

博 士 論 文

環状 KLVFF モチーフを基盤とした
アミロイド β の凝集阻害剤の創製研究

新 井 唯 正

目次

略語表	4
序論	6
本論	
第1章 環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフの同定	12
1-1 ペプチドの環化戦略	
1-2 KLVFF の環化誘導化	
1-3 環状 KLVFF のファーマコフォアの同定	
1-4 小括	
第2章 環状 KLVFF の凝集阻害活性向上を指向した構造修飾 と凝集阻害メカニズムの解析	20
2-1 背景	
2-2 凝集阻害活性の向上を指向した構造修飾	
2-3 凝集阻害メカニズムの解析	
2-4 off-pathway オリゴマーの形態解析	
2-5 細胞毒性評価	
2-6 環状 KLVFF の凝集阻害メカニズム	
2-7 環状 KLVFF の血清中における安定性評価	
2-8 小括	
第3章 環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基にした 非ペプチド性低分子凝集阻害剤の論理的創製	33
3-1 背景	
3-2 環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基にした 低分子凝集阻害剤の設計と合成	
3-3 低分子阻害剤の凝集阻害活性評価	
3-4 低分子阻害剤のドラッグライクネスに関する考察	
3-5 低分子阻害剤の構造最適化研究	

3-6 小括

Experimental section 43

References 66

総括 72

謝辞 74

略語表

A β	amyloid- β peptide
AD	Alzheimer disease
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion
AFM	atomic force microscopy
BBB	blood-brain barrier
Bn	benzyl
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
ch	cyclohexyl
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DIC	diisopropyl carbodiimide
DLS	dynamic light scattering
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
ESI	electrospray ionization
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
h	hour
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphate
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	hetero-nuclear single quantum coherence
LAH	lithium aluminium hydride
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -chloroperbenzoic acid
Me (or m)	methyl
min	minute
MS	mass spectrometry

M.W.	molecular weight
NMR	nuclear magnetic resonance
Ph	phenyl
ppm	parts per million
QOL	quality of life
rt	room temperature
SD	standard deviation
SEC	size-exclusion chromatography
SEM	standard error of the mean
SPPS	solid-phase peptide synthesis
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
ThT	thioflavin T
TIS	triisopropylsilane
TLC	thin layer chromatography
TOF	time-of-flight or turnover frequency
PSA	polar surface area
UV	ultraviolet
WST-8	(2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2 <i>H</i> -tetrazolium

序論

アルツハイマー病 (AD) は、認知機能の低下を主症状とする神経変性疾患の一つである^[1]。患者数は全世界で現在約 3000 万人と推定されており^[2]、認知症患者の半数以上を占める。2050 年には患者数が 1 億人にも上ると予想されている^[2]。1906 年に Alois Alzheimer が AD 患者の剖検例を報告してから 100 年余りが経ち、AD の病態解明は進んだ。しかしながら、未だ明らかになっていない部分が多く残されていることから、仮説に基づいた予防・治療法の開発が行われているのが現状である。このような背景から、現在のところ根本的な予防・治療法はなく、対症療法に留まっている。

1970 年代、AD 患者では正常人と比べアセチルコリンの産生が低下しており、これが AD の進行に関わるとする「コリン仮説」が提唱された^[3]。本仮説に基づいた創薬研究の中から、アセチルコリン分解酵素阻害剤である「ドネペジル (商品名: アリセプト)」^[4]が開発された。ドネペジルは 1996 年に FDA より医薬品として承認され、現在も世界中で第一選択薬として用いられている。しかしながら、アセチルコリン分解酵素阻害剤は認知機能や QOL を改善することはできたものの、AD を根本的に治療するまでには至らなかった。

現在では、アミロイドが AD の発症に関わるとする「アミロイドカスケード仮説」が広く受け入れられている (Figure 1)^[5]。老人斑、神経原線維変性、神経細胞死は、AD 病理の三大特徴である。このなかで、老人斑は病変初期から患者脳内に沈着が見られることから注目されるようになった^[5]。この老人斑は、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) が異常に凝集し、その凝集体が蓄積したものであることが分かった^[5]。 $A\beta$ は、アミロイド前駆体タンパク (amyloid precursor protein) から N 末端側を β -secretase に、C 末端側を γ -secretase に順に切断されることにより産生される。ここで、 γ -secretase の切断部位が 40 番目や 42 番目など複数にわたることから、 $A\beta$ には $A\beta_{1-40}$ や $A\beta_{1-42}$ などいくつかのアイソフォームが存在する。産生した $A\beta$ モノマーは凝集性が高く、オリゴマーを経由し、クロス β -シート構造を有するアミロイド線維を形成する^[6]。そして、 $A\beta$ の凝集体であるオリゴマー、線維が神経毒性を示すことから^[7,8]、 $A\beta$ の凝集が AD の発症に深く関わっているとされている。特に、 $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ など他の $A\beta$ に比べ、凝集性が高く、毒性も強い^[9]。また最近では、アミロイド線維よりオリゴマーの方が毒性が強いことが明らかになりつつある^[10]。すなわち、老人斑として沈着する線維状のアミロイドではなく、その中間体である $A\beta$ オリゴマーが真の毒性本体ではないかという考え方が提唱されている。

このようなアミロイドカスケード仮説に則り、 β -secretase (BACE-1) 及び γ -secretase 阻害剤/モジュレーター^[11]や、免疫療法^[12]、凝集阻害剤^[13]など $A\beta$ をターゲットとした予防・

治療法の開発が盛んに進められている。これらの中で臨床試験へと進んだものもあるが、現在までに医薬品として承認されたものはない。 β -secretase (BACE-1) や γ -secretase をターゲットとした創薬研究では、これらが他の生体内分子のプロセッシングにも関与することがしばしば障害となっている^[11]。例えば、 γ -secretase 阻害薬では、Notch の切断阻害による T リンパ球の分化障害など免疫系の異常を引き起こす副作用が報告されている。また、 $A\beta$ をターゲットとした抗体の臨床試験では、 $A\beta$ の蓄積量の低減には一部で成功しているものの、認知機能の有意な改善には至っていない。加えて、軽度（病気の進行初期）の患者では認知機能改善に対する有効性が出やすく、重度（病気の進行中期－後期）の患者では出にくい状況が報告されている^[14]。現在、こうした状況も鑑み、治療のタイミングに問題があるのではないかと指摘がある。すなわち、認知症の徴候が表れる前の初期の段階において、バイオマーカーによって病気を診断することができれば、治療・予防も可能になるのではないかと提唱されており、バイオマーカー探索も併せて注目されている^[15]。

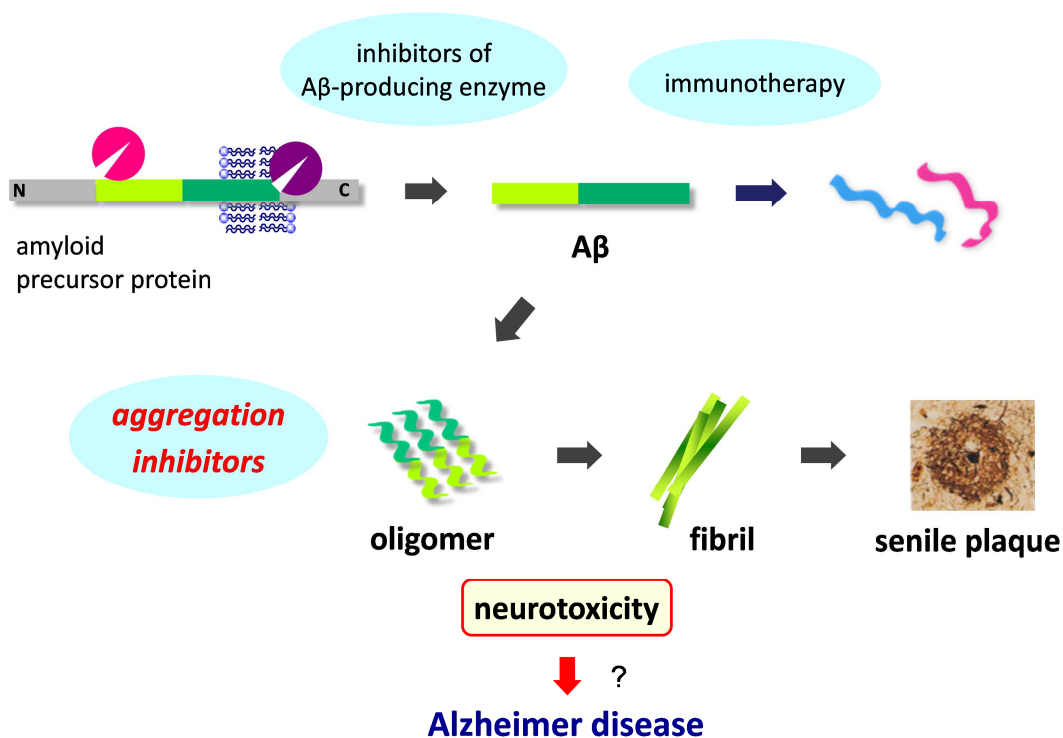


Figure 1. Amyloid cascade hypothesis.

このような背景の中で、本研究では $A\beta$ に対する凝集阻害剤に着目した。この分野においても、これまで低分子阻害剤^[13,16]やペプチド性阻害剤^[13,17,18,19]など数多くの報告があり、中には臨床試験へ進んだものもあるが、医薬品には結びついていない。例えば、ポリフェノ

ール的一种であるクルクミンは、AD 患者 34 人に対し 6 ヶ月間投与の臨床試験が行われたが、認知機能の有意な改善は認められなかった^[20]。A β は凝集過程において立体構造がダイナミックに変化することから立体構造が不明であり、現状では構造ベースの論理的分子設計により凝集阻害剤を創出することが困難である。そのため、A β の凝集を阻害するというアプローチは AD の根本的な予防・治療薬開発において有望であるはずにも関わらず、医薬として活性、物性、薬物動態、安全性などの点で優れた化合物が取得できていない状況ではないかと推察した。従って、これらの点で優れた凝集阻害剤を創製できれば、この分野の発展に貢献できると考えた。

既存の低分子凝集阻害剤としては、色素やポリフェノール系化合物が主流である (Figure 2)。これらは低分子化合物であるため、一般的に薬物動態プロファイルに優れると予想される。しかしながら、特にポリフェノール系化合物は様々な生体分子とも相互作用することが知られており、A β に対する特異性が欠点と考えられる。特異性の低さは、副作用を引き起こすリスクを高める。更に、上記のように論理的分子設計が困難であることから、現状では活性や特異性向上を指向し、これら低分子阻害剤を合理的に誘導化することもまた困難である。

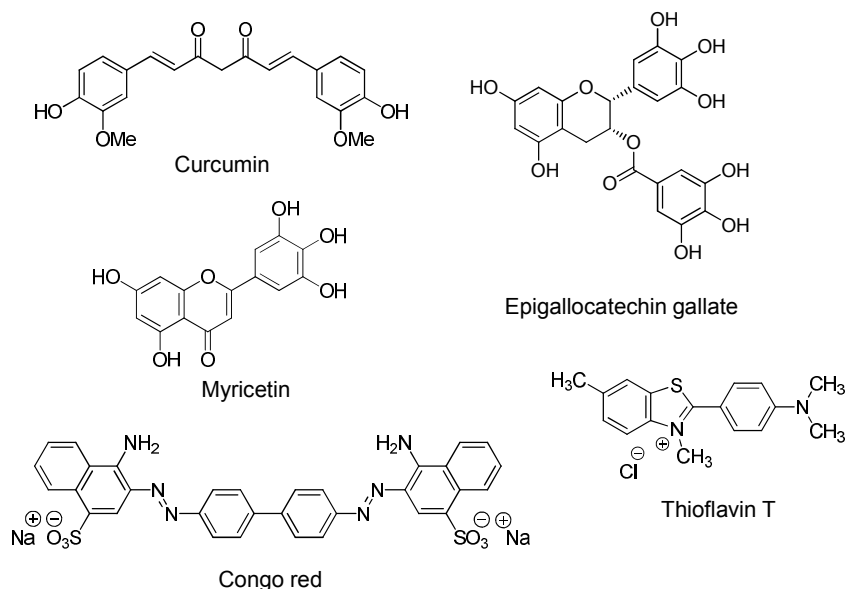
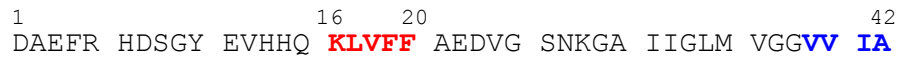


Figure 2. Reported small molecule inhibitors.

一方、A β の部分配列が全長 A β の凝集を阻害することが知られている。具体的には、A β の 16–20 番目の配列である Lys-Leu-Val-Phe-Phe (= KLVFF (**1**))^[17]や 39–42 番目の配列である Val-Val-Ile-Ala (= VVIA)^[18]が相当する。これら A β の部分配列をベースとしたペプチド性阻害分子は、先の低分子阻害剤と比べ、より 1)特異性が期待できる、2)合理的な誘導化が可能であるという 2 つの利点を有すると考えられる。A β の部分ペプチドは、全長 A β の凝集過程において、相当する自己認識部位に結合することにより、凝集阻害活性を発現すると考えられる^[17]。このように、全長 A β との特異的な相互作用に基づく阻害作用を有することから、A β の部分配列をベースとした分子には特異性が期待できると考えられる。更に、ペプチド同士の相互作用をテンプレートとしていることから、相互作用様式が不明である低分子阻害剤と比べ、より合理的な誘導化ができるのではないかと考える。特に KLVFF 領域は、A β の β -シート構造形成に重要な役割を担っているために阻害剤としてのポテンシャルが高い可能性がある^[6]。実際、**1** の凝集阻害活性向上を指向した **1** の誘導化が盛んに研究されている^[19]。例えば、*D*-アミノ酸への変換 (*D*-[KLVFF])^[19a]、アミド結合の *N*-メチル化 (SEN304 など)^[19b,c,d]、ポリリジンの導入 (KLVFFKKKKKK など)^[19e]、 α,α -ジ置換アミノ酸の導入 (AMY-1 など)^[19f]、プロリンの導入 (iA β 5 など)^[19g]、アミド結合からエステル結合への変換 (A β 16–20e)^[19h]、などが報告されている (**Figure 3**)。なかでも、Doig らは KLVFF から 30 倍以上活性が向上したペプチド性阻害剤、*D*-[chGly-Tyr-chGly-chGly-mLeu] (SEN304)^[19b,c]を同定している。

(a) A β 1–42:



(b)

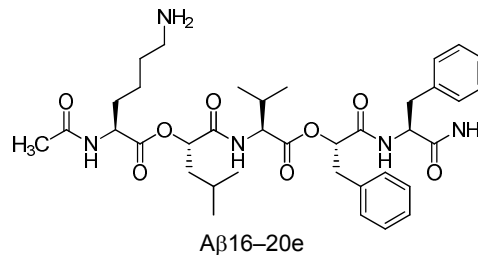
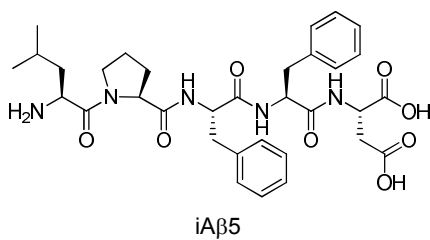
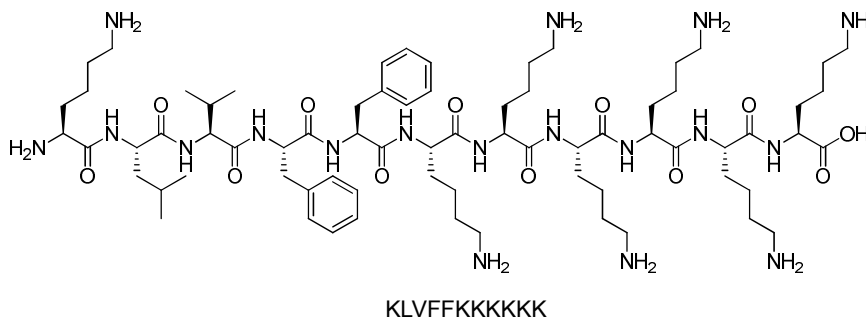
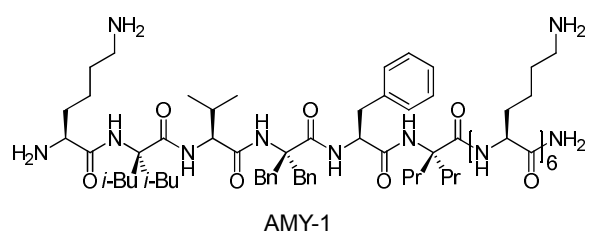
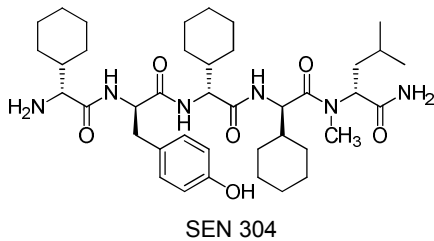
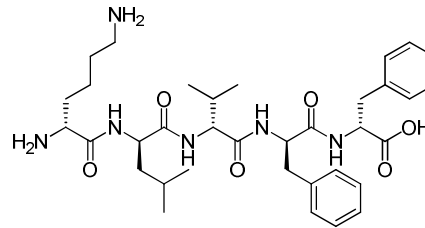
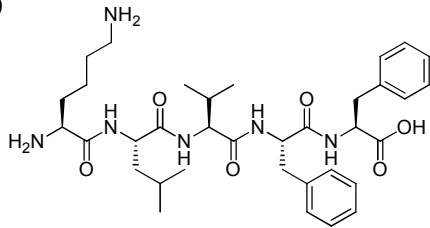


Figure 3. Amino acid sequence of A β 1–42, and reported peptidic inhibitors. The KLVFF region corresponding to A β 16–20 is highlighted in red. The VVIA region corresponding to A β 39–42 is highlighted in blue.

しかしながら、ペプチド性阻害剤は元来、代謝安定性（特に加水分解酵素に対する安定性）や細胞膜透過性が低い^[21]。特に A β 凝集阻害剤は、中枢（脳、脊髄）に分布する A β をターゲットとしていることから、脳血液関門（BBB）の透過が必須であると想定される。

そのため、細胞膜透過性の低さは AD 治療薬として致命的になりかねない。加えて、ペプチド性阻害剤では、阻害剤そのものが凝集性を示し、障害となる場合もある。

以上のような背景から本研究では、AD 治療薬の医薬リード創出を目指し、A β の部分配列である KLVFF をベースとした、高活性でドラッグライクな凝集阻害剤の設計・合成に取り組んだ。高活性でドラッグライクな凝集阻害剤の設計方針としてペプチドの環化戦略に着目した。ペプチドの環化により、活性の向上と、加水分解酵素に対する安定性、細胞膜透過性の改善が期待できると考えたためである。そこで KLVFF の環化誘導化を検討した結果、head-to-tail で環化することにより、凝集阻害活性が有意に向上することを見出した。本論文は、この発見を端緒とする、環状 KLVFF モチーフを基盤とした A β の凝集阻害剤の創製研究について述べる。第 1 章では、環状 KLVFF の構造活性相関研究より、主鎖のアミド結合がほとんど関与しない、ユニークなファーマコフォア（活性発現に必要な構造的特徴）モチーフを同定したことについて述べる。第 2 章では、環状 KLVFF の 4 番目フェニルアラニン側鎖について構造修飾を検討した結果、更に凝集阻害活性を向上させることに成功したこと、併せて、凝集阻害メカニズムを種々の生物物理学的、生化学的なアッセイにて解析した結果、環状 KLVFF 誘導体は A β を低毒性 off-pathway オリゴマーに誘導することを明らかにしたことについて述べる。第 3 章では同定したファーマコフォアモチーフを基に、環状ペプチドと同様、またはそれ以上にドラッグライクであると期待される、非ペプチド性低分子凝集阻害剤の論理的創製に成功したことについて述べる。これらの知見が、A β 凝集阻害剤研究の発展、延いては AD 治療薬の開発に貢献できれば幸いである。

第1章 環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフの同定

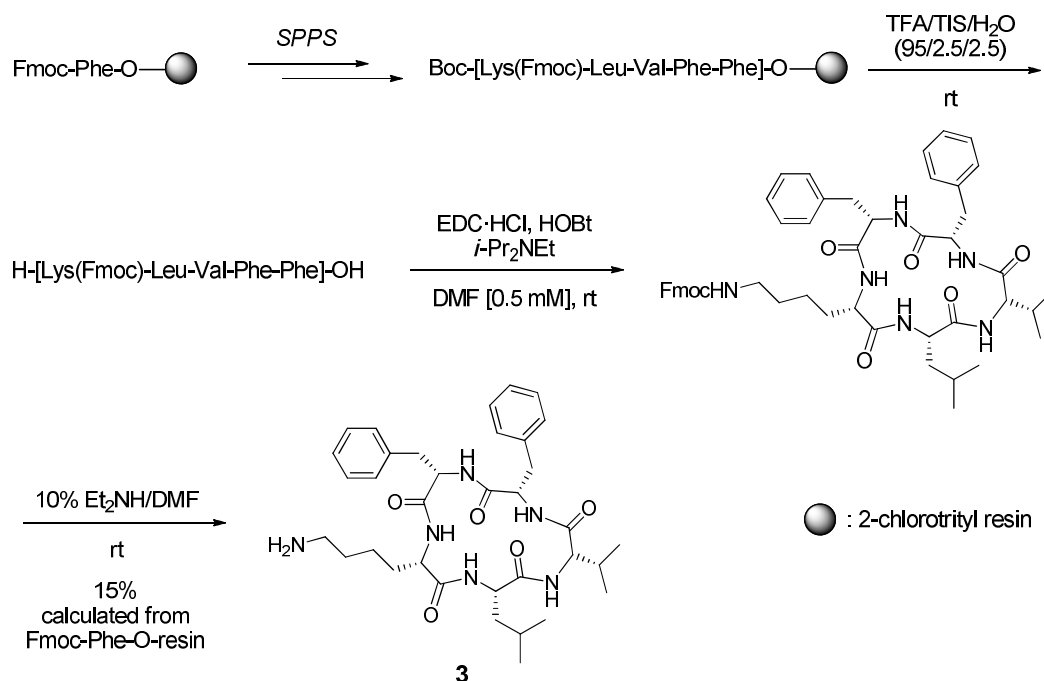
1-1 ペプチドの環化戦略

A β の部分配列をベースとしたよりドラッグライクな凝集阻害剤の設計方針として、ペプチドの環化戦略に着目した。ペプチドの環化により、活性の向上と、加水分解酵素に対する安定性、細胞膜透過性の改善が期待できると考えたためである（安定性、膜透過性の詳細は次章にて述べる）。1980 年代初頭より、鎖状に比べコンフォメーションがより剛直な環状ペプチドが注目されるようになった。例えば、生体内ホルモンの一種である、ソマトスタチンやメラノコルチンの環状誘導体^[22,23]、インテグリン受容体アゴニストとしての RGD (Arg-Gly-Asp)配列を含む環状ペプチド^[24]、またケモカイン受容体アンタゴニストとしての環状ペプチド^[25]などが代表的な研究である。これらはいずれも環状ペプチドに変換することにより、高活性を引き出すことに成功している。これは、活性コンフォメーションを固定化することにより、ターゲット分子との結合におけるエントロピーロスが抑えられたためと考えられる。更に、環状ペプチドはコンフォメーションが剛直であることから、活性発現に重要な構造的特徴、すなわち、ファーマコフォアを同定しやすいという利点も有する^[26]。特に、A β は凝集過程において立体構造がダイナミックに変化することから、阻害剤の構造を剛直にすることは、ファーマコフォア解析や A β と阻害剤との相互作用解析において有効ではないかと考えた。そこで本章では、凝集阻害活性の向上と、凝集阻害におけるファーマコフォアの同定を目的とし、KLVFF の環化誘導化を検討することとした。

