

博士論文

ケイ素を利用した
抗腫瘍活性物質の構造展開

中村 雅陽

目次

略語表

序章	1
第1章 研究背景と目的	3
第1節 研究背景	3
1.1 ケイ素について	3
1.2 生体内でのケイ素の働き	4
1.3 創薬化学におけるケイ素	5
第2節 本研究の目的	11
第2章 ステロイド代替骨格ジフェニルメタン骨格へのケイ素の導入	12
第1節 研究背景	12
1.1 マルチテンプレート	12
1.2 核内受容体と内因性リガンドとしてのステロイド誘導体	13
1.3 ステロイド代替骨格としてのジフェニルメタン骨格	14
第2節 アンドロゲンアンタゴニストの創製	16
- 炭素/ケイ素置換による選択性の転換 -	
2.1 背景	16
2.2 化合物のデザイン・合成	20
2.3 生物活性評価	24
2.3.1 VDR および AR レポータージーンアッセイ	24
2.3.2 細胞増殖抑制活性試験 (マウス乳がん SC-3 細胞)	29
2.3.3 標的タンパクに対する結合試験 (標識リガンドとの競合試験)	30
2.4 ドッキングシミュレーション	32
2.5 第2節のまとめ	35
第3節 エストロゲンレセプターリガンドの創製	36
3.1 背景	36
3.2 ケイ素体の合成	39
3.3 ケイ素体の ER 活性	40
3.4 第3節のまとめ	41
第4節 ステロイドサルファターゼ阻害剤の創製への展開	42
4.1 背景	42
4.2 化合物のデザイン	47
4.3 化合物の合成	49

4.4	生物評価	50
4.4.1	酵素阻害活性評価	50
4.4.2	ケイ素導入による活性向上についての考察	53
4.5	第4節のまとめ	55
第5節	小括	56
第3章	シランジオールおよびシラノールを導入した化合物の創製	57
第1節	研究背景	59
第2節	シランジオール構造を有するプロテアソーム阻害剤の創製	59
2.1	背景	59
2.2	化合物のデザイン・合成	61
2.3	生物評価（酵素阻害活性評価）と考察	63
第3節	シランジオール，シラノール構造を有する成人T細胞白血病（ATL） 細胞増殖阻害剤の創製	64
3.1	背景	64
3.2	化合物のデザイン	65
3.3	計算化学実験	67
3.4	化合物の合成	69
3.5	生物評価	70
3.6	第3節まとめ	74
第4節	小括	75
第4章	トリメチルシリル基および環状アルキルシリル基を有する 生理活性物質の創製	77
第1節	研究背景	77
第2節	トリメチルシリル基の利用	78
2.1	PSA 阻害剤	78
2.1.1	背景	78
2.1.2	化合物の合成	79
2.1.3	生物活性と考察	80
2.2	フタルイミド型チューブリン重合阻害剤	82
2.2.1	背景	82
2.2.2	化合物の合成	84
2.2.3	チューブリン重合阻害活性評価と考察	85
第3節	環状アルキルシリル基を有する核内受容体 ROR リガンドの創製	86
3.1	研究背景	86
3.1.1	テトラメチルテトラヒドロナフタレン(TMN)骨格とケイ素置換体	86

略語表

1,25-VD ₃	1 α ,25-dihydroxyvitamin D ₃
5 α R	5 α -reductase
Å	angstrom
ACE	angiotensin converting enzyme
AcOH	acetic acid
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
APN	aminopeptidase N
aq	aqueous solution
AR	Androgen receptor
Ar	Argon
ATL	Adult T cell Leukemia
ATP	adenosine triphosphate
ATRA	all <i>trans</i> retinoic acid
BINAP	2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Bn	benzyl
Bu	butyl
cat.	catalyst
Cp	cyclopentadienyl
DHEA	dehydroepiandrosterone
DHEAS	dehydroepiandrosterone sulfate
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMT-MM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride
DPM	disintegration per minute
E1	estrone
E1S	estrone sulfate
E2	estradiol
EC ₅₀	half maximal effective concentration
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	2-({2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl}(carboxymethyl)amino)acetic acid
ee	enantiomeric excess

Enz	enzyme
ER	Estrogen receptor
Et	ethyl
EtOH	ethanol
FAB	fast atom bombardment
FBS	fetal bovine serum
FXR	Farnesoid X receptor
GR	Glucocorticoid receptor
GTP	guanosine triphosphate
h	hour
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HIV	human immunodeficiency virus
HMGR	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HOSu	hydroxysuccinimide
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
HTLV-1	human T-lymphotropic virus-1
<i>i</i>	iso
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IL-17	interleukin-17
IPA	isopropyl alcohol
IκB	inhibitor of kappa B
LAH	lithium aluminium hydride
LC/MS	liquid chromatography / mass spectrometry
LH-RH	luteinizing hormone-releasing hormone
LXR	Liver X receptor
M	molar (= mol/L)
<i>m</i>	meta
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MEM	minimum essential medium
MeOH	methanol
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
min	minute
MOM	methoxymethyl

mp	melting point
MR	Mineralocorticoid receptor
MTPA	α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl
<i>n</i>	normal
NA	no activity
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NHS	hydroxysuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
<i>o</i>	ortho
ODS	octa decyl silyl
<i>p</i>	para
PBS	phosphate buffered saline
PC ₅₀	concentration of a test chemical at which the response is 50% of the response induced by the positive control
PDBID	Protein Data Bank ID
Ph	Phenyl
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
PR	Progesterone receptor
Pr	propyl
PSA	puromycin-sensitive aminopeptidase
PTLC	preparative thin layer chromatography
r.t.	room temperature
RAR	Retinoic acid receptor
RNA	ribonucleic acid
ROR	RAR-related orphan receptor
RXR	Retinoid X receptor
SAR	structure-activity relationship
sat.	saturated
SI	selectivity Index
STS	steroid sulfatase
<i>t</i>	tertiary
TEA	triethylamine
<i>tert</i>	tertiary
TES	triethylsilyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography

TMN	tetrahydrotetramethylnaphthalene
TMS	trimethylsilyl
Topo I	topoisomerase I
TPI	tubulin polymerization-inhibitory
Ts	tosyl
UPP	ubiquitin proteasome pathway
UV	ultraviolet
VDR	Vitamin D receptor
WST-1	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
κ	kappa
μ	micro

序章

元素の特性を活かした生理活性物質の創製は古くから試みられてきたが、従来用いられてきたヘテロ原子としては、酸素 (O)、窒素 (N) の他、リン (P)^{1,2}、イオウ (S)³、フッ素 (F)⁴をはじめとしたハロゲンなどが大部分を占めていた。加えて、近年、ホウ素 (B) が導入された多発性骨髄腫治療薬ボルテゾミブ⁵ が臨床使用されるようになった。一方、炭素 (C) の同族元素であるケイ素 (Si) を導入した生理活性物質の報告例は決して多くなく、その生物的特性は良く分かっていない。

そこで本研究では、ケイ素の特徴を活かした医薬品候補化合物の創製、創薬手法の提案を行うことを目標に検討を行い、創薬化学におけるケイ素の有用性を示すことを目的とした。

本論文の第 1 章では、研究背景としてケイ素と炭素の性質の比較と創薬化学におけるケイ素の利用の可能性について概説した。第 2 章では、ステロイド骨格の代替骨格として有用であるジフェニルメタン骨格⁶ にケイ素を導入し、活性の向上、核内受容体に対する選択性の転換に成功した例を示した。第 3 章では、シランジオールおよびシラノールを導入した化合物の創製について述べた。第 4 章では、トリメチルシリル基を導入した化合物及びテトラメチルテトラヒドロナフタレン骨格にケイ素を導入した核内受容体リガンドについて述べた。第 5 章では、ケイ素原子の結合の長さに注目し、ケイ素によるオレフィンおよびアミド構造の置き換えについての提案を行った。

¹ Azéma, L.; Baron, R.; Ladame, S. Targeting Enzymes with Phosphonate-Based Inhibitors: Mimics of Tetrahedral Transition States and Stable Isosteric Analogues of Phosphates. *Current Enzyme Inhibition* **2006**, *2*, 61-72.

² Naydenova, E.D.; Todorov, P.T.; Troev, K.D. Recent synthesis of aminophosphonic acids as potential biological importance. *Amino Acids* **2010**, *38*, 23-30.

³ 平井功一 医薬品と硫黄 *有機合成化学* **1987**, *45*, 536-548.

⁴ Kirk, K.L. Fluorination in Medicinal Chemistry: Methods, Strategies, and Recent Developments. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 305-321.

⁵ Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A.A.; Dick, L.R.; Grenier, L.; Klunder, J.M.; Ma, Y.T.; Plamondon, L.; Stein, R.L. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 333-338.

⁶ Hosoda, S.; Matsuda, D.; Tomoda, H.; Hashimoto, Y. Diphenylpentane skeleton as a multi-template for steroid skeleton-recognizing receptors/enzymes. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 572-580.

なお、本論文は、著者が東京大学 分子細胞生物学研究所 生体有機化学研究分野 橋本 祐一 研究室に、受託研究員として在籍していた際に得られた研究成果をまとめたものであり、本論文の内容の一部は、以下の学術論文にて既に発表済みである。

1) Design and synthesis of silicon-containing tubulin polymerization inhibitors: Replacement of the ethylene moiety of combretastatin A-4 with a silicon linker

Nakamura, M.; Kajita, D.; Matsumoto, Y.; Hashimoto, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 7381-7391.

2) Development of silicon-containing bis-phenol derivatives as androgen receptor antagonists: Selectivity switching by C/Si exchange

Nakamura, M.; Makishima, M.; Hashimoto, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 1643-1651.

3) Organosilicon Compounds as Adult T-Cell Leukemia Cell Proliferation Inhibitors

Nakamura, M.; Matsumoto, Y.; Toyama, M.; Baba, M.; Hashimoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, 61, 237-241.

4) Design and synthesis of silicon-containing steroid sulfatase inhibitors possessing pro-estrogen antagonistic character

Kajita, D. †; **Nakamura, M. †;** Matsumoto, Y.; Makishima, M.; Hashimoto, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 2244-2252. († : equal contribution)

5) Development of novel silicon-containing inverse agonists of retinoic acid receptor-related orphan receptors

Toyama, H.; **Nakamura, M.;** Nakamura, M.; Matsumoto, Y.; Nakagomi, M.; Hashimoto, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 1948-1959.

6) Structure-activity relationships of bisphenol A analogs at estrogen receptors (ERs): Discovery of an ER α -selective antagonist

Maruyama, K.; **Nakamura, M.;** Tomoshige, S.; Sugita, K.; Makishima, M.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 4031-4036.

7) Specific Inhibitors of Puromycin-Sensitive Aminopeptidase with a 3-(Halogenated Phenyl)-2,4(1H,3H)-quinazolinedione Skeleton

Matsumoto, Y.; Noguchi-Yachide, T.; **Nakamura, M.;** Mita, Y.; Numadate, A.; Hashimoto, Y. *Heterocycles* **2012**, 86, 1449-1463.

第1章 研究背景と目的

第1節. 研究背景

1.1 ケイ素について

ケイ素 (Silicon, Si) は、原子番号 14 番の元素であり、周期表で炭素と同じ第 14 族に属する。ケイ素は、天然に多く存在しており、地殻を構成する元素の量としては、酸素に次いで 2 番目に多いことが知られている⁷。自然界に存在するケイ素の多くは、岩石や鉱物中に酸素と結合したかたち、即ちシリカ (SiO₂) やケイ酸イオン (SiO₄⁴⁻, Si₂O₇⁶⁻) として存在している。

炭素とケイ素の直接結合した化合物は有機ケイ素化合物と呼ばれており、化学的に合成された最初の有機ケイ素化合物は、1863 年に C.Friedel らが合成したテトラエチルシラン (Et₄Si) である。その後、様々な有機ケイ素化合物の合成が試みられ、20 世紀前半にはシロキサン構造 (-SiR₂-O-SiR₂-) を有するポリシリコーンが発見された。ポリシリコーンは、化学的安定性・耐熱性などの対応する炭素化合物にはない特徴を有しており、その性質を活かした樹脂やオイルなど多くのシリコーン製品が発明され、現在に至っている。ケイ素の他の用途として、高純度ケイ素が半導体や太陽電池の重要な原料として用いられており、今日生産される半導体グレードの超高純度ケイ素の純度は 99.999999999999% (15 nine) に達する⁸。

また、有機合成の分野でも、アルコールの保護基としての使用や、ケイ素上にヘテロ原子を有するアルキルシランの過酸化物酸化によるアルコールへの変換反応 (玉尾・フレミング酸化反応)⁹、シリルエノールエーテルを用いるアルドール反応 (向山アルドール反応)¹⁰、有機ケイ素化合物と有機ハロゲン化物とのパラジウム触媒クロスカップリング反応 (檜山クロスカップリング反応)¹¹などに使用されている。

⁷ Birchall, J.D. The essentiality of silicon in biology, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 351-357.

⁸ 吉良満夫, 玉尾皓平編 現代ケイ素化学 化学同人 **2013**

⁹ Tamao, K. Discovery and synthetic applications of novel silicon-carbon bond cleavage reactions based on the coordination number change of organosilicon compounds. *Proc. Japan Acad., Series B* **2008**, 84, 123-133.

¹⁰ Mukaiyama, T. Explorations into New Reaction Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5590-5614.

¹¹ Hatanaka, Y.; Hiyama, T. Cross-coupling of organosilanes with organic halides mediated by a palladium catalyst and tris(diethylamino)sulfonium difluorotrimethylsilicate. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 918-920.

1.2 生体内でのケイ素の働き

ケイ素の生物への関わりについては、動物では鶏のヒナとラットでケイ素欠乏症が報告されており、ケイ素が不足することで発育に影響が出ることが知られている。その際のケイ素の生化学的機能として、骨生成への関与が推測されているが、詳細は明らかにされていない^{1, 12}。

一方、植物（藻類と陸上植物）においては、ケイ藻などの一部の藻類とシダ植物のトクサで必須性が認められている。ケイ藻は、増殖する際、炭素や窒素、リンのほかに、ケイ酸質の殻をつくるためにケイ素が一定の割合必要とされている。また、トクサはケイ酸を根から吸収し茎に送り、蓄積されたケイ酸が固化し、丈夫な茎を形成する。その他、一部の種子植物ではケイ素の有用性が認められており、中でもイネ科の植物はケイ素集積植物として知られている^{6, 13}。ケイ素は、イネを栽培する際の栄養として重要であり、茎などに蓄積したケイ素はカビの感染や害虫からの攻撃を軽減させ、蒸散による水分の減少を最小限に抑える働きをもつことも知られている¹⁴。

以上の様に、生体内でのケイ素の働きがいくつか報告されているが、それらは、無機化合物としてのケイ素（主にケイ酸）が関与しており、興味深いことに、自然界から有機ケイ素化合物¹⁵が発見された例は、調査した限り現在まで報告されていない¹⁶。

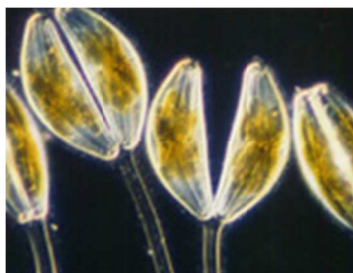


Figure 1-1. 群体性のケイ藻¹⁷

¹² 松永俊朗, 植物体内でのケイ素の化学形態. *日本土壌肥料雑誌* **2004**, 75, 387-391.

¹³ Epstein, E. *SILICON Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **1999**, 50, 641-664.

¹⁴ Ma, J.F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Tamai, K.; Konishi, S.; Fujiwara, T.; Katsuhara, M.; Yano, M. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* **2007**, 448, 209-212.

¹⁵ 炭素とケイ素が直接結合した化合物

¹⁶ Prasad, H. *Organosilicon Reagents in Natural Product Synthesis. Resonance.* **2002**, 7, 48-64.

¹⁷ ケイソウプロジェクトホームページ <http://www.u-gakugei.ac.jp/~diatom/japan/index.html>

1.3 創薬化学におけるケイ素

ケイ素 (Si) は、炭素 (C) と同じ周期表の 14 族に属することから、創薬化学において、ケイ素を炭素の代替元素として利用することが試みられている (Figure 1-2.)。炭素をケイ素に置換する効果として、分子サイズ・結合角の変化、脂溶性の向上、電気陰性度の違い (電荷の偏り) により、活性、選択性、体内動態などの変化・改善が期待される。また、ケイ素に置換することで化合物の特許上の新規性が得られる可能性もある¹⁸。以下に、ケイ素と炭素の比較および創薬化学への応用の可能性について述べる。

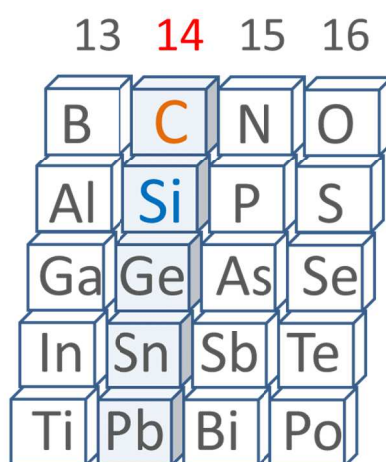


Figure 1-2. 周期表でのケイ素の周辺原子

(1) 分子サイズ・結合角

炭素、ケイ素の共有結合半径はそれぞれ 77 および 117 pm であり、ケイ素の方が約 1.5 倍長いことが知られている。また、炭素 - ケイ素 (C-Si) 結合および炭素 - 炭素 (C-C) 結合の平均距離はそれぞれ 1.87 Å, 1.54 Å であり、前者の方が約 20% 長いことも知られている¹⁹。また、ケイ素または炭素を中心原子と考えた際の結合角についても、ケイ素化合物の結合角 ($\angle\text{C-Si-C}$) は、ケイ素化合物の結合が炭素化合物より長いことで、周囲の立体障害が緩和され、結果、炭素化合物の結合角 ($\angle\text{C-C-C}$) と異なってくる場合がある。

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

¹⁸ Showell, G.A.; Mills, J.S. Chemistry challenges in lead optimization: silicon isosteres in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 551-556.

¹⁹ Franz, A.K.; Wilson, S.O. Organosilicon Molecules with Medicinal Applications, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 388-405.

(2) 脂溶性

ケイ素化合物は、対応する炭素化合物よりも脂溶性が高いことが知られている。例えば、トリメチルシリルベンゼン ($\text{Me}_3\text{Si-Ph}$) の $\log P$ は 4.7 であるのに対し、対応する炭素化合物である *tert*-ブチルベンゼン ($\text{Me}_3\text{C-Ph}$) の $\log P$ は 4.0 である¹⁹。ケイ素化合物の脂溶性が炭素化合物より高い原因として、炭素が分子サイズの大きいケイ素に置き換わることで、分子の表面積が大きくなり、脂溶性の向上につながると考えられる (Figure 1-3)。

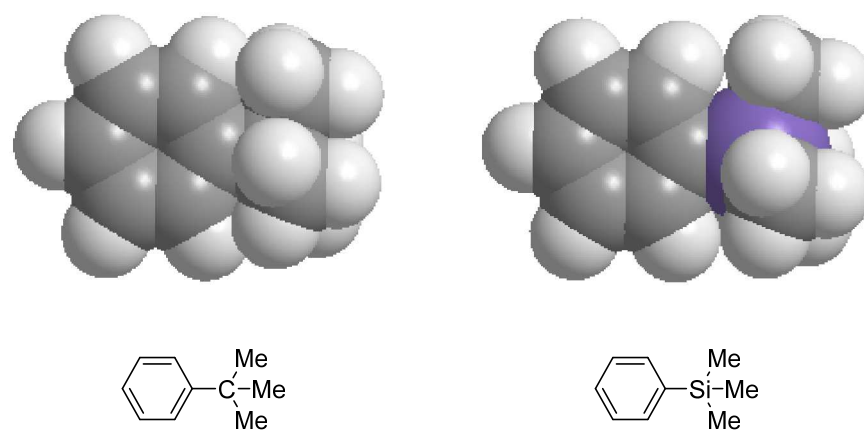


Figure 1-3. *t*-ブチルベンゼン (左) とトリメチルシリルベンゼン (右)

化合物の脂溶性の向上は、薬剤の組織移行性の向上、体内での薬物動態の改善につながると期待される²⁰。また、化合物の脂溶性は、化合物が脳内へ移行する際に障壁となる blood-brain barrier (BBB) の透過にも影響があると言われている²¹。即ち、化合物の脂溶性を向上させることで、脳腫瘍やアルツハイマー病治療薬など脳内へ移行させる必要がある化合物の薬効を向上させることができる可能性がある。

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

²⁰ Waring, M.J. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2010**, *5*, 235-248.

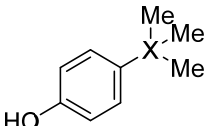
²¹ Clark, D.E. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 927-933.

(3) 電気陰性度および酸性度

炭素、ケイ素の電気陰性度はそれぞれ、2.50, 1.74 であり、ケイ素は炭素よりも陽性であると言える¹³。よって、アルキル置換ケイ素 (R_3Si-) を化合物に導入すると、誘起効果 (+I 効果) により、電子供与性基として働く。例として、トリメチルシリル酢酸 (Me_3Si-CH_2COOH) および *tert*-ブチル酢酸 (Me_3C-CH_2COOH) の pKa はそれぞれ、5.22 および 5.00 であり、アルキル置換ケイ素 (R_3Si-) の導入により、酸性度が低下している²²。

一方、フェノールにトリメチルシリル基を導入した場合には、フェノールの酸性度が高くなることが報告されている (Table 1-1.)²³。これは、ケイ素がベンゼンなどの芳香環と結合した場合、ケイ素の d 軌道と芳香環の π 電子に間に $d\pi-p\pi$ 結合が形成される効果 (-M 効果) によるものだと考えられる²⁴。

Table 1-1. フェノール誘導体の酸性度の比較



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

また、トリフェニルメタノール (Ph_3C-OH) と対応するトリフェニルシラノール (Ph_3Si-OH) の pKa (DMSO) はそれぞれ 16.97 および 16.57 であり、シラノールの酸性度が高いことが知られている¹⁵。この理由として、シラノールの酸素上の非共有電子対が、ケイ素の空の d 軌道と相互作用 ($d\pi-p\pi$ 結合を形成) することが示唆されている。このようにアルコールをシラノールに置換することで酸性度が増加することから、標的タンパクとの水素結合能が向上し、生物活性の向上にもつながることが期待される。

²² Saul Patai, S.; Rappoport, Z. The Chemistry of Organic Silicon Compounds. *John Wiley & Sons, Ltd.* 1989, ISBN: 0-471-91993-4.

²³ Fujii, S.; Miyajima, Y.; Masuno, H.; Kagechika, H. Increased Hydrophobicity and Estrogenic Activity of Simple Phenols with Silicon and Germanium-Containing Substituents. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 160-166.

²⁴ 橋本忠, 有機ケイ素化合物の合成 (第 12 報), *薬学雑誌*, 1967, 87, 524-527.

(4) 多重結合の形成

炭素化合物では、二重結合や三重結合、芳香環などの不飽和結合が安定に存在するが、対応するケイ素化合物では、一般に不安定で合成が難しい。炭素とケイ素の化学結合の違いは、s 軌道と p 軌道の広がりとの差と考えられている。炭素の価電子軌道である 2s 軌道と 2p 軌道は、広がりがほぼ同じでエネルギー準位も近く、容易に混成して σ 結合と π 結合を安定に形成する。一方、ケイ素の炭素の価電子軌道である 3s 軌道と 3p 軌道では、軌道の広がりが大きく異なり、エネルギー準位の差も大きい為に混成しにくい⁸。

以下に、ケイ素化合物が二重結合を形成しにくいことを利用した例を示す。ハロペリドール (Haloperidol) は、ブチロフェノン系抗精神病薬であり、中枢神経系におけるドパミン作動系、ノルアドレナリン作動系等に対する抑制作用によって効果を発現し、統合失調症、躁病の治療に用いられている²⁵。しかしながら、ハロペリドールの代謝物であるピリジニウム体 HPP+ は神経毒性を有することが知られており、臨床使用上の問題となっている²⁶。ピリジニウム体 HPP+ は、ハロペリドールが脱水を経て生じるオレフィン体 HPTP が、芳香族化して生じる。一方、アルコールをシラノールへ変換した Sila-ハロペリドールの場合、ケイ素 - 炭素二重結合 (Si=C) が不安定である為、オレフィン体 Sila-HPTP は生じず、毒性を示す HPP+ に対応する Sila-HPP+ も生成しない (Figure 1-4.)²⁷。

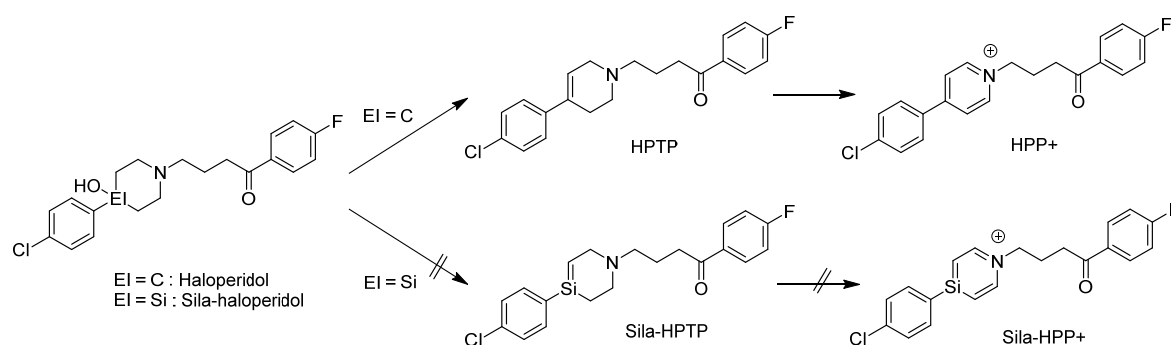


Figure 1-4. ハロペリドールおよびそのケイ素体の代謝経路

²⁵ セレネース®注 5mg 医薬品インタビューフォーム (大日本住友製薬) 2012 年 2 月 (改訂第 20 版)

²⁶ Kawashima, H.; Iida, Y.; Kitamura, Y.; Saji, H. Binding of 4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]pyridinium ion (HPP+), a metabolite of haloperidol, to synthetic melanin: implications for the dopaminergic neurotoxicity of HPP+. *Neurotox Res.* **2004**, *6*, 535-542.

²⁷ Tacke, R.; Popp, F.; Müller, B.; Theis, B.; Burschka, C.; Hamacher, A.; Kassack, M.U.; Schepmann, D.; Wunsch, B.; Jurva, U.; Wellner, E. Sila-haloperidol, a silicon analogue of the dopamine (D2) receptor antagonist haloperidol: synthesis, pharmacological properties, and metabolic fate. *ChemMedChem.* **2008**, *3*, 152-164.

