

博士論文

7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin 誘導体のナノ粒子の作製と  
抗腫瘍活性評価に関する研究

小関 良卓

平成 27 年

# 目次

## 略語表

### 第1章 序論

1-1 諸言	2
1-2 ターゲティング	3
1-3 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38)	6
1-4 SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子	7
1-5 本研究の目的	10

### 第2章 SN-38 プロドラッグの合成に基づいた高い加水分解耐性を有する薬剤ナノ粒子の探索

2-1 諸言	15
2-2 SN-38 二量体薬剤ナノ粒子の表面修飾	16
2-3 薬剤ナノ粒子の加水分解性を決定する要因の考察	21
2-4 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子	22
2-5 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の血清中加水分解性	46
2-6 胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子	50
2-7 様々な置換基を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子	60
2-8 考察	70
2-9 まとめ	75

### 第3章 SN-38 脂肪酸プロドラッグ薬剤ナノ粒子の薬効評価

3-1 諸言	79
3-2 がん細胞増殖抑制活性	80
3-3 がん細胞への取り込み効率およびブタ肝臓エステラーゼによる加水分解性	84
3-4 SN-38-C <sub>18</sub> 誘導体の合成と薬剤ナノ粒子の薬効評価	87
3-5 高濃度分散液の調製	90
3-6 まとめ	92

第4章	SN-38 コレステロール誘導体薬剤ナノ粒子の薬効評価	
4-1	諸言	95
4-2	高濃度分散液の作製	96
4-3	がん細胞増殖抑制活性	97
4-4	マウス中における血中滞留性	98
4-5	<i>in vivo</i> 抗腫瘍活性	99
4-6	SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の副作用の評価	100
4-7	まとめ	103
第5章	総括	
	総括	106
	謝辞	108
	実験の部	110

## 略語表

Ac	acetyl
ATR	attenuated total reflection
chol	cholesterol
COSY	correlation spectroscopy
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DEPT	distorsionless ehancement by polarization transfer
DDS	drug delivery system
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DLS	dynamic light scattering
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EPR	enhanced permeation and retention
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
FBS	fetal bovine serum
HBSS	Hank's balanced salt solution
HMBC	<sup>1</sup> H-detected multi-bond heteronuclear multiple quantum coherence
HMQC	<sup>1</sup> H-detected multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry
IR	infrared
Me	methyl
MOM	methoxymethyl
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	phosphate buffered saline
PMS	1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate
rt	room temperature
SEM	scanning electron microscope



SN-38	7-ethyl-10-hydroxycamptothecin
TLC	Thin layer chromatography
THF	tetrahydrofuran
THP	2-tetrahydropyranyl
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
XRD	X-ray diffraction

# 第 1 章

## 序論

## 1-1 諸言

2014 年の統計では、日本人の死因の 1 位は悪性新生物つまり「がん」である<sup>[1]</sup>。その割合は約 30%に上り、がんの治療法の確立は社会的に強く望まれている。がんの発生原因としては、発がん性物質などによる化学的要因、放射線や紫外線の照射による物理的要因、B 型肝炎ウイルスやピロリ菌などによる感染が提唱されおり、これらの要因が単一または複合的に作用してがんが発生する<sup>[2]</sup>。いずれの要因の場合でも、遺伝子の損傷ががん発生に密接に関わる。通常、損傷を受けた遺伝子は生体中の修復機能によって修復されるが、一定の確率で不完全な修復を受けた遺伝子を含む異常細胞（がん細胞）が生じる。たとえがん細胞が体内に生じたとしても、その大部分は免疫系が機能することで排除される。このような生体に備わっている様々な防御機能を免れて、がん細胞が増殖し蓄積することにより、がんが発症する。

がん治療法は、手術による切除を行う外科療法、放射線の照射による放射線療法、抗がん剤の投与による化学療法の 3 つに大別される。外科療法は局所的ながんに対して有効な治療法であるが、患者・医者ともに負担が大きく、また、膵臓がんのように手術が困難な症例も見られる<sup>[3]</sup>。外科療法と比較すると、放射線療法や化学療法は非侵襲的な治療法であり、臓器を切除せずにがんの治療が可能である。しかし、一般的に放射線療法や化学療法ではがん細胞と同時に正常な細胞にも作用するため、細胞分裂が活発な臓器を中心に副作用の発現が問題となる。放射線療法は外科療法と同様に局所的ながんの治療に限定されるのに対して、抗がん剤を用いた化学療法は全身のがんの治療に応用可能である。加えて、化学療法は特別な技能や設備を必要としないため、一般の医療現場で対応が可能である。したがって、副作用が低減化された抗がん剤を開発することは、がん治療において非常に有意義であると。

抗がん剤による副作用の低減を目的として、薬物をがん病巣に選択的に送達させる研究が行われている<sup>[4-7]</sup>。主な戦略としては、ナノキャリアと呼ばれる担体に薬物を内包させたナノ薬剤の使用が提唱されている。しかしながら、ナノキャリアの使用は、後述するように解決すべき問題点が残されている。

本博士論文では、有機化学（プロドラッグの合成）および材料化学（再沈法によるナノ粒子の作製）の手法を駆使して、ナノキャリアを使用せずに単一化合物から構成されるナノ薬剤「薬剤ナノ粒子」を作製し、その薬理効果を評価した。その詳細を以下に記述する。

## 1-2 ターゲティング

薬物投与は一般的に分子状態での投与が行われる（図1-1）。薬物の溶液を注射投与する場合はもちろん、固形化した錠剤を経口投与する場合も、錠剤が胃や腸で溶解した後に分子状態で吸収され、全身へ拡散する<sup>[8]</sup>。このような分子状態での投与の場合、薬物の全身拡散のため、投与した薬物のごく一部しか患部へ到達しないことが知られている。したがって、患部に治療に必要な量の薬物を送達するためには投与量を増やさなければならず、副作用発現の一因となる。これに対して、標的指向化した薬物、すなわち、薬物を患部へ集積しやすくする工夫を施した場合は、患部への効率的な薬物送達が可能となる。これをターゲティング<sup>[9]</sup>といい、ターゲティングが可能となれば、分子状態での投与の場合と比較して薬物の投与量を減少させることができ、その結果として患部以外の部位における副作用の軽減につながる。このようなターゲティングの手法は、抗がん剤のように副作用の強い薬物に対する適用が特に有効である。

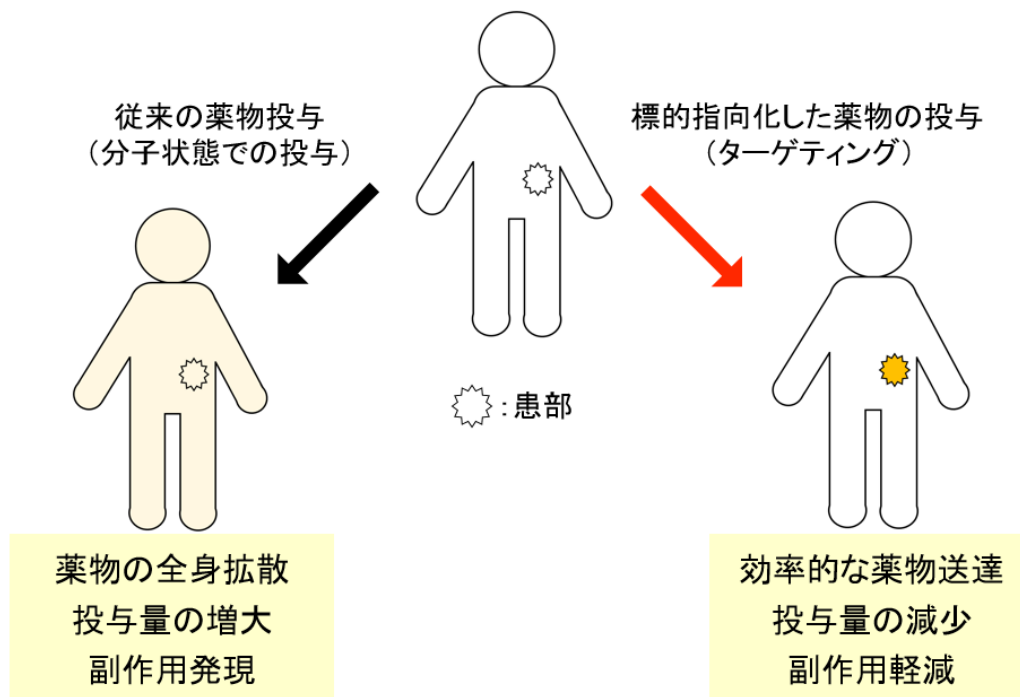


図1-1 ターゲティングの概念図

抗がん剤による治療では、投与する抗がん剤の粒径を制御することでターゲティングが可能となる<sup>[10]</sup>。図1-2に、血液循環系に薬物を投与した際の粒径の違いによる挙動の変化についての模式図を示した。分子状態～粒径10 nm程度の小さな粒子の場合、全身へ拡散しつつ、腎臓によってろ過され尿から排泄される<sup>[8]</sup>。粒径200nm～5  $\mu\text{m}$  の場合は肝臓に捕捉後、解毒を受けて腸管へ移行し、最終的には糞中排泄される<sup>[11]</sup>。また、肺の毛細血管は内径が5  $\mu\text{m}$  程度であるため、粒径5  $\mu\text{m}$  以上の大きな粒子の場合は肺に集積し、量が多い場合は肺血栓を引き起こす<sup>[12]</sup>。これらに対して、がん等が発生している腫瘍組織の周辺の血管には150～200 nmの隙間が存在することから、10～200 nmに粒径が制御されたナノ薬剤は、効率的に腫瘍組織へ集積させることが可能となる<sup>[13]</sup>。以上のように、粒径に依存した腫瘍への選択的な薬物送達機序をEnhanced Permeability and Retention effect（EPR 効果）という。

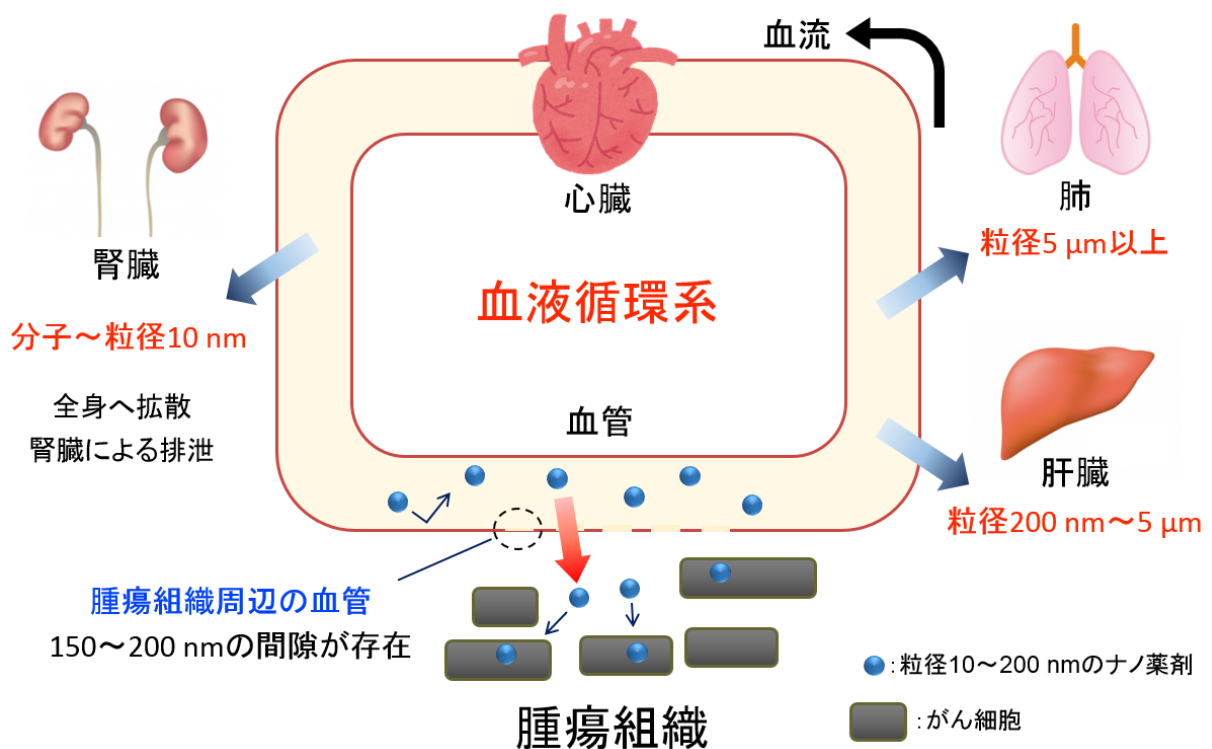
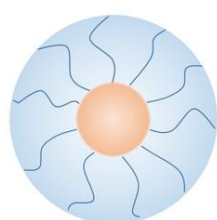
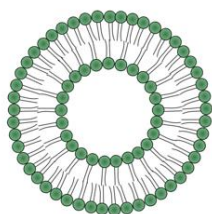


図1-2 EPR 効果による腫瘍組織へのターゲティング

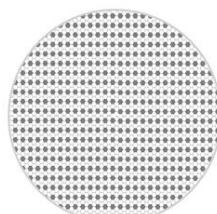
薬物を 10～200nm 程度の粒径に制御する手法として、ナノキャリアと呼ばれる担体に薬物を内包させる手法が提唱されている<sup>[4-7]</sup>。高分子を用いたミセル<sup>[14-16]</sup>、リポソーム等の脂質膜<sup>[17,18]</sup>、メソポーラスシリカ等の無機材料<sup>[19]</sup>、およびタンパク<sup>[20]</sup>などがナノキャリアとして報告されている。ナノキャリアの使用はナノ薬剤の血中滞留性の向上に有効である一方で、低い薬物担持率（一般的には 10wt%以下）やナノキャリア自身による副作用の問題が指摘されている<sup>[21,22]</sup>。これに対して、ナノキャリアを使用せずに作製したナノ薬剤「薬剤ナノ粒子」は、ナノキャリアに由来する問題点を改善した有効性の高い抗がん剤になりうると考えられる。



高分子ミセル



リポソーム



メソポーラスシリカ



タンパク

図 1-3 ナノキャリア

### 1-3 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38)

本研究では、薬剤ナノ粒子を作製するためのモデル化合物として 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38)を選定した。SN-38 は天然有機化合物である camptothecin から化学合成を経て見出された化合物である。

SN-38 のリード化合物である camptothecin は、中国原産の喜樹 (*Camptotheca acuminata*) より単離・構造決定されたアルカロイドである<sup>[23]</sup>。強い抗腫瘍活性が示されたことから、アメリカで抗がん剤として臨床試験が行われた。しかし、第二相臨床試験において、強い骨髄抑制と出血性膀胱炎等の副作用が確認されたため、開発が断念された<sup>[24-27]</sup>。その後、camptothecin の抗腫瘍活性を維持しつつ、副作用を軽減させることを目的として、camptothecin 類縁体の合成研究が行われた<sup>[28,29]</sup>。その結果、camptothecin の 7 位にエチル基、10 位に水酸基を導入した SN-38 が高い抗腫瘍活性を有することが明らかとなった<sup>[29]</sup>。しかしながら、SN-38 は水に難溶であるため、10 位のフェノール性水酸基にジアミン類を導入することで、水への可溶化が図られた。一連のジアミン誘導体のうち、マウス用いた動物実験において、抗腫瘍活性および治療係数が高い irinotecan の塩酸塩三水和物（以下、単に irinotecan と記述する）が選抜された<sup>[30]</sup>。その後の臨床研究の結果、irinotecan は、肺がん、大腸がん、乳がん等、多くのがんの治療に有用であることが実証され、現在医療の現場で使用されている。

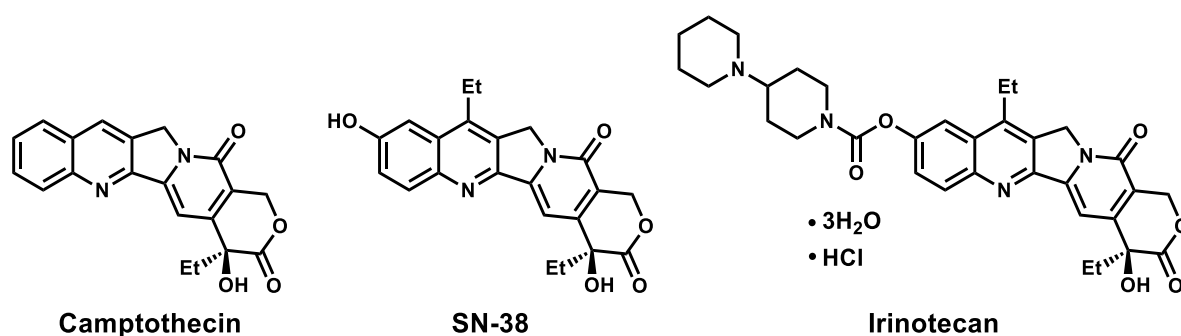


図 1-4 Camptothecin 類縁化合物の化学構造

#### 1-4 SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子

これまでの SN-38 の薬剤ナノ粒子の作製の研究について簡潔に記述する<sup>[31]</sup>。SN-38 の薬剤ナノ粒子の作製手法としては、再沈法を用いた<sup>[32,33]</sup>。再沈法は対象化合物の溶液を攪拌した貧溶媒中に勢い良く注入することで、溶解度差により急激な再沈澱を起こし、対象化合物のナノ結晶・ナノ粒子を作製する方法である。したがって、貧溶媒が水である場合は、対象化合物の疎水性が高いほど微小なナノ粒子の形成が期待される<sup>[34]</sup>。SN-38 の難水溶性という特性に着目して、再沈法により SN-38 の薬剤ナノ粒子の作製を試みたが、期待に反してナノファイバーが形成された (図 1-5)<sup>[31]</sup>。ナノファイバーが形成した要因は、1) SN-38 が平面性の高い分子であるため、一軸方向に結晶成長が進行したこと、2) 水に対する溶解度がある程度高いため、結晶成長が抑制できなかったことによるものと考えた。そこで、コハク酸をリンカーとして SN-38 の二量体を合成し平面性を下げ、疎水性を向上させた。SN-38 二量体を再沈法に供したところ、粒径 50 nm 程度の薬剤ナノ粒子の作製に成功し、そのがん細胞増殖抑制活性を評価すると、SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子は irinotecan と比較して非常に高い活性を示すことが明らかとなった<sup>[31]</sup> (図 1-6)。

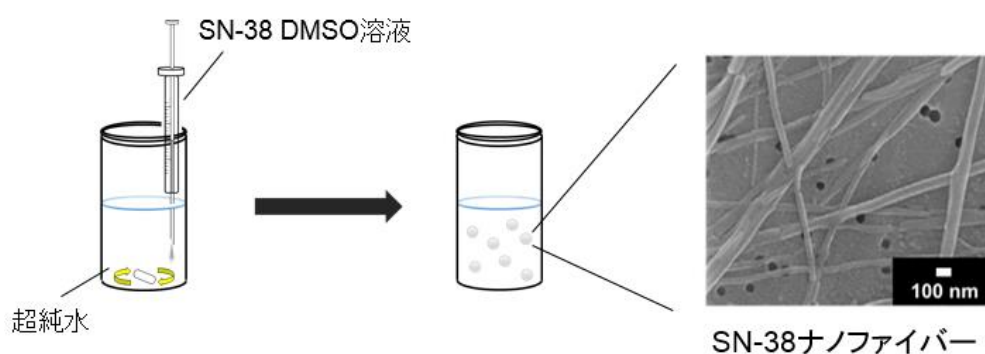


図 1-5 再沈法による SN-38 の薬剤ナノ粒子作製に関する検討



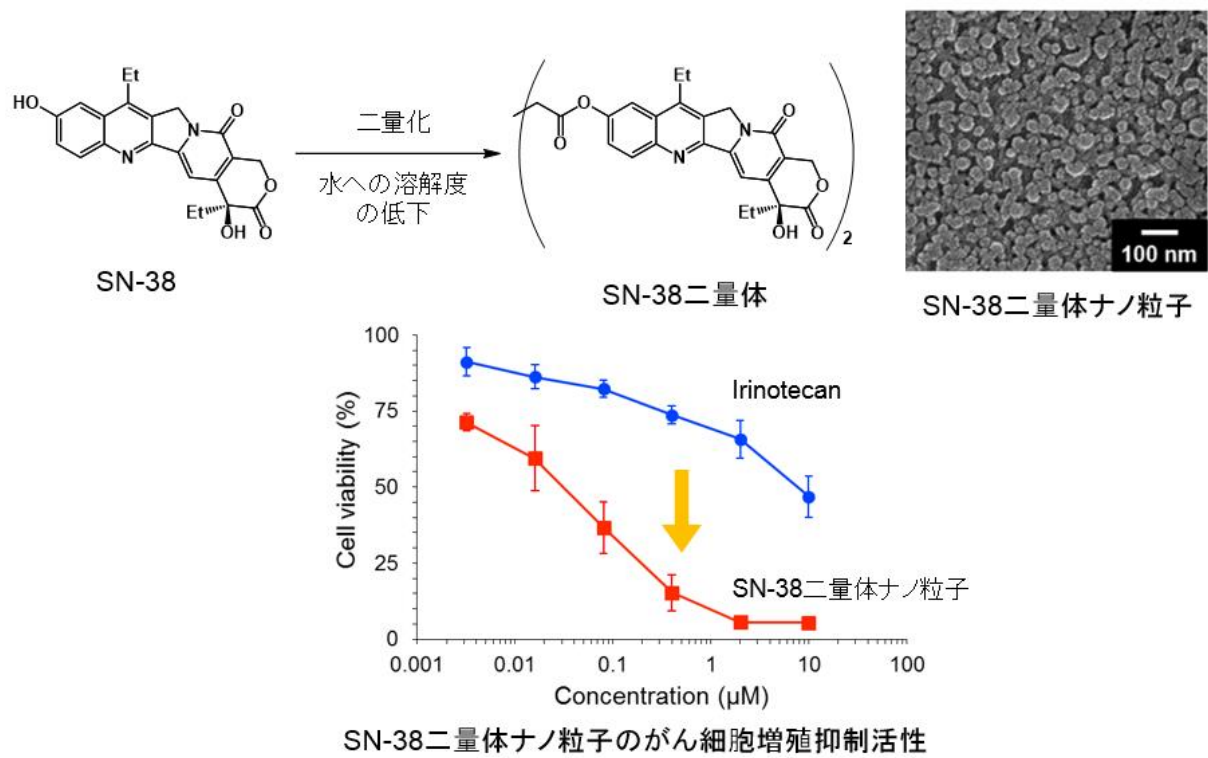


図 1-6 SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子作製に関する検討

SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子は細胞実験 (*in vitro*) で高い活性が示された。しかし、抗がん剤としての薬理効果を実証するためには、動物実験 (*in vivo*) における抗がん活性を評価する必要がある。そこで、筆者は SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子の *in vivo* 活性試験に取り組むことにした。

まず、動物実験に至る予備実験として、マウス血清中における加水分解安定性試験を行った (詳細は第 2 章で記述する)。図 1-7 は、SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子とマウス血清を 1 時間混合した試料の HPLC-MS/MS 分析で得られたクロマトグラムである。わずか 1 時間で薬剤ナノ粒子を構成する SN-38 二量体が加水分解を受け、SN-38 単量体が放出された。したがって、SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子はマウス血中においても速やかに加水分解を受けると考えられる。

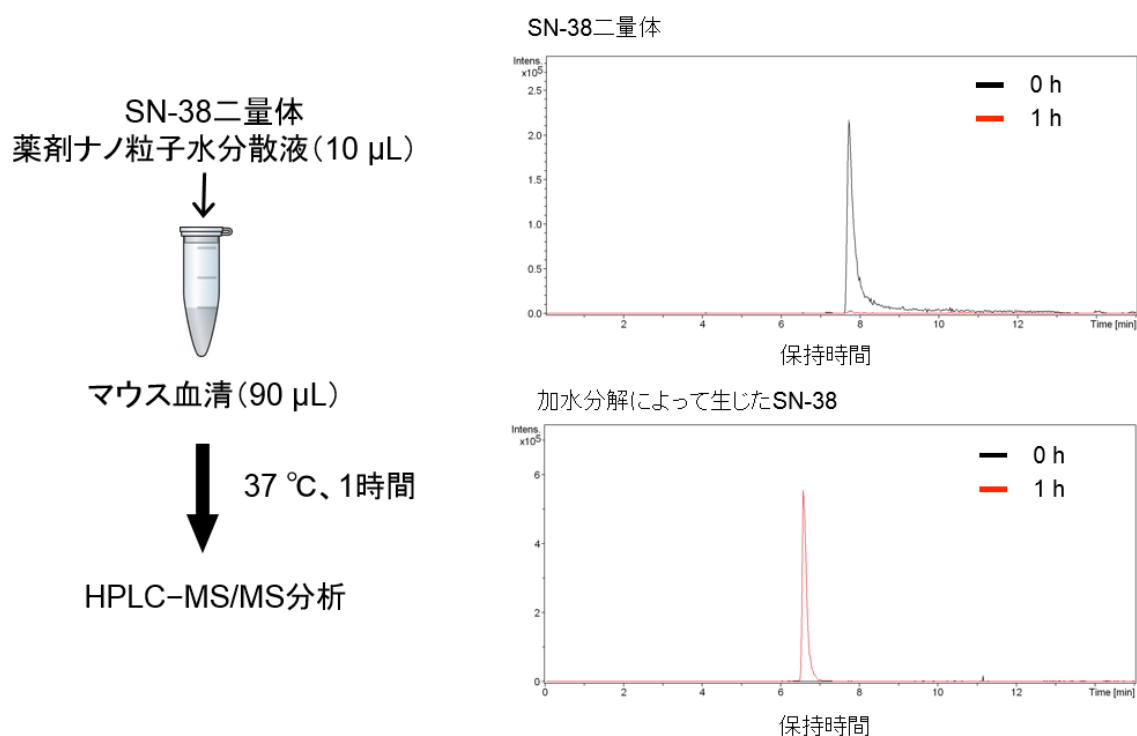


図 1-7 SN-38 二量体薬剤ナノ粒子のマウス血清中加水分解性

理想的な薬剤ナノ粒子の挙動は以下の通りである（図 1－8）。まず、実験動物（マウス）へ静脈注射により投与された薬剤ナノ粒子は、血液中を循環する。このとき、粒径 10～200 nm に制御された薬剤ナノ粒子は腎臓、肝臓、肺の各臓器における捕捉を逃れ、EPR 効果により腫瘍組織へ集積される。その後、腫瘍を形成するがん細胞に取り込まれ、加水分解を経て活性を発揮する。抗がん活性物質が SN-38 の場合は、核内のトポイソメラーゼ I を阻害することで、がん細胞の増殖が抑制される。予備実験の結果、SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子はマウス血清中において速やかに加水分解を受けたことから、血中において腫瘍組織へ集積する前に加水分解を受け、SN-38 分子が放出されて全身へ拡散することが懸念される。したがって、薬剤ナノ粒子を腫瘍組織へ効率的に送達するためには、血液循環系における加水分解性を抑制することが必須となる。

#### 薬剤ナノ粒子の投与

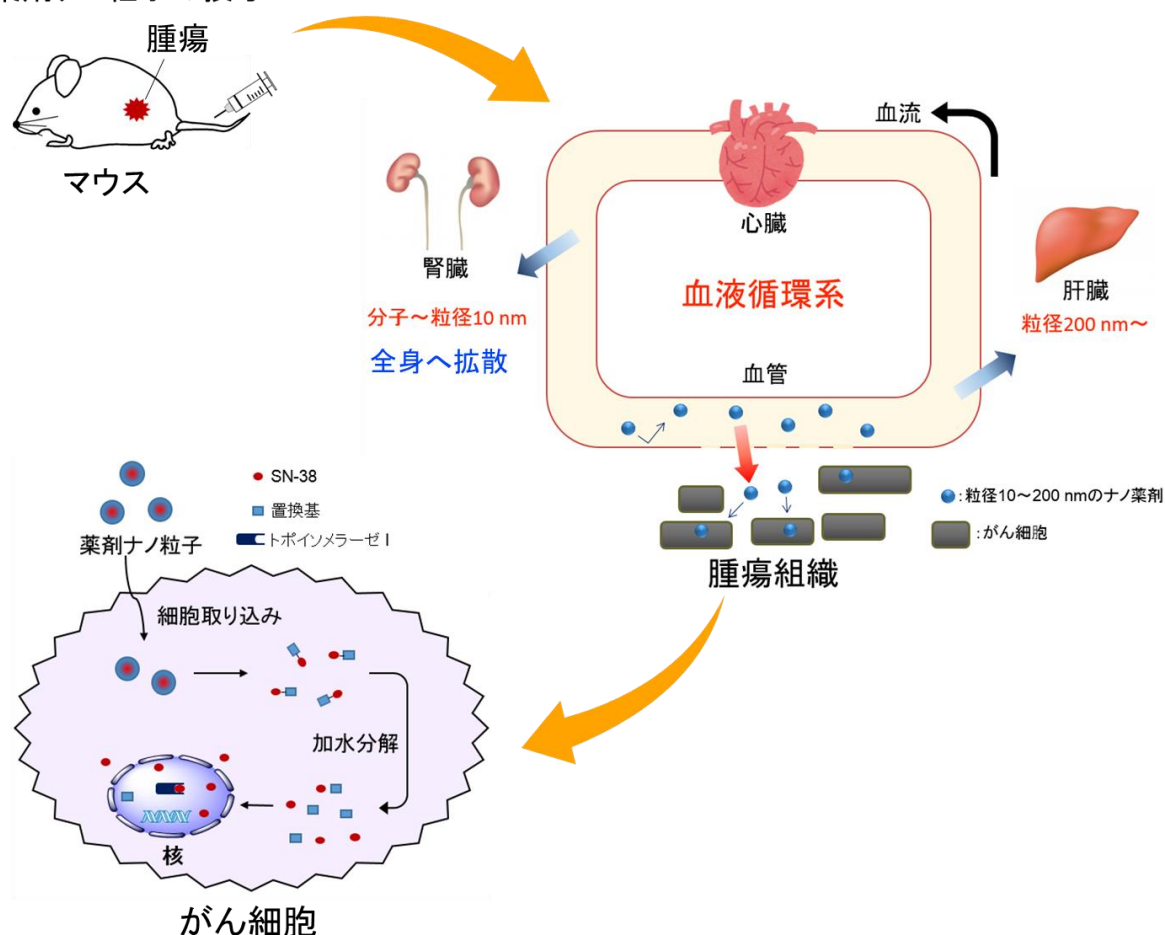


図 1－8 理想的な薬剤ナノ粒子の体内挙動

## 1-5 本研究の目的

前述したように、近年、がんの薬物治療における取り組みとして、粒径 10～200 nm のナノキャリアに薬物を内包させ、EPR 効果により腫瘍組織へ集積させる研究が活発に行われている。しかし、ナノキャリアを使用する場合は、薬物担持率が低い、ナノキャリア自身による副作用の発現といった問題点が指摘されている。これに対して、単一の化合物から構成されるナノ粒子「薬剤ナノ粒子」はナノキャリアによる問題を改善する手法として期待される。これまでに、SN-38 二量体から粒径 50 nm 程度と微小な薬剤ナノ粒子の作製に成功した。しかしながら、SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子はマウス血清中において速やかに加水分解を受けて SN-38 分子を放出することから、薬剤ナノ粒子を効率的に腫瘍組織へ送達するためには、血中における加水分解性を向上させる必要がある。

以上の背景を踏まえて、本研究では、SN-38 二量体を含めて、SN-38 誘導体（プロドラッグ）から作製される薬剤ナノ粒子の加水分解性を制御することを目的とした。具体的な方法としては、薬剤ナノ粒子の加水分解性を決定する要因を明らかにするために、SN-38 に導入する置換基の種類を検討した。この検討により、血中での加水分解に安定な薬剤ナノ粒子を作製するために適した置換基を選抜した。次に、選抜された SN-38 誘導体の薬剤ナノ粒子を用いて *in vivo* 抗腫瘍活性試験および副作用発現の評価を行い、irinotecan との比較を行った。これらの検討により、従来の抗がん剤よりも薬理効果が高く、かつ副作用が低い薬剤ナノ粒子を提唱することが本研究の最終的な目標である。

## 参考文献（第 1 章）

- [1] 平成 26 年（2014）人口動態統計、厚生労働省、2015 年
- [2] 東京大学生命科学教科書編集委員会、理系総合のための生命科学 第 3 版、羊土社、2013 年
- [3] M. Sheehan, C. Latona, G. Aranha, J. Pickleman, *Arch. Surg.* **2000**, *135*, 644–648.
- [4] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nature Nanotech.* **2007**, *2*, 751–760.
- [5] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18.
- [6] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler, *J. Control Release* **2015**, *200*, 138–157.
- [7] T. Ishida, H. Kiwada, *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 692–697.
- [8] H. Maeda, G.Y. Bharate, J. Daruwalla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 409–419.
- [9] P. Ruenraroengsak, J. M. Cook, A. T. Florence, *J. Control Release* **2010**, *141*, 265–276.
- [10] C. Kellerju, M. Kuhn, A. V. Wartburg, H. Stahelin, *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 936 – 940.
- [11] H. Stahelin, *Eur. J. Cancer* **1973**, *9*, 215 – 221.
- [12] J. D. Loike, S. B. Horwitz, *Biochemistry* **1976**, *15*, 5435 – 5443.
- [13] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387 – 6392.
- [14] R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, *263*, 1600 – 1603.
- [15] F. Koizumi, M. Kitagawa, T. Negishi, T. Onda, S. Matsumoto, T. Hamaguchi, Y. Matsumura, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10048 – 10056.
- [16] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815 – 823.
- [17] J. Huwyler, D. F. Wu, W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 14164 – 14169.
- [18] D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong, M. W. Dewhirst, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1197 – 1201.
- [19] Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. F. Liu, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 4873 – 4878.
- [20] W. J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins, J. O'Shaughnessy, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 7794 – 7803.

- [21] N. Vijayalakshmi, A. Ray, A. Malugin, H. Ghandehari, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1804–1810.
- [22] P. Huang, D. Wang, Y. Su, W. Huang, Y. Zhou, D. Cui, X. Zhu, D. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11748–11756.
- [23] M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888 – 3890.
- [24] J. A. Gottlieb, A. M. Guarino, J. B. Call, V. T. Oliverio, J. B. Block, *Cancer Chemother.* **1970**, *54*, 461–470.
- [25] C. G. Moertel, A. J. Schutt, R. J. Reitmeier, R. G. Hahn, **1972**, *56*, 95–101.
- [26] J. A. Gottlieb, J. K. Luce, *Cancer Chemother.* **1972**, *56*, 103–105.
- [27] F. M. Muggia, P. J. Creaven, H. H. Hansen, O. S. Selawrry, *Cancer Chemother.* **1972**, *56*, 515–521.
- [28] W. A. Creasey, M. Richards, D. Gil, K.C. Tsou, *Cancer Treat. Rep.* 1983, *67*, 179–182.
- [29] H. Nagata, N. Kaneda, T. Furuta, S. Sawada, T. Yokokura, T. Miyasaka, M. Fukuda, N. Noritake, *Cancer Treat. Rep.* **1987**, *71*, 341–348.
- [30] S. Sawada, S. Okajima, R. Aiyama, K. Nokata, T. Furuta, T. Yokokura, E. Sugino, K. Yamaguchi, T. Miyasaka, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1449–1454.
- [31] H. Kasai, T. Murakami, Y. Ikuta, Y. Koseki, K. Baba, H. Oikawa, H. Nakanishi, M. Okada, M. Shoji, M. Ueda, H. Imahori, M. Hashida, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10315–10318.
- [32] H. Kasai, H. S. Nalwa, H. Oikawa, S. Okada, H. Matsuda, N. Minami, A. Kakuta, K. Ono, A. Mukoh, H. Nakanishi, *Jpn. J. Appl. Phys.* **1992**, *31*, L1132 – L1134.
- [33] H. Oikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, *84*, 233–250.
- [34] J. Mori, Y. Miyashita, D. Oliveira, H. Kasai, H. Oikawa, H. Nakanishi, *J. Cryst. Growth* **2009**, *311*, 553–555.

## 第2章

SN-38 プロドラッグの合成に基づいた  
高い加水分解耐性を有する薬剤ナノ粒子の探索

## 2-1 緒言

SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子はマウス血清中で速やかに加水分解を起こした。したがって、SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子をマウスへ投与すると、血中で加水分解を受けて SN-38 が放出されると想定される。血中に放出された SN-38 分子は全身へ拡散するため、EPR 効果によるターゲティングが期待できない。薬剤ナノ粒子を効率的に腫瘍組織へ送達するためには、薬剤ナノ粒子の血中における加水分解耐性を向上させることが重要と言える。

第 2 章では、薬剤ナノ粒子の血中加水分解耐性の向上を目的として、2 つのアプローチを試みた。一つ目は SN-38 二量体から作製した薬剤ナノ粒子の表面修飾である。界面活性剤であるポリソルベート 80 により SN-38 二量体ナノ粒子の表面を修飾することで、薬剤ナノ粒子の粒子表面と血中の加水分解酵素との接近を抑制させることを試みた。二つ目は SN-38 への置換基の導入である。様々な置換基を SN-38 へ導入してプロドラッグとし、加水分解点となるエステル結合周辺の嵩高さやプロドラッグの疎水性等を変化させることで、加水分解耐性の高い薬剤ナノ粒子を探索することが狙いである。



## 2-2 SN-38 二量体薬剤ナノ粒子の表面修飾

SN-38 二量体から作製した薬剤ナノ粒子の、血中での加水分解に対する耐性を向上させることを目的として、中性の界面活性剤であるポリソルベート 80 (図 2-1) を用いて表面修飾を検討した。ポリソルベート 80 は非イオン性の界面活性剤であり、ソルビトールを基本骨格として約 20 単位のエチレンオキシド鎖からなる親水部と、主にオレイン酸とのエステルからなる疎水部を持つ。10 mM SN-38 二量体の DMSO 溶液に 0.1、1、10wt% の割合でポリソルベート 80 を混合させ、この混合溶液 100  $\mu$ L を激しく攪拌した超純水 10 mL 中へ注入した。図 2-2 に得られた薬剤ナノ粒子の SEM 観察の結果を示した。ポリソルベート 80 無添加および 0.1wt% 含有の場合は、粒径 50 nm 程度の球状の粒子であり、動的光散乱法 (DLS) による粒径測定の結果と良く一致した (図 2-3)。一方、ポリソルベート 80 を 1wt% または 10wt% 含有させた場合は、良好な SEM 像が得られなかった。これは、フィルター上でナノ粒子が埋もれている可能性が考えられる。ポリソルベート 80 を 1wt%、10wt% 含有させた場合、チンダル現象が双方とも確認され、また、DLS による粒径測定の結果、それぞれ平均粒径 43.0、40.5 nm であったことから、分散液中ではナノ粒子状態で存在すると示唆された。これらの分散液のゼータ電位を測定したところ、ポリソルベート 80 を添加しない場合は -36.5 mV であるのに対して、添加するポリソルベート 80 の割合が増加するに伴い 0 mV へ近づいた (図 2-3)。この原因は、ポリソルベート 80 の添加量の増加に伴って被覆率が向上し、SN-38 二量体薬剤ナノ粒子の表面電位を打ち消したことによると考察した。

次に、ポリソルベート 80 により表面修飾した SN-38 二量体薬剤ナノ粒子の、マウス血清中での加水分解性を評価した。マウス血清と薬剤ナノ粒子を 1 時間混合した試料を HPLC-MS/MS 測定して得られたクロマトグラムを図 2-4 に示した。ポリソルベート 80 の添加量に関わらず、SN-38 二量体のピークが消失し、SN-38 単量体のピークが観測された。したがって、ポリソルベート 80 による表面修飾では、SN-38 二量体薬剤ナノ粒子の加水分解耐性を向上させる効果は得られなかった。

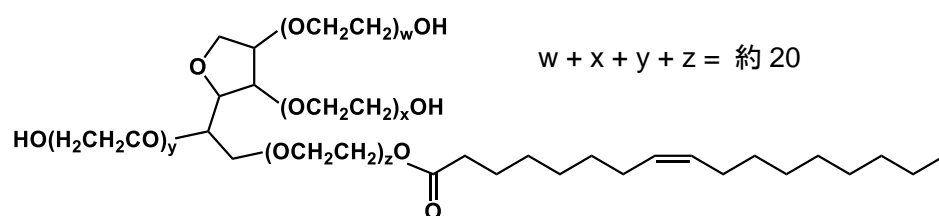


図 2-1 ポリソルベート 80 の化学構造

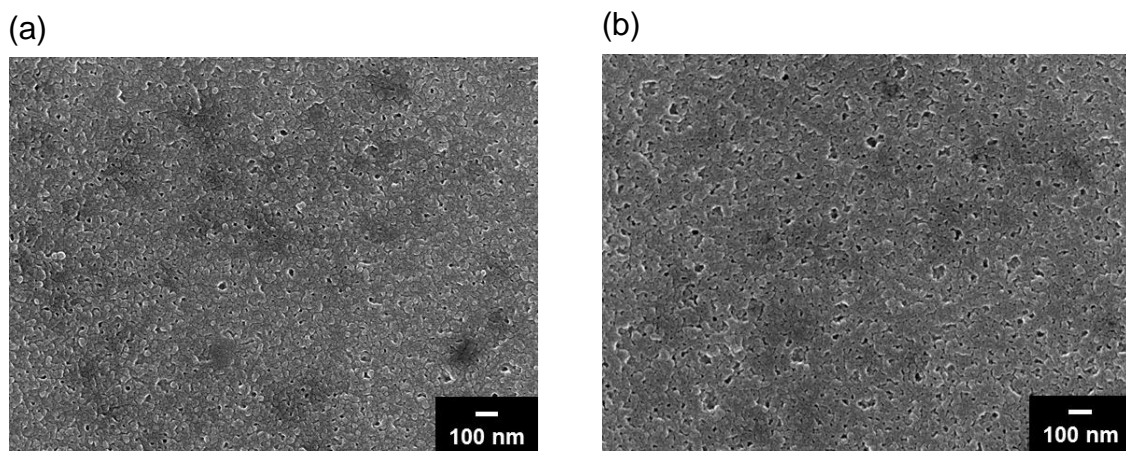


図 2-2 ポリソルベート 80 により表面修飾した SN-38 二量体ナノ粒子の SEM 像  
ポリソルベート 80 の含有率 (a)無添加、(b) 0.1wt%

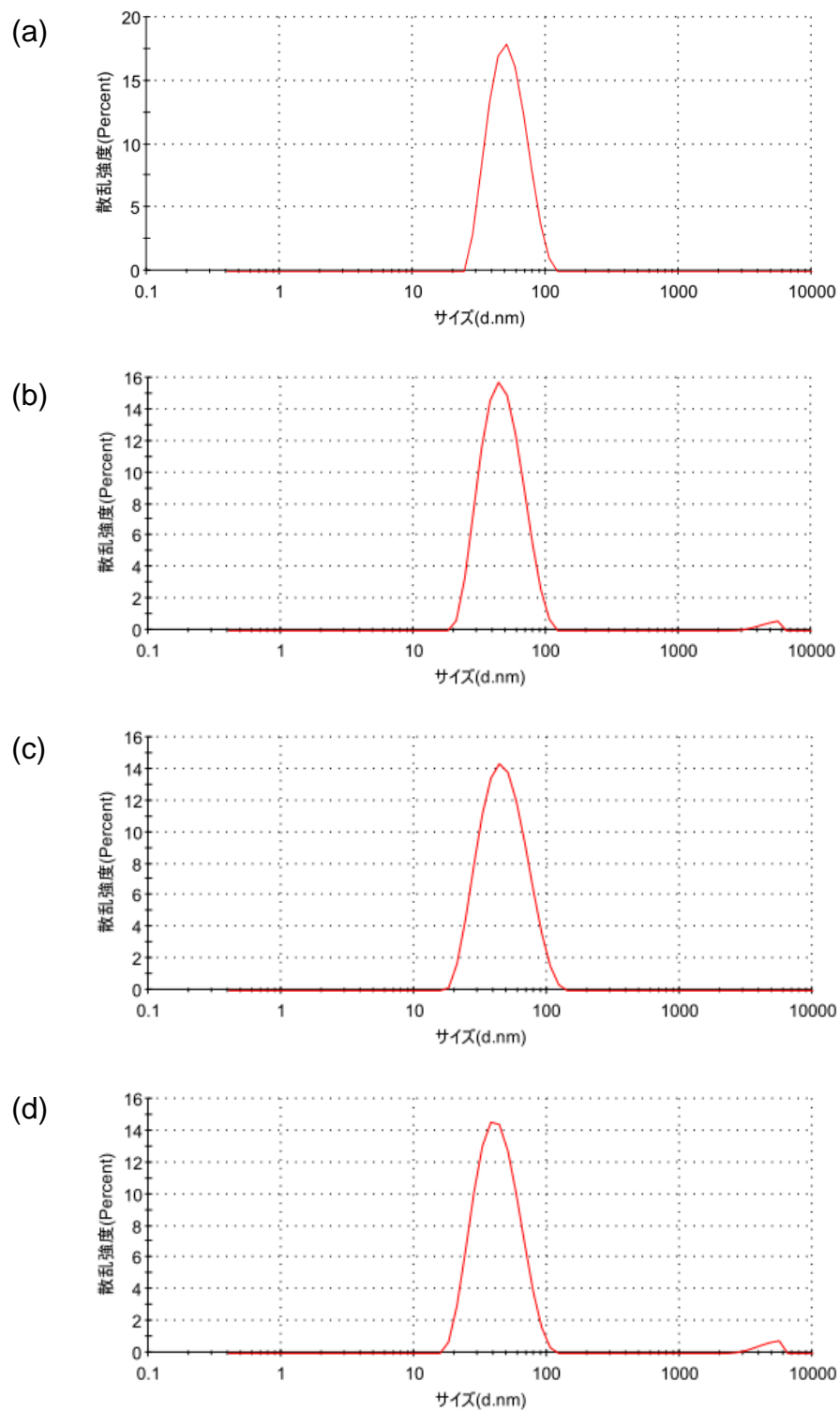


図 2-3 ポリソルベート 80 により表面修飾した SN-38 二量体ナノ粒子の粒度分布。ポリソルベート 80 の含有率 (a) 無添加、(b) 0.1wt%、(c) 1wt%、(d) 10wt%

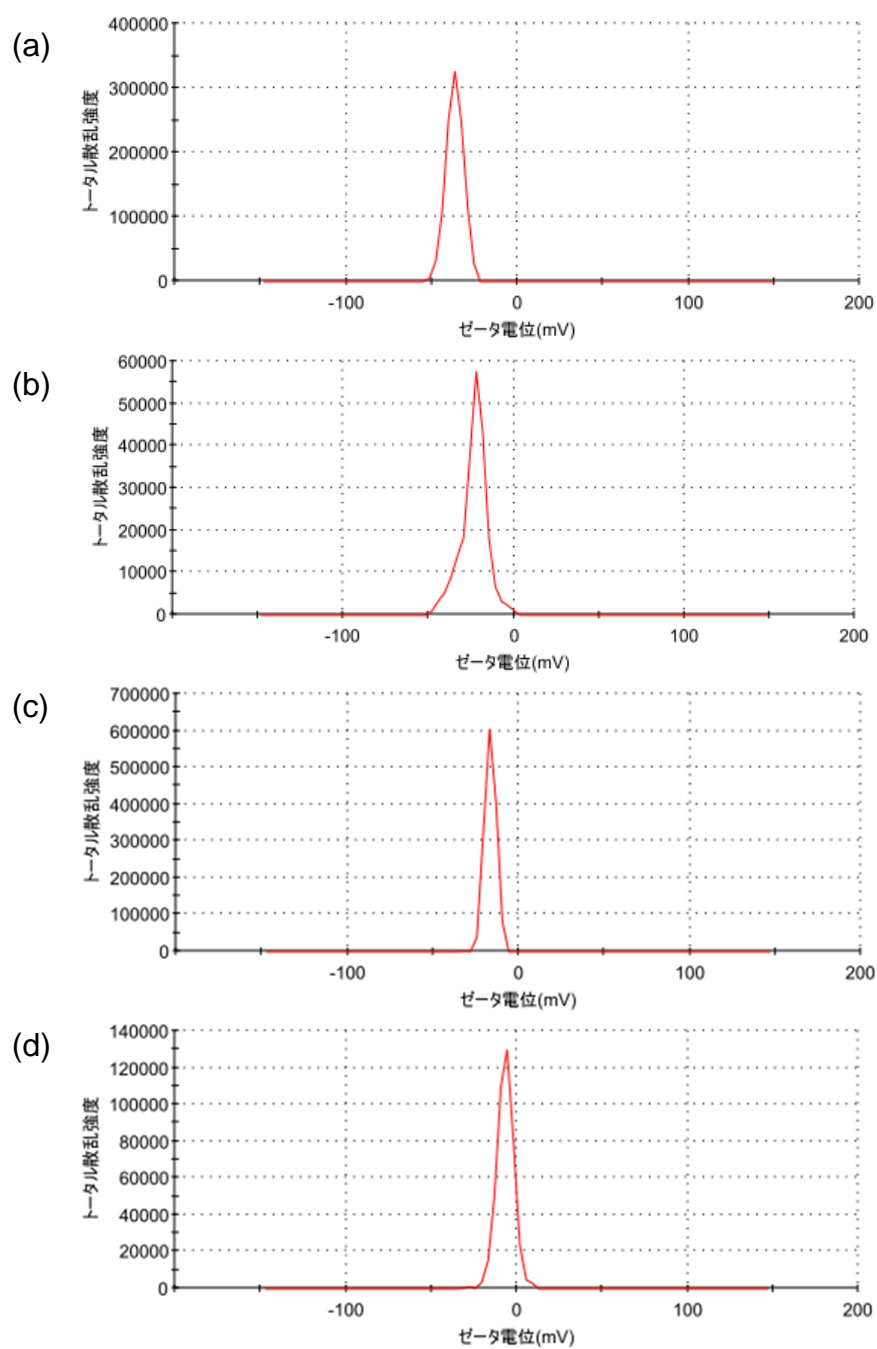


図 2-3 (続き) ポリソルベート 80 により表面修飾した SN-38 二量体ナノ粒子のゼータ電位。ポリソルベート 80 の含有率 (a) 無添加、(b) 0.1wt%、(c) 1wt%、(d) 10wt%

