

微生物代謝産物サッカロスリオリド B に着想を得た  
プロドラッグ化に関する研究

2 0 2 1

竹中 慧

# 目次

|                                                                 |       |
|-----------------------------------------------------------------|-------|
| 略語 .....                                                        | 1-2   |
| 序章 .....                                                        | 3-12  |
| 1. 天然有機化合物と $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造 .....                    | 3-4   |
| 2. $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の医薬品展開とその課題 .....                  | 5-7   |
| 3. プロドラッグ化による $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の活性制御 .....            | 8-9   |
| 4. 天然有機化合物 saccharothriolide B (STL B) .....                    | 10-12 |
| 第 1 章. Retro-Michael 反応による <i>o</i> -aminophenol の脱離条件の検討 ..... | 13-54 |
| 1. 背景 .....                                                     | 13    |
| 2. ケト/エステル/アミド型化合物を用いた <i>o</i> -aminophenol の脱離 .....          | 14-24 |
| 2.1. HPLC を用いた反応モニタリング .....                                    | 14-17 |
| 2.2. $^1\text{H}$ NMR 測定による <i>o</i> -aminophenol 脱離反応の検証 ..... | 18-20 |
| 2.3. 各 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物が示した反応性の考察 .....              | 21-24 |
| 3. ケト型内部オレフィンを用いた <i>o</i> -aminophenol の付加と脱離 .....            | 25    |
| 4. 反応溶媒の検討 .....                                                | 26-31 |
| 4.1. プロトン性溶媒と非プロトン性溶媒 .....                                     | 26-27 |
| 4.2. 水による脱離反応の促進 .....                                          | 28    |
| 4.3. 重水素交換による反応速度の評価 .....                                      | 29-31 |
| 5. 溶液 pH が <i>o</i> -aminophenol の脱離反応速度へ及ぼす影響 .....            | 32    |
| 6. フェノール性水酸基の <i>o</i> -aminophenol 脱離反応速度への影響 .....            | 33-34 |
| 7. <i>o</i> -Aminophenol の脱離を介した retro-Michael 反応機構の考察 .....    | 35-36 |
| 8. <i>o</i> -Aminophenol のフェノール性水酸基修飾 .....                     | 37-39 |
| 9. 小括 .....                                                     | 40    |
| 10. Experimental section .....                                  | 41-45 |
| 11. NMR spectroscopic data .....                                | 46-54 |

## 第 2 章. *o*-Aminophenol 修飾を基盤とした天然有機化合物の

|                                                                           |         |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| プロドラッグ化に関する検討                                                             | 55-103  |
| 1. 背景                                                                     | 55      |
| 2. 天然有機化合物 colchicine 誘導体を用いた脱離、生物活性評価                                    | 56-68   |
| 2.1. $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する colchicine 誘導体の合成                     | 56-58   |
| 2.2. Colchicine 誘導体を用いた retro-Michael 反応の定量評価                             | 59-60   |
| 2.3. Colchicine 誘導体の tubulin 重合阻害活性                                       | 61      |
| 2.4. ヒト結腸腺癌細胞 HT29 に対する colchicine 誘導体の生物活性評価                             | 62-63   |
| 2.5. フェノール性水酸基の糖修飾による脱離選択性の向上                                             | 64-68   |
| 2.5.1. Retro-Michael 反応の定量評価                                              | 64-65   |
| 2.5.2. Tubulin 重合阻害活性                                                     | 66      |
| 2.5.3. HT29 細胞に対する生物活性                                                    | 67-68   |
| 3. アニリン誘導体を用いた天然有機化合物 oridonin の保護                                        | 69-76   |
| 3.1. 天然有機化合物 oridonin と GLA のプロドラッグ                                       | 69-70   |
| 3.2. <i>o</i> -Aminophenol および <i>o</i> -anisidine が付加した oridonin 誘導体の安定性 | 71-72   |
| 3.3. 各アニリン類誘導体の安定性と生物活性評価                                                 | 73-76   |
| 4. 小括                                                                     | 77-78   |
| 5. Experimental section                                                   | 79-88   |
| 6. NMR spectroscopic data                                                 | 89-103  |
| 総括                                                                        | 104-107 |
| 参考文献                                                                      | 108-112 |
| 謝辞                                                                        | 113     |

## 略語

|                                    |                                                             |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Boc                                | <i>tert</i> -butoxycarbonyl                                 |
| BTK                                | Bruton's tyrosine kinase                                    |
| CD <sub>3</sub> CN                 | acetonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>                         |
| CD <sub>3</sub> OD                 | methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>                             |
| (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO | dimethyl sulfoxide- <i>d</i> <sub>6</sub>                   |
| CFA                                | $\alpha$ -chlorofluoroacetamide                             |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>    | dichloromethane                                             |
| CHCl <sub>3</sub>                  | chloroform                                                  |
| CH <sub>3</sub> CN                 | acetonitrile                                                |
| CRM1                               | chromosomal maintenance 1                                   |
| Cys                                | cysteine                                                    |
| DMAP                               | <i>N, N</i> -dimethyl-4-aminopyridine                       |
| DMEM                               | Dulbecco's modified eagle medium                            |
| DMSO                               | dimethyl sulfoxide                                          |
| D <sub>2</sub> O                   | deuterium oxide                                             |
| EDCI·HCl                           | 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride |
| EGFR                               | epidermal growth factor receptor                            |
| EGTA                               | ethylene glycol tetraacetic acid                            |
| ERK                                | extracellular signal-regulated kinase                       |
| ESI                                | electrospray ionization                                     |
| Et <sub>3</sub> N                  | triethylamine                                               |
| Et <sub>2</sub> O                  | diethyl ether                                               |
| EtOAc                              | ethyl acetate                                               |
| EtOH                               | ethanol                                                     |
| FAB                                | fast atom bombardment                                       |
| GLA                                | glaucoalyxin A                                              |
| GTP                                | guanosine 5'-triphosphate                                   |
| HCl                                | hydrochloric acid                                           |
| HPLC                               | high performance liquid chromatography                      |
| HR                                 | high resolution                                             |
| Hsp                                | heat shock protein                                          |

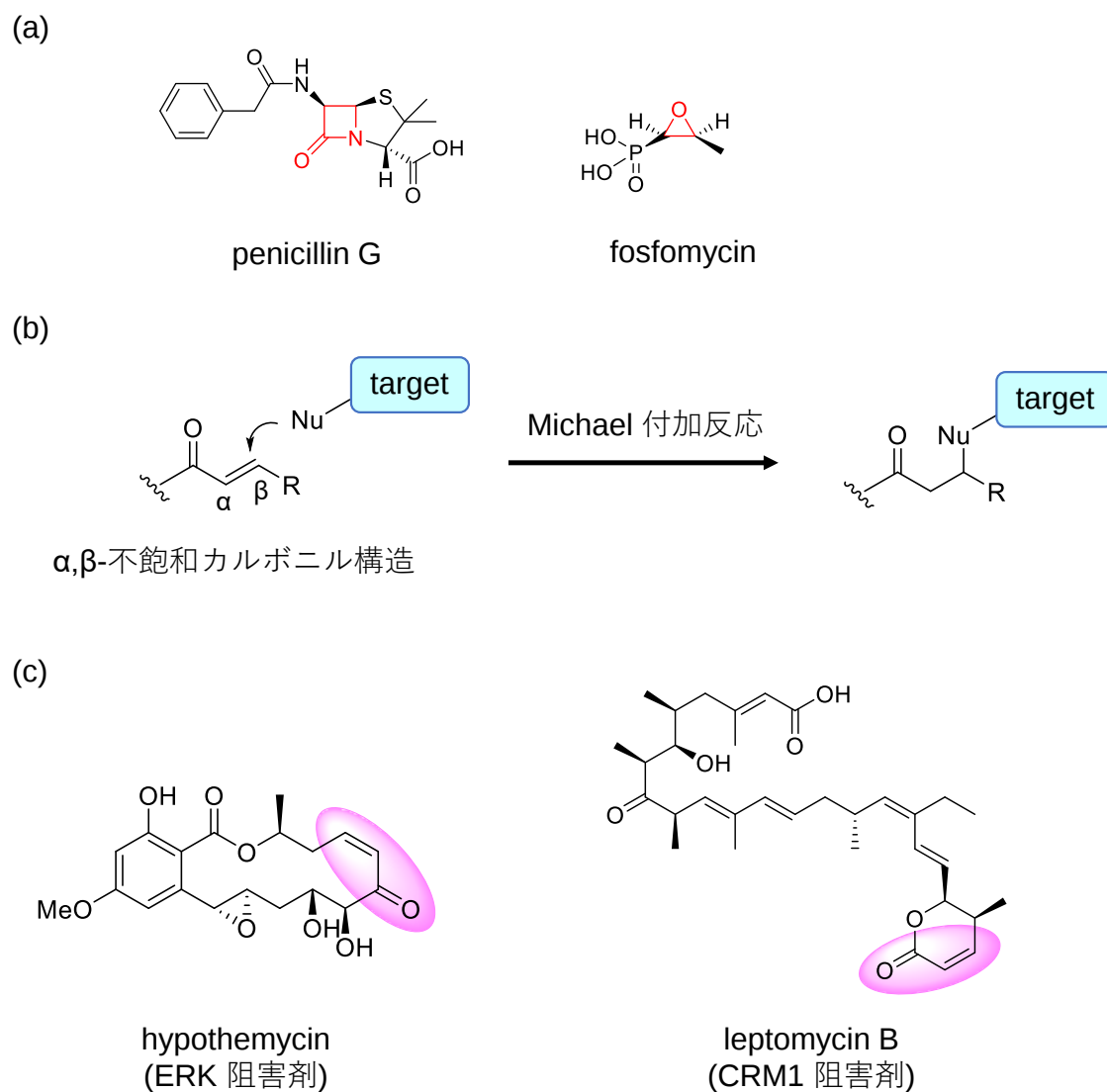
|                                 |                                                   |
|---------------------------------|---------------------------------------------------|
| IC <sub>50</sub>                | half maximal inhibitory concentration             |
| IT-TOF                          | ion trap - time of flight                         |
| KOH                             | potassium hydroxide                               |
| Lys                             | lysine                                            |
| MeCN                            | acetonitrile                                      |
| MeOH                            | methanol                                          |
| MgCl <sub>2</sub>               | magnesium chloride                                |
| MHz                             | megahertz                                         |
| MLR                             | mixed lymphocyte reaction                         |
| MS                              | mass spectrometry                                 |
| NaHCO <sub>3</sub>              | sodium bicarbonate                                |
| NaOAc                           | sodium acetate                                    |
| NaOMe                           | sodium methoxide                                  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | sodium sulfate                                    |
| NMR                             | nuclear magnetic resonance                        |
| ONPG                            | 2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside               |
| PBS                             | phosphate-buffered saline                         |
| PDSS                            | precursor-directed in situ synthesis              |
| Pd-C                            | palladium on carbon                               |
| pH                              | potential of hydrogen                             |
| PhI(OAc) <sub>2</sub>           | (diacetoxyiodo)benzene                            |
| PIPES                           | piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)         |
| pK <sub>a</sub>                 | acid dissociation constant                        |
| rt                              | room temperature                                  |
| SD                              | standard deviation                                |
| STL                             | saccharothiolide                                  |
| Ser                             | serine                                            |
| TCI                             | targeted covalent inhibitor                       |
| TEMPO                           | 2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl free radical |
| TFA                             | trifluoroacetic acid                              |
| THF                             | tetrahydrofuran                                   |
| TLC                             | thin-layer chromatography                         |
| Tris                            | tris(hydroxymethyl)aminomethane                   |

# 序章

## 1. 天然有機化合物と $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造

自然界に存在する天然有機化合物からは、これまで多くの有用な生物活性物質が見出され、一部は医薬品として用いられてきた<sup>1</sup>。それらが有する特定の化学構造の中には、疾患の発症に関与する標的分子と共有結合を形成し、生物活性を制御することで薬理効果を示すものがある。例えば、抗生物質 penicillin G の  $\beta$ -ラクタム環や、同じく抗生物質である fosfomycin が有するエポキシ環は、細菌の細胞壁合成酵素と不可逆的な共有結合を形成する (Figure 1a)<sup>2</sup>。その結果、細菌増殖抑制作用を示し、感染症治療薬として用いられている。

同じく、天然有機化合物の活性発現に重要な構造として、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造が挙げられる (Figure 1b)。標的タンパク質上の求核部位 (Nu) が、二重結合を形成する  $\beta$  位炭素を攻撃して Michael 付加することにより共有結合を形成し、標的タンパク質の機能は不可逆的に阻害され薬理活性が発揮される。例えば、真菌 *Hypomyces subiculosus* が産生する hypothemycin は、細胞周期の進行に関与する extracellular signal-regulated kinase (ERK) の ATP 結合部位を形成するシステイン (Cys) 残基と、放線菌 *Streptomyces* sp. AT51287 が産生する leptomycin B は、タンパク質核外輸送因子である chromosomal maintenance 1 (CRM1) 上の Cys 残基と、それぞれの化合物が有する  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル部位にて共有結合を形成して活性発現に寄与する (Figure 1c)<sup>3,4</sup>。



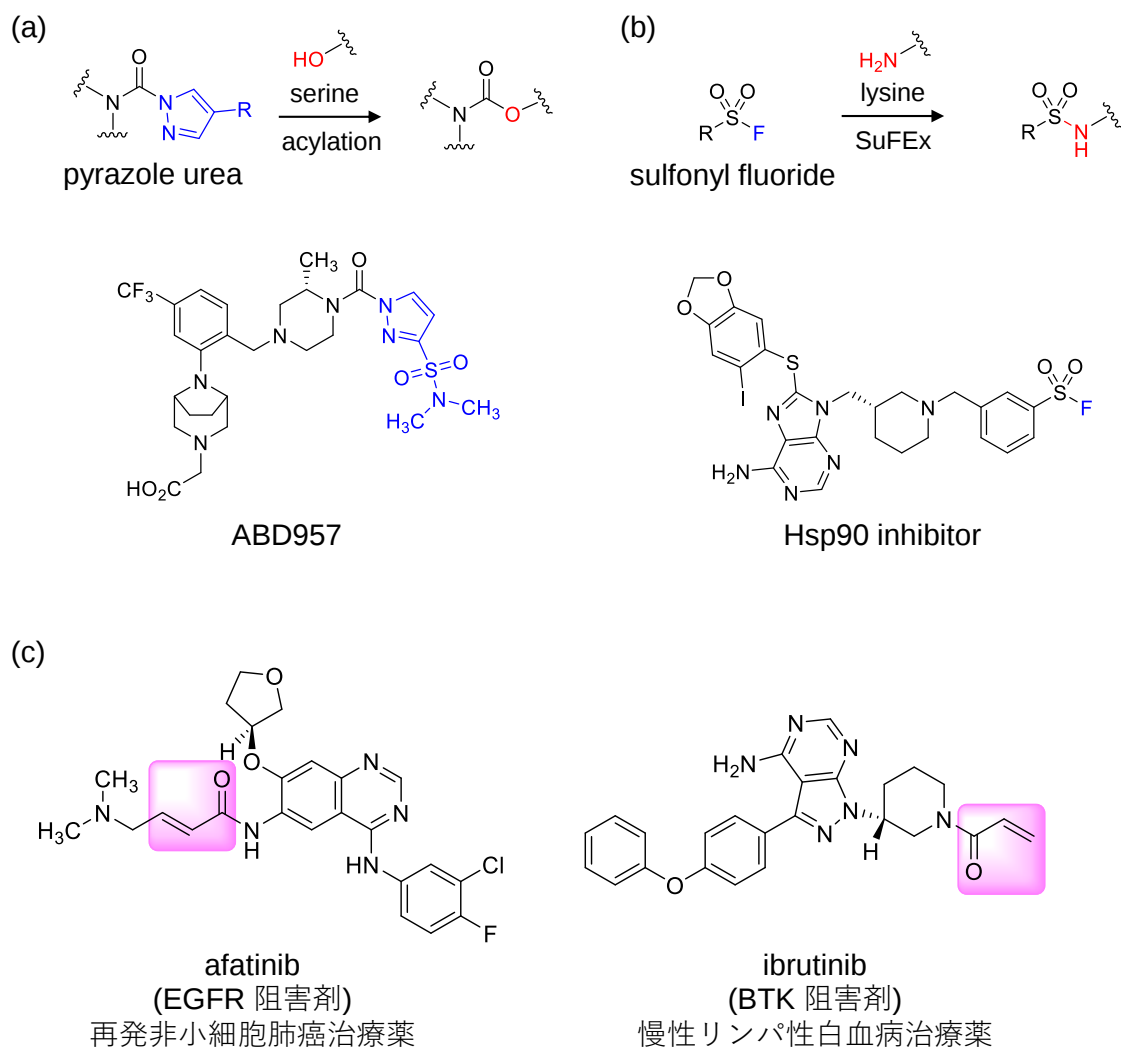
**Figure 1.** 天然有機化合物が有する生物活性発現に必要な化学構造の例. (a) Penicillin G の  $\beta$ -ラクタム環および fosfomycin のエポキシ環. これらの構造は、細菌の細胞壁合成酵素と不可逆的な共有結合を形成する。(b)  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する化合物と標的分子との Michael 付加反応. 本反応により標的分子の求核剤 (Nu) と  $\beta$  位の炭素との間に共有結合が形成される。その結果、標的の持つ生理機能に影響を与えることが可能となる。(c)  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する天然有機化合物の例. Hypothemycin、leptomycin B の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造は標的タンパク質中の Cys 残基におけるチオール基と共有結合を形成し、その機能を阻害する。

## 2. $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の医薬品展開とその課題

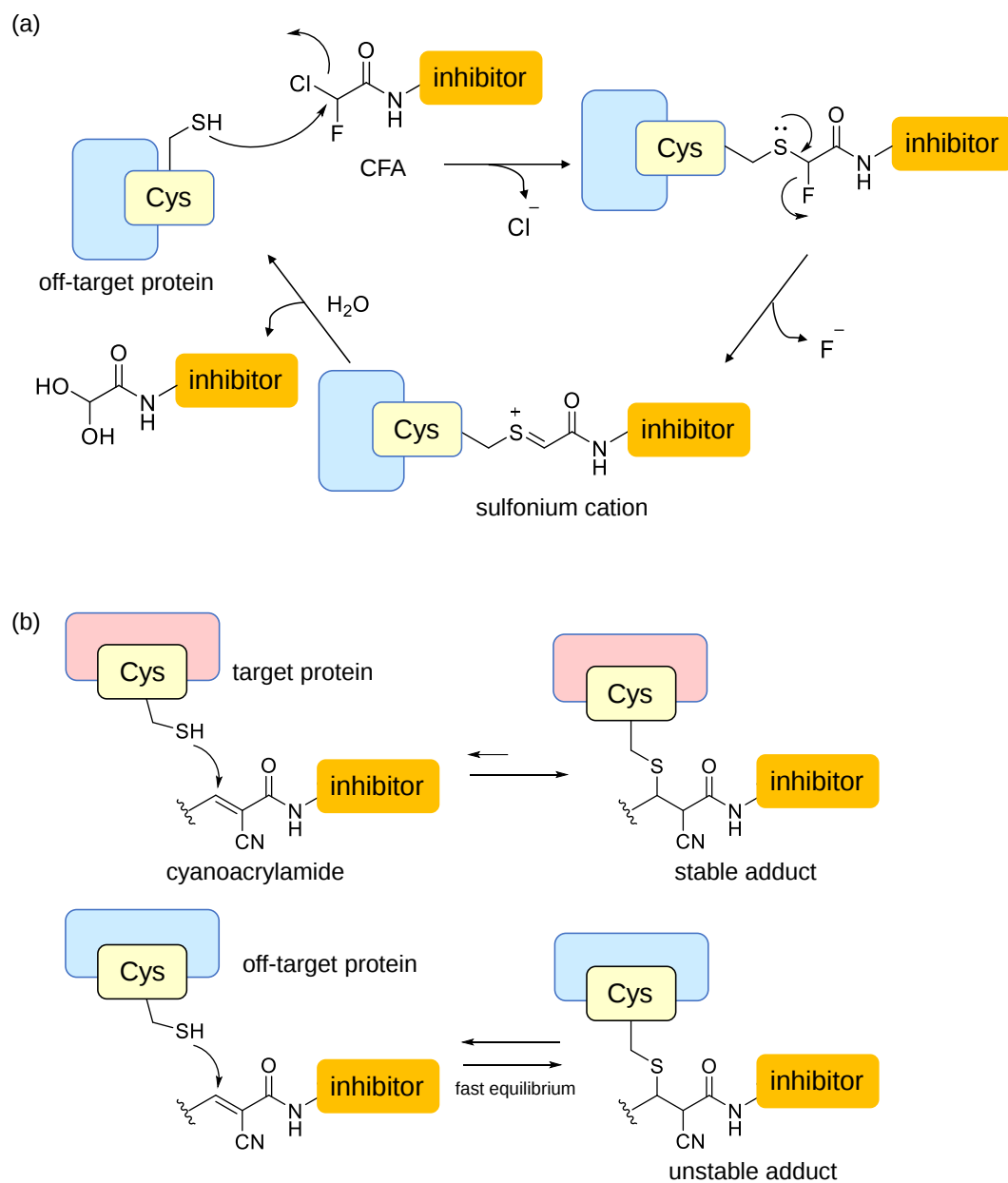
前項で紹介した penicillin G や fosfomycin のように、標的タンパク質と共有結合を形成し、その機能を阻害する医薬品は covalent drug と呼ばれる<sup>5</sup>。中でも、標的タンパク質との結合特異性を高める分子設計が施された covalent drug は、targeted covalent inhibitor (TCI) と呼ばれ、様々な反応基が報告されている (Figure 2a,b)<sup>6</sup>。例えば pyrazole urea は、セリン (Ser) 残基との共有結合時に脱離基として機能し、N-RAS 変異型の腫瘍細胞選択的な阻害剤 ABD 957 の部分構造として組み込まれている (Figure 2a)<sup>7</sup>。また、sulfonyl fluoride は熱ショックタンパク質 Hsp 90 の リシン (Lys) 残基と硫黄-フッ素交換反応 (SuFEx) によって共有結合し、その阻害作用の向上に寄与することが報告されている (Figure 2b)<sup>8</sup>。

$\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造もまた代表的な TCI 反応基であり、医薬品の薬理活性を高める目的で導入されている (Figure 2c)。例えば、再発非小細胞肺癌治療薬 afatinib 内のアクリルアミド構造は、上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) の Cys797 と不可逆的な共有結合を形成し、細胞増殖を抑制する<sup>9</sup>。また、慢性リンパ性白血病治療薬の ibrutinib に組み込まれたアクリルアミド構造も、同じく細胞増殖に関与するブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の Cys481 と不可逆の共有結合を形成する<sup>10</sup>。

このように、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造は抗腫瘍剤の薬理活性を向上させる目的で導入される一方で、正常細胞のタンパク質が有するアミノ基側鎖に対しても不可逆的に結合し、副作用をもたらす場合もある<sup>11,12</sup>。このため、高い反応性を確保しつつ、標的への選択性を高めることが創薬開発における課題となっている。解決法として、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造より低い反応性を持ち、可逆的な共有結合の形成に対して、より高い標的選択性を示す官能基:  $\alpha$ -chlorofluoroacetamide (CFA) 基や cyanoacrylamide を用いた研究が報告されている (Figure 3)<sup>13,14</sup>。



**Figure 2. TCI に用いられる反応基の例および  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造が生物活性発現に寄与する医薬品.** (a) Pyrazole urea. Pyrazole urea は、アシル化によって Ser 残基と共有結合を形成する。部分構造に pyrazole urea を組み込んだ化合物 ABD957 は、脱パルミトイル化酵素 ABHD17 を選択的に阻害し、N-RAS変異型の腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を示す。(b) Sulfonyl fluoride. Sulfonyl fluoride は、硫黄-フッ素交換反応 (SuFEx) により、Lys 残基と不可逆的な共有結合を形成する。図示した化合物は構造中の sulfonyl fluoride が Hsp90 の Lys 58 と共有結合し、その阻害剤として機能する。(c)  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造が薬理活性発現に寄与する医薬品の例. Afatinib (EGFR 阻害剤)、ibrutinib (BTK 阻害剤) は不可逆的な結合を介して標的分子の活性を阻害し、腫瘍増殖抑制作用を示す。

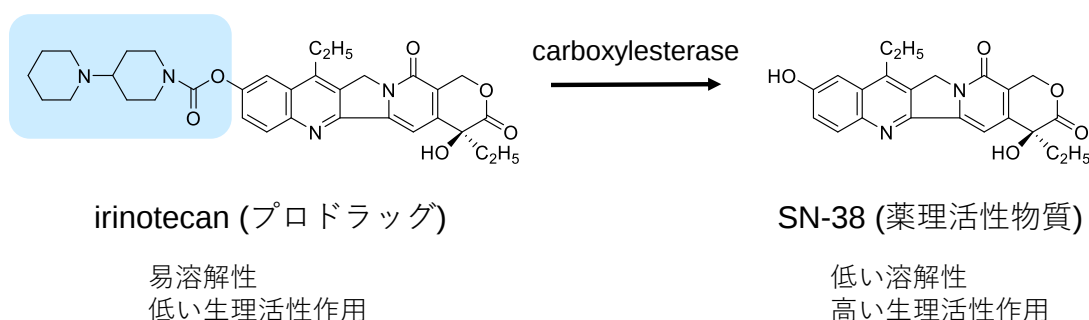


**Figure 3. CFA 基 および cyanoacrylamide と Cys 側鎖 チオール基との反応性.** (a) CFA 基. CFA 基とタンパク質上の Cys 側鎖チオール基との付加反応は、可逆的である。付加物からフッ素の脱離によってスルホニウムカチオン中間体を形成した後、加水分解によってチオール基が再び露出すると考えられている。(b) Cyanoacrylamide. Cyanoacrylamide は、標的分子と結合を形成すると、生物活性物質が有するリガンド構造をふまえて、安定な付加体を維持する。一方、それ以外の分子とは可逆的な結合により、平衡状態を示すことで非特異的な反応を抑えている。

### 3. プロドラッグ化による $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の活性制御

医薬品開発を指向した  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の薬理活性制御には、前述の改良された官能基を用いる他に、プロドラッグという手法も検討されている<sup>15</sup>。プロドラッグとは、薬理活性物質を疾患部位へ選択的に送達する Drug Delivery System (DDS) の一種である。その構造は、薬理活性物質に対して修飾を加えた活性前駆体であり、体内での代謝を利用して活性本体を放出する。薬理活性本体の安定性や溶解性が低い場合でも、プロドラッグ化による一時的な構造変換で、持続性や安全性、吸収率の向上が期待できる。そのため、これまでに様々な疾患に対するプロドラッグが開発、上市されている。例えば、抗癌剤 irinotecan は薬理活性本体であるトポイソメラーゼ阻害剤 SN-38 のフェノール性水酸基を溶解性補助基で保護した構造を持つ<sup>16</sup>。この修飾により、溶解性を向上させた irinotecan は 難水溶性化合物である SN-38 のプロドラッグとして作用する。すなわち、irinotecan を体内に投与するとカルボキシエステラーゼが溶解性補助基を加水分解し、活性本体の SN-38 が放出され薬理効果を発揮する (Figure 4)。

$\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造においても、プロドラッグ化研究は行われている。例えば、真菌 *Penicillium decumbens* が産生する brefeldin A や、植物 *Tanacetum parthenium* に含まれる parthenolide について、それぞれスルフィニル基やアミド基を導入した誘導体が検討され、生物活性の増強や溶解性の向上が確認されている (Figure 5a,b)<sup>17,18</sup>。自然界においても、巧みに  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造が保護された活性前駆体の存在が報告されている。例えば、放線菌 *Verrucospora* sp. MS100128 が産生する abyssomicin 類縁体の一つ、チオエーテル構造型誘導体の abyssomicin J が酸化反応を経由し、atrop-abyssomicin C へと変換され、結核菌に対する阻害作用を示すと考えられている (Figure 5c)<sup>19</sup>。



**Figure 4.** 医薬品 irinotecan の活性化メカニズム。プロドラッグである irinotecan は carboxylesterase による加水分解で活性本体 SN-38 を放出する。

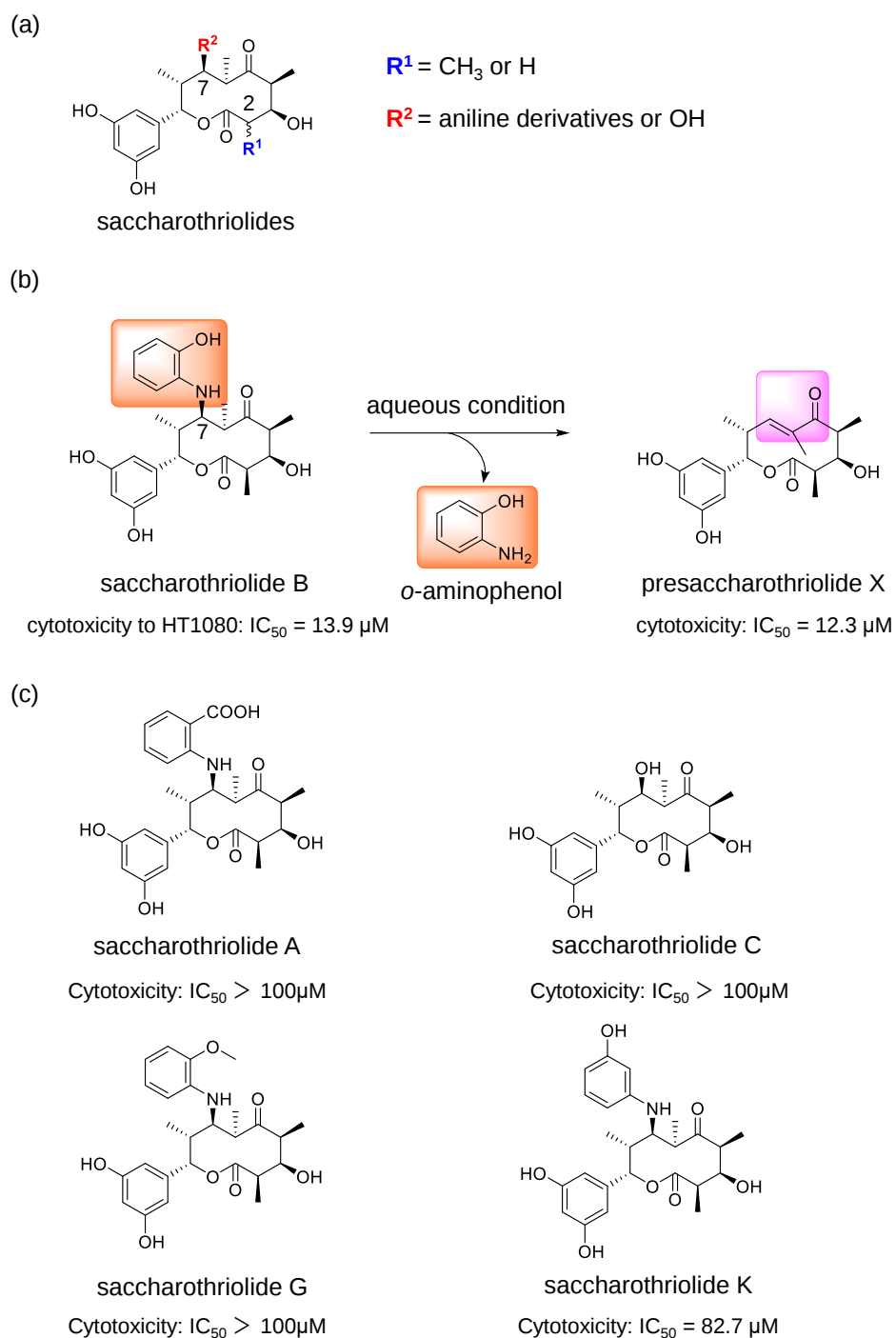


#### 4. 天然有機化合物 saccharothriolide B (STL B)

Saccharothriolide 類 (STLs) は所属研究室において、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 から単離された 10 員環マクロライドである<sup>20-23</sup>。STLs はマクロラクトン環 2 位に (R/S) メチル基もしくは水素原子、7 位にアニリン誘導体もしくは水酸基を持つ (Figure 6a)。7 位はカルボニルの  $\beta$  位炭素でもあり、類縁体の産生に Michael 付加反応が関与していると推測されている<sup>20</sup>。すなわち、不安定な  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する前駆体の存在が示唆され、これに *o*-aminophenol 等の構造が付加することで、各種類縁体が生合成される。実際に tryptophan 非存在下の培養液で培養することで、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する前駆体 presaccharothriolide X (preSTL X, **1**) が得られた<sup>23</sup>。さらに、培養液中に各種求核剤を添加することで、人為的に様々な STL 類縁体が合成された<sup>22,23</sup>。これは precursor-directed in situ synthesis (PDSS) と呼ばれ、簡便に目的の類縁化合物が取得可能な方法である。本法を用いて、様々な求核剤が付加した STL 類を合成し、安定性や生物活性が評価された<sup>21,23</sup>。

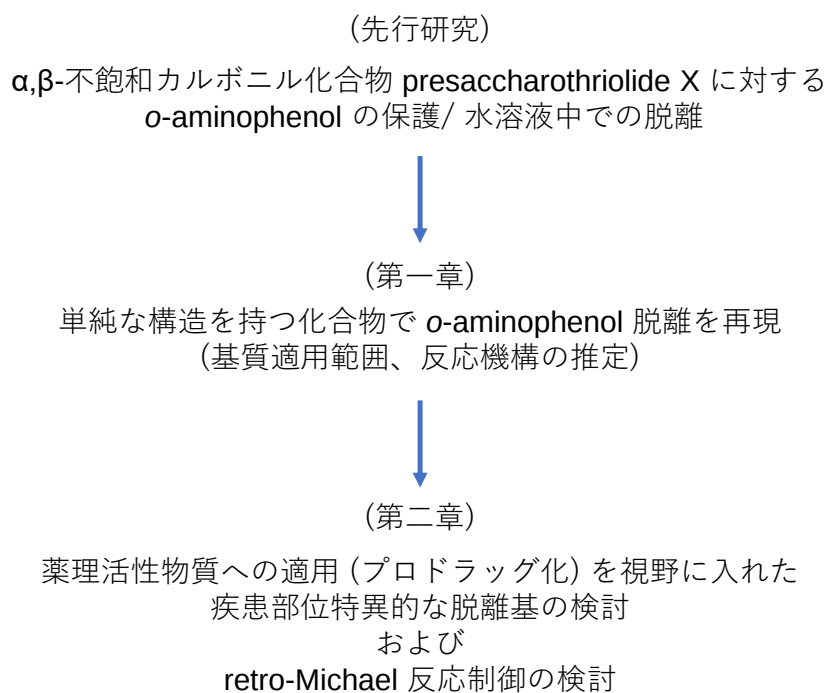
各種類縁化合物を用いた解析の結果、saccharothriolide B (STL B, **2**) は、水溶液中で非酵素的に preSTL X (**1**) へと変換され、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を露出することが判明した (Figure 6b)<sup>23</sup>。興味深いことに、STL B (**2**) の持つこの性質は、preSTL X (**1**) の 7 位に anthranilic acid、*o*-anisidine、*m*-aminophenol といった他のアニリン類を有する類縁体 STL A、STL G、および STL K (Figure 6c) には見られなかった。加えて、一連の誘導体の中で STL B (**2**) と preSTL X (**1**) の 2 化合物のみが、ヒト線維肉腫細胞 HT1080 に対して強い細胞増殖抑制効果を示した<sup>23</sup>。また、preSTL X (**1**) は水溶液中で  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル部位に水分子が付加した saccharothriolide C へと変換される不安定な基質であることも明らかとなり、一連の STL 化合物の生物活性本体は、preSTL X (**1**) である可能性が示唆された。すなわち、STL B (**2**) は *o*-aminophenol によって preSTL X (**1**) の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を保護している一方で、水溶液中では retro-Michael 反応により、非酵素的に preSTL X (**1**) を脱離すると推測された。

以上より、この“*o*-aminophenol による  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の保護”が、他の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する生物活性物質に適用できれば、本構造の高い反応性という課題を克服するための、新たな解決法となり得ると考えられた。



**Figure 6.** 天然有機化合物 STLs の各種類縁体と生物活性. (a) STLs の基本骨格. STLs は 10 員環のマクロラクトン骨格を有し、2 位 ( $=R^1$ ) と 7 位 ( $=R^2$ ) に各々置換基を有する。(b) 水溶液中での STL B (2) の脱離. 水溶液中で o-aminophenol の脱離が進行し、STL B (2) は preSTL X (1) へ変換される。(c) STL 類縁体とその生物活性. STL 類縁体 (STL A, C, G, K) の HT1080 細胞に対する  $\text{IC}_{50}$  値は、STL B (2) および preSTL X (1) よりも高い。

本論文では、希少放線菌由来の天然有機化合物 STL B (2) が示す現象から着想を得た “*o*-aminophenol による  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の保護” について、他の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する生物活性物質への適用を目指した。第 1 章では単純構造を持つ化合物を例として、本現象の汎用性、反応機構の解析、および環境応答型の脱離基を検討した。第 2 章では微小管重合阻害剤の colchicine へと応用し、環境応答型脱離、生物活性発現を検討し、さらには天然有機化合物 oridonin を用いた retro-Michael 反応制御を検討した。以上の実験結果より、*o*-aminophenol を用いた  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の保護という手段が医薬品開発における新規保護ツールとして有用か検証した (Figure 7)。



**Figure 7. 本研究の概要.** STL B (2) で観測された現象を、第 1 章で単純な構造を持つ化合物にて再現、および反応機構の推定を行った。その上で、第 2 章ではより疾患部位特異的な脱離を指向した、生物活性物質への応用 (プロドラッグ化) を検討した。

# 第 1 章

## Retro-Michael 反応による

## o-aminophenol の脱離条件の検討

### 1. 背景

序章では、標的となるタンパク質と共有結合を形成し、その生理機能を制御する targeted covalent inhibitor (TCI) を紹介した (Figure 2)。代表的な TCI である  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造は、標的分子と不可逆的な共有結合の形成による腫瘍増殖抑制効果の向上を目的に、医薬品構造にも組み込まれている一方で、高い反応性による正常組織への毒性が懸念されている<sup>24</sup>。

所属研究室では、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 が産生する天然有機化合物として、10 員環マクロライド化合物 *saccharothriolide* 類 (STLs) が単離構造決定された (Figure 6a)。このうち *saccharothriolide* B (STL B, **2**) は、唯一水溶液中で非酵素的に *o*-aminophenol を脱離し、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する *presaccharothriolide* X (preSTL X, **1**) に変換されることが明らかにされ、化合物 **1** と **2** は同程度の細胞毒性効果を示した。このことから、STL B (**2**) の細胞毒性の発現には、水溶液中での *o*-aminophenol の脱離による  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の露出が寄与するものと推察された (Figure 6b)<sup>23</sup>。この現象は、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の高い反応性によるオフターゲット効果という薬理的課題に対して、一つの解決法となり得る可能性を示唆している。すなわち、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する薬理活性物質を、一時的に *o*-aminophenol により保護し、治療標的部位に到達した時点で脱保護させることができれば、選択性の向上による副作用の回避や、疾患部位への薬物到達効率の向上が期待できる。

本章では、希少放線菌由来の天然有機化合物 STL B (**2**) で見出された、水溶液中における非酵素的な *o*-aminophenol の脱離現象が、STL B 以外の化合物でも再現可能かを検証するため、簡易な構造を持つ  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物を調整して実験を行った。加えて、種々溶液中における脱離現象の反応速度評価や、*o*-aminophenol のフェノール性水酸基の必要性も評価するとともに、反応機構を考察した。

## 2. ケト/エステル/アミド型化合物を用いた *o*-aminophenol の脱離

### 2.1. HPLC を用いた反応モニタリング

天然有機化合物 STL B (2) において観察された *o*-aminophenol の脱離反応が、化合物 2 に特異的な現象か否かを検討すべく、簡素な構造の *o*-aminophenol 付加物 (3, 4, 5) を合成し、実験に用いた。化合物 3 はケト型の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 dodec-1-en-3-one (6) に対し、CH<sub>3</sub>CN 中で *o*-aminophenol を Michael 付加させることで取得した。化合物 4, 5 はエステル型の benzyl acrylate (7)、およびアミド型の *N*-benzylacrylamide (8) について、SiO<sub>2</sub> 存在下、CH<sub>3</sub>CN 中で *o*-aminophenol を Michael 付加させて合成した (Figure 8)。

得られた付加体を MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) に溶解し、37 °C で 48 時間に渡り HPLC によるモニタリングを行った (Figure 9)。その結果、ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) の減少、および *o*-aminophenol と dodec-1-en-3-one (6) の生成が確認された。対照的に、エステル型およびアミド型付加体 (4, 5) については、*o*-aminophenol と  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (7, 8) の UV ピークは検出されなかった。以上より、MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) 条件下 (37 °C, 48 時間) において、*o*-aminophenol の脱離と  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出が観察されたのは、ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) のみであった。

次に、caffeine を内部標準物質として用いることで、本反応を定量評価した (Figure 9)。その結果、ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) は、経時的に残存率が低下し、48 時間後の残存率は 58% であった。反対に *o*-aminophenol、dodec-1-en-3-one (6) は経時的に増加し、48 時間後には反応開始時の化合物 3 の濃度に対して 51%、58% の放出が確認された。このことより、ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) は副反応が起こることなく *o*-aminophenol が脱離し、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物が放出したと考えられた。一方、エステル型 *o*-aminophenol 付加体 (4) およびアミド型 *o*-aminophenol 付加体 (5) は、48 時間後の残存率がそれぞれ 81% と 77% であり、*o*-aminophenol の脱離と  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出は認められなかった。すなわち、定量評価においても STL B (2) と同じ構造的特徴を有するケト型付加体 (3) のみ、*o*-aminophenol の脱離と  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出が再現されることが判明した。

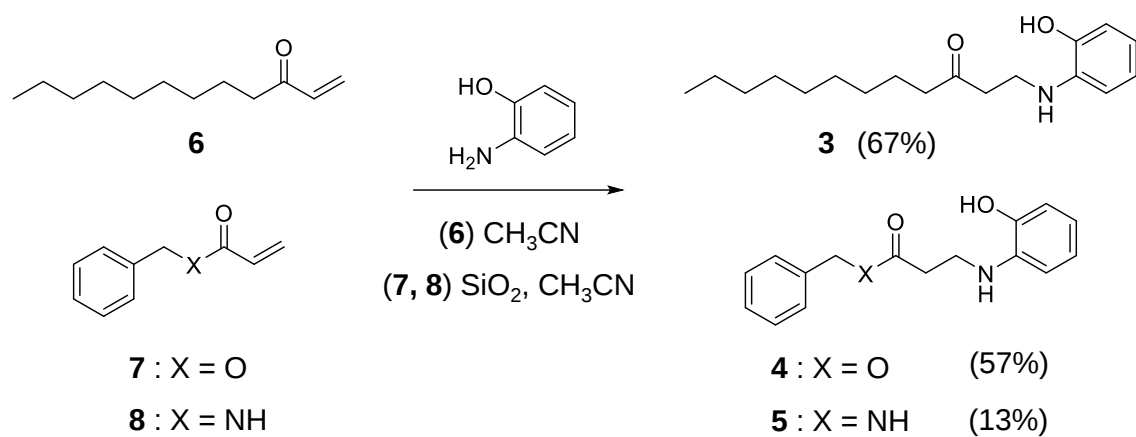
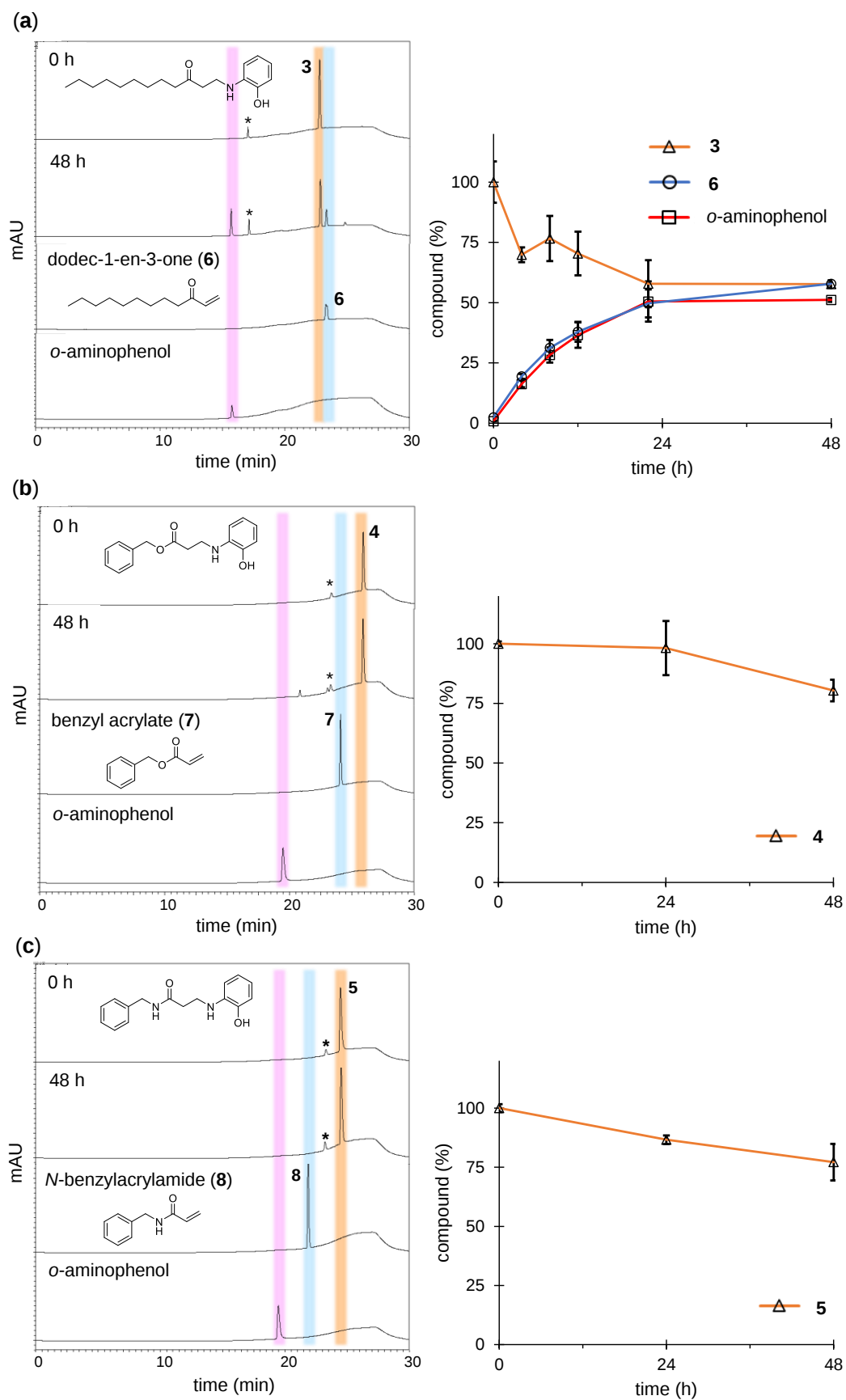


Figure 8. *o*-Aminophenol 付加体 (3, 4, 5) の合成スキーム.



