oxo-{2-[4-[2-(2-pyridinyldithioethyl)]-1-piperazinyl]}**

ethylamino}ethyl)sulfonioundecahydro-*closa*-dodecaborate (1-) sodium salt (17) の合成

化合物 **16** (21 mg, 56.5 μmol) と **5** (7.4 mg, 28.3 μmol) を DMF (0.5 mL) に溶解させ、50 $^\circ\text{C}$ で 1 時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去し、得られた残渣を HPLC (COSMSIL 5C18 AE-II, 10 \times 250 mm, flow rate 3.0 mL min^{-1} , linear gradient of solvent B into A, 10 to

80% B over 40 min) で精製し、凍結乾燥によって化合物 **17** (7.7 mg, 47% yield) をクリアアモルファスとして得た。¹H-NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 8.50 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 7.78–7.81 (m, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.26–7.28 (m, 1H), 3.84–4.01 (m, 2H), 3.30–3.39 (m, 3H), 3.09 (s, 4H), 3.03 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.76–2.95 (m, 12H), 1.01–1.58 (m, 11H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 165.83, 160.06, 150.39, 138.58, 122.25, 121.28, 56.74, 56.00, 52.05, 51.84, 46.11, 38.29, 26.62, 35.29, 16.22; HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₁₈H₃₈¹⁰BN₅OS₃ [M-Na]⁺ 556.3796, found 556.3769. 本化合物は新規化合物である。

S-(Cianoethyl)-S-{2-oxo-{2-{4-{2-{3-oxo-}[6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino]hexylamino}propyldithio}ethyl}-1-piperazinyl}ethylamino}ethyl}sulfonioundecahydro-closo-dodecaborate (1-) tetratrifluorate sodium salt (18) の合成

第二章第三節で示したりポペプチド結合型ホウ素キャリア **9a–9i** の合成と同様の方法で行なった。**8a** (11.4 mg, 4.8 μmol) を原料としてリポペプチド結合型ホウ素キャリア **18** (3.5 mg, 26% yield) を 4TFA 塩として白色粉体で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 30 to 95% D over 20 min. r.t. = 15.2 min. O.D. 220 nm; HRMS(ESI) *m/z*: calcd. C₁₀₁H₁₉₅¹⁰B₁₂N₂₉O₂₀S₃ [M+4H]⁴⁺ 587.6456, found 587.6435. 本化合物は新規化合物である。

N-(3-Hydroxypropyl)-2-nitro-N-{2-[(triphenylmethyl)thio]sulfanylethyl}-2-nitrobenzene sulfonamide (21) の合成

化合物 **19** (100 mg, 0.312 mmol) を CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解させ、Et₃N (65 μL, 0.468 mmol) と MsCl (36 μL, 0.468 mmol) を氷冷下に加え、15 分間攪拌した。反応液を CH₂Cl₂ (40 mL) を加えて希釈し、冷水 (15 mL × 2) で洗浄し、有機層を飽和食塩水で処理した後、MgSO₄ で乾燥させた。溶媒を減圧留去し、得られた残渣を DMF (1 mL) に

溶解させた。そこに **20** (122 mg, 0.468 mmol) と Cs₂CO₃ (152 mg, 0.468 mmol) を加え、50 °C で一日攪拌した。反応液をろ過した後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane/EtOAc 1:2) で精製し、**21** (102 mg, 58% yield) をクリアオイルとして得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 7.54–7.61 (m, 3H), 7.17–7.35 (m, 15H, overlapped with solvent peak), 3.49 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.17 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.42 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.42–1.47 (m, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 147.76, 144.31, 133.51, 132.81, 131.64, 130.35, 129.39, 127.84, 126.70, 124.07, 66.98, 58.64, 46.91, 44.78, 30.66, 30.24; HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₃₀H₃₀N₂NaO₅S₂ [M+Na]⁺ 585.1488, found 585.1493. 本化合物は新規化合物である。

***N*-{2-[(Triphenylmethyl)thio]ethyl}-2-nitrobenzenesulfonamide (22)** の合成

Ethylenediamine (8.6 g, 144 mmol) を CH₂Cl₂ (250 mL) に溶解させ、TrtCl (5.0 g, 17.9 mmol) の CH₂Cl₂ (50 mL) 溶液を氷冷下で3時間かけて滴下した。反応液はさらに室温に戻し、2時間攪拌した後、減圧留去によって溶媒を約 70 mL になるまで濃縮した。この有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (70 mL × 3) で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥し、溶媒を減圧留去することによって Trt 体 (6.05 g, quant.) をクリアオイルで得た。

得られた Trt 体 (6.05 g) と NaOH (788 mg, 19.7 mmol) を CH₂Cl₂/H₂O (1:1, 80 mL) で溶解させ、そこに NsCl (3.97 g, 17.9 mmol) を氷冷下で加えた。反応液を室温で3日間攪拌した後、水 (50 mL × 2) で洗浄し有機層を飽和食塩水で処理した後、Na₂SO₄ で乾燥させた。溶媒を減圧留去することによって得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane/EtOAc 3:1) で精製し、化合物 **22** (7.53 g, 86% yield) を白色固体として得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (dd, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.68–7.75 (m, 2H), 7.16–7.41 (m, 16H), 5.87 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.16 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.67 (s, 1H), 1.67 (s, 1H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ

148.12, 145.34, 133.53, 133.42, 132.71, 131.14, 128.40, 127.93, 126.45, 125.32, 77.26, 77.00, 76.75, 70.68, 44.33, 42.56; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{27}H_{24}N_3O_4S$ $[M+H]^+$ 486.1493, found 486.1488; m.p. 66.5–67.0 °C. 本化合物は新規化合物である。

***N*-{3-[*N'*-(2-Nitrophenylsulfonyl)-*N'*-(triphenylmethylthioethyl)amino]propyl}-*N*-{2-[(triphenylmethyl)amino]ethyl}-2-nitrobenzenesulfonamide (23) の合成**

化合物 **21** (5.72 g, 10.2 mmol) を CH_2Cl_2 (80 mL) に溶解させ、 Et_3N (2.13 mL, 15.3 mmol) と $MsCl$ (1.17 mL, 15.3 mmol) を氷冷下で加えた。氷冷下で 30 分間攪拌した後、 $CHCl_3$ (350 mL) を加えることによって希釈し、冷水 (100 mL \times 3) で洗浄した。有機層を飽和食塩水で処理した後、 $MgSO_4$ で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を DMF (100 mL) に溶解させ、そこに化合物 **22** (7.27 g, 15.3 mmol) と Cs_2CO_3 (4.68 g, 15.3 mmol) を加え、50 °C で終夜攪拌した。反応液をろ過した後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane/ $EtOAc$ 2:1 then 3:2) で精製し、化合物 **23** (6.57 g, 63% yield) を黄色アモルファスとして得た。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.02 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 7.51–7.68 (m, 6H), 7.13–7.41 (m, 30H, overlapped with solvent peak), 3.37 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.94–2.99 (m, 4H), 2.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.19 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 1.33–1.39 (m, 2H); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 147.81, 147.72, 145.51, 144.39, 133.48, 133.44, 133.38, 132.90, 131.83, 131.69, 131.12, 130.79, 129.51, 128.38, 127.94, 127.85, 126.84, 126.35, 124.29, 124.09, 70.64, 67.11, 46.98, 45.24, 43.93, 40.54, 30.32, 26.66; HRMS (ESI) m/z . calcd. for $C_{57}H_{53}N_5NaO_8S_3$ $[M+Na]^+$ 1054.2948, found 1054.2942. 本化合物は新規化合物である。

***N*-{2-[Bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]amino}ethyl}-*N*'-{3-[*N*'-(2-nitrophenylsulfonyl)-*N*'-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]thioethyl]amino}propyl}-2-nitrobenzenesulfonamide (24) の合成**

化合物 **23** (143 mg, 0.139 mmol) を CH₂Cl₂ (4.5 mL) に溶解させ、そこに TIPS (250 μL) と TFA (500 μL) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去した後、得られた残渣を Et₂O で洗浄した。集めた固体を CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解させ、そこに Et₃N (111 μL, 0.80 mmol) と DmtCl (163 mg, 0.48 mmol) を氷冷下で加えた。反応液を室温で 1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane/EtOAc 88:12 to 0:100) によって精製し、化合物 **24** (118 mg, 74% yield) を黄色アモルファスとして得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (dd, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.50–7.65 (m, 6H), 6.71–7.33 (m, 26H, overlapped with solvent peak), 3.75 (s, 6H), 3.74 (s, 6H), 3.38 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.99 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.37 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.19 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.65 (s, 1H), 1.40–1.46 (m, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 158.07, 157.72, 147.75, 147.64, 146.09, 145.00, 137.91, 136.70, 133.48, 133.40, 133.32, 132.79, 131.78, 131.68, 130.95, 130.67, 130.57, 129.42, 129.27, 128.13, 127.86, 127.78, 126.66, 126.14, 124.21, 124.03, 113.10, 113.07, 77.20, 69.60, 66.15, 55.18, 55.11, 47.08, 47.02, 45.27, 44.06, 40.65, 30.38, 26.72; HRMS (ESI) *m/z*: calcd. for C₆₁H₆₁KN₅O₁₂S₃ [M+K]⁺ 1190.3110, found 1190.3081. 本化合物は新規化合物である。

***N*'-{3-[*N*'-(1,1-Dimethyletoxy)carbonyl]-*N*'-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]thioethyl] amino}propyl}-*N*-{2-[bis(4-methoxyphenyl)phenyl]amino}ethyl}carbamic acid 1, 1-dimethylethyl ester (25) の合成**

