

Title	液胞型ATPアーゼの阻害機構の解明を目指した標識化 サリシリハラミドの合成研究
Author(s)	杉本, 賀規
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23464
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

13173 Fr 9

博士論文

液胞型ATPアーゼの阻害機構の解明を目指した 標識化サリシリハラミドの合成研究

平成20年度

杉本 賀規

博士論文

液胞型ATPアーゼの阻害機構の解明を目指した 標識化サリシリハラミドの合成研究

平成20年度

杉本 賀規

略語表

Ac	acetyl
ACMA	9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine
aq	aqueous (layer)
ATP	adenosine 5'-triphosphate
9-BBN	9-borabicyclo[3. 3. 1]nonane
BCA	bicinchoninic acid
Bu	butyl
Bz	benzoyl
CGM	chromaffin granule membranes
CSA	camphor sulfonic acid
CuTC	copper(I) thiophene carboxylate
d	day(s)
dba	dibenzylideneacetone
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DIBAL	diisobutylaluminum hydride
DMA	N,N'-dimethylacetamide
DMAP	N,N'-dimethyl-4-aminopyridine
DME	1,2-dimethoxyethane
DMEDA	N,N'-dimethylethylenediamine
DMF	N, N'-dimethylformamide
DMP	Dess-Martin Periodinane
DMSO	dimethylsulfoxide
dppf	1,1'-bis(diphenylphosophino)ferrocene
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ee	enantio excess
eq	equivalent
ESR	electron spin resonance

Et	ethyl
F-ATPase	ATP synthase
FCCP	carbonyl cyanide <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazone
F-SA	4- ¹⁹ F-salicylihalamide A
F-SB	4- ¹⁹ F-salicylihalamide B
G	gram
GI ₅₀	50% growth inhibition
h	hour(s)
Hex	hexyl
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMDS	hexamethyldisilazane
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HWE	Horner-Wadworth-Emmons
<i>i</i> -	iso
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
imid	imidazole
Ipc	isopinocampheyl
LDA	lithium diisopropylamide
<i>m</i> -	meta
Me	methyl
Mes	mesityl
<i>m</i> -CPBA	m-chloroperbenzoic acid
min	minute(s)
MNBA	2-methyl-6-nitrobenzoic acid anhydride
MOM	methoxymethyl
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MS4Å	molecular sieves 4Å
<i>n</i> -	normal
NCCD	N-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxy)-N'-cyclohexylcarbodiimide
NCI	national cancer institute (in USA)
NMO	4-methylmorpholine-N-oxide

	NMP	N-methylpyrrolidone
	NMR	nuclear magnetic resonance
	NOE	nuclear overhauser effect
	<i>p</i> -	para
	PEG	polyethyleneglycol
• .	PG	protecting group
	Ph	phenyl
	PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
	Pr	propyl
	quant	quantitative yield
	R	alkyl group
	RCM	ring closing metathesis
	REDOR	Rotational Echo Double Resonance
	rt	room temperature
	SA	(-)-salicylihalamide A
	Salen	N,N'-ethylenebis(salicylimine)
	SB	(-)-salicylihalamide B
	SM	starting material
	TBA	tetra-n-butylammonium
	TBDPS	tert-butyldiphenylsilyl
	TBS	tert-butyldimethylsilyl
	TEA	triethylamine
	Teoc	2,2-trichloroethoxycarbonyl
	tert-	tertiary
	Tf	trifluoromethanesulfonyl
	TFA	trifluoroacetic acid
	TFAA	trifluoroacetic anhydride
	TFP	tri(2-trifuryl)phosphine
	THF	tetrahydrofuran
	TIPS	triisopropylsilyl
	TLC	thin-layer chromatography
	TMS	trimethylsilyl

TPAP	tetra-n-propylammonium perruthenate
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
V-ATPase	Vacuolar type (H ⁺ -) ATPase
WSCD	water soluble carbodiimide (or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)
	carbodiimide hydrochloride)
· ·	

目次

第1章 序論

1-1	液胞型ATPアーゼ	1
1-2	V-ATPase特異的阻害剤	9
1-3	サリシリハラミドとベンゾラクトンエナミド系マクロリド	14
1-4	サリシリハラミドAの全合成研究	16
1-5	サリシリハラミドのAの、構造活性相関研究およびV-ATPase推定阻害機構	25
1-6	固体NMRと原子間距離測定	33
1-7	フッ素による有機化合物の標識	35
1-8	研究目的	37
参考	文献	39
第2章	〕 フッ素標識化サリシリハラミドの合成	
2-1	サリシリハラミドAの合成	42
2-2	フッ素化サリシリハラミドAの合成計画	55
2-3	フッ素化サリシリハラミドAの合成	57
参考	文献	65
第3章	資 フッ素標識化サリシリハラミドのV-ATPase阻害活性試験	
3-1	サル腎臓細胞を用いたイメージングアッセイ	67
3-2	クロマフィン顆粒膜を用いた定量的アッセイ	70
3-3	活性試験結果の考察	73
参考	文献	74
第4章	章 ビオチン化サリシリハラミドの合成	
4-1	ビオチン化サリシリハラミドAの合成	75
参考	文献	84
第5重	章 結論	85

86

第6章 実験項

謝辞

109

171

第1章 序論

1-1 液胞型(H⁺-)ATP アーゼ¹⁾

プロトンポンプである液胞型(H⁺-)ATP アーゼ(V-ATPase)は、多くの細胞内小器官 に発現している、生理的に重要な膜タンパク質である。特にリソソーム、分泌顆粒、 エンドソーム、ゴルジ体、クロマフィン小胞、シナプス小胞などの中央空胞系(central vacuolar system)に属するオルガネラの内部は、V-ATPaseの働きによって、いずれも pH 4.5 - 6.5 と酸性に保たれている。そのため、これらのオルガネラは、細胞質とは異 なる環境を形成し、それぞれ分化した小器官に特有な機能を担っている。V-ATPase は、酵母の液胞において見いだされて以来、真核生物全般に広く分布していることが 明らかとなってきた。例えば、V-ATPase は、上述の中央空胞系オルガネラ以外に、破 骨細胞、がん細胞、腎臓の尿細管上皮細胞、視覚の毛様体の上皮細胞および精巣上体 の上皮細胞の細胞膜にも存在し、それぞれ、骨粗しょう症、ガンの侵襲、尿細管性ア シドーシス、緑内障に関与している。このため、V-ATPase を標的とした創薬研究が、 近年盛んに行なわれている²⁾。

V-ATPase は、ATP の加水分解によって生じるエネルギーを駆動力として、プロトンを濃度勾配に逆らってオルガネラ内に能動輸送する働きを持つ。この際に造りだされる膜内外の電気化学的なポテンシャル差、あるいは内部のpH の低下(酸性化)は、それぞれのオルガネラが関与する種々の生理的活動に重要である。例えば、シナプス小胞内への神経伝達物質の濃縮、あるいはリソソームにおける異物の分解やエンドソーム内部のレセプター-リガンド複合体の解離と再生、がん細胞の転移、破骨細胞による骨の溶解・再吸収などに必要である事が知られている。

動物、植物、および真菌由来の種々のオルガネラから単離された V-ATPase を比較 すると、いずれも構造的に高い相同性がある。このことは、V-ATPase の構造が、多岐 の生物にわたって普遍的であることを示している。V-ATPase は、少なくとも 13 種類 の異なるサブユニットから構成されている複合タンパク質である。さらに、個々のサ ブユニットにもイソ型(アイソフォーム)が存在している。2001 年および 2007 年に推 定された構造推定された V-ATPase の構造を、それぞれ、図 1-1(右)、図 1-2 に示す。 V-ATPase は、大きく 2 つの部分、すなわち膜貫通部分 Vo部分と突出部分 V1部分に 分けられる。V1 部分は、サブユニット A, B, C, D, E, F, G, H の 8 つから構成されてお り、Vo部分は、サブユニット a, d, e, c, c', c'', Ac45 の7 つから構成されている (表 1-1)

- 1 -

^{1a,1d,1e)}。Vo部分はプロトンチャンネルを形成し、V₁部分は ATP 加水分解触媒作用を 有している。

V-ATPase と構造的に類似しているものとして、ATP 合成酵素(F-ATPase)³⁾が知ら れている (図 1-1 左)。F-ATPase は、ミトコンドリア内膜や葉緑体のチラコイド膜など の細胞膜に存在し、呼吸や光合成によって形成されたプロトンの濃度勾配を駆動力と して ATP を合成している膜タンパク質である。複合体構造および機能に関する研究は、 V-ATPase に比べて F-ATPase が先行しており、突出部位 F₁部分の高分解能 X 線結晶構 造解析 ⁴⁾および酵母菌 F₀F₁構造の低分解能 X 線結晶構造解析 ⁵⁾によって、F-ATPase を構成するサブユニットの位置関係や F-ATPase の機能発現機構は、おおよそ明らか にされている。そこで、F-ATPase との相同性を利用して、V-ATPase の複合体構造お よび機能発現に関する研究が展開されてきた。



図 1-1. V-ATPase (右)と F-ATPase (左)の比較 (2001 年に提出されたモデル)^{lc)}



図 1-2. V-ATPaseの構造 (2007 年に提唱されたモデル)^{1a)}

表 1-1. 明らかになっている V-ATPase の構成サブユニット ^{1a,1d,1e).}

サブユニット	分子量 /kDa	酵母遺伝子	哺乳類のアイソフォーム	サブユニットの機能	関連する疾患 (マウス)
突出部分Ⅴ₁					
A	70	VMA1		ATPase 部位 中心軸の固定子	
В	60	VMA2	B1 (腎臓, 精巣上体) B2 (遍在的)	非加水分解触媒部位 アクチンやアルドラーゼ の結合部位 中心軸の固定子	B1: 難聴 尿細管性 アシドーシス
C	40	VMA5	C1 (遍在的) C2a,b (肺, 腎臓, 精巣上体)	V-ATPaseの活性の 制御 周辺にある固定子 アクチンの結合部位	
D	34	VMA8		回転軸の構成 中心軸の軸受け	- <u></u>
E	33	VMA4	E1 (精巣) E2 (遍在的)	周辺にある固定子 RAVE やアルドラーゼの 結合部位	
F	14	VMA7		回転軸の構成 ATPase 活性の促進	
G	13	VMA10	G1 (遍在的) G2 (神経細胞) G3 (腎臓, 精巣上体)	周辺にある固定子 RAVE 結合部位	
H	50	VMA13	別々にスプライスを受け た 2つの変異体が存在す る。	V-ATPase の活性制御 中心軸の固定子 NEF の結合部位	
膜貫通部分 Vo					· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
а	100	VPH1(液胞) STV1(ゴルジ体)	a1 (神経細胞) a2 (内皮細胞) a3 (破骨細胞) a4 (腎臓, 精巣上体)	プロトン輸送通路 発現場所の制御 アルドラーゼの結合部位 周辺の固定子	a3: 大理石 骨病 a4: 難聴 尿細管性 アシドーシス
d	38	VMA6	d1 (遍在的) d2 (腎臓, 精巣上体)	V₁の ATP 加水分解と V₀のローター回転との連 動 回転軸の構成	·····
e	9	VMA9		不明	
C	17	VMA3		プロトン輸送 回転ローターの構成	· · · · ·
C'	17	VMA11	哺乳類に存在せず	プロトン輸送 回転ローターの構成	
с"	21	VMA16		プロトン輸送 回転ローターの構成 酵母菌にのみ存在	
Ac45	45	酵母に存在せず		不明	

サブユニットAとBは、ATP加水分解酵素の機能を担っており、ATPをADPに加 水分解する。この時、サブユニット A と B は、コンホメーション変化を起こし、ひ ずみエネルギーを蓄える。サブユニットAとBは、このひずみエネルギーを解消し ようとより安定な元の立体構造を取ろうとするが、この時、V1部位とVo部位を連結 している中心回転軸を時計周りに回転させる力が生じる。中心回転軸は、サブユニッ トD、F、dの3つから構成されており、サブユニットdの部分で、Vo部分の回転子(プ ロテオリピド・リング)に結合している。この回転子は、サブユニット c, c', c"から構 成される 6 量体であり、中心回転軸の回転に伴って、時計周りに回転する。この際、 プロトンを、Vo部分のサブユニットaから回転子のサブユニットcへと受け渡される ことによって、膜を挟んで能動輸送している。サブユニットaの膜突出部位と残りの サブユニットC.E.G.Hは、固定子として機能している。すなわち、サブユニットA と B が中心回転軸を時計回りに回転させる際に、A と B が回転しないように固定す るためのものである。この固定子が存在することで、サブユニット A と B で生じた 回転のトルクは、中心軸を介して、膜貫通部位の回転子へと伝えられる。このような 機構で、V₁部位における ATP 加水分解と Vo部分の回転子の回転が共役していて、1 分子の ATP が加水分解されることにより、2 個のプロトンが膜を介して能動輸送され ると考えられている。

Vo部分のプロトンチャネルに関しては、以下の知見が明らかになっている。先ず、 サブユニット c から成る疎水性の高いプロテオリピド・リングがプロトン輸送に関わ っていることは、酵母菌のサブユニット c, c', c"を用いた実験から明らかになった^の。 酵母菌のサブユニット c, c', c"の膜貫通領域を、図 1-3 に示す (プロトンチャネル活性 に重要なグルタミン酸は、緑色で表記している)。



図 1-3. 酵母菌のサブユニット c, c', c"の膜貫通領域の図⁶⁾

個々のサブユニットcは、グルタミン酸残基をただひとつだけ有している。このグ ルタミン酸を DCCD でマスクすると、V-ATPase のプロトンポンプ活性は完全に阻害 されることから、この部位の周辺が、プロトン結合部位であると考えられている。一 方で、プロトン輸送に別のサブユニットも関与すると考えられている。酵母菌の V-ATPase の Vo部位のサブユニット a の膜貫通領域図を、図 1-4 に示す (プロトンチ ャネル活性に重要なアミノ酸を、赤色で表記している)。サブユニット a は、9 回膜貫 通部位を有する大きなサブユニットである。変異導入実験により、593 番リジン残基 (K593)、729 番および 743 番ヒスチジン残基(H729 および H743)、735 番および 799 番 アルギニン残基(R735 および R799)、789 番グルタミン酸残基(E789)は、プロトンチャ ネル活性に重要な残基であると考えられている。なかでも、7 番目の膜貫通部位に存 在する R735 を変異すると、プロトンポンプ活性が完全に阻害されることから、特に R735 がプロトン輸送に非常に重要であることが明らかにされている^の。



図 1-4. 酵母菌のサブユニットaの膜貫通領域の図⁶⁾

以上の点を考慮した結果、現在提唱されているプロトン輸送機構のモデルを、図 1-5 に示す^{1a)}。



図 1-5. V-ATPase のプロトン輸送モデル^{1a)}: プロトンは、細胞質側プロトンチャネル (サブユニット a の上半分)のある部分から、膜内のプロトンチャネルに入り(図 1-5a)、 膜内に入ったプロトンは、サブユニット c, c'および c"のグルタミン酸残基に受け渡さ れる(図 1-5b)。一方、Voのプロテオリピド・リング(回転子)は、V1部分における ATP 加水分解と共役して、時計回りに回転している。この回転に伴い、グルタミン酸に結 合したプロトンは、内腔側プロトンチャネル(サブユニット a の下半分)のアルギニン 残基に受け渡される(図 1-5c)。そして、アルギニン残基に結合したプロトンは、サブ ユニット a のプロトン輸送路を介して、内腔側に抜ける(図 1-5d)。 生体分子(タンパク質,核酸,脂質など)が織り成す一連の生命現象を、化学反応に置き換え、その現象の意義を分子レベルで解明することは、科学者の最終的な目標である。生命現象の意義を分子レベルで解明する有効な方法論の一つは、特異的阻害剤を 用いた研究である⁷⁰。

特異的阻害剤とは、生理的に重要な生体内の標的分子(タンパク質など)を、特異的 に識別することにより、その分子の機能を変化させ、結果、細胞機能や生体反応を変 化させる化合物のことである。よって、生体内の標的分子の機能発現および生きた細 胞や生体におけるその機能発現の意義を、優れた特異的阻害剤を用いることにより統 一的に理解できるはずである。特に、V-ATPase の研究の進展において、特異的阻害剤 が果たした役割は大きい。V-ATPase が関与している生命現象が広範に及ぶことが明ら かになってきたが、それらはバフィロマイシンなどの V-ATPase 特異的阻害剤を用い ることで同定された。すなわち、バフィロマイシンを添加することで影響を受ける生 命現象は、V-ATPase が関連している生命現象であると比較的簡単に同定できる^{1b,8)}。

バフィロマイシン⁹⁾は、*Streptomyces griseus*から抗菌作用を指標に単離されたマクロリド系抗生物質であり、V-ATPase を特異的に阻害することが Bowman らによって発見された。また、類似の構造を有する 18 員環マクロリドであるコンカナマイシン¹⁰⁾も特異的阻害剤として知られている (図 1-6)。



図 1-6. V-ATPase 特異的阻害剤であるバフィロマイシン A1 とコンカナマイシン F

V-ATPase を標的とした薬剤開発および V-ATPase の機能発現機構の解明の観点から、 バフィロマイシンおよびコンカナマイシンの阻害機構の解明は重要である。現在まで に明らかになっている阻害機構を、以下に紹介する。

バフィロマイシンは、nMのIC50値でV-ATPaseを特異的に阻害することから、1分子

のバフィロマイシンで1分子のV-ATPaseを阻害していると考えられている⁸。比較的疎 水性が高いために、細胞外に加えても、細胞膜を通過して細胞内に入り、V-ATPase を阻害することができる。また、バフィロマイシンのin vivoにおけるV-ATPaseの阻害 は、in vitroでの結果と異なり可逆的であり、培地を洗浄すると30分程度で、オルガネ ラの内部が、阻害剤処理以前の程度にまで再び酸性化される⁸。バフィロマイシンの 構造活性相関研究¹¹⁾の結果より、テトラヒドロピラン環構造および21位のヒドロキシ 基は活性にあまり重要でなく、7位のヒドロキシ基およびジエン構造を含むマクロラ クトン構造が活性に重要であることが、明かにされている。この傾向は、コンカナマ イシンの構造活性相関研究¹²⁾からも得られている。また、バフィロマイシンにはなく コンカナマイシンAが有している糖側鎖は、阻害活性に殆ど影響がないことが明らか になっている。これらのことから、バフィロマイシンおよびコンカナマイシンの疎水 性の高いマクロラクトン部位が活性発現に重要であることが示唆された(図1-7)¹²⁾。 この事は、両者が膜貫通部位に作用しているという事実と矛盾していない。



図1-7. 相互作用に重要なバフィロマイシンおよびコンカナマイシンの部分構造12)

バフィロマイシンおよびコンカナマイシンによるV-ATPase阻害活性機構の詳細は、 まだ明らかではない。しかしながら、いずれもVo部分のサブユニットcに結合部位を 有していることが、コンカナマイシンの光親和性標識体¹³⁾であるJ-コンカノライドA (図1-8)を用いた実験により明らかにされている¹⁴⁾。バフィロマイシン、コンカナマイ シンおよび、J-コンカノライドAのATP加水分解阻害活性を表1-2に示す。



図1-8. コンカナマイシンの光親和性標識体であるJ-コンカノライドA

V-ATPase ^a	Bafilomycin A_1 / μM	$\begin{array}{c} Concanamycin \ A_1 \\ / \ \mu M \end{array}$	J-Concanolide A / μM
N. crassa	0.5	0.02	
M. sexta		0.01	15 - 20

^aバフィロマイシン、コンカナマイシンおよび J-コンカノライド A の ATP 加水分解阻 害活性を IC₅₀ 値で示した。

さらに、バフィロマイシンおよびコンカナマイシンとの結合に重要な、サブユニット c の残基が、Bowman らによって特定された¹⁵⁾(図 1-9)。すなわち、変異導入により調製されたバフィロマイシンおよびコンカナマイシン耐性アカパンカビ菌株は、サブユニット c 上のアミノ酸配列に変異を生じていた。その結果、阻害剤が結合する際に重要な9つの残基として、32番スレオニン残基(T32)、39番および54番イソロイシン残基(I39およびI54)、55番バリン残基(V55)、130番メチオニン残基(M130)、132番および140番ロイシン残基(L132およびL140)、136番フェニルアラニン残基(F136)、143番チロシン残基(Y143)が同定された(図 1-9 左)。また、これら9つのアミノ酸残

基うち、M130, L132, F136, L140, Y143 の5つが、プロトン結合部位である 138 番グル タミン酸残基(E138)を含む、ヘリックス4に集中していた。この点と、サブユニット cのヘリックス4がサブユニットaに空間的に近接していること(図1-9右)を考慮して、 バフィロマイシンおよびコンカナマイシンは、サブユニットcのプロトン結合部位の 近傍に結合し、プロテオリピドリングの回転を阻害することで阻害発現するというモ デルが提唱された。



図 1-9. アカパンカビ V-ATPase のサブユニット c の、アミノ酸残基トポロジー図(左) および4つの膜貫通ヘリックスの配置モデル(右)¹⁵⁾

また、Marsh らは、ESR により回転相関時間 τ を測定することで、スピンラベル化 サブユニット c から構成されるプロテオリピド・リングの回転が、コンカナマイシン A₁の添加により減速することを示した¹⁶⁾ (図 1-10)。すなわち、(ロブスター肝膵由来 の V-ATPase の)サブユニット c を、プロトンチャネル活性に重要な 138 番目のグルタ ミン酸(E138)を NCCD でスピンラベル化し、回転相関時間 τ を測定したところ、約 95 µs であった。そこに、阻害剤であるコンカナマイシン A₁ を作用させたところ、約 220 µs へと長くなった。この結果は、コンカナマイシン A₁ がサブユニット c と相互作用 することで、サブユニット c の回転が抑制されていることを示している。V-ATPase 阻害剤は、サブユニット c のプロテオリングの回転を止めることで活性を発現すると いう推測はなされていたが、実験的に証明された初めての例である。(表 1-3, 回転相 関時間(τ)は、サブユニット c リングが 1 回転するのに要する時間と考えてよい)。



図 1-10. ESR による、ラジカル標識化サブユニット c-プロテオリングの回転の観測

1-3 サリシリハラミドとベンゾラクトンエナミド系マクロリド

サリシリハラミドA(SA)¹⁷⁾は、海綿 Haliclona sp.から単離された 12 員環マクロリド であり、サリチル酸部およびエナミド側鎖を含んだ特徴的な構造を有する (図 1-11)。 バフィロマイシン類とは異なり、哺乳類の V-ATPase のみを 1 nM 以下の IC₅₀ 値で特異 的に阻害する事が特徴的である¹⁸⁾。また、ヒト腫瘍細胞に対して非常に強力な細胞毒 性を示し、また他の抗腫瘍性天然物と比較してより単純な構造を有していることから、 新たな抗ガン剤のリード化合物として注目を集めている。



(-)-salicylihalamide A (SA) (-)-salicylihalamide B (SB)

図 1-11. 抗腫瘍性マクロリドの SA およびサリシリハラミド B (SB)

その後、サリシリハラミドと類似した構造を有する一連の化合物、ロバタミド¹⁹、 アピキュレリン²⁰、およびオキシミジン²¹⁾などが相次いで発見された(図 1-12)。これ らはいずれも分子内にベンゾラクトン部分とエナミド部分を有していることから、ベ ンゾラクトンエナミド系マクロリドと分類されている。興味深いことに、これら一連 の化合物は、がん細胞に対する成長阻害活性プロファイルを共有していることが、ご く最近明らかとなった。すなわち、非小細胞肺がん細胞、大腸がん細胞、脳がん細胞、 卵巣がん細胞、腎臓がん細胞、前立腺がん細胞、乳がん細胞、白血病細胞およびメラ ノーマ細胞などの NCI-60 細胞系列に対して、成長阻害活性スクリーニングを行なっ たところ、一連のベンゾラクトン系エナミドは、白血病細胞とメラノーマ細胞に対し て、GI₅₀にして1nM以下と、特に強い抗腫瘍性を示すことが示された^{18,22})。

- 14 -



図 1-12. 種々のベンゾラクトンエナミド

1-4. サリシリハラミドAの全合成の研究例

サリシリハラミドA(SA)は、他の抗腫瘍性天然物と比較してより単純な構造を有し ていることから、新たな抗ガン剤のリード化合物として注目を集めている¹⁾。実際、 Reata 製薬会社では、サリシリハラミド誘導体が、新奇抗がん剤として臨床開発され ている²³⁾。ベンゾラクトンエナミドは、サリシル酸、マクロリド、エナミド側鎖を有 している。本質的に、真菌の V-ATPase には殆ど作用せず、哺乳類性 V-ATPase のみを nM レベルで阻害する。そのため世界各国で盛んに合成研究が行われており、2008 年 の時点で 9 つの研究グループによって全合成(または、形式全合成)が達成されている ^{22,24}。

SA は、構造上2つの部分、すなわち3箇所の不斉炭素を有するベンゾラクトン部 分、および高度に不飽和な*N*-アシルエナミド側鎖からなっている。これまでに行われ ている全合成においては、ベンゾラクトン部分を先に構築し、構造的に不安定である と予想されるエナミド側鎖を最終段階で導入するという手法がとられている。ベンゾ ラクトン部分の構築には、閉環メタセシス反応(RCM)と光延エステル化反応が主に用 いられているが、鈴木カップリングや Stille カップリング、および交差エステル化反 応が用いられている例もある (スキーム 1-1)。



スキーム 1-1. SA のベンゾラクトンの構築法

N-アシルエナミド側鎖の導入には、3 つの手法、すなわち、i) ヨードオレフィン とアミドとのカップリング反応、ii) イソシアネートとヘキサジエニル金属試薬との カップリング反応、iii) アルデヒドとアミドから調製されるアミナールの脱水反応が、 主に用いられている (スキーム 1-2)。以下、それぞれの合成法について概略を述べる。



スキーム 1-2. SAの N-アシルエナミド側鎖の導入法

Fürstner らは^{24a)}、対応するサリシル酸フラグメントとアルコールを光延エステル化 反応により連結し、続く Grubbs 第二世代触媒を用いた RCM によりベンゾラクトン部 分を構築している。その後、ヨードオレフィンに変換し、チオフェンカルボン酸銅(I) を用いたカップリング反応を行うことで、(*Z,Z*)-エナミド側鎖を立体選択的に構築す ることに成功している (スキーム 1-3)。17位のエナミド部位に関する立体異性体が副 生するため(17*E*:17*Z*=2.5:1)、望みの立体異性体を HPLC により単離・精製する必要が あるものの、他のグループと比較して、短工程且つ立体選択的に SA を合成している。



スキーム 1-3. Fürstner らによる SA の全合成

De Brabander らは^{24b)}、Fürstner らと同様に構築したベンゾラクトンを、イソシアナ ートへと誘導し、ヘキサジエニルリチウムとのカップリング反応を行うことで、全合 成を達成している (スキーム 1-4)。しかしながら、ヘキサジエニルリチウムを立体選 択的に調製することが困難なため、エナミド側鎖の立体選択的導入には問題があり、 さらに、続く脱保護反応は、エナミド部位の異性化を伴うため、得られるサリシリハ ラミドAは、対応するイソシアナートから2段階20%の低い収率で、側鎖の異性体 との混合物として得られている。また、生成した SA のエナミド部位と未反応のイソ シアナートとがカップリングして生成する、2量体型誘導体が副生成物として得られ てくるため、効率的な合成法ではないと考えられる。



スキーム 1-4. De Brabander らによる SA の全合成

Smith らは^{24c)}、De Brabander らと同様に構築したイソシアナートを、一旦エナミン に変換した後、(*Z*,*Z*)-ヘプタジエン酸塩化物とカップリングすることで全合成を達成 している (スキーム 1-5)。



スキーム 1-5. Smith らによる SA の全合成

Labreque らは^{24d)}、ベンゾラクトン部分を構築した後、アルデヒドへと誘導し、(Z,Z)-アミドとのカップリング反応により一旦 N,N'-ビスアミドへと変換し、続く脱離反応 によりエナミド側鎖を構築している (スキーム 1-6)。



スキーム 1-6. Labreque らによる SA の全合成

Herb らも^{24e)}、Labreque らと同様にベンゾラクトン部分をアルデヒドへ変換した後、 (Z,Z)-アミドとのカップリング反応により一旦アミナールへ誘導し、続く脱水反応に よりエナミド側鎖を構築している (スキーム 1-7)。しかしながら、Labreque らおよび Herb らの方法論では、アルデヒドと(Z,Z)-アミドとのカップリング反応、続く脱離反 応によるエナミド部分の構築の2段階収率が、それぞれ、18%、27%と低い。また、 エナミド部位を構築した段階で、生じた立体異性体をシリカゲルカラムクロマトグラ フィーにより分離することが可能であるが、最終段階の脱保護反応で、エナミド部位 が高頻度で再び異性化するのに加え、収率は、それぞれ、25~40%、69~75%と低い。



また、マクロリド部分の新奇構築法として、閉環メタセシス(RCM)の代わりに鈴木 -宮浦カップリング、Stille カップリングを用いる方法が、Maier ら^{24f)}、Rizzacasa ら^{24g)} によってそれぞれ開発されている (スキーム 1-8)。しかしながら、収率および立体選 択性の観点から、光延エステル化反応と RCM を併用するマクロラクトン構築法の方 が優れている。

Maier group



スキーム 1-8. Maier および Rizzacasa らによる新規マクロラクトン構築法

また、サリシリハラミドを含むベンゾラクトンエナミドの側鎖導入に有用な方法論 が、Coleman ら²⁵⁾により報告されている (スキーム 1-9)。すなわち、チオフェンカル ボン酸銅(I)²⁶⁾存在下、ヨードオレフィンと、マレイミドから調製されるアミドをカ ップリングして得られるエナミドの TBS 基を除去後、不安定イリドを作用させるこ とにより、エナミド側鎖を立体選択的に構築するというものである。



スキーム 1-9. Coleman らにより報告されたエナミド側鎖導入の新規方法論

以上のように、SAの全合成において困難な点は、(Z,Z)-エナミド側鎖を立体選択的 に導入すること、および導入したエナミド側鎖の異性化を防止することある。後者に 関しては、エナミド側鎖導入後に、保護基の除去等の反応を行わなければ解決できる 可能性が高い。 1-5 サリシリハラミドAの、構造活性相関研究および V-ATPase 推定阻害機構

様々な生理現象に V-ATPase は関わっているため、ヒト V-ATPase の阻害作用は、毒性につながる。そのため、抗がん剤や骨粗しょう症治療薬などの医薬品として、SA そのものは使用できない。V-ATPase は、がん細胞、および骨粗しょう症に関与している破骨細胞の細胞膜表面にも発現しているが、これらの標的細胞の V-ATPase のみに 選択的に作用する阻害剤を開発することを目的に、サリシリハラミド A (SA)の構造活性相関研究、および V-ATPase の阻害機構の解明研究が展開されている。

De Brabander らは、SA 誘導体 (図 1-12 および図 1-13)を用いた構造活性相関研究を 報告しており^{22,24b,27)}、ウシ型脳クラスリン被覆小胞顆粒 V-ATPase に対するプロトン 輸送阻害活性の結果を、表 1-4 に示す。



(+)-Salicylihalamide A (2) (unnatural)

図 1-13. De Brabander らによる種々の SA 誘導体 (1)



図 1-14. De Brabander らによる種々の SA 誘導体 (2)

 化合物	IC ₅₀ / nM ^a	阻害形式	化合物	IC ₅₀ / nM	阻害形式	化合物	IC ₅₀ / nM	阻害形式
1	<1.0	不可逆	8	1.0		15	7.5	可逆
2	270		9	1.6	不可逆	16	180	—
3	3.7		10	1.8	不可逆	17	- 300	—
4	1.2		11	> 1000	—	18	3.0	—
5	3.0		12	1800	· _	19	30	可逆
6	1.0		13	> 1000	-	20	1000	
7	< 1.0	不可逆	14	230		21	> 5000	可逆

表 1-3. 再構成されたウシ型脳クラスリン被覆小胞顆粒 V-ATPase に対する プロトン輸送阻害活性^{22,24b,27)}

"サリシリハラミド誘導体のプロトン輸送阻害活性

化合物 1 は、天然型 SA であり、1 nM 以下の IC₅₀ 値という低い濃度で V-ATPase を 阻害している。化合物2は、天然型1のエナンチオマーであり、阻害活性が270 nM の IC₅₀ 値と、1 より 270 倍以上低下している。化合物 3, 4 および 5 は、ベンゾラクト ンエナミド部位を 2 箇所有している SA 誘導体(二量体型誘導体)である。化合物 3, 4 および5は、二量体型誘導体のエナミド側鎖の構造において互いに異なっていて、そ れらの阻害活性は、それぞれ 3.7 nM, 1.2 nM, 3 nM の IC₅₀ 値と、おおよそ**1** と同等の 阻害活性を保持している。化合物 6 から 13 は、1 とは異なるエナミド側鎖を有する 誘導体である。化合物 6 から 10 の阻害活性は、それぞれ 1.0 nM, <1.0 nM, 1.0 nM, 1.6 nM. 1.8 nM の IC₅₀ 値と、おおよそ 1 と同等の阻害活性を有している。しかし、化合物 6から10と比べて大きなエナミド側鎖を有する化合物11,12および13の阻害活性は、 それぞれ >1000 nM, 1800 nM, >1000 nMの IC₅₀ 値と、1より 1000 倍以上低下している。 化合物 14 および 15 は、エナミド側鎖の代わりに α, β-不飽和カルボニル構造を有す る誘導体であり、それらの阻害活性は、それぞれ 230 nM および 7.5 nM の ICm 値であ る。エステル 14 が、1 よりも活性が 230 倍以上低下しているのに比べて、ケトン 15 は1とほぼ同等の阻害活性を保持している。化合物16および17は、2級アルコール およびフェノールをそれぞれマスクした誘導体である。化合物 16 および 17 阻害活性 は、それぞれ 180 nM および 300 nM の IC₅₀ 値であり、**1** よりも 180~300 倍活性が低 下している。化合物 18 は、化合物 9 のマクロラクトンのオレフィン部位が環元され た誘導体にほぼ対応しているが、その阻害活性は3.0 nMのIC₅₀値と、1と同等の活性
を保持している。そして化合物 19 は、化合物 9 のマクロラクトンのオレフィン部位 が還元されているだけでなく、エナミドがアミンに還元された誘導体にほぼ対応して いるが、その阻害活性は 30 nM の IC₅₀ 値と、1 と比較して大きな阻害活性の低下は見 られない。化合物 20 はエナミド側鎖をヘプチルエステルに変換したものであるが、 その阻害活性は 1000 nM の IC₅₀ 値と、1 と比較して顕著な低下が見られた。化合物 21 は化合物 9 のエナミド部位をオキシムエーテル様構造に変換したものであるが、 その阻害活性は 5000 nM 以上の IC₅₀ 値と、ほとんど活性を保持していない。

