

博士論文

新規 HIV-1 integrase-LEDGF/p75 allosteric
inhibitors の探索合成研究

杉山 修一

本文中以下の用語および試薬は、下記のように略記した。

HIV : human immunodeficiency virus

NMR : nuclear magnetic resonance

TLC : thin-layer chromatography

EC₅₀ : half maximal effective concentration

CC₅₀ : 50% cytotoxic concentration

HLM : human liver microsomes

RLM : rat liver microsomes

LC : liquid chromatography

MS : metabolic stability

CLt : total clearance

AUC : area under the curve

T_{1/2} : elimination half-time

F : bioavailability

Py : pyridine

Ph : phenyl

Bn : benzyl

IN : integrase

CCD : catalytic core domain

CTD : C-terminal domain

NTD : N-terminal domain

INLAIs : integrase-LEDGF/p75 allosteric inhibitors

LEDGF: lens epithelium-derived growth factor

PDB : Protein Data Bank

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry

ESI : electrospray ionization

BIC : bicitegravir

DTG : dolutegravir

RAL : raltegravir

TAF : tenofovir alafenamide

FTC : emtricitabine

ABC : abacavir

3TC : lamivudine

RPV : rilpivirine

cobi : cobicistat

rtv : ritonavir
PIs : protease inhibitors
INSTIs : integrase strand transfer inhibitors
NRTIs : nucleoside reverse transcriptase inhibitors
NNRTIs : non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
CD4 : cluster of differentiation 4
LIP : lymphocytic interstitial pneumonia
PLH : pulmonary lymphoid hyperplasia
DNA : deoxyribonucleic acid
RNA : ribonucleic acid
CCR5 : C-C chemokine receptor type 5
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4
HAART : highly active antiretroviral therapy
AIDS : acquired immunodeficiency syndrome
STR : single tablet regimen
PIC : pre-integration complex
SAR : structure-activity relationship
PDB : protein data bank
IBD : integrase binding domain
DIBAL : diisobutyl aluminium hydride
DMF : N,N-dimethyl formamide
NBS : N-bromo succinimide
TFAA : trifluoroacetic anhydride
DMSO : dimethyl sulfoxide
MsCl : methanesulfonyl chloride
Tf₂O : trifluoromethanesulfonic anhydride
Ms₂O : methanesulfonic anhydride
DMA : N,N-dimethylacetamide
THF : tetrahydrofuran
EtOAc : ethyl acetate
AcCl : acetyl chloride
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
ESI : electrospray ionization

目次		頁
序論		
1. 概論		1
2. HIV-1 integrase 及び lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)		5
3. HIV-1 integrase-LEDGF/p75 allosteric inhibitors (INLAIs)		7
4. 本研究の目的		10
本論		
第1章 ベンゼン骨格を有する新規 INLAIs の創出		
1. 創薬研究の方針		11
2. 化合物の合成		13
3. 構造活性相関および各種評価		17
第2章 ピリジン骨格を有する新規 INLAIs の創出		
1. 創薬研究の方針		24
2. 化合物の合成		25
3. 構造活性相関および各種評価		31
結語		39
実験の部		41
引用文献		69

序論

1. 概論

HIV (human immunodeficiency virus) はレトロウイルスに分類され、主に CD4 陽性 T リンパ球とマクロファージ系の細胞に感染する¹⁾。感染初期にはウイルス血症になり、発疹、発熱、リンパ節腫脹等の急性症状が現れる。その後免疫反応によってウイルスは減少するが、完全には排除できず免疫系とウイルスの増殖が拮抗し、慢性感染状態へと移行する(図1)。この状態では症状がほとんど現れず無症候期と呼ばれる。そして感染10年程度以降に CD4 陽性 T 細胞数 (CD4 数) が 200uL 以下になると、免疫不全状態となり、様々な日和見感染症の症状を呈する。この状態がいわゆる後天性免疫不全症候群 (AIDS : Acquired Immunodeficiency Syndrome) である。AIDS と診断される場合は表1に示した AIDS 指標疾患が認められる。

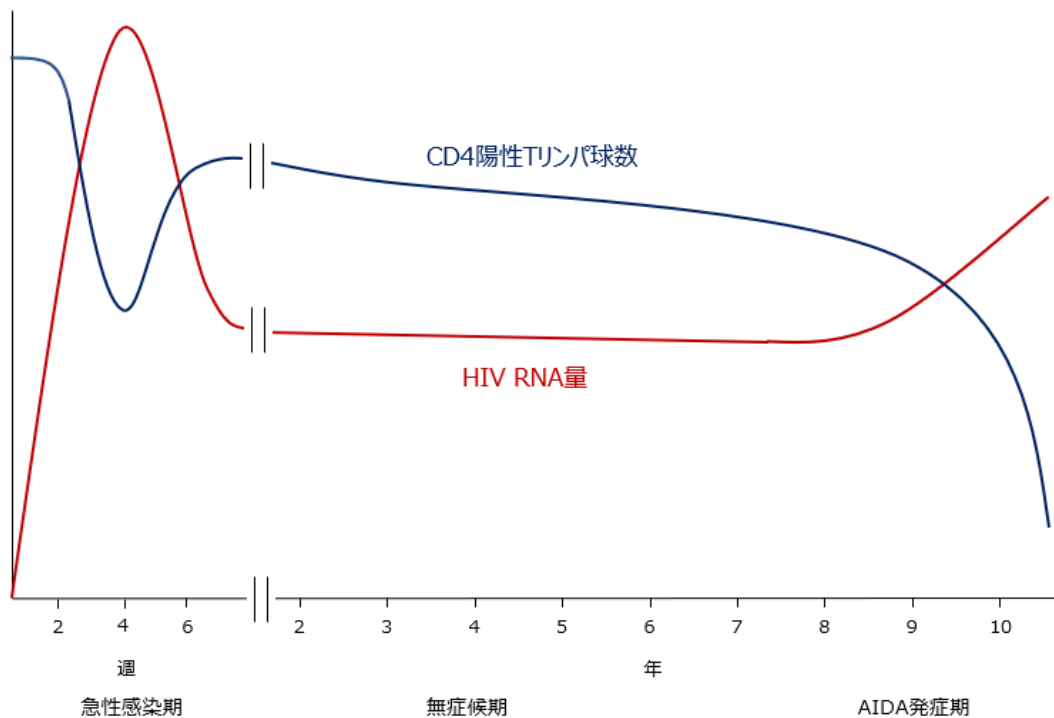


図1. HIV 感染症の臨床経過¹⁾

表1. AIDS指標疾患¹⁾

真菌症	カンジタ症（食道，気管，気管支，肺），クリプトコッカス症（肺以外），コクシジオイデス症，ヒストプラズマ症，ニューモシスチス肺炎
原虫感染症	トキソプラズマ脳症（生後1ヶ月以後），クリプトスポリジウム症（1ヶ月以上続く下痢を伴ったもの），イソスポラ症（1ヶ月以上続く下痢を伴ったもの）
細菌感染症	化膿性細菌感染症，サルモネラ菌血症（再発を繰り返すもので，チフス菌によるものを除く）活動性結核（肺結核又は肺外結核），非結核性抗酸菌症
ウイルス感染症	サイトメガロウイルス感染症（生後1ヶ月以後で，肝，脾，リンパ節以外），単純ヘルペスウイルス感染症，進行性多巣性白質脳症
腫瘍	カポジ肉腫，原発性脳リンパ腫，非ホジキンリンパ腫（a. 大細胞型・免疫芽球型，b. Burkitt 型），浸潤性子宮頸癌
その他	反復性肺炎，リンパ性間質性肺炎／肺リンパ過形成：LIP/PLH complex（13歳未満），HIV脳症（痴呆又は亜急性脳炎），HIV消耗性症候群（全身衰弱又はスリム病）

HIVは三大感染症（HIV，結核，マラリア）の一つであり，世界規模で流行が長期に渡っており，未だ撲滅に至っていない²⁾。また，現在HIVに感染している人数は世界で3790万人と推計され，累計3200万人がこの感染症によって命を落としている³⁾。そこでHIV治療薬の研究は重要になっており，世界中で研究が行われている。

図2にHIVのライフサイクルを示した。一連の工程は以下の順序で進んでいく⁴⁾。

- ① ウイルスの吸着，侵入
- ② 脱殻
- ③ ウイルスRNAからウイルスDNAへの逆転写
- ④ 宿主DNAへのインテグレーション
- ⑤ 転写，翻訳
- ⑥ ウイルスの成熟，出芽

HIVはRNAウイルスであり，宿主細胞のレセプター（CD4，CCR5，CXCR4）を利用して侵入する。その後ウイルス粒子内のRNAを放出し，逆転写酵素を用いてウイルスRNAをウイルスDNAに逆転写する。逆転写によって作られたウイルスDNAはintegrase (IN) の作用によって宿主のDNA中に組み込まれ，転写と翻訳のステップを経てウイルスタンパクが作られる。そして最終工程としてproteaseによってタンパクが切断され，宿主の細胞膜から出芽することによって成熟した新しいウイルス粒子が完成する。

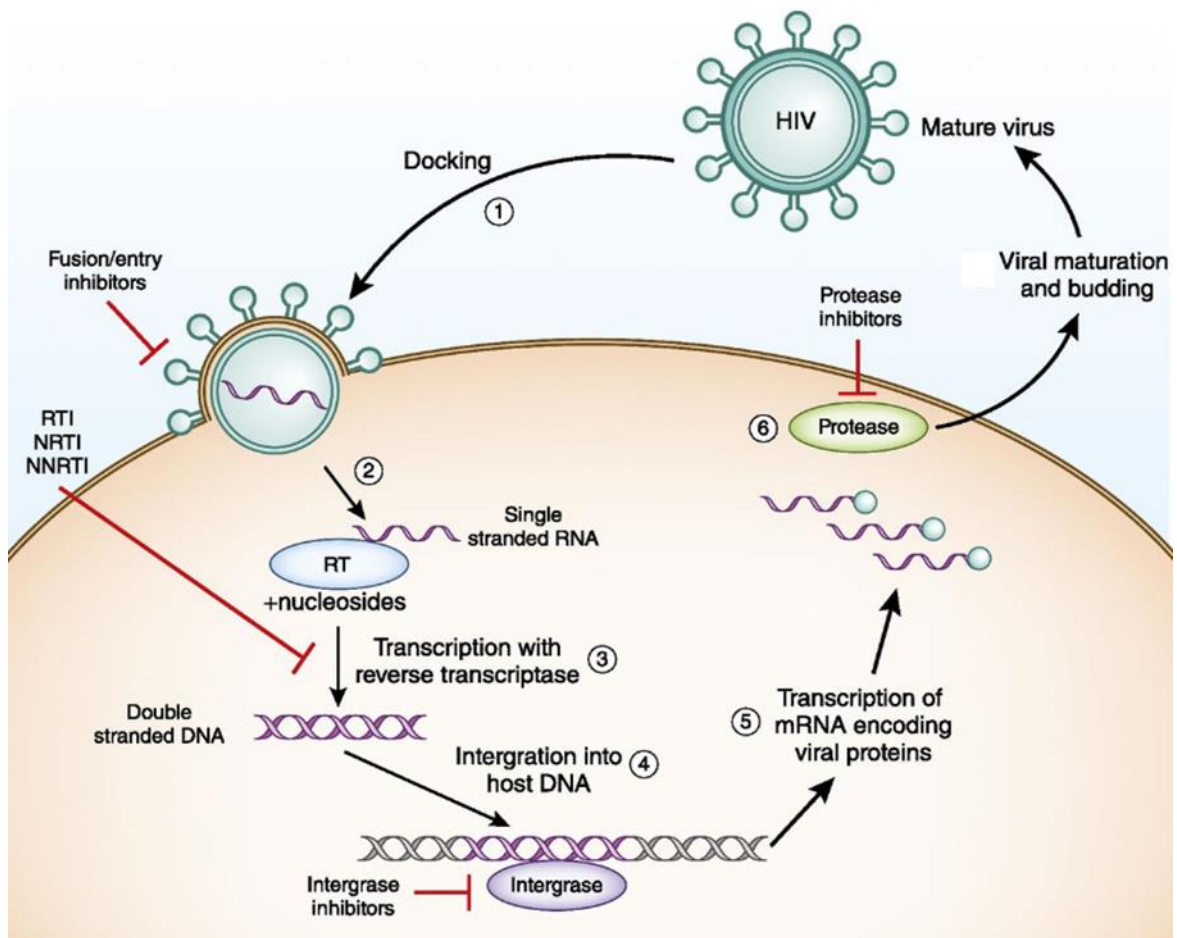


図2. HIVのライフサイクル⁴⁾

HIVの治療はHAART (Highly active antiretroviral therapy) と呼ばれる多剤併用療法が用いられる¹⁾。一般的に3種類の薬剤を組み合わせる治療を実施し、ウイルスの増殖を抑えるために生涯服薬を続ける必要がある。患者の負担はとて大きく、アドヒアランスと呼ばれる服薬順守が保てずに薬剤耐性株が出現し、治療が失敗してしまうことがある。そこで現在では、一日一回のみ服用の薬剤、3剤を1錠にまとめたSTR (single tablet regimen) や長期間持続する注射剤等の利便性が高い薬剤が普及し始めている。

現在用いられているHIV治療薬の種類は主に以下の4つに分類される⁵⁾。

- ① NRTIs (nucleoside reverse transcriptase inhibitors)
- ② NNRTIs (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors)
- ③ PIs (protease inhibitors)
- ④ INSTIs (integrase strand transfer inhibitors)

NRTIsは核酸系逆転写酵素阻害剤であり、ウイルスRNAからウイルスDNAに逆転写する酵素の活性中心に結合し阻害する。NNRTIsは非核酸系逆転写酵素阻害剤であり、逆転写酵素

の活性中心ではない部分，つまりアロステリック部位に結合し阻害する．PIsはプロテアーゼ阻害剤であり，複合タンパク質を機能タンパク質に切断するproteaseを阻害する．INSTIsはインテグラーゼストランドトランスファー阻害剤であり，ウイルスDNAを宿主DNAに組み込む過程を阻害する．またこの中でもHIVの増殖抑制能が高い薬剤を「キードラッグ」と呼び，増殖抑制能はキードラッグに及ばないが，それを補助する薬剤を「バックボーン」と分類されている¹⁾．

現在日本で推奨されている治療レジメンを表2に示した．キードラッグとしては主にINSTIsが用いられており，そのなかでもBIC (bictegravir), DTG (dolutegravir), RAL (raltegravir)が推奨されている¹⁾．またそのバックボーンとしては2種類のNRTIsが取り入れられている．また他のキードラッグとしてはPIs, NNRTIsが推奨されている．

表2．推奨される抗HIV薬の組み合わせ¹⁾

キードラッグ	最も推奨される組み合わせ
INSTIs	BIC/TAF/FTC DTG/ABC/3TC DTG+TAF/FTC RAL+TAF/FTC
PIs	DRV/cobi/TAF/FTC DRV+rtv+TAF/FTC
NNRTIs	RPV/TAF/FTC

2. HIV-1 integrase 及び lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)

HIV-1 の IN は逆転写された DNA を宿主 DNA に組み込む酵素である。その前の工程として HIV の DNA を核内に輸送する際に、IN は HIV-DNA, LEDGF (lens epithelium-derived growth factor) と PIC (pre-integration complex) を形成する⁶⁾。そして細胞質から核内へ移行するが、その際に LEDGF はその核内移行を促進すると考えられている(図3)。また核内移行後、LEDGF はクロマチンと結合し IN とクロマチンをつなぎとめ、インテグレーション反応を促進する。

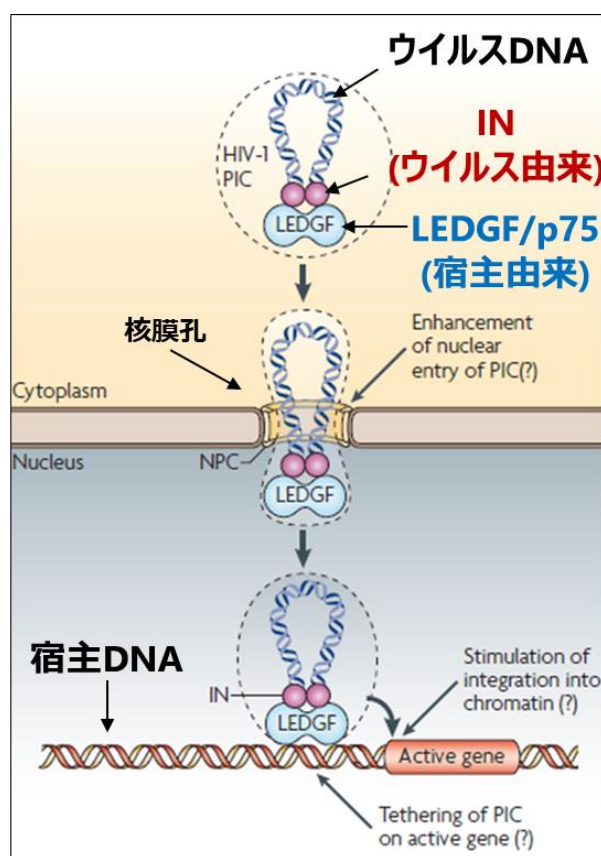


図3. LEDGF の役割⁶⁾

IN と LEDGF のドメイン構造を図4に示した⁷⁾。IN は 288 アミノ酸から成るウイルス由来の酵素であり、NTD (N-terminal domain), CCD (catalytic core domain), CTD (C-terminal domain) から形成される。インテグレーション反応に関与する活性中心は CCD に存在している。

一方、LEDGF は 530 アミノ酸から成る宿主由来のタンパク質であり、宿主での役割は良く分かっていない。LEDGF の IBD (integrase binding domain) が IN に結合することによって、PIC の核内移行とインテグレーション反応を促進する。

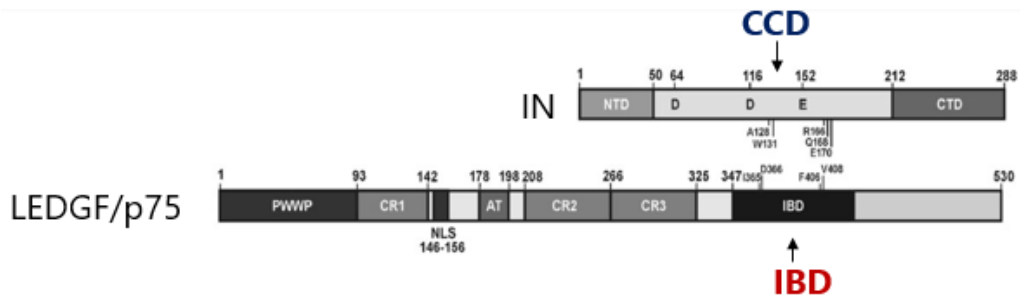


図4. integrase と LEDGF のドメイン構造⁷⁾

また、IN (CCD) と LEDGF/p75 の共結晶構造が報告されている⁷⁾(図5)。IN (CCD) は2量体を形成しており、その境界面に LEDGF/p75 の IBD が結合している。

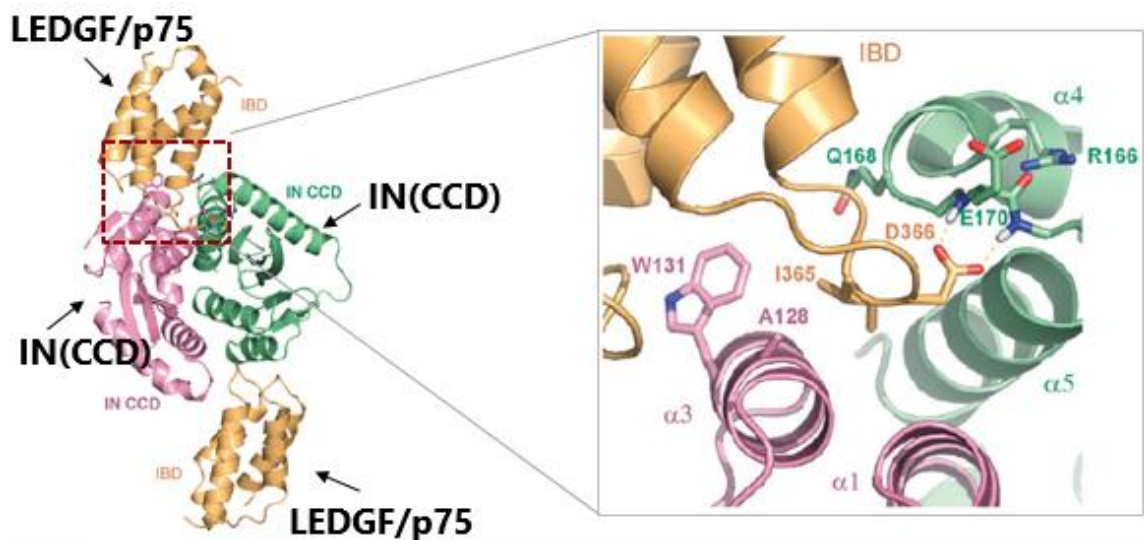


図5. IN (CCD) と LEDGF/p75 の共結晶構造⁷⁾

3. HIV-1 integrase-LEDGF/p75 allosteric inhibitors (INLAIs)

先述したように、IN の活性中心に結合し HIV-1 DNA を宿主 DNA に組み込む反応を阻害する INSTIs が主なキードラッグとして用いられている。その一方、IN の活性中心ではなくアロステリックサイトに結合し、酵素阻害を引き起こす INLAIs (integrase-LEDGF/p75 allosteric inhibitors)の研究が盛んに行われている⁸⁾。

2010年にバーチャルスクリーニングによって得られた INLAI である compound 6 と IN-CCD の共結晶構造が報告された⁹⁾(図6)。この構造を見て分かるように、LEDGF/p75-IBD が結合している領域に compound 6 がうまく重なっていることが分かる。また compound 6 の活性も評価されており、IN と LEDGF/p75 の結合阻害 (IC_{50}) および抗ウイルス活性 (EC_{50}) において数 μM の値を示している。以上の結果から、IN-CCD と LEDGF/p75 の結合を阻害することによって、抗ウイルス効果に繋がることが明らかとなった。