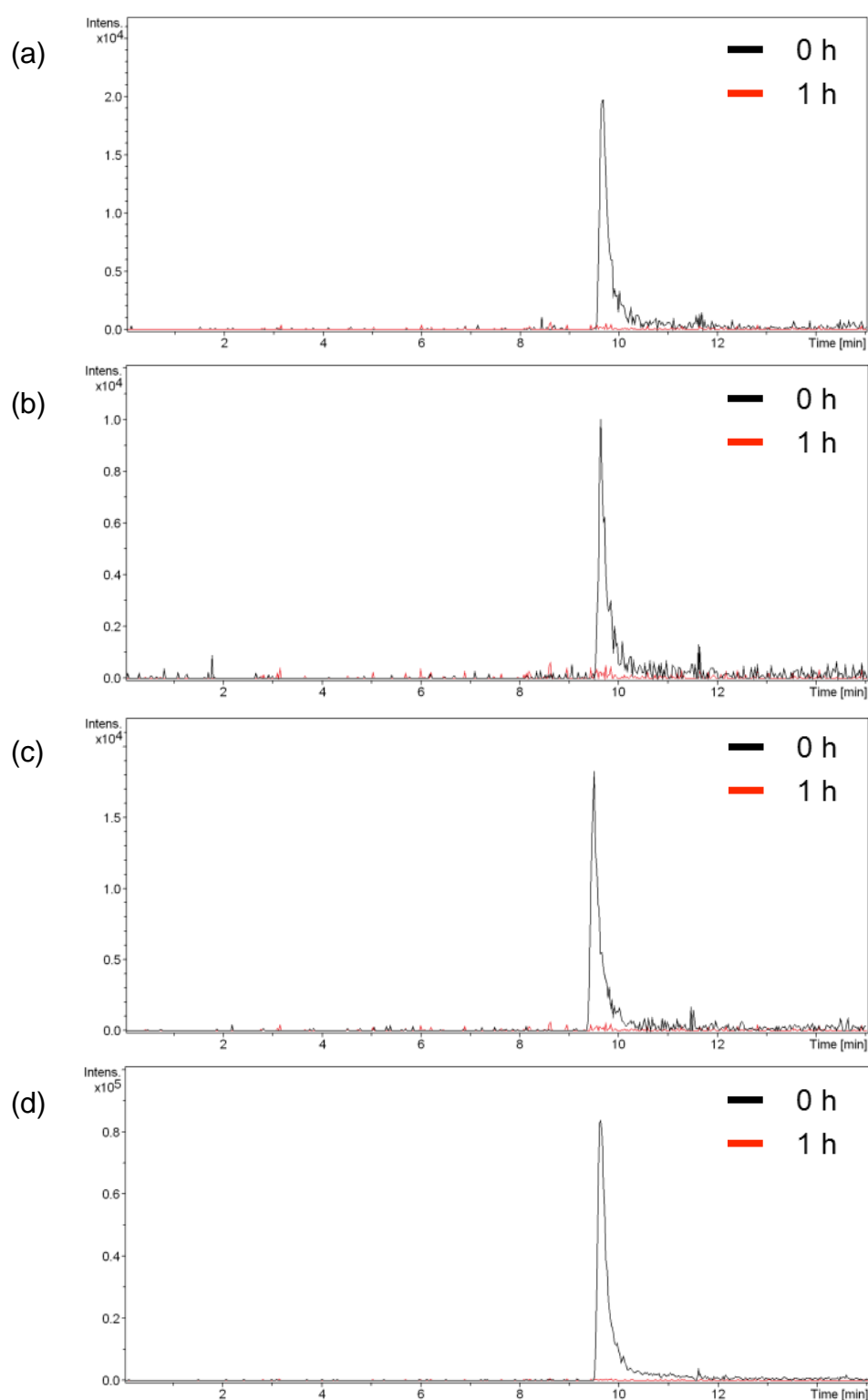


図 2-4 ポリソルベート 80 により表面修飾した SN-38 二量体ナノ粒子のマウス血清中における加水分解性。ポリソルベート 80 の含有率 (a) 無添加、(b) 0.1wt%、(c) 1wt%、(d) 10wt%

### 2-3 薬剤ナノ粒子の加水分解性を決定する要因の考察

薬剤ナノ粒子の加水分解経路は、以下の二つの経路が推定される（図2-5）。一つは、薬剤ナノ粒子の粒子表面に加水分解酵素が接近し、加水分解が進行する経路、もう一つは、薬剤ナノ粒子から放出された構成分子が加水分解酵素により加水分解される経路である。実験事実としては、ポリソルベート 80 による SN-38 二量体ナノ粒子の表面修飾により、マウス血清中における加水分解を抑制することはできなかった。したがって、SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子では後者の経路が進行したと推定した。すなわち、SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子の一部が、分散媒である水に溶解し、溶解した SN-38 二量体分子が血清中の加水分解酵素によって加水分解されたと考察した。

上記の推定に基づくと、薬剤ナノ粒子に血清中における加水分解耐性を付与するためには、薬剤ナノ粒子を構成する分子の疎水性を向上させることが有効と考えられる。これは、薬剤ナノ粒子を作製した際、疎水性が高い分子ほど、溶解状態よりもナノ粒子状態にある分子の割合が高まることに起因する。そこで、SN-38 に疎水性置換基を導入したプロドラッグの合成および薬剤ナノ粒子の作製を行い、プロドラッグの疎水性がマウス血清中における加水分解性に与える影響を検討した。

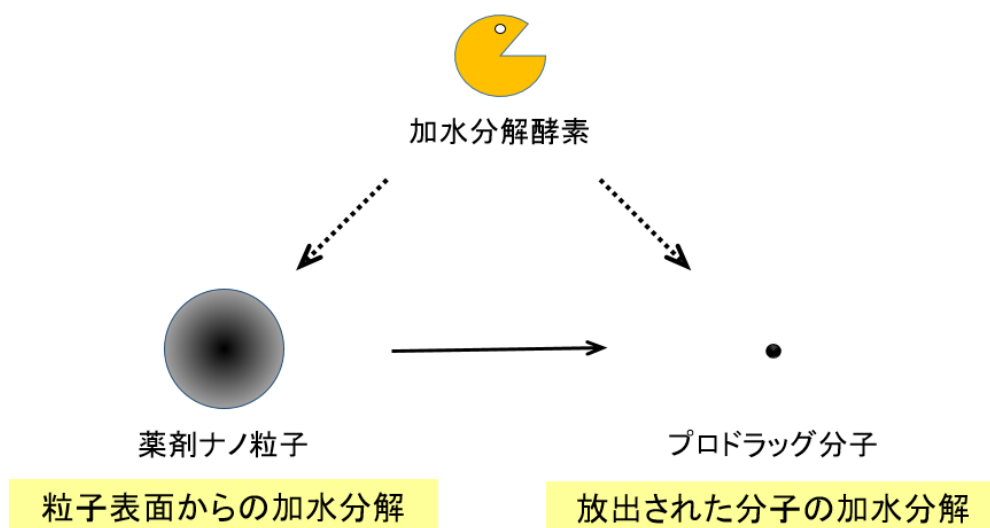


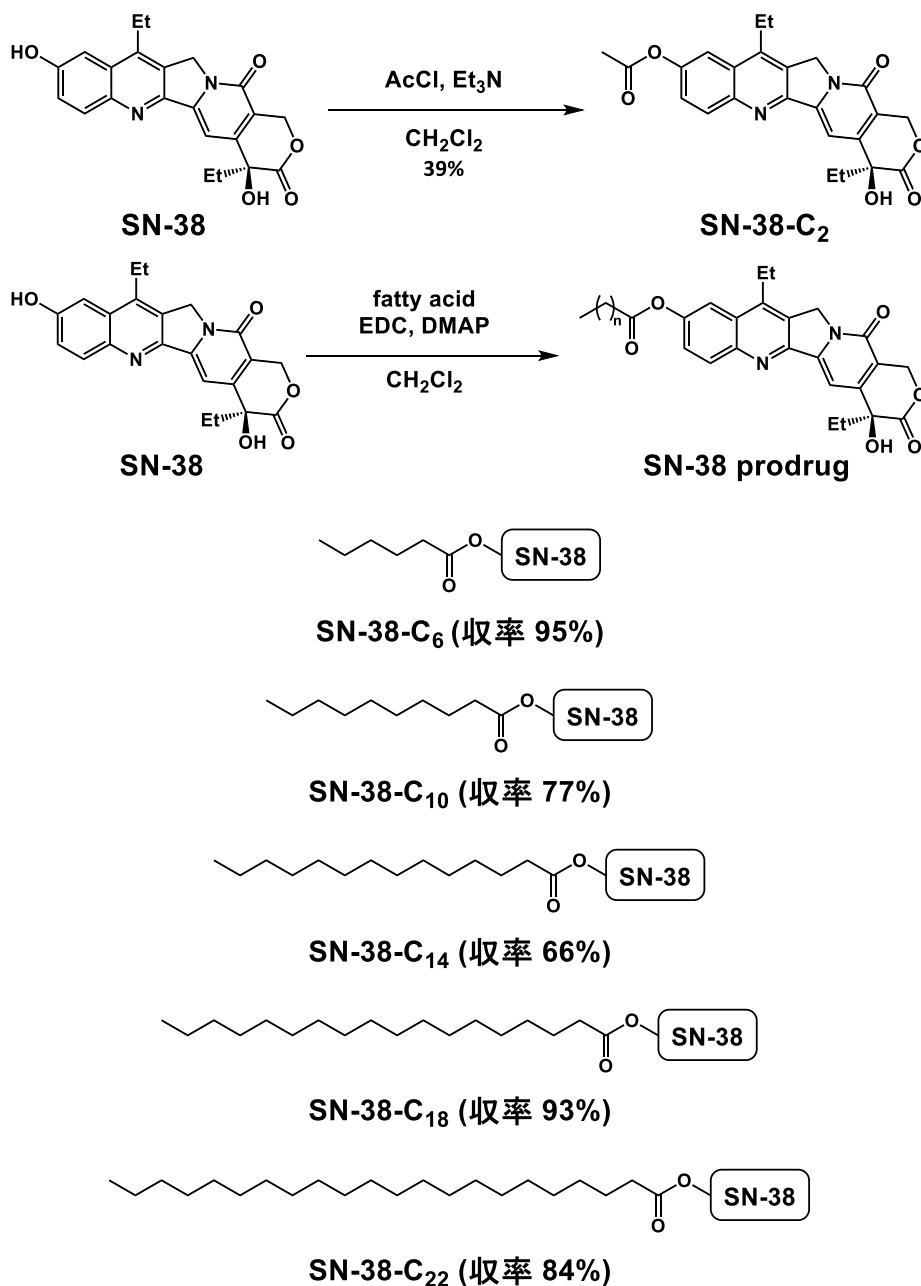
図2-5 想定される加水分解経路

## 2-4 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子

SN-38 へ導入する疎水性置換基として、まず脂肪酸を検討した。脂肪酸の炭素数を 2 から 22 に変化させることで SN-38 プロドラッグの疎水性を制御し、疎水性の違いが薬剤ナノ粒子の血清中における加水分解性に与える影響を調べた。

## 2-4-1 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの合成

脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの合成をスキーム 2-1 に示した。SN-38 にアセチル基を導入した SN-38-C<sub>2</sub> は SN-38 と塩化アセチルを反応させ合成した。また、炭素数 6 以上の脂肪酸の導入は EDC、DMAP を用いた脱水縮合反応により合成に成功した。



スキーム 2-1



#### 2-4-2 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの構造決定

SN-38 は、10 位の炭素に結合したフェノール性水酸基と 20 位の炭素に結合した 3 級水酸基の 2 つの水酸基を有する。したがって、エステル化反応によって得られた SN-38 プロドラッグの構造は、2 つの位置異性体が考えられる (図 2-6)。SN-38-C<sub>2</sub> の合成では、過剰の塩化アセチルを加えると、アセチル基が 2 つ導入された diacetylSN-38 が得られた (図 2-7)。1 当量の塩化アセチルを加えた場合には、SN-38-C<sub>2</sub>、および diacetylSN-38 のみを得られ、位置異性体と思われる化合物が単離されなかったことから、まず反応性がより高い方の水酸基と反応した後、もう一方の水酸基と反応すると考えられる。合成した SN-38 プロドラッグの反応位置を決定することは、薬剤ナノ粒子の作製および薬理効果の評価において考察を行うために重要な知見といえる。反応部位を決定するためには、SN-38 の NMR スペクトルのシグナル帰属に関する文献情報が参考になる。しかし、これまでに SN-38 の全合成に関する論文が多数報告されているものの、NMR スペクトルから水素および炭素の部位を帰属した例は皆無であった<sup>[1-6]</sup>。そこで、まず SN-38 の NMR スペクトルの解析を行い、SN-38-C<sub>2</sub> の NMR スペクトルと比較することで反応位置を特定することにした。

構造解析は一次元および二次元の NMR スペクトルから解析した。具体的には <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、DEPT、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、HMQC、HMBC の各種スペクトルを解析した。

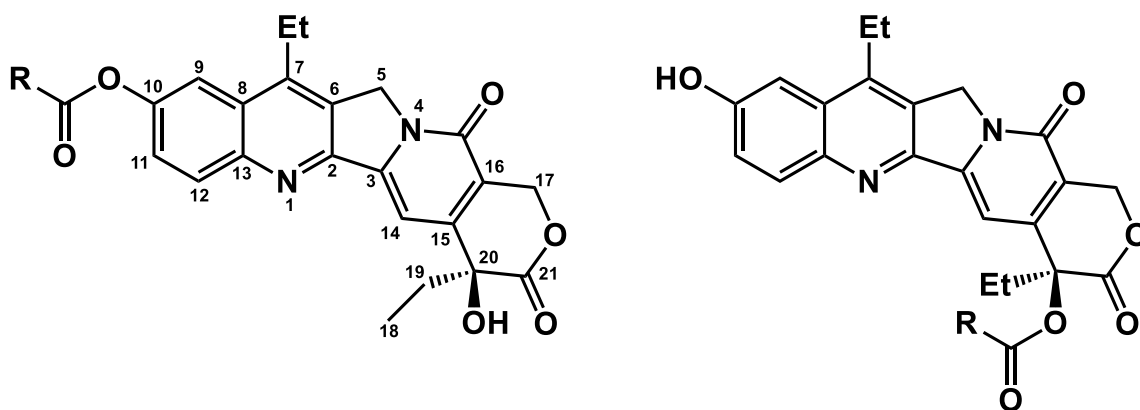


図 2-6 想定される SN-38 誘導体の化学構造

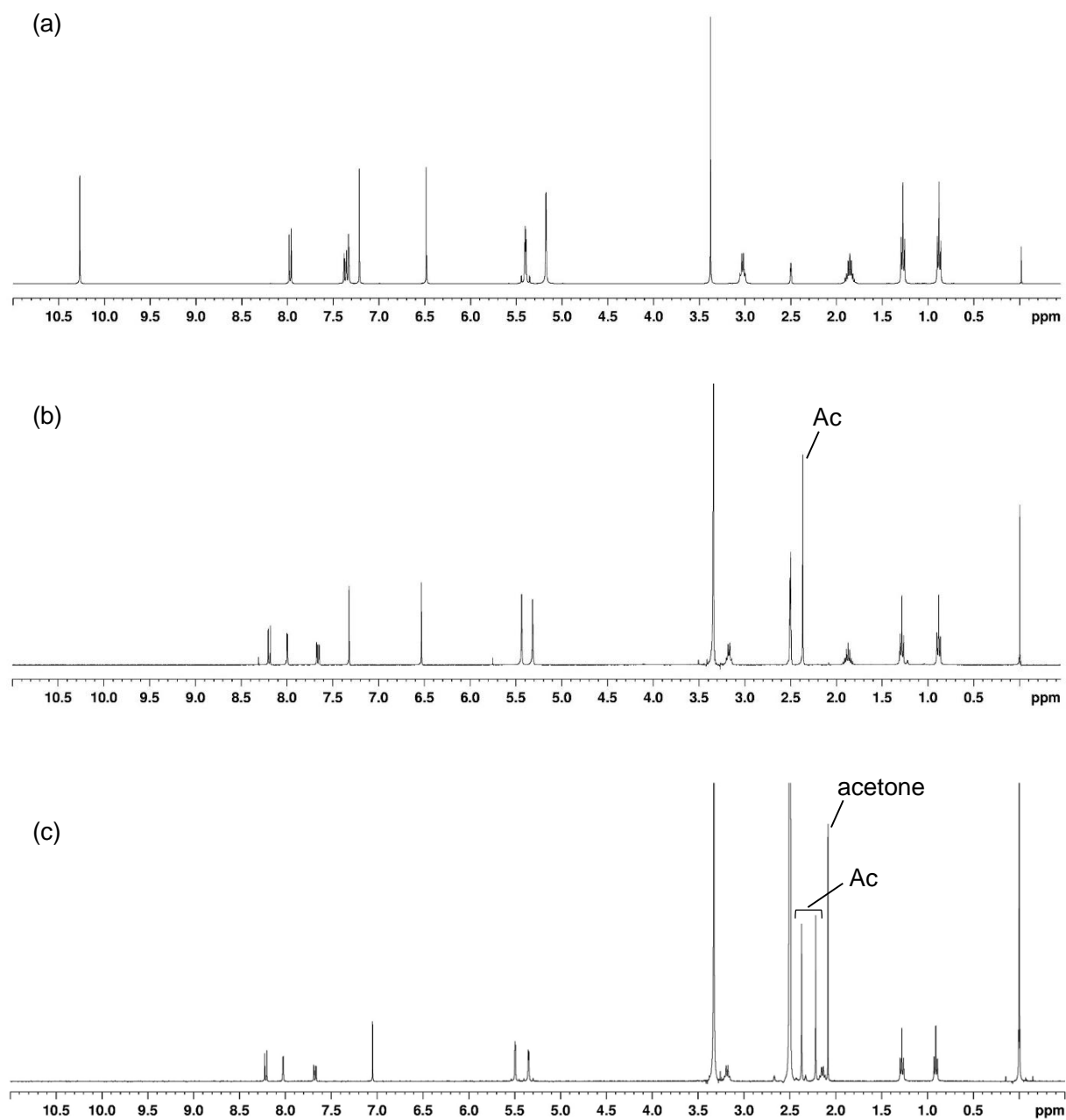


図 2-7 (a)SN-38、(b)SN-38- $\text{C}_2$ 、(c) diacetylSN-38 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

・ SN-38 の構造解析

SN-38 の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを図 2-8、9 に示した。多重度は  $^1\text{H}$  NMR ではスペクトル上から直接、 $^{13}\text{C}$  NMR では DEPT スペクトル (図 S2-3) および HMQC スペクトル (図 S2-5) から求めた。

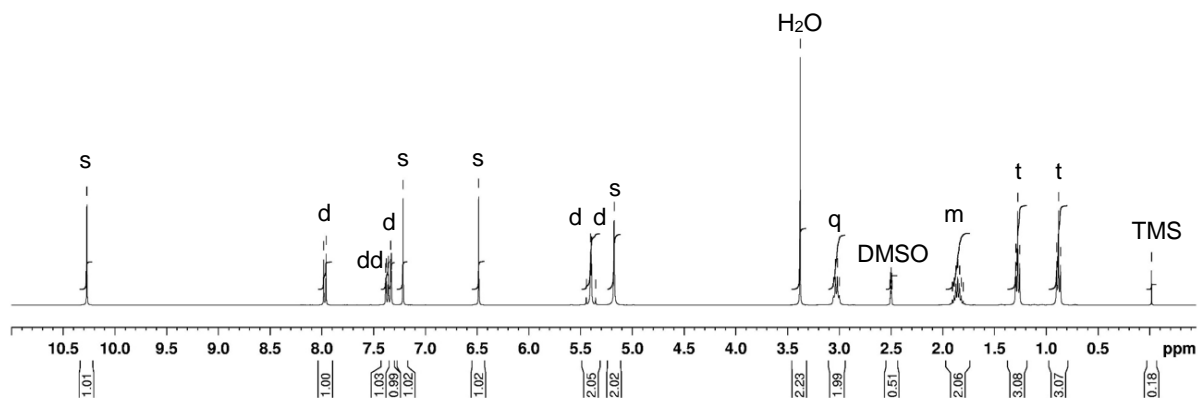


図 2-8 SN-38 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

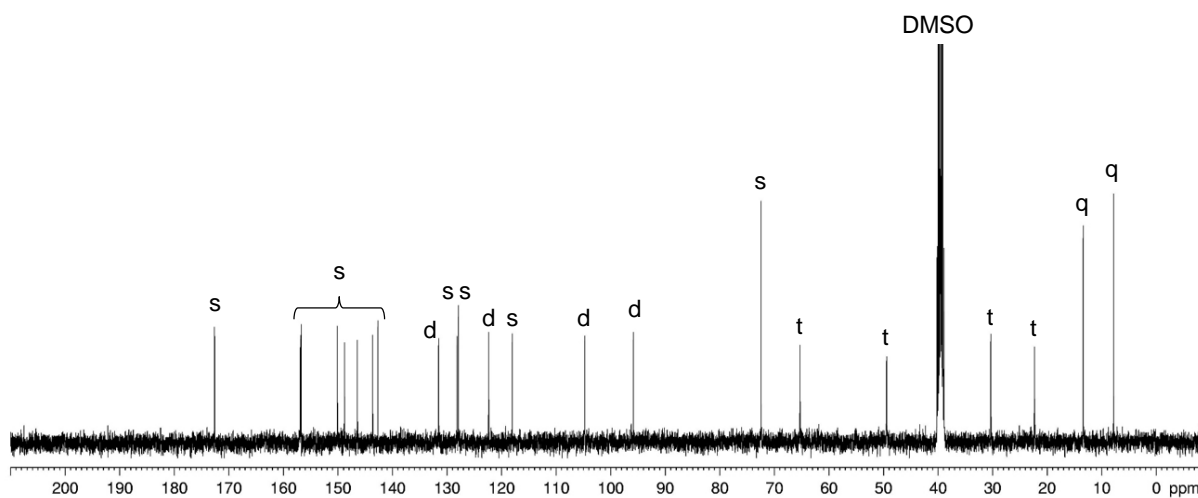


図 2-9 SN-38 の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル

s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet,  
dd: doublet of doublet, dq: doublet of quartet, m: multiplet

$^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル (図 S2-4)、DEPT スペクトル、および HMQC スペクトルから得られた部分構造を図 2-10 に示した。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルから  $\delta_{\text{H}}$  0.88 と 1.86、 $\delta_{\text{H}}$  1.28 と 3.03、 $\delta_{\text{H}}$  7.37 と 7.97 の間に相関が観測された。また、 $\delta_{\text{H}}$  6.5 と 10.3 のシグナルは HMQC スペクトルで交差ピークを与えなかったことから、水酸基の水素と推定した。次に、これらの部分構造の情報を踏まえ、HMBC スペクトル (図 S2-5) の解析を行った。図 2-11 にプロトンシグナルから炭素シグナルへの HMBC 相関を矢印で、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルから得られた相関を太線で示した。2 つの水酸基のシグナルの相関に注目すると、 $\delta_{\text{H}}$  10.3 のシグナルは  $\delta_{\text{C}}$  104.8、122.4、156.7 のシグナルと相関が得られ、 $\delta_{\text{H}}$  6.5 のシグナルは  $\delta_{\text{C}}$  30.3、72.5、172.6 のシグナルとの相関が得られた。したがって、 $\delta_{\text{H}}$  10.3 のシグナルは 10 位のフェノール性水酸基、 $\delta_{\text{H}}$  6.5 のシグナルは 20 位の 3 級水酸基のシグナルに帰属した。その他の HMBC 相関を解析すると、全ての炭素シグナルに交差ピークが観測された。矛盾なく配置すると、SN-38 の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR のシグナルは表 2-1 にまとめた様に帰属された。

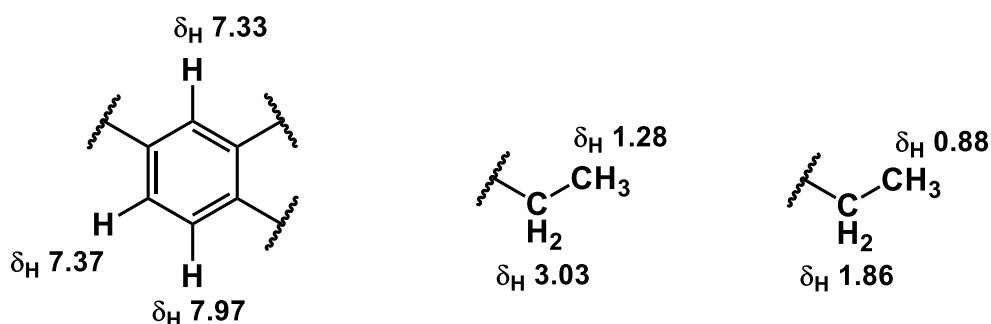


図 2-10 SN-38 の部分構造

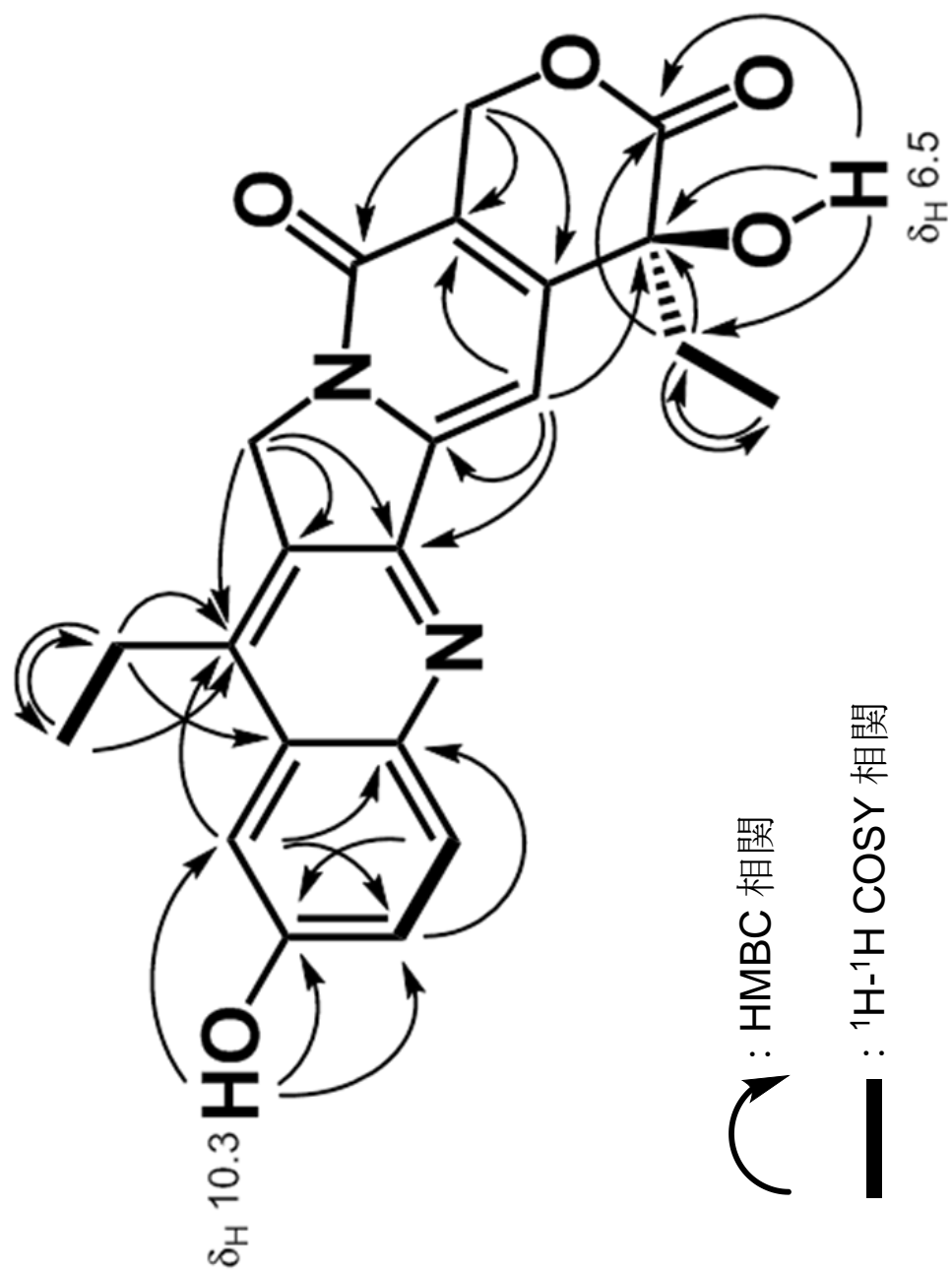


図 2-11 SN-38 の HMBC スペクトルの解析

・ SN-38-C<sub>2</sub> の構造解析

SN-38-C<sub>2</sub> の構造解析は SN-38 と同様に行った。SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルを図 2-12、13 に示した。SN-38 の一次元 NMR スペクトルと比較すると、<sup>1</sup>H NMR では  $\delta_{\text{H}}$  10.3 のシグナルが消失し、 $\delta_{\text{H}}$  2.37 にアセチル基由来と考えられるシングレットメチル (3H) のシグナルが新たに観測された。また、HMBC スペクトル (図 S2-11) の解析の結果、 $\delta_{\text{H}}$  6.5 のシグナルは SN-38 の場合と同様に 3 級水酸基由来と確認された (図 2-14)。SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR の全シグナルの帰属を表 2-1 にまとめた。

以上の NMR スペクトルの解析から、SN-38-C<sub>2</sub> の反応位置はフェノール性水酸基と決定した。エステル化反応において位置選択性が生じた要因は、3 級水酸基の立体障害によるものと考えられる。また、SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>1</sup>H NMR を CDCl<sub>3</sub> 中で測定すると  $\delta_{\text{H}}$  3.72 に 3 級水酸基のシグナルが観測された。そこで、SN-38-C<sub>2</sub> 以外の SN-38 プロドラッグにおいては、DMSO-*d*<sub>6</sub> を用いて <sup>1</sup>H NMR を測定した場合は  $\delta_{\text{H}}$  6.5 周辺のシングレットシグナルを、CDCl<sub>3</sub> を用いて <sup>1</sup>H NMR を測定した場合は  $\delta_{\text{H}}$  3.5~4.0 の 1H のシングレットシグナルを、3 級水酸基のシグナルと帰属した。なお、本論文で合成した全ての SN-38 プロドラッグは、<sup>1</sup>H NMR 測定において 3 級水酸基のシグナルと見られるシグナルが観測されたため、フェノール性水酸基に置換基が導入された SN-38 プロドラッグと決定した (図 2-15)。

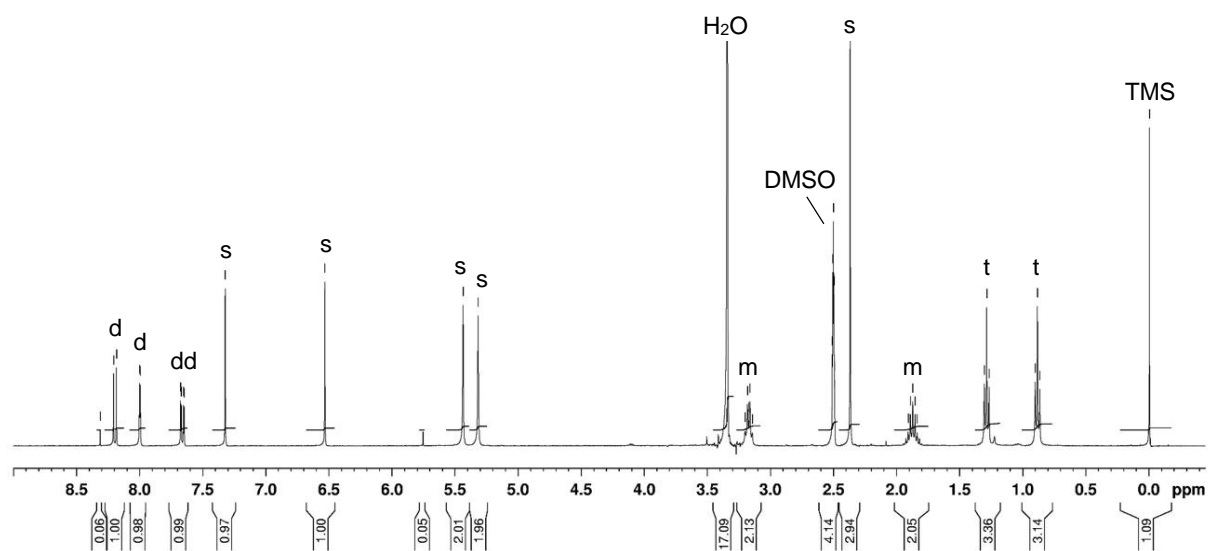


図 2-12 SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>1</sup>H NMR スペクトル

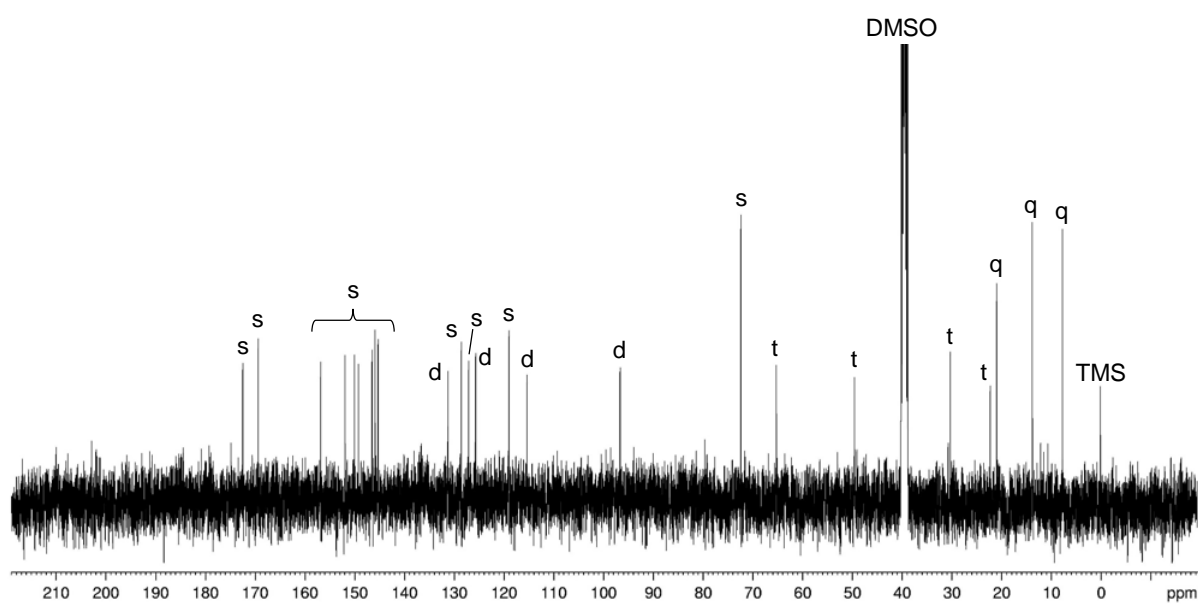


図 2-13 SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>13</sup>C NMR スペクトル

s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, dd: doublet of doublet, m: multiplet

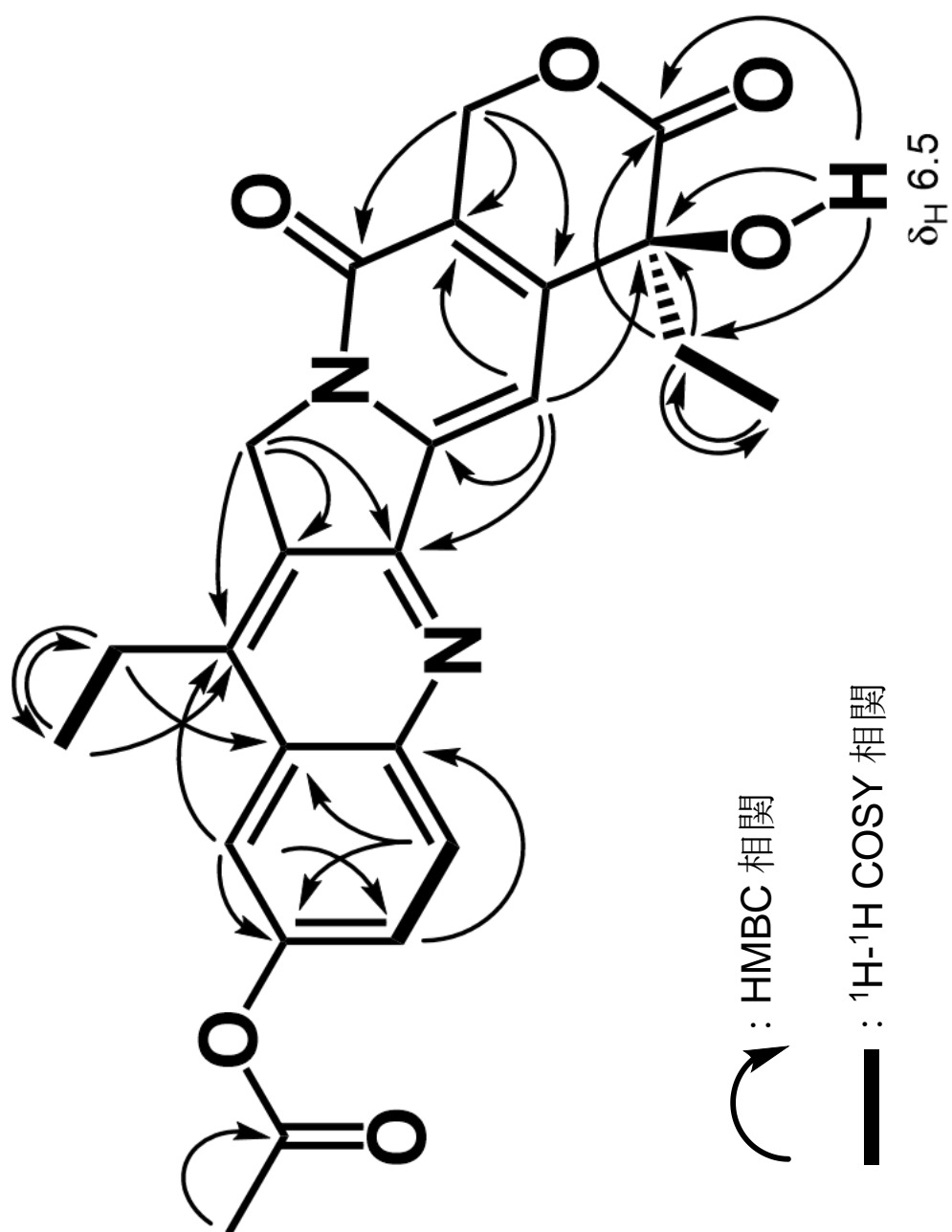


図 2-14 SN-38-C<sub>2</sub> の HMBC スペクトルの解析



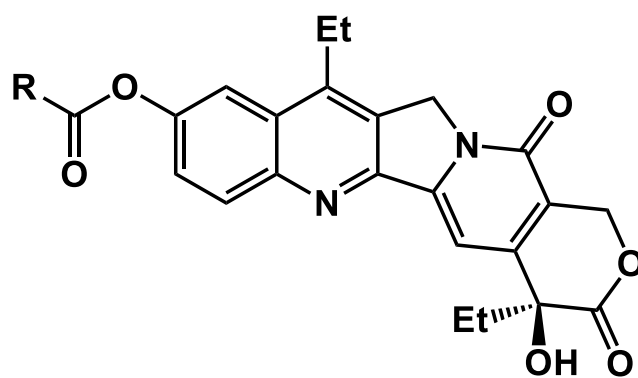


図 2-15 本研究で用いた SN-38 プロドラッグの化学構造

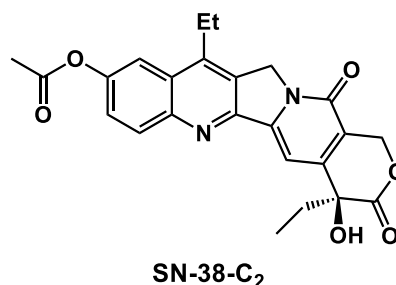
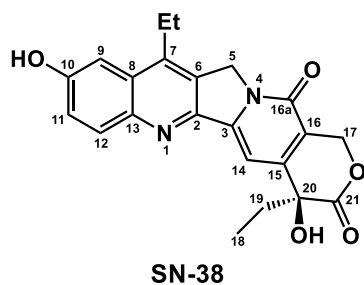


表 2-1 SN-38 と SN-38-C<sub>2</sub> の NMR スペクトルの帰属

SN-38

position	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1	—	—
2	—	146.2
3	—	148.8
4	—	—
5	5.18 (2H, s)	49.4
6	—	127.9
7	—	142.6
8	—	128.1
9	7.33 (1H, d, <i>J</i> = 2.4 Hz)	104.8
10	—	156.7
11	7.37 (1H, dd, <i>J</i> = 9.2, 2.4 Hz)	122.4
12	7.97 (1H, d, <i>J</i> = 9.2 Hz)	131.5
13	—	143.6
14	7.21 (1H, s)	95.8
15	—	150.1
16	—	118.0
16a	—	156.9
17	5.38 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz) 5.42 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz)	65.3
18	0.89 (3H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz)	7.8
19	1.88 (2H, m)	30.3
20	—	72.5
21	—	172.6
-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3.18 (2H, m)	22.3
-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1.29 (3H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz)	13.4

SN-38-C<sub>2</sub>

position	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1	—	—
2	—	145.9
3	—	151.9
4	—	—
5	5.32 (2H, s)	49.6
6	—	128.6
7	—	146.5
8	—	127.1
9	8.01 (1H, d, <i>J</i> = 2.2 Hz)	115.4
10	—	149.2
11	7.66 (1H, dd, <i>J</i> = 8.8, 2.4 Hz)	125.7
12	8.20 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	131.3
13	—	145.9
14	7.33 (1H, s)	96.7
15	—	119.0
16	—	150.1
16a	—	156.8
17	5.44 (2H, s)	65.3
18	0.89 (3H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz)	7.8
19	1.88 (2H, m)	30.3
20	—	72.4
21	—	172.5
-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3.18 (2H, m)	22.3
-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1.29 (3H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz)	13.9
-COCH <sub>3</sub>	—	169.4
-COCH <sub>3</sub>	2.37 (3H, s)	21.0

### 2-4-3 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子の作製

#### ・良溶媒の検討

脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグを再沈法に供するために、まず良溶媒の検討を行った。再沈法に用いる有機溶媒の条件としては、1) 貧溶媒である水と混和すること、2) 媒質である SN-38 プロドラッグを溶解可能であること、3) 毒性が低いことと設定した。条件 1 および 2 は再沈法によりナノ粒子を作製するうえで必須の条件である。また、薬剤ナノ粒子の作製に使用した有機溶媒は、最終的には留去または透析による除去を行うが、残留溶媒を考慮すると、低毒性の溶媒が好ましい。有機溶媒の毒性は厚生労働省が発行している残留溶媒ガイドライン<sup>[7]</sup>を参照し、その中で毒性が低く、かつ、水との混和性が高い有機溶媒であるアセトン、エタノール、DMSO、THF を本研究で再沈法に用いる有機溶媒とした（表 2-2）。脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグのこれらの有機溶媒に対する溶解性を表 2-3 に示した。10 mM の濃度となるように有機溶媒を添加し、超音波処理後の溶解性を評価した。その結果、SN-38-C<sub>2</sub> は DMSO のみに溶解し、SN-38-C<sub>6</sub> は DMSO および THF に溶解したが、DMSO の方に易溶であった。また、SN-38-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub>、-C<sub>18</sub>、-C<sub>22</sub> は THF のみに溶解した。なお、これらのプロドラッグはアセトンおよびエタノールにはほとんど溶解しなかった。

表 2-2 低毒性の有機溶媒<sup>[7]</sup>

酢酸	ヘプタン
アセトン	酢酸イソブチル
アニソール	酢酸イソプロピル
1 - ブタノール	酢酸メチル
2 - ブタノール	3 - メチル- 1 - ブタノール
酢酸 n- ブチル	メチルエチルケトン
t- ブチルメチルエーテル	メチルイソブチルケトン
クメン	2 - メチル- 1 - プロパノール
ジメチルスルホキシド	ペンタン
エタノール	1 - ペンタノール
酢酸エチル	1 - プロパノール
ジエチルエーテル	2 - プロパノール
ギ酸エチル	酢酸プロピル
ギ酸	テトラヒドロフラン

表 2-3 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの溶解度

	アセトン	エタノール	DMSO	THF
SN-38-C <sub>2</sub>	×	×	○	×
SN-38-C <sub>6</sub>	×	×	○	○
SN-38-C <sub>10</sub>	×	×	×	○
SN-38-C <sub>14</sub>	×	×	×	○
SN-38-C <sub>18</sub>	×	×	×	○
SN-38-C <sub>22</sub>	×	×	×	○

10 mM の SN-38 プロドラッグ溶液調製時の溶解性。室温、超音波処理 5 分。

×：溶け残りが見られた、○：溶解した

・再沈法による薬剤ナノ粒子の作製

合成した SN-38 プロドラッグを用いて、再沈法による薬剤ナノ粒子の作製を行った。溶解度試験を受けて、SN-38-C<sub>2</sub>、-C<sub>6</sub>は DMSO を、SN-38-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub>、-C<sub>18</sub>、-C<sub>22</sub>は THF を良溶媒として用いた。10 mM に調製した各 SN-38 プロドラッグ溶液 100  $\mu$ L を、マイクロシリンジを用いて超純水 10 mL 中に注入することで、水分散液 (100  $\mu$ M) を得た。得られた水分散液をろ過後、SEM 観察した結果、図 2-16 に示すようなナノ構造体が確認された。SN-38-C<sub>2</sub> からはナノファイバーが得られ、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub> からは粒径 100 nm 程度の球形のナノ粒子が得られた。また、SN-38-C<sub>18</sub>、-C<sub>22</sub> からは、それぞれ長径 200 nm、200~400 nm 程度のロッド状のナノ粒子が得られた。

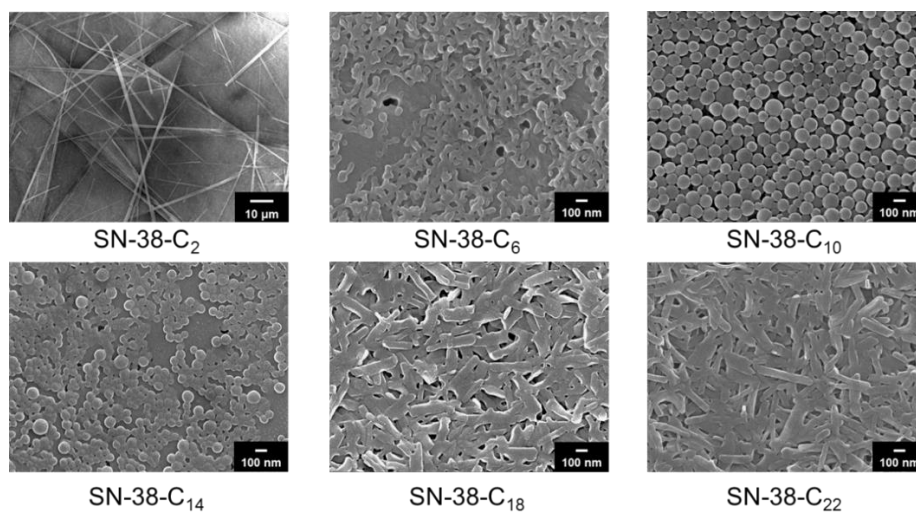


図 2-16 薬剤ナノファイバー・ナノ粒子の SEM 像

図 2-17～図 2-22 に SEM 像の拡大図、DLS による粒径測定、ゼータ電位測定の結果を示した。SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub>、-C<sub>18</sub>、-C<sub>22</sub> の薬剤ナノ粒子分散液では SEM 観察の結果と DLS による粒径測定の結果が良い一致を示した。SN-38 へ導入した脂肪酸の炭素数の違いによって、作製されたナノ構造体の形状に変化が生じた要因を検討するために、粉末法 X 線回折 (XRD) を測定した。その結果、SN-38-C<sub>2</sub> の薬剤ナノファイバーと SN-38-C<sub>6</sub> の薬剤ナノ粒子の間で顕著な XRD パターンの変化が見られた (図 2-23)。炭素数 18 の飽和カルボン酸であるステアリン酸のバルク結晶粉末の XRD パターンで観測される回折角 2.1 度のピークは長面間隔 (001 面) に由来すると帰属されている<sup>[7]</sup>。したがって、SN-38-C<sub>2</sub> と SN-38-C<sub>6</sub> の間で結晶のパッキング構造が SN-38 由来から脂肪酸由来に変わったために、形状に変化が生じたと考えられる。

作製した薬剤ナノ粒子水分散液を室温に保持し、分散安定性を目視により観察すると、SN-38-C<sub>2</sub> の水分散液では、作製直後に凝集による沈降が確認された。そのため、SN-38-C<sub>2</sub> の水分散液は粒径測定およびゼータ電位測定を実施しなかった。また、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub> の薬剤ナノ粒子の水分散液では、それぞれ 3 時間、12 時間程度で凝集した。これらに対して、SN-38-C<sub>14</sub>、-C<sub>18</sub>、-C<sub>22</sub> では 1 週間以上の分散安定性を示した。一般的に、ナノ粒子の表面電位であるゼータ電位の絶対値が大きいほど、ナノ粒子同士の静電反発により分散安定性が高まることが期待される<sup>[8]</sup>。しかしながら、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub>、-C<sub>18</sub>、-C<sub>22</sub> の薬剤ナノ粒子のゼータ電位は、それぞれ -44、-39、-49、-35、-38 mV と比較的高い値であったにもかかわらず、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub> の薬剤ナノ粒子の水分散液では、低い分散安定性を示した。したがって、脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノ粒子水分散液の系では、ゼータ電位の他に分散安定性へ影響を与える要因があると考えられる。そこで、作製 2 日後後の分散液をろ過し、SEM 観察を行った (図 2-24)。その結果、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub> は巨大な微粒子を形成していることが確認された。また、炭素数 14 以上の脂肪酸を導入した場合は、作製直後と 48 時間後の薬剤ナノ粒子において粒径に大きな変化は確認されなかった。したがって、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub> の薬剤ナノ粒子の分散安定性が低い要因は、一次粒子間の凝集によるものではなく、水分散液中で水への溶解と析出を繰り返し結晶成長が進行したためであると考えられる。

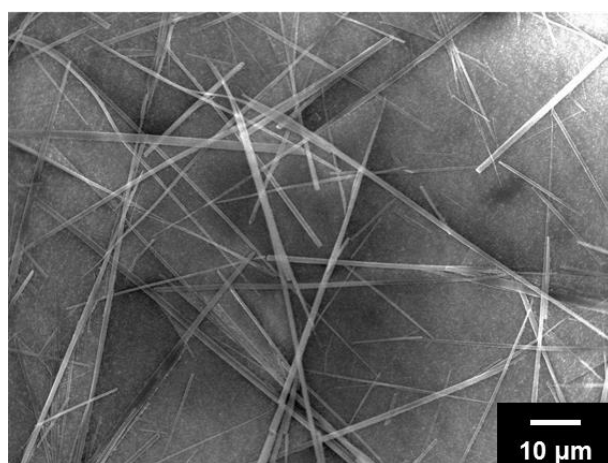
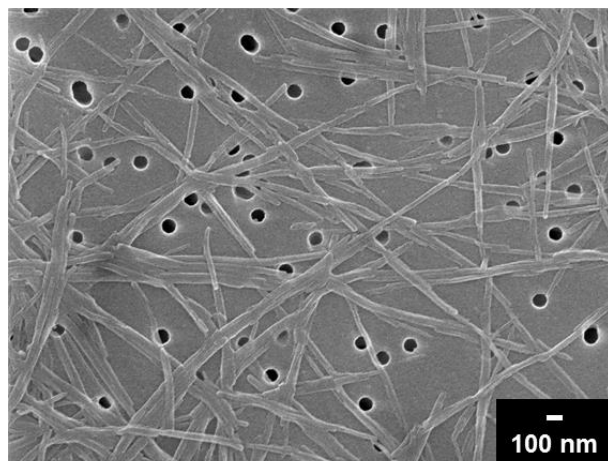


