

広範な有効域を有する  
Colchicine 系抗腫瘍薬の創製研究

2014 年

西山 裕之



# 目次

序論	2
本論	
第一章 7位に amide 型側鎖を有する Colchicine 誘導体の構造活性相関研究	
第一節 4位に置換基を有する誘導体の合成と細胞傷害活性	8
第二節 4-Chlorocolchicine の7位側鎖変換体 (脂肪族) の合成と細胞傷害活性	14
第三節 4-Chlorocolchicine の7位側鎖変換体 (芳香族) の合成と細胞傷害活性	17
第四節 4-Chlorocolchicine の7位側鎖変換体の抗腫瘍効果と代謝安定性	24
第五節 代謝安定性の改善を指向した誘導体の合成と細胞傷害活性	26
第六節 代謝安定性の改善を指向した誘導体の抗腫瘍効果	32
第七節 Tubulin 重合阻害活性	33
第二章 7位に sulfonamide, urea, または thiourea 型側鎖を有する 4-Chlorocolchicine 誘導体の構造活性相関研究	
第一節 Sulfonamide または urea 型側鎖を有する誘導体の合成と細胞傷害活性	35
第二節 Sulfonamide または urea 型側鎖を有する誘導体の抗腫瘍効果	38
第三節 Thiourea 型側鎖 (脂肪族) を有する誘導体の合成と細胞傷害活性	39
第四節 Thiourea 型側鎖 (芳香族) を有する誘導体の合成と細胞傷害活性	44
第五節 Thiourea 型側鎖を有する誘導体の抗腫瘍効果	47
第六節 代謝安定性の改善を指向した誘導体の合成と細胞傷害活性	48
第七節 Tubulin 重合阻害活性	56
第三章 Liposome を用いた DDS 化研究	58
結語	65
実験の部	66
参考文献	116
謝辞	122
主論文目録	123
論文審査委員	124

## 序論

ユリ科イヌサフラン (*Colchicum autumnale* L.) の種子や球根に多く含有されている colchicine は、tropolone 環を有し、生合成的にはイソキノリンアルカロイドの一種である (Figure 1)。Colchicine は 2000 年以上前から痛風の治療薬として用いられており、日本においても「痛風発作の緩解および予防」の適応において、厚生労働省から認可されている。その作用メカニズムについては長年未解明であったが 2013 年に、colchicine が tubulin に作用することで、ミトコンドリアの微小管を介した小胞体近傍への移動・集積を阻害し、自然免疫機構である NLRP3 インフラマソームの活性化を抑え、痛風の炎症作用を緩和することが明らかとなった<sup>1)</sup>。また、colchicine は同様に tubulin に結合することで微小管の形成を阻害するため、細胞分裂を抑制する作用も有しており、抗腫瘍薬としての応用が期待されている<sup>2)</sup>。

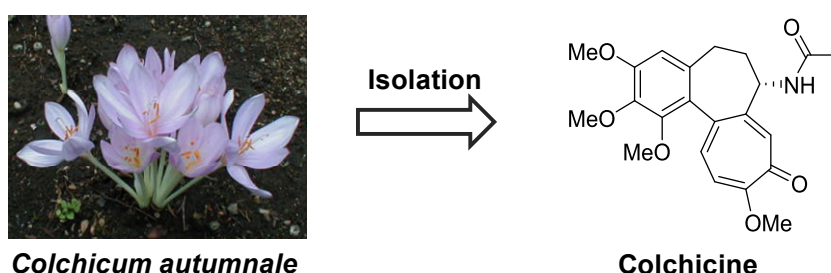


Figure 1: Colchicine is a main alkaloid contained in *Colchicum autumnale*

Tubulin は真核生物の細胞内に存在するタンパク質であり、グアノシン三リン酸 (GTP) の存在下、 $\alpha$ -subunit と  $\beta$ -subunit から成るヘテロ二量体を形成する。このヘテロ二量体は、螺旋状に集まり、微小管と呼ばれる管状のポリマーを形成して、細胞骨格となり細胞構造の維持や、シグナル伝達における輸送路などに係わっている。さらに、微小管の重要な役割として、細胞分裂における紡錘体の形成が挙げられる (Figure 2)<sup>3)</sup>。

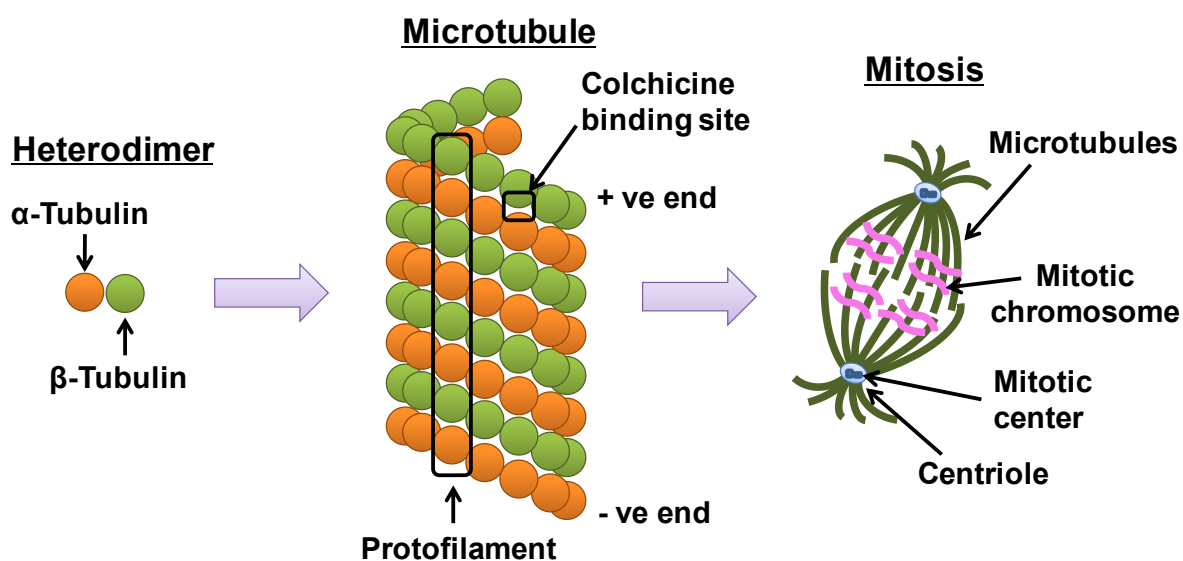
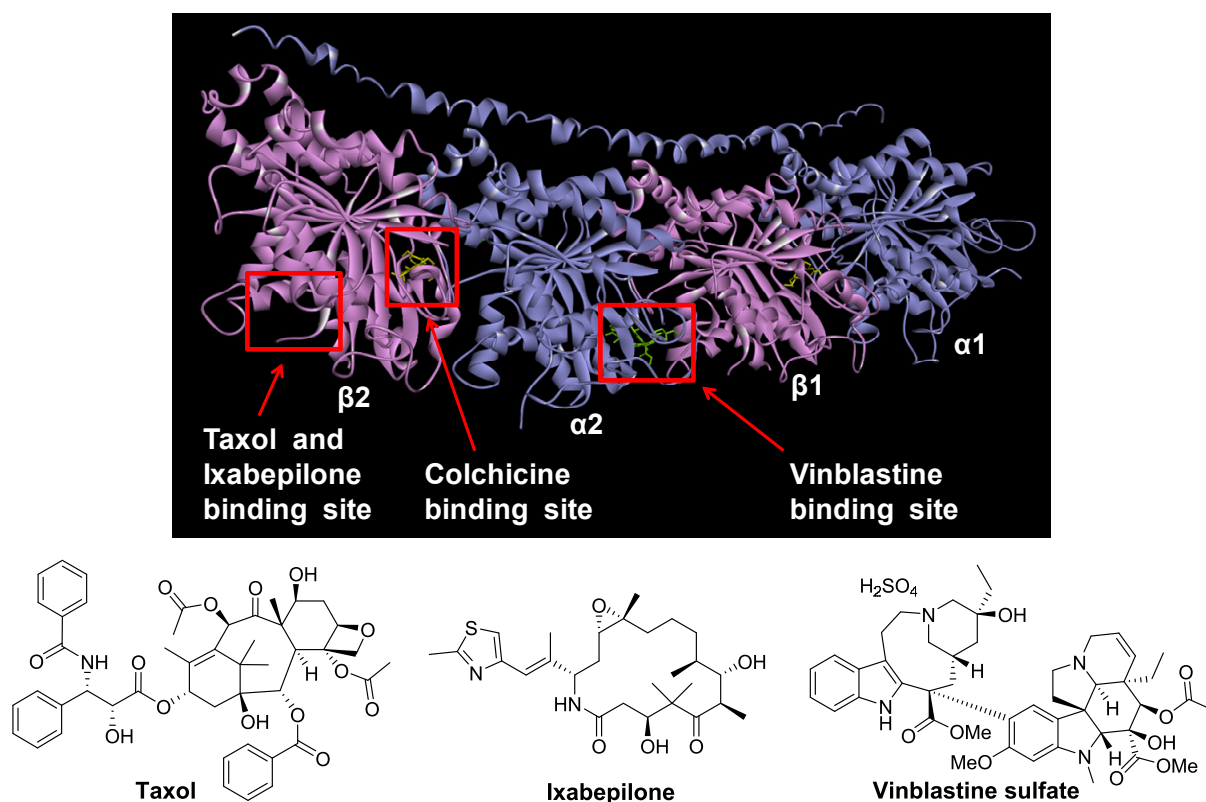


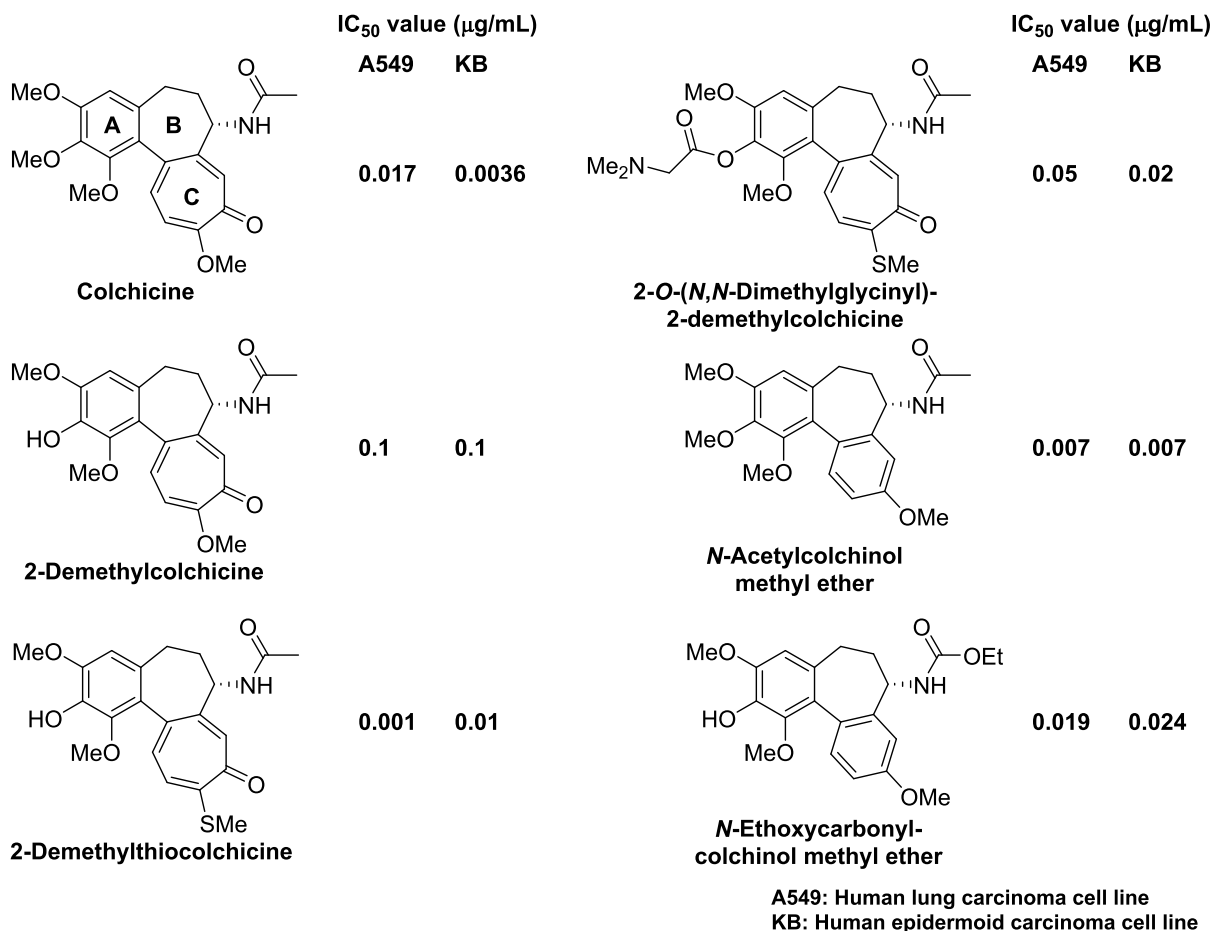
Figure 2: Structure and function of microtubules

この tubulin に作用する抗腫瘍剤として、vinblastine、ixabepilone や taxol などが知られており、vinblastine は、colchicine と同様に tubulin の重合を阻害する。それに対して ixabepilone および taxol は tubulin の重合を促進・安定化することで、細胞の有糸分裂を阻害して細胞死を引き起こす<sup>4)</sup> (Figure 3)。これら 3 剤は臨床現場において、がんの治療に用いられており、このことが tubulin 作用薬の抗腫瘍剤としての有用性を証明している。しかしながら、colchicine は有効域が狭く、心毒性や肝毒性といった重篤な副作用が認められるなど毒性域との乖離が不十分なことから、抗がん剤としては実用化に至っていない<sup>5)-8)</sup>。そのため、colchicine 結合サイトにて tubulin に作用し、広範な有効域を有する薬剤の創製が望まれている。



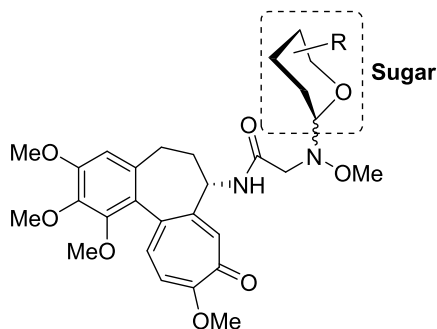
**Figure 3: Three different binding sites for microtubule interfering agents**

これまでに、colchicine をリード化合物として様々な誘導体の研究が行われてきた<sup>9)-15)</sup>。その中で、colchicine は A 環と C 環を介して tubulin と相互作用することが明らかとなり、A 環や C 環部分に結合する置換基の修飾や C 環 (tropone 環) を benzene 環に変えた化合物などが合成され、それらの生物活性に関する報告がなされている<sup>16)-19)</sup> (Figure 4)。



**Figure 4: Colchicine and its derivatives and their cytotoxicities**

2006年に、colchicineのB環部側鎖に糖を導入した誘導体が報告された<sup>20)</sup>(Figure 5)。導入する糖鎖の種類を変換することにより、tubulin重合阻害作用を有する誘導体はもとより、tubulinの重合促進・安定化作用を有する誘導体も見出されている。また、これらの誘導体をcolchicineやtaxolとコンビネーション・アッセイにて評価すると、殺細胞活性に相乗効果が認められることも示されている。



**Figure 5: Colchicine derivatives bearing a sugar side chain**

同様に、B環側鎖部分を変換することで、選択性の向上や親和性の向上など特定の機能を持たせたcolchicine誘導体も合成されており、注目を集めている(Figure 6)。化合物Iは、B環部側鎖

に cobalamin を結合させることで腫瘍細胞への選択性の向上を期待した化合物であり、化合物 II は dansyl 基を結合させることで tubulin 蛋白への親和性の向上を目指したものである<sup>21),22)</sup>。

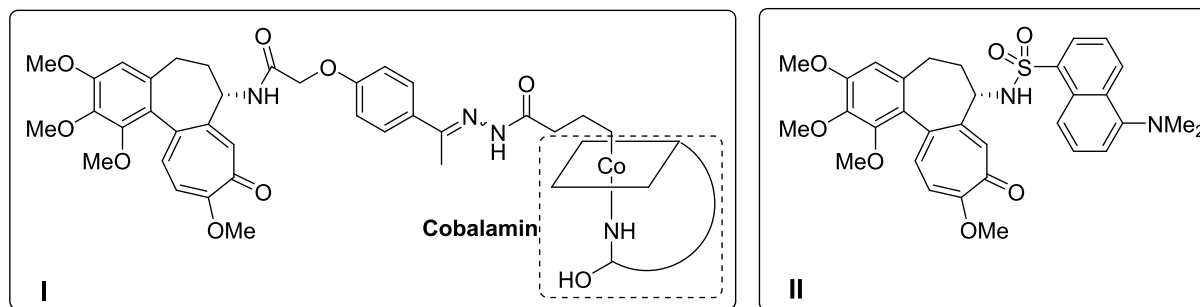


Figure 6: B-ring modified colchicine derivatives

また、2010 年には、colchicine の C 環部分に対して hetero Diels-Alder 反応を作用させることで、4 環性化合物へと変換した誘導体が合成され、その活性評価が行われた<sup>23)</sup> (Figure 7)。これらの 4 環性化合物は、細胞中で retro Diels-Alder 反応が進行することにより、colchicine が放出されて細胞傷害活性を示す pro-drug であることが報告されている。

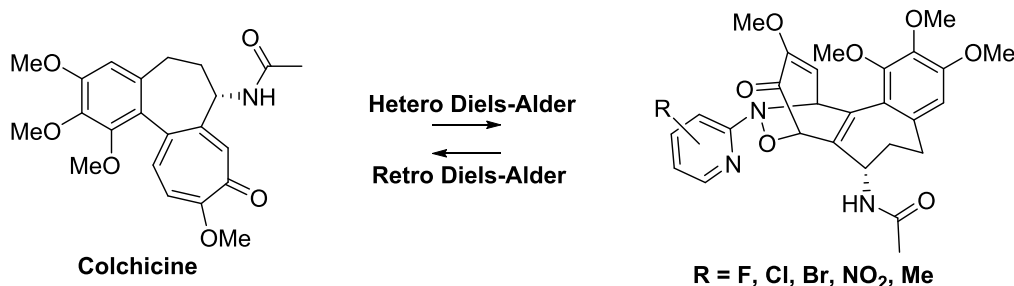
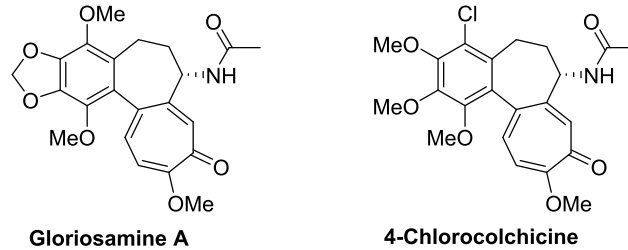


Figure 7: C-ring modified colchicine derivatives

以上のように、様々な colchicine 誘導体の検討が行われているものの、未だ毒性に関しては十分な改善が達成されておらず、新たな colchicine 誘導体の創製が切望されている。

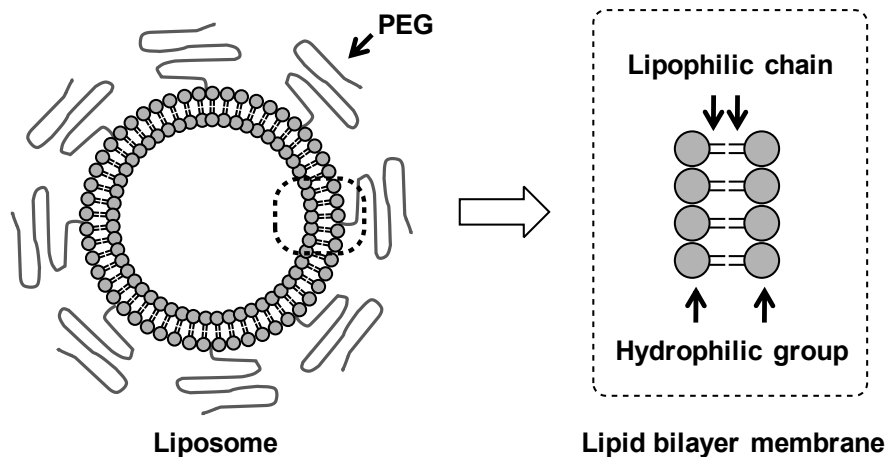
当研究室においては田中らが、抗腫瘍活性天然物の発見を目的にユリ科植物 *Gloriosa rothschildiana* の成分探索研究を行い、新規コルヒチノイドとして gloriosamine A の単離に成功している<sup>24)</sup> (Figure 8)。本化合物は、4 位に置換基を有する初めての天然コルヒチノイドであり、また *in vitro* 系での活性評価において細胞傷害活性を有することが明らかとなった。そこで八十歩らは、4 位に置換基を有するコルヒチノイドの可能性を探る目的で、様々な置換基を付した colchicine 類の合成を行ったところ、4-chlorocolchicine が強力な細胞傷害活性を有することを明らかにした<sup>25)</sup>。

そのため、本研究では強力かつ広範な有効域を有する colchicine 誘導体の獲得を目的として、さらなる 4 位および 7 位側鎖の変換体の合成を実施し、その活性を評価した (第一章および第二章)。



**Figure 8: Structures of gloriosamine A and 4-chlorocolchicine**

一方、医薬品を望みの標的へと選択的に誘導し効果および副作用を改善する方法として、しばしばドラッグ・デリバリー・システム (DDS) が検討されてきた。その中において、liposome はリン脂質を主体とする数十～数百 nm の粒径を有する閉鎖小胞であり、その内部に様々な分子を封入することが出来るとともに、生体適合性や生分解性に優れていることから、生物活性物質の運搬体として適用可能と考えられてきた<sup>26)</sup> (Figure 9)。



**Figure 9: Structure of liposome**

固形腫瘍では血管の構造が、正常な血管組織と比較して不完全であり、血管壁に数百 nm 程度の隙間が出来ているため、固形腫瘍周辺には EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により liposome などの小粒子が長時間留まりやすい<sup>27)</sup>。また、liposome 表面に polyethylene glycol (PEG) を修飾することで、マクロファージなどの単核食細胞系による捕捉から回避でき、血中滞留性を長時間維持することが可能となった<sup>28),29)</sup>。この良好な腫瘍集積性および血中滞留性が、liposome の薬物キャリアーとしての可能性を高めており、盛んに研究されている<sup>30)</sup>。現在では数品目の liposome 製剤が上市されるまでになり、臨床現場における liposome 製剤の有効性や安全性が認められつつある<sup>31)</sup>。

近年、liposome にアクティブ・ターゲティングの機能を付与した戦略が考案された<sup>32)</sup>。腫瘍細胞の表面に特異的に発現している受容体を、特異的に認識し相互作用する ligand を liposome 表面に修飾することで、liposome 製剤が EPR 効果によって腫瘍周辺に集積することに加え、細胞膜上に発現する受容体と liposome 表面の ligand が積極的に相互作用するため、さらに腫瘍組織周辺の薬剤濃度が高まる。そのため、受容体を介したエンドサイトーシスによる細胞内への



liposome 製剤の取り込みが促進し、強力な抗腫瘍効果と毒性の軽減が期待できる (Figure 10)。

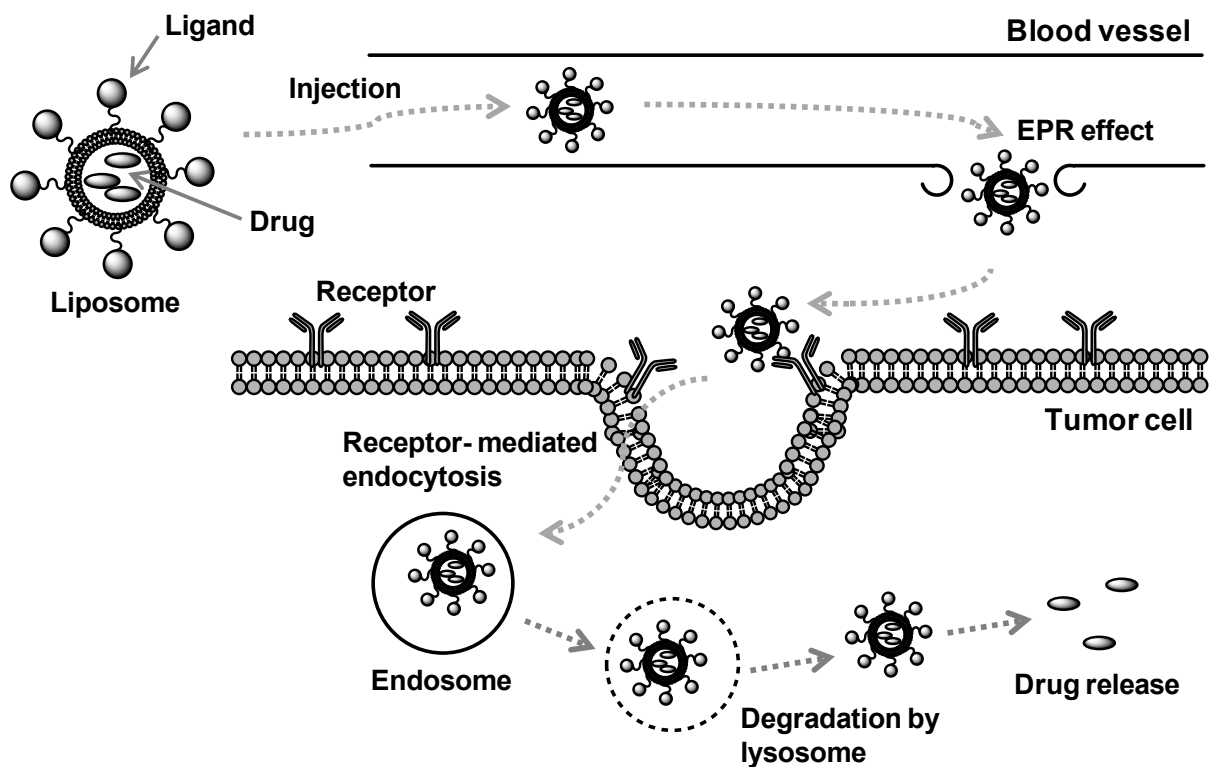


Figure 10: Active targeting strategy

アクティブ・ターゲティングの例として、様々な悪性腫瘍で過剰発現が認められる上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的としたモノクローナル抗体 (Cetuximab) を、doxorubicin を封入した liposome 表面に修飾した immunoliposome により抗腫瘍効果を高めたものや、トランスフェリンレセプター (TfR) を標的として、トランスフェリン (Tf) を修飾した liposome に oxaliplatin (L-OHP) を封入した薬剤を用いることで、通常の PEG-liposome 製剤よりも効果を高めたものが挙げられる<sup>33),34)</sup>。また、ヒト腫瘍の血管内皮細胞に対して結合能を示す Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG) ペプチドを修飾した liposome は血管新生が盛んな癌病巣に高く集積し、これに doxorubicin を封入することで、動物実験において優れた腫瘍増殖抑制効果と延命効果を示すことが報告されている<sup>35)</sup>。

そこで、より広範かつ強力な抗腫瘍効果を発揮する薬剤の獲得を目指して、アクティブ・ターゲティング機能を付与した liposome を利用した colchicine 誘導体の製剤化を試みた (第三章)。

## 本 論

### 第一章 7 位に amide 型側鎖を有する Colchicine 誘導体の構造活性相関研究

#### 第一節 4 位に置換基を有する誘導体の合成と細胞傷害活性

序論にて記述したように、colchicine (1) は細胞分裂の抑制作用を有していることから抗腫瘍薬としての応用が期待されているが、その毒性の強さから colchicine (1) に代わる有効域の広い誘導体の開発が切望されている。当研究室にて単離された新規コルヒチノイド gloriosamine A (2) は、4 位に置換基を有する初めての天然コルヒチノイドであり、*in vitro* における活性評価において細胞傷害活性を有することが明らかとなった<sup>24)</sup>。さらに、4 位置換 colchicine 類の合成を行ったところ、4-chlorocolchicine (3) が強力な細胞傷害活性を示した<sup>25)</sup> (Table 1-1)。

Table 1-1: Cytotoxicities of 1, 2, and 3

Compound No.	IC <sub>50</sub> value (nM)		
	A549	HT-29	HCT116
1	54.4	8.2	10.8
2	49.0	43.0	NT <sup>a)</sup>
3	9.9	7.9	8.1

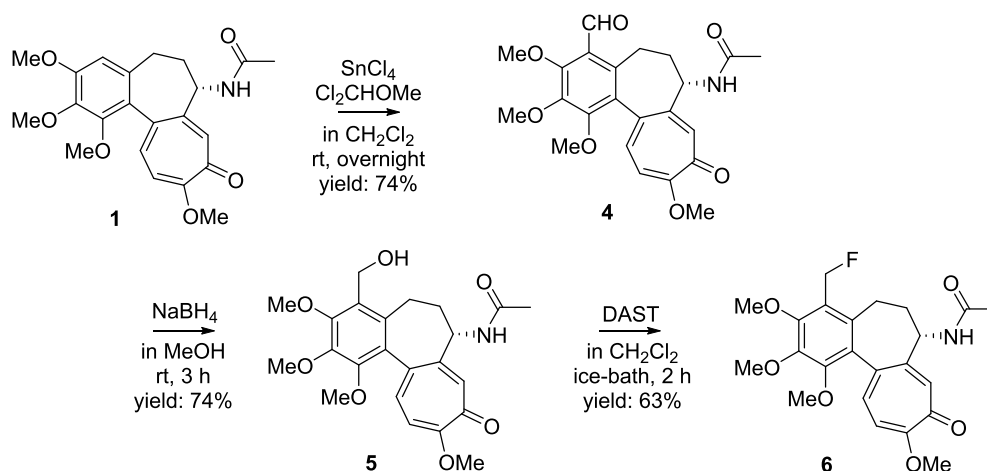
A549: Human lung carcinoma cell line. HT-29 and HCT116: Human colon carcinoma cell lines. a) Not tested.

化合物に Cl 基を導入して良好な活性を示した場合、その Cl 基を CF<sub>3</sub> 基や CN 基に変換することで、さらに生物活性が向上した事例が報告されている<sup>36)-38)</sup>。これは、Cl 基、CF<sub>3</sub> 基および CN 基の静電的な性質や van der Waals 半径が類似していることに起因していると考えられている<sup>39)</sup>。そこで、colchicine (1) の 4 位に CF<sub>n</sub>H<sub>3-n</sub> 基および CN 基を有する誘導体の合成を実施した。

#### 4-(Fluoromethyl)colchicine (6) の合成

文献既知の方法に従って、Colchicine (1) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中、SnCl<sub>4</sub> および dichloromethyl methyl ether と反応させることにより、4-formylcolchicine (4) を収率 74% で得た<sup>40)</sup>。ついで、7 を MeOH 中、NaBH<sub>4</sub> を用いて還元し、4-(hydroxymethyl)colchicine (5) へと収率 74% で導いた。この 5 を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中、DAST を用いて氷冷下、2 時間攪拌することで目的の 4-(fluoromethyl)colchicine (6) を収率 63% で得た (Scheme 1-1)。

6 は、HR-ESI-MS において分子イオンピーク  $m/z$  432.1826 ( $M+H^+$ ) が検出され、 $^1H$ -NMR で fluoromethyl 基由来の methylene ピークを  $\delta$ 5.49 に 2H 分 (d,  $J = 48.5$  Hz) 観測されたことから、その構造を確認した。

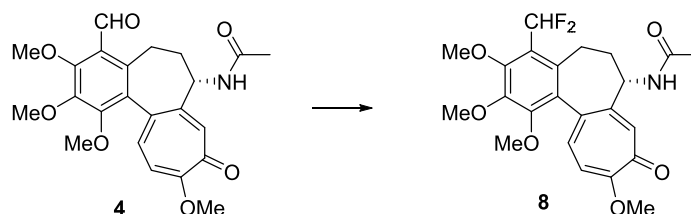


**Scheme 1-1: Synthesis of 4-(fluoromethyl)colchicine (6)**

#### 4-(Difluoromethyl)colchicine (8) の合成

DAST あるいは Deoxo-Fluor<sup>®</sup> を用いることで、4-formylcolchicine (4) の formyl 基を difluoromethyl 基へと変換することを試みたが、目的物 8 の生成は痕跡程度にしか認めなかった<sup>41)</sup> (Table 1-2)。

**Table 1-2: Screening condition for the synthesis of 8**

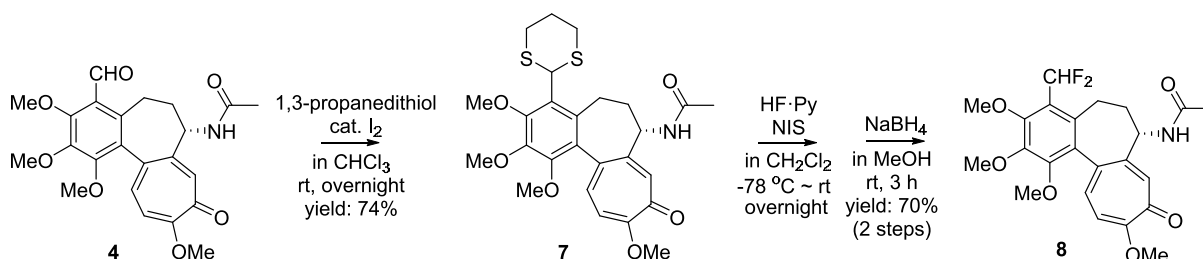


Run	Reagent	Solvent	Condition	Result
1	DAST (3 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt, overnight	Trace
2	Deoxo-Fluor <sup>®</sup> (1.7 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux, 3 h	Trace
3	Deoxo-Fluor <sup>®</sup> (1.7 eq) EtOH (0.2 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt, overnight	Trace
4	Deoxo-Fluor <sup>®</sup> (1.7 eq) EtOH (0.2 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux, overnight	Trace

そこで硫黄官能基を経由する方法を検討した。4 の CHCl<sub>3</sub> 溶液に、1,3-propanedithiol および触媒量の I<sub>2</sub> を加えて、室温下にて一晩攪拌し 4-([1,3]dithian-2-yl)colchicine (7) を収率 74% で得た<sup>42)</sup>。ついで、1,3-dithianyl 体 7 を、-78°C にて NIS および HF-Py の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液に添加した後、一晩攪拌しながら徐々に室温に戻すことで 4-difluoromethyl 体 8 へと導いた<sup>43)</sup>。このとき、シリカゲル

カラム精製において分離不可能な 4-formyl 体 **4** が副生したため、粗生成物を NaBH<sub>4</sub> で処理して、**4** を 4-hydroxymethyl 体 **5** へと変換した後、カラム精製にて **5** を除去し目的物 **8** を収率 70% で単離した (Scheme 1-2)。

**8** は、HR-ESI-MS において分子イオンピーク  $m/z$  450.1736 ( $M+H^+$ ) が観測され、<sup>1</sup>H-NMR で difluoromethyl 基由来の methyne ピークを  $\delta$ 7.25 に 1H 分 ( $t$ ,  $J = 54.0$  Hz) 検出されたことから、その構造を確認した。

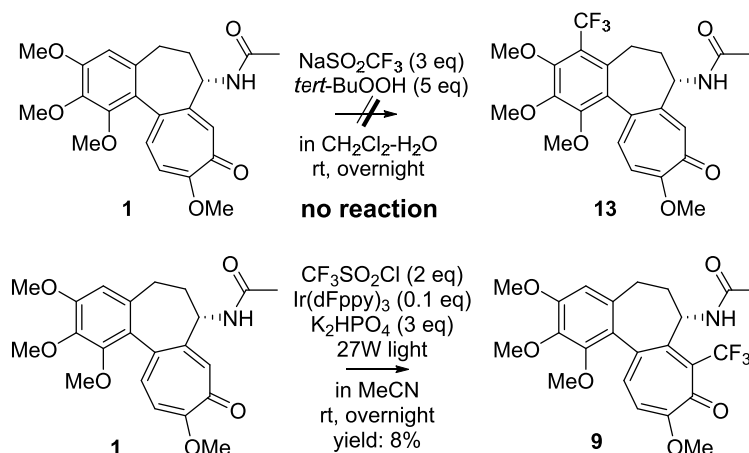


**Scheme 1-2: Synthesis of 4-(difluoromethyl)colchicine (8)**

#### 4-(Trifluoromethyl)colchicine (**13**) の合成

近年、芳香環上の proton を直接 CF<sub>3</sub> 化する手段として、MacMillan や Baran らによって優れた方法が開発されている<sup>44),45)</sup>。これらを参考に、colchicine (**1**) の 4 位を直接 CF<sub>3</sub> 化を試みたが、Baran らの方法では反応が全く進行せず、MacMillan らの方法では 8 位が CF<sub>3</sub> 化された 8-trifluoromethyl 体 **9** が収率 8% 程度で確認されるのみで、両法とも目的物 **13** は与えなかった (Scheme 1-3)。

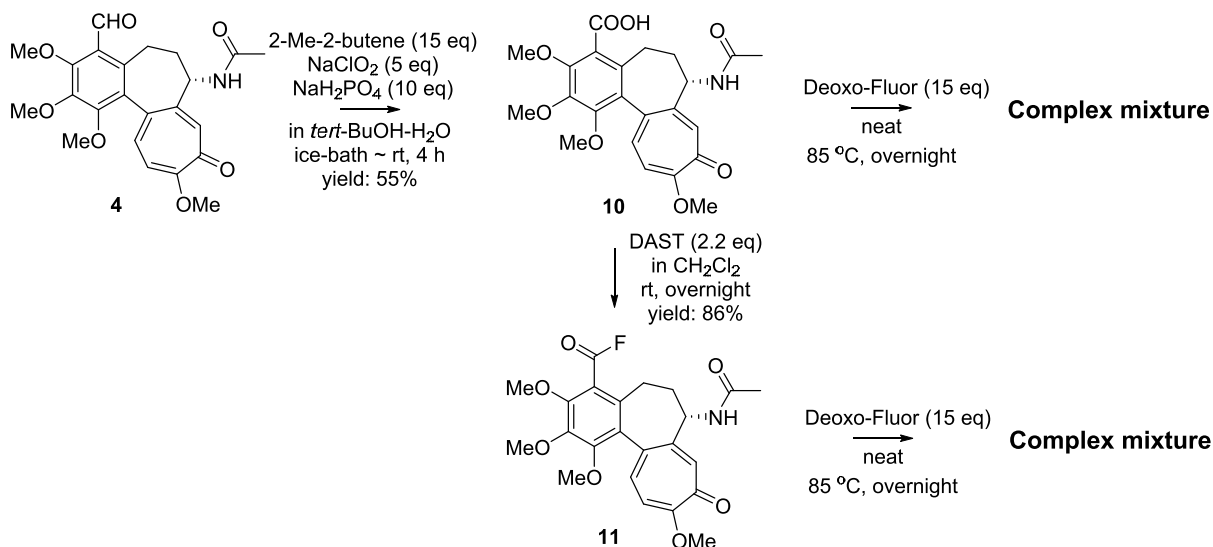
**9** は、ESI-MS において分子イオンピーク  $m/z$  468 ( $M+H^+$ ) が検出され、<sup>1</sup>H-NMR で benzene 環上の 4 位 proton ピークを  $\delta$ 6.79 に観測、tropolone 環の 11 位および 12 位のピークを、 $\delta$ 6.95 および  $\delta$ 7.11 に各々 1H 分ずつ観測された。さらに、colchicine (**1**) で  $\delta$ 7.13 に観測されていた 8 位 proton のピークが消失していたことから、その構造を確認した。



**Scheme 1-3: Attempts at the Synthesis of 13**

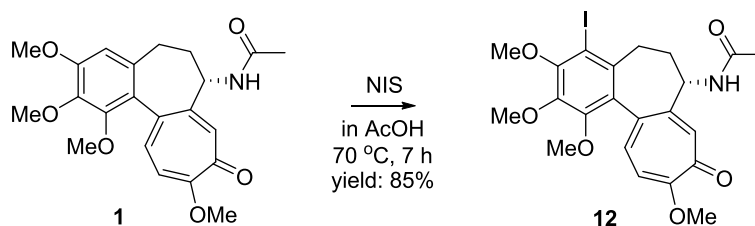
次に、4-formyl 体 **4** を 4-(hydroxycarbonyl)colchicine (**10**) へと導き、このものの CF<sub>3</sub> 化を試みた。**10** を Deoxo-Fluor<sup>®</sup> 中で加熱すると複雑な混合物を与えたため、**10** を DAST で処理し、

4-(fluorocarbonyl)colchicine (**11**) とした後、Deoxo-Fluor<sup>®</sup> 存在下で加熱したが同様に複雑な成績体を与えた<sup>41)</sup> (Scheme 1-4)。



**Scheme 1-4: Attempts at the synthesis of 13**

そこで、colchicine (**1**) の4位を iodo 化した後、CF<sub>3</sub>基へと変換する方法を試みた。まず、**1** を AcOH 溶液中、NIS 存在下にて 70°Cで 7 時間加熱し 4-iodocolchicine (**12**) を収率 85%で得た (Scheme 1-5)。得られた **12** のスペクトルデータは八十歩らの報告と良い一致を示した<sup>25)</sup>。



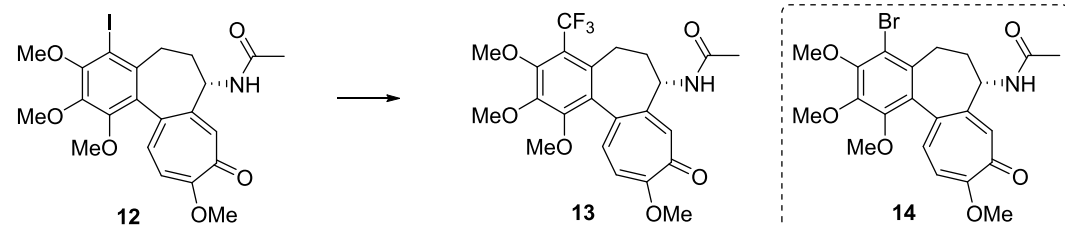
**Scheme 1-5: Synthesis of 12**

この 4-iodo 体 **12** を用いて、4 位に CF<sub>3</sub> 基を導入することを試みた (Table 1-3)。Aryl iodide に対する CF<sub>3</sub> 化の報告を参考に実験を行ったが反応は進行せず、原料 **12** を回収するのみであった (Run 1~3)<sup>46)-48)</sup>。種々、検討を行ったところ、FSO<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>COOMe および CuBr を用い、sealed tube 内で反応を行うと、目的物である 4-(trifluoromethyl)colchicine (**13**) が収率 48%で得られることが分かった (Run 4)<sup>49),50)</sup>。このとき、4 位の iodo 基が bromo 基に置換した 4-bromocolchicine (**14**) が 8%程度副生したため、触媒を CuBr から CuI へと変更し同様に反応を行うと、目的物 **13** の収率は 68%に向上した (Run 5)。また、本反応を sealed tube を用いずに行うと、痕跡程度にしか目的物 **13** は得られなかった (Run 6)。以上の検討から、sealed tube の使用が **12** の CF<sub>3</sub> 化に重要であることが分かった。

**13** は、HR-ESI-MS において分子イオンピーク  $m/z$  468.1634 (M+H<sup>+</sup>) が検出され、<sup>1</sup>H-NMR で 4 本の methoxyl 基のピーク、7 位の acetamide 基のシグナル、heptane 環の 5, 6, 7 位のシグナル、および tropolone 環の 8, 11, 12 位のシグナルが合理的に観測されたことから、その構造を確認し

た。

**Table 1-3: Screening condition for the synthesis of 13**

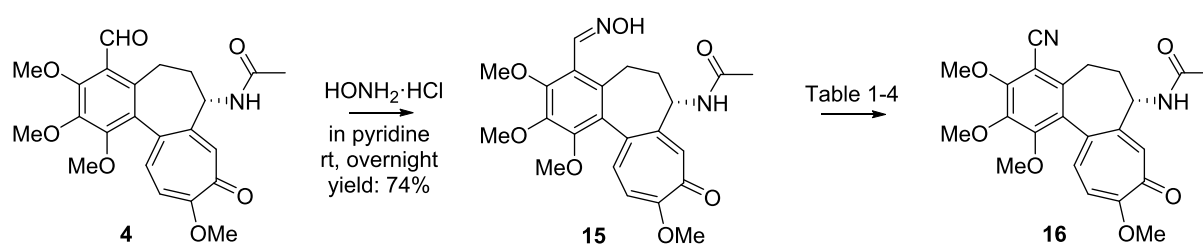


Run	Reagent	Solvent	Condition	Result
1	CICF <sub>2</sub> COOMe (2 eq) KF (1 eq), Cul (1 eq)	DMF	120 °C, 7 h	SM recovery
2	FSO <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> COOMe (1.5 eq) Cu (0.12 eq)	DMF	80 °C, overnight	SM recovery
3	TMSCF <sub>3</sub> (1.2 eq) Cul (1.5 eq), KF (1.2 eq)	DMF-NMP	80 °C, overnight	SM recovery
4	FSO <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> COOMe (1.5 eq) CuBr (0.2 eq)	NMP	120 °C, overnight <b>In a sealed tube</b>	48% ( <b>13</b> ), 8% ( <b>14</b> )
5	FSO <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> COOMe (3.0 eq) Cul (0.5 eq)	NMP	120 °C, overnight <b>In a sealed tube</b>	68% ( <b>13</b> )
6	FSO <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> COOMe (3.0 eq) Cul (0.5 eq)	NMP	120 °C, overnight	Trace

#### 4-Cyanocolchicine (**16**) の合成

4-Formylcolchicine (**4**) の pyridine 溶液に、hydroxylamine を加えて室温で一晩攪拌することで、4-((hydroxyimino)methyl)colchicine (**15**) を収率 74% で得た。**15** に対して脱水反応を種々検討したところ、CDI を用いた場合に目的の 4-Cyanocolchicine (**16**) が収率 83% で得られることが分かった<sup>51)-55)</sup> (Scheme 1-6 and Table 1-4)。

**16** は、HR-ESI-MS において分子イオンピーク  $m/z$  425.1642 ( $M+H^+$ ) が観測され、<sup>1</sup>H-NMR において化合物 **15** で観測されていた 4-(hydroxyimino)methyl 基の  $\delta$ 11.27 (1H, s) および  $\delta$ 8.24 (1H, s) のシグナルが消失していたことから、その構造を確認した。



**Scheme 1-6: Synthesis of 16**

**Table 1-4: Screening condition for the synthesis of 16**

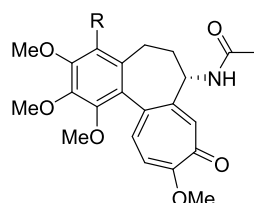
Run	Reagent	Solvent	Condition	Result
1	TCT (4 eq)	DMF	rt, overnight	Trace
2	NCS (2 eq) Pyridine (2 eq)	MeCN	rt, overnight	Complex mixture
3	EDCI (4 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux, overnight	28%
4	EDCI (2 eq)	Toluene	100 °C, overnight	34%
5	EDCI (4 eq)	DMF	100 °C, overnight	28%
6	CDI (2 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt, overnight	83%

#### 4 位に置換基を有する誘導体の細胞傷害活性

4 位に置換基を有する colchicine 誘導体の細胞傷害活性を示した (Table 1-5)。評価には、ヒト肺癌細胞株 A549、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 および HCT116 を用いた。

4 位に CH<sub>2</sub>F 基を導入した **6** は、4-Cl 体 **3** と比較して大幅に細胞傷害活性が減弱したが、フッ素数の増加と共に活性は向上する傾向が認められ、CHF<sub>2</sub> 体 **8** の HT-29 および HCT116 に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 48.1 および 45.8 nM、CF<sub>3</sub> 体 **13** はそれぞれ 35.0 および 37.9 nM であった。また、4-CN 体 **16** の活性は **8** および **13** よりも弱く、数百 nM 程度の IC<sub>50</sub> 値であった。

**3** と比較して、Colchicine (**1**) の 4 位に CH<sub>n</sub>F<sub>3-n</sub> 基や CN 基を導入した誘導体の細胞傷害活性は減弱したため、4 位の置換基は Cl 基が最適であることが分かった。そこで、以後 4 位は Cl 基に固定して、7 位置換基の変換体を検討することにした。

**Table 1-5: Cytotoxicities and SlogP values of 4-substituted colchicines**

Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			SlogP <sup>a)</sup>
No.	R	A549	HT-29	HCT116	
<b>1</b>	H	54.4	8.2	10.6	2.59
<b>3</b>	Cl	<b>9.9</b>	<b>7.9</b>	<b>8.1</b>	3.24
<b>6</b>	CH <sub>2</sub> F	8793	2615	4753	3.32
<b>8</b>	CHF <sub>2</sub>	55.4	48.1	45.8	3.62
<b>13</b>	CF <sub>3</sub>	55.2	35.0	37.9	3.92
<b>16</b>	CN	298.3	154.0	177.0	2.46

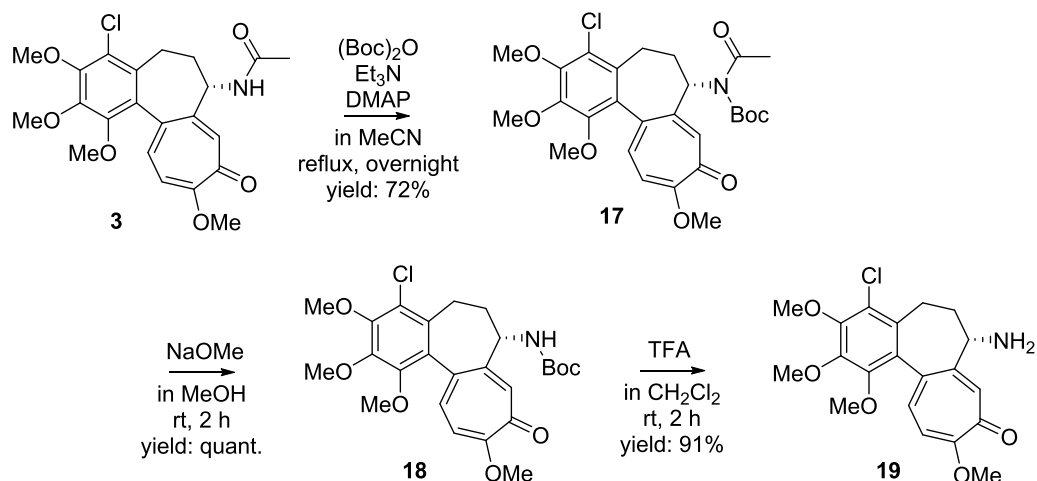
a) SlogP: The index of lipophilicity was estimated by MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Canada).

