

博士論文

論文題目 がん細胞特異的酵素活性を標的とした高選択的プロドラッグ型抗がん剤の創製

氏 名 林 健人

博士論文

がん細胞特異的酵素活性を標的とした 高選択的プロドラッグ型抗がん剤の創製

東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻

薬品代謝化学教室

林 健人

目次

第一章 序論	4
第一節 がん治療における薬物療法の役割と課題	5
第二節 酵素活性に基づく蛍光プローブの開発研究	8
第三節 酵素活性に基づくプロドラッグ型抗がん剤の開発研究	11
第四節 本研究の目的	14
第二章 キノンメチド放出型プロドラッグシステムの構築	15
第一節 背景と戦略	16
第二節 プロドラッグ候補化合物の合成と <i>in vitro</i> 薬効評価	19
第三節 共培養系における薬効の選択性	32
第四節 アザキノンメチド中間体と薬効との関係性	35
第五節 小括	39
第三章 <i>in vivo</i> で使用可能な高選択的プロドラッグ型抗がん剤の創製	40
第一節 gGlu-FMA 誘導体の合成と <i>in vitro</i> 薬効評価	41
第二節 腹膜播種モデルマウスを用いた <i>in vivo</i> 薬効評価	54
第三節 小括	63
第四章 総括と今後の展望	64
第一節 総括	65
第二節 今後の展望	67
実験の部	70
参考文献	110
謝辞	117

Abbriviation

gGlu-HMRG: γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green

GGT: γ -glutamyltransferase

5-FU: Fluorouracil

APN: Aminopeptidase N

LAP: Leucine aminopeptidase

DPP-IV: Dipeptidylpeptidase-IV

FMA: Fluoromethylaniline

FMP: Fluoromethylphenol

GP: Glycine-Proline

EP: Glutamic acid-Proline

LC/MS: Liquid Chromatography/Mass spectrometry

FAP: Fibroblast activation protein

CCK-8: Cell Counting Kit-8

TBS: *tert*-butyldimethylsilyl

TBAF: Tetrabutylammonium Fluoride

HATU: 1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridine-3-oxide
hexafluorophosphate

DMF: Dimethylformamide

THF: Tetrahydrofuran

DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine

EtOAc: Ethyl acetate

AcOH: Acetic acid

DAST: (Diethylamino)sulfur Trifluoride

EthD-1: Ethidium homodimer

ROS: Reactive oxygen species

AIF: Apoptosis induced factor

FACS: Flowcytometry

FBS: Fetal bovine serum

FITC: Fluorescein isothiocyanate

DMT-MM: 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

EWG: Electron Withdrawing Group

EDG: Electron Donating Group

DFT: Density functional theory

第一章

序論

第一節 がん治療における薬物療法の役割と課題

本邦における死因の第一位である癌は、今年年間約 100 万人が罹患する国民病であり、昨今の押し寄せる高齢化に伴い罹患数や死亡数は年々上昇している¹。一方で、癌に対する治療法は時代に伴って多様化してきており、現在では、外科手術、放射線治療、薬物療法を主に組み合わせてこれらの治療が行われている。特に薬物療法は、外科手術や放射線治療の適用が難しい高悪性度で微小な癌に対しても効果を示す可能性があることから、現在のがん治療において非常に重要な役割を担っている²。

現在、薬物療法に用いられている薬剤は、化学療法剤と分子標的薬の2つに大別される。化学療法剤は細胞の増殖の仕組みに着目して、その一部を阻害することによりがん細胞を殺傷するもので、アルキル化剤、代謝拮抗剤、微小管阻害剤、白金製剤、トポイソメラーゼ阻害剤、抗生物質に分類できる（Fig. 1-1-1）³。これらの薬剤は広範ながん患者に対して強力な抗がん作用を示す一方で、がん細胞と正常細胞を区別せずに作用するため、重い有害事象が引き起こされやすい傾向にある⁴。

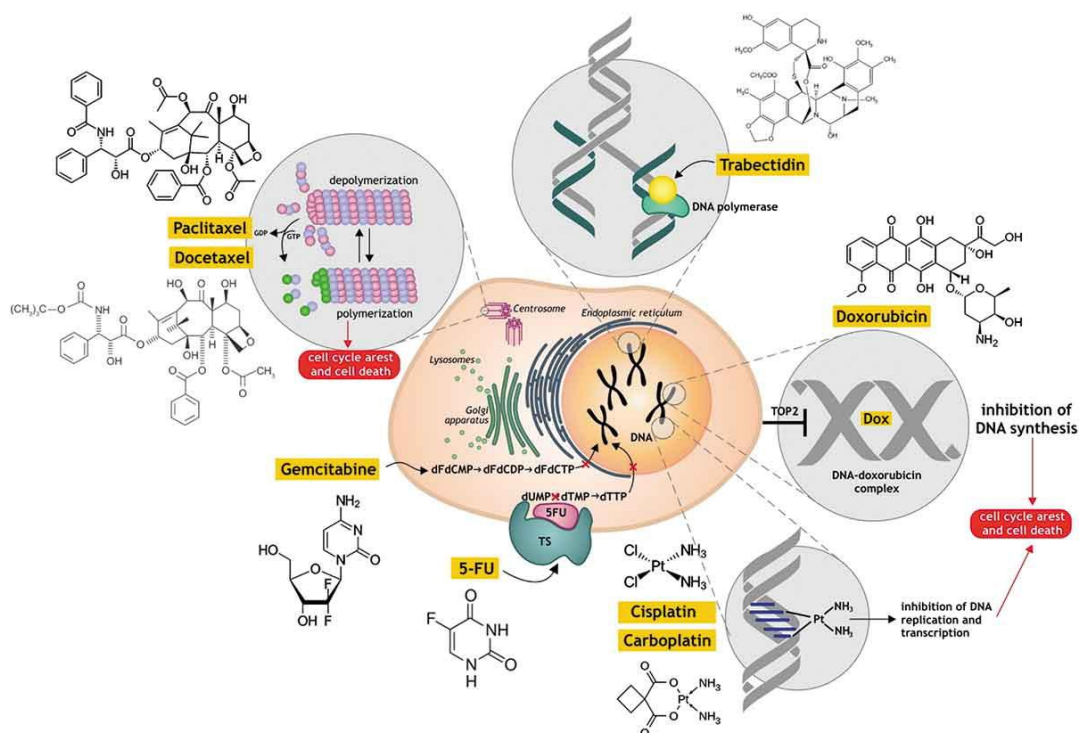


Fig. 1-1-1 | 化学療法剤の種類と代表的な薬剤³

化学療法剤の登場から約 40 年が経った 1980 年以降、分子生物学の急激な進展により、増殖・浸潤・免疫回避といったがん細胞を特徴づける現象とこれらに關与する重要な分子（バイオマーカー）が次々と明らかとなり、このようながん細胞特異的な分子に作用することでがん細胞選択的な薬効を示す分子標的薬の開発が盛んに行われるようになった (Fig. 1-1-2)。^{5,6}

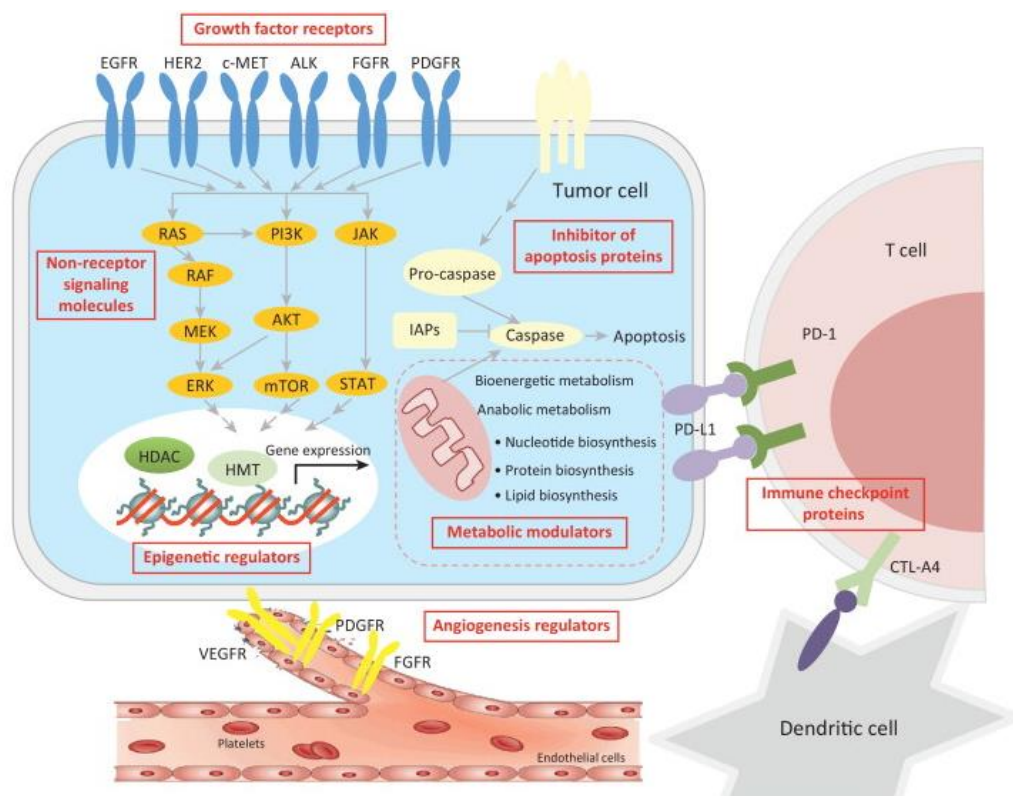


Fig. 1-1-2 | 分子標的抗がん剤の標的分子⁶

分子標的薬の登場により、従来の化学療法剤では治療できなかった癌の治療や副作用の低減が可能となり、現在でも分子標的薬は抗がん剤開発の中核を担っている。一方で、分子標的薬は継続投与を行うことで獲得耐性を引き起こし、癌の再発リスクを高める可能性がある⁷ことが知られており、標的が存在していても薬効を示さない初期耐性を有する症例⁸⁻¹⁰も多数報告されていることから、現状これら薬剤を用いても治療できないがん患者は未だ

に多く存在する。また、創薬の観点では、標的分子と特異的な相互作用をする分子を創製するために長い期間と費用を要する点や、Druggable な新規創薬標的が見出しづらくなっている点が問題視されており¹¹、新たなアプローチによる抗がん剤開発が望まれている。

第二節 酵素活性に基づく蛍光プローブの開発研究

このような背景の中、当研究室では特定の化学反応を媒介する蛋白質群である酵素に着目し、これらの活性を利用した疾患診断法および治療法の開発を行ってきた。酵素は酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、脱離酵素、異性化酵素、合成酵素、トランスロカーゼの7種に分類され、それぞれが特徴的な化学反応を触媒することが知られている¹²。また、これらの酵素の変異や過剰発現は様々な疾患に関与しており、特に癌においては発生、増殖、浸潤、転移等の過程と密接に関わっているため、これまで多くの酵素が癌のバイオマーカーとして報告されている^{13,14,15}。

当研究室では、このような酵素活性を利用した独自の蛍光制御手法を確立することで、がん部位を選択的に検出可能な蛍光診断プローブの開発を達成してきた。例えば、当研究室の坂部らが開発した gGlu-HMRG という分子は、生理的条件下、分子内でスピロ環を形成することで無蛍光性となっており、がん部位で高発現しているペプチド加水分解酵素の1種である γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) が触媒するアミド加水分解反応により、L-グルタミン酸部位が脱離することでスピロ環が開環し、初めて強蛍光性となる (Fig. 1-2-1)¹⁶。

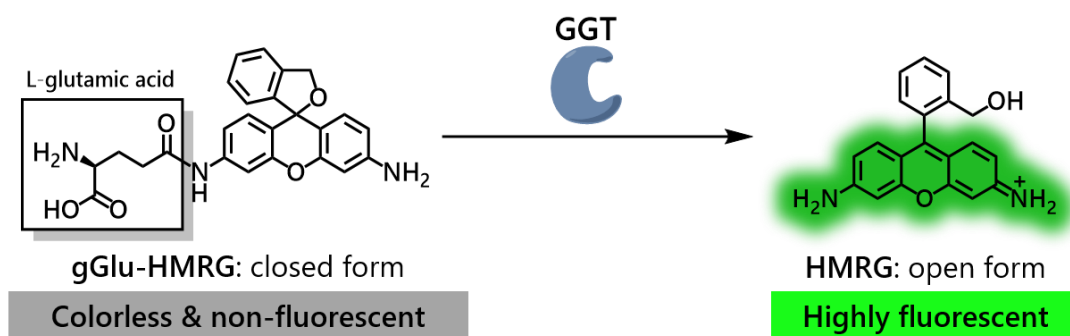


Fig. 1-2-1 | γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) の活性検出蛍光プローブ gGlu-HMRG の開発

この gGlu-HMRG を乳がん手術検体に散布することで 5 分以内にがん部位を検出することが可能であり、酵素反応前後での蛍光強度を制御することでヒト臨床検体上であっても高感度にごがん部位をイメージングできる可能性が示された (Fig. 1-2-2) ¹⁷。

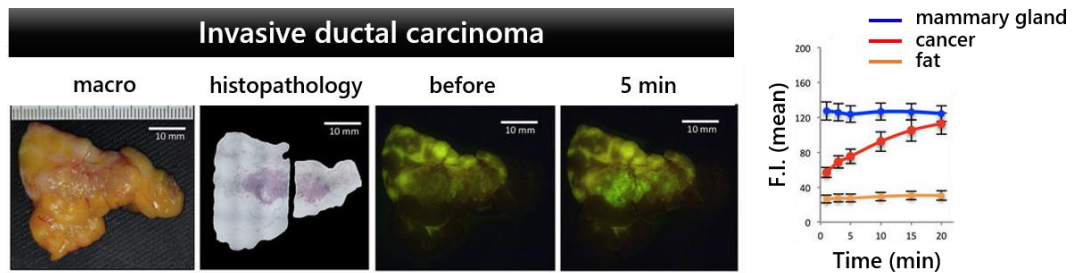
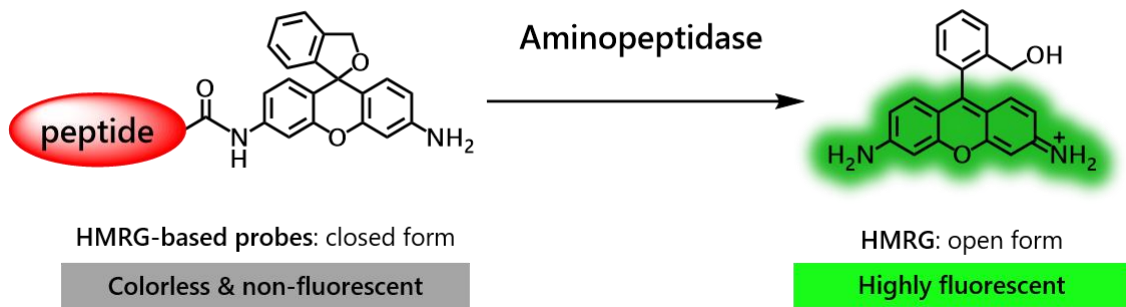


Fig. 1-2-2 | 乳がん手術検体を用いた gGlu-HMRG のがん部位選択的なイメージング ¹⁷

さらに近年、当研究室ではがん部位で特異的に亢進している酵素活性を網羅的かつ非侵襲的に新鮮臨床検体上で評価可能な探索技術の確立を目指した研究も行っている。例えば、当研究室の栗木らは、アミノペプチダーゼ活性を検出可能な数百種類に及ぶプローブラリーを構築し、これを活用して生細胞・新鮮臨床検体でのライブイメージングを行うことで、がん部位に特異的に亢進しているアミノペプチダーゼ活性を網羅的に評価する基盤探索技術を確立している (Fig. 1-2-3A) ¹⁸。Fig. 1-2-3B に示した Glu-Pro-HMRG は本ライブラリーを用いたスクリーニングによって見出された蛍光プローブの一例であり、胃癌手術検体上でがん部位を迅速かつ選択的にイメージングすることを可能としている ¹⁹。

A



B

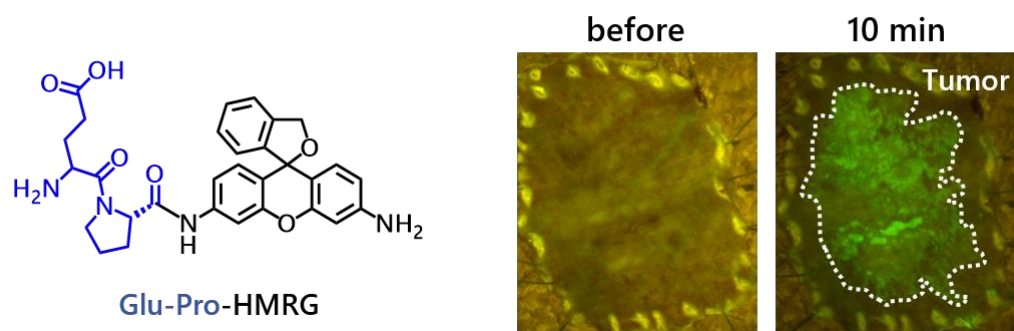


Fig. 1-2-3 | (A)アミノペプチダーゼによる HMRG-based プローブ群の活性化様式 (B) Glu-Pro-HMRG を用いた胃癌手術検体でのライブイメージング¹⁹

第三節 酵素活性に基づくプロドラッグ型抗がん剤の開発研究

前節では、がん細胞特異的な酵素活性を蛍光のスイッチングとして用いることでがん選択的なイメージングが可能となることを示したが、このような酵素活性を毒性発現のスイッチングとして用いることができれば、がん細胞を高選択的に傷害するプロドラッグ型抗がん剤が創製可能であると考えられる (Fig. 1-3-1)。すなわち、酵素反応前は無毒性の分子が酵素反応後に初めて毒性を示すような分子の設計が可能であり、蛍光プローブライブラリーを用いたスクリーニングにより見いだされた配列をそのまま利用できるため、標的と直接相互作用して薬効を示す従来の分子標的薬のような分子の最適化は不要となり、様々ながん種に対して効率的に抗がん剤を開発できるようになると期待される。

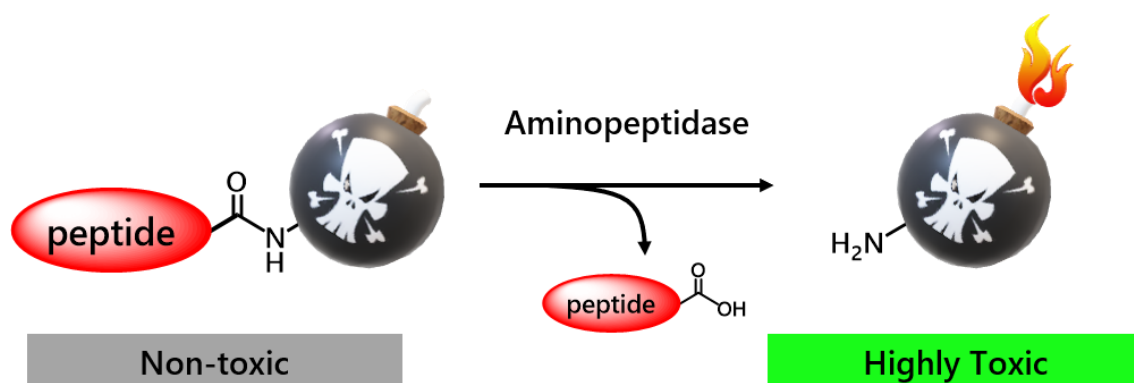


Fig. 1-3-1 | アミノペプチダーゼを標的としたプロドラッグ型抗がん剤の概要

これまで酵素反応を利用したプロドラッグは様々開発されているが、その大半が肝臓のカルボキシエステラーゼ²⁰やシトクロム P450²¹、血中のホスファターゼ²²等の酵素を標的とするものであり、上述したアミノペプチダーゼようながん細胞特異的な酵素を標的としたプロドラッグの開発例は非常に少ない。この原因としては、がん細胞で亢進している酵素活性の報告例が少ないことや、既存抗がん剤の修飾では酵素の良好な基質となるプロドラッグを創製しづらいことなどが考えられる。実際、現在臨床薬剤として使用されているのはカペシタビンに代表されるフルオロウラシル (5-FU) のプロドラッグのみであり、これは

腫瘍組織に存在するシチジンデアミナーゼやチミジンホスホリラーゼの活性を巧みに利用することで開発に成功したものである (Fig. 1-3-2) ²³。

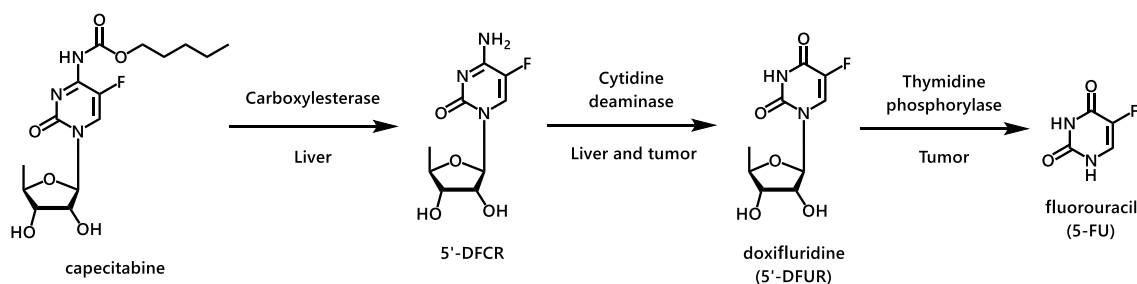


Fig. 1-3-2 | カペシタビンおよびドキシフルリジンの活性化機構 ²³

また、これまでアミノペプチダーゼを標的とした例は少ないものの、特定のがん細胞で高発現しているアミノペプチダーゼ N (APN)、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV)、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) 等を標的としたプロドラッグは報告されている (Fig. 1-3-3) ^{24,25,26}。特に、APN の活性により既存抗がん剤であるメルファランへと活性化されるメルフルフェンは、多発性骨髄腫の適応で Phase II 試験が実施されており、アミノペプチダーゼを標的としたプロドラッグが実臨床においても利用できる可能性が示唆されている ²⁴。一方で、メルフルフェンの *in vitro* での安全域は 2~3 倍程度 ²⁴ と十分とは言えず、酵素反応前に毒性を示さないような親薬物を設計できれば、より選択性の高いプロドラッグを開発できるようになると考えられる。

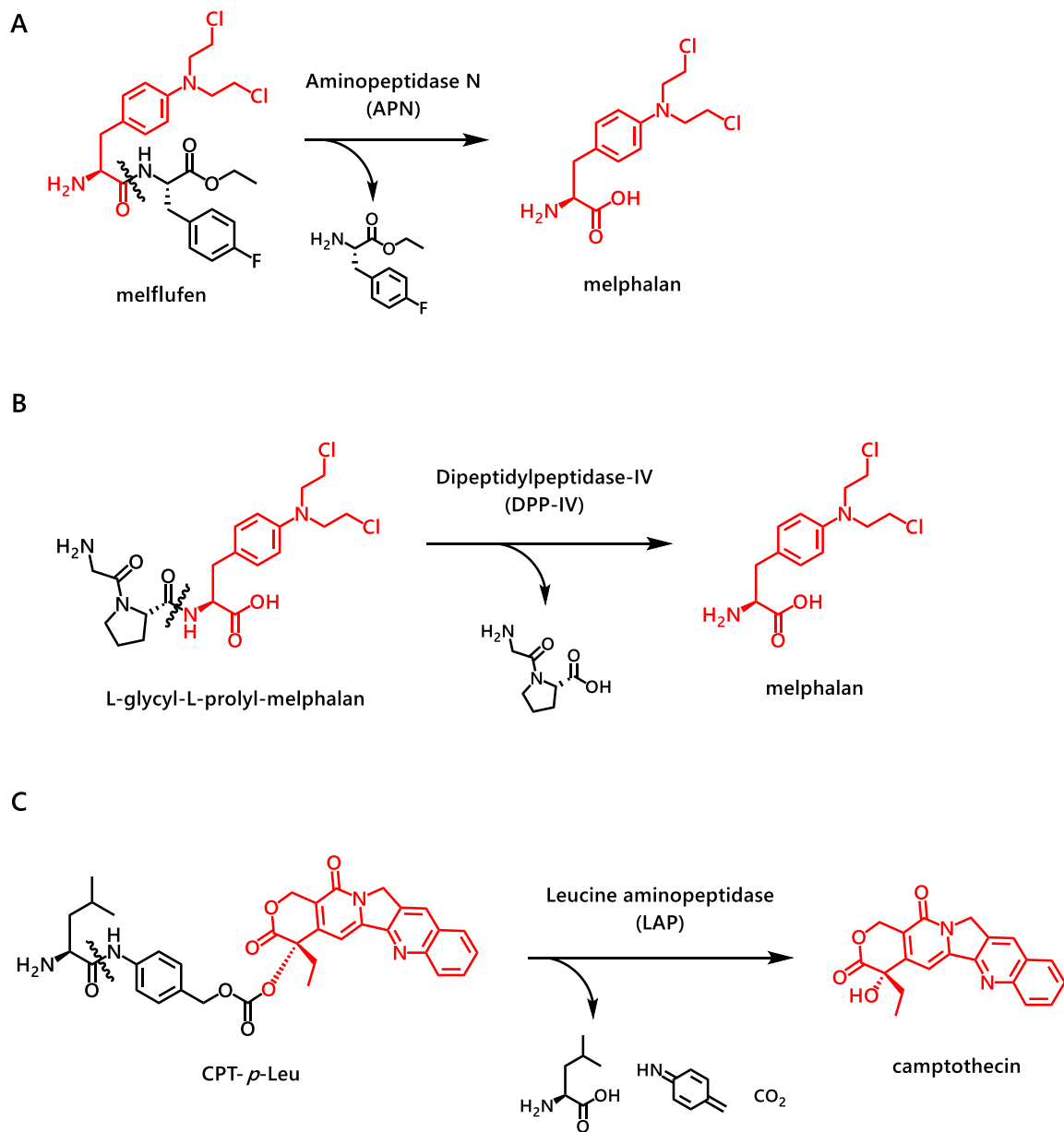


Fig. 1-3-3 | (A) アミノペプチダーゼ N (B) ジペプチジルペプチダーゼ IV (C) ロイシンアミノペプチダーゼを標的としたプロドラッグ^{24,25,26}

第四節 本研究の目的

第二節で述べたように、当研究室では酵素活性を利用して蛍光を制御することで多くのがんイメージングプローブの開発を達成しており、この制御原理に基づき蛍光プローブライブラリーを構築しスクリーニングを行うことで、がん部位に特徴的な酵素活性の情報を臨床検体から直接抽出することが可能となっている。このようにして見い出された酵素活性をプロドラッグ型抗がん剤開発へと結びつけることで、従来の分子標的薬開発のようにバイオマーカー探索から構造最適化までの長いプロセスを必要としない新たな創薬アプローチが確立できると考えた。

そこで、上述のような新たな創薬アプローチへの展開を見据え、本研究ではがん細胞特異的な酵素活性によってがん細胞を選択的に傷害可能なプロドラッグ型抗がん剤設計法のプラットフォーム構築を目指すこととした。

第二章

キノンメチド放出型プロドラッグシステムの構築

第一節 背景と戦略

まず、がん細胞のみを高選択的に傷害するプロドラッグ型抗がん剤の設計法構築にあたり、酵素反応前は毒性を示さないように適切な親薬物を選択する必要があるが、当研究室の堂浦らにより開発された SPiDER- β Gal¹²⁷ という蛍光プローブから、これらを可能とする新たなプロドラッグ型抗がん剤設計法の端緒を得ている。SPiDER- β Gal-1 は、がん細胞内に高発現している β -ガラクトシダーゼと反応し、*O*-グリコシド結合が開裂してフッ素アニオンが脱離することで *o*-キノンメチド中間体となり、この中間体にタンパク質の活性残基やグルタチオンのチオール基が求核付加することで蛍光を発するとともに、タグ化されることで細胞から漏出しなくなるという性質を帯びる (Fig. 2-1-1)。

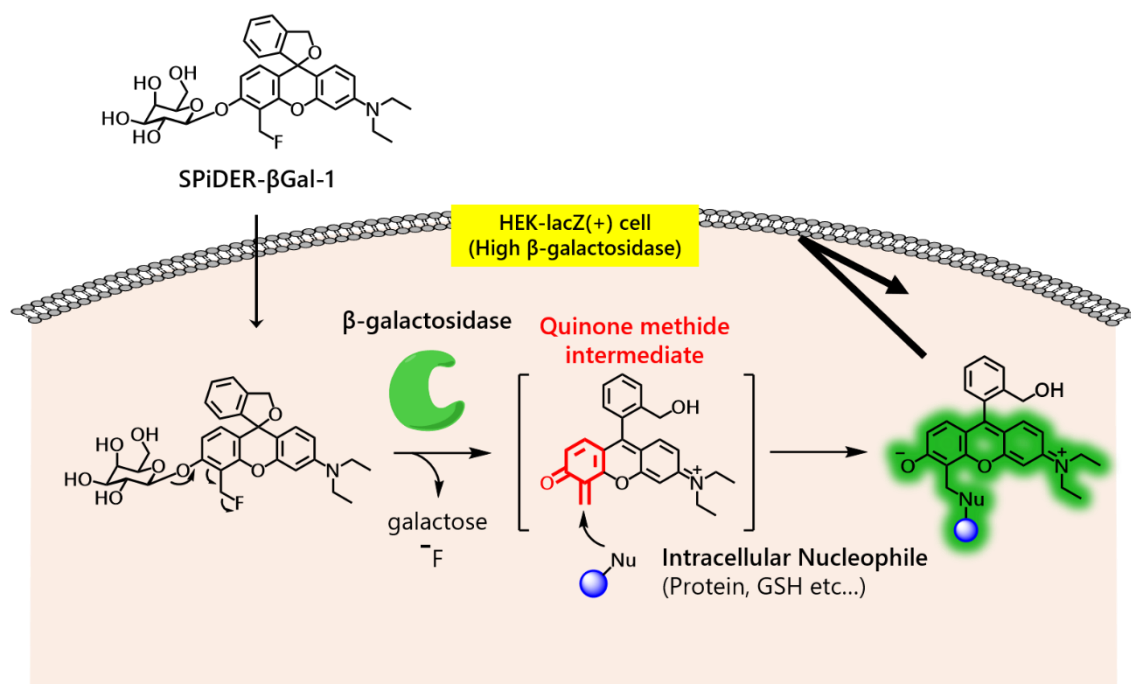


Fig. 2-1-1 | SPiDER- β Gal-1 プローブの蛍光制御原理とキノンメチドケミストリーに基づく滞留性獲得メカニズム

実際、SPiDER- β Gal-1 を用いることで HEK-*lacZ*(+)細胞 (β -ガラクトシダーゼ高発現細胞) のみを一細胞レベルの空間分解能でイメージングすることに成功している (Fig. 2-1-2A) ²⁷。一方、本プローブを高濃度で使用した場合、暗所において HEK-*lacZ*(+)細胞が選択的に死滅することが明らかとなっており、これは α -キノンメチド中間体と細胞内求核種が反応したことに起因する毒性と考えられ、タンパク質の機能阻害やグルタチオン枯渇等が引き起こされた可能性が考えられる (Fig. 2-1-2B) ²⁷。

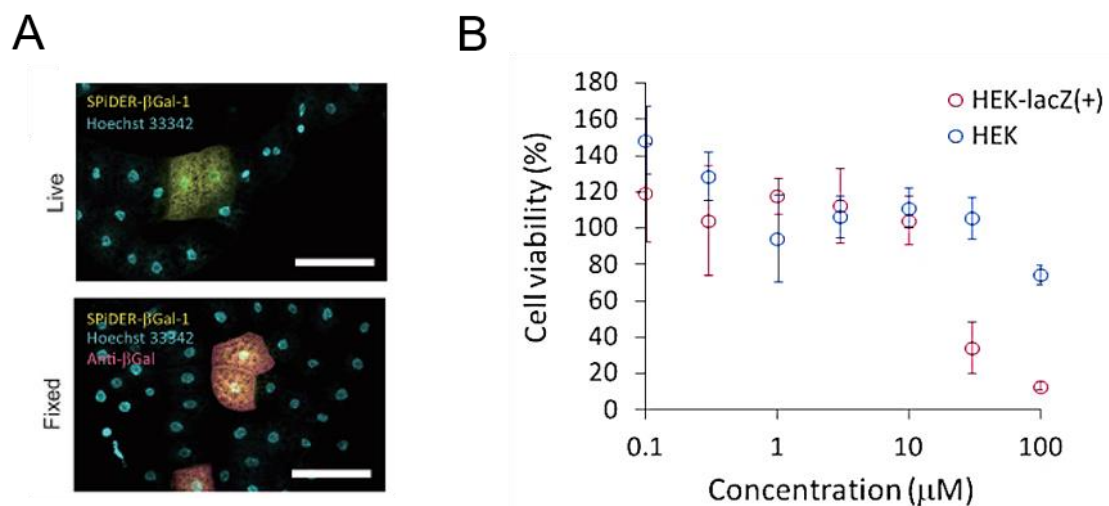


Fig. 2-1-2 | (A) SPiDER- β Gal-1 を用いた 1 細胞蛍光イメージング ²² (B) SPiDER- β Gal-1 が引き起こす β -ガラクトシダーゼ高発現細胞の選択的な細胞死 (2h, n = 3) ²⁷

この結果は、キノンメチド種を特異的に放出することで選択的な細胞死を誘導できる可能性を示唆するものであり、SPiDER プローブの原理を利用することで前述したプロドラッグ型抗がん剤の設計が可能であると考えた。

具体的には、フルオロメチル基を有するフェノールあるいはアニリン誘導体を酵素認識部位と連結させることで、がん細胞で亢進している酵素 (ペプチダーゼやグリコシダーゼ等) の活性により初めてキノンメチド種を生成し、がん細胞選択的に毒性を発現する化合物を創製できると考えた (Fig. 2-1-3)。

