

博士論文

含ケイ素誘導体の構造的特徴に着目した
創薬化学への応用

梶田 大資

目次

略語表

第 1 章 研究背景と目的	1
第 1 節 研究背景	1
1.1 ケイ素について	1
1.2 生体内におけるケイ素の働き	2
1.3 創薬化学におけるケイ素	3
第 2 節 ケイ素の創薬化学への応用	3
2.1 シランジオール構造を利用した加水分解遷移状態アナログ型阻害剤	9
2.2 アルキルシランの導入による脂溶性の向上	10
第 3 節 本研究の目的	11
第 2 章 ステロイド代替骨格であるジフェニルメタン骨格へのケイ素の導入	12
第 1 節 研究背景	12
1.1 マルチテンプレート	12
1.2 核内受容体とステロイド誘導体	13
第 2 節 estrogen 受容体リガンドの創製	16
2.1 背景	16
2.2 ケイ素誘導体の合成	19
2.3 ケイ素誘導体の ER 転写活性評価	21
2.4 第 2 節のまとめ	21
第 3 節 ステロイド sulfatase 阻害剤の創製への展開	22
3.1 背景	22
3.2 化合物デザイン	27
3.3 化合物の合成	29
3.4 生物評価	30
3.4.1 酵素阻害活性評価	30
3.4.2 ケイ素導入による影響	33
3.5 第 3 節のまとめ	35
第 3 章 シス二重結合の新規バイオイソスターの開拓	36

第1節 研究背景	38
第2節 tubulin 重合阻害剤 combretastatin A-4 が有するオレフィン構造のケイ素リンカーへの置き換え	39
2.1 背景	37
2.2 化合物デザイン・計算化学	39
2.3 ジフェニルシラン誘導体の合成	41
2.4 tubulin 重合阻害活性及び細胞増殖抑制活性評価	44
2.5 colchicine 結合部位への結合試験	49
2.6 CA-4 及び合成化合物の溶液安定性	51
2.7 本節のまとめ	52
第3節 PPAR α agonist oleoylethanolamide が有するオレフィン構造のケイ素リンカーへの置き換え	53
3.1 背景	53
3.2 化合物デザイン・計算化学実験	57
3.3 化合物の合成	58
3.4 PPAR 転写活性評価	60
3.5 本節のまとめ	62
終章	63
実験項	65

略語表

Å	angstrom
aq.	aqueous solution
Ar	Argon
Bn	benzyl
Bu	butyl
Cat.	Catalyst
DHEA	dehydroepiandrosterone
DHEAS	dehydroepiandrosterone sulfate
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPM	disintegration per minute
E1	estrone
E1S	estrone sulfate
E2	estradiol
EC ₅₀	half maximal effective concentration
EDTA	2-({2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl}(carboxymethyl)amino)acetic acid
ER	Estrogen receptor
Et	ethyl
EtOH	ethanol
FAB	fast atom bombardment
FBS	fetal bovine serum
GTP	guanosine triphosphate
h	hour
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
M	molar (= mol/L)
<i>m</i>	meta

Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MEM	minimum essential medium
MeOH	methanol
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid min minute
MOM	methoxymethyl
mp	melting point
<i>n</i>	normal
NA	no activity
NMR	nuclear magnetic resonance
<i>o</i>	ortho
ODS	octa decyl silyl
<i>p</i>	para
PBS	phosphate buffered saline
PDBID	Protein Data Band ID
Ph	Phenyl
Pr	propyl
PTLC	preparative thin layer chromatography
r.t.	room temperature
SAR	structure- activity relationship
sat.	saturated
STS	steroid sulfatase
<i>t</i>	tertiary
TEA	triethylamine
TES	triethylsilyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
TMS	trimethylsilyl
TPI	tubulin polymerization-inhibitory
Ts	tosyl
UV	ultraviolet
WST-1 monosodium salt	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
μ	micro

第 1 章 研究背景と目的

第 1 節 研究背景

1.1 ケイ素について

ケイ素 (Silicon, Si) は、周期表で炭素と同じ第 14 族に属する原子である。天然に存在するケイ素は、地殻を構成する元素量として、酸素の次に多いことが知られている¹。天然のケイ素の多くは、岩石や鉱物中に酸素と結合した、シリカ (SiO₂) やケイ酸イオン (SiO₄⁴⁻, Si₂O₇⁶⁻) として存在している。

炭素とケイ素が直接結合した構造を有する化合物は有機ケイ素誘導体と呼称され、1863 年に C. Friedel らはテトラエチルシラン (Et₄Si) を合成し、これが最初の有機ケイ素誘導体の化学合成例となった。その後も有機ケイ素誘導体の研究は盛んに行われており、20 世紀の前半にはシロキサン構造 (-SiR₂-O-SiR₂-) を有するポリシリコーンが発見された。ポリシリコーンは、化学的安定性・耐熱性等、対応する炭素化合物には見られない特徴をいくつか有しており、現在までに、その性質を活かしたシリコン樹脂やオイル等多くの製品が開発されている。その他のケイ素の利用例としては、高純度のケイ素が半導体や太陽電池等の原料として用いられており、現在では、純度 99.999999999999% (15 nine) の半導体グレードの超高純度ケイ素が生産されている²。

また有機合成の分野でも、ケイ素はアルコール保護基 (O-TMS, O-TBS 等) として使用されたり、アルキルシランの過酸化反応によるアルコールへの変換反応 (玉尾・フレミング酸化反応)³ やシリルエノールエーテルを用いるアルドール反応 (向山アルドール反応)⁴、ケイ素誘導体とハロゲン化物のパラジウム触媒を用いたクロスカップリング反応 (檜山クロスカップリング反応)⁵ 等に用いられたりしている。

¹ Birchall, J.D. The essentiality of silicon in biology, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24 351-357.

² 吉良満夫, 玉尾皓平編 現代ケイ素化学 化学同人 **2013**.

³ Tamao, K., Discovery and synthetic applications of novel silicon-carbon bond cleavage reactions based on the coordination number change of organosilicon compounds. *Proc. Japan Acad., Series B*, **2008**, 84, 123-133.

⁴ Mukaiyama, T., Explorations into New Reaction Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5590-5614.

⁵ Hatanaka, Y.; Hiyama, T., Cross-coupling of organosilanes with organic halides mediated by a palladium catalyst and tris(diethylamino)sulfonium difluorotrimethylsilicate. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 918-920.

1.2 生体内におけるケイ素の働き

ケイ素は生体内にも存在している。ケイ素と動物の関わりとして、鶏のヒナとラットでケイ素欠乏症が報告されており、ケイ素の欠乏は発育に悪影響を及ぼすことが分かっている。その際のケイ素の欠乏が発育を阻害する機序として骨生成への関与が推測されているが、詳細は解明されていない⁶。

一方、藻類や陸上植物においては、ケイ藻等の一部の藻類とシダ植物のトクサにおいてケイ素は生きるために必要不可欠な元素であることが知られている。ケイ藻は増殖する際ケイ酸質の殻をつくるため、炭素や窒素、リンの他にケイ素が一定の割合必要とされている。また、トクサは根から吸収したケイ酸を茎に送り、蓄積されたケイ酸が固化し、頑丈な茎を形成する。その他、一部の種子植物でもケイ素の有用性が認められており、中でもイネ科の植物はケイ素集積植物として知られている⁷。ケイ素はイネを栽培する際の栄養源として重要であり、茎などに蓄積したケイ素はカビの感染や害虫からの攻撃から植物を保護し、蒸散による水分の減少を最小限に抑える働きをもつことも知られている⁸。

以上のように、生体内におけるケイ素の働きがいくつか報告されている。しかし、それらは無機化合物としてのケイ素（主にケイ酸）が関与しており、興味深いことに自然界から有機ケイ素誘導体⁹が発見された例は、調査した限り現在まで報告されていない¹⁰。

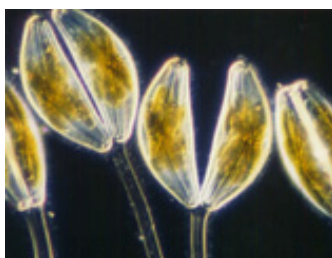


Figure 1-1. 群体性のケイ藻¹¹

⁶ 松永俊朗, 植物体内でのケイ素の化学形態. *日本土壌肥料雑誌* **2004**, 72, 387-391.

⁷ Epstein, E., *SILICON Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **1999**, 50, 641-664.

⁸ Ma, J.F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Tamai, K.; Konishi, S.; Fujiwara, T.; Katsuhara, M.; Yano, M., An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* **2007**, 448, 209-212.

⁹ 炭素とケイ素が直接結合した化合物

¹⁰ Prasad, H., *Organosilicon Reagents in Natural Product Synthesis. Resonance.* **2002**, 7, 48-64.

¹¹ ケイソウプロジェクトホームページ <http://www.u-gakugei.ac.jp/~diatom/japan/index.html>

1.3 創薬化学におけるケイ素

ケイ素 (Si) は、炭素 (C) と同族の元素であることから、創薬化学において、ケイ素を炭素の代替元素として利用することが試みられている (Figure 1-2)。炭素をケイ素に置換する効果として、分子サイズ・結合角の変化、脂溶性の向上、電気陰性度の違い (電荷の偏り) により、活性、選択性、体内動態等の変化・改善が期待される。また、ケイ素に置換することで化合物の特許上の新規性が得られる可能性もある¹²。以下、ケイ素と炭素の比較および創薬化学への応用の可能性について述べる。

13	14	15	16
B	C	N	O
Al	Si	P	S
Ga	Ge	As	Se
In	Sn	Sb	Te
Tl	Pb	Bi	Po

Figure 1-2. 周期表でのケイ素の周辺原子

(1) 分子サイズ・結合角

炭素およびケイ素の共有結合半径はそれぞれ 77 および 117 pm であり、ケイ素の方が約 1.5 倍長いことが知られている。また、炭素 - ケイ素 (C-Si) 結合および炭素 - 炭素 (C-C) 結合の原子間の平均距離はそれぞれ 1.87 Å、1.54 Å であり、前者の方が約 20%長いことも知られている¹³。また、ケイ素または炭素を中心原子と考えた際の結合角についても、ケイ素誘導体の結合角 (\angle C-Si-C) は、ケイ素誘導体の炭素 - ケイ素 (C-Si) 結合が炭素化合物の炭素 - 炭素 (C-C) 結合より長いことで周囲の立体障害が緩和され、その結果として炭素化合物の結合角 (\angle C-C-C) と異なってくる場合がある。

このようなケイ素の導入による分子サイズ・結合距離・結合角の変化は、化合物の *in vitro* で の生理活性や選択性に影響を及ぼす可能性がある。

¹² Showell, G.A.; Mills, J.S., Chemistry challenges in lead optimization : silicon isosteres in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 551-556.

¹³ Franz, A.K.; Wilson, S.O. Organosilicon Molecules with Medicinal Applications, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 388-405.

(2) 脂溶性

ケイ素誘導体は、対応する炭素化合物よりも脂溶性が高いことが知られている。例えば、*t*-butylbenzene のオクタノール/水分配係数 P は $\log P$ 値にして 4.0 であるのに対し、対応するケイ素誘導体である trimethylsilylbenzene の $\log P$ 値は 4.7 である¹³。分子サイズによってこのような脂溶性の変化が生じる。本例では、炭素が分子サイズの大きいケイ素に置き換わることで、分子の表面積が大きくなり、その結果脂溶性が向上する (Figure 1-3)。

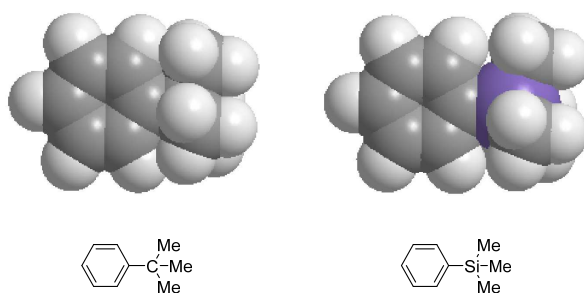


Figure 1-3. *t*-butylbenzene (左) と trimethylsilylbenzene (右)¹⁴

脂溶性向上により、薬剤の組織移行性や体内における薬物動態の改善に繋がると考えられる¹⁵。また、化合物の脂溶性は、化合物が脳内へ移行する際に障壁となる blood-brain barrier (BBB) の透過にも影響があると言われている¹⁶。すなわち、化合物の脂溶性を向上させることで、脳腫瘍やアルツハイマー病治療薬などの脳内へ移行させる必要がある化合物の薬効を向上させることができる可能性がある。

以上のように、ケイ素の導入による脂溶性の向上は、主に化合物の *in vivo* での活性に影響を及ぼす可能性があると考えられる。

¹⁴中村雅陽 ケイ素を利用した抗腫瘍活性物質の構造展開 東京大学大学院薬学系研究科 平成26年度博士論文

¹⁵ Waring, M.J., Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2010**, *5*, 235-248.

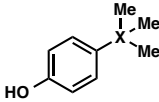
¹⁶ Clark, D.E., In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discovery Today*, **2003**, *8*, 927-933.

(3) 電気陰性度および酸性度

炭素、ケイ素の電気陰性度はそれぞれ、2.50 及び 1.74 であり、ケイ素は炭素よりも電氣的に陽性であるといえる⁷。よって、アルキル置換ケイ素 (R_3Si-) は、誘起効果 (+I 効果) により電子供与性置換基として働く。例として、trimethylsilyl 酢酸 (Me_3Si-CH_2COOH) 及び *t*-ブチル酢酸 (Me_3C-CH_2COOH) の pKa はそれぞれ、5.22 及び 5.00 であり、アルキル置換ケイ素 (R_3Si-) の導入により、酸性度が低下している¹⁷。

一方、phenol に trimethylsilyl 基を導入すると phenol の酸性度が高くなることが報告されている (Table 1-1)¹⁸。これは、ケイ素が benzene 等の芳香環と結合した場合、ケイ素の d 軌道と芳香環の π 電子の間に $d\pi-p\pi$ 結合が形成される効果 (-M 効果) によるものだと考えられる¹⁹。

Table 1-1. フェノール誘導体の酸性度の比較



	X	pKa
phenol	-	10.44
<i>t</i> Bu-C ₆ H ₄ OH	C	10.54
TMS-C ₆ H ₄ OH	Si	10.06

また、トリフェニルメタノール (Ph_3C-OH) と対応するケイ素誘導体であるトリフェニルシラノール (Ph_3Si-OH) の pKa (DMSO) はそれぞれ 16.97 及び 16.57 であり、シラノールの酸性度が高いことが知られている⁹。この理由として、シラノールの酸素上の非共有電子対が、ケイ素の空の d 軌道と相互作用し、 $d\pi-p\pi$ 結合を形成することが示唆されている。このように、アルコールをシラノールに置換することで酸性度が増加することから、標的タンパクとの水素結合能が向上し、生理活性の向上にもつながることが期待される。

¹⁷ Saul Patai, S.; Rappoport, Z. The Chemistry of Organic Silicon Compounds. John Wiley & Sons, Ltd. 1989, ISBN : 0-471-91993-4.

¹⁸ Fujii, S.; Miyajima, Y.; Masuno, H.; Kagechika, H., Increased Hydrophobicity and Estrogenic Activity of Simple Phenols with Silicon and Germanium-Containing Substituents. *J. Med. Chem.*, 2013, 56, 160-166.

¹⁹ 橋本忠, 有機ケイ素誘導体の合成 (第 12 報), 薬学雑誌, 1967, 87, 524-527.

(4) 多重結合の形成

炭素化合物では、二重結合や三重結合、芳香環等の不飽和結合がそれぞれ安定に存在し得るが、対応するケイ素誘導体はいずれも不安定であり、合成することは困難である。炭素とケイ素の化学結合における性質の違いは、s 軌道と p 軌道の広がりやの差に起因すると考えられる。炭素の価電子軌道である 2s 軌道と 2p 軌道は、広がりがほぼ同じでエネルギー準位も近く、容易に混成して σ 結合と π 結合を安定に形成する。一方、ケイ素の価電子軌道である 3s 軌道と 3p 軌道では、軌道の広がりが大きく異なっており、エネルギー順位の差も大きいため混成しにくい²。

以下に、ケイ素誘導体が二重結合を形成しにくいことを利用した例を示す。ハロペリドール (Haloperidol) は、ブチロフェノン系抗精神病薬であり、中枢神経系におけるドパミン作動系、ノルアドレナリン作動系等に対する抑制作用によって効果を発現し、統合失調症、躁病の治療に用いられている²⁰。しかしながら、ハロペリドールの代謝物であるピリジニウム体 HPP+ は神経毒性を有することが知られており、臨床使用の上で問題となっている²¹。ピリジニウム体 HPP+ は、ハロペリドールが脱水を経て生じるオレフィン体 HPTP が、芳香族化することで生じる。一方、アルコールをシラノールへ変換した Sila-ハロペリドールの場合、ケイ素-炭素二重結合 (Si=C) が不安定であるため、オレフィン体 Sila-HPTP は生じず、毒性を示す HPP+ に対応する Sila-HPP+ も生成しないため、毒性を回避できる (Figure 1-4)²²。

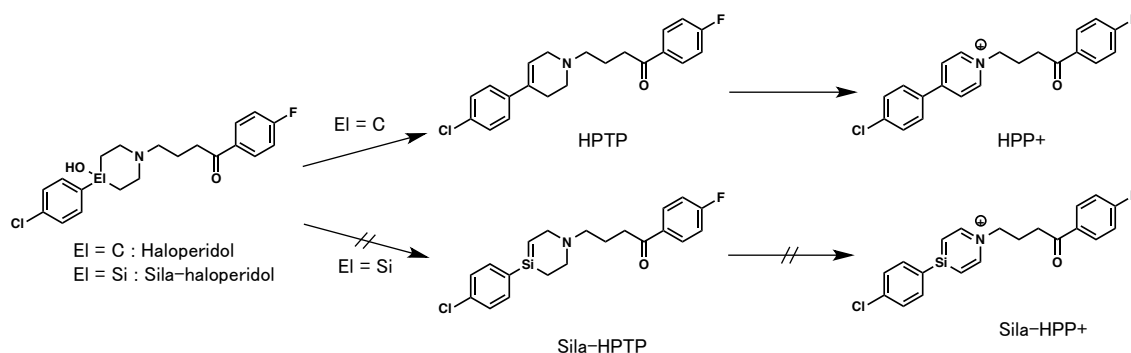


Figure 1-4. ハロペリドール及びそのケイ素誘導体の代謝経路

²⁰ セレネース®注5 mg 医薬品インタビューフォーム (大日本住友製薬) 2012年2月 (改訂第20版).

²¹ Kawashima, H.; Iida, Y.; Kitamura, Y.; Saji, H., Binding of 4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]pyridinium ion (HPP+), a metabolite of haloperidol, to synthetic melanin : implications for the dopaminergic neurotoxicity of HPP+., *Neurotox Res.* **2004**, *6*, 535-542.

²² Tacke, R.; Popp, F.; Müller, B.; Theis, B.; Burschka, C.; Hamacher, A.; Kassack, M.U.; Schepmann, D.; Wunsch, B.; Jurva, U.; Wellner, E., Sila-haloperidol, a silicon analogue of the dopamine (D2) receptor antagonist haloperidol : synthesis, pharmacological properties, and metabolic fate., *ChemMedChem.*, **2008**, *3*, 152-164.

酸素との二重結合形成においても炭素とケイ素では、性質が異なっている。炭素の場合には、ケトンとジオールの平衡はケトン型に偏っている。一方、ケイ素においては、ケイ素-酸素二重結合 (Si=O) が不安定なため、ジオール型 (シランジオール) に偏っている (Figure 1-5)¹³。

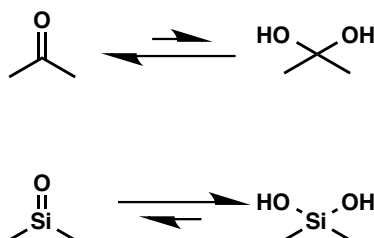


Figure 1-5. 炭素とケイ素におけるケトンとジオールの平衡

Table 1-2. に示すように、ケイ素のケトン体 (silanone) では、ケトンと比較して、 π 結合エネルギーが著しく減少している²³。よって、ケイ素誘導体では弱い π 結合を切断し、代わりにより強固な σ 結合を形成することで、エネルギー的により安定な構造をとることができる。すなわち、ケイ素においては、ケイ素-酸素二重結合 (Si=O) を形成しケトン型をとるよりも、ジオール型 (シランジオール) をとる方がエネルギー的に安定となるので、平衡はジオール型に偏る。

後述するが、このシランジオール構造をプロテアーゼによる基質の加水分解遷移状態をミミックした構造として利用する研究が行われており、いくつかの含ケイ素プロテアーゼ阻害剤が報告されている²⁴。

Table 1-2. H₂C=O及びH₂Si=Oの結合エネルギー (kcal/mol)

	σ	π	$\sigma+\pi$
H ₂ C=O	93.6	95.3	188.9
H ₂ Si=O	119.7	58.5	178.2

²³ Suzuki, H.; Tokitoh, N.; Okazaki, R.; Nagase, S.; Goto, M., Synthesis, Structure and Reactivity of the First Kinetically Stabilized Silanethione. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11096-11105.

²⁴ Hernández, D.; Lindsay, K.B.; Nielsen, L.; Mittag, T.; Bjerglund, K.; Friis, S.; Mose, R.; Skrydstrup, T., Further studies toward the stereocontrolled synthesis of silicon-containing peptide mimics. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3283-3293.

(5) ケイ素と炭素の比較のまとめ

ケイ素と炭素は類似した性質を示す一方で、上述の通り明らかに異なった性質も有する。以下に、ケイ素と炭素の比較のまとめを示す (Table 1-3)。

Table 1-3. ケイ素炭素の比較²⁵

property	carbon	silicon
covalent radius	77 pm	117 pm
bond length	1.54 Å (C-C)	1.87 Å (Si-C)
lipophilicity	log P of PhCMe ₃ : 4.0	log P of PhSiMe ₃ : 4.7
electronegativity	2.5	1.74
acidity of X-OH	weakly acidic	more acidic than C-OH
stability of X=C and X=X	stable	unstable

²⁵ Ref. 13 に記載の表を一部改編

第2節 ケイ素の創薬化学への応用

2.1 シランジオール構造を利用した加水分解遷移状態アナログ型阻害剤

アルコール (C-OH) の炭素をケイ素に置き換えた構造であるシラノール (Si-OH) は、対応するアルコールと比較して高い水素結合形成能、酸性度を有している。また、アルコールでは安定に単離することが困難なジェミナルジオール、トリオール構造もとり得ることから、医薬候補化合物のビルディングブロックとして有用な構造である。

特に、シランジオールはプロテアーゼ等による加水分解の遷移状態アナログ (transition state analog; TSA) 型阻害剤としての機能を付与する構造として、近年研究が進められている (Figure 2-1)。これまでの研究で、いくつかの遷移状態アナログ型阻害剤を創出することにも成功している (Figure 2-2)。

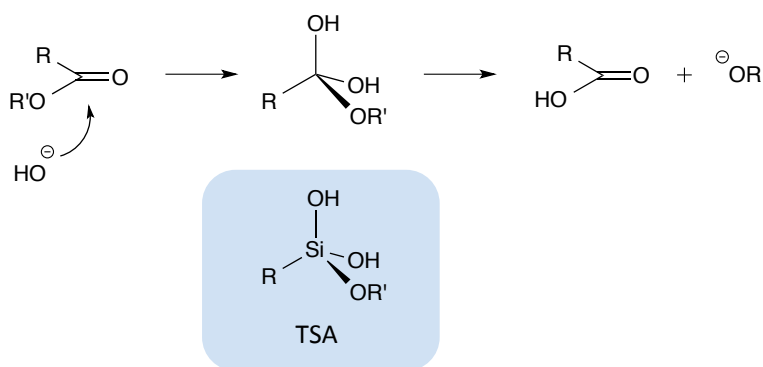


Figure 2-1. 加水分解遷移状態とその TSA

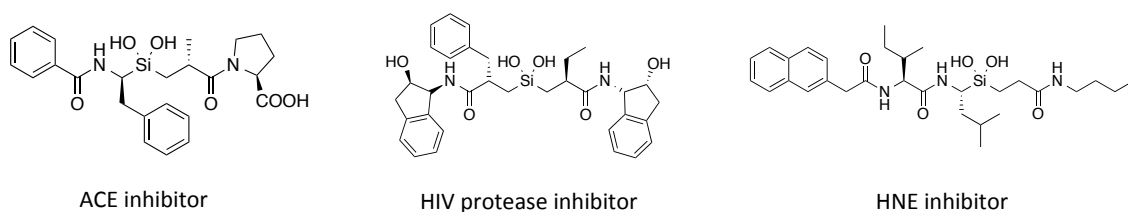


Figure 2-2. ジェミナルジオール構造を有する TSA 型阻害剤

2.2 アルキルシランの導入による脂溶性の向上

第1節にも記載した通りケイ素は炭素と比較して高い疎水性を有することから、炭素をケイ素に置換することで化合物全体の脂溶性を向上せさせることができる。このような構造変換を利用して創薬がこれまでにいくつか報告されている。

トポイソメラーゼ阻害薬として知られるカンプトテシンについては、トリメチルシリルエチル基を導入した誘導体である BNP1350 と、*tert*-ブチルジメチルシリル基を導入した誘導体である DB 化合物において、代謝安定性の向上や毒性を軽減させることに成功している (Figure 2-3)。

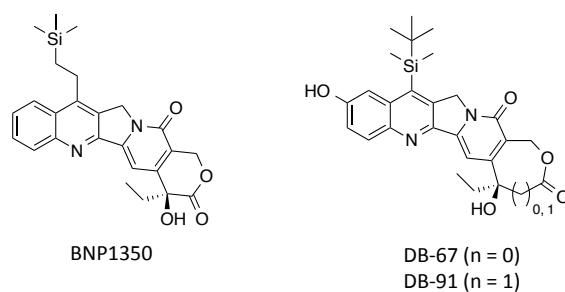


Figure 2-3. アルキルケイ素の導入によるドラッグライクネスの改善

第 2 節 本研究の目的

第 1 節でも述べたように、ケイ素は炭素と同族元素であり炭素と類似した性質を示す一方で、炭素とは異なる性質も有することから、ケイ素を含有した化合物の生理活性に興味を持たれる。しかしながら、ケイ素含有生理活性物質については、研究の歴史も浅く、研究例も少ないために、その生物学的特性や薬剤としての有用性については未知な部分が多い。また、いくつかのケイ素を含有した医薬品候補化合物²⁶⁻²⁹の臨床試験が行われてきたが、実際に臨床応用されている化合物はほとんど知られていない (Figure 1-6)。

これまでのケイ素の創薬への応用研究については第 2 節で触れ通り、安定なジェミナルジオール構造をとり得ることを利用した TSA 型阻害剤や、ケイ素の高い疎水性を利用したアルキルシランの導入等が知られている。そこで、本研究ではケイ素の原子サイズに着目し、含ケイ素誘導体に関する知見の獲得及び有用性の検討を目的として研究を行い、ケイ素の物理化学的性質に着目した創薬及び構造最適化手法の提案を行うこととした。尚、論文に記載された論文の一部は、日本化薬株式会社研究員の中村雅陽博士との共同研究による成果である。また、私の修士課程における実験データも併せて報告する。

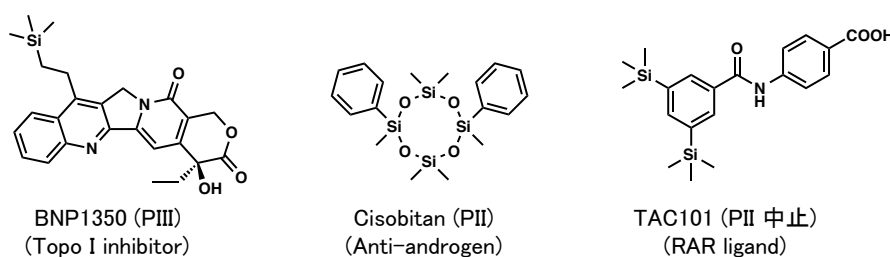


Figure 1-6. 臨床試験段階まで進んだケイ素含有医薬品候補化合物

²⁶ Gately, S.; West, R., Novel therapeutics with enhanced biological activity generated by the strategic introduction of silicon isosteres into known drug scaffolds. *Drug Development Research Drug Discovery*, **2007**, 68, 156-163.