## 第二節 4-Chlorocolchicine の 7 位側鎖変換体 (脂肪族) の合成と細胞傷害活性

第一節で、4-chlorocolchicine (**3**) の細胞傷害活性が優れていることを報告した。そこで、**3** の 7 位 amide 側鎖を種々変換して構造活性相関を確認した。

### 4-Chlorodeacetylcolchicine (**19**) の合成

反応の原料に用いた 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) は、八十歩らの報告に倣って合成した<sup>25)</sup> (Scheme 1-7)。得られた **19** のスペクトルデータは八十歩らの報告と良い一致を示した。



Scheme 1-7: Synthesis of **19**

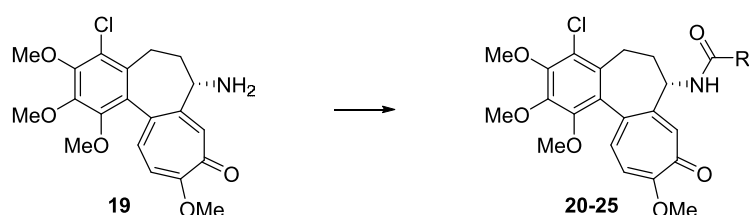
### N-Alkanoyl 体 **20-25** の合成

Deacetyl 体 **19** の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、trifluoroacetic anhydride を加えて、氷冷下 30 分間攪拌することで、trifluoroacetamide 体 **20** を収率 90% で得た。同様に、**19** に対して  $\text{Et}_3\text{N}$  存在下、対応する alkanoyl chloride を作用させて propanamide 体 **21**、butanamide 体 **22**、3-methylbutanamide 体 **23**、heptanamide 体 **24**、および cyclohexanecarboxamide 体 **25** をそれぞれ定量的、88%、94%、92%、および 28% で得た (Table 1-6)。

化合物 **20-25** の構造は、HR-ESI-MS において各目的物の分子イオンピーク ( $m/z$ ) を観測し、 $^1\text{H-NMR}$  において amide 由来 NH 基のシグナルや、導入した alkyl 基のシグナルを合理的に認めたことから確認した。



**Table 1-6: Syntheses of amides 20-25**



Product		Reagent	Condition <sup>a)</sup>	Yield (%)
No.	R			
<b>20</b>	CF <sub>3</sub>	TFAA (2 eq)	ice-bath, 30 min	90
<b>21</b>	Et	EtCOCl (1 eq) Et <sub>3</sub> N (1.1 eq)	rt, 2 h	quant.
<b>22</b>	<sup>n</sup> Pr	<sup>n</sup> PrCOCl (1 eq) Et <sub>3</sub> N (1.1 eq)	rt, 2 h	88
<b>23</b>	<sup>i</sup> Bu	<sup>i</sup> BuCOCl (1 eq) Et <sub>3</sub> N (1.1 eq)	rt, 2 h	94
<b>24</b>	<sup>n</sup> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	<sup>n</sup> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> COCl (1 eq) Et <sub>3</sub> N (1.1 eq)	rt, 2 h	92
<b>25</b>	Cy	CyCOCl (1 eq) Et <sub>3</sub> N (1.1 eq)	rt, 2 h	28

a) Solvent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

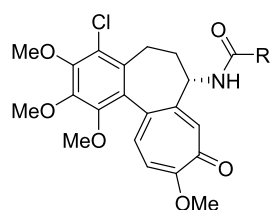
#### 4-Chlorocolchicine の 7 位側鎖変換体 (脂肪族) の細胞傷害活性

7 位側鎖に脂肪族官能基を有する誘導体の細胞傷害活性を示した (Table 1-7)。CF<sub>3</sub> 基を有する化合物 **20** は、いずれの細胞株に対しても強力な活性を示した。Et 基を有する **21** や <sup>n</sup>Pr 基を有する **22** も同様に強い活性を保持することが分かった。しかしながら、R 部位を <sup>i</sup>Bu 基あるいは <sup>n</sup>hexyl 基へと伸長すると、細胞傷害活性は減弱する傾向が認められた。一方、Cy 基を有する化合物 **25** は良好な IC<sub>50</sub> 値を示した。

これらの結果から、4-chlorocolchicine 誘導体が tubulin と相互作用する際に、alkyl 側鎖として少なくとも炭素数 3 まで、および環状側鎖として少なくとも 6 員環までは許容されるものと推測した。

Cy 基を有する誘導体 **25** が良好な活性を示したことから、R 部位に芳香環を有する誘導体も良好な活性を有することを期待した。そこで、R 部位に芳香族 6 員環を導入した誘導体を検討することにした。

**Table 1-7: Cytotoxicities and SlogP values of 20-25**



Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			SlogP <sup>a)</sup>
No.	R	A549	HT-29	HCT116	
<b>20</b>	CF <sub>3</sub>	<b>1.8</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	3.78
<b>21</b>	Et	<b>7.8</b>	<b>3.3</b>	<b>7.5</b>	3.63
<b>22</b>	<sup>n</sup> Pr	9.8	8.3	7.6	4.02
<b>23</b>	<sup>i</sup> Bu	40.3	16.1	23.7	4.27
<b>24</b>	<sup>n</sup> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	49.7	38.3	36.9	5.19
<b>25</b>	Cy	<b>10.4</b>	<b>7.1</b>	<b>7.2</b>	4.80

a) Estimated by MOE.

### 第三節 4-Chlorocolchicine の 7 位側鎖変換体 (芳香族) の合成と細胞傷害活性

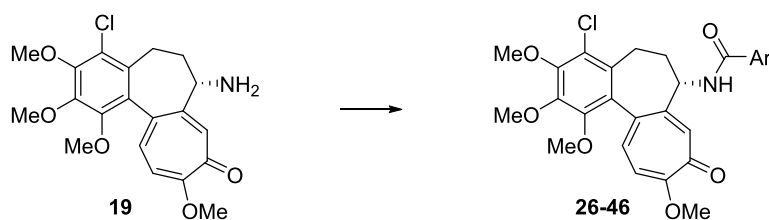
第二節で、7 位側鎖として Cy 基を有する誘導体 **25** が強力な細胞傷害活性を示すことを報告した。そこで、4-chlorocolchicine (**3**) の 7 位側鎖として芳香族を有する誘導体を合成し、その構造活性相関を確認した。

#### N-Aroyl 体 **26-46** の合成

Deacetyl 体 **19** の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液に、Et<sub>3</sub>N 存在下にて benzoyl chloride を加え、室温で 2 時間攪拌することで、benzamide 体 **26** を収率 77% で得た。同様にして、対応する aroyl halide を **19** に作用させて、N-aroylamide 体 **27-37**、**38**、**39**、および **41-43** を合成した。**37**、**40**、および **44-46** は、対応する carboxylic acid の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液に、EDCI、HOBT、および **19** を加え、脱水縮合することで得た (Table 1-8)。

化合物 **26-46** の構造は、HR-ESI-MS において各誘導体の分子イオンピーク ( $m/z$ ) を観測し、<sup>1</sup>H-NMR において amide 由来 NH 基のシグナルや、導入した aryl 基の proton を合理的に認めたことから確認した。

**Table 1-8: Syntheses of arylamides 26-46**



No.	Product Ar	Reagent <sup>a)</sup>	Yield (%)
<b>26</b>	Ph	PhCOCl (1 eq)	77
<b>27</b>	Ph-2-F	2-F-PhCOCl (1 eq)	70
<b>28</b>	Ph-3-F	3-F-PhCOCl (1 eq)	32
<b>29</b>	Ph-4-F	4-F-PhCOCl (1 eq)	68
<b>30</b>	Ph-3,4,5-triF	3,4,5-triF-PhCOCl (1 eq)	54
<b>31</b>	Ph-2-OMe	2-MeO-PhCOCl (1 eq)	73
<b>32</b>	Ph-3-OMe	3-MeO-PhCOCl (1 eq)	79
<b>33</b>	Ph-4-OMe	4-MeO-PhCOCl (1 eq)	83
<b>34</b>	Ph-2,4-diOMe	2,4-diMeO-PhCOCl (1 eq)	46
<b>35</b>	Ph-3,5-diOMe	3,5-diMeO-PhCOCl (1 eq)	66
<b>36</b>	Ph-3,4,5-triOMe	3,4,5-triMeO-PhCOCl (1 eq)	91
<b>37</b>	Ph-2-CN	2-CN-PhCOOH (1.2 eq) <sup>b)</sup> EDCI (1.2 eq), HOBT (1.2 eq)	62
<b>38</b>	Ph-3-CN	3-CN-PhCOCl (1 eq)	66
<b>39</b>	Ph-4-CN	4-CN-PhCOCl (1 eq)	77
<b>40</b>	Ph-2-NO <sub>2</sub>	2-NO <sub>2</sub> -PhCOOH (1.2 eq) <sup>b)</sup> EDCI (1.2 eq), HOBT (1.2 eq)	33
<b>41</b>	Ph-3-NO <sub>2</sub>	3-NO <sub>2</sub> -PhCOCl (1 eq)	85
<b>42</b>	Ph-4-NO <sub>2</sub>	4-NO <sub>2</sub> -PhCOCl (1 eq)	77
<b>43</b>	Ph-3,5-diNO <sub>2</sub>	3,5-diNO <sub>2</sub> -PhCOCl (1 eq)	63
<b>44</b>	Ph-2-NMe <sub>2</sub>	2-NMe <sub>2</sub> -PhCOOH (1.2 eq) <sup>b)</sup> EDCI (1.2 eq), HOBT (1.2 eq)	35
<b>45</b>	Ph-3-NMe <sub>2</sub>	3-NMe <sub>2</sub> -PhCOOH (1.2 eq) <sup>b)</sup> EDCI (1.2 eq), HOBT (1.2 eq)	54
<b>46</b>	Ph-4-NMe <sub>2</sub>	4-NMe <sub>2</sub> -PhCOOH (1.2 eq) <sup>b)</sup> EDCI (1.2 eq), HOBT (1.2 eq)	55

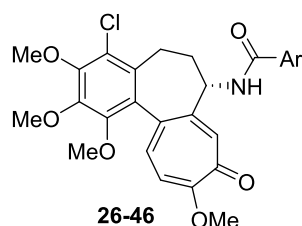
a) Base: Et<sub>3</sub>N (1 eq), Solvent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Condition: rt, 2 h. b) Without Et<sub>3</sub>N, Solvent: DMF, Condition: 0 °C, 30 min.

#### 4-Chlorocolchicine の 7 位側鎖変換体 (芳香族) の細胞傷害活性

7 位側鎖として芳香環を有する誘導体の細胞傷害活性を示した (Table 1-9)。Cyclohexyl 体 **25** の結果から期待した様に、benzamide 体 **26** は全ての細胞株に対して強い活性を示した。Fluorobenzamide 体 **27-29** は、fluoro 基の置換位置に関係なく強力な殺細胞効果を保持した。一方、芳香環上に methoxyl 基、cyano 基、nitro 基、および dimethylamino 基を有する場合は、置換位置による明確な傾向が認められた。methoxybenzamide 体 **31-33** において、*meta*-OMe 体 **32** の活性が、*ortho*-OMe 体 **31** および *para*-OMe 体 **33** よりも強く、この傾向は一連の mono 置換 benzamide 誘導体 (CN: **37-39**, NO<sub>2</sub>: **40-42**, NMe<sub>2</sub>: **44-46**) でも認められた。特に、NMe<sub>2</sub> 体 **44-46** では *meta*-NMe<sub>2</sub> 体 **45** の活性が、他の置換位置よりも 2 オーダー強いことが判明した。また、これらの化合物の中で *meta*-NO<sub>2</sub> 体 **41** は picomole オーダーの強力な IC<sub>50</sub> 値を有することが分かり、di および tri 置換誘導体の活性は減弱傾向であった。

以上の結果から、7 位側鎖 phenyl 基の *meta* 位への置換基の導入が、強力な細胞傷害活性の保持に有効であることが分かった。

Table 1-9: Cytotoxicities and SlogP values of 26-46



Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			SlogP <sup>a)</sup>
No.	Ar	A549	HT-29	HCT116	
<b>26</b>	Ph	<b>4.7</b>	<b>1.6</b>	<b>1.4</b>	4.53
<b>27</b>	Ph-2-F	<b>1.7</b>	<b>1.5</b>	<b>1.6</b>	4.67
<b>28</b>	Ph-3-F	<b>3.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.6</b>	4.67
<b>29</b>	Ph-4-F	<b>6.7</b>	<b>2.2</b>	<b>5.5</b>	4.67
<b>30</b>	Ph-3,4,5-triF	6.6	6.3	7.2	4.95
<b>31</b>	Ph-2-OMe	13.2	12.5	26.4	4.54
<b>32</b>	Ph-3-OMe	<b>2.7</b>	<b>1.4</b>	<b>1.6</b>	4.54
<b>33</b>	Ph-4-OMe	3.8	8.0	8.0	4.54
<b>34</b>	Ph-2,4-diOMe	85.4	53.1	57.3	4.55
<b>35</b>	Ph-3,5-diOMe	14.2	7.9	6.5	4.55
<b>36</b>	Ph-3,4,5-triOMe	124	47.7	51.7	4.56
<b>37</b>	Ph-2-CN	140	49.7	104	4.41
<b>38</b>	Ph-3-CN	<b>7.4</b>	<b>1.6</b>	<b>4.1</b>	4.41
<b>39</b>	Ph-4-CN	11.9	6.7	6.7	4.41
<b>40</b>	Ph-2-NO <sub>2</sub>	56.6	31.7	30.2	4.44
<b>41</b>	Ph-3-NO <sub>2</sub>	<b>1.7</b>	<b>0.1</b>	<b>0.8</b>	4.44
<b>42</b>	Ph-4-NO <sub>2</sub>	11.2	6.9	6.2	4.44
<b>43</b>	Ph-3,5-diNO <sub>2</sub>	31.2	5.0	6.8	4.35
<b>44</b>	Ph-2-NMe <sub>2</sub>	206	186	171	4.60
<b>45</b>	Ph-3-NMe <sub>2</sub>	<b>6.4</b>	<b>1.4</b>	<b>1.6</b>	4.60
<b>46</b>	Ph-4-NMe <sub>2</sub>	169	148	150	4.60

a) Estimated by MOE.

Phenyl基の *meta* 位に置換基を有する誘導体が、強力な細胞傷害活性を示す理由を探る目的で、*in silico* 手法によるドッキング解析を実施した。Tubulin の colchicine 結合サイトにおける methoxybenzamide 体 **31-33** の結合様式を示した (Figure 1-1)。Ortho-OMe 体 **31**、meta-OMe 体 **32**、および para-OMe 体 **33** のドッキングスコアは、それぞれ -8.33、-9.84、および -8.84 kcal/mol であり、*meta* 位置換体 **32** の結合が最も適していることが示唆された。Meta-OMe 体 **32** の 9 位 carbonyl 基は、tubulin  $\beta$ -subunit の Ala250 および Asp251 と水素結合を介して相互作用している。一方、ortho-OMe 体 **31** および para-OMe 体 **33** には、tubulin とその様な相互作用は認められなか

った。これは、colchicine 結合サイトの右下部分に位置する疎水性ポケットと、誘導体 **32** の *meta*-methoxyphenyl 基の相互作用が分子全体の位置取りに影響を及ぼし、**32** の C-9 carbonyl 基を tubulin  $\beta$ -subunit との水素結合に適した位置に固定させた結果と推測している。一方、**31** と **33** の *ortho* 位または *para* 位の MeO 基は、9 位の carbonyl 基を tubulin と相互作用可能な位置に分子をセットすることが出来ない。他の aroylamide 誘導体 (CN: **37-39**, NO<sub>2</sub>: **40-42**, NMe<sub>2</sub>: **44-46**)も、シミュレーションの結果から MeO 体 **31-33** と同様の結合様式であることが示唆された (Figures 1-2, 1-3, and 1-4)。これらの理由により、*meta* 位置換体が最も強力な細胞傷害活性を示すものと考えている。一方、いずれも同等の活性を示した *ortho*-F 体 **27**、*meta*-F 体 **28**、および *para*-F 体 **29** に関しては、フッ素原子の van der Waals 半径が、他の置換基と比較して小さく、分子全体の位置取りに与える影響が少ないため、**27**、**28**、および **29** の結合サイトにおける位置取りが類似すると考えられた (Figure 1-5)。この様な理由から、F 体 **27-29** は置換位置に影響することなく、同程度の細胞傷害活性を有するものと推測している。

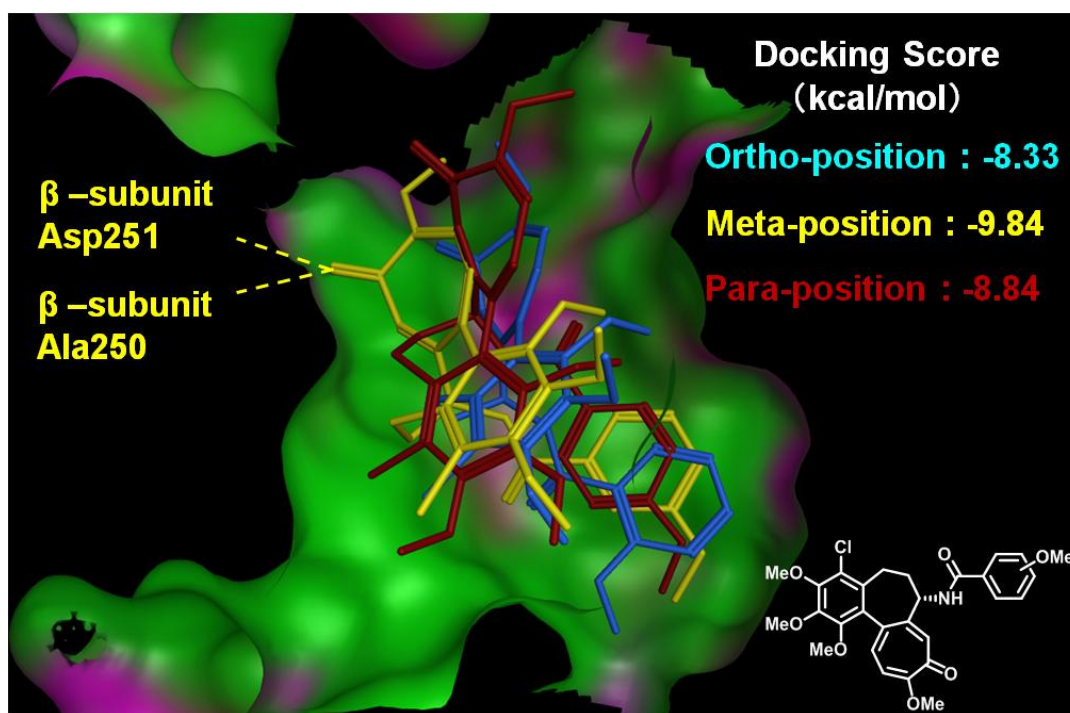


Figure 1-1: Docking modes of compounds **31** (blue), **32** (yellow), and **33** (red) at the colchicine binding site of tubulin (green: hydrophobic regions and pink: polar regions)

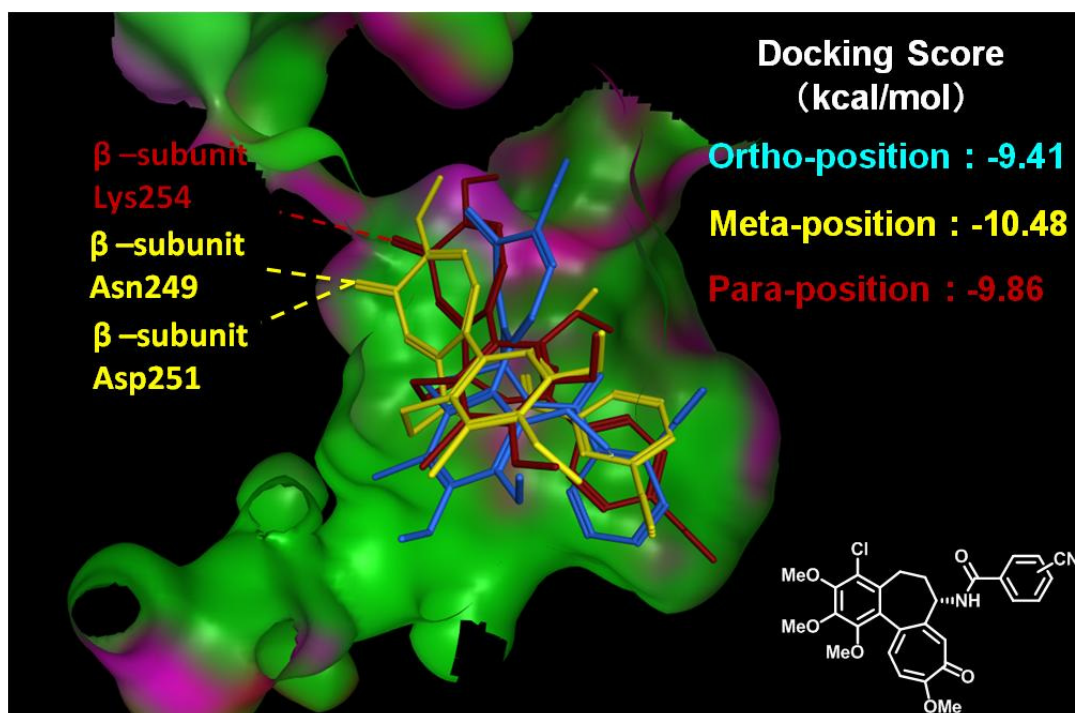


Figure 1-2: Docking modes of compounds 37 (blue), 38 (yellow), and 39 (red) at the colchicine binding site of tubulin (green: hydrophobic regions and pink: polar regions)

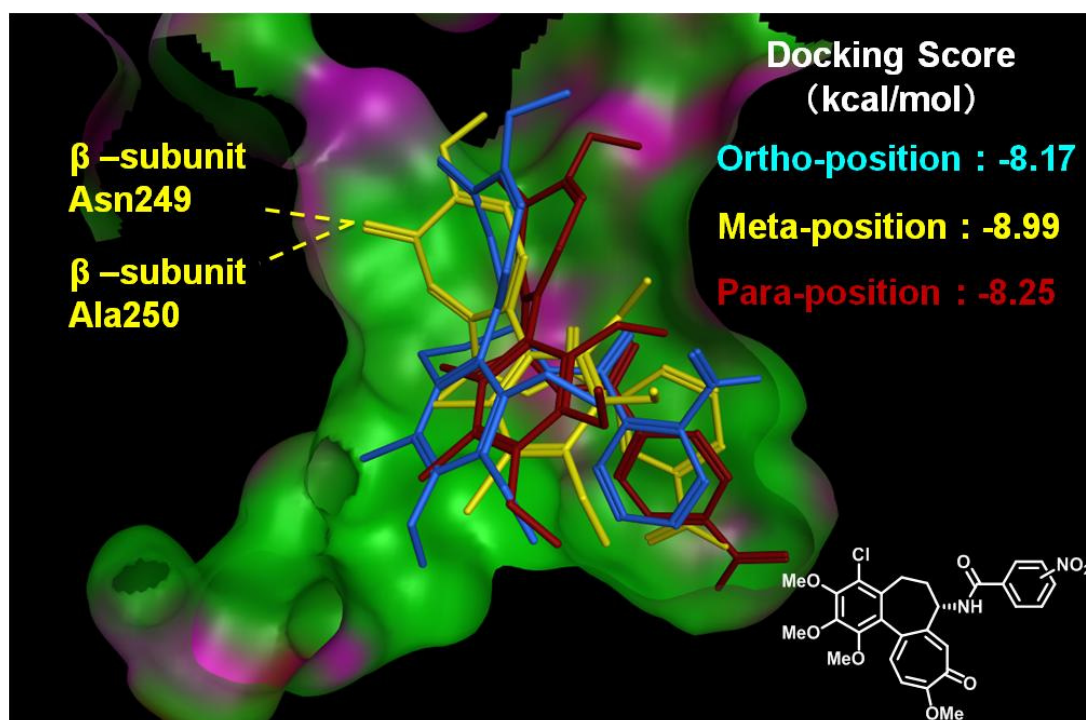


Figure 1-3: Docking modes of compounds 40 (blue), 41 (yellow), and 42 (red) at the colchicine binding site of tubulin (green: hydrophobic regions and pink: polar regions)



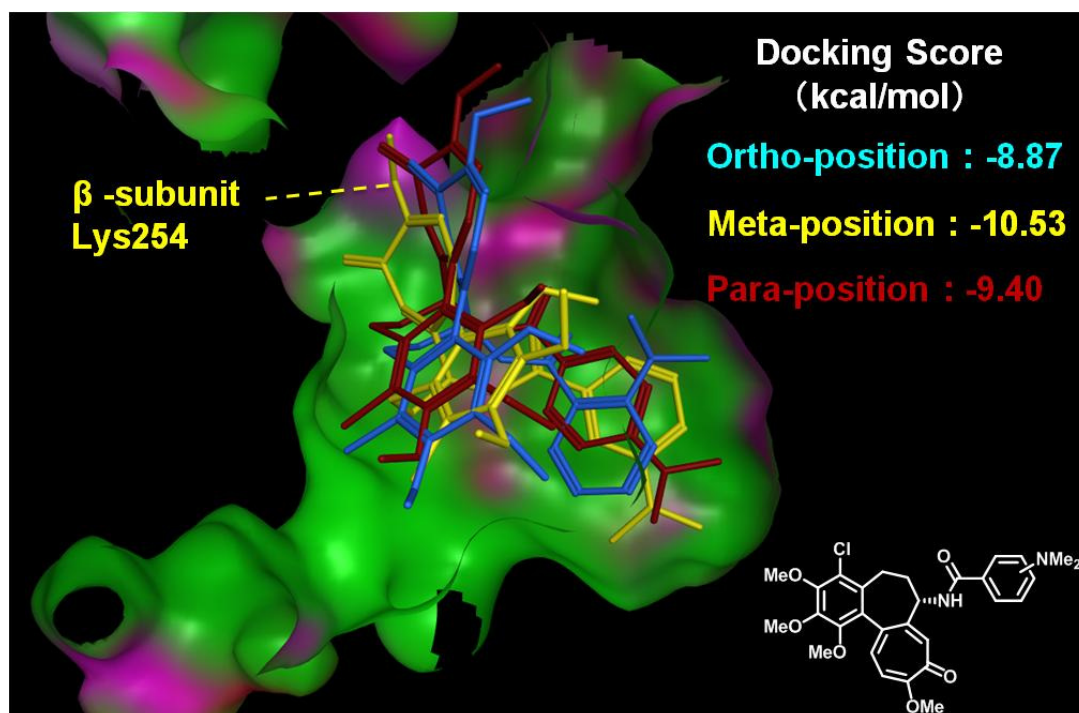


Figure 1-4: Docking modes of compounds 44 (blue), 45 (yellow), and 46 (red) at the colchicine binding site of tubulin (green: hydrophobic regions and pink: polar regions)

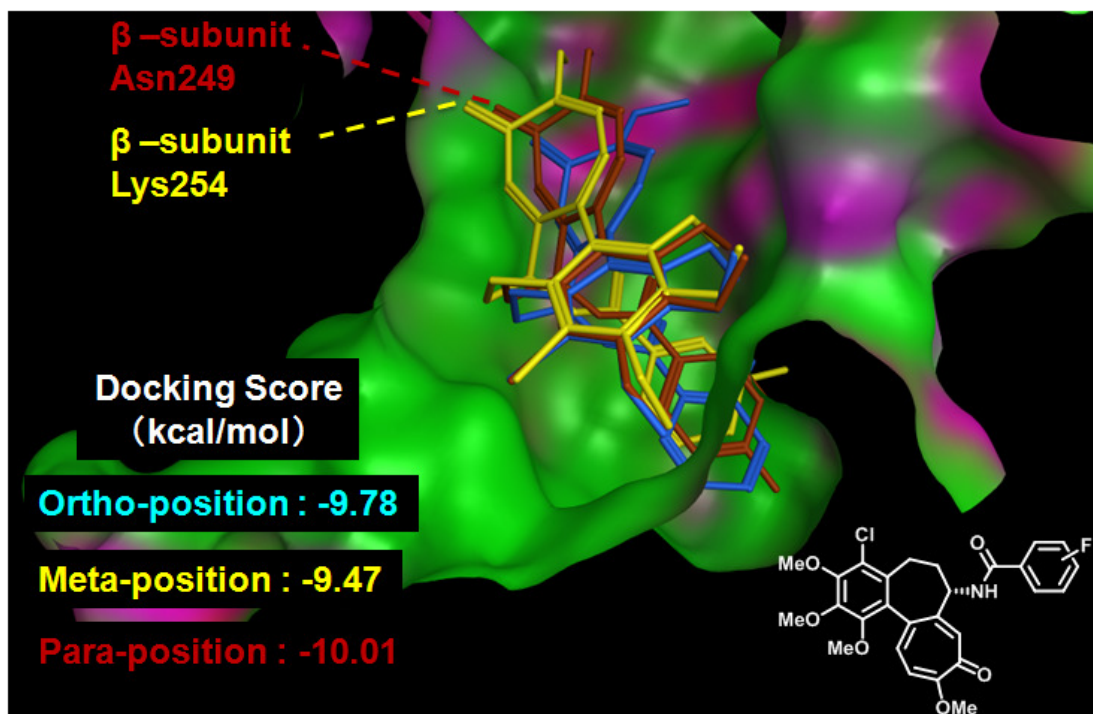


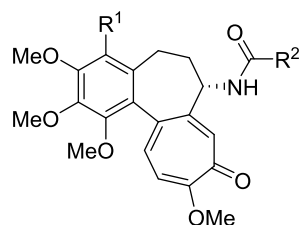
Figure 1-5: Docking modes of compounds 27 (blue), 28 (yellow), and 29 (red) at the colchicine binding site of tubulin (green: hydrophobic regions and pink: polar regions)

#### 第四節 4-Chlorocolchicine の 7 位側鎖変換体の抗腫瘍効果と代謝安定性

##### 4-Chlorocolchicine の 7 位側鎖変換体の抗腫瘍効果

第二節および第三節にて、4-chlorocolchicine の 7 位側鎖変換体の構造活性相関について記述した。その中から、強力な細胞傷害活性を有する 4-chlorocolchicine (**3**)、7-trifluoroacetamide 体 **20**、7-propanamide 体 **21**、および 7-(*meta*-methoxy)benzamide 体 **45** を選択して、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 を移植したヌードマウスに対する抗腫瘍効果を確認した (Table 1-10)。Picomole オーダーの細胞傷害活性を示した 7-(*meta*-nitro)benzamide 体 **41** は、投与液に対する溶解度が不十分であったため、*in vivo* 系の評価に用いるには不適切であった。また、ヌードマウスに対して薬剤を投与 (Days 1 & 5 の 2 回) した際に、体重減少が 20% を超えない単回の最大投与量を最大耐量 (MD) とした。

Table 1-10: Antitumor efficacies of 4-chlorocolchicine derivatives *in vivo*



No.	Compound		Dose (mg/kg/day)	Total dose <sup>a)</sup> (mg/kg)	IR <sup>b)</sup> (%)	Mortality
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>				
<b>1</b>	H	Me	0.75	2.25	14.0	0 / 5
		(colchicine)	1.5 <sup>c)</sup>	4.5	92.6	0 / 5
<b>3</b>	Cl	Me	1.875	5.625	36.7	0 / 5
			3.75	11.25	<b>56.4</b>	0 / 5
			7.5	22.5	<b>62.6</b>	0 / 5
			15.0 <sup>c)</sup>	45.0	76.5	0 / 5
<b>20</b>	Cl	CF <sub>3</sub>	5.0	15.0	30.6	0 / 4
			10.0 <sup>d)</sup>	30.0	<b>62.7</b>	0 / 4
<b>21</b>	Cl	Et	12.5	37.5	<b>57.3</b>	0 / 5
			25.0 <sup>d)</sup>	75.0	<b>76.1</b>	1 / 5
<b>45</b>	Cl	Ph-3-NMe <sub>2</sub>	2.5	7.5	31.4	0 / 5
			5.0 <sup>d)</sup>	15.0	25.3	0 / 5

a) Dosing schedule on days 1, 5, & 9. b) Inhibition rate. c) Maximum dose (MD). d) 1/2MD.

Colchicine (**1**) は、MD 量である 1.5 mg/kg/day を投与した場合に、92.6%と強力な腫瘍増殖阻止率 (IR%)を示したが、その半量 (1/2MD) の投与ではほとんど抗腫瘍効果を示さなかった。本結果が **1** の有効域が狭いことを示している。対して、4-chlorocolchicine (**3**) は MD 量の投与で、76.5%と強力な腫瘍増殖阻止率を示し、加えて、1/2MD および 1/4MD 量の投与においてもそれぞれ

れ 62.6%、56.4%の強い抗腫瘍活性を有していた。7-Trifluoroacetamide 体 **20** および 7-propanamide 体 **21** もまた、1/2 および 1/4 MD 量の投与において **1** を上回る腫瘍増殖阻止率を示した。特に、**21** は 1/2MD 量の投与で、原因不明のヌードマウスの死亡 (体重減少等の毒性の兆候は全く確認されなかった) を一匹認めたものの、76.1%と最も高い抗腫瘍効果を示した。また、*in vitro* において強力な細胞傷害活性を示した 7-arylamide 体 **45** は、*in vivo* ではほとんど効果を示さなかった。**45** が効果を示さなかった理由は不明であるが、体内動態等の生物薬剤学的な性質が不適切であったのではないかと推測している。

以上の結果から、4 位に Cl 基を導入した誘導体 **3**、**20** および **21** は *in vivo* において広範な抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。

#### 4-Chlorocolchicine の 7 位側鎖変換体の代謝安定性 (*in vitro*)

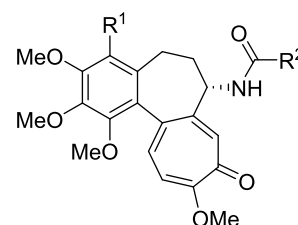
抗腫瘍効果の評価に用いた 4-chlorocolchicine (**3**)、7-trifluoroacetamide 体 **20**、7-propanamide 体 **21**、および 7-(*meta*-methoxy)benzamide 体 **45** の、マウス肝ミクロソームに対する代謝安定性 ( $CL_{int}$ ) を確認した (Table 1-11)。

化合物 **3**、**20** および **21** は強力かつ広範な *in vivo* 効果を有するものの、代謝安定性は colchicine (**1**) より劣っていることが明らかとなった。そこで、つぎに広範な抗腫瘍効果を維持しつつ、代謝安定性の改善を試みることにした。

**Table 1-11: Metabolic stabilities and SlogP values of 4-chlorocolchicine derivatives**

No.	Compound		SlogP <sup>a)</sup>	CL <sub>int</sub> <sup>b)</sup> (mL/min/mg)
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>		
<b>1</b>	H	Me	2.59	0.001
<b>3</b>	Cl	Me	3.24	0.028
<b>20</b>	Cl	CF <sub>3</sub>	3.78	0.339
<b>21</b>	Cl	Et	3.63	0.302
<b>45</b>	Cl	Ph-3-NMe <sub>2</sub>	4.60	0.122

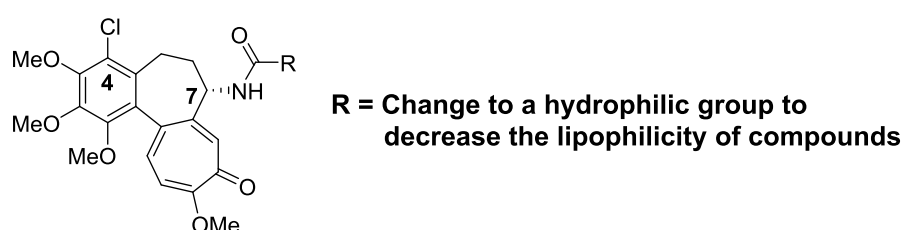
a) Estimated by MOE. b) Hepatic intrinsic clearance.



## 第五節 代謝安定性の改善を指向した誘導体の合成と細胞傷害活性

第四節において、4 位に Cl 基を導入した誘導体 **3**、**20** および **21** は広範な抗腫瘍活性を有する一方で、代謝安定性は colchicine (**1**) と比較して劣っていることが明らかとなった。そのため、広範な有効域と、良好な代謝安定性を併せ持つ誘導体の獲得を目的に、さらなる誘導体化を実施した。

Pfizer 社が約 47000 化合物の代謝安定性を検討した結果、脂溶性の低下と代謝安定性の向上に相関が認められることを報告している<sup>56)</sup>。4-Chlorocolchicine 誘導体 **3**、**20** および **21** の SlogP 値はそれぞれ 3.24、3.78、および 3.63 であり、colchicine (**1**) の 2.59 と比較すると脂溶性が高い (Table 1-11 参照)<sup>57)</sup>。そこで、4-chlorocolchicine (**3**) の 7 位側鎖に水溶性官能基を導入し、SlogP 値を下げることで代謝安定性の改善を試みることにした (Figure 1-6)。



**Figure 1-6: Strategy for improvement of metabolic stability**

### 7 位側鎖に amino 基を有する誘導体 **47** および **48** の合成

Dimethylglycine あるいは 3-(dimethylamino)propionic acid の DMF 溶液に、EDCI、HOBt、ついで deacetyl 体 **19** を加えて、氷冷下にて攪拌することで *N,N*-dimethylaminoacetamide 体 **47** および *N,N*-dimethylaminopropanamide 体 **48** をそれぞれ収率 68%、43% で得た (Table 1-12)。

化合物 **47** および **48** の構造は、HR-ESI-MS において各々の分子イオンピーク (*m/z*) を観測し、<sup>1</sup>H-NMR において amide 由来 NH 基の 1H 分のピークや、導入された dimethylaminoalkyl 基の proton を合理的に認めたことから確認した。

**Table 1-12: Syntheses of **47** and **48****

Product		Reagent <sup>a)</sup>	Yield
No.	n		(%)
<b>47</b>	1	Me <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> COOH (1.2 eq) <sup>b)</sup>	67
<b>48</b>	2	Me <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH·HCl (2 eq) <sup>c)</sup>	43

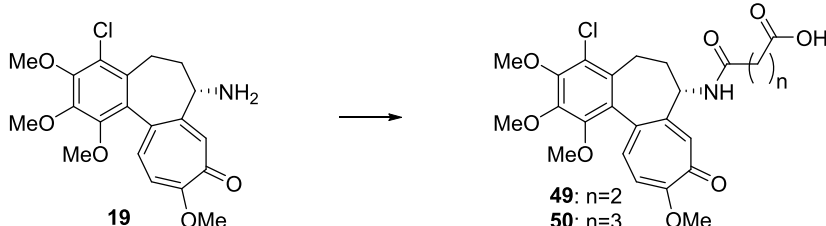
a) Solvent: DMF, Condition; 0 °C ~ rt, overnight. b) EDCl (1.2 eq), HOBt (1.2 eq). c) Et<sub>3</sub>N (2 eq), EDCl (2 eq), HOBt (2 eq).

### 7 位側鎖に carboxyl 基を有する誘導体 **49** および **50** の合成

Deacetyl 体 **19** および *N*-methylmorpholine の DMSO 溶液に、succinic anhydride あるいは glutaric anhydride を添加して、室温で 1 時間攪拌することで 3-carboxypropanamide 体 **49** および 4-carboxybutanamide 体 **50** をそれぞれ収率 60%、95% で得た (Table 1-13)。

化合物 **49** および **50** の構造は、HR-ESI-MS において各々の分子イオンピーク ( $m/z$ ) を観測し、 $^1\text{H-NMR}$  において amide 由来 NH 基の 1H 分のピークや、導入された alkyl 基のシグナルを合理的に認められたことから確認した。

Table 1-13: Syntheses of **49** and **50**



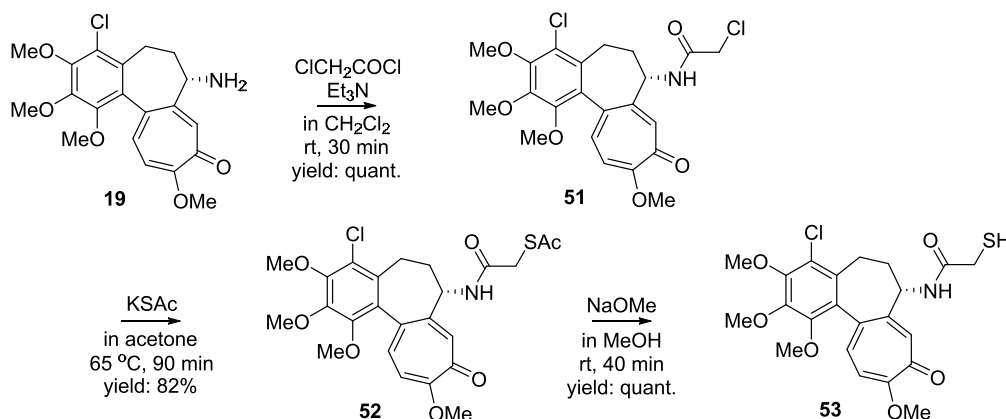
Product		Reagent <sup>a)</sup>	Yield (%)
No.	n		
<b>49</b>	2	Succinic anhydride (1.1 eq)	60
<b>50</b>	3	Glutaric anhydride (1.1 eq)	95

a) Base: *N*-methylmorpholine (5 eq), Solvent: DMSO, Condition; rt, 1 h.