酸素との二重結合形成においても炭素とケイ素では、異なった性質がみられる。炭素においては、ケトンとジオールの平衡はケトン型に偏っている。一方、ケイ素の場合は、ケイ素 - 酸素二重結合 ($\text{Si}=\text{O}$) が安定ではない為、ジオール型 (シランジオール) に偏っている (Figure 1-5.)¹⁹。

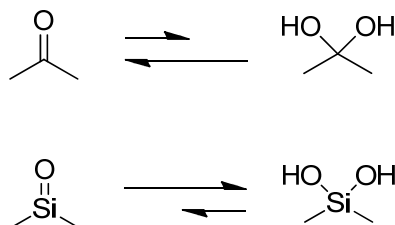


Figure 1-5. 炭素とケイ素におけるケトンとジオールの平衡

Table 1-2. に示すように、ケイ素のケトン体 (silanone) では、炭素のケトンに比べ、 π 結合エネルギーが著しく減少している²⁸。よって、ケイ素体においては、弱い π 結合を切断し、新たにより強い σ 結合を形成することで、より大きなエネルギーを得ることができる。即ち、ケイ素においては、ケイ素 - 酸素二重結合 ($\text{Si}=\text{O}$) を形成するよりも、ジオール型 (シランジオール) をとる方が、エネルギー的に安定であるため、平衡もジオール型に偏る。

このシランジオール構造を、プロテアーゼによる基質の加水分解時におけるテトラヘドラルな遷移状態を模倣した構造として利用する試みが行われており、いくつかのプロテアーゼ阻害剤が報告されている²⁹。シランジオールの利用の詳細については、後述する。

Table 1-2. $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ および $\text{H}_2\text{Si}=\text{O}$ の結合エネルギー (kcal/mol)

	σ	π	$\sigma+\pi$
$\text{H}_2\text{C}=\text{O}$	93.6	95.3	188.9
$\text{H}_2\text{Si}=\text{O}$	119.7	58.5	178.2

²⁸ H, Suzuki.; N, Tokitoh.; R, Okazaki.; S, Ngase.; M, Goto. Synthesis, Structure, and Reactivity of the First Kinetically Stabilized Silanethione. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11096-11105.

²⁹ Hernández, D.; Lindsay, K.B.; Nielsen, L.; Mittag, T.; Bjerglund, K.; Friis, S.; Mose, R.; Skrydstrup, T. Further studies toward the stereocontrolled synthesis of silicon-containing peptide mimics. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3283-3293.

(5) ケイ素と炭素の比較のまとめ

ケイ素と炭素は周期表で同じ 14 族に属することから、類似の性質を示す一方、上述の通り、明らかに異なった性質も有する。以下に、ケイ素と炭素の比較のまとめを示す (Table 1-3.)。

Table 1-3. ケイ素と炭素の比較³⁰

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

³⁰ Ref.19 に記載の表を一部改編

第2節 本研究の目的

上述の様に、ケイ素は炭素と異なった特徴的な性質を有することから、ケイ素を含有した化合物の生理活性に興味を持たれる。しかしながら、ケイ素含有生理活性物質については、研究の歴史も浅く、例も少ない為に、その生物学的特性は良くわかっていない。また、いくつかのケイ素を含有した医薬品候補化合物³¹⁻³⁴の臨床試験が行われてきたが、実際に臨床応用されている化合物はほとんど知られていない (Figure 1-6)。

そこで本研究では、以下の2点を目的に研究を行い、創薬化学におけるケイ素の有用性を検討することとした。

- 1) ケイ素の特徴を活かした医薬品候補化合物の創製
- 2) ケイ素の特徴を利用した創薬および化合物の構造最適化手法の提案

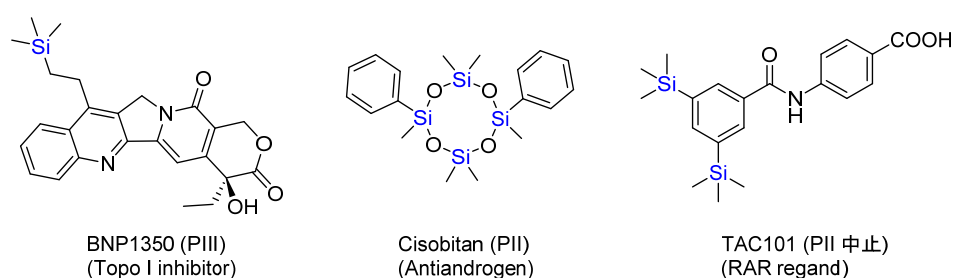


Figure 1-6. 臨床試験段階まで進んだケイ素含有医薬品候補化合物の例

³¹ Gately, S.; West, R. Novel therapeutics with enhanced biological activity generated by the strategic introduction of silicon isosteres into known drug scaffolds. *Drug Development Research Drug Discovery* **2007**, 68, 156-163.

³² Alfthan, O.; Andersson, L.; Esposti, P.L.; Fossa, S.D.; Gammelgaard, P.A.; Gjores, J.E.; Isacson, S.; Rasmussen, F.; Ruutu, M.; von Schreeb, T.; Setterberg, G.; Strandell, P.; Strindberg, B. Cisobitan in treatment of prostatic cancer. A prospective controlled multicenter study. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **1983**, 17, 37-43.

³³ Daud, A.; Valkov, N.; Centeno, B.; Derderian, J.; Sullivan, P.; Munster, P.; Urbas, P.; Deconti, R.C.; Berghorn, E.; Liu, Z.; Hausheer, F.; Sullivan, D. Phase II trial of karenitecin in patients with malignant melanoma: clinical and translational study. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 3009-3016.

³⁴ Rizvi, N.A.; Marshall, J.L.; Ness, E.; Hawkins, M.J.; Kessler, C.; Jacobs, H.; Brenckman, W.D. Jr.; Lee, J.S.; Petros, W.; Hong, W.K.; Kurie, J.M. Initial clinical trial of oral TAC-101, a novel retinoic acid receptor alpha selective retinoid, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* **2002**, 20, 3522-3532.

第2章 ステロイド代替骨格ジフェニルメタン骨格へのケイ素の導入

第1節 研究背景

1.1 マルチテンプレート

タンパク質は生物機能を担う重要な分子であることから、創薬研究においては、標的タンパク質と結合してその機能を制御する化合物の探索が行われている。ヒトゲノム解析の結果から、ヒトゲノムの総数は20,000~25,000種であり³⁵、翻訳後修飾などを加味するとヒトタンパク質の総数は50,000~70,000種と見積もられている。一方で、構造生物学的解析から、タンパク質ドメインのフォールド（空間構造）は1,000種類程度であることが示唆されている^{36, 37}。言い換えると、複数のタンパク質ドメインが同一のフォールドを持つことになり、あるドメインに適合するリガンド骨格は、他の複数のタンパク質に対するリガンドテンプレートになる可能性があると考えられる。このようなターゲットタンパク質の種類を超えたりガンド共通構造は、マルチテンプレートと呼ばれることがある。

創薬におけるリード化合物探索やケミカルバイオロジーにおけるライブラリー構築において、マルチテンプレートを基に構造展開を行うことで母核構造の探索手順などが省けるため、効率的なリードおよびリード化合物の創出が可能になると考えられる。東京大学分子細胞生物学研究所 橋本研究室（以下、橋本研究室）ではこれまでにサリドマイド（**Figure 2-1.**）およびフタルイミド骨格をマルチテンプレートとした種々の生理活性物質の創製に成功している^{38, 39, 40}。

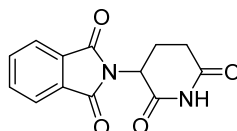


Figure 2-1. サリドマイドの構造

³⁵ Stein, L.D. Human genome: End of the beginning. *Nature* **2004**, 431, 915-916.

³⁶ Koonin, E.V.; Wolf, Y.I.; Karev, G.P. The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature* **2002**, 420, 218-233.

³⁷ Koch, M.A.; Wittenberg, L.O.; Basu, S.; Jeyaraj, D.A.; Gourzoulidou, E.; Reinecke, K.; Odermatt, A.; Waldmann, H. Compound library development guided by protein structure similarity clustering and natural product structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 16721-16726.

³⁸ Hashimoto, Y. Structural development of biological response modifiers based on retinoids and thalidomide. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 543-551.

³⁹ Hashimoto, Y. Novel biological response modifiers derived from thalidomide. *Curr. Med. Chem.* **1998**, 5, 163-178.

⁴⁰ Hashimoto, Y. Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 461-479.

1.2 核内受容体と内因性リガンドとしてのステロイド誘導体

核内受容体は転写因子の一種であり、リガンドが結合することで細胞核内での転写を制御する。ヒトではステロイドホルモン受容体をはじめ 48 種類が存在することが知られている⁴¹。これらは構造や転写活性化機構の類似性が高く、核内受容体スーパーファミリーを形成している。核内受容体は生殖、恒常性維持、脂質・骨等の代謝、免疫調節など、生物の多くの生命機能を制御している。

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

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

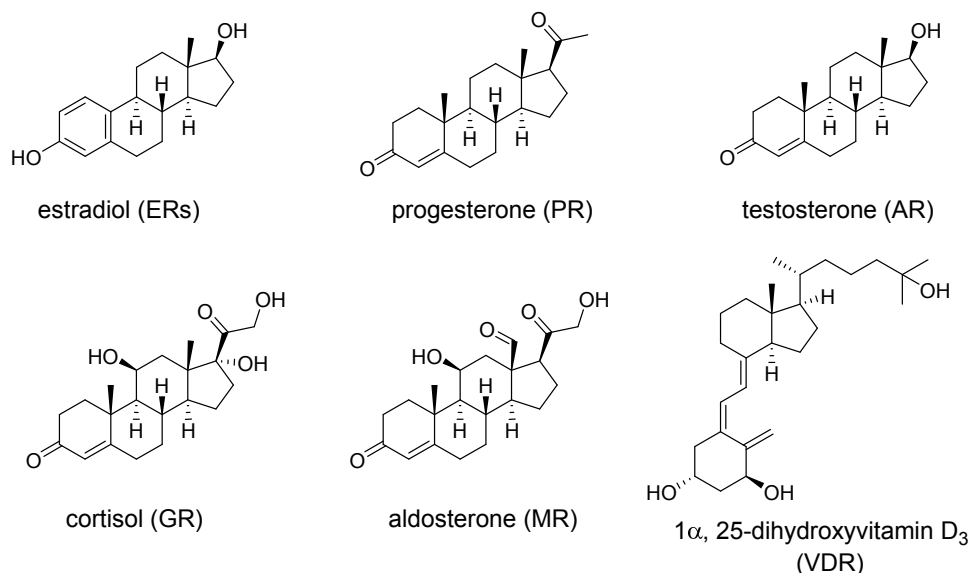


Figure 2-2. 核内受容体の内因性リガンドとしてのステロイド誘導体

⁴¹ Maglich, J.M.; Sluder, A.; Guan, X.; Shi, Y.; McKee, D.D.; Carrick, K.; Kamdar, K.; Willson, T. M.; Moore, J.T. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biol.* **2001**, 2, RESEARCH0029, 1-7.

1.3 ステロイド代替骨格としてのジフェニルメタン骨格

前述のとおりステロイド誘導体は様々な生理活性を有することから、ステロイド骨格を有する医薬品の研究開発が盛んに行われ、抗がん剤、抗炎症剤等として数多くの化合物が臨床使用されている。しかしながら、ステロイド骨格を有する薬剤またはその代謝物が、本来のターゲット以外のタンパクにも作用し、副作用を生じることが問題となっている。

このような副作用を回避すべく、ステロイド誘導体の構造最適化研究が行われてきたが、合成上の理由から構造展開の自由度が制限されることもあり、近年は、非ステロイド型のリガンドの報告も増加してきている。以下に、非ステロイド型の核内受容体リガンドの一例を示す (Figure 2-3)。

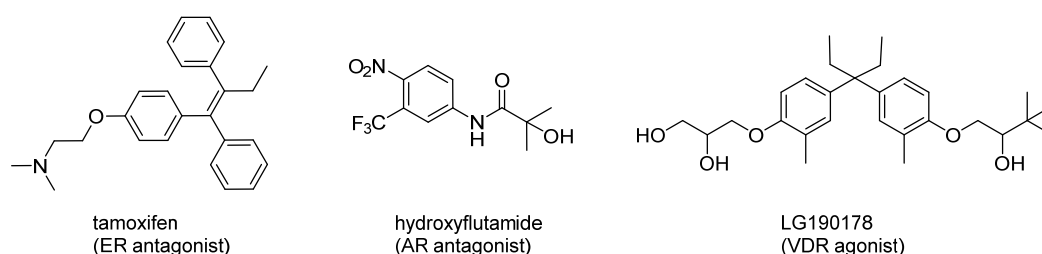


Figure 2-3. Ligands of the steroid hormone receptors with a non-steroidal skeleton.

一方、橋本研究室の細田らは、ジフェニルメタン骨格を有する VDR アゴニスト LG190178 の誘導体研究から、本骨格の化合物の一部が AR アンタゴニスト活性も示すことを見出した⁴²。また、VDR および AR は、ステロイド誘導体を内在性のリガンドとして認識することから、ジフェニルメタン骨格が、天然のマルチテンプレートであるステロイド骨格の代替骨格になりうるという仮説を立て、検証を実施した。その結果、高活性な VDR/AR デュアルリガンド(*R,S*)-DPP-1023⁴²、FXR アゴニスト⁴³、5 α 還元酵素阻害剤⁴⁴、HMGR 阻害剤の創製に成功し、ジフェニルメタン骨格がステロイド骨格の代替骨格となりうることを示した (Figure 2-4)⁴⁵。

⁴² Hosoda, S.; Tanatani, A.; Wakabayashi, K.; Makishima, M.; Imai, K.; Miyachi, H.; Nagasawa, K.; Hashimoto, Y. Ligand with a 3,3-diphenylpentane skeleton for nuclear vitamin D and androgen receptors: Dual activities and metabolic activation. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5489-5502.

⁴³ Kainuma, M.; Kasuga, J. I.; Hosoda, S.; Wakabayashi, K. I.; Tanatani, A.; Nagasawa, K.; Miyachi, H.; Makishima, M.; Hashimoto, Y. Diphenylmethane skeleton as a multi-template for nuclear receptor ligands: Preparation of FXR and PPAR ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3213-3218.

⁴⁴ Hosoda, S.; Hashimoto, Y. 3,3-Diphenylpentane skeleton as a steroid skeleton substitute: Novel inhibitors of human 5 α -reductase 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5414-5418.

⁴⁵ 細田信之介 ステロイド代替構造となるジフェニルペンタン骨格を用いた生理活性物質の創製 東京大学大学院薬学系研究科 平成 20 年度博士論文

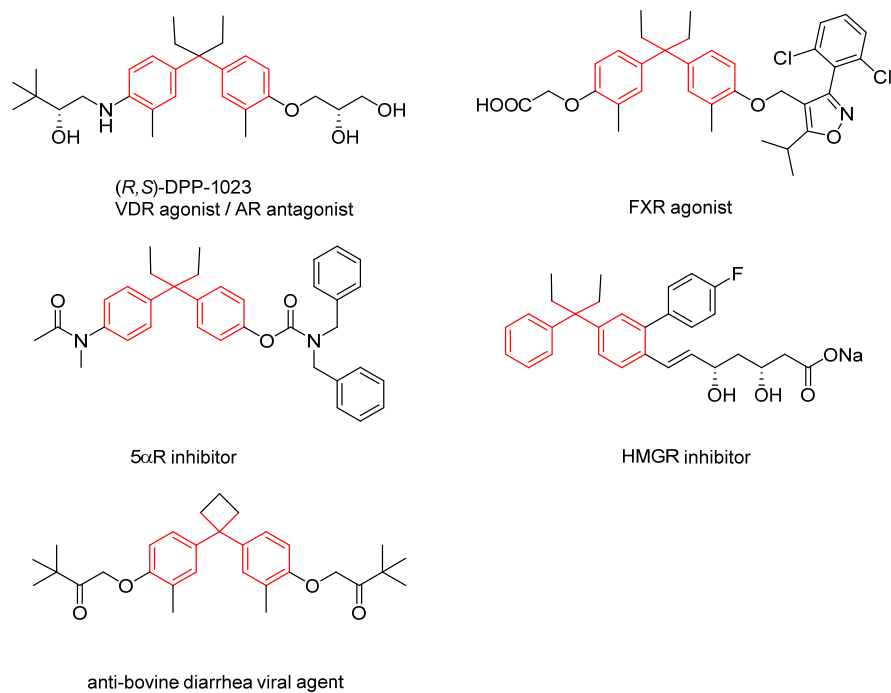


Figure 2-4. ジフェニルメタン骨格（赤色）を有する生理活性物質

そこで、私はマルチテンプレートとしてのジフェニルメタン骨格の更なる拡張を念頭に置き、ジフェニルメタン骨格へケイ素を導入したジフェニルシラン誘導体をデザインし、ケイ素の導入による生理活性への影響の検証を行うこととした (**Figure 2-5**). 本章では、ケイ素を導入した AR アゴニストの創製, ER リガンドの創製, ステロイドサルファターゼ阻害剤の創製について述べる.

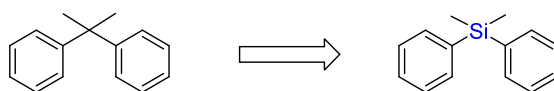


Figure 2-5. ジフェニルメタン骨格へのケイ素の導入

第2節 アンドロゲンアンタゴニストの創製 - 炭素/ケイ素置換による選択性の転換 -

2.1 背景

ビタミンDの生物学的活性体である $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ ($1,25\text{-VD}_3$) (1)は、カルシウムの代謝調節、骨代謝調節、細胞の増殖・分化誘導および免疫調節などの作用を発現する⁴⁶⁻⁵⁰。これらの $1,25\text{-VD}_3$ の活性のほとんどは、特異的転写因子としてのビタミンDレセプター (VDR) への結合と活性化を介して生じると考えられている (Figure 2-6.)^{48,49}。

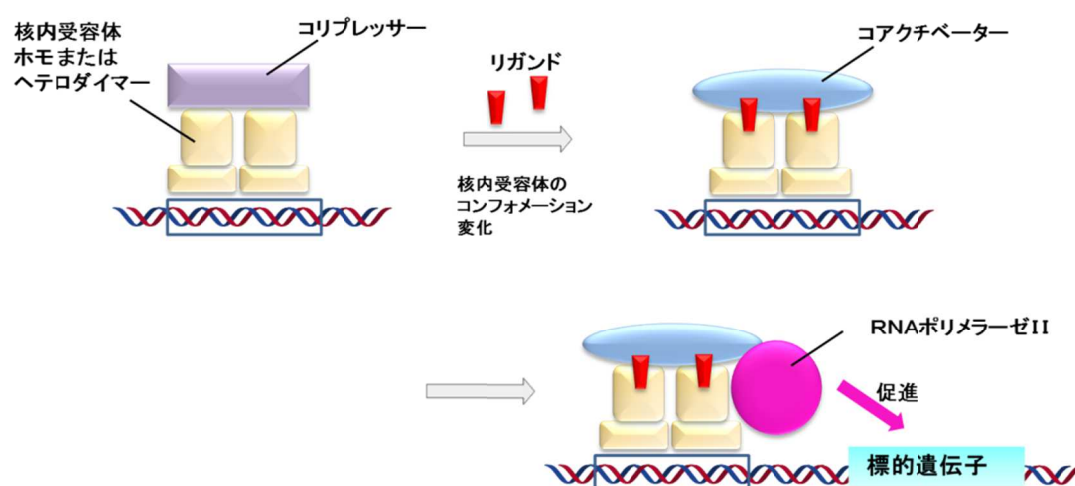


Figure 2-6. 核内受容体の転写活性化

⁴⁶ Bouillon, R.; Okamura, W.H.; Norman, A.W. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocrine Rev.* **1995**, *16*, 200-257.

⁴⁷ Norman, A.W.; Roth, J.; Orci, L. The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). *Endocrine Rev.* **1982**, *3*, 331-366.

⁴⁸ Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schütz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **1995**, *83*, 835-839.

⁴⁹ Bjorklund, S.; Almouzni, G.; Davidson, I.; Nightingale, K.P.; Weiss, K. Global transcription regulators of eukaryotes. *Cell* **1999**, *96*, 759-767.

⁵⁰ Baeke, F.; Takiishi, T.; Korf, H.; Gysemans, C.; Mathieu, C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology* **2010**, *10*, 482-496.

近年、1,25-VD₃が、白血病細胞に対する分化誘導活性^{51, 52}、前立腺がん、乳がん、大腸がんを含む様々なタイプのがん細胞への増殖阻害作用活性⁵³⁻⁵⁵を示すことが報告されている。このことから、現在までに、数千ものセコステロイド骨格を有するビタミン D 誘導体が合成され⁵⁶、1,25-VD₃ (1)およびアルファカルシドール(2)などのビタミン D 誘導体が、カルシウム代謝の調節や乾癬、骨粗しょう症などの治療薬として臨床使用されている (Figure 2-7.)⁵⁷。しかしながら、これらのセコステロイド骨格を有する薬剤の中には、高カルシウム血症などの副作用を誘発する薬剤があることも知られている。

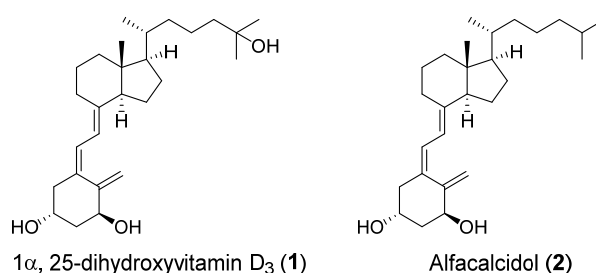


Figure 2-7. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-VD₃) (1)およびアルファカルシドール(2)の構造

⁵¹ Abe, E.; Miyaura, C.; Sakagami, H.; Takeda, M.; Konno, K.; Yamazaki, T.; Yoshiki, S.; Suda, T. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃. *T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 4990-4994.

⁵² Bar-shavit, Z.; Teitelbaum, S. L.; Reitsma, P.; Hall, A.N.N.; Pegg, L.E.; Trial, J.; Kahn, A. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 5907-5911.

⁵³ Johnson, C.S.; Muindi, J.R.; Hershberger, P.A.; Trump, D.L. The antitumor efficacy of calcitriol: preclinical studies. *Anticancer Res.* **2006**, 26, 2543-2549.

⁵⁴ Guzey, M.; Kitada, S.; Reed, J.C. Apoptosis induction by 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ in prostate cancer. *Mol. Cancer Therapeutics.* **2002**, 1, 667-677.

⁵⁵ James, S.Y.; Mackay, A.G.; Colston, K.W. Effects of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1996**, 58, 395-401.

⁵⁶ Colston, K.; Colston, M. J.; Feldman, D. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology* **1981**, 108, 1083-1086.

⁵⁷ Guyton, K.Z.; Kensler, T.W.; Posner, G.H. Vitamin D and vitamin D analogs as cancer chemopreventive agents. *Nutrition Rev.* **2003**, 61, 227-238.

Boehm らは、ジフェニルメタン骨格を有する LG190178 (**3a**), LG190176 (**4b**) および LG190155 (**5c**)を含むノンセコステロイド型のビタミン D 誘導体を報告している (Figure 2-8.)^{58, 59}. これらの化合物は、VDR レポータージーンアッセイ⁶⁰において高い転写活性化作用 ($EC_{50} = 40-600$ nM) を示し、ヒト白血病細胞 HL-60 の分化誘導活性 ($EC_{50} = 30-800$ nM) も示した. また、ヒト前立腺がん細胞 LNCaP の増殖抑制活性も示し、*in vivo* においても VDR のターゲット遺伝子の発現を制御した.

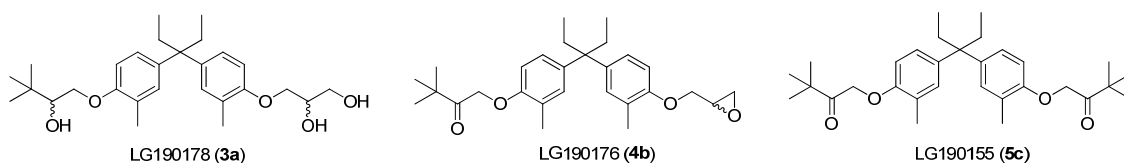


Figure 2-8. Chemical structures of nonsecosteroidal vitamin D derivatives, LG190178 (**3a**), LG190176 (**4a**) and LG190155 (**5a**)

近年、橋本研究室の細田らは、様々な LG190178 誘導体のデザインおよび合成を報告している^{42, 61}. 合成した化合物のうち、(*R,S*)-DPP-1023 (**6**)を含む LG190178 の窒素導入体は、LG190178 に比べ、高いビタミン D 活性を示した (Figure 2-9.).

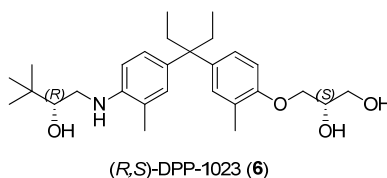


Figure 2-9. Chemical structure of (*R,S*)-DPP-1023 (**6**)

また、本構造展開を行っている際、細田らは、これらのジフェニルメタン骨格を有するノンセコステロイド型のビタミン D 誘導体が、アンドロゲンレセプター (AR) アンタゴニスト活性も有していることを見出した.

⁵⁸ Boehm, M.F.; Fitzgerald, P.; Zou, A.; Elgort, M.G.; Eric, D.; Mere, L.; Mais, D.E.; Bissonnette, R.P.; Heyman, R.A.; Nadzan, A.M.; Reicman, M.; Allegretto, E.A. Novel nonsecosteroidal vitamin D mimics exert VDR-modulating activities with less calcium mobilization than 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 265-275.

⁵⁹ Fernández-Gacio, A.; Fernández-Marcos, C.; Swamy, N.; Ray, R. Affinity labeling of the nuclear vitamin D receptor with nonsteroidal alkylating agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 213-216.

⁶⁰ 試験方法については、本節 2.3.1 参照

⁶¹ Maruyama, K.; Noguchi-Yachide, T.; Sugita, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. Novel selective anti-androgens with a diphenylpentane skeleton. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6661-6666.