1-2 KLVFF の環化誘導化

環状 KLVFF は、Scheme 1-1 に従って合成した。C 末端をクロロトリチル樹脂に担持させた保護アミノ酸を出発物質とし、ペプチド固相合成により N 末端が Boc 基で、Lys 側鎖のアミノ基が Fmoc 基で保護された鎖状 KLVFF を調製した。TFA カクテル(TFA/TIS/H₂O = 95/2.5/2.5)を用い、樹脂からの切り出しと Boc 基の除去を行った後、高希釈条件下(基質濃度: 0.5 mM)、縮合剤を作用させることにより分子内環化反応を行った^[27]。最後に、塩基性条件下で Fmoc 基を除去し、環状 KLVFF **3** を得た。

Scheme 1-1. Synthesis of *cyclo*-[KLVFF] (**3**)



3 の $\text{A}\beta$ に対する凝集阻害活性は、チオフラビン T (ThT) の蛍光強度を指標とした ThT アッセイにて評価した。ThT は、 $\text{A}\beta$ の凝集（主に、高分子量オリゴマーから線維）に特徴的なクロス β -シート構造を認識し結合する^[28]。そして結合時に 440 nm 付近の光で励起されると、480 nm 付近の蛍光を発することが知られている。そのため、ThT の蛍光強度変化は、 $\text{A}\beta$ の凝集の程度と相関するとされている。そこで、 $\text{A}\beta$ (10 μM) と **3** (30 μM) とを混合させたリン酸バッファー溶液 (pH 7.4) を 37 $^\circ\text{C}$ で 3 時間インキュベートした後、ThT を加え、その蛍光強度を測定した。その結果、 $\text{A}\beta$ 単独の系における蛍光強度を 100% とすると、**3** の添加により蛍光値が 53% まで減少された。同様の手法にて **1** を評価したところ蛍光値が 97% であったことから、head-to-tail で環化することにより有意に凝集阻害活性が向上したことが示された^[29]。更に、**3** による凝集阻害活性は少なくとも 12 時間後まで持続し、濃度依存的であることが分かった (Figure 1-3)。

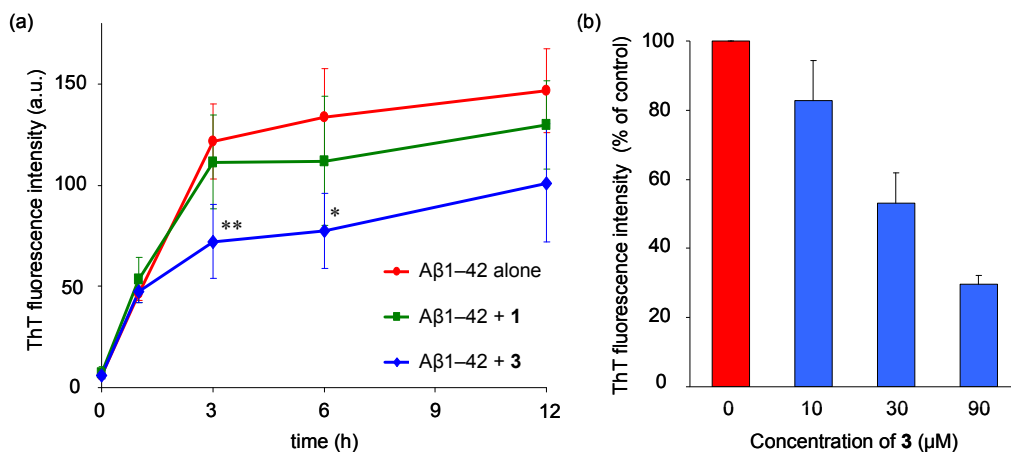


Figure 1-3. (a) Time courses of ThT fluorescence intensity, incubated at 37 °C (red line: Aβ1-42 alone (10 μM), green line: Aβ1-42 + **1** (10 μM + 30 μM), blue line: Aβ1-42 + **3** (10 μM + 30 μM)), Mean ± S.D., $n = 4-15$, ** $p < 0.01$ vs. Aβ1-42 + **1**, * $p < 0.05$ vs. Aβ1-42 + **1** (Student's *t*-test); (b) Concentration-dependency of **3**. Relative ThT fluorescence intensity to that of Aβ1-42 alone (10 μM), incubated at 37 °C for 3 h. Mean ± S.D., $n = 3$.

次に、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、アミロイド線維の形成に与える影響を検証した (Figure 1-4)。その結果、Aβ 単独の系ではアミロイド線維の形成が観察されたのに対し (left panel)、**3** を添加した系ではほとんど観察されなかった (right panel)。一方、**1** を添加した系では、小さい線維状の凝集体の形成が観察された (middle panel)。これらの結果より、AFM においても **3** が **1** よりも線維形成を強く阻害していることが示唆された。

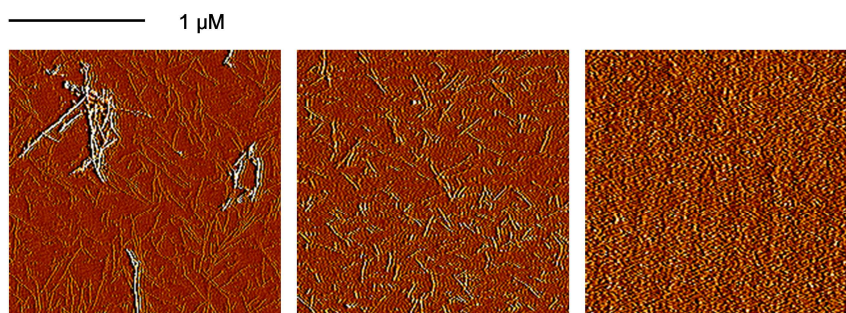


Figure 1-4. Atomic force microscopy images of Aβ1-42 alone (10 μM, left panel), Aβ1-42 + **1** (10 μM each, middle panel), and Aβ1-42 + **3** (10 μM each, right panel). Incubation time = 6 h.

1-3 環状 KLVFF のファーマコフォアの同定

先述のとおり、KLVFF のすべてのアミノ酸を *D*-アミノ酸に変換した **2** は、**1** と比べ阻害活性が向上することが報告されている^[19a]。そこで、**3** において同様にすべて *D*-アミノ酸に変換したエナンチオマー、すなわち *cyclo-D*-[KLVFF] (**4**) (= *cyclo*-[klvff]; 本論文では、*D*-アミノ酸を小文字で表記することとする) を合成した(Figure 1-5)。その結果、**4** は **3** とほぼ同等の阻害活性を示した (Table 1-1)。この結果は鎖状 KLVFF 誘導体の構造活性相関の結果 (**1** vs. **2**) と明確に異なる点で興味深いと考えられた。

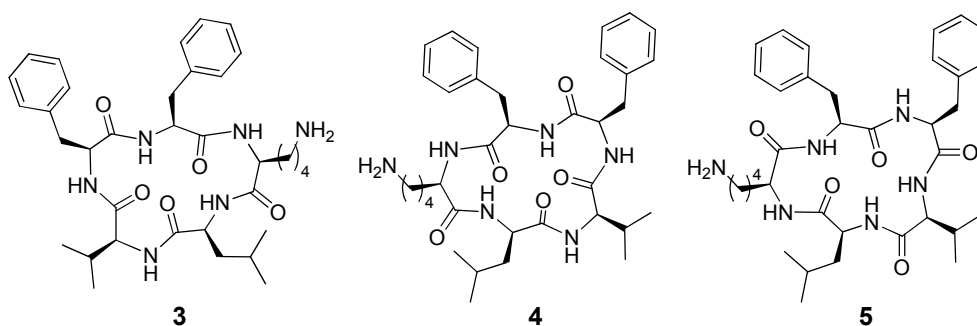


Figure 1-5. Chemical structures of **3**, **4**, and **5**

Table 1-1. Comparison of inhibitory activities between linear and cyclic-KLVFF

Compound	Structure	ThT fluorescence intensity [%] ^[a]
1	KLVFF	97
2	klvff (= <i>D</i> -[KLVFF])	69 ^[b]
3	<i>cyclo</i> -[KLVFF]	53 ^[b]
4	<i>cyclo</i> -[klvff] (= <i>cyclo-D</i> -[KLVFF])	50 ^[c]

[a] Relative fluorescence intensity of A β 1–42 (10 μ M) + inhibitor (30 μ M) vs. A β 1–42 (10 μ M) alone incubated for 3 h. All data shown are mean values of at least three independent experiments. [b] $p < 0.01$ vs. **1**, [c] $p < 0.05$ vs. **2** (Tukey's multiple comparisons among **1–4**).

ここで、**3** と **4** が同等の凝集阻害活性を示したことは、両者の構造上の類似性由来するのではないかと考え、分子モデリングソフトを用いてこれらの立体配座を比較検討した

(Figure 1-6)。その結果、両者の最安定構造を Figure 1-6 に示すフォームで重ね合わせた場合、Phe の側鎖同士、および Leu と Val の側鎖同士がそれぞれ重なりうるということが分かった。Leu と Val の側鎖の化学構造は類似していることから、両者に重なりが見られた 2 番目 Leu (本論文では、Leu²と表記する)、3 番目 Val (以降は、Val³と表記する)、4 番目 Phe (以降は、Phe⁴と表記する)、5 番目 Phe (以降は、Phe⁵と表記する) の側鎖構造が環状 KLVFF の阻害活性発現に寄与している可能性が考えられた。

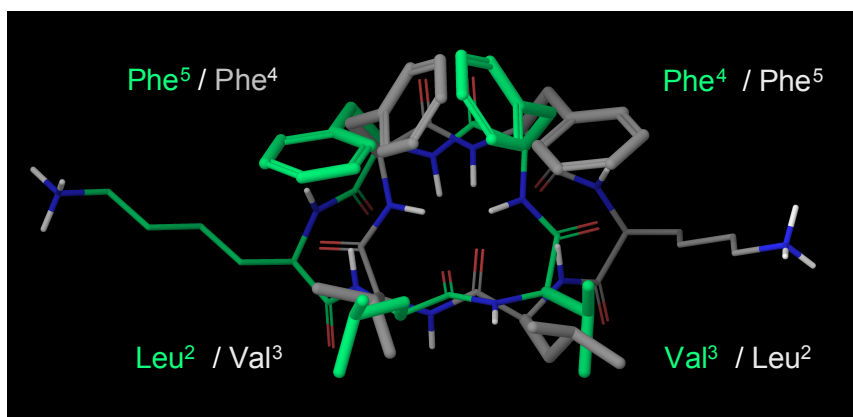


Figure 1-6. Overlaid structures of lowest-energy conformers of **3** (gray) and **4** (green).

そこでまず、主鎖アミド結合の活性発現への関与を調べる目的で、**4** のレトロインバースペプチド(C α の立体化学とアミノ酸配列がそれぞれすべて逆転^[30]、すなわち *cyclo*-[FFVLK] (**5**)を合成した。活性評価の結果、ほぼ完全に阻害活性が保持された (**4** vs. **5**, Table 1-2, Figure 1-7)。更に、時間依存および濃度依存性について精査した結果、**4** と **5** はほぼ同様のプロファイルを示した (Figure 1-7)。一般にレトロインバースペプチドでは、親ペプチドと比べ主鎖アミド結合の向きが逆になる一方、側鎖の空間的位置関係は概ね保持される。従って、この結果より環状 KLVFF では主鎖のアミド結合よりも側鎖構造が活性発現に重要であることが示唆された。対照的に、鎖状 KLVFF 誘導体 **2** のレトロインバースペプチド **6** を合成したところ、阻害活性が消失した。この結果より、鎖状 KLVFF では主鎖のアミド結合が活性発現に重要であることが示唆された。

Table 1-2. Inhibitory activities of retro-inverso derivatives of linear and cyclic-KLVFF

Compound	Structure	ThT fluorescence intensity [%] ^[a]
2	klvff	69
4	<i>cyclo</i> -[klvff]	50
5	<i>cyclo</i> -[FFVLK]	49
6	FFVLK	99 ^[b]

[a] Relative fluorescence intensity of A β 1–42 (10 μ M) + inhibitor (30 μ M) vs. A β 1–42 (10 μ M) alone incubated for 3 h. All data shown are mean values of at least three independent experiments. [b] $p < 0.01$ vs. **2** (Tukey's multiple comparisons among **1–6**).

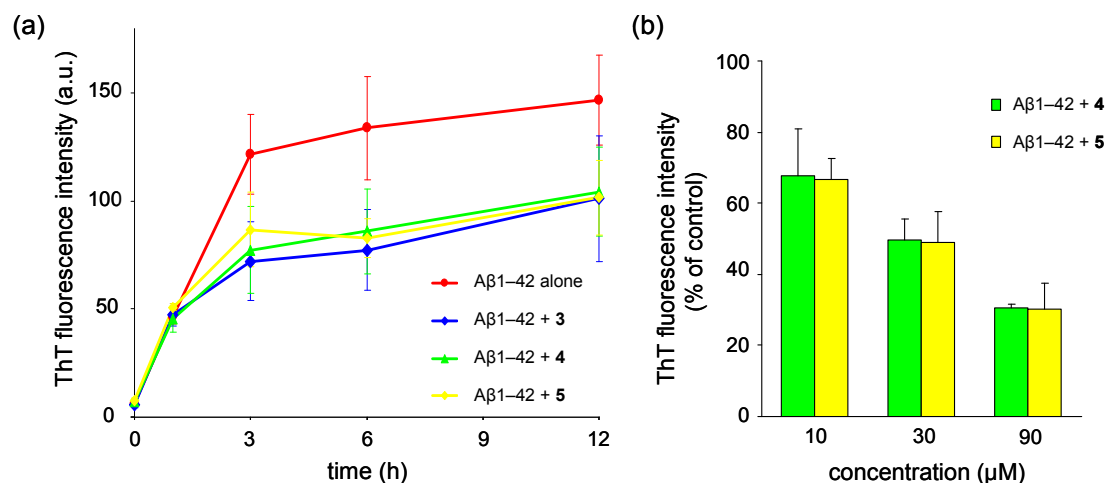


Figure 1-7. (a) Time courses of ThT fluorescence intensity, incubated at 37 $^{\circ}$ C (red line: A β 1–42 alone (10 μ M), blue line: A β 1–42 + **3** (10 μ M + 30 μ M), green line: A β 1–42 + **4** (10 μ M + 30 μ M), yellow line: A β 1–42 + **5** (10 μ M + 30 μ M)), Mean \pm S.D., $n = 4$ –15; (b) Concentration-dependency of **4** and **5**. Relative ThT fluorescence intensity to that of A β 1–42 alone (10 μ M), incubated at 37 $^{\circ}$ C for 3 h. Mean \pm S.D., $n = 3$.

次に、側鎖構造が凝集阻害活性に与える影響を調べる目的で、**4**の5つのアミノ酸をそれぞれ Ala (アラニン) に置き換える、アラニンスキャンを行った (**7–11**, **Table 1-3**)。まず1番目 Lys (以降、Lys¹と表記する) を Ala に置き換えた **7** を合成した結果、ほぼ阻害活性が保持された。この結果より、Lys¹の側鎖構造はほとんど活性発現に寄与していないことが示唆された。一方、Phe⁴、Phe⁵をそれぞれ Ala に置き換えた **10**、**11**を合成した結果、阻害活

性がほぼ消失した。この結果より、Phe⁴、Phe⁵の側鎖構造は、活性発現に非常に重要であることが示唆された。また Leu²、Val³をそれぞれ Ala に置き換えた **8**、**9** を合成した結果、阻害活性はやや低下した。この結果より、Leu²、Val³の側鎖構造は、5つの側鎖の中では中程度活性発現に寄与していると考えられる。

更に、側鎖構造の空間的な位置関係が凝集阻害活性に与える影響を調べる目的で、**4**の5つのアミノ酸をそれぞれ対応するL-アミノ酸に置き換える検討を行った(**12–16**, **Table 1-3**)。**4**のD-Leu²、D-Val³、D-Phe⁴、D-Phe⁵をそれぞれ対応するL-アミノ酸に置き換えた**13–16**を合成した結果、すべてにおいて阻害活性が低下した。一方、D-Lys¹を対応するL-アミノ酸に置き換えた**12**は、活性が保持される傾向にあった。これらの結果より、Leu²、Val³、Phe⁴、Phe⁵の側鎖構造の空間的な位置関係が活性発現に重要であることが示唆された。

Table 1-3. Structure-activity relationship studies of cyclic KLVFF

Compound	Structure	ThT fluorescence intensity [%] ^[a]
4	<i>cyclo</i> -[klvff]	50
7	<i>cyclo</i> -[alvff]	51
8	<i>cyclo</i> -[kavff]	72
9	<i>cyclo</i> -[klaff]	75
10	<i>cyclo</i> -[klvaf]	99
11	<i>cyclo</i> -[klvfa]	97
12	<i>cyclo</i> -[Klvff]	75
13	<i>cyclo</i> -[kLvff]	99
14	<i>cyclo</i> -[kLVff]	82
15	<i>cyclo</i> -[klvFf]	88
16	<i>cyclo</i> -[klvFf]	88

[a] Relative fluorescence intensity of Aβ1–42 (10 μM) + inhibitor (30 μM) vs. Aβ1–42 (10 μM) alone incubated for 3 h. All data shown are mean values of at least three independent experiments.

以上の環状 KLVFF 誘導体の構造活性相関は、**Figure 1-6** から考察された仮説を支持する結果と考えられる。すなわち、環状 KLVFF では、主鎖のアミド結合よりむしろ Leu²、Val³、Phe⁴、Phe⁵の4つの側鎖構造とそれらの空間的な位置関係が阻害活性発現に大きく寄与して

いること、すなわちファーマコフォアであることが示唆された。

1-4 小括

本章では、全長 A β に対する凝集阻害活性を有する A β の 16–20 番目の部分フラグメント、KLVFF の凝集阻害活性向上と、凝集阻害におけるファーマコフォアの同定を目的とし、KLVFF の環化誘導化を検討した。その結果、KLVFF を head-to-tail で環化することにより、凝集阻害活性が向上することを見出した。更に、環状 KLVFF 誘導体の構造活性相関研究より、主鎖のアミド結合がほとんど関与しない、Leu²、Val³、Phe⁴、Phe⁵ の 4 つの側鎖構造から成るユニークなファーマコフォアモチーフを同定した。

第2章 環状KLVFFの凝集阻害活性向上を指向した構造修飾と凝集阻害メカニズムの解析

2-1 背景

生体内には、多数の生物活性を有するペプチドが存在し、生命活動の恒常性に貢献している。こうした生物活性ペプチドは、ターゲット分子に対し高い結合活性や特異性を示すにも関わらず、これら自体が経口薬となっているケースはほとんどない。その原因としては、ペプチドは元来、代謝安定性（特に加水分解酵素に対する安定性）や細胞膜透過性が低いためと考えられる^[21]。生体内では、必要な場所に、必要な時に、必要な量の生物活性ペプチドが産生される一方で、生体外からの投与では上記の問題から活性発現に結びつかないと考えられる。このような背景から現在の医薬は、非ペプチド性の低分子化合物が主流となっている。

一方、近年、環状ペプチドに代表される大環状化合物が医薬候補の一つとして注目されてきている^[31]。環状ペプチドは、鎖状ペプチドに比べ、一般に代謝安定性が高い。すなわち、加水分解酵素である、エキソペプチダーゼとエンドペプチダーゼの両方に対して安定性が高い^[32]。エキソペプチダーゼは、N末端よりアミノ酸を一残基ずつ分解する酵素であるため、末端を持たない環状ペプチドは分解できない。また、エンドペプチダーゼは特定のアミノ酸を認識して切断する酵素で、高い基質特異性を有する。環状ペプチドは鎖状に比べ剛直なコンフォメーションをとることから、エンドペプチダーゼの基質認識部位に結合しにくいと考えられている。更に、細胞膜透過性についても有用な知見が得られてきている^[33]。例えば、シクロスポリンAは、11残基のアミノ酸からなる環状ペプチドであるにも関わらず、現在経口剤として用いられている医薬である（**Figure 2-1a**）。本化合物の分子量は1,000を上回り、分子内に多数のアミド結合が内在するため、Lipinskiの法則（Rule of five）^[34]など一般論からすれば、経口吸収性には不利な化合物と言える。そこで、シクロスポリンAの経口吸収性獲得について、分子内水素結合が関与している可能性が提唱された（**Figure 2-1b**）。シクロスポリンAは、アミド結合の大半がN-メチル化されていることが特徴である。アミド結合のN-メチル化により、特に脂質二重膜内のような疎水性環境下では、水素結合ドナー、アクセプター同士の分子水素結合形成が促進され、環内に極性官能基が局在し、環外に疎水性官能基が張り出すコンフォメーションをとることにより膜透過性を獲得しているのではないかと考えられている^[33b]。以上のように、環状ペプチドは、ペプチドの元来有する問題を克服できる可能性が示されてきたことから、医薬リードとしての資質を備えているものと考えられる。そこで本章では、今回見出した環状KLVFF誘導体の医薬リードとしての可能性を検証すべく、1)凝集阻害活性の向上、2)凝集阻害メカニズムの解

析、3)神経毒性の軽減作用、4)ヒト血清中での安定性についてそれぞれ検討したので、以下に詳細を述べる。

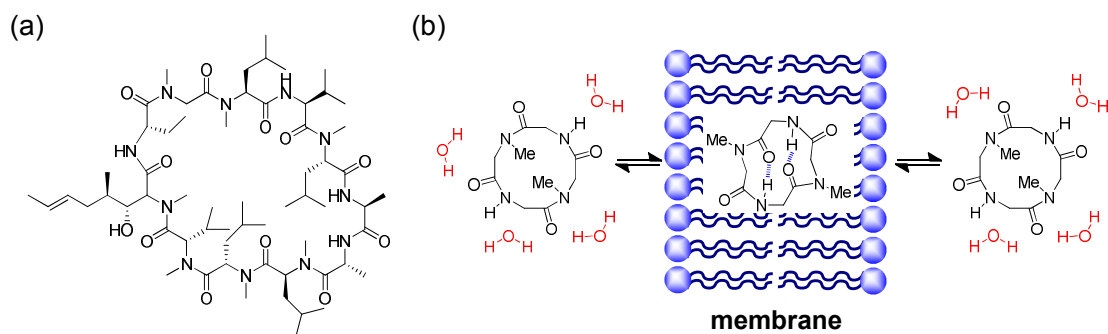


Figure 2-1. (a) Chemical structure of Cyclosporin A; (b) Schematic representation of the conformational hypothesis in membrane permeability^[33b].