### 7-Mercaptoacetamide 体 **53** の合成

Deacetyl 体 **19** の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液中、 $\text{Et}_3\text{N}$  存在下にて  $\text{ClCH}_2\text{COCl}$  を添加して、室温で攪拌することで chloroacetamide 体 **51** を定量的に得た。ついで、**51** の acetone 溶液中に KSAc を加えることで、(acetylthio)acetamide 体 **52** を収率 82% で得た。この **52** に対して、MeOH 溶液中、NaOMe を作用させて、脱 Ac 化し目的の mercaptoacetamide 体 **53** を定量的に得た (Scheme 1-8)。

**53** の構造は、HR-ESI-MS において分子イオンピーク  $m/z$  466.1093 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) を観測し、 $^1\text{H-NMR}$  において中間体 **52** の acetyl 基由来の 3H 分の proton が消失したことから確認した。

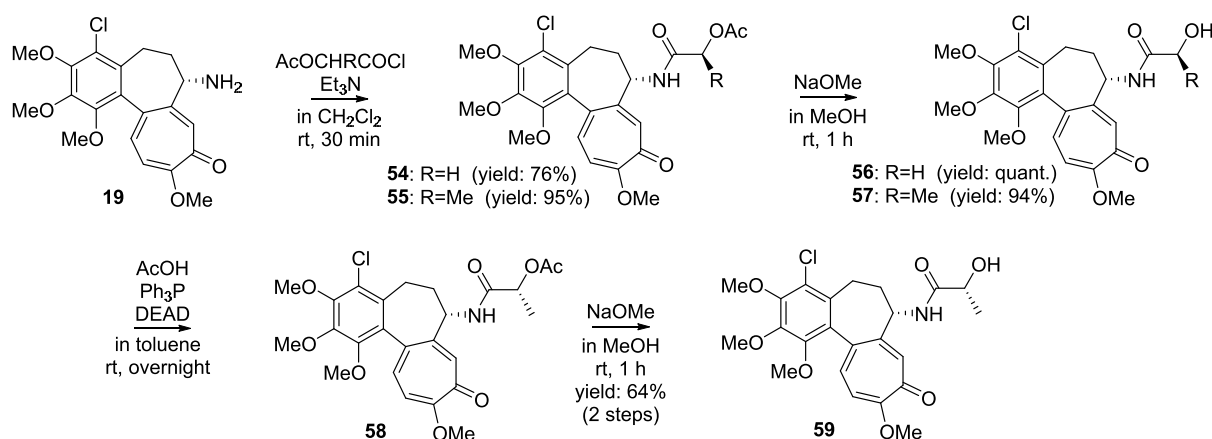


Scheme 1-8: Synthesis of **53**

### 7- $\alpha$ -Hydroxyalkanamide 体 **56**、**57** および **59** の合成

Deacetyl 体 **19** の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、 $\text{Et}_3\text{N}$  存在下に、 $\text{AcOCH}_2\text{COCl}$  または  $(S)\text{-AcOCH}(\text{Me})\text{COCl}$  を添加して、化合物 **54** および **55** をそれぞれ収率 76% および 95% で得た。これらの Ac 基を MeOH 中、 $\text{NaOMe}$  で処理して脱 Ac 化し、hydroxyacetamide 体 **56** および  $(S)$ -2-hydroxypropanamide 体 **57** をそれぞれ定量的および収率 94% で得た。この **57** を光延反応に付し **58** とした後、先と同様に  $\text{NaOMe}$  にて脱 Ac 化し、 $(R)$ -2-hydroxypropanamide 体 **59** を収率 64% (2 工程) で得た (Scheme 1-9)。

**56**、**57** および **59** は、HR-ESI-MS にて各々の分子イオンピーク ( $m/z$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  において各々導入した  $\alpha$ -hydroxyalkanoyl 基のシグナルを合理的に認めたことから、その構造を確認した。



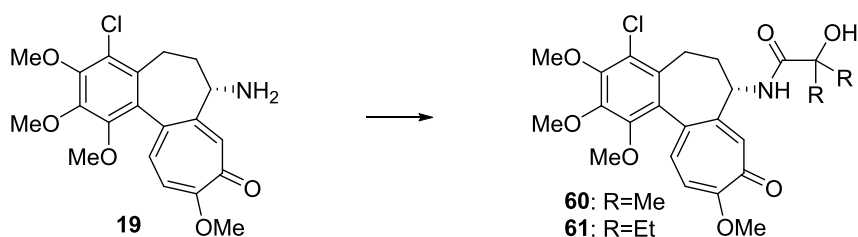
Scheme 1-9: Syntheses of **56**, **57**, and **59**

### 7- $\alpha$ -Hydroxyalkanamide 体 **60** および **61** の合成

2-Hydroxy-2-methylpropionic acid または 2-ethyl-2-hydroxybutyric acid の DMF 溶液に、EDCI および HOBt を加えて、氷冷下、30 分間攪拌した後、deacetyl 体 **19** を添加して、室温にて 3 時間攪拌することで、 $\alpha$ -hydroxy- $\alpha$ -methylpropanamide 体 **60** および  $\alpha$ -ethyl- $\alpha$ -hydroxybutanamide 体 **61** をそれぞれ定量的および収率 59% で得た (Table 1-14)。

**60** および **61** は、HR-ESI-MS にて各々の分子イオンピーク ( $m/z$ ) を観測し、 $^1\text{H-NMR}$  において各々導入した  $\alpha$ -hydroxyalkanoyl 基のシグナルを合理的に認めたことから、その構造を確認した。

**Table 1-14: Syntheses of 60 and 61**



Product		Reagent <sup>a)</sup>	Yield (%)
No.	R		
<b>60</b>	Me	2-Hydroxy-2-methylpropionic acid (1.2 eq)	quant.
<b>61</b>	Et	2-Ethyl-2-hydroxybutyric acid (1.2 eq)	59

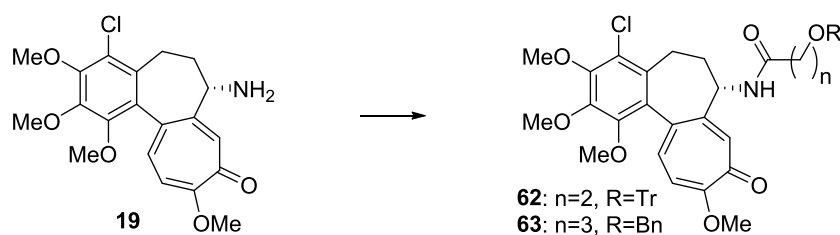
a) Reagents: EDCI (1.2 eq), HOBT (1.2 eq), Solvent: DMF, Condition; rt, 3 h.

#### 7-Hydroxyalkanamide 体 **64** および **65** の合成

文献既知の方法により、1,3-propanediol から 2 工程で合成した 3-(Triphenylmethoxy)propionic acid、または市販の 4-(benzyloxy)butyric acid の DMF 溶液に、EDCI および HOBT を加えて、氷冷下、30 分間攪拌した後、deacetyl 体 **19** を添加して、室温にて 3 時間攪拌することで、3-(triphenylmethoxy)propanamide 体 **62** および 4-(benzyloxy)butanamide 体 **63** を、それぞれ定量的および収率 59% で得た <sup>58)</sup> (Table 1-15)。ついで、**62** の MeOH 溶液に TsOH を加え、室温で 5 時間攪拌することで 3-hydroxypropanamide 体 **64** を収率 86% で得た (Table 1-16)。**63** の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液に -78°C にて BBr<sub>3</sub> を添加し、同温度で 30 分間攪拌することで 4-hydroxybutanamide 体 **65** を収率 41% で得た (Table 1-16)。

**64** および **65** は、HR-ESI-MS にて各々の分子イオンピーク ( $m/z$ ) を検出し、<sup>1</sup>H-NMR において各々導入した hydroxyalkanoyl 基のシグナルを合理的に認めたことから、その構造を確認した。

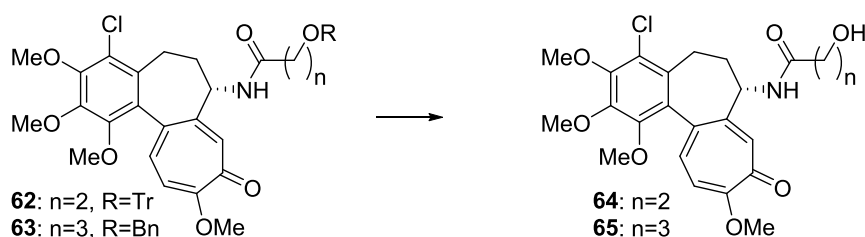
**Table 1-15: Syntheses of 62 and 63**



Product			Reagent <sup>a)</sup>	Yield (%)
No.	n	R		
<b>62</b>	2	Tr	3-(Triphenylmethoxy)propionic acid (1.1 eq) <sup>b)</sup>	94
<b>63</b>	3	Bn	4-(Benzyloxy)butyric acid (2 eq) <sup>c)</sup>	50

a) Solvent: DMF, Condition; rt, 3 h. b) EDCI (1.1 eq), HOBT (1.1 eq). c) EDCI (2 eq), HOBT (2 eq).

**Table 1-16: Syntheses of 64 and 65**



Product		Reagent	Solvent	Condition	Yield (%)
No.	n				
<b>64</b>	2	<i>p</i> TsOH (2 eq)	MeOH	rt, 5 h	86
<b>65</b>	3	BBr <sub>3</sub> (1 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-78 °C, 30 min	41

#### 7 位側鎖に水溶性官能基を有する誘導体の細胞傷害活性

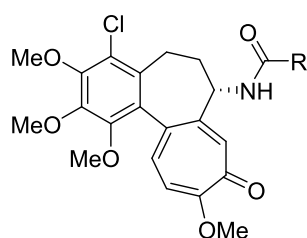
7 位側鎖として水溶性官能基を有する誘導体の細胞傷害活性を示した (Table1-17)。塩基性 amino 基を有する化合物 **47** および **48** は、4-chlorocolchicine (**3**) と比較して活性が減弱した。同様に、carboxyl 基を有する **49** および **50** も大幅に活性が減じ、また、thiol 基を有する誘導体 **53** の活性も弱かった。一方、中性官能基である hydroxyl 基を有する **56** は良好な細胞傷害活性を保持したため、7 位側鎖に hydroxyl 基を有する誘導体を詳細に調査した。**57** および **59** の結果から、amide 基の α 位の立体は、ほとんど活性に影響を与えないことが分かった。そこで、vicinal dimethyl 基を有する **60** を合成すると、同様に良好な殺細胞効果を示した。しかし、vicinal diethyl 基へと変換すると、活性は 1/5 程度まで減じた。同様に、**56** の methylene 鎖を伸長すると、活性は減弱する傾向が認められた。

また、期待したように、4-chlorocolchicine (**3**) よりも SlogP 値の低い化合物 **56** および **60** の代謝安定性は改善し、colchicine (**1**) と同等の安定性を示した。

以上のように、7 位側鎖を α-hydroxyalkanamide 基へと変換することで、良好な細胞傷害活性を維持しつつ、代謝安定性を改善することに成功した。



**Table 1-17: Cytotoxicities and SlogP values of 47-50, 53, 56, 57, 59-61, 64, and 65**



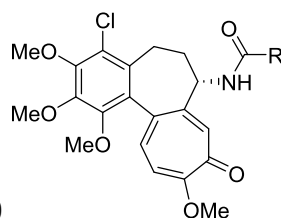
Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			SlogP <sup>a)</sup>	CL <sub>int</sub> <sup>b)</sup>
No.	R	A549	HT-29	HCT116		
<b>47</b>	CH <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	160	46.0	67.0	1.36	NT <sup>c)</sup>
<b>48</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	960	354	539	1.75	NT
<b>49</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	>5 µg/mL	6270	6580	1.75	NT
<b>50</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	5360	2250	3680	2.14	NT
<b>53</b>	CH <sub>2</sub> SH	400	209	192	3.15	NT
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> OH	<b>16.3</b>	<b>8.0</b>	<b>8.2</b>	2.21	<b>0.001</b>
<b>57</b>	(S)-CH(Me)OH	<b>18.7</b>	<b>8.5</b>	<b>7.9</b>	2.60	NT
<b>59</b>	(R)-CH(Me)OH	<b>19.5</b>	<b>7.2</b>	<b>7.7</b>	2.60	NT
<b>60</b>	C(Me) <sub>2</sub> OH	<b>19.4</b>	<b>7.8</b>	<b>8.1</b>	2.99	<b>0.005</b>
<b>61</b>	C(Et) <sub>2</sub> OH	38.0	36.5	38.7	3.77	NT
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	230	46.1	48.6	2.60	NT
<b>65</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	357	168	175	2.99	NT

a) Estimated by MOE. b) Hepatic intrinsic clearance (mL/min/mg). c) Not tested.

## 第六節 代謝安定性の改善を指向した誘導体の抗腫瘍効果

4-Chlorocolchicine (**3**) の7位側鎖に  $\alpha$ -hydroxyalkanamide 基を導入した誘導体 **56** および **60** が良好な細胞傷害活性と代謝安定性を示したため、**56** および **60** のヌードマウスに対する抗腫瘍効果 (*in vivo*) を確認した (Table 1-18)。

**56** および **60** ともに、マウスに異常を認めることなく 1/2MD の投与量で、それぞれ 66.7% および 67.3% の強力な抗腫瘍効果を示した。さらに、両化合物は 1/4MD 量においても、それぞれ 43.6% および 58.5% の効果を保持した。これらの結果は、化合物 **56** および **60** が抗腫瘍剤として有望であることを示している。

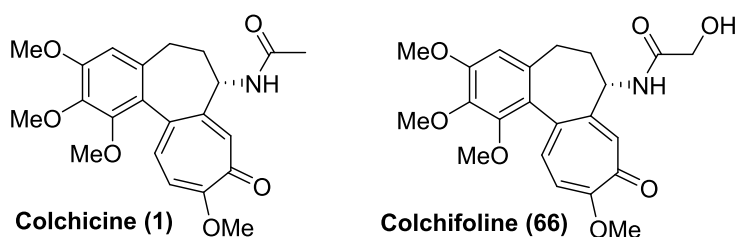


**Table 1-18: Antitumor efficacies of 56 and 60**

Compound		Dose	Total dose <sup>a)</sup>	IR <sup>b)</sup>	Mortality
No.	R	(mg/kg/day)	(mg/kg)	(%)	
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> OH	20.0	60.0	<b>43.6</b>	0 / 3
		40.0 <sup>c)</sup>	120	<b>66.7</b>	0 / 3
<b>60</b>	C(Me) <sub>2</sub> OH	50.0	150	<b>58.5</b>	0 / 4
		100 <sup>c)</sup>	300	<b>67.3</b>	0 / 4

a) Dosing schedule on days 1, 5, & 9. b) Inhibition rate. c) 1/2MD.

また、**56** の4位無置換体である colchifoline (**66**) は、マウスに対する毒性が colchicine (**1**) と同程度に強いことが報告されている <sup>59)</sup> (Figure 1-7)。このことから、colchicine (**1**) の4位に Cl 基が存在することが、colchicine (**1**) に固有の毒性を軽減し、広範な有効域の付与に貢献していると推測している。



Toxic dose ( $\mu\text{mol/kg}$ ): **3.0**

**3.9**

**Figure 1-7: Toxic doses of 1 and 66 in mice**

## 第七節 Tubulin 重合阻害活性

Colchicine (1)、4-chlorocolchicine (3)、強力かつ広範な抗腫瘍効果および良好な代謝安定性を有する 56 および 60 の tubulin に対する重合阻害活性を評価した (Figures 1-7 ~ 1-10)。IC<sub>50</sub> 値は反応開始 5 分後の値を採用し、溶媒 (DMSO) のみを添加した場合の tubulin 重合度との比較から算出した。いずれの誘導体も濃度依存的、かつ 1 よりも強力に tubulin の重合を阻害した。本結果から、これら誘導体の殺細胞効果の作用機序は 1 と同様に tubulin 重合阻害であることが分かった。

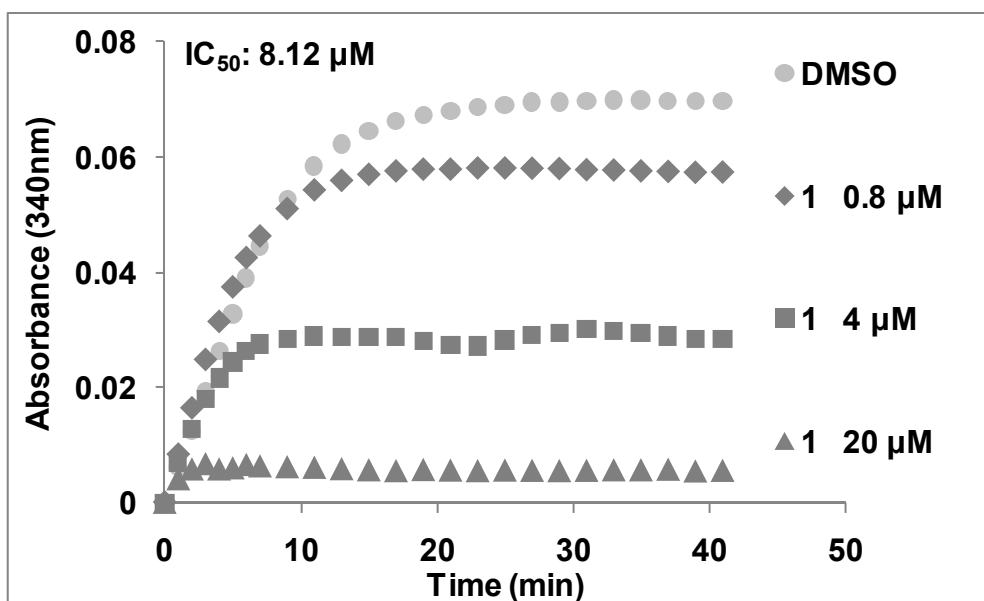


Figure 1-7: Inhibition of tubulin assembly by 1

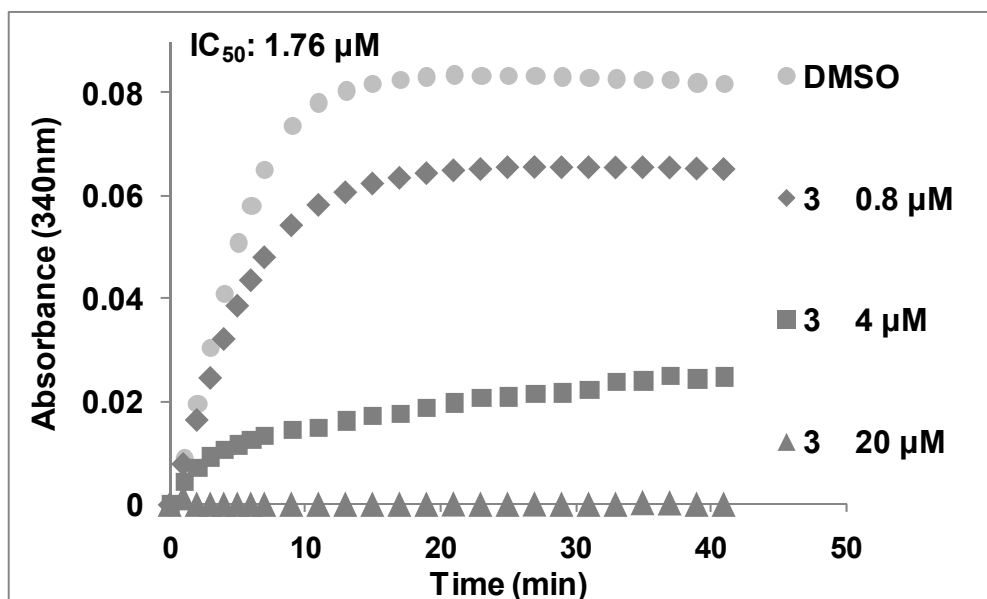


Figure 1-8: Inhibition of tubulin assembly by 3

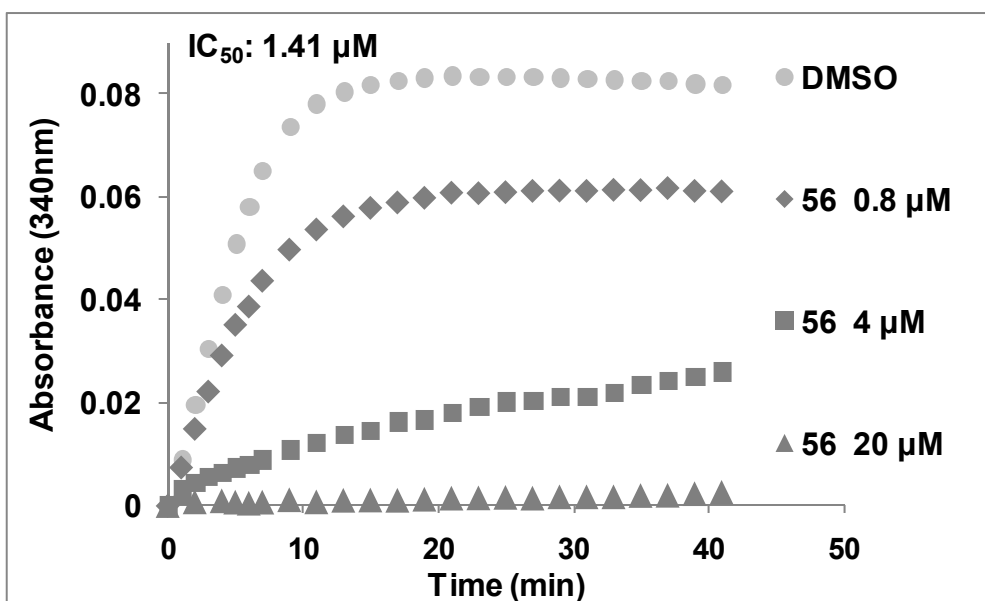


Figure 1-9: Inhibition of tubulin assembly by 56

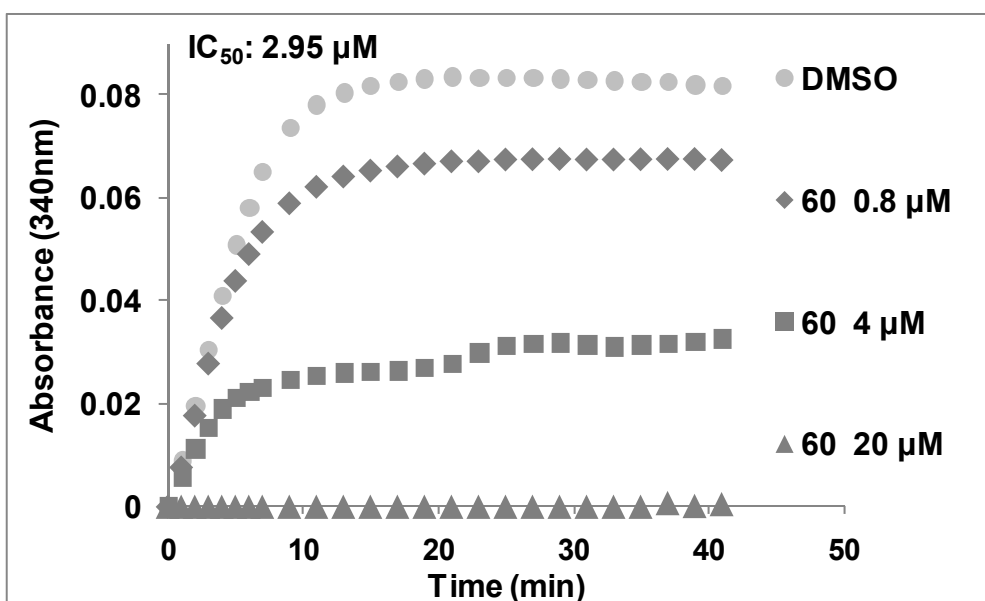


Figure 1-10: Inhibition of tubulin assembly by 60

以上、colchicineの4位および7位変換体の合成を行い、4位にCl基、7位に $\alpha$ -hydroxyalkanamide基を有する誘導体 **56** および **60** が、強力かつ広範な抗腫瘍効果および良好な代謝安定性を有することを明らかにした。抗腫瘍薬として有望な化合物を見出すことに成功した。

## 第二章 7位に sulfonamide, urea, または thiourea 型側鎖を有する 4-Chlorocolchicine 誘導体の構造活性相関研究

前章にて、4位に Cl 基、および7位に  $\alpha$ -hydroxyalkanamide 基を有する誘導体が、強力かつ広範な抗腫瘍活性ならびに良好な代謝安定性を有することを明らかにした。7位に天然型の側鎖 (amide) を有する誘導体から有望な化合物部を見出すことが出来たため、本章では、7位に非天然型の側鎖 (sulfonamide, urea, または thiourea) を有する 4-chlorocolchicine 類の可能性について検討した。

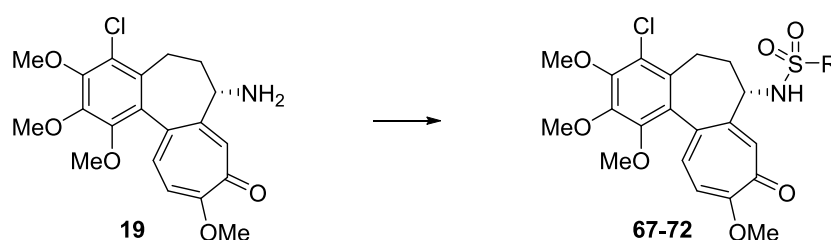
### 第一節 Sulfonamide または urea 型側鎖を有する誘導体の合成と細胞傷害活性

#### 7-Sulfonamide 体 67-72 の合成

Deacetyl 体 **19** の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、 $\text{Et}_3\text{N}$  存在下、それぞれ対応する sulfonyl chloride を添加し、攪拌することで 7-sulfonamide 体 **67-72** を得た (Table 2-1)。

**67-72** の構造は、HR-ESI-MS にて各目的物の分子イオンピーク  $m/z$  を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  において sulfonamide 由来の NH 基や、導入した alkyl 基あるいは phenyl 基のシグナルを合理的に認めことから確認した。

Table 2-1: Syntheses of 67-72



Product		Reagent	Condition <sup>a)</sup>	Yield (%)
No.	R			
<b>67</b>	Me	$\text{MeSO}_2\text{Cl}$ (1.2 eq), $\text{Et}_3\text{N}$ (1.5 eq)	0 °C, 1 h	95
<b>68</b>	Et	$\text{EtSO}_2\text{Cl}$ (1.4 eq), $\text{Et}_3\text{N}$ (2 eq)	rt, overnight	quant.
<b>69</b>	<i>i</i> Pr	<i>i</i> $\text{PrSO}_2\text{Cl}$ (1.2 eq), $\text{Et}_3\text{N}$ (1.5 eq)	0 °C, 2 h	9
<b>70</b>	<sup>c</sup> Pr	<sup>c</sup> $\text{PrSO}_2\text{Cl}$ (1.2 eq), $\text{Et}_3\text{N}$ (1.5 eq)	0 °C, 1 h	57
<b>71</b>	<i>i</i> Bu	<i>i</i> $\text{BuSO}_2\text{Cl}$ (1.2 eq), $\text{Et}_3\text{N}$ (1.5 eq)	0 °C, 1 h	85
<b>72</b>	Ph	$\text{PhSO}_2\text{Cl}$ (1.2 eq), $\text{Et}_3\text{N}$ (1.5 eq)	0 °C, 30 min	44

a) Solvent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

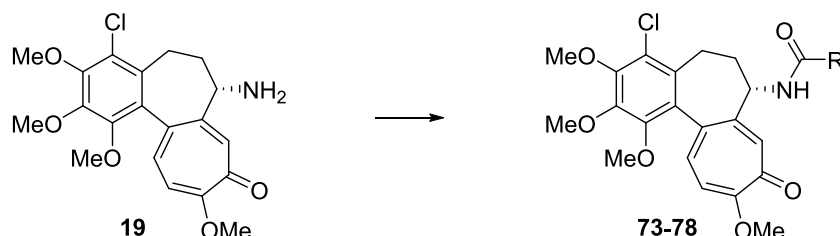
#### 7-Ureide 体 73-78 の合成


Deacetyl 体 **19** の  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (2:1) あるいは  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、ethylisocyanate、isopropylisocyanate あるいは phenylisocyanate を添加し、攪拌することで 7-ureide 体 **73-75** をそれぞれ収率 61%、97%および 65%で得た。また、7-ureide 体 **76-78** は、deacetyl 体 **19** の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、 $\text{Et}_3\text{N}$

存在下、dimethylcarbamoyl chloride、diethylcarbamoyl chloride あるいは piperidine-1-carbonyl chloride を添加し、加熱することでそれぞれ収率 98%、44%および 56%で得た (Table 2-2)。

7-Ureide 体 **73-78** の構造は、HR-ESI-MS にて各々の分子イオンピーク  $m/z$  を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  において導入した alkyl 基や ureide 基のシグナルを合理的に認めたことから確認した。

**Table 2-2: Syntheses of 73-78**

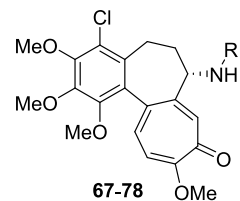


Product		Reagent	Solvent	Condition	Yield (%)
No.	R				
<b>73</b>	NHEt	EtN=C=O (2 eq)	MeOH-H <sub>2</sub> O <sup>a)</sup>	0 °C, 75 min	61
<b>74</b>	NH <sup>i</sup> Pr	<sup>i</sup> PrN=C=O (2 eq)	MeOH-H <sub>2</sub> O <sup>a)</sup>	0 °C, 75 min	97
<b>75</b>	NHPh	PhN=C=O (2 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0 °C, 2 h	65
<b>76</b>	NMe <sub>2</sub>	Me <sub>2</sub> NCOCl (3.6 eq) Et <sub>3</sub> N (4.5 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux, overnight	98
<b>77</b>	NEt <sub>2</sub>	Et <sub>2</sub> NCOCl (1.5 eq) Et <sub>3</sub> N (2 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux, 3 h	44
<b>78</b>		Piperidine-1-COCl (5 eq) Et <sub>3</sub> N (5 eq)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux, overnight	56


a) MeOH:H<sub>2</sub>O= 2:1.

#### 7-Sulfonamide 体 **67-72** および 7-ureide 体 **73-78** の細胞傷害活性

7-Sulfonamide 体 **67-72**、および 7-ureide 体 **73-78** の細胞傷害活性値を示した (Table 2-3)。Sulfonamide 体 **67-72** および urea 型化合物 **76-78** は、官能基の種類 (脂肪族鎖状、環状あるいは芳香族) や炭素鎖長に影響することなく、一定の IC<sub>50</sub> 値 (数十 nM) を示した。また、sulfonamides (**68** and **70**)は、colchicine (**1**) と同等の代謝安定性を示し、7 位側鎖に sulfonamide 基の導入は代謝安定性の付与に有利であることが示唆された。一方、末端に monoalkyl 基が置換した ureide 体 **73** および **74** では、活性が減弱した。この活性は、alkyl 基を phenyl 基 **75** へと変換すると改善が認められた。



**Table 2-3: Cytotoxicities, SlogP values, and metabolic stabilities of 67-78**

Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			SlogP <sup>a)</sup>	CL <sub>int</sub> <sup>b)</sup> (mL/min/mg)
No.	R	A549	HT-29	HCT116		
67	SO <sub>2</sub> Me	45.4	38.6	36.9	2.65	NT <sup>c)</sup>
68	SO <sub>2</sub> Et	48.1	42.6	39.9	3.04	0.005
69	SO <sub>2</sub> <sup>i</sup> Pr	44.9	42.2	40.7	3.43	NT
70	SO <sub>2</sub> <sup>c</sup> Pr	38.0	35.5	32.6	3.19	0.005
71	SO <sub>2</sub> <sup>i</sup> Bu	40.8	36.4	33.2	3.68	NT
72	SO <sub>2</sub> Ph	36.8	8.7	25.8	4.08	NT
73	CONH <sup>t</sup> Et	247	81.8	134	3.42	NT
74	CONH <sup>i</sup> Pr	289	181	189	3.81	NT
75	CONHPh	48.1	35.2	36.0	4.93	NT
76	CONMe <sub>2</sub>	192	53.2	50.4	3.37	NT
77	CONEt <sub>2</sub>	48.3	43.9	44.3	4.15	0.021
78	CON 	26.6	42.6	42.4	4.30	0.043

a) Estimated by MOE. b) Hepatic intrinsic clearance. c) Not tested.

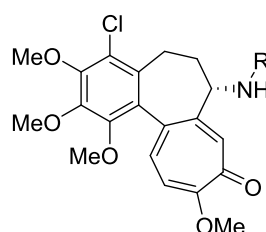
7 位に sulfonamide 基や ureide 基を有する 4- chlorocolchicine 誘導体に、強力な細胞傷害活性を有する誘導体は認められなかったが、これらの中から **68**、**70**、**77** および **78** を選択して *in vivo* における抗腫瘍効果を確認した。

## 第二節 Sulfonamide または urea 型側鎖を有する誘導体の抗腫瘍効果


7 位に sulfonamide 基や ureide 基を有する 4-chlorocolchicine 誘導体の中から、**68**、**70**、**77** および **78** を選択して、*in vivo* における抗腫瘍効果を確認した (Table 2-4)。

化合物 **78** は、*in vivo* 投与液への溶解度が不十分であったため、ヌードマウスに対する最大耐量 (MD) を求めることが出来なかった。そのため、最大溶解量 (MSD) の 1/2 量および 1/4 量を投与した。

Sulfonamide 体 **68** および **70**、および ureide 体 **78** が、1/2MD (あるいは 5/7MD、1/2MSD) の投与量でそれぞれ 51.7%、45.5% および 54.3% と、colchicine (**1**) と比較して広範な有効域を示したが、腫瘍増殖阻止率 (IR) は、amide 型誘導体である **56** および **60** には及ばなかった (Table 1-18 参照)。また、*N,N*-diethylureide 体 **77** はほとんど抗腫瘍効果を示さなかった。



**Table 2-4: Antitumor efficacies of 68, 70, 77, and 78**

Compound		Dose	Total dose <sup>a)</sup>	IR <sup>b)</sup>	Mortality
No.	R	(mg/kg/day)	(mg/kg)	(%)	
<b>68</b>	SO <sub>2</sub> Et	35.0	105	43.3	0 / 4
		70.0 <sup>c)</sup>	210	51.7	0 / 4
<b>70</b>	SO <sub>2</sub> <sup>c</sup> Pr	25.0	75.0	43.9	0 / 4
		50.0 <sup>d)</sup>	150	45.5	0 / 4
<b>77</b>	CONEt <sub>2</sub>	35.0	105	28.0	0 / 4
		70.0 <sup>d)</sup>	210	13.2	0 / 4
<b>78</b>	CON 	50.0	150	37.1	0 / 4
		100 <sup>e)</sup>	300	54.3	0 / 4

a) Dosing schedule on days 1, 5, & 9. b) Inhibitor rate. c) 5/7MD. d) 1/2MD. e) 1/2MSD.

7 位に sulfonamide 基や ureide 基を有する 4-chlorocolchicine 誘導体からは、強力な抗腫瘍活性を有する誘導体を見出すことは出来なかった。そのため、7 位に thioureide 基を有する誘導体を検討することにした。



### 第三節 Thiourea 型側鎖 (脂肪族) を有する誘導体の合成と細胞傷害活性

7 位に sulfonamide 基あるいは ureide 基を有する 4-chlorocolchicine 誘導体に、良好な活性を示す化合物は見出せなかった。そこで、本節では alkylthioureide 基を有する誘導体について調査した。

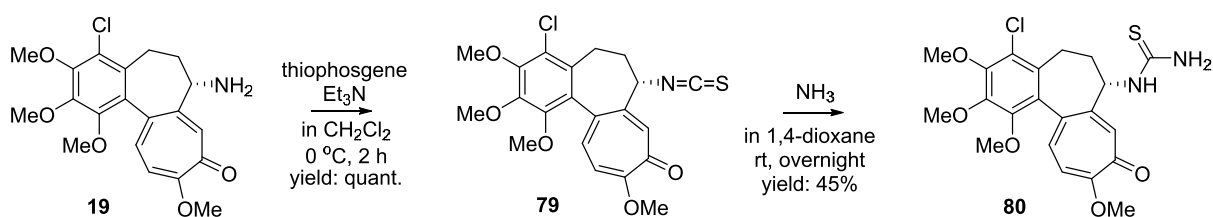
#### Thiocarbamoyl 体 **80** の合成

Deacetyl 体 **19** の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、thiophosgene および  $\text{Et}_3\text{N}$  を添加して、氷冷下にて 2 時間攪拌することで、7-isothiocyanate 体 **79** を定量的に得た。

**79** の構造は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  434.0819 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて、**19** の 7- $\text{NH}_2$  基のシグナルが消失したことから確認した。

ついで、**79** の 1,4-dioxane 溶液に  $\text{NH}_3$  (0.5 mol/L in 1,4-dioxane) を加えて、室温にて 5 時間攪拌することで、7-thiocarbamoyl 体 **80** を収率 45% で得た (Scheme 2-1)。

**80** は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  451.1065 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて thiocarbamoyl 基由来の NH のシグナルを観測したことから、構造を確認した。



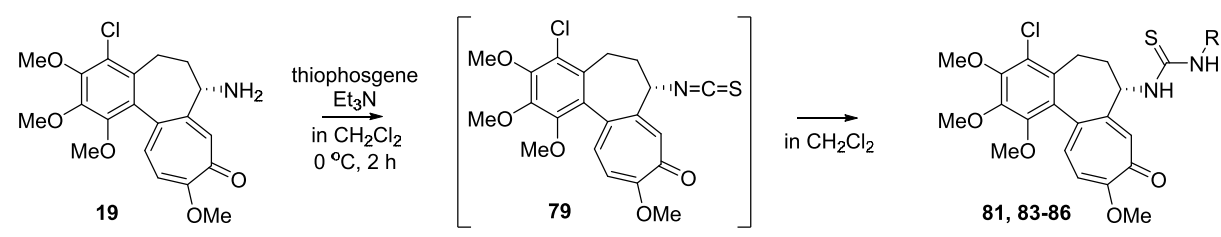
Scheme 2-1: Synthesis of **80**

#### *N*-Alkylthiocarbamoyl 体 **81** および **83-86** の合成

Thioureide 体 **80** が、7-isothiocyanate (**79**) を経由することで得られたため、one-pot 条件での合成を検討した (Table 2-5)。先と同様に、deacetyl 体 **19** から **79** を調製した後、反応液に  $\text{MeNH}_2$  を加えることで *N*-methylthioureide 体 **81** が収率 78% で得られた。One-pot で良好な結果を与えたため、同様の方法にて **83**、**84**、**85**、および **86** を合成し、それぞれ収率 69%、68%、63%、および 19% で得た (Table 2-5)。

**81** および **83-86** の構造は、HR-ESI-MS にてそれぞれの分子イオンピーク ( $m/z$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて、thiocarbamoyl 基由来の NH のピークや、導入した alkyl 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

**Table 2-5: Syntheses of 81 and 83-86**

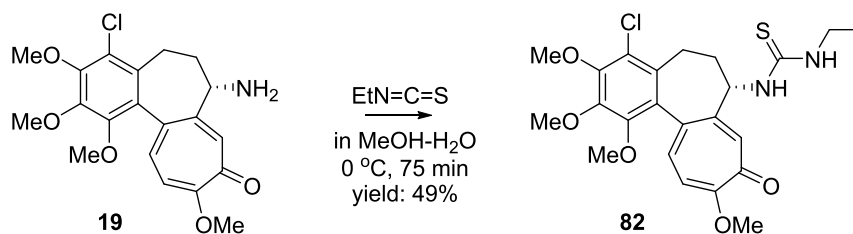


Product		Reagent	Condition	Yield
No.	R	(2 eq)		(%)
<b>81</b>	Me	MeNH <sub>2</sub> ·HCl Et <sub>3</sub> N	rt, 48 h	78
<b>83</b>	<sup>n</sup> Pr	<sup>n</sup> PrNH <sub>2</sub>	rt, overnight	69
<b>84</b>	<sup>n</sup> Bu	<sup>n</sup> BuNH <sub>2</sub>	rt, overnight	68
<b>85</b>	<sup>n</sup> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	<sup>n</sup> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NH <sub>2</sub>	rt, overnight	63
<b>86</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	rt, overnight	19

#### N-Ethylthioureide 体 82 の合成

Deacetyl 体 **19** の MeOH-H<sub>2</sub>O 溶液に、EtN=C=S を添加することで N-ethylthiocarbonyl 体 **82** を収率 49% で得た (Scheme 2-2)。

**82** は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  479.1410 (M+H<sup>+</sup>) が検出され、<sup>1</sup>H-NMR にて、thiocarbonyl 基由来の NH のピークや、導入した ethyl 基のシグナルが観測されたことから、その構造を確認した。



**Scheme 2-2: Synthesis of 82**

#### N,N-Dialkylthioureide 体 87-94 の合成

N-Alkylthiocarbonyl 体の合成と同様に、deacetyl 体 **19** から **79** を調製した後、対応する 2 級 amine を加えることで N,N-dialkylthioureide 体 **87-94** を one-pot で得た (Table 2-6)。

化合物 **87-94** の構造は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク ( $m/z$ ) を検出し、<sup>1</sup>H-NMR にて、thiocarbonyl 基由来の NH のピークや、導入した dialkyl 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

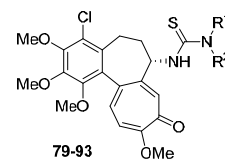
**Table 2-6: Syntheses of 87-94**

Product			Reagent <sup>a)</sup>	Yield
No.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	(2 eq)	(%)
<b>87</b>	Me	Me	Me <sub>2</sub> NH·HCl Et <sub>3</sub> N	quant.
<b>88</b>	Et	Et	Et <sub>2</sub> NH	85
<b>89</b>	<sup>n</sup> Pr	<sup>n</sup> Pr	<sup>n</sup> Pr <sub>2</sub> NH	98
<b>90</b>	Me	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	2-(methylamino)ethanol	92
<b>91</b>		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Azetidine	18
<b>92</b>		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Pyrrolidine	72
<b>93</b>		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Piperidine	70
<b>94</b>		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	Morpholine	70

a) Condition: rt, overnight.

#### Alkylthiourea 体 **80-94** の細胞傷害活性

7-Alkylthiourea 体 **80-94** の細胞傷害活性を示す (Table 2-7)。Ethylthiocarbamoyl 体 **82** は、対応する ethylcarbamoyl 体 **73** よりも、細胞傷害活性が大幅に増強していることが明らかとなった (Table 2-3 参照)。そのため、7-thiourea 体の構造活性相関を詳細に検討した。N-mono 置換 thiourea 誘導体 **81-84** は強力な活性を示した一方で、N-hexylthiocarbamoyl 体 **85** の活性は減弱した。7位側鎖を伸長すると活性が減弱する傾向は、7-amide 型誘導体と同様であった (Table 1-7 参照)。この傾向は、N,N-di 置換 thiourea でも認められ、dimethyl 体 **87** および diethyl 体 **88** では良好な細胞傷害活性を示したが、dipropyl 体 **89** では活性が減じた。その一方で、全ての環状 thiourea 体 **91-94** は強力な活性を保持し、amide 型誘導体と同様に、少なくとも6員環までは活性が許容されることが分かった。7位に amide 側鎖を有する誘導体の場合は、側鎖に hydroxyl 基を導入したときに細胞傷害活性を保持しつつ、代謝安定性の改善が認められた (Table 1-17 参照)。そのため、それに倣って化合物 **86** および **90** を合成したが、7-thiourea タイプでは活性の減弱を招くことが分かった。



**Table 2-7: Cytotoxicities, SlogP values, and metabolic stabilities of 80-94**

No.	Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			SlogP <sup>a)</sup>	CL <sub>int</sub> <sup>b)</sup>
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	A549	HT-29	HCT116		
80	H	H	45.0	<b>6.1</b>	<b>9.0</b>	2.94	NT
81	H	Me	<b>10.9</b>	<b>2.8</b>	<b>6.3</b>	3.20	NT
82	H	Et	37.9	<b>8.6</b>	<b>7.9</b>	3.59	0.124
83	H	<sup>n</sup> Pr	<b>9.9</b>	<b>1.6</b>	<b>4.3</b>	3.98	NT
84	H	<sup>n</sup> Bu	<b>7.4</b>	<b>1.0</b>	<b>1.8</b>	4.37	NT
85	H	<sup>n</sup> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	212	176	171	5.15	NT
86	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	251	52.7	89.7	2.56	NT
87	Me	Me	<b>10.7</b>	<b>8.8</b>	<b>8.4</b>	3.54	NT
88	Et	Et	<b>10.1</b>	<b>6.1</b>	<b>6.9</b>	4.32	0.541
89	<sup>n</sup> Pr	<sup>n</sup> Pr	40.3	38.2	34.4	5.10	NT
90	Me	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	44.9	30.4	32.6	2.90	NT
91		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	33.3	<b>5.8</b>	<b>8.4</b>	3.68	NT
92		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	<b>12.2</b>	<b>7.5</b>	<b>7.2</b>	4.07	NT
93		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	<b>9.6</b>	<b>6.1</b>	<b>6.9</b>	4.46	NT
94		-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	44.9	<b>7.2</b>	<b>9.1</b>	3.31	0.061

a) Estimated by MOE. b) Hepatic intrinsic clearance.

7-Ethylthioureide 体 **82** が、7-ethylureide 体 **73** よりも良好な細胞傷害活性を示す理由を推測するために、*in silico* によるドッキング・シミュレーションを行った。

**82** の thiourea-NH 基は、tubulin α-subunit の Thr179 残基と水素結合を介して、tubulin と相互作用していることが示唆された (Figure 2-2)。それに加えて、**82** の 9 位 carbonyl 基と tubulin β-subunit の Lys254 残基も、水素結合によって相互作用していることが示唆された。一方、urea 体 **73** ではその様な相互作用は認められなかった (Figure 2-1)。

その理由は、次の様に推測している。一般的に、thiourea-NH 基の水素結合供与体としての能力は、対応する urea-NH 基よりも高いことが知られている。それは通常、thiourea-NH 基の pKa 値が、対応する urea-NH 基の pKa 値よりも低く、酸性度が高いことに起因している<sup>60)</sup>。そのため、**82** の thiourea-NH 基と tubulin α-subunit (Thr179) の相互作用が、colchicine 結合サイトにおける **82** 分子の位置取りを決定し、**82** の 9 位 carbonyl 基と tubulin β-subunit (Lys254) の水素結合は、urea 体 **73** よりも有利と思われた。その結果、thiourea 体 **82** の細胞傷害活性が urea 体 **73** の活性を上回るものと推測した。他の thiourea 型誘導體も同様の理由により、対応した urea 体より高活性を示したと考えられる。以上から、4-chlorocolchicine 類の 7 位に alkylthioureide 基の導入は、非常に効果的であることが分かった。

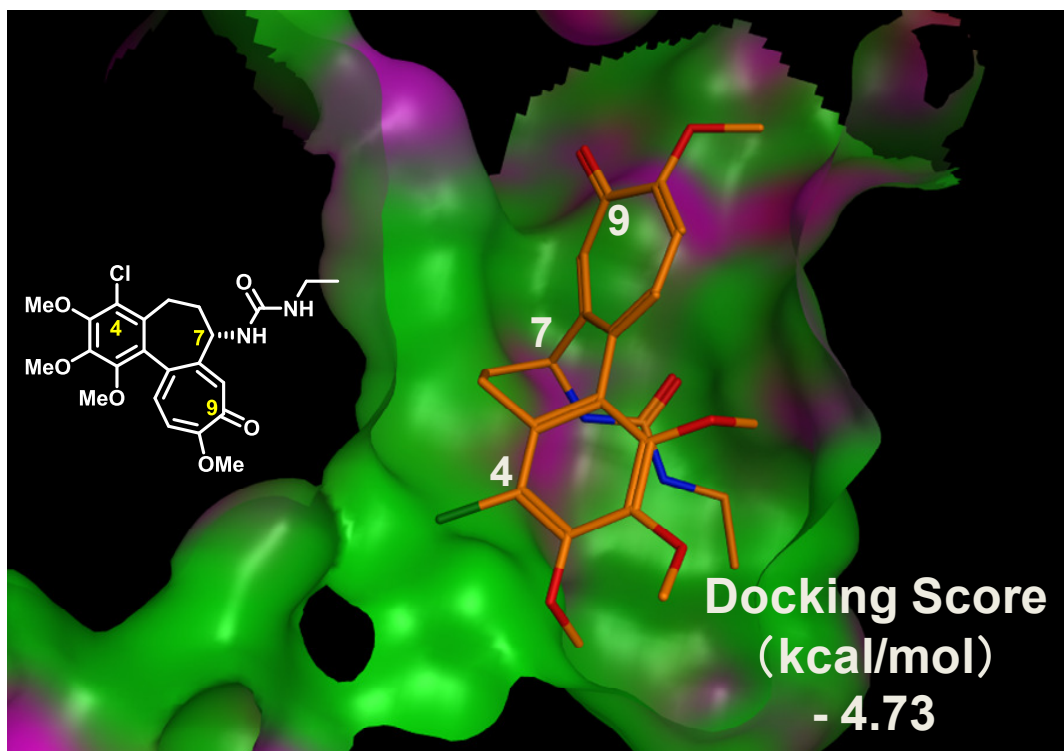


Figure 2-1: Docking mode of urea (73) at the colchicine binding site of tubulin (green: hydrophobic regions and pink: polar regions)

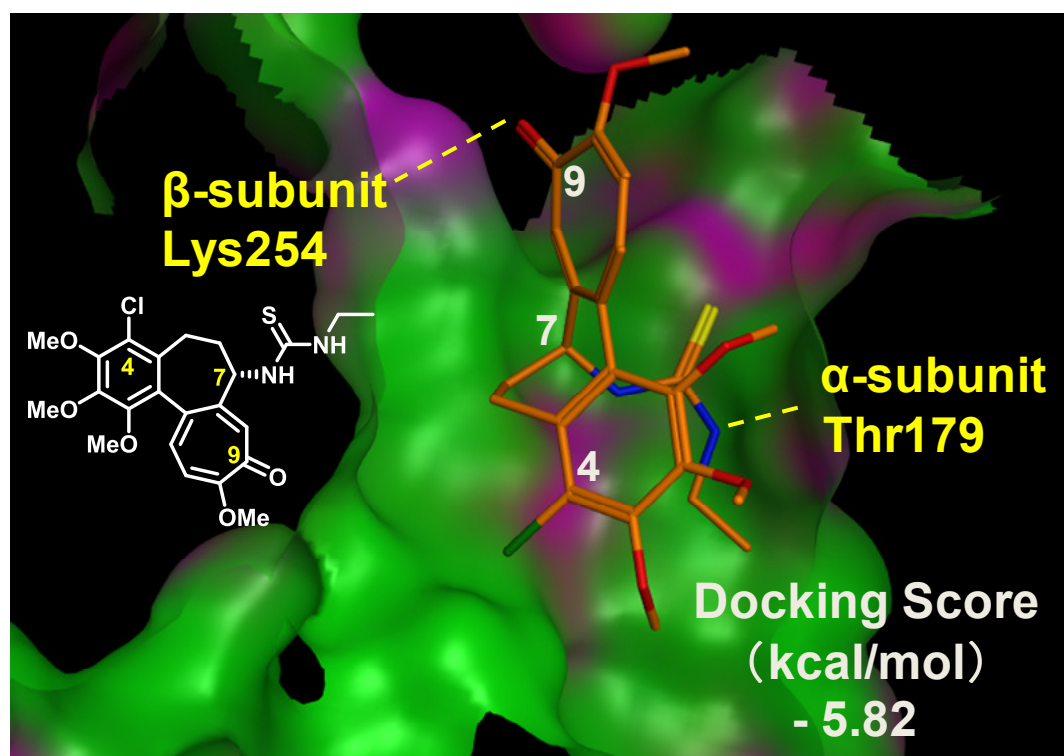


Figure 2-2: Docking mode of thiourea (82) at the colchicine binding site of tubulin (green: hydrophobic regions and pink: polar regions)

#### 第四節 Thiourea 型側鎖 (芳香族) を有する誘導体の合成と細胞傷害活性

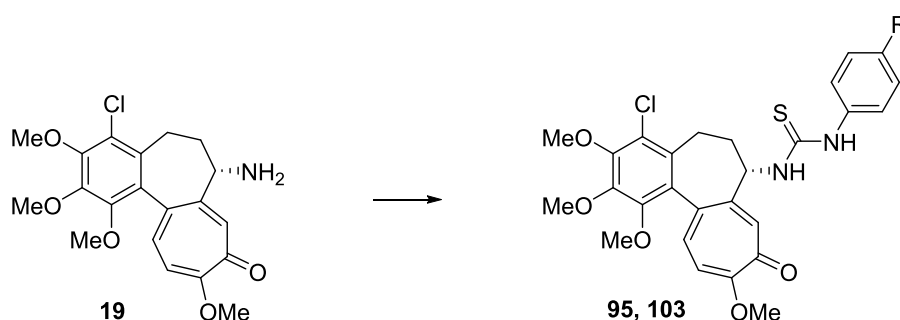
7 位に alkylthioureaide 基を有する 4-chlorocolchicine 誘導体が、強力な活性を有することが明らかになったため、本節では arylthioureaide 基を有する誘導体について検討した。

##### N-Arylthioureaide 体 95 及び 103 の合成

Deacetyl 体 19 の溶液中に、 $\text{PhN}=\text{C}=\text{S}$  あるいは  $4\text{-(Me}_2\text{N)PhN}=\text{C}=\text{S}$  を加えて攪拌することで、arylthioureaide 体 95 および 103 をそれぞれ収率 74% および 63% で得た (Table 2-8)。

95 および 103 は、HR-ESI-MS にて、それぞれ分子イオンピーク  $m/z$  527.1257 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) および 570.1864 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) が検出され、 $^1\text{H-NMR}$  にて、thiocarbamoyl 基由来の NH のピークや、導入した aryl 基のシグナルが合理的に観測されたことから、その構造を確認した。

Table 2-8: Syntheses of 95 and 103



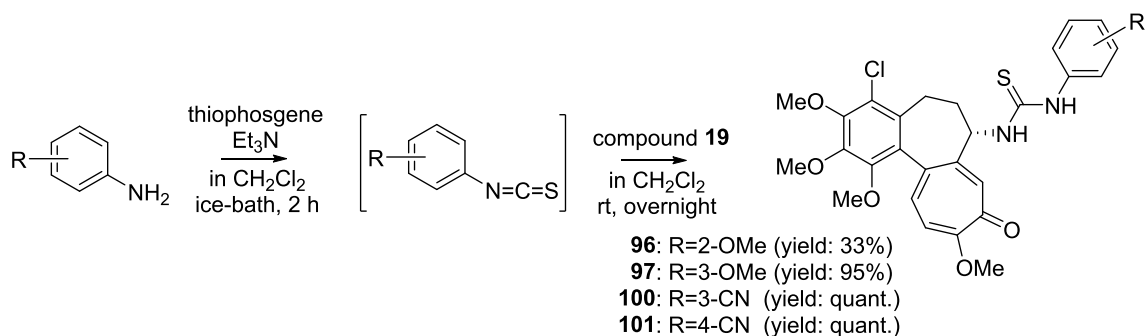
Product		Reagent	Solvent	Condition	Yield
No.	R	(2 eq)			(%)
95	H	$\text{PhN}=\text{C}=\text{S}$	$\text{MeOH-H}_2\text{O}^{\text{a)}$	$0\text{ }^\circ\text{C}$ , 75 min	74
103	$\text{NMe}_2$	$4\text{-(Me}_2\text{N)PhN}=\text{C}=\text{S}$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	rt, 4 h	63

a)  $\text{MeOH:H}_2\text{O} = 2:1$ .