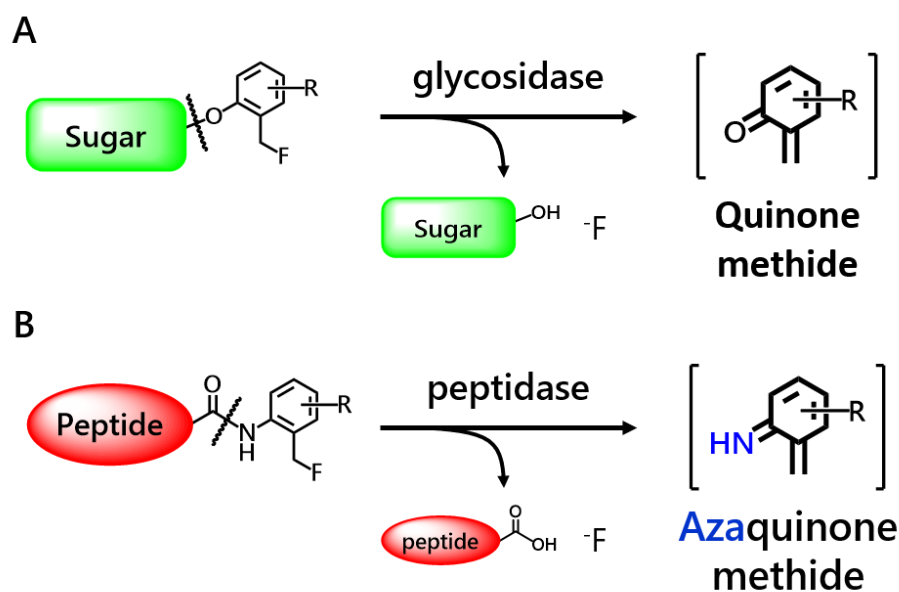


Fig. 2-1-3 | (A) グリコシダーゼや (B) ペプチダーゼ活性によってがん細胞特異的にキノンメチド種を放出する新たなプロドラッグ型抗がん剤設計法

通常プロドラッグの親薬物に用いられる既存の化学療法剤は、酵素反応後にごん細胞内から受動拡散で漏出可能であるため、がん細胞内で高い薬剤濃度を保てない場合や付近の正常細胞を傷害してしまう可能性が考えられる。一方、本研究で考案したプロドラッグから放出されるキノンメチド種は強力な求電子剤であり、細胞内では近傍の細胞内求核種と速やかに反応して消費されることが考えられるため、がん細胞選択的な薬効が期待される。また、最低 1 つのベンゼン環で細胞死を誘導できる可能性があり、既存薬を用いる場合と比較して構造修飾が容易になると考えられる。

第二節 プロドラッグ候補化合物の合成と *in vitro* 薬効評価

まず、前節で考案したプロドラッグ型抗がん剤設計法が機能するか検証するため、いくつかのプロドラッグ候補化合物を合成して評価することとした。候補化合物の標的として用いる酵素には、既に種々のがん細胞で活性の亢進が報告されているアミノペプチダーゼである γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)^{28,29} およびジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV)³⁰ とグリコシダーゼである β -ガラクトシダーゼの 3 種を選択した。尚、当研究室では上記 3 種の酵素活性を利用したがんイメージングプローブ^{16, 19, 31}の開発に成功しており、いずれも臨床検体や動物モデルにおいてがん選択的なイメージングを達成している (Fig. 2-2-1)。

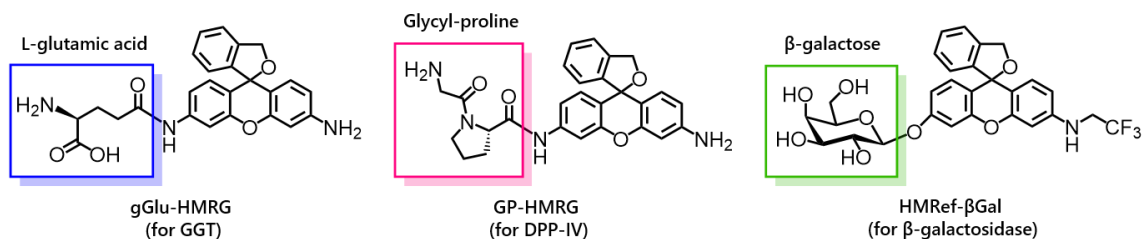


Fig. 2-2-1 | 当研究室で開発された酵素活性を利用したがんイメージングプローブ

また、キノンメチド部分は SPiDER プローブのような蛍光母核である必要はなく、抗がん剤開発という目的を踏まえ、まずはベンゼン環 1 つの最小骨格を用いて検討することとした。以下に、設計したプロドラッグ候補化合物の構造を示し、次頁より合成について述べる (Fig. 2-2-2)。

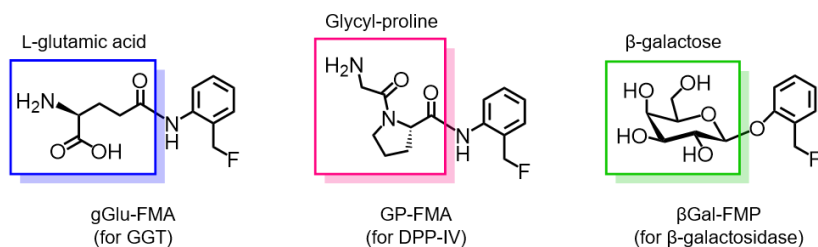
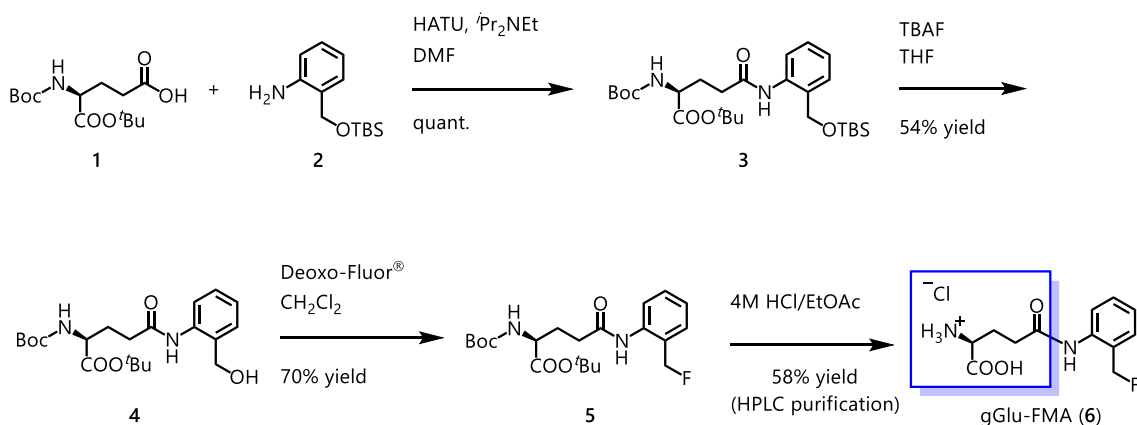


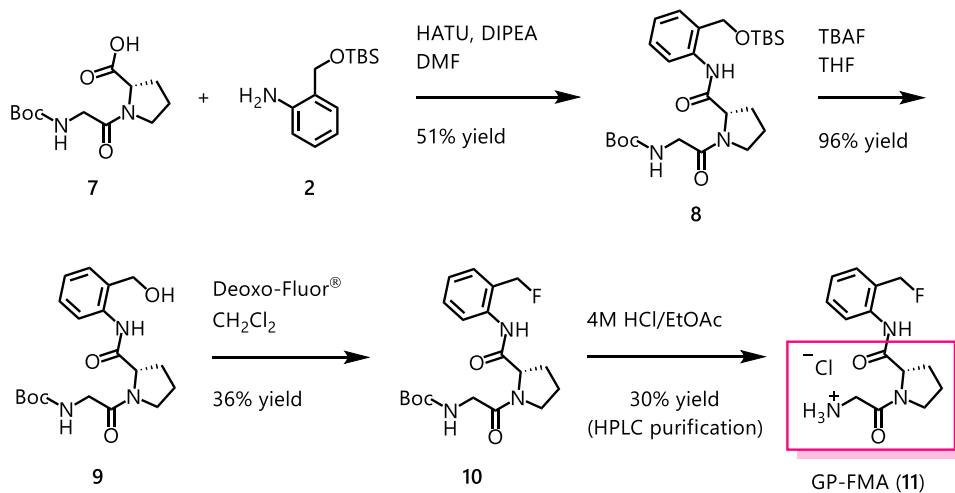
Fig. 2-2-2 | 設計したプロドラッグモデル化合物の構造

まず、GGT プロドラッグ候補化合物である gGlu-FMA の合成を示す (Scheme 2-1-1)。
N-Boc-Glu-O^tBu (1) と水酸基が TBS 保護されたアニリン (2) の縮合、TBAF による TBS 基の除去を経てベンジルアルコール体 (4) に導いたのち、Deoxo-Fluor[®]による水酸基のフッ素化、続くアミノ酸保護基の脱保護を行うことで、目的の gGlu-FMA (6) を得た。



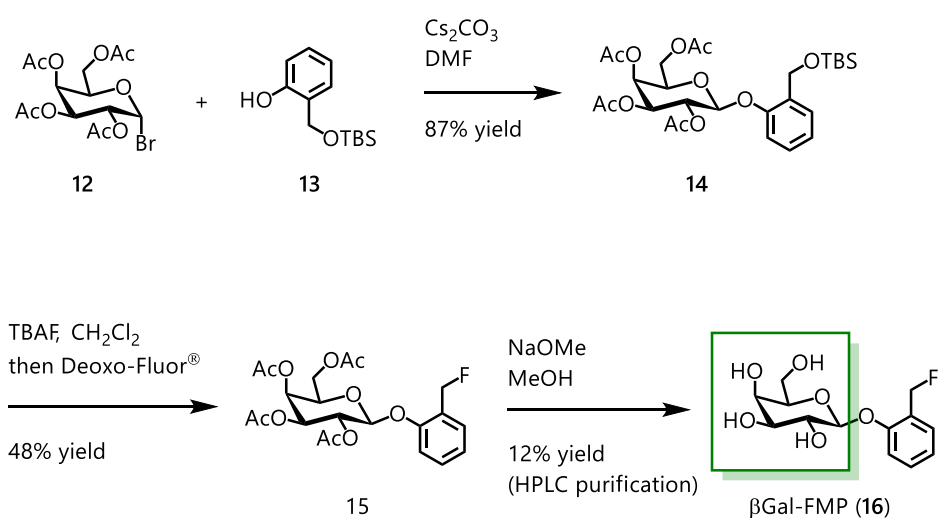
Scheme 2-2-1 | GGT プロドラッグ候補化合物 gGlu-FMA の合成

次に、DPP-IV プロドラッグ候補化合物である GP-FMA の合成を示す (Scheme 2-2-2)。
N-Boc-Glu-O^tBu (1) の代わりに固相合成で得た *N*-Boc-Gly-Pro-OH (7) を用いることで、gGlu-FMA (6) と同様の合成経路で GP-FMA (11) を得ることができた。



Scheme 2-2-2 | DPP-IV プロドラッグ候補化合物 GP-FMA の合成

最後に、 β -ガラクトシダーゼプロドラッグ候補化合物である β Gal-FMP の合成を示す (Scheme 2-2-3)。アセチル基で保護された α -ブロモガラクトース (12) と 1 級水酸基が TBS 保護されたフェノール (13) を用いて β 選択的なグリコシル化を行い、 β -ガラクトシド体 (14) を得た後、TBS 基の除去と水酸基のフッ素化をワンポットで行うことでフルオロメチル体 (15) へ導いた。最後にアセチル基の除去を行うことで、目的の β Gal-FMP (16) を得た。



Scheme 2-2-3 | β -ガラクトシダーゼプロドラッグ候補化合物 β Gal-FMP の合成

次に、合成した 3 種のプロドラッグ候補化合物が標的の酵素の基質となるか検証するため、精製酵素との酵素反応を行い、LC/MS にて生成物を解析した。なお、簡略化したプロトコルも文中に併記する（詳細なプロトコルは実験の部を参照。以下、本論文を通じて全て同様。）。

まず、gGlu-FMA の結果を示す。LC/MS 解析の結果、GGT 添加により gGlu-FMA は完全に消費され、2-アミノベンジルアルコールが生成物として確認された (**Fig. 2-2-3**)。これは、生成したアザキノンメチド中間体にバッファー中の水が求核剤となって反応したものと考えられ、アザキノンメチド中間体の生成を間接的に示す結果である。また、GGT の阻害剤である GGSTop® の添加により酵素反応が阻害され、gGlu-FMA が GGT の基質となることが確かめられた。

Protocol

↓ gGlu-FMA 100 μ M with or without GGSTop® 100 μ M in PBS (pH 7.4), 1% DMSO as a co-solvent

↓ Add GGT 1 U/mL, 37°C for 12 h

↓ LC/MS analysis (eluent A: H₂O containing 0.1% ammonium formate, eluent B: 80% acetonitrile/H₂O, 0.1% ammonium formate, A/B = 95/5→5/95 in 15 min)

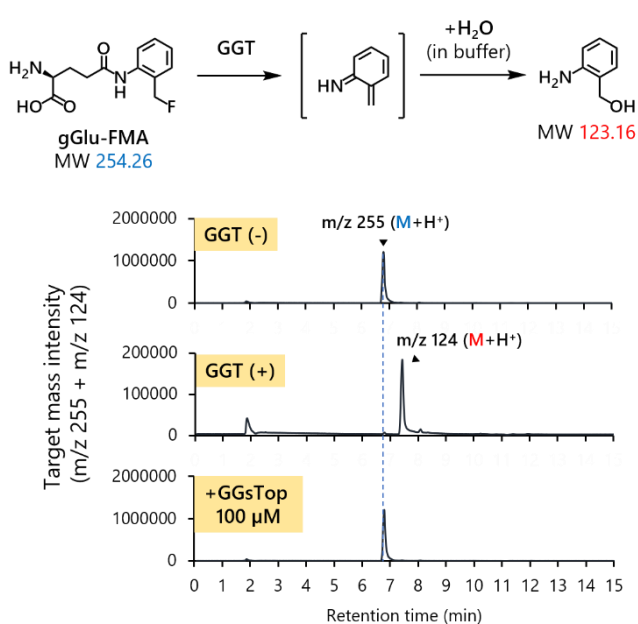


Fig. 2-2-3 | gGlu-FMA と GGT との酵素反応物解析（上段: GGT 添加前、中段: GGT 添加 12 時間後、下段: GGSTop® 共存下）

GP-FMA も同様、DPP-IV 添加により 2-アミノベンジルアルコールが生成し、阻害剤 K579 により酵素反応が阻害されることが確認された (Fig. 2-2-4)。

Protocol

↓ GP-FMA 100 μ M with or without K579 500 nM in PBS (pH 7.4), 2% DMSO as a co-solvent

↓ Add DPP-IV 81 mU/mL, 37°C for 12 h

↓ LC/MS analysis (eluent A: H₂O containing 0.1% ammonium formate, eluent B: 80% acetonitrile/H₂O, 0.1% ammonium formate, A/B = 95/5→5/95 in 15 min)

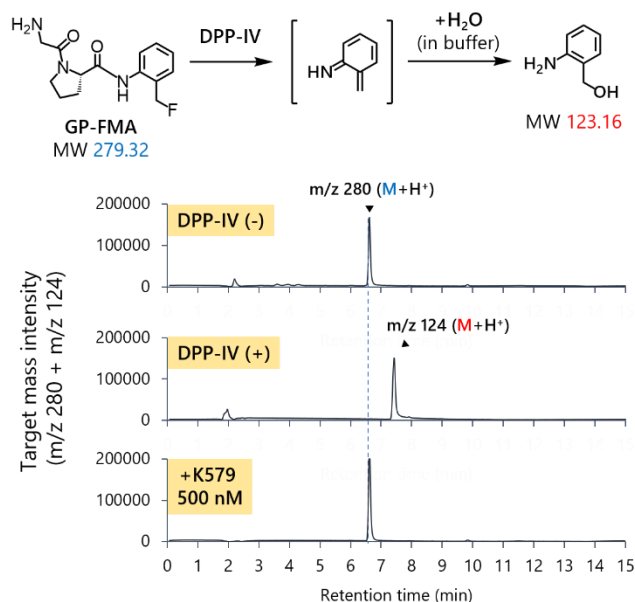


Fig. 2-2-4 | GP-FMA と DPP-IV との酵素反応物解析 (上段: DPP-IV 添加前、中段: DPP-IV 添加 12 時間後、下段: K579 共存下)

β Gal-FMP では、 β -ガラクトシダーゼ添加により 2-ヒドロキシベンジルアルコールが生成し、阻害剤 β -GA により酵素反応が阻害されることが確認された (Fig. 2-2-5)。

Protocol

↓ β Gal-FMP 100 μ M with or without β -GA 1 mM in PBS (pH 7.4), 2% DMSO as a co-solvent

↓ Add β -galactosidase 4 nM, 37°C for 12 h

↓ LC/MS analysis (eluent A: H₂O containing 0.1% ammonium formate, eluent B: 80% acetonitrile/H₂O, 0.1% ammonium formate, A/B = 95/5→5/95 in 15 min)

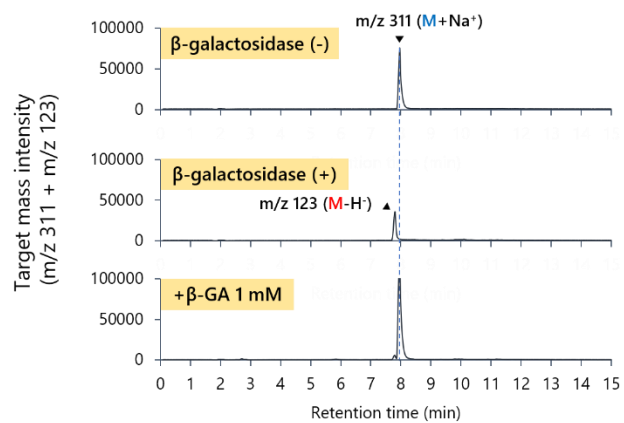
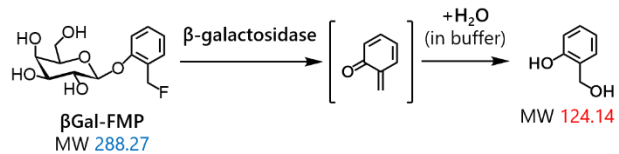


Fig. 2-2-5 | β Gal-FMP と β -ガラクトシダーゼとの酵素反応物解析（上段: β -ガラクトシダーゼ添加前、中段: β -ガラクトシダーゼ添加 12 時間後、下段: β -GA 共存下）

合成した 3 種のプロドラッグ候補化合物が酵素に認識されてキノンメチド中間体を生成することが確認されたため、続いて、酵素高発現/低発現細胞株を用いた *in vitro* 薬効評価を行うこととした。化合物投与 24 時間後の細胞生存率を一般的な比色定量法である CCK-8 アッセイにより行った。

Protocol

↓ Seed cells at 1.0×10^4 cells/well in 96 well plates (n=3), incubate at 37°C in 5%CO₂ for 12 h

↓ Add prodrugs 1 to 50 μM (0.5% DMSO), incubate at 37°C in 5%CO₂ for 24 h

↓ Add WST-8 10 μL in each well, incubate at 37°C in 5%CO₂ for 3 h

↓ Measure absorbance at 440 nm

まず、GGT プロドラッグ候補化合物である gGlu-FMA の結果を示す。CCK-8 アッセイの結果、gGlu-FMA 投与により GGT 高発現細胞の細胞生存率が濃度依存的に低下し、GGT 低発現細胞の細胞生存率は低下しないことが明らかとなり、プロドラッグ型抗がん剤として機能することが示された (Fig. 2-2-6)。また、阻害剤 GGsTop®により生存率が完全に回復したことから、gGlu-FMA の薬効は GGT 特異的であることも明らかとなった。

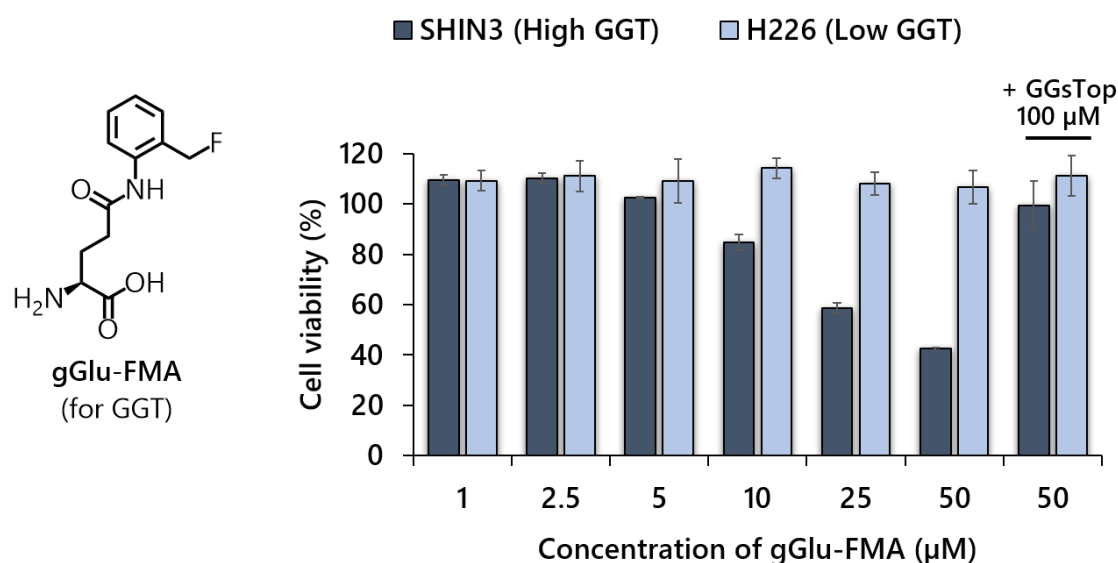


Fig. 2-2-6 | gGlu-FMA 投与 24 時間後の GGT 高発現/低発現細胞の細胞生存率変化 (n = 3)

次に、DPP-IV プロドラッグ候補化合物である GP-FMA の結果を示す。GP-FMA も gGlu-FMA 同様、化合物投与により DPP-IV 高発現細胞の細胞生存率が濃度依存的に減少し、DPP-IV 低発現細胞と比較してより低濃度で薬効が発現しており、プロドラッグ型抗がん剤として機能することが明らかとなった (Fig. 2-2-7)。一方で、DPP-IV 低発現細胞においても濃度依存的な増殖阻害効果が観測されており、DPP-IV 阻害剤である K579 により細胞生存率が回復しなかったことから、GP-FMA の構造毒性あるいは DPP-IV 様活性を有した他酵素による意図しないプロドラッグの活性化が引き起こされている可能性が考えられた。

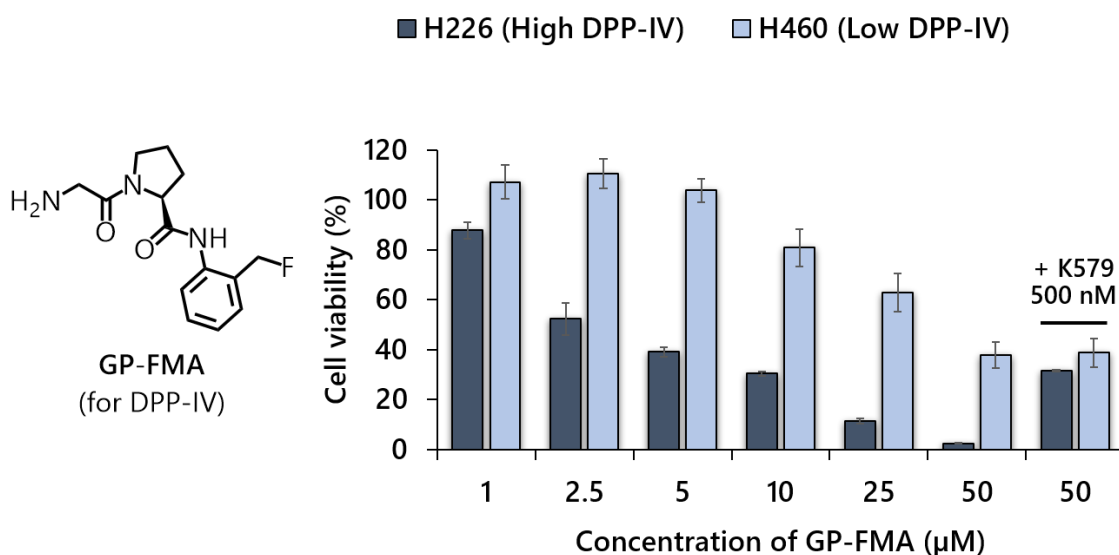


Fig. 2-2-7 | GP-FMA 投与 24 時間後の DPP-IV 高発現/低発現細胞の細胞生存率変化 (n = 3)

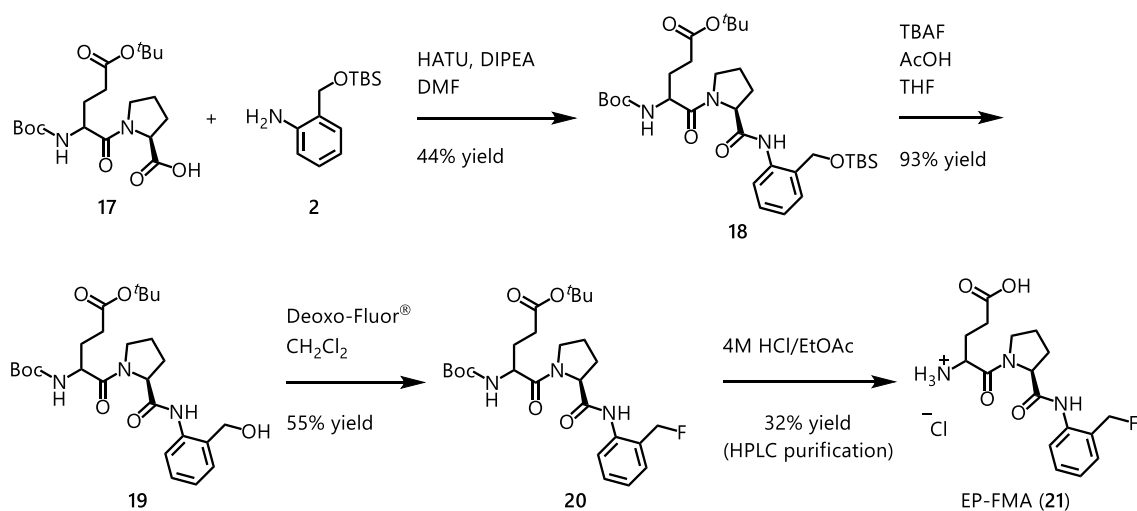
実際、DPP-IV には多くの類似のペプチダーゼが存在することが知られており、その大半が細胞質内に局在すると報告されている (Table 2-2-1)^{32,33}。DPP-IV が細胞膜上に局在することを踏まえると、GP-FMA が細胞膜を透過して細胞内へ入り、これらの DPP-IV 様のペプチダーゼと反応することで、DPP-IV 低発現細胞に対しても毒性を示したと予想することができる。そこで、GP-FMA の細胞膜透過性を低下させることで細胞内の DPP-IV 様ペ

プチダーゼと反応しなくなり、毒性を低減できるのではないかと考えた。

Table 2-2-1 | DPP-IV 様のプロリルペプチダーゼの種類と局在³³

Enzyme	Localization
DPP4	cell surface
DPP7	intracellular vesicles, secretion
DPP8	cytosol
DPP9	cytosol
FAP	cell surface
Prolyl oligopeptidase	intracellular organelle

当研究室では、蛍光プローブ開発研究の過程において Gly-Pro ジペプチド以外にも Glu-Pro ジペプチドが DPP-IV の基質となる¹⁹ ことを見出しており、グルタミン酸側鎖のカルボキシル基によって膜透過性が低下することを期待して Glu-Pro 配列を導入した EP-FMA を新たに設計・合成した (Scheme 2-2-4)。



Scheme 2-2-4 | EP-FMA の合成

合成した EP-FMA を同様の CCK-8 アッセイへ付した結果、期待通り DPP-IV 低発現細胞に対する毒性が低減することが明らかとなった (**Fig. 2-2-8**)。この結果から、細胞膜上に局在する GGT や DPP-IV 等の酵素を標的とする場合には、可能な限りプロドラッグ自体の細胞膜透過性は低い方が好ましいと考えられ、GP-FMA と EP-FMA で選択性に大きな変化が生じたのは、アザキノンメチドを発生させる部分骨格がベンゼン環 1 つと非常にコンパクトであったためと推察できる。

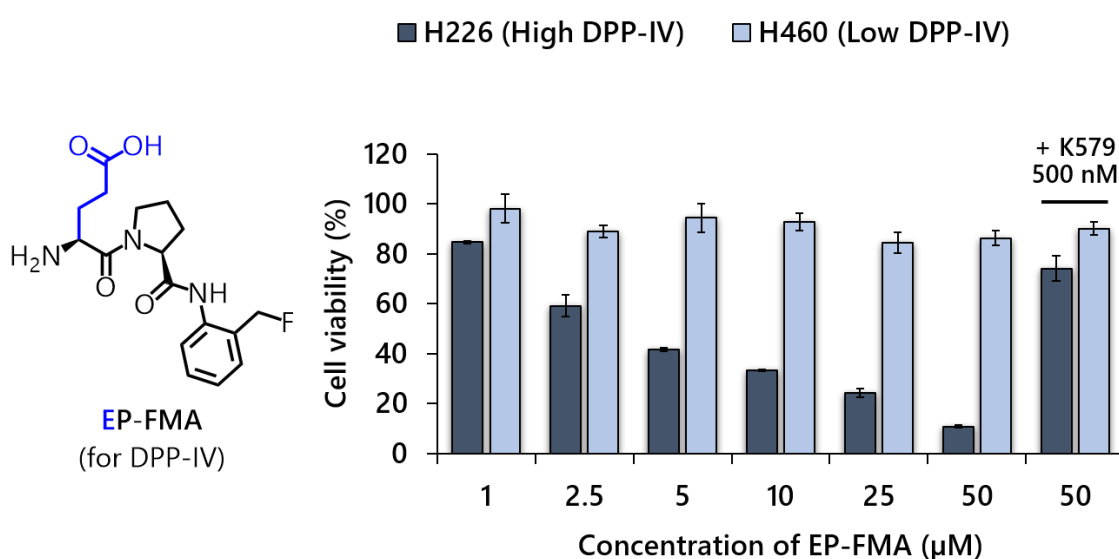


Fig. 2-2-8 | EP-FMA 投与 24 時間後の DPP-IV 高発現/低発現細胞の細胞生存率変化 (n = 3)

最後に、 β -ガラクトシダーゼプロドラッグ候補化合物である β Gal-FMP の結果を示す。CCK-8 アッセイの結果、 β Gal-FMP は β -ガラクトシダーゼ高発現および低発現細胞ともに細胞生存率を変化させないことが明らかとなった (**Fig. 2-2-9**)。この原因として、 β Gal-FMP の細胞膜透過性が十分ではなく細胞質に局在する β -ガラクトシダーゼと上手く反応できなかったことや GGT や DPP-IV を標的としたプロドラッグとは放出されるキノンメチド種が異なることが考えられる。

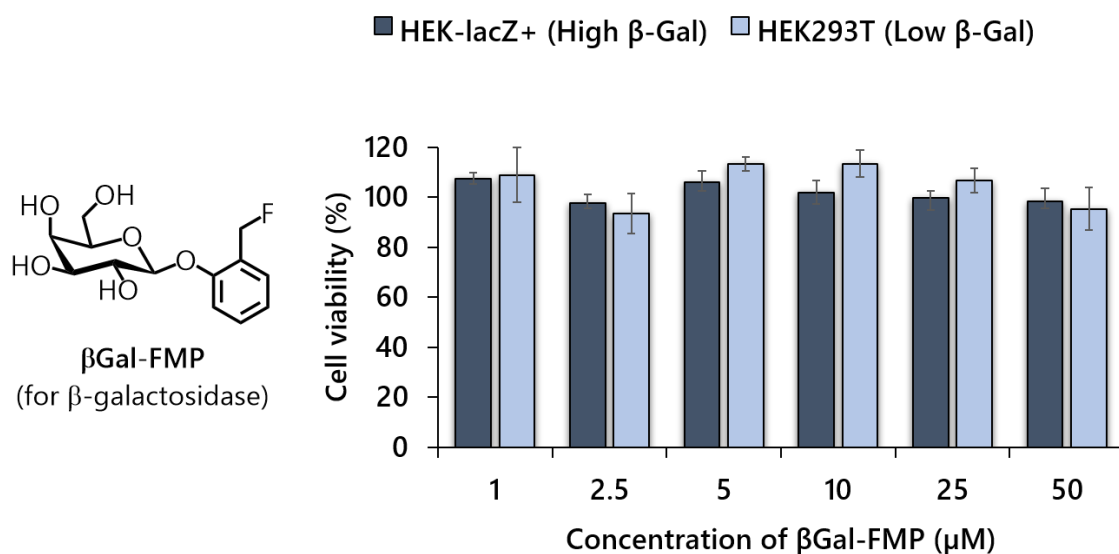


Fig. 2-2-9 | β Gal-FMP 投与 24 時間後の β -ガラクトシダーゼ高発現/低発現細胞の細胞生存率変化 (n = 3)

仮に β Gal-FMP の細胞膜透過性に問題が無い場合、GGT や DPP-IV を標的としたプロドラッグと同様、 β -ガラクトシダーゼと反応後にアザキノンメチド中間体を生成するような化合物を合成できれば期待通りの薬効を示すようになると考えられる。これらを達成するためには、Fig. 2-2-10 に示すようにガラクトース部位とフルオロメチルアニリン部位をカーバメートで連結させた化合物を合成すればよいと考え、Scheme 2-2-5 に示す合成経路に従って合成を行った。