図 2-17 SN-38 (上) および SN-38-C<sub>2</sub> (下) の薬剤ナノファイバー

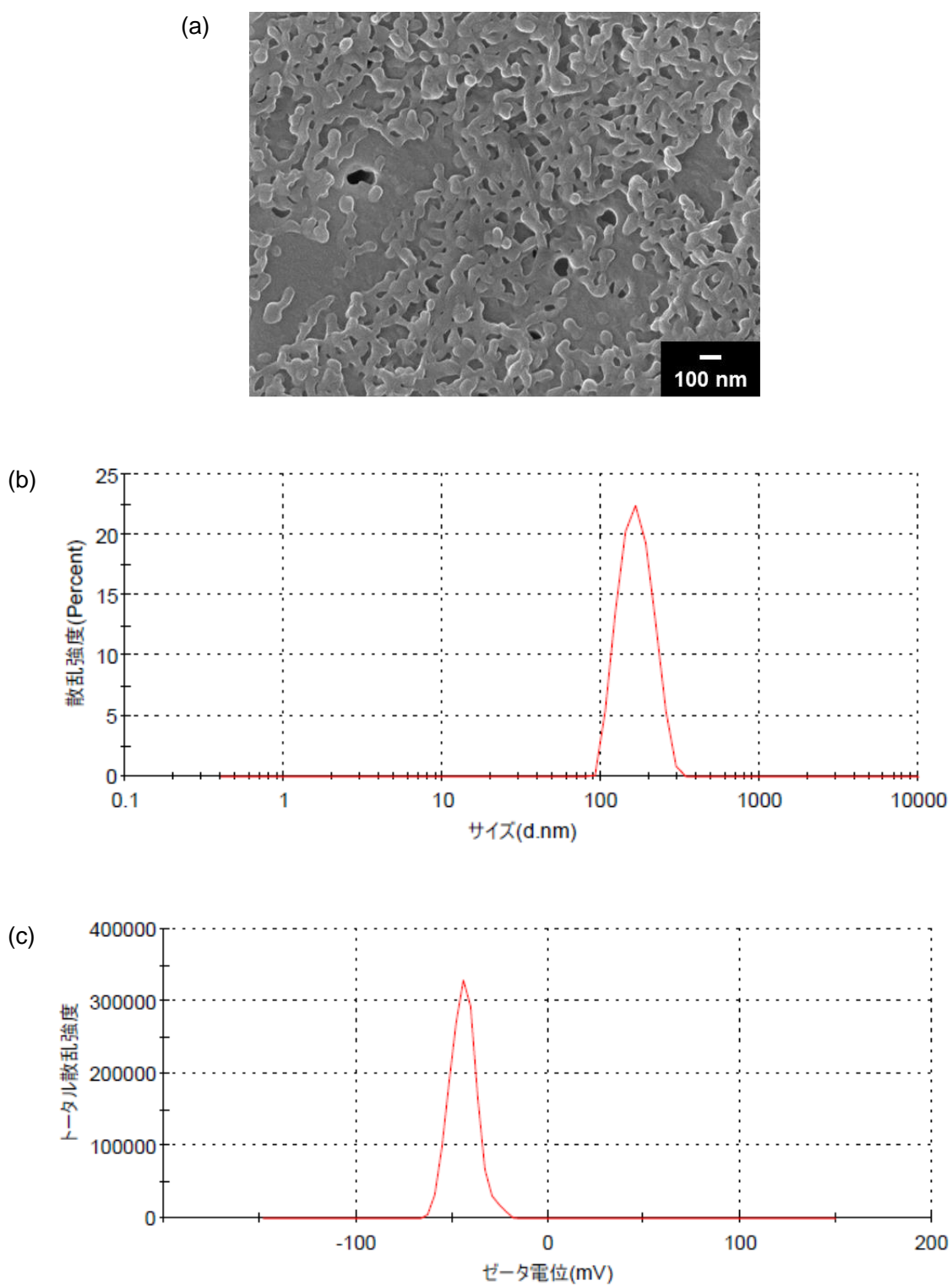


図 2-18 SN-38-C<sub>6</sub> の薬剤ナノ粒子

(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位



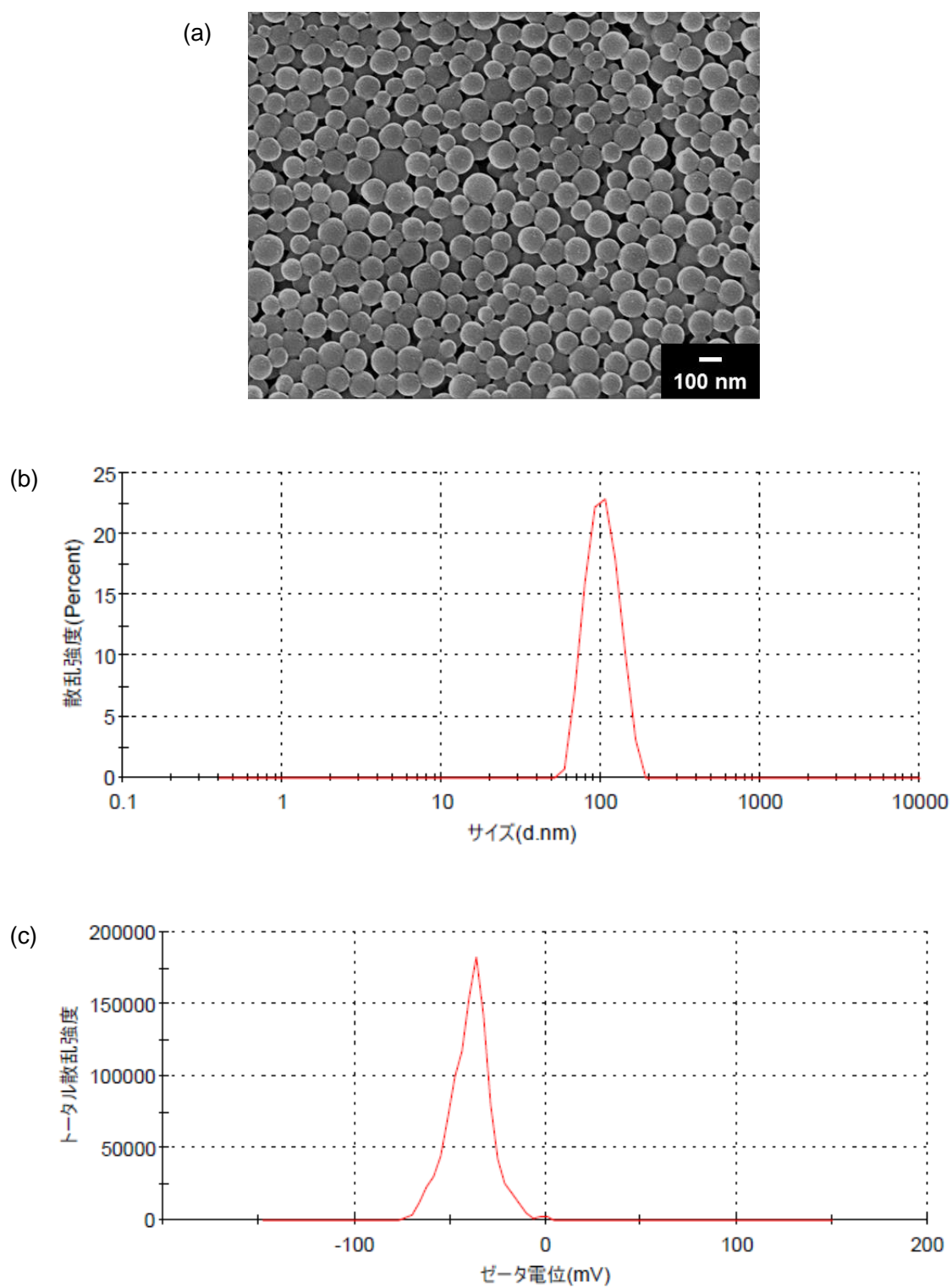


図 2-19 SN-38-C<sub>10</sub> の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

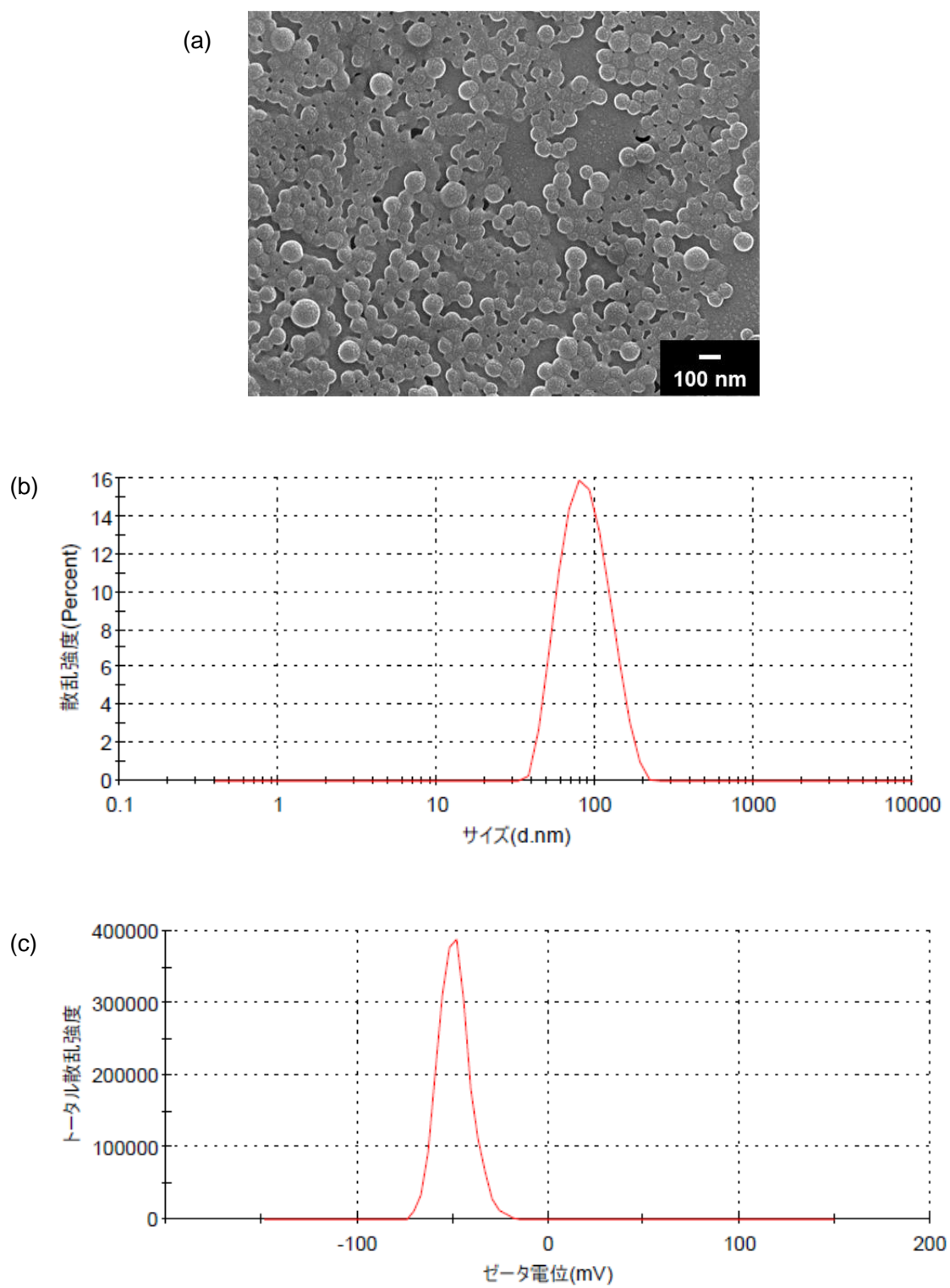


図 2-20 SN-38-C<sub>14</sub> の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

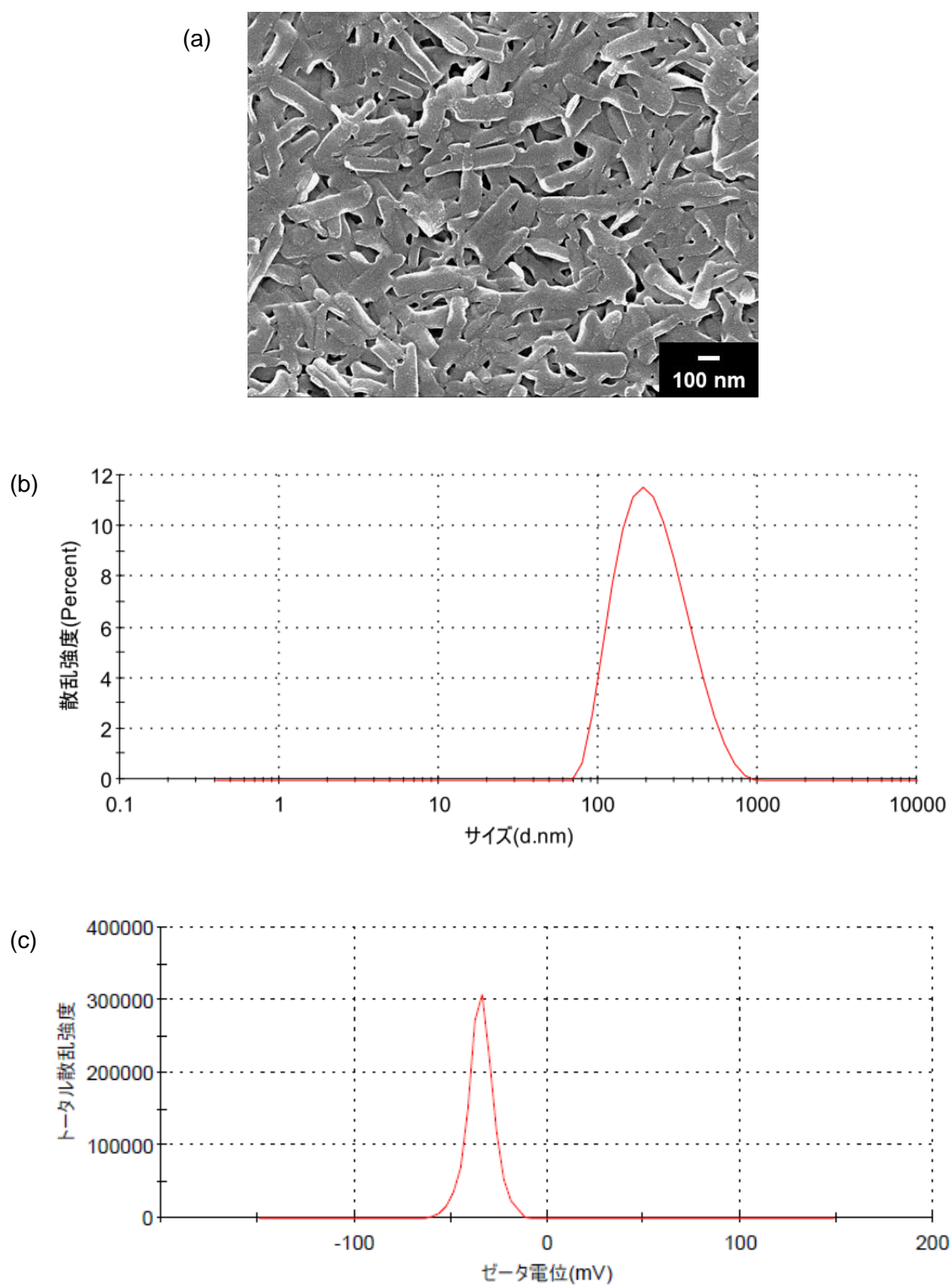


図 2-21 SN-38-C<sub>18</sub> の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

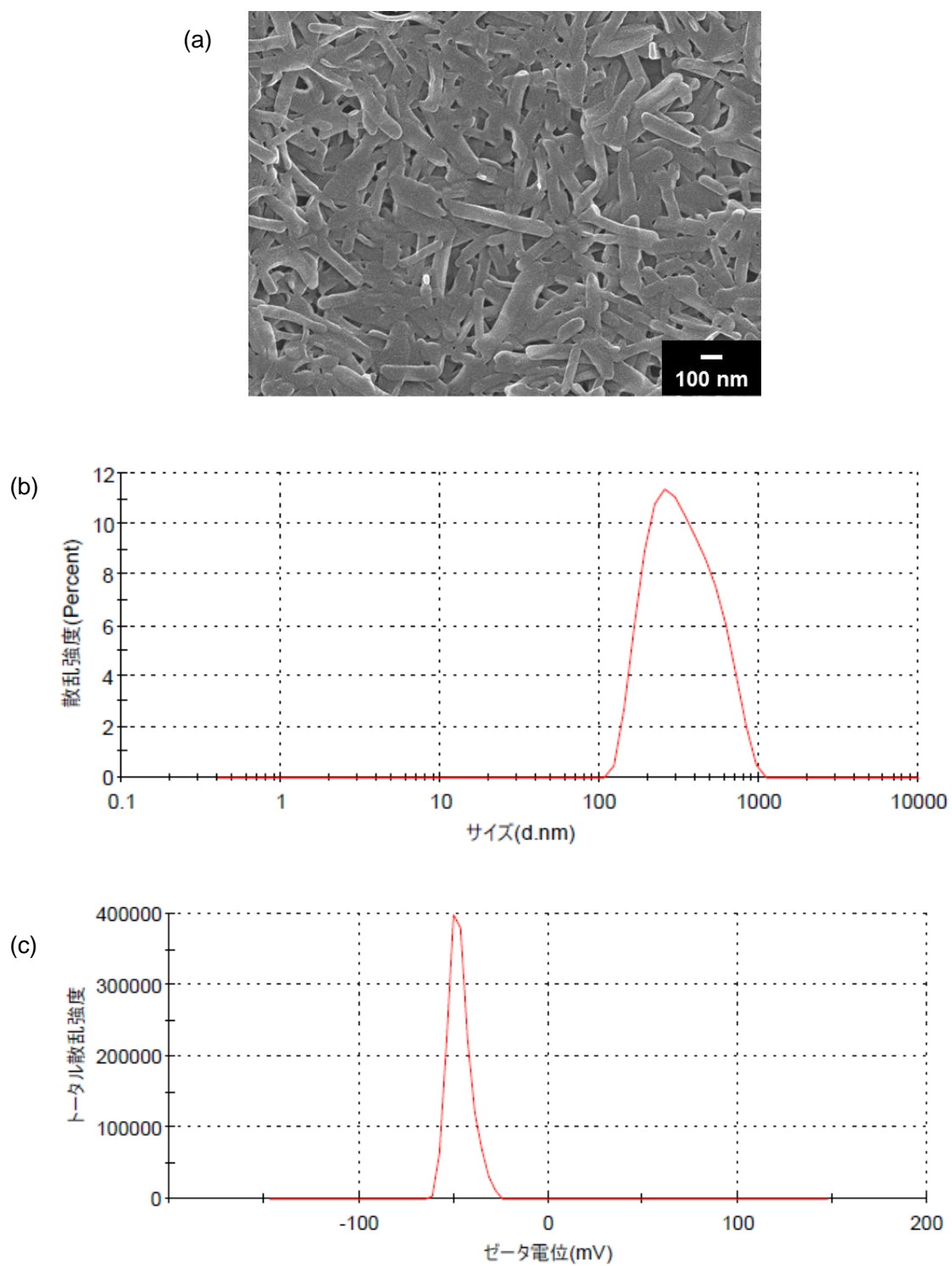


図 2-22 SN-38-C<sub>22</sub> の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

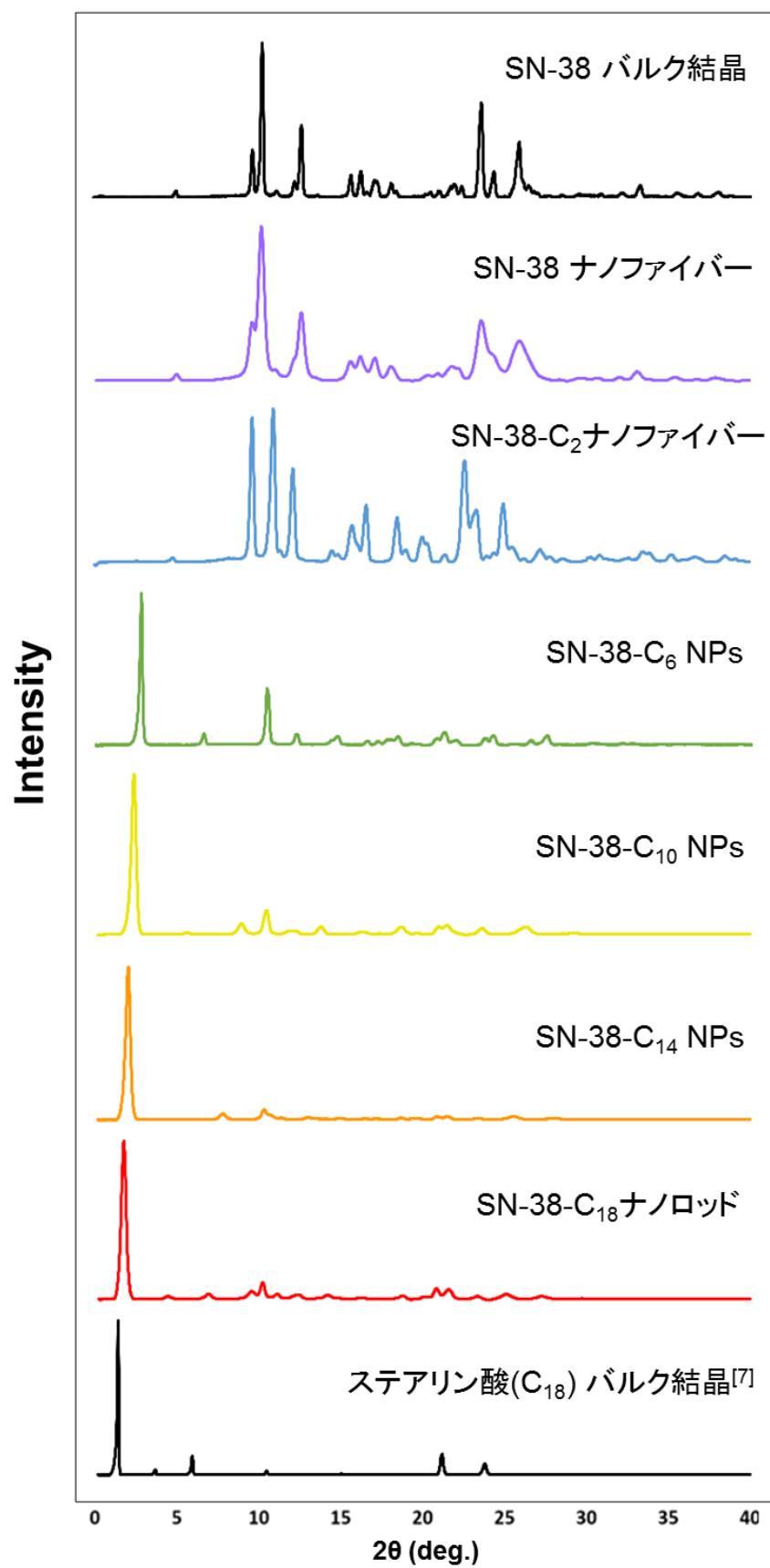


図 2-23 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノファイバー・ナノ粒子の粉末法 XRD パターン

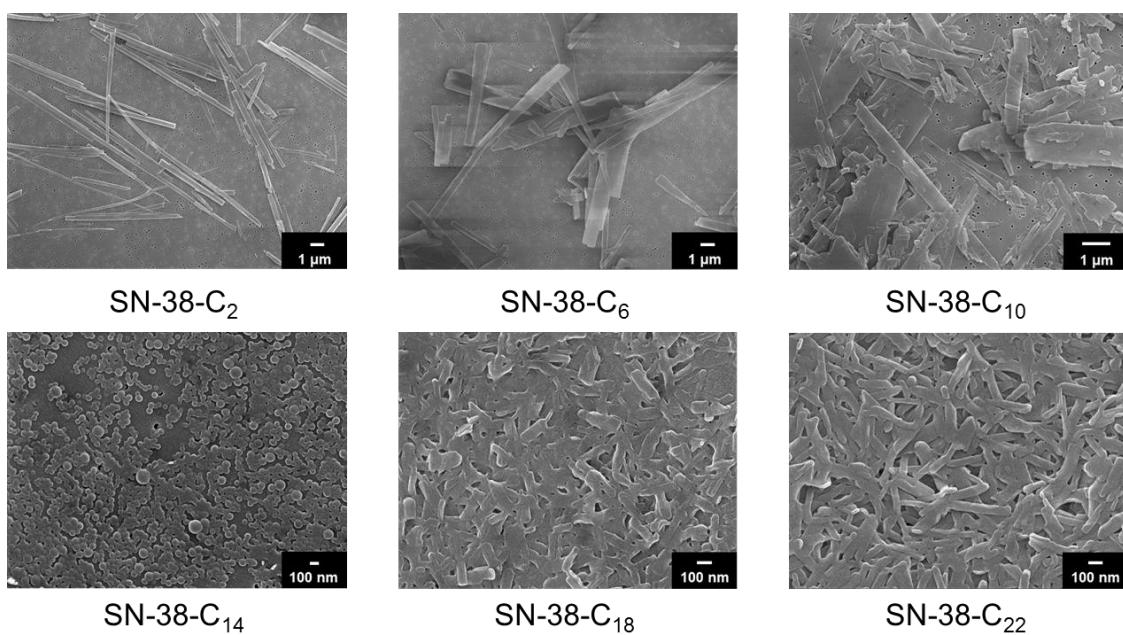


図 2-24 作製 2 日後の薬剤ナノファイバー・ナノ粒子の SEM 像

## 2-5 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の血清中加水分解性

脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノファイバーおよびナノ粒子を用いてマウス血清中における加水分解性を調べた。100  $\mu\text{M}$  に調製した水分散液 9  $\mu\text{L}$  をマウス血清 81  $\mu\text{L}$  と混合し、37  $^{\circ}\text{C}$  の恒温槽中で 1 時間インキュベートした。その後、クロロホルム 90  $\mu\text{L}$  を用いて抽出し、遠心分離によって水層とクロロホルム層を分離した。クロロホルム層 60  $\mu\text{L}$  をアセトニトリル 540  $\mu\text{L}$  により希釈した試料を HPLC-MS/MS 測定に供し、SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のマウス血清中における加水分解耐性を以下の式より求めた。

$$\text{加水分解耐性 (\%)} = A_1/A_0 \times 100$$

$A_0$ : 血清処理前の試料の SN-38 プロドラッグのピーク面積

$A_1$ : 血清と混合 1 時間後の試料の SN-38 プロドラッグのピーク面積

HPLC-MS/MS 測定により得られたクロマトグラムを図 2-25～図 2-30 に示した。黒色のラインが血清処理前の試料、赤色のラインが血清と混合 1 時間後の試料を測定した結果である。SN-38- $\text{C}_2$ 、- $\text{C}_6$ 、 $\text{C}_{10}$  の薬剤ナノファイバー・ナノ粒子では 0.7、1.0、2.8 の加水分解耐性の値を示し、マウス血清中において 1 時間以内にほぼ加水分解が完了した。一方、脂肪酸の炭素数が 14 以上となると、急激に加水分解が抑制され、SN-38- $\text{C}_{14}$ 、- $\text{C}_{18}$ 、 $\text{C}_{22}$  の薬剤ナノ粒子では加水分解耐性の値は 76、84、90 となり、炭素数が増加するほど加水分解耐性が向上する傾向にあった。

脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の加水分解耐性が、脂肪酸の炭素数によって変化した要因を考察する。§ 2-3 で述べた通り、薬剤ナノ粒子の加水分解経路は、粒子表面から進行する経路と、薬剤ナノ粒子から放出された構成分子が加水分解される経路が考えられる。粒子表面からの加水分解を考えると、脂肪酸の炭素数の増加に伴って置換基の体積が増加し、粒子表面に表出しているエステル結合部位の割合が相対的に減少するために、脂肪酸の炭素数の増加に伴って加水分解が抑制されたと考察した。対して、薬剤ナノ粒子から放出された構成分子の加水分解を考えると、脂肪酸の炭素数の増加に伴って SN-38 プロドラッグの疎水性が向上するため、作製された薬剤ナノ粒子のマウス血清（水系）への溶解度が低下すると想定される。その結果、薬剤ナノ粒子から放出される構成分子の数が減少するために、脂肪酸の炭素

数の増加に伴って加水分解が抑制されたと考えられる。ここで、薬剤ナノ粒子から放出される分子数が同一であると仮定すると、脂肪酸の炭素数が増加するにつれて、エステル結合周辺が嵩高くなるため、保護効果<sup>[9,10]</sup>により加水分解が抑制されるはずである。したがって、脂肪酸の炭素数を変化させると、置換基が SN-38 プロドラッグに占める割合や SN-38 プロドラッグの疎水性、またはエステル結合周辺の嵩高さが同時に変化するため、どの要因が薬剤ナノ粒子の加水分解性に寄与するか判別することが困難となる。そこで、置換基の体積およびエステル結合周辺の嵩高さを一定にするために、胆汁酸系化合物を SN-38 に導入した。同一の炭素骨格を有する化合物を用いて含有する水溶性置換基（水酸基）の数で疎水性を変化させ、SN-38 プロドラッグの疎水性に応じた薬剤ナノ粒子の加水分解性の違いを調べた。その詳細を次節で記述する。



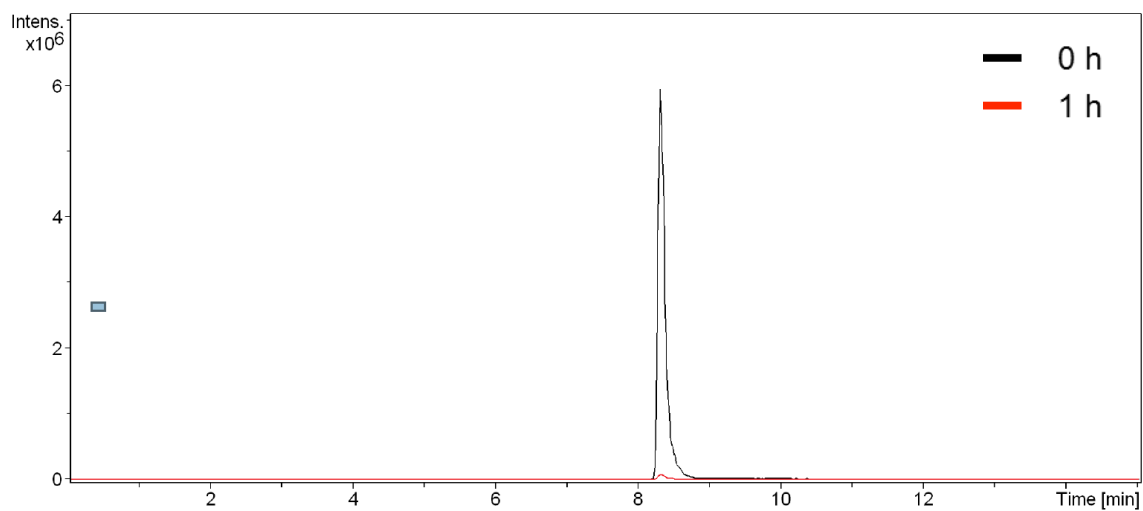


図 2-25 SN-38-C<sub>2</sub> 薬剤ナノファイバーのマウス血清中加水分解性

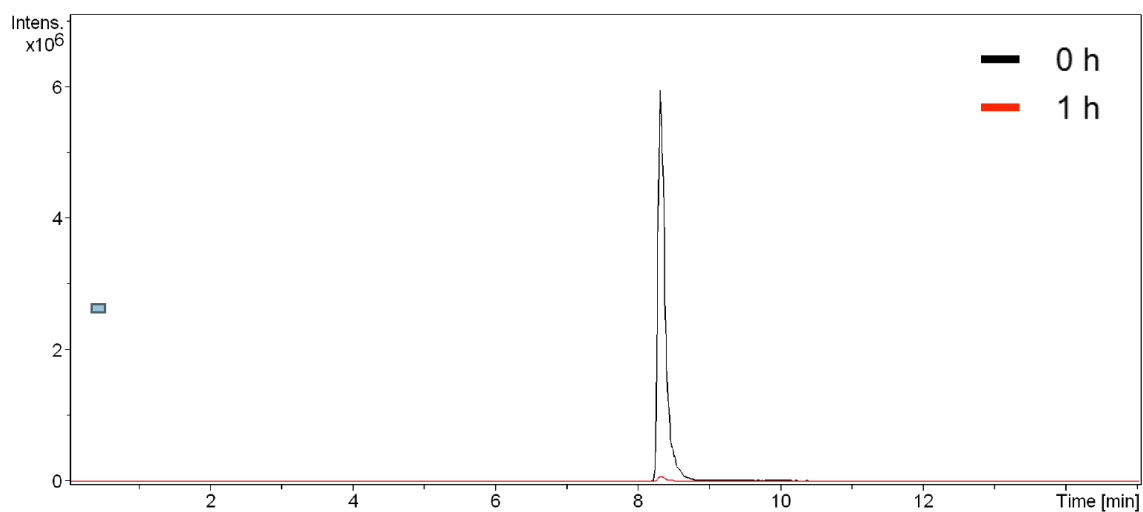


図 2-26 SN-38-C<sub>6</sub> 薬剤ナノ粒子のマウス血清中加水分解性

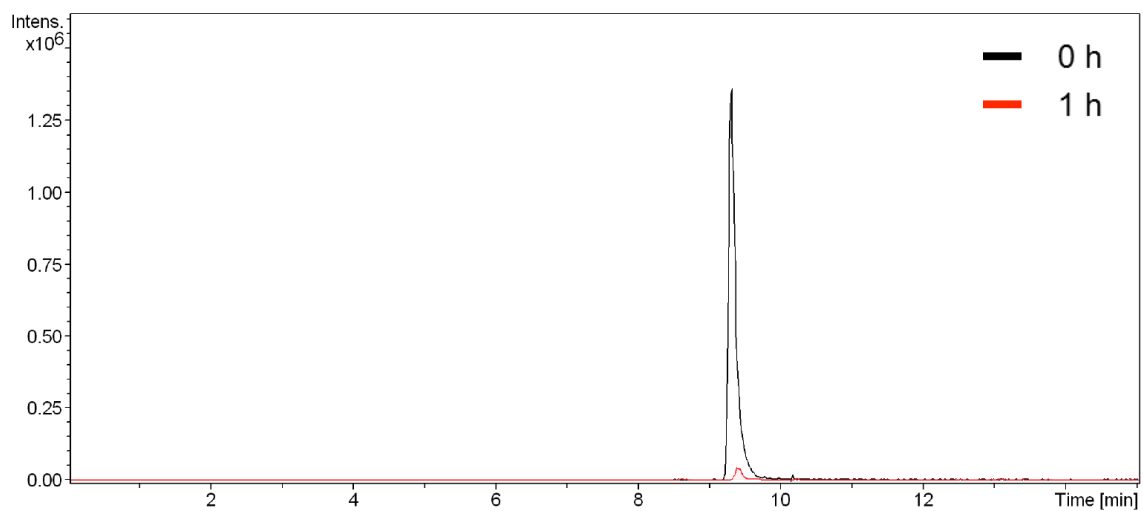


図 2-27 SN-38-C<sub>10</sub> 薬剤ナノ粒子のマウス血清中加水分解性

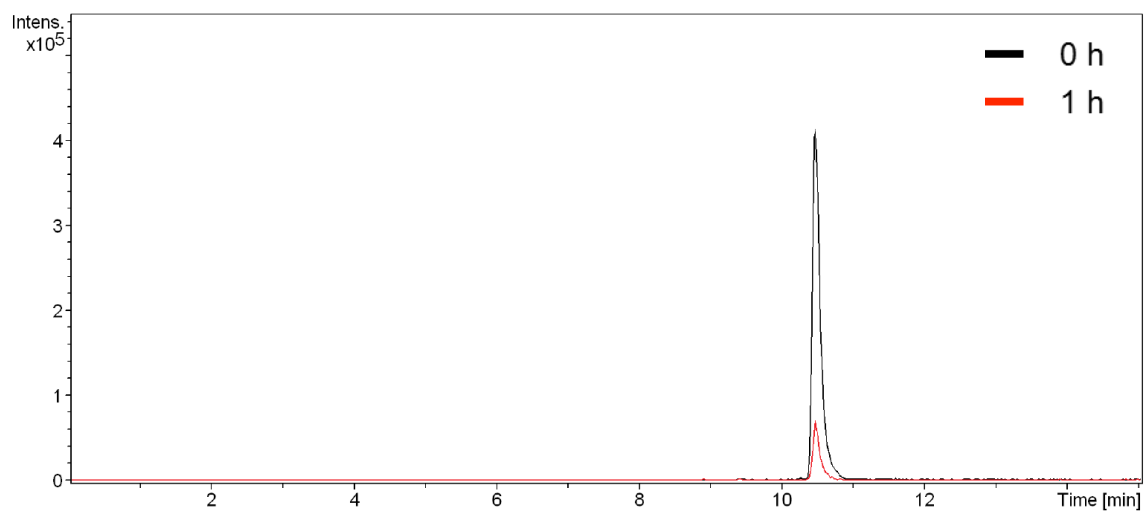


図 2-28 SN-38-C<sub>14</sub> 薬剤ナノ粒子のマウス血清中加水分解性

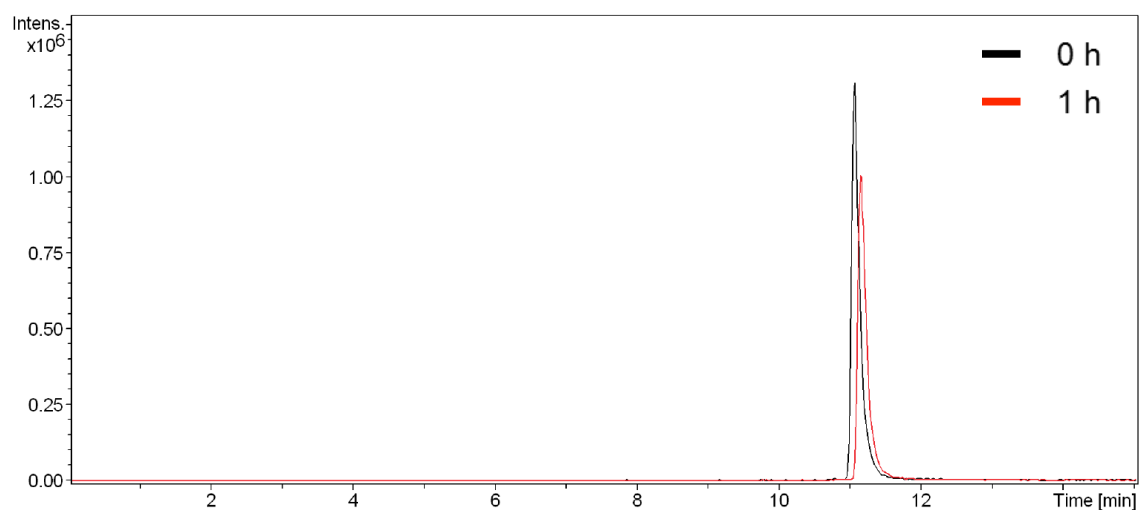


図 2-29 SN-38-C<sub>18</sub> 薬剤ナノ粒子のマウス血清中加水分解性

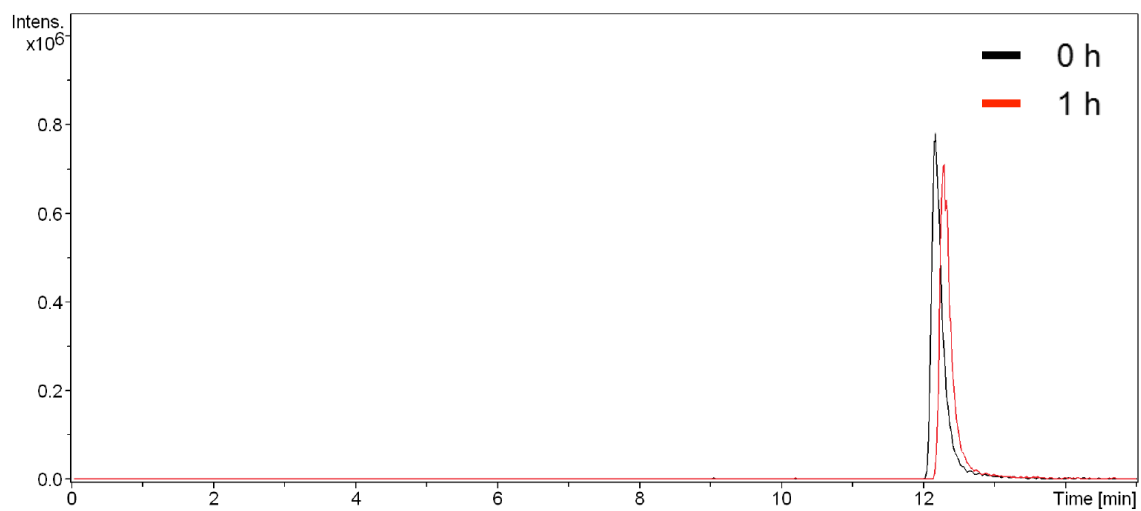


図 2-30 SN-38-C<sub>22</sub> 薬剤ナノ粒子のマウス血清中加水分解性

## 2-6 胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒

脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のマウス血清中における加水分解耐性は脂肪酸の炭素数の増加に伴って向上した。加水分解耐性が向上した要因が、粒子表面のエステル結合部位の割合の差によるものか、薬剤ナノ粒子からの構成化合物の放出挙動の差か、あるいは、放出された化合物の立体障害による反応性の差かを検討するために、胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子を作製し、マウス血清中における加水分解性を評価した。

使用した胆汁酸系化合物の構造式を図 2-31 に示した。リトコール酸、デオキシコール酸、コール酸は同一の炭素骨格を有する化合物であり、SN-38 と結合させてプロドラッグとした場合、結合部周辺の構造が非常に類似しているため、加水分解における置換基の体積および立体障害の影響は少ないと考えられる。一方、これらの化合物は、それぞれ 1、2、3 個の水酸基を有するため、水酸基の数に応じて SN-38 プロドラッグの疎水性を変化させることが可能となる。

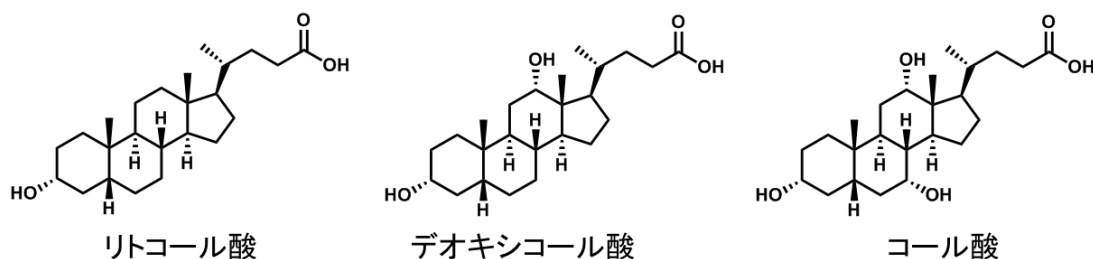
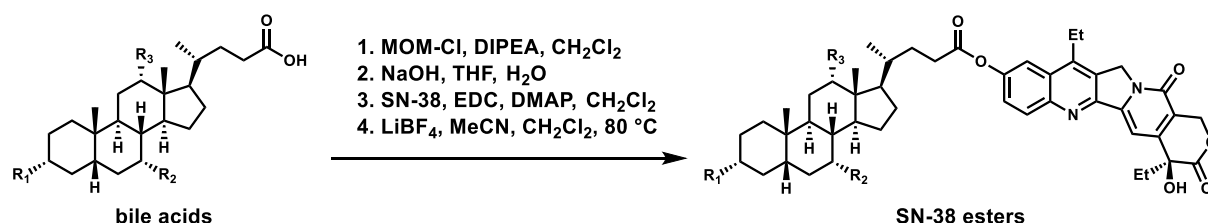


図 2-31 胆汁酸系化合物の化学構造

## 2-6-1 胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグの合成

胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグの合成をスキーム 2-2 に示した。SN-38 とリトコール酸、デオキシコール酸、コール酸の MOM 保護体とを反応させエステル体とし、 $\text{LiBF}_4$ <sup>[11,12]</sup>を用いて MOM 基を脱保護することで SN-38 lithocholate、SN-38 deoxycholate、SN-38 cholate を合成した。SN-38 cholate MOM 保護体の脱保護反応の検討を表 2-4 に示した。一般的な MOM 基の脱保護条件である HCl もしくは TFA を用いた条件下では、複雑な生成物を与えると共に酸加水分解により SN-38 が少量再生された。一方、弱ルイス酸である  $\text{LiBF}_4$  を用いて脱保護反応を行った場合は、酸加水分解を起こすことなく反応が進行し、脱保護体である SN-38 cholate が良好な収率で得られた。同様の脱保護条件を用いて SN-38 lithocholate および SN-38 deoxycholate を合成した。



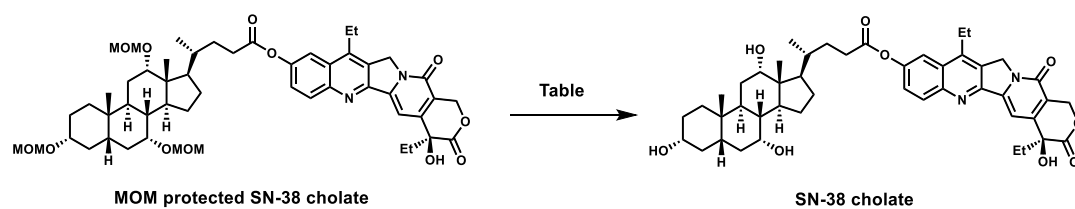
SN-38 lithocholate ( $\text{R}_1 = \text{OH}$ ,  $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$ ): 64% (4 steps)

SN-38 deoxycholate ( $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{OH}$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$ ): 18% (4 steps)

SN-38 cholate ( $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OH}$ ): 72% (4 steps)

スキーム 2-2 胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグの合成

表 2-4 MOM 基の脱保護条件の検討



entry	condition	results
1	0.2 M HCl, dioxane, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	complex mixture
2	TFA (6 eq.), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	complex mixture
3	LiBF <sub>4</sub> (10 eq.), MeCN, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 80 °C	87%

## 2-6-2 胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子の作製

合成した SN-38 プロドラッグを用いて、再沈法による薬剤ナノ粒子の作製を行った。胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグでは、いずれも THF を良溶媒として用いた。10 mM に調製した各 SN-38 プロドラッグ溶液 100  $\mu$ L を、マイクロシリンジを用いて超純水 10 mL 中に注入することで、水分散液 (100  $\mu$ M) を得た。得られた水分散液をろ過後、SEM 観察した結果、図 2-32 に示すようにそれぞれ 50 nm 程度の球状のナノ粒子が確認された。

図 2-33～図 2-35 に SEM 像の拡大図、DLS による粒径測定、ゼータ電位測定の結果を示した。DLS により測定した粒度分布は、SEM により観察された一次粒子径と概ね一致した。また、作製した薬剤ナノ粒子水分散液を室温に保持した際の分散安定性を目視により観察すると、いずれの水分散液も 1 週間以上の良好な分散安定性を示した。

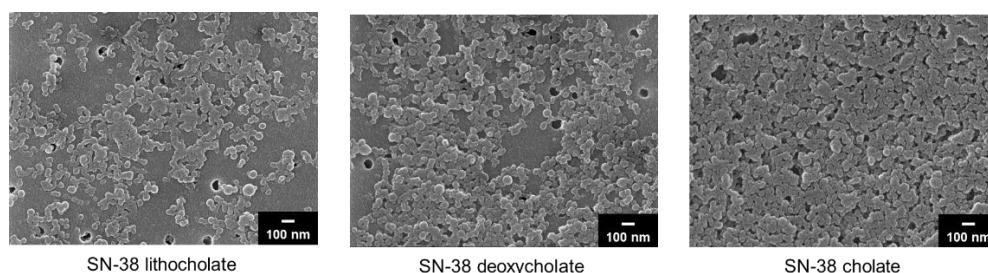


図 2-32 胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の SEM 像

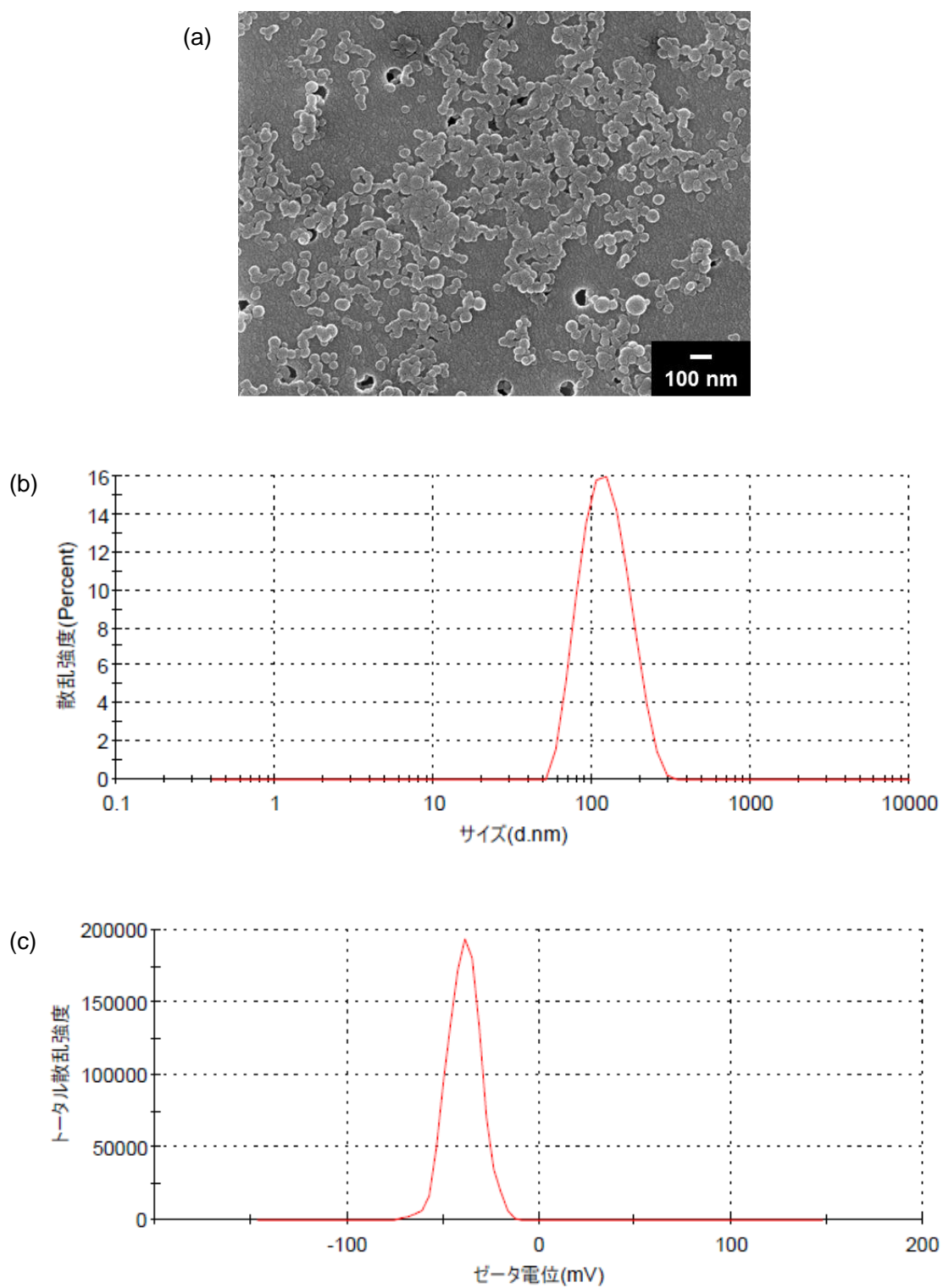


図 2-33 SN-38 lithocholate の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

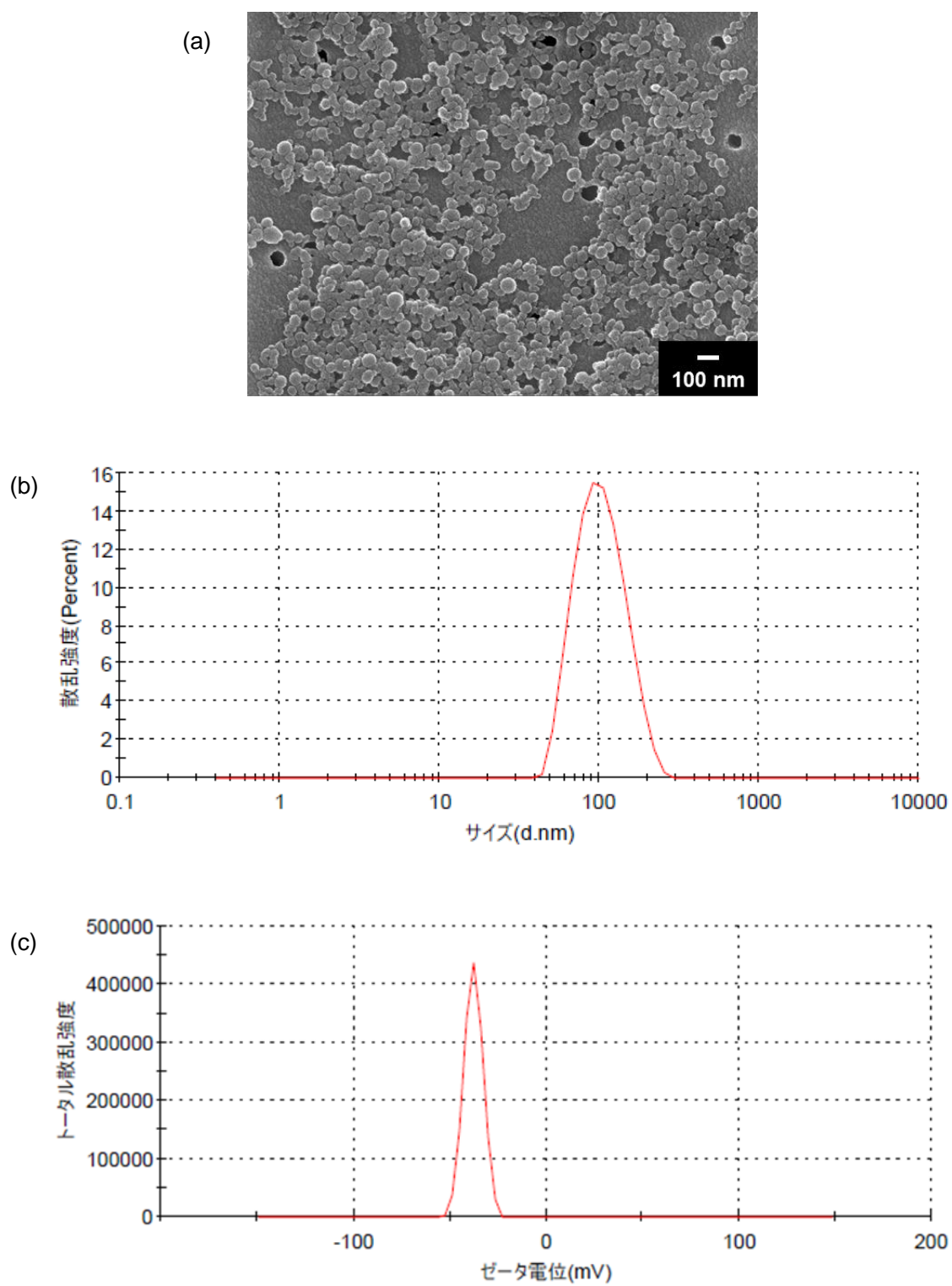


図 2-34 SN-38 deoxycholate の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位