##### N-Arylthioureaide 体 96、97、100、および 101 の合成

対応する aniline 誘導体の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、thiophosgene と  $\text{Et}_3\text{N}$  を加えて氷冷下、2 時間攪拌して arylisothiocyanate を調製した後、19 を添加し室温で一晩攪拌することで、N-arylthioureaide 体 96、97、100、および 101 をそれぞれ収率 33%、95%、定量的および定量的に得た (Scheme 2-3)。

96、97、100、および 101 の構造は、HR-ESI-MS にて、それぞれの分子イオンピーク  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて、thiocarbamoyl 基由来の NH のピークや、導入した aryl 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。



**Scheme 2-3: Syntheses of 96, 97, 100, and 101**

### N-Arylthioureide 体 98 および 102 の合成

Deacetyl 体 19 の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、thiophosgene および  $\text{Et}_3\text{N}$  を加えて氷冷下にて 2 時間攪拌して 7-isothiocyanate 体 79 を調製した後、対応する aniline 誘導体を加えて、さらに室温にて一晩攪拌することで、arylthioureide 体 98 および 102 をそれぞれ収率 72% および 18% で得た (Table 2-9)。

98 および 102 の構造は、HR-ESI-MS にて、それぞれ分子イオンピーク  $m/z$  557.1516 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) および 570.1815 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて、thiocarbamoyl 基由来の NH のピークや、導入した aryl 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

**Table 2-9: Syntheses of 98 and 102**

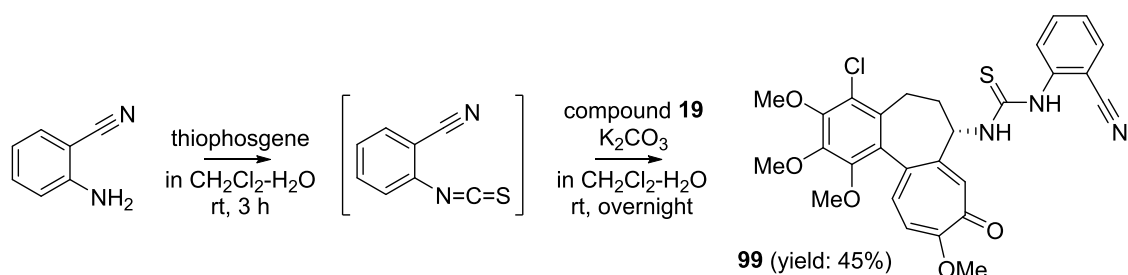
Product		Reagent <sup>a)</sup>	Yield
No.	R	(2 eq)	(%)
<b>98</b>	4-OMe	<i>p</i> -Anisidine	72
<b>102</b>	3-NMe <sub>2</sub>	3-(Me <sub>2</sub> N)PhNH <sub>2</sub> ·HCl Et <sub>3</sub> N	18

a) Condition: rt, overnight.

### N-(2-Cyanophenyl)thioureide 体 99 の合成

2-Aminobenzonitrile の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、thiophosgene を加えて室温下 3 時間攪拌して 2-isothiocyanatobenzonitrile を調製した後、19 および  $\text{K}_2\text{CO}_3$  を加えて、さらに室温下にて一晩攪拌することで、N-(2-cyanophenyl)thioureide 体 99 を収率 45% で得た。

**99** の構造は、HR-ESI-MSにて分子イオンピーク  $m/z$  552.1365 ( $M+H^+$ ) を観測し、 $^1H$ -NMRにて、thiocarbamoyl 基由来の NH のピークや、導入した aryl 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

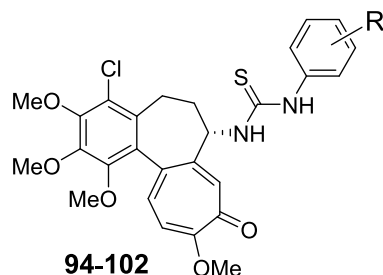


**Scheme 2-4: Synthesis of 99**

### 7 位に arylthiourea 型側鎖を有する誘導体の細胞傷害活性

7 位に arylthiourea 型側鎖を有する 4-chlorocolchicine 類の細胞傷害活性を示した (Table 2-10)。Phenylthiourea 体 **95** や、*meta* 位や *para* 位に methoxyl 基を有する **97** や **98** が強力な細胞傷害活性を示した。一方、*ortho*-methoxyl 体 **96** の活性は、**97** や **98** よりも 1 オーダー程度減弱した。類似の傾向は cyano 基置換体 **99-101** でも観察され、*meta* 位置換体 **100** および *para* 位置換体 **101** の活性が、*ortho* 体 **99** よりも良好であった。また、dimethylamino 置換体は *para* 位置換体 **103** の殺細胞効果が強力であり、*meta* 位置換体 **102** よりも優れていた。

**Table 2-10: Cytotoxicities, Slog $P$  values, and metabolic stabilities of 95-103**



Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			Slog $P$ <sup>a)</sup>	CL <sub>int</sub> <sup>b)</sup>
No.	R	A549	HT-29	HCT116		(mL/min/mg)
<b>95</b>	H	24.4	<b>0.4</b>	<b>1.2</b>	5.09	NT <sup>c)</sup>
<b>96</b>	2-OMe	77.6	15.0	29.4	5.10	NT
<b>97</b>	3-OMe	23.3	<b>0.5</b>	<b>1.4</b>	5.10	NT
<b>98</b>	4-OMe	<b>8.0</b>	<b>0.3</b>	<b>1.4</b>	5.10	NT
<b>99</b>	2-CN	3795	866	2204	4.96	NT
<b>100</b>	3-CN	126	6.7	25.3	4.96	NT
<b>101</b>	4-CN	67.8	6.4	25.0	4.96	NT
<b>102</b>	3-NMe <sub>2</sub>	38.4	4.4	24.2	5.16	NT
<b>103</b>	4-NMe <sub>2</sub>	<b>1.8</b>	<b>0.3</b>	<b>1.1</b>	5.16	0.152

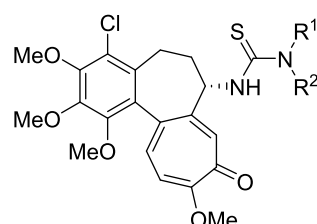
a) Estimated by MOE. b) Hepatic intrinsic clearance. c) Not tested.



## 第五節 Thiourea 型側鎖を有する誘導体の抗腫瘍効果

7 位に thiourea 基を有する 4-chlorocolchicine 誘導体の中から、強力な細胞傷害活性を示した **82**、**88**、**94** および **103** を選択して、*in vivo* における抗腫瘍効果を確認した (Table 2-11)。

試験した全ての誘導体が、1/2MD の投与量にて、ヌードマウスの死亡や体重減少などの毒性所見を認めることなく、良好な抗腫瘍効果を示した。7-thiourea 体は、7-amide 型誘導体の *in vivo* 活性と同様に、広範な抗腫瘍効果を有することが明らかとなった (Table 1-10 & 1-18 参照)。特に、7-ethylthiourea 体 **82** は、1/2MD 量で 62.6% の強い腫瘍増殖抑制率を示し、1/4MD 量においても 44.4% の良好な活性を有していた。また、7-amide 型誘導体では、側鎖に芳香環を有する **45** に抗腫瘍効果はほとんど認められなかったが、7-thiourea 体では芳香環を有する **103** に、1/2MD 量で 52.5% の抗腫瘍効果が認められた。



**Table 2-11: Antitumor efficacies of 82, 88, 94, and 103**

No.	Compound		Dose (mg/kg/day)	Total dose <sup>a)</sup> (mg/kg)	IR <sup>b)</sup> (%)	Mortality
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>				
<b>82</b>	H	Et	20.0	60.0	<b>44.4</b>	0 / 4
			40.0 <sup>c)</sup>	120	<b>62.6</b>	0 / 4
<b>88</b>	Et	Et	25.0	75.0	29.5	0 / 4
			50.0 <sup>c)</sup>	150	54.6	0 / 4
<b>94</b>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		25.0	75.0	31.3	0 / 4
			50.0 <sup>c)</sup>	150	52.7	0 / 4
<b>103</b>	H	Ph-4-NMe <sub>2</sub>	10.0	30.0	32.6	0 / 4
			20.0 <sup>c)</sup>	60.0	52.5	0 / 4

a) Dosing schedule on days 1, 5, & 9. b) Inhibition rate. c) 1/2MD.

**82**、**88**、**94**、および **103** は広範な抗腫瘍活性を有することが明らかとなったものの、その代謝安定性は colchicine (**1**) と比較して劣っていた (Table 2-7 および 2-10 参照)。誘導体化において、7-amide 型誘導体では側鎖に hydroxyl 基を導入することで強力な細胞傷害活性を維持しながら、代謝安定性を改善することが可能であったが、7-thiourea 体では hydroxyl 基を導入すると、殺細胞効果の減弱が認められた。そこで、*in vivo* にて抗腫瘍効果が認められた 7 位に aryl 基を有する thiourea 体 **103** に着目した。本 aryl 基を heteroaryl 基へと変換し SlogP 値を減じることで、強力な細胞傷害活性を保持しつつ、代謝安定性が改善することを期待した。そのため、7-thiourea 基の末端に heteroaryl 基を有する誘導体の合成に着手した。

## 第六節 代謝安定性の改善を指向した誘導体の合成と細胞傷害活性

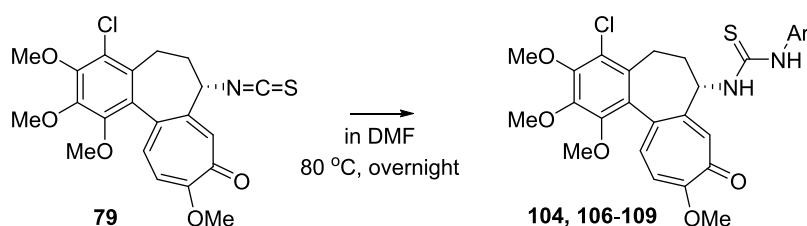
7位の側鎖に thioureide 基を有する 4-chlorocolchicine 類が強力な細胞傷害活性と、広範な抗腫瘍効果を有することを示したが、代謝安定性は **1** と比較して劣っていた。そこで、arylthioureide 基を有する **103** が、*in vivo* で抗腫瘍効果を示したことに着目した。本 aryl 基を heteroaryl 基へと変換して誘導体の SlogP 値を減じることで、強力な細胞傷害活性を保持しながら、代謝安定性が改善することを期待して、heteroaryl 基を有する誘導体の合成を実施した。

### N-(Heteroaryl)thioureide 体 **104** および **106-109** の合成

7-Isothiocyanate 体 **79** の DMF 溶液に、対応する(heteroaryl)amine を添加して 80°C で一晩攪拌することで、N-heteroarylthioureide 体 **104** および **106-109** をそれぞれ収率 47%、63%、54%、49%、および 38% で得た。

**104** および **106-109** の構造は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  ( $M+H^+$ ) を観測し、<sup>1</sup>H-NMR にて、thiocarbamoyl 基由来の NH のピークや、導入した heteroaryl 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

**Table 2-12: Syntheses of **104** and **106-109****



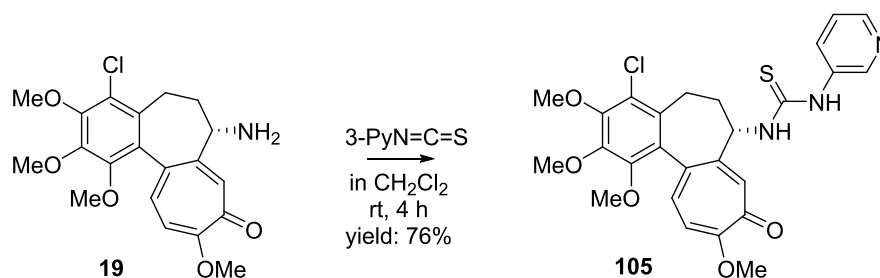
Product		Reagent <sup>a)</sup> (1.2 eq)	Yield (%)
No.	Ar		
<b>104</b>		2-Aminopyridine	47
<b>106</b>		4-Aminopyridine	63
<b>107</b>		3-Aminopyridazine	54
<b>108</b>		5-Aminopyrimidine	49
<b>109</b>		2-Aminopyrazine	38

a) Solvent: DMF. Condition: 80 °C, overnight.

### N-(Pyridin-3-yl)thioureide 体 105 の合成

Deacetyl 体 **19** の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液に、3-isothiocyanatopyridine を加えて室温下にて 4 時間攪拌することで、N-(pyridin-3-yl)thioureide 体 **105** を収率 76% で得た (Scheme 2-5)。

**105** の構造は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  528.1376 (M+H<sup>+</sup>) を観測し、<sup>1</sup>H-NMR にて、thiocarbamoyl 基由来の NH のピークや、導入した pyridin-3-yl 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。



**Scheme 2-5: Synthesis of 105**

### N-(Heteroaryl)thioureide 体 112 および 124 の合成

2-Aminothiazole あるいは 3-amino-5-methyl-1,2,4-triazole の MeCN 溶液に、1,1'-(thiocarbonyl)-diimidazole を加えて攪拌することで、imidazole-1-carbothioamide 体 **110** および **111** をそれぞれ収率 47% および 63% で得た<sup>61)</sup> (Table 2-13)。

**110** および **111** の構造は、それぞれ ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  211 (M+H<sup>+</sup>) および 209 (M+H<sup>+</sup>) を検出し、<sup>1</sup>H-NMR にて導入した imidazole のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

**Table 2-13: Syntheses of 110 and 111**

The reaction scheme shows the synthesis of **110** and **111**. An aromatic amine (ArNH<sub>2</sub>) reacts with 1,1'-(thiocarbonyl)-diimidazole (1 equivalent) in acetonitrile (MeCN) to form the corresponding imidazole-1-carbothioamide product (**110** or **111**).

Product		Condition	Yield (%)
No.	Ar		
<b>110</b>		40 °C, 2 h	47
<b>111</b>		rt, 2 h	63

ついで、deacetyl 体 **19** に **110** あるいは **111** を加えて加熱下、攪拌することで N-(thiazol-2-yl)-thioureide 体 **112** および N-(5-methyltriazol-2-yl) thioureide 体 **124** を、それぞれ収率 93% および 55% で得た<sup>61)</sup> (Table 2-14)。

**112** および **124** は、それぞれ HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  534.1058 ( $M+H^+$ ) および 532.1414 ( $M+H^+$ ) が検出され、 $^1H$ -NMR にて thioureide 基の NH のピークや、導入した heteroaryl 基のシグナルが合理的に観測されたことから、その構造を確認した。

**Table 2-14: Syntheses of 112 and 124**

Product		Reagent (1.1 eq)	Solvent	Condition	Yield (%)
No.	Ar				
<b>112</b>		<b>110</b>	MeCN	reflux, 1 h	93
<b>124</b>		<b>111</b>	DMF	60 °C, 2 h	55

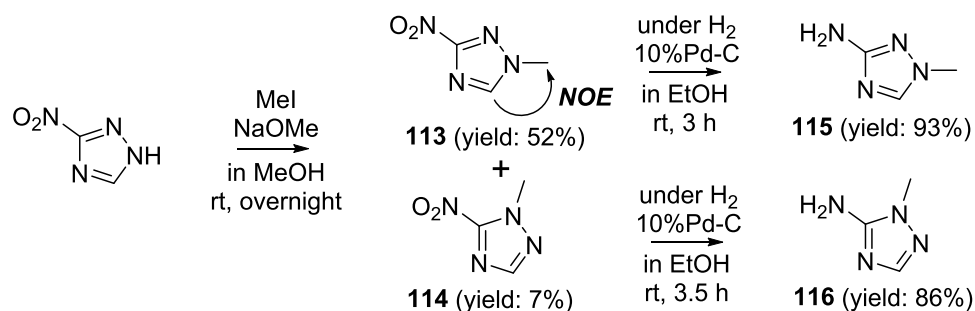
#### *N*-(Heteroaryl)thioureide 体 **117-119** および **121-123** の合成

3-Nitro-1,2,4-triazole の MeOH 溶液に、NaOMe および MeI を加えて室温下、一晩攪拌することで *N*-methyl 化した後、シリカゲルカラムにて精製することで、1-methyl-3-nitrotriazole (**113**) および 2-methyl-3-nitrotriazole (**114**) をそれぞれ収率 52% および 7% で単離した (Scheme 2-6)。

**113** および **114** の構造は、ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  129 ( $M+H^+$ ) を検出し、 $^1H$ -NMR にて *N*-methyl 基のシグナルを **113** では  $\delta$ 4.02 に、**114** では  $\delta$ 4.16 に観測したこと、**113** の triazole 環上の proton と *N*-methyl 基に NOE が観測されたことから確認した。この *N*-methyl 基のケミカルシフトは、文献報告 ( $\delta$ 4.03 および  $\delta$ 4.18) と良い一致を示した<sup>62)</sup>。

ついで、**113** あるいは **114** の EtOH 溶液に 10%Pd-C を加え、水素雰囲気下、室温にて攪拌することで、aminotriazole 体 **115** および **116** をそれぞれ収率 93% および 86% で得た (Scheme 2-6)。

**115** および **116** は、ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  99 ( $M+H^+$ ) を検出し、 $^1H$ -NMR にて新たに NH<sub>2</sub> 基のピークを観測したことから、その構造を確認した。



**Scheme 2-6: Syntheses of 115 and 116**

7-Isothiocyanate 体 **79** の DMF 溶液に、それぞれ対応する(heteroaryl)amine 類を加えて、加熱下にて攪拌することで、*N*-(heteroaryl)thioureide 体 **117-119** および **121-123** をそれぞれ収率 66%、72%、96%、31%、66%、および 57% で得た (Table 2-15)。

**117-119** および **121-123** の構造は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  ( $M+H^+$ ) をそれぞれ検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて thiourea 基の NH のピークや、導入した heteroaryl 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

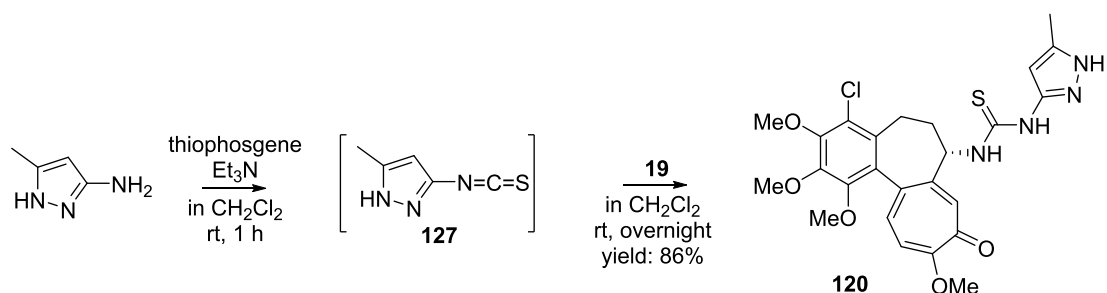
**Table 2-15: Syntheses of 117-119 and 121-123**

Product		Reagent	Solvent	Condition	Yield (%)
No.	Ar				
<b>117</b>		2-amino-4-methylthiazole (2 eq)	DMF	100 °C overnight	66
<b>118</b>		3-aminopyrazole (2 eq)	DMF	100 °C overnight	72
<b>119</b>		3-amino-1-methylpyrazole (2 eq)	DMF	100 °C overnight	96
<b>121</b>		3-aminotriazole (1.2 eq)	DMF	80 °C 2 h	31
<b>122</b>		<b>115</b> (1.2 eq)	DMF	80 °C overnight	66
<b>123</b>		<b>116</b> (1.2 eq)	DMF	80 °C overnight	57

#### *N*-(5-Methylpyrazol-3-yl)thioureide 体 **120** の合成

3-Amino-5-methylpyrazole の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に thiophosgene を加えて、室温にて 1 時間攪拌することで、3-isothiocyanatopyrazole 体 **127** を調製した。本調製液に、**19** を加えてさらに一晩攪拌することで、*N*-(5-methylpyrazol-3-yl)thioureide 体 **120** を収率 86% で得た。

**120** の構造は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  531.1613 ( $M+H^+$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて thioureide 基の NH のピークや、導入した 5-methylpyrazole 基のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

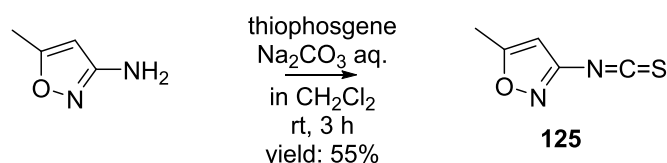


**Scheme 2-7: Synthesis of 120**

### *N*-(5-Methylisoxazol-3-yl)thiourea 体 126 の合成

3-Amino-5-methylisoxazole の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液および thiophosgene を加えて、室温にて 3 時間攪拌することで 3-(isothiocyanato)isoxazole 体 125 を収率 55% で得た (Scheme 2-8)。

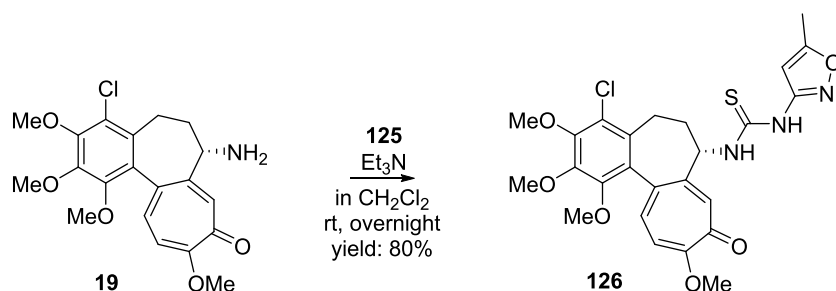
125 の構造は、ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  141 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて  $\text{NH}_2$  基のピークが消失していたことから確認した。



**Scheme 2-8: Synthesis of 125**

ついで、deacetyl 体 19 の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、 $\text{Et}_3\text{N}$  および 125 を加えて室温下、一晩攪拌することで *N*-(5-methylisoxazol-3-yl)thiourea 体 126 を収率 80% で得た (Scheme 2-9)。

126 の構造は、ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  532.1328 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) を検出し、 $^1\text{H-NMR}$  にて thiourea の  $\text{NH}$  基のピークや、導入した methylisoxazole のシグナルを合理的に観測したことから確認した。

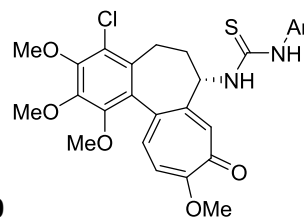


**Scheme 2-9: Synthesis of 126**

### 7 位に(heteroaryl)thiourea 型側鎖を有する誘導体の細胞傷害活性

7 位に(heteroaryl)thiourea 型側鎖を有する 4-chlorocolchicine 類の細胞傷害活性を示した (Table 2-16 and 2-17)。

ヘテロ芳香族 6 員環化合物 **104-109** は、phenyl 基を有する **103** と比較して脂溶性 (SlogP 値) は改善したものの、細胞傷害活性は減弱傾向にあった (Table 2-10 参照)。



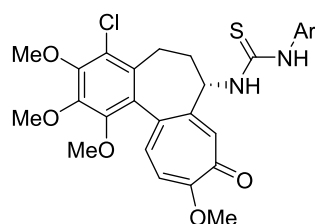
**Table 2-16: Cytotoxicities, and SlogP values of 104-109**

Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			SlogP <sup>a)</sup>
No.	Ar	A549	HT-29	HCT116	
<b>104</b>		170	34.6	61.7	4.48
<b>105</b>		186	31.6	41.7	4.48
<b>106</b>		247	23.5	34.1	3.90
<b>107</b>		39.6	6.3	13.2	3.88
<b>108</b>		941	154	177	3.88
<b>109</b>		37.4	19.4	33.0	3.88

a) Estimated by MOE.

次に、ヘテロ芳香族 5 員環である thiazole 体 **112** を合成し、その活性を確認したところ、**103** と同等の細胞傷害活性を有することが分かった (Table 2-10 参照)。そのため、様々なヘテロ芳香族 5 員環を合成し、その細胞傷害活性を確認したところ、化合物 **123** 以外の全ての化合物が強力な殺細胞効果を有することが明らかとなった。特に、3-pyrazolylthioureide 体 **118**、5-methyl-3-pyrazolylthioureide 体 **120**、3-triazolylthioureide 体 **121**、および 5-methyl-3-triazolylthioureide 体 **124** は、評価に用いた 3 細胞株のうち、2 株以上で sub-nanomole オーダーの極めて強力な細胞傷害活性を示した。その中で、**120** は HCT116 に対する細胞傷害活性が、本研究にて合成した誘導体中で最も強く、かつ colchicine (**1**) と同等の代謝安定性を有していた。

Table 2-17: Cytotoxicities, SlogP values, and metabolic stabilities of 112, 117-124, and 126



Compound		IC <sub>50</sub> value (nM)			SlogP <sup>a)</sup>	CL <sub>int</sub> <sup>b)</sup>
No.	Ar	A549	HT-29	HCT116		(mL/min/mg)
112		10.1	1.1	6.5	4.55	NT
117		7.6	<b>0.4</b>	2.4	4.85	NT
118		7.8	<b>0.3</b>	<b>0.9</b>	3.81	0.188
119		5.8	<b>0.7</b>	1.3	4.18	0.037
120		2.0	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	4.12	<b>0.004</b>
121		<b>0.5</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>	3.21	0.088
122		34.8	6.0	8.8	3.58	NT
123		40.3	18.0	33.9	3.58	NT
124		1.7	<b>0.3</b>	<b>0.5</b>	3.52	0.233
126		42.5	5.6	7.3	4.39	NT

a) Estimated by MOE. b) Hepatic intrinsic clearance.

ヘテロ芳香族 5 員環を有する thiourea 型誘導体が、非常に強力な細胞傷害活性を示す理由を推測するために、**120** を用いて *in silico* によるドッキング解析を実施した (Figure 2-3)。

5-Methyl-3-pyrazolyl- thioureide 体 **120** は、ethylthioureide 体 **82** の場合 (Figure 2-2 参照) と同様に、C-7 thioureide 基と C-9 carbonyl 基が水素結合を介して、tubulin  $\alpha$ -subunit の Thr179 残基および  $\beta$ -subunit の Lys254 と相互作用していることに加えて、**120** の pyrazole 環と tubulin  $\beta$ -subunit の Asn258 が CH- $\pi$  相互作用していることが示唆された。この CH- $\pi$  相互作用の存在が、ヘテロ芳香族 5 員環を有する thiourea 型誘導体が高活性を示す要因と推測している。



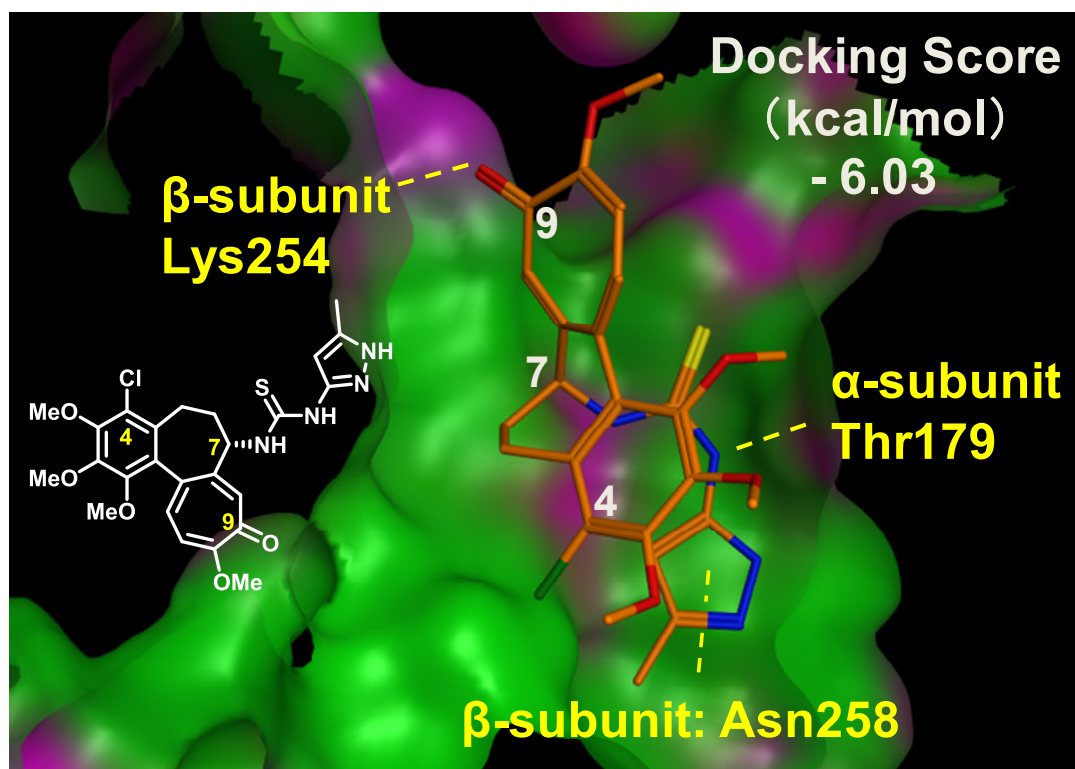


Figure 2-3: Docking mode of thiourea (120) at the colchicine binding site of tubulin (green: hydrophobic regions and pink: polar regions)

## 第七節 Tubulin 重合阻害活性

強力かつ広範な抗腫瘍効果を示した **82**、HCT116 に対して最も強い細胞傷害活性を示し、**1** と同等の代謝安定性を有する **120** の tubulin 重合阻害活性を評価した (Figures 2-4 and 2-5)。Amide 型誘導体と同様に、両誘導体とも濃度依存的、かつ **1** よりも強力に tubulin の重合を阻害すること、殺細胞効果の作用機序は **1** と同様であることが分かった。Tubulin は細胞分裂において重要な役割を担っているため、tubulin 阻害活性と細胞傷害活性の強弱は、パラレルになる場合が多い<sup>9)</sup>。それらから想定したように、sub-nanomole オーダーの強力な細胞傷害活性を示した **120** の tubulin 重合阻害活性は、amide 型誘導体も含めて本研究にて評価した誘導体の中で最も強かった。

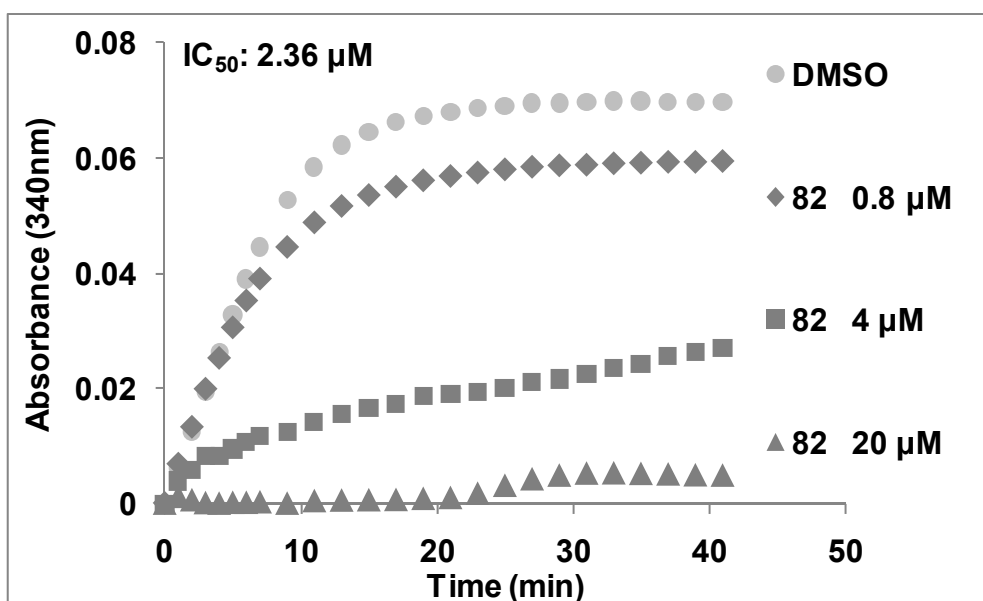


Figure 2-4: Inhibition of tubulin assembly by 82

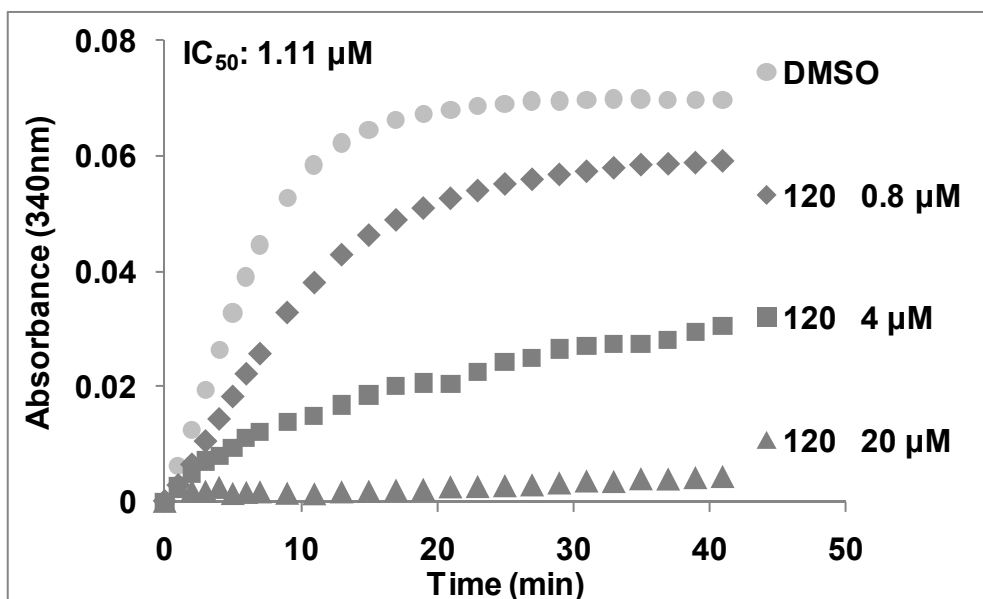


Figure 2-5: Inhibition of tubulin assembly by 120

以上、7位に非天然型の側鎖を有する誘導体の合成を実施し、thioureide 基の末端に ethyl 基を有する誘導体 **82** は強力かつ広範な抗腫瘍活性を有し、その ethyl 基を 5-methyl-3-pyrazole 基へと変換した誘導体 **120** は、HCT116 に対して最も強い細胞傷害活性と良好な代謝安定性を有することを明らかにした。7位に非天然型側鎖を有する誘導体の中から、thioureide 型側鎖を有する誘導体に抗腫瘍薬として有望な化合物を見出すことに成功した。

### 第三章 Liposome を用いた DDS 化研究

序論にて記述した様に、近年、liposome 製剤のアクティブ・ターゲティングに関する研究がなされている。これは、腫瘍細胞膜上に特異的に発現している受容体を認識する分子を、liposome 表面に修飾することで、EPR 効果による腫瘍集積性に加えて、受容体を介したエンドサイトーシスにより、liposome 製剤を細胞内部へと積極的に導こうというものである<sup>32)</sup>。

ソマトスタチンレセプター (SSTR) は、7 回膜貫通型 G タンパク質共役型レセプター (GPCR) の一種でホルモン分泌の制御に関与しており、5 つのサブタイプ (SSTR1~5) が存在し、甲状腺髄様癌の様な神経内分泌腫瘍に高発現していることが知られている<sup>63)</sup>。この SSTR に対して選択的に結合する化合物として octreotide が存在し、特に SSTR2 および SSTR5 に対する選択性が高いことが報告されている<sup>63)</sup>。

2011 年に、この octreotide を liposome 表面に修飾する戦略が報告された<sup>64)</sup>。抗がん剤である CPT-11 を liposome に封入した後、liposome 表面に、octreotide を PEG の末端に結合させた Oct-PEG-DSPE を修飾することで、SSTR を高発現している甲状腺髄様癌細胞株 TT への選択性が向上し、CPT-11 単独での効果を上回る抗腫瘍活性が認められている (Figure 3-1)。

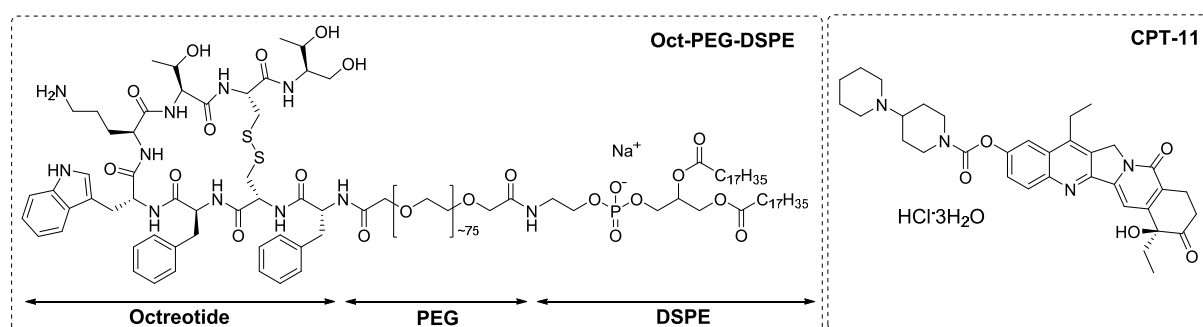


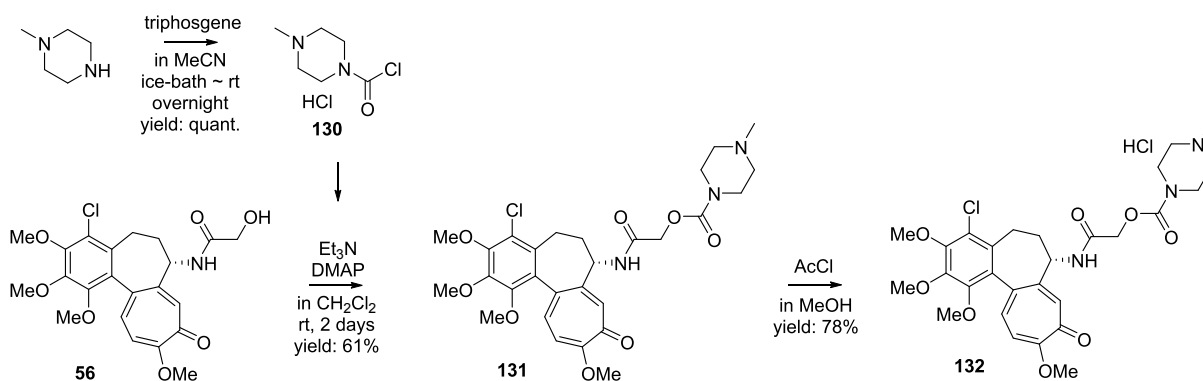
Figure 3-1: Chemical structures of Oct-PEG-DSPE and CPT-11

そこで、より広範かつ強かに抗腫瘍効果を発揮する薬剤の獲得を目指して、アクティブ・ターゲティングとして Oct-PEG-DSPE を付与した liposome を利用した colchicine 誘導体の製剤化を試みた。

#### 56 を用いた liposome 製剤化の検討

Colchicine 誘導体として、強力かつ広範な抗腫瘍活性および良好な代謝安定性を有する化合物 56 を用いて、liposome 製剤を調製することを検討した。56 は中性化合物であり電荷を持たないため、56 を高濃度に liposome 内部へと誘導することは出来ない。そこで、Bangham 法により、liposome の脂質二重膜中に 56 を組み込むことを試みた<sup>65)</sup>。しかし、調製した liposome 製剤は不安定であり、56 が膜外へと容易に漏出することが明らかとなった (Figure 3-2)。この傾向は、脂質二重膜を形成するリン脂質およびコレステロールの組成や種類を変更しても改善することはなかった。



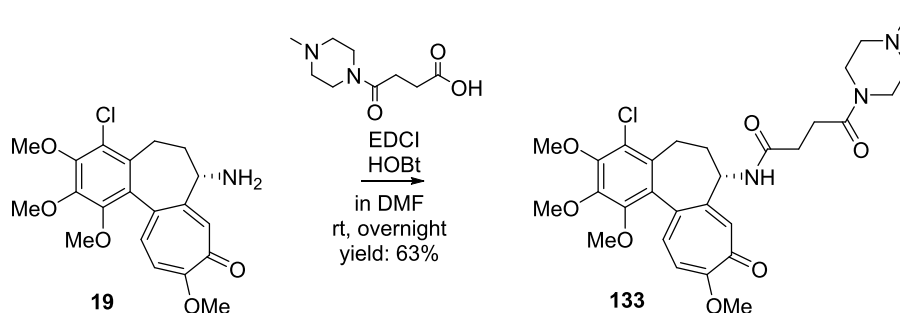


**Scheme 3-2: Syntheses of 131 and 132**

遊離塩基体 **131** および塩酸塩 **132** の細胞傷害活性を評価した (Table 3-1)。**131** と **132** は同程度の細胞傷害活性を示し、親化合物である **56** の活性と比較すると 1/5 程度に減弱していた (Table 1-17 参照)。また、**131** の carbamate 部位の酸素原子を methylene へと置き換えた amide 化合物 **133** を合成して活性を確認すると、**131** よりもさらに 1 オーダー低い IC<sub>50</sub> 値を示した。

なお、**133** は、4-(4-methylpiperazin-1-yl)-4-oxobutanoic acid の DMF 溶液に、EDCI、HOBt および **19** を加えることで、収率 63% で得た (Scheme 3-3)。

**133** の構造は、HR-ESI-MS にて分子イオンピーク  $m/z$  574.2317 ( $M+H^+$ ) を検出し、<sup>1</sup>H-NMR にて、amide 由来の NH 基や、導入した側鎖のシグナルを合理的に観測したことから確認した。



**Scheme 3-3: Synthesis of 133**

**Table 3-1: Cytotoxicities of 131-133**

Compound No.	IC <sub>50</sub> value (nM)		
	A549	HT-29	HCT116
<b>131</b>	191	84.3	64.4
<b>132</b>	161	24.8	39.7
<b>133</b>	1150	264	726

これまでの検討から、4-chlorocolchicine 類の 7 位側鎖を伸長すると活性に減弱が認められること、塩基性 amino 基を導入した **48** の IC<sub>50</sub> 値は数百 nM であることが分かっている (Table 1-17 参照)。これらの知見および **133** の活性値から鑑みると、**131** および **132** の細胞傷害活性は想定以上に強い。そのため、**132** は pro-drug であり、腫瘍細胞内に存在する酵素により carbamate 結合が

徐々に切断されて、親化合物である **56** へと変換されているのではないかと推測している。しかしながら、ヒトカルボキシエステラーゼ、マウス肝ミクロソーム、およびマウス血漿を用いた検討からは、**132** の carbamate 結合が酵素的に切断されて **56** が生成しているという明確な証拠は得られなかった。**132** は pro-drug であるのか、あるいは活性本体であるのかに関しては、さらなる検討が必要である。

### 132 を用いた liposome 製剤の調製

**132** は、数十 nM の IC<sub>50</sub> 値にて殺細胞活性を示していたため、このものの liposome 製剤の調製を検討した。

Cation 性の colchicine 誘導体 **132** を liposome 内部へと導くために、anion 性の中空 liposome である COATSOME EL-01-A (日油製) を用いた。COATSOME EL-01-A に、**132** の水溶液を加えて振り混ぜることで、**132** を liposome 内部へと誘導した後 (**L1**)、本溶液に Oct-PEG-DSPE (神戸天然物化学製) の水溶液を添加し、COATSOME EL-01-A の相転移温度である 40°C よりも高温で静置することで、liposome 表面に Octreotide を修飾した (**L2**)。この操作を、Oct-PEG-DSPE 濃度を変化させて行うことで、liposome の脂質量に対して、1.6、3、および 6 mol% 量の octreotide を liposome 表面に修飾した。また、Oct-PEG-DSPE の代わりに、PEG<sub>2000</sub>-DSPE を用いることで、PEG を liposome 表面に修飾した **L3** を調製した (Figure 3-3)。

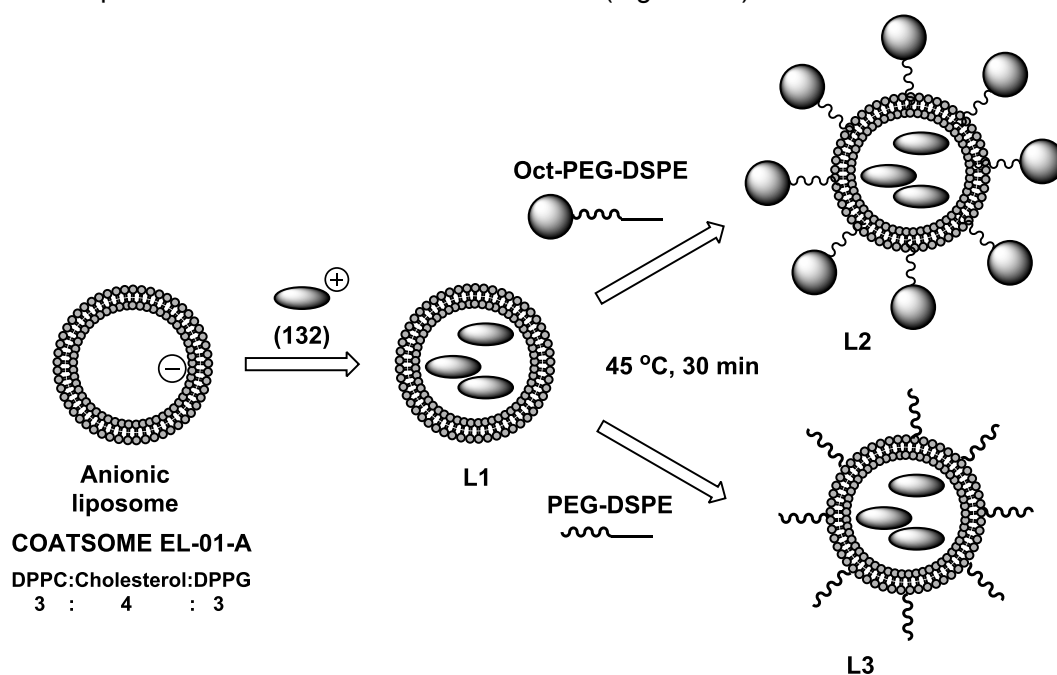


Figure 3-3: Preparation of L2 and L3

### Liposome 製剤の物性値および安定性

調製した liposome 製剤の物性値を示した (Table 3-2)。6 mol%Oct **L2-0** は、**132** を封入していない空の liposome に、octreotide を 6mol%修飾したものである。いずれの liposome 製剤も、EPR 効果による腫瘍集積性や、肝臓や脾臓などの細網内皮系 (RES) における捕獲からの回避に有効である平均粒子径 200 nm 以下を満たしていた<sup>67)</sup>。また、**L2** 上の octreotide 量は、市販の octreotide 定量キット (Peninsula Laboratories 製) を用いて、所定の量が修飾されていることを確認した。

**Table 3-2: Physical properties of L2 and L3**

Liposome <sup>a)</sup> No.	<b>132</b> <sup>b)</sup> (mg/mL)	Mean diameter (nm)	Polydispersity	Zeta-potential (mV)
1.6mol%Oct <b>L2</b>	0.69	53.9	0.33	-53.5
3 mol%Oct <b>L2</b>	0.55	75.8	0.28	-60.3
6 mol%Oct <b>L2</b>	0.70	103.7	0.22	-54.3
1.6 mol%PEG <b>L3</b>	0.63	75.6	0.26	-59.4
3 mol%PEG <b>L3</b>	0.60	115.6	0.20	-53.1
6 mol%PEG <b>L3</b>	0.67	101.7	0.41	-67.0
6 mol%Oct <b>L2-0</b>	0.00	148.3	0.16	-41.5

a) A given amount of octreotide was existed on liposome. b) Concentration of **132** in liposome.