化合物 **24** (2.57 g, 2.23 mmol) を MeCN (40 mL) に溶解させ、K₂CO₃ (1.85 g, 13.4 mmol) と thiophenol (1.36 mL, 13.4 mmol) を加え、室温で 12 時間攪拌した。反応液に EtOAc (250 mL) を加えることによって希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (80

mL × 3) で洗浄し、有機層を飽和食塩水で処理した後、MgSO₄で乾燥させた。溶媒を減圧留去することによって得られた残渣をCH₂Cl₂ (100 mL) で溶解させ、Et₃N (930 μL, 6.69 mmol) とBoc₂O (1.46 g, 6.69 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane/EtOAc 4:1 then 3:1) で精製し、化合物**25** (1.42 g, 65% yield) を黄色アモルファスとして得た。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.14–7.44 (m, 18H, overlapped with solvent peak), 6.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 8H), 3.75–3.76 (m, 12H), 3.25 (s, 2H), 3.08 (s, 2H), 2.87–2.97 (m, 4H), 2.25–2.41 (m, 4H), 1.34–1.52 (m, 20H, overlapped with solvent peak); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 157.99, 157.71, 155.70, 155.41, 155.02, 146.48, 145.28, 138.41, 137.12, 130.61, 129.55, 129.37, 128.32, 127.81, 126.52, 126.07, 113.06, 79.46, 79.25, 69.65, 65.74, 55.15, 55.13, 47.58, 46.98, 46.51, 46.11, 45.54, 45.10, 42.34, 30.68, 30.38, 28.37; HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₅₉H₇₁N₃NaO₈S [M+Na]⁺ 1004.4854, found 1004.4884. 本化合物は新規化合物である。

***N*-(2-Aminoethyl)-*N*'-[[3-*N*'-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-*N*'-[2-(2-pyridinyldithio)ethyl]amino}propyl}carbamic acid 1,1-dimethylethyl ester (26) の合成**

化合物 **25** (1.1 g, 1.12 mmol) と 2,2'-dipyridyl disulfide (2.47 g, 11.2 mmol) を CH₂Cl₂ (17 mL) で溶解させ、そこに TFA (2 mL) と TIPS (1 mL) を氷冷下加えた。反応液を室温、窒素雰囲気下で 3 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH 15:1 then 10:1) で精製し、化合物 **26** (262 mg, 48% yield) をクリアオイルで得た。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.31 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.70–7.75 (m, 2H), 7.13 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.38–3.44 (m, 4H), 3.14 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 3.02 (s, 2H), 2.88 (s, 2H), 1.64–1.67 (m, 2H), 1.27–1.36 (m, 18H, 2 peaks were contained); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 160.88, 156.75, 150.35, 139.08, 122.29, 121.06, 120.80, 81.78, 81.28, 47.69, 46.84, 46.09, 45.76, 45.55, 39.53, 37.39, 28.59 (2 peaks were contained); HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₂₂H₃₉N₄O₄S₂ [M+H]⁺ 487.2407, found 487.2415. 本化合物は新規化合物である。

L-^αN-Palmitoyl-^εN-{3-{2-{3-{2-[(2-chloroacetyl)amino]ethyl}aminopropyl}aminoethyl dithio}propionyl}Lys-L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asp-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂ tetratrifluoroacetate (27) の合成

固相担持ペプチドの構築は、第二章第三節で示したペプチド **8a–8i** の合成と同様の方法で行なった。得られた固相担持ペプチド (0.025 mmol resin scale) を 10% TFA と 5% TIPS を含む CH₂Cl₂ (1.5 mL) で室温、5 分間の振とうを 3 回繰り返した後、CH₂Cl₂ で洗浄した。そこに化合物 **26** (3.0 eq.) の 1% 酢酸を含む MeOH 溶液を加え、室温で終夜振とうした。MeOH, DMF で洗浄した後、2-chloroacetyl chloride (5.0 eq.) と DIPEA (5.0 eq.) の DMF 溶液 (2 mL) を加え、40 °C で 10 分間マイクロウェーブを照射した。*m*-cresole/H₂O/TFA (10:10:180, 2.85 mL) で室温、3 時間処理することで樹脂からペプチドを切り出し、HPLC (Cosmosil 5C18-AR II preparative column, 10 × 250 mm, flow rate 3 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 30 to 60% D over 40 min) で精製することによって、ペプチド **27** (5.7 mg, 7.1% yield from 0.05 mmol scale resine) を 4TFA として白色粉体得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min, r.t. = 16.2 min. O.D. 220 nm. HRMS (ESI) *m/z*. calcd. for C₉₇H₁₇₈ClN₂₈O₂₀S₂ [M+3H]³⁺ 718.0962, found 718.0950. 本化合物は新規化合物である。

S-{2-Oxo-{2-{3-{2-{3-oxo-[6-oxo-(L-Ala-L-Val-L-Ala-L-Asn-L-Arg-L-Ser-L-Lys-L-Lys-L-Ser-L-Arg-L-Ala-L-Leu-L-Phe-NH₂)-5-N-palmitoylamino]hexylamino}propyl dithio}ethylamino}propylamino}ethylamino}ethyl}thioundecahydro-closo-dodecaborate(2-) tetratrifluorate disodium salt (28) の合成

化合物 **27** (3.6 mg, 1.27 μmol) と ¹⁰BSH·2Na (2.7 mg, 12.7 μmol) を DMF (0.25 mL) に溶解させ、50 °C で 2 時間攪拌した。反応液を水 (0.5 mL) で希釈した後、HPLC (Cosmosil 5C18-AR II preparative column, 10 × 250 mm, flow rate 3 mL/min, linear gradient of solvent D into C, 30 to 60% D over 30 min) で精製し、**28** (1.6 mg, 42% yield) を 6TFA

塩として白色粉末で得た。Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min, r.t. = 18.0 min. O.D. 220 nm; HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{97}H_{190}^{10}B_{12}N_{28}O_{20}S_3 [M+2H]^{2+}$ 1163.7527, found 1163.7497.

第三章 第一節に関する実験

細胞培養

T98G 細胞は 10% の FBS, 50 U/mL penicillin, 0.05% streptomycin と kanamycin を含む EMEM を培地として用いた。37 °C, 5% CO₂ 雰囲気下で培養を行なった。

細胞内ホウ素濃度の測定

T98G 細胞 (1×10^6 cells) を 100 mm シャーレに播種し、24 時間後、**9a** 又は **9b** (10 又は 20 μ M, 1% DMSO as a cosolvent) を 10% FBS を含む培地中で 37 °C、各時間処理した。PBS で 3 回洗浄した後、0.05w/v% のトリプシンと 0.53 mM の EDTA 4Na (2.5 mL) で 37 °C、5 分間処理し、培地 (2.5 mL) でクエンチした。遠心分離によって細胞を集めた後、硝酸 (ホウ素検出用(wako)、200 μ L) で室温、1 時間処理して溶解させ、超純水で 5 mL にメスアップした。これをフィルター (Dismic, 13HP045AN, ADVANTEC) で濾過後、ICP-AES でホウ素濃度を測定した。ICP-AES の検量線は JCSS 化学分析用ホウ素標準液 (関東化学) を用いて調整したホウ素溶液を用いて作成した。

統計処理

データは土標準偏差で表示し、Welch の t 検定によって分析した (n=3)。P 値は 0.05 以下から有意差有と判断した。

第三章 第二節に関する実験

細胞培養

第三章 第一節で述べた方法に準ずる。

細胞内ホウ素濃度の測定

ホウ素キャリアの細胞への処理時間を 12 時間にし、それ以外は第三章第一節に準じた方法で行なった。

統計処理

第三章 第一節に準じた方法で行なった。

第四章 第一節に関する実験

血清培地中での **9a** の安定性試験

10% FBS を含む EMEM (50 μ L) に 0.5 μ L の **9a** (stock solution in DMSO, 1 mM; final concentration 10 μ M) を溶解させ、37 $^{\circ}$ C で 2, 6, 12, 24 時間、インキュベートした。各サンプルに MeCN (100 μ L) と HPLC の内部標準物質である *n*-butyl-4-hydroxybenzoate (10 mM, 0.5 μ L) を加え、10 分間氷冷後、遠心操作 (15,000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C) を行ない、フィルター (Dismic, 13HP045AN, ADVANTEC) で濾過することで血清タンパク質を除いた。これを HPLC (50 μ L injection, conditions: linear gradient of solvent D into C, 50% D over 5 min, 50 to 95% D over 5 min, 95% D over 5 min, r.t. = 9.4 min (**9a**), O.D. 220 nm.) で分析し、検量線法によって定量することで **9a** の残存率を求めた。

統計処理

第三章 第一節に準じた方法で行なった。

第四章 第二節に関する実験

細胞培養

T98G 細胞は第三章第一節に準じた方法で培養を行なった。MCF-7 細胞は 10%の FBS, 50 U/mL penicillin, 0.05% streptomycin と kanamycin を含む EMEM を培地として用いた。37 °C, 5% CO₂ 雰囲気下で培養を行なった。MDA-MB-231 細胞は 10%の FBS, 50 U/mL penicillin, 0.05% streptomycin と kanamycin を含む Leibovitz's L-15 Medium を培地として用いた。37 °C, 大気雰囲気下で培養を行なった。

フローサイトメトリー

培養した各細胞を 50 mM EDTA を含む PBS で処理して回収した。各細胞 (5×10^5 cells/tube) を PBS 中 FVD780 (1/2000) で、氷冷下 30 分間処理し、PBS で洗浄した。細胞を Staining buffer (1% BSA, 0.02% NaN₃ in PBS) で洗浄、再懸濁した後、Fc blocker (1/100) で氷冷下 15 分間処理し、PBS 洗浄を行なった。その後、anti-PAR1 抗体 (WEDE15, final concentration 10 µg/mL) 又は mouse IgG (for isotopic control, final concentration 10 µg/mL) で氷冷下 90 分間処理した。PBS 洗浄後、FITC 標識 anti-Mouse IgG (final concentration 5 µg/mL) で氷冷下 30 分間処理し、PBS 洗浄後、BD FACSVerse™ (BD Bioscience) を用いて分析した。

9a と P1pal-13 の競合とりこみ実験

T98G 細胞 (1×10^6 cells) を 100 mm シャーレに播種し、24 時間後、各 10 µM の 9a と P1pal-13 (1% DMSO as a cosolvent) を 10% FBS を含む培地中で 37 °C、12 時間処理

した。その後、第三章第一節に示した方法と同様にホウ素濃度を測定した。

9a と DTT 処理

T98G 細胞 (1×10^6 cells) を 100 mm シャーレに播種し、24 時間後、**9a** (10 μ M, 1% DMSO as a cosolvent) を 10% FBS を含む培地中で 37 °C、12 時間処理した。PBS で 3 回洗浄した後、10 mM DTT を含む PBS で室温、10 分間処理した。