Figure 2-10.は、VDR (PDBID : 2ZFX)⁶²と AR (PDBID : 2AXA)⁶³のリガンド結合ドメインの重ね合わせである。両タンパクとも良く重なっており、化合物の結合部位も類似している。

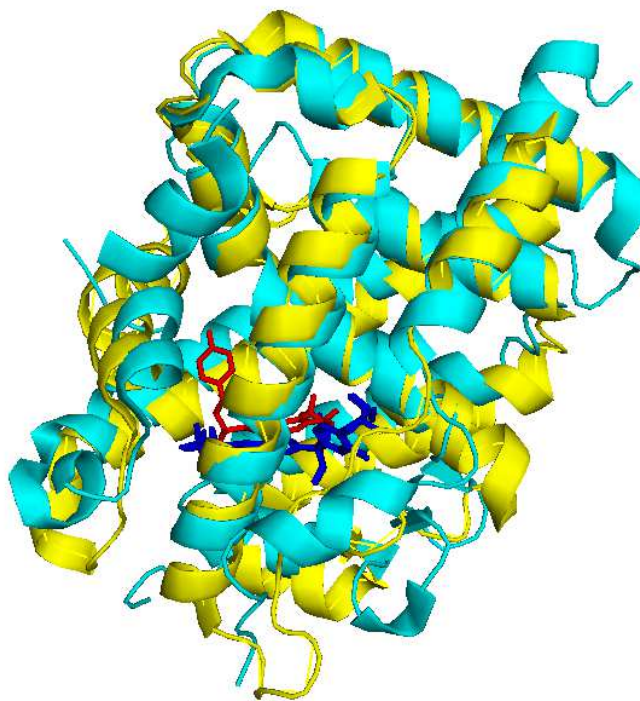


Figure 2-10. VDR (水色) と AR (黄色) のリガンド結合ドメインの重ね合わせ

そこで、私は、炭素と様々な性質の違いを有するケイ素原子をジフェニルメタン骨格に導入し、ビタミン D レセプター (VDR) アゴニスト活性とアンドロゲンレセプター (AR) アンタゴニスト活性に与える影響を、検討することとした。

また、前立腺がん治療薬の創製を目指し、抗腫瘍作用につながる一方、高カルシウム血症などの副作用にもつながる VDR アゴニスト活性を減弱させ、AR アンタゴニスト活性を高めた化合物の取得も目標とした。

本節では、ケイ素を導入したジフェニルメタン誘導体 (ジフェニルシラン誘導体) のデザイン及び合成、VDR および AR レポータージーンアッセイ評価および、AR アンタゴニスト活性を計測する目的で行ったアンドロゲン依存的なヒト乳がん SC-3 細胞の増殖抑制活性試験の結果について示す。

⁶² Kakuda, S.; Okada, K.; Eguchi, H.; Takenouchi, K.; Hakamata, W.; Kurihara, M.; Takimoto-Kamimura, M. Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with the nonsecosteroidal vitamin D3 analogue YR301. *Acta Crystallogr Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2008**, 64, 970-973.

⁶³ Bohl, C.E.; Miller, D.D.; Chen, J.; Bell, C.E.; Dalton, J.T. Structural basis for accommodation of nonsteroidal ligands in the androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 37747-37754.

2.2 化合物のデザイン・合成

橋本研究室での以前の検討を基に⁴², 私は先ず初めに VDR レポータージーンアッセイにおいて高い活性を示し, 様々なタイプのがん細胞に対しても増殖抑制作用を示す LG190178 (**3a**)の 4 級炭素をケイ素に置き換えることを計画した (Figure 2-11.).

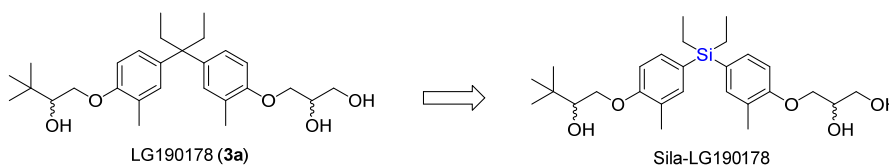


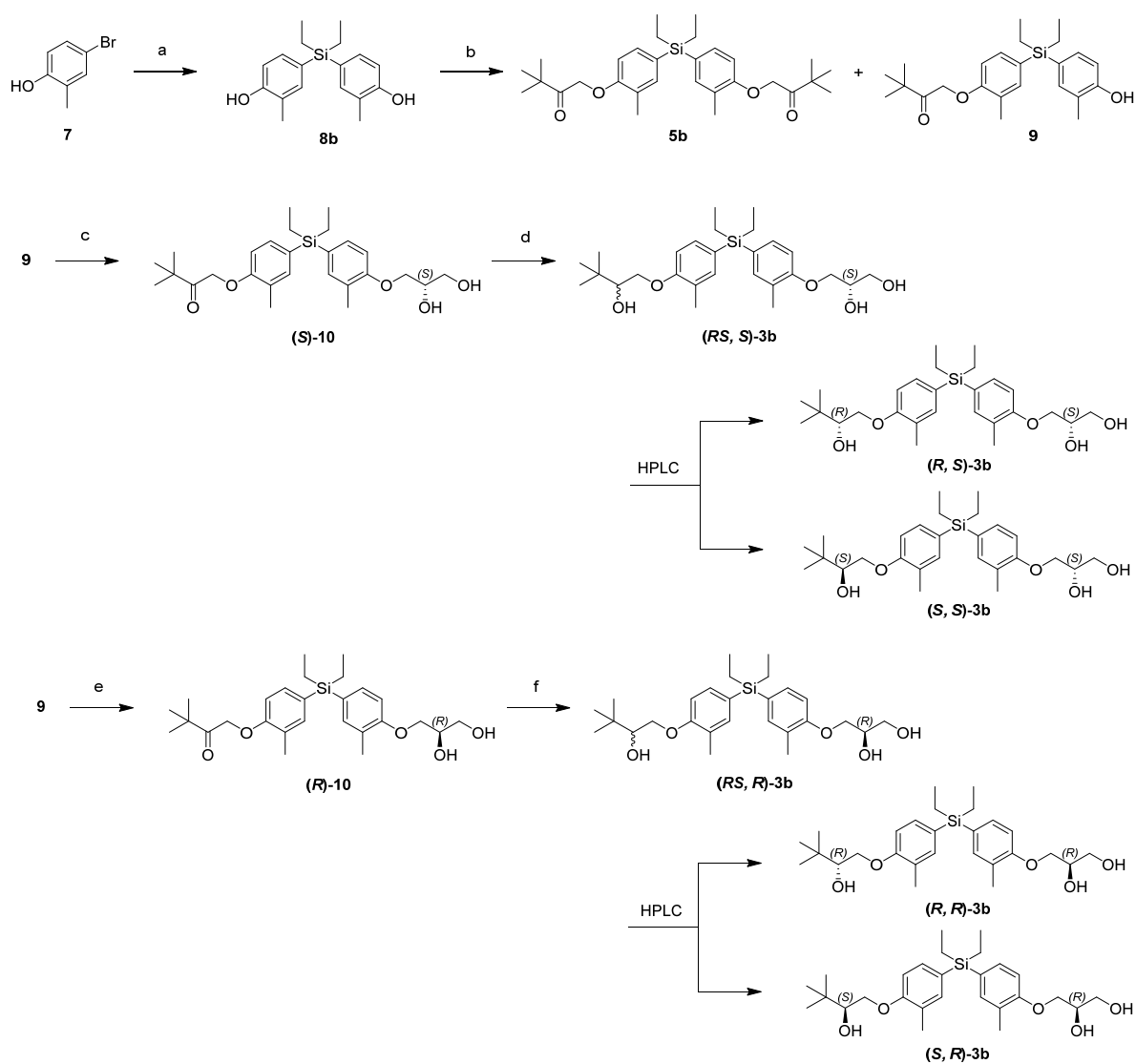
Figure 2-11. 合成計画

ケイ素を導入した LG190178 誘導体は, Scheme 2-1. に示すような一般的な有機合成法によって合成した. 以下に合成法の概略を示す.

4,4'-(diethylsilanediyl)bis(2-methylphenol) (**8b**)は, 4-bromo-2-methylphenol をテトラヒドロフラン(THF)中, *n*-butyllithium (*n*-BuLi)で処理後, dichlorodiethylsilane と反応させる既知の方法で合成した⁶⁴. 化合物 **5b** および **9** は, **8b** と 1-chloropinacolone の反応により合成した. 光学活性なジオール(**S**)-**10** および (**R**)-**10** は, 光学活性な glycidol を用い合成した. ジオール (**S**)-**10** および (**R**)-**10** の還元は sodium borohydride (NaBH₄)を用いて行い, エピマー混合物としてトリオール(**RS, S**)-**3b** および (**RS, R**)-**3b** をそれぞれ得た. これらをキラル HPLC で分離することにより, 光学活性なトリオール(**R, S**)-**3b**, (**S, S**)-**3b**, (**R, R**)-**3b** および (**S, R**)-**3b** を単離した.

なお, 本論文では, ピバロイル基またはその還元体が存在する場合は, それを左側に記載し, 隣接ジオールが存在する場合は, 右側に記すこととした. 化合物 **3b** の光学活性体の立体配置 (*S* または *R*) については, 左の側鎖の立体配置を始めに記し, 次に右の側鎖の立体配置を記すこととした.

⁶⁴ Hosoda, S.; Aoyama, H.; Goto, Y.; Salim, M. T. A.; Okamoto, M.; Hashimoto, M.; Baba, M.; Hashimoto, Y. Discovery of diphenylmethane analogs as anti-bovine diarrhea viral agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3157-3161.

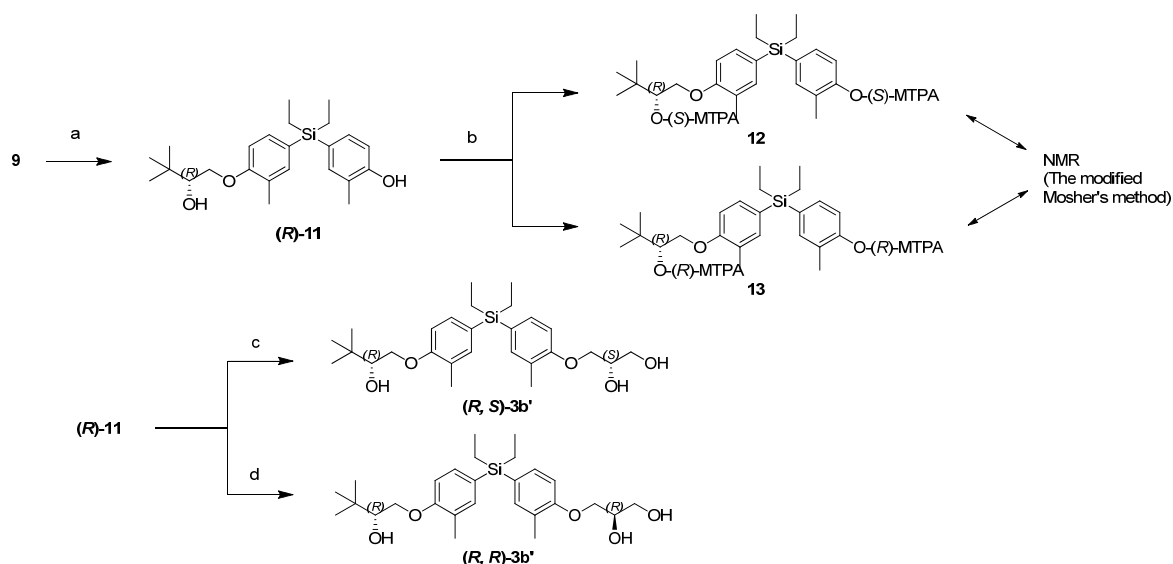


Scheme 2-1. Synthesis of the silicon-containing LG190178 analog **3b**^a

^a Reagents and conditions: (a) *n*-BuLi, THF, dichlorodiethylsilane, -78 °C then r.t., 6 h, 39%; (b) 1-chloropinacolone, sodium hydride (NaH), DMF, 0 °C then r.t., 5.5 h, 22% (**5b**), 20% (**9**); (c) (S)-glycidol, NaH, DMF, 0 °C then 80 °C, 3.5 h, 46%; (d) NaBH₄, MeOH, r.t. 1 h, 84%; (e) (R)-glycidol, NaH, DMF, 0 °C then 80 °C, 3.5 h, 39%; (f) NaBH₄, MeOH, r.t. 1 h, 81%.

光学活性なトリオール(**R, S**)-**3b**, (**S, S**)-**3b**, (**R, R**)-**3b** および (**S, R**)-**3b** の絶対配置は, **Scheme 2-2**.で示した不斉合成法により合成した光学活性な(**R, S**)-**3b'**および (**R, R**)-**3b'**を標品とし, それぞれをキラル HPLC で分析した際の保持時間の比較により決定した.

具体的には, 化合物 **9** を(**R**)-2-methyl-CBS(Corey-Baski-Shibata)-oxazaborolidine 触媒 を用いた不斉還元⁶⁵により, 光学活性なアルコール (**R**)-**11** へと変換した (93% ee). 化合物(**R**)-**11** の絶対配置は, (**R**)-**11** を(+)- および (-)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylacetyl (MTPA) esters **12** および **13** へ変換した後, NMR を用いた新モッシャー法を用いて確認した⁶⁶. 得られた(**R**)-**11** を光学活性な glycidol と反応させることにより, 光学活性なトリオール(**R, S**)-**3b'** および (**R, R**)-**3b'**を得た. それらのキラル HPLC の保持時間より, (**R, S**)-**3b** および(**R, R**)-**3b** の構造をそれぞれ決定した.



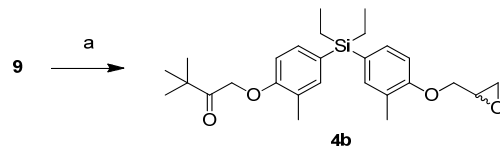
Scheme 2-2. Asymmetric synthesis of (**R, S**)-**3b'** and (**R, R**)-**3b'**^a

^aReagents and conditions: (a) (**R**)-2-methyl-CBS-oxazaborolidine cat., borane *N*-ethyl-*N*-isopropylaniline complex, THF, 20 °C, 1 h, 92%, 93% ee; (b) (**R**) or (**S**)-MTPA-Cl, pyridine, CH₂Cl₂, r.t., 20h; (c) (**R**)-glycidol, K₂CO₃, acetone, 60 °C, 6 h, 31%, >99% ee; (d) (**S**)-glycidol, K₂CO₃, acetone, 60 °C, 6 h, 20%, >99% ee.

⁶⁵ Demizu, Y.; Nakatsu, A.; Sato, Y.; Honzawa, S.; Yamashita, A.; Sugiura, T.; Kittaka, A.; Kato, S.; Okuda, H.; Kurihara, M. Facile synthesis of stereoisomers of the non-secosteroidal ligand LG190178 and their evaluation using the mutant vitamin D receptor. *Lett. Org. Chem.* **2011**, *8*, 43-47.

⁶⁶ Kusumi, T.; Ooi, T.; Ohkubo, Y.; Yabuuchi, T. The Modified Mosher's Method and the Sulfoximine Method. *Bull. Chem. Soc. Jpn* 2006, *79*, 965-980.

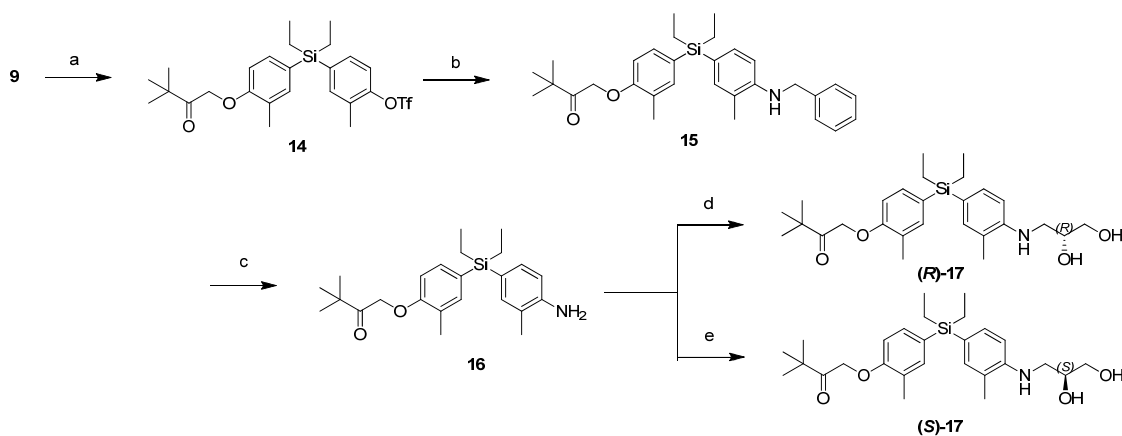
含ケイ素 LG190176 誘導体 **4b** は、化合物 **9** と epichlorohydrin との反応で合成した (Scheme 2-3). また、炭素体 LG190176 (**4a**) および LG190155 (**5a**) は、文献記載の方法で合成した⁵⁸.



Scheme 2-3. Synthesis of the silicon-containing LG190176 analog **4b**^a

^a Reagents and conditions: (a) epichlorohydrin, NaH, DMF, 0 °C then 120 °C, 3.5 h, 64%.

次に、以前、橋本研究室で見出した含窒素ビタミン D アンタゴニスト DLAMs⁶⁷の知見を基に、化合物(**R**)-**10** および(**S**)-**10** に窒素を導入した化合物 (**R**)-**17** および (**S**)-**17** の合成を計画した。化合物(**S**)-**17** および (**R**)-**17** は Scheme 2-4. で示した方法で合成した。化合物 **14** は化合物 **9** のトリフルオロメタンスルホン化により合成した。続いて、Buchwald-Hartwig's amination 反応⁶⁸により、化合物 **14** を化合物 **15** へ変換した。化合物 **15** の脱ベンジル化の後、光学活性な glycidol と反応させることによって、目的の光学活性なジオール(**R**)-**17** および (**S**)-**17** を得た。



Scheme 2-4. Synthesis of the aza-analogs (**R**)-**17** and (**S**)-**17**^a

^a Reagents and conditions: (a) triflic anhydride, TEA, CH₂Cl₂, r.t., 1 h, 88%; (b) palladium diacetate, BINAP, Cs₂CO₃, benzylamine, toluene, 100 °C, 6 h, 72%; (c) Pd/C, H₂, EtOH, 61%; (d) (*S*)-glycidol, EtOH, 75 °C, 11 h, 42%; (e) (*R*)-glycidol, EtOH, 75 °C, 11 h, 47%.

⁶⁷ Hashimoto, Y.; Miyachi, H. Nuclear receptor antagonists designed based on the helix-folding inhibition hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5080-5093.

⁶⁸ Wolfe, J.P.; Ahman, J.; Sadighi, J.P.; Singer, R.A.; Buckwald, S.L. An Ammonia Equivalent for the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and Triflates. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6363-6366.

2.3 生物活性評価

2.3.1 VDR および AR レポータージーンアッセイ

合成した化合物の VDR および AR への活性・選択性については、HEK293 細胞を用いたレポータージーンアッセイにより評価した。

レポータージーンアッセイは、ホスト細胞にレセプターのプラスミド、および転写調節領域の下流にレポーター（ルシフェラーゼ）遺伝子配列を導入したプラスミドを導入し、化合物処理後のルシフェラーゼ活性を測定（化学発光を検出）することで、化合物の活性を評価する方法である（Figure 2-12.）。なお、遺伝子導入効率の目安とする為、 β -galactosidase のプラスミドも同時に導入し、その活性の評価も行った。

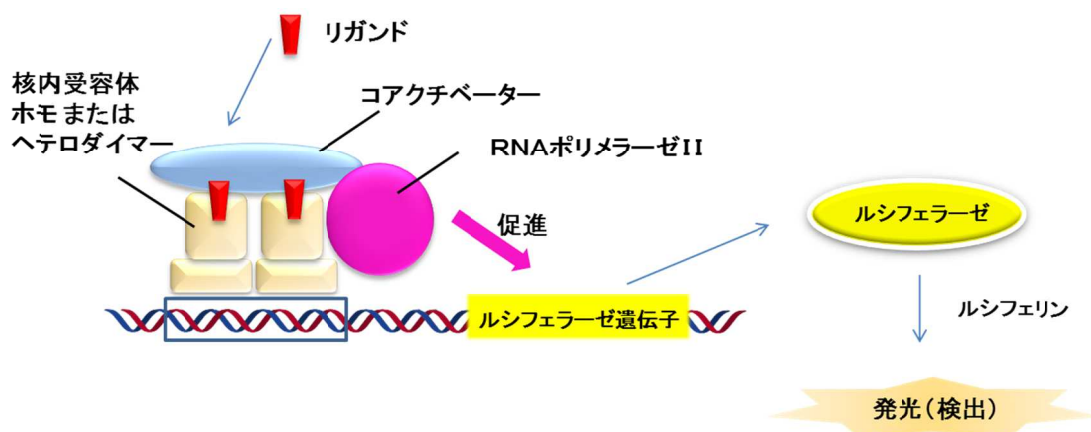


Figure 2-12. レポータージーンアッセイの概略

始めに、私は、LG 化合物と対応するケイ素導入化合物の活性を比較することとした(**Table 2-1**)。VDR レポーター遺伝子アッセイにおいて、 $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ (**1**, 25-VD_3) (**1**) は、非常に高い VDR 転写活性を示した ($\text{EC}_{50} = 0.003 \mu\text{M}$)。なお、本論文の合成化合物の VDR 転写活性については、 EC_{50} 値が算出できない化合物が存在した為、以降、「 $10 \mu\text{M}$ $1, 25\text{-VD}_3$ (**1**) (positive control (PC))の VDR 転写活性の 50%を示す濃度」と定義した PC_{50} 値⁶⁹を活性の指標として用いた(**Figure 2-13**)。

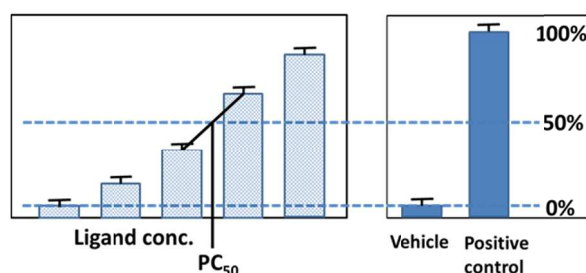


Figure 2-13. PC_{50} 値の概略

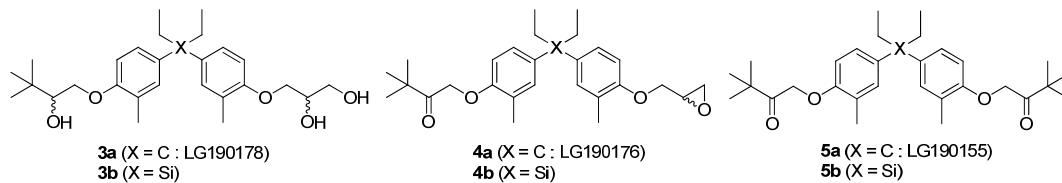
LG190178 (**3a**)は、VDR レポーター遺伝子アッセイ試験において、強力な VDR 転写活性を示した ($\text{PC}_{50} = 0.14 \mu\text{M}$)。また、対応するケイ素体 **3b** も高い VDR 転写活性を示したが ($\text{PC}_{50} = 0.92 \mu\text{M}$)、炭素体 **3a** の活性には及ばなかった。LG190178 (**4a**)も高い VDR アゴニスト活性を示したが ($\text{PC}_{50} = 0.68 \mu\text{M}$)、対応するケイ素体 **4b** の活性はそれほど強くなかった ($\text{PC}_{50} = 4.8 \mu\text{M}$)。LG190155 (**5a**)については、 PC_{50} 値が $4.6 \mu\text{M}$ 程度の活性を示したのに対し、ケイ素体 **5b** では VDR アゴニスト活性は消失した。以上より、化合物 **3a-5a** の炭素をケイ素に置換した場合、VDR アゴニスト活性が減弱されるということが明らかとなった。

続いて、私は AR レポーター遺伝子アッセイを実施した。試験は、 3 nM testosterone 存在下で行った。AR アンタゴニストとして知られる hydroxyflutamide は、強い AR 転写抑制活性を示した ($\text{IC}_{50} = 0.3 \mu\text{M}$)。化合物 **3a**, **4a** および **5a** の AR アンタゴニスト活性は、いずれも弱く、 IC_{50} 値は $10 \mu\text{M}$ 以下であった。興味深いことに、対応するケイ素化合物 **3b**, **4b** および **5b** の AR アンタゴニスト活性は、それぞれの対応する炭素体 **3a**, **4a** および **5a** の活性より強力であった。なお、**Table 2-1**に示した化合物の中には、本条件下で、AR アゴニスト活性を示す化合物は存在しなかった。

VDR と AR のレポーター遺伝子アッセイの結果の比較より、私は、ジフェニルメタン骨格へのケイ素原子を導入は、AR アンタゴニスト活性の向上及び VDR のアゴニスト活性の減弱につながることを見出した。即ち、ケイ素化合物 **3b**, **4b** および **5b** の AR 選択性 (VDR/AR 値) は、対応する炭素化合物より高くなるということが明らかとなった。

⁶⁹ Yamasaki, K.; Takeyoshi, M.; Yakabe, Y.; Sawaki, M.; Imatanaka, N.; Takatsuki, M. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology* **2002**, 170, 21-30.

Table 2-1. The results of VDR and AR reporter gene assays of LG-compounds and their silicon analogs



compound	X =	VDR PC ₅₀ (μM) ^{a,c}	AR IC ₅₀ (μM) ^{b,c} (inhibition % at 10 μM)	VDR/AR ^d
LG190178 (3a) ^e	C	0.14	>>10 (16%)	<0.014
3b ^e	Si	0.92	6.8	0.14
LG190176 (4a) ^f	C	0.68	>>10 (12%)	<0.068
4b ^f	Si	4.8	>10 (49%)	ca.0.48
LG190155 (5a)	C	4.6	>10 (44%)	<0.46
5b	Si	>30	6.2	>4.8
Hydroxyflutamide	-	inactive ^g	0.3	-
1, 25-VD ₃ (1)	-	0.003 (EC ₅₀)	>10 (45%)	-

^a VDR transcriptional activity.

^b AR transcription-inhibitory activity.

^c Assays were performed in triplicate.

^d VDR(PC₅₀)/AR(IC₅₀) was defined as VDR transcriptional activity (PC₅₀ value)/ AR transcription-inhibitory activity (IC₅₀ value).

^e Diastereomeric mixture.

^f Enantiomeric mixture.