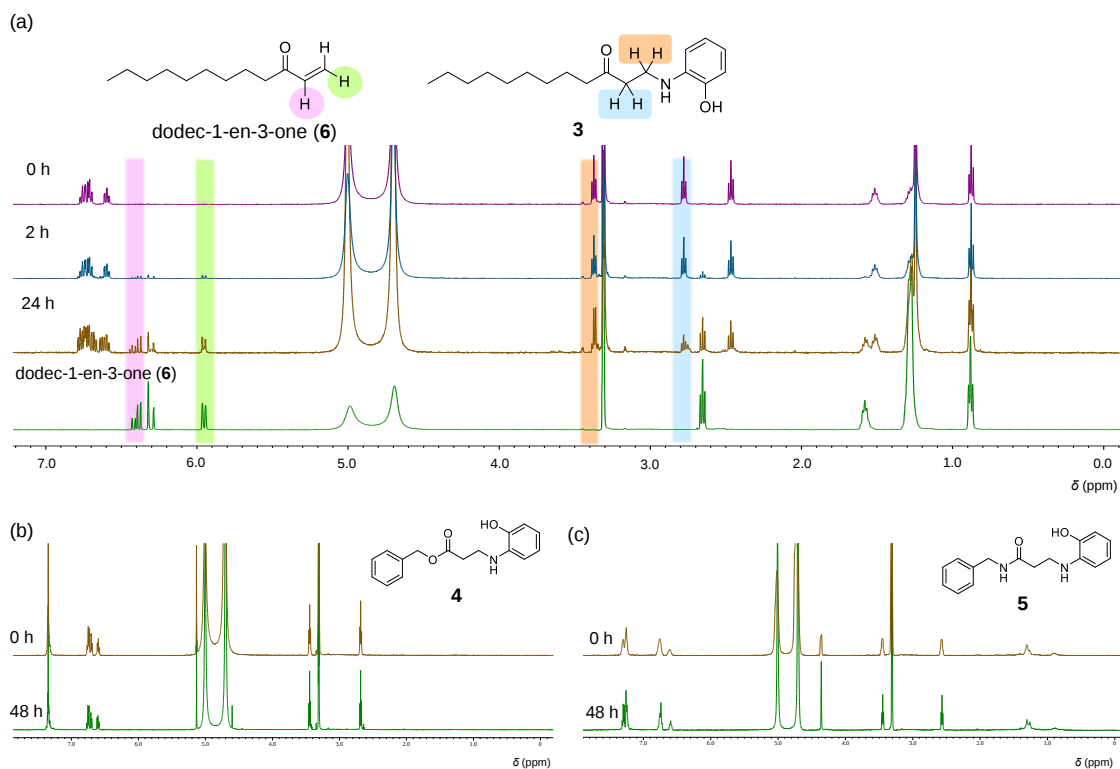
**Figure 9.** 各 *o*-aminophenol 付加体 (3-5) の MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) 溶媒中における HPLC チャート (左)、および定量評価 (右). (a) ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) データ. ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3, オレンジ) の UV ピークは、48 時間後減少し、残存率は約 50% であった。反対に dodec-1-en-3-one (6, 青)、および *o*-aminophenol (ピンク) の UV ピーク増加を認めた。定量評価において、両者は経時的に増加し、反応開始時の化合物 3 に対するモル分率は約 50% であった。(b, c) エステル型、およびアミド型 *o*-aminophenol 付加体 (4, 5) データ. 双方において、*o*-aminophenol、benzyl acrylate (7)、および *N*-benzylacrylamide (8) の UV ピークは確認されなかった。48 時間後の残存率はエステル型 (4) は 81%、アミド型 (5) は 77% であった。(mean ± SD, n = 3), 内部標準物質として caffeine(\*) を使用した。(a) Cosmosil MS II,  $\Phi$  4.6 × 250 mm, 0.8 mL/min, 5-100% MeOH in aq., 210nm. (b,c) Cosmosil PBr,  $\Phi$  4.6 × 250 mm, 0.8 mL/min, 5-100% MeOH in aq., 210 nm.

## 2.2. $^1\text{H}$ NMR 測定による *o*-aminophenol 脱離反応の検証

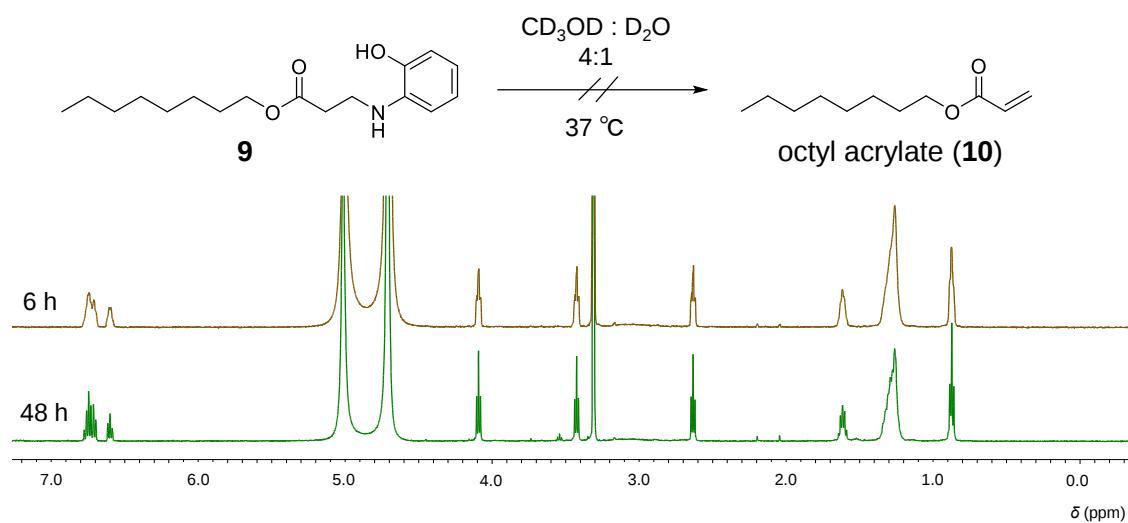
MeOH と水の混合溶媒中における HPLC モニタリングの結果、ケト型の *o*-aminophenol 付加体 (3) より *o*-aminophenol の脱離に伴う dodec-1-en-3-one (6) の放出が確認された (Figure 9)。この結果は、天然有機化合物 STL B (2) と同様に、*o*-aminophenol の脱離による retro-Michael 反応の進行を示唆する。そこで、化学構造の観点から  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出を保証すべく、 $^1\text{H}$  NMR によるモニタリングを行い、ケミカルシフトの推移を評価した (Figure 10)。

まず始めに、HPLC によるモニタリングと同じ溶液組成として、 $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) を調整し、ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) の  $37^\circ\text{C}$  における脱離を NMR チューブ中で行い、定期的にモニタリングした (Figure 10a)。溶解後 2 時間の時点で、dodec-1-en-3-one (6) 由来の二重結合、およびカルボニル  $\alpha$  および  $\beta$  位由来のケミカルシフトが確認された。これらの積分値は、24 時間後にかけて増加していった。この結果より、HPLC によるモニタリング結果 (Figure 9) と同様に、 $^1\text{H}$  NMR 測定によるケミカルシフト値の変遷からも、脱離反応が進行していることが証明された。

次に、エステル型、およびアミド型 *o*-aminophenol 付加体 (4, 5) についても、同様の条件でモニタリングを行った (Figure 10b,c)。その結果、対応する  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (7, 8) を含め、付加体以外の新規シグナルは確認されなかった。このことは、ケト型にて観察された retro-Michael 反応が、エステル型やアミド型では進行していないことを示唆している。ただ、反応の進行に影響を与えた原因として、 $\alpha$  位の原子の違い (C, O, N) 以外に、エステル型とアミド型付加体 (4, 5) が有する芳香環の存在も考えられた。そこで、ケト型付加体 (3) 同様に鎖状のアルキル基を有するエステル型 *o*-aminophenol 付加体 (9) を用いて  $37^\circ\text{C}$  下、 $^1\text{H}$  NMR による反応モニタリングを行った。その結果、48 時間後においても octyl acrylate (10) 由来のシグナルは確認されず、芳香環を持つ化合物 (4) と同様に反応は進行しなかった (Figure 11)。これより、一連の付加体 (3-5, 9) を用いた retro-Michael 反応の進行の有無には、 $\alpha$  位の原子の寄与が大きいことが示唆された。



**Figure 10.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) を用いたケト型、エステル型、およびアミド型 *o*-aminophenol 付加体の反応性試験.** (a) ケト型、(b) エステル型、および (c) アミド型 *o*-aminophenol 付加体 (3-5) の 37°C、 $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) 中における  $^1\text{H}$  NMR スペクトル. ケト型 (3) 由来のスペクトル (オレンジ、青) は経時的に減少する一方で、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (6) 由来のスペクトル (ピンク、緑) が増加した。ケト型、エステル型各付加体 (4, 5) は溶解後 48 時間経過しても新規シグナルの出現は認められなかった。



**Figure 11.** 鎖状エステル型 *o*-aminophenol 付加体 (**9**) の  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) 解析.  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) 溶解後の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル. 鎖状エステル型 *o*-aminophenol 付加体 (**9**) は溶解後 48 時間経過しても 新規シグナルの出現は認められなかった。

### 2.3. 各 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物が示した反応性の考察

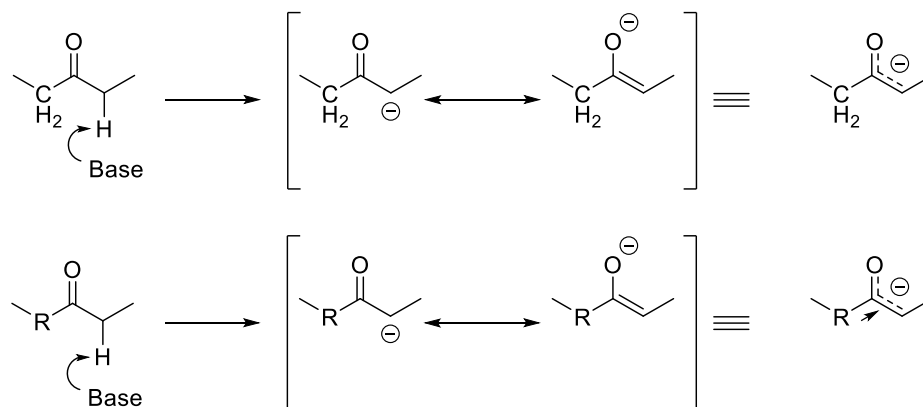
前項までの結果より、エステル、アミド型における *o*-aminophenol の脱離、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出は、脱離反応の第一段階であるカルボニル  $\alpha$  位のプロトンの引き抜きが、酸性度の低下により制御されたためと考えられる。ケト型の場合、カルボニル  $\alpha$  位のプロトンが塩基によって引き抜かれた後に生じる共役塩基は、共鳴安定化により Figure 12a に示す共鳴構造を取ることで、安定化される。

一方、エステル型、およびアミド型の場合には、酸素、窒素原子が有する非共有電子対からの電子供与により、共鳴安定性が低下する。そのため、カルボニル  $\alpha$  位のプロトンの酸性度は低下し、反応性が低下すると考えられる。各  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物に対する *o*-aminophenol の Michael 付加反応においても、付加体の収率はケト型 (3) は室温条件下で 67%、エステル型 (4) とアミド型 (5) は加熱して各々 57、13% とより低い収率であった (Figure 8)。

エステル、アミド型では  $\alpha$  位 O、N 原子の非共有電子対がカルボニルの炭素原子へと押し出され、分極が低下する (Figure 12b)。すなわち、ケト型カルボニル炭素はエステル型、アミド型と比較して最も強い  $\delta^+$  を帯びる。その結果、 $\beta$  位が求核攻撃を受けた際に二重結合から電子を受け取りやすくなり、付加反応が最も効率よく進行すると考えられる。

共有結合性の阻害剤において、創薬研究で報告される多くがエステルおよびアミド型であるが、今回の結果で、最も反応性の高いケト型について本法が適用できることが判明し、今後強力な生理活性物質を制御できる有効な手法となり得る可能性が示された。

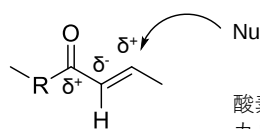
(a)



R = NH, O

酸素、窒素原子上の非共有電子対からの電子供与による不安定化

(b)



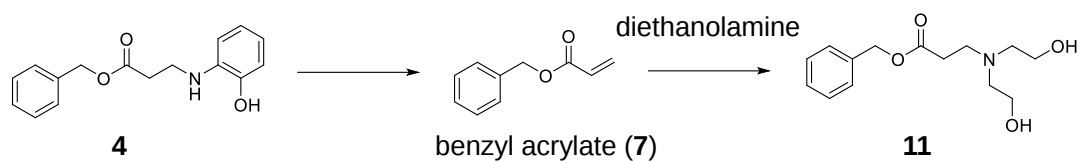
酸素、窒素原子からの電子供与により、カルボニル炭素の  $\delta^+$  性低下

R = CH<sub>2</sub>, NH, O

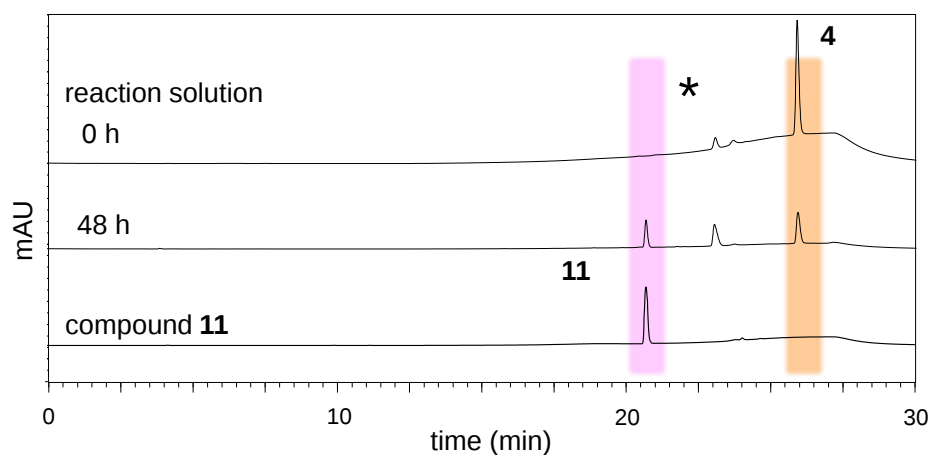
**Figure 12. Retro-Michael/ Michael 反応におけるケト/ エステル/ アミド型カルボニル化合物の反応性についての考察.** (a) retro-Michael 反応において、エステル型とアミド型は、酸素や窒素原子上の非共有電子対がカルボニル炭素へ押し出され、共鳴構造が不安定化される。(b) Michael 反応においても、(a) 同様にカルボニル炭素へ電子が押し出され、分極が低下することで、反応の効率が低下する。

エステル型 *o*-aminophenol 付加体 (**4**) は、Figure 9b で示した HPLC によるモニタリングにおいて、*o*-aminophenol の脱離や benzyl acrylate (**7**) の放出が確認されなかった。また、<sup>1</sup>H NMR 測定によるモニタリング (Figure 10b) では、副生成物の生成は認められなかった。 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の **7** が検出されなかった原因として、エステル型の retro-Michael 反応は付加体の高い安定性により、脱離しても速やかに付加体を再生し、脱離が可視化できなかった可能性を考えた。そこで、diethanolamine を本実験における  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**7**) の捕捉剤として使用した。

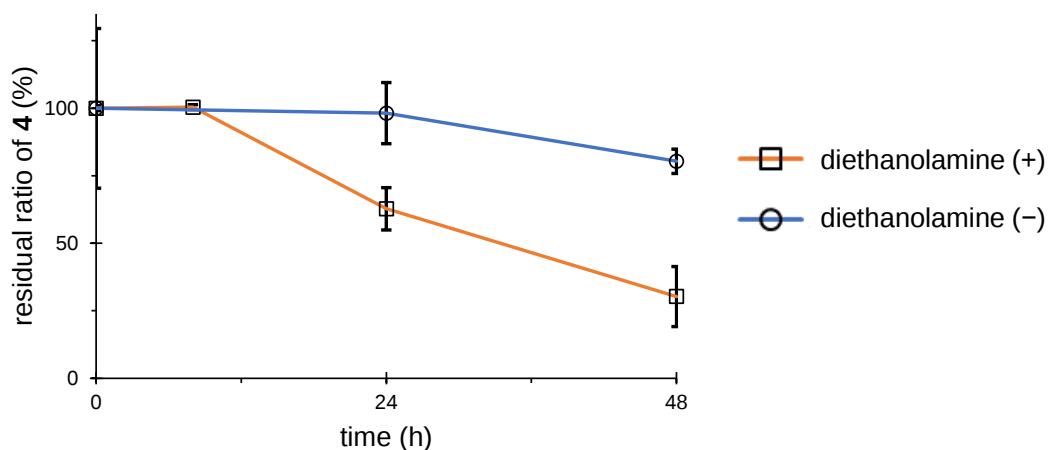
Figure 9 と同じ反応条件で HPLC による分析・定量を行った結果、48 時間後には diethanolamine 付加物 (**11**) の生成が確認された (Figure 13a)。原料である化合物 **4** の残存率は diethanolamine 無しの場合は 80%、有りでは 30% と後者がより多く減少した (Figure 13b)。この現象は、系中で微量に放出された **7** を diethanolamine が速やかに捕捉して **11** を形成した結果、平衡状態を保つために **4** から **7** への変換が増加することでもたらされた可能性が考えられる。加えて、diethanolamine が塩基として働き、化合物 **3** におけるカルボニルの  $\alpha$  位のプロトンを引き抜くことで脱離反応が促進された可能性も考えられる。すなわち、エステル型 *o*-aminophenol 付加体 (**4**) でも  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**7**) の放出が進行することが間接的に示唆された。しかしながら、捕捉剤非存在下での脱離効率はケト型 *o*-aminophenol 付加体 (**4**) よりも低く、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**7**) の放出効率も直接の評価はできないことから、以後本プロドラッグ化法の検討ではケト型 (**3**) を用いた。



(a)



(b)

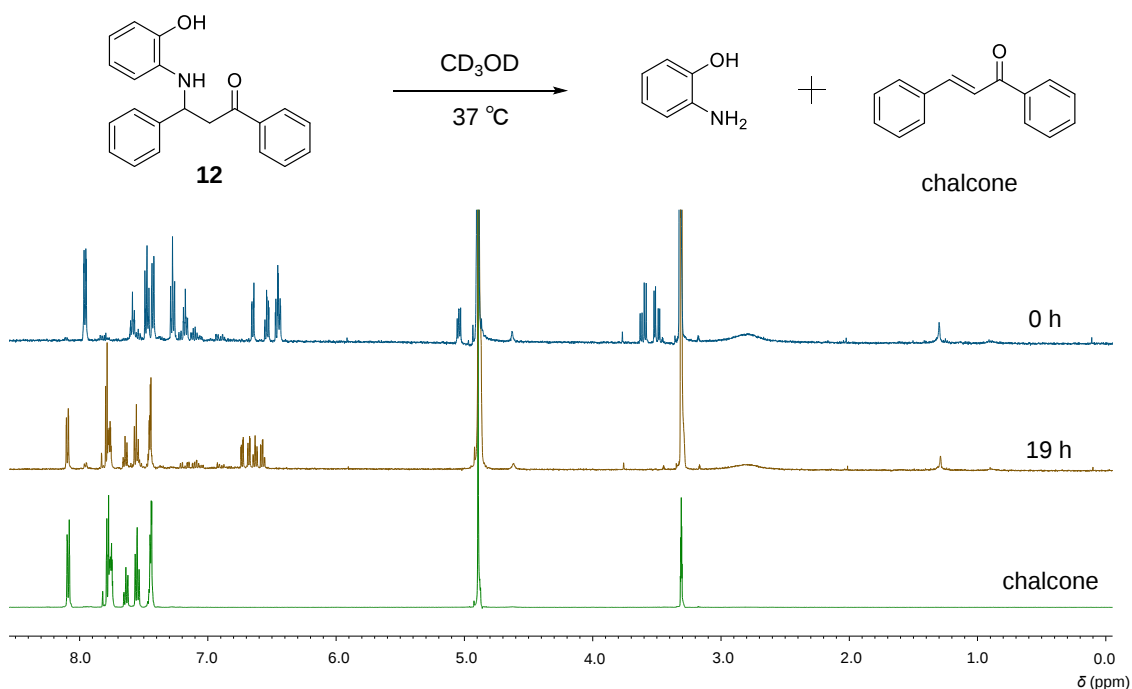


**Figure 13. Diethanolamine を用いたエステル型付加体 (**4**) の脱離モニタリング.**

Diethanolamine 存在下におけるエステル型付加体 (**4**) の定量評価を 37 °C 下、MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) 混合溶媒中で HPLC を用いて行った。(a) HPLC UV チャートの変遷. 内部標準物質として caffeine(\*) を使用し、経時的な変化をモニタリングした結果、エステル型付加体 (**4**, オレンジ) の一部は、48 時間までに、diethanolamine 付加物 (**11**, ピンク) に変換された (分析条件は Figure 9b に準ずる)。(b) Diethanolamine 非存在下 (青)、および存在下 (オレンジ) での定量評価. 48 時間の反応終了時、化合物 **11** 存在下において、付加体 (**4**) の残存率は 30% だった。(mean ± SD, n = 3).

### 3. ケト型内部オレフィンを用いた *o*-aminophenol の付加と脱離

前項において確認された *o*-aminophenol の脱離に伴うケト型  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出現象が、STL B (2) と同じ内部オレフィン化合物でも進行するか検討した。芳香族ケトンである chalcone を用い、Figure 8 と同様の方法によって、その *o*-aminophenol 付加体 (12) を合成した。化合物 12 を  $^1\text{H}$  NMR にてモニタリングしたところ、末端オレフィンと同様に  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出が確認された (Figure 14)。このことから、*o*-aminophenol の脱離に伴う  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出現象は、内部オレフィンを有するケト型化合物に対しても適用可能であることが示唆された。



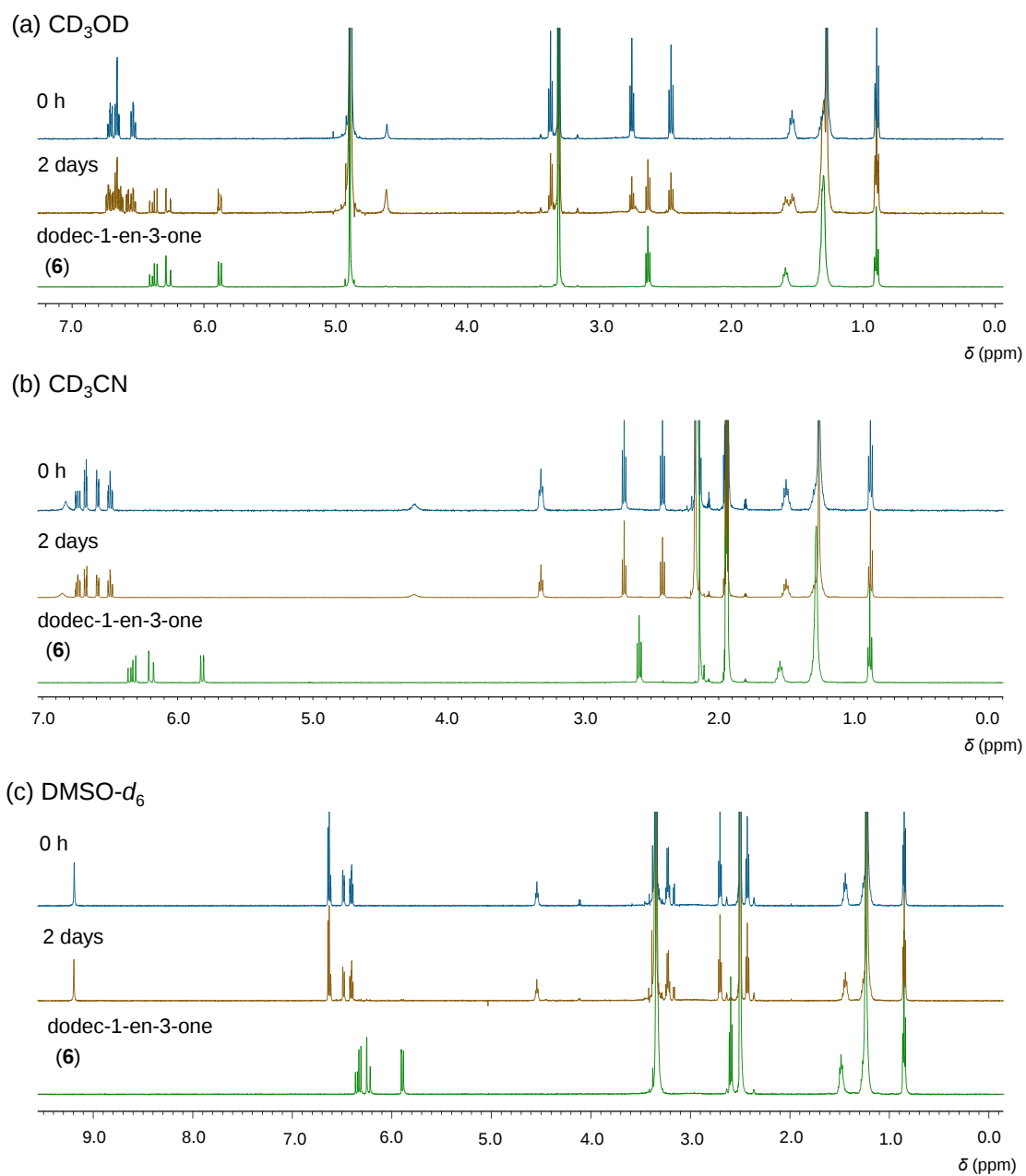
**Figure 14.** 内部オレフィンモデル chalcone の *o*-aminophenol 付加体 (12) を用いた  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) 脱離モニタリング.  $\text{CD}_3\text{OD}$  溶解後、NMR チューブ中で 19 時間 ( $37^\circ\text{C}$ ) 静置すると、chalcone 由来のシグナルが検出された。

## 4. 反応溶媒の検討

### 4.1. プロトン性溶媒と非プロトン性溶媒

より詳細な反応機構を知る為、脱離が確認されたケト型 *o*-aminophenol 付加体 (**3**) を用いて反応条件の検討を行った。まず初めに反応溶媒の影響を、CD<sub>3</sub>OD、CD<sub>3</sub>CN、および DMSO-*d*<sub>6</sub> の重溶媒 3 種を使用して、NMR チューブ中で 2 日間 (37 °C) インキュベートし、<sup>1</sup>H NMR 測定を行った。

その結果、Michael 受容体の dodec-1-en-3-one (**6**) の放出が確認されたのは、プロトン性溶媒の CD<sub>3</sub>OD のみであった (Figure 15a)。その他の非プロトン性溶液では dodec-1-en-3-one (**6**) 由来のシグナルは確認できず (Figure 15bc)、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出が進行するにはプロトン性溶媒が必要であることが示唆された。

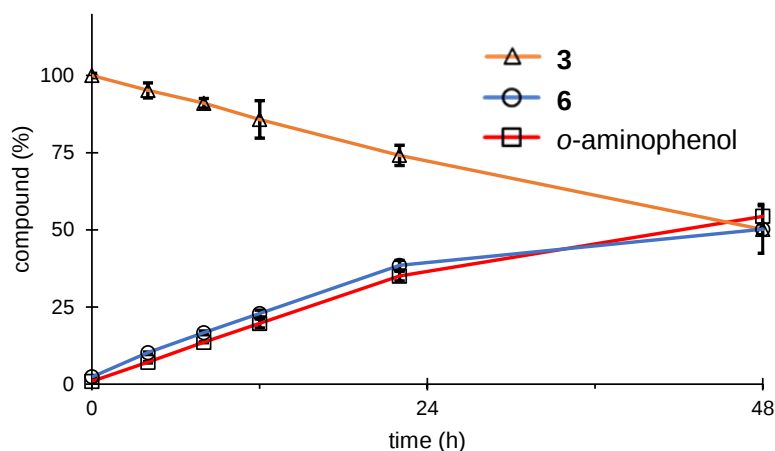


**Figure 15.**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) による各重溶媒中での retro-Michael 反応モニタリング. ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) を用いて retro-Michael 反応の進行を評価した。(a)  $\text{CD}_3\text{OD}$ 、(b)  $\text{CD}_3\text{CN}$ 、および (c)  $\text{DMSO}-d_6$  のうち、 $\text{CD}_3\text{OD}$  のみで dodec-1-en-3-one (6) の放出が確認された。

#### 4.2. 水による脱離反応の促進

これまで、プロトン性溶媒が Michael 反応を有利に進めることは報告されているが<sup>25</sup>、前項において retro-Michael 反応においても同様に有利であることが示唆された。先行研究では、STL B (2) の *o*-aminophenol 脱離現象は MeOH 100% 溶液では確認されず、MeOH と PBS の混合溶液中でのみ観測されている。この結果から、プロトン性溶媒間についても、反応促進に差があることが示唆された。そこで、ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3)、*o*-aminophenol および dodec-1-en-3-one (6) について検量線を作成し、MeOH と MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) 溶液中での両者の脱離効率を比較した (Figure 9a, 16)。

その結果、MeOH では *o*-aminophenol 付加体 (3) は反応開始時の 50% まで減少した。また、反応開始時における化合物 3 と比較した *o*-aminophenol、dodec-1-en-3-one (6) のモル分率も評価したところ、50% に達するまで約 48 時間を要した。一方、水との混合溶媒では半分の約 24 時間であった。そのため、プロトン性溶媒内においても、水は MeOH より大きな脱離促進作用を有することが示唆された。

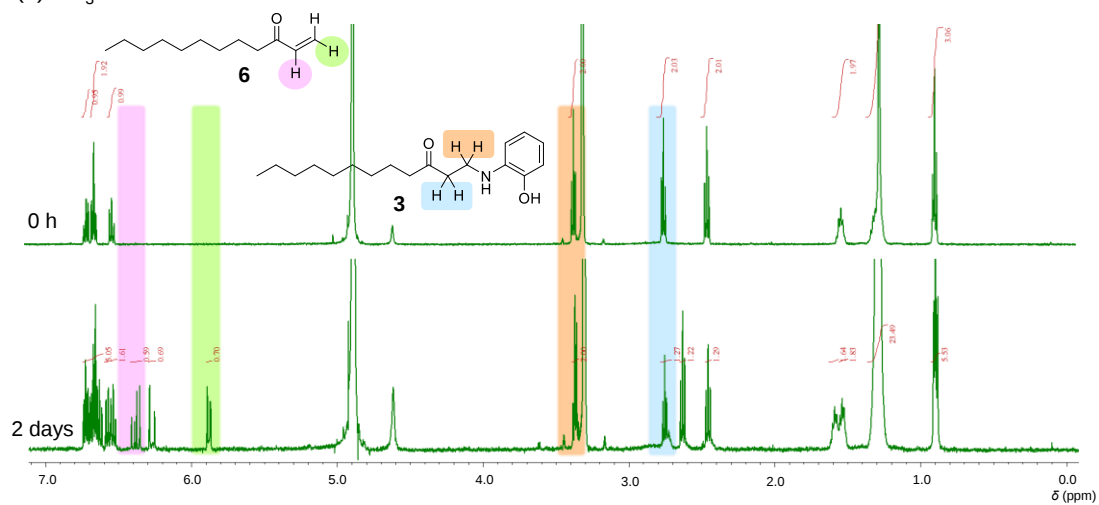


**Figure 16.** ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) の MeOH 中における *o*-aminophenol 脱離定量評価. 付加体 (3)、*o*-aminophenol、および dodec-1-en-3-one (6) の存在率は 48 時間後に等しくなった。(定量条件は Figure 9a に準ずる. mean  $\pm$  SD, n = 3).

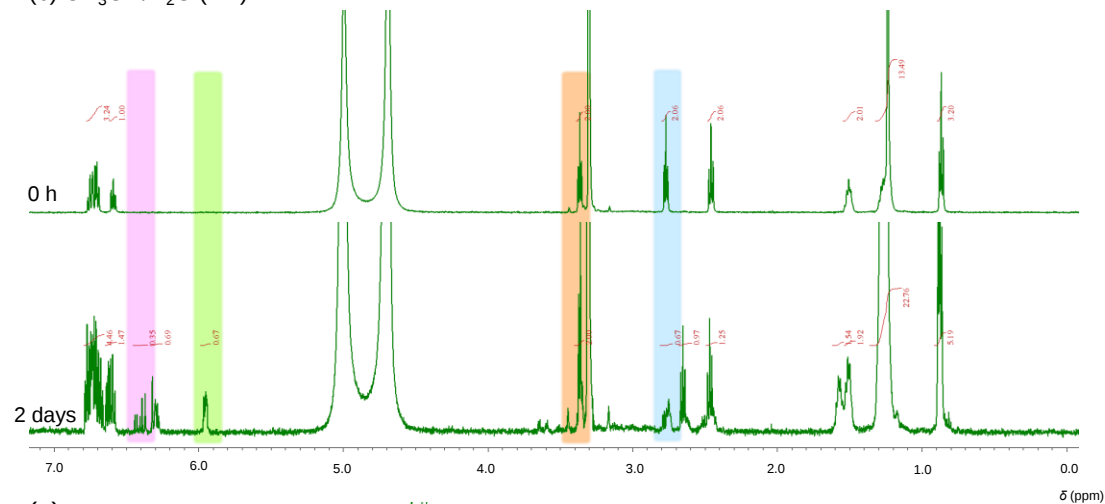
### 4.3. 重水素交換による反応速度の評価

一般的に Michael 反応は平衡反応であることから、重溶媒中での重水素との交換に伴いプロトンピーク面積が減少する。そこで重水素交換を  $^1\text{H}$  NMR にて評価し、各溶媒間での反応速度の比較を試みた。評価は、脱離、付加反応において、溶媒中の重水素と交換されピーク面積が減少するカルボニル  $\alpha$  位のプロトンと、交換されない  $\beta$  位のプロトンピーク面積を比較することで行った。 $\text{CD}_3\text{OD}$  と  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) の溶媒間で比較を行った結果、 $\text{CD}_3\text{OD}$  中では付加体 (3) と dodec-1-en-3-one (6) の重水素交換されていないカルボニル  $\alpha$  位プロトンはそれぞれ 64、84% であったのに対して、水溶液中では 34、52% と低い値を示した。これより、化合物 3 からの *o*-aminophenol の脱離、および化合物 6 と *o*-aminophenol の付加反応は、水溶液中の方がより大きな速度で進行していると考えられた (Figure 17)。

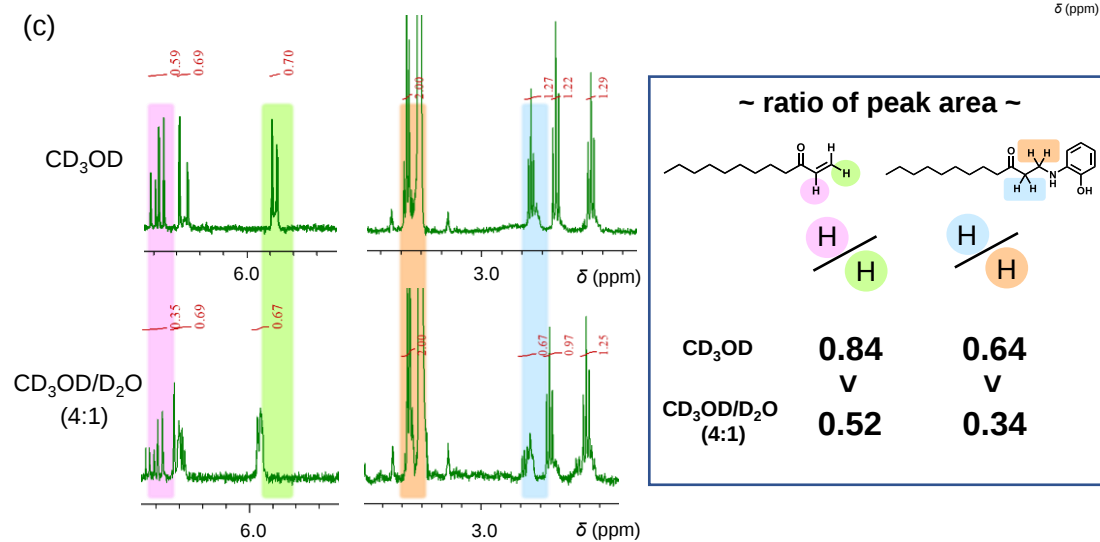
(a) CD<sub>3</sub>OD 100%



(b) CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O (4:1)



(c)

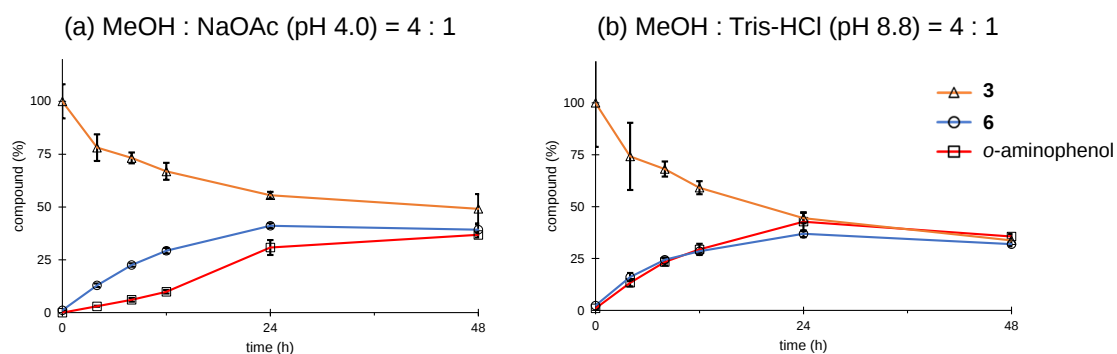


**Figure 17.**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) によるカルボニル  $\alpha$  位水素の重水素交換反応モニタリング.  
(a)  $\text{CD}_3\text{OD}$  (b)  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) にて測定. **3** の  $\beta$  位 (オレンジ)、dodec-1-en-3-one (**6**) の  $\beta$  位 (緑)、**3** の  $\alpha$  位 (青)、dodec-1-en-3-one (**6**) の  $\alpha$  位 (ピンク). (c) 拡大図.  $\alpha$  位と  $\beta$  位プロトンピークの面積比は、 $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) 溶液中の方がより小さく、重水素交換がより速く進行していることが示唆された。

## 5. 溶液 pH が *o*-aminophenol の脱離反応速度へ及ぼす影響

次に、水系溶媒中での pH の影響も比較した。酸性条件として、MeOH/ NaOAc (pH 4.0) の 4:1 混合溶媒、塩基性条件として、MeOH/Tris-HCl (pH 8.8) の 4:1 混合溶媒を用い、HPLC による定量分析を行った。

その結果、ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (**3**) の脱離に要する時間は、酸性と塩基性の両条件とも大きく変わらず (Figure 18)、pH 4.0 と pH 8.8 においては、*o*-aminophenol の脱離と dodec-1-en-3-one (**6**) の放出速度にも大きな影響はないと考えられた。



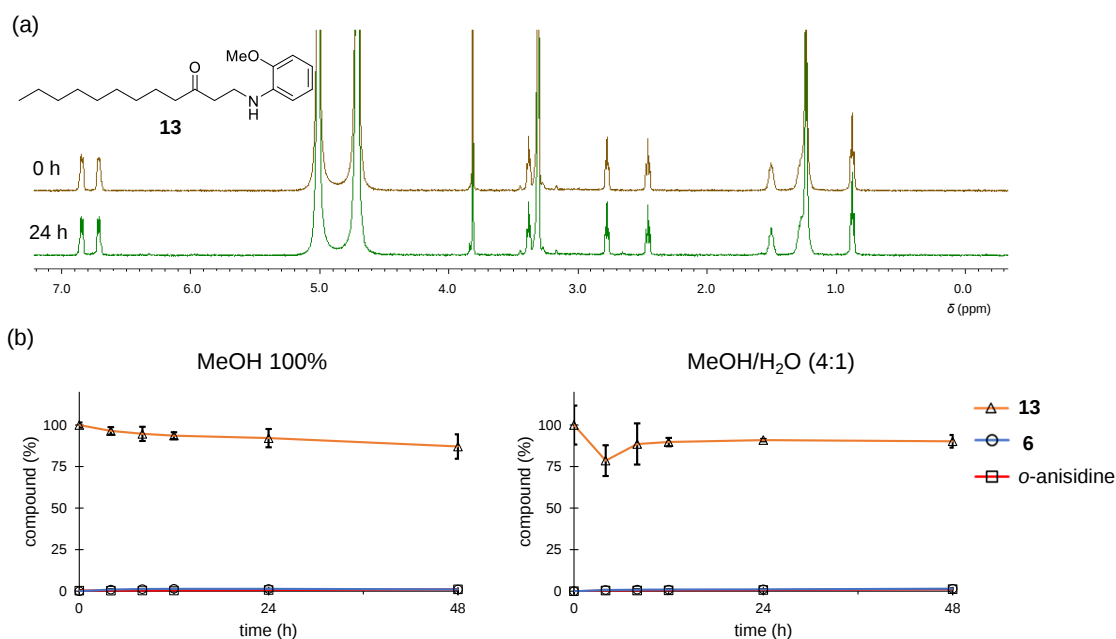
**Figure 18.** 酸性および塩基性水溶液における *o*-aminophenol 脱離定量評価. (a) MeOH/NaOAc (pH 4.0) の 4:1 混合溶媒中での結果. (b) MeOH: Tris-HCl (pH 8.8) の 4:1 混合溶媒中での結果. (a), (b) とともに、約 24 時間後にケト型 *o*-aminophenol 付加体 (**3**) は残存率 50% を示した. (定量条件は Figure 9a に準ずる. mean  $\pm$  SD, n = 3).

## 6. フェノール性水酸基の *o*-aminophenol 脱離反応速度への影響

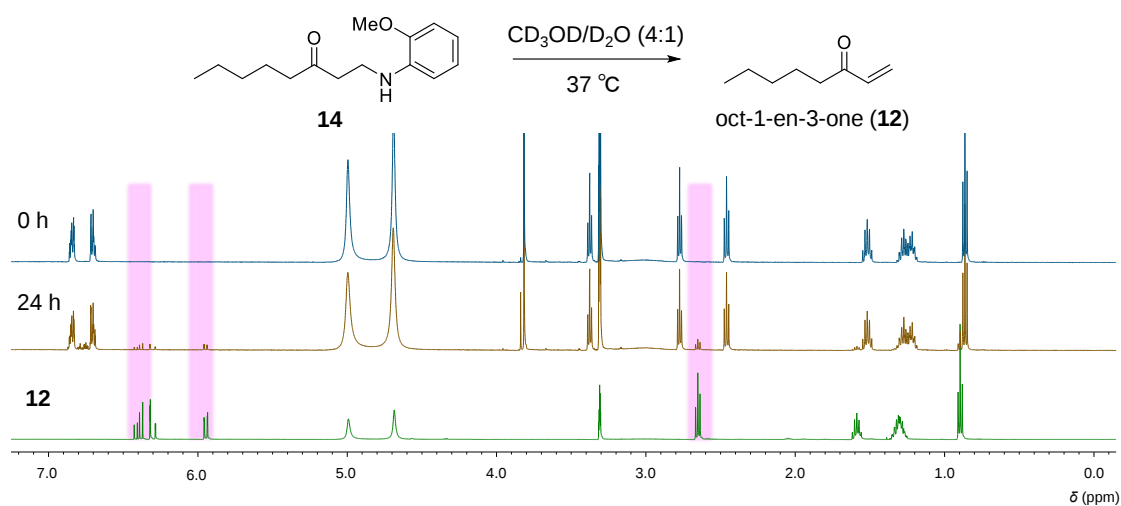
次に、*o*-aminophenol について注目した場合、他のアニリン誘導体と比較して、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出が特異的か検討した。天然有機化合物 STL 類を用いた場合では、アニリン部位のフェノール性水酸基がメトキシ基に変換された STL G については脱離が起こらなかった<sup>23</sup>。そこで、STL G に対応する *o*-anisidine 付加体 (**13**) を合成し、<sup>1</sup>H NMR によるモニタリングと HPLC を用いた定量評価を、ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (**3**) と同様の条件で行った (Figure 19)。

その結果、<sup>1</sup>H NMR 測定と HPLC 定量の双方において、化合物 **13** からの dodec-1-en-3-one (**6**) と *o*-anisidine の放出は確認されず、副生成物の生成も認められなかった。一方で、HPLC 定量の結果、*o*-anisidine 付加体 (**13**) の残存率は約 90% とわずかながら減少が見られ、脱離反応の進行が示唆された。

そこで、放出される Michael 受容体の水溶性が、HPLC 測定に影響を与える可能性を考慮し、よりアルキル側鎖の短い oct-1-en-3-one を原料に *o*-anisidine 付加体 (**14**) を合成した。付加体 (**14**) を CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O (4:1) に溶解し、<sup>1</sup>H NMR モニタリングを行った結果、24 時間後に oct-1-en-3-one を放出していることが確認された (Figure 20)。これより、フェノール性水酸基は retro-Michael 反応を促進させる因子の一つであるとともに、*o*-anisidine 付加体についても構造や反応条件によって、脱離が進行することが示唆された。



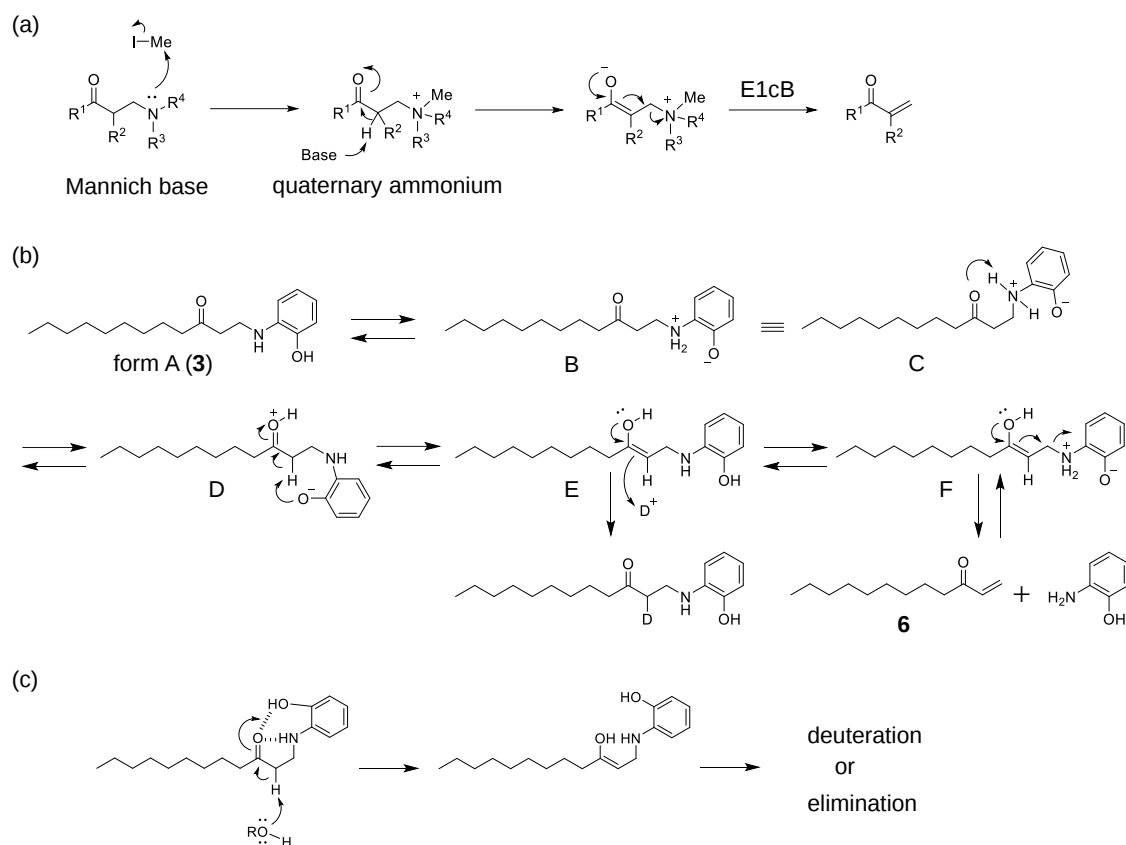
**Figure 19.** *o*-Anisidine 付加体 (**13**) の *o*-anisidine 脱離モニタリング. (a)  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) 測定データ.  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) において、37 °C 下、24 時間経過しても dodec-1-en-3-one (**6**) のシグナルは観測されなかった。(b) HPLC 定量結果.  $^1\text{H}$  NMR と同じく dodec-1-en-3-one (**6**)、*o*-anisidine は検出されなかった一方で、付加体 (**13**) は 48 時間後に約 10% 減少した。(mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).