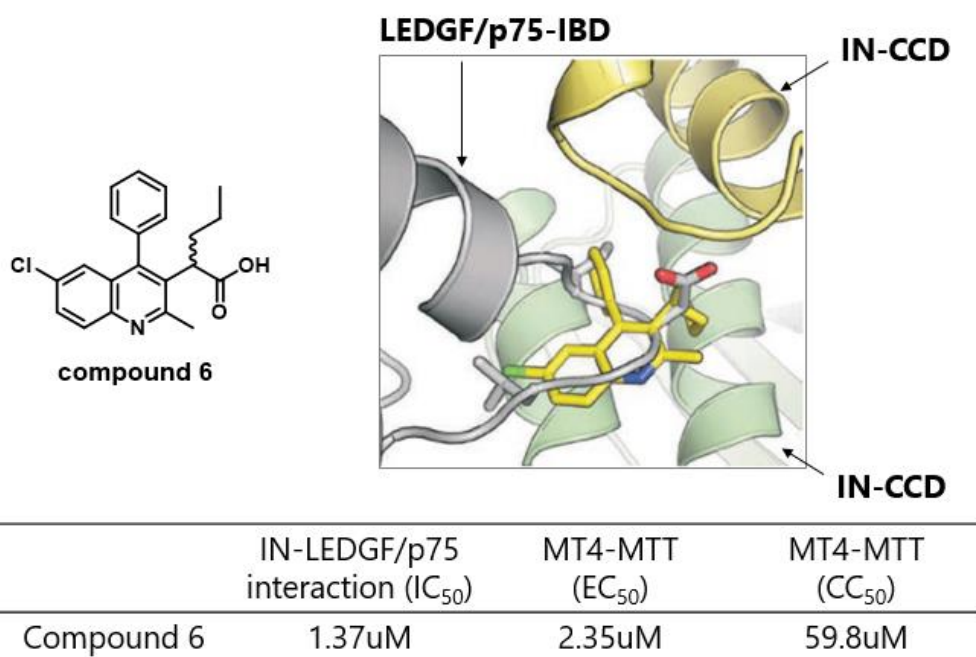


図6. Compound 6 と IN-CCD の共結晶構造及び活性⁹⁾

しかしながら、作用メカニズムは integrase のアロステリックサイトに INLAIs が結合し酵素阻害を引き起こすことであると考えられていたが、最近の研究からそれがメインの作用ではないことが明らかになってきた。

2014年の Slaughter らの報告によると、INLAIs は integrase の異常な多量化を引き起こし、INLAIs 存在下産生されたウイルスは完全に成熟したウイルスにならず、異常な構造や未成熟な構造を有することが見出されている¹⁰⁾(図7)。そしてそのウイルスは構造の形成異

常から感染力を失い、新たな細胞に感染することができないと考えられている。

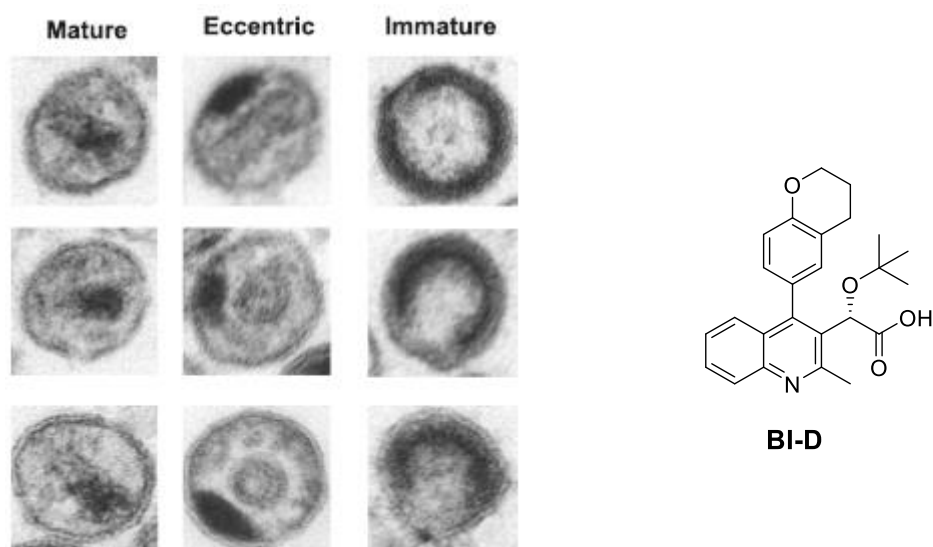


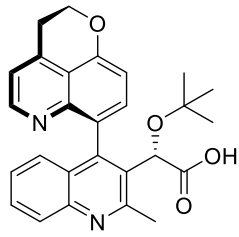
図 7. INLAIs (BI-D)によるウイルス粒子の形成異常¹⁰⁾

またこのターゲットは様々な研究機関から注目されており、熾烈な開発競争がなされている。INLAIsの特許を出願している主な研究機関を以下に示す¹¹⁾。

- ① Boehringer Ingelheim
- ② Laboratoire BIODIM
- ③ Gilead
- ④ KU LEUVEN
- ⑤ KRICT
- ⑥ Pfizer
- ⑦ Bristol Myers Squibb
- ⑧ ViiV Healthcare
- ⑨ SHIONOGI

INLAIsの研究に取り組んでいる研究機関の数、規模から見て分かるようにこのターゲットは有望であると考えられる。

一番目に臨床試験に進んだ化合物として Boehringer Ingelheim の **BI 224436** がある (図 8)。しかし、理由が明らかにされないまま Phase I 試験で中止になっている¹²⁾。現在臨床試験中の化合物は ST PHARM の **STP0404** のみであり、現在 Phase I 試験を実施中である¹²⁾。**STP0404** の構造は現時点では開示されていない。今までのところ、この INLAIs で上市された化合物は存在せず、その上市が待たれている。



BI 224436

図 8. BI 224436 の構造

4. 本研究の目的

先述したように、HIV は薬剤の飲み忘れ等のアドヒアランス不良により容易にウイルスの耐性変異が起こる。一度耐性変異が入ってしまうと今まで使用していた薬の効果が減弱し、薬の変更を余儀なくされ、治療に用いることができる薬剤の幅が狭くなっていく。使用できる薬がない状態を避けるためにも新規メカニズムの薬は依然求められており、その探索研究が盛んに行われている。そこで私は新規メカニズムである INLAIs に着目し、研究に取り組むことにした。

この INLAIs は非常に多くの研究機関が特許を出願しており競合が激しい。そこで他の化合物との差別化を狙った独自の骨格の創出および、新規ファーマコフォアの獲得を本研究の目的とし研究を開始することにした。さらに臨床試験に進んだ化合物である **BI 224436** と比較して、より強力な抗ウイルス活性を示す化合物を見出すことも目的とした。

本論

第1章 ベンゼン骨格を有する新規 INLAIs の創出

1. 創薬研究の方針

INLAIs は既に多くの研究機関で研究されており、特許も多数報告されている⁹⁾。そこで先述したように、まずは SAR を自由に実施可能にするために独自の骨格を創出することにした。

Boehringer Ingelheim 社は INLAIs である **BI 224436** を既に Phase 1 試験まで進めている¹³⁾。後にこの化合物は Gilead 社へ導出された。しかし、この化合物は Phase 1 で理由の開示なしに、試験が中止している。**BI 224436** の構造を見て分かるように、部分構造としてピリジン環 (青線) と *t*-ブトキシ酢酸ユニット (赤線) を有している (図9)。*t*-ブトキシ酢酸ユニットは報告されている化合物ほぼ全てに共通する構造で必須のファーマコフォアだと考えられる。また他の研究機関から 1~4 に示す構造を有する化合物も報告されている⁹⁾。

ここで私は、中心骨格としてピリジン環が多く用いられていることに気づいた。このピリジン環を他の環に変換することによって、他社の特許との抵触を回避し、自由に SAR が可能であること、またピリジン骨格とは異なる展開ができるのではないかという事を考えた。

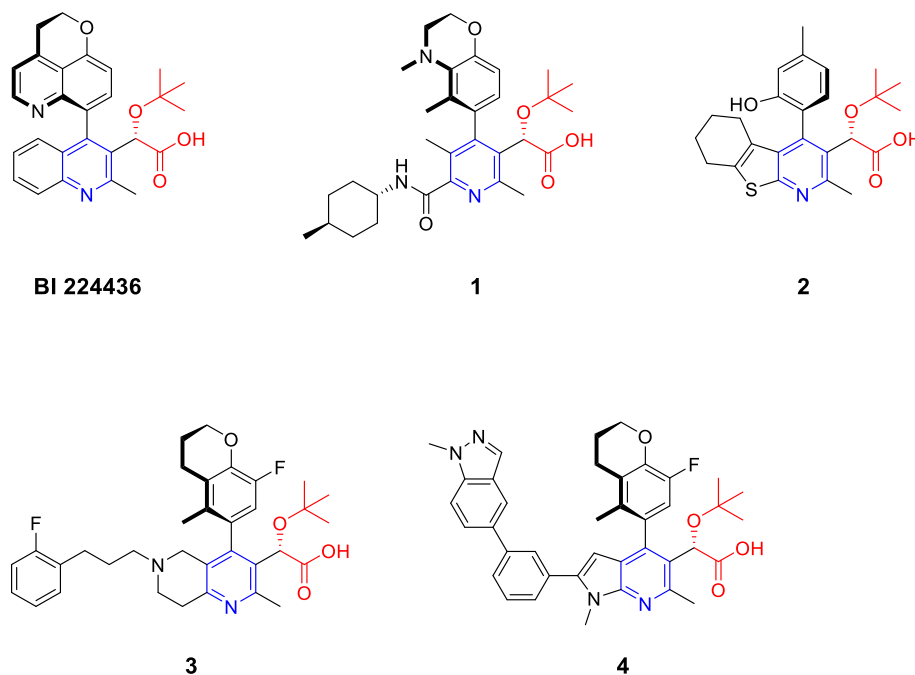


図9. BI 224436 と化合物 1~4 の構造⁹⁾

図 10 に新規骨格のコンセプトを示した。INLAIs に共通する構造である *t*-ブトキシ酢酸ユニットが置換したピリジン **5** を基に新規骨格をデザインした。先述したように *t*-ブトキシ酢酸ユニットはおそらく活性発現に必須の構造であると考えられるのでそのまま残し、母核のピリジンを変換することを考えた。その際、ピリジン環では下方向に置換基が伸ばせないことに着目し、その方向に置換基が伸ばすことができるベンゼン骨格を考案した。また窒素原子は環外に出し、アニリンにすることで、置換基修飾が容易になり SAR を行いやすくなると考え新規ベンゼン骨格 **6** を考案した。

他の研究機関の骨格を見て分かるように、母核の 1 位から置換基を伸ばしているものはほとんど存在せず、独自性の高い新たなファーマコフォアをこの領域で獲得できるチャンスがあると考えた。

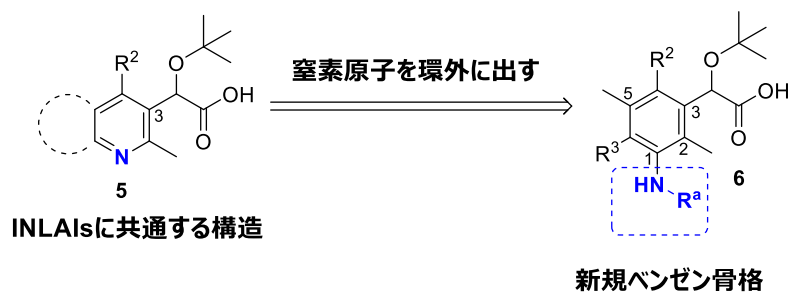


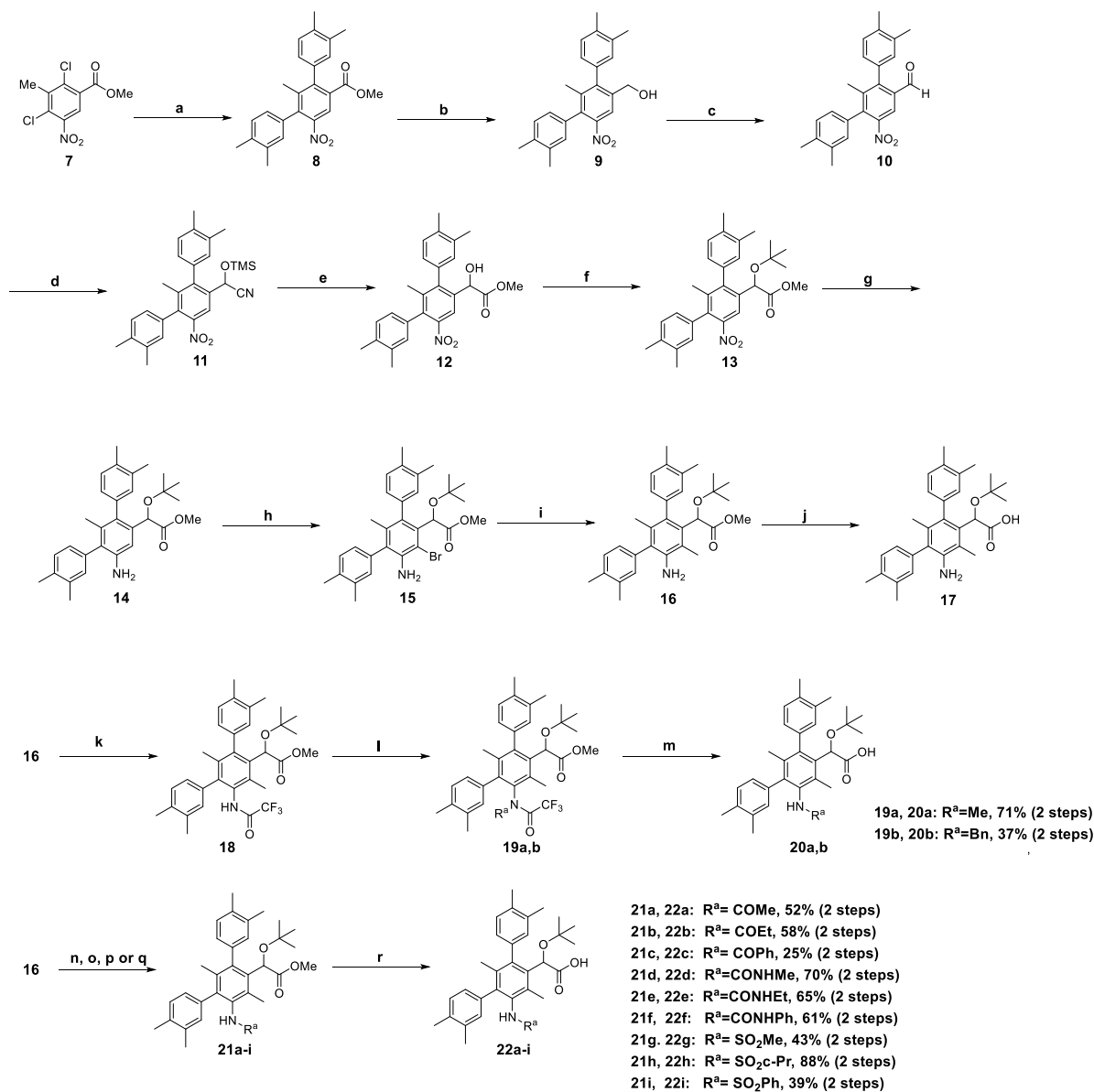
図 10. 新規骨格のコンセプト

2. 化合物の合成

最初に 1 位の置換基を探索するための合成ルートを構築することにした (スキーム 1). 市販のジクロロベンゼン **7** に対して 3,4-ジメチルベンゼンを鈴木カップリングで導入し **8** を得た. 続いてメチルエステルを DIBAL で還元してアルコール体 **9** へと変換後, MnO_2 で酸化してアルデヒド **10** とした. アルデヒド **10** に対して TMSCN を反応させ, シアノヒドリン **11** へと変換後, 酸性条件下メタノール中で加熱することにより, メチルエステル体 **12** へと導いた. 得られた **12** の水酸基を *t*-Bu 化した後に, ニトロ基を水酸化パラジウムを用いて水素添加し, アニリン **14** へと変換した. 続いて NBS を用いてブロモ化し, トリメチルボロキシンの鈴木カップリングによってメチル体 **16** へと変換した. 得られた **16** のメチルエステルを加水分解してカルボン酸 **17** を得た.

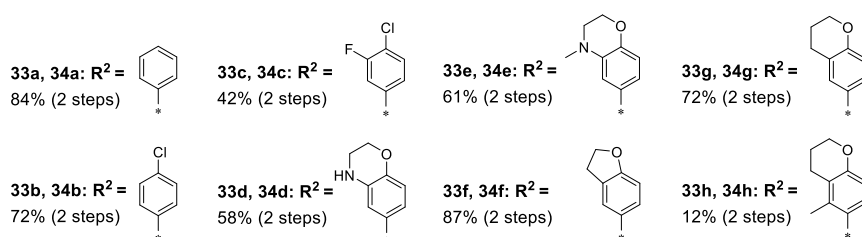
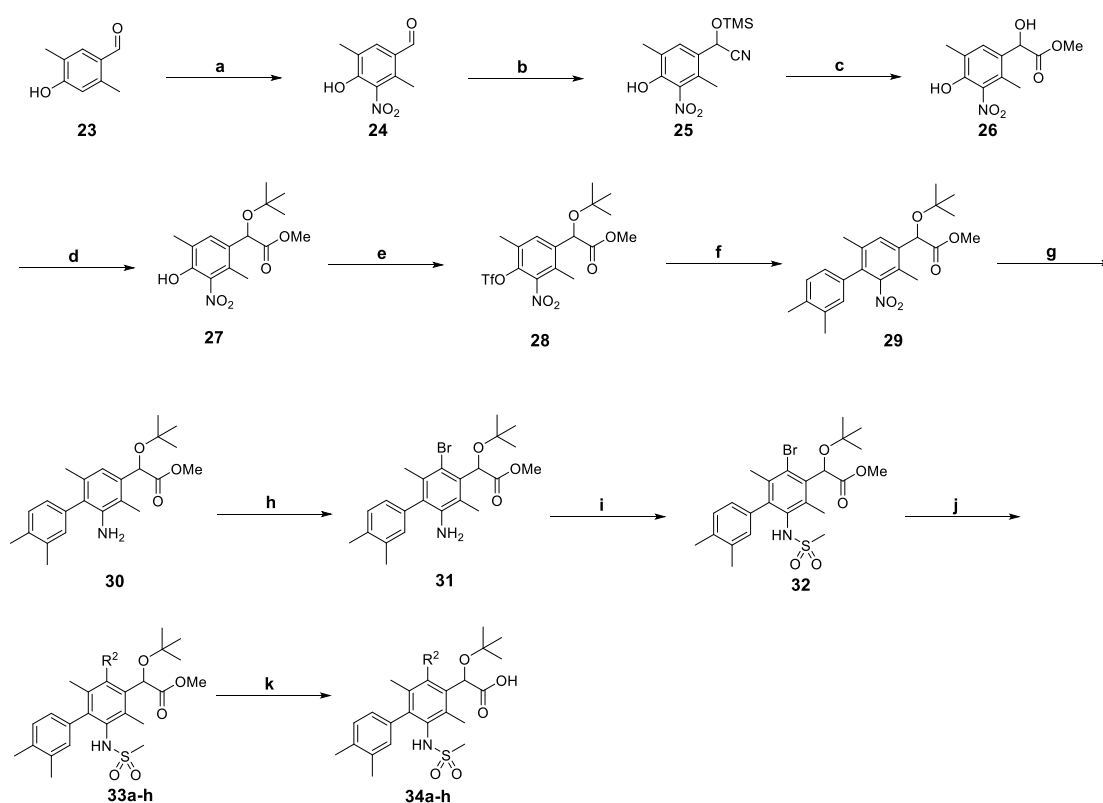
次に中間体 **16** のアニリンに TFAA を反応させトリフルオロアセトアミド **18** を得た. 続いてアルキルハライドを反応させて **19a,b** へと変換し, メチルエステルを加水分解, トリフルオロアセチル基の脱保護を同時に行い, それぞれ **20a,b** へと導いた.

最後に中間体 **16** に対して各種試薬を反応させ **21a-i** に変換し, メチルエステルを加水分解してそれぞれ **22a-i** へと導いた.



スキーム 1. Reagents and conditions: (a) 3,4-dimethylphenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃aq, 1,4-dioxane, 100°C, 71%; (b) DIBAL, CH₂Cl₂, -78°C, 90%; (c) MnO₂, CH₂Cl₂, reflux, 84%; (d) TMSCN, ZnI₂, CH₂Cl₂, r.t.; (e) H₂SO₄, MeOH, 90°C, 89% (2 steps); (f) HClO₄, *t*-BuOAc, r.t., 60%; (g) Pd(OH)₂, H₂, MeOH, r.t., 89%; (h) NBS, DMF, r.t., 95%; (i) trimethylboroxine, PdCl₂·(dppf), K₂CO₃aq, 1,4-dioxane, H₂O, 120°C, 58%; (j) NaOHaq, THF, MeOH, 60°C, 69%; (k) TFAA, pyridine, CH₂Cl₂, 0°C, 98%; (l) Ral or RaBr, K₂CO₃, DMF, r.t.; (m) NaOHaq, DMSO, 100°C; (n) RCOCl, pyridine, r.t.; (o) RNCO, toluene, 70°C; (p) triphosgene, RNH₂, Et₃N, (CH₂Cl)₂, r.t.; (q) RSO₂Cl, pyridine, 50°C; (r) NaOHaq, THF, MeOH, 60°C

次に1位の置換基を Ms 基に固定して、R²の置換基を探索できるルートの開発に取り組んだ（スキーム 2）。まず市販のフェノール **23** に対してニトロ化を行い、ニトロフェノール **24** を得た。続いてアルデヒドに TMSCN を付加させ、TMS シアノヒドリン **25** を得た後に酸性条件下シアノ基をメチルエステル **26** に変換した。次に **26** の水酸基を酢酸 *t*-Bu と過塩素酸を用いて *t*-Bu エーテル体 **27** に変換後、フェノール性水酸基を Tf₂O を用いてトリフラート化した。得られたトリフラート体 **28** に対して、3,4-ジメチルフェニルボロン酸を用いて鈴木カップリングを行い **29** を得た。**29** のニトロ基を Pd(OH)₂ を用いて水素雰囲気化還元し、アニリン **30** に変換した後、NBS を用いて4位をブロモ化した。**31** に対して Ms₂O を反応させて、4位の変換を行うための共通中間体であるメタンスルホンアミド体 **32** を得た。**32** に対して対応するボロン酸、ボロン酸エステルを鈴木カップリングさせることによりカップリング体 **33a-h** に変換後、メチルエステル体を加水分解することにより、対応するカルボン酸 **34a-h** を合成した



スキーム 2. Reagents and conditions: (a) H_2SO_4 , KNO_3 , 0°C , 97%; (b) TMSCN , ZnI_2 , CH_2Cl_2 , 0°C ; (c) HCl in MeOH , H_2O , reflux, 91% (2 steps); (d) HClO_4 , $t\text{-BuOAc}$, r.t., 86%; (e) Tf_2O , pyridine, CH_2Cl_2 , r.t., 96%; (f) 3,4-dimethylphenylboronic acid, $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, $\text{K}_2\text{CO}_3\text{aq}$, 1,4-dioxane, 80°C , 63%; (g) $\text{Pd}(\text{OH})_2$, H_2 , MeOH , AcOH , 93%; (h) NBS , DMF , 0°C , 90%; (i) Ms_2O , pyridine, 60°C , 64%; (j) $\text{R}^2\text{B}(\text{OH})_2$ or $\text{R}^2\text{B}(\text{pin})$, $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, $\text{K}_2\text{CO}_3\text{aq}$, 1,4-dioxane, 100°C ; (k) NaOHaq , THF , MeOH , 60°C

3. 構造活性相関および各種評価

1位の置換基 R¹の構造活性相関の結果を表3に示した。NL432に対する活性と細胞毒性を評価した。まず他の研究機関があまり手を付けていない、1位の置換基 R¹の変換を行った。その際、4位と6位は脂溶性置換基が好まれるという情報が有ったので、3,4-ジメチルベンゼンに固定した⁹⁾。

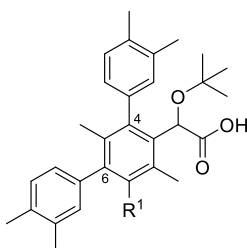
無置換のアミン **17** とメチルアミン **20a** は NL432 に対して阻害活性を示した (EC₅₀ (NL432) = 27 nM, 31 nM)。しかしながら、ベンジルアミン **20b** は無置換のアミン **17**, メチルアミン **20a** と比較して弱い活性を示した (EC₅₀ (NL432) = 480 nM)。この結果から置換基 R¹の脂溶性が増加すると活性が下がるのではないかという仮説を立て、アミド、ウレア、スルホンアミドの様な極性官能基を導入することにした。

アセトアミド **22a** は無置換のアミン **17** と比較して、予想通り活性が向上した (EC₅₀ (NL432) = 19 nM)。ここで先述の仮説と併せて、水素結合アクセプターを有する置換基が活性に重要ではないかという仮説も立てた。続いて、プロピオンアミド **22b** はアセトアミド **22a** と同様の活性を示し、ベンズアミド **22c** はアミンの傾向と同様に活性が低下した (EC₅₀ (NL432) = 51 nM)。置換基 R¹がウレア (**22d-f**)の場合では、活性と脂溶性の傾向は逆であり、フェニルウレア **22f** がメチルウレア **22d** よりも強い活性を示した。


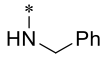
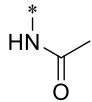
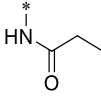
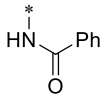
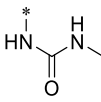
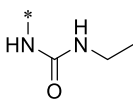
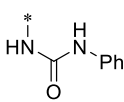
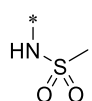
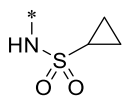
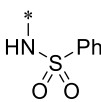
続いてスルホンアミド基の導入においては、メタンスルホンアミド **22g** がシクロプロピルスルホンアミド **22h**, フェニルスルホンアミド **22i** よりも3倍程度強い活性を示し、置換基 R¹の変換で最も良い活性を示した (EC₅₀ (NL432) = 11 nM)。

また置換基 R¹の変換において細胞毒性と活性の乖離は十分であった。

表3. R¹の構造活性相関^a



Cmpd.	R ¹	MT-4/MTT	MT-4/MTT
		NL432 : EC ₅₀ (nM)	CC ₅₀ (nM)
17	[*] NH ₂	27 ± 4.1	12000 ± 130

20a		31 ± 8.1	8800 ± 280
20b		480 ± 130	4000 ± 190
22a		19 ± 3.9	19000 ± 1300
22b		19 ± 10	15000 ± 1400
22c		51 ± 10	9100 ± 300
22d		77 ± 11	20000 ± 1400
22e		37 ± 8.8	15000 ± 1500
22f		29 ± 5.9	8000 ± 130
22g		11 ± 0.5	15000 ± 650
22h		29 ± 6.6	11000 ± 1100
22i		33 ± 10	11000 ± 1200
	BI 224436	56 ± 8.1	>50000

^aData represent the mean ± s.d. from three independent experiments.