²⁷ Alfthan, O.; Andersson, L.; Esposti, P.L.; Fossa, S.D.; Gammelgaard, P.A.; Gjores, J.E.; Isacson, S.; Rasmussen, F.; Ruutu, M.; von Schreeb, T.; Setterberg, G.; Strandell, P.; Strindberg, B., Cisobitan in treatment of prostatic cancer. A prospective controlled multicenter study. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **1983**, 17, 37-43.

²⁸ Daud, A.; Valkov, N.; Centeno, B.; Derderian, J.; Sullivan, P.; Munster, P.; Urbas, P.; Deconti, R.C.; Berghorn, E.; Liu, Z.; Hausheer, F.; Sullivan, D., Phase II trial of karenitecin in patients with malignant melanoma : clinical and translational study. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 3009-3016.

²⁹ Rizvi, N.A.; Marshall, J.L.; Ness, E.; Hawkins, M.J.; Kessler, C.; Jacobs, H.; Brenckman, W.D.Jr.; Lee, J.S.; Petros, W.; Hong, W.K.; Kurie, J.M., Initial clinical trial of oral TAC-101, a novel retinoic acid receptor alpha selective retinoid, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* **2002**, 20, 3522-3532.

第2章 ステロイド代替骨格であるジフェニルメタン骨格へのケイ素の導入

第1節 研究背景

1.1 マルチテンプレート

様々な生理機能を担う重要な分子であるタンパク質は創薬研究においても良く研究されており、標的タンパク質と結合することでその機能を制御する化合物の探索が行われている。ヒトゲノム解析の結果から、ヒトゲノムの総数は20,000~25,000種程であり³⁰、翻訳後修飾等も加味して考えると、ヒトタンパク質の総数は50,000~70,000種程もあると見積もられている。しかし、その一方で、構造生物学的解析から、タンパク質ドメインのフォールド構造(空間構造)は1,000種類程度にとどまることが示唆されている^{31, 32}。すなわち、複数のタンパク質ドメインが同一のフォールドを持ち、あるドメインに結合し得るリガンド骨格は、他の複数のタンパク質に対するリガンドのテンプレートになる可能性がある。このようなターゲットタンパクの種類を超えたりガンド共通構造は、マルチテンプレートと呼ばれる。

創薬研究におけるリード化合物の探索や、ケミカルバイオロジー研究におけるライブラリー構築において、マルチテンプレートを基盤とした構造展開を行うことで、母核構造の探索手順等を省き、効率的にシード及びリード化合物を創出することが可能となる。東京大学分子細胞生物学研究所 橋本研究室(以下、橋本研究室)ではこれまでにサリドマイド(**Figure 2-1**)及びフタルイミド骨格をマルチテンプレートとした種々の生理活性物質の創製に成功している^{33, 34, 35}。

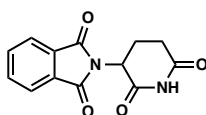


Figure 2-1. サリドマイドの構造

³⁰ Stein, L.D., Human genome : End of the beginning. *Nature*, **2004**, *431*, 915-916.

³¹ Koonin, E.V.; Wolf, Y.I.; Karev, G.P., The structure of the protein universe and genome evolution., *Nature*, **2002**, *420*, 218-233.

³² Koch, M.A.; Wittenberg, L.O.; Basu, S.; Jeyaraj, D.A.; Gourzoulidou, E.; Reinecke, K.; Odermatt, A.; Waldmann, H., Compound library development guided by protein structure similarity clustering and natural product structure., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 16721-16726.

³³ Hashimoto, Y., Structural development of biological response modifiers based on retinoids and thalidomide., *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 543-551.

³⁴ Hashimoto, Y., Novel biological response modifiers derived from thalidomide. *Curr. Med. Chem.*, **1998**, *5*, 163-178.

³⁵ Hashimoto, Y., Structural development of biological response modifiers based on thalidomide., *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 461-479.

1.2 核内受容体とステロイド誘導体

転写因子の一種である核内受容体は、リガンドが結合することで細胞核内における転写を制御する機能を有する。ヒトではステロイドホルモン受容体をはじめとした 48 種類の核内受容体が存在することが知られている³⁶。これらは構造や転写活性化機構の類似性が高く、核内受容体スーパーファミリーを形成している。核内受容体は生殖、恒常性維持、脂質・骨等の代謝、免疫調節等、生物の様々な機能を制御している。

核内受容体のうち、ステロイド誘導体を内因性のリガンドとする受容体が幾つか知られている (Figure 2-2)。例えば、estrogen 受容体 (ER)、progesterone 受容体 (PR)、androgen 受容体 (AR) はそれぞれ、ステロイド骨格を有する estrogen、progesterone、testosterone を内在性のリガンドとして認識し、ヒトの発生・生殖等をコントロールしている。糖質コルチコイド受容体 (GR) は、コルチゾールなどの糖質コルチコイドをリガンドとし、糖代謝・抗炎症・免疫抑制作用を制御している。また、鉱質コルチコイド受容体 (MR) は、アルドステロンをリガンドとして認識し、電解質代謝を制御している。vitamin D 受容体 (VDR) については、ステロイドの B 環が開環したセコステロイド骨格を有する活性型 vitamin D₃ を内因性リガンドとし、骨代謝調節や細胞の分化誘導、免疫調節等に関与している。このため活性型 vitamin D₃ は、現在では vitamin であると同時に内因性ホルモンであるとみなされている。

このようにステロイドは多くのターゲットタンパク質に結合して強力な作用を発現するため、天然のマルチテンプレートであるといえる。

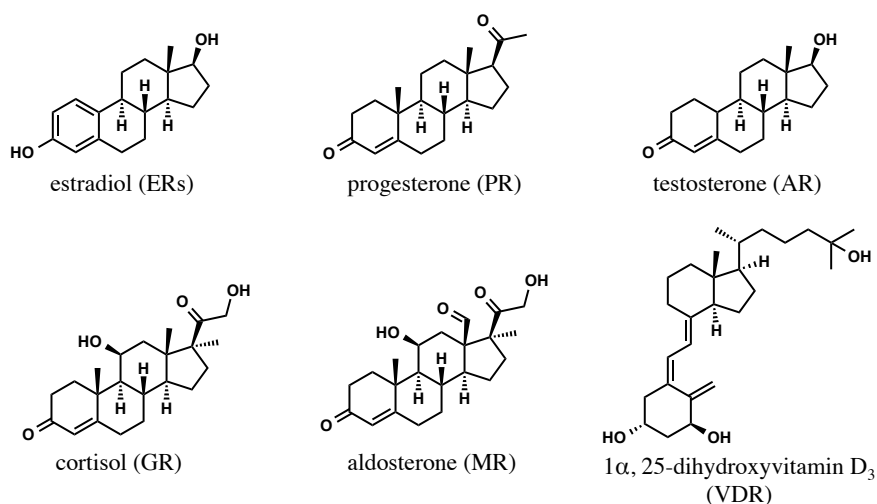


Figure 2-2. 核内受容体の内因性リガンドとしてのステロイド誘導体

³⁶ Maglich, J.M.; Sluder, A.; Guan, X.; Shi, Y.; McKee, D.D.; Carrick, K.; Kamdar, K.; Willson, T.M.; Moore, J.T., Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biol.*, **2001**, 2, RESEARCH0029, 1-7.

1.3 ステロイド代替骨格としてのジフェニルメタン骨格

前述のとおりステロイド誘導体は様々な生理活性を有することから、ステロイド骨格を基盤とした医薬品の研究開発は盛んに行われてきた。その結果、抗がん剤や抗炎症剤等の数多くのステロイド骨格を有する薬剤が臨床で用いられている。しかしながら、ステロイド骨格を有する薬剤またはその代謝物が、本来のターゲット以外のタンパクにも作用し、副作用を生じ易いことが問題となっている。

副作用を回避するため、ステロイド誘導体の構造最適化研究が数多く行われてきたが、合成上の理由から構造展開の自由度が制限されることもあり有用な結果を得ることは困難であると考えられる。そのような中で、近年は非ステロイド型のリガンドの報告も増加してきている。

Figure 2-3 に、非ステロイド型の核内受容体リガンドの一例を示す。

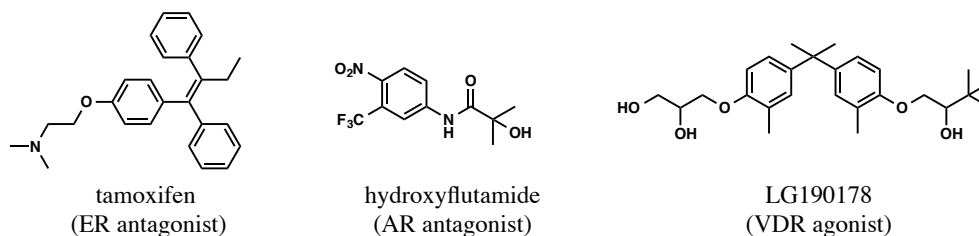


Figure 2-3. Ligands of the steroid hormone receptors with a non-steroidal skeleton.

一方、橋本研究室の細田らは、ジフェニルメタン骨格を有する VDR agonist LG190178 の誘導体研究から、本骨格の化合物の一部が AR antagonist 活性も示すことを見出した³⁷。また、VDR および AR は、ステロイド誘導体を内在性のリガンドとして認識することから、ジフェニルメタン骨格が、天然のマルチテンプレートであるステロイド骨格の代替骨格になり得るという仮説を立て、検証した。その結果、高活性な VDR/AR デュアルリガンド (*R, S*)-DPP 1023³⁷、FXR agonist³⁸、5 α 還元酵素阻害剤³⁹、HMGR 阻害剤の創製に成功し、ジフェニルメタン骨格がステロイド骨格の代替骨格となり得ることを示した (**Figure 2-4**)⁴⁰。

³⁷ Hosoda, S.; Tanatani, A.; Wakabayashi, K.; Makishima, M.; Imai, K.; Miyachi, H.; Nagasawa, K.; Hashimoto, Y., Ligand with a 3,3-diphenylpentane skeleton for nuclear vitamin D and androgen receptors : Dual activities and metabolic activation. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5489-5502.

³⁸ Kainuma, M.; Kasuga, J.I.; Hosoda, S.; Wakabayashi, K.I.; Tanatani, A.; Nagasawa, K.; Miyachi, H.; Makishima, M.; Hashimoto, Y., Diphenylmethane skeleton as a multi-template for nuclear receptor ligands : Preparation of FXR and PPAR ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3213-3218.

³⁹ Hosoda, S.; Hashimoto, Y., 3,3-Diphenylpentane skeleton as a steroid skeleton substitute : Novel inhibitors of human 5 α -reductase 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 5414-5418.

⁴⁰ 細田信之介 ステロイド代替構造となるジフェニルペンタン骨格を用いた生理活性物質の創製 東京大学大学院薬学系研究科 平成 20 年度博士論文

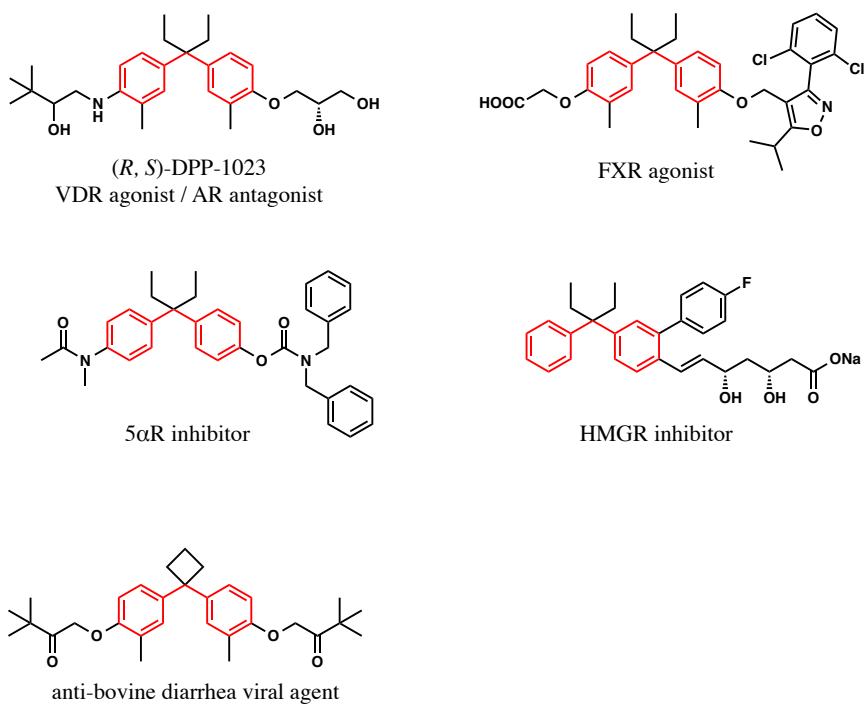


Figure 2-4. ジフェニルメタン骨格（赤色）を有する生理活性物質

そこで、私はマルチテンプレートとしてのジフェニルメタン骨格の更なる拡張を念頭に置き、ジフェニルメタン骨格へケイ素を導入したジフェニルシラン誘導体をデザインし、ケイ素の導入による生理活性への影響の検証を行うこととした (**Figure 2-5**)。本章では、ケイ素を導入した ER リガンドの創製、ステロイド *sulfatase* 阻害剤の創製について述べる。尚、本節の研究は日本化薬株式会社研究員の中村雅陽博士との共同研究である。

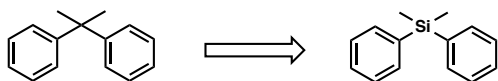


Figure 2-5. ジフェニルメタン骨格へのケイ素の導入

第2節 estrogen 受容体リガンドの創製

2.1 背景

estrogen 受容体 (ER) は核内受容体の一種であり、ステロイドホルモンであるエストラジオール等の estrogen を内因性のリガンドとする。ER には、ER α 及び ER β の2つのサブタイプが存在するが発現部位に差があり、前者は女性生殖器系、後者は前立腺、卵巣に多く存在することが知られている⁴¹。

乳がんには疾患部位に発現するタンパク質の種類等により様々なタイプが有ることが知られており、乳がんの治療方針を決定する際には、ホルモン感受性、HER2⁴² 感受性を指標に分類を行う。本分類によると、乳がん患者の70-80%はステロイドホルモン依存性の乳がんに分類される (Table 2-1)⁴³。また、乳がんの約70%のがん細胞で ER α が高発現しているとの報告があり、このタイプの乳がんでは、乳がん細胞の増殖には ER α が関与していることが示唆されている⁴⁴。現在、抗 estrogen 作用を有する抗がん剤としてタモキシフェン等が用いられているが、タモキシフェンは ER α 及び ER β 両方のサブタイプへ結合することが知られており、選択性に乏しい⁴⁵。近年では、サブタイプ選択的な薬剤の研究も行われている。

Table 2-1. 乳がんの分類^a

	ER+/PR+	ER-/PR-
HER2+	8.5%	6.0%
HER2-	66.6%	19.0%

^a population-based study of the tumor status of women diagnosed with breast cancer in the Stlanta, Georgia, metropolitan area yielded these incidence rates by broad subtype.

ER : estrogen receptor,
HER2 : human epidermal growth factor receptor 2,
PR : progesterone receptor.

⁴¹ Muramatsu, M.; Inoue, S., Estrogen receptors : how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem. Biophys Res. Commun.* **2000**, *270*, 1-10.

⁴² human EGFR (epidermal growth factor receptor) 2

⁴³ Lund, M.J.; Butler, E.N.; Haer, B.Y.; Ward, K.C.; Andrews, J.H.; Oprea-Ilies, G.; Bayakly, A.R.; O'Regan, R.M.; Vertino, P.M.; Eley, J.W., Age/race differences in HER2 testing and in incidence rates for breast cancer triple subtypes : a population-based study and first report. *Cancer*, **2010**, *116*, 2549-2559.

⁴⁴ Fillmore, C.M.; Gupta, P.B.; Rudnick, J.A.; Caballero, S.; Keller, P.J.; Lander, E.S.; Kuperwasser, C., Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2010**, *107*, 21737-21742.

⁴⁵ Liu, X.; Pisha, E.; Tonetti, D.A.; Yao, D.; Li, Y.; Yao, J.; Burdette, J.E.; Bolton, J.L., Antiestrogenic and DNA damaging effects induced by tamoxifen and toremifene metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 832-837.

一方、ポリカーボネート系プラスチックやエポキシ樹脂の原料として用いられている bisphenol A (**2a**) 及びその類縁体は、ER リガンドとして機能することが知られている (**Figure 2-6**)⁴⁶。しかしながら、それらの類縁体の agonist / antagonist 活性に関する構造活性相関、ER α 及び ER β に対する選択性に関する詳細な検討はなされていなかった。

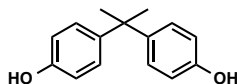


Figure 2-6. bisphenol A (**2a**) の構造

橋本研究室の丸山らは、bisphenol A (**2a**) がジフェニルメタン骨格を有していることに注目し、**2a** 及びその類縁体の ER に対する活性及び選択性を調べることにより、ジフェニルメタン系の化合物に関するマルチプレート手法の拡張に有益な情報が得られると考え構造活性相関研究を行った⁴⁷。活性の評価は、ER レポータージーンアッセイを用いて行い、antagonist 活性は、0.5 nM estradiol 存在下の ER 転写活性に対する阻害率を求めた。**Table 2-2** に ER レポータージーンアッセイ評価結果を示した。

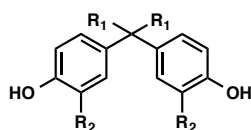
化合物 **1-7** の ER agonist 活性を比較すると、R₁ の置換基が大きくなるに従って、ER α 、 β 共に agonist 活性が消失していく結果となった。ER antagonist 活性については、R₁ にエチル基、*n*-プロピル基、*n*-ブチル基を導入すると活性が向上し、シクロプロパンやシクロペンタン等の環状構造を導入すると活性が低下する傾向が認められた。また、ジフェニルメタン誘導体の ER antagonist 活性は、 α に対する選択性が高い傾向があることも示唆された。ER α の antagonist 活性に着目すると、R₂ にメチル基を導入することで、活性が向上する傾向が確認できた (**8-14**)。しかしながら、R₂ により炭素鎖長の長いエチル基、*n*-プロピル基を導入すると活性が減弱した (**15-20**)。

このように、シンプルな構造をとるジフェニルメタン誘導体だが、置換基変換が容易にでき、それにより ER agonist から antagonist への転換や、ER サブタイプ選択性を制御することが可能であることがわかった。すなわち、本研究の結果より、ジフェニルメタン系化合物のマルチプレート手法においても、置換基を最適化することで、選択性の制御や活性の改善が可能であることが期待される。

⁴⁶ Molina-Milina, J.M.; Amaya, E.; Grimaldi, M.; Sáenz, J.M.; Real, M.; Fernández, M.F.; Balaguer, P.; Olea, N., In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **2013**, 272, 127-136.

⁴⁷ 丸山慶輔 転写制御を志向した化合物の効率的創製 -ジフェニルメタン骨格による展開- 東京大学大学院薬学系研究科 平成 25 年度博士論文

Table 2-2. ジフェニルメタン誘導体の ER レポータージーンアッセイ評価結果



compound	R ₁	R ₂	ER α		ER β	
			EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
1	H		909	(35%) ^b	1910	(24%) ^b
2a	Me		(33%) ^a	(38%) ^b	1115	(25%) ^b
3a	Et		NA	86	(28%) ^a	93
4	<i>n</i> -Pr	H	NA	99	(43%) ^a	2159
5	<i>n</i> -Bu		NA	79	NA	183
6	-(CH ₂) ₄ -		NA	165	NA	271
7	-(CH ₂) ₅ -		NA	518	NA	564
8	H		(23%) ^a	(26%) ^b	5497	NA
9	Me		(31%) ^a	1198	(19%) ^a	(25%) ^b
10a	Et		NA	25	(15%) ^a	264
11a	<i>n</i> -Pr	Me	NA	4.9	NA	140
12a	<i>n</i> -Bu		NA	14	NA	146
13	-(CH ₂) ₄ -		NA	84	NA	765
14	-(CH ₂) ₅ -		NA	227	NA	789
15	Et		NA	232	NA	1307
16	<i>n</i> -Pr	Et	NA	493	NA	2610
17	<i>n</i> -Bu		NA	2945	NA	4533
18	Et		NA	(17%) ^b	NA	(35%) ^b
19	<i>n</i> -Pr	<i>n</i> -Pr	NA	(38%) ^b	NA	(23%) ^b
20	<i>n</i> -Bu		NA	(15%) ^b	NA	(14%) ^b

^a % of maximal activation of E2 at 10 μ M

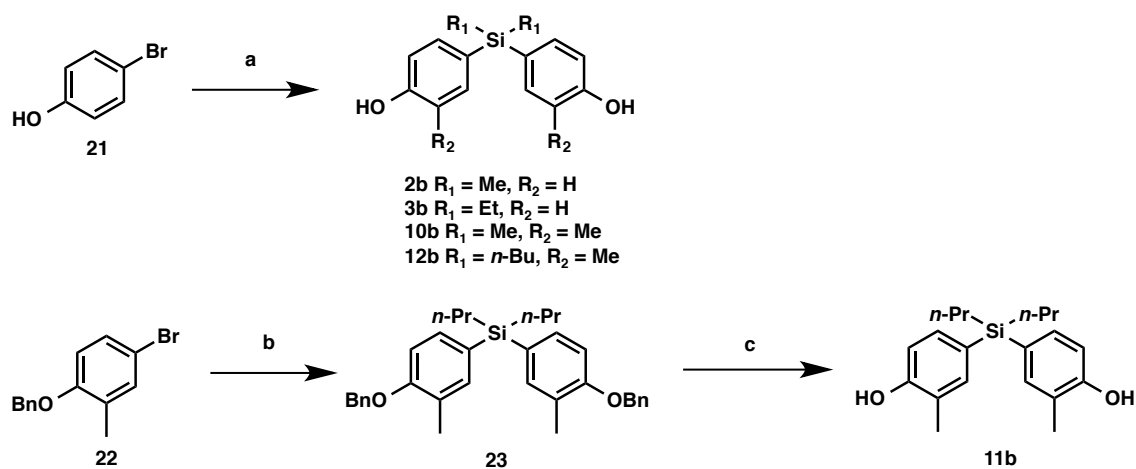
^b % of inhibition at 3 μ M

NA means no activity at 10 μ M

以上のジフェニルメタン系化合物の ER に対する転写活性の評価結果から本節では、ジフェニルメタン骨格の2つの芳香環に挟まれた炭素原子をケイ素に置き換えたジフェニルシラン系の化合物について ER 転写活性を評価し、含ケイ素誘導体に関する新たな知見を得るための研究に着手した。ジフェニルメタン系化合物においても、置換基を最適化することで、選択性の制御や活性の改善が可能であることを検討するため、種々のジフェニルシラン誘導体をデザイン・合成し、ER 転写活性を評価することとした。

2.2 ケイ素誘導体の合成

ケイ素誘導体 4,4'-(dimethylsilanediyl)diphenol (**2b**) は、4-bromophenol (**21**) を、*n*-butyllithium (*n*-BuLi) で処理後、dichlorodimethylsilane と反応させ合成した。尚、この反応は既知反応である。**3b**, **10b** 及び **12b** も、**2b** と同様の手法で合成した。置換基 R¹ に *n*-プロピルを導入した **11b** は、化合物 **22** を *n*-BuLi で処理した後、dichlorodi-*n*-propylsilane を加え、化合物 **23** とし、その後、接触還元により脱ベンジル化することで合成した (Scheme 2-1)。



Scheme 2-1. Synthesis of compound **2b-3b**, **10b-12b**^a

^a Reagents and conditions : (a) *n*-BuLi/hexane, dichlorodialkylsilane, THF, 1 h at 0 °C, 5 h at r.t., 2-45% ; (b) *n*-BuLi/hexane, dichlorodimethylsilane, THF, 1 h at 0 °C, 5 h at r.t., 4.3% ; (c) Pd/C, EtOH, r.t., 3 days, 3.8%.

2.3 ケイ素誘導体の ER 転写活性評価

合成したケイ素誘導体の ER 転写活性評価を行った。活性評価は炭素誘導体の評価と同様の条件下で行った。合成したケイ素誘導体と炭素誘導体の ER 転写活性評価の結果を **Table 2-3** に示す。

ケイ素誘導体の ER agonist 活性は、炭素誘導体の場合と同様に R₁ の置換基が嵩高くなるにつれ減少する傾向が確認できた。ER antagonist 活性に着目すると、ケイ素誘導体よりも炭素誘導体の方が僅かに高い活性を示した。ER α/β への antagonist 活性についてのサブタイプ選択性は、同様の置換基を有している場合を考えるとケイ素誘導体の方が炭素誘導体よりも高い傾向が確認できた。合成したケイ素誘導体のうち、化合物 **10b** は、対応する炭素誘導体と同程度の ER α antagonist 活性を示し、ER β に対する ER α の選択性は約 100 倍となった (ER β に対する活性を IC₅₀ = 3 μM として概算)。

Table 2-3. ジフェニルシラン誘導体の ER レポータージーンアッセイ評価結果

compound	X	R ₁	R ₂	ERα		ERβ		selectivity ERβ (IC ₅₀ /ERα (IC ₅₀))
				EC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^b (nM)	EC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^b (nM)	
1	C	H	H	909	(35%) ^d	1910	(24%) ^d	-
2a	C	Me	H	(33%) ^c	(38%) ^d	1115	(25%) ^d	-
2b	Si	Me	H	(25%) ^c	(51%) ^d	(34%) ^c	NA	-
3a	C	Et	H	NA	86	(28%) ^c	93	1.1
3b	Si	Et	H	(7%) ^c	115	(12%) ^c	(53%) ^c	ca. 8
10a	C	Et	Me	NA	25	(15%) ^c	264	10.6
10b	Si	Et	Me	NA	30	NA	(54%) ^d	ca. 100
11a	C	<i>n</i> -Pr	Me	NA	4.9	NA	140	28.6
11b	Si	<i>n</i> -Pr	Me	(6%) ^c	26	(5%) ^c	804	30.9
12a	C	<i>n</i> -Bu	Me	NA	14	NA	146	10.4
12b	Si	<i>n</i> -Bu	Me	NA	(30%) ^d	NA	NA	-

^a ER-agonistic activity

^b ER-antagonistic activity

^c % of maximal activation of E2 at 10 μM

^d % inhibition at 3 μM

^e % inhibition at 1 μM

NA of EC₅₀ means no activity at 10 μM

NA of IC₅₀ means no activity at 3 μM

2.4 第2節のまとめ

本節では、ER 活性を有するジフェニルメタン誘導体の2つの芳香環に間に位置する炭素をケイ素に置換し、ER agonist 活性及び antagonist 活性、サブタイプ選択性の検討を行った。

諸々の活性評価の結果、ケイ素誘導体と炭素誘導体が示す ER agonist/antagonist 活性の傾向は、類似していることが確認できた。ケイ素誘導体の活性は、炭素誘導体の活性と比較すると減弱する傾向があった。ER α/β への antagonist 活性についてのサブタイプ選択性は、同様の置換基を有する誘導体に着目すると、ケイ素誘導体が炭素誘導体を上回る傾向が確認できた。合成した誘導体のうち、化合物 **10b** は、高い ER α antagonist 活性を示し ($IC_{50} = 30$ nM)、ER β に対する ER α の選択性は約 100 倍であった (**Figure 2-7**)。

本節で得られた構造活性相関の結果から、ジフェニルメタン系の化合物の2つの芳香環の間に位置する炭素をケイ素に置換することで、ER に対する転写活性は若干低下するが、サブタイプ選択性は大きく向上することが示唆された。

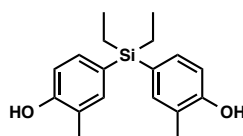


Figure 2-7. 化合物 **10b**

第3節 ステロイド sulfatase 阻害剤の創製への展開

3.1 背景

2.1 項に記載した通り、乳がんの70-80%はステロイドホルモン依存性乳がんであると言われていいる。ホルモン依存性乳がんは、生体内で合成される女性ホルモンである estrogen の作用により増殖することから、「ホルモン療法」と呼ばれる estrogen と競合する抗 estrogen を用いる治療や estrogen 自体の生成量を減らす薬剤 (aromatase 阻害剤等) を用いる治療方法がとられている。また、女性のホルモン依存性乳がんの場合、閉経前後で治療方法が異なり、異なる抗がん剤を使用して治療を進めていく。

閉経前の女性は卵巣の機能が活発であるため、乳がん細胞の増殖を促す女性ホルモンである estrogen は主に卵巣で生合成される。そのため、治療には卵巣での estrogen 生合成を促進する下垂体ホルモンの働きを抑えることで治療を行う。LH-RH (Luteinizing hormone-releasing hormone) agonist⁴⁸がそのような機能を有しており、実際に臨床で使用されている。estrogen と競合して治療効果を発揮する抗 estrogen については、閉経前後いずれにおいても薬効を示すが⁴⁹、薬剤のタイプによっては閉経後乳がんのみを適応に持つものも存在する^{50,51}。閉経後の女性の場合卵巣の機能が低下しているため、副腎から分泌された androgen (男性ホルモン) がもととなり脂肪組織で estrogen の生合成が行われる。androgen から estrogen への変換は、aromatase と呼ばれる酵素を介して行われるため、aromatase の機能を阻害することで治療効果が得られる。実際に、いくつかの aromatase 阻害剤が臨床使用されている (Figure 2-8)⁵²。しかしながら、aromatase 阻害剤による治療だけでは満足な治療効果は得られておらず、新たな作用機序を有する薬剤の開発は喫緊の課題である。

⁴⁸ Nishimura, R.; Anan, K.; Yamamoto, Y.; Higaki, K.; Tanaka, M.; Shibuta, K.; Sagara, Y.; Ohno, S.; Tsuyuki, S.; Mase, T., Efficacy of goserelin plus anastrozole in premenopausal women with advanced or recurrent breast cancer refractory to an LH-RH analogue with tamoxifen : results of the JMTO BC08-01 phase II trial. *Oncology Reports*, **2013**, *29*, 1707-1713.