**Figure 20.** *o*-Anisidine 付加体 (**14**) の  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) によるモニタリング. *o*-anisidine 付加体 (**14**) を  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) に溶解すると、24 時間後に oct-1-en-3-one のシグナルが観測された。

## 7. *o*-Aminophenol の脱離を介した retro-Michael 反応機構の考察

プロトン性溶媒中における *o*-anisidine の非酵素的な脱離反応は、E1cB 反応における Mannich 塩基からのエノン生成と類似しているが<sup>26</sup>、反応の進行に必要な四級アンモニウム形成にはアルキル化が必要であり、また脱離においては塩基が必要となる点で異なっている (Figure 21a)。一連の結果から、本反応は Figure 21b に示す機構で進行すると考えられる。すなわち、反応の第一段階としてプロトン性溶媒中で化合物は双性イオンの状態 (B) へと変換される。続いて、カルボニルの酸素原子が正の電荷を帯びた窒素原子上の水素原子の引き抜きを行い (C)、自身が正の電荷を帯びる (D)。次にフェノール性水酸基の負に帯電した酸素原子が  $\alpha$  位の水素原子の引き抜きを行い、カルボニルへと電子が押し出されることで、エノール型へ変換される (E)。一旦立ち上がった電子の押し込みと同時に  $\alpha$  位への重水素原子取り込み、もしくは平衡状態で再び双性イオンの形態をとり、電子を窒素原子が受け取ることで、*o*-aminophenol と dodec-1-en-3-one (**6**) の放出が起こると考えられる。他の反応機構としては、カルボニル酸素原子とフェノール性水酸基、およびアミンとの間に水素結合が生じ、エノールを形成する形式も可能性として考えられる (Figure 21c)。



**Figure 21. E1cB 反応と retro-Michael 反応推定機構.** (a) E1cB 反応. Mannich 塩基からアルキル化による四級アンモニウムが形成される。カルボニル  $\alpha$  位のプロトンが塩基により引き抜かれ、E1cB 反応が起こった結果、Michael 受容体が生成する。(b, c) *o*-aminophenol 付加体における retro-Michael 反応の推定機構. 双性イオン (b)、もしくは水素結合の形成 (c) により反応が開始する。

## 8. *o*-Aminophenol のフェノール性水酸基修飾

以上の解析より、STL B (2) で認められた *o*-aminophenol に伴う  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出現象が、化合物 3 や 12 のような単純な *o*-aminophenol 付加化合物においても再現可能であることが示された<sup>27</sup>。そこで、反応性の高い  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物について、同反応を利用したプロドラッグ技術の開発を指向し、薬物送達性や選択性を向上させる一環として、疾患部位特異的な脱離能の付与を検討した。

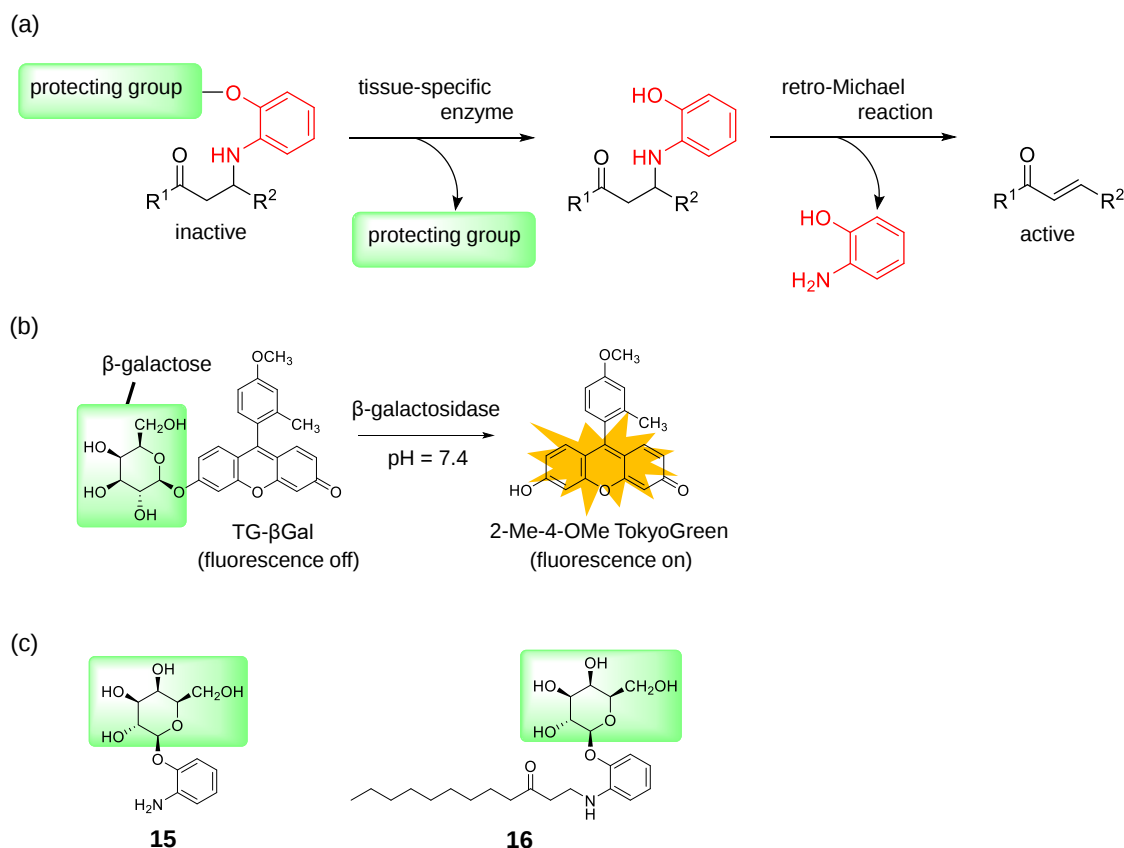
すなわち、脱離の促進因子であると判明した *o*-aminophenol 上フェノール性水酸基に対し、保護基修飾を行った (Figure 22a)。保護基修飾では、1) 酵素による保護基の切断でフェノール性水酸基を露出させる、2) retro-Michael 反応による *o*-aminophenol の脱離、という二段階反応を経た  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出を意図したプロドラッグ化を検討した。保護基と  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の間に存在する *o*-aminophenol の存在は、芳香環上への置換基導入で、Figure 21b に示すフェノール性水酸基の pKa を調整した反応速度の制御<sup>28</sup>、および酵素の認識能向上に繋がると考えた<sup>29</sup>。具体的には、保護基として  $\beta$ -galactose を選択した。 $\beta$ -galactose 1 位のグリコシド結合を認識し、加水分解反応により切断する  $\beta$ -galactosidase は、これまで腫瘍細胞近傍での発現増加が明らかになっている<sup>30</sup>。その特性から、腫瘍組織を迅速かつ正確に判別する蛍光標識試薬として組み込まれたり<sup>31</sup>、腫瘍組織選択的な生理活性物質放出を指向したプロドラッグ研究にも用いられている<sup>32</sup> (Figure 22b)。この修飾により、疾患組織依存的に存在する酵素への応答性を付与し、組織選択的な生理活性物質の作用発現を期待した。

これらの報告を参考に、ケト型  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 dodec-1-en-3-one (6) に対して、*o*-aminophenyl- $\beta$ -galactoside (15) を付加させた糖付加体モデル (16) を合成し (Figure 22c)、 $\beta$ -galactosidase に対する反応性を評価した (Figure 23)。緩衝液中、糖付加体モデル (16) に対して  $\beta$ -galactosidase を添加後、37 °C にて静置し、HPLC によるモニタリングを行った。

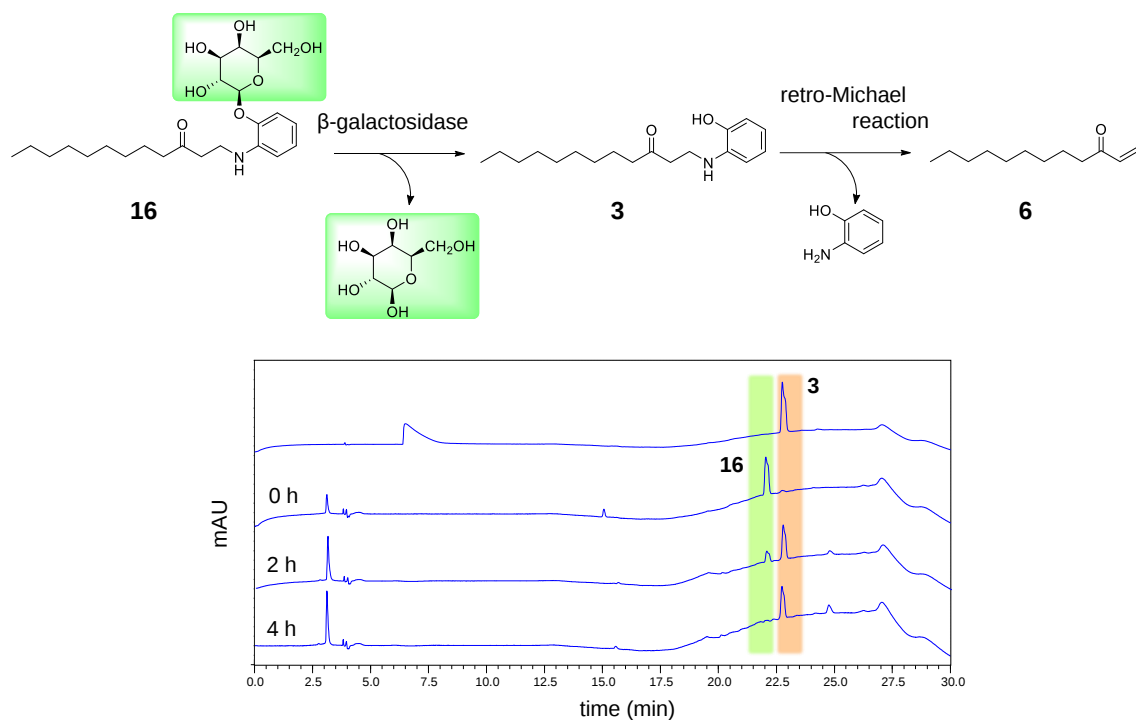
その結果、反応開始 2 時間後に *o*-aminophenol 付加体 (3) の放出が確認され、さらに 4 時間後には、 $\beta$ -galactosidase 処理により放出された化合物 3 は消失した (Figure 23)。しかしながら、MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) 溶媒下で観察された dodec-1-en-3-one (6) の放出 (Figure 9a) は観察されなかった。そこで、化合物 3 単体について溶媒組成を MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) から (1:9) へと変更し、 $\beta$ -galactosidase 処理 (Figure 23) の条件と同様、水がより豊富に存在する環境下にて化合物 3 からの *o*-aminophenol 脱離の定量を試みた。

その結果、MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) での定量結果 (Figure 9a) において観察された *o*-aminophenol の脱離と dodec-1-en-3-one (6) の放出は観察されなかった (Figure 24)。一方で、化合物 3 についてはその経時的な減少は認められたため、水豊富な条件下では、HPLC による *o*-

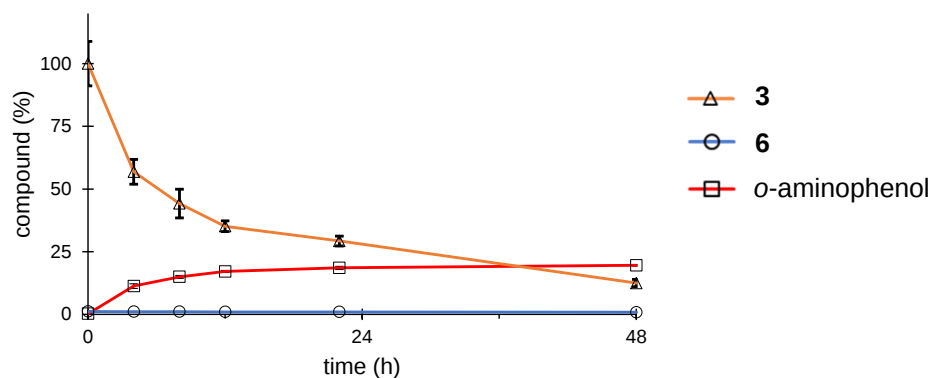
aminophenol や dodec-1-en-3-one (**6**) の検出は困難であることが示唆された。また、次章の内容になるが、微小管重合阻害剤 colchicine について化合物 **16** と同様の誘導体を調整・分析した結果では、HPLC モニタリングによって、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出が認められたことから (Figure 27)、糖付加体 (**16**) は  $\beta$ -galactosidase 存在下で dodec-1-en-3-one (**6**) へと変換されたと考えられる。



**Figure 22. 疾患部位特異的な生理活性物質の放出戦略.** (a) 本研究で設計した疾患部位特異的な生理活性物質放出のスキーム. *o*-Aminophenol の水酸基上に保護基を付与し、疾患部位特異的な酵素存在下でのみ生理活性物質を放出する。(b)  $\beta$ -galactosidase を利用した環境応答型脱離の例. 非蛍光の化合物 TG- $\beta$ Gal は  $\beta$ -galactosidase 存在下、蛍光を発する 2-Me-4-OMe TokyoGreen へと変換される<sup>31</sup>。(c)  $\beta$ -Galactosidase 依存的な dodec-1-en-3-one (**6**) の放出設計. *o*-Aminophenol のフェノール性水酸基を  $\beta$ -galactose にて修飾した *o*-aminophenyl- $\beta$ -galactoside (**15**)、および dodec-1-en-3-one (**6**) に対して *o*-aminophenyl- $\beta$ -galactoside (**15**) を付加した糖付加体化合物 (**16**) の構造式。



**Figure 23.**  $\beta$ -galactosidase 応答性の化合物 (**16**) の  $\beta$ -galactosidase 応答性評価. 糖付加体 (**16**, オレンジ) に対し、 $\beta$ -galactosidase を添加すると、加水分解反応により *o*-aminophenol 付加体 (**3**, 緑) へと変換されることが HPLC 分析 (条件は Figure 9a に準ずる) にて明らかになった。



**Figure 24.** ケト型 *o*-aminophenol 付加体 (**3**) の MeOH:H<sub>2</sub>O (1:9) 中における *o*-aminophenol 脱離定量評価. 付加体 (**3**) は経時的に減少する一方で、*o*-aminophenol、および dodec-1-en-3-one (**6**) の増加は認められなかった。(定量条件は Figure 9a に準ずる. mean  $\pm$  SD, n = 3).

## 9. 小括

本章のまとめとして、希少放線菌由来の天然有機化合物 STL B (2) で見出された プロトン性溶媒中での *o*-aminophenol の脱離は、STL B に特異な現象ではなく、簡素な構造のケト型 *o*-aminophenol 付加化合物でも観測されることが判明した。また、末端ケト型の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物において、プロトン性溶媒およびフェノール性水酸基の存在下で反応が優位に進行することが示され、これらの反応条件から本反応機構の推定を行った。加えて、*o*-aminophenol の修飾により、疾患部位特異的な生理活性物質の放出など、プロドラッグ技術へと展開できる可能性が示唆された。

## 10. Experimental section

### General procedures

All commercially available reagents were purchased from Nacalai, Fujifilm-Wako, or Tokyo-Kasei unless described. Benzyl acrylate (**7**) was purchased from Tokyo-Kasei.  $\beta$ -Galactosidase (molecular weight 540,000) was purchased from Fujifilm-Wako. Silica gel column was performed using Kanto Silica Gel 60N (63-210 mm) (Kanto Chemical). TLC was performed using glass-backed silica gel 60F254 (Merck). NMR spectra were recorded on a JOEL 500 MHz instrument (JEOL).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts are shown relative to the residual solvent:  $\delta_{\text{H}}$  7.26 and  $\delta_{\text{C}}$  77.16 for  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{H}}$  2.50 for  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  1.94 for  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  3.31 and  $\delta_{\text{C}}$  49.00 for  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Chemical shifts ( $\delta$ ) are shown in parts per million (ppm) and coupling constants ( $J$ ) are in hertz (Hz). High-resolution mass spectra were recorded on an ESI-ITTOF-MS (Shimadzu) or a FAB-MS JEOL JMS-700 double-focusing mass spectrometer (JEOL).

### Chemical synthesis procedures

*Dodec-1-en-3-one* (**6**). To a stirred solution of decanal (0.83 g, 5.3 mmol) in THF (10.6 mL) was added vinylmagnesium bromide (1.0 M in THF, 6.4 mL, 6.4 mmol) at 0 °C. After being stirred for 1 h, the mixture was warmed up to rt and stirred for an additional five days. The reaction was quenched with 3 M HCl aqueous solution and the layers were separated. The aqueous layer was extracted six times with  $\text{Et}_2\text{O}$ , and the combined organic layers were washed with sat.  $\text{NaHCO}_3$ , dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and evaporated. The residue was subjected to silica gel column chromatography (*n*-hexane/ $\text{EtOAc}$ ) to afford a fraction containing 1-dodecen-3-ol (1.17 g). To a stirred solution of oxalyl chloride (0.75 mL, 9.5 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (34 mL) was added DMSO (0.90 mL, 12.7 mmol) at -78 °C. The resulting solution was stirred at -78 °C for 30 minutes, and then a solution containing dodec-1-en-3-ol (1.17 g in 2.5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) was added. After being stirred at -78 °C for 45 min, triethylamine (4.4 mL, 31.8 mmol) was added to the mixture. After 10 minutes the reaction mixture was warmed up to rt. The reaction mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , washed with water and brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and evaporated. The residue was purified by silica gel open column chromatography (*n*-hexane/ $\text{EtOAc}$ ) to afford compound **6** as colorless oil (557.9 mg, 58% over two steps):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  6.38 (dd,  $J$  = 17.8, 10.3 Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J$  = 17.8, 1.3 Hz, 1H), 5.88 (dd,  $J$  = 10.3, 1.3 Hz, 1H), 2.63 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.54-1.64 (m, 2H), 1.36-1.24 (overlapped, 12H), 0.90 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  203.4, 137.7, 129.2, 40.3, 33.1, 30.61, 30.59, 30.4, 30.3, 25.2, 23.7, 14.4; HR-

MS (FAB)  $[M+H]^+$   $m/z$  183.1746 (calcd. for  $C_{12}H_{23}O$ , 183.1749).

*1-((2-Hydroxyphenyl) amino) dodecan-3-one (3)*. Compound **6** (10.4 mg, 0.057 mmol) and *o*-aminophenol (31.1 mg, 0.28 mmol) were dissolved in  $CH_3CN$  (57.0  $\mu$ L) and stirred at rt for 17 h. The mixture was subjected to silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford compound **3** as an orange solid (11.2 mg, 67%):  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  6.87-6.80 (m, 1H), 6.78-6.66 (overlapped, 3H), 3.39 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 2.73 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 2.42 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.62-1.52 (m, 2H), 1.34-1.18 (overlapped, 12H), 0.88 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 125 MHz)  $\delta$  211.1, 145.3, 136.2, 121.4, 119.3, 114.8, 114.2, 43.5, 42.0, 39.8, 32.0, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 23.9, 22.8, 14.3; HR-MS (ESI)  $[M+H]^+$   $m/z$  292.2278 (calcd. for  $C_{18}H_{30}NO_2$ , 292.2271).

*Benzyl 3-((2-hydroxyphenyl) amino) propanoate (4)*. Benzyl acrylate (**7**) (210.8 mg, 1.3 mmol), *o*-aminophenol (709.3 mg, 6.5 mmol) and silica gel (700.8 mg) were dissolved in  $CH_3CN$  (1.3 mL) and stirred at 86 °C for 15.5 h. The mixture was subjected to silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford compound **4** as dark brown oil (202.5 mg, 57%):  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta$  7.37-7.28 (overlapped, 5H), 6.73-6.62 (overlapped, 3H), 6.57-6.51 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.44 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 2.67 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H);  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ , 125 MHz)  $\delta$  173.9, 146.4, 137.8, 137.5, 129.5, 129.18, 129.16, 121.2, 118.9, 114.8, 112.7, 67.4, 40.8, 35.0; HR-MS (ESI)  $[M+H]^+$   $m/z$  272.1283 (calcd. for  $C_{16}H_{18}NO_3$ , 272.1281).

*N-Benzylacrylamide (8)*. To a stirred solution of benzylamine (0.22 mL, 2.0 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (5 mL) were added  $Et_3N$  (0.31 mL, 2.2 mmol) and acryloyl chloride (0.18 mL, 2.2 mmol) at 0 °C. After being stirred at rt for 1 h, the reaction was quenched with sat.  $NaHCO_3$  and extracted with  $CH_2Cl_2$  three times. The combined organic layers were dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford *N*-benzylacrylamide (**8**) as a white solid (221.1 mg, 69%): HR-MS (ESI)  $[M+H]^+$   $m/z$  162.0916 (calcd. for  $C_{10}H_{12}NO$ , 162.0913). NMR spectrum was in agreement with the literature data.<sup>33</sup>

*N-Benzyl-3-((2-hydroxyphenyl)amino) propanamide (5)*. *N*-Benzylacrylamide (**8**) (209.6 mg, 1.3 mmol), *o*-aminophenol (709.3 mg, 6.5 mmol) and silica gel (700.8 mg) were dissolved in  $CH_3CN$  (1.3 mL) and stirred at 85 °C for 36 h. The mixture was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford compound **5** as dark brown oil (46.5 mg, 13%):  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz)

$\delta$  7.31-7.24 (overlapped, 4H), 7.24-7.19 (m, 1H), 6.74-6.66 (overlapped, 3H), 6.56-6.50 (m, 1H), 4.37 (s, 2H), 3.45 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 2.55 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  174.4, 146.3, 139.8, 138.0, 129.5, 128.5 (2C), 128.1, 121.2, 118.7, 114.7, 112.6, 44.1, 41.5, 36.7; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  271.1440 (calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$ , 271.1441).

*Octyl 3-((2-hydroxyphenyl)amino)propanoate (9)*. Octyl acrylate (**10**) (300 mg, 1.63 mmol) and *o*-aminophenol (888 mg, 8.14 mmol) were dissolved in  $\text{CH}_2\text{CN}$  (1.63 mL) and stirred at 80 °C for 3 h. The mixture was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford compound **9** as dark brown oil (8.8 mg, 2.0 %):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  6.74-6.63 (overlapped, 3H), 6.56-6.51 (m, 1H), 4.09 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 3.42 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 2.62 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 1.63 (quin,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.39-1.24 (overlapped, 10H), 0.90 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  174.3, 146.4, 137.8, 121.2, 118.9, 114.8, 112.7, 65.8, 40.9, 35.0, 33.0, 30.4 (2C), 29.7, 27.1, 23.7, 14.4; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  294.2066 (calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_3$ , 294.2064).

*Benzyl 3-(bis(2-hydroxyethyl)amino)propanoate (11)*. Benzyl acrylate (**7**) (0.45 g, 2.77 mmol) and diethanolamine (0.429 g, 4.08 mmol) were dissolved in MeOH (10 mL) and stirred at rt for 25 h. The mixture was evaporated and the residue was extracted with EtOAc (15 mL) and brine (5 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated *in vacuo*. Compound **11** was obtained as colorless oil (496.5 mg, 63%); HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  268.1504 (calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ , 268.1543). NMR spectrum was in agreement with the literature data.<sup>34</sup>

*3-((2-Hydroxyphenyl)amino)-1,3-diphenylpropan-1-one (12)*. Chalcone (100 mg, 0.48 mmol), *o*-aminophenol (52.4 mg, 0.48 mmol) and KOH (13.4 mg, 0.24 mmol) were dissolved in EtOH (1 mL) and stirred at rt for 6 h. The mixture was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford compound **12** as an orange solid (5.4 mg, 4%); HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  318.1485 (calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{NO}_2$ , 318.1489);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = -2.6 (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ). NMR spectrum was in agreement with the literature data.<sup>35</sup>

*1-((2-Methoxyphenyl) amino) dodecan-3-one (13)*. Dodec-1-en-3-one (**6**) (10.4 mg, 0.057 mmol) and *o*-anisidine (35.0 mg, 0.28 mmol) were dissolved in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (57.0  $\mu\text{L}$ ) and stirred at rt overnight. The mixture was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford compound **13** as a white solid (10.0 mg, 57%);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  6.84-6.79 (m, 2H), 6.69-6.63 (m,

2H), 3.81 (s, 3H), 3.38 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.76 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.45 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.57-1.50 (m, 2H), 1.35-1.21 (overlapped, 12H), 0.90 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  212.9, 149.2, 138.3, 122.3, 119.1, 112.5, 111.0, 56.0, 43.8, 42.3, 40.0, 33.1, 30.60, 30.58, 30.4, 30.2, 24.8, 23.7, 14.5; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  306.2435 (calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{NO}_2$ , 306.2428).

*1-((2-Methoxyphenyl)amino)octan-3-one (14)*. 1-Octen-3-one (50  $\mu\text{L}$ , 0.334 mmol) and *o*-anisidine (56.2  $\mu\text{L}$ , 0.5 mmol) were dissolved in MeOH (2.67 mL) and water (668  $\mu\text{L}$ ). The mixture was stirred at rt overnight and was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford compound **14** as a white solid (56.5 mg, 68%):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  6.83-6.77 (overlapped, 2H), 6.67-6.62 (overlapped, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.38 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.75 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.45 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.54 (quin,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.36-1.20 (overlapped, 4H), 0.89 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  213.1, 148.9, 138.9, 122.3, 118.3, 111.8, 110.9, 56.0, 43.8, 42.5, 39.6, 32.5, 24.5, 23.5, 14.3; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  250.1794 (calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ , 250.1802).

*o*-Aminophenyl- $\beta$ -galactoside (**15**). *o*-Nitrophenyl  $\beta$ -galactoside (ONPG) (200 mg, 0.664 mmol) was added to methanol (19.0 mL) and the solution was stirred until the solid was dissolved. 5% Pd-C (39.8 mg) was added to the solution. Hydrogen gas was introduced into the mixed solution for 3.5 h at rt under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was filtered to remove Pd-C and the filtrate was evaporated *in vacuo*. Compound **15** was obtained as a white powder (quant., 184 mg): HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  272.1116 (calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_6$ , 272.1129);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -57.0$  (c 0.07, MeOH). NMR spectrum was in agreement with the literature data.<sup>36</sup>

*1-((2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenyl)amino)dodecan-3-one (16)*. Dodec-1-en-3-one (**6**) (6.0 mg, 0.033 mmol) and **15** (17.9 mg, 0.066 mmol) were dissolved in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (329  $\mu\text{L}$ ) and stirred at rt overnight. The mixture was purified by silica gel column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **16** as a white solid (1.7 mg, 11%):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  7.10 (dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H), 6.93 (td,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, 1H), 6.68 (dd,  $J = 8.0, 1.5$  Hz, 1H), 6.59 (td,  $J = 7.5, 1.3$  Hz, 1H), 4.62 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.89 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 3.82-3.71 (overlapped, 3H), 3.61-3.56 (brt, 1H), 3.55 (dd,  $J = 10.0, 3.5$  Hz, 1H), 3.38 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.77 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.48 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.58-1.50 (m, 2H), 1.36-1.22 (overlapped, 12H), 0.90 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  213.0, 146.9, 140.9, 125.1, 118.8, 118.0, 112.4, 105.4, 77.0, 74.9, 72.4, 70.2, 62.4, 44.0, 42.8, 39.7, 33.1, 30.6 (2C), 30.4, 30.3, 24.8, 23.7, 14.4; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  454.2783 (calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{NO}_7$ , 454.2799);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} =$

-62.4 (c 0.03, MeOH).

### **Monitoring of the conversions of *o*-aminophenol/*o*-anisidine Michael adducts**

Compounds (**3**, **4**, **5** and **13**) (1.0 mM) and caffeine (internal standard, 100  $\mu$ M) were dissolved in MeOH, MeOH/milliQ water (4:1), MeOH/0.1 M NaOAc (pH 4.0) (4:1) or MeOH/50 mM Tris-HCl (pH 8.8) (4:1) and incubated at 37 °C. A portion of the reaction mixture and the authentic samples were analyzed by HPLC. HPLC conditions for compounds **3**: Cosmosil MS II ( $\Phi$  4.6  $\times$  250 mm), a linear gradient of 5-100% MeOH in aq. at a flow rate of 0.8 mL/min; HPLC conditions for compounds **4** and **5**: Cosmosil PBr ( $\Phi$  4.6  $\times$  250 mm), at the same conditions above. Keto-type: Chromatograms at 210 nm (**3**, **6**, **13**, *o*-aminophenol, *o*-anisidine and caffeine) were used for measuring the amount of the compounds. Ester and amide-type: Chromatograms at 210 nm (**4**, **5**, **7**, **8** and *o*-aminophenol) and 270 nm (caffeine) were used for measuring the amount of the compounds. Observed peak areas (**3-8**, *o*-aminophenol, *o*-anisidine, and caffeine) were calculated and quantified using Labsolution ver. 5.90 (Shimadzu) and excel.

### **<sup>1</sup>H NMR based monitoring**

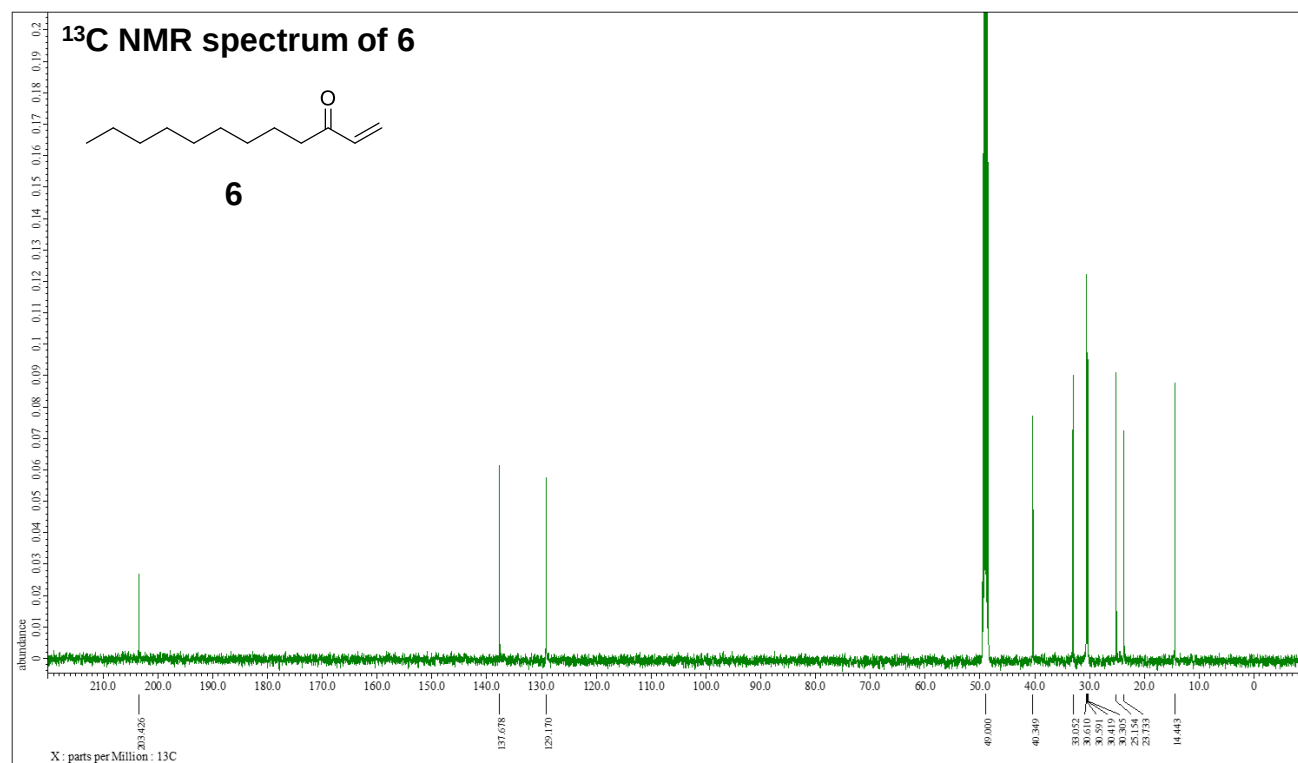
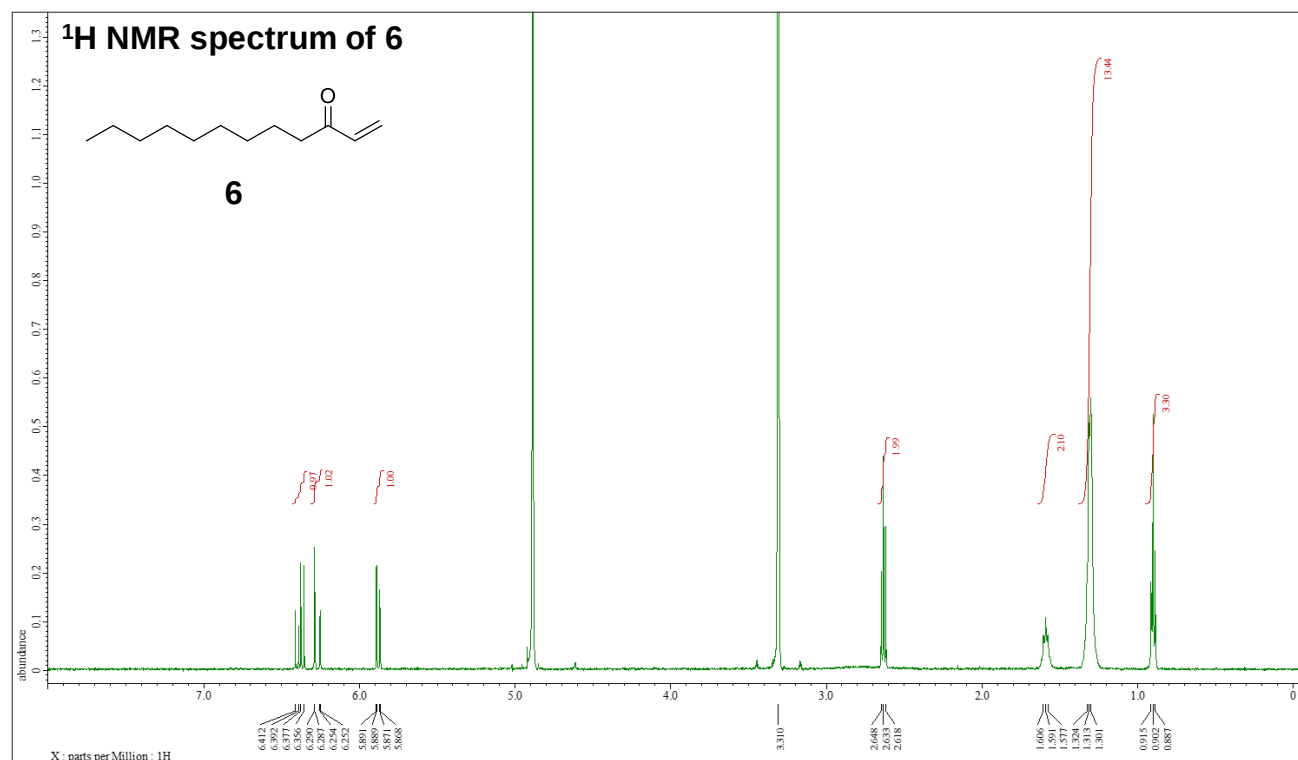
Compound **3** or **9** (3.7-4.6 mM) were dissolved into CD<sub>3</sub>OD or CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O (4:1). The mixtures in NMR tubes were incubated at 37 °C sealing with parafilm. The chemical shifts of <sup>1</sup>H NMR were recorded at 1 day, and 2 days after incubation started.

### **Monitoring of the releasing of **3** from **16** in the presence of $\beta$ -galactosidase**

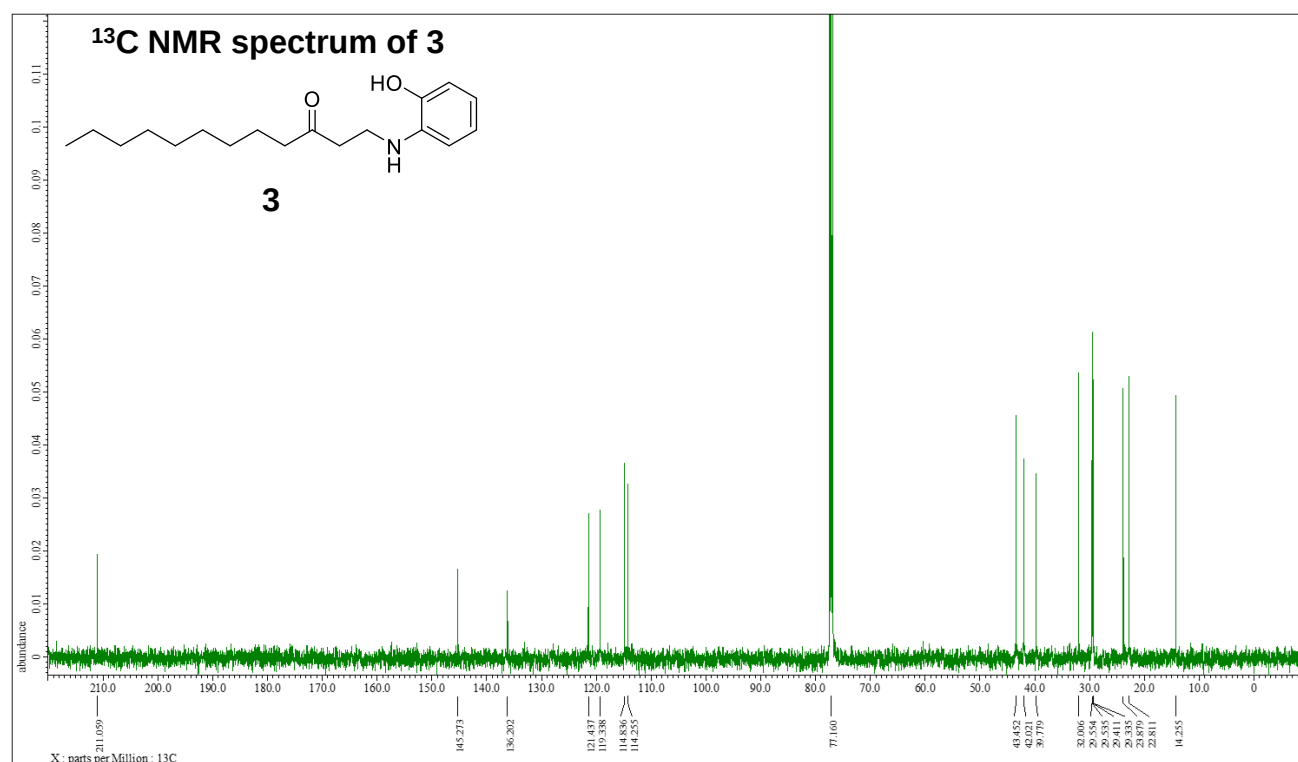
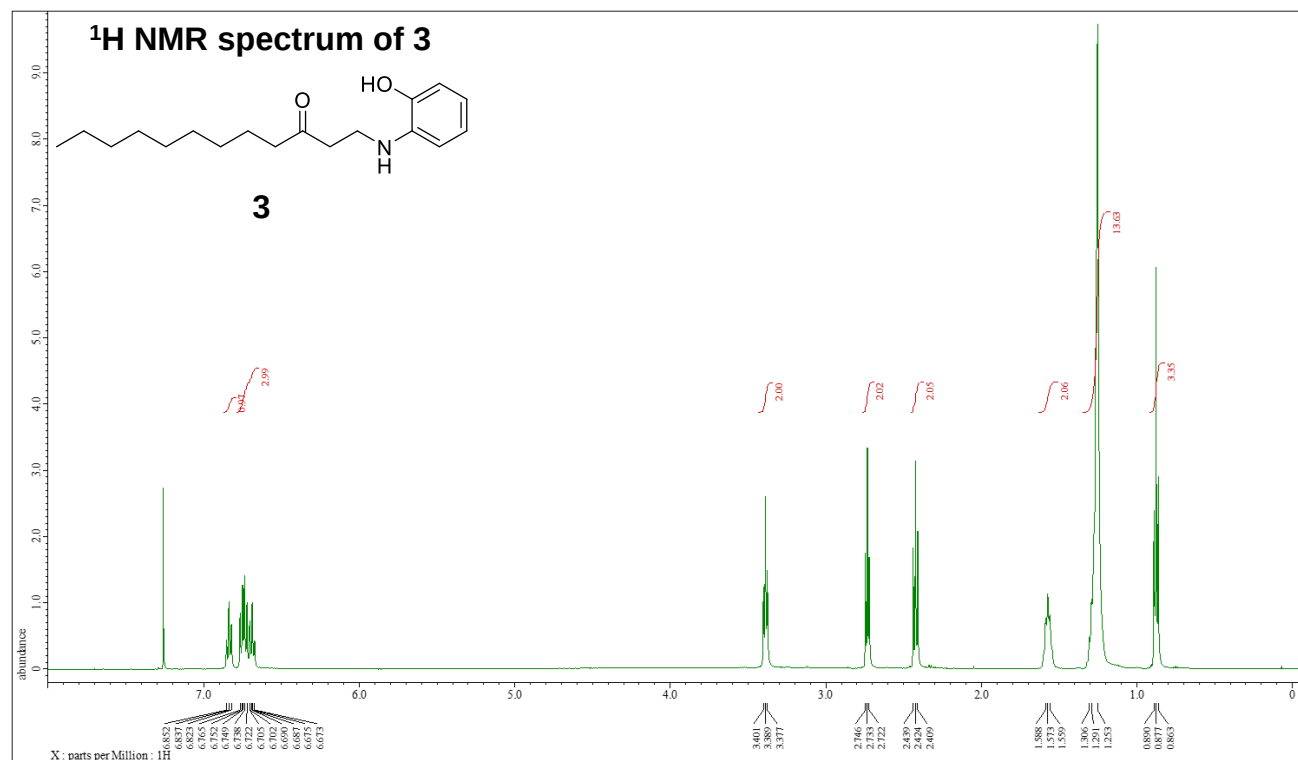
Compound **16** (0.2 mM),  $\beta$ -galactosidase (2.8 U/mL) and 1.3 mM MgCl<sub>2</sub> were dissolved into 90 mM phosphate buffer (pH 7.3). The mixture was incubated at 37 °C for 2 or 4 h. Reaction was quenched with ice cold MeOH (300  $\mu$ L) and centrifuged at 15,000 rpm, 10 min, 4 °C. The supernatant was analyzed by HPLC. HPLC conditions were follows: Cosmosil MS II ( $\Phi$  4.6  $\times$  250 mm), a linear gradient of 5-100% MeOH in aq. at a flow rate of 0.8 mL/min. Chromatograms observed at 254 nm.

## 11. NMR spectroscopic data

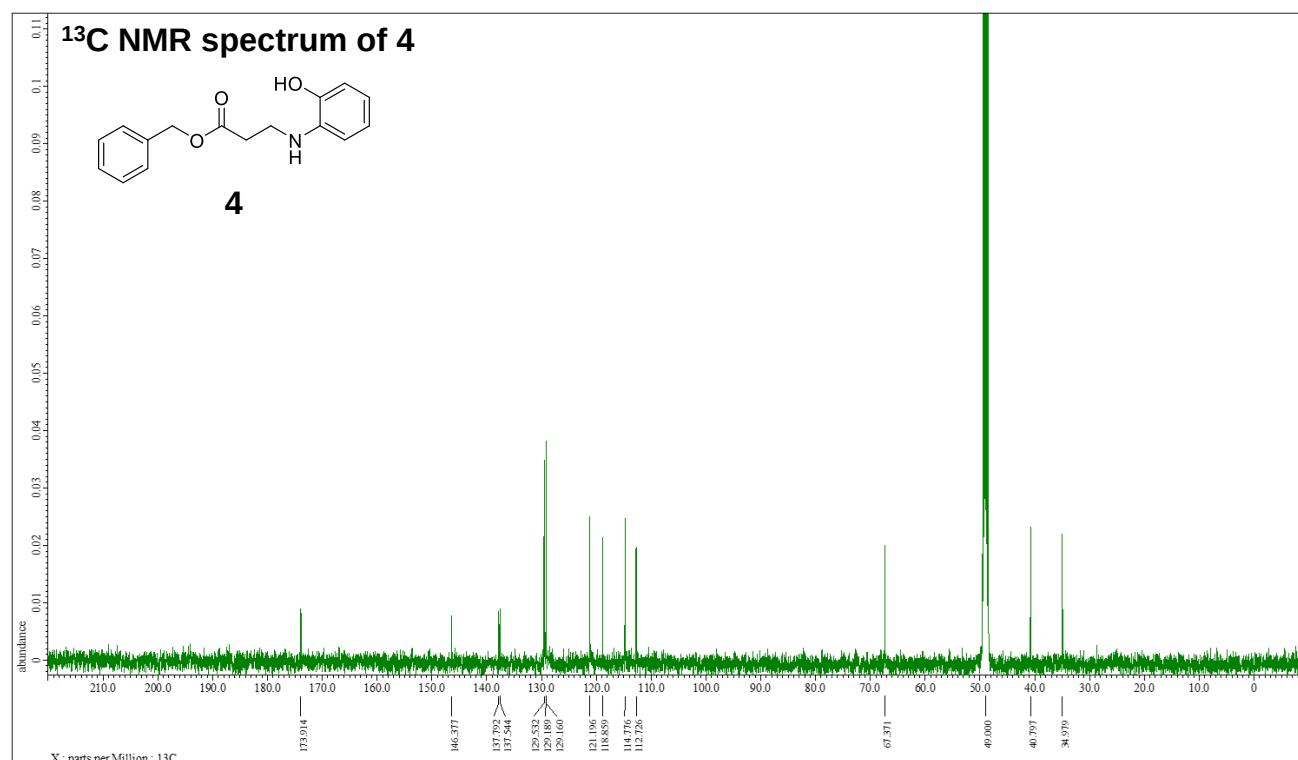
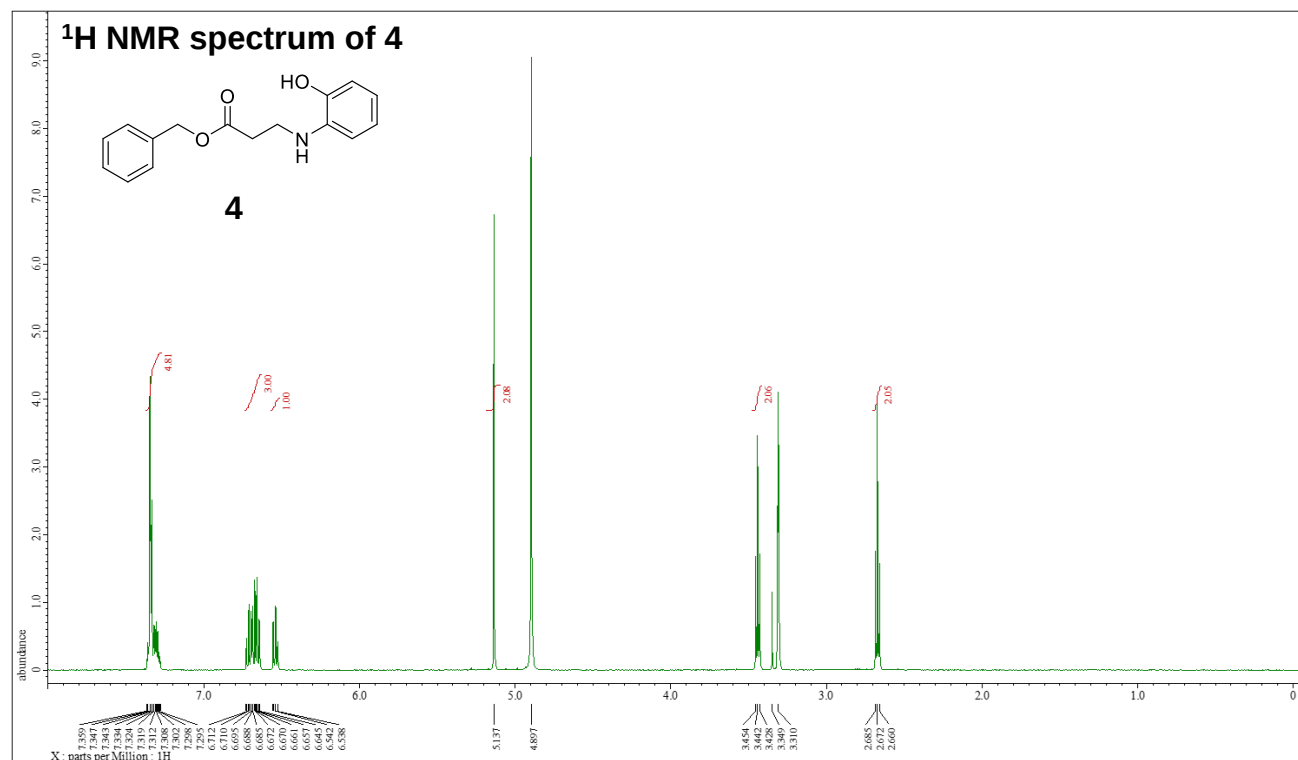
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