2-2 凝集阻害活性の向上を指向した構造修飾

前章にて見出した環状 KLVFF **4** の ThT アッセイにおける EC₅₀ 値 (10 μM の Aβ1-42 単独の系における蛍光強度を 50% 下げるのに必要な阻害剤濃度) は 26.4 μM であった。医薬を目指す上では凝集阻害活性が依然として未熟であると考えられることから、まず活性の向上を目指し、**4** の誘導化に取り組むこととした^[35]。

第 1 章における環状 KLVFF の構造活性相関研究より、フェニルアラニン (Phe) の側鎖構造が活性発現に最も寄与していることが示唆されたことから、この部分の修飾により活性向上が期待できると考えた。そこで、**4** の Phe⁴ の β 位にもう一つフェニル基を導入した **17** を合成した結果、**4** に比べ有意に凝集阻害活性が向上することを見出した (**Figure 2-2**, **Table 2-1**)。なお、Phe⁵ で同様の検討を行った場合でもほぼ同等の活性向上が認められた (**17** vs. **18**)。

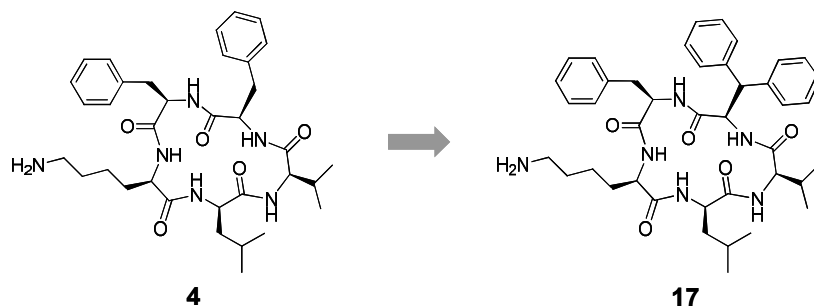


Figure 2-2. Introduction of an additional phenyl group at the β -position of the Phe⁴ side chain (inhibitor **17**).

また、**17** の位置異性体に相当する、Phe⁴ を 2-, 3-, 4-フェニル-*D*-フェニルアラニン(**19–21**)、1-ナフチル-*D*-アラニン(**22**)へ変換した化合物は、**17** とほぼ同等の活性を示した。一方で、**21** のフェニル基をピリジン(**23–25**)やピリミジン(**26**)に置き換えた化合物では、**21** に比べ活性が低下した。これらの結果より、疎水性官能基の導入は活性向上に効果的であり、逆に極性官能基の導入はあまり効果的でないことが示唆された。すなわち、疎水性官能基は阻害剤と A β との疎水性相互作用に有利にはたらき、極性官能基はこの相互作用を妨げると考えられる。活性向上が認められた **17–22** の間には有意差が見られなかったことから、**17** を代表例として選抜し、引き続き阻害メカニズム解析実験の検討に用いることとした。なお、**17** の ThT アッセイにおける EC₅₀ 値は 7.8 μ M であり、環状 KLVFF **4** (26.4 μ M) と比べ約 3 倍、KLVFF (>90 μ M) と比べ 10 倍以上活性が向上している (**Figure 2-3a**)。

Table 2-1. Structural modification of cyclic-KLVFF (**4**) focusing on Phe⁴ position.

Compound	Structure	ThT fluorescence intensity [%] ^[a]
4	<i>cyclo</i> -[klvff]	49.8 ± 5.8 (EC ₅₀ = 26.4 μM)
17	<i>cyclo</i> -[klvf(β-Ph)f]	27.3 ± 8.1* (EC ₅₀ = 7.8 μM)
18	<i>cyclo</i> -[klvff(β-Ph)]	24.8 ± 6.0*
19	<i>cyclo</i> -[klvf(2-Ph)f]	22.6 ± 0.8*
20	<i>cyclo</i> -[klvf(3-Ph)f]	24.8 ± 2.3*
21	<i>cyclo</i> -[klvf(4-Ph)f]	32.5 ± 5.4*
22	<i>cyclo</i> -[klva(1-naphthyl)f]	25.8 ± 4.6*
23	<i>cyclo</i> -[klvf(4-(2-pyridyl))f]	51.9 ± 14.2
24	<i>cyclo</i> -[klvf(4-(3-pyridyl))f]	46.1 ± 9.9
25	<i>cyclo</i> -[klvf(4-(4-pyridyl))f]	49.1 ± 6.9
26	<i>cyclo</i> -[klvf(4-(5-pyrimidyl))f]	59.4 ± 14.7

[a] Relative ThT fluorescence intensity of Aβ1–42 (10 μM) + inhibitor (30 μM) vs. Aβ1–42 (10 μM) alone, incubated at 37 °C for 3 h. Mean ± S.D. values, *n* = 3–12.

p* < 0.01 vs. **4 (Student's *t*-test).

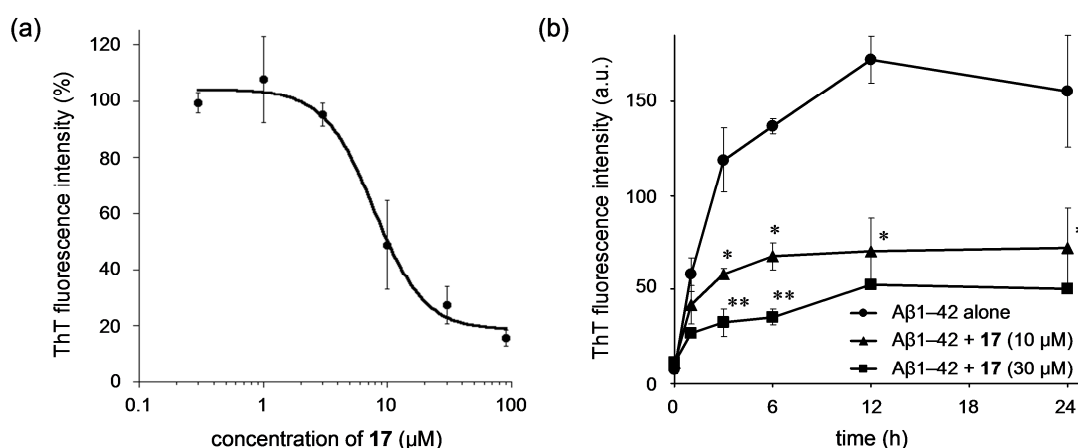


Figure 2-3. (a) Dose-response curve for **17** measured with the ThT assay. **17** was co-incubated with 10 μM Aβ1–42 at 37 °C for 3 h prior to ThT fluorescence measurements. Mean ± S.D., *n* = 3.

Percent ThT fluorescence was calculated by normalizing to 100% using the A β 1–42 alone control. EC₅₀ value was calculated by fitting the data to a four-parameter dose-response model using KaleidaGraph 4.5 (Synergy Software, Reading, PA, USA). (b) Time-courses of ThT fluorescence intensity, incubated at 37 °C (circle: A β 1–42 alone (10 μ M), triangle: A β 1–42 + **17** (10 μ M + 10 μ M), square: A β 1–42 + **17** (10 μ M + 30 μ M), Mean \pm S.D., $n = 3$, * $p < 0.05$ vs. A β alone, ** $p < 0.01$ vs. A β + 10 μ M **17** (Student's t -test)

2-3 凝集阻害メカニズムの解析

阻害剤 **17** の凝集阻害メカニズムの解析にあたり、ThT 蛍光強度結果の経時変化に着目した (**Figure 2-3b**)。ここでは、A β (10 μ M)と **17** (10 or 30 μ M)とを混合させたリン酸バッファ溶液 (pH 7.4)を 37 °C でインキュベートし、ThT 蛍光強度の経時変化を追跡した結果、阻害剤 **17** を添加した系においてはA β 単独の系と比べ最大蛍光強度を低下させ、それが 24 時間後まで持続している。この結果に対し、次のような考察を行った。凝集阻害過程において、仮に **17** が A β に結合し可逆的な複合体 (**Figure 2-4, reversible complex**) を形成すると、ThT 蛍光強度は **17** の非存在下と比べて最終的な蛍光強度は変わらず、それに到達する時間が延長すると考えられる。一方、もし不可逆的な (あるいは、反応速度に非常に大きな違いがある平衡状態) 複合体 (**Figure 2-4, irreversible complex**)、言い換えれば“off-pathway^[36]”の複合体を形成すると、最終的にネイティブな A β 線維量が減少するため、A β 単独の系と比べ最終的な蛍光強度が変化することが予想される。実際、off-pathway メカニズムをとる阻害剤では、ThT 蛍光実験においてそのような現象が報告されている^[36]。**Figure 2-3b** の ThT 蛍光強度の経時変化において、**17** 共存下の ThT 蛍光は、A β 単独時と比べ、最終的な値が顕著に低いことから off-pathway メカニズムが関与していることが示唆される。そこで、**17** の off-pathway メカニズムを更に検証すべく、種々の生物物理学的、生化学的アッセイを行うこととした。

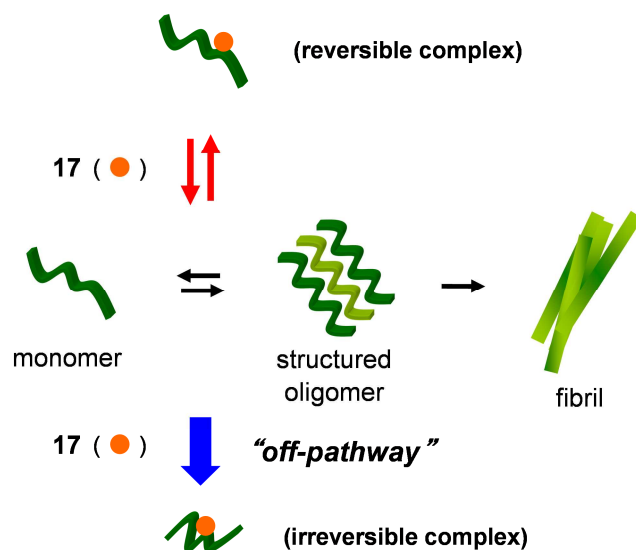


Figure 2-4. Two possible mechanisms for aggregation inhibition of A β 1-42 by 17.

まず動的光散乱法 (DLS) を利用し、A β のサイズ分布、すなわち、流体力学半径 (R_H) 分布の経時変化を追跡した (Figure 2-5a)。A β (30 μ M)^[37] 単独の系では、37 °C でインキュベート開始直後に、 $R_H = 30$ nm 付近の A β 種が主に観察された。インキュベート 3 時間後では、凝集の進行に伴い、 $R_H = 30-100$ の A β 種が減少し、 $R_H > 7 \times 10^3$ の A β 種が主に観察された。一方、A β (30 μ M) と 17 (90 μ M) を混合させた系では、インキュベート開始直後に $R_H = 10^2-10^3$ と $R_H > 7 \times 10^3$ の主に 2 つの A β 種が観察された^[38]。この結果より、A β は 17 と混合させると即座に会合が進行していることが示唆された。3 時間後では、前者が減少し、後者が増加した。このように 17 の有無によって A β のサイズ分布に明確な違い (特に、17 の存在により $R_H = 30$ nm の A β 種が消失し、代わりに $R_H = 10^2-10^3$ と $R_H > 7 \times 10^3$ が出現) が観察された。この結果は、17 の添加により A β の凝集経路が変化を受けている可能性を支持するものと考えられる。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による分析においても、この可能性を支持する結果が得られた (Figure 2-5b)。A β (10 μ M) 単独の系と A β (10 μ M) と 17 (30 μ M) を混合させた系をそれぞれ 37 °C でインキュベートしたところ、直後の時間帯 ($t = 0$ h) においては両方の系において 14.5 mL の溶出容量時にピーク (モノマー/低分子量オリゴマーに相当) が観察された。一方、インキュベート 6 時間後では、いずれの系においても当該ピークはほぼ消失した。これは凝集に伴いモノマー/低分子量オリゴマーが減少したためと考えられる。

ここで、A β 単独の系では、8.5 mL の溶出容量時にオリゴマー由来のピークが観察された^[39]のに対し、**17** 存在下では、相当するピークが一切観察されなかった。このような溶出パターンの違いは、生成しているオリゴマーの性質の違いを反映している可能性があると考えられる。

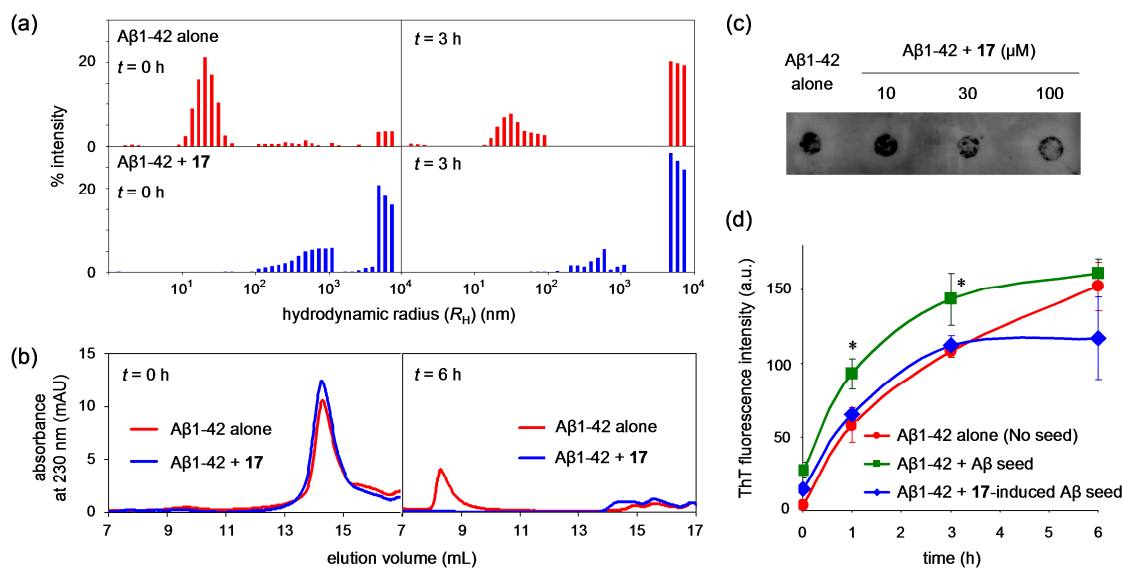


Figure 2-5. (a) Dynamic light scattering. Buffer solutions (pH 7.4) of A β 1–42 (30 μ M) with (1:3 ratio) or without **17** were incubated at 37 $^{\circ}$ C. (b) Size-exclusion chromatography. Buffer solutions (pH 7.4) of A β 1–42 (10 μ M) with (1:3 ratio) or without **17** were incubated at 37 $^{\circ}$ C. (c) A dot blot assay with oligomer-specific A11 antibody. Buffer solution (pH 7.4) containing A β 1–42 (10 μ M) and **17** (1:0, 1:1, 1:3, and 1:10 ratio) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 6 h. (d) Seeding assay. “A β seed” was prepared by incubation of A β 1–42 (10 μ M) in buffer (pH 7.4) at 37 $^{\circ}$ C for 24 h and “**17**-induced A β seed” was prepared by incubation of A β 1–42 (10 μ M) in buffer (pH 7.4) in the presence of **17** (30 μ M) at 37 $^{\circ}$ C for 24 h. Independent ThT assay using fresh A β 1–42 (10 μ M) was conducted with the addition (or no addition) of the prepared seeds (10% v/v). Mean \pm S.D., $n = 3$, $*p < 0.05$ vs. A β 1–42 alone and A β + **17**-induced A β seed (Student’s t -test).

次に、アミロイドオリゴマーに特異的に結合する A11 抗体^[40]を用い、ドットブロットアッセイを行った (**Figure 2-5c**)。A β (10 μ M)単独の系と、A β (10 μ M)と **17** (10, 30, 100 μ M)を混合させた系をそれぞれ 37 $^{\circ}$ C で 6 時間インキュベートした後、A11 抗体により染色した。その結果、**17** の濃度依存的に染色強度が弱くなった。この結果より、**17** の存在下ではネイ

タイプオリゴマーの生成量が減少していることが示唆された。

また、**17** の存在下で生成する A β 種が、ネイティブな A β モノマーの凝集に対するシードとなるか否か評価した (**Figure 2-5d**)。まず、**17** の存在下、非存在下で A β (10 μ M) を 37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートし、シード (**17** 存在下 : **17** 由来の A β シード、**17** 非存在下 : A β シードとする) を得た。その後、これらのシードを用い、新たに調製した A β (10 μ M) の凝集速度に与える影響について評価した。凝集速度は、ThT 蛍光強度の上昇速度を指標とした。その結果、A β シード添加時では非添加時に比べ、凝集速度が速くなった (green line vs. red line)。これは、シードの添加によって凝集が促進されるという既存の報告^[36,41]と合致する結果である。一方、**17** 由来の A β シード添加時では、非添加時と凝集速度がほぼ同等であった (blue line vs. red line)。これらの結果より、**17** の存在下で生成する A β 種にはネイティブな A β モノマーの凝集に対するシード能がほとんどないことが示唆された。

以上の相補的な生物物理学的、生化学的な解析より、**17** の存在により A β の off-pathway 化学種が生成していることが示唆された。

2-4 off-pathway オリゴマーの形態解析

次に、**17** の存在下で生成する off-pathway 化学種の形態学的な知見を得るため、AFM を用いて解析を行った (**Figure 2-6**)。まず、A β (10 μ M) の HEPES バッファー溶液 (pH 7.4) を 37 $^{\circ}$ C で 6 時間インキュベートした後、AFM にて生成物の形態を観察したところ、 z 軸の高さが 5–20 nm の剛直なアミロイド線維が観察された (a)。一方、A β (10 μ M) と **17** (30 μ M) を混合させた系では、線維は全く観察されず、代わりに z 軸の高さが 2–4 nm の小さな球状の化学種が主に観察された (b)。加えて、 z 軸の高さが ~6 nm の球状の化学種も散見された。**17** (30 μ M) 単独の系では、 z 軸の高さは 1 nm 以下であった (c)。これらの解析より、**17** により誘導される off-pathway 化学種は、高さ数 nm のオリゴマー粒子^[42]に相当することが分かった。

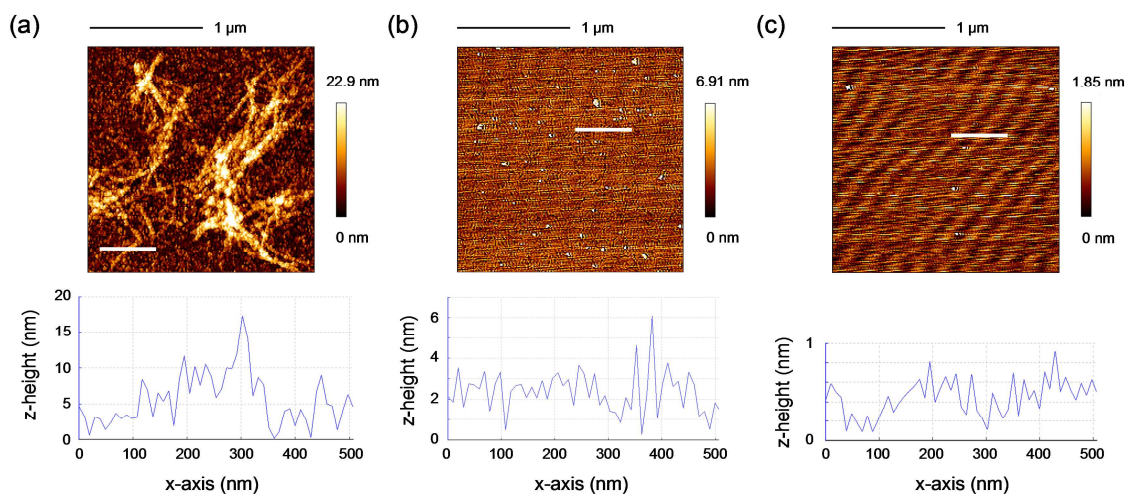


Figure 2-6. Atomic force microscopy images of Aβ1-42 alone (10 μM, a), Aβ1-42 + 17 (10 μM + 30 μM, b), and 17 alone (30 μM, c). Each sample was incubated at 37 °C for 6 h. Lower graphs indicate z-heights obtained at the white bars of upper images.

ここで、Aβ (10 μM)と 17 (30 μM)とを混合させたリン酸バッファー溶液 (pH 7.4)を 37 °Cで 6 時間インキュベートした後、逆相 HPLC による分析を行うことにより、Aβ に結合していないフリーな 17 の残存量を見積もることとした (Figure 2-7)。その結果、インキュベート開始時と比較し、17 の残存量は顕著に減少した。一方、KLVFF (1)を用いて同様の実験を行ったところ、1 の残存量はインキュベート開始時からほとんど変化しなかった。なお、Aβ の非存在下、すなわち 17 (30 μM)単独の系においても 17 の減少は認められなかった。これらの結果において、17 が off-pathway Aβ オリゴマー種の中に強固に取り込まれたために、17 の回収率が低下した可能性が考えられる^[43]。

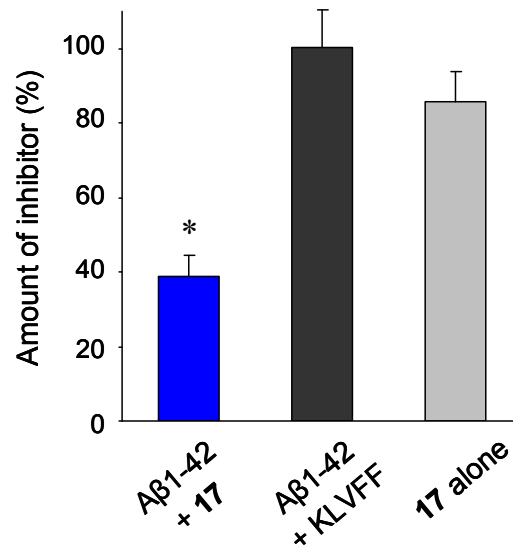


Figure 2-7. Quantity of free inhibitor verified by reverse-phase HPLC. Buffer solution (pH 7.4) containing Aβ1-42 (10 μM) and **17** or KLVFF (1:3 ratio each) was incubated at 37 °C for 6 h and analyzed by HPLC. **17** alone (30 μM) was analyzed in a same manner. Ratios of ligand concentrations at time = 6 h relative to time = 0 h are shown in percentages. Mean ± S.D., $n = 3$, * $p < 0.01$ vs. Aβ1-42 + KLVFF and **17** alone (Student's t -test).

