

博士論文

論文題目 タンパク質間相互作用に着目した VDR 阻害薬
ならびに Plk1 阻害薬の創製研究

氏 名 三田 裕介

目次

目次	i
略語集	iii

第1章 研究背景

1-1節 タンパク質間相互作用	
1-1-1. タンパク質間相互作用の重要性	1
1-2節 ペプチド等価体	
1-2-1. ペプチド等価体の重要性	4
1-3節 本博士論文の研究概要	
1-3-1. 研究概要	7

第2章 LXXLL配列を模倣したビタミンD受容体ー コアクチベーター相互作用阻害薬の創製

2-1節 核内受容体	
2-1-1. 核内受容体概説	9
2-1-2. 核内受容体のLXXLL配列を介した転写活性化	11
2-2節 ビタミンD受容体	
2-2-1. ビタミンD受容体概説	15
2-2-2. 骨パジェット病概説	16
2-2-3. 既知VDR阻害薬	18
2-3節 LXXLLペプチド等価体の創製	
2-3-1. 作業仮説	20
2-3-2. 研究目的	22
2-3-3. 化合物デザイン	23
2-3-4. 化合物の合成	28
2-3-5. TR-FRETアッセイによる活性評価	34
2-3-6. レポータージーンアッセイによる活性評価	36
2-3-7. VDR以外の核内受容体に対する阻害活性評価	40
2-3-8. ドッキングスタディによる評価	44
2-3-9. 小括①	45
2-4節 活性向上に向けた化合物の展開	
2-4-1. ベンゾジアゼピン8位アミノ基の寄与	46
2-4-2. 8位アミノ基を有するベンゾジアゼピン化合物の7位構造展開	51
2-4-3. 7位フェニル基に着目した構造展開	59
2-4-4. コバレントドラッグ化の検討	62
2-4-5. 小括②	64
2-5節 LXXLLペプチド等価体の総括	
2-5-1. LXXLLペプチド等価体創製の総括	65

第3章 非ペプチド・ATP非競合型polo-like kinase 1阻害薬の創製	
3-1節 Polo-like kinase 1	
3-1-1. PIk概説	66
3-1-2. PIk1概説	68
3-1-3. 抗がん剤のターゲットとしてのPIk1	71
3-2節 非ペプチド・ATP非競合型PIk1阻害薬の創製	
3-2-1. 作業仮説	74
3-2-2. 研究目的	75
3-2-3. 化合物デザイン	76
3-2-4. 化合物の合成	78
3-2-5. ELISAによるPBD-PLHSpTペプチド相互作用阻害活性評価	79
3-2-6. ELISAによるPIk1キナーゼ阻害活性評価	81
3-2-7. ターフェニル化合物の構造展開	83
3-2-8. PIk1キナーゼ阻害活性とATP競合の評価	87
3-2-9. 小括	88
3-3節 コバレントドラッグ化を狙った構造展開	
3-3-1. コバレントドラッグ化を狙った構造展開	89
3-4節 非ペプチド・ATP非競合型PIk1阻害薬の創製の総括	
3-4-1. 非ペプチド・ATP非競合型PIk1阻害薬の創製の総括	90
第4章 総括	
4-1節 総括	
4-1-1. 総括	91
第5章 実験項	
5-1節 実験項(第2章)	
5-1-1. 計算科学(第2章)	94
5-1-2. 有機合成(第2章)	95
5-1-3. 活性評価(第2章)	124
5-2節 実験項(第3章)	
5-2-1. 有機合成(第3章)	125
5-2-2. 活性評価(第3章)	138
補足	139
謝辞	145

略語集

1,25(OH) ₂ D ₃	calcitriol
24,25(OH) ₂ D ₃	24,25-dihydroxycholecalciferol
25(OH)D ₃	25-hydroxycholecalciferol
Ac	acetyl
AcOEt	ethyl acetate
AcOH	acetic acid
AF-1	activation function 1
AF-2	activation function-2
aq	aqueous
AR	androgen receptor
ATP	adenosine triphosphate
BINAP	2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
dba	dibenzylideneacetone
DDQ	dichlorodicyanoquinone
DIPEA	N,N-diisopropylethylamine
DMAP	N,N-dimethyl-4-aminopyridine
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dppf	1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
DRIP	vitamin D receptor interacting protein
DTT	dithiothreitol
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
ER	estrogen receptor
FAB	fast atom bombardment
FTase	farnesyltransferase
Glu	Glutamic acid
GST	glutathione S-transferase

GTP	guanosine triphosphate
h	hour
H12	helix 12
HAT	histone acetyl transferase
HEK	human embryonic kidney
His	histidine
HMBC	hetero-nuclear multiple-bond connectivity
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HRP	horse radish peroxidase
IL	interleukin
Ile	isoleucine
ipc	isopinocampheyl
LBD	ligand binding domain
Leu	leucine
LUC	luciferase
Lys	lysine
MAP	mitogen-activated protein
Me	methyl
Met	Methionine
min	minute
NCoR	nuclear receptor corepressor
NIS	N-iodosuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
NR	nuclear receptor
°C	degree Celcius
PBD	polo-box domain
PBIP1	polo-box-interacting protein 1
PDB	protein data bank
Phe	phenylalanine
Plk	polo-like kinase
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor

PPI	protein–protein interaction
Pro	proline
PTH	parathyroid hormone
quant.	quantitative yield
r.t.	room temperature
RaNi	Raney nickel
RAR	retinoic acid receptor
RNA	ribonucleic acid
RXR	retinoid X receptor
Ser	serine
SMRT	silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
S _N 2	bimolecular nucleophilic substitution
SRC	steroid receptor coactivator
<i>t</i>	tertiary
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
TBAI	tetra- <i>n</i> -butylammonium iodide
TBS	<i>t</i> -butyldimethylsilyl
TFA	trifluoroacetic acid
TFIID	transcription factor II D
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TR-FRET	time-resolved fluorescence resonance energy transfer
Trp	tryptophan
val	valine
VDR	vitamin D receptor
VDRE	vitamin D responsive element
VEGF	vascular endothelial growth factor

第 1 章 研究背景

1-1 節 タンパク質間相互作用

1-1-1. タンパク質間相互作用の重要性

タンパク質間相互作用 (PPI: protein-protein interaction) とは複数のタンパク質同士が会合すること¹⁻¹⁻¹⁾である。タンパク質間相互作用は、シグナル伝達に關与する¹⁻¹⁻²⁾等、生体にとって重要な役割を果たしており、これらを自在に制御できれば、標的タンパク質のさらなる機能解明や、創薬研究を通じた医薬品の創製等が期待される。

なお抗体医薬においては既に医薬品として実用化されている事例が存在している。例えば大腸がんや肺がんの治療に用いられる bevacizumab (AvastinTM)¹⁻¹⁻³⁾ は、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) に対するモノクローナル抗体であり、VEGF と VEGF 受容体のタンパク質間相互作用を阻害することで、腫瘍血管新生の阻害、腫瘍増殖抑制、転移の抑制を起こす。またキャスルマン病や関節リウマチの治療に使用される tocilizumab (ActemraTM)¹⁻¹⁻⁴⁾ は、インターロイキン-6 (IL-6: Interleukin-6) 受容体に対するモノクローナル抗体であり、IL-6 と IL-6 受容体のタンパク質間相互作用を阻害することで、IL-6 に起因する炎症反応等を抑制する (Figure 1-1-1)。

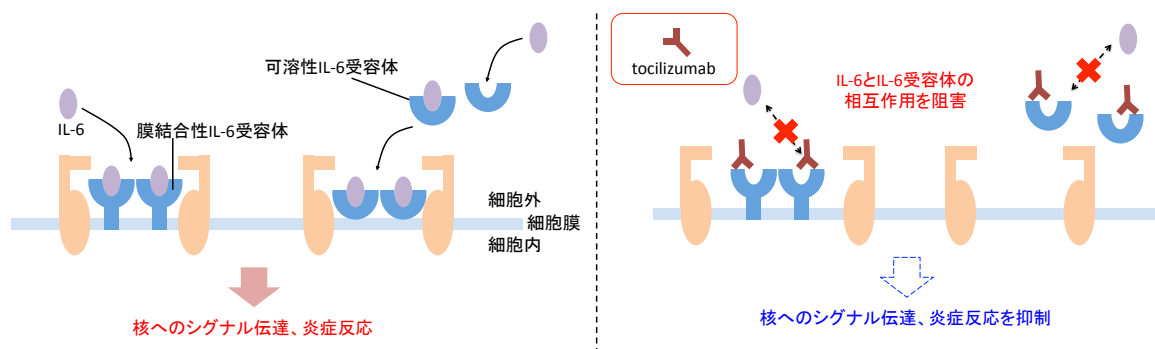


Figure 1-1-1. tocilizumab の作用機序 (論文¹⁻¹⁻⁴⁾より改編)

¹⁻¹⁻¹⁾ 日本薬学会編. メディシナルケミストリー用語解説 260. じほう. 2007

¹⁻¹⁻²⁾ Vinayagam A, Stelzl U, Foulle R, Plassmann S, Zenkner M, Timm J, Assmus HE, Andrade-Navarro MA, Wanker EE. "A directed protein interaction network for investigating intracellular signal transduction." *Sci. Signal.* 2011, 4, 189

¹⁻¹⁻³⁾ "Bevacizumab. Anti-VEGF monoclonal antibody, avastin, rhumab-VEGF." *Drugs R&D.* 2002, 3, 28

¹⁻¹⁻⁴⁾ Ohsugi Y, Tsuchimoto N. "Pharmacological and clinical profile of humanized anti-human IL-6 receptor antibody (tocilizumab, ACTEMRA), a novel therapeutic drug for Castleman's disease." *Folia Pharmacol. Jpn.* 2005, 126, 419

1-1-2. タンパク質間相互作用を制御する低分子リガンドの創製

前項1-1-1.ではタンパク質間相互作用の重要性について述べた。しかし近年に至るまで、タンパク質間相互作用は”Undruggable”であるとされ、低分子を用いてタンパク質間相互作用を制御することは難しいと考えられてきた。即ち、古典的な低分子医薬品の研究では、生体内における基質やその遷移状態を模倣し、その比較的小さい結合部位を占有できるような化合物の創出に主眼が置かれ¹⁻¹⁻⁵⁾、種々の低分子医薬品が見いだされてきた。その一方でタンパク質間相互作用を模倣するには、広範囲(>800 Å²)に渡って、非連続的な相互作用が求められるため¹⁻¹⁻⁶⁾、低分子によるタンパク質間相互作用の制御は、古典的な医薬品低分子の創製よりも難易度が高いのが現状である。しかしながら、タンパク質間相互作用の多くは、鍵となる数個のアミノ酸残基から構成され、その相互作用への寄与が大きい”hot-spot”と呼ばれる構造を有しており¹⁻¹⁻⁷⁾、この構造を足がかりとして種々のタンパク質間相互作用を制御する低分子が創製されつつある¹⁻¹⁻⁸⁾。

¹⁻¹⁻⁵⁾ Babine RE, Bender SL. “Molecular Recognition of Protein – Ligand Complexes: Applications to Drug Design.” *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1359

¹⁻¹⁻⁶⁾ Wilson AJ. “Inhibition of protein-protein interactions using designed molecules.” *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3289

¹⁻¹⁻⁷⁾ Clackson T, Wells JA. “A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface.” *Science* **1995**, 267, 383

¹⁻¹⁻⁸⁾ Azzarito V, Long K, Murphy NS, Wilson AJ. “Inhibition of α -helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules.” *Nat. Chem.* **2013**, 5, 161

具体例としては、がんに対して抑制的に働く転写因子 p53 と、p53 をユビキチン化することでp53の分解を促すユビキチンリガーゼMDM2との相互作用を阻害する低分子化合物RG7112 が報告されている¹⁻¹⁻⁹⁾(Figure 1-1-2) 。p53 と MDM2 の hot-spot は、p53 上に存在する 3 つの疎水性アミノ酸残基 Phe19、Trp23、Leu26 であり、この 3 つの残基が MDM2 によって認識される¹⁻¹⁻¹⁰⁾。RG7112 はこの相互作用をよく模倣し、p53 と MDM2 の相互作用を阻害することで、p53 の分解を防ぎ、がん細胞の増殖を抑制する。また RG7112 は臨床試験が実施されている¹⁻¹⁻⁹⁾。

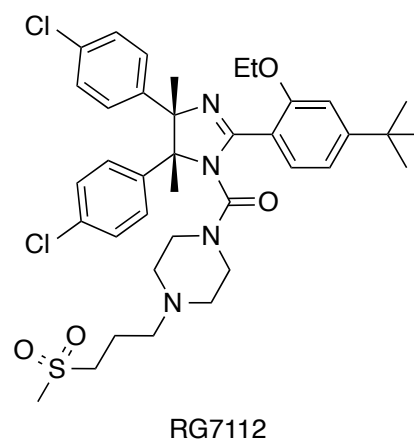
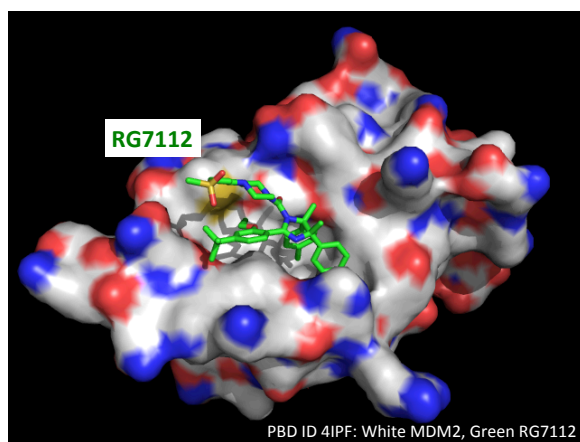
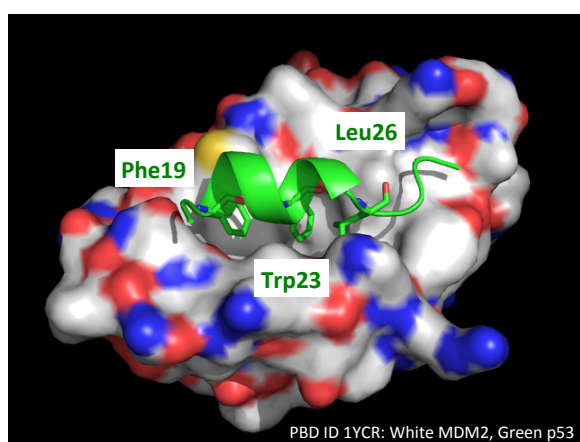


Figure 1-1-2. (上) MDM2 (白: 骨格) と p53 (緑) の相互作用(PBD ID:1YCR より作成)

(下) MDM2 (白: 骨格) と RG7112 (緑) の相互作用(PBD ID: 4IPF より作成)

¹⁻¹⁻⁹⁾ Vu B, Wovkulich P, Pizzolato G, Lovey A, Ding Q, Jiang N, Liu JJ, Zhao C, Glenn K, Wen Y, Tovar C, Packman K, Vassilev L, Graves B. "Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development." *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 466

¹⁻¹⁻¹⁰⁾ Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP. "Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain." *Science* **1996**, 274, 948

1-2 節 ペプチド等価体

1-2-1. ペプチド等価体の重要性

ペプチド等価体とは、天然のペプチド上あるいはタンパク質上に存在するファーマコフォアを模倣した化合物であり、由来ペプチドあるいはタンパク質と同等の生物学的効果を有する化合物のことを指す¹⁻²⁻¹⁾。ペプチド等価体のメリットは、天然のペプチドの医薬応用上の課題となる生体内での安定性やバイオアベリラビリティーの改善が期待できることである。またタンパク質間相互作用を非ペプチド性低分子により阻害する方策として、タンパク質間相互作用に重要なアミノ酸残基である”hot-spot”のペプチド断片を模倣したペプチド等価体を創製するアプローチが知られており、先に述べた RG7112 もその一例である。

¹⁻²⁻¹⁾ Vagner J, Qu H, Hruby VJ. “Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery.” *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 292

物性改善を目指したペプチド等価体創製の具体例として Ras 阻害薬¹⁻²⁻²⁾の L-739750¹⁻²⁻³⁾, FTI-276¹⁻²⁻⁴⁾ AZD-3409¹⁻²⁻⁵⁾の創製を挙げる(Figure 1-2-1)。Ras は MAP キナーゼを始めとするシグナル伝達に關与する GTP アーゼであり、Ras の活性化は細胞のがん化に關与する。Ras の成熟には種々の翻訳後修飾が必要であり、その一つが C 末端の CAAX モチーフ (A: 脂肪族アミノ酸残基 (Leu, Ileu, Val); X: 任意のアミノ酸残基)をファルネシルトランスフェラーゼ(FTase: farnesyltransferase) が認識してファルネシル化する反応である(Figure 1-2-1)。

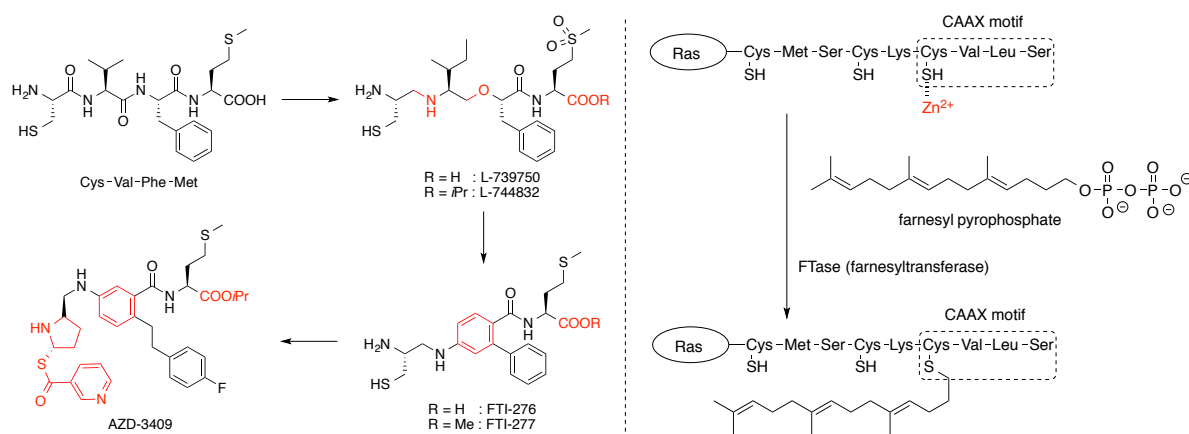


Figure 1-2-1. CAAX ペプチド等価体の創製と FTase によるファルネシル化

¹⁻²⁻²⁾ Avendaño C, Menéndez JC. "Peptidomimetics in cancer chemotherapy." *Clin. Transl. Oncol.* **2007**, 9, 563

¹⁻²⁻³⁾ Kohl NE, Wilson FR, Mosser SD, Giuliani E, deSolms SJ, Conner MW, Anthony NJ, Holtz WJ, Gomez RP, Lee TJ, Smith RL, Fraham SL, Hartman GD, Gibbs JB, A Oliff. "Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 9141

¹⁻²⁻⁴⁾ Augeri DJ, O'Connor SJ, Janowick D, Szczepankiewicz B, Sullivan G, Larsen J, Calvin D, Cohen J, Devine E, Zhang H, Cherian S, Saeed B, Ng SC, Rosenberg S. "Potent and selective non-cysteine-containing inhibitors of protein farnesyltransferase." *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4288

¹⁻²⁻⁵⁾ Stephens TC, Wardleworth MJ, Matusiak ZS, Ashton SE, Hancox UJ, Bate M, Ferguson R, Boyle T. "AZD3409, a novel, oral, prenyl transferase inhibitor with promising preclinical antitumour activity." *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **2003**, 44 (970), Abs 4870.

CAAX テトラペプチドが FTase を阻害することが示されてから、Cys-Val-Phe-Met テトラペプチドがリード化合物として見いだされ、構造展開が行われてきた。その構造展開の主目的は、FTase の活性に重要であり、Zn 原子と相互作用するチオール基を維持したまま、いかに薬物動態を改善するかということを主眼に行われてきた。L-739750 ではアミド結合をエーテルや 2 級アミンに置換し、また FTI-276 では芳香環の導入によって非ペプチド化を行い、生体内の安定性の向上を図っている。さらに吸収の向上を期待してカルボキシル基をエステル構造へと変化したプロドラッグ体 L-744832 と FTI-277 が見いだされている。なおチオール基由来の毒性の懸念がされたためか、FTI-277 の臨床試験は行われていない。その一方で同じくチオールを有する L-744832 の臨床試験は行われている¹⁻²⁻⁶⁾。

さらに L-744832 と FTI-277 の構造展開を推し進めて見いだされた化合物が AZD-3409 である。AZD3409 は芳香環の導入による非ペプチド化に加えて、毒性低減を目的として Cys 残基由来のチオール基をメルカプトプロリンへと変換し、さらにチオエステルへとプロドラッグ化した化合物であり、本化合物も臨床試験が行われている¹⁻²⁻⁷⁾。

¹⁻²⁻⁶⁾ Le DT, Shannon KM. “Ras processing as a therapeutic target in hematologic malignancies.” *Curr Opin Hematol.* **2002**, *9*, 308

¹⁻²⁻⁷⁾ Appels NM, Bolijn MJ, Chan K, Stephens TC, Hootin-Boes G, Middleton M, Beijnen JH, de Bono JS, Harris AL, Schellens JH. “Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the prenyl transferase inhibitor AZD3409 in patients with advanced cancer.” *Br. J. Cancer.* **2008**, *98*, 1951

1-3 節 本博士論文の研究概要

1-3-1. 研究概要

タンパク質間相互作用とは複数のタンパク質同士が会合することである。タンパク質間相互作用は、シグナル伝達に關与する等、生体にとって重要な役割を果たしており、これらの相互作用を、低分子を用いて自在に制御できれば、標的タンパク質のさらなる機能解明や、創薬研究を通じた医薬品の創製等が期待される。しかしながら、比較的広い面積かつ浅いポケットを介して起こるタンパク質間相互作用を、低分子を用いて制御するのは困難な場合も多く、成功例は限られているのが現状である。博士課程において著者は、ペプチド鎖上に存在するタンパク質間相互作用に重要なファーマコフォアに着目し、これを模倣する低分子化合物の創製に取り組んだ。具体的には、①ベンゾジアゼピン骨格を有したタンパク質間相互作用を阻害するビタミン D 受容体 (VDR) 阻害薬、および、②ターフェニル骨格を有したタンパク質間相互作用を修飾する Polo-like kinase 1 (Plk1) 阻害薬を見いだした (Figure 1-4-1)。

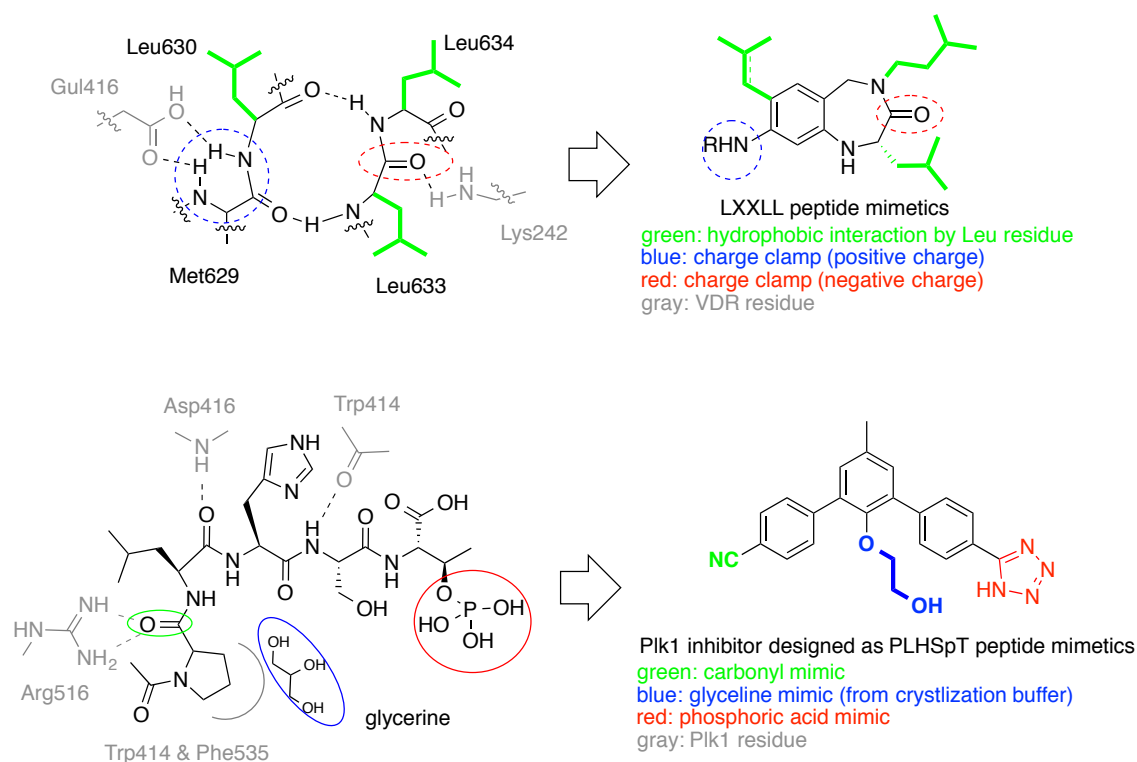


Figure 1-4-1. 本論文の研究概要

本博士論文では上記の2テーマに関して論述する。

なお本博士論文の主たる内容は以下の学術論文に発表してある。

Mita Y, Dodo K, Noguchi-Yachide T, Hashimoto Y, Ishikawa M. “Structure-activity relationship of benzodiazepine derivatives as LXXLL peptide mimetics that inhibit the interaction of vitamin D receptor with coactivators.” *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 993

Mita Y, Noguchi-Yachide T, Ishikawa M, Hashimoto Y. “Small-molecular, non-peptide, non-ATP-competitive polo-like kinase 1 (Plk1) inhibitors with a terphenyl skeleton.” *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 608

第2章 LXXLL 配列を模倣したビタミンD受容体- コアクチベーター相互作用阻害薬の創製

2-1 節 核内受容体

2-1-1. 核内受容体概説

核内受容体 (NR: Nuclear Receptor) はステロイドホルモンや活性型ビタミンなどの脂溶性低分子をリガンドとする転写因子であり、細胞増殖・分化・代謝等を調節している。ヒトゲノム解析の結果、ヒトには 48 種類の核内受容体が存在することが知られており、いずれもがんを始めとする様々な難治性疾患の発症や治療と密接に関与することが明らかになりつつある²⁻¹⁻¹⁾。

現在、核内受容体は核内受容体に起因する難治性疾患の治療薬開発において重要な分子標的として捉えられており、核内受容体を標的としたアゴニストやアンタゴニストが創製されている。

²⁻¹⁻¹⁾ a) Laudet V., Gronemeyer H. “The Nuclear Receptor FactsBook” **2001**, Academic Press;
b) Tanatani A. “Development of Novel Nuclear Receptor Ligands Based on Receptor-Folding Inhibition Hypothesis” *YAKUGAKU ZASSHI*, **2007**, 127, 341

実際に急性骨髄性白血病治療薬として用いられているレチノイン酸受容体 (RAR: Retinoic acid Receptor) アゴニストであるタミバロテン²⁻¹⁻²⁾や、前立腺がん治療薬として用いられているアンドロゲン受容体 (AR: Androgen Receptor) アンタゴニストのフルタミド²⁻¹⁻³⁾やビカルタミド²⁻¹⁻⁴⁾、乳がん治療薬として用いられているエストロゲン受容体 (ER: Estrogen Receptor) アンタゴニストであるタモキシフェン²⁻¹⁻⁵⁾、糖尿病治療においてインスリン抵抗性改善薬として使われるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) γ アゴニストのピオグリタゾン²⁻¹⁻⁶⁾など、例を挙げれば枚挙に暇がない (Figure 2-1-1)。

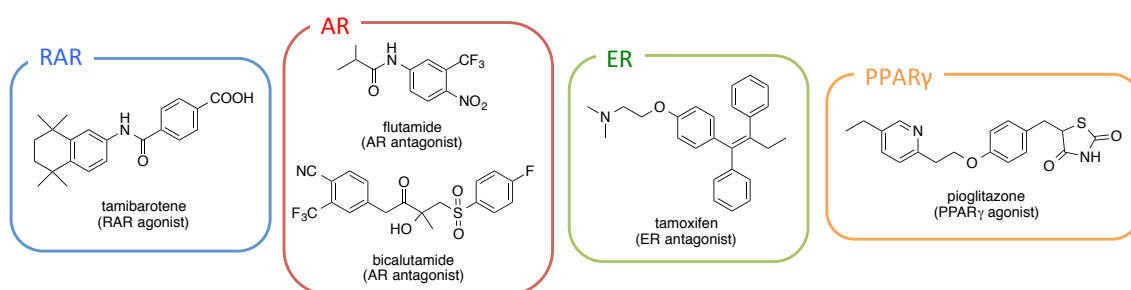


Figure 2-1-1. 医薬応用されている代表的な核内受容体アゴニストとアンタゴニスト

²⁻¹⁻²⁾ a) Kagechika H, Kawachi E, Hashimoto Y, Himi T, Shudo K. "Retinobenzoic acids. 1. Structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity." *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2182; b) Hashimoto Y, Petkovich M, Gaub MP, Kagechika H, Shudo K, Chambon P. "The retinoic acid receptors alpha and beta are expressed in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60." *Mol. Endocrinol.* **1989**, *3*, 1046

²⁻¹⁻³⁾ Peets EA, Henson MF, Neri R. "On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide (alpha-alpha-alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide) in the rat." *Endocrinology* **1974**, *94*, 532

²⁻¹⁻⁴⁾ Chodak G, Sharifi R, Kasimis B, Block NL, Macramalla E, Kennealey GT. "Single-agent therapy with bicalutamide: a comparison with medical or surgical castration in the treatment of advanced prostate carcinoma." *Urology* **1995**, *46*, 849

²⁻¹⁻⁵⁾ Ward HW. "Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels." *Br. Med. J.* **1973**, *1*, 13

²⁻¹⁻⁶⁾ Sugiyama Y, Shimura Y, Ikeda H. "Effects of pioglitazone on hepatic and peripheral insulin resistance in Wistar fatty rats." *Arzneimittelforschung* **1990**, *40*, 43

2-1-2. 核内受容体の LXXLL 配列を介した転写活性化

一般に、核内受容体群は共通して A から F までの六つのドメイン構造を有している²⁻¹⁻⁷⁾ (Figure 2-1-2)。

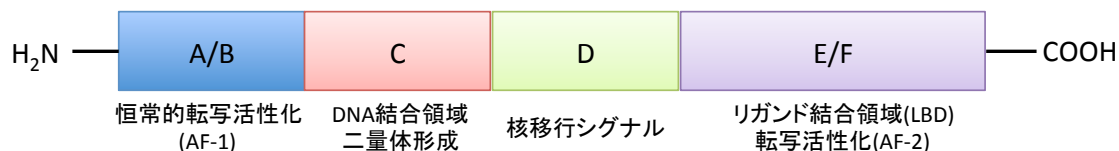


Figure 2-1-2. 核内受容体のドメイン構造²⁻¹⁻⁷⁾

A/B 領域は基本的にリガンド非依存性の転写活性化能を有する AF-1 (activation function 1) と呼ばれる領域である。分子中央部の C 領域は各受容体固有の DNA 配列を認識して結合する DNA 結合領域であり、DNA と結合するための特異的構造が存在する。D 領域には核内に移行するためのシグナル配列が存在する。受容体の C 末端領域である E/F 領域は内因性リガンドや外因性リガンドが結合するので、リガンド結合領域 (LBD: ligand binding domain) と呼ばれている。またこの領域にはリガンド依存性の転写制御領域である AF-2 (activation function 2) と呼ばれる領域が含まれ、12 番目のヘリックスである helix 12 (H12) の折りたたみが核内受容体の転写制御に重要な役割を果たしており²⁻¹⁻⁸⁾、アゴニストの結合により H12 が適切に折りたたまれることで、コアクチベーター相互作用部位が形成され、転写活性化が促進する (Figure 2-1-3)。

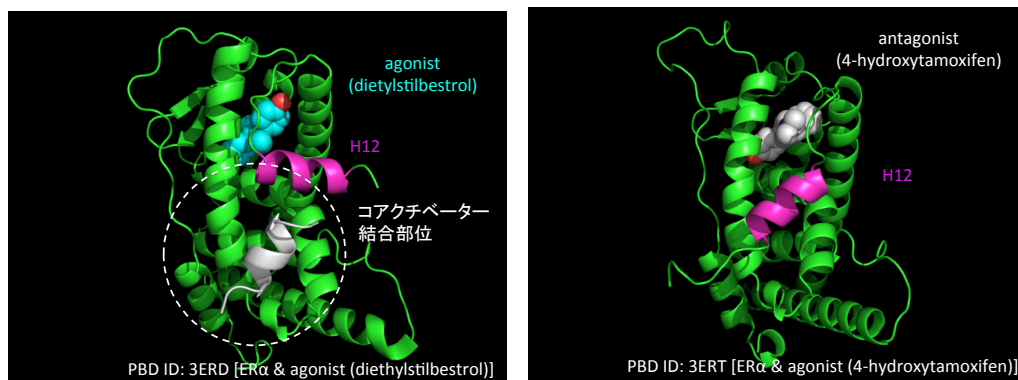


Figure 2-1-3. リガンドの結合と H12 の折りたたみ構造の変化

左: 緑: ER α , シアン: agonist, マゼンダ: H12, 白: コアクチベーター由来ペプチドフラグメント (PBD ID 3ERD より作成)、右: 緑: ER α , 白: antagonist, マゼンダ: H12 (PBD ID 3ERT より作成)

²⁻¹⁻⁷⁾ 穴戸 宏造 (編), 新藤 充 (編). 創薬をめざす有機合成戦略—進化する医薬品づくり, 化学同人, **2007**, p149

²⁻¹⁻⁸⁾ hiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. “The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen.” *Cell* **1998**, 95, 927

アゴニストの結合していない核内受容体は、核内受容体コリプレッサー²⁻¹⁻⁹⁾ (NCoR: nuclear receptor corepressor) や SMRT²⁻¹⁻¹⁰⁾ (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) といったコリプレッサーと結合し、その転写活性化は抑制されている。コリプレッサーは $\Phi XX\Phi\Phi$ 配列 (Φ : Leu か Ile、X: 任意のアミノ酸) を介して、核内受容体の AF-2 と結合しており、この結合は H12 が存在しなくても形成されることが知られている²⁻¹⁻¹¹⁾。一方で、核内受容体にアゴニストが結合すると、核内受容体同士のホモダイマー、あるいはヘテロダイマーの形成と、H12 の適切な折りたたみが起こり、AF-2 のコンフォメーションが変化することによって、コリプレッサーの乖離とコアクチベーターの結合が起こる²⁻¹⁻¹²⁾ (Figure 2-1-4)。この際、核内受容体がコアクチベーター上に存在する LXXLL 配列 (L: Leu、X: 任意のアミノ酸) を認識することが知られており、核内受容体の転写活性化には、核内受容体とコアクチベーターの相互作用が必須となる。

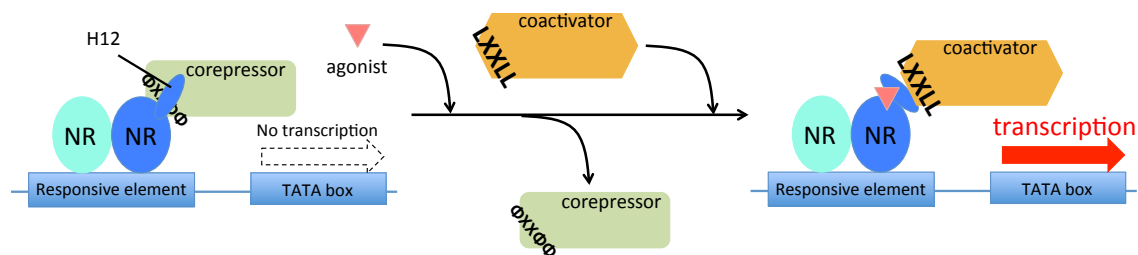


Figure 2-1-4. コリプレッサーの乖離とコアクチベーターの結合

²⁻¹⁻⁹⁾ Kurokawa R, Söderström M, Hörlein A, Halachmi S, Brown M, Rosenfeld MG, Glass CK. "Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor." *Nature* **1995**, 377, 451

²⁻¹⁻¹⁰⁾ Chen JD, Evans RM. "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." *Nature* **1995**, 377, 454

²⁻¹⁻¹¹⁾ Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, Krishna V, Chatterjee K, Evans RM, Schwabe JW. "Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors." *Genes Dev.* **1999**, 13, 3209

²⁻¹⁻¹²⁾ a) Feng W, Ribeiro RC, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL. "Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors." *Science* **1998**, 280, 1747; b) Teichert A, Arnold LA, Otieno S, Oda Y, Augustinaite I, Geistlinger TR, Kriwacki RW, Guy RK, Bikle DD. "Quantification of the vitamin D receptor-coregulator interaction." *Biochemistry* **2009**, 48, 1454

前述のように核内受容体とコアクチベーターの LXXLL 配列を介した相互作用は転写活性化に必須である。その相互作用の様式は LXXLL ペプチドフラグメントと各種核内受容体の複合体 X 線結晶構造解析により明らかにされている²⁻¹⁻¹⁴⁾。

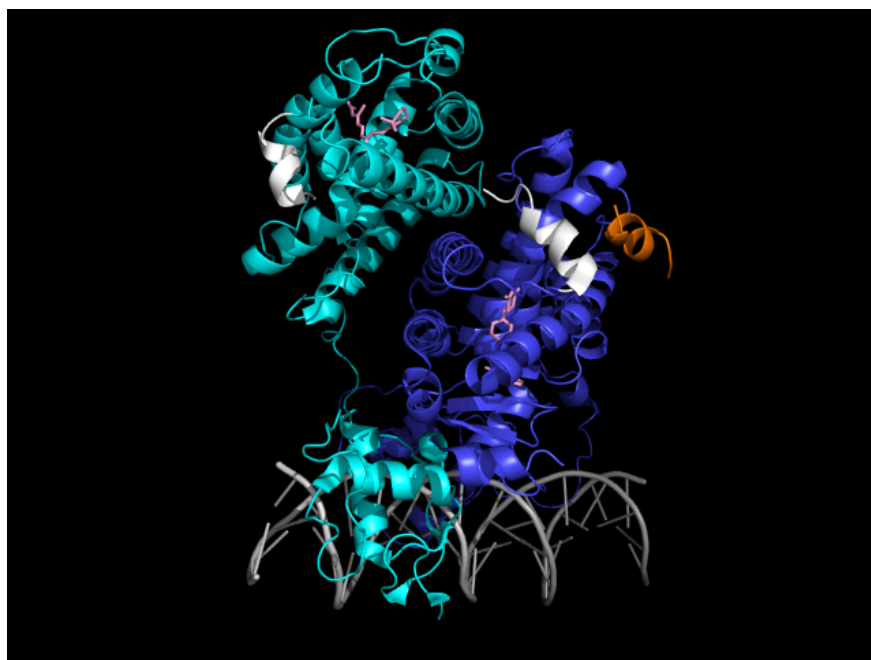


Figure 2-1-6. 核内受容体の LXXLL 配列との相互作用²⁻¹⁻¹⁵⁾ (PDB ID 3DZY より作成)

シアン: RXR α , 青: PPAR γ , 白: H12, 橙: LXXLL ペプチドフラグメント, ピンク: リガンド, グレー: DNA

²⁻¹⁻¹⁴⁾ a) RAR α ; Pogenberg V, Guichou JF, Vivat-Hannah V, Kammerer S, Pérez E, Germain P, de Lera AR, Gronemeyer H, Royer CA, Bourguet W. “Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies.” *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1625; b) RXR β & LXR α ; Svensson S, Ostberg T, Jacobsson M, Norström C, Stefansson K, Hallén D, Johansson IC, Zachrisson K, Ogg D, Jendeberg L. “Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation.” *EMBO J.* **2003**, *22*, 4625; c) VDR; Vanhooke JL, Benning MM, Bauer CB, Pike JW, DeLuca HF. “Molecular structure of the rat vitamin D receptor ligand binding domain complexed with 2-carbon-substituted vitamin D3 hormone analogues and a LXXLL-containing coactivator peptide.” *Biochemistry* **2004**, *43*, 4101; d) AR; Hur E, Pfaff SJ, Payne ES, Grøn H, Buehrer BM, Fletterick RJ. “Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface.” *PLoS Biol.* **2004**, *2*, E274; e) ER α ; ref 2-1-8); f) ER β ; McDevitt RE, Malamas MS, Manas ES, Unwalla RJ, Xu ZB, Miller CP, Harris HA. “Estrogen receptor ligands: design and synthesis of new 2-arylidene-1-ones.” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3137; g) PPAR α ; Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Plunket KD, Moore LB, Collins JL, Oplinger JA, Klierer SA, Gampe RT Jr, McKee DD, Moore JT, Willson TM. “Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 13919

²⁻¹⁻¹⁵⁾ Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP, Rastinejad F. “Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA.” *Nature* **2008**, *456*, 350

2-2 節 ビタミン D 受容体

2-2-1. ビタミン D 受容体概説

ビタミン D 受容体 (VDR: vitamin D receptor) は核内受容体スーパーファミリーのうちの一つであり、その主要なアゴニストは活性型ビタミン D₃ [calcitriol, 1,25(OH)₂D₃] である。VDR は腸管や骨、腎細胞に加えて、繊維芽細胞などにも発現している。VDR はレチノイド X 受容体 (RXR: retinoid X receptor) とヘテロダイマーを形成し、骨・カルシウム代謝調節機構や、細胞の分化・増殖に関与している²⁻²⁻¹⁾。以下にビタミン D₃ と VDR による骨・カルシウム代謝調節機構を示す (Figure 2-2-1)。

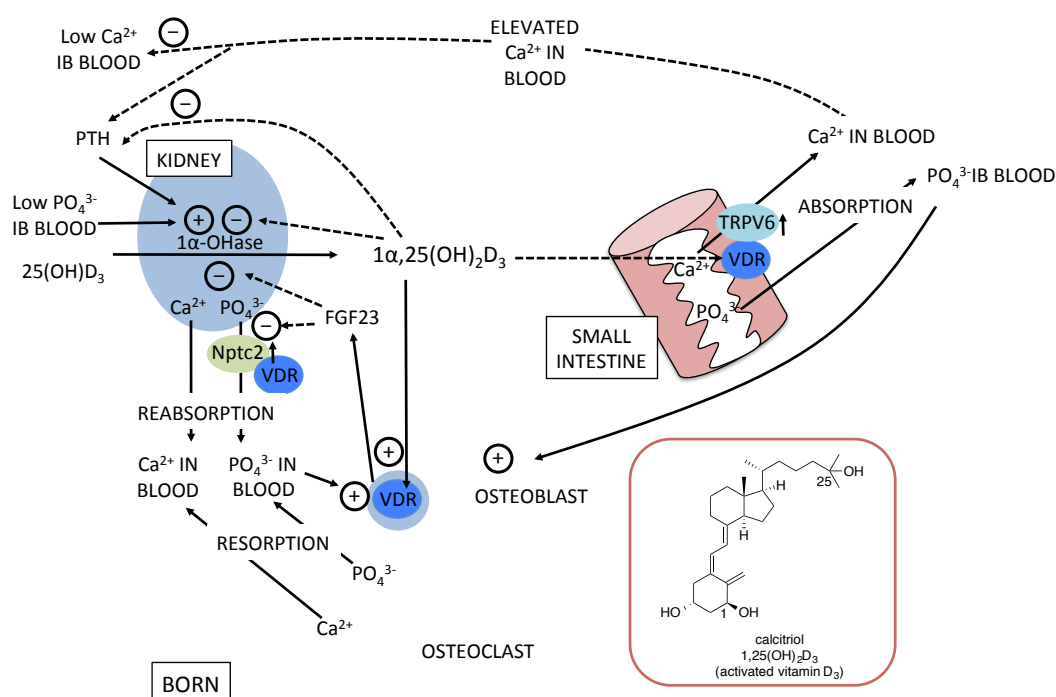


Figure 2-2-1. ビタミン D₃ と VDR による骨・カルシウム代謝調節機構

(論文²⁻¹⁻¹²⁾より改編)

ビタミン D₃ は肝臓および腎近位尿細管において代謝され活性型ビタミン D₃ となる。活性型ビタミン D₃ は VDR による転写を介して小腸、骨、腎においてカルシウムの吸収を促進する。また活性型ビタミン D₃ は腎近位尿細管での活性型ビタミン D₃ の産生を抑制するとともに、活性型ビタミン D₃ の合成を促進する副甲状腺ホルモンであるパラトルモン (PTH: parathyroid hormone) の分泌を PTH 遺伝子を介した負のフィードバックにより抑制することで、血中カルシウム濃度を調節している。

²⁻²⁻¹⁾ 田中千賀子 (編), 加藤隆一 (編). *NEW 薬理学改訂第 4 版*, 南江堂, 2005, P210

2-2-2. 骨パジェット病概説

VDR の関与する疾患としては、骨パジェット病 (Paget's disease of bone) が知られている。骨パジェット病は 1877 年、Paget により変形性骨炎として初めて報告された疾患²⁻²⁻²⁾である (Figure 2-2-2)。本邦でも平成 24 年度厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「重症骨系統疾患の予後改善に向けての集学的研究²⁻²⁻³⁾」において研究対象に指定される等、研究がなされている難病の一つである。

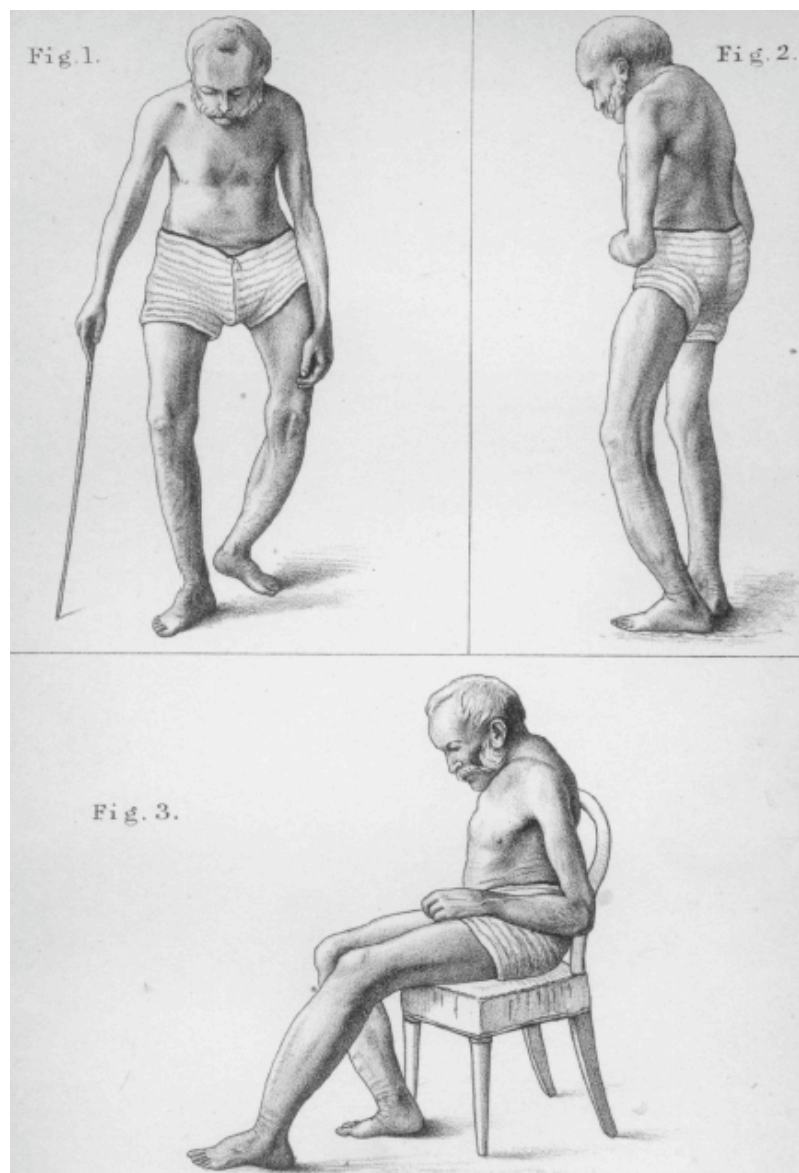


Figure 2-2-2. 骨パジェット病患者のスケッチ (論文²⁻²⁻²⁾より引用)

²⁻²⁻²⁾ Paget J. "On a Form of Chronic Inflammation of Bones (Osteitis Deformans)." *Med. Chir. Trans.* 1877, 60, 37

²⁻²⁻³⁾ 難病情報センター <http://www.nanbyou.or.jp/entry/3158>

骨パジェット病は局所での骨リモデリングの異常による骨微細構造の変化、骨の形態的な腫大・変形、およびそれに伴う局所骨強度低下をきたす疾患であり、主な症状は腰痛、股関節痛、骨格変形、骨折などが挙げられる²⁻²⁻⁴⁾。有症率の高い英国では、加齢とともに使用していたシルクハットが入らなくなり、頭蓋骨の変形に気付かれることがしばしば紹介される。また聴覚障害が見られることもあり、ベートーベン (Figure 2-2-3) の難聴の原因が骨パジェット病だとする学説²⁻²⁻⁵⁾も存在する。



Figure 2-2-3. ベートーベンの肖像画

(http://www.archiv.fraunhofer.de/archiv/presseinfos/pflege.zv.fhg.de/german/press/pi/pi2002/08/md_fo6a.html より転載)

北欧を除くヨーロッパ諸国、アメリカ、オーストラリア、ニュージーランドで 0.1～5% と有症率が高いが、日本では少なく 100 万人に 2.8 人程度である。高齢者に多く、世界的には 1.2～1.8 : 1 の比率で男性患者が多いが、日本では 0.86 : 1 の比率で女性が多いことが報告されている。

骨パジェット病の原因は未だ解明されていない。現在の治療では外科的手術と薬物療法が行われている。薬物療法ではカルシトン製剤やビスホスホネート薬が用いられているものの、薬効の減弱が見られることや²⁻²⁻⁶⁾、根治療法が存在しないことなど、解決すべき課題は多い。

²⁻²⁻⁴⁾ Hashimoto J. *et al.* "Prevalence and Clinical Features of Paget's Disease of Bone in Japan." *Osteoporosis Japan* **2007**, *15*, 111

²⁻²⁻⁵⁾ Naiken VS. "Beethoven's deafness." *JAMA* **1971**, *215*, 1671

²⁻²⁻⁶⁾ Roodman GD, Windle JJ. "Paget disease of bone." *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 200

2-2-3. 既知 VDR 阻害薬

骨パジェット病患者由来の破骨細胞前駆体細胞は活性型ビタミン D₃ に対して過感受性を示し、生理条件下の濃度の活性型ビタミン D₃ に対して破骨細胞へと分化することが報告²⁻²⁻⁷⁾されている。また破骨細胞前駆体細胞に VDR 阻害薬を投与することで、破骨細胞への分化を抑制できることも報告²⁻²⁻⁷⁾されており、VDR 阻害薬は骨パジェット病治療薬になる可能性がある。しかしながら現在報告されている VDR アンタゴニストは、安定性や構造展開に不利であるセコステロイド骨格を有する化合物群のみが報告されているだけである (Figure 2-2-4)。

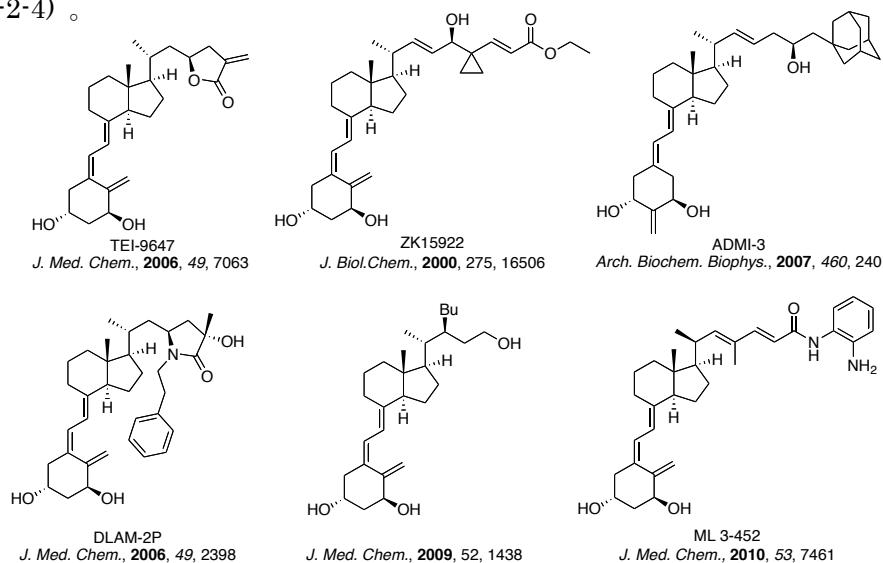


Figure 2-2-4. 代表的な VDR アンタゴニスト²⁻²⁻⁸⁾

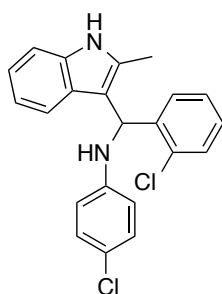
²⁻²⁻⁷⁾ Ishizuka S, Kurihara N, Reddy SV, Cornish J, Cundy T, Roodman GD. “(23*S*)-25-Dehydro-1 α -hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone, a vitamin D receptor antagonist that inhibits osteoclast formation and bone resorption in bone marrow cultures from patients with Paget's disease.” *Endocrinology* **2005**, 146, 2023