その後、第三章第一節に示した方法と同様にホウ素濃度を測定した。

統計処理

第三章 第一節に準じた方法で行なった。

第四章第三節に関する実験について

中性子非照射時のコロニー形成アッセイ

T98G 細胞 (8×10^4 cells) を 6-well プレーートの各 well に播種し、24 時間インキュベートした。続いて **9a**, **18** 及び BSH (20 μ M, 1% DMSO as a cosolvent) を 24 時間、培地中で細胞に処理し、PBS 洗浄した。トリプシンで処理し、培地でクエンチした後、遠心分離後に上清を除去した。培地で細胞を懸濁させ、テフロンチューブに移した後、1.5 時間室温で静置した。その後、細胞懸濁液は細胞数計数後、正確に希釈して播種した。2 週間培養した後、70%エタノールで固定し、ギムザ染色を行ない、細胞数を計測した。

第四章第四節に関する実験について

中性子照射とコロニー形成アッセイ

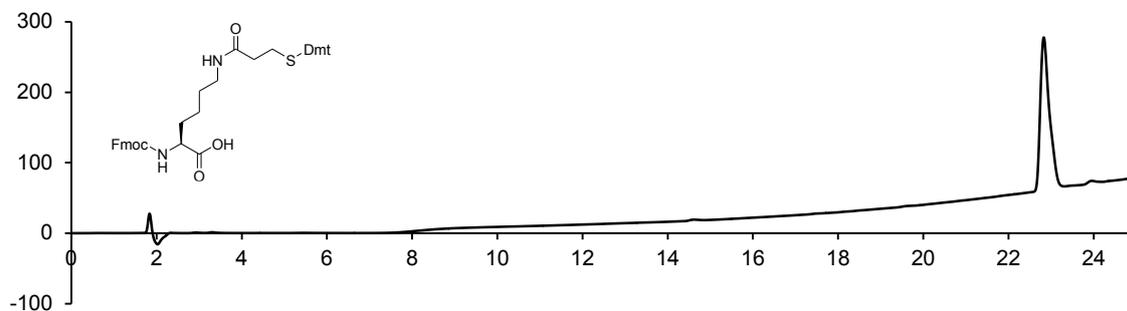
T98G 細胞 (1×10^6 cells) を 100 mm シャーレに播種し、24 時間インキュベートした。

続いて **9a, 18** 及び BSH (20 μ M, 1% DMSO as a cosolvent) を 25 時間、培地中で細胞に処理し、PBS 洗浄した。トリプシンで処理し、培地でクエンチした後、遠心分離後に上清を除去した。培地で細胞を懸濁させ、テフロンチューブに移した後、京都大学原子炉重水施設にて 1 MW の強度で室温で中性子ビームを照射した⁶⁰。チューブの前方及び後方に張り付けた同位体活性化金箔によって中性子フルエンスは測定し、物理線量に変換した⁶¹。二次 γ 線を含む混入した γ 線は、thermoluminescence dosimeter (TLD) 粉末によって測定した。照射したビームに含まれる中性子フラックスの平均は 1.0×10^9 n/cm²s で合計線量及び γ 線量はそれぞれ 0.04 Gy/min と約 0.01 Gy/min であった。照射後、細胞懸濁液は細胞数計数後、正確に希釈して播種した。2 週間培養した後、70% エタノールで固定し、ギムザ染色を行ない、細胞数を計測した。

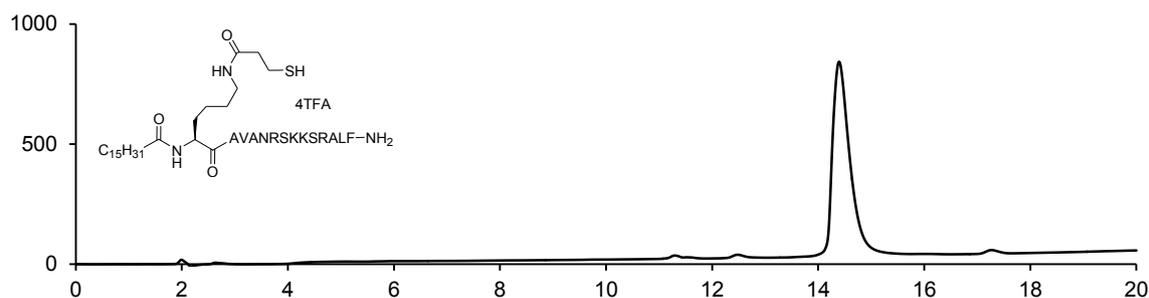
統計処理

Table 3 の非照射時のコロニー形成率のデータは $\pm 95\%$ 信頼区間で示した (n=6)。その他は第三章 第一節に準じた方法で行なった。

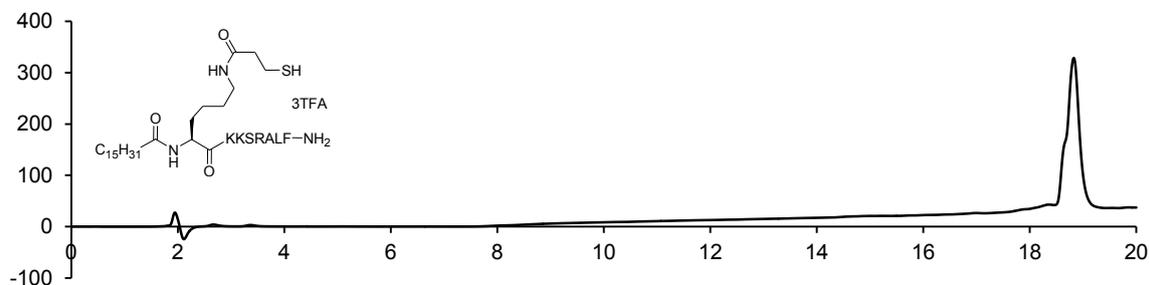
化合物 4, 8-12, 16, 18, 27 及び 28 の HPLC 解析



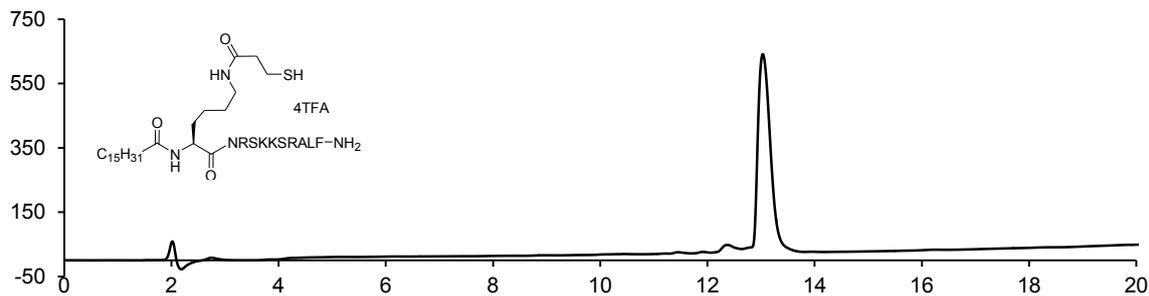
HPLC chart of **4**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 30 to 95% D over 20 min, then 95% over 5 min. r.t. = 22.8 min.



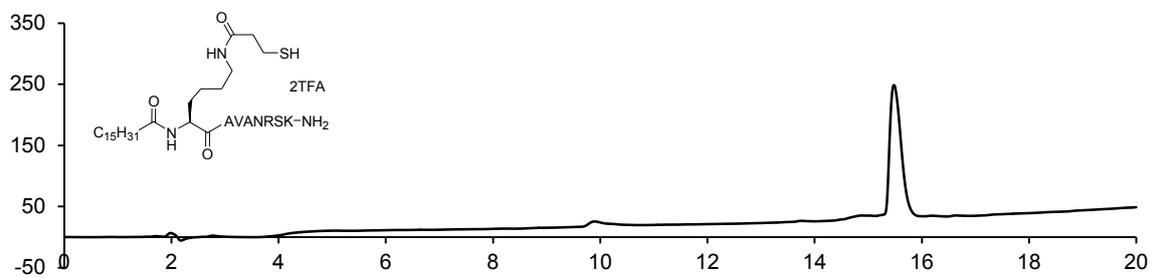
HPLC chart of **8a**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 10 to 80% D over 20 min, r.t. = 14.4 min. O.D. 220 nm.



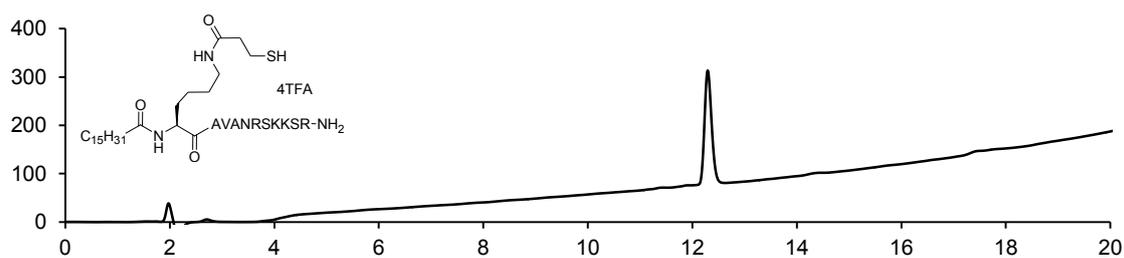
HPLC chart of **8b**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min, r.t. = 18.8 min. O.D. 220 nm



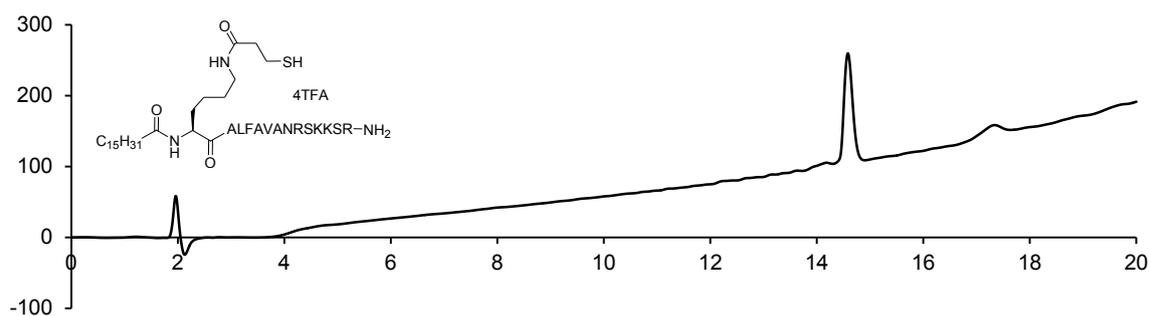
HPLC chart of **8c**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 13.0 min. O.D. 220 nm.