置換基 R¹としてメタンスルホンアミドが最も良い活性を示すことを見出したので、続いて置換基 R²の変換を行うことにした(表4)。この際、置換基 R¹はメタンスルホンアミド基に固定した。最初に化合物 **22g** 中の置換基 R²として3,4-ジメチルベンゼンが導入されているので、メタ位とパラ位の置換基の効果について検証していくことにした。

まず無置換ベンゼン **34a** は3,4-ジメチルベンゼン **22g** と比較して活性が3倍程度低下した(EC₅₀(NL432) = 34 nM)。この結果からメタ位、パラ位のどちらかもしくは両方が活性に重要だということが分かった。続いて *p*-Cl ベンゼン **34b** が EC₅₀(NL432) = 11 nM を示し、*p*-Cl, *m*-F ベンゼン **34c** が EC₅₀(NL432) = 26 nM を示したことから、特にパラ位の置換基が活性に重要だという事が分かった。

次に、パラ位、メタ位に置換基が許容されることから、パラ位とメタ位を結んで縮環した置換基の検討を行った。ジヒドロベンゾオキサジン **34d** は活性が大きく低下したが(EC₅₀(NL432) = 330 nM)、アニリン部位をメチル化したメチルジヒドロベンゾオキサジン **34e** は活性を示した(EC₅₀(NL432) = 31 nM)。この結果から、置換基 R⁴の周辺は水素結合ドナーが好まれない可能性があると考えた。続いてジヒドロベンゾフラン **34f**、クロマン **34g** では **34g** の方が良好な活性を示した。**34f** と **34g** の違いは、縮環している環状エーテルが5員環か6員環かどうかであり、6員環の方が、脂溶性のポケットをうまく埋めることができているために活性がより強いのではないかと考察した。

最後に **34g** を基に置換基の固定化を試みた。**34g** は ¹H-NMR, TLC の挙動からアトロプアイソマー混合物であることが想定される。さらにその二つの異性体はクロマトグラフィーで一時的に分離できても、時間の経過と共にアトロプアイソマー混合物に戻ってしまう。また、図12に **34d** と HIV-1 IN-CCD の共結晶構造を示したが、この図からクロマンは母核のベンゼンに対してほぼ直交していることが分かる。そこで片方の異性体に固定化することで活性配座を取りやすくし、活性が向上するのではないかと考え検証することにした。

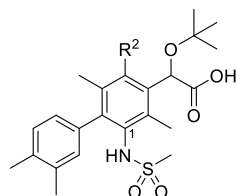
34g のオルト位に Me 基を導入した **34h** では期待通り、アトロプアイソマー混合物ではなく単一の化合物であった。また活性は **34g** と比較して5倍程度向上し EC₅₀(NL432) = 3.9 nM を示した。この活性向上の理由としては前述の通り、ビアリアル部分の自由回転を阻害し、活性配座を取りやすくしたことが要因であると考えている。またこの **34h** の配座として2種類が考えられるが、図11に示した左側の配座であると想定している。その理由として、右側の配座ではクロマンのメチレン部分がタンパクと衝突しており、結合に不利な点が挙げられる(図中のオレンジ色の点線はタンパクとの衝突を表している)。

以上の結果から、この置換基 R²の変換で活性が向上することを示すことができ、更に細胞毒性は低く、活性と毒性の乖離は十分である事が明らかとなった。最高活性を示した **34h** は、比較対象化合物としていた **BI 224436** よりも14倍程度強い活性を示した。

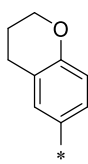
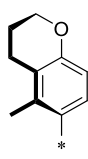
構造活性相関についてまとめると、置換基 R¹ と R² の変換が活性の向上に重要であることを明らかにすることができた。特に置換基 R¹ の変換は新しい知見であり、今後の新規

INLAIs 探索の上で重要な情報になってくる事が予想される.

表 4. R² の構造活性相関^a



Cmpd.	R ²	MT-4/MTT	
		NL432 : EC ₅₀ (nM)	CC ₅₀ (nM)
34a		34 ± 4.0	>50000
34b		11 ± 2.9	26000 ± 610
34c		26 ± 3.7	22000 ± 3000
34d		330 ± 12	42000 ± 12000
34e		31 ± 1.1	31000 ± 5700
34f		35 ± 10	38000 ± 10000

34g		22 ± 3.7	28000 ± 2700
34h ^b		3.9 ± 1.2	24000 ± 1000
BI 224436		56 ± 8.1	>50000

^a Data represent the mean \pm s.d. from three independent experiments.

^b estimated structure of the atropisomer

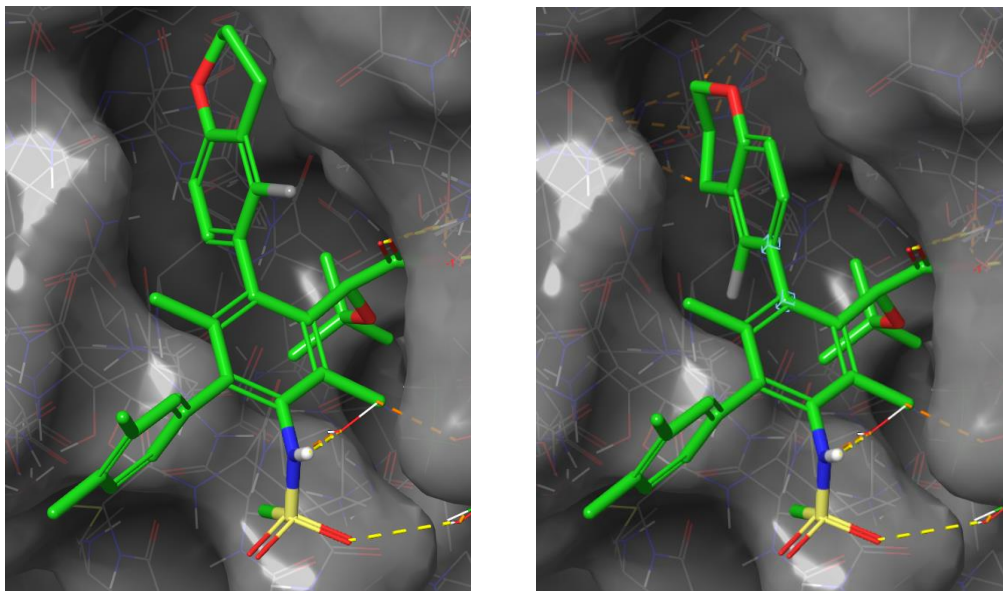


図 11. 34h の 2 種類のアトロプアイソマー予測結合様式

図 12 に **34 d** と HIV-1 IN-CCD の共結晶構造を示した (PDB ID 6LMQ)。他に報告されている INLAIs と同様にカルボン酸部分は E170 と H171 のアミノ酸主鎖及び T174 のアミノ酸側鎖と相互作用していることが分かった¹²⁾。また置換基 R² のジヒドロベンゾオキサジンは Q168 のアミノ酸主鎖と相互作用していることが明らかとなった。更に、置換基 R¹ のスルホンアミドは Q95 の側鎖と相互作用していた。この相互作用はおそらくピリジンでは直接獲得することはできず、1 位から置換基を伸ばしたベンゼン骨格だからこそ取り得る相互作用である。

また、表 3 に示した R¹ の構造活性相関において、スルホンアミド、アミド、ウレアの様な水素結合アクセプターが活性向上に寄与している結果が得られたが、これはおそらく Q95 との相互作用形成による効果だと考えられる。

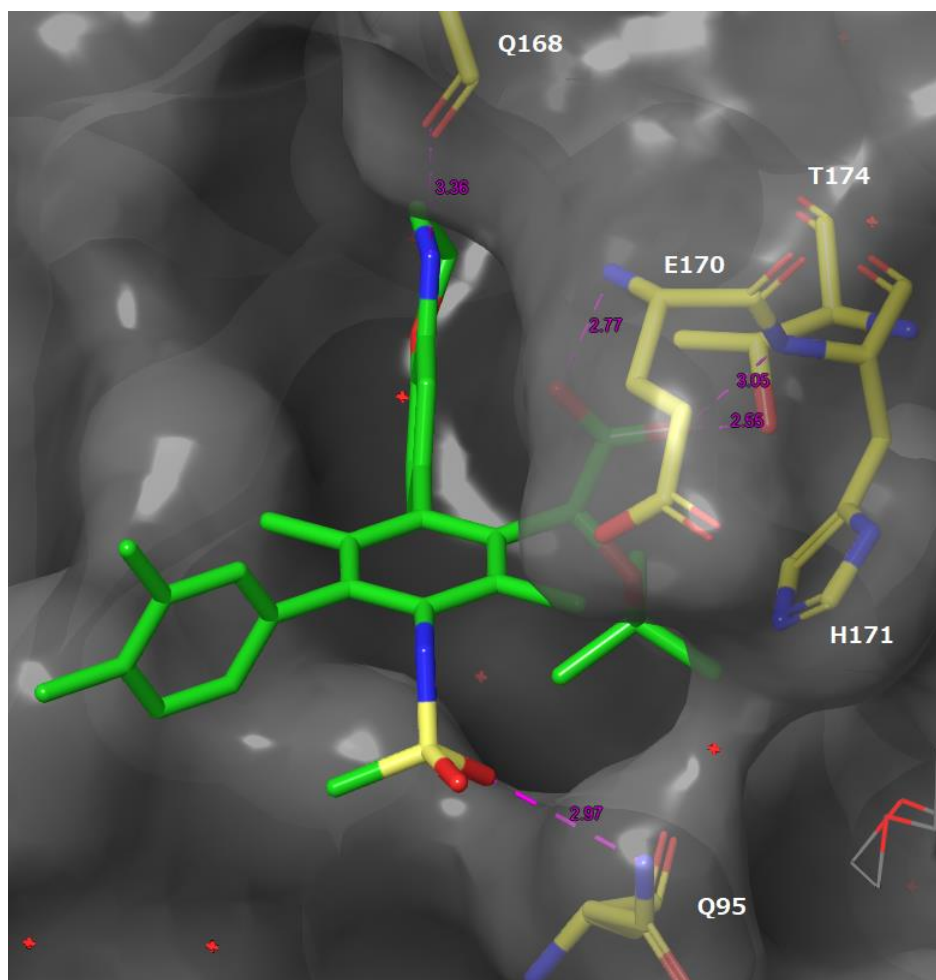


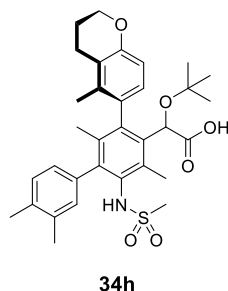
図 12. **34d** と HIV-1 IN-CCD の共結晶構造 (PDB ID 6LMQ, 分解能 : 2.1 Å)

次に最高活性を示した化合物 **34h** の代謝安定性とラットの薬物動態学的パラメーターを測定した (表 5). 薬物動態学試験は静脈注射 (iv) と経口投与 (po) で行い, それぞれ 0.5 mg/kg, 1 mg/kg で実施した.

化合物 **34h** は中程度の代謝安定性 (MS) をラット, ヒトのマイクロソームを用いた試験で示した (HLM MS = 59 %, RLM MS = 61 %). また良い全身クリアランス (CLt) 及び生物学的利用率 (BA) を示した (CLt = 6.99 mL/min/kg, BA = 36 %).

これらの試験によって化合物 **34h** は中程度の代謝安定性及び, ラットにおいて良い薬物動態学プロファイルを有している事を確認できた.

表 5. 化合物 **34h** の代謝安定性と薬物動態学的パラメーター



Cmpd.	HLM ^b MS (%)	RLM ^b MS (%)	CLt ^b (mL/min/kg)	AUCiv ^b (ng·hr/mL)	T _{1/2} ^b (h)	F ^b (%)
34h	59	61	6.99	1190	3.1	36

^a The compound was administered at 0.5 mg/kg (iv), 1.0 mg/kg (po) using a cassette dosing method.

^b HLM: human liver microsome, RLM: rat liver microsome, CLt: total clearance, AUC: area under the curve T_{1/2}: elimination half-life, F: bioavailability

小括すると, 1 位から置換基が伸長した新規ベンゼン骨格を有する INLAIs をデザインし合成することに成功した. この新規骨格の置換基 R¹ に水素結合アクセプターを導入することで活性が向上し, その要因として Q95 と相互作用していることが共結晶 X 線構造解析で分かった. 最適化 SAR の結果, 化合物 **34h** は EC₅₀ (NL432) = 3.9 nM を示し, 比較としていた **BI 224436** の活性 (EC₅₀ (NL432) = 56 nM) を上回った. またこの化合物 **34h** は, 中程度の代謝安定性及び, ラットにおいて良い薬物動態学プロファイルを有している事を確認できた.

第2章 ピリジン骨格を有する新規 INLAIs の創出

1. 創薬研究の方針

第1章ではベンゼン環の1位から置換基が伸長した新規 INLAIs の発見について述べた。探索合成研究において、置換基の変換のみで活性、動態、安全性、物性面での課題が解決できる場合もあるが、その骨格に依存した課題であった場合、置換基の変換のみで解決することは困難である。そこで探索合成研究の初期における新規骨格探索は重要になってくる。この観点から骨格複線化を求め、新たに新規骨格をデザインすることにした。

第1章でも述べたように、INLAIs の中心骨格には部分構造としてピリジンが用いられることが多い¹²⁾。またベンゼンと比較してピリジンは脂溶性が下がり、一般的に代謝安定性が向上する等のメリットがある。また6置換のベンゼンと比較してピリジンは5置換になるため、合成が容易である。そこで、多く用いられているピリジン骨格と我々が見出した1位の置換基を組み合わせた骨格 **36** を着想した(図1.3)。ここでピリジンの窒素原子は1位から置換基を伸長させるために左にずらした。この新規骨格 **36** の位置に窒素原子を有するピリジン骨格は未だに報告されていない。さらにこの骨格 **36** の1位から私が見出した置換基の伸長を組み合わせることは、容易には発想できない独自のデザインであり、この骨格の展開において、新たな知見が得られることが期待できる。

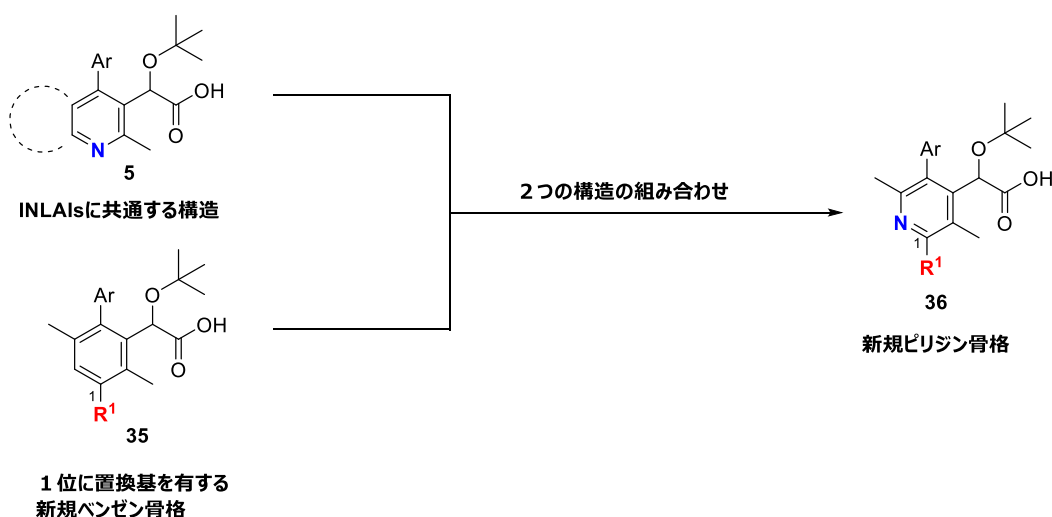
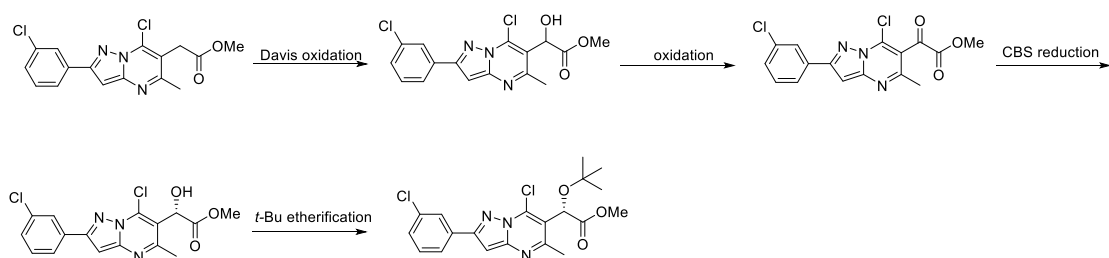


図1.3. 新規骨格 **36** のコンセプト

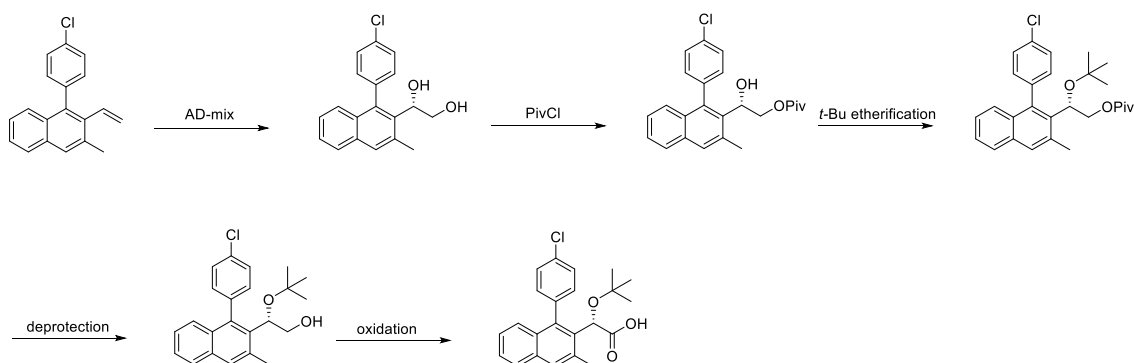
2. 化合物の合成

1章の合成で示したように INLAIs に必須のファーマコフォアである *t*-BuO 酢酸ユニットは導入に多工程を要する。また他の研究機関もこのユニットの導入には多工程を要しており、1工程で導入している例はない^{13), 14), 15)}。Scheme 3 に示したように光学活性体の合成においては、3~5工程必要となっていて、効率的な SAR 展開の障壁になっている。そこで工程数削減を目的として、カップリング反応を用いることによって、このユニットが短工程で導入できないか検討した。

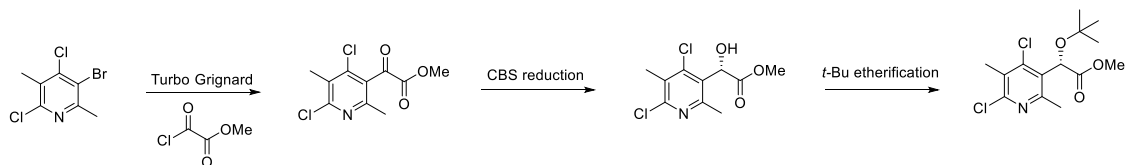
WO2012033735A1



WO2012003497A1

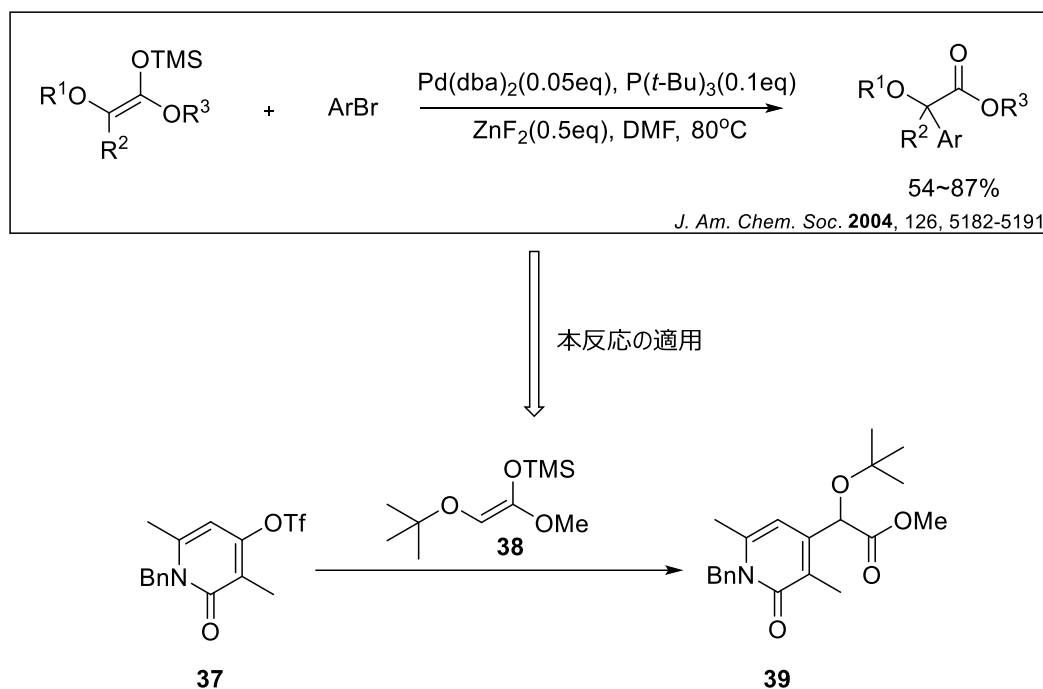


WO2010130034A1



スキーム 3. *t*-BuO 酢酸の導入例

Hartwig らがアリールハライドとシリルエノールエーテルのカップリングを報告しており¹⁷⁾, *t*-BuO エーテル部分を有するシリルエノールエーテル **38** が合成できれば, ラセミ体のカップリング体 **39** が得られると考えた (スキーム 4).