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

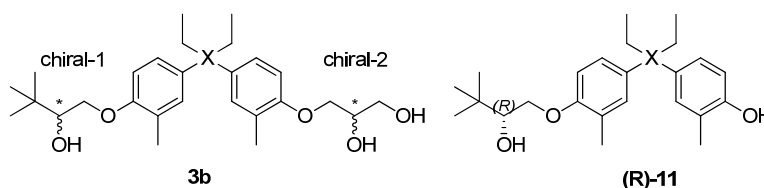
LG190178 のケイ素体 **3b** が, LG190178 (**3a**)と比較して, 高い AR 選択性を示したことから, 私は次にケイ素体 **3b** の光学異性体および(**R**)-**11** について同様の評価を行うこととした。結果は **Table 2-2**. に示した。

VDR レポータージーンアッセイにおいて, ケイ素体 **3b** のアイソマーのうち, (**R,S**)-**3b** が最も高い活性を示し ($PC_{50} = 0.81 \mu M$), (**S,R**)-**3b** が最も低い活性であった ($PC_{50} > 10 \mu M$)。この傾向は, LG190178 の立体異性体の VDR 結合親和性⁴²と一致していた。(**R,S**)-**3b** の右の側鎖部分を除去した(**R**)-**11** の VDR アゴニスト活性は, (**R,S**)-**3b** と比較して 10 倍程度低下した。このことから, 右側のジオール部分は, VDR アゴニスト活性の向上に寄与していることが示唆された。

また, ケイ素体 **3b** アイソマーの AR アンタゴニスト活性 (IC_{50} 値) は, 5.8-7.4 μM であった。化合物(**R**)-**11** の IC_{50} 値は, 10 μM 以上であった。VDR アゴニスト活性の場合と同様に, 右側のジオール部分は, AR アンタゴニスト活性にも寄与していることが示唆された。

これらの結果より, ケイ素体 **3b** アイソマーのうち, (**S,R**)-**3b** が最も高い AR 選択性 (VDR/AR 値) を示し, その選択性は, LG190178 (**3a**)の 100 倍以上であった。

Table 2-2. Results of VDR and AR reporter gene assays of optically pure isomers of **3b** and compound (**R**)-**11**



compound	X =	VDR PC_{50} (μM) ^{a,c}	AR IC_{50} (μM) ^{b,c} (inhibition % at 10 μM)	VDR(PC_{50})/AR(IC_{50}) ^d
(R, S)- 3b ^e	Si	0.81	5.8	0.14
(S, S)- 3b ^e	Si	2.2	8.3	0.27
(R, R)- 3b ^e	Si	2.1	6.7	0.31
(S, R)- 3b ^e	Si	>10	7.4	>1.4
(R)- 11	Si	8.2	>10 (47%)	-

^aVDR transcriptional activity.

^bAR transcription-inhibitory activity.

^c Assays were performed in triplicate.

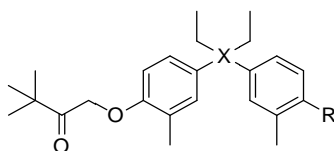
^dVDR (PC_{50})/AR (IC_{50}) was defined as VDR transcriptional activity (PC_{50} value)/AR transcription-inhibitory activity (IC_{50} value).

^eThe chiralities are indicated as (chiral-1, chiral-2).

次に、化合物(**R**)-, (**S**)-**10** および窒素導入体(**R**)-, (**S**)-**17** の VDR アゴニスト/AR アンタゴニスト活性比の評価を実施した (Table 2-3.). 化合物(**R**)-, (**S**)-**10** の VDR 転写活性 (PC₅₀ 値) はそれぞれ、3.7 および 2.0 μM であった. また、窒素導入体(**R**)-, (**S**)-**17** の VDR 転写活性 (PC₅₀ 値) はそれぞれ、7.0 および 2.5 μM であり、窒素の導入による活性向上の効果は見られなかった.

AR レポータージーンアッセイにおいては、化合物(**R**)-**10** の AR 転写抑制活性 (IC₅₀ = 4.0 μM) が最も強く、他の 3 化合物の IC₅₀ 値は 10 μM 以下であった.

Table 2-3. Results of VDR and AR reporter gene assays of compounds (**R**)- and (**S**)-**10** and aza-analogs (**R**)- and (**S**)-**17**



compound	X =	R =	VDR PC ₅₀ (μM) ^{a,c}	AR IC ₅₀ (μM) ^{b,c} (inhibition % at 10 μM)	VDR/AR ^d
(R)- 10	Si		3.7	4.0	0.93
(S)- 10	Si		2.0	>10 (44%)	-
(R)- 17	Si		7.0	>10 (38%)	-
(S)- 17	Si		2.5	>10 (44%)	-

^aVDR transcriptional activity.

^bAR transcription-inhibitory activity.

^c Assays were performed in triplicate.

^dVDR (PC₅₀)/AR (IC₅₀) was defined as VDR transcriptional activity (PC₅₀ value)/ AR transcription-inhibitory activity (IC₅₀ value).

2.3.2 細胞増殖抑制活性試験（マウス乳がん SC-3 細胞）

合成した化合物のうち AR 選択性を示した化合物のアンドロゲンアンタゴニスト活性を、テストステロン添加により増殖が促進されるアンドロゲン依存的なマウス乳がん SC-3 細胞を用いて評価した^{70, 71}。評価結果を **Table 2-4** に示す。ケイ素を導入した LG190178 誘導体 **3b** の光学異性体のうち最も AR 選択性が高かった **(S,R)-3b** は、非常に強力な細胞増殖抑制効果を示した ($IC_{50} = 0.072 \mu M$)。これは、アンドロゲンアンタゴニストとして知られる hydroxyflutamide の活性 ($IC_{50} = 1.4 \mu M$) と比較して、20 倍以上高活性であった。また、化合物 **(R)-10** も同様に、強力な活性を示した ($IC_{50} = 0.113 \mu M$)。

以上の様に、試験したケイ素化合物 **(S,R)-3b** および **(R)-10** は、AR レポータージーンアッセイでの転写抑制活性より 1-2 桁低い薬剤濃度で、SC-3 細胞に対する増殖抑制活性を示した。この理由としては、試験した両化合物とも、AR 選択的な化合物ではあるが、完全に VDR の活性を消去したものでない為、VDR 活性に由来する細胞増殖抑制活性との相乗効果により、SC-3 の評価系で高い活性を示したと考えられる。

Table 2-4. Androgen-antagonistic activity

compound	SC-3 IC_{50} (μM) ^a
(S, R)-3b	0.072
(R)-10	0.113
Hydroxyflutamide	1.4
Bicalutamide	3.0

^aInhibitory activity on testosterone-induced cell growth of androgen-dependent cell line SC-3. Assays were performed in triplicate.

⁷⁰ Hiraoka, D.; Nakamura, N.; Nishizawa, Y.; Uchida, N.; Noguchi, S.; Matsumoto, K.; Sato, B. Inhibitory and stimulatory effects of glucocorticoid on androgen-induced growth of murine Shionogi carcinoma 115 in vivo and in cell culture. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 6560-6564.

⁷¹ Kasayama, S.; Saito, H.; Kouhara, H.; Sumitani, S.; Sato, B. Suramin interrupts androgen-inducible autocrine loop involving heparin binding growth factor in mouse mammary cancer (Shionogi carcinoma 115) cells. *J. Cell. Physiol.* **1993**, *154*, 254-261.

2.3.3 標的タンパクに対する結合試験（標識リガンドとの競合試験）

次に、VDR および AR への合成化合物の結合を確認し、レポータージーンアッセイの結果の裏付け、および SC-3 細胞に対する増殖抑制活性発現の作用機序の確認を行うことを計画した。方法は、VDR または AR に対する既知のリガンドの放射標識体を用い、合成化合物との競合を観察する試験法を用いることとした (Figure 2-14.)。

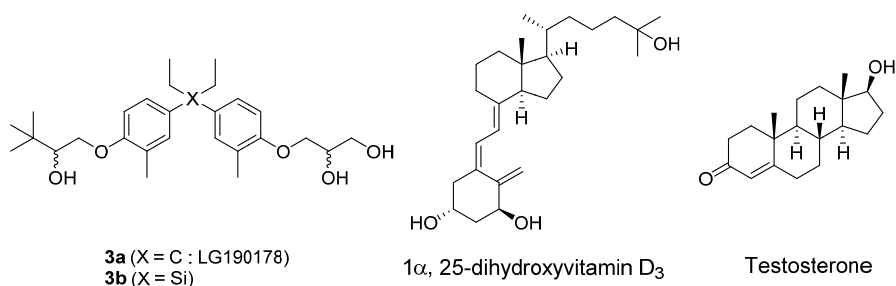


Figure 2-14. 用いた試験化合物（左）と放射標識リガンド（中：VDR リガンド，右：AR リガンド）

VDR への結合試験では、タンパクとして精製ウシ胸腺 VDR を用い、放射標識リガンドとしてトリチウムラベルされた **1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃** (**1,25-VD₃**) ([³H]1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, [26,27-³H]-)を使用した⁴²。評価化合物は、LG190178 (**3a**)およびそのケイ素体 **3b**、ポジティブコントロールとして、cold-1,25-VD₃を用いた。結果を **Figure 2-15** に示す。炭素体 **3a** で結合が確認できた一方、ケイ素体 **3b** は試験した濃度範囲では結合がみられなかった。VDR レポータージーンアッセイの結果では、LG190178 (**3a**)の方が、ケイ素体 **3b** よりも高活性であったことから、本結果と傾向が一致する。

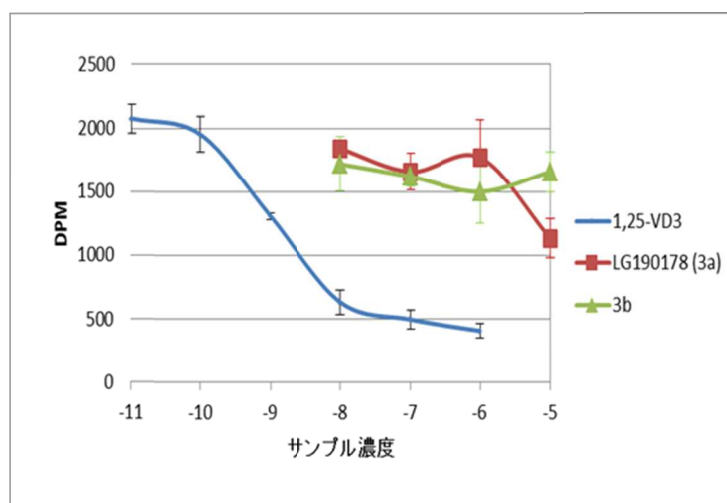


Figure 2-15. VDR に対する競合試験 (n=3)

AR への結合試験では、SC-3 細胞を用い、内在する AR への結合を測定することとした⁷²。⁷³ 放射標識リガンドとしては、トリチウムラベルされたテストステロン ([³H] testosterone, [1,2,6,7,16,17-³H(N)]-) を用いた。評価化合物は、LG190178 (**3a**)およびそのケイ素体 **3b**、ポジティブコントロールとして、cold-テストステロンを用いた。結果を **Figure 2-16**に示す。AR に対する結合試験では、LG190178 (**3a**)、ケイ素体 **3b** 共にタンパクへの結合が観察された。VDR レポータージーンアッセイの結果では、ケイ素体 **3b** が炭素体 **3a** よりも高活性であったが、本結合試験では結合の強弱の差までは検出できなかった。

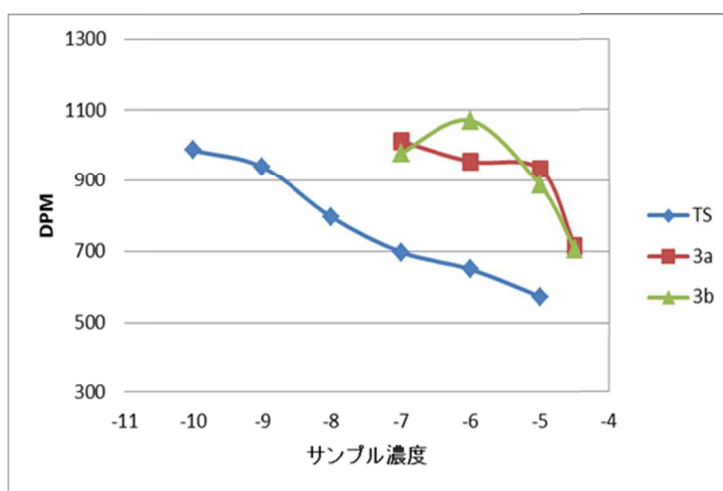


Figure 2-16. AR に対する競合試験 (n=2)

⁷² Yoshino, H.; Sato, H.; Tachibana, K.; Shiraishi, T.; Nakamura, M.; Ohta, M.; Ishikura, N.; Nagamuta, M.; Onuma, E.; Nakagawa, T.; Arai, S.; Ahn, K.H.; Jung, K.Y.; Kawata, H. Structure-activity relationships of bioisosteric replacement of the carboxylic acid in novel androgen receptor pure antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3159-3168.

⁷³ Takahashi, H.; Ishioka, T.; Koiso, Y.; Sodeoka, M.; Hashimoto, Y. Anti-androgenic activity of substituted azo- and azoxy-benzene derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 1387-1390.

2.4 ドッキングシュミレーション

合成化合物の VDR および AR の選択性について考察する目的で、代表化合物 **5a**, **5b** と VDR および AR のドッキングシュミレーションを実施した (**Figure 2-17.**). ドッキングシュミレーションには, Autodock 4.2^{74, 75}を用い, 計算結果は, PyMol⁷⁶を用いて描画した.

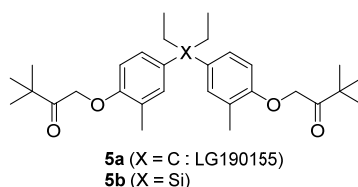


Figure 2-17. ドッキングに用いた炭素化合物 **5a** およびケイ素化合物 **5b** の構造

VDR (PDBID : 2ZFX)⁶² と化合物 **5a** (水色) および **5b** (ピンク) とのドッキングシュミレーション結果を **Figure 2-18.**に示す.

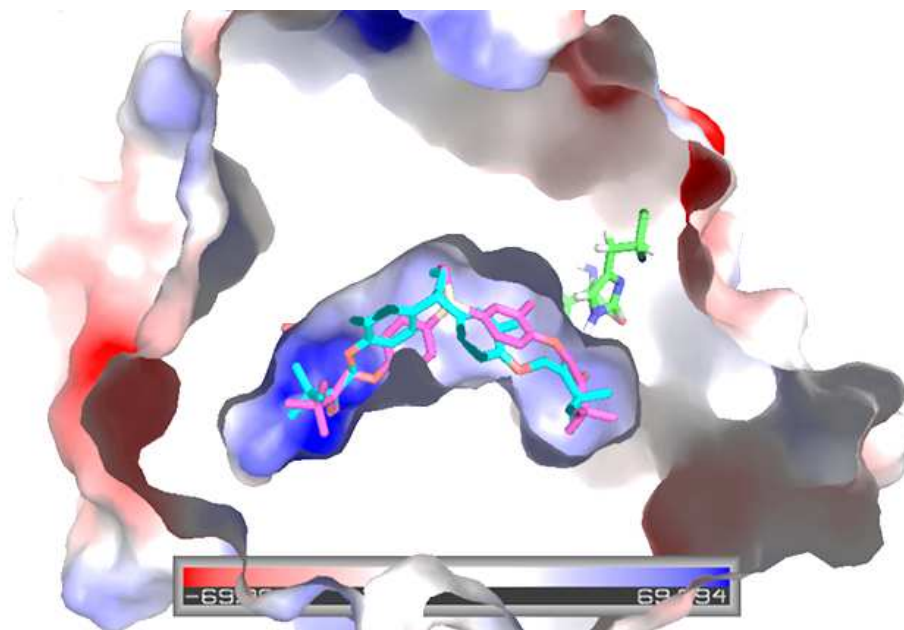


Figure 2-18. VDR と化合物 **5a** (水色) および **5b** (ピンク) とのドッキング

⁷⁴ Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 2785-2791.

⁷⁵ Cosconati, S.; Forli, S.; Perryman, A.L.; Harris, R.; Goodsell, D.S.; Olson, A. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. *J. Expert Opin. Drug Discovery* **2010**, 5, 597-607.

⁷⁶ DeLano, W. The PyMol Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC: San Carlos, CA, USA, <<http://www.pymol.org>>.

VDR のリガンド結合部位には、図の左側に ARG270 に由来する強くプラスに帯電した領域（青色）が存在し、化合物のカルボニル基と水素結合をしていることが示唆された。図の右側には HIS301, HIS393 が存在し、水素結合の形成が予測されるが、ケイ素体 **5b** では、分子サイズが若干大きく、水素結合を形成するために分子が歪んでいる様子が観察できる。

また、タンパクと水素結合を形成する分子内の 2 つのカルボニル基の距離を測定すると、炭素体 **5a** が 12.6 Å であるのに対しケイ素体 **5b** は 13.7 Å であった (**Figure 2-19**)。このようなケイ素原子の大きさに起因した分子サイズの増大が、ケイ素体の VDR 活性低減に寄与している可能性がある。

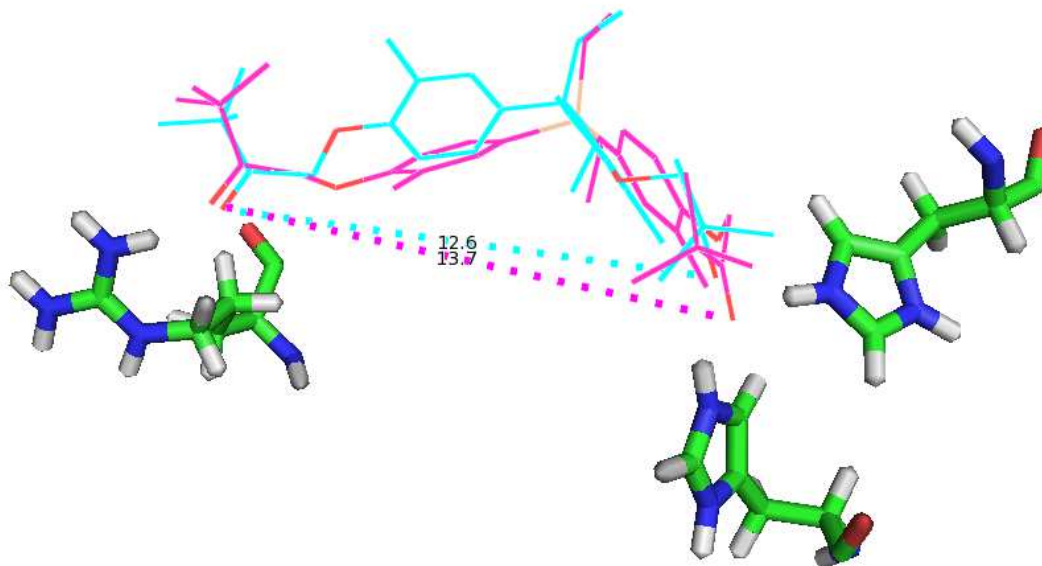


Figure 2-19. タンパクと水素結合時の炭素体 **5a**（水色）とケイ素体 **5b**（ピンク）のカルボニル基の距離の比較（炭素体：12.6 Å，ケイ素体：13.7 Å）

AR (PDBID : 2AXA)⁶³と化合物 **5a** (水色) および **5b** (ピンク) とのドッキングシミュレーションの結果を, **Figure 2-20.**に示す. AR のリガンド結合部位には, VDR で見られたような顕著な極性領域がなく, また, 空間が狭い為, 炭素体 **5a**, ケイ素体 **5b** 共に歪んだ形で結合している. 比較的無極性 (≒脂溶性) な領域が多いことから, 脂溶性のケイ素体の結合に若干有利になっている可能性がある. なお, いずれの化合物とも HIS874 と水素結合が示唆された.

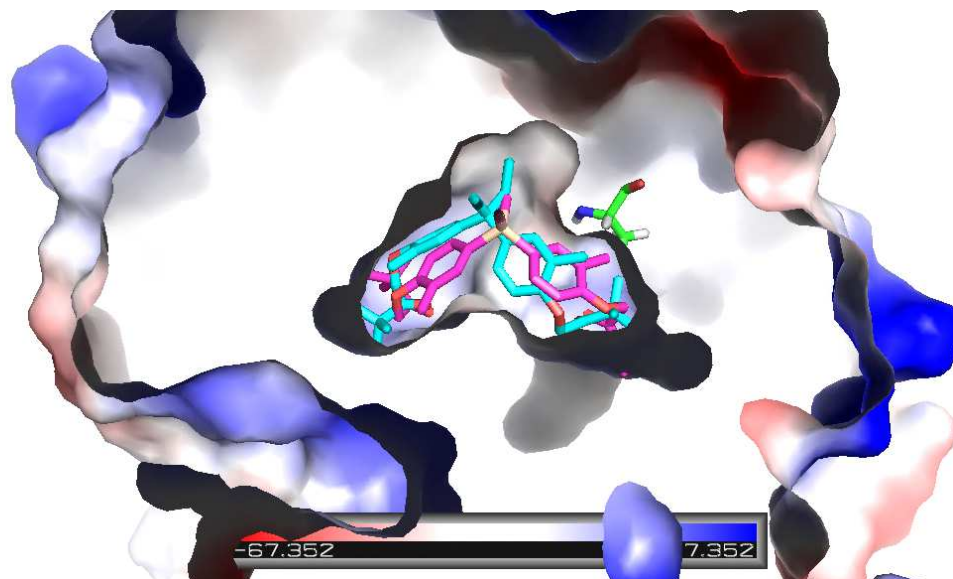


Figure 2-20. AR と化合物 **5a** (水色) および **5b** (ピンク) とのドッキング

2.5 第2節のまとめ

橋本研究室で以前行われた検討において、VDR 活性を示すジフェニルメタン誘導体が AR アンタゴニスト活性を示すことが明らかにされていたことから、私は、ジフェニルメタン骨格にケイ素を導入し、それぞれの活性に与える影響を調査した。

VDR と AR のレポータージーンアッセイの結果より、私は、ジフェニルメタン骨格にケイ素を導入することにより、AR アンタゴニスト活性が上昇し、VDR アゴニスト活性が減弱することを見出した。結果として、ケイ素導入体の AR 選択性は、対応する炭素体よりも高くなることが分かった。本結果は、私が知る限り、炭素/ケイ素置換による核内受容体 (NR) に対する選択性の転換の初めての報告である。

ケイ素を導入した LG190178 誘導体 **3b** のうち、最も高い AR 選択性を示した光学異性体 (**S,R**)-**3b** は、SC-3 細胞の細胞増殖抑制試験において、非常に高い抗アンドロゲン活性を示した ($IC_{50} = 0.072 \mu M$)。これは、アンドロゲンアンタゴニストとして知られる hydroxyflutamide の活性 ($IC_{50} = 1.4 \mu M$) より、20 倍以上高活性であった。

本節に示した結果は、炭素/ケイ素置換が AR 選択的なりガンドの創製に有効な手段であることを示唆するものであると考えられる。

第3節 エストロゲンレセプターリガンドの創製

3.1 背景

エストロゲン受容体 (ER) は、ステロイド骨格を有する estradiol などのエストロゲンを内在性のリガンドとして機能を発揮する核内受容体である。エストロゲン受容体 (ER) には、ER α および ER β と呼ばれる 2 つのサブタイプが存在することが知られており、前者は女性生殖器系、後者は前立腺、卵巣に多く存在していることが知られている⁷⁷。

乳がんには様々なタイプがあることが知られており、乳がんの治療方針を決定する際に、ホルモン感受性、HER2⁷⁸ 感受性を指標に分類を行う。本分類によると、乳がん患者の 70-80% はホルモン依存性の乳がんであるとされる (Table 2-5.)⁷⁹。また、乳がんの約 70% のがん細胞で ER α が高発現しているとの報告があり、乳がん細胞の増殖には、特に ER α が関与していることが示唆される⁸⁰。現在、抗エストロゲン作用を有する抗がん剤としてタモキシフェンなどが用いられているが、タモキシフェンは ER α および ER β 両方のレセプターへ結合することが知られている⁸¹。近年は、サブタイプ選択的な薬剤の研究も行われている。

Table 2-5. 乳がんの分類^a

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

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

ER : estrogen receptor,

HER2 : human epidermal growth factor receptor 2,

PR : progesterone receptor.

⁷⁷ Muramatsu, M.; Inoue, S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem. Biophys Res. Commun.* **2000**, 270, 1-10.

⁷⁸ human EGFR (epidermal growth factor receptor) 2

⁷⁹ Lund, M.J.; Butler, E.N.; Hair, B.Y.; Ward, K.C.; Andrews, J.H.; Oprea-Ilie, G.; Bayakly, A.R.; O'Regan, R.M.; Vertino, P.M.; Eley, J.W. Age/race differences in HER2 testing and in incidence rates for breast cancer triple subtypes: a population-based study and first report. *Cancer* **2010**, 116, 2549-2559

⁸⁰ Fillmore, C.M.; Gupta, P.B.; Rudnick, J.A.; Caballero, S.; Keller, P.J.; Lander, E.S.; Kuperwasser, C. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, 107, 21737-21742.

⁸¹ Liu, X.; Pisha, E.; Tonetti, D.A.; Yao, D.; Li, Y.; Yao, J.; Burdette, J.E.; Bolton, J.L. Antiestrogenic and DNA damaging effects induced by tamoxifen and toremifene metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, 16, 832-837.

一方、ポリカーボネート系プラスチックの原料として用いられている bisphenol A (**19a**)とその類縁体は、ER リガンドとして機能することが知られている (Figure 2-21.)⁸²。しかしながら、それらの類縁体のアゴニスト活性、アンタゴニスト活性に関する構造活性相関、ER α および ER β に対する選択性に対する詳細な報告はされていなかった。

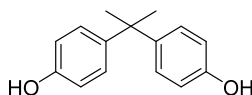


Figure 2-21. bisphenol A (**19a**)の構造

橋本研究室の丸山らは、bisphenol A (**19a**)がジフェニルメタン骨格を有していることに注目し、**19a** およびその類縁体の ER に対する活性及び選択性を精査することによって、ジフェニルメタンタイプのマルチテンプレート手法の拡張に寄与する情報が得られると考え、研究を行った⁸³。活性の評価は、ER レポータージーンアッセイを用いて行い、アンタゴニスト活性は、0.5 nM estradiol 存在下におけるその阻害率を求めた。Table 2-6.に主な結果を示した。

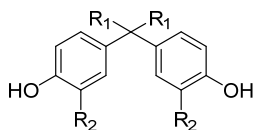
化合物 **18-20a** および **23-26** の ER アゴニスト活性を比較すると、R₁ の置換基が大きくなるにつれ、ER α , ER β 共にアゴニスト活性が消失していく結果となった。ER アンタゴニスト活性については、中心炭素部分にエチル基、*n*-プロピル基、*n*-ブチル基を導入すると活性が向上し、環状構造を導入すると低下する傾向があった。また、ジフェニルメタン誘導体の ER に対する阻害活性は、 α 選択的な傾向があることも示唆された。ER α のアンタゴニスト活性において、R₂ にメチル基を導入することで、活性が向上する傾向がみられた (化合物 **8a**, **21a-22a** および **27-30**)。しかしながら、R₂ へより長いエチル基、*n*-プロピル基を導入すると活性が低減した (化合物 **31-36**)。

この様に、ジフェニルメタン誘導体は比較的単純な構造を有しているが、その置換基を変換することで、ER アンタゴニストからアゴニストの転換、ER サブタイプへの選択性の付与が可能であることが明らかとなった。即ち、本例は、ジフェニルメタンタイプのマルチテンプレート手法においても、適切な置換基を配置することで、活性の向上、選択性の付与が可能であることを示す好例であると言える。

⁸² Molina-Molina, J.M.; Amaya, E.; Grimaldi, M.; Sáenz, J.M.; Real, M.; Fernández, M.F.; Balaguer, P.; Olea, N. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **2013**, 272, 127-136.