この構造活性相関研究から、SAの V-ATPaseの阻害活性について、以下に述べる傾向が明らかにされた。先ず、1 と化合物 6-10 との阻害活性の大きさが殆ど変わらないことから、活性発現には側鎖の構造はあまり重要ではないと考えられる。しかしながら、化合物 6-10 に比べて化合物 11-13 の阻害活性の大きさが大きく低下していることから、ファルネシノール、コレステロールおよびビオチンといった大きな置換基を側鎖に導入すると、SA の活性が大きく低下することが分かった。また、化合物 16 および 17 の阻害活性が 1 と比べて 180~300 倍低下していることから、フェノール性ヒドロキシ基および 2 級アルコールは、活性発現に重要であることが分かった。

また、化合物 18 は、マクロラクトン環の二重結合が還元されているが、1 とほぼ 同等の阻害活性を示し、二量体型エナミド誘導体 3,4 および 5 も 1 とほぼ同等の阻害 活性を示している。一方、エナミド部位を有していない化合物 19,20 および 21 の阻 害活性は、天然物と比較して大きく低下している。これらの結果から、エナミド部位 の存在が、SA の阻害活性発現に重要であることが分かった。

まとめると、天然物1のジエン側鎖の構造は、阻害活性発現にとって不可欠という わけではない。一方で、フェノール性ヒドロキシ基とエナミド部位が保存されている ことが、阻害活性発現にとって本質的に重要である。同様の知見が、同じくベンゾラ クトン系エナミドであるロバタミドCの構造活性相関研究²⁸⁾からも、得られている。

また、エナミド部位を保持していない α , β -不飽和ケトン **15** が、**1** と同等の阻害活性を有している。よって、エナミド部位そのものが、阻害活性発現にとって不可欠というわけではない。すなわち、V-ATPaseの結合ポケットに適合し、結合する際に不可欠な立体配座を構築することは、エナミド部位でなくとも、 α , β -不飽和ケトン部位で可能であることを示唆している。

一方、SA による V-ATPase の阻害活性発現において、エナミド部位が果たす役割に 関連して、De Brabander らは以下の結果を報告している。SA の阻害機構に関しては、 哺乳類性 V-ATPase の膜貫通 Vo部分に不可逆結合していることが、示唆されている。 また、図 1-11 および図 1-12 の SA 誘導体を用いた構造活性相関研究から、エナミド 部位を有する 1, 7, 9 および 10 は、V-ATPase に不可逆結合するが、エナミド構造を有 さない 15, 19 および 21 は、天然物 1 と異なり、V-ATPase に可逆的に結合しているこ とが明かになった。よって、SA が V-ATPase に不可逆結合するためには、エナミド部 位が必須であると考えられている。

さらに、De Brabander らは、化合物 9 の側鎖の末端が放射性同位体のトリチウムで 標識された、放射性誘導体 21 を調製して V-ATPase 阻害実験をおこない、その研究過 程で、全体の 44%阻害された V-ATPase を単離した。この V-ATPase からは、トリチウ ム由来の放射線が、全体の 18%に相当する線量でしか観測されず、残りの 26%に相当 するとトリチウム線源は、消失していた²⁷⁾。この結果は、21 が V-ATPase に結合する 際に、トリチウム標識化されている側鎖が脱離していることを示唆している。この結 果と上述の構造活性相関の結果 (表 1-3)を踏まえて、De Brabander らは、以下の様な、 SA による V-ATPase の阻害機構を提唱している²⁷⁾ (図 1-15)。

すなわち、V-ATPase に存在するリジンやシステインなどアミノ酸残基に由来する、 求核性のアミノ基あるいはチオールなどが、SA のエナミン部位と交換反応を起こし て、阻害剤と共有結合を形成する一方、アミド側鎖が放出されるというものである。 しかし、この機構は推測の域を出ておらず、今後より詳細な研究を行う必要がある。



図 1-15. SA による V-ATPase の推定阻害機構²⁷⁾

一方、同じくベンゾラクトンエナミド類である、ロバタミドCの光親和性標識体が 調製されており (図 1-16)²⁸⁾、結合部位の解明に有効であると思われるが、それを利用 した研究は報告されていない。



"ウシ型脳クラスリン被覆小胞顆粒 V-ATPase に対するプロトン輸送阻害活性

図 1-16. ロバタミド C の光親和性標識誘導体とその V-ATPase 阻害活性²⁸⁾

V-ATPase に対するサリシリハラミド A の結合部位に関する知見については、Huss らによる、J-コンカノライド A との競合実験の結果 (図 1-17)¹⁴⁾から明らかにされてい る。すなわち、コンカナマイシン、バフィロマイシン A₁およびバフィロマイシン B₁ (図 1-18)を、それぞれ共存させると、サブユニット c に対する J-コンンカノライド A の 結合が阻害された。一方、サリシリハラミド A を共存させても、J-コンンカノライド A はサブユニット c に結合した。この結果から、J-コンカノライド A、コンカナマイ シン、バフィロマイシン A₁およびバフィロマイシン B₁²⁹⁾は、サブユニット c に結合 するが、サリシリハラミド A は、それらとは異なる部位に結合することが示唆された。



図 1-17. SDS-PAGE による J-コンカノライドA に対する結合阻害実験の結果 "。阻害 剤を作用させた後、終濃度 10 μ M の J-コンカノライドA を投与し、UV 照射後に泳動 することで得られた放射線写真図¹⁴: 左図, コンカナマイシンを阻害剤として選択し、 種々の濃度で添加;右図,バフィロマイシン A₁、バフィロマイシン B₁および SA を阻 害剤として選択し、それぞれ 10 μ M および 100 μ M で添加

^a M. sexta の中腸由来の V-ATPase のサブユニット c への結合能を指標とした

さらに、Xie と De Brabander らにより、サリシリハラミド A は、V-ATPase の膜貫通 領域 Vo に結合し、バフィロマイシンとは異なる阻害様式を有していることが明らか にされている 27)。

哺乳類 V-ATPase の特異的阻害剤であるサリシリハラミド A の阻害機構解明の研究 において、大腸菌を用いるタンパク発現システムや哺乳類 V-ATPase の変異体を利用 することは困難である。このため、SA の V-ATPase 阻害機構については、膜貫通部位 Vo部分の、バフィロマイシンとは異なる部位に結合し、V-ATPase を阻害することは 明らかであるが、結合部位の詳細は明らかではない。

以上述べてきたように、サリシリハラミドによる V-ATPase の阻害機構に関する研究は、構造活性相関研究の結果をもとにして主に行なわれている。しかしながら、 V-ATPase における SA の結合部位、SA による V-ATPase の阻害機構の分子レベルでの 詳細、および SA と V-ATPase のつくる分子複合体の構造に関しては、ほとんど明ら かにされていないのが現状である。

1-6 固体 NMR と原子間距離測定

近年、高分解能 NMR を用いて、分子中の特定の原子間距離情報を精密に測定する 方法論が開発されており、一つの分子に対して得られた幾つかの原子間情報を基に、 分子の折れ曲がりの様子など、分子の立体構造を構築することが可能になってきた。 溶液 NMR の場合、核オーバーハウザー (Overhauser)効果 (NOE)から見積もられる水 素原子間距離を基に分子量3万程度までの蛋白質の立体構造決定が可能になっている。 しかしながら、膜タンパク質の場合は原子の位置がある程度固定しているため、溶液 では分子運動によって平均化されていた原子間の磁気的相互作用が存在する。このた め通常の NMR 測定では分解能が低く、二次元 NMR 法を用いても、分子内で多くの 原子間距離を同時に測定することは困難である。一方、固体 NMR において測定され る原子間距離の精度は非常に高い。さらに、直接磁気双極子相互作用を観測するので、 より遠い原子間距離測定も可能である。固体 NMR によって原子間距離を測るために は、従来、高速マジック角回転(MAS)によって消去されていた磁気双極子相互作用を 復活させる必要がある。この方法は、同種原子間距離を測る場合と異種原子間距離を 測る場合で異なってくる。同種原子間距離を測る方法として、現在最もよく使われて いる方法は回転共鳴法(Rotational Resonance)である。この方法では、化学シフト値の 異なる2つの同種核(例えば¹³C核)の共鳴周波数差の整数倍の周波数でローターを 回転させる。このことにより、同種核間磁気双極子相互作用が復活し、縦磁化の交換 速度が速くなる。この交換速度の増加の程度から原子間距離を決定する方法である。 異種原子間距離を決定する方法として、回転エコー二重共鳴法(REDOR, Rotational) Echo Double Resonance)がよく使われる。この方法は、ローターの周期に同期して、180 パルスを磁気双極子結合を持つ核の片方に照射する。このパルスの影響で回転エコー の再結像が妨げられる。この回転エコーの減衰の程度から異種核間磁気双極子相互作 用の大きさを見積もることが可能となり、原子間距離の情報が得られる。距離測定の 目安として C, N 原子間距離であれば 5 Å 程度まで、C, F 原子間距離であれば 15 Å 程 度までの距離がそれぞれ±0.05 Åおよび 0.3 Åの精度で測定できる。この固体高分解能 NMR による距離測定を生体分子に応用することにより、蛋白質-リガンド複合体の結 合部位などの局所構造を精密に決定することが可能である。蛋白質-リガンド複合体 への **REDOR** 法の適用例³⁰⁾を以下に示す。

タキソールは制ガン剤として現在臨床的に用いられており、微小管を形成するチュ ーブリンに結合し、その脱重合活性を阻害することが知られている。Schaefer らは、 タキソール(Paclitaxel)の¹³C、¹⁵N、¹⁹F 標識体を天然から誘導し、チューブリンに結合 した状態のコンホメーションを¹³C{¹⁹F}および¹⁵N{¹⁹F}REDOR 測定によって推定し ている (図 1-18)。この場合、¹⁹F と¹³C の距離はそれぞれ 9.6 Å、10.4 Å であると求め られ、現在、距離情報から得られたタキソールのコンホメーションを基に、より親和 性の高い誘導体の調製が検討された。



図 1-18. チューブリンタンパク質に結合したタキソールの分子内 REDOR 測定²⁷⁾

このように、REDOR 法は、標的タンパク質に結合したリガンドの立体配座を知る 上で有用な方法であると考えられる。しかしながら、NMR の測定核である 13 C、 15 N は天然存在率が非常に少なく、また 19 F は天然の生体分子には含まれていないため、 標識体を調製するなどの工夫が必要になってくる。タキソールの例は、天然物から容 易に誘導可能な側鎖の一部や官能基を標識したものであるが、標識位置が基本骨格か らかなり遠い位置にある。タキソールが独特な活性を発現するのは、チューブリンの 結合ポケットに丁度収まりよく基本骨格が適合するためであり、基本骨格の周辺部位 を標識した誘導体を用いて得られた結果を用いて、チューブリンとの結合の際に重要 な、基本骨格の立体配座を推定することは難しいと思われる。この問題を解決するた めには、分子の基本骨格そのものを標識化する必要がある。タンパク質やペプチドへ 13 C や 15 N を導入することは、PureSystem などの遺伝子工学的手法を用いることで比 較的容易であるが、 19 F についてはその報告例がない。また、非ペプチド性の天然物 の骨格構造に標識原子を導入することは、天然物そのもの全合成に匹敵するため、非 常に挑戦的な課題である 31 。 1-7 フッ素による有機化合物の標識

含フッ素有機化合物は、医薬品や農薬、あるいは機能材料物質としての応用が期待 されているため、フッ素化合物の合成法、およびフッ素化反応の開発は、近年めざま しい進展を遂げている³²⁾。求電子的なフッ素化試薬として、最近、*N*-フルオロピリジ ニウム塩が広く用いられている^{32,33a)}(図1-19, 左から右へ行くほどフッ素化能は高く なる)。この試薬は、従来の求電子的フッ素化試薬であるフッ素ガス(F₂)、ハイポフル オライト(CF₃OF)、硫酸セシウムフルオライト(CsSO₄F)、フッ化キセノン(XeF₂)などに 比べて爆発性、腐食性がなく、安全かつ簡便に扱うことができるという利点を有して いる。



図 1-19. 種々の N-フルオロピリジニウム塩

これら試薬の特徴は、ピリジン環上の置換基の性質によりフッ素化能が変化するの で、基質の反応性に応じて使い分けができ適用範囲が広い。例えば脂肪族化合物のフ ッ素化においては、Grignard 試薬や活性メチレン化合物のナトリウム塩のフッ素化、 エノールエーテル類からのα-フルオロケトンへの変換、スルフィドからのα-フルオ ロスルフィドへの変換など広範囲に用いられている³³⁾(スキーム 1-10)。



スキーム 1-10. N-フルオロピリジニウム塩を用いてのフッ素化反応

一方で、これらの試薬は芳香環のフッ素化にも広く応用されている。しかし、一置 換芳香環化合物のフッ素化においては、導入されるフッ素の位置選択性の低さが問題 となっていた。この問題に関して、Umemoto らは^{33a)}フェノール、フシリルフェノー ルエーテルを o-選択的にフッ素化する試薬を開発した(スキーム 1-11)。その o-選択性 は極めて高いため、この試薬を使用することで多置換芳香環化合物の o-選択的フッ素 化を行うことができると期待されている。



1-8 研究目的

V-ATPase は、1-1節で述べたように生命活動に重要な役割を担っており、骨粗しょう症などの疾病にも深く関わっている。その特異的阻害剤である SA は、ヒト腫瘍細胞に対して強力な細胞毒性を示し、新たな抗がん剤のリード化合物として大きく注目されている^{2,23)}。しかしながら分子レベルでの活性発現機構は、ほとんど明らかにされていない。

本研究の最終目的は、SA による V-ATPase の阻害機構を解明するために分子複合体 の構造解析を行うことである。構造解析の手段としては、1-6 節で述べた、フッ素 19 を利用固体 NMR 測定(REDOR 法)を適用することにしたが、フッ素体が天然物と 同等の阻害活性を有しているかどうかを確かめる必要がある。

そこで、まず4位を¹⁹Fで標識した SA の合成を行って、その V-ATPase の阻害活性 を測定することを検討した (図 1-20)。この標識位置は、ベンゾラクトンエナミドの共 通部分が V-ATPase 阻害活性発現に重要であると考えられること、及びフッ素導入の 容易さを考慮して決定した。



図 1-20. 4 位をフッ素 19 で標識したサリシリハラミドA

そして、SA の結合部位を明らかにするために、ビオチン標識化サリシリハラミド を設計・合成し、その結合領域を明らかにすることを目的とした (図 1-21)。



図 1-21. ビオチン標識化サリシリハラミドAのデザイン

ベンゾラクトン系エナミドは、哺乳類性 V-ATPase のみを特異的に阻害することが 特徴的である。中でも、SAは、構造が比較的単純であることから、V-ATPase が関連 する疾患のリード化合物として非常に有望視されている。しかしながら、SA による V-ATPase の阻害作用は、組織選択性がないため、毒性にもつながる。SA の様な V-ATPase 特異的阻害剤を医薬品として用いるためには、その阻害機構を解明する必 要があるが、その詳細はほとんど明らかにされていない。

本研究により、阻害活性を保持しているフッ素標識化サリシリハラミド(F-SA)を合成することができれば、フッ素原子の特性を活かした研究法、例えば、¹⁹F-NMR 測定などにより、SA による阻害機構を、分子レベルで解明することにつながることが期待される。また、ビオチン標識化サリシリハラミドを合成し、結合部位を特定することができれば、その阻害機構の解明に著しく貢献することができるであろう。

参考文献

- (1) V-ATPase に関する総説: (a) Forgac, M. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 2007, 8, 917-929.;
 (b) 森山芳則 生化学 1993, 65, 413-436.; (c) Nishi, T.; Fogac, M. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 2002, 3, 94-103.; (d) 今村博臣, 横山 謙 生化学, 2007, 79, 425-437.; (e) 横山 謙, 西 毅 蛋白質 核酸 酵素 2004, 49, 2035-2043.; (f) 吉田賢右, 茂木立志 著, シリーズバイオサイエンスの新世紀 生体膜のエネルギー装置, 日本生化学会編, 共立出版, 2000, 89-101.; (g) 村田武士, 山登一郎, 柿沼喜巳, 横山 謙 蛋白質 核酸 酵素 2007, 52, 335-341.; (h) Yao, G-F.; Feng, H.-T.; Cai, Y.-L.; Qi, W.-L.; Kong, K.-M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007, 357, 821-827.; (i) 西 毅 生化学 2005, 77, 354-358.; (j) Qi, J.; Wang, Y.; Forgac, M. J. Bioenerg. Biomembr. 2007, 39, 423-426.; (k) Wilkens, S.; Zhang, Z.; Zheng, Y. Micron 2005, 36, 109-126.; (l) Inoue, T.; Wang, Y.; Jefferies, K.; Qi, J.; Hinton, A.; Forgac, M. J. Bioenerg. Biomembr. 2005, 37, 393-398.; (m) Sun-Wada, G-H.; Wada, Y.; Futai, M. Biochim. Biophys. Acta. 2004, 1658, 106-114.
- (2) V-ATPase を標的とした創薬研究に関する総説: (a) Niikura, K. Drug News Perspect.
 2006, 19, 139-144.; (b) Bowman, E. J.; Bowman, B. J. J. Bioenerg. Biomembr. 2005, 37, 431-435.; (c) Beutler, J. A.; McKee, T. C. Curr. Med. Chem. 2003, 10, 787-796.
- (3) 吉田賢右, 茂木立志 著, シリーズバイオサイエンスの新世紀 生体膜のエネルギー装置, 日本生化学会編, 共立出版, 2000, 74-88.
- (4) Abrahams, J. P.; Leslie, A. G.; Lutter, R.; Walker, J. E. Nature 1994, 370, 621-628.
- (5) Stock, D.; Leslie, A. G. W.; Walker, J. E. Science 1999, 286, 1700-1705.
- (6) Kawasaki-Nishi, S.; Nishi, T.; Forgac, M. FEBS Lett. 2003, 545, 76-85.
- (7) 日高弘義 著, 阻害剤研究法 最近の進歩と展開, 共立出版, 1985.

(8) 森山芳則, 吉森保, 山本章嗣, 田代裕, 二井将光 生化学 1993, 38, 2000-2011.

(9) Bowman, E. J.; Siebers. A.; Altendorf, K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 7972-7976.

(10) Woo, J. T.; Shinohara, C.; Sakai, K.; Hasumi, K.; Endo, A. J. Antibiot. 1992, 45, 1108-1116.

(11) (a) Gagliardi, S.; Gatti, P. A.; Belfiore, P.; Zocchetti, A.; Clarke, G. D.; Farina, C. J. Med. Chem. 1998, 41, 1883-1893.; (b) Gagliardi, S.; Rees, M.; Farina, C. Curr. Med. Chem. 1999, 6, 1197-1212.

(12) Droese, S.; Boddien, C.; Gassel, M.; Ingenhorst, G.; Zeeck, A.; Altendorf, K.

Biochemistry 2001, 40, 2816-2825.

(13) (a) Dröse, S.; Bindseil, K. U.; Bowman, E. J.; Siebers, A.; Zeeck, A.; K. Altendorf

Biochemistry 1993, 32, 3902-3906.; (b) Ingenhorst, G.; Bindseil, K. U.; Boddien, C.; Dröse,

S.; Gaßel, M.; Altendorf, K.; Zeeck, A. Eur. J. Org. Chem. 2001, 4525-4532.

(14) Huss, M.; Ingenhorst, G.; König, S.; Gaßel, M.; Dröse, S.; Zeeck, A.: Altendorf, K.; Wieczorek, H. J. Biol. Chem. 2002, 277, 40544-40548.

(15) (a) Bowman, E. J.; Graham, L. A.; Stevens, T. H.; Bowman, B. J. J. Biol. Chem. 2004, 279, 33131-33138.; (b) Bowman, B. J.; Bowman, E. J. J. Biol. Chem. 2002, 277, 3965-3972.

(16) Pàli, T.; Whyteside, G.; Dixon, N.; Kee, T. P.; Ball, S.; Harrison, M. A.; Findlay, J. B. C.;
Finbow, M. E.; Marsh, D. *Biochemistry* 2004, 43, 12297-12305.

(17) Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina, J. H. II; Boyd, M. R. J. Org. Chem. 1997, 62, 8188-8192.

(18) Boyd, M. R.; Farina, C.; Belfiore, P.; Gagliardi, S.; Kim, J.-W.; Hayakawa, Y.; Beutler, J. A.; McKee, T. C.; Bowman, B. J.; Bowman, E. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 297, 114-120.

(19) (a) McKee, T. C.; Galinis, D. L.; Pannell, L. K.; Cardellina, J. H., II; Laakso, J.; Ireland,

C. M.; Murrray, L.; Capon, R. J.; Boyd, M. R. J. Org. Chem. 1998, 63, 7805-7810. (b) Galinis,

D. L.; McKee, T. C.; Pannell, L. K.; Cardellina, J. H., II.; Boyd, M. R. J. Org. Chem. 1997, 62, 8968-8969.

(20) (a) Kunze, B.; Jansen, R.; Sasse, F.; Höfle, G.; Reichenbach, H. J. Antibiot. 1998, 51,

1075-1080.; (b) Jansen, R.; Kunze, B. Reichenbach, H.; Höfle, G. Eur. J. Org. Chem. 2000, (issue 6), 913-919.

(21) Kim, J. W.; Shin-ya, K.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. J. Org. Chem. 1999, 64, 153-155.

(22) Larry, Y. Chem. Rev. 2003, 103, 4283-4306.

(23) 以下のホームページを参照:

http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00538343?term=reata&rank=6

(24) (a) Fürstner, A.; Dierkes, T.; Thiel, O. R.; Blanda, G. Chem. Eur. J. 2001, 7, 5286-5298.;
(b) Wu, Y.; Liao, X.; Wang, R.; Xie, X.-S.; De Brabander, J. K. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 3245-3253.;
(c) Smith, A. B., III; Zheng, J. Tetrahedron 2002, 58, 6455-6471.;
(d) Labrecque, D.; Charron S.; Rej, R.; Blais, C.; Lamothe S. Tetrahedron Lett. 2001, 42, 2645-2648.;
(e) Herb, C.; Bayer, A.; Maier, M. E. Chem. Eur. J. 2004, 10, 5649-5660.;
(f) Herb, C.; Maier, M.

E. J. Org. Chem. 2003, 68, 8129-8135.; (g) Holloway, G. A.; Hügel, H. M.; Rizzacasa, M. A. J. Org. Chem. 2003, 68, 2200-2204.; (h) Haack, T.; Haack, K.-L.; Diederich, W. E.; Blackman, B.; Roy, S.; Pusuluri, S.; Georg, G. I. J. Org. Chem. 2005, 70, 7592-7604.; (i) Snider, B. B.; Song, F. Org. Lett. 2001, 3, 1817-1820.; (J) Yadav, J. S.; Srihari, P. Tetrahedron: Asymmetry 2004, 15, 81-89.

(25) Coleman, R. S.; Liu, P.-H. Org. Lett. 2004, 6, 577-580.

(26) (a) Allred, G. D.; Liebeskind, L. S. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 2748-2749.; (b) Zhang,
S.; Zhang, D.; Liebeskind, L. S. J. Org. Chem. 1997, 62, 2312-2313.

(27) Xie, X.-S.; Padron, D.; Liao, X.; Wang, J.; Roth, M. G.; De Brabander, J. K. J. Biol. Chem. 2004, 279, 19755-19763.

(28) (a) Shen, R.; Lin, C. T.; Bowman, E. J.; Bowman, B. J.; Porco, J. A. Jr. J. Am. Chem. Soc.
2003, 125, 7889-7901.; (b) Shen, R.; Lin, C. T.; Bowman, E. J.; Bowman, B. J.; Porco, J. A. Jr. Org. Lett. 2002, 4, 3103-3106.

(29) (a) Werner, G.; Hagenmaier, H.; Drautz, H.; Baumgartner, A.; Zähner, H. J. Antibiotics **1984**, *37*, 110-117.; (b) Goetz, M. A.; McCormick, P. A.; Monaghan, R. L.; Ostlind, D. A.

Hensens, O. D.; Liesch, J. M.; Albers-Schonberg, G. J. Antibiotics 1985, 38, 161-168.; (c)

Deeg, M.; Hagenmaier, H.; Kretschmer, A. J. Antibiotics 1987, 40, 320-328.

(30) Li, Y.; Poliks, B.; Cegelski, L.; Poliks, M.; Gryczynski, Z.; Piszczek, G.; Jagtap, P. G.;

Studelska, P. R.; Kingston, D. G. I.; Schaefer, J.; Bane, S. Biochemistry 2000, 39, 281-291.

(31)機能解明を指向した標識化天然物の合成、大石 徹、村田道雄 化学工業 2004,8, 604-609.

(32) (a) 北原智哉, 石原 孝, 田口武夫 フッ素の化学, 講談社, 1993.; (b) Ma, J. -A.;

Cahard, D. Chem. Rev. 2004, 104, 6119-6149.; (c) Tietze, L.; Ila, H.; Bell, H. P. Chem. Rev.

2004, 104, 3453-3516.; (d) Dawood, K. M. Tetrahedron 2004, 60, 1435-1451.

(33) (a) Umemoto, T.; Tomizawa, G. J. Org. Chem. 1995, 60, 6563-6570.;

(b) ダイキンフッ素化テクノロジーパンフレット

(http://www.daikin.co.jp/chm/pro/kasei/fusso/pdf/fluorination_j.pdf).;

(c) ダイキン化成品販売株式会社ホームページを参照

(http://www.daikin-dcs.co.jp/finechemical/mecreagent.html)

第2章 フッ素化サリシリハラミドの合成

2-1 サリシリハラミドAの合成

第1章4節でとりあげた全合成例および方法論を参考に、先ず、予備実験として、 天然型サリシリハラミド類の合成ルートを確立することにした。スキーム 2-1 に、合 成計画を示す。エナミド側鎖の導入は、Coleman らまたは Fürstner らの方法により最 終段階で行うことにした。すなわち、Coleman らの方法¹⁾ではヨードオレフィン(5)と アミド(7)との、Fürstner らの方法²⁾ではヨードオレフィン(6)とアミド(8)との、チオフ エンカルボン酸銅(I)を用いたカップリング反応により導入することにした。マクロ ラクトン(5)および 6 は、ジエン(9)から閉環メタセシス続く高井オレフィン化反応に より構築し、エステル(9)は、サリシル酸(10)とアルコール(11)の光延エステル化反応 により連結することにした。



スキーム 2-10. 天然型 SA の合成計画

まず、De Brabander ら³⁾および Fürstner らの方法²⁾に従い、サリチル酸フラグメント (10)の合成を行なった (スキーム 2-2)。市販の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸(12)に対し、 DME 中、塩化チオニル、DMAP を作用させることで、サリシル酸誘導体(13)を 97% の収率で得た⁴。得られた 13 に対して Tf₂O を作用させてトリフラート(14)に変換し た後、アリルトリ n-ブチルスズとの Stille カップリングを行うことで、アリルベンゼ ン誘導体(15)を得た。得られた 15 に対し、Grignard 試薬とアリルアルコールから系内 にて調製したマグネシウムアリルアルコキシドを塩基として作用させてアリルベン ゾエート(16)に変換した後、生じたフェノール性水酸基をヨウ化メチルでメチル化す ることで、メトキシベンゼン誘導体(17)を得た。最後に、Pd(Ph₃P)₄存在下、モルホリ ンを用いて、辻-Trost 反応⁵⁾を行い、アリルエステル(17)のアリル基を除去することで、 サリチル酸フラグメント(9)³⁾を 6 段階 64%の収率で合成した。



スキーム 2-2. サリシル酸フラグメント(10)の合成

次に、マクロリドフラグメント(11)の合成を行った (スキーム 2-3)。Smith らの報告 ⁶⁾を参考に、市販の(*R*)-グリシドール(18)のアルコールを*p*-メトキシベンジルエーテル (19)へと導いた後に、ビニルマグネシウムブロミドとヨウ化銅(I)から調製したビニ ル銅試薬を作用させることでエポキシドを開環して、アルコール(20)を得た⁷⁾。その 後、20 のヒドロキシ基を TBS エーテルとして保護して得られたオレフィン(21)に対 して、四酸化オスミウムを作用させてジオール(22)へと導いた後に、生じたジオール 部位を過ヨウ素酸ナトリウムにより開裂することでアルデヒド(23)を得た。

- 43 -

1



得られたアルデヒド(23)に対して Brown の不斉クロチル化反応⁸⁾を行ったところ、 望みの立体化学を有するアルコール(24a)⁶⁾およびそのジアステレオマー24b を、 23a:24b=23:1の分離不可能な混合物として、2段階収率 88%で得た (スキーム 2-4)。



スキーム 2-4. アルデヒド(23)に対する Brown の不斉クロチル化反応

得られた 24 のヒドロキシ基を MOM エーテル(25)へと導いた後に、末端オレフィ ンをヒドロホウ素化することで得られる一級アルコール(26)を、 Dess-Martin 試薬に より酸化し、続いて Wittig 反応により増炭を行うことで、オレフィン(37)へと変換し た (スキーム 2-5)。更に、37 の PMB 基を酸化的に除去してところ、副生する *p*-メト キシベンズアルデヒドを除去することが困難であったため、水素化ホウ素ナトリウム によりアルコール(29)へと還元した。そして、シリカゲルカラムクロマトグラフィー により 29 を除去することでアルコール(28)を得た。その後、一級アルコールをメシ ラートへ(30)へと導いた。



続いて、シアン化カリウムを用いて、メシラート(**30**)のシアノ化を検討した(表 2-1)。 先ず、エントリー1として、鳥飼らの報告⁹⁾を参考に、DMSO中、4等量のシアン化 カリウム、1等量の18-クラウン-6-エーテルを用いて、80 ℃で反応を行ったところ、 基質の分解反応が主に起こり、分子内環化体(**32a**)およびエポキシド(**32b**)がそれぞれ、 25%、16%と得られるに留まった。そこで、エントリー2では、反応温度を45℃と比 較的低温で行ったところ、32 時間と長時間を要するものの、目的のニトリル(**31**)が 72%の収率で得られ、また、原料 **30** が 10%の収率で回収された。エントリー3 では、 溶媒への溶解度を向上させるために念入りにすり潰したシアン化カリウムを用い、 45 ℃ で 27 時間反応を行ったところ、基質の分解反応が主に起こり、目的物 **31** はほ とんど得られなかった。そこで、エントリー4 として、溶媒を DMSO から DMF に変 更し、使用するシアン化カリウムと 18-クラウン-6-エーテルをそれぞれ 2 等量および 0.5 等量と少なくして、室温で反応を行った。その結果、73 時間と長時間を要するも のの、目的物 31 が 69%の収率で得られ、また、原料 30 が 21%の収率で回収された。



表 2-1. シアン化カリウムを用いたメシラート(30)からニトリル(31)への変換検討

	solvent	temp. / °C	time	yield / %				
entry			/ h	31	32a	32b	30	
1	DMSO	80	1.5	5	25	16	17	
2	DMSO	45	32	72	11	-	10	
3	DMSO	45	27	—	11	10	9	
4 ^a	DMF	rt	73	69	·		21	

^aKCN (2.0 eq), 18-crown-6 (0.5 eq)

エントリー4の条件でシアノ化反応を行った後、回収された原料を再びシアノ化反応に供することを3度繰り返すことで、メシラート(30)をニトリル(31)へ、83%の収率で変換することができた(スキーム 2-6)。得られた 31のシアノ基を2段階で還元して、アルコール(32)へと導いた後に、TBAFを用いて TBS基を除去することで、ビシナルジオール(33)を得た。最後に、DMF中、水素化ナトリウムを0℃でジオール(33)に作用させて、そこに1.01等量の*p*-メトキシベンジルクロリドを添加することで、1級アルコール選択的に*p*-メトキシベンジルエーテル化を行い、マクロリドフラグメントであるアルコール(11)³⁾を、76%の収率で得た。

- 46 -



サリシル酸部(**10**)とマクロリドフラグメント(**11**)の両フラグメントが合成できたので、Fürstner らの方法²⁾に従ってマクロラクトン(**7**)の合成を検討した (スキーム 2-7)。

カルボン酸(10)とアルコール(11)を光延エステル化反応¹⁰⁾により連結し、定量的に エステル(8)へ誘導した。得られたジエン(9)に対し、第一世代の Grubbs 触媒を用いる 閉環メタセシス反応¹¹⁾を行ったところ、反応は14分と速やかに且つ高収率で進行し、 望む *E*-体(34)および異性体(35)を、30:1 の混合物として、収率 96%で得た。これらは 互いに分離不可能であったため、混合物のまま DDQ により *p*-メトキシベンジル基を 除去したところ、望む *E*-マクロリド(36)と *Z*-マクロリド(37)をシリカゲルカラムクロ マトグラフィーにより分離することができた。そこで 36 のみを、Dess-Martin 酸化に よりアルデヒド(38)へと導いた。



続いて、38に対して、高井反応によるヨードオレフィン化反応の検討をおこなった (表2-2)。アルデヒド(38)に対し、THF中、0℃で塩化クロム(Ⅱ)存在下にヨードホルム を作用させたが^{12a)}、望むE-ヨードオレフィン(5)とその立体異性体(39)が4:3の混合物 として得られ、また30%と低収率であった。これらは、シリカゲルカラムクロマトグ ラフィーでの分離が不可能であった。そこで、Fürstner及びEvansらの報告に従い^{2,12b)}、 ジオキサン-THFの6:1の混合溶媒中で行ったところ、高収率で反応が進行し、E-体(5) とZ-体(39)を8:1の選択性で得た。



entry	solvent	CrCl ₂	CHI₃	time	5/39	yield	
1	THF	<u>/ eq</u> 6	<u>/ eq</u> 2	3	4/3	30	
2	THF-dioxane [6:1]	12	4	16	8/1	quant.	