スキーム 4. Hartwig 報告のカップリング反応とその適用

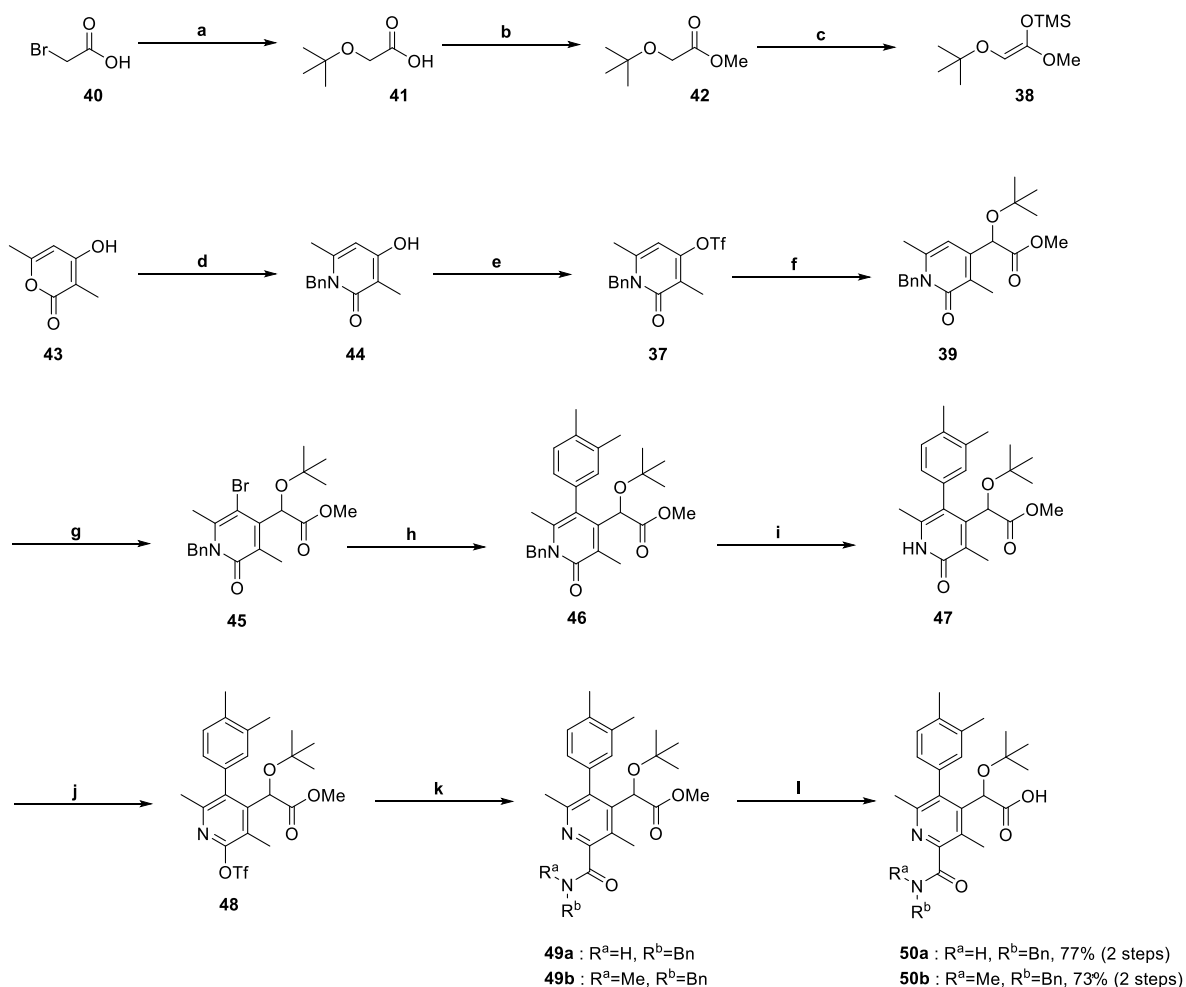
スキーム 5 にその合成ルートを示した. 最初に市販のプロモ酢酸 **40** に対して *t*-BuOH を置換させ **41** を得た. 続いてヨウ化メチルを用いてカルボン酸をメチルエステル化し, エステル体 **42** へと変換した. 最後に KHMDS とトリメチルシリルクロライドを用いて, シリルエノールエーテル **38** を得た. カップリングパートナー **38** が得られたので, アリールトリフレート **37** の調製を行うことにした. 市販のピロン **43** に対してベンジルアミンを反応させ, ピリドン **44** を得た. 続いて水酸基をトリフレート化してアリールトリフレート体 **37** を合成した.

カップリングの準備が整ったので Hartwig らが報告している反応を適用することにした. シリルエノールエーテル **38** とアリールトリフレート **37** に対してジベンジリデンアセトンパラジウムとフッ化亜鉛を用いることにより反応は首尾良く進行し, 目的物 **39** を 51% で得ることに成功した. この反応はラセミ体の *t*-BuO 酢酸ユニットを 1 工程で導入する最初の例であり, INLAIs の母核の探索において有用な反応になり得る. またスキーム 6 に示した

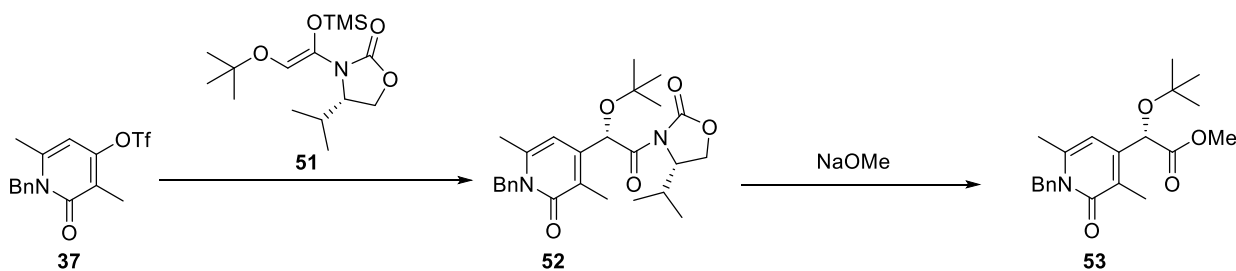
ように、本反応はジアステレオ選択的なカップリングも報告されており、この反応を適用することによって光学活性体 **53** を得ることができると考えられる (スキーム 6)。

続いてカップリング体 **39** の修飾を行った。**39** に対して NBS を用いて 4 位をブロモ化後、鈴木カップリングによって 4 位に 3,4-ジメチルフェニル基を導入した。次にピリドンの窒素原子上のベンジル基を酢酸溶媒中、Pd/C を用いて水素添加で除去し **47** を得た。最後に Tf₂O を用いて共通中間体であるトリフラート体 **48** へと導いた。この中間体から 1 位の置換基の変換を種々実施した。

アミド体 **50a,b** の合成は中間体 **48** に対して一酸化炭素雰囲気化、パラジウムとアミンを用いることによって対応するアミド体 **49a,b** を合成した。最後にメチルエステルを加水分解することによってカルボン酸 **50a,b** へと変換した。



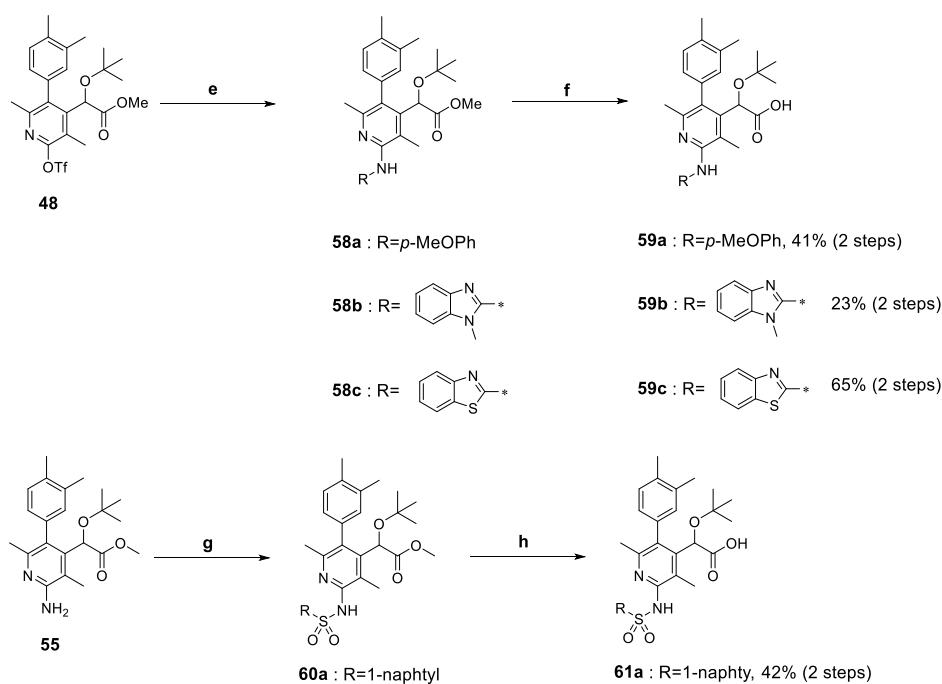
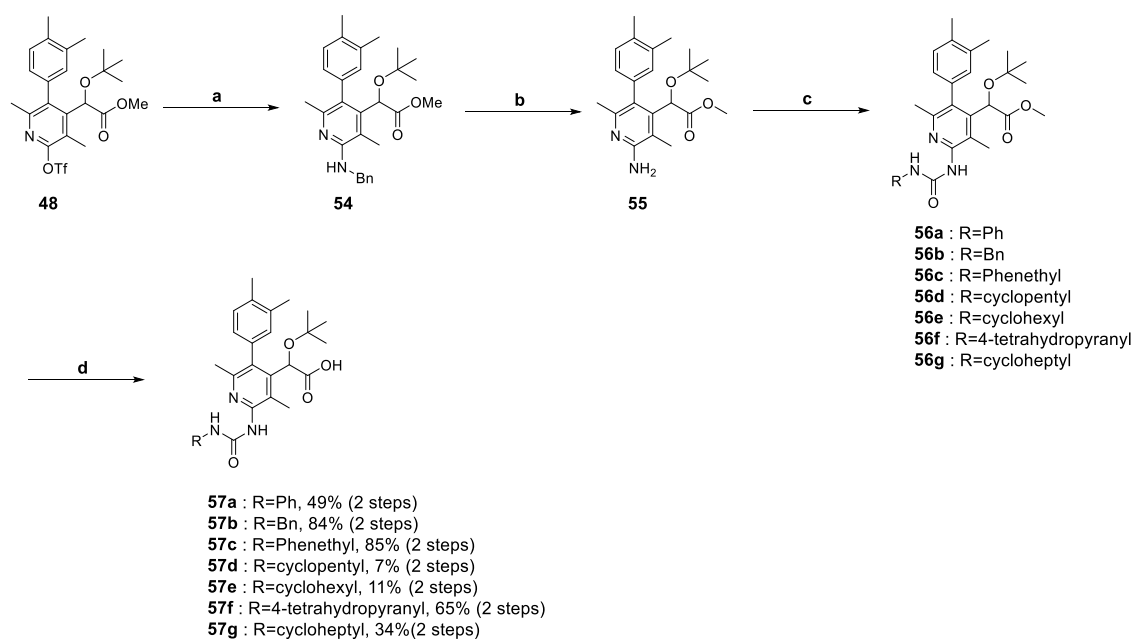
スキーム 5. Reagents and conditions: (a) NaH, *t*-BuOH, THF, reflux, 74%; (b) MeI, K₂CO₃, DMF, r.t., 71%; (c) KHMDS, TMSCl, THF, -78°C, 67%; (d) BnNH₂, H₂O, reflux, 51%; (e) Tf₂O, Py, CH₂Cl₂, r.t., 92%; (f) **38**, Pd(dba)₂, P(*t*-Bu)₃, ZnF₂, DMF, 100°C, 51%; (g) NBS, CH₃CN, r.t., 82%; (h) 3,4-diMePhB(OH)₂, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃aq, DMF, 140°C; (i) H₂, Pd/C, AcOH, 80°C, 44% in 2 steps; (j) Tf₂O, Py, CH₂Cl₂, 0°C; (k) amine, Pd(PPh₃)₄, CO(1 atm), Et₃N, LiCl, DMF, 80°C; (l) NaOHaq, MeOH, reflux



スキーム 6. ジアステレオ選択的カップリング反応の適用

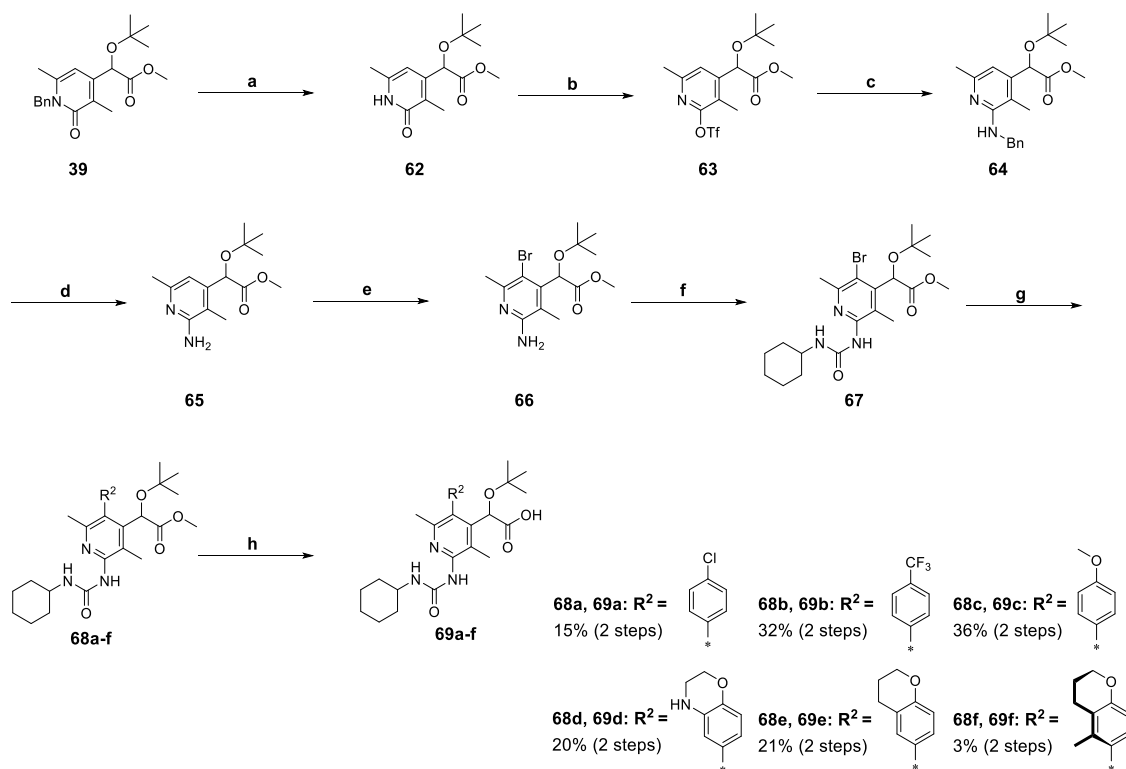
スキーム 7 に 1 位変換体の合成ルートを示した。中間体**48**に対してBuchwald-Hartwigアミネーションを用い、窒素源としてベンジルアミンを導入した。続いてMeOH溶媒中、水素雰囲気下Pd/Cを用いてベンジル基を除去し、アミノピリジン**55**を得た。次にアミノ基に各イソシアネートを反応させ、対応するウレア体**56a-g**を合成した。最後に加水分解によってメチルエステルをカルボン酸へと変換し**57a-g**を得た。

化合物**59a-c**の合成は中間体**48**に対してBuchwald-Hartwigアミネーションにより各アミンを導入し、メチルエステルを加水分解することにより達成した。また、化合物**61a**はアミノピリジン**55**をスルホンアミド化、続く加水分解によって合成した。



スキーム 7. Reagents and conditions: (a) BnNH₂, Pd(dba)₂, xantphos, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane, 80°C, 98%; (b) H₂, Pd/C, MeOH, r.t., 86%; (c) RNCO, Et₃N, 1,2-dichloroethane, 60°C; (d) NaOHaq, MeOH, reflux; (e) RNH₂, Pd₂(dba)₃, xantphos, Cs₂CO₃, toluene, reflux; (f) NaOHaq, MeOH, reflux; (g) 1-naphthalenesulfonyl chloride, Py, 80°C; (h) NaOHaq, MeOH, reflux

次に1位の置換基をシクロヘキシルウレアに固定し、4位の置換基 R^2 を変換した化合物の合成に着手した (スキーム 8)。中間体 **39** のベンジル基を酢酸中 Pd/C を用いて水素添加で除去した。続いてピリドン **62** に対して Tf_2O を用いてトリフラート化し、ベンジルアミンをカップリング反応で導入して化合物 **64** を得た。次にベンジル基を Pd/C を用いて水素添加で除去し、アミノピリジン **65** へと変換した。アミノピリジン **65** に対して、NBS を用い4位をブロモ化し、シクロヘキシルイソシアネートとの反応によって共通中間体であるウレア **67** を得た。ウレア **67** との種々のボロン酸もしくはボロン酸エステルとの鈴木カップリング反応により、対応するカップリング体 **68a-f** を得た。最後にメチルエステルを水酸化ナトリウムを用いて加水分解することによりカルボン酸体 **69a-f** を得た。



スキーム 8. Reagents and conditions: (a) Pd/C, H_2 , AcOH, $80^\circ C$, 88%; (b) Tf_2O , pyridine, CH_2Cl_2 , $0^\circ C$, 96%; (c) $BnNH_2$, Cs_2CO_3 , $Pd(dba)_2$, xantphos, 1,4-dioxane, $80^\circ C$, 87%; (d) Pd/C, H_2 , MeOH, r.t., 99%; (e) NBS, CH_3CN , $0^\circ C$, 95%; (f) cyclohexyl isocyanate, CH_2Cl_2 , r.t., 67%; (g) $PdCl_2(dtbpf)$, $R^2B(OH)_2$ or $R^2B(pin)$, K_2CO_3 aq, DMF, $120^\circ C$; (h) $NaOH$ aq, MeOH/THF, $90^\circ C$

3. 構造活性相関および各種評価

表6に置換基 R¹ の構造活性相関の結果を示した。WT, T174I に対する抗ウイルス活性と細胞毒性の評価を行った。ここで T174I は耐性分離試験で確認された変異株であり, EC₅₀(WT) < 100 nM の化合物のみ T174I に対する活性を評価した。

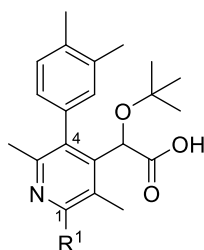
まず4位の置換基を1章で述べたベンゼン骨格の SAR と同様に 3,4-ジメチルベンゼンに固定し, 置換基 R¹ の変換を行った。p-メトキシアニリン **59a** は WT に対して中程度の活性を示した (EC₅₀ = 220 nM)。更に, 2-アミノベンゾイミダゾール **59b** と 2-アミノベンゾチアゾール **59c** も WT に対して同程度の活性を示した (EC₅₀ = 190 nM, 350 nM)。しかしながら, 1-ナフタレンスルホンアミド **61a** はそれらの化合物よりも良い活性を示した (EC₅₀ = 32 nM)。主な構造的違いはスルホンアミドを有しているかいないかである。この結果から, R¹ の置換基として水素結合アクセプターが活性発現に重要ではないかと考えた。第1章でベンゼン骨格の1位のスルホンアミドが Q95 の側鎖と相互作用していることを述べたが, 同じことが **61a** で生じているのだと考察した。

次に, Q95 との相互作用を狙ってアミドやウレア等のカルボニル基を有する置換基を導入することにした。ベンジルアミド **50a** は N-メチルベンジルアミド **50b** と比較して WT に対して2倍強い活性を示した (EC₅₀ = 180 nM)。化合物 **50a** と **50b** の構造的違いは分子内水素結合を形成できるかどうかである。これはベンジル基の様な脂溶性置換基の方向が活性に影響していることを示している可能性がある。この仮説を基に分子内水素結合を形成し, 置換基を固定できるウレアを導入した。アミド **50a** と比較して対応するベンジルウレア **57b** は5倍強い活性を示した (EC₅₀ = 35 nM)。アミドは疑似的な5員環を形成するのに対し, ウレアは6員環を形成する (図14)。したがって, それぞれのベンジル基の向きが異なり, 6員環の場合のベンジル基の位置が活性発現に重要なのではないかと考察した。

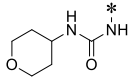
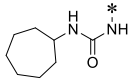
これらの結果からベンジルウレア **57b** の最適化を行うことにした。**57b** よりも1炭素短いフェニルウレア **57a** はより良い活性を示し (EC₅₀ = 11 nM), そのフェニル基がシクロヘキシル基になった **57e** は更に活性が向上した (EC₅₀ = 6.6 nM)。更に, シクロアルカンに分類される **57d, 57g** も同様の活性を示した (EC₅₀ = 8.3 nM, 11 nM)。一方, 4-テトラヒドロピランの活性は **57a** と比較して弱かった (EC₅₀ = 45 nM) ことから, この領域は極性基が好まれないであろうと考察した。以上の結果から良好な抗ウイルス活性発現のためにはシクロヘキサンのような脂溶性が高く, 柔軟性がある置換基が必要であるということが分かった。

また T174I 変異株に対しては, 置換基 R¹ の変換で活性を示す化合物は見いだせなかった。その理由として置換基 R¹ は T174 から離れているため, その変換は変異株のリガンド結合ポケットとの相互作用に影響を与えなかったことが考えられる。

表 6. R¹ の構造活性相関^a



Cmpd.	R ¹	MT-4/MTT	MT-4/MTT	MT-4/MTT
		WT : EC ₅₀ (nM)	T174I : EC ₅₀ (nM)	CC ₅₀ (nM)
59a		220	N.T.	28000
59b		190	N.T.	14000
59c		350	N.T.	6600
61a		32	1000	16000
50a		180	N.T.	54000
50b		360	N.T.	77000
57a		11	>1000	9900
57b		35	>4000	17000
57c		20	>2000	11000
57d		8.3	>1000	8000
57e		6.6	>1000	7900

57f		45	>5000	29000
57g		11	>1000	7700

^aData represent the mean from two independent experiments.