⁸³ 丸山慶輔 転写制御を志向した化合物の効率的創製 -ジフェニルメタン骨格による展開- 東京大学大学院薬学系研究科 平成 25 年度博士論文

Table 2-6. ジフェニルメタン誘導体の ER レポーター遺伝子アッセイ評価結果



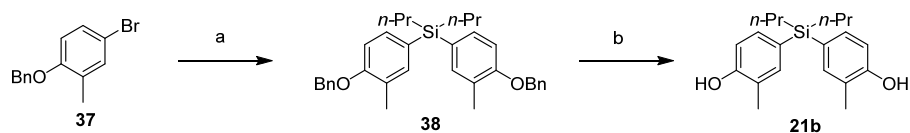
compound	R ₁	R ₂	ER α		ER β	
			EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
18	H		909	(35%) ^b	1910	(24%) ^b
19a	Me		(33%) ^a	(38%) ^b	1115	(25%) ^b
20a	Et		NA	86	(28%) ^a	93
23	<i>n</i> -Pr	H	NA	99	(43%) ^a	2159
24	<i>n</i> -Bu		NA	79	NA	183
25	-(CH ₂) ₄ -		NA	165	NA	271
26	-(CH ₂) ₅ -		NA	518	NA	564
27	H		(23%) ^a	(26%) ^b	5497	NA
28	Me		(31%) ^a	1198	(19%) ^a	(25%) ^b
8a	Et		NA	25	(15%) ^a	264
21a	<i>n</i> -Pr	Me	NA	4.9	NA	140
22a	<i>n</i> -Bu		NA	14	NA	146
29	-(CH ₂) ₄ -		NA	84	NA	765
30	-(CH ₂) ₅ -		NA	227	NA	789
31	Et		NA	232	NA	1307
32	<i>n</i> -Pr	Et	NA	493	NA	2610
33	<i>n</i> -Bu		NA	2945	NA	4533
34	Et		NA	(17%) ^b	NA	(35%) ^b
35	<i>n</i> -Pr	<i>n</i> -Pr	NA	(38%) ^b	NA	(23%) ^b
36	<i>n</i> -Bu		NA	(15%) ^b	NA	(14%) ^b

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

^b % inhibition at 3 μ M

3.2 ケイ素体の合成

ケイ素体 **19b-20b** および **22b** は、第 1 節で示した化合物 **8b** と同様の方法で合成した。 *n*-プロピル体 **21b** は、化合物 **37** を *n*-ブチルリチウムで処理した後、ジクロロジプロピルシランを加え、化合物 **38** とし、その後、水素添加反応により脱ベンジル化することにより合成した (Scheme 2-5)。



Scheme 2-5. Synthesis of compound **21b**^a

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

3.3 ケイ素体の ER 活性

合成したケイ素化合物の ER レポータージーンアッセイを実施した。試験は、炭素体の評価の際と同様の条件下で実施した。合成したケイ素体と対応する炭素体の ER 活性評価の結果を **Table 2-7.**に示す。

ケイ素化合物の ER アゴニスト活性は、炭素体の場合と同様に R₁ の置換基が大きくなるにつれ減少する傾向がみられた。ER アンタゴニスト活性については、ケイ素体よりも炭素体の方が若干高かった。ER α と ER β へのアンタゴニスト活性におけるサブタイプ選択性については、化合物が同様の置換基を有している場合、ケイ素体の方が炭素体よりも高い傾向があった。合成したケイ素化合物のうち、化合物 **8b** は、対応する炭素化合物と同程度の ER α アンタゴニスト活性を示し (IC₅₀ = 30 nM), ER β に対する ER α の選択性は約 100 倍であった (ER β に対する IC₅₀ を 3 μ M として概算)。

Table 2-7. ジフェニルシラン誘導体の ER レポータージーンアッセイ評価結果

compound	X	R ₁	R ₂	ER α		ER β		selectivity
				EC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^b (nM)	EC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^b (nM)	ER β (IC ₅₀) / ER α (IC ₅₀)
18	C	H	H	909	(35%) ^d	1910	(24%) ^d	-
19a	C	Me	H	(33%) ^c	(38%) ^d	1115	(25%) ^d	-
19b	Si	Me	H	(25%) ^c	(51%) ^d	(34%) ^c	NA	-
20a	C	Et	H	NA	86	(28%) ^c	93	1.1
20b	Si	Et	H	(7%) ^c	115	(12%) ^c	(53%) ^e	ca. 8
8a	C	Et	Me	NA	25	(15%) ^c	264	10.6
8b	Si	Et	Me	NA	30	NA	(54%) ^d	ca. 100
21a	C	<i>n</i> -Pr	Me	NA	4.9	NA	140	28.6
21b	Si	<i>n</i> -Pr	Me	(6%) ^c	26	(5%) ^c	804	30.9
22a	C	<i>n</i> -Bu	Me	NA	14	NA	146	10.4
22b	Si	<i>n</i> -Bu	Me	NA	(30%) ^d	NA	NA	-

^a ER-agonistic activity

^b ER-antagonistic activity

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

^d % inhibition at 3 μ M

^e % inhibition at 1 μ M

3.4 第3節のまとめ

本節では、ER 活性を有するジフェニルメタン誘導体に、ケイ素を導入し、ER アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性、サブタイプ選択性へ与える影響について検討を行った。

試験の結果、ケイ素体と炭素体が示す ER アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の傾向は、類似していることが分かった。ケイ素体の活性は、炭素体の活性に比べ低下する傾向があった。ER α と ER β へのアンタゴニスト活性におけるサブタイプ選択性については、化合物が同様の置換基を有している場合、ケイ素体の方が炭素体よりも高い傾向があった。合成したケイ素化合物のうち、化合物 **8b** は、高い ER α アンタゴニスト活性を示し (IC₅₀ = 30 nM)、ER β に対する ER α の選択性は約 100 倍であった (Figure 2-22.)。

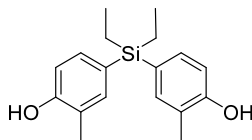


Figure 2-22. 化合物 **8b** の構造

第4節 ステロイドサルファターゼ阻害剤の創製への展開

4.1 背景

前節で示した通り，乳がんの70-80%はホルモン依存性の乳がんであると言われている．ホルモン依存性の乳がんは，生体内で合成されるエストロゲンにより増殖することから，「ホルモン療法」と呼ばれるエストロゲンと競合する抗エストロゲンを用いる治療やエストロゲン自体の生成量を減らす薬剤を用いる治療が行われる．また，女性のホルモン依存性乳がんの場合，閉経前後で治療方法（用いる抗がん剤）が異なる．

閉経前の女性では卵巣機能が活発に働いている為，乳がん細胞の増殖を促すエストロゲンは主に卵巣で合成される．そこで，治療には，卵巣でのエストロゲン合成を促す下垂体のホルモンの働きを抑える作用を有するLH-RH (luteinizing hormone-releasing hormone)アゴニスト⁸⁴が用いられる．エストロゲンと競合する抗エストロゲンについては，閉経状態にかかわらず効果を示すが⁸⁵，薬剤によっては閉経後乳がんのみを適応にもつ薬剤もある^{86, 87}．卵巣機能が低下した閉経後の女性の場合，エストロゲンの産生は主に副腎から分泌されたアンドロゲン（男性ホルモン）をもとに脂肪組織で行われる．アンドロゲンからエストロゲンへの変換は，アロマターゼと呼ばれる酵素によって行われることから，アロマターゼ阻害剤が治療に用いられている（**Figure 2-23.**）⁸⁸．しかしながら，このアロマターゼ阻害剤を用いた治療も完全ではなく，新たな作用機序を有する薬剤が求められている．

⁸⁴ Nishimura, R.; Anan, K.; Yamamoto, Y.; Higaki, K.; Tanaka, M.; Shibuta, K.; Sagara, Y.; Ohno, S.; Tsuyuki, S.; Mase, T. Efficacy of goserelin plus anastrozole in premenopausal women with advanced or recurrent breast cancer refractory to an LH-RH analogue with tamoxifen: results of the JMTO BC08-01 phase II trial. *Oncology Reports* **2013**, *29*, 1707-1713.

⁸⁵ ノルバデックス®錠 10, 20 mg 医薬品インタビューフォーム（アストラゼネカ株式会社）2011年11月改訂

⁸⁶ フェアストン®錠 40, 60 医薬品インタビューフォーム（日本化薬株式会社）2013年2月作成

⁸⁷ Vogel CL, Johnston MA, Capers C, Braccia D. Toremifene for breast cancer: a review of 20 years of data. *Clin Breast Cancer*. **2014**, *14*, 1-9.

⁸⁸ Lønning, P.E.; Eikesdal, H.P. Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocr. Relat. Cancer* **2013**, *20*, R183-201.

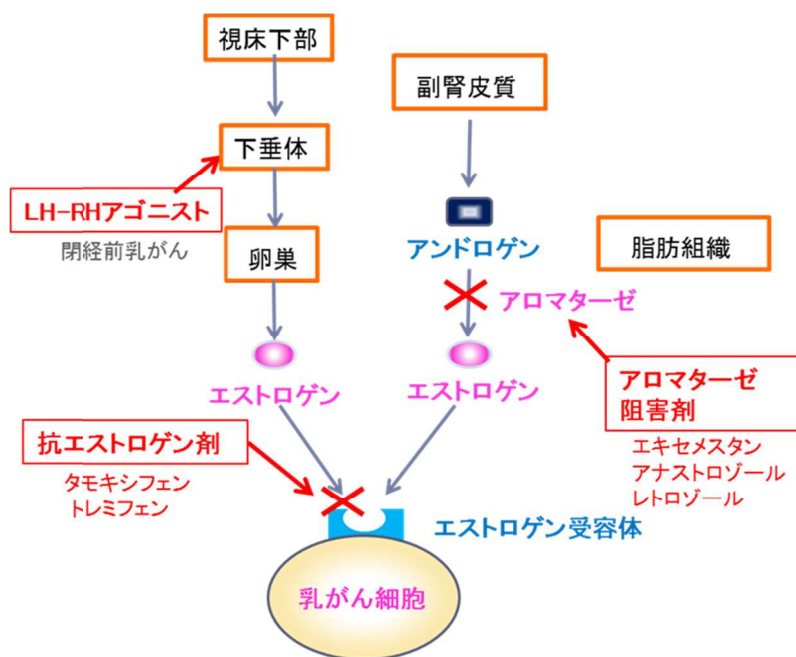
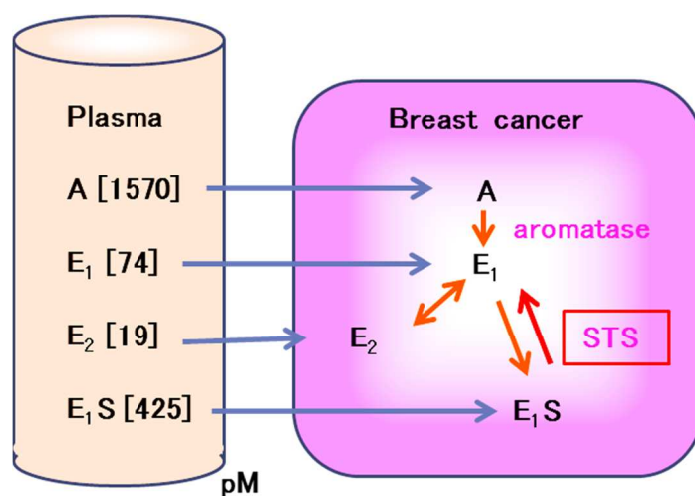


Figure 2-23. 乳がんのホルモン療法

乳がん組織局所でのエストロゲン合成には、前述のアロマターゼの他に、ステロイドサルファターゼ (STS) と呼ばれる酵素の関与も知られており、近年、抗がん剤開発の新しいターゲットとして注目されている⁸⁹。なお、がん組織におけるステロイドサルファターゼの酵素活性 (pmol/mg protein/hr) は、アロマターゼの酵素活性と比較し、数百倍高いことも報告されている⁹⁰。ステロイドサルファターゼは、血漿中に多く存在する estrone sulfate (E1S)を組織内で加水分解し, estradiol (E2)の前駆体である estrone (E1)へ変換する酵素である。Figure 2-24.の様に、アロマターゼと別経路でE2の産生に寄与していることから、ステロイドサルファターゼを阻害する薬剤は、アロマターゼ阻害剤との併用により、より高い抗腫瘍活性を期待できる可能性がある。



A: androstenedion, E₁: estrone
E₂: estradiol, E₁S: estrone sulfate

Figure 2-24. 乳がん細胞におけるステロイドサルファターゼおよびアロマターゼの働き⁹¹

⁸⁹ 中田泰介 石田浩幸 塩津行正 ステロイドサルファターゼ阻害薬 日本臨床2010, 68, 1073-1078.

⁹⁰ Chetrite, G.S.; Cortes-Prieto, J.; Philippe, J.C.; Wright, F.; Pasqualini, J.R. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, 72, 23-27.

⁹¹ Lønning, P.E.; Johannessen, D.C.; Lien, E.A.; Ekse, D.; Fotsis, T.; Adlercreutz, H. Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotrophins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 52, 491-496.

ステロイドサルファターゼ阻害剤については、これまでにいくつかの化合物が報告され、臨床試験が行われた例がある⁹²。STS 阻害薬として最初に臨床試験が行われた化合物は、ステロイド骨格を有する EMATE⁹³であったが、代謝物が強力なエストロゲン作用を示すことが明らかとなり、開発は中止された。その後、同じグループによって、非ステロイド型で coumarin 骨格を有する STX64⁹⁴が創製され、臨床試験が行われている (Figure 2-25)。

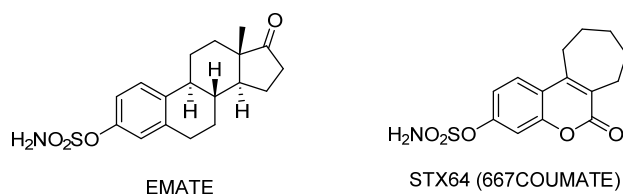


Figure 2-25. EMATE および STX64 の構造

また、ビスフェノール化合物 **39** も報告されているが⁹⁵、前節で示したビスフェノール誘導体の ER 活性評価から、化合物 **39** の代謝によって生じると思われる化合物 **18** は、ER アゴニスト活性を有する為、化合物 **39** は、EMATE と同様になんかの治療薬としては不適であると考えられる。

Figure 2-27. に、STS 阻害剤の想定される作用機序を示す。いずれの場合もスルファメート部分が切断され、アルコール (R-OH) が生じている。

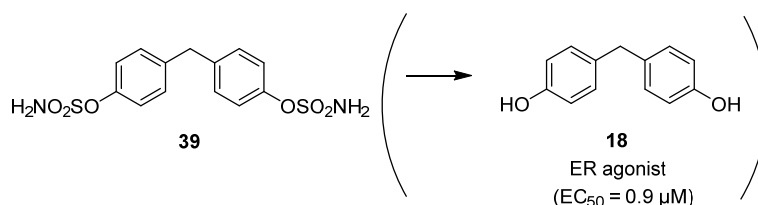


Figure 2-26. ビスフェノールタイプの STS 阻害剤 **39** と推定代謝物 **18**

⁹² Maltais, R.; Poirier, D. Steroid sulfatase inhibitors: a review covering the promising 2000-2010 decade. *Steroids* **2011**, *76*, 929-948.

⁹³ Lawrence, W.L.W.; Leblond, B.; Purohit, A.; Potter, B.V. Synthesis and evaluation of analogues of estrone-3-O-sulfamate as potent steroid sulfatase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2506-2519.

⁹⁴ Woo, L.W.; Ganeshpillai, D.; Thomas, M.P.; Sutcliffe, O.B.; Malini, B.; Mahon, M.F.; Purohit, A.; Potter, B.V. Structure-activity relationship for the first-in-class clinical steroid sulfatase inhibitor Irosustat (STX64, BN83495). *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2019-2034.

⁹⁵ Hejaz, H.A.; Woo, L.W.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V. Synthesis, in vitro and in vivo activity of benzophenone-based inhibitors of steroid sulfatase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2759-2772.

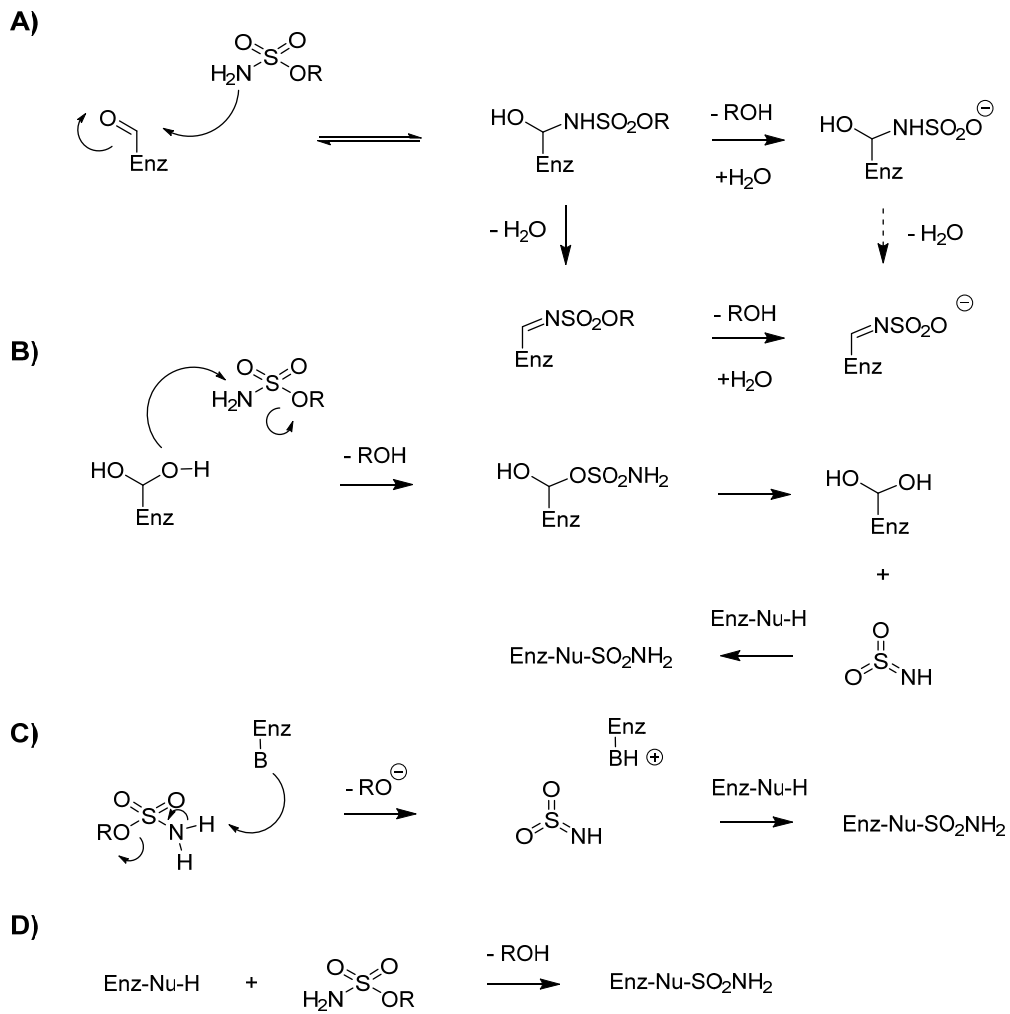


Figure 2-27. ステロイドサルファターゼ阻害剤の予想される作用機序⁹⁶

⁹⁶ Ref. 92 に記載図を一部改編

4.2 化合物のデザイン

上記のような先行化合物の現状を踏まえ、私は、デザインした STS 阻害剤の代謝物であるアルコール（フェノール）が、ER アンタゴニスト作用を示すような化合物の設計を行うこととした。即ち、「STS 阻害活性」と「代謝物による ER アンタゴニスト活性」の2つの阻害作用を有する化合物の創製を行うことを計画した（**Figure 2-28.**）。なお、同様の考えに基づく、阻害剤が既に報告されていたが、ステロイド骨格を有する化合物であった⁹⁷。

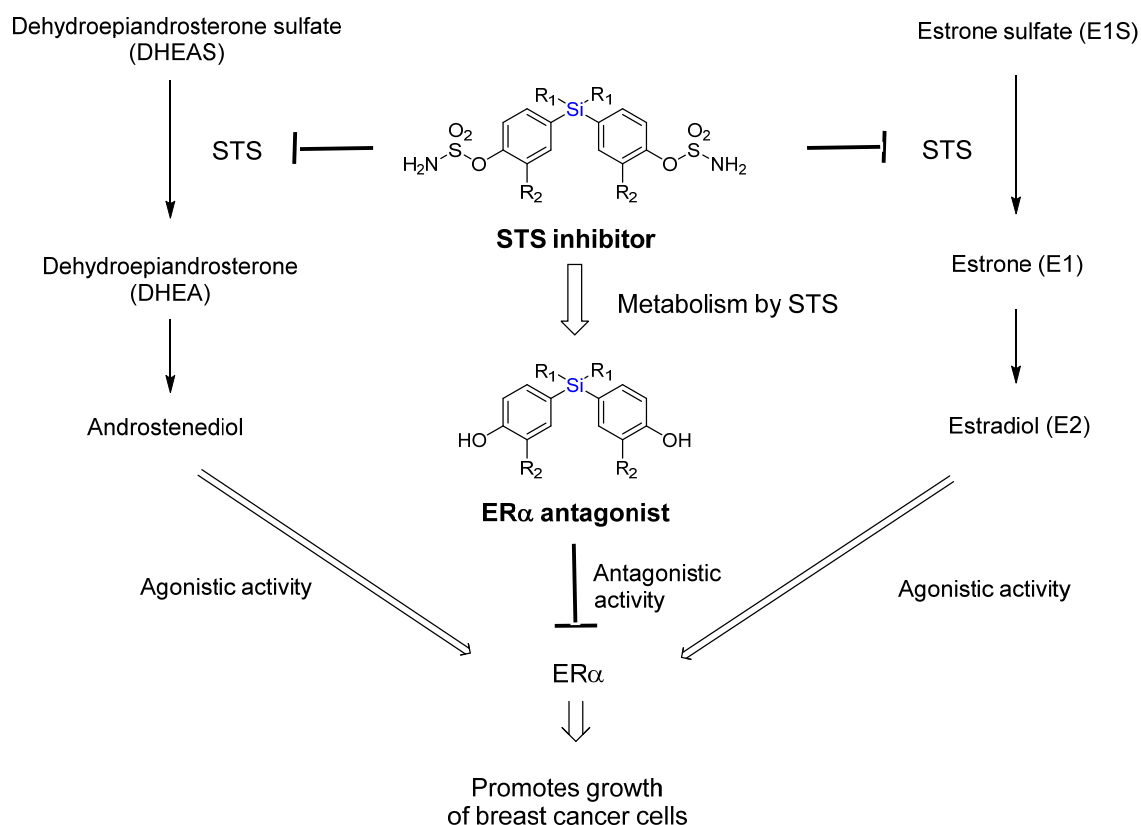


Figure 2-28. 化合物のデザインと作用機序

⁹⁷ Rasmussen, L.M.; Zaveri, N.T.; Stenvang, J.; Peters, R.H. Lykkesfeldt, A.E. A novel dual-target steroid sulfatase inhibitor and antiestrogen: SR 16157, a promising agent for the therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2007**, *106*, 191-203.