⁴⁹ ノルバデックス®錠 10, 20 mg 医薬品インタビューフォーム (アストラゼネカ株式会社) 2011年11月改訂

⁵⁰ フェアストン®錠 40, 60 mg 医薬品インタビューフォーム (日本化薬株式会社) 2013年2月作成

⁵¹ Vogel CL, Johnston MA, Capers C, Braccia D., Toremifene for breast cancer : a review of 20 years of data. *Clin Breast Cancer*. **2014**, *14*, 1-9.

⁵² Lønning, P.E.; Eikesdal, H.P. Aromatase inhibition 2013 : clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocr. Relat. Cancer*, **2013**, *20*, R183-201.

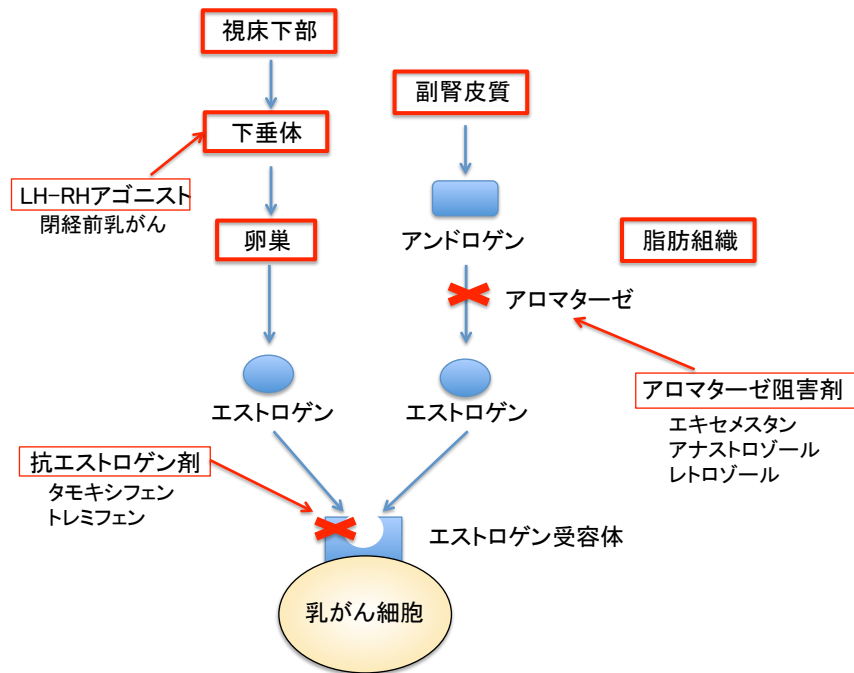


Figure 2-8. 乳がんのホルモン療法

乳がん組織局所での estrogen 合成には、aromatase の他に、steroid sulfatase (STS) と呼ばれる酵素が関与していることもわかってきており、近年、乳がん治療薬を指向した抗がん剤開発の新規のターゲットタンパク質として注目され、盛んに研究されている⁵³。尚、乳がん局所における STS の酵素活性 (pmol/mg protein/hr) は、aromatase の酵素活性と比較すると、数百倍高いことも報告されている⁵⁴。生体内において STS は、血漿中に存在する estrone sulfate (E1S) を認識すると加水分解により脱硫酸エステル化し、estradiol (E2) の前駆体である estrone (E1) へと変換する役割を担う。**Figure 2-9** に示したように、aromatase とは異なる機序で E2 の生合成に関与しており、STS 阻害剤は、aromatase 阻害剤と重複して治療効果を発揮する可能性がある。すなわち、より高い抗腫瘍活性を期待できると考えられる。

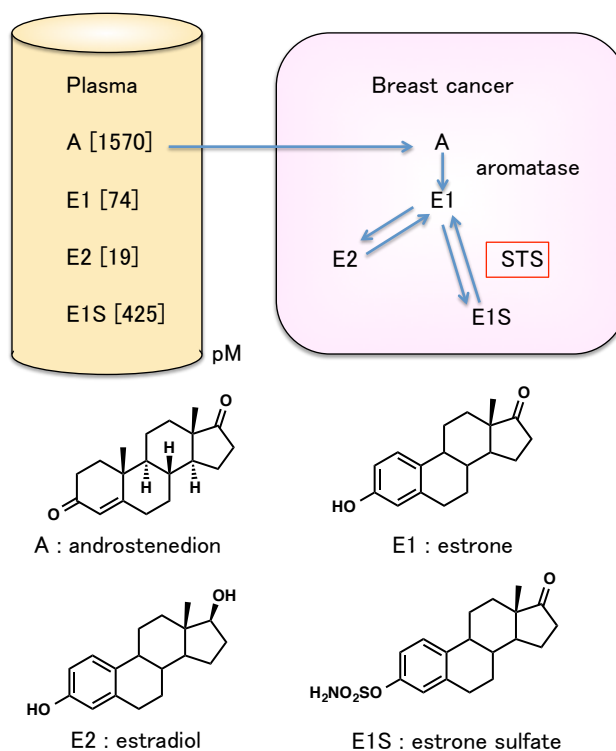


Figure 2-9. 乳がん細胞内の steroid sulfatase 及び aromatase の働き⁵⁵

⁵³ 中田泰介 石田浩幸 塩津行正 ステロイド sulfatase 阻害薬 日本臨床 **2010**, 68, 1073-1078.

⁵⁴ Chetrite, G.S.; Cortes-Prieto, J.; Philippe, J.C.; Wright, F.; Pasqualini, J.R., Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, 72, 23-27.

⁵⁵ Lønning, P.E.; Johannessen, D.C.; Lien, E.A.; Ekse, D.; Fotsis, T.; Adlercreutz, H., Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotrophins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 52, 491-496.

STS 阻害剤については、現在までに報告された幾つかの医薬候補化合物について臨床試験が行われている⁵⁶。EMATE⁵⁷は STS 阻害剤として初めて臨床試験まで進んだ医薬候補化合物であるが、STS を阻害した後に副生する estrone (E1) が estrogen 作用 (ER agonist 作用) を示すことが明らかとなり、臨床試験からドロップアウトした。しかしその後、非ステロイドタイプの STX64⁵⁸ という STS 阻害剤が同研究チームにより新たに創製され、臨床試験に至っている (Figure 2-10)。

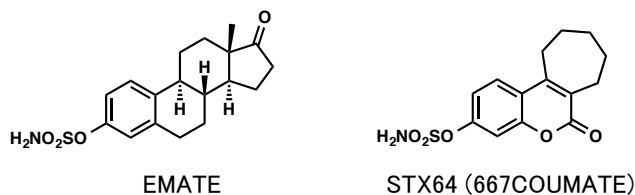


Figure 2-10. EMATE及びSTX64の構造

また、ビスフェノール化合物 **24** も報告されているが⁵⁹、前節で示したビスフェノール誘導体の ER 活性評価から、化合物 **24** の代謝によって生じると思われる化合物 **1** は、ER agonist 活性を有するため、化合物 **24** は、EMATE と同様がんの治療薬としては不適であると考えられる (Figure 2-11)。

Figure 2-12 に、STS 阻害剤の想定される作用機序を示す。いずれの場合も sulfamate 部分が切断され、アルコール (R-OH) が生じる。

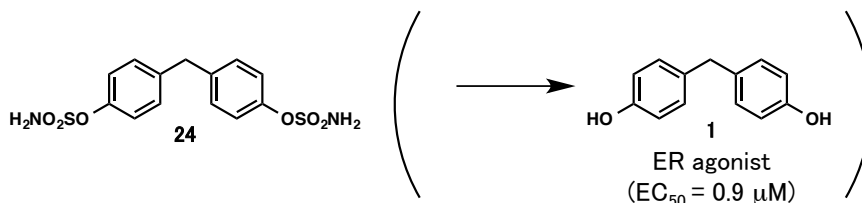


Figure 2-11. ビスフェノールタイプの STS 阻害剤 **24** と推定代謝物 **1**

⁵⁶ Maltais, R.; Poirier, D., Steroid sulfatase inhibitors : a review covering the promising 2000-2010 decade. *Steroids*, **2011**, 76, 929-948.

⁵⁷ Lawrence, W.L.W.; Leblond, B.; Purohit, A.; Potter, B.V., Synthesis and evaluation of analogues of estrone-3-O-sulfamate as potent steroid sulfatase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 2506-2519.

⁵⁸ Woo, L.W.; Ganeshapillai, D.; Thomas, M.P.; Sutcliffe, O.B.; Malini, B.; Mahon, M.F.; Purohit, A.; Potter, B.V., Structure-activity relationship for the first-in-class clinical steroid sulfatase inhibitor Irosustat (STX64, BN83495). *ChemMedChem*, **2011**, 6, 2019-2034.

⁵⁹ Hejaz, H.A.; Woo, L.W.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V., Synthesis, in vitro and in vivo activity of benzophenone-based inhibitors of steroid sulfatase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2759-2772.

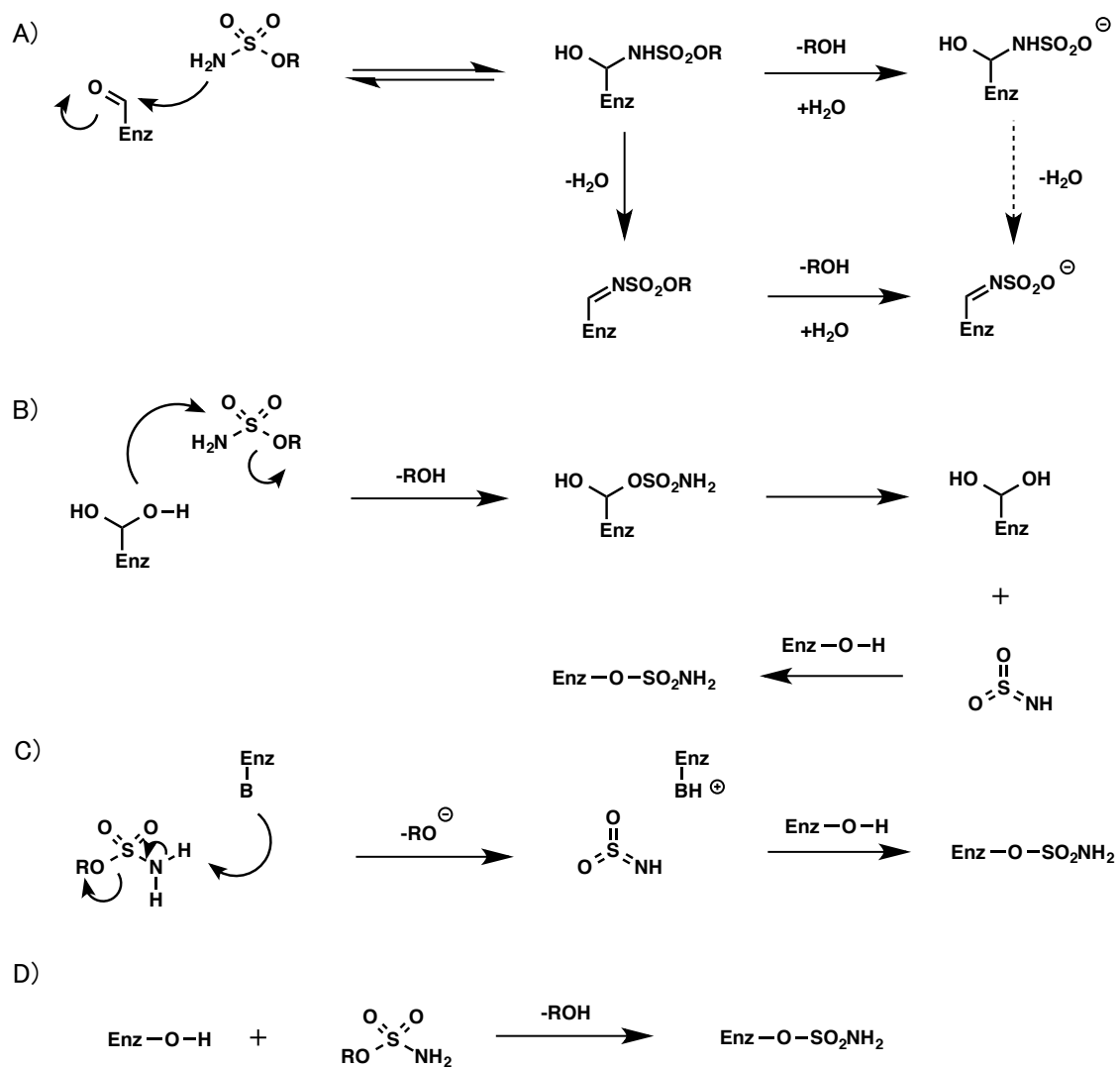


Figure 2-12. ステロイド sulfatase 阻害剤の予想される作用機序⁵⁹

⁵⁹ Ref. 56 に記載図を一部改編

3.2 化合物デザイン

上記のような先行化合物の現状を踏まえ、私は、代謝物であるアルコール（フェノール）が ER antagonist 作用を示すような新規 STS 阻害剤の設計を行うこととした。すなわち、「STS 阻害活性」と「代謝物による ER antagonist 活性」の2つの阻害作用を有する化合物の創製を行うことを計画した (Figure 2-13)。なお、同様の考えに基づく阻害剤が既に報告されていたが、ステロイド骨格を有する化合物であった⁶⁰。

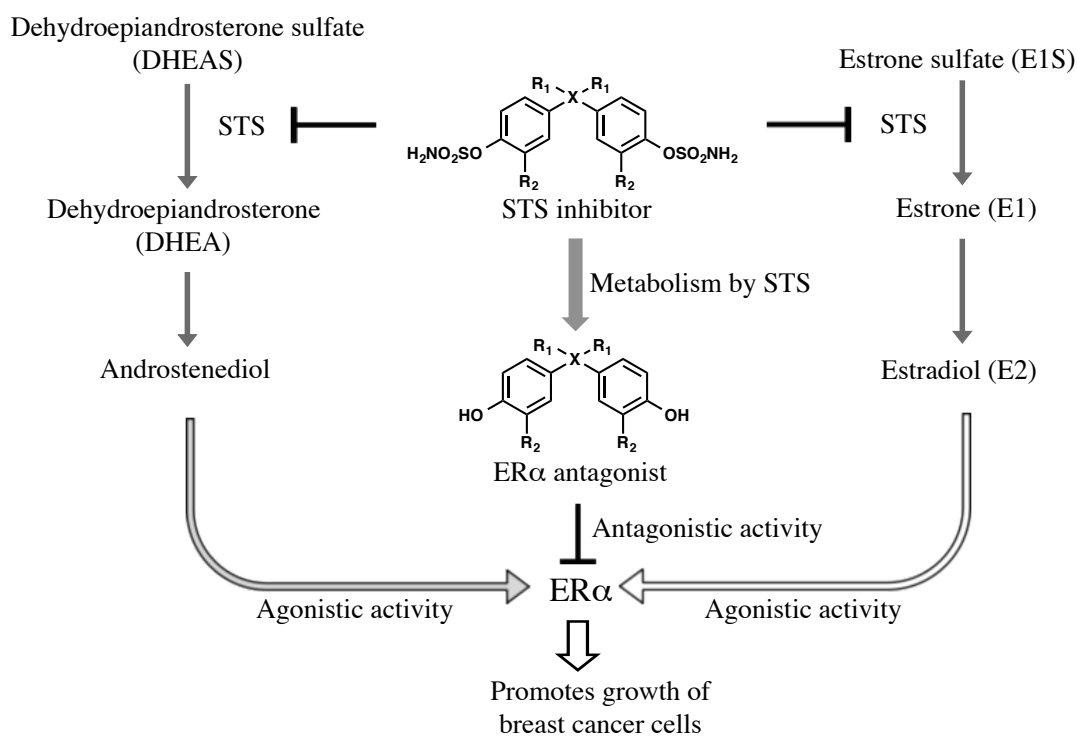


Figure 2-13. 化合物のデザインと作用機序

⁶⁰ Rasmussen, L.M.; Zaveri, N.T.; Stenvang, J.; Peters, R.H.; Lykkesfeldt, A.E., Anovel dual-target steroid sulfatase inhibitor and antiestrogen : SR16157, a promising agent for the therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2007**, *106*, 191-203.

そこで、私は前節で得られた ER 活性を示すジフェニルメタン誘導体の知見を活かし、非ステロイドタイプのジフェニルメタン骨格を有する STS 阻害剤の創製に着手した。

また、前出のビスフェノールタイプの STS 阻害剤 **24** の論文中において、ジフェニルスルフィドタイプの阻害剤 **25** が、化合物 **24** よりも高い STS 阻害活性を示していたことから、2 つのベンゼン環の距離が長くなると STS 阻害活性が高くなると予想し、ケイ素の導入も計画した。以下に、炭素体 **24**、イオウ体 **25**、ケイ素誘導体 **26b** の 2 つのベンゼン環間の距離を示す (Figure 2-14)。予想したとおり、ケイ素誘導体 **26b** の 2 つのベンゼン環間の距離は、炭素体 **24** 及びイオウ体 **25** のベンゼン環間の距離より長いことが確認された。本計算結果より、ケイ素誘導体は高い STS 阻害活性を示すことが期待されたため、種々のケイ素誘導体を合成することを計画した。

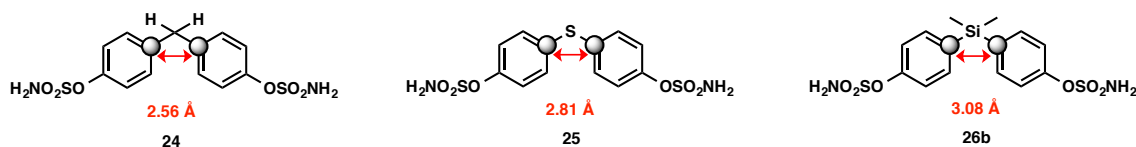
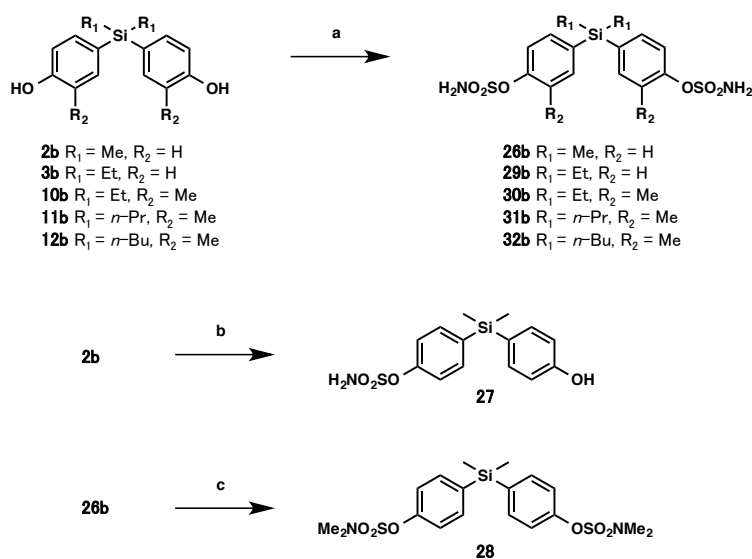


Figure 2-14. 炭素体 **24**、イオウ体 **25**、ケイ素誘導体 **26b** の 2 つのベンゼン環間の距離

3.3 化合物の合成

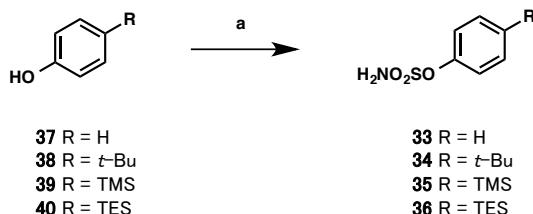
原料のフェノール **2b**, **3b** 及び **10b-12b** は、2.2 項に記載の方法で合成した。目的のジ sulfamate 体 **26b** 及び **29b-32b** は、DMA 中、過剰量の sulfamoyl chloride と反応させることにより合成した。モノ sulfamate 体 **27** は、**2b** を原料に 1.2 当量の sulfamoyl chloride を反応させることにより合成した。ジメチルアミノ体 **28** は、**26b** をヨウ化メチルでメチル化することにより合成した (Scheme 2-2)。



Scheme 2-2. Synthesis of silicon-containing compounds **26b-32b**^a

^aReagents and conditions : (a) excess sulfamoyl chloride, DMA, r.t., 25-47% ; (b) sulfamoyl chloride (1.2 eq.), DMA, r.t., 4 h, 13% ; (c) NaH, CH₃I, DMF, r.t., 19 h, 16%.

STS 阻害活性に対する構造活性相関を得るため、ジフェニルメタン誘導体からベンゼン環を 1 つ除去した以下のモノフェノール型誘導体 **33-36** も同様の方法で合成した (Scheme 2-3)。



Scheme 2-3. Synthesis of phenol analogs **33-36**^a

^aReagents and conditions : (a) excess sulfamoyl chloride, DMA, r.t., 36-56%

3.4 生物評価

3.4.1 酵素阻害活性評価

ステロイド sulfatase の酵素阻害活性は、ヒト乳がん MCF-7 細胞の内在性のステロイド sulfatase を用いて測定することとした。ライセートにした細胞に、トリチウム標識した E1S を加え一定時間インキュベートし、STS により変換された E1 及び E2 を抽出した。その後、抽出液の放射活性を測定することで、酵素の活性を計測した。なお、既知の STS 阻害剤である STX64 を 10 μ M 添加した際の阻害率を 100%とした (Figure 2-15)。

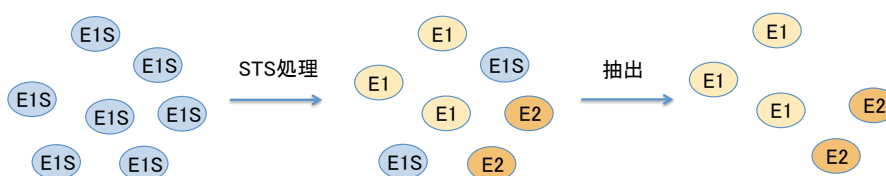


Figure 2-15. STS 酵素阻害活性の測定法

はじめに、デザインしたケイ素誘導体 **26b** 及び文献既知の化合物 **24**, **25** の STS 阻害活性を試験した (Table 2-4)。期待していたとおり、ケイ素誘導体 **26b** は、炭素体 **24** より高い STS 阻害活性を示した。しかしながら、イオウ体 **25** の阻害活性には若干及ばなかった。

Table 2-4. 化合物 **24**, **25** 及び **26b** の STS 阻害活性

compound	X	R ₁	R ₂	STS inhibition (%)	
				0.1 μ M	1 μ M
24	C	H	H	<10	50.1
25	S	-	H	57.1	89.7
26b	Si	Me	H	35.8	81.9
STX64	-	-	-	-	100

ここで、化合物の側鎖の構造が STS 阻害活性に与える影響を調査するため、ケイ素誘導体 **26b** の側鎖を変換した化合物の活性を試験した (Table 2-5)。sulfamate 構造を 1 つ除去した化合物 **27** の STS 阻害活性は、ケイ素誘導体 **26b** と比較して若干低下したものの、高い STS 阻害活性を維持した。一方、両方の sulfamate 構造を除去したビスフェノール **2b** の STS 阻害活性は、ほとんど消失した。同様に、sulfamate の末端アミンをジメチル化した化合物 **28** の STS 阻害活性もほとんど消失した。これらの結果より、STS 阻害活性の発現には、少なくともひとつの sulfamate 構造が必要であることが確認された。

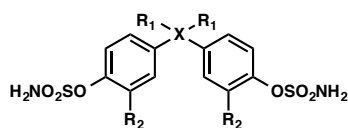
Table 2-5. 化合物 **2b**, **26b**, **27** 及び **28** の STS 阻害活性

compound	R ₃	R ₄	STS inhibition (%)	
			0.1 μM	1 μM
26b	OSO ₂ NH ₂	OSO ₂ NH ₂	35.8	81.9
27	OSO ₂ NH ₂	OH	25.2	76.4
2b	OH	OH	<10	<10
28	OSO ₂ NMe ₂	OSO ₂ NMe ₂	<10	<10

次に、中心原子 X 上及びベンゼン環上の置換基の影響を精査するため、推定代謝物であるフェノール体の ER 活性が既知の母核を有した化合物 **26a-32b** の STS 阻害活性評価を行った (Table 2-6)。中心原子 X 上の置換基 R₁ に関しては、炭素体とケイ素誘導体共に、置換基として Me 基、Et 基は許容されるが、*n*-Pr 基以上の長いアルキル鎖の導入は STS 阻害活性の低下につながる事が明らかとなった。ベンゼン環上の置換基 R₂ については、前節の検討より、R₂ へのメチル基の導入がフェノール誘導体の ER α の antagonist 活性の上昇に寄与することが示唆されている。一方、STS 阻害活性においては、R₂ へのメチル基の導入を行うことにより、若干活性が低下する傾向がみられた。また、評価した化合物群の全体の STS 阻害活性を比較すると、当初の予想通り、ケイ素誘導体の活性は、対応する炭素体の活性より高い傾向があることが確認された。

本節の結果と、第 2 節で示した ER に対する構造活性相関の結果と合わせると、化合物 **30b** が本研究のコンセプトである「STS 阻害活性」と「代謝物による ER antagonist 活性」の 2 つの阻害作用を有する化合物として適切であると考えられる。

Table 2-6. 化合物 **26a-32b** の STS 阻害活性及び化合物 **2a-12b** の ER α antagonist 活性



compound	X	R ₁	R ₂	STS inhibition (%)		metabolites	ER α agonistic activity of
				0.1 μ M	1 μ M		metabolites (bisphenol derivatives)
							IC ₅₀ ^a (nM)
26a	C	Me	H	<10	<10	2a	(38%) ^b
26b	Si	Me	H	35.8	81.9	2b	(51%) ^b
29a	C	Et	H	11	29.9	3a	86
29b	Si	Et	H	62	96.4	3b	115
30a	C	Et	Me	<10	25.4	10a	25
30b	Si	Et	Me	22.6	82.6	10b	30
31a	C	<i>n</i> -Pr	Me	<10	21.1	11a	4.9
31b	Si	<i>n</i> -Pr	Me	<10	18.7	11b	26
32a	C	<i>n</i> -Bu	Me	10.3	28	12a	14
32b	Si	<i>n</i> -Bu	Me	<10	16.4	12b	(30%) ^b

^a ER-antagonistic activity

^b % inhibition at 3 μ M

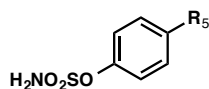
3.4.2 ケイ素導入による影響

STS 阻害剤の創製に関する他の研究グループによる研究結果では、ジフェニルスルフィドタイプの STS 阻害剤 **25** が、炭素誘導体 **24** よりも高い活性を示すことが明らかとなっていた。このことから、2つの芳香環間の距離を広げることで STS 阻害活性が向上すると予想し、炭素をケイ素に置換したジフェニルシラン型誘導体の合成を計画した。実際にジフェニルシラン誘導体の合成、STS 阻害活性評価を実施した結果、期待した通りケイ素誘導体は炭素誘導体より高い活性を示し、ジフェニルスルフィド誘導体と同程度の活性を示した。