²⁻²⁻⁸⁾ a) TEI-9647; Saito N, Matsunaga T, Saito H, Anzai M, Takenouchi K, Miura D, Namekawa J, Ishizuka S, Kittaka A. “Further synthetic and biological studies on vitamin D hormone antagonists based on C₂₄-alkylation and C₂ α -functionalization of 25-dehydro-1 α -hydroxyvitamin D₃-26,23-lactones.” *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7063; b) ZK15922; Herdick M, Steinmeyer A, Carlberg C. “Antagonistic action of a 25-carboxylic ester analogue of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ is mediated by a lack of ligand-induced vitamin D receptor interaction with coactivators.” *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 16506; c) ADMI-3; Igarashi M, Yoshimoto N, Yamamoto K, Shimizu M, Ishizawa M, Makishima M, DeLuca HF, Yamada S. “Identification of a highly potent vitamin D receptor antagonist: (25*S*)-26-adamantyl-25-hydroxy-2-methylene-22,23-didehydro-19,27-dinor-20-epi-vitamin D₃ (ADMI3).” *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 460, 240; d) DLAM-2P; Nakano Y, Kato Y, Imai K, Ochiai E, Namekawa J, Ishizuka S, Takenouchi K, Tanatani A, Hashimoto Y, Nagasawa K. “Practical synthesis and evaluation of the biological activities of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ antagonists, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactams. Designed on the basis of the helix 12-folding inhibition hypothesis.” *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2398; e) Inaba Y, Yoshimoto N, Sakamaki Y, Nakabayashi M, Ikura T, Tamamura H, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K. “A new class of vitamin D analogues that induce structural rearrangement of the ligand-binding pocket of the receptor.” *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1438; f) ML 3-452; Lamblin M, Spingarn R, Wang TT, Burger MC, Dabbas B, Moitessier N, White

また LXXLL 配列を含むコアクチベーター由来のペプチドフラグメントにより、VDR を介した転写が抑制されることが報告²⁻²⁻⁹⁾されているが、ペプチドゆえの膜透過性や生体内での安定性に課題が存在する。

上述のように骨パジェット病治療薬としての VDR 阻害薬の創製が期待されるものの、既存の VDR アンタゴニストやペプチドには解決すべき課題が存在する。そこで私はこれらの課題に対する一つの解として、VDR を阻害する LXXLL ペプチド等価体の創製を目指すこととした。

なお著者が本研究に取り組んだ後に、結合部位は未同定であるが VDR と共有結合を形成し、VDR-コアクチベーター相互作用を阻害する化合物が報告²⁻²⁻¹⁰⁾されている (Figure 2-2-5)。



J. Med. Chem., **2012**, *55*, 4640

Figure 2-2-5. 近年報告された VDR-コアクチベーター相互作用阻害物質

JH, Gleason JL. “An o-aminoanilide analogue of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ functions as a strong vitamin D receptor antagonist.” *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7461

²⁻²⁻⁹⁾ Pike JW, Pathrose P, Barmina O, Chang CY, McDonnell DP, Yamamoto H, Shevde NK. “Synthetic LXXLL peptide antagonize 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent transcription.” *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 252

²⁻²⁻¹⁰⁾ Nandhikonda P, Lynt WZ, McCallum MM, Ara T, Baranowski AM, Yuan NY, Pearson D, Bikle DD, Guy RK, Arnold LA. “Discovery of the first irreversible small molecule inhibitors of the interaction between the vitamin D receptor and coactivators.” *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4640

2-3 節 LXXLL ペプチド等価体の創製

2-3-1. 作業仮説

著者は、VDR 阻害薬の創製に当たって、コアクチベーター上の LXXLL 配列を介した核内受容体の転写活性化に着目し、「LXXLL 配列を模倣した非ペプチド性低分子、即ち LXXLL ペプチド等価体を用いることで、VDR とコアクチベーターの相互作用を阻害し、その結果 VDR を介した転写を抑制できる」とする作業仮説を構築した (Figure 2-3-1)。

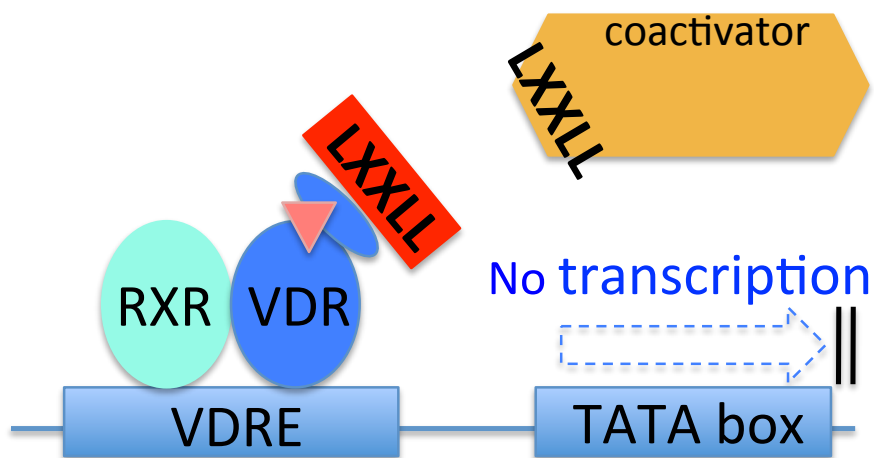


Figure 2-3-1. 作業仮説 : LXXLL ペプチド等価体による VDR を介した転写阻害

なお現在までに AR および ER に関しては、同様の作業仮説に基づく LXXLL ペプチド等価体の創製が報告 2-3-1) されている (Figure 2-3-2)。

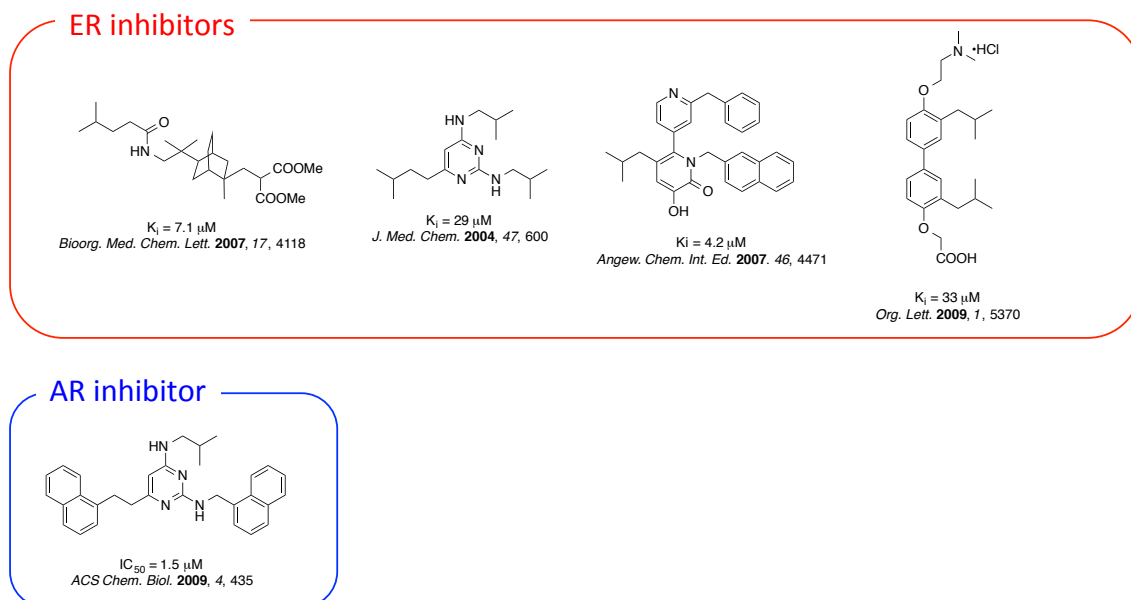


Figure 2-3-2. 報告された LXXLL ペプチド等価体

一方でこれらの化合物の核内受容体—コアクチベーター相互作用阻害活性は決して高いものではなく、VDR を標的とした LXXLL ペプチド等価体の報告もない。これらの化合物は LXXLL 配列を介した核内受容体—コアクチベーター相互作用における 2 つの重要な相互作用、即ち、①ロイシン側鎖による疎水性相互作用、および、②charge clamp と呼ばれる静電相互作用、のうち、主として①のロイシン側鎖による疎水性相互作用を模倣したデザインである (二つの相互作用の詳細は 2-3-3.化合物デザインを参照)。それゆえ①のロイシン側鎖による疎水性相互作用に加えて、②の charge clamp による静電相互作用を模倣した化合物は、より高い核内受容体—コアクチベーター相互作用阻害活性を持つことが期待された。

2-3-1) a) Zhou HB, Collins ML, Gunther JR, Comninou JS, Katzenellenbogen JA. “Bicyclo[2.2.2]octanes: close structural mimics of the nuclear receptor-binding motif of steroid receptor coactivators.” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 4118; b) Rodriguez AL, Tamrazi A, Collins ML, Katzenellenbogen JA. “Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of small molecule inhibitors of estrogen receptor alpha coactivator binding.” *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 600; c) Becerril J, Hamilton AD. “Helix mimetics as inhibitors of the interaction of the estrogen receptor with coactivator peptides.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4471; d) Williams AB, Weiser PT, Hanson RN, Gunther JR, Katzenellenbogen JA. “Synthesis of biphenyl proteomimetics as estrogen receptor-alpha coactivator binding inhibitors.” *Org. Lett.* **2009**, 11, 5370; e) Gunther JR, Parent AA, Katzenellenbogen JA. “Alternative inhibition of androgen receptor signaling: peptidomimetic pyrimidines as direct androgen receptor/coactivator disruptors.” *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4, 435

2-3-2. 研究目的

著者は本研究の目的を『前述の「LXXLL 配列を模倣した非ペプチド性低分子、即ち LXXLL ペプチド等価体を用いることで、VDR とコアクチベーターの相互作用を阻害し、その結果 VDR を介した転写を抑制できる」という作業仮説に基づいて、VDR-コアクチベーター相互作用を阻害し、VDR を介した転写活性化を抑制する LXXLL ペプチド等価体を創製すること』と設定した。本研究の目的を達成することで、一般に難しいとされる「タンパク質間相互作用を制御する低分子化合物」を論理的に創製する実証例を提示するとともに、新規骨格・新規作用機序を有する VDR 阻害薬を提案できることが期待された。

以下、本研究目的を達成すべく、取り組んだ研究内容について記述する。

2-3-3. 化合物デザイン

LXXLL ペプチド等価体の化合物デザインにあたり、VDR とコアクチベーター由来の LXXLL 配列を含んだペプチドフラグメントの複合体 X 結晶構造²⁻¹⁻¹²を参考にした (Figure 2-3-3)。

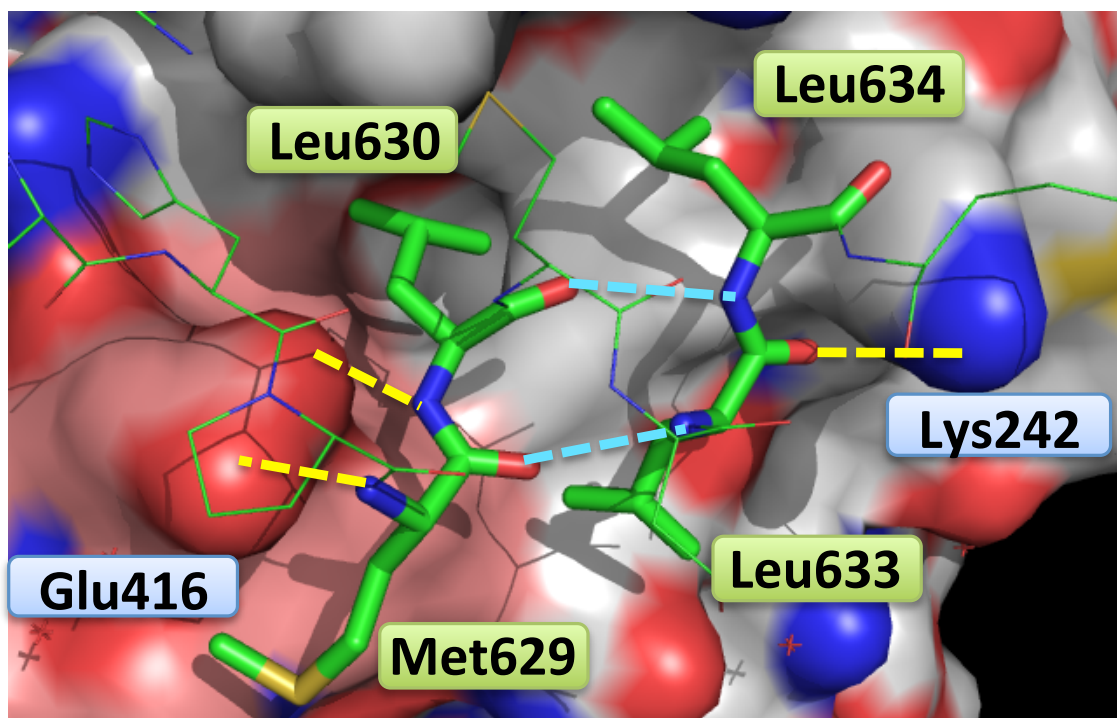


Figure 2-3-3. VDR と LXXLL ペプチドフラグメントの複合体 X 結晶構造

PDB ID: 1RK3 より作成した。コアクチベーター由来 LXXLL ペプチドフラグメントは緑で表示し、活性に重要な残基は太く表示した。VDR の表面構造は白で示し、H12 に相当する部位はピンクで表示した。また静電相互作用 (charge clamp) は黄色の点線で示し、LXXLL ペプチドフラグメントが形成する環上構造に重要な水素結合を水色の点線で示した。

VDR と LXXLL ペプチドフラグメントの相互作用には以下の二つの相互作用が重要であることが知られている。

①ロイシン側鎖による疎水性相互作用

(コアクチベーター上の Leu630, Leu633, Leu634 におけるアルキル側鎖)

②charge clamp と呼ばれる静電相互作用

(コアクチベーター上の Leu630、Met629 における窒素原子と VDR の Glu416 のカルボキシル基、およびコアクチベーター上の Leu633 の酸素原子と VDR の Lys242 のアミノ基に働く水素結合作用)

上記の相互作用に重要な部位を模式化した図を示す (Figure 2-3-4)。コアクチベーター由来 LXXLL ペプチドフラグメントは、LXXLL 配列の近傍では α -helix を形成しており、相互作用に重要なファーマコフォアを有するアミノ酸残基が水素結合により環状構造を形成している。そこで、この環状構造をベンゾジアゼピン骨格に置き換えることで LXXLL ペプチドを模倣できると考え、ベンゾジアゼピン型の LXXLL ペプチド等価体をデザインした (Figure 2-3-4)。母核にベンゾジアゼピン骨格を採用した理由は、ファーマコフォアを模倣するのに適した大きさを持つ剛直な骨格であったためである。また医薬品として用いられているベンゾジアゼピン骨格ならば、ペプチドの課題である膜透過性や安定性の改善が期待できると考えたため、ベンゾジアゼピン骨格を採用した。

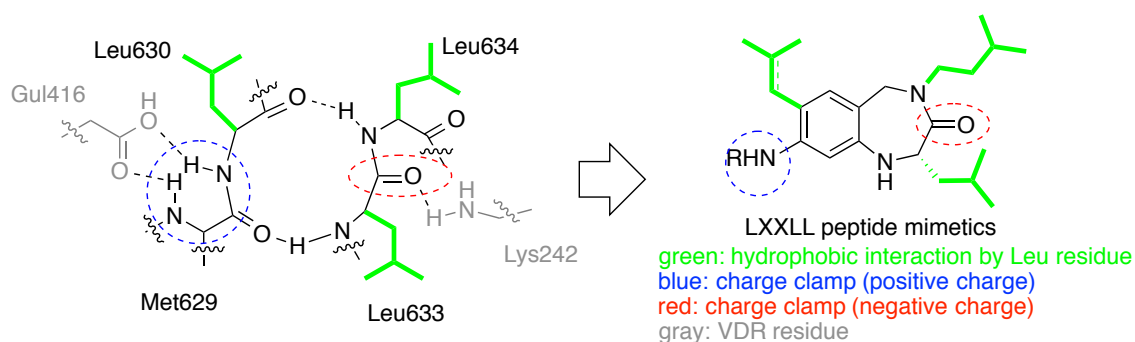


Figure 2-3-4. VDR—LXXLL ペプチドフラグメント相互作用模式図と化合物デザイン

LXXLL ペプチドフラグメント上に存在する相互作用に重要な Leu 側鎖を緑色太字、charge clamp 相互作用部位を青色の円および赤色の円で表記した。また VDR 側の charge clamp に寄与する残基を灰色で表記した。

ベンゾジアゼピン骨格の置換基位置の選定に当たっては、ベンゾジアゼピン骨格を有する LXXLL ペプチド等価体を複数デザインし (Figure 2-3-5)、そのデザインした化合物群の中から最も妥当な置換基を有する化合物デザインの検証を行った。検証では、デザインした化合物の安定コンフォメーションを計算し、LXXLL ペプチド周辺の活性コンフォメーションと重ね合わせを行った。

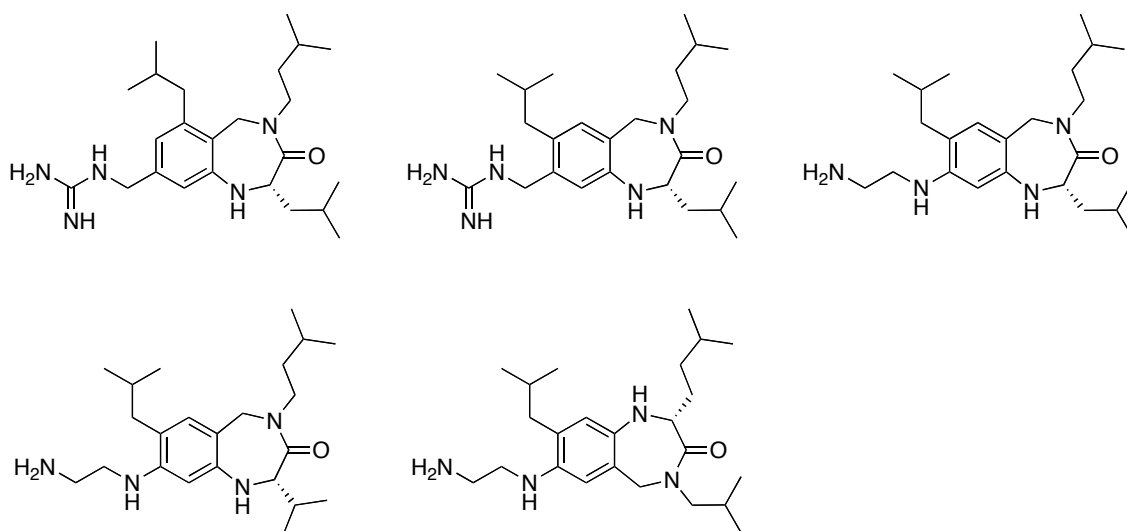


Figure 2-3-5. デザインしたベンゾジアゼピン型化合物

計算の結果、最も妥当だと判断した化合物を以下に示す (Figure 2-3-6)。なお計算条件は以下に示した。

計算条件

化合物

Chem 3D Pro (ver. 5.0) の MM2 (Molecular Dynamics の後 Minimized Energy) により最安定コンフォメーションを推測。

LXXLL ペプチド

Protein Data Bank (PDB ID 1RK3) より LXXLL ペプチド周辺の活性コンフォメーションを抽出

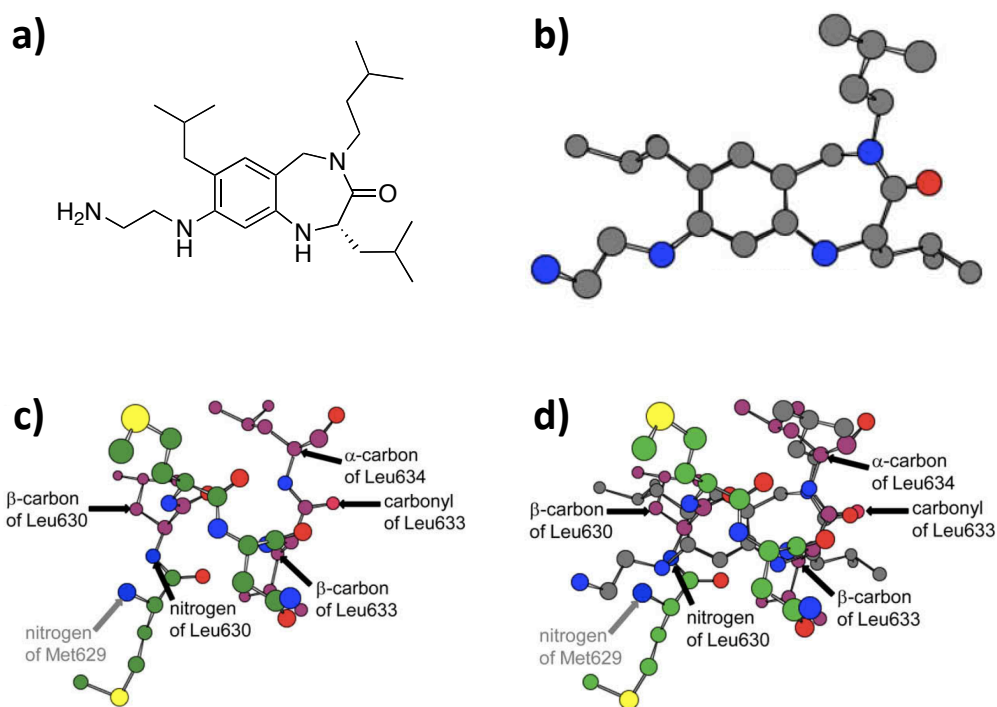


Figure 2-3-6. デザインした化合物と LXXLL ペプチドフラグメントの重ね合わせ

a) デザインした LXXLL ペプチド等価体、b) LXXLL ペプチド等価体の安定コンフォメーション、c) LXXLL ペプチドフラグメントの活性コンフォメーション、d) b) と c) の重ね合わせ。LXXLL ペプチド等価体の炭素原子は灰色で、LXXLL ペプチドフラグメントの炭素原子は緑色で、ロイシン側鎖上の炭素原子は紫色で表記した。

活性コンフォメーションの重ね合わせに当たっては、各炭素鎖の自由回転を考慮した際に、デザイン化合物における剛直なベンゾジアゼピン骨格に直接結合していて空間的な位置関係が変化しない炭素原子と、LXXLL ペプチド上の対応する炭素原子との差異が小さいことが重要であると考えた。そこで相対的な位置関係が変化しないデザイン化合物の各炭素原子と、対応する Leu630 の β 炭素、Leu633 の β 炭素、Leu634 の α 炭素との差異を測定した。また charge clamp として機能する Met630 のアミド窒素原子および Leu633 のアミド酸素原子についても重要であると考え、重ね合わせにより差異を測定した。

得られた重ね合わせより活性コンフォメーションに重要であると考えられる原子の差異は以下の通りであった (Table 2-3-1)。

Table 2-3-1. LXXLL ペプチド等価体と LXXLL ペプチドフラグメントの差異

活性コンフォメーションに重要な原子	重ね合わせ時の差異 (Å)
Leu630 の β 炭素原子	0.79
Leu633 の β 炭素原子	1.14
Leu634 の α 炭素原子	0.60
Met630 のアミド窒素原子	0.58
Leu633 のアミド酸素原子	0.97

上記結果における差異は概ね 1 Å 以下であり、他のデザインした化合物と比較して、最も重ね合わせ時の差異が小さかったため、本化合物デザインを採用した。

また化合物の構造展開に関しては、Met629 のアミド窒素に対応する charge clamp 部位の構造展開を計画した (Figure 2-3-7)。

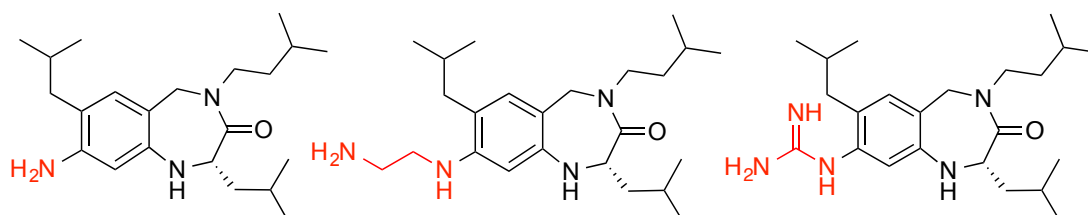
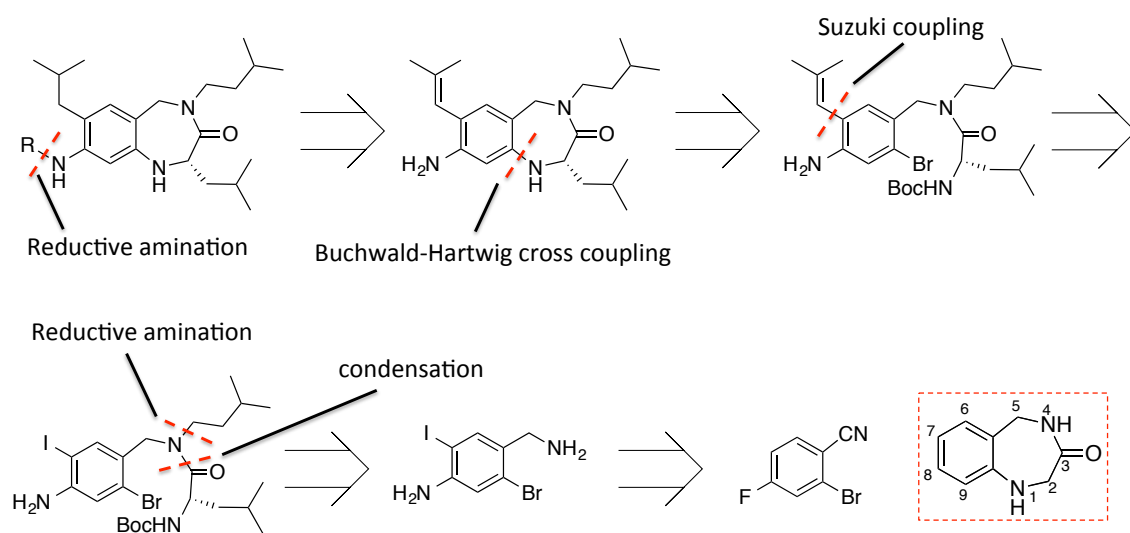


Figure 2-3-7. Met630 のアミド窒素に対応する charge clamp 部位の構造展開

具体的には Leu630 のアミド窒素原子だけでなく、Met629 の窒素アミド原子の相互作用を模倣することを期待して、アミノ基を 2 つ有する化合物、および、charge clamp を認識する Glu416 のカルボン酸との相互作用の増強を期待して塩基性の強いグアニジン基を有する化合物の設計・合成を行うこととした。

2-3-4. 化合物の合成

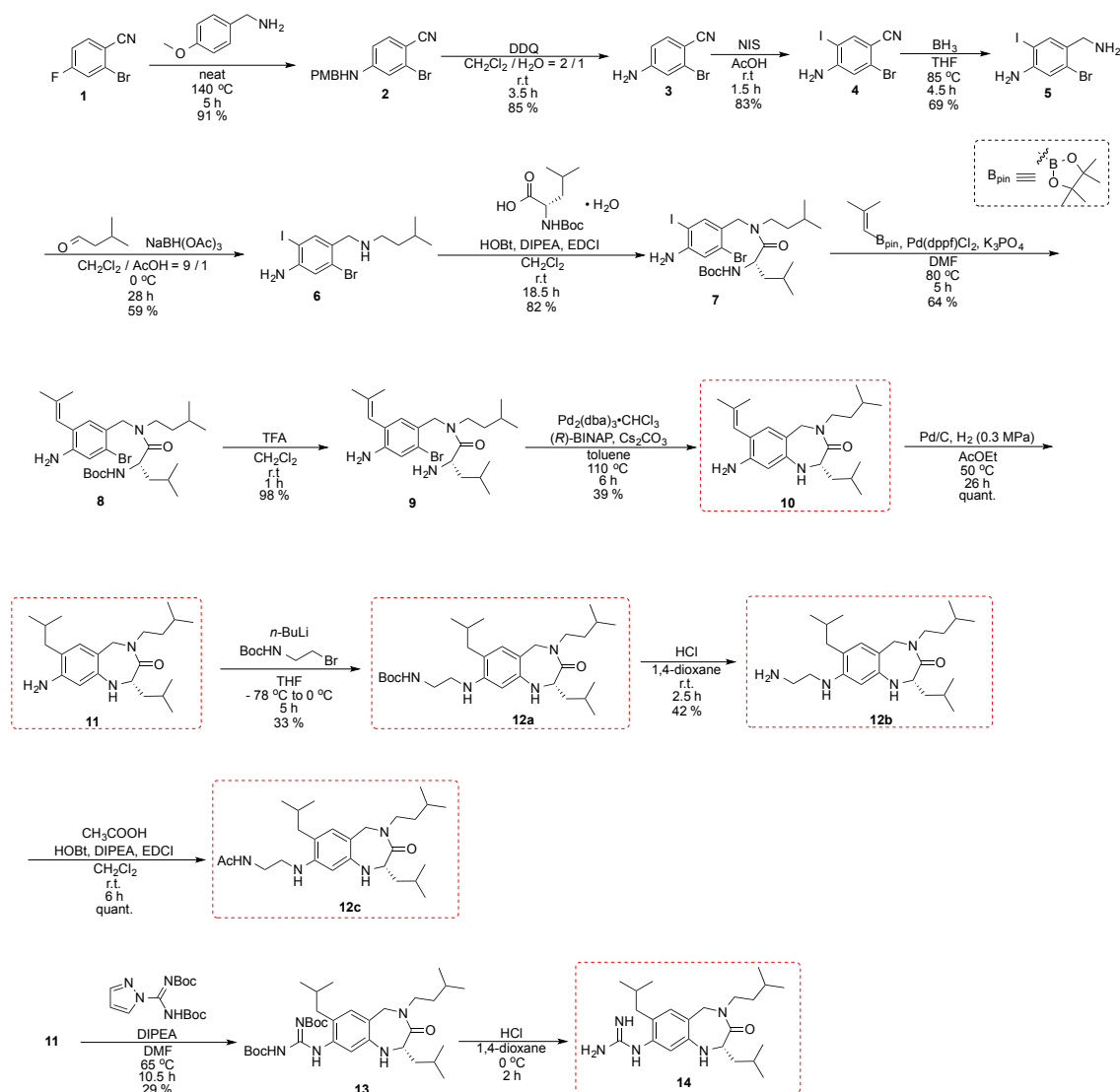
ベンゾジアゼピン型の LXXLL ペプチド等価体の逆合成解析を以下に示す (Scheme 2-3-1)。



Scheme 2-3-1. 逆合成解析

合成戦略として、8 位のアミノ基から伸びる側鎖は還元的アミノ化による導入を計画した。ベンゾジアゼピン骨格の構築には Buchwald-Hartwig クロスカップリングを用いた分子内環化による 7 員環の形成を試みた。さらにロイシン側鎖に対応する 3 つのアルキル側鎖は、7 位は Suzuki カップリング、4 位は還元的アミノ化による導入を計画し、2 位はアミノ酸側鎖を利用することにした。

以下に最終的に採用した合成スキームを示す (Scheme 2-3-2)。



Scheme 2-3-2. ベンゾジアゼピン型 LXXLL ペプチド等価体の合成

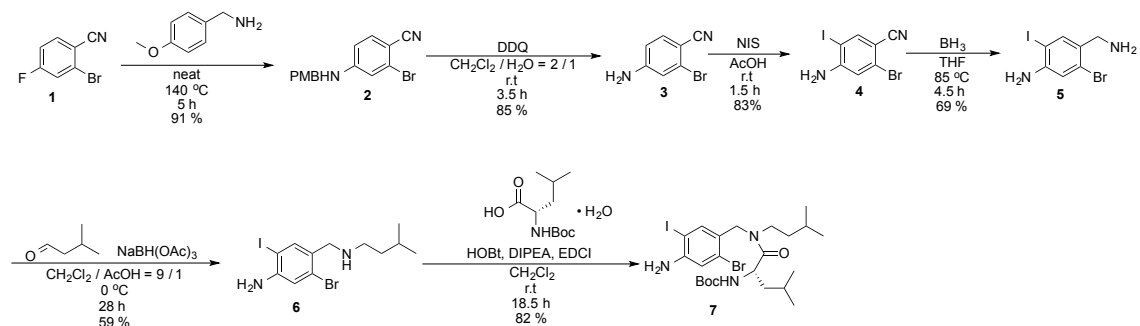
化合物合成の詳細については次ページ以降に記す。

①化合物 **7** の合成

②化合物 **11** の合成

③charge clamp 側鎖の導入

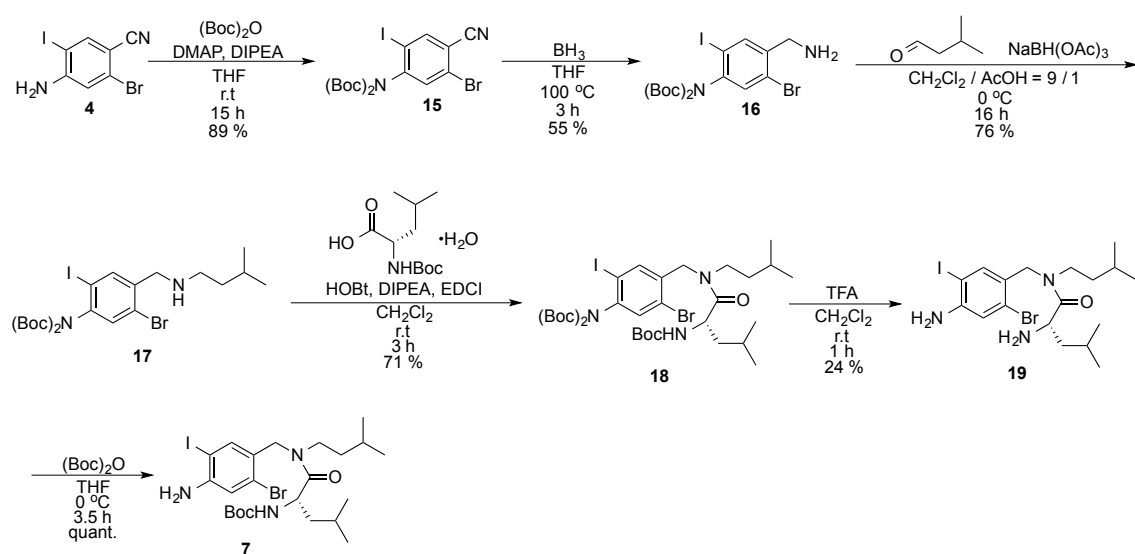
①化合物 **7** の合成 (Scheme 2-3-3)



Scheme 2-3-3. 化合物 **4** の合成

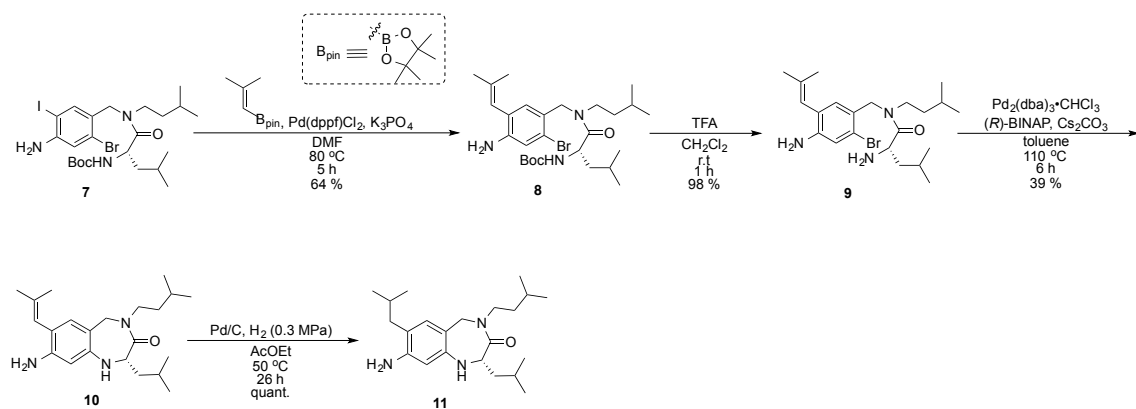
化合物 **1** を出発原料とし、フッ素原子に対する求核置換反応により 4-メトキシベンジルアミノ基を導入した後、DDQ を用いて PMB 基を除去することで化合物 **3** を得た。続いて NIS を用いてアミノ基のオルト位をヨウ素化し、ニトリル基をボランにより還元することで化合物 **5** を得た。化合物 **5** とイソバレルアルデヒドを還元的アミノ化で反応させた後、N-Boc-L-ロイシンと縮合することで化合物 **7** を得た。

また化合物 **6** から化合物 **7** への反応においてアニリンとアルキルアミンの二つの反応点が存在するため、化合物 **4** を diBoc 化したスキームを構築し、化合物 **6** を用いた縮合がアルキルアミンで起こり、正しく化合物 **7** が合成できているかを評価した (Scheme 2-3-4)。即ち、化合物 **4** を diBoc 化した化合物 **15** を用いて Scheme 2-2-3 と同様の反応を行い、化合物 **18** を得た。化合物 **18** の三つの Boc 基を除去した後、選択的にアルキルアミンを monoBoc 化した化合物が化合物 **7** と同一であることを確認した。なお実際の合成スキームは収率と手間を考慮し、diBoc 化しないスキーム (Scheme 2-3-3) を採用した。



Scheme 2-3-4. 化合物 **7** の構造の確認

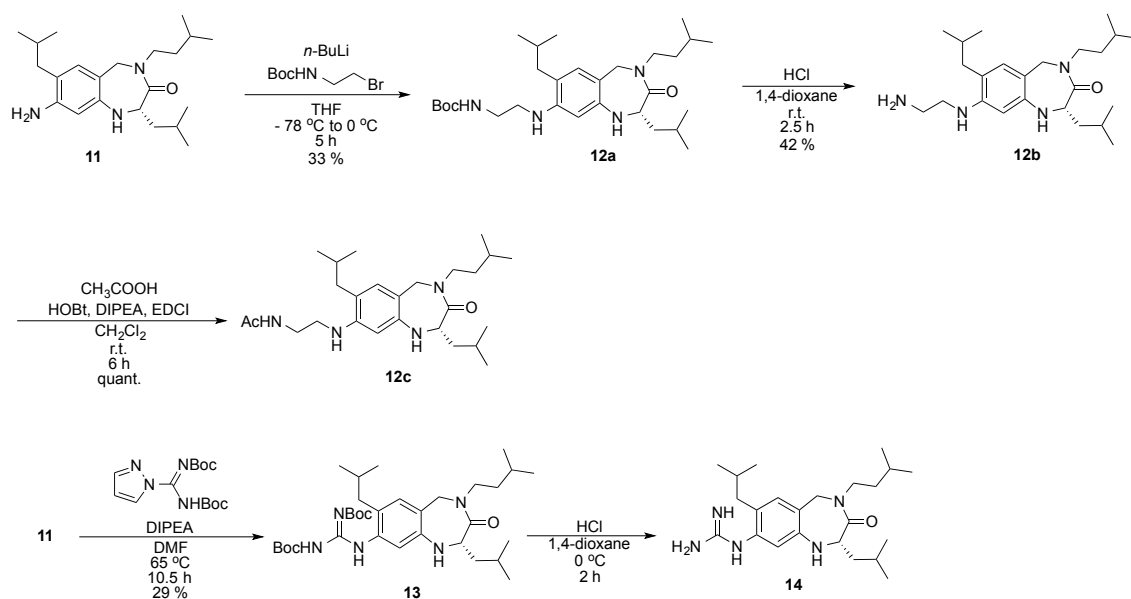
②化合物 11 の合成 (Scheme 2-3-5)



Scheme 2-3-5. 化合物 11 の合成

化合物 **7** から Suzuki カップリングを用いてイソクロチル基の導入を行い、TFA を用いて Boc 基を除去することで化合物 **9** を得た。化合物 **9** で分子内 Buchwald-Hartwig クロスカップリングを行うことで **7** 員環を構築し、ベンゾジアゼピン骨格を有する化合物 **10** を得た。さらに中圧条件下 (0.3 MPa) で接触還元することで、二重結合を還元した化合物 **11** を得た。

③charge clamp 側鎖の導入 (Scheme 2-3-6)



Scheme 2-3-6. charge clamp 側鎖の導入

化合物 **11** の 8 位アミノ基に charge clamp として置換基導入を検討した。化合物 **11** に n -ブチルリチウムを用いて $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応により化合物 **12a** を得た後、塩酸を用いて Boc 基を除去し化合物 **12b** を得た。さらに化合物 **12b** を酢酸と縮合することにより化合物 **12c** を得た。また化合物 **11** に対して Boc 基で保護されたピラゾール試薬を用いて化合物 **13** を得た後、Boc 基を除去することにより化合物 **14** を得た。

2-3-5. TR-FRET アッセイによる活性評価

得られた LXXLL ペプチド等価体の VDR—コアクチベーター相互作用阻害活性を評価するため、非細胞系のアッセイ法として時間分解蛍光共鳴エネルギー移動アッセイ (TR-FRET assay: time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay) を採用した。以下に TR-FRET アッセイの原理を示す (Figure 2-3-8)。

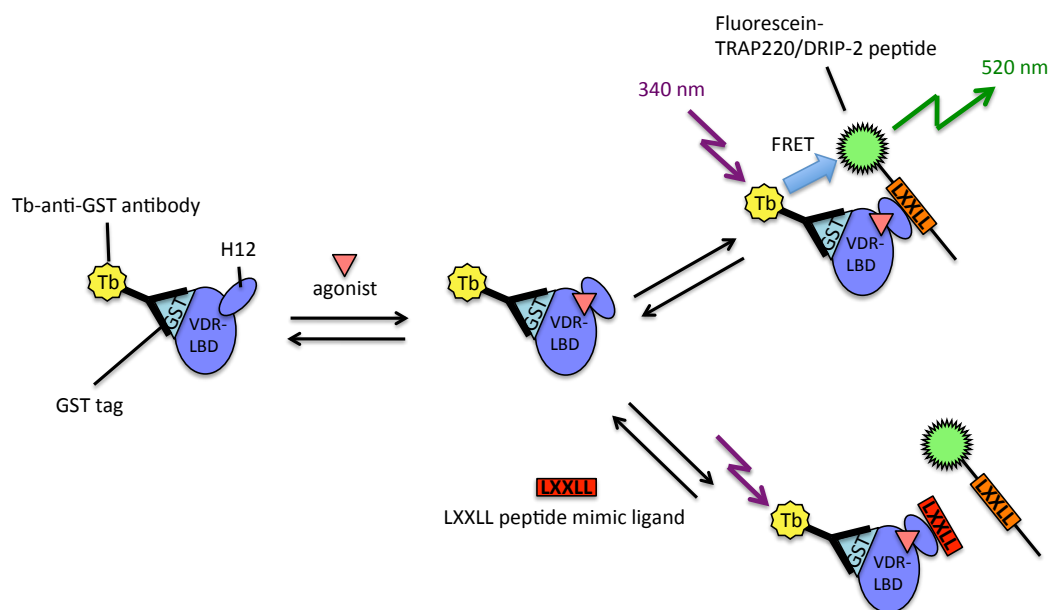


Figure 2-3-8. TR-FRET アッセイの原理

基本的に TR-FRET アッセイの原理は通常の FRET アッセイと同じである。本実験系では、ドナーとなる蛍光団をつけた抗 GST 抗体を用いて GST タグが発現した VDR を標識する。またコアクチベーター由来の LXXLL ペプチドフラグメントをアクセプターとなる蛍光団を用いて標識する。VDR と LXXLL ペプチドフラグメントが相互作用し、ドナーとアクセプターの蛍光団が近接した場合にのみ FRET が起こる。即ち、340 nm の励起光によりドナーが励起状態になり、近接したドナーとアクセプター間で共鳴によるエネルギー移動が起こる。その結果、アクセプターが励起状態になり、アクセプターが基底状態に戻る際に 520 nm の蛍光が検出される。本アッセイでは 520 nm の蛍光を定量することにより、化合物による VDR-LBD と LXXLL ペプチドフラグメントの相互作用阻害活性を評価した。

なお TR-FRET アッセイと FRET アッセイの違いは、TR-FRET アッセイのドナーに励起状態の寿命が長いものを用いることで、励起から測定までの時間を遅らせることが可能になる点である。一般に励起光はナノ秒単位で消失するが、本アッセイ系で用いた Tb 錯体は 100 マイクロ秒ほど励起状態を維持することが出来る。これによる利点は励起光によるノイズを減少させ、アッセイ系のバックグラウンドを下げられる点である。

TR-FRET アッセイの結果、いずれの LXXLL ペプチド等価体にも VDR-コアクチベーター相互作用阻害活性があることを見出した (Table 2-3-4)。また charge clamp 側鎖の検討の結果、Boc 化体である化合物 **12a** が最も強い阻害活性を示した。しかしながら化合物 **12a-c**、および **14** は安定性に課題があったため、以下の活性評価は **10** および **11** について行うこととした。

Table 2-3-4. TR-FRET アッセイ結果 ^a

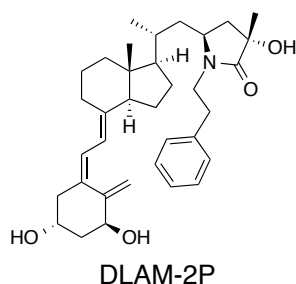
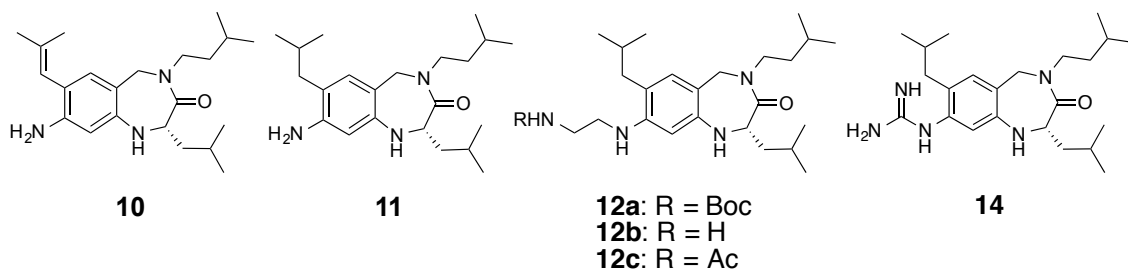
compound	IC ₅₀ (μM)
10	20
11	>30 (48%) ^b
12a	13
12b	28
12c	>30 (43%) ^b
14	>30 (46%) ^b
DLAM-2P^c	<10 (87%) ^d

^aFRET assay was performed with a VDR agonist (1,25(OH)₂D₃) (10 nM) and test compounds.

^bThe ratio of VDR inhibition at 30 μM

^cVDR antagonist.