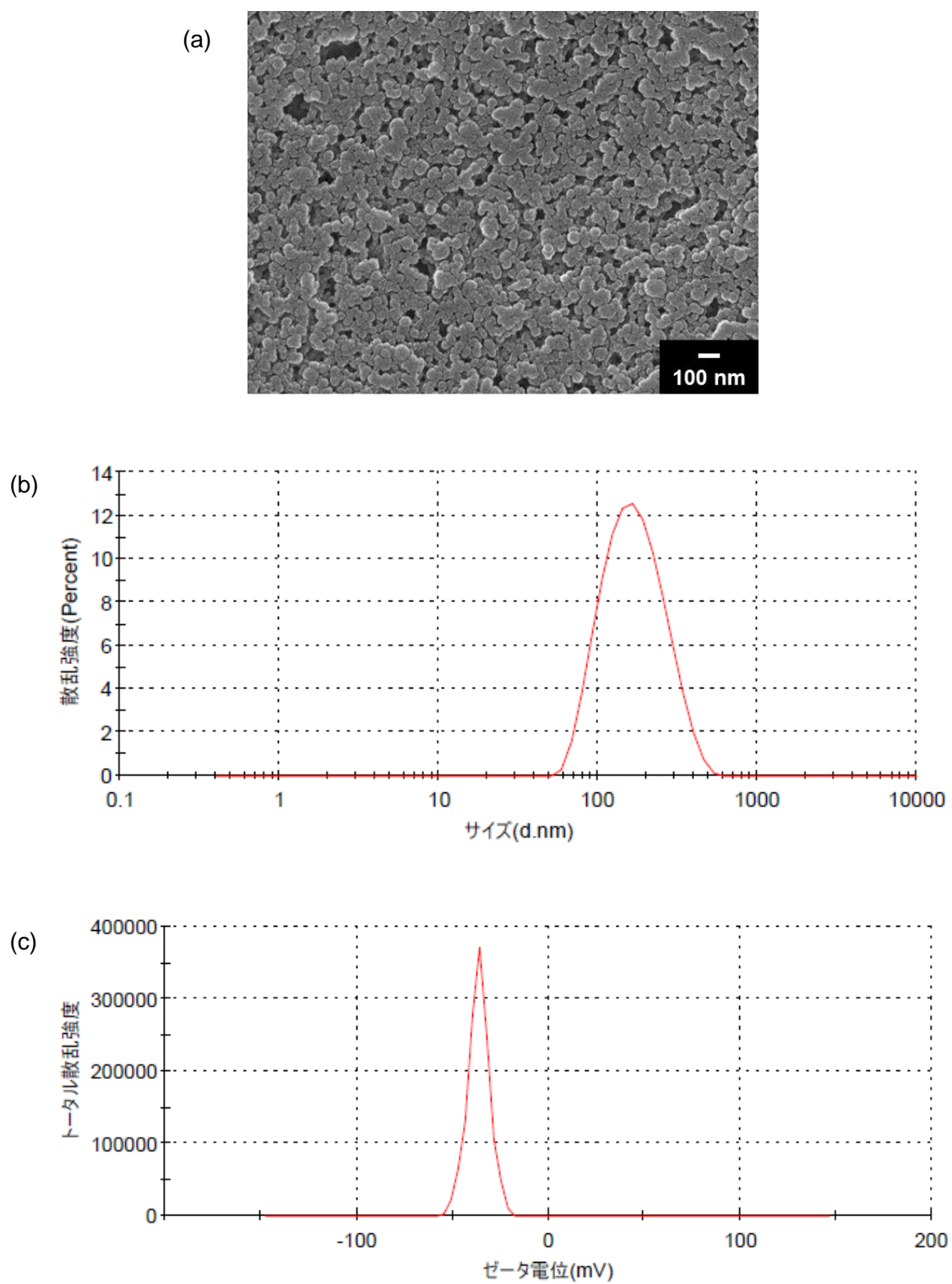


図 2-35 SN-38 cholate の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

### 2-6-3 胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の血清中加水分解性

胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノ粒子を用いて、マウス血清中における加水分解性を調べた。マウス血清と薬剤ナノ粒子を 1 時間混合した試料の HPLC-MS/MS 測定の結果得られたクロマトグラムを図 2-36 に示した。SN-38 lithocholate、deoxycholate、cholate の薬剤ナノ粒子は、それぞれ 61、4.7、2.1 の加水分解耐性の値を示し、置換基に含まれる水酸基の数が減少するほど加水分解耐性が向上した。

胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の、血清中における加水分解性の検討では、置換基の体積およびエステル結合周辺の嵩高さは概ね一定であるため、薬剤ナノ粒子の加水分解性の違いは置換基の水酸基の数、すなわち疎水性の影響を強く受けたと考えられる。つまり、SN-38 プロドラッグの疎水性が低下するほど、薬剤ナノ粒子の血清中における溶解度が向上するために、加水分解の進行が促進されたと結論付けた。以上の実験結果を踏まえると、想定される薬剤ナノ粒子の加水分解経路のうち、粒子表面から進行する経路よりも、薬剤ナノ粒子から放出された構成分子が加水分解を受ける経路の方が、妥当な加水分解経路であると考えられる（図 2-37）。

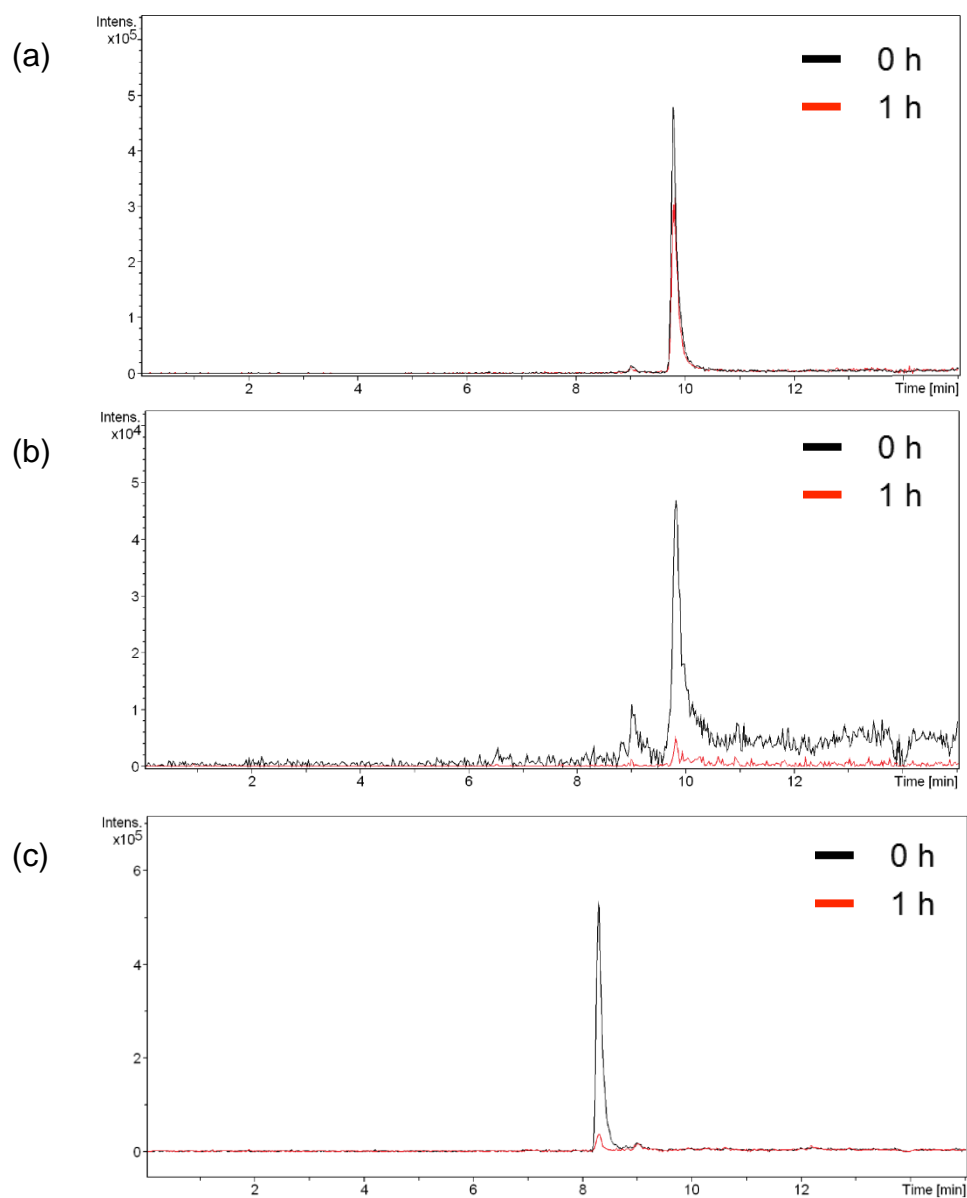


図 2-36 胆汁酸系化合物を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のマウス血清中加水分解性。(a) SN-38 lithocholate、(b) SN-38 deoxycholate、(c) SN-38 cholate

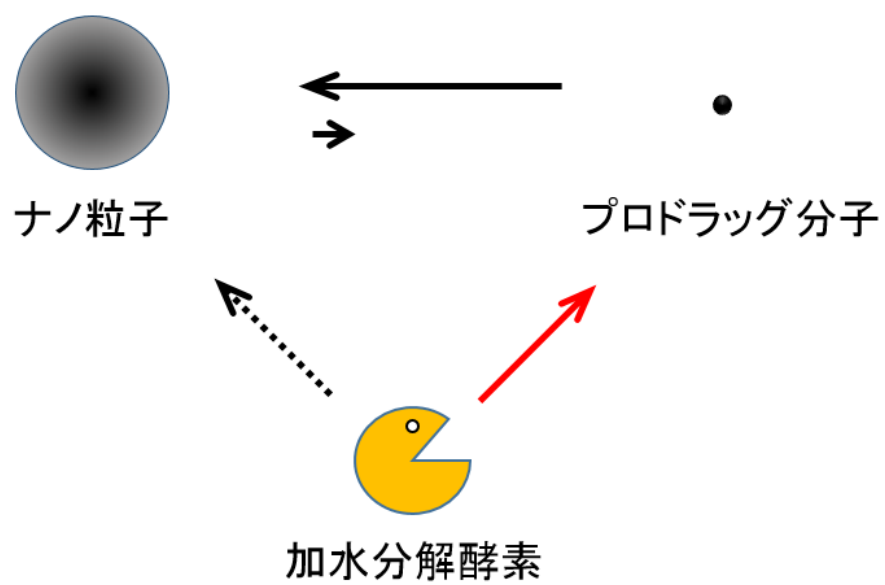


図 2-37 薬剤ナノ粒子の加水分解経路

## 2-7 様々な置換基を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子

前節では、SN-38 プロドラッグの疎水性を向上させるほど、薬剤ナノ粒子の加水分解耐性がより高くなることを明らかにした。特に、SN-38 lithocholate の薬剤ナノ粒子は、高い加水分解耐性の値を示したが、リトコール酸は肝毒性等の副作用が報告されているため<sup>[13,14]</sup>、本研究における疎水性置換基としては適用しにくい。そこで、毒性の低い置換基として、安息香酸、メントール、ビタミン E、ビタミン D<sub>3</sub>、コレステロールを新たな置換基として用い（図 2-38）、これらの疎水性置換基を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のマウス血清中における加水分解性をさらに検討した。

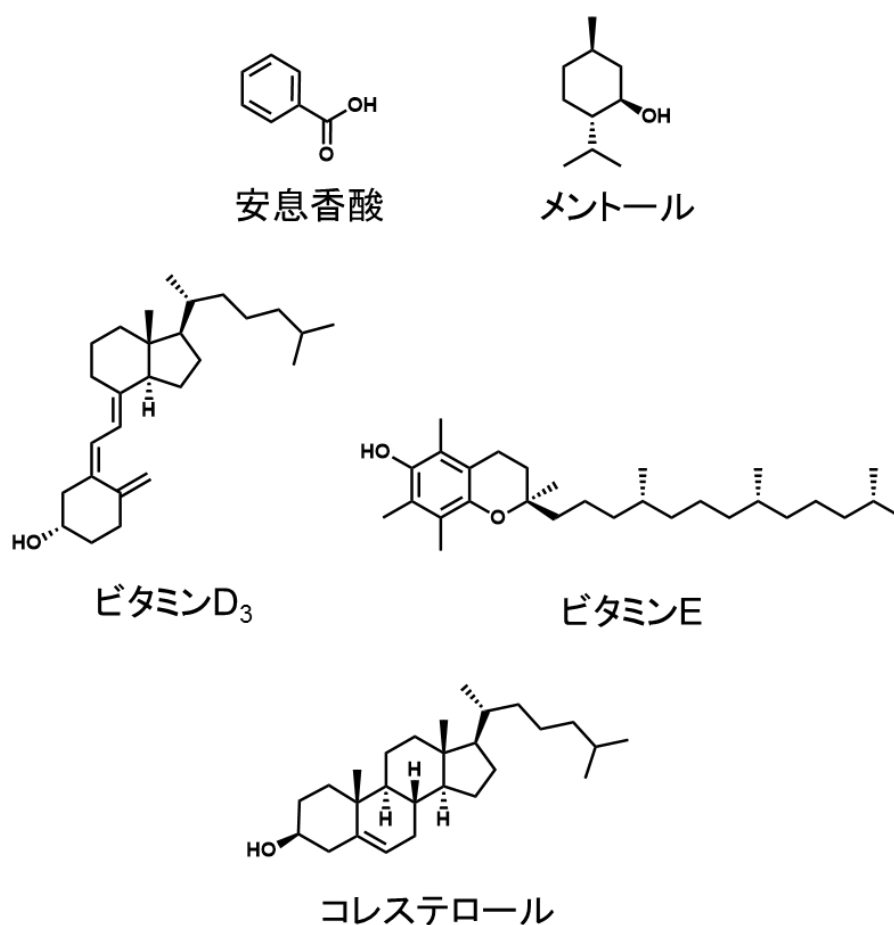
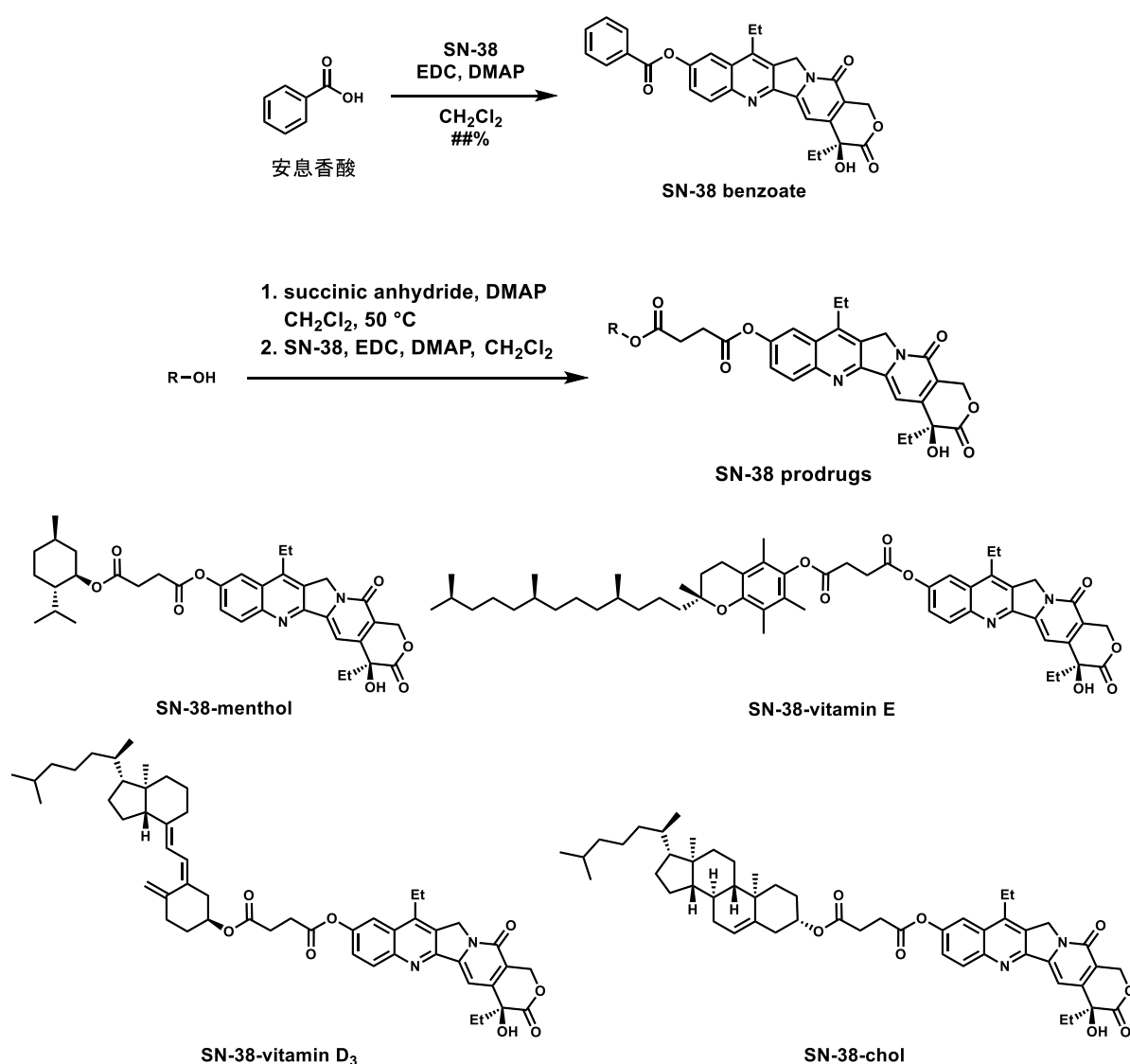


図 2-38 新たに SN-38 へ導入する疎水性置換基

## 2-7-1 様々な置換基を導入した SN-38 プロドラッグの合成

メントール、安息香酸、ビタミン E、ビタミン D<sub>3</sub>、コレステロールを導入した SN-38 プロドラッグの合成をスキーム 2-3 に示した。SN-38 と安息香酸を EDC、DMAP の縮合条件で反応させて SN-38 benzoate を合成した。また、メントール、ビタミン E、ビタミン D<sub>3</sub>、コレステロールの反応点は水酸基であるため、同じく水酸基を有する SN-38 と結合させるために、コハク酸をリンカーして用いた。まず、コハク酸無水物との反応によりコハク酸を導入し、次に SN-38 と反応させることで、SN-38-menthol、SN-38-vitamin E および SN-38-cholesterol (SN-38-chol) を合成した。



スキーム 2-3 SN-38 プロドラッグの合成

## 2-7-2 様々な置換基を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子の作製

合成した SN-38 プロドラッグを用いて、再沈法による薬剤ナノ粒子の作製を行った。THF を良溶媒として用いて 10 mM に調製した各 SN-38 プロドラッグ溶液 100  $\mu$ L を、マイクロシリンジを用いて超純水 10 mL 中に注入することで、水分散液 (100  $\mu$ M) を作製した。得られた水分散液をろ過後、SEM 観察した結果、図 2-39 に示すような球状のナノ粒子が確認された。

図 2-40～図 2-44 に SEM 像の拡大図、DLS による粒径測定、ゼータ電位測定の結果を示した。SEM 観察 DLS により測定した粒度分布は、SN-38 benzoate を除き、SEM により観察された一次粒子径と概ね一致した。また、作製した薬剤ナノ粒子水分散液を室温に保持した際の分散安定性を目視により観察すると、SN-38 benzoate は作製直後に凝集による沈降が確認された。SN-38-menthol、SN-38-vitamine D<sub>3</sub>、SN-38-vitamine E および SN-38-chol では 1 週間以上の分散安定性を示した。特に、SN-38-chol の薬剤ナノ粒子は少なくとも半年程度の室温保持では凝集は確認されず、良好な分散安定性を示した。

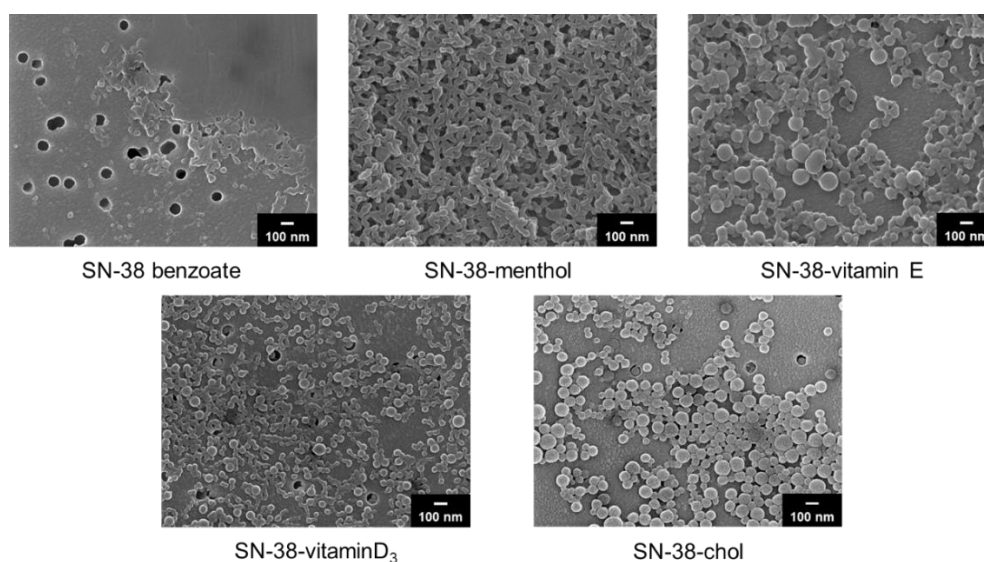


図 2-39 SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノ粒子の SEM 像

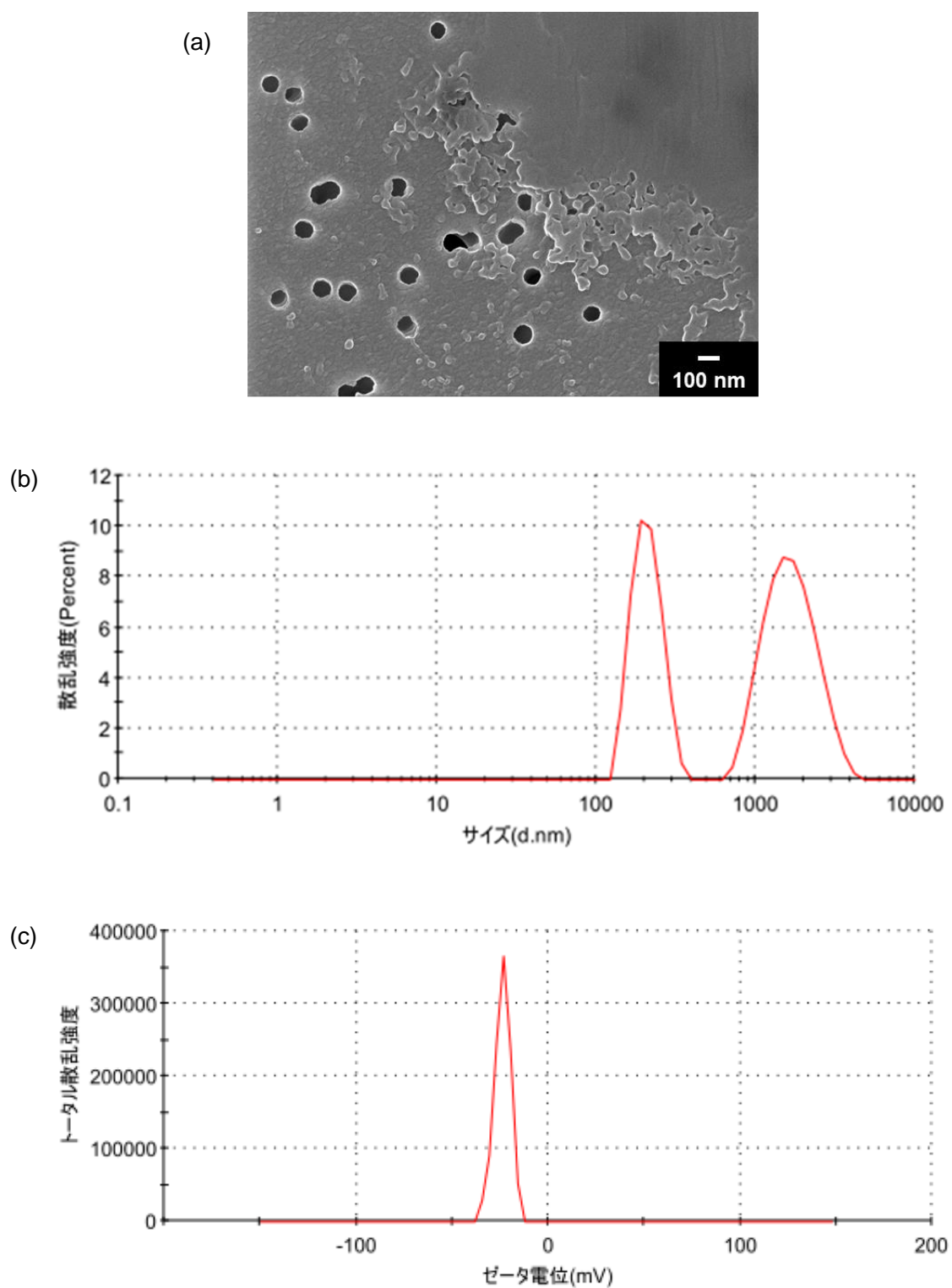


図 2-40 SN-38 benzoate の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位



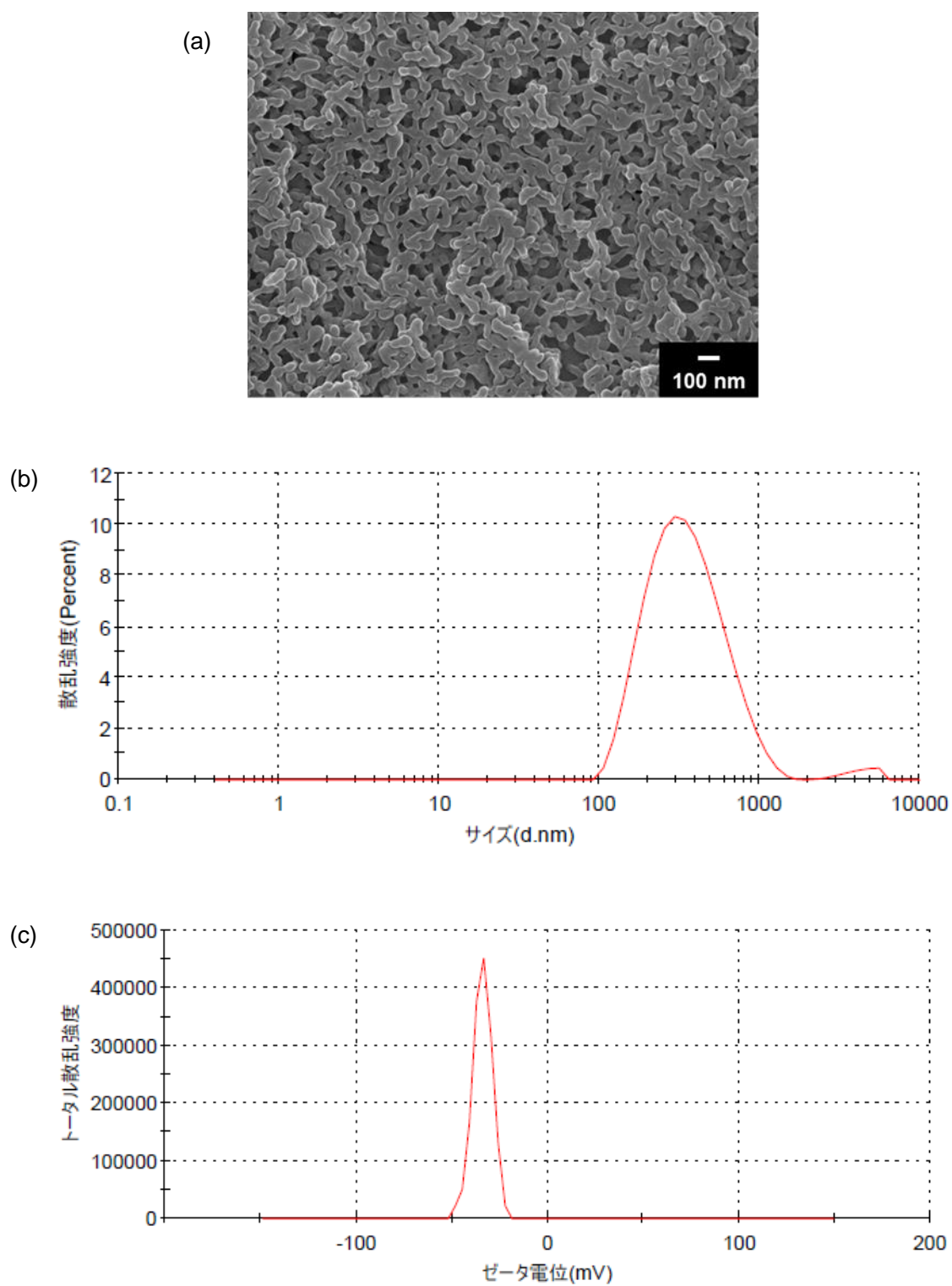


図 2-41 SN-38-menthol の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

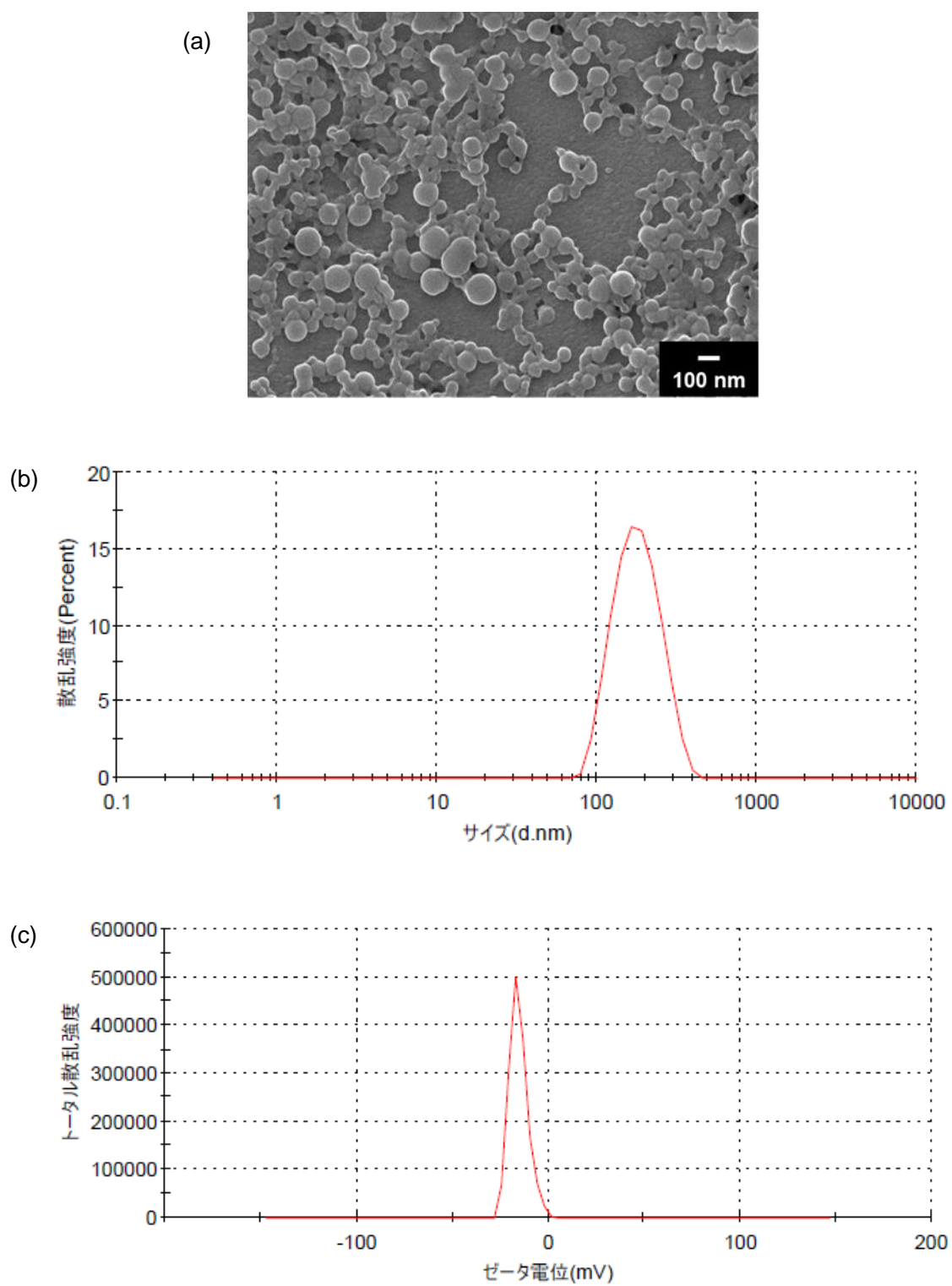


図 2-42 SN-38-vitamin E の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

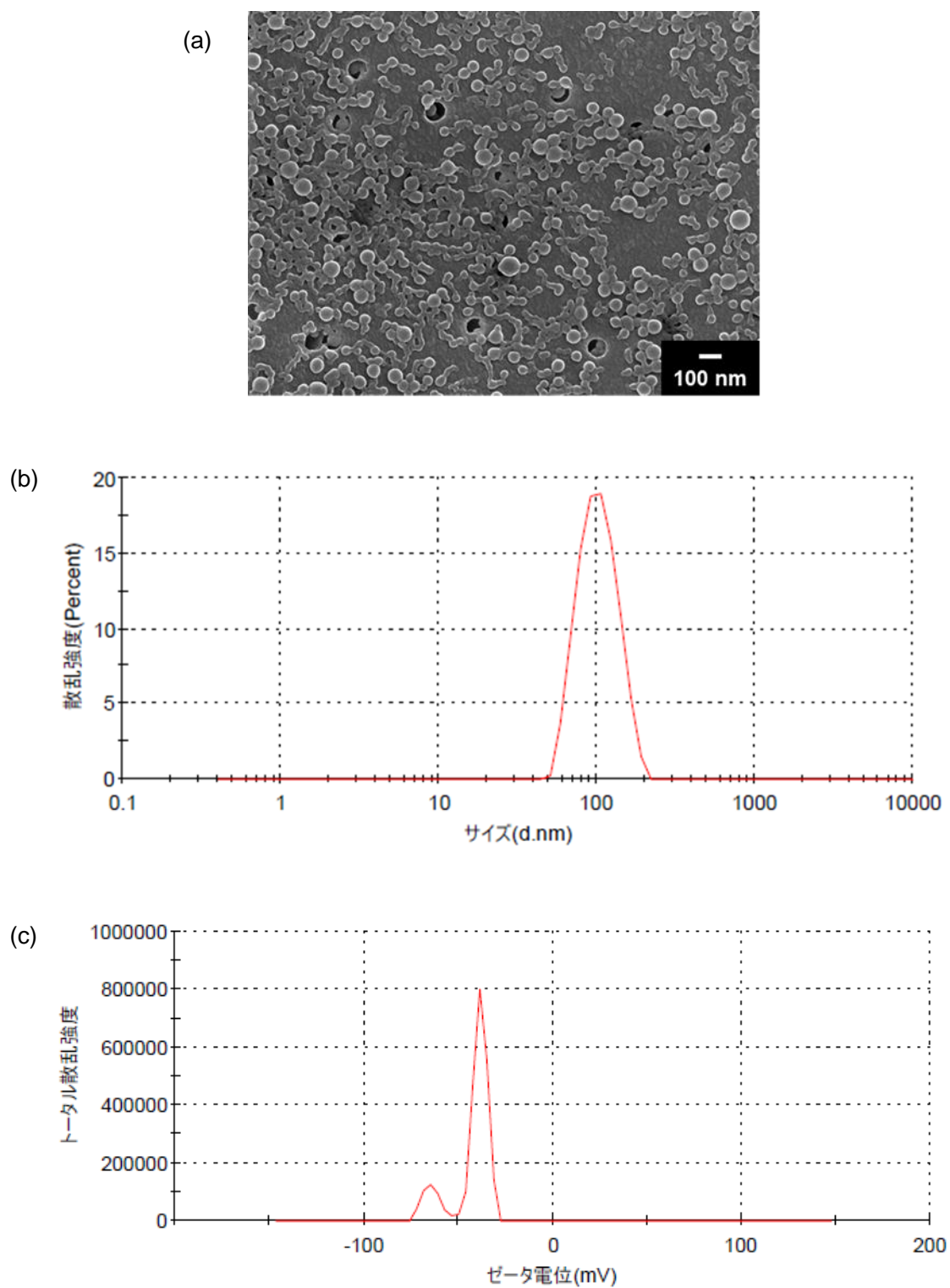


図 2-43 SN-38-vitamin D<sub>3</sub> の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

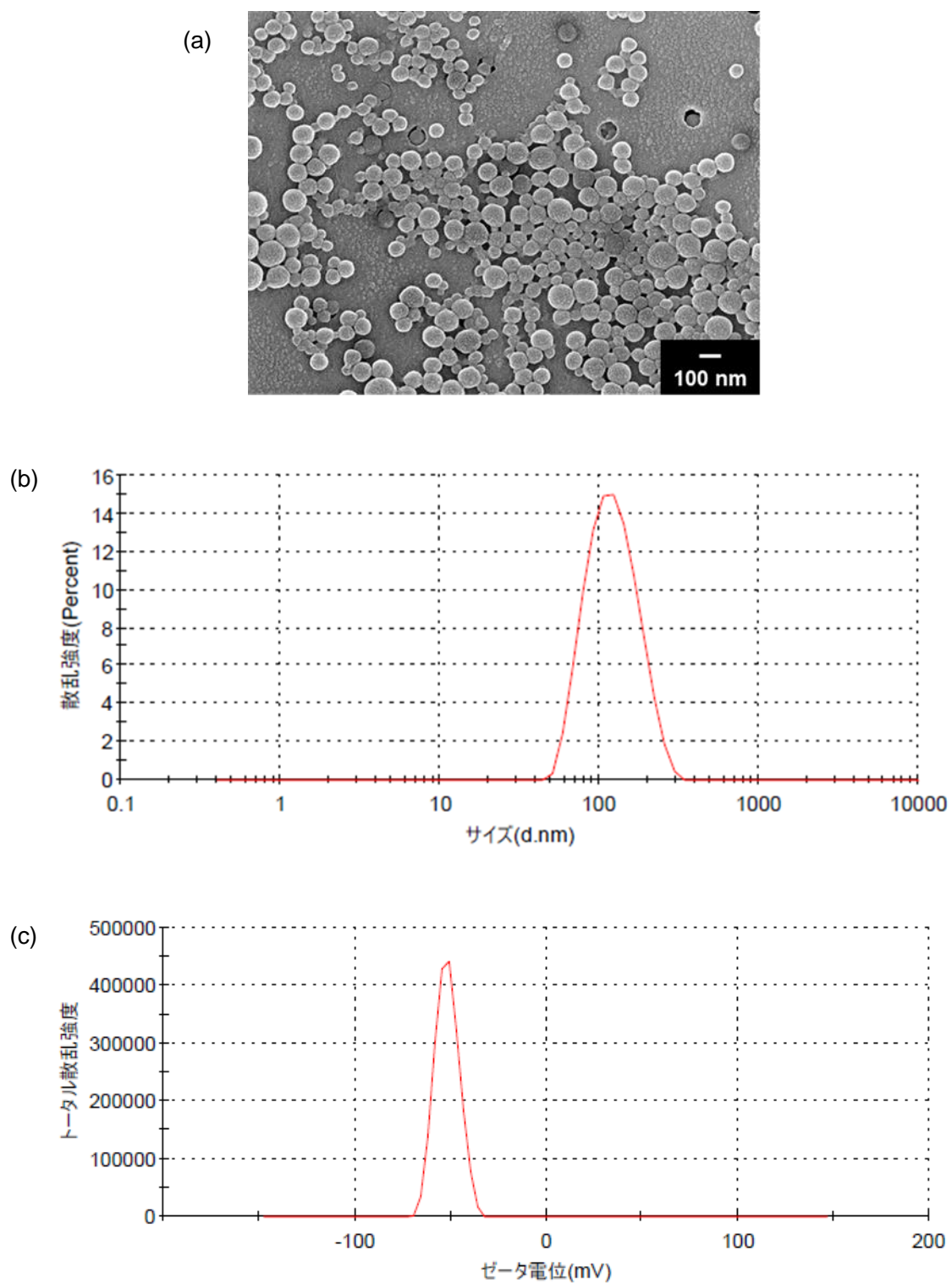


図 2-44 SN-38-Chol の薬剤ナノ粒子  
(a) SEM 像、(b) DLS による粒径測定、(c) ゼータ電位

### 2-7-3 様々な置換基を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子のマウス血清中における加水分解性

安息香酸、メントール、ビタミン E、ビタミン D<sub>3</sub>、コレステロールを導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子を用いて、マウス血清中における加水分解性を調べた。マウス血清と薬剤ナノ粒子を 1 時間混合した試料の HPLC-MS/MS 測定により得られたクロマトグラムを図 2-45 に示した。SN-38 benzoate、SN-38-menthol、SN-38-vitamine D<sub>3</sub>、SN-38-vitamine E および SN-38-chol の加水分解耐性の値は、それぞれ 0.1、8.2、67、79、91 であり、SN-38 chol から作製した薬剤ナノ粒子が優れた加水分解耐性を示した。

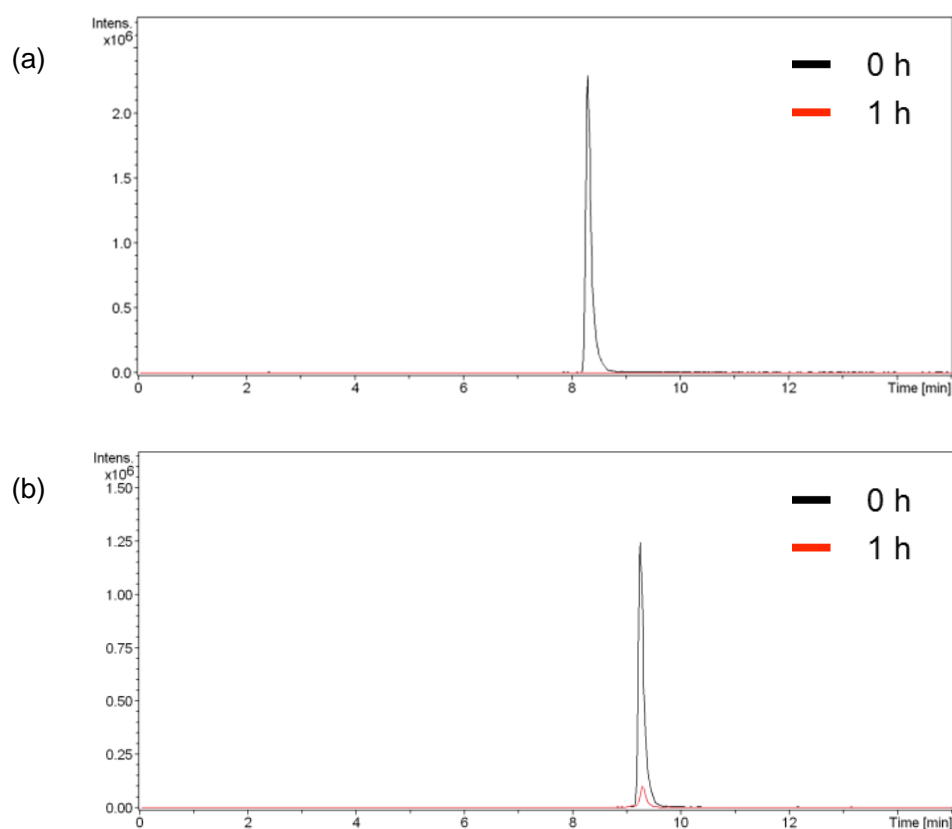


図 2-45 様々な置換基を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子のマウス血清中における加水分解性。(a) SN-38 benzoate、(b) SN-38-menthol

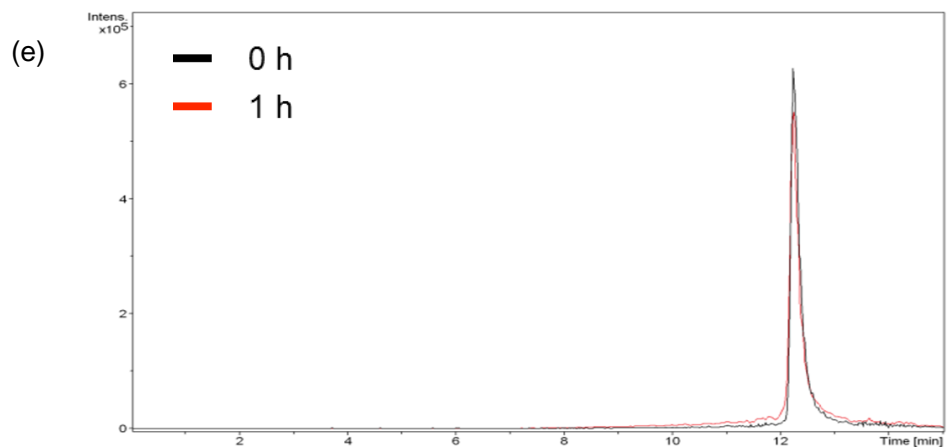
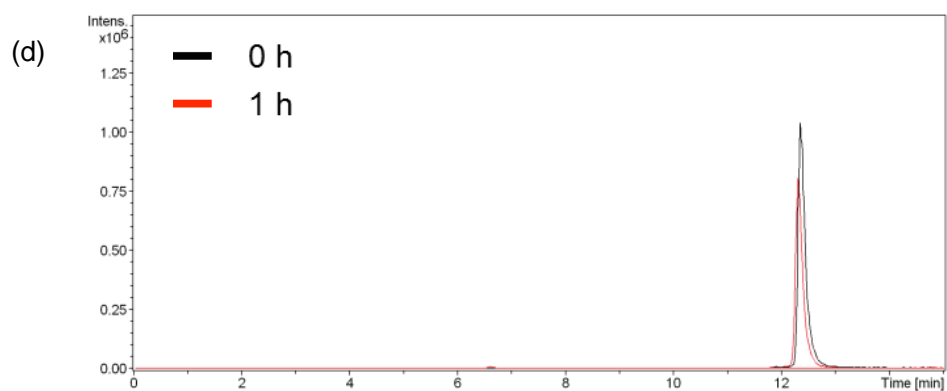
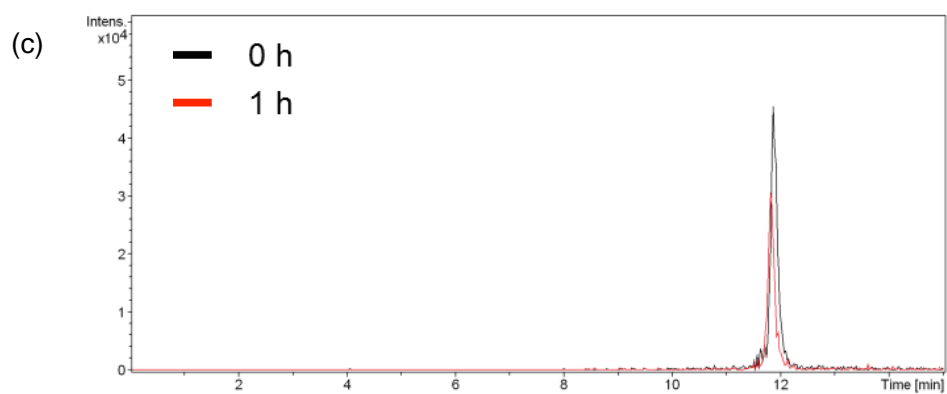


図 2-45 (続き) 様々な置換基を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子のマウス血清中における加水分解性。(c) SN-38-vitamin D<sub>3</sub>、(d) SN-38-vitamin E、(e) SN-38chol

## 2-8 考察

第2章で合成した SN-38 プロドラッグを再掲する (図 2-46)。また、これらの SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノ粒子の、マウス血清中における加水分解耐性、粒径 (DLS による測定値)、ゼータ電位および、SN-38 プロドラッグの分子量、 $\text{clogP}$  を表 2-5 にまとめた。 $\text{clogP}$  はオクタノール/水分配係数の計算値であり、値が大きいほど疎水性が高いことを意味する。

薬剤ナノ粒子の加水分解を決定する要因を考察するために、加水分解耐性と粒径、ゼータ電位、分子量、 $\text{clogP}$  との関係をプロットした。図 2-47、図 2-48 は薬剤ナノ粒子の加水分解耐性の値と DLS により求めた粒径またはゼータ電位の値をプロットしたものである。薬剤ナノ粒子の粒径、ゼータ電位いずれも、加水分解耐性との相関が高いとは言えなかった。図 2-49 に SN-38 プロドラッグの分子量と加水分解耐性の関係を示した。SN-38 に導入した置換基の分子量が大きいほど、薬剤ナノ粒子を作製した際に粒子表面に表出するエステル結合部位の割合が減少する効果や、薬剤ナノ粒子から構成分子が放出された際にエステル結合の周辺を保護される効果により、加水分解の進行の抑制が期待される。図 2-49 のプロットからは、概ね分子量の増加に伴って加水分解耐性が向上する傾向が見受けられた。しかしながら、SN-38 二量体や SN-38 deoxycholate、SN-38 cholate のように、分子量が比較的大きい分子を用いた場合でも、疎水性が低い場合は速やかに加水分解が進行した。以上のことから、薬剤ナノ粒子の加水分解性はプロドラッグ分子の疎水性に影響を受けると考えられる。実際に、SN-38 プロドラッグの  $\text{clogP}$  の値と加水分解耐性の値をプロットすると、 $\text{clogP}$  値の増加に伴って加水分解耐性が向上し、高い相関性が示された (図 2-50)。すなわち、§ 2-6 で考察した通り、SN-38 プロドラッグの疎水性が高いほど、マウス血清中における薬剤ナノ粒子の溶解が抑制されるために、加水分解耐性が向上したと理解できる。