以上のような結果を示したことや、ケイ素の導入が生理活性に及ぼす影響等に更なる考察を与えるために、モノフェノールタイプの化合物に sulfamate 構造を導入した誘導体 **33-36** についての STS 阻害活性評価を行った。

実験の結果 phenol 誘導体 **33** 及び *tert*-butyl-phenol 誘導体 **34** の STS 阻害活性は非常に弱いものだったが、TMS-phenol 誘導体 **35** 及び TES-phenol 誘導体 **36** は、高い STS 阻害活性を示した(**Table 2-7**)。以上の実験の結果を考察すると、ベンゼン環が1つの誘導体についても STS 阻害活性が確認できたことから、ジフェニル系化合物についても2つの芳香環間の距離以外にも STS 阻害活性に影響を及ぼす因子が存在し得ると考えられる。

Table 2-7. phenol 誘導体 **33-36** の STS 阻害活性



compound	R ₅	STS inhibition (%)
		1 μM
33	H	11.4
34	CMe ₃	12.4
35	SiMe ₃	68.6
36	SiEt ₃	93.4

前項で述べたように、sulfamate 型阻害剤は STS と結合した後ホルミルグリシン残基と不可逆的に反応し、不活性型 STS に変化させることで STS の本来の活性を阻害することが分かっている (Figure 2-12)。以上のような阻害機構を考慮すると、STS 阻害剤が酵素と反応する際の反応性の強弱により阻害活性が異なってくると考えられる。化合物 34 及び 35 を比較すると、STS を阻害した後に脱離する phenol 37 及び 38 の酸性度はケイ素誘導体の方が高い値を示し (Figure 2-16)、STS のアミノ酸残基による求核反応が起こり易いと考えられる。

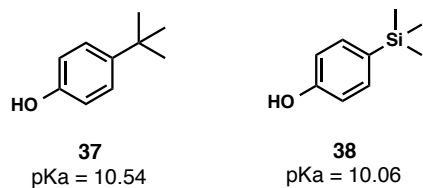


Figure 2-16. 脱離するフェノールの酸性度 (pKa) ¹⁸

3.5 第3節のまとめ

本説では、これまでに得られたジフェニルメタン誘導体の ER に対する agonist/antagonist 活性の評価結果を活かし、閉経後ホルモン依存性乳がん治療薬の創製研究で注目されている STS に対する酵素阻害活性及び ER antagonist 活性を有する化合物の創製に着手した。本研究でデザイン、合成したケイ素誘導体について STS 阻害活性評価を実施した結果、他の研究グループにより創製された STS 阻害剤と同程度の STS 阻害活性を示し、且つ、STS を阻害した後に副生する副生物は有用な ER antagonist 活性を示すジフェニルシラン誘導体 **30b** の創製を達成した (Table 2-8)。

Table 2-8. リード化合物 **24** 及び **25** と得られたケイ素誘導体 **30b** の活性のまとめ

compound	X	R ₁	R ₂	STS阻害活性 IC ₅₀ (μM)	ERに対する代謝物の活性
24	C	H	H	1.02	agonist
25	S	-	H	0.09	agonist
30b	Si	Et	Me	0.17	antagonist (ERα : IC ₅₀ = 30 nM)

第3章 シス二重結合の新規バイオイソスターの開拓

第1節 研究背景

本章では、ケイ素の原子サイズや炭素原子との結合距離の長さが炭素とは異なることに着目し、ケイ素リンカー (-Si-) の創薬化学、医薬化学における有用性を示す。周期表上では炭素と同族元素であるケイ素原子は、炭素と似た性質を有する一方で炭素原子よりも原子サイズが大きいことが知られている。炭素ケイ素結合及び炭素炭素結合の結合距離はそれぞれ 1.87 Å、1.54 Å であり、前者の方が長い⁶¹。一方、炭素炭素二重結合、すなわちオレフィン構造を有する化合物は、異性化により目的に適さない異性体に変化したり、生体内での代謝により活性が消失したりする問題が生じることがあり、安定性に問題を抱える例が多く存在する。

以上のようなケイ素の性質を鑑み、シスオレフィン構造のバイオイソスターとしてケイ素リンカー (-Si-) が利用できないかと考え、本章の研究に着手した (Figure 3-1)。次節以降では、既知の tubulin 重合阻害剤に着目し、スチルベン構造中に不安定なシスオレフィン構造を有する tubulin 重合阻害剤 combretastatin へのケイ素リンカーを導入し、合成した combretastatin 誘導体の生理活性および安定性の評価の結果について記す。尚、本節の研究は日本化薬株式会社研究員の中村雅陽博士との共同研究である。

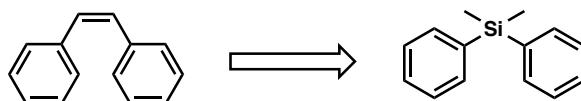


Figure 3-1. olefin 構造のケイ素リンカーによる置き換え

⁶¹ Franz, A.K.; Wilson, S.O., Organosilicon Molecules with Medicinal Applications. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 388-405.

第2節 tubulin 重合阻害剤 combretastatin A-4 が有するオレフィン構造のケイ素リンカーへの置き換え

2.1 背景

Combretastatin は、1980 年代に南アフリカの樹木である *Combretum caffrum* から単離された天然物である (Figure 3-2)。combretastatin は、tubulin の colchicine サイトを認識、結合し、細胞内における tubulin の重合を阻害する活性を有することが明らかとなったことから⁶²、その後数多く combretastatin 誘導体の単離や合成が実施されてきた。tubulin の重合は細胞分裂において紡錘体の形成に必須であることから、tubulin の重合を阻害された細胞はそこで細胞分裂がストップする。これまでに合成された combretastatin 誘導体のうち、combretastatin A-4 (CA-4 (39)) は非常に強力な抗腫瘍活性を示すことが明らかとなっている⁶³。また、CA-4 (39) は、血管内皮細胞にも影響を及ぼし、血流抑制活性を示すことも報告されている⁶⁴。現在までに臨床応用に至ったものはないが、CA-4 のリン酸プロドラッグである CA-4P (40) についての臨床試験が実施されている⁶⁵。

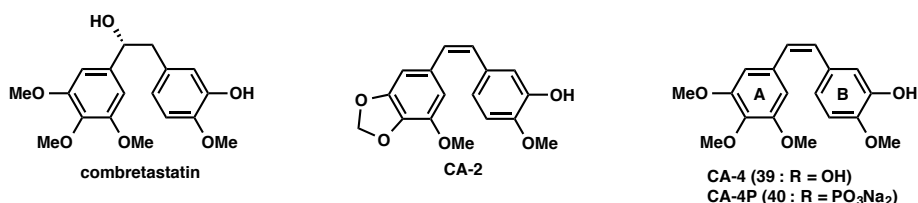


Figure 3-2. コンブレタスタチン誘導体

⁶² Pettit, G.R.; Cragg, G.M.; Herald, D.L.; Schmidt, J.M.; Lohavanuaya, P., Isolation and structure of combretastatin. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1374-1376.

⁶³ Pettit, G.R.; Singh, S.B.; Boyd, M.R.; Hamel, E.; Pettit, R.K.; Schmidt, J.M.; Hogan, F., Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5, and A-6 (1a)., *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1666-1672.

⁶⁴ Nielsen, T.; Bentzen, L.; Pedersen, M.; Tramm, T.; Rijken, P.F.; Bussink, J.; Horsman, M.R., assessed using MRI-based vessel size imaging., *Clin. Cancer Res.*, **2012**, *18*, 6469-6477.

⁶⁵ Zweifel, M.; Jayson, G.C.; Reed, N.S.; Osborne, R.; Hassan, B.; Ledermann, J.; Shreeves, G.; Poupard, L.; Lu, S.P.; Balkissoon, J.; Chaplin, D.J.; Rustin, G.J., Phase II trial of combretastatin A4 phosphate, carboplatin, and paclitaxel in patients with platinum-resistant ovarian cancer., *Ann. Oncol.*, **2011**, *22*, 2036-2041.

CA-4 (39) はその抗腫瘍活性については目を見張るものがあるものの、分子内にシスオレフィン構造を有しており、薬剤の保存時や投与時に化学的により安定なトランス型へと異性化することが報告されている (Figure 3-3)^{66,67}。異性化したトランス型の CA-4 (39) の抗腫瘍活性は低く、抗がん剤としては不適切である。そこで、この異性化反応の問題を解決するために、CA-4 のオレフィン構造を他の化学的に安定な構造へ変換した化合物の創製がいくつかの研究グループにより試みられている⁶⁸。本研究と類似のコンセプトを基に進められた研究としては、Dos Santos Edos A らによる、S や Se を導入した tubulin 重合阻害剤の創製研究がある⁶⁹。

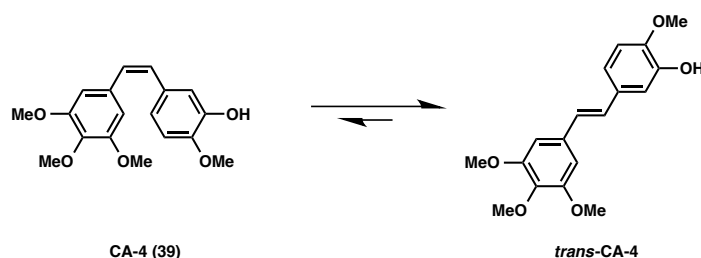


Figure 3-3. CA-4 (39) の異性化反応

⁶⁶ Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T. Syntheses and antitumor activity of cis-restricted combretastatins: Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Fujita, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Nihei, Y.; Suga, Y.; Morinaga, 5-membered heterocyclic analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3153-3158.

⁶⁷ Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Chakraborti, A.K.; Lin, C.M.; Hamel, E. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2579-2588.

⁶⁸ Tron, G.C.; OPirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A.A., Medicinal chemistry of combretastatin A4 : present and future directions., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044.

⁶⁹ Dos Santos Edos A.; Hamel, E.; Bai, R.; Burnett, J.C.; Tozatti, C.S.; Bogo, D.; Perdomo, R.T.; Antunes, A.M.; Marques, M.M.; Matos Mde F.; de Lima, D.P. Synthesis and evaluation of diaryl sulfides and diaryl selenide compounds for antitubulin and cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4669-4673.

2.2 化合物デザイン・計算化学

第1章等でも述べた通り、ケイ素原子は炭素原子より大きいことから、炭素ケイ素結合は炭素炭素結合よりも長いことが分かっている。私はこの様な炭素とケイ素の原子サイズの違いに注目し、CA-4 (39) のシスオレフィンをケイ素リンカーへと置換し、その生理活性や化学的性質を明らかにするべく、ケイ素誘導体 41 をデザインした。

まず私は化合物 41 及び 42 の2つの芳香環間の距離を計算した。Gaussian 09 program を用いて構造を最適化し、MP2/6-31+G*level により計算を実施した⁷⁰。計算実験の結果を、Figure 3-4 に示す。仮説どおり、ケイ素誘導体 41 の距離は、CA-4 (39) のシスオレフィンの長さと同程度の値を示した。一方、対応する炭素誘導体 42 の距離は短く、CA-4 (39) 及びケイ素誘導体 41 の距離には及ばなかった。

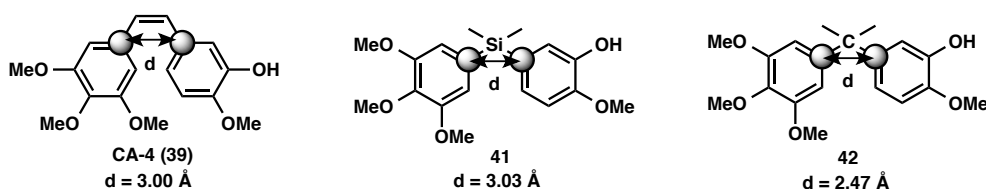


Figure 3-4. コンブレタスタチンとジフェニル系誘導体の結合距離の計算結果

⁷⁰ Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, Jr. J.A.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; and Pople, J.A.; Wallingford, C.T. *Gaussian 09* (Revision-A.01), Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, (2009)

続いて、ケイ素誘導体 **41** 及び CA-4 (**39**) と tubulin タンパク質の結晶構造 (PDB ID : 1SA0)⁷¹ のドッキングシミュレーションを実施した。実験には AutoDock 4.2^{72,73} を用いた。シミュレーションの結果は **Figure 3-5** に示した。結果の作画には、PyMOL software⁷⁴ を用いた。

colchicine 結合サイトは、 α tubulin と β tubulin のヘテロダイマーに存在する深い溝状のサイトであることが報告されている⁷⁵。仮説通り、ケイ素誘導体 **41** 及び CA-4 (**39**) は、tubulin タンパク質の colchicine 結合サイトにおいてよく重なって結合し、どちらの化合物も tubulin タンパク質のアミノ酸残基 Cys241 及び Val181 と水素結合し得ることが示唆された。以上のシミュレーションの結果より、CA-4 (**39**) をベースにデザインしたケイ素誘導体 **41** は CA-4 (**39**) と同様強力な tubulin 重合阻害活性を示すと予想し、ケイ素誘導体 **41** とその類縁体をデザイン、合成し、それらの生理活性評価を行うこととした。

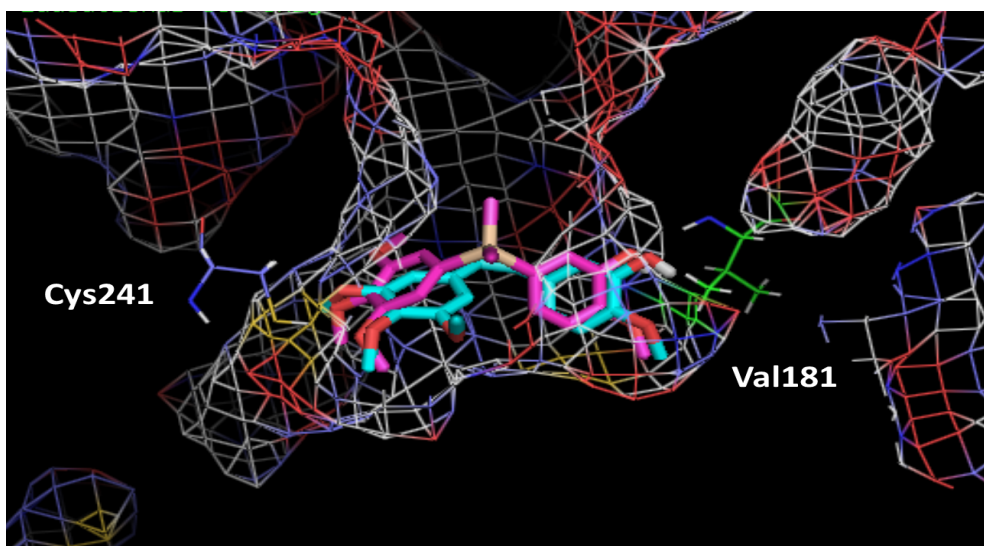


Figure 3-5. CA-4 (**39**) (aqua)とケイ素誘導体 **41** (pink) のドッキングモデル

⁷¹ Ravelli, R.B.; Gigant, B.; Curmi, P.A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.

⁷² Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 2009, *30*, 2785-2791.

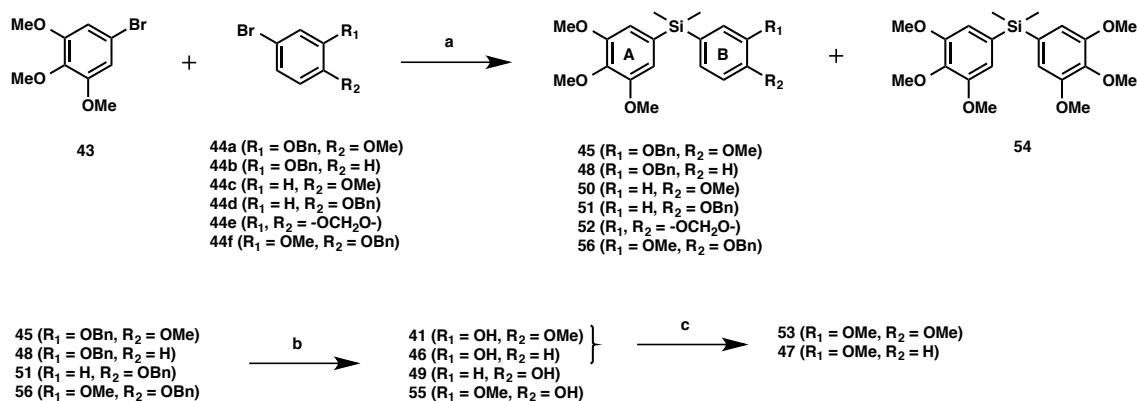
⁷³ Cosconati, S.; Forli, S.; Perryman, A.L.; Harris, R.; Goodsell, D.S.; Olson, A. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. *J. Expert Opin. Drug Discovery* **2010**, *5*, 597-607.

⁷⁴ DeLano, W. The PyMol Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC: San Carlos, CA, USA, <<http://www.pymol.org>>.

⁷⁵ Massaroti, A.; Coluccia, A.; Silvestri, R.; Sorba, G.; Brancale, A., The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective. *ChemMedChem*. **2012**, *7*, 33-42.

2.3 ジフェニルシラン誘導体の合成

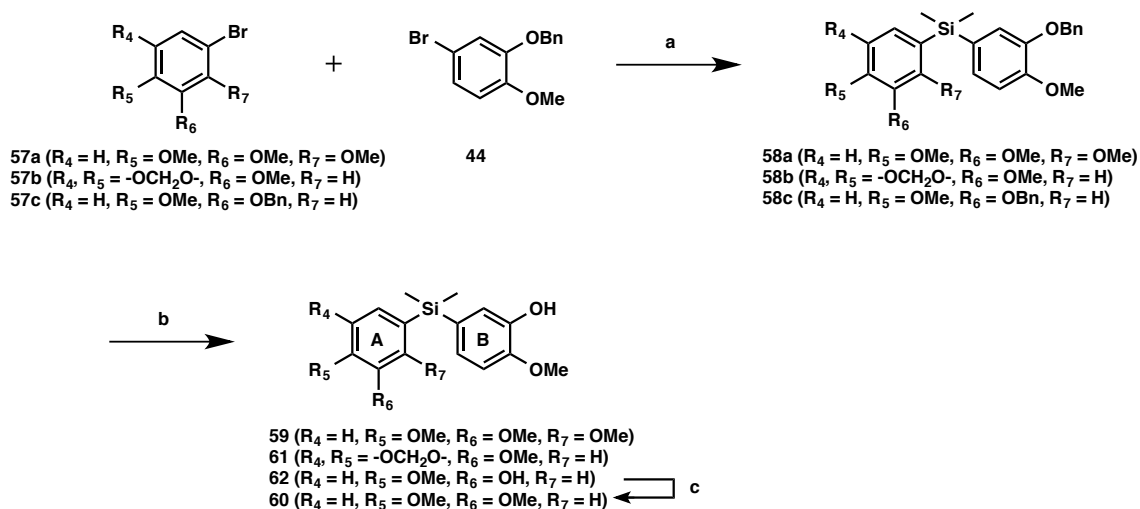
前項での結合距離の計測及びドッキングシミュレーションによって得られた結果から、まず、ケイ素誘導体 **41** の合成を行うこととした。また、combretastatin 誘導体が A 環に有する 3 つの methoxy 基は活性発現に重要であることが報告されていることから⁶⁸、A 環の置換基は CA-4 (**39**) と同様にし、B 環上の置換基を種々の置換基に変換した誘導体の合成を行うこととした。これらの化合物の合成方法は、Scheme 3-1 に示した。原料の bromobenzene **44a**, **44b** 及び **44f** は対応する phenol の bromo 化によって合成した。diallyldimethylsilane は 3, 4, 5-tribromobenzene (**43**) と bromobenzene (**44a-f**) を *n*-butyllithium (*n*-BuLi) で処理した後に、dichlorodimethylsilane と反応させることにより合成した。化合物 **41**, **46**, **49** 及び **55** は化合物 **45**, **48**, **51** 及び **56** の脱 benzyl 化により合成した。化合物 **53** 及び **47** は、化合物 **41** 及び **46** の methyl 化によりそれぞれ合成した。



Scheme 3-1. Synthesis of silicon-containing compound **41** and its B-ring-modified derivatives **45-56**.^a

^a Reagents and conditions : (a) dichlorodimethylsilane, *n*-BuLi, THF, -70 °C to r.t., 12-42% ; (b) H₂, Pd/C, EtOH, r.t., 33-88% ; (c) iodomethane, K₂CO₃, acetone, reflux/sodium hydride, DMF, 41-66%.

次に、化合物 **41** の A 環上置換基を変換し、その最適化を試みた。化合物 **59-62** についても、上記の誘導体と同様の手法で合成した (Scheme 3-2)。



Scheme 3-2. Synthesis of the A-ring-modified derivatives **59-62**.^a

^a Reagents and conditions : (a) dichlorodimethylsilane, *n*-BuLi, THF, -70 °C to r.t. ; (b) H₂, Pd/C, EtOH, r.t., 5-36% (2 steps) ; (c) iodomethane, K₂CO₃, acetone, reflux, 15%.

続いて私はケイ素上の置換基の変換を行い、最適化することとした。誘導体 **64a-b** は、diallyldimethylsilane 誘導体 (**45, 48, 50-52** 及び **56**) の合成と同様の方法で、dichlorodiethylsilane **63a** 及び dichlorosilacyclobutane **63b** をそれぞれ原料に用いて合成した (Scheme 3-3)。

Diallyldimethylsilane **65** は、化合物 **64a** の脱 benzyl 化により容易に合成可能であった。一方、化合物 **64b** の脱 benzyl 化を、ethanol/ethyl acetate 混合溶媒下で実施した結果、ethanol が付加した誘導体 **66** が得られた。そこで、**64b** の脱 benzyl 化を ethyl acetate 単独で行い、目的の化合物 **67** を得ることができた。

Diallyldimethylsilane **69** は methoxymethyl (MOM) ester より、2 steps で合成した。対応する炭素誘導体 **73** は、isoerianin と呼ばれる既知化合物⁷³であり、原料の化合物 **71** を trimethylaluminium で処理することで得られる olefin **72** を還元することによって合成した。

⁷³ Petrov, O.I.; Gerova, M.S.; Chaney, C.D.; Petrova, K.V. New Efficient Synthesis of Combretastatin A-4 via Colvin Rearrangement., *Synthesis.*, **2011**, 22, 3711-3715.

2.4 tubulin 重合阻害活性及び細胞増殖抑制活性評価

はじめに、合成した化合物の tubulin 重合阻害 (Tubulin polymerization-inhibitory : TPI) 活性評価を行った。TPI 活性の評価は、ブタ脳由来の tubulin を用いる他の研究グループにより報告されている評価方法^{74, 75}により行った。評価対象の化合物については濃度を 30 μM に固定して評価した。続いて、合成した種々の化合物についてヒト乳がん MCF-7 細胞に対する細胞増殖抑制活性評価^{76, 77}を実施した。尚、腫瘍細胞増殖抑制活性は IC_{50} 値を示す。

CA-4 (**39**)、化合物 **41** 及びその B 環を変換した化合物 **45-56** の生理活性評価結果を、Table 3-1 に示した。評価化合物の濃度を 30 μM にとした TPI 活性評価において、CA-4 (**39**) は 66% の tubulin 重合阻害活性を示した。シスオレフィンにケイ素リンカーに置換したケイ素誘導体 **41** は期待したとおり、同じく 30 μM で 62% の阻害活性を示した。すなわち、化合物 **41** は、CA-4 (**39**) と同等の tubulin 重合阻害活性を示すことが認められた。ケイ素化合物 **41** の誘導体においては、化合物 **41** の hydroxyl 基を benzyl ester に変換した化合物 **45** は活性を示さなかった。化合物 **41** の B 環上の置換基 R_2 の methoxy 基を取り除いた誘導体 **46** は tubulin 重合阻害活性を示さなかった。同じく、置換基 R_2 の methoxy 基を持っていない化合物 **47** 及び **48** にも、活性は認められなかった。これらのことから、B 環上の置換基 R_2 の methoxy 基は、TPI 活性発現に必要不可欠であると予想できる。ケイ素誘導体 **41** の置換基 R_1 の hydroxyl 基を取り除いた誘導体 **50** の tubulin 重合阻害活性は、ケイ素誘導体 **41** の活性より減弱する結果となった。また、置換基 R_1 に hydroxyl 基を持たない誘導体 **49, 51** 及び **53** は、微弱な活性を示した。methylenedioxy 誘導体 **52** も、微弱な活性を示した。以上の tubulin 重合阻害活性評価の結果から、B 環上の置換基 R_1 の変換は、tubulin 重合阻害活性の低減につながることを示唆された。置換基 R_3 に methoxy 基を新たに導入した trimethoxy 化合物 **54** には活性は認められなかった。ケイ素化合物 **41** の methoxy 基と hydroxyl 基の位置を入れ替えた化合物 **55** の活性は、大きく減弱する結果となった。ケイ素誘導体 **55** の hydroxyl 基を benzyl 化した誘導体 **56** は、微弱ながら tubulin 重合阻害活性を示した。

⁷⁴ Development of tubulin-polymerization inhibitors based on the thalidomide skeleton. Chem. Pharm. Aoyama, H.; Noguchi, T.; Misawa, T.; Nakamura, T.; Miyachi, H.; Hashimoto, Y.; Kobayashi, H. Bull. **2007**, *55*, 944-949.

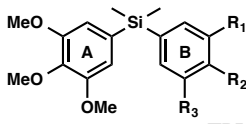
⁷⁵ Li, Y.; Kobayashi, H.; Tokiwa, Y.; Hashimoto, Y.; Iwasaki, S. Interaction of Phomopsin a with porcine brain tubulin: Inhibition of tubulin polymerization and binding at a rhizoxin binding. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 219-224.

⁷⁶ Borrel, C.; Thoret, S.; Cachet, X.; Guénard, D.; Tillequin, F.; Koch, M.; Michel, S. New antitubulin derivatives in the combretastatin A4 series: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3853-3864.

⁷⁷ O'Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Bergin, O.; Nathwani, S.M.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. Synthesis and evaluation of azetidione analogues of combretastatin A-4 as tubulin targeting agents. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8569-8584.

ヒト乳がん MCF-7 細胞の細胞増殖抑制活性評価について、CA-4 (39) は、非常に強力な細胞増殖抑制活性を示した。ケイ素誘導体 41 も、強力な細胞増殖抑制活性を示したが、CA-4 (39) の活性には及ばなかった。ケイ素誘導体 41 の B 環上 methoxy 基を取り除いた化合物 46 は、TPI 評価の結果と同様細胞増殖抑制活性も確認できなかった。置換基 R₁ の hydroxyl 基を除去した化合物 50 では、ケイ素誘導体 41 と比較して活性は低下した。化合物 52、53 の IC₅₀ は、それぞれ 1.12 及び 0.49 μM であり、CA-4 に及ばないまでも細胞増殖抑制活性を示すことがわかった。B 環が trimethoxy 基を有する化合物 54 には、活性は認められなかった。ケイ素誘導体 41 の methoxy 基と hydroxyl 基の位置を入れ替えた化合物についても、細胞増殖抑制活性を示さなかった。以上の細胞増殖抑制活性評価の結果から、tubulin 重合阻害活性と腫瘍細胞増殖抑制活性は、ある程度相関していることがわかった。完全に相関した結果が得られないことについては、非細胞系で実験した TPI 活性評価と、細胞系で実験を行った細胞増殖抑制活性評価において後者では細胞膜透過性も考慮する必要があるため、化合物の疎水性/親水性、分子サイズ等が活性に影響を及ぼすことが考えられる。

Table 3-1. Tubulin polymerization-inhibitory activity and tumor cell growth-inhibitory activity of compound 41 and its B-ring modified derivatives 45-56.



compound	R ₁	R ₂	R ₃	TPI assay ^a Inhibition (%) at 30 μM	MCF-7 assay ^b IC ₅₀ (μM)
CA-4 (39)	-	-	-	66	0.004
41	OH	OMe	H	62	0.043
45	OBn	OMe	H	NA ^c	>30
46	OH	H	H	NA ^c	>30
47	OMe	H	H	NA ^c	(52% at 30 μM)
48	OBn	H	H	NA ^c	(57% at 30 μM)
49	H	OH	H	2	>30
50	H	OMe	H	30	0.15
51	H	OBn	H	4	24.9
52	-OCH ₂ O-		H	14	1.12
53	OMe	OMe	H	11	0.49
54	OMe	OMe	OMe	NA ^c	>30
55	OMe	OH	H	1	>30
56	OMe	OBn	H	4	25.3

^a Tubulin polymerization-inhibitory activity.