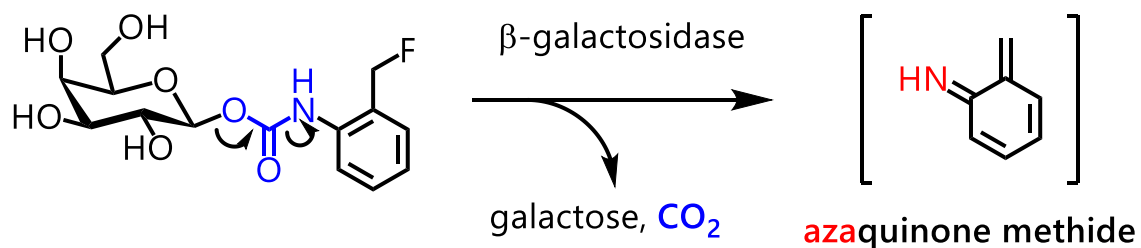
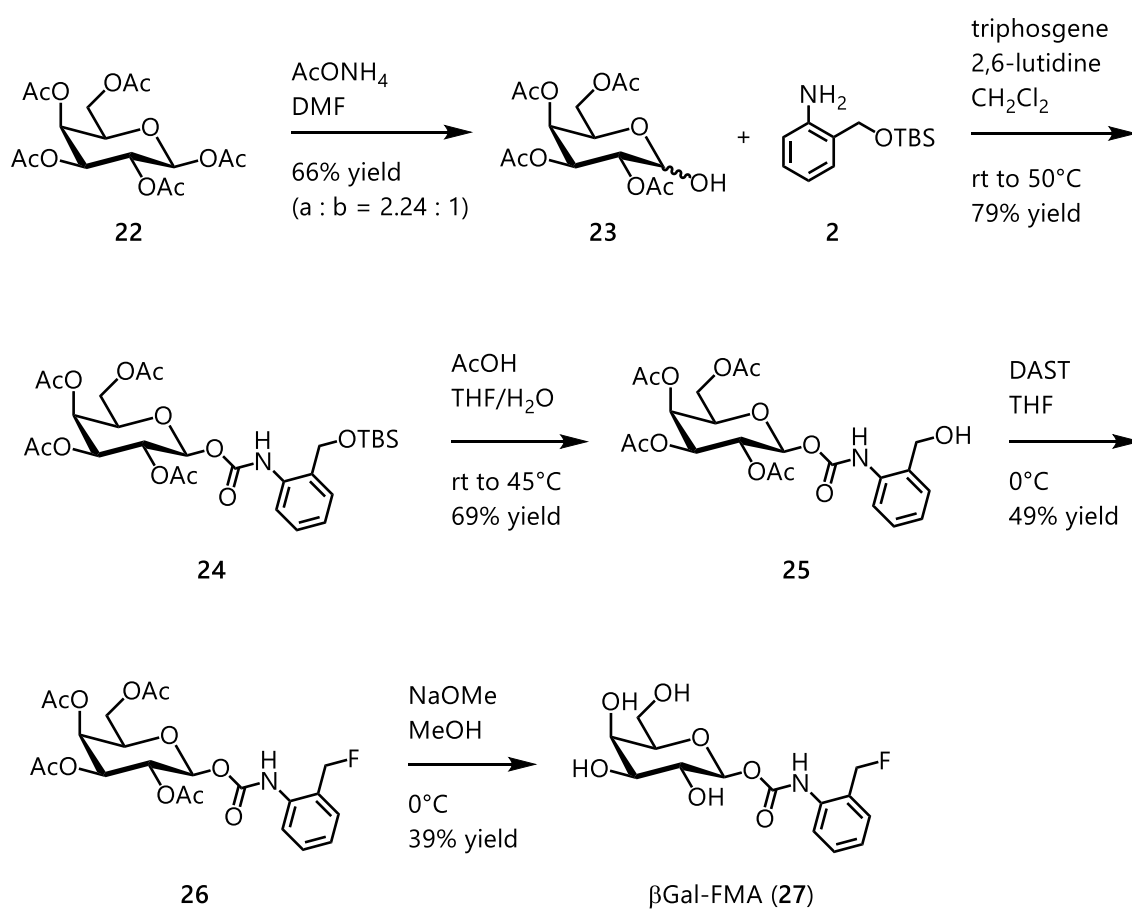


Fig. 2-2-10 | β -ガラクトシダーゼによってアザキノンメチド中間体を生成する化合物のデザイン

まず、アノマー位以外がアセチル基で保護されているガラクトース誘導体 (**23**) とアニリン誘導体 (**2**) をトリホスゲンと塩基存在下で混合することでカーバメート体 (**24**) へと導き、酢酸を用いて TBS 基を除去することでアルコール体 (**25**) とした。この際、TBAF で TBS 基の除去を行うと、生成したアルコキシドがカーバメートのカルボニル基を分子内求核攻撃し、分解してしまうことが明らかとなった。DAST によるフッ素化を行った後、アセチル基の除去を行うことで、目的の β Gal-FMA (**27**) を得た。



Scheme 2-2-5 | β Gal-FMA の合成

合成した β Gal-FMA を同様の CCK-8 アッセイに付した結果、 β Gal-FMA は β -ガラクトシダーゼ高発現細胞のみで濃度依存的な毒性を示すことが明らかとなり、細胞内に局在するグリコシダーゼを標的とした場合でも考案したプロドラッグシステムが機能する可能性が示唆された (**Fig. 2-2-11**)。現在、キノンメチド種 (キノンメチド vs. アザキノンメチド) と薬効との関係性については明らかとなっていないが、細胞内求核種との反応性が異なる可能性は十分に考えられ、今後詳細に検討していく予定である。

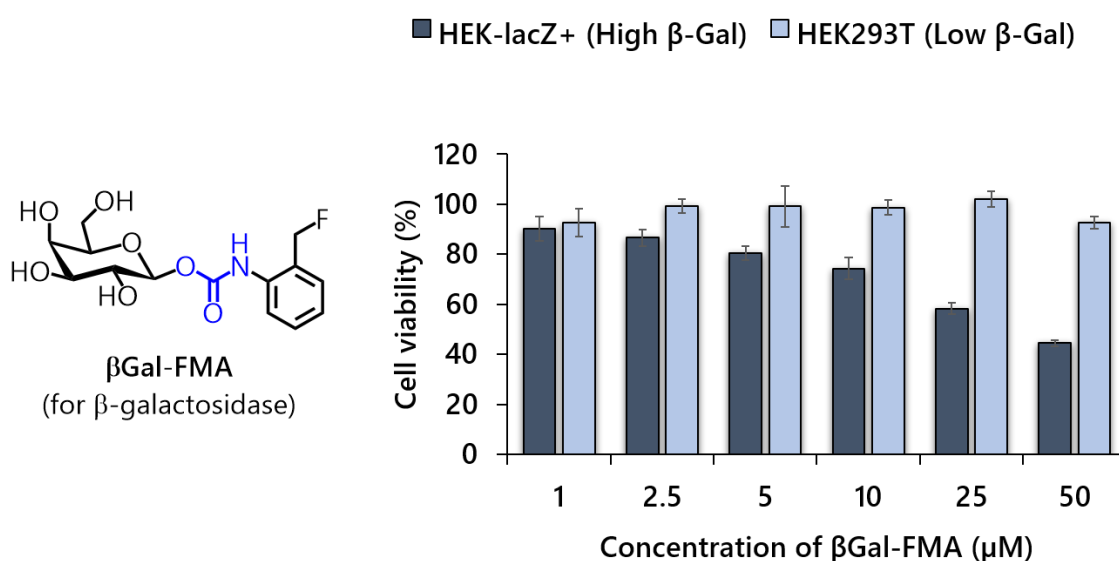


Fig. 2-2-11 | β Gal-FMA 投与 24 時間後の β -ガラクトシダーゼ高発現/低発現細胞の細胞生存率変化 (n = 3)

第三節 共培養系における薬効の選択性

前節では、考案したプロドラッグシステムに基づいて設計したプロドラッグ候補化合物が酵素を高発現している細胞を選択的に傷害可能であることを示した。一方、ヒトのがん組織では酵素を高発現しているがん細胞と酵素が高発現していない正常細胞が混在しており、臨床応用を考えるとこのような状況下でもがん細胞のみを選択的に傷害できる化合物であることが望ましいと考えられる。そこで、前述の検討で選択的な薬効を示した GGT 標的化プロドラッグである gGlu-FMA を選択し、GGT 高発現/低発現細胞の共培養系条件下での薬効を評価することとした。

具体的には、CellTracker™ で予め染め分けておいた 2 種の細胞を混合し、gGlu-FMA と死細胞染色試薬 EthD-1 を投与して共焦点顕微鏡によるタイムラプスイメージングを行ったところ、GGT 高発現細胞である SHIN3 細胞（ヒト卵巣癌由来）のみが死滅して EthD-1 で染色される様子が確認できた（Fig. 2-3-1 上段）。この際、長時間のイメージングによって CellTracker™ の蛍光が褪色していく様子が見られ、励起光の継続照射による光毒性も懸念されたため、24 時間後の別視野においても撮像を行った。その結果、別視野においても SHIN3 細胞が選択的に傷害を受けている様子が観測され、H226 細胞はほぼ intact な状態で生存しているように見受けられた（Fig. 2-3-1 下段）。以上より、酵素活性の異なる 2 細胞が隣接している状態であっても、gGlu-FMA はがん細胞を選択的に傷害することが可能であり、プロドラッグ型抗がん剤として優れた選択性を有する化合物であることが明らかとなった。

Protocol

- ↓ Seed SHIN3 cells (stained with CellTracker™ Blue) and H226 cells (stained with CellTracker™ Green) on a same 35 mm glass-bottom dish by 1.5×10^5 cells/dish, incubate at 37°C in 5%CO₂ for 12 h
- ↓ Change medium (RPMI1640, 10% FBS, no phenol red) containing gGlu-FMA 25 μM, EthD-1 1 μM
- ↓ Timelapse fluorescence imaging with SP5 for 24 h

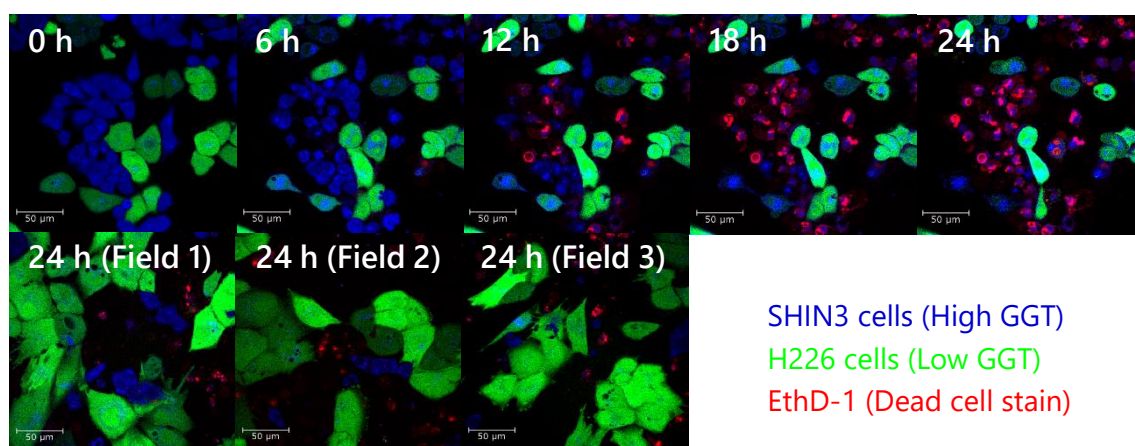


Fig. 2-3-1 | 共培養条件下における gGlu-FMA の選択性評価（上段）タイムラプスイメージング（下段）24 時間後の別視野における蛍光画像

また、同様のプロトコルでフローサイトメトリーによる解析も行ったところ、細胞集団全体で見ても SHIN3 細胞のみが選択的に死滅していることが確認でき、死細胞の割合も CCK-8 アッセイの結果と相違なかった（**Fig. 2-3-2**）

この結果は、細胞膜上の GGT によって生成したアザキノンメチド中間体が、酵素反応を起こした細胞に入り込むだけの寿命を有していることを示唆するものである。また、アザキノンメチド中間体は隣接した細胞へ到達する前に多量に存在する水分子と反応して消失（解毒）すると予想され、結果的に共培養条件下でも高い選択性を示すことができたのではないかと推察される。

Protocol

↓ Seed SHIN3 cells (stained with CellTracker™ Green) and H226 cells (not stained) on a same well in 6 well plates by 1.5×10^5 cells/well, incubate at 37°C in 5%CO₂ for 12 h

↓ Change medium (RPMI1640, 10% FBS, P/S) containing gGlu-FMA 25 μM, EthD-1 1 μM

↓ Trypsinize and flowcytometry analysis

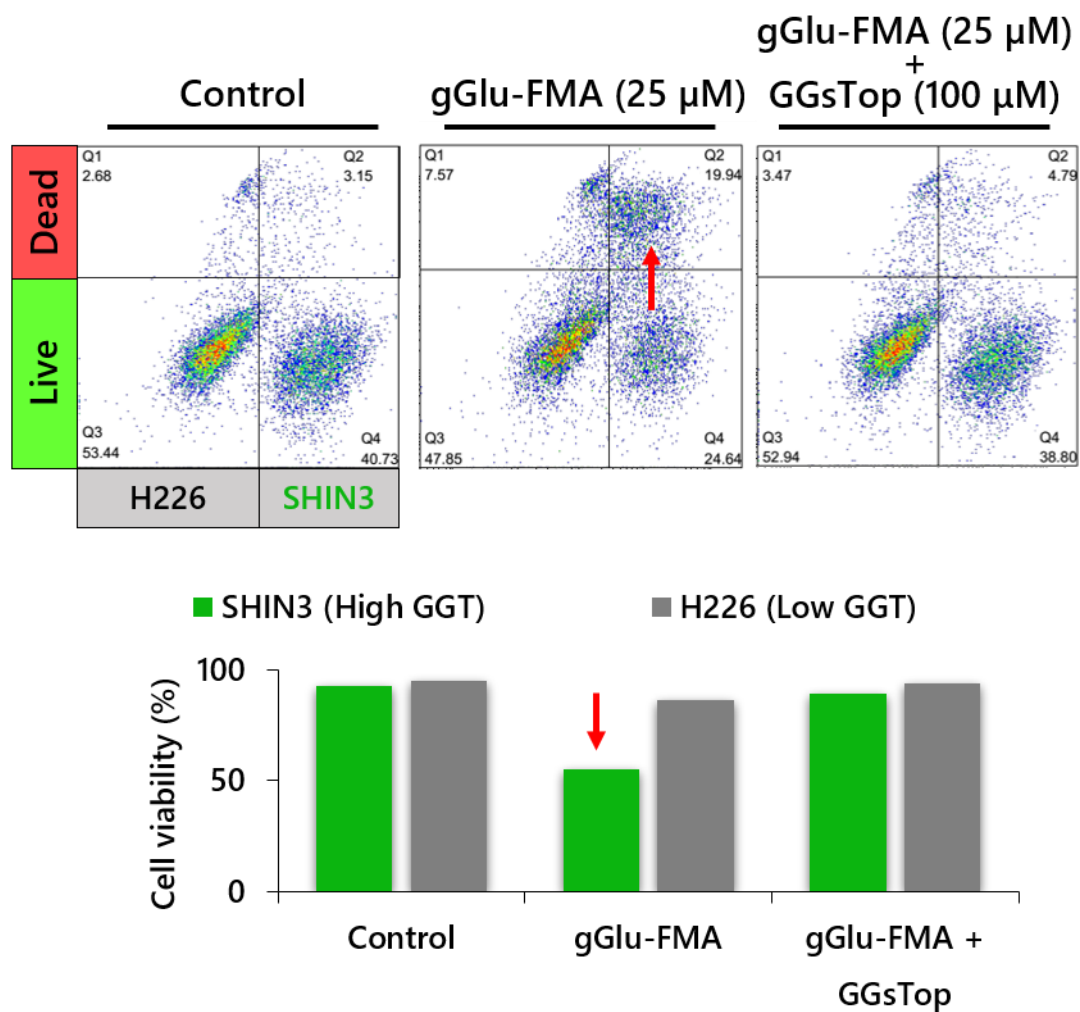


Fig. 2-3-2 | フローサイトメトリーによる共培養条件下での gGlu-FMA の薬効評価（上段）ドットプロット（下段）ドットプロットから算出された細胞生存率

第四節 アザキノンメチド中間体と薬効との関係性

前節では、gGlu-FMA が共培養条件下においても GGT 高発現細胞を選択的に傷害可能であることを示した。一方で、アザキノンメチド中間体がどのように作用しているのかは明らかとなっていないため、薬効発現との関係性について理解を深めることとした。前述したように、アザキノンメチド中間体が細胞膜を透過するだけの寿命を有していると仮定すれば、細胞内に含まれる求核種、具体的にはがん細胞内に 1~10 mM という高い濃度で含まれ³⁴、分子内に求核性の高いチオール基を有するグルタチオン (GSH) と高確率で付加体を形成すると考えられる。

そこで、gGlu-FMA を用い、化合物投与によって細胞内 GSH 濃度が減少しているか検証をすることとした。具体的には、GGT 高発現/低発現細胞にそれぞれ 25 μ M の gGlu-FMA を投与して 24 時間後の細胞ライセート中に含まれる GSH 濃度を定量したところ、GGT 高発現細胞でのみ gGlu-FMA 投与によって GSH 濃度がコントロールと比較して 8 分の 1 程度まで低下することが明らかとなった (**Fig. 2-4-1**)。また、酸化型グルタチオン (GSSG) の濃度は 1.4 倍程度の増加であり、酸化によって GSH が減少した訳ではないことから、生成したアザキノンメチド中間体が直接 GSH と反応しているものと考えられる。

以上より、細胞外で生成したアザキノンメチド中間体は細胞膜を透過して細胞内の GSH と反応していることが示唆され、25 μ M の gGlu-FMA 投与により数百 μ M レベルの GSH が減少していることから、アザキノンメチド中間体が酵素反応を起こした細胞で効率的に消費されていると推察された。

Protocol

↓ Seed SHIN3 cells and SKOV3 cells in 6 well plates at 2.0×10^5 cells/well, incubate at 37°C in 5%CO₂ for 12 h

↓ Change medium (RPMI1640, 10% FBS, P/S) containing gGlu-FMA 25 μ M, incubate at 37°C in 5%CO₂ for 24 h

↓ Wash with PBS \times 2, add CellLytic M 500 μ L in each well

↓ Centrifuge at 15000 rpm for 15 min

↓ Measure protein concentration of supernatant, prepare 0.2 mg/mL lysate

↓ Measure GSH/GSSG concentration in lysate by using GSSG/GSH Quantification Kit

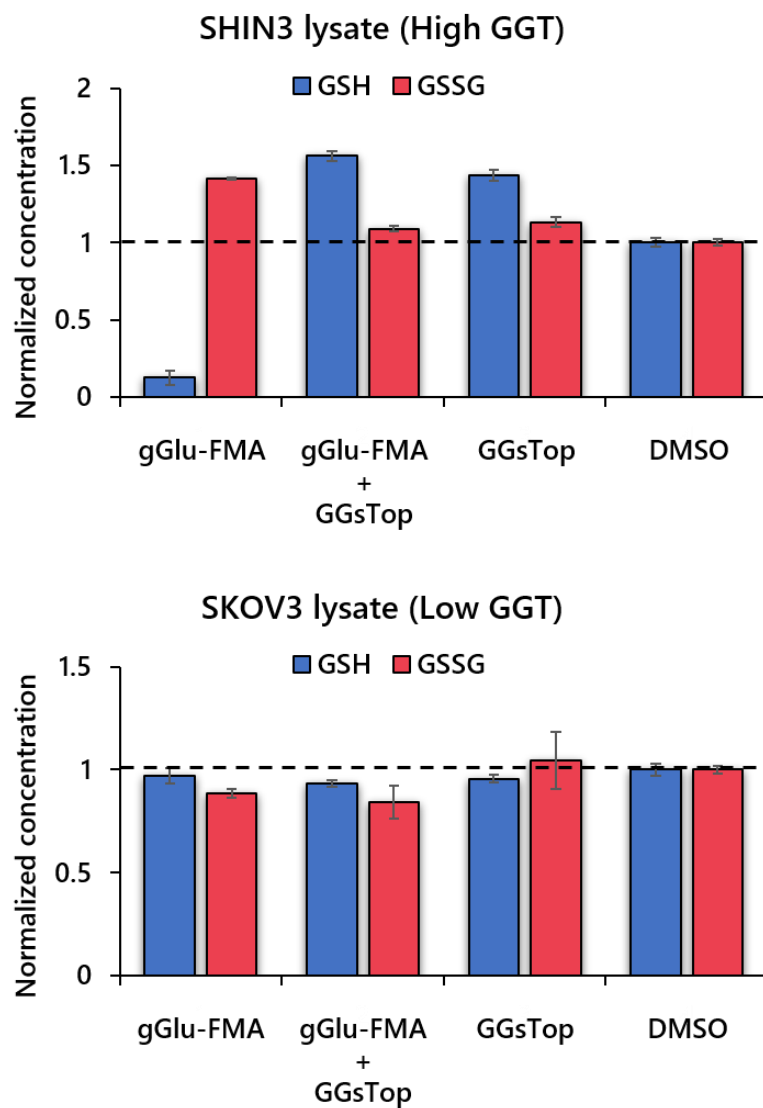


Fig. 2-4-1 | gGlu-FMA (25 μ M) 投与 24 時間後における SHIN3 細胞および SKOV3 細胞ライセート中含まれるグルタチオン濃度 (縦軸の濃度は DMSO 投与群の値で標準化している)

ここまでの検討により、gGlu-FMA は細胞内の GSH 濃度を大きく低下させる作用があることを見出しているが、GSH は本来抗酸化物質として働くことで細胞内のレドックスバランスを保っており、GSH が枯渇すると細胞内の活性酸素種（ROS）が増加し、ミトコンドリアではチトクローム c の流出やアポトーシス誘導因子（AIF）が放出され、結果的にアポトーシスを引き起こすことが知られている (Fig. 2-4-2)³⁵。

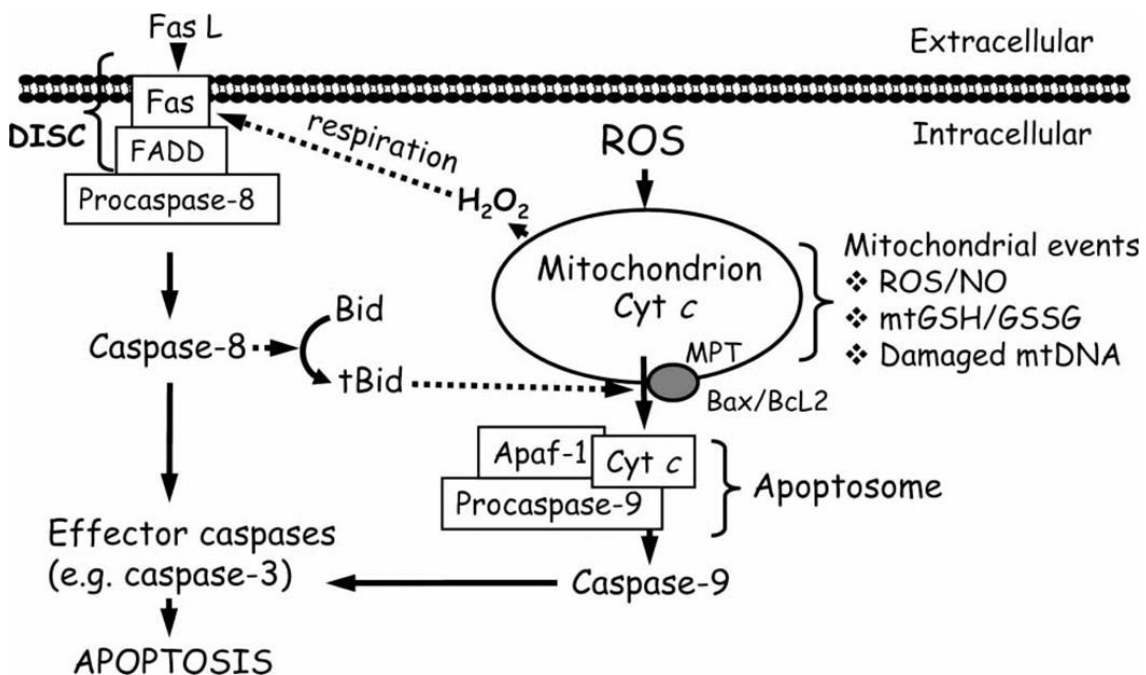


Fig. 2-4-2 | ミトコンドリアにおける酸化ストレスとアポトーシスの関係性

そこで、gGlu-FMA 投与により実際にアポトーシスが起きているか確認することとした。具体的には、25 μ M の gGlu-FMA を SHIN3 細胞（GGT 高発現株）に投与し、24 時間後に Annexin V-FITC（アポトーシス細胞を染色）および EthD-1（ネクローシス細胞および後期アポトーシス細胞を染色）による染色を行い、FACS 装置にて解析を行った。その結果、gGlu-FMA 投与により 24 時間後には約 40%の細胞がアポトーシスへ移行しており、ネクローシス様の細胞集団はほとんど検出されなかった (Fig. 2-4-3)。

以上の検討より、GGT 活性によって生成したアザキノンメチド中間体が細胞内の GSH

と付加体を形成し、GSH が枯渇することで細胞内のレドックスバランスが大きく崩れ、結果的にアポトーシスが引き起こされた可能性が示唆された。一方で、細胞内 GSH 以外にも生存に必要なタンパク質の活性残基等と付加体を形成している可能性もあり、薬効発現メカニズムに関しては今後詳細に検証していく予定である。

Protocol

- ↓ Seed SHIN3 cells (1.5×10^5 cells/well) in 6 well plates, incubate at 37°C in 5% CO_2 for 12 h
- ↓ Replace medium (RPMI1640, 10% FBS, P/S) containing 25 μM gGlu-FMA, incubate at 37°C in 5% CO_2 for 24 h
- ↓ Trypsinize, add staining solution containing 1 μL Annexin V-FITC and 1 μM EthD-1, incubate at 37°C for 15 min
- ↓ Flowcytometry analysis

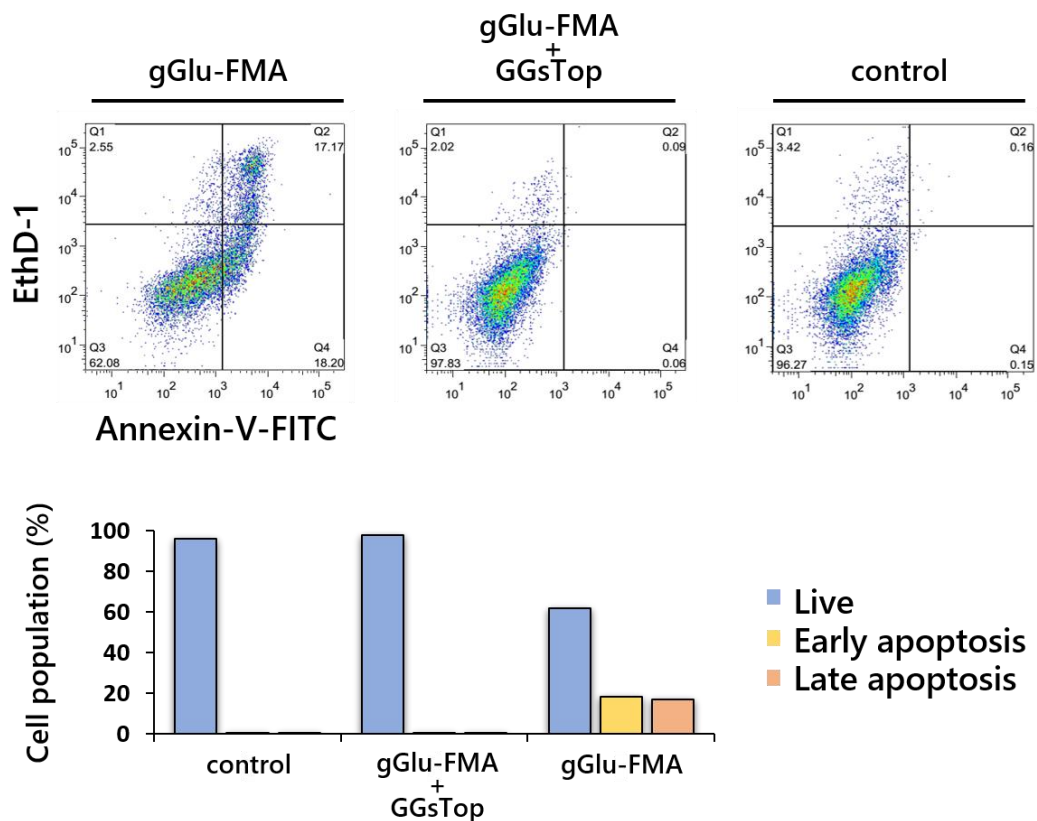


Fig. 2-4-3 | SHIN3 細胞に gGlu-FMA を投与して 24 時間後のアポトーシス解析 (上段) ドットプロット (B) ドットプロットから算出したアポトーシス細胞の割合

四節 小括

本章では、当研究室で開発された SPiDER- β Gal1 の構造と原理を参考に、がん細胞特異的な酵素活性により細胞選択的にキノンメチド種を放出することで細胞死を誘導する新たなプロドラッグ型抗がん剤設計法を考案し、アミノペプチダーゼである GGT や DPP-IV、グリコシダーゼである β -ガラクトシダーゼを標的とした 3 種のプロドラッグ候補化合物の創製に成功した。この際、選択性が不十分な場合や薬効を示さない場合であっても酵素認識部位やキノンメチド種の構造変換によって簡便に改善可能であることがわかり、汎用性の高いプロドラッグシステムであることが示唆された。

また、GGT を標的としたプロドラッグ候補化合物である gGlu-FMA は、GGT 高発現/低発現細胞が隣接している共培養系においても GGT 高発現細胞に選択的に傷害を与えることが可能であることが明らかとなった。さらに、gGlu-FMA には GGT 高発現細胞の細胞内 GSH 濃度を数百 μ M のオーダーで減少させる作用があることが明らかとなり、アポトーシス経路にて細胞が死滅していることから、GGT 活性によって生成したアザキノンメチド中間体が細胞内 GSH を枯渇させることで細胞内のレドックスバランスが大きく崩れ、結果的に細胞死を引き起こされることが示唆された。

第三章

in vivo で使用可能な 高選択的プロドラッグ型抗がん剤の創製

第一節 gGlu-FMA 誘導体の合成と *in vitro* 薬効評価

第二章では、GGT 高発現細胞のみを優れた選択性で傷害可能な gGlu-FMA を見出している。一方で、gGlu-FMA の細胞系での EC_{50} 値は $25\ \mu\text{M}$ 程度であり、 nM オーダーの EC_{50} 値を有する既存の抗がん剤と比較するとその殺細胞活性は弱く、*in vivo* での使用を考えると更なる殺細胞活性の向上が望まれる。そこで、gGlu-FMA の誘導体化によってこれらを達成することとした。

第二章で述べたように、GGT 活性により生成したアザキノンメチド中間体は細胞内の GSH と効率的に反応していることが示唆されており、この付加体形成は本プロドラッグの薬効発現に重要な過程であることが考えられる。従って、アザキノンメチド中間体の電子状態は薬効に直接影響する因子となり得ると推測した。具体的には、キノンメチド種は電子欠損の化学種である³⁶ ため、電子吸引性基をベンゼン環に導入することで更に反応性が高まり、細胞内 GSH 等の細胞内求核種と反応しやすくなると考えた (Fig. 3-1-1)。実際、Weinert らはキノンメチドに電子吸引性基を導入することで水やチオール等の求核種との反応性が向上するという報告をしている³⁷。

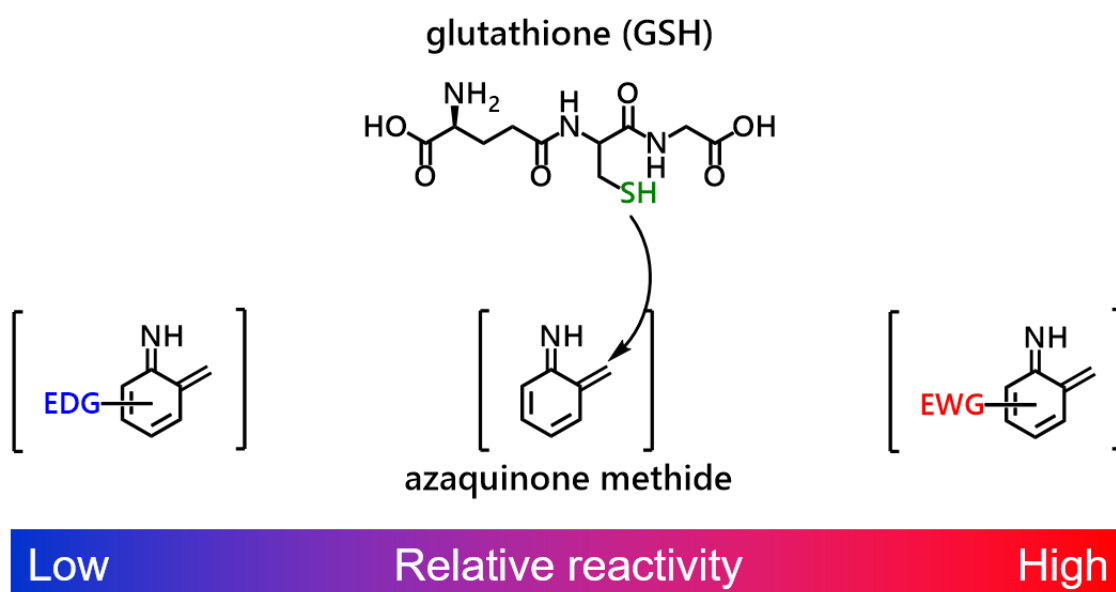


Fig. 3-1-1 | 推定される置換アザキノンメチド中間体と細胞内求核種との反応性

以上を踏まえ、gGlu-FMA のベンゼン環 4 位あるいは 5 位に電子吸引性基を中心とする種々の置換基を導入した誘導体を新たに設計し、合成することとした (Fig. 3-1-2)。