(E)-ヨードオレフィン(7)と(Z)-ヨードオレフィン(39)の8:1の混合物のジクロロメタン溶液に、-78°Cで2.6 等量のBBr₃を作用させたところ、目的のヨードオレフィン(6)を、その幾何異性体(40)と共に4:1の比率で、79%の収率で分離不可能な混合物として得た(スキーム2-8)。



望むカップリング前駆体を合成することができたので、Coleman らが報告した方法 論²⁾に従って、*N*-アシルエナミド側鎖の立体選択的な導入を試みた。先ず、アミド(**7**) の合成を行った (スキーム 2-9)。CeCl₃存在下、NaBH₄を用いてマレイミド(**41**)の 1,2-還元を行うことで、アミナール(**42**)を得た。化合物 **42** は極めて親水性が高く非極性 溶媒に難溶性であったため、メタノール-酢酸エチル系を用いる再沈殿法により精製 した。続いて、**42** のヒドロキシ基を TBS エーテルとして保護することで、目的のア ミド(7)を2段階収率21%で得た¹³⁾。



続いて、ヨードオレフィン(5)とアミド(7)のカップリング反応を検討した (スキーム 2-10)¹⁾。すなわち、ベンゾフェノンケチルから蒸留したジオキサン中、塩基としてリ ン酸カリウム、配位子として N, N'-ジメチルエチレンジアミン、チオフェンカルボン 酸銅(I)¹⁴⁾存在下、ヨードオレフィン(5)とアミド(7)を反応させたところ、目的の(*E*)-エナミド(43)とその立体異性体(44)を、1:1の分離不可能な混合物として、収率 25%で 得ることに成功した。尚、本反応は、基質 5 のスケールが 5 mg と比較的小さなスケ ールでも、再現性よく進行することが分かった。得られたエナミド(43)および 44 の TBS 基を、THF 中-45 °C で 12 分間 TBAF を作用させることで除去し、アミナール(45) を 48%と低収率ながら得ることができた。しかしながら、アミナール(45)に対する(*Z*)-選択的 Wittig 反応を行ったところ、望みの反応は進行せず、原料のアミナールが回収 された。



スキーム 2-10. Coleman らの方法論を用いた、エナミド側鎖の立体選択的導入の検討

この理由としては、平衡条件下でアミナールから発生するアルデヒドの周囲の立体 障害が非常に大きいために、反応点であるアルデヒド部位にイリドが接近できなかっ たこと、あるいは、平衡がアミナール型に大きく偏っていることなどが考えられる (スキーム 2-11)。



スキーム 2-11. アミナール(45)に対する Wittig 反応における推定反応機構

Coleman らの方法論を用いて、N-アシルエナミド側鎖を立体選択的に導入すること は困難であったので、次に、Fürstner らの方法²⁾を検討した。先ず、Labreque らの報 告¹⁵⁾を参考に、アミド(8)²⁾の合成を行った (スキーム 2-12)。市販の *cis*-2-ペンテン-1-オール(47)に対して、ジクロロメタン中、氷冷下で TPAP 酸化¹⁶⁾をおこなった。反応 終了後、氷冷下、100~40 mmHg で減圧濃縮を行うことで溶媒のジクロロメタンを留 去し、アルデヒド(48)を含む黒色濃縮残渣を得た。続いて、得られた 48 に対し安藤 試薬(49)を用いた(2)-選択的 HWE 反応¹⁷⁾を行った。反応終了後、シリカゲルカラムク ロマトグラフィーにより、前段階反応の TPAP 由来の夾雑物のみを除去することで、 望みの(212)-不飽和エステル(50)およびその異性体(51)を混合物として得た。続いて、 エステル(50)および 51 を塩基加水分解することで得られる不飽和カルボン酸(52)及 び(53)を、混合酸無水物を経由するアンモノリシスに供することで、(212)-アミド(8) とその立体異性体(21E)-アミド(54)を、3:1の比率で、安藤試薬(49)から4 段階 75%の 収率で得た。



続いて、ヨードオレフィン(6)とアミド(8)のカップリング反応を検討した²⁾。本反応 で用いるチオフェンカルボン酸銅(I)は、水分や酸素に対して非常に不安定である。 例えば、マレイン酸ジ-n-ブチルスズ、続いて水素化カルシウムから減圧蒸留し、使用 前に数度の凍結脱気法を施して酸素を除去した DMA 中においてですら、わずかに含 まれる酸素や水分によって銅試薬は不活性化してしまう。そのため、本反応は非常に 困難を伴ったが、15回の凍結脱気法を施し、溶存酸素を徹底的に除去したDMA中で、 カップリング反応が進行することを見出した。その上で、以下の条件検討をおこなっ た(表 2-3)。先ず、エントリー1として、ヨードオレフィン(6)に対し、DMA中、塩基 として3等量の炭酸ルビジウム、チオフェンカルボン酸銅(1)存在下、3等量のアミ ド(8)を作用させたところ、目的物は得られず、エナミド側鎖の異性体が合計 3%と得 られるに留まった。そこで、エントリー2では、Panekらの報告¹⁸⁾を参考に、配位子 として 2.2'-ビピリジルを用い、カップリング反応を行なった。すると、反応性は向上 し、目的物である SA(1)を 8%の収率で得ることに成功した。しかしながら、依然と して側鎖の異性体(55)が14%の収率で得られた。そこで、エントリー3では、使用す る塩基とアミドの等量を6等量に増やして反応を行った。すると、収率は向上し、さ らに側鎖の異性化を完全に抑制することができた。その結果、反応終了後の HPLC 精 製後の段階で、目的の SA(1),及びサリシリハラミド B (SB)(3)を、それぞれ 23%、26% の収率で得ることに成功した。尚、合成した**1**および**3**の¹H-NMR¹³C-NMR IR スペ クトル, UV スペクトル、精密質量および旋光度は、報告されている天然物 ¹⁹⁾のそれ とほぼ一致していた。



表 2-3. ヨードオレフィン(6)とアミド(8)のカップリング反応の条件検討



"6 等量の Rb₂CO₃ およびアミドを使用

2-2 フッ素化サリシリハラミドの合成計画

2-2-1 フッ素標識体のデザイン

サリシリシハラミド A (SA)は、他のベンゾラクトンエナミド類と同様の、NCI-60 細胞系列に対する成長阻害活性プロファイル、および、サリシル酸部位、マクロリド 骨格およびエナミド側鎖といった共通構造を有している (図 1-10)。サリシル酸部位と エナミド部位は、ベンゾラクトンエナミドの共通の構造的な特徴であり、標的タンパ ク質に対する結合モチーフであると考えられる。この点は、SA およびロバタミド C の構造活性相関研究からも支持されている。一方、様々な求電子的フッ素化反応が開 発されており、フェノール芳香環にフッ素原子を導入することは比較的容易である。 しかしながら、標的タンパク質との水素結合に関与する可能性がある、フェノール性 ヒドロキシ基がサリシル酸部位に存在している。従って、フッ素原子を芳香環に導入 することで、V-ATPase 阻害活性が保持されるかどうかについては不明であるが、この 点および合成の容易さを考慮して、芳香環の4位にフッ素原子を導入した 4-¹⁹F-サリ シリハラミド A (F-SA)(2)を設計した (図 2-1)。



図 2-1. フッ素化サリシリハラミドのデザイン

2-2-2 合成計画

本章 2-1 節で確立した方法論を、フッ素化サリシリハラミドの合成に適用すること にした。スキーム 2-13 に F-SA(2)の合成計画を示す。



スキーム 2-13. F-SA (2)の合成計画

すなわち、側鎖の導入をヨードオレフィン(57)とアミド(8)とのチオフェンカルボン 酸銅(I)を用いたカップリング反応により最終段階で導入することにした。マクロラ クトン(57)は、ジエン(58)より第一世代 Grubbs 触媒を用いた閉環メタセシス反応 (RCM)、続く高井オレフィン化反応により得られると考えた。エステル(58)は、フッ 素化サリシル酸(59)とアルコール(11)との光延エステル化反応により連結することに した。尚、本合成戦略において、サリシル酸部位にフッ素原子が導入されても、非標 識体と同様に、各段階の反応がうまく進行するかどうかが問題であった。 2-3 フッ素化サリシリハラミドの合成

2-3-1 芳香環フッ素化の検討

求電子的フッ素化試薬として、6-トリフルオロ-N-フルオロピリジニウム塩(60a)を 用いることにし(第1章6節を参照)²⁰⁾、サリチル酸誘導体(13)⁴⁾に対するフッ素原子の 導入を検討した(表 2-4)。文献^{20a)}を参考に、1,1,2-トリクロロエタン中、13 に対し6-トリフルオロメチル N-フルオロピリジニウム塩(60a)を作用させたところ、目的とす るフッ素化サリチル酸誘導体(61a)及びその異性体(61b)をそれぞれ、26%、25%の収 率で得ることに成功した(エントリー1)。しかしながら、60a は現在市販されていない ため使用試薬の変更を迫られた。そこで、エントリー2 では、入手可能なフッ素化試 薬として、5-トリフルオロメチル N-フルオロピリジニウム塩(60b)^{20b)}を用い検討を行 った。しかしながら、60b は 60a よりも反応性が低いため、反応は殆ど進行せず原料 が回収されるだけであった。そこで、エントリー3 では、活性化剤として 20 mol%の トリフルオロメタンスルホン酸を加えて反応を行った^{20b)}。しかしながら、原料のア セトニドの分解反応が主に起こり、目的物は殆ど得られなかった。そこで、溶媒とし て、より高沸点の1,1,2,2-テトラクロロエタンを用いて146 ℃で反応を行ったところ、 目的とする 4-フッ素化体(61a)及び 6-異性体(61b)をそれぞれ、20%、35%の収率で得 ることに成功した。



表 2-4. N-フルオロピリジニウム塩を用いたアセトニド(13)に対するフッ素化の検討

a sa ka s	a a buara t	reagent	13 / eq	additive	temp. / °C	time / h	yield / %				
entry							solvent	61a	61b	61c	
	1	Cl ₂ CHCH ₂ Cl	60a	1.2	-	100	17	26	25	3	
	2	Cl ₂ CHCH ₂ Cl	60b	1.2		100	15	trace			
	3	Cl ₂ CHCH ₂ CI	60b	1.4	TfOH (20 mol%)	100	3	0.6 (61a+61b+61c)		+61c)	
	4	Cl ₂ CHCHCl ₂	60b	1.2	-	147	3	20	35	4	

梅本らの報告によると^{20a)}、N-フルオロピリジニウム塩(60a)および 60b を用いるフ エノールのフッ素化の位置選択性は、基質のフェノール性ヒドロキシ基と試薬のピリ ジニウム塩の硫酸基との間に分子間水素結合を有する π-π 錯体(62)を遷移状態として 経由するため、高い o-選択性を示す。しかしながら、本反応におけるフッ素化の o-, p-選択性はおよそ 1:1 であり、予想とは異なる結果であった。これは、サリチル酸誘導 体(13)のフッ素化反応では、アセトニドのカルボニル基の酸素原子とフェノール性ヒ ドロキシ基の水素原子の間に水素結合が形成されていることにより、ヒドロキシ基が ピリジニウム塩の硫酸基と相互作用することが困難である。そのため、分子間水素結 合を有する π-π 錯体(63b)を形成することが困難になり、フッ素化の o-選択性が減少 したと考えられる (スキーム 2-14)。



スキーム 2-14. フェノールとアセトニド(13)のフッ素化における位置選択性の違い

フッ素化サリチル酸誘導体(61a)および 61b のそれぞれのフッ素の導入位置に関し ては、以下の実験の結果より判断した (スキーム 2-15)。すなわち、61a および 61b の残りのフェノール性ヒドロキシ基をメチル化することで得られる、メトキシ体 (64a)および 64b の¹H-NMR のメチル基のシグナルが、64a では1 重線であるのに対 して、64b では2 重線 (*J*=1.5 Hz) であった。この結果を、導入されたメチル基とフ ッ素の空間的距離が、64a においてはより長く、一方、64b のそれは短いことに起因 していると考察した。すなわち、メトキシ基とフッ素原子の互いの位置関係を、64a では*p*-位、64b では*o*-位とそれぞれ推定した。



スキーム 2-15. フッ素化サリシル酸誘導体(61a)および 61b のメチル化反応

2-3-2 フッ素化サリシル酸(59)の合成

フッ素化サリチル酸誘導体(61a)と 13 の混合物に Tf₂O を作用させてトリフラート (65)および 14 に変換したところ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりそれ ぞれ分離することができた (スキーム 2-16)。トリフラート(65)に対しアリルトリ *n*-ブチルスズとの Stille カップリング²¹⁾を行うことで得られるフッ素化アリルベンゼン (66)に、Grignard 試薬とアリルアルコールから調製したマグネシウムアリルアルコキ シドを作用させてフッ素化アリルベンゾエート(67)へと誘導した。この際、アリルベ ンゼンのオレフィン部位が異性化した 68 が、67:68 = 7:1 の比で分離不可能な混合物 として得られた。生じたヒドロキシ基をメチル化することで得られるメトキシベンゼ ン誘導体(69)へと変換した。最後に、Pd(Ph₃P)₄存在下、辻-Trost 反応⁵⁾により、アリ ルエステル(69)のアリル基を除去することで、フッ素化サリシル酸(59)を合成した。 尚、アリルエステル化反応にて生じた 69 に由来する 70 は、この段階においても分離・ 除去することができなかった。



スキーム 2-16. フッ素化サリシル酸(59)の合成

2-3-3 フッ素化サリシリハラミドの合成

サリシル酸部とマクロリドフラグメントの合成が完了したので、フッ素化マクロラ クトンの合成を行なった (スキーム 2-17)。フッ素化カルボン酸(59)とアルコール(11) を光延エステル化反応¹⁰⁾により連結し、91%の高収率でフッ素化ジエン(58)へ誘導し た。得られた 58 に対し、第一世代の Grubbs 触媒を用いる閉環メタセシス反応¹¹⁾を行 ったところ、反応は速やかに且つ 90%の高収率で進行し、望む(*E*)-マクロラクトン(72) とその異性体(73)を、10:1の選択性で得ることに成功した。尚、本反応において、70 由来のエステル(71)は反応しなかったため、目的物から容易に除去することができた。 (*E*)-体(72)および(*Z*)-体(73)は互いに分離不可能であったため、混合物のまま DDQ に より *p*-メトキシベンジル基を除去して*E*-オレフィン(74)と*Z*-オレフィン(75)を得た。



スキーム 2-17. フッ素化マクロラクトン(74)および 75 の合成

アルコール(74)を Dess-Martin 酸化して得られるアルデヒド(76)を、ジオキサン-THF の 6:1 の混合溶媒中で高井反応^{2),12b)}を行うことで、望む *E*-ヨードオレフィン(77)と *Z*-体(78)を 3.3:1 の選択性で、2 段階 80%の収率で、シリカゲルカラムクロマトグラフ ィーで分離不可能な混合物として得た (スキーム 2-18)。最後に、-78 ℃ にて BBr₃を 作用させることで保護基を除去し、目的のカップリング前駆体(57)を、76%の収率で、 その立体異性体(79)と共に 4.3:1 の比率で得た。



スキーム 2-18. カップリング前駆体(57)の合成

天然型 SA の合成に用いた条件を、F-SA(2)の合成に適用した (スキーム 2-19)。す なわち、アルゴン雰囲気下、凍結脱気を 15 回施した DMA 中に、1 等量のチオフェン カルボン酸銅(I),3 等量のアミド(8),3 等量の炭酸セシウムを加えて室温・遮光下 30 分攪拌した後に、ヨードオレフィン(57)を加えて、90 ℃ で 1 時間反応させたところ、 反応は非標識体と同様に進行した。反応後の精製は、天然型 SA と同様の条件で行っ た。すなわち、前処理としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して得られ た粗精製物を、ODS カラム(ナカライテスク社, COSMOSIL 5C18-MS シリーズ)を用い て HPLC 精製を行った。その結果、目的のフッ素化サリシリハラミド A (F-SA)(2)およ びフッ素化サリシリハラミド B (F-SB)(4)をそれぞれ 15%、22% の収率で得ることに 成功した。


スキーム 2-19. F-SA (2)および F-SB (4)の合成

参考文献

(1) Coleman, R. S.; Liu, P.-H. Org. Lett. 2004, 6, 577-580.

(2) Fürstner, A.; Dierkes, T.; Thiel, O. R.; Blanda, G. Chem. Eur. J. 2001, 7, 5286-5298.

(3) Wu, Y.; Liao, X.; Wang, R.; Xie, X.-S.; De Brabander, J. K. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124,

3245-3253.; (c) Smith, A. B., III; Zheng, J. Tetrahedron 2002, 58, 6455-6471.

(4) Hadfield, A.; Schweitzer, H.; Trova, M. P.; Green, K. Synth. Commun. 1994, 24, 1025-1028.

(5) (a) Tsuji, J.; Takahashi, H.; Morikawa, M. Tetrahedron. Lett. 1965, 4387-4388.; (b) Trost,
B. M.; Fullerton, T. J. J. Am. Chem. Soc. 1973, 95, 292-294.

(6) Smith, A. B., III; Xian, M. Org. Lett. 2005, 7, 5229-5232.

(7) Bonini, C.; Chiummiento, L.; Lopardo, M. T.; Pullez, M.; Colobert, F.; Solladié, G. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 2695-2697.

(8) (a) Brown, H. C.; Bhat, K. S. J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 293-294.; (b) Brown, H. C.;
Bhat, K. S. J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 5919-5923.

(9) Torikai, K., Oishi, T., Ujihara, S., Matsumori, N., Konoki, K., Murata, M., and Aimoto, S. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 10217-10226.

(10) Mitsunobu, O. Synthesis 1981, 1-28.

(11) Schwab, P.; France, M. B.; Ziller, J. W.; Grubbs, R. H Angew. Chem. Int. Ed. 1995, 34, 2039-2041.

(12) (a) Takai, K.; Nitta, K.; Utimoto, K. J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 7408-7410.; (b) Evans,
D. A.; Black, W. C. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 4497-4513.

(13) Mase, N.; Nishi, T.; Hiyoshi, M.; Ichihara, K.; Bessho, J.; Yoda, H.; Takabe, K. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I 2002, 707-709.

(14) (a) Allred, G. D.; Liebeskind, L. S. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 2748-2749.; (b) Zhang,
S.; Zhang, D.; Liebeskind, L. S. J. Org. Chem. 1997, 62, 2312-2313.

(15) Labrecque, D.; Charron S.; Rej, R.; Blais, C.; Lamothe S. Tetrahedron Lett. 2001, 42, 2645-2648.

(16) Ley, S. V.; Norman, J.; Griffith, W. P.; Marsden, S. P. Synthesis 1994, 639-664.

(17) Ando, K.; Oishi, T.; Hirama, M.; Ohno, H.; Ibuka, T. J. Org. Chem. 2000, 65, 4745-4749.

(18) Su, Q.; Panek, J. S. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 2425-2430.

(19) Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina, J. H. II; Boyd, M. R. J. Org. Chem. 1997, 62, 8188-8192.

- (20) (a) Umemoto, T.; Tomizawa, G. J. Org. Chem. 1995, 60, 6563-6570.;
- (b) ダイキンフッ素化テクノロジーパンフレット
- (http://www.daikin.co.jp/chm/pro/kasei/fusso/pdf/fluorination_j.pdf).;
- (c) ダイキン化成品販売株式会社ホームページを参照
- (http://www.daikin-dcs.co.jp/finechemical/mecreagent.html)
- (21) (a) Espinet, P.; Echavarren, A. M. Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 4704-4734.; (b)
- Amatore, C.; Jutand, A.; Meyer, G.; Atmani, H.; Khalil, F.; Chahdi, F. O. Organometallics 1998, 17, 2958 2964.

第3章 フッ素化サリシリハラミドの V-ATPase 阻害活性試験

合成したサリシリハラミド類 (F-SA、F-SB、SA および SB)の V-ATPase 阻害活性を、 サル腎臓培養細胞(COS-7)¹⁾およびブタ副腎から調製したクロマフィン顆粒膜²⁾を用い て、pH 感受性蛍光色素による pH 変化により評価した。

3-1 サル腎臓細胞を用いたイメージングアッセイ

サリシリハラミドの生物活性は、サル腎臓細胞内の酸性コンパートメントであるリ ソソームの内部 pH を測定することで見積った。すなわち、リソソームの細胞膜には V-ATPase が発現しており、リソソーム内部は、プロトンの能動輸送によって酸性に保 たれている。したがって、リソソーム膜上の V-ATPase の機能が阻害され、膜内への プロトンの供給が遮断されると、プロトンの受動拡散により、膜内 pH は外部環境の それと等しくなる。ここに、酸性環境で蛍光を発する LysoSensorGreen³⁾などの pH セ ンサーを共存させていると、内部 pH が上昇するにつれて蛍光の退色が観測される (図 3-1)。



図 3-1. pH 感受性蛍光色素とリソソーム膜内 pH の関係

実験は以下の手順で行った。すなわち、1 μ MのSA、SB、F-SA、F-SB それぞれを、 サル腎臓細胞に投与して5時間インキュベートした。さらに、1 μ MのLysoSensorGreen

を加え、細胞を1分間インキュベートした後、過剰な蛍光色素を除去し、蛍光を観測 した。図 3-2 のパネルAは、コントロールとして未処理の細胞を示しており、局所的 に強い蛍光が観測された。これは、リソソーム内部が酸性化されていること、すなわ ち、リソソーム膜の V-ATPase は機能していることを示している。蛍光強度は、青→ 緑→赤の順に強くなるように着色してある (同図のパネル C)。また、図中のアスタリ スクは、リソソームの局在位置を示しており、スケールバーの大きさは、20 µm に対 応している。パネルBとCは、SA で処理して得られた結果であり、蛍光量の減少が 観測されることから、V-ATPaseの機能は阻害されていると判断できる。パネルDとE は、SB で処理して得られた結果であり、蛍光量の減少が観測された。SB は、SA と 共に天然から得られてくるものの極微量であったために、V-ATPase 阻害活性について の報告はなされていなかったが、今回の活性試験で V-ATPase 阻害活性を有している ことが初めて明らかになった。パネルFとG、パネルHとIは、それぞれ、F-SA、 F-SB で処理して得られた結果である。いずれのパネルも、蛍光量の減少または消光 が観測された。また、結果を図示しないが、各種阻害剤で処理したサル腎臓細胞が、 トリパンブルー染色で染色されないことから、阻害剤被処理細胞が、生存しているこ とを確認した。すなわち、蛍光量の減少および消光が引き起こされたのは、添加した 薬剤により直接 V-ATPase の機能が阻害されたためであるといえる。

以上の結果から、培養細胞を用いた実験では、天然物の SA、SB だけでなく、フッ素化体 F-SA、F-SB も確かに V-ATPase 阻害活性を有していることが明らかになった。



図 3-2. 各種阻害剤(1 µM)で処理したサル腎臓細胞内の LysoSenserGreen の蛍光強度

3-2 クロマフィン顆粒膜を用いた定量的アッセイ

V-ATPaseの阻害活性の評価法では一般的に、ウシ副腎髄質由来クロマフィン顆粒膜を用いた ATP 依存的プロトン輸送を指標にする方法が用いられる²⁾。しかしながら、 新鮮なウシの組織を入手することが困難であったため、本研究では、ブタ副腎髄質由 来クロマフィン顆粒を用いた。クロマフィン顆粒膜へのプロトン輸送能は、pH 感受 性蛍光色素である ACMA^{2,4)}の蛍光の退色を指標として測定した。なお、ACMA は、 酸性環境で消光し、中性付近で強い蛍光を発する。

実験は以下の手順で行った。すなわち、クロマフィン顆粒膜に対し、ACMA、バリ ノマイシンを加え、0℃で10分間インキュベートした後に、各種阻害剤を添加して、 さらに37℃で3分間インキュベートした。そこへ、MgATPを加えることで、クロマ フィン顆粒へのATP依存性プロトン輸送を開始させた。MgATPの添加から2分後に、 プロトノフォアであるFCCPを加え、顆粒膜内外のプロトン勾配を解消させた。図3-3 に、10 nMのSAを作用させたときに得られたACMAの蛍光強度およびその時間推移 の結果を示す。なお、同図の縦軸は、FCCPを添加した後の蛍光値を100としたとき の相対蛍光強度であり、横軸は、ATP 添加時を開始時刻とした時の時間経過を示す。 また、青線は、コントロールとして DMSO を添加した際に得られた曲線であり、桃 色線は、10 nMのSAを作用させた際に得られた曲線である。



図 3-3.10 nM の SA を作用させて得られた相対蛍光強度とその時間推移 (左図:測定全体の蛍光強度 右図:ATP 添加直後の蛍光強度の拡大図)

ATP を添加すると、クロマフィン顆粒膜上の V-ATPase が、ATP 依存的にプロトン 輸送を行う。その結果、膜内 pH は低下し、ACMA の蛍光量は減少する。プロトンフ オアである FCCP を添加すると、膜内外の pH 勾配、すなわち、V-ATPase により形成 された酸性環境が解消される。そのため、膜内 pH は ATP を添加する直前まで上昇し、 ACMA 由来の蛍光が観測される (図 3-3: SA 非添加時の青色曲線)。一方、クロマフ ィン顆粒膜上の V-ATPase の機能が阻害剤処理により阻害されると、ATP を添加して も膜内へのプロトンの供給はもはや起こらず、膜内と外部環境の pH が等しくつりあ うまで、膜内のプロトンは受動拡散の働きにより膜外へ拡散する。よって、ACMA 由 来の蛍光量の減少は観察されない (図 3-3: SA 添加時の桃色曲線)。

このような実験を、各種阻害剤について濃度を変えて行った。その結果を、図 3-4 に示す。尚、同図において、各点につき 3 回測定し、測定誤差のばらつきはエラーバーで表示している。また、得られた IC₅₀ 値の結果を、表 3-1 に示した。







表 3-1. 合成したサリシリハラミド類の、V-ATPase プロトン輸送阻害活性"

entry	compound	IC ₅₀ /nM		
1	1a (SA)	0.7±0.3		
2	2a (F-SA)	1.6±0.1		
3	1b (SB)	28±6		
4	2b (F-SB)	15±10		

"IC50値は、3回の測定値の平均値である

SA は、文献⁵⁾で報告されているように、約1 nM 以下の IC₅₀ 値 (IC₅₀ = 0.7 nM)と、 強力な阻害活性を有していた。F-SA も、SA と比較して若干弱いものの、期待通り、 V-ATPase に対する強力な阻害活性を保持していた (IC₅₀ = 2 nM)。一方、SB は、SA と共に天然から得られてくるものの、極微量であったために、V-ATPase 阻害活性につ いての報告はなされていなかった。今回の測定で、SB は、30 nM の IC₅₀ 値を有して いることが初めて明らかになった。また、F-SB の阻害活性は、10 nM の IC₅₀ 値と、 SB と同等の活性を有していた。

3-3 活性試験結果の考察

合成したサリシリハラミド類の阻害活性試験結果から、サリシリハラミド類の構造 と阻害活性について、以下の結論が導かれる。1) SA (IC₅₀ = 0.7 nM)と F-SA (IC₅₀ = 2 nM)、および SB (IC₅₀ = 30 nM)と F-SB (IC₅₀ = 10 nM)の V-ATPase 阻害活性の大きさは、 3 倍程度しか違っていないことから、芳香環の4位にフッ素原子を導入しても、阻害 活性はほとんど影響を受けない。このことは、哺乳類性 V-ATPase の阻害機構を、フ ッ素原子の特性を利用して解明する研究において、合成した F-SA および F-SB が有用 な分子プローブであることを示唆している。2) 一方で、SA (IC₅₀ = 0.7 nM)と SB (IC₅₀ = 30 nM)の阻害活性は、約 40 倍の差があり、F-SA (IC₅₀ = 2 nM)と F-SB (IC₅₀ = 10 nM) の阻害活性も、5 倍程度だが差が認められる。このことから、17位のエナミドの立体 化学の違いが、阻害活性に影響を与えることが示唆された。 参考文献

(1) Matsushita, M.; Tanaka, S.; Nakamura, N.; Inoue, H.; Kanazawa, H. Trafic 2004, 5, 140-151.

(2) Nelson, N.; Cidon, S.; Moriyama, Y. "Methods in Enzymology", ed. by Fleischer, S. and Fleischer, B. **1988**, *157*, 619-633, Academic Press, New York.

(3) Lyubimov, A. V.; Carr, S. N.; Brown, A. P.; Art, J. J.; Crowell, J. A.; Levine, B. S. J. Photochem. Photobiol. B: Biology 2005, 80, 225-234.

(4) (a) Galkin, M. A.; Ishmukhametov, R. R.; Vik, S. B. Biochim. Biophys. Acta 2006, 1757, 206–214.;
(b) McCarty, R. E. J. Bioenerg. Biomembr. 2006, 38, 67–74.;
(c) Camarasa, C.; Prieto, S.; Ros, R.; Salmon, J.-M.; Barre, P. Yeast 1996, 12, 1301-1313.

(5) Boyd, M. R.; Farina, C.; Belfiore, P.; Gagliardi, S.; Kim, J.-W.; Hayakawa, Y.; Beutler, J. A.; McKee, T. C.; Bowman, B. J.; Bowman, E. J. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001, 297, 114-120.