これらの liposome 製剤の、遮光下、冷蔵保存における安定性を、liposome 外部に漏出する **132** を定量することで確認した (Table 3-3)。Oct-PEG-DSPE を修飾した liposome 製剤 (**L2**)、および PEG<sub>2000</sub>-DSPE を修飾した liposome 製剤 (**L3**) とともに安定であり、封入した **132** が liposome の外側に経時的に漏出することは認められなかった。これらの liposome 製剤は、遮光下、冷蔵保存において、少なくとも 2 ヶ月は安定であることが分かった。**56** に電荷を付与した誘導体 **132** を用いることで、安定な liposome 製剤を調製することが可能となった。

**Table 3-3: Stabilities of L2 and L3**

Liposome No.	Concentration of <b>132</b> (mg/mL) <sup>a)</sup>			
	Initial	2 months	4 months	6 months
1.6mol%Oct <b>L2</b>	0.013	0.014	NT <sup>b)</sup>	0.011
3 mol%Oct <b>L2</b>	0.007	NT	0.012	NT
6 mol%Oct <b>L2</b>	0.006	0.005	NT	NT
1.6 mol%PEG <b>L3</b>	0.012	0.019	NT	0.017
3 mol%PEG <b>L3</b>	0.010	NT	0.004	NT
6 mol%PEG <b>L3</b>	0.031	0.016	NT	NT

Storage condition: 5 °C in the dark. a) Concentration of **132** existing outside of liposome. b) Not tested.



### Liposome 製剤の細胞傷害活性

Octreotide は SSTR ファミリーのうち、SSTR2 および SSTR5 に選択的に結合する<sup>63)</sup>。甲状腺髄様癌株 TT と共に、各種ヒト腫瘍細胞株 (HCT116, MIA Paca-2, NCI-H460, HCC1806) の SSTR2 および SSTR5 の発現量を確認した (Figures 3-4 and 3-5)。

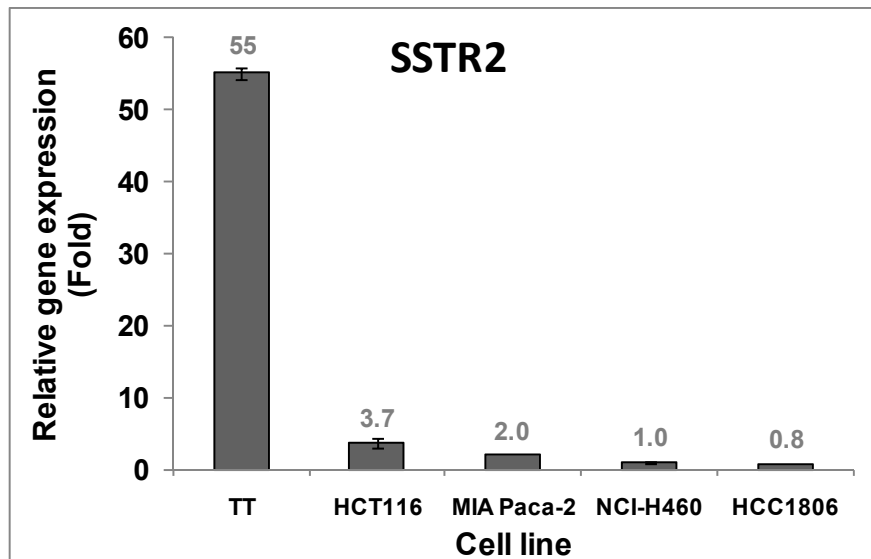


Figure 3-4: Relative expression level of SSTR2

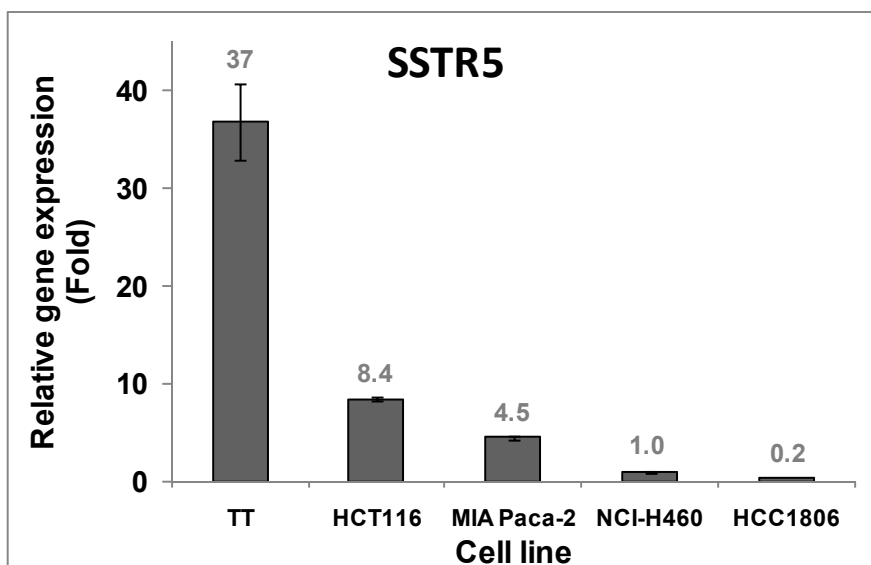


Figure 3-5: Relative expression level of SSTR5

文献報告と同様に、TT 細胞の SSTR2 および SSTR5 の発現量が、他の細胞株と比較して非常に高かった<sup>63)</sup>。これらの中から、SSTR2 および SSTR 5 の高発現株として TT および HCT116、低発現株としてヒト肺大細胞癌細胞株である NCI-H460 およびヒト乳癌細胞株である HCC1806 を選択して、liposome 製剤の細胞傷害活性を確認した (Table 3-4)。

Octreotide を修飾した **L2** において、octreotide 量に比例して、SSTR 高発現株に対する細胞傷害活性が向上する (SSTR 低発現株に対しては活性が変化しない) ことを期待したが、**L2** は SSTR2 および 5 低発現株はもとより、高発現株に対しても **132** 単独や **L3** の細胞傷害活性を上回ることはなかった。空リポソームである **L2-0** は全く活性を示さなかったことから、**L2** や **L3** の細胞傷害活性は **132** の殺細胞作用に基づくものと判断した。

**Table 3-4: Cytotoxicities of L2, L3, and L2-0**

Agent No.	IC <sub>50</sub> value (nM)			
	SSTR2/5 high expression		SSTR2/5 low expression	
	TT	HCT116	NCI-H460	HCC1806
<b>132</b>	504	102	439	74.8
1.6 mol%Oct <b>L2</b>	660	403	666	107
3 mol%Oct <b>L2</b>	511	366	591	78.9
6 mol%Oct <b>L2</b>	981	549	973	119
1.6 mol%PEG <b>L3</b>	322	109	488	91.1
3 mol% PEG <b>L3</b>	602	173	567	89.6
6 mol% PEG <b>L3</b>	302	104	411	72.2
6 mol%Oct <b>L2-0</b>	- <sup>a)</sup>	-	-	-

a) IC<sub>50</sub> value could not be determined. (inactive.)

Octreotide を修飾した liposome 製剤の報告では、octreotide 濃度が liposome の脂質量に対して 1.4 mol%以上で TT 細胞への薬剤の取り込み量の増加が認められている<sup>64)</sup>。また、**L2** に所定量の octreotide が修飾されていることは、市販の octreotide 定量キットを用いて確認している。そのため、3 mol% Oct **L2** および 6 mol% Oct **L2** の TT に対する細胞傷害活性に、増強が認められなかった理由として、liposome 製剤がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる前に、liposome が崩壊して **132** が放出されていることや、liposome 膜と腫瘍細胞膜が融合することで細胞内へ **132** が放出されている可能性が考えられる。

今後は、liposome に用いる脂質の種類および組成の変更や、リモート・ローディングに pH 勾配を利用した方法を試みることで、生体試料の存在下における liposome 製剤の安定化を図り、アクティブ・ターゲティング戦略の可能性を探っていく計画である。

## 結 語

Colchicine は、*Colchicum autumnale* (Liliaceae) の塊根エキスに多く含まれ、痛風の治療薬として古くから用いられてきた。一方で、tubulin に結合し微小管の形成を阻害することで細胞分裂を抑制することから、抗腫瘍薬としての応用が期待されている。しかし、有効域が狭く、毒性域との乖離が不十分なため、未だ抗腫瘍薬としての実用化には至っていない。そこで、広範な有効域を有する誘導体の獲得を目的に、colchicine の構造活性相関研究およびアクティブ・ターゲティングの機能を付与した liposome を用いた製剤化の研究を行い、以下の知見を得た。

Colchicine の 4 位に置換基を有する誘導体の合成を行い、その生物活性を評価したところ、4 位の置換基は Cl 基が最適であることが判明した。つぎに、colchicine の 4 位を Cl 基に固定して 7 位 amide 側鎖の変換体を種々合成し、それらの生物活性を評価した結果、 $\alpha$ -hydroxyalkanamide 基を有する誘導体が強力な細胞傷害活性と好ましい代謝安定性を併せ持つことが明らかとなった。これらの tubulin 重合阻害活性を確認したところ、colchicine よりも強力な阻害活性を有していた。また、*In vivo* における抗腫瘍効果の検討から、これらの誘導体が強力かつ広範な有効域を有することを明らかにし、抗腫瘍薬として有望な化合物を見出した。(第一章)

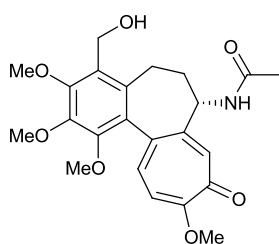
4-Chlorocolchicine の 7 位に非天然型側鎖を有する誘導体の合成を行い、その生物活性を評価した。側鎖に thioureide 基を有する誘導体が強い細胞傷害活性を有することが分かり、その効果は thioureide-NH 基と tubulin の水素結合を介した相互作用に基づくことが示唆された。それらの中で、thioureide 側鎖の末端に ethyl 基を有する誘導体は広範な抗腫瘍効果を有していた。また、末端に 5-methyl-3-pyrazole を有する誘導体は HCT116 に対して最も強い細胞傷害活性を示し、かつ良好な代謝安定性を併せ持つことを明らかにした。これらの tubulin 重合阻害活性を確認したところ、5-methyl-3-pyrazole 体が最も強力な阻害効果を有することが分かった。7 位に非天然型側鎖を有する誘導体からも、抗腫瘍薬として有望な化合物を見出した。(第二章)

より広範な有効域を有する薬剤の獲得を目指して、liposome を用いた colchicine 誘導体の製剤化の検討を行った。その結果、4-chlorocolchicine 誘導体に電荷を有する官能基を導入することにより、水溶液中で安定な liposome 製剤を調製することが可能となった。(第三章)



## 第一章付属実験

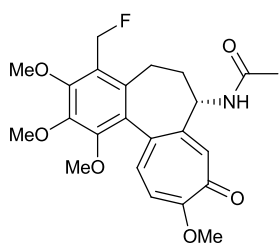
### Synthesis of 4-(hydroxymethyl)colchicine (5)



A mixture of 4-formylcolchicine (**4**) (100 mg, 0.23 mmol) and NaBH<sub>4</sub> (13 mg, 0.35 mmol) in MeOH (2.5 mL) was stirred at ambient temperature under argon atmosphere for 3 h. Acetone was added to the reaction mixture and the whole mixture was stirred for 30 min at ambient temperature. After adding water, the whole mixture extracted two times with CHCl<sub>3</sub>. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **5** (74 mg, 0.17 mmol, 74% yield) as an off-white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -130.84 ° (*c* = 0.425, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.55 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.11 (1H, s), 7.09 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.87 (1H, t, *J* = 5.1 Hz), 4.54 (1H, dd, *J* = 11.3, 4.4 Hz), 4.47 (1H, dd, *J* = 11.3, 5.9 Hz), 4.31-4.24 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.00 (1H, dd, *J* = 12.6, 4.5 Hz), 2.10-1.95 (2H, m), 1.85 (3H, s), 1.81-1.73 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 430.1866; found, 430.1858.

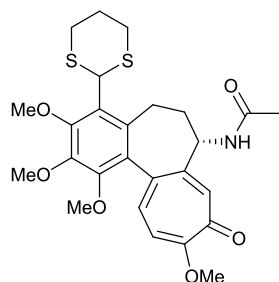
### Synthesis of 4-(fluoromethyl)colchicine (6)



To a stirred solution of 4-(hydroxymethyl)colchicine (**5**) (30 mg, 0.070 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was added DAST (11 μL, 0.084 mmol) at 0 °C under argon atmosphere. After stirring 2 h at 0 °C, the reaction mixture was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **6** (19 mg, 0.044 mmol, 63% yield) as an off-white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -140.76 ° (*c* = 0.157, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.60 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 5.49 (2H, d, *J* = 48.5 Hz), 4.28-4.21 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.54 (3H, s), 2.93 (1H, dd, *J* = 13.9, 4.6 Hz), 2.13-1.94 (2H, m), 1.86-1.77 (1H, m), 1.85 (3H, s). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>FNO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 432.1822; found, 432.1826.

### Synthesis of 4-(1,3-dithian-2-yl)colchicine (7)

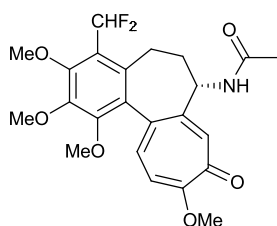


To a stirred solution of 4-formylcolchicine (**4**) (250 mg, 0.59 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (6 mL) were added 1,3-propanedithiol (70 μL, 0.70 mmol) and iodine (15 mg, 0.059 mmol) at ambient temperature under argon atmosphere. After stirring overnight at ambient temperature, 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> aq. and saturated NaHCO<sub>3</sub> aq. were added to the reaction mixture and the whole mixture was extracted two times with CHCl<sub>3</sub>. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under

reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **7** (224 mg, 0.43 mmol, 74% yield) as an amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -94.32 ° (*c* = 0.469, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.58 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.08 (1H, s), 7.05 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 6.99 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.94-3.89 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.18-3.09 (2H, m), 2.94-2.85 (2H, m), 2.19-2.01 (3H, m), 1.88-1.80 (2H, m), 1.86 (3H, s), 1.73-1.63 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>6</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 518.1671; found, 518.1719.

### Synthesis of 4-(difluoromethyl)colchicine (**8**)

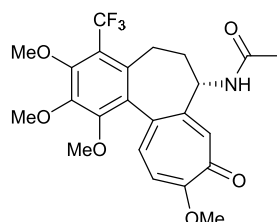


A solution of 4-(1,3-dithian-2-yl)colchicine (**7**) (50 mg, 0.097 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was slowly added to a mixture of NIS (87 mg, 0.39 mmol) and HF·pyridine (HF:65%, 119 mg, 3.9 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) at -78 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight and allowed to warm to ambient temperature during the course of the reaction.

After adding 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> aq., the mixture was stirred for 10 min at ambient temperature followed by addition of NaHCO<sub>3</sub> aq. The whole mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> aq, 0.1 mol/L HCl and then brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in MeOH (2 mL). NaBH<sub>4</sub> (2 mg, 0.048 mmol) was added to the solution, and the reaction mixture was stirred for 30 min at ambient temperature under argon atmosphere. The reaction was quenched with acetone followed by addition of CHCl<sub>3</sub>. The whole mixture was washed with H<sub>2</sub>O, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **8** (30 mg, 0.067 mmol, 70% yield) as a white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -31.24 ° (*c* = 0.120, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.62 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.25 (1H, t, *J* = 54.0 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 7.10 (1H, s), 7.03 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.28-4.21 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.56 (3H, s), 3.11 (1H, dd, *J* = 13.7, 4.9 Hz), 2.17-2.08 (1H, m), 1.99-1.91 (1H, m), 1.87-1.80 (1H, m), 1.86 (3H, s). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 450.1728; found, 450.1736.

### Synthesis of 4-(trifluoromethyl)colchicine (**13**)

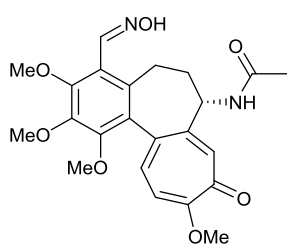


A mixture of 4-iodocolchicine (**12**) (50 mg, 0.095 mmol), CuI (9.1 mg, 0.048 mmol) and FSO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe (55 mg, 0.29 mmol) in NMP (1 mL) was stirred overnight at 120 °C under argon atmosphere in a sealed tube. Water was added to the mixture and the whole mixture was extracted two times with CHCl<sub>3</sub>. The combined organic layers were washed with brine,

dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **13** (30 mg, 0.065 mmol, 68% yield) as an off-white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -95.57 ° ( $c = 0.212$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.62 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.11 (1H, d,  $J = 11.1$  Hz), 7.09 (1H, s), 7.02 (1H, d,  $J = 11.1$  Hz), 4.29-4.23 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.57 (3H, s), 2.97 (1H, dd,  $J = 14.7, 5.3$  Hz), 2.22-2.12 (1H, m), 1.99-1.89 (1H, m), 1.87 (3H, s), 1.86-1.77 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{NO}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 468.1634; found, 468.1634.

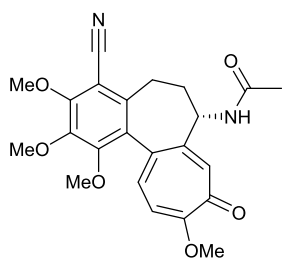
### Synthesis of 4-((hydroxyimino)methyl)colchicine (15)



A solution of 4-formylcolchicine (**4**) (30 mg, 0.070 mmol) and  $\text{HONH}_2\cdot\text{HCl}$  (10 mg, 0.14 mmol) in pyridine (0.5 mL) was stirred overnight at ambient temperature. Water was added to the mixture and the whole mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford as compound **15** (23 mg, 0.052 mmol, 74% yield) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -92.52 ° ( $c = 0.209$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.27 (1H, s), 8.57 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 8.24 (1H, s), 7.11 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.10 (1H, s), 7.02 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.30-4.24 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.32-3.27 (1H, m), 2.05-1.94 (2H, m), 1.86 (3H, s), 1.77-1.71 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 443.1818; found, 443.1806.

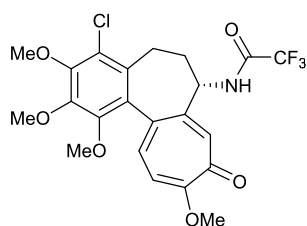
### Synthesis of 4-cyanocolchicine (16)



To a stirred solution of 4-((hydroxyimino)methyl)colchicine (**15**) (30 mg, 0.068 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added CDI (22 mg, 0.14 mmol) under argon atmosphere. After stirring overnight at room temperature, the reaction mixture was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **16** (24 mg, 0.056 mmol, 83% yield) as an off-white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -99.23 ° ( $c = 0.078$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 8.65 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.11 (1H, s), 7.11 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.28-4.21 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.63 (3H, s), 2.86 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.5$  Hz), 2.35-2.26 (1H, m), 2.09-1.99 (1H, m), 1.93-1.85 (1H, m), 1.86 (3H, s). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 425.1713; found, 425.1642.

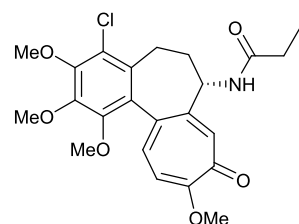
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(trifluoroacetyl)deacetylcolchicine (**20**)



A mixture of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and TFAA (38  $\mu$ L) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) was stirred at 0  $^\circ\text{C}$  under argon atmosphere for 30 min. Saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  was added to the reaction mixture and the whole mixture was extracted two times with  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **20** (56 mg, 0.12 mmol, 90% yield) as a white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-114.4^\circ$  ( $c = 0.250$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.64 (1H, br-s), 7.44 (1H, s), 7.34 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.34 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.64-4.58 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.31 (1H, dd,  $J = 13.8, 5.7$  Hz), 2.41-2.33 (1H, m), 2.20-2.17 (1H, m), 2.09-2.01 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}^{35}\text{ClF}_3\text{NO}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 488.1088; found, 488.1078; calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}^{37}\text{ClF}_3\text{NO}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 490.1058; found, 490.1090.

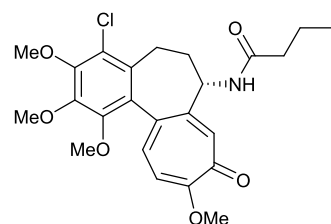
### Synthesis of 4-chloro-*N*-propionyldeacetylcolchicine (**21**)



To a stirred solution of **19** (5.54 g, 14.1 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 mL) were added  $\text{Et}_3\text{N}$  (2.1 mL, 15.5 mmol) and propionyl chloride (1.23 mL, 14.1 mmol) under argon atmosphere at 0  $^\circ\text{C}$ . After stirring for 2 h at room temperature, the reaction was quenched by adding  $\text{H}_2\text{O}$  and the whole mixture was extracted four times with  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **21** (6.33 g, 14.1 mmol, quant.) as an off-white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-119.5^\circ$  ( $c = 0.997$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.49 (1H, s), 7.30 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz), 6.85 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz), 4.57 (1H, ddd,  $J = 12.0, 6.1, 6.1$  Hz), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.24 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.0$  Hz), 2.34-2.23 (3H, overlapped), 2.15 (1H, ddd,  $J = 13.4, 13.4, 6.2$  Hz), 1.80 (1H, ddd,  $J = 11.9, 11.9, 5.9$  Hz), 1.10 (3H, dd,  $J = 7.6, 7.6$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}^{35}\text{ClNO}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 448.1527; found, 448.1509; calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}^{37}\text{ClNO}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 450.1497; found, 450.1497.

### Synthesis of *N*-butyryl-4-chlorodeacetylcolchicine (**22**)



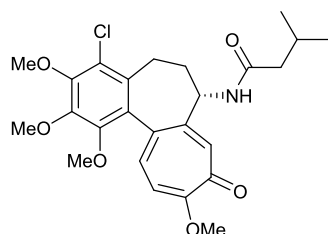
Compound **22** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and butyryl chloride (13  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Amorphous solid (52 mg, 0.11 mmol, 88% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-128.6^\circ$  ( $c = 0.391$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.52 (1H, s), 7.30 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.85 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.79 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 4.61-4.55 (1H,



m), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.25 (1H, dd,  $J = 12.8, 4.3$  Hz), 2.25-2.23 (2H, m), 2.21-2.14 (1H, m), 1.81-1.77 (1H, m), 1.70-1.58 (3H, m), 0.92 (3H, t,  $J = 7.4$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{24}H_{29}^{35}ClNO_6$   $[M+H]^+$ , 462.1683; found, 462.1696; calcd for  $C_{24}H_{29}^{37}ClNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 464.1654; found, 464.1693.

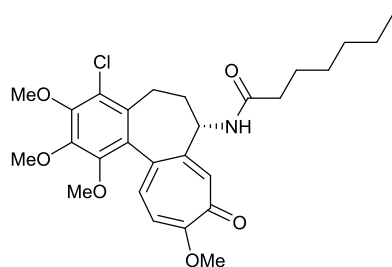
### Synthesis of 4-chloro-*N*-isovalerydeacetylcolchicine (23)



Compound **23** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and butyryl chloride (13  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Amorphous solid (57 mg, 0.12 mmol, 94% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-145.1^\circ$  ( $c = 0.300$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.47 (1H, s), 7.29 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.83 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.24 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 4.61-4.57 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.25 (1H, dd,  $J = 13.4, 4.4$  Hz), 2.27-2.04 (4H, m), 1.77-1.74 (2H, m), 0.95 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz), 0.92 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{25}H_{31}^{35}ClNO_6$   $[M+H]^+$ , 476.1840; found, 476.1834; calcd for  $C_{25}H_{31}^{37}ClNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 478.1810; found, 478.1840.

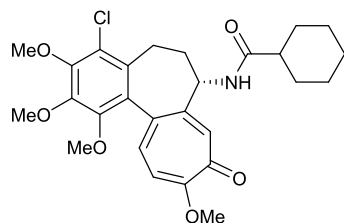
### Synthesis of 4-chloro-*N*-heptanoyldeacetylcolchicine (24)



Compound **24** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and heptanoyl chloride (20  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Amorphous solid (59 mg, 0.12 mmol, 92% yield).

$[\alpha]_D^{24}$ :  $-136.4^\circ$  ( $c = 0.460$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.48 (1H, s), 7.29 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.84 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.38 (1H, br-s), 4.58-4.55 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.25 (1H, dd,  $J = 12.6, 5.4$  Hz), 2.26-2.11 (2H, m), 1.78-1.75 (1H, m), 1.62-1.54 (2H, m), 1.29-1.27 (8H, m), 0.88-0.84 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{27}H_{35}^{35}ClNO_6$   $[M+H]^+$ , 504.2153; found, 504.2134; calcd for  $C_{27}H_{35}^{37}ClNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 506.2123; found, 506.2112.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(cyclohexanecarbonyl)deacetylcolchicine (25)

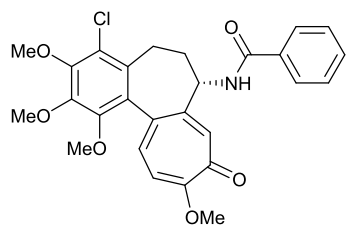


Compound **25** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and cyclohexanecarbonyl chloride (17  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. White solid (18 mg, 0.036 mmol, 28% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-144.2^\circ$  ( $c = 0.064$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.47 (1H, s), 7.29 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.83 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.23 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz), 4.58-4.52 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.25 (1H, dd,  $J = 12.8, 4.5$  Hz), 2.26-2.12 (3H, m), 1.94-1.90 (2H, m), 1.82-1.76 (1H, m), 1.66-1.63 (2H, m), 1.50-1.15 (6H, m). HR-ESI-MS:

calcd for  $C_{27}H_{33}^{35}ClNO_6$   $[M+H]^+$ , 502.1996; found, 502.1990; calcd for  $C_{27}H_{33}^{37}ClNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 504.1967; found, 504.1970.

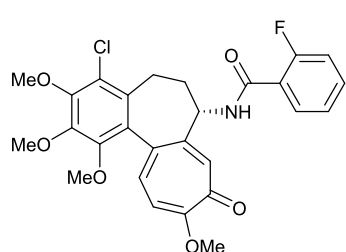
#### Synthesis of *N*-benzoyl-4-chlorodeacetylcolchicine (26)



Compound **26** was prepared from compound **19** (150 mg, 0.38 mmol) and benzoyl chloride (44  $\mu$ L, 0.38 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Amorphous solid (146 mg, 0.29 mmol, 77% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-53.3^\circ$  ( $c = 0.324$ , MeOH). CD (MeOH,  $19^\circ\text{C}$ ,  $c = 0.26$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (373),  $-8.03$  (335),  $-3.79$  (286),  $-13.92$  (264), 0 (252), 21.60 (229), 11.54 (211), 22.34 (203).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.80-7.79 (2H, m), 7.63 (1H, s), 7.49-7.47 (1H, m), 7.41-7.37 (2H, m), 7.35 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.93 (1H, br-s), 6.88 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.80-4.78 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.2$  Hz), 2.37-2.32 (1H, m), 2.25-2.22 (1H, m), 1.98-1.94 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{27}H_{27}^{35}ClNO_6$   $[M+H]^+$ , 496.1527; found, 496.1517; calcd for  $C_{27}H_{27}^{37}ClNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 498.1497; found, 498.1507.

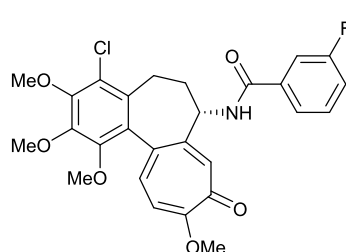
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-fluorobenzoyl)deacetylcolchicine (27)



Compound **27** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 2-fluorobenzoyl chloride (15  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Yellow-brown solid (46 mg, 0.090 mmol, 70% yield).

$[\alpha]_D^{24}$ :  $-54.2^\circ$  ( $c = 0.137$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.96-7.94 (1H, m), 7.55 (1H, s), 7.52-7.48 (1H, m), 7.33 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.26-7.14 (3H, m), 6.85 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.79-4.73 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.01 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.2$  Hz), 2.42-2.32 (1H, m), 2.27-2.21 (1H, m), 1.95-1.87 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{27}H_{26}^{35}ClFNO_6$   $[M+H]^+$ , 514.1433; found, 514.1430; calcd for  $C_{27}H_{26}^{37}ClFNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 516.1403; found, 516.1418.

#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-fluorobenzoyl)deacetylcolchicine (28)

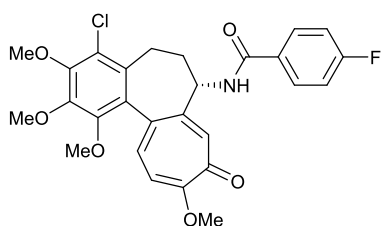


Compound **28** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3-fluorobenzoyl chloride (15  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Red-brown solid (21 mg, 0.041 mmol, 32% yield).

$[\alpha]_D^{24}$ :  $-17.9^\circ$  ( $c = 0.078$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.82 (1H, s), 7.66 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.55-7.53 (2H, m), 7.47 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.35-7.33 (1H, m), 7.15-7.13 (1H, m), 6.99 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.82-4.77 (1H, m), 4.05 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd,  $J = 13.1, 5.7$  Hz), 2.41-2.32 (1H, m), 2.29-2.19 (1H, m), 2.16-2.08 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{27}H_{26}^{35}ClFNO_6$   $[M+H]^+$ , 514.1433;

found, 514.1442; calcd for  $C_{27}H_{26}^{37}ClFNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 516.1403; found, 516.1436.

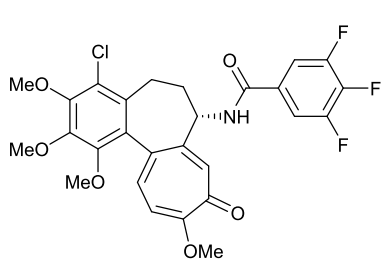
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-fluorobenzoyl)deacetylcolchicine (29)



Compound **29** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 4-fluorobenzoyl chloride (15  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Amorphous solid (45 mg, 0.088 mmol, 68% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-66.9^\circ$  ( $c = 0.063$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.83-7.79 (2H, m), 7.57 (1H, s), 7.36 (1H, br-s), 7.34 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.01-6.99 (2H, m), 6.88 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.31 (1H, dd,  $J = 13.4, 5.4$  Hz), 2.37-2.33 (1H, m), 2.24-2.20 (1H, m), 1.97-1.94 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{27}H_{26}^{35}ClFNO_6$   $[M+H]^+$ , 514.1433; found, 514.1440; calcd for  $C_{27}H_{26}^{37}ClFNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 516.1403; found, 516.1421.

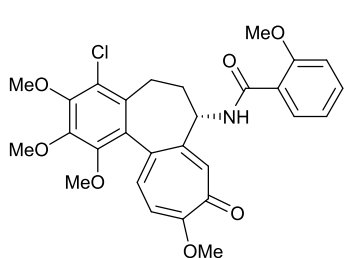
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3,4,5-trifluorobenzoyl)deacetylcolchicine (30)



Compound **30** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3,4,5-trifluorobenzoyl chloride (17  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Red-brown solid (38 mg, 0.069 mmol, 54% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-52.3^\circ$  ( $c = 0.078$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.26 (1H, br-s), 7.65 (1H, s), 7.49-7.47 (2H, m), 7.40 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.95 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.05 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.68 (3H, s), 3.31 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.6$  Hz), 2.39-2.35 (1H, m), 2.20-2.15 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{27}H_{24}^{35}ClF_3NO_6$   $[M+H]^+$ , 550.1244; found, 550.1237; calcd for  $C_{27}H_{24}^{37}ClF_3NO_6$   $[M+H+2]^+$ , 552.1215; found, 552.1190.

#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-methoxybenzoyl)deacetylcolchicine (31)

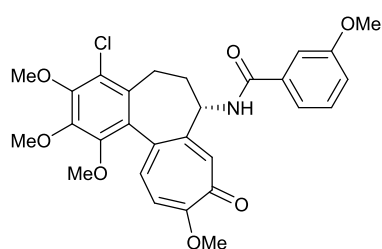


Compound **31** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 2-methoxybenzoyl chloride (17  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Pale yellow solid (49 mg, 0.093 mmol, 73% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-64.6^\circ$  ( $c = 0.110$ , MeOH). CD (MeOH, 20°C,  $c = 0.22$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (373),  $-8.32$  (334),  $-1.61$  (288),  $-16.56$  (263), 0 (250), 11.11 (240), 1.04 (229), 45.78 (208).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.35 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz), 8.01 (1H, dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz), 7.51 (1H, s), 7.48-7.44 (1H, m), 7.28 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.04-7.00 (2H, m), 6.80 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.79-4.73 (1H, m), 4.05 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd,  $J = 13.2, 4.6$  Hz), 2.40-2.31 (1H, m), 2.27-2.23 (1H, m), 1.89-1.85 (1H, m). ESI-MS  $m/z$ : 526  $[M+H]^+$ , 528  $[M+H+2]^+$ . HR-ESI-MS: calcd for  $C_{28}H_{29}^{35}ClNO_7$   $[M+H]^+$ , 526.1633;

found, 526.1623; calcd for  $C_{28}H_{29}^{37}ClNO_7$   $[M+H+2]^+$ , 528.1603; found, 528.1541.

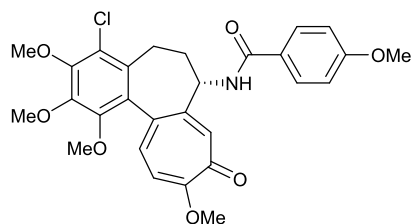
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-methoxybenzoyl)deacetylcolchicine (32)



Compound **32** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3-methoxybenzoyl chloride (17  $\mu$ L, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Amorphous solid (53 mg, 0.101 mmol, 79% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-209.4^\circ$  ( $c = 0.087$ , MeOH). CD (MeOH,  $20^\circ\text{C}$ ,  $c = 0.19$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (373),  $-8.18$  (330),  $-3.55$  (294),  $-13.43$  (264), 0 (253),  $10.94$  (241),  $10.28$  (237),  $27.26$  (214).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.54 (1H, s), 7.34-7.31 (3H, m), 7.27 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.02-7.00 (1H, m), 6.96 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz), 6.85 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.31 (1H, dd,  $J = 13.3, 5.0$  Hz), 2.39-2.30 (1H, m), 2.25-2.21 (1H, m), 1.95-1.89 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{28}H_{29}^{35}ClNO_7$   $[M+H]^+$ , 526.1633; found, 526.1649; calcd for  $C_{28}H_{29}^{37}ClNO_7$   $[M+H+2]^+$ , 528.1603; found, 528.1633.

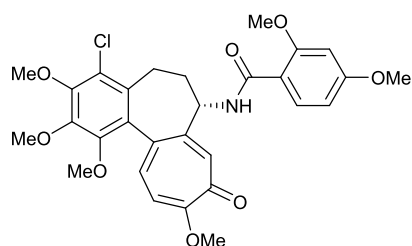
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-methoxybenzoyl)deacetylcolchicine (33)



Compound **33** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 4-methoxybenzoyl chloride (26 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Amorphous solid (56 mg, 0.11 mmol, 83% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-37.2^\circ$  ( $c = 0.148$ , MeOH). CD (MeOH,  $21^\circ\text{C}$ ,  $c = 0.15$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (372),  $-6.05$  (330),  $-2.71$  (277),  $-3.55$  (265), 0 (260),  $6.40$  (242),  $4.86$  (237),  $7.13$  (227),  $1.40$  (219).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.75 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.54 (1H, s), 7.31 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.87 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz), 6.85 (1H, br-s), 6.84 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.00 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd,  $J = 13.3, 4.5$  Hz), 2.38-2.29 (1H, m), 2.25-2.21 (1H, m), 1.92-1.89 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{28}H_{29}^{35}ClNO_7$   $[M+H]^+$ , 526.1633; found, 526.1649; calcd for  $C_{28}H_{29}^{37}ClNO_7$   $[M+H+2]^+$ , 528.1603; found, 528.1602.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2,4-dimethoxybenzoyl)deacetylcolchicine (34)

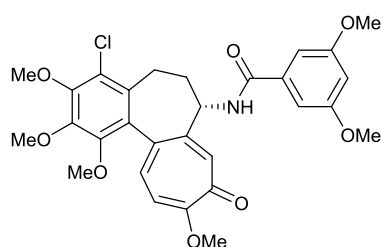


Compound **34** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 2,4-dimethoxybenzoyl chloride (26 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. White solid (33 mg, 0.059 mmol, 46% yield).

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-23.8^\circ$  ( $c = 0.147$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.29 (1H, d,  $J = 6.3$  Hz), 7.98 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.64 (1H, s), 7.34 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.85 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.54 (1H, dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz),

6.51 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 4.78-4.71 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.00 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd,  $J = 13.2, 5.1$  Hz), 2.40-2.31 (1H, m), 2.26-2.18 (1H, m), 1.93-1.84 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{29}H_{31}^{35}ClNO_8 [M+H]^+$ , 556.1738; found, 556.1747; calcd for  $C_{29}H_{31}^{37}ClNO_8 [M+H+2]^+$ , 558.1709; found, 558.1755.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3,5-dimethoxybenzoyl)deacetylcolchicine (35)

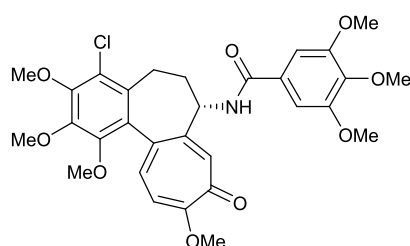


Compound **35** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3,5-dimethoxybenzoyl chloride (26 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. White solid (47 mg, 0.085 mmol, 66% yield).

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-44.0^\circ$  ( $c = 0.219$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.65 (1H, s), 7.38 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.01 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz),

6.93 (2H, s), 6.90 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.56 (1H, s), 4.77-4.71 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.79 (6H, s), 3.69 (3H, s), 3.31 (1H, dd,  $J = 13.3, 5.2$  Hz), 2.40-2.30 (1H, m), 2.25-2.17 (1H, m), 2.02-1.95 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{29}H_{31}^{35}ClNO_8 [M+H]^+$ , 556.1738; found, 556.1727; calcd for  $C_{29}H_{31}^{37}ClNO_8 [M+H+2]^+$ , 558.1709; found, 558.1723.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)deacetylcolchicine (36)

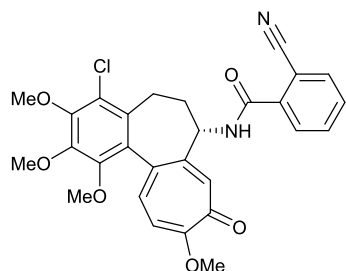


Compound **36** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride (30 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Yellow-brown solid (68 mg, 0.12 mmol, 91% yield).

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-41.5^\circ$  ( $c = 0.084$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$

7.75 (1H, s), 7.63 (1H, br-s), 7.40 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.07 (2H, s), 6.93 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.79-4.72 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.5$  Hz), 2.42-2.33 (1H, m), 2.22-2.16 (1H, m), 2.09-2.03 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{30}H_{33}^{35}ClNO_9 [M+H]^+$ , 586.1844; found, 556.1727; calcd for  $C_{30}H_{33}^{37}ClNO_9 [M+H+2]^+$ , 588.1814; found, 588.1821.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-cyanobenzoyl)deacetylcolchicine (37)

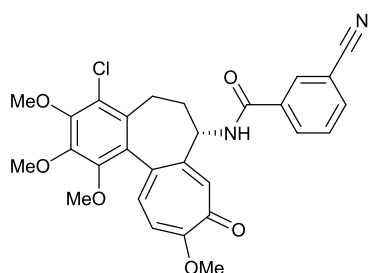


To a stirred solution of 2-cyanobenzoic acid (23 mg, 0.15 mmol) in DMF (1 mL) were added EDCI (29 mg, 0.15 mmol) and HOBT (21 mg, 0.15 mmol) under argon atmosphere at  $0^\circ C$ . After stirring for 30 min at  $0^\circ C$ , compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) was added to the mixture. The resulting mixture was further stirred at ambient temperature for 3 h. The reaction was quenched by adding  $H_2O$  and the whole mixture was extracted two times with AcOEt. The combined organic layers were washed

with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and then brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **37** (41 mg, 0.079 mmol, 62% yield) as a yellow-brown solid.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -129.1 ° (*c* = 0.338, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.96 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.72 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.64-7.53 (3H, m), 7.46 (1H, br-s), 7.35 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.86-4.80 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.01 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd, *J* = 13.5, 5.5 Hz), 2.47-2.38 (1H, m), 2.26-2.18 (1H, m), 2.03-1.95 (1H, m). ESI-MS *m/z*: 521 [M+H]<sup>+</sup>, 523 [M+H+2]<sup>+</sup>. HR-ESI-MS: calcd for C<sub>28</sub>H<sub>26</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 521.1479; found, 521.1479; calcd for C<sub>28</sub>H<sub>26</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H+2]<sup>+</sup>, 523.1450; found, 523.1472.

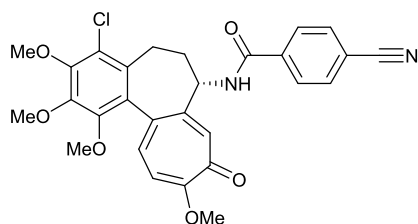
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-cyanobenzoyl)deacetylcolchicine (**38**)



Compound **38** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3-cyanobenzoyl chloride (21 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Light yellow solid (44 mg, 0.084 mmol, 66% yield).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -58.6 ° (*c* = 0.251, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.33 (1H, br-s), 8.14 (1H, s), 7.98 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.67 (1H, s), 7.66-7.65 (1H, m), 7.42-7.40 (1H, m), 7.41 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 6.95 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.81-4.75 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.71 (3H, s), 3.33 (1H, dd, *J* = 12.7, 5.4 Hz), 2.41-2.35 (1H, m), 2.26-2.15 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>28</sub>H<sub>26</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 521.1479; found, 521.1464; calcd for C<sub>28</sub>H<sub>26</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H+2]<sup>+</sup>, 523.1450; found, 523.1428.