以上のように、SN-38 プロドラッグに導入する置換基の疎水性を変化させることで、マウス血清中における加水分解性を制御することに成功した。特に、加水分解耐性を向上させるためには、コレステロールのような疎水性の高い置換基を SN-38 へ導入することが有効であることが明らかになった。

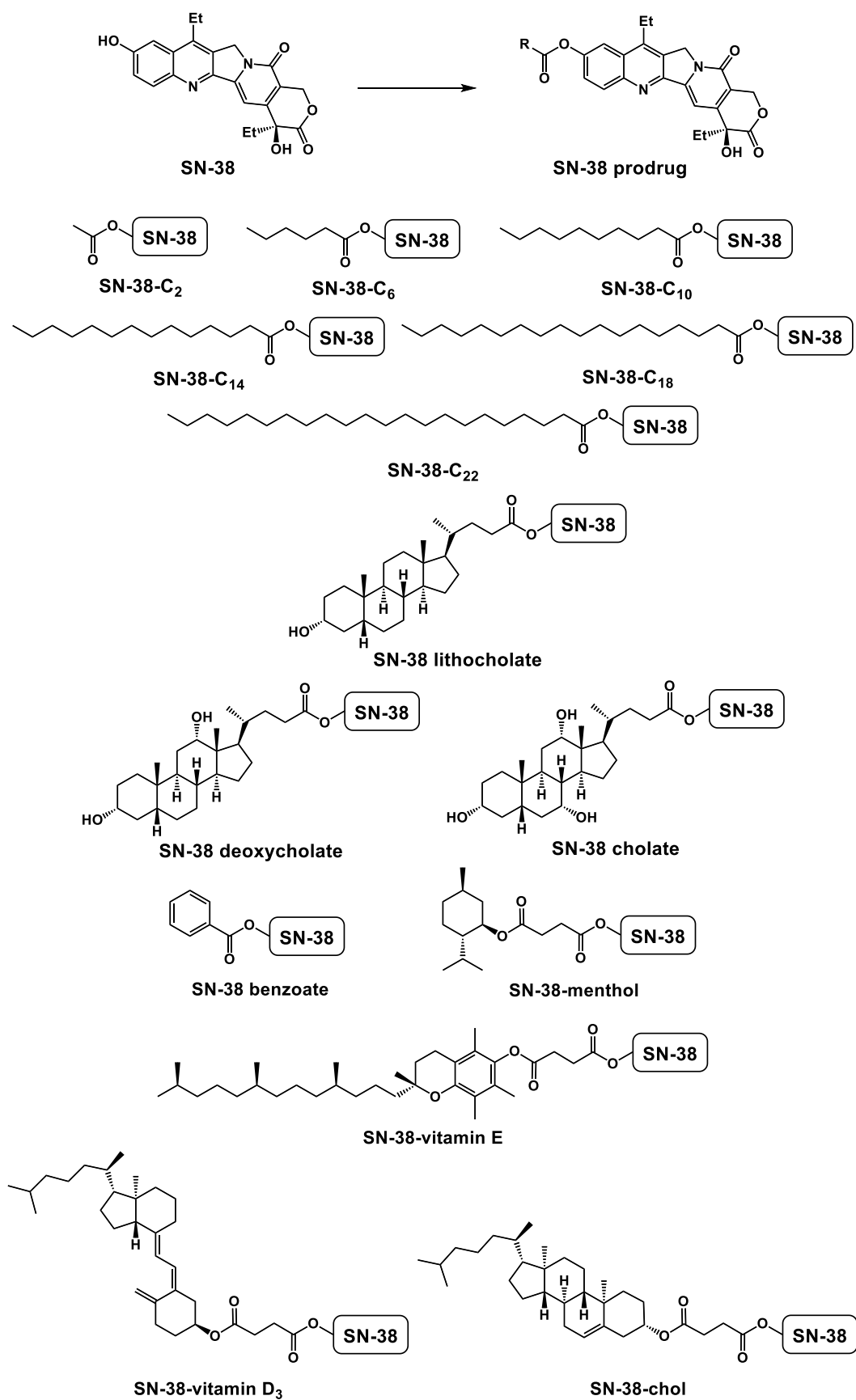


図 2-46 第 2 章で合成した SN-38 プロドラッグの化学構造



表 2-5 SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノ粒子の物性値

SN-38プロドラッグ	粒径 (DLS; nm)	ゼータ電位 (mV)	分子量	clogP	加水分解耐性 (%)
dimer	49	-37	867	2.6	0.9
C <sub>2</sub>	-	-	434	1.3	< 0.1
C <sub>6</sub>	160	-44	491	3.5	1.0
C <sub>10</sub>	98	-39	547	5.6	2.8
C <sub>14</sub>	83	-49	603	7.7	76.4
C <sub>18</sub>	196	-35	659	9.8	84.1
C <sub>22</sub>	425	-45	715	11.9	90.1
cholanate	177	-41	735	10.2	88.1
lithocholate	113	-39	751	8.1	61.2
deoxycholate	95	-43	767	6.0	4.7
cholate	152	-36	783	4.0	2.1
benzoate	211	-24	497	3.6	< 0.1
menthol	304	-34	631	5.5	8.2
vitamin E	168	-16	905	13.4	79.1
vitamin D <sub>3</sub>	97	-43	859	11.7	67.0
cholesterol	112	-52	861	11.8	91.3
SN-38	-	-	392	1.7	-
Irinotecan	-	-	587	2.4	6.1

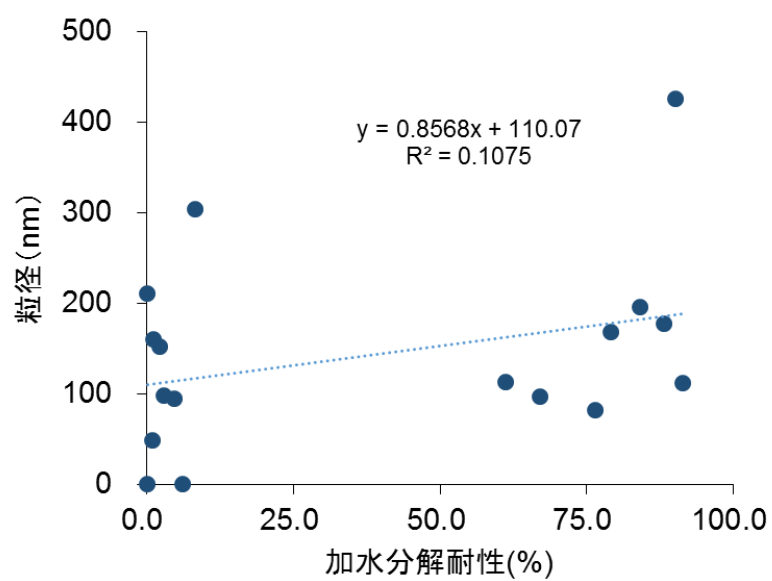


図 2-47 薬剤ナノ粒子の粒径と加水分解耐性の相関

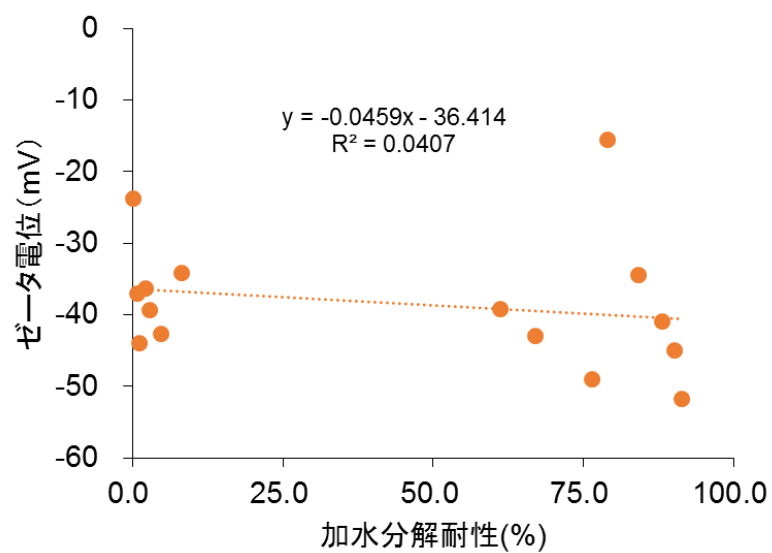
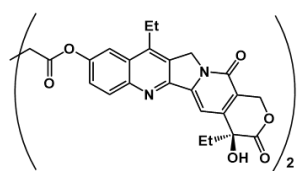
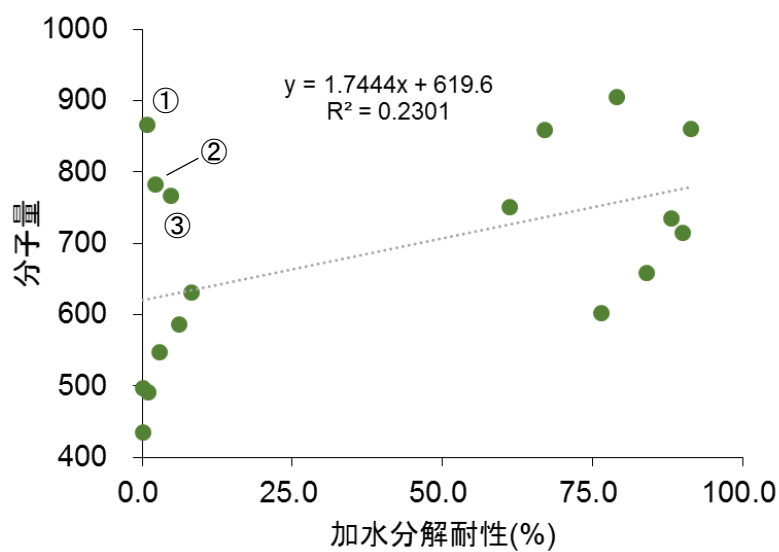
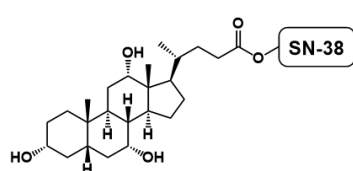


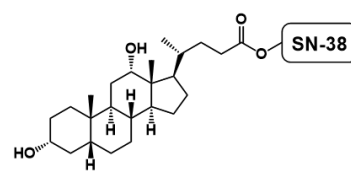
図 2-48 薬剤ナノ粒子のゼータ電位と加水分解耐性の相関



① SN-38二量体



② SN-38 cholate



③ SN-38 deoxycholate

図 2-49 SN-38 プロドラッグの分子量と加水分解耐性の相関

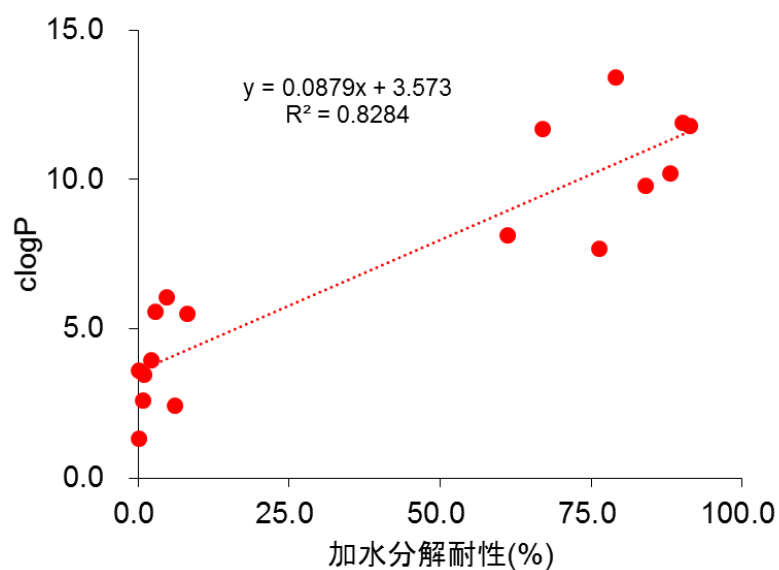


図 2-50 clogP (疎水性)と加水分解耐性の相関

## 2-9 まとめ

第2章では、薬剤ナノ粒子の加水分解耐性を向上させることを目的として、1) SN-38 二量体薬剤ナノ粒子の表面修飾、2) SN-38 への疎水性置換基の導入を検討した。

SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子をポリソルベート 80 による表面修飾を行った場合、ポリソルベート 80 の添加量に関係なく、マウス血清中における加水分解が速やかに進行し、SN-38 単量体が生成した。したがって、ポリソルベート 80 による表面修飾では、SN-38 二量体薬剤ナノ粒子の加水分解耐性を向上させる効果は得られなかった。

一方、SN-38 のフェノール性水酸基へ種々の置換基を導入し、その薬剤ナノ粒子を用いて加水分解耐性を評価したところ、導入した置換基の疎水性が高くなるにつれて、薬剤ナノ粒子の加水分解耐性が向上することが明らかになった。特に、図 2-51 に示した 8 つの SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノ粒子が高い加水分解耐性を示した。ここで、*In vivo* 薬理活性の評価を考慮して、これら 8 つの SN-38 プロドラッグから、さらなる絞り込みを行った。第1章でも言及したように、EPR 効果の発現が期待される粒径は 10~200 nm である。したがって、粒径 200 nm 以上の薬剤ナノ粒子が形成された SN-38-C<sub>18</sub>、-C<sub>22</sub> は除外される。また、リトコール酸は肝毒性が報告されていることから、生体内での加水分解により放出された置換基による副作用が懸念されるため、SN-38 lithocholate も除外した。ビタミン E およびビタミン D<sub>3</sub> を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子は、粒径、加水分解耐性、毒性いずれの条件も満たしたが、それぞれ、酸化条件、光照射条件に不安定である。したがって、以上の懸案事項を全て回避した SN-38-C<sub>14</sub> および SN-38-chol を、本研究の目的を達成するための有望な SN-38 プロドラッグとして選抜した。

以下、SN-38-C<sub>14</sub> を含めて脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグから作製した薬剤ナノ粒子の薬理活性評価を第3章で、また、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の薬理活性評価を第4章で検討した。

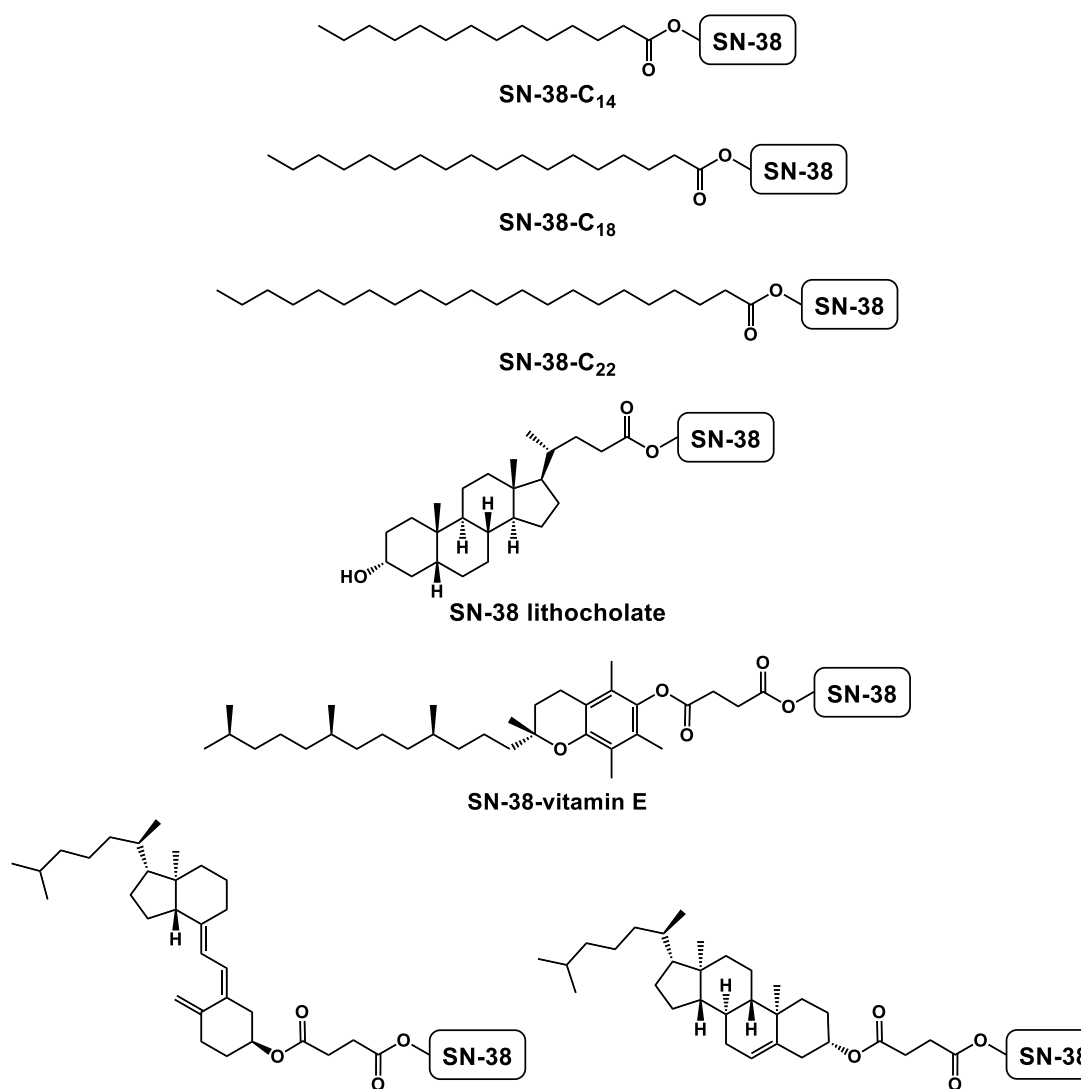


図 2-51 高い加水分解耐性を示した薬剤ナノ粒子を構成する SN-38 プロドラッグ

- [1] S. Sawada, S. Okajima, R. Aiyama, K. Nokata, T. Furuta, T. Yokokura, E. Sugino, K. Yamaguchi, T. Miyasaka, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1991**, 39, 1449–1454.
- [2] Y. Luo, H. Gao, Y. Li, W. Huang, W. Lub, Z. Zhangm, *Tetrahedron* **2006**, 62, 2465–2470.
- [3] Y.-Y. Kuang, J.-Z. Niu, F.-E. Chen, *Helv. Chim. Acta.* **2010**, 93, 2094–2099.
- [4] S. Yu, Q.-Q. Huang, Y. Luo, W. Lu, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 713–717.
- [5] Y.-S. Yao, J.-L. Liu, J. Xi, B. Miu, G.-S. Liu, S. Wang, L. Meng, Z.-J. Yao, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 10462–10469.
- [6] A. V. R. Raoa, R. Raoa, J. S. Yadavb, M. Khaggac, *Synthetic Commun.* **2013**, 43, 1661 – 1667.
- [7] 医薬品の残留溶媒ガイドライン、厚生労働省、1998 年
- [8] 柴山充弘、佐藤尚弘、岩井俊昭編著、光散乱法の基礎と応用、講談社、2014 年
- [9] P. Redden, J.-A. E. Douglas, M. J. Burke, D. F. Horrobin, *Int. J. Pharm.*, **1998**, 165, 87–96.
- [10] Y.-J. You, Y. Kim, N.-H. Nam, B.-Z. Ahn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2629–2632.
- [11] B. H. Lipshutz, D. F. Harvey, *Synth. Commun.* **1982**, 12, 267–277.
- [12] R. E. Ireland, M. D. Varney, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 635–648.
- [13] F. M. Muggia, P. J. Creaven, H. H. Hansen, O. S. Selawrry, *Cancer Chemother.* **1972**, 56, 515–521.
- [14] W. A. Creasey, M. Richards, D. Gil, K.C. Tsou, *Cancer Treat. Rep.* **1983**, 67, 179–182.

## 第 3 章

### SN-38 脂肪酸プロドラッグ薬剤ナノ粒子の薬効評価

### 3-1 諸言

第2章では、SN-38に導入する置換基の種類に応じた薬剤ナノ粒子のマウス血清中における加水分解性の違いを検討した。炭素数2~22の脂肪酸を導入したSN-38プロドラッグから作製した薬剤ナノファイバー・ナノ粒子(図3-1)では、脂肪酸の炭素数の増加に伴って血清中における加水分解耐性が向上することが明らかとなった。特に、SN-38-C<sub>14</sub>は、加水分解耐性が高く、かつ、EPR効果の発現が期待される粒径100 nm程度の薬剤ナノ粒子の作製に成功したため、本研究の目的を達成するための有望なSN-38プロドラッグとして選抜した。第3章では、まず、SN-38-C<sub>14</sub>の薬剤ナノ粒子を含めて、脂肪酸を導入したSN-38プロドラッグ薬剤ナノ粒子の*in vitro*活性評価を行い、導入する脂肪酸の炭素数の違いによって薬理活性に変化が生じるかについて検討した。その後、マウスを用いた*in vivo*活性評価を試みた。

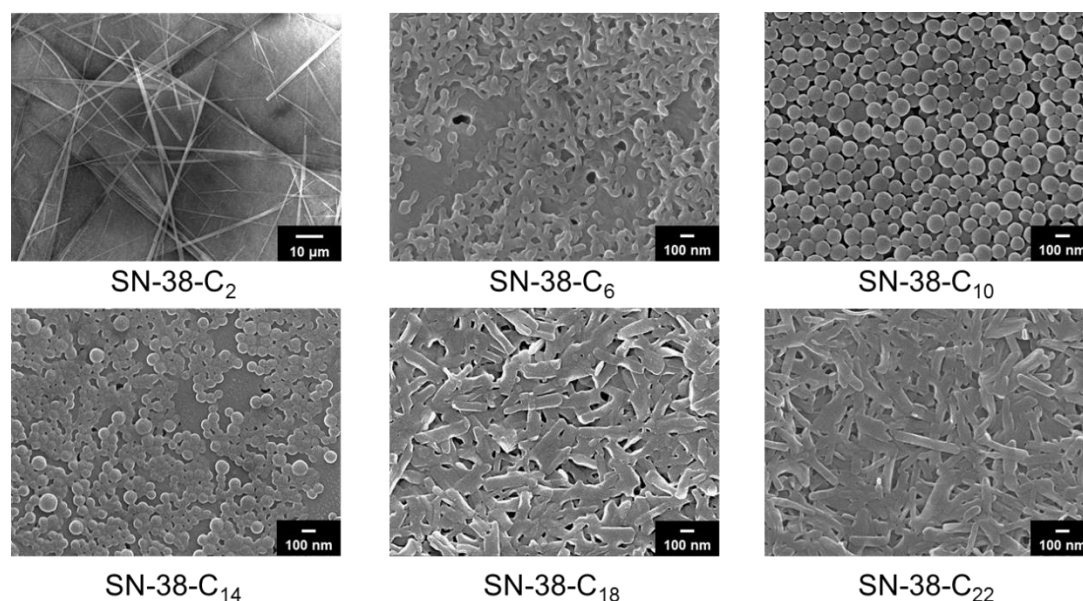


図3-1 脂肪酸を導入したSN-38プロドラッグから作製した薬剤ナノファイバー・ナノ粒子のSEM像



### 3-2 がん細胞増殖抑制活性

SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子の薬理活性を評価するために、がん細胞増殖抑制活性試験を行った。がん細胞はヒト肝がん由来の HepG2 細胞を使用し、WST-8 法<sup>[1]</sup>を用いて薬剤ナノ粒子を添加した際の細胞生存率を求めた。

SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子が薬理活性を発現するためには、細胞内で酵素によるエステル結合の加水分解を受けて活性本体である SN-38 が生じる必要がある。加水分解酵素は生体内に普遍的に存在する酵素であるが、特に肝臓において多く生産されているため、初期の実験としては肝がん由来の細胞を用いた。本研究では、肝がん由来細胞として、がん細胞実験に一般的に用いられている HepG2 細胞を使用した<sup>[2-4]</sup>。

がん細胞の生存率を求める手法としては、一般的に MTT 法が用いられてきた<sup>[5]</sup>。MTT 法は、MTT が生細胞中で還元反応により紫色の開環体であるホルマザンを生じることを利用して、比色法により生細胞数を求める手法である。しかし、MTT 法の短所として、MTT から生じるホルマザンは細胞培養の培地（水系）への溶解度が低いため、DMSO 等の有機溶媒を添加して溶解させる操作が必要であることや、生成したホルマザンが細胞毒性を示すため、生存率測定の際に偽陽性が生じる場合があることが報告されている<sup>[6]</sup>。そのため、近年、MMT 法に替わる手法として、WST-8 法が用いられている<sup>[1]</sup>。WST-8 法の原理を図 3-2 に示した。WST-8 法は、MTT 法と同様にテトラゾール環の還元反応に基づいた手法である。WST-8 はスルホン基の導入により水に可溶であり、また、ニトロ基の導入により還元反応における反応性が向上している。水溶性の WST-8 は細胞浸透性が低いため、PMS を介在し、還元反応が進行する。すなわち、細胞に取り込まれた PMS により NADH が還元されて NAD<sup>+</sup>となり、水素を受け取った還元型 PMS となる。次に、細胞外に移動した還元型 PMS が WST-8 を還元することで、オレンジ色の WST-8 ホルマザンが生成する。生成したホルマザンの量は、細胞が生産する脱水素酵素の量に依存するため、生細胞数と比例する。したがって、生成したホルマザンの吸光度（450 nm）を測定し、陰性対照との比を求めることで、細胞生存率を測定することができる。

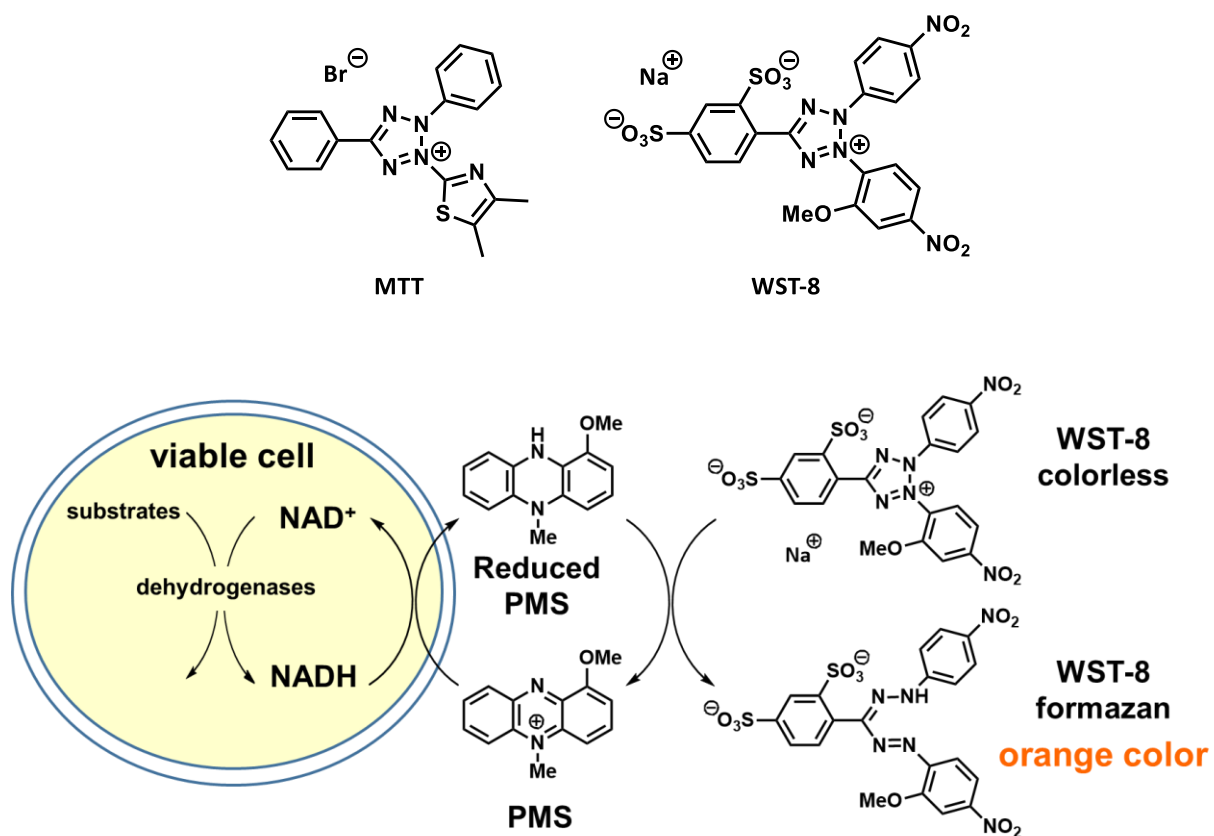


図 3-2 MTT、WST-8 の化学構造と WST-8 法の原理

・脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性

図 3-3 は、脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性を測定した結果である。0.01~50 M の濃度の薬剤ナノ粒子の水分散液を、HepG2 細胞を培養したプレートに添加し、培養 48 時間後の生細胞数を WST-8 法により求めた。また、比較のために、現在臨床で用いられている irinotecan の活性も測定した。50% の増殖抑制活性を示す濃度である  $IC_{50}$  の値で活性を比較すると、SN-38- $C_2$ 、SN-38- $C_6$  が高いがん細胞増殖抑制活性を示した。また、SN-38 に導入した脂肪酸の炭素数の増加に伴って活性が低下し、最も活性が低い SN-38- $C_{22}$  の薬剤ナノ粒子と irinotecan が同程度の活性を示した。SN-38 は核内のトポイソメラーゼ I を阻害することで、がん細胞の増殖を抑制することが知られている<sup>[7]</sup>。そのため、SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子の活性は核内に到達する SN-38 の量に依存すると考えられる。核内への SN-38 の送達経路としては、薬剤ナノ粒子ががん細胞内へと取り込まれ、細胞内で薬剤ナノ粒子を構成する SN-38 プロドラッグが加水分解を受けて放出された SN-38 が核内へと到達すると想定される (図 3-4)。そこで、薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性の決定因子と想定される細胞への取り込み効率および細胞内における加水分解性を調べた。その詳細を次節に記述する。

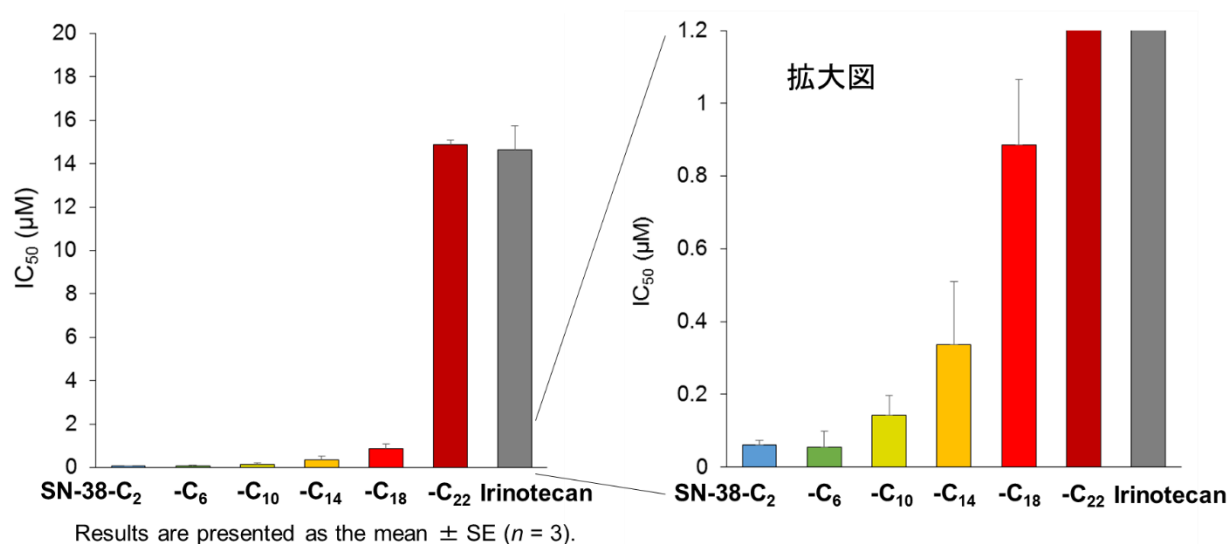


図 3-3 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性

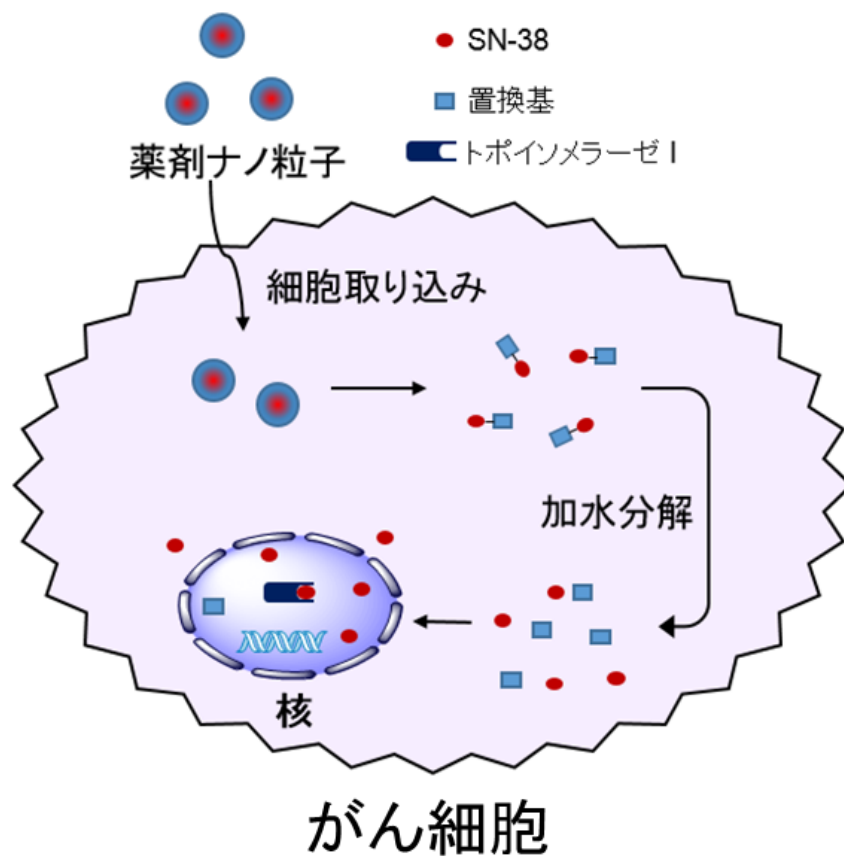


図 3-4 推定される SN-38 の核内への送達経路

### 3-3 がん細胞への取り込み効率およびブタ肝臓エステラーゼによる加水分解性

SN-38 に導入した脂肪酸の炭素数の違いにより、薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性に差が生じることが明らかとなった。その要因を解明するために、主要因として考えられるがん細胞への取り込み効率と加水分解性を調べた。

#### ・ 薬剤ナノ粒子のがん細胞への取り込み効率

薬剤ナノ粒子のがん細胞への取り込み効率は以下の実験により調べた。HepG2 細胞に薬剤ナノ粒子の水分散液を添加し、6 時間保持した後の細胞内の SN-38 プロドラッグを定量した。その結果、図 3-5 に示したように、炭素数の増加に伴って細胞内のプロドラッグの量が増加することが明らかとなった。細胞は脂質膜に覆われているため、脂溶性の高い物質ほど、細胞に取り込まれやすいことが知られている<sup>[8]</sup>。したがって、脂肪酸の炭素数の増加に伴い、薬剤ナノ粒子の脂溶性が増加したために、細胞取り込み効率が向上したと考えられる。実際に、水溶性化合物である irinotecan の細胞取り込み量は 1.9 pmol/well であり、薬剤ナノ粒子の細胞取り込み量の十分の一以下の値であった。

以上の結果から、irinotecan のがん細胞増殖抑制活性が薬剤ナノ粒子の場合よりも低かった要因は、細胞取り込み効率を反映したためと示唆される。一方、SN-38 に導入した脂肪酸の炭素数の増加に伴って活性が低下したのに対し、がん細胞への取り込み効率は脂肪酸の炭素数の増加に伴って増加した。このことは、図 3-3 に示したがん細胞増殖抑制活性の差に関する要因としては、むしろ逆の効果である、そこで、もう一つの要因として考えられる、薬剤ナノ粒子の加水分解性を検討することにした。

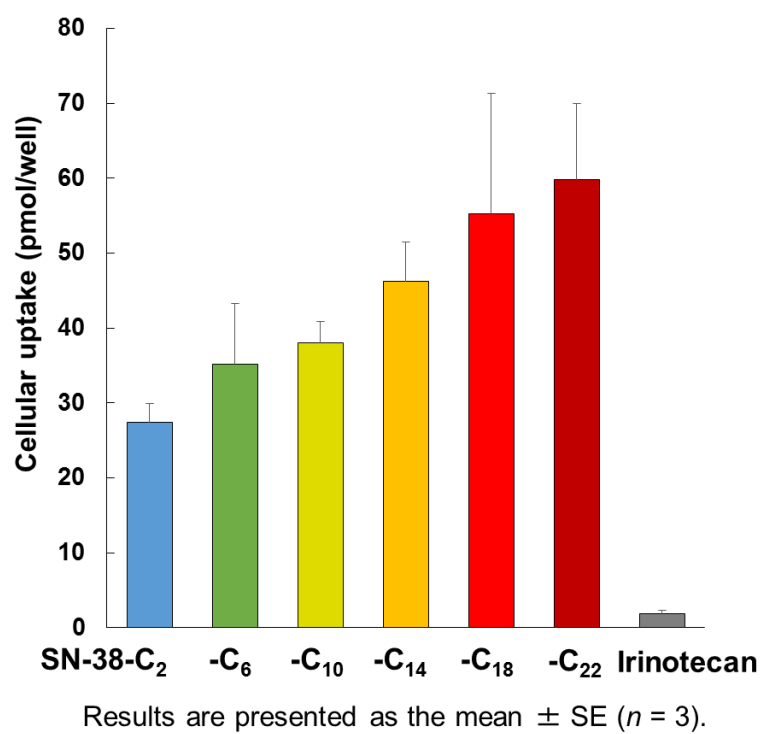


図 3-5 脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の細胞取り込み

・ブタ肝臓エステラーゼによる加水分解性

第2章では、薬剤ナノ粒子の加水分解性を評価するためにマウス血清を用いた。血清中には加水分解酵素だけではなく、その他の酵素を含めたタンパクや、糖質、脂質、尿酸、無機塩などを含んでおり、より生体環境に近づけた条件での加水分解性の評価に適している。本節では、エステラーゼ単体による薬剤ナノ粒子の加水分解性を評価するために、一般的なエステラーゼであるブタ肝臓エステラーゼ (PLE) を用いた<sup>[9,10]</sup>。PLE による薬剤ナノ粒子の加水分解性は、10  $\mu$ M の薬剤ナノ粒子を 30 ユニットの PLE 中で処理した際の半減期 ( $t_{1/2}$ ) により評価した (表3-1)。SN-38-C<sub>2</sub>、-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub> の薬剤ナノファイバー・ナノ粒子では速やかに加水分解が完了し、 $t_{1/2}$  は 30 分以内であることが分かった。また、SN-38-C<sub>14</sub>、-C<sub>18</sub> の薬剤ナノ粒子はそれぞれ 2.1、9.4 時間の  $t_{1/2}$  を示し、SN-38-C<sub>22</sub> の薬剤ナノ粒子では 24 時間後でも加水分解がほとんど進行しなかった。以上のように、脂肪酸の炭素数の増加に伴って、加水分解の進行が抑制されることが明らかとなった。この加水分解性の炭素数依存性は、がん細胞増殖抑制活性の結果と非常に良い一致を示した。したがって、細胞内における加水分解性が、がん細胞増殖抑制活性を決定する主要因であると結論付けた。

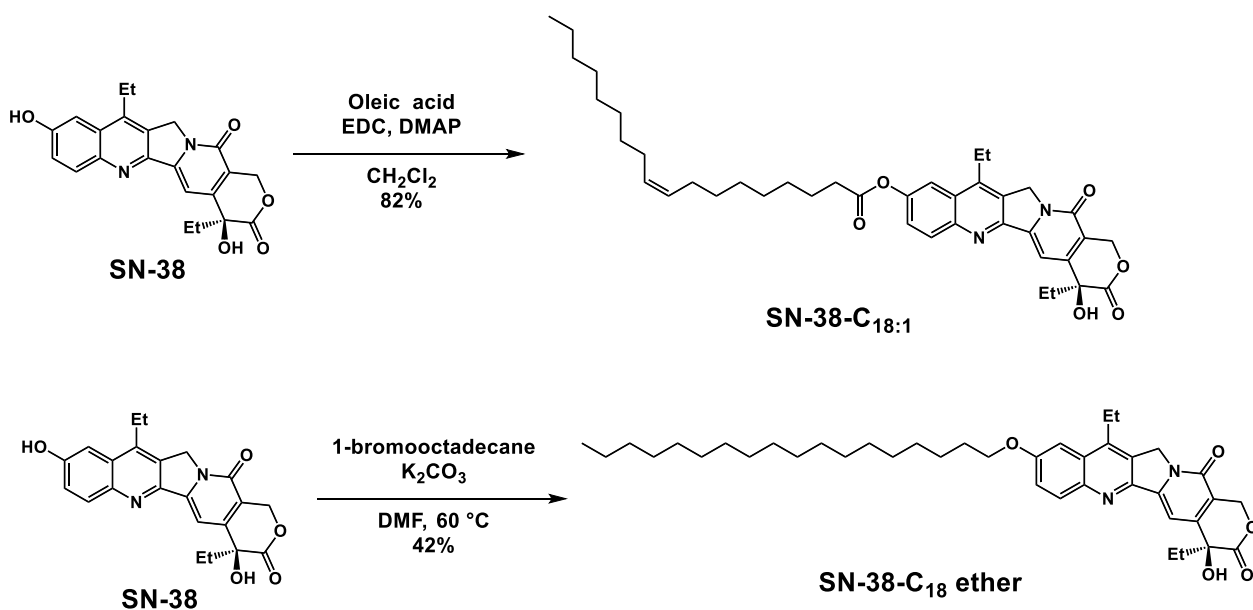
表 3-1 半減期

SN-38-C <sub>n</sub>	-C <sub>2</sub>	-C <sub>6</sub>	-C <sub>10</sub>	-C <sub>14</sub>	-C <sub>18</sub>	-C <sub>22</sub>	Irinotecan
$t_{1/2}$ (h)	<0.5	<0.5	<0.5	2.1	9.4	>24	4.5

### 3-4 SN-38-C<sub>18</sub> 誘導体の合成と薬剤ナノ粒子の薬効評価

§3-3 では、がん細胞増殖抑制活性は薬剤ナノ粒子を構成する SN-38 プロドラッグの炭素数の違いによる加水分解性の差に影響を受けることが示された。本節では、SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性と加水分解性の関係について、別の角度からの検討を試みた。

新たに合成した SN-38 誘導体の反応条件と化学構造をスキーム 3-1 に示した。オレイン酸を導入した SN-38-C<sub>18:1</sub> は EDC を用いた縮合反応により合成した。また、SN-38 とオクタデシル基をエーテル結合により結合させた SN-38-C<sub>18</sub> ether は 1-ブロモオクタデカンとの Williamson エーテル化反応により合成した。



スキーム 3-1 SN-38-C<sub>18</sub> 誘導体の合成



SN-38-C<sub>18</sub> と SN-38-C<sub>18:1</sub> の clogP はそれぞれ 9.8、9.3 と算出された。また、導入した脂肪酸の融点は、ステアリン酸は 70.5 °C であり、オレイン酸は 16.2 °C である<sup>[11]</sup>。この融点の違いは脂肪鎖に働く分子間力により説明される<sup>[12]</sup>。すなわち、ステアリン酸は直鎖状であるため、分子同士が接近しやすく、分子間相互作用が強くなる。一方、オレイン酸は二重結合を持ち、折れ曲がった構造をとるため、分子同士の接近が妨げられ、分子間相互作用が弱くなる。したがって、SN-38-C<sub>18</sub> と SN-38-C<sub>18:1</sub> から作製した薬剤ナノ粒子を用いることで、疎水性の影響を抑えた条件で、分子間相互作用が加水分解性に与える影響を比較することが可能となる。また、SN-38-C<sub>18</sub> と SN-38-C<sub>18</sub> ether を比較すると、SN-38-C<sub>18</sub> は加水分解可能なエステル結合により置換基を導入しているのに対し、SN-38-C<sub>18</sub> ether はエーテル結合により置換基を導入した。生体内環境では、エーテル結合の加水分解は非常に遅いことが知られている<sup>[13]</sup>。したがって、SN-38-C<sub>18</sub> と SN-38-C<sub>18</sub> ether を用いることで、SN-38 と置換基をつなぐ結合の強さが加水分解性に与える影響を比較することが可能となる。

SN-38-C<sub>18:1</sub>、SN-38-C<sub>18</sub> ether から作製した薬剤ナノ粒子を SEM 観察した結果、図 3-6 に示したように、粒径 100 nm 程度のナノ粒子が確認された。これらの薬剤ナノ粒子の水分散液を用いて HepG2 細胞の増殖抑制活性を評価した結果、SN-38-C<sub>18</sub>、SN-38-C<sub>18:1</sub> の薬剤ナノ粒子でそれぞれ 0.89、0.094  $\mu$ M の IC C<sub>50</sub> の値を示したが、SN-38-C<sub>18</sub> ether の薬剤ナノ粒子では 20  $\mu$ M でも 50%の細胞増殖抑制活性を示さなかった（図 3-7）。また、HepG2 細胞への薬剤ナノ粒子の取り込み効率と PLE による加水分解性を評価したところ、細胞取り込み量は大きな差が見られなかったのに対して、加水分解実験により求めた t<sub>1/2</sub> は SN-38-C<sub>18</sub>、SN-38-C<sub>18:1</sub> の薬剤ナノ粒子でそれぞれ 9.4、1.9 時間であり、SN-38-C<sub>18</sub> ether の薬剤ナノ粒子では 24 時間後でも加水分解が進行しなかった（表 3-2）。

以上の結果から、薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性は、薬剤ナノ粒子の加水分解性に依存することが改めて示された。第 2 章では、薬剤ナノ粒子の加水分解性は、SN-38 プロドラッグの疎水性に依存すると考察したが、SN-38-C<sub>18:1</sub> の薬剤ナノ粒子を用いた加水分解実験により、疎水性だけではなく薬剤ナノ粒子を構成する分子の間に働く分子間相互作用も加水分解性に影響を与えることが明らかになった。この結果から、SN-38 に導入する脂肪酸の炭素数の増加に伴って脂肪鎖間に働く分子間相互作用が向上したために、加水分解に対して安定になったことが示唆される。薬剤ナノ粒子の疎水性と分子間相互作用が、それぞれの程度の割合で加水分解性に寄与するかについては今後さらなる研究が必要であるが、SN-38 に導入する脂肪酸の炭素数の増加に伴って、薬剤ナノ粒子の PLE に対する加水分解耐性が劇的に向上したことから、疎水性と分子間相互作用が協奏的に寄与していると考えられる。

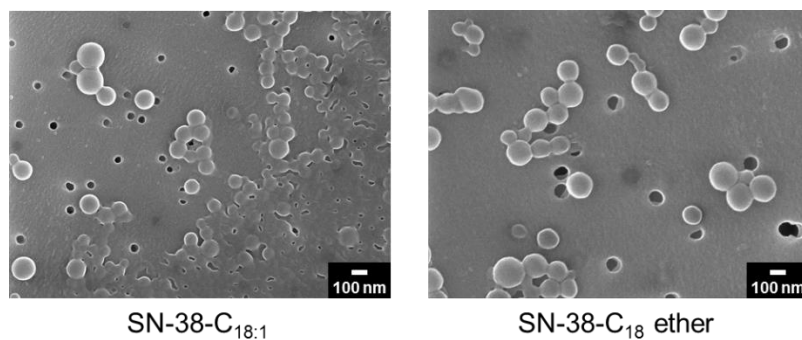
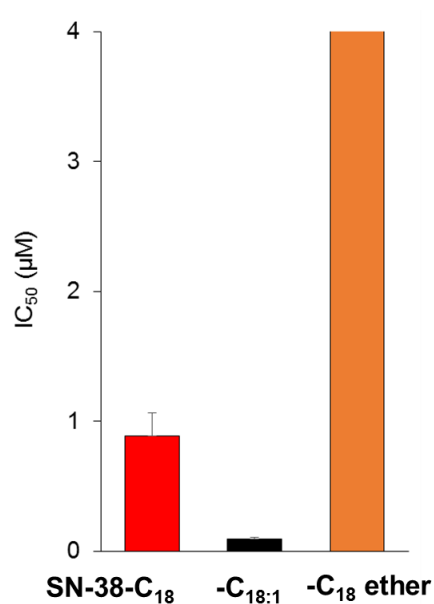


図 3-6 SN-38- $C_{18}$  誘導体から作製した薬剤ナノ粒子の SEM 像



Results are presented as the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

図 3-7 SN-38- $C_{18}$  誘導体のがん細胞増殖抑制活性

表 3-2 SN-38- $C_{18}$  誘導体の細胞取り込み効率と加水分解性

Compound	Cellular uptake (pmol/well)	Hydrolysis $t_{1/2}$ (h)
SN-38- $C_{18}$	$55.2 \pm 3.05$	9.4
SN-38- $C_{18:1}$	$53.0 \pm 4.77$	1.9
SN-38- $C_{18}$ ether	$56.9 \pm 2.30$	>24

### 3-5 高濃度分散液の調製

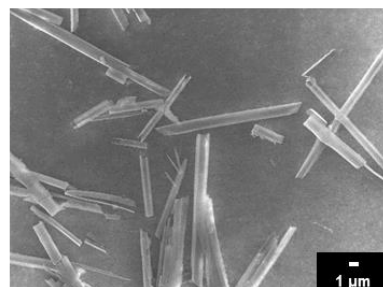
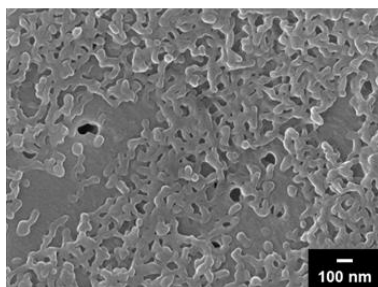
ここまで検討により、炭素数 2~18 の脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグは、irinotecan と比較して 10 倍以上高いがん細胞増殖抑制活性を示すことが明らかになった。そこで、次の段階として、第 2 章で選抜した SN-38-C<sub>14</sub> の薬剤ナノ粒子を中心に *in vivo* 活性の評価を検討した。

抗がん剤を用いた動物実験では、一般的に実験動物の体重 1 kg に対して抗がん活性化合物換算当で 2~20 mg の量で投与されている<sup>[14-16]</sup>。また、SN-38 のプロドラッグとして現在臨床で用いられている irinotecan は、発症しているがんの種類により投与量が異なるが、10~100 mg/kg の量でヒトへの投与が行われている<sup>[17]</sup>。そこで、本研究では、SN-38 換算で 10 mg/kg をマウスへの薬剤ナノ粒子の投与量として設定した。体重 25 g のマウスに 100  $\mu$ L 投与する場合は、その SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の分散液の濃度は 6.3 mM と計算される。そこで、まず、7 mM の薬剤ナノ粒子水分散液を調製し、浸透圧を調整するために 9% の塩化ナトリウム水溶液と 9 : 1 の割合で混合することで、6.3 mM の薬剤ナノ粒子生理食塩水分散液を調整した。

SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub>、-C<sub>18</sub> を 46.7 mM の THF 溶液 0.75 mL を超純水 3 mL 中に注入し、透析によって THF を除去後、5 mL に定容することで、7 mM の水分散液とした。なお、SN-38-C<sub>22</sub> は溶解度が低く、46.7 mM の濃度では完全に溶解させることはできなかった。SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub>、-C<sub>18</sub> から 7 mM の高濃度分散液を調整したところ、作製直後に凝集により沈降した。そこで、分散剤としてポリソルベート 80 を添加して水分散液を調製した。ポリソルベート 80 を添加した場合でも、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub> から作製した水分散液は凝集性を示し、SEM 観察の結果、図 3-8 に示したような巨大な微粒子が確認された。一方、ポリソルベート 80 を添加して調製した SN-38-C<sub>18</sub> の水分散液は良好な分散性安定性を示し、SEM 観察の結果、200~300 nm 程度のロッド状のナノ粒子が確認された。したがって、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub> は高濃度の薬剤ナノ粒子分散液を調製するためには疎水性が不十分であることから結晶成長が進行したと考えられる。つまり、SN-38 プロドラッグの疎水性を向上させることが、高濃度の薬剤ナノ粒子分散液を作製するために有効であると示唆された。なお、SN-38-C<sub>18</sub> の高濃度分散液中ではその薬剤ナノ粒子の粒径は 200 nm 以上であり、EPR 効果の発現は期待できないため、動物実験を実施しなかった。

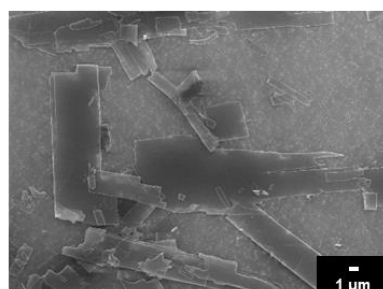
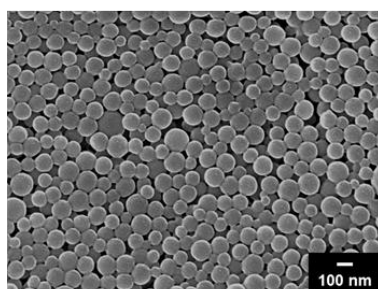
0.1 mM分散液

7 mM分散液



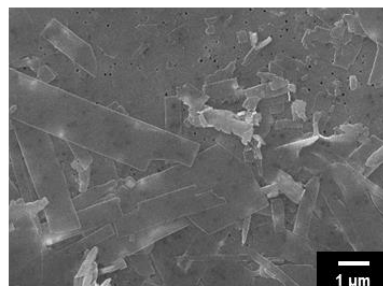
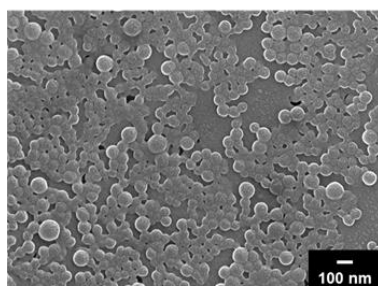
SN-38-C<sub>6</sub>

SN-38-C<sub>6</sub>



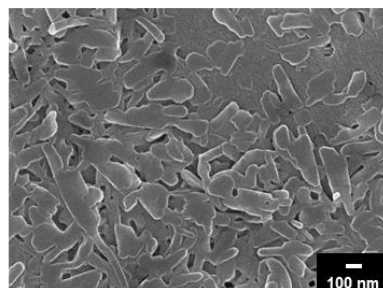
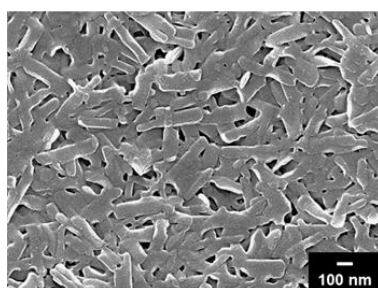
SN-38-C<sub>10</sub>

SN-38-C<sub>10</sub>



SN-38-C<sub>14</sub>

SN-38-C<sub>14</sub>



SN-38-C<sub>18</sub>

SN-38-C<sub>18</sub>

図 3-8 高濃度分散液中の SEM

### 3-6 まとめ

第3章では、SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の *in vitro* 活性評価を行った。炭素数 2～22 の脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性を評価した結果、炭素数の増加に伴って活性が低下することが明らかになった。がん細胞への薬剤ナノ粒子の取り込み効率を調べたところ、脂肪酸の炭素数の増加に伴って細胞内のプロドラッグの量が増加する傾向にあった。その一方で、ブタ肝臓エステラーゼによる加水分解性を調べた結果、脂肪酸の炭素数の増加に伴って加水分解が逆に抑制されることが判明した。つまり、細胞内における加水分解性が、がん細胞増殖抑制活性を決定する主要因であると結論付けられる。また、薬剤ナノ粒子の加水分解性に影響を与える要因としては、第2章で議論した疎水性に加えて、分子間相互作用の寄与も重要であることが新たに分かった。

脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子を用いて動物実験を行うことを試みたが、動物実験に必要な高濃度 (7 mM) の薬剤ナノ粒子分散液を作製した場合、SN-38-C<sub>6</sub>、-C<sub>10</sub>、-C<sub>14</sub> では結晶成長が進行し、巨大な微粒子が形成した。一方、SN-38-C<sub>18</sub> から高濃度分散性を作製すると、低濃度 (0.1 mM) と同程度の粒径の薬剤ナノ粒子の作製に成功し、SN-38 プロドラッグの疎水性を向上させることが、高濃度の薬剤ナノ粒子分散液を作製するために有効であることが示唆された。

### 参考文献（第3章）

- [1] H. Stahelin, *Eur. J. Cancer* **1973**, 9, 215–221.
- [2] J. D. Loike, S. B. Horwitz, *Biochemistry* **1976**, 15, 5435–5443.
- [3] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, 46, 6387–6392.
- [4] R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, 263, 1600–1603.
- [5] F. Koizumi, M. Kitagawa, T. Negishi, T. Onda, S. Matsumoto, T. Hamaguchi, Y. Matsumura, *Cancer Res.* **2006**, 66, 10048–10056.
- [6] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 815–823.
- [7] J. Huwyler, D. F. Wu, W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 14164–14169.
- [8] D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong, M. W. Dewhirst, *Cancer Res.* **2000**, 60, 1197–1201.
- [9] Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. F. Liu, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 4873–4878.
- [10] W. J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins, J. O'Shaughnessy, *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 7794–7803.
- [11] 長倉三郎、井口洋夫、江沢洋、岩村秀、佐藤文隆、久保亮五編集、岩波 理化学辞典 第5版、岩波書店、1998年
- [12] P. Huang, D. Wang, Y. Su, W. Huang, Y. Zhou, D. Cui, X. Zhu, D. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 11748–11756.
- [13] M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3888–3890.
- [14] J. A. Gottlieb, J. K. Luce, *Cancer Chemother.* **1972**, 56, 103–105.
- [15] F. M. Muggia, P. J. Creaven, H. H. Hansen, O. S. Selawrry, *Cancer Chemother.* **1972**, 56, 515–521.
- [16] W. A. Creasey, M. Richards, D. Gil, K.C. Tsou, *Cancer Treat. Rep.* **1983**, 67, 179–182.
- [17] H. Nagata, N. Kaneda, T. Furuta, S. Sawada, T. Yokokura, T. Miyasaka, M. Fukuda, N. Noritake, *Cancer Treat. Rep.* **1987**, 71, 341–348.