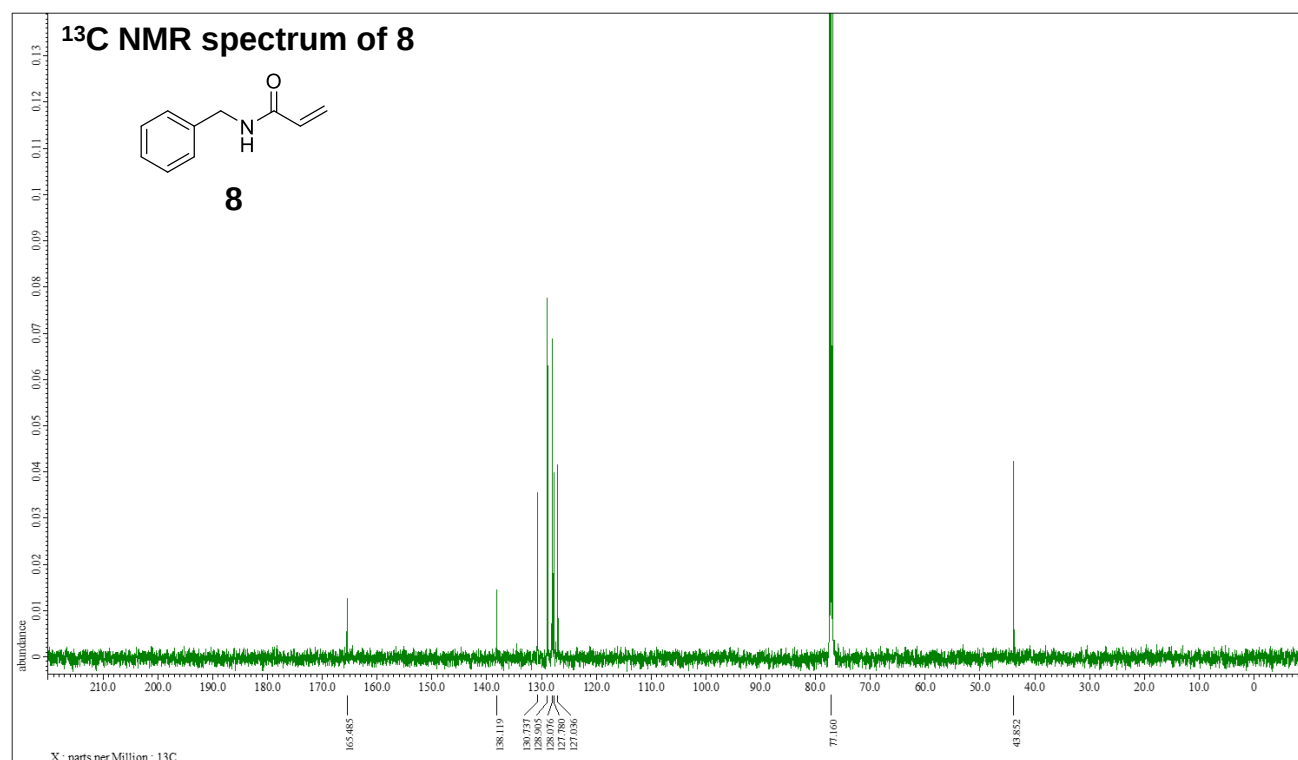
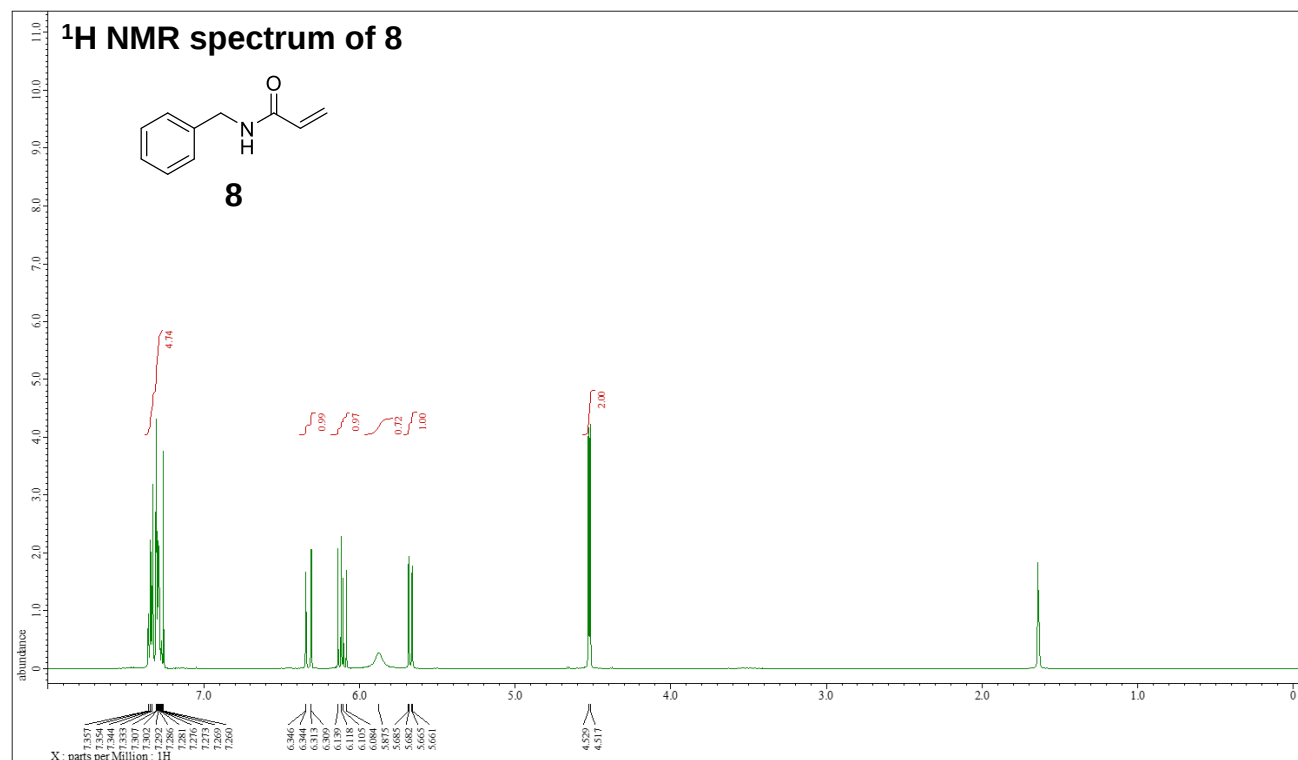
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



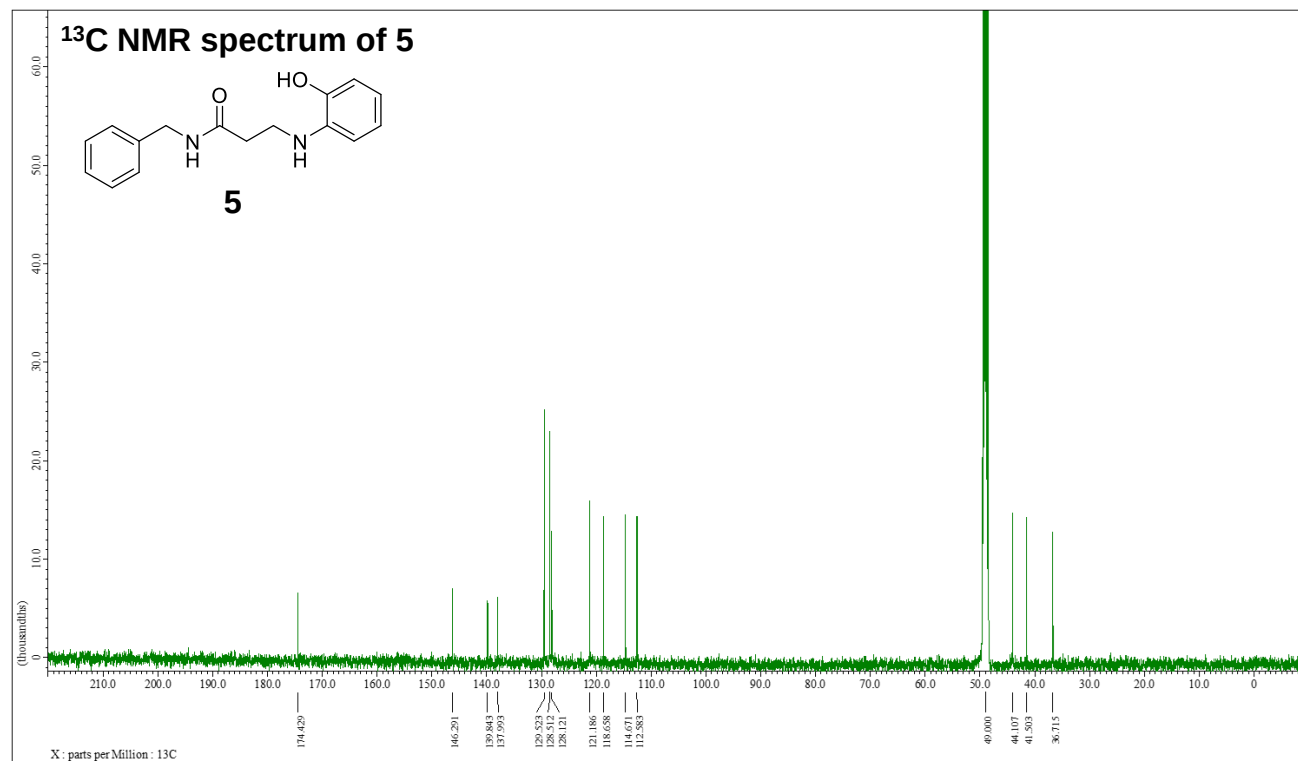
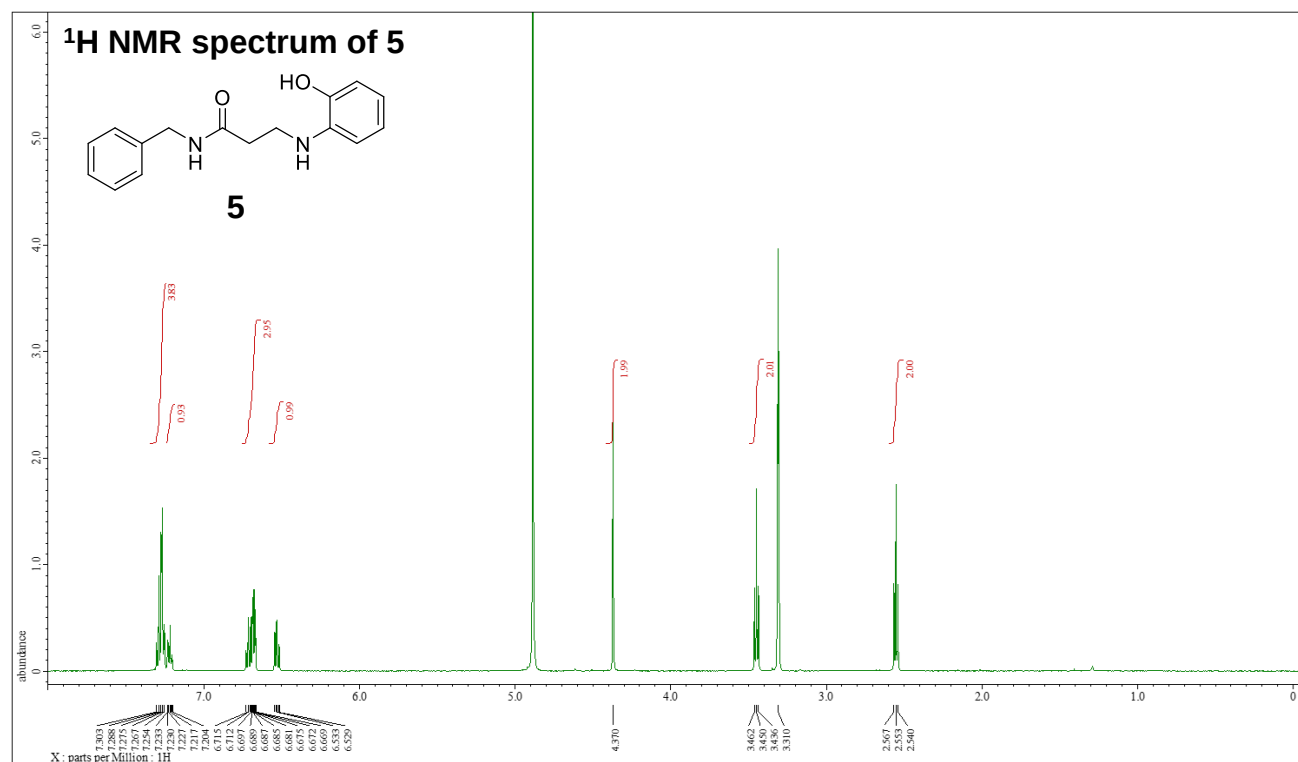
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



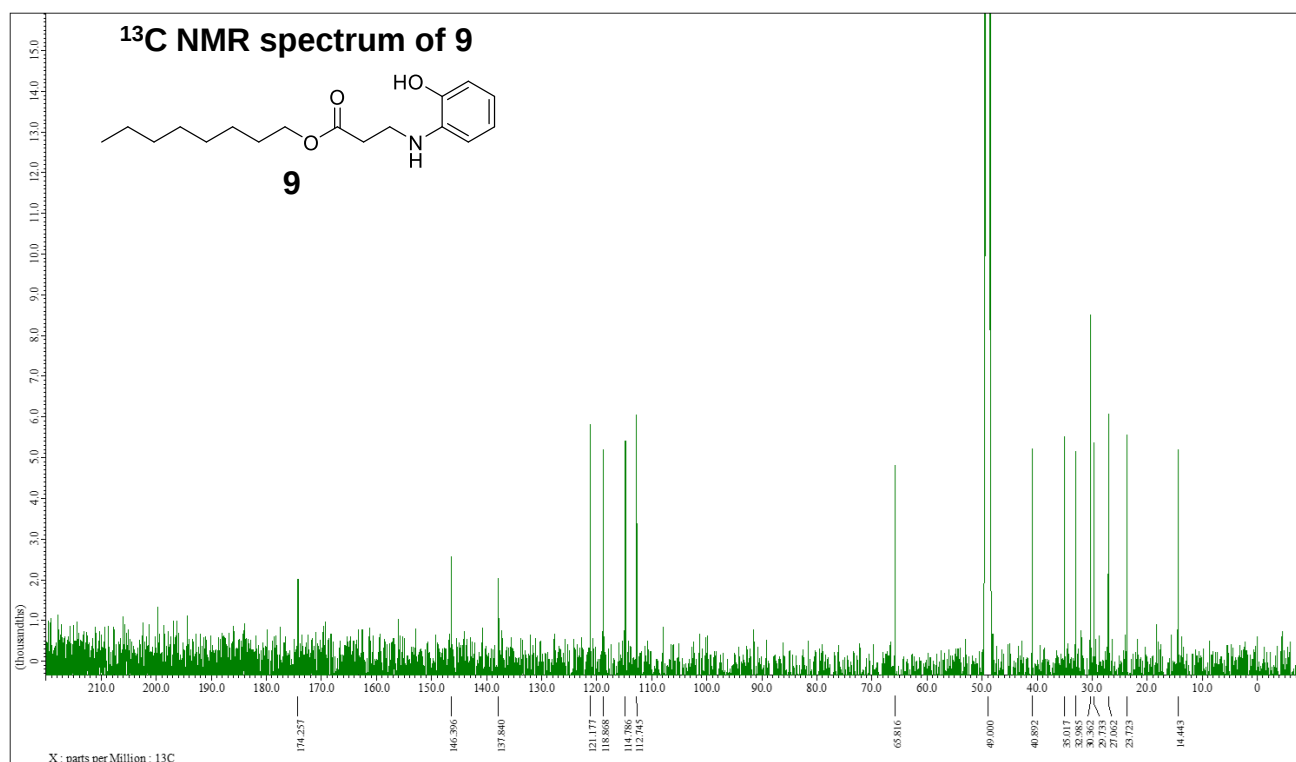
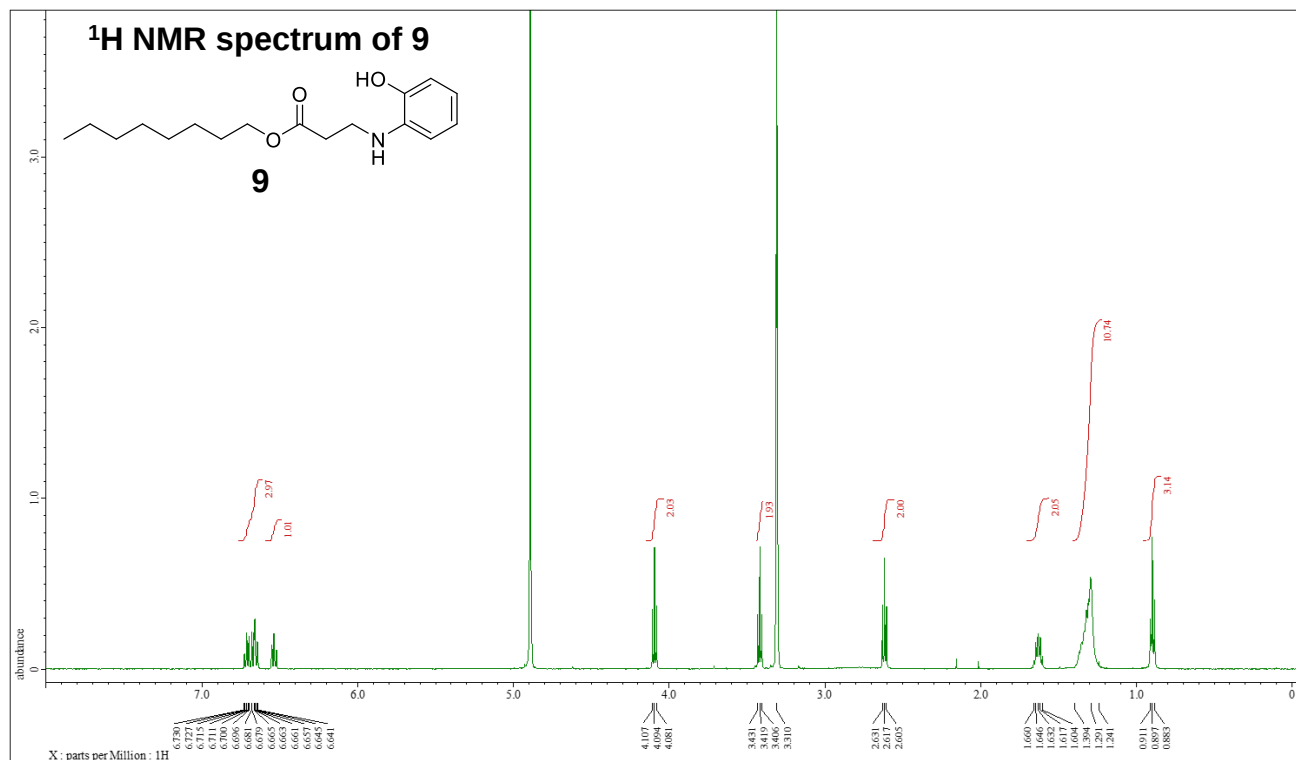
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



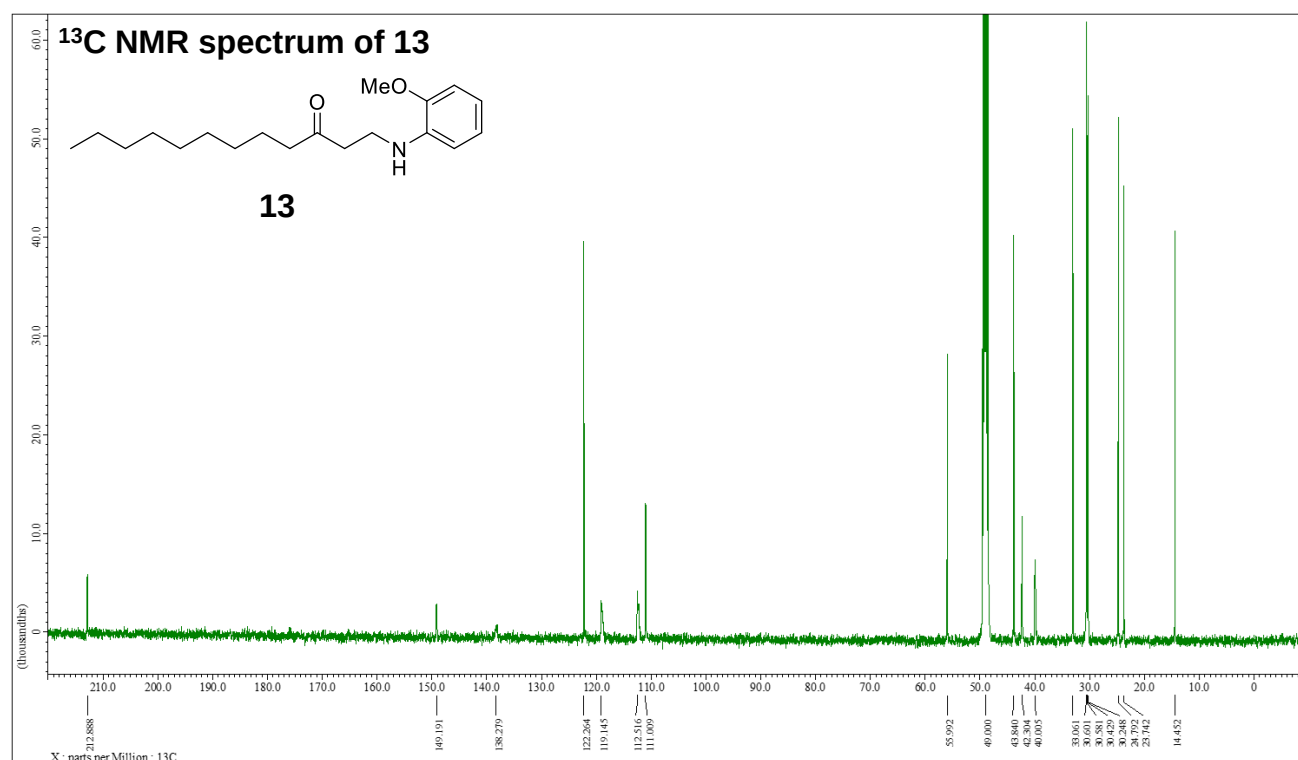
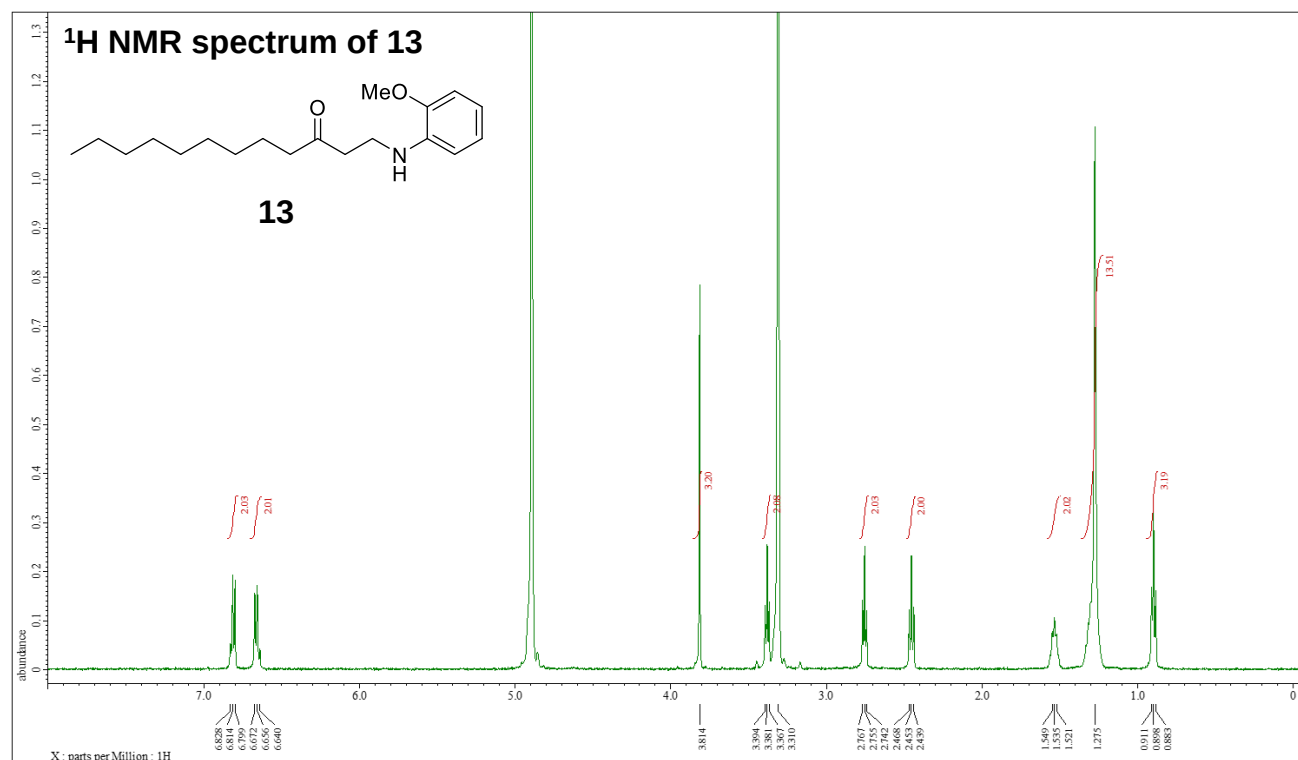
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



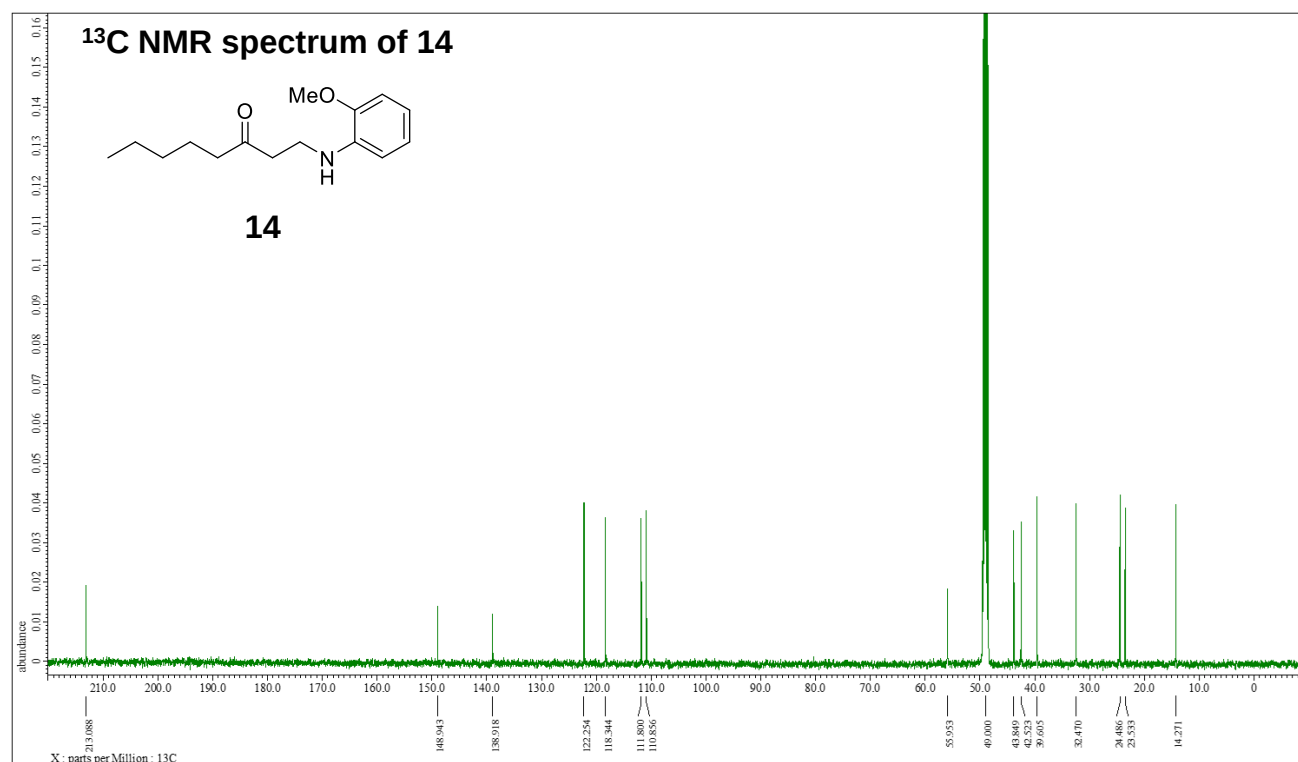
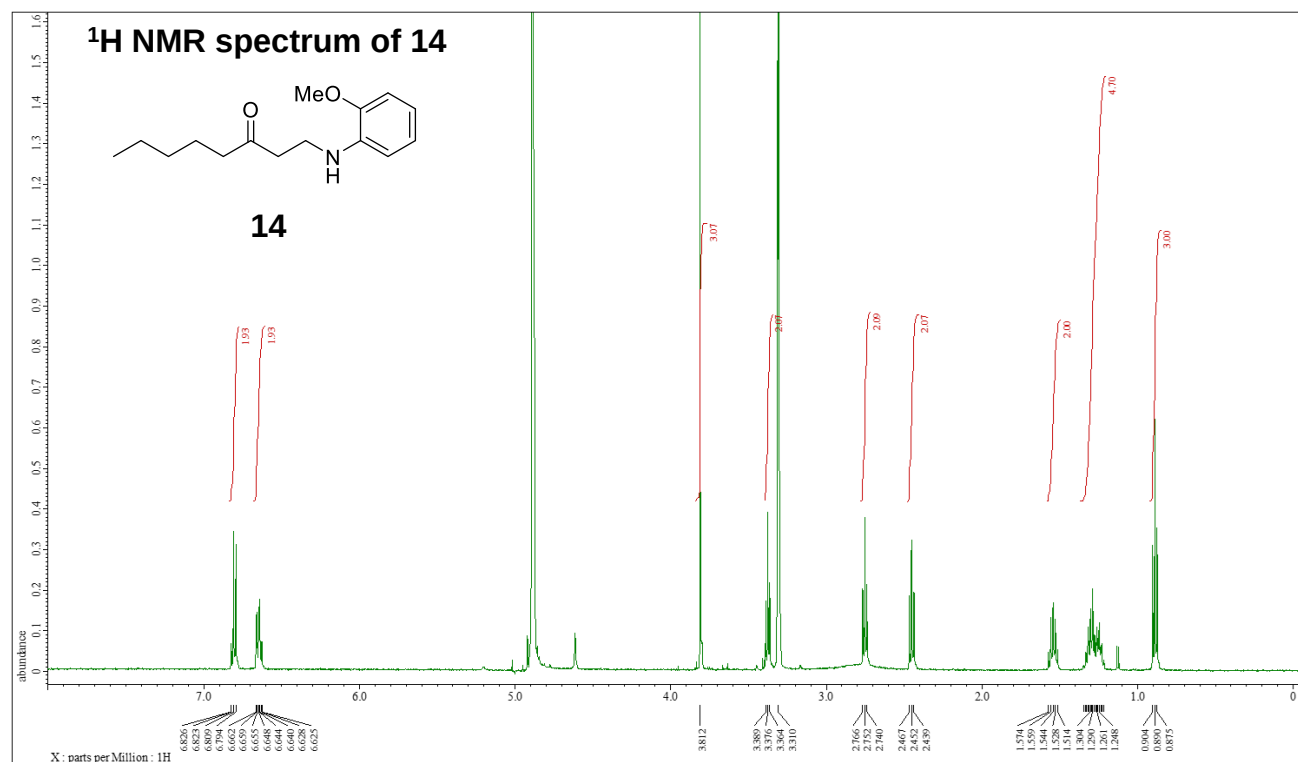
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



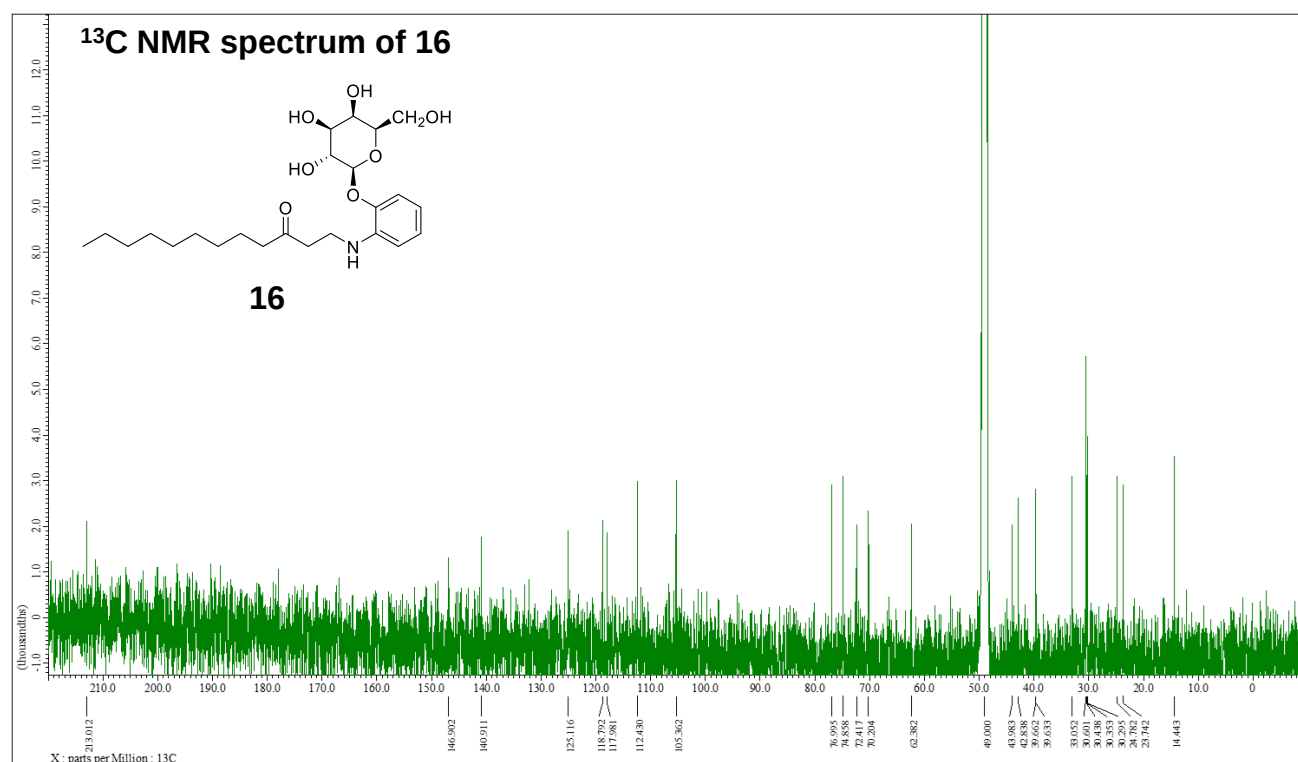
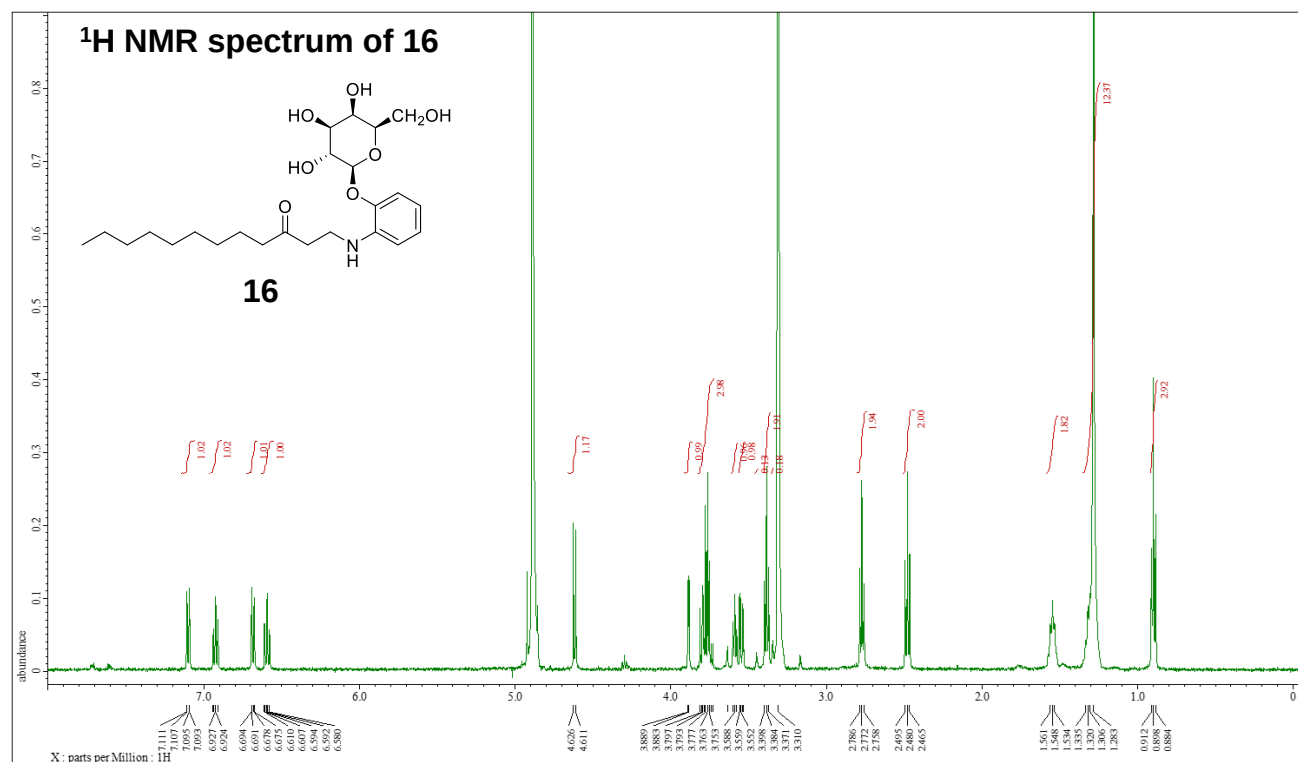
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



## 第 2 章

# *o*-Aminophenol 修飾を基盤とした 天然有機化合物のプロドラック化に関する検討

### 1. 背景

第 1 章では、簡素な鎖状化合物であるケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) について、プロトン性溶媒中における *o*-aminophenol の脱離と  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 dodec-1-en-3-one (6) の放出が確認された。このことから、プロトン性溶媒下における非酵素的な *o*-aminophenol の脱離と  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出は、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 から単離された天然有機化合物 saccharothriolide B (STL B, 2) に特異な現象ではないと考えられた。よって、*o*-aminophenol による一時保護で安定性を向上させた  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物を、同反応で疾患部位選択的に放出制御できれば、高反応で非特異的な結合性を示す生物活性物質について、副作用の軽減が期待できる。

本章では、同反応を生物活性物質に応用することで、疾患部位依存的な生物活性発現を目指した。まず、植物イヌサフラン由来の天然有機化合物で、痛風発作治療薬として臨床で用いられている colchicine について、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を導入し、*o*-aminophenol 脱離に伴う疾患部位特異的な生物活性体の放出を評価した。加えて、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を内包する植物 *Rabdosia rubescens* 由来の天然有機化合物 oridonin に着目し、*o*-aminophenol を始めとするアニリン類の付加実験に供し、その脱離の時間調節の可能性を検討した。

## 2. 天然有機化合物 colchicine 誘導体を用いた脱離、生物活性評価

イヌサフランが産生するアルカロイド colchicine は、微小管の重合阻害作用を有し、リウマチや痛風治療薬として臨床で用いられている (Figure 25a)<sup>37</sup>。加えて、肺、結腸癌に対する強力な抗腫瘍作用も報告されているが、非特異的な生体組織に対する結合による副作用が懸念され、当該領域での臨床応用は実現していない。そこで、colchicine に  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を導入した誘導体を合成し、*o*-aminophenol の脱離を利用した腫瘍細胞選択的な増殖抑制能の付与を検討した。

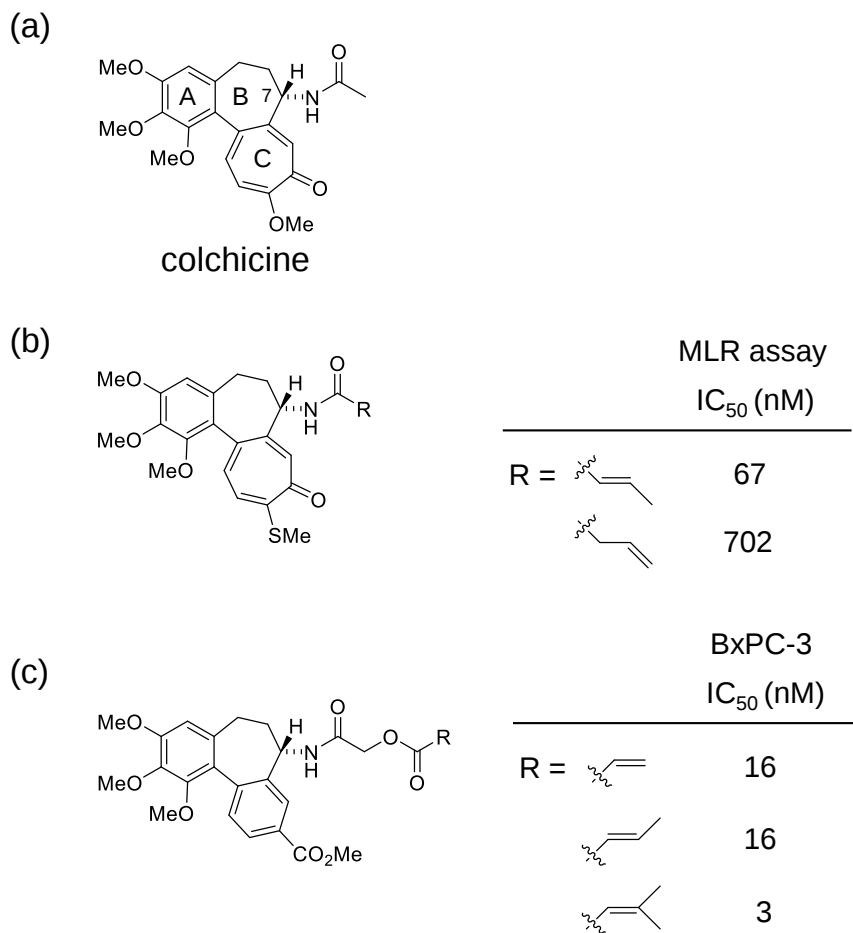
Colchicine については、様々な誘導体による活性や選択性向上を指向した研究が行われている<sup>38</sup>。本研究が注目する  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造は、Cys を始めとした求核性アミノ酸残基との間で共有結合を形成する。これらの反応性アミノ酸残基を有する標的分子との共有結合形成は強固であるため、多剤耐性化した悪性腫瘍に対する増殖抑制効果の発現に寄与している<sup>39</sup>。そのため、colchicine に対し  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の導入と、*o*-aminophenol 修飾による保護で、環境応答的な活性発現調節が可能になれば、幅広い腫瘍細胞に対する増殖抑制効果の発揮という長所を活かしつつ、副作用の課題を解決できる可能性があり、他の生物活性物質に対する本保護法の応用への足掛かりとなり得る。

### 2.1. $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する colchicine 誘導体の合成

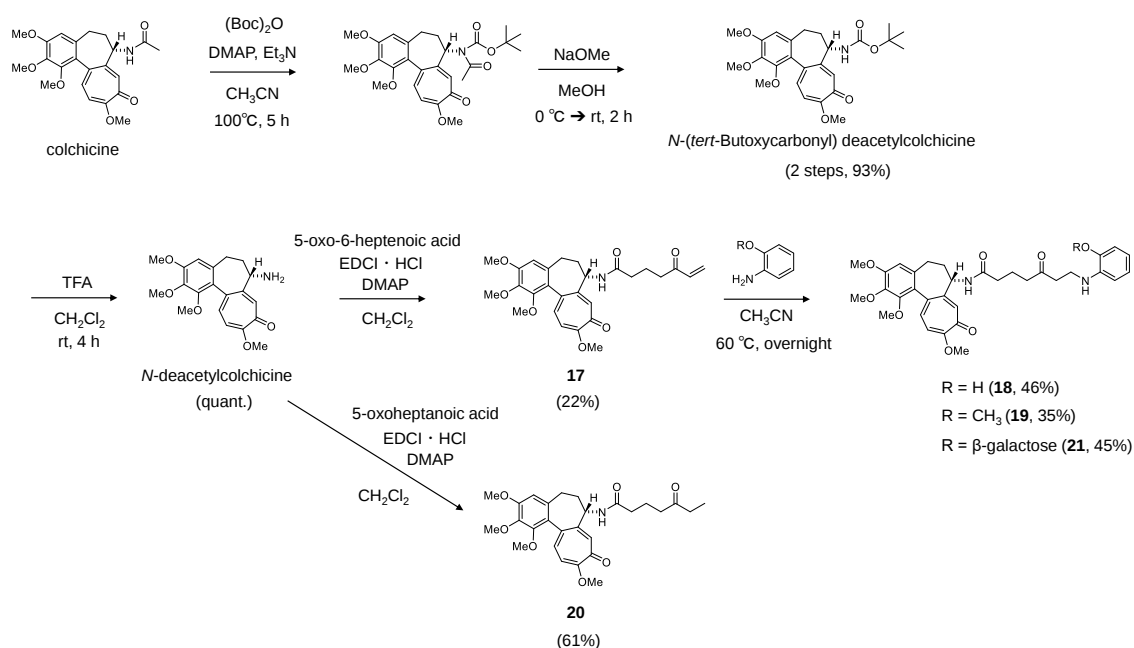
Colchicine およびその類縁体への  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造導入例はいくつか報告されている。例えば、B 環上の C-7 位に結合する *N*-アセチル部位を変換した thiocolchicine 誘導体 (Figure 25b) は、非 Michael 受容体化合物よりも、mixed lymphocyte reaction (MLR) アッセイにおいて高い生物活性を示した<sup>40</sup>。また、C-7 位アミノ基に対する直接導入以外にも、メチレンを介して導入した誘導体も報告されている。例えば、allocolchicine にメチレンを介して  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を組み込んだ化合物群 (Figure 25c) は、タンパク質上の Cys 残基などの求核性側鎖と反応することで高い腫瘍増殖抑制効果を示すと想定されている<sup>41</sup>。

これらを参考に、*N*-deacetylcolchicine の B 環 C-7 位のアミノ基に対して、5-oxo-6-heptenoic acid を縮合させ、ケト型  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を導入した新規誘導体 (17) を合成した (Figure 26)。化合物 17 の *o*-aminophenol 付加体 (18) と *o*-anisidine 付加体 (19) については、*o*-aminophenol および *o*-anisidine の添加による Michael 付加反応で合成した。また、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造が与える活性への影響を評価すべく、飽和型誘導体 (20) を *N*-deacetylcolchicine に対する 5-oxoheptanoic acid の縮合により合成した。これらの化合物を用いて、第 1 章でのケト型 *o*-aminophenol 付加体 (3) の実験結果を参考に retro-Michael

反応を検討した。



**Figure 25. Colchicine および  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル導入型誘導体の構造式.** (a) Colchicine の構造式. (b) Thiocolchicine に  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造 / 末端オレフィンを導入した誘導体. MLR アッセイにおいて、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を導入した誘導体は、非共役のオレフィンを導入した誘導体よりも約 10 倍高い活性を示す<sup>40</sup>。 (c) Allocolchicine に対し  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を導入した誘導体. これらは、膀胱癌細胞 BxPC-3 に対して高い腫瘍増殖抑制効果を示す<sup>41</sup>。

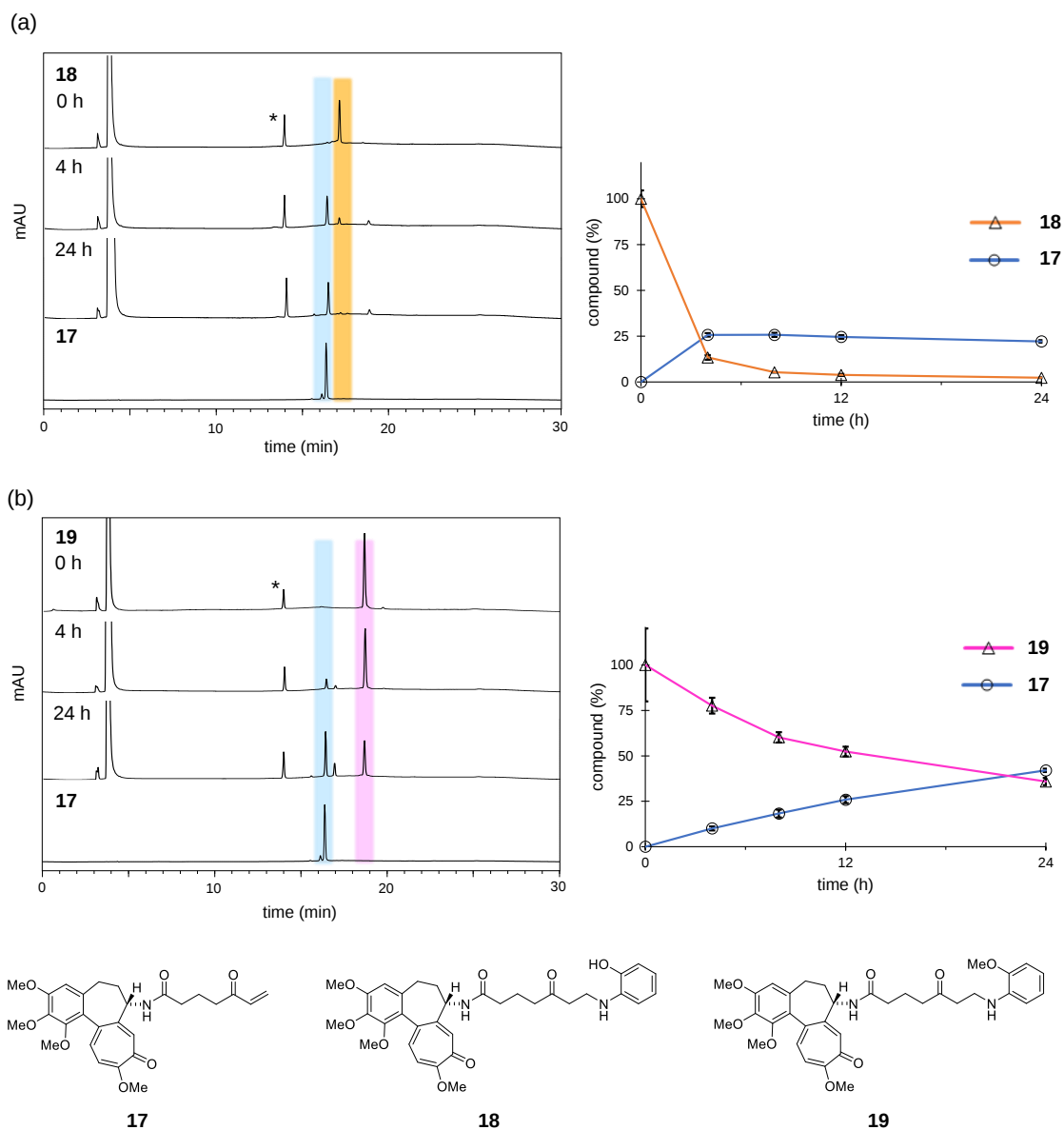


**Figure 26. Colchicine の B 環 C-7 位を修飾した新規誘導体の合成経路.** Colchicine を出発物質として、3 ステップで脱アセチル化された *N*-deacetylcolchicine を得た。その後、*N*-deacetylcolchicine に対し 5-oxo-6-heptenoic acid を縮合し、Michael 受容体を導入した化合物 **17** を収率 22% で合成した。化合物 **17** に対して、*o*-aminophenol、*o*-anisidine および *o*-aminophenyl-β-galactoside (**15**) を Michael 付加させ、**18** (46%)、**19** (35%)、**21** (45%) を得た。飽和型誘導体 (**20**) は、*N*-deacetylcolchicine に対し 5-oxoheptanoic acid を縮合させることで、収率 61% で得た。