第4章 ビオチン化サリシリハラミドの合成

4-1 ビオチン化サリシリハラミドAの合成

4-2-1 ビオチン化サリシリハラミドの設計

第1章で述べたように、サリシリハラミドA (SA)は、哺乳類型 V-ATPaseの膜貫通 部位 Vo 部分に、非可逆的に結合することが明らかにされている。しかしながら、 V-ATPase が多くのサブユニットからなる複合タンパク質であることもあり、その結合 領域の詳細については未解明である。そこで、SA の結合部位を特定するための分子 プローブを調製することにした。ビオチン-アビジン相互作用を併用した化学発光に より、分子プローブの結合ドメインを検出することにし、情報基としてビオチンを選 択した (図 4-1)。すなわち、ビオチン標識化サリシリハラミドを投与し、SA 部分を V-ATPase の Voの標的タンパク質に結合させることで、先ず作用標的部位をビオチン で標識する。次に、ビオチン標識化サブユニットを SDS-PAGE によって分離した後、 西洋ワサビペルオキシターゼ(horseradish peroxidase, HRP)が導入されたアビジンを投 与し、ビオチン-アビジン相互作用によりビオチンを HRP で標識する。ここに、過酸 化水素水とルミノールを作用させると、HRP による過酸化水素の分解に伴いルミノー ル由来の蛍光が観測される。すなわち、ルミノール由来の蛍光が観察される分子量バ ンドが、SA の作用標的部位を含んでいるサブユニットであると同定することができ る。



図 4-1. ビオチン-アビジン相互作用を基盤とした SA の結合部位の同定

サリシリハラミドA(SA)は、官能基の導入が可能な2つのヒドロキシ基、すなわち フェノール性(3 位)および2級アルコール(13 位)を有している。また、SA の構造活性 相関の研究¹⁾(第1章4節を参照)から、3 位および13 位のベンゾエート誘導体の阻害 活性の強さは、天然型 SA と比較して、それぞれ、300 nM, 180 nM と大きく低下して いるものの(表 4-1)、未だ nM のレベルで活性を保持していることから、フェノール ヒドロキシ基および2級アルコールの官能基変換は、V-ATPase 阻害活性においてある 程度許容されると考えられた。また、第1章で述べた様に、フェノール性ヒドロキシ 基は、ベンゾラクトンエナミド系天然物の共通部分であるため、2 級アルコールへの 官能基導入を計画した。そして、2 級アルコールに PEG リンカー部分を有するビオチ ン化誘導体(82a)および 82b を設計した (図 4-2)。



図 4-2. ビオチン化サリシリハラミド(82a)および 82b の設計



表 4-1. SA のフェノールおよびアルコールベンゾエート誘導体の V-ATPase 阻害活性

	SA (1)	80	81
IC ₅₀ / nMª	< 1.0	300	180

"ウシ脳クラスリン被覆小胞顆粒におけるプロトン輸送阻害活性¹⁾

4-2-2 モデル基質を用いたビオチン化反応の検討

まず、エナミド側鎖を有していない、ヨードオレフィン(6)をモデル基質として用い、 ビオチン化カルボン酸(83)とのエステル化反応を行った。カルボン酸(83)は、ジクロ ロメタンやベンゼン等の非極性溶媒への溶解性が非常に悪かったので、DMF やジオ キサンを反応溶媒として用いてエステル化反応を行った (表 4-2)。

先ず、DMF 溶媒中で TEA 存在下、HOBt と WSCD を作用させてカルボン酸(83)か ら活性化エステルを調製し²⁾、そこに、基質(6)の DMF 溶液を加えて室温で 30 分反応 させた (スキーム 4-1)。しかし、目的物は得られず、フェノール性ヒドロキシ基にビ オチン部位が導入されたヨードオレフィン(84)が収率 47%で得られるのみであった。 また、原料6が60%で回収された。



EDCI, HOBt, DMF

t, 30 min 47% (60% of **6** was recovered)

スキーム 4-1. EDCI-HOBt によるアルコール(6)とカルボン酸(83)のエステル化反応

次に、ジオキサン溶媒中で山口エステル化反応を試みた(表 4-2)³⁾。先ず、ジオキサン中、TEA存在下、カルボン酸(83)と 2,2,2-トリクロロベンゾイルクロリドを、室温で13時間反応させて、混合酸無水物を調製した。そこへ、基質6とDMAPのジオキサン溶液を加えて室温で6時間反応させたところ、フェノールビオチン化誘導体(84)が63%の収率で得られた。また、6のフェノール性ヒドロキシ基がベンゾエート化された86bが、原料6との混合物として得られた。

そこで、エントリー2 として、基質 6 と DMAP のジオキサン溶液を加えた後 100 ℃ で 24 時間反応させたところ、84 は得られず、目的のビオチン化誘導体(85)および 85 のフェノール性ヒドロキシ基がベンゾエート化された 86a を、1:0.3 との混合物とし て、収率 15%で得ることに成功した。また、ベンゾエート体(86b)が、原料 6 との混 合物として得られた。収率向上を目的に、エントリー3 では、ジオキサン溶媒中で椎 名法 ⁴⁾を行った。結果、エントリー2 と同様に 85 を、85 のフェノール性ヒドロキシ 基がアシル化された 87a との1:1の混合物として得ることができが、この条件では、 エントリー2 よりも、混合酸無水物による 82 のフェノール性ヒドロキシ基のアシル 化が起こりやすかった。

- 78 -



表 4-2. アルコール(6)とカルボン酸(83)とのカップリング反応

entry	reagents	temp / °C	time / h	products
1	2,2,2-trichlorobenzoyl chloride	rt	6	84 (63%) 86b + 6 [1.5 : 1]
2	2,2,2-trichlorobenzoyl chloride	100	24	85+86a [1 ∶ 0.3] (15%), 86b+6 [2 ∶ 1]
3	MNBA	100	24	85+87a [1 : 1] (15%), 87b+6 [3.5:1]





エントリー1と2において、ヨードオレフィン(6)とビオチン化カルボン酸(83)との エステル化反応を、室温で行うと、フェノールビオチン化ヨードオレフィン(84)が優 先的に得られ、一方、加熱条件下(100°C)で行うと、アルコールビオチン化誘導体(85) および 86a が優先的に得られた。この実験結果は以下のように説明される(スキーム 4-2)。分子内の2つのヒドロキシ基のうちフェノールは、相対的に酸性度が大きく、 塩基(DMAPまたはTEA)による脱プロトン化を受けてフェノキシドイオンになりやす い。フェノキシドイオンの求核性は、アルコールのそれよりも大きいため、フェノー ルのアシル化が速度論的に優先して起こり、室温では 84 のみが得られたと考えた。 一方、84 は、弱酸であるフェノールとカルボン酸の混合酸無水物であり、ある程度 活性化されていると考えられる。そのため、加熱条件下では、84 は、反応系中に存 在している求核触媒の DMAPによる求核攻撃を受け、再び生じた活性中間体 S2 を生 成する。これとアルコールから形成されるエステル(85)は熱力学的に安定であるため、 加熱条件下では、85 を優先的に与える方に平衡が偏ったと考えられる。







スキーム 4-3. 表 4-2 エントリー1 および 2 の実験結果の説明

4-2-3 ビオチン化サリシリハラミドの合成

4-2-2 で見出した条件を、ビオチン化サリシリハラミド A の合成に適用した。すな わち、ジオキサン中、TEA 存在下、カルボン酸(83)と 2,2,2-トリクロロベンゾイルク ロリドを、30 ℃ で 13 時間反応させて混合酸無水物を形成させた。そこに、基質と DMAP のジオキサン溶液を加え、室温で 12 時間反応させ、その後、100 ℃ で 13 時間 反応させた。反応終了後、HPLC 精製を行って、目的のアルコールビオチン化誘導体 82b を、2%の収率と、わずかながら得ることに成功した (スキーム 4-3)。



スキーム 4-4. ビオチン化サリシリハラミドの合成

参考文献

(1) (a) Larry, Y. Chem. Rev. 2003, 103, 4283-4306.; (b) Wu, Y.; Liao, X.; Wang, R.; Xie, X.-S.; De Brabander, J. K. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 3245-3253.; (c) Xie, X.-S.; Padron, D.; Liao, X.; Wang, J.; Roth, M. G.; De Brabander, J. K. J. Biol. Chem. 2004, 279, 19755-19763.

(2) Vatmurge, N. S.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Shirazi, F.; Chavan, P. S.; Deshpande Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 2043-2047.

(3) Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. Bull. Chem. Soc. J. 1979, 52, 1989-1993.

(4) (a) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7535-7539.; (b) Shiina, I.; Fukui, H.; Sasaki, A. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2312-2317.; Shiina, I. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 239-273.

第5章 結論

¹⁹F-NMR 測定を用いた V-ATPase 阻害機構解明に有用であると思われる、4 位にフ ッ素原子を導入したサリシリハラミドAおよびBの合成に成功した

そして、in vivoの細胞毒性試験およびクロマフィン顆粒膜を用いた定量的阻害活性 試験によって、合成した 4-¹⁹F-サリシリハラミド類は、天然型サリシリハラミドと同 等の V-ATPase 阻害活性を保持していることを明らかにした。

サリシリハラミド類の結合部位特定を志向した、ビオチン標識化サリシリハラミド Aの合成に成功した。

サリシリハラミドAによる V-ATPase 阻害発現機構の詳細は、明らかにされていないが、今回合成した分子プローブを応用することで、サリシリハラミド A による V-ATPase の阻害機構を分子レベルで解明することが期待でき、V-ATPase を標的とした創薬研究に大いに貢献することができるであろう。

第6章 実験項

Chemistry

General Procedures.

All the solvents and chemicals were used without further treatment unless otherwise stated. The following solvents and chemicals used were purified by distillation over the drying agents indicated in parentheses and were transferred under argon atmosphere: THF, Et₂O and 1,4-dioxane (Mg/benzophenone), 1,1,2,2-tetrachloroethane, pyridine, triethylamine, and morpholine (CaH₂), dichloromethane (LiAlH₄), allyl alcohol and methanol (Mg). N-methylpyrrolidone (NMP) was dried over activated MS4Å for 3 days and distilled. N.N'-dimethyl acetamide (DMA) was distilled over di-n-butyltin dilaurilate, re-distilled over CaH₂ under reduced pressure, and stocked in the presence of activated MS4Å. Before use, the DMA was degassed by frozen-thaw method over 10 times. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using E. Merck silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated plates (0.25-mm thickness). For column chromatography, Kanto silica gel 60N (spherical, neutral, 100-210 µm), and Merck silica gel 60 (40-63 µm, for flash column chromatography) were used. Optical rotations were recorded on a JASCO P-1010 polarimeter. IR spectra were recorded on a JASCO FT-IR-300E or JASCO FT-IR-4200ST Fourier transform infrared spectrometer. ¹H, ¹³C and ¹⁹F-NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-GSX500 or JNM-ECA500 spectrometer. Chemical shifts of ¹H and ¹³C NMR are reported in ppm from tetramethylsilane with reference to internal residual solvent [¹H NMR, CHCl₃ (7.24), C₆HD₅ (7.15), CHDCl₂ (5.29), HOD (4.80); ¹³C NMR, CDCl₃ (77.0), C₆D₆ (128)], chemical shifts of ¹⁹F NMR are reported in ppm with reference to CF₃COOH (-76.5) in D₂O. The following abbreviations are used to designate the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q =quartet and m = multiplet. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on an AB QSTAR Elite under ESI-TOF conditions. Combustion elemental analyses were performed using Yanaco CHN CORDER MT-3.

MOM ether 25. To the 20 mL two-necked flask charged with TBAI (45.4 mg, 0.123 mmol) was added a solution of alcohol 24 (242 mg, 0.613 mmol) in dichloromethane (1.02 mL) and DIPEA (0.246 mL, 1.41 mmol). To the reaction mixture, MOMCl (0.069 mL, 0.920 mmol) was added dropwise at 0 °C, and the resulting solution was allowed to room temperature. After being stirred at room temperature for 7 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO3 and Na2S2O3 at 0 °C, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (20:1 to 10:1 hexane/ethyl acetate) to afford 25 (252 mg, 0.574 mmol, 94%) as colorless oil. $[\alpha]_D^{23}$ -7.2 (c 1.40, CHCl₃); $R_f = 0.65$ (5:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2953, 2929, 2888, 2856, 1613, 1514, 1463, 1362, 1302, 1249, 1099, 1039, 917, 835, 776 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.84 (2H, d, J = 8.5 Hz), 5.75 (1H, ddd, J = 17.0, 10.6, 7.4 Hz, H11), 5.01 (1H, d, J = 17.0 Hz, H10a), 5.00 (1H, d, J = 10.6 Hz, H10b), 4.62 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.58 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.43 (2H, s), 3.92 (1H, ddt, J = 5.6, 5.6, 5.6 Hz)H15), 3.78 (3H, s), 3.61 (1H, m, H13), 3.37 (2H, d, J = 5.2 Hz, H16), 3.34 (3H, s), 2.43 (1H, m, H12), 1.70 (1H, dt, J = 14.2, 5.9 Hz, H14a), 1.61 (1H, dt, J = 14.2, 6.6 Hz, H14b), 1.03 $(3H, d, J = 6.9 \text{ Hz}), 0.86 (9H, s), 0.04 (3H, s), 0.03 (3H, s); {}^{13}\text{C NMR} (125 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3) \delta$ 159.0, 140.1, 130.6, 129.1, 115.1, 113.6, 96.0, 77.3, 74.5, 72.8, 69.1, 55.7, 55.3, 40.9, 36.3, 25.9, 18.1, 15.1, -4.3, -4.8.

Alcohol **26**. To a solution of 9-BBN dimer (312 mg, 1.28 mmol) in THF (1.3 mL), a solution of **25** (374 mg, 0.853 mmol) in THF (0.9 mL) was added dropwise at 0 °C for 20 sec, and the resulting solution was allowed to room temperature. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ (6.1 mL) and aqueous 30% H₂O₂ (0.82 mL) at 0 °C, and the resulting solution was allowed to room temperature overnight, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous Na₂S₂O₃ at 0 °C, and extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (5:1 to 1:1 hexane/ethyl acetate) to afford **26** (320 mg, 0.701 mmol, 82%) as colorless oil. $[\alpha]_D^{23}$ -2.5 (c 1.50, CHCl₃); R_f = 0.48 (1:1 hexane/ethyl

acetate); IR (film) 3428, 2953, 2930, 2886, 2856, 1613, 1514, 1463, 1362, 1302, 1249, 1096, 1038, 835, 776 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.85 (2H, d, J = 8.6 Hz), 4.61 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.58 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.43 (2H, s), 3.92 (1H, ddt, J = 5.6, 5.6, 5.6 Hz, H15), 3.78 (3H, s), 3.68 (1H, dt, J = 10.7, 6.3 Hz, H10a), 3.58 (1H, m, H13), 3.61-3,53 (1H, m, H10b), 3.39 (2H, d, J = 5.4 Hz, H16), 3.34 (3H, s), 1.90 (1H, m, H12), 1.78-1.70 (1H, m, H14a), 1.73 (1H, br s, -OH), 1.64 (1H, ddd, J = 14.3, 7.2, 6.2 Hz, H14b), 1.56 (1H, ddt, J = 14.0, 6.4, 6.4 Hz, H11a), 1.45 (1H, ddt, J = 14.0, 6.3, 6.3 Hz, H11b), 0.93 (3H, d, J = 6.9 Hz), 0.86 (9H, s), 0.035 (3H, s), 0.032 (3H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.1, 130.5, 129.2, 113.7, 95.9, 78.5, 74.3, 72.9, 69.2, 60.6, 55.8, 55.3, 35.8, 34.7, 32.6, 25.9, 18.1, 15.1, -4.4, -4.8.

Olefin 27. To a solution of 26 (642 mg, 1.41 mmol) in dichloromethane (4.7 mL), Dess-Martin periodinane (899 mg, 2.12 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 50 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and Na₂S₂O₃ at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with a saturated aqueous Na₂S₂O₃, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford aldehyde as pale bright yellow oil, which was used in the next reaction without further purification. To a suspension of methyltriphenylphosphonium bromide (1.51 g, 4.23 mmol) in THF (9.4 mL), potassium tert-butoxide (396 mg, 3.53 mmol) was added at 0 °C, and the resulting solution was stirred at 0 °C for 10 min. To the yellow reaction solution, a solution of the aldehyde in THF (4.7 mL) was added dropwise at 0 °C. After being stirred at 0 °C for 15 min, the reaction mixture was quenched with acetone and saturated aqueous NH4Cl at 0 °C, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, water and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (20.1 hexane/ethyl acetate) to afford 27 (559 mg, 1.23 mmol, 88%) as colorless oil. $[\alpha]_D^{25}$ +7.6 (c 0.895, CHCl₃); $R_f = 0.50$ (5:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2954, 2929, 2888, 2856, 1613, 1514, 1463, 1249, 1099, 1039, 916, 835, 776 cm⁻¹; ¹H NMR $(500 \text{ MHz}, \text{ CDCl}_3) \delta$ 7.23 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.85 (2H, d, J = 8.6 Hz), 5.73 (1H, ddd, J =17.2, 10.2, 7.2 Hz, H10), 4.98 (1H, d, J = 17.2 Hz, H9a), 4.95 (1H, d, J = 10.2 Hz, H9b), 4.58 (2H, s), 4.44 (2H, s), 3.95 (1H, dtd, J = 7.6, 5.2, 4.3 Hz, H15), 3.78 (3H, s), 3.53 (1H, dt, J = 7.6, 5.2, 4.3 Hz, H15), 3.78 (3H, s), 3.53 (1H, dt, J = 7.6, 5.2, 4.3 Hz, H15), 3.78 (3H, s), 3.53 (1H, dt, J = 7.6, 5.2, 4.3 Hz, H15), 3.78 (3H, s), 3.53 (1H, dt, J = 7.6, 5.2, 4.3 Hz, H15), 3.78 (2H, s), 3.53 (1H, dt, J = 7.6, 5.2, 4.3 Hz, H15), 3.78 (2H, s), 3.53 (1H, dt, J = 7.6, 5.2, 4.3 Hz, H15), 3.78 (2H, s), 3.53 (2H, s) 8.2, 3.9 Hz, H13), 3.40 (1H, dd, J = 9.9, 4.3 Hz, H16a), 3.39 (1H, dd, J = 9.9, 5.4 Hz, H16b), 3.34 (3H, s), 2.07 (1H, m, H11a), 1.87-1.81 (1H, m, H11b), 1.82-1.76 (1H, m, H12), 1.70 (1H, ddd, J = 14.2, 7.4, 4.2 Hz, H14a), 1.60 (1H, ddd, J = 14.2, 8.3, 5.2 Hz, H14b), 0.88 (3H, d, J =6.7 Hz), 0.87 (9H, s), 0.042 (3H, s), 0.039 (3H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.0 137.5, 130.6, 129.2, 115.8, 113.6, 95.9, 78.2, 74.2, 72.9, 69.4, 55.8, 55.2, 36.9, 36.0, 35.3, 25.9, 18.2, 14.4, -4.4, -4.7.

Alcohol 28. To a solution of 27 (661 mg, 1.46 mmol) and water (0.38 mL) in dichloromethane (7.3 mL), 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (495mg, 2.19 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 62 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and Na₂S₂O₃ at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford alcohol as pale vellow oil. which was used in the next reaction without further purification. To a solution of the alcohol in methanol (2.9 mL), Sodium borohydride (37.4 mg, 0.99 mmol) was added and then the resulting solution was stirred at 0 °C for 20 min. the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NH4Cl at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous NH₄Cl, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (20:1 to 10:1 hexane/ethyl acetate) to afford 28 (442 mg, 1.33 mmol, 91%) as pale yellow oil. $[\alpha]_{D}^{23}$ +42.5 (c 1.50, CHCl₃); R_f = 0.27 (5:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 3468, 2955, 2930, 2887, 2857, 1640, 1471, 1255, 1086, 1038, 916, 836, 776 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.73 (1H, ddd, J = 16.9, 10.2, 6.9 Hz, H10), 5.00 (1H, d, J = 16.9 Hz, H9a), 4.98 (1H, d, J = 10.2 Hz, H9b), 4.63 (1H, d, J = 7.0 Hz), 4.59 (1H, d, J = 7.0 Hz), 4.44 (2H, s), 3.94 (1H, ddt, J = 5.4, 5.4, 5.4 Hz, H15), 3.58 (1H, dd, J = 11.3, 4.4 Hz, H16a), 3.51 (1H, td, J = 6.2, 4.2 Hz, H13), 3.48 (1H, dd, J = 11.3, 5.2 Hz, H16b), 2.11-2.01 (1H, m, H11a), 1.91-1.85 (1H, m, H12), 1.87-1.80 (1H, m, H11b), 1.64 (2H, t, J = 6.2 Hz, H14), 0.88 (9H, s), 0.87 (3H, d, J =6.4 Hz), 0.07 (6H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 116.0, 95.9, 78.0, 70.2, 65.5, 55.9, 37.4. 35.8, 33.9, 25.8, 18.0, 13.8, -4.5, -4.7.

Mesylate 30. To a solution of 28 (713 mg, 2.14 mmol) in dichloromethane (21.4 mL), TEA (1.04 mL, 7.49 mmol) and mesyl chloride (0.33 mL, 4.28 mmol) was added dropwise at 0 °C. After being stirred at 0 °C for 20 min, the reaction mixture was diluted with dichloromethane, quenched with H₂O at 0 °C, and extracted with hexane. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (20:1 to 10:1 hexane/ethyl acetate) to afford **30** (897 mg, 2.14 mmol, quant.) as pale yellow oil. $\left[\alpha\right]_{D}^{26}$ +45.1 (c 0.705. CHCl₃); $R_f = 0.38$ (3:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2956, 2931, 2892, 2857, 1640, 1471, 1360, 1256, 1177, 1099, 1038, 957, 837, 778 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.73 (1H, ddd, J = 17.0, 10.2, 6.9 Hz, H10), 5.00 (1H, d, J = 17.0 Hz, H9a), 4.99 (1H, d, J = 10.2 Hz, H9b), 4.62 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.59 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.26 (1H, dd, J = 9.3, 2.0 Hz, H16a), 4.16-4.08 (2H, m, H16b and H15), 3.55 (1H, ddd, J = 7.7, 5.4, 4.4 Hz, H13), 3.36 (3H, s), 3.00 (3H, s), 2.09-2.01 (1H, m, H11a), 1.92-1.80 (2H, m, H11b and H12), 1.67-1.62 (2H, m, H14), 0.88 (9H, s), 0.86 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.09 (3H, s), 0.07 (3H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) § 136.9, 116.2, 95.9, 77.4, 73.1, 68.1, 56.0, 37.4, 37.3, 35.7, 34.0, 25.8, 18.0, 13.8, -4.6, -4.7.

Nitrile **31**. To a solution of **30** (897 mg, 2.14 mmol) in DMF (7.64 mL), 18-crown-6 ether (283 mg, 1.07 mmol) and potassium cyanide (283 mg, 4.28 mmol) was added at room temperature. After being stirred at room temperature for 72 to 85 h, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO₃ at 0 °C and extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (10:1 to 5:1 hexane/ethyl acetate) to afford **31** (607 mg, 1.77 mmol, 83%, for 3 cycles) as colorless oil. $[\alpha]_D^{24}$ +44.5 (c 0.880, CHCl₃); $R_f = 0.56$ (3:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2956, 2931, 2890, 2857, 2251, 1641, 1471, 1379, 1257, 1150, 1091, 1036, 916, 838, 777 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.72 (1H, ddd, J = 17.1, 10.2, 6.7 Hz, H10), 5.02 (1H, d, J = 17.1 Hz, H9a), 5.00 (1H, d, J = 10.2 Hz, H9b), 4.62 (1H, d, J = 7.0 Hz), 4.55 (1H, d, J = 7.0 Hz), 4.12 (1H, ddt, J = 9.0, 6.2, 4.1 Hz, H15), 3.44 (1H, ddd, J = 9.7, 4.0, 3.0 Hz, H13), 3.36 (3H, s), 2.59 (1H, dd, J = 16.6, 4.2 Hz, H16a), 2.51 (1H, dd, J = 16.6, 6.2 Hz, H16b), 2.09-2.01 (1H, m, H11a), 1.92-1.80 (2H, m, H11b and H12), 1.76 (1H, ddd, J = 14.3, 9.9, 4.0

Hz, H14a), 1.76 (1H, ddd, J = 14.4, 8.9, 2.9 Hz, H14b), 0.89 (9H, s), 0.87 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.11 (3H, s), 0.08 (3H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 136.8, 118.0, 116.3, 95.7, 77.3, 66.0, 56.0, 37.4, 36.7, 35.7, 25.7, 25.5, 17.9, 13.9, -4.6, -4.8.

Alcohol 32. To a solution of 31 (577 mg, 1.68 mmol) in dichloromethane (16.8 mL), DIBAL in hexane (1.02 M, 1.98 mL, 2.02 mmol) was added dropwise at -92 °C for 3 min. After being stirred at -92 to -70 °C for 73 min, the reaction mixture was quenched with methanol and saturated aqueous NH4Cl at -60 °C and allowed to 0 °C. After being stirred at 0 °C for 1 h, the reaction mixture was added saturated aqueous potassium sodium tartrate to, stirred vigorously at room temperature overnight, and extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford aldehyde as pale yellow oil, which was used in the next reaction without further purification. To a solution of the aldehyde in methanol (16.8 mL), Sodium borohydride (22.2 mg, 0.588 mmol) was added and then the resulting solution was stirred at 0 °C for 40 min. the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NH₄Cl at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous NH₄Cl, water and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (10:1 to 3:1 hexane/ethyl acetate) to afford 32 (397 mg, 1.14 mmol, 68%) as colorless oil. And nitrile 31 (108 mg, 0.315 mmol, 19%) was recovered, which had been missed to reduce into the aldehyde in the previous step. $[\alpha]_D^{23}$ +69.4 (c 0.360, CHCl₃); $R_f = 0.17$ (5:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 3439, 2955, 2930, 2887, 2857, 1641, 1471, 1255, 1151, 1038, 915, 836, 775 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.72 (1H, ddd, J = 17.0, 10.2, 6.8 Hz, H10), 5.00 (1H, d, J = 17.0 Hz, H9a), 4.98 (1H, d, J = 10.2 Hz, H9b), 4.62 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.54 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.11 (1H, ddt, J = 9.7, 6.4, 3.9 Hz, H15), 3.80 (1H, ddd, J = 10.9, 8.6, 3.9 Hz, H17a), 3.71 (1H, ddd, J = 10.9, 3.75.6, 4.9 Hz, H17b), 3.42 (1H, ddd, J = 10.0, 3.6, 2.7 Hz, H13), 3.35 (3H, s), 2.07-1.98 (1H, m, H11a), 1.94-1.78 (3H, m, H11b, H12 and H16a), 1.69 (1H, ddd, J = 14.2, 10.2, 3.9 Hz, H14a), 1.63 (1H, dtd, J = 14.7, 6.2, 3.7 Hz, H16b), 1.58 (1H, ddd, J = 14.2, 9.6, 2.6 Hz, H14b), 0.88 (9H, s), 0.87 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.09 (3H, s), 0.08 (3H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 137.1, 116.0, 95.8, 78.1, 69.6, 60.2, 55.8, 37.5, 37.0, 36.8, 35.9, 25.8, 17.9, 13.8, -4.4, -4.8.

Diol 33. To a solution of 32 (464 mg, 1.33 mmol) in THF (0.5 mL), TBAF in THF (1.0 M, 5.3 mL, 5.3 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was quenched with methanol, H₂O and saturated aqueous NH₄Cl at 0 °C, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated aqueous NH₄Cl, water and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (3:1 to 1:3 hexane/ethyl acetate) to afford **33** (288 mg, 1.24 mmol, 93%) as pale yellow oil. $[\alpha]_D^{24}$ +53.7 (c 0.220, CHCl₃); R_f = 0.25 (1:3 hexane/ethyl acetate); IR (film) 3387, 2931, 1641, 1442, 1377, 1261, 1097, 1036, 915, 800 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.72 (1H, ddd, J = 17.6, 9.4, 6.9 Hz, H10), 4.99 (1H, d, J = 17.6 Hz, H9a), 4.99 (1H, d, J = 9.4 Hz, H9b), 4.72 (1H, d, J = 6.7 Hz), 4.62 (1H. d, J = 6.7 Hz), 4.04 (1H, dtd, J = 9.2, 5.9, 2.7 Hz, H15), 3.86-3.77 (3H, m, H17 and -OH), 3.75 (1H, ddd, J = 10.3, 3.4, 3.0 Hz, H13), 3.39 (3H, s), 2.90 (1H, br s, -OH), 1.99 (ddd, J = 13.9, 5.3, 5.3 Hz, H11a), 1.95-1.90 (1H, m, H12), 1.87 (ddd, J = 13.9, 6.9, 6.9 Hz)H11b), 1.73-1.63 (3H, m, H14a and H16), 1.48 (1H, ddd, J = 14.6, 2.7, 2.7 Hz, H14b), 0.88 (3H, d, J = 6.6 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 136.8, 116.2, 95.5, 81.5, 72.2, 61.6, 56.1, 38.7, 37.7, 36.0, 35.3, 13.4.

macrolide fragment **11**. To a suspension of sodium hydride (60% in oil, 181 mg, 4.52 mmol) in DMF (12.5 mL), a solution of **33** (263 mg, 1.13 mmol) in DMF (12.5 mL) was added dropwise at 0 °C for 21 min and the resulting solution was allowed to room temperature. After being stirred at room temperature for 90 min, the reaction solution was added a solution of *p*-methoxybenzyl chloride (0.161 mL, 1.19 mmol) in DMF (2.0 mL) to via a very thin cannula at room temperature for 40 min. After being stirred at room temperature for 27 min, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NaHCO₃ at 0 °C and extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with water, saturated aqueous NH₄Cl, re-water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (3:1 to 1:3 hexane/ethyl acetate) to afford **11** (246 mg, 0.696 mmol, 62%) as pale yellow oil. The ¹H-NMR of **11** was identical to that of the corresponding compound reported previously. $[\alpha]_D^{24} = +27.7$ (c 1.11, CHCl₃); R_f 0.10 (3:1 hexane/ethyl acetate); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (2H, d. J = 9.0 Hz), 6.85 (2H, d, J = 8.6 Hz), 5.72 (1H, ddt, J = 17.0, 10.0, 7.0 Hz), 4.98 (1H, d, J = 16.7),

4.97 (1H, d, J = 11.1 Hz), 4.68 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.60 (1H, J = 6.8 Hz), 4.43 (2H, s), 3.93 (1H, ddd, J = 8.0, 4.2 Hz, H15), 3.78 (3H, s), 3.66 (1H, ddd, J = 9.4, 3.6, 3.6 Hz, H13), 3.63 (1H, ddd, J = 9.7, 6.2, 6.2 Hz, H17a), 3.58 (1H, ddd, J = 9.4, 6.0, 6.0 Hz, H17b), 3.36 (3H, s), 2.00 (1H, ddd, J = 12.8, 6.4, 6.4 Hz, H11a), 1.89 (1H, m, H12), 1.84 (1H, ddd, J = 13.1, 7.1, 7.1 Hz, H11b), 1.80-1.68 (2H, m, H16), 1.63 (1H, ddd, J = 14.5, 9.3, 8.2 Hz, H14a), 1.51 (1H, ddd, J = 14.6, 3.7, 3.7 Hz, H14b), 0.87 (3H, d, 6.6 Hz).

Salicylihalamide A (1) and B (3). N,N'-dimethyl acetamide (DMA) used in this reaction was degassed by frozen-thow methode over 10 times. To the 20 mL Schlenk flask dried by heating with flame under reduced pressure for 10 min Rb₂CO₃ (139 mg, 0.60 mmol) was added under argon atmosphere, and dried by a drier under reduced pressure for 15 min, and charged with argon gas after cooling to room temperature. To this flask, copper (I) thiophene carboxylate (19 mg, 0.10 mmol), a solution of 8 (75 mg, 0.60 mmol) and 2,2'-bipyridine (20 mg, 0.12 mmol) in DMA (0.9 mL) which was dried over MS4Å, and then the resulting mixture was immediately degassed until any bubble was not found. After being stirred for 30 min at room temperature with light shielding, a solution of 6 (44 mg, 0.10 mmol) in DMA (0.6 mL) which was dried over MS4Å, was added and the resulting solution was immediately degassed until any bubble was not found. After being stirred for 1 h at 90 °C with light shielding, the reaction solution was diluted with ether at room temperature, and was guenched with pH 7 phosphate buffer at 0 °C. The organic layer was separated, washed with pH 7 phosphate buffer, water and brine, and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 3/1 to 1/3) to afford the roughly purified substance (58.3 mg), which was purified by the preparative HPLC to afford salicylihalamide A (1) (10.1 mg, 0.023 mol, 23%) and salicylihalamide B (3) (11.4 mg, 0.026 mmol, 26%) as a colorless wax, respectively. HPLC conditions: column: COSMOSIL 5C18-MS-II (NACALAI TESQUE, INC.), 10 x 250 mm; detection: $\lambda = 280$ nm; flow rate: 2.0 ml/min; elution with a gradient solvent system: MeOH/H₂O = 7/3, 0 - 100 min: MeOH/H₂O = 7/3 \rightarrow MeOH, 100 - 120 min: MeOH, 120 -140 min; The $t_{\rm R}$ of salicylihalamide A (1) and salicylihalamide B (3) were 64.2 min and 81.0 min, respectively.

1: $[\alpha]_{D}^{19} = -32.6$ (c 0.169, MeOH); Rf 0.25 (hexane / ethyl acetate = 1/1); IR (film) 3285, 2964, 1700, 1653, 1589, 1523, 1464, 1293, 1248, 1216, 1123, 1066, 971 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, C_6D_6) δ 11.5 (1H, br s, C3-OH), 7.93 (1H, br dd, J = 11.4, 11.4 Hz, H22), 7.12 (1H, dd, J = 14.3, 10.9 Hz, H18), 6.99-6.94 (2H, m, H4 and H5), 6.62 (1H, dd, J = 11.6, 11.6 Hz, H21), 6.50 (1H, br d, -NH), 6.48 (1H, dd, J = 6.6, 2.3 Hz, H6), 5.62 (1H, ddddd, J = 10.8, 7.7, 7.7, 1.3, 1.3 Hz, H23), 5.54(1H, ddd, J = 10.0, 6.6, 6.6 Hz, H15), 5.28 (1H, ddd, J = 15.5, 4.3, 4.3 Hz, H9), 5.10 (1H, br d, J = 10.9Hz, H20), 5.05 (1H, br ddd, J = 14.6, 6.9, 6.9 Hz, H10), 4.77 (1H, br ddd, J = 14.3, 7.2, 7.2 Hz, H17), 3.62 (1H, br dd, J = 16.5, 5.3 Hz, H8a), 3.44 (1H, dd, J = 8.3, 2.9 Hz, H13), 3.32 (1H, br d, J = 16.0 Hz, H8b), 2.17 (1H, ddd, J = 14.0, 7.2, 7.2 Hz, H16a), 2.12 (1H, ddd, J = 12.3, 5.7, 5.7 Hz, H11a), 2.05 (1H, ddd, J = 14.0, 6.9, 6.9 Hz, H16b), 1.97 (2H, tdd, J = 7.6, 7.6, 1.4 Hz, H24), 1.66 (1H, dd, J = 15.1, 10.8 Hz, H14a), 1.62 (1H, dd, J = 13.5, 8.9 Hz, H11b), 1.56-1.45 (1H, m, H12), 1.27 (1H, dd, J = 14.9, 8.6 Hz; H14b), 0.82 (3H, d, J = 6.9Hz, H26), 0.77 (3H, t, J = 7.7 Hz, H25); ¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆) § 171.2, 170.0, 163.0, 162.9, 142.6, 141.7, 136.9, 134.0, 132.7, 127.1, 126.0, 124.9, 123.6, 119.7, 117.1, 114.7, 107.0, 75.3, 70.4, 39.3, 38.6, 37.6, 36.4, 35.5, 20.8, 14.0, 13.9; HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₂₆H₃₃NNaO₅(M+Na⁺) 462.2256, found 462.2253.