^dThe ratio of VDR inhibition at 10 μM



2-3-6. レポータージーンアッセイによる活性評価

次に LXXLL ペプチド等価体群が細胞系でも VDR 阻害活性を示すことを確認するため、レポータージーンアッセイでの活性評価を行った。レポータージーンアッセイの原理を以下に示す (Figure 2-3-9)。

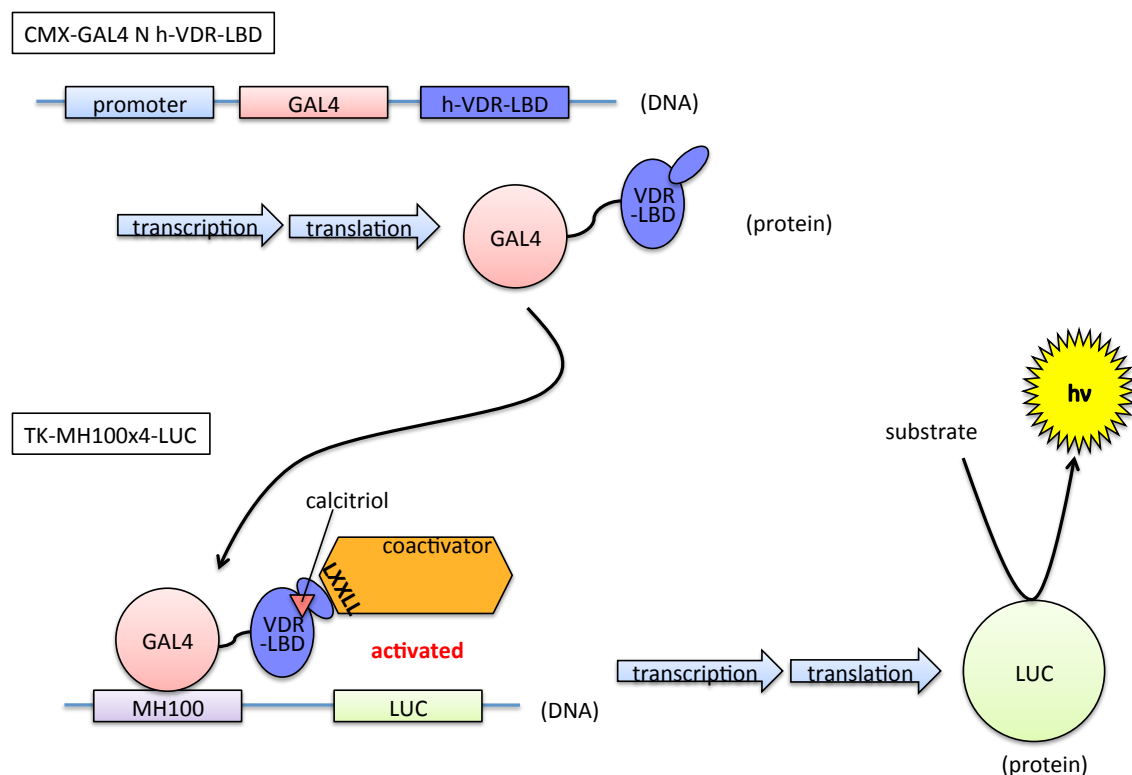


Figure 2-3-9. レポータージーンアッセイの原理

レポータージーンアッセイでは GAL4 と VDR リガンド結合部位 (VDR-LBD) を連結した DNA プラスミド、および MH100 とルシフェラーゼを連結した DNA プラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、トランスフェクションした VDR-LBD 由来の転写産物であるルシフェラーゼ由来の発光量を定量することで、トランスフェクションした VDR の転写活性を測定している。ルシフェラーゼ発現の具体的なメカニズムは以下の通りである。即ち、タンパク質である GAL4 は DNA 上の MH100 配列と結合し、GAL4 と結合している VDR-LBD がアゴニスト依存的にコアクチベーターと相互作用する。その結果転写活性化が起こり、MH100 の下流に存在する LUC 遺伝子よりルシフェラーゼが転写・翻訳される。なお well 間におけるトランスフェクション効率の規格化には β -galactosidase の活性を指標に用いている。

VDR に対するレポータージーンアッセイを行い、化合物 **10** および化合物 **11** が細胞系においても VDR 依存的な転写阻害活性、即ち VDR 阻害活性を示すことを確認した (Table 2-3-5)。

Table 2-3-5. レポータージーンアッセイ結果 ^a

compound	IC ₅₀ (μM)
10	17 (68%) ^b
11	>30 (47%) ^b
DLAM-2P ^c	0.22 (98%) ^d

^a1,25(OH)₂D₃ was used as a VDR agonist,

^bThe ratio of inhibition at 30 μM,

^cVDR antagonist,

^dinhibition ratio at 10 μM

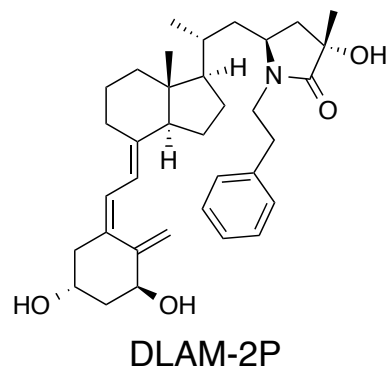
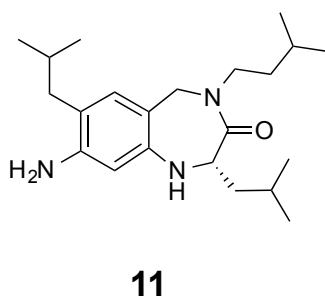
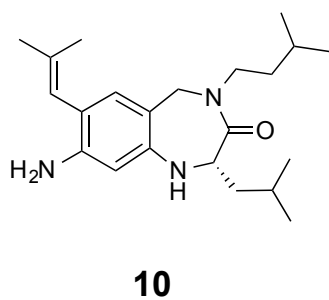


Table 2-3-5 で確認された、LXXLL ペプチド等価体であるベンゾジアゼピン化合物の VDR 阻害活性は、その想定される作用機序から、既存の VDR アンタゴニストとは異なる挙動を示すことが予想された。即ち既存のアンタゴニストはアゴニストと競合的な作用機序で VDR 阻害活性を示すため、アゴニスト濃度の増加により VDR 阻害が減弱するのに対し、LXXLL ペプチド等価体はアゴニストと非競合的な作用機序、即ちアゴニストが VDR と結合した後の VDR-コアクチベーター相互作用を阻害することで VDR 阻害活性を示すと考えられるため、VDR 阻害活性がアゴニスト濃度に依存せずに一定になるものと予想された (Figure 2-3-10)。

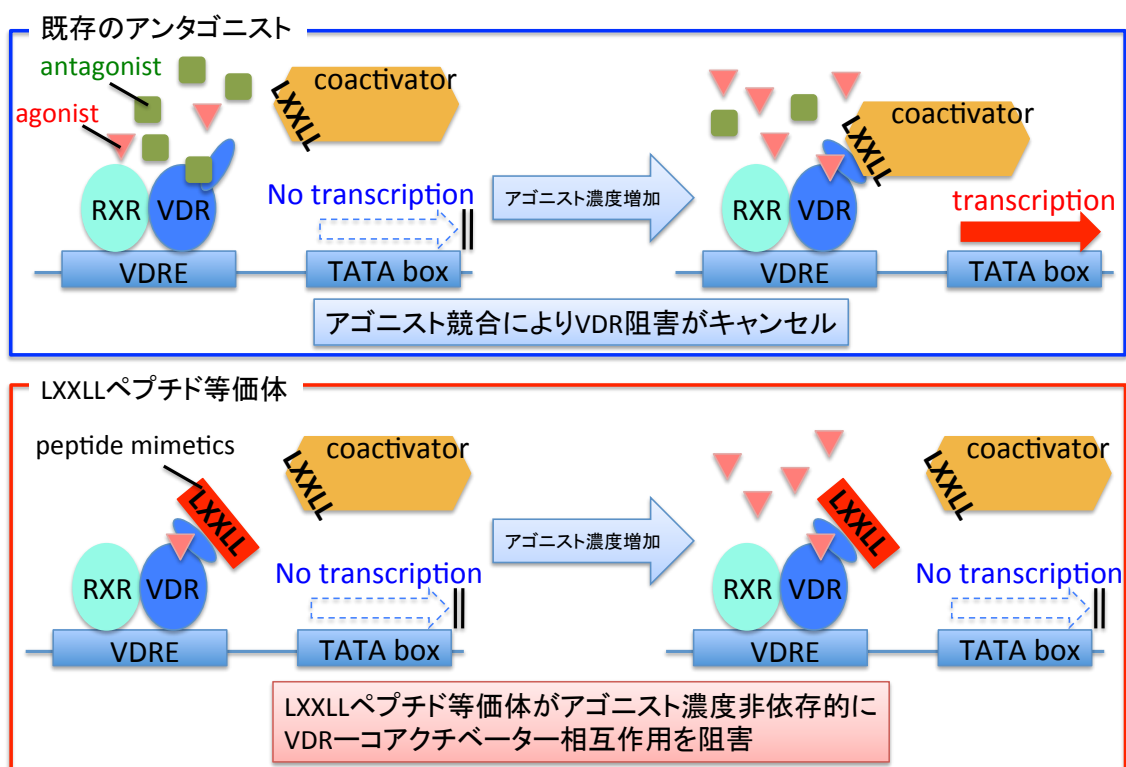


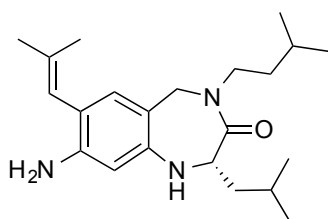
Figure 2-3-10. 想定される作用機序

そこで、前述の仮説を確かめるべく、アゴニストとして用いた 1,25(OH)₂D₃ の濃度を通常濃度条件 (3 nM) と 100 倍の高濃度条件 (300 nM) で実験を行った結果、LXXLL ペプチド等価体 **10** および **11** による VDR 阻害は、アゴニスト濃度 (3 ~ 300 nM) の影響をほとんど受けなかった (Table 2-3-6)。一方、セコステロイド骨格を持つ VDR アンタゴニストである DLAM-2P の VDR 阻害活性は、高濃度のアゴニスト共存によって大きく減弱した (Table 2-3-6)。本実験で観察された LXXLL ペプチド等価体と DLAM-2P のアゴニスト濃度依存的な VDR 阻害の挙動の違いは、両者の VDR 阻害に関する作用機序の違いを示唆するものと考察している。

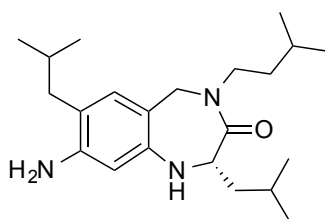
Table 2-3-6. VDR 阻害活性に対するアゴニスト濃度依存性評価

compound	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
agonist	1,25(OH) ₂ D ₃ (3 nM)	1,25(OH) ₂ D ₃ (300 nM)
10	17 (68%) ^a	23 (59%) ^a
11	>30 (47%) ^a	30 (53%) ^a
DLAM-2P ^b	0.22 (98%) ^c	3.3 (66%) ^c

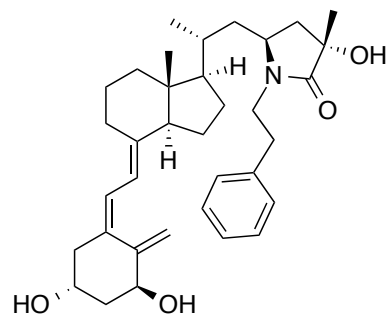
^ainhibition ratio at 30 μM, ^bVDR antagonist,
^cinhibition ratio at 10 μM



10



11



DLAM-2P

2-3-7. VDR 以外の核内受容体に対する阻害活性評価

LXXLL 配列を介したコアクチベーターによる核内受容体の転写活性化は、核内受容体全般に共通するメカニズムである。それゆえ創製した LXXLL ペプチド等価体の他の核内受容体に対する選択性を評価するため、ER に対するレポータージーンアッセイを行った (Table 2-3-7)。その結果、化合物 **10** は ER α に対してほとんど阻害活性を示さなかったが、ER β に対しては弱いながらも阻害活性を示した。また化合物 **11** は ER α 、ER β の両者に対してほとんど阻害活性を示さなかった。

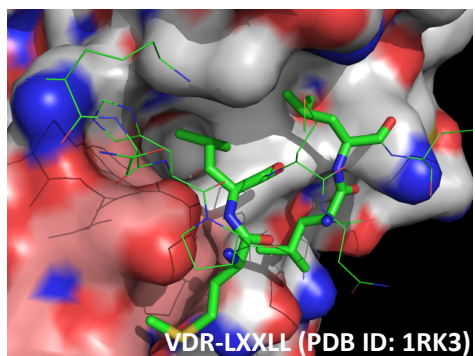
Table 2-3-7. ER に対する選択性評価

compound	ER α	ER β
	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
agonist	estradiol	estradiol
10	>30 (8%) ^a	22
11	>30 (8%) ^a	>30 (18%) ^a

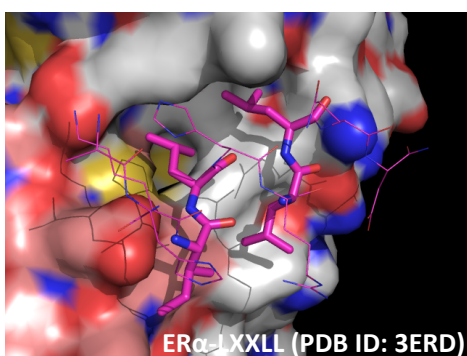
^ainhibition ratio at 30 μ M

LXXLL ペプチド等価体の各核内受容体に対する選択性の違いは、核内受容体の LXXLL 配列認識部位の構造差異、および核内受容体と結合したコアクチベーターの活性コンフォメーションの違いによるものだと考察している。以下に具体的な差異について記述する。まず核内受容体の LXXLL 配列認識部位の構造差異 (Figure 2-3-11) について記す。

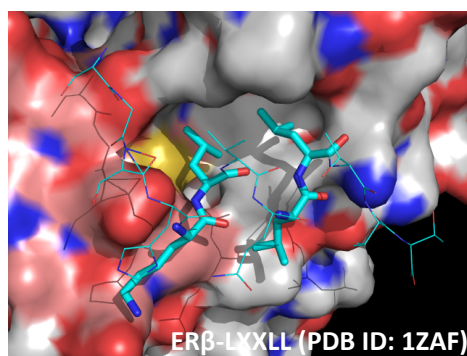
a)



b)



c)



d)

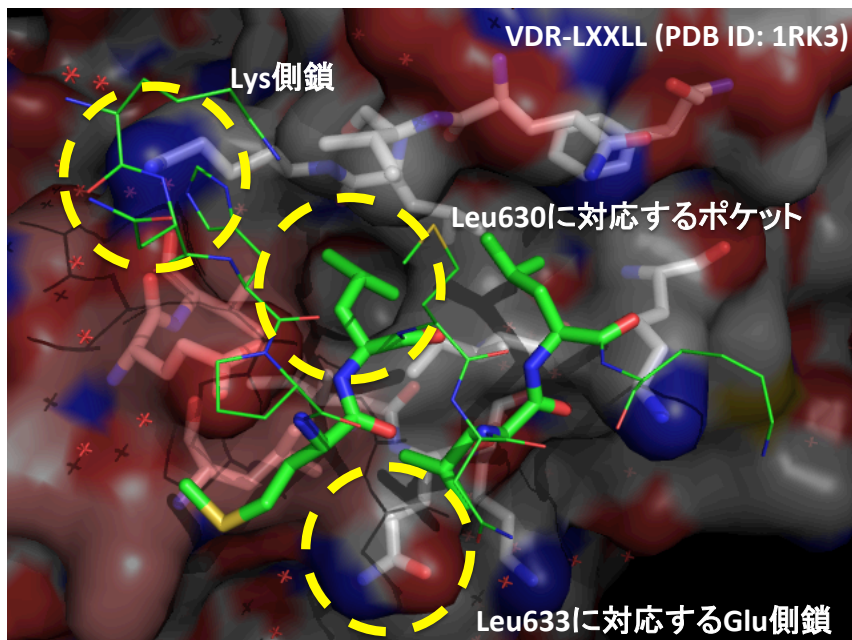


Figure 2-3-11. 各核内受容体における LXXLL 配列認識部位の構造差異

a) : VDR (PDB ID: 1RK3) 、 b) : ERα (PDB ID: 3ERD) 、 c) : ERβ (PDB ID: 1ZAF) より作成した。各核内受容体における H12 対応部位をピンクで示した。d) : VDR(PDB ID: 1RK3)の拡大図。VDR に特徴的な部位を黄色で表示した。

各核内受容体の LXXLL 配列認識部位の構造は、ER α と ER β の間での違いは小さいが、VDR と ER との間では構造的な差異が観察できる。特に Leu630 に対応する側鎖認識部位近傍には特徴的なポケットおよびリシン側鎖が存在する。また Leu633 に対応する側鎖認識部位近傍では電荷を持つグルタミン側鎖が存在する。Table 2-3-7 において、化合物 **10** および化合物 **11** が ER に対して VDR よりも低い阻害活性を示した実験結果には、VDR と ER 間の構造的な差異が寄与していると考察している。

続いて核内受容体と結合したコアクチベーターの活性コンフォメーションの違い(Figure 2-3-12)について記述する。

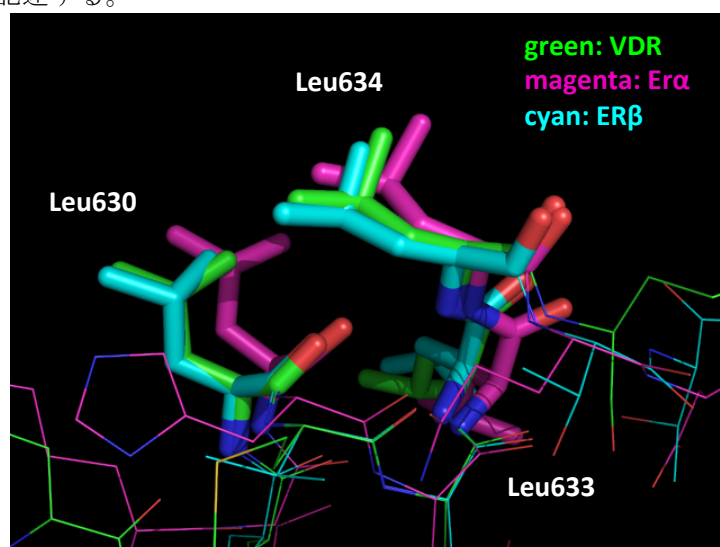


Figure 2-3-12. LXXLL ペプチドフラグメントの活性コンフォメーションの違い
緑 : VDR (PDB ID: 1RK3) 、マゼンダ : ER α (PDB ID: 3ERD) 、シアン : ER β (PDB ID: 1ZAF) より作成した。図中の Leu630、Leu633、Leu634 は VDR に対するコアクチベーターのアミノ酸配列を示す。

コアクチベーターの LXXLL ペプチドフラグメントの活性コンフォメーションについては、VDR に結合した状態と ER β に結合した状態では構造的な差異はあまり見られない。一方で、結合する相手が VDR である場合と ER α である場合との間では、差異が大きく、特に VDR に対するコアクチベーター上の Leu630 に対応する側鎖部位での差異が大きい。Table 2-3-7 において化合物 **2** が ER α に対して活性を示さず、ER β にのみ阻害活性を示した実験結果には、この LXXLL ペプチドフラグメントの活性コンフォメーションの違いも寄与していると考察している。

上記より、LXXLL ペプチド等価体 **10** および **11** に VDR と ER α および ER β との間に選択性が得られた原因は、LXXLL ペプチドを認識する核内受容体間のタンパク質表面の構造的差異、および LXXLL ペプチドフラグメントの活性コンフォメーション差異によるものと考察している。

2-3-8. ドッキングスタディによる評価

AutoDock4.2 を用いて化合物 **10** と VDR (PDB ID: 1RK3) のドッキングスタディを行った (Figure 2-3-13)。Glu416 側鎖および Lys242 側鎖は計算時に可変する残基として扱い、他のアミノ酸残基は剛直な固体として計算を行った。Figure 2-3-13 は得られた計算結果を元の PDB データに導入して作成した。

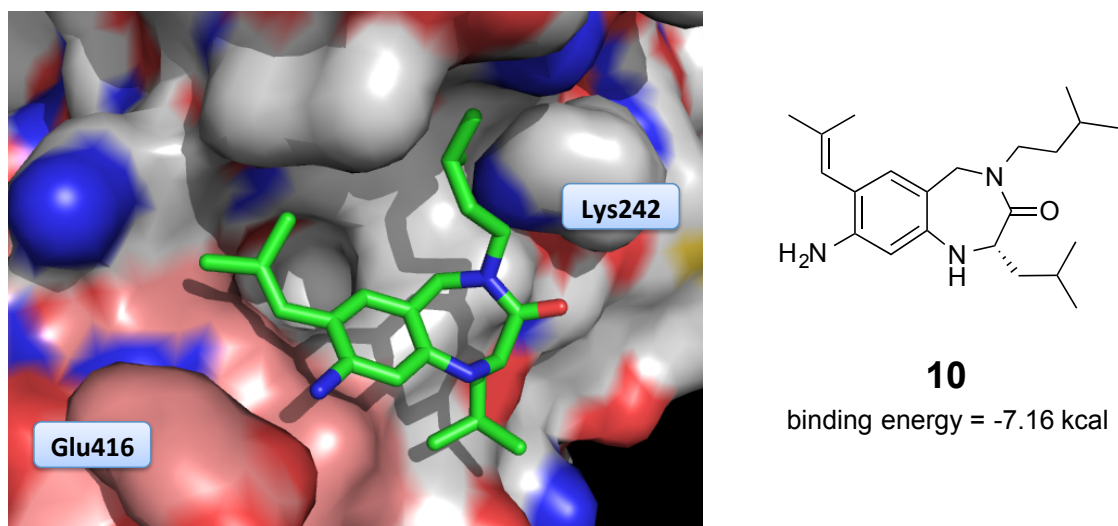


Figure 2-3-13. 化合物 **10** のドッキングスタディ

化合物 **10** は-7.16kcal で VDR の LXXLL ペプチド認識部位と相互作用するという結果が得られた。これは化合物 **10** が化合物デザイン時に期待した形式で、VDR と相互作用していることを支持する結果だと考えている。

2-3-9. 小括①

著者は本節において、VDR—コアクチベーター相互作用を阻害し、VDR を介した転写を抑制するベンゾジアゼピン型の LXXLL ペプチド等価体を創製した(Figure 2-3-14)。阻害活性は弱いものの、これは私の知る限り非セコステロイド型ならびに非ペプチド型の VDR 阻害物質として初の報告である。また得られた LXXLL ペプチド等価体は ER α に対して阻害活性を示さず、VDR と ER α において選択性を示した。

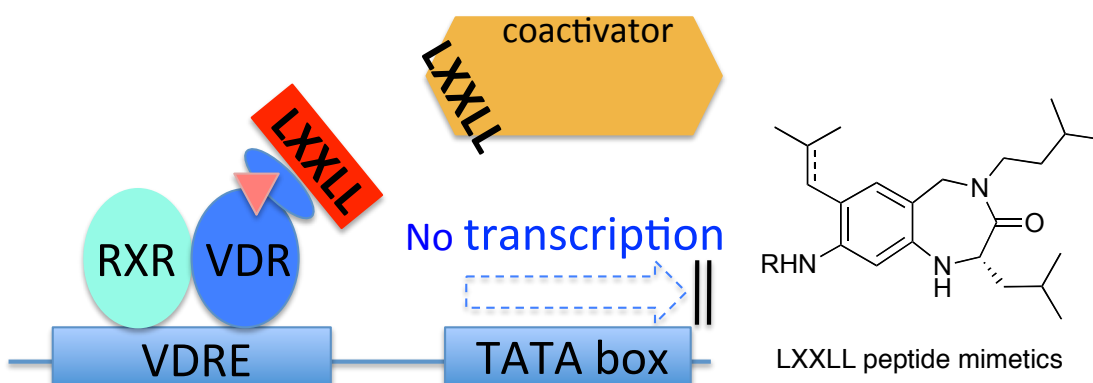


Figure 2-3-14. VDR—コアクチベーター相互作用阻害物質の創製

2-4 節 活性向上に向けた化合物の展開

2-4-1. ベンゾジアゼピン 8 位アミノ基の寄与

前節で LXXLL ペプチド等価体の創製に成功した。引き続いて構造活性相関を得ることによって、化合物高活性化に有用な情報を得ることを試みた。具体的には、VDR に特徴的である 7 位のポケットとの相互作用を期待して 7 位炭素鎖の構造展開を試みた。加えて charge clamp 部位として存在する 8 位のアミノ基が VDR 阻害活性に寄与しているか評価すべく、8 位アミノ基を有さない化合物の設計を試みた (Figure 2-4-1)。

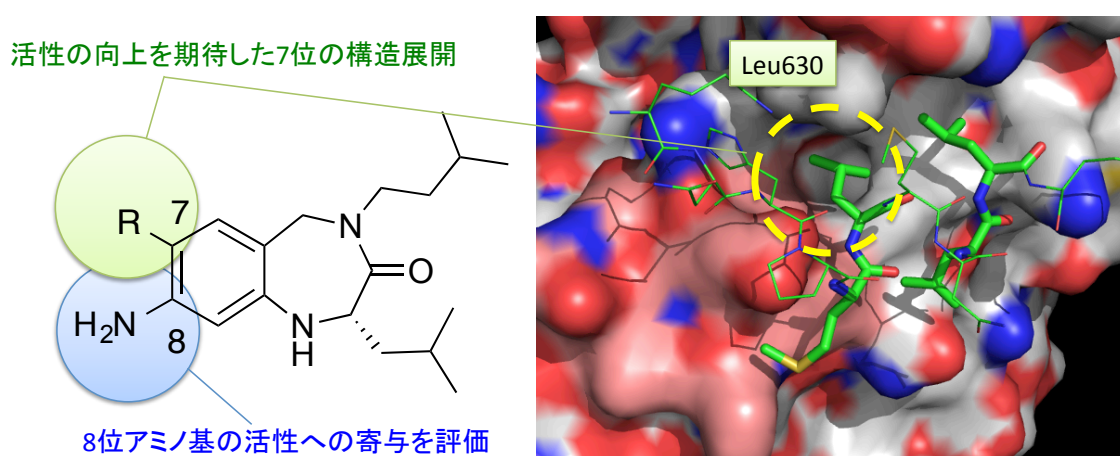


Figure 2-4-1. 7 位および 8 位の構造展開

また化合物の具体的な構造展開に関しては、8 位アミノ基を有さず、かつ、7 位に対応するポケットとの相互作用を期待した直鎖炭素鎖の導入、およびポケット内部での水素結合を期待してヒドロキシル基を導入した化合物の設計・合成を計画した (Figure 2-4-2)。

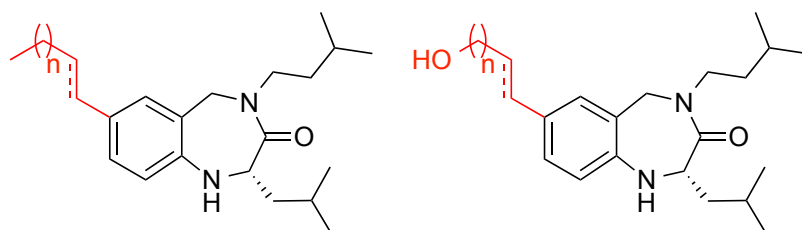
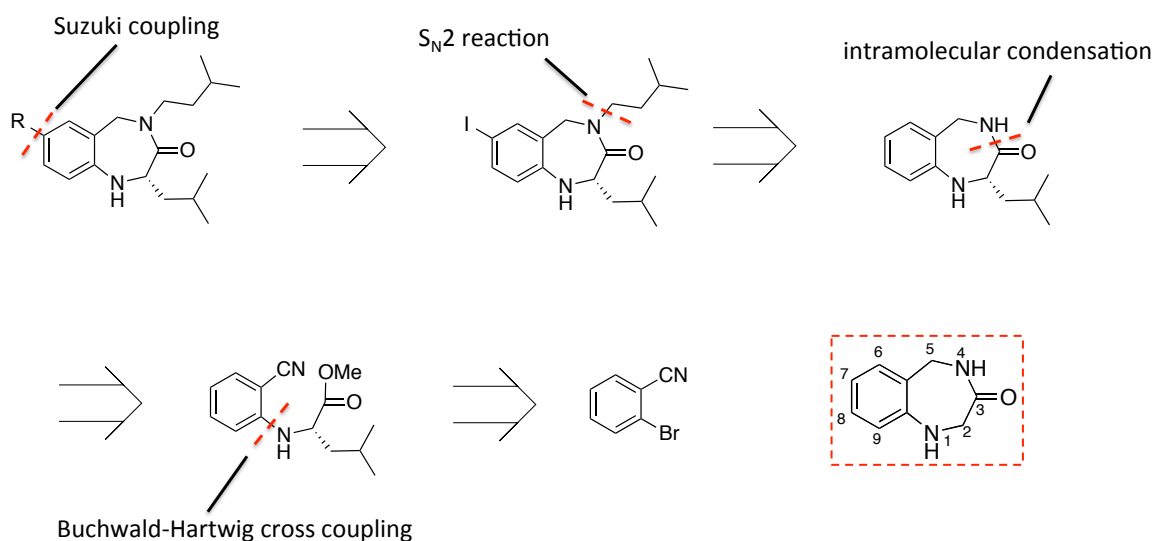


Figure 2-4-2. 7 位に対応するポケットとの相互作用を期待した構造展開

そこで 8 位アミノ基を有さず、7 位構造展開に有利な新規合成スキームの構築を計画した。

逆合成解析を以下に示す (Scheme 2-4-1)。

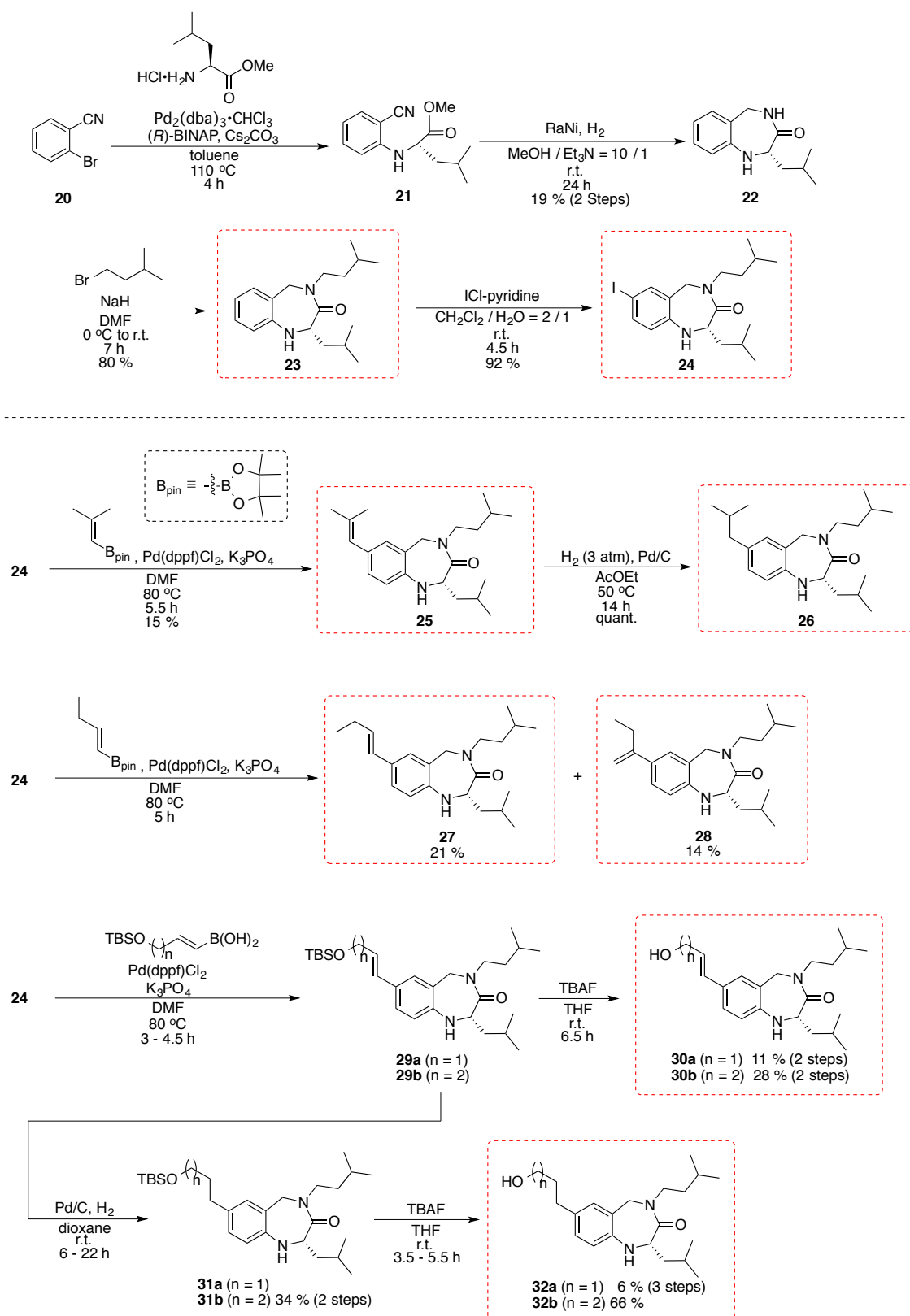


Scheme 2-4-1. 8 位アミノ基を持たないベンゾジアゼピン化合物の逆合成解析

Leu630 対応部位である 7 位のアシル側鎖は、ベンゾジアゼピン骨格の 7 位選択的なヨウ素化法²⁻⁴⁻¹⁾を利用してヨウ素を導入した後、Suzuki カップリングによる導入を計画した。また 4 位のアシル鎖の導入は S_N2 反応によるアミドの N-アルキル化を予定した。ベンゾジアゼピン骨格の構築にはニトリルを還元することにより生じたアミンと Buchwald-Hartwig クロスカップリングで導入したエステルを分子内で縮合することで構築することを試みた。

²⁻⁴⁻¹⁾ Fadia EA, Catherine CKY, Stephen TR, Leon BH. "Regioselective alkylation at the N4 position of a 3-oxo-1,4-benzodiazepine on solid support" *Mol. Diversity* **2000**, 5, 1

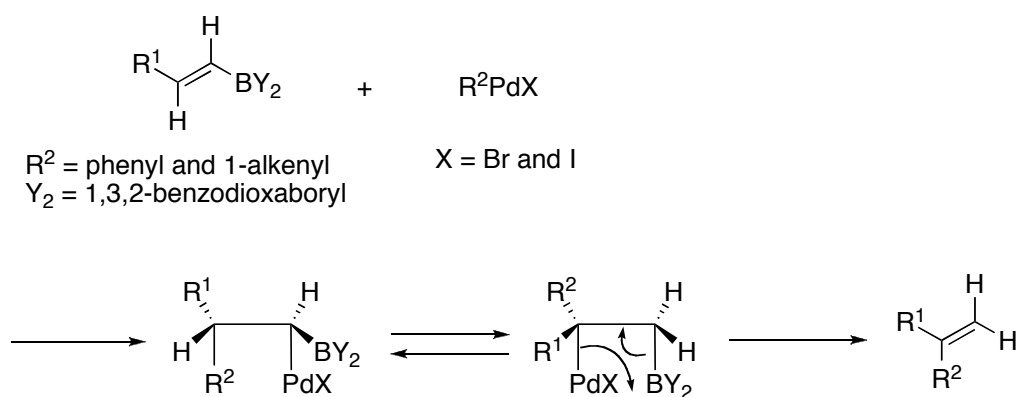
以下に合成スキームを示す (Scheme 2-4-2)。



Scheme 2-4-2. 8 位にアミノ基を有さないベンゾジアゼピン化合物の合成

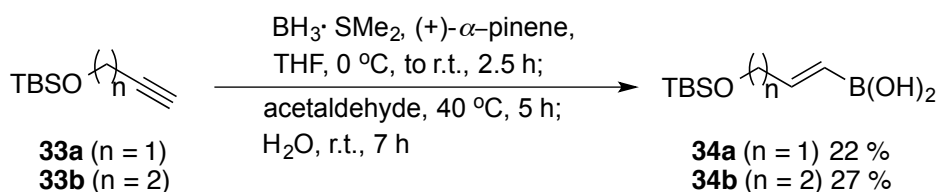
化合物 **20** を出発物質として、Buchwald-Hartwig クロスカップリングにより L-ロイシンメチルエステルを導入し化合物 **21** とした。次いで Raney ニッケルを用いた接触還元でニトリル基をアミノ基に変換し、分子内タンデム環化反応によりベンゾジアゼピン骨格を構築し化合物 **22** を得た。その後アミドの N-アルキル化を行い **23** を合成し、7 位を選択的にヨウ素化²⁻⁴⁻¹⁾することで化合物 **24** を得た。化合物 **24** に種々のボロン酸誘導体を Suzuki カップリングした後、二重結合の還元および TBS 基の除去を行うことで、8 位が無置換の LXXLL ペプチド等価体を複数合成した。

なお化合物 **24** から化合物 **28** の合成における反応メカニズムは、先行研究²⁻⁴⁻²⁾において提唱された反応の途中で異性化が起こる反応メカニズム (Scheme 2-4-3) ではないかと考えている。



Scheme 2-4-3. 先行研究²⁻⁴⁻²⁾で提唱されている反応メカニズム

また水酸基を TBS 保護したボロン酸誘導体はヒドロホウ素化により合成した (Scheme 2-4-4)。

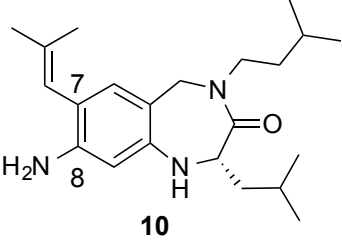

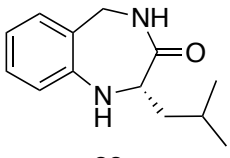


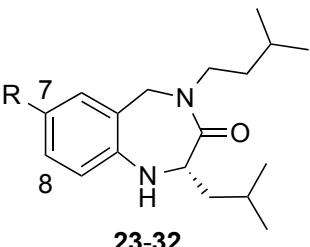
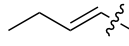

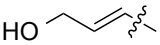
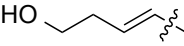
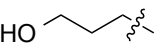
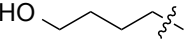


Scheme 2-4-4. ボロン酸誘導体 **34** の合成

²⁻⁴⁻²⁾ Miyaura N, Suzuki A. "The palladium-catalyzed "head-to-tail" cross-coupling reaction of 1-alkenylboranes with phenyl or 1-alkenyl iodides. A novel synthesis of 2-phenyl-1-alkenes or 2-alkyl-1,3-alkadienes via organoboranes" *J. Organomet. Chem.* **1981**, 213, C53

得られた 8 位にアミノ基を有さない化合物群の VDR 阻害活性をレポータージーンアッセイで評価した (Table 2-4-1)。

Table 2-4-1. 8 位にアミノ基を有さない誘導体のレポータージーンアッセイ結果 ^a

	compound	R	IC ₅₀ (μM)
 10	10		26
	22		>30 (29%) ^b
	23	H ^c	N.A. ^c
 22	24	I ^c	>30 (30%) ^b
	25		N.A. ^c
	26		>30 (45%) ^b
 23-32	27		>30 (5%) ^b
	28		>30 (32%) ^b
	30a	HO 	>30 (27%) ^b
	30b	HO 	>30 (28%) ^b
	32a	HO 	>30 (9%) ^b
	32b	HO 	>30 (3%) ^b

^a1,25(OH)₂D₃ was used as a VDR agonist,

^binhibition ratio at 30 μM, ^cno activity

全体として 8 位にアミノ基が存在しないと VDR 阻害活性が低下する傾向が見られた。この結果より 8 位のアミノ基は活性増強に関与していると考えられ、本部位の charge clamp として寄与を示唆する結果だと考えている。また 7 位から伸長した炭素鎖の二重結合の有無によって、VDR 阻害活性が変化する傾向が見られた (**25** と **26**、および **30a-b** と **32a-b**)。この結果より、VDR 側の Leu630 認識部位による 7 位炭素鎖の認識には、7 位炭素鎖の形状が重要であることが示唆された。

2-4-2. 8 位アミノ基を有するベンゾジアゼピン化合物の 7 位構造展開

Table 2-4-1 の結果より、ベンゾジアゼピン型 LXXLL ペプチド等価体の活性発現には 8 位のアミノ基が重要であること、および 7 位炭素鎖の形状が VDR 阻害活性に影響を与えることが明らかとなった。そこで 8 位アミノ基を有したまま、7 位の構造展開を行うことで高活性化を期待した。化合物の具体的な構造展開に関しては、8 位アミノ基を有し、かつ、7 位に対応するポケットとの相互作用を期待した直鎖炭素鎖の導入、および芳香環を導入した化合物の設計・合成を計画した (Figure 2-4-3)。

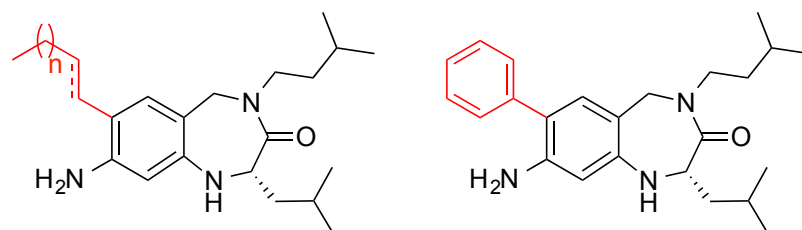
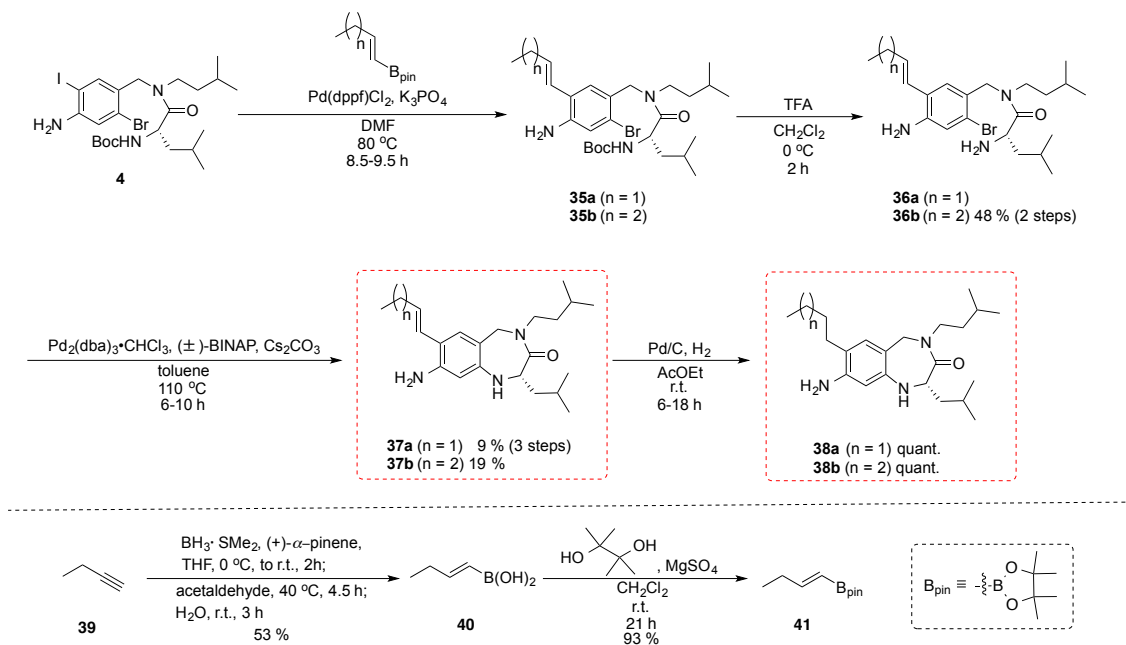


Figure 2-4-3. 8 位アミノ基を有し、7 位での相互作用を期待した構造展開

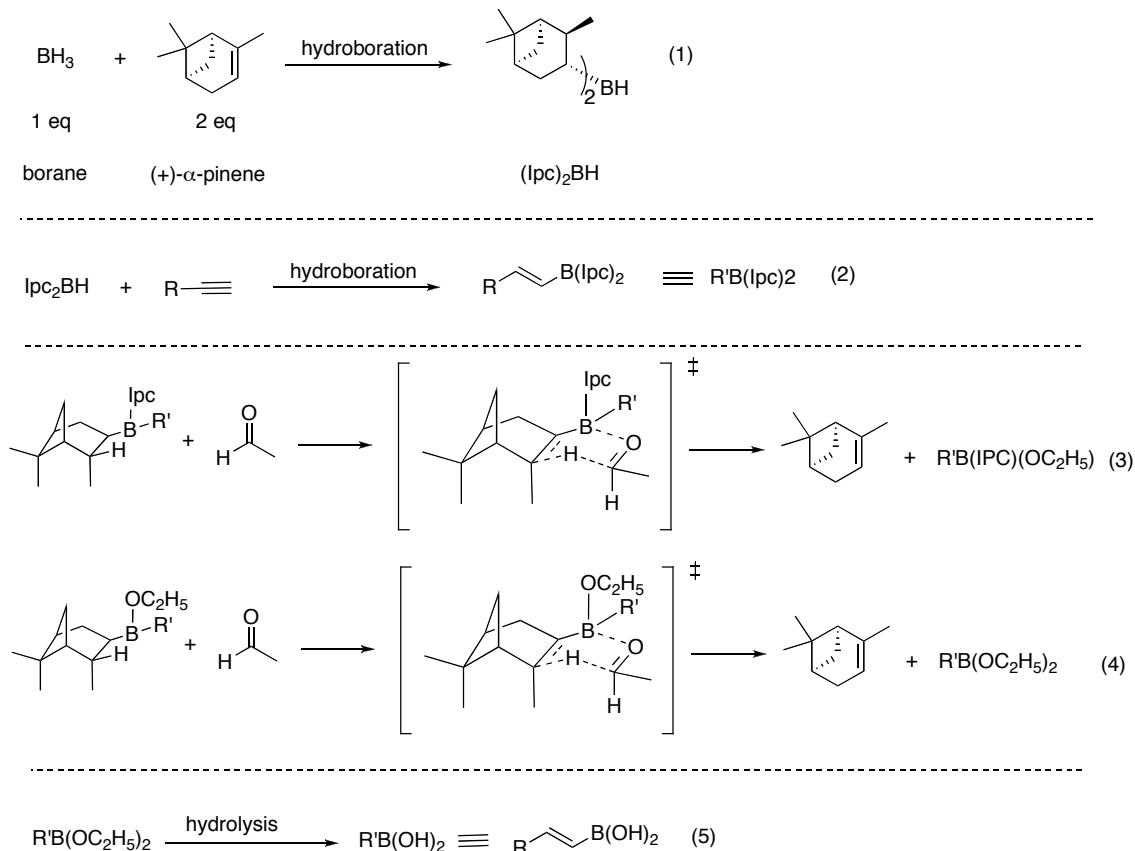
7 位に直鎖炭素鎖を有する化合物の合成は Scheme 2-3-5 と同様のスキームを用いた (Scheme 2-4-5)。



Scheme 2-4-5. 化合物 **37** および **38** の合成

化合物 **4** と対応するボロン酸ピナコールエステル誘導体で Suzuki カップリングを行いカップリングさせた後、TFA により Boc 基を除去して化合物 **36a-b** を得た。その後、分子内 Buchwald-Hartwig クロスカップリングによる 7 員環形成を行い、ベンゾジアゼピン骨格を構築し、化合物 **37a-b** とした。更に接触還元により化合物 **38a-b** を得た。なお炭素数 4 のボロン酸ピナコールエステル誘導体 **41** は化合物 **39** へのヒドロホウ素化の後、ピナコールエステル化することで合成した。

また化合物 **39** のヒドロホウ素化の反応メカニズムは以下のように考察している²⁻⁴⁻³⁾ (Scheme 2-4-6)。

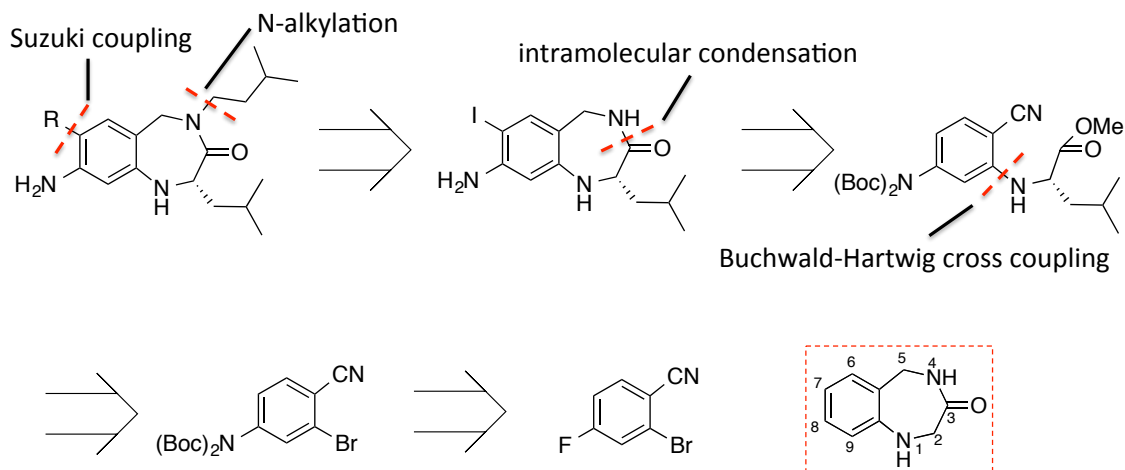


Scheme 2-4-6. ヒドロハウ素化の想定反応メカニズム (2-4-3)

まず 1 等量のボランと 2 等量のピネンから $(\text{Ipc})_2\text{BH}$ が形成され (式(1))、そこにアルキンが添加されることによりヒドロホウ素化が起こる (式(2))。次いでアルデヒドが六員環の遷移状態を経て反応することにより、B-C 結合が B-O 結合へと置換される (式(3), (4))。最後に加水分解が起こることによりボロン酸が得られる (式(5))、というメカニズムを想定している。

2-4-3) Navalkishore NJ, Chongsuh P, Verinder KM, Bakthan S, Herbert CB. "Chiral synthesis via organoboranes. 33. The controlled reaction of B-alkyldiisopinocampheylboranes with aldehydes providing a convenient procedure for the enantiomeric enrichment of the boronic ester products through kinetic resolution" *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 504

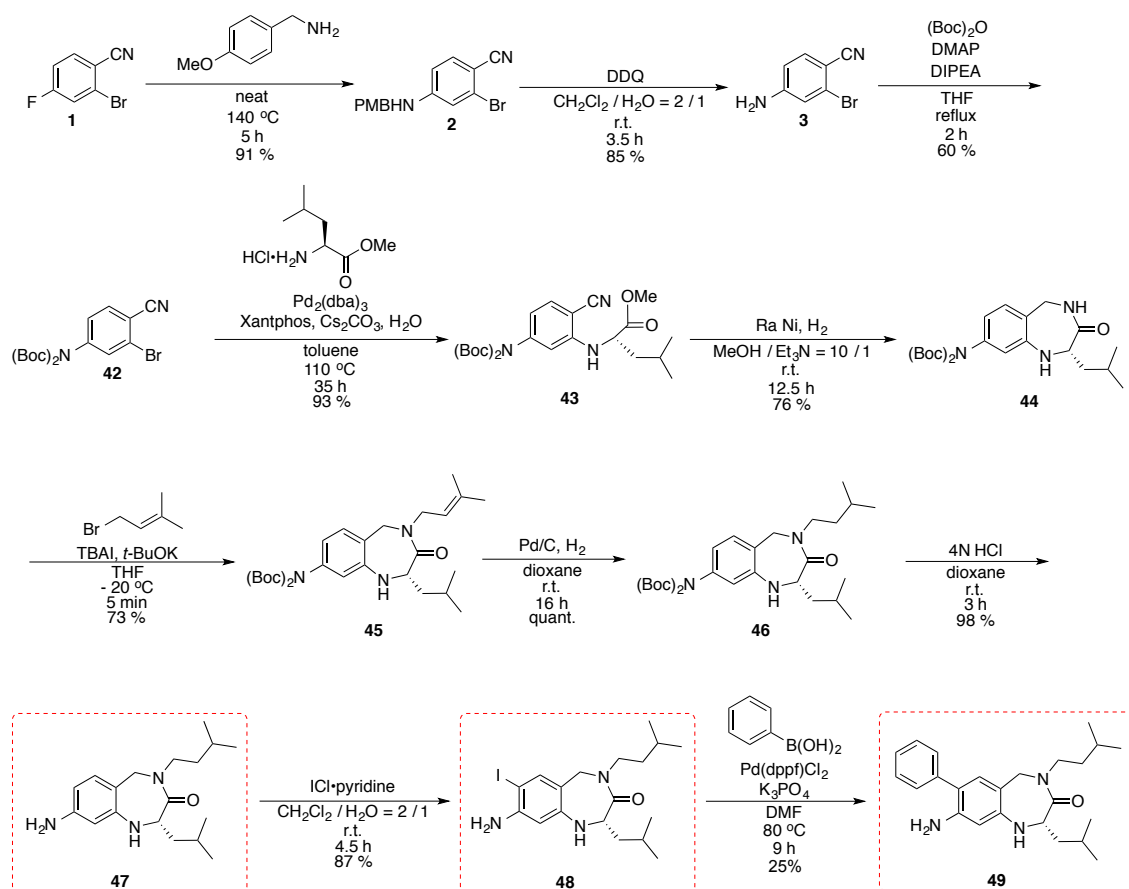
Scheme 2-4-5 では目的化合物 **37a-b** および **38a-b** を得ることが出来たが、多段階合成が必要とされるため、多数の 7 位誘導体の合成には不向きであった。そこで scheme 2-4-2 に基づいて、8 位アミノ基を有したベンゾジアゼピン化合物において 7 位を効率的に構造展開できる合成スキームの構築を試みた。逆合成解析を以下に示す (Scheme 2-4-7)。



Scheme 2-4-7. 8 位アミノ基を有し、7 位炭素鎖の構造展開に適したベンゾジアゼピン化合物の逆合成解析

逆合成解析は Scheme 2-3-2 に従い、出発物質に窒素原子を導入した後、アミノ基を Boc 基で保護を行った上で、Scheme 2-4-4 と同様の合成ルートでの合成を計画した。即ち Leu630 対応部位である 7 位のアルキル側鎖は、ベンゾジアゼピン骨格の 7 位選択的なヨウ素化法²⁻⁴⁻¹⁾を利用したヨウ素化と Suzuki カップリングによる導入を計画した。また 4 位のアルキル鎖は S_N2 反応によるアミドの N-アルキル化による導入を予定した。ベンゾジアゼピン骨格の構築にはニトリルを還元することにより生じたアミンと Buchwald-Hartwig クロスカップリングで導入したエステルを分子内で縮合することで構築することを試みた。

以下に合成スキームを示す (Scheme 2-4-8)。



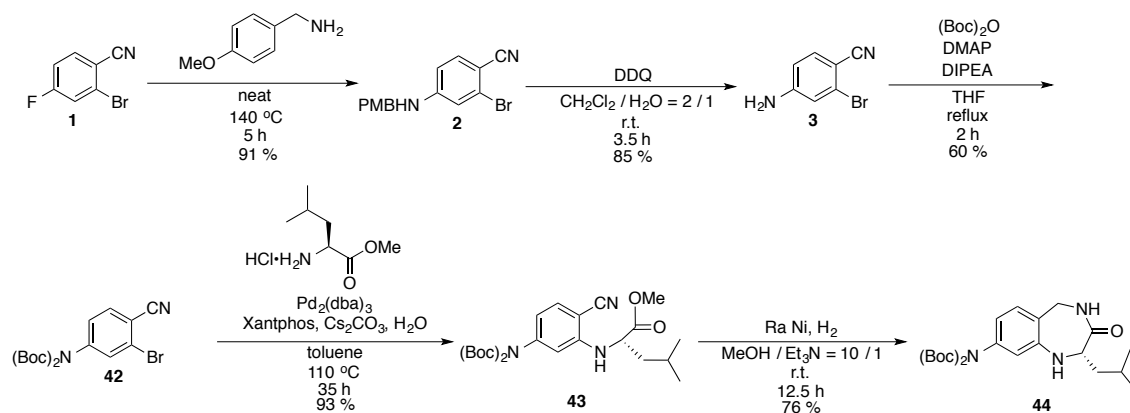
Scheme 2-4-8. 8位アミノ基を有するベンゾジアゼピン化合物の合成

化合物合成の詳細については次ページ以降に示す。

①化合物 **44** の合成

③化合物 **49** の合成

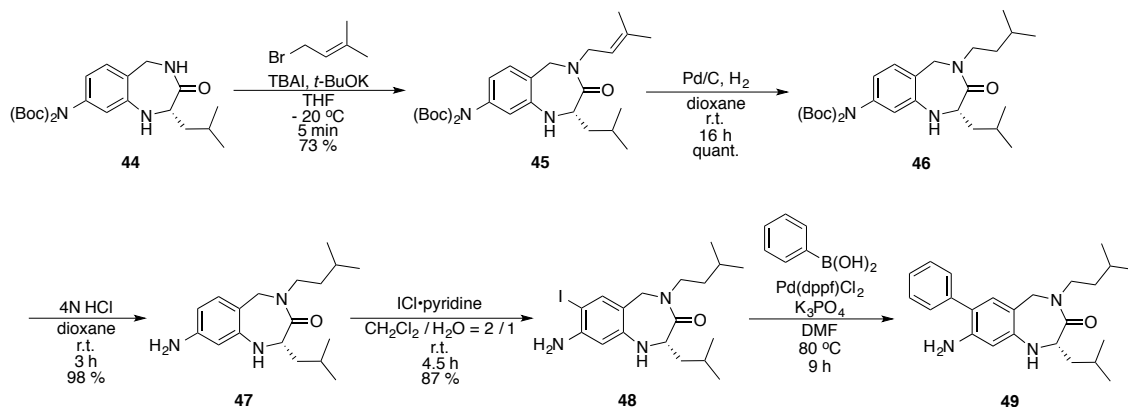
①化合物 **44** の合成



Scheme 2-4-9. 化合物 **44** の合成

化合物 **3** までの合成は Scheme 2-3-2 に従った。即ち、化合物 **1** を出発物質としてフッ素原子に対する求核置換反応により 4-メトキシベンジルアミノ基を導入した後、DDQ を用いて PMB 基を除去することで化合物 **3** を得た。続いて化合物 **3** を diBoc 化した後、Buchwald-Hartwig クロスカップリングで L-ロイシンメチルエステルを導入し化合物 **43** とした。さらに Raney ニッケルを用いた接触還元によりニトリル基をアミノ基に変換させ、次いで分子内タンデム環化反応させることによりベンゾジアゼピン化合物 **44** を得た。

②化合物 49 の合成

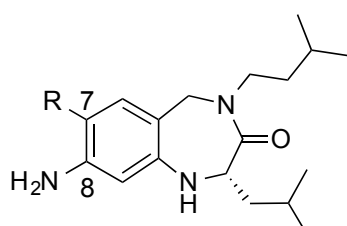

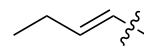
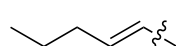
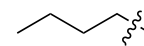
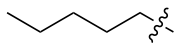



Scheme 2-4-10. 化合物 49 の合成

化合物 44 に 1-bromo-3-methylbut-2-ene を低温下、短時間反応させることで化合物 45 を得た後、接触還元することで 4 位に炭素鎖を導入した化合物 46 を得た。次いで Boc 基を除去し、ICl·pyridine を用いて 7 位をヨウ素化²⁴⁾することで、化合物 48 を得た後、フェニルボロン酸と Suzuki カップリングすることでビフェニル体 49 を得た。