## 2.2. Colchicine 誘導体を用いた retro-Michael 反応の定量評価

まず初めに *o*-aminophenol 付加体 (**18**)、*o*-anisidine 付加体 (**19**) について、PBS バッファ一中における retro-Michael 反応を HPLC により定量評価した (Figure 27)。その結果、*o*-aminophenol 付加体 (**18**) と *o*-anisidine 付加体 (**19**) の双方において、経時的な retro-Michael 反応の進行による  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**17**) の放出が観察された。反応開始から 4 時間後における付加体の残存率は、化合物 **18** (13%)、化合物 **19** (78%) であり、第 1 章で用いた付加体 (**3**, **13**) と同様に retro-Michael 反応は *o*-aminophenol 付加体がより速やかに進行した。

*o*-Aminophenol 付加体 (**18**) より放出される化合物 **17** の量的推移を、反応開始時点における化合物 **18** に対するモル分率として評価すると、反応開始 4 時間後で約 30% に達し、以降は定常状態に至った。*o*-Anisidine 付加体 (**19**) から  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**17**) の放出は反応開始より 4 時間以降も進行し、24 時間後における化合物 **19** に対するモル分率は約 50% であった。このことから、第 1 章 (Figure 9a,19) で使用したケト型付加体 (**3**, **13**) と比較して、colchicine 誘導体 (**18**, **19**) を用いた retro-Michael 反応は、速やかに進行することが確認された。化合物 **3** について溶液中の水比率を上げると *o*-aminophenol の脱離はより速やかに進行したこと (Figure 24)、oct-1-en-3-one の *o*-anisidine 付加体 (**14**) でも retro-Michael 反応は進行した (Figure 20) ことから、各付加体 (**3**, **13**, **18**, **19**) の減少速度の違いは溶液組成の違いによって生じたと考えられた。

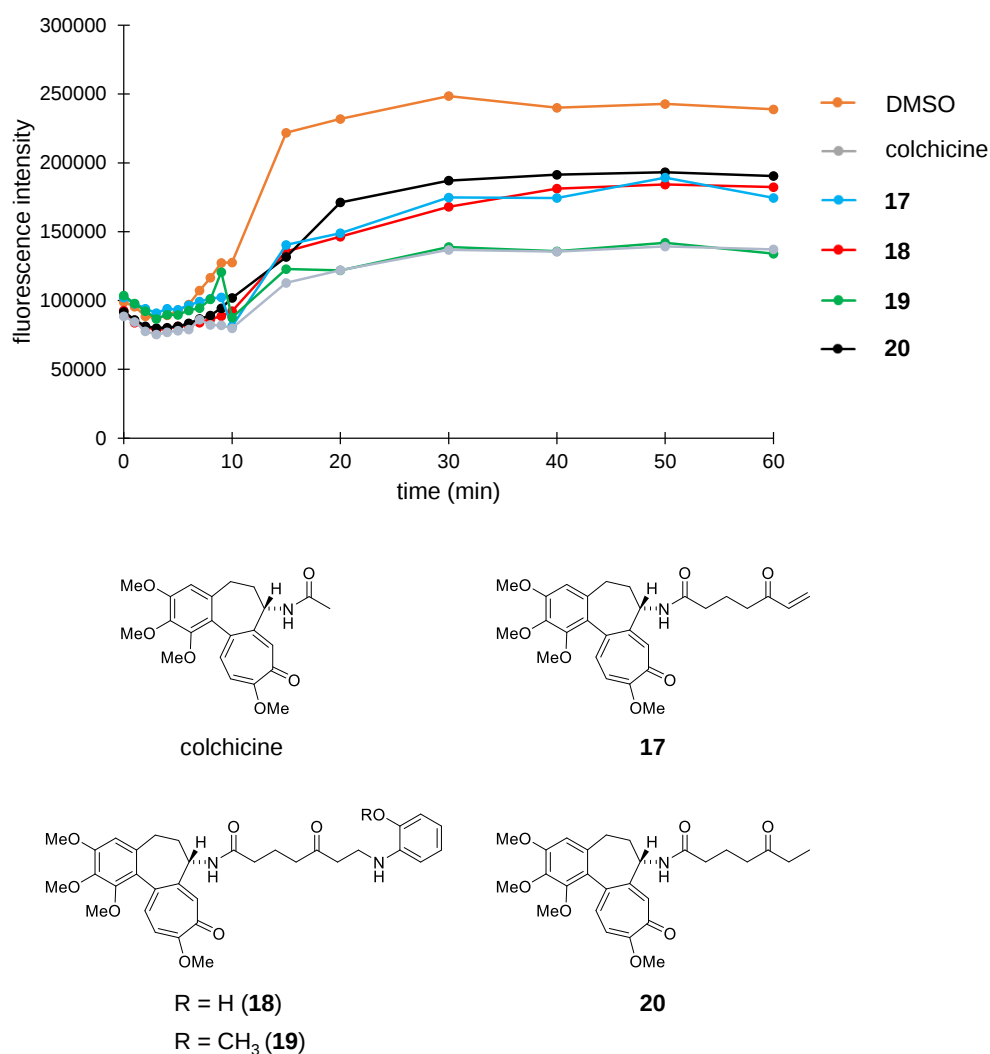


**Figure 27. Colchicine 誘導体 (18, 19) の PBS 溶液中における脱離モニタリング.** (a) *o*-Aminophenol 付加体 (18) の HPLC チャートおよび定量評価. *o*-Aminophenol 付加体 (18, オレンジ) は PBS 溶液中、37 °C において、化合物 17 (青) を放出した。内部標準物質として caffeine (\*) を用いた定量的結果、化合物 18 は反応開始時点から 4 時間で残存量が 80% 以上消失し、定常状態に至った。(b) *o*-Anisidine 付加体 (19) の HPLC チャートおよび定量評価. (a) と同一の反応条件下において、*o*-anisidine 付加体 (19, ピンク) も化合物 17 (青) を放出した。化合物 19 は反応開始時点から 24 時間後も約 42% が残存し、18 より緩やかに脱離が進行した。(Cosmosil MS II,  $\Phi$  4.6  $\times$  250 mm, 0.8 mL/min, 10-60% CH<sub>3</sub>CN in aq., 210 nm. n = 3, mean  $\pm$  SD).

### 2.3. Colchicine 誘導体の tubulin 重合阻害活性

前項で合成した一連の新規誘導体 (**17-20**) について、colchicine と同様の生物活性を示すか検討するため、微小管重合阻害効果を評価した<sup>42</sup>。

その結果、新規合成した誘導体 (**17-20**) は、negative control の DMSO (60 min) と比較した場合、いずれも蛍光強度の低下が観察された (**17**: 48% 阻害, **18**: 36% 阻害, **19**: 78% 阻害, **20**: 30% 阻害, Figure 28)。以上より、全ての誘導体にて tubulin 重合阻害活性が認められた。



**Figure 28. DMSO, colchicine, および colchicine 誘導体 (17-20) の微小管重合阻害試験.** 蛍光強度が低いほど強い in vitro 微小管重合阻害作用を示す。新規合成された colchicine 誘導体 (**17-20**) (10  $\mu$ M) はいずれも微小管重合阻害活性を示した。(蛍光検出条件; Excitation: 380 nm, Emission: 460 nm).

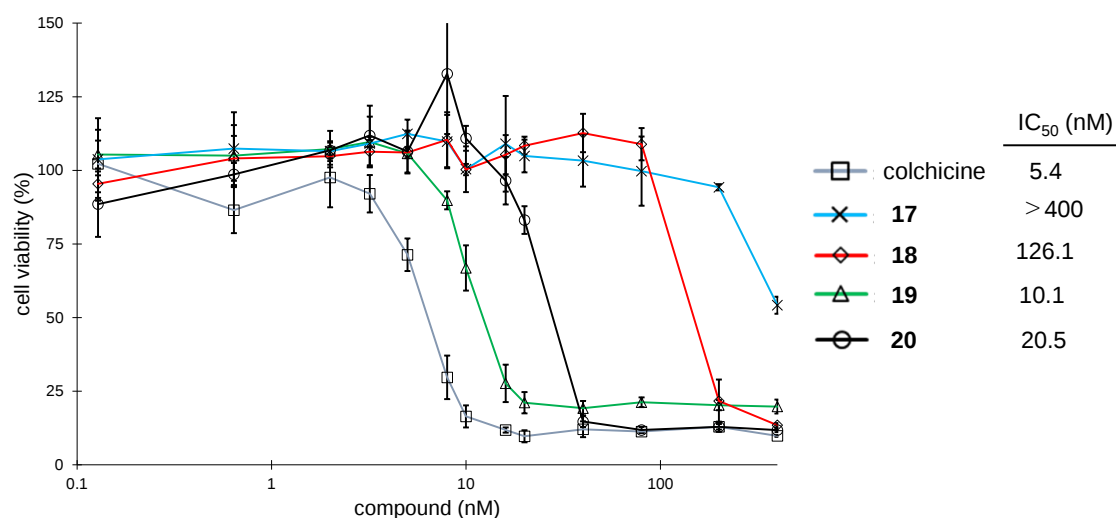
#### 2.4. ヒト結腸腺癌細胞 HT29 に対する colchicine 誘導体の生物活性評価

新規の colchicine 誘導体 (17-20) は、微小管重合阻害作用を示した (Figure 28)。そこで次に、腫瘍細胞を用いた生物活性評価を行った。ヒト結腸腺癌細胞である HT29 細胞に対し、colchicine および各誘導体 (17-20) を添加し、72 時間後に IC<sub>50</sub> 値を算出した (Figure 29)。

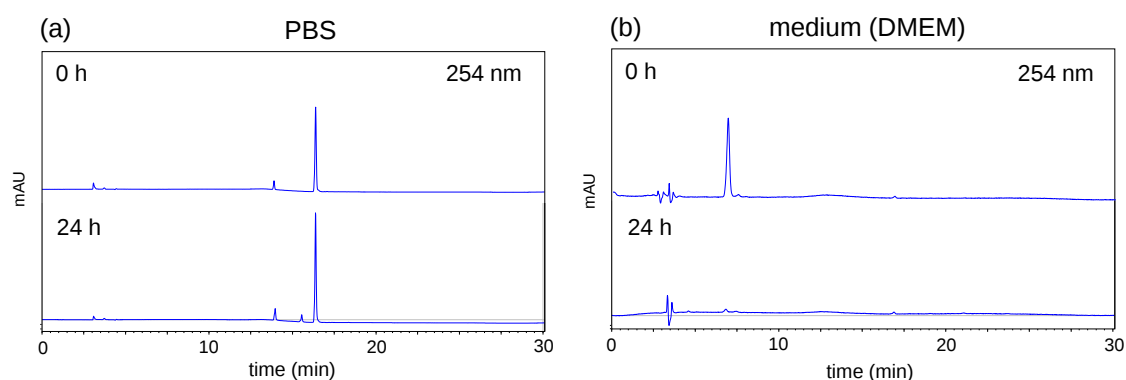
その結果、*o*-anisidine 付加体 (19) が colchicine (5.4 nM) に次いで強い細胞増殖抑制活性を示した (10.1 nM, Figure 29)。一方で、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) の IC<sub>50</sub> 値は 400 nM 以上であった。以上より、各種誘導体 (17-19) は前項の微小管重合阻害効果 (in vitro) では同程度の活性を示した (Figure 28) が、腫瘍増殖抑制効果は各化合物で大きく異なっていることが明らかになった。

この原因として、今回の腫瘍増殖抑制試験では、培地中に含まれるウシ胎児血清やアミノ酸等の成分が、化合物 17 が有する  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造と非特異的に反応した可能性が考えられた。実際、細胞生存率の評価は化合物添加から 72 時間後であったため、ウシ胎児血清に含まれるタンパク質やアミノ酸成分との十分な反応時間もあると推測された。また、化合物 17 の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を *o*-aminophenol によって保護した化合物 18 についても、17 よりも腫瘍増殖抑制効果は上がるものの (126.1 nM)、水溶液中で retro-Michael 反応により化合物 17 へと変換されるため (Figure 27)、飽和型誘導体 (20) (20.5 nM) と比較して低い腫瘍増殖抑制効果を示すと推測された。一連の結果より、化合物 17 の腫瘍増殖抑制効果の低下は、無保護の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造によってもたらされた可能性が示唆された。そこで、PBS と今回の試験で細胞培地として用いた Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 中における化合物 17 の安定性を、HPLC モニタリングで評価した。

その結果、化合物 17 は PBS バッファー中において 24 時間後に約 89% が残存していたのに対し (Figure 30a)、DMEM 中では 24 時間後の残存は認められなかった (Figure 30b)。この結果より、化合物 17 は腫瘍増殖抑制試験では、DMEM 中のタンパク質成分と反応し、微小管に対する結合が低下する可能性が示唆された。



**Figure 29.** ヒト結腸癌細胞 HT29 に対する colchicine 及び各誘導体 (17-20) の増殖抑制効果. 各誘導体添加後 72 時間での細胞生存率を算出した。新規合成した誘導体のうち、*o*-anisidine 付加体 (19) や飽和型誘導体 (20) は colchicine 同様、高い腫瘍増殖抑制効果を示した。一方、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) は 400 nM でも 54% の細胞生存率を示し、*o*-aminophenol 付加体 (18) も IC<sub>50</sub> 値が 6 倍以上増大した。



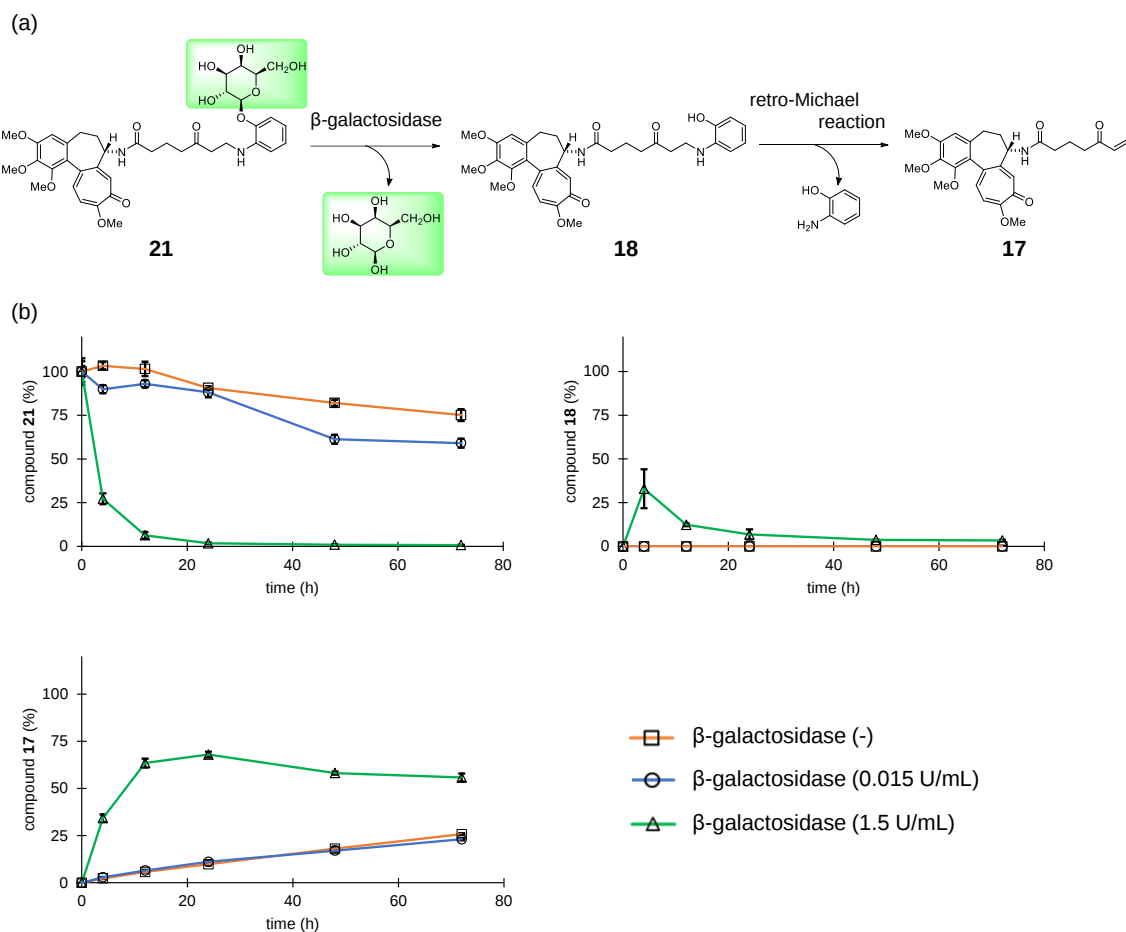
**Figure 30.** Colchicine 誘導体 (17) の PBS および DMEM 中における HPLC チャート. 化合物 17 は (a) PBS 中において、溶解後 24 時間経過しても化合物ピーク (16.5 min) が確認できる (残存率 89%)。一方で、(b) DMEM 中では溶解直後に観測された化合物ピーク (7 min) は溶解後 24 時間経過すると検出されなくなった。(HPLC methods: (a) 5-100%, (b) 40-60% CH<sub>3</sub>CN in aq., Cosmosil MS II,  $\Phi$  4.6  $\times$  250 mm, 0.8 mL/min, 254 nm).

## 2.5. フェノール性水酸基の糖修飾による脱離選択性の向上

前項より、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**17**) は *in vitro* で微小管に対し活性を示すが、HT29 細胞に対する細胞毒性は自身の持つ  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の高い反応性によって、colchicine と比較し大幅に低下した。そこで、疾患部位に対する選択性を向上させるため、化合物 **17** の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造に対して、*o*-aminophenyl- $\beta$ -galactoside (**15**) による保護を検討した。他の colchicine 誘導体 (**18**, **19**) の合成方法と同様に (Figure 26)、化合物 **17** に対して *o*-aminophenyl- $\beta$ -galactoside (**15**) を Michael 付加させることで、 $\beta$ -galactose 付加体 (**21**) を合成した (Figure 26)。腫瘍細胞周辺では  $\beta$ -galactosidase の発現が増加しているため<sup>30</sup>、化合物 **21** は腫瘍細胞近傍で  $\beta$ -galactosidase による *o*-aminophenol 付加体 (**18**) および  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 **17** を放出し、腫瘍細胞選択的な生物活性物質の作用発現に繋がると期待された (Figure 31a)。

### 2.5.1. Retro-Michael 反応の定量評価

新規合成した  $\beta$ -galactose 付加体 (**21**) について、水溶液中での安定性と  $\beta$ -galactosidase 応答性を定量的に評価した (Figure 31b)。その結果、 $\beta$ -galactosidase 存在下 (1.5 U/mL) において化合物 **21** の残存率は反応開始後から 4 時間で約 20% まで低下した。一方、 $\beta$ -galactosidase 処理によって生じた *o*-aminophenol 付加体 (**18**) は 4 時間で約 30% (反応開始時点における化合物 **21** のモル濃度比) まで増加し、その後減少した。化合物 **21** や **18** の経時的な減少とは反対に、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**17**) は増加し、72 時間後には 60% の化合物 **21** が **17** へと変換された。最終生成物である  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**17**) は、化合物 **21** や **18** の減少に伴って増加し、72 時間後に約 60% (反応開始時点における化合物 **21** のモル濃度比) となった。加えて、酵素希釈時 (0.015 U/mL) および非存在下では、化合物 **18** は検出されず、化合物 **17** も反応開始後 72 時間の時点で、反応開始時点における化合物 **21** のモル濃度と比較して約 20% しか確認できなかった。これらの結果から、化合物 **21** は  $\beta$ -galactosidase 非存在下では、PBS 溶液中で安定に存在するが、 $\beta$ -galactosidase による加水分解で  $\beta$ -galactose 部位が切断され、*o*-aminophenol 付加体 (**18**) が得られた後、retro-Michael 反応による *o*-aminophenol の脱離を経て  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**17**) を放出することが示された。

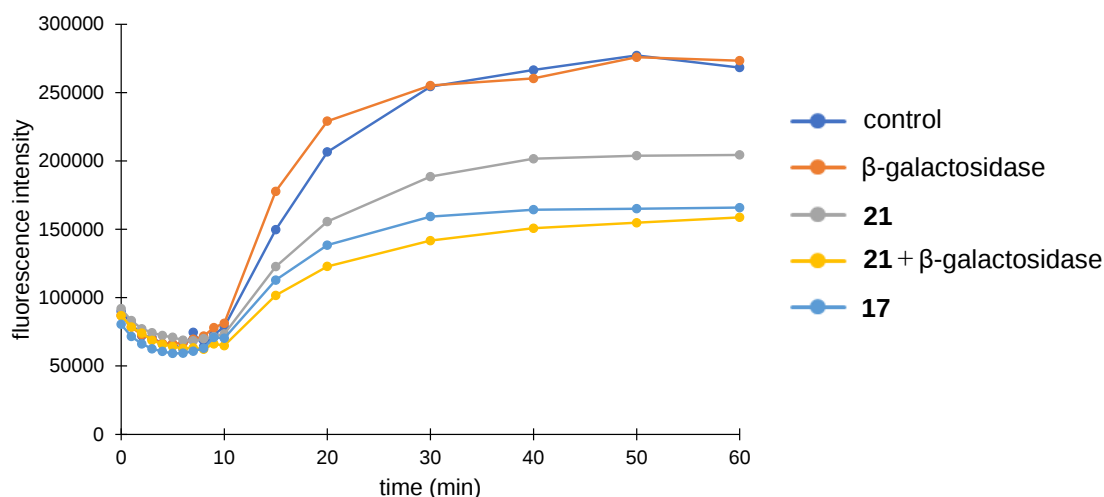


**Figure 31.  $\beta$ -Galactosidase 存在もしくは非存在下での化合物 21, 18 および 17 定量評価.**

(a)  $\beta$ -galactosidase 存在下における糖付加体 (21) から  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) の放出スキーム. 糖付加体 (21) は  $\beta$ -galactosidase 存在下、加水分解反応により *o*-aminophenol 付加体 (18) へと変換され、さらに retro-Michael 反応による *o*-aminophenol の脱離によって、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) を放出する。(b)  $\beta$ -galactosidase 存在もしくは非存在下における化合物 21 と放出される化合物 18 および 17 の定量評価.  $\beta$ -Galactosidase 存在下 (1.5 U/mL, 緑)、糖付加体 (21) は反応開始 24 時間後に消失し、*o*-aminophenol 付加体 (18) の一時的な増加、および  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) の増加が認められた。一方、低濃度  $\beta$ -galactosidase 存在下 (0.015 U/mL, 青)、もしくは  $\beta$ -galactosidase 非添加時 (オレンジ) には、化合物 21 の減少と 17 の増加は緩やかであった。(定量条件は Figure 27 に準ずる.  $n = 3$ , mean  $\pm$  SD).

### 2.5.2. Tubulin 重合阻害活性

新規誘導体 **21** は  $\beta$ -galactosidase 存在下選択的に  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (**17**) を放出することが示された。そこで、反応溶液中で放出された化合物 **17** が、単独投与時と等しく微小管重合阻害効果を示すか、Figure 28 と同じ方法にて評価した。化合物 **21** 単独の重合阻害効果は化合物 **17** よりも低い一方で、 $\beta$ -galactosidase 存在下では、蛍光強度の減衰が確認され、化合物 **17** と同等の重合阻害効果を示した (Figure 32)。前述の HPLC による定量結果 (Figure 31) と併せて考えると、 $\beta$ -galactosidase の添加により、化合物 **21** から放出された **17** が微小管重合阻害作用を発揮したと推察された。



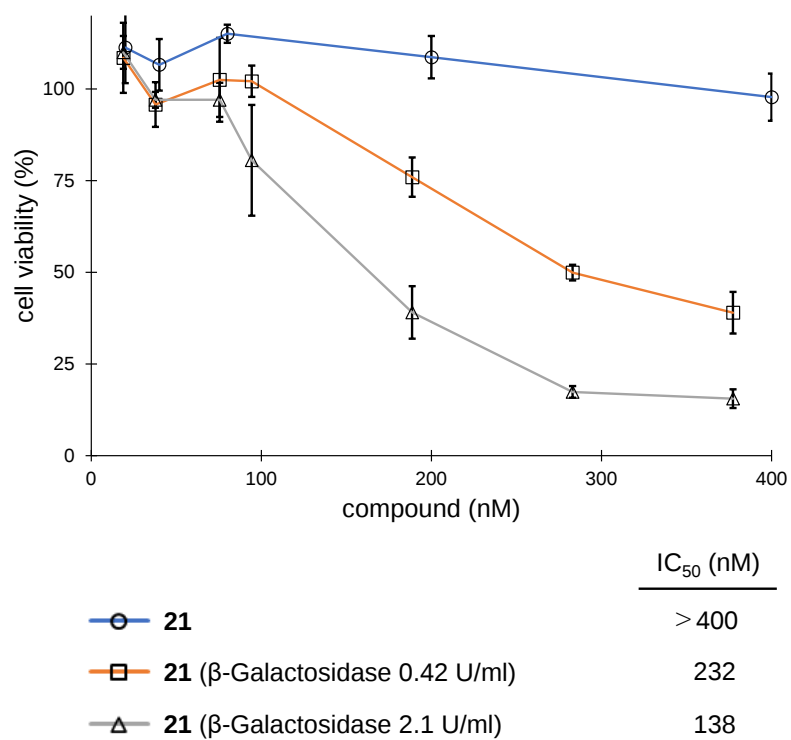
**Figure 32.  $\beta$ -Galactosidase 非存在および存在下における、 $\beta$ -galactose 糖付加体 (**21**) の微小管重合阻害試験.** 化合物 **21** (5  $\mu$ M) は 化合物 **17** (5  $\mu$ M) より微小管重合阻害効果は低いことが示唆された。 $\beta$ -Galactosidase 単独では、酵素および化合物非存在下 (control) と比較して蛍光強度に影響を与えないが、化合物 **21** に添加すると蛍光強度が低下することから、化合物 **17** の放出による重合阻害能の向上が示唆された。(蛍光検出条件; Excitation: 380 nm, Emission: 460 nm).

### 2.5.3. HT29 細胞に対する生物活性

腫瘍細胞選択的な  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) の放出を指向して設計した糖付加体 (21) は、自身の微小管重合阻害効果は低い一方で、 $\beta$ -galactosidase 存在下では化合物 17 を放出し、かつ微小管重合阻害効果を示すことが明らかになった (Figure 32)。そこで、 $\beta$ -galactosidase 存在下における化合物 21 から 17 の放出現象が、腫瘍増殖抑制効果に与える影響を HT29 細胞を用いて評価した。

まず始めに、 $\beta$ -galactosidase 非存在下における化合物 21 の腫瘍増殖抑制効果を評価したところ、その  $IC_{50}$  は、化合物 17 同様に 400 nM 以上であり、今回合成した誘導体の中では活性が低かった (Figure 33)。次に、 $\beta$ -galactosidase 存在下における化合物 21 の生物活性を評価した。すると、 $\beta$ -galactosidase が 0.42 U/mL 存在下において  $IC_{50}$  値は 232 nM、2.1 U/mL 存在下では  $IC_{50}$  値は 138 nM を示した (Figure 33)。すなわち、化合物 21 の腫瘍増殖抑制効果は  $\beta$ -galactosidase の濃度に依存して向上し、化合物 17 と比べて高い生物活性を示すことが明らかになった。

以上の結果より、 $\beta$ -galactose 付加体 (21) は *o*-aminophenol 付加体 (18) を経た  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) の放出を  $\beta$ -galactosidase 存在下で行い、微小管重合阻害効果と腫瘍増殖抑制効果の選択性を向上させることが明らかになった。化合物 21 自身の活性が低いことから、*o*-aminophenol と  $\beta$ -galactose の二重保護という戦略は、高反応性の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) のプロドラッグ化に適していることが示唆された。



**Figure 33.**  $\beta$ -Galactosidase 存在下における糖付加体 (21) の腫瘍細胞増殖抑制効果. 化合物 21 は HT29 細胞に対する細胞毒性 (72 時間処理) が  $\beta$ -galactosidase 濃度依存的に向上した。

### 3. アニリン誘導体を用いた天然有機化合物 oridonin の保護

$\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を付与した colchicine 誘導体を用いた実験 (前項)により、*o*-aminophenol のフェノール性水酸基上に  $\beta$ -galactose を結合させた糖付加体 (21) は、 $\beta$ -galactosidase 存在下にて加水分解を受け、*o*-aminophenol 付加体 (18) へと変換されることを明らかにした。PBS バッファー中において、化合物 18 の残存率は反応開始時と比較して溶解後 4 時間後に約 20% まで低下し、速やかに  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) を放出した (Figure 27)。

一連の結果から、 $\beta$ -galactose 付与による標的への選択性の向上は期待されるものの、生理条件下においては  $\beta$ -galactosidase の加水分解産物から *o*-aminophenol の脱離、活性本体である  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出は非常に速いことが示唆された。そこで、*o*-aminophenol の脱離速度を制御することができれば、 $\beta$ -galactose 付与による疾患部位への選択性向上と合わせて、より疾患部位特異的な生物活性物質の放出設計が可能と考えた。

そこで、*o*-aminophenol 部位について、様々な置換基を導入したアニリン類の付加体を合成し、脱離速度と HT29 細胞に対する増殖抑制効果の評価を行うこととした。なお、前項まで使用していた colchicine 誘導体では、化合物 (18, 19) から  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) の放出は PBS バッファー中にて速やかに進行する一方、細胞毒性の評価には 3 日という期間を要することから、より速やかに細胞毒性を発現する生物活性物質への適用を検討した。そこで、アニリン誘導体の脱離速度と細胞毒性効果を評価する基盤の生物活性物質として、本項では  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有した状態で単離され、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を付与した colchicine 誘導体 (17) よりも安定的と目される、植物 *Rabdosia rubescens* 由来の天然有機化合物 oridonin を使用した。

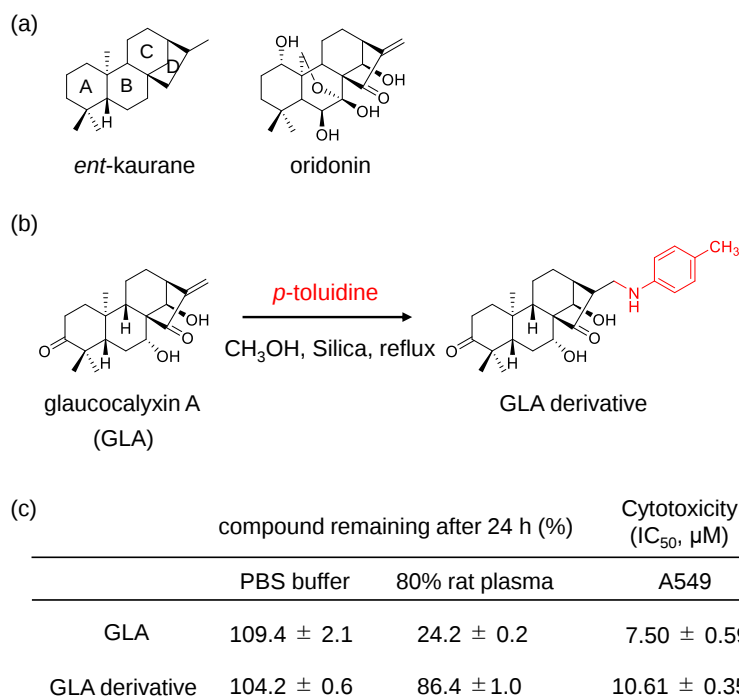
#### 3.1. 天然有機化合物 oridonin と GLA のプロドラッグ

以降の実験では、植物 *Rabdosia rubescens* に含まれている *ent*-kaurane 型ジテルペノイド oridonin (Figure 34a) を用いた。Oridonin はその薬理活性として抗菌、抗炎症、および抗腫瘍作用などが知られており<sup>43,44</sup>、現在まで結合標的の同定による作用機序解析の研究や、生物活性の増強を指向した構造活性相関の研究が報告されている<sup>45,46</sup>。また、oridonin の D 環上に存在する  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造は、多くの癌細胞で発現している転写因子 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の Cys542 と共有結合を形成して腫瘍増殖抑制効果の発現へ寄与すると考えられている<sup>47</sup>。実際オレフィン部位を飽和化した化合物は腫瘍増殖抑制効果が低下することが明らかになっており<sup>48</sup>、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の保護が、プロドラッグ化など、様々な活性を示す oridonin のさらなる薬理的価値の向上に繋が

ると期待した。

同じ *ent*-kaurane 型ジテルペノイド骨格上の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を保護した例に、植物 *Rabdosia japonica* 由来の天然有機化合物 glaucocalyxin A (GLA) がある (Figure 34b)<sup>49</sup>。GLA の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル部位に *p*-toluidine を付加した誘導体 (a GLA derivative) は、血漿中にて GLA よりも高い残存率を示した。この結果は、*p*-toluidine が、GLA の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を保護した結果によると考察されている。加えて、この *p*-toluidine 付加体はヒト肺胞基底上皮腺癌細胞である A549 細胞に対し、GLA と同程度の増殖抑制効果を示したことから、*p*-toluidine 保護体はプロドラッグ的な機能を有すると考えられている。

本項では oridonin の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル部位に対してアニリン類を付加した新規誘導体を合成した。得られた誘導体の脱離効率および生物活性の評価を通じて、アニリン類によるプロドラッグ化を実験的に検証した。

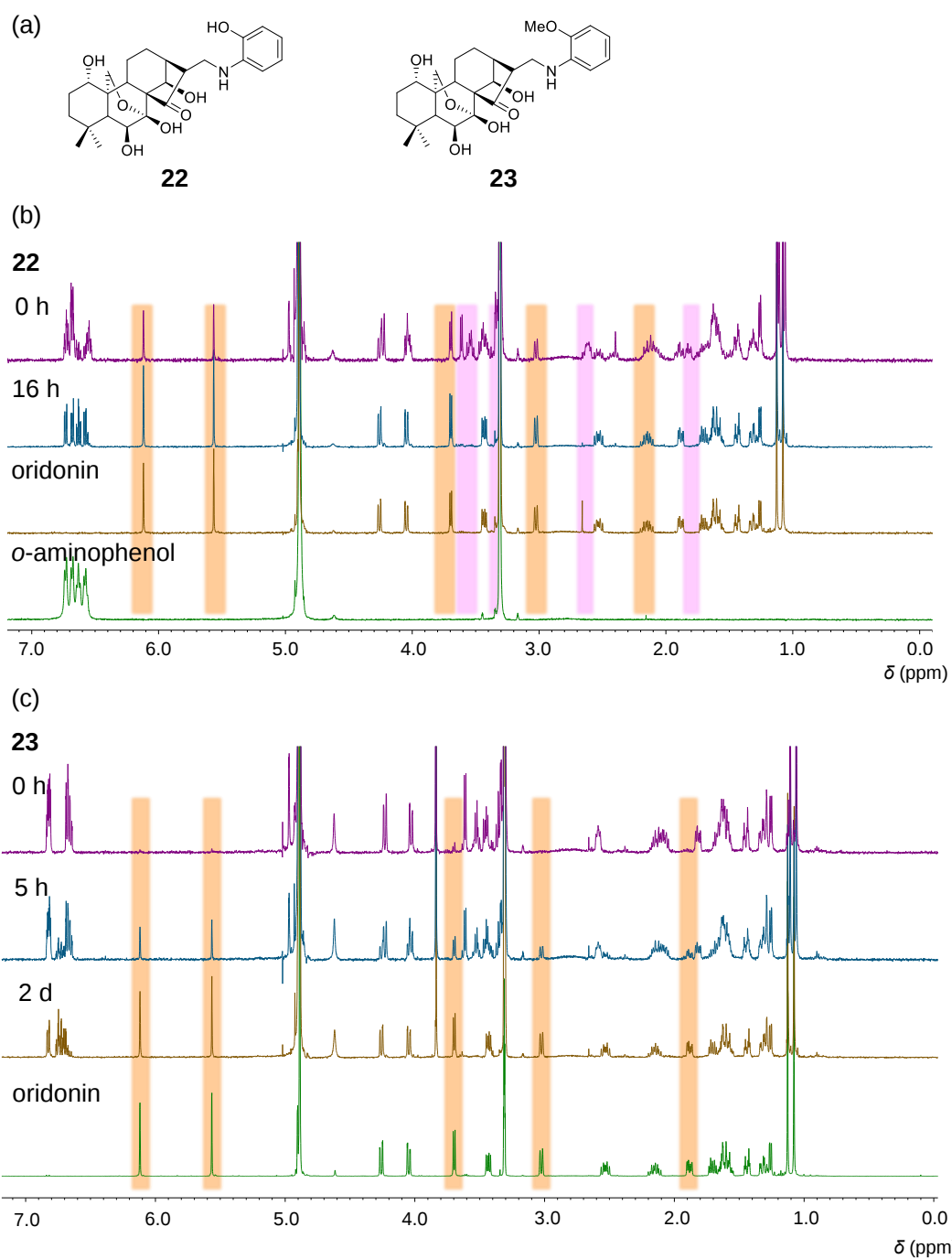


**Figure 34. Oridonin 構造式と類縁体 glaucocalyxin A (GLA) のプロドラッグ化.** (a) *Ent*-kaurane 骨格、および oridonin 構造式. (b) Glaucocalyxin A (GLA) と *p*-toluidine を付加させた誘導体 (GLA derivative) 構造式. (c) (b) の各溶液中における残存率、および A549 細胞に対する IC<sub>50</sub> 値.<sup>49</sup> ラット血漿中では GLA 誘導体が GLA の約 3.6 倍多く残存している。両者の腫瘍細胞増殖抑制効果は同程度である。

### 3.2. *o*-Aminophenol および *o*-anisidine が付加した oridonin 誘導体の安定性

まず始めに、化合物 (3, 14) や colchicine 誘導体 (18, 19) 同様、*o*-aminophenol と *o*-anisidine の脱離反応が oridonin 付加体でも進行するか、 $^1\text{H}$ NMR による脱離モニタリングにより検証した。Oridonin の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造に対して *o*-aminophenol と *o*-anisidine を各々導入した新規誘導体 (22, 23) を合成し、HPLC により精製を行い (Figure 35a)、 $\text{CD}_3\text{OD}$  中、 $37^\circ\text{C}$  における経時的な  $^1\text{H}$ NMR スペクトルの変化を追跡した。その結果、*o*-aminophenol 付加体 (22) は、単一ピークとして得たにも関わらず、モニタリング開始時点の  $^1\text{H}$ NMR 測定では既に脱離が進行し、oridonin との混合物として存在していた。モニタリング開始 16 時間後には付加体が消失し、oridonin に変換していることが確認された (Figure 35b)。一方、*o*-anisidine 付加体 (23) は  $\text{CD}_3\text{OD}$  に溶解直後は単一化合物として存在していた。しかし、5 時間後には oridonin の放出が確認され、2 日後には化合物 22 同様、ほぼ付加体は消失し、oridonin へ変換された (Figure 35c)。

Dodec-1-en-3-one (6) や colchicine 誘導体 (17) と比較した場合、oridonin の脱離は速やかに進行した。この原因として、oridonin は  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル付近の立体障害が大きく、近接する *o*-位の置換基により付加体の安定性が低下した可能性が考えられた。加えて、oridonin の  $\alpha$  位炭素は三級であり、前者二つの二級炭素と比較して配座が固定されている。そのため、*o*-aminophenol の水酸基が  $\alpha$  位の水素原子を引き抜きやすくなった可能性も考えられる。これらの考察と GLA を用いた先行研究より<sup>49</sup>、アニリンの芳香環 *p*-位への置換基導入による脱離反応の進行抑制を試みた。

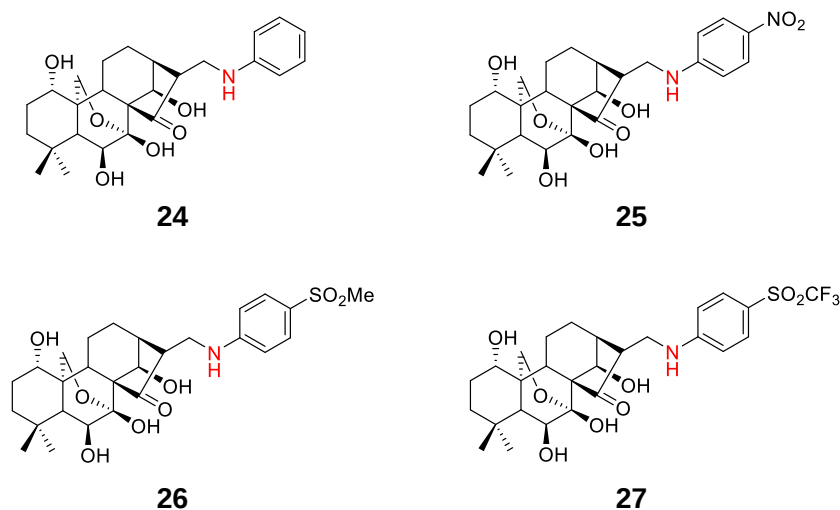


**Figure 35.**  $^1\text{H}$  NMR による oridonin 誘導体 (22, 23) の脱離モニタリング. (a) *o*-Aminophenol および *o*-anisidine 付加体 (22, 23) 構造式. (b) *o*-Aminophenol 付加体 (22) の  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) モニタリング. *o*-Aminophenol 付加体 (22, ピンク) は  $\text{CD}_3\text{OD}$  溶解直後から oridonin (オレンジ) を放出し、 $37^\circ\text{C}$  下にて 16 時間後には消失した. (c) *o*-Anisidine 付加体 (23) の  $^1\text{H}$  NMR モニタリング. (b) と同じ条件下、*o*-anisidine 付加体 (23) も 2 日後には oridonin へと変換された。

### 3.3. 各アニリン類誘導体の安定性と生物活性評価

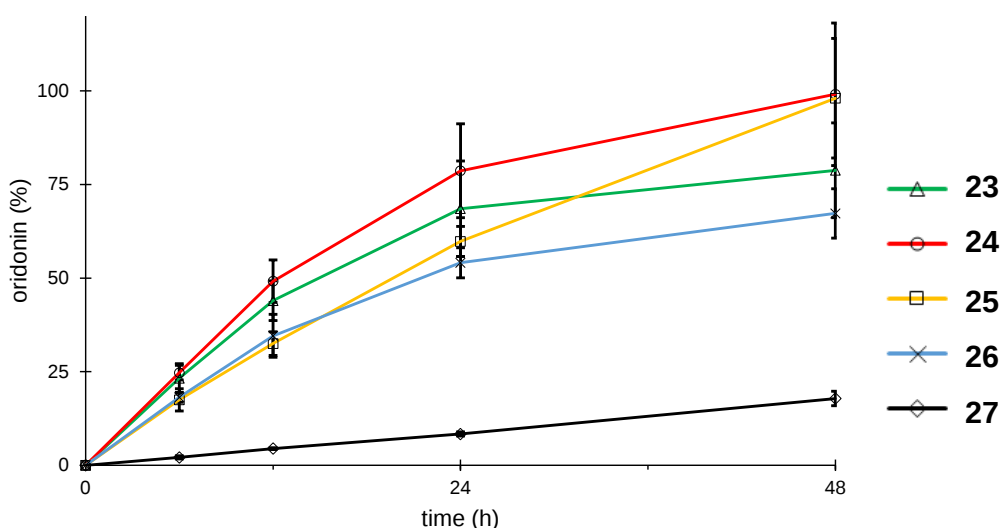
導入する置換基は、第 1 章で考察した反応機構 (Figure 21b) を参考に選択した。すなわち、本反応はアニリンの正に帯電した N 原子上の水素原子を、カルボニル酸素原子が引き抜き (form C)、反応の最終段階でも再び正に帯電した N 原子へと共役により電子が押し出されることで脱離が完了する (form F) と考えられる。そこで、N 原子がイオン化しにくい条件、すなわち、pKa 値が低く分子型を取り易いアニリン類の導入により、脱離反応の抑制を期待した。

そこで、*o*-anisidine (pKa=4.54) 付加体 (23) に加えて、無置換のアニリン (pKa=4.61) 付加体 (24)、電子求引基を有する *p*-nitroaniline (pKa = 1.01) 付加体 (25)、*p*-(methylsulfonyl) aniline (pKa = 1.36) 付加体 (26)、および *p*-[(trifluoromethyl)sulfonyl] aniline (pKa = -0.01) 付加体 (27) を合成した (Figure 36)。



**Figure 36.** アニリン類を  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造に付加した oridonin 類縁体. アニリン (pKa = 4.61) 付加体 (24)、*p*-nitroaniline (pKa = 1.01) 付加体 (25)、*p*-(methylsulfonyl) aniline (pKa = 1.36) 付加体 (26)、*p*-[(trifluoromethyl)sulfonyl] aniline (pKa = -0.01) 付加体 (27) を合成した。

得られた付加体 (**23-27**) の oridonin 放出効率を比較するため、MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) に溶解し、37 °C 下、HPLC による定量モニタリングを行った (Figure 37)。その結果、48 時間後における oridonin の放出率は **23** (79%)、**24** (99%)、**25** (98%)、**26** (67%)、**27** (18%) であった。脱離するアニリン誘導体の pKa が低いほど脱離反応が遅くなる傾向は、全ての付加体では観察されなかったが、最も小さい pKa を示すアニリン誘導体の付加物 **27** が、最も低い脱離能を示した結果は、pKa が脱離速度を決定する要素の一つである可能性を示唆した。また、化合物 **23** は、実験に供した **23** の濃度を基準とした場合、79% の oridonin を放出した一方で、第 1 章で用いた 鎖状の *o*-anisidine 付加体 (**13**) は、同じ反応条件下で dodec-1-en-3-one (**6**) を放出しなかった (Figure 19)。よって、*o*-aminophenol 付加体 (**22**) だけでなく、*o*-anisidine 付加体 (**23**) についても oridonin に適用した場合は、retro-Michael 反応が速く進行することが先の <sup>1</sup>H NMR 結果 (Figure 35) とともに定量的に示された。



**Figure 37. Oridonin 誘導体の脱離効率.** MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) 中、37 °C において、oridonin 誘導体 (**23-27**) は、化合物 **27** 以外は同程度の効率で oridonin を放出した。

次に、一連の oridonin 脱離効率が、生物活性発現に与える影響を検討した。化合物 **23-27** について、ヒト結腸腺癌細胞である HT29 細胞に対する細胞増殖抑制効果を、化合物添加後 15、24、および 48 時間で評価した。

その結果、oridonin を含めた全ての化合物で経時的に IC<sub>50</sub> 値が減少した (Figure 38)。本実験では、付加体自身が生物活性を示す可能性や、アニリン類の付加による化合物の膜透過性への影響等、詳細な検討が必要ではあるが、多くの付加体は oridonin よりも高い IC<sub>50</sub> 値を示した。すなわち、付加体において生物活性が抑制されている可能性が示唆された。加えて、Figure 37 で示した HPLC 定量試験において、最も oridonin 放出率の低かった化合物 **27** は、HT29 細胞に対する IC<sub>50</sub> 値の経時的な減衰も鈍かった。Oridonin の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造は標的分子と共有結合を形成することで腫瘍増殖抑制効果に寄与するため<sup>47,48</sup>、各種付加体より放出された oridonin の放出効率が生物活性発現の差に影響を与えた可能性が示唆された。

実際、同じく *ent*-kaurane 型ジテルペノイド骨格を有する glaucocalyxin A (GLA) においても、アニリンの芳香環上 *p*-位へ電子供与基を導入した付加体は、電子求引基を導入した付加体より高い腫瘍増殖抑制効果を示した<sup>49</sup>。この結果は、同様の理由で脱離速度が上がり、より多くの GLA が放出されることで生物活性が増強した可能性を示唆している。

実験に使用した各種付加体のうち、*o*-anisidine (pKa = 4.54) やアニリン (pKa = 4.61) より pKa の小さい *p*-nitroaniline (pKa = 1.01) を付加したもの (**25**) は、各測定時間において oridonin とほぼ同等の IC<sub>50</sub> 値を示した。細胞内において、ニトロ基は還元酵素ニトロレダクターゼにより、電子供与性基であるアミンへ変換されることが知られている<sup>50</sup>。本実験でも同じ還元反応により、化合物 **25** が 1,4-benzenediamine (pKa = 6.17) の oridonin 付加体へと変換され、脱離速度が増大した結果、他の付加体より短時間で細胞毒性を発揮した可能性が考えられる。

| IC <sub>50</sub> (μM) | 15 h        | 24 h        | 48 h        |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| oridonin              | 25.6 ± 0.36 | 20.1 ± 0.26 | 9.7 ± 0.10  |
| <b>23</b>             | 30.2 ± 0.35 | 24.8 ± 0.22 | 9.8 ± 0.21  |
| <b>24</b>             | 30.3 ± 0.47 | 20.3 ± 0.29 | 10.0 ± 0.23 |
| <b>25</b>             | 18.8 ± 1.26 | 18.4 ± 1.78 | 9.9 ± 0.12  |
| <b>26</b>             | 49.8 ± 0.41 | 30.4 ± 0.37 | 20.1 ± 0.36 |
| <b>27</b>             | 50.6 ± 0.47 | 49.4 ± 0.42 | 25.1 ± 0.52 |

**Figure 38. Oridonin 誘導体の腫瘍細胞増殖抑制効果.** HT29 細胞を用いた oridonin、oridonin 誘導体 (**23-27**) の 15、24、48 時間後における IC<sub>50</sub> 値。いずれの化合物も経時的に活性は増強し、Figure 37 で最も脱離効率が低い化合物 **27** は、生物活性の発現も遅延した。

## 4. 小括

本章では、微小管重合阻害作用を示す天然有機化合物 colchicine について、*o*-aminophenol を基盤とした誘導体化により、疾患部位特異的な  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル型生物活性物質の放出を試みた。まず始めに、colchicine に  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を付与した化合物 (17) を合成し、その物性や細胞毒性を評価した。その結果、化合物 17 は微小管重合阻害作用を示す一方、培地中において安定性が低く、HT29 細胞に対する増殖抑制効果もカルボニルの不飽和部分を飽和化した化合物 (20) より低下することが明らかになった。HPLC 分析などの結果、化合物 17 の低い生物活性は、培地成分との非特異的な結合が原因と考えられた。そこで、化合物 17 を不安定な  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する生物活性物質として使用し、その選択性を向上させるといったプロドラッグ的な化学修飾戦略を検討することとした。

まず、化合物 17 上の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル部位に対して、第 1 章同様に *o*-aminophenol で保護した付加体 (18) を合成した。HPLC 分析の結果、化合物 18 は、PBS バッファー中で *o*-aminophenol を脱離、化合物 17 を放出することが示され、細胞増殖抑制効果も向上した。この結果から、高い反応性を示す  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル部位に対して、*o*-aminophenol が保護基として一時的に付加することで、その反応性を抑え、微小管との結合を高めた可能性が示され、希少放線菌由来天然有機化合物 STL B (2) で観察された現象を応用した第 1 章の戦略が、実際の活性物質にも有効であった。

そこで、疾患部位でより選択的に  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出を可能にするプロドラッグ的修飾を試みた。すなわち、第 1 章で検討した、*o*-aminophenol のフェノール性水酸基に  $\beta$ -galactose を付与した戦略を実施し、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造が二重にマスキングされた糖付加体 (21) を合成した。HPLC による定量評価の結果、化合物 21 は  $\beta$ -galactosidase 存在下で、化合物 18 を経由して化合物 17 へと変換されることが判明した。また、化合物 21 は微小管の重合阻害活性、および腫瘍増殖抑制効果についても  $\beta$ -galactosidase 存在下で増強した。この生物活性の発揮は、化合物 21 について  $\beta$ -galactosidase による加水分解に伴う retro-Michael 反応を経て、最終的に放出された化合物 17 によるものと考えられる。すなわち、 $\beta$ -galactosidase 依存的な本修飾は、不安定な生物活性物質の保護と選択性を高めるプロドラッグ的修飾戦略として有効である。

続いて、さらなる選択性向上のため  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出速度の制御によって、生物活性発現の時間調節が可能か、植物由来天然有機化合物 oridonin に対して、様々な置換基を有するアニリン類の付加体を合成することで検討した。

まず始めに、*o*-aminophenol、*o*-anisidine を付加した oridonin 誘導体 (22, 23) を合成し、

$^1\text{H}$  NMR による脱離のモニタリングを行った。その結果、簡素な鎖状化合物、および colchicine 誘導体と比較して、oridonin 誘導体 (22, 23) は素早く脱離することが認められ、置換基導入による脱離速度の検討化合物として適していることが確認された。続いて、より安定的で脱離速度の緩やかな付加体合成を試みるため、第 1 章で考察した反応機構を参照し、アミノ基の  $\text{pKa}$  がより低い化合物が保護基として有利と考えた。そこで、 $p$ -位に各種置換基を導入した、 $\text{pKa}$  が -0.01 から 4.61 のアニリン類を保護基として導入した oridonin 誘導体 (24-27) を設計・合成した。

合成した付加体 (23-27) の oridonin 放出効率、および HT29 細胞の増殖抑制効果を評価した結果、付加体自身の生物活性や膜透過性、および付加部位の立体化学の影響を考慮する必要はあるものの、oridonin 放出効率と生物活性発現に要する時間には相関があることが示唆された。以上の結果より、 $\text{pKa}$  に着目したアニリン類への置換基導入は、付加体からの  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出速度を制御し、生物活性の発現時間を調節できる新たな修飾法であることが示された。

## 5. Experimental section

### General procedures

All commercially available reagents were purchased from Nacalai, Fujifilm-Wako, or Tokyo-Kasei unless described. Colchicine was purchased from Tokyo-Kasei. Silica gel column was performed using Kanto Silica Gel 60N (63-210 mm) (Kanto Chemical). TLC was performed using glass-backed silica gel 60F254 (Merck). NMR spectra were recorded on a JOEL 500 MHz instrument (JEOL) or Brüker Advance I 600 MHz instrument (Brüker).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts are shown relative to the residual solvent:  $\delta_{\text{H}}$  7.26 and  $\delta_{\text{C}}$  77.16 for  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{H}}$  2.50 for  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  1.94 for  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  8.74 and  $\delta_{\text{C}}$  149.3 for  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  3.31 and  $\delta_{\text{C}}$  49.00 for  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Chemical shifts ( $\delta$ ) are shown in parts per million (ppm) and coupling constants ( $J$ ) are in hertz (Hz). High-resolution mass spectra were recorded on an ESI-ITTOF-MS (Shimadzu).