^b Tumor cell growth-inhibitory activity against human breast cancer cell line MCF-7. Assays were performed in triplicate.

^c No activity was observed in the concentration range examined.

次に、A 環上の置換基を変換した誘導体 **59-62** の TPI 活性評価及び細胞増殖抑制活性評価を行った (Table 3-2)。ケイ素誘導体 **41** の A 環置換基 R₄ の methoxy 基を置換基 R₇ に移動させた化合物 **59** の活性は、TPI 活性、細胞増殖抑制活性共に化合物 **41** と比べて低下する結果となった。dimethoxy 化合物 **60** には、微弱ながら活性が認められた。CA-2 系の誘導体 **61** は、若干の TPI 活性を示したが、細胞増殖抑制活性は化合物 **41** と比べて、大きく低下する結果となった。左右対称となるよう置換基を導入した **62** にも、微弱な活性は認められなかった。A 環上の置換基の検討結果より、ケイ素化合物 **41** の 3, 4, 5-trimethoxy 基は CA-4 (**39**) と同様 TPI 活性及び細胞増殖抑制活性の発現に重要であることが認められた。

Table 3-2. Tubulin polymerization-inhibitory activity and tumor cell growth-inhibitory activity of the A-ring modified derivatives **59-62**.

compound	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	TPI assay ^a Inhibition (%) at 30 μM	MCF-7 assay ^b IC ₅₀ (μM)
CA-4 (39)	-	-	-	-	66	0.004
41	OMe	OMe	OMe	H	62	0.043
59	H	OMe	OMe	OMe	25	0.74
60	H	OMe	OMe	H	5	5.52
61	-OCH ₂ O-		OMe	H	27	(11% at 1 μM)
62	H	OMe	OH	H	12	9.24

^a Tubulin polymerization-inhibitory activity.

^b Tumor cell growth-inhibitory activity against human breast cancer cell line MCF-7. Assays were performed in triplicate.

ケイ素誘導体 **41** のケイ素上の置換基の最適化の結果を Table 3-3 に示す。TPI 活性評価において、化合物 **41** (R = Me, R' = Me) は強い活性を示した。一方、化合物 **65** 及び **66** は、化合物 **41** と比較して活性が減弱した。以上の化合物の評価結果から、ケイ素上へ嵩高い置換基を導入することで立体障害が生じ、活性が低下すると考えられる。そこで、私は、silacyclobutane 化合物 **67** 及び methylsilane 化合物 **69** のデザイン・合成及び評価を実施した。ケイ素誘導体 **69** と比較するため、isoerianin と呼ばれる対応する炭素誘導体 **73** の合成も実施した。その結果予想通り、化合物 **67** は極めて高い TPI 活性を示すことが確認できた。また、化合物 **69** 及び **73** の TPI 活性は、若干減弱した。

ヒト乳がん MCF-7 細胞に対して細胞増殖抑制活性評価を実施した結果、誘導体 **65** 及び **66** は、TPI 活性評価の際と同様に、化合物 **41** よりも細胞増殖抑制活性が減弱した。silacyclobutane 化合物 **67** は TPI スクリーニング評価において最も高い TPI 活性を示したが、化合物 **67** の細胞増殖抑制活性は、化合物 **41** に僅かに及ばず、若干減弱するという結果となった。methylsilane 化合物 **69** は、極めて強力な細胞増殖抑制活性を示した。また、対応する炭素誘導体 **73** の細胞増殖抑制活性は、ケイ素誘導体 **69** の活性よりも約 10 倍程度低い結果となった。本結果は、ケイ素リンカーが、シスオレフィンのバイオアイソスターとして機能するという仮説を支持するものである。

Table 3-3. Effects of modification of substituent groups on silicon in **41**. Tubulin polymerization-inhibitory activity and tumor cell growth-inhibitory activity of compounds **65-67**, **69** and **73**.

compound	X	R	R'	TPI assay ^a Inhibition (%) at 30 μM	MCF-7 assay ^b IC ₅₀ (μM)
CA-4 (39)	-	-	-	66	0.004
41	Si	Me	Me	62	0.043
65	Si	Et	Et	16	1.71
66 ^c	Si	Pr	OEt	5	0.58
67	Si	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -		87	0.062
69 ^c	Si	Me	H	51	0.007
73 ^c	C	Me	H	54	0.075

^a Tubulin polymerization-inhibitory activity.

^b Tumor cell growth-inhibitory activity against human breast cancer cell line MCF-7. Assays were performed in triplicate.

^c Racemic mixture.

これまでに得られた CA-4 を基盤としたジフェニルシラン誘導体の構造活性相関の結果を、**Figure 3-6** にまとめる。合成したケイ素含有化合物の構造活性相関の結果は、シスオレフィンを有する CA-4 誘導体の構造活性相関の結果と類似していることがわかった。

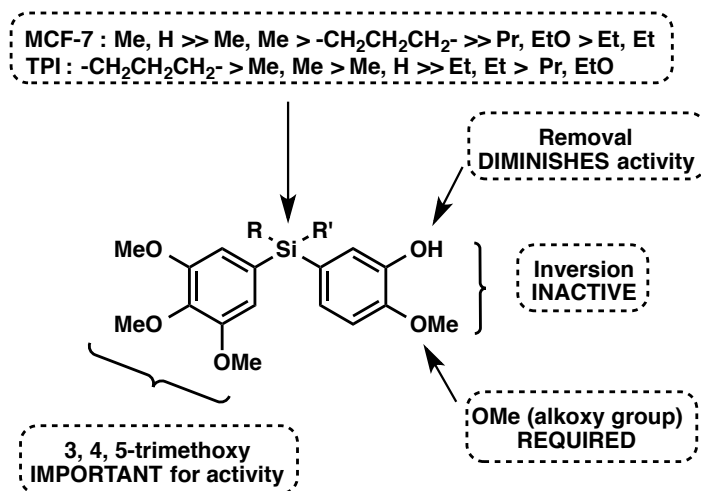


Figure 3-6. Structure-activity relationships of the synthesized compounds.

2.5 colchicine 結合部位への結合試験

合成したジフェニル系誘導体について tubulin 上の結合サイトを同定する目的で、トリチウム標識された colchicine ($[^3\text{H}]$ colchicine) を用いた競合試験を行った⁷⁸。合成した種々の化合物の中でも代表的なものについて、結合試験及び TPI 活性評価における IC_{50} 値を **Table 3-4** に示した。

colchicine との結合評価試験において、CA-4 (**39**) は、colchicine の tubulin に対する結合を非常に強く阻害した。含ケイ素誘導体 **41** 及び **67** は、3 μM でそれぞれ 46.6%及び 88.1%の阻害活性を示し、概ね TPI 活性評価の結果と相関していた。細胞増殖抑制活性評価において最も高い活性を示した methylsilane 化合物 **69** は、極めて強力に colchicine の結合を阻害した。対応する炭素誘導体 **73** の colchicine 結合阻害活性は、細胞増殖活性評価の際と同様に、ケイ素誘導体 **69** の活性と比較して減弱する結果となった。

Table 3-4. Results of colchicine site competitive binding assay and IC_{50} in TPI assay.

compound	Y	TPI assay ^a IC_{50} (μM)	Inhibition of $[^3\text{H}]$ colchicine binding ^b		
			3 μM	10 μM	30 μM
CA-4 (39)		4.5	93.6%	-	-
41		16	46.6%	79.8%	90.8%
67		11.8	88.1%	99.0%	98.3%
69 ^c		28	90.7%	98.9%	99.6%
73 ^c		21.5	30.9%	73.5%	83.6%

^a Tubulin polymerization-inhibitory activity.

^b Assays were performed in triplicate.

^c Racemic mixture.

⁷⁸ Romagnoli, R.; Baraldi, P.G.; Carrion, M.D.; Cara, C.L.; Cruz-Lopez, O.; Tolomeo, M.; Grimaudo, S.; Di Cristina, A.; Pipitone, M.R.; Balzarini, J.; Zonta, N.; Brancale, A.; Hamel, E. Design, synthesis and structure-activity relationship of 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]furan derivatives as a novel class of inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6862-6871.

以上の結果を考察するため、化合物 **69** 及び **73** の2つの芳香環間の距離を計算した。計算の結果、それぞれの距離は 3.04 Å 及び 2.49 Å であり、化合物 **73** の距離は CA-4 (**39**) の *cis* 炭素-炭素二重結合の距離 (3.00 Å) と近いことが確認された。これらの結果は、ケイ素リンカーが、*cis* 炭素-炭素二重結合の代替構造として作用するという私の仮説を支持している。

2.6 CA-4 及び合成化合物の溶液安定性

分子内に *cis* 炭素-炭素二重結合を有する CA-4 (39) は、薬剤の保存、投与時により化学的に安定な *trans*-体へと異性化し、その結果、薬剤の有効性が低下することが知られている。そこで、私は、CA-4 (39) 及び合成した化合物 41, 69 の溶液安定性について、試験を行うことを計画した。CA-4 (39) の PBS 緩衝液への溶解度が低かったことから、試験化合物を PBS 緩衝液/アセトニトリル = 1 : 1 の混合溶液に溶解させ、室温で蛍光灯下に静置し、HPLC によりそれぞれの化合物の安定性を評価した。Figure 3-7 に、CA-4 (39) の溶液の HPLC チャートを示す。試験開始 4 時間後、CA-4 (39) の溶液には既に、2 つの生成物が観察された。これらのうち 1 つは、CA-4 (39) の *trans*-体であると考えられる。24 時間後、CA-4 (39) の濃度 (純度) は、当初の 84.5%まで減少していた (Table 3-5)。一方、化合物 41, 69 及び 73 は、同条件で新しい生成物は観察されず、本条件下では安定であることがわかった (data not shown)。

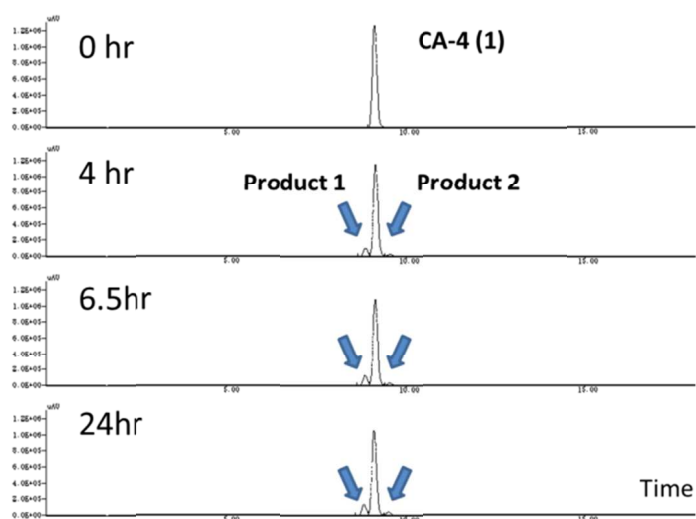


Figure 3-7. Stability test of CA-4 (39) (HPLC charts).

Table 3-5. Stability test of CA-4 (39) (remaining amount of 39).

Time (hr)	0	4	6.5	24
CA-4 (39) (%)	100	90	87.9	84.5
Product 1 (%)	0	7.9	9.6	11.3
Product 2 (%)	0	2.1	2.5	4.2

2.7 本節のまとめ

CA-4 (39) は、保存、投与時に、低活性な *trans*-体に異性化することが知られていることから、私は、安定性及び腫瘍細胞増殖抑制活性の向上を目指し、ケイ素含有化合物のデザイン及び合成を行った。

tubulin 重合阻害剤 (TPI) スクリーニング試験において、いくつかの合成化合物は、CA-4 (39) と同等の活性を示した。それらの化合物のうち、化合物 69 は非常に強いヒト乳がん MCF-7 細胞に対する細胞増殖抑制活性を示し、その IC₅₀ 値は、CA-4 (39) と同等の 0.007 μM であった。一方、対応する炭素体 73 の活性は、ケイ素誘導体 69 よりも 10 倍程度低かった。colchicine との競合試験においても、ケイ素誘導体 69 は炭素体 73 よりも強い活性を示した。これらの結果は、ケイ素リンカーが、*cis* 炭素-炭素二重結合の代替構造として作用するという私の仮説を支持するものである。加えて、CA-4 (39) は、極性溶媒中で分解がみられたが、ケイ素誘導体 69 は同じ条件かで安定であった。

以上のことから、*cis* 炭素-炭素二重結合のケイ素リンカーによる置き換えは、tubulin 重合阻害剤の構造最適化の有用な手段になり得ることが示唆された。

第3節 PPAR α agonist oleoylethanolamide が有するオレフィン構造のケイ素リンカーへの置き換え

3.1 背景

前節で、私はケイ素の疎水性構造としての有用性を示した。すなわち、安定性に問題があったスチルベン構造を有する tubulin 重合阻害剤 CA-4 (39) の、シスオレフィン構造をケイ素リンカー (-Si-) に置換することで、CA-4 (39) の抗腫瘍活性を維持しつつ、安定性を改善することに成功した (Figure 3-8)。この結果は、ケイ素リンカーがオレフィンの代替構造になり得るという私の仮説を支持するものである。そこで、本節ではスチルベン構造以外のシスオレフィンの代替構造としてもケイ素リンカーが機能するかを検討すべく、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 α (PPAR α) の agonist である Oleoylethanolamide (OEA) (74) が有する長鎖アルキル鎖中のシスオレフィンの代替として、ケイ素リンカーが機能するかを検証した (Figure 3-9)。

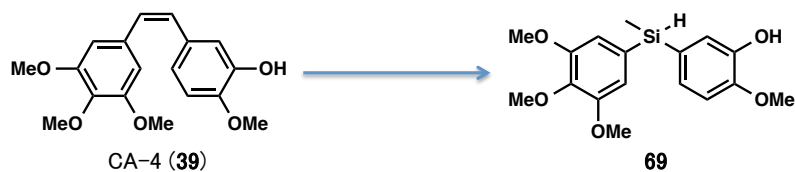


Figure 3-8. スチルベン構造中のシスオレフィンをケイ素リンカーで代替



Figure 3-9. 長鎖アルキル鎖中のシスオレフィンをケイ素リンカーで代替

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) は核内受容体スーパーファミリーの1つであり、リガンド応答性の転写因子である。PPARには α 、 δ 、 γ の3つのサブタイプが存在しており、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸などの脂肪酸やプロスタグランジン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドが内因性リガンドと考えられている^{79,80}。PPARのそれぞれのサブタイプは組織特異的に発現しており、脂質、リポタンパク質、糖のホメオスタシスにおいて極めて重要な働きをしている。

PPAR α は褐色脂肪組織、肝臓、心臓、腎臓、小腸に発現しており、脂肪酸酸化を制御している⁸¹。PPAR α 選択的 agonist である fenofibrate などは血漿中のトリグリセリド量を低下させることから、高脂血症治療薬として臨床で用いられている⁸²。

PPAR δ は主に骨格筋、脂肪組織を含む全身の組織に発現している。PPAR δ 選択的 agonist である GW501516 はインスリン抵抗性の改善⁸³や脂肪酸の異化⁸⁴を促進することが動物実験で明らかとなっており、糖、脂質のホメオスタシスに関わることが期待されている。

PPAR γ は脂肪細胞やマクロファージに発現しており、脂肪細胞の分化やインスリン感受性の獲得に関わるタンパク質の発現を誘導する。PPAR γ 選択的 agonist である thiazolidinedione は糖尿病治療薬として臨床で用いられている。

Figure 3-10 に内因性リガンドと合成リガンドの例を示す。

⁷⁹ Dreyer, C.; Krey, G.; Keller, H.; Givel, F.; Helftenbein, G.; Wahli, W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 1992, 68, 879.

⁸⁰ Krey, G.; Braissant, O.; L'Horset, F.; Kalkhoven, E.; Perroud, M.; Parker, M.G.; Wahli, W. Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* 1997, 11, 779.

⁸¹ Feige, J.N.; Gelman, L.; Michalid, L.; Desvergne, B.; Wahli, W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid Res.*, 2006, 45, 120.

structure-activity relationship of 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]furan derivatives as a novel class
⁸² Fruchart, J.C.; Staels, B.; Duriez, P., PPARs, metabolic disease and atherosclerosis., *Pharmacol. Res.*, 2001, 44, 345.

⁸³ Lee, C.H.; Olson, P.; Hevenr, A.; Mehl, I.; Chong, L.W.; Olefsky, J.M.; Gonzalez, F.J.; Ham, J.; Kang, H.; Peters, J.M.; Evans, R.M., PPAR δ regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, 103, 3444.

⁸⁴ Tanaka, T.; Yamamoto, J.; Iwasaki, S.; Asaba, H.; Hamura, H.; Ikeda, Y.; Watanabe, M.; Magoori, K.; Ioka, R.X.; Tachibana, K.; Watanabe, Y.; Uchiyama, Y.; Sumi, K.; Iguchi, H.; Ito, S.; Doi, T.; Hamakubo, T.; Naito, M.; Auwerx, J.; Yanagisawa, M.; Kodama, T.; Sakai, J., Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, 100, 15924.

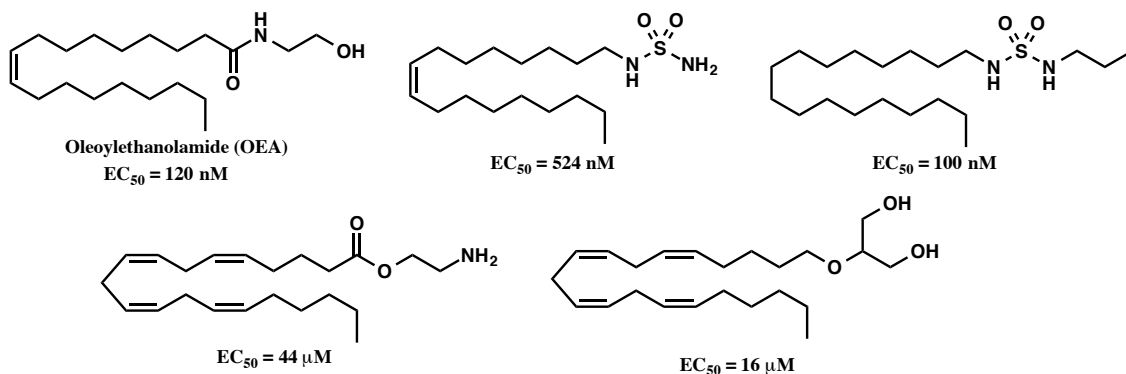


Figure 3-10. PPAR の内因性リガンドとそれぞれのサブタイプに対する agonist の構造式

内因性の脂肪酸アミドである OEA の生理作用としては、食欲・体重増加の抑制^{85, 86}、脂肪酸分解・脂肪酸酸化の亢進⁸⁷、胃内容排出や腸運動の阻害^{88, 89}等が知られている (**Figure 3-11**)。長らくこのような OEA による作用の分子メカニズムはわかっていなかったが、2003 年に Fu らにより OEA は PPAR α を介して作用することが提唱された⁹⁰。さらに、PPAR α 以外にも、OEA は G タンパク共役型受容体 GPR119⁹¹ や、バニロイド受容体 TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1)⁹² にも作用することが示唆されており、OEA の生理作用に PPAR α 、GPR119 及び TRPV1 が受容体としてそれぞれどの程度関与しているのかについて、より一層の研究の進展が待たれる。

⁸⁵ Oveisi, F.; Gaetani, S.; Eng, K.T.-P.; Piomelli, D., Oleoylethanolamide inhibits food intake in free-feeding rats after oral administration. *Pharmacol Res.*, **2004**, *49*, 461-466.

⁸⁶ Rodríguez de Fonseca, F.; Navarro, M.; Gómez, R.; Escuredo, L.; Nava, F.; Fu, J.; Murillo-Rodríguez, E.; Giuffrida, A.; LoVerme, J.; Gaetani, S.; Kathuria, S.; Gall, C.; Piomelli, D., An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, **2001**, *414*, 209-212.

⁸⁷ Guzmán, M.; Lo Verme, J.; Fu, J.; Oveisi, F.; Blázquez, C.; Piomelli, D., Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)., *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 27849-27854.

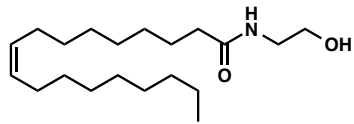
⁸⁸ Capasso, R.; Matias, I.; Lutz, B.; Borrelli, F.; Capasso, F.; Marsicano, G.; Mascolo, N.; Petrosino, S.; Monory, K.; Valenti, M.; Di Marzo, V.; Izzo, A.A., Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo., *Gastroenterology*, **2005**, *129*, 941-951.

⁸⁹ Aviello, G.; Matias, I.; Capasso, R.; Petrosino, S.; Borrelli, F.; Orlando, P.; Romano, B.; Capasso, F.; Di Marzo, V.; Izzo, A.A., Inhibitory effect of the anorexic compound oleoylethanolamide on gastric emptying in control and overweight mice., *J Mol Med (Berl)*, **2008**, *86*, 413-422.

⁹⁰ Fu, J.; Gaetani, S.; Oveisi, F.; Lo Verme, J.; Serrano, A.; Fonseca, R.D.; Rosengarth, A.; Luecke, H.; Di Giacomo, B.; Tarzia, G.; Piomelli, D., Oleoylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR α ., *Nature*, **2003**, *425*, 90-93.

⁹¹ Overton, H.A.; Babbs, A.J.; Doel, S.M.; Fyfe, M.C.T.; Gardner, L.S.; Griffin, G.; Jackson, H.C.; Procter, M.J.; Rasamison, C.M.; Tang-Christensen, M.; Widdowson, P.S.; Williams, G.M.; Reynet, C., Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents., *Cell Metab.*, **2006**, *3*, 167-175.

⁹² Ahern, G.P., Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 30429-30434.



Oleoylethanolamide (OEA) (74)

主な受容体

PPAR α
GPR119
TRPV1

主な生理作用

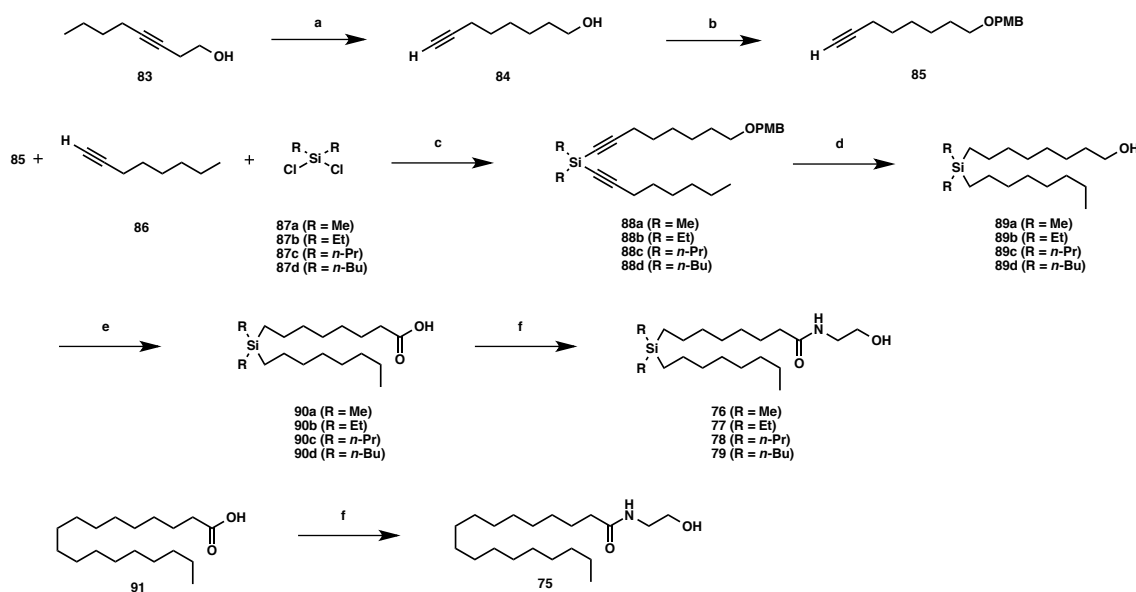
食欲・体重増加の抑制
脂肪酸代謝
胃内容排出・腸運動阻害

Figure 3-11. OEA (74) の主な受容体及び生理作用

3.3 化合物の合成

計算化学実験によって得られた結果から、まず、含ケイ素誘導体 **76** 及び **76** の置換基 **R** の炭素数を変換した化合物 **76-79** の合成を行うことを計画した。化合物 **85** は、化合物 **83** を原料としてアルキンジッパー反応を行い、ヒドロキシル基を PMB 化することで合成した。化合物 **88a-d** は化合物 **85** 及び **86** を *n*-butyllithium (*n*-BuLi) で処理した後、dichlorodialkylsilane (**87a-d**) と反応させることにより合成した。化合物 **89a-d** は、化合物 **88a-d** の脱 PMB 化により合成した。化合物 **90a-d** は、化合物 **87a-d** のデスマーチン酸化により合成した。化合物 **76-79** は、化合物 **90a-d** をクロロギ酸メチルで処理した後、エタノールアミンと反応させることにより合成した。

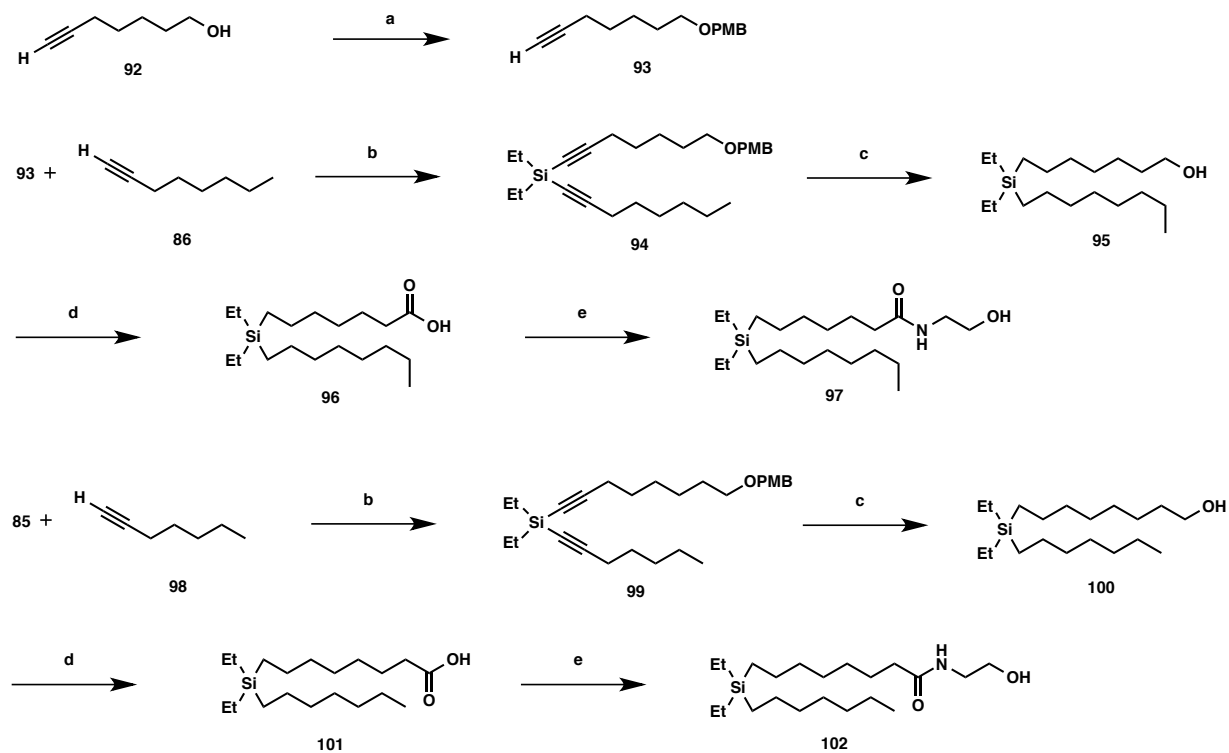
また、比較のため OEA (**74**) に対応する飽和脂肪酸アミド **75** も合成した。化合物 **75** はステアリン酸 (**91**) をクロロギ酸メチルで処理した後、エタノールアミンと反応させることにより合成した。



Scheme 3-4. Synthesis of compounds **75-79**.^a

^a Reagents and conditions : (a) NaH, ethylenediamine, 65 °C, 72% ; (b) CSA, 4-methoxybenzyl trichloroacetimidate, CH₂Cl₂, r.t., 34% ; (c) *n*-BuLi, THF, -78 °C to r.t., 44% or crude ; (d) H₂, Pd/C, ethyl acetate, r.t., 42% or 1.4-44% (2 steps) ; (e) DMP, CH₂Cl₂, r.t., 56-70% or crude ; (f) triethylamine, methyl chloromate, ethanolamine, CH₂Cl₂, r.t., 14-40% or 34% (2 steps).

