

# シスアコニチン酸の酸性解離性結合を含んだ ポリビニルアルコールドキシソルビシン結合体の合成と そのアイソマーによるドキシソルビシン遊離への依存性

柿木充史、金尾義治、池田有香、田中哲郎、藤田佳平衛

Biol. Pharm. Bull., 31(1) 103-110 (2008)

## Synthesis of Poly (vinyl alcohol)-Doxorubicin Conjugates Containing cis-Aconityl Acid-Cleavable Bound and Its Isomer Dependent Doxorubicin Release

Atsufumi Kakinoki, Yoshiharu Kaneo, Yuka Ikeda, Tetsuro Tanaka, and Kahee Fujita

**ABSTRACT** Aconityl-doxorubicin (ADOX) was synthesized by the modified method of Shen and Ryser. Two isomers of cis-ADOX (cis-configuration) and trans-ADOX (trans-configuration) were generated in the reaction of DOX and cis-aconic anhydride. These products were separated completely by using HPLC and analyzed by TOF-MS spectroscopy and <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR experiments. The yields of cis-ADOX and trans-ADOX were 36.3 and 44.8%, respectively. The free gamma-carboxylic group of ADOX molecule was coupled to poly (vinyl alcohol) (PVA) via ethylenediamine spacer, resulting the macromolecular conjugates of PVA-cis-ADOX and PVA-trans-ADOX, respectively. The DOX content of the conjugates estimated by the hydrolysis method detected the aglycone of DOX which can be estimated as the PVA-bound DOX selectively was 4.4 w/w% which was similar to 4.6 w/w% by the ordinary UV method. Both PVA-cis-ADOX and PVA-trans-ADOX were very stable at neutral pH, but the release of DOX was increased markedly under acidic conditions. Half-life of the release of DOX from PVA-cis-ADOX at pH 5.0 was 3 h which was 4.7-fold shorter than that from PVA-trans-ADOX (14 h). The cytotoxicities of PVA-cis-ADOX and PVA-trans-ADOX were evaluated by using J774.1 cells employing a [<sup>3</sup>H]uridine incorporation assay as a measure of RNA synthesis. A significant difference in antitumor activity between PVA-cis-ADOX and PVA-trans-ADOX was observed where the former was much active than the later. It was suggested that the conjugate enters the cells and reaches the lysosomal/endosomal compartment, and that the aconityl spacer releases DOX from the conjugate in the acidic compartment of lysosomes/endosomes due to the participation of a free carboxylic group.

**抄録** アコニチルドキシソルビシン (ADOX) をShenとRyserの方法を改良して合成した。ドキシソルビシン (DOX) と無水シスアコニチン酸との反応で、シス-ADOX異性体とトランス-ADOXが生成した。これらの生成物はHPLCを用いることで完全に分離し、TOF-MS、<sup>1</sup>H-NMR並びに<sup>13</sup>C-NMRで分析された。シス-ADOXとトランス-ADOXの収率は、それぞれ36.3%と44.8%であった。ADOX分子内の遊離のγ位のカルボキシル基と、エチレンジアミンのスペーサーを介してポリビニルアルコール (PVA) とを結合

させ、それぞれPVA-cis-ADOXとPVA-trans-ADOXの高分子結合体を得た。選択的にPVAに結合したDOXとして評価されるDOXのアグリコンを測定する加水分解法による結合体のDOXの含量は、4.4w/w%であり、これは通常のUV法による4.6w/w%に近い値であった。PVA-cis-ADOXとPVA-trans-ADOXはともに、中性pHで非常に安定であった。しかしながら酸性条件下ではDOXの遊離が顕著に増加した。pH5.0におけるPVA-cis-ADOXからのDOXの遊離に関する半減期は3hで、これは、PVA-trans-ADOXからの14hに比べて4.7倍短時間であった。PVA-cis-ADOXとPVA-trans-ADOXの細胞毒性は、J774.1細胞を用いてRNA合成を測定する<sup>3</sup>Hウリジン取込法により評価した。PVA-cis-ADOXとPVA-trans-ADOXの間には、前者が後者に比べてより活性が高いという顕著な抗腫瘍活性の違いが観察された。このことは、結合体が細胞に入り、リソソームあるいはエンドソームの画分に到達し、これらの酸性の画分中でアコニチルスペーサーの遊離のカルボキシル基の関与によりDOXを遊離することを示唆するものであった。