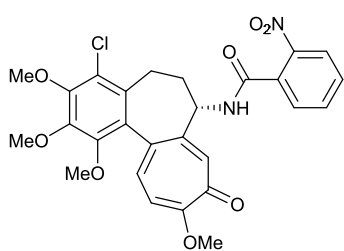
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-cyanobenzoyl)deacetylcolchicine (**39**)



Compound **39** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 4-cyanobenzoyl chloride (21 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. White solid (51 mg, 0.098 mmol, 77% yield).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>26</sup>: -48.6 ° (*c* = 0.366, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.45 (1H, d, *J* = 5.9 Hz), 7.93 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.71 (1H, s), 7.52 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.44 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 6.98 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 4.81-4.75 (1H, m), 4.06 (3H, s), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.31 (1H, dd, *J* = 13.2, 5.6 Hz), 2.44-2.35 (1H, m), 2.24-2.17 (1H, m), 2.16-2.06 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>28</sub>H<sub>26</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 521.1479; found, 521.1472; calcd for C<sub>28</sub>H<sub>26</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H+2]<sup>+</sup>, 523.1450; found, 523.1439.

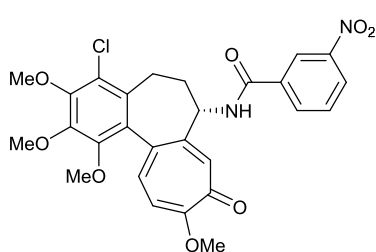
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-nitrobenzoyl)deacetylcolchicine (40)



Compound **40** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 2-nitrobenzoic acid (26 mg, 0.15 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. White solid (23 mg, 0.043 mmol, 33% yield).

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-127.2^\circ$  ( $c = 0.157$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.04 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 7.71-7.63 (3H, m), 7.58-7.56 (1H, m), 7.35 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz), 6.88 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.86 (1H, br-s), 4.85-4.79 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.02 (3H, s), 4.02 (3H, s), 3.66 (3H, s), 3.31 (1H, dd,  $J = 13.7, 5.4$  Hz), 2.44-2.34 (1H, m), 2.22-2.18 (1H, m), 1.95-1.81 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 541.1378; found, 541.1356; calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 543.1348; found, 543.1362.

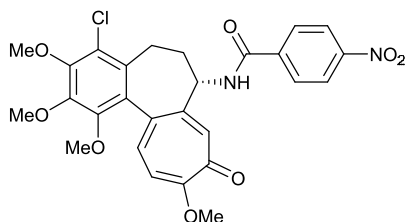
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-nitrobenzoyl)deacetylcolchicine (41)



Compound **41** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3-nitrobenzoyl chloride (27 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Yellow solid (59 mg, 0.11 mmol, 85% yield).

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-49.7^\circ$  ( $c = 0.507$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.90 (1H, d,  $J = 6.1$  Hz), 8.57 (1H, s), 8.16 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 7.96 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.89 (1H, s), 7.47 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.34 (1H, t,  $J = 7.9$  Hz), 7.03 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 4.07 (3H, s), 4.02 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.33 (1H, dd,  $J = 13.4, 5.6$  Hz), 2.47-2.38 (1H, m), 2.34-2.29 (1H, m), 2.27-2.17 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 541.1378; found, 541.1421; calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 543.1348; found, 543.1346.

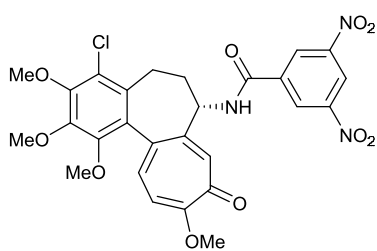
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-nitrobenzoyl)deacetylcolchicine (42)



Compound **42** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 4-nitrobenzoyl chloride (24 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. White solid (53 mg, 0.10 mmol, 77% yield).

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-47.6^\circ$  ( $c = 0.283$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.31 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 8.07-8.02 (2H, m), 7.95 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.64 (1H, s), 7.41 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.95 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.80-4.74 (1H, m), 4.05 (3H, s), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.32 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.5$  Hz), 2.45-2.36 (1H, m), 2.22-2.19 (1H, m), 2.11-2.04 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 541.1378; found, 541.1393; calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 543.1348; found, 543.1349.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)deacetylcolchicine (43)

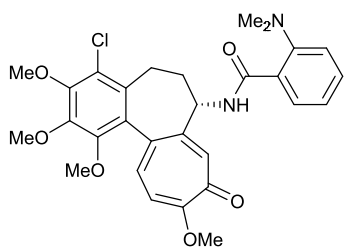


Compound **43** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3,5-dinitrobenzoyl chloride (30 mg, 0.13 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Yellow solid (47 mg, 0.080 mmol, 63% yield).

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-34.4^\circ$  ( $c = 0.375$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.91 (1H, d,  $J = 5.9$  Hz), 8.95 (1H, t,  $J = 1.8$  Hz), 8.63 (2H, s),

7.94 (1H, s), 7.54 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.14 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.12 (3H, s), 4.03 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.67 (3H, s), 3.37 (1H, dd,  $J = 12.2, 2.9$  Hz), 2.49-2.42 (2H, m), 2.28-2.19 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_{10}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 586.1228; found, 586.1213; calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_{10}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 588.1199; found, 588.1182.

#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-(dimethylamino)benzoyl)deacetylcolchicine (**44**)

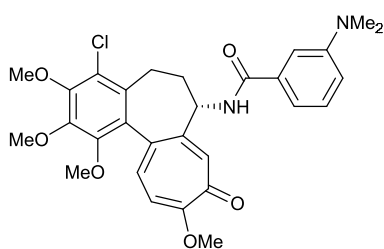


Compound **44** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 2-(dimethylamino)benzoic acid (25 mg, 0.15 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. White solid (24 mg, 0.045 mmol, 35% yield).

$[\alpha]_D^{26}$ :  $-59.0^\circ$  ( $c = 0.119$ , MeOH). CD (MeOH,  $22^\circ\text{C}$ ,  $c = 0.23$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (376),  $-7.73$  (343),  $-3.03$  (299),  $-10.62$  (264), 0 (242),  $-0.10$

(239), 0 (237), 18.43 (222), 17.99 (220), 20.27 (213), 18.40 (209).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.54 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.42-7.38 (2H, m), 7.33 (1H, s), 7.17-7.15 (2H, m), 7.06-6.99 (2H, m), 4.52-4.46 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.15 (1H, dd,  $J = 12.9, 3.7$  Hz), 2.70 (6H, s), 2.17-2.14 (1H, m), 2.10-1.98 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 539.1949; found, 539.1949; calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 541.1919; found, 541.1932.

#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-(dimethylamino)benzoyl)deacetylcolchicine (**45**)



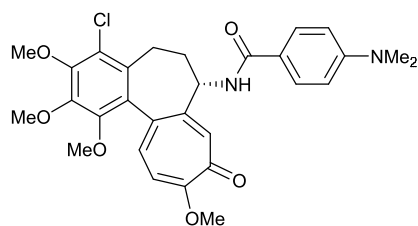
Compound **45** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3-(dimethylamino)benzoic acid (25 mg, 0.15 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. Yellow solid (37 mg, 0.069 mmol, 54% yield).

$[\alpha]_D^{24}$ :  $-54.5^\circ$  ( $c = 0.112$ , MeOH). CD (MeOH,  $22^\circ\text{C}$ ,  $c = 0.23$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (374),  $-9.19$  (334),  $-4.47$  (287),  $-11.79$  (263), 0 (246),

31.37 (225), 15.62 (204).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.96 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.28 (1H, t,  $J = 7.9$  Hz), 7.20-7.17 (3H, m), 7.13 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 7.05 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz), 6.89 (1H, dd,  $J = 8.1, 2.4$  Hz), 4.51-4.45 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.16 (1H, dd,  $J = 12.1, 5.5$  Hz), 2.92 (6H, s), 2.21-2.10 (2H, m), 2.07-2.03 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 539.1949; found, 539.1940; calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 541.1919; found, 541.1937.



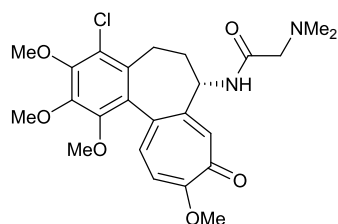
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-(dimethylamino)benzoyl)deacetylcolchicine (**46**)



Compound **46** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 4-(dimethylamino)benzoic acid (25 mg, 0.15 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. Light yellow solid (38 mg, 0.070 mmol, 55% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ : +10.4 ° ( $c = 0.413$ , MeOH). CD (MeOH, 22°C,  $c = 0.17$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (374), -7.29 (337), 0 (299), -11.20 (264), 0 (251), 9.71 (241), 0 (233), -1.45 (230), 0 (228), 24.51 (213), 20.28 (203).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.71 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.50 (1H, s), 7.28 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.83 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 6.80 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.73 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd,  $J = 12.9, 4.1$  Hz), 3.01 (6H, s), 2.32-2.23 (2H, m), 1.95-1.88 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 539.1949; found, 539.1956; calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 541.1919; found, 541.1945.

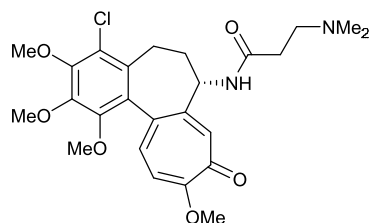
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(dimethylaminoacetyl)deacetylcolchicine (**47**)



Compound **47** was prepared from compound **19** (130 mg, 0.33 mmol) and *N,N*-dimethylglycine (41 mg, 0.40 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. Yellow solid (107 mg, 0.22 mmol, 68% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -117.9 ° ( $c = 0.168$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.58 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.16 (1H, s), 7.12 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.31-4.28 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.10 (1H, dd,  $J = 13.2, 5.6$  Hz), 2.89 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), 2.21 (6H, s), 2.10-2.06 (2H, m), 1.93-1.92 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 477.1792; found, 477.1782; calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 479.1763; found, 479.1757.

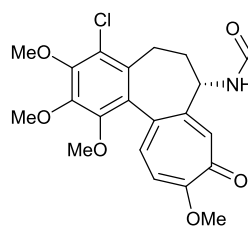
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-(dimethylamino)propionyl)deacetylcolchicine (**48**)



Compound **48** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 3-dimethylpropionic acid hydrochloride (39 mg, 0.26 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. Off-white solid (27 mg, 0.055 mmol, 43% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ : -129.3 ° ( $c = 0.121$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.64 (1H, d, 7.1 Hz), 7.13 (1H, s), 7.12 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.11 (1H, dd,  $J = 13.4, 5.1$  Hz), 2.43-2.37 (2H, m), 2.31-2.27 (2H, m), 2.11 (6H, s), 2.10-2.08 (1H, m), 1.99-1.90 (1H, m), 1.86-1.78 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 491.1949; found, 491.1931; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 493.1919; found, 493.1919.

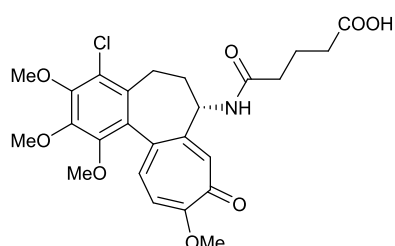
### Synthesis of *N*-(3-carboxypropionyl)-4-chlorodeacetylcolchicine (**49**)



A solution of compound **19** (80 mg, 0.20 mmol), *N*-methylmorpholine (88  $\mu$ L, 1.0 mmol), and succinic anhydride (24 mg, 0.22 mmol) in DMSO was stirred at ambient temperature for 1 h under argon atmosphere. To the reaction mixture was added saturated aqueous citric acid and the whole mixture was extracted two times with AcOEt. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **49** (60 mg, 0.12 mmol, 60% yield) as a light yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-125.6^\circ$  ( $c = 0.158$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.75 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.16 (1H, s), 7.13 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 7.03 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.25-4.19 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.10 (1H, dd,  $J = 13.4, 5.4$  Hz), 2.35 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz), 2.26 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz), 2.12-2.08 (1H, m), 1.97-1.92 (1H, m), 1.87-1.78 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}^{35}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 492.1425; found, 492.1436; calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}^{37}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 494.1396; found, 494.1397.

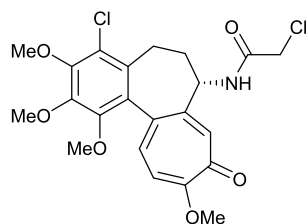
### Synthesis of *N*-(4-carboxybutyryl)-4-chlorodeacetylcolchicine (**50**)



Compound **50** was prepared from compound **19** (100 mg, 0.26 mmol) and glutaric anhydride (32 mg, 0.28 mmol) using the same procedure as that described for compound **49**. Light yellow solid (112 mg, 0.24 mmol, 95% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-124.5^\circ$  ( $c = 0.381$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.87 (1H, s), 7.77 (1H, br-s), 7.44 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 4.58-4.52 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.27 (1H, dd,  $J = 13.1, 4.8$  Hz), 2.53-2.34 (6H, m), 2.26-2.23 (1H, m), 2.18-2.10 (1H, m), 2.01-2.00 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}^{35}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 506.1582; found, 506.1560; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}^{37}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 508.1552; found, 508.1545.

### Synthesis of *N*-chloroacetyl-4-chlorodeacetylcolchicine (**51**)

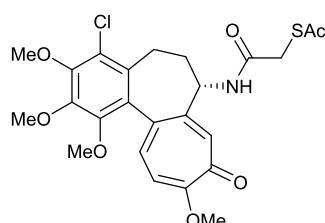


Compound **51** was prepared from compound **19** (24 mg, 0.061 mmol) and chloroacetyl chloride (5.8  $\mu$ L, 0.073 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Yellow oil (31 mg, 0.061 mmol, quant.).

$[\alpha]_{\text{D}}^{13}$ :  $-129.2^\circ$  ( $c = 0.05$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.57 (1H, br-d,  $J = 6.8$  Hz), 7.40 (1H, s), 7.28 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.84 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.55 (1H, ddd,  $J = 12.1, 6.2, 6.2$  Hz), 4.09 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz), 4.02 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s),

3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.28 (1H, dd,  $J = 13.2, 4.4$  Hz), 2.29 (1H, dddd,  $J = 12.1, 12.1, 6.0, 6.0$  Hz), 2.19 (1H, ddd,  $J = 13.1, 13.1, 5.9$  Hz), 1.89 (1H, ddd,  $J = 11.6, 11.6, 5.0$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{22}H_{24}^{35}Cl_2NO_6$   $[M+H]^+$ , 468.0981; found, 468.0979; calcd for  $C_{22}H_{24}^{35}Cl^{37}ClNO_6$   $[M+H+2]^+$ , 470.0951; found, 470.0981; calcd for  $C_{22}H_{24}^{37}Cl_2NO_6$   $[M+H+4]^+$ , 472.0922; found, 472.0947.

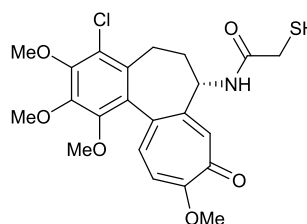
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(thioacetoxyacetyl)deacetylcolchicine (**52**)



To a stirred solution of compound **51** (50 mg, 0.11 mmol) in acetone (10 mL) was added potassium thioacetate (75  $\mu$ g, 0.66 mmol) under argon atmosphere at 0 °C and the reaction mixture was stirred for 90 min at 65 °C. The reaction mixture was diluted with  $CHCl_3$  and washed with  $H_2O$ . The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $CHCl_3/MeOH$ ) to afford compound **52** (46 mg, 0.090 mmol, 82% yield) as a yellow oil.

$[\alpha]_D^{15}$ :  $-211.7^\circ$  ( $c = 0.02$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.29 (1H, br-d,  $J = 3.5$  Hz), 7.28 (1H, s), 7.24 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz), 6.80 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz), 4.49 (1H, ddd,  $J = 12.2, 6.1, 6.1$  Hz), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (1H, dd,  $J = 14.5, 1.8$  Hz), 3.60 (3H, s), 3.54 (1H, dd,  $J = 14.4, 2.5$  Hz), 3.25 (1H, dd,  $J = 12.7, 3.9$  Hz), 2.45 (3H, s), 2.22 (1H, dddd,  $J = 11.0, 11.0, 5.9, 5.9$  Hz), 2.16 (1H, ddd,  $J = 10.7, 10.7, 4.8$  Hz), 1.78 (1H, ddd,  $J = 11.0, 11.0, 4.9$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{24}H_{27}^{35}ClNO_7S$   $[M+H]^+$ , 508.1197; found, 508.1198; calcd for  $C_{24}H_{27}^{37}ClNO_7S$   $[M+H+2]^+$ , 510.1167; found, 510.1167.

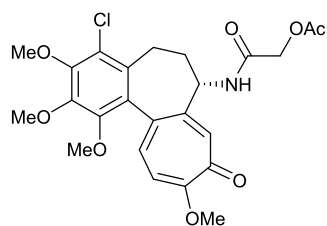
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(mercaptoacetyl)deacetylcolchicine (**53**)



To a stirred solution of compound **52** (10 mg, 0.020 mmol) in MeOH (4.5 mL) was added NaOMe (1 M in MeOH, 30  $\mu$ L, 0.030 mmol) under argon atmosphere at 0 °C. After stirring for 40 minutes at ambient temperature, the reaction was quenched with AcOH (3 drops). Then, the reaction mixture was diluted with  $CHCl_3$  and washed with  $H_2O$ . The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $CHCl_3/MeOH$ ) to afford compound **53** (9.5 mg, 0.020 mmol, quant.) as a yellow oil.

$[\alpha]_D^{16}$ :  $-173.7^\circ$  ( $c = 0.02$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.67 (1H, br-d,  $J = 7.0$  Hz), 7.40 (1H, s), 7.28 (1H, d,  $J = 10.4$  Hz), 6.83 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz), 4.53 (1H, ddd,  $J = 12.1, 6.2, 6.2$  Hz), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.32-3.20 (3H, overlapped), 2.27 (1H, dddd,  $J = 12.0, 12.0, 5.9, 5.9$  Hz), 2.19 (1H, ddd,  $J = 13.0, 13.0, 5.9$  Hz), 2.02 (1H, dd,  $J = 9.0, 9.0$  Hz), 1.84 (1H, ddd,  $J = 11.5, 11.5, 4.9$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{22}H_{25}^{35}ClNO_6S$   $[M+H]^+$ , 466.1091; found, 466.1093; calcd for  $C_{22}H_{25}^{37}ClNO_6S$   $[M+H+2]^+$ , 468.1062; found, 468.1107.

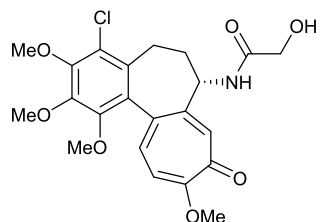
### Synthesis of *N*-acetoxycetyl-4-chlorodeacetylcolchicine (**54**)



Compound **54** was prepared from compound **19** (0.15 g, 0.38 mmol) and acetoxyacetyl chloride (45.3  $\mu$ L, 0.42 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Off-white solid (0.14 g, 0.24 mmol, 76% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -143.1  $^{\circ}$  ( $c = 0.227$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.45 (1H, s), 7.31 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.12 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 6.86 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.63-4.58 (1H, m), 4.60 (1H, d,  $J = 15.7$  Hz), 4.54 (1H, d,  $J = 15.7$  Hz), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.30-3.25 (1H, m), 2.32-2.14 (2H, m), 2.18 (3H, s), 1.90-1.83 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}^{35}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 492.1425; found, 492.1429; calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}^{37}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 494.1396; found, 494.1408.

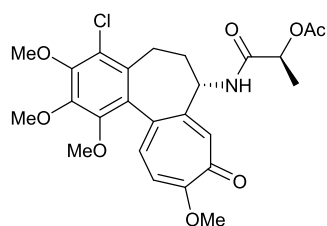
### Synthesis of *N*-acetoxycetyl-4-chlorodeacetylcolchicine (**56**)



Compound **56** was prepared from compound **54** (0.16 g, 0.33 mmol) using the same procedure as that described for compound **53**. Off-white solid (0.15 g, 0.33 mmol, quant.).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -123.9  $^{\circ}$  ( $c = 1.002$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.68 (1H, s), 7.56 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.34 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.90 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.66-4.59 (1H, m), 4.20 (1H, d,  $J = 16.3$  Hz), 4.04 (1H, d,  $J = 16.3$  Hz), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.31-3.26 (1H, m), 2.33-2.14 (2H, m), 1.94-1.87 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}^{35}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 450.1320; found, 450.1360; calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}^{37}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 452.1290; found, 452.1357.

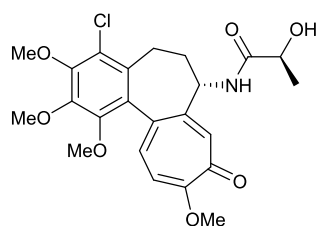
### Synthesis of (*S*)-*N*-(2-acetoxypropionyl)-4-chlorodeacetylcolchicine (**55**)



Compound **55** was prepared from compound **19** (0.10 g, 0.26 mmol) and (*S*)-2-acetoxypropionyl chloride (36  $\mu$ L, 0.28 mmol) using the same procedure as that described for compound **21**. Off-white solid (0.12 g, 0.24 mmol, 95% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -159.2  $^{\circ}$  ( $c = 0.197$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.80 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.14 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.93 (1H, q,  $J = 6.7$  Hz), 4.27-4.21 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.53 (3H, s), 3.13 (1H, dd,  $J = 12.3, 3.8$  Hz), 2.16-2.08 (1H, m), 2.02 (3H, s), 1.99-1.90 (2H, m), 1.33 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}^{35}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 506.1582; found, 506.1582; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}^{37}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 508.1552; found, 508.1594.

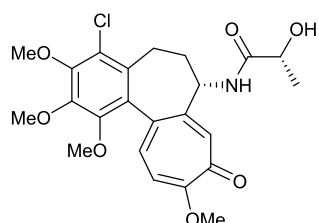
### Synthesis of (S)-4-chloro-N-(2-hydroxypropionyl)deacetylcolchicine (57)



Compound **57** was prepared from compound **55** (0.12 g, 0.25 mmol) using the same procedure as that described for compound **53**. Off-white solid (0.11 g, 0.23 mmol, 94% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -136.1 ° ( $c = 0.212$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.50 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.16 (1H, s), 7.12 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 5.58 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz), 4.29-4.22 (1H, m), 4.02 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.53 (3H, s), 3.10 (1H, dd,  $J = 12.4, 6.1$  Hz), 2.14-2.06 (2H, m), 1.93-1.84 (1H, m), 1.17 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}^{35}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 464.1476; found, 464.1482; calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}^{37}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 466.1447; found, 466.1487.

### Synthesis of (R)-4-chloro-N-(2-hydroxypropionyl)deacetylcolchicine (59)

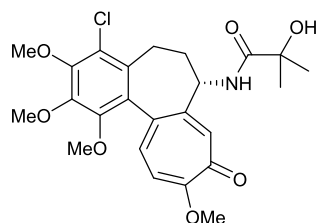


To a stirred solution of compound **57** (100 mg, 0.22 mmol), AcOH (15  $\mu\text{L}$ , 0.26 mmol) and  $\text{PPh}_3$  (0.17 g, 0.66 mmol) in toluene (4.3 mL) was added dropwise DEAD (2.2 mol/L in toluene, 0.30 mL, 0.66 mmol) at 0 °C under argon atmosphere. After stirring overnight at ambient temperature, the reaction mixture was purified by silica gel flash

column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **58**. Compound **59** was prepared from compound **58** using the same procedure as that described for compound **53**. Off-white solid (64 mg, 0.14 mmol, 64% yield in 2 steps).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -125.5 ° ( $c = 0.209$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.48 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.15 (1H, s), 7.12 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 5.52 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz), 4.27-4.20 (1H, m), 4.00-3.93 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.10 (1H, dd,  $J = 12.7, 5.9$  Hz), 2.15-2.04 (2H, m), 1.95-1.85 (1H, m), 1.17 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}^{35}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 464.1476; found, 464.1492; calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}^{37}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 466.1447; found, 466.1470.

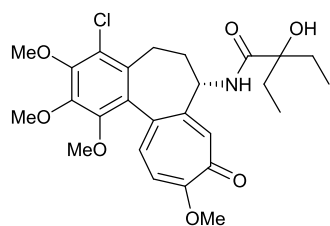
### Synthesis of 4-chloro-N-(2-hydroxy-2-methylpropionyl)deacetylcolchicine (60)



Compound **60** was prepared from compound **19** (30 mg, 0.077 mmol) and 2-hydroxy-2-methylpropionic acid (10 mg, 0.092 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. Off-white solid (37 mg, 0.077 mmol, quant.).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -140.9 ° ( $c = 0.171$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.37 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.17 (1H, s), 7.12 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 5.49 (1H, s), 4.24-4.17 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.54 (3H, s), 3.10 (1H, dd,  $J = 12.2, 5.4$  Hz), 2.18-2.06 (2H, m), 1.94-1.85 (1H, m), 1.21 (3H, s), 1.20 (3H, s). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}^{35}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 478.1633; found, 478.1666; calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}^{37}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 480.1603; found, 480.1607.

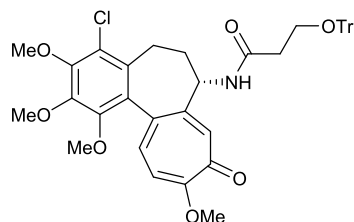
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-ethyl-2-hydroxybutyryl)deacetylcolchicine (**61**)



Compound **61** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 2-ethyl-2-hydroxybutyric acid (20 mg, 0.16 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. White solid (37 mg, 0.075 mmol, 59% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -166.5 ° ( $c = 0.254$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.32 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 7.22 (1H, s), 7.11 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 7.01 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.97 (1H, s), 4.33-4.27 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.10 (1H, dd,  $J = 12.9, 5.4$  Hz), 2.20-2.06 (2H, m), 1.90-1.82 (1H, m), 1.67-1.54 (2H, m), 1.47-1.38 (2H, m), 0.76-0.69 (6H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}^{35}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 506.1946; found, 506.1957; calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}^{37}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 508.1916; found, 508.1867.

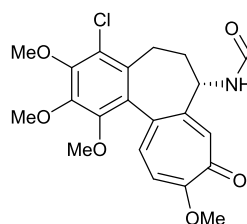
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-(triphenylmethoxy)propionyl)deacetylcolchicine (**62**)



Compound **62** was prepared from compound **19** (70 mg, 0.18 mmol) and 3-(triphenylmethoxy)propionic acid (65 mg, 0.20 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. Off-white solid (118 mg, 0.17 mmol, 94% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -120.4 ° ( $c = 0.222$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.78 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.34-7.20 (16H, m), 7.13 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.35-4.28 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.18-3.09 (2H, m), 3.05-2.99 (1H, m), 2.53-2.39 (2H, m), 2.18-2.09 (1H, m), 2.02-1.83 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{41}^{35}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 706.2572; found, 706.2534; calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{41}^{37}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 708.2542; found, 708.2211.

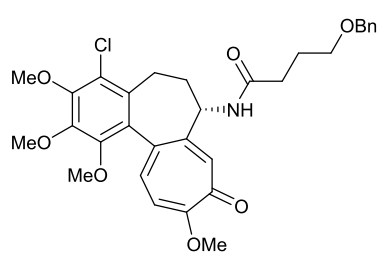
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-hydroxypropionyl)deacetylcolchicine (**64**)



A solution of compound **62** (95 mg, 0.14 mmol) and *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (5 mg, 0.028 mmol) in MeOH was stirred at ambient temperature for 5 h. After evaporation of the reaction mixture, the residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **64** (54 mg, 0.12 mmol, 86% yield) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -138.0 ° ( $c = 0.280$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.59 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.13 (1H, s), 7.12 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.54 (1H, t,  $J = 5.2$  Hz), 4.28-4.22 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.57-3.52 (2H, m), 3.53 (3H, s), 3.10 (1H, dd,  $J = 13.7, 5.1$  Hz), 2.35-2.23 (2H, m), 2.15-2.06 (1H, m), 1.99-1.80 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}^{35}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 464.1476; found, 464.1491; calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}^{37}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 466.1447; found, 466.1482.

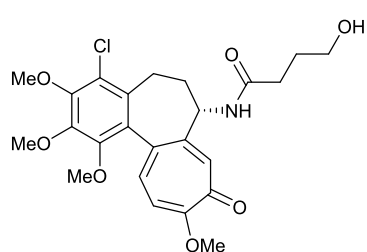
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-(benzyloxy)butyryl)deacetylcolchicine (**63**)



Compound **63** was prepared from compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) and 4-(benzyloxy)butyric acid (27  $\mu$ L, 0.26 mmol) using the same procedure as that described for compound **37**. Pale yellow solid (36 mg, 0.063 mmol, 50% yield).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.61 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.34-7.30 (4H, m), 7.28-7.24 (1H, m), 7.13 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.12 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.46 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz), 4.41 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.37 (2H, t,  $J = 6.5$  Hz), 3.10 (1H, dd,  $J = 13.4, 5.1$  Hz), 2.23 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz), 2.14-2.06 (1H, m), 1.98-1.88 (1H, m), 1.86-1.78 (1H, m), 1.75-1.68 (2H, m). ESI-MS  $m/z$ : 568  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 570  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ .

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-hydroxybutyryl)deacetylcolchicine (**65**)



To a stirred solution of compound **63** (41 mg, 0.072 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.5 mL) was added  $\text{BBr}_3$  (1 mol/L in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 72  $\mu$ L, 0.072 mmol) at  $-78$   $^\circ\text{C}$  under argon atmosphere. After stirring for 30 min at  $-78$   $^\circ\text{C}$ , the reaction was quenched with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$ . The mixture was extracted two times with  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica-gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **65** (14 mg, 0.029 mmol, 41% yield) as a white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-137.8$   $^\circ$  ( $c = 0.078$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.59 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.13 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.46 (1H, t,  $J = 5.1$  Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.34-3.30 (2H, m), 3.10 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.5$  Hz), 2.17 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz), 2.13-2.06 (1H, m), 1.99-1.90 (1H, m), 1.87-1.79 (1H, m), 1.62-1.54 (2H, m). ESI-MS  $m/z$ : 478  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 480  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ . HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}^{35}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 478.1633; found, 478.1642; calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}^{37}\text{ClNO}_7$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 480.1603; found, 480.1632.

### *In vitro* assay

#### Cell culture

Human lung cancer cell line A549 and human colorectal cancer cell lines, HT-29 and HCT116, were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA). The cancer cell lines were continuously cultured at  $37$   $^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin (10% FBS/DMEM).

### **Cytotoxicity evaluation.**

A 50  $\mu$ L volume (1000 cells) of an exponentially growing cell suspension was seeded into a 96-well microtiter plate and 50  $\mu$ L of each drug at various concentrations was added 24 h after the seeding of the tumor cells. After incubation for 96 h at 37 °C, 10  $\mu$ L of TetraColor ONE (Seikagaku Biobusiness Corporation, Tokyo, Japan) was added to each well and the plates were incubated further for 1 h at 37 °C. After incubation, optical density was measured at 450 nm with a microplate reader (Spectramax 384 Plus, Molecular Devices, CA), and the concentration causing 50% inhibition of cell proliferation ( $IC_{50}$ ) was calculated by linear regression analysis of the linear portion of the growth curves.

### **Metabolic stability in mouse microsomes**

BALB/c mouse hepatic microsomes were purchased from XenoTech, LLC (Lenexa, KS). The reaction mixture (0.5 mL) containing 0.25 mg/mL microsomal protein and 1  $\mu$ mol/L test compound in 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4) was preincubated for 5 min at 37 °C, and the reaction was started by adding 30  $\mu$ L of NADPH-regenerating system solution (BD Gentest, Woburn, MA). The reaction mixture (50  $\mu$ L) was sampled and the reaction was terminated by adding 150  $\mu$ L of 1% formic acid at 0, 5, 10, 15, 30, and 60 min. All incubations were done in triplicate. The test compound in the reaction mixture was measured by LC-MS/MS using a Scherzo SM-C18 column (150  $\times$  2.0 mm ID., Imtakt, Japan). The column temperature and the flow rate were 40 °C and 0.35 mL/min, respectively. Mobile phases A and B were acetonitrile and 2 mmol/L ammonium formate (pH 3.3), respectively. The gradient elution was as follows: mobile phase A was linearly increased from 15% to 95% over a period of 4 minutes, kept at 95% for the next 2 minutes, and then equilibrated at 15% for 5 minutes. Metabolic stability was calculated by the following formula (A).  
Metabolic stability (mL/min/mg) = slope of a semi-logarithmic plot of test compound concentration / microsomal protein concentration (0.25 mg/mL) (A).

### **Tubulin polymerization assay**

*In vitro* tubulin polymerization assays were done using a Tubulin Polymerization Assay Kit (Cytoskeleton, inc.). Lyophilized porcine microtubule protein was resuspended in G-PEM buffer (80 mM PIPES, pH 6.9, 0.5 mM EGTA, 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM GTP, 10% glycerol) to a final concentration of 4 mg/mL. Tubulin polymerization was monitored spectrophotometrically by the change in absorbance at 340 nm. The absorbance was measured at 1-min intervals for 45 min using SpectraMax (Molecular device). The  $IC_{50}$  for tubulin polymerization was defined as the concentration of compound that inhibited tubulin assembly by 50% compared to solvent-treated control at 5 min.

### ***In vivo* assay**

#### **Animals**



Inbred specific-pathogen-free 5-week-old male BALB/C nude mice were purchased from Japan SLC, Inc. (Hamamatsu, Japan). The mice were kept in plastic cages and allowed free access to water and a standard diet (MF, Oriental Yeast Industry Co., Tokyo, Japan). Temperature and humidity were kept at  $24\pm 1$  °C and  $55\pm 10\%$ , respectively. In vivo antitumor experiments were performed according to our internal and ethics committee regulations.

### **Antitumor experiments**

After transplanting HCT116 cells ( $2 \times 10^6$  cells/mouse) subcutaneously to the inguinal region of nude mice, the mice were grouped (3~5 mice/group) on the day when the estimated tumor volume calculated by the following formula (B) reached approximately  $300 \text{ mm}^3$  (Day 1). The derivatives were administered intravenously three times on days 1, 5, and 9. As negative control, 5% glucose/Tween 80/propylene glycol (85/10/5) was administered following the same administration schedule as that of the derivatives. The tumors were excised on Day 22 and tumor growth inhibition rate (IR (%), formula (C)) was calculated from the tumor weights.

Estimated tumor volume ( $\text{mm}^3$ ) =  $1/2 \times \text{long diameter} \times \text{short diameter} \times \text{short diameter}$  (B).

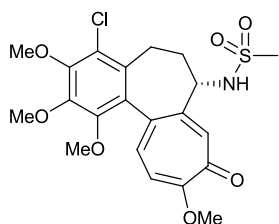
IR (%) =  $(1 - \text{mean tumor weight in the tested group} / \text{mean tumor weight in the control group}) \times 100$  (C).

### ***In silico* simulation**

The modules in Maestro (the unified interface for all Schrödinger software) were used by default settings to search stable conformations of 4-chlorocolchicine derivatives in the colchicine binding site of tubulin, where the receptor residues moved concomitantly during the docking (induced fit docking).<sup>68)</sup> Firstly, to prepare the docking receptor, the  $\alpha,\beta$ -tubulin complex merged with the DAMA-colchicine and GTPs (PDB code 1SA0, chain A and B) was processed using the Protein Preparation module in Maestro. The module assigned ionization states and hydrogens in the complex structure, and energy-minimized the hydrogens in the OPLS 2005 force field.<sup>69)</sup> Secondly, the 3D structure of each 4-chlorocolchicine was generated by the Ligprep 2.4 module, which produced a single low-energy and geometrically reasonable conformer using the OPLS 2005 force field. Finally, the Induced Fit Docking module was used to create the receptor grid and dock 4-chlorocolchicines to the grid. In the grid generation setting, the grid box and center were set to default by using the DAMA-colchicine molecule in the  $\beta$ -tubulin, and the van der Waals scaling of the receptor was 0.5. In the docking process, each 4-chlorocolchicine derivative, whose van der Waals scaling was 0.5, was taken for the initial Glide SP docking using the Glide 5.6 module.<sup>70)</sup> The derived docking poses were then refined by using the Prime 2.2 module. Residues within 5.0 Å of the ligand poses were minimized in order to form suitable conformations of the poses at the active site of the receptor. After that, the Glide SP redocking of each protein–ligand complex within 30 kcal/mol of the best was performed, and outputted.

## 第二章付属実験

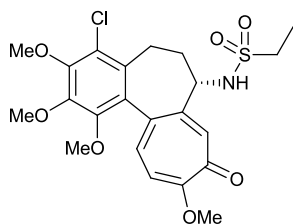
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(methanesulfonyl)deacetylcolchicine (**67**)



To a stirred solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.070 mmol) and Et<sub>3</sub>N (26  $\mu$ L, 0.19 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) was added MeSO<sub>2</sub>Cl (12  $\mu$ L, 0.15 mmol) at 0 °C under argon atmosphere. After stirring 2 h at 0 °C, the reaction was quenched with water. Then, the whole mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> aq, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **67** (57 mg, 0.12 mmol, 95% yield) as a yellow solid.

$[\alpha]_D^{25}$ : -79.11 ° ( $c$  = 0.032, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.77 (1H, s), 7.31 (1H, d,  $J$  = 10.7 Hz), 6.88 (1H, d,  $J$  = 10.7 Hz), 5.52 (1H, br-s), 4.36-4.30 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.27 (1H, dd,  $J$  = 14.1, 5.4 Hz), 2.89 (3H, s), 2.40-2.31 (1H, m), 2.15-2.12 (1H, m), 1.89-1.85 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub><sup>35</sup>ClNO<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>, 470.1040; found, 470.1058; calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub><sup>37</sup>ClNO<sub>7</sub>S [M+H+2]<sup>+</sup>, 472.1011; found, 472.1032.

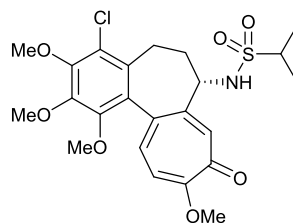
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(ethanesulfonyl)deacetylcolchicine (**68**)



Compound **68** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (198 mg, 0.51 mmol) and EtSO<sub>2</sub>Cl (72  $\mu$ L, 0.73 mmol) using the same procedure as that described for compound **67**. Yellow solid (243 mg, 0.50 mmol, 99% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : 113.46 ° ( $c$  = 0.189, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.70 (1H, s), 7.26 (1H, d,  $J$  = 10.7 Hz), 6.84 (1H, d,  $J$  = 11.0 Hz), 5.36 (1H, br-s), 4.33-4.27 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.27 (1H, dd,  $J$  = 13.8, 5.2 Hz), 2.99-2.89 (2H, m), 2.36-2.31 (1H, m), 2.17-2.13 (1H, m), 1.91-1.83 (1H, m), 1.32 (3H, t,  $J$  = 7.4 Hz). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub><sup>35</sup>ClNO<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>, 484.1197; found, 484.1221; calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub><sup>37</sup>ClNO<sub>7</sub>S [M+H+2]<sup>+</sup>, 486.1167; found, 486.1211.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(propane-2-sulfonyl)deacetylcolchicine (**69**)

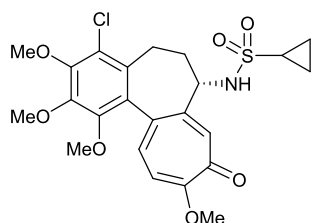


Compound **69** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and <sup>i</sup>PrSO<sub>2</sub>Cl (17  $\mu$ L, 0.15 mmol) using the same procedure as that described for compound **67**. Pale yellow solid (6 mg, 0.012 mmol, 9% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : -104.47 ° ( $c$  = 0.013, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.65 (1H, s), 7.26-7.23 (1H, m), 6.81 (1H, d,  $J$  = 11.0 Hz), 5.08 (1H, br-s), 4.30-4.24 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.26 (1H, dd,  $J$  = 13.5, 5.2 Hz), 3.04-2.97 (1H, m), 2.38-2.33 (1H, m), 2.22-2.11 (1H, m), 1.88-1.83 (1H, m), 1.32 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz), 1.27 (3H, d,  $J$  =

6.8 Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{23}H_{29}^{35}ClNO_7S$   $[M+H]^+$ , 498.1353; found, 498.1387; calcd for  $C_{23}H_{29}^{37}ClNO_7S$   $[M+H+2]^+$ , 500.1324; found, 500.1371.

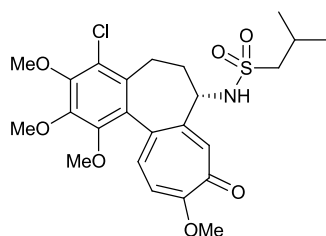
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(cyclopropylsulfonyl)deacetylcolchicine (**70**)



To a stirred solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) in  $CH_2Cl_2$  was added  $Et_3N$  (26  $\mu L$ , 0.19 mmol) and  $^cPrSO_2Cl$  (12  $\mu L$ , 0.15 mmol) under argon atmosphere with ice-bath cooling. After stirring 1 h at 0  $^\circ C$ , the reaction was quenched with water and the whole mixture was extracted with  $CHCl_3$ . The organic layer was washed with brine, dried over  $Na_2SO_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $CHCl_3/MeOH$ ) to afford compound **70** (36 mg, 0.073 mmol, 57% yield) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-133.77^\circ$  ( $c = 0.214$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.83 (1H, s), 7.28 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 6.85 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 5.18 (1H, br-s), 4.33-4.27 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.27 (1H, dd,  $J = 13.7, 5.6$  Hz), 2.42-2.30 (2H, m), 2.16-2.13 (1H, m), 1.85-1.81 (1H, m), 1.09-1.05 (1H, m), 0.99-0.96 (1H, m), 0.87-0.79 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{23}H_{29}^{35}ClNO_7S$   $[M+H]^+$ , 496.1197; found, 496.1042; calcd for  $C_{23}H_{29}^{37}ClNO_7S$   $[M+H+2]^+$ , 498.1167; found, 498.1050.

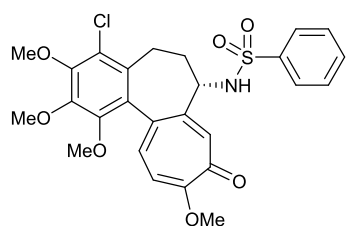
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-methylpropane-1-sulfonyl)deacetylcolchicine (**71**)



Compound **71** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and 2-methylpropane-1-sulfonyl chloride (12  $\mu L$ , 0.15 mmol) using the same procedure as that described for compound **67**. White solid (56 mg, 0.11 mmol, 85% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-129.61^\circ$  ( $c = 0.228$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.70 (1H, s), 7.26 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.84 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 5.18 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz), 4.33-4.27 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.26 (1H, dd,  $J = 14.0, 5.0$  Hz), 2.88 (1H, dd,  $J = 14.0, 6.0$  Hz), 2.74 (1H, dd,  $J = 14.0, 7.0$  Hz), 2.38-2.29 (1H, m), 2.25-2.10 (2H, m), 1.88-1.82 (1H, m), 1.03 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz), 1.00 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{24}H_{31}^{35}ClNO_7S$   $[M+H]^+$ , 512.1510; found, 512.1517; calcd for  $C_{24}H_{31}^{37}ClNO_7S$   $[M+H+2]^+$ , 514.1480; found, 514.1517.

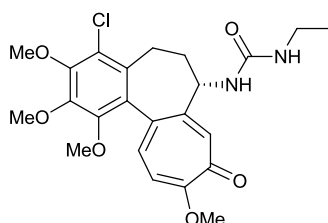
### Synthesis of *N*-benzenesulfonyl-4-chlorodeacetylcolchicine (**72**)



Compound **72** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and PhSO<sub>2</sub>Cl (20 μL, 0.15 mmol) using the same procedure as that described for compound **67**. White solid (30 mg, 0.056 mmol, 44% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -179.37 ° ( $c = 0.134$ , MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.65-7.63 (2H, m), 7.47 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz), 7.37 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz), 7.28 (1H, s), 7.17 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 6.72 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 5.41 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 4.16-4.10 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.17 (1H, dd,  $J = 13.2, 4.6$  Hz), 2.18-2.03 (2H, m), 1.74-1.71 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>26</sub>H<sub>27</sub><sup>35</sup>ClNO<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 532.1197; found, 532.1132; calcd for C<sub>26</sub>H<sub>27</sub><sup>37</sup>ClNO<sub>7</sub> [M+H+2]<sup>+</sup>, 534.1167; found, 534.1107.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(ethylcarbamoyl)deacetylcolchicine (**73**)

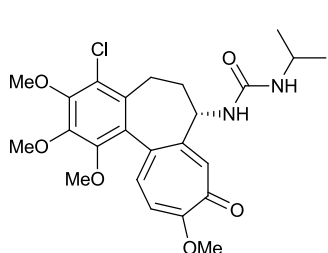


A solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and ethyl isocyanate (20 μL, 0.26 mmol) in MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1, 1.5 mL) was stirred for 90 min at 0 °C. The reaction mixture was extracted two times with CHCl<sub>3</sub>. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced

pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **73** (36 mg, 0.078 mmol, 61% yield) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -45.84 ° ( $c = 0.094$ , MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.79 (1H, s), 7.36 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz), 6.92 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz), 6.67 (1H, br-s), 4.54-4.49 (1H, m), 4.03 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.24-3.15 (2H, m), 3.10-3.06 (1H, m), 2.30-2.27 (1H, m), 2.14-2.07 (1H, m), 1.72-1.65 (1H, m), 1.04 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 463.1636; found, 463.1666; calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H+2]<sup>+</sup>, 465.1606; found, 465.1636.

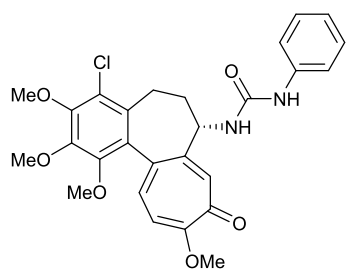
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(isopropylcarbamoyl)deacetylcolchicine (**74**)



Compound **74** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and isopropyl isocyanate (25 μL, 0.26 mmol) using the same procedure as that described for compound **73**. Amorphous solid (59 mg, 0.12 mmol, 97% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -72.78 ° ( $c = 0.264$ , MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.94 (1H, s), 7.46 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz), 6.28 (1H, br-s), 4.57-4.53 (1H, m), 4.06 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.84-3.80 (1H, m), 3.62 (3H, s), 3.23 (1H, dd,  $J = 13.5, 4.9$  Hz), 2.34-2.28 (1H, m), 2.12-2.05 (1H, m), 1.79-1.76 (1H, m), 1.08 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz), 1.05 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>24</sub>H<sub>29</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 477.1792; found, 477.1838; calcd for C<sub>24</sub>H<sub>29</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H+2]<sup>+</sup>, 479.1763; found, 479.1815.