2-5 細胞毒性評価

次に、凝集阻害剤 **17** の Aβ の神経毒性に与える影響について、ラット副腎褐色細胞腫である PC12 細胞を用いて検証した (**Figure 2-8**)。ウマ血清を 1%含む HEPES-DMEM 培地中の細胞に対し、Aβ (10 μM) 単独、Aβ + **17** (10 + 5 μM)、Aβ + **17** (10 + 10 μM)、Aβ + **17** (10 + 20 μM) をそれぞれ混合させ、37 °C で 48 時間インキュベートした後、WST-8 試薬により生細胞数を定量した。溶媒投与群の細胞生存率を 100% としたとき、Aβ 単独の系では約 20% まで生存率が減少した。一方、**17** の存在下では濃度依存的な生存率の増加が認められた。なお、**17** 単独の結果より、**17** そのものにはほとんど細胞毒性は認められなかった。これらの結果より、阻害剤 **17** を添加し Aβ の凝集を阻害することにより、その神経毒性を軽減させることができた。おそらく、**17** により誘導される Aβ の off-pathway 化学種は、ネイティブオリゴマーと比べ細胞毒性が低いものと考えられる。

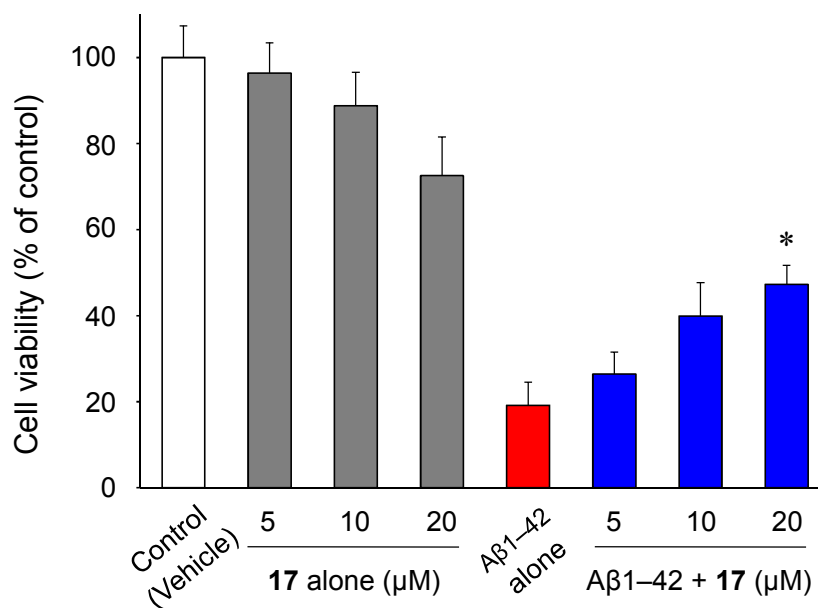


Figure 2-8. Concentration-dependent effect of **17** on the cytotoxicity of Aβ1-42. PC12 cells were treated with Aβ1-42 (10 μM) in the absence or presence of **17** (5, 10, 20 μM) for 48 h, and analyzed by a cell viability assay (mean ± SEM, n=3; **p*<0.05 vs. Aβ1-42 alone by Dunnett's test).

2-6 環状 KLVFF の凝集阻害メカニズム

以上の生物物理学的、生化学的な解析より想定される **17** の凝集阻害メカニズムを **Figure 2-9** 示す。**17** は Aβ と結合すると即座に off-pathway 化学種を生成し、引き続き会合が進行する (**Figure 2-5a**)。しかし、この off-pathway 化学種はアミロイド線維へは成長せず、高さ数 nm のオリゴマー粒子で留まる (**Figure 2-6**)。更に、off-pathway オリゴマーは、クロス β-シート構造を認識し結合する ThT (**Figure 2-3**)、及びアミロイドのオリゴマーを特異的に認識する A11 抗体 (**Figure 2-5c**) に対しほとんど親和性を示さず、細胞毒性もネイティブオリゴマーと比べ有意に低い (**Figure 2-8**)。

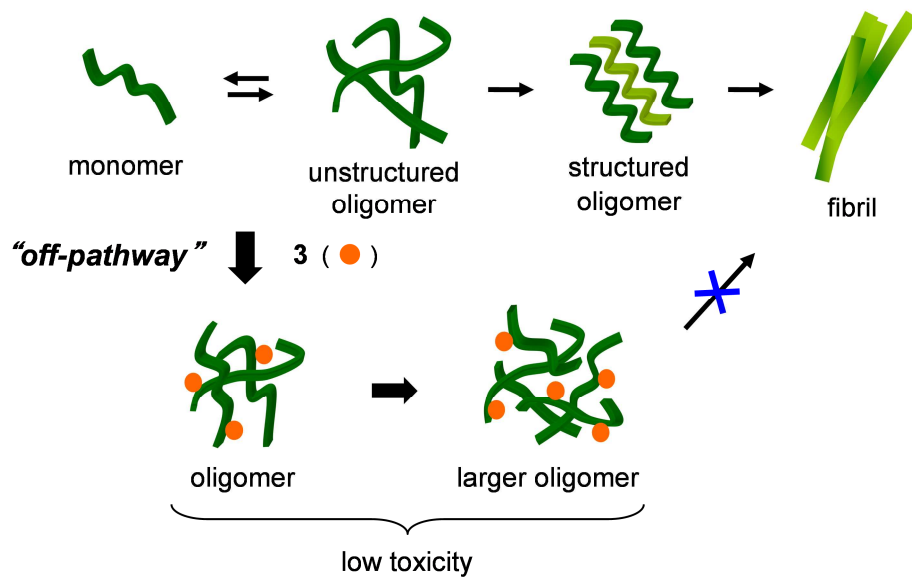


Figure 2-9. Proposed mechanism for aggregation inhibition of A β 1-42 by **17**.

2-7 環状 KLVFF の血清中における安定性評価

最後に、ペプチドの欠点の一つである加水分解酵素に対する安定性に関して知見を得るべく、環状ペプチド **17** と鎖状ペプチド KLVFF (**1**) のヒト血清中での安定性を評価した。その結果、KLVFF は 10 分でほぼすべて分解されたのに対し、**17** は少なくとも 6 時間後までほとんど分解を受けなかった (**Figure 2-10**)。これらの結果より、ヒト血清中において **17** は KLVFF と比べて高い安定性を示すと考えられる。

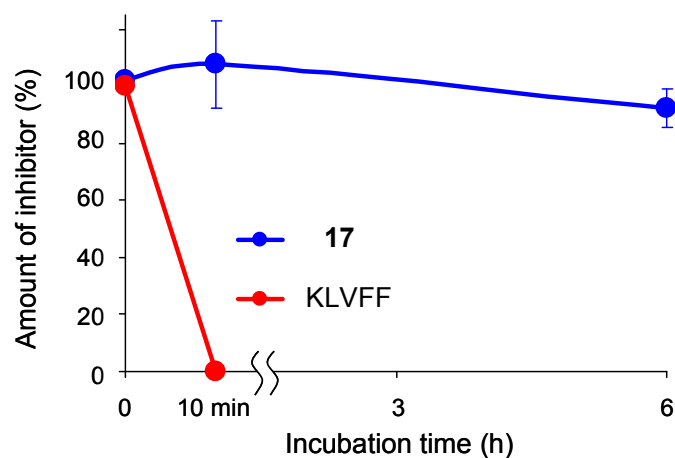


Figure 2-10. Stabilities of **17** (blue) and KLVFF (red) in human serum, incubated at 37 °C. Ratios of inhibitor concentrations relative to time = 0 h are shown in percentages. Mean \pm S.D., $n = 3$.

2-8 小括

本章では、環状 KLVFF 誘導体の医薬リードとしての可能性を検証することを目的とし、1)凝集阻害活性向上を指向した構造修飾、2)凝集阻害メカニズムの解析、3)神経毒性の軽減作用、4)ヒト血清中での安定性についてそれぞれ検討した。まず、環状 KLVFF **4** の Phe⁴ 側鎖の β 位にもう一つフェニル基を導入することにより、凝集阻害活性が 3 倍程度向上した **17** を得ることに成功した。次に、**17** による凝集阻害メカニズムを 8 つの相補的な生物物理学的、生化学的なアッセイにて解析した結果、**17** は A β を off-pathway オリゴマーに誘導することにより凝集を阻害していることを明らかにした^[44]。この off-pathway オリゴマーは、 β -シート性が低く、ネイティブな A β モノマーの凝集に対するシード能も低く、更に細胞毒性も低かった。更に、**17** はヒト血清中で高い安定性を示し、加水分解酵素に対する安定性が高いことが示唆された。以上の検討結果より、環状 KLVFF 誘導体 **17** は、AD 治療薬の有望な医薬リードとなり得ると考えられる。しかしながら、今後 *in vivo* にて医薬候補化合物としての可能性を検証するためには、膜透過性など薬物動態に関する検討が今後の課題と考える。

第3章 環状KLVFFのファーマコフォアモチーフを基にした非ペプチド性低分子凝集阻害剤の論理的創製

3-1 背景

第2章にて示したように、環状ペプチドは医薬リードとして高いポテンシャルを有すると考えられる。特に $A\beta$ の凝集阻害のような、タンパク質-タンパク質相互作用を標的とする場合においては、一般的に、タンパク質間の比較的広い領域と相互作用する必要があるという観点から、低分子化合物よりも分子量が大きな中分子量の化合物群が注目されているように思われる^[45]。それでもなお、細胞膜透過性等の薬物動態面の利点を考えると、高活性な低分子化合物が理想的であると考えられる。 $A\beta$ 凝集阻害剤は中枢（脳、脊髄）に分布する $A\beta$ をターゲットとすることから、血液脳関門の透過など薬物動態プロファイルが薬効発現に果たす役割が大きいと考えられるためである。実際に、タンパク質-タンパク質相互作用を標的とした阻害剤研究においても、中分子化合物（ペプチドも含む）と併せて低分子化合物も研究されている。すなわち、タンパク質間の広い界面の中に相互作用に決定的な役割を果たすアミノ酸残基（ホットスポット）が存在するケースも同定され^[46]、当該ホットスポットをターゲットとした低分子阻害剤の創製研究が展開されている^[47]。そこで本章では、 $A\beta$ 凝集阻害剤における低分子化合物についてその可能性を模索することとした。

ペプチドをベースとした低分子化合物への構造展開に関しては、内因性の生物活性ペプチドにおいて多くの成功例が報告されている^[48]。例えば、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬の創製研究が挙げられる（**Figure 3-1**）。研究初期では、内因性ペプチドであるアンジオテンシン II 誘導体が盛んに研究されていたが、薬物動態プロファイルの悪さ（低いバイオアベイラビリティ）が問題となっていた。そこで、**Figure 3-1** のように、アンジオテンシン II と受容体との結合において鍵と想定される部分構造（ファーマコフォア）を抽出し、それを模倣した低分子化合物を設計することにより、バイオアベイラビリティが高く、経口投与可能な化合物の創製に成功している。

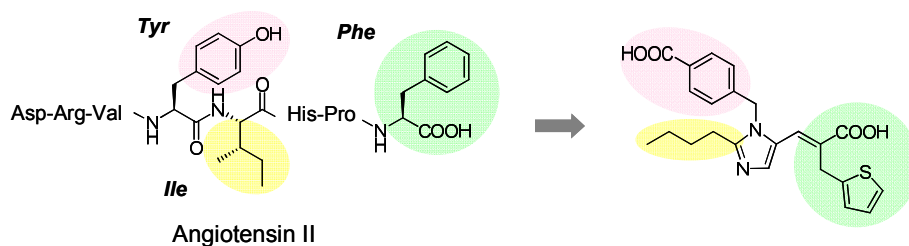


Figure 3-1. An example of development of small-sized angiotensin II antagonist, derivatized from angiotensin II peptide sequence^[48a]

上記の成功例を参考とし、ペプチド性阻害剤のファーマコフォアをベースとした低分子阻害剤の創出を着想した。しかしながら、凝集阻害剤の分野では、著者の知る限り、これまでペプチド性阻害剤をベースとし、論理的に低分子阻害剤へ変換した報告例はない。これは、主鎖のアミド結合が凝集阻害活性発現に不可欠であることに由来するのではないかと考えられる。すなわち、例えば $A\beta$ の凝集阻害剤の場合、 $A\beta$ の部分配列に相当する KLVFF は、主鎖のアミド結合による水素結合と側鎖の疎水性相互作用により全長 $A\beta$ と相互作用し、凝集阻害活性を示していると考えられる (**Figure 3-2**) が、特に前者の相互作用の寄与が大きいことから^[19]、水素結合を担うアミド結合を除くことが原理的に困難であると考えられる。一方、本研究で見出した環状 KLVFF は、主鎖のアミド結合が凝集阻害活性発現にほとんど関与しない、Leu²、Val³、Phe⁴、Phe⁵ の 4 つの側鎖構造から成るユニークなファーマコフォアを有する。そこで本章では、環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基に、非ペプチド性の低分子凝集阻害剤の創製を検討することとした。

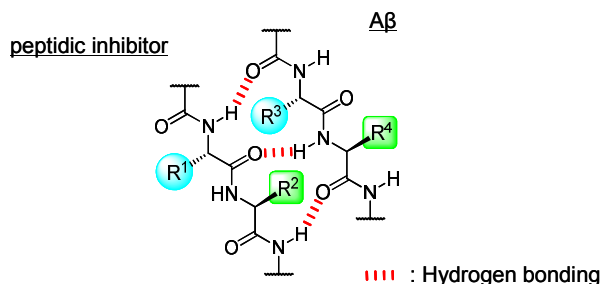


Figure 3-2. Proposed interaction mode of peptidic inhibitor

3-2 環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基にした低分子凝集阻害剤の設計と合成

環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基に非ペプチド性の低分子凝集阻害剤 **27** を設計した (Figure 3-3)。すなわち、ピリジン環を母骨格とし、その 2、4、6 位に Leu² 側鎖ミミックとしてイソペンチルカルボキサミド基、Phe⁴ 側鎖ミミックとしてベンジル基、Phe⁵ 側鎖ミミックとしてフェノキシ基をそれぞれ配置することにより、環状 KLVFF のファーマコフォアを模倣することを考えた。ピリジン環は、窒素原子に起因した分子全体の親水性向上を期待して採用した。なお、構造の単純化のため、ここでは 4 つのファーマコフォアの中、Leu²、Phe⁴、Phe⁵ の 3 つを利用することとした。分子モデリングを用いた検討によると、環状 KLVFF **4** の Leu²、Phe⁴、Phe⁵ の β 炭素間の距離は、ピリジン誘導体 **27** の 3 つのファーマコフォア部分の根元の原子間の距離とよい一致を示している (Figure 3-3a)。また、**4** と **27** のファーマコフォア部分同士が重なりうることも確認された (Figure 3-3b)。

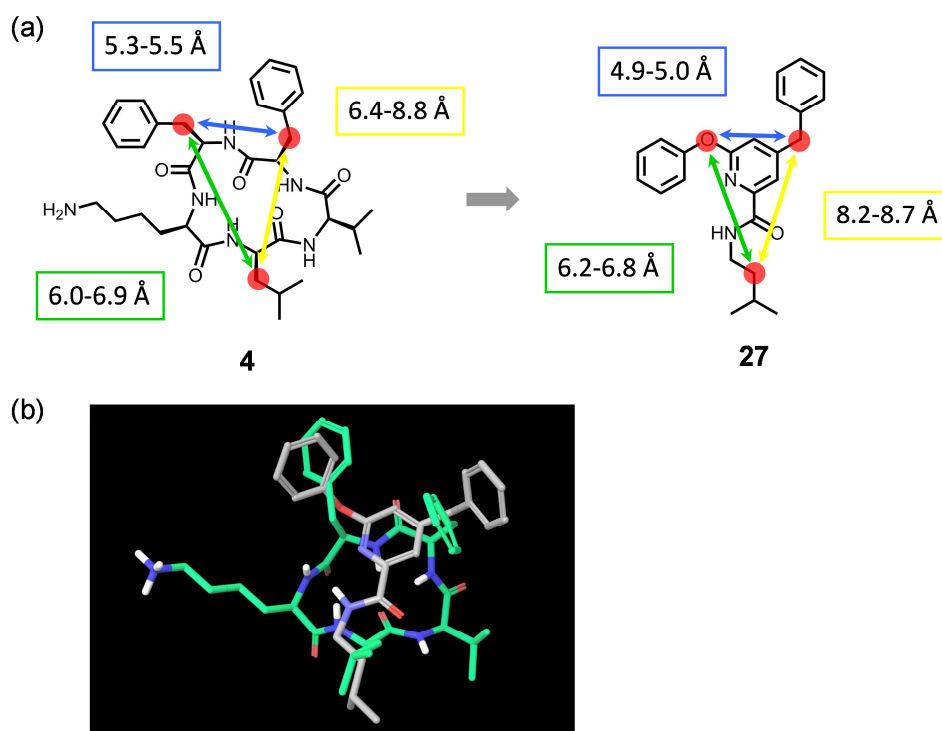
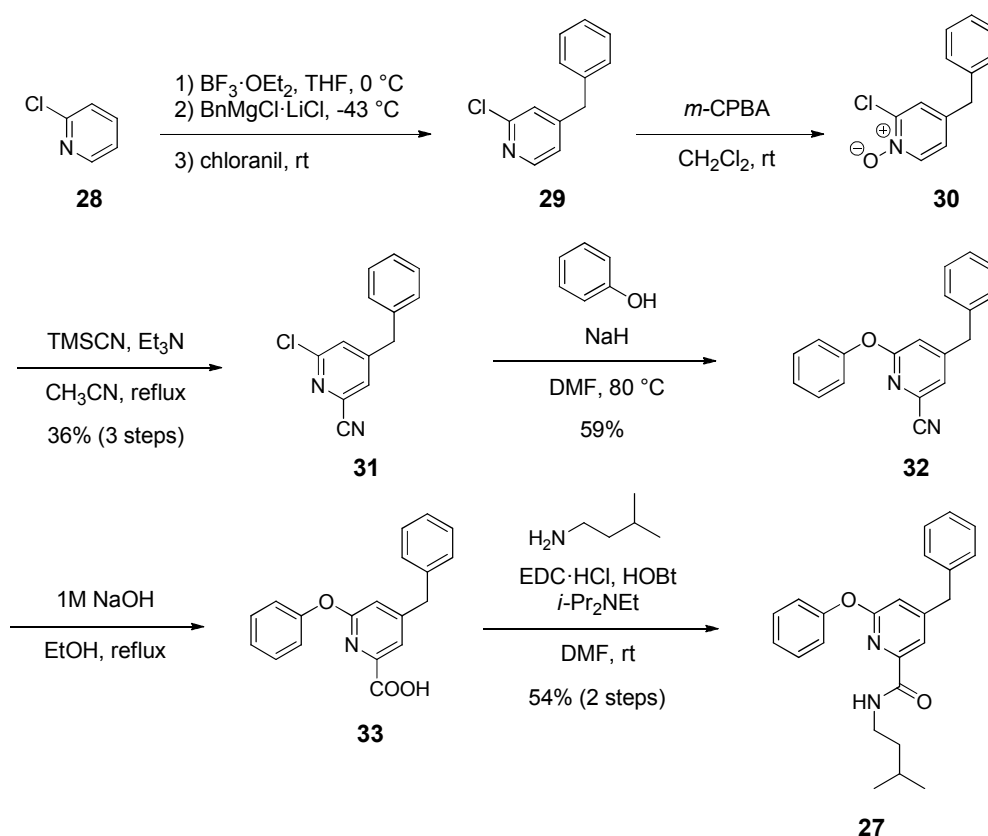


Figure 3-3. (a) Design of a non-peptidic small molecule inhibitor **27**. and distant relationships among three pharmacophore moiety (two phenyl groups and isopentyl group) of **4** and **27**. (b) Overlaid structures of **4** (green) and **27** (gray).

ピリジン誘導体 **27** は、Scheme 3-1 に従って合成した。2-クロロピリジンを出発物質とし、

まず Knochel らの報告^[49]に従い、ピリジン 4 位の選択的なベンジル化を行った。その後、ピリジン *N*-オキシドを経由し、トリメチルシリルシアニドを用いてシアノ化を行った。続いて、塩基性条件下、フェノールを作用させることによりフェノキシ基を導入した。最後に、シアノ基の加水分解、イソペンチルアミンとのアミド縮合を経て、目的とする **27** を合成した。

Scheme 3-1. Synthesis of pyridine derivative **27**.

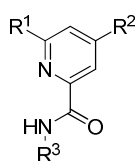


3-3 低分子阻害剤の凝集阻害活性評価

次に合成した **27** の凝集阻害活性を評価した。まず、ThT アッセイを行ったところ、ベースとなる環状 KLVFF **4** と比べるとやや弱いものの **9** (Val³→Ala) と同等の活性を示した (**Figure 3-4a**)。また **27** は濃度依存的な凝集阻害活性を示した (**Figure 3-4b**)。さらに、**27** による凝集阻害は少なくとも 12 時間後まで持続することも分かった (**Figure 3-4a**)。ここで、ピリジン誘導体 **27** においても、環状 KLVFF 誘導体 **17** と同様の ThT 蛍光強度の経時変化が観察された。すなわち、Aβ (10 μM) と **27** (50 μM) とを混合させたリン酸バッファー溶液 (pH 7.4) を 37 °C でインキュベートし、ThT 蛍光強度の経時変化を追跡した結果、最終的な ThT

蛍光値が A β 単独時と比べ顕著に低かった (Figure 3-4a)。この結果より、27 の凝集阻害についても環状ペプチドと同様に off-pathway メカニズムが関与している可能性が高いと考えられる。また、3つのファーマコフォア部分の一つずつ除いた誘導体を合成した結果、いずれの場合においても有意に阻害活性が低下した (34–36, Table 3-1)。この結果より、27 においても 3つのファーマコフォア部分がそれぞれ阻害活性発現に寄与していることが確認された。

Table 3-1. Structure-activity relationship studies of cyclic-KLVFF



Compound	R ¹	R ²	R ³	ThT fluorescence intensity [%] ^[a]
4	-	-	-	39 ± 1.4
9	-	-	-	58 ± 5.9
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
27	PhO	Bn	isopentyl	71 ± 9.4 (70 ± 6.7) ^[b]
34	H	Bn	isopentyl	83 ± 13 ^[b]
35	PhO	H	isopentyl	111 ± 18 ^[b]
36	PhO	Bn	Me	99 ± 14 ^[b]

[a] Relative fluorescence intensity to that of A β 1–42 alone (10 μ M) incubated in the presence of each inhibitor (50 μ M) for 3 h. Mean \pm S.D., $n = 3$ –7. [b] each inhibitor = 90 μ M.