### ~ Colchicine section ~

#### Chemical synthesis procedures

*N*-Deacetylcolchicine. To a stirred solution of colchicine (2.4 g, 6.0 mmol) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (50 mL) was added  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.7 mL, 12 mmol) and DMAP (0.73 g, 6.0 mmol).  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (6.0 g, 28.2 mmol) was added to the mixture at 0 °C and it was stirred for 5 h at 100 °C. The reaction was quenched by the addition of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and was washed with sat. citric acid. The organic layer was washed with saturated brine and evaporated. NaOMe in MeOH (2.86 mL, 14.9 mmol) was added to the crude (2.57 g) at 0 °C and stirred at rt for 2 h. The solution was neutralized by the addition of sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (30 mL), extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and evaporated. The residue was purified by silica gel open column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)deacetylcolchicine (2.54 g, 93%). To a stirred solution of *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)deacetylcolchicine in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (48 mL) was added TFA (4.8 mL) and stirred for 4 h. The solution was added TFA (1 mL) and stirred for 30 min. The residue was purified by silica gel open column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford *N*-deacetylcolchicine as a pale orange solid (quant., 2.26 g):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  9.38 (brs, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.35 (d,  $J$  = 11 Hz, 1H), 6.89 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 4.20-4.10 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.91 (s, 6H), 3.59 (s, 3H), 2.74-2.58 (overlapped, 2H), 2.52-2.40 (m, 1H), 2.40-2.30 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  179.0, 164.2, 154.2, 151.0, 147.0, 141.7, 136.8, 136.7, 133.8, 131.5, 124.5, 113.9, 107.8, 61.3 (2C), 56.7, 56.2, 54.0, 35.9, 29.7; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  358.1677 (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_5$ , 358.1649).

**6-Heptene-1,5-diol.** 2,3-Dihydropyran (2.0 g, 23.8 mmol) was added 0.2 M HCl (5 mL) at 0 °C for 15 min and stirred at rt for 1 h. The solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with sat. NaHCO<sub>3</sub>, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford a fraction containing 2-hydroxytetrahydropyran (2.55 g). To a stirred solution of the crude in THF (20 mL) were added vinylmagnesium bromide (1.0 M in THF, 48 mL, 47.6 mmol) at 0 °C and stirred at rt for 14 h. The reaction was quenched with 2 M HCl aqueous solution, washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford 6-heptene-1,5-diol as colorless oil (1.48 g, 48%, over two steps): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 5.92-5.82 (m, 1H), 5.22 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.12 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.65 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.63-1.38 (overlapped, 7H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 141.2, 114.9, 73.3, 62.9, 36.7, 32.6, 21.6; HR-MS (ESI) [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 153.0880 (calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>2</sub>, 153.0886).

**5-Oxo-6-heptenoic acid.** To a stirred solution of 6-heptene-1,5-diol (0.7 g, 5.38 mmol) in H<sub>2</sub>O (10 mL) and 1,4-dioxane (15 mL) was added TEMPO (168 mg, 1.08 mmol) and PhI(OAc)<sub>2</sub> (5.2 g, 16.1 mmol) at rt for 14 h. The solution was extracted with 1 M HCl and CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was evaporated. The residue was purified by silica gel open column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford 5-oxo-6-heptenoic acid as a pale yellow solid (672.7mg, 88%): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 6.38-6.32 (m, 1H), 6.24 (dd, *J* = 17.8, 1.3 Hz, 1H), 5.85 (dd, *J* = 10.3, 1.8 Hz, 1H), 2.70 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.97 (quin, *J* = 7.1 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 200.0, 177.6, 136.5, 128.6, 38.4, 32.9, 18.9; HR-MS (ESI) [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 141.0547 (calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>, 141.0557).

**(S)-5-Oxo-N-(1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[*a*]heptalen-7-yl)hept-6-enamide (17).** To a stirred solution of 5-oxo-6-heptenoic acid (98.2 mg, 0.69 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was added EDC · HCl (132.4 mg, 0.69 mmol), DMAP (21.1 mg, 0.173 mmol) and *N*-deacetylcolchicine (123.4 mg, 0.345 mmol) at 0 °C for 1 h, then for 17 h at rt. The solution was evaporated and purified by silica gel open column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford **17** as a pale yellow solid (36.9 mg, 22%): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7.35 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.39-6.31 (m, 1H), 6.30 (brd, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.23 (dd, *J* = 17.8, 1.3 Hz, 1H), 5.84 (dd, *J* = 10.0, 1.0 Hz, 1H), 4.62 (quin, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 2.64 (td, *J* = 7.0, 1.0 Hz, 2H), 2.57-2.47 (m, 1H), 2.42 (td, *J* = 13.3, 7.0 Hz, 1H), 2.33-2.18 (overlapped, 3H), 1.96-1.85 (m, 2H), 1.81 (td, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR

(CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  200.5, 179.6, 172.0, 164.2, 153.6, 151.4, 150.9, 141.8, 136.5, 136.2, 135.3, 134.2, 130.9, 128.8, 125.8, 112.3, 107.5, 61.7, 61.6, 56.5, 56.2, 52.2, 38.5, 37.1, 35.3, 30.0, 19.6; HR-MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  482.2177 (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>7</sub>, 482.2173):  $[\alpha]_D^{20}$  = -249.8 (c 0.03, MeOH).

(*S*)-7-((2-Hydroxyphenyl)amino)-5-oxo-*N*-(1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[*a*]heptalen-7-yl)heptanamide (**18**). Compound **17** (6.4 mg, 0.013 mmol) and *o*-aminophenol (7.3 mg, 0.067 mmol) were dissolved in CH<sub>3</sub>CN (67  $\mu$ L) and stirred at 60 °C for 13.5 h. The mixture was purified by HPLC (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) to afford compound **18** as an orange solid (3.6 mg, 46%): <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$  7.42 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.20 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.73-6.63 (m, 3H), 6.55 (td,  $J$  = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 4.48 (q,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.36 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.63 (dd,  $J$  = 13.8, 6.3 Hz, 1H), 2.48 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 2.40-2.30 (m, 1H), 2.28 (td,  $J$  = 7.1, 3.5 Hz, 2H), 2.24-2.14 (m, 1H), 1.92 (td,  $J$  = 12.0, 7.0 Hz, 1H), 1.82 (quin,  $J$  = 7.0 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$  211.8, 180.8, 175.0, 165.5, 155.2, 154.4, 152.2, 146.6, 142.7, 138.6, 137.7, 136.0, 131.2, 126.8, 121.2, 119.2, 115.1, 114.9, 113.3, 108.8, 61.9, 61.7, 57.0, 56.6, 53.7, 42.6 (2C), 40.2, 37.2, 35.6, 30.5, 20.6; HR-MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  591.2694 (calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 591.2701):  $[\alpha]_D^{20}$  = -103.2 (c 0.03, MeOH).

(*S*)-7-((2-Methoxyphenyl)amino)-5-oxo-*N*-(1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[*a*]heptalen-7-yl)heptanamide (**19**). Compound **17** (7.9 mg, 0.017 mmol) and *o*-anisidine (10.2 mg, 0.082 mmol) were dissolved in CH<sub>3</sub>CN (83  $\mu$ L), stirred at rt overnight and 60 °C for 18 h. The mixture was purified by HPLC (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) to afford compound **19** as a pale yellow solid (3.5 mg, 35%): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  7.33 (s, 1H), 7.28 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H), 6.85 (td,  $J$  = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 6.81 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H), 6.75 (dd,  $J$  = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 6.68-6.60 (m, 2H), 6.52 (s, 1H), 6.29 (br, 1H), 4.59 (quin,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.44 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 2.86-2.67 (m, 2H), 2.54-2.49 (m, 1H), 2.47 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.39 (td,  $J$  = 13.3, 7.0 Hz, 1H), 2.22 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.19-2.14 (m, 1H), 1.90-1.82 (m, 2H), 1.74 (td,  $J$  = 11.9, 6.8 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  210.0, 179.5, 172.0, 164.1, 153.6, 151.4, 150.9, 147.2, 141.8, 137.9, 136.3, 135.3, 134.2, 130.9, 125.8, 121.4, 116.9, 112.3, 110.1, 109.7, 107.4, 61.7, 61.5, 56.5, 56.2, 55.5, 52.2, 42.2, 41.8, 38.4, 37.0, 35.1, 30.0, 19.4; HR-MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  605.2832 (calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 605.2857):  $[\alpha]_D^{20}$  = -157.8 (c 0.03, MeOH).

(*S*)-5-Oxo-*N*-(1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[*a*]heptalen-7-yl)heptanamide (**20**). To a stirred solution of 5-oxoheptanoic acid (28.8 mg, 0.2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (290  $\mu$ L) was added EDC  $\cdot$  HCl (38.3 mg, 0.2 mmol), DMAP (6.1 mg, 0.05 mmol) and *N*-deacetylcolchicine (35.7 mg, 0.1 mmol) at 0  $^{\circ}$ C for 1 h, then for 26 h at rt. The solution was evaporated and purified by silica gel open column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford **20** as a pale yellow solid (29.5 mg, 61%): <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$  7.42 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.48 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.00 (s, 1H), 3.90 (s, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.60 (s, 1H), 2.64 (dd, *J* = 14.0, 6.5 Hz, 1H), 2.50-2.42 (overlapped, 4H), 2.40-2.30 (m, 1H), 2.28 (td, *J* = 7.3, 2.5 Hz, 1H), 2.24-2.14 (m, 1H), 1.93 (td, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 1.86-1.76 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$  213.4, 180.8, 175.0, 165.4, 155.2, 154.4, 152.2, 142.7, 138.6, 137.7, 136.0, 131.2, 126.8, 115.0, 108.8, 61.9, 61.7, 57.0, 56.6, 53.7, 41.9, 37.3, 36.5, 35.7, 30.5, 20.8, 8.0; HR-MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 484.2373 (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>7</sub>, 484.2330): [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -227.7 (c 0.03, MeOH).

5-Oxo-*N*-((*S*)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[*a*]heptalen-7-yl)-7-((2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)phenyl)amino)heptanamide (**21**). Compound **17** (6.2 mg, 0.013 mmol) and **15** (17.4 mg, 0.064 mmol) were dissolved in CH<sub>3</sub>CN (128  $\mu$ L) and stirred at 60  $^{\circ}$ C overnight. The mixture was purified by HPLC (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) to afford compound **21** as a pale yellow solid (4.4 mg, 45%): <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$  7.42 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 6.91 (td, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.66 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 6.58 (td, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.48 (dd, *J* = 12.0, 7.0 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.89-3.86 (overlapped, 4H), 3.82-3.71 (overlapped, 3H), 3.62-3.57 (overlapped, 4H), 3.55 (dd, *J* = 9.8, 2.8 Hz, 1H), 3.35 (td, *J* = 6.6, 2.7 Hz, 2H), 2.76 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.63 (dd, *J* = 13.5, 6.0 Hz, 1H), 2.50 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.39-2.31 (m, 1H), 2.28 (td, *J* = 7.3, 3.0 Hz, 2H), 2.23-2.13 (m, 1H), 1.94 (td, *J* = 12.1, 6.3 Hz, 1H), 1.83 (quin, *J* = 7.3 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$  211.7, 180.8, 175.1, 165.5, 155.2, 154.4, 152.2, 146.8, 142.7, 140.9, 138.6, 137.8, 136.1, 131.2, 126.8, 125.1, 118.8, 117.9, 115.1, 112.4, 108.8, 105.3, 77.0, 74.8, 72.4, 70.2, 62.4, 61.9, 61.7, 57.0, 56.6, 53.7, 42.9, 42.7, 39.7, 37.3, 35.6, 30.6, 20.6; HR-MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 753.3216 (calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>, 753.3229): [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -164.5 (c 0.03, MeOH).

## Monitoring of the conversions of colchicine derivatives (17-19)

Compounds (**17-19**) (100  $\mu$ M) and caffeine (internal standard, 50  $\mu$ M) were dissolved in phosphate

buffer and incubated at 37 °C. A portion of the reaction mixture and the authentic samples were analyzed by HPLC. HPLC conditions for compounds **17-19**: Cosmosil MS II ( $\Phi$  4.6 × 250 mm), a linear gradient of 10-60% CH<sub>3</sub>CN in aq. at a flow rate of 0.8 mL/min. Chromatograms were visualized an absorbance at 210 nm. Observed peak areas (**17-19** and caffeine) were calculated and quantified using Labsolution ver. 5.90 (Shimadzu) and excel.

### **Tubulin polymerization assay**

The fluorescence-based in vitro tubulin polymerization assay was performed using the Tubulin Polymerization Assay Kit (BK011P, Cytoskeleton). The conditions were 2 mg/mL tubulin in 80 mM PIPES Sesquisodium pH 6.9, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA and 1.0 mM GTP. The tubulin reaction mixture (45  $\mu$ L) and compound **17-21** (100  $\mu$ M, 5  $\mu$ L) were charged on a 96-well plate on ice. The increase in fluorescence was monitored at rt by excitation at 380 nm and emission at 460 nm with the 2103 EnVision™ Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer).

### **Cytotoxicity assays**

HT29 cell line is maintained in DMEM medium with 10% fetal bovine serum in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The tumor cells were plated into 96 well plates in the density of 2000 cells per well in 100  $\mu$ L of medium. The cells were allowed to adhere overnight. Stock solutions of the colchicine and colchicine analogues (**17-21**) were dissolved in DMSO to a concentration of 10 mM. Dilutions of the compounds ranging from 12.8 nM to 40  $\mu$ M were prepared in DMSO. One microliter of each dilution was added to the wells containing cells in duplicates. After 72 h, the plates were cooled to rt, and 20  $\mu$ L of CellTiter-Glo luminescent reagent (Promega) was added to each well. The solution of each well (90  $\mu$ L) was moved to white 96 well plates. The luminescence of each well was measured by using the 2103 EnVision™ Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer). GraphPad Prism (5.01, GraphPad Software, Inc.) was used to calculate the IC<sub>50</sub> values of all tested compounds.

### **Stability test of compound 17 in medium**

Stock solutions of compound **17** was prepared in DMSO and each sample was dissolved in 100  $\mu$ L of DMEM medium to a final concentration of 100  $\mu$ M at 37 °C. After 0 and 24 h, solutions were extracted with 100  $\mu$ L of EtOAc and lipophilic layers were concentrated. The residue was dissolved in 100  $\mu$ L CH<sub>3</sub>CN and analyzed by HPLC. HPLC conditions for compounds **17**: Cosmosil MS II ( $\Phi$  4.6 × 250 mm), a linear gradient of 40-60% CH<sub>3</sub>CN in aq. at a flow rate of 0.8 mL/min.

Chromatograms were visualized an absorbance at 254 nm.

### **Monitoring of the conversion of compound 21 with $\beta$ -galactosidase**

Compound **21** (5  $\mu$ M), caffeine (internal standard, 2.5  $\mu$ M),  $\text{MgCl}_2$  (1.2 mM) and  $\beta$ -galactosidase were dissolved in  $0.1 \times \text{PBS}$  and incubated at 37 °C. Reaction was quenched with ice cold MeOH (100  $\mu$ L) and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min (4 °C). The supernatant was analyzed by HPLC. HPLC conditions for compounds **17**, **18**, and **21**: Cosmosil MS II ( $\Phi$  4.6  $\times$  250 mm), a linear gradient of 10-60%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in aq. at a flow rate of 0.8 mL/min. Chromatograms were visualized an absorbance at 210 nm. Observed peak areas (**17**, **18**, **21**, and caffeine) were calculated and quantified using Labsolution ver. 5.90 (Shimadzu) and excel.

### **Tubulin polymerization assays of 21 in the presence of $\beta$ -galactosidase**

Compound **21** (200  $\mu$ M) and  $\beta$ -galactosidase (5.0 U/mL) were incubated at 37 °C for 24 h. The tubulin mixture (previously explained, 45  $\mu$ L) and compounds (5  $\mu$ L) were charged on a 96-well plate on ice. The increase in fluorescence was monitored at rt by excitation at 380 nm and emission at 460 nm with the 2103 EnVision™ Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer).

### **Cytotoxicity assays of 21 in the presence of $\beta$ -galactosidase**

HT29 cell line is maintained in DMEM medium with 10% fetal bovine serum in a humidified incubator at 37 °C with 5%  $\text{CO}_2$ . The tumor cells were plated into 96 well plates in the density of 2000 cells per well in 100  $\mu$ L of medium. The cells were allowed to adhere overnight. Stock solutions of **21** were dissolved in DMSO to a concentration of 10 mM. Dilutions of the compounds ranging from 10  $\mu$ M to 7.5 mM were prepared in DMSO. Each dilution (1  $\mu$ L) and  $\beta$ -galactosidase (44.6 or 8.9 U/mL, 5  $\mu$ L) were added to the wells containing cells in duplicates. After 72 h, the plates were cooled to rt, and 20  $\mu$ L of CellTiter-Glo luminescent reagent (Promega) was added to each well. The solution of each well (90  $\mu$ L) was moved to white 96 well plates. The luminescence of each well was measured by using the 2103 EnVision™ Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer).

### **~ Oridonin section ~**

#### **Chemical synthesis procedures**

*(1S,5S,6S,6aR,8R,9S,11bS,14R)-1,5,6,14-tetrahydroxy-8-(((2-hydroxyphenyl)amino)methyl)-4,4-dimethyldecahydro-1H-6,11b-(epoxymethano)-6a,9-methanocyclohepta[a]naphthalen-7(8H)-one*

(**22**). Oridonin (9.2 mg, 0.025 mmol), *o*-aminophenol (8.2 mg, 0.075 mmol) and silica gel (24 mg) were dissolved in MeOH (322  $\mu$ L) and stirred at 60 °C for 23 h. The crude was purified by HPLC (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) to afford compound **22** and oridonin mixture (**22**: oridonin: *o*-aminophenol = 1:0.9:0.9) as a pale yellow solid (6.8 mg): <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 600 MHz)  $\delta$  11.56 (br, 1H), 9.46 (br, 1H), 7.17-7.13 (m, 1H), 7.03 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 6.82-6.75 (m, 1H), 6.72 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 5.98-5.92 (m, 1H), 5.90-5.84 (m, 1H), 5.27 (s, 1H), 4.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 4.32-4.22 (m, 1H), 4.10-4.04 (m, 1H), 4.02-3.92 (m, 1H), 3.74-3.62 (overlapped, 2H), 3.00-2.92 (m, 1H), 2.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.36-2.28 (m, 1H), 2.06-1.76 (overlapped, 6H), 1.51-1.48 (m, 1H), 1.44-1.36 (m, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.14 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 150 MHz)  $\delta$  222.7, 145.6, 137.8, 120.1, 116.5, 114.0, 110.2, 97.7, 74.9, 74.4, 72.6, 63.3, 59.4, 55.6, 52.8, 46.6, 41.1, 40.5, 39.1, 38.9, 33.4, 33.0, 30.2, 21.8, 19.7, 18.8; HR-MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 474.2404 (calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>7</sub>, 474.2486): [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -58.6 (c 0.1, pyridine).

(1*S*,5*S*,6*S*,6*aR*,8*R*,9*S*,11*bS*,14*R*)-1,5,6,14-tetrahydroxy-8-(((2-methoxyphenyl)amino)methyl)-4,4-dimethyldecahydro-1*H*-6,11*b*-(epoxymethano)-6*a*,9-methanocyclohepta[*a*]naphthalen-7(8*H*)-one (**23**). To a stirred solution of oridonin (10.5 mg, 0.0288 mmol) in DMSO (288  $\mu$ L) was added *o*-anisidine (17.8 mg, 0.144 mmol) and stirred at rt for 2 days. The crude was purified by HPLC (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) to afford compound **23** as a white solid (6.7 mg, 48%): <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz)  $\delta$  7.05-7.00 (m, 1H), 6.94-6.90 (m, 1H), 6.88-6.84 (m, 1H), 6.82-6.77 (m, 1H), 6.55 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 5.98 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.36-5.30 (m, 1H), 4.77 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.42 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J* = 11.0, 6.5 Hz, 1H), 3.98-3.84 (overlapped, 2H), 3.72-3.60 (overlapped, 5H), 2.91 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.58-2.50 (m, 1H), 2.08-1.99 (m, 1H), 1.99-1.91 (m, 1H), 1.91-1.80 (overlapped, 3H), 1.80-1.70 (m, 1H), 1.50 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 1.45-1.31 (m, 2H), 1.28 (s, 3H), 1.15 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz)  $\delta$  223.6, 147.0, 138.0, 121.3, 116.3, 109.63, 109.56, 97.4, 74.0, 73.5, 72.2, 63.5, 62.5, 60.7, 54.7, 53.1, 50.4, 40.8, 40.2, 38.7, 37.0, 33.5, 32.5, 29.9, 21.3, 19.9, 18.8; HR-MS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 488.2549 (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>7</sub>, 488.2643): [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 24.5 (c 0.03, pyridine).

(1*S*,5*S*,6*S*,6*aR*,8*R*,9*S*,11*bS*,14*R*)-1,5,6,14-tetrahydroxy-4,4-dimethyl-8-((phenylamino)methyl)decahydro-1*H*-6,11*b*-(epoxymethano)-6*a*,9-methanocyclohepta[*a*]naphthalen-7(8*H*)-one (**24**). Oridonin (12.3 mg, 0.034 mmol), aniline (9.4 mg, 0.101 mmol) and silica gel (32.9 mg) were dissolved in MeOH (439  $\mu$ L) and stirred at 65 °C for 16 h. The crude was purified by HPLC (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) to afford compound **24** as a white solid (7.6 mg,

49%):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz)  $\delta$  8.70 (br, 1H), 7.75 (br, 1H), 7.30 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.96 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 6.81 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 6.57 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 1H), 6.06 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 5.98 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.77 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 4.43 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 4.22 (dd,  $J$  = 11.0, 6.5 Hz, 1H), 3.96-3.86 (overlapped, 2H), 3.72-3.65 (m, 1H), 3.65-3.56 (m, 1H), 2.96 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 2.60-2.48 (m, 1H), 2.08-1.70 (overlapped, 6H), 1.50 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 1.46-1.30 (m, 2H), 1.28 (s, 3H), 1.15 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz)  $\delta$  223.4, 129.2, 116.6, 112.5, 97.4, 74.0, 73.5, 72.2, 63.5, 62.5, 60.8, 53.2, 50.5, 40.9, 33.5, 32.5, 29.9, 21.3, 19.8, 18.8; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  458.2519 (calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{NO}_6$ , 458.2537):  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = 25.4 (c 0.03, pyridine).

(1*S*,5*S*,6*S*,6*aR*,8*R*,9*S*,11*bS*,14*R*)-1,5,6,14-tetrahydroxy-4,4-dimethyl-8-(((4-nitrophenyl)amino)methyl)decahydro-1*H*-6,11*b*-(epoxymethano)-6*a*,9-methanocyclohepta[*a*]naphthalen-7(8*H*)-one (**25**). Oridonin (5.5 mg, 0.015 mmol), 4-nitroaniline (6.3 mg, 0.045 mmol) and silica gel (15.0 mg) were dissolved in MeOH (200  $\mu\text{L}$ ) and stirred at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 25 h. The crude was purified by HPLC ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) to afford compound **25** as a yellow solid (3.1 mg, 41%):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz)  $\delta$  8.80 (br, 1H), 8.24 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 7.96 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 1H), 7.75 (br, 1H), 6.81 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 2H), 6.45 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 1H), 6.00 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 5.43 (br, 1H), 4.76 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 1H), 4.42 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 1H), 4.22 (dd,  $J$  = 11.3, 6.3 Hz, 1H), 3.98-3.84 (overlapped, 2H), 3.70-3.62 (overlapped, 2H), 2.94 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 2.60-2.48 (m, 1H), 2.06-1.98 (m, 1H), 1.96-1.79 (overlapped, 4H), 1.69 (td,  $J$  = 14.5, 6.5 Hz, 1H), 1.48 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 1.46-1.39 (m, 1H), 1.38-1.32 (m, 1H), 1.28 (s, 3H), 1.14 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz)  $\delta$  222.7, 154.2, 137.0, 126.2, 110.7, 97.4, 74.0, 73.3, 72.2, 63.5, 62.3, 60.8, 53.3, 50.4, 40.8, 39.6, 38.7, 36.9, 33.5, 32.5, 29.8, 21.2, 19.9, 18.8; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  503.2314 (calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_8$ , 503.2388):  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = -49.7 (c 0.03, pyridine).

(1*S*,5*S*,6*S*,6*aR*,8*R*,9*S*,11*bS*,14*R*)-1,5,6,14-tetrahydroxy-4,4-dimethyl-8-(((4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)methyl)decahydro-1*H*-6,11*b*-(epoxymethano)-6*a*,9-methanocyclohepta[*a*]naphthalen-7(8*H*)-one (**26**). Oridonin (5.6 mg, 0.016 mmol), 4-(methylsulfonyl)aniline (7.9 mg, 0.046 mmol) and silica gel (15.0 mg) were dissolved in MeOH (200  $\mu\text{L}$ ) and stirred at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 25 h. The crude was purified by HPLC ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) to afford compound **26** as a white solid (5.6 mg, 67%):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz)  $\delta$  8.77 (br, 1H), 7.97 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.75 (br, 1H), 7.37 (br, 1H), 6.93 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 6.49 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 1H), 6.00 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.77 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 4.43 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 4.22 (dd,  $J$  = 11.0, 6.0 Hz,

1H), 3.93-3.87 (overlapped, 2H), 3.70-3.60 (overlapped, 2H), 3.21 (s, 3H), 2.95 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 2.60-2.48 (m, 1H), 2.07-1.80 (overlapped, 5H), 1.71 (td,  $J = 14.1, 6.8$  Hz, 1H), 1.49 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 1.46-1.32 (m, 2H), 1.28 (s, 3H), 1.15 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz)  $\delta$ : 222.9, 152.8, 129.3, 127.2, 111.3, 97.4, 74.0, 73.4, 72.2, 63.5, 62.4, 60.8, 53.2, 50.4, 44.4, 40.8, 39.5, 38.7, 36.9, 33.5, 32.5, 29.8, 21.2, 19.9, 18.8; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  536.2358 (calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{NO}_8\text{S}$ , 536.2313);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 36.0$  (c 0.03, pyridine).

(1*S*,5*S*,6*S*,6*aR*,8*R*,9*S*,11*bS*,14*R*)-1,5,6,14-tetrahydroxy-4,4-dimethyl-8-(((4-((trifluoromethyl)sulfonyl)phenyl)amino)methyl)decahydro-1*H*-6,11*b*-(epoxymethano)-6*a*,9-methanocyclohepta[*a*]naphthalen-7(8*H*)-one (27). Oridonin (11.5 mg, 0.032 mmol), 4-(trifluoromethylsulfonyl)aniline (21.3 mg, 0.095 mmol) and silica gel (30.4 mg) were dissolved in MeOH (406  $\mu\text{L}$ ) and stirred at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 21 h. The crude was purified by HPLC ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) to afford compound 27 as a white solid (3.9 mg, 21%):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  7.70 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.83 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 5.00 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 4.62 (br, 1H), 4.24 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.04 (dd,  $J = 10.3, 1.3$  Hz, 1H), 3.68-3.59 (overlapped, 2H), 3.50-3.34 (overlapped, 3H), 2.70-2.63 (m, 1H), 2.22-2.02 (overlapped, 2H), 1.83 (dd,  $J = 12.3, 4.3$  Hz, 1H), 1.69-1.55 (overlapped, 2H), 1.46 (dt,  $J = 7.0, 3.4$  Hz, 1H), 1.32 (td,  $J = 13.1, 4.3$  Hz, 1H), 1.26 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 1.11 (s, 3H), 1.06 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  223.7, 156.8, 134.0, 115.2, 97.9, 74.89, 74.86, 73.7, 64.6, 63.1, 61.7, 54.8, 51.3, 42.2, 40.2, 39.8, 38.2, 34.6, 33.0, 30.4, 21.9, 21.0, 19.8; HR-MS (ESI)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  612.1840 (calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{NNaO}_8\text{S}$ , 612.1849);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -27.0$  (c 0.03, pyridine).

### Monitoring of the conversions of oridonin derivatives (23-27)

Compounds (23-27) (50  $\mu\text{M}$ ) and caffeine (internal standard, 10  $\mu\text{M}$ ) were dissolved in MeOH/milliQ water (4:1) and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$ . A portion of the reaction mixture and the authentic samples were analyzed by HPLC. HPLC conditions: PEGASIL ODS SP100 ( $\Phi$  4.6  $\times$  250 mm), a linear gradient of 25-70%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in aq. at a flow rate of 0.8 mL/min. Chromatograms were visualized an absorbance at 210 nm (for oridonin) and 270 nm (for caffeine). Observed peak areas (oridonin and caffeine) were calculated and quantified using Labsolution ver. 5.90 (Shimadzu) and excel.

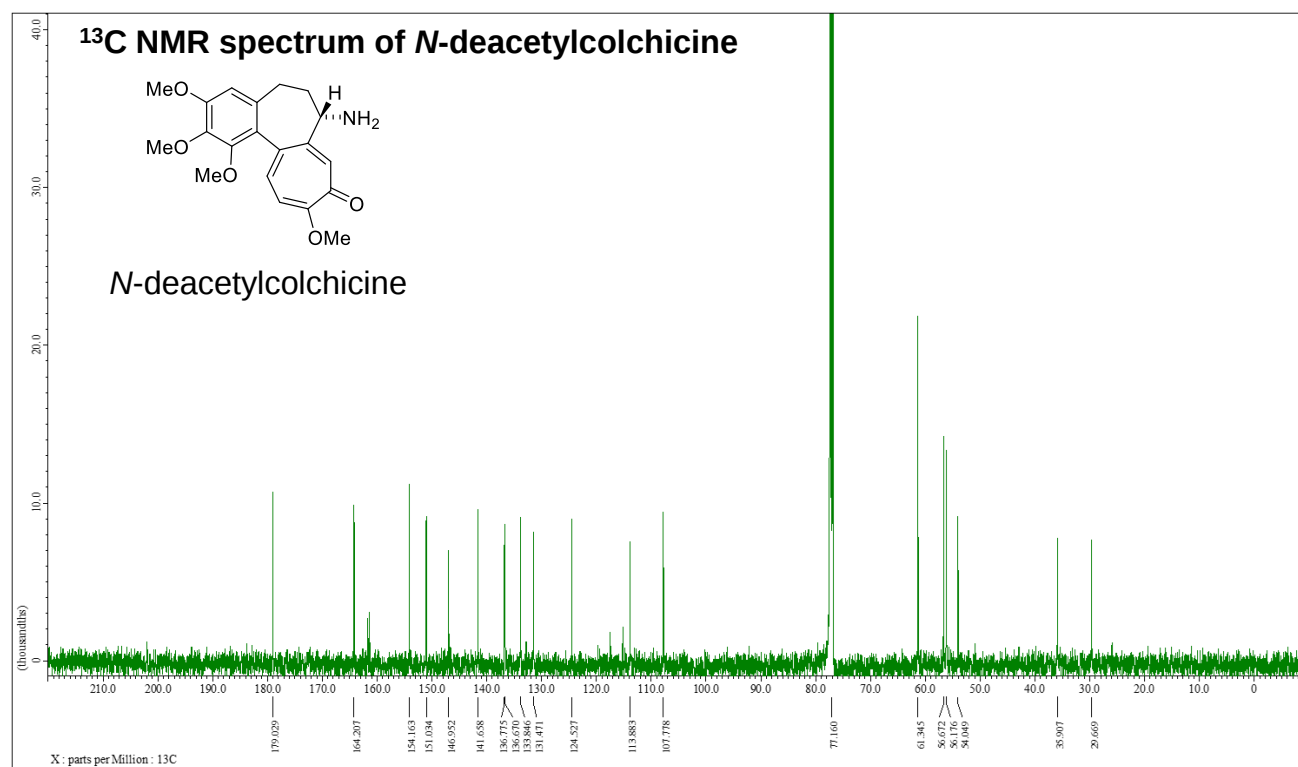
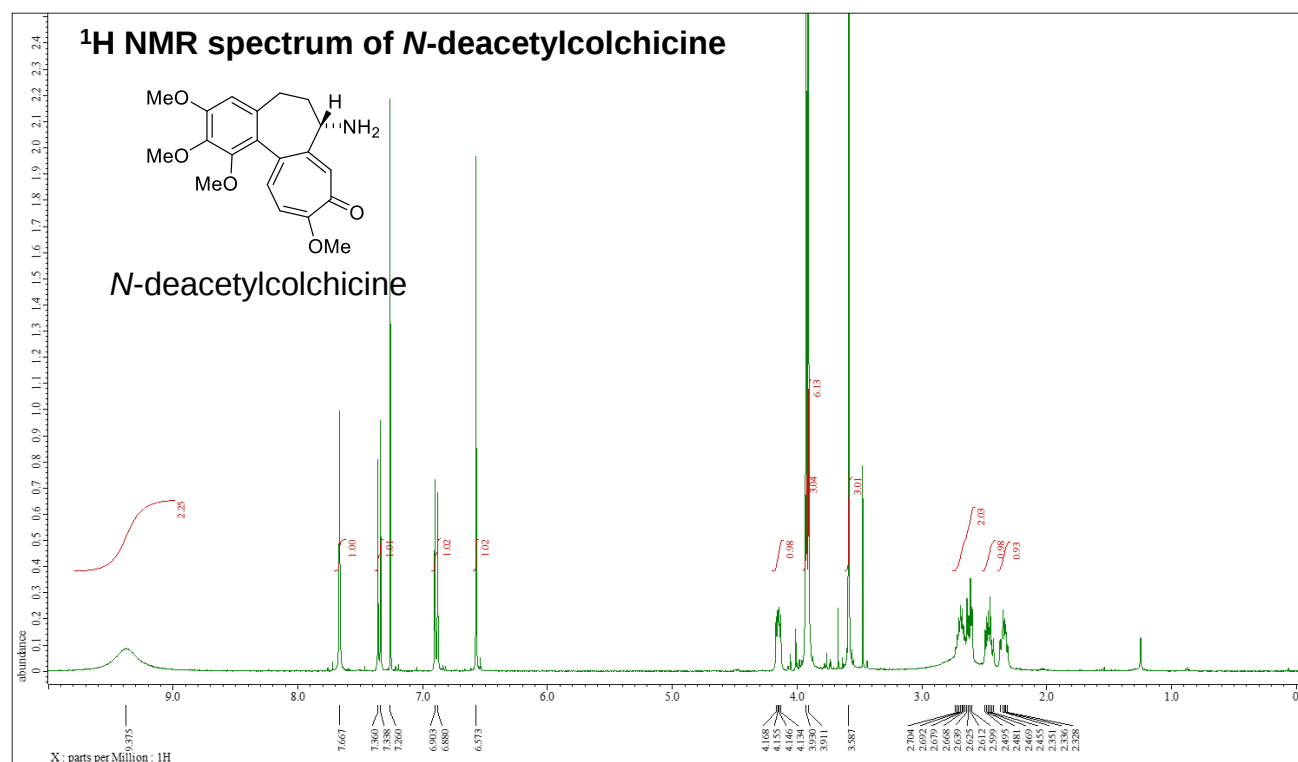
### Cytotoxicity assays

HT29 cell line is maintained in DMEM medium with 10% fetal bovine serum in a humidified incubator at 37  $^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ . The tumor cells were plated into 96 well plates in the density of 2000

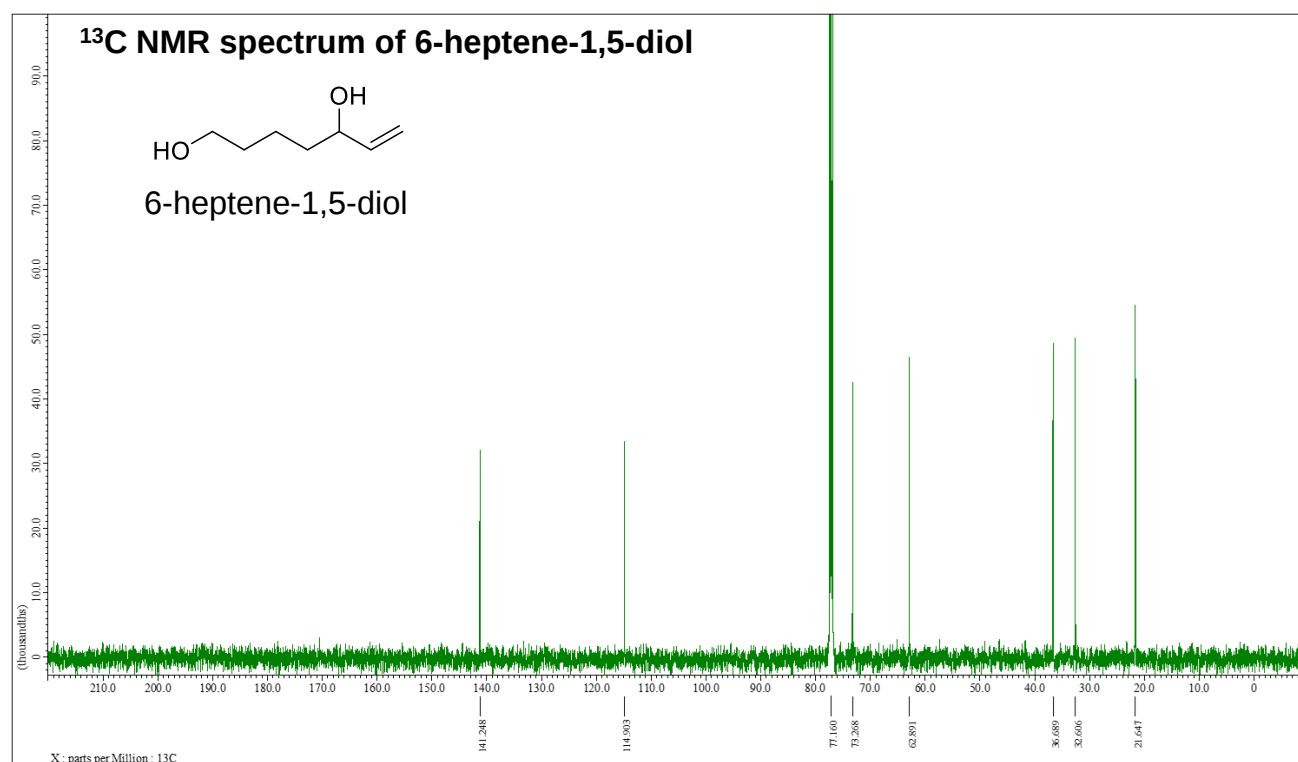
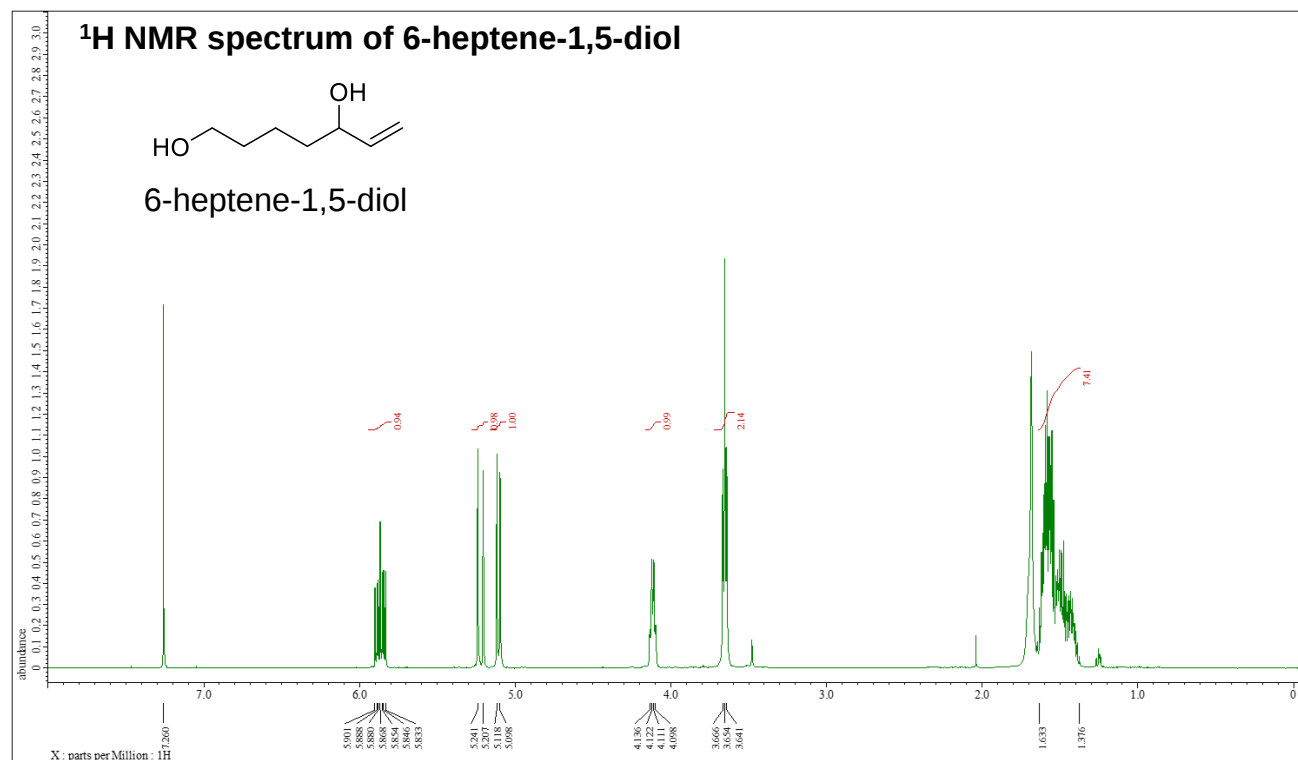
cells per well in 100  $\mu$ L of medium. The cells were allowed to adhere overnight. Stock solutions of the oridonin analogues were dissolved in DMSO to a concentration of 10 mM. Dilutions of the compounds ranging from 10  $\mu$ M to 7.5 mM were prepared in DMSO. One microliter of each dilution was added to the wells containing cells in duplicates. After 15, 24, and 48 h, the plates were cooled to rt, and 20  $\mu$ L of CellTiter-Glo luminescent reagent (Promega) was added to each well. The solution of each well (90  $\mu$ L) was moved to white 96 well plates. The luminescence of each well was measured by using the 2103 EnVision<sup>TM</sup> Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer).