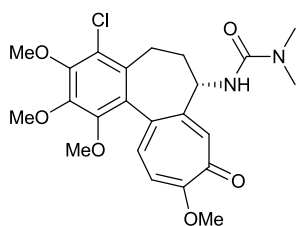
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(phenylcarbamoyl)deacetylcolchicine (**75**)



A solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (200 mg, 0.51 mmol) and phenyl isocyanate (110  $\mu$ L, 1.02 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 mL) was stirred for 2 h at 0  $^\circ\text{C}$ . The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **75** (168 mg, 0.33 mmol, 65% yield) as an amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -52.32  $^\circ$  ( $c = 0.052$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.19 (1H, s), 7.48 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.29-7.26 (2H, m), 7.16-7.14 (2H, m), 7.07 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.03 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz), 6.92-6.90 (1H, m), 4.73-4.67 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.22 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.2$  Hz), 2.43-2.33 (1H, m), 2.12-2.04 (1H, m), 1.84-1.80 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 511.1636; found, 511.1549; calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 513.1606; found, 513.1595.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(dimethylcarbamoyl)deacetylcolchicine (**76**)

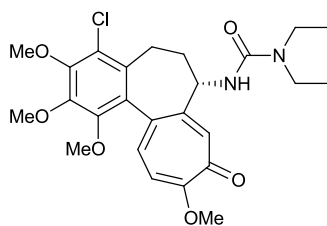


To a stirred solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (26  $\mu$ L, 0.19 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) was added  $\text{Me}_2\text{NCOCl}$  (14  $\mu$ L, 0.15 mmol) at ambient temperature under argon atmosphere. After stirring 4 h under reflux,  $\text{Et}_3\text{N}$  (52  $\mu$ L, 0.38 mmol) and  $\text{Me}_2\text{NCOCl}$  (28  $\mu$ L, 0.38 mmol) were added. Then, the reaction mixture

was further refluxed overnight. After adding saturated  $\text{NaHCO}_3$  aq, the whole mixture was extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **76** (58 mg, 0.13 mmol, 98% yield) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -43.28  $^\circ$  ( $c = 0.298$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.58 (1H, s), 7.29 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.83 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 5.03 (1H, d,  $J = 5.9$  Hz), 4.51-4.45 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.25 (1H, dd,  $J = 13.1, 4.3$  Hz), 2.92 (6H, s), 2.31-2.22 (1H, m), 2.18-2.14 (1H, m), 1.77-1.74 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 163.1636; found, 163.1640; calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 165.1606; found, 165.1614.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(diethylcarbamoyl)deacetylcolchicine (**77**)



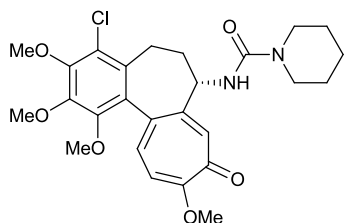
A solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (301 mg, 0.77 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (215  $\mu$ L, 1.54 mmol) and  $\text{Et}_2\text{NCOCl}$  (146  $\mu$ L, 1.54 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) was refluxed overnight under argon atmosphere with stirring. After cooling to room temperature,  $\text{CHCl}_3$  and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  were added. The organic layer was taken, washed

with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **77** (168 mg,

0.34 mmol, 44% yield) as a yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -20.00 ° ( $c = 0.050$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.60 (1H, s), 7.31 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.84 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.85 (1H, d,  $J = 6.3$  Hz), 4.55-4.49 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.36-3.32 (2H, m), 3.28-3.19 (3H, m), 2.28-2.23 (1H, m), 2.17-2.14 (1H, m), 1.76-1.74 (1H, m), 1.14 (6H, t,  $J = 7.1$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 491.1949; found, 491.1982; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 493.1919; found, 493.1946.

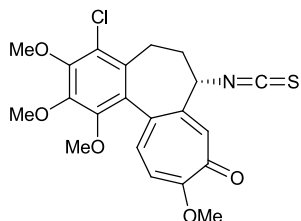
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(piperidine-1-carbonyl)deacetylcolchicine (**78**)



Compound **78** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and piperidine-1-carbonyl chloride (80  $\mu\text{L}$ , 0.64 mmol) using the same procedure as that described for compound **77**. Yellow solid (36 mg, 0.072 mmol, 56% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -45.51 ° ( $c = 0.145$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.18 (1H, s), 7.11 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 7.00 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 4.20-4.17 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.29-3.28 (4H, m), 3.10 (1H, dd,  $J = 13.5, 4.3$  Hz), 2.09-2.06 (1H, m), 2.00-1.89 (2H, m), 1.56-1.50 (2H, m), 1.41-1.37 (4H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 503.1949; found, 503.1952; calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 505.1919; found, 505.1948.

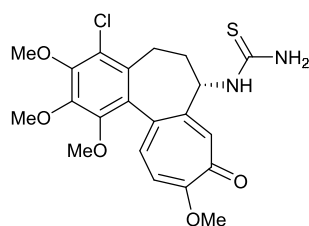
### Synthesis of 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**)



A mixture of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (400 mg, 1.02 mmol), thiophosgene (93  $\mu\text{L}$ , 1.22 mmol) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (355  $\mu\text{L}$ , 2.55 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) was stirred 2 h at 0 °C under argon atmosphere. 10%  $\text{NaHSO}_4$  aq was added to the reaction mixture and the whole mixture was extracted two times with  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic layers were washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  aq and brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **79** (443 mg, 1.02 mmol, quant.) as an amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -81.11 ° ( $c = 0.233$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.24 (1H, s), 7.17 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.10 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.92-4.87 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.11 (1H, dd,  $J = 12.8, 6.0$  Hz), 2.46-2.39 (1H, m), 2.20-2.08 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}^{35}\text{ClNO}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 434.0829; found, 434.0819; calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}^{37}\text{ClNO}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 436.0799; found, 436.0788.

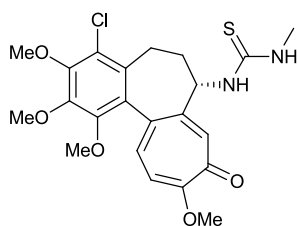
### Synthesis of 4-chloro-*N*-carbamothioyldeacetylcolchicine (**80**)



To a stirred solution of 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (26 mg, 0.060 mmol) in 1,4-dioxane (1 mL) was added NH<sub>3</sub> (0.5 mol/L in 1,4-dioxane, 240  $\mu$ L, 0.12 mmol) at ambient temperature under argon atmosphere. After stirring overnight, the reaction mixture was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **80** (16 mg, 0.035 mmol, 45% yield) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -104.97° ( $c = 0.072$ , MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.29 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.14 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.70-4.63 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.11 (1H, dd,  $J = 12.4, 4.1$  Hz), 2.17-2.01 (2H, m), 1.89-1.81 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup>, 451.1094; found, 451.1065; calcd for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S [M+H+2]<sup>+</sup>, 453.1065; found, 453.1064.

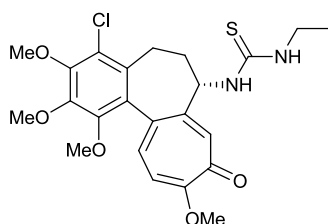
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(methylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**81**)



Compound **81** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (63 mg, 0.16 mmol) and methylamine hydrochloride (22 mg, 0.32 mmol) using the same procedure as that described for compound **88**. Yellow solid (58 mg, 0.12 mmol, 78% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -95.53° ( $c = 0.112$ , MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.09 (1H, br-s), 7.46 (1H, br-s), 7.14 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.07 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.82-4.73 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.14-3.09 (1H, m), 2.82 (3H, d,  $J = 4.4$  Hz), 2.16-1.85 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup>, 465.1251; found, 465.1207; calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S [M+H+2]<sup>+</sup>, 467.1221; found, 467.1202.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(ethylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**82**)

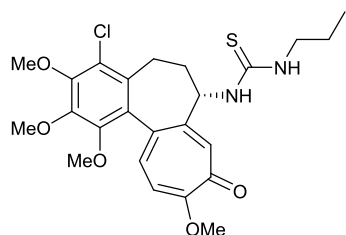


A solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and ethyl isothiocyanate (22  $\mu$ L, 0.26 mmol) in MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1, 1.5 mL) was stirred for 90 min at 0 °C. The reaction mixture was extracted two times with CHCl<sub>3</sub>. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **82** (30 mg, 0.063 mmol, 49% yield) as a yellow solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -97.12° ( $c = 0.202$ , MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.44 (1H, br-s), 7.84 (1H, s), 7.50 (1H, dd,  $J = 10.7$  Hz), 7.04 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 5.07-5.01 (1H, m), 4.07 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.74 (3H, s), 3.63-3.56 (1H, m), 3.38-3.33 (1H, m), 3.25 (1H, dd,  $J = 13.7, 5.4$  Hz), 2.49-2.40 (1H, m), 2.13-2.10 (1H, m), 1.96-1.89 (1H, m), 1.11 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup>, 479.1407; found, 479.1410; calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S

$[M+H+2]^+$ , 481.1378; found, 481.1365.

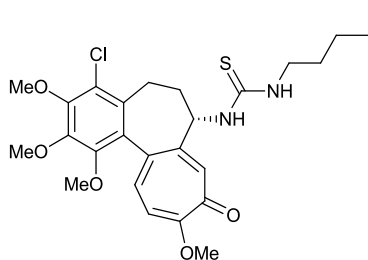
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(propylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**83**)



Compound **83** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (63 mg, 0.16 mmol) and propylamine (26  $\mu$ L, 0.32 mmol) using the same procedure as that described for compound **88**. Yellow solid (54 mg, 0.11 mmol, 69% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-88.98^\circ$  ( $c = 0.251$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.97 (1H, br-s), 7.54 (1H, br-s), 7.14 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.81-4.71 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.30-3.21 (2H, m), 3.12 (1H, dd,  $J = 12.9, 5.1$  Hz), 2.17-1.81 (3H, m), 1.51-1.42 (2H, m), 0.84 (3H, t,  $J = 7.4$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[M+H]^+$ , 493.1564; found, 493.1559; calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[M+H+2]^+$ , 495.1534; found, 495.1614.

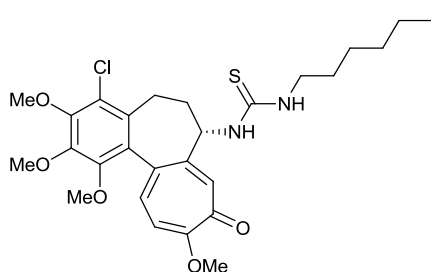
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(butylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**84**)



Compound **84** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (64 mg, 0.16 mmol) and butylamine (32  $\mu$ L, 0.32 mmol) using the same procedure as that described for compound **88**. Yellow solid (55 mg, 0.11 mmol, 68% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-95.34^\circ$  ( $c = 0.236$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.96 (1H, br-s), 7.51 (1H, br-s), 7.14 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 4.80-4.70 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.42-3.35 (1H, m), 3.30-3.26 (1H, m), 3.12 (1H, dd,  $J = 12.6, 5.0$  Hz), 2.17-1.81 (3H, m), 1.47-1.40 (2H, m), 1.30-1.24 (2H, m), 0.86 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[M+H]^+$ , 507.1720; found, 507.1777; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[M+H+2]^+$ , 509.1691; found, 509.1759.

#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(hexylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**85**)

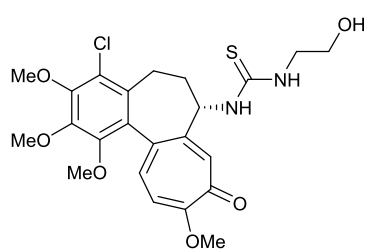


Compound **85** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (62 mg, 0.16 mmol) and *n*-hexylamine (42  $\mu$ L, 0.32 mmol) using the same procedure as that described for compound **88**. Yellow solid (54 mg, 0.10 mmol, 63% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-90.24^\circ$  ( $c = 0.232$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.98 (1H, br-s), 7.51 (1H, br-s), 7.14 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.05-7.01 (2H, m), 4.81-4.69 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.31-3.23 (2H, m), 3.14-3.09 (1H, m), 2.17-1.80 (3H, m), 1.30-1.21 (8H, m), 0.85 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[M+H]^+$ , 535.2033; found, 535.2028; calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[M+H+2]^+$ , 537.2004; found, 537.2000.



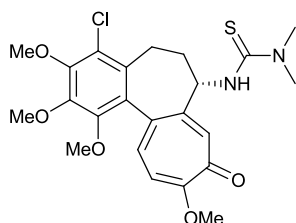
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(hydroxyethylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**86**)



Compound **86** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (62 mg, 0.16 mmol) and hydroxyethylamine (19  $\mu$ L, 0.32 mmol) using the same procedure as that described for compound **88**. Yellow solid (15 mg, 0.030 mmol, 19% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-85.83^\circ$  ( $c = 0.200$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.19 (1H, br-s), 7.60 (1H, br-s), 7.15 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.82 (1H, s), 4.75 (1H, s), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.49-3.42 (3H, m), 3.39-3.35 (1H, m), 3.14-3.09 (1H, m), 2.17-2.03 (2H, m), 1.89-1.77 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 495.1357; found, 495.1364; calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 497.1327; found, 497.1322.

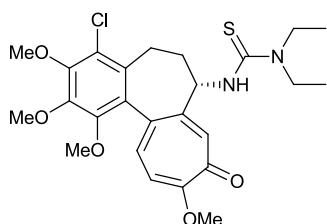
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(dimethylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**87**)



Compound **87** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and dimethylamine hydrochloride using the same procedure as that described for compound **88**. Pale yellow solid (37 mg, 0.077 mmol, quant.).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-52.10^\circ$  ( $c = 0.119$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.63 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 7.09 (1H, s), 7.02 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.91-4.85 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.20 (6H, s), 3.12 (1H, dd,  $J = 13.2, 5.1$  Hz), 2.26-2.18 (1H, m), 2.16-2.08 (1H, m), 2.04-1.95 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 479.1407; found, 479.1403; calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 481.1378; found, 481.1453.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(diethylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**88**)



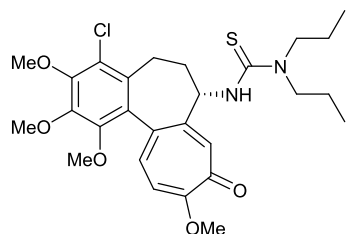
To a stirred solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.077 mmol) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (26  $\mu$ L, 0.18 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) was added thiophosgene (6.1  $\mu$ L, 0.080 mmol) at  $0^\circ\text{C}$  under argon atmosphere. After stirring 2 h at  $0^\circ\text{C}$ ,  $\text{Et}_2\text{NH}$  (16  $\mu$ L, 0.15 mmol) was added. Then the reaction mixture was stirred overnight and allowed to warm to

ambient temperature during the course of the reaction. The reaction was quenched with 10% citric acid. After diluting with AcOEt, the organic layer was taken, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **88** (33 mg, 0.065 mmol, 85% yield) as an off-white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-38.54^\circ$  ( $c = 0.472$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.54 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 7.08 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 5.02-4.95 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.72-3.64 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.12 (1H, dd,  $J = 13.5, 5.5$  Hz), 2.33-2.24 (1H,

m), 2.15-2.07 (1H, m), 2.02-1.95 (1H, m), 1.09 (6H, t,  $J = 7.0$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{25}H_{32}^{35}ClN_2O_5S$   $[M+H]^+$ , 507.1720; found, 507.1714; calcd for  $C_{25}H_{32}^{37}ClN_2O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 509.1691; found, 509.1718.

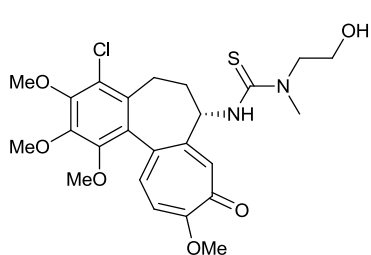
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(di-*n*-propylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**89**)



Compound **89** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and di-*n*-propylamine using the same procedure as that described for compound **88**. Off-white solid (41 mg, 0.075 mmol, 98% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-45.49^\circ$  ( $c = 0.220$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.50 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.14 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.09 (1H, s), 7.02 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 5.01-4.94 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.69-3.61 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.54-3.46 (2H, m), 3.13 (1H, dd,  $J = 13.3, 5.2$  Hz), 2.31-2.23 (1H, m), 2.16-2.07 (1H, m), 2.01-1.93 (1H, m), 1.60-1.50 (4H, m), 0.83 (6H, t,  $J = 7.3$  Hz). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{27}H_{36}^{35}ClN_2O_5S$   $[M+H]^+$ , 535.2033; found, 535.2015; calcd for  $C_{27}H_{36}^{37}ClN_2O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 537.2004; found, 537.2060.

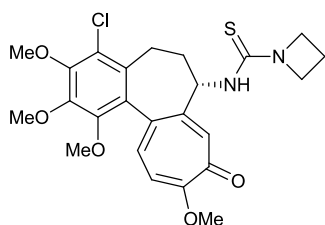
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(*N'*-(2-hydroxyethyl)methylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**90**)



Compound **90** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and 2-(methylamino)ethanol using the same procedure as that described for compound **88**. Pale yellow solid (36 mg, 0.071 mmol, 92% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-50.35^\circ$  ( $c = 0.228$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.75 (1H, d,  $J = 6.3$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.08 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.98 (1H, br-s), 4.89-4.83 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86-3.64 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.59-3.54 (2H, m), 3.21 (3H, s), 3.12 (1H, dd,  $J = 12.6, 5.2$  Hz), 2.21-1.97 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{24}H_{30}^{35}ClN_2O_6S$   $[M+H]^+$ , 509.1513; found, 509.1327; calcd for  $C_{24}H_{30}^{37}ClN_2O_6S$   $[M+H+2]^+$ , 511.1484; found, 511.1308.

#### Synthesis of *N*-(azetidine-1-carbonothioyl)-4-chlorodeacetylcolchicine (**91**)

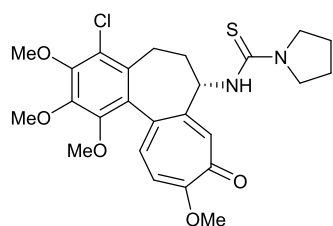


Compound **91** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and azetidine using the same procedure as that described for compound **88**. Off-white solid (7 mg, 0.014 mmol, 18% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-17.42^\circ$  ( $c = 0.092$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.85 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.14 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 7.08 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.80-4.73 (1H, m), 4.08-3.90 (4H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.12 (1H, dd,  $J = 12.6, 6.2$  Hz), 2.22-2.06 (4H, m), 2.02-1.92 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{24}H_{28}^{35}ClN_2O_5S$   $[M+H]^+$ , 491.1407; found, 491.1491; calcd for  $C_{24}H_{28}^{37}ClN_2O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 493.1378; found,

493.1458.

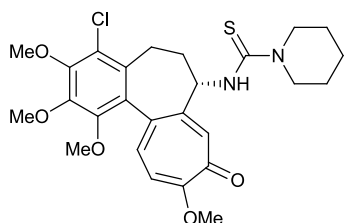
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(pyrrolidine-1-carbonothioyl)deacetylcolchicine (**92**)



Compound **92** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and pyrrolidine using the same procedure as that described for compound **88**. Pale yellow solid (28 mg, 0.055 mmol, 72% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-25.57^\circ$  ( $c = 0.078$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.55 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.12 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.94-4.87 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.58-3.45 (4H, m), 3.12 (1H, dd,  $J = 13.4, 5.1$  Hz), 2.25-1.84 (7H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 505.1564; found, 505.1608; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 507.1534; found, 507.1632.

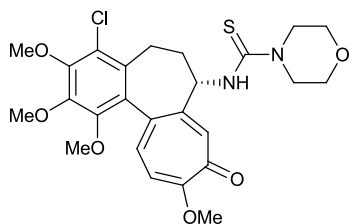
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(piperidine-1-carbonothioyl)deacetylcolchicine (**93**)



Compound **93** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and piperidine using the same procedure as that described for compound **88**. Off-white solid (28 mg, 0.054 mmol, 70% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-30.97^\circ$  ( $c = 0.090$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.85 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.96-4.90 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86-3.76 (4H, m), 3.63 (3H, s), 3.12 (1H, dd,  $J = 13.1, 5.2$  Hz), 2.23-1.96 (3H, m), 1.64-1.58 (2H, m), 1.50-1.44 (4H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 519.1720; found, 519.1714; calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 521.1691; found, 521.1689.

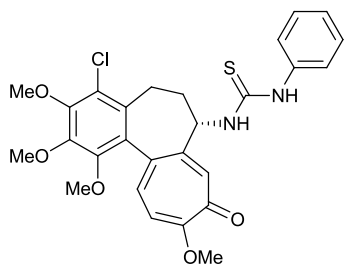
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(morpholine-4-carbonothioyl)deacetylcolchicine (**94**)



Compound **94** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and morpholine using the same procedure as that described for compound **88**. Off-white solid (28 mg, 0.054 mmol, 70% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-50.76^\circ$  ( $c = 0.118$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.03 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.16 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.92-4.86 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87-3.75 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.59 (4H, t,  $J = 4.8$  Hz), 3.12 (1H, dd,  $J = 12.2, 5.1$  Hz), 2.21-1.99 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 521.1513; found, 521.1523; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 523.1484; found, 523.1518.

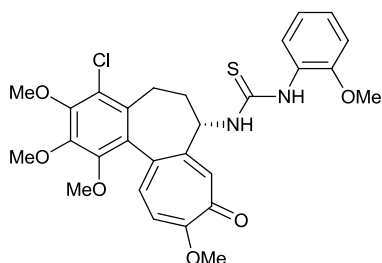
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(phenylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**95**)



Compound **95** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and phenyl isothiocyanate (30  $\mu$ L, 0.26 mmol) using the same procedure as that described for compound **82**. Pale yellow solid (50 mg, 0.095 mmol, 74% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : -84.76  $^\circ$  ( $c = 0.140$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.85 (1H, br-s), 8.01 (1H, br-s), 7.86 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.50 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz), 7.36 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.29-7.27 (2H, m), 7.15 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz), 5.13-5.07 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.20 (1H, dd,  $J = 13.8$ , 5.7 Hz), 2.45-2.35 (1H, m), 2.04-1.98 (1H, m), 1.94-1.86 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 527.1407; found, 527.1257; calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 529.1378; found, 529.1252.

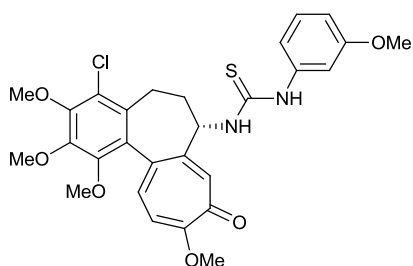
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-methoxyphenylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**96**)



Compound **96** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and *o*-anisidine using the same procedure as that described for compound **101**. Off-white solid (14 mg, 0.025 mmol, 33% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : -62.49  $^\circ$  ( $c = 0.066$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.17 (1H, s), 8.61 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.92 (1H, dd,  $J = 7.8$  Hz, 1.4 Hz), 7.16 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 7.13-7.09 (2H, m), 7.06-7.02 (2H, m), 6.86 (1H, td,  $J = 7.8$ , 1.4 Hz), 4.84-4.78 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.86 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.18-3.10 (1H, m), 2.20-2.09 (2H, m), 1.99-1.91 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 557.1513; found, 557.1429; calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 559.1484; found, 559.1428.

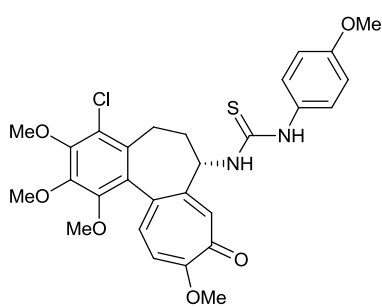
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-methoxyphenylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**97**)



Compound **97** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and *m*-anisidine using the same procedure as that described for compound **101**. Off-white solid (39 mg, 0.070 mmol, 91% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : -74.42  $^\circ$  ( $c = 0.258$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.72 (1H, s), 8.44 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.22-7.11 (4H, m), 7.04 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz), 6.95 (1H, dd,  $J = 8.3$ , 1.5 Hz), 6.66 (1H, ddd,  $J = 8.3$ , 2.4, 0.7 Hz), 4.83-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.71 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.16-3.10 (1H, m), 2.19-2.10 (2H, m), 2.04-1.98 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 557.1513; found, 557.1515; calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 559.1484; found, 559.1506.

#### Synthesis of 4-chloro-*N*-((4-methoxyphenyl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (**98**)

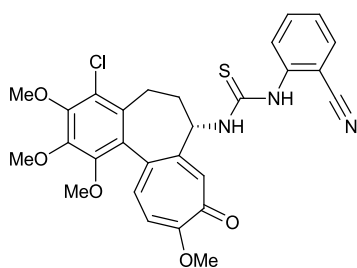


Compound **98** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (62 mg, 0.16 mmol) and *p*-anisidine (39 mg, 0.32 mmol) using the same procedure as that described for compound **88**. Yellow solid (64 mg, 0.12 mmol, 72% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-51.66^\circ$  ( $c = 0.211$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9.50 (1H, s), 8.20 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.27 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz),

6.88 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.73 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.15-3.10 (1H, m), 2.16-1.96 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 557.1513; found, 557.1516; calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}^{37}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 559.1484; found, 559.1501.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(2-cyanophenylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**99**)

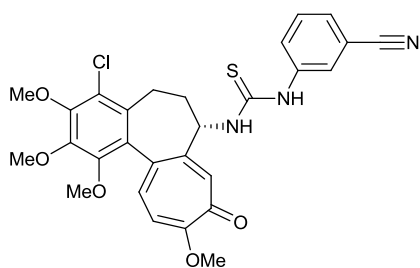


A solution of 2-cyanoaniline (14 mg, 0.11 mmol) and thiophosgene (8.8  $\mu\text{L}$ , 0.11 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{H}_2\text{O}$  (1:1, 3 mL) was stirred for 3h at room temperature under argon atmosphere. After adding a solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.077 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.5 mL) and a solution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (12 mg, 0.11 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mL), the reaction mixture was stirred overnight and

allowed to warm to ambient temperature during the course of the reaction. Brine was added to the reaction mixture and the whole mixture was extracted two times with  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **99** (19 mg, 0.035 mmol, 45% yield) as an off-white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-96.20^\circ$  ( $c = 0.089$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9.77 (1H, s), 8.87 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.79 (1H, dd,  $J = 7.7, 1.3$  Hz), 7.66-7.57 (2H, m), 7.35 (1H, td,  $J = 7.7, 1.3$  Hz), 7.16 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.14 (1H, s), 7.04 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.19-3.10 (1H, m), 2.17-1.98 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{27}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 552.1360; found, 552.1365; calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{27}^{37}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 554.1330; found, 554.1353.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-cyanophenylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**100**)

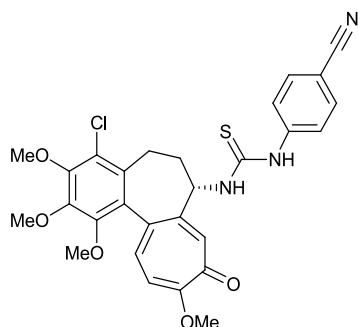


Compound **100** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.077 mmol) and 3-cyanoaniline using the same procedure as that described for compound **101**. Amorphous solid (42 mg, 0.077 mmol, quant.).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-84.31^\circ$  ( $c = 0.102$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9.95 (1H, s), 8.73 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 8.03 (1H, s), 7.72 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.54-7.47

(2H, m), 7.17 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.12 (1H, s), 7.05 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.80-4.74 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.20-3.11 (1H, m), 2.21-2.12 (2H, m), 2.04-1.98 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{28}H_{27}^{35}ClN_3O_5S$   $[M+H]^+$ , 552.1360; found, 552.1364; calcd for  $C_{28}H_{27}^{37}ClN_3O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 554.1330; found, 554.1354.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-cyanoanilino)deacetylcolchicine (101)

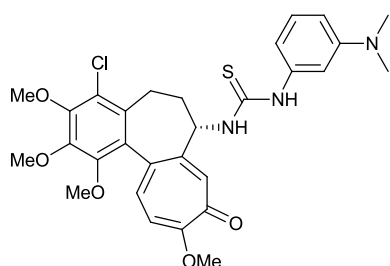


A solution of 4-cyanoaniline (14 mg, 0.11 mmol), thiophosgene (8.8  $\mu$ L, 0.11 mmol) and  $Et_3N$  (32  $\mu$ L, 0.11 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (1.5 mL) was stirred for 2 h at 0  $^\circ$ C under argon atmosphere. After adding 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.077 mmol), the reaction mixture was stirred overnight and allowed to warm to ambient temperature during the course of the reaction. The resulting mixture was purified by silica gel flash column chromatography

( $CHCl_3/MeOH$ ) to afford compound **101** (42 mg, 0.077 mmol, quant.) as an off-white solid.

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-91.09^\circ$  ( $c = 0.206$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  10.12 (1H, s), 8.83 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.76-7.71 (4H, m), 7.17 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.12 (1H, s), 7.05 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.77-4.71 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.11 (1H, m), 2.22-1.98 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{28}H_{27}^{35}ClN_3O_5S$   $[M+H]^+$ , 552.1360; found, 552.1370; calcd for  $C_{28}H_{27}^{37}ClN_3O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 554.1330; found, 554.1359.

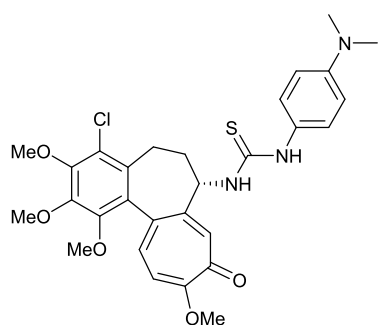
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-(dimethylamino)phenyl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (102)



Compound **102** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.078 mmol) and *N,N*-dimethyl-*m*-phenylenediamine hydrochloride using the same procedure as that described for compound **88**. Amorphous solid (7 mg, 0.014 mmol, 18% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-12.71^\circ$  ( $c = 0.157$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  9.60 (1H, s), 8.29 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 7.16 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz), 7.11 (1H, s), 7.10 (1H, t,  $J = 8.1$  Hz), 7.03 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz), 6.91 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz), 6.66 (1H, dd,  $J = 8.1, 1.6$  Hz), 6.48 (1H, dd,  $J = 8.1, 2.4$  Hz), 4.84-4.78 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.17-3.08 (1H, m), 2.86 (6H, s), 2.18-1.99 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{29}H_{33}^{35}ClN_3O_5S$   $[M+H]^+$ , 570.1829; found, 570.1815; calcd for  $C_{29}H_{33}^{37}ClN_3O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 572.1800; found, 572.1799.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-(dimethylamino)phenylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**103**)

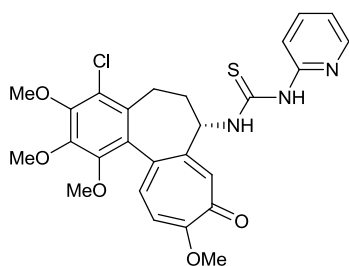


Compound **103** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and 4-(dimethylamino)phenyl isothiocyanate (43 mg, 0.26 mmol) using the same procedure as that described for compound **82**. Yellow solid (46 mg, 0.081 mmol, 63% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-10.77^{\circ}$  ( $c = 0.204$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.40 (1H, s), 8.02 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz),

7.14 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.10 (1H, s), 7.03 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 6.68 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 4.84-4.79 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.11 (1H, dd,  $J = 12.8, 5.5$  Hz), 2.87 (6H, s), 2.13-2.09 (2H, m), 2.03-1.98 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{33}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 570.1829; found, 570.1864; calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{33}^{37}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 572.1800; found, 572.1852.

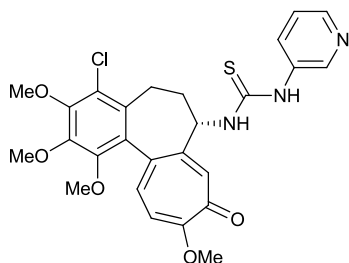
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(pyridin-2-ylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**104**)



Compound **104** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (30 mg, 0.069 mmol) and 2-aminopyridine (7 mg, 0.076 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Off-white solid (17 mg, 0.033 mmol, 47% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $+158.33^{\circ}$  ( $c = 0.108$ , MeOH). CD (MeOH,  $17^{\circ}\text{C}$ ,  $c = 0.17$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (360),  $-1.12$  (349), 0 (337), 17.29 (307), 0 (290),  $-18.67$  (261),  $-14.14$  (252),  $-16.63$  (246), 0 (237), 27.48 (226), 1.11 (206), 4.95 (202).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.37 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 10.85 (1H, s), 8.34-8.32 (1H, m), 7.86-7.81 (1H, m), 7.22-7.18 (2H, m), 7.14-7.11 (1H, m), 7.07 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.00 (1H, s), 4.87-4.80 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.15 (1H, m), 2.31-2.09 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 528.1360; found, 528.1315; calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}^{37}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 530.1330; found, 530.1295.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(3-pyridylcarbamothioyl)deacetylcolchicine (**105**)

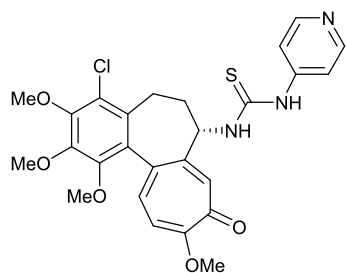


Compound **105** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (50 mg, 0.13 mmol) and 3-pyridyl isothiocyanate (29  $\mu\text{L}$ , 0.26 mmol) using the same procedure as that described for compound **82**. Pale yellow solid (51 mg, 0.097 mmol, 76% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ :  $-127.75^{\circ}$  ( $c = 0.227$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.79 (1H, s), 8.67 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 8.57 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz), 8.28 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz), 7.94 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 7.32 (1H, dd,  $J = 8.2, 4.8$  Hz), 7.17 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.14 (1H, s), 7.05 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz), 4.81-4.75 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.17-3.12 (1H, m), 2.19-2.13 (2H, m), 2.06-1.99 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 528.1360; found, 528.1376; calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}^{37}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ ,

530.1330; found, 530.1366.

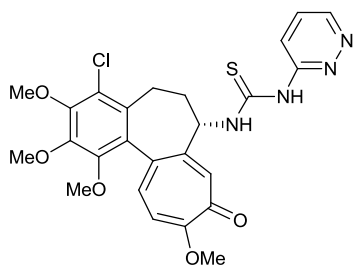
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(pyridin-4-ylcarbamoithioyl)deacetylcolchicine (**106**)



Compound **106** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.077 mmol) and 4-aminopyridine (11 mg, 0.11 mmol) using the same procedure as that described for compound **88**. Yellow solid (25 mg, 0.048 mmol, 63% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -114.24 ° ( $c = 0.128$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.07 (1H, s), 8.89 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 8.37 (2H, d,  $J = 5.6$  Hz), 7.59 (2H, d,  $J = 5.6$  Hz), 7.18 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.11 (1H, s), 7.05 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.76-4.69 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.18-3.13 (1H, m), 2.22-2.12 (2H, m), 2.06-1.97 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 528.1360; found, 528.1323; calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}^{37}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 530.1330; found, 530.1307.

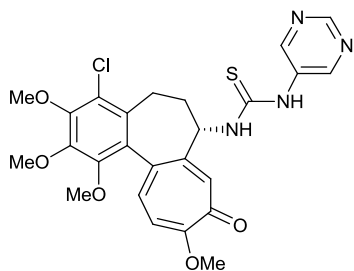
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(pyridazin-3-ylcarbamoithioyl)deacetylcolchicine (**107**)



Compound **107** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (30 mg, 0.069 mmol) and 3-aminopyridazine (7 mg, 0.076 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Off-white solid (20 mg, 0.037 mmol, 54% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : +83.98 ° ( $c = 0.077$ , MeOH). CD (MeOH, 18 °C,  $c = 0.16$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (371), -2.50 (350), 0 (327), 3.97 (302), 0 (282), -14.15 (261), 0 (238), 23.35 (227), 0 (212), -0.67 (210), 0 (209).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.15 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 11.07 (1H, s), 8.97 (1H, d,  $J = 4.6$  Hz), 7.74 (1H, dd,  $J = 9.0, 4.6$  Hz), 7.54 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz), 7.21 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.08 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.00 (1H, s), 4.87-4.81 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.19 (1H, dd,  $J = 12.4, 3.4$  Hz), 2.35-2.19 (2H, m), 2.13-2.05 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}^{35}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 529.1312; found, 529.1375; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}^{37}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 531.1283; found, 531.1337.

#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(pyrimidin-5-ylcarbamoithioyl)deacetylcolchicine (**108**)



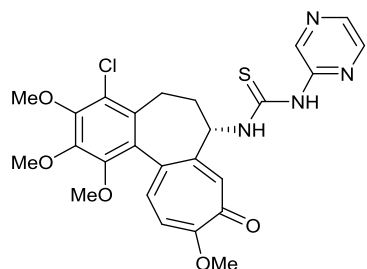
Compound **108** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (30 mg, 0.069 mmol) and 5-aminopyrimidine (8 mg, 0.083 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Yellow solid (18 mg, 0.034 mmol, 49% yield).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -130.95 ° ( $c = 0.160$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.83 (1H, s), 8.89 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz), 8.88 (1H, s), 8.87 (2H, s), 7.17 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.13 (1H, s), 7.05 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.81-4.74 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.61



(3H, s), 3.20-3.11 (1H, m), 2.23-2.11 (2H, m), 2.05-1.98 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{25}H_{26}^{35}ClN_4O_5S$   $[M+H]^+$ , 529.1312; found, 529.1310; calcd for  $C_{25}H_{26}^{37}ClN_4O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 531.1283; found, 531.1276.

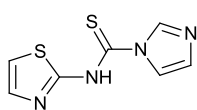
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(pyrazin-2-ylcarbamoithioyl)deacetylcolchicine (109)



Compound **109** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (30 mg, 0.069 mmol) and 2-aminopyrazine (10 mg, 0.10 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Off-white solid (14 mg, 0.026 mmol, 38% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : +148.25° ( $c = 0.069$ , MeOH). CD (MeOH, 18 °C,  $c = 0.16$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (386), 9.29 (336), 0 (318), -24.09 (242), 0 (234), 31.42 (225), 10.23 (209), 15.50 (201).  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.51 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 11.18 (1H, s), 8.59 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz), 8.34 (1H, dd,  $J = 2.7, 1.2$  Hz), 8.32 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 7.20 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.07 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.00 (1H, s), 4.84-4.78 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.15 (1H, m), 2.30-2.12 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{25}H_{26}^{35}ClN_4O_5S$   $[M+H]^+$ , 529.1312; found, 529.1284; calcd for  $C_{25}H_{26}^{37}ClN_4O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 531.1283; found, 531.1236.

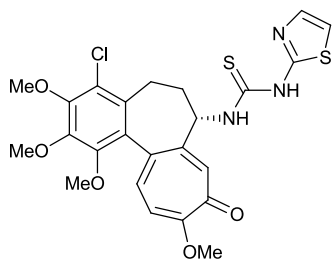
#### Synthesis of *N*-(thiazol-2-yl)-1*H*-imidazole-1-carbothioamide (110)



To a stirred solution of 2-aminothiazole (1.00 g, 9.99 mmol) in MeCN (10 mL) was added 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (1.78 g, 9.99 mmol) at ambient temperature under argon atmosphere. After stirring 2 h at 40 °C, the mixture was cooled to 0 °C. The precipitate was collected by filtration, washed with cold MeCN and *n*-hexane, and dried in reduced pressure to afford the desired material **110** (1.37 g, 6.49 mmol, 65% yield) as a pale yellow solid.

$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.64 (1H, s), 7.95 (1H, t,  $J = 1.2$  Hz), 7.75 (1H, d,  $J = 4.4$  Hz), 7.31 (1H, dd,  $J = 4.1$  Hz), 7.07 (1H, s). ESI-MS  $m/z$ : 211  $[M+H]^+$ .

#### Synthesis of 4-chloro-*N*-(thiazol-2-ylcarbamoithioyl)deacetylcolchicine (112)

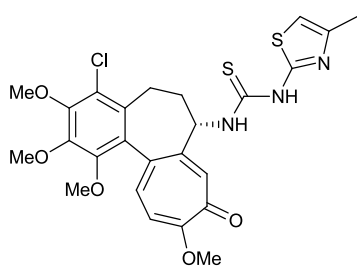


To a stirred solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (30 mg, 0.077 mmol) in MeCN (1.5 mL) was added *N*-(thiazol-2-yl)-1*H*-imidazole-1-carbothioamide **110** (18 mg, 0.084 mmol) at room temperature under argon atmosphere. The solution was heated under reflux for 1 h with stirring. After cooling to room temperature, 10% NaHSO<sub>4</sub> aq. was added to the reaction mixture and the whole mixture was extracted two times with AcOEt. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound

**112.** (38 mg, 0.071 mmol, 93% yield) as an off-white solid.

$[\alpha]_D^{25}$ : +28.38° ( $c = 0.250$ , MeOH). CD (MeOH, 18 °C,  $c = 0.21$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (375), -6.84 (342), 0 (323), 5.11 (311), 0 (296), -44.18 (252), 0 (243), 55.07 (231), 2.89 (210), 12.70 (201).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.44 (1H, br-s), 7.20-7.01 (4H, m), 4.76-4.69 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.20-3.13 (1H, m), 2.23-1.98 (3H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 534.0924; found, 534.1058; calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}^{37}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 536.0895; found, 536.1025.

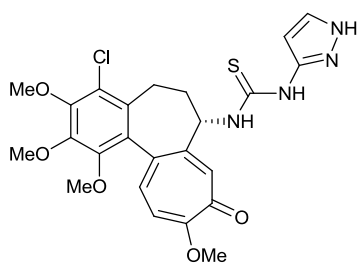
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-methylthiazol-2-yl)carbamoithiyl)deacetylcolchicine (117)



Compound **117** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (30 mg, 0.069 mmol) and 2-amino-4-methylthiazole (16 mg, 0.14 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Yellow solid (25 mg, 0.046 mmol, 66% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : +38.97° ( $c = 0.136$ , MeOH). CD (MeOH, 18 °C,  $c = 0.21$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (380), -7.81 (348), 0 (328), 7.33 (315), 0 (301), -47.55 (253), 0 (244), 63.50 (229), 0 (211), -3.28 (209), 0 (206).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.18 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 7.08-7.00 (2H, m), 6.69 (1H, br-s), 4.76-4.69 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.19-3.13 (1H, m), 2.27-2.00 (3H, m), 2.24 (3H, br-s). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 548.1081; found, 548.1034; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}^{37}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 550.1051; found, 550.0988.

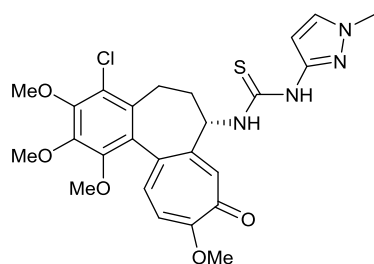
### Synthesis of 4-chloro-*N*-(pyrazol-3-ylcarbamoithiyl)deacetylcolchicine (118)



Compound **118** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (30 mg, 0.069 mmol) and 3-aminopyrazole (11 mg, 0.14 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Yellow solid (26 mg, 0.050 mmol, 72% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : +73.95° ( $c = 0.119$ , MeOH). CD (MeOH, 20 °C,  $c = 0.19$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (373), -5.34 (340), 0 (318), 9.72 (287), 0 (273), -28.94 (256), 0 (244), 5.49 (240), 0 (235), -6.25 (231), 0 (229), 27.97 (220), 14.75 (208), 19.88 (202).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12.64 (1H, s), 10.66 (1H, s), 10.39 (1H, br-s), 7.73 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz), 7.18 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.05 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.98 (1H, s), 5.96 (1H, s), 4.88-4.81 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.19-3.14 (1H, m), 2.30-2.16 (2H, m), 2.00-1.90 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{35}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 517.1312; found, 517.1301; calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{37}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 519.1283; found, 519.1272.

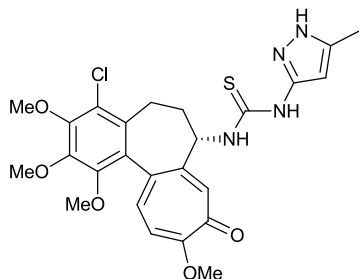
### Synthesis of 4-chloro-*N*-((1-methylpyrazol-3-yl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (**119**)



Compound **119** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (30 mg, 0.069 mmol) and 3-amino-1-methylpyrazole (13 mg, 0.14 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Yellow solid (32 mg, 0.060 mmol, 96% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : +139.62° ( $c = 0.106$ , MeOH). CD (MeOH, 20 °C,  $c = 0.20$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (371), -4.89 (341), 0 (324), 14.52 (290), 0 (276), -32.53 (257), 0 (247), 5.20 (245), 0 (242), -30.14 (234), 0 (229), 38.33 (222), 12.38 (209), 20.67 (203).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.61 (1H, s), 10.20 (1H, br-s), 7.66 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz), 7.18 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.05 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.98 (1H, s), 5.92 (1H, s), 4.83-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.82 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.19-3.14 (1H, m), 2.29-2.16 (2H, m), 2.05-1.98 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}^{35}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 531.1469; found, 531.1487; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}^{37}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 533.1439; found, 533.1485.

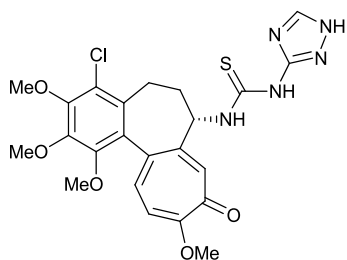
### Synthesis of 4-chloro-*N*-((5-methylpyrazol-3-yl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (**120**)



Compound **120** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (62 mg, 0.16 mmol) and 3-amino-5-methylpyrazole (23 mg, 0.24 mmol) using the same procedure as that described for compound **101**. Yellow solid (73 mg, 0.14 mmol, 86% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : +78.89° ( $c = 0.199$ , MeOH). CD (MeOH, 20 °C,  $c = 0.18$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (371), -6.00 (342), 0 (320), 10.07 (289), 0 (274), -30.60 (255), 0 (242), 1.21 (241), 0 (238), -2.86 (232), 0 (230), 31.21 (221), 14.06 (208), 20.70 (203).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.36 (1H, s), 10.59 (1H, br-s), 10.46 (1H, br-s), 7.18 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.06 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.96 (1H, s), 5.73 (1H, s), 4.86-4.80 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.18-3.08 (1H, m), 2.27-2.16 (5H, m), 1.96-1.90 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}^{35}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 531.1469; found, 531.1613; calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}^{37}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 533.1439; found, 533.1595.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-((1,2,4-triazol-3-yl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (**121**)



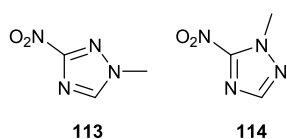
To a stirred solution of 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (72 mg, 0.17 mmol) in DMF (1 mL) was added 3-amino-1,2,4-triazole (17 mg, 0.20 mmol) at ambient temperature under argon atmosphere. The mixture was stirred for 2 h at 80 °C. After cooling to room temperature,  $\text{CHCl}_3$  was added. The whole mixture was washed with  $\text{NaHCO}_3$  aq., dried over

$\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to afford compound **121** (27 mg, 0.053 mmol, 31% yield)

as a yellow solid.

$[\alpha]_D^{25}$ : -77.02 ° ( $c = 0.082$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.49 (1H, br-s), 8.10 (2H, br-s), 7.72 (1H, br-s), 7.19 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.09 (1H, s), 7.06 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 4.80-4.78 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.65 (3H, s), 3.17-3.13 (1H, m), 2.55-2.53 (1H, m), 2.21-2.03 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}^{35}\text{ClN}_5\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 518.1265; found, 518.1307; calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}^{37}\text{ClN}_5\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 520.1235; found, 520.1282.

### Synthesis of 1-methyl-3-nitro-1*H*-1,2,4-triazole (**113**) and 1-methyl-5-nitro-1*H*-1,2,4-triazole (**114**)



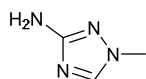
NaOMe (1.45 g, 26.8 mmol) and MeI (1.67 mL, 26.8 mmol) were added to a solution of 3-nitro-1,2,4-triazole (1.02 g, 8.93 mmol) in MeOH (20 mL), and then the mixture was stirred overnight at ambient temperature.

After evaporating under reduced pressure,  $\text{CHCl}_3$  was added to the residue. The organic solution was washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ ) to afford compound **113** (598 mg, 4.68 mmol, 52% yield) as a white solid and compound **114** (80 mg, 0.63 mmol, 7% yield) as a white solid.