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

また、前出のビスフェノールタイプの STS 阻害剤 **39** の論文中において、ジフェニルスルフィドタイプの阻害剤 **40** が、化合物 **39** よりも高い活性を示していたことから、2つのベンゼン環の距離が長くなると STS 活性が高くなると予想し、ケイ素の導入も計画した。以下に、炭素体 **39**、イオウ体 **40**、ケイ素体 **41b** の2つのベンゼン環間の距離を示す(**Figure 2-29**)。予想した通り、ケイ素体 **41b** の2つのベンゼン環間の距離は、炭素体 **39** およびイオウ体 **40** のベンゼン環間の距離より長いことが確認された。本計算結果より、ケイ素化合物は高い STS 活性を示すことが期待された為、種々のケイ素化合物を合成することを計画した。

なお、本節に記載の内容は、梶田大資との共同研究である。

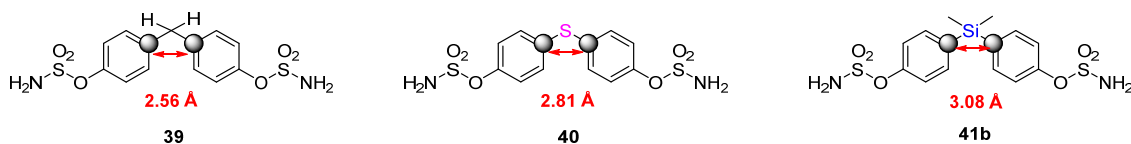
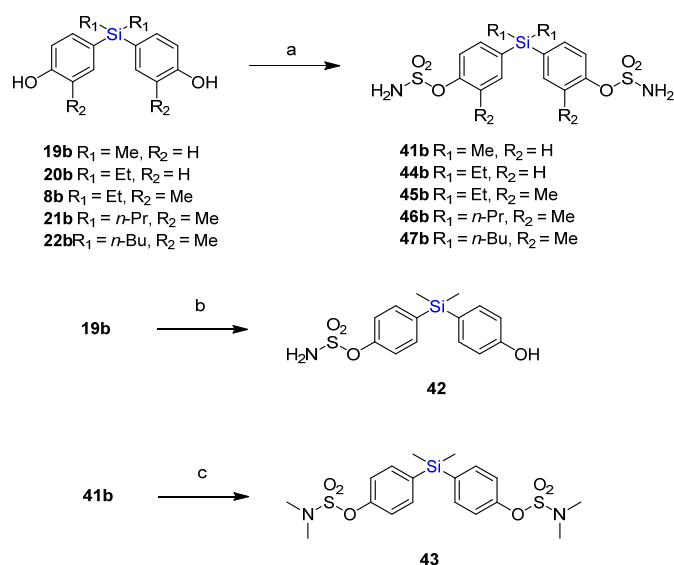


Figure 2-29. 炭素体 **39**、イオウ体 **40**、ケイ素体 **41b** の2つのベンゼン環間の距離

4.3 化合物の合成

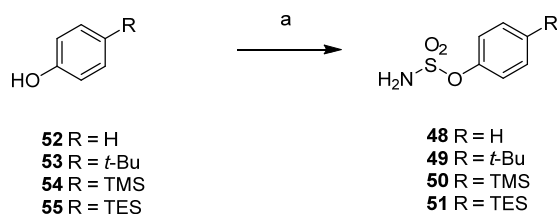
原料のフェノール **8b** および **19b-22b** は、前節に記載の方法で合成した。目的のジサルファメート体 **41b** および **44b-47b** は、DMA 中、過剰量の sulfamoyl chloride と反応させることにより合成した。モノサルファメート体 **42** は、**19b** を原料に 1.2 当量の sulfamoyl chloride を反応させることにより合成した。ジメチルアミノ体 **43** は、**41b** をヨウ化メチルでメチル化することにより合成した (Scheme 2-6)。炭素 **39** および硫黄化合物 **40** についても、同様の方法で合成した。



Scheme 2-6. Synthesis of silicon-containing compounds **41b-47b**^a

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

STS 阻害活性に対する構造活性相関を得る為、ジフェニルメタン誘導体からベンゼン環を一つ除去した以下のモノフェノール型誘導体 **48-51** も同様の方法で合成した (Scheme 2-7)。



Scheme 2-7. Synthesis of phenol analogs **48-51**^a

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

4.4 生物評価

4.4.1 酵素阻害活性評価

ステロイドサルファターゼの酵素阻害活性は、ヒト乳がん MCF-7 細胞の内在性のステロイドサルファターゼを用いて測定することとした。ライセートにした細胞に、トリチウム標識した E1S を加え一定時間インキュベートし、STS により変換された E1 および E2 を抽出した。その後、抽出液の放射活性を測定することで、酵素の活性を計測した。なお、既知の STS 阻害剤である STX64 を 10 μ M 添加した際の阻害率を 100% とした (Figure 2-30.)。

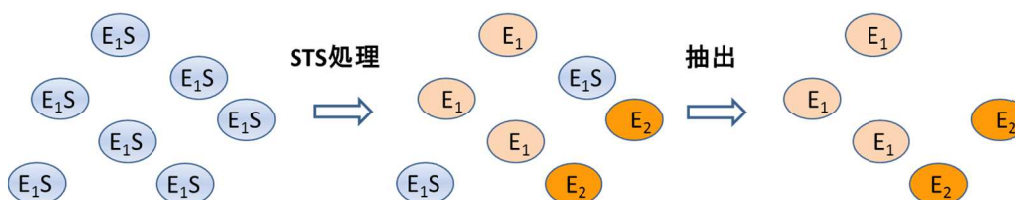


Figure 2-30. STS 酵素阻害活性の測定法

はじめに、デザインしたケイ素誘導体 **41b** および文献既知の化合物 **39**, **40** の STS 阻害活性を試験した (Table 2-8.)。期待していた通り、ケイ素体 **41b** は、炭素体 **39** より高い酵素阻害活性を示した。しかしながら、イオウ体 **40** の活性には若干及ばなかった。

Table 2-8. 化合物 **39**, **40** および **41b** の STS 阻害活性

compound	X	R ₁	R ₂	STS inhibition (%)	
				0.1 μ M	1 μ M
39	C	H	H	<10	50.1
40	S	-	H	57.1	89.7
41b	Si	Me	H	35.8	81.9
STX64	-	-	-	-	100

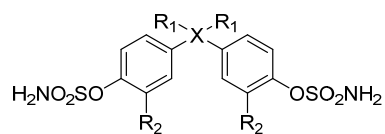
ここで、化合物の側鎖の構造が STS 阻害活性に与える影響を調査する為、ケイ素体 **41b** の側鎖を変換した化合物の活性を試験した (Table 2-9.)。スルファメート構造を一つ除去した化合物 **42** の STS 阻害活性は、ケイ素体 **41b** と比較し、若干低下したものの、高い STS 阻害活性を維持した。一方、両方のスルファメート構造を除去したビスフェノール **19b** の STS 阻害活性は、ほとんど消失した。同様に、スルファメートの末端アミンをジメチル化した化合物 **43** の STS 阻害活性もほとんど消失した。これらの結果より、STS 阻害活性の発現には、少なくとも一つのスルファメート構造が必要であることが確認された。

Table 2-9. 化合物 **19b**, **41b**, **42** および **44** の STS 阻害活性

compound	R ₃	R ₄	STS inhibition (%)	
			0.1 μM	1 μM
41b	OSO ₂ NH ₂	OSO ₂ NH ₂	35.8	81.9
42	OSO ₂ NH ₂	OH	25.2	76.4
19b	OH	OH	<10	<10
43	OSO ₂ NMe ₂	OSO ₂ NMe ₂	<10	<10

次に、中心原子 X 上及びベンゼン環上の置換基の影響を精査する為、推定代謝物であるフェノール体の ER 活性が既知の母核を有した化合物 **41a-47b** の STS 阻害活性評価を行った (Table 2-10.)。中心原子 X 上の置換基 R₁ に関しては、炭素体とケイ素体共に、置換基として Me 基, Et 基は許容されるが, *n*-Pr 基以上の長いアルキル鎖の導入は STS 阻害活性の低下につながる事が明らかとなった。ベンゼン環上の置換基 R₂ については、前節の検討より、R₂ へのメチル基を導入がフェノール誘導体の ER α のアンタゴニスト活性の上昇に寄与することが示唆されている。一方、STS 阻害活性においては、R₂ へのメチル基を行うことにより、若干の活性が低下する傾向がみられた。評価した化合物群の全体の STS 阻害活性を比較すると、当初の予想通り、ケイ素体の活性は、対応する炭素体の活性より高い傾向があることが確認された。

Table 2-10. 化合物 41a-47b の STS 阻害活性



compound	X	R ₁	R ₂	STS inhibition (%)	
				0.1 μM	1 μM
41a	C	Me	H	<10	<10
41b	Si	Me	H	35.8	81.9
44a	C	Et	H	11	29.9
44b	Si	Et	H	62	96.4
45a	C	Et	Me	<10	25.4
45b	Si	Et	Me	22.6	82.6
46a	C	<i>n</i> -Pr	Me	<10	21.1
46b	Si	<i>n</i> -Pr	Me	<10	18.7
47a	C	<i>n</i> -Bu	Me	10.3	28
47b	Si	<i>n</i> -Bu	Me	<10	16.4

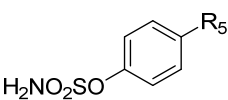
4.4.2 ケイ素導入による活性向上についての考察

当初、私は、先行研究の結果より、ジフェニルスルフィドタイプの阻害剤 **40** が、炭素体 **39** よりも高い活性を示していたことから、2つのベンゼン環の距離が長くなると STS 活性が高くなると予想し、ケイ素の導入を計画した。実際にケイ素体の合成および STS 活性評価試験を行ったところ、予想通りケイ素体は炭素体よりも高く、イオウ体と同等の活性を示した。

そこで、本節の化合物群が STS 活性を示す為に必要な必須構造の解明および、ケイ素の導入の効果をさらに検討すべく、ジフェニルメタン誘導体からベンゼン環を一つ除去したモノフェノール型誘導体 **48-51** の STS 阻害活性評価を行った（但し、本化合物の推定代謝物であるフェノールは、高いエストロゲンアゴニスト活性を示すことが知られており²³、本節の2重阻害剤のコンセプトとしては合致しない化合物である。）。

評価の結果、興味深いことに、フェノール誘導体 **48** および *t*-Bu-フェノール誘導体 **49** は弱い STS 阻害活性しか示さなかったのに対し、TMS-フェノール誘導体 **50** および TES-フェノール誘導体 **51** は、高い STS 阻害活性を示すことが明らかとなった（Table 2-11.）。即ち、ベンゼン環が一つの TMS および TES 体でも STS 阻害活性が見られたことから、ベンゼン環の距離以外にも活性に寄与する要因があることが示唆された。

Table 2-11. フェノール誘導体 **48-51** の STS 阻害活性



The chemical structure shows a benzene ring with a nitro group (H₂NO₂SO-) at the 1-position and an R₅ substituent at the 4-position.

compound	R ₅	STS inhibition (%)
		1 μM
48	H	11.4
49	<i>t</i> -Bu (CMe ₃)	12.4
50	TMS (SiMe ₃)	68.6
51	TES (SiEt ₃)	93.4

前述のとおり，スルファメート（スルファミン酸エステル）型阻害剤は STS（酵素）と不可逆的に反応し，酵素活性を阻害することが知られている（**Figure 2-27.**）．即ち，酵素と反応する際の阻害剤の反応性の違いが，酵素阻害活性に影響を及ぼす可能性がある．化合物 **49** および **50** を比較した場合，脱離するフェノール **53** および **54** の酸性度は，ケイ素体の方が高く（**Figure 2-31.**），酵素からの求核的な攻撃による反応が進行しやすいと考えられる．予備的に，化合物 **49** と **50** の PBS 中での加水分解の様子を HPLC で観察したところ，ケイ素体 **50** の方が炭素体よりも早く加水分解が進行した（data not shown）．これらのことから，ケイ素の電子的な効果が STS 阻害活性へ影響を及ぼした可能性がある．

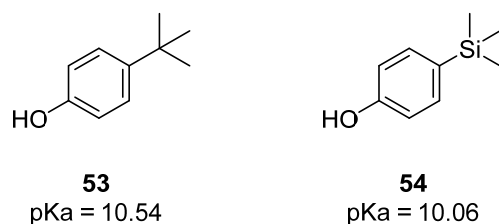


Figure 2-31. 脱離するフェノールの酸性度 (pKa) ²³

4.5 第4節のまとめ

本節では、前節で得られたジフェニルメタン誘導体の ER 活性の情報を活用し、閉経後乳がんの治療ターゲットとして注目されているステロイドサルファターゼに対する阻害活性及び ER アンタゴニスト活性を有する化合物の創製を目標に検討を行った。種々のケイ素化合物を合成し、STS 活性の評価を行った結果、既知物質と同程度の STS 阻害活性を保持しつつ、その代謝物が高い ER アンタゴニスト活性を示すケイ素化合物 **45b** の創製に成功した (Table 2-12.)。

Table 2-12. リード化合物 **39** および **40** と得られたケイ素化合物 **45b** の活性のまとめ

compound	X	R ₁	R ₂	STS 阻害活性 IC ₅₀ (μM)	ERα に対する 代謝物の活性
39	C	H	H	1.02	agonist
40	S	-	H	0.09	agonist
45b	Si	Et	Me	0.17	antagonist (ERα:IC ₅₀ = 30 nM)

第 5 節. 小括

本章第 1 節では，創薬化学におけるマルチテンプレート手法とステロイド代替骨格としてのジフェニルメタン骨格について概説した．第 2 節では，ジフェニルメタン骨格を有する核内受容体 VDR アゴニストおよび AR アンタゴニスト活性を有する化合物に，ケイ素を導入することで，VDR 活性が低減し，AR 活性が向上することを見出した．最も AR 選択的であった含ケイ素化合物 **(S,R)-3b** は，マウス乳がん SC-3 細胞の増殖抑制活性試験において，アンドロゲンアンタゴニストとして知られるヒドロキシフルタミドの 20 倍の活性を示した ($IC_{50} = 0.072 \mu M$)．第 3 節では，核内受容体 ER について着目し， $ER\alpha/\beta$ に対するアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性について精査した．結果，炭素体とケイ素体では，類似の活性パターンを示したが，活性はケイ素体が若干弱いことが分かった．一方， $ER\beta$ に対する $ER\alpha$ へのサブタイプ選択性は，ケイ素体の方が高い傾向があった．第 4 節では，第 3 節で得られた知見を活かし，ステロイドサルファターゼ阻害および ER 阻害活性を有する含ケイ素化合物 **45b** の創製に成功した．

本章の結果より，ジフェニルメタン骨格へケイ素を導入することにより，標的への選択性の転換や生理活性の変化が生じることが明らかとなった．即ち，標的に応じ，ジフェニルメタン化合物の炭素/ケイ素置換を行うことにより，目的にあった分子が創製できる可能性が示唆される．本章で得られた結果は，マルチテンプレートとしてのジフェニルメタン骨格の適応範囲を広げるものであり，マルチテンプレートとしてのジフェニルメタン/ジフェニルシラン骨格の更なる有用性を示す結果だと考えられる．

第3章 シランジオールおよびシラノールを導入した化合物の創製

第1節 研究背景

ケイ素と炭素の大きな違いの一つとして、酸素との二重結合を形成する際、炭素はケトンとジオールの平衡がケトン型に偏っているのに対し、ケイ素はジオール型（シランジオール）に偏っていることを第1章で述べた（**Figure 3-1.**）⁹⁸。このケイ素の特徴的な構造であるシランジオール構造を利用したいくつかのプロテアーゼ阻害剤が報告されている。

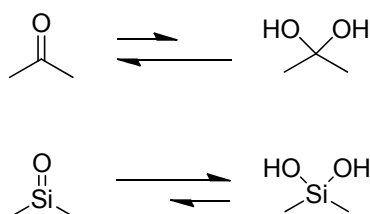


Figure 3-1. 炭素とケイ素におけるケトンとジオールの平衡

タンパク加水分解酵素であるプロテアーゼは、活性中心のアミノ酸または金属イオンが触媒的に作用し、テトラヘドラルな遷移状態を経て基質のペプチド結合を加水分解している（**Figure 3-2.**）。この様なテトラヘドラルな遷移状態を模倣して、Sieburthらはシランジオールを導入した高活性な HIV プロテアーゼ阻害剤 **56**⁹⁹ や ACE (angiotensin converting enzyme) 阻害剤 **57**¹⁰⁰などを報告している（**Figure 3-3.**）。

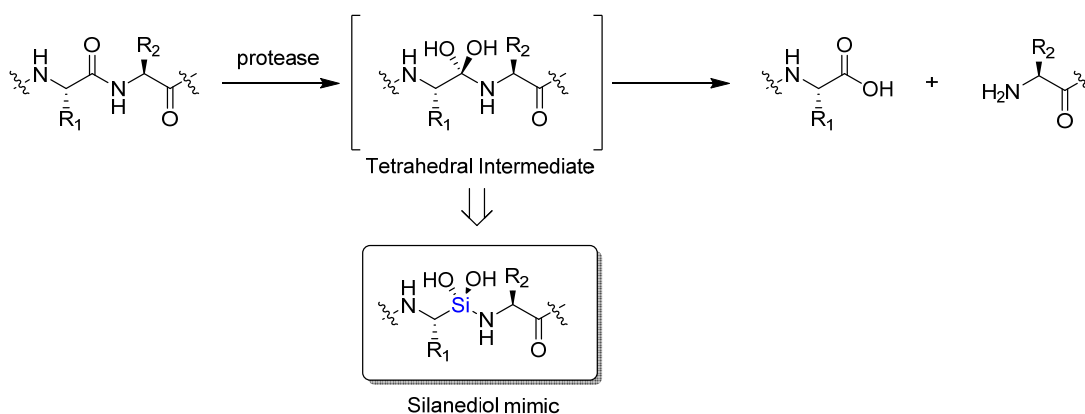


Figure 3-2. プロテアーゼによるペプチド結合の切断

⁹⁸ Franz, A.K.; Wilson, S.O. Organosilicon Molecules with Medicinal Applications. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 388–405.

⁹⁹ Chen, C.A.; Sieburth, S.M.; Glekas, A.; Hewitt, G.W.; Trainor, G.L.; Erickson-Viitanen, S.; Garber, S.S.; Cordova, B.; Jeffry, S.; Klabe, R.M. Drug design with a new transition state analog of the hydrated carbonyl: silicon-based inhibitors of the HIV protease. *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1161–1166.

¹⁰⁰ Kim, J.; Sieburth, S.M. Silanediol peptidomimetics. Evaluation of four diastereomeric ACE inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2853–2856.

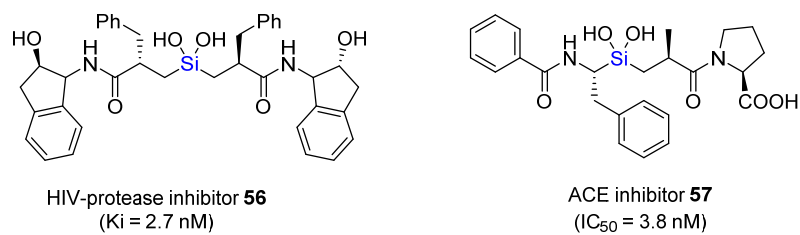


Figure 3-3. シランジオール構造を有する高活性なプロテアーゼ阻害剤

そこで、本章では、このシランジオール構造に着目し、新規なプロテアソーム阻害剤の創製への試みについて述べた（第2節）。また、シランジオール構造に加え、シラノール構造を導入した成人 T 細胞白血病（ATL）細胞増殖阻害剤の創製についても述べた（第3節）。

第2節 シランジオール構造を有するプロテアソーム阻害剤の創製

2.1 背景

プロテアソームは、真核細胞における ATP 依存性タンパク質分解を担う酵素であり、多くの細胞タンパク質の分解に関与している¹⁰¹。26S プロテアソームは、分子量約 2000 kDa の巨大分子で、プロテアーゼ活性を有する中央が筒状の 20S プロテアソーム (分子量約 700 kDa) の両端に、19S プロテアソームが結合した構造である。プロテアソームは、ユビキチンにより標識されたタンパク質を分解することが知られており、ユビキチン-プロテアソーム系 (ubiquitin proteasome pathway : UPP) と呼ばれている (Figure 3-4)。UPP は、細胞周期、シグナル伝達などに関与していることも知られている¹⁰²。

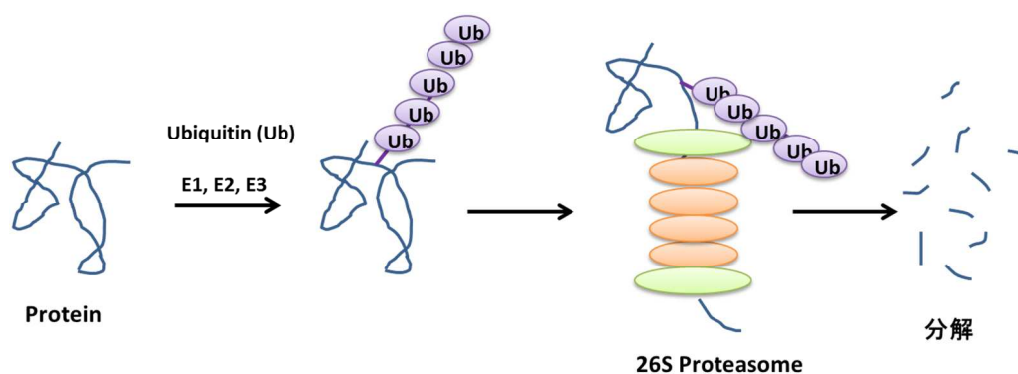


Figure 3-4. ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパクの分解

また、UPP は多くの転写応答の調節に関与しており、腫瘍細胞において重要な役割を果たす NF- κ B の活性化にも関与している。NF- κ B は、サイトカイン、接着分子、転写因子などの多岐にわたる遺伝子の転写調節に関与し、腫瘍の細胞浸潤、転移、アポトーシス回避、細胞増殖などに影響を与えている。通常、NF- κ B は、その阻害タンパク質である I κ B α と結合して細胞質内に不活性型として存在している。I κ B α は、リン酸化を受けた後、ポリユビキチン化を受け、最終的に 26S プロテアソームによって分解され、その結果、NF- κ B が遊離し、作用を発現する。

¹⁰¹ Coux, O.; Tanaka, K.; Goldberg, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 801-847.

¹⁰² Glickman, M.H.; Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 373-428.

多発性骨髄腫治療薬として用いられているボルテゾミブは、プロテアソームのキモトリプシン様活性を有する $\beta 5$ サブユニットの活性中心に結合し、プロテアソームを特異的かつ可逆的に阻害する。その結果、 $I\kappa B\alpha$ の分解が抑制されることにより、 $NF-\kappa B$ の活性化が抑えられる。ボルテゾミブは、その他のプロテアソームが関連する腫瘍細胞の複数のシグナル伝達経路への影響を及ぼし、抗腫瘍活性を示すことも示唆されている (Figure 3-5.)¹⁰³。

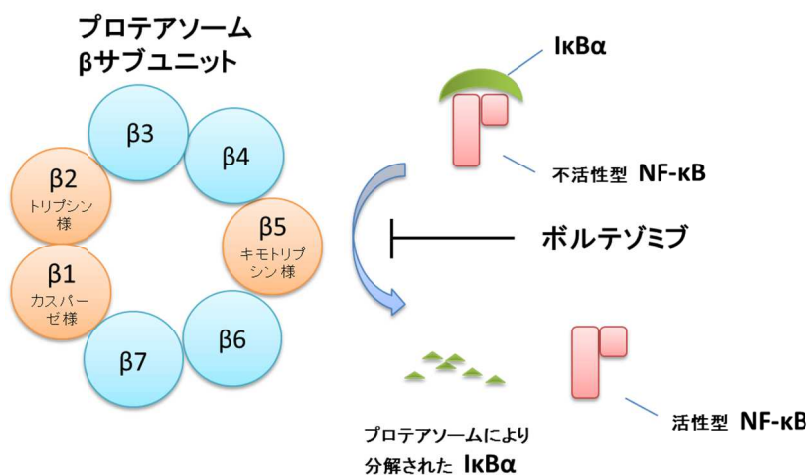


Figure 3-5. $NF-\kappa B$ の活性化とボルテゾミブの作用機序

¹⁰³ ベルケイド®注射用 3 mg 医薬品インタビューフォーム (ヤンセンファーマ株式会社) 2013年10月改訂 (改訂第8版)

2.2 化合物のデザイン・合成

前述のとおり、シランジオール構造を有するいくつかのプロテアーゼ阻害剤が報告されているが、シランジオール構造を有するプロテアソーム阻害剤は報告されていない。そこで、私は、ボルテゾミブ(**58**)のボロン酸部位をシランジオール構造に置換した化合物 **59** をデザインした (Figure 3-6)。現在までに、生理活性物質のボロン酸部位をシランジオールへ置換した例が報告されていない点からも、その活性への影響について興味を持たれる。

また、プロテアソームの活性中心では、Threonine 残基がペプチドの加水分解に寄与することが知られており、ボルテゾミブと 20S プロテアソームの共結晶 (PDBID: 3MG0)¹⁰⁴では、ボルテゾミブのホウ素に Threonine の水酸基が配位していることが確認されている。このホウ素への水酸基の配位は可逆的であることから、ボルテゾミブは、可逆的に酵素活性を阻害するすると考えられている。一方、ケイ素は、酸素と強い結合を形成することが知られていることから、ホウ素をケイ素に置換することによって、不可逆的な阻害剤が得られることも期待した。

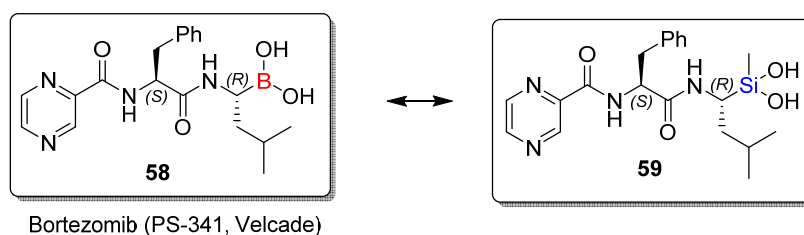
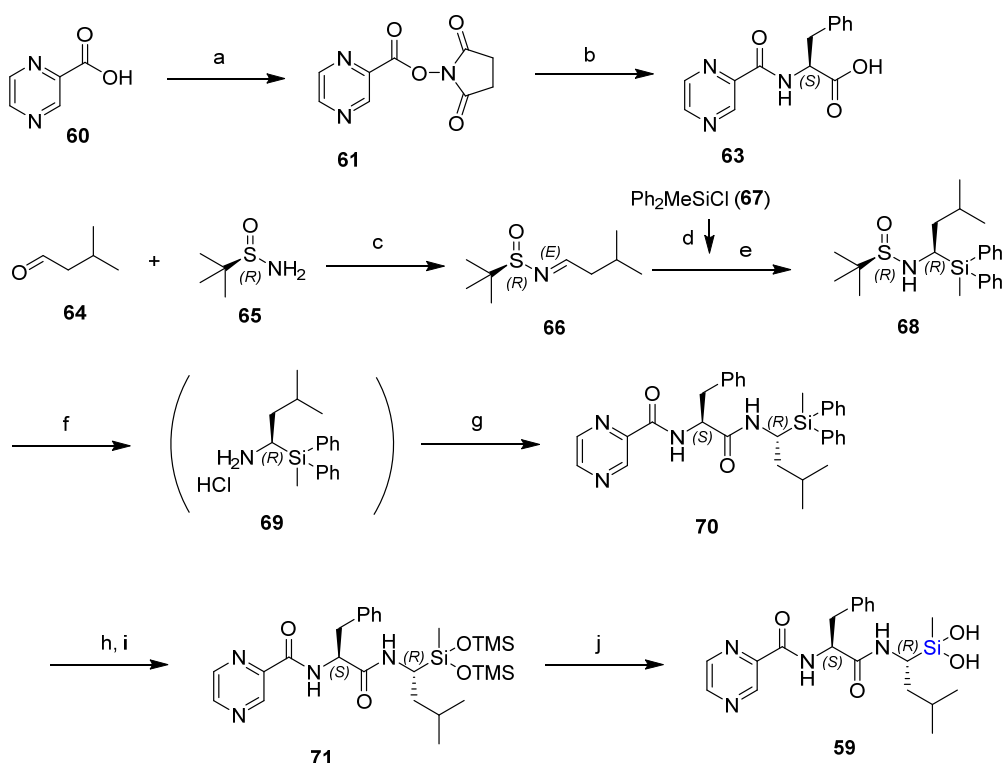


Figure 3-6. ボルテゾミブ(**58**)およびデザインしたシランジオール構造を有する化合物 **59** の構造

¹⁰⁴ Blackburn, C.; Gigstad, K.M.; Hales, P.; Garcia, K.; Jones, M.; Bruzzese, F.J.; Barrett, C.; Liu, J.X.; Soucy, T.A.; Sappal, D.S.; Bump, N.; Olhava, E.J.; Fleming, P.; Dick, L.R.; Tsu, C.; Sintchak, M.D.; Blank, J.L. Characterization of a new series of non-covalent proteasome inhibitors with exquisite potency and selectivity for the 20S beta5-subunit. *Biochem. J.* **2010**, 430, 461-476.