## 6. NMR spectroscopic data

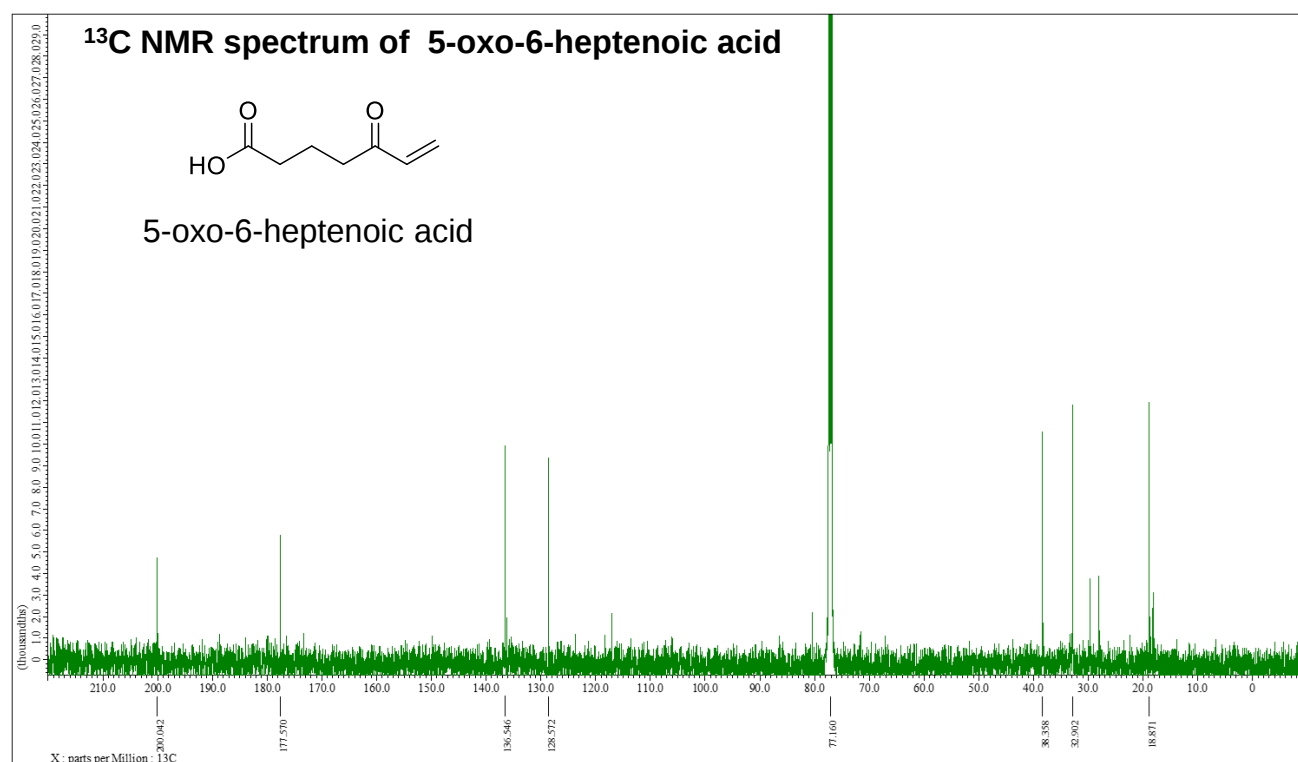
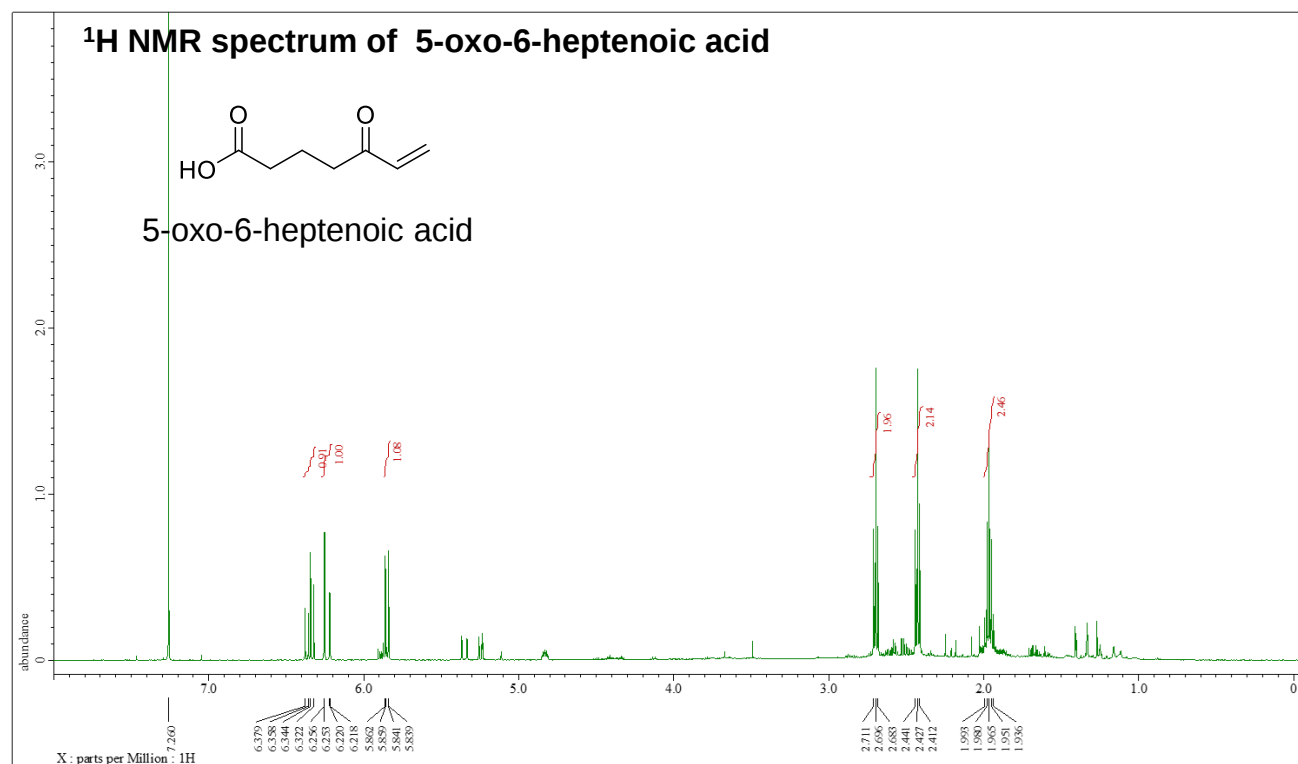
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



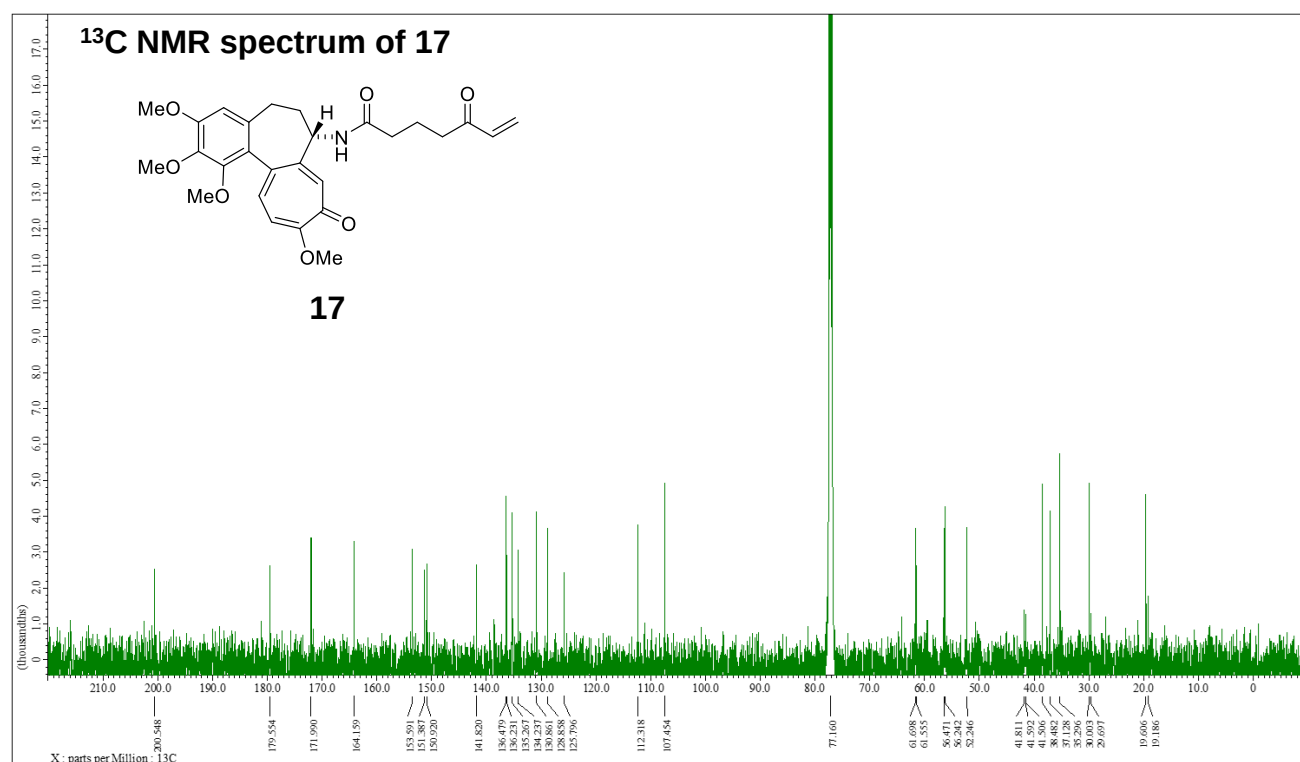
**$^1\text{H}$  NMR spectrum of 17**

**17**

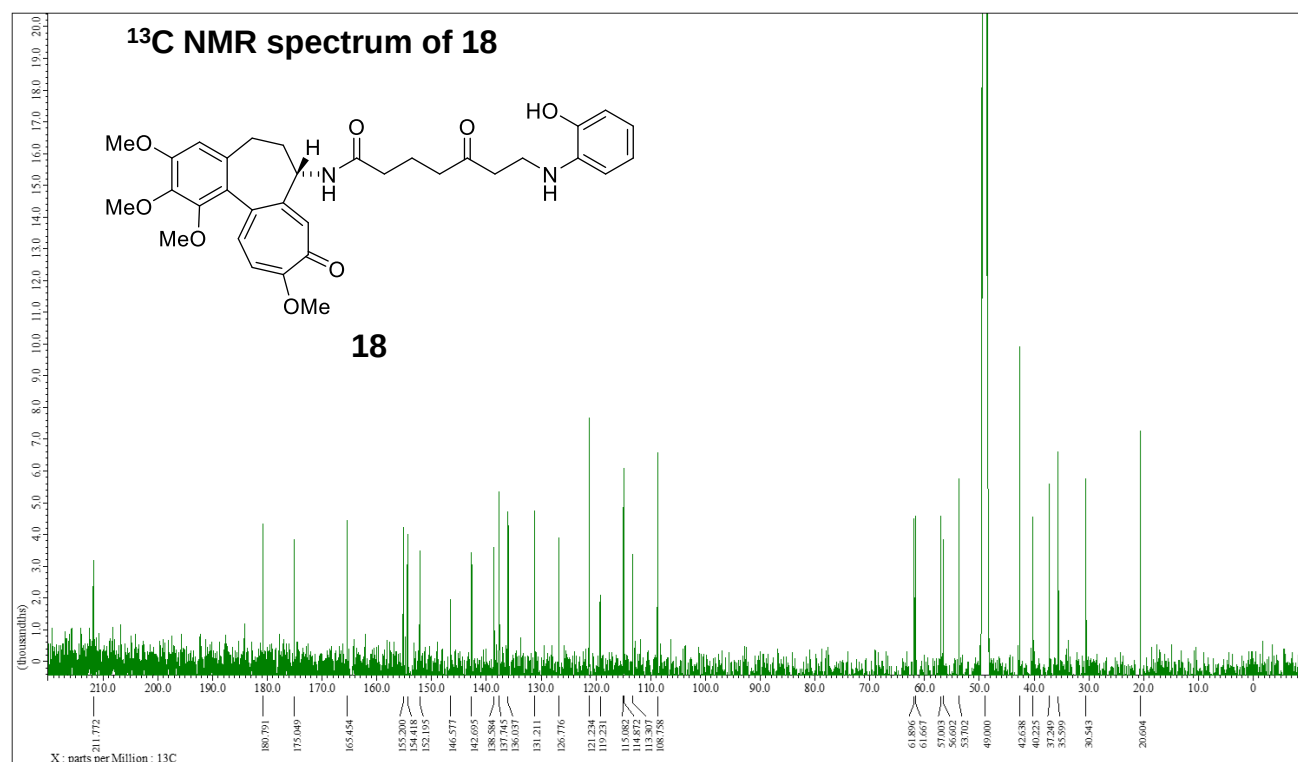
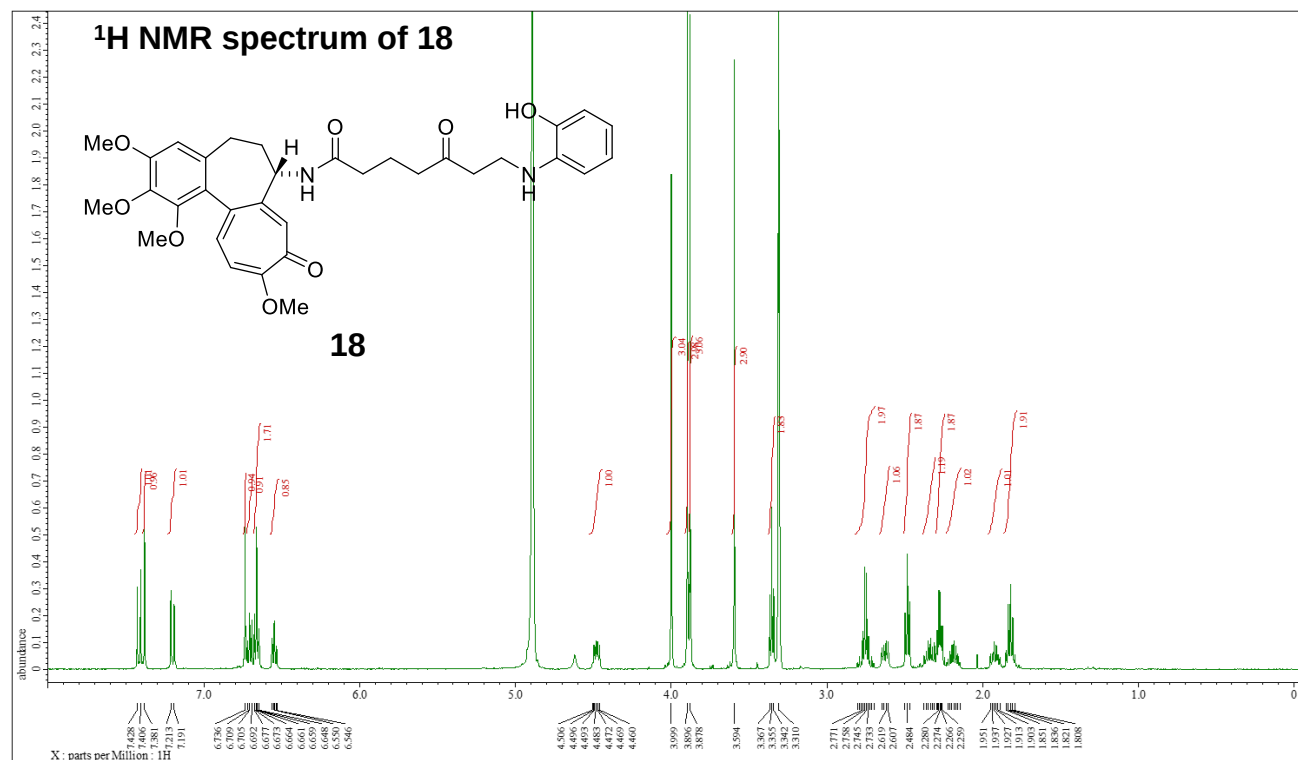
Chemical structure of 17: COc1ccc2c(c1)ccc3c2c(=O)ccc3C[C@H]4C=CC(=C(C=C4)OC)OC

Integration values (from left to right): 0.07, 0.08, 0.98, 0.99, 0.06, 0.06, 0.82, 0.82, 1.00, 3.98, 3.99, 3.65, 2.96, 1.56, 1.35, 0.96, 2.88, 1.98, 0.93.

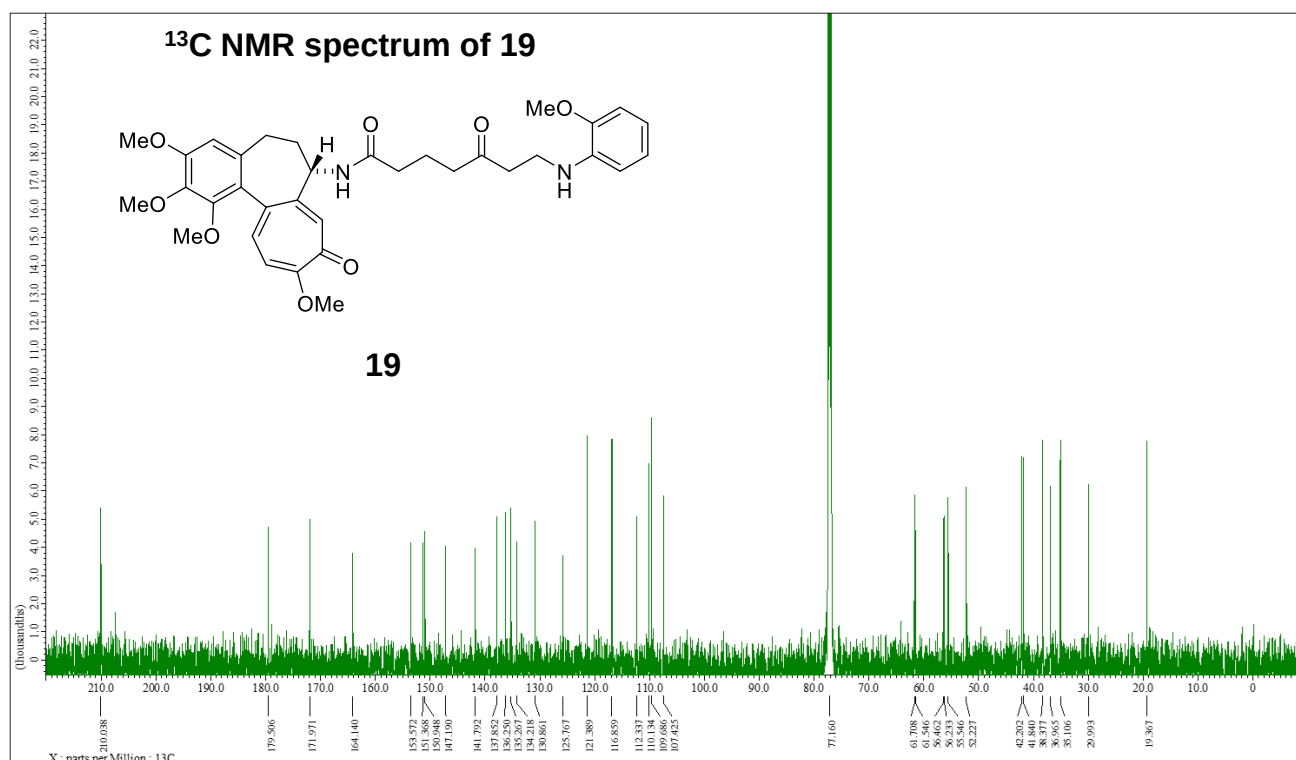
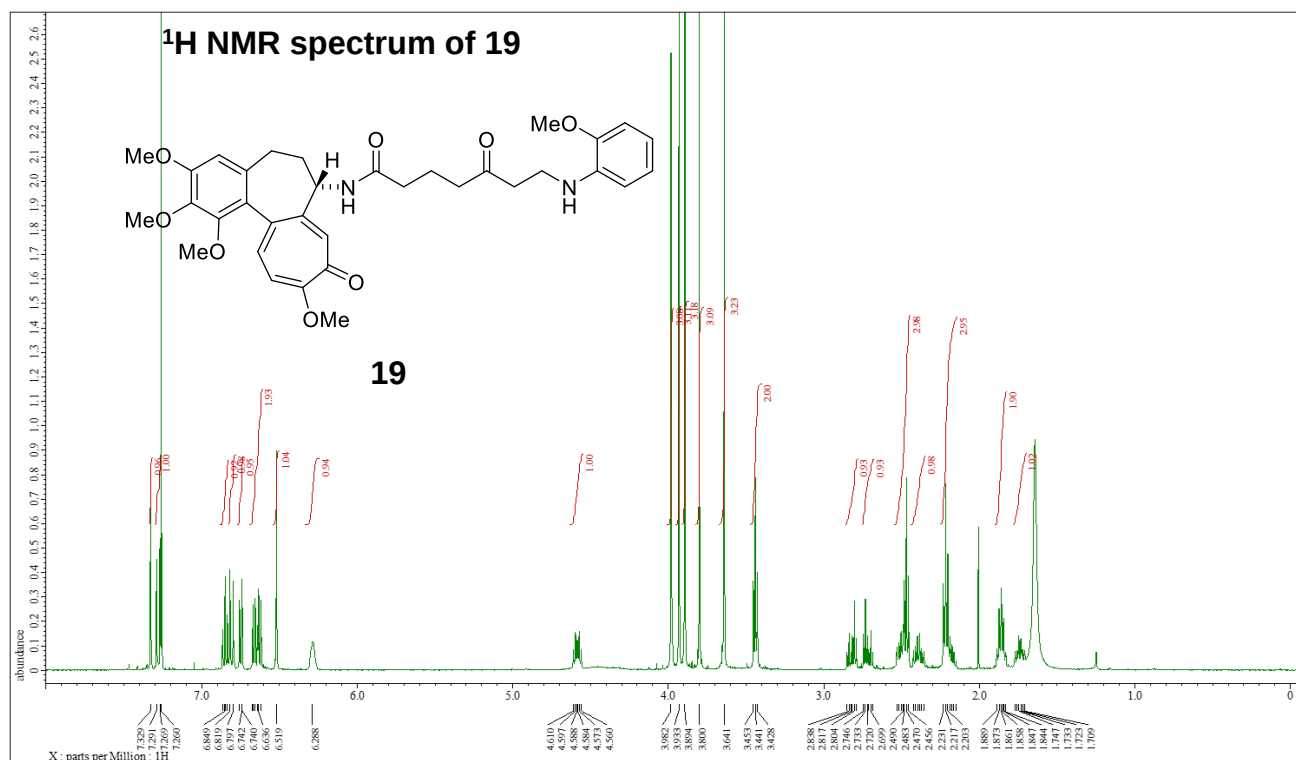
Peak list (ppm): 7.353, 7.297, 7.276, 7.260, 6.820, 6.798, 6.529, 6.336, 6.315, 6.251, 6.230, 6.216, 5.851, 5.830, 5.811, 5.802, 4.641, 4.628, 4.618, 4.604, 4.591, 3.985, 3.983, 3.989, 3.652, 2.654, 2.652, 2.650, 2.648, 2.624, 2.511, 2.408, 2.395, 2.374, 2.274, 2.264, 2.259, 2.239, 2.234, 2.224, 2.017, 1.944, 1.944, 1.917, 1.902, 1.885, 1.883, 1.811, 1.799, 1.787.



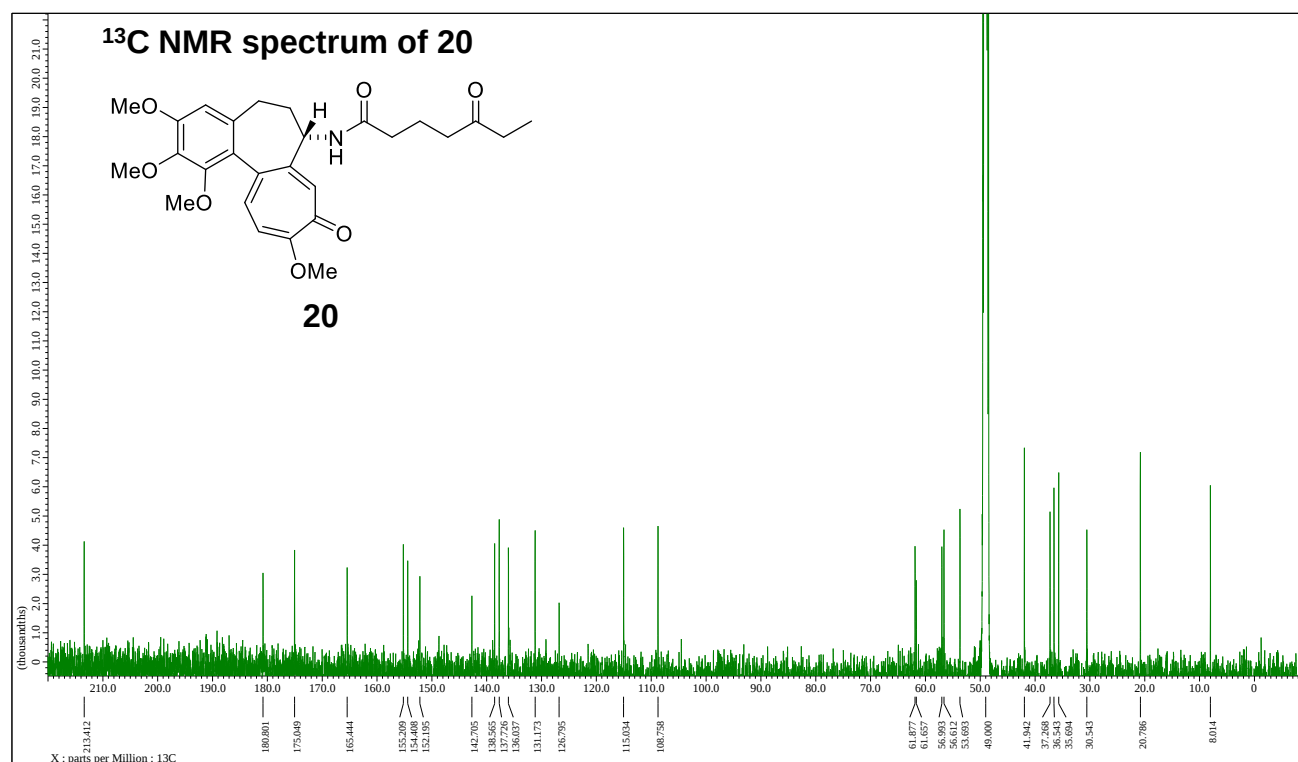
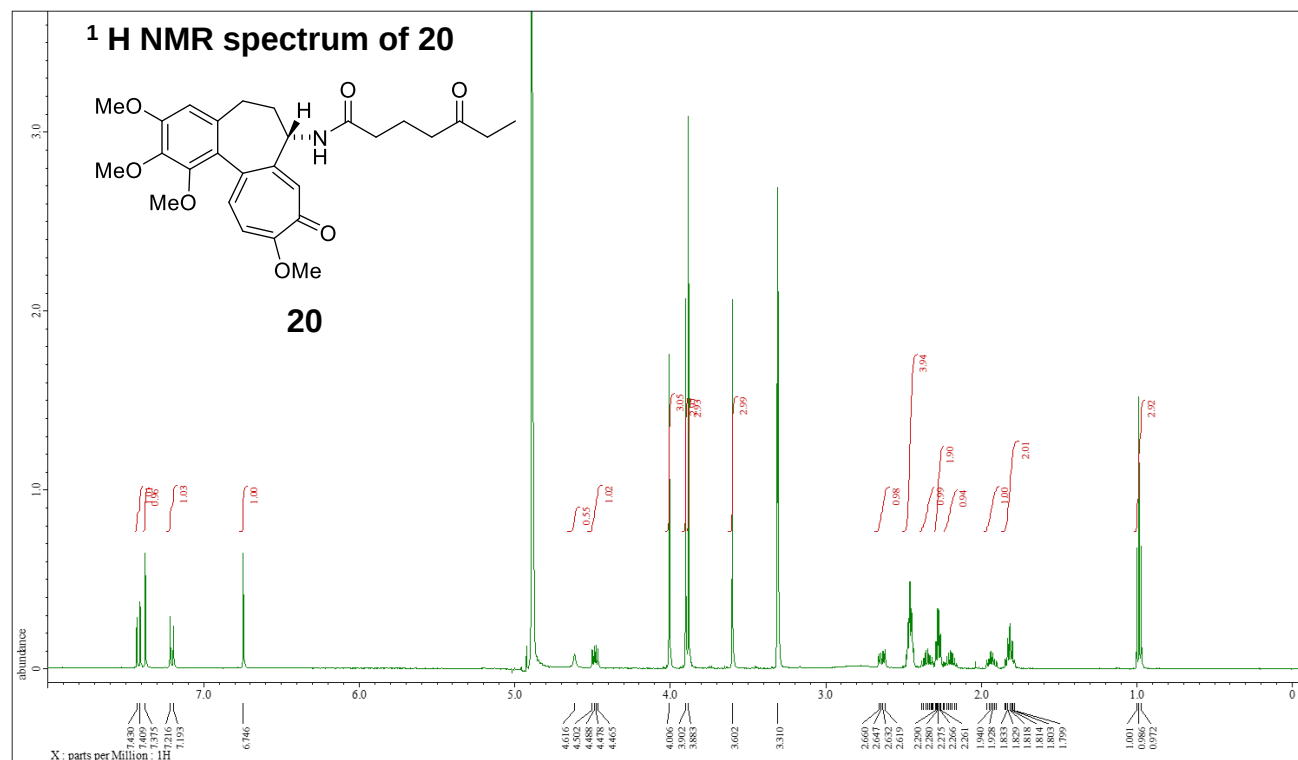
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



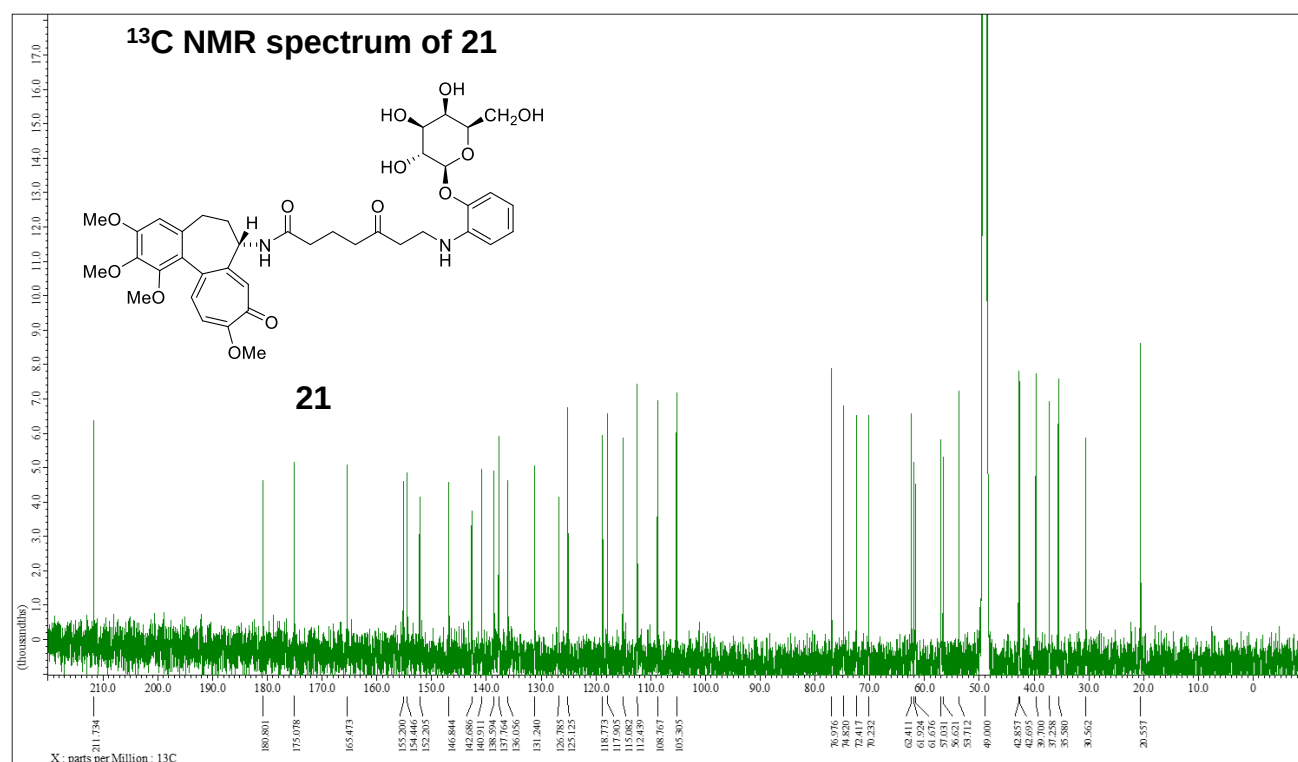
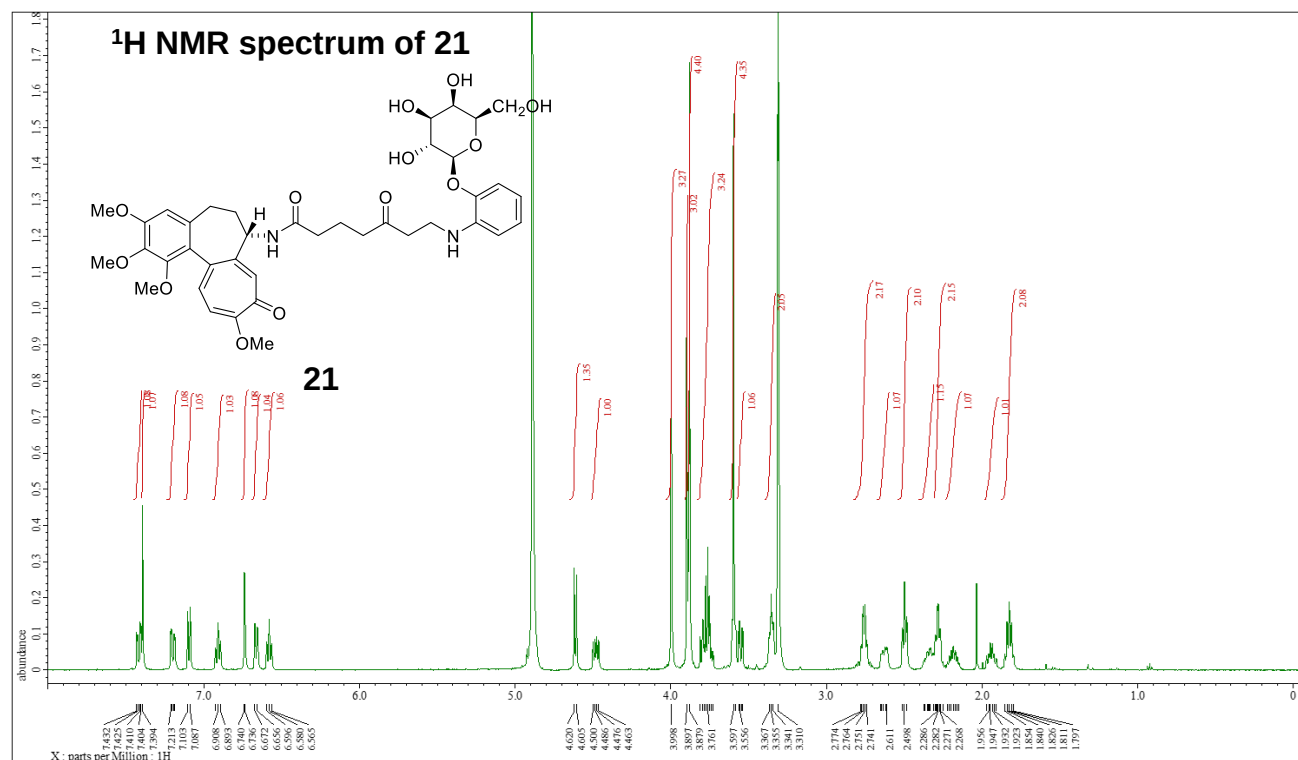
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



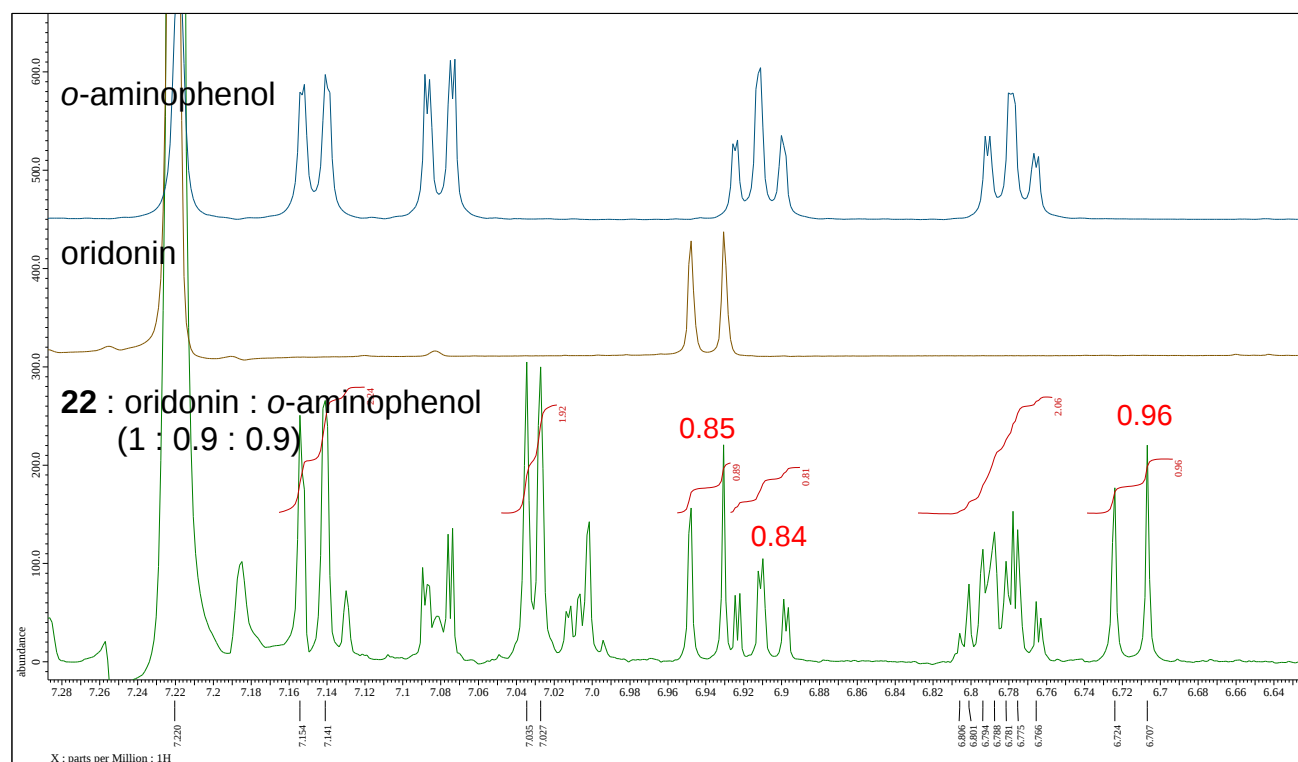
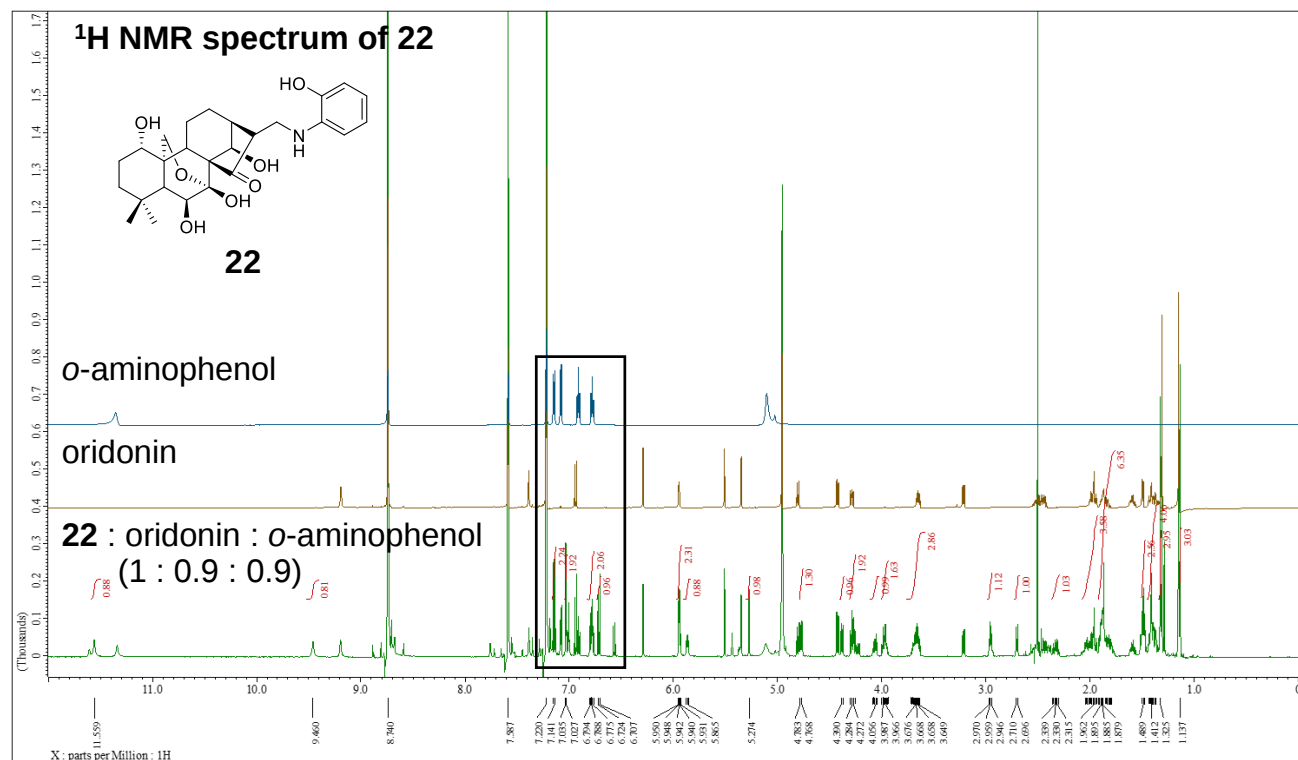
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

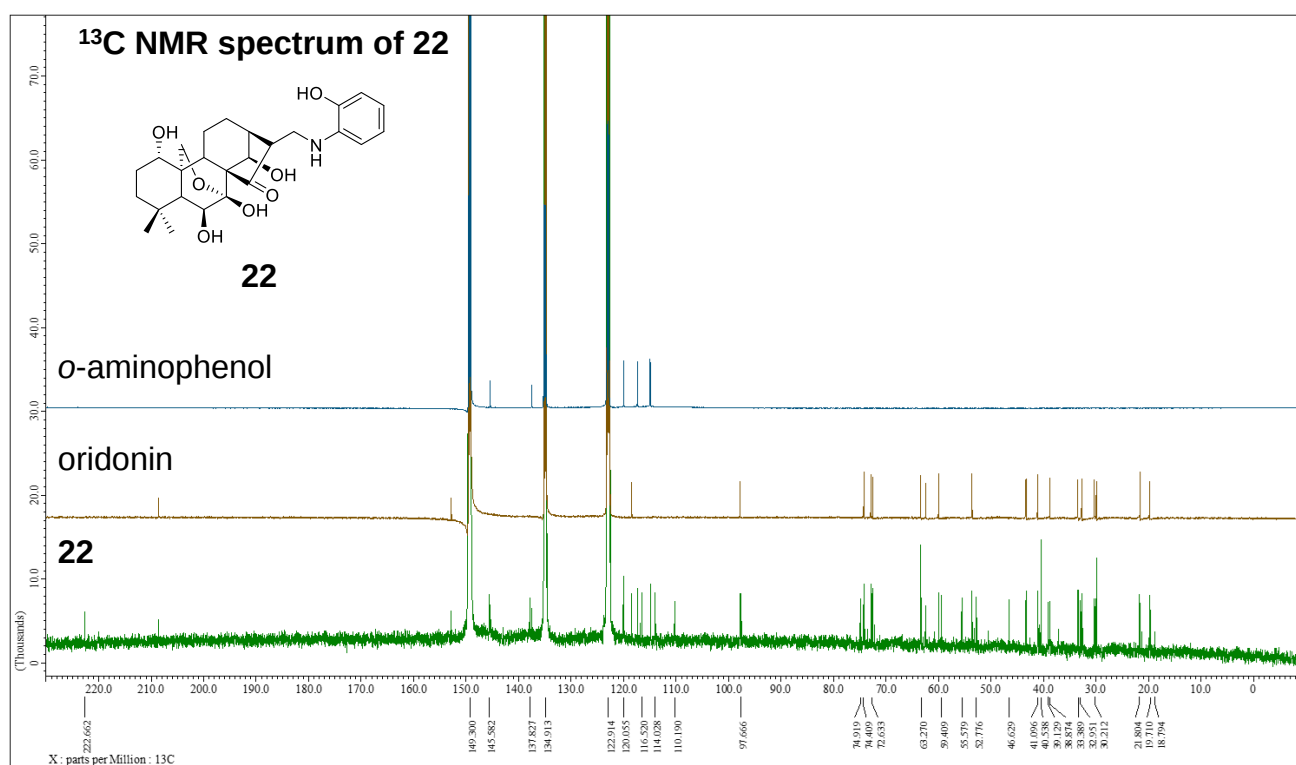


$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

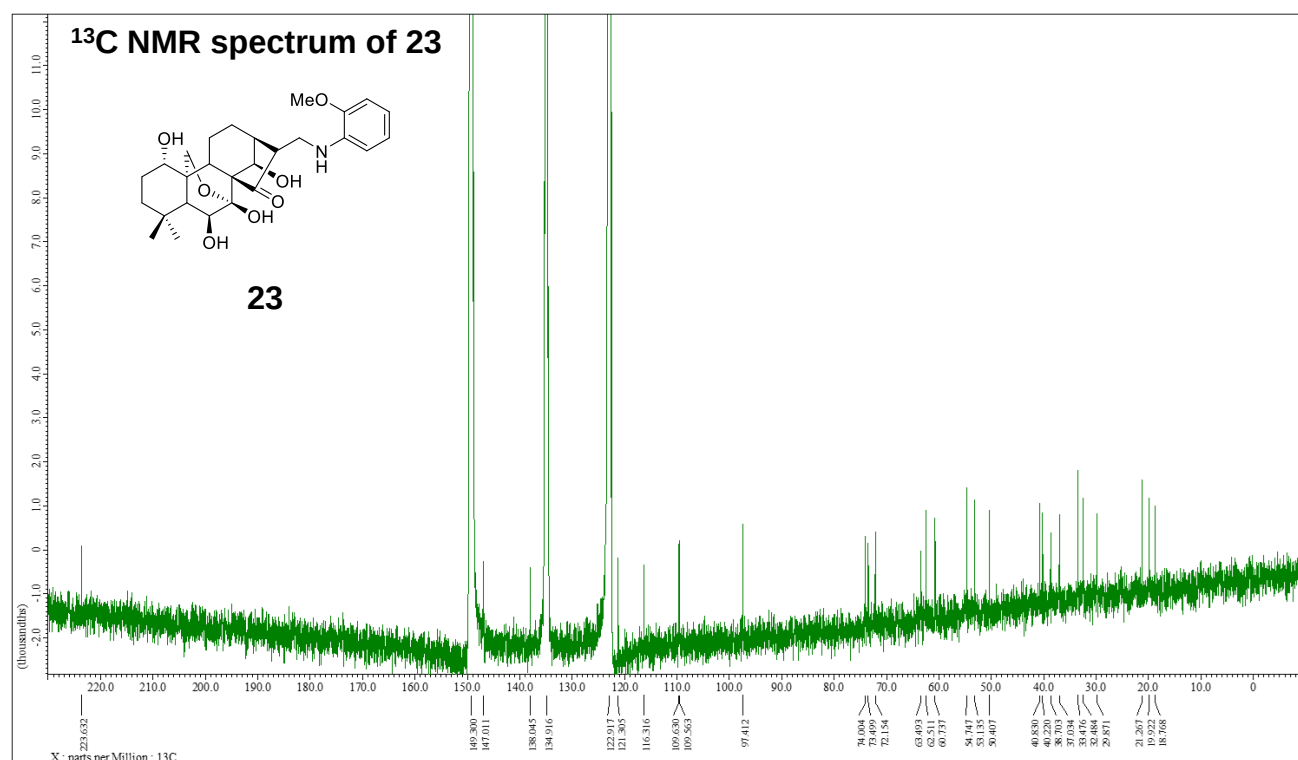
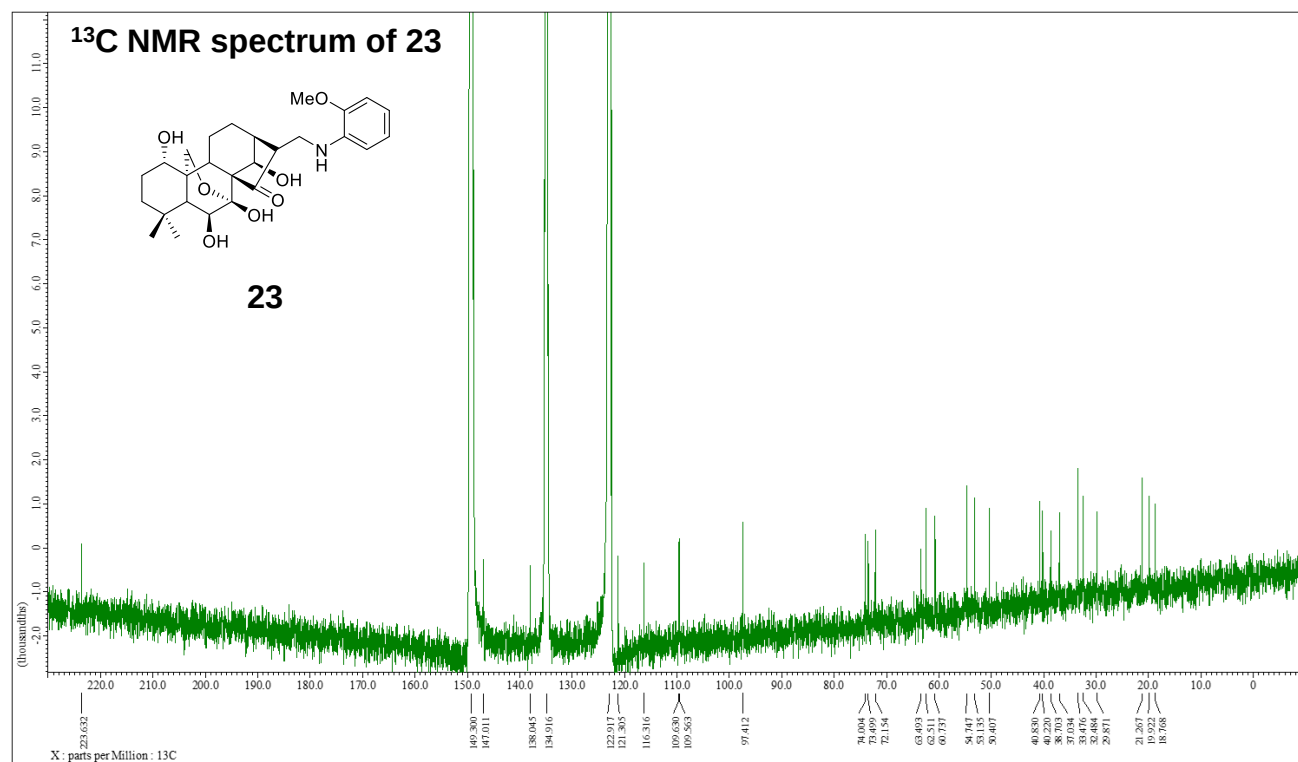