**113**:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.80 (1H, s), 4.02 (3H, s). ESI-MS  $m/z$ : 129  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**114**:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.21 (1H, s), 4.16 (3H, s). ESI-MS  $m/z$ : 129  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

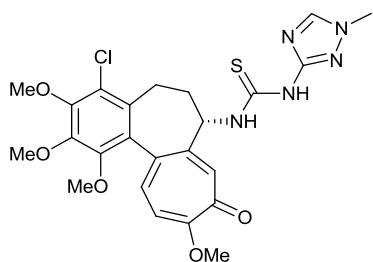
### Synthesis of 3-amino-1-methyl-1*H*-1,2,4-triazole (**115**)



To a solution of compound **113** (97 mg, 0.76 mmol) in EtOH (5 mL) was added 10% Pd/C (10 mg), and then the mixture was vigorously stirred for 3 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The insoluble material was removed with a pad of Celirte. The filtrate was concentrated and dried under reduced pressure to afford compound **115** (69 mg, 0.70 mmol, 93%) as an yellow solid.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.63 (1H, s), 4.18 (2H, br-s), 3.73 (3H, s). ESI-MS  $m/z$ : 99  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### Synthesis of 4-chloro-*N*-((1-methyl-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (**122**)

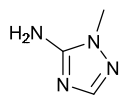


Compound **122** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (54 mg, 0.12 mmol) and 3-amino-1-methyl-1*H*-1,2,4-triazole (**115**) (15 mg, 0.14 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Yellow solid (42 mg, 0.079 mmol, 66% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : +53.60 ° ( $c = 0.216$ , MeOH). CD (MeOH, 20 °C,  $c = 0.17$  mM)  $\Delta\epsilon$  (nm): 0 (372), -7.10 (339), 0 (313), 11.60 (280), 0 (270), -46.76 (257), 0 (245), 24.80 (237), 21.88 (231), 30.10 (222), 11.23 (209).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  11.17 (1H, s), 10.42 (1H, d,

$J = 6.6$  Hz), 8.50 (1H, s), 7.19 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.06 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.95 (1H, s), 4.85-4.79 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.85 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.17-3.15 (1H, m), 2.26-2.19 (2H, m), 2.05-2.00 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{24}H_{27}^{35}ClN_5O_5S$   $[M+H]^+$ , 532.1421; found, 532.1516; calcd for  $C_{24}H_{27}^{37}ClN_5O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 534.1392; found, 534.1474.

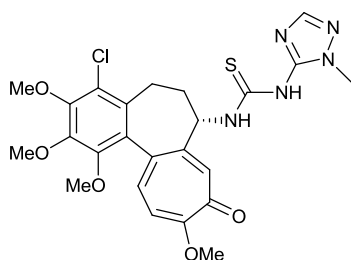
### Synthesis of 3-amino-1-methyl-1*H*-1,2,4-triazole (**116**)



To a solution of compound **114** (40 mg, 0.31 mmol) in EtOH (2 mL) was added 10% Pd/C (4 mg), and then the mixture was vigorously stirred for 3.5 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The insoluble material was removed with a pad of Celirte. The filtrate was concentrated and dried under reduced pressure to afford compound **116** (26 mg, 0.27 mmol, 86%) as a yellow solid.

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.47 (1H, s), 4.39 (2H, br-s), 3.64 (3H, s). ESI-MS  $m/z$ : 99  $[M+H]^+$ .

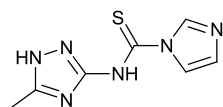
### Synthesis of 4-chloro-*N*-((1-methyl-1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (**123**)



Compound **123** was prepared from 4-chloro-7-isothiocyanato-7-de(acetamide)colchicine (**79**) (81 mg, 0.18 mmol) and 5-amino-1-methyl-1*H*-1,2,4-triazole (**116**) (22 mg, 0.22 mmol) using the same procedure as that described for compound **121**. Yellow solid (42 mg, 0.079 mmol, 66% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-49.09^\circ$  ( $c = 0.265$ , MeOH).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  10.96 (1H, s), 10.74 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 7.91 (1H, s), 7.19 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 7.06 (1H, d,  $J = 10.7$  Hz), 6.99 (1H, s), 4.82-4.75 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.77 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.17 (1H, m), 2.24-2.19 (2H, m), 2.08-2.01 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for  $C_{24}H_{27}^{35}ClN_5O_5S$   $[M+H]^+$ , 532.1421; found, 532.1477; calcd for  $C_{24}H_{27}^{37}ClN_5O_5S$   $[M+H+2]^+$ , 534.1392; found, 534.1448.

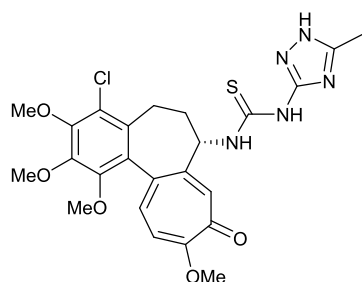
### Synthesis of *N*-(5-methyl-1,2,4-triazol-3-yl)-1*H*-imidazole-1-carbothioamide (**111**)



To a stirred solution of 3-amino-5-methyl-1,2,4-triazole (265 mg, 2.7 mmol) in MeCN (2.7 mL) was added 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (481 mg, 2.7 mmol) at ambient temperature under argon atmosphere. After stirring for 2 h, the precipitate was collected by filtration, washed with cold MeCN, and dried under reduced pressure to afford the desired material **111** (377 mg, 1.8 mmol, 67% yield) as a yellow solid.

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  8.41 (1H, t,  $J = 1.1$  Hz), 8.26 (2H, br-s), 7.83 (1H, t,  $J = 1.5$  Hz), 7.05 (1H, dd,  $J = 1.5, 1.1$  Hz), 2.12 (3H, s). ESI-MS  $m/z$ : 209  $[M+H]^+$ .

### Synthesis of 4-chloro-*N*-((5-methyl-1,2,4-triazol-3-yl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (**124**)

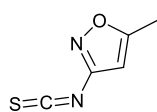


To a stirred solution of 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (61 mg, 0.16 mmol) in DMF (2 mL) was added *N*-(5-methyl-1,2,4-triazol-3-yl)-1*H*-imidazole-1-carbothioamide (36 mg, 0.17 mmol) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 2 h at 60 °C. After cooling to room temperature, water was added to the reaction mixture and the

whole mixture was extracted two times with AcOEt. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **124**. (46 mg, 0.088 mmol, 55% yield) as a yellow solid.

$[\alpha]_D^{25}$ : -64.44 ° (*c* = 0.225, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.32 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 8.06 (2H, br-s), 7.19 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 7.07-7.04 (2H, m), 4.82-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.15 (1H, dd, *J* = 12.9, 5.4 Hz), 2.60-2.53 (1H, m), 2.20 (3H, s), 2.18-1.99 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>24</sub>H<sub>27</sub><sup>35</sup>ClN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup>, 532.1421; found, 532.1414; calcd for C<sub>24</sub>H<sub>27</sub><sup>37</sup>ClN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S [M+H+2]<sup>+</sup>, 534.1392; found, 534.1376.

### Synthesis of 3-isothiocyanato-5-methylisoxazole (**125**)

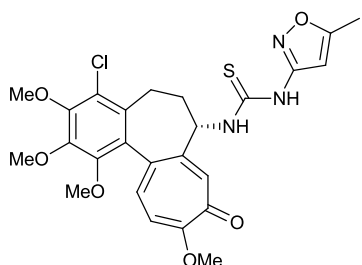


A solution of 3-amino-5-methylisoxazole (326 mg, 3.3 mmol), thiophosgene (278 μL, 3.6 mmol) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq. (769 mg in 4 mL, 7.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.5 mL) was stirred for 3h at room temperature. Brine was added to the reaction mixture and the

whole mixture was extracted two times with CHCl<sub>3</sub>. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford the title compound **125** (255 mg, 1.8 mmol, 55% yield) as a yellow oil.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.97 (1H, t, *J* = 0.9 Hz), 2.43 (3H, t, *J* = 0.9 Hz). ESI-MS *m/z*: 141 [M+H]<sup>+</sup>.

### Synthesis of 4-chloro-*N*-((5-methylisoxazol-3-yl)carbamothioyl)deacetylcolchicine (**126**)



Compound **126** was prepared from 4-chlorodeacetylcolchicine (**19**) (75 mg, 0.19 mmol) and 3-isothiocyanato-5-methylisoxazole (**125**) (32 mg, 0.23 mmol) using the same procedure as that described for compound **95**. Yellow solid (98 mg, 0.15 mmol, 80% yield).

$[\alpha]_D^{25}$ : -108.11 ° (*c* = 0.244, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.20 (1H, s), 7.17 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 7.13 (1H, s), 7.05 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 4.25-4.14 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.54 (3H, s), 3.15 (1H, dd, *J* = 12.8, 4.8 Hz), 2.28-2.12 (2H, m), 1.93 (3H, s), 1.91-1.83 (1H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub><sup>35</sup>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup>, 532.1309; found, 532.1328; calcd for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub><sup>37</sup>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [M+H+2]<sup>+</sup>, 534.1280; found,

534.1323.

### ***In vitro* assay**

#### **Cell culture**

Human lung cancer cell line A549 and human colorectal cancer cell lines, HT-29 and HCT116, were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA). The cancer cell lines were continuously cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (10% FBS/DMEM).

#### **Cytotoxicity evaluation**

A 50 µL volume (1000 cells) of an exponentially growing cell suspension was seeded into a 96-well microtiter plate and 50 µL of each drug at various concentrations was added 24 h after the seeding of the tumor cells. After incubation for 96 h at 37 °C, 10 µL of TetraColor ONE (Seikagaku Biobusiness Corporation, Tokyo, Japan) was added to each well and the plates were incubated further for 1 h at 37 °C. After incubation, optical density was measured at 450 nm with a microplate reader (Spectramax 384 Plus, Molecular Devices, CA), and the concentration causing 50% inhibition of cell proliferation (IC<sub>50</sub>) was calculated by linear regression analysis of the linear portion of the growth curves.

#### **Metabolic stability in mouse microsomes**

BALB/c mouse hepatic microsomes were purchased from XenoTech, LLC (Lenexa, KS). The reaction mixture (0.5 mL) containing 0.25 mg/mL microsomal protein and 1 µmol/L test compound in 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4) was preincubated for 5 min at 37 °C, and the reaction was started by adding 30 µL of NADPH-regenerating system solution (BD Gentest, Woburn, MA). The reaction mixture (50 µL) was sampled and the reaction was terminated by adding 150 µL of 1% formic acid at 0, 5, 10, 15, 30, and 60 min. All incubations were done in triplicate. The test compound in the reaction mixture was measured by LC-MS/MS using a Scherzo SM-C18 column (150 × 2.0 mm ID., Imtakt, Japan). The column temperature and the flow rate were 40 °C and 0.35 mL/min, respectively. Mobile phases A and B were acetonitrile and 2 mmol/L ammonium formate (pH 3.3), respectively. The gradient elution was as follows: mobile phase A was linearly increased from 15% to 95% over a period of 4 minutes, kept at 95% for the next 2 minutes, and then equilibrated at 15% for 5 minutes. Metabolic stability was calculated by the following formula (A).  
Metabolic stability (mL/min/mg) = slope of a semi-logarithmic plot of test compound concentration / microsomal protein concentration (0.25 mg/mL) (A).

#### **Tubulin polymerization assay**

*In vitro* tubulin polymerization assays were done using a Tubulin Polymerization Assay Kit

(Cytoskeleton, inc.). Lyophilized porcine microtubule protein was resuspended in G-PEM buffer (80 mM PIPES, pH 6.9, 0.5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM GTP, 10% glycerol) to a final concentration of 4 mg/mL. Tubulin polymerization was monitored spectrophotometrically by the change in absorbance at 340 nm. The absorbance was measured at 1-min intervals for 45 min using SpectraMax (Molecular device). The IC<sub>50</sub> for tubulin polymerization was defined as the concentration of compound that inhibited tubulin assembly by 50% compared to solvent-treated control at 5 min.

### ***In vivo* assay**

#### **Animals**

Inbred specific-pathogen-free 5-week-old male BALB/C nude mice were purchased from Japan SLC, Inc. (Hamamatsu, Japan). The mice were kept in plastic cages and allowed free access to water and a standard diet (MF, Oriental Yeast Industry Co., Tokyo, Japan). Temperature and humidity were kept at 24±1 °C and 55±10%, respectively. *In vivo* antitumor experiments were performed according to our internal and ethics committee regulations.

#### **Antitumor experiments**

After transplanting HCT116 cells (2 × 10<sup>6</sup> cells/mouse) subcutaneously to the inguinal region of nude mice, the mice were grouped (3~5 mice/group) on the day when the estimated tumor volume calculated by the following formula (B) reached approximately 300 mm<sup>3</sup> (Day 1). The derivatives were administered intravenously three times on days 1, 5, and 9. As negative control, 5% glucose/Tween 80/propylene glycol (85/10/5) was administered following the same administration schedule as that of the derivatives. The tumors were excised on Day 22 and tumor growth inhibition rate (IR (%), formula (C)) was calculated from the tumor weights.

Estimated tumor volume (mm<sup>3</sup>) = 1/2 × long diameter × short diameter × short diameter (B).

IR (%) = (1 – mean tumor weight in the tested group / mean tumor weight in the control group) × 100 (C).

#### ***In silico* simulation**

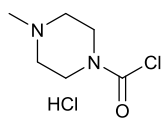
The modules in Maestro (the unified interface for all Schrödinger software) were used by default settings to search stable conformations of 4-chlorocolchicines in the colchicine binding site of tubulin. Firstly, to prepare the docking receptor, the α,β-tubulin complex merged with the DAMA-colchicine and GTPs (PDB code 1SA0, chain A and B) was processed using the Protein Preparation module in Maestro. The module assigned ionization states and hydrogens in the complex structure, and energy-minimized the hydrogens in the OPLS 2005 force field.<sup>69)</sup> Secondly, the Receptor Grid Generation module was used to create the receptor grid where 4-chlorocolchicines were docked. The grid box and center were set to default by using the DAMA-colchicine molecule in the β-tubulin. The van der Waals scaling of the receptor was 1.0.



Thirdly, the 3D structure of each 4-chlorocolchicine derivative was generated by the Ligprep 2.4 module, which produced a single low-energy and geometrically reasonable conformer using the OPLS 2005 force field. Finally, the Glide 5.6 module was used to dock the derivative (ligand) to the colchicine binding pocket.<sup>70)</sup> As a first step in the Glide SP docking mode, many new ligand conformations were generated through torsional variations of the each ligand 3D structure. For each conformer with default 0.8 van der Waals scaling, the Glide module performed an exhaustive search of possible positions and orientations over the receptor grid previously defined, and the energetically stable poses were taken through minimization in the OPLS 2005 force field. They were further evaluated and re-ranked using the Glide score, and top 25 poses for each ligand were outputted.

### 第三章付属実験

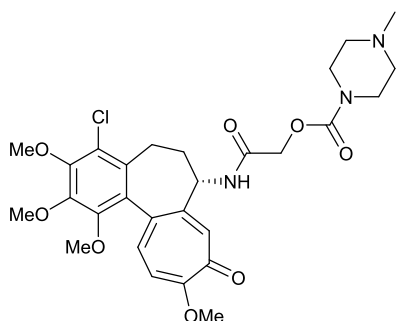
#### Synthesis of 1-methylpiperazine-4-carbonylchloride hydrochloride (**130**)



A solution of 1-methylpiperazine (0.50 mL, 4.54 mmol) and triphosgene (1.35 g, 4.54 mmol) in MeCN (9 mL) was stirred overnight at ambient temperature. After concentration under reduced pressure, Et<sub>2</sub>O was added to the residue. The mixture was sonicated and then the solid was collected by filtration. The solid material was washed with Et<sub>2</sub>O then hexane, and dried *in vacuo* to afford compound **130** (0.90 g, 4.54 mmol, quant.) as a white solid.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.7 (1H, br-s), 4.45 (2H, d, *J* = 15.1 Hz), 4.12 (1H, t, *J* = 12.6 Hz), 3.88 (1H, t, *J* = 12.6 Hz), 3.60-3.52 (2H, m), 2.98-2.89 (2H, m), 2.87 (3H, d, *J* = 4.6 Hz).

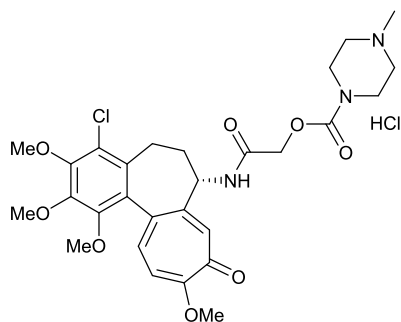
#### Synthesis of 4-chloro-*N*-((4-methylpiperazine-1-carboxyloxy)acetyl)deacetylcolchicine (**131**)



To a stirred solution of compound **56** (32 mg, 0.071 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) were added Et<sub>3</sub>N (47 μL, 0.33 mmol), DMAP (3 mg, 0.028 mmol) and compound **130** (31 mg, 0.16 mmol), and the mixture was stirred overnight at room temperature. Et<sub>3</sub>N (47 μL, 0.33 mmol) and **130** (31 mg, 0.16 mmol) were added to the mixture. After stirring overnight at ambient temperature, Et<sub>3</sub>N (87 μL, 0.61 mmol) and **130** (62 mg, 0.32 mmol) were added to the mixture. The resulting mixture was further stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution, and the whole mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> solution then brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **131** (25 mg, 0.043 mmol, 61% yield) as an off-white solid.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -100.28° (*c* = 0.215, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.74 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 10.8 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, *J* = 10.8 Hz), 4.48 (2H, s), 4.28-4.21 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.43-3.28 (4H, m), 3.14-3.07 (1H, m), 2.28-2.22 (4H, m), 2.19-2.07 (1H, m), 2.16 (3H, s), 2.00-1.83 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>28</sub>H<sub>35</sub><sup>35</sup>ClN<sub>3</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 576.2113; found, 576.1971; calcd for C<sub>28</sub>H<sub>35</sub><sup>37</sup>ClN<sub>3</sub>O<sub>8</sub> [M+H+2]<sup>+</sup>, 578.2083; found, 578.1928.

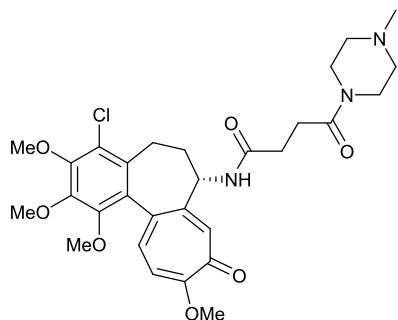
### Synthesis of 4-chloro-*N*-((4-methylpiperazine-1-carboxyloxy)acetyl)deacetylcolchicine hydrochloride (**132**)



To a stirred solution of AcCl (9.4  $\mu$ L, 0.13 mmol) in MeOH (0.3 mL) was added compound **131** (51 mg), and the mixture was stirred for 5 min at ambient temperature. Et<sub>2</sub>O was added to the resulting solution, and the precipitate was collected by filtration. The solid was washed with Et<sub>2</sub>O, and dried under reduced pressure to afford compound **132** (42 mg, 0.069 mmol, 78% yield) as an off-white solid.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.52 (1H, s), 8.82 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.14 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.05 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.54 (2H, s), 4.30-4.23 (1H, m), 4.14-3.98 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.41-3.09 (4H, m), 3.12 (1H, dd, *J* = 13.6, 4.9 Hz), 3.04-2.90 (2H, m), 2.76 (3H, s), 2.17-2.07 (1H, m), 2.01-1.84 (2H, m).

### Synthesis of 4-chloro-*N*-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)-4-oxobutanoyl)deacetylcolchicine (**133**)



To a stirred solution of 4-(4-methylpiperazin-1-yl)-4-oxobutyric acid (28 mg, 0.14 mmol) in DMF (1 mL) were added EDCI (27 mg, 0.14 mmol) and HOBt (22 mg, 0.14 mmol) under argon atmosphere at 0 °C. After stirring for 15 min at 0 °C, compound **19** (50 mg, 0.13 mmol) was added to the mixture. The resulting mixture was further stirred overnight at ambient temperature. The reaction was quenched by adding saturated aqueous

NaHCO<sub>3</sub>, and the whole mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by DIOL silica gel flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to afford compound **133** (46 mg, 0.081 mmol, 63% yield) as an off-white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -145.03 ° (*c* = 0.214, MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.62 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.12 (1H, s), 7.12 (1H, d, *J* = 10.3 Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 11.2 Hz), 4.26-4.19 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.52 (3H, s), 3.40-3.34 (4H, m), 3.10 (1H, dd, *J* = 12.9, 5.2 Hz), 2.48-2.32 (4H, m), 2.22 (2H, t, *J* = 4.6 Hz), 2.18 (2H, t, *J* = 4.6 Hz), 2.15-2.06 (1H, m), 2.13 (3H, s), 1.98-1.79 (2H, m). HR-ESI-MS: calcd for C<sub>29</sub>H<sub>37</sub><sup>35</sup>ClN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 574.2320; found, 574.2317; calcd for C<sub>29</sub>H<sub>37</sub><sup>37</sup>ClN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H+2]<sup>+</sup>, 576.2291; found, 576.2303.

### Materials

Octreotide-poly(ethylene glycol)<sub>3400</sub>-distearoylphosphatidylethanolamine (Oct-PEG-DSPE) was purchased from KNC Laboratories Co., Ltd. (Kobe, Japan). Methoxy-PEG<sub>2000</sub>-DSPE (PEG-DSPE) and COATSOME EL-01-A were purchased from NOF Corporation (Tokyo, Japan).

### **Preparation of Oct-PEG-DSPE (or PEG<sub>2000</sub>-DSPE) liposomes loaded with compound 132 (L2 or L3)**

A solution of **132** (1 mg) in water (Milli-Q: 1 mL) was added to COATSOME EL-01-A (liposome: 10 mg) at ambient temperature. After shaking several times, a solution of Oct-PEG-DSPE (or PEG-DSPE: 1.6 ~ 6.0 mol% with total lipid) in water (Milli-Q: 10 mL) was added to the liposome suspension (**L1**). The resulting mixture was incubated at 45 °C for 30 min, and then the free Oct-PEG-DSPE (or PEG-DSPE) and free **132** existing outside the liposomes in the aqueous media were removed by centrifugal filtration (Millipore: Ultracel-30K, 4 °C, 3200 rpm). Water (Milli-Q) was added to the residue, and then the aqueous media was removed by centrifugal filtration (4 °C, 3200 rpm). This procedure (addition of water then removal of water) was done one more time. By adding water (Milli-Q: 1 mL) to the residue, the Oct-PEG-DSPE (or PEG-DSPE) liposomes loaded with **132** was obtained (**L2** or **L3**). Empty liposome (**L2-0**) was prepared using the same protocol but without loading **132**. The final concentration of **132** inside the liposomes (**L2** or **L3**) was determined by comparing to absorption intensity of a given concentration of **132** at wavelength 340 nm using a UV-visible spectrometer (Cary 50 Bio, Varian, USA) after disruption of the liposomes with EtOH. The final Octreotide concentration on the liposomes (**L2** or **L2-0**) was determined using an Octreotide-EIA kit (Peninsula Laboratories, LLC, USA) after disruption of the liposomes by dilution in 10% Triton. The final concentration of the phospholipid in the liposomes (**L2**, **L3**, and **L2-0**) was determined using a phospholipid C Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan). The mean diameter and zeta-potential of the resulting liposomes (**L2**, **L3**, and **L2-0**) were determined using a particle characterization system (Zetasizer Nano-ZS, Malvern, UK).

### **Temporal stability of Oct-PEG-DSPE (or PEG<sub>2000</sub>-DSPE) liposomes loaded with compound 132 (L2 or L3) at 5 °C in the dark**

Aqueous media from the liposome suspension (**L2** or **L3**) was collected by centrifugal filtration (Millipore: Ultracel-30K, 4 °C, 3200 rpm). The concentration of **132** in the aqueous media was determined by comparing to absorption intensity of a given concentration of **132** at wavelength 340 nm using a UV-visible spectrometer (Cary 50 Bio, Varian, USA) after disruption of the liposomes with EtOH.

### ***In vitro* assay**

#### **Cell culture**

Human lung cancer cell line A549, human colorectal cancer cell lines, HT-29 and HCT116, human medullary thyroid cancer cell line TT, human non-small cell lung cancer cell line NCI-H460, human triple-negative breast cancer cell line HCC1806 and human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA). The cancer cell lines were continuously cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in RPMI1640 medium

supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (10% FBS/DMEM).

#### **Relative expression level of SSTR2 and SSTR5 (Real-time RT-PCR)**

Total RNA from each cancer cell line was extracted using RNAspin Mini Kit (GE Healthcare, NJ). Reverse transcription was performed with random hexamer primers using GoScript Reverse Transcription System (Promega, WI). Quantitative real-time PCR was carried out on the ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, CA). The standard curve method was used to determine fold change in expression using ACTB as an internal standard gene. Each sample was in triplicate. The following primers were used for the quantitative real-time PCR. SSTR2: 5'-AAGGTGAGCGGCACAGATG-3', 5'-GGTCTCATTTCAGCCGGGATT-3'; SSTR5: 5'-GAAGGTGACGCGCATGGT-3', 5'-GACGATGTTGACGGTGAAGAAG-3'; ACTB: 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3', 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'.

#### **Cytotoxicity evaluation**

A 50 µL volume (500 cells for A549 and HCT116, 1000 cells for HT-29, NCI-H460, and HCC1806, 2500 cells for TT) of an exponentially growing cell suspension was seeded into a 96-well microtiter plate and 50 µL of each drug at various concentrations was added 24 h after the seeding of the tumor cells. After incubation for 96 h at 37 °C, 10 µL of WST-8 Kit (Kishida Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan) was added to each well and the plates were incubated further for 1 h at 37 °C. After incubation, optical density was measured at 450 nm with a microplate reader (Spectramax 384 Plus, Molecular Devices, CA), and the concentration causing 50% inhibition of cell proliferation (IC<sub>50</sub>) was calculated by linear regression analysis of the linear portion of the growth curves.

## 参考文献

- 1) T. Misawa, M. Takahama, T. Kozaki, H. Lee, J. Zou, T. Saitoh, and S. Akira, Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.*, **2013**, *14*, 454-460.
- 2) T. Graening and H.-G. Schmalz, Total Syntheses of Colchicine in Comparison: A Journey through 50 Years of Synthetic Organic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3230-3256.
- 3) P. G. Morris and M. N. Fornier, Microtubule Active Agents: Beyond the Taxane Frontier. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 7167-7172.
- 4) R. M. Lee and D. A. Gewirtz, Colchicine Site Inhibitors of Microtubule Integrity as Vascular Disrupting Agents. *Drug Dev. Res.*, **2008**, *69*, 352-358.
- 5) I. B. Boruchow, Bone Marrow Depression Associated with Acute Colchicine Toxicity in the Presence of Hepatic Dysfunction. *Cancer*, **1966**, *19*, 541-543.
- 6) J. Zhou and P. Giannakakou, Targeting Microtubules for Cancer Chemotherapy. *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, **2005**, *5*, 65-71.
- 7) S. Mendis, Colchicine cardiotoxicity following ingestion of *Gloriosa superba* tubers. *Postgrad. Med. J.*, **1989**, *65*, 752-755.
- 8) I. Mikaelian, A. Bunes, M.-C. de Vera-Mudry, C. Kanwal, D. Coluccio, E. Rasmussen, H. W. Char, V. Carvajal, H. Hilton, J. Funk, J.-C. Hoflack, M. Fielden, F. Herting, M. Dunn, and L. Suter-Dick, Primary Endothelial Damage Is the Mechanism of Cardiotoxicity of Tubulin-Binding Drugs. *Toxicol. Sci.*, **2010**, *117*, 144-151.
- 9) B. Bhattacharyya, D. Panda, S. Gupta, and M. Banerjee, Anti-Mitotic Activity of Colchicine and the Structural Basis for Its Interaction with Tubulin. *Med. Res. Rev.*, **2008**, *28*, 155-183.
- 10) F. Q. Alali, T. El-Elimat, C. Li, A. Qandil, A. Alkofahi, K. Tawaha, J. P. Burgess, Y. Nakanishi, D. J. Kroll, H. A. Navarro, J. O. Falkinham, III, M. C. Wani, and N. H. Oberlies, New Colchicinoids from a Native Jordanian Meadow Saffron, *Colchicum brachyphyllum*: Isolation of the First Naturally Occurring Dextrorotatory Colchicinoid. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 173-178.
- 11) T. J. Fitzgerald, Molecular features of colchicine associated with antimitotic activity and inhibition of tubulin polymerization. *Biochem. Pharmacol.*, **1976**, *25*, 1383-1387.
- 12) P. Kerkes, P. N. Sharma, A. Brossi, C. F. Chignell, and F. R. Quinn, Synthesis and biological effects of novel thiocolchicines. 3. evaluation of *N*-acyldeacetylthiocolchicines, *N*-(alkoxycarbonyl)deacetylthiocolchicines, and *O*-ethyldeacetylthiocolchicines. New synthesis of thiodemecolcine and antileukemic effects of 2-demethyl- and 3-demethylthiocolchicine. *J. Med. Chem.*, **1985**, *28*, 1204-1208.
- 13) M. Roesner, H.-G. Caprano, A. E. Jacobson, L. Atwell, A. Brossi, M. A. Iorio, T. H. Williams, R. H. Sik, and C. F. Chignell, Biological effects of modified colchicines. Improved preparation of 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine, and (+)-colchicine and reassignment of the

- position of the double bond in dehydro-7-deacetamidocolchicines. *J. Med. Chem.*, **1981**, *24*, 257-261.
- 14) S.-H. Lee, S.-K. Park, J.-M. Kim, M.-H. Kim, K.-H. Kim, K.-W. Chun, K.-H. Cho, J.-Y. Youn, and S. K. Namgoong, New Synthetic Thiocolchicine Derivatives as Low-toxic Anticancer Agents. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*, **2005**, *338*, 582-589.
  - 15) M. Cifuentes, B. Schilling, R. Ravindra, J. Winter and M. E. Janik, Synthesis and biological evaluation of B-ring modified colchicines and isocolchicine analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 2761-2764.
  - 16) M. J. Andreu and S. N. Timasheff, Interaction of tubulin with single ring analogs of colchicine. *Biochemistry*, **1982**, *21*, 534-543.
  - 17) C. Dumortier, Q. Yan, S. Bane, and Y. Engelborghs, Mechanism of tubulin-colchicine recognition: a kinetic study of the binding of the colchicine analogues colchicine and isocolchicine. *Biochem. J.*, **1997**, *327*, 685-688.
  - 18) K. Nakagawa-Goto, M. K. Jung, E. Hamel, C.-C. Wu, K. F. Bastow, A. Brossi, S. Ohta, and K.-H. Lee, Antitumor Agents 238. Anti-tubulin and *in vitro* Cytotoxic Effects of *N*-Substituted Alcolchicinoids. *Heterocycles*, **2005**, *65*, 541-551.
  - 19) K. Nakagawa-Goto, X. C. Chen, E. Hamel, C.-C. Wu, K. F. Bastow, A. Brossi and K.-H. Lee, Antitumor agents. Part 236: Synthesis of water-soluble colchicine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 235-238.
  - 20) A. Ahmed, N. R. Peters, M. K. Fitzgerald, J. A. Watson, Jr., F. M. Hoffmann, and J. S. Thorson, Colchicine Glycorandomization Influences Cytotoxicity and Mechanism of Action. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 14224-14225.
  - 21) J. D. Bagnato, A. L. Eilers, R. A. Horton, and C. B. Grissom, Synthesis and Characterization of a Cobalamin-Colchicine Conjugate as a Novel Tumor-Targeted Cytotoxin. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 8987-8996.
  - 22) L. Das, A. B. Datta, S. Gupta, A. Poddar, S. Sengupta, M. E. Janik, and B. Bhattacharyya, -NH-Dansyl Isocolchicine Exhibits a Significantly Improved Tubulin-Binding Affinity and Microtubule Inhibition in Comparison to Isocolchicine by Binding Tubulin through Its A and B Rings. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 3249-3258.
  - 23) B. Yang, Z. C. Zhu, H. V. Goodson, and M. J. Miller, Synthesis and biological evaluation of ring-C modified colchicine analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 3831-3833.
  - 24) M. Kitajima, A. Tanaka, N. Kogure, and H. Takayama, Four new colchicinoids, gloriosamines A-D, from *Gloriosa rothschildiana*. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 257-260.
  - 25) N. Yasobu, M. Kitajima, N. Kogure, Y. Shishido, T. Matsuzaki, M. Nagaoka, and H. Takayama, Design, Synthesis, and Antitumor Activity of 4-Halocolchicines and Their Pro-drugs Activated by Cathepsin B. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2011**, *2*, 348-352.
  - 26) 寺田 弘, 中川 晋作, 辻 孝三, 牧野 公子, 絹田 精鎮, 西野 敦 編著, 応用が広がるDDS, エヌ・ティー・エス (2013), 47-55.

- 27) Y. Matsumura and H. Maeda, A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.*, **1986**, *46*, 6387-6392.
- 28) A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, and L. Huang, Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, **1990**, *268*, 235-237.
- 29) D. Papahadjopoulos, T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthay, S. K. Huang, K.-D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann, and F. J. Martin, Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 11460-11464.
- 30) S. Umezaki, K. Maruyama, J.-I. Hosoda, I. Nagae, Y. Koyanagi, M. Nakata, O. Ishida, M. Iwatsuru, and S. Tsuchida, Direct measurement of the extravasation of polyethyleneglycol-coated liposomes into solid tumor tissue by in vivo fluorescence microscopy. *Int. J. Pharm.*, **1996**, *144*, 11-17.
- 31) H. Kikuchi, Liposomal medicines in practical use and their future. *Pharm. Tech. Japan*, **2009**, *25*, 2700-2703.
- 32) 秋吉 一成, 辻井 薫 監修, リポソーム応用の新展開～人口細胞の開発に向けて～, エヌ・テイ・エス (2005), 539-569.
- 33) C. Mamot, D. C. Drummond, C. O. Noble, V. Kallab, Z. Guo, K. Hong, D. B. Kirpotin, and J. W. Park, Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Immunoliposomes Significantly Enhance the Efficacy of Multiple Anticancer Drugs *In vivo*. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 11631-11638.
- 34) R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Kuwata, M. Mutoh, N. Ishiguro, N. Utoguchi, A. Shinohara, M. Eriguchi, H. Yanagie, and K. Maruyama, Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome. *Int. J. Pharm.*, **2008**, *346*, 143-150.
- 35) T. Asai, K. Shimizu, M. Kondo, K. Kuromi, K. Watanabe, K. Ogino, T. Taki, S. Shuto, A. Matsuda, and N. Oku, Anti-neovascular therapy by liposomal DPP-CNDAC targeted to angiogenic vessels. *FEBS Lett.*, **2002**, *520*, 167-170.
- 36) I. Kinoyama, N. Taniguchi, A. Toyoshima, E. Nozawa, T. Kamikubo, M. Imamura, A. Matsuhisa, K. Samizu, E. Kawanimani, T. Niimi, N. Hamada, H. Koutoku, T. Furutani, M. Kudoh, M. Okada, M. Ohta, and S.-I. Tsukamoto, (+)-(2R,5S)-4-[4-Cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl]-2,5-dimethyl-N-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]piperazine-1-carboxamide (YM580) as an Orally Potent and Peripherally Selective Nonsteroidal Androgen Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 716-726.
- 37) L. S. Lin, T. J. Lanza, Jr., J. P. Jewell, P. Liu, S. K. Shah, H. Qi, X. Tong, J. Wang, S. S. Xu, T. M. Fong, C.-P. Shen, J. Lao, J. C. Xiao, L. P. Shearman, D. S. Stribling, K. Rosko, A. Strack, D. J. Marsh, Y. Feng, S. Kumar, K. Samuel, W. Yin, L. H. T. Van der Ploeg, M. T. Goulet, and W. K. Hagmann, Discovery of N-[(1S,2S)-3-(4-Chlorophenyl)-2-(3-cyanophenyl)-1-methylpropyl]-2-methyl-2-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]propanamide (MK-0364), a Novel, Acyclic Cannabinoid-1 Receptor Inverse Agonist for the Treatment of Obesity. *J. Med. Chem.*, **2006**,



- 49, 7584-7587.
- 38) J. M. Cid, G. Tresadern, J. A. Vega, A. I. de Lucas, E. Matesanz, L. Iturrino, M. L. Linares, A. Garcia, J. I. Andres, G. J. Macdonald, D. Oehlrich, H. Lavreysen, A Megens, A. Ahnaou, W. Drinkenburg, C. Mackie, S. Pype, D. Gallacher, and A. A. Trabanco, Discovery of 3-Cyclopropylmethyl-7-(4-phenylpiperidin-1-yl)-8-trifluoromethyl[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridine (JNJ-42153605): A Positive Allosteric Modulator of the Metabotropic Glutamate 2 Receptor. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 8770-8789.
- 39) C. G. Wermuth 編著, 長瀬 博 監訳, 最新創薬化学 上巻 (第 2 版), テクノミック (2006), 314-335.
- 40) P. Kouroupis and H.-J. Hansen, From Colchicine and Some of Its Derivatives to 1,2,3,9,10-Pentamethoxybenzo[a]heptalenes. *Helv. Chem. Acta*, **1995**, *78*, 1247-1277.
- 41) For Deoxo-Fluor<sup>®</sup>, see: G. S. Lal, G. P. Pez, R. J. Pesaresi, F. M. Prozonic, and H. Cheng, Bis(2-methoxyethyl)aminosulfur Trifluoride: A New Broad-Spectrum Deoxofluorinating Agent with Enhanced Thermal Stability. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 7048-7064.
- 42) H. Firouzabadi, N. Iranpoor, and H. Hazarkhani, Iodine Catalyzes Efficient and Chemoselective Thioacetalization of Carbonyl Functions, Transthioacetalization of O,O- and S,O- Acetals and Acylals. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 7527-7529.
- 43) S. C. Sondej and J. A. Katzenellenbogen, *gem*-Difluoro Compounds: A Convenient Preparation from Ketones and Aldehydes by Halogen Fluoride Treatment of 1,3-Dithiolanes, *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 3508-3513.
- 44) D. A. Nagib and D. W. C. MacMillan, Trifluoromethylation of arenes and heteroarenes by means of photoredox catalysis. *Nature*, **2011**, *480*, 224-228.
- 45) Y. Ji, T. Brueckl, R. D. Baxter, Y. Fujiwara, I. B. Seiple, S. Su, D. G. Blackmond, and P. S. Baran, Innate C-H trifluoromethylation of heterocycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, 14411-14415.
- 46) Q.-Y. Chen, G.-Y. Yang, and S.-W. Wu, Copper electron-transfer induced trifluoromethylation with methyl fluorosulphonyldifluoroacetate. *J. Fluorine Chem.*, **1991**, *55*, 291-298.
- 47) L. L. Chang, W. T. Ashton, K. L. Flanagan, T.-B. Chen, S. S. O'Malley, G. J. Zingaro, P. K. S. Siegl, S. D. Kivlighn, and V. J. Lotti, Triazolinone Biphenylsulfonamides as Angiotensin II Receptor Antagonists with High Affinity for Both the AT1 and AT2 Subtypes. *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 4464-4478.
- 48) S. Wille, M. Hein, and R. Miethchen, First cross-coupling reactions on halogenated 1*H*-1,2,4-triazole nucleosides. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 3301-3308.
- 49) Q.-Y. Chen and S.-W. Wu, Methyl Fluorosulphonyldifluoroacetate; A New Trifluoromethylating Agent. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 705-706.
- 50) M. Sloss, J. McKenna, W. H. Yoon, S. Norris, D. Robinson, J. Parnes, G. Shevlin, P. Erdman, R. Hilgraf, R. Albers, S. Hegde, A. Wallace, H. Chan, L. Madakamutil, H. Raymon, Pyrazole pyrazine amine compounds as kinase inhibitors, compositions thereof and methods of

- treatment therewith. US 20090270418. 2009-10-29.
- 51) For 4-cyanocolchicine, see: G. Muller, A. B. Font, and R. Bardoneschi, Substitution am C-1 des Colchicins. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1963**, 105-113.
  - 52) For 4-cyanocolchicine, see: F. R. Quinn, Z. Neiman, and J. A. Beisler, Toxicity Quantitative Structure-Activity Relationships of Colchicines. *J. Med. Chem.*, **1981**, *24*, 636-639.
  - 53) L. D. Luca and G. Giacomelli, A. Porcheddu, Beckmann Rearrangement of Oximes under Very Mild Conditions. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 6272-6274.
  - 54) M. Gucma and W. M. Gołębiewski, Convenient Conversion of Aldoximes into Nitriles with *N*-chlorosuccinimide and Pyridine. *Synthesis*, **2008**, 1997-1999.
  - 55) G. M. Shutske and K. J. Kapples, A novel synthesis of 3-Amino-1,2-benzisoxazoles – an entry into the isoxazolo[3,4,5-*ef*][1,4]benzoxazepine ring system. *J. Heterocyclic Chem.*, **1989**, *26*, 1293-1298.
  - 56) T. W. Johnson, K. R. Dress, and M. Edwards, Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 5560-5564.
  - 57) For Slog $P$ , see: S. A. Wildman, and G. M. Crippen, Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1999**, *39*, 868-873.
  - 58) P. Angehrn, S. Buchmann, C. Funk, E. Goetschi, H. Gmuender, P. Hebeisen, D. Kostrewa, H. Link, T. Luebbers, R. Masciadri, J. Nielsen, P. Reindl, F. Ricklin, A. Schmitt-Hoffmann, and F.-P. Theil, New Antibacterial Agents Derived from the DNA Gyrase Inhibitor Cyclothialidine. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 1487-1513.
  - 59) A. Brossi, P. N. Sharma, L. Atwell, A. E. Jacobson, M. A. Iorio, M. Molinari, and C. F. Chignell, Biological effects of modified colchicines. 2. Evaluation of catecholic colchicines, colchicofolines, colchicide, and novel *N*-acyl- and *N*-aroyldeacetylcolchicines. *J. Med. Chem.*, **1983**, *26*, 1365-1369.
  - 60) F. G. Bordwell, Equilibrium Acidities in Dimethyl Sulfoxide Solution. *Acc. Chem. Res.*, **1988**, *21*, 456-463.
  - 61) A. S. Cantrell, P. Engelhardt, M. Högberg, S. R. Jaskunas, N. G. Johansson, C. L. Jordan, J. Kangasmetsä, M. D. Kinnick, P. Lind, J. M. Morin, Jr., M. A. Muesing, R. Noreén, B. Öberg, P. Pranc, C. Sahlberg, R. J. Ternansky, R. T. Vasileff, L. Vrang, S. J. West, and H. Zhang, Phenethylthiazolylthiourea (PETT) Compounds as a New Class of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. 2. Synthesis and Further Structure-Activity Relationship Studies of PETT Analogs. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4261-4274.
  - 62) G. T. Sukhanov and A. Y. Lukin, Reaction of 3-nitro-1,2,4-triazole derivatives with alkylating agents. 1. Alkylation in the presence of alkali. *Chem. Heterocycl. Compounds*, **2005**, *41*, 861-865.
  - 63) S. Grozinsky-Glasberg, I. Shimon, M. Korbonits, and A. B. Grossman, Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: efficacy and mechanisms. *Endocr. Relat. Cancer*, **2008**, *15*, 701-720.

- 64) Y. Iwase, and Y. Maitani, Octreotide-Targeted Liposomes Loaded with CPT-11 Enhanced Cytotoxicity for the Treatment of Medullary Thyroid Carcinoma. *Mol. Pharmaceutics*, **2011**, *8*, 330-337.
- 65) A. D. Bangham, M. M. Standish, and J. C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, **1965**, *13*, 238-252.
- 66) 秋吉 一成, 辻井 薫 監修, リポソーム応用の新展開～人口細胞の開発に向けて～, エヌ・テイ・エス (2005), 180.
- 67) A. L. Klibanov, K. Maruyama, A. M. Beckerleg, V. P. Torchilin, and L. Huang, Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1991**, *1062*, 142-148.
- 68) W. Sherman, T. Day, M. P. Jacobson, R. A. Friesner, and R. Farid, Novel Procedure for Modeling Ligand/Receptor Induced Fit Effects. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 534-553.
- 69) J. L. Banks, H. S. Beard, Y. Cao, A. E. Cho, W. Damm, R. Farid, A. K. Felts, T. A. Halgren, D. T. Mainz, J. R. Maple, R. Murphy, D. M. Philipp, M. P. Repasky, L. Y. Zhang, B. J. Berne, R. A. Friesner, E. Gallicchio, and R. M. Levy, Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *J. Comp. Chem.*, **2005**, *26*, 1752-1780.
- 70) R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren; J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, and P. S. Shenkin, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 1739-1749.

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 高山廣光 教授に心より感謝申し上げます。

多大なる御指導と御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 北島満里子 准教授に心より感謝申し上げます。

貴重な御助言と御討論を頂きました千葉大学大学院薬学研究院 小暮紀行 助教に深謝申し上げます。

多くの御支援を頂きました千葉大学大学院薬学研究院 生体機能性分子研究室 石田寛明 氏を始め、同研究室の皆様に深く感謝致します。

Liposome製剤の調製法に関して、御指導と御助言を賜りました星薬科大学医薬品化学研究所 米谷芳枝 元教授に万謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり、終始御指導と御助言を賜りました株式会社ヤクルト本社 中央研究所 橋本秀介 博士、沢田誠吾 博士、松崎健 博士、八重樫隆 博士、長岡正人 博士、山崎竜太 博士、栗田晃伸 氏、高橋康之 氏、株式会社ヤクルト本社 医薬開発部 小平浩 氏に心より感謝申し上げます。

本研究の推進に多大なる御協力を頂きました株式会社ヤクルト本社 中央研究所 小野雅弘 氏、杉本卓弥 氏、上野哲 氏、笹井俊雄 氏、浅川直之 氏、松本常男 氏、西坂扶岐子 氏、西山由紀子 氏、内田美幸 氏、株式会社ヤクルト本社 医薬開発部 富永恵隆 氏、高橋寛行 氏を始め、株式会社ヤクルト本社の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の機会を賜りました株式会社ヤクルト本社 中央研究所長 石川文保 博士、中央研究所長代理 南野昌信 博士に心より御礼申し上げます。

## 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. **Nishiyama, H.**; Ono, M.; Sugimoto, T.; Sasai, T.; Asakawa, N.; Yaegashi, T.; Nagaoka, M.; Matsuzaki, T.; Kogure, N.; Kitajima, M.; and Takayama, H.: Synthesis, and biological evaluation of 4-chlorocolchicine derivatives as potent anticancer agents with broad effective dosage ranges.

*Med. Chem. Commun.*, 3, 1500-1504 (2012)

2. **Nishiyama, H.**; Ono, M.; Sugimoto, T.; Sasai, T.; Asakawa, N.; Ueno, S.; Tominaga, Y.; Yaegashi, T.; Nagaoka, M.; Matsuzaki, T.; Kogure, N.; Kitajima, M.; and Takayama, H.: 4-Chlorocolchicine derivatives bearing a thiourea side chain at the C-7 position as potent anticancer agents.

*Med. Chem. Commun.*, in press (2014)

## 論文審査委員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行なわれた。

主査	千葉大学大学院教授	(薬学研究院)	薬学博士	石川 勉
副査	千葉大学大学院教授	(薬学研究院)	薬学博士	西田 篤司
副査	千葉大学大学院教授	(薬学研究院)	理学博士	石橋 正己