3: $\left[\alpha\right]_{D}^{20} = -90.4$ (c 0.025, MeOH); Rf 0.25 (hexane / ethyl acetate = 1/1); IR (film) 3286. 2960, 2924, 1695, 1653, 1587, 1507, 1464, 1294, 1247, 1211, 1119, 1032, 966 cm⁻¹; ¹H NMR $(500 \text{ MHz}, C_6D_6) \delta 11.8 (1H, \text{ br}, C3-OH), 7.97 (1H, \text{ br} \text{ dd}, J = 11.4, 11.4 \text{ Hz}, H22), 7.57 (1H, C3-OH), 7.97 (1H, C3-O$ br d, J = 9.2 Hz, -NH), 7.31 (1H, dd, J = 10.0, 10.0 Hz, H18), 6.98-6.94 (2H, m, H4 and H5), 6.62 (1H, ddd, J=11.4, 11.4, 0.9 Hz, H21), 6.45 (1H, dd,6.3, 2.6 Hz, H6), 5.26-5.12 (2H, m, H15 and H10), 6.48 (1H, dd, J = 6.6, 2.3 Hz, H6), 5.62 (1H, ddddd, J = 10.8, 7.7, 7.7, 1.3, 1.3 Hz, H23), 5.44 (1H, d, J = 11.5 Hz, H20), 5.25-5.12 (2H, m, H15 and H10), 5.07 (1H, ddd, J =15.3, 7.2, 7.2 Hz, H9), 4.48 (1H, ddd, J = 8.0, 8.0, 8.0 Hz, H17), 3.56 (1H, br dd, J = 16.5, 5.3 Hz, H8a), 3.24 (1H, br d, J = 16.9 Hz, H8b), 3.21 (1H, br d, J = 9.7 Hz, H13), 2.11-1.99 (1H, m, H11a), 2.04 (1H, ddd, J = 14.0, 7.4, 7.4 Hz, H16a), 1.94 (2H, tdd, J = 7.6, 7.6, 1.4 Hz, H24), 1.84 (1H, ddd, J=14.3, 7.7, 7.7 Hz, H16b), 1.77-1.68 (1H, m, H11b), 1.72 (1H, dd, J =14.7, 10.7 Hz, H14a), 1.45 (1H, br q, J = 6.8 Hz, H12), 1.19 (1H, dd, J = 15.2, 8.6 Hz, H14b), 0.82 (3H, d, J = 6.9Hz, H26), 0.77 (3H, t, J = 7.4 Hz, H25); ¹³C NMR (125 MHz, C_6D_6 δ 172.0, 162.9, 141.9, 137.3, 134.6, 132.8, 126.8, 125.4, 124.9, 123.7, 119.5, 117.2, 103.2, 76.1, 70.9, 39.4, 38.4, 38.0, 36.2, 31.4, 20.8, 14.0, 13.8; HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₂₆H₃₃NNaO₅ (M+Na⁺) 462.2256, found 462.2245.

65. То the 300 mL two-necked flask Fluorinated triflate charged with N-fluoro-5-(trifluoromethyl)pyridinium-2-sulphonate (60b) (3.98 g, 16.2 mmol) was added a solution of actal 13 (3.73 g, 19.4 mmol) in dry 1,1,2,2-tetrachloroethane (49 mL), and the resulting mixture was refluxed for 4 h with light shielding. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with dichloromethane (90 mL), quenched with saturated aqueous Na₂S₂O₃ at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, pH 7 phosphate buffer solution, and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (50:1 to 5:1 hexane/ethyl acetate) to afford a mixture of 61a and recovered 13 containing 1,1,2,2-tetrachloroethane, and a mixture of 61b and 61c. 61a: $R_f =$ 0.40 (10:1 hexane/ethyl acetate, developed in twice); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.99 (1H, br s), 7.26 (1H, dd, J = 9.7, 9.7 Hz), 5.98 (1H, dd, J = 9.2, 3.4 Hz), 1.78 (6H, s). **61b**: Rf 0.36 (10:1 hexane/ethyl acetate, developed in twice); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.3 (1H, br s), 7.24 (1H, dd, J = 9.7, 9.7 Hz), 6.37 (1H, dd, J = 8.6, 2.9 Hz), 1.73 (6H, s); ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂) δ 10.3 (1H, br s), 7.25 (1H, dd, J = 10.9, 6.0 Hz), 6.39 (1H, dd, J = 9.2, 3.4 ¹Hz), 1.70 (6H, s). **61c**: Rf 0.36 (hexane/ethyl acetate = 10/1, developed in twice); ¹H NMR $(500 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3) \delta 9.98 (1\text{H}, \text{ br s}), 7.18 (1\text{H}, \text{ dd}, J = 10.0, 10.0 \text{ Hz}), 1.78 (6\text{H}, \text{ s}); ^1\text{H NMR}$ $(500 \text{ MHz}, \text{CD}_2\text{Cl}_2) \delta 9.96 (1\text{H}, \text{ br s}), 7.20 (1\text{H}, \text{ dd}, J = 10.3, 10.3 \text{ Hz}), 1.76 (6\text{H}, \text{ s}).$

To a solution of **61a** and **13** in pyridine (18 mL), trifluoromethanesulfonic anhydride (11.0 mL, 2.09 mmol) was added dropwise at 0 °C, and the mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous NH₄Cl, water, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (30:1 to 10:1 hexane/ethyl acetate) to afford **65** (1.07 g, 3.11 mmol, 16%, two steps) as a colorless solid which was separated from **14** (1.71g, 5.25 mmol, 27%, two steps). **65**: $R_f = 0.18$ (10:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 3092, 2986, 1749, 1632, 1497, 1419, 1403, 1395, 1381, 1319, 1301, 1286, 1264, 1229, 1219, 1182, 1141, 1068, 1033, 979, 907, 856, 828, 649, 593 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 6.95 (1H, dd, *J* = 9.2, 3.6 Hz), 1.80 (6H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 156.1 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 150.4 (d, ¹ $J_{CF} = 254$ Hz), 145.7 (d, $J_{CF} = 15$ Hz), 143.9 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 122.2 (d, $J_{CF} = 19$ Hz), 118.7 (d, ¹ $J_{CF} = 312$ Hz, -CF₃), 110.0, 108.0, 25.5; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ 132.4 (dd, *J* = 8.9, 4.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₁₁H₈F₄NaO₆S (M+Na⁺)

366.9875, found 366.9877.

Fluorinated allyl benzene 66. Lithium chloride (395 mg, 9.33 mmol) in a Schlenk flask was dried by being heated under reduced pressure. Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (0)-methylene chloride complex (166 mg, 0.16 mmol), tris(2-furyl)phosphine (74.3 mg, 0.32 mmol), and N-methylpyrrolidone (2.2 mL) were added to the flask, and a solution of 65 (1.07 g, 3.11 mmol) in N-methylpyrrolidone (4.0 mL) was added and then stirred at room temperature for 12 min. To the stirred solution, allyl tri-n-buthyltin (1.14 mL, 3.73 mmol) was added dropwise at 0 °C. After being stirred at room temperature for 8 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous KF at 0 °C, the resulting precipitates were removed filtration, and the filtrate was extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous KF, water, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (20:1 to 10:1 hexane/ethyl acetate) to afford **66** (620 mg, 2.62 mmol, 84%) as a pale greenish vellow oil. $R_f = 0.50$ (5:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2956, 2924, 1740, 1639, 1616, 1594, 1503, 1465, 1429, 1391, 1381, 1281, 1262, 1204, 1150, 1065, 1030, 997, 982, 911, 823 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.24 (1H, dd, J = 9.6, 8.6 Hz), 6.88 (1H, dd, J = 8.6, 4.7 Hz). 5.98 (1H, ddt, J = 16.9, 10.3, 6.5 Hz), 5.04 (1H, ddd, J = 10.2, 2.9, 1.3 Hz), 5.01 (1H, ddd, J = 10.2, 1.4 Hz), 5.01 (1H, ddd, J 17.1, 3.3, 1.7 Hz), 3.82 (2H, d, J = 6.4 Hz), 1.73 (6H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.2 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 149.7 (d, ${}^{1}J_{CF} = 247$ Hz), 145.1 (d, $J_{CF} = 13$ Hz), 140.1 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 136.4, 124.0 (d, $J_{CF} = 6$ Hz), 121.6 (d, $J_{CF} = 17$ Hz), 116.2, 113.6, 106.3, 37.7, 25.6; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -138.5 (dd, J = 9.9, 4.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{13}H_{13}F_4NaO_3$ (M+Na⁺) 259.0746, found 259.0747.

Fluorinated benzoate **67**. To a solution of 2-propene-1-ol (1.40 mL, 20.6 mmol) in THF (1 mL), a solution of ethylmagnesium bromide in THF (0.49 M, 21.1 mL, 10.3 mmol) was added dropwise at 0 °C, and the resulting solution was stirred at room temperature for 20 min. To the reaction mixture, a solution of **66** (610 mg, 2.58 mmol) in THF (3 mL) was added dropwise at 0 °C. After being stirred at room temperature for 17 h, the reaction mixture was diluted with ether, quenched with aqueous NH₄Cl at 0 °C, and extracted with ether. The

organic layer was washed with saturated aqueous NH₄Cl, water, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (40:1 to 10:1 hexane/ethyl acetate) to afford **67** (494 mg, 2.09 mmol, 81%) as a pale greenish yellow oil (7:1 mixture of **67** and **68**). $R_f = 0.37$ (20:1 hexane/ethyl acetate, developed in twice); IR (film) 3080, 2982, 1734, 1669, 1615, 1595, 1490, 1432, 1373, 1307, 1251, 1171, 1143, 983, 918, 822, 811, 797, 767 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 11.1 (1H, s), 7.14 (1H, dd, J = 9.8, 8.7 Hz), 6.66 (1H, dd, J = 8.4, 5.0 Hz), 6.01 (1H, ddt, J = 17.2, 10.5, 6.0 Hz), 5.92 (1H, ddt, J = 17.0, 10.2, 6.3 Hz), 5.42 (1H, dd, J = 17.0, 2.6 Hz), 5.34 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.00 (1H, dd, J = 10.2, 3.0 Hz), 4.92 (1H, dd, J = 17.0, 3.4 Hz), 4.86 (2H, dt, J = 6.0, 1.4 Hz), 3.64 (2H, br d, J = 6.2 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.4 (d, $J_{CF} = 2$ Hz), 151.0 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 150.4 (d, ¹ $J_{CF} = 243$ Hz), 137.7 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 137.3, 131.0, 121.2 (d, $J_{CF} = 6$ Hz), 121.2 (d, $J_{CF} = 6$ Hz), 120.1 (d, $J_{CF} = 13$ Hz), 120.0, 115.6, 66.8, 39.7; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -138.8 (dd, J = 9.9, 4.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₁₃H₁₃F₄NaO₃ (M+Na⁺) 259.0746, found 259.0759.

Fluorinated methoxy benzene 69. To a solution of 67 (481 mg, 2.04 mol) in acetone (4.0 mL), potassium carbonate (366 mg, 2.65 mmol) and methyl iodide (1.27 mL, 20.4 mmol) were added. After being stirred at room temperature for 23 h, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (20:1 hexane/ethyl acetate) to afford 69 (471 mg, 1.88 mmol, 93%) as a pale greenish yellow oil. R_f= 0.65 (20:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2982, 2944, 1734, 1640, 1606, 1490, 1458, 1421, 1359, 1277, 1195, 1160, 1134, 1105, 1043, 986, 922, 820, 734 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.05 (1H, dd, J = 11.2, 8.5 Hz), 6.86 (1H, dd, J = 8.5, 4.5 Hz), 5.99 (1H, ddt, J = 17.2, 10.5, 5.9 Hz), 5.85 (1H, ddt, J = 16.9, 10.2, 6.6 Hz), 5.41 (1H, ddd, J = 17.2, 2.9, 1.4Hz), 5.28 (1H, ddd, J = 10.3, 2.4, 1.3 Hz), 5.04 (1H, ddd, J = 10.2, 3.0, 1.3 Hz), 5.02 (1H, ddd, J = 16.9, 3.4, 1.7 Hz), 4.79 (2H, dd, J = 5.9, 1.4 Hz), 3.92 (3H, d, J = 1.9 Hz, -OMe), 3.32 (2H, br d, J = 6.7 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.5 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 153.6 (d, ${}^{1}J_{CF} = 4$ 246 Hz), 144.7 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 136.0, 133.7 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 131.7, 129.1, 124.7 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 119.1, 117.9 (d, $J_{CF} = 19$ Hz), 116.5, 66.1, 62.0 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 37.0; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -133.5 (br ddg, J =11.1, 4.5, 1.8 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{14}H_{15}FNaO_3$ (M+Na⁺) 273.0903, found 273.0929.

Fluorinated salicylate **59**. To a flask charged with tetrakis(triphenylphosphine)palladium (8.3 mg, 7.2 μmol), a solution of **69** (18.0 mg, 71.9 μmol) in THF (2.3 mL), followed by morpholine (62.7 μL, 0.72 mmol) was added dropwise. After being stirred at room tempeature for 1 h, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (1:1 hexane/ethyl acetate, containing 0.05% HCOOH) to afford **59** (12.9 mg, 61.2 μmol, 85%) as a colorless oil (7:1 mixture of **59** and **70**). R_f = 0.44 (1:1 hexane/ethyl acetate); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.10 (2H, dd, J = 11.2, 8.3 Hz), 6.92 (2H, dd, J = 8.6, 4.6 Hz), 5.90 (1H, ddt, J = 17.0, 10.0, 6.3 Hz), 5.05 (1H, d, J = 10.3 Hz), 5.04 (1H, d, J = 17.2 Hz), 3.98 (3H, d, J = 1.7 Hz), 3.47 (2H, br d, J = 6.9 Hz); IR (film) 3503, 2946, 2654, 2361, 1707, 1640, 1606, 1559, 1491, 1462, 1425, 1280, 1199, 1164, 1141, 1042, 994, 968, 921, 820, 768, 708, 668 cm⁻¹; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.7, 153.7 (d, ¹ $_{CF} = 246$ Hz), 145.1 (d, $J_{CF} = 13$ Hz), 136.0, 134.4 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 127.6, 125.1 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 118.6 (d, $J_{CF} = 18$ Hz), 116.7, 62.2 (d, $J_{CF} = 6$ Hz), 37.3; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -133.1 (br dq, J = 10.8, 2.2 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calculated for C₁₁H₁₀FO₃ (M-H) 209.0613, found 209.0639.

Fluorinated diene **58**. To a stirred solution of triphenylphosphine (254 mg, 0.97 mmol), **59** (0.86 mmol), and **11** (254 mg, 0.72 mmol) in ether (3.6 mL), DEAD (40% in toluene, 0.44 mL, 0.97 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 36 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH₄Cl at 0 °C and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous NH₄Cl, water, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (10:1 to 5:1 hexane / ethyl acetate) to afford **58** (368 mg, 0.68 mmol, 91%) as a pale greenish yellow oil. $[\alpha]_D^{27}$ +3.63 (c 0.32, CHCl₃); R_f = 0.50 (3:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2935, 1727, 1640, 1613, 1514, 1490, 1458, 1442, 1421, 1362, 1275, 1248, 1197, 1173, 1155, 1139, 1097, 1039, 995, 975, 917, 820 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (2H, d. *J* = 8.6 Hz), 7.03 (1H, dd, *J* = 11.2, 8.5 Hz), 6.87-6.82 (3H, m), 5.88 (1H, ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.4 Hz), 5.71 (1H, ddt, *J* = 17.0, 10.0, 7.0 Hz), 5.42 (1H, dddd, *J* = 6.2, 6.0, 6.0, 6.0, 6.0 Hz, H15), 5.05 (1H, dd, *J* = 10.0, 1.9 Hz), 4.68 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 4.45 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.41 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 3.90 (3H, d, *J* =

2.0 Hz, -OMe), 3.78 (3H, s), 3.61 (1H, ddd, J = 9.5, 8.4, 5.9 Hz, H17a), 3.60 (1H, dt, J = 10.0, 3.6 Hz, H13), 3.55 (1H, ddd, J = 9.5, 6.9, 6.9 Hz, H17b), 3.38 (3H, s), 3.30 (2H, br d, J = 6.4 Hz), 3.30 (2H, br d, J = 6.4 Hz), 2.05 (1H, ddd, J = 13.9, 6.6 Hz, H11a), 2.03 (1H, ddd, J = 14.0, 6.0 6.0 Hz, H16a), 1.97 (1H, ddd, J = 14.0, 6.9, 5.7 Hz, H16b), 1.93-1.85 (1H, m, H12), 1.80 (1H, ddd, J = 13.9, 8.6, 7.9 Hz, H11b), 1.73-1.69 (2H, m, H14), 0.87 (3H, d, J = 6.7 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.6, 159.1, 153.4 (d, ¹ $_{CF} = 246$ Hz), 144.3 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 137.1, 136.2, 133.3 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 130.5, 129.6, 129.3, 124.5 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 117.7 (d, $J_{CF} = 17$ Hz), 116.6, 115.9, 113.7, 96.7, 78.2, 72.7, 71.3, 66.4, 61.7 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 55.8, 55.3, 37.5, 36.7, 36.3, 35.3, 35.1, 13.7; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -133.6 (br ddq, J = 10.8, 4.5, 1.8 Hz); HRMS (ESI-TOF) *m*/*z* calcd for C₃₁H₄₁FNaO₇ (M+Na⁺) 567.2734, found 567.2731.

Fluorinated (E)-olefin lactone 72. To a flask charged with dichloromethane (18 mL) under vigorous stirring, a solution of 58 (358 mg, 0.66 mmol) in dichloromethane (67 mL) and (Cy₃P)₂Cl₂Ru=CHPh (41 mg, 0.0495 mmol) in dichloromethane (63 mL) were added simultaneously at room temperature over 26 min, and the resulting solution was stirred at room temperature for 21 min. The reaction was quenched with triethylamine (3.2 mL), exposed to air for 13 h with vigorous stirring, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (10:1 to 5:1 hexane/ethyl acetate) to afford 72 (306 mg, 0.59 mmol, 90%) as a pale gray oil (10:1 mixture of E:Z isomers at C9). $[\alpha]_D^{26}$ -44.5 (c 0.21, CHCl₃); $R_f = 0.28$ (3:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2954, 2933, 1725, 1613, 1587, 1514, 1489, 1456, 1417, 1359, 1275, 1248, 1207, 1173, 1155, 1142, 1099, 1067, 1040, 975, 917, 822 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.97 (1H, dd, J = 11.3, 8.3 Hz), 6.85 (2H, d. J = 8.6 Hz), 6.78 (1H, dd, J = 8.4, 4.5 Hz), 5.50-5.40 (2H, m, H15 and H10), 5.29 (1H, ddt, J = 15.2, 9.5, 2.2 Hz, H9), 4.84 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.76 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.45 (2H, s), 4.06 (1H, dd, J = 9.5, 3.7 Hz, H13), 3.82 (3H) d, J = 1.9 Hz), 3.78 (3H, s), 3.63 (1H, br dd, J = 16.4, 10.0 Hz, H8a), 3.61 (2H, t, dd, J = 6.7, 6.7 Hz, H17), 3.41 (3H, s), 3.28 (1H, ddt, J = 16.4, 4.6, 2.6 Hz, H8b), 2.28 (1H, br ddd, J =14.0, 5.7, 3.3 Hz, H11a), 2.17-2.06 (1H, m, H12), 2.01 (1H, dddd, J = 14.2, 8.3, 6.0, 6.0 Hz, H16a), 1.90 (1H, dddd, J = 14.2, 7.2, 7.2, 4.6 Hz, H16b), 1.72 (1H, dd, J = 15.6, 8.9 Hz, H14a), 1.68 (1H, dd, J = 14.1, 11.6 Hz, H11b), 1.46 (1H, dd, J = 15.5, 9.5, H14b), 0.84 (3H, d, J = 6.9; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.9, 159.1, 153.6x (d, ¹ $J_{CF} = 246$ Hz), 144.7 ($J_{CF} = 246$ Hz), 144.7 (J_{CF} = 246 Hz),

12 Hz), 134.1, 131.5 ($J_{CF} = 2$ Hz), 130.6, 130.2, 129.1, 128.3, 125.5 ($J_{CF} = 7$ Hz), 117.1 ($J_{CF} = 19$ Hz), 113.7, 96.8, 79.3, 72.8, 72.6, 66.3, 61.6 ($J_{CF} = 7$ Hz), 55.6, 55.3, 37.7, 37.3, 36.4, 35.5, 34.0, 13.4; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -133.0 (br ddq, J = 11.7, 4.5, 1.8 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₂₉H₃₇FNaO₇ (M+Na⁺) 539.2421, found 539.2426.

Alcohol 74. To a solution of 72 (296 mg, 0.57 mmol) and water (0.57 mL) in dichloromethane (11 mL), 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (182 mg, 0,80 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 53 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and saturated aqueous Na₂S₂O₃ at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (3:1 to 1:1 hexane/ethyl acetate) to afford 74 (220 mg, 0.55 mmol, 97%) as a pale bright yellow oil (10:1 mixture of E:Z isomers at C9). $[\alpha]_D^{27}$ -37.8 (c 0.26, CHCl₃); $R_f = 0.29$ (1:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 3441, 2954, 1725, 1605, 1489, 1457, 1417, 1382, 1348, 1275, 1231, 1197, 1155, 1142, 1102, 1041, 975, 917, 822, 717 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.98 (1H, dd, J = 11.5, 8.5 Hz), 6.80 (1H, dd, J = 8.4, 4.5 Hz), 5.48 (1H, dddd, J = 8.5, 8.5, 4.7, 4.7 Hz, H15), 5.46 (1H, ddt, J =15.2, 11.5, 2.6 Hz, H10), 5.30 (1H, ddt, J = 15.2, 9.6, 2.2 Hz, H9), 4.85 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.80 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.08 (1H, dd, J = 9.4, 3.4 Hz, H13), 3.92 (3H, d, J = 2.0 Hz), 3.82 (1H, ddd, J = 11.6, 7.7, 4.4 Hz, H17a), 3.75 (1H, ddd, J = 11.2, 6.0, 5.3 Hz, H17b), 3.63 (1H, dd, J = 16.5, 9.6 Hz, H8a), 3.43 (3H, s), 3.29 (1H, dddd, J = 16.5, 4.2, 2.4, 2.4 Hz, H8b), 2.29 (1H, ddd, J = 14.4, 5.6, 3.2 Hz, H11a), 2.18-2.07 (1H, m, H12), 1.94 (1H, dddd, J = 14.5, 9.5)5.9, 4.4 Hz, H16a), 1.84 (1H, dddd, J = 14.4, 7.7, 4.7, 4.7 Hz, H16b), 1.75 (1H, dd, J = 15.6, 8.2 Hz, H14a), 1.69 (1H, ddd, J = 14.3, 11.6, 11.6 Hz, H11b), 1.46 (1H, dd, J = 15.6, 9.3 Hz, H14b), 0.85 (3H, d, J = 6.7 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 167.1 (d, $J_{CF} = 2$ Hz), 153.5 (d, ${}^{1}J_{CF} = 247$ Hz), 144.3 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 134.1 (d, $J_{CF} = 3$ Hz), 131.6, 129.9, 128.2, 125.7 (d, $J_{\rm CF} = 7$ Hz), 117.3 (d, $J_{\rm CF} = 19$ Hz), 97.0, 73.5, 61.9 (d, $J_{\rm CF} = 7$ Hz), 59.4, 55.6, 38.9, 37.6, 37.3, 35.5, 34.1, 13.4; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -132.8 (ddg, J = 11.7, 4.5, 1.8 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{21}H_{29}FNaO_6$ (M+Na⁺) 419.1846, found 419.1861.
Iodoolefin 77. To a solution of 74 (211 mg, 0.53 mmol) in dichloromethane (11 mL) Dess-Martin periodinane (339 mg, 0.80 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 73 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and saturated aqueous Na₂S₂O₃ at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford aldehyde 76 as pale bright yellow oil, which was used in the next reaction without further purification. Chromium chloride (II) (782 mg, 6.36 mmol) was dried by being heated with flame under reduced pressure for 15min. To a suspension of the chromium chloride (II) in THF (4.6 mL), a solution of the aldehyde and iodoform (835 mg, 2.12 mmol) in dioxane (27.6 mL) was added at 0 °C to give a reddish-brown suspension. After being stirred at room temperature for 26 h with light shading, the reaction mixture was diluted with ether (32 mL) and the suspension was poured into a mixture of ether (12 mL) and water (36 mL) at 0 °C. The organic layer was separated, washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, saturated aqueous NaHCO₃, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (15:1 to 5:1 hexane/ethyl acetate) to afford 77 (221 mg, 0.43 mmol, 80%) as a pale yellow oil (3.3 :1 mixture of E:Z isomers at C17). $[\alpha]_D^{27}$ -84.5 (c 0.21, CHCl₃); R_f = 0.49 (3:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2955, 2932, 1727, 1606, 1489, 1456, 1426, 1417, 1382, 1347, 1273, 1230, 1196, 1155, 1139, 1102, 1042, 975, 917, 821, 811 cm^{-1} : ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.99 (1H, dd, J = 11.5, 8.5 Hz), 6.78 (1H, dd, J = 8.5, 4.4 Hz), 6.69 (1H, ddd, J=14.4, 8.2, 6.2 Hz, H17), 6.15 (1H, d, J=14.5 Hz, H18), 5.45 (1H, dddd, J = 14.8, 11.4, 2.7, 2.7 Hz, H10), 5.33 (1H, ddd, J = 8.3, 8.3, 4.6 Hz, H15), 5.28 (1H, dddd, J = 15.2, 9.6, 2.1, 2.1 Hz, H9), 4.85 (1H, d, J = 6.7 Hz), 4.78 (1H, d, J = 6.7 Hz), 4.05 (1H, dd, J = 9.4, 3.7 Hz, H13), 3.96 (3H, d, J = 2.0 Hz), 3.62 (1H, dd, J = 16.3, 9.5 Hz, H8a), 3.43 (3H, s), 3.28 (1H, dddd, J = 16.4, 3.9, 2.4, 2.4 Hz, H8b), 2.45 (1H, dddd, J = 14.6, 8.0, 6.3, 1.5 Hz, H16a), 2.33 (1H, dddd, J = 14.9, 8.2, 4.6, 0.9 Hz, H16b), 2.29 (1H, br d, J = 14.2 Hz, H11a), 2.17-2.07 (1H, m, H12), 1.68 (dd, J = 15.1, 8.6 Hz, H14a), 1.67 (1H, ddd, J = 14.2, 11.5, 11.5 Hz, H11b), 1.40 (1H, dd, J = 15.4, 9.5 Hz, H14b), 0.84 (3H, d, J = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.9 (d, J_{CF} = 4 Hz), 153.6 (d, ${}^{1}J_{CF}$ = 246 Hz), 144.8 (d, J_{CF} = 12 Hz), 141.71, 136.9, 134.1 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 131.5, 128.3, 125.4 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 117.2 (d, $J_{CF} = 19$ Hz), 97.1, 79.4, 77.6, 73.8, 61.9 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 55.7, 42.4, 37.6, 37.2, 35.1, 34.1, 13.3;

¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -132.7 (ddq, J = 11.3, 4.5, 2.4 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₂₂H₂₈FINaO₅ (M+Na⁺) 541.0863, found 541.0881.

Coupling precursor 57. To a vigorously stirred solution of 77 (211 mg, 0.41 mmol) in dichloromethane (45 mL), a solution of tribromoborane in dichloromethane (1.0 M, 1.06 mL, 1.06 mmol) was added at -78 °C. After being stirred at -78 °C for 65 min, the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature, then quenched with ice-cold water (70 mL) at -5 °C and extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (5:1 to 3:1 hexane/ethyl acetate) to afford 57 (138 mg. 0.30 mmol, 76%) as a colorless powder (4:1 mixture of E:Z isomers at C17). $\left[\alpha\right]_{D}^{27}$ +19.4 (c 0.69, CHCl₃); $R_f = 0.27$ (3:1 hexane/ethyl acetate, developed in twice); IR (film) 3469, 2956. 2359, 1703, 1612, 1491, 1425, 1356, 1291, 1274, 1168, 1141, 1028, 968, 820, 767, 669, 623 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.1 (1H, br s, -OH), 7.10 (1H, dd, J = 8.5 Hz), 6.63 (1H) dd, J = 8.3, 5.0 Hz), 6.57 (1H, ddd, J = 14.3, 7.4, 7.4 Hz, H17), 6.18 (1H, ddd, J = 14.3, 1.3, 1.3 Hz, H18), 5.52 (1H, dddd, J = 10.6, 5.9, 5.9, 1.0 Hz, H15), 5.40 (1H, ddd, J = 15.5, 4.6, 4.6 Hz, H9), 5.12 (1H, br ddd, J = 15.2, 9.3, 5.3 Hz, H10), 3.69 (1H, dd, J = 8.7, 3.4 Hz, H13), 3.59 (1H, br dd, J = 16.7, 5.1 Hz, H8a), 3.40 (1H, ddd, J = 16.8, 2.0, 2.0 Hz, H8b), 2.47-2.41 (2H, m, H16), 2.33 (1H, br dddd, J = 13.5, 6.7, 1.8, 1.8 Hz, H11a), 1.93 (1H, dd, J = 15.0, 10.6 Hz, H14a), 1.84-1.92 (2H, m, H12), 1.79 (1H, ddd, J = 13.6, 9.2, 9.2 Hz, H11b), 1.33 (1H, ddd, J = 15.1, 8.8, 1.0 Hz, H14b), 0.90 (3H, d, J = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 150.5 (d, ${}^{1}J_{CF}$ = 241 Hz), 149.4, 140.7, 136.8 (d, J_{CF} = 5 Hz), 135.9, 132.0, 127.4, 122.3 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 119.0 (d, $J_{CF} = 17$ Hz), 78.4, 73.7, 70.5, 41.4, 38.5, 38.2, 37.4, 35.2, 13.6; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -139.1 (br s); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{19}H_{22}FINaO_4$ (M+Na⁺) 483.0445, found 483.0457.