目的の化合物 **59** は、以下の合成ルートで合成した (Scheme 3-1.)。初めに、ボルテズミブと共通構造である原料のカルボン酸 **63** を 2 工程で合成した¹⁰⁵。また、含ケイ素ユニット **68** は、既知の方法を用いてアルデヒド **64** から 2 工程で合成した¹⁰⁶。合成した **68** を酸で処理することで、アミンの塩酸塩 **69** とし、別途合成したカルボン酸 **63** と縮合し、ジフェニルシラン体 **70** を得た。得られたフェニルシラン体 **70** を酢酸水銀 (II) で処理し¹⁰⁷、生じたシランジオールのアルコールを TMS で保護し、前駆体 **71** を得た。前駆体 **71** は、NaOD/D₂O 中で加水分解することによって、目的のシランジオール体 **59** へと変換した。シランジオール体 **59** の構造は NMR および LC/MS で確認を行った。得られたシランジオール体 **59** の溶液は緩衝液で希釈し、そのまま生物評価を行った。



Scheme 3-1. Synthesis of the silicon-containing compound **59**^a

^a Reagents and conditions: (a) HOSu, DCC, CH₂Cl₂, r.t., 24 h, 35%; (b) L-phenylalanine hydrochloride (**62**), TEA, CH₂Cl₂, 13 h, 59%; (c) PPTS, MgSO₄, reflux, 21 h, 62 %; (d) lithium, THF, r.t.; (e) solution of reaction d, THF, -78 °C, 7 h, then r.t. 12 h, 90%; (f) 5% HCl/MeOH, r.t. 10 h; (g) compound **63**, DMT-MM, 4-methylmorpholine, THF, r.t., 41%; (h) Hg(OAc)₂, THF, H₂O, r.t., 3 h; (i) TMSCl, TEA, CH₂Cl₂, r.t. 2 h, 8% (2 steps) (j) 2%(wt) NaOD/D₂O, CD₃OD, r.t. 7h, quant.

¹⁰⁵ 特許文献 CN 102206188A

¹⁰⁶ Hernandez, H.; Mose, R.; Skrydstrup, T. Reductive Lithiation of Methyl Substituted Diarylmethylsilanes: Application to Silanediol Peptide Precursors. *Org. Lett.* **2011**, 13, 732-735.

¹⁰⁷ Kim, J.; Sieburth, S.M. A Silanediol Inhibitor of the Metalloprotease Thermolysin: Synthesis and Comparison with a Phosphinic Acid Inhibitor. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 3008-3014.

2.3 生物評価 (酵素阻害活性評価) と考察

プロテアソーム酵素阻害評価は、市販のアッセイキット (20S Proteasome assay kit (BML-AK740), BIOMOL International 社製) を用いて実施した。具体的には、20S プロテアソームのキモトリプシン様プロテアーゼ活性を、蛍光基質 (Suc-LLVY-AMC) の分解により生じる AMC の蛍光 (Ex.360nm/Em.460nm) を用いて求める方法を用いた。

評価の結果、ポジティブコントロールに用いたボルテゾミブ(**58**)は、文献値¹⁰⁸と同等の高い阻害活性を示した ($IC_{50}=25.4\text{ nM}$)。一方、合成したシランジオール体 **59** は、酵素の阻害活性は見られたものの、ボルテゾミブ(**58**)と比較して 1000 倍以上活性が低下した (阻害率 21% at 30 μM)。

この原因として、ホウ素は 3 配位で平面構造を取っているのに対し、ケイ素の場合は、4 配位であることから、水酸基の方向に差異が生じた為、活性が大きく低下した可能性がある。また、ケイ素体は、ケイ素上にメチル基を有していることから、メチル基の立体障害が活性低下につながった可能性がある。

これまで、いくつかのシランジオール構造を有するプロテアーゼ阻害剤が報告されているが、本結果より、既存のプロテアソーム阻害剤のボロン酸構造をシランジオールで置換したのみでは、高活性な化合物を得ることは困難であることが分かった。しかしながら、合成した化合物は弱いながら酵素阻害活性を有していたことから、シランジオールの周囲の構造を変換することにより、活性向上が行えると考えられる。

¹⁰⁸ Demo, S.D.; Kirk, C.J.; Aujay, M.A.; Buchholz, T.J.; Dajee, M.; Ho, M.N.; Jiang, J.; Laidig, G.J.; Lewis, E.R.; Parlati, F.; Shenk, K.D.; Smyth, M.S.; Sun, C.M.; Vallone, M.K.; Woo, T.M.; Molineaux, C.J.; Bennett, M.K. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res.* **2007**, 67, 6383-6391.

第3節 シランジオール, シラノール構造を有する成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞増殖阻害剤の創製

3.1 背景

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (Adult T-cell leukemia : ATL) は, 成熟ヘルパー T 細胞の悪性腫瘍であり, レトロウィルスの HTLV-1 (human T-lymphotropic virus type 1) の感染により, 発症すると言われている^{109, 110}. 疫学的な研究によると HTLV-1 感染者は, 世界中で 1500-2000 万人と言われており, 日本, カリブ地域, アフリカに多い¹¹¹. 本邦での HTLV-1 感染者は 120 万人と推定されており, 毎年, 700 人以上が ATL を発症している¹¹². ATL の治療には, 他のリンパ性の悪性疾患に用いられる抗がん剤が使用されるが, 悪性の ATL に対しては, その効果は限定的である. このことから, ATL 治療薬となりうるリード化合物の探索, 創製が求められている^{113, 114, 115}.

近年, 橋本研究室では, テトラヒドロテトラナフタレン (tetrahydrotetramethylnaphthalene : TMN) 骨格を有する ATL 細胞選択的な細胞増殖抑制活性を有する 2-acetyl-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethylnaphthalene (**72**)を見出している (**Figure 3-7.**)^{116, 117}.

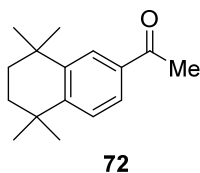


Figure 3-7. Structure of 2-acetyl-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethylnaphthalene (**72**)

¹⁰⁹ Uchiyama, T.; Yodoi, J.; Sagawa, K.; Takatsuki, K.; Uchino, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **1977**, 50, 481-492.

¹¹⁰ Tamiya, S.; Matsuoka, M.; Etoh, K.; Watanabe, T.; Kamihira, S.; Yamaguchi, K.; Takatsuki, K. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* **1996**, 88, 3065-3073.

¹¹¹ Edlich, R.F.; Arnette, J.A.; Williams, F.M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J. Emerg. Med.* **2000**, 18, 109-119.

¹¹² Takatsuki, K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology* **2005**, 2, 1-3.

¹¹³ Taylor, G.P.; Matsuoka, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene* **2005**, 24, 6047-6057.

¹¹⁴ Baba, M.; Okamoto, M.; Hamasaki, T.; Horai, S.; Wang, X.; Ito, Y.; Suda, Y.; Arima, N. Highly enhanced expression of CD70 on human T-lymphotropic virus type 1-carrying T-cell lines and adult T-cell leukemia cells. *J. Virol.* **2008**, 82, 3843-3852.

¹¹⁵ Uozumi, K. Treatment of adult T-cell leukemia. *J. Clin. Exp. Hematopathol* **2010**, 50, 9-25.

¹¹⁶ Nakamura, M.; Hamasaki, T.; Tokitou, M.; Baba, M.; Hashimoto, Y.; Aoyama, H. Discovery of tetrahydrotetramethylnaphthalene analogs as adult T-cell leukemia cell-selective proliferation inhibitors in a small chemical library constructed based on multi-template hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 4740-4746.

¹¹⁷ Hamasaki, T.; Toyama, M.; Aoyama, H.; White, Y.; Okamoto, M.; Arima, N.; Hashimoto, Y.; Baba, M. Selective inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by a novel tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* **2011**, 31, 2241-2247.

3.2 化合物のデザイン

橋本研究室で実施した ATL 細胞増殖抑制活性を有する化合物の構造活性相関研究より、化合物 **72** をはじめとして ATL 細胞選択的な細胞増殖抑制活性を有する化合物は、共通してカルボニル構造とその α 位に水素を有していることが分かっている¹¹⁶。このことから、私は、ケトンの互変異性体であるエノールが、活性・選択性発現に寄与している可能性があると考えた (Figure 3-8.)。

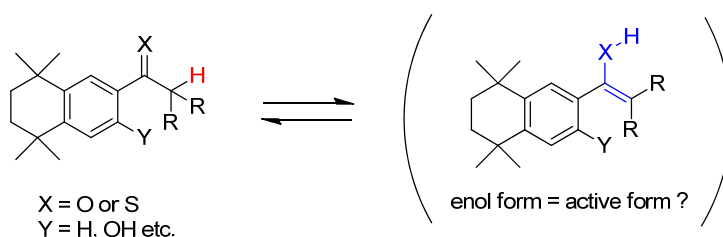


Figure 3-8. ATL 細胞増殖阻害剤の互変異性体

そこで、私は、ケトンとジオールの平衡が炭素体においてはケトン型に偏っているのに対し、ケイ素体ではジオール型（シランジオール）に偏っていることに注目し、シランジオール及びシラノール基を導入した化合物 **73-77** および **79-81** の合成を計画した。また比較の為、炭素体のアルコール **78** の合成も計画した (Figure 3-9.)。その他、ホウ素およびリンを導入した化合物 **82-85**、ケトンの先端に電子吸引性基を導入した化合物 **86-89** の合成も計画した (Figure 3-10.)。

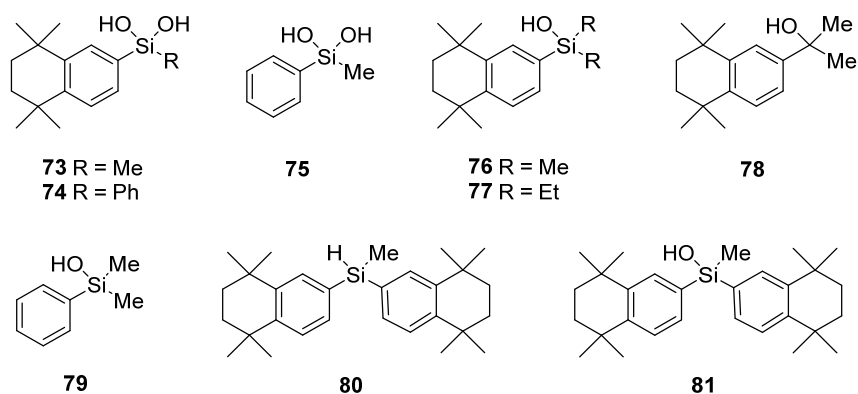


Figure 3-9. 合成を計画した含ケイ素化合物とその類縁体

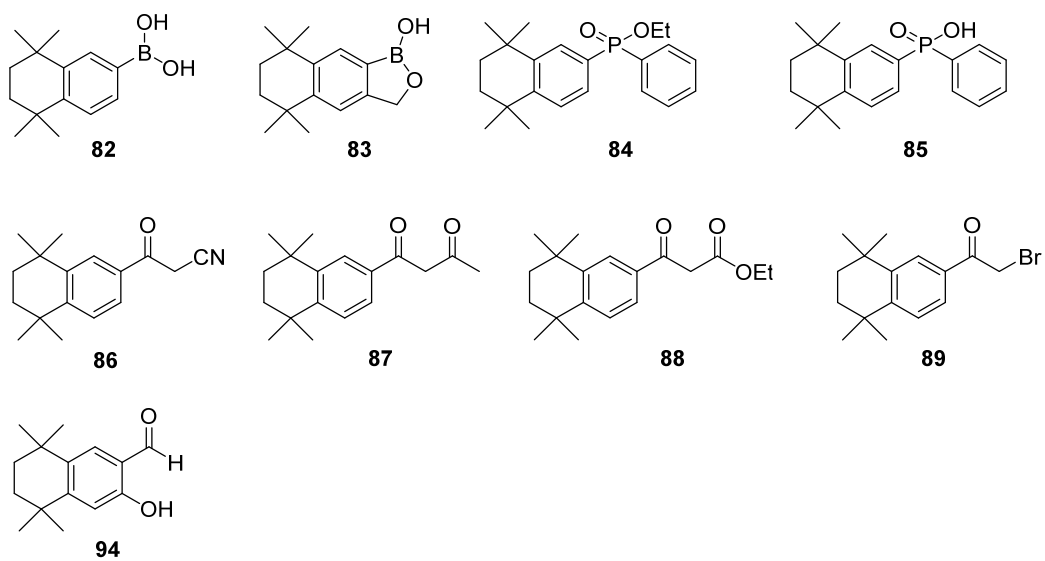


Figure 3-10. その他，合成，評価を行った化合物

3.3 計算化学実験

合成に先立ち、ケイ素誘導体と炭素誘導体の類似点および差異を検討する為、計算化学的な検討を行った。一般に、ケイ素は炭素より長い分子間の結合距離を有し、その電気陰性度は小さいことが知られている。ここでは、ケイ素化合物 **76** および対応する炭素化合物 **78** に注目し、それぞれの化合物の安定構造および静電ポテンシャルを Gaussian 09 program package¹¹⁸を用いて、M06/6-31+G* レベルで算出した。Figure 3-11.に示すように、ケイ素と炭素の結合半径の違いに起因して、ケイ素体 **76** の分子サイズが大きいことが分かる。一方、両化合物の静電ポテンシャルは、類似していることが分かった (Figure 3-12.)。

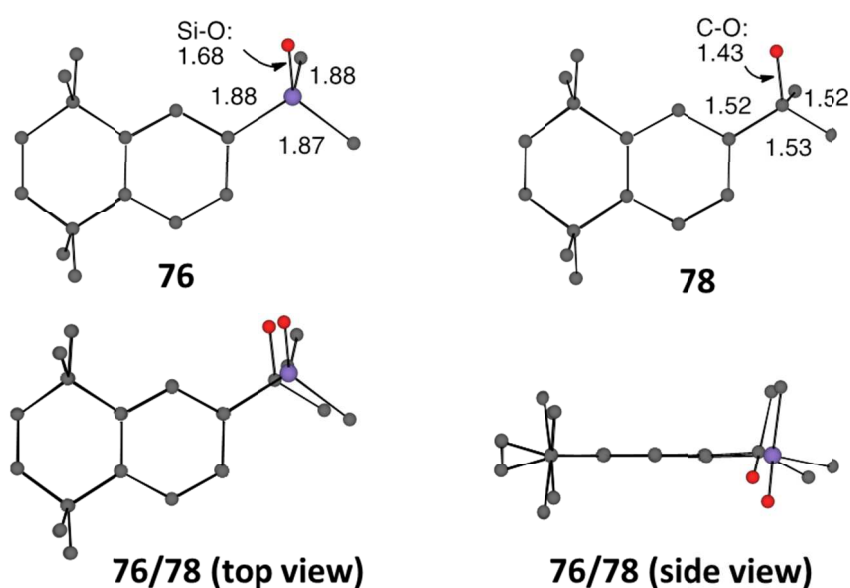


Figure 3-11. Superpositions of the calculated structures of compounds **76** and **78** obtained by geometry optimizations. Hydrogen atoms are omitted for clarity

¹¹⁸ Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, Jr. J.A.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; and Pople, J.A.; Wallingford, C.T. *Gaussian 09* (Revision-A.01), Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, (2009)

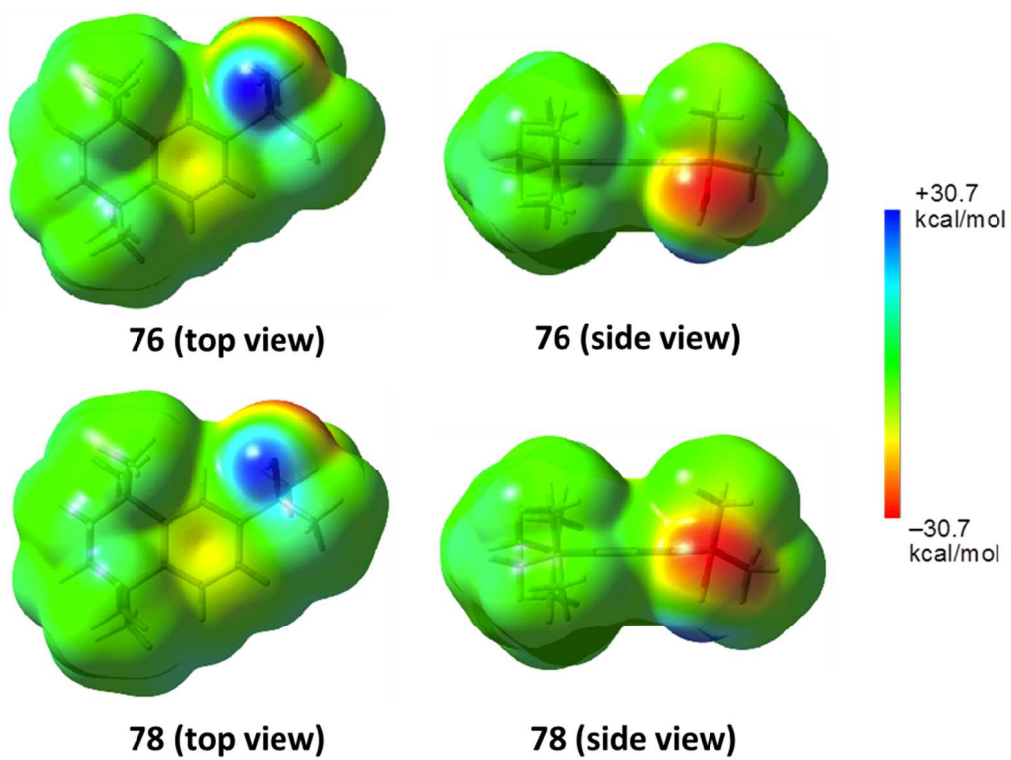
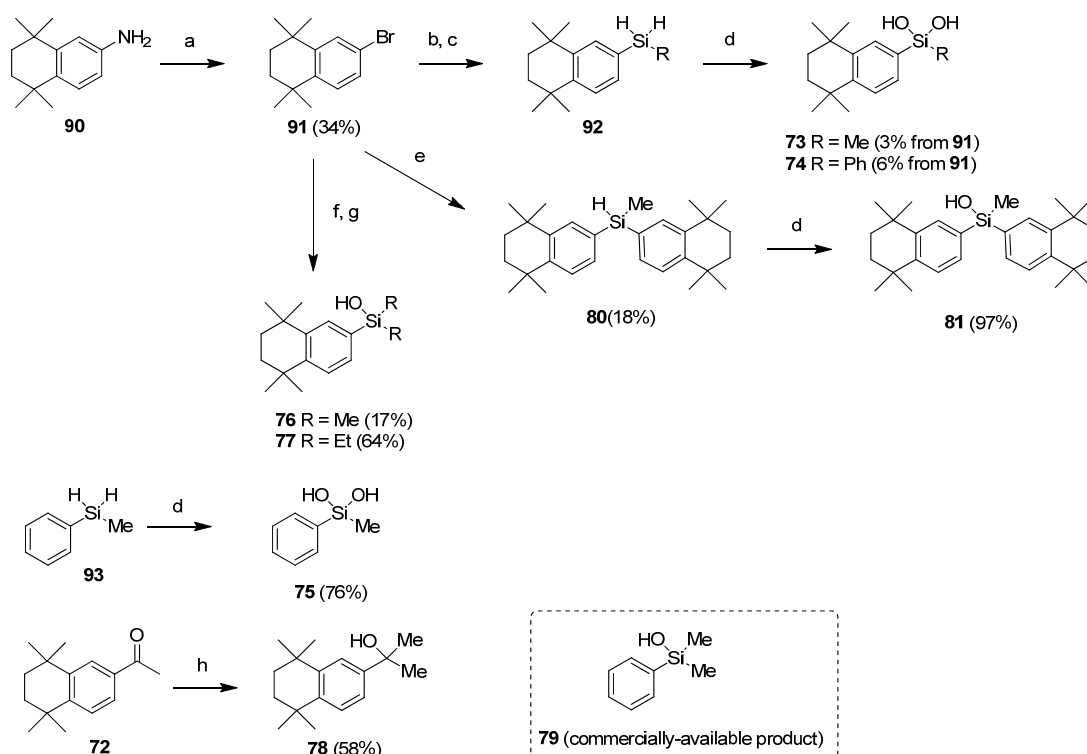


Figure 3-12. Electrostatic potential field maps of compounds **76** and **78**

3.4 化合物の合成

化合物 **72-81** は, **Scheme 3-2**. に示すような一般的な合成法で合成した. 化合物 **72** は, 既知の方法で合成した¹¹⁶. シランジオール **73** および **74** は次のように合成した. 既知の方法で合成したアミン **90**¹¹⁹ を Sandmeyer 反応により, ブロモ体 **91** へと変換した. これを *n*-BuLi で処理後, methyltrichlorosilane または phenyltrichlorosilane と反応させ, 反応生成物をリチウムアルミニウムヒドライド (LAH) で還元することによって中間体 **92** を合成した. その後, 空气中で Pd/C を用いて酸化することによって, 目的のシランジオール **73** および **74** を合成した. シラノール誘導体 **76, 77**, および **81** は, 類似の方法で合成した. 炭素体 **78** は, 化合物 **72** を, methylmagnesium bromide (MeMgBr) で処理することで合成した. その他, ホウ素およびリンを導入した化合物 **82-85**, ケトンの先端に電子吸引性基を導入した化合物 **86-89** の合成法については省略する (実験項参照).



Scheme 3-2. 化合物 **72-81** の合成^a

^a Reagents and condition: (a) NaNO₂, HBr aq, CuBr (b) *i*-PrMgBr-LiCl, THF, RSiCl₃ (R= Me, Ph) (c) LAH, THF (d) Pd/C, Air, 1,4-dioxane (e) *n*-BuLi/hexane, THF, MeSiCl₃ (f) *n*-BuLi/hexane, THF, Me₂SiCl₂ (R = Me, Et) (g) NaOH aq (h) MeMgBr, THF.

¹¹⁹ Kagechika, H.; Kawachi, E.; Hashimoto, Y.; Shudo, K.; Himi, T. Retinobenzoic acids. 1. Structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2182-2192.

3.5 生物評価

ATL 細胞選択的阻害剤の評価は、鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科附属 難治ウイルス病態制御研究センター 馬場 昌範教授に依頼した。評価には、急性型の ATL 由来の S1T 細胞および HTLV-1 ネガティブな T 細胞リンパ腫由来の MOLT-4 を用いた。試験化合物のうち、S1T 細胞の増殖を抑制するが、MOLT-4 細胞の増殖を阻害しない化合物が、ATL 治療薬のリード化合物に適していると考えられる。S1T および MOLT-4 細胞はそれぞれ、試験化合物の存在下または非存在下、4 日間培養し、生存している細胞数を MTT アッセイにより求め、 IC_{50} 値を算出した。結果を **Table 3-1.**に示す。

化合物 **72** は、S1T 細胞選択的な細胞増殖抑制活性を示し、その selectivity index 値 (SI: IC_{50} value for MOLT-4 cells/ IC_{50} value for S1T cells) は 9.6 であった。シランジオール **73** は S1T に対して弱い活性を示した。しかしながら、MOLT-4 細胞に対しても活性も示したことから、シランジオール **73** の細胞選択性は低いことが分かった (SI 値 = 1.1)。化合物 **73** のメチル基をフェニル基に置換した化合物 **74** は、S1T および MOLT-4 双方に対しての増殖抑制活性が上昇し、SI 値も化合物 **73** より大きくなった (SI 値 = 1.7)。TMN 骨格をベンゼンに置換した化合物 **75** は、活性を示さなかった ($IC_{50} > 100$)。シラノール **76** は、シランジオール **73** と同等の活性を示した。化合物 **76** のメチル基をエチル基に置換した化合物 **77** の活性は、化合物 **76** と比較し僅かに上昇した。シラノール **76** の炭素体、即ちアルコール **78** の S1T に対する活性は、シラノール体 **76** と同様であった。この結果より、本化合物群においては、シラノールをアルコールのバイオアイソスターとして利用できることが示唆された。TMN 骨格を持たない化合物 **79** は、化合物 **75** と同様に活性を示さなかった ($IC_{50} > 100$)。これらの結果より、TMN 骨格は、細胞増殖抑制活性の発現に必須の構造であることが示唆される。化合物 **81** は、今回試験したケイ素化合物の中で最も高い S1T および MOLT-4 細胞に対する増殖抑制活性を示し、最も高い S1T 選択性を示した (SI 値 = 2.0)。一方、化合物 **81** の水酸基を除去した化合物 **80** は、活性を示さなかった ($IC_{50} > 100$)。このことから、水酸基は、細胞増殖抑制活性の発現に重要であることが明らかとなった。

Table 3-1. Anti-proliferative activity of compounds **72-81** against S1T and MOLT-4 cells

Compounds	IC ₅₀ (μM)		SI ^a
	S1T	MOLT-4	
72^b	6.9	66.0	9.6
73	56.3	63.1	1.1
74	23.2	40.4	1.7
75	>100	>100	-
76	38.7	48.0	1.2
77	28.2	37.7	1.3
78	35.7	73.8	2.1
79	>100	>100	-
80	>100	>100	-
81	6.3	12.8	2.0

^a SI = selectivity index (IC₅₀ value for MOLT-4 cells/IC₅₀ value for S1T cells)

^b Values taken from the literature.¹¹⁶

次に、ホウ素およびリンを導入した化合物 **82-85**、ケトンの先端に電子吸引性基を導入した化合物 **86-89**、ホウ素体の合成中間体であるアルデヒド **94** の活性評価結果を **Table 3-2.** に示す。

含ホウ素化合物 **82** および **83** は、両細胞に対して弱い活性を示したが、選択性はほとんどなかった。リン化合物 **84** については、興味深いことに、S1T と MOLT-4 への選択性が逆転していた (SI 値 = 0.5)。リン化合物 **85** は、両細胞に対して活性を示さなかった。これは、化合物 **85** が、酸構造を有していることから、細胞透過性が低下し、活性を示さなかったと考えられる。

ケトンの先端に電子吸引性基を導入した化合物 **86-89** については、S1T 細胞への選択性が弱いながら見られるものの、リード化合物 **72** には及ばず、その活性も弱いものであった。以前の検討より、ケトンの先端の修飾を行うと、活性が低下する傾向があることから、本化合物群でも立体障害により活性が低下したものと考えられる。また、ホウ素体の合成中間体であるアルデヒド **94** は、両細胞に高い細胞増殖抑制活性を示したが、細胞選択性はみられなかった。

Table 3-2. Anti-proliferative activity of compounds **82-89** and **94** against S1T and MOLT-4 cells

Compounds	IC ₅₀ (μM)		SI ^a
	S1T	MOLT-4	
82	31.7	33.8	1.1
83	58.1	54.0	0.9
84	33.7	17.7	0.5
85	>100	>100	-
86	34.7	58.8	1.7
87	37.1	61.0	1.6
88	18.0	44.1	2.5
89	10.3	10.5	1.0
94	1.7	1.4	0.8

^a SI = selectivity index (IC₅₀ value for MOLT-4 cells/IC₅₀ value for S1T cells)

^b Values taken from the literature.¹¹⁶

化合物 **81** が、今回試験したケイ素化合物の中で最も高い細胞増殖抑制活性を示した一方、水酸基を除去した化合物 **80** は活性を示さなかったことから、化合物 **80** と **81** のモデル化合物の静電ポテンシャルを計算した。結果を **Figure 3-13** に示す。化合物 **81** の水酸基部分の電荷分布および静電ポテンシャルが水素体 **80** と明らかに異なることから、水酸基が活性へ影響を及ぼしている可能性が示唆される。