## 第 4 章

### コレステロールを導入した SN-38 プロドラッグ 薬剤ナノ粒子の薬効評価

#### 4-1 諸言

第3章では、脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性を評価し、脂肪酸の炭素数に依存して活性が変化する要因が加水分解性によるものであることを明らかにした。第2章で選抜した SN-38-C<sub>14</sub> の薬剤ナノ粒子は、irinotecan と比較してがん細胞増殖抑制活性が高いにもかかわらず、血清中において高い加水分解に対する耐性を示した、また、粒径が 100 nm 程度であったことから、EPR 効果の発現により効率的に腫瘍組織に集積することが期待された。しかしながら、SN-38-C<sub>14</sub> は、高濃度の分散液を作製すると巨大な微粒子を形成したため、動物実験を実施することができなかった。そこで、第4章では、第2章で SN-38-C<sub>14</sub> と共に選抜した SN-38-chol を用いて、まず、高濃度分散液の調製を検討し、その後、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の *in vitro* および *in vivo* 薬理活性を評価した。



## 4-2 高濃度分散液の作製

SN-38-chol の薬剤ナノ粒子の高濃度分散液の調製を検討した。§ 3-5 と同様に、46.7 mM の SN-38-chol の THF 溶液 0.75 mL を超純水 3 mL 中に注入し、透析によって THF を除去後、5 mL に定容することで、7 mM の水分散液とした。この分散液は良好な分散性を示したが、SEM 観察の結果、非常に広いサイズ分布の薬剤ナノ粒子が確認された (図 4-1)。一方、SN-38-chol の THF 溶液に SN-38-chol と同量のポリソルベート 80 を含有させて水に注入した場合は、20~150 nm 程度の薬剤ナノ粒子であり、サイズ分布を狭めることに成功した。これは、界面活性剤であるポリソルベート 80 によって、THF 溶液の界面張力が低下し、溶媒の水への拡散が促進されたためであると考えられる。

以上のように、SN-38-chol では動物実験に用いる高濃度の分散性を調製することに成功した。そこで、次節以降で、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の *in vitro* および *in vivo* 薬理活性の評価を行った。

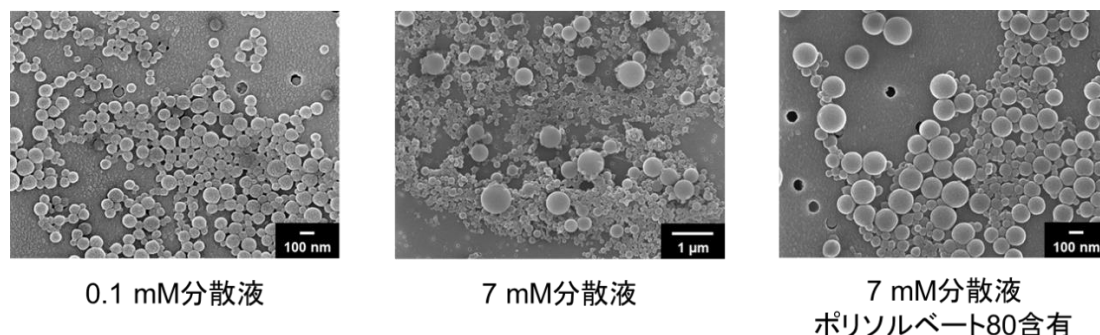
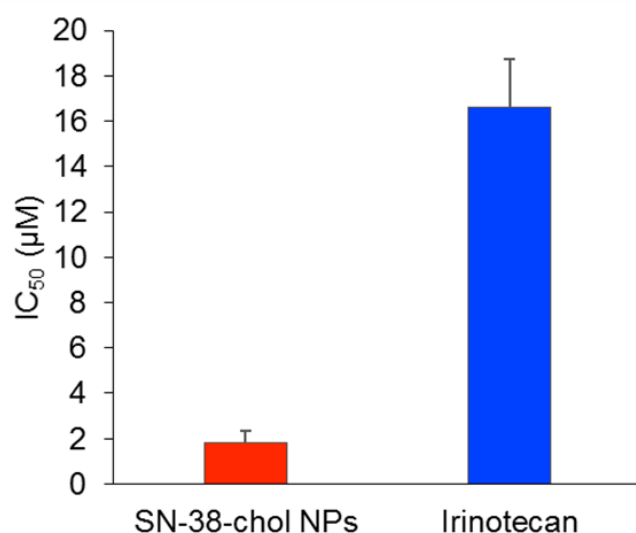


図 4-1 SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の SEM 像

### 4-3 がん細胞増殖抑制活性

第3章では薬剤ナノ粒子の加水分解を促すために、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞を選  
択した。しかし、SN-38 のプロドラッグとしてがん治療に用いられている irinotecan は肝  
がんの治療には適用外である<sup>[1]</sup>。そこで、第4章では irinotecan による治療が実施されて  
いる乳がん由来のがん細胞を用いた。図4-2に示したように、マウス乳がん由来の 4T1-  
Luc 細胞を用いて、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子と irinotecan の *in vitro* がん細胞増殖抑制活性  
を測定すると、IC<sub>50</sub> の値はそれぞれ 1.83、16.6  $\mu$ M であり、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子がよ  
り高い活性であった。

SN-38-chol 薬剤ナノ粒子ががん細胞増殖抑制活性を有することが明らかとなったため、  
マウスを用いた動物実験に移行した。



Results are presented as the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

図4-2 SN-38-chol 薬剤ナノ粒子と irinotecan のがん細胞増殖抑制活性

#### 4-4 マウス中における血中滞留性

マウスを用いた動物実験としては、まず血中滞留性試験を行った。マウスの血管内へ投与された薬剤ナノ粒子は血液中を循環し、EPR 効果により一定の確率で腫瘍組織に浸透することが知られている<sup>[2]</sup>。したがって、血中滞留性が優れたナノ粒子は、腫瘍組織への集積量の増大が期待される。SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の分散液を用いて血中滞留性を評価した結果を図 4-3 に示した。SN-38 量換算でマウスの体重 1 kg あたり 10 mg の SN-38-chol 薬剤ナノ粒子もしくは irinotecan を尾静脈から注射投与し、血中濃度の経時変化を HPLC-MS/MS 測定したところ、irinotecan と比較して、SN-38-chol NPs は良好な血中滞留性を示した。HPLC-MS/MS 測定のクロマトグラムを比較すると、irinotecan の場合は投与後 30 分には血中で加水分解を受けて SN-38 が検出されたのに対し、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の投与時では、いずれの時間点でも SN-38 が検出されなかった。すなわち、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子は血中において、非常に高い加水分解耐性を有することが明らかになった。この結果は、第 2 章で行ったマウス血清中における加水分解性の結果とよく対応する。

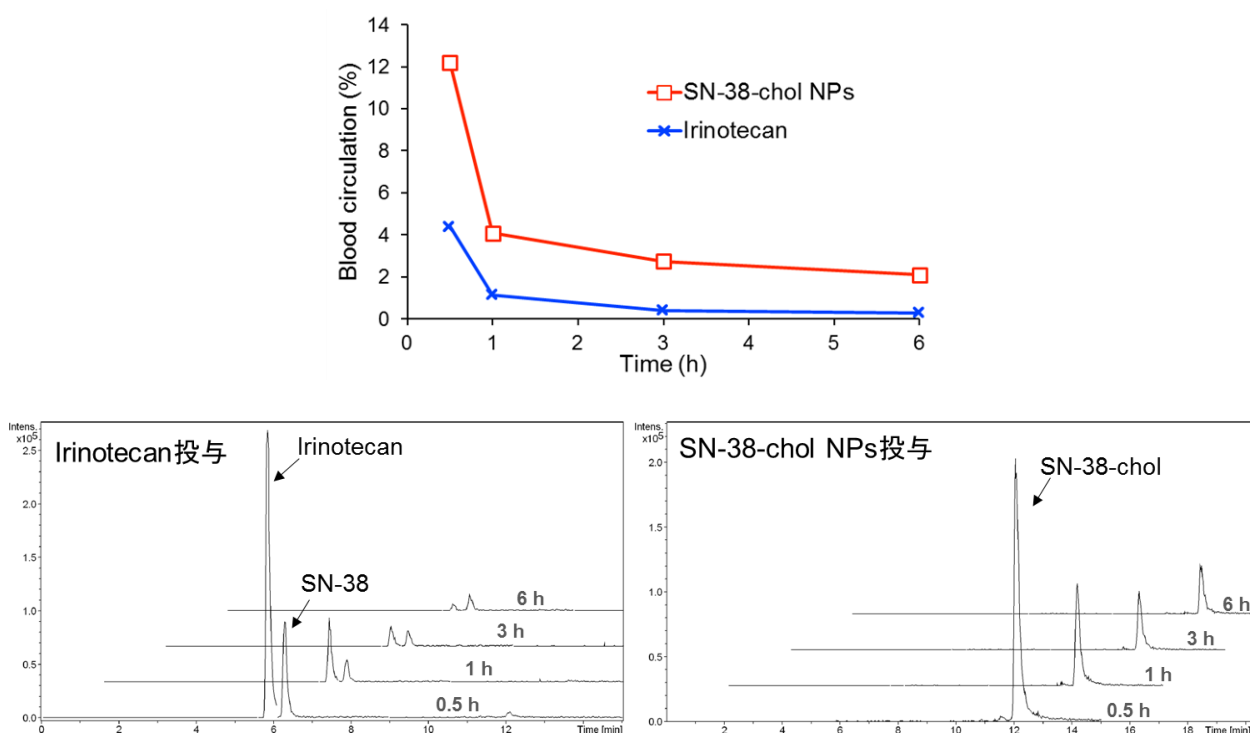


図 4-3 SN-38-chol 薬剤ナノ粒子と irinotecan の血中滞留性

#### 4-5 *in vivo* 抗腫瘍活性

SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の薬理活性を明らかにするために、*in vivo* 抗腫瘍活性試験を行った。ヌードマウスの背部2ヶ所に4T1細胞を皮下注射して腫瘍を形成させ、腫瘍が3~5 mmに成長後、抗がん剤の投与を開始した。抗がん剤としては、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子分散性、irinotecan 溶液を投与し、また、コントロールとして生理食塩水の投与も行った。2日に1度の頻度で5回の投与を行い、抗がん剤を投与した際に生理食塩水投与群と比較して腫瘍の成長が抑制されるか検討した。図4-4に示したように、生理食塩水投与群やirinotecan 投与群と比較してSN-38-chol 薬剤ナノ粒子投与群（SN-38-chol NPs）が最も高い活性を示した。加えて、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の投与量を1mg/kgにした場合は、10倍量のイリノテカン投与した場合と同程度の抗腫瘍活性を示した。この結果は、活性本体であるSN-38のがん細胞への到達量を反映していると示唆される。腫瘍組織のがん細胞へ同じ量のSN-38を到達させるためには、irinotecanと比較してSN-38-chol 薬剤ナノ粒子の投与量は1/10で良いと言え、優れた薬理効果が示された。

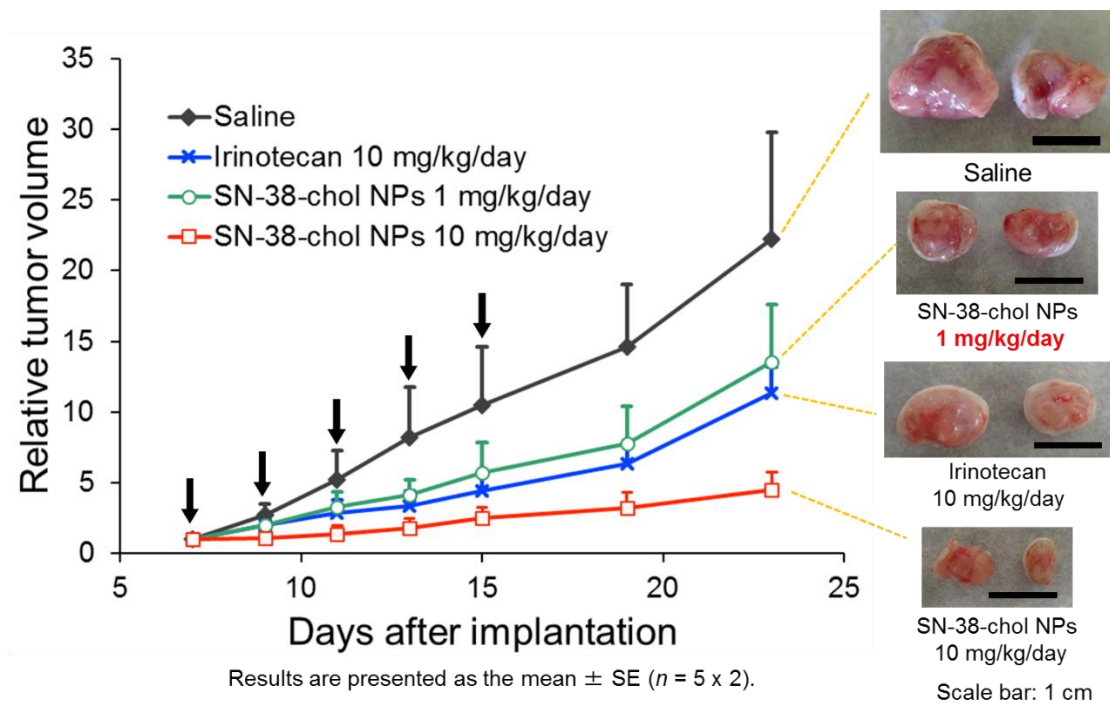


図4-4 SN-38-chol 薬剤ナノ粒子と irinotecan の *in vivo* 抗腫瘍活性

#### 4-7 SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の副作用の評価

最後に、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の副作用の評価を行った。Irinotecan を投与した際に見られる副作用としては、嘔吐、腸管穿孔、下痢、脱毛が挙げられる<sup>[1]</sup>。特に、下痢の症状が多く見られ、重篤な場合は脱水症状により死に至るケースも報告されている。下痢が起こる機構は以下のように説明されている(図4-5)<sup>[3]</sup>。投与された irinotecan は、血液循環中にカルボキシエステラーゼにより加水分解され、SN-38 が放出される。SN-38 は肝臓でグルクロン酸会合体「SN-38G」へと変換され、腸管に排出されるが、SN-38G は腸管細菌の生産する  $\beta$ -グルクロニダーゼによって加水分解を受けるため、SN-38 が再生する。以上の機構で腸管内に生じた SN-38 が腸管の粘膜を損傷することで、下痢が誘発される。そこで、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子と irinotecan を投与した際のマウスの腸管を採取し、腸管損傷の程度を観察した。

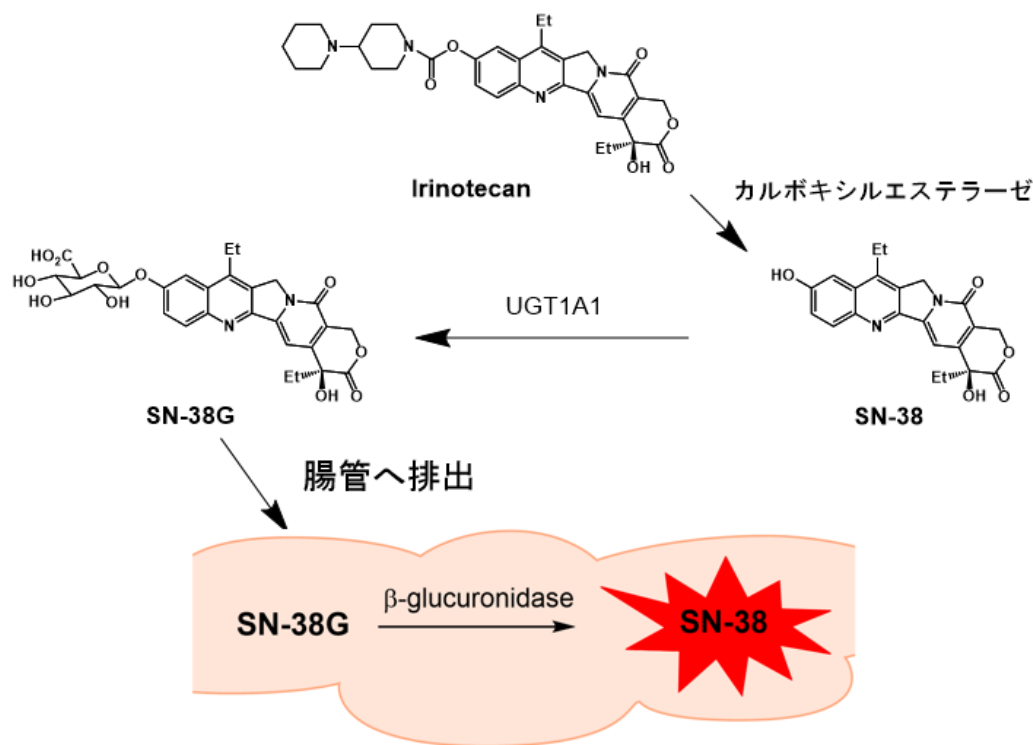


図 4-5 irinotecan 投与時の下痢誘発の機構

§4-6の *in vivo* 抗腫瘍活性評価に用いたマウスから採取した腸管を、ホルマリン固定およびヘマトキシリン・エオジン染色することで観察用の標本を得た。腸管損傷の程度は、それぞれの標本について顕微鏡下で観察し（図4-6）、10視野でアポトーシス（細胞死）およびミトーシス（有糸細胞分裂）の数をカウントした。

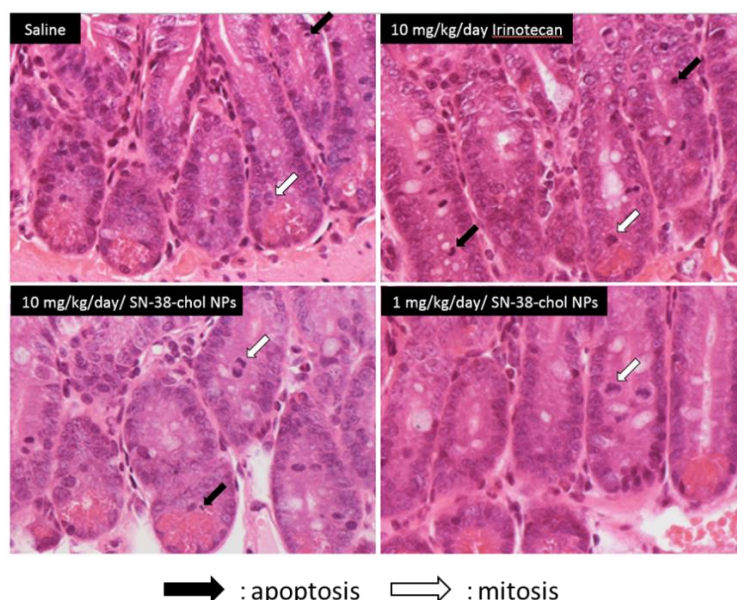


図4-6 抗がん剤投与後のマウス腸管の観察

腸管内皮が損傷を受けるとアポトーシスが誘起される。また、損傷を受けた腸管組織は、機能を修復するためにミトーシスが活発となる。したがって、腸管細胞が損傷を受けるとアポトーシスおよびミトーシスを起こす細胞が増加する<sup>[4]</sup>。標本観察の結果、irinotecan投与群と比較して、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子投与群はアポトーシスおよびミトーシスの数が減少し、腸管損傷が軽減されることが明らかになった（図4-7）。

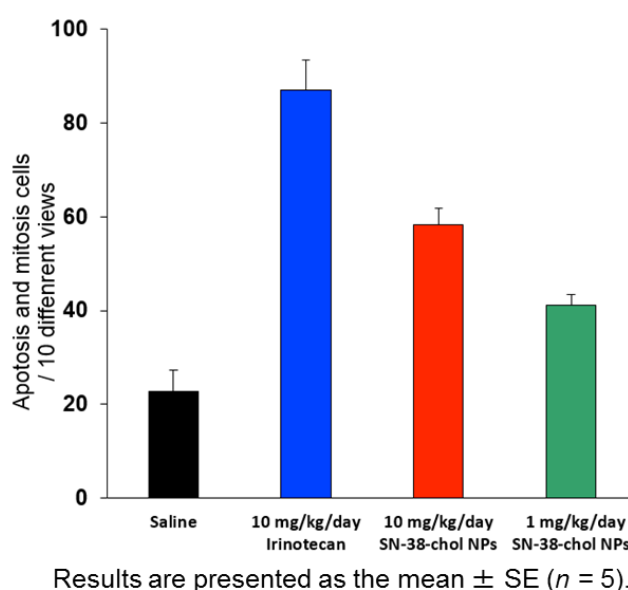


図4-7 腸管損傷の評価

SN-38-chol 薬剤ナノ粒子を投与した際の腸管損傷が irinotecan 投与時と比較して軽微であった要因は、マウス体内で生産される SN-38G の量の違いによるものと考えられる。§ 4-4 の血中滞留性試験で、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子をマウスへ投与した場合は、SN-38 が検出されなかったことから、SN-38-chol から SN-38 への加水分解の進行が非常に遅いために、SN-38G の生産量および腸管移行量が少なく、腸管損傷が抑えられたと推測した。実際に、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子および irinotecan の投与 2 時間後の血中 SN-38G 量を定量したところ、irinotecan 投与時のみ SN-38G が検出され、上記の仮説が支持された (図 4-8)。

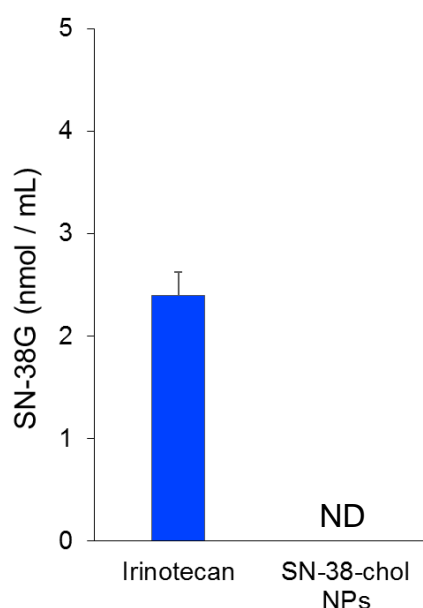


図 4-8 投与 2 時間後の血中 SN-38G 量

#### 4-8 まとめ

第4章では、第2章のスクリーニングで選抜した SN-38-chol の薬剤ナノ粒子を用いて、*in vitro* および *in vivo* 活性試験を行った。4T1-Luc 細胞を用いてがん細胞増殖抑制活性を評価したところ、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子は irinotecan と比較して高い活性を示した。また、担がんマウスを用いた *in vivo* 抗腫瘍活性試験においても SN-38-chol 薬剤ナノ粒子は irinotecan と比較して高い活性を示した。さらに、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子は、投与する濃度を十分の一とした場合、10 倍濃度の irinotecan と同程度の活性を示したことから、優れた薬理効果が確認された。この *in vivo* 抗腫瘍活性の差は、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子が irinotecan よりも高い血中滞留性を有することから、腫瘍組織のがん細胞への到達した SN-38 量の差と示唆される。また、irinotecan の主な副作用である下痢の原因となる腸管損傷を評価したところ、irinotecan を投与した場合と比較して SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の投与時は腸管損傷が抑制されることが明らかになった。

以上の結果から、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子は、現在臨床で用いられている irinotecan と比較して、高い抗腫瘍活性を示したと同時に副作用発現の要因の一つである腸管損傷が抑制されたため、非常に優れた抗がん剤となることが期待される。



#### 参考文献（第4章）

- [1] 医薬品インタビューフォーム、カンプト®点滴静注、2014年1月（第8版）
- [2] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
- [3] N. Kaneda, H. Nagata, T. Furuta, T. Yokokura, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 1715–1720.
- [4] J. Huwyler, D. F. Wu, W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 14164 – 14169.

## 第 5 章

### 総括

本研究を総括する。

近年、粒径 200 nm 以下にサイズ制御した薬剤（ナノ薬剤）をがん病巣へ効率的に集積させる薬剤ターゲティングに関する研究が試みられている。ナノ薬剤の作製には、リポソームや高分子ミセル等からなるナノキャリアに薬物を内包させる手法が報告されているが、ナノキャリアによる抗原性の発現や、1 つのナノ粒子に担持可能な薬物の量が少ない等の問題点が指摘されている。以上の背景を踏まえ、本研究では上記の問題点を克服した有効性の高い薬剤の開発を目指して、キャリアフリーのナノ薬剤「薬剤ナノ粒子」の創成を目的とした。

第 2 章では、血中における薬剤ナノ粒子の加水分解耐性を向上させることを目的として、1) SN-38 二量体薬剤ナノ粒子の表面修飾、2) SN-38 への種々の疎水性置換基の導入を検討した。SN-38 二量体の薬剤ナノ粒子をポリソルベート 80 による表面修飾を行った場合、ポリソルベート 80 の添加量に関係なく、マウス血清中における加水分解が速やかに進行した。一方、SN-38 のフェノール性水酸基へ種々の置換基を導入し、その薬剤ナノ粒子を用いて加水分解耐性を評価したところ、導入した置換基の疎水性が高くなるにつれて、薬剤ナノ粒子の加水分解耐性が向上することが明らかになった。すなわち、SN-38 プロドラッグの疎水性の向上に伴って、分散溶媒である水への溶解度が低下したためであると考えられる。薬剤ナノ粒子の粒径、加水分解耐性、および導入した置換基の毒性・安定性を勘案して、最終的に、SN-38-C<sub>14</sub> および SN-38-chol を、本研究の目的を達成するための有望な SN-38 プロドラッグとして選抜した。

第 3 章では、第 2 章で選抜した SN-38-C<sub>14</sub> を含めて脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の *in vitro* 活性評価を行った。炭素数 2~22 の脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子のがん細胞増殖抑制活性を評価した結果、炭素数の増加に伴って活性が低下することが明らかになった。ここで、がん細胞への薬剤ナノ粒子の取り込み効率を調べたところ、脂肪酸の炭素数の増加に伴って細胞内のプロドラッグの量が増加する傾向にあった。その一方で、エステラーゼによる加水分解性を調べた結果、脂肪酸の炭素数の増加に伴って加水分解が逆に抑制されることが判明した。これらの結果から、細胞内における加水分解性が、がん細胞増殖抑制活性を決定する主要因であると結論付けた。次に、脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグの薬剤ナノ粒子を用いて動物実験を行うことを試みたが、動物実験に必要な高濃度の薬剤ナノ粒子分散液を作製した場合、巨大な微粒子が形成され、EPR 効果の発現が期待される 10~200 nm の薬剤ナノ粒子を得ることができなか

った。そこで、前章で選抜したもう一つの SN-38 プロドラッグである SN-38-chol について、次章では検討することにした。

第 4 章では、第 2 章で選抜した SN-38-chol の薬剤ナノ粒子を用いて、*in vitro*、*in vivo* 活性試験を行った。4T1-Luc 細胞を用いてがん細胞増殖抑制活性を評価したところ、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子は irinotecan と比較して高い活性を示した。また、担がんマウスを用いた *in vivo* 抗腫瘍活性試験においても SN-38-chol 薬剤ナノ粒子は irinotecan と比較して高い活性を示した。さらに、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の投与濃度を 1/10 とした場合、irinotecan と同程度の活性を示したことから、優れた薬理効果が確認された。この *in vivo* 抗腫瘍活性の差は、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子が irinotecan よりも高い血中滞留性を有することから、腫瘍組織を構成するがん細胞の核内へと到達した SN-38 量の差と示唆される。また、irinotecan の主な副作用である下痢の原因となる腸管損傷を評価したところ、irinotecan を投与した場合と比較して SN-38-chol 薬剤ナノ粒子の投与時は腸管損傷が抑制されることが明らかになった。

以上の結果から、SN-38-chol 薬剤ナノ粒子は、現在臨床で用いられている irinotecan と比較して優れた薬理効果が発現することが分かり、今後の臨床応用が期待される。

本研究で得られた最も重要な知見は、薬剤ナノ粒子の加水分解性は、薬剤ナノ粒子を構成するプロドラッグの疎水性に依存することを明らかにした点である。薬剤ナノ粒子の応用範囲を考えると、がん治療薬のみならず点眼薬や塗布剤等、様々な疾患の治療薬としても適用可能と考えられる。各々の疾患ごとに最適な加水分解性が異なることが予想されるが、その際に、薬物へ導入する置換基の疎水性を最適化することで、患部における薬物の放出性を制御することが可能になると見込まれる。

本研究の成果が、将来、画期的な新薬を開発するための一助となれば幸甚である。

## 謝辞

本研究に際して、終始ご指導ご鞭撻を賜りました及川英俊教授に厚く御礼申し上げます。博士編入試験にはじまり、学会要旨や学術論文の作成の折に、多くの有益なご助言を頂きました。また、ディスカッション中に頂いた鋭い御意見は、本論文を作成にあたり非常に有益なものとなりました。深く感謝致します。

ナノ薬剤という非常に興味深い研究テーマを与えていただき、ご指導をいただきました笠井均准教授に厚く御礼申し上げます。ご教示いただいた斬新な研究センスや考え方は研究を進めるうえで大変貴重なものとなりました。また、私の進路や私生活に至るまで、常に多大なるご配慮をいただき大変感謝しております。

小野寺恒信助教には、報告会や発表練習の中で多くのご指摘、ご助言をいただきました。また、測定法の原理や装置の仕組みなど、研究の足場を固めるために欠かせないことを教えていただき感謝しております。

副査を務めていただいた上田実教授、ならびに岩本武明教授に厚く御礼申し上げます。審査において大変有益なご指摘を頂きました。

本研究を進めるあたり、多くの方にご協力いただきました。京都大学物質－細胞統合システム拠点の村上達也准教授には、細胞実験およびマウスを用いた血中滞留性評価の手法をご教授いただきました。また、東北大学大学院医学研究科の大内憲明教授、権田幸祐教授、多田寛講師、叢莉蔓博士、高野真由美博士、古川靖子研究員および東北大学病院病理部の渡辺みか准教授には、マウスを用いた *in vivo* 抗腫瘍活性および副作用の評価についてご教授いただきました。ここに、心より感謝の意を表します。

私が過去に研究室に在籍した、宮城大学食産業学部 菰田俊一准教授、東北大学大学院農学研究科 桑原重文教授、上田実教授、東北大学多元物質科学研究所 村松淳司教授に厚く御礼申し上げます。先生方の研究室に所属し、有機化学、とりわけ有機化合物の合成、精製、および構造決定について学んだ経験は本研究を遂行するうえで欠かせないものでした。

横山美由紀秘書ならびに川村麻奈秘書には、事務連絡や書類手続き等で大変お世話になりました。日々のお心遣いのおかげで、研究室生活を円滑に送ることができました。深く感謝いたします。

日々の研究を共にした先輩、同輩、後輩の皆様に深く感謝いたします。皆様の研究に対する姿勢から、とても刺激を受けました。皆様のおかげで、楽しい研究室生活を送ることができたと思っております。本当にありがとうございました。

最後に、社会人から学生の身へ戻ることを快諾し、精神的な支えとなってくれた妻の由基に心から感謝します。

2016 年 1 月

## 実験の部

実験の部では各章の実験方法およびスペクトルデータを示した。実験の部の構成は以下の通りである。

## 第2章

試薬

装置

SN-38 のスペクトルデータ

有機合成の方法

SN-38 プロドラッグの合成

SN-38 プロドラッグのスペクトルデータ

脂肪酸を導入した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の XRD 測定

再沈法による薬剤ナノ粒子の作製

HPLC-MS/MS 分析

マウス血清中における加水分解実験

clogP の計算

## 第3章

試薬

細胞

装置

HPLC-MS/MS 分析条件

HepG2 細胞を用いた、がん細胞増殖抑制活性試験

ブタ肝臓エステラーゼを用いた加水分解実験

細胞取り込み量の定量

SN-38 の C<sub>18</sub> 誘導体の合成

SN-38 の C<sub>18</sub> 誘導体のスペクトルデータ

## 第4章

試薬



細胞

動物

装置

血中滞留性試験

*In vivo* 抗腫瘍活性試験

腸管採取および腸管損傷評価

SN-38G の定量実験

## 第2章

### ・試薬

実験に用いた試薬は以下の企業から購入した試薬を精製することなく用いた。

#### 【和光純薬工業】

塩化アセチル、カプロン酸 (C<sub>6</sub>)、カプリン酸 (C<sub>10</sub>)、ミリスチン酸 (C<sub>14</sub>)、ステアリン酸 (C<sub>18</sub>)、ベヘン酸 (C<sub>22</sub>)、リトコール酸、デオキシコール酸、コール酸、コハク酸無水物、メントール、安息香酸、ビタミン E、ビタミン D3、コレステロール、DMAP、クロロメチルメチルエーテル (MOM-Cl)、テトラフルオロホウ酸リチウム、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン、DIPEA、ジクロロメタン、アセトン、エタノール、THF、DMSO、メタノール、アセトニトリル、ギ酸

#### 【東京化成工業】

SN-38、EDC

#### 【Aldrich】

マウス血清

### ・装置

NMR: AVANCE-400 (Bruker)

IR: AVATOR 360 (Nicolet)

HR-MS: micrOTOF-Q II-S1 (Bruker)

HPLC-MS

HPLC: 1260 Infinity シリーズ (Agilent)

MS: HCT ultra-IMR (Bruker)

SEM: JSM-6700F (JEOL)

粒径測定・ゼータ電位測定: Zetasizer nanoZS (Malvern)

・ SN-38 のスペクトルデータ

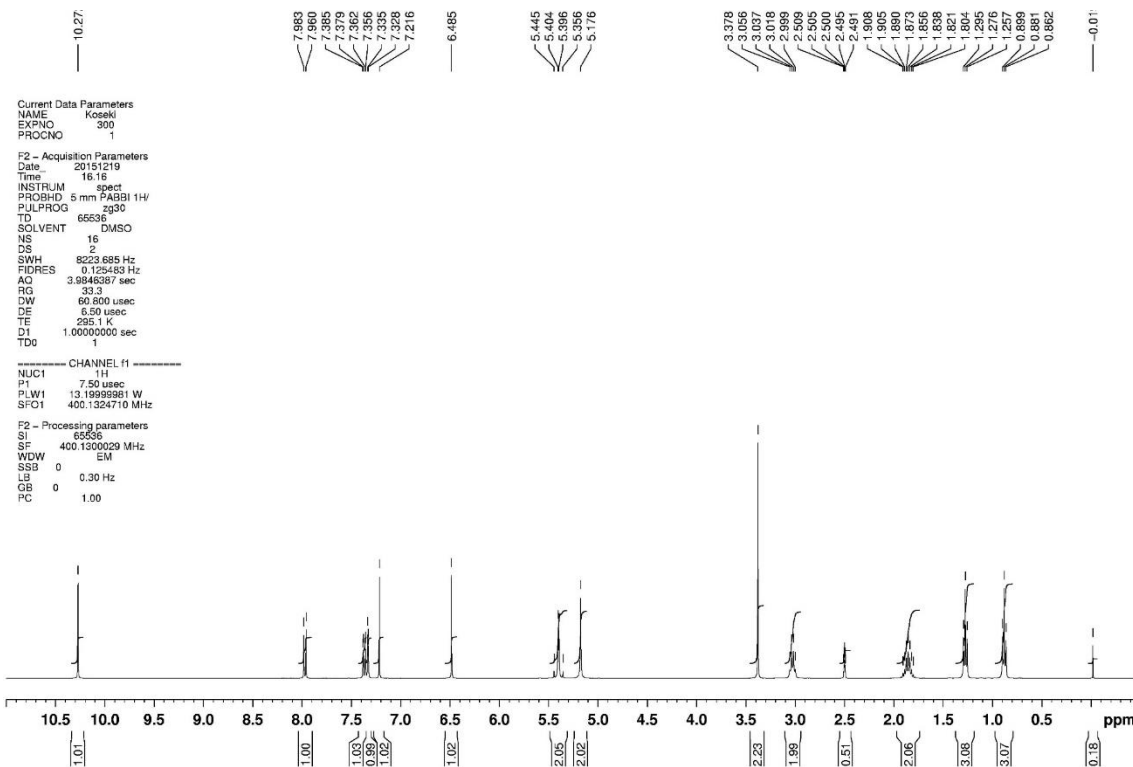


図 S2-1 SN-38 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (400 MHz、DMSO- $d_6$ )

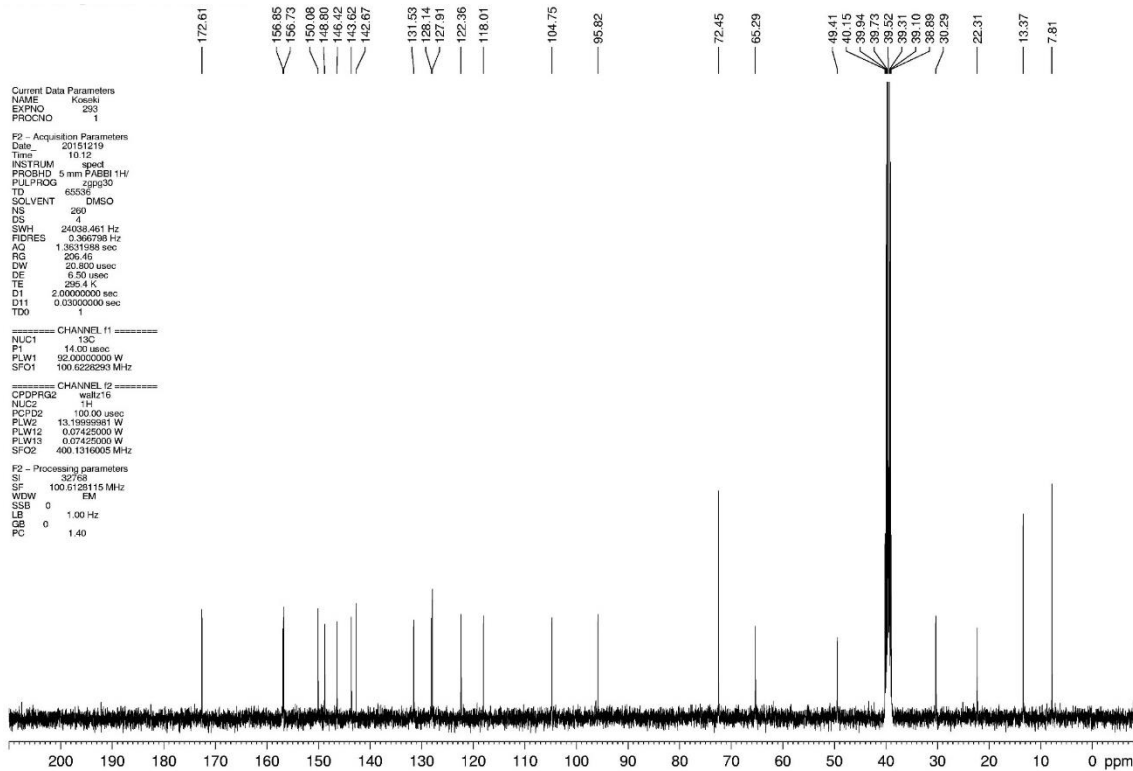


図 S2-2 SN-38 の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (100 MHz、DMSO- $d_6$ )

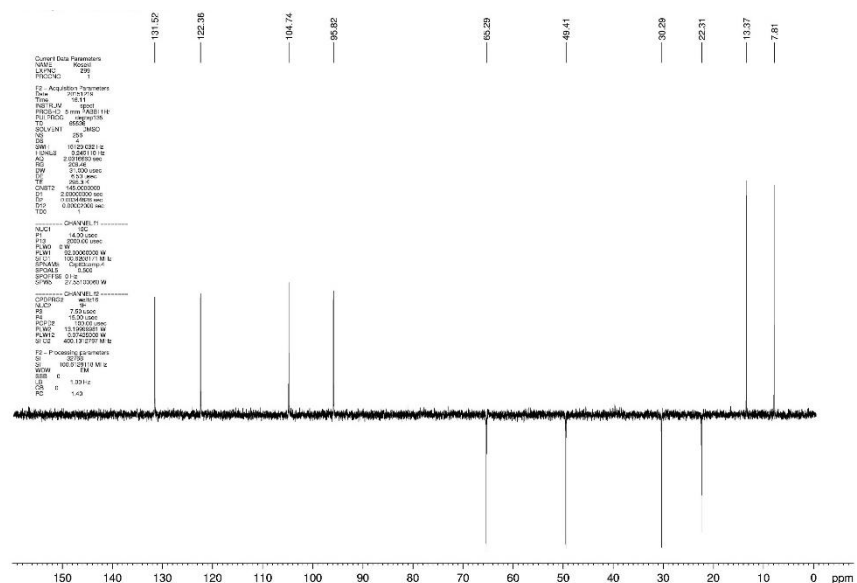
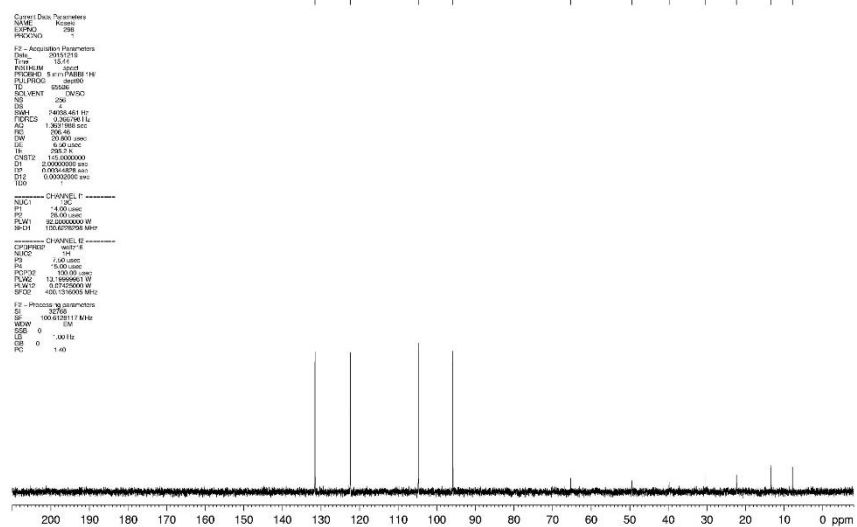
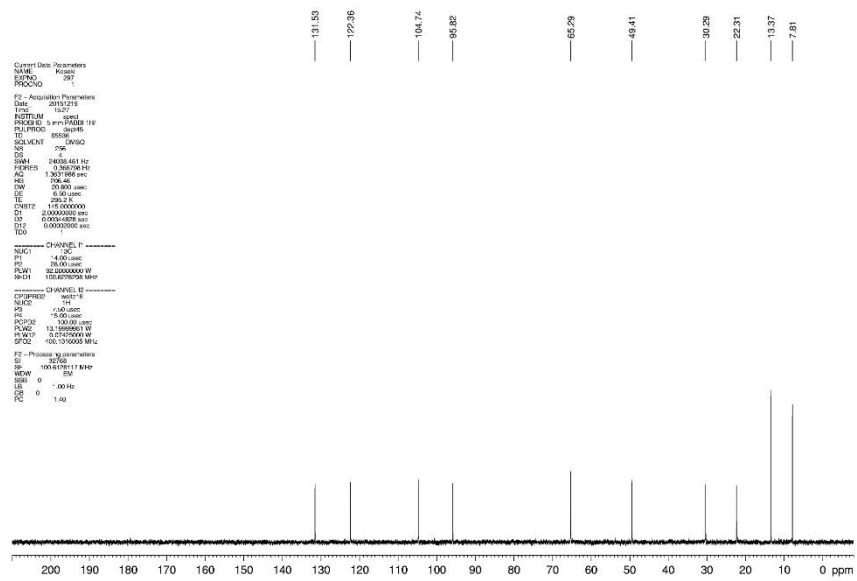
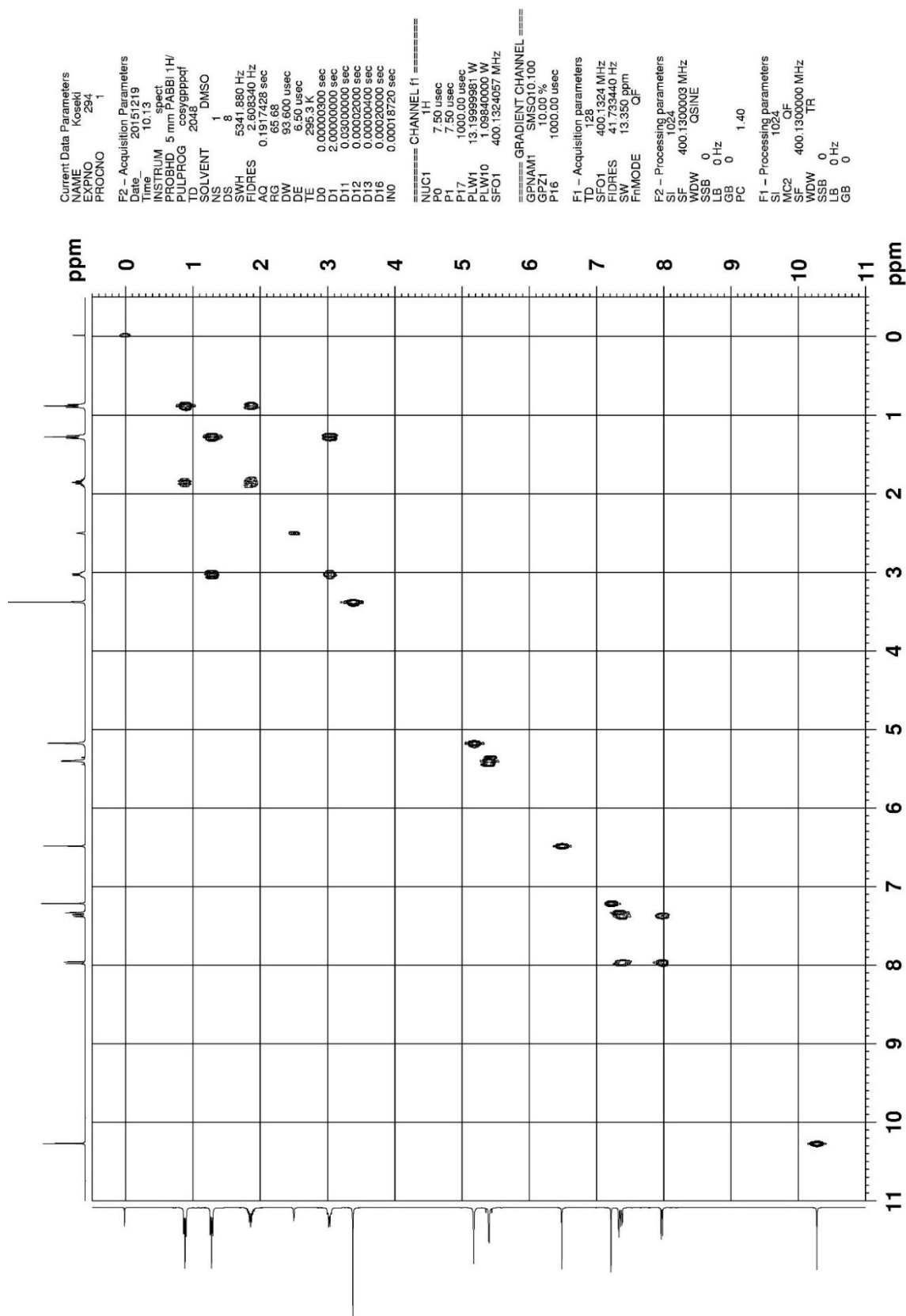