次に、置換基 R をエチル基に固定し、極性基を有するアルキル鎖を一炭素減炭した化合物 **97**、及びオクチル基を一炭素減炭した化合物 **102** を化合物 **76-79** と同様の手法で合成した。



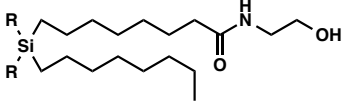
Scheme 3-5. Synthesis of compounds **97** and **102**.^a

^a Reagents and conditions : (a) CSA, 4-methoxybenzyl trichloroacetimidate, CH_2Cl_2 , r.t., 70% ; (b) *n*-BuLi, dichlorodiethylsilane, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ to r.t., crude ; (c) H_2 , Pd/C, ethyl acetate, r.t., 14-15% (2 steps) ; (d) DMP, CH_2Cl_2 , r.t., 19-50% ; (e) triethylamine, methyl chloromate, ethanolamine, CH_2Cl_2 , r.t., 40-68%

3.4 PPAR 転写活性評価

ケイ素に直結した置換基 R を種々の長さに変換した化合物 **76-79** の PPAR 転写活性評価結果を **Table 3-6** に示す。化合物濃度を 30 μM に固定した PPAR レポーター遺伝子アッセイにおいて、置換基 R にエチル基を導入した **77** が最も高い PPAR α agonist 活性を示したが、リード化合物である OEA (**74**) の活性には及ばなかった。置換基 R にメチル基を導入した **76** にも、若干の PPAR α agonist 活性を認めた。また、エチル基よりも長いアルキル鎖を導入した化合物 **78** 及び **79** では、炭素数の増加に伴い PPAR α agonist 活性が减弱し、化合物 **79** は PPAR α agonist 活性を示さなかった。PPAR δ に対する agonist 活性に着目すると、置換基 R にエチル基及び *n*-プロピル基を導入した **77** 及び **78** が、OEA と同等、もしくは OEA を上回る agonist 活性を示した。また、化合物 **76-78** について、OEA (**74**) と比べて PPAR δ に対する選択性が向上した。なお、いずれの化合物にも PPAR γ に対する agonist 活性は認められなかった。

Table 3-6. OEA (**74**) 及びその誘導体の PPAR レポーター遺伝子アッセイ評価結果



compound	R	PPAR α	PPAR δ	PPAR γ
		agonistic activity (%) at 30 μM ^a	agonistic activity (%) at 30 μM ^b	agonistic activity (%) at 30 μM ^c
OEA (74)	-	71	24	NA
75	-	9	2	NA
76	Me	19	16	NA
77	Et	30	24	NA
78	<i>n</i> -Pr	19	27	NA
79	<i>n</i> -Bu	NA	NA	NA

^a % of maximal activation of GW7647 at 30 nM

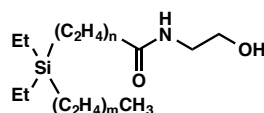
^b % of maximal activation of GW501516 at 30 nM

^c % of maximal activation of rosiglitazone at 10 μM

NA means no activity at 30 μM

次に、置換基 R を、Table 3-6 において最も高い PPAR α agonist 活性を示したジエチルに固定して、残りの置換基の炭素数 (n, m) を変換した化合物 **97** 及び **102** の PPAR 転写活性評価を行った (Table 3-7)。新たに合成した化合物 **97** 及び **102** は、30 μ M で細胞毒性を示したため、本活性評価では各化合物濃度 10 μ M における agonist 活性を示した。極性基を有するアルキル鎖の炭素数 n を 1 炭素減炭した化合物 **97** は、PPAR α 及び δ に対して微弱ながら agonist 活性を示した。一方、化合物 **77** のオクチル基のヘキシル基に変換した化合物 **102** では、PPAR α に対する agonist 活性は化合物 **97** と同様に、微弱な agonist 活性しか認められなかったものの、PPAR δ に対する agonist 活性は大きく向上した (PPAR δ agonistic activity = 31% at 10 μ M)。このことから、化合物 **77** の極性基を有するアルキル鎖及びオクチル基の炭素数を変換することで、サブタイプ選択性を制御できる可能性が示唆された。また、Table 3-8 において、置換基 R に *n*-プロピル基を有する化合物 **78** が化合物 **77** を上回る PPAR δ agonist 活性を示したことから、置換基 R を *n*-プロピル基に固定して、その他の置換基の炭素鎖長を変換することで、より効果的に PPAR δ agonist を創製できる可能性がある。なお、いずれの化合物にも PPAR γ に対する agonist 活性は認められなかった。

Table 3-7. OEA (**74**) 及びその誘導体の PPAR レポータージーンアッセイ評価結果



compound	n	m	PPAR α	PPAR δ	PPAR γ
			agonistic activity (%) at 10 μ M ^a	agonistic activity (%) at 10 μ M ^b	agonistic activity (%) at 10 μ M ^c
OEA (74)	-	-	21	2	NA
75	-	-	2	NA	NA
77	7	7	4	17	NA
97	6	7	4	7	NA
102	7	6	3	31	NA

^a % of maximal activation of GW7647 at 30 nM

^b % of maximal activation of GW501516 at 30 nM

^c % of maximal activation of rosiglitazone at 10 μ M

NA means no activity at 10 μ M

3.5 本節のまとめ

本節では、長鎖アルキル鎖中のシスオレフィンの代替構造としてケイ素リンカーが機能するかを検討するため、OEA (74) をリード化合物としてケイ素含有化合物のデザイン及び合成を行った。

PPAR 転写活性評価の結果、OEA (74) のシスオレフィンをケイ素リンカーに置換した化合物のうち、いくつかの合成化合物は PPAR α agonist 活性を示した。その中でも、置換基 R にエチル基を導入した化合物 77 は最も高い PPAR α agonist 活性を示した。さらに、77 は OEA (74) と同等の PPAR δ agonist 活性も有していた。また、ケイ素に直結した置換基の炭素鎖長を変換した化合物についても合成・活性評価し、オクチル基をヘキシル基に変換した化合物 102 は OEA (74) 及び 77 を上回る PPAR δ agonist 活性を示した。一方で、102 の PPAR α に対する agonist 活性は 77 を下回っていた。

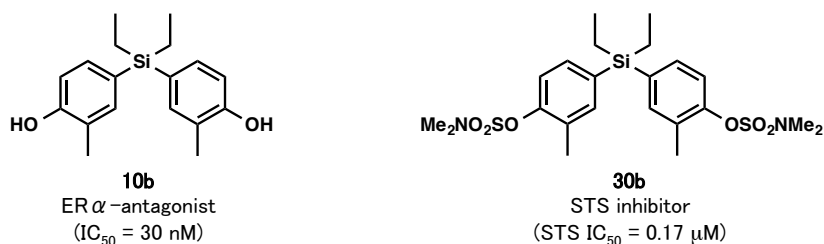
前節では CA-4 (39) のシスオレフィンをケイ素リンカーで代替することに成功したが、OEA (74) に関しては、シスオレフィンのケイ素リンカーによる代替は不可能ではないが、有利ではないと考えられる。しかし、本節ではシスオレフィン構造をケイ素リンカーに置換することで、PPAR α に対する活性は減弱し、PPAR δ に対する選択性が向上する傾向が認められた。すなわち、ケイ素リンカーの導入によりサブタイプ選択性を制御できる可能性がある。OEA と PPAR の共結晶はまだ得られていないが、本結果から、OEA が PPAR α と相互作用する際にオレフィン部分への嵩高い置換基の導入は不利になる可能性が示唆された。本研究の結果から、シスオレフィン構造を有する化合物の構造展開において、ケイ素リンカーの導入は1つの有効な手法であると考えられる。

終章

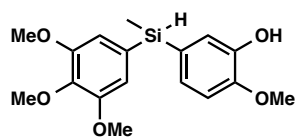
本研究では、含ケイ素誘導体に関する知見の獲得及び有用性の検討を目的として研究を行い、ケイ素の物理化学的性質に着目した創薬及び構造最適化手法の提案を行うこととした。

第1章では、研究背景としてケイ素と炭素の性質の比較と、創薬化学におけるケイ素導入の効果について述べた。

第2章では、estrogen agonist であるビスフェノール A (**2a**) の構造変換により、強力な estrogen antagonist 活性を有するケイ素誘導体 **10b** ($ER\alpha$ IC_{50} = 30 nM) 等の創製に成功した。また、ジフェニルメタン骨格を有する STS 阻害剤に、ケイ素を導入することにより、その活性を向上させることに成功した。これらの知見を合わせ、「STS 阻害活性」と「代謝物による ER antagonist 活性」を有する 2 重阻害剤 **30b** の創製に成功した (STS IC_{50} = 0.17 μ M)。本章の結果より、ジフェニルメタン骨格へケイ素を導入することにより、標的への選択性の転換や生理活性の変化が生じることを示した。すなわち、標的に応じ、ジフェニルメタン化合物の炭素/ケイ素置換を行うことにより、目的に合った分子を創製することが可能であるといえる。

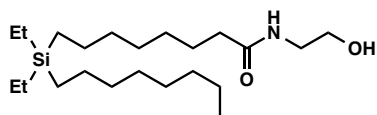


第3章では、ケイ素の結合の長さに着目し、ケイ素によるスチルベン及び長鎖アルキル鎖中のシスオレフィン構造の置き換えについての提案を行った。第3章前半では、tubulin 重合阻害剤である combretastatin A-4 (**39**) の有する不安定なシスオレフィン構造をケイ素リンカーで置換することを計画し、生理活性を維持したまま安定性を向上させた化合物 **69** の創製に成功した (TPI IC_{50} = 28 μ M, $MCF-7$ IC_{50} = 0.007 μ M)。比較のために合成した炭素体 **73** は、ケイ素誘導体より低活性であった。これらの結果は、ケイ素リンカーが、シス炭素-炭素二重結合の代替構造として作用するという私の仮説を支持するものであるといえる。第3章後半では、内因性 PPAR α agonist である OEA (**74**) が有するシスオレフィン構造をケイ素リンカーで置換することを計画し、研究を行った。その結果、ケイ素リンカーを導入した化合物 **77** が OEA (**74**) には及ばないものの、PPAR α agonist 活性を示した (PPAR α agonistic activity : 30% at 30 μ M)。また、ケイ素リンカー導入により PPAR δ に対する選択性が向上した。化合物 **77** を基に構造展開し、PPAR δ に対する選択性が向上した化合物 **102** を見出した。以上のことから、シスオレフィン構造のケイ素リンカーによる置換の効果は、化合物の構造や標的の違いにより異なることが示唆された。



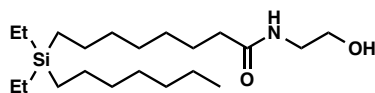
69

Tubulin polymerization inhibitor
(MCF-7 IC₅₀ = 0.007 μM)



77

PPAR α -agonist
(agonistic activity : 30% at 30 μM)



102

PPAR δ -agonist
(agonistic activity : 31% at 10 μM)

以上の通り、本研究ではケイ素に関する新たな知見が得られ、創薬化学におけるケイ素の有用性を示唆された。これらの結果は、今後の医薬化学及び有機ケイ素化学の発展に寄与するものであると考えられる。

実験項

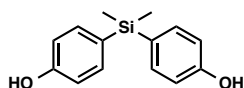
1. 有機合成

General :

¹H NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-GX500 and JNM-ECA-500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts for ¹H-NMR are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane (*d*) and coupling constants are in hertz (Hz). The following abbreviations are used for spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, sept = septet, m = multiplet, br = broad. Chemical shifts for ¹³C-NMR are reported in ppm relative to the centerline of the triplet at 77.0 ppm for deuteriochloroform. Mass spectra were recorded on a JEOL JMS-HX110 spectrometer using 3-nitrobenzyl alcohol (NBA) as matrix. Melting points were determined on a MP-J3 melting point apparatus (Yanaco, Japan). Routine thin layer chromatography (TLC) and preparative TLC (PTLC) were performed on silica gel 60 F254 plates (Merck, Germany). Flash column chromatography was performed on Silica gel 60 (spherical, particle size 40-100 μ m; Kanto). The purity of tested compounds was determined by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC (Nexera system, Shimadzu, Japan)) [YMC-UltraHT Hydrosphre C18 column (75 x 3.0 mm I.D. S-3, 12 nm), 20-90% MeCN in H₂O with 0.1% phosphoric acid for 8.5 min, 0.8 mL/min, 40 °C, UV detection: 254 nm].

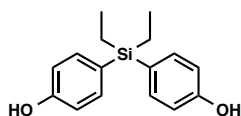
第 2 章 第 2 節

4,4'-(dimethylsilanediyl)diphenol (**2b**)⁹³



To a solution of 4-bromophenol (3.82 g, 22.1 mmol) in dry THF (25 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (2.69 M, 19 mL, 51.5 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. To this was added dichlorodimethylsilane (0.88 mL, 7.3 mmol) at -78 °C, and stirring was continued at room temperature for 5 h. The reaction was quenched with NH₄Cl aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 2/1) to give **2b** (0.81 g, 45.4%) as a white solid. mp : 172-174 °C (lit. 174 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.30 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 6.76 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 0.43 (6H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 159.41, 136.63, 129.22, 115.90. MS (FAB+) *m/z* : 245 (M+H⁺).

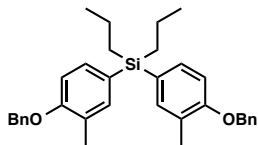
4,4'-(diethylsilanediyl)diphenol (**3b**)⁹³



The title compound was prepared according to the procedure described for **2b**, starting from dichlorodiethylsilane (y. 11.8%). Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.36 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 6.82 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 4.88 (s, 2H), 1.02-0.97 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 156.44, 136.64, 127.63, 115.02, 7.51, 4.30. MS (FAB+) *m/z* : 272 (M⁺).

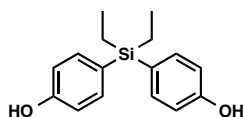
⁸³ O'Tagle, L.H.; Terraza, C.A.; Alvarez, P. Synthesis and Characterization of Poly(carbonates) and Poly(thiocarbonates) Derived from Diphenols Containing Silicon as Central Atom. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2006**, *181*, 239-248.

Bis(4-(benzyloxy)-3-methylphenyl)dipropylsilane (**23**)



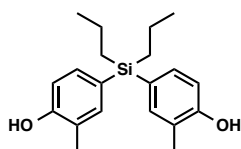
The title compound was prepared according to the procedure described for **2b**, starting from dichlorodi-*n*-propylsilane and 1-(benzyloxy)-4-bromo-2-methylbenzene (**22**) (y. 4.3%). Yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.45 (d, 4H, *J* = 7.4 Hz), 7.39 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 7.34-7.31 (m, 2H), 7.27 (m, 4H), 6.88 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 5.08 (s, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.44-1.34 (m, 4H), 1.03-0.95 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 157.75, 137.49, 137.18, 133.89, 128.49, 127.79, 127.72, 127.11, 126.25, 110.66, 69.52, 18.58, 17.47, 16.50, 15.75. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₃₄H₄₀O₂Si 508.2798, found 508.2758 (M⁺).

4,4'-(Diethylsilanediyl)bis(2-methylphenol) (**10b**)



The title compound was prepared according to the procedure described for **2b**, starting from dichlorodiethylsilane (y. 11.8%). White solid. mp : 110-112 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.15 (s, 2H), 7.11 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 6.73 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 2.16 (s, 6H), 0.96-0.94 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 157.51, 138.54, 134.85, 127.19, 124.92, 115.21, 16.22, 7.85, 5.32. MS (FAB+) *m/z* : 300 (M⁺).

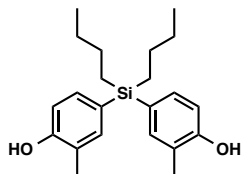
4,4'-(dipropylsilanediyl)bis(2-methylphenol) (**11b**)



To a mixture of bis(4-(benzyloxy)-3-methylphenyl)dipropylsilane (**23**) (747 mg, 1.47 mmol), EtOH (0.5 mL) and ethyl acetate (1.5 mL) was added 5% Pd/C (37.4 mg) at room temperature, and the mixture was stirred under an H₂ atmosphere at the same temperature for 18 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **11b** (18.4 mg, 3.8%) as a white solid. mp : 99-101 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.04 (s, 2H), 6.99 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 6.62 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 2.06 (s, 6H), 1.28-1.19 (m, 4H), 0.85 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 157.50, 138.49, 134.79, 127.46, 124.88, 115.15,

18.88, 18.57, 16.98, 16.27. MS (FAB⁺) m/z : 328 (M⁺). HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for C₂₀H₂₈O₂Si 328.1859, found 328.1851 (M⁺).

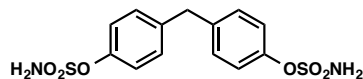
4,4'-(dibutylsilyl)bis(2-methylphenol) (12b)



The title compound was prepared according to the procedure described for **2b**, starting from 4-bromo-*o*-cresol and dichlorodibutylsilane (y. 2%). Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 6.93 (s, 2H), 6.87 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 6.67 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 4.61 (s, 2H), 2.50 (t, 4H, *J* = 8.0 Hz), 2.22 (s, 6H), 1.58-1.51 (m, 4H) , 1.38-1.29 (m, 4H) , 0.91 (t, 6H, *J* = 7.4 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 151.64, 135.13, 130.97, 126.78, 123.33, 114.67, 34.73, 33.95, 22.32, 15.73, 13.94. HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for C₂₂H₃₂N₂Si 356.2172, found 356.2151 (M⁺).

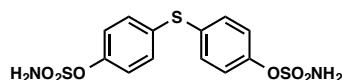
第 2 章 第 3 節

Methylenebis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (**24**)



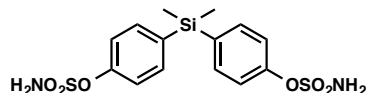
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-methylenebiphenol (**1**) (y. 81.6%). Colorless crystals. mp : 173-175 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.26 (dd, 4H, *J* = 6.6, 2.3 Hz), 7.22 (dd, 4H, *J* = 6.6, 2.3 Hz), 3.99 (s, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 150.49, 141.10, 131.00, 123.45, 41.44. MS (FAB⁺) *m/z* : not detected.

Thiobis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (**25**)



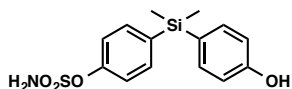
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-methylenebiphenol (y. 4.6%). White solid. mp : 150-152 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.30 (dd, 4H, *J* = 6.3, 2.0 Hz), 7.19 (dd, 4H, *J* = 6.3, 2.0 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 151.49, 135.21, 133.51, 124.43. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₂H₁₂N₂O₆S₃ 375.9858, found 375.9897 (M⁺).

(Dimethylsilanediyl)bis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (**26b**)



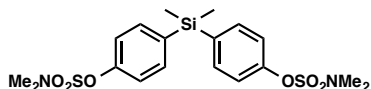
To a solution of 4,4'-(dimethylsilanediyl)diphenol (**2b**) (200 mg, 0.82 mmol) in DMA (1 mL) was added sulfamoyl chloride (283 mg, 2.46 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with H₂O aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1 to 1/1) to afford a white solid. This was recrystallized from chloroform/hexane to give **26b** (154.4 mg, 46.8%) as colorless crystals. mp : 154-155 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.07 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 6.81 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 0.56 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 153.13, 137.66, 136.63, 122.84. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₄H₁₉N₂O₆S₂Si 403.0454, found 403.449 (M+H⁺).

4-((4-Hydroxyphenyl)dimethylsilyl)phenyl sulfamate (**27**)



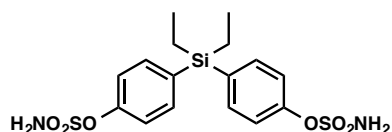
To a solution of 4,4'-(dimethylsilanediyl)diphenol (**2b**) (24 mg, 0.98 mmol) in DMA (1 mL) was added sulfamoyl chloride (135.9 mg, 1.18 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction was quenched with H₂O aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (chloroform/ MeOH = 40/1) and PTLC (hexane/ethyl acetate = 2/1) to give **27** (42.7 mg, 13.4%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.54 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 7.29 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 6.84 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 4.90 (brs, 3H), 0.52 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 156.78, 150.87, 138.54, 135.93, 135.89, 128.46, 121.41, 115.22, -2.16. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₄H₁₇NO₄SSiNa 346.0545, found 346.0558 (M+Na⁺).

(Dimethylsilanediyl)bis(4,1-phenylene) bis(dimethylsulfamate) (**28**)



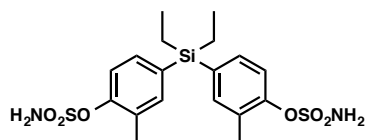
To a solution of (dimethylsilanediyl)bis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (**26b**) (70.2 mg, 0.17 mmol) in dry DMF (1 mL) was added sodium hydride (60% suspension in mineral oil, 34.4 mg, 0.79 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. To this was added methyl iodide (0.054 mL, 0.87 mmol), and stirring was continued at room temperature for 19 h. The reaction was quenched with H₂O, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1) to afford a white solid. This was recrystallized from hexane/ethyl acetate to give **28** (12.9 mg, 16.1%) as colorless needles. mp : 128-129 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.51 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 7.27 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 2.98 (s, 12H), 0.55 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 151.33, 136.46, 135.81, 121.20, 38.86, -2.25. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₇N₂O₆S₂Si 459.1080, found 459.1077 (M+H⁺).

(Diethylsilanediyl)bis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (29b)



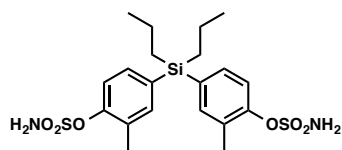
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-(diethylsilanediyl)diphenol (**3b**) (y. 24.8%). Colorless crystals. mp : 175-176 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.55 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 7.32 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 1.11 (t, 4H, *J* = 7.7 Hz), 0.98 (q, 6H, *J* = 7.7 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 153.17, 137.33, 135.52, 122.83, 7.57, 4.64. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₆H₂₃N₂O₆S₂Si 431.0769, found 431.0767 (M+H⁺).

(Diethylsilanediyl)bis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (30b)



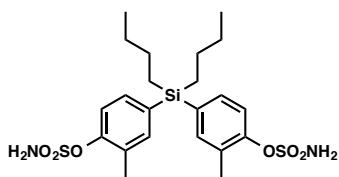
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-(diethylsilanediyl)bis(2-methylphenol) (**8b**) (y. 25.1%). White solid. mp : 155-156 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.37 (s, 2H), 7.34-7.32 (m, 4H), 2.32 (s, 6H), 1.09-0.99 (m, 4H), 0.98-0.96 (m, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 151.68, 138.99, 135.57, 134.65, 132.15, 122.67, 16.65, 7.62, 1.62. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₆N₂O₆S₂SiNa 481.0899 found 481.0906 (M+Na⁺).

(Dipropylsilanediyl)bis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (31b)



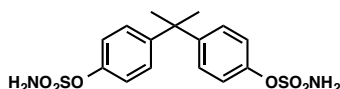
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-(diethylsilanediyl)diphenol (**21b**) (y. 1.4%). White solid. mp : 100-102 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.27 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.25 (s, 2H), 7.23 (dd, 2H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 2.24 (s, 6H), 1.36 (m, 4H), 1.09 (m, 4H), 0.98 (t, 6H, *J* = 7.2 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 149.68, 138.21, 135.70, 133.72, 130.60, 121.11, 29.69, 18.44, 17.23, 16.59, 15.05. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₀H₃₀N₂O₆S₂Si 486.1315, found 486.1329 (M⁺).

(Dibutylsilanediy)bis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (32b)



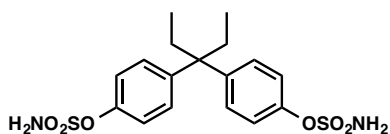
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-(dibutylsilanediy)bis(2-methylphenol) (**22b**) (y. 33.8%). White solid. mp : 55-56 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.22 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.07 (2H, s), 7.01 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 2.57 (t, 4H, *J* = 7.7 Hz), 1.59-1.58 (m, 4H), 1.37-1.30 (m, 4H), 0.93 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 148.58, 142.49, 132.41, 132.40, 127.78, 123.01, 35.97, 34.97, 23.30, 16.67, 14.25. MS (FAB⁺) *m/z* : not detected.

Propane-2,2-diylbis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (26a)



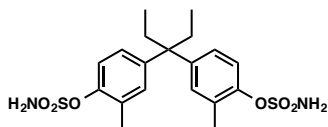
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol (y. 26%). White solid. mp : 199-201 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.30 (dd, 8H, *J* = 6.8, 2.2), 7.22 (dd, 8H, *J* = 6.8, 2.2), 1.69 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 148.85, 148.71, 127.74, 121.56, 42.25, 29.89. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₅H₁₈N₂O₆S₂ 386.0606, found 386.0621 (M⁺).

Pentane-3,3-diylbis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (29a)



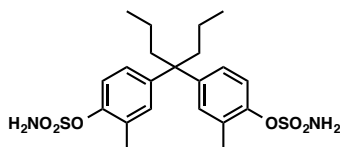
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-(pentane-3,3-diyl)diphenol⁸³ (y. 26%). White solid. mp : 230-232 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.24 (d, 4H, *J* = 9.2 Hz), 7.21 (d, 4H, *J* = 9.2 Hz), 2.17 (q, 4H, *J* = 7.3 Hz), 0.64 (t, 6H, *J* = 7.3 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 147.89, 146.12, 128.91, 121.39, 48.86, 28.41, 8.26. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₇H₂₂N₂O₆S₂ 414.0919, found 414.0894 (M⁺).

Pentane-3,3-diylbis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (30a)



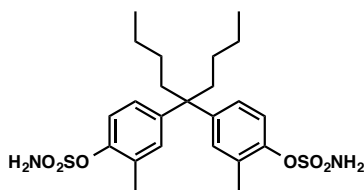
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(pentane-3,3-diyl)bis(2-methylphenol) (y. 45%). Yellow solid. mp : 140-142 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.14 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.98-6.92 (m, 4H), 2.20 (s, 6H), 2.03 (q, 4H, *J* = 7.3 Hz), 0.52 (t, 6H, *J* = 7.3 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 176.57, 176.24, 160.20, 159.97, 155.82, 150.56, 78.46, 58.15, 45.07, 36.81. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₉H₂₆N₂O₆S₂ 442.1232, found 442.1255 (M⁺).

Heptane-4,4-diylbis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (31a)



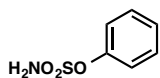
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-(heptane-4,4-diyl)bis(2-methylphenol) (y. 7.4%). White solid. mp : 180-182 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.14 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.98 (s, 2H), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 2.20 (s, 6H), 1.97-1.93 (m, 4H), 0.91-0.86 (m, 4H), 0.77 (t, 6H, *J* = 6.9 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 148.53, 148.40, 131.82, 131.79, 127.47, 122.44, 49.87, 41.06, 18.29, 16.92, 14.99. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₁H₃₀N₂O₆S₂ 470.1545, found 470.1541 (M⁺).

Nonane-5,5-diylbis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (32a)



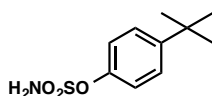
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4,4'-(nonane-5,5-diyl)bis(2-methylphenol) (y. 31%). White solid. mp : 75-77 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.23 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.07 (d, 2H, *J* = 2.3 Hz), 7.02 (d, 2H, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 2.29 (s, 6H), 1.27 (m, 4H), 0.97-0.91 (m, 4H), 0.83 (t, 6H, *J* = 7.2). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 147.73, 146.51, 130.89, 130.33, 126.69, 120.96, 48.49, 37.14, 25.99, 23.27, 16.88, 14.01. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₃H₃₄N₂O₆S₂ 498.1858, found 498.1880 (M⁺).