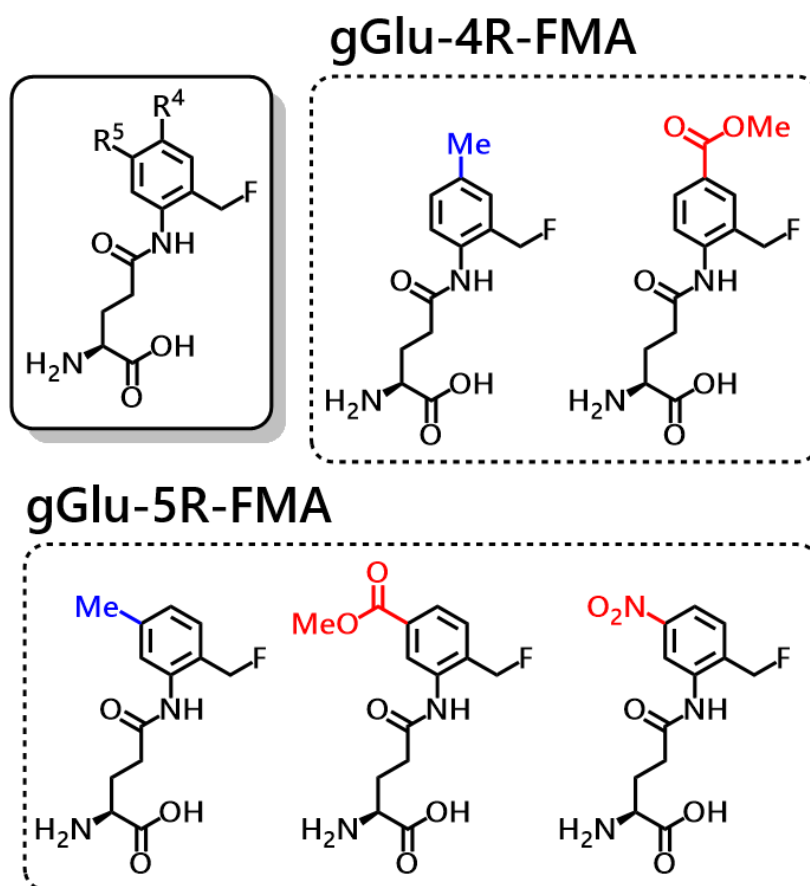
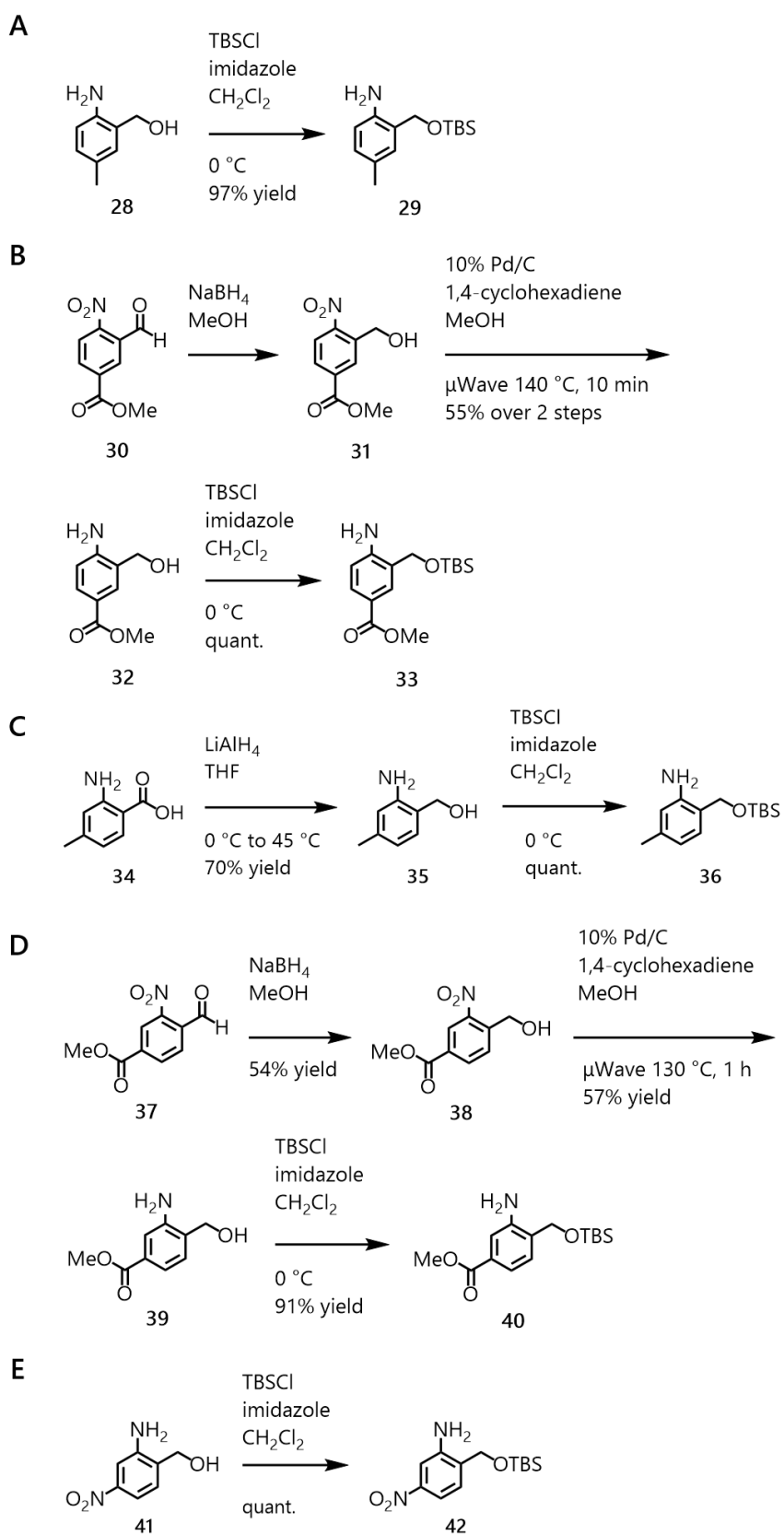


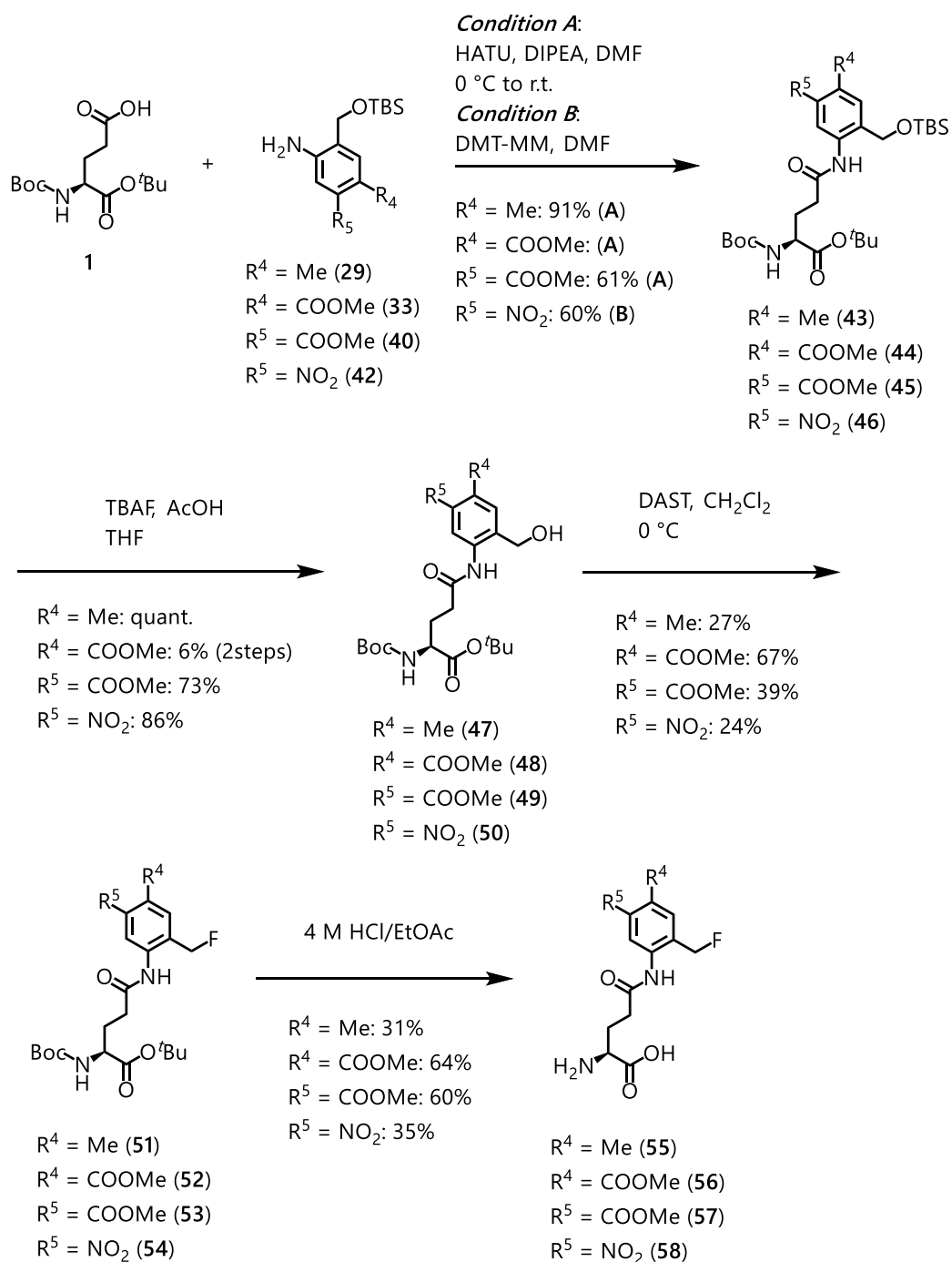
Fig. 3-1-2 | 新たに設計した gGlu-FMA 誘導体の構造

これら誘導体は、Scheme 3-1-1 に示すように既知のビルディングブロックをそれぞれ合成し、gGlu-FMA と同様の合成経路 (Scheme 2-2-1) で合成することとした。



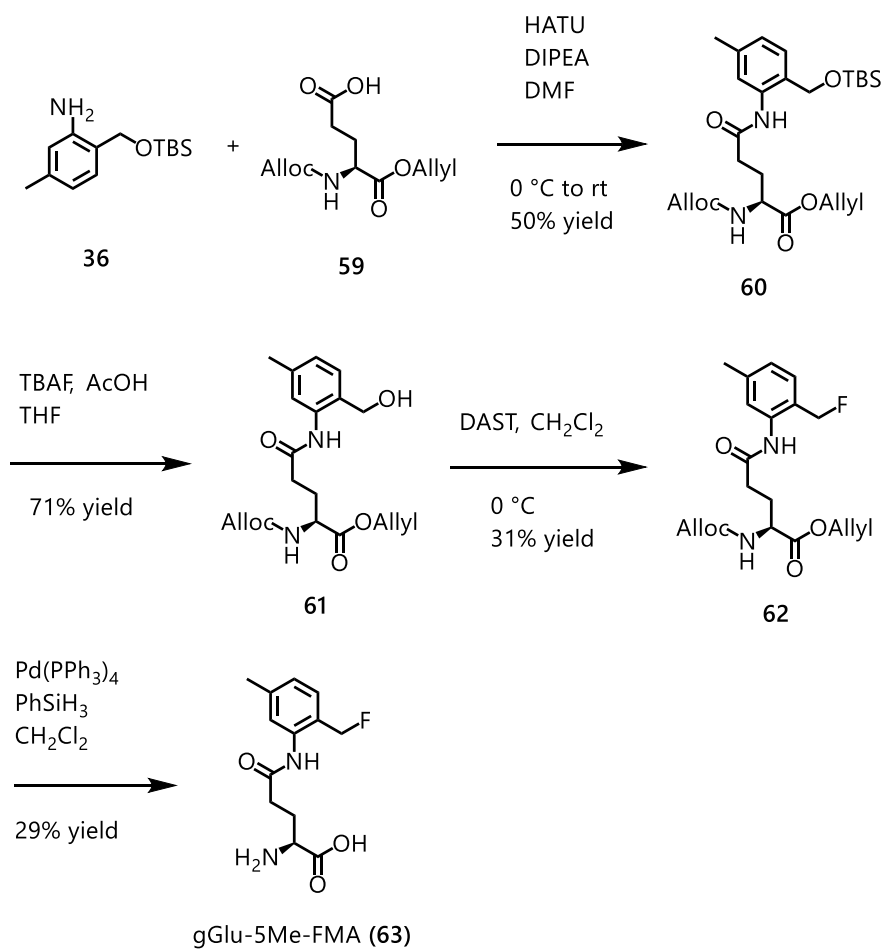
Scheme 3-1-1 | ビルディングブロックの合成(A~E)

検討の結果、5 位にメチル基を有するもの以外は gGlu-FMA と同様の合成経路にて目的物を得ることが可能であった (Scheme 3-1-2)。



Scheme 3-1-2 | gGlu-4R-FMA ($R = \text{Me}, \text{COOMe}$) および gGlu-5R-FMA ($R = \text{Me}, \text{COOMe}, \text{NO}_2$) の合成

5 位にメチル基を有するものはフルオロメチル基部分が不安定であり、アミノ酸脱保護の際に酸処理を行うと分解が起こり目的物を回収することができなかった。そこで、*N*-Alloc-Glu-OAllyl (59) を出発原料として用い、同様の合成経路に従ってフルオロメチル体へと導いたのち、Pd(PPh₃)₄ とフェニルシランを用いた中性条件下での脱保護³⁸を行うことで目的の gGlu-5Me-FMA を得ることができた (Scheme 3-1-3)。



Scheme 3-1-3 | gGlu-5Me-FMA の合成

次に、合成した gGlu-FMA 誘導体が GGT の基質となるか確認するため、精製酵素との酵素反応を行い、LC/MS によって解析を行った。その結果、いずれの誘導体も経時的に原料が消費されて生成物である 2-アミノベンジルアルコール体へと変換されることが明らかとなった (Fig. 3-1-3)。

Protocol

↓ gGlu-FMA deriv. 100 μ M in PBS (pH 7.4), 1% DMSO as a co-solvent
 ↓ Add GGT 1 U/mL
 ↓ LC/MS analysis (at 37°C) every 15 min (eluent A: H₂O containing 0.1% ammonium formate, eluent B: 80% acetonitrile/H₂O, 0.1% ammonium formate, A/B = 95/5→5/95 in 15 min)

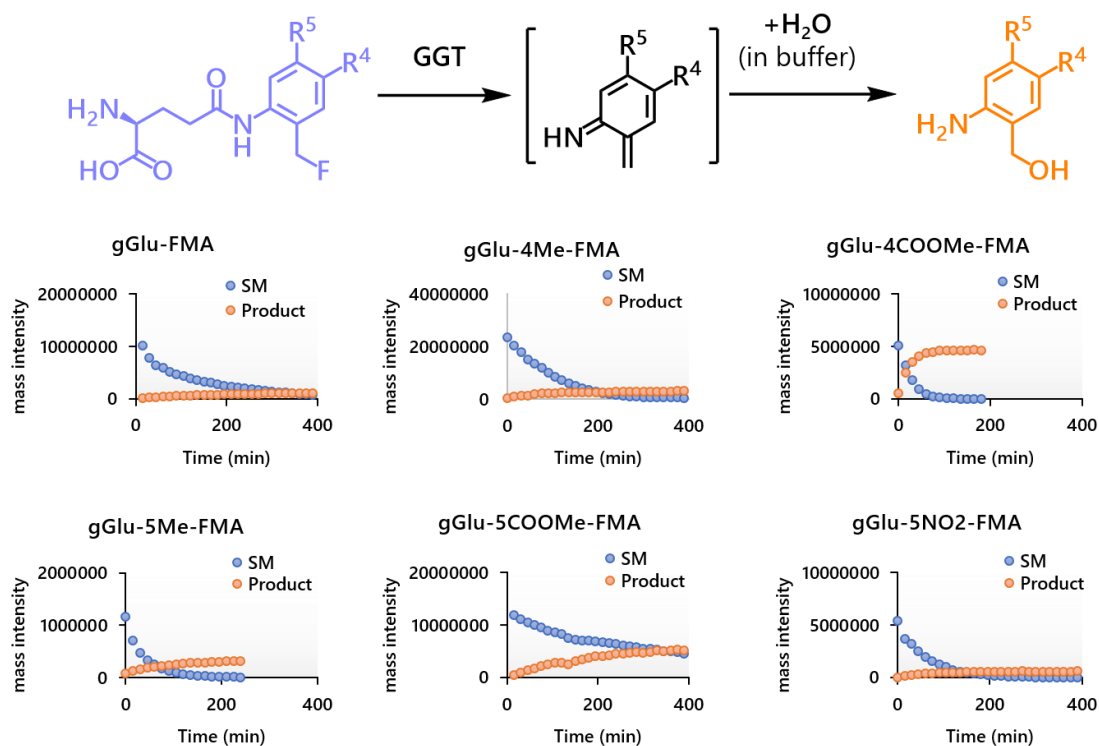


Fig. 3-1-3 | LC/MS による gGlu-FMA 誘導体と GGT との反応物解析

続いて、5 種の gGlu-FMA 誘導体を用い、前章同様 CCK-8 アッセイによる *in vitro* 薬効評価を行った。以下に、4 位置換誘導体 (gGlu-4R-FMA) の結果について示す。

まず、4 位に電子吸引性基であるメトキシカルボニル基を導入した誘導体では、アザキノンメチド中間体の反応性が向上し細胞内求核種とより反応しやすくなることで殺細胞活性が増強すると予想されたが、期待に反して薬効はやや減弱する結果となった (Fig. 3-1-4)。一方、4 位にメチル基を導入した誘導体は、SHIN3 細胞に対する gGlu-FMA の殺細胞活性 ($EC_{50} \approx 25 \mu\text{M}$) を上回ることが明らかとなり、 EC_{50} 値はおおよそ $3 \mu\text{M}$ であった。また、この 4Me 体は GGT 低発現細胞である SKOV3 細胞には依然として毒性を示さないことが明らかとなり、gGlu-FMA の高い細胞選択性を維持したまま殺細胞活性を向上させることに成功した。

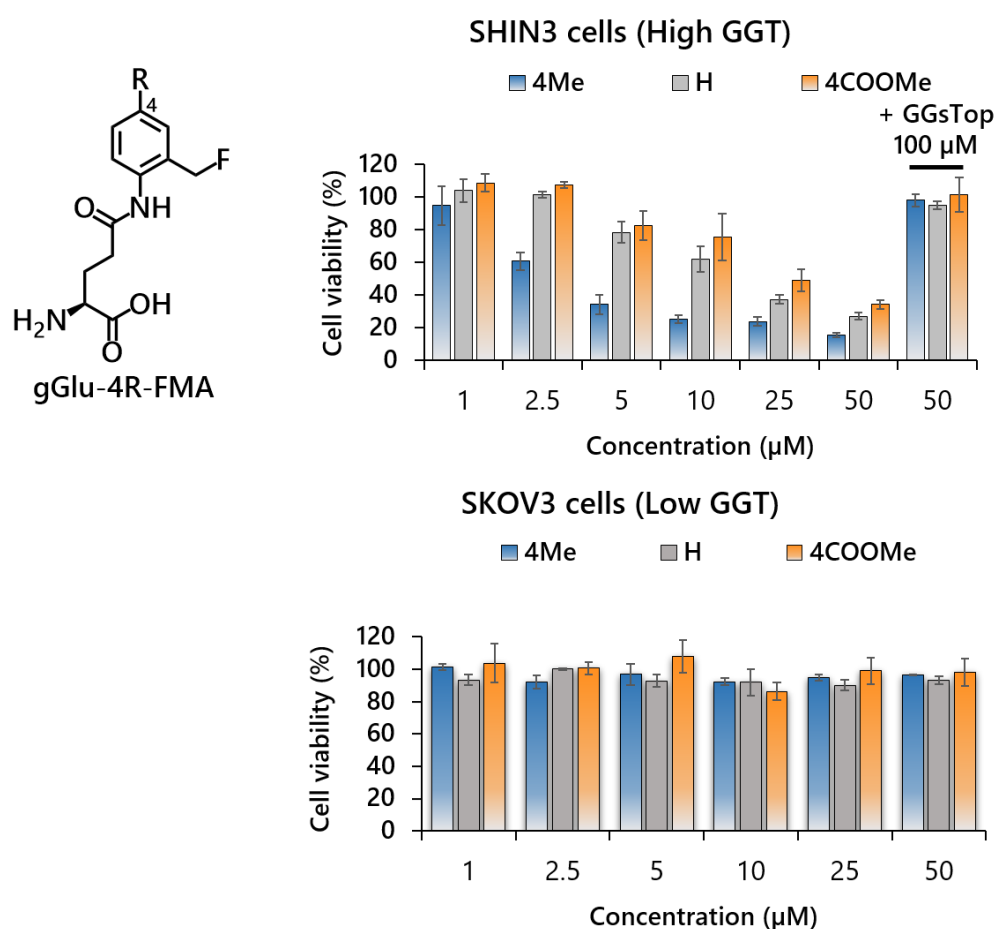


Fig. 3-1-4 | gGlu-4R-FMA 投与 24 時間後の細胞生存率 (n = 3)

次に、5 位置換誘導体 (gGlu-5R-FMA) の結果を示す。4 位置換誘導体と同様、殺細胞活性の向上が期待されたニトロ基やメトキシカルボニル基を導入した誘導体はいずれも薬効が完全に消失する結果となった (Fig. 3-1-5)。また、5 位にメチル基を導入した誘導体も SHIN3 細胞に対してより強力な殺細胞活性 ($IC_{50} \approx 3 \mu M$) を示し、優れた細胞選択性を維持していることが確認された。

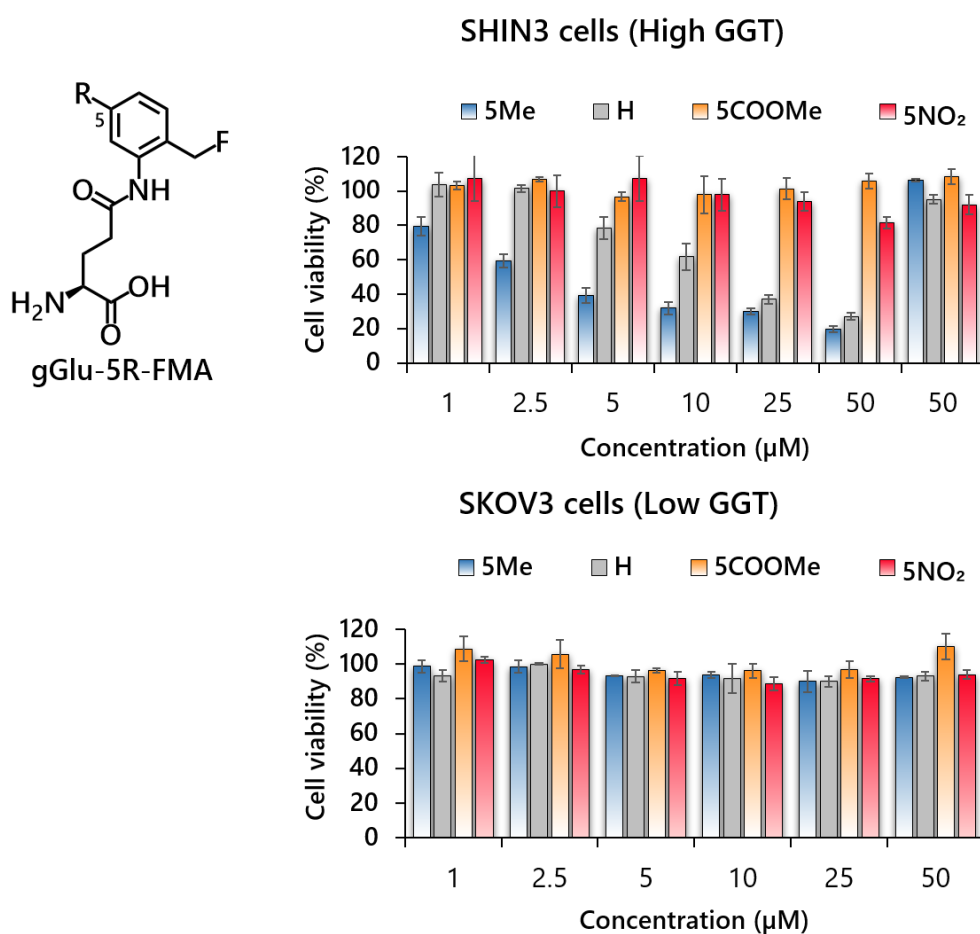


Fig. 3-1-5 | gGlu-5R-FMA 投与 24 時間後の細胞生存率 (n = 3)

更に、誘導体化により殺細胞活性が向上した gGlu-5Me-FMA を用いて、第二章第二節で述べたような共培養系での薬効評価を行った。薬剤投与直後と 24 時間後の同視野における蛍光画像を取得し比較したところ、gGlu-FMA と同様 SHIN3 細胞が選択的に死滅する様子が観測され、gGlu-5Me-FMA も高い選択性を有することが示唆された (Fig. 3-1-6)。

Protocol

↓ Seed SHIN3 cells (stained with CellTracker™ Blue) and H226 cells (stained with CellTracker™ Green) on a same 35 mm glass bottom dish with grid by 1.5×10^5 cells/well, incubate at 37°C in 5%CO₂ for 12 h

↓ Change medium (RPMI1640, 10% FBS, no phenol red) containing gGlu-FMA 25 μM, EthD-1 1 μM, incubate at 37°C in 5%CO₂ for 30 min

↓ Fluorescence imaging with SP5 (0 h), incubate at 37°C in 5%CO₂ for 24h

↓ Fluorescence imaging with SP5 (24 h)

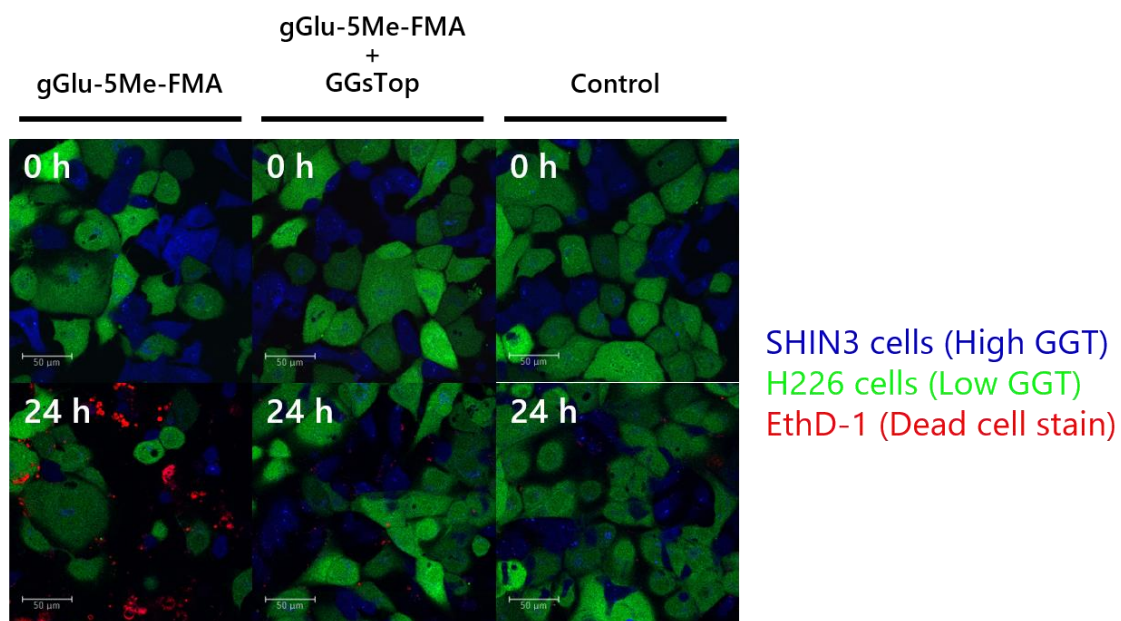


Fig. 3-1-6 | 共培養条件下における gGlu-5Me-FMA の選択性評価 (上段) 薬剤添加直後の蛍光画像 (下段) 薬剤添加 24 時間後の蛍光画像

ここまでの検討において、gGlu-FMA のベンゼン環部位へのメチル基導入によって選択性を保ったまま殺細胞活性が向上することを見出している。一方で、アザキノンメチド中間体の反応性向上による殺細胞活性の増強が期待されたニトロ基やメトキシカルボニル基の置換した gGlu-FMA 誘導体はいずれも薬効が減弱する結果となり、電子吸引性基の導入は逆効果であることが示唆されている。

そこで、これらの置換基効果について理解を深めるため、まずは前章第 4 節で述べた細胞内グルタチオン濃度の定量を行うこととした。具体的には、gGlu-FMA、殺細胞活性が向上した gGlu-4Me-FMA、殺細胞活性が減弱した gGlu-5NO₂-FMA の 3 種の化合物を選択し、薬剤投与 24 時間後の細胞内 GSH を定量した。

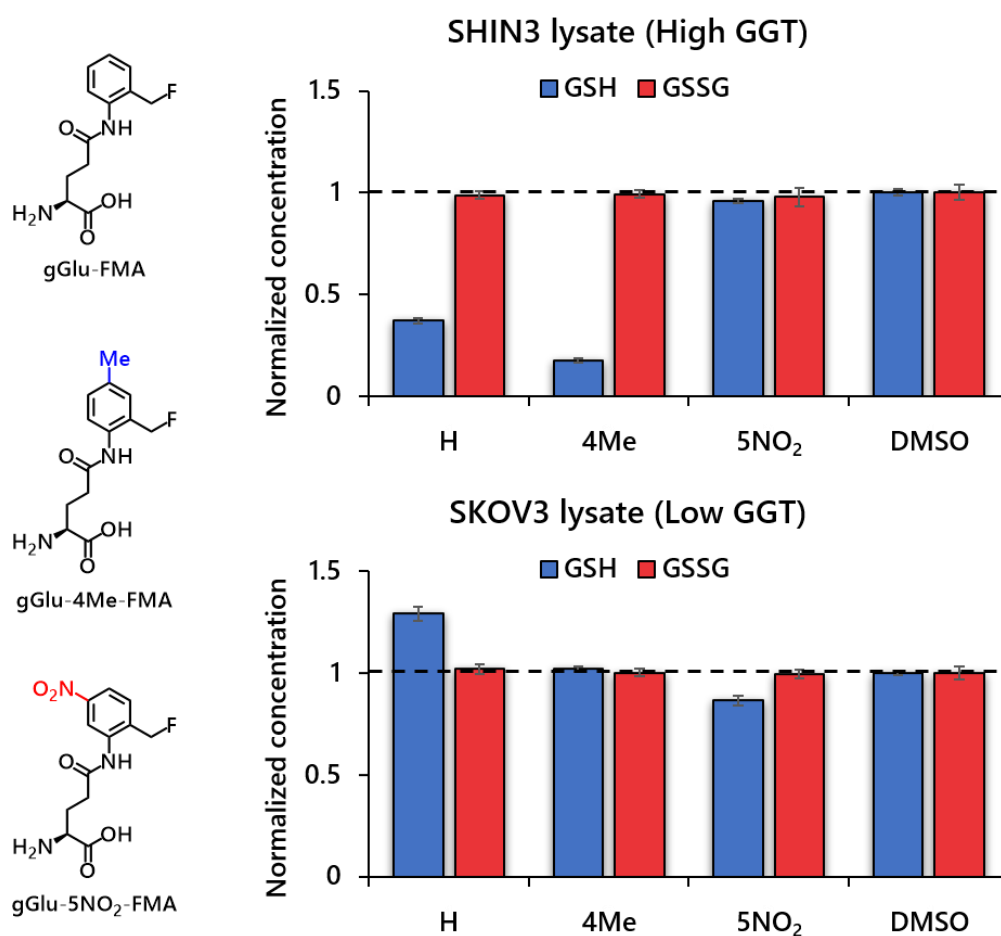


Fig. 3-1-7 | gGlu-FMA 誘導体投与による細胞内グルタチオン濃度の変動 (25 μM, 24 h)

その結果、CCK-8 アッセイにおいて薬効を示していた gGlu-FMA および gGlu-4Me-FMA では大幅なグルタチオン濃度の低下が見られた一方で、薬効を示さなかった gGlu-5NO₂-FMA 投与ではグルタチオン濃度がほとんど変化していないことが明らかとなった (Fig. 3-1-7)。

この結果は、GGT 活性によって生じたニトロ基置換アザキノンメチド中間体が細胞内グルタチオン以外の求核種と反応して消失した可能性を示唆するものであり、具体的には、ニトロ基といった電子吸引性基が置換したアザキノンメチド中間体は非常に高反応性であるため、これらが細胞内に移行する前に細胞外液に大量に含まれる水分子と反応してしまったことが予想される (Fig. 3-1-8)。