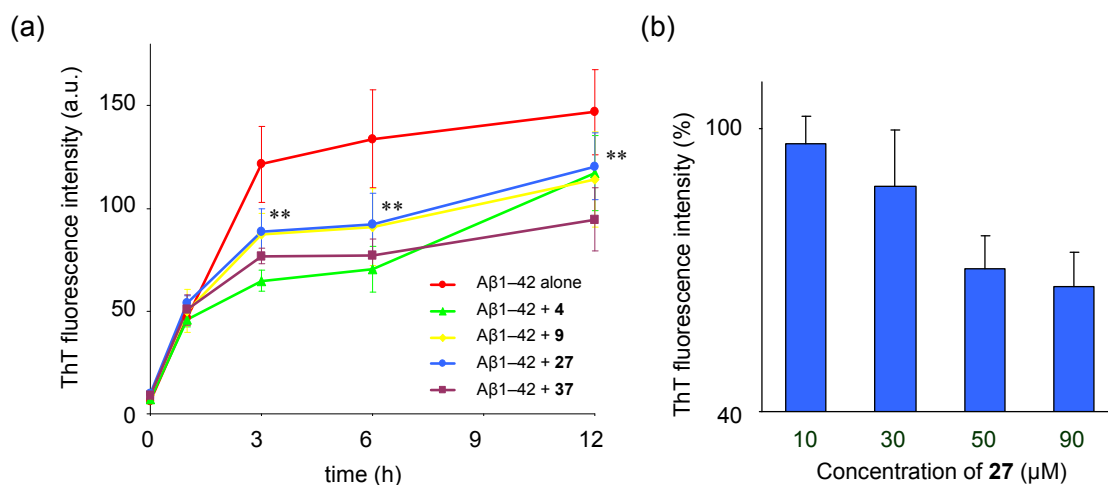


Figure 3-4. (a) Time courses of ThT fluorescence intensity, incubated at 37 °C (red line: Aβ1-42 alone (10 μM), green line: Aβ1-42 + 4 (10 μM + 50 μM), yellow line: Aβ1-42 + 9 (10 μM + 50 μM), blue line: Aβ1-42 + 27 (10 μM + 50 μM), purple line: Aβ1-42 + 37 (10 μM + 50 μM)), Mean ± S.D., $n = 4-15$, $**p < 0.01$ (4, 9, 27, 37) vs. Aβ1-42 alone. (Student's *t*-test) (b) Relative ThT fluorescence intensity to that of Aβ1-42 alone (10 μM) incubated in the presence of 27 for 3 h ($n = 3$, Mean ± S.D.).

更に、Sedimentation assay^[50]においても 27 の濃度依存的な凝集阻害活性が認められた (Figure 3-5a)。Sedimentation assay では、Aβ (10 μM) と 27 (30 or 100 μM) とを混合させたリン酸バッファー溶液 (pH 7.4) を 37 °C でインキュベートし、遠心分離後、その上澄み液中の非凝集 Aβ 量を逆相 HPLC にて測定した。インキュベート開始時の非凝集 Aβ 量を 100% とし、経時変化を追跡した結果、27 を添加した系では Aβ 単独の系と比べ、上清中に残存している非凝集 Aβ 量が有意に増加していることが確認された (6 時間: Aβ1-42 alone: 25%; Aβ1-42 + 27 (10 μM + 30 μM): 78%; Aβ1-42 + 27 (10 μM + 100 μM): 91%)。また、SDS-PAGE により Aβ の凝集に与える影響を評価した結果、27 が高分子量オリゴマー (100-200 kDa) の生成を阻害していることが示唆された (Figure 3-5b)。そして、AFM においても 27 が濃度依存的に Aβ の線維形成を阻害していることが確認された (Figure 3-5c)。

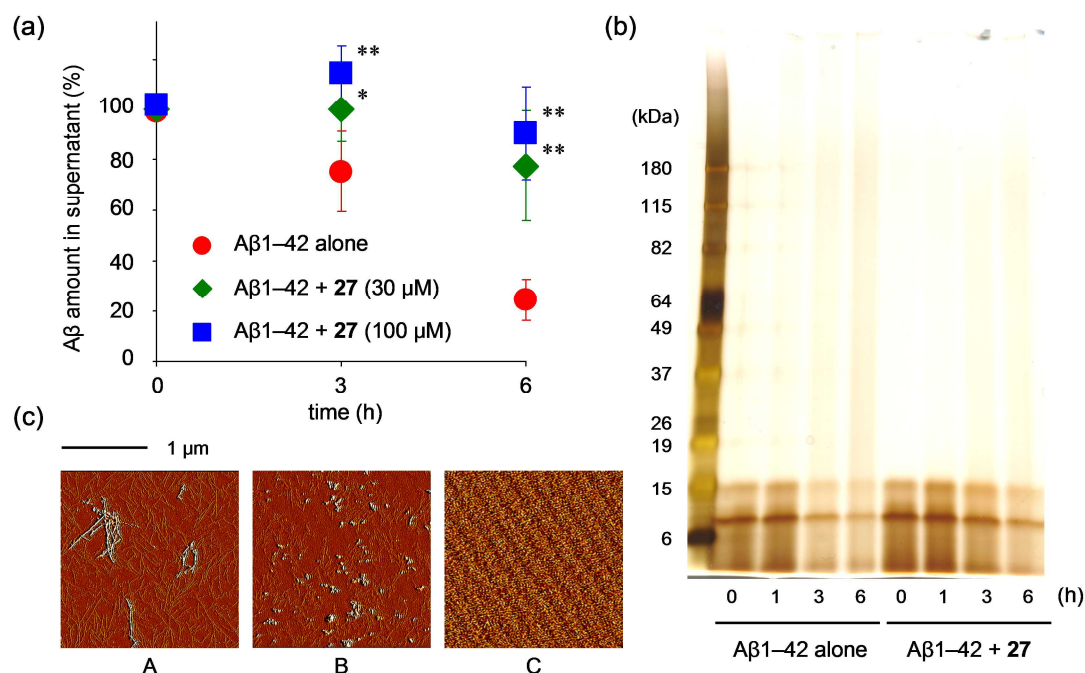


Figure 3-5. (a) Sedimentation assay (red: Aβ1-42 alone (10 μM), green: Aβ1-42 + 27 (10 μM + 30 μM), blue: Aβ1-42 + 27 (10 μM + 100 μM)), Mean ± S.D., $n = 3-5$, ** $p < 0.01$ vs. Aβ1-42 alone, * $p < 0.05$ vs. Aβ1-42 alone (Student's t -test). (b) SDS-PAGE analysis of Aβ1-42 alone (10 μM) and Aβ1-42 + 27 (10 μM + 100 μM). (c) Atomic force microscopy images of Aβ1-42 alone (10 μM, A), Aβ1-42 + 27 (10 μM + 100 μM, B), and Aβ1-42 + 27 (10 μM + 30 μM, C). Incubation time = 6 h.

以上のように、様々な生化学アッセイを用いることによって **27** が Aβ の凝集を阻害していることが多角的に確認された。

3-4 低分子阻害剤のドラッグライクネスに関する考察

今回、新たに設計・合成した非ペプチド性の低分子凝集阻害剤 **27** のドラッグライクネスについて、物性パラメータを指標に考察した。Lipinski の法則 (Rule of five) によれば、下記の 4 項目がドラッグライク、すなわち薬物動態プロファイルに優れた化合物を創製するための基準とされている^[34]。

- 水素結合ドナー (供与体) (すなわち、OH と NH) が 5 個以下
- 水素結合アクセプター (受容体) (すなわち、N と O など) が 10 個以下
- 分子量 (M.W.) が 500 以下
- 分配係数が LogP として 5 以下

さらに、Veber らの研究^[51]から、下記 2 項目が追加された。

- ・ 極性表面積 (PSA) が 140Å² 以下
- ・ 回転可能な結合数が 10 以下

これら 6 項目がドラッグライクな化合物創製において有用な経験則として、創薬研究において汎用されている。そこで、低分子阻害剤 **27** についてこれらの項目を算出した (Table 3-2)。その結果、**27** は CLogP 以外の項目すべてにおいて基準値を満たしていることが明らかとなった。このことから、**27** は有望な医薬リードとなり得ると考えられる。なお、環状 KLVFF **4** ではすべての項目において基準を満たすに至っていない。従って、Lipinski らの経験則によれば、環状 KLVFF **4** よりも低分子阻害剤 **27** のほうが良好な薬物動態プロファイルを示すことが期待される。

Table 3-2. Comparison of physiochemical properties between cyclic peptide inhibitor **4** and small molecule inhibitors **27**.

Physiochemical properties	criteria	27	4
M.W.	≤500	375	635
H-bond donors	≤5	1	7
H-bond acceptors	≤10	4	11
CLogP ^[a]	≤5	6.6	5.2
rotatable bonds	≤10	8	21
tPSA ^[a]	≤140	50	171

[a] Calculated by ChemBioDraw Ultra 12.0.

3-5 低分子阻害剤の構造最適化研究

更なる構造最適化検討の結果、母核部分をピリジンからピリミジン^[52]に、イソペンチル基を 2-アダマンチル基に変換することにより、阻害活性を環状 KLVFF **4** とほぼ同等のレベルまで向上することができた (Figure 3-6)。この結果は、**27** の構造変換により更なる活性の向上が可能であることを示唆しているものと考えられる。

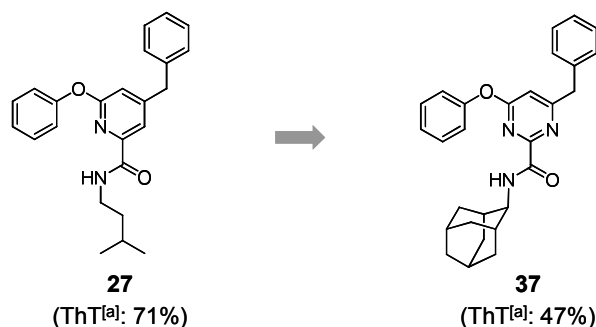


Figure 3-6. Identification of **37** based on the structure optimization studies of **27**. [a] Relative fluorescence intensity to that of A β 1–42 alone (10 μ M) incubated in the presence of each inhibitor (50 μ M) for 3 h. Mean \pm S.D., $n = 3-7$.

3-6 小括

本章では、KLVFF をベースとした非ペプチド性低分子凝集阻害剤の導出を目的として検討を行った。その結果、環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基にすることにより、低分子阻害剤の論理的創製に成功した^[53]。まず、主鎖のアミド結合が阻害活性発現にほとんど関与しない、環状 KLVFF のユニークなファーマコフォアモチーフを模倣すれば、非ペプチド性の低分子阻害剤が創製できるのではないかとの着想の基、ピリジン誘導体 **27** を設計、合成した。**27** は、ベースとした環状 KLVFF よりはやや弱いものの、有意な凝集阻害活性を示した。**27** の物性パラメータを算出したところ、脂溶性以外の項目は Lipinski の法則における基準値を満たしたことから、ドラッグライクな化合物であることが示唆された。なお、環状 KLVFF **4** ではすべての項目において基準を満たすに至っていない。併せて、**27** の構造変換により更に活性を向上させた **37** は、環状ペプチド (**4**) とほぼ同等の活性を示した。従って、ドラッグライクネスと構造の展開性という観点から、今回見出した低分子阻害剤 **27** は有望な医薬リードとなり得ると考えられる。しかしながら、低分子阻害剤の活性は依然として未熟であり、細胞レベルにおける A β の毒性軽減には至っていない^[54]。また、物性パラメータとしても脂溶性がやや高い。従って、AD 治療薬を指向し、より実用性の高い凝集阻害剤を創製するためには、更なる阻害活性の向上と物性の改善が課題と考えられる。

著者の知る限り、本研究は、凝集阻害剤研究において、ペプチド性阻害剤をベースとして論理的に低分子阻害剤を導出した初めての成功例である。環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基盤とし、論理的に非ペプチド性低分子凝集阻害剤を創製した本研究の方法

論は、今後の A β 凝集阻害剤の探索研究に有用と考えられる。化合物ライブラリーからのランダムスクリーニングに代わって、本ファーマコフォアを基にした、より効率的な化合物スクリーニングが可能になると考えられる。

Experimental section

Materials and Methods

General. Analytical HPLC charts were obtained by using a JASCO HPLC system equipped with a UV-2075 spectrometer, PU-2080 pumps, a DG-2080-54 degasser, and an MX-2080-32 mixer, or a HITACHI HPLC system equipped with an L-4200 UV-vis detector, an L-6210 pump or L-6200/L-6000 pumps, and an ERC-3510 or L-5090 degasser. Preparative HPLC were conducted by using a JASCO HPLC system equipped with a UV-2075 spectrometer, PU-2086 pumps, a DG-2080-53 degasser, and an MX-2080-32 mixer. MALDI-TOF MS were measured on a Shimadzu Biotech Axima ToF² spectrometer using α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid as a matrix. NMR spectra were recorded on JEOL ECX500 (500 MHz for ¹H NMR and 125 MHz for ¹³C NMR) and JEOL ECS400 (400 MHz for ¹H NMR) spectrometers in the solvent indicated. Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to residual solvent peak and coupling constants (J) are reported in Hz. Multiplicities are described by the following abbreviations s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, m=multiplet, br=broad. ESI-MS spectra were measured on a Waters ZQ4000 spectrometer (for LRMS), and a JEOL JMS-T100LC AccuTOF spectrometer (for HRMS).

Materials. All protected amino acids were purchased from Watanabe Chemical Ind., Ltd. (Hiroshima, Japan) and Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan). 2-Chlorotriyl chloride resin (100-200 mesh) was purchased from Calbiochem-Novabiochem Ja-pan Ltd. (Tokyo, Japan). 1-Hydroxybenzotriazole (HOBt) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydro-chloride (EDC·HCl) were obtained from Watanabe Chemical. *i*-Pr₂NEt, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), and Triisopropylsilane (TIS) were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (Milwaukee, WI, USA). Piperidine was purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). *N,N*-Dimethylformamide (DMF), tetrahydrofuran (THF), Et₂O, CH₂Cl₂, 1,2-dichloroethane, acetonitrile (CH₃CN), toluene, EtOH, and *t*-BuOH were obtained from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan) and Wako Pure Chemical Ind., Ltd. (Osaka, Japan), and used without further manipulation unless otherwise stated. Other chemicals were purchased from the following commercial suppliers: Wako Pure Chemical Ind., Ltd., Nacalai Tesque, Kanto Chemical Co., Inc., and Sigma-Aldrich, Inc. Flash column chromatography was performed using Kanto Chemical silica

gel (spherical, 40–63 μm). Thin layer chromatography (TLC) and preparative TLC were performed on Merck Kieselgel 60 F254 (0.25 mm) plates. *O*-Acyl isopeptide of A β 1–42^[55] was synthesized in our laboratory or purchased from Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan). The intense and uncontrollable self-assembling nature of A β 1–42 is known to cause difficulties in preparing monomer A β 1–42, resulting in irreproducible or discrepant study outcomes.^[56] To minimize the handling difficulty and batch dependency, throughout the present study I used a non-aggregative precursor of A β 1–42, *O*-acyl isopeptide of A β 1–42,^[55] which rapidly converts to monomer A β 1–42 in situ by adjusting the media pH to 7.4. The system is widely used in various biochemical experiments to investigate the functions of A β 1–42 and the inhibitor assay.^[57,58]

Analytical HPLC. Analytical HPLC was performed using a C18 reverse phase column (4.6 \times 150 mm; YMC-Pack ODS-AM or YMC-Triart C18; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan or 4.6 \times 150 mm; COSMOSIL 5C18-MS-II; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) with a linear gradient of 0–100% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA over 20 min or 40 min at room temperature at a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. The eluent was monitored by absorbance at 220 nm or 230 nm. HPLC grade solvents were used.

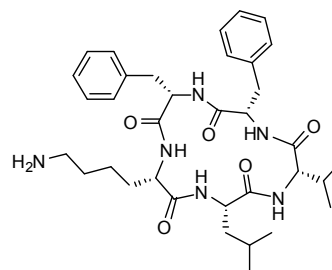
Preparative HPLC. Preparative HPLC was carried out using a C18 reverse phase column (20 \times 250 mm; YMC-Pack ODS-AM; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan or 10 \times 250 mm; COSMOSIL 5C18-MS-II; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) with a linear gradient of 0–100% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA over 80 min at 40 °C at a flow rate of 10.0 mL min⁻¹ for 20 \times 250 mm column or 3.0 mL min⁻¹ for 10 \times 250 mm column. The eluent was monitored by absorbance at 230 nm. HPLC grade solvents were used.

General protocol for solid phase peptide synthesis (SPPS). Generally, the peptide chains in this studies were assembled by the sequential coupling of activated N α -Fmoc-amino acid (2.5 equiv.) in DMF in the presence of DIC (2.5 equiv.) and HOBt (2.5 equiv.) with a reaction time of 1 h at room temperature. The resins were washed with DMF (\times 5), and then N α -Fmoc cleavage was carried out by treatment with 20% piperidine/DMF (*v/v*) (10 sec \times 1 and 10 min \times 1), followed by washing with DMF (\times 10). The coupling and cleavage cycles were repeated. The peptide-resins were washed with MeOH (\times 5) and dried for at least 2 h *in vacuo*. The peptides were cleaved from the resins with TFA in the presence of TIS and distilled water (95:2.5:2.5) for 90 min at room temperature, concentrated *in vacuo*, and precipitated with Et₂O at 0 °C. The resulting precipitate was collected by filtration,

dissolved with 0.1% aqueous TFA/CH₃CN (1:1), and lyophilized for at least 12 h to give the crude peptide. If necessary, the crude peptide was purified by preparative reverse phase HPLC with 0.1% aqueous TFA/CH₃CN system as an eluent, immediately frozen at -78 °C, and lyophilized for at least 12 h to afford the desired peptide.

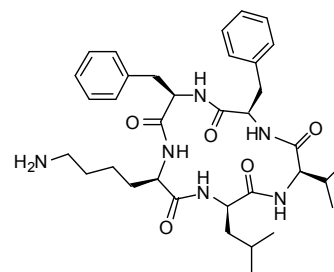
Molecular modeling method. Molecular modeling was performed using Maestro ver. 9.3 (Schrödinger LLC; New York, 2012). Initial three-dimensional structures were constructed by “LigPrep” with the OPLS_2005 force field at pH 7.4. “Conformational Search” of resulting structures was performed by “MacroModel” with the OPLS_2005 force field in water using “Torsional Sampling” method (Maximum iterations, 5000; Maximum number of steps, 1000; Energy window for saving structures, 50.0 kJ/mol). “Multiple Minimization” of generated conformers was then performed (Maximum iterations, 5000). Default values were used for all other parameters. Finally, resulting conformers were superimposed by using “Superimposition” method (**Figure 1-6** and **Figure 3-3b**), or top 10 low-energy conformers were extracted to calculate the atomic distances (**Figure 3-3a**).

cyclo-[KLVFF] (3). 2-Chlorotrityl chloride resin (600 mg) and Fmoc-Phe-OH (348 mg, 0.900 mmol) were taken to the manual solid-phase reactor and stirred for 2.5 h in the presence of *i*-Pr₂NEt (630 μL, 3.62 mmol) in 1,2-dichloroethane (4.5 mL). After washing with DMF (1.5 ml, ×5), capping was performed with MeOH (600 μL) in the presence of *i*-Pr₂NEt (419 μL, 2.40 mmol) in DMF for 20 min. After washing successively with DMF (×5), DMF/H₂O (1:1, ×5), CHCl₃ (×2) and MeOH (×2) followed by drying *in vacuo*, the loading ratio was determined (782 mg, 0.524 mmol) photometrically from the amount of Fmoc chromophore liberated upon treatment with 50% piperidine/DMF (*v/v*) for 30 min at 37 °C. The resulting Fmoc-Phe-O-resin (640 mg, 0.429 mmol) was sequentially coupled with Fmoc-Phe-OH (403 mg, 1.04 mmol), Fmoc-Val-OH (364 mg, 1.04 mmol), Fmoc-Leu-OH (379 mg, 1.04 mmol), and Boc-Lys(Fmoc)-OH (503 mg, 1.04 mmol) in the presence of DIC (166 μL, 1.04 mmol) and HOBt (164 mg, 1.04 mmol) in DMF (4 ml). The Fmoc group was removed by 20% piperidine/DMF (*v/v*). After coupling with Boc-Lys(Fmoc)-OH, the resulting protected peptide-resin (resin: 778 mg) was treated with TFA/TIS/H₂O (13 mL, 342 μL, 342 μL) for 90 min at room temperature, concentrated *in vacuo*, and precipitated with Et₂O (10–15

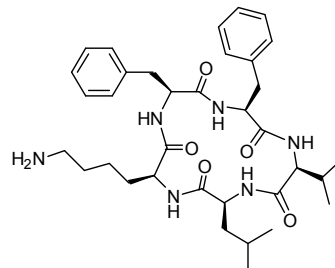


mL) at 0 °C. The resulting precipitate was collected by filtration, dissolved with 0.1% aqueous TFA/CH₃CN (1:1), and lyophilized for 18 h to give the crude pentapeptide (180 mg). To a solution of this crude peptide in DMF (53 mL), EDC·HCl (79.8 mg, 0.416 mmol), HOBt (63.7 mg, 0.416 mmol), and *i*-Pr₂NEt (145 μL, 0.832 mmol) were added. After stirring for 14 h at room temperature, the reaction was stopped by adding distilled water, and the mixture was extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to afford the crude cyclic-pentapeptide. 10% Et₂NH/DMF (*v/v*, 4.6 mL) was added to this crude cyclic-pentapeptide. After stirring for 1 h at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*, and then acidified with aqueous TFA (pH 3–4). The residue was purified by preparative reverse phase HPLC with 0.1% aqueous TFA/CH₃CN system as an eluent, immediately frozen at –78 °C, and lyophilized for 24 h to afford TFA salt of **3** (48.0 mg, 15% yield calculated from Fmoc-Phe-O-resin) as a white amorphous powder. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.41 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.71 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 5.7 Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 5.7 Hz, 3H), 1.16–1.31 (m, 2H), 1.48–1.90 (m, 8H), 2.68–2.82 (m, 4H), 2.97 (dd, *J* = 10.0, 13.5 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 6.0, 13.5 Hz, 1H), 3.68–3.75 (m, 1H), 4.08–4.16 (m, 1H), 4.22–4.36 (m, 2H), 4.40–4.47 (m, 1H), 7.06 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.15–7.33 (m, 8H), 7.71 (brs, 3H), 7.80–7.85 (m, 2H), 7.97–8.01 (m, 2H), 8.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 18.5, 18.8, 21.7, 22.4, 22.5, 24.6, 26.4, 30.1, 30.8, 36.9, 37.3, 38.7, 40.8, 53.1, 54.4, 55.6, 55.8, 60.7, 126.5, 126.6, 128.3 (4C), 128.8 (2C), 129.1 (2C), 137.1, 137.3, 170.1, 170.2, 170.4, 170.6, 171.2; MALDI-MS (TOF): *m/z* calcd for C₃₅H₅₀N₆O₅ 635.8 [M+H]⁺, found 635.1; HPLC: Retention time (*t*_R) = 24.1 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