図 S2-3 SN-38 の DEPT45、90、135 スペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)



☒ S2-4 SN-38 の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

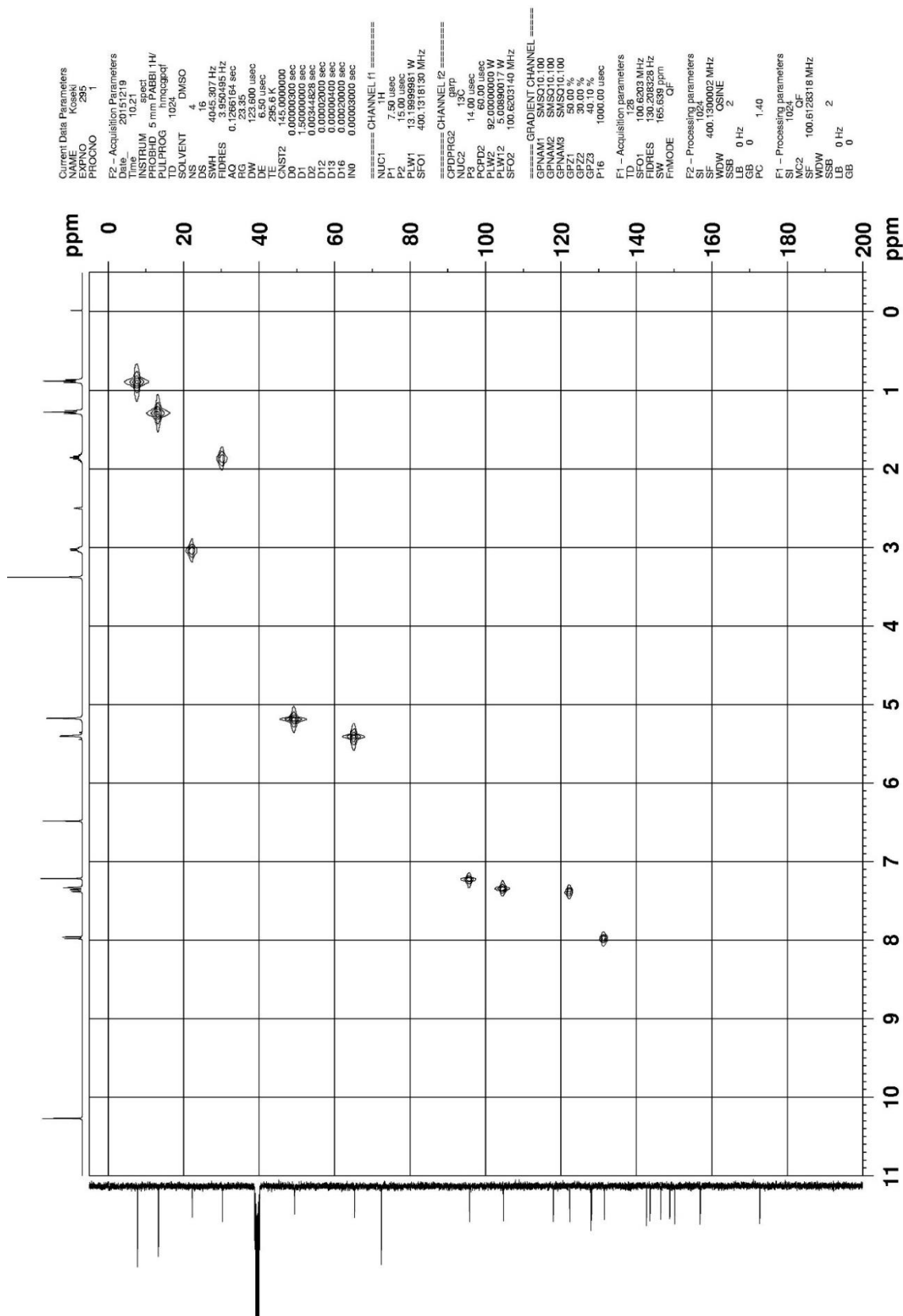


図 S2-5 SN-38 の HMQC スペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

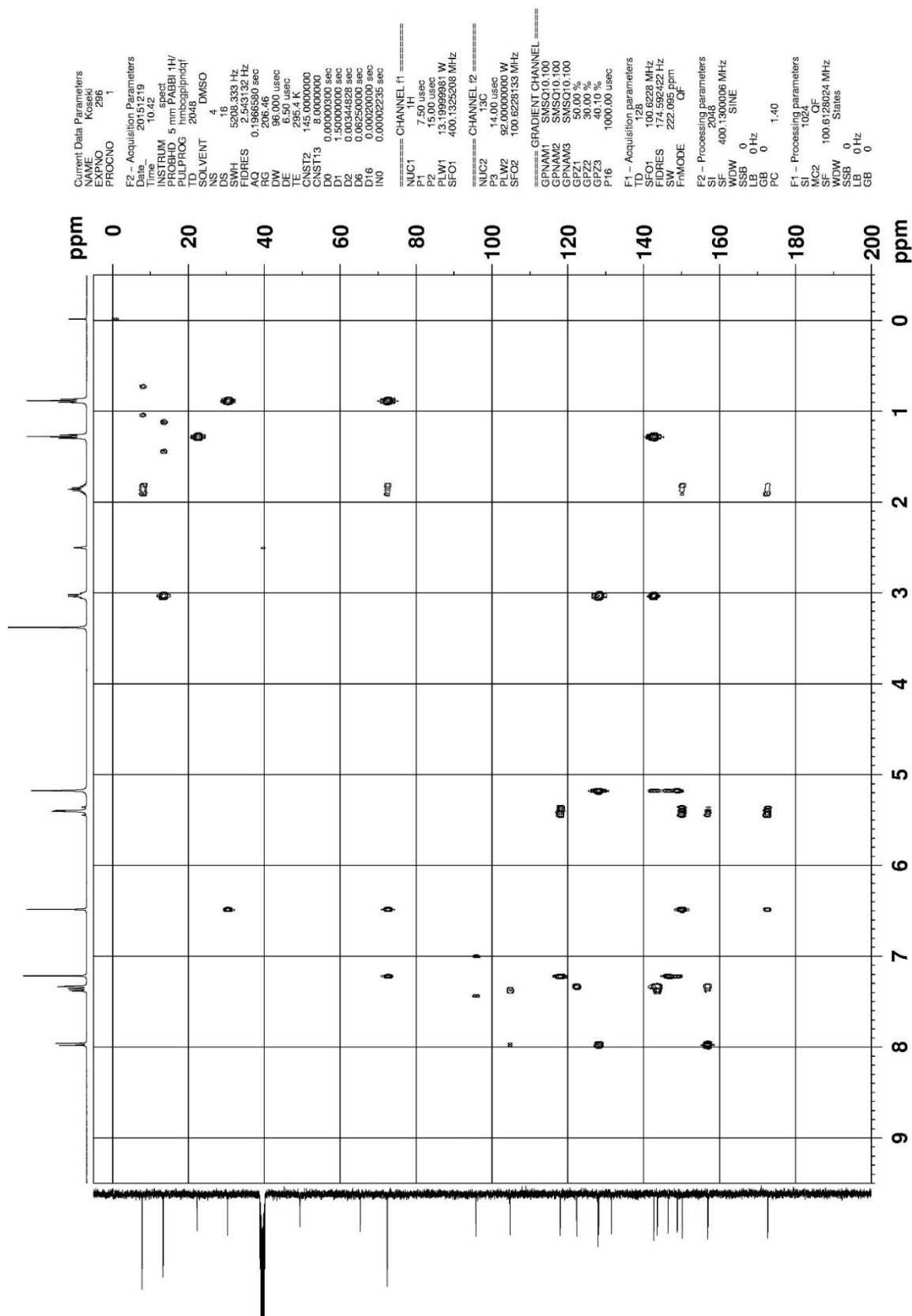


図 S2-6 SN-38 の HMBC スペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

## ・ SN-38 プロドラッグの合成と

### SN-38-C<sub>2</sub> の合成

SN-38 (105 mg, 0.2681 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13 mL), and then Et<sub>3</sub>N (176  $\mu$ L, 1.27 mmol) and DMAP (3.6 mg, 0.0295 mmol) were added sequentially at 25 °C. The reaction mixture was cooled to 0 °C and acetyl chloride (22  $\mu$ L, 0.306 mmol) was added dropwise. After stirring for 16 h at 25 °C, the reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with saturated aqueous solution of NH<sub>4</sub>Cl, water and brine. The mixture was then dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified using silica gel column chromatography with CHCl<sub>3</sub> to give SN-38-C<sub>2</sub> (44.8 mg, 0.103 mmol, 39%) as a pale yellow solid.

IR:  $\nu_{\max}$  1746, 1656, 1604, 1225, 1199, 1176, 1164, 1033, 1011, 902, 838 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  0.88 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.29 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.84 – 1.91 (2H, m), 2.37 (3H, s), 3.14 – 3.20 (2H, m), 5.32 (2H, s), 5.44 (2H, s), 6.53 (1H, s), 7.32 (1H, s), 7.66 (1H, dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz), 8.00 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.19 (1H, d, *J* = 8.8 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  7.8, 13.9, 21.0, 22.3, 30.3, 49.6, 65.3, 72.4, 96.7, 115.4, 119.0, 125.7, 127.1, 128.6, 131.3, 145.3, 145.9, 146.5, 149.2, 150.1, 151.9, 156.8, 169.4, 172.5. HR-MS (ESI-TOF): *m/z* calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 435.1551, found 435.1564.

### General synthesis procedure of SN-38 prodrugs with carboxyl acid

SN-38 (100 mg, 0.255 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12.7 mL, 0.02 M), and then fatty acid (0.281 mmol), EDC (97.4 mg, 0.510 mmol), and DMAP (3.1 mg, 0.0255 mmol) were added sequentially at 25 °C. After stirring for 4 h at 25 °C, the reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with saturated aqueous solution of NH<sub>4</sub>Cl, water, and brine. The organic layer was then dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified using silica gel column chromatography with CHCl<sub>3</sub> to give SN-38 fatty acid ester.



#### SN-38-C<sub>6</sub> の合成

SN-38 (98.2 mg, 0.250 mmol), caproic acid (35  $\mu$ L, 0.280 mmol), EDC (105.5 mg, 0.550 mmol), and DMAP (4.2 mg, 0.0344 mmol) afford SN-38-C<sub>6</sub> (116.6 mg, 0.238 mmol, 95%) as a pale yellow solid. IR:  $\nu_{\max}$  1756, 1661, 1599, 1225, 1213, 1179, 1164, 1135, 1106  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  0.96 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 1.04 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 1.38 – 1.45 (7H, m), 1.78 – 1.96 (4H, m), 2.66 (2H, t,  $J$  = 7.6 Hz), 3.16 (2H, q,  $J$  = 7.6 Hz), 3.72 (1H, s), 5.27 (2H, s), 5.31 (1H, d,  $J$  = 16.4 Hz), 5.76 (1H, d,  $J$  = 16.4 Hz), 7.56 (1H, dd,  $J$  = 9.2, 2.4 Hz), 7.65 (1H, s), 7.83 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz), 8.24 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  8.0, 14.1, 22.4, 23.2, 24.6, 31.4, 31.7, 34.5, 49.5, 66.3, 73.0, 98.2, 114.5, 118.7, 125.5, 127.4, 127.5, 132.1, 145.4, 146.8, 147.3, 149.8, 150.3, 151.8, 157.7, 172.3, 173.9. HR-MS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 491.2177, found 491.2175.

#### SN-38-C<sub>10</sub> の合成

SN-38 (99.4 mg, 0.253 mmol), capric acid (54.1 mg, 0.314 mmol), EDC (132.5 mg, 0.691 mmol), and DMAP (7.1 mg, 0.0581 mmol) afford SN-38-C<sub>10</sub> (106.6 mg, 0.195 mmol, 77%) as a pale yellow solid. IR:  $\nu_{\max}$  1763, 1739, 1664, 1599, 1283, 1227, 1212, 1175, 1165, 1133, 1107, 1064, 831  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  0.89 (3H, t,  $J$  = 7.6 Hz), 1.04 (3H, t,  $J$  = 7.6 Hz), 1.29 – 1.42 (15H, m), 1.78 – 1.96 (4H, m), 2.66 (2H, t,  $J$  = 7.6 Hz), 3.16 (2H, q,  $J$  = 7.6 Hz), 3.73 (1H, s), 5.27 (1H, s), 5.31 (1H, d,  $J$  = 16.4 Hz), 5.76 (1H, d,  $J$  = 16.0 Hz), 7.55 (1H, dd,  $J$  = 9.2, 2.4 Hz), 7.65 (1H, s), 7.83 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz), 8.24 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  8.0, 14.1, 14.2, 22.8, 23.3, 25.0, 29.3, 29.4, 29.6, 31.8, 32.0, 34.6, 49.5, 66.4, 72.9, 98.2, 114.6, 118.7, 125.6, 127.4, 127.5, 132.1, 145.4, 146.9, 147.4, 149.8, 150.3, 151.9, 157.7, 172.3, 174.0. HR-MS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd. for C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 547.2803, found 547.2800.

#### SN-38-C<sub>14</sub> の合成

SN-38 (100.7 mg, 0.257 mmol), myristic acid (61.4 mg, 0.269 mmol), EDC (98.9 mg, 0.516 mmol), and DMAP (5.9 mg, 0.0483 mmol) afford SN-38-C<sub>14</sub> (102.1 mg, 0.169 mmol, 66%) as a pale yellow solid. IR:  $\nu_{\max}$  1764, 1739, 1664, 1600, 1468, 1414, 1282, 1227, 1213, 1175, 1165, 1134, 1108, 1064, 832  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  0.88 (3H, t,  $J$  = 6.8 Hz), 1.04 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 1.27 – 1.42 (23H, m), 1.80 – 1.92 (4H, m), 2.66 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 3.15 (2H, q,  $J$  = 7.2 Hz), 3.72 (1H, s), 5.27 (1H, s), 5.31 (1H, d,  $J$  = 16.4 Hz), 5.76 (1H, d,  $J$  = 16.0 Hz), 7.55 (1H, dd,  $J$  = 9.2, 2.4 Hz), 7.65 (1H, s), 7.83 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz), 8.24 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz).

$J = 7.6$  Hz), 3.82 (1H, s), 5.26 (2H, s), 5.31 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 5.75 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz), 7.54 (1H, dd,  $J = 9.2, 2.0$  Hz), 7.65 (1H, s), 7.81 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 8.23 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  8.0, 14.1, 14.3, 22.8, 23.3, 25.0, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.76, 29.80, 29.83, 31.8, 32.1, 34.6, 49.6, 66.5, 72.9, 98.1, 114.7, 118.7, 125.6, 127.4, 127.6, 132.2, 145.4, 147.1, 147.6, 149.9, 150.3, 152.0, 157.8, 172.4, 174.1. HR-MS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd. for  $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_6$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 603.3429, found 306.3434.

#### SN-38- $\text{C}_{18}$ の合成

SN-38 (79.9 mg, 0.204 mmol), stearic acid (62.3 mg, 0.219 mmol), EDC (119 mg, 0.622 mmol), and DMAP (6.1 mg, 0.0499 mmol) afford SN-38- $\text{C}_{18}$  (125.4 mg, 0.190 mmol, 93%) as a pale yellow solid. IR:  $\nu_{\text{max}}$  1765, 1738, 1664, 1599, 1468, 1283, 1223, 1213, 1175, 1168, 1133, 1108, 1064, 832  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0.88 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz), 1.04 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz), 1.26 – 1.42 (31H, m), 1.80 – 1.92 (4H, m), 2.66 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz), 3.16 (2H, q,  $J = 8.0$  Hz), 3.74 (1H, s), 5.27 (2H, s), 5.31 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 5.76 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 7.55 (1H, dd,  $J = 9.2, 2.4$  Hz), 7.65 (1H, s), 7.83 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 8.24 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  8.0, 14.1, 14.3, 22.8, 23.3, 25.0, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.75, 29.79, 29.8, 31.8, 32.1, 34.6, 49.5, 66.4, 72.9, 98.2, 114.6, 118.7, 125.6, 127.4, 127.6, 132.1, 145.4, 147.0, 147.5, 149.9, 150.4, 151.9, 157.8, 172.3, 174.0. HR-MS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd. for  $\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_6$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 659.4055, found 659.4075.

#### SN-38-benzoate の合成

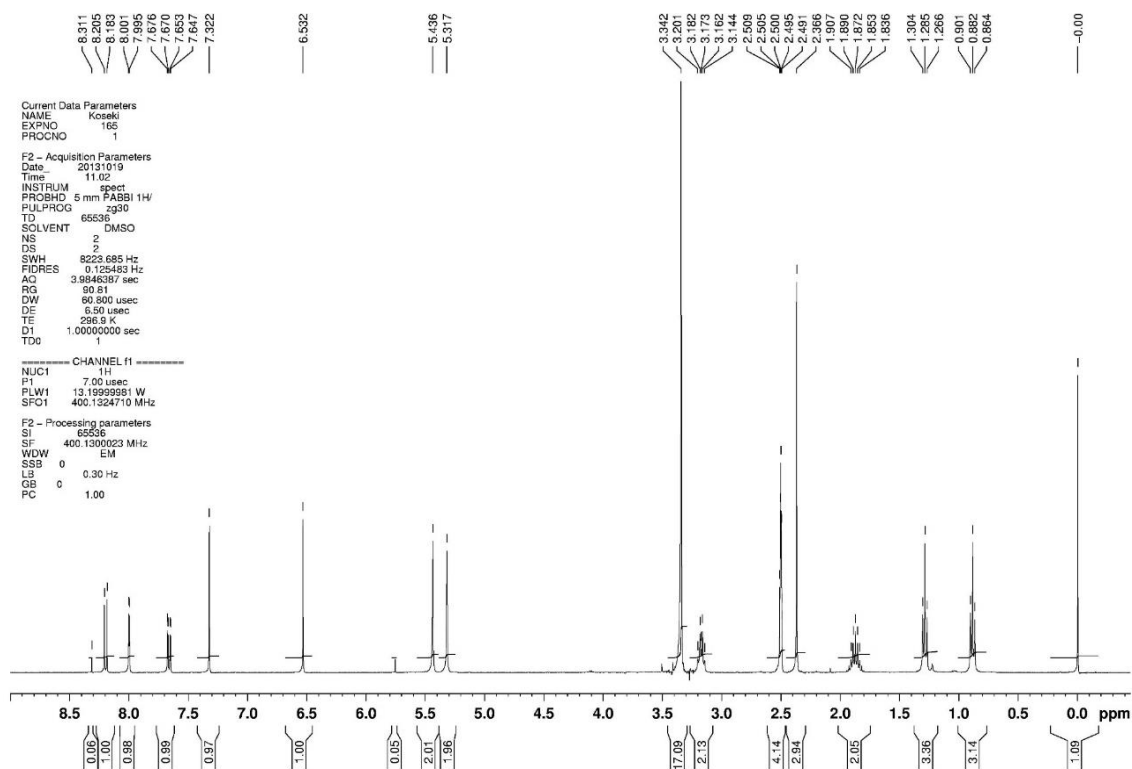
SN-38 (100 mg, 0.255 mmol) was added to a solution of benzoic acid (31.1 mg, 0.255 mmol), EDC (122 mg, 0.638 mmol) and DMAP (3.1 mg, 0.0255 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.6 mL) at room temperature. After the reaction mixture was stirred overnight, it was quenched with 1N HCl aq. (5 mL), and the resulting mixture was extracted  $\text{CHCl}_3$  (2 x 15 mL). The combined extracts were washed with brine (10 mL) then dried with  $\text{MgSO}_4$ . Concentration in vacuo afforded a residue, which was purified by column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  100:1) to give SN-38-benzoic acid (46.1 mg, 36 %) as a white powder.  $^1\text{H}$  NMR (400 Mz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 1.05 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H), 1.42 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H), 1.85-1.97 (m, 2H), 3.19 (dd,  $J = 7.6, 15.2$  Hz, 2H), 3.71 (s, 1H), 5.29 (s, 2H), 5.32 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 5.77 (d,  $J = 16.4$  Hz, 1H), 7.55-7.66 (m, 2H), 7.67-7.72 (m, 2H), 7.98 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.27-8.32 (m, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (400 Mz,

CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.8, 14.0, 23.2, 31.6, 49.4, 66.3, 72.8, 98.1, 114.8, 118.6, 125.5, 127.3, 127.5, 128.7, 129.0, 130.3, 132.1, 134.0, 145.3, 146.8, 147.4, 149.9, 150.2, 151.8, 157.6, 165.0, 173.8 ppm.

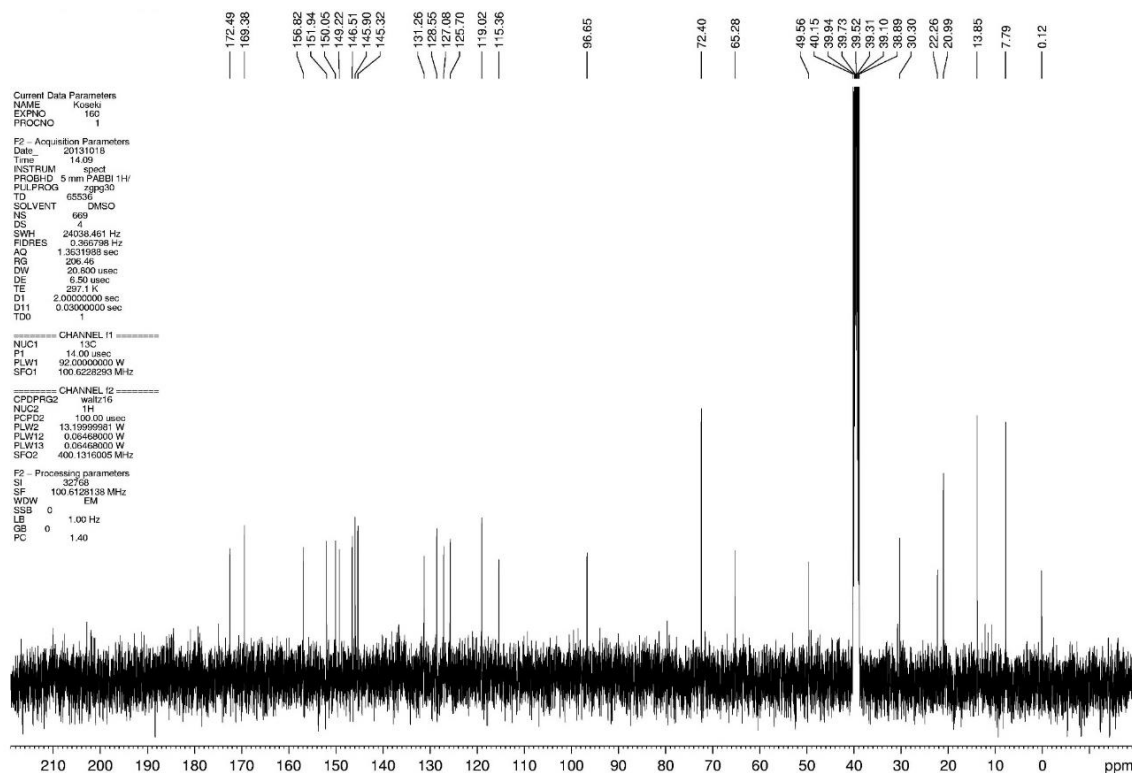
#### SN-38-vitamin E の合成

SN-38 (50 mg, 0.127 mmol) was added to a solution of VE-succinate (67.6 mg, 0.127 mmol), EDC (36.5 mg, 0.191 mmol) and DMAP (1.6 mg, 0.0127 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.3 mL) at room temperature. After the reaction mixture was stirred overnight, it was quenched with H<sub>2</sub>O (5 mL), and the resulting mixture was extracted CHCl<sub>3</sub> (2 x 15 mL). The combined extracts were washed with brine (10 mL) then dried with MgSO<sub>4</sub>. Concentration in vacuo afforded a residue, which was purified by column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 100:0  $\rightarrow$  100:1) to give SN-38-VE-ester (52.0 mg, 45 %) as a pale yellow amorphous solid. <sup>1</sup>H NMR (400 Mz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.85 (t, J = 6.8 Hz, 12H), 1.03-1.53 (m, 30H), 1.73-1.96 (m, 7H), 1.99 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.59 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.11-3.16 (m, 6H), 3.70 (s, 1H), 5.26 (s, 2H), 5.31 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 5.76 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 7.56 (dd, J = 0.8, 9.2 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 8.23 (d, J = 9.2 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (400 Mz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.8, 11.8, 12.1, 13.0, 13.9, 19.6, 19.7, 20.6, 21.0, 22.6, 22.7, 23.1, 24.4, 24.8, 27.9, 28.7, 29.4, 31.6, 32.7, 32.8, 37.2, 37.4, 39.3, 49.4, 66.3, 72.3, 75.1, 88.1, 93.8, 98.0, 114.6, 117.4, 117.5, 119.1, 123.1, 124.9, 125.3, 126.6, 127.2, 127.4, 132.1, 140.4, 145.3, 146.8, 147.4, 149.5, 150.2, 151.8, 157.6, 170.84, 170.86, 173.8 ppm.

・SN-38 プロドラッグのスペクトルデータ



☒ S2-7 SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、DMSO-*d*<sub>6</sub>)



☒ S2-8 SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>13</sup>C NMR スペクトル (100 MHz、DMSO-*d*<sub>6</sub>)

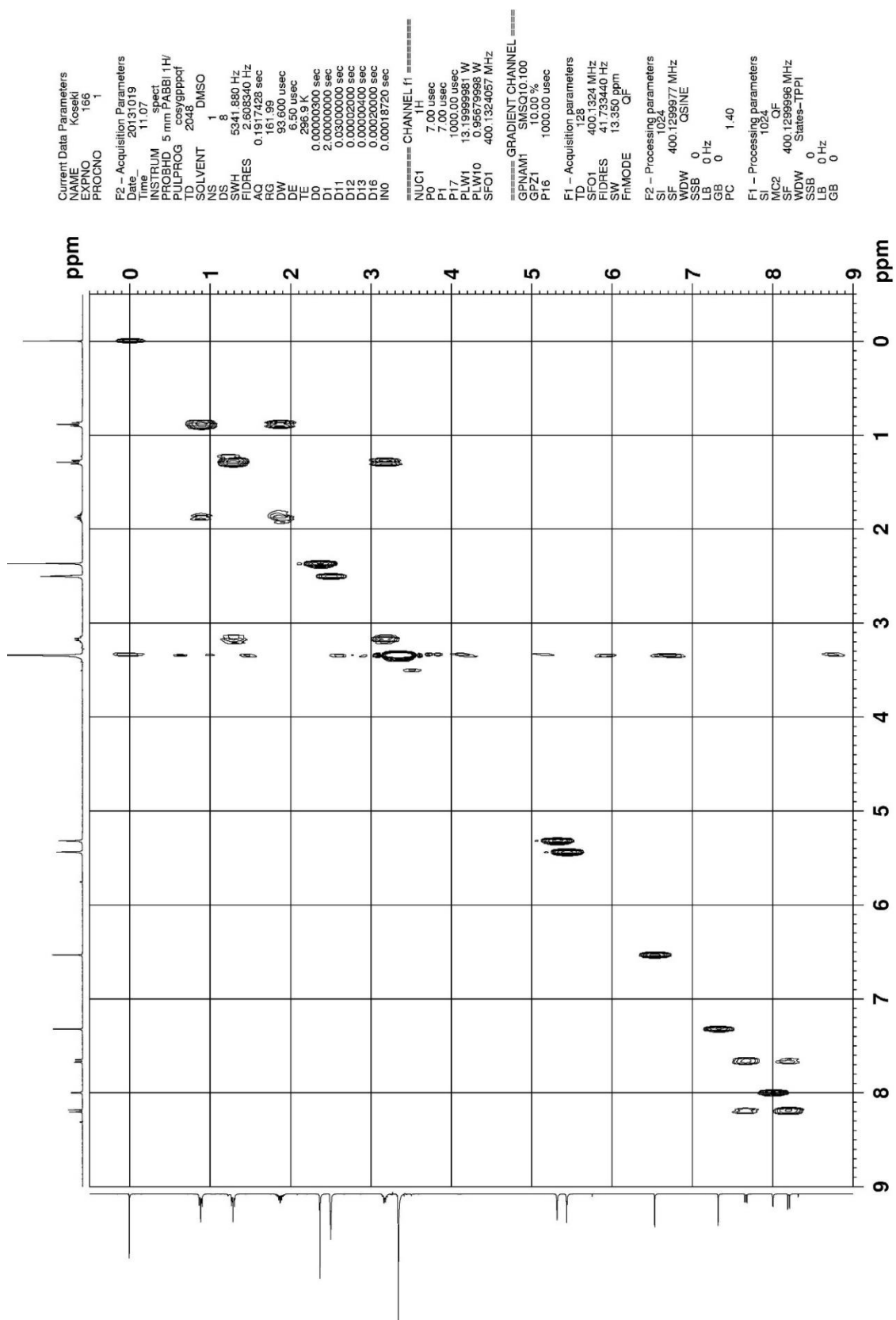
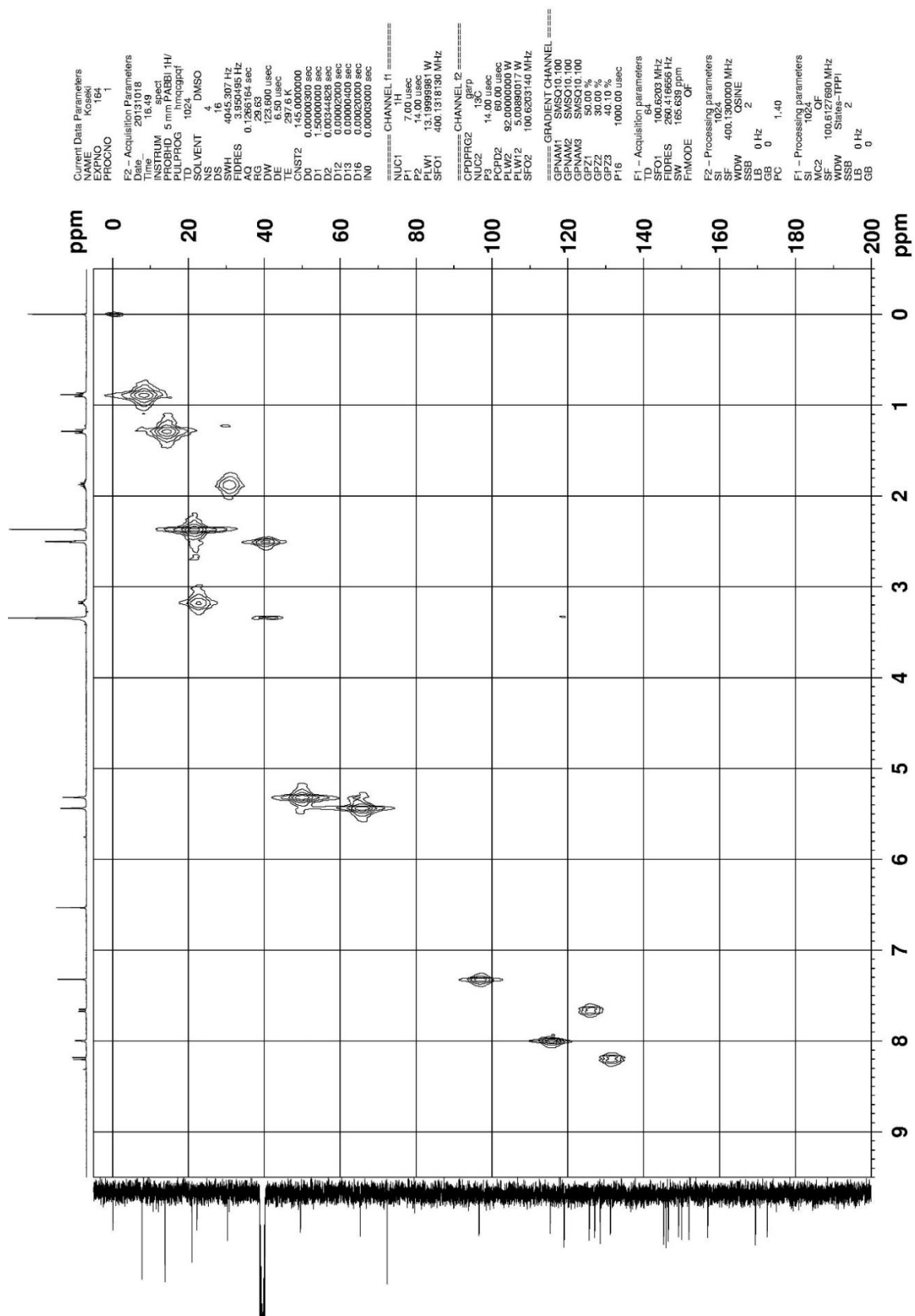
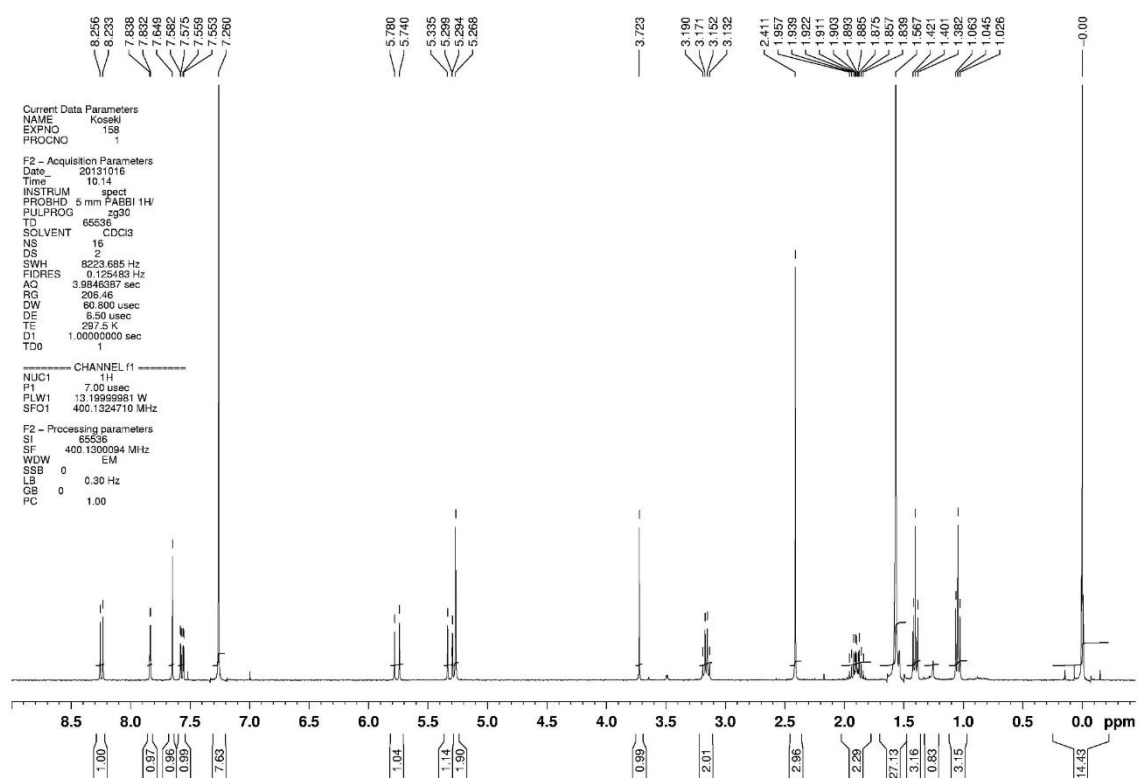


図 S2-9 SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)



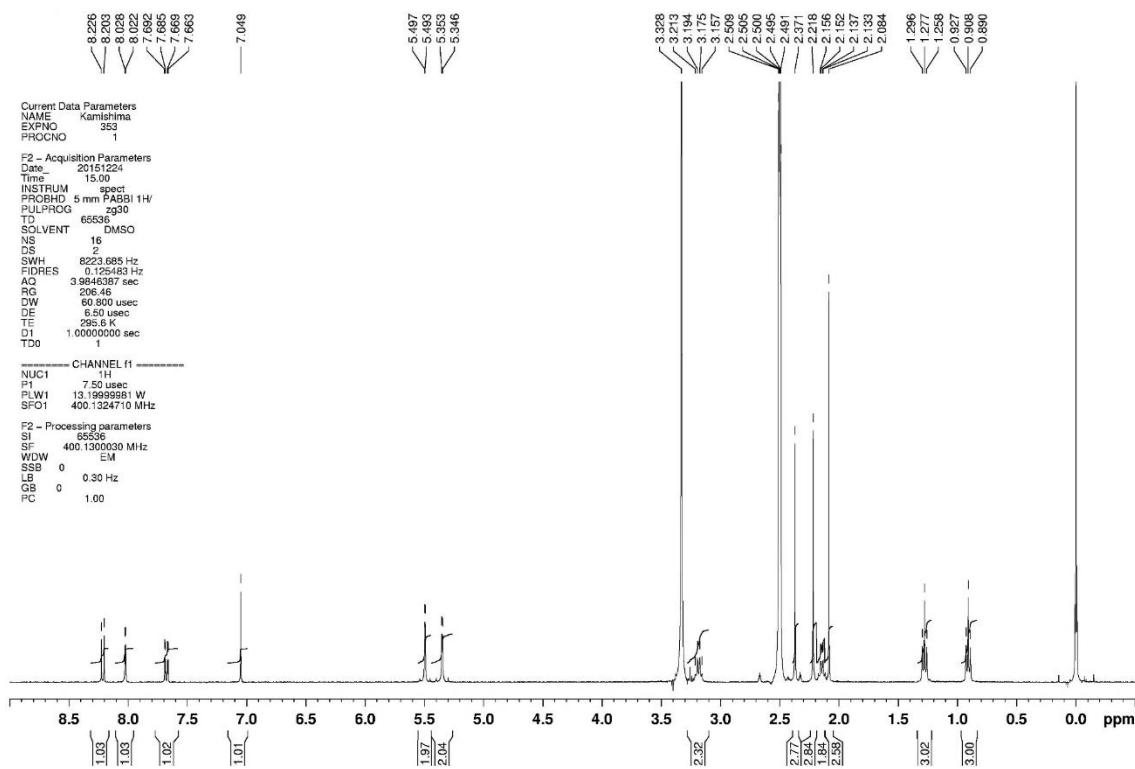
☒ S2-10 SN-38-C<sub>2</sub> の HMQC スペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)



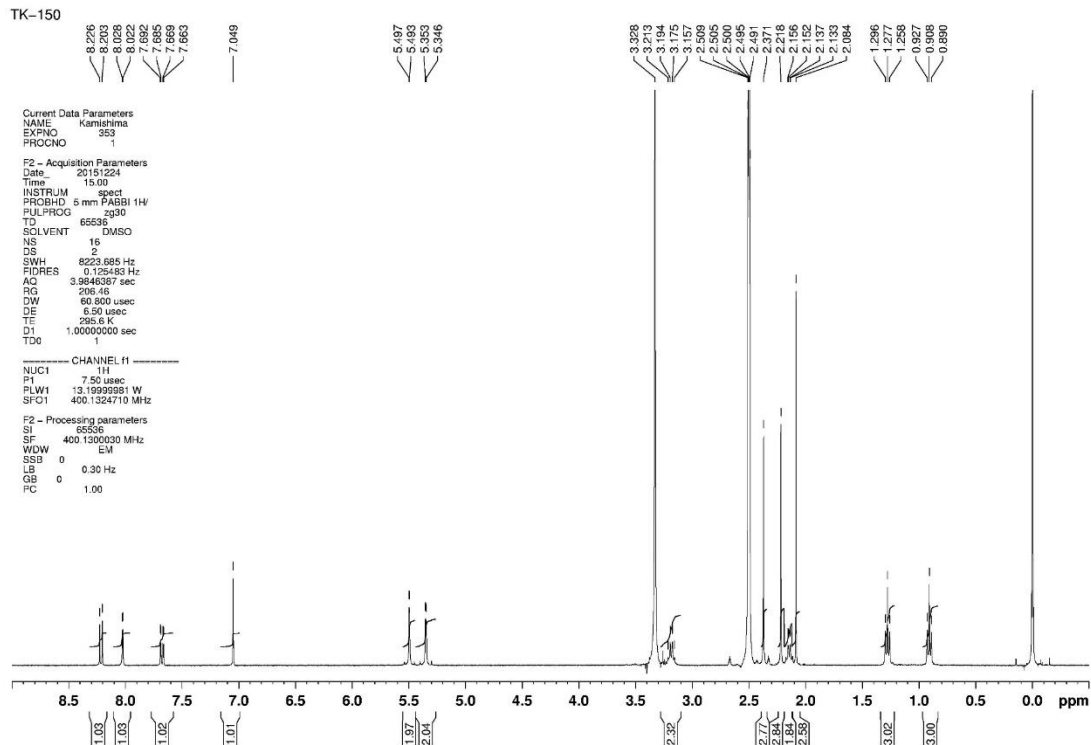


☒ S2-12 SN-38-C<sub>2</sub> の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>)





☒ S2-13 DiacetylSN-38 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (400 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )



☒ S2-14 DiacetylSN-38 の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (100 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )

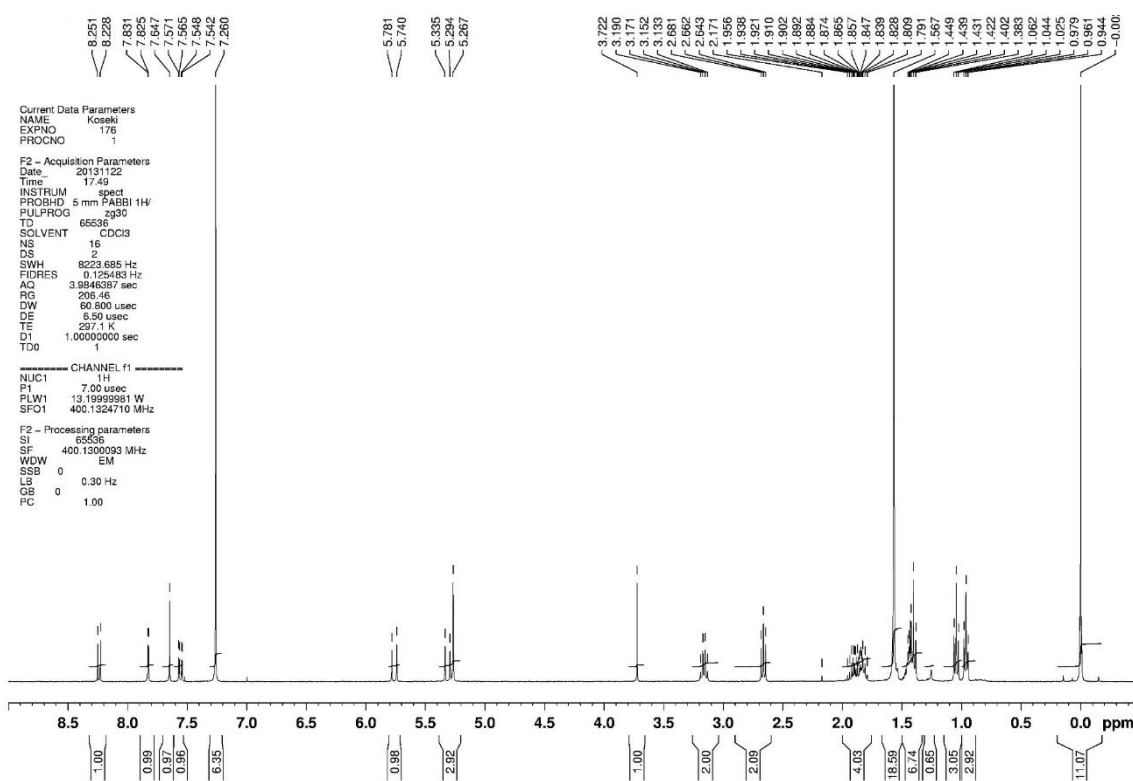


図 S2-15 SN-38-C<sub>6</sub> の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>)

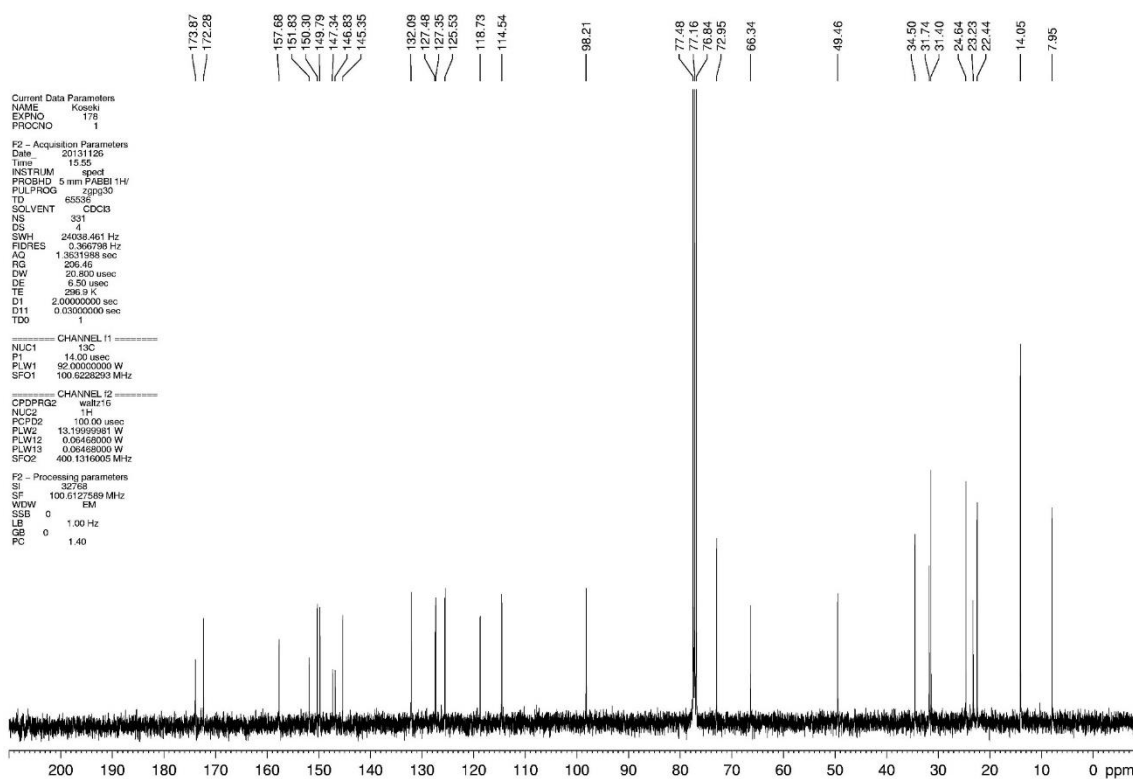
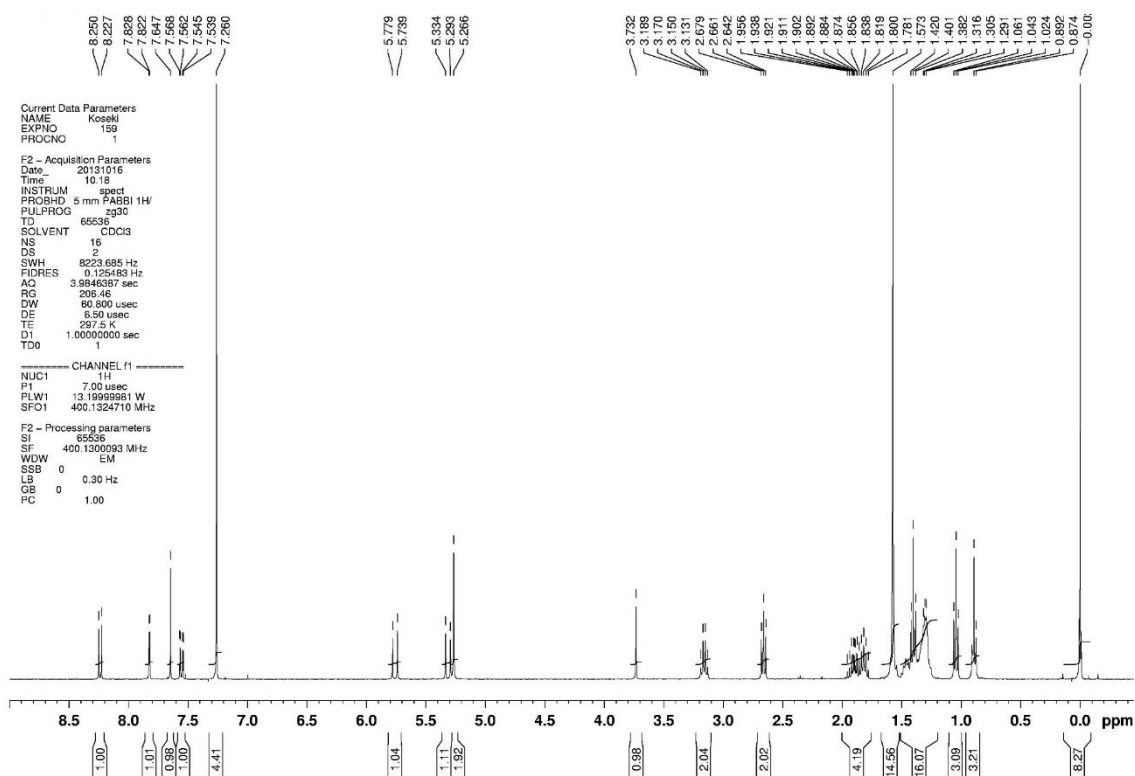
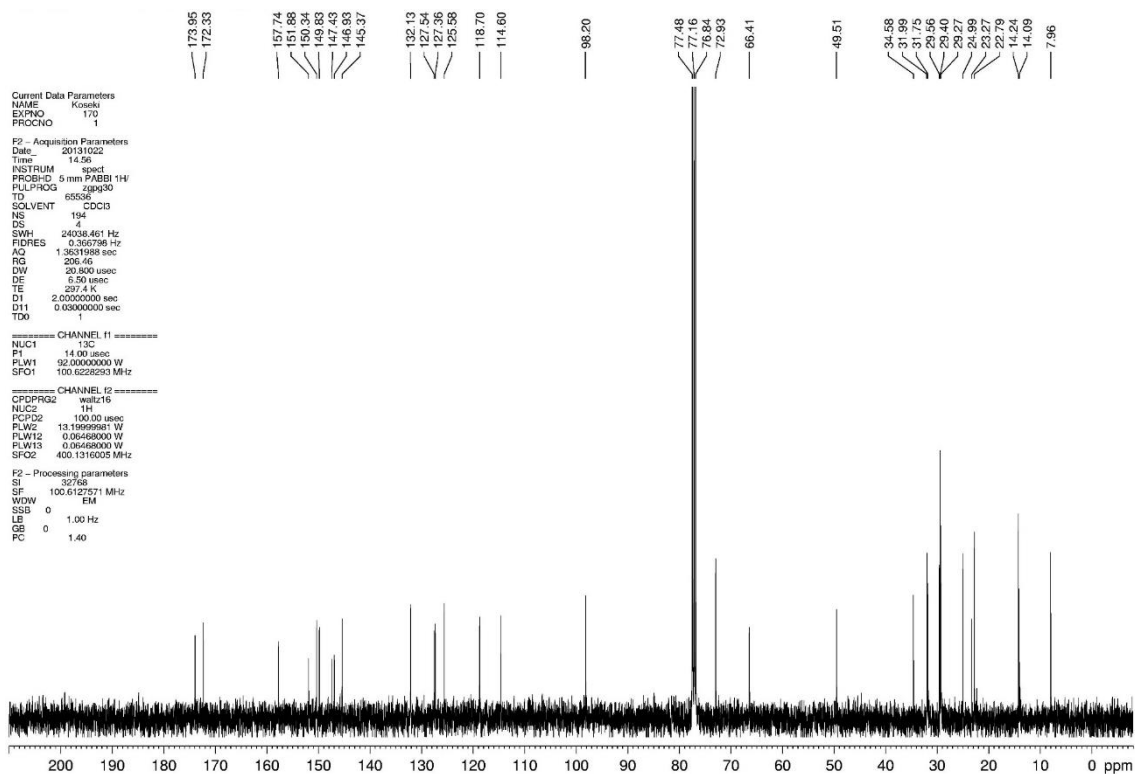