得られた 8 位アミノ基を有し、7 位の構造展開を行った化合物群の VDR 阻害活性をレポーター遺伝アッセイで評価した (Table 2-4-2)。

Table 2-4-2. 8 位アミノ基を有するベンゾジアゼピン化合物 7 位構造展開

	compound	R	IC ₅₀ (μM)
	10		26
	47	H	> 30 (7 %) ^b
	48	I	30
	37a		>30 (48%) ^b
	37b		toxic ^c
	38a		25
	38b		>30 (47%) ^b
	49		24

^a1,25(OH)₂D₃ was used as a VDR agonist,
^binhibition ratio at 30 μM, ^ctoxic at 30 μM

7 位の構造展開の結果、7 位の炭素分岐鎖を直鎖へと崩しても、概ね VDR 阻害活性が維持されたが活性の向上は見られなかった。またフェニル基を導入した化合物 **49** でも活性が維持されることを見いだした。

2-4-3. 7 位フェニル基に着目した構造展開

Table 2-4-2 より 7 位の構造展開において、フェニル基を導入した化合物 **49** が VDR 阻害活性を維持することを見いだした。この結果を受けて、構造展開の有利さを考慮し、7 位フェニル基の構造展開を計画した。具体的には Leu630 認識部位近傍に存在する Lys260 の塩基性アミノ酸側鎖との相互作用を期待して、カルボン酸誘導体の導入を試みた (Figure 2-4-4)。

Lys260との相互作用を期待して、フェニル基誘導体を展開

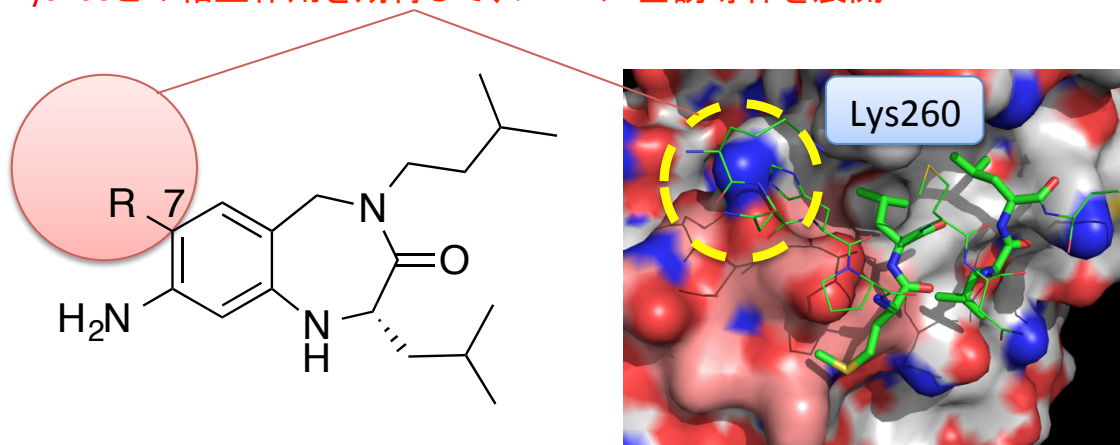


Figure 2-4-4. 7 位フェニル基に着目した構造展開

化合物の具体的な構造展開に関しては、フェニル基にカルボン酸の導入を計画したほか、7 位ポケット内での水素結合形成を期待して、ヒドロキシル基を有する化合物の合成も行った (Figure 2-4-5)。

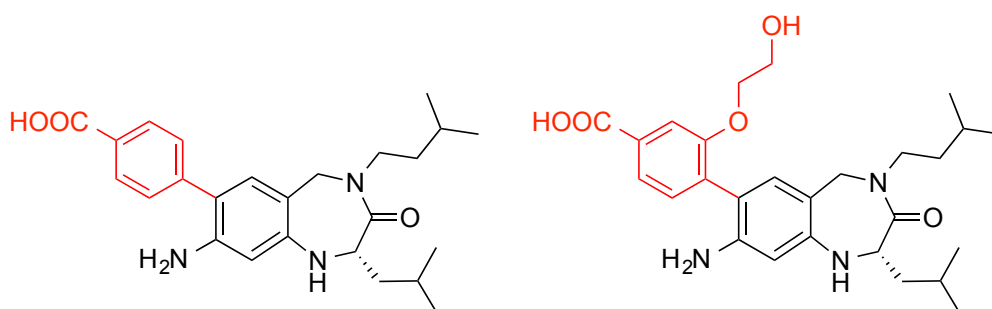
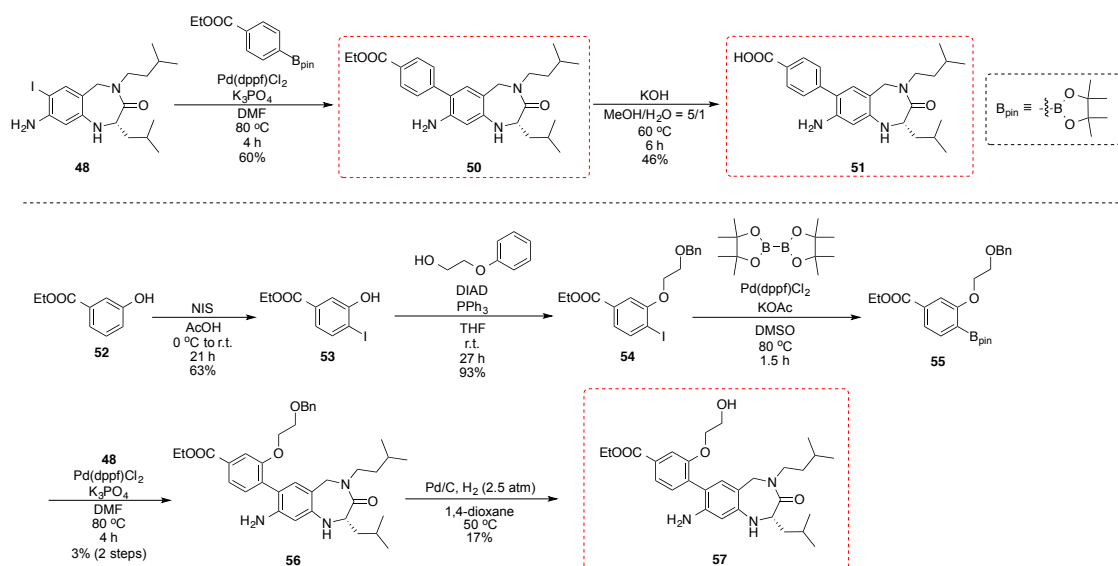


Figure 2-4-5. Lys260 残基との相互作用を期待したフェニル基誘導体

カルボン酸誘導体合成には Suzuki カップリングを用いた。合成スキームを以下に示す (Scheme 2-4-11)。

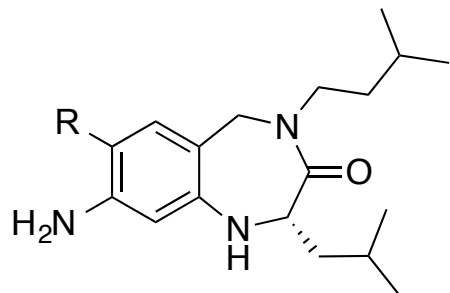

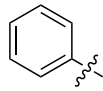
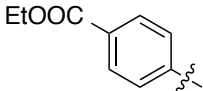
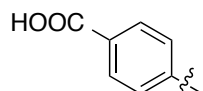
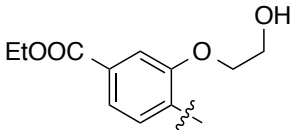


Scheme 2-4-11. 7 位フェニル基の構造展開

化合物 **48** と 4-エトキシカルボニルフェニルボロン酸ピナコールエステルを Suzuki カップリングすることで化合物 **50** を得た後、エステルを加水分解することでカルボン酸体 **51** を得た。また化合物 **52** を出発原料とし、NIS を用いてヨウ素化した化合物 **53** を得た。ヨウ素化の位置は NMR を用いて HMBC (Hetero-nuclear Multiple-Bond Connectivity) を測定することで決定した。次いで Mitsunobu 反応を用いてフェノール性水酸基に置換基導入を行った化合物 **54** を得た後、カップリングによりボロン酸ピナコールエステル体 **55** へと導いた。ヨウ素化体 **48** とボロン酸ピナコールエステル体 **55** を Suzuki カップリングした後、中圧条件での接触還元によりベンジル基を除去した化合物 **57** を得た。

得られた7位フェニル基誘導体群のVDR阻害活性をレポータージーンアッセイで評価した (Table 2-4-3)。

Table 2-4-3. 7 位フェニル基の構造展開 ^a

	compound	R	IC ₅₀ (μM)
	10		26
	49		24
	50		14
	51		> 30 (8 %) ^b
	57		20

^a1,25(OH)₂D₃ was used as a VDR agonist,

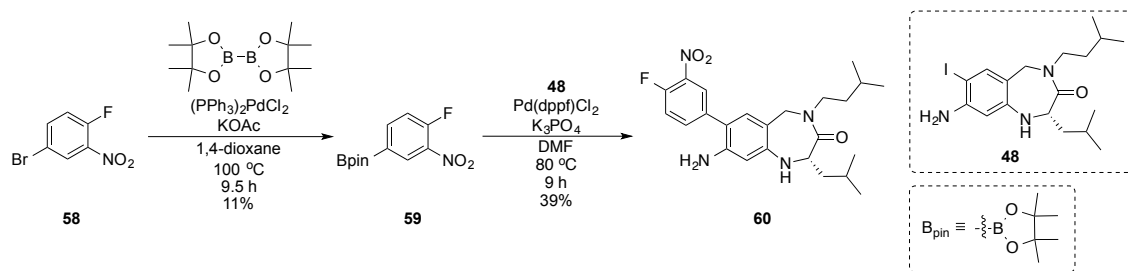
^binhibition ratio at 30 μM

安息香酸エステルを導入した化合物 **50** に最も強い活性が見られ、リード化合物 **10** よりも 2 倍程度活性が向上した。一方で安息香酸を導入した化合物 **51** では、VDR 阻害活性の減弱が見られた。これはカルボン酸の導入により膜透過性が低下したことが一因であると考察している。また 7 位ポケット内部で水素結合形成を期待した化合物 **57** は、明確な活性向上は見られなかった。

2-4-4. コバレントドラッグ化の検討

コバレントドラッグとは分子内に共有結合性を有する構造を持ち、タンパク質等の標的分子と共有結合を形成する低分子化合物である。コバレントドラッグのメリットとしては、①potency の向上、および、低濃度でも高濃度の基質等と十分に競合する、②共有結合を形成する残基の有無による選択性の獲得、③（タンパク質半減期に依存する）投与間隔の長期化・投与の低濃度化、および off target との相互作用や薬物間相互作用のリスク低減、④薬剤耐性変異に対する活性獲得等のメリットが知られている²⁻⁴⁻⁴⁾。

Table 2-4-3 より 7 位フェニル基にカルボン酸誘導体を導入すると活性が向上するという結果得た。これを受けて活性や選択性の向上を期待し、7 位に Lys260 の塩基性側と共有結合を形成する官能基の導入を計画し、LXXLL ペプチド等価体をコバレントドラッグ化することを試みた。Lys 残基との相互作用を期待した官能基としてはフルオロニトロベンゼンを採用した。以下に合成スキームを示す (Scheme 2-4-12)。



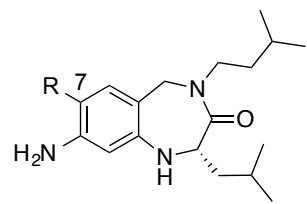


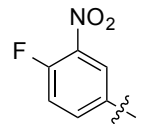
Scheme 2-4-12. コバレントドラッグ化を期待した化合物 **60** の合成

出発原料 **58** をボロン酸ピナコールエステル体 **59** へと変換し、ヨウ素体 **48** と Suzuki カップリングすることで目的化合物 **60** を得た。

²⁻⁴⁻⁴⁾ Kalgutkar AS, Dalvie DK. “Drug discovery for a new generation of covalent drugs.”
Expert Opin. Drug Discov. **2012**, 7, 561

得られた化合物 **60** を VDR レポータージーンアッセイで評価したが細胞毒性が見られ、また有効濃度的には、阻害活性の向上は見られなかった (Table 2-4-4)。LXXLL ペプチド等価体のコバレントドラッグ化には、今後の更なる検討が必要だと考えている。

Table 2-4-4. コバレントドラッグ化を期待した化合物 **60** の活性評価 ^a

	compound	R	IC ₅₀ (μM)
	10		26
	49		24
	60		toxic ^b

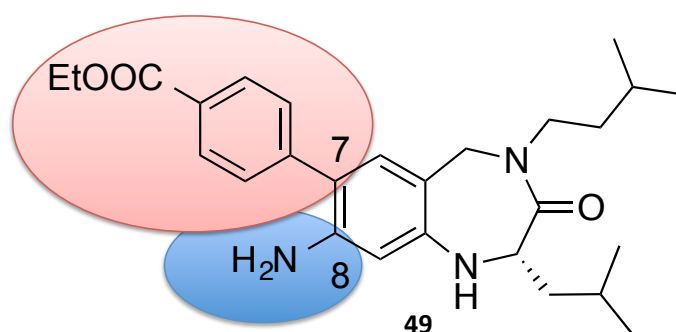
^a1,25(OH)₂D₃ was used as a VDR agonist,

^bToxic at 20 μM

2-4-5. 小括②

著者は本節において、前節で見いだしたベンゾジアゼピン型 LXXLL ペプチド等価体の構造展開を行った。その結果、8 位アミノ基が VDR 阻害活性に寄与していることを明らかにした。また 7 位炭素鎖の構造展開より、分岐炭素鎖をフェニル基に置換しても許容されることを見だし、ビフェニル構造を有する化合物 **49** を、リード化合物 **10** よりも高活性な化合物として見いだした (Figure 2-4-6)。またコバレントドラッグ化を検討したが、明確な結果を得ることが出来ず、今後の更なる検討が期待される。

7位にフェニル基が許容、構造展開により高活性化



VDR阻害活性発現に寄与、化合物デザインの妥当性を支持

Figure 2-4-6. ベンゾジアゼピン型 LXXLL ペプチドの構造活性相関

2-5 節 LXXLL ペプチド等価体創製の総括

2-5-1. LXXLL ペプチド等価体創製の総括

著者は本章において、核内受容体の転写活性化に必須である、核内受容体とコアクチベーターとの LXXLL 配列を介したタンパク質間相互作用に着目し、LXXLL ペプチド等価体を創製することで、核内受容体の転写活性化を抑制することを達成した。

具体的には VDR-コアクチベーター相互作用を阻害し、VDR を介した転写を抑制するベンゾジアゼピン型の LXXLL ペプチド等価体を創製した (Figure 2-5-1)。活性は弱いものの、これは私の知る限り非セコステロイド型ならびに非ペプチド型の VDR 阻害物質として初の報告である。また得られた LXXLL ペプチド等価体は ERα に対して阻害活性を示さず、VDR と ERα において選択性を示した。

また著者は本章において、前節で見いだしたベンゾジアゼピン型 LXXLL ペプチド等価体の構造展開を行った。その結果、8 位アミノ基が VDR 阻害活性に寄与していることを明らかにした。また 7 位炭素鎖の構造展開より、分岐炭素鎖をフェニル基に置換しても許容されることを見だし、ビフェニル構造を有する化合物を、リード化合物よりも高活性な化合物として見いだした (Figure 2-5-1)。

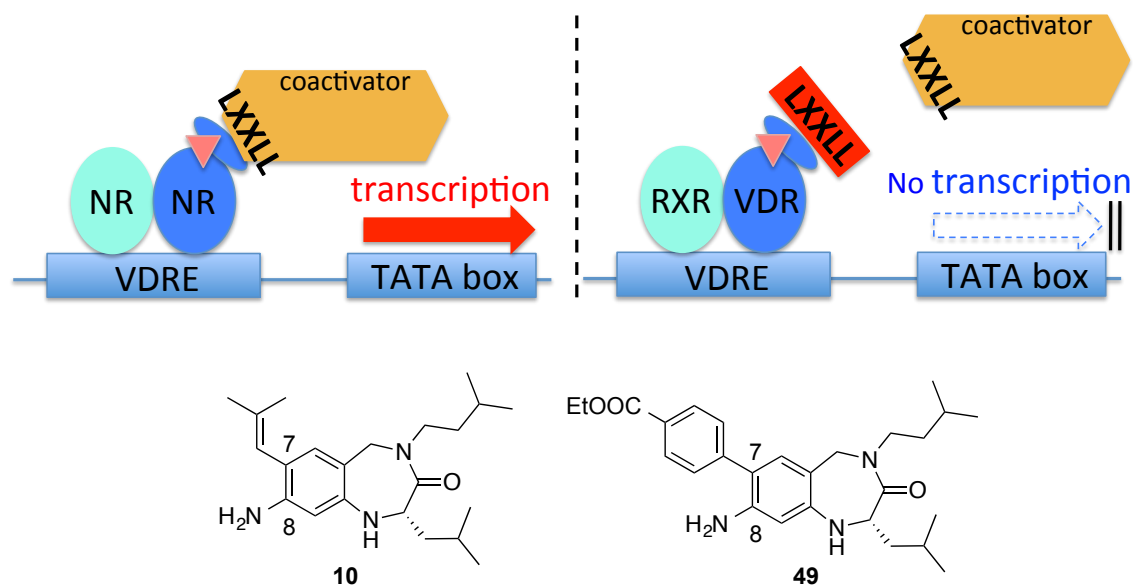


Figure 2-5-1. LXXLL ペプチド等価体の創製

本研究は「タンパク質間相互作用におけるファーマコフォアを模倣して、論理的にペプチド等価体を設計する」という研究コンセプトの実証例の一つであり、また新規作用機序・新規骨格を有する VDR 阻害薬を提案できたものと考えている。

第3章 非ペプチド・ATP 非競合型 polo-like kinase 1 阻害薬の創製

3-1 節 Polo-like kinase 1

3-1-1. Plk 概説

polo-like kinase (Plk) はSer/Thrプロテインキナーゼの一種であり、細胞分裂と細胞増殖に関与する。ヒトでは5種類のサブタイプが報告されている。PlkはC末端側にpolo-box domain (PBD) と呼ばれるタンパク質の認識に関与する非触媒ドメインを持つことが特徴であり³⁻¹⁻¹⁾、PBDはPB1とPB2と呼ばれる二つのpolo-boxモチーフから構成されている³⁻¹⁻¹⁾ (Figure 3-1-1)。またPlk1のキナーゼ活性部位はN末端側の49-351残基部位に存在する。

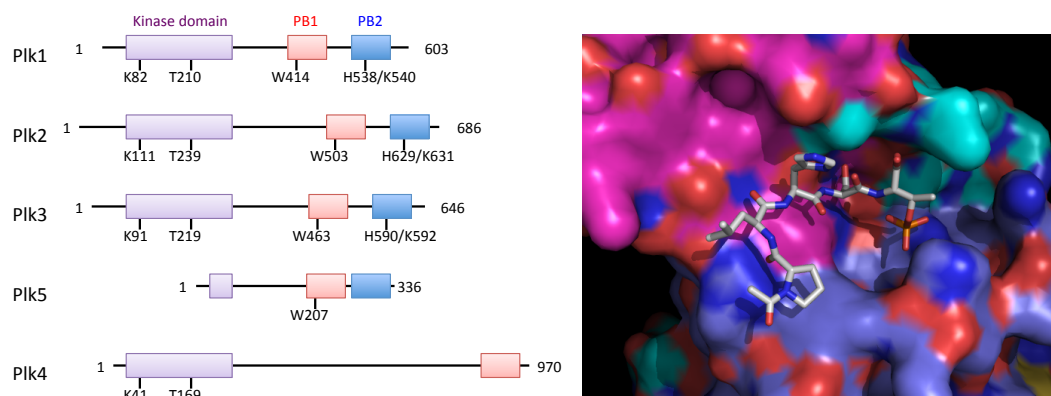


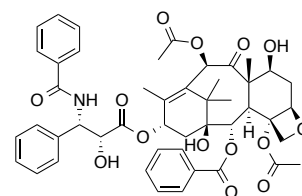
Figure 3-1-1. Plk の polo-box domain

左: Plk の PBD 構造 (論文^{3-1-1 b)}より改編、図中に活性に重要な残基を示した)

右: Plk1PBD と PLHSpT ペプチド (PBD ID 3HIK より作成)

³⁻¹⁻¹⁾ a) Park JE, Soung NK, Johmura Y, Kang YH, Liao C, Lee KH, Park CH, Nicklaus MC, Lee KS. "Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function." *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, 67, 1957; b) de Cárcer G, Manning G, Malumbres M. "From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases." *Cell Cycle* **2011**, 10, 2255

5つのPlkのサブタイプにおいて、最も研究がなされているのはPlk1である。Plk1は細胞分裂において種々の制御を行っており、抗がん剤のターゲットとして知られている³⁻¹⁻²⁾。Plk2は細胞分裂S期開始³⁻¹⁻³⁾およびpaclitaxel (TAXOL®)等に由来する紡錘体阻害ストレス後の細胞生存メカニズム³⁻¹⁻⁴⁾に寄与している。またPlk3はM期開始に関与しており³⁻¹⁻⁵⁾、DNAの損傷や細胞へのストレスで活性化されると考えられている³⁻¹⁻⁶⁾。Plk4はPBDにおいてPB1のみを有する構造を持ち、中心体の構成要素である中心小体の複製に関与している³⁻¹⁻⁷⁾。Plk5はキナーゼドメインを持たないタンパク質であり、神経系の調節とがん化の抑制に寄与していると考えられている³⁻¹⁻⁸⁾。



paclitaxel (TAXOL®)

Figure 3-1-2. paclitaxel

Plk1, Plk2, Plk3はPBDを構成する二つのpolo-boxモチーフ、即ちPB1及びPB2において相同性を持つ。polo-boxモチーフ同士的位置関係はFigure 3-1-1右図のようになり、PB1とPB2の境界上にリン酸化ペプチド (Ser-pSer/pThrモチーフ) 認識部位が存在する³⁻¹⁻⁹⁾。PBDはPlk1の細胞内分布に関与しており、Plk1の正しい細胞内分布、及びキナーゼ活性発現に重要であると考えられている³⁻¹⁻¹⁰⁾。

³⁻¹⁻²⁾ Degenhardt Y, Lampkin T. "Targeting Polo-like kinase in cancer therapy." *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16, 384

³⁻¹⁻³⁾ Ma S, Charron J, Erikson RL. "Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation." *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 6936

³⁻¹⁻⁴⁾ Burns TF, Fei P, Scata KA, Dicker DT, El-Deiry WS. "Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells." *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 5556

³⁻¹⁻⁵⁾ Conn CW, Hennigan RF, Dai W, Sanchez Y, Stambrook PJ. "Incomplete Cytokinesis and Induction of Apoptosis by Overexpression of the Mammalian Polo-Like Kinase, Plk3." *Cancer Res.* **2000**, 60, 6826

³⁻¹⁻⁶⁾ Xie S, Wu H, Wang Q, Cogswell JP, Husain I, Conn C, Stambrook P, Jhanwar-Uniyal M, Dai W. "Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway." *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 43305

³⁻¹⁻⁷⁾ Habedanck R, Stierhof YD, Wilkinson CJ, Nigg EA. "The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication." *Nat. Cell Biol.* **2005**, 7, 1140

³⁻¹⁻⁸⁾ de Cárcer G, Escobar B, Higuero AM, García L, Ansón A, Pérez G, Mollejo M, Manning G, Meléndez B, Abad-Rodríguez J, Malumbres M. "Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression." *Mol. Cell. Biol.* **2011**, 31, 1225

³⁻¹⁻⁹⁾ Elia AE, Cantley LC, Yaffe MB. "Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates." *Science* **2003**, 299, 1228

³⁻¹⁻¹⁰⁾ Lee KS, Grenfell TZ, Yarm FR, Erikson RL. "Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95, 9301

3-1-2. Plk1 概説

Plk1 は細胞分裂に重要な役割を果たしており、細胞分裂の各ステップにおいて種々のタンパク質をリン酸化する³⁻¹⁻²⁾。また細胞分裂の進行に伴って、その細胞内分布がセントロメア、動原体、中心体、収縮環へと変化する³⁻¹⁻²⁾ (Figure 3-1-3)。

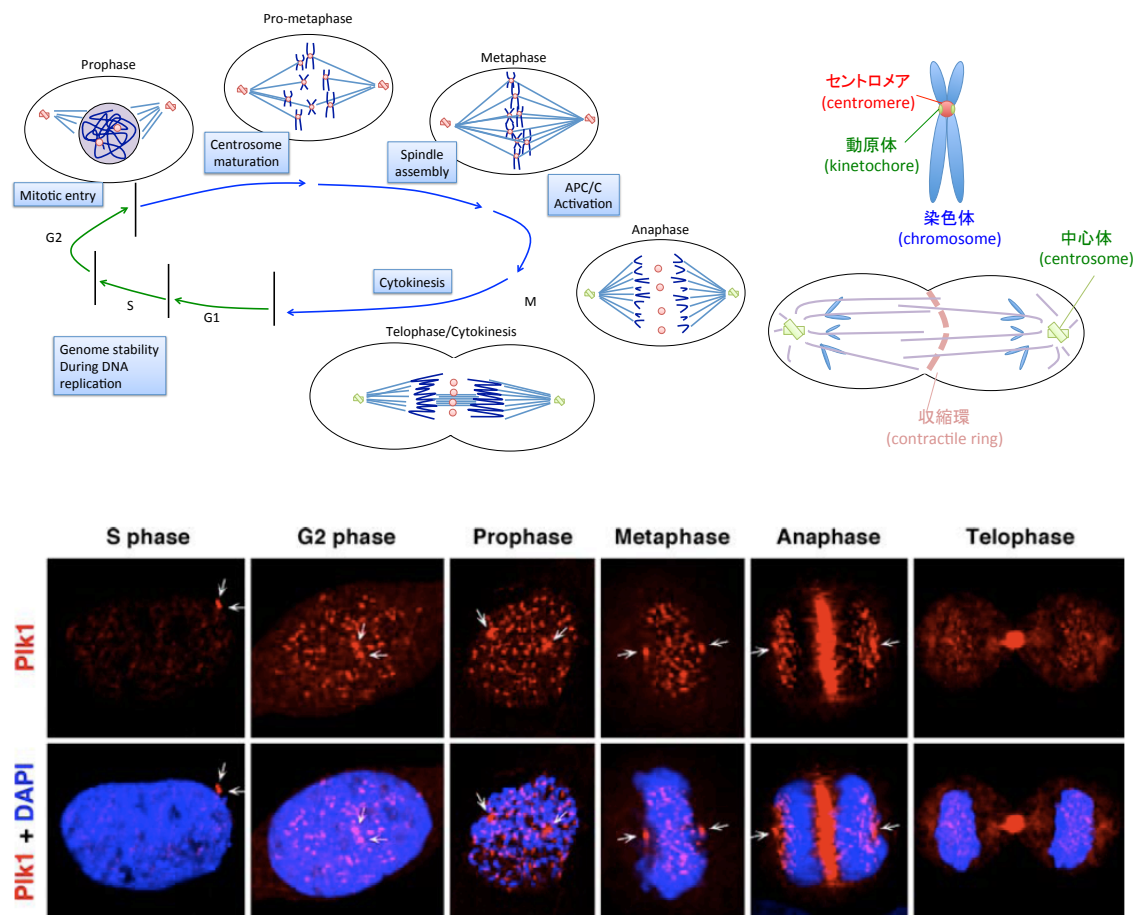


Figure 3-1-3. 左上：細胞分裂におけるPlk1の細胞内分布(概念図)(文献³⁻¹⁻²⁾より改編)；赤：Plk1、右上：染色体における部位名称；セントロメア (centromere) 分裂期に動原体となる染色体領域；動原体 (kinetochore) 分裂期に紡錘糸が結合する領域；染色体 (chromosome)；中心体 (centrosome) 紡錘糸(微小管)の-端になる；収縮環 (contractile ring) 細胞を二つに分ける、下：細胞分裂におけるPlk1の細胞内分布 (蛍光顕微鏡写真) (文献³⁻¹⁻¹⁾より改編)；赤：Plk1、DAPI：核及び染色体

Figure 3-1-3 中、左上図の赤、および下図の赤い蛍光が Plk1 の分布を示す。PBD の相互作用が Plk 1 の活性発現に関与すると考えられているのは Pro-metaphase から Metaphase にかけてであり、PBD を介したタンパク質間相互作用により Plk1 が動原体と中心体に分布し、種々の基質タンパク質をリン酸化することで動原体集合 (kinetochore assembly) と紡錘体集合チェックポイント (spindle assembly checkpoint) に貢献するとされている。Plk1 は細胞の分裂期のみに発現し、発現ピークは G2 期から M 期にかけてピークとなる。

Plk1 は細胞分裂において種々の基質をリン酸化し細胞分裂を制御しているが、その制御には PBD を介した Plk1 の細胞分布が重要であることが報告されている³⁻¹⁻¹¹⁾。Plk1 の PBD に対して結合する Ser-pSer/pThr モチーフを持つタンパク質は多数知られており³⁻¹⁻¹⁾、その中の一つである polo-box-interacting protein 1 (PBIP1) が Plk1 の細胞内局在に関与している³⁻¹⁻¹²⁾ (Figure 3-1-4)。

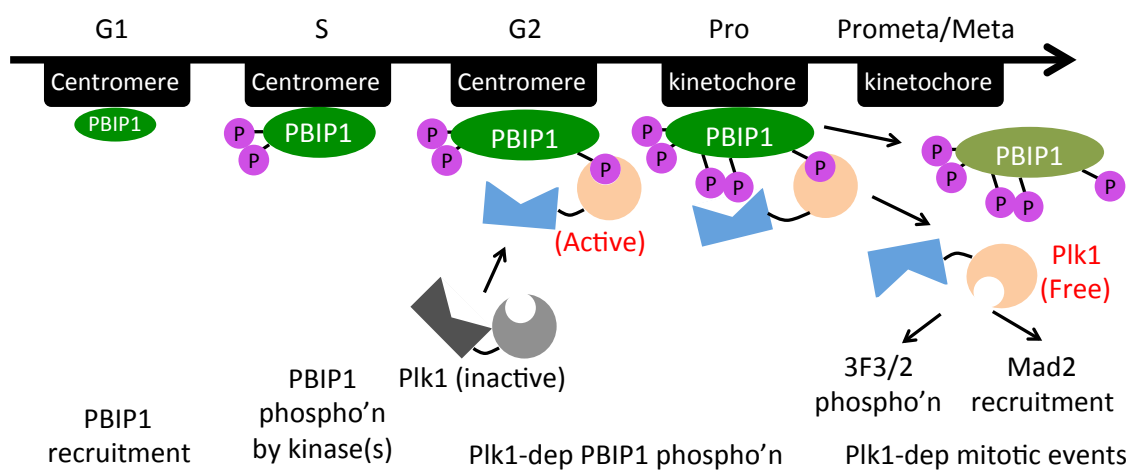


Figure 3-1-4. PBIP1 を介した Plk1 の細胞局在（論文³⁻¹⁻¹²⁾より改編）

PBIP1 は G1 期においてセントロメアに局在し、キナーゼによってリン酸化を受ける。また G2 期において、Plk1 によって Thr78 が直接リン酸化される。このリン酸化 Thr78 を含んだペプチド配列は Plk1 の PBD に認識され、Plk1 が PBIP1 と相互作用するため、結果として Plk1 のセントロメア（あるいは動原体）への細胞局在が形成される。Prometa/meta 期においては PBIP1 の減少に伴い、Plk1 は他の基質タンパク質との相互作用およびリン酸化を行い、細胞分裂の制御を行っている。

³⁻¹⁻¹¹⁾ Yun SM, Moulaei T, Lim D, Bang JK, Park JE, Shenoy SR, Liu F, Kang YH, Liao C, Soung NK, Lee S, Yoon DY, Lim Y, Lee DH, Otaka A, Appella E, McMahon JB, Nicklaus MC, Burke TR Jr, Yaffe MB, Wlodawer A, Lee KS. “Structural and functional analyses of minimal phosphopeptides targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1.” *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 876

³⁻¹⁻¹²⁾ Kang YH, Park JE, Yu LR, Soung NK, Yun SM, Bang JK, Seong YS, Yu H, Garfield S, Veenstra TD, Lee KS. “Self-regulated Plk1 recruitment to kinetochores by the Plk1-PBIP1 interaction is critical for proper chromosome segregation.” *Mol. Cell.* **2006**, 24, 409

3-1-3. 抗がん剤のターゲットとしての Plk1

Plk1 は非小細胞肺癌や頭頸部がん等、種々のがん細胞に過剰発現しており、Plk1 を阻害すると細胞分裂の停止・細胞増殖抑制・アポトーシス誘導・腫瘍縮小が起こることが知られている³⁻¹⁻²⁾。現在、Plk1 をターゲットとした抗がん剤 (Figure 3-1-5) の臨床試験が行われている³⁻¹⁻¹³⁾。これら化合物はいずれも ATP と競合的に作用することで、Plk1 阻害活性を示す。

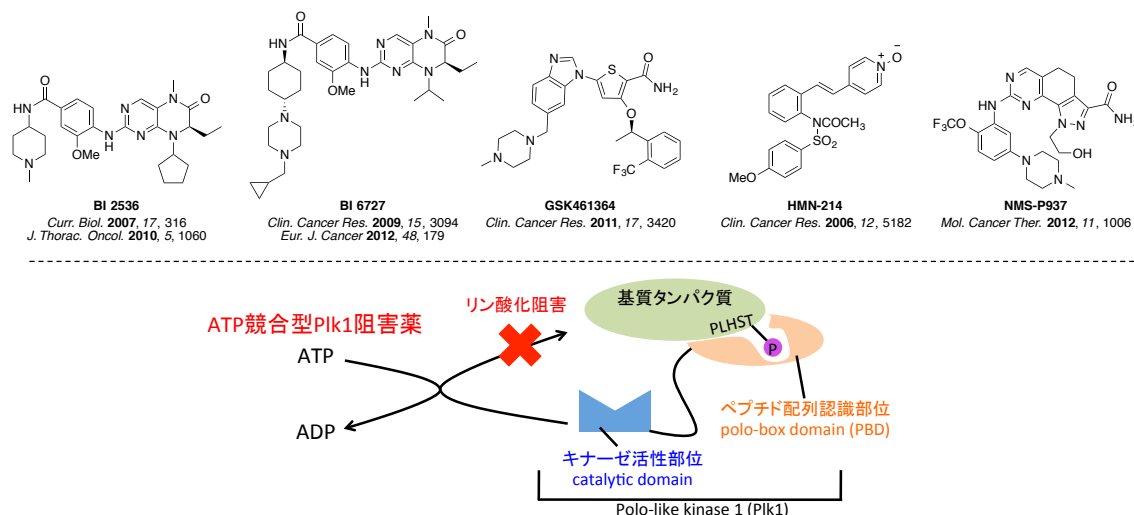


Figure 3-1-5. 現在臨床試験中のATP競合型Plk1阻害による抗がん剤³⁻¹⁻¹³⁾

³⁻¹⁻¹³⁾ a) BI2536; 1) Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lénárt P, Petronczki M, Krssák M, Gürtler U, Garin-Chesa P, Lieb S, Quant J, Grauert M, Adolf GR, Kraut N, Peters JM, Rettig WJ. "BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo." *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 316; 2) Sebastian M, Reck M, Waller CF, Kortsik C, Frickhofen N, Schuler M, Fritsch H, Gaschler-Markefski B, Hanft G, Munzert G, von Pawel J. "The efficacy and safety of BI 2536, a novel Plk-1 inhibitor, in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer who had relapsed after, or failed, chemotherapy: results from an open-label, randomized phase II clinical trial." *J. Thorac. Oncol.* **2010**, *5*, 1060; b) BI6727; 1) Rudolph D, Steegmaier M, Hoffmann M, Grauert M, Baum A, Quant J, Haslinger C, Garin-Chesa P, Adolf GR. "BI 6727, a Polo-like kinase inhibitor with improved pharmacokinetic profile and broad antitumor activity." *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 3094; 2) Schöffski P, Awada A, Dumez H, Gil T, Bartholomeus S, Wolter P, Taton M, Fritsch H, Glomb P, Munzert G. "A phase I, dose-escalation study of the novel Polo-like kinase inhibitor volasertib (BI 6727) in patients with advanced solid tumours." *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 179; c) GSK461364; Olmos D, Barker D, Sharma R, Brunetto AT, Yap TA, Taegtmeyer AB, Barriuso J, Medani H, Degenhardt YY, Allred AJ, Smith DA, Murray SC, Lampkin TA, Dar MM, Wilson R, de Bono JS, Blagden SP. "Phase I study of GSK461364, a specific and competitive Polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid malignancies." *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 3420; d) HMN-214; Garland LL, Taylor C, Pilkington DL, Cohen JL, Von Hoff DD. "A phase I pharmacokinetic study of HMN-214, a novel oral stilbene derivative with polo-like kinase-1-interacting properties, in patients with advanced solid tumors." *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 518 e) NMS-P937; Valsasina B, Beria I, Alli C, Alzani R, Avanzi N, Ballinari D, Cappella P, Caruso M, Casolaro A, Ciavolella A, Cucchi U, De Ponti A, Felder E, Fiorentini F, Galvani A, Gianellini LM, Giorgini ML, Isacchi A, Lansen J, Pesenti E, Rizzi S, Rocchetti M, Sola F, Moll J. "NMS-P937, an orally available, specific small-molecule polo-like kinase 1 inhibitor with antitumor activity in solid and hematologic malignancies." *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 1006

一方で Plk1 の PBD における相互作用が Plk1 による細胞分裂制御に必須であることに着目し、PBD での相互作用を阻害することで、Plk1 の働きを阻害するペプチド化合物も報告がある³⁻¹⁻¹⁴⁾ (Figure 3-1-6) 。即ち、PBIP1 と Plk1 の相互作用に重要であるリン酸化 Thr78 を含んだペプチド配列由来のペプタイド PLHSpT (Pro-Leu-His-Ser-pThr) の誘導体は、PBD における相互作用を阻害することで、Plk1 の正常な細胞局在形成を阻害し、Plk1 を介した適切なリン酸化を阻害することによって、細胞分裂の停止とアポトーシスを引き起こすことが報告されている³⁻¹⁻¹¹⁾。PLHSpT ペプチドそのものは膜透過性を有さないため細胞に対して活性を持たない³⁻¹⁻¹¹⁾が、構造展開によって膜透過性の獲得^{3-1-14 b)}や高活性化^{3-1-13 c)}が達成されている。

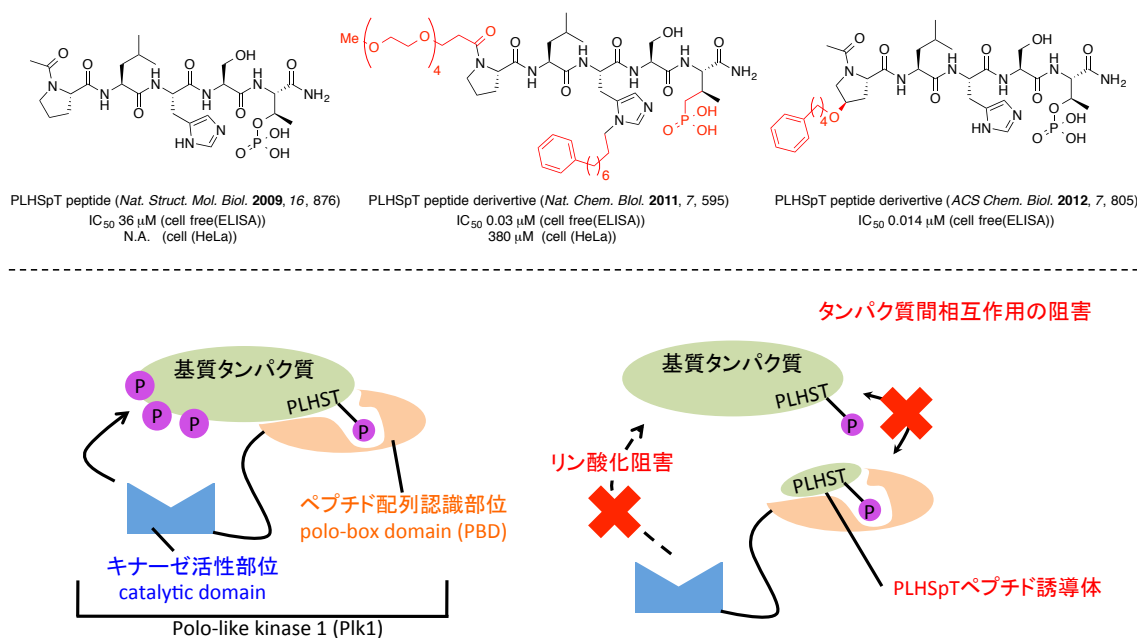


Figure 3-1-6. PBD 相互作用を阻害する PLHSpT ペプチド誘導体³⁻¹⁻¹⁴⁾

³⁻¹⁻¹⁴⁾ a) ref 3-1-11) Nat. Struct. Mol. Biol. **2009**, 16, 876; b) Liu F, Park JE, Qian WJ, Lim D, Gräber M, Berg T, Yaffe MB, Lee KS, Burke TR Jr. "Serendipitous alkylation of a Plk1 ligand uncovers a new binding channel." Nat. Chem. Biol. **2011**, 7, 595; c) Liu F, Park JE, Qian WJ, Lim D, Scharow A, Berg T, Yaffe MB, Lee KS, Burke TR Jr. "Identification of high affinity polo-like kinase 1 (Plk1) polo-box domain binding peptides using oxime-based diversification." ACS Chem. Biol. **2012**, 7, 805

3-2 節 非ペプチド・ATP 非競合型 Plk1 阻害薬の創製

3-2-1. 作業仮説

著者はPlk1のPBDにおけるリン酸化ペプチド認識による相互作用と細胞内局在形成に着目し、「PLHSpT配列を模倣した非ペプチド性低分子、即ちPLHSpTペプチド等価体の創製により、Plk1と基質タンパク質の相互作用を阻害することで、PBDを介したPlk1の細胞内局在形成、およびPlk1を介したリン酸化を阻害できる」とする作業仮説を構築した。

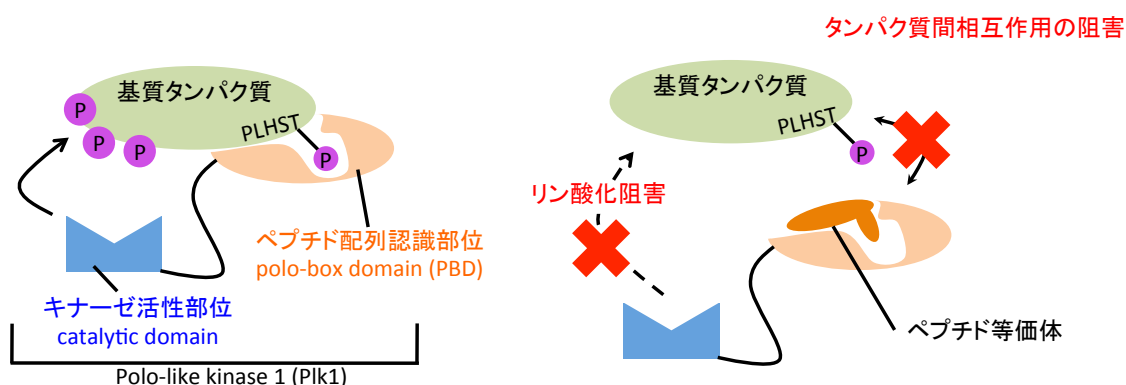


Figure 3-2-1. 作業仮説：PDBでの相互作用を阻害することによるPlk1阻害

3-1-3で述べたようにPlk1阻害薬はATP競合型キナーゼ阻害薬が複数知られている。しかしながら一般にATP競合型キナーゼ阻害薬は、キナーゼ間でATP結合ドメインの構造が高度に保存されているため、標的以外のキナーゼとの選択性が問題となり得る³⁻²⁻¹⁾。一方で、本作業仮説のPBDでの相互作用阻害に基づくPlk1阻害薬はATPと競合しないため、選択性の向上が期待される。加えて標的キナーゼのATP結合ドメインに変異が入ることにより、がん細胞が抗がん剤に耐性を獲得する事例も多く知られており³⁻²⁻²⁾、ATP競合型キナーゼ阻害薬以外の、作用機序の異なるキナーゼ阻害薬を創製することは有用であると考えられる。しかしながら3-1-3で述べた既知のPlk1-PBD相互作用阻害薬に関しては、ペプチドや天然物由来の構造であり、必ずしもドラッグライクで構造展開に有利な構造ではない。

そこで著者はPBDとPLHSpTペプチドの複合体X線結晶構造解析に基づき、PLHSpTペプチド等価体を設計・合成することで、上述の課題を解決したPlk1阻害薬が創製できると考えた。

³⁻²⁻¹⁾ Missner E, Bahr I, Badock V, Lücking U, Siemeister G, Donner P. “Off-target decoding of a multitarget kinase inhibitor by chemical proteomics.” *Chembiochem* **2009**, 10, 1163

³⁻²⁻²⁾ a) Niederst MJ, Engelman JA. “Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer.” *Sci. Signal.* **2013**, 6, re6; b) Yang SH. “Molecular Basis of Drug Resistance: Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors and Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors.” *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)* **2013**, 75, 188

3-2-2. 研究目的

著者は本研究の目的を『前述の「PLHSpT 配列を模倣した非ペプチド性低分子、即ち PLHSpT ペプチド等価体の創製により、Plk1 と基質タンパク質の相互作用を阻害することで、PBD を介した Plk1 の細胞内局在形成、および Plk1 を介したリン酸化を阻害できる」とした作業仮説に基づいて、Plk1・PBD におけるタンパク質間相互作用を阻害し、Plk1 を介した細胞分裂制御を阻害する ATP 非競合型 Plk1 阻害薬を創製すること』と設定した。本研究の目的を達成することで、一般に難しいとされる「タンパク質間相互作用を制御する低分子化合物」を論理的に創製する実証例を提示するとともに、新規骨格・新規作用機序を有する Plk1 阻害薬を提案できることが期待された。

以下、本研究目的を達成すべく、取り組んだ研究内容について記述する。

3-2-3. 化合物デザイン

PLHSpT ペプチド等価体の化合物デザインにあたり、Plk1 と PLHSpT ペプチドとの複合体 X 線結晶構造解析を参考にした (Figure 3-2-2)。

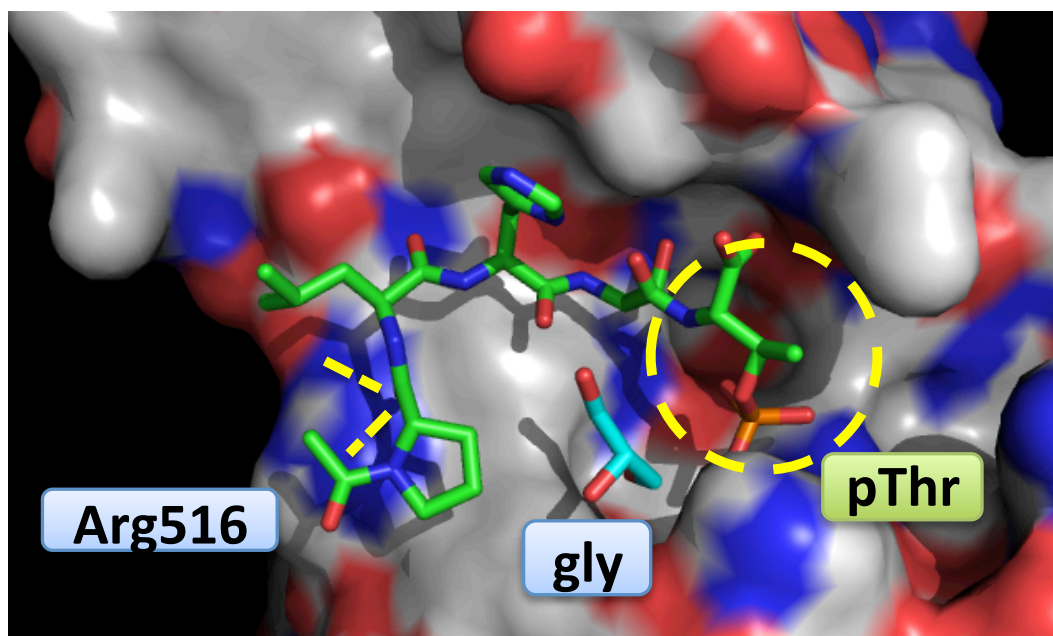


Figure 3-2-2. Plk1とPLHSpTペプチドの複合体X線結晶構造解析

PDB ID: 3HIK より作成した。PLHSpT ペプチドフラグメントは緑で表示した。Plk1 の表面構造における炭素原子は白で示した。加えて結晶化条件における buffer 中のグリセロールをシアンで示した。また PLHSpT ペプチドの認識に重要なリン酸基を黄色円で、Plk1 に特徴的な Arg519 との相互作用を黄色点線で示した。

先行研究³⁻¹⁻¹¹⁾では、Plk1とPLHSpTペプチドの相互作用を模倣するには、以下の4つの相互作用が鍵になり得ると主張されている。

①SpT モチーフによる静電相互作用

(Ser-pThr からなるモチーフで Plk1 に結合するペプチドに必須)

②N 末端 Pro 残基の静電相互作用および疎水性相互作用

[Plk1 に特徴的な Arg516 のグアニジンと Pro 残基のカルボニルの静電相互作用 (Plk2 と Plk3 は Arg 残基ではなく Lys 残基が対応している)、および、Trp414 と Phe535 との疎水性相互作用]

③結晶化条件において観察されたグリセロール

(PBD によるリン酸化ペプチド認識への関与を示唆)

④水分子によるネットワーク

(PBD によるリン酸化ペプチド認識への関与を示唆)

上記の相互作用模倣に重要と考えられる部位を模式化した図を示す (Figure 3-2-3)。著者は重要な相互作用を模倣しうる化合物として、ターフェニル骨格を有する PLHSpT ペプチド等価体を設計した (Figure 3-2-3)。ターフェニル骨格を採用した理由は、ターフェニル骨格が PLHSpT ペプチドにおけるファーマコフォアを良く模倣した剛直な骨格であり、かつ誘導体合成が容易であると考えたためである。特に、ターフェニル骨格の両端のベンゼン環上に二つの親水性基を導入することにより、相互作用に重要である SpT モチーフおよび Arg516 と相互作用するカルボニルを模倣できると考えた。さらに中央ベンゼン環より水酸基を伸長させることにより、X 線結晶構造解析で見られたグリセリンの相互作用を模倣することを期待した。

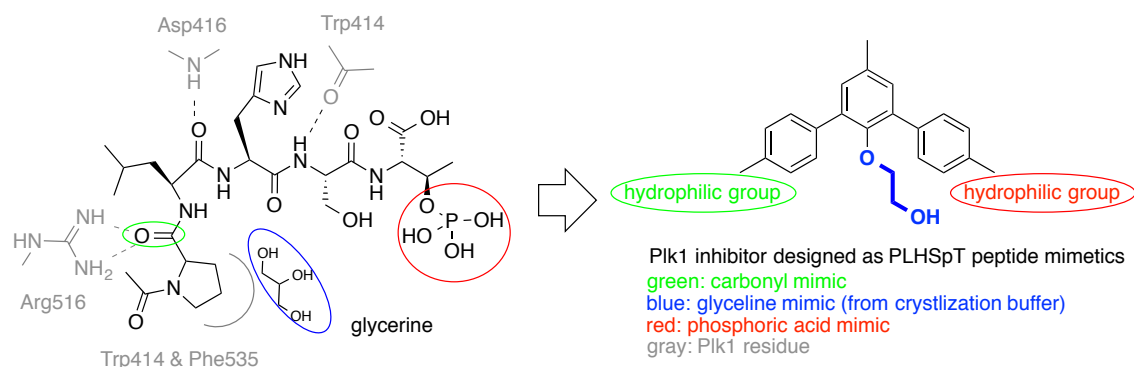
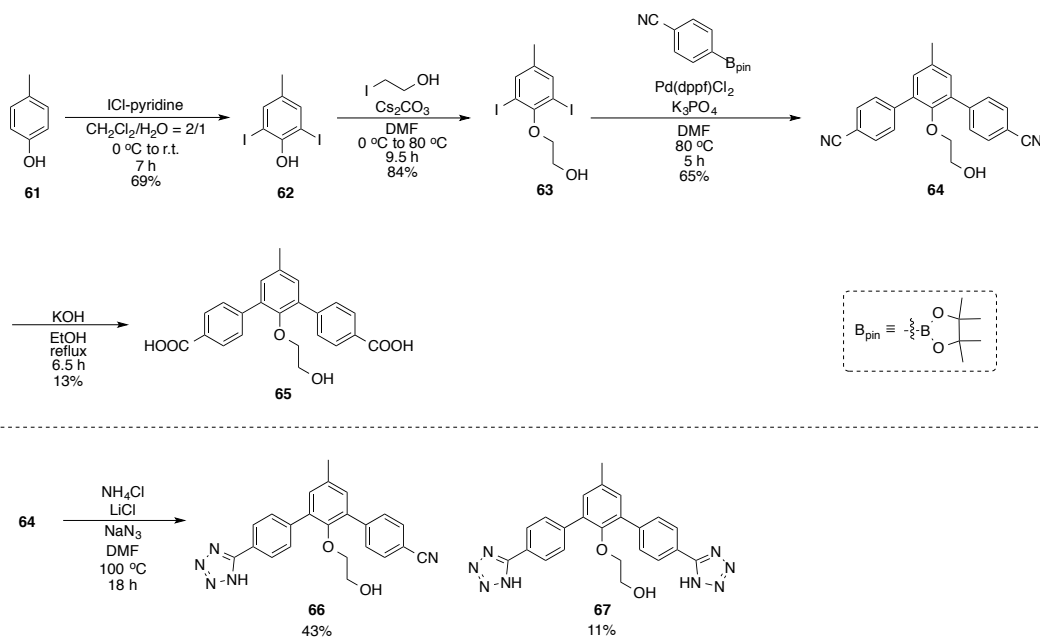