 4^{-19} F-Salicylihalamide A (**2**) and B (**4**). *N*,*N*'-dimethyl acetamide (DMA) used in this reaction was degassed by frozen-thow methode over 10 times. Rb₂CO₃ (139 mg, 0.60 mmol) in a Schlenk flask was dried by heating with a drier under reduced pressure for 15 min. After cooling to room temperature, copper (I) thiophenecarboxylate (19 mg, 0.10 mmol) was added

in globe box. A solution of (2Z, 4Z)-2,4-heptadienamide 8 (75 mg, 0.60 mmol) and 2.2'-bipyridine (20 mg, 0.12 mmol) in DMA (0.7 mL) which was dried over MS4A, was added and the resulting mixture was immediately degassed over and over again until any bubble was not found. After being stirred for 30 min at room temperature with light shielding, a solution of of 57 (46mg, 0.10 mmol) in DMA (0.7 mL) which was dried over MS4Å was added, and the resulting solution was immediately degassed over and over again until any bubble was not found. After being stirred for 1 h at 90 °C with light shielding, the reaction mixture was diluted with ether at room temperature, and was quenched with pH 7 phosphate buffer at 0 °C. The organic layer was separated, washed with pH 7 phosphate buffer, water and brine, and dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (3:1 to 1:3 hexane/ethyl acetate) to afford the roughly purified substance (29 mg), which was purified by the preparative HPLC to afford 4-¹⁹F-salicylihalamide A (2) (7.1 mg, 0.015 mol, 15%) and 4-¹⁹F-salicylihalamide B (4) (10.1 mg, 0.022 mmol, 22%) as a colorless wax, respectively. HPLC conditions: column: COSMOSIL 5C₁₈-MSII, 10 x 250 mm; detection: 280 nm; flow rate: 2.0 ml/min, eluent: 70:30 MeOH/H₂O, 100 min, 70:30→100:0, 20 min, 100:0, 30 min. The retention times (t_R) of **2** and **4** were 63.4 min and 73.4 min, respectively. **2**: $\lceil \alpha \rceil_D^{28}$ -50.0 (c 0.213, MeOH); $R_f = 0.34$ (1:1 hexane/ethyl acetate); λ_{max} (MeOH) 282 nm ($\epsilon = 26,200$); IR (film) 3281, 2963, 2931, 1691, 1656, 1611, 1492, 1461, 1288, 1248, 1218, 1138, 1081, 1027, 971. 820. 678 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) δ 10.5 (1H, br ,C3-OH), 7.91 (1H, br dd, J =11.5, 11.5 Hz, H22), 7.08 (1H, dd, J = 14.3, 10.6 Hz, H18), 6.72 (1H, dd, J = 9.7, 8.3 Hz, H5), 6.61 (1H, ddd, J=11.5, 11.5, 0.9 Hz, H21), 6.56 (1H, br s, -NH), 6.19 (1H, dd, J=8.3, 4.6 Hz, H6), 5.63 (1H, ddddd, J = 10.9, 7.7, 7.7, 1.3, 1.3 Hz, H23), 5.53 (1H, m, H15), 5.23 (1H, ddd, J = 15.5, 4.7, 4.7 Hz, H9), 5.10 (1H, br d, J = 11.5 Hz, H20), 5.13-5.03 (1H, m, H10), 5.05 (1H, br ddd, J = 14.6, 6.9, 6.9 Hz, H10), 4.85 (1H, ddd, J = 14.3, 7.2, 7.2 Hz, H17), 3.68 (1H, br d, J = 6.0 Hz, H13), 3.37 (2H, m, H8), 2.21 (1H, ddd, J = 14.3, 7.4, 7.4 Hz, H16a), 2.12 (1H, m, H11a), 2.08 (1H, ddd, J = 13.6, 6.0, 6.0 Hz, H16b), 1.97 (2H, tdd, J = 7.6, 7.6, 1.4 Hz, H24), 1.66 (1H, dd, J = 15.0, 9.9 Hz, H14a), 1.65-1.53 (2H, m, H11b and H12), 1.31 (1H, dd, J = 14.6, 9.2 Hz, H14b), 0.83 (3H, d, J = 6.9Hz, H26), 0.77 (3H, t, J = 7.6 Hz, H25); ¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆) δ 169.7 164.2, 160.5, 151.5 (d, ¹J_{CF} = 240 Hz), 141.9, 137.2, 135.8, 130.8, 129.5, 126.0, 124.9, 121.7, 119.7, 117.5, 108.8, 76.0, 71.1, 38.3, 37.6, 36.7, 36.2, 20.8, 14.0, 13.7 (1 of the sp₂ carbons were obserded); ¹⁹F NMR (470 MHz, C₆D₆) δ -138.6 (s);

HRMS (ESI-TOF) m/z calculated for $C_{26}H_{33}FNO_5$ (M+H⁺) 458.2343, found 458.2341. 4: $[\alpha]_{D}^{28}$ -71.0 (c 0.301, MeOH); $R_{f} = 0.34$ (hexane/ethyl acetate = 1/1); λ_{max} (MeOH) 282 nm (ϵ = 22,100); IR (film) 3357, 2964, 2931, 1707, 1654, 1590, 1491, 1274, 1248, 1207, 1170, 1137, 1032, 973, 678 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) δ 7.90 (1H, dd, J = 11.5, 11.4 Hz, H22), 7.71 (1H, br s, -NH), 7.26 (1H, dd, J = 9.9 Hz, H18), 6.72 (1H, dd, J = 9.7, 9.7 Hz, H5), 6.67 (1H, dd, J = 11.7, 11.7 Hz, H21), 6.17 (1H, dd, J = 8.2, 4.6 Hz, H6), 5.63 (1H, br ddd, J = 10.9, 7.9, 7.9 Hz, H23), 5.51 (1H, d, J = 10.9 Hz, H20), 5.36 (1H, m, H15), 5.20-5.08 (2H, m, H9 and H10), 4.65 (1H, ddd, J = 8.3, 8.3, 8.0 Hz, H17), 3.60 (1H, m, H13), 3.34 (1H, br d, J = 15.7Hz, H8a), 3.30 (1H, br d, J = 15.7 Hz, H8b), 2.17 (1H, ddd, J = 14.0, 7.2, 7.2 Hz, H16a), 2.11-2.01 (1H, m, H11a), 2.06 (1H, br d, J = 14.5 Hz, H16b), 1.97 (2H, tdd, J = 7.6, 7.6, 1.4Hz, H24), 1.76 (1H, dd, J = 14.9, 10.0 Hz, H14a), 1.72-1.65 (1H, m, H11b), 1.65-1.55 (1H, m, H12), 1.30 (1H, dd, J = 14.9, 8.9 Hz, H14b), 0.85 (3H, d, J = 6.9Hz, H26), 0.78 (3H, t, J = 7.7Hz, H25); 13 C NMR (125 MHz, C₆D₆) δ 170.0, 164.0, 151.2 (d, ${}^{1}J_{CF}$ = 246 Hz), 142.0, 137.4, 136.7, 131.1, 128.9, 124.9 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 122.2 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 119.6, 118.3 (d, $J_{CF} = 17$ Hz), 105.2, 76.2, 71.3, 38.5, 38.3, 37.8, 36.3, 31.9, 20.8, 14.0, 13.6 (3 of the sp₂ carbons were obserded): ¹⁹F NMR (470 MHz, C_6D_6) δ -138.4 (s); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{26}H_{32}FNNaO_5$ (M+Na⁺) 480.2162, found 480.2162.

Alcohol-biotinated iodoolefin (**85**). To a stirred solution of **83** (6.0 mg, 12 µmol) in dioxane (200 µL), TEA (5.0 µL, 36 µmol) and 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (1.85 µL, 11.9 µmol) was added at room temperature and stirred at 30 °C for 13 h. To the reaction solution, **6** (4.4 mg, 9.9 µmol) and DMAP (4.9 mg, 38 µmol) in dioxane (500 µL) was added at room temperature. After being stirred at 100 °C for 24 h with light shielding, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate, and was quenched with with pH 7 phosphate buffer at room temperature. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (3:1 hexane/ethyl acetate to 9:1 chloroform/methanol) to afford **85** (1.4 mg, 1.5 µmol, 15%) as a white wax (10:3 mixture of **85** and **86a**). **82**: $R_f = 0.65$ (9:1 chloroform/methanol, developed in twice); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.07 (1H, dd, J = 8.2, 7.7 Hz, H5), 6.75 (1H, ddd, J = 14.5 Hz, H18), 5.50-5.41 (1H, m, H10), 5.31 (1H, dd, 1H, dd, J = 7.4 Hz, H6), 6.24 (1H, d, J = 14.5 Hz, H18), 5.50-5.41 (1H, m, H10), 5.31 (1H, dd,

J = 9.3, 3.3 Hz, H13), 5.34-5.26 (1H, m, H9), 5.05 (1H, ddd, J = 8.0, 8.0, 5.3 Hz, H15), 4.41 (1H, ddd, J = 8.0, 5.0, 0.9 Hz, biotin angular proton), 4.23 (1H, dd, J = 8.0, 4.4 Hz, biotin angular proton), 3.71 (2H, td, J = 6.0, 1.0 Hz, PEG linker), 3.62-3.52 (14H, m, H8 and PEG linker), 3.46 (2H, t, J = 5.3 Hz, PEG linker), 3.28 (2H, t, J = 5.4 Hz, PEG linker), 3.13 (1H, 9.0, 5.9, 4.5 Hz, biotin), 2.85 (1H, dd, J = 12.7, 5.0 Hz, biotin), 2.63 (1H, d, J = 12.7 Hz, biotin), 2.58-2.52 (2H, m, PEG linker), 2.40 (1H, dddd, J = 15.0, 6.9, 6.9, 1.5 Hz, H16a), 2.31 (1H, dddd, J = 15.0, 9.0, 5.3, 0.7 Hz, H16b), 2.30-2.22 (1H, m, H11a), 2.15 (2H, t, J = 7.6 Hz, biotin aliphalic linker), 2.13-2.04 (1H, m, H12), 1.78 (1H, ddd, J = 15.4, 15.4, 8.7 Hz, H14a), 1.78-1.47 (6H, m, H11b, H14b and biotin aliphalic linker), 1.37 (2H, dt, 7.3, 7.3 Hz, biotin aliphalic linker), 0.80 (3H, d, J = 6.9 Hz, H26).

Alcohol-biotinated Salicylihalamide B (82b). To a stirred solution of 83 (6.0 mg, 12 µmol) in dioxane (200 µL), TEA (5.0 µL, 36 µmol) and 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (1.85 µL, 11.9 umol) was added at room temperature and stirred at 30 °C for 13 h. To the reaction solution, 6 (4.4 mg, 9.9 µmol) and DMAP (4.9 mg, 38 µmol) in dioxane (500 µL) was added at room temperature. After being stirred at 100 °C for 13 h with light shielding, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate, and was quenched with with pH 7 phosphate buffer at room temperature. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by the preparative HPLC to afford 82b (210 µg, 0.23 µmol, 2%) as a white wax. Its yield was determined by the NMR measurement with 2.07 µmol of DMF coexisting. HPLC conditions: column: COSMOSIL 5C₁₈-MSII, 10 x 250 mm; detection: 280 nm; flow rate: 1.5 ml/min, eluent: 70:30 MeOH/H₂O, 115 min, 70:30-86:14, 10 min, 86:14, 50 min, 86:14-100:0, 10 min, 100:0, 40 min. The retention time ($t_{\rm R}$) of **82b** were 107 min. **82b**: R_f = 0.65 (9:1 chloroform/methanol, developed in twice): ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.26 (1H, dd, J = 12.0, 11.0 Hz, H22), 7.02 (1H, dd, J = 8.3, 7.6 Hz, H5), 6.83 (1H, dd, J = 11.7, 11.6 Hz, H21), 6.71 (1H, ddd, J = 9.2, 1.2, 1.2 Hz, H18), 6.62 (1H, d, J = 8.3 Hz, H4), 6.49 (1H, d, J = 7.6 Hz, H6), 5.82 (1H, br d, J = 12.0 Hz, H20), 5.78 (1H, br dt, J = 11.0, 7.6 Hz, H23), 5.51-5.41 (1H, m, H10), 5.37 (1H, dd, J = 9.0. 3.3 Hz, H13), 5.30 (1H, dddd, J = 15.3, 9.0. 2.0, 2.0 Hz, H9), 5.08 (1H, br ddd, J = 15.2, 6.7, 6.7 Hz, H15), 4.94 (1H, ddd, J = 8.9, 8.9, 7.3 Hz, H17), 4.42 (1H, ddd, J = 7.9, 5.0, 0.9 Hz, biotin angular proton), 4.23 (1H, dd, J = 7.8, 4.3 Hz, biotin angular proton), 3.71 (2H, br t, J =

6.3 Hz, PEG linker), 3.62-3.52 (14H, m, H8 and PEG linker), 3.47 (2H, t, J = 5.4 Hz, PEG linker), 3.29 (2H, t, J = 5.6 Hz, PEG linker), 3.13 (1H, 9.0, 5.9, 4.5 Hz, biotin), 2.86 (1H, dd, J = 12.7, 5.0 Hz, biotin), 2.63 (1H, d, J = 12.7 Hz, biotin), 2.58-2.52 (2H, m, PEG linker), 2.50-2.39 (2H, m, H16), 2.29-2.22 (1H, m, H11a), 2.24 (2H, dtd, J = 7.4, 7.4, 1.3 Hz, H24), 2.15 (2H, t, J = 7.6 Hz, biotin aliphalic linker), 2.13-2.04 (1H, m, H12), 1.82 (1H, dd, J = 14.5, 8.9 Hz, H14a), 1.76 (1H, ddd, J = 14.5, 11.5, 11.5 Hz, H14b), 1.71-1.48 (5H, m, H11b and biotin aliphalic linker), 1.38 (2H, dt, 7.3, 7.3 Hz, biotin aliphalic linker), 0.98 (3H, t, J = 7.4 Hz, H25), 0.80 (3H, d, J = 7.0 Hz, H26).

Biology

Materials. All the chemical used in this study were commercially available special grade ones without further treatment. Water was purified with a Millipore Simpli Laboratory system (Millipore Inc., Bedford, MA) and used within a few hours. The following reagents used in this protocol were as follows: SME buffer (0.3 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM MOPS and pH 7.5 with NaOH), Pepstatin A (10 mg/mL in ethanol), Leupeptin (10 mg/mL in ethanol), reaction medium for proton pump assay (0.3 M sucrose, 40 mM KCl, 5 mM Tricine, and pH 8 with NaOH), 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) (0.1 M in ethanol), Valinomycin (1 mg / mL in ethanol), MgATP (0.1 M aq. and pH 7.5 with NaOH), and Carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) (1 mM in ethanol) , HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions) (137 mM NaCl, 5.3mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 4.2 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 5.6 mM Glucose, 15 mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pH 7.4 with NaOH).

Assay of synthesized salicylihalamides using Simian Kidney Cell. Simian (Cercopithecus aethiops) kidney COS-7 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% fetal calf serum at 37 °C in 5% CO₂/95% air with a CO₂ incubator. The cells were seeded on Poly-L -lysine coated coverslips. After overnight culture, the synthesized salicylihalamide was added into the culture media to give a final concentration of 1 μ M, and incubated at 37 °C for 5 h. Then, the cells were loaded with pH indicator LysoSensor Green DND-189 (Invitrogen, Molecular probes) at a final concentration of 1 μ M. After 1 min, an excess of the indicator was washed out with HBSS. The cells were observed using a fluorescence microscope, and images were acquired using a cooled CCD camera. For typan blue exclusion test, the intact or drug-treated cells were soaked in phosphate buffered saline containing 0.3% trypan blue. The cells were observed with bright-field and phase-contrast microscope.

Preparation of Chromaffin Granule Membranes (CGM) from porcine adrenal glands. Preparation of Chromaffin Granule Membranes (CGM) from porcine adrenal glands was operated according to references, in which the preparation of CGM from bovine adrenal glands was described. The following manipulation was carried out at 4 °C unless otherwise noted. Porcine adrenal glands are obtained from the local meat distributor (IKEDA meat-packing company Co., Ltd., Kyoto, Japan). Thirty to thirty-five adrenal medullae were separated from the cortex by pinching the connecting tissue with pointed forceps. The isolated adrenal medullae were kept at 4 °C in 200 mL of freshly prepared SME buffer containing 5 µg/mL of pepstatin A and leupeptin. The medullae were briefly homogenized in a Waring blender and re-homogenized in the Polytron homogenizer on ice bath. The mixture was filtered through two layers of gauze and the filtrate was kept on ice. The pink-colored filtrate was centrifuged at 2,000 g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 10,000 g for 20 min. The obtained pellet was gently suspended in ca. 25 mL of SME containing the protease inhibitors. The suspension was applied on top of sucrose layers in polyallomer tubes. The bottom layer of 3.0 mL buffer contained 1.8 M sucrose and the top layer of 3.6 mL buffer contained 1.2 M sucrose. The protease inhibitors were added to the each layer just before use. About 4.2 mL of the suspension was applied on the layers in six tubes and centrifuged at 72,000 g for 17 h. The supernatant was removed and the pale pink pellet containing the chromaffin granules was suspended in a small amount of SME containing the protease inhibitors and homogenized with a glass homogenizer. The suspension was poured into 300 mL of the hypotonic solution (10 mM MOPS, pH 7.5 with NaOH, 1.25 mM Na₂ATP, and 1 µg/mL of the protease inhibitors). After vigorous stirring for 1 min, the solution was centrifuged at 3,000 g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 200,000 g for 60 min. The chromaffin granule membranes were obtained as a brownish pink pellet and diluted into 1.8 mL of the MOPS solution (20 mM MOPS, pH 7.5 with NaOH, 25% glycerol, 5 mM Na₂ATP, 5 mM monothioglycerol and 10 µg/mL of the protease inhibitors). The resulting solution contained 4 to 8 mg of the membrane proteins including V-ATPase, judging from both the quantitative determination of the total protein concentration by the BCA assay, and the Western blotting with the antibody against subunit b on V₁ domain of V-ATPase. The prepared CGM was suspended at the protein concentration of 5 mg/mL in the MOPS solution and kept frozen at -80 °C.

Assay of synthetic salicylihalamides in the inhibitory activity against Chromaffin Granule Membrane V-ATPase. The measurement of fluorescence quenching of 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) as an indicator for proton uptake into the membrane vesicles was employed. To a 2 mL of the reaction medium for proton pump assay, chromaffin granule membranes from porcine adrenal glands containing 50 µg of protein, 4.0 µL of 1.0 M ACMA, and 0.67 µL of valinomycin were added, and the resulting solution was incubated at 37 °C for 10 min. A solution of the synthesized salicylihalamide in DMSO (prepared to give 0.1% final concentration of DMSO) was added and incubated at 37 °C for 3 min, then 10 µL of 0.1 M MgATP was added and incubated for 2 min. The proton gradients made by the V-ATPases in the membranes were cancelled by addition of 3.4 µL of 1 mM FCCP. The fluorescence quenching in the presence of MgATP was monitored by a spectrofluorometer with an excitation wavelength of 412 nm and emission at 480 nm. The initial rate of quenching was estimated as the slope of the quenching trace performed on sets of 20 points (20 s of quenching trace) and is expressed as the rate of quenching/min. The proton transport activity is expressed as the percentage versus DMSO-matched controls with standard deviation from triplicate experiments. IC_{50} values were obtained graphically by plotting the percent activity of proton transport versus the log values of the inhibitor concentrations.



- 109 -



- 110 -

.



- 111 -



- 112 -



- 113 -



- 114 -



- 115 -



- 116 -



- 117 -



- 118 -



- 119 -



- 120 -



- 121 -

.



- 122 -



- 123 -



- 124 -



- 125 -



- 126 -



- 127 -



- 128 -



- 129 -



- 130 -



- 131 -



- 132 -



- 133 -



- 134 -




- 136 -





- 138 -



- 139 -



- 140 -





- 142 -



- 143 -



- 144 -



- 145 -



- 146 -



- 147 -









- 151 -



- 152 -



- 153 -



- 154 -







- 157 -





- 159 -



- 160 -







- 163 -



- 164 -



- 165 -



- 166 -



- 167 -





- 169 -



- 170 -

謝辞

本研究は大阪大学大学院理学研究科化学専攻生体分子化学研究室で行なわれたも のであり、本テーマを与えて下さり、研究生活の様々な面で暖かい御指導、御助言を 賜りました村田道雄教授に心から御礼申し上げます。実験操作をはじめとして、本研 究の遂行にあたり直接の御指導、御鞭撻を賜りました大石徹准教授に深く感謝申し上 げます。数々の御助言、御協力を賜りました松森信明、出村哲夫両助教に深く感謝い たします。フッ素化サリシリハラミド類の生物活性試験の御指導、御助言を賜りまし た、本学大学院理学研究科生物専攻膜機能学研究室の松下昌史助教、金澤 浩教授、 此木敬一博士 (現・東北大学大学院農学研究科准教授)に心から感謝申し上げます。よ き先輩として、実験生活のみならず日常生活でも大変お世話になりました蓬台俊宏博 士 (現・住友化学)、葛西佑介博士 (現・東北大学)、土川博史博士 (現・関西学院大学)、 鳥飼浩平博士 (現・東京大学)、丸吉京介博士 (現・第一三共製薬)、渡部浩史博士 (現・ 武田薬品工業)に深く感謝いたします。快適で、明るい雰囲気を作り出して頂いた生 体分子化学研究室の学生の皆様に深く感謝いたします。最後に、大学院での研究室を 経済的に、精神的に支えて下さいました両親に深く感謝致します。

平成 21 年 3 月
公表論文

Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Fluorinated Analogues of Salicylihalamide. Sugimoto, Y.; Konoki, K.; Murata, M.; Matsushita, M.; Kanazawa, H.; Oishi, T. J. Med. Chem. 2009, 52, 798-806.

Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Fluorinated Analogues of Salicylihalamide

Yoshinori Sugimoto, Keiichi Konoki, Michio Murata, Masafumi Matsushita, Hiroshi Kanazawa, and Tohru Oishi*,

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan, Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan

Received October 7, 2008

Salicylihalamide A (SA), a benzolactone enamide compound, possesses potent cytotoxicity against human tumor cell lines. SA is a selective inhibitor of mammalian vacuolar type H⁺-ATPase (V-ATPase), and is distinct from previously known V-ATPase inhibitors such as bafilomycins and concanamycins that do not discriminate between mammalian and nonmammalian V-ATPases. Because of its potent antitumor activity and structural simplicity, SA is a promising candidate for an anticancer drug. Although a number of structure—activity relation studies using synthetic analogues have been reported, no fluorinated derivative of SA has been evaluated even though selective addition of a fluorine atom into a therapeutic small molecule candidate often enhances pharmacokinetic and physicochemical properties. We designed and synthesized fluorinated analogues of SA and evaluated their V-ATPase inhibitory activities. Compared to the natural product, the synthetic analogues were potent V-ATPase inhibitors, suggesting that these analogues are potential drug candidates and potential molecular probes for mode-of-action studies using fluorine-based analytical methods such as ¹⁹F-NMR spectroscopy.

Introduction

Development of antitumor drugs with limited side effects is important for cancer patients undergoing chemotherapy. Although combinatorial chemistry has greatly influenced the drug discovery process,¹ isolation of novel natural products remains important for discovery of lead compounds possessing promising biological profiles.² Salicylihalamide A (SA", 1a) was isolated from the sponge Haliclona sp. (southwestern Australian coast) by Boyd and co-workers in 1997 with the minor component salicylihalamide B (SB, 1b),3 containing a labile enamide linkage connecting a salicylic acid-derived macrolactone core (Figure 1). Since the discovery of SA, a number of structurally similar bioactive compounds that possess a benzolactone enamide moiety have been isolated (Figure 2),⁴ e.g., lobatamides A (2),⁵ apicularenes A (3),⁶ 4 (CJ-12,950),⁷ and oximidines I (5).⁸ SA elicited a unique differential cytotoxicity profile in the human tumor NCI 60-cell line, with a mean panel GI50 value of 15 nM, and mclanoma cell lines showed the highest average sensitivity (GI₅₀ = 7 nM).³ Furthermore, SA was a potent inhibitor of vacuolar H⁺-ATPases (V-ATPases), with an IC₅₀ value less than 1.0 nM against bovine brain V-ATPase.9 The V-ATPases are ubiquitous proton-translocating pumps of eu-

10.1021/im801265e CCC: \$40.75



Figure 1. Structures of salicylihalamide A and B.



Figure 2. Structures of benzolactone enamide class compounds.

karyotic cells located on the membranes of vacuoles, lysosomes, and other components of the endomembrane system, which regulate the pH of the compartments. Numerous physiological processes depend on the activity of V-ATPases, which are implicated as a contributing factor in multiple diseases including osteoporosis and cancer.¹⁰ SA is distinct from previously known V-ATPase inhibitors such as bafilomycins and concanamycins, which do not discriminate between mammalian and nonmam-

© XXXX American Chemical Society

^{*} To whom correspondence should be addressed. Phone: +81-6-6850-5775. Fax: +81-6-6850-5775. E-mail: oishi@chem.sci.osaka-u.ac.jp.

[†] Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University. [‡] Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University.

^a Abbreviations: ACMA, 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine; ATP, adenosine 5'-triphosphate; BCA, bicinchoninic acid; CGM, chromaffin granule membranes; CuTC; copper thiophene-2-carboxylate; dba, dibenzylideneacetone; DDQ, 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone; DEAD, diethyl azodicarboxylate; DMA, *N*,*N*-dimethylacetamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCCP, carbonyl cyanide *p*-triftuoromethoxyphenylhydrazone; F-SA, 4-¹⁹F-salicylihalamide A; F-SB, 4-¹⁹F-salicylihalamide B; GI₅₀, 50% growth inhibition; HEPES, 4-(2hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; IC₅₀, 50% inhibition concentration; MOPS, 3-(*N*morpholino)propanesulfonic acid; NCI, National Cancer Institute; NMP, *N*-methylpyrrolidone; NMR, nuclear magnetic resonance; PMB, *p*-methoxybenzyl; SA, salicylihalamide A; SB, salicylihalamide B; Tf, triftuoromethanesulfonyl; TFP, 2-trifurylphosphine; THF, tetrahydrofuran; V-ATPase, vacuolar type H⁺-ATPase.

B Journal of Medicinal Chemistry, XXXX, Vol. xxx, No. xx



Figure 3. Design and synthetic strategy of fluorinated salicylihalamides.

malian V-ATPases. SA binds to the transmembrane (V_0) domain of V-ATPase at a site different from bafilomycin A₁ and concanamycin A,¹¹ while the precise mode-of-action of SA and structure of the ligand-protein complex have not been elucidated.

Because of the potent antitumor activity and structural simplicity compared with other V-ATPase inhibitors, SA is expected to be a promising anticancer drug candidate.12 Although a number of synthetic studies and structure-activity relation studies have been reported,13 no fluorinated derivatives of SA have been evaluated, while examination of the role of fluorine in medicinal chemistry reveals that selective addition of fluorine into a therapeutic small molecule candidate can enhance pharmacokinetic and physicochemical properties such as metabolic stability and membrane permeability and can increase binding affinity of drug candidates to the target protein.14 Therefore, fluorinated SA may be a promising drug candidate, as well as a possible molecular probe for elucidating the mode-of-action when using fluorine-based analytical methods such as ¹⁹F-NMR spectroscopy. The properties of ¹⁹F (nuclear spin of 1/2, high gyromagnetic ratio, 100% natural abundance, and low background signals in biological systems) make it useful for investigating biological systems.¹⁵ Here, we report the design and synthesis of fluorinated salicylihalamides and evaluation of the V-ATPase inhibitory activity.

Results and Discussion

Chemistry. The compounds, 4^{-19} F-salicylihalamide A (F-SA, **6a**) and B (F-SB, **6b**), were designed as target molecules (Figure 3) because the salicylate moiety is a common structural feature of natural benzoenamide class products, which is considered to be a binding motif toward the target protein, and electrophilic fluorination of phenol derivatives is a versatile synthetic method.¹⁶ However, the utility of introduction of fluorine at C4 position was uncertain because of its proximity to the hydroxy group at C3, which might be involved in hydrogen bonding with the target protein. Fluorinated analogues were synthesized based on previous reports of the total synthesis and synthetic studies of SA¹³ and benzolactone enamide class natural products (Figure 3).^{17–19} The enamide side chain, the most labile moiety of the molecule, was planned to be introduced

Scheme 1^a



^a Reagents and conditions: (a) Cl₂CHCHCl₂, 146 °C, 3 h, **12a**:**12b**:**12c**: **10** = 5:9:1:10; (b) Tf₂O, pyridine, 0 °C, 1 h, **13** (16%, two steps), **14** (27%, two steps); (c) *n*-Bu₃SnCH₂CH=CH₂, $[Pd_2(dba)_3]$ ·CHCl₃, TFP, LiCl, NMP, rt, 18 h, 84%; (d) EtMgBr, CH₂=CHCH₂OH, THF, 0 °C to rt, 18 h, 81%; (e) Mel, K₂CO₃, acetone, 24 h, 92%; (f) Pd(PPh₃)₄, morpholine, THF, 1 h, 85%.

at the final stage by cross-coupling using amide 8,^{13d} and the macrocyclic core was to be constructed by ring-closing metathesis of the diene derived from salicylate derivative 7 and alcohol 9^{13g} by Mitsunobu esterification.²⁰

For synthesis of building block 7, electrophilic fluorination of the salicylate derivative 10²¹ was conducted as shown in Scheme 1. Treatment of 10 with N-fluoro-5-(trifluoromethyl)pyridinium-2-sulfonate 11²² in 1,1,2,2-tetrachloroethane at 146 °C for 3 h afforded a mixture of monofluorinated 12a and 12b, difluorinated 12c, and recovered 10 in ca. 5:9:1:10 ratio. The mixture was separated by silica gel column chromatography as a mixture of 12a and 10, and 12b and 12c, respectively. The mixture of 12a and 10 was treated with Tf2O in pyridine to afford triflate 13 (16%, 2 steps), which was separated from 14.23 According to De Brabander's procedure,13a triflate 13g was converted to carboxylic acid 7 via (i) Stille coupling of triflate 13 with allylstannane, (ii) transesterification of 15 with removal of the acetonide by treatment with alkoxide generated from allyl alcohol and ethylmagnesium bromide, (iii) protection of the resulting phenol 16 as a methyl ether 17, and (iv) conversion of the allyl ester to carboxylic acid 7 through the action of a palladium catalyst.

Then, the coupling of the fragments was performed as shown in Scheme 2. Condensation of carboxylic acid 7 with secondary alcohol 9 under Mitsunobu esterification conditions using DEAD/PPh₃ afforded diene 18. Ring-closing metathesis of the diene by the action of Grubbs catalyst²⁴ resulted in the formation of macrocycle 19 (E:Z = 10:1). Removal of the PMB group followed by Dess-Martin oxidation of the resulting alcohol 20 gave an aldehyde, which was converted to iodoolefin 21 by Takai olefination²⁵ under modified conditions reported by Evans.²⁶ Removal of the methyl group with BBr₃ gave key intermediate 22 for the coupling reaction to construct the enamide moiety,²⁷ which is the most critical step in the present synthesis. Prior to the synthesis of fluorinated analogues, coupling of counterpart 23^{13f} with amide 8 giving natural SA was examined. After considerable experimentation according to Fürstner's procedure^{13f} and modification by Panek,^{18a} coupling of iodoolefin 23 with amide 8 was achieved by treatment

Scheme 2^a



"Reagents and conditions: (a) DEAD, PPh₃, Et₂O, rt, 36 min, 91%; (b) $(PCy_3)_2Cl_2Ru=CHPh$, CH_2Cl_2 , rt, 21 min, 90%; (c) DDQ, CH_2Cl_2/H_2O , 0 °C to rt, 53 min, 97%; (d) Dess-Martin periodinane, CH_2Cl_2 , 0 °C to rt, 65 min; (e) $CrCl_2$, CHI_3 , dioxane, THF, rt, 26 h 80% (two steps); (f) BBr₃, CH_2Cl_2 , -78 °C, 1 h, 74%; (g) 8, CuTC, 2,2'-bipyridine, Rb₂CO₃, DMA, 90 °C, 60 min, 1a (23%), 1b (26%); (h) 8, CuTC, 2,2'-bipyridine, Rb₂CO₃, DMA, 90 °C, 60 min, 6a (15%), 6b (22%).

with copper thiophene-2-carboxylate $(CuTC)^{28}$ in the presence of Rb₂CO₃ and 2,2'-bipyridine in *N*,*N*-dimethylacetamide (DMA) at 90 °C for 60 min to afford a mixture of *E*,*Z*-isomers of the enamide moiety in ca. 1:1 ratio. The mixture of enamide moiety isomers was purified by HPLC to afford SA (1a, 23%) and SB (1b, 26%), whose physical data were identical to reported values.³ Note that the use of exhaustively degassed solvent (DMA) is essential for a successful coupling reaction. Although nearly equal amounts of isomers formed in contrast to the previous report, ^{136,18a,27} it is advantageous for structure—activity relation studies to obtain a significant amount of SB, which was isolated as a minor compound. In an analogous sequence, fluorinated analogues were synthesized and purified by HPLC to afford F-SA (**6a**, 15%) and F-SB (**6b**, 22%).

Biological Results and Discussion. V-ATPase inhibitory activity of fluorinated analogues F-SA (6a) and F-SB (6b), as well as synthetic SA (1a) and SB (1b), were evaluated in cultured simian renal cells (COS-7) and chromaffin granule membranes prepared from porcine adrenal glands by monitoring a pH change visualized by fluorescent dyes.

1. Imaging Assays Using Simian Renal Cells (COS-7). The effect of salicylihalamides was examined on the luminal pH of intracellular acidic compartments (lysosomes), which were acidified prominently by the proton pumping activity of V-ATPase. Simian renal cells (COS-7)²⁹ were incubated with salicylihalamides SA (1a) and SB (1b), and 4-¹⁹F-salicylihalamides, F-SA (6a) and F-SB (6b), at a concentration of 1 μ M for 5 h. Then, the cells were incubated with the pH indicator LysoSensor Green (1 μ M) for 1 min.³⁰ As shown in Figure 4A, lysosomes of intact cells emitted significant fluorescence,

Journal of Medicinal Chemistry, XXXX, Vol. xxx, No. xx C



Figure 4. Change in pH of acidic organelles (lysosomes) of simian renal cells (COS-7) induced by salicylihalamides: (A) control; (B) salicyclihalamide A (SA, **1a**), 1 μ M; (C) SA; (D) salicyclihalamide B (SB, **1b**), 1 μ M; (E) SB; (F) 4-¹⁹F-salicylihalamide A (F-SA, **6a**), 1 μ M; (G) F-SA; (II) 4-¹⁹F-salicylihalamide B (F-SB, **6b**), 1 μ M; (I) F-SB; Change in pH was visualized by fluorescence microscopy using LysoSensor Green. The panels B and C, D and E, F and G, and H and I were the results of duplicate experiments. The fluorescent intensity (arbitrary unit) is indicated in pseudocolor as shown in the color scale on the top-right. Asterisks denote the nuclei of the cells. Scale bar, 20 μ m.



Figure 5. Concentration-dependent inhibition of H⁺ transport activity of V-ATPase (from porcine adrenal glands) by synthetic salicylihalamides.

indicating that these organelles were highly acidified. When the cells were treated with SA (Figure 4B,C) or SB (Figure 4D,E), fluorescence diminished, reflecting an increase in pH in these organelles by inhibition of V-ATPase. To assess the viability, the trypan blue dye exclusion test was also performed after the drug treatment, and the results suggested that the viability was not affected by the drug treatment at this time point (data not shown). As expected, not only F-SA (Figure 4F,G) but also F-SB (Figure 4H,I) also actively inhibited the proton pump.

2. Quantitative Assays Using Chromaffin Granule Membranes. Although V-ATPase inhibitory activity is commonly evaluated by measuring ATP-dependent proton uptake into isolated chromaffin granules from bovine adrenal glands,³¹ chromaffin granules from porcine adrenal glands were used in this study due to short supply of fresh bovine tissue. Proton uptake into the membrane vesicles was measured by monitoring the fluorescence quenching of the 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA)^{31,32} employed as an indicator. The activity of synthetic SA and SB, as well as fluorinated analogues F-SA and F-SB, were evaluated (Figure 5), and the results are summarized in Table 1. SA elicited potent inhibitory activity with an IC₅₀ value of approximately ≤ 1 (0.7) nM, comparable

D Journal of Medicinal Chemistry, XXXX, Vol. xxx, No. xx

Table 1. Inhibition of H⁺ Transport Activity of V-ATPase (from Porcine Adrenal Glands) by Synthetic Salicylihalamides^a

entry	compound	IC ₅₀ /nM
1	1a (SA)	<1 (0.7)
2	6a (F-SA)	2
3	1b (SB)	30
4	6b (F-SB)	10

^a IC₅₀ values are the average of three experiments.

to reported values. As expected, F-SA acted as a potent inhibitor of V-ATPase (IC₅₀ = 2 nM), but was slightly less potent than SA. Since the V-ATPase inhibitory activity of SB has not been reported (SB was isolated as minor compound: ~0.5 mg), the IC₅₀ value of be approximately 30 nM was determined for the first time. This value indicates that SB is 30 times less potent than SA. Note that the activity of F-SB was comparable to that of the corresponding natural product (IC₅₀ = 10 nM).