N.T. : not tested

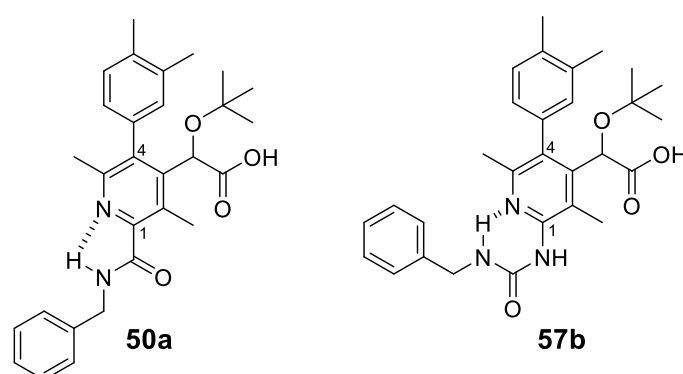


図 1 4. アミド **50a** とウレア **57b** の分子内水素結合の比較

1位の置換基の最適化が終わったので、活性が最も良かったシクロヘキシルウレアに置換基 R^1 を固定して、置換基 R^2 の変換を行うことにした (表 7)。置換基 R^2 の変換を行うことで、先述の考察から T174I 変異株に対する活性は向上するのではないかと考えた。

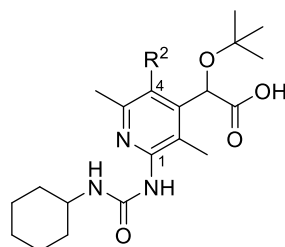
まず、パラ位の置換基の変換を行うことにした。 *p*-クロロフェニル **69a** と *p*-メトキシフェニル **69c** は WT に対して同程度の活性 ($EC_{50} = 17 \text{ nM}$, 10 nM) を示したが、 *p*-トリフルオロフェニル **69b** は少し弱い活性を示した ($EC_{50} = 61 \text{ nM}$)。また **69c** に関しては T174I 変異株に対しても中程度の活性を示した ($EC_{50} = 750 \text{ nM}$)。この結果から **69c** の様にパラ位に酸素原子を持った化合物周辺を探索することにし、パラ位とメタ位を結んで環化させた縮環を検討することにした。ジヒドロベンゾオキサジン **69d** は WT に対して活性を示さなかった。第一章で示したこのジヒドロベンゾオキサジンを有する化合物と IN-CCD の共

結晶構造から分かるように、アニリン部分の水素原子が Q168 側鎖と相互作用しているの
で、結合には有利である。このことから、活性が落ちてしまった原因の一つとして、化合物
の極性が高いことに起因した低膜透過性が想定されるが、はっきりした原因は分かってい
ない。一方、クロマン **69e** は WT に対して良い活性を示し ($EC_{50} = 21$ nM), T174I に対し
ても中程度の活性を示した ($EC_{50} = 560$ nM)。

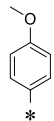
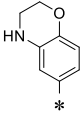
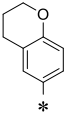
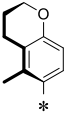
T174I の変異はスレオニンがイソロイシンになることにより、リガンドを溶媒露出方向
へ押し出す。この変化が置換基 R^2 周辺のスペースを拡大させるので、2 環性のクロマン **69e**
は T174I 変異体のポケットにうまく結合し活性を示しているのではないかと考察している。
最後にベンゼン骨格の SAR と同様に置換基の固定化を試みた。オルト位に Me 基を導入し
たメチルクロマン **69f** では WT および T174I に対して活性が向上した ($EC_{50} = 6.6$ nM, 270
nM)。メチルクロマン **69f** が高活性を示した理由としてはベンゼン骨格の時と同様に、オル
ト位のメチル基がビアリアル部分の回転を阻害することによりアトロプアイソマーが生じ、
片方のアトロプアイソマーが活性配座を取ることを有利なため、高い活性を示したと考
えている。

置換基 R^2 の変換では WT だけではなく T174I 変異体に対する活性も向上させることが
できた。また、化合物 **69f** は **BI 224436** よりも強い活性を示し、この骨格のポテンシャルを
示すことができた。

表 7. R^2 の構造活性相関^a



Cmpd.	R^2	MT-4/MTT	MT-4/MTT	MT-4/MTT
		WT : EC_{50} (nM)	T174I : EC_{50} (nM)	CC $_{50}$ (nM)
69a		17	1800	16000
69b		61	7700	9800

69c		10	750	19000
69d		>100	N.T.	30000
69e		21	560	17000
69f		6.6	270	11000
BI 224436		22	>5000	>50000

^aData represent the mean from two independent experiments.

N.T. : not tested

化合物 **69f** と HIV-1 IN-CCD の共結晶構造を図 1 5 に示した (PDB ID 7D83). E170 と H171 のアミノ酸主鎖は他の INLAIs と同様に、リガンドのカルボン酸部分と相互作用していることが分かったが、他の相互作用を確認することはできなかった。ベンゼン骨格の SAR において 2 位のスルホンアミドが Q95 と相互作用していることを確認できていたが、化合物 **69f** のウレアは Q95 と相互作用していなかった。おそらく、ウレアが分子内水素結合を形成することによって向きが固定され、ウレアのカルボニル基が Q95 に近づけないことが相互作用を形成できない原因だと考えている。この分子内水素結合によって、ウレア部分が疑似的な 6 員環を形成し、シクロヘキサンの位置を方向付けており、そのシクロヘキサンはタンパクの表面に沿うように配置していることが分かった。またメチルクロマンのメチレン部分は紙面上側を向っていて、疎水性のポケットにうまくはまっていることが分かった。

今回の共結晶 X 線構造解析では HIV-1 IN の部分構造である CCD を用いていたが、IN の全長つまり NTD + CCD + CTD とリガンドの共結晶も報告されている (図 1 6)¹⁹⁾。その構造によると、溶媒露出だと考えていた領域にちょうど IN の CTD が覆いかぶさっており、脂溶性が好まれるポケットを形成している (緑が脂溶性が好まれる領域)。そして今回の化合物 **69f** のシクロヘキサンがその領域に位置する。このことから、1 位の置換基にウレアを用いることで活性が向上したのは、ウレアの置換基が分子内水素結合によって脂溶性が好まれる領域に位置したからであると考察した。

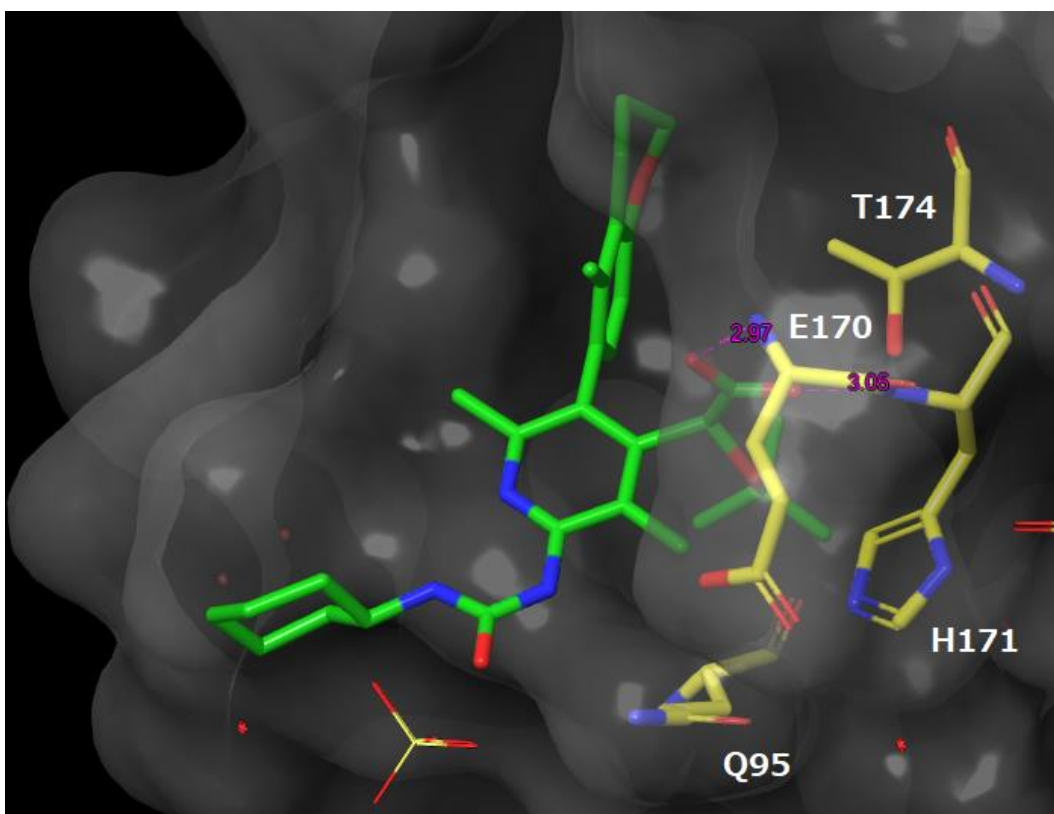


図 1 5. 化合物 **69f** と HIV-1 IN-CCD の共結晶構造 (PDB ID 7D83, 分解能 : 2.4 Å)

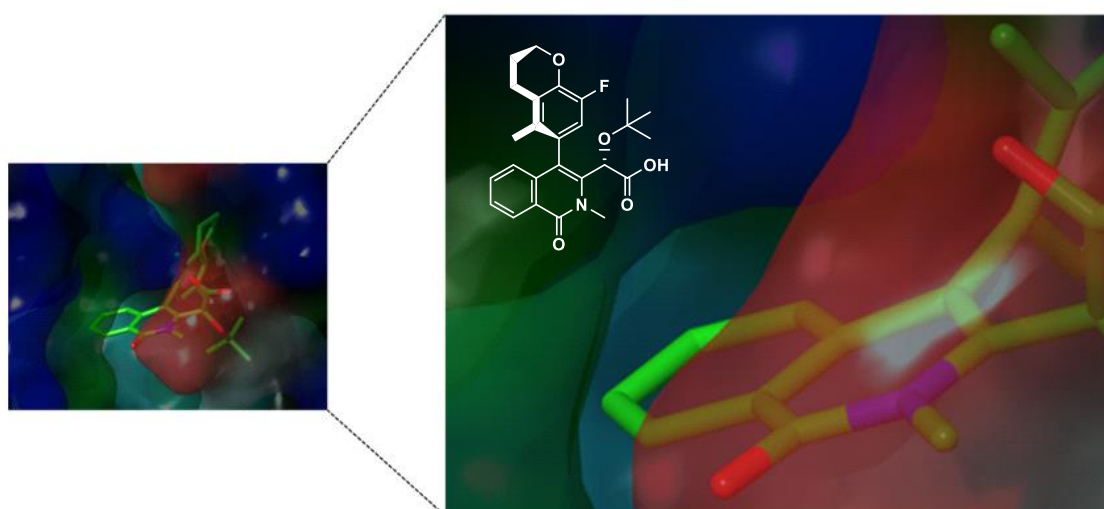


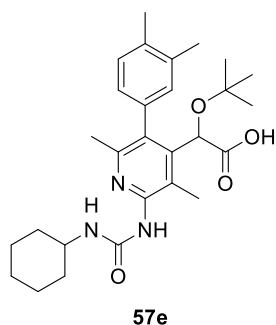
図 1 6. HIV-1 IN 全長とリガンドの共結晶構造

続いて化合物 **57e** の代謝安定性試験と薬物動態学的パラメーターの測定を行った(表 8)。ベンゼン骨格と同様に薬物動態学試験は静脈注射 (iv) と経口投与 (po) で行い, それぞれ 0.5 mg/kg, 1 mg/kg で実施した。

化合物 **57e** は中程度の代謝安定性 (MS) をラット, ヒトのマイクロソームを用いた試験で示した (HLM MS = 65 %, RLM MS = 66 %)。また全身クリアランス (CLt) 及び生物学的利用率 (BA) を示した (CLt = 12.5 mL/min/kg, BA = 9.2 %)。

これらの試験によって化合物 **57e** は中程度の代謝安定性とラットにおいて良い薬物動態学プロファイルを有している事を確認できた。

表 8. 化合物 **57e** の代謝安定性と薬物動態学的パラメーター



Cmpd.	HLM ^b MS (%)	RLM ^b MS (%)	CLt ^b (mL/min/kg)	AUC _{iv} ^b (ng.hr/mL)	T _{1/2} ^b (h)	F ^b (%)
57e	65	66	12.5	127	1.6	9.2

^a Compound was administered at 0.5 mg/kg (iv), 1.0 mg/kg (po) using a cassette dosing method.

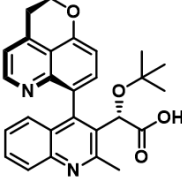
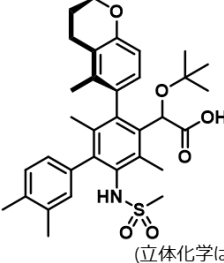
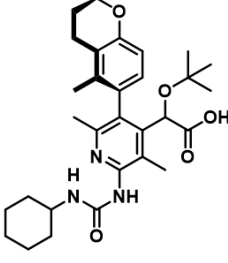
^b HLM: human liver microsome, RLM: rat liver microsome, CLt: total clearance, AUC: area under the curve, T_{1/2}: elimination half-life, F: bioavailability

小括すると, 第 1 章で見出した 1 位の置換基とピリジンをハイブリッドした新規骨格をデザインし合成することに成功した。この新規骨格は分子内水素結合を形成することができ, それが置換基を固定化することにより, 活性の向上に寄与しているのではないかという結果が得られた。最適化 SAR の結果, 置換基 R² の変換は WT だけでなく, T174I に対す

る活性の向上に寄与することが分かった。化合物 **69f** は EC_{50} (WT) = 6.6 nM, EC_{50} (T174I) = 270nM を示し、比較としていた **BI 224436** の活性 (EC_{50} (WT) = 22 nM, EC_{50} (T174I) > 5000nM)を上回った。また化合物 **57e** は、中程度の代謝安定性とラットにおいて良い薬物動態学プロファイルを有している事を確認できた。

最後に **BI 224436** と化合物 **34h**, **69f** のプロファイルの比較を示した。私がデザインを実施し最適化を行った化合物 **34h**, **69f** はラセミ体でありながら **BI 224436** と比較して強い活性を示した。化合物 **69f** においては WT だけでなく耐性変異株の **T174I** にも活性を示している。**BI 224436** では **T174I** に対して全く活性を示さなかったので、この知見は今後の INLAIs 探索において有用な知見になると考えられる。一方、薬物動態学的パラメーターにおいては、化合物 **34h**, **69f** は **BI 224436** と比較して劣っている。おそらく脂溶性が高いことが原因で代謝安定性が悪くなり、CLt も悪いのではないかと考えられるので、今後は活性を維持しながら極性を付与し、動態を改善していく変換が求められてくる。

表 9. **BI 224436** と化合物 **34h**, **69f** のプロファイルの比較

compound	BI 224436	34h	69f
		 (立体化学は推定)	
EC_{50} (NL432)_nM	56	3.9	N.T.
EC_{50} (WT)_nM	22	N.T.	6.6
EC_{50} (T174I)_nM	>5000	N.T.	270
CC_{50} _nM	>50000	24000	11000
MS_h_r_%	98, 100	59, 61	N.T.
CLt_mL/min/kg	1.09	6.99	N.T.
AUC_ng.hr/mL	7680	1190	N.T.
$T_{1/2}$ _h	4.2	3.1	N.T.
BA_%	64	36	N.T.

N.T. : not tested

結語

私は抗 HIV 新規メカニズムである INLAIs に着目し、新規骨格の創出及び **BI 224436** よりも強い活性を示す化合物の創出を目指して研究に取り組んだ。その結果、探索が今までされてこなかった領域に置換基を伸長できるベンゼン骨格の創出に成功した(図 1 7)。またその置換基の SAR において、新規ファーマコフォアとして Q95 との相互作用を獲得した。

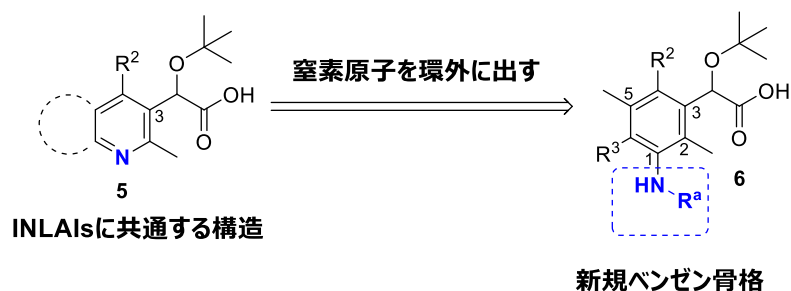


図 1 7. 新規ベンゼン骨格のデザイン

更はその知見を活かし、INLAIs で良く用いられるピリジン骨格にその置換基を導入したピリジン骨格をデザインした (図 1 8)。この新規骨格は分子内水素結合を形成することができ、それが置換基を固定化し、活性の向上に寄与していることが分かった。

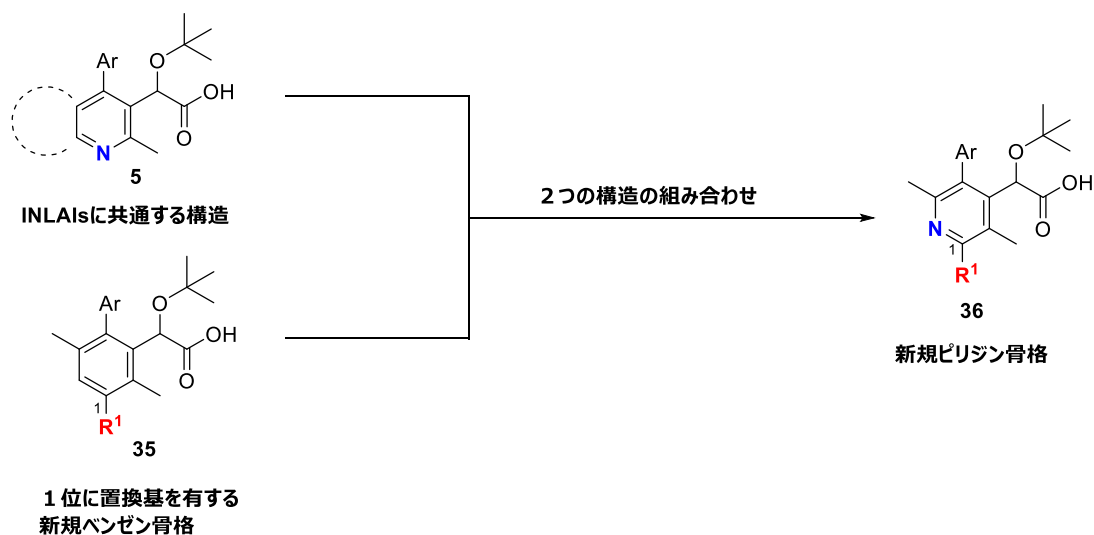
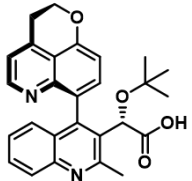
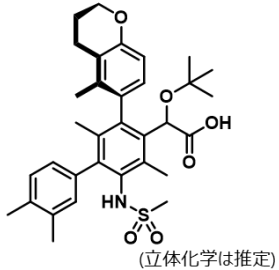
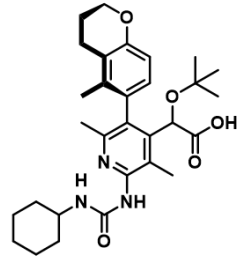


図 1 8. 新規ピリジン骨格のデザイン

各新規骨格で最適化された化合物 **34h**, **69f** は比較対照である **BI 224436** よりも強い抗ウイルス活性を示すことが分かった (表 1 0)。化合物 **69f** においては WT だけでなく耐性変

異株の **T174I** にも活性を示した。 **BI 224436** では **T174I** に対して全く活性を示さなかった
 ので、この知見は今後の INLAIs 探索において有用な知見になると考えられる。一方、薬物
 動態学的パラメーターにおいては、化合物 **34h** は **BI 224436** と比較して劣っている。今後
 は活性を維持しながら動態を改善していく変換が求められてくる。

表 1 0. **BI 224436** と化合物 **34h**, **69f** のプロファイルの比較

compound	BI 224436	34h	69f
			
EC ₅₀ (NL432)_nM	56	3.9	N.T.
EC ₅₀ (WT)_nM	22	N.T.	6.6
EC ₅₀ (T174I)_nM	>5000	N.T.	270
CC ₅₀ _nM	>50000	24000	11000
MS_h_r_%	98, 100	59, 61	N.T.
CLt_mL/min/kg	1.09	6.99	N.T.
AUC_ng.hr/mL	7680	1190	N.T.
T _{1/2} _h	4.2	3.1	N.T.
BA_%	64	36	N.T.

実験の部

Chemistry

Reactions were carried out under a nitrogen atmosphere with anhydrous solvents. ¹H NMR spectra were measured on a Bruker 400MHz spectrometer in a solution of either CDCl₃ or DMSO-*d*₆, using tetramethylsilane as the internal standard. Chemical shifts are expressed as δ (ppm) values for protons relative to the internal standard (s = singlet, d = doublet, m = multiplet, dd = double doublet, br = broad peak). High resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a Thermo Fisher Scientific LTQ OrbiTrap. Mass spectra (MS) were recorded using Shimadzu LCMS-2020 and Waters ACQUITY UPLC. Unless otherwise noted, all reagents and solvents obtained from commercial suppliers were used without further purification.

Methyl 2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-carboxylate (8)

To a solution of methyl 2,4-dichloro-3-methyl-5-nitro benzoate **7** (18.5 g, 70.1 mmol) in 1,4-dioxane (315 mL), were added 3,4-dimethylphenylboronic acid (22.07 g, 147 mmol), 2M aq K₂CO₃ (105 mL, 210 mmol), and Pd(PPh₃)₄ (810 mg, 0.701 mmol). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 22 h. Ice water and 2 M aq HCl were added to the reaction mixture and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated aq NaHCO₃ solution and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/9:1–4:1) to obtain the product as a yellow foam (20.1 g, 71% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.85 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 6.80-6.98 (m, 4H), 7.15-7.21 (m, 2H), 8.08 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 404.10.