Figure 3-2-3. Plk1-PLHSpTペプチド相互作用模式図と化合物デザイン

Plk1 と PLHSpT ペプチドの相互作用に重要な部位をそれぞれ緑 (N 末端相互作用)、青 (グリセロール)、赤 (SpT モチーフ) で表記した。また Plk1 側で相互作用に寄与する残基を灰色で表記した。

3-2-4. 化合物の合成

化合物の合成スキームを以下に示す (Scheme 3-2-1)。



Scheme 3-2-1. ターフェニル化合物の合成

出発原料**61**を一塩化ヨウ素・ピリジン複合体を用いてヨウ素化し、2-ヨウ化エタノールと $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応させることで、Suzukiカップリングの共通中間体**63**を得た。化合物**63**を4-シアノフェニルボロン酸ピナコールエステルとSuzukiカップリングすることで、ジニトリル体**64**を得た。さらに**64**を加水分解することで、ジカルボン酸体**65**を得た。またジニトリル体**64**をアジ化ナトリウムと反応させ、ニトリル基をカルボン酸のバイオアイソスターとして知られる脂溶性酸性官能基であるテトラゾール基へと変換したところ、モノテトラゾール体**66**とジテトラゾール体**67**を得た。

3-2-5. ELISAによるPBD-PLHSpTペプチド相互作用阻害活性評価

得られたターフェニル化合物群のPBD-PLHSpTペプチド相互作用阻害活性を評価すべく、先行研究³⁻¹⁻¹¹⁾を元に、ELISAに基づく評価系の構築を行った。評価系の原理を以下に示す (Figure 3-2-4)。

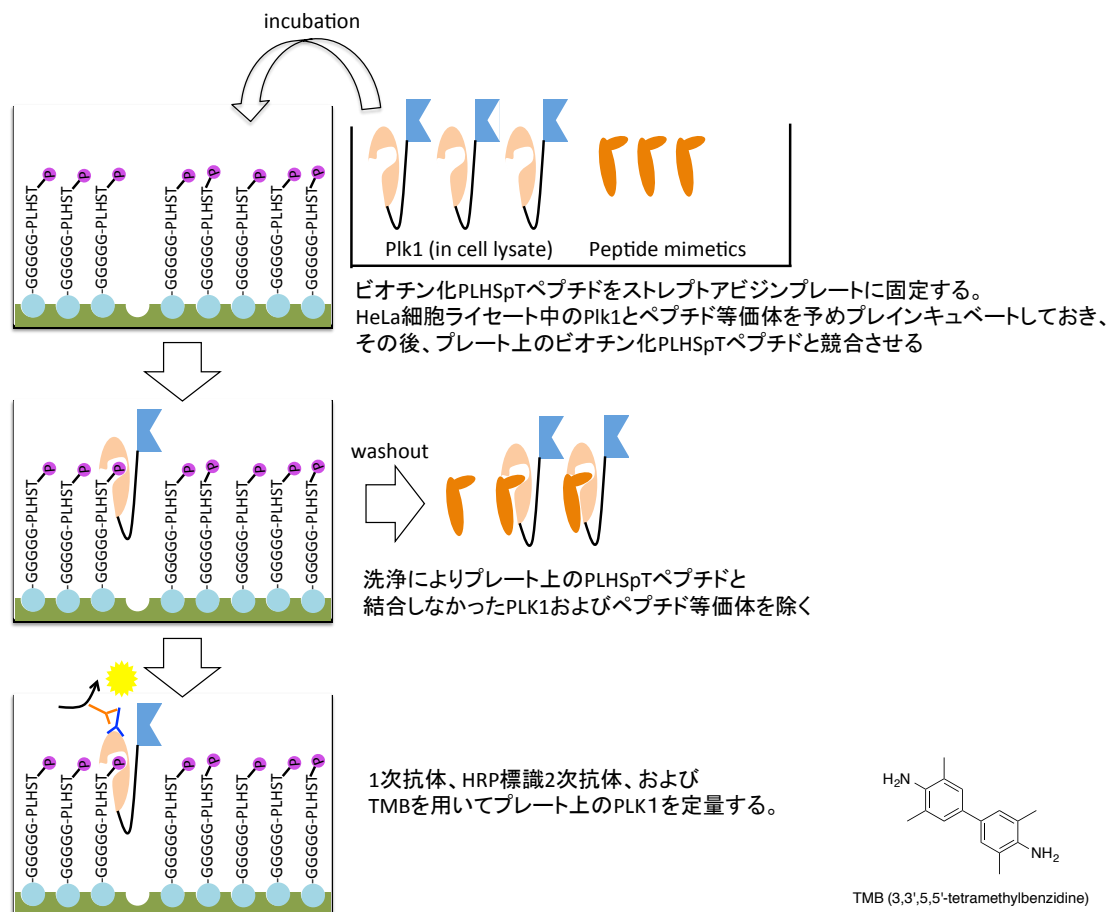
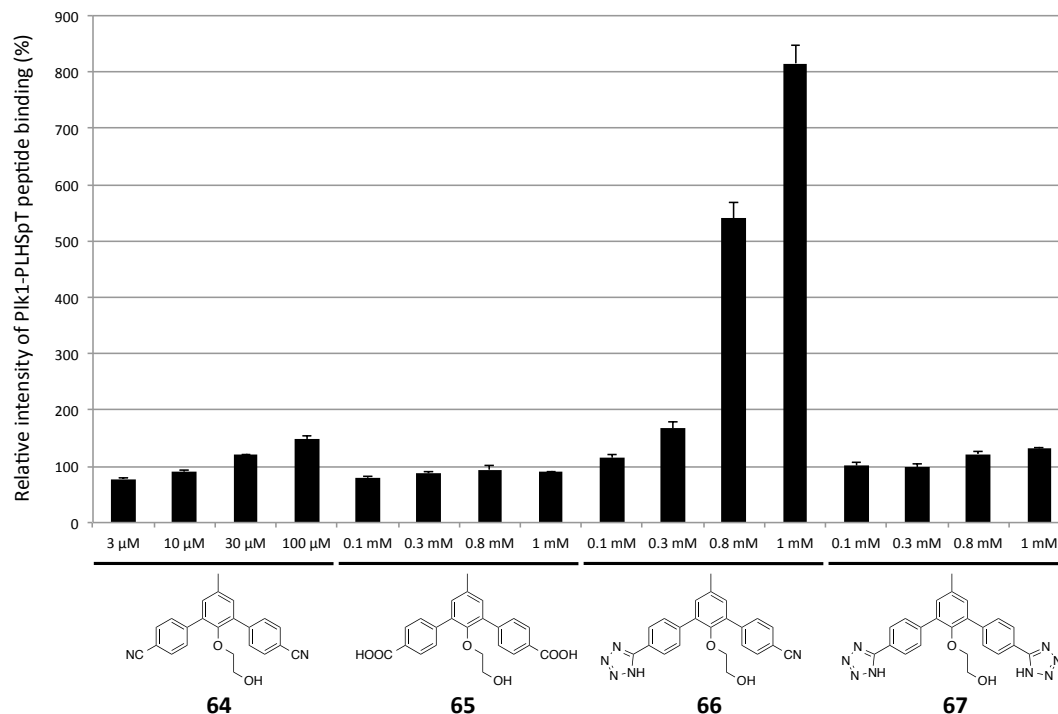


Figure 3-2-4. PBD-PLHSpTペプチド相互作用阻害活性評価の原理

Plk1はHeLa細胞に高発現しているため、評価系のPlk1はHeLa細胞のライセートに含まれるものを使用した。予めHeLaライセートとペプチド等価体をブレインキュベーションした後、PLHSpTペプチドが固定されたプレート上で、Plk1に対してPLHSpTペプチドとペプチド等価体を競合させた。インキュベーション終了後、プレートの洗浄操作を行い、プレート上のPLHSpTペプチドと結合したPlk1を1次抗体、HRP標識2次抗体、およびTMBの酸化による発色で検出することで、PBD-PLHSpTペプチド相互作用阻害活性の評価を行った。

PBD-PLHSpTペプチド相互作用阻害活性の評価結果を以下に示す (Figure 3-2-5)。
DMSO処理時の結合強度を100%として規格化して示した。



^aPlk1 kinase activity was calculated based on the value of the DMSO-treated sample, taken as 100%.

^bIC₅₀ value of PLHSpT pentapeptide, used as a positive control is 5.27 μ M.

^cThe maximum solubility of compound **64** was about 100 μ M under the buffer condition for this assay system.

Figure 3-2-5. PBD-PLHSpTペプチド相互作用阻害活性^a

ポジティブコントロールとして用いたPLHSpTペプチドは、期待通りPDBとプレート上のPLHSpTペプチド相互作用を阻害した (IC₅₀ 5.27 μ M)。一方で期待に反して、ターフェニル化合物群**64-67**にはPBD-PLHSpTペプチド相互作用を増強する傾向が見られ、化合物**66**では顕著にその傾向が見られた。なお化合物**64**は溶解性が悪く100 μ Mまでの評価しか行っていない。

本実験で得られた結果は、ターフェニル化合物がPBD-PLHSpTペプチド相互作用を阻害するとした作業仮説に反して、ターフェニル化合物がPBD-PLHSpTペプチド相互作用を増強することを示唆する結果であった。その作用機序は不明であるが、ターフェニル化合物がPlk1に作用し、そのPLHSpTペプチド認識の活性コンフォメーションを変えることにより、PLHSpTペプチドの認識能を増強している可能性があると考えた。またターフェニル化合物がPlk1のキナーゼ活性に対しても影響を与える可能性を期待し、化合物**66**のPlk1キナーゼ阻害活性を評価した。

3-2-6. ELISAによるPlk1キナーゼ阻害活性評価

前項3-2-5にて、ターフェニル化合物がPlk1のPLHSpTペプチド認識能を向上させることが示唆されたため、ターフェニル化合物**66**によるPlk1キナーゼ阻害活性を評価した。評価系の原理を以下に示す (Figure 3-2-6)。

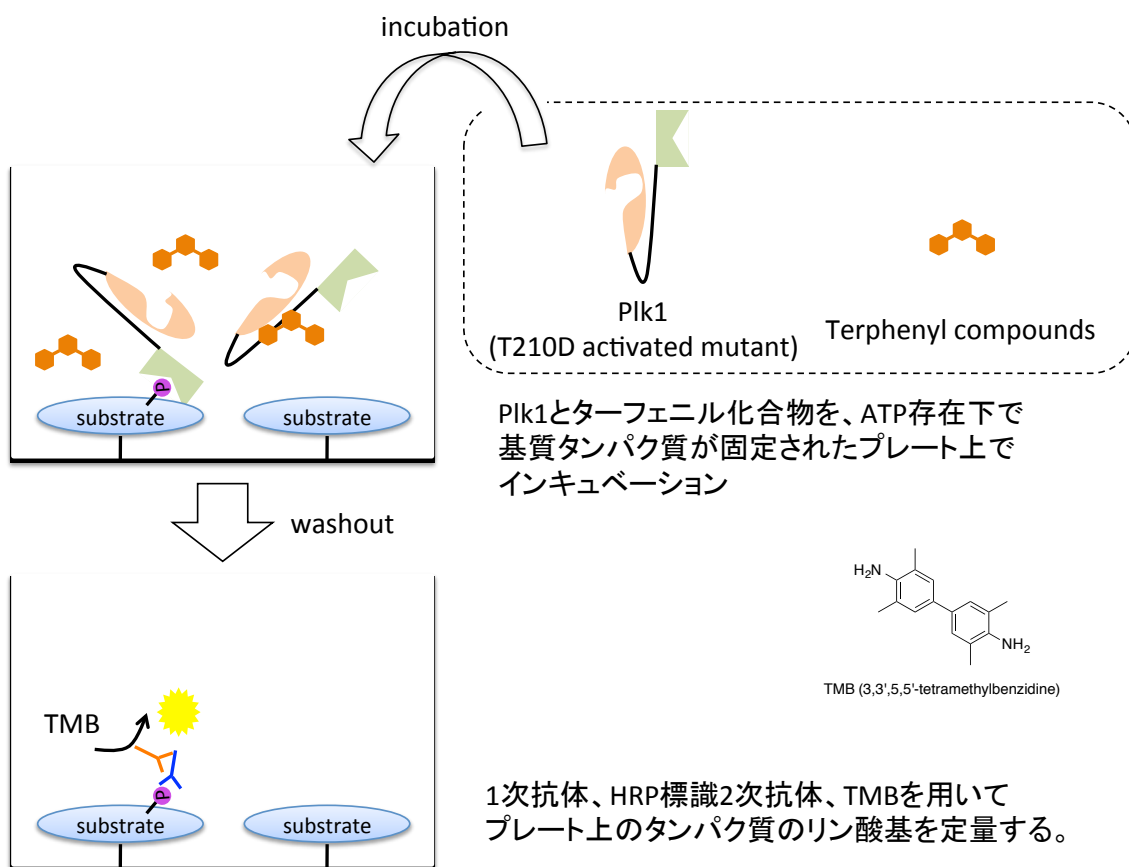


Figure 3-2-6. Plk1キナーゼ阻害活性評価の原理

本実験ではキナーゼドメインの活性化ループ (active-site loop) にT210Dの変異を有し、恒常的に活性化されている変異Plk1の生成タンパク質を用いた。変異Plk1をATPおよびターフェニル化合物存在下でプレート上に固定した基質タンパク質とインキュベーションすることにより、基質タンパク質のリン酸化を行い、そのリン酸基を1次抗体、HRP標識2次抗体、およびTMBの酸化による発色を用いて検出・定量を行った。

Plk1キナーゼ阻害活性の評価結果を以下に示す (Figure 3-2-7)。DMSO処理時のキナーゼ活性を100%として規格化して示した。

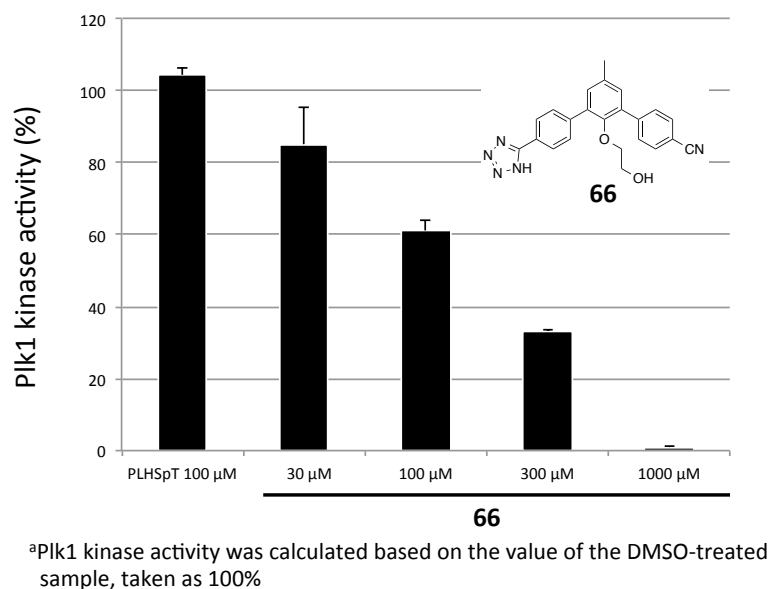


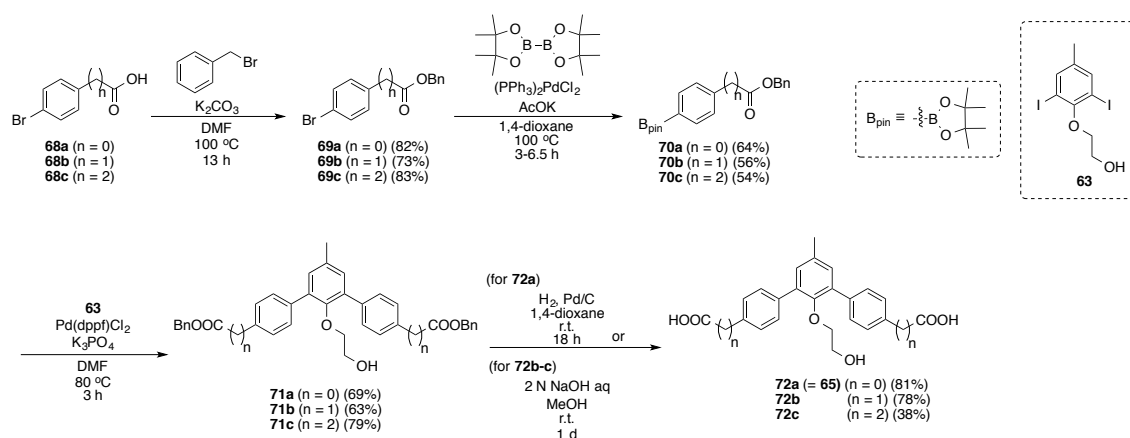
Figure 3-2-7. Plk1キナーゼ阻害活性^a

本実験系ではPLHSpTペプチドはPlk1キナーゼ阻害活性を示さなかったのに対して、ターフェニル化合物**66**は用量依存的にPlk1キナーゼ活性を阻害した (IC₅₀ 151 μM)。本結果は、ターフェニル化合物がPlk1のPLHSpTペプチド認識部位とは別の部位に作用することで、Plk1キナーゼ活性を阻害する可能性を示唆する結果である。

続いてターフェニル化合物**66**に見られたPlk1キナーゼ阻害活性に着目し、本活性の構造活性相関を得るべく、さらなる構造展開を計画した。

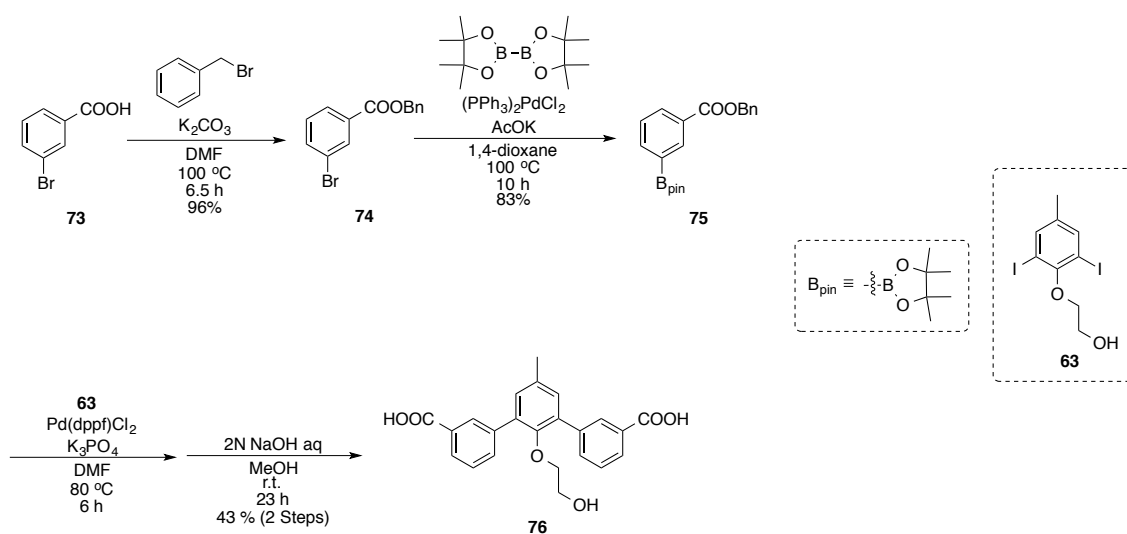
3-2-7. ターフェニル化合物の構造展開

ターフェニル化合物の構造活性相関を得るべく、種々の化合物の合成を行った。化合物の合成には、共通中間体**63**と対応するフェニルボロン酸誘導体をSuzukiカップリングすることで誘導体の合成を行った。以下に合成スキームを示す。



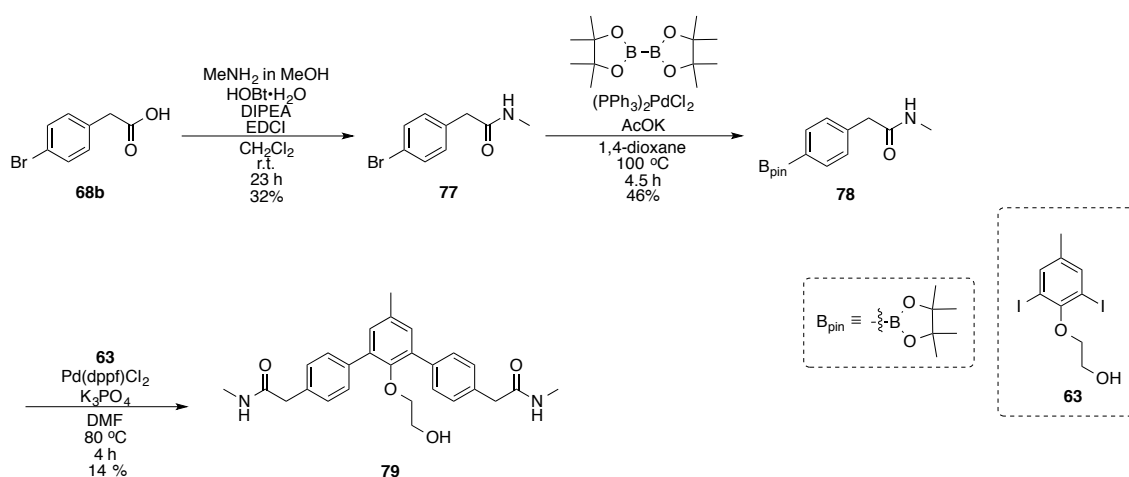
Scheme 3-2-2. 親水基のリンカー長が異なる誘導体**72a-c**の合成

Scheme 3-2-2では親水基のリンカー長を検討すべく、リンカー長の異なる誘導体**72a-c**を合成した。即ち化合物**68a-c**のカルボキシル基をベンジル基で保護し、ピナコールエステル誘導体へと変換した後、共通中間体**63**とSuzukiカップリングおよびベンジル基の除去を行うことで、目的とする化合物**72a-c**を得た。



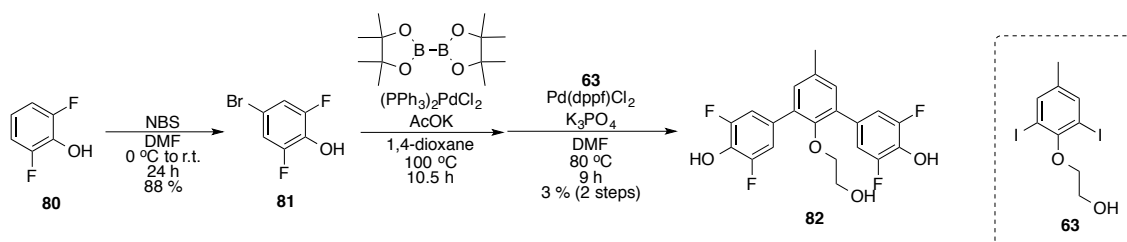
Scheme 3-2-3. メタ位にカルボキシル基を有する誘導体**76**の合成

Scheme 3-2-3ではフェニル基上の親水性基の位置の影響を調べるべく、フェニル基のメタ位にカルボキシル基を有する誘導体**76**の合成を合成した。出発原料**73**のカルボキシル基をベンジル保護し、カップリングによりピナコールエステル誘導体へと変換した後、共通中間体**63**とSuzukiカップリング、およびエステル加水分解を行うことで、目的とする化合物**76**得た。



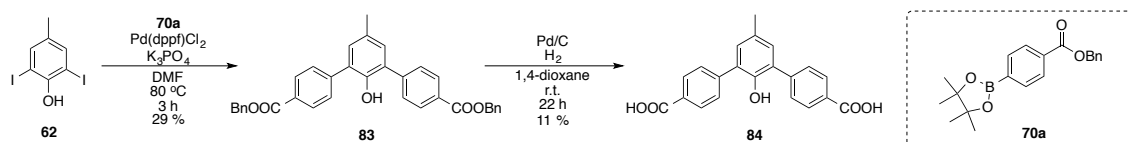
Scheme 3-2-4. アミド基を有する誘導体**79**の合成

Scheme 3-2-4では、カルボン酸等の酸性度を下げる目的で、アミド基を有する誘導体**79**を合成した。出発原料**68b**に対してメチルアミンを縮合させ、ピナコールエステル誘導体へと変換した後、共通中間体**63**とSuzukiカップリングすることで、ジアミド体**79**を得た。



Scheme 3-2-5. ジフルオロフェノールを有する誘導体**82**の合成

ジフルオロフェノールはカルボキシル基のバイオアイソスターとして知られている³⁻²⁻³⁾。Scheme 3-2-5では、出発物質**80**をNBSを用いてブロモ化し、ピナコールエステル誘導体へと変換した後、共通中間体**63**とのSuzukiカップリングを行い、ジフルオロフェノールを有する誘導体**82**を得た。



Scheme 3-2-6. 中央ベンゼン環から水酸基を伸長しない化合物**84**の合成

Scheme 3-2-6ではグリセロールを模倣すべく導入した水酸基の効果を検討すべく、中央ベンゼン環から水酸基を伸長しない化合物**84**の合成を行った。中央ベンゼン環のフェノール性水酸基が無置換の中間体**62**に対してSuzukiカップリングを行い、ベンジル基を除去することで、目的化合物**84**を合成した。

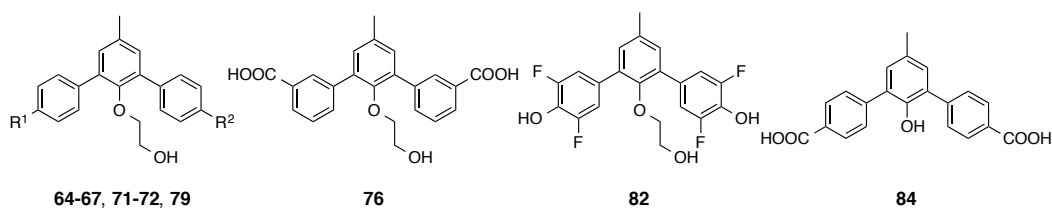
上記得られた化合物群に関して、Plk1キナーゼ阻害活性の評価を行った。

³⁻²⁻³⁾ Meanwell NA. “Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design.” *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529

Plk1キナーゼ阻害活性の評価結果を以下に示す (Table 3-2-1)。

Table 3-2-1. Plk1キナーゼ阻害活性^a

compound	R ¹	R ²	Inhibition ratio ^b (%)
66		-CN	66
64	-CN	-CN	11
65 (72a)	-COOH	-COOH	14
67			47
71a	-COOBn	-COOBn	0
72b	-CH ₂ COOH	-CH ₂ COOH	53
72c	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₂ CH ₂ COOH	26
79	-CH ₂ CONHCH ₃	-CH ₂ CONHCH ₃	0 ^c
76			0
82			61
84			36



^aPlk1 kinase activity was calculated based on the value of the DMSO-treated sample, taken as 100%

^bInhibition ratio at 300 μM

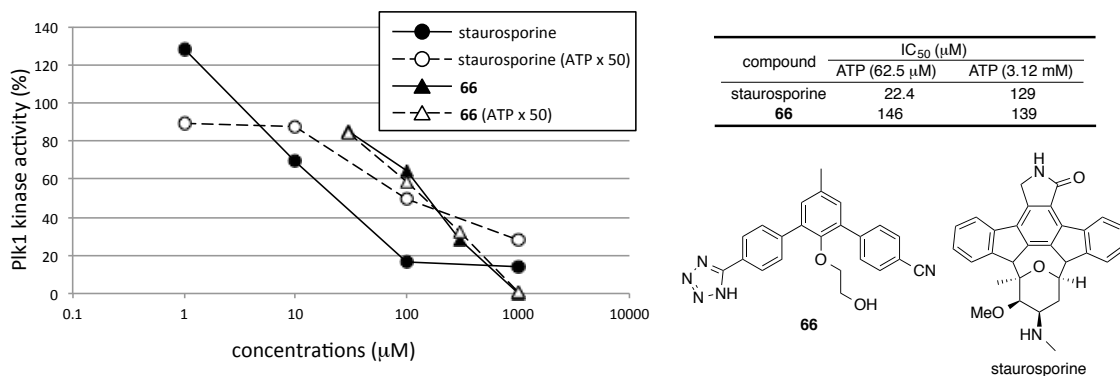
^cInhibition ratio at 250 μM (300 μM could not be tested because of poor solubility)

Table 3-2-1に300 μMにおけるキナーゼ阻害率を示した。なおアミド体**79**は溶解性が悪く250 μMで阻害率を評価した。評価の結果、化合物**66**, **67**, **72b**, **82**は比較的強い阻害率を示した。また化合物**64**, **65**, **72c**, **84**は中程度の阻害率を示した。一方で、化合物**71a**, **76**, **79**は阻害活性を示さなかった。上記の結果は、ターフェニル化合物によるPlk1キナーゼ活性阻害には、酸性官能基が必要であること、特に、テトラゾールやジフルオロフェノールの様な親油性の高い酸性官能基が好まれることを示唆している。

次いでターフェニル化合物によるPlk1キナーゼ阻害活性の作用機序について考察すべく、化合物**66**を用いてATPとの競合の有無について評価した。

3-2-8. Plk1キナーゼ阻害活性とATP競合の評価

ターフェニル化合物のPlk1阻害に対する作用機序を検討すべく、Plk1阻害におけるATP濃度依存性を評価した。活性の評価には3-2-6に記述したELISAによるPlk1キナーゼ阻害活性評価系を用いて、ATPの濃度を通常プロトコル濃度（62.5 μM ）と50倍の濃度（3.12 mM）の2種類の条件で実験を行った。以下に結果を示す（Figure 3-2-8）。



^aPlk1 kinase activity was calculated based on the value of the DMSO-treated sample, taken as 100%

Figure 3-2-8. Plk1阻害活性に対するATP競合の評価^a

既知ATP競合型キナーゼ阻害薬であるstaurosporineは、通常のATP濃度におけるIC₅₀が22.4 μM であったのに対して、ATP濃度を50倍にした結果、IC₅₀が129 μM になり阻害活性の減弱が見られた。一方でターフェニル化合物**66**のPlk1キナーゼ阻害活性はATP濃度に対してほとんど影響を受けなかった。本実験の結果より、ターフェニル化合物は、ATP結合部位とは異なる場所でPlk1と相互作用し、ATP非競合的な形式でPlk1キナーゼ活性を阻害している可能性が示唆された。

3-2-9. 小括

著者は本節において、Plk1-PBDにおけるリン酸化ペプチド認識による相互作用と細胞内局在形成に着目し、「PLHSpT配列を模倣した非ペプチド性低分子、即ちPLHSpTペプチド等価体の創製により、Plk1と基質タンパク質の相互作用を阻害することで、PBDを介したPlk1の細胞内局在形成、およびPlk1を介したリン酸化を阻害できる」とする作業仮説を構築し、PLHSpTペプチド等価体として、ターフェニル化合物を設計・合成した。

ターフェニル化合物のPlk1-PBDとPLHSpTペプチドの相互作用阻害活性を評価したが、期待に反してターフェニル化合物はPBDとPLHSpTペプチド相互作用を阻害せず、逆にPBD-PLHSpTペプチド相互作用を増強する傾向が見られた。またターフェニル化合物のPlk1キナーゼ阻害活性について評価した結果、ATP非競合的にキナーゼ活性を阻害することを見いだした。

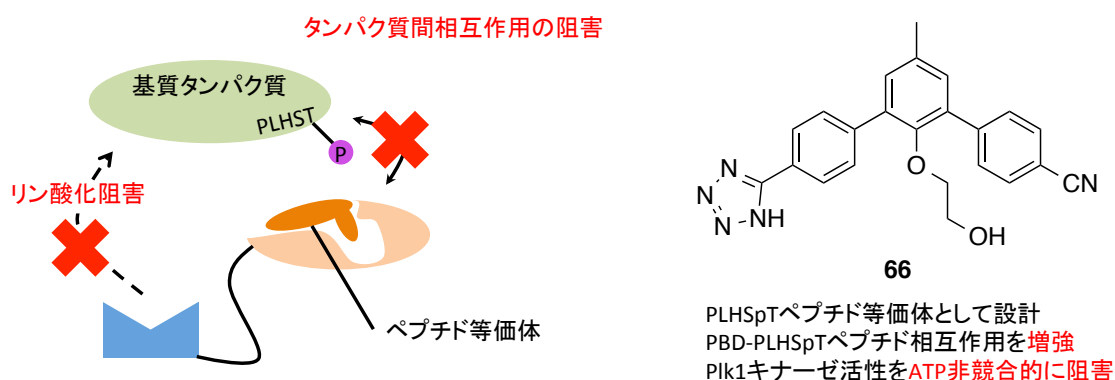
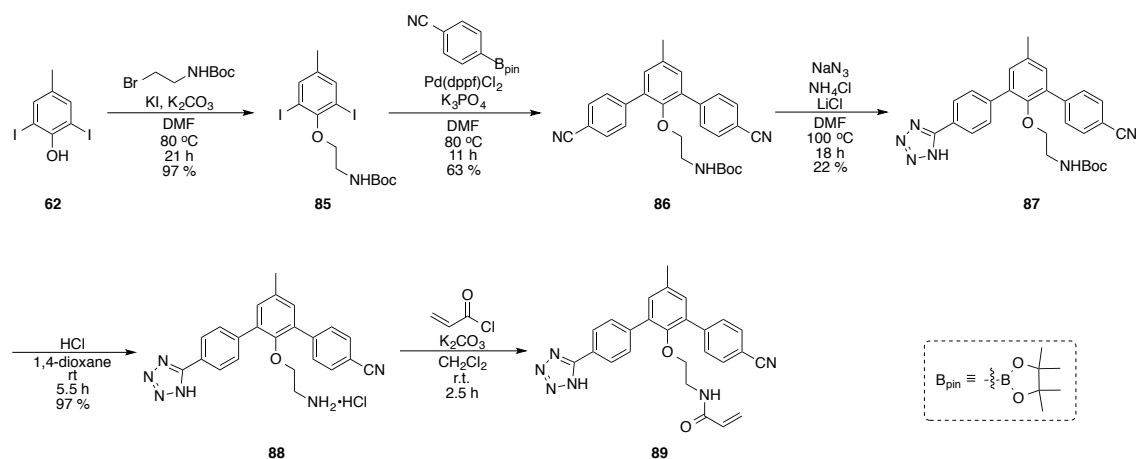


Figure 3-2-9. ターフェニル化合物の創製

3-3 節 コバレントドラッグ化を狙った構造展開

3-3-1. コバレントドラッグ化を狙った構造展開

著者は前節において、Plk1-PBDとPLHSpTペプチドの相互作用に着目し、ターフェニル骨格を有するPLHSpTペプチド等価体の設計・合成を行った。その結果、ターフェニル化合物は作業仮説に反してPBD-PLHSpTペプチド相互作用を増強するものの、ATP非競合型のPlk1キナーゼ阻害活性を示すことを見いだした。次いで著者は、ターフェニル化合物をコバレントドラッグ化することを計画し、活性の向上^{2,4,4)}に加えて、同時にターフェニル化合物のPlk1に対する未知結合部位の同定を期待した。ターフェニル化合物の結合部位の近傍にCys残基が存在することを期待し、コバレントドラッグ化の官能基にはアクリルアミド構造を採用した。またアクリルアミド構造の導入部位は、比較的活性に影響が少ないと考えられた中央ベンゼン環から伸びる水酸基部位に導入を試みた。以下にデザインしたコバレントドラッグ化を狙った化合物**89**の合成スキームを示す (Scheme 3-3-1)。



Scheme 3-3-1. ターフェニル化合物のコバレントドラッグ化

化合物**62**を2-(*tert*-ブトキシカルボニルアミノ)エチルブロミドに $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応させることで、化合物**85**を得た後、Suzukiカップリングにより行い化合物**86**を得た。次いで一方のニトリル基をテトラゾール基へと変換した化合物**87**を得た後、Boc基の除去および塩化アクリロイルとの縮合反応によりアクリルアミド体**89**を得た。なお化合物**89**の生成にはHPLCを用いた (純度 > 95%)。

なお得られた化合物**89**を用いたPlk1キナーゼ阻害活性評価、および、結合部位の同定に関しては、今後の検討課題である。

3-4 節 非ペプチド・ATP 非競合型 Plk1 阻害薬の創製の総括

3-4-1. 非ペプチド・ATP 非競合型 Plk1 阻害薬の創製の総括

著者は本章において、Plk1-PBDにおけるリン酸化ペプチド認識による相互作用と細胞内局在形成に着目し、「PLHSpT配列を模倣した非ペプチド性低分子、即ちPLHSpTペプチド等価体の創製により、Plk1と基質タンパク質の相互作用を阻害することで、PBDを介したPlk1の細胞内局在形成、およびPlk1を介したリン酸化を阻害できる」とする作業仮説を構築し、PLHSpTペプチド等価体として、ターフェニル化合物を設計・合成した。

ターフェニル化合物のPlk1-PBDとPLHSpTペプチドの相互作用阻害活性を評価したが、期待に反してターフェニル化合物はPBDとPLHSpTペプチド相互作用を阻害せず、逆にPBD-PLHSpTペプチド相互作用を増強する傾向が見られた。またターフェニル化合物のPlk1キナーゼ阻害活性について評価した結果、ATP非競合的にキナーゼ活性を阻害することを見いだした。

現在のPlk1阻害による抗がん剤の創製研究ではATP競合型が主流であり、臨床試験が行われているのもATP競合型のみである。またATP非競合型としてPBD相互作用を阻害する化合物も研究がなされている。しかしながら本研究で見いだしたターフェニル化合物は、上記の相互作用とは異なる作用機序を有することが示唆されており、活性が弱いことが課題ではあるが、特徴的な化合物を見いだすことが出来たと考えている。また今後の課題として、ターフェニル化合物の作用機序の解明が挙げられる。それを達成すべくコバレントドラッグ化を狙った化合物**89**の合成を行った。今後、本化合物を用いることで、ターフェニル化合物の作用機序が明らかになることが期待される。

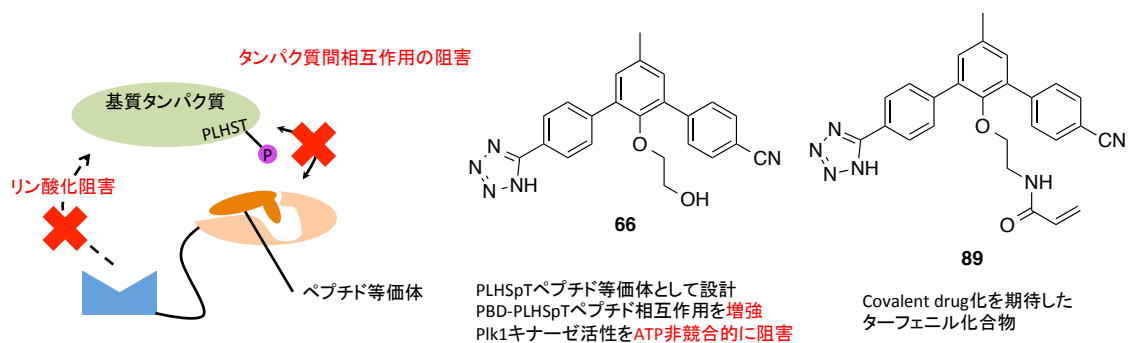


Figure 3-4-1. 非ペプチド・ATP非競合型Plk1阻害薬の創製

第 4 章 総括

4-1 節 総括

4-1-1. 総括

本論文にて著者は、タンパク質間相互作用に着目し、それから着想を得て、VDR阻害薬ならびにPlk1阻害薬の創製を行った。

具体的には、核内受容体の転写活性化に必須であるコアクチベーター上の LXXLL 配列を介した核内受容体-コアクチベーター相互作用に着目して、VDR-コアクチベーター相互作用を阻害し、VDR を介した転写を抑制するベンゾジアゼピン型の LXXLL ペプチド等価体を創製した。活性は弱いながらも、これは私の知る限り非セコステロイド型ならびに非ペプチド型の VDR 阻害物質として初の報告である。

本研究は「タンパク質間相互作用におけるファーマコフォアを模倣して、論理的にペプチド等価体を設計する」という研究コンセプトの実証例の一つであり、また新規作用機序・新規骨格を有する VDR 阻害薬を提案できたものと考えている。

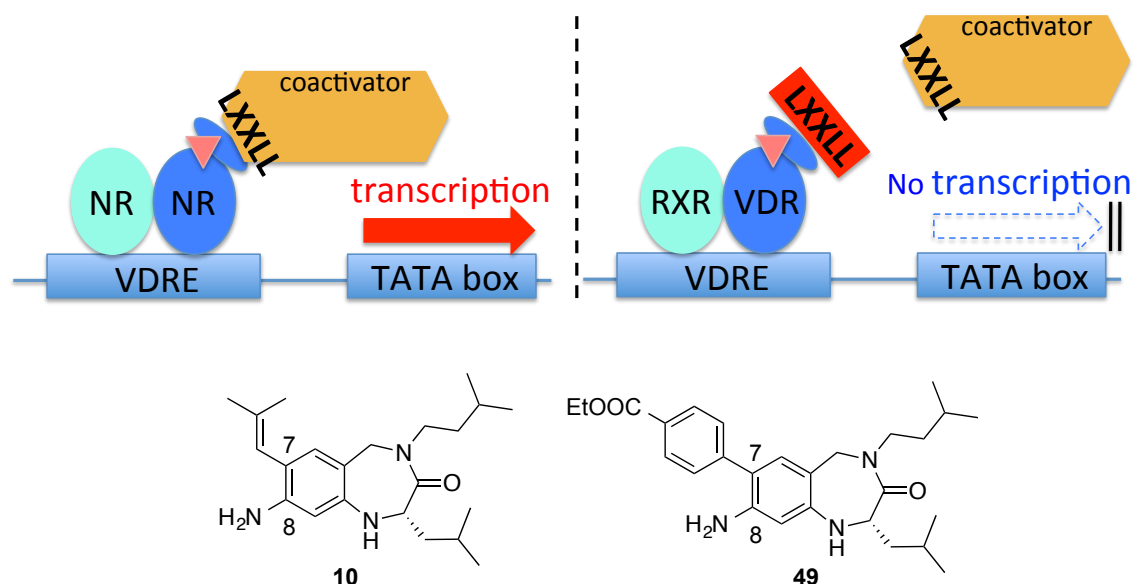


Figure 4-1-1. LXXLL ペプチド等価体の創製

また著者は、Plk1-PBDにおけるリン酸化ペプチド認識による相互作用と細胞内局在形成に着目し、PBDにおけるタンパク質間相互作用を阻害するペプチド等価体の創製に取り組んだ結果、PBDにおけるタンパク質間相互作用を増強し、ATP非競合的にPlk1キナーゼ阻害活性を阻害するターフェニル型化合物を見いだした。本作用機序は不明であるが、コバレントドラッグ化した化合物を用いて作用機序が明らかになることが期待される。

本研究は、「タンパク質間相互作用におけるファーマコフォアを模倣して、論理的にペプチド等価体を設計する」という研究コンセプトとは異なるものの、幸運にもATP非競合型のPlk1キナーゼ阻害薬という興味深い化合物を見いだすことが出来た。今後の更なる検討により、その作用メカニズムが明らかになれば、Plk1の更なる機能解明や治療薬への展開が期待される。

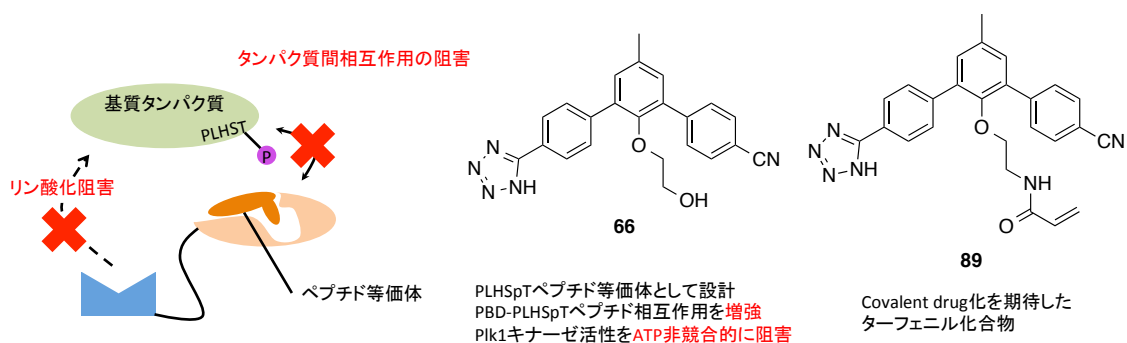


Figure 4-1-2. 非ペプチド・ATP非競合型Plk1阻害薬の創製

タンパク質間相互作用は、シグナル伝達に関与する等、生体にとって重要な役割を果たしており、これらを自在に制御できれば、標的タンパク質のさらなる機能解明や、創薬研究を通じた医薬品の創製等が期待される。しかし近年に至るまで、タンパク質間相互作用は”Undruggable”であるとされ、低分子を用いてタンパク質間相互作用を制御することは難しいと考えられてきた。

一方で著者は、本論文に記述した研究において、タンパク質間相互作用に着目し、それから着想を得て、2種類の生理活性物質を創製するに至った。本論文の研究を通じて、活性は弱いながらも、タンパク質間相互作用を阻害、あるいは増強する新規低分子化合物を創出できた事実は、これからのタンパク質間相互作用を制御する低分子化合物創製研究に対して一つの指針をあたえるものになると考えている。また本研究で見いだした化合物が特徴あるケミカルツールとしてVDR、およびPlk1の機能解明に応用できるものと期待している。

第 5 章 実験項

5-1 節 実験項(第 2 章)

5-1-1. 計算科学(第 2 章)

Calculations of the most stable conformations

We used Chem 3D Pro (ver. 5.0) to calculate the most stable conformations of test compounds. The most stable conformation was calculated by MM2 (Molecular Dynamics, then Minimized Energy).

Docking study

We used AutoDock4.2 for docking study of VDR and LXXLL peptide mimetics. X-ray data of VDR was PDB ID 1RK3. In docking study, Lys242 and Glu416 were treated as flexible residues, and the rest residues were treated as rigid surface. Genetic algorithm was Lamarckian GA (4.2). We run calculations 100 times per one docking study.

Example of docking study protocol

110214 docking study of VDR_LXXLLmimic

protein:VDR_1RK3.pdb (PDBID:1RK3)

ligand:091202_LXXLLligand.pdbqt

(created after MM2 minimization with Chem 3D) YM124

flexible residue:VDR_1RK3_fle_110203.pdbqt

(residues of GLU416 and LYS242 made flexible.)

rigid residue: VDR_1RK3_fle_110203.pdbqt

grid:110203_YM150_mita.gpf (GRID BOX: r50xg50xb60, r10, g-12, b10)

docking:110214_YM124_mita.dpf

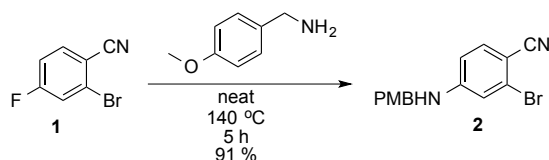
result: 110214_YM124_mita.dlg (No.14 -7.16 kcal)

5-1-2. 有機合成(第 2 章)

General

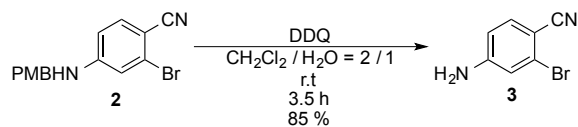
Melting points were determined by using a Yanagimoto hot-stage melting point apparatus and are uncorrected. $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on JEOL JNM-GX500 (500 MHz) spectrometer and a JEOL JMN-ECA500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) relative to deuteriochloroform or tetramethylsilane as an internal reference with coupling constants in Hz. The abbreviations s, d, dd, ddd, t, td, q, quin, sex and m signify singlet, doublet, doublet doublet, doublet doublet doublet, triplet, triplet doublet, quartet, quintet, sextet and multiplet, respectively. Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS) and high resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a JEOL JMS-HX110 spectrometer with *m*-nitrobenzyl alcohol. NH TLC plate or PTLC plate was Fujisilisia's NH plate.

2-Bromo-4-(4-methoxybenzylamino)-benzonitrile **2**



4-Methoxybenzylamine (5.3 mL, 40.2 mmol) was added to 2-bromo-4-fluorobenzonitrile (5.36 g, 26.8 mmol). After stirred for 5 h at 140 °C in sealed flask, the reaction mixture was quenched with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was recrystallized from AcOEt / hexane to afford **2** (5.96 g, 18.8 mmol, 70 %) as a pale yellow solid. The mother water was concentrated and the resulting mixture was purified by silica gel chromatography (AcOEt / hexane = 4 / 1) to afford **2** (1.76 g, 5.56 mmol, 21 %) as a pale yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.37 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.52 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 4.54 (m, 1H), 4.28 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H). MS (FAB) m/z 317, 329 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

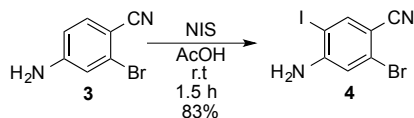
4-Amino-2-bromobenzonitrile **3**



2, 3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (2.90 g, 12.8 mmol) was added to a stirred solution of **2** (4.03 g, 12.8 mmol) in CH_2Cl_2 (85 mL) and H_2O (43 mL) at r.t.. After stirred for 3.5 h, the reaction mixture was filtered to remove precipitated solid and the filtrate was added to saturated NaHCO_3 aq and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (AcOEt / hexane =

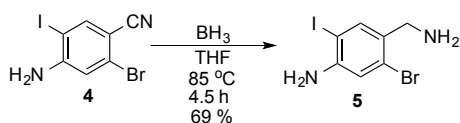
1 / 2) to afford **3** (2.13 g, 10.8 mmol, 85 %) as a white solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 4.21 (m, 2H). MS (FAB) m/z 197, 199 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

4-Amino-2-bromo-5-iodobenzonitrile **4**



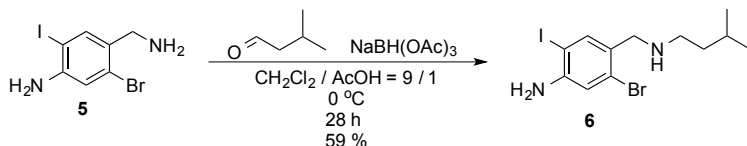
Under the condition of protection from light, *N*-iodosuccinimide (NIS) (81.3 mg, 361 μmol) was added to a stirred solution of **3** (67.0 mg, 340 μmol) in AcOH (3.5 mL) at r.t.. After stirred for 2.5 h, the reaction mixture was quenched with 2 N NaOH aq and adjusted its pH to pH 10. Then the reaction mixture was extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (AcOEt / hexane = 3 / 1) to afford **4** (90.4 mg, 280 μmol , 82 %) as a pale white solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.68 (m, 2H). MS (FAB) m/z 323, 325 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

4-(Aminomethyl)-5-bromo-2-iodoaniline **5**



Under Ar atmosphere, a solution of borane in THF (1.06 M, 3.6 mL, 3.82 mmol) was added to a stirred **4** (303 mg, 938 μmol) in THF (6 mL) at 0°C . The reaction mixture was stirred for 4.5 h at 85°C . Then, MeOH (15 mL) was added to the reaction mixture at 0°C . After stirred for 1 h at r.t., the reaction mixture was concentrated. The resulting residue was added to saturated NaHCO_3 aq and extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (CHCl_3 / MeOH = 20 / 1) to afford **5** (210 mg, 642 μmol , 69 %) as a pale yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.09 (m, 2H), 3.76 (s, 2H). MS (FAB) m/z 327, 329 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

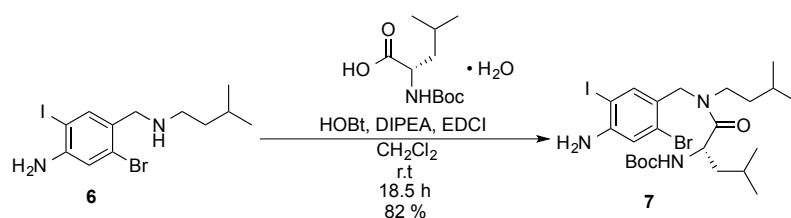
5-Bromo-2-iodo-4-[(3-methylbutylamino)methyl]aniline **6**



Under Ar atmosphere, sodium Triacetoxyborohydride (4.54 g, 21.4 mmol) was added to a stirred solution of **5** (1757 mg, 5.37 mmol) and Isovaleraldehyde (0.55 mL, 5.11 mmol) in AcOH (8.5 mL) and CH_2Cl_2 (77 mL) at 0°C . After stirred for 28 h at 0°C , the reaction mixture was quenched and adjusted its pH to 10 with 2 N NaOH aq at 0°C , then extracted with

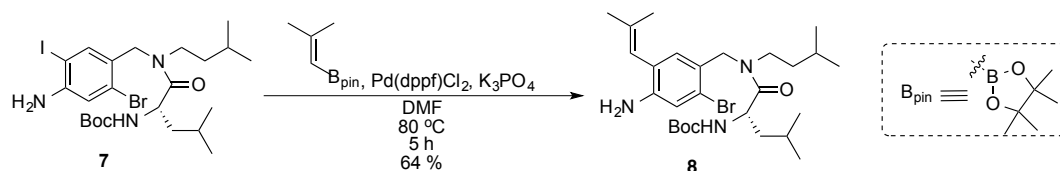
CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 3 / 1, then CHCl₃ / MeOH = 5 / 1) to afford **6** (1259 mg, 3.17 mmol, 59 %) as yellow oil. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.08 (m, 2H), 2.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.40 (td, *J* = 7.5, 7.0 Hz, 2H), 0.89 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H). MS (FAB) *m/z* 397, 399 (M+H)⁺.