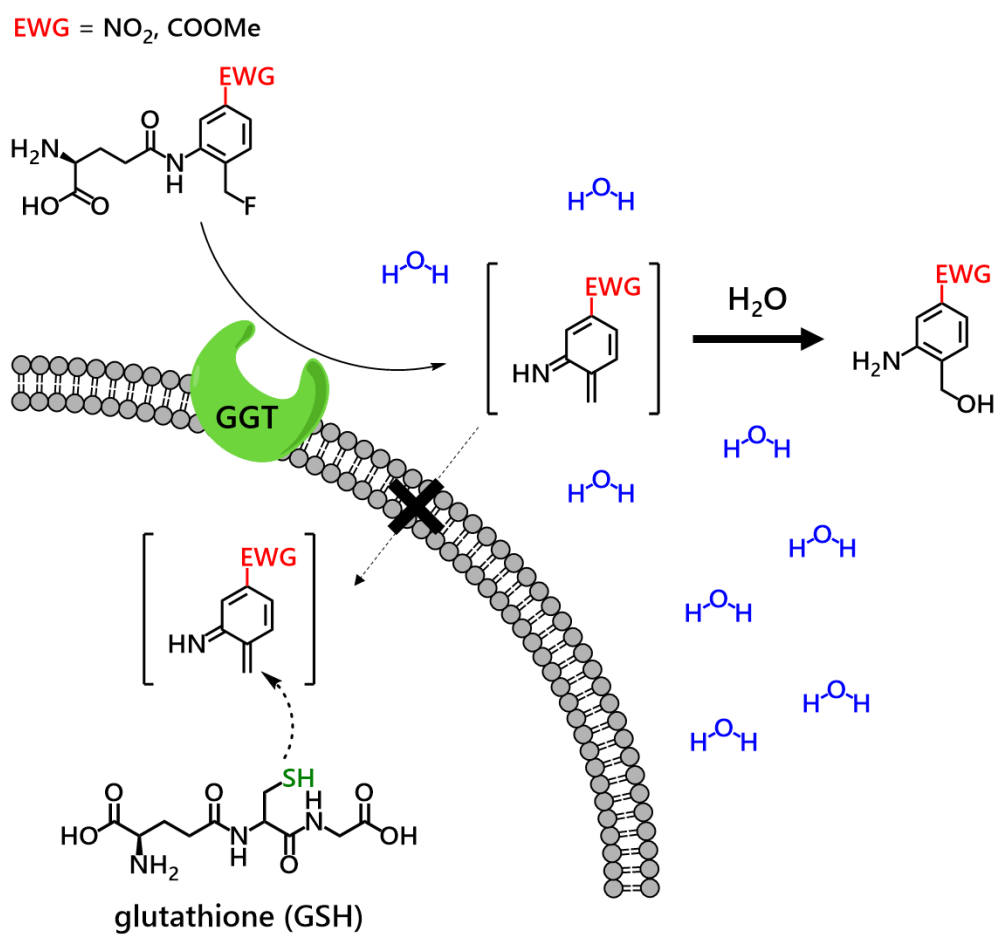


Fig. 3-1-8 | 推定される電子吸引性基置換誘導体の薬効消失メカニズム

さらに、置換基導入によって予想したようなアザキノンメチド中間体の反応性の差が生じ得るのか検証するため、アザキノンメチド中間体と反応する分子種を一義的に水と GSH の 2 種と仮定し、アザキノンメチド中間体とこれら求核種との反応性を DFT 計算によって見積もることとした。具体的には、Fig.3-1-9 に示した 1 例のように、構造最適化したアザキノンメチド-水付加体あるいはアザキノンメチド-エタンチオール (GSH の代わりに使用) 付加体から水あるいはエタンチオールを脱離させていくスキャンを行うことで遷移状態を取得し、遷移状態の構造最適化、IRC 計算を行うことで付加体形成に必要な活性化エネルギーを算出した。尚、計算は全て Gaussian 09 の B3LYP/6-311+g(2d,p)にて行った。

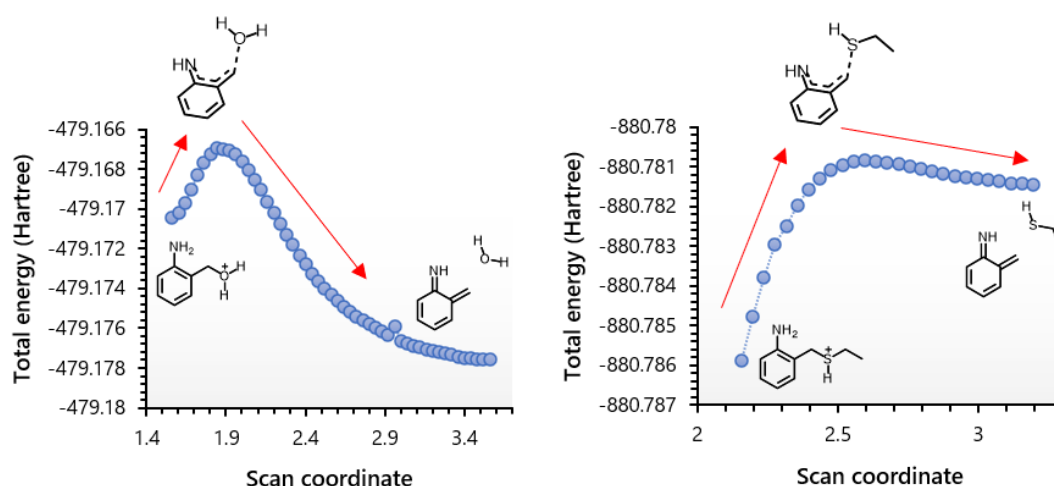


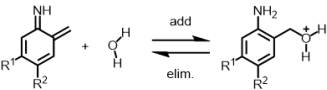
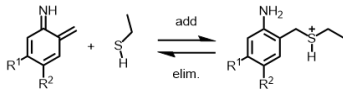
Fig. 3-1-9 | アザキノンメチドに対する水およびエタンチオール付加における遷移状態探索の流れ

合成した誘導体に対応する置換基を有したアザキノンメチド類に対して一連の計算を行い、算出された活性化エネルギーを Table 3-1-1 にまとめた。尚、エタンチオールとの付加反応において遷移状態が取得できなかったもの (5NO₂, 5COOMe, 4COOMe) は活性化エネルギーを 0 として記載している。

DFT 計算の結果、アザキノンメチドとエタンチオールとの付加体形成における活性化エネルギーは置換基の有無に関わらず非常に小さく、いずれのアザキノンメチド中間体も細胞内へ移行した際には GSH と速やかに反応することが予想された。一方で、アザキノンメチドと水の付加体形成における活性化エネルギーは置換基の種類によってばらつきがみられ、電子豊富なアザキノンメチドの方が相対的に水と反応しづらくなることが示された。

以上の検討から、GGT 活性によって細胞外で生成したアザキノンメチド中間体が細胞内へ移行する前に水分子と反応するという過程が重要である可能性が示唆され、メチル基の導入によって殺細胞活性が向上したのは、アザキノンメチド中間体がより水分子と付加体を形成しづらくなり、相対的にグルタチオンとの反応効率が向上したことによるものと推測された。

Table 3-2-1 | DFT 計算によるアザキノンメチド中間体の反応性

	ΔE_{add} (kJ/mol)	ΔE_{elim} (kJ/mol)		ΔE_{add} (kJ/mol)	ΔE_{elim} (kJ/mol)
$R^1 = \text{NO}_2, R^2 = \text{H}$	10.7	21.5	$R^1 = \text{NO}_2, R^2 = \text{H}$	0	-
$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{COOMe}$	15.1	14.6	$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{COOMe}$	0	-
$R^1 = \text{COOMe}, R^2 = \text{H}$	18.4	14.6	$R^1 = \text{COOMe}, R^2 = \text{H}$	0	-
$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{H}$	26.0	8.8	$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{H}$	0	29.8
$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{Me}$	32.9	7.7	$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{Me}$	0	26.9
$R^1 = \text{Me}, R^2 = \text{H}$	35.0	4.2	$R^1 = \text{Me}, R^2 = \text{H}$	5.4	23.2

第二節 腹膜播種モデルマウスを用いた *in vivo* 薬効評価

前節で合成した gGlu-FMA 誘導体の中で最も強い殺細胞活性を示し、且つ高い化学的安定性を有していた gGlu-4Me-FMA を用いて *in vivo* での応用、具体的には腹膜播種モデルに対する治療効果を評価することとした。

腹膜播種とは、主に胃がん、大腸がん、卵巣がんの原発巣から臓器の壁を突き破って腹腔内へ転移してきたものを指し、非常に悪性度が高いことから腹膜播種が認められた時点でステージⅢあるいはⅣの診断がつく^{39,40}。また、腹腔内に癌が散らばってしまうために、基本的には手術不能である場合が多く、現在ではS-1、シスプラチン、イリノテカン、タキサン系抗癌剤を用いた全身化学療法（標準治療はS-1+シスプラチン）が腹膜播種の主な治療法となっている⁴¹。一方で、このような全身化学療法では腹膜播種を有する例の長期生存率は少なく、大腸がんや胃がんの腹膜播種症例ではいずれも5年生存率が10%を下回るという報告がされている^{42,43}。このように腹膜播種患者に対しては有効とされる化学療法剤をすべて使い切ることによって延命を図り、全て無効になれば緩和医療へ移行するといった流れが一般的で、未だに画期的な治療法は確立されていない。

一方、近年では、腹膜播種に対して上記の化学療法剤を患者の腹腔内に直接投与することの有用性が示され始めており、S-1+パクリタキセル経静脈・腹腔内併用療法のように先進医療として認可が下りている治療法も存在する⁴⁴。腹膜播種に対して腹腔内投与をする利点の一つに、全身投与と比較して長時間高い局所濃度を保つことが可能である点⁴⁵が挙げられ、前節で開発したgGlu-4Me-FMAのように水溶性の高い化合物では、全身投与で高い局所濃度を実現することは難しいため、腹腔内投与を行う意義があると考えられる。そこで、腹膜播種モデルマウスに対してgGlu-4Me-FMAを腹腔内投与することで抗腫瘍効果が見られるか検証することとした。

腹膜播種モデルマウスは、GGT 高発現株として知られる A549 細胞⁴⁶ のルシフェラーゼ恒常発現細胞 (A549-luc 細胞) をヌードマウスの腹腔内に注射することで作製した。ルシフェラーゼ発現細胞を用いた理由としては、IVIS 装置を用いることで luciferin-luciferase 反応による生物発光をマウスの体外から検出することが可能であり、マウスをサクリファイスすることなく腹腔内の腫瘍を定量できることから、今回の腹膜播種モデルに採用した。

本検討では、gGlu-4Me-FMA 以外に、腹膜播種の標準治療薬としても用いられる cisplatin (CDDP)⁴¹ の薬効も併せて評価することとし、併用による相乗効果にも期待して併用群も作製することとした。マウスは 1 群 6 匹で saline 群、CDDP 群、gGlu-4Me-FMA 群、gGlu-4Me-FMA+CDDP 群の 4 群を作製し、Fig. 3-2-1 に示すような投薬スケジュールに従って薬剤を腹腔内投与した。また、薬剤投与初日、7 日目、14 日目に IVIS 装置による発光イメージングを行い、14 日目にはマウスを安楽死させたのち、腸間膜を取り出して gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージングにより腹膜播種の有無を確認した。尚、gGlu-4Me-FMA の投与ドーズ (2 mg/kg i.p.) は、事前に簡易的な急性毒性試験を行って長期間の連日投与に耐えうるドーズであることを確認している (data not shown)。また、CDDP に関してはいくつかの既報^{47,48} を基に投与ドーズを設定したが、5 日間連日投与すると顕著な体重減少が見られたため、2 週目以降は休薬という形をとった。

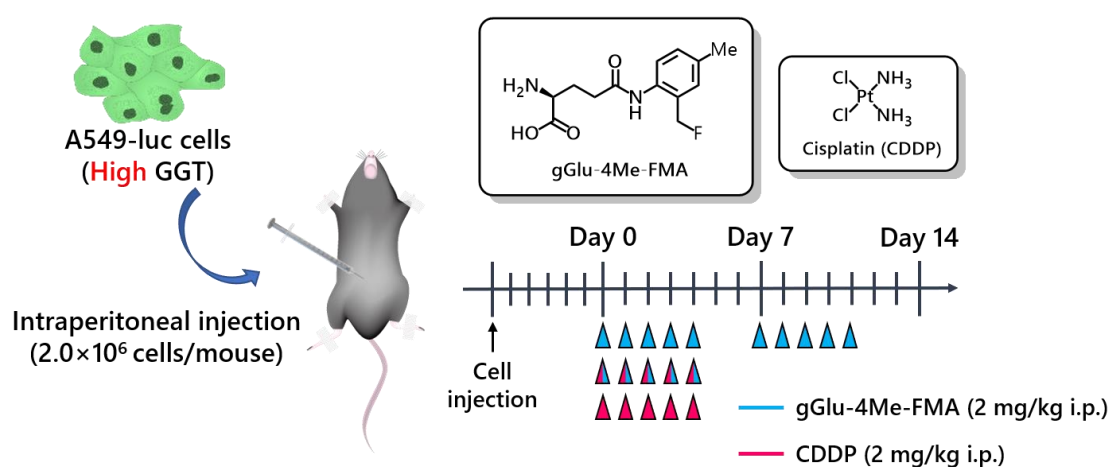


Fig. 3-2-1 | 腹膜播種モデルマウスを用いた in vivo 薬効評価の流れ

まずは、saline 群の結果を示す。発光イメージング画像は 6 匹中代表的な 3 匹を示しているが、saline 群では腹腔内の発光強度が日を追うごとに増加していく様子が確認された (Fig. 3-2-2A, B)。なお、14 日目までは癌の進行による顕著な体重変化は見られず、緩やかに増加していった (Fig. 3-2-2C)。

Protocol (luminescence imaging)

- ↓ A549-luc xenografts were anesthetized with isoflurane.
- ↓ D-luciferin (3.3 mg/200 μ L saline/mouse) was administered i.p.
- ↓ luminescence was measured with IVIS lumina II.

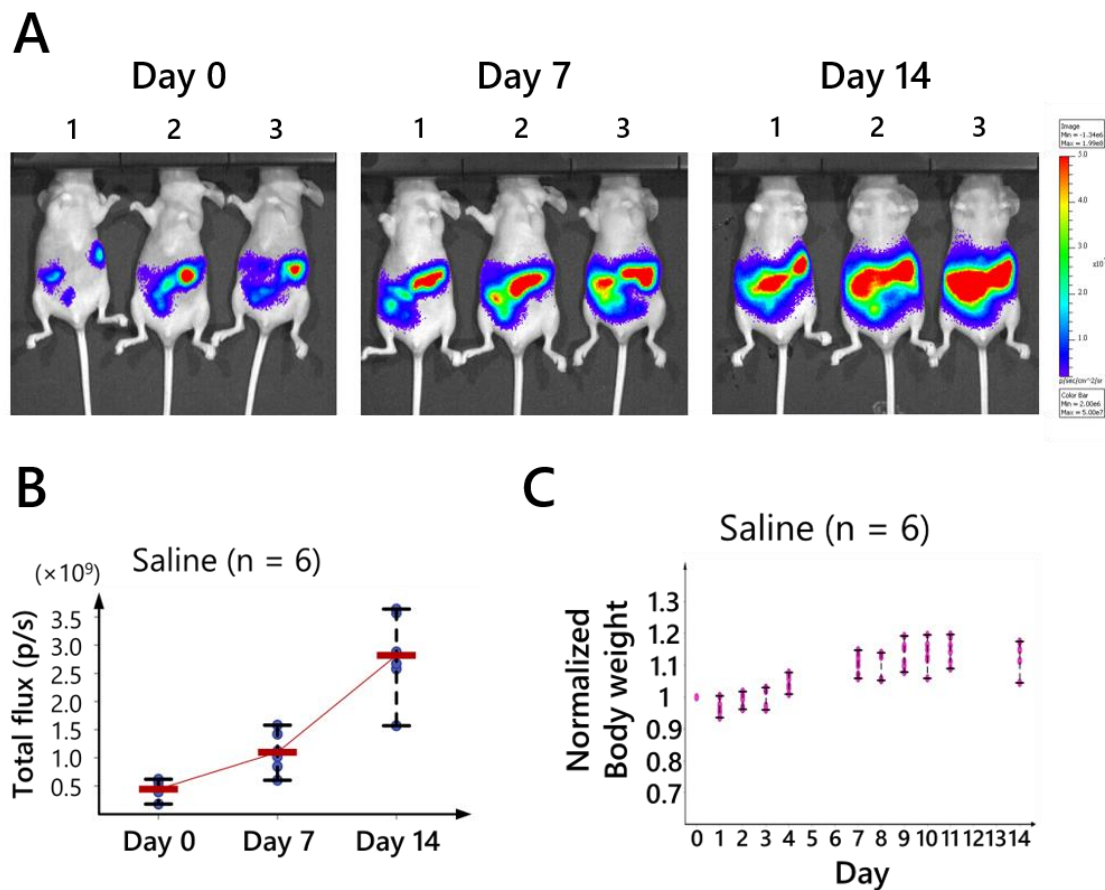


Fig. 3-2-2 | saline 投与群 (n = 6) の結果 (A) IVIS lumina II による発光イメージングの代表画像 (B) 腹腔内の発光強度推移 (C) 体重変化推移 (初日の体重で標準化してある)

また、gGlu-HMRG を用いた蛍光イメージング^{16,17} では緑色蛍光で示されるような腹膜播種が腸間膜上で多数観測され、A549-luc 細胞を腹腔内に播種したマウスが腹膜播種モデルとして機能することが確かめられた (**Fig. 3-2-3**)。

Protocol (fluorescence imaging of mesentery)

- ↓ A549-luc xenografts were euthanized 14 days after initial treatment.
- ↓ Mesentery was resected.
- ↓ Treat gGlu-HMRG 10 μ M (500 μ L), incubate at r.t. for 10 min
- ↓ Fluorescence imaging with MaestroTM In-Vivo Imaging System

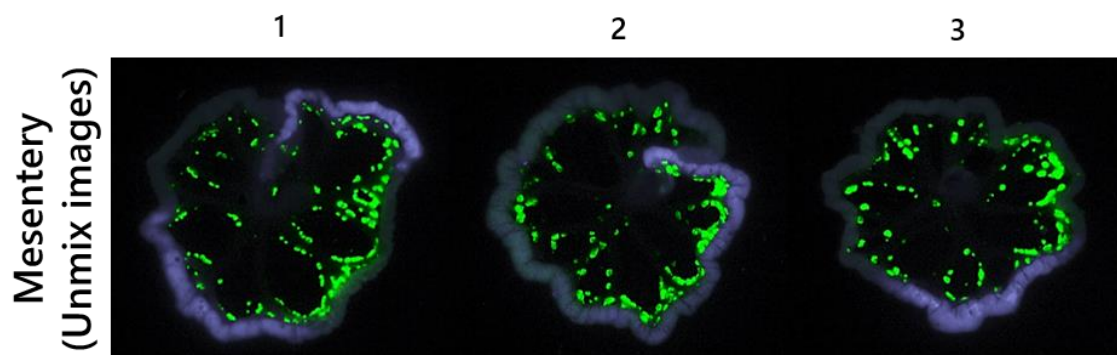


Fig. 3-2-3 | gGlu-HMRG (10 μ M) による腸間膜の蛍光イメージング画像 (Ex. 450-480 nm, Em. 510-600 nm)

次に、CDDP 投与群の結果を示す。前述したように CDDP の毒性が予想以上に強く、1週目の5日間連日投与により顕著な体重減少が見られたため、2週目からは休薬となってしまった (**Fig. 3-2-4C**)。発光イメージングの結果から、腹腔内の発光強度は増加しておらず抗腫瘍効果は見られたものの、がんを死滅させる程の効果は示さないことが明らかとなった (**Fig. 3-2-4A,B**)。また、蛍光イメージングによっても腸間膜上に多くの腹膜播種が残存している様子が確認された (**Fig. 3-2-4D**)。

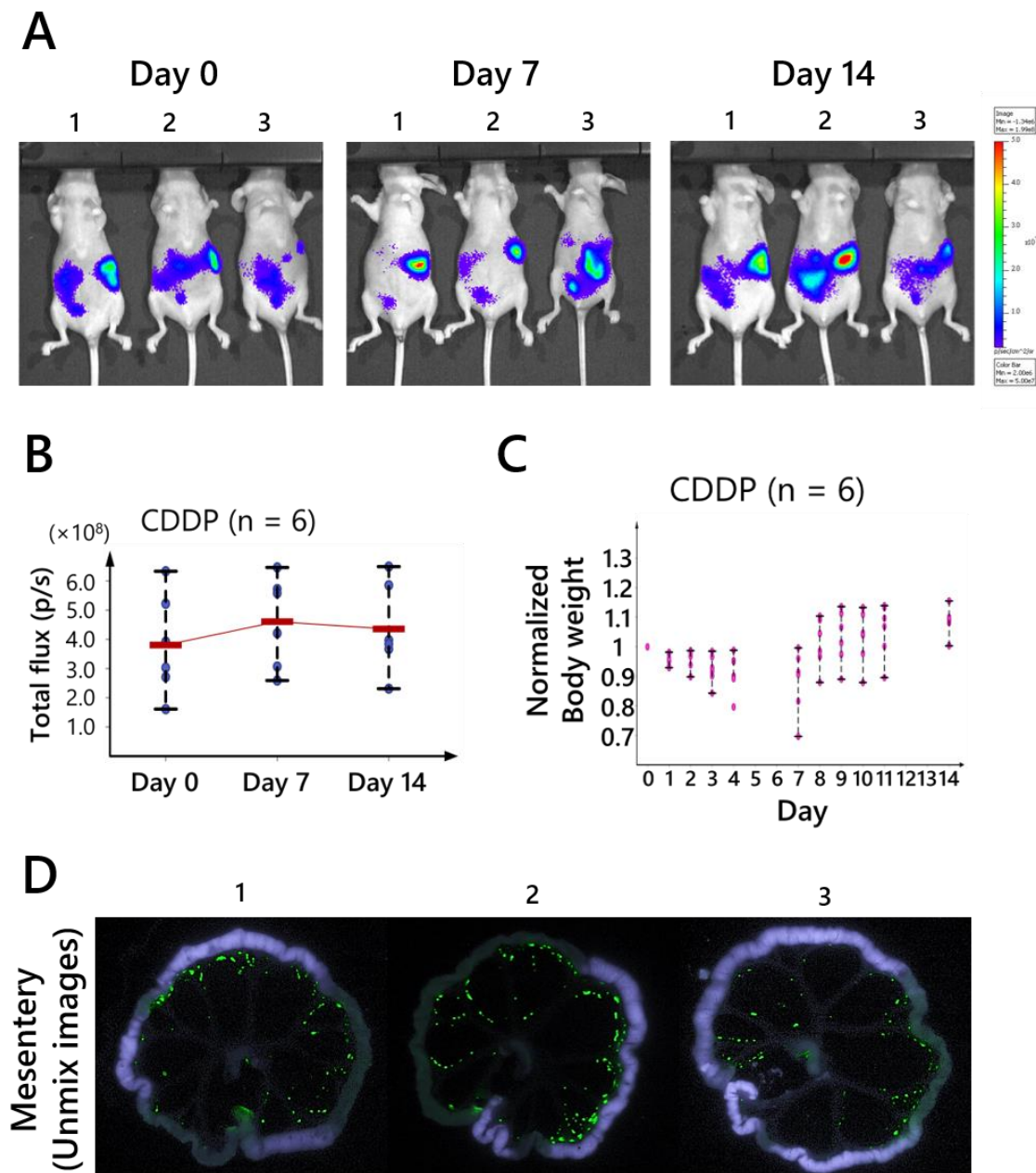


Fig. 3-2-4 | CDDP 投与群 (n = 6) の結果 (A) IVIS lumina II による発光イメージングの代表画像 (B) 腹腔内の発光強度推移 (C) 体重変化推移 (初日の体重で標準化してある) (D) gGlu-HMRG (10 μ M) による腸間膜の蛍光イメージング画像 (Ex. 450-480 nm, Em. 510-600 nm)

続いて、gGlu-4Me-FMA 投与群の結果を示す。発光イメージングの結果から、薬剤投与開始 7 日目時点で腹腔内の発光強度は顕著に減少していることが確認され、蛍光イメージ

ングによっても腸間膜上の腹膜播種が有意に減少していたことから、gGlu-4Me-FMA 単剤での抗腫瘍効果が認められた (Fig. 3-2-5A,B,D)。また、Fig. 3-2-5C に示すように、本薬剤は連日投与を行っても体重減少が見られず、比較的安全性の高い薬剤と考えられるため、更に投与量を上げることができれば癌を完全に死滅させることも可能であると考えられる。

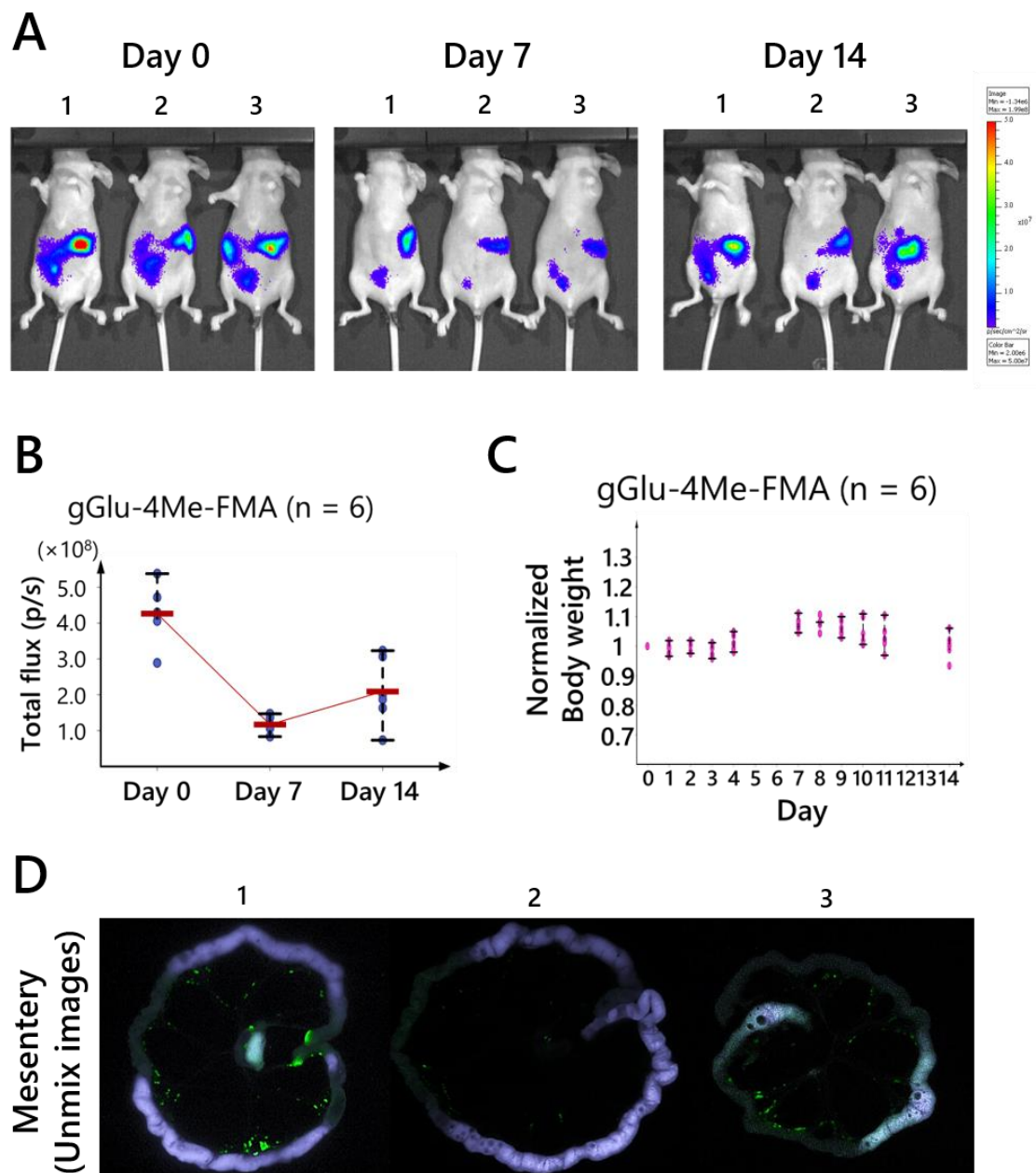


Fig. 3-2-5 | gGlu-4Me-FMA 投与群 (n = 6) の結果 (A) IVIS lumina II による発光イメージングの代表画像 (B) 腹腔内の発光強度推移 (C) 体重変化推移 (初日の体重で標準化してある) (D) gGlu-HMRG (10 μ M) による腸間膜の蛍光イメージング画像 (Ex. 450-480 nm, Em. 510-600 nm)

最後に、gGlu-4Me-FMA+CDDP 併用群の結果を示す。Fig. 3-2-6C に示すように併用群においても CDDP の毒性により体重減少が見られたため、1 週目の 5 日間連日投与以降は休薬となってしまったが、2 剤の投与により 7 日目時点で腹腔内の発光強度はゼロに近いレベルまで低下することが明らかとなり、その後休薬が続いても発光強度が上昇することはなかった (**Fig. 3-2-6A, B**)。さらに、gGlu-HMRG でのイメージングにおいても腸間膜の腹膜播種は 3 個体とも確認されず、腹腔内の A549-luc 細胞が完全に死滅したものと推測される (**Fig. 3-2-6D**)。このように gGlu-4Me-FMA+CDDP 併用群で見られた抗腫瘍効果は、gGlu-4Me-FMA 単剤や CDDP 単剤と比較して明らかに強力なものであり、2 剤の併用により何らかの相乗効果が生じたと予想される。

現在、この相乗効果のメカニズムについては明らかとなっていないものの、CDDP は GST 媒介のグルタチオン抱合を受けて細胞外へ排出される^{49,50} という報告がされていることから、gGlu-4Me-FMA が引き起こす GSH 枯渇によって CDDP の感受性が高められたのではないかと予想している。他にも、CDDP は①継続投与により GGT 活性を高める^{28,51}②活性酸素種 (ROS) を産生する⁵² という報告もあることから、今後詳細な検討が必要である。

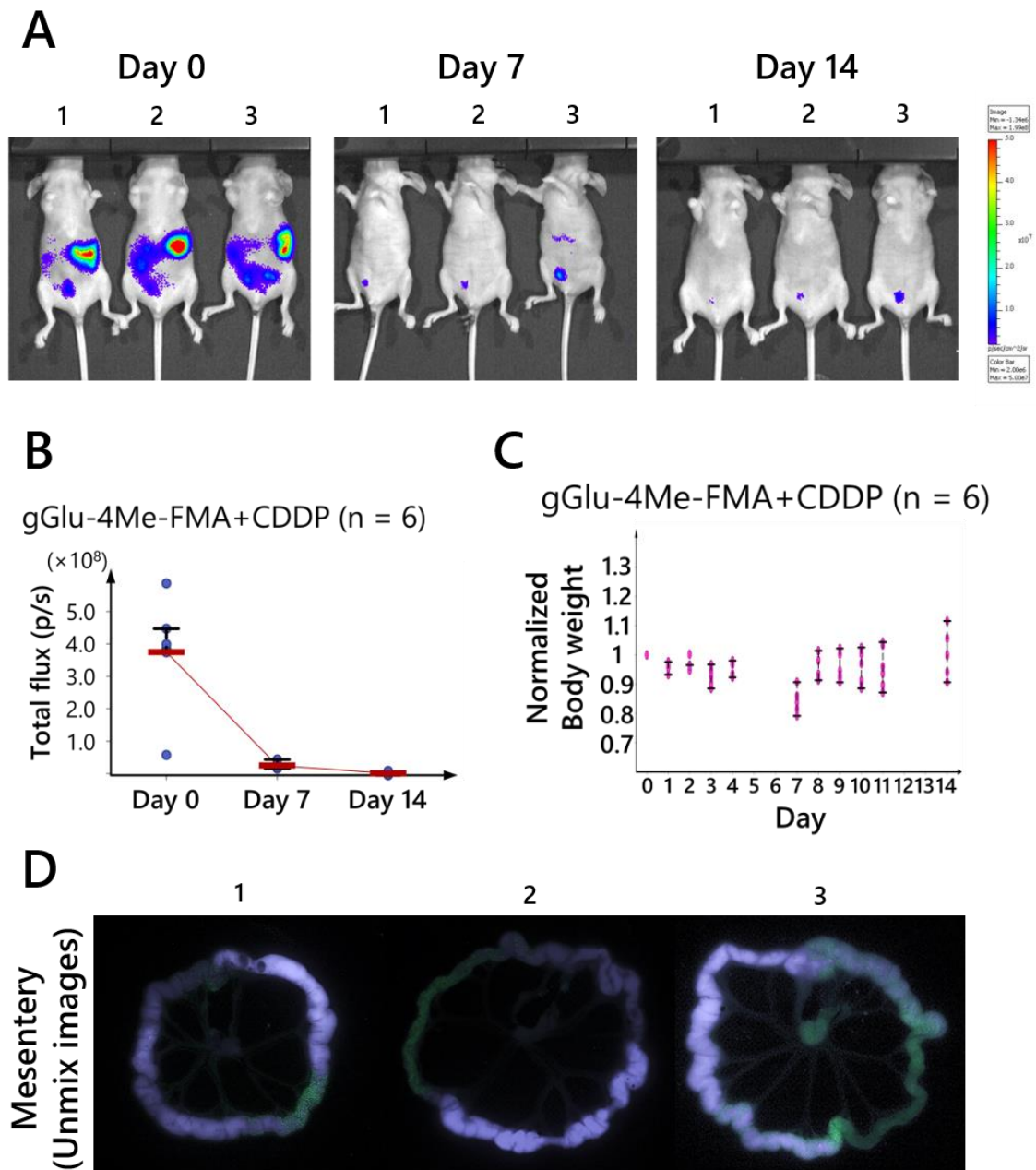


Fig. 3-2-6 | gGlu-4Me-FMA+CDDP 併用群 (n = 6) の結果 (A) IVIS lumina II による発光イメージングの代表画像 (B) 腹腔内の発光強度推移 (C) 体重変化推移 (初日の体重で標準化してある) (D) gGlu-HMRG (10 μ M) による腸間膜の蛍光イメージング画像 (Ex. 450-480 nm, Em. 510-600 nm)