(2',3,3'',4,4''-Pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)methanol (9)

To a solution of methyl 2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-carboxylate **8** (20.1 g, 49.7 mmol) in CH₂Cl₂ (300 mL), 1M DIBAL-H solution in toluene (149 mL, 149 mmol) was added over 1 h at -78 °C. The reaction mixture was stirred at -78 °C for 2 h. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture with stirring for 30 min. To the reaction mixture, ice water was added and then extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with saturated aq NaHCO₃ solution and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/5:1–1:1) to obtain the product as an orange oil (16.8 g, 90% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.80 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 4.42 (s, 2H), 6.85-6.98 (m, 4H), 7.14-7.27(m, 2H), 7.83 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 376.20.

2',3,3'',4,4''-Pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-carbaldehyde (10)

To a solution of (2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)methanol **9** (16.8 g, 44.7 mmol) in CH₂Cl₂ (170 mL), MnO₂ (38.9 g, 447 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 2.5 h. After filtration of the precipitate, the filtrate was concentrated to obtain the product as an orange oil (14.0 g, 84% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.91 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 6.90-7.03 (m, 4H), 7.17-7.25 (m, 2H), 8.18 (s, 1H), 9.66 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 374.10.

2-(2',3,3'',4,4''-Pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-((trimethylsilyloxy) acetonitrile (11)

To a solution of 2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-carbaldehyde **10** (14.0 g, 37.4 mmol) in CH₂Cl₂ (140 mL), ZnI₂ (12.6 g, 37.4 mmol), TMSCN (15.7 mL, 112 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Saturated aq NaHCO₃ solution was added to the reaction mixture and then extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated and the residue (18.8g) was used without further purification.

Methyl 2-hydroxy-2-(2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetate (12)

To a solution of crude 2-(2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-((trimethylsilyloxy)acetonitrile **11** (18.8g) in MeOH (83 mL), H₂SO₄ (20.8 mL, 374 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 21 h. The reaction mixture was added to ice water and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated aq NaHCO₃ solution and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/3:1–1:1) to obtain the product as a yellow foam (14.4 g, 89% yield (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.80 (s, 3H), 2.25-2.33 (m, 12H), 3.37 (brs, 1H), 3.73 (s, 1.5H), 3.74 (s, 1.5H), 4.99 (m, 1H), 6.86-7.03 (m, 4H), 7.13-7.25 (m, 2H), 7.65 (brs, 1H).

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl) acetate (13)

To a solution of methyl 2-hydroxy-2-(2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl) acetate **12** (14.4 g, 33.2 mmol) in *t*-BuOAc (144 mL), 70% aq perchloric acid (5.7 mL, 66.3 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 2 h. Saturated aq NaHCO₃ solution was

added to the reaction mixture and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/4:1) to obtain the product as a pale orange foam (9.77 g, 60% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.10 (s, 4.5H), 1.11 (s, 4.5H), 1.78 (s, 3H), 2.25-2.36 (m, 12H), 3.66 (s, 3H), 4.87 (s, 0.5H), 4.89(s, 0.5H), 6.85-7.00 (m, 4H), 7.15-7.26 (m, 2H), 7.99 (s, 0.5H), 8.01 (s, 0.5H); MS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ 512.25.

Methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4''-pentamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (14)

To a solution of methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3,3'',4,4''-pentamethyl-6'-nitro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetate **13** (2.45 g, 5.0 mmol) in MeOH (25 mL), Pd(OH)₂ (490 mg, 0.698 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt under hydrogen atmosphere for 7 h. After filtering through Celite, the solvent was concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/4:1-1:1) to obtain the product as a pale pink foam (2.03 g, 89% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.13 (s, 4.5H), 1.04 (s, 4.5H), 1.71 (s, 3H), 2.22-2.35 (m, 12H), 3.63 (s, 3H), 4.83 (brs, 1H), 6.83-7.26 (m, 6H), 7.56 (brs, 1H); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 460.25.

Methyl 2-(6'-amino-5'-bromo-2',3,3'',4,4''-pentamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (15)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4''-pentamethyl- [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate **14** (5.22 g, 11.4 mmol) in DMF (52 mL), NBS (2.02 g, 11.4 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. Saturated aq NaHCO₃ solution was added to the reaction mixture and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/10:1-3:1) to obtain the product as an orange oil (5.78 g, 95% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.13 (s, 4.5H), 1.05 (s, 4.5H), 1.61 (s, 3H), 2.22-2.33 (m, 12H), 3.69 (s, 3H), 5.21 (brs, 1H), 6.82-7.26 (m, 6H); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 538.

Methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate (16)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-5'-bromo-2',3,3'',4,4'' pentamethyl- [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy)acetate **15** (369 mg, 0.685 mmol) in 1,4-dioxane (7.4 mL) and H₂O (0.74 mL), trimethylboroxine (258 mg, 2.06 mmol), PdCl₂(dppf) (56.0 mg, 0.069 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 120 °C for 7.5 h. Ice water was added to the reaction mixture and then extracted

with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/10:1-5:1) to obtain the product as an orange oil (188 mg, 58% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.99 (s, 9H), 1.62 (s, 3H), 2.18-2.36 (m, 15H), 3.67 (s, 1.5H), 3.69 (s, 1.5H), 5.03 (s, 1H), 6.89-7.25 (m, 6H).

2-(6'-Amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy)acetic acid (17)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate **16** (100 mg, 0.211 mmol) in THF (1.1 mL) and MeOH (2.2 mL), 2 M aq NaOH (0.528 mL, 1.06 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 5 h, then 2 M aq HCl was added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. Concentration of the solvent gave the product as a pale orange powder (67 mg, 69% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.89 (s, 9H), 1.48 (s, 1.5H), 1.50 (s, 1.5H), 2.10 (s, 3H), 2.18-2.30 (m, 12H), 3.90 (brs, 2H), 4.86 (s, 0.5H), 4.89 (s, 0.5H), 6.82-7.29 (m, 6H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₃₈O₃N [M+H]⁺: 460.2846; found: 460.2841.

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(2,2,2-trifluoroacetamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetate (18)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate **16** (550 mg, 1.61 mmol) in CH₂Cl₂ (5.5 mL), pyridine (0.187 mL, 2.32 mmol), TFAA (0.246 mL, 1.74 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1.5 h, then 2 M aq HCl and water were added to the reaction mixture, followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/20:1-4:1) to obtain the product as a white foam (648 mg, 98% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.00 (s, 9H), 1.68-1.71 (m, 3H), 2.24-2.33 (m, 15H), 3.67-3.71 (m, 3H), 5.07 (m, 1H), 6.85-7.20 (m, 7H).

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(2,2,2-trifluoro-N-methylacetamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetate (19a)

To a solution of methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(2,2,2-trifluoroacetamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetate **18** (147 mg, 0.258 mmol) in DMF (1.5 mL), K₂CO₃ (71.3 mg, 0.516 mmol), MeI (0.081 mL, 1.29 mmol) was added. The reaction mixture was

stirred at rt for 2 h, and then 2 M aq HCl and water were added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated and the residue was used without further purification.

2-(tert-Butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(2,2,2-trifluoro-N-methylacetamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (20a)

To a solution of crude methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(2,2,2-trifluoro-N-methylacet amido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl) acetate **19a** in DMSO (1 mL), 2M aq NaOH (0.25 mL, 0.5 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 3 h, then 2 M aq HCl and water were added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃: MeOH/10:1) to obtain the product as a pale white powder (22 mg, 71% yield(2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.89 (s, 9H), 1.48-1.51 (m, 3H), 2.20-2.30 (m, 15H), 2.36 (s, 3H), 4.89 (m, 1H), 6.85-7.25 (m, 6H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₁H₄₀O₃N [M+H]⁺: 474.3003 ; found: 474.2999.

2-(6'-(Benzylamino)-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy)acetic acid (20b)

This compound was prepared from **18** in a similar manner to that described for **19a**, **20a**. (pale yellow powder, 36mg, 37% yield (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.02-1.06 (m, 9H), 1.61 (s, 1.5H), 1.62 (s, 1.5H), 2.26-2.33 (m, 12H), 2.43 (brs, 3H), 3.89 (brs, 2H), 5.19-5.23 (m, 2H), 6.76-7.30 (m, 11H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₇H₄₄O₃N [M+H]⁺: 550.3316; found: 550.3313.

Methyl 2-(6'-acetamido-2',3'',4,4'',5'-pentamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate (21a)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate **16** (100 mg, 0.211 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL), were added pyridine (0.034 mL, 0.422 mmol), and AcCl (0.023 mL, 0.317 mmol) at 0°C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1.5 h, then 2 M aq HCl and water were added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated and the residue was used without further purification.

Methyl 2-(6'-acetamido-2',3'',4,4'',5'-pentamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate (22a)

To a solution of crude methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate **21a** in THF (0.8 mL) and MeOH (1.6 mL), 2 M aq NaOH (0.383 mL, 0.766 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 4 h, then 2 M aq HCl and water were added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with water and dried with anhydrous Na₂SO₄. Concentration of the solvent gave the product as a white powder (58 mg, 52% yield (2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.90 (s, 9H), 1.57 (s, 1.5H), 1.59 (s, 1.5H), 1.66 (s, 3H), 2.11-2.31 (m, 15H), 4.91 (s, 0.5H), 4.94 (s, 0.5H), 6.80-7.30 (m, 6H), 8.81 (brs, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₂H₄₀O₄N [M+H]⁺: 502.2952; found: 502.2947.

2-(tert-Butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-propionamido-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (22b)

This compound was prepared from **16** in a similar manner to that described for **21a**, **22a**. (white powder, 63 mg, 58% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.92-0.98 (m, 3H), 1.05 (brs, 9H), 1.68 (s, 1.5H), 1.69 (s, 1.5H), 1.90-2.16 (m, 2H), 2.19-2.33 (m, 15H), 5.17 (brs, 1H), 6.37 (s, 1H), 6.79-7.00 (m, 3H), 7.12-7.32 (m, 3H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₃H₄₂O₄N [M+H]⁺: 516.3108 ; found: 516.3101.

2-(6'-Benzamido-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy)acetic acid (22c)

This compound was prepared from **16** in a similar manner to that described for **21a**, **22a**. (white powder, 29 mg, 25% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.09 (brs, 9H), 1.69-1.75 (m, 3H), 2.24-2.33 (m, 15H), 5.22 (brs, 1H), 6.91-7.23 (m, 6H), 7.30-7.47 (m, 6H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₇H₄₂O₄N [M+H]⁺: 564.3108 ; found: 564.3102.

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3'',4,4'',5'-pentamethyl-6'-(3-methylureido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetate (21d)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate **16** (100 mg, 0.211 mmol) in (CH₂Cl)₂ (2 mL), Et₃N (0.029 mL, 0.211 mmol), triphosgene (25.1 mg, 0.084 mmol) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h.

Next, MeNH₂ (0.528 mL, 1.06 mmol) was added to the solution with stirring at rt for 1.5h. Saturated aq NaHCO₃ solution and water were added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated and the residue was used without further purification.

2-(tert-Butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(3-methylureido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (22d)

This compound was prepared from **21d** in a similar manner to that described for **22a**. (white powder, 75 mg, 70% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.04 (s, 4.5H), 1.05 (s, 4.5H), 1.69 (s, 1.5H), 1.70 (s, 1.5H), 2.23-2.35 (m, 15H), 2.71 (s, 1.5H), 2.72 (s, 1.5H), 4.22 (brs, 1H), 5.18-5.15 (m, 1H), 5.43-5.51 (m, 1H), 6.77-7.23 (m, 5H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₂H₄₁O₄N₂ [M+H]⁺: 517.3061 ; found: 517.3055.

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(6'-(3-ethylureido)-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetate (21e)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate **16** (100 mg, 0.211 mmol) in toluene (1 mL), ethyl isocyanate (0.025 mL, 0.317 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 70 °C for 4 h. Water was added to the reaction mixture and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated and the residue was used without further purification.

2-(tert-Butoxy)-2-(6'-(3-ethylureido)-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (22e)

This compound was prepared from **21e** in a similar manner to that described for **22a**. (white powder, 71 mg, 65% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.04 (brs, 9H), 1.03-1.09 (m, 3H), 1.69 (s, 1.5H), 1.71 (s, 1.5H), 2.23-2.35 (m, 15H), 3.08-3.29 (m, 2H), 4.23 (brs, 1H), 5.22 (s, 0.5H), 5.23 (s, 0.5H), 5.35-5.48 (m, 1H), 6.79-7.02 (m, 3H), 7.12-7.23 (m, 3H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₃H₄₃O₄N₂ [M+H]⁺: 531.3217; found: 531.3213.

2-(tert-Butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(3-phenylureido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (22f)

This compound was prepared from **16** in a similar manner to that described for **21e**, **22e**. (white

powder, 74 mg, 61% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.02-1.09 (m, 9H), 1.71 (s, 1.5H), 1.72 (s, 1.5H), 2.20-2.40 (m, 15H), 5.20-5.28 (m, 1H), 5.67 (s, 1H), 6.10-6.20 (m, 1H), 6.81-7.33 (m, 11H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₇H₄₃O₄N₂ [M+H]⁺: 579.3217; found: 579.3212.

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(methylsulfonamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetate (21g)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy) acetate **16** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (1 mL), MsCl (0.025 mL, 0.317 mmol) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 5 h, then 2 M aq HCl and water were added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated and the residue was used without further purification.

2-(tert-Butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(methyl sulfonamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (22g)

This compound was prepared from **21g** in a similar manner to that described for **22a**. (white powder, 48 mg, 43% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.03 (s, 9H), 1.65-1.71 (m, 3H), 2.23-2.33 (m, 12H), 2.42-2.49 (m, 6H), 5.19 (s, 1H), 5.84 (s, 0.5H), 5.89 (s, 0.5H), 6.89-7.28 (m, 6H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₁H₃₈O₅NS [M-H]⁻: 536.2476; found: 536.2460.

2-(tert-Butoxy)-2-(6'-(cyclopropanesulfonamido)-2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (22h)

This compound was prepared from **16** in a similar manner to that described for **21g**, **22g**. (506 mg, 88% (2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.40-0.72 (m, 4H), 0.90 (s, 9H), 1.16-1.28 (m, 1H), 1.56-1.64 (m, 3H), 2.19-2.26 (m, 9H), 2.28 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 4.88-4.94 (m, 1H), 6.92-7.26 (m, 6H), 8.32 (s, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₃H₄₂NO₅S [M+H]⁺: 564.2778 ; found: 564.2771.

2-(tert-Butoxy)-2-(2',3,3'',4,4'',5'-hexamethyl-6'-(phenylsulfonamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (22i)

This compound was prepared from **16** in a similar manner to that described for **21g**, **22g**. (pale yellow powder, 49 mg, 39% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.10 (s,

9H), 1.49 (s, 1.5H), 1.51 (s, 1.5H), 1.98-2.53 (m, 15H), 5.15-5.23 (m, 1H), 5.85-6.07 (m, 1H), 6.16-6.34 (m, 1H), 6.54-7.39 (m, 9H), 7.49-7.58 (m, 1H); HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{36}H_{42}NO_5S$ $[M+H]^+$: 600.2778 ; found: 600.2774.

4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-nitrobenzaldehyde (24)

To a solution of 4-hydroxy-2,5-dimethylbenzaldehyde **23** (21.7 g, 144 mmol) in H_2SO_4 (303 mL), KNO_3 (16.1 g, 159 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The reaction mixture was poured into ice water. Precipitated solid was collected by filtration and washed with water to obtain the product as a yellow solid (27.3 g, 97% yield). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 2.35 (s, 3H), 2.81 (s, 3H), 7.88 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 10.28 (s, 1H); MS (ESI): m/z $[M-H]^-$ 194.20.

2-(4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-nitrophenyl)-2-((trimethyl silyl)oxy)acetonitrile (25)

To a solution of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-nitrobenzaldehyde **24** (25 g, 128 mmol) in CH_2Cl_2 (750 mL) were added, ZnI_2 (12.6 g, 128 mmol) and $TMSCN$ (51.5 mL, 384 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 0.5h. Saturated aq $NaHCO_3$ solution was added to the reaction mixture and then extracted with $CHCl_3$. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was concentrated and the residue (47.7g) was used without further purification.

Methyl 2-hydroxy-2-(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-nitro phenyl)acetate (26)

To a solution of crude 2-(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-nitrophenyl)-2-((trimethylsilyl)oxy)acetonitrile **25** (47.7g) in 5-10% HCl in MeOH (456 mL), H_2O (2.21 mL, 123 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 19 h. After concentration of the solvent, water was added to the reaction mixture and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated aq $NaHCO_3$ solution and dried with anhydrous Na_2SO_4 . Concentration of the solvent gave the product as a yellow solid (28.6 g, 91% yield (2 steps)). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 2.28 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 3.44 (brs, 1H), 3.78 (s, 3H), 5.38 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 9.50 (s, 1H); MS (ESI) m/z $[M-H]^-$ 253.90.

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-nitrophenyl)acetate (27)

To a solution of methyl 2-hydroxy-2-(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-nitrophenyl)acetate **26** (3.0 g, 11.75 mmol) in *t*-BuOAc (30 mL), 70% aq perchloric acid (2.12 mL, 35.3 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 10 min. Saturated aq $NaHCO_3$ solution was added to the

reaction mixture and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/10:1-5:1) to obtain the product as a colorless solid (3.15 g, 86% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.23 (s, 9H), 2.29 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 5.22 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 9.52 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ 310.10.

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2,5-dimethyl-3-nitro-4-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)phenyl)acetate (28)

To a solution of methyl 2-(tert-butoxy)-2-(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-nitrophenyl)acetate **27** (9.34 g, 30.0 mmol) in CH₂Cl₂ (94 mL), pyridine (3.63 mL, 45.0 mmol), Tf₂O (6.08 mL, 36.0 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h, and then 2M aq HCl and ice water were added to the reaction mixture and followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/20:1-4:1) to obtain the product as a pale yellow solid (12.7 g, 96% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) :1.24 (s, 9H), 2.36 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 5.20 (s, 1H), 7.69 (s, 1H).

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3,3',4',6-tetramethyl-2-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetate (29)

To a solution of methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2,5-dimethyl-3-nitro-4-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy) phenyl)acetate **28** (5.0 g, 11.3 mmol) in 1,4-dioxane (68 mL), 3,4-dimethylphenyl boronic acid (2.54 g, 16.9 mmol) were added, 2M aq K₂CO₃ (22.6 mL, 45.1 mmol) and PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (460 mg, 0.564 mmol). The reaction mixture was stirred at 80 °C for 2 h. Ice water and 2 M aq HCl were added to the reaction mixture and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated aq NaHCO₃ solution and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/9:1-4:1) to obtain the product as a colorless foam (2.82 g, 63% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) :1.27 (s, 9H), 2.10 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 5.25 (s, 1H), 6.89-6.97 (m, 2H), 7.12-7.17 (m, 1H), 7.58 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* [M+NH₄]⁺ 417.2.

Methyl 2-(2-amino-3,3',4',6-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (30)

To a solution of methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3,3',4',6-tetramethyl-2-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetate **29** (1.17 g, 2.92 mmol) in MeOH (18 mL) and AcOH (2 mL), Pd(OH)₂ (500 mg, 0.356 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt under 5.5 atm hydrogen atmosphere for 18 h. After filtering through Celite, the solvent was concentrated to obtain the product as a pale pink foam (1.00

g, 93% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) :1.18 (s, 9H), 1.85 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.93 (s, 2H), 5.20 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.87 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.93 (s, 1H), 7.24 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 370.6.

Methyl 2-(2-amino-5-bromo-3,3',4',6-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (31)

To a solution of methyl 2-(6'-amino-2',3,3'',4,4''-pentamethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)-2-(tert-butoxy)acetate **30** (1.08 g, 2.92 mmol) in DMF (15 mL), NBS (525 mg, 2.92 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h. Saturated aq NaHCO₃ solution and water was added to the reaction mixture and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/20:1-2:1) to obtain the product as a pale brown oil (1.18 g, 90% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) :1.19 (s, 9H), 1.99 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 4.03 (s, 2H), 5.89 (s, 1H), 6.87 (dd, 1H, *J* = 7.3, 10.1 Hz), 6.93 (d, 1H, *J* = 10.1 Hz), 7.27 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 447.9, 450.4.

Methyl 2-(3-bromo-2,3',4',5-tetramethyl-6-(methyl sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(tert-butoxy) acetate (32)

To a solution of methyl 2-(2-amino-5-bromo-3,3',4',6-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate **31** (4.7 g, 10.5 mmol) in pyridine (47 mL), Ms₂O (3.65 g, 21.0 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 4 h, and then 2 M aq HCl and ice water were added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane: EtOAc/10:1-1:1) to obtain the product as a yellow foam (3.54 g, 64% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.25 (s, 9H), 2.19 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 5.67 (s, 0.5H), 5.68 (s, 0.5H), 6.05 (s, 1H), 6.91-7.01 (m, 2H), 7.20-7.24 (m, 1H), MS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ 524, 526.

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(2',3,4,5'-tetramethyl-6'-(methylsulfonamido)-[1,1':3',1''- terphenyl]-4'-yl) acetate (33a)

To a solution of methyl 2-(3-bromo-2,3',4',5-tetramethyl-6- (methylsulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate **32** (100 mg, 0.19 mmol) in DMA (2 mL), were added phenylboronic acid (34.7 mg, 0.285 mmol), 2M aq K₂CO₃ (0.19 mL, 0.38 mmol) and PdCl₂(dtbpf) (24.8 mg, 0.038 mmol). The reaction mixture was stirred at 110 °C for 2 h, then 2 M aq HCl was added to the reaction mixture

followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated and the residue was used without further purification.

2-(tert-Butoxy)-2-(2',3,4,5'-tetramethyl-6'-(methylsulfon amido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl) acetic acid (34a)

This compound was prepared from **33a** in a similar manner to that described for **22a**. (white powder, 81.3 mg, 84% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.03 (s, 9H), 1.67 (s, 1.5H), 1.68 (s, 1.5H), 2.30 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.45 (s, 1.5H), 2.46 (s, 1.5H), 2.48 (brs, 3H), 5.16 (brs, 1H), 5.85 (s, 0.5H), 5.91 (s, 0.5H), 6.90-6.99 (m, 1H), 7.03-7.13 (m, 1H), 7.19-7.25 (m, 2H), 7.35-7.62 (m, 4H), 9.83 (brs, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₉H₃₄O₅NS [M-H]⁻: 508.2163; found: 508.2149.

2-(tert-Butoxy)-2-(4''-chloro-2',3,4,5'-tetramethyl-6'-(methylsulfonamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (34b)

This compound was prepared from **32** in a similar manner to that described for **33a**, **34a**. (white foam, 74 mg, 72% (2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.91 (s, 9H), 1.59 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.25 (brs, 6H), 2.41 (s, 3H), 4.84 (s, 1H), 6.98 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.05 (s, 1H), 7.21 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.29 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.37 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.53 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.59 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 8.51 (s, 1H), 12.63 (brs, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₉H₃₃O₅NCIS [M-H]⁻: 542.1773; found: 542.1760.