(*S*)-*tert*-Butyl 1-[(4-amino-2-bromo-5-iodobenzyl)(3-methylbutyl)amino]-4-methyl-1-oxopentan-2-ylcarbamate **7**



Under Ar atmosphere, *N*-*tert*-(butoxycarbonyl)-*L*-leucine monohydrate (1195 mg, 4.79 mmol) was added to a stirred solution of **6** (1259 mg, 3.18 mmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (743 mg, 4.85 mmol), diisopropylethylamine (0.9 mL, 5.15 mmol), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1002 mg, 5.23 mmol) in CH₂Cl₂ (32 mL). After stirred for 18.5 h at r.t., the reaction mixture was quenched with H₂O and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 3 / 1) to afford **7** (1585 mg, 2.60 mmol, 61.7 %) as white foam. There were two rotamers and their ratio was 0.3 / 0.7. (determined by ¹H-NMR) ¹H-NMR(500MHz, CDCl₃) δ 7.43 (s, 0.7 H), 7.36 (s, 0.3H), 6.94 (s, 0.3 H), 6.91 (s, 0.7H), 5.19-5.14 (m, 1H), 4.44 (d, *J* = 15.3 Hz, 0.5 H), 4.68-4.63 (m, 0.5 H), 4.55-4.43 (m, 1H), 4.37 (d, *J* = 15.3 Hz, 0.5 H), 4.14-4.09 (m, 2 H), 3.50-3.40 (m, 0.5 H), 3.30-3.20 (m, 1.5H), 3.20-3.15 (m, 0.5 H), 1.80-1.70 (m, 0.5 H), 1.70-1.65 (m, 0.5 H), 1.55 (s, 9H), 1.45 (s, 6H), 1.42 (s, 3 H), 1.32-1.24 (m, 2H), 1.01 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz), 0.92 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H) 0.90-0.85 (m, 4H). MS (FAB) *m/z* 610, 612 (M+H)⁺

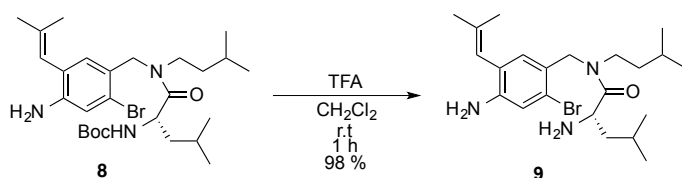
(*S*)-*tert*-Butyl 1-[(4-amino-2-bromo-5-(2-methylprop-1-enyl)benzyl)(3-methylbutyl)amino]-4-methyl-1-oxopentan-2-ylcarbamate **8**



Under Ar atmosphere, 2-methyl-1-propenylboronic acid pinacol ester (0.45 mL, 2.20 mmol) was added to a solution of **7** (1369 mg, 2.24 mmol), [1'1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium (II) (194 mg, 265 μmol) and Tripotassium phosphate (1447 mg, 6.82 mmol) in DMF (23 mL). After stirred for 8 h at 80 °C, the reaction mixture was diluted by AcOEt and washed with saturated NaHCO₃ aq and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and

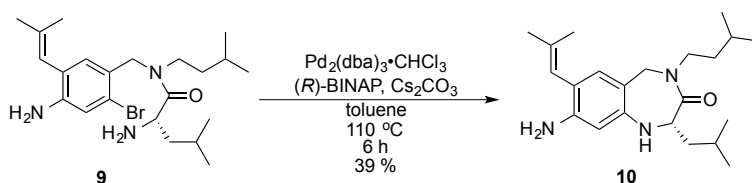
concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 4 / 1) to afford **8** (767 mg, 1.42 mmol, 64 %) as a yellow oil. There were two rotamers and their ratio was 0.4 / 0.6. (determined by $^1\text{H-NMR}$) $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.90 (s, 0.4 H), 6.87 (s, 0.6H), 6.84 (s, 0.6H), 6.72 (s, 0.4H), 5.91 (s, 1H), 5.24 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 4.80 (d, J = 15.3 Hz, 0.6 H), 4.67-4.59 (m, 1H), 4.55-4.46 (m, 1H), 4.41 (d, J = 15.3 Hz, 0.6 H), 3.71 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.49 (d, J = 3.7 Hz, 0.5 H), 3.43-3.38 (m, 0.3 H), 3.26-3.19 (m, 1.7 H), 1.87 (s, 2H), 1.65 (s, 2 H), 1.63 (s, 1H), 1.62 (s, 1H), 1.59-1.48 (m, 4H) 1.43 (s, 6H), 1.41 (s, 3 H), 1.35-1.31 (m, 2 H), 0.99 (d, J = 6.7 Hz, 2 H), 0.93 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 0.92-0.86 (m, 8 H). MS (FAB) m/z 538, 540 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(S)-2-Amino-N-[4-amino-2-bromo-5-(2-methylprop-1-enyl)benzyl]-N-(3-methylbutyl)-4-methylpentanamide **9**



To a stirred solution of **8** (767 mg, 1.42 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added TFA (10 mL) at r.t. and stirred for 1 h. 2 N NaOH aq was added to the reaction mixture to adjust its pH to pH 10 at 0 $^\circ\text{C}$. Then the resulting mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (CHCl_3 / MeOH = 20 / 1) to afford **9** (608 mg, 1.39 mmol, 98 %) as a brown oil. There were two rotamers and their ratio was 0.5 / 0.5. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.92 (s, 0.5H), 6.88 (s, 0.5H), 6.87 (s, 0.5H), 6.67 (s, 0.5H), 5.92 (s, 1H), 4.95 (d, J = 15.3 Hz, 0.5H), 4.51(d, J = 17.1 Hz, 0.5 H), 4.35 (d, J = 17.1 Hz, 0.5 H), 4.31 (d, J = 15.3 Hz, 0.5H), 3.71 (dd, J = 10.4, 3.66 Hz, 2H), 3.65-3.52 (m, 2H), 3.28-3.18 (m, 1H), 3.18-3.02 (m, 1H), 1.90-1.86 (m, 6H), 1.71-1.67(m, 3H), 1.64 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 3 H), 1.58-1.26 (m, 8H), 0.95-0.81 (m, 12H). MS (FAB) m/z 438, 440 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

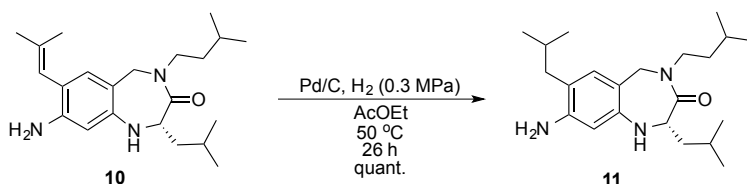
(S)-8-Amino-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-7-(2-methylprop-1-enyl)-2-(3-methylpropyl) - 3H-1,4-benzodiazepin-3-non **10**



Under Ar atmosphere, a solution of tris(dibenzylidenacetone)dipalladium(0)-chloroform (3.2 mg, 3.1 μmol) and (*R*)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (4.8 mg, 7.7 μmol) in toluene (1 mL) at r.t. and degassed by sonication for 10 minutes. Then, the solution of **9** (17.6 mg, 40.1 μmol) in toluene (1 mL) and Cesium carbonate (44.4 mg, 136 μmol) were added. The resulting mixture was stirred at 110 $^\circ\text{C}$ for 6 h. The reaction mixture was quenched with saturated NaHCO_3 aq, brine and H_2O , then extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The

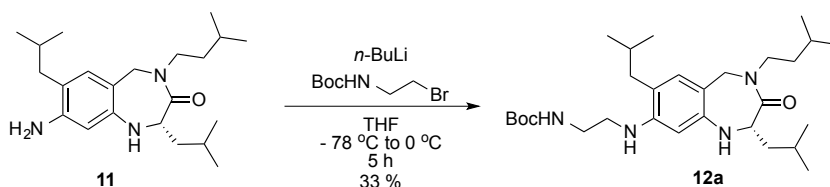
resulting residue was purified by PTLC (CHCl₃ / MeOH = 20 / 1) to afford **2** (5.6 mg, 15.7 μmol, 39 %) as a yellow solid. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃-D₂O) δ 6.56 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.26 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.65 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 3.58-3.52 (m, 1H), 3.43-3.38 (m, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.83-1.75 (m, 2H) 1.71 (s, 3H), 1.51-1.35 (m, 4H), 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.6, 144.9, 144.7, 136.4, 131.1, 120.3, 114.8, 110.7, 102.9, 52.1, 51.4, 45.7, 40.4, 37.2, 25.9, 25.9, 24.7, 23.0, 22.5 (3C), 19.4. MS (FAB) *m/z* 357 (M)⁺, 358 (M+H)⁺. HRMS (FAB) calcd for C₂₂H₃₅N₃O 357.2780, found 357.2782 (M)⁺. m.p. 83-85 °C.

(*S*)-8-Amino-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2,7-di(3-methylpropyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **11**



Under Ar atmosphere, 10 % Pd/C (2.0 mg) was added to a stirred solution of **10** (121 mg, 338 μmol) in AcOEt (5 mL). Then Ar atmosphere was substituted by H₂ at 0.3 MPa. After stirred strongly for 26 h at 50 °C, the reaction mixture was filtered with Celite and concentrated to afford pure **11** (121 mg, 337 μmol, quant.) as a yellow solid. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 6.53 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.26 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.65 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.58-3.53 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.42-3.38 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 2.25 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 2.23 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 1.90-1.77 (m, 3H), 1.49-1.41 (m, 2H), 1.38-1.35 (m, 2H), 0.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) *m/z* 359 (M)⁺, 360 (M+H)⁺. HRMS (FAB) calcd for C₂₂H₃₇N₃O 359.2937, found 359.2936 (M)⁺. m.p. 95-98 °C.

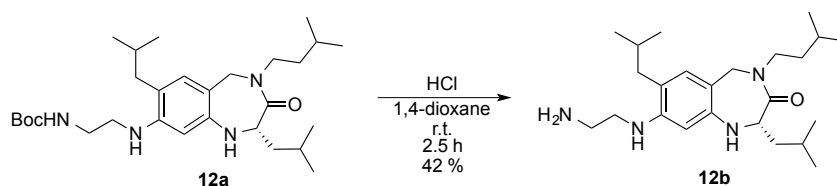
(*S*)-*tert*-Butyl- 2-[1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2,7-di(3-methylpropyl)-3-oxo-3*H*-1,4-benzodiazepin-8-ylamino]ethylcarbamate **12a**



Under Ar atmosphere, *n*-BuLi in hexane (1.59 M) (60 μL, 95.9 μmol) was added to a stirred solution of **11** (22.9 mg, 63.7 μmol) in THF (1 mL) at -78 °C, then the temperature was raised to 0 °C and 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl bromide (31.1 mg, 168 μmol) in THF (0.2 mL) was added to the solution. After stirred 5 h at 0 °C, the reaction mixture was quenched with H₂O at -78 °C and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (CHCl₃ / MeOH = 20 / 1) to afford **12a** (10.5 mg,

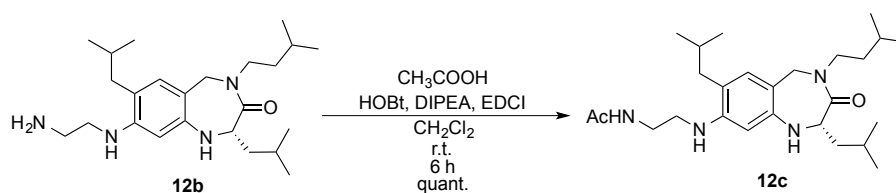
20.9 μmol , 33 %) as yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.52 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.26 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 4.94 (m, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 3.64 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.54 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.53-3.47 (m, 1H), 3.46 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.16 (m, 2H), 2.22 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 1.90-1.84 (m, 1H), 1.83-1.76 (m, 2H), 1.52-1.48 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.40-1.35 (m, 3H), 0.96 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 502 (M^+), 503 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_3$ 502.3883, found 502.3888 (M) $^+$

(S)-8-(2-Aminoethylamino)-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2,7-di(3-methylpropyl)-3H-benzodiazepin-3-one **12b**



4N HCl in dioxane (1 mL) was added to **12a** (11.2 mg, 22.3 μmol) and stirred for 2.5 h at r.t.. Then MeOH was added to the reaction mixture and the resulting mixture was concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (CHCl_3 / MeOH / 30 % NH_3 aq = 9 / 1 / 0.1) to afford **12b** (3.8 mg, 9.44 μmol , 42 %) as a yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.52 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.27 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 4.53 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 3.64 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.64 (s, 1H), 3.54-3.48 (m, 2H), 3.44-3.40 (m, 1H), 3.19 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.98 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.24 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 1.90-1.78 (m, 3H), 1.52-1.43 (m, 3H), 1.39-1.35 (m, 2H), 0.96 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 402 (M^+), 403 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}$ 402.3359, found 402.3362 (M) $^+$

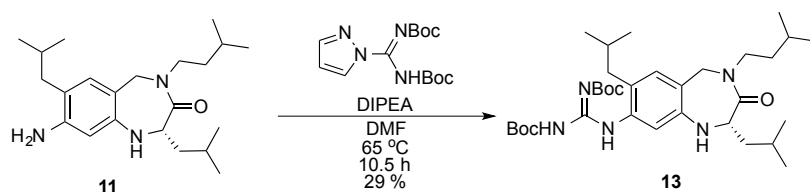
(S)-N-[2-[1,2,4,5-Tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2,7-di(3-methylpropyl)-3-oxo-3H-1,4-benzodiazepin-8-ylamino]ethyl]ethanamide **12c**



Under Ar atmosphere, DIPEA (2 μL , 11.4 μmol), EDCI (1.7 mg, 8.9 μmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (2.2 mg, 14.4 μmol) and acetic acid (1 μL , 17 μmol) was added to a stirred solution of **12b** (1.6 mg, 3.97 μmol) in CH_2Cl_2 . After stirred 6 h at r.t., the reaction mixture was quenched with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (CHCl_3 / MeOH = 10 / 1) to afford **12c** in quantitative yield as yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.53 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.70 (m, 1H), 5.26 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 4.52 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 3.64 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 3.56-3.47 (m, 2H), 3.55-3.45 (m, 1H), 3.44-3.38 (m, 2H), 3.21-3.18

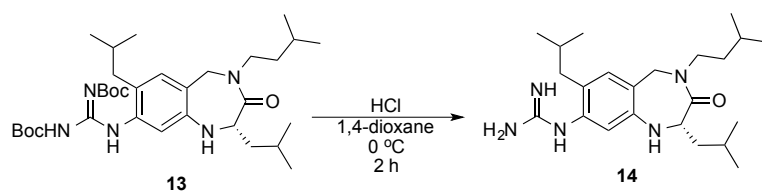
(m, 2H), 2.22 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 2.21 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.91-1.85 (m, 1H), 1.83-1.74 (m, 2H), 1.52-1.41 (m, 3H), 1.39-1.34 (m, 2H), 0.96 (d, $J = 9.8$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.92 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.92 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 444 (M^+), 445 ($M+H$)⁺. HRMS (FAB) calcd for $C_{26}H_{44}N_4O_2$ 444.3464, found 444.3459 (M)⁺

(*S*)-*tert*-Butyl(*tert*-butoxycarbonylamino)[1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2,7-di(3-methylpropyl)-3-oxo-3*H*-1,4-benzodiazepin-8-ylamino]methylenecarbamate **13**



Under Ar atmosphere, *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-1-*H*-pyrazole-1-carboxyamidine (14 mg, 45.1 μ mol) and DIPEA (12.7 μ L, 72.5 μ mol) was added to a stirred solution of **11** (5.2 mg, 14.5 μ mol) in DMF (0.5 mL). After stirred 10 h at 65 °C, the reaction mixture was diluted with AcOEt and washed with H₂O and Brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting mixture was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 2 / 1) to afford **13** (2.5 mg, 4.2 μ mol, 29 %) as yellow oil. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 11.67 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.30 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 4.55 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.69 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.60-3.55 (m, 2H), 3.41-3.35 (m, 1H), 2.35 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.94-1.89 (m, 1H), 1.84-1.78 (m, 1H), 1.74-1.70 (m, 1H), 1.53 (s, 1H), 1.49 (s, 1H), 1.47-1.32 (m, 6H), 0.96 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 601 (M^+), 602 ($M+H$)⁺.

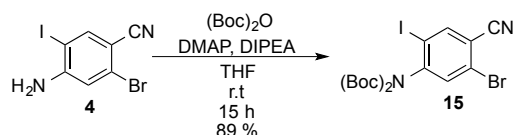
(*S*)-1-[1,2,4,5-Tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2,7-di(3-methylpropyl)-3-oxo-3*H*-1,4-benzodiazepin-8-yl]guanidine **14**



4*N* HCl in dioxane (0.5 mL) was added to **13** (2.5 mg, 4.2 μ mol) at 0 °C and stirred 2 h at 0 °C. Then MeOH was added to the reaction mixture and the resulting mixture was concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (CHCl₃ / EtOH / 25 % NH₃ aq / H₂O = 4 / 4 / 1 / 1) to afford **14** (trace.) as a white solid. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 6.78 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.33 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 4.58 (m, 1H), 4.16 (m, 1H), 3.75 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 3.58-3.51 (m, 2H), 3.50-3.44 (m, 2H), 2.37-2.25 (m, 2H), 1.92-1.85 (m, 1H), 1.83-1.82 (m, 1H), 1.76-1.71 (m, 1H), 1.49-1.43 (m, 2H), 1.40-1.33 (m, 2H), 0.94 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H),

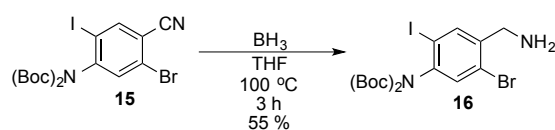
0.86 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 402 (M+H)⁺. HRMS (FAB) calcd for C₂₃H₃₉N₅O 401.3155, found 401.3154 (M)⁺

tert*-Butyl(*tert*-butoxycarbonyl)(5-bromo-4-cyano-2-iodophenyl)carbamate **15*



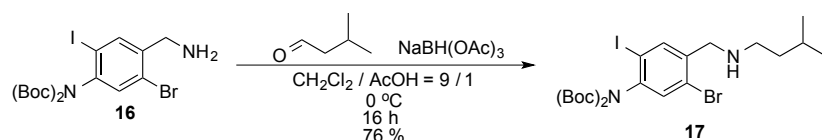
Under Ar atmosphere, a solution of Di-*tert*-butyl-dicarbonate (2754 mg, 12.6 mmol) in THF (5 mL) was added to a stirred solution of **4** (1013 mg, 3.14 mmol) and 4-(*N,N*-Dimethylamino)pyridine (40.1 mg, 328 μ mol) in THF (5 mL). Then, Diisopropylethylamine (2.7 mL, 15.5 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 15 h at r.t.. The precipitated solid was filtrated and washed with hexane to afford **15** (1438 mg, 2.79 mmol, 89 %) as a white solid. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 1.44 (s, 18H). MS (FAB) m/z 523, 525 (M+H)⁺.

tert*-Butyl(*tert*-butoxycarbonyl)[4-(aminomethyl)-5-bromo-2-iodophenyl]carbamate **16*



Under Ar atmosphere, a solution of Borane in THF (0.99 M, 10.2 mL, 10.1 mmol) was added to a stirred **15** (1321 mg, 2.53 mmol) in THF (9 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 3 h at 100 °C. Then, MeOH (15 mL) was added to the reaction mixture at 0 °C. After stirred for 2 h at r.t., the reaction mixture was concentrated. The resulting residue was added to saturated NaHCO₃ aq and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 5 / 1) to afford **16** (738 mg, 1.40 mmol, 55 %) as a white solid. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 3.89 (s, 2H), 1.43 (s, 18H). MS (FAB) m/z 527, 529 (M+H)⁺.

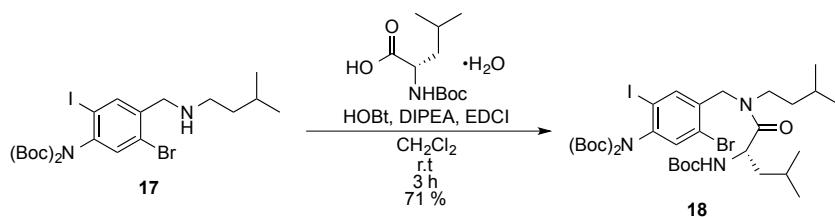
tert*-Butyl(*tert*-butoxycarbonyl){5-bromo-2-iodo-4-[(3-methylbutylamino)methyl]phenyl}carbamate **17*



Under Ar atmosphere, sodium Triacetoxyborohydride (1368 mg, 6.45 mmol) was added to a stirred solution of **16** (846 mg, 1.61 mmol) and Isovaleraldehyde (173 μ L, 1.61 mmol) in AcOH (2 mL) and dehydrated CH₂Cl₂ (18 mL) at 0 °C. After stirred for 16 h at 0 °C, the reaction mixture was neutralized with 2 N NaOH aq and saturated NaHCO₃ aq at 0 °C and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by

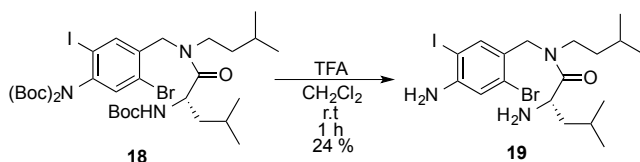
silica gel chromatography (hexane / CHCl₃ / MeOH = 15 / 10 / 1) to afford **17** (649 mg, 1.23 mmol, 76 %) as a yellow oil. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 3.83 (s, 2H), 2.62 (t, *J* = 7.31 Hz, 2H), 1.68-1.62 (m, 1H), 1.42 (s, 18H), 0.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H). MS (FAB) *m/z* 597, 599 (M+H)⁺.

(*S*)-*tert*-Butyl 1-[[2-bromo-4-di(*tert*-butoxycarbonyl)amino-5-iodobenzyl](3-methylbutyl)amino]-4-methyl-1-oxopentan-2-ylcarbamate **18**



Under Ar atmosphere, *N*-*tert*-(butoxycarbonyl)-*L*-leucine (8.1 mg, 35 μmol) was added to a stirred solution of **17** (21 mg, 35 μmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (5.8 mg, 38 μmol), diisopropylethylamine (9.2 μL, 53 μmol), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (7.6 mg, 40 μmol) in dehydrated CH₂Cl₂ (0.5 mL). The reaction mixture was stirred for 17 h at r.t.. Then *N*-Boc-*L*-Leu (17.8 mg, 77 μmol), HOBT (11.2 mg, 73 μmol), DIPEA (18.5 μL, 106 μmol), EDCI (16.7 mg, 87 μmol) and dehydrated CH₂Cl₂ (0.5 mL) were added to the reaction mixture. After stirred for 3 h at r.t., the reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ and washed with saturated NaHCO₃ aq and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 5 / 1) to afford **18** (20.2 mg, 24.9 μmol, 71 %) as a white solid. There were two rotamers and their ratio was 0.3 / 0.7 (determined by ¹H-NMR) ¹H-NMR(500MHz, CDCl₃) δ 7.61 (s, 0.3H), 7.59 (s, 0.7H), 7.43 (s, 0.3H), 7.39 (s, 0.7H), 5.17-5.14 (m, 0.7H), 5.13-5.10 (m, 0.3H), 4.80-4.76 (m, 0.6H), 4.72-4.65 (m, 1H), 4.54-4.50 (m, 1.4H), 3.40-3.20 (m, 2H), 1.84-1.74 (m, 0.3H), 1.61-1.54 (m, 1.7H), 1.46 (s, 7.2H), 1.44-1.42 (m, 23.8H), 1.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 2.4H), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 2.4H), 0.93-0.90 (m, 6H), 0.87 (d, *J* = 6.7 Hz, 0.6H), 0.85 (d, *J* = 6.7 Hz, 0.6H) MS (FAB) *m/z* 810, 812 (M+H)⁺, 832, 834 (M+Na)⁺.

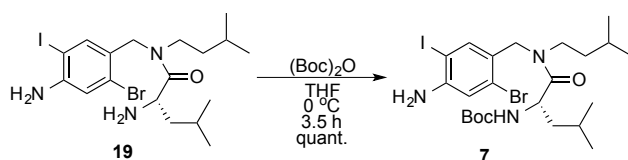
(*S*)-2-Amino-*N*-(4-amino-2-bromo-5-iodobenzyl)-*N*-(3-methylbutyl)-4-methylpentanamide **19**



TFA (1 mL) was added to a stirred solution of **18** (51.6 mg, 63.7 μmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) and stirred for 1 h at r.t.. The reaction mixture was quenched with saturated NaHCO₃ aq and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (CHCl₃ / MeOH = 10 / 1) to afford **19** (7.7 mg, 15.1

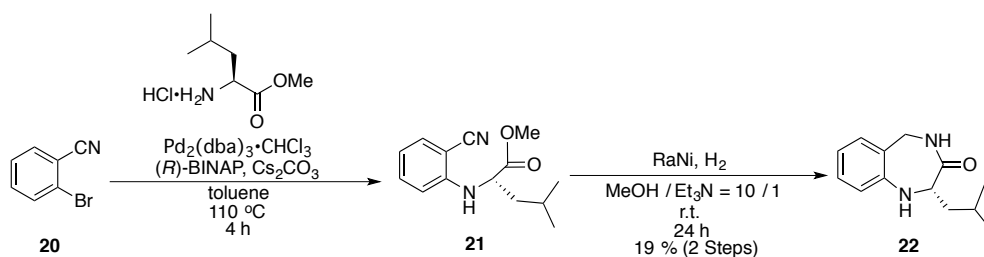
μmol , 23.7 %) as a colorless solid. There were two rotamers and their ratio was 0.6 / 0.4. (determined by $^1\text{H-NMR}$), $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.45 (s, 0.6H), 7.28 (s, 0.4H), 6.96 (s, 0.4H), 6.92 (s, 0.6H), 4.87 (d, J = 14.6 Hz, 0.6H), 4.46 (d, J = 17.7 Hz, 0.5H), 4.35 (d, J = 17.7 Hz, 0.5H), 4.28 (d, J = 15.3 Hz, 0.6H), 4.17 (s, 1H), 4.14-4.10 (m, 1.5H), 3.69 (dd, J = 9.2, 3.7 Hz, 0.6H), 3.65-3.56 (m, 0.6H), 3.45 (dd, J = 9.2, 4.3 Hz, 0.4H), 3.30-3.24 (m, 0.6H), 3.17-3.03 (m, 1H), 1.91-1.86 (m, 0.6H), 1.81-1.74 (m, 0.4H), 1.57-1.34 (m, 5H), 0.97 (t, J = 6.7 Hz, 3H), 0.93-0.88 (m, 9H), 0.84 (d, J = 6.7 Hz, 1.5H). MS (FAB) m/z 510, 512 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(*S*)-*tert*-Butyl 1-[(4-amino-2-bromo-5-iodobenzyl)(3-methylbutyl)amino]-4-methyl-1-oxopentan-2-ylcarbamate **7**



Under Ar atmosphere, a solution of Di-*tert*-butyl-dicarbonate (2.4 mg, 11.0 μmol) in THF (0.25 mL) was added to a stirred solution of **19** (5.6 mg, 11.0 μmol) in THF (0.25 mL) at 0 $^{\circ}\text{C}$. After stirred for 3.5 h at 0 $^{\circ}\text{C}$, the reaction mixture was diluted with AcOEt and washed with H_2O and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 2 / 1) to afford **7** (7.0 mg, 11.0 μmol , quant.) as a colorless oil.

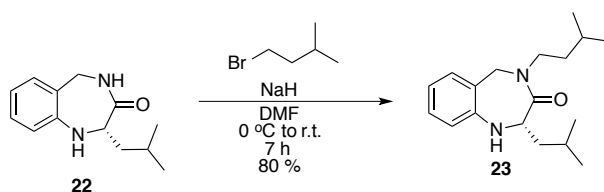
(*S*)-1,2,4,5-Tetrahydro-2-(2-methylpropyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **22**



Under Ar atmosphere, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (104 mg, 100 μmol), (*R*)-BINAP (139 mg, 223 μmol) and cesium carbonate (3.61 g, 11.1 mmol) were successively added to a solution of 2-Bromobenzonitrile (1.08 g, 5.95 mmol) and L-Leucine Methyl ester Hydrochloride (1.44 g, 7.97 mmol) in toluene (11 mL). After stirred for 4 h at 110 $^{\circ}\text{C}$, the reaction mixture was quenched with H_2O and extracted AcOEt. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 1 / 0 to 20 / 1) to afford mixture of desired compound and by-product (306 mg, pale yellow oil). This mixture was used for next step without further purification. In next step, under Ar atmosphere, the H_2O suspension of RaNi (TCl: 1.5 mL) was added to a solution of the mixture in MeOH / Et_3N (MeOH 12 mL and Et_3N 1.2 mL). Then Ar atmosphere was substituted by H_2 . After stirred for 24 h at r.t., the reaction mixture was filtrated with Celite and concentrated. Then MeOH was added to the resulting residue and the

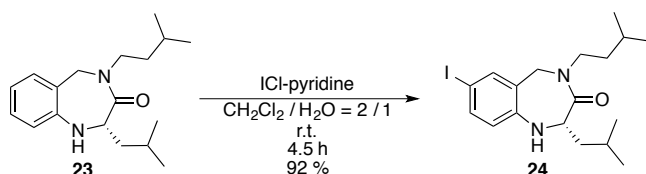
resulting mixture was concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 1 / 1 to 2 / 1) to afford **22** (241 mg, 1.10 mmol, 19 % (2steps)) as a white solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.07 (dd, J = 8.0, 7.3 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.67 (dd, J = 8.0, 7.3 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.83-6.31 (m, 1H), 5.01 (dd, J = 16.0, 5.5 Hz, 1H), 4.50-4.41 (m, 1H), 3.90 (dd, J = 16.0, 6.7 Hz, 1H), 3.58-3.42 (m, 1H), 1.92-1.79 (m, 2H), 1.55-1.47 (m, 1H), 0.99 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.8 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 218 (M^+), 219 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ 218.1419, found 218.1419 (M) $^+$. m.p. 124-126 $^\circ\text{C}$

(S)-1,2,4,5-Tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **23**



Under Ar atmosphere, NaH (10.2 mg, 425 μmol) was added to a solution of **22** (36.6 mg, 168 μmol) in DMF (2 mL) at 0 $^\circ\text{C}$. After stirred 15 min at r.t., 1-Bromo-3-methylbutane (23.2 μL , 184 μmol) was added to the reaction mixture at 0 $^\circ\text{C}$. After stirred 7 h at r.t., the reaction mixture was quenched with H_2O and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 1: 0 to 5 : 1) to afford **23** (39.0 mg, 135 μmol , 80 %) as white needle crystal. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.05 (dd, J = 7.3, 6.7 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 6.62 (dd, J = 8.0, 7.3 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.37 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 4.53 (td, J = 6.8, 6.4 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.57-3.43 (m, 3H), 1.94-1.88 (m, 1H), 1.86-1.77 (m, 1H), 1.52-1.31 (m, 4H), 0.97 (d, J = 5.5 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 288 (M^+), 289 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$ 288.2202, found 288.2206 (M) $^+$. m.p. 85 $^\circ\text{C}$

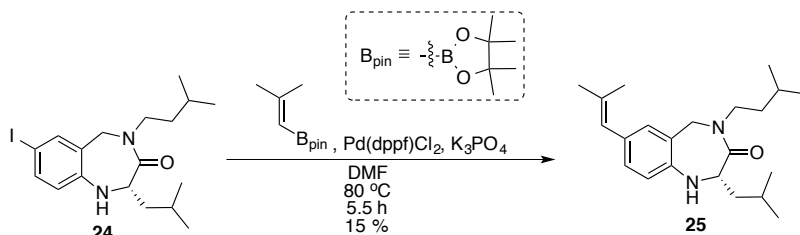
(S)-1,2,4,5-Tetrahydro-7-iodo-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **24**



ICl-pyridine complex (36.5 mg, 151 μmol) was added to a solution of **23** (39.0 mg, 135 μmol) in CH_2Cl_2 / H_2O (CH_2Cl_2 3.6 mL and H_2O 1.8 mL). After stirred 4.5 h at r.t., the reaction mixture was quenched with Sat. NaHCO_3 aq (3 mL) and 21 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ aq (3 mL). After identification of solution color change (brown to pale yellow), the reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 1 / 0 to 6 / 1) to afford **24** (51.4 mg, 124 μmol , 92 %) as white solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.28 (dd, J = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.29 (d, J =

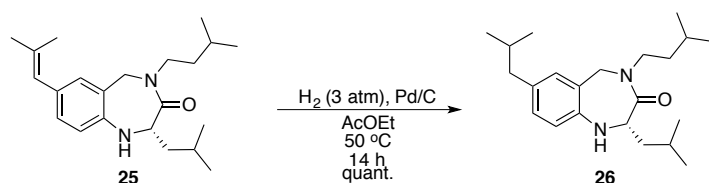
16.8 Hz, 1H), 4.58-4.54 (m, 1H), 3.68 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.55-3.53 (m, 1H), 3.51-3.47 (m, 2H), 1.93-1.87 (m, 1H), 1.83-1.74 (m, 1H), 1.51-1.31 (m, 4H), 0.96 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 414 (M^+), 415 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{18}H_{27}IN_2O$ 414.1168, found 414.1163 (M) $^+$. m.p. 94-96 °C

(S)-1,2,4,5-Tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-7-(2-methylprop-1-enyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **25**



Under Ar atmosphere, K_3PO_4 (55.2 mg, 260 μ mol), $Pd(dppf)Cl_2$ (6.1 mg, 8.3 μ mol) and 2-Methyl-1-propenyl boronic acid pinacol ester (15.6 μ L, 76.4 μ mol) were added to a solution of **24** (26.4 mg, 63.7 μ mol) in DMF (0.65 mL). After stirred 5.5 h at 80 °C, the reaction mixture was quenched with H_2O and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 1/0 to 6/1) to afford almost pure mixture. Then the mixture was purified by 1st PTLC (hexane / AcOEt = 2: 1) and 2nd PTLC (hexane / AcOEt = 6/1 (2 times)) to afford **25** (3.4 mg, 9.9 μ mol, 15%) as a white solid. 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.94 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.36 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 4.59-4.54 (m, 1H), 3.73 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.57-3.42 (m, 3H), 1.93-1.86 (m, 1H), 1.86 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.83-1.76 (m, 1H), 1.52-1.32 (m, 4H), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 342 (M^+), 343 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{22}H_{34}N_2O$ 342.2671, found 342.2666 (M) $^+$. m.p. 112-113 °C

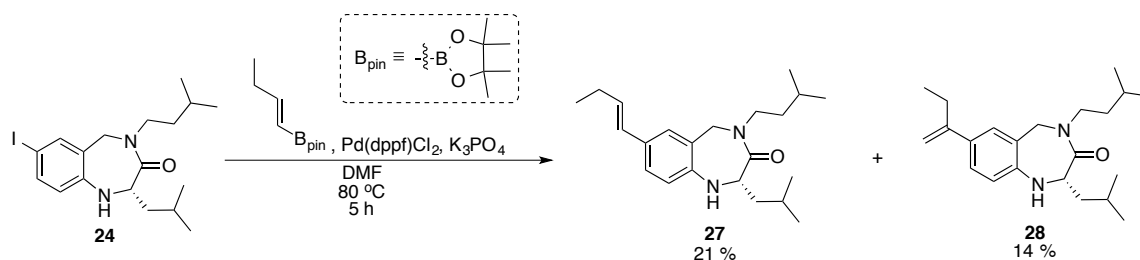
(S)-1,2,4,5-Tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2,7-di(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **26**



Under Ar atmosphere using a pressure tight flask, 10 % Pd/C (6.5 mg) was added to a solution of **25** (2.0 mg, 5.80 μ mol) in AcOEt (6 mL). Then Ar atmosphere was substituted by H_2 (0.3 atm). After stirred 14 h at 50 °C, the reaction mixture was filtrated with Celite and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 6/1 (2 times)) to afford quantitative **26** as white solid. 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.83 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.35 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 4.58-4.52 (m, 1H), 3.73 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 3.62-3.56 (m,

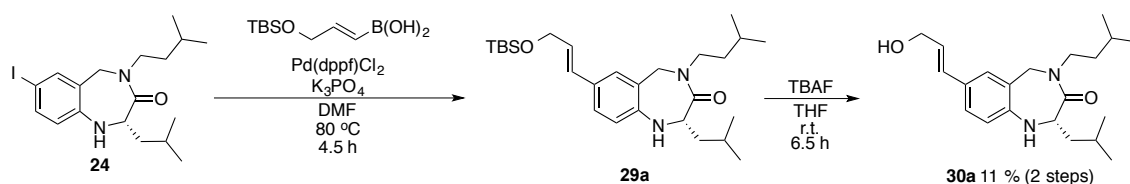
1H), 3.44-3.37 (m, 2H), 2.36-2.28 (m, 2H), 1.93-1.86 (m, 1H), 1.84-1.73 (m, 2H), 1.49-1.32 (m, 4H), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 344(M^+), 345 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{22}H_{36}N_2O$ 344.2828, found 344.2827 (M) $^+$. m.p. 103-105 °C

(*S,E*)-7-(But-1-enyl)-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **27** and
(*S*)-7-(But-1-en-2-yl)-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **28**



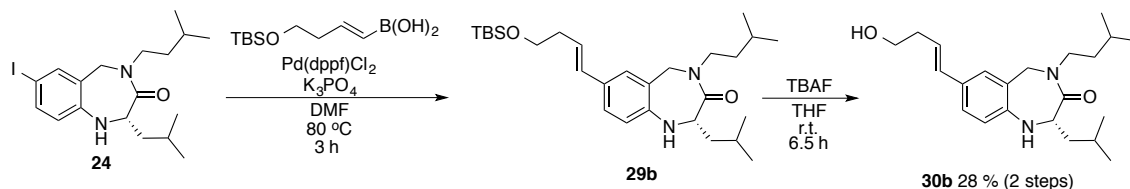
Under Ar atmosphere, K_3PO_4 (40.7 mg, 145 μ mol), $Pd(dppf)Cl_2$ (6.1 mg, 8.3 μ mol) and (*E*)-buten-1-ylboronic acid pinacol ester (39.4 mg, 216 μ mol) were added to a solution of **24** (21.3 mg, 51.4 μ mol) in DMF (0.5 mL). After stirred 5 h at 80 °C, the reaction mixture was quenched with H_2O and brine, then extracted with AcOEt. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated. Firstly, the resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 6 / 1) to afford mixture. Secondly, the mixture was purified by PTLC (NH plate) (hexane / AcOEt = 2 : 1) to afford mixture. Finally, the mixture was purified by HPLC with Sensyu Pak PEGASIL ODS (20 ϕ x 250 mm) (CH_3CN / H_2O = 85 : 15) to afford **27** (3.7 mg, 10.8 μ mol, 21%) as a yellow oil and **28** (2.5 mg, 7.30 μ mol, 14 %) as a yellow oil. Compound **27**; 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.07 (dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.22 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.05 (td, $J = 15.9, 6.1$ Hz, 1H) 5.34 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 4.59-4.53 (m, 1H), 3.74 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.54-3.44 (m, 3H), 2.23-2.15 (m, 2H), 1.94-1.87 (m, 1H), 1.85-1.76 (m, 1H), 1.57-1.33 (m, 4H), 1.07 (t, $J = 7.9$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 5.5$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 342 (M^+), 343 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{22}H_{34}N_2O$ 342.2671, found 342.2673 (M) $^+$. Compound **28**; 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.14 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.38 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.92-4.91 (m, 1H), 4.62-4.57 (m, 1H), 3.77 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.59-3.44 (m, 3H), 2.48-2.42 (m, 2H), 1.94-1.88 (m, 1H), 1.85-1.75 (m, 1H), 1.50-1.35 (m, 4H), 1.09 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 342 (M^+), 343 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{22}H_{34}N_2O$ 342.2671, found 342.2673 (M) $^+$

(S)-1,2,4,5-Tetrahydro-7-(3-hydroxyprop-1-enyl)-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **30a**



Under Ar atmosphere, K_3PO_4 (69.9 mg, 329 μmol), $Pd(dppf)Cl_2$ (9.6 mg, 13.1 μmol) and (E)-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)prop-1-enylboronic acid (**34a**) (34.6 mg, 160 μmol) were added to a solution of **24** (39.8 mg, 96.1 μmol) in DMF (1 mL). After stirred 4.5 h at 80 °C, the reaction mixture was quenched with brine and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 1 / 0 to 6 / 1) to afford mixture of **29a**. Then the mixture was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 4 : 1 x 2nd times) to afford almost pure **29a** (13.8 mg) as yellow oil. This mixture was used for next reaction without further purification. In the next step, under Ar atmosphere, an 1.0 M solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in THF (18 μL , 18 μmol) was added to a stirred solution of almost pure **29a** (7.1 mg) in THF (0.5 mL). After stirred 3.5 h, the reaction mixture was quenched with H_2O and brine, and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 1 : 1) to afford **30a** (1.8 mg, 5.23 μmol , 11 %, 2 steps) as a colorless oil. 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.11 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.61 (td, J = 15.9, 6.1 Hz, 1H), 5.36 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 4.62-4.57 (m, 1H), 4.30-4.26 (m, 2H), 3.75 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.60-3.58 (m, 1H), 3.55-3.46 (m, 2H), 1.95-1.88 (m, 1H), 1.85-1.75 (m, 1H), 1.51-1.42 (m, 2H), 1.42-1.33 (m, 2H), 0.97 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 344 (M^+), 345 ($M+H$)⁺. HRMS (FAB) calcd for $C_{21}H_{32}N_2O_2$ 344.2464, found 344.2466 (M)⁺

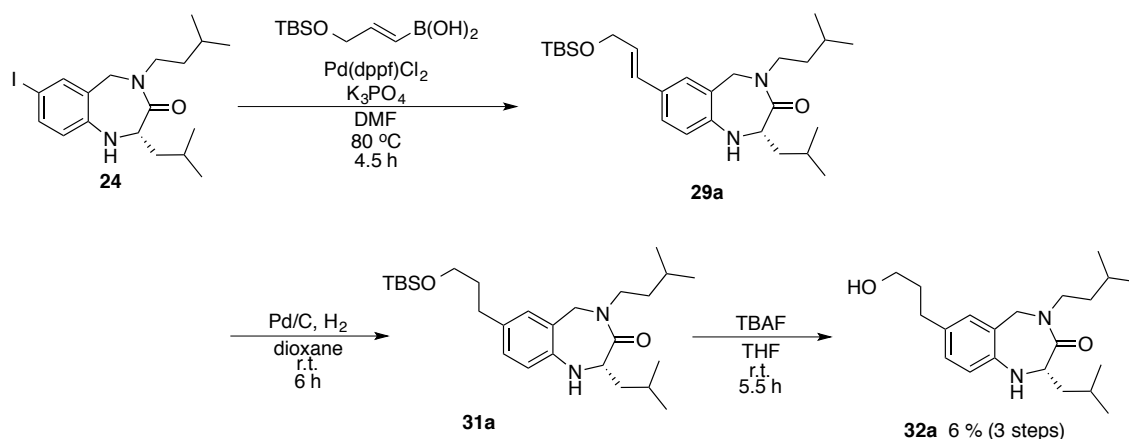
(S)-1,2,4,5-Tetrahydro-7-(4-hydroxybut-1-enyl)-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **30b**



Under Ar atmosphere, K_3PO_4 (21.7 mg, 102 μmol), $Pd(dppf)Cl_2$ (6.2 mg, 8.5 μmol) and (E)-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)but-1-enylboronic acid (**34b**) (26.5 mg, 115 μmol) were added to a solution of **24** (12.2 mg, 29.4 μmol) in DMF (300 μL). After stirred 3 h at 80 °C, the reaction mixture was quenched with H_2O and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H_2O , dried over $MgSO_4$ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 1 / 0 to 6 / 1) to afford mixture of **29b** (7.9 mg) as a yellow oil. This mixture was used for next reaction without further purification. In the next step, under Ar atmosphere, an 1.0 M

solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in THF (17 μ L, 17 μ mol) was added to a stirred solution of almost pure **29b** (7.1 mg) in THF (0.5 mL). After stirred 3 h, an 1.0 M solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in THF (8.5 μ L, 8.5 μ mol) was added to the reaction mixture because the starting material was not vanished by monitoring the reaction with TLC. After stirred 3.5 h, the reaction mixture was quenched with H₂O, and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 1 / 1) to afford **30d** (2.9 mg, 8.09 μ mol, 28 %, 2 steps) as a colorless oil. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.97 (td, *J* = 7.3, 15.9 Hz, 1H), 5.34 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.61-4.54 (m, 1H), 3.75-3.70 (m, 2H), 3.74 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.56-3.53 (m, 1H), 3.52-3.46 (m, 2H), 2.45 (dd, *J* = 7.3, 6.7 Hz, 2H), 1.94-1.87 (m, 1H), 1.85-1.75 (m, 1H), 1.52-1.34 (m, 4H), 0.97 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) *m/z* 358 (M⁺), 359 (M+H)⁺. HRMS (FAB) calcd for C₂₂H₃₄N₂O₂ 358.2620 found 358.2623 (M)⁺

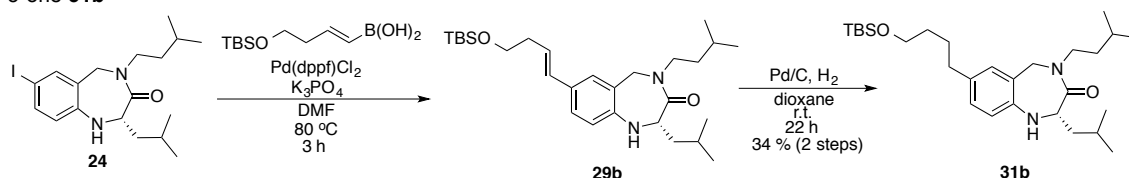
(*S*)-1,2,4,5-Tetrahydro-7-(3-hydroxypropyl)-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **32a**



Refer to the protocol of compound **29a** about Suzuki coupling. In the next step, 10 % Pd/C (2.0 mg) was added to a stirred solution of almost pure **29a** (7.9 mg) in dioxane (0.7 mL). After stirred 6 h at r.t., the reaction mixture was filtrated with Celite and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 4 : 1) to afford almost pure **31a** (4.9 mg). This mixture was used next reaction without any further purification. In the next step, under Ar atmosphere, an 1.0 M solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in THF (13 μ L, 13 μ mol) was added to a stirred solution of almost pure **31a** (4.9 mg) in THF (0.5 mL). After stirred at r.t., the reaction mixture was quenched with H₂O and brine, and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 1 / 1) to afford mixture of **32a**. This mixture was purified by PTLC (hexane : AcOEt = 1 : 1) to afford **32a** (1.2 mg, 3.5 μ mol, 6% (3 steps)) as a colorless oil. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 6.89 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 5.34 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.56-4.53 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.68-3.64 (m, 2H), 3.57-3.41 (m, 3H), 1.92-1.85 (m, 1H), 1.84-1.76 (m, 3H), 1.50-1.42 (m, 2H), 1.41-1.34 (m, 2H), 0.97 (d,

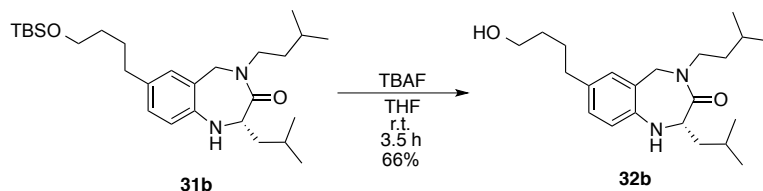
$J = 6.1$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 346 (M^+), 347 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{21}H_{34}N_2O_2$ 346.2620, found 346.2620 (M) $^+$

(S)-1,2,4,5-Tetrahydro-7-{4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)butyl}-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **31b**



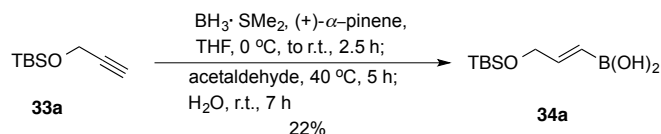
Refer to the protocol of compound **29d** about Suzuki coupling. **29b** (39.1 mg, 94.4 μ mol) was used. In the next step, 10 % Pd/C (2.8 mg) was added to a stirred solution of mixture of **29b** (22.3 mg) in dioxane (2 mL). After stirred 22 h at r.t., the reaction mixture was filtrated with Celite and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 4 / 1 x 2 times) to afford **31b** (15.2 mg, 32.0 μ mol, 34 %, 2 steps). 1 H-NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.87 (dd, $J = 8.2$, 1.9 Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.33 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 4.56-4.51 (m, 1H), 3.73 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.61 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.56-3.43 (m, 2H), 3.41-3.39 (m, 1H), 2.48 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.92-1.86 (m, 1H), 1.84-1.77 (m, 1H), 1.61-1.50 (m, 4H), 1.48-1.41 (m, 2H), 1.40-1.33 (m, 2H), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 5.5$ Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.89 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.04 (s, 6Ha). MS (FAB) m/z 474 (M^+), 475 ($M+H$) $^+$

(S)-1,2,4,5-Tetrahydro-7-(4-hydroxybutyl)-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **32b**



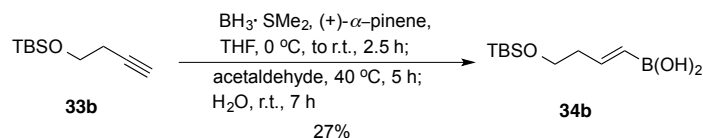
Under Ar atmosphere, an 1.0 M solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in THF (12 μ L, 12 μ mol) was added to a stirred solution of **31b** (5.6 mg, 11.8 μ mol) in THF (120 μ L). After stirred 5 h at 0 $^{\circ}$ C, an 1.0 M solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in THF (6 μ L, 6 μ mol) and THF (0.5 mL) were added to the reaction mixture and the reaction mixture was warmed to r.t., because the starting material was not vanished by monitoring the reaction with TLC. After stirred 3.5 h at r.t., the reaction mixture was quenched with H_2O , and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 1 / 1) to afford **32b** (2.8 mg, 7.8 μ mol, 66 %) as colorless oil. 1 H-NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.87 (dd, $J = 7.9$, 1.8 Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 4.57-4.52 (m, 1H), 3.73 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.67-3.64 (m, 2H), 3.56-3.44 (m, 2H), 3.42-3.38 (m, 1H), 2.50 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.92-1.86 (m, 1H), 1.85-1.75 (m, 1H), 1.67-1.54 (m, 4H), 1.50-1.41 (m, 2H), 1.41-1.32 (m, 2H), 0.96 (d, $J = 5.5$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 360 (M^+), 361 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{22}H_{36}N_2O_2$ 360.2777, found 360.2773 (M) $^+$

(*E*)-3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)prop-1-enylboronic acid **34a**



A bomb flask was charged with THF (6.3 mL) and $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ (1.1 mL, 11.6 mmol) at 0 °C, then (+)- α -pinene (3.5 mL, 22.1 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at 0 °C for 5 minutes then allowed to warm to r.t. and stirred at r.t. for 3 h, during which time a white precipitate formed. The solution was then recooled to 0 °C and *tert*-butyldimethyl(prop-2-ynyl)silane (**33a**) (2.0 mL, 9.86 mmol) was added the reaction resulting in a clear, colorless solution. The flask was then sealed with a Teflon screw cap and was stirred at 0 °C for 5 minutes, warmed to r.t., and stirred at r.t. for 2.5 h. The solution was recooled to 0 °C and acetaldehyde (7 mL, 126 mmol) was added to the reaction. The bomb flask was resealed with the Teflon screw cap and the reaction was stirred at 40 °C for 5 h. Then H_2O (2.5 mL) was added to the reaction mixture at 0 °C. After stirring for 7 h at r.t., the reaction was quenched with AcOEt, dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 3 / 1 to 2 / 1) to afford **34a** (467 mg, 2.16 mmol, 22 %) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 6.57 (td, J = 17.7, 3.7 Hz, 1H), 5.87 (td, J = 17.7, 1.8 Hz, 1H), 4.26 (dd, J = 3.7, 1.8 Hz, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.04 (s, 6H). MS (FAB) not detected.