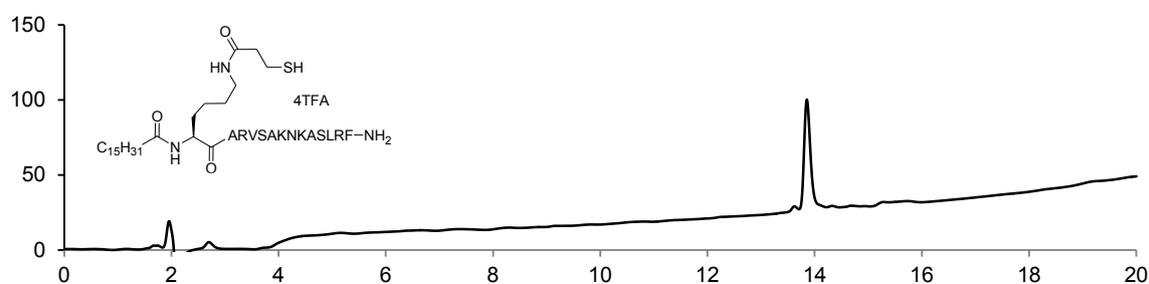
HPLC chart of **8d**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.5 min. O.D. 220 nm.



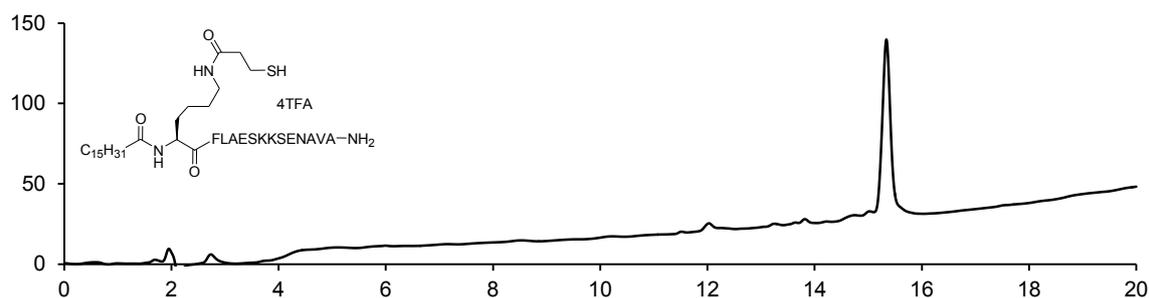
HPLC chart of **8e**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min. r.t. = 12.3 min. O.D. 220 nm.



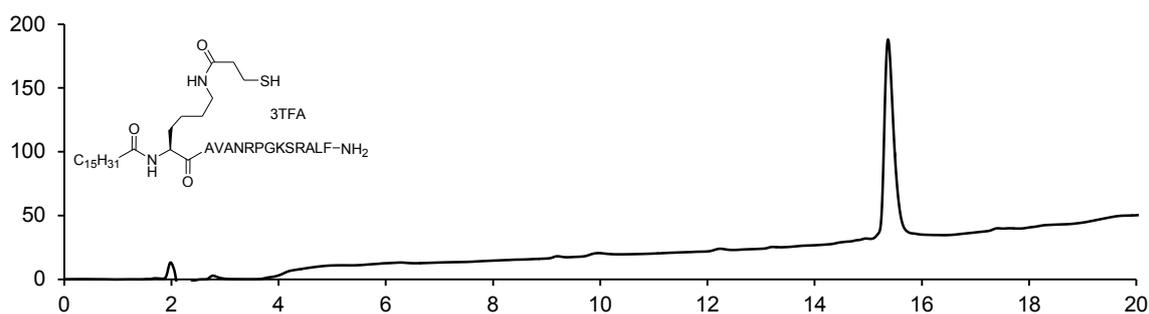
HPLC chart of **8f**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min. r.t. = 14.6 min. O.D. 220 nm.



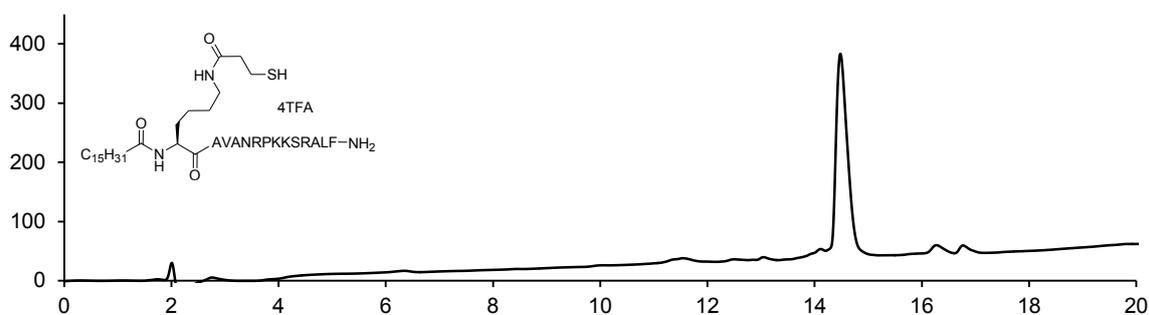
HPLC chart of **8g**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 13.8 min. O.D. 220 nm.



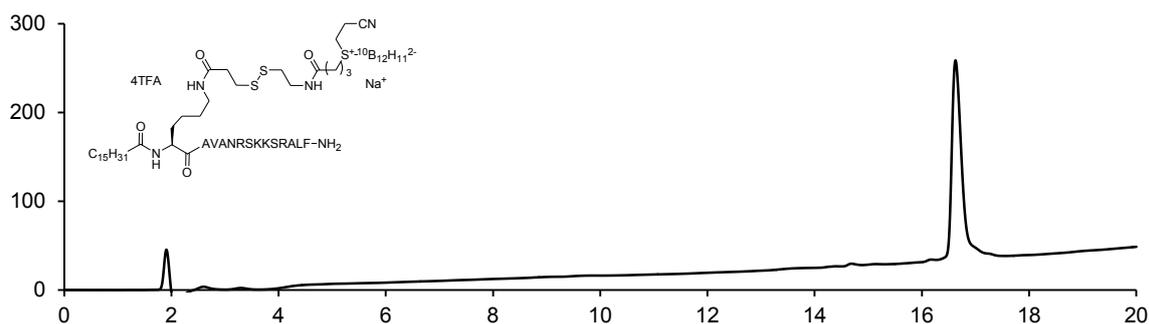
HPLC chart of **8h**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.3 min. O.D. 220 nm.



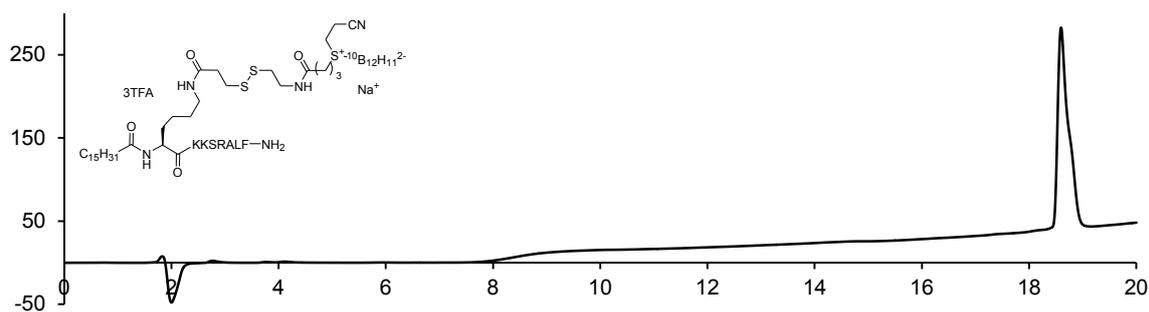
HPLC chart of **8i**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.4 min. O.D. 220 nm.



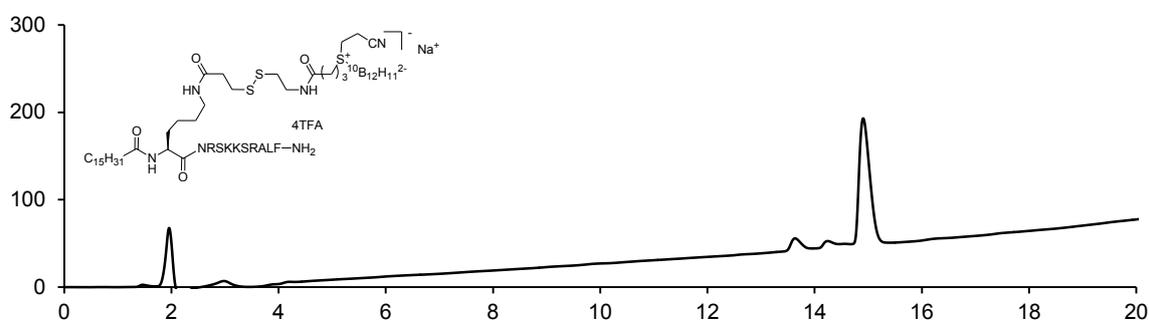
HPLC chart of **8j**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 14.5 min. O.D. 220 nm.



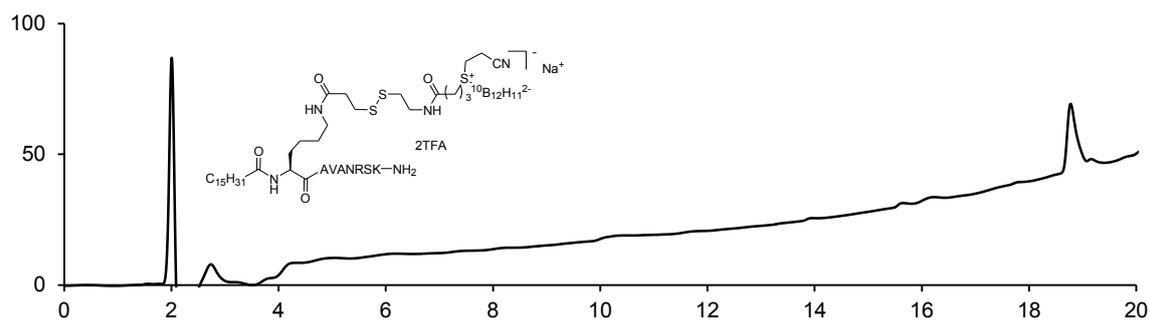
HPLC chart of **9a**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 16.6 min. O.D. 220 nm.