最後に、各薬剤投与群の発光強度推移を示す (Fig. 3-2-7)。本腹膜播種モデルでは、saline 投与群のように 2 週間程度で腹腔内のがん細胞が指数関数的に増加することが見て取れるが、本研究で開発した gGlu-4Me-FMA を用いると単剤および CDDP との併用によって腹腔内の腫瘍の増殖を有意に抑制することが可能であることがわかる。本試験での結果は、酵素活性によってがん細胞選択的にキノンメチド種を放出するという新たなタイプのプロドラッグがモデルマウスといった高次の系でも有効である可能性を示唆するものであり、グルタチオン枯渇という既存抗がん剤にはない作用を持つことから併用効果にも期待が持たれ、今後本プロドラッグシステムの更なる発展が期待される。

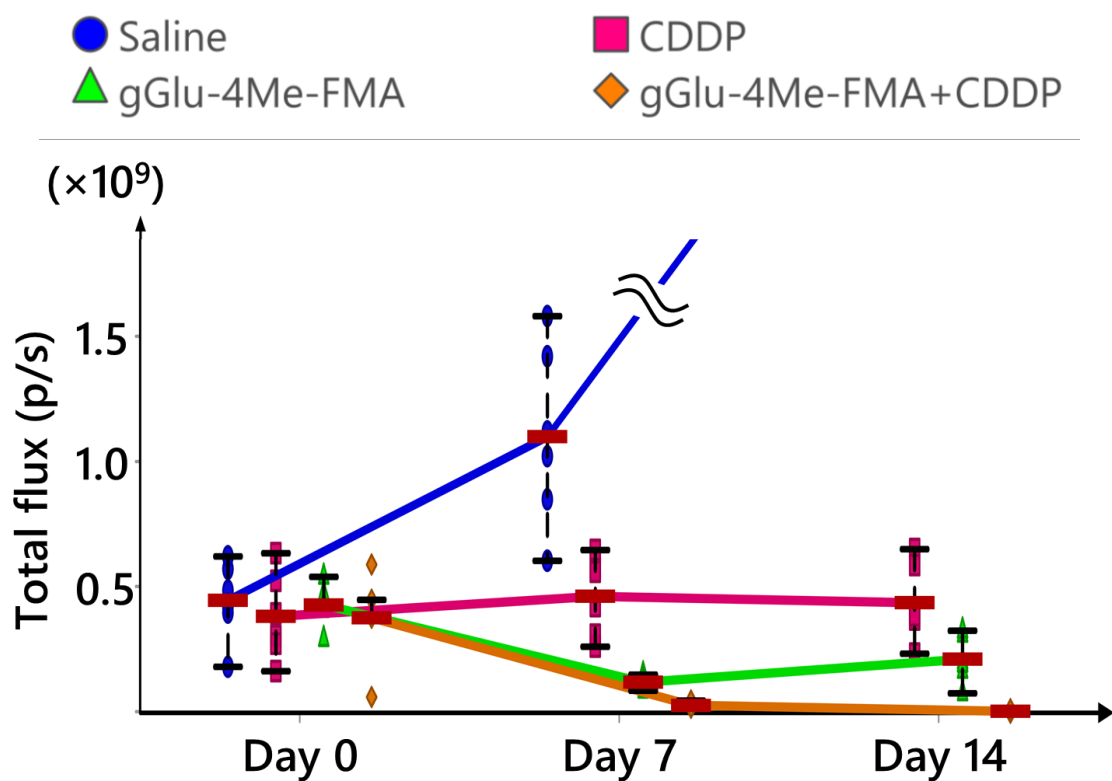


Fig. 3-2-7 | 各薬剤投与群 (n = 6) の発光強度推移

第四節 小括

本章では、*in vitro* で優れた細胞選択性を示した gGlu-FMA の *in vivo* での応用を目指し、誘導体化に取り組んだ。放出されるアザキノンメチド中間体の電子状態が薬効に重要であるという仮説に基づき、ベンゼン環に種々の置換基を導入する戦略で誘導体化を行ったところ、メチル基を導入するのみで殺細胞活性が数 μM の EC_{50} 値まで向上することを見出した。DFT 計算によりアザキノンメチド類の反応性を精査した結果、メチル基などの電子供与性基が置換したアザキノンメチドは水分子と反応しづらくなり、グルタチオンとの反応効率が相対的に上昇することで殺細胞活性が増強したと推測された。

また、誘導体化で得られた gGlu-4Me-FMA を腹膜播種モデルにて評価したところ、2 mg/kg の腹腔内連日投与により腹腔内の腫瘍を有意に減少させることが明らかとなり、gGlu-4Me-FMA が腹膜播種に対して有効な薬剤となり得ることを示した。さらに、標準治療薬として用いられている CDDP との併用を行うことでより強力な抗腫瘍効果を示すことも明らかとなり、本研究で考案したキノンメチド種の放出を原理とするプロドラッグ型抗がん剤が併用薬としても有用である可能性が示された。

第四章

総括と今後の展望

第一節 総括

本研究では、臨床検体から見いだされる酵素活性の情報をそのまま抗がん剤開発へと直結させるという新たな創薬アプローチへの展開を見据え、酵素活性によってがん細胞を高選択的に傷害可能なプロドラッグ型抗がん剤の設計法確立を目指した。

第 2 章では、酵素反応とキノンメチドケミストリーに基づく細胞内滞留性プローブである SPiDER- β Gal-1 の暗所毒性に着目し、がん細胞の酵素活性により初めてキノンメチド種を生成して毒性を発現する新たなプロドラッグ型抗がん剤の設計法を考案した。プロドラッグシステムの検証として既になん細胞で高発現していることが報告されている 3 種の酵素に対するプロドラッグの創製に取り組んだ結果、いずれの酵素を標的とした場合でも酵素を高発現している細胞を選択的に傷害可能な化合物を見い出すことが可能であった。この検討により、酵素の局在が細胞膜上と細胞質のどちらであっても選択的な薬効を示すことが明らかとなり、考案したプロドラッグシステムが多様な酵素群に対して適応可能な汎用性の高いものであることが示唆された。また、GGT を標的としたプロドラッグの候補化合物として合成した gGlu-FMA は、共培養条件下においても GGT 活性が高い細胞のみを高選択的に傷害することが可能であることがわかり、これは活性種であるアザキノンメチド中間体が比較的短寿命な化学種であり、隣接した細胞に移行する前に周辺の水分子と反応して解毒されることでこのような高い選択性が実現できたと考えられる。さらに、gGlu-FMA は細胞内のグルタチオン濃度を投与濃度以上に大きく減少させる作用を有することが明らかとなり、アザキノンメチド中間体が酵素反応を起こした細胞内で効率的に GSH と付加体を形成することで細胞に強い酸化ストレスが与えられたことが示唆された。

第 3 章では、*in vivo* で使用可能な高選択的プロドラッグ型抗がん剤の開発を目指し、EC₅₀ 値が数十 μ M 程度と比較的弱い殺細胞活性を有していた gGlu-FMA の誘導体化に取り組ん

だ。gGlu-FMA のベンゼン環部位に種々の置換基を導入した誘導体を合成し薬効を評価した結果、メチル基を導入するのみで殺細胞活性は EC_{50} 値で数 μM 程度まで増強することが明らかとなり、簡便な誘導体化で優れた選択性を有し、*in vivo* で検討できるレベルの殺細胞活性を有する誘導体を取得することが可能であった。一方で、ニトロ基等の電子吸引性基を導入すると薬効は減弱することも明らかとなり、細胞内 GSH 濃度定量実験や DFT 計算から、アザキノンメチド中間体の反応性が高すぎると周囲の水分子と優先的に反応して解毒されてしまう可能性が示唆された。このように単純な置換基導入で殺細胞活性が上下することは非常に興味深く、今後計算化学等によりキノンメチド種の毒性が予測できるようになればプロドラッグの精密設計が可能となり、高い選択性と強力な殺細胞活性を有する化合物が効率的に開発できる可能性がある。さらに本章では、誘導体化によって見出した gGlu-4Me-FMA を用い、腹膜播種モデルマウスに対する *in vivo* 薬効評価を行った。その結果、gGlu-4Me-FMA は単剤でも有意に腹腔内の癌を減少させ、腹膜播種の標準治療薬である CDDP を上回る抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。また、CDDP 単剤では毒性により顕著な体重減少が見られた一方で、gGlu-4Me-FMA は連日投与しても体重は変化せず、安全域においても既存薬を凌ぐことが示唆された。さらに、gGlu-4Me-FMA は CDDP と併用することでより強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、腹腔内の癌を完全に死滅させることが可能であった。gGlu-4Me-FMA は既存薬との併用薬としても有望であることが示唆されたが、これはキノンメチド種の選択的な放出を原理とするプロドラッグに共通する可能性があり、今後他酵素を標的としたプロドラッグでもこのような併用による相乗効果が期待される。

以上のように、gGlu-4Me-FMA が *in vivo* でも抗腫瘍効果を示したことにより、酵素活性によってがん細胞選択的にキノンメチド種を生成するという新たなプロドラッグシステムの有用性が強く示され、今後の創薬に大きく貢献する技術となることが期待される。

第二節 今後の展望

①抗体指向型酵素プロドラッグ療法（ADEPT）への応用

本研究で述べたような酵素活性を利用したプロドラッグ型抗がん剤の開発において、がん部位のみでプロドラッグの活性化が行われることは非常に重要な点であり、腎臓や肝臓等の特定の臓器においても比較的高い酵素活性を示す場合には、副作用のリスクが高まることに留意しなければならない。このような背景の中、プロドラッグのがん選択性を高めるアプローチの 1 つとして抗体指向型酵素プロドラッグ療法（ADEPT: Antibody-directed enzyme prodrug therapy）が知られている。ADEPT は、がん細胞が特異的に産生するヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）や癌胎児性抗原（CEA）等の抗原に対する抗体に任意の酵素を連結した酵素抗体複合体をプロドラッグ投与前に投与することで標的のがん細胞特異的に酵素活性を付与し、その後酵素に対応するプロドラッグを投与することでがん部位での活性化を引き起こすことが可能な手法である⁵³。ADEPT の大きな利点として哺乳動物にホモログが存在しない酵素を利用できる点が挙げられ、 β -ラクタマーゼやシトシンデアミナーゼ等の様々な酵素の利用が報告されている^{54,55}。また、抗 CEA 抗体とカルボキシペプチダーゼ（CPG2）の抗体酵素複合体とプロドラッグである CMDA あるいは BIP の組み合わせは Phase I 試験での有効性が示されており^{56,57}、本研究で考案したキノンメチド放出型のプロドラッグシステムと組み合わせることで高い安全性を有するプロドラッグ型抗がん剤を創製できる可能性がある（Fig. 4-2-1）。

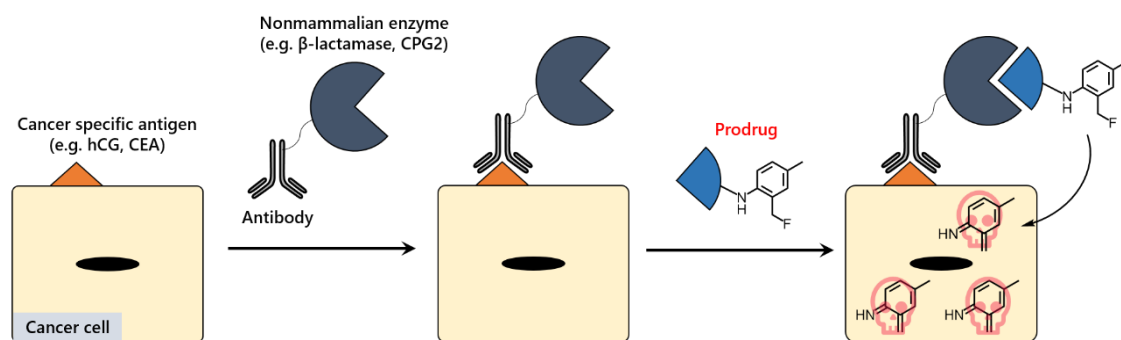


Fig. 4-2-1 | キノンメチド放出型プロドラッグシステムの ADEPT への応用

②がん部位の酵素活性に基づく革新的な個別化医療技術の開発

従来のがんに対する薬物療法では、がんの種類やステージ等によって使用される薬剤が決められていたが、分子生物学的手法の進展に伴って癌に関連する遺伝子や蛋白質の解明が進むことで、同じがん患者でもがん細胞の遺伝子や蛋白質のプロファイルは少しずつ異なっていることがわかり、このような違いが抗がん剤に対する感受性に影響を与えることも明らかとなった⁵⁸。このような背景から、近年ではがん治療に入る前にコンパニオン診断薬等を用いた遺伝子検査を行い、予め患者ごとに最適な薬剤を選択するといった個別化医療が注目されている。

本研究では、酵素活性が亢進しているがん細胞を選択的に傷害可能なプロドラッグ型抗がん剤の設計法を確立することに成功しており、第 1 章で述べた蛍光プローブライブラリーを用いたがん部位の酵素活性探索技術¹⁸と組み合わせることで、上記の個別化医療とは全く異なる革新的な個別化医療技術を開発することができると考えた。具体的には、各患者のがん組織検体に対して病理検査と蛍光プローブライブラリーを用いたスクリーニングを行うことで、がん部位で特異的に蛍光上昇を示すプローブを探索し、これらの配列に基づいたプロドラッグ型抗がん剤を処方することで、酵素活性に基づくオーダーメイド治療が実現すると考えられる (Fig. 4-2-2)。

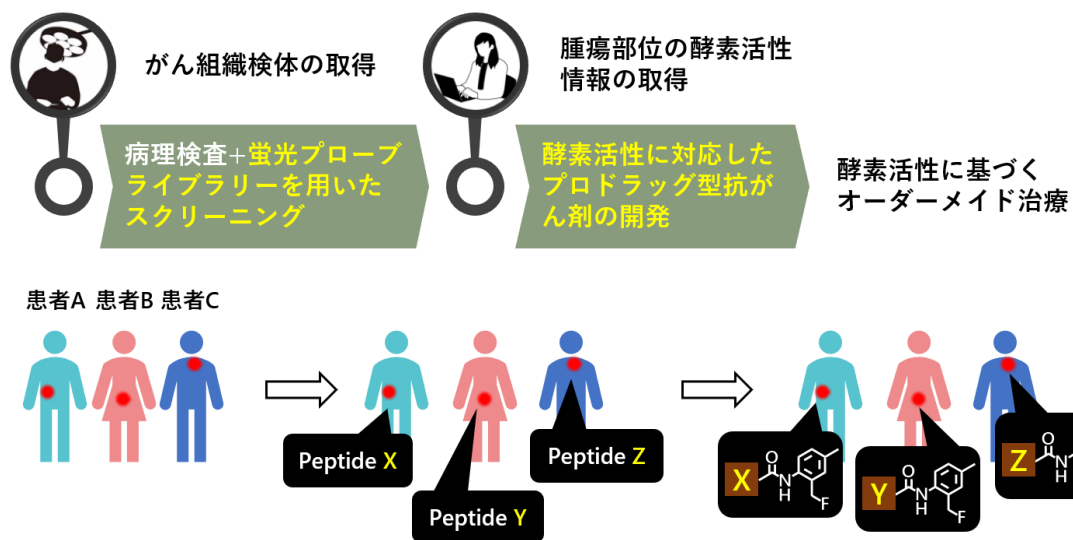


Fig. 4-2-2 | がん部位の酵素活性に基づく新たな個別化医療の流れ

実験の部

Material and methods

Materials

All chemical reagents and dry solvents for synthesis were purchased from commercial suppliers (Tokyo Chemical Industries Inc., FUJIFILM Wako Pure Chemical Inc., Kanto Chemical Inc., Watanabe Chemical Industries Inc., Merck Inc.), and were used without further purification. Human recombinant dipeptidylpeptidase-IV (D3446) and β -galactosidase from *Escherichia coli* (48275) was supplied by Merck Inc.. γ -glutamyltranspeptidase from bovine kidney (46557003) was supplied by Oriental Yeast Co. Ltd.

Instruments

The reaction progress was monitored on a TLC Silica gel 60 F254 (Merck Inc.) and ACQUITY UPLC/MS system (Waters Inc.). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECZ400 (400 MHz for ^1H NMR and 151 MHz for ^{13}C NMR); σ values are in ppm relative to tetramethylsilane (TMS). Mass spectra (MS) were measured with a JEOL JMS-T100LCAccuTOF (ESI). HPLC purification and analyses were performed on an HPLC system composed of reverse-phase columns (GL Sciences Inc., Inertsil® ODS-3 10mm X 250 mm for purification and Inertsil® ODS-3 4.6 mm X 250 mm for analysis), with a pump (PU-2080, JASCO Inc.) and a detector (MD-2015, JASCO Inc.). LC/MS analysis was performed on a reverse-phase column (Poroshell 120 EC-C18 2.1mm X 150 mm, Agilent Technologies Inc.), fitted on Agilent Technologies 1200 series / 6130 Quadrupole (LC/MS) system. Quantification of absorbance was conducted with plate reader, EnVision 2103 Multilabel Reader (Perkin Elmer Inc.).

Enzyme assay

In screw-cap vial for LC/MS analysis (Agilent Technologies Inc.), phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing prodrugs (100 μ M) with or without inhibitors (100 μ M GGsTop[®] for GGT, 500 nM K579, for DPP-IV, 1 mM β -GA for β -galactosidase) and DMSO as a cosolvent (less than 2%) was prepared. Enzyme (1U/mL for GGT, 81 mU/mL for DPP-IV, 4 nM for β -galactosidase) was added, then incubated at 37°C for 12 hours. LC/MS analysis (SIM) was conducted using under following conditions (eluent A: H₂O containing 0.1% ammonium formate, eluent B: 80% acetonitrile/H₂O, 0.1% ammonium formate, A/B = 95/5→5/95 in 15 min).

Cell Lines and Culture Conditions

SHIN3 cells, H226 cells, H460 cells, SKOV3 cells were cultured in RPMI1640 (gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum (gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.) and 1% penicillin/streptomycin. HEK-lacZ(+) cells, HEK293T cells and A549-luc cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum (gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.), 1% penicillin/streptomycin and 10 μ g/mL blasticidin S (FUJIFILM Wako Pure Chemical Inc., only for HEK-lacZ(+) cells). All cells were cultured at 37°C in 5%/95% CO₂/Air incubator.

Cell viability assay

Cells (1.0×10^4 cells/well/200 μ L) were seeded in a 96-well microplate (Thermo Fisher Scientific Inc.). After 12 hours, prodrugs were treated with over a range of concentrations (0 [control] or 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 μ M). At 24 hours after prodrug treatment, 10 μ L of water-soluble tetrazolium salt WST-8 solution (Cell Counting Kit-8, Dojindo Inc.) was added to each

well, and the microplate was incubated at 37°C in 5%CO₂ for 2-3 hours. The absorbance of WST-8 formazan (λ_{max} : 450 nm) was determined with EnVision™ 2103 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer Inc.). Cell viability was expressed as a percentage of that of the control (untreated) cells. For each concentration of prodrugs, mean values of the mean absorbance rates from three wells were calculated.

Cell ablation under co-cultured conditions

Fluorescence imaging

SHIN3 cells labeled with a 10 μM CellTracker™ Blue CMAC Dye (Thermo Fisher Scientific Inc.) and H226 cells labeled with a 10 μM CellTracker™ Green CMFDA Dye (Thermo Fisher Scientific Inc.) were prepared using the manufacturer's protocol. Both cells (1.5×10^5 cells each) were seeded on a same 35 mm glass-bottom dish, then incubated at 37°C in 5%CO₂ for 12 hours. Culture media was removed, then fresh media (10% fetal bovine serum, no phenol red, no penicillin/streptomycin) containing prodrugs (25 μM) and EthD-1 (1 μM) was added. Fluorescence images were acquired at every 1 hours (Fig. 2-3-1) or at 24 hours after prodrug treatment (Fig. 3-1-6) using a confocal microscopy SP5 (CellTracker™ Blue: Ex. 405 nm, Em. 450-467 nm, CellTracker™ Green: Ex. 488 nm, Em 510-530 nm, EthD-1: Ex. 525 nm, Em. 600-630 nm).

Flow cytometry analysis

SHIN3 cells labeled with a 10 μM CellTracker™ Green CMFDA Dye (Thermo Fisher Scientific Inc.) was prepared using the manufacturer's protocol. SHIN3 cells and no stained H226 cells (1.5×10^5 cells each) were seeded in a 6-well microplate, then incubated at 37°C in 5%CO₂ for 12 hours. Culture media was removed, then fresh media (10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin) containing prodrugs (25 μM) and EthD-1 (1 μM) was

added. At 24 hours after incubation at 37°C in 5%CO₂, culture media was removed and cells were washed with phosphate-buffered saline (pH 7.4). Cells were harvested with 0.25% Trypsin/EDTA and fluorescence intensities of CellTracker™ Green CMFDA Dye (FITC filter: 515–545 nm) and EthD-1 (APC filter: 650–670 nm) were monitored by a flow cytometer (BD LSR II, BD Biosciences Inc.).

Quantification of intracellular GSH/GSSG level

SHIN3 cells and SKOV3 cells (2.0×10⁵ cells/well) were seeded on 6-well plates. After 12 hours, culture medium was replaced with fresh medium (no phenol red, no Penicillin/Streptomycin) containing prodrugs (25 µM). After 24 hours, culture medium was removed and cells were washed with phosphate-buffered saline (pH 7.4) twice. Then CellLytic M (500 µL) was added to each well. Lysed samples were collected and transferred to 1.5 mL plastic tube and centrifuged 15000 rpm×15 min at 4°C. The supernatant was collected as a cell lysate. Protein concentration was measured by BCA method and 0.2 mg/mL lysate samples were prepared. GSH/GSSG concentration in lysates was measured with GSSG/GSH Quantification Kit (Dojindo Inc.) using the manufacturer's protocol.

Apoptosis detection assay

SHIN3 cells (2.0×10⁵ cells/well) were seeded on 6-well plates and incubated at 37°C in 5%CO₂ for 12 hours. After 12 hours, culture medium was replaced with fresh medium (10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin) containing prodrugs (25 µM) and incubated at 37°C in 5%CO₂ for 24 hours. After 24 hours, culture medium was removed and cells were washed with phosphate-buffered saline (pH 7.4) and harvested with 0.25% Trypsin/EDTA. Cells were resuspended with 1X Annexin V Binding Buffer (BioVision Inc.) containing 1 µL

Annexin V-FITC (BioVision Inc.) and 1 μ M EthD-1 and incubated at 37°C for 15 min in the dark. Fluorescence intensities of Annexin V-FITC (FITC filter: 515–545 nm) and EthD-1 (APC filter: 650–670 nm) were monitored by a flow cytometer (BD LSR II, BD Biosciences Inc.).

DFT calculation

All DFT calculations [Structure optimization, Potential Energy Surface (PES) scan, Intrinsic Reaction Coordinate (IRC)] was carried out by Gaussian'09 software package using B3LYP/6-311+g(2d,p). Activation energies (ΔE) of the reaction between azaquinone methide species and water (or ethanethiol) were calculated from the results of IRC calculation.

Evaluation of *in vivo* efficacy

Preparation of peritoneal dissemination xenografts and drug administration

All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo. 6-wk-old female BALBc/cAJcl-nu/nu mice were purchased from CLEA Japan Inc.. Mice were randomly grouped (n = 6, 4 groups). Mice were euthanized with isoflurane, A549-luc cell suspension (1.0×10^6 cells/200 μ L/mouse) were injected i.p. At 6 days after cell injection, drug administration was started by following schedule {Saline ([200 μ L/day i.p. for 5 days] \times 2), gGlu-4Me-FMA ([2 mg/kg/day i.p. for 5 days] \times 2), cDDP (2 mg/kg/day i.p. for 5 days), gGlu-4Me-FMA+cDDP (gGlu-4Me-FMA: 2 mg/kg/day i.p. for 5 days, CDDP: 2 mg/kg/day i.p. for 5 days) } .

in vivo bioluminescence imaging

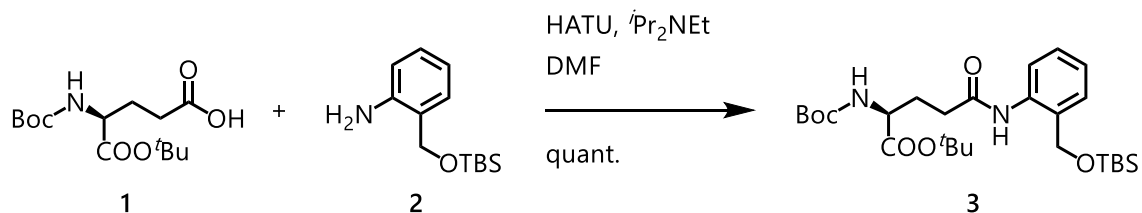
A549-luc xenografts were anesthetized with isoflurane. D-luciferin potassium salt (3.3 mg/200 μ L saline/mouse) was administered i.p.. Bioluminescence images was acquired every 3 min using IVIS lumina II (Caliper Life Sciences Inc). Image processing was performed

using Living Image R3.0 software. ROI was formed to cover the whole peritoneal cavity.

ex vivo fluorescence imaging

A549-luc xenografts were euthanized 14 days after initial treatment, and mesentery was resected. 10 μ M gGlu-HMRG in phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% DMSO as a co-solvent was applied onto the mesentery. After 10 min incubation, fluorescence images were acquired with MaestroTM In-Vivo Imaging System (PerkinElmer Inc.) equipped with an excitation filter set at 450-480 nm and a 515 nm long-pass emission filter.

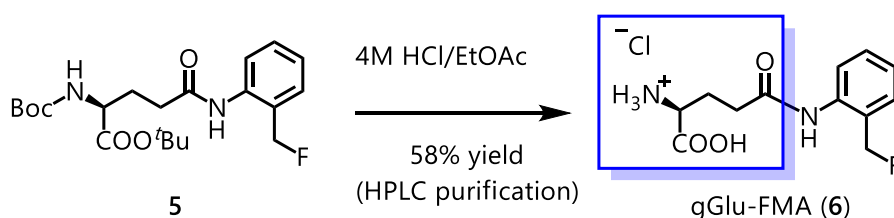
gGlu-FMA の合成 (Scheme 2-2-1)



Synthesis of *tert*-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)-*L*-glutamate (3)

(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (1.26 g, 4.17 mmol) was dissolved in Dry DMF (15 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. HATU (2.42 g, 6.25 mmol) and DIPEA (2.16 mL, 12.5 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 5 min. Then, 2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)aniline (1.19 g, 5.00 mmol) in Dry DMF (5 mL) was added to the mixture, warmed at room temperature and continuously stirred for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water, saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 10% to 30% EtOAc/hexane) to afford the title compound (2.18 g, quant.) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.88 (brs, 1H, -CONH-), 8.15 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 7.3 Hz), 7.10 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 7.13 (dd, 1H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 6.9 Hz), 5.20 (brd, 1H, -OCONH-, *J* = 7.8 Hz), 4.75 (d, 1H, *HBn*, *J*_{gem} = 13 Hz), 4.71 (d, 1H, *HBn'*, *J*_{gem} = 13 Hz), 4.27-4.15 (m, 1H), 2.52-2.34 (m, 2H), 2.32-2.20 (m, 1H), 2.07-1.95 (m, 1H), 1.46 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 1.42 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃), 0.90 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.07 (s, 6H, Si(CH₃)₂); LRMS 523.73 (M+H⁺)

tert-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(hydroxymethyl)phenyl)-*L*-glutamate (215 mg, 0.527 mmol) was dissolved in Dry CH₂Cl₂ (10 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. Deoxo-Flour® (514 µL, 2.64 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 20% to 30% EtOAc/hexane) to afford the title compound (151.8 mg, 0.370%) as a yellow oil. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz): δ 8.04 (brs, 1H, -CONH-), 7.84 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.37 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 7.3 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 7.17 (dd, 1H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 6.9 Hz), 5.43 (d, 2H, *HBn*, *J*_{*HBn-F*} = 48 Hz, *J*_{*gem*} = 11 Hz), 4.22-4.11 (m, 1H), 2.80 (brs, 1H, -CH₂OH), 2.51-2.35 (m, 2H), 2.29-2.16 (m, 1H), 1.97-1.85 (m, 1H), 1.44 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 1.40 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃); LRMS 411.52 (M+H⁺)

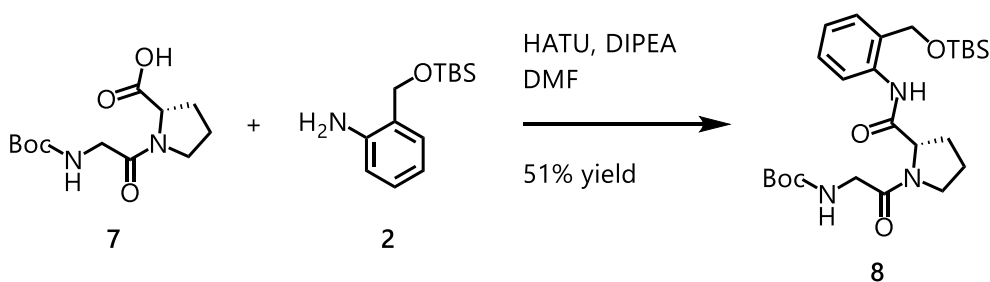


Synthesis of *tert*-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(fluoromethyl)phenyl)-*L*-glutamate: gGlu-FMA (6)

tert-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(fluoromethyl)phenyl)-*L*-glutamate (70.3 mg, 0.171 mmol) was dissolved in EtOAc (2 mL), then 4M HCl/EtOAc (2 mL) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by reverse phase

HPLC (0.1% AcOH, 0% to 100% MeCN/H₂O) to afford the title compound (28.9 mg, 58%) as a white solid. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz): δ 7.49 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.43 (dd, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.36 (dd, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.29 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.35 (d, 2H, *H*_{Bn}, *J*_{*H*_{Bn}-F} = 48 Hz), 3.80-3.77 (m, 1H), 2.67-2.56 (m, 2H), 2.20-2.15 (m, 2H); ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz): δ 174.7, 173.8, 134.3, 132.0, 130.4, 130.0, 128.1, 127.5, 82.9, 81.3, 54.1, 31.6, 26.3; HRMS Calcd for C₁₂H₁₇FN₂O₃: 255.11450 (M+H⁺); Found: 255.11370 (+ 0.80 mDa)

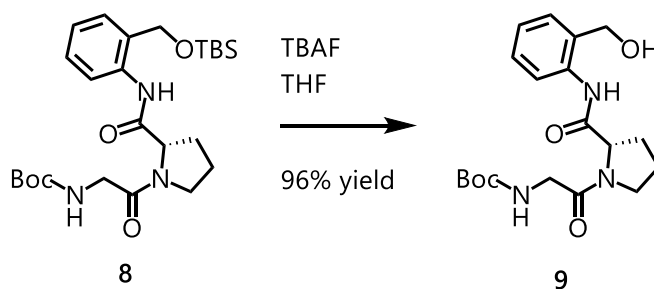
GP-FMA の合成 (Scheme 2-2-2)



Synthesis of *tert*-butyl (S)-(2-(2-((2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate (8)

tert-butyl (S)-(2-(2-((2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate (86.4 mg, 0.176 mmol) was dissolved in Dry DMF (2 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. HATU (206 mg, 0.532 mmol) and DIPEA (183 μL, 1.06 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 5 min. Then, 2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)aniline (101 mg, 0.425 mmol) in Dry DMF (1 mL) was added to the mixture, warmed at room temperature and continuously stirred for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water, saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried

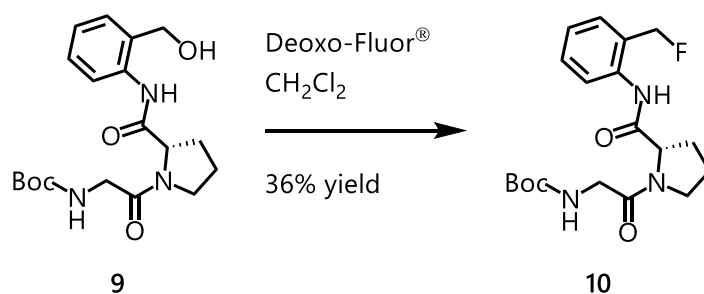
(Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 40% to 50% EtOAc/hexane) to afford the title compound (88.1 mg, 51%) as a white solid. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.44-7.41 (m, 2H), 7.28-7.18 (m, 2H), 4.75 (d, 1H, *HBn*, *J*_{gem} = 14 Hz), 4.70 (d, 1H, *HBn'*, *J*_{gem} = 14 Hz), 4.53 (dd, 1H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.7 Hz), 3.95 (d, 1H, *J*_{gem} = 17 Hz), 3.88 (d, 1H, *J*_{gem} = 17 Hz), 3.71-3.56 (m, 2H), 2.17-1.91 (m, 3H), 1.41 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃), 0.91 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.09 (s, 6H, Si(CH₃)₂); LRMS 492.69 (M+H⁺)



Synthesis of *tert*-butyl (S)-(2-(2-((2-(hydroxymethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate (9)

(*tert*-butoxycarbonyl)glycyl-*L*-proline (96.5 mg, 0.354 mmol) was dissolved in Dry THF (5 mL), then tetrabutylammonium fluoride (ca. 1mol/L in THF, 879 μL, 0.879 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar atmosphere for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 0% to 7% MeOH/CH₂Cl₂) to afford the title compound (63.9 mg, 96%) as a colorless oil. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.70 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.30 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.25 (ddd, 1H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.4 Hz), 7.13 (ddd, 1H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.4 Hz), 4.61 (dd, 1H, *HBn*, *J*_{gem} = 14 Hz, *J* = 4.1 Hz),