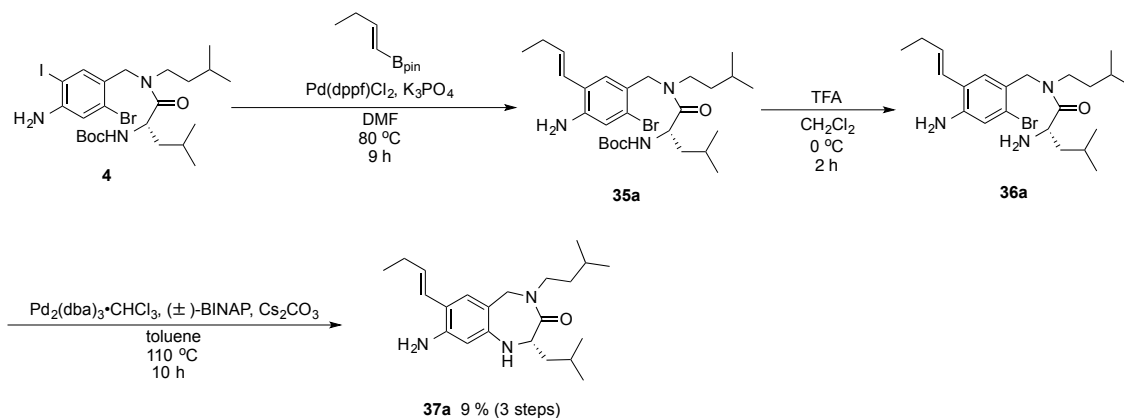
(*E*)-4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)but-1-enylboronic acid **34b**



A bomb flask was charged with THF (6.3 mL) and $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ (1.1 mL, 11.6 mmol) at 0 °C, then (+)- α -pinene (3.5 mL, 22.1 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at 0 °C for 5 minutes then allowed to warm to r.t. and stirred at r.t. for 3 h, during which time a white precipitate formed. The solution was then recooled to 0 °C and (but-3-ynyl)(*tert*-butyl)dimethylsilane (**33b**) (2.1 mL, 10.1 mmol) was added the reaction resulting in a clear, colorless solution. The flask was then sealed with a Teflon screw cap and was stirred at 0 °C for 5 minutes, warmed to r.t., and stirred at r.t. for 2.5 h. The solution was recooled to 0 °C and acetaldehyde (7 mL, 126 mmol) was added to the reaction. The bomb flask was resealed with the Teflon screw cap and the reaction was stirred at 40 °C for 5 h. Then H_2O (2.5 mL) was added to the reaction mixture at 0 °C. After stirring for 7 h at r.t., the reaction was quenched with AcOEt, dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 3 / 1 to 2 / 1) to afford **34b** (638 mg, 2.77 mmol, 27 %) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 6.54 (td, J = 17.3, 3.7 Hz, 1H), 5.64 (d, J = 17.3 Hz, 1H), 3.71 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.36 (td, J = 6.7, 6.1 Hz, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H). MS (FAB) not detected.

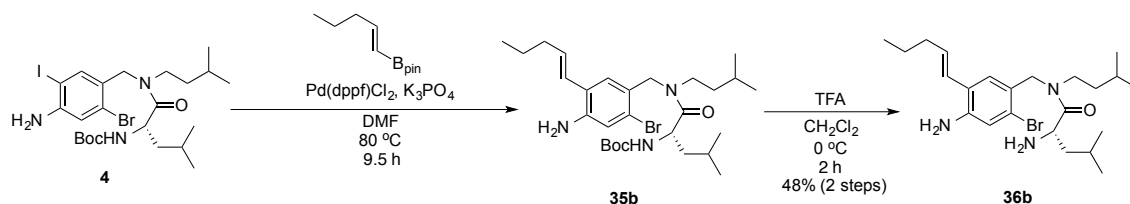
(*S,E*)-8-Amino-7-(but-1-enyl)-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-1,2,4,5-tetrahydrohydro-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one

37a



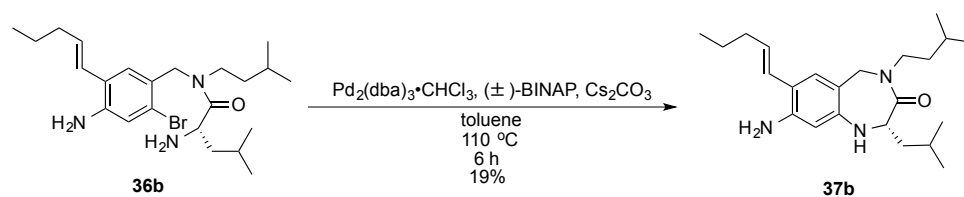
Under Ar atmosphere, [1'1-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium (II) (30.2 mg, 41.3 μmol) was added to a solution of **4** (204 mg, 335 μmol), **41** (58.3 mg, 320 μmol) and Tripotassium phosphate (208 mg, 980 μmol) in DMF (3.3 mL). After stirred for 9 h at 80 °C, the reaction mixture was quenched with H₂O and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 4 / 1) to afford almost pure **35a** (99.8 mg) as blown oil. Then, Trifluoroacetic acid (2.0 mL, 26.9 mmol) was added to a solution almost pure **36a** (99.8 mg) in CH₂Cl₂ (2 mL) at 0 °C. After stirred for 2 h at 0 °C, the reaction mixture was adjusted its pH to pH 10 with 2 N NaOH aq and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue (78.3 mg) was used for next reaction without any purification. In the next step, under Ar atmosphere, tris(dibenzylidenacetone)dipalladium(0)-chloroform (20.8 mg, 20.1 μmol) was added to a solution of the resulting residue (78.3 mg), (\pm)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (26.9 mg, 43.2 μmol), and Cesium carbonate (295 mg, 905 μmol) in toluene (6 mL). After stirred for 10 h at 110 °C, the reaction mixture was quenched with Sat. NaHCO₃ aq and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting mixture was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 2 / 1) to afford yellow oil (24.3 mg). Then, part of this oil (15.7 mg) was purified by HPLC (Senshu Pak (ODS), CH₃CN / H₂O = 8 / 2, r.t., 5 mL / min, 30.5–34.5 min) to afford **37a** (10.9 mg, 30.5 μmol , 9 % (3 steps)) as a white solid. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 6.80 (s, 1H), 6.26 (td, *J* = 1.3, 15.9 Hz, 1H), 5.94 (td, *J* = 6.7, 15.9 Hz, 1H), 5.82 (s, 1H), 5.24(d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.54–4.49 (m, 1H), 3.68 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.65–3.55 (m, 2H), 3.55–3.47 (m, 1H), 3.47–3.40 (m, 1H), 3.40–3.38 (m, 1H), 2.24–2.16 (m, 4H), 1.91–1.85 (m, 1H), 1.81–1.76 (m, 1H), 1.52–1.36 (m, 4H), 1.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.89 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H). MS (FAB) *m/z* 357 (M⁺), 358 (M+H)⁺. HRMS (FAB) calcd for C₂₂H₃₅N₃O 357.2780, found 357.2776 (M)⁺

(*S,E*)-2-Amino-*N*-(4-amino-2-bromo-5-(pent-1-enyl)benzyl)-*N*-(3-methylbutyl)-4-methylpentanamide **36b**



Under Ar atmosphere, [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium (II) (34 mg, 46.5 μ mol) was added to a solution of **4** (206 mg, 338 μ mol), *trans*-1-Penten-1-ylboronic acid pinacol ester (641 mg, 327 μ mol) and Tripotassium phosphate (220 mg, 1036 μ mol) in DMF (1 mL). After stirred for 9.5 h at 80 °C, the reaction mixture was quenched with H₂O and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 3 / 1) to afford blown oil (129 mg). But this oil had some impurity and was used for next reaction without further purification. In the next reaction, Trifluoroacetic acid (2.5 mL, 33.7 mmol) was added to a solution of blown oil (129 mg) in CH₂Cl₂ (2.5 mL) at 0 °C. After stirred for 2 h at 0 °C, the reaction mixture was adjusted its pH to pH 11 with 2 N NaOH aq and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (CHCl₃ / MeOH = 10 / 1) to afford **36b** (73 mg, 161 μ mol, 48 % (2 steps)) as a yellow oil. There were rotamers and rotameres population was 0.5 : 0.5 (determined by ¹H-NMR) ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 7.04 (s, 0.5H), 6.90 (s, 0.5H), 6.88 (s, 0.5H), 6.85 (s, 0.5H), 6.26 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.00 (td, *J* = 6.7, 15.6 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 15.0 Hz, 0.5H), 4.50 (d, *J* = 17.1 Hz, 0.5H), 4.37 (d, *J* = 17.1 Hz, 0.5H), 4.27 (d, *J* = 15.0 Hz, 0.5H), 3.78-3.68 (m, 3H), 2.20-2.15 (m, 2H), 1.49-1.34 (m, 8H), 0.96-0.89 (m, 12 H), 0.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 1.5H), 0.84 (d, *J* = 6.7 Hz, 1.5 H). MS (FAB) *m/z* 452, 454 (M+H)⁺.

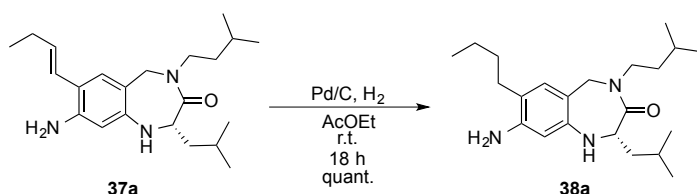
(*S,E*)-8-Amino-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-1,2,4,5-tetrahydro-7-(pent-1-enyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **37b**



Under Ar atmosphere, Tris(dibenzylidenacetone)dipalladium(0)-chloroform (30.1 mg, 29.1 μ mol) was added to a solution of **36b** (73 mg, 161 μ mol), (±)-2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphtyl (24.6 mg, 39.5 μ mol), and Cesium carbonate (300 mg, 923 μ mol) in toluene (2.5 mL). After stirred for 6 h at 110 °C, the reaction mixture was quenched with H₂O and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting mixture was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 2 / 1), PTLC (hexane / AcOEt = 3 / 2) and PTLC (hexane / AcOEt = 2 / 1) to afford **37b** (11.3 mg, 30.4 μ mol, 19 %) as yellow oil. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 6.80 (s, 1H), 6.26 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 5.89 (td, *J* = 15.6, 6.4 Hz, 1H), 5.82 (s, 1H), 5.24 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.53-4.50 (m, 1H), 3.65-3.55 (m,

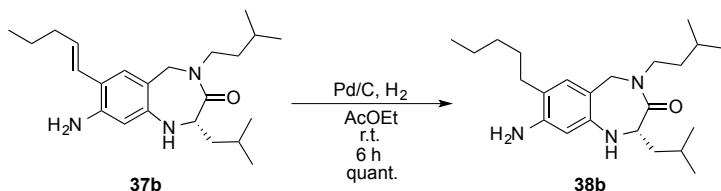
2H), 3.55-3.47 (m, 1H), 3.47-3.40 (m, 2H), 2.16 (td, $J = 7.4, 6.4$ Hz, 2H), 1.90-1.85 (m, 1H), 1.82-1.74 (m, 1H), 1.53-1.34 (m, 6H), 0.96-0.93 (m, 9H), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 371 (M^+), 372 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{23}H_{27}N_3O$ 371.2937, found 379.2937 (M) $^+$

(*S,E*)-8-Amino-7-butyl-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-1,2,4,5-tetrahydrohydro-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **38a**



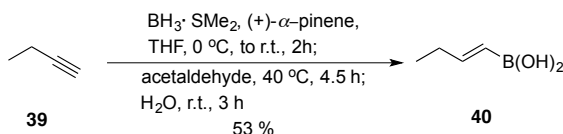
Under Ar atmosphere, 10 % Pd/C (7.7 mg) was added to a stirred solution of **37a** (7.6 mg, 21.3 μmol) in AcOEt (2 mL). Then Ar atmosphere was substituted by H_2 . After stirred strongly for 18 h at r.t., the reaction mixture was filtered with Celite and concentrated to afford pure **38a** in quantitative yield as a yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.57 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.24 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 4.52-4.48 (m, 1H), 3.65 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.54-3.40 (m, 4H), 3.33-3.26 (m, 1H), 2.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.90-1.82 (m, 1H), 1.82-1.74 (m, 1H), 1.54-1.32 (m, 8H), 0.97-0.91 (m, 9H), 0.89 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 359 (M^+), 360 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{22}H_{37}N_3O$ 359.2937, found 359.2934 (M) $^+$

(*S,E*)-8-Amino-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-1,2,4,5-tetrahydrohydro-7-pentyl-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **38b**



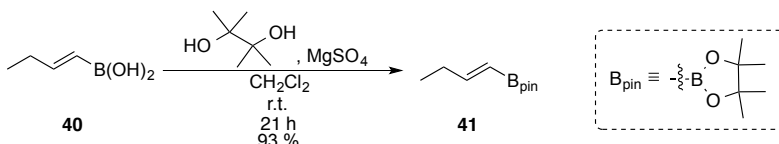
Under Ar atmosphere, 10 % Pd/C (2 mg) was added to a stirred solution of **37b** (8.3 mg, 22.3 μmol) in AcOEt (2 mL). Then Ar atmosphere was substituted by H_2 . After stirred strongly for 6 h at r.t., the reaction mixture was filtered with Celite and concentrated to afford pure **38b** in quantitative yield as a yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.57 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.25 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 4.50 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.65 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 3.52-3.42 (m, 4H), 3.35-3.25 (m, 1H), 2.36 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.89-1.84 (m, 1H), 1.81-1.75 (m, 1H), 1.56-1.30 (m, 10H), 0.96-0.93 (m, 6H), 0.91-0.88 (m, 6H), 0.83 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 373 (M^+), 374 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{23}H_{39}N_3O$ 373.3093, found 373.3089 (M) $^+$

(*E*)-But-1-enylboronic acid **40** (*J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 466)



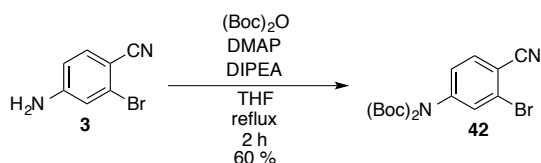
A bomb flask was charged with THF (11 mL) and $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ (1.8 mL, 19.4 mmol) at 0 °C, then (+)- α -pinene (6.8 mL, 42.9 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at 0 °C for 10 minutes then allowed to warm to r.t. and stirred at r.t. for 2 h, during which time a white precipitate formed. The solution was then recooled to 0 °C and an excess of 1-butyne (**39**) was condensed into the reaction via a cannula resulting in a clear, colorless solution. The flask was then sealed with a Teflon screw cap and was stirred at 0 °C for 30 minutes, warmed to r.t., and stirred at r.t. for 1.5 h. The solution was separated into two bomb flask and recooled to 0 °C and acetaldehyde (10.4 mL, 185 mmol, 9.5 eq.) was added. The bomb flask was resealed with the Teflon screw cap and the reaction was stirred at 40 °C for 4.5 h. The reaction was allowed to cool to 0 °C and air was blown to the reaction to remove acetaldehyde, then H_2O was added to the reaction mixture. After stirring for 3 h at r.t., the solution was diluted with EtOAc and the resulting mixture was extracted with 10% NaOH aq (2 x 10 mL). The combined aqueous extractions were acidified to pH 2 with concentrated HCl aq. The acidified aqueous layer was then extracted with EtOAc (3 x 30 mL), and the combined organic extracts were washed with sat. NaHCO_3 aq, dried over MgSO_4 , and concentrated to afford **40** (1.03 g, 10.3 mmol, 53%) as a colorless solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 / D_2O = 95 / 5) δ 6.46 (td, J = 17.6, 6.1 Hz, 1H), 5.28 (td, J = 17.6, 1.8 Hz, 1H), 2.09-2.01 (m, 2H), 0.93 (t, J = 7.3 Hz, 3H). MS (FAB) not detected.

(*E*)-Buten-1-ylboronic acid pinacol ester **41**



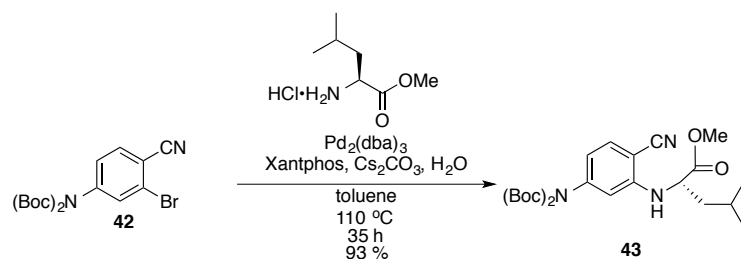
40 (217 mg, 2.17 mmol) and MgSO_4 (0.63 g, 5.23 mmol) was added to a solution of pinacol (237 mg, 2.00 mmol) in CH_2Cl_2 (6 mL). After stirred for 21 h at r.t., the reaction mixture was filtered and concentrated to afford pure **41** (338 mg, 1.86 mmol, 93 %) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.70 (td, J = 18.0, 6.1 Hz, 1H), 5.43 (td, J = 18.0, 1.9 Hz, 1H), 2.20-2.14 (m, 2H), 1.26 (s, 12 H), 1.02 (t, J = 7.3 Hz, 3H). MS (FAB) not detected.

tert-Butyl(*tert*-butoxycarbonyl)(3-bromo-4-cyanophenyl)carbamate **42**



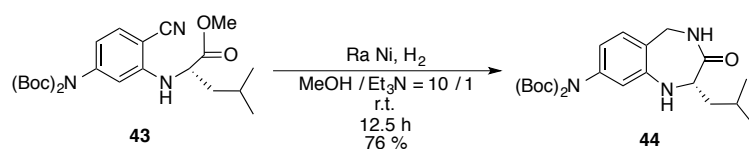
Di-*tert*-butyl Dicarbonate (24.6 g, 113 mmol) in THF (75 mL), 4-Dimethylaminopyridine (532 mg, 4.35 mmol) and Diisopropylethylamine (35 mL, 201 mmol) were added to a solution of **3** (7.7 g, 39.1 mmol) at 0 °C. After refluxed 2 h, the reaction mixture was cooled to r.t., concentrated (to about 30 mL). Then the mixture was quenched with H₂O and brine, and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting residue was recrystlized (from hexane / AcOEt) to afford **9** (8.40 g, 21.1 mmol, 54 %) as white cubic crystal. Then, the mother water was concentrated and purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 6 / 1) to afford mixture of **42**. The mixture was reprecipitation (from EtOH) to afford pure **42** (899 mg, 2.26 mmol, 6 %) as a white solid. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 7.57 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 1.45 (s, 18H). MS (FAB) *m/z* 397, 399 (M⁺)

(*S*)-Methyl 2-(5-(bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-cyanophenylamino)-4-methylpentanoate **43**



42 (2.00 g, 5.03 mmol), L-Leucine methyl ester hydrochloride (1.09 g, 6.04 mmol), Pd₂(dba)₃ (260 mg, 252 μmol), Xantphos (437 mg, 755 μmol) and cesium carbonate (3.28 g, 10.1 mmol) were succeedingly added to a flask. The atmosphere was substituted by Ar, toluene (50 mL) was added to the flask. After stirred 14 h at 110 °C, H₂O (20 μL) was added to the reaction and the reaction mixture was stirred for 19 h at 110 °C. The reaction mixture was quenched with brine and H₂O, and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over Na₂SO₄, and concentrated. The resulting residue was purified by amino silica gel chromatography (NH-SiO₂) (hexane / AcOEt = 5 / 1) to afford **43** (2.16 g, 4.68 mmol, 93 %) as faint yellow syrup. ¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 7.41 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.82-4.79 (m, 1H), 4.10-4.04 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 1.82-1.71 (m, 3H), 1.43 (s, 18 H), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) *m/z* 461 (M⁺)

(*S*)-8-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-(2-methylpropyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **44**

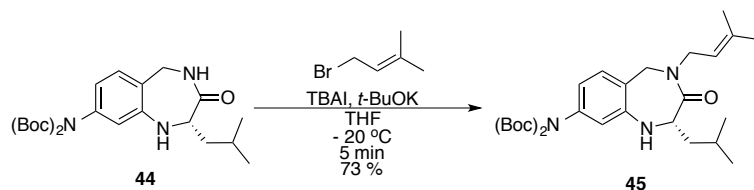


Under Ar atmosphere, the H₂O suspension of RaNi (TCI: 4 mL) was added to a solution of **43** (533 mg, 1.17 mmol) in MeOH / Et₃N (MeOH 40 mL and Et₃N 4 mL). Then Ar atmosphere was substituted by H₂. After stirred for 12.5 h at r.t., the reaction mixture was filtrated with Celite and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel

chromatography (hexene / AcOEt = 1 / 1 to 1 / 2) to afford **44** (449 mg, 1.01 mmol, 24 % (2steps)) as white solid.

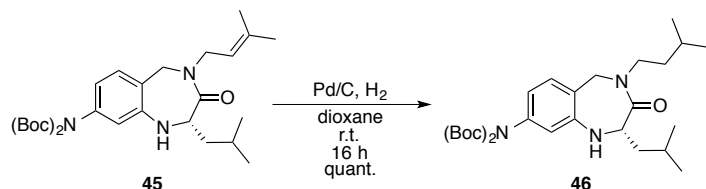
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.89 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.46 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 6.7, 6.1 Hz, 1H), 4.99 (dd, J = 16.5, 6.7 Hz, 1H), 4.48-4.43 (m, 1H), 3.89 (dd, J = 16.5, 6.7 Hz, 1H), 3.52-3.50 (m, 1H), 1.92-1.79 (m, 2H), 1.51-1.49 (m, 1H), 1.45 (s, 18H), 0.98 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 433 (M^+), 434 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(S)-8-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbut-2-enyl)-2-(2-methylpropyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **45**



Tetrabutylammonium iodide (331 mg, 895 μmol), 1-bromo-3-methyl-2-butene (103 μL , 895 μmol) and *t*-BuOK (108 mg, 0.964 μmol), were added to a solution of **44** (388 mg, 0.895 μmol) at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. After stirred 5 minutes at $-20\text{ }^\circ\text{C}$, the reaction mixture was quenched with H_2O and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 3 / 1 to 3 / 2) to afford **45** (328 mg, 654 μmol , 76 %) as colorless amorphous. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.40 (dd, J = 8.0, 1.9 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.21 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 5.09 (dd, J = 7.9, 6.7 Hz, 1H), 4.65-4.57 (m, 1H), 4.20 (dd, J = 14.7, 6.7 Hz, 1H), 3.99 (dd, J = 14.7, 6.7 Hz, 1H), 3.75 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.57-3.47 (m, 1H), 1.94-1.87 (m, 1H), 1.85-1.75 (m, 1H), 1.69 (s, 6H), 1.47-1.42 (m, 1H), 1.44 (s, 18H), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 501 (M^+), 502 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

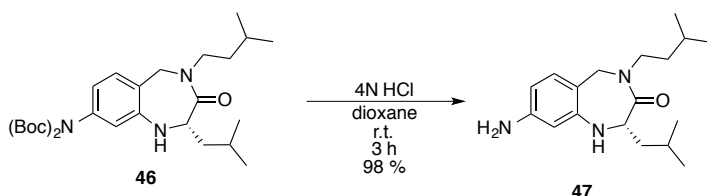
(S)-8-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3*H*-1,4-benzodiazepin-3-one **46**



Under Ar atmosphere, 10 % Pd/C (33 mg) was added to a solution of **45** (328 mg, 654 μmol) in dioxane (7 mL). Then Ar atmosphere was substituted by H_2 . After stirred 16 h at r.t., the reaction mixture was filtrated with Celite and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 3 / 1 to 1 / 1) to afford **46** in quantitative yield as colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.89 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.41 (dd, J = 8.0, 2.2 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.35 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 4.61-4.56 (m, 1H), 3.77 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 3.65-3.57 (m, 1H),

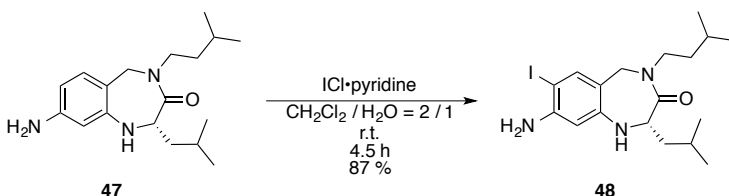
3.53-3.48 (m, 1H), 3.42-3.33 (m, 1H), 1.95-1.87 (m, 1H), 1.84-1.75 (m, 1H), 1.50-1.45 (m, 1H), 1.43 (s, 18H), 1.42-1.30 (m, 2H), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 503 (M^+), 504 ($M+H$) $^+$.

(S)-8-Amino-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **47**



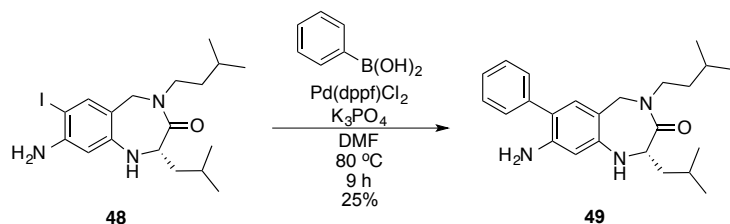
4 N HCl in dioxane (4 mL) was added to **46** (200 mg, 397 μ mol). After stirred 3 h at r.t., the reaction mixture was quenched with Sat. NaHCO_3 aq and extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (CHCl_3 / $\text{MeOH} = 20 / 1$) to afford **47** (118 mg, 389 μ mol, 98 %) as a white solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.99 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 5.84 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 5.25 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 4.57-4.51 (m, 1H), 3.65 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 3.56-3.41 (m, 4H), 3.41-3.38 (m, 1H), 1.92-1.85 (m, 1H), 1.83-1.74 (m, 1H), 1.54-1.31 (m, 4H), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 303 (M^+), 304 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}$ 303.2311, found 303.2306 (M) $^+$ m.p. 185-186 $^\circ\text{C}$

(S)-8-Amino-1,2,4,5-tetrahydro-7-iodo-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **48**



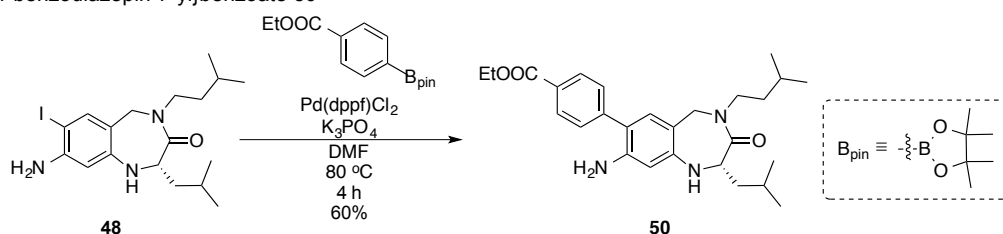
ICl-pyridine complex (1.4 mg, 5.80 μ mol) was added to a solution of **47** (2.3 mg, 7.58 μ mol) in CH_2Cl_2 / H_2O (CH_2Cl_2 202 μL and H_2O 101 μL). After stirred 6.5 h at r.t., the reaction mixture was quenched with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / $\text{AcOEt} = 1 / 1$) to afford **48** (2.4 mg, 5.59 μ mol, 74 %) as a white solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.14 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.20 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 4.53-4.49 (m, 1H), 3.92-3.85 (m, 2H), 3.16 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 3.52-3.41 (m, 3H), 1.91-1.85 (m, 1H), 1.82-1.72 (m, 1H), 1.53-1.33 (m, 4H), 0.96 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 5.5$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H). MS (FAB) m/z 429 (M^+), 430 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{IN}_3\text{O}$ 429.1277, found 429.1272. (M) $^+$ m.p. 150 $^\circ\text{C}$

(S)-8-Amino-1,2,4,5-tetrahydro-4-(3-methylbutyl)-2-(2-methylpropyl)-7-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-3-one **49**



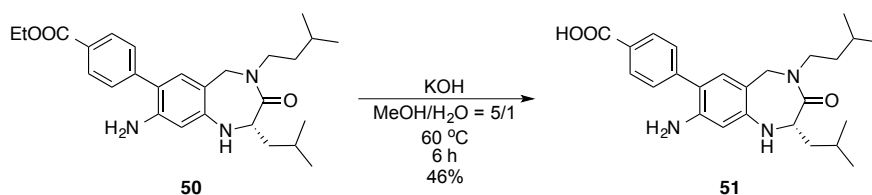
48 (21.8 mg, 50.8 μ mol), phenylboronic acid (7.5 mg, 61.5 μ mol) and K_3PO_4 (34.4 mg, 162 μ mol) were added to a flask, and the atmosphere was substituted by Ar. Then DMF (500 μ L) and $Pd(dppf)Cl_2$ (7.2 mg, 9.84 μ mol) were added to the flask. After stirred 10 h at 80 $^{\circ}C$, the reaction mixture was quenched with brine and H_2O , and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 2 / 1 to 3 / 2) to afford mixture of **49**. This mixture was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 3 / 2) to afford **49** (4.9 mg, 12.9 μ mol, 25 %) as a colorless oil. 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.43 (m, 4H), 7.32-7.28 (m, 1H), 6.71 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.29 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 4.60-4.55 (m, 1H), 3.72-3.63 (m, 2H), 3.69 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 3.52-3.45 (m, 1H), 1.93-1.87 (m, 1H), 1.84-1.76 (m, 1H), 1.52-1.44 (m, 2H), 1.43-1.34 (m, 2H), 0.98 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.1 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 379 (M^+), 380 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{24}H_{33}N_3O$ 379.2624, found 379.2621 (M) $^+$

(S)-Ethyl 4-{8-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-(2-methylpropyl)-4-(3-methylbutyl)-3-oxo-3H-1,4-benzodiazepin-7-yl}benzoate **50**



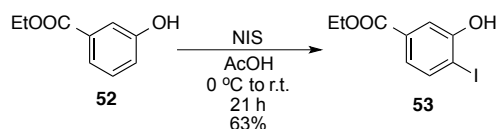
48 (49.0 mg, 114 μ mol), Ethyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoate (47.4 mg, 172 μ mol) and K_3PO_4 (73.2 mg, 345 μ mol) were added to a flask, and the atmosphere was substituted by Ar. Then DMF (1 mL) and $Pd(dppf)Cl_2$ (7.5 mg, 10.3 μ mol) were added to the flask. After stirred 4 h at 80 $^{\circ}C$, the reaction mixture was quenched with brine and H_2O , and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated. The residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 3 / 2) to afford **50** (31.0 mg, 68.7 μ mol, 60 %) as yellow oil. 1H -NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.08 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.49 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.73 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.29 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 4.61-4.56 (m, 1H), 4.40 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.72-3.68 (m, 3H), 3.55-3.52 (m, 1H), 3.50 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.94-1.87 (m, 1H), 1.84-1.78 (m, 1H), 1.52-1.43 (m, 2H), 1.43-1.35 (m, 2H), 1.41 (t, J = 6.7 Hz, 3H), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 451 (M^+), 452 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{27}H_{37}N_3O_3$ 451.2835, found 451.2833 (M) $^+$

(S)-4-{8-Amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-(2-methylpropyl)-4-(3-methylbutyl)-3-oxo-3*H*-1,4-benzodiazepin-7-yl}benzoic acid **51**



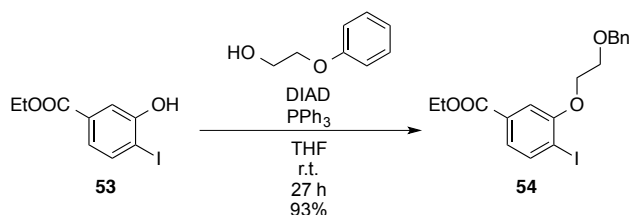
KOH (3.0 mg, 54 μmol) in MeOH (0.5 mL) was added to a solution of **50** (12.7 mg, 28.1 μmol) in MeOH (0.5 mL). After stirred 1.5 h at 60 $^\circ\text{C}$, H_2O (0.2 mL) was added to the reaction mixture because the reaction did not proceed by monitoring TLC. After stirred 6 h at 60 $^\circ\text{C}$, the reaction mixture was quenched and neutralized by 2 N HCl aq and sat. NaHCO_3 aq to its pH 7 at 0 $^\circ\text{C}$. Brine and H_2O were added to the reaction mixture and the reaction was extracted with AcOEt and CHCl_3 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The residue was purified by PTLC (CHCl_3 / MeOH = 10 / 1) to afford **51** (5.5 mg, 13.0 μmol , 46 %) as a yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 6.74 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.30 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 4.61-4.56 (m, 1H), 3.71 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.53-3.47 (m, 2H), 1.95-1.88 (m, 1H), 1.84-1.77 (m, 1H), 1.52-1.44 (m, 2H), 1.44-1.35 (m, 2H), 0.98 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.7 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 423 (M^+), 424 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3$ 423.2522, found 423.2523 (M) $^+$

Ethyl 3-hydroxy-4-iodobenzoate **53**



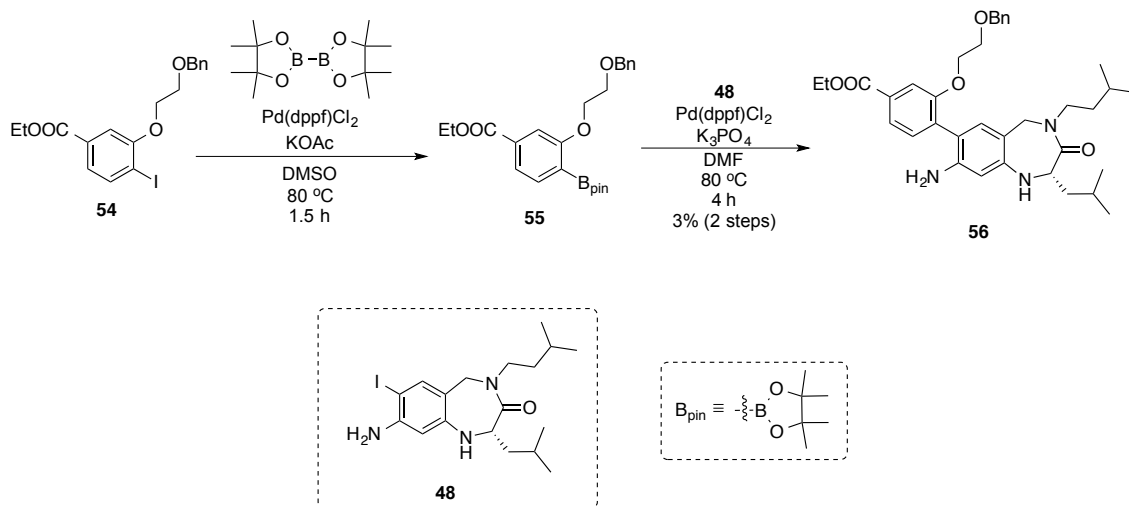
N-Iodosuccinimide (1.40 g, 6.24 mmol) was added to a stirred solution of **52** (1.02 g, 6.13 mmol) in AcOH (30 mL) at 0 $^\circ\text{C}$, then the reaction mixture was stirred for 21 h at rt. At 0 $^\circ\text{C}$, 10 N NaOH aq. was added to adjust the pH to 5, and a white solid precipitated. The solid was removed by filtration and the filtrate was extracted with AcOEt. The white solid was added to the organic layer, and the resulting solution was dried over MgSO_4 and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 4 / 1) and recrystallization (from CH_2Cl_2 / hexane) to afford **53** (1.13 g, 3.88 mmol, 63 %) as a white amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.75 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.37 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 1.39 (t, J = 6.7 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 165.9, 155.0, 138.5, 132.57, 123.0, 115.7, 91.5, 61.4, 14.2. HMBC was used to determine the iodide position. MS (FAB) m/z 292 (M) $^+$, 293 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Ethyl 3-[2-(benzyloxy)ethoxy]-4-iodobenzoate **54**



Diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (590 μ L, 3.00 mmol) was added dropwise to a stirred solution of **53** (436 mg, 1.49 mmol), 2-(benzyloxy)ethanol (456 mg, 3.00 mmol) and PPh₃ (1.11 g, 1.81 mmol) in THF (15.0 mL). The reaction mixture was stirred for 27 h at rt, then concentrated, quenched with H₂O, and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄, and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 4 / 1) to afford **54** (591 mg, 1.39 mmol, 93 %) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.42-7.34 (m, 5H), 7.31-7.26 (m, 1H), 4.27 (s, 2H), 4.37 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 4.28 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.93 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 1.39 (t, J = 7.3 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 426 (M)⁺, 427 (M+H)⁺.

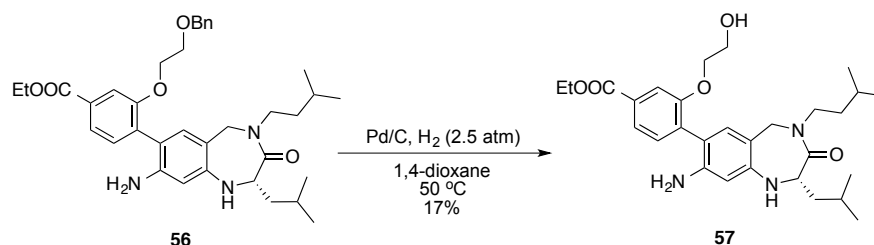
(S)-Ethyl 4-[8-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-(2-methylpropyl)-4-(3-methylbutyl)-3-oxo-3H-1,4-benzodiazepin-7-yl]-3-[2-(benzyloxy)ethoxy] benzoate **56**



DMSO (10.0 mL) was added to a mixture of **54** (224 mg, 526 μ mol), bis(pinacolato)diboron (280 mg, 1.10 mmol), KOAc (150 mg, 1.53 mmol) and PdCl₂(dppf) (30.3 mg, 41.4 μ mol). The atmosphere was replaced with Ar. The reaction mixture was stirred for 1.5 h at 80 °C, then the reaction was quenched with H₂O and the mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H₂O, dried over MgSO₄, and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 1 / 0 to 5 / 1) and PTLC (hexane / AcOEt = 5 / 2) to afford **55** (mixture, 18.4 mg) as a colorless oil. This was used for the next reaction without further purification. **48** (14.5 mg, 33.8 μ M), **55** (mixture, 18.4 mg) and K₃PO₄ (21.8 mg, 103 μ mol) were added to a flask, and the atmosphere was substituted by Ar.

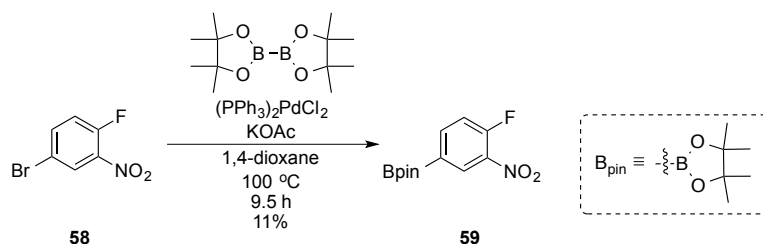
Then DMF (0.75 mL) and Pd(dppf)Cl₂ (2.80 mg, 3.80 μmol) were added to the flask. After stirred 4 h at 80 °C, the reaction mixture was quenched with brine and H₂O, and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 3 / 2) to afford **56** (8.20 mg, 13.6 μmol, 3 % (2 steps)) as a yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.35-7.25 (m, 6H), 6.69 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.29-5.18 (m, 1H), 4.60-4.52 (m, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.39 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.28-4.20 (m, 2H), 3.81-3.78 (m, 2H), 3.69-3.60 (m, 3H), 3.55-3.40 (m, 3H), 1.95-1.86 (m, 1H), 1.84-1.76 (m, 1H), 1.52-1.34 (m, 2H), 1.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.28-1.23 (m, 2H), 0.99-0.94 (m, 6H), 0.90-0.86 (m, 3H), 0.85-0.80 (m, 3H). MS (FAB) *m/z* 601 (M)⁺, 602 (M+H)⁺.

(S)-Ethyl 4-[8-Amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-(2-methylpropyl)-4-(3-methylbutyl)-3-oxo-3*H*-1,4-benzodiazepin-7-yl]-3-(2-hydroxyethoxy) benzoate **57**



Under an Ar atmosphere in a pressure-tight flask, 10 % Pd/C (8.20 mg) was added to a solution of **56** (8.20 mg, 13.6 μmol) in 1,4-dioxane (3.5 mL). The atmosphere was replaced with H₂ (2.5 atm). The reaction mixture was stirred 4 h at 50 °C, then filtered through Celite and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC (hexane / AcOEt = 1 / 1) to afford **57** (1.20 mg, 2.35 μmol, 17 %) as a colorless oil. The product was a mixture of conformers in a ratio of 0.3 : 0.7 (determined by ¹H-NMR). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 0.3H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 0.7H), 7.62 (s, 0.3H), 7.58 (s, 0.7H), 7.30-7.24 (m, 1H), 6.70 (s, 0.7H), 6.66 (s, 0.3H), 6.07 (s, 0.3H), 5.99 (s, 0.7H), 5.34-5.27 (m, 1H), 4.65-4.45 (m, 2H), 4.44-4.37 (m, 2H), 4.24-4.19 (m, 2H), 4.00-3.35 (m, 8H), 1.94-1.86 (m, 1H), 1.86-1.74 (m, 1H), 1.54-1.30 (m, 7H), 1.05-0.95 (m, 6H), 0.94-0.76 (m, 6H). MS (FAB) *m/z* 511 (M)⁺, 512 (M+H)⁺. HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₉H₄₁N₃O₅ 511.3046, found 511.3050 (M)⁺.

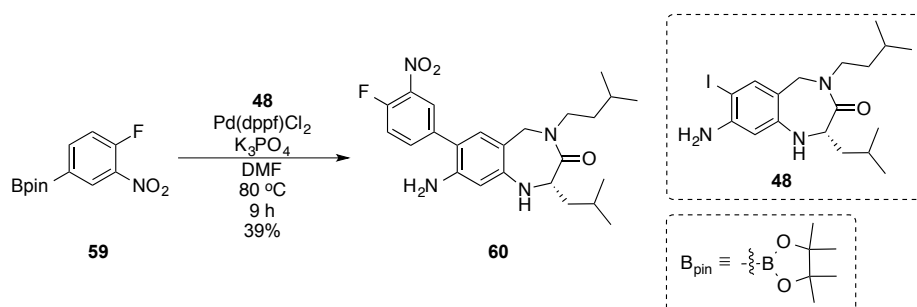
2-(4-Fluoro-3-nitrophenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane **59**



Under an Ar atmosphere, 1,4-dioxane (5.0 mL) was added to a mixture of 4-Bromo-1-fluoro-2-nitrobenzene (122 μL,

1.00 mmol), bis(pinacolate)diboron (253 mg, 996 μmol), AcOK (441 mg, 4.49 mmol), and $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ (44.7 mg, 63.9 μmol). The reaction mixture was stirred for 9.5 h at 100 $^\circ\text{C}$, then filtered through Celite. The filtrate was diluted with AcOEt, and washed with H_2O . The organic layer was dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 4/1 to 2/1) to afford **59** (28.1 mg, 105 μmol , 11%) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.47 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 8.03 (ddd, J = 8.4, 8.0, 1.8 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 10.9, 8.0 Hz, 1H), 1.35 (s, 12H). MS (FAB) m/z 248 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(S)-8-Amino-7-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-2-isobutyl-4-isopentyl-1,2,4,5-tetrahydro-3H-benzo[e][1,4]diazepin-3-one **60**



48 (42.7 mg, 99.5 μmol), **59** (28.1 mg, 105 μmol) and K_3PO_4 (81.1 mg, 382 μmol) were added to a flask, and the atmosphere was substituted by Ar. Then DMF (1 mL) and Pd(dppf)Cl_2 (8.00 mg, 10.9 μmol) were added to the flask. After stirred 9 h at 80 $^\circ\text{C}$, the reaction mixture was quenched with brine and H_2O , and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (hexane / AcOEt = 3 / 2), then purified by PTLC (hexane / AcOEt = 3 / 2) to afford **60** (17.2 mg, 38.8 μmol , 39 %) as a red solid. ^1H -NMR(500 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (dd, J = 7.4, 2.3 Hz, 1H), 7.71-7.69 (m, 1H), 7.32 (dd, J = 10.9, 9.2 Hz, 2H), 6.68 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.29 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 4.61-4.56 (m, 1H), 3.69 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 3.61-3.44 (m, 5H), 1.94-1.87 (m, 1H), 1.84-1.75 (m, 1H), 1.53-1.35 (m, 4H), 0.98 (d, J = 5.7 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.9 Hz, 3H). MS (FAB) m/z 442 (M^+), 443 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{FN}_4\text{O}_3$ 442.2380, found 442.2376 (M) $^+$. m.p. 196-199 $^\circ\text{C}$

5-1-3. 活性評価(第 2 章)

TR-FRET assay

LanthaScreen™ TR-FRET Vitamin D Receptor Coactivator Assay kit (Invitrogen) was used for TR-FRET assay. Glutathione-S-transferase(GST)-tagged VDR-LBD (0.5 nM), terbium-labeled anti-GST antibody (2 nM), a fluorescein-labeled fragment of coactivator peptide (100 nM), and 1,25(OH)₂D₃ (10 nM) were mixed and incubated with 384-well plate. The binding affinity between VDR and coactivator peptide was evaluated in terms of the TR-FRET ratio (520 nm: 495 nm). The assay was performed in quintuplicate. After eliminating the highest and the lowest points, the average value of the remaining triplicate points was calculated. This assay was highly reproducible.

VDR reporter gene assay

We utilized a VDR-responsive reporter gene assay with CMX-GAL4N-hVDR LBD as the recombinant receptor gene, TK-MH100x4-LUC as the reporter gene, and the CMX β-galactosidase gene for normalization, as previously reported⁵⁻¹⁻¹⁾. The cells were incubated with 1,25(OH)₂D₃ (3 nM) in the presence or absence of test compounds. After incubation, cells were assayed for luciferase reporter gene and β-galactosidase activities. None of the compounds evaluated in our experiments reduced β-galactosidase activity in the concentration range investigated.

ER reporter gene assay

ERα and ERβ reporter gene assay with CMX-GAL4N-h ERα LBD or CMX-GAL4N-h ERβ LBD as reporter genes, and estradiol (0.3 nM) as an ER agonist were used instead of CMX-GAL4N-hVDR LBD and 1,25(OH)₂D₃.

⁵⁻¹⁻¹⁾ Ishizawa M, Matsunawa M, Adachi R, Uno S, Ikeda K, Masuno H, Shimizu M, Iwasaki K, Yamada S, Makishima M. "Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators without inducing hypercalcemia." *J. Lipid Res.* **2008**, 49, 763

5-2 節 実験項(第 3 章)

5-2-1. 有機合成(第 3 章)

General

Melting points were determined by using a Yanagimoto hot-stage melting point apparatus and are uncorrected. $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on a JEOL JNM-GX500 (500 MHz) spectrometer and a JEOL JMN-ECA500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) relative to deuteriochloroform or tetramethylsilane as an internal reference with coupling constants in Hz. The abbreviations s, d, dd, ddd, t, td, q, quin, sex and m signify singlet, doublet, doublet doublet, doublet doublet doublet, triplet, triplet doublet, quartet, quintet, sextet and multiplet, respectively. Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS) and high resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a JEOL JMS-HX110 spectrometer with m-nitrobenzyl alcohol. Elemental analyses were carried out in the Microanalytical Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, and were within $\pm 0.4\%$ of theoretical values. NH TLC plate or PTLC plate was Fuji Sylisia's NH plate.

General procedure A (GP-A)

Under an Ar atmosphere, DMF was added to a mixture of **63** (or **62**), the corresponding boronic acid pinacol ester, K_3PO_4 , and $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$. The reaction mixture was stirred for an appropriate time at $80\text{ }^\circ\text{C}$, then filtered through Celite. The filtrate was diluted with H_2O and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H_2O , dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography to afford the target material.

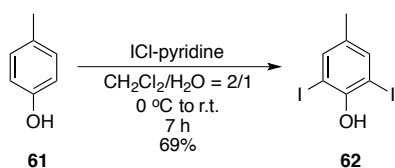
General procedure B (GP-B)

Benzyl bromide and K_2CO_3 were added to a solution of carboxylic acid **68** in DMF at $0\text{ }^\circ\text{C}$, then the atmosphere was replaced with Ar. The reaction mixture was stirred for an appropriate time at $100\text{ }^\circ\text{C}$, then the reaction was quenched with H_2O and the whole was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H_2O and brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography to afford the target material.

General procedure C (GP-C)

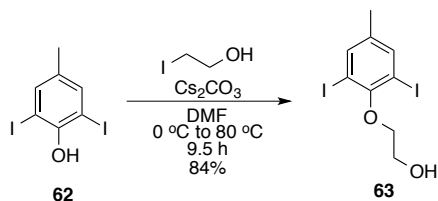
Under an Ar atmosphere, 1,4-dioxane was added to a mixture of aryl bromide, bis(pinacolate)diboron, KOAc, and $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$. The reaction mixture was stirred for an appropriate time at $100\text{ }^\circ\text{C}$, then filtered through filter paper or Celite. The filtrate was diluted with H_2O and brine, and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H_2O and brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography to afford the target material.

2,6-Diiodo-4-methylphenol **62**



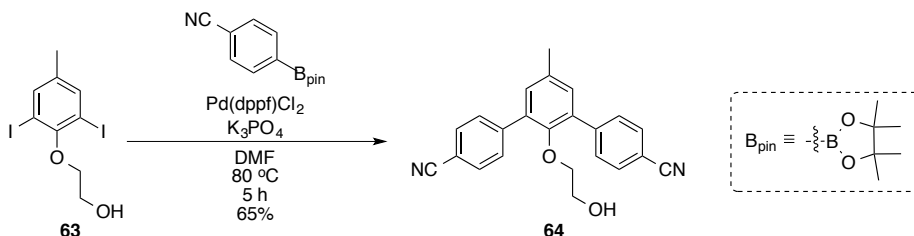
ICl-pyridine complex (5.46 g, 22.6 mmol) was added to a stirred solution of *p*-cresol (1.11 g, 10.3 mmol) in CH_2Cl_2 (66 mL) and H_2O (33 mL) at $0\text{ }^\circ\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 7 h at rt, then the reaction was quenched with 0.3 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ aq at rt, and the mixture was stirred until its color changed to yellow. At that point, it was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 20/1) to afford **62** (2.54 g, 7.06 mmol, 69%) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.49 (s, 2H), 5.57 (s, 1H), 2.22 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 360 (M^+)

2-(2,6-Diiodo-4-methylphenoxy)ethanol **63**



2-Iodoethanol (467 μL , 6.00 mmol) was added to a solution of **62** (1.08 g, 3.00 mmol) and Cs_2CO_3 (3.04 g, 9.33 mmol) in DMF (10 mL) at $0\text{ }^\circ\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 9.5 h at $80\text{ }^\circ\text{C}$, then the reaction was quenched with H_2O , and the mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H_2O , dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 3/1) to give **63** (1.02 g, 2.51 mmol, 84%) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.60 (s, 2H), 4.15–4.12 (m, 2H), 4.06–4.02 (m, 2H), 2.33–2.29 (m, 1H), 2.25 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 404 (M^+).

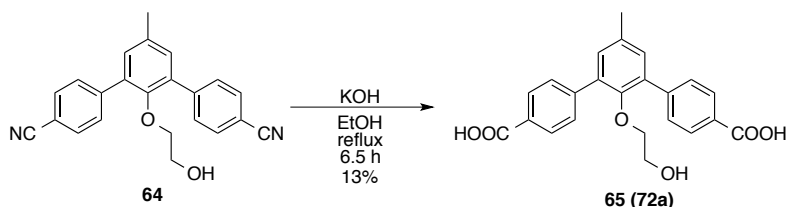
2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-(1,1':3',1'-terphenyl)-4,4'-dinitrile **64**



This compound was prepared by means of GP-A, with **63** (198 mg, 490 μmol), 4-cyanophenylboronic acid pinacol ester (228 mg, 995 μmol), K_3PO_4 (447 mg, 2.11 mmol), Pd(dppf)Cl_2 (39.6 mg, 54.1 μmol) and DMF (10 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 4/1 to 2/1) afforded **64** (113 mg, 319 μmol , 65%) as a pale yellow solid. ^1H

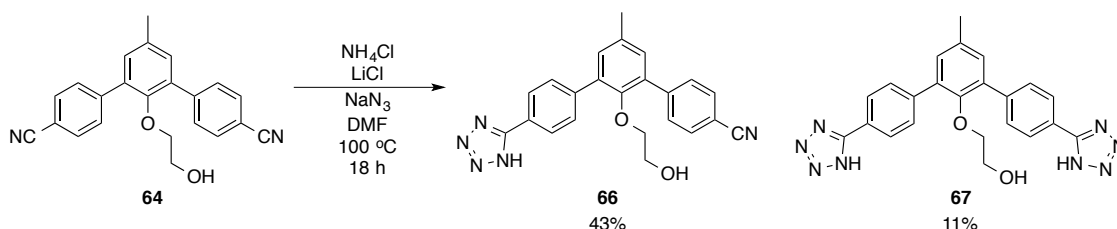
NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.76–7.70 (m, 8H), 7.20 (s, 2H), 3.32–3.25 (m, 4H), 2.42 (s, 3H), 1.07–1.03 (m, 1H). MS (FAB) m/z : 354 (M^+), 355 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: 354.1368, found 354.1373 (M^+) $^+$. m.p. 210–212 °C.

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-dicarboxylic acid **65** (= **72a**)



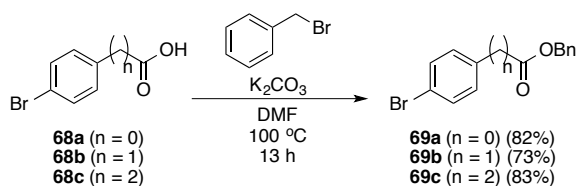
KOH (438 mg, 7.81 mmol) was added to a solution of **64** (47.0 mg, 133 μmol) in EtOH (2.5 mL). The reaction mixture was refluxed for 6.5 h, then acidified with 2 N HCl aq to pH 1. The mixture was extracted with AcOEt and the organic layer was washed with H_2O , dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 5/1$) to afford **65** (= **72a**) (6.90 mg, 17.6 μmol , 13%) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.09 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H), 7.74 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H), 7.26 (s, 2H), 3.24–3.22 (m, 4H), 2.42 (s, 3H), 1.20–1.15 (m, 1H). MS (FAB) m/z : 392 (M^+), 393 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_6$ 392.1260, found 392.1255 (M^+) $^+$. m.p. 276–279 °C.