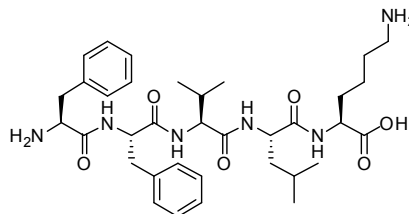
cyclo-[klvff] (**4**). Compound **4** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.50 mg (4.2% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): *m/z* calcd for C₃₅H₅₀N₆O₅ 635.8 [M+H]⁺, found 635.4; HPLC: *t*_R = 24.1 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



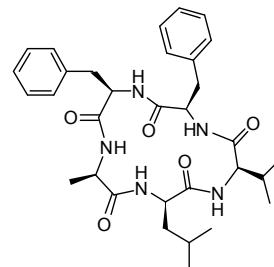
cyclo-[FFVLK] (5). Compound **5** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 1.7 mg (2.6% yield from Fmoc-Leu-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{50}N_6O_5$ 635.8 $[M+H]^+$, found 635.5; HPLC: $t_R = 22.9$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



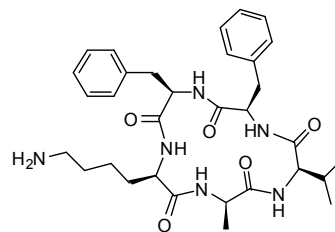
FFVLK (6). Compound **6** was synthesized by SPPS. white amorphous powder; Yield: 16.1 mg (50% yield from Fmoc-Lys-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{52}N_6O_6$ 653.8 $[M+H]^+$, found 653.7; HPLC: $t_R = 16.7$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



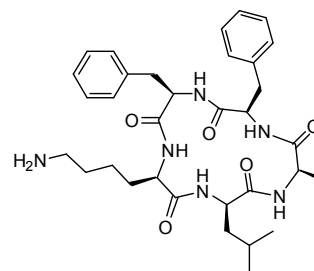
cyclo-[alvff] (7). Compound **7** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.64 mg (1.8% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{32}H_{43}N_5O_5$ 578.7 $[M+H]^+$, found 578.2; HPLC: $t_R = 27.1$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



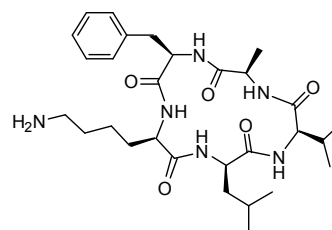
cyclo-[kavff] (8). Compound **8** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.53 mg (1.5% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{32}H_{44}N_4O_5$ 593.7 $[M+H]^+$, found 593.1; HPLC: $t_R = 21.4$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



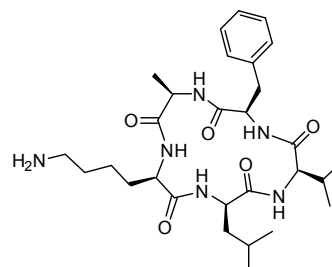
cyclo-[klaff] (9). Compound **9** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.76 mg (2.1% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{33}H_{46}N_6O_5$ 607.8 $[M+H]^+$, found 607.1; HPLC: $t_R = 21.5$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



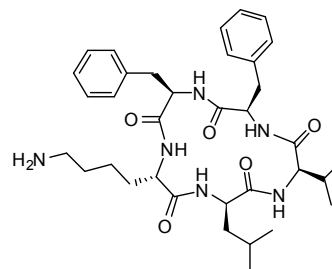
cyclo-[klvaf] (10). Compound **10** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.11 mg (0.3% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{29}H_{46}N_6O_5$ 559.7 $[M+H]^+$, found 558.7; HPLC: $t_R = 19.8$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



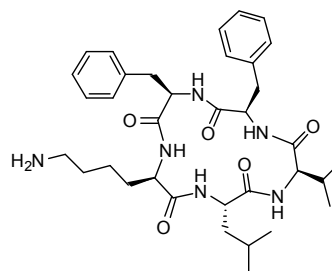
cyclo-[klvfa] (11). Compound **11** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.37 mg (1.1% yield from Fmoc-*D*-Ala-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{29}H_{46}N_6O_5$ 559.7 $[M+H]^+$, found 558.7; HPLC: $t_R = 20.9$ min (YMC-Pack ODS-AM), purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



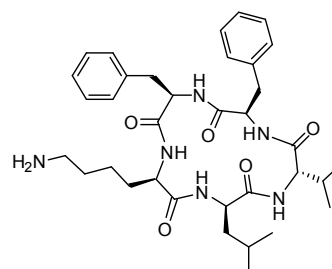
cyclo-[Klvff] (12). Compound **12** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.66 mg (1.8% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{50}N_6O_5$ 635.8 $[M+H]^+$, found 635.1; HPLC: $t_R = 22.7$ min (YMC-Pack ODS-AM), purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



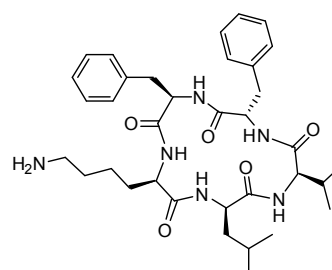
cyclo-[kLvff] (13). Compound **13** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 6.4 mg (17% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{50}N_6O_5$ 635.8 $[M+H]^+$, found 635.2; HPLC: $t_R = 21.7$ min (YMC-Pack ODS-AM), purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



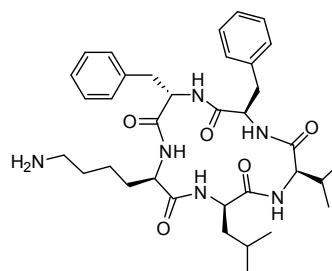
cyclo-[klVff] (14). Compound **14** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 4.4 mg (12% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{50}N_6O_5$ 635.8 $[M+H]^+$, found 635.1; HPLC: $t_R = 22.5$ min (YMC-Pack ODS-AM), purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



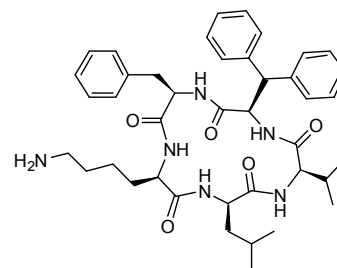
cyclo-[klvFf] (15). Compound **15** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 1.7 mg (4.7% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{50}N_6O_5$ 635.8 $[M+H]^+$, found 635.9; HPLC: $t_R = 21.7$ min (YMC-Pack ODS-AM), purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



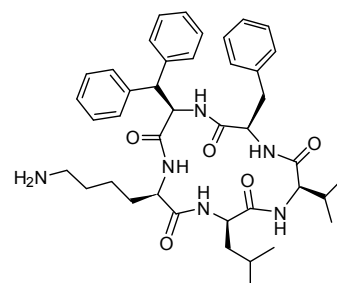
cyclo-[klvFF] (16). Compound **16** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 2.0 mg (5.3% yield from Fmoc-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{50}N_6O_5$ 635.8 $[M+H]^+$, found 635.8; HPLC: $t_R = 22.0$ min (YMC-Pack ODS-AM), purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



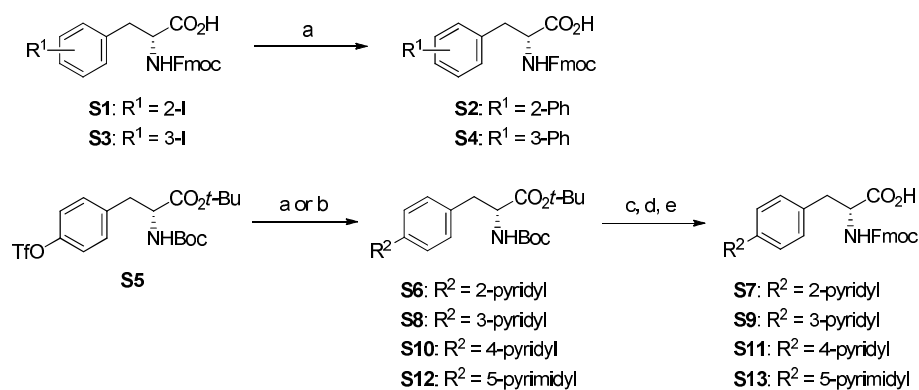
cyclo-[klvff(β -Ph)] (17). Compound **17** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. HATU was used instead of EDC·HCl and HOBT in cyclization reaction. white amorphous powder; Yield: 16.3 mg (20% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{41}H_{54}N_6O_5$ 733.9 $[M+Na]^+$, found 734.0; HPLC: $t_R = 25.7$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



cyclo-[klvff(β -Ph)] (18). Compound **18** was synthesized in a similar manner to that described for compound **3**. HATU was used instead of EDC·HCl and HOBT in cyclization reaction. white amorphous powder; Yield: 0.33 mg (1.5% yield from Fmoc-*D*-Phe(β -Ph)-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{41}H_{54}N_6O_5$ 711.9 $[M+H]^+$, found 711.7; HPLC: $t_R = 26.6$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

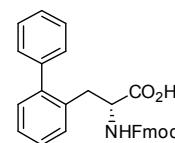


Scheme S1^a



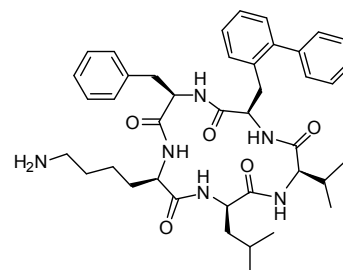
^aReagents and conditions: (a) $PhB(OH)_2$ or $R^2-B(OH)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, 2 M Na_2CO_3 aq. Toluene, EtOH, 100 °C, 3–5 h, 66% for **S2**, 56% for **S4**, 92% for **S10**; (b) R^2-SnBu_3 , $Pd(PPh_3)_4$, LiCl, DMF, 100 °C, 3–5 h, 70% for **S6**, 78% for **S8**, 92% for **S12**; (c) 4 N HCl/1,4-dioxane, rt, 3–6 h; (d) Fmoc-Cl, *i*-Pr₂NEt, CH_2Cl_2 , rt, 6–15 h; (e) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 12–15 h, 52% for **S7**, 63% for **S9**, 50% for **S11**; 43% for **S13** (3 steps).

(R)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-([1,1'-biphenyl]-2-yl)propanoic acid (S2). To a solution of

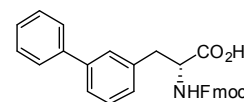


(**S1**) (300 mg, 0.584 mmol) in toluene (2.8 mL) and EtOH (1.2 mL), phenylboronic acid (142 mg, 1.17 mmol), 2 M aqueous Na₂CO₃ (1.2 mL, 2.34 mmol), and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (Pd(PPh₃)₄, 67.5 mg, 0.0584 mmol) were added under an argon atmosphere. After stirring for 1 h at 100 °C, the reaction was stopped by adding aqueous HCl at room temperature, and the mixture was extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using preparative TLC (AcOEt/MeOH = 97/3) to afford **S2** (180 mg, 66% yield) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.03 (dd, J = 9.2, 14.3 Hz, 1H), 3.28 (dd, J = 5.2, 14.3 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.28 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 4.34–4.40 (m, 1H), 4.84 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.18–7.52 (m, 14H), 7.72–7.77 (m, 3H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₂₅N₁O₄ 486.1681 [M+Na]⁺, Found 486.1664.

cyclo-[klvf(2-Ph)f] (19). Compound **19** was synthesized using **S2** in a similar manner to that described for compound **3**. HATU was used instead of EDC·HCl and HOBT in cyclization reaction. white amorphous powder; Yield: 1.05 mg (2.5% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): *m/z* calcd for C₄₁H₅₄N₆O₅ 711.9 [M+H]⁺, found 711.2; HPLC: *t_R* = 26.5 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

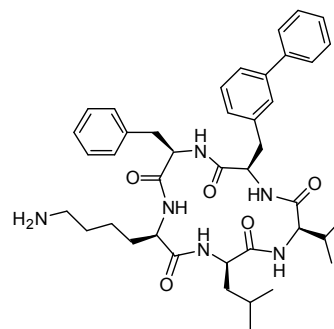


(R)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-([1,1'-biphenyl]-3-yl)propanoic acid (S4). Compound **S4** was synthesized from

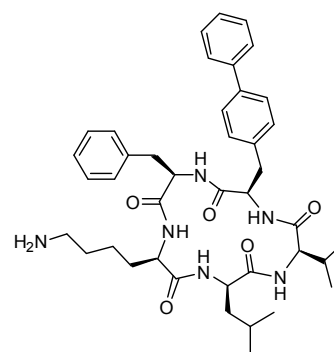


(**S3**) (300 mg, 0.584 mmol) in a similar manner to that described for compound **S2**. white solid; Yield: 152 mg (56% yield); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.16 (dd, J = 6.9, 14.3 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 5.2, 14.3 Hz, 1H), 4.17 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.31–4.44 (m, 2H), 4.70–4.77 (m, 1H), 5.22 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.08–7.55 (m, 14H), 7.70–7.74 (m, 3H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₂₅N₁O₄ 486.1681 [M+Na]⁺, Found 486.1663.

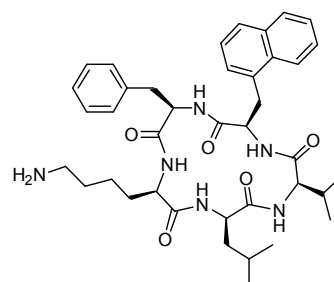
cyclo-[klvf(3-Ph)f] (20). Compound **20** was synthesized using **S4** in a similar manner to that described for compound **3**. HATU was used instead of EDC·HCl and HOBT in cyclization reaction. white amorphous powder; Yield: 0.97 mg (2.4% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): *m/z* calcd for C₄₁H₅₄N₆O₅ 711.9 [M+H]⁺, found 711.3; HPLC: *t_R* = 26.9 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



cyclo-[klvf(4-Ph)f] (21). Compound **21** was synthesized using commercially available 4-phenyl-*D*-phenylalanine in a similar manner to that described for compound **3**. HATU was used instead of EDC·HCl and HOBT in cyclization reaction. white amorphous powder; Yield: 0.67 mg (1.6% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): *m/z* calcd for C₄₁H₅₄N₆O₅ 711.9 [M+H]⁺, found 711.3; HPLC: *t_R* = 27.0 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

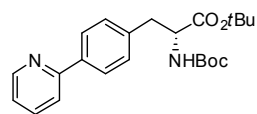


cyclo-[klva(1-naphthyl)f] (22). Compound **22** was synthesized using commercially available *D*-1-naphthylalanine in a similar manner to that described for compound **3**. HATU was used instead of EDC·HCl and HOBT in cyclization reaction. white amorphous powder; Yield: 7.28 mg (18% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): *m/z* calcd for C₃₉H₅₂N₆O₅ 707.9 [M+H]⁺, found 707.5; HPLC: *t_R* = 25.9 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



(R)-tert-butyl

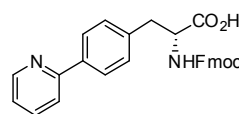
2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(pyridine-2-yl)phenyl)propanoate



(S6). To a solution of **(R)-tert-butyl**

2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(((4-trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)phenyl)propanoate^[59] (**S5**) (500 mg, 1.07 mmol) in DMF (7.1 mL), 2-(tributylstannyl)pyridine (514 μ L, 1.61 mmol), LiCl (136 mg, 3.21 mmol), and Pd(PPh₃)₄ (124 mg, 0.107 mmol) were added under an argon atmosphere. After stirring for 5 h at 100 °C, the reaction was stopped by adding aqueous KF, and then further stirred for 12 h at room temperature. The mixture was extracted with AcOEt (\times 3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using flash column chromatography (10% K₂CO₃/SiO₂ (w/w)^[60], hexane/AcOEt = 90/10 to 70/30) to afford **S6** (300 mg, 70% yield) as a yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.36–1.38 (m, 18H), 3.07 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 4.40–4.47 (m, 1H), 4.97 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.14–7.25 (m, 3H), 7.64–7.72 (m, 2H), 7.87 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.63 (d, J = 4.6 Hz, 1H); LRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₃H₃₀N₂O₄ 399.2 [M+H]⁺, found 398.8.

(R)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4-(pyridin-2-yl)phenyl)propanoic acid (**S7**). To a solution of **S6** (180 mg, 0.452 mmol) in

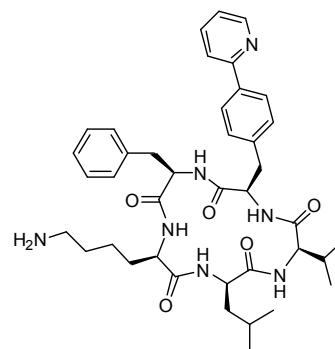


1,4-dioxane (0.9 mL), 4 N HCl/1,4-dioxane (3.6 mL) was added at 0 °C.^[61]

After stirring for 3 h at room temperature, the reaction was stopped by adding saturated aqueous NaHCO₃ at 0 °C, and the mixture was extracted with AcOEt (\times 3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to afford yellow oil, which was used without further purification. To a solution of this intermediate and *i*-Pr₂NEt (236 μ L, 1.36 mmol) in CH₂Cl₂ (3.0 mL), a solution of Fmoc-Cl (175 mg, 0.678 mmol) in CH₂Cl₂ (1.5 mL) was added dropwise over 5 min at 0 °C under an argon atmosphere. After stirring for 6 h at room temperature, the reaction was stopped by adding 0.1% aqueous TFA at 0 °C, and the mixture was extracted with AcOEt (\times 3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using flash silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 95/5 to 70/30) to afford yellow oil. To a solution of this intermediate in CH₂Cl₂ (2.4 mL), TFA (0.6 mL) was added at 0 °C. After stirring for 15 h at room temperature, the reaction was stopped by adding saturated aqueous NaHCO₃ at 0 °C, and the mixture was extracted with CHCl₃ (\times 3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using re-precipitation with

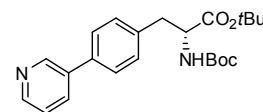
MeOH/Et₂O to afford **S7** (110 mg, 52% yield from **S6**) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.95 (dd, *J* = 13.5, 7.7 Hz, 1H), 3.09–3.19 (m, 1H), 3.94–4.11 (m, 1H), 4.11–4.28 (m, 3H), 6.89 (brs, 1H), 7.23–7.40 (m, 7H), 7.62 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.80–7.94 (m, 6H), 8.63 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₉H₂₄N₂O₄ 465.1814 [M+H]⁺, Found 465.1803.

cyclo-[klvf(4-(2-pyridyl))] (23). Compound **23** was synthesized using **S7** in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.79 mg (1.9% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): *m/z* calcd for C₄₀H₅₃N₇O₅ 712.9 [M+H]⁺, found 712.1; HPLC: *t*_R = 19.9 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



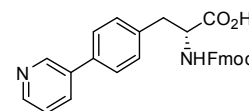
(R)-tert-butyl

2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(pyridine-3-yl)phenyl)propanoate (S8). Compound **S8** was synthesized from **S5** (500 mg, 1.07 mmol) in



a similar manner to that described for compound **S6**. colorless oil; Yield: 332 mg (78% yield); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.34–1.36 (m, 18H), 2.98–3.10 (m, 2H), 4.38–4.47 (m, 1H), 5.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.20–7.31 (m, 3H), 7.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.76–7.81 (m, 1H), 8.50 (dd, *J* = 1.6, 4.8 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H); LRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₃H₃₀N₂O₄ 399.2 [M+H]⁺, found 398.8.

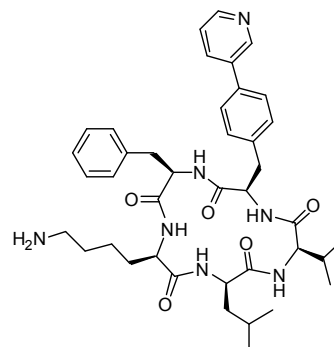
(R)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4-(pyridin-3-yl)phenyl)propanoic acid (S9). Compound **S9** was synthesized from **S8** (250



mg, 0.627 mmol) in a similar manner to that described for compound **S7**.

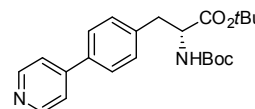
white solid; Yield: 183 mg (63% yield from **S8**); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.93 (dd, *J* = 10.8, 14.0 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 4.3, 14.0 Hz, 1H), 4.12–4.27 (m, 4H), 7.22–7.45 (m, 6H), 7.60–7.88 (m, 8H), 8.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.64 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.95 (s, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₉H₂₄N₂O₄ 465.1814 [M+H]⁺, Found 465.1806.

cyclo-[klvf(4-(3-pyridyl))f] (24). Compound **24** was synthesized using **S9** in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.92 mg (1.1% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{40}H_{53}N_7O_2$ 712.9 $[M+H]^+$, found 712.1; HPLC: t_R = 19.8 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



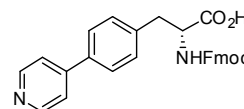
(*R*)-tert-butyl

2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(pyridine-4-yl)phenyl)propanoate (S10). Compound **S10** was synthesized from **S5** (500 mg, 1.07 mmol)



in a similar manner to that described for compound **S2**. yellow oil; Yield: 393 mg (92% yield); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.37 (s, 18H), 3.00–3.14 (m, 2H), 4.41–4.47 (m, 1H), 5.02 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.22–7.27 (m, 2H), 7.41–7.54 (m, 4H), 8.59 (d, J = 5.7 Hz, 2H); LRMS (ESI): m/z calcd for $C_{23}H_{30}N_2O_4$ 399.2 $[M+H]^+$, found 398.7.