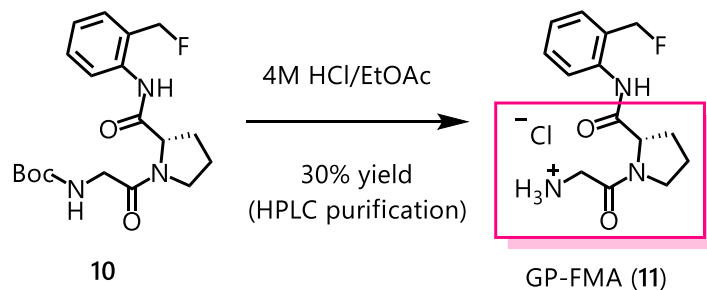
4.57 (dd, 1H, *HBn*, $J_{gem} = 14$ Hz, $J = 4.1$ Hz), 4.55 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 3.7$ Hz), 3.94 (s, 2H), 3.73-3.55 (m, 2H), 2.30-2.12 (m, 2H), 2.10-2.03 (m, 2H), 1.43 (s, 9H, $\text{NHCOO}(\text{CH}_3)_3$); LRMS 378.42 ($\text{M}+\text{H}^+$)



Synthesis of *tert*-butyl (S)-(2-(2-((2-(fluoromethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate (10)

tert-butyl (S)-(2-(2-((2-(hydroxymethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate (63.9 mg, 0.169 mmol) was dissolved in Dry CH_2Cl_2 (2 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. Deoxo-Fluor® (166 μL , 0.847 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO_3 and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water, saturated aqueous NaHCO_3 and brine, dried (Na_2SO_4) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 50% to 70% EtOAc/hexane) to afford the title compound (22.9 mg, 36%) as a pale yellow oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.93 (brs, 1H, $-\text{CONH}-$), 7.95 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.36 (dd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz), 7.29 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.13 (dd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.3$ Hz), 5.41 (brs, 1H, $-\text{OCONH}-$), 5.39 (d, 2H, *HBn*, $J_{\text{HBn-F}} = 48$ Hz), 4.76 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz), 4.03 (dd, 1H, $J_{gem} = 17$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 3.93 (dd, 1H, $J_{gem} = 17$ Hz, $J = 4.6$ Hz), 3.60-3.54 (m, 1H), 3.49-3.40 (m, 1H), 2.22-2.11 (m, 1H), 2.11-2.02 (m, 1H), 2.01-1.90 (m, 1H), 1.44 (s, 9H,

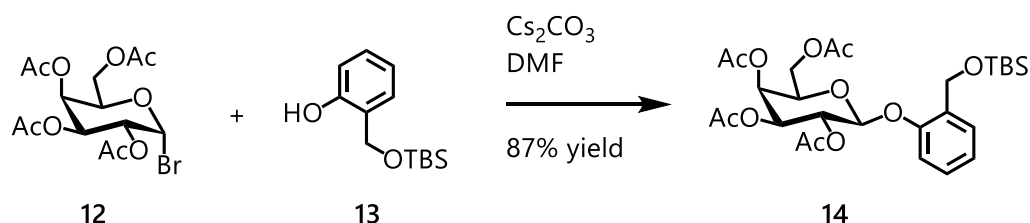
NHCOO(CH₃)₃; LRMS 380.43 (M+H⁺)



**Synthesis of (S)-N-(2-(fluoromethyl)phenyl)-1-glycylpyrrolidine-2-carboxamide:
GP-FMA (11)**

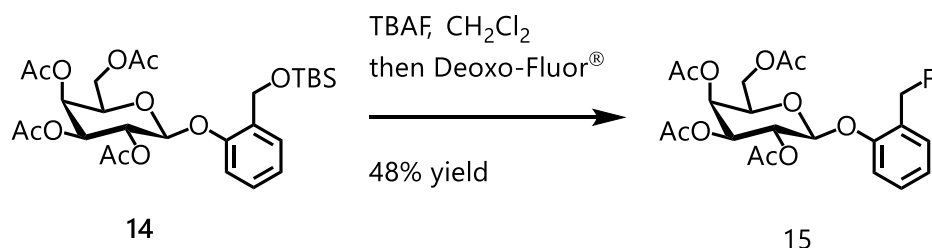
tert-butyl (S)-2-(2-((2-(2-(fluoromethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl) carbamate (22.9 mg, 0.0604 mmol) was dissolved in EtOAc (1 mL), then 4M HCl/EtOAc (2 mL) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by reverse phase HPLC (0.1% AcOH, 0% to 100% MeCN/H₂O) to afford the title compound (5.7 mg, 30%) as a white solid. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.46 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.41-7.27 (m, 3H), 5.38 (ddd, 2H, *HBn*, *J*_{*HBn-F*} = 48 Hz, *J*_{*HBn'-F*} = 34 Hz, *J*_{*gem*} = 11 Hz), 4.61 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz, 3.7 Hz), 3.88 (d, 2H, *J*_{*gem*} = 4.1 Hz), 3.68-3.52 (m, 2H), 2.39-2.28 (m, 1H), 2.17-1.97 (m, 3H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 172.1, 164.8, 128.9, 128.1, 126.6, 125.9, 60.6, 46.4, 40.2, 29.5, 24.5; HRMS Calcd for C₁₄H₁₉FN₃O₂: 280.14610 (M+H⁺); Found: 280.14657 (+ 0.47 mDa).

β Gal-FMP の合成 (Scheme 2-2-3)



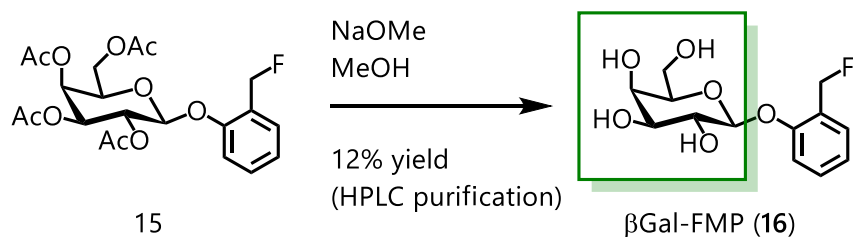
Synthesis of (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenoxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (14)

A mixture of 2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenol (301 mg, 1.26 mmol) and cesium carbonate (4.11 g, 12.6 mmol) in Dry DMF (7 mL) was stirred at 0 °C under Ar atmosphere for 5 min. (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(acetoxymethyl)-6-bromotetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (4.51 g, 11.0 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 5 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 20% to 40% EtOAc/hexane) to afford the title compound (626.8 mg, 87%) as a colorless oil. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz): δ 7.50 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.20 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 7.3 Hz), 7.08 (dd, 1H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.3 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.47-5.43 (m, 2H), 5.13 (dd, 1H, *J* = 11 Hz, *J* = 3.7 Hz), 5.08 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 4.75 (d, 1H, *J*_{gem} = 15 Hz), 4.62 (d, 1H, *J*_{gem} = 15 Hz), 4.22-4.09 (m, 3H), 2.16 (s, 3H, OCOCH₃), 2.04 (s, 3H, OCOCH₃), 2.03 (s, 3H, OCOCH₃), 1.98 (s, 3H, OCOCH₃), 0.96 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.12 (s, 6H, Si(CH₃)₂); LRMS 591.63 (M+Na⁺)



Synthesis of (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(2-(fluoromethyl)phenoxy) tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (15)

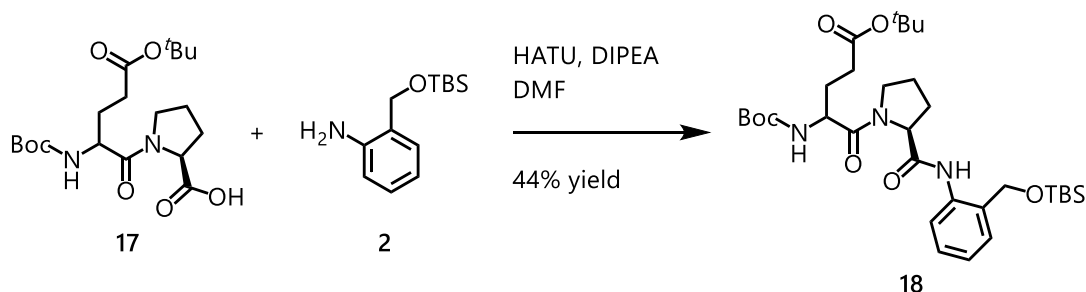
(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenoxy) tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (76.7 mg, 0.135 mmol) was dissolved in Dry CH₂Cl₂ (5 mL), cooled at -78 °C under Ar atmosphere. Tetrabutylammonium Fluoride (ca. 1mol/L in THF, 39 μL, 0.135 mmol) was added to the mixture, which was stirred at -78 °C for 1 h. Then, Deoxo-Fluor® (132 μL, 0.675 mmol) was added to the mixture, continuously stirred for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂ twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 20% to 40% EtOAc/hexane) to afford the title compound (29.7 mg, 48%) as a pale yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.38 (d, 1H, *J* = 7.8Hz), 7.32 (dd, 1H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.8 Hz), 7.10 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 7.8 Hz), 7.07 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 5.54 (dd, 1H, *J* = 11 Hz, *J* = 7.8 Hz), 5.47 (dd, 1H, *J*_{H_{Bn}-F} = 48 Hz, *J*_{gem} = 11 Hz), 5.46 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz), 5.23 (dd, 1H, *J*_{H_{Bn}-F} = 48 Hz, *J*_{gem} = 11 Hz), 5.11 (dd, 1H, *J* = 11 Hz, *J* = 3.7 Hz), 5.03 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 4.25 (dd, 1H, *J* = 11 Hz, *J* = 6.9 Hz), 4.15 (dd, 1H, *J* = 11 Hz, *J* = 6.0 Hz), 4.08 (dd, 1H, *J* = 6.9 Hz, *J* = 6.0 Hz), 2.18 (s, 3H, OCOCH₃), 2.06 (s, 3H, OCOCH₃), 2.06 (s, 3H, OCOCH₃), 2.01 (s, 3H, OCOCH₃); LRMS 479.59 (M+Na⁺)



Synthesis of (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(2-(fluoromethyl)phenoxy)-6-(hydroxymethyl) tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol: βGal-FMP (16)

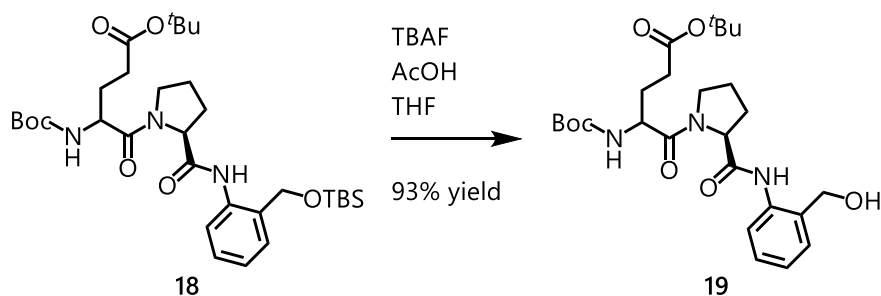
(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(2-(fluoromethyl)phenoxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (29.7 mg, 0.0650 mmol) was dissolved in Dry MeOH (5 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. 28% NaOMe/MeOH (50 μL) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was neutralized with Amberlite IR120®, filtered and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by reverse phase HPLC (0% to 100% MeCN/H₂O) to afford the title compound (2.25 mg, 12%) as a white solid. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.35 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz, 7.3 Hz), 7.21 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.03 (dd, 1H, *J* = 7.3 Hz), 5.51 (d, 2H, *H*_{Bn}, *J*_{*H*_{Bn}-F} = 48 Hz), 4.85 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 3.88 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 3.79 (dd, 1H, *J* = 9.6 Hz, 7.8 Hz), 3.78-3.70 (m, 2H), 3.65 (dd, 1H, *J* = 6.9 Hz, 5.0 Hz), 3.55 (dd, 1H, *J* = 9.6 Hz, 3.7 Hz); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): no data; HRMS Calcd for C₁₃H₁₇FNao₆: 311.09069 (M+Na⁺); Found: 311.08976 (-0.93 mDa).

EP-FMA の合成 (Scheme 2-2-4)



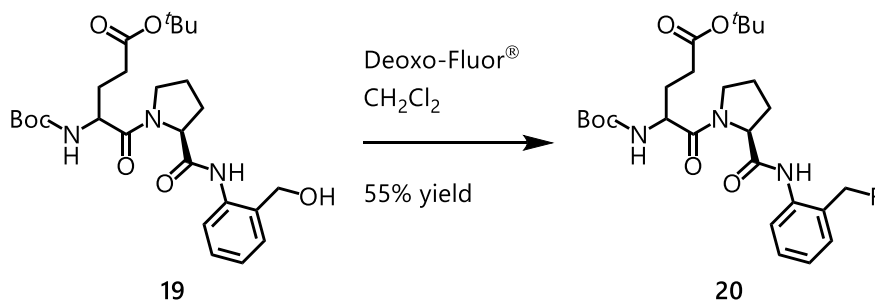
Synthesis of *tert*-butyl 4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*S*)-2-((2-(((*tert*-butyl dimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-5-oxopentanoate (18)

(5-((*tert*-butoxy)-2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoyl)-L-proline (66.1 mg, 0.165 mmol) was dissolved in Dry DMF (1 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. HATU (95 mg, 0.248 mmol) and DIPEA (85 μ L, 0.495 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 5 min. Then, 2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)aniline (47 mg, 0.198 mmol) in Dry DMF (1 mL) was added to the mixture, warmed at room temperature and continuously stirred for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water, saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (16 g silica gel, 10% to 30% EtOAc/hexane) to afford the title compound (65.2 mg, 64%) as a brown oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.01 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.82 (d, *HBn*, *J*_{gem} = 13 Hz, 1H), 4.63 (d, *HBn*, *J*_{gem} = 13 Hz, 1H), 4.55 (dd, *J* = 8.7, 5.0 Hz, 2H), 3.77 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.28-2.41 (m, 2H), 1.99-2.26 (m, 5H), 1.69-1.78 (m, 1H), 1.42 (s, 18H), 0.90 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.05 (s, 3H); LRMS 620.35 (M+H⁺)



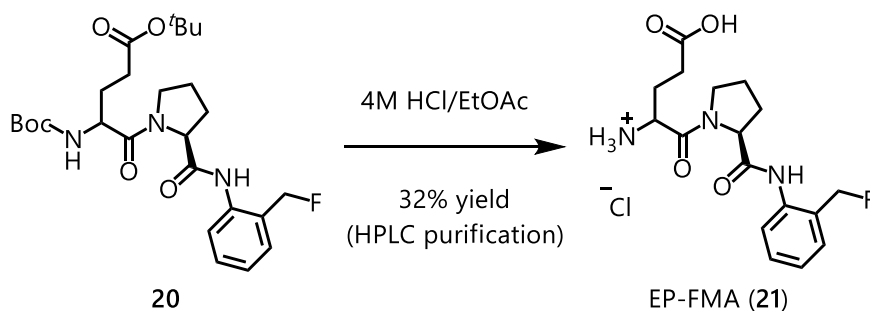
Synthesis of *tert*-butyl 4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*S*)-2-((2-(hydroxymethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-5-oxopentanoate (19)

tert-butyl 3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-((*S*)-2-((2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-4-oxobutanoate (69.7 mg, 0.112 mmol) was dissolved in Dry THF (1 mL), then tetrabutylammonium fluoride (ca. 1mol/L in THF, 337 μ L, 0.337 mmol) and acetic acid (12.7 μ L, 0.225 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar atmosphere for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (16 g silica gel, 60% to 80% EtOAc/hexane) to afford the title compound (52.8 mg, 93%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.99 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.26-4.59 (m, 4H), 3.68-3.74 (m, 2H), 2.24-2.30 (m, 2H), 1.96-2.10 (m, 4H), 1.63-1.72 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.38 (s, 9H); LRMS 504.18 (M-H⁺)



Synthesis of *tert*-butyl 4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*S*)-2-((2-(fluoromethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-5-oxopentanoate (20)

tert-butyl 4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*S*)-2-((2-(hydroxymethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-5-oxopentanoate (52.8 mg, 0.104 mmol) was dissolved in Dry CH₂Cl₂ (1 mL), then DAST (68.4 μ L, 0.522 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 10 min. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂ twice. The organic phase was washed with water, saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (16 g silica gel, 0% to 7% MeOH/CH₂Cl₂) to afford the title compound (28.8 mg, 55%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.99 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.39 (d, 2H, *HBn*, *J*_{*HBn-F*} = 48 Hz), 4.26-4.59 (m, 2H), 3.68-3.74 (m, 2H), 2.24-2.30 (m, 2H), 1.96-2.10 (m, 4H), 1.63-1.72 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.38 (s, 9H); LRMS 508.27 (M+H⁺)

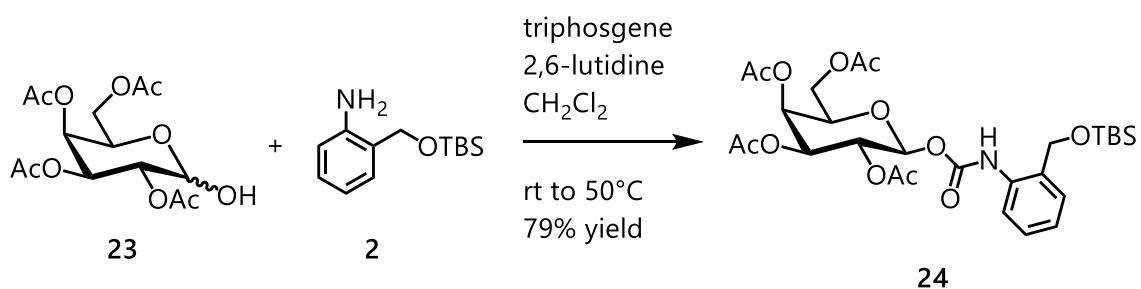


Synthesis of 4-amino-5-((*S*)-2-((2-(fluoromethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-5-oxopentanoic acid: EP-FMA (21)

tert-butyl 4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*S*)-2-((2-(fluoromethyl)phenyl)carbamoyl)

pyrrolidin-1-yl)-5-oxopentanoate (14.4 mg, 0.0284 mmol) was dissolved in EtOAc (500 μ L), then 4M HCl/EtOAc (500 μ L) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 24 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by reverse phase HPLC (0% to 100% MeCN/H₂O) to afford the title compound (3.5 mg, 32%) as a white solid. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.26-7.50 (m, 4H), 5.25-5.49 (m, 2H), 4.61 (dd, J = 8.0, 5.3 Hz, 1H), 4.22 (dd, J = 8.2, 3.2 Hz, 1H), 3.70 (td, J = 6.5, 2.4 Hz, 2H), 2.50 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.28-2.42 (m, 1H), 1.87-2.20 (m, 5H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 177.52, 171.69, 168.10, 128.91, 128.24, 128.15, 126.67, 126.42, 125.74, 81.94, 80.32, 60.78, 51.89, 31.88, 29.28, 26.11, 24.92; HRMS Calcd for C₁₄H₁₉FN₃O₂: 352.16726 (M+H⁺); Found: 352.16609 (-1.17 mDa).

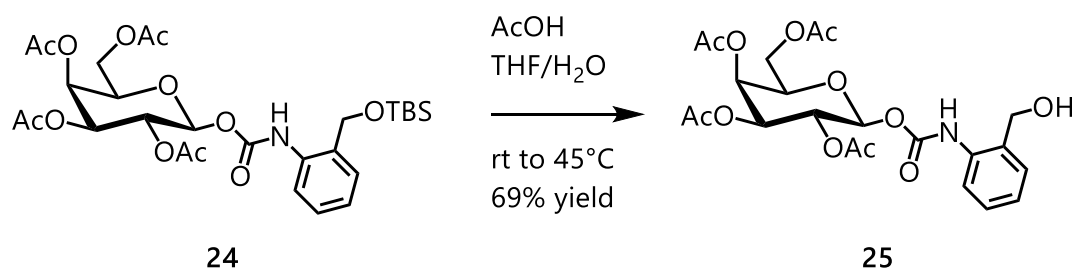
β Gal-FMA の合成 (Scheme 2-2-5)



Synthesis of (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(((2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)carbamoyl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (24)

2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)aniline (69.6 mg, 0.293 mmol) was dissolved in Dry CH₂Cl₂ (2 mL). Triphosgene (29 mg, 0.0977 mmol) and 2,6-lutidine (103 μ L, 0.879 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 45 min. Then,

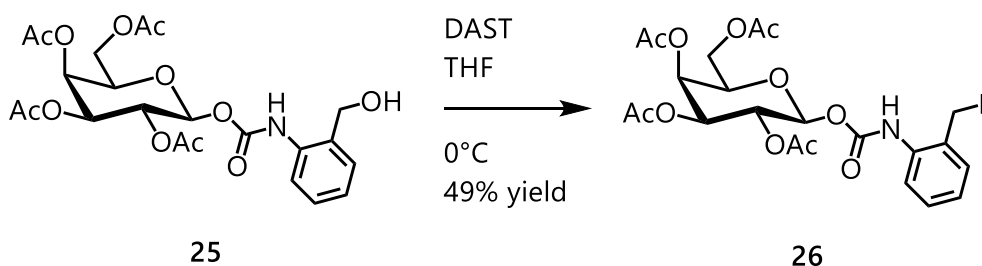
(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-(acetoxymethyl)-6-hydroxytetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (102.1 mg, 0.293 mmol, $\alpha : \beta = 2.24 : 1$) was added to the mixture, warmed at 50°C and continuously stirred for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water, saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 10% to 30% EtOAc/hexane) to afford the title compound (43.7 mg, 79%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.59 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.31 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.02 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.35 (dd, *J* = 10.3, 8.5 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 10.3, 3.4 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.07-4.21 (m, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H); LRMS 634.21 (M+Na⁺)



Synthesis of (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(((2-(hydroxymethyl)phenyl) carbamoyl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (25**)**

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(((2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl) carbamoyl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (43.7 mg, 0.0714 mmol) was dissolved in Dry THF (500 μ L). 80% AcOH aq. (1 mL) was added to the mixture, then warmed at 45°C and stirred for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with

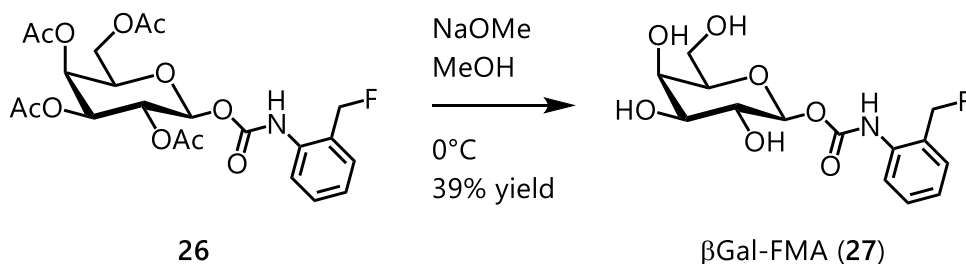
H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 50% to 70% EtOAc/hexane) to afford the title compound (24.4 mg, 69%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.21 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.36 (dd, *J* = 10.3, 8.5 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 10.5, 3.2 Hz, 1H), 4.70 (dd, *J* = 20.4, 12.6 Hz, 2H), 4.06-4.20 (m, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.99 (s, 3H); LRMS 520.13 (M+Na⁺)



Synthesis of (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(((2-(fluoromethyl)phenyl)carbamoyl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (26)

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(((2-(hydroxymethyl)phenyl)carbamoyl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (24.4mg, 0.0491 mmol) was dissolved in Dry THF (500 μL). cooled at 0 °C under Ar atmosphere. DAST (32.2 μL, 0.246 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 45 min. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 20% to 60% EtOAc/hexane) to afford the title compound (11.9 mg, 49%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ

7.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.39-7.43 (m, 1H), 7.27 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 5.75 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 5.30-5.51 (m, 4H), 5.11 (dd, $J = 10.6, 3.1$ Hz, 1H), 4.07-4.20 (m, 4H), 2.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 4H), 2.00 (s, 3H); LRMS 522.10 ($M+Na^+$)

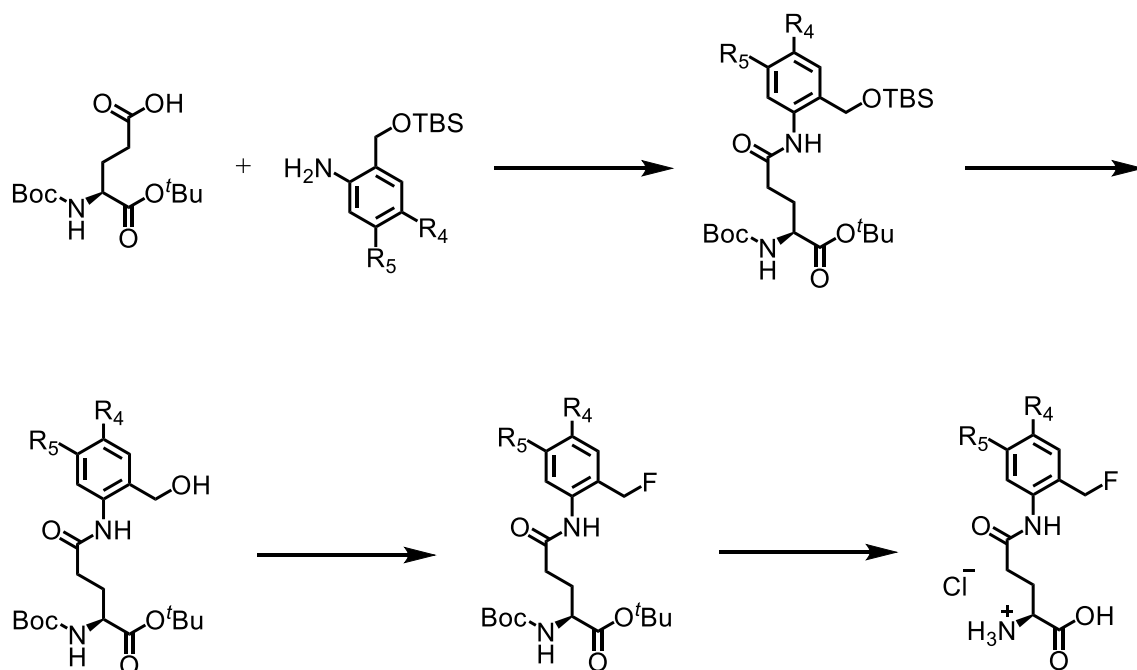


Synthesis of (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl (2-(fluoromethyl)phenyl)carbamate: βGal-FMA (27)

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(acetoxymethyl)-6-(((2-(fluoromethyl)phenyl)carbamoyl)oxy)

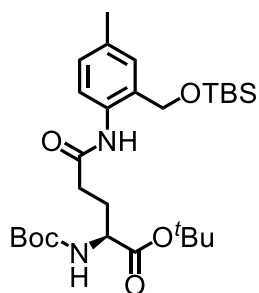
tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate (11.9 mg, 0.0238 mmol) was dissolved in Dry MeOH (500 μ L), cooled at 0 $^{\circ}$ C under Ar atmosphere. 28% NaOMe/MeOH (4.8 μ L, 0.0238 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 $^{\circ}$ C for 1.5 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was neutralized with Amberlite IR120®, filterated and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by reverse phase HPLC (0% to 100% MeCN/ H_2O) to afford the title compound (3.1 mg, 39%) as a white solid. 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.35-7.39 (m, 1H), 7.23 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.38-5.50 (m, 3H), 5.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.89 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 3.70-3.78 (m, 3H), 3.64 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 3.56 (dd, $J = 9.8, 3.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 154.0, 135.4, 129.1, 128.6, 128.5, 125.3, 124.2, 96.3, 81.1 (d, $^1J_{C-F} = 164$ Hz), 76.1, 73.7, 70.0, 68.8, 61.0; HRMS calcd for $C_{14}H_{18}F_1N_1Na_1O_7$ 354.09650, obsd 354.093593 [$M+Na$] $^+$ (-2.91 mDa)

gGlu-FMA 誘導体の合成 I (Scheme 3-1-2)



① R₄ = Me, R₅ = H

Synthesis of *tert*-butyl N²-(*tert*-butoxycarbonyl)-N⁵-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-4-methylphenyl)-L-glutamate (43)



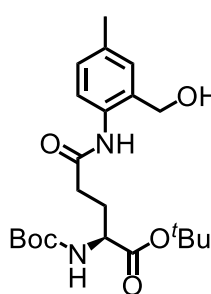
(S)-5-(*tert*-butoxy)-4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (811 mg, 2.67 mmol) was dissolved in Dry DMF (20 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. HATU (952 mg, 4.01 mmol) and DIPEA (1.74 mL, 8.02 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 5 min. Then, 2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-4-

methylaniline (807 mg, 3.21 mmol) was added to the mixture, warmed at room temperature and continuously stirred for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated

with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 10% to 20% EtOAc/hexane) to afford the title compound (1.31 g, 91%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.78 (brs, 1H, -CONH-), 8.00 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.09 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.91 (s, 1H), 5.21 (brd, 1H, -OCONH-, *J* = 7.8 Hz), 4.70 (d, 1H, *HBn*, *J*_{gem} = 13 Hz), 4.67 (d, 1H, *HBn'*, *J*_{gem} = 13 Hz), 4.28-4.14 (m, 1H), 2.52-2.33 (m, 2H), 2.32-2.18 (m, 1H), 2.29 (s, 3H, ArCH₃), 2.06-1.92 (m, 1H), 1.46 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 1.42 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃), 0.90 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂); LRMS 537.70 (M+H⁺)

Synthesis of *tert*-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(hydroxymethyl)-4-methylphenyl)-*L*-glutamate (47)

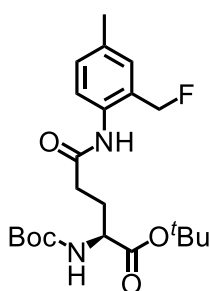
tert-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-4-methylphenyl)-*L*-glutamate (1.31 g, 2.43 mmol) was dissolved in Dry THF (14 mL), then tetrabutylammonium fluoride (ca. 1mol/L in THF, 7.3 mL, 7.3 mmol) and AcOH (329 μL, 4.87 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar



atmosphere for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 40% to 60% EtOAc/hexane) to afford the title compound (1.03 g, quant.) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.75 (brs, 1H, -CONH-), 7.68 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.07 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.01 (s, 1H), 5.36 (brd, 1H, -OCONH-, *J* = 8.2 Hz), 4.60 (d, 1H, *HBn*, *J*_{gem} = 13 Hz), 4.54 (d, 1H, *HBn'*, *J*_{gem} = 13 Hz),

4.22-4.10 (m, 1H), 2.48-2.32 (m, 2H), 2.32-2.06 (m, 1H), 2.27 (s, 3H, ArCH₃), 2.20-1.82 (m, 1H), 1.44 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 1.40 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃); LRMS 423.64 (M+H⁺)

Synthesis of *tert*-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(fluoromethyl)-4-methylphenyl)-*L*-glutamate (51)



tert-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(hydroxymethyl)-4-methyl

phenyl)-*L*-glutamate (476 mg, 1.13 mmol) was dissolved in Dry

CH₂Cl₂ (10 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. DAST (738 μL, 5.63

mmol) was added to the mixture, which was stirred for 1 h. At the end of

the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous

NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂ twice. The organic phase was washed with saturated

aqueous NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was

purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 20% to 30% EtOAc/hexane)

and by gel permeation chromatography (CHCl₃) to afford the title compound (129 mg, 27%)

as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.14 (brs, 1H, -CONH-), 7.68 (d, 1H, *J* = 8.2

Hz), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.12 (s, 1H), 5.38 (d, 2H, *HBn*, *J*_{*HBn-F*} = 48 Hz, *J*_{*gem*} = 11 Hz),

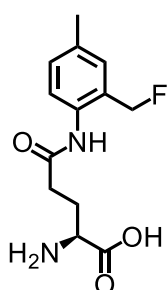
5.30 (brd, 1H, -OCONH-, *J* = 6.0 Hz), 4.32-4.16 (m, 1H), 2.56-2.36 (m, 2H), 2.36-2.20 (m,

1H), 2.31 (s, 3H, ArCH₃), 2.20-1.84 (m, 1H), 1.45 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 1.43 (s, 9H,

NHCOO(CH₃)₃); LRMS 425.63 (M+H⁺)

Synthesis of *N*⁵-(2-(fluoromethyl)-4-methylphenyl)-*L*-glutamine: gGlu-4Me-FMA

(55)



tert-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(fluoromethyl)-4-methyl

phenyl)-*L*-glutamate (38.5 mg, 0.0907 mmol) was dissolved in 4M

HCl/EtOAc (1 mL), which was stirred at room temperature for 12 h. At the end

of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue

was purified by reverse phase HPLC (0% to 100% MeCN/H₂O) to afford the

title compound (7.5 mg, 31%) as a white solid. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz): δ 7.26 (s, 1H),

7.23 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.17 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.32 (d, 2H, *HBn*, *J*_{*HBn-F*} = 48 Hz), 3.62 (t,

1H, *J* = 6.0 Hz), 2.63 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.33 (s, 3H, ArCH₃), 2.22-2.10 (m, 2H); ¹³C NMR

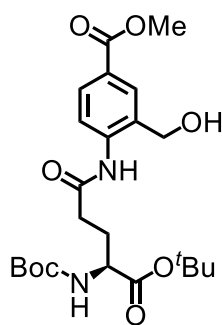
(CD₃OD, 100 MHz): δ 174.2, 173.6, 137.7, 133.6, 132.8, 130.8, 130.2, 127.2, 82.5 (d, CH₂F,

*J*_{C-F} = 163 Hz), 55.4, 33.2, 27.8, 21.0; HRMS Calcd for C₁₃H₁₈FN₂O₃: 269.13015 (M+H⁺);

Found: 269.13277 (+2.63 mDa).