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-(1,1':3':1''-terphenyl)-4''-(1H-tetrazol-5-yl)-4-nitrile **66** and 2-[5'-methyl-4,4''-ditetrazol-5-yl-(1,1':3',1''-terphenyl)-2'-oxy]ethanol **67**



Under an Ar atmosphere, DMF (1.0 mL) was added to a mixture of **64** (33.0 mg, 93.1 μmol), NH_4Cl (18.9 mg, 353 μmol), LiCl (2.50 mg, 59.0 μmol), NaN_3 (20.7 mg, 318 μmol). The reaction mixture was stirred for 18 h at 100 °C, then the reaction was quenched with H_2O and the mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 3/1$) to afford **66** (15.9 mg, 40.0 μmol , 43%, white solid) and **67** (4.50 mg, 10.2 μmol , 11%, colorless oil). Compound **66**: ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.11 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 3.26–3.23 (m, 4H), 2.43 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 397 (M^+), 398 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2$: 397.1539, found 397.1542 (M^+) $^+$. Anal. C, 66.72; H, 5.00; N, 16.70 (Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 66.49; H, 5.09; N, 16.86). m.p. 218–221 °C. Compound **67**: ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.12 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H), 7.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H), 7.27 (s, 2H), 3.28–3.25 (m, 4H), 2.44 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 440 (M^+), 441 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_2$ 440.1709, found 440.1706 (M^+) $^+$.

Benzyl 4-bromobenzoate **69a**



This compound was prepared by means of GP-B, with 4-bromobenzoic acid (4.33 g, 21.5 mmol), benzyl bromide (2.58 mL, 21.7 mmol), K_2CO_3 (6.11 g, 44.2 mmol), and DMF (25 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 10/1 to 5/1) afforded **69a** (5.13 g, 17.6 mmol, 82%) as a white solid. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.45–7.33 (m, 5H), 5.35 (s, 2H). MS (FAB) m/z : 183, 185 ($M-OBn^+$).

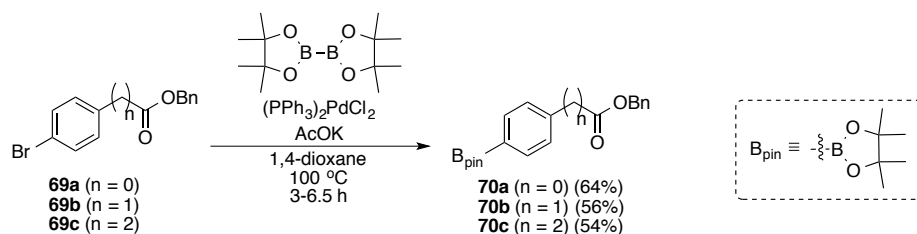
Benzyl 2-(4-bromophenyl)acetate **69b**

This compound was prepared by means of GP-B, with 4-bromophenylacetic acid (1.07 g, 4.99 mmol), benzyl bromide (564 μ L, 5.00 mmol), K_2CO_3 (1.39 g, 10.0 mmol), and DMF (10 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 10/1) afforded **9b** (1.11 g, 3.62 mmol, 73%) as a pale yellow oil. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.44 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.37–7.29 (m, 5H), 7.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 3.62 (s, 2H). MS (FAB) m/z : 304, 306 (M^+), 305, 307 ($M+H$) $^+$.

Benzyl 3-(4-bromophenyl)propionate **69c**

This compound was prepared by means of GP-B, with 3-(4-bromophenyl)propionic acid (1.15 g, 5.02 mmol), benzyl bromide (594 μ L, 5.00 mmol), K_2CO_3 (1.43 g, 10.4 mmol), and DMF (10 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 10/1) afforded **9c** (1.34 g, 4.18 mmol, 83%) as a colorless oil. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.36–7.32 (m, 3H), 7.30–7.27 (m, 3H), 7.05 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 2.92 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H). MS (FAB) m/z : 319, 321 (M^+).

Benzyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoate **70a**



This compound was prepared by means of GP-C, with **69a** (510 mg, 1.75 mmol), bis(pinacolate)diboron (488 mg, 1.92 mmol), KOAc (700 mg, 7.13 mmol), $(PPh_3)_2PdCl_2$ (63.5 mg, 90.5 μ mol) and 1,4-dioxane (18 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 1/0 to 1/1) afforded **70a** (381 mg, 1.13 mmol, 64%) as a yellow solid. 1H NMR

(500 MHz, CDCl₃) δ : 8.05 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.40 (dd, J = 7.3, 7.3 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 1.35 (s, 12H). MS (FAB) m/z : 339 (M+H)⁺.

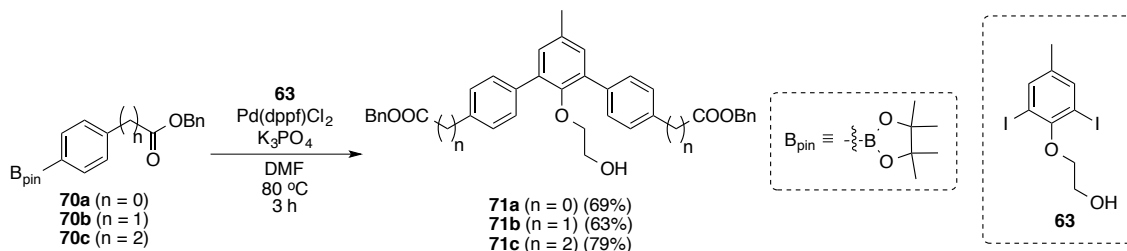
Benzyl 2-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetate **70b**

This compound was prepared by means of GP-C, with **69b** (630 mg, 2.06 mmol), bis(pinacolate)diboron (536 mg, 2.11 mmol), KOAc (788 mg, 8.03 mmol), (PPh₃)₂PdCl₂ (39.5 mg, 56.3 μ mol) and 1,4-dioxane (20 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 1/0 to 5/1) afforded **70b** (410 mg, 1.16 mmol, 56%) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.77 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.35–7.28 (m, 7H), 5.12 (s, 2H), 3.68 (s, 2H), 1.34 (s, 12H). MS (FAB) m/z : 352 (M⁺), 353 (M+H)⁺.

Benzyl 3-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)propionate **70c**

This compound was prepared by means of GP-C, with **69c** (637 mg, 2.00 mmol), bis(pinacolate)diboron (534 mg, 2.10 mmol), KOAc (791 mg, 8.06 mmol), (PPh₃)₂PdCl₂ (47.8 mg, 68.1 μ mol) and 1,4-dioxane (20 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 1/0 to 5/1) afforded **70c** (392 mg, 1.07 mmol, 54%) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.73 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.37–7.28 (m, 5H), 7.20 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 2.98 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.68 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.34 (s, 12H). MS (FAB) m/z : 366 (M⁺), 367 (M+H)⁺.

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-dicarboxylic acid, dibenzyl ester **71a**



This compound was prepared by means of GP-A, with **63** (189 mg, 469 μ mol), **70a** (348 mg, 1.03 mmol), K₃PO₄ (404 mg, 1.90 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (34.6 mg, 47.2 μ mol) and DMF (5.0 mL). Purification by silica gel chromatography (toluene/AcOEt = 10/1) afforded **71a** (186 mg, 325 μ mol, 69%) as a pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.15 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.47 (d, J = 7.3 Hz, 4H), 7.41 (dd, J = 7.3, 7.3 Hz, 4H), 7.36 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.19 (s, 2H), 5.39 (s, 4H), 3.29–3.25 (m, 2H), 3.25–3.21 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.08–1.04 (m, 1H). MS (FAB) m/z : 572 (M⁺), 573 (M+H)⁺. HRMS (FAB) calcd for C₃₇H₃₂O₆: 572.2199, found 572.2200 (M)⁺.

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-diacetic acid, dibenzyl ester **71b**

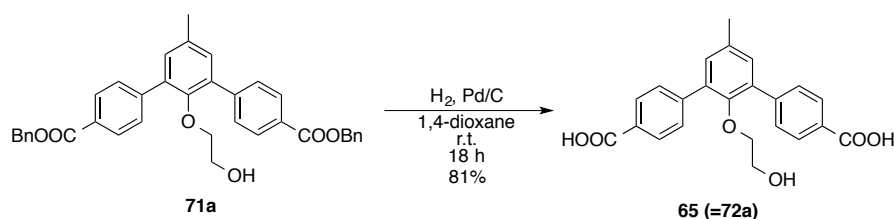
This compound was prepared by means of GP-A, with **63** (102 mg, 252 μ mol), **70b** (190 mg, 539 μ mol), K₃PO₄ (237 mg, 1.12 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (20.3 mg, 27.7 μ mol) and DMF (2.5 mL). Purification by silica gel chromatography

(toluene/AcOEt = 8/1) afforded **71b** (94.7 mg, 158 μ mol, 63%) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.38–7.31 (m, 14H), 7.15 (s, 2H), 5.16 (s, 4H), 3.73 (s, 4H), 3.30–3.28 (m, 2H), 3.22–3.17 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.09–1.05 (m, 1H). MS (FAB) m/z : 600 (M^+), 601 ($\text{M}+\text{H}^+$).

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-dipropionic acid, dibenzyl ester **71c**

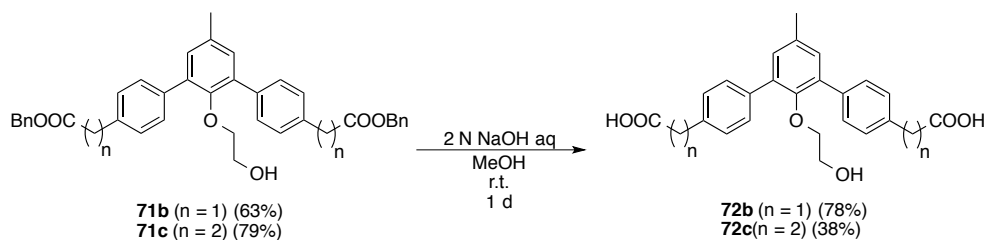
This compound was prepared by means of GP-A, with **63** (102 mg, 252 μ mol), **70c** (223 mg, 609 μ mol), K_3PO_4 (243 mg, 1.14 mmol), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (23.3 mg, 31.8 μ mol) and DMF (2.5 mL). Purification by silica gel chromatography (toluene/AcOEt = 8/1) afforded **71c** (94.7 mg, 158 μ mol, 63%) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.38–7.32 (m, 10H), 7.27–7.24 (m, 4H), 7.13 (s, 2H), 5.13 (s, 4H), 3.29–3.26 (m, 2H), 3.21–3.17 (m, 2H), 3.02 (t, J = 7.9 Hz, 4H), 2.73 (t, J = 7.9 Hz, 4H), 2.39 (s, 3H), 1.08–1.04 (m, 1H). MS (FAB) m/z : 628 (M^+), 629 ($\text{M}+\text{H}^+$).

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-dicarboxylic acid **65** (= **72a**)



Under an Ar atmosphere, 10% Pd/C (21.5 mg) was added to a solution of **71a** (75.8 mg, 132 μ mol) in 1,4-dioxane (3.0 mL). The Ar atmosphere was replaced with H_2 . The reaction mixture was stirred for 18 h at rt, then filtered through Celite. The filtrate was concentrated to afford **65** (= **72a**) (41.8 mg, 107 μ mol, 81%) as a white solid. See data for **65**.

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-diacetic acid **72b**



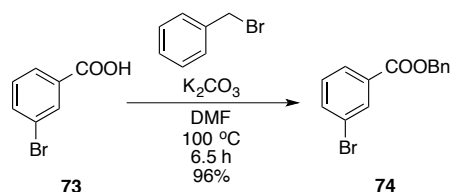
2 N NaOH aq (60.0 μ L, 120 μ mol) was added to a stirred solution of **71b** (18.0 mg, 30.0 μ mol) in MeOH (1.0 mL) at rt. The reaction mixture was stirred for 1 day at rt, then concentrated. The resulting residue was dissolved in AcOEt/MeOH (10/1), and 2 N HCl aq was added to the solution. The organic layer was partitioned and the water layer was extracted with AcOEt/MeOH (10/1). The combined organic layer was washed with H_2O , dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$ = 4/4/1/1) to afford **72b** (R_f 0.00; 9.80 mg, 23.3 μ mol, 78%) as a yellow oil. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.53 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 7.36 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 7.12 (s, 2H), 3.55 (s,

4H), 3.25–3.20 (m, 4H), 2.37 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 420 (M^+), 421 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{25}H_{24}O_6$: 420.1568, 420.1568 (M) $^+$.

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-dipropionic acid **72c**

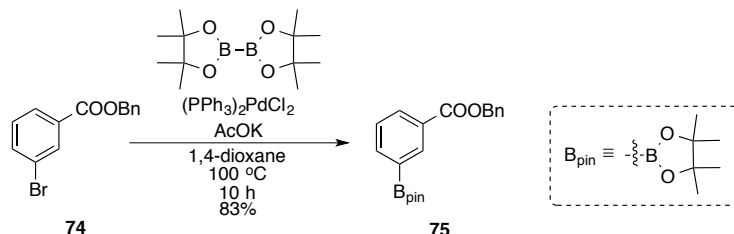
2 N NaOH aq (92.5 μ L, 185 μ mol) was added to a stirred solution of **71c** (29.1 mg, 46.3 μ mol) in MeOH (1.0 mL) at rt. The reaction mixture was stirred for 1 day at rt, then concentrated. The resulting residue was dissolved in Et₂O, and 2 N HCl aq was added to the solution. The organic layer was partitioned and the water layer was extracted with Et₂O. The combined Et₂O layer was washed with H₂O, dried over MgSO₄, and concentrated. The resulting residue was recrystallized (EtOH/hexane) to afford **72c** (7.80 mg, 17.4 μ mol, 38%) as a white needles. 1H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.29 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.11 (s, 2H), 3.22–3.18 (m, 4H), 2.96 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 2.64 (t, J = 7.9 Hz, 4H), 2.37 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 448 (M^+), 449 ($M+H$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $C_{27}H_{28}O_6$: 448.1886, found 448.1885 (M) $^+$. m.p. 176–179 $^{\circ}C$.

Benzyl 3-bromobenzoate **74**



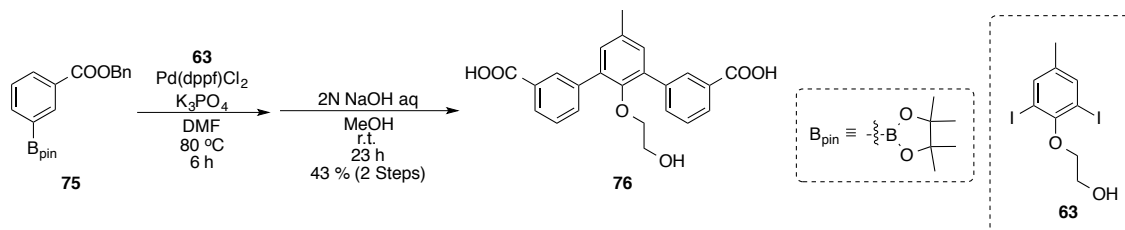
This compound was prepared by means of GP-B, with 3-bromobenzoic acid (5.03 g, 25.0 mmol), benzyl bromide (3.00 mL, 25.3 mmol), K₂CO₃ (6.96 g, 50.4 mmol), and DMF (25 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 10/1) afforded **74** (6.87 g, 23.9 mmol, 96%) as a colorless oil. 1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.20 (s, 1H), 8.00 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 7.46–7.29 (m, 6H), 5.63 (s, 2H). MS (FAB) m/z : 291, 293 ($M+H$) $^+$.

Benzyl 3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoate **75**



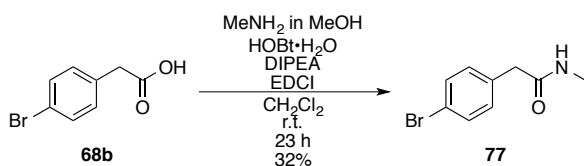
This compound was prepared by means of GP-C, with **74** (1.03 g, 3.54 mmol), bis(pinacolate)diboron (902 mg, 3.55 mmol), KOAc (1.06 g, 10.8 mmol), (PPh₃)₂PdCl₂ (47.8 mg, 68.1 μ mol) and 1,4-dioxane (35 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 15/1 to 10/1) afforded **75** (998 mg, 2.95 mmol, 83%) as a colorless oil. 1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.50 (s, 1H), 8.16 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.48–4.32 (m, 6H), 5.38 (s, 2H), 1.35 (s, 12H). MS (FAB) m/z : 338 (M^+), 339 ($M+H$) $^+$.

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-3,3''-dicarboxylic acid **76**



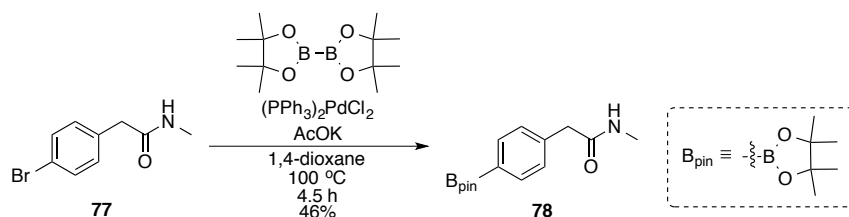
Under an Ar atmosphere, DMF (4.5 mL) was added to a mixture of **3** (169 mg, 418 μ mol), **75** (315 mg, 931 μ mol), K_3PO_4 (362 mg, 1.71 mmol), and $Pd(dppf)Cl_2$ (30.7 mg, 41.9 μ mol). The reaction mixture was stirred for 6 h at 80 $^{\circ}C$, then the reaction was quenched with H_2O and brine, and the mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was dried over $MgSO_4$, and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (toluene/AcOEt = 10/1) to afford a mixture of dicarboxylic acid and dibenzyl ester (203 mg) as a pale yellow oil. In the next reaction, 2 N NaOH aq (600 μ L, 1.20 mmol) was added to a solution of the mixture (203 mg) in MeOH (3.0 mL) at rt. The reaction mixture was stirred for 23 h at rt, then the reaction was quenched with H_2O , and the whole was acidified with 2 N HCl aq at 0 $^{\circ}C$. The resulting solution was extracted with AcOEt, and the water layer was extracted with AcOEt/MeOH (10/1). The organic layers were combined and washed with H_2O . The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated. The resulting residue was purified by reprecipitation (EtOH/hexane/ CH_2Cl_2) to afford **76** (70.8 mg, 180 μ mol, 43% (two steps)) as a white solid. 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.28 (s, 2H), 8.02 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.55 (dd, J = 7.3, 7.3 Hz, 2H), 7.24 (s, 2H), 3.24–3.15 (m, 4H), 2.43 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 393 (M+H) $^{+}$. HRMS (FAB) calcd for $C_{23}H_{20}O_6$: 392.1260, found 392.1256 (M) $^{+}$. m.p. 240–242 $^{\circ}C$.

2-(4-Bromophenyl)-*N*-methylethanamide **77**



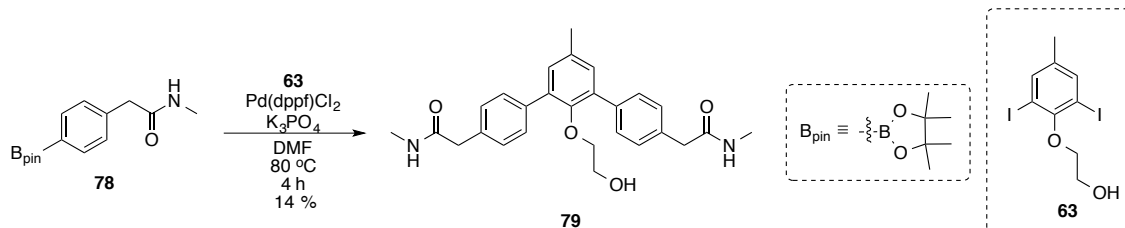
Methylamine (40% in MeOH) (600 μ L, 5.88 mmol) was added to a solution of **68b** (1.01 g, 4.69 mmol), HOBT· H_2O (836 mg, 5.46 mmol), DIPEA (2.50 mL, 14.3 mmol), and EDCI (1.09 g, 5.76 mmol) in CH_2Cl_2 (25 mL) at rt. The reaction mixture was stirred for 23 h, then the reaction was quenched with satd $NaHCO_3$ aq and the mixture was partitioned. The organic layer was washed with satd $NaHCO_3$ aq and H_2O , dried over $MgSO_4$, and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography ($CHCl_3/MeOH$ = 10/1 to 5/1) to afford **17** (344 mg, 1.51 mmol) as a white crystals. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.45–5.20 (m, 1H), 3.52 (s, 2H), 2.78 (d, J = 4.9 Hz, 3H). MS (FAB) m/z : 228, 230 (M+H) $^{+}$.

2-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-*N*-methylethanamide **78**



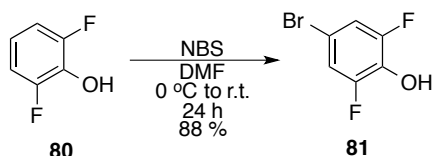
This compound was prepared by means of GP-C, with **77** (229 mg, 1.00 mmol), bis(pinacolate)diboron (264 mg, 1.04 mmol), KOAc (392 mg, 3.99 mmol), $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ (33.3 mg, 47.4 μmol) and 1,4-dioxane (10 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 1/1 to 1/2) afforded **78** (127 mg, 462 μmol , 64%) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.26–7.25 (m, 2H), 5.35–5.16 (m, 1H), 3.60 (s, 2H), 2.73 (d, J = 4.9 Hz, 3H), 1.33 (s, 12H). MS (FAB) m/z : 275 (M^+), 276 ($\text{M}+\text{H}^+$).

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-*N*,*N*'-dimethyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-diacetamide **79**



This compound was prepared by means of GP-A, with **63** (88.6 mg, 219 μmol), **78** (127 mg, 462 μmol), K_3PO_4 (186 mg, 876 μmol), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (15.3 mg, 20.9 μmol) and DMF (2.5 mL). Purification by silica gel chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 10/1), PTLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 10/1) and reprecipitation (AcOEt) afforded **79** (13.4 mg, 30.0 μmol , 14%) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.56 (d, J = 7.9 Hz, 4H), 7.34 (d, J = 7.9 Hz, 4H), 7.13 (s, 2H), 3.53 (s, 4H), 3.22–3.18 (m, 4H), 2.73 (s, 6H), 2.67 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 446 (M^+), 447 ($\text{M}+\text{H}^+$). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$ 446.2206, found 446.2202 (M^+). m.p. 234–236 °C.

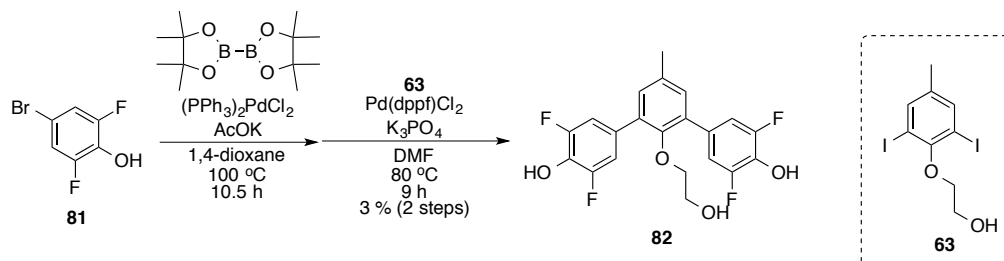
4-Bromo-2,6-difluorophenol **81**



N-Bromosuccinimide (3.60 g, 20.2 mmol) was added to a stirred solution of 2,5-difluorophenol (2.61 g, 20.1 mmol) in DMF (10 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 24 h at rt with shielding from light, then the reaction was quenched with H_2O , and the mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H_2O , dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 4/1) to

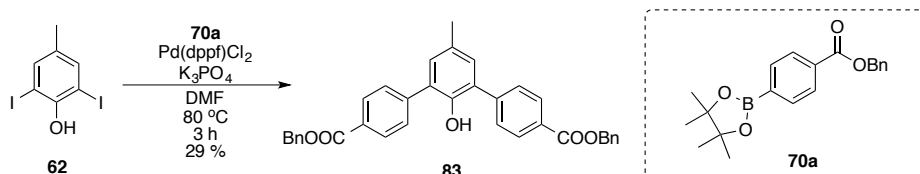
afford **81** (3.72 g, 17.8 mmol, 88%) as pale yellow needles. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.09 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 5.23 (s, 1H). MS (FAB) m/z : 256 (M^+), 257 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

2'-(2-Hydroxyethoxy)-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-3,3'',5,5''-tetrafluoro-4,4''-diol **82**



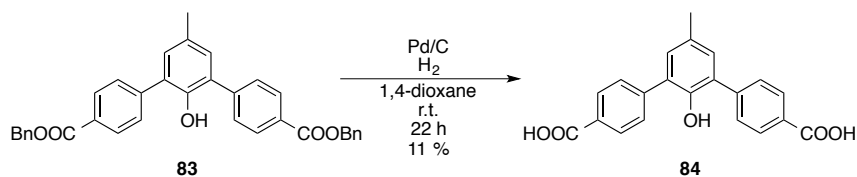
Under an Ar atmosphere, 1,4-dioxane (20 mL) was added to a mixture of **81** (1.09 g, 5.23 mmol), bis(pinacolate)diboron (1.33 g, 5.24 mmol), KOAc (1.96 g, 20.0 mmol), and $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ (82.1 mg, 117 μmol). The reaction mixture was stirred for 10.5 h at 100 $^\circ\text{C}$, and filtered through Celite. The filtrate was diluted with H_2O and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H_2O , dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 3/1) to afford a mixture of pinacol ester boronic acid (373 mg) as a white solid. This mixture was used in the next step without further purification. In the next step, DMF (7 mL) was added to pinacol ester boronic acid (373 mg, mixture), **63** (263 mg, 651 μmol), K_3PO_4 (578 mg, 2.72 mmol), and Pd(dppf)Cl_2 (47.3 mg, 64.6 μmol) under an Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 9 h at 80 $^\circ\text{C}$, and filtered through Celite. The filtrate was diluted with H_2O and extracted with AcOEt. The water layer was acidified with 2 N HCl aq to pH 1, and extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with H_2O , dried over MgSO_4 , and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 1/0 to 1/2) and recrystallization (CH_2Cl_2 /hexane) to afford **82** (53.9 mg, 132 μmol , 3% (two steps)) as colorless crystals. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.20 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.11 (s, 2H), 5.17–5.14 (m, 2H), 3.42–3.34 (m, 4H), 2.39 (s, 3H), 1.28–1.25 (m, 1H). MS (FAB) m/z : 408 (M^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{O}_4$: 408.0985, found 408.0981 (M^+) $^+$. m.p. 123 $^\circ\text{C}$.

2'-Hydroxy-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-dicarboxylic acid, dibenzyl ester **83**



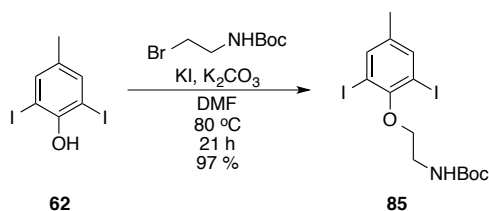
This compound was prepared by means of GP-A, with **62** (269 mg, 822 μmol), **70a** (556 mg, 1.64 mmol), K_3PO_4 (719 mg, 3.38 mmol), Pd(dppf)Cl_2 (62.2 mg, 85.0 μmol) and DMF (8.5 mL). Purification by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 1/0 to 5/1) afforded **23** (126 mg, 238 μmol , 28%) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.17 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.26 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.48–7.45 (m, 4H), 7.42–7.38 (m, 4H), 7.37–7.33 (m, 2H), 7.12 (s, 2H), 5.39 (s, 4H), 5.13 (s, 1H), 2.37 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 528 (M^+), 529 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

2'-Hydroxy-5'-methyl-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-dicarboxylic acid **84**



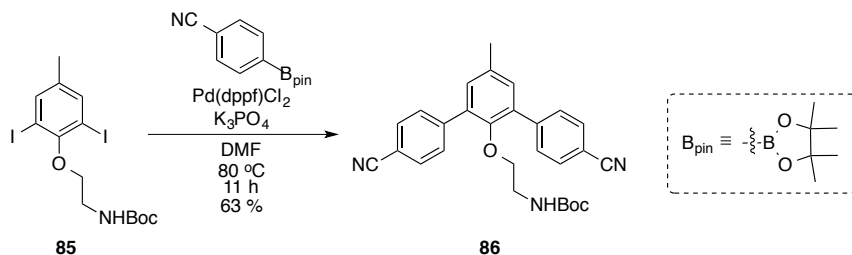
Under an Ar atmosphere, 10% Pd/C (21.5 mg) was added to a solution of **83** (70.2 mg, 133 μ mol) in 1,4-dioxane (2.0 mL). Then atmosphere was replaced with H₂. The reaction mixture was stirred for 22 h at rt, then filtered through Celite. The filtrate was reprecipitated (EtOH/hexane) to afford **84** (5.10 mg, 14.6 μ mol, 11%) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.11 (s, 2H), 3.35 (s, 1H), 2.35 (s, 3H). MS (FAB) *m/z*: 348 (M⁺), 349 (M+H)⁺. HRMS (FAB) calcd for C₂₁H₁₆O₅: 348.0998, 348.0995 (M)⁺. m.p. decomposed (248 °C).

tert-Butyl 2-(2,6-diiodo-4-methylphenoxy)ethylcarbamate **85**



Under Ar atmosphere, DMF (5.0 mL) was added to a mixture of **62** (362 mg, 1.01 mmol), KI (82.5 mg, 497 μ mol), K₂CO₃ (214 mg, 1.55 mmol) and 2-(*t*-Butoxycarbonylamino)ethyl bromide (336 mg, 1.50 mmol). The reaction mixture was stirred for 21 h at 80 °C, then the reaction was diluted with AcOEt, and the mixture was washed with H₂O. The organic layer was dried over MgSO₄, and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 6/1) to afford **85** (495 mg, 984 μ mol, 97%) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.58 (s, 2H), 5.28-5.17 (m, 1H), 4.03 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.65-3.56 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.47 (s, 9H). MS (FAB) *m/z* 504 (M+H)⁺.

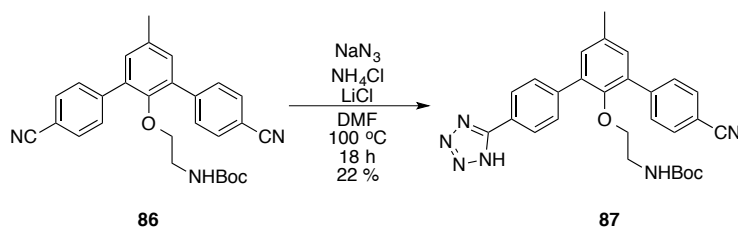
tert-Butyl 2-[2,6-(4-cyanophenyl)-4-methylphenoxy]ethylcarbamate **86**



Under an Ar atmosphere, DMF (10 mL) was added to a mixture of **85** (495 mg, 984 μ mol), 4-cyanophenylboronic acid (462 mg, 3.14 mmol), K₃PO₄ (962 mg, 4.53 mmol), and Pd(dppf)Cl₂ (22.7 mg, 31.0 μ mol). The reaction mixture was stirred for 11 h at 80 °C, then filtered through Celite. The filtrate was diluted with H₂O and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H₂O, dried over MgSO₄, and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel

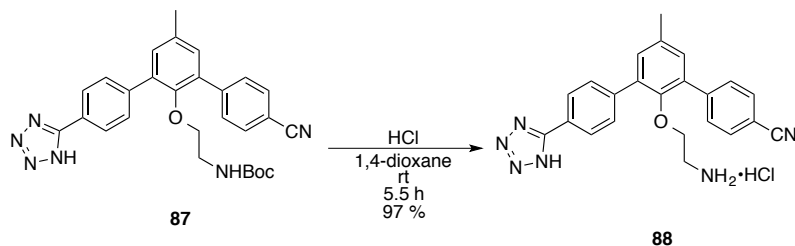
chromatography (hexane/AcOEt = 4/1 to 2/1) to afford **86** (279 mg, 615 μ mol, 63%) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.77-7.70 (m, 8H), 7.19 (s, 2H), 4.14-4.06 (m, 1H), 3.18 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 2.92-2.85 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). MS (FAB) m/z 454 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

tert-Butyl {2-[(4-cyano-5'-methyl-4''-(1H-tetrazol-5-yl)-[1,1':3',1''-terphenyl]-2'-yl)oxy]ethyl}carbamate **87**



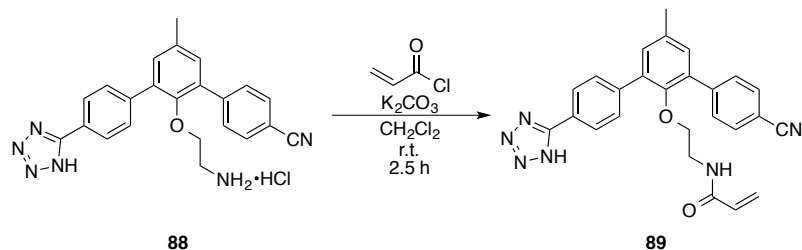
Under Ar atmosphere, DMF (3.0 mL) was added to a mixture of **17** (132 mg, 291 μ mol), NH_4Cl (44.9 mg, 839 μ mol), LiCl (5.60 mg, 132 μ mol), NaN_3 (39.8 mg, 612 μ mol). The reaction mixture was stirred for 11.5 h at 100 $^\circ\text{C}$, then the reaction was quenched with H_2O and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane/AcOEt = 1/1, then $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 3/1) to afford starting material **86** (41.9 mg, 92.4 μ mol, 32%) as a white solid and **87** (55.6 mg, 112 μ mol, 39%) as a colorless oil. ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.10 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.33 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 3.11 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.72-2.65 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.24 (s, 9H). MS (FAB) m/z : 497 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

2'-(2-Aminoethoxy)-5'-methyl-4''-(1H-tetrazol-5-yl)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4-carbonitrile hydrochloride **88**



4 N HCl-dioxane (1.5 mL) was added to **87** (70.0 mg, 141 μ mol) at rt. The reaction mixture was stirred for 5.5 h at rt, then the reaction was diluted with MeOH and concentrated. Then Adding MeOH to the resulting residue and concentration of the solution were performed twice to afford **88** (58.9 mg, 136 μ mol, 97%) as a white solid. ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.16 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.59-7.53 (m, 3H), 7.36 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 2.56-2.48 (m, 4H), 2.39 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 397 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

N-(2-((4-Cyano-5'-methyl-4''-(1H-tetrazol-5-yl)-[1,1':3',1''-terphenyl]-2'-yl)oxy)ethyl)acrylamide **89**



Acryloyl chloride (8.48 μL , 105 μmol) was added to a solution of **88** (22.8 mg, < 52.7 μmol , mixture) and K_2CO_3 (13.2 mg, 95.5 μmol) in CH_2Cl_2 (0.75 mL) and H_2O (0.25 mL) at 0 $^\circ\text{C}$. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0 $^\circ\text{C}$, then the reaction was quenched with H_2O and brine, then extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The resulting residue was purified by PTLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 5/1) to afford mixture of **89** (2.1 mg). As necessary, the mixture of **89** was purified by HPLC purification (Sensyu Pak, PEGASIL ODS, 10 ϕ x 250 mm, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ = 40/60, 1 mL/min, detect 254 nm). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.03 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.88-7.75 (m, 3H), 7.77 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.03 (dd, J = 17.0, 10.0 Hz, 1H), 5.91 (dd, J = 17.0, 2.0 Hz, 1H), 5.48 (dd, J = 10.0, 2.0 Hz, 1H) 3.17 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.96-2.89 (m, 2H), 2.37 (s, 3H). MS (FAB) m/z : 471 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_2$ 451.1882, found 451.1880 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

5-2-2. 活性評価(第 3 章)

ELISA-based PBD-binding inhibition assay

Biotin-GGGGG-PLHSpT peptide (PH Japan) was first diluted with coating solution (KPL Inc., 50-84-01) to the final concentration of 0.1 μ M, and then 100 μ L of the resulting solution was immobilized onto a 96-well streptavidin-coated plate (Thermo Fisher Scientific Inc., 236004) for 90 min. To block unoccupied sites, wells were washed three times with PBST (PBS (pH 7.4) + 0.05% Tween 20) and incubated with 100 μ L of blocking buffer (PBS + 1% BSA (Sigma, A2153)) for 90 min. HeLa lysate was prepared by homogenization with a sonicator (SHIMADZU, USP-600A) in homogenization buffer (20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1.5 mM EDTA, 0.5 mM Na₃VO₄ and 20 mM disodium 4-nitrophenyl phosphate), centrifuged at 105,000 $\times g$ for 60 min at 4 °C (Beckman, Optima L-70 Ultracentrifuge) and the supernatant diluted with homogenization buffer to the assay concentration (5.0×10^6 cells/mL for HeLa cells). Then, 225 μ L/well of the resulting lysate was applied a 96-well plate (IWAKI, 3860-096) and 25 μ L/well of DMSO solution of 10 times test compounds was added to the plate. Pre-incubation was carried out for 30 min at rt. Blocking buffer was removed from the streptavidin-coated plate and the plate was washed three times with PBST. Then, 100 μ L/well mixture of HeLa lysate and test compounds were added to the plate in duplicate and incubation was continued for 60 min at rt. To terminate the reaction, the ELISA plate was washed three times with PBST. For detection of bound biotin-GGGGG-PLHSpT peptide and Plk1, plates were incubated for 1 h with 100 μ L/well of monoclonal anti-Plk1 antibody (Novus Biologicals, NB100-74502 or Thermo Fisher Scientific Inc., MA1-848) at a concentration of 1 μ g/mL in the blocking buffer. The plates were washed three times, then 100 μ L/well of an HRP-conjugated secondary antibody (Cell Signaling Technology, Inc., #7076) diluted to 1:500 in the blocking buffer was added to each well and incubation was continued for 1 h at rt. Afterwards, the plates were washed five times with PBST and incubated with 100 μ L/well of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution (TMB) (Cell Signaling Technology, Inc., #7004S) for 15 min at rt. The reactions were terminated by the addition of 100 μ L/well stop solution (Cell Signaling Technology, Inc., #7002S) and the optical density for each sample was measured at 450 nm by using a plate reader (PerkinElmer Co., Ltd, ARVO-SX).

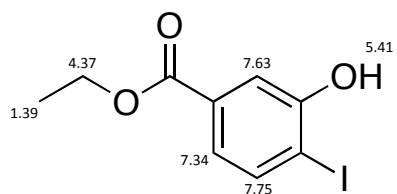
Assay for inhibitory activity of Plk1

In this assay, a CycLex Polo-like kinase 1 Assay/Inhibitor Screening Kit (CycLex Co. Ltd, CY-1163) was used and the assay was performed according to the kit instructions. We used recombinant Plk1 enzyme (CycLex Co. Ltd, CY1163E), which is the same as the constitutive active form of human full-length Plk1 with the mutation T210D in the active-site loop of kinase domain, together with an N-terminal GST tag. To investigate the mechanism of inhibition of Plk1 by terphenyl compounds, assay was performed at a normal ATP concentration (62.5 μ M final concentration) and at a high ATP concentration (3.12 mM final concentration).

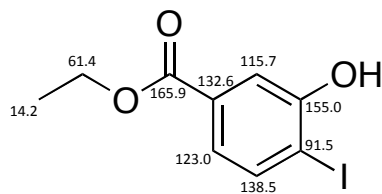
補足

補足 1: 化合物 **53** の構造決定

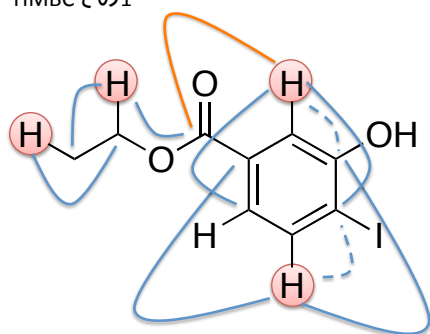
$^1\text{H-NMR}$



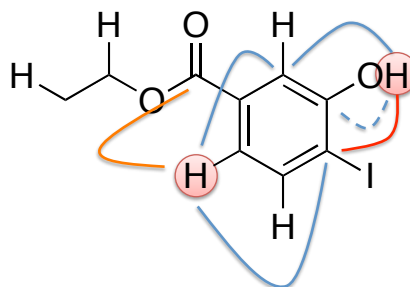
$^{13}\text{C-NMR}$



HMBCその1



HMBCその2



HMBCにおけるカップリング(弱いカップリングは点線で示した。)

図中オレンジのカップリングによりエステルのオルト位がプロトンであることが決まり、
図中赤のカップリングより、ヨウ素がフェノールのオルト位であることが決まるので構造が確定する。

補足 2: TR-FRET assay protocol

Prepare complete TR-FRET coregulator buffer G

VDR-LBD は氷浴で解凍、他のものは室温に戻す

VDR-LBD およびその希釈液は vortex しないこと

- ① 1 M DTT 30 μ L を TR-FRET Coregulator Buffer G 5970 (3980 + 1990) μ L に加えて、
Complete TR-FRET Coregulator Buffer G (5 mM DTT) とする
※作った buffer は VDR-LBD に使う分(1000 μ L)のみ氷浴する。残りの buffer は室温
- ② DMSO 40 μ L を Complete TR-FRET Coregulator Buffer G 1960 μ L に加えて、
2% DMSO とし、これを 10 μ L ずつ row 3(N-J 5 well)に分注(for control)

Prepare 4X Agonist Control and 4X Antagonist Dilution Series

- ③ Calcitriol (40, 4, 0.4 nM, 2% DMSO)を 5 μ L ずつ row 4, 5, 6 の各 well(5 well ずつ)に分注
Calcitriol は 40 nM を 800 μ L 余分につくる
- ④ row 4, 5, 6 に 2 % DMSO 5 μ L ずつ分注
- ⑤ Calcitriol (40 nM, 2 % DMSO)を row 7-15(N-J), 3-14(G-C)に 5 μ L ずつ分注
- ⑥ DLAM および自分の化合物群の希釈系列(40 μ M, 4 nM, 4 pM, 2% DMSO)を row 7-9 に
5 μ L ずつ分注

Prepare 4X VDR-LBD

- ⑦ 4300 nM VDR-LBD stock 0.23 μ L x2 を Cold Complete Coregulator Buffer G 1000 μ L
に加えて、4X VDR-LBD solution (2 nM)とし、全ての well に 5 μ L ずつ分注

Prepare 4X Fluorescein-TRAP220/DRIP-2/ 4X Tb anti-GST Antibody

- ⑧ 100 μ M fluorescein-TRAP220 / DRIP-2 を 2 μ L x2、3.6 μ M(= ~0.54 mg/mL)
Tb anti-GST antibody を 1.1 μ L x2 を Complete TR-FRET Coregulator Buffer G 994
 μ L に加える。これを全ての well に 5 μ L ずつ分注
(※ 6.7 μ M = ~1 mg/mL)

Plate Incubation and Reads

- ⑨ プレートを遮光して室温で 2 時間おだやかに震盪する。カバーをかけておく
- ⑩ 以下の条件で蛍光を測定
Excitation 340 nm
Emission 520 nm and 490 to 495 nm
Delay Time 100 μ s, Integration Time 200 μ s

VDR TR-FRET assay 希釈系列

	well に入れる前の 濃度	入れる量	DMSO 濃度	最終濃度
DLAM or 自分の化合物	40 μ M, 4 nM, 4 pM or 120 μ M, 40 μ M, 4 μ M	5 μ L	2%	10 μ M, 1 nM, 1 pM or 30 μ M, 10 μ M, 1 μ M
Calcitriol	40 nM	5	2 %	10 nM
VDR-LBD	2 nM	5	0 %	0.5 nM
Fl-peptide / Tb anti GST antibody	400 nM / 8 nM	5	0 %	100 nM / 2 nM
		Total 20 μ L	Total 1 %	

1日目						
①96穴白プレートを開け、4×3でマーカーキング						
②継代と同様						
③リザーバーに、プレート1枚につき培地10mLとコンフ2mL(3日目に8相当)を加えてビベッティング						
④1wellあたり100μL入れる ※ビベットの先はしっかりつめ、内壁を伝わせて入れ、出し切らない						
⑤一晚培養						
VDR2日目						
	ブラスミド	12 well	96well	48well	n plate	
外	1/10 TE	58.8	470.4	235.2	470.4	μL 棚
	CaCl ₂	7	56	28	56	μL G6
	CMX-GAL4N hVDR LBD (0.1ug/ul)	2.1	16.8	8.4	16.8	μL G6+H3
	tk-MH100x4-LUC(0.5ug/ul)	1.4	11.2	5.6	11.2	μL G6+H3
	CMX b-gal(0.2ug/ul)	0.7	5.6	2.8	5.6	μL G6
	計	70	560	280	560	μL
内	2BES	70	560	280	560	μL 棚
			*8	n=	1	

①クリーンベンチの電源を入れる
②冷蔵庫からブラスミドを出し、vortex→チビタン
③エッペンに多いものから順に入れ、ビベッティング→vortex→チビタン
④Luc assay用チューブに2×BESを入れる
⑤クリーンベンチ内で③の溶液を吸い取って④のチューブにvortexしながら1滴ずつ入れる
⑥クリーンベンチ内に20～30分静置
⑦リザーバーを出し、細胞をクリーンベンチ内に入れる
⑧チューブを10秒～1分vortexし、リザーバーに入れて10μLずつwellに入れる ※リン酸カルシウムの結晶が沈まないようビベッティング ※最後のの方は入れにくくなるので1度に4wellずつ
⑨インキュベーターで6～8時間インキュベーション
⑩化合物を25μLずつwellに入れる ⑪12～16hインキュベーション

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Materials for HEK293 or SL2 cells in 96-well plate

How many wells are tested?	96									①ルミノメーター、パソコン電源ON
How many plate are tested?	1									②冷凍庫から0.1M ATP、50mM CoA、10mM Luciferinを出す
β-Gal sol (125ul/well) ←三角フラスコ										③β-Gal solution調製
J2	ONPG	6.0	mg							※スターラーでゆっくり攪拌
棚	β-Gal bf	12.0	ml							④Tularik Lysis Luc solution調製
棚	in ONPG bf	3.0	ml							※Luciferinは遮光してから
J1	β-ME(2-メルカプトエタノール)	42.0	μl	※ノート、UT-CRIS						⑤細胞を確認後、培地を捨て、キムタオル上で残液を除去
	合計	15.0	ml							
Tularik Lysis Luc Sol for 96 well (50ul/well) ←チューブ										⑥④のTularik Lysis Luc solutionを50μLずつwellに入れる
棚	DDW	5.60	ml							※読み取りの向きに合わせて左上から右下へ6or12wellずつ
冷蔵庫	10x Core buffer	780	μl							⑦1分後、ルミノメーターで測定(AhR活性)
冷蔵庫	10X Triton X	780	μl							※AhR Luc Assay
H4	0.1M ATP (-20℃)	117	μl							⑧β-Gal solutionを125μlずつwellに入れる
H4	50mM CoA (-20℃)	78	μl							⑨遮光して室温で20min静置
(J1)	β-ME(2-メルカプトエタノール)	55	μl							
H4	10mM Luciferin (-20℃)	195	μl	※遮光	97.5	x2	65.0	x3		⑩ルミノメーターで測定(トランスフェクション効率→補正)
	合計	7.6	ml							※AhR b-Gal Assay
										⑪ルミノメーター、パソコンOFF

補足 3: Plk1 PBD 結合阻害実験プロトコール

ver. 2012/06/18

①遠心機および超遠心機(VACUUM を押すこと)の電源を入れ、4℃に冷却する。クリーンベンチを付け、培地、TE、PBS を温める。PBST, PBS, coating buffer, Tris buffer を室温に戻す。

②コンフルエントになった HeLa 細胞を継代の要領(PBS で wash, TE 0.5 mL で 1 min インキュベーター)ではがし 50 mL 遠心管に移す。cell count を行った後、2000 rpm, 10 min, 4℃で遠心する。以下氷上で操作する。

③遠心した上清の培地をデカントおよび吸引で除去し、同量の PBS を加えてピペッティングの後、再び 2000 rpm, 10 min, 4℃で遠心する。上清は⑧の操作前に除去する。

④遠心の待ち時間にストレプトアビジンプレート(Nunc, 236004)を必要分だけ分割し(8 well 単位)、ストリップをフレームに固定してナンバリングする。(lane 1 および 12 はアッセイデータが安定しないので使用しないこと)

⑤PBST buffer (PBS(pH 7.4) + 0.025 % Tween 20) 300 μ L x 3 / well で wash する。溶液は吸引して捨てる。(PBS の pH は系の安定性に重大な影響を与えるので、必ず確認する)biotin-GGGGG-PLHSpT ペプチドを coating solution(KPL, 50-84-00)に希釈して、最終濃度を 0.1 μ M とし、100 μ L ずつを well に入れる。90 min 室温で静置する。以下遮光。

⑥予め調製した Tris buffer (@冷蔵庫, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1.5 mM EDTA) 10 mL に対して Na₃VO₄ (@K2, 0.5 mM) 0.92 mg, および NO₂C₆H₄PO₄Na₂•6H₂O (@G8, 20 mM) 74.2 mg を加えて、破碎バッファーとする。氷浴。

⑧遠心で得られた pellet に 10 cm dish 一枚に対して 1 mL の破碎バッファーを加え、超音波破碎(12 sec x 4 times, 1 min intervals, ampl. = 20 %)を行う。得られた破碎溶液を 36000 rpm (105000 g), 60 min, 4℃で超遠心する。(専用の遠心管、青いふた、石川先生の近くの下の引き出し、遠心開始時は enter→start)

⑨blocking buffer(PBS + 1 % BSA (@培地の冷蔵庫))を調製。a) avidin-biotin の blocking, b) 抗 PLK1 抗体の希釈, c) 2 次抗体の希釈に用いるので必要量を調整。on ice にしておく。

⑩⑤のプレートの溶媒を吸引し、PBST 300 μ L x 3 で wash する。blocking buffer (PBS + 1 % BSA (@J1)) on ice を 100 μ L ずつ加えて 90 min 室温で静置する。

⑪⑧の超遠心の上清を破砕バッファーで希釈し、 5.0×10^6 cells/mL に調整したものを HeLa lysate とする。96well プレート上で HeLa lysate (or 破砕バッファー) 225 μ L に化合物サンプル(or DMSO) 25 μ L を加えて、30 min 室温で静置し、プレインキュベーションする。(化合物 10 倍希釈、DMSO10 %)、(実験操作開始の目安は⑩のインキュベーションが残り 60 min くらいになったら開始すると良い)

⑫⑩のプレートの溶液を吸引し、PBST 300 μ L x 3 で wash する。⑪で調製した lysate+サンプル溶液を 100 μ L ずつ加えて、室温で 60 min 静置する。

⑬⑫の溶液を吸引し、PBST 300 μ L x 3 で wash する。抗 PLK1 抗体 (@H2, Anti-PLK1, Mouse-Mono(1.30E+09))を 1:1000 in blocking buffer を 100 μ L ずつ加えて、1 時間室温で静置する。

⑭⑬の溶液を吸引し、PBST 300 μ L x 3 で wash する。抗マウス HRP 付き抗体(@H1 Cell Signaling #7076) 1:500 in blocking buffer を 100 μ L ずつ加えて、1 時間室温で静置する。

⑮⑭の溶液を捨て、PBST 300 μ L x 5 で wash する。TMB(@G7 Cell Signaling #7004S)を時間を見ながら一定間隔で 100 μ L ずつ加えて、遮光条件下、室温で 15 分静置する。

⑯well ごとに時間差が出ないように時間を計りながら stop solution(@G7 Cell Signaling #7002S)を 100 μ L 加えて反応を停止する。

⑰プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定(protocol PLK1_ELISA@450nm, shake 5 sec→Abs@450nm 0.1 sec)。

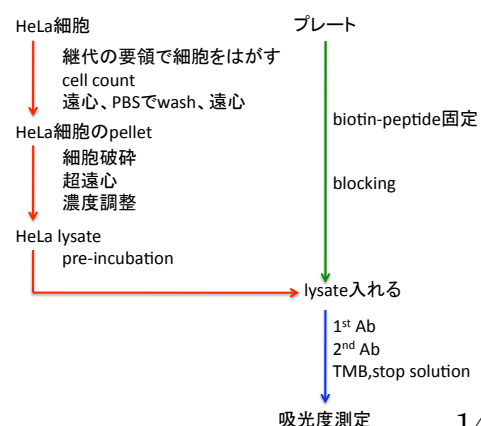
Lot memo

PBS

PBST

Tris

coating buffer



謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究室配属時より 6 年間に渡って終始御指導、御鞭撻を賜りました東京大学分子細胞生物学研究所 生体有機化学研究分野 橋本祐一 教授、並びに、石川稔 准教授に深い謝意を申し上げます。

本研究の遂行に当たって、多くの適切な御助言、御討論を賜りました、星薬科大学薬学部 杉田和幸 教授、東京薬科大学薬学部 青山洋史 准教授、帝京大学薬学部 松本洋太郎 講師、理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 どど孝介 研究員、東京大学分子細胞生物学研究所 生体有機化学研究分野 藤井晋也 講師、小林久芳 博士、谷内出友美 博士、国立衛生研究所有機化学部 三澤隆史 研究員に御礼申し上げます。

本研究において活発な討論に参加して頂き、公私にわたって様々な面で御協力を賜りました東京大学分子細胞生物学研究所 生体有機化学研究分野の先輩、同期、後輩の皆々様に深く感謝致します。

本研究の一部は日本学術振興会の特別研究員として行った成果であります。財政的な支援をいただきました日本学術振興会に感謝致します。

最後になりましたが、大学、大学院において研究に打ち込める環境を作ってくださり、また理解を示してくれた家族に心より感謝いたします。

平成 26 年 春

三田裕介