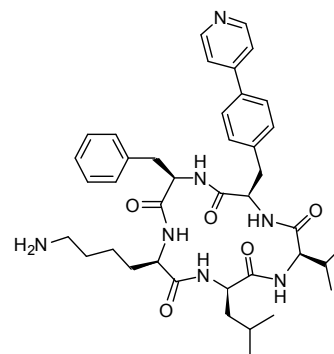
(*R*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4-(pyridin-4-yl)phenyl)propanoic acid (S11). Compound **S11** was synthesized from **S10**



(300 mg, 0.753 mmol) in a similar manner to that described for compound

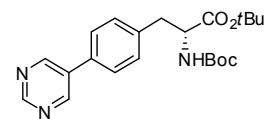
S7. white solid; Yield: 174 mg (50% yield from **S10**); 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 2.93 (dd, J = 9.7, 13.8 Hz, 1H) 3.11–3.18 (m, 1H), 4.11–4.20 (m, 4H), 7.22–7.70 (m, 13H), 7.86 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 8.59 (d, J = 5.7 Hz, 1H); HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{29}H_{24}N_2O_4$ 465.1814 $[M+H]^+$, Found 465.1831.

cyclo-[klvf(4-(4-pyridyl))f] (25). Compound **25** was synthesized using **S11** in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.90 mg (1.4% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $C_{40}H_{53}N_7O_5$ 712.9 $[M+H]^+$, found 712.3; HPLC: t_R = 19.7 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



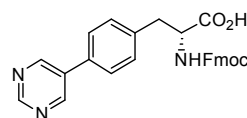
(R)-tert-butyl

2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(pyrimidine-5-yl)phenyl)propanoate (S12). Compound **S12** was synthesized from **S5** (620 mg, 1.32



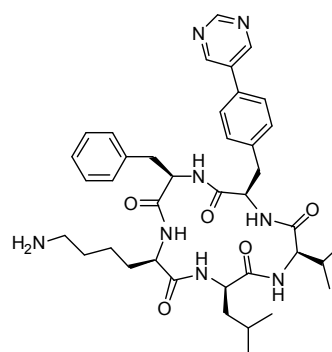
mmol) in a similar manner to that described for compound **S6**. yellow oil; Yield: 485 mg (92% yield); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.38–1.42 (m, 18H), 3.06 (dd, $J = 5.8, 13.8$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J = 6.3, 13.8$ Hz, 1H), 4.43–4.50 (m, 1H), 5.05 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.91 (s, 2H), 9.17 (s, 1H); LRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ 400.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 399.9.

(R)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4-(pyrimidin-5-yl)phenyl)propanoic acid (S13). Compound **S13** was synthesized from **S12** (465 mg, 1.16 mmol) in a similar manner to that described for

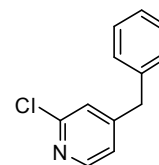


compound **S7**. yellow solid; Yield: 231 mg (43% yield from **S12**); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.94 (dd, $J = 10.9, 13.7$ Hz, 1H) 3.15 (dd, $J = 4.0, 13.7$ Hz, 1H), 4.12–4.26 (m, 4H), 7.22–7.41 (m, 4H), 7.43 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.60–7.66 (m, 2H), 7.72 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 9.08 (s, 2H), 9.15 (s, 1H); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ 466.1767 $[\text{M}+\text{H}]^+$, Found 466.1753.

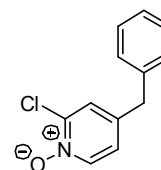
cyclo-[klvf(4-(5-pyrimidyl))f] (26). Compound **26** was synthesized using **S13** in a similar manner to that described for compound **3**. white amorphous powder; Yield: 0.30 mg (0.4% yield from Fmoc-*D*-Phe-O-resin); MALDI-MS (TOF): m/z calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_5$ 713.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 713.6; HPLC: $t_R = 22.5$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).



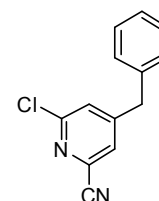
4-benzyl-2-chloropyridine (29). According to the literature^[49], BnMgCl·LiCl (0.5 M in THF) was prepared using BnMgCl (55 mL, 55 mmol, 1.0 M in THF), LiCl (2.33 g, 55 mmol) and THF (55 mL). To a flame-dried flask filled with an argon gas, 2-chloropyridine (5.52 mL, 50 mmol) and dry THF (140 mL) were added. BF₃·OEt₂ (6.79 mL, 55 mmol) was added dropwise at 0 °C, and the mixture was stirred for 15 min at 0 °C. Freshly prepared BnMgCl·LiCl (110 mL, 0.5 M in THF) was added at -43 °C, and the mixture was stirred for 3 h at -30 °C. Chloranil (24.6 g, 100 mmol) was added at room temperature, and the mixture was further stirred for 15 h. The reaction was stopped by adding saturated ammonia in water solution, and the mixture was filtered through a short pad of silica gel (eluted with AcOEt). The organic solvent was removed *in vacuo*, and the mixture was extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 99/1 to 90/10) to afford **29** along with inseparable compounds.



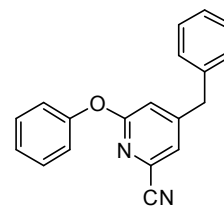
4-benzyl-2-chloropyridine N-oxide (30). *m*-Chloroperoxybenzoic acid (*m*-CPBA, 16.8 g, 75 mmol) was added to a solution of **29** in CH₂Cl₂ (100 mL) at 0 °C under an argon atmosphere. After stirring for 16 h at room temperature, K₂CO₃ (13.8 g, 100 mmol) was added. After stirring for 3 h at room temperature, the mixture was filtered through a celite pad (eluted with CH₂Cl₂). The solvent was partially removed *in vacuo*, and the residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 50/50 to AcOEt/MeOH = 95/5) to afford **30** (4.00 g, 36% from **28**) as a yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.84 (s, 2H), 6.92 (dd, *J* = 2.3, 6.5 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.15–7.27 (m, 4H), 8.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H).



4-benzyl-6-chloropicolinonitrile (31). To a solution of **30** (3.80 g, 17.3 mmol) in CH₃CN (17 mL), Et₃N (2.52 mL, 26.0 mmol) and TMSCN (5.43 mL, 43.3 mmol) were added at room temperature under an argon atmosphere. After stirring for 48 h under reflux, the reaction was stopped by adding 2 M aq. NaOH, and extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 95/5 to 70/30) to afford **31** (1.98 g, 50%) as a yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.99 (s, 2H), 7.13 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.28–7.37 (m, 4H), 7.40 (s, 1H).

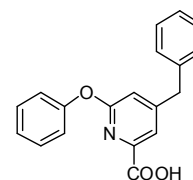


4-benzyl-6-phenoxy nicotinonitrile (32). To a solution of NaH (34.6 mg, 1.44 mmol, 55%) in DMF (3.3 mL), PhOH (130 mg, 1.38 mmol) was added at 0 °C under an argon atmosphere. After stirring for 5 min at the same temperature, a solution of **31** (300 mg, 1.31 mmol) in DMF (3.3 mL) was

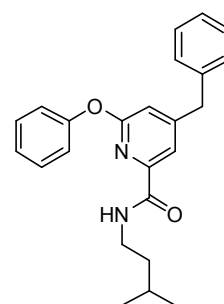


added dropwise at 0 °C. After stirring for 14 h at 80 °C, the reaction was stopped by adding satu-rated aqueous NaHCO₃, and products were extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 98/2 to 80/20) to afford **32** (169 mg, 59%) as a yellow green oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 4.03 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 7.14–7.46 (m, 11H); LRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₉H₁₄N₂O [M+Na]⁺ 309.1, found 308.7.

4-benzyl-6-phenoxy nicolinic acid (33). 1 M aqueous NaOH (4.2 mL) was added to a solution of **32** (169 mg, 0.590 mmol) in EtOH (4.2 mL) at room temperature under air. After stirring for 2 h under reflux, the organic solvent was removed *in vacuo*. The water phase was washed with Et₂O, and acidified with 2 M aqueous HCl. The mixture was extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to afford **33** (168 mg), which was used in next step without further purification.



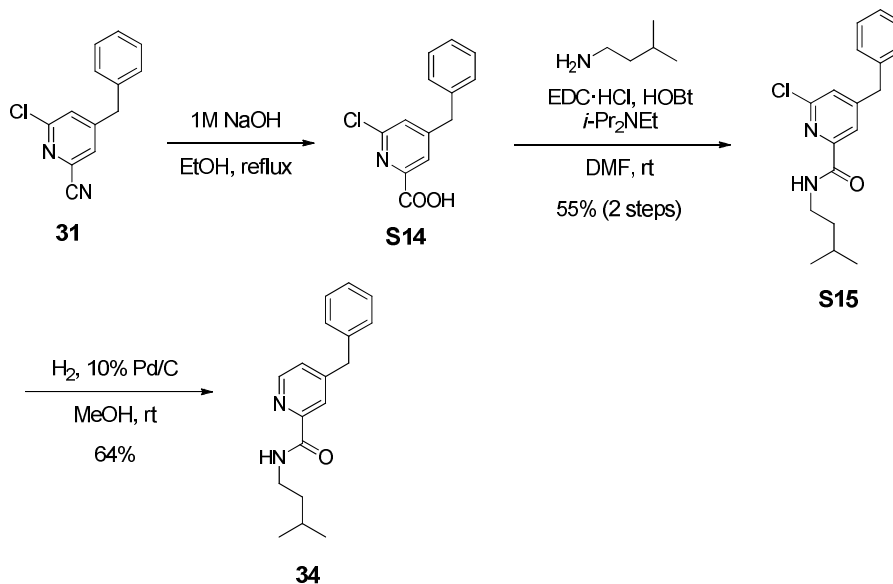
4-benzyl-N-isopentyl-6-phenoxy nicotinamide (27). To a solution of **33** (84.0 mg) in DMF (2.8 mL), isopentylamine (47.9 μL, 0.413 mmol), *i*-Pr₂NEt (144 μL, 0.825 mmol), HOBt (50.5 mg, 0.330 mmol) and EDC·HCl (63.3 mg, 0.330 mmol) were added at room temperature under an argon atmosphere. After stirring for 15 h at room temperature, the reaction was stopped by adding saturated aqueous NaHCO₃, and products were



extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane/AcOEt = 4/1) to afford **27** (60.1 mg, 54% from **32**) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.85 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H), 1.33 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.49 (heptuplet, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.32 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 6.80 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.15–7.32 (m, 6H), 7.38 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (br, 1H), 7.75 (s, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 22.3 (2C), 25.5, 37.3, 38.0, 41.3, 113.7, 117.7, 121.2, 124.8, 126.8, 128.8, 128.9, 129.5, 138.2, 147.7, 153.6, 155.7, 162.5, 163.5; HRMS (ESI): *m/z*

calcd for $C_{24}H_{26}N_2O_4$ $[M+Na]^+$ 397.1892, Found 397.1906; HPLC: $t_R = 31.9$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

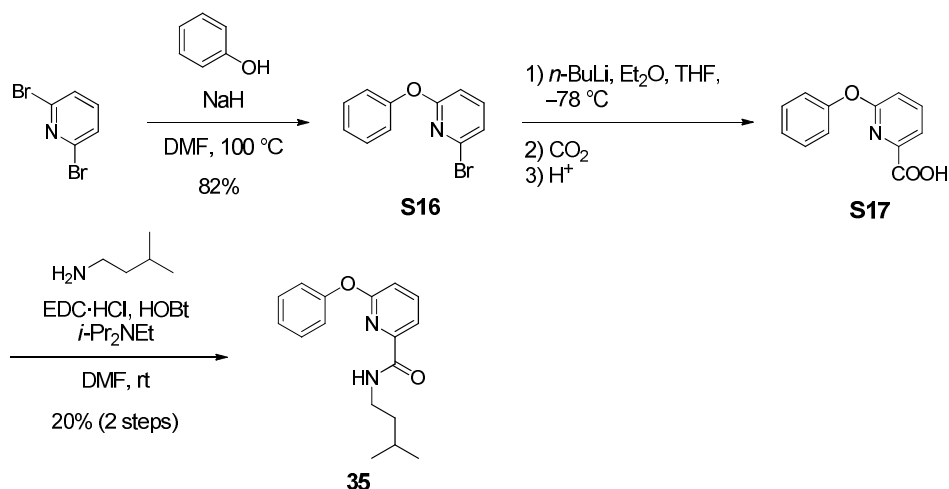
Scheme S2



4-benzyl-6-chloro-*N*-isopentylpicolinamide (S15). Compound **S15** was synthesized in a similar manner to that described for compound **27**. colorless oil; Yield: 45.7 mg (55% from **31**); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 0.88 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.44 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.61 (heptuplet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.39 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 7.08–7.28 (m, 6H), 7.70 (brs, 1H), 7.92 (s, 1H); LRMS (ESI): m/z calcd for $C_{18}H_{21}ClN_2O$ $[M+H]^+$ 317.1, found 317.0.

4-benzyl-*N*-isopentylpicolinamide (34). 10% Pd/C (15.3 mg) was added to a solution of **S15** (45.7 mg, 0.144 mmol) in MeOH (1.0 mL) at room temperature. After stirring under H₂ (1 atm) for 24 h at room temperature, the mixture was filtered through a celite pad (eluted with MeOH). The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was purified by preparative TLC (hexane/AcOEt = 3/1) to afford **34** (26.0 mg, 64%) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.88 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H), 1.44 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.62 (heptuplet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.39 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 7.08–7.28 (m, 6H), 7.93 (brs, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.33 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H); HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{18}H_{22}N_2O$ $[M+H]^+$ 283.1810, Found 283.1806; HPLC: $t_R = 26.7$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

Scheme S3

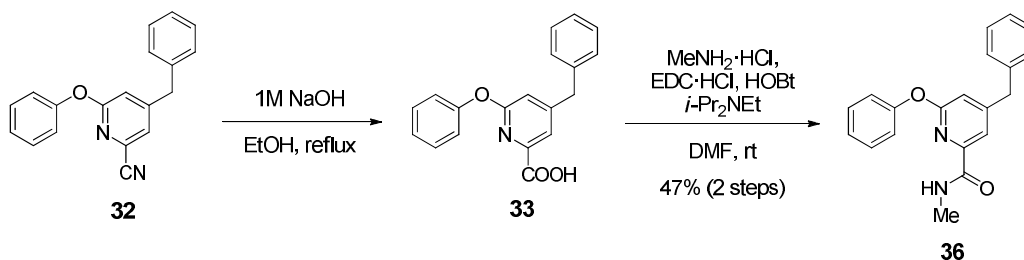


2-bromo-6-phenoxy-pyridine (S16). Compound **S16** was synthesized in a similar manner to that described for compound **32** (temperature: 100 °C). white powder; Yield: 5.00 g (82%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.15–7.32 (m, 4H), 7.44 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.54 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H); LRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₁H₈BrNO [M+Na]⁺ 272.0, found 271.6.

***N*-isopentyl-6-phenoxy-picolinamide (35).** *n*-BuLi (15.2 mL, 63.8 mmol, 2.6 M) in hexane was added to a solution of **S16** (9.05 g, 36.0 mmol) in Et₂O (300 mL) and THF (60 mL) at -78 °C under an argon atmosphere. After stirring for 15 min at the same temperature, the mixture was bubbled with CO₂ gas through conc. H₂SO₄. The reaction temperature was allowed to rise to room temperature, and the mixture was stirred for 2 h. The reaction was stopped by adding 1 M aqueous NaOH, and the water phase was washed with AcOEt. The mixture was acidified with 1 M aqueous HCl, and products were extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to afford **S17**, which was used in next step without further purification. To a solution of **S17** in DMF (125 mL), isopentylamine (2.9 mL, 25.0 mmol), *i*-Pr₂NEt (6.5 mL, 38 mmol), HOBT (3.80 g, 25.0 mmol) and EDC·HCl (4.80 g, 25.0 mmol) were added at room temperature under an argon atmosphere. After stirring for 15 h at room temperature, the reaction was stopped by adding saturated aqueous NaHCO₃, and products were extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 90/10 to 70/30) to afford **35** (2.08 g, 20% from **S16**) as a pale yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.81 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.31 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.46 (heptuplet, *J* = 6.8 Hz,

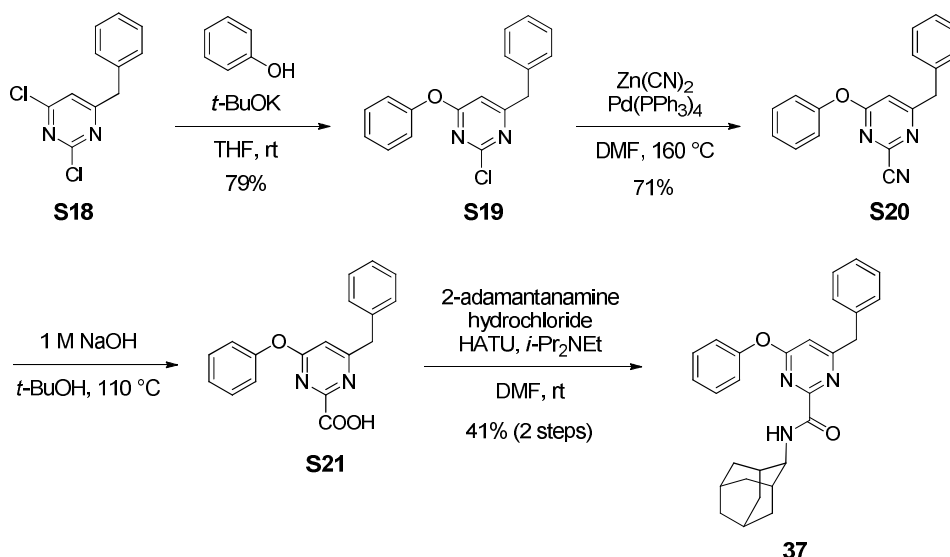
1H), 3.29 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.05–7.38 (m, 5H), 7.45 (brs, 1H), 7.73–7.84 (m, 2H); HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{17}H_{20}N_2O_2$ $[M+Na]^+$ 307.1422, Found 307.1416; HPLC: $t_R = 27.7$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

4-benzyl-*N*-methyl-6-phenoxy-picolinamide (36).



Compound **36** was synthesized in a similar manner to that described for compound **27**. colorless oil; Yield: 22.0 mg (47% from **32**); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 2.87 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H), 3.99 (s, 2H), 6.80 (s, 1H), 7.08 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.16–7.47 (m, 9H), 7.77 (s, 1H); HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{20}H_{18}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 341.1266, Found 341.1251; HPLC: $t_R = 27.2$ min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

Scheme S4



4-benzyl-2-chloro-6-phenoxy-pyrimidine (S19). To a solution of *t*-BuOK (621 mg, 5.53 mmol) in THF (16 mL), PhOH (501 mg, 5.53 mmol) was added at 0 °C under an argon atmosphere. After stirring for 5 min at the same temperature, a solution of **S18**^[62] (1.23 g, 5.27 mmol) in THF (10 mL)

was added dropwise at 0 °C. After stirring for 3 h at room temperature, the reaction was stopped by adding saturated aqueous NH₄Cl and products were extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 99/1 to 90/10) to afford **S19** (1.20 g, 79%) as a pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 4.03 (s, 2H), 6.48 (s, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.20–7.43 (m, 8H).

4-benzyl-6-chloropyrimidine-2-carbonitrile (S20). To a solution of **S19** (446 mg, 1.55 mmol) in DMF (7.8 mL), Zn(CN)₂ (273 mg, 2.33 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (89.6 mg, 0.0775 mmol) were added at room temperature under an argon atmosphere. After stirring for 1 h at 160 °C, the reaction was stopped by adding 2 M aqueous NaOH, and products were extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 99/1 to 90/10) to afford **S20** (316 mg, 71%) as a pale yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.07 (s, 2H), 6.77 (s, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.23–7.46 (m, 8H).

N-(adamantan-2-yl)-4-benzyl-6-phenoxy pyrimidine-2-carboxamide (37). 1 M aqueous NaOH (1.0 mL) was added to a solution of **S20** (32.0 mg, 0.111 mmol) in *t*-BuOH (1.0 mL) at room temperature under air. After stirring for 1 h at 110 °C, the reaction was stopped by adding 2 M aqueous HCl, and products were extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to afford **S21**, which was used in next step without further purification. To a solution of **S21** in DMF (1.1 mL), 2-adamantanamine hydrochloride (31.3 mg, 0.167 mmol), *i*-Pr₂NEt (77.3 μL, 0.444 mmol), and *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU, 50.6 mg, 0.133 mmol) were added at room temperature under an argon atmosphere. After stirring for 3 h at room temperature, the reaction was stopped by adding saturated aqueous NaHCO₃, and extracted with AcOEt (×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane/AcOEt = 7/3) to afford **37** (20.0 mg, 41% from **S20**) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.37–1.86 (m, 14H), 4.14 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 6.66 (s, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.20–7.42 (m, 8H), 8.12 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₈H₂₉N₃O₂ [M+H]⁺ 462.2157, Found 462.2153; HPLC: *t*_R = 37.2 min (YMC-Pack ODS-AM); purity: >95% (HPLC analysis at 230 nm).

Preparation of A β 1–42 stock solution. Stock solutions of *O*-acyl isopeptide in 0.1% aqueous TFA and native A β 1–42 in 0.02% aqueous ammonia were prepared in the same manners as described in Ref 58.

Thioflavin-T (ThT) Fluorescence. The ThT assay was conducted in a similar manner as that described in Ref 58. In brief, a stock solution of the *O*-acyl isopeptide was thawed and diluted with an equal volume of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), and additional phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) was added to obtain 10 μ M of the peptide solution. To the solution, an appropriate amount of each inhibitor was added as a DMSO solution to adjust the final concentration to a desired one (10, 30, 50, 90, or 100 μ M inhibitor). The same volume of DMSO was added to “A β only” sample as a control. The prepared sample was incubated at 37 °C for the desired time periods. The aliquot sample was mixed with 50 μ M ThT in 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.5) and the mixture was subjected to ThT fluorescence assay. The fluorescence was measured at an emission wavelength of 480 nm and an excitation of 440 nm. I checked that absorption of inhibitors **27** and **37** at the concentration of the assay at 440 nm (where ThT is excited) was below the detection limit. In addition, the ThT fluorescence value of “A β 1–42 alone” sample underwent little change when representative inhibitors **3**, **4**, **9**, **27**, and **37** were added to the solution of A β 1–42 and then ThT was successively added to the mixture solution (**Figure**), indicating that the fluorescence values were not interfered by the presence of the inhibitors. In the assay using native A β 1–42 (instead of *O*-acyl isopeptide), similar inhibitory activities [ThT intensity: A β 1–42 alone (10 μ M, incubated at 37 °C for 3 h): 100%; A β 1–42 + **1** (10 μ M + 30 μ M): 96%; A β 1–42 + **3** (10 μ M + 30 μ M): 52%*; A β 1–42 + **4** (10 μ M + 30 μ M): 49%*; A β 1–42 + **27** (10 μ M + 50 μ M): 79%**; $n = 4-15$, * $p < 0.01$ vs. A β 1–42 + **1**, ** $p < 0.01$ vs. A β 1–42 alone (Student’s *t*-test)] were observed to those observed using *O*-acyl isopeptide.