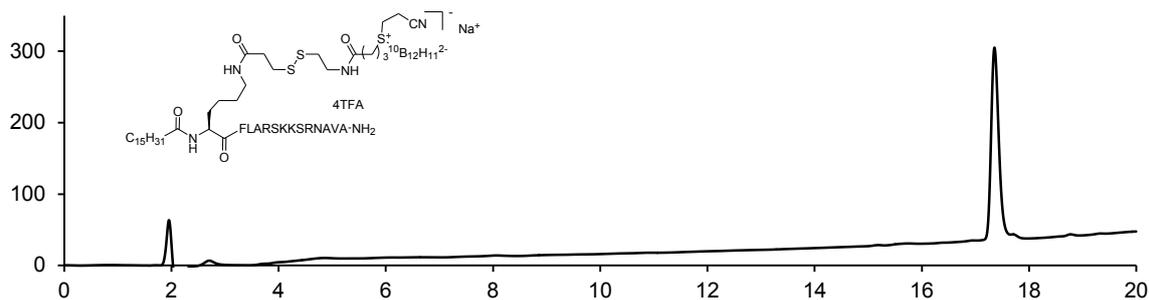
HPLC chart of **9b**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min, r.t. = 18.6 min. O.D. 220 nm.



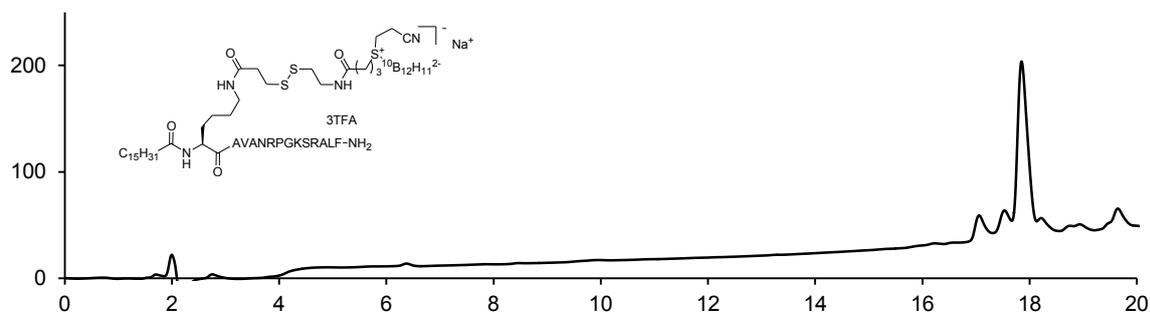
HPLC chart of **9c**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 14.9 min. O.D. 220 nm.



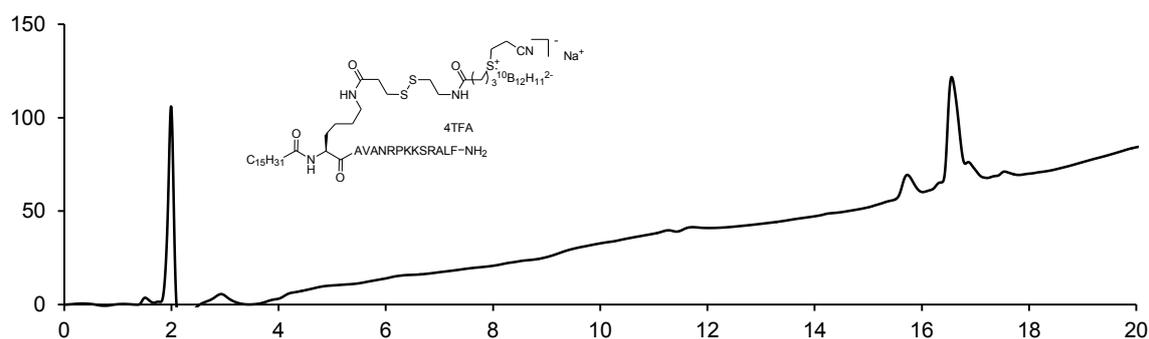
HPLC chart of **9d**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 18.8 min. O.D. 220 nm.



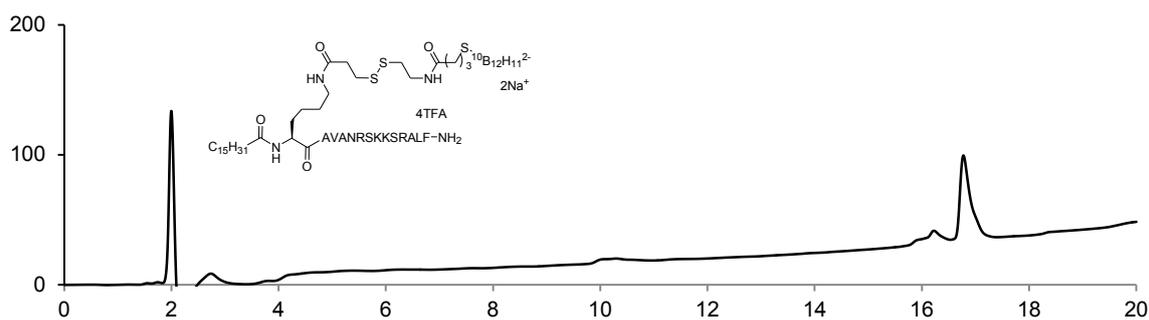
HPLC chart of **9h**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 17.4 min. O.D. 220 nm.



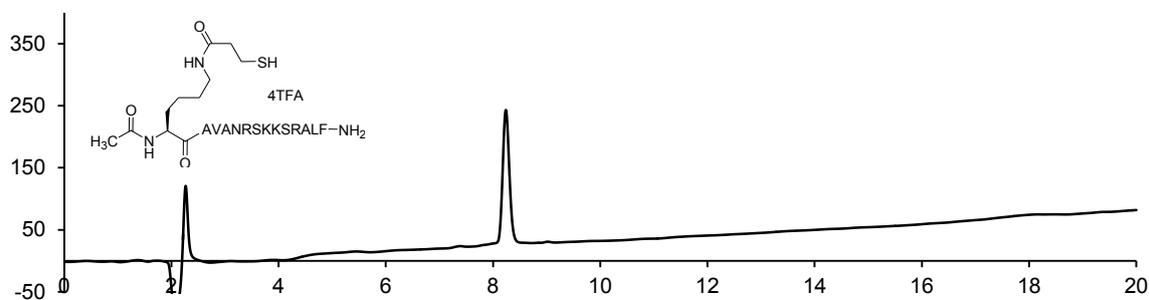
HPLC chart of **9i**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 95% D over 20 min. r.t. = 17.9 min. O.D. 220 nm.



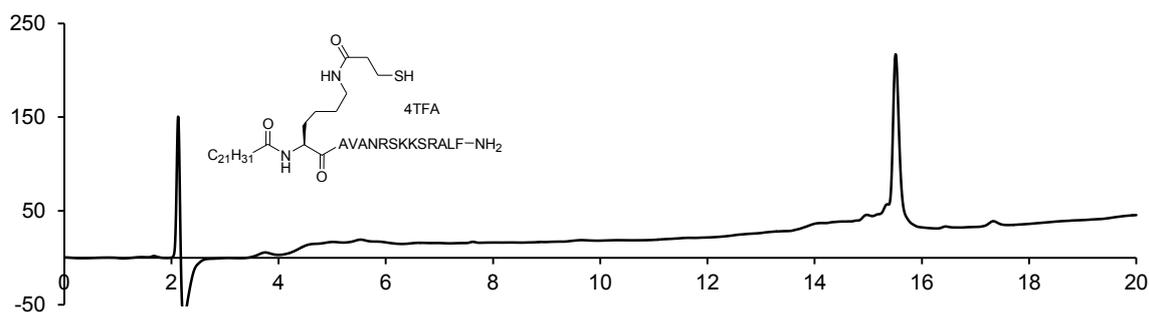
HPLC chart of **9j**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 16.6 min. O.D. 220 nm.



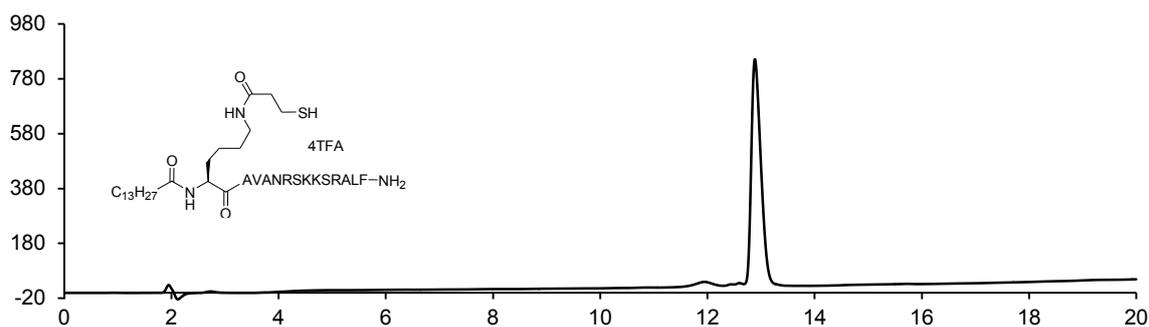
HPLC chart of **10a**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 16.8 min. O.D. 220 nm.