2-(tert-Butoxy)-2-(4''-chloro-3''-fluoro-2',3,4,5'-tetra methyl-6'-(methylsulfonamido)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-yl)acetic acid (34c)

This compound was prepared from **32** in a similar manner to that described for **33a**, **34a**. (colorless solid, 42 mg, 42%(2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.07 (s, 9H), 1.64-1.69 (m, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.43-2.55 (m, 6H), 5.07 (brs, 1H), 5.87 (s, 0.5H), 5.92 (s, 0.5H), 6.88-7.14 (m, 3H), 7.20-7.55 (m, 3H), 9.73 (brs, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₉H₃₂O₅NCIFS [M-H]⁻: 560.1679; found: 560.1663.

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(3,4-dihydro-2H benzo[b][1,4] oxazin-6-yl)-2,3',4',5-tetramethyl-6-(methylsulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetic acid (34d)

This compound was prepared from **32** in a similar manner to that described for **33a**, **34a**. (yellow

foam, 56 mg, 58% (2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.94 (s, 4.5H), 0.95 (s, 4.5H), 1.63 (brs, 2H), 1.66 (brs, 1H), 2.00 (brs, 3H), 2.25 (brs, 6H), 2.36 (brs, 3H), 3.29 (brs, 2H), 4.11-4.20 (m, 2H), 5.07-5.13 (m, 1H), 5.79-5.87 (m, 1H), 6.25-6.32 (m, 0.5H), 6.37-6.45 (m, 0.5H), 6.54 (brs, 1H), 6.66-6.75 (m, 1H), 6.93-7.09 (m, 2H), 7.17-7.22 (m, 1H), 8.43 (s, 1H), 12.48 (brs, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₁H₃₇O₆N₂S [M-H]⁻: 565.2378; found: 565.2365.

2-(tert-Butoxy)-2-(2,3',4',5-tetramethyl-3-(4-methyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)-6-(methylsulfon amido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetic acid (34e)

This compound was prepared from **32** in a similar manner to that described for **33a**, **34a**. (white foam, 29 mg, 61% (2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.91 (s, 4.5H), 0.94 (s, 4.5H), 1.65-1.69 (m, 3H), 1.99-2.02 (m, 3H), 2.23-2.30 (m, 6H), 2.37 (brs, 3H), 2.74-2.79 (m, 3H), 3.23-3.29 (m, 2H), 4.23-4.30 (m, 2H), 5.05-5.10 (m, 1H), 6.40-6.46 (m, 0.5H), 6.51-6.57 (m, 0.5H), 6.69-6.80 (m, 2H), 6.95-7.10 (m, 2H), 7.18-7.23 (m, 1H), 8.45 (brs, 1H), 12.51 (brs, 1H). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₂H₄₁O₆N₂S [M+H]⁺: 581.2680 ; found: 581.2673.

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)-2,3',4',5-tetramethyl-6-(methylsulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetic acid (34f)

This compound was prepared from **32** in a similar manner to that described for **33a**, **34a**. (colorless solid, 92 mg, 87% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.05 (s, 9H), 1.67-1.73 (m, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.42 (s, 1.5H), 2.43 (s, 1.5H), 2.47 (brs, 3H), 3.16-3.34 (m, 2H), 4.57-4.68 (m, 2H), 5.25 (s, 0.5H), 5.27 (s, 0.5H), 5.89 (s, 0.5H), 5.94 (s, 0.5H), 6.8-6.88 (m, 1H), 6.89-6.99 (m, 1.5H), 7.00-7.13 (m, 1.5H), 7.19-7.24 (m, 1.5H), 7.36 (brs, 0.5H), 9.85 (brs, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₁H₃₆O₆NS [M-H]⁻: 550.2269; found: 550.2254.

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(chroman-6-yl)-2,3',4',5tetra methyl-6-(methylsulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetic acid (34g)

This compound was prepared from **32** in a similar manner to that described for **33a**, **34a**. (white powder, 58 mg, 72% (2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.91 (s, 9H), 1.62 (s, 1.5H), 1.64 (s, 1.5H), 1.84-1.97 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 2.25 (brs, 6H), 2.38 (brs, 3H), 2.59-2.83 (m, 2H), 4.12-4.21 (m, 2H), 4.95 (s, 0.5H), 4.99 (s, 0.5H), 6.76-6.85 (m, 1H), 6.87-6.93 (m, 1H), 6.94-7.08 (m, 3H), 7.19 (s, 0.5H), 7.20 (s, 0.5H), 8.42 (s, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₂H₃₈O₆NS [M-H]⁻: 564.2425; found: 564.2418.

2-(tert-Butoxy)-2-((R)-2,3',4',5-tetramethyl-3-(5-methyl chroman-6-yl)-6-(methylsulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetic acid (34h)

This compound was prepared from **32** in a similar manner to that described for **33a**, **34a**. (white powder, 21 mg, 12% (2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.02 (s, 9H), 1.13-1.21 (m, 2H), 1.49 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.25 (s, 6H), 2.44 (s, 3H), 2.60-2.67 (m, 2H), 4.08-4.15 (m, 2H), 4.90 (s, 1H), 6.64-6.69 (m, 1H), 6.74-6.82 (m, 1H), 6.91-6.98 (m, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.17-7.24 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 12.37 (brs, 1H). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₃H₄₀O₆NS [M-H]⁻: 578.2582; found: 578.2567.

2-(tert-Butoxy)acetic acid (41)

To a suspension of NaH (10.4 g, 259 mmol) in THF (500 mL), *t*-BuOH (20.5 mL, 216 mmol) and 2-bromoacetic acid **40** (20 g, 144 mmol) were added at 0°C. The reaction mixture was stirred at reflux for 4 h. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to give the product as a yellow oil (14 g, 74% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.27 (s, 9H), 4.03 (s, 3H)

Methyl 2-(tert-butoxy)acetate (42)

To a solution of 2-(tert-butoxy)acetic acid **41** (150 g, 1.14 mmol) in DMF (2.25 L), K₂CO₃ (314 g, 2.27 mol) and MeI (241 g, 1.70 mol) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was distilled (1 mmHg/80°C) to give the product as a yellow oil (117 g, 71% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.25 (s, 9H), 3.76 (s, 3H), 4.05 (s, 3H)

(Z)-((2-(tert-Butoxy)-1-methoxyvinyl)oxy)trimethylsilane (38)

To a solution of 0.5 M KHMDS in THF (677 mL, 339 mmol) in THF (100 mL), methyl 2-(tert-butoxy)acetate **42** (45 g, 308 mmol) was added at -78°C. After continuing the stirring at -78°C for 1 h, TMSCl (47.2 mL, 369 mmol) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at -78°C for 10 min. The solution was concentrated and *n*-hexane was added to the residue. After filtering through Celite, the solvent was concentrated. The residue was distilled (0.1 mmHg/90°C) to give the product as a colorless oil (45 g, 67% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0.23 (s, 9H), 1.23 (s, 9H), 3.50 (s, 3H),

5.36 (s, 1H)

1-Benzyl-4-hydroxy-3,6-dimethylpyridin-2(1H)-one (44)

To a suspension of 4-hydroxy-3,6-dimethyl-2H-pyran-2-one **43** (25 g, 178 mmol) in H₂O (250 mL), BnNH₂ (19.5 mL, 178 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 5 h. After concentration of the solvent, the residue was filtered and washed with *n*-hexane to give the product as an orange solid (21 g, 51% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.87 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 5.25 (s, 2H), 5.90 (s, 1H), 7.07-7.12 (m, 2H), 7.23-7.37 (m, 3H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 230.55

1-Benzyl-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl trifluoromethanesulfonate (37)

To a solution of *1-benzyl-4-hydroxy-3,6-dimethylpyridin-2(1H)-one 44* (22 g, 96 mmol) in CH₂Cl₂ (200 mL), pyridine (10.1 mL, 125 mmol) and Tf₂O (17.8 mL, 106 mmol) were added at 0°C. The reaction mixture was stirred at 0°C for 30 min. Next, 2 M aq HCl and water was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to give the product as a yellow oil (32 g, 92% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 2.18 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 5.33 (s, 2H), 6.07 (s, 1H), 7.12-7.16 (m, 2H), 7.25-7.36 (m, 3H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 362.40

Methyl 2-(1-benzyl-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (39)

To a solution of 1-benzyl-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl trifluoromethanesulfonate **37** (32 g, 89 mmol) in DMF (300 mL) were added ZnF₂ (13.7 g, 133 mmol), Pd(dba)₂ (5.1 g, 8.86 mmol), P(*t*-Bu)₃ (4.16 mL, 17.7 mmol), and (Z)-((2-(tert-butoxy)-1-methoxyvinyl)oxy)trimethylsilane **38** (58.3 g, 267 mmol). The reaction mixture was stirred at 100°C for 45 min. Water was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to give the product as a yellow solid (16 g, 51% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.24 (s, 9H), 2.26 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 5.17 (s, 1H), 5.28 (d, 2H, J= 15.8Hz), 5.35(d, 2H, J= 15.8Hz), 6.31 (s, 1H), 7.14-7.18 (m, 2H), 7.21-7.32 (m, 3H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 358.65

Methyl 2-(1-benzyl-5-bromo-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (45)

To a solution of *methyl 2-(1-benzyl-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate* **39** (9.0 g, 25.2 mmol) in CH₃CN (100 mL), NBS (4.48 g, 25.2 mmol) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred at rt for 30 min. Saturated aq NaHCO₃ solution was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to give the product as a white solid (9.02 g, 82% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.24 (s, 9H), 2.29 (s, 3H), 2.52 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 5.33-5.58 (m, 2H), 7.11-7.19 (m, 2H), 7.22-7.36 (m, 3H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 436.10

Methyl 2-(1-benzyl-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (**46**)

To a solution of *methyl 2-(1-benzyl-5-bromo-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate* **45** (8.0 g, 18.3 mmol) in DMF (80 mL) were added 2 M K₂CO₃ aq (22.5 mL, 55 mmol), 3,4-dimethylphenylboronic acid (5.5 g, 36.7 mmol), and Pd(PPh₃)₄ (2.12 g, 1.83 mmol). The reaction mixture was stirred at 140°C for 1 h. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was used without further purification. MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 462.70

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)acetate (**47**)

To a solution of crude *methyl 2-(1-benzyl-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate* **46** (5 g, 10.8 mmol) in AcOH (50 mL), 10%wt Pd/C (500 mg) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C under hydrogen atmosphere for 1.5 h. After filtering through Celite, the solvent was concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/ EtOAc) to give the product as a white solid (3.0 g, 44% yield (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers); 0.98 (brs, 9H), 2.04-2.08 (m, 3H), 2.20-2.32 (m, 9H), 3.68 (s, 1.5H), 3.69 (s, 1.5H), 4.82 (s, 1H), 6.87-7.19 (m, 3H), 11.92 (brs, 1H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 462.70

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)pyridin-4-yl)acetate (**48**)

To a solution of *methyl 2-(tert-butoxy)-2-(5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-*

dihydropyridin-4-yl)acetate **47** (3.0 g, 8.08 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) were added pyridine (0.849 mL, 10.5 mmol) and Tf₂O (1.50 mL, 8.8 mmol) at 0°C. The reaction mixture was stirred at 0°C for 30 min. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to give the product as a colorless oil (3.0 g, 74% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.97 (s, 9H), 2.18 (s, 1.5H), 2.20 (s, 1.5H), 2.29 (s, 1.5H), 2.29 (s, 1.5H), 2.34 (brs, 3H), 2.35 (s, 1.5H), 2.36 (s, 1.5H), 3.69 (s, 1.5H), 3.71 (s, 1.5H), 4.96 (s, 1H), 6.88-7.01 (m, 2H), 7.18-7.24 (m, 1H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 504.05

Methyl 2-(2-(benzylcarbamoyl)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (**49a**)

To a solution of *methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)pyridin-4-yl) acetate* **48** (200 mg, 0.397 mmol) in DMF (2 mL) were added Et₃N (0.11 mL, 0.794 mmol), BnNH₂ (0.13 mL, 1.19 mmol), LiBr (103 mg, 1.19 mmol), and Pd(PPh₃)₄ (45.9 mg, 0.04 mmol). The reaction mixture was stirred at 80°C under CO atmosphere for 30 min. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was used without further purification. MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 489.25

2-(2-(Benzylcarbamoyl)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetic acid (**50a**)

To a solution of crude *methyl 2-(2-(benzylcarbamoyl)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate* **49a** in MeOH (2 mL), 2 M aq NaOH (0.546 mL, 1.09 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 30 min. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH) to give the product as a white solid (145 mg, 77% yield (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.99 (s, 4.5H), 1.00 (s, 4.5H), 2.20 (s, 1.5H), 2.23 (s, 1.5H), 2.30 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 4.60-4.70 (m, 2H), 5.18 (s, 1H), 6.89-7.00 (m, 1H), 7.17-7.41 (m, 7H), 8.39-8.48 (m, 1H), HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₉H₃₄N₂O₄ [M+H]⁺: 475.2591; found: 475.2586

2-(2-(Benzyl(methyl)carbamoyl)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-

butoxy)acetic acid (50b)

This compound was prepared from **48** in a similar manner to that described for **49a**, **50a**. (colorless oil, 101 mg, 73% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (mixture of conformers): 0.78-0.86 (m, 9H), 2.13-2.32 (m, 12H), 2.71 (s, 1.5H), 2.92 (s, 1.5H), 4.32 (s, 1H), 4.57-4.67 (m, 0.5H), 4.76-4.91 (m, 1.5H), 6.86-7.15 (m, 2H), 7.21-7.39 (m, 6H), HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₃₆N₂O₄ [M+H]⁺: 489.2748; found: 489.2745

Methyl 2-(2-(benzylamino)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (54)

To a solution of *methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-((trifluoromethyl) sulfonyl)oxy)pyridin-4-yl) acetate* **48** (300 mg, 0.596 mmol) in 1,4-dioxane (3 mL), were added Cs₂CO₃ (582 mg, 1.79 mmol), BnNH₂ (0.13 mL, 1.19 mmol), xantphos (68.9 mg, 0.119 mmol), and Pd(dba)₂ (34.3 mg, 0.06 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux for 2 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to give the product as a yellow foam (270 mg, 98% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.96 (s, 9H), 2.11-2.15 (m, 6H), 2.26 (s, 1.5H), 2.28 (s, 1.5H), 2.32 (s, 3H), 3.65 (s, 1.5H), 3.67 (s, 1.5H), 4.38-4.45 (m, 1H), 4.65-4.75 (m, 2H), 4.92 (s, 1H), 6.92-7.08 (m, 2H), 7.11-7.18 (m, 1H), 7.28-7.47 (m, 5H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 461.70

Methyl 2-(2-amino-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (55)

To a solution of *methyl 2-(2-(benzylamino)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate* **54** (1.04 g, 2.26 mmol) in MeOH (10 mL), 10%wt Pd/C (100 mg) was added. The reaction mixture was stirred at rt under hydrogen atmosphere for 4.5 h. After filtering through Celite, the solvent was concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/ EtOAc) to give the product as a white solid (720 mg, 86% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers); 0.97 (s, 9H), 2.05 (s, 1.5H), 2.09 (s, 1.5H), 2.10 (s, 1.5H), 2.17 (s, 1.5H), 2.18 (s, 1.5H), 2.26 (s, 1.5H), 2.28 (s, 1.5H), 2.32 (s, 3H), 3.66 (s, 1.5H), 3.68 (s, 1.5H), 4.38 (s, 2H), 4.91 (s, 1H), 6.89-6.96 (m, 1H), 6.99-7.05 (m, 1H), 7.12-7.19 (m, 1H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 371.55

Methyl 2-(2-(3-benzylureido)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (56b)

To a solution of *methyl 2-(2-amino-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate* **55** (50 mg, 0.135 mmol) in 1,2-dichloroethane (1 mL) were added Et₃N (0.056 mL, 0.405 mmol) and benzyl isocyanate (0.033 mL, 0.27 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux for 1 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was used without further purification. MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 504.75

2-(2-(3-Benzylureido)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetic acid (**57b**)

To a solution of crude methyl 2-(2-(3-benzylureido)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate **56b** in MeOH (1 mL), 2 M aq NaOH (0.194 mL, 0.387 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 30 min. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH) to give the product as a white solid (53 mg, 84% yield (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.98 (s, 4.5H), 0.99 (s, 4.5H), 2.08 (s, 1.5H), 2.09 (s, 1.5H), 2.22 (brs, 3H), 2.28 (brs, 3H), 2.31 (brs, 3H), 4.62 (d, *J*=5.3Hz, 2H), 5.07 (s, 0.5H), 5.08 (s, 0.5H), 6.86-6.96 (m, 1H), 7.04-7.28 (m, 4H), 7.31-7.42 (m, 4H), 10.43 (d, *J*=5.3Hz, 2H), HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₉H₃₅N₃O₄ [M+H]⁺: 490.2700; found: 490.2698

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-(3-phenylureido)pyridin-4-yl)acetic acid (**57a**)

This compound was prepared from **55** in a similar manner to that described for **56b**, **57b**. (white solid, 38.5 mg, 49% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.01 (s, 4.5H), 1.02 (s, 4.5H), 2.25 (brs, 3H), 2.29-2.32 (m, 6H), 2.33 (s, 1.5H), 2.34 (s, 1.5H), 5.12 (s, 0.5H), 5.12 (s, 0.5H), 6.91-7.10 (m, 2.5H), 7.19-7.37 (m, 4.5H), 7.57-7.62 (m, 2H), 12.47 (s, 1H), HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₈H₃₃N₃O₄ [M+H]⁺: 476.2544; found: 476.2542

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-(3-phenethylureido)pyridin-4-yl)acetic acid (**57c**)

This compound was prepared from **55** in a similar manner to that described for **56b**, **57b**. (white solid, 54 mg, 85% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.97 (s, 4.5H), 0.98 (s, 4.5H), 2.27-2.37 (m, 9H), 2.59 (s, 1.5H), 2.61 (s, 1.5H), 2.88-2.96 (m, 2H), 3.48-3.56 (m, 2H), 5.03

(s, 0.5H), 5.05 (s, 0.5H), 6.85-6.91 (m, 1H), 7.15-7.33 (m, 8H), 9.09-9.21 (m, 1H), 11.12 (s, 0.5H), 11.18 (s, 0.5H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{30}H_{37}N_3O_4$ $[M+H]^+$: 504.2857; found: 504.2851

2-(tert-Butoxy)-2-(2-(3-cyclopentylureido)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)acetic acid (57d)

This compound was prepared from **55** in a similar manner to that described for **56b**, **57b**. (white solid, 7 mg, 7% (2 steps)). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.97 (s, 9H), 1.53-1.80 (m, 5H), 1.92-2.05 (m, 3H), 2.16 (s, 1.5H), 2.17 (s, 1.5H), 2.28 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 4.20-4.30 (m, 1H), 5.04 (s, 0.5H), 5.05 (s, 0.5H), 6.87-6.97 (m, 1H), 7.07 (brs, 1H), 7.14-7.23 (m, 2H), 10.09-10.17 (m, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{27}H_{37}N_3O_4$ $[M+H]^+$: 468.2857; found: 468.2852

2-(tert-Butoxy)-2-(2-(3-cyclohexylureido)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)acetic acid (57e)

This compound was prepared from **55** in a similar manner to that described for **56b**, **57b**. (white solid, 7 mg, 11% (2 steps)). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.98 (s, 4.5H), 0.99 (s, 4.5H), 1.22-1.79 (m, 8H), 1.93-2.02 (m, 2H), 2.17-2.21 (m, 6H), 2.29 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 3.80-3.90 (m, 1H), 5.07 (s, 0.5H), 5.08 (s, 0.5H), 6.89-6.98 (m, 2H), 7.16-7.23 (m, 2H), 10.04-10.14 (m, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{28}H_{39}N_3O_4$ $[M+H]^+$: 482.3013; found: 482.3010

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-(3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)ureido)pyridin-4-yl)acetic acid (57f)

This compound was prepared from **55** in a similar manner to that described for **56b**, **57b**. (white solid, 76 mg, 65% (2 steps)). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.97 (s, 4.5H), 0.98 (s, 4.5H), 1.56-1.76 (m, 2H), 1.92-2.06 (m, 2H), 2.14-2.68 (m, 12H), 3.50-3.60 (m, 2H), 3.92-4.06 (m, 3H), 5.04 (s, 0.5H), 5.06 (s, 0.5H), 6.87-7.00 (m, 1H), 7.15-7.24 (m, 2H), 10.38 (brs, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{27}H_{37}N_3O_5$ $[M+H]^+$: 484.2806; found: 484.2801

2-(tert-Butoxy)-2-(2-(3-cycloheptylureido)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)acetic acid (57g)

This compound was prepared from **55** in a similar manner to that described for **56b**, **57b**. (white solid, 41 mg, 34% (2 steps)). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.98 (s, 9H), 1.50-1.71 (m, 10H), 1.92-2.06 (m, 2H), 2.18 (s, 1.5H), 2.19 (s, 1.5H), 2.21 (brs, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.32 (s,

3H), 4.05 (brs, 1H), 5.05 (s, 0.5H), 5.06 (s, 0.5H), 6.89-7.23 (m, 4H), 10.08-10.18 (m, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{29}H_{41}N_3O_4$ $[M+H]^+$: 496.3170; found: 496.3168

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-6-((4-methoxyphenyl)amino)-2,5-dimethylpyridin-4-yl)acetate (58a)

To a solution of *methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-((trifluoromethyl) sulfonyl)oxy)pyridin-4-yl) acetate 48* (80 mg, 0.159 mmol) in toluene (4 mL) were added Cs_2CO_3 (78 mg, 0.238 mmol), 4-methoxyaniline (23.5 mg, 0.191 mmol), xantphos (4.14 mg, 0.007 mmol), and $Pd(dba)_2$ (4.4 mg, 0.005 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux for 1 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After concentration of the solvent, the residue was used without further purification. MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 477

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-6-((4-methoxyphenyl)amino)-2,5-dimethylpyridin-4-yl)acetic acid (59a)

To a solution of crude *methyl 2-(2-(3-benzylureido)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate 58a* in MeOH (2 mL), 2 M aq NaOH (0.6 mL, 1.2 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 5 h. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with $CHCl_3$. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na_2SO_4 . After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography ($CHCl_3/MeOH$) to give the product as a pale yellow solid (30 mg, 41% yield (2 steps)). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1.01 (s, 9H), 2.17 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 5.10 (s, 1H), 6.17 (brs, 1H), 6.86 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 6.90-6.99 (m, 1H), 7.11-7.23 (m, 2H), 7.43 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{28}H_{34}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 463.2591; found: 463.2584

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-((1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)amino)pyridin-4-yl)acetic acid (59b)

This compound was prepared from **48** in a similar manner to that described for **58a**, **59a**. (pale yellow solid, 18 mg, 23% (2 steps)). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1.03 (s, 9H), 2.22 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 5.09 (s, 1H), 6.93-7.03 (m, 1H), 7.10-7.37 (m, 6H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{29}H_{34}N_4O_3$ $[M+H]^+$: 487.2704; found: 487.2699