4-(tert-Butyl)phenyl sulfamate (33)⁸⁴



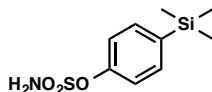
The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from phenol (y. 35.8%). White solid. mp : 80-81 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.44-7.37 (m, 2H), 7.34-7.29 m, 3H), 4.95-4.88 (m, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 150.13, 130.03, 127.47, 122.18. MS (FAB⁺) m/z : 173 (M⁺).

4-(tert-Butyl)phenyl sulfamate (34)



The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4-(tert-butyl)phenol (y. 55.5%). White solid. mp : 98-100 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.42 (dd, 2H, *J* = 6.9, 2.3 Hz), 7.24 (dd, 2H, *J* = 6.9, 2.3 Hz), 4.95 (brs, 2H), 1.32 (9H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 150.57, 147.81, 126.91, 121.54, 34.70, 31.43. HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for C₁₀H₁₅NO₃S 229.0773, found 229.0779 (M⁺).

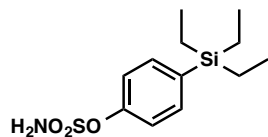
4-(Trimethylsilyl)phenyl sulfamate (35)



The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4-(trimethylsilyl)phenol (y. 54.2%). White solid. mp : 97-99 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.56 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 4.87 (brs, 2H), 0.24 (s, 9H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 150.71, 140.19, 135.07, 121.38, -1.08. HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for C₉H₁₆NO₃SSi 246.0620, found 246.0617 (M+H⁺).

⁸⁴ Hanson, S.R.; Whalen, L.J.; Wong, C.H. Synthesis and evaluation of general mechanism-based inhibitors of sulfatases based on (difluoro)methyl phenyl sulfate and cyclic phenyl sulfamate motifs. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8386-8395.

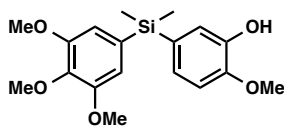
4-(Triethylsilyl)phenyl sulfamate (36)



The title compound was prepared according to the procedure described for **26b**, starting from 4-(triethylsilyl)phenol (y. 35.5%). White solid. mp : 73-75 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.53 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 4.87 (brs, 2H), 0.96 (t, 9H, *J* = 8.1 Hz), 0.79 (q, 6H, *J* = 8.1 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 150.71, 137.24, 135.87, 121.32, 7.39, 3.38, 3.17. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₂H₂₂NO₃SSi 288.1089, found 228.1089 (M+H⁺).

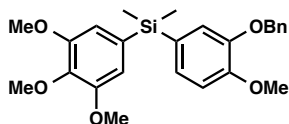
第 3 章 第 2 節

5-(Dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (**41**)

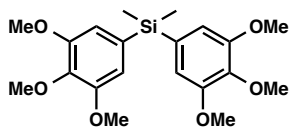


To a solution of (3,4-dimethoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**45**) (144.6 mg, 0.33 mmol) in EtOH (4 mL) was added 5% Pd/C (14.5 mg) at room temperature, and the mixture was stirred under an H₂ atmosphere at the same temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **41** (94.7 mg, 82%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.08 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.00 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.71 (s, 2H), 5.57 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 0.51 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.05, 147.67, 145.30, 139.18, 133.51, 130.49, 126.54, 119.89, 110.91, 110.50, 60.86, 56.25, 55.86, -2.02. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₅O₅Si 349.1471, found 349.1478 (M+H⁺).

(3,4-Dimethoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**45**)



and Diethylbis(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**54**)

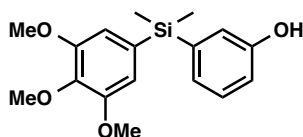


To a solution of 5-bromo-1,2,3-trimethoxyphenol (543.6 mg, 2.2 mmol) in dry THF (5 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (2.65 M, 0.83 mL, 2.2 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. The mixture was stirred at same temperature for 1 h, and then added to a solution of dichlorodimethylsilane (0.3 mL, 2.0 mmol) in dry THF (2.5 mL) at -78 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, and cooled to -78 °C. To this was added a solution of (3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)lithium (2.0 mmol) in dry THF at -78 °C. The mixture was stirred at the same temperature for 2 h, and at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with NH₄Cl aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl

acetate = 19/1 to 4/1) to give **45** and **54**. Compound **45** (187.2 mg, y. 21%), white solid. mp : 57-59 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.38 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.29-7.27 (m, 1H), 7.09 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 6.92 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.65 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 6H), 0.47 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.05, 150.91, 147.76, 139.16, 137.30, 133.48, 129.39, 128.56, 128.02, 127.90, 127.49, 119.91, 111.64, 110.86, 71.30, 60.86, 56.23, 55.89, -1.96. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₅H₃₀O₅Si 438.1863, found 438.1871 (M⁺).

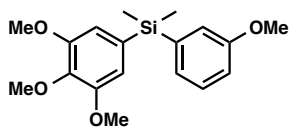
Compound **54** (218.1 mg, y. 27.8%), white solid. mp : 39-41 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 6.72 (s, 4H), 3.87 (s, 6H), 3.85 (s, 12H), 0.54 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.12, 139.32, 133.09, 110.99, 60.88, 56.30, -1.86. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₀H₂₉O₆Si 393.1733, found 393.1732 (M+H⁺).

3-(Dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)phenol (**46**)



The title compound was prepared according to the procedure described for **41**, starting from compound **48**. Yield : 88%. White solid. mp : 104-106 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.27-7.23 (m, 1H), 7.08 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 6.95 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz), 6.85-6.83 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 4.81 (brs, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 0.53 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 155.09, 153.09, 140.33, 139.26, 133.01, 129.38, 126.55, 120.71, 116.25, 110.98, 60.87, 56.26, -2.18. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₇H₂₂O₄Si 318.1287, found 318.1291 (M⁺).

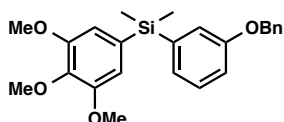
(3-Methoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**47**)



Methyl iodide (16 μL, 0.25 mmol) was added to a mixture of 3-(dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)phenol (**46**) (61 mg, 0.19 mmol), sodium hydride (60% suspension in mineral oil, 8.4 mg, 0.21 mmol) and DMF (1 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. The reaction was quenched with H₂O, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of PTLC (hexane/ethyl acetate = 5/1) to give **47** (49.1 mg, 66%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.33-7.29 (m, 1H), 7.11 (d, 1H,

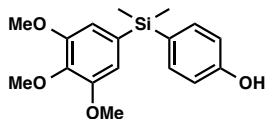
$J = 6.9$ Hz), 7.06 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.93-6.90 (m, 1H), 6.71 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 3.80 (s, 3H), 0.54 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 159.07, 153.10, 139.90, 139.27, 133.09, 129.17, 126.51, 119.93, 114.29, 110.97, 60.87, 56.26, 55.19, -2.13. HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{Si}$ 333.1522, found 333.1524 (M+H⁺).

(3-(Benzyloxy)phenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (48)



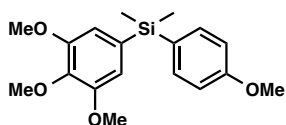
To a solution of 5-bromo-1,2,3-trimethoxyphenol (494.1 mg, 2 mmol) and 1-(benzyloxy)-3-bromobenzene (**44b**) (526.3 mg, 2 mmol) in dry THF (15 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (2.65 M, 1.51 mL, 4 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. This was stirred at the same temperature for 1 h, and then dichlorodimethylsilane (0.27 mL, 2.2 mmol) was added. The mixture was stirred at -78 °C for 2 h, and at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with NH_4Cl aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1) to give **48** (327.5 mg, 40%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.42-7.29 (m, 6H), 7.14-7.11 (m, 2H), 7.00-6.97 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.04 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 0.53 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 158.35, 153.10, 140.00, 139.27, 137.08, 133.06, 129.19, 128.68, 128.08, 127.67, 126.74, 120.86, 115.24, 110.96, 70.00, 60.87, 56.26, -2.14. HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Si}$ 408.1757, found 408.1762 (M⁺).

4-(Dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)phenol (49)



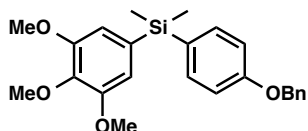
The title compound was prepared according to the procedure described for **41**, starting from compound **51**. Yield : 33%. White solid. mp : 97-99 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.39 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.84 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.70 (s, 2H), 5.38 (brs, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 0.51 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 156.87, 153.01, 139.03, 135.91, 133.88, 128.90, 115.16, 110.96, 60.89, 56.25, -1.91. HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{Si}$ 319.1366, found 319.1373 (M+H⁺).

(4-Methoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (50)



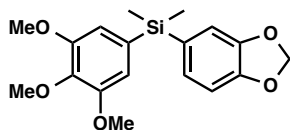
The title compound was prepared according to the procedure described for **48**, starting from 4-bromoanisole. Yield : 12%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.45 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 6.91 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 6.70 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 3.82 (s, 6H), 0.52 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 160.64, 153.06, 139.16, 135.70, 133.73, 128.93, 113.71, 110.93, 60.84, 56.25, 55.12, -1.91. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₅O₄Si 333.1522, found 333.1522 (M+H⁺).

(4-(Benzyloxy)phenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (51)



The title compound was prepared according to the procedure described for **48**, starting from 1-(benzyloxy)-4-bromobenzene. Yield : 42%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.46-7.24 (m, 1H), 6.99 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.70 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 0.52 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 159.87, 153.07, 137.02, 135.74, 133.70, 129.30, 128.70, 128.09, 127.58, 114.60, 110.92, 105.30, 69.85, 60.87, 56.25, 56.17, -1.90. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₄H₂₈O₄Si 408.1757, found 408.1765 (M₊).

Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylidimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (52)



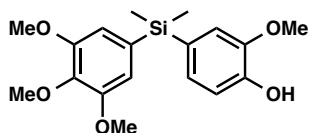
The title compound was prepared according to the procedure described for **48**, starting from 5-bromobenzo[d][1,3]dioxole. Yield : 36%. White solid. mp : 75-76 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.00 (dd, 2H, *J* = 7.6, 1.1 Hz), 6.96 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 6.85 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 5.94 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 0.51 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.10, 148.64, 147.50, 139.27, 133.33, 131.18, 128.31, 113.52, 110.91, 108.71, 100.67, 60.87, 56.27, -1.92. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₃O₅Si 347.1315, found 333.1524 (M+H⁺).

(3,4-Dimethoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**53**)



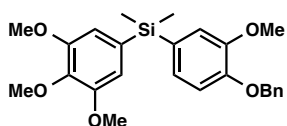
Methyl iodide (21 μL , excess) was added to a mixture of 5-(dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (**41**) (30 mg, 0.086 mmol), potassium carbonate (11.9 mg, 0.172 mmol) and acetone (2 mL) at room temperature. The mixture was stirred under reflux for 11 h and at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **53** (79.1 mg, 41%) as a white solid. mp : 73-74 $^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.10 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.1$ Hz), 7.00 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 6.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.71 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 6H), 3.84 (s, 6H), 0.53 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 153.08, 150.19, 148.66, 139.20, 133.58, 129.35, 127.60, 116.51, 111.08, 110.94, 60.87, 56.26, 55.98, 55.80, -1.83. HRMS (FAB $^+$) m/z : calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{Si}$ 362.1550, found 362.1540 (M^+).

4-(Dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (**55**)



The title compound was prepared according to the procedure described for **41**, starting from compound **56**. Yield : 74%. White solid. mp : 123-125 $^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.06 (dd, 1H, $J = 7.7, 1.4$ Hz), 6.94-6.96 (m, 2H), 6.70 (s, 2H), 5.73 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 0.52 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 152.97, 146.83, 146.33, 139.09, 133.56, 128.69, 127.96, 115.72, 114.40, 110.84, 60.78, 56.16, 55.88, -1.90. HRMS (FAB $^+$) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Si}$ 348.1393, found 348.1411 (M^+).

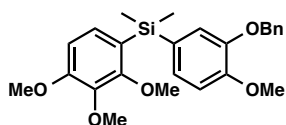
(4-(Benzyloxy)-3-methoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**56**)



The title compound was prepared according to the procedure described for **48**, starting from compound **44f**. Yield : 12%. Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.44 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.36 (td, 2H, $J = 6.6, 1.7$ Hz), 7.28-7.31 (m, 1H), 7.01-7.03 (m, 2H), 6.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.69 (s, 2H), 5.17 (s, 2H),

3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 0.52 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 152.95, 149.30, 149.11, 137.07, 133.45, 129.82, 128.54, 127.81, 127.42, 127.17, 117.13, 113.43, 110.80, 70.67, 60.77, 56.13, 56.08, 30.93, -1.98. HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Si}$ 438.1863, found 438.1867 (M^+).

(3-(Benzyloxy)-4-methoxyphenyl)dimethyl(2,3,4-trimethoxyphenyl)silane (58a)



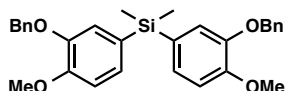
The title compound was prepared according to the procedure described for **48**, starting from compound **57a**. Colorless oil (crude). This was used in the next step without further purification.

(3-(Benzyloxy)-4-methoxyphenyl)(7-methoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-dimethylsilane (58b)



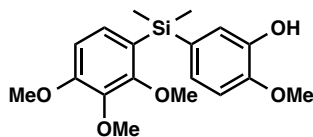
The title compound was prepared according to the procedure described for **48**, starting from compound **57b**. Colorless oil (crude). This was used in the next step without further purification.

Bis(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)dimethylsilane (58c)



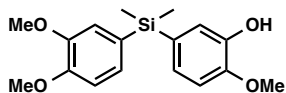
The title compound was prepared according to the procedure described for **48**, starting from compound **57c**. Yield : 39%. White solid. mp : 82-84 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.39 (d, 4H, $J = 6.9$ Hz), 7.33 (t, 4H, $J = 7.4$ Hz), 7.28 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.01 (dd, 2H, $J = 8.0, 1.1$ Hz), 6.95 (d, 2H, $J = 1.7$ Hz), 6.88 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 5.08 (s, 4H), 3.89 (s, 6H), 0.39 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 150.65, 147.59, 137.24, 129.63, 128.45, 127.81, 127.74, 127.45, 119.69, 111.48, 71.10, 55.79, -2.13. HRMS (FAB⁺) m/z : calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Si}$ 484.2070, found 484.2034 (M^+).

5-(Dimethyl(2,3,4-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (59)



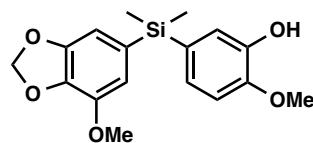
The title compound was prepared according to the procedure described for **41**, starting from compound **58a**. Yield : 4.8% (2 steps). Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.09 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 7.02 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.7$ Hz), 6.96 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.86 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 0.51 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 158.42, 155.39, 147.15, 144.98, 141.37, 131.59, 130.23, 126.35, 123.15, 119.87, 110.23, 107.13, 60.47, 60.36, 55.89, 55.71, -1.78. HRMS (FAB $^+$) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Si}$ 348.1393, found 348.1411 (M^+).

5-((3,4-Dimethoxyphenyl)dimethylsilyl)-2-methoxyphenol (60)



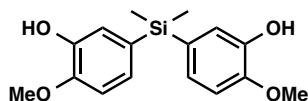
The title compound was prepared according to the procedure described for **47**, starting from compound **62**. Yield : 15%. Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.07-7.09 (m, 2H), 6.99-7.00 (m, 2H), 6.85-6.89 (m, 2H), 5.56 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 0.50 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 149.95, 148.51, 147.37, 145.15, 130.80, 129.68, 127.40, 126.41, 119.80, 116.39, 110.93, 110.37, 55.83, 55.73, 55.67, -2.08. HRMS (FAB $^+$) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{Si}$ 318.1287, found 318.1288 (M^+).

2-Methoxy-5-((7-methoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)dimethylsilyl)phenol (61)



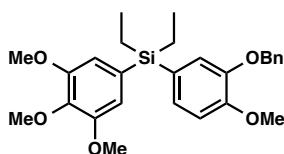
The title compound was prepared according to the procedure described for **41**, starting from compound **58b**. Yield : 8.4% (2 steps). Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.06 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 6.99 (dd, 1H, $J = 1.7, 8.0$ Hz), 6.86 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.66 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.95 (s, 2H), 5.56 (s, 1H), 3.890 (s, 3H), 3.886 (s, 3H), 0.48 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 148.78, 147.46, 145.18, 143.72, 136.19, 132.21, 130.36, 126.39, 119.76, 113.48, 110.39, 107.44, 101.13, 56.66, 55.74, -2.11. HRMS (FAB $^+$) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Si}$ 332.1080, found 332.1076 (M^+).

5,5'-(Dimethylsilanediyl)bis(2-methoxyphenol) (62)



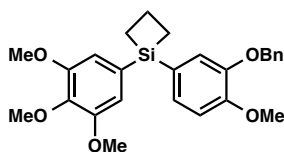
The title compound was prepared according to the procedure described for **41**, starting from compound **58c**. Yield : 86%. White solid. mp : 130-133 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.06 (d, 2H, *J* = 1.7 Hz), 6.99 (dd, 2H, *J* = 1.7, 8.0 Hz), 6.85 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 5.54 (s, 2H), 3.88 (s, 6H), 0.48 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 147.36, 145.12, 130.74, 126.42, 119.82, 110.37, 55.75, -2.21. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₆H₂₀O₄Si 304.1131, found 304.1155 (M⁺).

(3-(Benzyloxy)-4-methoxyphenyl)diethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (64a)



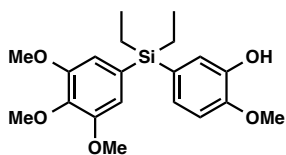
The title compound was prepared according to the procedure described for **45**, starting from dichlorodiethylsilane. Yield : 32.6%. White solid. mp : 61-62 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.38 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.33-7.30 (m, 2H), 7.27-7.25 (m, 1H), 7.07 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.98 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 6.92 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.63 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.80 (s, 6H), 0.99-0.94 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 152.97, 150.83, 147.61, 139.12, 137.34, 131.43, 128.77, 128.56, 127.86, 127.40, 127.21, 120.60, 111.54, 71.24, 60.87, 56.22, 58.84, 7.54, 4.31. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₇H₃₄O₅Si 466.2176, found 466.2184 (M⁺).

1-(3-(Benzyloxy)-4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (64b)



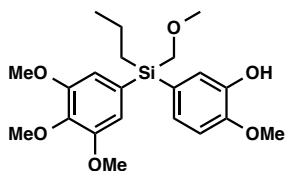
The title compound was prepared according to the procedure described for **45**, starting from 1,1-dichlorosilacyclobutane. Yield : 10%. White solid. mp : 95-97 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.39-7.37 (m, 2H), 7.35-7.32 (m, 2H), 7.29-7.25 (m, 1H), 7.20 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 7.10 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.96 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.77 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 2.22-2.19 (m, 2H), 1.45-1.40 (m, 4H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.22, 151.34, 147.92, 129.58, 137.20, 131.50, 128.59, 127.93, 127.56, 127.47, 119.89, 111.71, 111.10, 71.24, 60.91, 56.27, 55.93, 18.24, 14.42. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₆H₃₀O₅Si 450.1863, found 450.1863 (M⁺).

5-(Diethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (**65**)



The title compound was prepared according to the procedure described for **41**, starting from compound **64a**. Yield : 94%. White solid. mp : 62-63 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.07 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 6.99 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.69 (s, 2H), 5.57 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 1.05-0.99 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 152.98, 147.53, 145.25, 139.14, 131.48, 128.34, 127.34, 120.54, 111.60, 110.43, 60.87, 56.24, 55.80, 7.56, 4.23. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₀H₂₉O₅Si 377.1784, found 377.1777 (M+H⁺).

5-(Ethoxy(propyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (**66**)



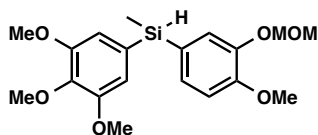
To a mixture of 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)siletane (**64b**) (79.7 mg, 0.18 mmol), EtOH (5 mL) and ethyl acetate (1 mL) was added 5% Pd/C (14.5 mg) at room temperature, and the whole was stirred under an H₂ atmosphere at the same temperature for 14 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1) and PTLC (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **66** (21.8 mg, 30%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.14 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.08 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.89 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.78 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 3.75 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz), 1.48-1.43 (m, 2H), 1.21 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz), 1.11-1.07 (m, 2H), 0.98 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.04, 148.04, 145.29, 139.58, 130.70, 127.58, 127.33, 120.35, 111.31, 110.43, 60.86, 59.28, 56.24, 55.82, 18.54, 18.34, 16.85, 16.74. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₂₁H₃₁O₆Si 407.890, found 407.1895 (M+H⁺).

2-Methoxy-5-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)siletan-1-yl)phenol (**67**)



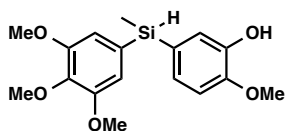
To a mixture of 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)siletane (**64b**) (201.9 mg, 0.45 mmol) and ethyl acetate (5 mL) was added 5% Pd/C (20 mg) at room temperature, and the whole was stirred under an H₂ atmosphere at the same temperature for 13 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 4/1) to give **67** (48.5 mg, 30%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.19 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.11 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.92 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.82 (s, 2H), 5.66 (brs, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 6H), 2.26-2.22 (m, 2H), 1.47 (t, 4H, *J* = 8.3 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.23, 148.08, 145.49, 139.58, 131.60, 128.60, 127.11, 120.20, 111.15, 110.63, 60.90, 56.29, 55.89, 18.25, 14.34. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₉H₂₄O₅Si 360.1393, found 360.1394 (M⁺).

(4-Methoxy-3-(methoxymethoxy)phenyl)(methyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)-silane (**68**)



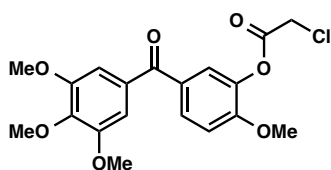
To a solution of 4-bromo-2-(methoxymethoxy)phenol (**44g**) (494.18 mg, 2 mmol) and 5-bromo-1,2,3-trimethoxyphenol (494.1 mg, 2 mmol) in dry THF (15 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (1.76 M, 2.5 mL, 4 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. This was stirred at same temperature for 1.5 h, and then methylchlorosilane (0.23 mL, 2.2 mmol) was added. Stirring was continued at -78 °C for 2 h and at room temperature for 13.5 h. The reaction was quenched with NH₄Cl aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 4/1) to give crude (**68**) (426.7 mg) as a colorless oil, which was used in the next step without further purification.

2-Methoxy-5-(methyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)phenol (**69**)



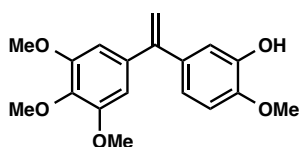
To a solution of crude (4-methoxy-3-(methoxymethoxy)phenyl)(methyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**68**) (31 mg) in MeOH (1 mL) was added one drop of conc. HCl aq. at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then evaporated, and the residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 3/1) to give **69** (8.8 mg, 18% (2 steps)) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.10 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.05 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.89 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.75 (s, 2H), 5.60 (s, 1H), 4.87 (q, 1H, *J* = 3.6 Hz), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 0.59 (d, 3H, *J* = 3.6 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.21, 147.94, 145.45, 139.45, 130.62, 127.42, 127.32, 120.36, 110.64, 110.41, 60.89, 56.25, 55.88, -4.51. HRMS (FAB⁺) *m/z* : calcd for C₁₇H₂₃O₅Si 335.1315, found 335.1306 (M+H⁺).

2-Methoxy-5-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)phenyl 2-chloroacetate (**71**)



The title compound was prepared according to the reported method²⁹. Yield : 72%. White solid. mp : 149-151 °C (lit. 149-151 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.79 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.62 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 7.07 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.03 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 193.67, 165.49, 154.53, 153.00, 141.88, 138.82, 132.75, 130.47, 130.33, 124.93, 111.79, 107.49, 61.07, 56.42, 56.31, 40.61. MS (FAB⁺) *m/z* : 395 (M+H⁺).

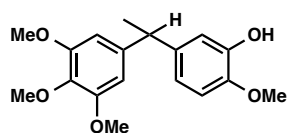
2-Methoxy-5-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)vinyl)phenol (**72**)



To a solution of 2-methoxy-5-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)phenyl 2-chloroacetate (**71**) (197.4 mg, 0.5 mmol) in dry toluene (2 mL) was added a solution of trimethylaluminium in toluene (1.8 M, 0.56 mL) under an Ar atmosphere at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 6 h and at 100 °C for 3 h, and then poured into ice water. The whole was extracted with ethyl acetate. The extract was

successively washed with water and brine, and then dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 10/1 to 0/1) to give **72** (17.5 mg, 11%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 6.97 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 6.85 (dd, 1H, $J = 8.6, 1.7$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 6.55 (s, 2H), 5.60 (s, 1H), 5.38 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 5.31 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 3.91 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 152.90, 149.63, 146.50, 145.28, 137.79, 137.53, 134.78, 120.27, 114.55, 112.96, 110.23, 105.80, 61.01, 56.22, 56.06. MS (FAB⁺) m/z : 317 ($\text{M}+\text{H}^+$).

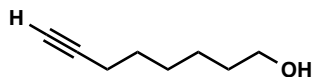
2-Methoxy-5-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethyl)phenol (**73**)



To a solution of 2-methoxy-5-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)vinyl)phenol (**72**) (17.5 mg, 0.043 mmol) in EtOH (2 mL) was added 5% Pd/C (14.5 mg) at room temperature, and the mixture was stirred under an H_2 atmosphere at the same temperature for 13 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 2/1) to give **73** (11.7 mg, 83%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 6.81 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.78 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 6.71 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.3$ Hz), 6.43 (s, 2H), 5.58 (s, 1H), 3.99 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 9H), 1.58 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 153.12, 145.47, 144.94, 142.34, 139.79, 136.26, 118.86, 113.84, 110.56, 104.63, 60.91, 56.15, 56.05, 44.54, 22.14. MS (FAB⁺) m/z : 319 ($\text{M}+\text{H}^+$).