②R₄ = COOMe, R₅ = H

Synthesis of methyl (S)-4-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-3-(hydroxymethyl)benzoate (48)



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid

(347 mg, 1.14 mmol) was dissolved in Dry DMF (10 mL), cooled at 0 °C

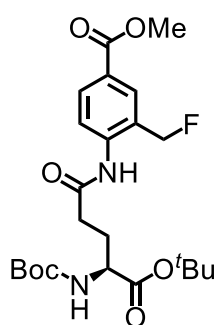
under Ar atmosphere. HATU (408 mg, 1.72 mmol) and DIPEA (743 μL,

3.43 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 5 min.

Then, methyl 4-amino-3-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)

benzoate (405 mg, 1.37 mmol) was added to the mixture, warmed at room temperature and continuously stirred for 12 h. Additional HATU (408 mg, 1.72 mmol), DIPEA (743 μ L, 3.43 mmol) and (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (347 mg, 1.14 mmol) was added, then stirred at 50 $^{\circ}$ C for more 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was roughly purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 10% to 20% EtOAc/hexane) to afford the title compound (197 mg) as a crude mixture. A mixture of methyl (S)-4-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-3-(hydroxymethyl)benzoate (197 mg) was dissolved in Dry THF (5 mL), then tetrabutylammonium fluoride (ca. 1 mol/L in THF, 1 mL, 1.00 mmol) and AcOH (46 μ L, 0.678 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar atmosphere for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 40% to 60% EtOAc/hexane) to afford the title compound (39.9 mg, 6% over 2 steps) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.16 (brs, 1H, -CONH-), 8.24 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.97 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.85 (s, 1H), 5.31 (brd, 1H, -OCONH-, *J* = 7.3 Hz), 4.84-4.64 (m, 2H, *HBn*), 4.27-4.15 (m, 1H), 3.88 (s, 3H, ArCOOCH₃), 3.26-3.18 (m, 1H, CH₂OH), 2.36-2.22 (m, 1H), 2.03-1.88 (m, 1H), 1.45 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 1.41 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃); LRMS 467.48 (M+H⁺)

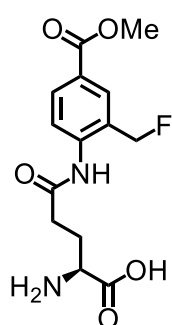
Synthesis of methyl (S)-4-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-3-(fluoromethyl)benzoate (52)



methyl (S)-4-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-3-(hydroxymethyl)benzoate (38.6 mg, 0.0824 mmol) was dissolved in Dry CH₂Cl₂ (2 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. DAST (54 μL, 0.412 mmol) was added to the mixture, which was stirred for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with

saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂ twice. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 20% to 60% EtOAc/hexane) to afford the title compound (25.9 mg, 67%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.48 (brs, 1H, -CONH-), 8.23 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.07 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.99 (s, 1H), 5.70-5.38 (m, 2H, *HBn*), 5.30 (brs, 1H, -OCONH-), 4.28-4.18 (m, 1H), 3.91 (s, 3H, ArCOOCH₃), 2.62-2.42 (m, 2H), 2.40-2.26 (m, 1H), 2.20-1.82 (m, 1H), 1.46 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 1.44 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃); LRMS 469.40 (M+H⁺)

Synthesis of *N*⁵-(2-(fluoromethyl)-4-(methoxycarbonyl)phenyl)-*L*-glutamine: gGlu-4COOMe-FMA (56)



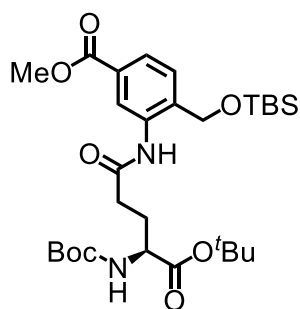
methyl (S)-4-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-3-(fluoromethyl)benzoate (29.5 mg, 0.0553 mmol) was dissolved in 4M HCl/EtOAc (2 mL), which was stirred at room temperature for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by reverse phase HPLC (0% to 100%

MeCN/H₂O) to afford the title compound (11 mg, 64%) as a white solid. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 8.09 (s, 1H), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 5.44 (d, 2H, *HBn*, *J*_{*HBn-F*} = 48 Hz), 4.06 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 3.89 (s, 3H, ArCOOCH₃), 2.76 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz),

2.25 (tt, 2H, $J = 6.9$ Hz, 6.4 Hz); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 173.1, 171.4, 167.7, 140.7, 131.9, 131.4, 131.0, 128.7, 126.0, 82.2 (d, CH_2F , $J_{\text{C-F}} = 164$ Hz), 53.4, 52.7, 32.7, 26.8; HRMS Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{NaO}_5$: 335.10192 ($\text{M}+\text{Na}^+$); Found: 335.10105 (-0.87 mDa).

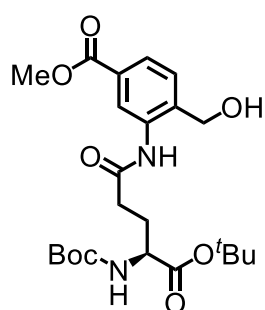
③ $\text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_5 = \text{COOMe}$

Synthesis of methyl (S)-3-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)benzoate (45)



(S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (170 mg, 0.560 mmol) was dissolved in Dry DMF (6 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. HATU (200 mg, 0.840 mmol) and DIPEA (364 μL , 1.68 mmol) was added to the mixture, which was stirred at 0 °C for 5 min. Then, methyl 3-amino-4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)benzoate (198 mg, 0.672 mmol) was added to the mixture, warmed at room temperature and continuously stirred for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H_2O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water, saturated aqueous NaHCO_3 and brine, dried (Na_2SO_4) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 20% to 40% EtOAc/hexane) to afford the title compound (199 mg, 61%) as a colorless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.93 (brs, 1H, $-\text{CONH}-$), 8.77 (s, 1H), 7.73 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.20 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 5.20 (brd, 1H, $-\text{OCONH}-$, $J = 7.8$ Hz), 4.78 (d, 1H, HBn , $J_{\text{gem}} = 13$ Hz), 4.74 (d, 1H, HBn' , $J_{\text{gem}} = 13$ Hz), 4.26-4.16 (m, 1H), 3.88 (s, 3H, ArCOOCH_3), 2.53-2.34 (m, 2H), 2.34-2.20 (m, 1H), 2.06-1.90 (m, 1H), 1.45 (s, 9H, $\text{COO}(\text{CH}_3)_3$), 1.41 (s, 9H, $\text{NHCOO}(\text{CH}_3)_3$), 0.90 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.08 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); LRMS 581.56 ($\text{M}+\text{H}^+$)

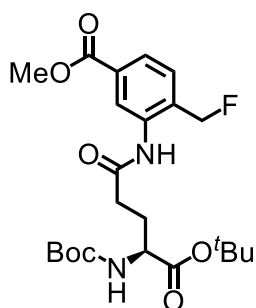
Synthesis of methyl (S)-3-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-4-(hydroxymethyl)benzoate (49)



methyl (S)-3-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)benzoate (199 mg, 0.343mmol) was dissolved in Dry THF (10 mL), then tetrabutylammonium fluoride (ca. 1mol/L in THF, 1.03 mL, 1.03 mmol) and AcOH (42 μ L, 0.687 mmol) was added to the mixture, which was

stirred at room temperature under Ar atmosphere for 2 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NH_4Cl and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with brine, dried (Na_2SO_4) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 40% to 60% EtOAc/hexane) to afford the title compound (116 mg, 73%) as a colorless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.96 (brs, 1H, -CONH-), 8.55 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.75 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.29 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 5.34 (brd, 1H, -OCONH-, $J = 7.8$ Hz), 4.74 (dd, 1H, HBn , $J_{\text{gem}} = 13$ Hz, $J = 6.0$ Hz), 4.67 (dd, 1H, HBn' , $J_{\text{gem}} = 13$ Hz, $J = 5.5$ Hz), 4.26-4.12 (m, 1H), 3.88 (s, 3H, ArCOOCH_3), 3.51 (dd, 1H, CH_2OH , $J = 6.0$ Hz, $J = 5.5$ Hz), 2.54-2.38 (m, 2H), 2.34-2.20 (m, 1H), 2.01-1.84 (m, 1H), 1.45 (s, 9H, $\text{COO}(\text{CH}_3)_3$), 1.41 (s, 9H, $\text{NHCOO}(\text{CH}_3)_3$); LRMS 467.49 ($\text{M}+\text{H}^+$)

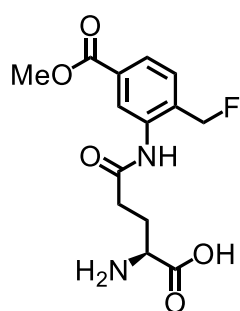
Synthesis of methyl (S)-3-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-4-(fluoromethyl)benzoate (53)



methyl (S)-3-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-4-(hydroxymethyl)benzoate (110 mg, 0.236 mmol) was dissolved in Dry CH₂Cl₂ (10 mL), then Fluolead® (119 mg, 0.472 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar atmosphere for 1.5 h. At the end of the reaction,

the reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂ twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 20% to 40% EtOAc/hexane) to afford the title compound (43.6 mg, 39%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.47 (brs, 1H, -CONH-), 8.45 (s, 1H), 7.85 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 5.48 (d, 2H, *HBn*, *J*_{*HBn-F*} = 48 Hz, *J*_{*gem*} = 12 Hz), 5.33 (brd, 1H, -OCONH-, *J* = 7.8 Hz), 4.28-4.17 (m, 1H), 3.90 (s, 3H, ArCOOCH₃), 2.57-2.40 (m, 2H), 2.35-2.22 (m, 1H), 1.97 -1.82 (m, 1H), 1.45 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 1.43 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃); LRMS 469.43 (M+H⁺)

Synthesis of N⁵-(2-(fluoromethyl)-5-(methoxycarbonyl)phenyl)-L-glutamine: gGlu-5COOMe-FMA (57)

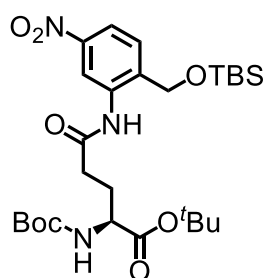


methyl (S)-3-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-4-(fluoromethyl)benzoate (43.6 mg, 0.0931 mmol) was dissolved in EtOAc (5 mL), then 4M HCl/EtOAc (10 mL) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*.

The residue was purified by reverse phase HPLC (20% to 100% MeCN/H₂O) to afford the title compound (19.4 mg, 60%) as a white solid. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 8.04 (s, 1H, *H*_c), 7.91 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.44 (d, 2H, *HBn*, *J*_{*HBn-F*} = 48 Hz), 4.07 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 2.75 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.26 (tt, 2H, *J* = 7.3 Hz, 6.4 Hz); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 172.0, 170.2, 166.3, 136.5, 134.6, 130.7, 127.8, 126.9, 126.6, 80.7 (d, CH₂F, *J*_{*C-F*} = 165 Hz), 52.1, 51.5, 31.1, 25.6; HRMS Calcd for C₁₄H₁₈FN₂O₅: 313.11997 (M+H⁺); Found: 313.11879 (-1.18 mDa).

④R₄ = H, R₅ = NO₂

Synthesis of *tert*-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-5-nitrophenyl)-L-glutamate (46)

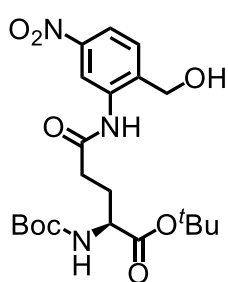


(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol) was dissolved in Dry DMF (2 mL). DMT-MM (137 mg, 0.494 mmol) and 2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-5-nitroaniline (112 mg, 0.396 mmol) were added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar atmosphere for 12 hours.

At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with H₂O and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 20% to 40% EtOAc/hexane) to afford the title compound (110 mg, 60%) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.05-9.10 (m, 2H), 7.86-7.89 (m, 1H), 7.25-7.30 (m, 1H),

5.22 (s, 1H), 4.75-4.85 (m, 2H), 4.10-4.20 (m, 1H), 2.45-2.54 (m, 2H), 2.26-2.29 (m, 1H), 1.98-2.00 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.09 (s, 6H); LRMS 568.23 (M+H⁺)

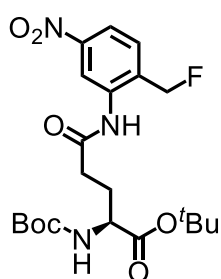
Synthesis of *tert*-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(hydroxymethyl)-5-nitrophenyl)-L-glutamate (50)



tert-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-5-nitrophenyl)-L-glutamate (110 mg, 0.194mmol) was dissolved in Dry THF (2 mL), then tetrabutylammonium fluoride (ca. 1mol/L in THF, 581 μ L, 0.581 mmol) and AcOH (14 μ L, 0.387 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar

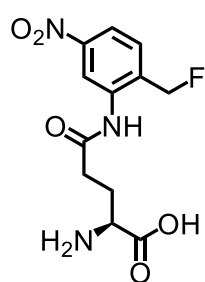
atmosphere for 1 hours. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 3% to 10% MeOH/CH₂Cl₂) to afford the title compound (76 mg, 86%) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.27 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.81 (d, J = 13.3 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.07-4.18 (m, 1H), 2.49-2.56 (m, 2H), 2.27-2.34 (m, 1H), 1.91-1.96 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.42 (s, 9H); LRMS 454.53 (M+H⁺)

Synthesis of *tert*-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(fluoromethyl)-5-nitrophenyl)-L-glutamate (54)



tert-butyl *N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*⁵-(2-(hydroxymethyl)-5-nitrophenyl)-L-glutamate (76 mg, 0.168 mmol) was dissolved in Dry CH₂Cl₂ (1 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. DAST (88 µL, 0.672 mmol) was added to the mixture, which was stirred for 2 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂ twice. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 10% to 30% EtOAc/hexane) to afford the title compound (18 mg, 24%) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.83-8.88 (m, 2H), 8.03 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.38-5.67 (m, 3H), 4.21-4.21 (m, 1H), 2.50-2.60 (m, 2H), 2.30-2.38 (m, 1H), 1.81-1.87 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.46 (s, 9H); LRMS 469.43 (M+H⁺)

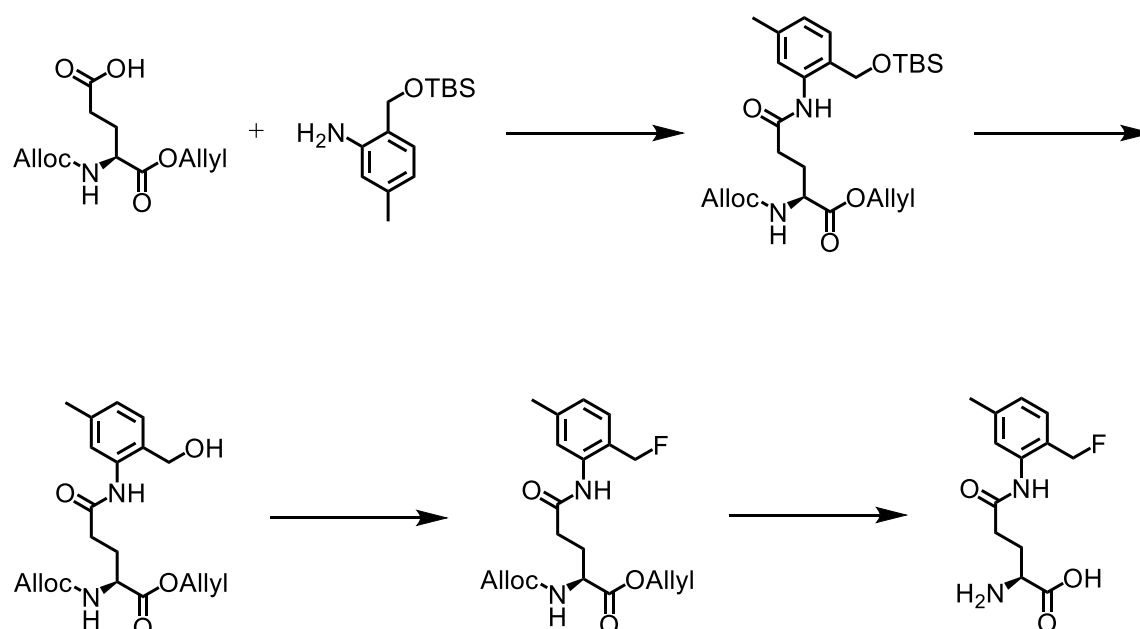
Synthesis of *N*⁵-(2-(fluoromethyl)-5-nitrophenyl)-L-glutamine: gGlu-5NO₂-FMA (58)



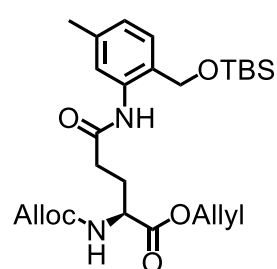
methyl (S)-3-(5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-4-(fluoromethyl)benzoate (43.6 mg, 0.0931 mmol) was dissolved in EtOAc (5 mL), then 4M HCl/EtOAc (10 mL) was added to the mixture, which was stirred at room temperature for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by reverse phase HPLC (20% to 100% MeCN/H₂O) to afford the title compound (19.4 mg, 60%) as a white solid. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 8.41 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 46.9 Hz, 2H), 4.05-4.09 (m, 1H), 2.76-2.79 (m,

2H), 2.22-2.32 (m, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 171.97, 170.16, 148.10, 137.56, 137.40, 135.53, 128.48, 128.38, 120.23, 119.87, 81.17 (d, CH_2F , $J_{\text{C-F}} = 167$ Hz), 52.07, 31.18, 25.42; HRMS Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{FN}_3\text{O}_5$: 298.08392 (M-H^-); Found: 298.08026 (-3.67 mDa).

gGlu-FMA 誘導体の合成 II (Scheme 3-1-3)



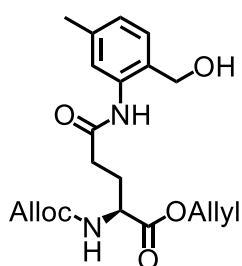
Synthesis of allyl N^2 -((allyloxy)carbonyl)- N^5 -(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-5-methylphenyl)-L-glutamate (60)



(*S*)-5-(allyloxy)-4-(((allyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (63.0 mg, 0.232 mmol) was dissolved in Dry DMF (5 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. HATU (83.0 mg, 0.348 mmol) and DIPEA (151 μL , 0.697 mmol) was added to the mixture, which was stirred at

0 °C for 5 min. Then, 2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-5-methylaniline (70 mg, 0.279 mmol) was added to the mixture, warmed at room temperature and continuously stirred for 12 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with water and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (34 g silica gel, 20% to 30% EtOAc/hexane) to afford the title compound (59.0 mg, 50%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.80 (brs, 1H, -CONH-), 7.93 (s, 1H), 6.89 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.76 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 5.90-5.70 (m, 2H), 5.56 (brd, 1H, -OCONH-, *J* = 8.0 Hz), 5.28-5.10 (m, 4H), 4.62 (s, 2H, *HBn*), 4.58-4.40 (m, 4H), 4.40-4.30 (m, 1H), 2.51-2.30 (m, 2H), 2.36-2.21 (m, 1H), 2.26 (s, 3H, ArCH₃), 2.13-1.95 (m, 1H), 0.83 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂); LRMS 505.72 (M+H⁺)

Synthesis of allyl *N*²-((allyloxy)carbonyl)-*N*⁵-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-5-methylphenyl)-*L*-glutamate (61)

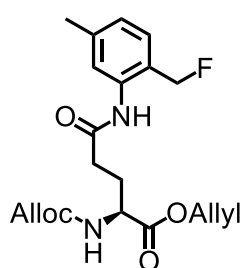


allyl *N*²-((allyloxy)carbonyl)-*N*⁵-(2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-5-methylphenyl)-*L*-glutamate (59.0 mg, 0.117 mmol) was dissolved in Dry THF (3 mL), then tetrabutylammonium fluoride (ca. 1mol/L in THF, 351 μL, 0.351 mmol) and AcOH (16 μL, 0.234 mmol) was added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar atmosphere for 12 h.

At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc twice. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 40% to 60% EtOAc/hexane) to afford the title compound (32.6 mg, 71%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.68 (brs, 1H, -CONH-), 7.80 (s, 1H), 7.06 (d,

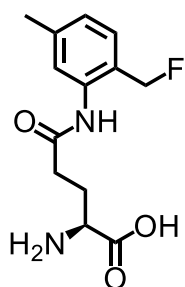
1H, $J = 7.8$ Hz), 6.88 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 5.96-5.80 (m, 2H), 5.66 (brd, 1H, -CONH-, $J = 7.8$ Hz), 5.36-5.14 (m, 4H), 4.71-4.35 (m, 8H), 2.87 (brs, 1H, CH₂OH), 2.55-2.41 (m, 2H), 2.39-2.27 (m, 1H), 2.32 (s, 3H, ArCH₃), 2.14-1.97 (m, 1H); LRMS 391.53 (M+H⁺)

Synthesis of allyl *N*²-((allyloxy)carbonyl)-*N*⁵-(2-(fluoromethyl)-5-methylphenyl)-*L*-glutamate (62)



allyl *N*²-((allyloxy)carbonyl)-*N*⁵-(2-(hydroxymethyl)-5-methylphenyl)-*L*-glutamate (32.6 mg, 0.0835 mmol) was dissolved in Dry CH₂Cl₂ (2 mL), cooled at 0 °C under Ar atmosphere. DAST (55 μL, 0.417 mmol) was added to the mixture, which was stirred for 3 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with CH₂Cl₂ twice. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (14 g silica gel, 20% to 40% EtOAc/hexane) to afford the title compound (10.3 mg, 31%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.77 (s, 1H), 7.17 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 6.96 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 5.97-5.82 (m, 2H), 5.57 (brd, 1H, -CONH-, $J = 6.9$ Hz), 5.40 (d, 2H, *HBn*, $J_{HBn-F} = 48$ Hz, $J_{gem} = 11$ Hz), 5.36-5.17 (m, 4H), 4.65 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 4.59-4.42 (m, 3H), 2.59-2.42 (m, 2H), 2.45-2.27 (m, 1H), 2.36 (s, 3H, ArCH₃), 2.15-2.00 (m, 1H); LRMS 393. 45 (M+H⁺)

Synthesis of *N*⁵-(2-(fluoromethyl)-5-methylphenyl)-*L*-glutamine (63)



allyl *N*²-((allyloxy)carbonyl)-*N*⁵-(2-(fluoromethyl)-5-methylphenyl)-*L*-glutamate (10.3 mg, 0.0262 mmol) and phenylsilane (33 μ L, 0.262 mmol) was dissolved in Dry CH_2Cl_2 (1 mL), then $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.6 mg, 25 mol%) was added to the mixture, which was stirred at room temperature under Ar atmosphere for 1 h. At the end of the reaction, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by reverse phase HPLC (20% to 100% MeCN/ H_2O) to afford the title compound (3.1 mg, 44%) as a white solid. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.31 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.22 (s, 1H), 7.09 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 5.32 (d, 2H, HBn , $J_{\text{HBn-F}} = 48$ Hz), 3.65 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 2.71-2.59 (m, 2H), 2.32 (s, 3H, ArCH_3), 2.23-2.10 (m, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 172.0, 170.1, 139.4, 134.8, 130.0, 128.7, 127.0, 126.4, 81.1 (d, CH_2F , $J_{\text{C-F}} = 163$ Hz), 52.3, 31.2, 25.7, 19.8; HRMS Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{NaO}_3$: 267.11450 ($\text{M} + \text{Na}^+$); Found: 267.11153 (-2.97 mDa).

参考文献

1. 国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センター編.
“最新がん統計”. がん情報サービス.
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html, (参照 2020-01-06)
2. L. Falzone *et al.*, Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front. Pharmacol.* **2018**, 9, 1300.
3. I. Larionova *et al.*, Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology* **2019**, 8, e1596004-1-15.
4. L. Y. Ramirez *et al.*, Potential Chemotherapy Side Effects: What Do Oncologists Tell Parents? *Pediatr Blood Cancer* **2009**, 52, 497-502.
5. D. Hanahan *et al.*, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, 144, 646-674.
6. M. Haung *et al.*, Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, 35, 41-50.
7. A. J. Sabnis, T. G. Bivona, Principles of Resistance to Targeted Cancer Therapy: Lessons from Basic and Translational Cancer Biology. *TRENDS MOL. MED.* **2019**, 25, 185-197.
8. S. Yano *et al.*, Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, 6, 2011-2017.
9. A. C. Faber *et al.*, BIM expression in treatment-naïve cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. *Cancer Discov.* **2011**, 1, 352-365.
10. S. V. Sharma *et al.*, A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* **2010**, 141, 69-80.
11. D. M. K. Keefe, E. H. Bateman, Potential Successes and Challenges of Targeted Cancer Therapies. *JNCI Monographs* **2019**, 53, 25-29.

12. Keith Tipton and Andrew McDonald, A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification.

<https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/11/A-Brief-Guide-to-Enzyme-Classification-and-Nomenclature-rev.pdf> (2020-03-02)
13. S. R. Punganuru *et al.*, Cancer-Specific Biomarker hNQO1-Activatable Fluorescent Probe for Imaging Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Cancers* **2018**, 10 ,470.
14. G. D. Pietro *et al.*, Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol* **2010**, 6, 153-170.
15. D. M. Nanus, Of Peptides and Peptidases: The Role of Cell Surface Peptidases in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 6307-6309.
16. Y. Urano *et al.*, Rapid Cancer Detection by Topically Spraying a γ -Glutamyltranspeptidase–Activated Fluorescent Probe. *Sci. Transl. Med.* **2011**, 3, 110-119.
17. H. Ueo *et al.*, Rapid intraoperative visualization of breast lesions with γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 12080.
18. 栗木優伍. 新規エキソペプチダーゼ活性検出蛍光プローブ群の開発による新医療技術の創製. 東京大学, 2019, 博士論文.
19. H. Onoyama *et al.*, Rapid and sensitive detection of early esophageal squamous cell carcinoma with fluorescence probe targeting dipeptidylpeptidase IV. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 26399.
20. S. E. Pratt *et al.*, Human carboxylesterase-2 hydrolyzes the prodrug of gemcitabine (LY2334737) and confers prodrug sensitivity to cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2011**, 19, 1159-1168.

21. T. Komatsu *et al.*, Roles of cytochromes P450 1A2, 2A6, and 2C8 in 5-fluorouracil formation from tegafur, an anticancer prodrug, in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, 28, 1457-1463.
22. A. J. Wiemer and D. F. Wiemer, Prodrugs of phosphonates and phosphates: crossing the membrane barrier. *Top Curr. Chem.* **2015**, 360, 115-160.
23. M. M. Martino and R. Martino, Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. *Oncologist* **2002**, 7, 288-323.
24. M. Wickstrom *et al.*, The alkylating prodrug J1 can be activated by aminopeptidase N, leading to a possible target directed release of melphalan. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79, 1281-1290.
25. A. Dahan *et al.*, Dipeptidyl Peptidase IV as a Potential Target for Selective Prodrug Activation and Chemotherapeutic Action in Cancers. *Mol. Pharmaceutics*, **2014**, 11, 4385-4394.
26. F. Wang *et al.*, A Leucine Aminopeptidase-Activated Theranostic Prodrug for Cancer Diagnosis and Chemotherapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, 2, 4904-4910.
27. T. Doura *et al.*, Detection of LacZ - Positive Cells in Living Tissue with Single - Cell Resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 9620 -9624.
28. A. Pompella *et al.*, Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 231-238.
29. Q. Wang *et al.*, Tumor and serum gamma-glutamyl transpeptidase, new prognostic and molecular interpretation of an old biomarker in gastric cancer. *Oncotarget* **2017**, 8, 36171-36184.
30. B. Pro and N.H. Dang, CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol. Histopathol.* **2004**, 19, 1345-1351.

31. D. Asanuma *et al.*, Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo. *Nat. Comm.* **2015**, 6, 6463.
32. L. Liu *et al.*, Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4): Localization and activity in human and rodent islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, 453, 398-404.
33. J. S. Rosenblum and J. W. Kozarich, Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, 7, 496-504.
34. M. P. Gamcsik *et al.*, Glutathione Levels in Human Tumors. *Biomarkers* **2012**, 17, 646-674.
35. M. L. Circu *et al.*, Glutathione and apoptosis. *Cell* **2008**, 42, 689-706.
36. M. S. Singh *et al.*, ortho-Quinone methide (o-QM): a highly reactive, ephemeral and versatile intermediate in organic synthesis. *RSC Adv.*, **2014**, 4, 55924.
37. E. E. Weinert *et al.*, Substituents on Quinone Methides Strongly Modulate Formation and Stability of Their Nucleophilic Adducts. *J. AM. CHEM. SOC.* **2006**, 128, 11940-11947.
38. Z. Ruan *et al.*, A Novel, One-Step Palladium and Phenylsilane Activated Amidation from Allyl Ester on Solid Support. *Res. Lett. Org. Chem.* **2008**, 2008, 696090.
39. K. Taniguchi *et al.*, Staging of gastric cancer with the Clinical Stage Prediction score. *World J. Surg. Oncol.* **2019**, 17, 47.
40. H. Ueno *et al.*, Optimal Colorectal Cancer Staging Criteria in TNM Classification. *J. Clin. Oncol.* **2012**, 30, 1519-1526.
41. Y. Yonemura *et al.*, Recent advances in the treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancers by nucleoside antimetabolites. *Cancer Sci.* **2007**, 98, 11-18.

42. J. Franko *et al.*, Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: a pooled analysis of north central cancer treatment group phase III trials N9741 and N9841. *J. Clin. Oncol.* **2012**, 30, 263-267.
43. S. H. Hong *et al.*, Treatment outcomes of systemic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis arising from gastric cancer with no measurable disease: retrospective analysis from a single center. *Gastric Cancer* **2013**, 16, 290-300.
44. H. Ishigami *et al.*, Phase III Trial Comparing Intraperitoneal and Intravenous Paclitaxel Plus S-1 Versus Cisplatin Plus S-1 in Patients With Gastric Cancer With Peritoneal Metastasis: PHOENIX-GC Trial. *J. Clin. Oncol.* **2018**, 36, 1922-1929.
45. K. Miyamoto *et al.*, Disposition Kinetics of Taxanes in Peritoneal Dissemination. *GASTROENT. RES. PRACT.* **2012**, 963403.
46. A. Corti *et al.*, γ -Glutamyltransferase enzyme activity of cancer cells modulates L- γ -glutamyl-p-nitroanilide (GPNA) cytotoxicity. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 891.
47. X. Bai *et al.*, Inhibition of Protein Phosphatase 2A Enhances Cytotoxicity and Accessibility of Chemotherapeutic Drugs to Hepatocellular Carcinomas. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13, 2062-2072.
48. I. Khasabova *et al.*, Pioglitazone, a PPAR γ agonist, reduces cisplatin-evoked neuropathic pain by protecting against oxidative stress. *PAIN* **2011**, 160, 688-701.
49. S. A. Yellin. *et al.*, Relationship of glutathione and glutathione-S-transferase to cisplatin sensitivity in human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* **1994**, 85, 223-232.
50. A. D. Luca *et al.*, A structure-based mechanism of cisplatin resistance mediated by glutathione transferase P1-1. *PNAS* **2019**, 116, 13943-13951.

51. M. H. Hanigan, Chapter Three - Gamma-Glutamyl Transpeptidase: Redox Regulation and Drug Resistance. *Adv. Cancer Res.* **2014**, 112, 103-141.
52. T. Sasada *et al.*, Redox control of resistance to cisdiamminedichloroplatinum(II)(CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **1996**, 97, 2268-76.
53. S. K. Sharma and K. D. Bagshawe, Translating antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) and prospects for combination. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2017**, 17, 1-13.
54. X. Zhou *et al.*, Characterization of a fusion protein of RGD4C and the beta-lactamase variant for antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Onco Targets Ther.* **2014**, 7, 535–541.
55. H. Panjideh *et al.*, Biodistribution and efficacy of [¹³¹I]A33scFv:: CDy,a recombinant antibody-enzyme protein for colon cancer. *Int. J. Oncol.* **2008**, 32, 925–930.
56. M. P. Napier *et al.*, Antibody-directed enzyme prodrug therapy: efficacy and mechanism of action in colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 765–772.
57. A. Mayer *et al.*, A phase I study of single administration of antibody-directed enzyme prodrug therapy with the recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibody-enzyme fusion protein MFECP1 and a bis-iodo phenol mustard prodrug. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 6509–6516.
58. A. Zehir *et al.*, Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat. Med.* **2017**, 23, 703-713.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科、薬品代謝化学教室、浦野泰照教授に心より感謝申し上げます。最初の面談時に「どんな方向でもいいから 5km 進んでくれ」という言葉をかけてくださったことは今でも鮮明に覚えており、途中研究が迷走してしまった時期もありましたが、先生はそのような時も寛大な心で見守ってくださりました。何より 3 年間楽しく研究に取り組むことが出来たことを誇りに思います。

実験報告会等で貴重なご助言をいただきました、神谷真子准教授、花岡健二郎准教授、上野匡助教、小松徹助教、小嶋良輔助教に深く感謝致します。各先生方がそれぞれ違う角度からの的確なご助言をしてくださったお蔭で、実験の方向性を円滑に決定することができました。

常に励まし、共に研究を行い、忙しい中で相談相手になってくださった薬品代謝化学教室のすべての皆様に感謝致します。特に、学生生活の心の支えとなってくれた同期の井上大輝博士、橘棕博士、柳光一博士に深く感謝致します。同期ながら尊敬する部分が多く、適度な刺激を摂取しながら日々を送ることができました。

最後に、学生生活を支えてくれた家族に心より感謝致します。

令和 2 年 3 月

東京大学大学院薬学系研究科 博士後期課程 薬品代謝化学教室
林 健人