$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )

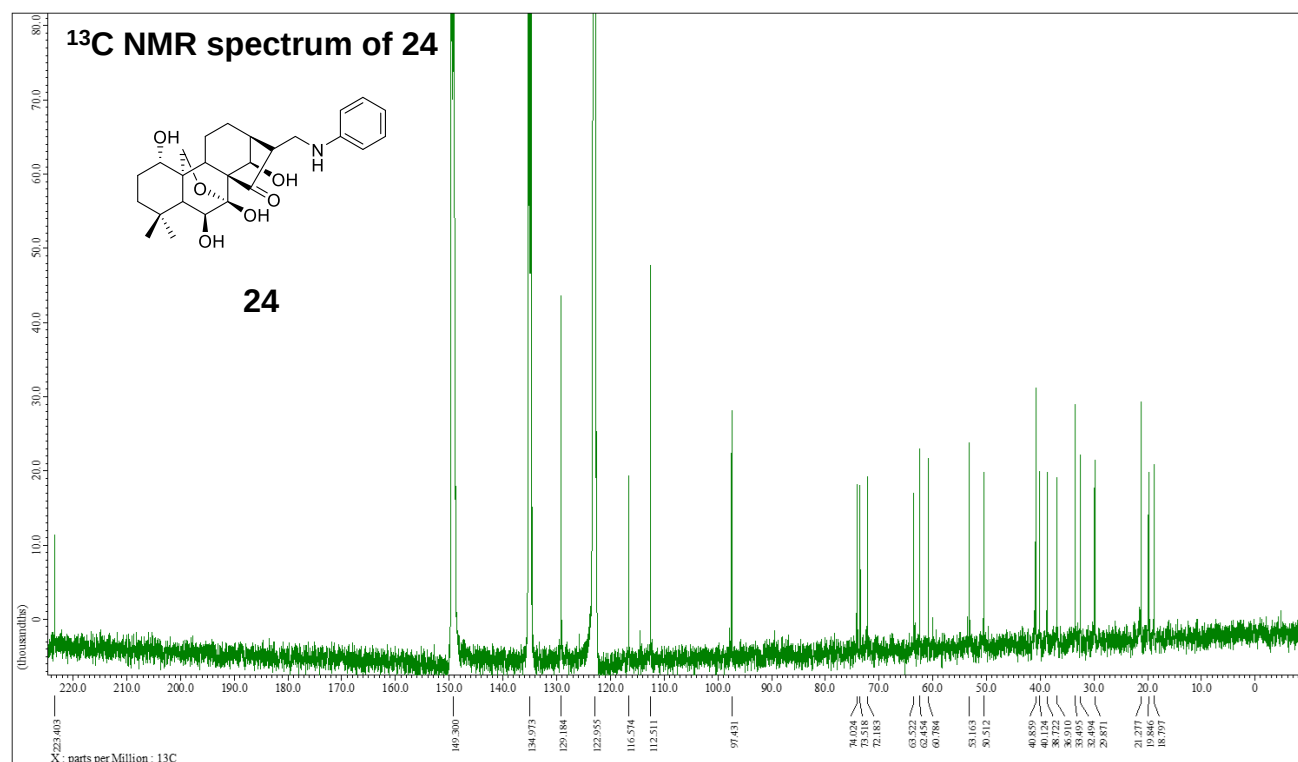
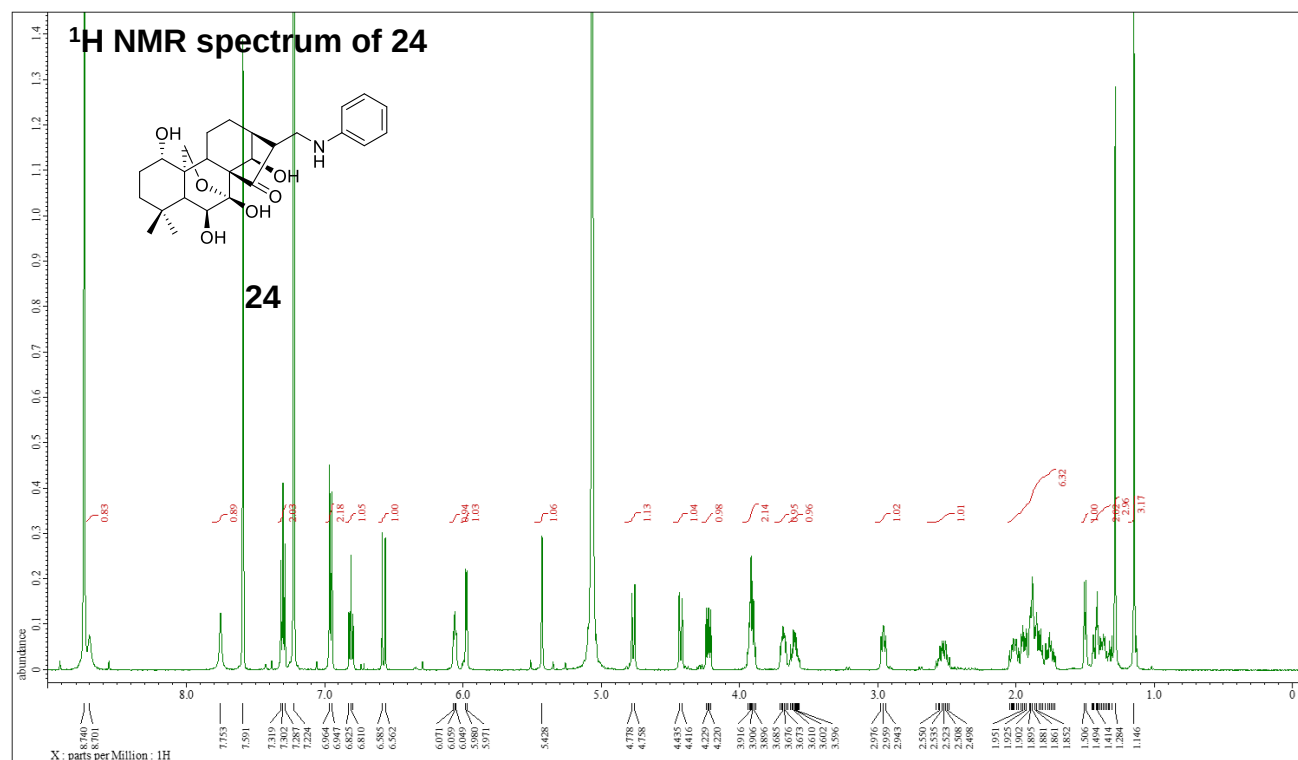


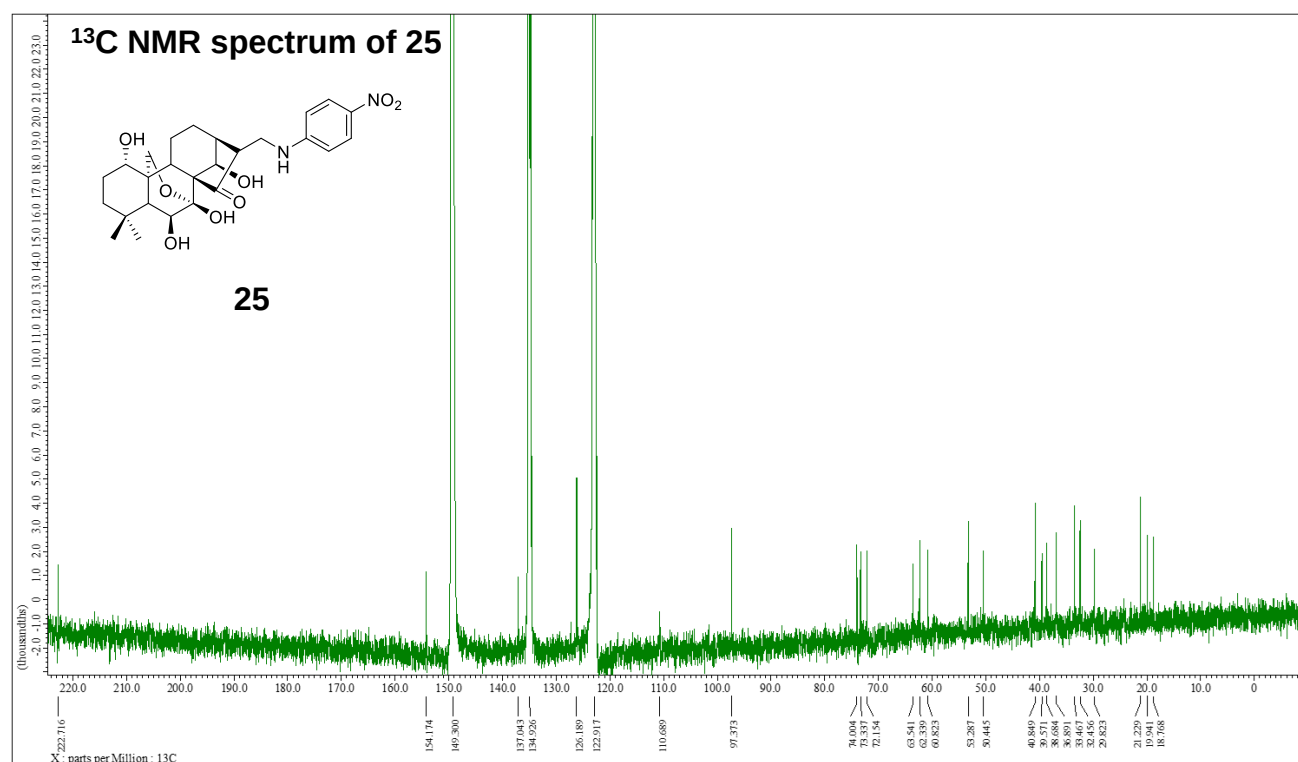


$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )

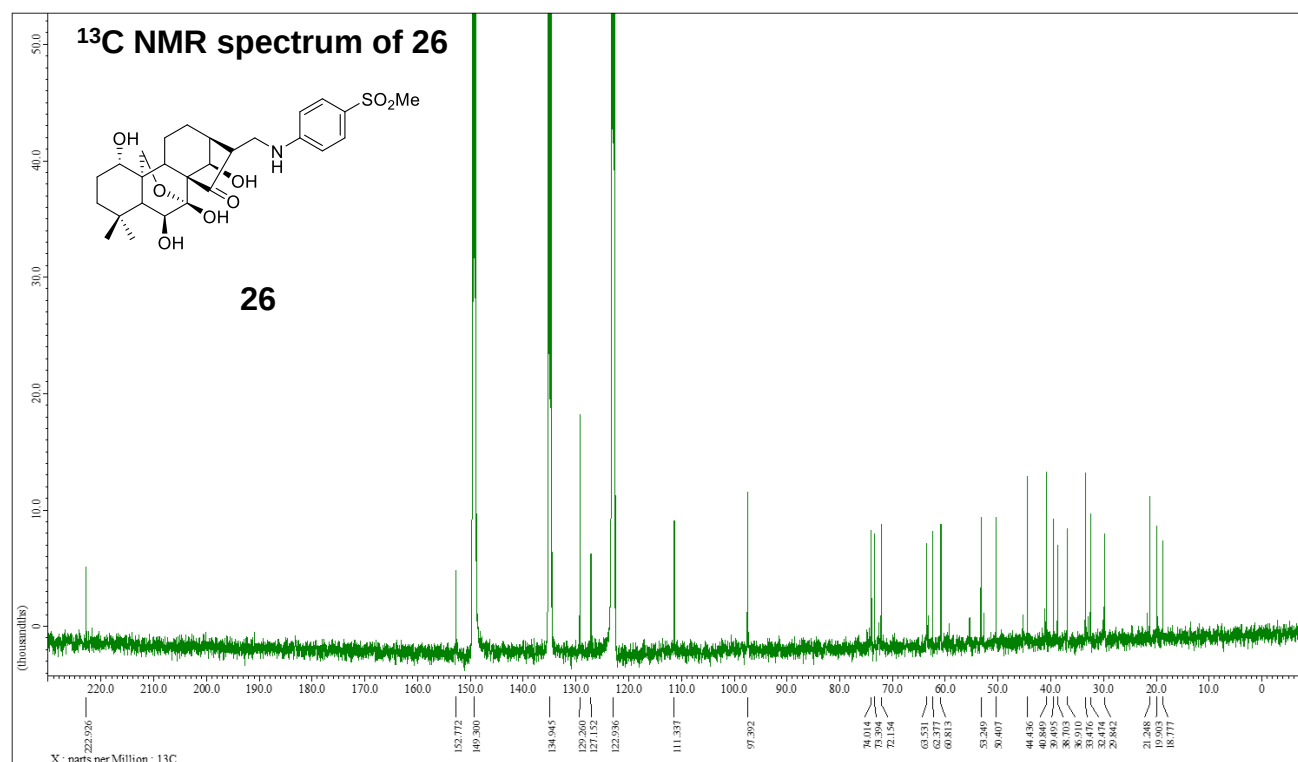
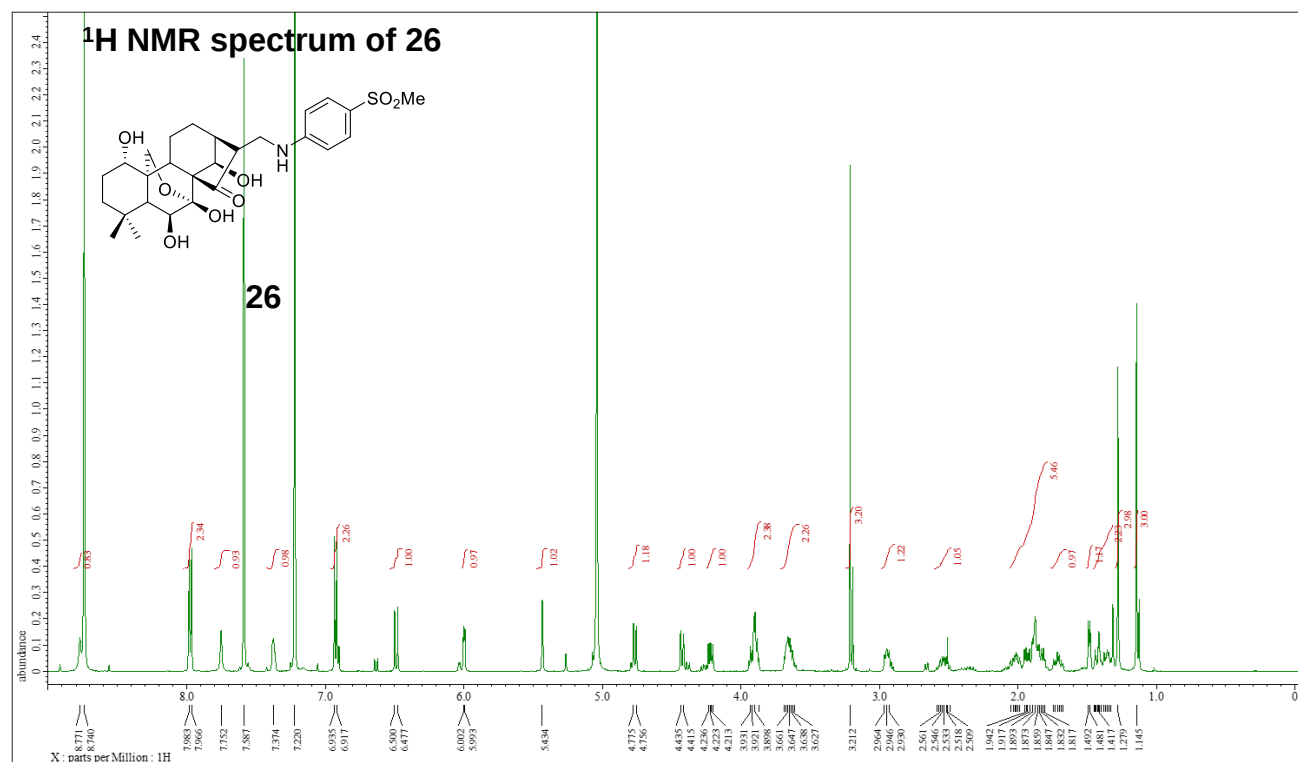


$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )

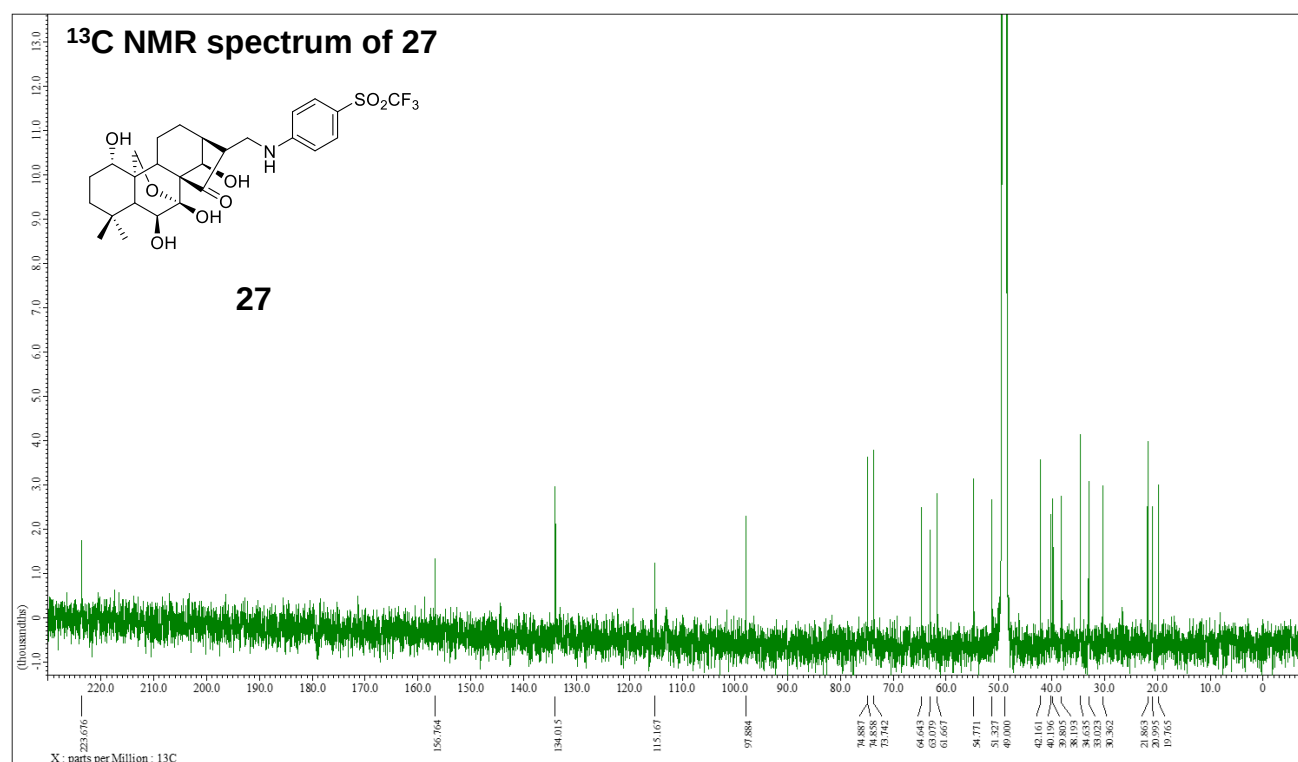
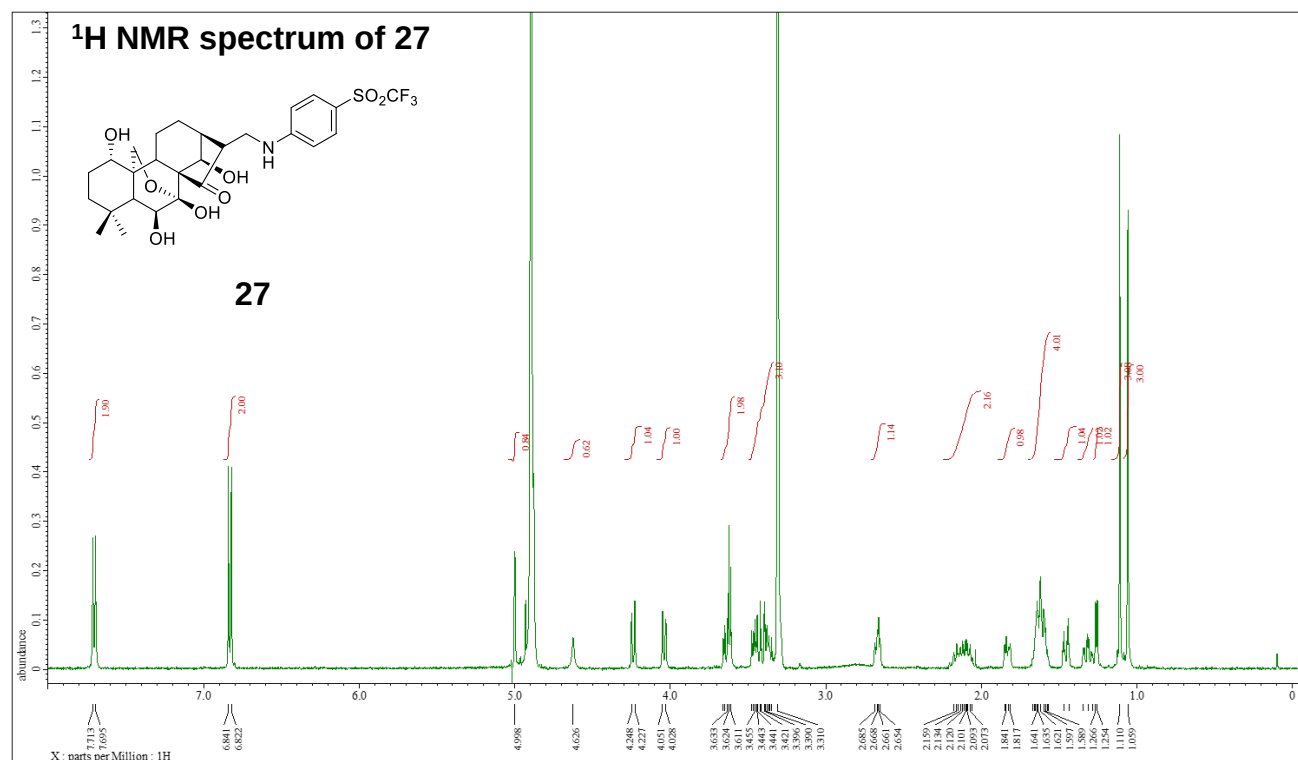


[illegible]

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



## 総括

本研究では、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 が産生する天然有機化合物 saccharothriolide B (STL B, **2**) が水溶液中で *o*-aminophenol を脱離し、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 presaccharothriolide X (preSTL X, **1**) を放出する現象に着目して、簡素な構造を持つ化合物群を用いた反応機構の検証、環境依存的な放出方法の検討、そして生物活性物質への適用を試みた。化合物 **1** に *o*-anisidine や anthranilic acid が付加した化合物からは preSTL X (**1**) の放出は見られないため、*o*-aminophenol を用いることで反応性の高い  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を一時的に保護し、疾患部位で  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニルを有する薬剤を放出する DDS の開発に応用できると期待した。

### 1. *o*-Aminophenol が脱離する条件の検討

第 1 章では、STL B (**2**) で観察された *o*-aminophenol の脱離、および  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の放出について、単純な構造を有する化合物を用いて、その再現性を確認した。その結果、*o*-aminophenol の脱離反応は STL B (**2**) のような 10 員環マクロライド以外の直鎖状分子でも進行することが確認された。

さらにケト、エステル、およびアミド型の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物を用いて、 $^1\text{H}$ NMR 測定や HPLC による定量解析を行った結果、本反応はケト型の *o*-aminophenol 付加体 (**3**) でのみ観測された。反応溶媒を検討した結果、プロトン性溶媒選択的に反応は進行した。また、同じプロトン性溶媒についても、水は MeOH より高い反応効率をもたらすことが明らかになった。次に、*o*-aminophenol のフェノール性水酸基は、メトキシ基と比較して  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の放出を優位に促進することが明らかになった。一連の結果から反応機構を考察した結果、反応が優位に進行した原因は、*o*-aminophenol の負電荷を帯びたフェノール性水酸基が、カルボニル  $\alpha$  位のプロトンを引き抜くことによってもたらされたと考えられた。

さらに、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル部位について *o*-aminophenyl- $\beta$ -galactoside (**15**) で保護した化合物 **16** を合成し、より環境応答的な脱離を試みた。すると、 $\beta$ -galactosidase 存在下において *o*-aminophenol と  $\beta$ -galactose 間のグリコシド結合が加水分解されてフェノール性水酸基が露出し、*o*-aminophenol 付加体 (**3**) が生成、それに続いて *o*-aminophenol が脱離し、dodec-1-en-3-one (**6**) へと変換されることが示唆された。

## 2. 生物活性物質への適用

第 2 章では、腫瘍細胞に対して毒性を示す天然有機化合物 colchicine と oridonin を用いて、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の一時的保護と脱離がもたらす生物活性への影響を評価した。

### 2.1 Colchicine

最初に、微小管重合阻害剤として上市されているイヌサフラン由来天然有機化合物の colchicine を対象とした。まず、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を導入した新規誘導体 (17) を合成し、17 の *o*-aminophenol 付加体 (18) および *o*-anisidine 付加体 (19) も別途合成した。HPLC による定量試験の結果、*o*-aminophenol 付加体 (18) は PBS バッファー中で化合物 17 を放出し、その反応は付加体 19 より速やかに進行することを確認した。

次に、生物活性について微小管重合阻害活性試験と細胞毒性評価により検証した。本研究で合成した新規  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物である 17 は colchicine 同様に微小管重合阻害作用を示した。しかし、HT29 細胞に対する増殖抑制効果は colchicine ( $IC_{50} = 5.4 \text{ nM}$ ) と比べて著しく低下した ( $IC_{50} \geq 400 \text{ nM}$ )。HPLC を用いた PBS バッファーと培地溶液中での安定性を比較した結果、化合物 17 の細胞毒性の低下は、培地中での低い安定性、すなわち培地由来のタンパク質成分などとの非特異的な結合に起因する可能性が示唆された。実際、化合物 17 の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル部位へ *o*-aminophenol を導入した付加体 18 は、化合物 17 よりも高い細胞増殖抑制効果 ( $IC_{50} = 153.1 \text{ nM}$ ) を示した。PBS バッファー中で付加体 18 が化合物 17 を放出した結果と併せて、*o*-aminophenol は細胞培養液中で脱離するまで  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を保護している可能性が示唆された。

続いて、疾患部位応答的な  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 (17) の放出を指向し、第 1 章で用いた *o*-aminophenyl- $\beta$ -galactoside (15) による保護を化合物 17 に施した  $\beta$ -galactose-*o*-aminophenol 付加体 (21) を合成した。HPLC による定量試験の結果、糖付加体 21 は PBS 溶液中で安定に存在する一方、 $\beta$ -galactosidase 存在下では酵素濃度依存的に減少し、*o*-aminophenol 付加体 (18) を経て化合物 17 へと変換された。これより、糖付加体 21 は  $\beta$ -galactosidase 応答的に化合物 17 を放出することが明らかになった。生物活性に関しても、非酵素存在下では糖付加体 21 の HT29 細胞に対する増殖抑制効果は低い ( $IC_{50} \geq 400 \text{ nM}$ ) が、 $\beta$ -galactosidase 添加により活性は向上 ( $IC_{50} = 137 \text{ nM}$ ) し、微小管重合阻害能も発揮することが判明した。この結果から、 $\beta$ -galactosidase 添加によって放出された化合物 17 が活性本体として生物活性を発揮し、糖付加体 21 はその前駆体、すなわちプロドラッグ様化合物として機能していると考えられた。

## 2.2 Oridonin

Dodec-1-en-3-one (**6**) と colchicine 誘導体を用いた実験から、*o*-aminophenol は *o*-anisidine より速く脱離することが明らかとなった。この結果から、保護基として用いる芳香環への置換基導入によって脱離速度の制御が可能か検討し、同時に生物活性発現への影響も評価した。本実験では、生物活性の発現時間が colchicine より短く、かつ  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造が細胞毒性の発現に寄与している天然有機化合物 oridonin を用いた。

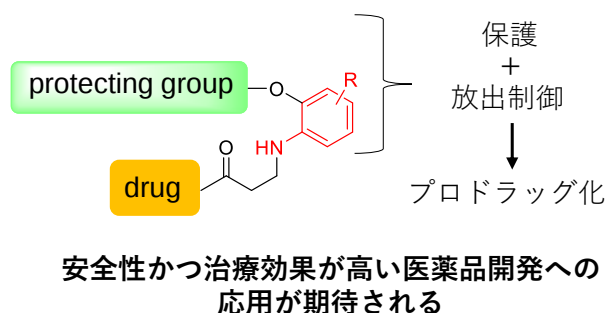
最初に *o*-aminophenol 付加体 (**22**) および *o*-anisidine 付加体 (**23**) を合成したところ、**22** は精製後の  $^1\text{H}$  NMR 測定時には既に *o*-aminophenol が脱離していた。これにより、dodec-1-en-3-one (**6**) や colchicine 誘導体と比較して、oridonin は脱離反応がより速く進行することが明らかになった。そこで、第 1 章で考察した反応機構から、保護基に含まれるアミノ基の  $\text{pK}_a$  が低い電子吸引基の導入による脱離速度の低下を指向した。

新たにアニリン、*p*-nitroaniline、*p*-(methylsulfonyl) aniline および *p*-[(trifluoromethyl)sulfonyl] aniline を oridonin に導入した各種誘導体 (**24-27**) を合成し、水溶液中での脱離効率を HPLC で定量した。その結果、他の誘導体が 2 日間で最終的に 30-50% oridonin を放出する一方で、付加体 **27** からの oridonin の放出は約 10% であった。15-48 時間の各時間帯で評価した HT29 細胞に対する細胞増殖抑制効果も、付加体 **27** の活性発現は他の誘導体と比較して遅延した。付加するアニリン類の  $\text{pK}_a$  値が、必ずしも脱離速度や細胞毒性の強さに反映される訳ではなかったが、アニリン芳香環上への置換基導入は、生物活性物質の放出速度と活性発現時間に影響を与える可能性が示唆された。

### 3. まとめ

本研究では、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 が産生する天然有機化合物 saccharothriolide B (STL B, 2) において *o*-aminophenol が示す  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の保護現象が、dodec-1-en-3-one (6)、直鎖  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニルを導入した colchicine 誘導体、および oridonin にて再現可能であることを示した。このうち、oridonin に対する *o*-aminophenol の保護は、高い脱離速度を示したが、アニリン芳香環への各種置換基導入による反応速度の抑制に成功した。

これらの結果から、*o*-aminophenol 上のフェノール性水酸基に対し、治療標的組織に応じた保護基を適用することで、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の高い反応性を抑え、かつ各種疾患への選択的な薬剤の放出が期待できる。また、芳香環上への置換基導入による retro-Michael 反応の速度の制御で、生物活性発現時間の調節が期待できる (Figure 39)。今後、本手法をより発展させることで、これまで高い反応性ゆえにその薬理活性を正しく評価できていなかった  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物を再評価する手段としての展開が期待できる。加えて正常組織に対する毒性への懸念から、腫瘍細胞に対する強力な毒性を示しながらも医薬品に実用化できなかった  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物についても、本手法はプロドラッグ化を実現する新規手段となり得ると考えられる。



**Figure. 39** 本研究のまとめ及び新規プロドラッグ化の展望. フェノール性水酸基に対する疾患部位特異的な反応性官能基による保護 (緑色部位) で脱離選択性の向上、アニリン芳香環上への置換基導入 (赤色部位) で脱離速度の制御を検討した。これらの修飾は、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の保護と環境応答型の放出を指向したプロドラッグ化法として、安全性かつ治療効果の高い新規医薬品開発への展開が期待できる。

## 参考文献

- (1) Koehn, F. E.; Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206-220.
- (2) Gersch, M.; Kreuzer, J.; Sieber, S. A. Electrophilic natural products and their biological targets. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 659-682.
- (3) Rastelli, G.; Rosenfeld, R.; Reid, R.; Santi, D. V. Molecular modeling and crystal structure of ERK2-hypothemycin complexes. *J. Struct. Biol.* **2008**, *164*, 18-23.
- (4) Kudo, N.; Matsumori, N.; Taoka, H.; Fujiwara, D.; Schreiner, E. P.; Wolff, B.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9112-9117.
- (5) Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307-317.
- (6) Shindo, N.; Ojida, A. Recent progress in covalent warheads for in vivo targeting of endogenous proteins. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *47*, 116386-116397.
- (7) Remsberg, J. R.; Suci, R. M.; Zambetti, N. A.; Hanigan, T. W.; Firestone, A. J.; Inguva, A.; Long, A.; Ngo, N.; Lum, K. M.; Henry, C. L.; Richardson, S. K.; Predovic, M.; Huang, B.; Dix, M. M.; Howell, A. R.; Niphakis, M. J.; Shannon, K.; Cravatt, B. F. ABHD17 regulation of plasma membrane palmitoylation and N-Ras-dependent cancer growth. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 856-864.
- (8) Cuesta, A.; Wan, X.; Burlingame, A. L.; Taunton, J. Ligand conformational bias drives enantioselective modification of a surface-exposed lysine on Hsp90. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 3392-3400.
- (9) Solca, F.; Dahl, G.; Zoephel, A.; Bader, G.; Sanderson, M.; Klein, C.; Kraemer, O.; Himmelsbach, F.; Haaksma, E.; Adolf, G. R. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *343*, 342-350.
- (10) Pan, Z.; Scheerens, H.; Li, S.-J.; Schultz, B. E.; Sprengeler, P. A.; Burrill, L. C.; Mendonca, R. V.; Sweeney, M. D.; Scott, K. C. K.; Grothaus, P. G.; Jeffery, D. A.; Spoerke, J. M.; Honigberg, L. A.; Young, P. R.; Dalrymple, S. A.; Palmer, J. T. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 58-61.
- (11) Eskens, F. A.; Mom, C. H.; Planting, A. S.; Gietema, J. A.; Amelsberg, A.; Huisman, H.; Doorn, L.; Burger, H.; Stopfer, P.; Verweil, J.; de Vries, E. G. E. A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2)

- tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer*. **2008**, *98*, 80-85.
- (12) Advani, R. H.; Buggy, J. J.; Sharman, J. P.; Smith, S. M.; Boyd, T. E.; Grant, B.; Kolibaba, K. S.; Furman, R. R.; Rodriguez, S.; Chang, B. Y.; Sukbuntherng, J.; Izumi, R.; Hamdy, A.; Hedrick, E.; Fowler, N. H. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 88-94.
- (13) Shindo, N.; Fuchida, H.; Sato, M.; Watari, K.; Shibata, T.; Kuwata, K.; Miura, C.; Okamoto, K.; Hatsuyama, Y.; Tokunaga, K.; Sakamoto, S.; Morimoto, S.; Abe, Y.; Shiroishi, M.; Caaveiro, J. M. M.; Ueda, T.; Tamura, T.; Matsunaga, N.; Nakao, T.; Koyanagi, S.; Ohdo, S.; Yamaguchi, Y.; Hamachi, I.; Ono, M.; Ojida, A. Selective and reversible modification of kinase cysteines with chlorofluoroacetamides. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 250-258.
- (14) Bradshaw, J. M.; McFarland, J. M.; Paavilainen, V. O.; Bisconte, A.; Tam, D.; Phan, V. T.; Romanov, S.; Finkle, D.; Shu, J.; Patel, V.; Ton, T.; Li, X.; Loughhead, D. G.; Nunn, P. A.; Karr, D. E.; Gerritsen, M. E.; Funk, J. O.; Owens, T. D.; Verner, E.; Brameld, K. A.; Hill, R. J.; Goldstein, D. M.; Taunton, J. Prolonged and tunable residence time using reversible covalent kinase inhibitors. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 525-531.
- (15) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
- (16) Mathijissen, R. H. J.; Alphen, R. J.V.; Verweij, J.; Loos, W. J.; Nooter, K.; Stoter, G.; Sparreboom, A. Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11). *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2182-2194.
- (17) Fox, B. M.; Vroman, J. A.; Fanwick, P. E.; Cushman, M. Preparation and evaluation of sulfide derivatives of the antibiotic brefeldin A as potential prodrug candidates with enhanced aqueous solubilities. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3915-3924.
- (18) Hexum, J. K.; Becker, C. M.; Kampera, A. M.; Ohlfest, J. R.; Largaespada, D. A.; Harki, D. A. Parthenolide prodrug LC-1 slows growth of intracranial glioma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2493-2495.
- (19) Wang, Q.; Song, F.; Xiao, X.; Huang, P.; Li, L.; Monte, A.; Abdel-Mageed, W. M.; Wang, J.; Guo, H.; He, W.; Xie, F.; Dai, H.; Liu, M.; Chen, C.; Xu, H.; Liu, M.; Piggott, A. M.; Liu, X.; Capon, R. J.; Zhang, L. Abyssomicins from the South China Sea deep-sea sediment *Verrucosispora* sp.: Natural thioether Michael addition adducts as antitubercular prodrugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1231-1234.

- (20) Lu, S.; Nishimura, S.; Hirai, G.; Ito, M.; Kawahara, T.; Izumikawa, M.; Sodeoka, M.; Shin-ya, K.; Tsuchida, T.; Kakeya, H. Saccharothriolides A-C, novel phenyl-substituted 10-membered macrolides isolated from a rare actinomycete *Saccharothrix* sp. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8074-8077.
- (21) Lu, S.; Nishimura, S.; Ito, M.; Tsuchida, T.; Kakeya, H. Isolation and structure elucidation of cytotoxic saccharothriolides D to F from a rare actinomycete *Saccharothrix* sp. and their structure-activity relationship. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1891-1895.
- (22) Lu, S.; Nishimura, S.; Ito, M.; Kato, T.; Kakeya, H. Precursor-directed in situ synthesis of saccharothriolides G and H by the actinomycete *Saccharothrix* sp. A1506. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 718-720.
- (23) Lu, S.; Nishimura, S.; Takenaka, K.; Ito, M.; Kato, T.; Kakeya, H. Discovery of presaccharothriolide X, a retro-Michael reaction product of saccharothriolide B, from the rare actinomycete *Saccharothrix* sp. A1506. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 4406-4410.
- (24) Barf, T.; Kaptein, A. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6243-6262.
- (25) De, K.; Legros, J.; Crousse, B.; Bonnet-Delpon, D. Solvent-promoted and-controlled aza-Michael reaction with aromatic amines. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6260-6265.
- (26) Tramontini, M.; Angiolini, L. Further advances in the chemistry of mannich bases. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 1791-1837.
- (27) Takenaka, K.; Kaneko, K.; Takahashi, N.; Nishimura, S.; Kakeya, H. Retro-aza-Michael reaction of an *o*-aminophenol adduct in protic solvents inspired by natural products. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *35*, 116059-116064.
- (28) Vigroux, A.; Bergon, M.; Zedde, C. Cyclization-activated prodrugs: *N*-(Substituted 2-hydroxyphenyl and 2-hydroxypropyl)carbamates based on ring-opened derivatives of active benzoxazolones and oxazolidinones as mutual prodrugs of acetaminophen. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3983-3994.
- (29) Walther, R.; Rautio, J.; Zelikin, A. N. Prodrugs in medicinal chemistry and enzyme prodrug therapies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *118*, 65-77.
- (30) Chatterjee, S. K.; Bhattacharya, M.; Barlow, J. J. Glycosyltransferase and glycosidase activities in ovarian cancer patients. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 1943-1951.
- (31) Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888-4894.
- (32) Doura, T.; Takahashi, K.; Ogra, Y.; Suzuki, N. Combretastatin A4- $\beta$ -galactosyl conjugates for ovarian cancer prodrug monotherapy. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 211-214.

- (33) Nonoo, R. H.; Armstrong, A.; Mann, D. J. Kinetic template-guided tethering of fragments. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 2082-2086.
- (34) Wei, J.; Shi, J.; Zhang, J.; He, G.; Pan, J.; He, J.; Zhou, R.; Guo, L.; Ouyang, L. Design, synthesis and biological evaluation of enzymatically cleavable NSAIDs prodrugs derived from self-immolative dendritic scaffolds for the treatment of inflammatory diseases. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4192-4200.
- (35) Ollevier, T.; Nadeau, E. An efficient and mild bismuth triflate-catalysed three-component Mannich-type reaction *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3126-3134.
- (36) Amaike, M.; Kobayashi, H.; Shinkai, S. New organogelators bearing both sugar and cholesterol units: an approach toward molecular design of universal gelators. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 2553-2558.
- (37) Cocco, G.; Chu, D. C. C.; Pandolfi, S. Colchicine in clinical medicine. A guide for internists. *Eur. J. Intern. Med.* **2010**, *21*, 503-508.
- (38) Gracheva, I. A.; Shchegravina, E. S.; Schmalz, H-G.; Beletskaya, I. P.; Fedorov, A. Y. Colchicine alkaloids and synthetic analogues: current progress and perspectives. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 10618-10651.
- (39) Buey, R. M.; Calvo, E.; Barasoain, I.; Pineda, O.; Edler, M. C.; Matesanz, R.; Cerezo, G.; Vanderwal, C. D.; Day, B. W.; Sorensen, E. J.; López, J. A.; Andreu, J. M.; Hamel, E.; Di'az, J. F. Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 117-125.
- (40) Chang, D.-J.; Lee, S.; Jang, J.; Kim, S.-O.; Kim, W.-J.; Suh, Y.-G. Part II. Development of novel colchicine-derived immunosuppressants with improved pharmacokinetic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6750-6755.
- (41) Sazanova, E. S.; Gracheva, I. A.; Allegro, D.; Barbier, P.; Combes, S.; Svirshchevskaya, E. V.; Fedorov, A. Y. Allocolchicinoids bearing a Michael acceptor fragment for possible irreversible binding of tubulin. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, 696-706.
- (42) Ding, Z.; Ma, M.; Zhong, C.; Wang, S.; Fu, Z.; Hou, Y.; Liu, Y.; Zhong, L.; Chu, Y.; Li, F.; Song, C.; Wang, Y.; Yang, J.; Li, W. Development of novel phenoxy-diketopiperazine-type plinabulin derivatives as potent antimicrotubule agents based on the co-crystal structure. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115186-115199.
- (43) Li, D.; Han, T.; Xu, S.; Zhou, T.; Tian, K.; Hu, X.; Cheng, K.; Li, Z.; Hua, H.; Xu, J. Antitumor and antibacterial derivatives of oridonin: a main composition of dong-ling-cao. *Molecules* **2016**, *21*, 575-584.
- (44) Xu, J.; Wold, E. A.; Ding, Y.; Shen, Q.; Zhou, J. Therapeutic potential of oridonin and its analogs: From anticancer and antiinflammation to neuroprotection. *Molecules* **2018**, *23*, 474-489.

- (45) He, H.; Jiang, H.; Chen, Y.; Ye, J.; Wang, A.; Wang, C.; Liu, Q.; Liang, G.; Deng, X.; Jiang, W.; Zhou, R. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2550-2561.
- (46) Ding, Y.; Ding, C.; Ye, N.; Liu, Z.; Wold, E. A.; Chen, H.; Wild, C.; Shen, Q.; Zhou, J. Discovery and development of natural product oridonin-inspired anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 102-117.
- (47) Shen, X.; Zhao, L.; Chen, P.; Gong, Y.; Liu, D.; Zhang, X.; Dai, L.; Sun, Q.; Lou, J.; Jin, Z.; Zhang, B.; Niu, D.; Chen, C.; Qi, X.; Jia, D. A thiazole-derived oridonin analogue exhibits antitumor activity by directly and allosterically inhibiting STAT3. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 17471-17486.
- (48) Xu, S.; Luo, S.; Yao, H.; Cai, H.; Miao, X.; Wu, F.; Yang, D.-H.; Wu, X.; Xie, W.; Yao, H.; Chen, Z.-S.; Xu, J. Probing the anticancer action of oridonin with fluorescent analogues: Visualizing subcellular localization to mitochondria. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5022-5034.
- (49) Yang, J.; Liu, Y.; Xue, C.; Yu, W.; Zhang, J.; Qiao, C. Synthesis and biological evaluation of glaucocalyxin A derivatives as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 235-241.
- (50) Cui, L.; Zhong, Y.; Zhu, W. P.; Xu, Y. F.; Du, Q. S.; Wang, X.; Qian, X. H.; Xiao, Y. A new prodrug-derived ratiometric fluorescent probe for hypoxia: High selectivity of nitroreductase and imaging in tumor cell. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 928-931.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、多くの御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 掛谷秀昭教授に深く御礼申し上げます。

京都大学大学院薬学研究科 高須清誠教授、並びに大野浩章教授には本博士論文を査読していただき多くの御教示を賜りました。ここに深く御礼申し上げます。

研究の御指導および本博士論文の作成において多くの御意見賜りました京都大学大学院薬学研究科 服部明准教授に深謝いたします。

本研究の立案及び遂行におきまして、東京大学大学院農学生命科学研究科 西村慎一講師には多岐にわたる貴重な御指導・御意見を賜りました。大変厚く御礼申し上げます。

八戸工業高等学校専門学校マテリアル・バイオ工学コース 金子賢介助教には、研究全般に関する貴重な御意見を多数頂戴し、機器分析を始めとした実験の遂行にも多大なるご尽力を賜りました。この場を借りて深謝いたします。

新規誘導体の合成を始めとした、有機合成研究全般に関して御意見頂戴しました高橋伸明博士に深謝いたします。

細胞培養および実験に関してご協力いただきました、京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 野中元裕准教授に深謝いたします。

京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻システムケモセラピー・制御分子学分野 室員、および元室員の皆様の協力により、研究室における日々の実験に集中して取り組むことができました。この場を借りて深謝いたします。

最後に、これまで自身の意志を尊重し、進学及び研究を行う機会を与えると同時に、様々な面から支援してくれた家族の理解と協力に心からの敬意を表すると共に、深く感謝申し上げます。