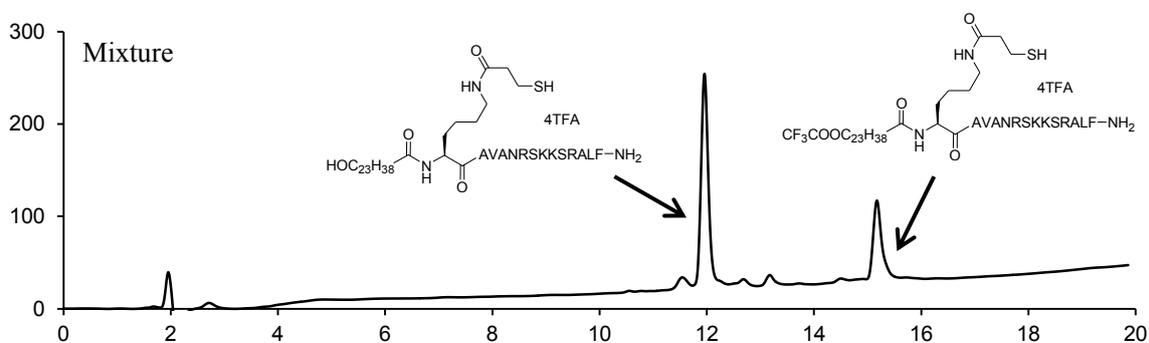
HPLC chart of **11a**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 15 to 60% D over 20 min. r.t. = 8.2 min. O.D. 220 nm.



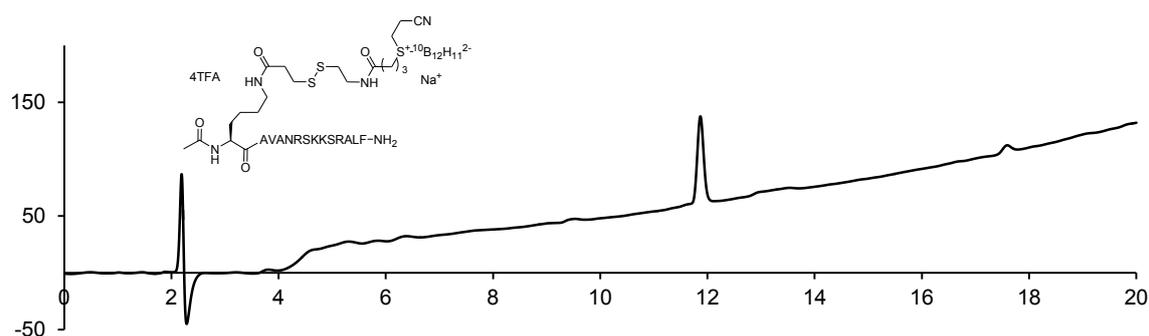
HPLC chart of **11b**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 10 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.6 min. O.D. 220 nm.



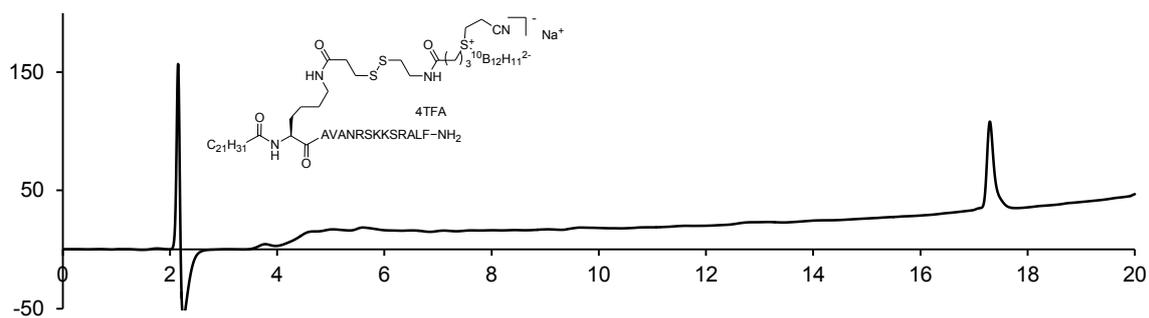
HPLC chart of **11c**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 12.9 min. O.D. 220 nm.



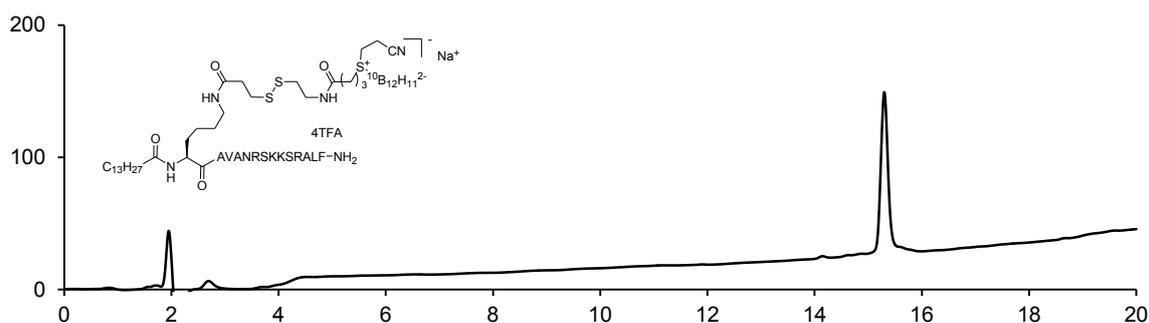
HPLC chart of **11d and 11e**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 11.9 min (**11d**), 15.1 min (**11e**). O.D. 220 nm.



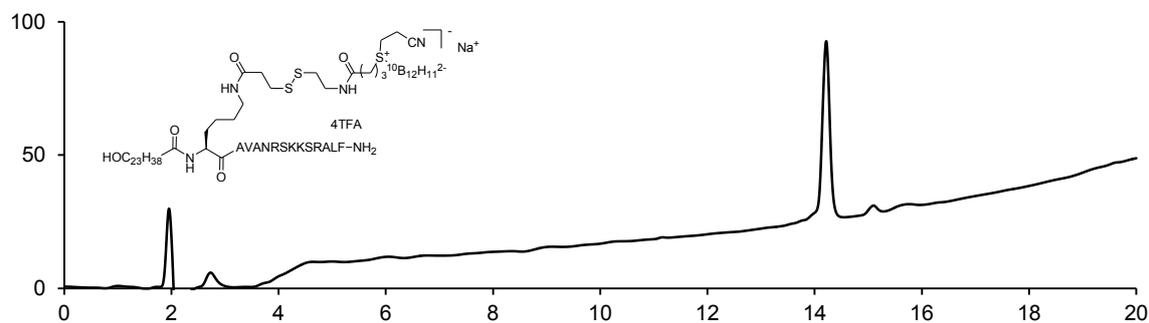
HPLC chart of **12a**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 15 to 60% D over 20 min. r.t. = 13.4 min. O.D. 220 nm.



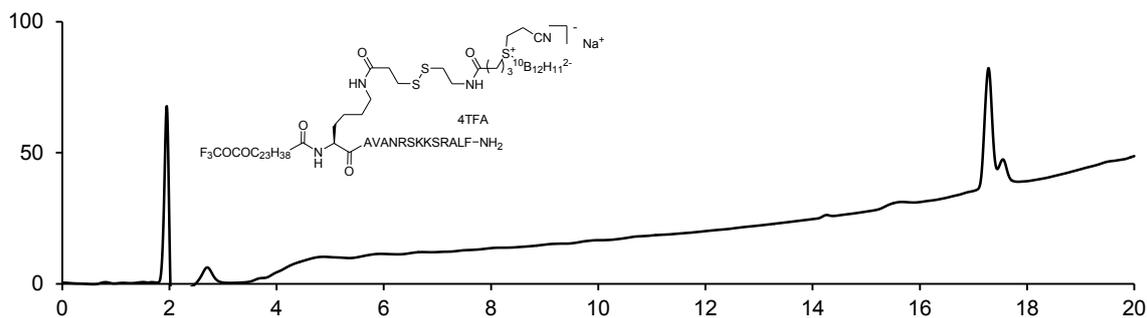
HPLC chart of **12b**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 10 to 80% D over 20 min. r.t. = 17.3 min. O.D. 220 nm.



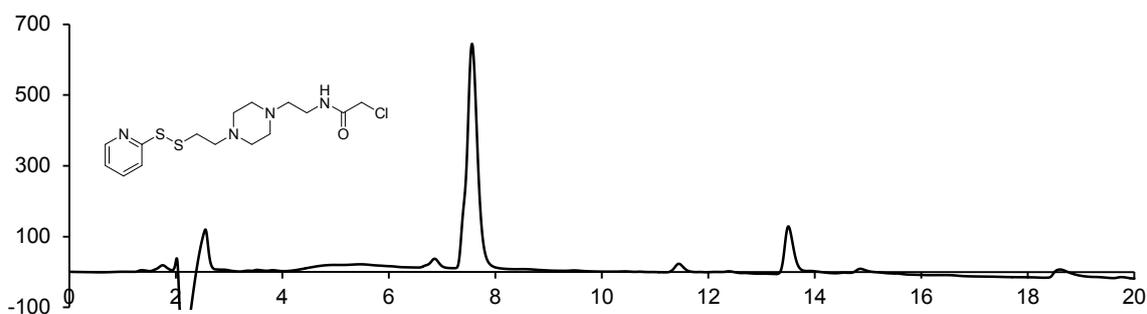
HPLC chart of **12c**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 15.3 min. O.D. 220 nm.



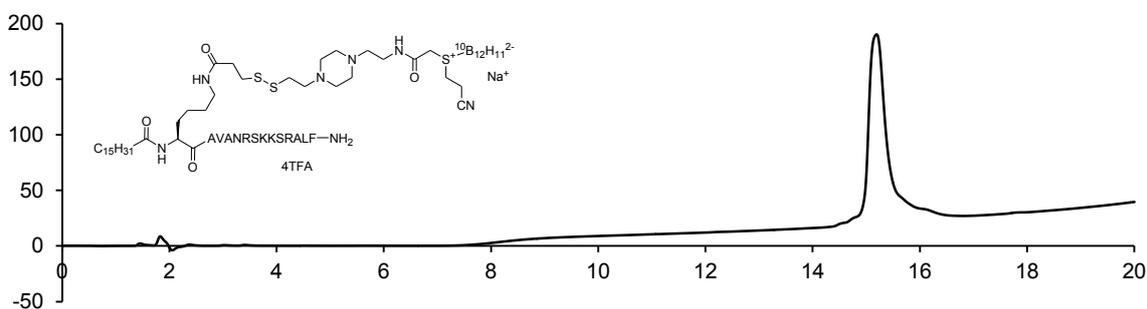
HPLC chart of **12d**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 14.2 min. O.D. 220 nm.