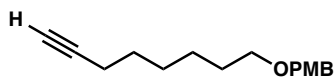
第 3 章 第 3 節

7-octyn-1-ol (**84**)



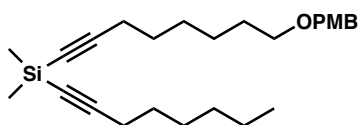
To ethylene diamine (15mL) was added sodium hydride (2.00 g, 50.0 mmol) at 0 °C, and stirred at r.t. for 1 h. Then, stirring was continued at 65 °C for 1 h. The mixture was then cooled to 45 °C before addition of 3-octyn-1-ol (**83**) (1.43 mL, 10.0 mmol) dropwise over 2 min, and stirred at 65 °C for 1 day. The reaction was quenched with 2M HCl aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1 to 1/1) to give **84** (906 mg, 72%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 3.59 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 2.14 (2H, td, *J* = 7.0, 2.7 Hz), 1.89 (1H, t, *J* = 2.7 Hz), 1.55-1.46 (4H, m), 1.41-1.29 (4H, m). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 84.57, 68.18, 62.86, 32.56, 28.44, 28.35, 25.20, 18.29. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

1-methoxy-4-((oct-7-yn-1-yloxy)methyl)benzene (**85**)



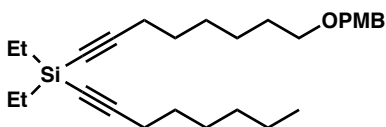
To a solution of 7-octyn-1-ol (**84**) (792 mg, 6.28 mmol) in dichloromethane (3 mL) was added a solution of 4-methoxybenzyl trichloroacetimidate (1.30 mL, 6.28 mmol) in dichloromethane (3 mL) at r.t.. Then, a solution of (D)-camphorsulfonic acid (333 mg, 0.63 mmol) in dichloromethane (3 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at r.t. for 19 h, and quenched with saturated aqueous sodium bicarbonate solution, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 10/1 to 4/1) to give **85** (520 mg, 34%) as a yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.27 (2H, d, *J* = 4.0 Hz), 6.88 (2H, d, *J* = 4.0 Hz), 4.43 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.44 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 2.18 (2H, td, *J* = 7.0, 2.8 Hz), 1.93 (1H, t, *J* = 2.6 Hz), 1.61 (2H, m), 1.52 (2H, m), 1.39 (4H, m). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 159.07, 130.72, 129.20, 113.71, 84.65, 72.50, 70.01, 68.11, 55.24, 29.60, 28.54, 28.39, 25.69, 18.32. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

(8-((4-methoxybenzyl)oxy)oct-1-yn-1-yl)dimethyl(oct-1-yn-1-yl)silane (88a)



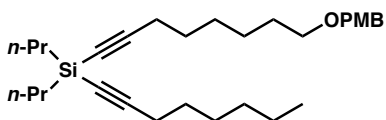
To a solution of 1-methoxy-4-((oct-7-yn-1-yloxy)methyl)benzene (**85**) (2.08 g, 8.44 mmol) and 1-octyne (**86**) (1.24 mL, 8.44 mmol) in dry tetrahydrofuran (15 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (1.60 M, 13.2 mL, 21.1 mmol) under an Ar atmosphere at -78°C . The mixture was stirred at the same temperature for 1 h, and then added to a solution of dichlorodimethylsilane (**87a**) (819 mL, 8.44 mmol) in dry tetrahydrofuran (1.6 mL) at -78°C . Stirring was continued at room temperature for 2.5 h. The reaction was quenched with NH_4Cl aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over Na_2SO_4 . The solvent was evaporated to give **88a** (crude) as a yellow oil. This was used in the next step without further purification.

diethyl(8-((4-methoxybenzyl)oxy)oct-1-yn-1-yl)(oct-1-yn-1-yl)silane (88b)



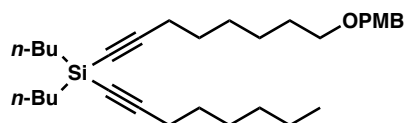
The title compound was prepared according to the procedure described for **88a**, starting from compound **87b**. Yield : 44%. Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 7.25 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 6.89 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 4.40 (2H, s), 3.78 (3H, s), 3.43 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 2.23 (4H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.58-1.29 (16H, m), 1.02 (6H, t, $J = 7.9$ Hz), 0.89 (3H, t, $J = 6.9$ Hz) 0.62 (4H, q, $J = 7.9$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 129.84, 114.39, 72.88, 70.47, 55.48, 31.98, 30.44, 30.39, 30.24, 30.09, 29.94, 29.38, 29.23, 29.20, 29.07, 26.43, 23.21, 20.14, 20.10, 14.28, 7.57, 7.46. MS (FAB+) m/z : not detected.

(8-((4-methoxybenzyl)oxy)oct-1-yn-1-yl)(oct-1-yn-1-yl)dipropylsilane (88c)



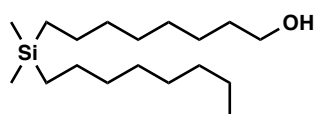
The title compound was prepared according to the procedure described for **88a**, starting from compound **87c**. Colorless oil (crude). This was used in the next step without further purification.

dibutyl(8-((4-methoxybenzyl)oxy)oct-1-yn-1-yl)(oct-1-yn-1-yl)silane (88d)



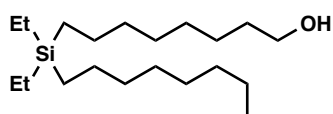
The title compound was prepared according to the procedure described for **88a**, starting from compound **87d**. Yellow oil (crude). This was used in the next step without further purification.

8-(dimethyl(octyl)silyl)octan-1-ol (89a)



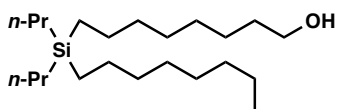
To a mixture of (8-((4-methoxybenzyl)oxy)oct-1-yn-1-yl)dimethyl(oct-1-yn-1-yl) silane (**88a**) (134 mg, 0.325 mmol) and ethanol (10 mL) was added 5% Pd/C (13.4 mg) at room temperature, and the mixture was stirred under an H₂ atmosphere at the same temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 10/1) to give **89a** (49.4 mg, 1.4%, 2 step) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, acetone-*d*₆) : δ 3.52 (2H, q, *J* = 5.7 Hz), 3.37 (1H, t, *J* = 5.7 Hz), 1.52-1.47 (2H, m), 1.36-1.29 (20H, m), 0.88 (3H, t, *J* = 6.9 Hz), 0.52 (4H, t, *J* = 7.7 Hz), -0.04 (6H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 62.48, 34.43, 33.82, 30.23, 30.12, 27.32, 26.88, 26.73, 24.60, 15.84, 15.57, 14.07, -3.22. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

8-(diethyl(octyl)silyl)octan-1-ol (89b)



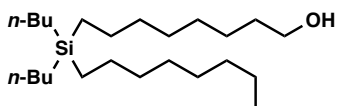
The title compound was prepared according to the procedure described for **89a**, starting from compound **88b**. Yield : 42%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 3.64 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 1.59-1.54 (2H, m), 1.40-1.26 (26H, m), 0.93-0.87 (7H, m), 0.51-0.49 (6H, m). ¹³C-NMR (500 MHz, acetone-*d*₆) : δ 62.49, 34.62, 33.83, 30.39, 30.24, 30.09, 29.94, 26.74, 24.58, 24.57, 23.34, 14.36, 12.30, 12.28, 7.80, 4.32. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

8-(octyldipropylsilyl)octan-1-ol (**89c**)



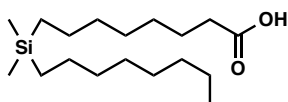
The title compound was prepared according to the procedure described for **89a**, starting from compound **88c**. Yield : 44% (2 step). Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 3.64 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 1.60-1.54 (2H, m), 1.42-1.26 (26H, m), 0.96-0.87 (9H, m), 0.50-0.45 (8H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 63.10, 33.96, 33.87, 32.80, 31.95, 29.38, 29.29, 29.26, 25.76, 23.91, 22.69, 18.68, 17.50, 15.33, 14.12, 12.56, 12.54. MS (FAB+) m/z : not detected.

8-(dibutyl(octyl)silyl)octan-1-ol (**89d**)



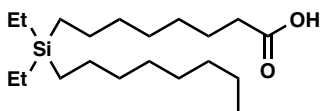
The title compound was prepared according to the procedure described for **89a**, starting from compound **88d**. Yield : 6.8% (2 step). Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 3.52 (2H, q, $J = 5.8$ Hz), 3.38 (1H, t, $J = 5.8$ Hz), 1.50-1.47 (2H, m), 1.33-1.29 (30H, m), 0.90-0.87 (9H, m), 0.56-0.53 (8H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 62.49, 34.60, 34.57, 33.83, 32.66, 30.24, 30.09, 30.06, 29.95, 27.51, 26.96, 26.74, 24.62, 24.59, 23.34, 14.36, 14.05, 13.09, 13.06, 12.84. MS (FAB+) m/z : not detected.

8-(dimethyl(octyl)silyl)octanoic acid (**90a**)



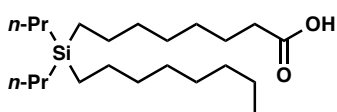
To a mixture of 8-(dimethyl(octyl)silyl)octan-1-ol (**89a**) (49.4 mg, 0.164 mmol) and dichloromethane (2 mL) was Dess-Martin Periodinane (DMP) (76.7 mg, 0.180 mmol), and stirred at the room for 20 h. The reaction was quenched with sat. NaHCO_3 aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over Na_2SO_4 . The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 10/1 to 4/1) to give **90a** (29.3 mg, 56%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 10.42 (1H, br), 2.28 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.62-1.56 (2H, m), 1.31 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J = 6.9$ Hz), 0.52 (4H, t, $J = 6.9$ Hz), -0.04 (6H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 174.71, 34.44, 34.29, 34.17, 32.66, 30.24, 30.01, 29.94, 29.76, 25.69, 24.59, 24.57, 23.33, 15.83, 14.36, -3.20. MS (FAB+) m/z : 315 ($\text{M}+\text{H}^+$).

8-(diethyl(octyl)silyl)octanoic acid (90b)



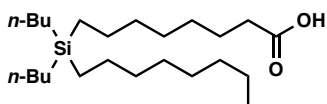
The title compound was prepared according to the procedure described for **90a**, starting from compound **89b**. Colorless oil (crude). This was used in the next step without further purification.

8-(octyldipropylsilyl)octanoic acid (90c)



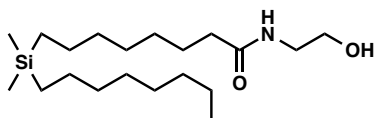
The title compound was prepared according to the procedure described for **90a**, starting from compound **89c**. Yield : 70%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 2.35 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.65-1.62 (2H, m), 1.34-1.26 (24H, m), 0.96-0.87 (9H, m), 0.52-0.47 (8H, m). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 179.53, 33.94, 33.70, 31.95, 29.29, 29.02, 28.90, 24.70, 23.91, 23.87, 22.69, 18.66, 17.49, 15.33, 14.11, 12.54. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

8-(dibutyl(octyl)silyl)octanoic acid (90d)



The title compound was prepared according to the procedure described for **90a**, starting from compound **89d**. Yield : 62%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 2.35 (2H, t, *J* = 7.7 Hz), 1.66-1.60 (2H, m), 1.33-1.22 (28H, m), 0.88 (9H, t, *J* = 7.2 Hz), 0.50-0.46 (8H, m). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 179.28, 33.93, 33.52, 31.94, 29.29, 29.27, 28.75, 26.86, 26.19, 24.65, 23.89, 23.77, 22.69, 14.12, 13.80, 12.46, 12.43, 12.16. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

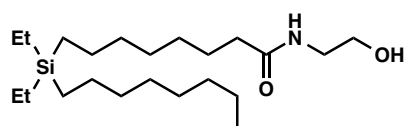
8-(dimethyl(octyl)silyl)-*N*-(2-hydroxyethyl)octanamide (76)



To a mixture of 8-(dimethyl(octyl)silyl)octanoic acid (**90a**) (4.7 mg, 14.9 nmol) and triethylamine (4.15 mL, 29.8 nmol) in dichloromethane (0.5 mL) was added methyl chloromate (1.80 mL, 29.8 nmol) at 0 °C, and stirred at room temperature for 2 h. Then, ethanolamine was added with stirring at 0 °C, the

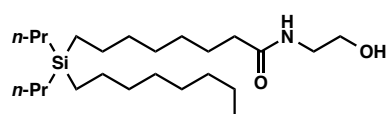
mixture was stirred at room temperature for 20 h. The reaction was quenched with sat. NH_4Cl aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over Na_2SO_4 . The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/1) to give **76** (1.9 mg, 36%) as a yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 7.07 (1H, br), 3.90 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 3.55 (2H, q, $J = 5.6$ Hz), 3.27 (2H, q, $J = 5.5$ Hz), 2.16 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.61-1.55 (2H, m), 1.30 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J = 6.9$ Hz), 0.52 (4H, t, $J = 8.0$ Hz), -0.04 (6H, s). HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{43}\text{O}_2\text{NSi}$ 357.3063, found 358.3061 ($\text{M}+\text{H}^+$).

8-(diethyl(octyl)silyl)-*N*-(2-hydroxyethyl)octanamide (**77**)



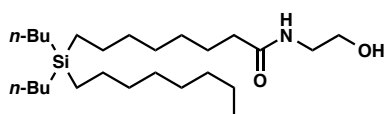
The title compound was prepared according to the procedure described for **76**, starting from compound **90b**. Yield : 34% (2 step). Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 7.08 (1H, br), 3.90 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.55 (2H, q, $J = 5.5$ Hz), 3.27 (2H, q, $J = 5.7$ Hz), 2.16 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.61-1.55 (2H, m), 1.31 (24H, m), 0.94 (4H, t, $J = 7.7$ Hz), 0.88 (3H, t, $J = 6.9$ Hz), 0.54 (6H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 173.75, 62.33, 42.96, 36.67, 34.63, 34.56, 32.66, 30.40, 30.25, 30.09, 29.94, 26.51, 24.58, 23.34, 14.37, 12.31, 12.29, 7.81, 4.32. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{47}\text{O}_2\text{NSi}$ 385.3376, found 386.3422 ($\text{M}+\text{H}^+$).

N-(2-hydroxyethyl)-8-(octyldipropylsilyl)octanamide (**78**)



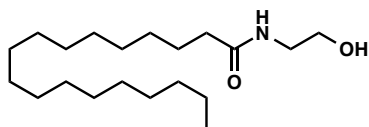
The title compound was prepared according to the procedure described for **76**, starting from compound **90c**. Yield : 40%. Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 3.54 (2H, q, $J = 5.2$ Hz), 3.27 (2H, t, $J = 5.2$ Hz), 2.16 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.59-1.57 (2H, m), 1.37-1.29 (24H, m), 0.97-0.94 (6H, m), 0.88 (3H, t, $J = 6.0$ Hz), 0.55-0.52 (8H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 173.66, 62.13, 42.79, 36.57, 34.58, 34.55, 32.62, 30.36, 30.21, 30.05, 29.90, 26.47, 24.62, 24.58, 23.30, 18.93, 18.15, 15.95, 14.33, 13.15, 13.10. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{O}_2\text{NSi}$ 414.3761, found 414.3762 ($\text{M}+\text{H}^+$).

8-(dibutyl(octyl)silyl)-*N*-(2-hydroxyethyl)octanamide (79)



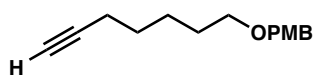
The title compound was prepared according to the procedure described for **76**, starting from compound **90d**. Yield : 14%. Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 7.06 (1H, br), 3.89 (1H, t, $J = 5.5$), 3.55 (2H, q, $J = 5.5$ Hz), 3.27 (2H, q, $J = 5.5$ Hz), 2.16 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.58 (2H, m), 1.37-1.29 (28H, m), 0.90-0.87 (9H, m), 0.56-0.53 (8H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 173.69, 62.31, 42.93, 36.63, 34.54, 32.61, 30.35, 30.21, 30.05, 29.91, 27.47, 26.91, 26.46, 24.61, 24.55, 23.30, 14.33, 14.06, 14.01, 13.08, 13.01, 12.79. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{O}_2\text{NSi}$ 441.4002, found 442.4013 ($\text{M}+\text{H}^+$).

N-(2-hydroxyethyl)stearamide (75)



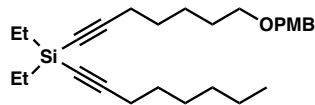
The title compound was prepared according to the procedure described for **76**, starting from compound **91**. Yield : 74%. Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) : δ 7.73 (1H, br), 3.35 (2H, m), 3.08 (2H, q, $J = 5.9$ Hz), 2.18 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.03 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 1.46 (2H, m), 1.28-1.23 (28H, m), 0.85 (3H, t, $J = 6.9$ Hz). MS (FAB+) m/z : 328 (M^+).

1-((hept-6-yn-1-yloxy)methyl)-4-methoxybenzene (93)



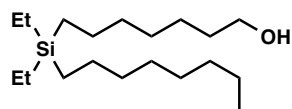
The title compound was prepared according to the procedure described for **85**, starting from compound **92**. Yield : 70%. Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.26 (2H, d, $J = 5.7$ Hz), 6.88 (2H, d, $J = 5.7$ Hz), 4.43 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.44 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 2.19 (2H, td, $J = 7.0, 2.7$ Hz), 1.93 (1H, t, $J = 2.7$ Hz), 1.65-1.59 (2H, m), 1.56-1.51 (2H, m), 1.50-1.45 (4H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 159.09, 130.68, 129.21, 113.73, 84.54, 72.54, 69.89, 68.19, 55.26, 29.24, 28.30, 25.39, 18.36. MS (FAB+) m/z : not detected.

diethyl(7-((4-methoxybenzyl)oxy)hept-1-yn-1-yl)(oct-1-yn-1-yl)silane (94)



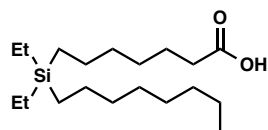
The title compound was prepared according to the procedure described for **88a**, starting from compound **86**. Yellow oil (crude). This was used in the next step without further purification.

7-(diethyl(octyl)silyl)heptan-1-ol (95)



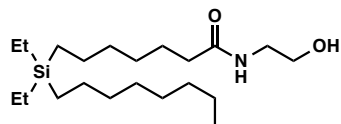
The title compound was prepared according to the procedure described for **89a**, starting from compound **94**. Yield : 14% (2 step). Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 3.64 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.59-1.55 (2H, m), 1.31-1.26 (20H, m), 0.93-0.86 (9H, m), 0.51-0.46 (8H, m). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 63.08, 33.94, 33.89, 32.83, 32.82, 31.95, 29.29, 29.12, 25.69, 23.85, 23.82, 22.68, 14.11, 11.71, 11.68, 7.50, 3.71. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

7-(diethyl(octyl)silyl)heptanoic acid (96)



The title compound was prepared according to the procedure described for **90a**, starting from compound **95**. Yield : 50%. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 2.35 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.66-1.60 (2H, m), 1.34-1.26 (18H, m), 0.95-0.87 (9H, m), 0.57-0.46 (8H, m). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 179.48, 33.96, 33.94, 33.50, 31.95, 29.30, 28.77, 24.64, 23.86, 23.71, 22.69, 14.12, 11.68, 7.51, 3.70. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

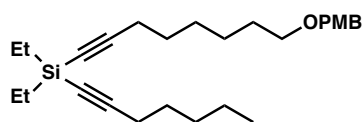
7-(diethyl(octyl)silyl)-*N*-(2-hydroxyethyl)heptanamide (97)



The title compound was prepared according to the procedure described for **76**, starting from compound **96**. Yield : 40%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 6.42 (1H, br), 3.74 (2H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.44-3.43 (2H, m), 3.00 (1H, s), 2.25 (2H, t, *J* = 7.7 Hz), 1.65-1.62 (2H, m), 1.31-1.26 (18H, m),

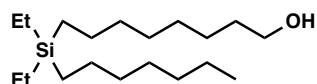
0.92-0.86 (9H, m), 0.51-0.44 (8H, m). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 175.11, 62.24, 42.70, 36.43, 33.93, 33.64, 31.93, 29.29, 28.98, 25.77, 23.84, 23.77, 22.67, 14.11, 11.72, 11.64, 7.50, 3.66. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{45}\text{O}_2\text{NSi}$ 372.3300, found 372.3292 ($\text{M}+\text{H}^+$).

diethyl(hept-1-yn-1-yl)(8-((4-methoxybenzyl)oxy)oct-1-yn-1-yl)silane (99)



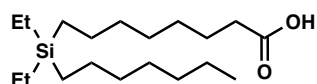
The title compound was prepared according to the procedure described for **88a**, starting from compound **98**. Yellow oil (crude). This was used in the next step without further purification.

8-(diethyl(heptyl)silyl)octan-1-ol (100)



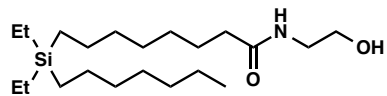
The title compound was prepared according to the procedure described for **89a**, starting from compound **99**. Yield : 15% (2 step). Colorless oil. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 3.64 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 1.60-1.54 (2H, m), 1.46-1.28 (24H, m), 0.93-0.87 (7H, m), 0.51-0.46 (6H, m). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 63.09, 33.92, 33.85, 32.80, 31.87, 29.38, 29.27, 29.02, 25.76, 25.73, 23.87, 23.84, 22.72, 14.12, 11.70, 7.51, 3.72. MS (FAB+) m/z : not detected.

8-(diethyl(heptyl)silyl)octanoic acid (101)



The title compound was prepared according to the procedure described for **90a**, starting from compound **95**. Yield : 19%. Colorless oil. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 2.35 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.66-1.60 (2H, m), 1.34-1.28 (18H, m), 0.95-0.87 (9H, m), 0.51-0.46 (8H, m). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 179.81, 33.98, 33.94, 33.91, 33.67, 31.87, 29.02, 28.89, 24.69, 23.86, 23.80, 22.72, 14.12, 11.67, 7.51, 3.70. MS (FAB+) m/z : not detected.

8-(diethyl(heptyl)silyl)-*N*-(2-hydroxyethyl)octanamide (102)



The title compound was prepared according to the procedure described for **76**, starting from compound **101**. Yield : 68%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 6.16 (1H, br), 3.72 (2H, t, *J* = 5.1 Hz), 3.42 (2H, q, *J* = 5.1), 2.72 (1H, s), 2.22 (2H, t, *J* = 7.7 Hz), 1.65-1.60 (2H, m), 1.29-1.23 (18H, m), 0.92-0.86 (9H, m), 0.50-0.45 (8H, m). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 174.97, 62.32, 42.65, 36.47, 33.91, 33.75, 31.94, 31.86, 29.24, 29.01, 25.81, 23.86, 23.84, 22.71, 14.11, 11.70, 11.68, 7.51, 3.69. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₁H₄₅O₂NSi 372.3300, found 372.3292 (M+H⁺).

2. 生物実験

第 2 章 第 2 節

ER reporter gene assay^{47, 95}

ER-agonistic and antagonistic activities of compounds were evaluated by means of reporter gene assay using a Gal4-human ER α or ER β reporter system. A fragment of human ER α / β was inserted into the pCMX-GAL4 vector to obtain pCMX-GAL4-hER (pCMX-flag vector to make pCMX-ER α / β). GAL4-responsive MH100 (USA)x4-tk-LUK reporter was used. Human embryonic kidney (HEK 293) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM without Phenol Red) containing 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic-antimycotic (Nacalai) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Transfections were performed by the calcium phosphate coprecipitation method. Test compounds were added at 8 h after transfection. Cells were harvested 16-20 h after the treatment, and luciferase and β -galactosidase activities were assayed using a luminometer and a microplate reader. DNA cotransfection experiments were done with 50 ng of reporter plasmid, 15-20 ng pCMX-s-galactosidase, 10-15 ng of each receptor expression plasmid and pGEM carrier DNA to make a total of 150 ng DNA per well in a 96-well plate. Luciferase data were normalized to an internal β -galactosidase control, and reported values are means of triplicate assays. Antagonist activity was measured in the presence of 0.3 nM 17 β -estradiol.

⁸⁵ Noguchi-Yachide, T.; Sugita, K.; Hashimoto, Y. Estrogen Receptor α / β Ligands Derived from Thalidomide. *Heterocycles* **2011**, *83*, 2137-2147.

第 2 章 第 3 節

STS-inhibitory activity assay

The STS-inhibitory activity assay was performed essentially according to the reported method⁹⁶. Briefly, MCF-7 cells were cultured in D-MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 10% FBS at 37 °C under 5% CO₂ in air. Homogenate of MCF-7 cells was prepared by repeated (five times) freezing and thawing of the combined cell pellets from several culture flasks, followed by homogenization in a homogenizer. The homogenate was diluted with Tris-EDTA (TE) buffer and centrifuged (15000 g, 4 °C, 15 minutes). We quantified the protein concentration of the supernatant by the Bradford method, and adjusted the concentration to 0.2 mg/mL by adding TE buffer. We used this solution as the STS solution.

STS activity was determined by measuring the total of labeled estrone ([³H]E1) and estradiol ([³H]E2) formed from labeled estrone sulfate ([³H]E1S, PerkinElmer Co., Ltd.). Mixtures of STS solution (300 μL), [³H]E1S (final : 10 nM, 1 μCi) and each inhibitor (10 μL) were incubated at 37 °C for 5 hours. Then, 1 mL of toluene was added to the reaction mixture. Each mixture was shaken and centrifuged to allow phase separation. The organic layer (600 μL) containing [³H]E1 and [³H]E2 was added to 4 mL of scintillation cocktail. The radioactivity of each solution was measured in a liquid scintillator. The inhibitory activity in the presence of 1 μM STX64 was defined as 100%. The assay was performed in triplicate.

⁹⁶ Boivin, R.P.; Luu-The, V.; Lachance, R.; Labrie, F.; Poirier, D. Structure-activity relationships of 17alpha-derivatives of estradiol as inhibitors of steroid sulfatase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4465-4448.

第 3 章 第 2 節

Tubulin polymerization inhibition (TPI) assay

The TPI assay was performed according to the reported method⁹⁷. Briefly, microtubule protein was prepared from porcine brain by several cycles of assembly-disassembly, as described⁹⁸. Tubulin solution was prepared at a concentration of 1.8-2.0 mg/mL. Tubulin polymerization was followed by means of turbidity measurements (absorbance at 400 nm) at 37 °C in microtubule assemble buffer containing 100 mM MES, 1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol, and 1 mM GTP (pH 6.5).

MCF-7 cell proliferation assay

The tumor cell growth-inhibitory activity of the compounds was evaluated by measurement of inhibition of MCF-7 cell growth, as described previously^{99, 100}. Briefly, MCF-7 cells were cultured in D-MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 10% FBS in the presence or absence of a test compound for three days at 37 °C under 5% CO₂ in air. The number of cells with vehicle alone was defined as 100%. The concentration of test compounds that inhibited by 50% the increase of the cell number was quantified (IC₅₀). The assay was performed in triplicate.

Colchicine competitive binding assay¹⁰¹

Mixtures of 1.0 μM (0.1 mg/mL) tubulin, 1.5 μM [³H]colchicine (20 pCi/μL) and test compounds at 3, 10, or 30 μM were prepared and incubated for 30 min at 37 °C. After treatment with 1.5% dextran-coated charcoal solution, they were further incubated for 20 min at 4 °C and centrifuged. The amount of radiolabeled colchicine bound to the tubulin was determined with a scintillation counter. The inhibitory activity in the presence of added 10 μM CA-4 (**39**) was defined as 100%. The assay was performed in triplicate.

⁹⁷ Aoyama, H.; Noguchi, T.; Misawa, T.; Nakamura, T.; Miyachi, H.; Hashimoto, Y.; Kobayashi, H. Development of tubulin-polymerization inhibitors based on the thalidomide skeleton. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 944-949.

⁹⁸ Li, Y.; Kobayashi, H.; Tokiwa, Y.; Hashimoto, Y.; Iwasaki, S. Interaction of Phomopsin a with porcine brain tubulin: Inhibition of tubulin polymerization and binding at a rhizoxin binding site. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 219-224.

⁹⁹ Borrel, C.; Thoret, S.; Cachet, X.; Guénard, D.; Tillequin, F.; Koch, M.; Michel, S. New antitubulin derivatives in the combretastatin A4 series: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3853-3864.

¹⁰⁰ O'Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Bergin, O.; Nathwani, S.M.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. Synthesis and evaluation of azetidinone analogues of combretastatin A-4 as tubulin targeting agents. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8569-8584.

¹⁰¹ Romagnoli, R.; Baraldi, P.G.; Carrion, M.D.; Cara, C.L.; Cruz-Lopez, O.; Tolomeo, M.; Grimaudo, S.; Di Cristina, A.; Pipitone, M.R.; Balzarini, J.; Zonta, N.; Brancale, A.; Hamel, E. Design, synthesis and structure-activity relationship of 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]furan derivatives as a novel class of inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6862-6871.

第 3 章 第 3 節

PPAR reporter gene assay¹⁰¹

PPAR-agonistic activities of compounds were evaluated by means of reporter gene assay using a Gal4-human PPAR α , δ or γ reporter system. A fragment of human PPAR $\alpha/\delta/\gamma$ was inserted into the pCMX-GAL4 vector to obtain pCMX-GAL4-hPPAR (pCMX-flag vector to make pCMX-PPAR $\alpha/\delta/\gamma$). GAL4-responsive MH100 (USA)x4-tk-LUK reporter was used. Human embryonic kidney (HEK 293) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM without Phenol Red) containing 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic-antimycotic (Nacalai) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Transfections were performed by the calcium phosphate coprecipitation method. Test compounds were added at 8 h after transfection. Cells were harvested 16-20 h after the treatment, and luciferase and β -galactosidase activities were assayed using a luminometer and a microplate reader. DNA cotransfection experiments were done with 50 ng of reporter plasmid, 15-20 ng pCMX-s-galactosidase, 10-15 ng of each receptor expression plasmid and pGEM carrier DNA to make a total of 150 ng DNA per well in a 96-well plate. Luciferase data were normalized to an internal β -galactosidase control, and reported values are means of triplicate assays.

※尚、実験項の一部は共同実験者である日本化薬株式会社研究員の中村雅陽博士の博士論文にも掲載されている。

¹⁰¹ 本島和典 マルチ創薬テンプレート手法の有用性の実験的実証 ~新規生理活性物質の創出と選択性の付与~ 東京大学大学院薬学系研究科 平成 22 年度博士論文