2-(2-(Benzo[d]thiazol-2-ylamino)-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetic acid (59c)

This compound was prepared from **48** in a similar manner to that described for **58a**, **59a**. (pale yellow solid, 51 mg, 65% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.06 (s, 9H), 2.31 (s, 1.5H), 2.34 (s, 1.5H), 2.37 (s, 4.5H), 2.43 (s, 1.5H), 2.62 (s, 1.5H), 2.63 (s, 1.5H), 5.13 (s, 0.5H), 5.15 (s, 0.5H), 6.95-7.04 (m, 1H), 7.17-7.24 (m, 1.5H), 7.29-7.50 (m, 2.5H), 7.58-7.63 (m, 1H), 7.71-7.76 (m, 1H), HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₈H₃₁N₃O₃S [M+H]⁺: 490.2159; found: 490.2157

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-(naphthalene-1-sulfonamido)pyridin-4-yl)acetate (60a)

To a solution of methyl 2-(2-amino-5-(3,4-dimethylphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate **55** (100 mg, 0.27 mmol) in pyridine (4 mL), naphthalene-2-sulfonyl chloride (122 mg, 0.54 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at r.t. for 5 h. Next, 2 N HCl aq was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was used without further purification. MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 561

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(3,4-dimethylphenyl)-2,5-dimethyl-6-(naphthalene-1-sulfonamido)pyridin-4-yl)acetic acid (61a)

This compound was prepared from **60a** in a similar manner to that described for **50a**. (white solid, 60 mg, 42% (2 steps)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.81 (s, 9H), 1.88 (brs, 3H), 2.19 (s, 6H), 2.24 (s, 3H), 4.67 (s, 0.5H), 4.68 (s, 0.5H), 6.84-6.94 (m, 1H), 6.99-7.20 (m, 2H), 7.59-7.70 (m, 2H), 7.97-8.07 (m, 3H), 8.09-8.15 (m, 1H), 8.60 (s, 1H), HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₁H₃₄N₂O₅S [M+H]⁺: 547.2261; found: 547.2258

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)acetate (62)

To a solution of methyl 2-(1-benzyl-3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate **39** (17.5 g, 49 mmol) in AcOH (175 mL), 10%wt Pd/C (8.3 g) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C under hydrogen atmosphere for 5 h. After filtering through Celite, the solvent was concentrated to give the solid. The solid was filtered and washed with *n*-hexane to give the product as a white solid (11.5 g, 88% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.23 (s, 9H), 2.19 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 5.15 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 10.45 (brs, 1H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 268.40

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3,6-dimethyl-2-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)pyridin-4-yl)acetate (63)

To a solution of *methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)acetate 62* (11.5 g, 43.1 mmol) in CH₂Cl₂ (115 mL), pyridine (4.43 mL, 56 mmol), Tf₂O (8.0 mL, 47.4 mmol) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred at 0°C for 20 min. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to give the product as a colorless oil (16.5 g, 96% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.23 (s, 9H), 2.34 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 5.19 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 400.00

Methyl 2-(2-(benzylamino)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (64)

To a solution of *methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3,6-dimethyl-2-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)pyridin-4-yl)acetate 63* (2.76 g, 6.91 mmol) in toluene (20 mL) were added Cs₂CO₃ (6.75 g, 20.7 mmol), BnNH₂ (1.41 g, 13.2 mmol), xantphos (780 mg, 1.35 mmol), and Pd(dba)₂ (397 mg, 0.69 mmol). The reaction mixture was stirred at 80°C for 2 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to give the product as a colorless oil (2.13 g, 87% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.23 (s, 9H), 2.09 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 4.36 (t, J=5.3Hz, 1H), 4.67 (d, J=5.3Hz, 2H), 5.15 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 7.26-7.30 (m, 1H), 7.31-7.37 (m, 2H), 7.39-7.44 (m, 2H)

Methyl 2-(2-amino-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (65)

To a solution of *methyl 2-(2-(benzylamino)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate 64* (14 g, 39.3 mmol) in MeOH (140 mL), 10%wt Pd/C (6.4 g) was added. The reaction mixture was stirred at rt under hydrogen atmosphere for 22 h. After filtering through Celite, the solvent was concentrated to give a solid. The solid was filtered and washed with *n*-hexane to give the product as a white solid (10.4 g, 99% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.23 (s, 9H), 2.16 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 5.10 (brs, 2H), 5.16 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 267.35

Methyl 2-(2-amino-5-bromo-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (66)

To a solution of *methyl 2-(2-amino-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate 65* (2.4 g, 9.01 mmol) in CH₃CN (24 mL), NBS (1.76 g, 9.91 mmol) was added at 0°C. The reaction mixture

was stirred at 0°C for 15 min. Saturated aq NaHCO₃ solution was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residual solid was filtered and washed with *n*-hexane to give the product as a beige solid (2.95 g, 95% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.21 (s, 9H), 2.16 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 4.39 (brs, 2H), 5.80 (s, 1H), MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 344.95

Methyl 2-(3-bromo-6-(3-cyclohexylureido)-2,5-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate (67)

To a solution of *methyl 2-(2-amino-5-bromo-3,6-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate 66* (500 mg, 1.45 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL), cyclohexyl isocyanate (363 mg, 5.80 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 36 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residual solid was filtered and washed with *n*-hexane to give the product as a beige solid (453 mg, 67% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.02-1.63 (m, 6H), 1.20 (s, 9H), 1.65-1.77 (m, 2H), 1.86-2.02 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.77-3.88 (m, 1H), 5.83 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 9.63 (d, J=7.3Hz, 1H)

Methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3-(4-chlorophenyl)-6-(3-cyclohexylureido)-2,5-dimethylpyridin-4-yl)acetate (68a)

To a solution of *methyl 2-(3-bromo-6-(3-cyclohexylureido)-2,5-dimethylpyridin-4-yl)-2-(tert-butoxy)acetate 67* (100 mg, 0.213 mmol) in DMF (1 mL) were added 2 M K₂CO₃ aq (0.319 mL, 0.639 mmol), 4-chlorophenylboronic acid (37 g, 0.234 mmol), and PdCl₂(PPh₃)₂ (7.0 mg, 0.01 mmol). The reaction mixture was stirred at 80°C for 1 h. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was used without further purification.

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(4-chlorophenyl)-6-(3-cyclohexylureido)-2,5-dimethylpyridin-4-yl)acetic acid (69a)

To a solution of crude *methyl 2-(tert-butoxy)-2-(3-(4-chlorophenyl)-6-(3-cyclohexylureido)-2,5-dimethylpyridin-4-yl)acetate 68a* in MeOH (2 mL), 2 M aq NaOH (1 mL, 2.0 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 2 h. Next, 2 M aq HCl was added to the reaction mixture and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na₂SO₄. After concentration of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH) to give the product as a pale yellow solid (16 mg, 15% yield (2 steps)). ¹H NMR

(CDCl₃) δ (ppm): 0.99 (s, 9H), 1.06-1.99 (m, 10H), 2.17 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 3.79-3.90 (m, 1H), 4.96 (s, 1H), 7.10 (brs, 1H), 7.13-7.19 (m, 1H), 7.40-7.48 (m, 3H), 10.03 (d, J=7.3Hz, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₆H₃₄ClN₃O₄ [M+H]⁺: 488.2311; found: 488.2306

2-(tert-Butoxy)-2-(2-(3-cyclohexylureido)-3,6-dimethyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyridin-4-yl)acetic acid (69b)

This compound was prepared from **67** in a similar manner to that described for **68a**, **69a**. (pale yellow solid, 36 mg, 32% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0.97 (s, 9H), 1.20-1.77 (m, 8H), 1.90-2.03 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 3.79-3.89 (m, 1H), 4.85 (s, 1H), 7.32-7.37 (m, 1H), 7.65-7.78 (m, 3H), 7.88 (brs, 1H), 10.26 (d, J=7.2Hz, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₇H₃₄F₃N₃O₄ [M+H]⁺: 522.2574; found: 522.2570

2-(tert-Butoxy)-2-(2-(3-cyclohexylureido)-5-(4-methoxyphenyl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)acetic acid (69c)

This compound was prepared from **67** in a similar manner to that described for **68a**, **69a**. (pale yellow solid, 37 mg, 36% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0.99 (s, 9H), 1.22-2.03 (m, 10H), 2.20 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 3.81-3.90 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 5.09 (s, 1H), 6.92-7.03 (m, 3H), 7.09-7.14 (m, 1H), 7.39-7.44 (m, 1H), 10.06 (d, J=8.0Hz, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₇H₃₇N₃O₅ [M+H]⁺: 484.2806; found: 484.2801

2-(tert-Butoxy)-2-(2-(3-cyclohexylureido)-5-(3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)-3,6-dimethylpyridin-4-yl)acetic acid (69d)

This compound was prepared from **67** in a similar manner to that described for **68a**, **69a**. (pale yellow solid, 22 mg, 20% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 1.02 (s, 9H), 1.18-2.03 (m, 10H), 2.18 (s, 1.5H), 2.20 (s, 1.5H), 2.23 (s, 3H), 3.42-3.52 (m, 2H), 3.78-3.90 (m, 1H), 4.24-4.35 (m, 2H), 5.16 (s, 0.5H), 5.19 (s, 0.5H), 6.37-6.47 (m, 1H), 6.67-6.88 (m, 2H), 7.00 (brs, 1H), 10.04-10.17 (m, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₈H₃₈N₄O₅ [M+H]⁺: 511.2915; found: 511.2915

2-(tert-Butoxy)-2-(3-(chroman-6-yl)-6-(3-cyclohexylureido)-2,5-dimethylpyridin-4-yl)acetic acid (64e)

This compound was prepared from **67** in a similar manner to that described for **68a**, **69a**. (pale yellow solid, 23 mg, 21% (2 steps)). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) (1:1 ratio of conformers): 0.99 (s, 9H),

1.22-2.91 (m, 18H), 3.60-3.87 (m, 1H), 4.20-4.34 (m, 2H), 5.08 (brs, 1H), 6.79-7.24 (m, 3H), 9.04 (brs, 1H), 10.23 (brs, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{29}H_{39}N_3O_5$ $[M+H]^+$: 510.2962; found: 510.2962

2-(tert-Butoxy)-2-((S)-2-(3-cyclohexylureido)-3,6-dimethyl-5-(5-methylchroman-6-yl)pyridin-4-yl)acetic acid (69f)

This compound was prepared from **67** in a similar manner to that described for **68a**, **69a**. (pale yellow solid, 14 mg, 3% (2 steps)). 1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1.10 (s, 9H), 1.24-2.14 (m, 12H), 1.93 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.60-2.77 (m, 2H), 3.79-3.89 (m, 1H), 4.16-4.23 (m, 2H), 5.01 (s, 1H), 6.70-6.85 (m, 2H), 7.09-7.21 (m, 1H), 10.12 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{30}H_{41}N_3O_5$ $[M+H]^+$: 524.3119; found: 524.3117

Biological assay

Cells and viruses

Molt-4 cells persistently infected with HIV-1 strain IIIB (Harada et al., 1985) and human T cell line MT-4 cells were obtained from the Institute for Virus Research, Kyoto University. Molt-4 cells and MT-4 cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 100 mg/mL kanamycin sulfate. HIV-1 recombinant molecular clone NL432 was obtained from A. Adachi (Tokushima University, Tokushima, Japan). NL432 based site-directed IN mutant clone T174I was constructed by previously described method.²⁰⁾

Antiviral assay and cytotoxicity assays

Antiviral activity and cytotoxicity were measured using MT-4 cells, as described previously.²¹⁾ MT-4 cells at 2.5×10^4 cells/well were aliquoted to 96-well plates in the presence of varying concentrations of compounds. After incubation for 1 hour, NL432 wild-type, HIV-1 strain IIIB or T174I mutant virus at a 50% tissue culture infectious dose of 4 to 10 was infected and cultured for 4 days. The antiviral activity was evaluated as the cell viability measured by absorbance at 560 (subtract background at 690 nm) using the yellow tetrazolium MTT reagent [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)]. The effective concentration achieving 50% inhibition (EC_{50}) of cell death caused by HIV-1 infection was determined from concentration response curves using a four-parameter logistic curve fitting model. Under the same conditions, the cytotoxicity of the compounds (CC_{50}) was determined using MT-4 cells without HIV-1 infection.

Metabolic stability studies

The metabolic stabilities of the test compound in rat and human liver microsomes were determined at one concentration (0.5 μ M). The compounds were incubated with 0.5 mg protein/mL in suspension in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1mM NADPH at 37 °C. Microsomal incubations were initiated by the addition of 100-fold concentrated solution of the compounds. Incubations was terminated by addition of 2-fold volume of organic solvent (MeCN/MeOH = 1:1) after 0 and 30 min of incubation at 37 °C. The preparation protein was removed by centrifugation. The supernatants were analyzed by LC/MS/MS. All incubations were conducted in duplicate, and the percentage of compound remaining at the end of the incubation was determined from the LC/MS/MS peak area ratio.

Pharmacokinetic studies

Male Sprague-Dawley rats (8 weeks) were purchased from Charles River Laboratories. Compounds were formulated as suspensions in 0.5% methylcellulose and dosed orally at 1 mg/5 mL/kg (n = 2) under isoflurane anesthesia on the nonfasted condition. Blood samples (0.2 mL) were collected with 1 mL syringes containing anticoagulants (EDTA-2K and heparin) at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h after dosing. Compounds were formulated as solutions in DMA/propylene glycol (1:1, v/v) and dosed intravenously from the tail vein at 0.5 mg/1 mL/kg (n = 2) under isoflurane anesthesia in the nonfasted condition. Blood samples (0.2 mL) were collected with 1 mL syringes containing anticoagulants (EDTA-2K and heparin) at 2, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 and 1440 min after dosing. Blood samples were centrifuged to obtain plasma samples, which were transferred to each tube and stored in a freezer until analysis. Plasma concentrations were determined by LC/MS/MS following protein precipitation with methanol. Pharmacokinetic parameters were calculated using WinNonlin based on a noncompartment model.

X-ray crystallography

Crystallization

Recombinant IN CCD (50-212; F185K) protein was expressed in *E. coli* and purified as described.²²) Crystals of IN CCD protein were grown at 20°C using the sitting drop vapor diffusion method. A 1:1 mixture was prepared of 10 mg/ml protein in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, and 5 mM dithiothreitol with reservoir solution (0.1 M sodium cacodylate pH 6.5, 0.2 M ammonium sulfate, 10% PEG 8000, 5 mM dithiothreitol). The crystals were soaked at 20°C for 16 hours with reservoir solution containing 5 mM compound in 5% DMSO. The crystals were then harvested in 30% glycerol prepared in soaking solution and flash-cooled in a nitrogen stream.

Structure determination

X-ray diffraction data were collected with MicroMax-007HF and R-axis IV++ (Rigaku). Data were processed with HKL2000²³⁾, solved by molecular replacement in MOLREP²⁴⁾, and refined in RECMAC²⁵⁾ with iterative manual model building in Coot²⁶⁾. Structures and structure factors were deposited in the Protein Data Bank database with accession codes 6LMQ (**31d**) and 7D83 (**69f**). X-ray data collection and refinement statistics for compounds (**31d**, **69f**) are described the below table.

PDB code	6LMQ (31d)	7D83 (69f)
Data collection statistics		
Space group	<i>P</i> 3 ₁ 2 1	<i>P</i> 3 ₁ 2 1
Cell parameters (Å)	71.9, 71.9, 65.5	72.3, 72.3, 65.8
Wavelength (Å)	1.5418	1.5418
Resolution (Å)	50.00-2.10 (2.14-2.10)	50.00-2.43 (2.47-2.43)
Number of unique reflections	11752 (580)	7819 (366)
Multiplicity	5.1 (4.6)	6.5 (5.6)
Completeness (%)	99.5 (99.8)	99.8 (96.8)
Rmerge (%)	6.4 (54.4)	8.3 (56.0)
Mean I/σ(I)	13.7 (2.5)	10.8 (2.4)
Refinement statistics		
Resolution range (Å)	19.1-2.10	36.2-2.43
Number of reflections in working set	11184 (812)	7444 (541)
Number of reflections in test set	557 (36)	359 (28)
R value (%)	21.1 (29.2)	22.4 (28.4)
Rfree value (%)	23.9 (37.0)	27.8 (24.6)
rmsd bond length (Å ²)	0.031	0.029
rmsd angle (°)	1.757	1.410
Number of water molecules in AU	27	15
Mean B value (Å ²)	41.3	39.9
Ramachandran plot statistics		
Residues in favored/allowed regions (%)	96.8/3.2	97.5/2.5

引用文献

1. 抗 HIV 治療ガイドライン. <https://www.haart-support.jp/guideline.htm>
2. 外務省ホームページ. <https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/kansen/kansen.html>
3. UNAIDS DATA 2019. https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2019-UNAIDS-data_en.pdf
4. Mohamed G. Atta, Sophie De Seigneux, Gregory M. Lucas, *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019, 14, 435–444
5. Menéndez-Arias, L. *Antiviral Res*. 2013, 98, 93–120.
6. Suzuki, Y., Craigie, R. *Nat Rev Microbiol*. 5, 2007, 187-196
7. Katrien Busschots, Jan De Rijck, Frauke Christa, Zeger Debyser, *Mol Biosyst*. 2009, 5, 21-31
8. Jonas Demeulemeester, Patrick Chaltin, Arnaud Marchand, Marc De Maeyer, Zeger Debyser, Frauke Christ, *Expert Opin. Ther. Patents*, 2014, 24, 609-632.
9. Frauke Christ, Arnout Voet, Arnaud Marchand, Stefan Nicolet, Belete ADesimmie, Damien Marchand, Dorothée Bardiot, Nam Joo Van der Veken, Barbara Van Remoortel, Sergei V Strelkov, Marc De Maeyer, Patrick Chaltin, Zeger Debyser, *Nature Chemical Biology*. 2010, 6, 442-448
10. Alison Slaughter, Kellie A Jurado, Nanjie Deng, Lei Feng, Jacques J Kessl, Nikoloz Shkriabai, Ross C Larue, Hind J Fadel, Pratiq A Patel, Nivedita Jena, James R Fuchs, Eric Poeschla, Ronald M Levy, Alan Engelman, Mamuka Kvaratskhelia. *Retrovirology*. 2014, 11, 100
11. Total Patent One (<https://www.totalpatentone.com/search>)を用いて調査
12. 明日の新薬 (<https://asushin2.com/ReportDisp.do>)を用いて調査
13. Lee D. Fader, Eric Malenfant, Mathieu Parisien, Rebekah Carson, François Bilodeau, Serge Landry, Marc Pesant, Christian Brochu, Sébastien Morin, Catherine Chabot, Ted Halmos, Yves Bousquet, Murray D. Bailey, Stephen H. Kawai, René Coulombe, Steven LaPlante, Araz Jakalian, Punit K. Bhardwaj, Dominik Wernic, Patricia Schroeder, Ma'an Amad, Paul Edwards, Michel Garneau, Jianmin Duan, Michael Cordingley, Richard Bethell, Stephen W. Mason, Michael Bös, Pierre Bonneau, Marc-André Poupart, Anne-Marie Faucher, Bruno Simoneau, Craig Fenwick, Christiane Yoakim, Youla Tsantrizos, *ACS Med. Chem. Lett*. 2014, 5, 422–427.
14. Pendri Annapurna, Li Guo, Gerritz Samuel, Langley David R., Trainor George L., Meanwell Nicholas A., WO2012033735A1
15. Babaoglu Kerim, Bjornson Kyla, Guo Hongyan, Halcomb Randall L., Link John O., Mcfadden Ryan, Mitchell Michael L., Roethle Paul, Trenkle James D., Vivian Randall W., Xu Lianhong, WO2012003497A1

16. Yoakim Christiane, Bailey Murray D., Bilodeau Francois, Carson Rebekah J., Fader Lee, Kawai Stephen, Laplante Steven, Simoneau Bruno, Surprenant Simon, Thibeault Carl, Tsantrizos Youla S., WO2010130034A1
17. Xiaoxiang Liu, John F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 5182-5191
18. Manuel Tsiangl, Gregg S. Jones, Anita Niedziela-Majka, Elaine Kan, Eric B. Lansdon, Wayne Huang, Magdeleine Hung, Dharmaraj Samuel, Nikolai Novikov, Yili Xu, Michael Mitchell, Hongyan Guo, Kerim Babaoglu, Xiaohong Liu, Romas Geleziunas, and Roman Sakowicz, *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 21189–21203.
19. Kushol Gupta, Vesa Turkki, Scott Sherrill-Mix, Young Hwang, Grant Eilers, Louis Taylor, Charlene McDanal, Ping Wang, David Temelkoff, Robert T. Nolte, Emile Velthuisen, Jerry Jeffrey, Gregory D. Van Duyne, Frederic D. Bushman, *PloS Biol*, 2016, 14(12)
20. Yoshinaga T, Seki T, Miki S, Miyamoto T, Suyama-Kagitani A, Kawauchi-Miki S, Kobayashi M, Sato A, Stewart E, Underwood M, Fujiwara T. *Antiviral Research*. 2018, 152:1-9.
21. Kobayashi M, Yoshinaga T, Seki T, Wakasa-Morimoto C, Brown KW, Ferris R, Foster SA, Hazen RJ, Miki S, Suyama-Kagitani A, Kawauchi-Miki S, Taishi T, Kawasuji T, Johns BA, Underwood MR, Garvey EP, Sato A, Fujiwara T. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, 55, 813-821.
22. 36. Dyda F, Hickman AB, Jenkins TM, Engelman A, Craigie R, et al, *Science* 1994, 266, 1981–1986.
23. Otwinowski, Z., Borek, M. W. D., and Cymborowski, M. (2011) DENZO and SCALEPACK. in International Tables for Crystallography (Arnold, E., Himmel, D. M., and Rossmann, M. G., ed.) pp. 226–235, John Wiley & Sons, West Sussex, UK Google Scholar
24. Vagin, A., and Teplyakov, A. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010, 66, 22–25.
25. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1997, 53, 240–255.
26. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010, 66: 486–501.

謝辞

本研究を纏めるにあたり、終始御懇意なるご指導とご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 大和田智彦教授に心より感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 金井求教授、浦野泰照教授、清水敏之教授、川島茂裕特任准教授に厚く御礼を申し上げます。

塩野義製薬株式会社 井栞章所長には、本研究の遂行および本論文の作成に際し、終始温かい御指導、御助言を賜りました。心から感謝致します。また、本研究を発表するにあたり御尽力頂きました、塩野義製薬株式会社 川筋孝プロジェクトマネージャーに厚く御礼申し上げます。

本研究を共に遂行し、また論文作成に温かい御協力を賜りました、塩野義製薬株式会社 秋山俊行氏、富田健嗣博士、埴田善之博士、岩耒努氏、松岡瑛梨子氏、秋久恵里佳氏、有田修平氏、関貴弘博士、吉永智一博士に感謝致します。また、本論文の作成を温かく見守って下さいました吉田裕ディレクター、奥野隆行プロジェクトマネージャー、創薬化学1グループの皆様感謝致します。

最後に、いつも温かく私を励ましサポートしてくれた妻 佳那恵、息子 慶輔、娘 友理に心から感謝致します。