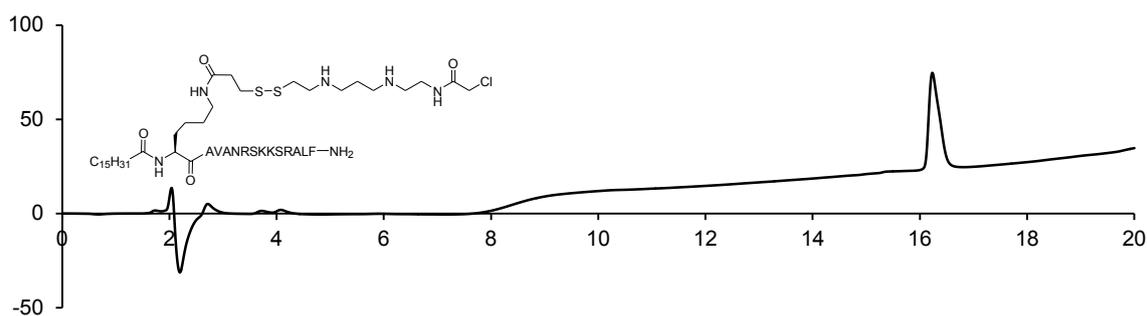
HPLC chart of **12e**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min. r.t. = 17.3 min. O.D. 220 nm.



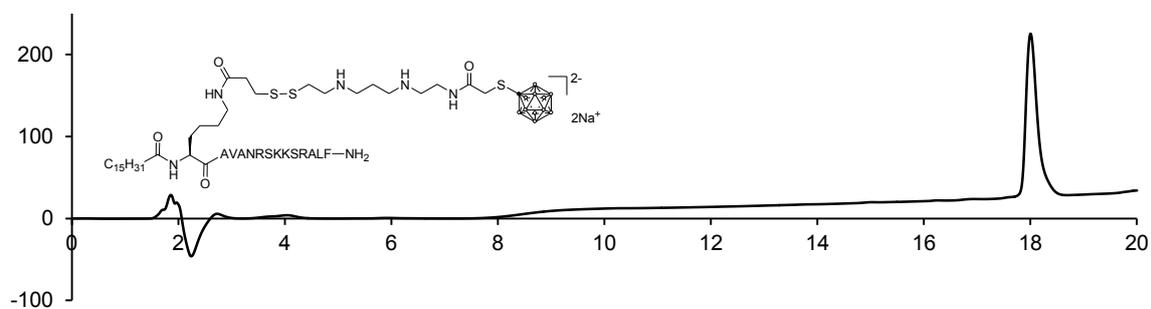
HPLC chart of **16**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent B into A, 5 to 55% D over 20 min. r.t. = 7.5 min. O.D. 195 nm.



HPLC chart of **18**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 30 to 95% D over 20 min. r.t. = 15.2 min. O.D. 220 nm.



HPLC chart of **27**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min, r.t. = 16.2 min. O.D. 220 nm.



HPLC chart of **28**. Analytical HPLC conditions: linear gradient of solvent D into C, 20 to 80% D over 20 min, r.t. = 18.0 min. O.D. 220 nm.

参考文献

- (1) Allemani, C.; Matsuda, T.; Di Carlo, V.; Harewood, R.; Matz, M.; Nikšić, M.; Bonaventure, A.; Valkov, M.; Johnson, C. J.; Estève, J.; et al. Global Surveillance of Trends in Cancer Survival 2000–14 (CONCORD-3): Analysis of Individual Records for 37 513 025 Patients Diagnosed with One of 18 Cancers from 322 Population-Based Registries in 71 Countries. *Lancet* **2018**, *391* (10125), 1023–1075.
- (2) Kageji, T.; Nagahiro, S.; Mizobuchi, Y.; Matsuzaki, K.; Nakagawa, Y.; Kumada, H. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Newly-Diagnosed Glioblastoma: Comparison of Clinical Results Obtained with BNCT and Conventional Treatment. *J. Med. Investig.* **2014**, *61* (3.4), 254–263.
- (3) Barth, R. F. Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11* (11), 3987–4002.
- (4) Barth, R. F.; Vicente, M. G. H.; Harling, O. K.; Iii, W. S. K.; Riley, K. J.; Binns, P. J.; Wagner, F. M. Current Status of Boron Neutron Capture Therapy of High Grade Gliomas and Recurrent Head and Neck Cancer. *Radiat. Oncol.* **2012**, *7* (1), 1.
- (5) Suzuki, M.; Tanaka, H.; Sakurai, Y.; Kashino, G.; Yong, L.; Masunaga, S.; Kinashi, Y.; Mitsumoto, T.; Yajima, S.; Tsutsui, H.; et al. Impact of Accelerator-Based Boron Neutron Capture Therapy (AB-BNCT) on the Treatment of Multiple Liver Tumors and Malignant Pleural Mesothelioma. *Radiother. Oncol.* **2009**, *92* (1), 89–95.
- (6) Morita, N.; Hiratsuka, J.; Kondoh, H.; Uno, M.; Asano, T.; Niki, Y.; Sakurai, Y.; Ono, K.; Harada, T.; Imajo, Y. Improvement of the Tumor-Suppressive Effect of Boron Neutron Capture Therapy for Amelanotic Melanoma by Intratumoral Injection of the Tyrosinase Gene. *Cancer Res.* **2006**, *66* (7), 3747–3753.
- (7) Takagaki, M.; Sakai, R.; Tanaka, T.; Ohsawa, N.; Akagi, H.; Ono, K. Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors. *KURRI Prog. Rep.* **2004**, 140.

- (8) Aihara, T.; Morita, N.; Kamitani, N.; Kumada, H.; Ono, K.; Hiratsuka, J.; Harada, T. BNCT for Advanced or Recurrent Head and Neck Cancer. In *Neutron Capture Therapy*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; Vol. 9783642313, pp 417–424.
- (9) Kato, I.; Ono, K.; Sakurai, Y.; Ohmae, M.; Maruhashi, A.; Imahori, Y.; Kirihata, M.; Nakazawa, M.; Yura, Y. Effectiveness of BNCT for Recurrent Head and Neck Malignancies. *Appl. Radiat. Isot.* **2004**, *61* (5), 1069–1073.
- (10) Suzuki, M.; Kato, I.; Aihara, T.; Hiratsuka, J.; Yoshimura, K.; Niimi, M.; Kimura, Y.; Ariyoshi, Y.; Haginomori, S. I.; Sakurai, Y.; et al. Boron Neutron Capture Therapy Outcomes for Advanced or Recurrent Head and Neck Cancer. *J. Radiat. Res.* **2014**, *55* (1), 146–153.
- (11) Wongthai, P.; Hagiwara, K.; Miyoshi, Y.; Wiriyasermkul, P.; Wei, L.; Ohgaki, R.; Kato, I.; Hamase, K.; Nagamori, S.; Kanai, Y. Boronophenylalanine, a Boron Delivery Agent for Boron Neutron Capture Therapy, Is Transported by ATB0+, LAT1 and LAT2. *Cancer Sci.* **2015**, *106* (3), 279–286.
- (12) Yokoyama, K.; Miyatake, S. I.; Kajimoto, Y.; Kawabata, S.; Doi, A.; Yoshida, T.; Asano, T.; Kirihata, M.; Ono, K.; Kuroiwa, T. Pharmacokinetic Study of BSH and BPA in Simultaneous Use for BNCT. *J. Neurooncol.* **2006**, *78* (3), 227–232.
- (13) Issa, F.; Kassiou, M.; Rendina, L. M. Boron in Drug Discovery: Carboranes as Unique Pharmacophores in Biologically Active Compounds. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5701–5722.
- (14) Dash, B. P.; Satapathy, R.; Maguire, J. A.; Hosmane, N. S. Polyhedral Boron Clusters in Materials Science. *New J. Chem.* **2011**, *35* (10), 1955–1972.
- (15) 中村浩之. ホウ素化合物・薬剤の歴史と現状. *Radioisotopes* **2015**, *64*, 47–58.
- (16) Chandra, S.; Barth, R. F.; Haider, S. A.; Yang, W.; Huo, T.; Shaikh, A. L.; Kabalka, G. W. Biodistribution and Subcellular Localization of an Unnatural Boron-Containing Amino Acid (Cis-ABCPC) by Imaging Secondary Ion Mass Spectrometry for Neutron Capture Therapy of Melanomas and Gliomas. *PLoS One* **2013**, *8* (9).
- (17) Hill, J. S.; Kahl, S. B.; Kaye, a H.; Stylli, S. S.; Koo, M. S.; Gonzales, M. F.; Vardaxis, N. J.; Johnson,

- C. I. Selective Tumor Uptake of a Boronated Porphyrin in an Animal Model of Cerebral Glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1992**, *89* (5), 1785–1789.
- (18) Tjarks, W.; Tiwari, R.; Byun, Y.; Narayanasamy, S.; Barth, R. F. Carboranyl Thymidine Analogues for Neutron Capture Therapy. *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, No. 47, 4978–4991.
- (19) Barth, R. F.; Yang, W.; Wu, G.; Swindall, M.; Byun, Y.; Narayanasamy, S.; Tjarks, W.; Tordoff, K.; Moeschberger, M. L.; Eriksson, S.; et al. Thymidine Kinase 1 as a Molecular Target for Boron Neutron Capture Therapy of Brain Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105* (45), 17493–17497.
- (20) Nakamura, H. Development of High Boron Content Liposomes and Their Promising Antitumor Effect for Neutron Capture Therapy. *YAKUGAKU ZASSHI* **2013**, *133* (12), 1297–1306.
- (21) Nakamura, H.; Ueda, N.; Ban, H. S.; Ueno, M.; Tachikawa, S. Design and Synthesis of Fluorescence-Labeled Closo-Dodecaborate Lipid: Its Liposome Formation and in Vivo Imaging Targeting of Tumors for Boronneutron Capture Therapy. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (7), 1374–1380.
- (22) Tietze, L. F.; Griesbach, U.; Schuberth, I.; Bothe, U.; Marra, A.; Dondoni, A. Novel Carboranyl C-Glycosides for the Treatment of Cancer by Boron Neutron Capture Therapy. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9* (6), 1296–1302.
- (23) Imperio, D.; Del Grosso, E.; Fallarini, S.; Lombardi, G.; Panza, L. Synthesis of Sugar–Boronic Acid Derivatives: A Class of Potential Agents for Boron Neutron Capture Therapy. *Org. Lett.* **2017**, *19* (7), 1678–1681.
- (24) Iguchi, Y.; Michiue, H.; Kitamatsu, M.; Hayashi, Y.; Takenaka, F.; Nishiki, T.; Matsui, H. Tumor-Specific Delivery of BSH-3R for Boron Neutron Capture Therapy and Positron Emission Tomography Imaging in a Mouse Brain Tumor Model. *Biomaterials* **2015**, *56*, 10–17.
- (25) Kimura, S.; Masunaga, S. I.; Harada, T.; Kawamura, Y.; Ueda, S.; Okuda, K.; Nagasawa, H. Synthesis and Evaluation of Cyclic RGD-Boron Cluster Conjugates to Develop Tumor-Selective Boron Carriers for Boron Neutron Capture Therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (5), 1721–1728.
- (26) Yang, W.; Wu, G.; Barth, R. F.; Swindall, M. R.; Bandyopadhyaya, A. K.; Tjarks, W.; Tordoff, K.;