Conclusions

In conclusion, 4-19F-salicylihalamide A (F-SA) and B (F-SB) were synthesized through electrophilic fluorination of the salicylate derivative, ring-closing metathesis for the construction of the macrocyclic core, and cross-coupling reaction for installation of the enamide side chain. The V-ATPase inhibitory activity of synthetic salicylihalamides was evaluated both in vivo and in vitro using cultured simian renal cells (COS-7) and chromaffin granule membranes prepared from porcine adrenal glands, respectively. The F-SA was a potent V-ATPase inhibitor $(IC_{50} = 2 \text{ nM})$ comparable to SA (<1 nM), suggesting that the fluorinated analogue is a promising drug candidate and a potential probe for mode-of-action studies using fluorine-based analytical methods. In this study, the previously unknown IC_{50} value of SB was estimated to be 30 nM and that of F-SB (10 nM) was comparable to SB. Further studies on the antitumor activity of fluorinated salicylihalamides and mode-of-action studies based on ¹⁹F-NMR are currently in progress in our laboratory.

Experimental Section

Chemistry. General Procedures. All the solvents and chemicals were used without further treatment unless otherwise stated. The following solvents and chemicals used were purified by distillation over the drying agents indicated in parentheses and were transferred under argon atmosphere: THF, Et₂O and 1,4-dioxane (Mg/benzophenone), 1,1,2,2-tetrachloroethane, pyridine, triethylamine, and morpholine (CaH₂), dichloromethane (LiAlH₄), allyl alcohol (Mg). N-methylpyrrolidone (NMP) was dried over activated MS4A for 3 days and distilled. N,N'-dimethyl acetamide (DMA) was distilled over di-n-butyltin dilaurilate, redistilled over CaH2 under reduced pressure, and stocked in the presence of activated MS4A. Before use, the DMA was degassed by freeze-thaw method over 10 times. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using E. Merck silica gel 60 F₂₅₄ precoated plates (0.25-mm thickness). For column chromatography, Kanto silica gel 60N (spherical, neutral, 100-210 μ m), and Merck silica gel 60 (40-63 μ m, for flash column chromatography) were used. Optical rotations were recorded on a JASCO P-1010 polarimeter. IR spectra were recorded on a JASCO FT-IR-300E Fourier transform infrared spectrometer. ¹H, ¹³C, and ¹⁹F-NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-GSX500 or JNM-ECA500 spectrometer. Chemical shifts of 'H and ¹³C NMR are reported in ppm from tetramethylsilane with reference to internal residual solvent ['H NMR, CHCl₃ (7.24), C₆HD₅ (7.15), CHDCl₂ (5.29); ¹³C NMR, CDCl₃ (77.0), C₆D₆ (128)], chemical shifts of ¹⁹F NMR are reported in ppm with reference to CF₃COOH (-76.5) in D₂O. The following abbreviations are used to designate the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, and m = multiplet. High resolution mass spectra (HRMS) were

recorded on an AB QSTAR Elite under ESI-TOF conditions. Combustion elemental analyses were performed using Yanaco CHN CORDER MT-3.

8-Fluoro-5-trifluoromethanesulfonyloxy-2,2-dimethyl-4Hbenzo[d][1,3]dioxin-4-one (13). To the 300 mL two-necked flask charged with N-fluoro-5-(trifluoromethyl)pyridinium-2-sulfonate 11 (3.98 g, 16.2 mmol) was added a solution of 5-hydroxy-2.2dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one 10 (3.73 g, 19.4 mmol) in dry 1,1,2,2-tetrachloroethane (49 mL), and the resulting mixture was refluxed for 4 h with light shielding. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with dichloromethane (90 mL), quenched with saturated aqueous Na₂S₂O₃ at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, pH 7.0 phosphate buffer solution and brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (50:1 to 5:1 hexane/ethyl acetate) to afford a mixture of 12a and recovered 10 containing 1,1,2,2-tetrachloroethane, and a mixture of 12b and 12c. 12a: $R_f = 0.40$ (10:1 hexane/ethyl acetate, developed in twice); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.99 (1H, br s), 7.26 (1H, dd, J =9.7, 9.7 Hz), 5.98 (1H, dd, J = 9.2, 3.4 Hz), 1.78 (6H, s). 12b: $R_{\rm f}$ 0.36 (10:1 hexane/ethyl acetate, developed in twice); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.3 (1H, br s), 7.24 (1H, dd, J = 9.7, 9.7 Hz), 6.37 (1H, dd, J = 8.6, 2.9 Hz), 1.73 (6H, s); ¹H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ 10.3 (1H, br s), 7.25 (1H, dd, J = 10.9, 6.0 Hz), 6.39 (1H, dd, J = 9.2, 3.4 Hz), 1.70 (6H, s). 8c: R_f 0.36 (hexane/ethyl acetate = 10/1, developed in twice); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.98 (1H, br s), 7.18 (1H, dd, J = 10.0, 10.0 Hz), 1.78 (6H, s); ¹H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ 9.96 (1H, br s), 7.20 (1H, dd, J =10.3, 10.3 Hz), 1.76 (6H, s).

To a solution of 12a and 10 in pyridine (18 mL), trifluoromethanesulfonic anhydride (11.0 mL, 2.09 mmol) was added dropwise at 0 °C, and the mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ at 0 °C and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous NH4Cl, water, and brine, dried over MgSO4, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (30:1 to 10:1 hexane/ethyl acetate) to afford 13 (1.07 g, 3.11 mmol, 16%, two steps) as a colorless solid which was separated from 14 (1.71 g, 5.25 mmol, 27%, two steps). 13: $R_f = 0.18$ (10:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 3092, 2986, 1749, 1632, 1497, 1419, 1403, 1395, 1381, 1319, 1301, 1286, 1264, 1229, 1219, 1182, 1141, 1068, 1033, 979, 907, 856, 828, 649, 593 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (1H, t, J = 9.0 Hz), 6.95 (1H, dd, J = 9.2, 3.6 Hz), 1.80 (6H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 156.1 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 150.4 (d, ${}^{1}J_{CF} = 254$ Hz), 145.7 (d, $J_{CF} = 15$ Hz), 143.9 (d, $J_{CF} =$ 4 Hz), 122.2 (d, $J_{CF} = 19$ Hz), 118.7 (d, ${}^{1}J_{CF} = 312$ Hz, -CF₃), 110.0, 108.0, 25.5; 19 F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ 132.4 (dd, J =8.9, 4.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C11H8F4NaO6S (M + Na⁺) 366.9875, found 366.9877.

8-Fluoro-5-(2-propenyl)-2,2-dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-one (15). Lithium chloride (395 mg, 9.33 mmol) in a Schlenk flask was dried by being heated under reduced pressure. Tris-(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)-methylene chloride complex (166 mg, 0.16 mmol), tris(2-furyl)phosphine (74.3 mg, 0.32 mmol), and N-methylpyrrolidone (2.2 mL) were added to the flask, and a solution of 13 (1.07 g, 3.11 mmol) in N-methylpyrrolidone (4.0 mL) was added and then stirred at room temperature for 12 min. To the stirred solution, allyl tri-n-buthyltin (1.14 mL, 3.73 mmol) was added dropwise at 0 °C. After being stirred at room temperature for 8 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous KF at 0 °C, the resulting precipitates were removed filtration, and the filtrate was extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous KF, water, brine, dried over MgSO4, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (20:1 to 10:1 hexane/ ethyl acetate) to afford 15 (620 mg, 2.62 mmol, 84%) as a pale greenish-yellow oil. $R_f = 0.50$ (5:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2956, 2924, 1740, 1639, 1616, 1594, 1503, 1465, 1429, 1391, 1381, 1281, 1262, 1204, 1150, 1065, 1030, 997, 982, 911, 823 cm⁻¹; ¹H

NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.24 (1H, dd. J = 9.6, 8.6 Hz), 6.88 (1H, dd, J = 8.6, 4.7 Hz), 5.98 (1H, ddt, J = 16.9, 10.3, 6.5 Hz), 5.04 (1H, ddd, J = 10.2, 2.9, 1.3 Hz), 5.01 (1H, ddd, J = 17.1, 3.3, 1.7 Hz), 3.82 (2H, d, J = 6.4 Hz), 1.73 (6H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.2 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 149.7 (d, ${}^{1}J_{CF} = 247$ Hz), 145.1 (d, $J_{CF} = 13$ Hz), 140.1 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 136.4, 124.0 (d, $J_{CF} = 6$ Hz), 121.6 (d, $J_{CF} = 17$ Hz), 116.2, 113.6, 106.3, 37.7, 25.6; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -138.5 (dd, J = 9.9, 4.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) *m*/z calcd for C₁₃H₁₃F₄NaO₃ (M + Na⁺) 259.0746, found 259.0747.

3-Fluoro-2-hydroxy-6-(2-propenyl)benzoic Acid 2-Propenyl Ester (16). To a solution of 2-propene-1-ol (1.40 mL, 20.6 mmol) in THF (1 mL), a solution of ethylmagnesium bromide in THF (0.49 M, 21.1 mL, 10.3 mmol) was added dropwise at 0 °C, and the resulting solution was stirred at room temperature for 20 min. To the reaction mixture, a solution of 15 (610 mg, 2.58 mmol) in THF (3 mL) was added dropwise at 0 °C. After being stirred at room temperature for 17 h, the reaction mixture was diluted with ether, quenched with aqueous NH4Cl at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous NH4Cl, water, and brine, dried over MgSO4, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (40:1 to 10:1 hexane/ethyl acetate) to afford 16 (494 mg, 2.09 mmol, 81%) as a pale greenish-yellow oil. $R_{\rm f}$ = 0.37 (20:1 hexane/ethyl acetate, developed in twice); IR (film) 3080, 2982, 1734, 1669, 1615, 1595, 1490, 1432, 1373, 1307, 1251, 1171, 1143, 983, 918, 822, 811, 797, 767 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz. CDCl₃) δ 11.1 (1H, s), 7.14 (1H, dd, J = 9.8; 8.7 Hz), 6.66 (1H, dd, J = 8.4, 5.0 Hz), 6.01 (1H, ddt, J = 17.2, 10.5, 6.0 Hz), 5.92 (1H, ddt, J = 17.0, 10.2, 6.3 Hz), 5.42 (1H, dd, J = 17.0, 2.6 Hz),5.34 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.00 (1H, dd, J = 10.2, 3.0 Hz), 4.92 (1H, dd, J = 17.0, 3.4 Hz), 4.86 (2H, dt, J = 6.0, 1.4 Hz), 3.64 (2H, br d, J = 6.2 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.4 (d, $J_{CF} = 2$ Hz), 151.0 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 150.4 (d, ${}^{1}J_{CF} = 243$ Hz), 137.7 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 137.3, 131.0, 121.2 (d, $J_{CF} = 6$ Hz), 121.2 (d, $J_{CF} = 6$ Hz), 120.1 (d, $J_{CF} = 13$ Hz), 120.0, 115.6, 66.8, 39.7; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -138.8 (dd, J = 9.9, 4.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{13}H_{13}F_4NaO_3$ (M + Na⁺) 259.0746, found 259.0759.

3-Fluoro-2-methoxy-6-(2-propenyl)benzoic Acid 2-Propenyl Ester (17). To a solution of 16 (481 mg, 2.04 mol) in acetone (4.0 mL), potassium carbonate (366 mg, 2.65 mmol), and methyl iodide (1.27 mL, 20.4 mmol) were added. After being stirred at room temperature for 23 h, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (20:1 hexane/ethyl acetate) to afford 17 (471 mg, 1.88 mmol, 93%) as a pale greenish-yellow oil. $R_f = 0.65$ (20:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2982, 2944, 1734, 1640, 1606, 1490, 1458, 1421, 1359, 1277, 1195, 1160, 1134, 1105, 1043, 986, 922, 820, 734 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.05 (1H, dd, J =11.2, 8.5 Hz), 6.86 (1H, dd, J = 8.5, 4.5 Hz), 5.99 (1H, ddt, J =17.2, 10.5, 5.9 Hz), 5.85 (1H, ddt, J = 16.9, 10.2, 6.6 Hz), 5.41 (1H, ddd, J = 17.2, 2.9, 1.4 Hz), 5.28 (1H, ddd, J = 10.3, 2.4, 1.3)Hz), 5.04 (1H, ddd, J = 10.2, 3.0, 1.3 Hz), 5.02 (1H, ddd, J =16.9, 3.4, 1.7 Hz), 4.79 (2H, dd, J = 5.9, 1.4 Hz), 3.92 (3H, d, J = 1.9 Hz, -OMe), 3.32 (2H, br d, J = 6.7 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.5 (d, J_{CF} = 4 Hz), 153.6 (d, ${}^{1}J_{CF}$ = 246 Hz), 144.7 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 136.0, 133.7 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 131.7, 129.1, 124.7 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 119.1, 117.9 (d, $J_{CF} = 19$ Hz), 116.5, 66.1, 62.0 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 37.0; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -133.5 (br ddq, J = 11.1, 4.5, 1.8 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₁₄H₁₅FNaO₃ (M + Na⁺) 273.0903, found 273.0929.

3-Fluoro-2-methoxy-6-(2-propenyl)benzoic Acid (7). To a flask charged with tetrakis(triphenylphosphine)palladium (8.3 mg, 7.2 μ mol), a solution of 17 (18.0 mg, 71.9 μ mol) in THF (2.3 mL), followed by morpholine (62.7 μ L, 0.72 mmol), was added dropwise. After being stirred at room tempeature for 1 h, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (1:1 hexane/ethyl acetate, containing 0.05% HCOOH) to afford 7 (12.9 mg, 61.2 μ mol, 85%) as a colorless oil. $R_{\rm f} = 0.44$ (1:1 hexane/ethyl acetate); ¹H NMR

(500 MHz, CDCl₃) δ 7.10 (2H, dd, J = 11.2, 8.3 Hz), 6.92 (2H, dd, J = 8.6, 4.6 Hz), 5.90 (1H, ddt, J = 17.0, 10.0, 6.3 Hz), 5.05 (1H, d, J = 10.3 Hz), 5.04 (1H, d, J = 17.2 Hz), 3.98 (3H, d, J = 1.7 Hz), 3.47 (2H, br d, J = 6.9 Hz); IR (film) 3503, 2946, 2654, 2361, 1707, 1640, 1606, 1559, 1491, 1462, 1425, 1280, 1199, 1164, 1141, 1042, 994, 968, 921, 820, 768, 708, 668 cm⁻¹; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.7, 153.7 (d, ¹ $J_{CF} = 246$ Hz), 145.1 (d, $J_{CF} = 13$ Hz), 136.0, 134.4 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 127.6, 125.1 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 118.6 (d, $J_{CF} = 18$ Hz), 116.7, 62.2 (d, $J_{CF} = 6$ Hz), 37.3; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -133.1 (br dq, J = 10.8, 2.2 Hz); HRMS (ESI-TOF) *m*/z calculated for C₁₁H₁₀FO₃ (M-H⁻) 209.0613, found 209.0639.

3-Fluoro-2-methoxy-6-(2-propenyl)-benzoic acid (1S,3R,4S)-3-(methoxymethoxy)-1-[2-[(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-4methyl-6-heptenyl Ester (18). To a stirred solution of triphe-nylphosphine (254 mg, 0.97 mmol), 7 (0.86 mmol), and 9 (254 mg, 0.72 mmol) in ether (3.6 mL), DEAD (40% in toluene, 0.44 mL, 0.97 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 36 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH4Cl at 0 °C and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous NH4Cl, water, and brine, dried over MgSO4, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (10:1 to 5:1 hexane/ethyl acetate) to afford 18 (368 mg, 0.68 mmol, 91%) as a pale greenish-yellow oil. $[\alpha]_D^{27} + 3.63$ (c 0.32, CHCl₃); $R_f = 0.50$ (3:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2935, 1727, 1640, 1613, 1514, 1490, 1458, 1442, 1421, 1362, 1275, 1248, 1197, 1173, 1155, 1139, 1097, 1039, 995, 975, 917, 820 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (2H, d. J = 8.6 Hz), 7.03 (1H, dd, J = 11.2, 8.5 Hz), 6.87-6.82 (3H, m), 5.88 (1H, ddt, J = 17.0, 10.2, 6.4 Hz), 5.71 (1H, ddt, J = 17.0, 10.0, 7.0Hz), 5.42 (1H, dddd, J = 6.2, 6.0, 6.0, 6.0, 6.0 Hz, H15), 5.05 (1H, dd, J = 10.2, 3.0 Hz), 5.00 (1H, dd, J = 17.0, 3.3 Hz), 4.94(1H, dd, J = 17.2, 3.2 Hz), 4.90 (1H, dd, J = 10.0, 1.9 Hz), 4.68(1H, d, J = 6.9 Hz), 4.66 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.45 (1H, d, J =11.5 Hz), 4.41 (1H, d, J = 11.5 Hz), 3.90 (3H, d, J = 2.0 Hz, -OMe), 3.78 (3H, s), 3.61 (1H, ddd, J = 9.5, 8.4, 5.9 Hz, H17a), 3.60 (1H, dt, J = 10.0, 3.6 Hz, H13), 3.55 (1H, ddd, J = 9.5, 6.9)6.9 Hz, H17b), 3.38 (3H, s), 3.30 (2H, br d, J = 6.4 Hz), 3.30 (2H, br d, J = 6.4 Hz), 2.05 (1H, ddd, J = 13.9, 6.6 Hz, H11a), 2.03 (1H, ddd, J = 14.0, 6.0 6.0 Hz, H16a), 1.97 (1H, ddd, J = 14.0, 6.9, 5.7 Hz, H16b), 1.93-1.85 (1H, m, H12), 1.80 (1H, ddd, J = 13.9, 8.6, 7.9 Hz, H11b), 1.73-1.69 (2H, m, H14), 0.87 (3H, d, J = 6.7 Hz); $^{13}\mathrm{C}$ NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.6, 159.1, 153.4 (d, ${}^{1}J_{CF} = 246$ Hz), 144.3 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 137.1, 136.2, 133.3 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 130.5, 129.6, 129.3, 124.5 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 117.7 (d, $J_{CF} = 17$ Hz), 116.6, 115.9, 113.7, 96.7, 78.2, 72.7, 71.3, 66.4, 61.7 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 55.8, 55.3, 37.5, 36.7, 36.3, 35.3, 35.1, 13.7; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -133.6 (br ddq, J = 10.8, 4.5, 1.8 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{31}H_{41}FNaO_7$ (M + Na⁺) 567.2734, found 567.2731.

(3S,5R,6S,8E)-3,4,5,6,7,10-Hexahydro-13-fluoro-14-methoxy-5-(methoxymethoxy)-3-[2-[(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-6methyl-1H-2-benzoxacyclododecin-1-one (19). To a flask charged with dichloromethane (18 mL) under vigorous stirring, a solution of 18 (358 mg, 0.66 mmol) in dichloromethane (67 mL) and (Cy₃P)₂Cl₂Ru=CHPh (41 mg, 0.0495 mmol) in dichloromethane (63 mL) were added simultaneously at room temperature over 26 min, and the resulting solution was stirred at room temperature for 21 min. The reaction was quenched with triethylamine (3.2 mL), exposed to air for 13 h with vigorous stirring, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (10:1 to 5:1 hexane/ethyl acetate) to afford 19 (306 mg, 0.59 mmol, 90%) as a pale-gray oil (10:1 mixture of E:Z isomers at C9). $[\alpha]_D^{26}$ -44.5 (c 0.21, CHCl₃); $R_f =$ 0.28 (3:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2954, 2933, 1725, 1613, 1587, 1514, 1489, 1456, 1417, 1359, 1275, 1248, 1207, 1173, 1155, 1142, 1099, 1067, 1040, 975, 917, 822 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (2H, d. J = 8.6 Hz), 6.97 (1H, dd, J = 11.3, 8.3Hz), 6.85 (2H, d. J = 8.6 Hz), 6.78 (1H, dd, J = 8.4, 4.5 Hz), 5.50-5.40 (2H, m, H15 and H10), 5.29 (1H, ddt, J = 15.2, 9.5,

F Journal of Medicinal Chemistry, XXXX, Vol. xxx, No. xx

2.2 Hz, H9), 4.84 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.76 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.45 (2H, s), 4.06 (1H, dd, J = 9.5, 3.7 Hz, H13), 3.82 (3H, d, J = 1.9 Hz), 3.78 (3H, s), 3.63 (1H, br dd, J = 16.4, 10.0 Hz, H8a), 3.61 (2H, t,dd, J = 6.7, 6.7 Hz, H17), 3.41 (3H, s), 3.28 (1H, ddt, J = 16.4, 4.6, 2.6 Hz, H8b), 2.28 (1H, br ddd, J = 14.0, 5.7, 3.3Hz, H11a), 2.17-2.06 (1H, m, H12), 2.01 (1H, dddd, J = 14.2, 8.3, 6.0, 6.0 Hz, H16a), 1.90 (1H, dddd, J = 14.2, 7.2, 7.2, 4.6 Hz, H16b), 1.72 (1H, dd, J = 15.6, 8.9 Hz, H14a), 1.68 (1H, dd, J = 14.1, 11.6 Hz, H11b), 1.46 (1H, dd, J = 15.5, 9.5, H14b), 0.84 (3H, d, J = 6.9); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.9, 159.1, 153.6x (d, ${}^{1}J_{CF} = 246$ Hz), 144.7 ($J_{CF} = 12$ Hz), 134.1, 131.5 (J_{CF} = 2 Hz), 130.6, 130.2, 129.1, 128.3, 125.5 ($J_{CF} = 7$ Hz), 117.1 $(J_{CF} = 19 \text{ Hz}), 113.7, 96.8, 79.3, 72.8, 72.6, 66.3, 61.6 (J_{CF} = 7)$ Hz), 55.6, 55.3, 37.7, 37.3, 36.4, 35.5, 34.0, 13.4; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -133.0 (br ddq, J = 11.7, 4.5, 1.8 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C29H37FNaO7 (M + Na⁺) 539.2421, found 539.2426

(3S,5R,6S,8E)-3,4,5,6,7,10-Hexahydro-3-(2-hydroxyethyl)-13fluoro-14-methoxy-5-(methoxymethoxy)-6-methyl-1H-2-benzoxacyclododecin-1-one (20). To a solution of 19 (296 mg, 0.57 mmol) and water (0.57 mL) in dichloromethane (11 mL), 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (182 mg, 0,80 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 53 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO3 and saturated aqueous Na₂S₂O₃ at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (3:1 to 1:1 hexane/ethyl acetate) to afford 20 (220 mg, 0.55 mmol, 97%) as a pale bright-yellow oil (10:1 mixture of *E:Z* isomers at C9). $[\alpha]_D^{27}$ -37.8 (c 0.26, CHCl₃); $R_f = 0.29$ (1:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 3441, 2954, 1725, 1605, 1489, 1457, 1417, 1382, 1348, 1275, 1231, 1197, 1155, 1142, 1102, 1041, 975, 917, 822, 717 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.98 (1H, dd, J = 11.5, 8.5 Hz), 6.80 (1H, dd, J = 8.4, 4.5 Hz), 5.48 (1H, dddd, J = 8.5, 8.5, 4.7, 4.7 Hz, H15), 5.46 (1H, ddt, J = 15.2, 11.5, 2.6Hz, H10), 5.30 (1H, ddt, J = 15.2, 9.6, 2.2 Hz, H9), 4.85 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.80 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.08 (1H, dd, J = 9.4, 3.4 Hz, H13), 3.92 (3H, d, J = 2.0 Hz), 3.82 (1H, ddd, J = 11.6, 7.7, 4.4 Hz, H17a), 3.75 (1H, ddd, J = 11.2, 6.0, 5.3 Hz, H17b), 3.63 (1H, dd, J = 16.5, 9.6 Hz, H8a), 3.43 (3H, s), 3.29 (1H, dddd, J =16.5, 4.2, 2.4, 2.4 Hz, H8b), 2.29 (1H, ddd, J = 14.4, 5.6, 3.2 Hz, H11a), 2.18-2.07 (1H, m, H12), 1.94 (1H, dddd, J = 14.5, 9.5, 5.9, 4.4 Hz, H16a), 1.84 (1H, dddd, J = 14.4, 7.7, 4.7, 4.7 Hz, H16b), 1.75 (1H, dd, J = 15.6, 8.2 Hz, H14a), 1.69 (1H, ddd, J =14.3, 11.6, 11.6 Hz, H11b), 1.46 (1H, dd, J = 15.6, 9.3 Hz, H14b), 0.85 (3H, d, J = 6.7 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 167.1 (d, $J_{CF} = 2$ Hz), 153.5 (d, ${}^{1}J_{CF} = 247$ Hz), 144.3 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 134.1 (d, $J_{CF} = 3$ Hz), 131.6, 129.9, 128.2, 125.7 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 117.3 (d, $J_{CF} = 19$ Hz), 97.0, 73.5, 61.9 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 59.4, 55.6, 38.9, 37.6, 37.3, 35.5, 34.1, 13.4; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) $\delta - 132.8$ (ddq, J = 11.7, 4.5, 1.8 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{21}H_{29}FNaO_6$ (M + Na⁺) 419.1846, found 419.1861.

(3S,5R,6S,8E)-3,4,5,6,7,10-Hexahydro-13-fluoro-3-(3-iodo-2propenyl)-14-methoxy-5-(methoxymethoxy)-6-methyl-1H-2-benzoxacyclododecin-1-one (21). To a solution of 20 (211 mg, 0.53 mmol) in dichloromethane (11 mL) Dess-Martin periodinane (339 mg, 0,80 mmol) was added at 0 °C. After being stirred at room temperature for 73 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO3 and saturated aqueous Na2S2O3 at 0 °C, and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated, and concentrated under reduced pressure to afford aldehyde as a pale bright-yellow oil, which was used in the next reaction without further purification. Chromium chloride(II) (782 mg, 6.36 mmol) was dried by being heated with flame under reduced pressure for 15min. To a suspension of the chromium chloride(II) in THF (4.6 mL), a solution of the aldehyde and iodoform (835 mg, 2.12 mmol) in dioxane (27.6 mL) was added at 0 °C to give a reddishbrown suspension. After being stirred at room temperature for 26 h with light shielding, the reaction mixture was diluted with ether

(32 mL), and the suspension was poured into a mixture of ether (12 mL) and water (36 mL) at 0 °C. The organic layer was separated, washed with saturated aqueous Na2S2O3, saturated aqueous NaHCO₃, water, and brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (15:1 to 5:1 hexane/ ethyl acetate) to afford 21 (221 mg, 0.43 mmol, 80%) as a paleyellow oil (3.3:1 mixture of E:Z isomers at C17). $[\alpha]_D^{27}$ -84.5 (c 0.21, CHCl₃); $R_f = 0.49$ (3:1 hexane/ethyl acetate); IR (film) 2955, 2932, 1727, 1606, 1489, 1456, 1426, 1417, 1382, 1347, 1273, 1230, 1196, 1155, 1139, 1102, 1042, 975, 917, 821, 811 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.99 (1H, dd, J = 11.5, 8.5 Hz), 6.78 (1H, dd, J = 8.5, 4.4 Hz), 6.69 (1H, ddd, J = 14.4, 8.2, 6.2 Hz, H17), 6.15 (1H, d, J = 14.5 Hz, H18), 5.45 (1H, dddd, J = 14.8, 11.4, 2.7, 2.7 Hz, H10), 5.33 (1H, ddd, J = 8.3, 8.3, 4.6 Hz, H15), 5.28 (1H, dddd, J = 15.2, 9.6, 2.1, 2.1 Hz, H9), 4.85 (1H, d, J = 6.7)Hz), 4.78 (1H, d, J = 6.7 Hz), 4.05 (1H, dd, J = 9.4, 3.7 Hz, H13), 3.96 (3H, d, J = 2.0 Hz), 3.62 (1H, dd, J = 16.3, 9.5 Hz, H8a), 3.43 (3H, s), 3.28 (1H, dddd, J = 16.4, 3.9, 2.4, 2.4 Hz, H8b), 2.45 (1H, dddd, J = 14.6, 8.0, 6.3, 1.5 Hz, H16a), 2.33 (1H, dddd, J = 14.9, 8.2, 4.6, 0.9 Hz, H16b), 2.29 (1H, br d, J = 14.2 Hz, H11a), 2.17–2.07 (1H, m, H12), 1.68 (dd, J = 15.1, 8.6 Hz, H14a), 1.67 (1H, ddd, J = 14.2, 11.5, 11.5 Hz, H11b), 1.40 (1H, dd, J = 15.4, 9.5 Hz, H14b), 0.84 (3H, d, J = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.9 (d, $J_{CF} = 4$ Hz), 153.6 (d, ${}^{1}J_{CF} = 246$ Hz), 144.8 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 141.71, 136.9, 134.1 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 131.5, 128.3, 125.4 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 117.2 (d, $J_{CF} = 19$ Hz), 97.1, 79.4, 77.6, 73.8, 61.9 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 55.7, 42.4, 37.6, 37.2, 35.1, 34.1, 13.3; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ –132.7 (ddq, J = 11.3, 4.5, 2.4 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C22H28FINaO5 (M + Na⁺) 541.0863, found 541.0881.

(3S,5R,6S,8E)-3,4,5,6,7,10-Hexahydro-13-fluoro-3-(3-iodo-2propenyl)-14-hydroxy-5-(methoxymethoxy)-6-methyl-1H-2-benzoxacyclododecin-1-one (22). To a vigorously stirred solution of 21 (211 mg, 0.41 mmol) in dichloromethane (45 mL), a solution of tribromoborane in dichloromethane (1.0 M, 1.06 mL, 1.06 mmol) was added at -78 °C. After being stirred at -78 °C for 65 min, the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature, then quenched with ice-cold water (70 mL) at -5 °C and extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (5:1 to 3:1 hexane/ethyl acetate) to afford 22 (138 mg, 0.30 mmol, 76%) as a colorless powder (4:1 mixture of E:Z isomers at C17). $[\alpha]_{D^{27}}$ +19.4 (c 0.69, CHCl₃); $R_{f} = 0.27$ (3:1 hexane/ethyl acetate, developed in twice); IR (film) 3469, 2956, 2359, 1703, 1612, 1491, 1425, 1356, 1291, 1274, 1168, 1141, 1028, 968, 820, 767, 669, 623 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.1 (1H, br s, -OH), 7.10 (1H, dd, J = 8.5 Hz), 6.63 (1H, dd, J = 8.3, 5.0 Hz), 6.57 (1H, ddd, J = 14.3, 7.4, 7.4 Hz, H17), 6.18 (1H, ddd, J = 14.3, 1.3, 1.3 Hz, H18), 5.52 (1H, dddd, J = 10.6, 5.9, 5.9, 1.0 Hz, H15), 5.40 (1H, ddd, J = 15.5, 4.6, 4.6 Hz, H9), 5.12 (1H, br ddd, J = 15.2, 9.3, 5.3 Hz, H10), 3.69 (1H, dd, J = 8.7, 3.4Hz, H13), 3.59 (1H, br dd, J = 16.7, 5.1 Hz, H8a), 3.40 (1H, ddd, J = 16.8, 2.0, 2.0 Hz, H8b), 2.47-2.41 (2H, m, H16), 2.33 (1H, br dddd, J = 13.5, 6.7, 1.8, 1.8 Hz, H11a), 1.93 (1H, dd, J = 15.0, 10.6 Hz, H14a), 1.84-1.92 (2H, m, H12), 1.79 (1H, ddd, J = 13.6, 9.2, 9.2 Hz, H11b), 1.33 (1H, ddd, J = 15.1, 8.8, 1.0 Hz, H14b), 0.90 (3H, d, J = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 150.5 (d, ${}^{1}J_{CF} = 241$ Hz), 149.4, 140.7, 136.8 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 135.9, 132.0, 127.4, 122.3 (d, $J_{CF} = 7$ Hz), 119.0 (d, $J_{CF} = 17$ Hz), 78.4, 73.7, 70.5, 41.4, 38.5, 38.2, 37.4, 35.2, 13.6; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -139.1 (br s); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{19}H_{22}FINaO_4$ (M + Na⁺) 483.0445, found 483.0457.