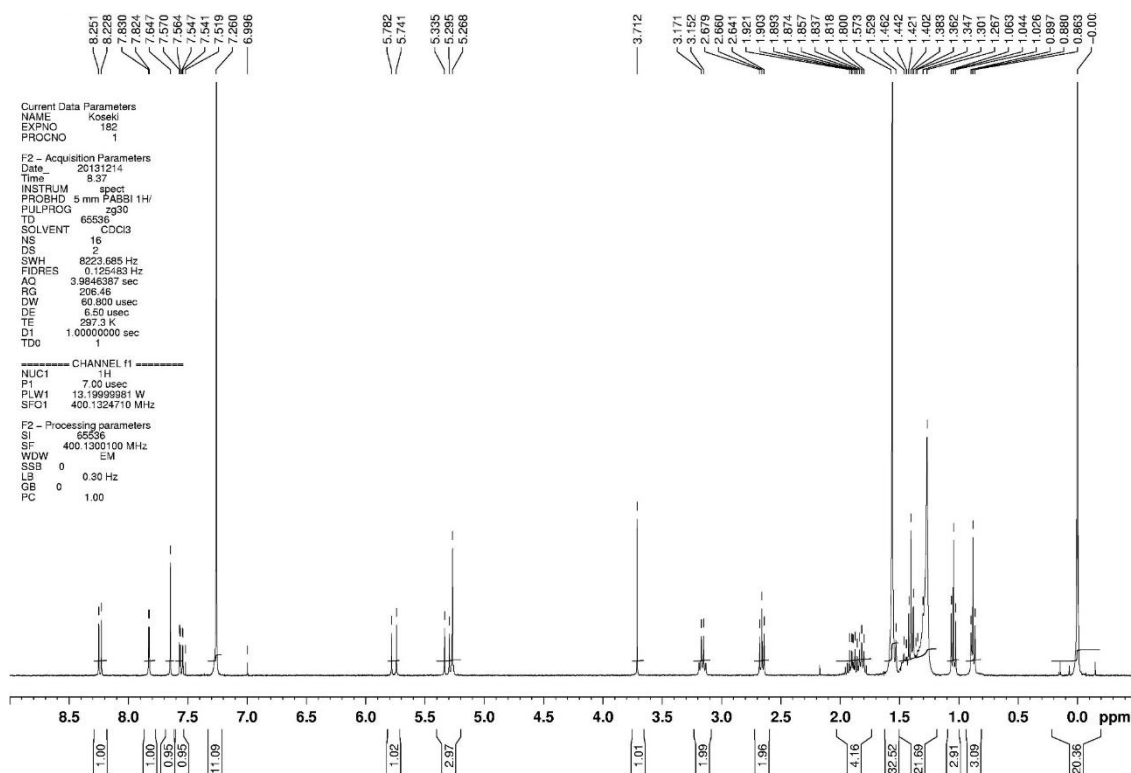
図 S2-16 SN-38-C<sub>6</sub> の <sup>13</sup>C NMR スペクトル (100 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



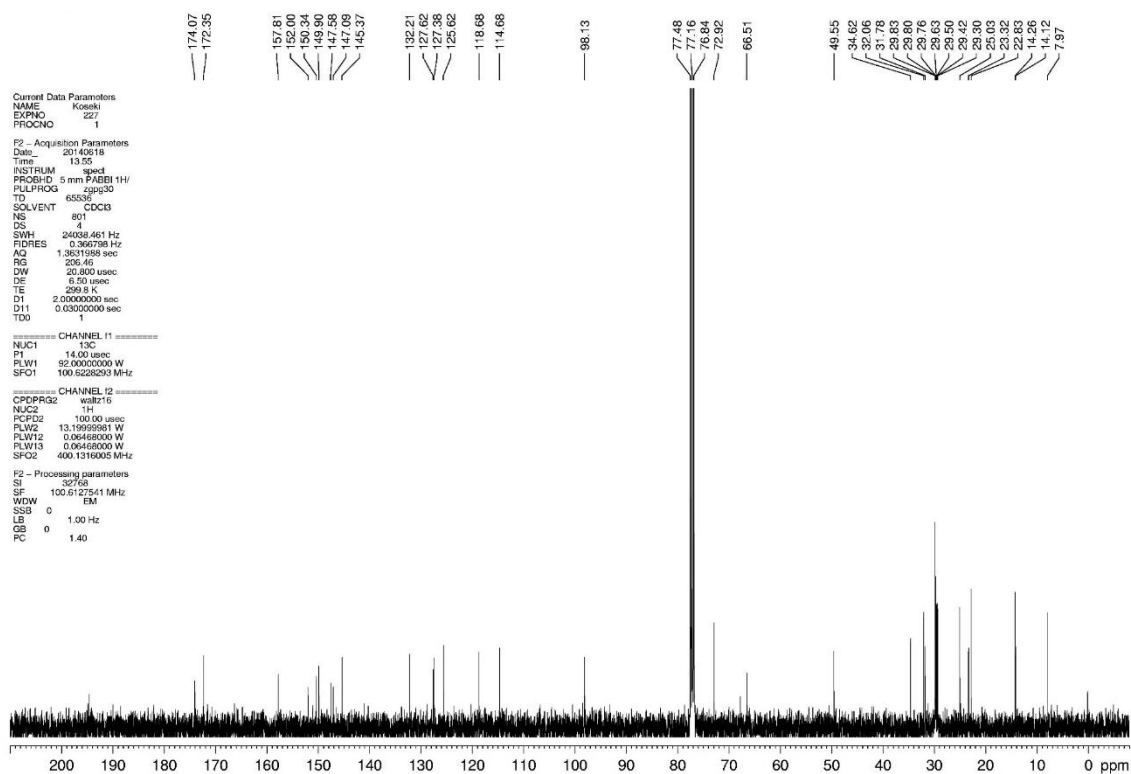
☒ S2-17 SN-38-C<sub>10</sub> の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



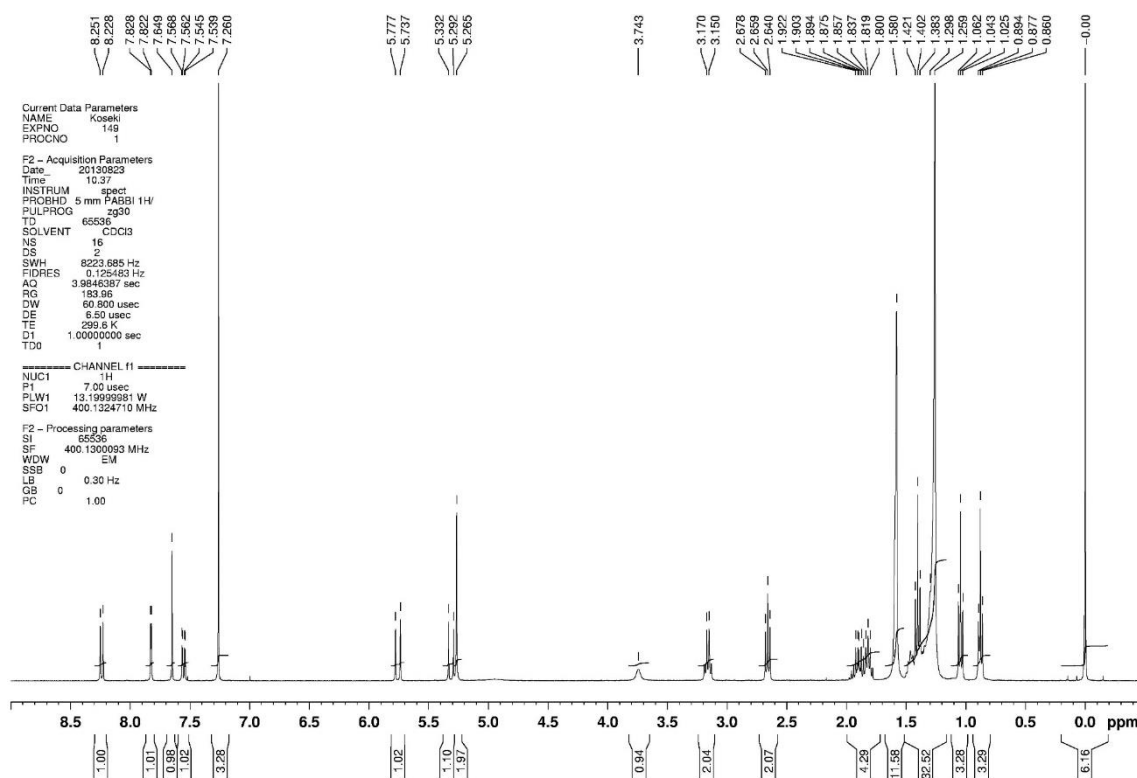
☒ S2-18 SN-38-C<sub>10</sub> の <sup>13</sup>C NMR スペクトル (100 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



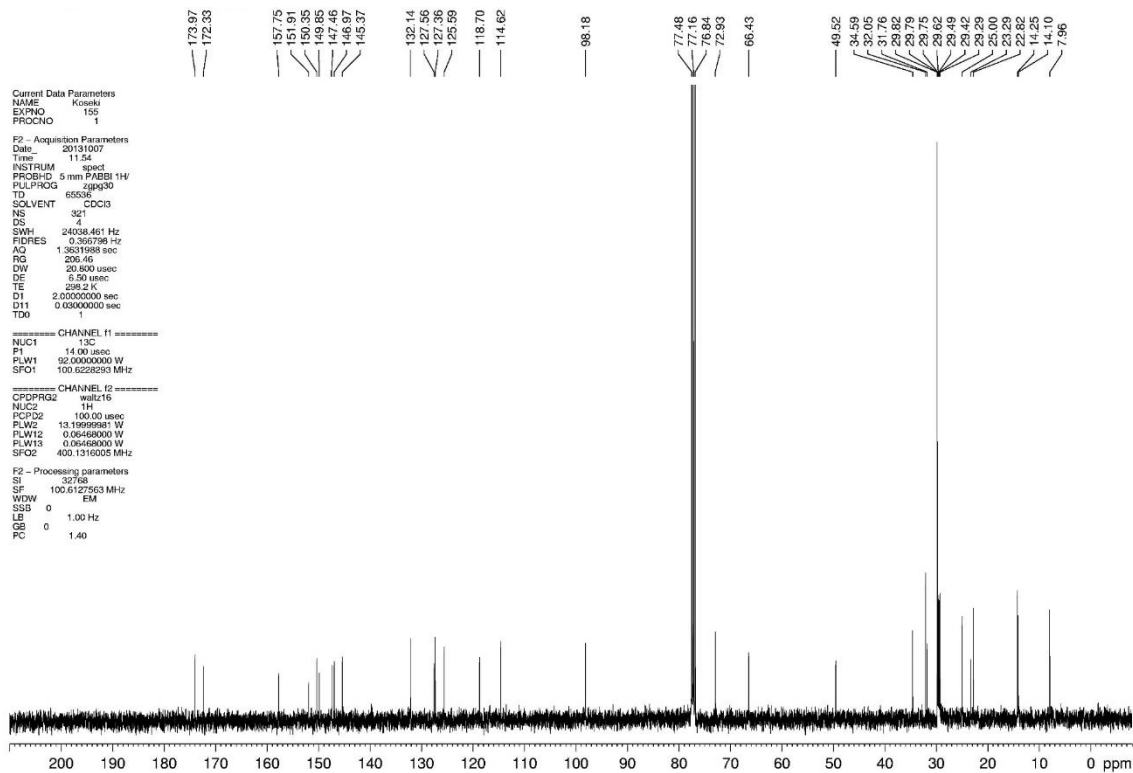
☒ S2-19 SN-38-C<sub>14</sub> の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



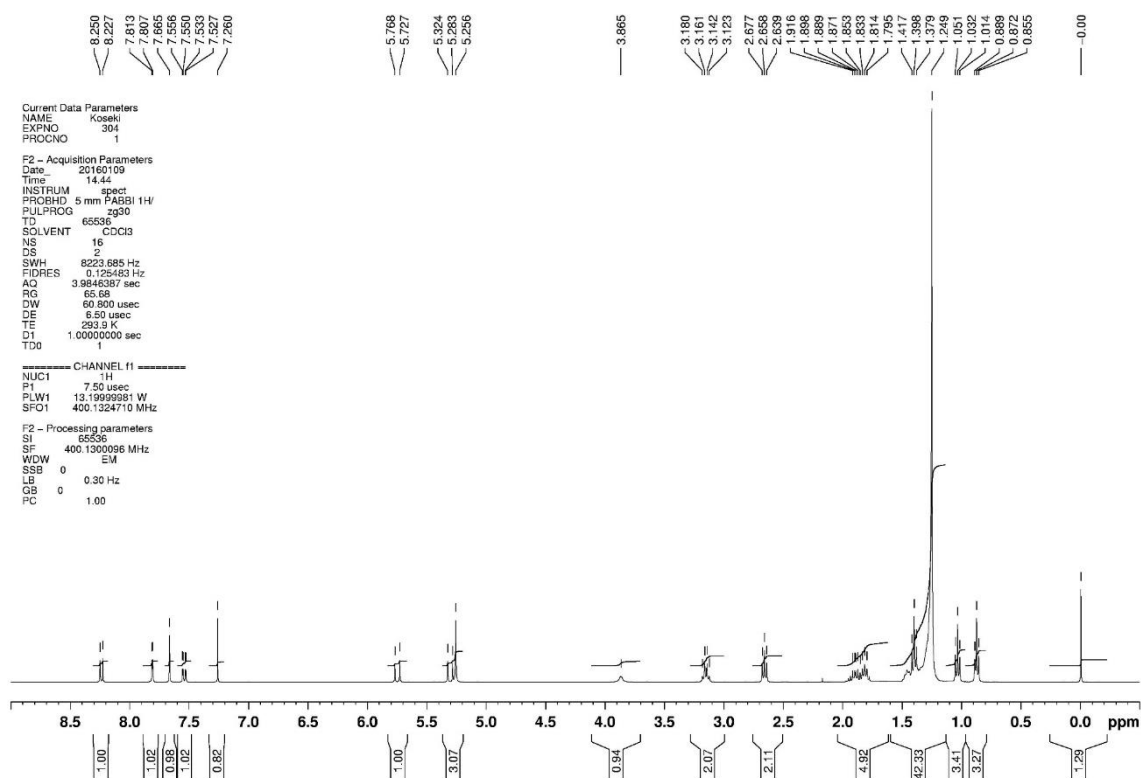
☒ S2-20 SN-38-C<sub>14</sub> の <sup>13</sup>C NMR スペクトル (100 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



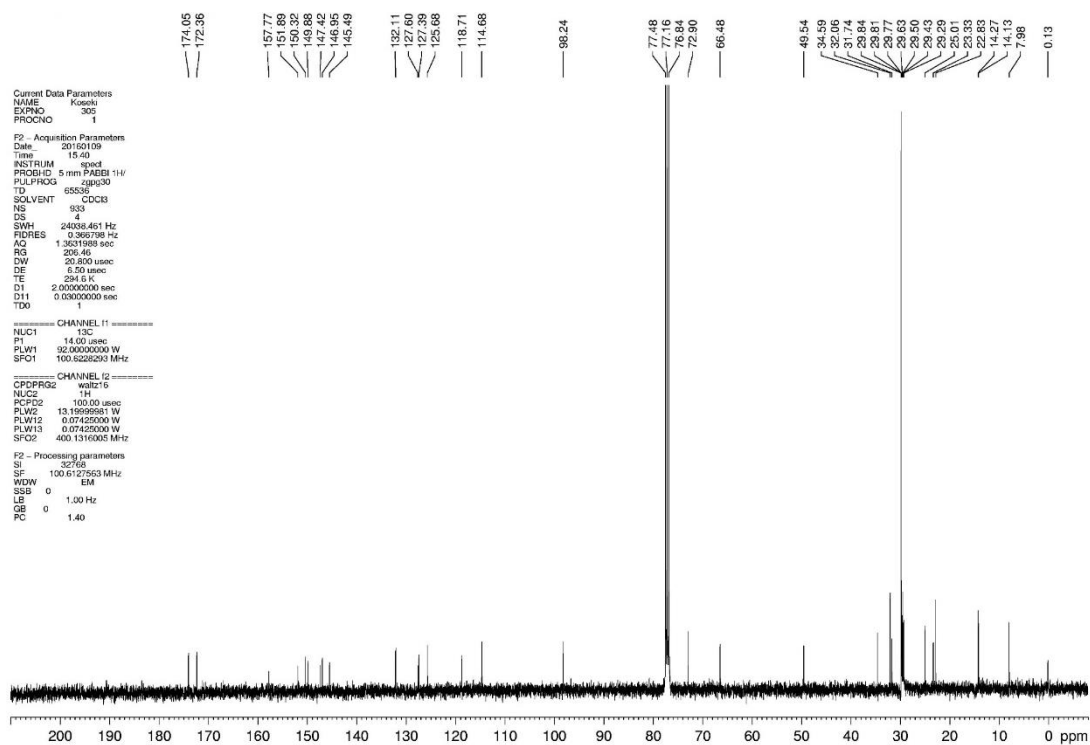
☒ S2-21 SN-38-C<sub>18</sub> の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



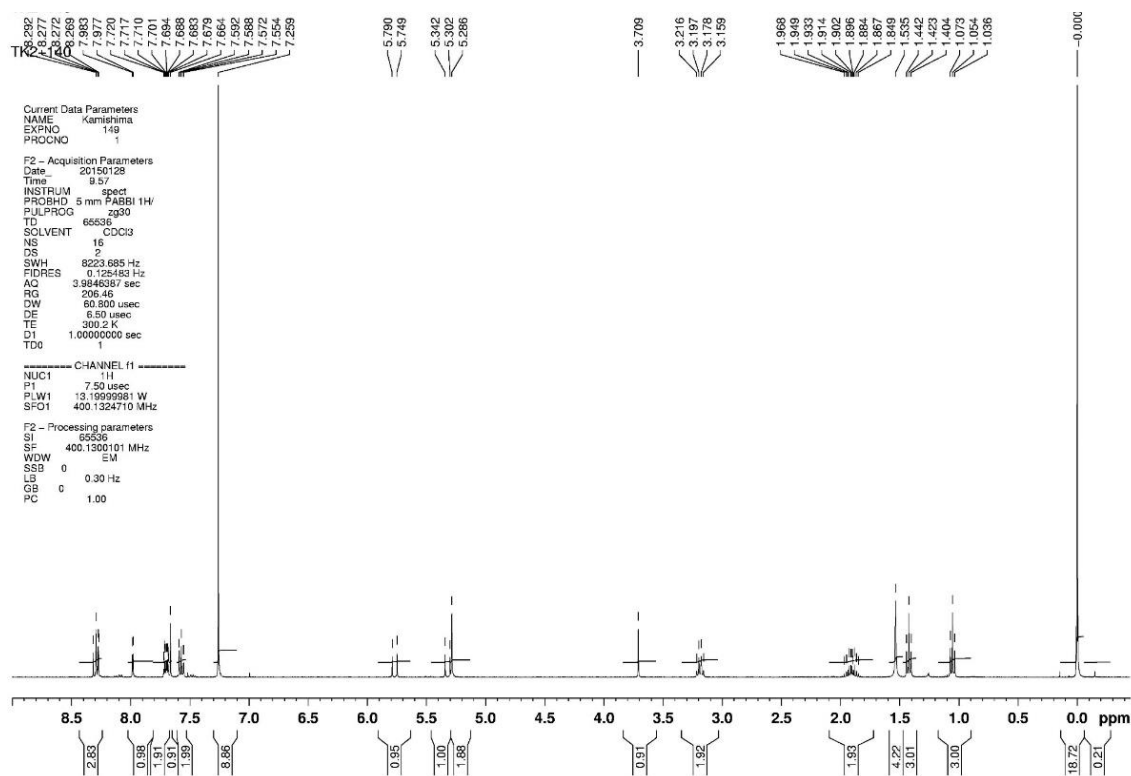
☒ S2-22 SN-38-C<sub>18</sub> の <sup>13</sup>C NMR スペクトル (100 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



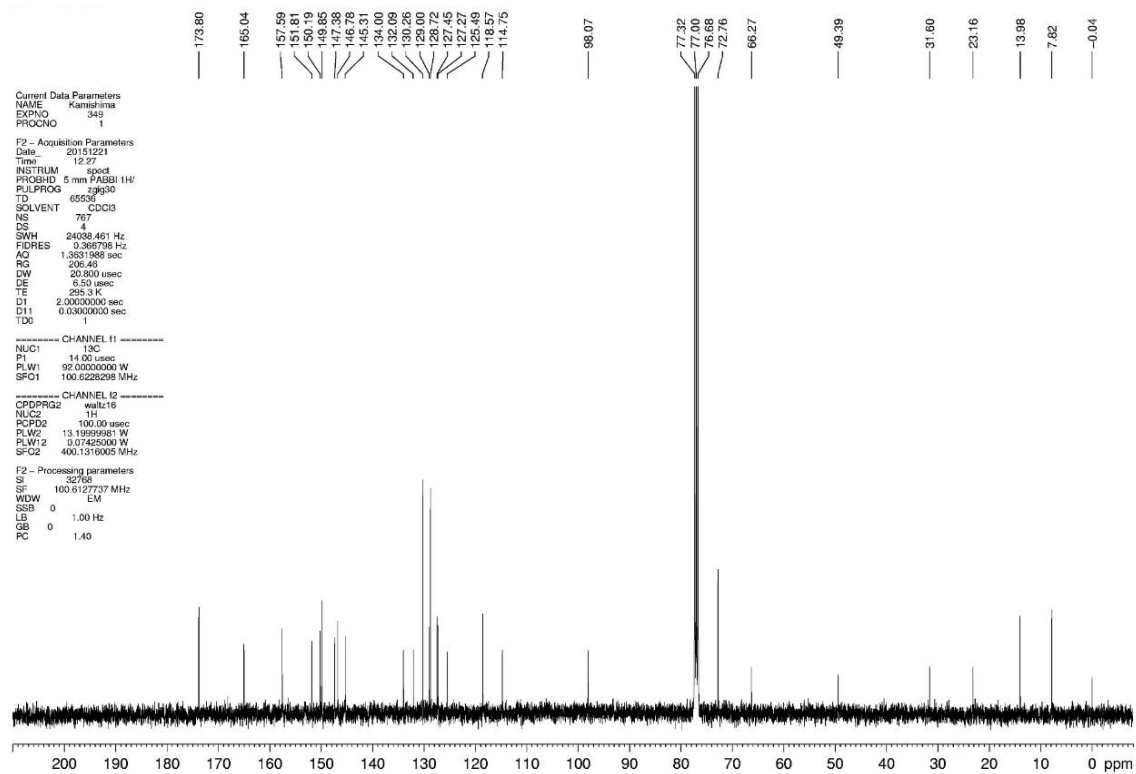
☒ S2-23 SN-38-C<sub>22</sub>の<sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



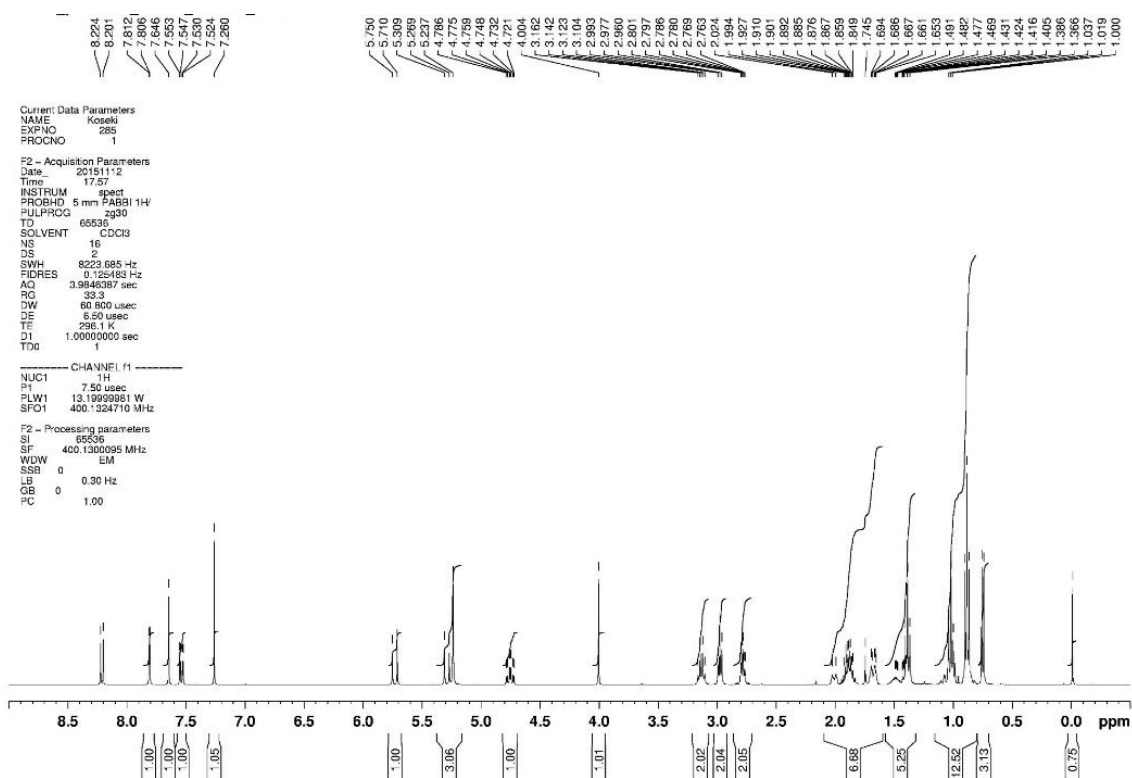
☒ S2-24 SN-38-C<sub>22</sub>の<sup>13</sup>C NMR スペクトル (100 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



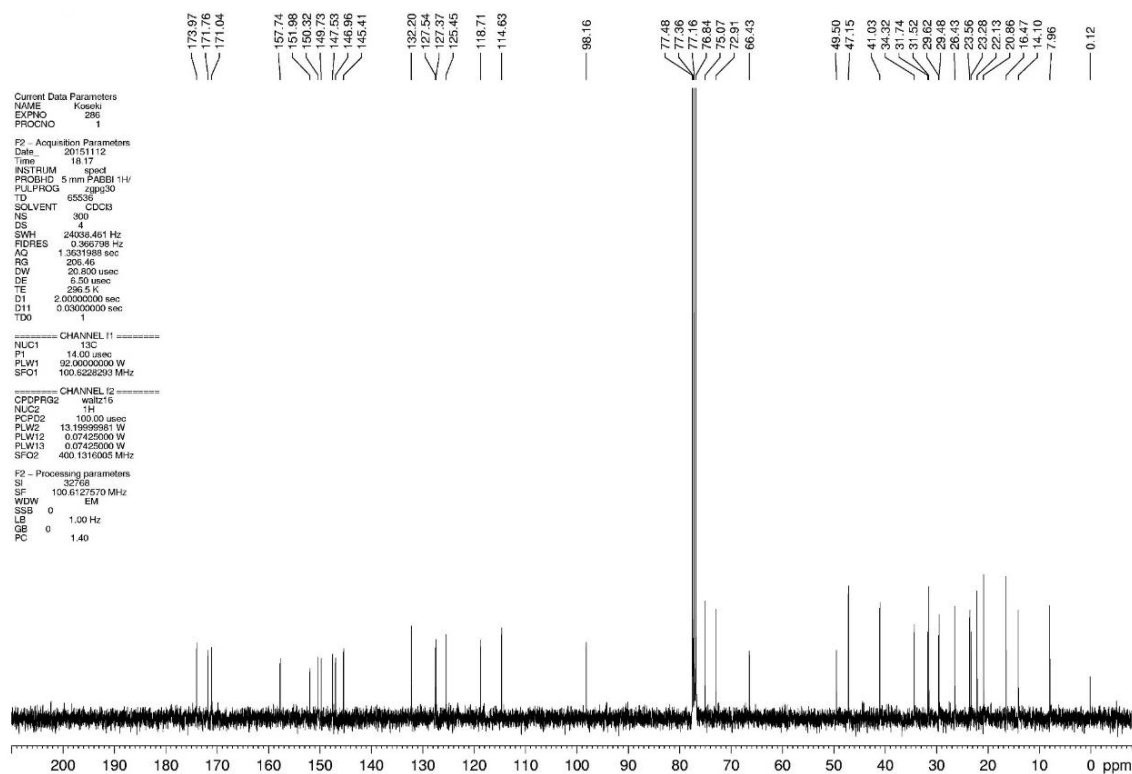
☒ S2 - 25 SN-38 benzoate の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (400 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )



☒ S2 - 26 SN-38 benzoate の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (100 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )



☒ S2-27 SN-38 menthol の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (400 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )



☒ S2-28 SN-38 menthol の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (100 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )



- ・再沈法による薬剤ナノ粒子の作製

スターラーバーを備えた 30 mL スクリュー管に超純水(10 mL)を入れ、マグネティックスターラーを用いて激しく攪拌した。そこへ、マイクロシリンジを用いて 10 mM SN-38 プロドラッグ溶液(100  $\mu$ L)を注入した。使用した有機溶媒は本論中に記述した。

- ・血清中における加水分解実験

マウス血清(81  $\mu$ L)に、SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の水分散液(9  $\mu$ L)を添加し、37 °C でインキュベーションした。1 時間後に、反応液に  $\text{CHCl}_3$  (90  $\mu$ L)を加えて攪拌後、10000 rpm で 5 分間遠心分離し、 $\text{CHCl}_3$  層(60  $\mu$ L)を MeCN (540  $\mu$ L)へ加えた。この試料を HPLC-MS/MS 分析に供した。

マウス血清と  $\text{CHCl}_3$  を上記条件で事前に混合し、酵素を失活させた後に SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の水分散液を添加し、同様の処理を行った試料を対照試料 (0 h) として用いた。

- ・HPLC-MS/MS

HPLC-MS/MS 測定条件を以下に示した。

カラム：逆相カラム(Imtakt Unison UK-C8,  $\square\square 2 \times 100$  mm)

カラムオープン温度：30 ° C

移動相：A 液：0.1%ギ酸  $\text{H}_2\text{O}$ 、B 液：0.1%ギ酸 MeCN

グラジエント条件：A 液/B 液=85/15  $\rightarrow$  A 液/B 液=10/90 : 0 分  $\rightarrow$  6 分

流速：0.3 mL/min

サンプル注入量：1  $\mu$ L

Precursor ion: 各 SN-38 プロドラッグのプロトン付加体 $[\text{M} + \text{H}]^+$

### 第3章

#### ・試薬

実験に用いた試薬は以下の企業から購入した試薬を精製することなく用いた。

#### 【和光純薬工業】

オレイン酸、オクタデシルブロミド、オクタデシルアルコール、コハク酸無水物、炭酸カリウム、ジクロロメタン、DMF、THF、メタノール (LC/MS 用)、アセトニトリル (LC/MS 用)、ギ酸 (LC/MS 用)、PBS、トリパンブルー

#### 【東京化成】

SN-38、EDC

#### 【アルドリッチ】

ブタ肝臓エステラーゼ

#### 【その他】

DMEM、HBSS、FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン、セルカウンティングキット-8、passive lysis buffer、

#### ・細胞

HepG2：理研 Cell bank から購入した。

#### ・装置

NMR: AVANCE-400 (Bruker)

IR: AVATOR 360 (Nicolet)

HR-MS: micrOTOF-Q II-S1 (Bruker)

HPLC-MS

HPLC: 1260 Infinity シリーズ (Agilent)

MS: HCT ultra-IMR (Bruker)

SEM: JSM-6700F (JEOL)

粒度分布・ゼータ電位測定: Zetasizer nanoZS (Malvern)

マイクロプレートリーダー: iMark マイクロプレートリーダー (BIO RAD)

• SN-38-C<sub>18:1</sub> と -C<sub>18</sub> ether の合成

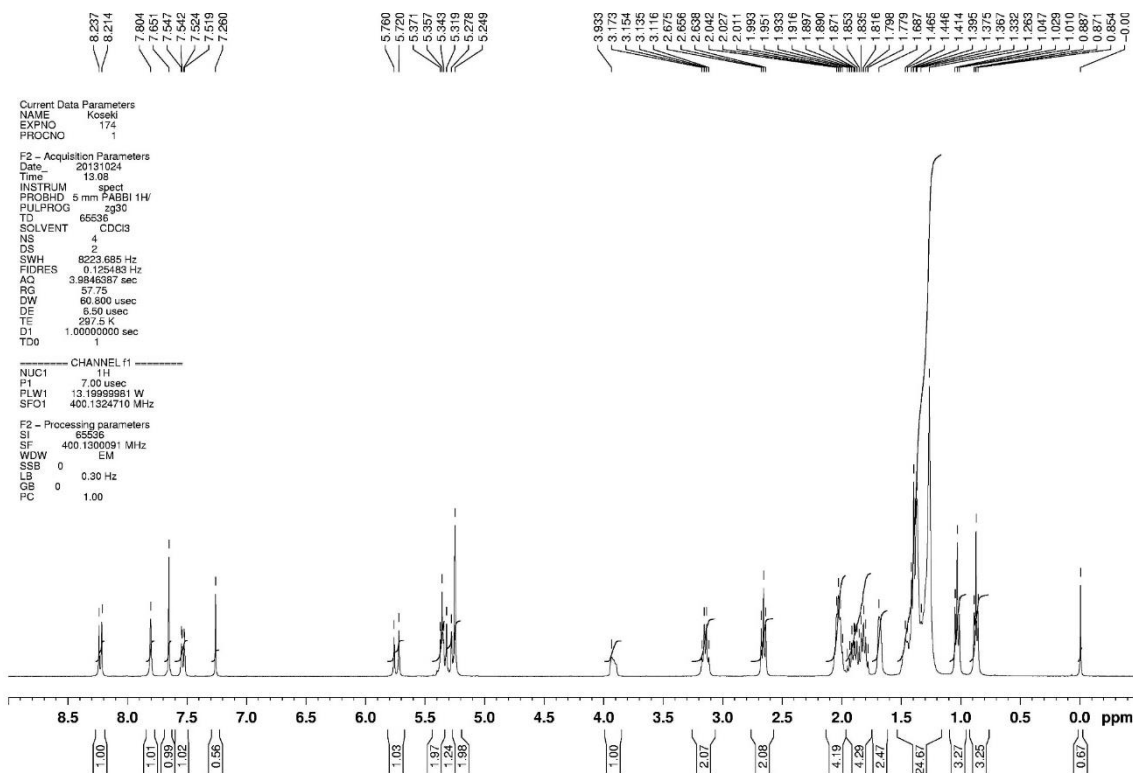
SN-38- C<sub>18:1</sub>

SN-38 (104.5 mg, 0.266 mmol), oleic acid (90  $\mu$ L, 0.280 mmol), EDC (98.6 mg, 0.514 mmol), and DMAP (4.0 mg, 0.0327 mmol) afford SN-38-C<sub>18:1</sub> (144.1 mg, 0.219 mmol, 82%) as a pale yellow solid. IR:  $\nu_{\max}$  1762, 1739, 1661, 1598, 1282, 1227, 1212, 1175, 1164, 1131, 1106, 1064, 831  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  0.88 (3H, t,  $J$  = 7.6 Hz), 1.04 (3H, t,  $J$  = 7.6 Hz), 1.23 – 1.42 (23H, m), 1.78 – 1.94 (4H, m), 2.00 – 2.05 (4H, m), 2.66 (2H, t,  $J$  = 7.6 Hz), 3.16 (2H, q,  $J$  = 7.6 Hz), 3.74 (1H, s), 5.27 (2H, s), 5.31 (1H, d,  $J$  = 16.0 Hz), 5.75 (1H, d,  $J$  = 16.0 Hz), 7.55 (1H, dd,  $J$  = 9.2, 2.4 Hz), 7.56 (1H, s), 7.82 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz), 8.24 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  8.0, 14.1, 14.3, 22.8, 23.3, 25.0, 27.3, 27.4, 29.25, 29.32, 29.5, 29.7, 29.8, 29.9, 31.8, 32.0, 34.6, 49.5, 66.5, 72.9, 98.2, 114.7, 118.7, 125.6, 127.4, 127.6, 129.8, 130.2, 132.2, 145.4, 147.0, 147.5, 149.9, 150.4, 152.0, 157.8, 172.3, 174.0. HR-MS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>53</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 657.3898, found 657.3907.

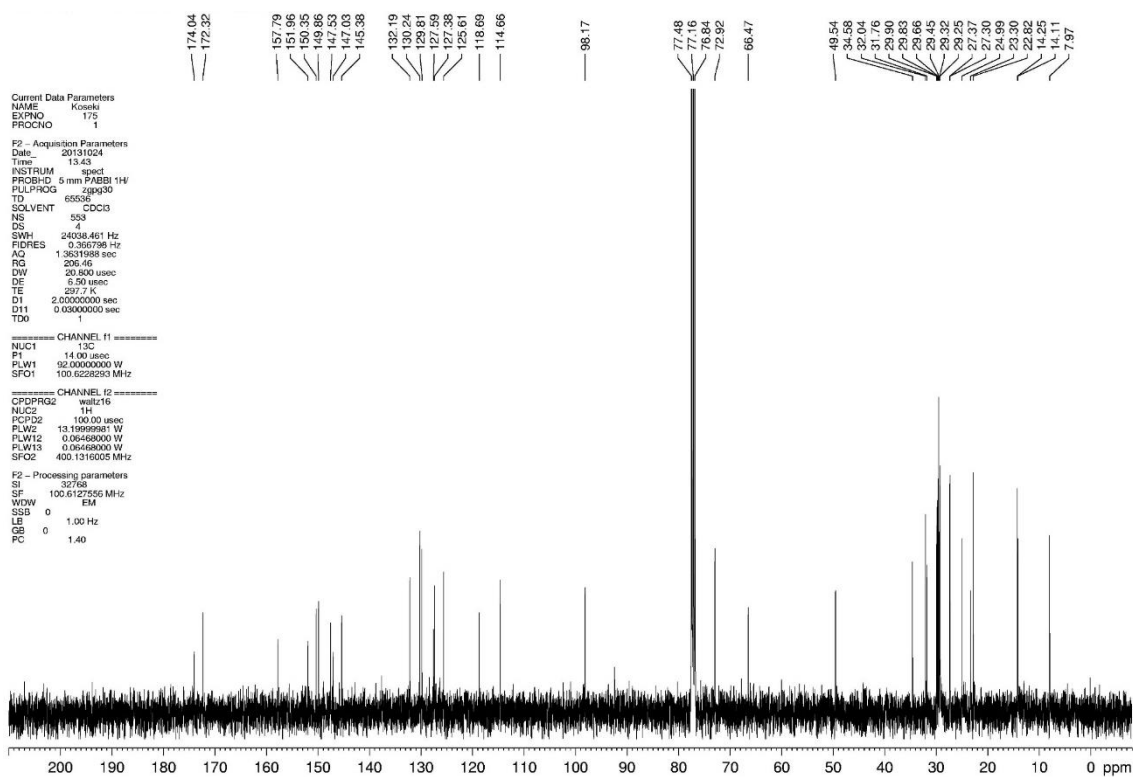
SN-38-C<sub>18</sub> ether

SN-38 (100 mg, 0.255 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.638 mmol) were added to a solution of 1-bromooctadecane (127 mg, 0.382 mmol) in DMF (2.6 mL) at room temperature and it was stirred at 60°C. After 3 h, it was quenched with saturated aqueous solution of NH<sub>4</sub>Cl and the resulting mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The combined extracts were washed with brine (5 mL) then dried with MgSO<sub>4</sub>. Concentration *in vacuo* afforded a residue, which was diluted with hexane (10 mL) and then filtered to afford SN-38-C<sub>18</sub>-ether (69 mg, 42%) as a pale yellow powder. IR:  $\nu_{\max}$  1750, 1599, 1600, 1513, 1467, 1238, 1222, 1160, 1054, 1033, 831  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  0.87 (3H, t,  $J$  = 6.8 Hz), 1.03 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 1.26 – 1.66 (33H, m), 1.85 – 1.93 (4H, m), 3.13 (2H, q,  $J$  = 7.6 Hz), 3.89 (1H, s), 4.12 (2H, t,  $J$  = 2.4 Hz), 5.21 (2H, s), 5.29 (1H, d,  $J$  = 16.0 Hz), 5.73 (1H, d,  $J$  = 16.0 Hz), 7.27 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz), 7.44 (1H, dd,  $J$  = 9.2, 2.4 Hz), 7.59 (1H, s), 8.11 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  8.0, 13.7, 14.2, 22.8, 23.3, 26.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.73, 29.75, 29.80, 29.84, 31.8, 32.1, 49.6, 66.5, 68.7, 73.0, 97.5, 102.5, 117.9, 122.8, 127.3, 128.4, 132.2, 143.6, 145.5, 147.6, 149.6, 150.4,

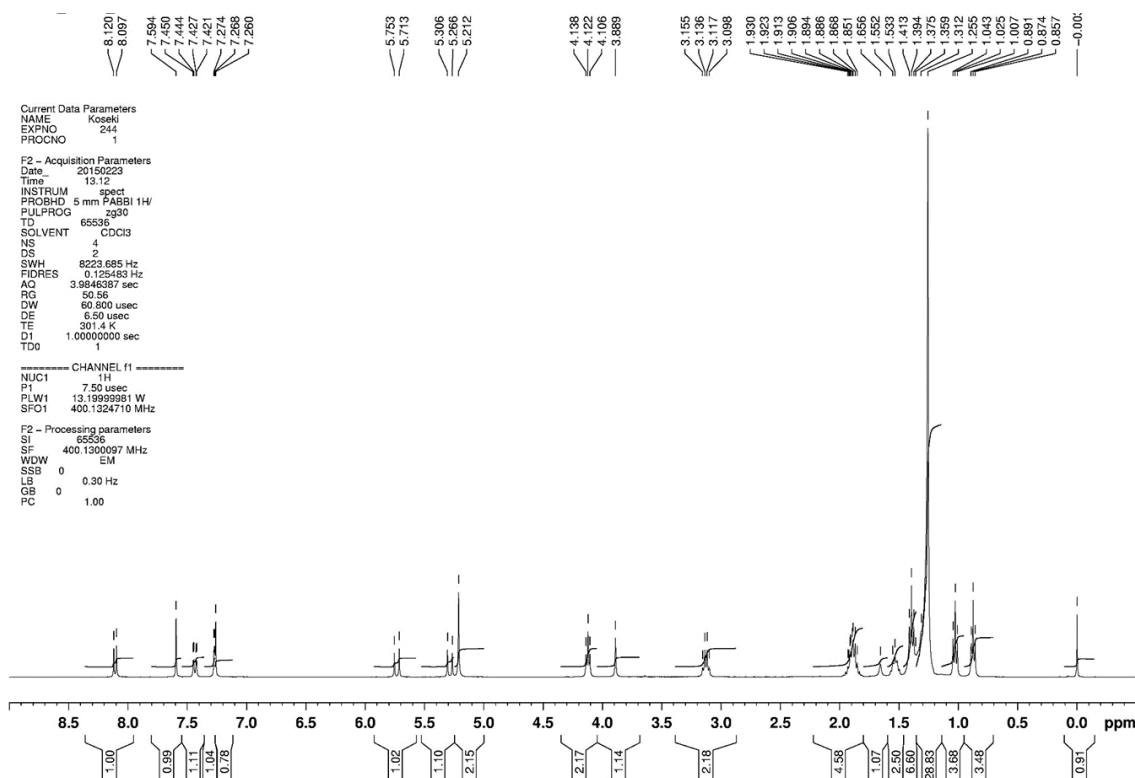
157.9, 158.6, 174.1. HR-MS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd. for  $C_{40}H_{57}N_2O_5$  ( $[M+H]^+$ ) 645.4261, found 645.4272.



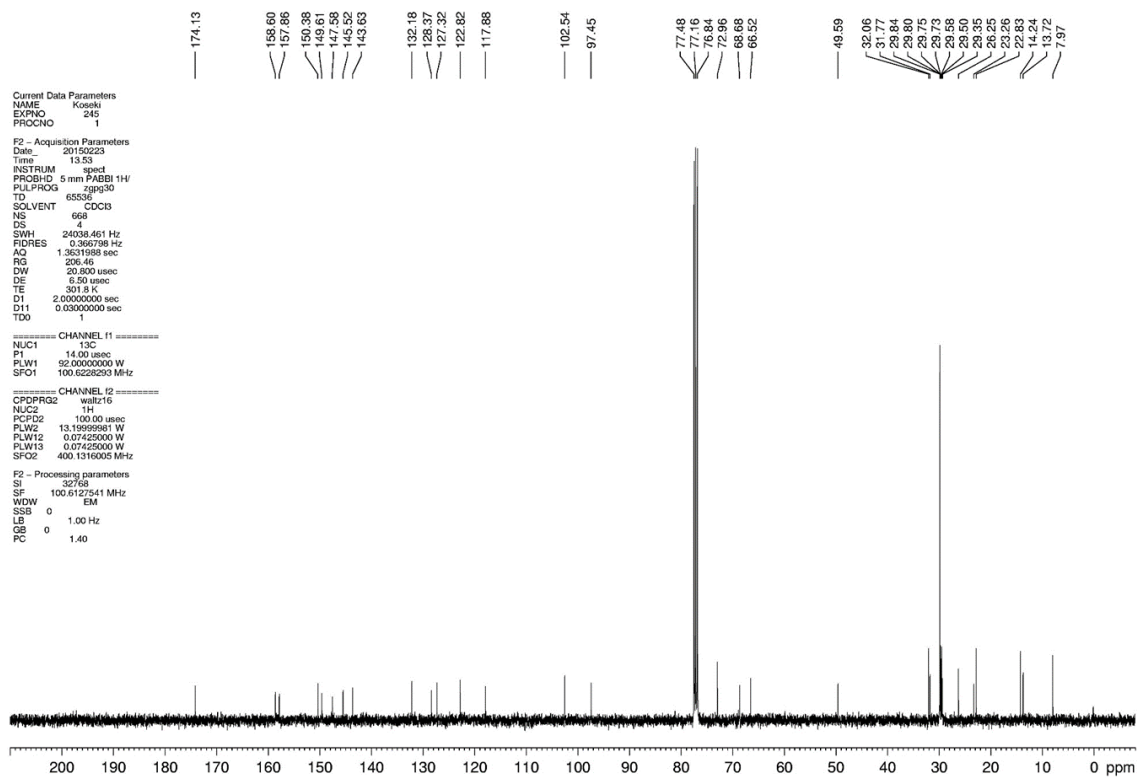
☒ S3-1 SN-38-C<sub>18:1</sub> の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



☒ S3-2 SN-38-C<sub>18:1</sub> の <sup>13</sup>C NMR スペクトル (100 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



☒ S3-3 SN-38-C<sub>18</sub> ether の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>)



☒ S3-4 SN-38-C<sub>18</sub> ether の <sup>13</sup>C NMR スペクトル (100 MHz、CDCl<sub>3</sub>)

- ・ HepG2 細胞を用いた、がん細胞増殖抑制活性試験

HepG2 は、DMEM に 10% FBS を混合したものを培地として、継代したものをを用いた。96 well プレートに、HepG2 ( $2 \times 10^5$  cells/mL, 100  $\mu$ L/well) を播種し、一日 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ中で培養した。培地を吸引した後に、培地で希釈した SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の水分散液(0.01~10  $\mu$ M、100  $\mu$ L/well)をそれぞれ添加し、5% CO<sub>2</sub> インキュベータで 48 時間培養した。その後、細胞培養用の培地(100  $\mu$ L)で細胞を洗浄した後に、培地で 10 倍希釈した Cell Counting Kit-8 (100  $\mu$ L)で置換し、CO<sub>2</sub> インキュベータで 50 分培養することで発色させた。最後に、マイクロプレートリーダーで吸光度(OD<sub>450</sub> - OD<sub>620</sub>)を測定した。陰性対照として薬剤ナノ粒子分散液の代わりに細胞培養用の培地を加えて同様の処理を行った。

- ・ ブタ肝臓エステラーゼを用いた加水分解実験

30 units エステラーゼ PBS 溶液(450  $\mu$ L)に、薬剤ナノ粒子水分散液(10  $\mu$ L、50  $\mu$ L)を添加し、37 °C でインキュベーションした。0.5、1、3、6、24 時間後に、反応液(10  $\mu$ L)を分取し、MeCN (90  $\mu$ L)を加えた。10000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み(60  $\mu$ L)を MeCN (540  $\mu$ L)へ加えて HPLC-MS/MS 分析に供した。

- ・ 細胞取り込み量の定量

96 well プレートに、HepG2 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/mL, 100  $\mu$ L/well) を播種し、一日 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ中で培養した。培地を吸引した後に、SN-38 プロドラッグ薬剤ナノ粒子の水分散液 (10  $\mu$ M、100  $\mu$ L/well) をそれぞれ添加し、5% CO<sub>2</sub> インキュベータで 6 時間培養した。その後、細胞を PBS (100  $\mu$ L)で 3 回洗浄し、Lysis buffer (100  $\mu$ L)を加えた。5 分間、5% CO<sub>2</sub> インキュベータで保持し、細胞を完全に溶解させた。溶解物(50  $\mu$ L)と MeCN (450  $\mu$ L) を混合し、10000 rpm で 5 分間遠心分離した上澄み(200  $\mu$ L)を HPLC-MS/MS 分析に供した。