- Moeschberger, M.; Sferra, T. J.; Binns, P. J.; et al. Molecular Targeting and Treatment of Composite EGFR and EGFRvIII-Positive Gliomas Using Boronated Monoclonal Antibodies. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (3), 883–891.
- (27) Kikuchi, S.; Kanoh, D.; Sato, S.; Sakurai, Y.; Suzuki, M.; Nakamura, H. Maleimide-Functionalized Closo-Dodecaborate Albumin Conjugates (MID-AC): Unique Ligation at Cysteine and Lysine Residues Enables Efficient Boron Delivery to Tumor for Neutron Capture Therapy. *J. Control. Release* **2016**, *237*, 160–167.
- (28) Covic, L.; Gresser, A. L.; Talavera, J.; Swift, S.; Kuliopulos, A. Activation and Inhibition of G Protein-Coupled Receptors by Cell-Penetrating Membrane-Tethered Peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (2), 643–648.
- (29) Gurbel, P. A.; Bliden, K. P.; Turner, S. E.; Tantry, U. S.; Gesheff, M. G.; Barr, T. P.; Covic, L.; Kuliopulos, A. Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36* (1), 189–197.
- (30) Dimond, P.; Carlson, K.; Bouvier, M.; Gerard, C.; Xu, L.; Covic, L.; Agarwal, A.; Ernst, O. P.; Janz, J. M.; Schwartz, T. W.; et al. G Protein-Coupled Receptor Modulation with Pepducins: Moving Closer to the Clinic. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1226* (1), 34–49.
- (31) Tsuji, M.; Ueda, S.; Hirayama, T.; Okuda, K.; Sakaguchi, Y.; Isono, A.; Nagasawa, H. FRET-Based Imaging of Transbilayer Movement of Pepducin in Living Cells by Novel Intracellular Bioreductively Activatable Fluorescent Probes. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (18), 3030–3037.
- (32) Stewart, K. M.; Horton, K. L.; Kelley, S. O. Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vehicles for Biology and Medicine. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (13), 2242–2255.
- (33) Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. Endosomal Escape Pathways for Delivery of Biologicals. *J. Control. Release* **2011**, *151* (3), 220–228.
- (34) Martens, T. F.; Remaut, K.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Braeckmans, K. Intracellular Delivery of Nanomaterials: How to Catch Endosomal Escape in the Act. *Nano Today* **2014**, *9* (3), 344–364.

- (35) Yang, E.; Boire, A.; Agarwal, A.; Nguyen, N.; O'Callaghan, K.; Tu, P.; Kuliopulos, A.; Covic, L. Blockade of PAR1 Signaling with Cell-Penetrating Pepducins Inhibits Akt Survival Pathways in Breast Cancer Cells and Suppresses Tumor Survival and Metastasis. *Cancer Res.* **2009**, *69* (15), 6223–6231.
- (36) Keränen, A. Opportunistic Network Environment Simulator. *Spec. Assign. report, Helsinki Univ. ...* **2008**, *17* (8), 49.
- (37) Dean P Jones; L Carlson, J.; C Mody Jr, V.; Lynn, J.; Jr, P. S.; Cai, J.; Michael. Redox State of Glutathione in Human Plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28* (4), 625–635.
- (38) Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K.-D. Drug Delivery Strategy Utilizing Conjugation via Reversible Disulfide Linkages: Role and Site of Cellular Reducing Activities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55* (2), 199–215.
- (39) West, K.; Otto, S. Reversible Covalent Chemistry in Drug Delivery. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2005**, *2* (3), 123–160.
- (40) Jiménez, J. C.; López-Macià, A.; Gracia, C.; Varón, S.; Carrascal, M.; Caba, J. M.; Royo, M.; Francesch, A. M.; Cuevas, C.; Giralt, E.; et al. Structure-Activity Relationship of Kahalalide F Synthetic Analogues. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (16), 4920–4931.
- (41) Hidai, Y.; Kan, T.; Fukuyama, T. Total Synthesis of Polyamine Toxin HO-416b Utilizing the 2-Nitrobenzenesulfonamide Protecting Group. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (25), 4711–4714.
- (42) Kan, T.; Fukuyama, T. New Strategies: A Highly Versatile Synthetic Method for Amines. *Chem. Commun.* **2004**, *4* (4), 353.
- (43) Góngora-Benítez, M.; Mendive-Tapia, L.; Ramos-Tomillero, I.; Breman, A. C.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. Acid-Labile Cys-Protecting Groups for the Fmoc/TBu Strategy: Filling the Gap. *Org. Lett.* **2012**, *14* (21), 5472–5475.
- (44) Pujals, S.; Giralt, E. Proline-Rich, Amphipathic Cell-Penetrating Peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (4–5), 473–484.
- (45) Brahmachari, S. K.; Ananthanarayanan, V. S. Beta-Turns in Nascent Procollagen Are Sites of

- Posttranslational Enzymatic Hydroxylation of Proline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1979**, *76* (10), 5119–5123.
- (46) Ward, B. P.; Ottaway, N. L.; Perez-Tilve, D.; Ma, D.; Gelfanov, V. M.; Tschöp, M. H.; DiMarchi, R. D. Peptide Lipidation Stabilizes Structure to Enhance Biological Function. *Mol. Metab.* **2013**, *2* (4), 468–479.
- (47) Han, J.; Huang, Y.; Chen, X.; Zhou, F.; Fei, Y.; Fu, J. Lipidation and Conformational Constraining for Prolonging the Effects of Peptides: Xenopus Glucagon-like Peptide 1 Analogues with Potent and Long-Acting Hypoglycemic Activity. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *123* (July), 111–123.
- (48) Ni, J.; Qu, L.; Yang, H.; Wang, M.; Huang, Y. Palmitoylation and Its Effect on the GTPase-Activating Activity and Conformation of RGS2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38* (12), 2209–2218.
- (49) de Almeida, V. H.; Monteiro, R. Q. Protease-Activated Receptor 1 (PAR1): A Promising Target for the Treatment of Glioblastoma? *Transl. Cancer Res.* **2016**, *5* (S6), S1274–S1280.
- (50) Smith, T. H.; Li, J. G.; Dores, M. R.; Trejo, J. A. Protease-Activated Receptor-4 and Purinergic Receptor P2Y₁₂ Dimerize, Co-Internalize, and Activate Akt Signaling via Endosomal Recruitment of β -Arrestin. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (33), 13867–13878.
- (51) Boire, A.; Covic, L.; Agarwal, A.; Jacques, S.; Sherifi, S.; Kuliopulos, A. PAR1 Is a Matrix Metalloprotease-1 Receptor That Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cell* **2005**, *120* (3), 303–313.
- (52) Niedzwiecki. Patterns of MMP-2 and MMP-9 Expression in Human Cancer Cell Lines. *Oncol. Rep.* **2009**, *21* (5), 143–151.
- (53) Choi, K. Y.; Swierczewska, M.; Lee, S.; Chen, X. Protease-Activated Drug Development. *Theranostics* **2012**, *2* (2), 156–179.
- (54) Demeule, M.; Regina, A.; Che, C.; Poirier, J.; Nguyen, T.; Gabathuler, R.; Castaigne, J.-P.; Beliveau, R. Identification and Design of Peptides as a New Drug Delivery System for the Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *324* (3), 1064–1072.

- (55) Galibert, M.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Boturyn, D. Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (8), 1901–1904.
- (56) Gabel, D.; Moller, D.; Harfst, S.; Rösler, J.; Ketz, H. Synthesis of S-Alkyl and S-Acyl Derivatives of Mercaptoundecahydrododecaborate, a Possible Boron Carrier for Neutron Capture Therapy. *Inorg. Chem.* **1993**, *32* (11), 2276–2278.
- (57) Gnaccarini, C.; Peter, S.; Scheffer, U.; Vonhoff, S.; Klusmann, S.; Göbel, M. W. Site-Specific Cleavage of RNA by a Metal-Free Artificial Nuclease Attached to Antisense Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (24), 8063–8067.
- (58) Horikawa, R.; Sunayama, H.; Kitayama, Y.; Takano, E.; Takeuchi, T. A Programmable Signaling Molecular Recognition Nanocavity Prepared by Molecular Imprinting and Post-Imprinting Modifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (42), 13023–13027.
- (59) Liu, N.; Hoogendoorn, S.; Van De Kar, B.; Kaptein, A.; Barf, T.; Driessen, C.; Filippov, D. V.; Van Der Marel, G. A.; Van Der Stelt, M.; Overkleeft, H. S. Direct and Two-Step Bioorthogonal Probes for Bruton's Tyrosine Kinase Based on Ibrutinib: A Comparative Study. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (18), 5147–5157.
- (60) Sakurai, Y.; Kobayashi, T. Characteristics of the KUR Heavy Water Neutron Irradiation Facility as a Neutron Irradiation Field with Variable Energy Spectra. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **2000**, *453* (3), 569–596.
- (61) Masunaga, S. Impact of the P53 Status of the Tumor Cells on the Effect of Reactor Neutron Beam Irradiation. *KURRI Prog. Rep.* **2002**, No. December, 144.

主論文目録

本学位論文の内容は、以下の発表論文による。

- [1] Aoi Isono, Mieko Tsuji, Yu Sanada, Akari Matsushita, Shinichiro Masunaga, Tasuku Hirayama and Hideko Nagasawa, *ChemMedChem*, **2019**, *in press* (DOI: 10.1002/cmdc.201800793)