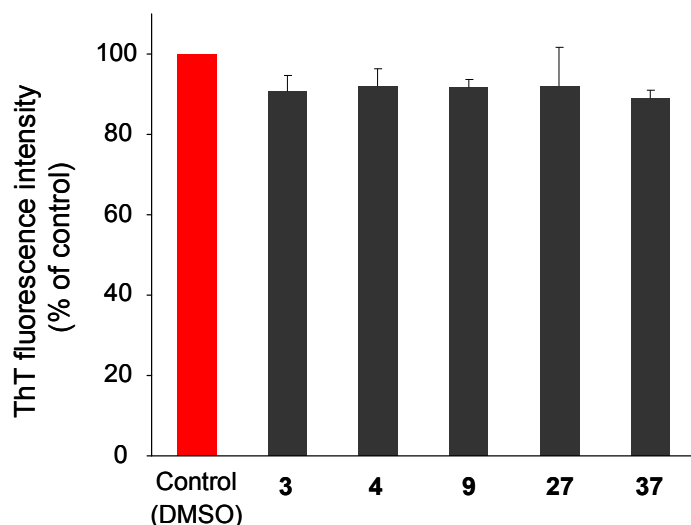


Figure. Influences of representative inhibitors on the binding of aggregated A β 1–42 with ThT in the fluorescence assay. Red bar: 10 μ M of A β 1–42 was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 3 h and then applied to the ThT fluorescence assay (final concentration of A β 1–42: 0.24 μ M, ThT: 1.2 μ M), black bars: **3**, **4**, **9**, and **37** (equal molar concentration to ThT) and **27** (3-fold excess molar concentration to ThT) were added to the solution of A β 1–42 (0.24 μ M), and after 5 min ThT (1.2 μ M) was successively added to the mixture solution. Mean \pm S.D., $n = 3$.

Sedimentation assay. The sedimentation assay was conducted in a similar manner as that described in Ref 50. In brief, a stock solution of *O*-acyl isopeptide was thawed and diluted with an equal volume of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), and additional phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) was added to obtain 10 μ M of the peptide solution. To the solution, an appropriate amount of **27** was added as a DMSO solution to adjust the final concentration to a desired one (30 or 100 μ M inhibitor). The same volume of DMSO was added to “A β only” sample as a control. The prepared sample was incubated at 37 $^{\circ}$ C for the desired time periods (0, 3, 6 h). After a centrifugation (10,000 rpm) at room temperature for 5 min on MiniSpin (Eppendorf Co. Ltd., Hamburg, Germany), the upper three-quarters fraction of the solution was collected and the concentration of A β was analyzed by reverse-phase HPLC.

Atomic Force Microscope. The experiment of atomic force microscope was performed in a similar manner as that described in Ref 58. In brief, stock solution of the *O*-acyl isopeptide was thawed and diluted with 0.1 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer (pH 7.4)

including 100 mM NaCl to obtain 10 μ M of the peptide solution. The inhibitor in DMSO was added to the desired concentration (10, 30 μ M). The same volume of DMSO was added for the control experiments. The prepared sample was incubated at 37 °C for 6 h. The aliquot sample was spotted on freshly cleaved mica, incubated at room temperature for 3 min, rinsed with 20 μ L of filtered deionized water and dried in air.

SDS-PAGE. A stock solution of *O*-acyl isopeptide was thawed and diluted with an equal volume of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), and additional phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) was added to obtain 10 μ M of the peptide solution. To the solution, an appropriate amount of **27** was added as a DMSO solution to adjust the final concentration to 100 μ M. The same volume of DMSO was added to “A β only” sample as a control. The prepared sample was incubated at 37 °C for the desired time periods (0, 1, 3, 6 h). The incubated sample was mixed with SDS sample buffer and the mixture solution was analyzed on Novex[®] 4–20% Tris-glycine gel (Invitrogen, California, USA) with Tris-glycine SDS running buffer under non-reducing condition. Molecular weight was estimated with SeeBlue[®] pre-stained standard (Invitrogen, California, USA). The gel was silver-stained with SilverXpress silver staining kit (Invitrogen, California, USA) according to a manufacture’s protocol.

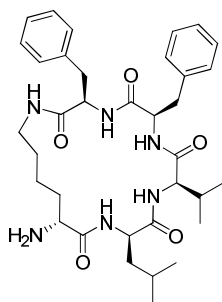
Serum stability. A DMSO solution of the inhibitor (1 mM, 1 μ L) was added to 1 mL of human serum (Sigma-Aldrich, Inc., Milwaukee, WI, USA) to a final concentration of 1 μ M, and the mixture was incubated at 37 °C for the desired time periods (0 min, 10 min, 6 h). 400 μ L aliquot of the solution was withdrawn, and then 800 μ L of acetonitrile was added to the solution. The resulting precipitates were spun down by centrifugation (10, 000 rpm, 5 min), and the supernatant was analyzed using LC-MS/MS TripleTOF[™] 4600 (ABSCIEX, Massachusetts, USA).

References

- [1] Holtzman, D. M.; Morris, J. C.; Goate, A. M. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 77sr1.
- [2] Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M. *Alzheimer's & Dementia* **2007**, *3*, 186–191.
- [3] (a) Davies, P.; Maloney, A. J. F. *Lancet* **1976**, *308*, 1403; (b) Perry, E. K.; Perry, R. H.; Blessed, G.; Tomlinson, B. E. *Lancet* **1977**, *309*, 189.
- [4] Sugimoto, H.; Imura, Y.; Yamanishi, Y.; Yamatsu, K. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4821–4829.
- [5] (a) Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *297*, 353–356; (b) Cras, P.; Kawai, M.; Loweryf, D. D.; Gonzalez-Dewhit, P.; Greenberg, B.; Perry, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7552–7556.
- [6] (a) Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747; (b) Lührs, T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Döbeli, H. Schubert, D. Riek, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *99*, 17342–17347.
- [7] Selkoe, D. J. *Behav. Brain Res.* **2008**, *192*, 106–113.
- [8] Chimon, S.; Shaibat, M. A.; Jones, C. R.; Calero, D. C.; Aizezi, B.; Ishii, Y. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1157–1164.
- [9] (a) Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N.; Ihara, Y. *Neuron* **1994**, *13*, 45–53; (b) Younkin, S. G. *Ann. Neurol.* **1995**, *37*, 287–288.
- [10] Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *298*, 789–791.
- [11] Tomita, T. *Expert Rev. Neurother.* **2009**, *9*, 661–679
- [12] Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandevent, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. *Nature* **1999**, *400*, 173–177.
- [13] Stains, C. I.; Mondal, K.; Ghosh, I. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1674–1692.
- [14] Callaway, E. *Nature* **2012**, *489*, 13–14.
- [15] (a) Blennow, K.; Hampel, H.; Weiner, M.; Zetterberg, H. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6*, 131–144; (b) Kaneko, N.; Nakamura, A.; Washimi, Y.; Kato, T.; Sakurai, T.; Arahata, Y.; Bundo, M.; Takeda, A.; Niida, S.; Ito, K.; Toba, K.; Tanaka, K.; Yanagisawa, K. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2014**, *90*, 104–117.

- [16] (a) Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 27–37; (b) Hawkes, C. A.; Ng, V.; McLaurin, J. *Drug Dev. Res.* **2009**, *70*, 111–124; (b) Cheng, B.; Gong, H.; Xiao, H.; Petersen, R. B.; Zheng, L.; Huang, K. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1830*, 4860–4871.
- [17] Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8545–8548.
- [18] Fradinger, E. A.; Monien, B. H.; Urbanc, B.; Lomakin, A.; Tan, M.; Li, H.; Spring, S. M.; Condrón, M. M.; Cruz, L.; Xie, C. W.; Benedek, G. B.; Bitan, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14175–14180.
- [19] (a) Chalifour, R. J.; McLaughlin, R. W.; Lavoie, L.; Morissette, C.; Tremblay, N.; Boule, M.; Sarazin, P.; Stea, D.; Lacombe, D.; Tremblay, P.; Gervais, F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34874–34881 (D-amino acid); (b) Kokkoni, N.; Stott, K.; Amijee, H.; Mason, J. M.; Doig, A. J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 9906–9918 (SEN 304); (c) Amijee, H.; Bate, C.; Williams, A.; Virdee, J.; Jeggo, R.; Spanswick, D.; Scopes, D. I. C.; Treherne, J. M.; Mazzitelli, S.; Chawner, R.; Evers, C. E.; Doig, A. J. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8338–8352 (SEN 304); (d) Gordon, D. J.; Sciarretta, K. L.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237–8245 (N-methylation); (e) Ghanta, J.; Shen, C.-L.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29525–29528 (poly-Lys); (f) Etienne, M. A.; Aucoin, J. P.; Fu, Y. W.; McCarley, R. L.; Hammer, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3522–3523 (α,α -di-substituted amino acid); (g) Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *226*, 672–680 (Pro residue); (h) Gordon, D. J.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2003**, *42*, 475–485 (ester bond).
- [20] Baum, L.; Lam, C. W.; Cheung, S. K.; Kwok, T.; Lui, V.; Tsoh, J.; Lam, L.; Leung, V.; Hui, E.; Ng, C.; Woo, J.; Chiu, H. F.; Goggins, W. B.; Zee, B. C.; Cheng, K. F.; Fong, C. Y.; Wong, A.; Mok, H.; Chow, M. S. Ho, P. C.; Ip, S. P.; Ho, C. S. Yu, X. W.; Lai, C. Y.; Chan, M. H.; Szeto, S.; Chan, I. H.; Mok, V. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2008**, *28*, 110–113.
- [21] Hamman, J. H.; Enslin, G. M.; Kotze, A. F.; *Biodrugs* **2005**, *19*, 165–177.
- [22] Veber, D. F.; Freidlinger, R. M.; Perlow, D. S.; Paleveda, W. J. Jr; Holly, F. W.; Strachan, R. G.; Nutt, R. F.; Arison, B. H.; Homnick, C.; Randall, W. C.; Glitzer, M. S.; Saperstein, R.; Hirschmann, R. *Nature* **1981**, *292*, 55–58.
- [23] Al-Obeidi, F.; Hadley, M. E.; Pettitt, B. M.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3413–3416.
- [24] Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.

- [25] Fujii, N.; Oishi, S.; Hiramatsu, K.; Araki, T.; Ueda, S.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Kusano, S.; Terakubo, S.; Nakashima, H.; Broach, J. A.; Trent, J. O.; Wang, Z. X.; Peiper, S. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3251–3253.
- [26] (a) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523; (b) Fung, S.; Hruby, V. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 352–358.
- [27] White, C. J.; Yudin, A. K. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509–524.
- [28] LeVine III, H. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274–284.
- [29] Although I also examined a side chain-to-tail cyclic analogue (below) of *D*-[KLVFF], this analogue showed no improvement in the activity (ThT intensity: 80% under conditions described in **Table 1-1** legend) compared to the linear *D*-[KLVFF].

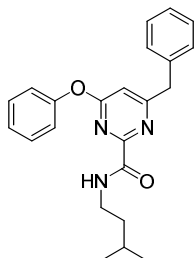


- [30] Chorev, M.; Goodman, M. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 266–273.
- [31] (a) Luo, J.; Abrahams, J. P. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 2410–2419; (b) Giordanetto, F.; Kihlberg, J. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 278–295; (c) Bauer, R. A.; Wurst, J. M.; Tan, D. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 308–314.
- [32] Tyndall, J. D. A.; Nall, T.; Fairlie, D. P. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 973–999.
- [33] (a) Rezai, T.; Yu, B.; Millhauser, G. L.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2510–2511; (b) White, T. R.; Renzelman, C. M.; Rand, A. C.; Rezai, T.; McEwen, C. M.; Gelev, V. M.; Turner, R. A.; Lington, R. G.; Leung, S. S. F.; Kalgutkar, A. S.; Bauman, J. N.; Zhang, Y.; Liras, S.; Price, D. A.; Mathiowetz, A. M.; Jacobsen, M. P.; Lokey, R. S. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 810–817.
- [34] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
- [35] Treatment with A β 1–42 (10 μ M) reduced the cell viability to 20%, and the cell viabilities was reduced to a similar extent even in the presence of **4** (20 μ M).
- [36] (a) Ladiwala, A. R. A.; Lin, J. C.; Bale, S. S.; Marcelino-Cruz, A. M.; Bhattacharya, M.; Dordick, J. S.; Tessier, P. M. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 24228–24237; (b) Ehrnhoefer, D. E.;

- Bieschke, J.; Boeddrich, A.; Herbst, M.; Masino, L.; Lurz, R.; Engemann, S.; Pastore, A.; Wanker, E. E. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 558–566.
- [37] An A β concentration of 30 μ M was adopted in the dynamic light scattering experiments to acquire sufficient intensities.
- [38] Scattering from large particles magnified. See: Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Teplow, D. B. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 429–459.
- [39] When A β 1–42 alone was incubated longer, the peak at 14.5 mL eventually disappeared due to progression of the aggregation to higher molecular weight assemblies, which might be removed during the pre-treatment step and/or filtered out prior to loading onto the gel of the column.
- [40] Kaye, R.; Head, E.; Thompson, J. L.; McIntire, T. M.; Milton, S. C.; Cotman, C. W.; Glabe, C. G. *Science* **2003**, *300*, 486–489.
- [41] Harper, J. D.; Lansbury, P. T. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 385–407.
- [42] Particles with a sub-nanometer z-height are typically observed in oligomer states prior to protofibrils in the native aggregation pathway. See: Stine, W. B. Jr; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612–11622.
- [43] It is possible that 3-embedded A β 1–42 was removed during the pre-treatment step and/or eluted together.
- [44] Arai, T.; Sasaki, D.; Araya, T.; Sato, T.; Sohma, Y.; Kanai M. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2577-2583.
- [45] Hoffmann, T.; Metternich, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8670–8671.
- [46] Clackson, T.; Wells, J. A. *Science* **1995**, *267*, 383–386.
- [47] (a) Arkin, M. R.; Wells, J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301–317; (b) Yin, H.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4130–4163.
- [48] (a) Weinstock, J.; Keenan, R. M.; Samanen, J.; Hempel, J.; Finkelstein, J. A.; Franz, R. G.; Gaitanopoulos, D. E.; Girard, G. R.; Gleason, J. G. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1514–1517; (b) Gante, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1699–1720; (c) Giannis, A.; Kolter, T.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1244–1267; (d) Arkin, M. R.; Wells, J. A. *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301–317.
- [49] Chen, Q.; du Jourdin, X. M.; Knochel, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4958–4961.
- [50] O’Nuallain, B.; Thakur, A. K.; Williams, A. D.; Bhattacharyya, A. M.; Chen, S.; Thiagarajan, G.; Wetzel, R. *Methods Enzymol.* **2006**, *413*, 34–74.

[51] Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.

[52] A pyrimidine derivative (blow) exhibited comparable activity (ThT intensity: 75% under conditions described in **Table 3-1** legend) to pyridine derivative **27**.



[53] (a) Arai, T.; Araya, T.; Sasaki, D.; Taniguchi, A.; Sato, T.; Sohma, Y.; Kanai M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8236–8239; (b) 新谷卓士 修士論文 (2014 年度).

[54] Unpublished result. **27** itself showed cytotoxicity, that is, treatment with **27** (10 μ M) reduced the cell viability to 35%.

[55] Sohma, Y.; Kiso, Y. *Chem. Rec.* **2013**, *13*, 218–223.

[56] (a) Rahimi, F.; Shanmugam, A.; Bitan, G. *Curr. Alzheimer Res.* **2008**, *5*, 319–341; (b) Anonymous (Editorial) *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 399.

[57] For examples: (a) Balducci, C.; Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Scip, A.; Biasini, E.; Tapella, L.; Colombo, L.; Manzoni, C.; Borsello, T.; Chiesa, R.; Gobbi, M.; Salmona, M.; Forloni, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 2295–2300; (b) Földi, I.; Datki, Z. L.; Szabó, Z.; Bozsó, Z.; Penke, B.; Janáky, T. *J. Neurochem.* **2011**, *117*, 691–702; (c) Stra-valaci, M.; Bastone, A.; Beeg, M.; Cagnotto, A.; Colombo, L.; Di Fede, G.; Tagliavini, F.; Cantù, L.; Del Favero, E.; Maz-zanti, M.; Chiesa, R.; Salmona, M.; Diomede, L.; Gobbi, M. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27796–27805; (d) Butterfield, S.; Hejjaoui, M.; Fauvet, B.; Awad, L.; Lashuel, H. A. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 204–236; (e) Roychaudhuri, R.; Lomakin, A.; Bernstein, S.; Zheng, X.; Condrón, M. M.; Benedek, G. B.; Bowers, M.; Teplow, D. B. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2422–2441.

[58] Taniguchi, A.; Sasaki, D.; Shiohara, A.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1382–1385.

[59] Limin, W.; Brian, P. L.; Karl, P.; Wenchao, Q.; Hank, F. K. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 301–312.

[60] Harrowven, D. C.; Curran, D. P.; Kostiuk, S. L.; Wallis-Guy, I. L.; Whiting, S.; Stenning, K. J.; Tang, B.; Packard, E.; Nanson, L. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6335–6337.

- [61] Han, G.; Tamaki, M; Hruby, V. J. *J. Pept. Res.* **2001**, *58*, 338–341.
- [62] Combs, K.; Fang, H.; Hu, S.; Van, Z. M.; Whitehouse, D. *PCT Int. Appl.* WO2004099192, 2004.

総括

本研究では、AD 治療薬の医薬リード創出を目指し、A β の 16–20 番目の部分フラグメント、KLVFF をベースとした、高活性でドラッグライクな凝集阻害剤の設計・合成に取り組んだ。高活性でドラッグライクな凝集阻害剤の設計方針として、ペプチドの環化戦略に着目した。ペプチドの環化により、活性の向上と、加水分解酵素に対する安定性、細胞膜透過性の改善が期待できると考えたためである。

第 1 章では、凝集阻害活性の向上と、凝集阻害におけるファーマコフォアの同定を目的とし、KLVFF の環化誘導化を検討した。その結果、KLVFF を head-to-tail で環化することにより、凝集阻害活性が有意に向上することを見出した。更に、環状 KLVFF の構造活性相関を検討した結果、主鎖のアミド結合がほとんど関与しない、Leu²、Val³、Phe⁴、Phe⁵ の 4 つの側鎖構造から成るファーマコフォアモチーフを同定した。本モチーフは、鎖状 KLVFF とは異なり、主鎖のアミド結合が活性発現にほとんど寄与しない点でユニークである。

第 2 章では、今回見出した環状 KLVFF 誘導体の医薬リードとしての可能性を検証することを目的とし、1)凝集阻害活性向上を指向した構造修飾、2)凝集阻害メカニズムの解析、3)神経毒性の軽減作用、4)ヒト血清中での安定性についてそれぞれ検討した。まず、活性向上を目指し、第 1 章で得られた構造活性相関情報を基に構造修飾を検討した結果、凝集阻害活性を 3 倍程度向上させることに成功した。そして、環状 KLVFF 誘導体の凝集阻害メカニズムを 8 つの相補的な生物物理学的、生化学的なアッセイにて解析した結果、環状 KLVFF 誘導体は A β を低毒性 off-pathway オリゴマーに誘導することを明らかにした。この結果より、A β の凝集を阻害することにより、その神経毒性を軽減できる可能性が示されたと考えられる。更に、環状 KLVFF 誘導体はヒト血清中で高い安定性を示し、加水分解酵素に対する安定性が高いことが示唆された。以上の検討結果より、環状 KLVFF 誘導体は、AD 治療薬の有望な医薬リードとなり得ると考えられる。

第 3 章では、KLVFF をベースとした非ペプチド性低分子凝集阻害剤の導出を目的とした。今回見出した、主鎖のアミド結合が阻害活性発現にほとんど関与しない環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基に模倣すれば、非ペプチド性の低分子凝集阻害剤が創製できるのではないかとこの着想の基、ピリジン誘導体を設計、合成した。その結果、ベースとしたペプチドとほぼ同等の凝集阻害活性を有する低分子阻害剤の創製に成功した。ここで、今回新たに設計・合成した低分子阻害剤ピリジン誘導体はの物性パラメータを算出したとこ

る、脂溶性以外の項目は Lipinski の法則における基準値を満たしたことから、ドラッグライクな化合物であることが示唆された。併せて、構造変換により活性の向上も期待できることが示唆された。従って、ドラッグライクネスと構造の展開性という観点から、ピリジン誘導体は有望な医薬リードとなり得ると考えられる。

本研究は凝集阻害剤研究において、ペプチド性阻害剤をベースとして論理的に低分子阻害剤を導出した初めての成功例であると考えられる。環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基盤とし、論理的に非ペプチド性低分子凝集阻害剤を創製した本研究の方法論は、今後の A β 凝集阻害剤の探索研究に有用と考えられる。化合物ライブラリーからのランダムスクリーニングに代わって、本ファーマコフォアを基にした、より効率的な化合物スクリーニングが可能になると考えられる。

以上のように、本研究では KLVFF をベースとし、有望な医薬リードとなり得る凝集阻害剤として、環状 KLVFF 誘導体及びピリジン／ピリミジン誘導体の創製に成功した。本研究を通じて得られた知見が、今後の A β 凝集阻害剤研究の発展、延いては AD 治療薬の開発に貢献できれば幸いである。

謝辞

本研究を行う機会を与えていただき、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院 薬系研究科 金井求教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤な直接のご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院 薬系研究科 相馬洋平 ERATO プロジェクトグループリーダー（講師相当）に深く感謝いたします。

大学への留学の機会を与えていただきました、東レ株式会社 医薬研究所 伊関克彦所長、東レ株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室 河合孝治室長、東レ株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室 林亮司研究主幹（現 安全性研究室長）、東レ株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室 青木拓実主任研究員（現 研開企画部主部）に深く感謝いたします。また、留学中に様々な形でお世話になりました、東レ株式会社医薬研究所の皆様に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者であります、大阪大学 蛋白質研究所 佐藤毅助教（現 同研究所 講師）に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者であります、東京大学大学院 薬学系研究科 新谷卓士氏（現 博士課程 1 年）、東京大学大学院 薬学系研究科 佐々木大輔博士（現 ERATO プロジェクト研究推進主任）、東京大学大学院 薬学系研究科 谷口敦彦博士（現 ERATO プロジェクト研究員）、並びに、生化学アッセイを行っていただいた、東京大学大学院 薬学系研究科 小林由紀氏（現 ERATO プロジェクト技術補佐員）に深く感謝いたします。

折に触れ有益なご助言をいただきました、東京大学大学院 薬学系研究科 松永茂樹准教授（現 北海道大学大学院 薬学研究院 教授）、東京大学大学院 薬学系研究科 國信洋一郎 ERATO プロジェクトグループリーダー（准教授相当）、川島茂裕 ERATO プロジェクトグループリーダー（講師相当）、東京大学大学院 薬学系研究科 生長幸之助助教、東京大学大学院 薬学系研究科 山次健三 ERATO プロジェクトグループリーダー（助教相当）、東京大学大学院 薬学系研究科 清水洋平助教に深く感謝いたします。

公私にわたり御厚情賜りました、JST-ERATO 金井触媒生命分子プロジェクト 医薬機能グループの皆様をはじめ、東京大学大学院 薬学系研究科 有機合成化学教室、並びに JST-ERATO 金井触媒生命分子プロジェクトの皆様に深く感謝いたします。

最後に、私の研究生生活を常に応援し、支えて下さいました妻 翔子、長女 那々歩、そして父 英司、母 茂美、弟 基之、妹 久美、義父 田中義彦、義母 田中敬子に深く感謝いたします。

2015年4月吉日