Salicylihalamide A (1a) and B (1b). N,N'-dimethyl acetamide (DMA) used in this reaction was degassed by freeze—thaw method over 10 times. To the 20 mL Schlenk flask dried by heating with flame, under reduced pressure for 10 min Rb₂CO₃ (139 mg, 0.60 mmol) was added under argon atmosphere and dried by a drier under reduced pressure for 15 min and charged with argon gas after cooling to room temperature. To this flask, copper(I) thiophene

carboxylate (19 mg, 0.10 mmol), a solution of (2Z,4Z)-2,4heptadienamide 8 (75 mg, 0.60 mmol) and 2,2'-bipyridine (20 mg, 0.12 mmol) in DMA (0.9 mL), which was dried over MS4A, and then the resulting mixture was immediately degassed until no bubbles were found. After being stirred for 30 min at room temperature with light shielding, a solution of 23 (44 mg, 0.10 mmol) in DMA (0.6 mL), which was dried over MS4A, was added and the resulting solution was immediately degassed until no bubbles were found. After being stirred for 1 h at 90 °C with light shielding, the reaction solution was diluted with ether at room temperatur, and was quenched with pH 7.0 phosphate buffer at 0 °C. The organic layer was separated, washed with pH 7.0 phosphate buffer, water and brine, and dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 3/1 to 1/3) to afford the roughly purified substance (58.3 mg), which was purified by the preparative HPLC to afford salicylihalamide A (1a) (10.1 mg, 0.023 mol, 23%) and salicylihalamide B (1b) (11.4 mg, 0.026 mmol, 26%) as a colorless wax, respectively. HPLC conditions: column: COSMOSIL 5C18-MS-II (NACALAI TESQUE, INC.), 10 mm \times 250 mm; detection: $\lambda = 280$ nm; flow rate: 2.0 mL/min; elution with a gradient solvent system: MeOH/H₂O = 7/3, $0-100 \text{ min: MeOH/H}_2O = 7/3 \rightarrow \text{MeOH}, 100-120 \text{ min: MeOH},$ 120-140 min; The $t_{\rm R}$ of salicylihalamide A (1a) and salicylihalamide B (1b) were 64.2 and 81.0 min, respectively.

1a. $[\alpha]_{0}^{19} = -32.6$ (c 0.169, MeOH); R_{f} 0.25 (hexane/ethyl acetate = 1/1); IR (film) 3285, 2964, 1700, 1653, 1589, 1523, 1464, 1293, 1248, 1216, 1123, 1066, 971 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, $C_6 D_6$ δ 11.5 (1H, br, C3-OH), 7.93 (1H, br dd, J = 11.4, 11.4 Hz, H22), 7.12 (1H, dd, J = 14.3, 10.9 Hz, H18), 6.99-6.94 (2H, m, H4 and H5), 6.62 (1H, dd, J = 11.6, 11.6 Hz, H21), 6.50 (1H, br d, -NH), 6.48 (1H, dd, J = 6.6, 2.3 Hz, H6), 5.62 (1H, ddddd, J = 10.8, 7.7, 7.7, 1.3, 1.3 Hz, H23), 5.54(1H, ddd, J = 10.0, 6.6,6.6 Hz, H15), 5.28 (1H, ddd, J = 15.5, 4.3, 4.3 Hz, H9), 5.10 (1H. br d, J = 10.9 Hz, H20), 5.05 (1H, br ddd, J = 14.6, 6.9, 6.9 Hz, H10), 4.77 (1H, br ddd, J = 14.3, 7.2, 7.2 Hz, H17), 3.62 (1H, br dd, J = 16.5, 5.3 Hz, H8a), 3.44 (1H, dd, J = 8.3, 2.9 Hz, H13), 3.32 (1H, br d, J = 16.0 Hz, H8b), 2.17 (1H, ddd, J = 14.0, 7.2, 7.2 Hz, H16a), 2.12 (1H, ddd, J = 12.3, 5.7, 5.7 Hz, H11a), 2.05 (1H, ddd, J = 14.0, 6.9, 6.9 Hz, H16b), 1.97 (2H, tdd, J = 7.6, 7.6, 1.4 Hz, H24), 1.66 (1H, dd, J = 15.1, 10.8 Hz, H14a), 1.62 (1H, dd, J = 13.5, 8.9 Hz, H11b), 1.56-1.45 (1H, m, H12), 1.27 (1H, dd, J = 14.9, 8.6 Hz, H14b), 0.82 (3H, d, J = 6.9 Hz, H26),0.77 (3H, t, J = 7.7 Hz, H25); ¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆) δ 171.2, 170.0, 163.0, 162.9, 142.6, 141.7, 136.9, 134.0, 132.7, 127.1, 126.0, 124.9, 123.6, 119.7, 117.1, 114.7, 107.0, 75.3, 70.4, 39.3, 38.6, 37.6, 36.4, 35.5, 20.8, 14.0, 13.9; HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{26}H_{33}NNaO_5$ (M + Na⁺) 462.2256, found 462.2253.

1b. $[\alpha]_{D}^{20} = -90.4$ (c 0.025, MeOH); R_{f} 0.25 (hexane/ethyl acetate = 1/1); IR (film) 3286, 2960, 2924, 1695, 1653, 1587, 1507, 1464, 1294, 1247, 1211, 1119, 1032, 966 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, $C_6 D_6 \delta$ 11.8 (1H, br, C3-OH), 7.97 (1H, br dd, J = 11.4, 11.4 Hz, H22), 7.57 (1H, br d, J = 9.2 Hz, -NH), 7.31 (1H, dd, J = 10.0, 10.0 Hz, H18), 6.98-6.94 (2H, m, H4 and H5), 6.62 (1H, ddd, J = 11.4, 11.4, 0.9 Hz, H21), 6.45 (1H, dd, 6.3, 2.6 Hz, H6), 5.26-5.12 (2H, m, H15 and H10), 6.48 (1H, dd, J = 6.6, 2.3 Hz, H6), 5.62 (1H, ddddd, J = 10.8, 7.7, 7.7, 1.3, 1.3 Hz, H23), 5.44 (1H, d, J = 11.5 Hz, H20), 5.25-5.12 (2H, m, H15 and H10), 5.07 (1H, ddd, J = 15.3, 7.2, 7.2 Hz, H9), 4.48 (1H, ddd, J = 8.0, 8.0, 8.0 Hz, H17), 3.56 (1H, br dd, J = 16.5, 5.3 Hz, H8a), 3.24 (1H, br d, J = 16.9 Hz, H8b), 3.21 (1H, br d, J = 9.7 Hz, H13), 2.11-1.99 (1H, m, H11a), 2.04 (1H, ddd, J = 14.0, 7.4, 7.4 Hz, H16a), 1.94 (2H, tdd, J = 7.6, 7.6, 1.4 Hz, H24), 1.84 (1H, ddd, J = 14.3, 7.7, 7.7 Hz, H16b), 1.77-1.68 (1H, m, H11b), 1.72 (1H, dd, J = 14.7, 10.7 Hz, H14a), 1.45 (1H, br q, J = 6.8 Hz, H12), 1.19 (1H, dd, J = 15.2, 8.6 Hz, H14b), 0.82 (3H, d, J = 6.9 Hz, H26), 0.77 (3H, t, J = 7.4 Hz, H25); ¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆) δ 172.0, 162.9, 141.9, 137.3, 134.6, 132.8, 126.8, 125.4, 124.9, 123.7, 119.5, 117.2, 103.2, 76.1, 70.9, 39.4, 38.4, 38.0, 36.2, 31.4, 20.8, 14.0, 13.8; HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₂₆H₃₃NNaO₅ $(M + Na^{+})$ 462.2256, found 462.2245.

Journal of Medicinal Chemistry, XXXX, Vol. xxx, No. xx G

4-19F-Salicylihalamide A (6a) and B (6b). N.N'-dimethyl acetamide (DMA) used in this reaction was degassed by freeze-thaw method over 10 times. Rb₂CO₃ (139 mg, 0.60 mmol) in a Schlenk flask was dried by heating with a drier under reduced pressure for 15 min. After cooling to room temperature, copper(I) thiophenecarboxylate (19 mg, 0.10 mmol) was added in glove box. A solution of (2Z,4Z)-2,4-heptadienamide 8 (75 mg, 0.60 mmol) and 2,2'-bipyridine (20 mg, 0.12 mmol) in DMA (0.7 mL), which was dried over MS4A, was added and the resulting mixture was immediately degassed over and over again until no bubbles were found. After being stirred for 30 min at room temperature with light shielding, a solution of of 22 (46 mg, 0.10 mmol) in DMA (0.7 mL), which was dried over MS4A, was added and the resulting solution was immediately degassed over and over again until no bubbles were found. After being stirred for 1 h at 90 °C with light shielding, the reaction mixture was diluted with ether at room temperature and was quenched with pH 7.0 phosphate buffer at 0 °C. The organic layer was separated, washed with pH 7.0 phosphate buffer, water and brine, and dried over Na2SO4, filtrered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (3:1 to 1:3 hexane/ethyl acetate) to afford the roughly purified substance (29 mg), which was purified by the preparative HPLC to afford 4-¹⁹F-salicylihalamide A (6a) (7.1 mg, 0.015 mol, 15%) and 4-19F-salicylihalamide B (6b) (10.1 mg, 0.022 mmol, 22%) as a colorless wax, respectively. HPLC conditions: column: COSMOSIL 5C₁₈-MSII, 10 mm × 250 mm; detection: 280 nm; flow rate: 2.0 mL/min, eluent: 70:30 MeOH/H₂O, 100 min, 70:30 \rightarrow 100:0, 20 min, 100:0, 30 min. The retention times (t_R) of **6a** and **6b** were 63.4 and 73.4 min, respectively. **6a**: $[\alpha]_D^{28}$ -50.0 (c 0.213, MeOH); $R_f = 0.34$ (1:1 hexane/ethyl acetate); λ_{max} (MeOH) 282 nm ($\epsilon = 26200$); IR (film) 3281, 2963, 2931, 1691, 1656, 1611, 1492, 1461, 1288, 1248, 1218, 1138, 1081, 1027, 971, 820, 678 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) δ 10.5 (1H, br, C3-OH), 7.91 (1H, br dd, J = 11.5, 11.5 Hz, H22), 7.08 (1H, dd, J = 14.3, 10.6 Hz, H18), 6.72 (1H, dd, J = 9.7, 8.3 Hz, H5), 6.61 (1H, ddd, J = 11.5, 11.5, 0.9 Hz, H21), 6.56 (1H, br s, -NH), 6.19 (1H, dd, J = 8.3, 4.6 Hz, H6), 5.63 (1H, ddddd, J = 10.9, 7.7, 7.7, 1.3, 1.3 Hz, H23), 5.53 (1H, m, H15), 5.23 (1H, ddd, J = 15.5, 4.7, 4.7 Hz, H9), 5.10 (1H, br d, J = 11.5 Hz, H20), 5.13-5.03 (1H, m, H10), 5.05 (1H, br ddd, J = 14.6, 6.9, 6.9 Hz, H10), 4.85 (1H, ddd, J = 14.3, 7.2, 7.2 Hz, H17), 3.68 (1H, br d, J = 6.0 Hz, H13), 3.37 (2H, m, H8), 2.21 (1H, ddd, J = 14.3, 7.4, 7.4 Hz, H16a), 2.12 (1H, m, H11a), 2.08 (1H, ddd, J = 13.6, 6.0, 6.0 Hz, H16b), 1.97 (2H, tdd, J = 7.6, 7.6, 1.4 Hz, H24), 1.66 (1H, dd, J = 15.0, 9.9 Hz, H14a), 1.65-1.53 (2H, m, H11b and H12), 1.31 (1H, dd, J = 14.6, 9.2 Hz, H14b), 0.83 (3H, d, J = 6.9 Hz, H26), 0.77 (3H, t, J = 7.6 Hz, H25); ¹³C NMR (125) MHz, $C_6 D_6$) δ 169.7 164.2, 160.5, 151.5 (d, ${}^1J_{CF} = 240$ Hz), 141.9, 137.2, 135.8, 130.8, 129.5, 126.0, 124.9, 121.7, 119.7, 117.5, 108.8, 76.0, 71.1, 38.3, 37.6, 36.7, 36.2, 20.8, 14.0, 13.7 (1 of the sp_2 carbons were obserded); ¹⁹F NMR (470 MHz, C₆D₆) δ -138.6 (s); HRMS (ESI-TOF) m/z calculated for C₂₆H₃₃FNO₅ (M + H⁺) 458.2343, found 458.2341. **6b**: $[\alpha]_{D^{28}} - 71.0$ (c 0.301, MeOH); R_{f} = 0.34 (hexane/ethyl acetate = 1/1); λ_{max} (MeOH) 282 nm (ε = 22,100); IR (film) 3357, 2964, 2931, 1707, 1654, 1590, 1491, 1274, 1248, 1207, 1170, 1137, 1032, 973, 678 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, C_6D_6) δ 7.90 (1H, dd, J = 11.5, 11.4 Hz, H22), 7.71 (1H, br s, -NH), 7.26 (1H, dd, J = 9.9 Hz, H18), 6.72 (1H, dd, J = 9.7, 9.7Hz, H5), 6.67 (1H, dd, J = 11.7, 11.7 Hz, H21), 6.17 (1H, dd, J = 8.2, 4.6 Hz, H6), 5.63 (1H, br ddd, J = 10.9, 7.9, 7.9 Hz, H23), 5.51 (1H, d, J = 10.9 Hz, H20), 5.36 (1H, m, H15), 5.20-5.08 (2H, m, H9 and H10), 4.65 (1H, ddd, J = 8.3, 8.3, 8.0 Hz, H17), 3.60 (1H, m, H13), 3.34 (1H, br d, J = 15.7 Hz, H8a), 3.30 (1H, br d, J = 15.7 Hz, H8b), 2.17 (1H, ddd, J = 14.0, 7.2, 7.2 Hz, H16a), 2.11-2.01 (1H, m, H11a), 2.06 (1H, br d, J = 14.5 Hz, H16b), 1.97 (2H, tdd, J = 7.6, 7.6, 1.4 Hz, H24), 1.76 (1H, dd, J= 14.9, 10.0 Hz, H14a), 1.72-1.65 (1H, m, H11b), 1.65-1.55 (1H, m, H12), 1.30 (1H, dd, J = 14.9, 8.9 Hz, H14b), 0.85 (3H, d, J = 6.9 Hz, H26), 0.78 (3H, t, J = 7.7 Hz, H25); ¹³C NMR (125 MHz, $C_6 D_6$) δ 170.0, 164.0, 151.2 (d, ${}^{I}J_{CF} = 246$ Hz), 142.0, 137.4, 136.7, 131.1, 128.9, 124.9 (d, $J_{CF} = 12$ Hz), 122.2 (d, $J_{CF} = 5$ Hz), 119.6,

H Journal of Medicinal Chemistry, XXXX, Vol. xxx, No. xx

118.3 (d, $J_{CF} = 17$ Hz), 105.2, 76.2, 71.3, 38.5, 38.3, 37.8, 36.3, 31.9, 20.8, 14.0, 13.6 (3 of the sp₂ carbons were obserded); ¹⁹F NMR (470 MHz, C₆D₆) δ -138.4 (s); HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C₂₆H₃₂FNNaO₅ (M + Na⁺) 480.2162, found 480.2162.

Biology. Materials. All the chemical used in this study were commercially available special grade ones without further treatment. Water was purified with a Millipore Simpli Laboratory system (Millipore Inc., Bedford, MA) and used within a few hours. The following reagents used in this protocol were as follows: SME buffer (0.3 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM MOPS and pH 7.5 with NaOH), pepstatin A (10 mg/mL in ethanol), leupeptin (10 mg/mL in ethanol), reaction medium for proton pump assay (0.3 M sucrose, 40 mM KCl, 5 mM tricine, and pH 8.0 with NaOH), 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) (0.1 M in ethanol), valinomycin (1 mg/mL in ethanol), MgATP (0.1 M aq and pH 7.5 with NaOH), and carbonyl cvanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) (1 mM in ethanol), Hanks' balanced salt solutions (HBSS) (137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 4.2 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 5.6 mM glucose, 15 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pH 7.4 with NaOH).

Assay of Synthesized Salicylihalamides Using Simian Kidney Cell. Simian (Cercopithecus aethiops) kidney COS-7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal calf serum at 37 °C in 5% CO2/95% air with a CO2 incubator.²⁸ The cells were seeded on poly-L-lysine coated coverslips. After overnight culture, the synthesized salicylihalamide was added into the culture media to give a final concentration of 1 μ M, and incubated at 37 °C for 5 h. Then, the cells were loaded with pH indicator LysoSensor Green DND-189 (Invitrogen, Molecular probes)²⁹ at a final concentration of 1 μ M. After 1 min, an excess of the indicator was washed out with HBSS. The cells were observed using a fluorescence microscope, and images were acquired using a cooled CCD camera. For tryptan blue exclusion test, the intact or drug-treated cells were soaked in phosphate buffered saline containing 0.3% trypan blue. The cells were observed with bright-field and phase-contrast microscope.

Preparation of Chromaffin Granule Membranes (CGM) from Porcine Adrenal Glands. Preparation of chromaffin granule membranes (CGM) from porcine adrenal glands was operated according to refs 30, 31 in which the preparation of CGM from bovine adrenal glands was described. The following manipulation was carried out at 4 °C unless otherwise noted. Porcine adrenal glands are obtained from the local meat distributor (IKEDA meatpacking company Co., Ltd., Kyoto, Japan). Then 30-35 adrenal medullae were separated from the cortex by pinching the connecting tissue with pointed forceps. The isolated adrenal medullae were kept at 4 °C in 200 mL of freshly prepared SME buffer containing $5 \,\mu \text{g/mL}$ of pepstatin A and leupeptin. The medullae were briefly homogenized in a Waring blender and rehomogenized in the Polytron homogenizer on ice bath. The mixture was filtered through two layers of gauze, and the filtrate was kept on ice. The pinkcolored filtrate was centrifuged at 2000g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 10000g for 20 min. The obtained pellet was gently suspended in ca. 25 mL of SME containing the protease inhibitors. The suspension was applied on top of sucrose layers in polyallomer tubes. The bottom layer of 3.0 mL buffer contained 1.8 M sucrose, and the top layer of 3.6 mL buffer contained 1.2 M sucrose. The protease inhibitors were added to the each layer just before use. About 4.2 mL of the suspension was applied on the layers in six tubes and centrifuged at 72000g for 17 h. The supernatant was removed and the palepink pellet containing the chromaffin granules was suspended in a small amount of SME containing the protease inhibitors and homogenized with a glass homogenizer. The suspension was poured into 300 mL of the hypotonic solution (10 mM MOPS, pH 7.5 with NaOH, 1.25 mM Na2ATP, and 1 µg/mL of the protease inhibitors). After vigorous stirring for 1 min, the solution was centrifuged at 3000g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 200000g for 60 min. The chromaffin granule membranes were obtained as a brownish-pink pellet and

diluted into 1.8 mL of the MOPS solution (20 mM MOPS, pH 7.5 with NaOH, 25% glycerol, 5 mM Na₂ATP, 5 mM monothioglycerol, and 10 μ g/mL of the protease inhibitors). The resulting solution contained 4–8 mg of the membrane proteins including V-ATPase, judging from both the quantitative determination of the total protein concentration by the BCA assay, and the Western blotting with the antibody against subunit b on the V₁ domain of V-ATPase. The prepared CGM was suspended at the protein concentration of 5 mg/mL in the MOPS solution and kept frozen at -80 °C.

Assay of Synthetic Salicylihalamides in the Inhibitory Activity against Chromaffin Granule Membrane V-ATPase. The measurement of fluorescence quenching of 9-amino-6-chloro-2methoxyacridine (ACMA) as an indicator for proton uptake into the membrane vesicles was employed.³¹ To a 2 mL of the reaction medium for proton pump assay, chromaffin granule membranes from porcine adrenal glands containing 50 μ g of protein, 4.0 μ L of 1.0 M ACMA, and 0.67 μ L of valinomycin were added, and the resulting solution was incubated at 37 °C for 10 min. A solution of the synthesized salicylihalamide in DMSO (prepared to give 0.1% final concentration of DMSO) was added and incubated at 37 °C for 3 min, and then 10 µL of 0.1 M MgATP was added and incubated for 2 min. The proton gradients made by the V-ATPases in the membranes were canceled by addition of 3.4 μ L of 1 mM FCCP. The fluorescence quenching in the presence of MgATP was monitored by a spectrofluorometer with an excitation wavelength of 412 nm and emission at 480 nm. The initial rate of quenching was estimated as the slope of the quenching trace performed on sets of 20 points (20 s of quenching trace) and is expressed as the rate of quenching/min. The proton transport activity is expressed as the percentage versus DMSO-matched controls with standard deviation from triplicate experiments. IC50 values were obtained graphically by plotting the percent activity of proton transport versus the log values of the inhibitor concentrations.

Acknowledgment. We thank Prof. Yoshinori Moriyama, Okayama University, for helpful advice on the isolation of chromaffin granule membranes. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (no. 16073211) from MEXT, Japan.

References

- (a) Lee, A.; Breitenbucher, J. G. The impact of combinatorial chemistry on drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 2003, 6, 494– 508. (b) Sehgal, A. Drug discovery and development using chemical genomics. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 2002, 5, 526–531.
- (2) (a) Galm, U.; Shen, B. Natural product drug discovery: The times have never been better. *Chem. Biol.* 2007, 14, 1098-1104. (b) Lam, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 2007, 15, 279-289.
- (3) (a) Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina, J. H., II; Boyd, M. R. Salicylihalamide A and B, novel cytotoxic macrolides from the marine sponge *Haliclona* sp. J. Org. Chem. **1997**, 62, 8188-8192. (b) Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina, J. H., II; Boyd, M. R. Salicylihalamides A and B, Novel Cytotoxic Macrolides from the Marine Sponge *Haliclona* sp. [Erratum]. J. Org. Chem. **2001**, 66, 1532.
- (4) Yet, L. Chemistry and biology of salicylihalamide A and related compounds. Chem. Rev. 2003, 103, 4283–4306.
- (5) (a) McKee, T. C.; Galinis, D. L.; Pannell, L. K.; Cardellina, J. H., II; Laakso, J.; Ireland, C. M.; Murray, L.; Capon, R. J.; Boyd, M. R. The lobatamides, novel cytotoxic macrolides from southwestern pacific tunicates. J. Org. Chem. 1998, 63, 7805–7810. (b) Suzumura, K.; Takahashi, I.; Matsumoto, H.; Nagai, K.; Setiawan, B.; Rantiatmodjo, R. M.; Suzuki, K.; Nagano, N. Structural elucidation of YM-75518, a novel antifungal antibiotic isolated from *Pseudomonas* sp. Q38009. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 7573–7576.
- (6) (a) Jansen, R.; Kunze, B.; Reihenbach, H.; Höfle, G. Antibiotics from gliding bacteria, LXXXVI. Apicularen A and B, cytotoxic 10membered lactones with a novel mechanism of action from *Chondromyces* species (mycobacteria): isolation, structure elucidation, and biosynthesis. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 913–919. (b) Kunze, B.; Jansen, R.; Sasse, F.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Apicularens A and B, new cytostatic macrolides from *Chondromyces* species (Myxobacteria): production, physicochemical and biological properties. *J. Antibiot.* 1998, *51*, 1075–1080.

- (7) Dekker, K. A.; Aiello, R. J.; Hirai, H.; Inagaki, T.; Sakakibara, T.; Suzuki, Y.; Thompson, J. F.; Yamauchi, Y.; Kojima, N. Novel lactone compounds from Mortierella verticillata that induce the human low density lipoprotein receptor gene: fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. J. Antibiot. 1998, 51, 14-20.
 (8) Kim, J. W.; Shin-ya, K.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H.
- Oximidines I and II: Novel antitumor macrolides from Pseudomonas Sp. J. Org. Chem. 1999, 64, 153-155. Boyd, M. R.; Farina, C.; Belfiore, P.; Gagliardi, S.; Kim, J. W.;
- (9) Hayakawa, Y.; Beutler, J. A.; McKee, T. C.; Bowman, B. J.; Bowman, E. J. Discovery of a novel antitumor benzolactone enamide class that selectively inhibits mammalian vacuolar-type (H+)-ATPases. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001, 297, 114-120. (10) Sun-Wada, G.-H.; Wada, Y.; Futai, M. Diverse and essential roles of
- mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physi-ological understanding of inside acidic compartments. *Biochim.* Biophys. Acta 2004, 1658, 106-114.
- (11) Xie, X.-S.; Padron, D.; Liao, X.; Wang, J.; Roth, M. G.; De Brabander, J. K. Salicylihalamide A inhibits the V₀ sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from bafilomycin A1. J. Biol. Chem. 2004, 279, 19755-19763.
- (12) Bowman, E. J.; Bowman, B. J. V-ATPases as drug targets. J. Bioenerg. Biomembr. 2005, 37, 431-435.
- (13) (a) Wu, Y.; Esser, L.; De Brabander, J. K. Revision of the absolute configuration of salicylihalamide A through asymmetric total synthesis. Angew. Chem., Int. Ed. 2000, 39, 4308–4310. (b) Wu, Y.; Seguil, O. R.; De Brabander, J. K. Synthesis and initial structure-activity relationships of modified salicylihalamides. Org. Lett. 2000, 2, 4241-4244. (c) Smith, A. B., III; Zheng, J. A first generation total synthesis of (+)-salicylihalamide A. Synlett 2001, 1019-1023. (d) Labrecque, D.; Charron, S.; Rej, R.; Blais, C.; Lamothe, S. Enantioselective total synthesis of salicylihalamides A and B. Tetrahedron Lett. 2001, 42, 2645-2648. (e) Snider, B. B.; Song, F. Total Synthesis of (-)-Salicylihalamide A. Org. Lett. 2001, 3, 1817-1820. (f) Fürstner, A.; Dierkes, T.; Thiel, O. R.; Blanda, G. Total synthesis of (-)-salicylihalamide. Chem. Eur. J. 2001, 7, 5286-5298. (g) Wu, Y.; Liao, X.; Wang, R.; Xie, X.-S.; De Brabander, J. K. Total synthesis and initial structure-function analysis of the potent V-ATPase inhibitors salicylihalamide A and related compounds. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 3245–3253. (h) Smith, A. B., III; Zheng, J. Total synthesis of (-)-salicylihalamide A and related congeners. Tetrahedron 2002, 58, (455–6471. (i) Yang, K. L.; Haack, T.; Blackman, B.; Diederich, W. E.; Roy, S.; Pusuluri, S.; Georg, G. I. Enantiospecific formal total syntheses of (-)-salicylihalamides A and B from D-glucose and L-rhamnose. Org. Lett. 2003, 5, 4007-4009. (j) Yadav, J. S.; Srihari, P. Total synthesis of (-)-salicylihalamides A and B. Tetrahedron: Asymmetry 2004, 15, 81-89. (k) Lebreton, S.; Xie, X.-S.; Ferguson, 2004, 10, 5649-5660.
- (14) (a) Isanbor, C.; O'Hagan, D. Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. J. Fluorine Chem. 2006, 127, 303-319. (b) Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D. Recent advances (1995-2005) in fluorinated pharmaceuticals based on natural products. J. Fluorine Chem. 2006, 127, 992-1012. (c) Shah, P.; Westwell, A. D. The role of fluorine in medicinal chemistry. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2007, 22, 527-540. (15) (a) Watts, A. Solid-state NMR in drug design and discovery for
- (a) Watts, A. Bolia star targets. Nat. Rev. Drug Discovery 2005, 4, 555– 568. (b) Ulrich, A. S. Solid state 19F NMR methods for studying biomembranes. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2005, 46, 1-21. (c) Yu, J.-X.; Kodibagkar, V. D.; Cui, W.; Mason, R. P. 19F: a versatile reporter for non-invasive physiology and pharmacology using magnetic resonance. *Current Med. Chem.* **2005**, *12*, 819–848. (d) Dalvit, C. Ligand- and substrate-based 19F NMR screening: principles and applications to drug discovery. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.
- applications to drug disordry. Prog. Water Magn. Reson. Spectrolet. 2007, 51, 243-271.
 (16) Lal, G. S.; Pez, G. P.; Syvret, R. G. Electrophilic NF fluorinating agents. Chem. Rev. 1996, 96, 1737-1755.
 (17) Lobatamide: (a) Shen, R.; Lin, C. T.; Bowman, E. J.; Bowman, B. J.; Porco, J. A., Jr. Lobatamide C: total synthesis, stereochemical assignment prenaration of simplified analogues, and V-ATPase assignment, preparation of simplified analogues, and V-ATPase inhibition studies. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 7889–7901. (b) Shen, R.; Lin, C. T.; Porco, J. A., Jr. Total synthesis and stereochemical

assignment of the salicylate antitumor macrolide lobatamide C. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 5650-5651. (c) Shen, R.; Lin, C. T.; Bowman, E. J.; Bowman, B. J.; Porco, J. A., Jr. Synthesis and V-ATPase inhibition of simplified lobatamide analogues. Org. Lett. 2002, 4, 3103-3106.

- (18) Apicularene: (a) Su, Q.; Panek, J. S. Total synthesis of (-)-apicularen. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 2425-2430. (b) Nicolaou, K. C.; Kim, D. W.; Baati, R.; O'Brate, A.; Giannakakou, P. Total synthesis and biological evaluation of (-)apicularen A and analogues thereof. *Chem.*-Eur. J. 2003, 9, 6177-6191. (c) Nicolaou, K. C.; Kim, D. W.; Baati, R. Stereocontrolled total synthesis of apicularen A and its $\Delta^{17,18}$ Zisomer Angew Chem Ly Chem Ly Construction of the second synthesis of apicularen A and the second synthesis of the second synthesynthesis of the second synthesis of the second synthesis of t Z isomer. Angew. Chem., Int. Ed. 2002, 41, 3701-3704. (d) Bhattacharjee, A.; Seguil, O. R.; De Brabander, J. K. Total synthesis and biological evaluation of apicularen A and synthetic analogs. Tetra-
- hedron Lett. 2001, 42, 1217–1220.
 (19) Oximidine: (a) Wang, X.; Bowman, E. J.; Bowman, B. J.; Porco, J. A., Jr. Total synthesis of the salicylate enamide macrolide oximidine III: application of relay ring-closing metathesis. Angew. Chem., Int. Ed. 2004, 43, 3601–3605. (b) Wang, X.; Porco, J. A., Jr. Total synthesis of the salicylate enamide macrolide oximidine II. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 6040-6041.
- (20) Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. Synthesis 1981, 1-28.
- (21) Hadfield, A.; Schweitzer, H.; Trova, M. P.; Green, K. Practical, largescale synthesis of 2,2-dimethyl-5-hydroxy-4-oxobenzo-1,3-dioxin. Synth. Commun. 1994, 24, 1025-1028.
- (22) Umemoto, T.; Tomizawa, G. Highly selective fluorinating agents: A counteranion-bound N-fluoropyridinium salt system. J. Org. Chem. 1995, 60, 6563-6570.
- (23) Fürstner, A.; Konetzki, I. Synthesis of 2-hydroxy-6-([(16R)-β-Dmannopyranosyloxy]heptadecyl) benzoic acid, a fungal metabolite with GABA $_{\Lambda}$ ion channel receptor inhibiting properties. *Tetrahedron* **1996**, 52, 15071-15078.
- (24) Schwab, P.; France, M. B.; Ziller, J. W.; Grubbs, R. H. A series of well-defined metathesis catalysts-synthesis of [RuCl₂(=CHR⁴)(PR₃)₂] and its reactions. Angew. Chem., Int. Ed. 1995, 34, 2039–2041.
- (25) Takai, K.; Nitta, K.; Utimoto, K. Simple and selective method for RCHO \rightarrow (E)-RCH=CHX conversion by means of a CHX₃-CrCl₂ system. J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 7408-7410.
- Evans, D. A.; Black, W. C. Total synthesis of (+)-A83543A [(+)-(26)lepicidin A]. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 4497-4513.
- (a) Shen, R.; Porco, J. A., Jr. Synthesis of enamides related to the (27)salicylate antitumor macrolides using copper-mediated vinylic substitu-tion. Org. Lett. 2000, 2, 1333-1336. (b) Coleman, R. S.; Liu, P.-H. Divergent and stereocontrolled synthesis of the enamides side chains of oximidines I/II/III, salicylihalamides A/B, lobatamides A/D, and CJ-12,950. Org. Lett. 2004, 6, 577-580.
 (28) (a) Zhang, S.; Zhang, D.; Liebeskind, L. S. Ambient temperature,
- (Ullmann-like reductive coupling of aryl, heteroaryl, and alkenyl halides. J. Org. Chem. 1997, 62, 2312–2313. (b) Allred, G. D.; Liebeskind, L. S. Copper-mediated cross-coupling of organostannanes with organic iodides at or below room temperature. J. Am. Chem. Soc. 1996, *118*, 2748-2749.
- (29) Matsushita, M.; Tanaka, S.; Nakamura, N.; Inoue, H.; Kanazawa, H. A novel kinesin-like protein, KIF1Bb3 is involved in the movement of lysosomes to the cell periphery in non-neuronal cells. Traffic 2004, 5, 140-151.
- (30) Lyubimov, A. V.; Carr, S. N.; Brown, A. P.; Art, J. J.; Crowell, J. A.; Levine, B. S. Evaluation of hydrogen ion concentrations in prostates from rats and dogs using fluorescent confocal microscopy. J. Photochem. Photobiol., B 2005, 80, 225-234.
- (31) Nelson, N.; Cidon, S.; Moriyama, Y. Methods in Enzymology Fleischer, S. Fleischer, B., Eds.; Academic Press: New York, 1988; Vol. 157, pp 619-633.
- (32) (a) Galkin, M. A.; Ishmukhametov, R. R.; Vik, S. B. A functionally inactive, cold-stabilized form of the Escherichia coli F1F0 ATP synthase. Biochim. Biophys. Acta 2006, 1757, 206-214. (b) McCarty, R. E. The decay of the ATPase activity of light plus thiol-activated thylakoid membranes in the dark. J. Bioenerg. Biomembr. 2006, 38, 67-74. (c) Camarasa, C.; Prieto, S.; Ros, R.; Salmon, J.-M.; Barre, P. Evidence for a selective and electroneutral K⁺/H⁺-exchange in Saccharomyces cerevisiae using plasma membrane vesicles. Yeast 1996, 12, 1301-1313.

JM801265E