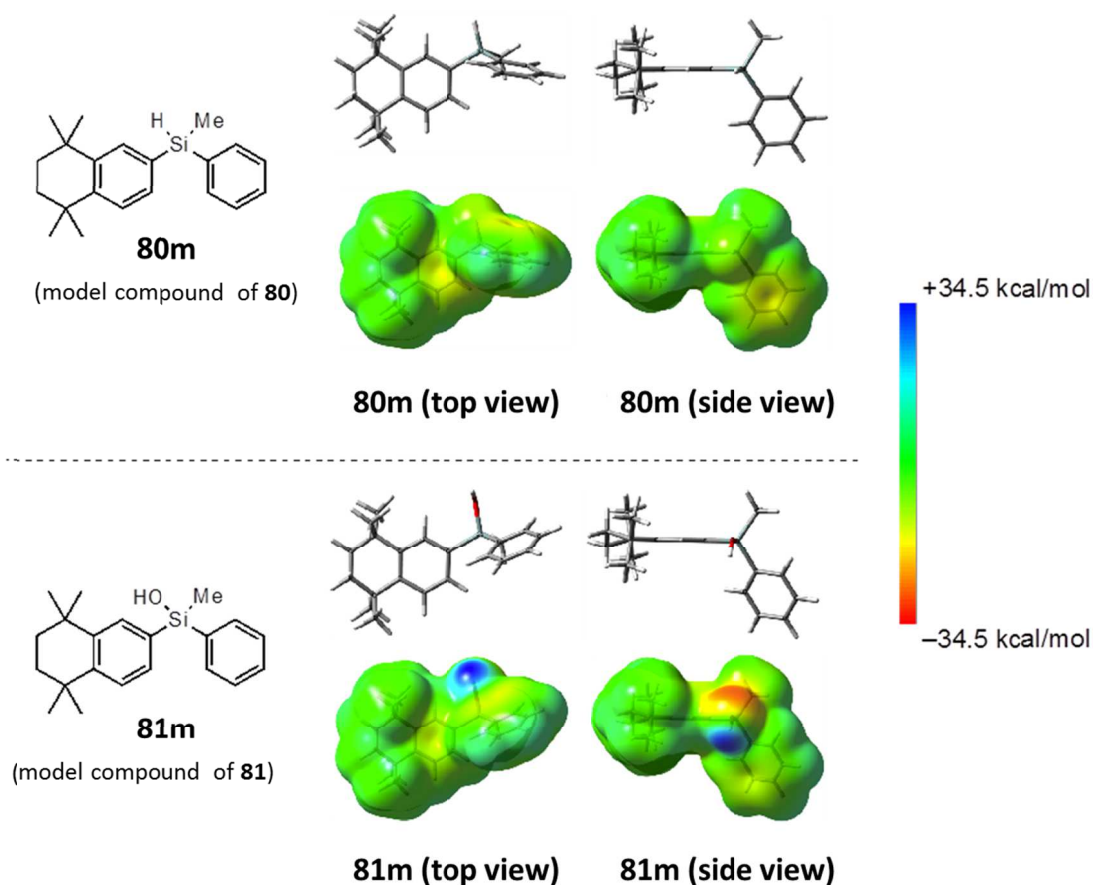


Figure 3-13. Electrostatic potential field maps of the compounds **80** and **81**

3.6 第3節まとめ

私は、橋本研究室で見出した TMN 骨格を有する ATL 細胞選択的増殖阻害剤の構造活性相関の結果を基に、シランジオール及びシラノール誘導体をデザインした。合成したケイ素化合物のうち、シラノール **81** は、S1T に対する最も高い細胞増殖抑制活性を示し、その活性はリード化合物 **72** と同等であった (S1T $IC_{50} = 6.3 \mu M$)。しかしながら、シラノール **81** の MOLT-4 に対する選択性は、リード化合物 **72** には及ばなかった (SI 値 = 2.0)。本化合物群においては、細胞選択性の向上が次の課題であり、更なる構造最適化が必要である。

以上の結果より、シランジオールおよびシラノール基を有する化合物においても、一定の活性がみられたことから、化合物へのシランジオールおよびシラノール基の導入は、化合物の構造最適化を行う際の一つの選択肢となりうると考えられる。

第4節 小括

本章では、ケイ素の特徴的な構造であるシランジオールとシラノールに着目した生理活性物質の創製について述べた。

第2節では、新規なプロテアソーム阻害剤の創製を目指し、既存のプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブのボロン酸部位を、シランジオールで置き換えを行うことを計画した。合成したシランジオール体のプロテアソーム酵素阻害評価を行ったところ、シランジオール体の活性は、ボルテゾミブと比較して1000倍以上低下していることが明らかとなった。これまで、いくつかのシランジオール構造を有するプロテアーゼ阻害剤が報告されてきているが、本結果より、既存のプロテアソーム阻害剤のボロン酸構造をシランジオールで置換したのみでは、高活性な化合物を得ることは困難であることが分かった。しかしながら、合成した化合物は、弱いながら酵素阻害活性を有していたことから、シランジオールの周囲の構造を変換することにより、活性向上が行えると考えられる。

第3節では、シランジオールおよびシラノール構造を有する成人T細胞白血病(ATL)細胞増殖阻害剤の創製を試みた。検討の結果、リード化合物と同等の活性を有するシラノール誘導体を得ることに成功した。しかしながら、他のリンパ腫細胞に対する選択性は、リード化合物に劣っていた。本化合物群においては、細胞選択性の向上が次の課題であり、更なる構造最適化が必要である。本結果より、シランジオールおよびシラノール基を有する化合物も一定の活性を示したことから、化合物へのシランジオールおよびシラノール基の導入は、化合物の構造最適化を行う際の一つの選択肢となりうると考えられる。

第4章 トリメチルシリル基および環状アルキルシリル基を有する生理活性物質の創製

第1節 研究背景

ケイ素含有医薬品候補化合物として第1章で挙げた BNP1350 および TAC101 は共に、トリメチルシリル基を有している。また、基礎研究の段階ではあるが、神経障害性疼痛治療薬であるプレガバリン¹²⁰のケイ素誘導体である Silagaba121 が報告されており、本化合物もトリメチルシリル基を有している (Figure 4-1.)¹²¹。この様にトリメチルシリル基を有する化合物がいくつか知られているが、創薬化学における化合物の構造展開、官能基変換において、トリメチルシリル基をはじめとしたアルキルシリル型置換基の導入を行うことは一般的ではなく、実際に導入した際の置換基効果も明確にはなっていない。

そこで、本章では、トリメチルシリル基および環状アルキルシリル基を有する化合物の創製を試み、生物活性に及ぼす影響について考察することとした。はじめに、アルキルシリル型置換基として最も良く利用されているトリメチルシリル基導入した化合物について述べ (第2節)、次に、環状構造のアルキルシリル基を有する核内受容体 ROR リガンドの創製とその活性について考察する (第3節)。



Figure 4-1. プレガバリン (左) および Silagaba121 (右) の構造

¹²⁰ リリカ®カプセル 25 mg, 75 mg, 150 mg 医薬品インタビューフォーム (ファイザー株式会社) 2013 年 4 月改訂 (第 7 版)

¹²¹ Muratake, H.; Ito, A.; Toda, T.; Suzuki, H.; Fukasawa, H.; Tsuda, M.; Inoue, K.; Sugiyama, K.; Shudo, K. (R)- and (S)-4-Amino-3-(trimethylsilyl)methylbutanoic acids ameliorate neuropathic pain without central nervous system-related side effects. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7602-7604.

第2節 トリメチルシリル基の利用

2.1 PSA 阻害剤

2.1.1 背景

ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (puromycin-sensitive aminopeptidase : 以下 PSA) は, 分子量約 100 kDa のメタロプロテアーゼであり¹²², アミノペプチダーゼ N (APN) と類似の基質特異性を持つ. PSA は, 細胞分裂, アポトーシス¹²³, 生殖機能¹²⁴等に関与していると言われている. しかしながら, PSA の生理的な機能は, 未だ解明されない部分も多い. そこで, 橋本研究室の加来田らは, 選択的な PSA 阻害剤の創製を試み, PAQ-22 (**95**) などの PSA 特異的な阻害剤の取得に成功している (Figure 4-2.)¹²⁵. これらの PSA 阻害剤は, マウスメラノーマ B16F10/L5 細胞を用いたマトリゲルアッセイにより, 濃度依存的な細胞浸潤阻害活性も示すことが明らかとされている¹²⁵.

本節 2.1 では, より高活性な PSA 阻害活性を有する PAQ-22 誘導体の取得, 更なる構造活性相関情報を得ることを目的に, ケイ素およびハロゲンを導入した化合物のデザインおよび評価の結果について述べる.

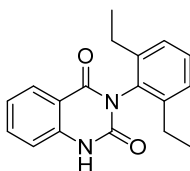


Figure 4-2. PAQ-22 (**95**)の構造

¹²² Menzies, F.M.; Hourez, R.; Imarisio, S.; Raspe, M.; Sadiq, O.; Chandraratna, D.; O'Kane, C.; Rock, K.L.; Reits, E.; Goldberg, A.L.; Rubinsztein, D.C. Puromycin-sensitive aminopeptidase protects against aggregation-prone proteins via autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, 19, 4573-4586.

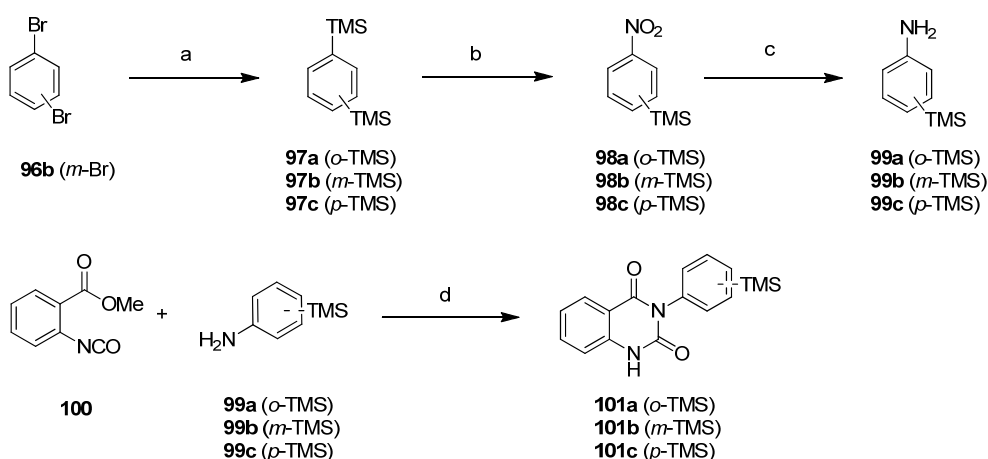
¹²³ Constam, D.B.; Tobler, A.R.; Rensing-Ehl, A.; Kemler, I.; Hersh, L.B.; Fontana, A. Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26931-26939.

¹²⁴ Osada, T.; Watanabe, G.; Sakaki, Y.; Takeuchi, T.; Puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for the maternal recognition of pregnancy in mice. *Mol. Endocrinol.* **2001**, 15, 882-893.

¹²⁵ Kakuta, H.; Tanatani, A.; Nagasawa, K.; Hashimoto, Y. Specific nonpeptide inhibitors of puromycin-sensitive aminopeptidase with a 2,4(1H,3H)-quinazolinone skeleton. *Chem. Pharm. Bull.* 2003, 51, 1273-1282.

2.1.2 化合物の合成

トリメチルシリル基を導入した化合物 **101a-c** は以下の方法で合成した (Scheme 4-1). *m*-ジトリメチルシリルベンゼン **97b** は, *m*-ジブロモベンゼン **96b** より合成した. *o*-および *p*-ジトリメチルシリルベンゼン **97a, c** は, 市販品を用いた. *o*-, *m*-および *p*-ジトリメチルシリルベンゼン **97a-c** をそれぞれ, 発煙硝酸/無水酢酸で処理し, *o*-, *m*-および *p*-トリメチルシリルニトロベンゼン **98a-c** を得た¹²⁶. 得られたニトロベンゼン **98a-c** を, 還元することにより, それぞれ *o*-, *m*-および *p*-トリメチルシリルアニリンを得た **99a-c**. その後, イソシアネート **100** との反応, 分子内環化反応により, 目的のトリメチルシリル基導入体 **101a-b** を合成した. その他, ハロゲン導入体 **102a-104c** についても類似の方法で合成した¹²⁷.



Scheme 4-1. トリメチルシリル基導入体 **101a-c** の合成^a

^a Reagents and conditions: (a) *n*-butyl lithium, TMSCl, THF, -78 °C then r.t., 14 h, 67%; (b) fuming HNO₃, Ac₂O, 130 °C, 1 h, 25-73%; (c) 5% Pd/C, H₂, EtOH, r.t., 53-65%; (d) TEA, MeCN, 80 °C, 4 h, 54.8 -91.2%.

¹²⁶ 橋本忠, 有機ケイ素化合物の合成 (第 12 報), 薬学雑誌, **1967**, 87, 524-527.

¹²⁷ Matsumoto, Y.; Noguchi-Yachide, T.; Nakamura, M.; Mita, Y.; Numadate, A.; Hashimoto, Y. Specific Inhibitors of Puromycin-Sensitive Aminopeptidase with a 3-(Halogenated Phenyl)-2,4(1H,3H)-quinazolinedione Skeleton. *Heterocycles* **2012**, 86, 1449-1463.

2.1.3 生物活性と考察

PSA の阻害活性は、ヒト T 細胞性白血病細胞 MOLT-4 を用い、L-alanine 4-methyl-coumaryl-7-amide (Ala-MCA) の PSA による分解によって生じる 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の蛍光を測定することにより計測した (Figure 4-3)。APN の阻害活性評価では、骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いた。

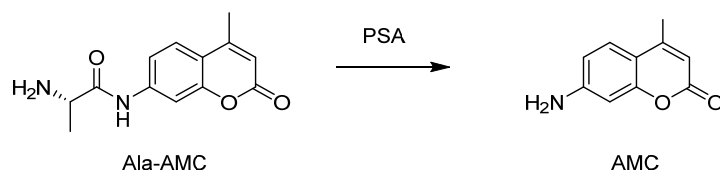
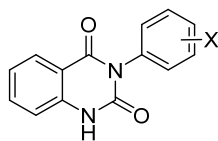


Figure 4-3. PSA 活性評価の原理

PSA および APN に対する阻害活性評価の結果を Table 4-1. に示す。PAQ-22 (95) は、APN に対する阻害活性を示さず、PSA 選択的な阻害剤である。同様に、今回、合成したケイ素導入体 101a-c 及びハロゲン導入体 102a-104c も APN に対する阻害を示さなかった。PSA に対する阻害活性については、トリメチル基導入体では、ベンゼン環のオルト位に置換基を導入した化合物 101a のみで活性がみられ、その活性は 2 および 6 位にエチル基を有する PAQ-22 (95) と同程度の活性であった。ハロゲン化合物に関しては、フッ素導入体 102a-c は、オルト、メタ、パラ置換体いずれの場合も活性を示さなかった。一方、塩素導入体 103a-c、および臭素導入体 104a-c の活性は、メタ体、オルト体の順に活性が低下し、パラ体では活性が消失した。

置換基の電子的な効果として、芳香環に結合したトリメチルシリル基は、電子吸引的に働くとされるが、今回、同時に試験した強い電子吸引基であるフッ素の導入体では、PSA 阻害活性がみられなかった。このことから、本化合物群の PSA 阻害活性に対する置換基の電子的効果の影響は小さいことが示唆された。一方、PAQ-22 関連化合物のこれまでの構造活性相関研究より、ベンゼン環のオルト位に適切な大きさの置換基を有する化合物が PSA 阻害活性を示すことが分かっている。これは、ベンゼン環のオルト位に置換基が導入されることにより、キナゾリンジオン環とベンゼン環に適切なねじれが生じる結果であると予想される。今回試験したオルト位に置換基を有する化合物の活性の強さ (TMS>Br>Cl>F) は、置換基の大きさの順列と一致する。本結果より、本化合物群においては、置換基の大きさが、PSA 阻害活性に大きな影響を及ぼしていると考えられる。

Table 4-1. PAC-Q22 (**95**)および合成化合物 **101a-104c** の PSA および APN 活性



compound	X	PSA IC ₅₀ (μM)	APN IC ₅₀ (μM)
PAQ-22 (95)	2,6-diethyl	3.8	>100
101a	<i>o</i> -TMS	5.9	>100
101b	<i>m</i> -TMS	>100	>100
101c	<i>p</i> -TMS	>100	>100
102a	<i>o</i> -F	>100	>100
102b	<i>m</i> -F	>100	>100
102c	<i>p</i> -F	>100	>100
103a	<i>o</i> -Cl	67.1	>100
103b	<i>m</i> -Cl	46.6	>100
103c	<i>p</i> -Cl	>100	>100
104a	<i>o</i> -Br	46.9	>100
104b	<i>m</i> -Br	28.9	>100
104c	<i>p</i> -Br	>100	>100

2.2 フタルイミド型チューブリン重合阻害剤

2.2.1 背景

微小管は、細胞骨格成分であり、有糸分裂、細胞運動性、細胞形状の維持など多くの細胞機能に関与している^{128, 129}。微小管は、 α および β チューブリンのヘテロダイマーの自己集積（重合）により形成される円筒状の構造体である（**Figure 4-4.**）。このことから、チューブリンは、微小管動態の阻害作用による抗有糸分裂薬の分子ターゲットとされている¹³⁰。

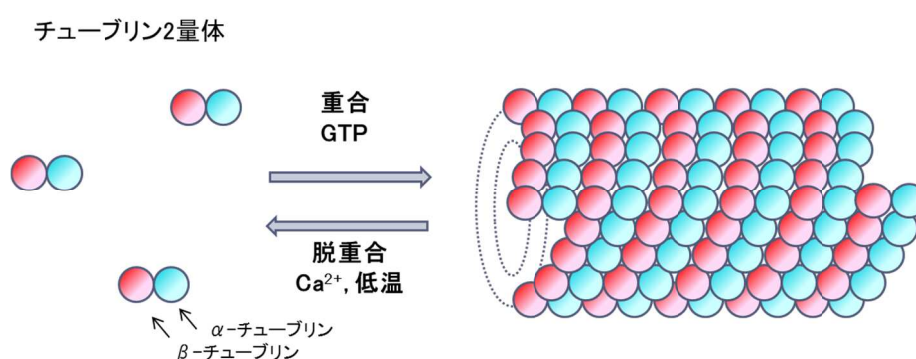


Figure 4-4. チューブリンの構造

微小管を標的とする薬剤は大きく 2 つに分類できる。1つはチューブリンの重合を阻害する薬剤（チューブリン重合阻害剤）であり、もう1つは、チューブリンの重合を促進し、安定化する薬剤（チューブリン安定化剤、脱重合阻害剤）である。また、チューブリンには、3つの薬剤結合部位が知られており、それぞれ、タキサン結合サイト、ビンカアルカロイド結合サイト、コルヒチン結合サイトと呼ばれている。現在、多くのチューブリンに作用する化合物が知られており、paclitaxel, vinblastine や eribulin などが、抗がん剤として利用されている（**Figure 4-5.**）^{131, 132}。

¹²⁸ De Martino, G.; La Regina, G.; Coluccia, A.; Edler, M.C.; Barbera, M.C.; Brancale, A.; Wilcox, E.; Hamel, E.; Artico, M.; Silvestri, R. Arylthioindoles, potent inhibitors of tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 6120-6123.

¹²⁹ Plattner, J.; Desai, M.C. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, **2006**, 7, 81.

¹³⁰ Mikstacka, R.; Stefański, T.; Rózański. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. *J. Cell Mol. Biol. Lett.* **2013**, 18, 368-397.

¹³¹ Yue, Q.X.; Liu, X.; Guo, D.A. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med.* **2010**, 76, 1037-1043.

¹³² Shablak, A. Eribulin for advanced breast cancer: a drug evaluation. *J. Breast Cancer* **2013**, 16, 12-15.

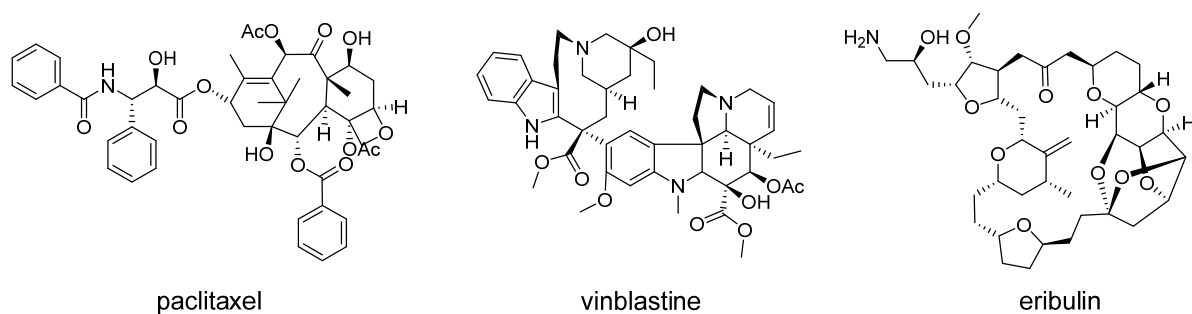


Figure 4-5. チューブリンをターゲットとした抗がん剤

一方、橋本研究室では、他のチューブリン重合阻害剤と比べ低分子ながら高いチューブリン重合阻害活性を示す 5HPP-33 (**105**) の創出に成功している^{133, 134}。本化合物は、本節 2.1 に示した PAQ-22 (**95**) と同様にベンゼン環の 2 および 6 位にアルキル基を有していることから、オルト位にトリメチルシリル基を導入することにより、5HPP-33 (**105**) と同等の活性を示す化合物が得られると考えた。本節 2.2 では、オルト位にトリメチルシリル基を導入した化合物 **106** および比較の為、*t*-ブチル基を導入した 5HPP-33 誘導体 **107** も合成し、チューブリン重合阻害活性評価を行うことを計画した (**Figure 4-6**)。

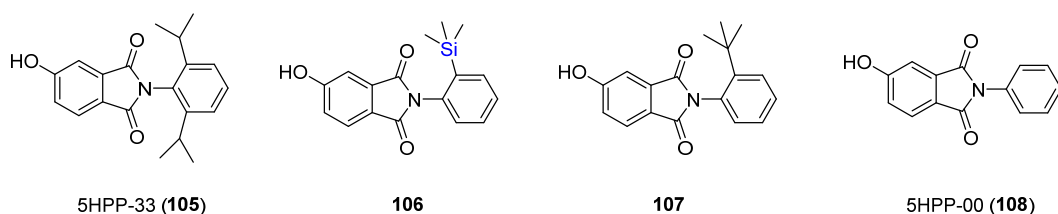


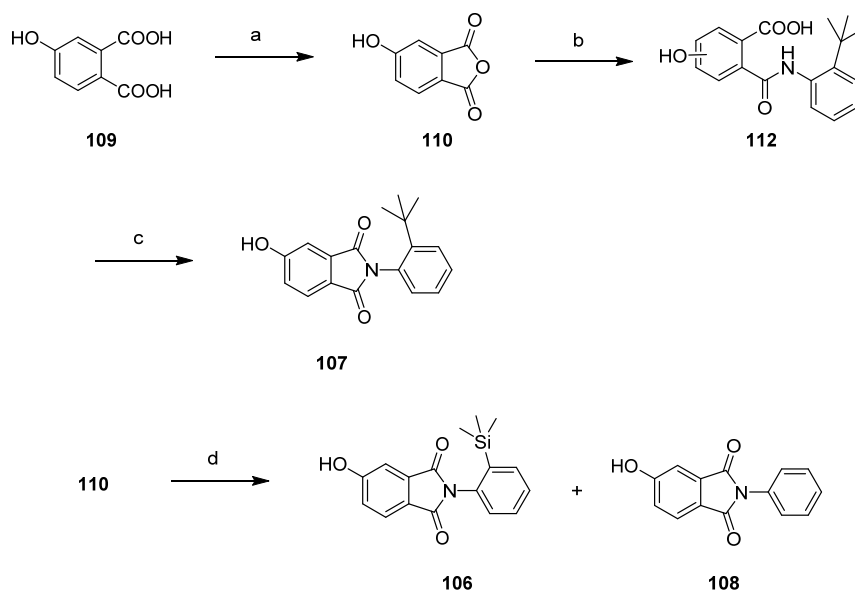
Figure 4-6. 5HPP-33 (**105**) および合成を計画した化合物の構造

¹³³ Inatsuki, S.; Noguchi, T.; Miyachi, H.; Oda, S.; Iguchi, T.; Kizaki, M.; Hashimoto, Y.; Kobayashi, H. Tubulin-polymerization inhibitors derived from thalidomide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, **15**, 321-325.

¹³⁴ Aoyama, H.; Noguchi, T.; Misawa, T.; Nakamura, T.; Miyachi, H.; Hashimoto, Y.; Kobayashi, H. Development of tubulin-polymerization inhibitors based on the thalidomide skeleton. *Chem. Pharm. Bull.* 2007, **55**, 944-949.

2.2.2 化合物の合成

化合物の合成は、以下の方法で実施した (Scheme 4-2.)。4-ヒドロキシフタル酸 **109** を、ジクロロベンゼン中で加熱脱水し、酸無水物 **110** とした。得られたフタル酸無水物 **110** とオルト-*t*-ブチルアニリン **111** をトルエン中で加熱還流を行ったところ、目的のフタルイミドは得られず、アミド **112** の状態で反応が停止した。そこで、より沸点の高いジクロロベンゼンに溶媒を変更し、アミド体 **112** を加熱脱水することで目的の化合物を得ることに成功した。このことから、トリメチルシリル体 **106** の合成では、溶媒としてジクロロベンゼンを用い、フタル酸無水物 **110** とオルトトリメチルシリルアニリン **99a** との反応を試みた。反応の結果、目的のケイ素導入体 **106** を、低収率ながら単離することに成功した。また、本反応では、目的物 **106** のトリメチルシリル基が脱離して生じたと思われる化合物 **108** (5HPP-00) も得られた。



Scheme 4-2. 化合物 **106-108** の合成^a

^a Reagents and conditions: (a) 1,2-dichlorobenzene, reflux, 3 h, 84%; (b) 2-*tert*-butylaniline (**111**), toluene, reflux, 2 h, 90%; (c) 1,2-dichlorobenzene, reflux, 6 h, 32%; (d) 2-(trimethylsilyl)aniline (**99a**), 1,2-dichlorobenzene, reflux, 5 h, (**106** : 4%, **108** : 44%).

2.2.3 チューブリン重合阻害活性評価と考察

チューブリン重合阻害活性評価には、ブタ脳由来のチューブリンを用い、チューブリンの重合に伴い変化する 400 nm における濁度を測定する方法を用いた¹³⁴。なお、薬剤を添加せず、重合が十分進行した際の濁度の値を 100%とした。

チューブリン重合阻害活性評価の結果、5HPP-33 (**105**)は、20 μ M で 81.7%の重合阻害率であり、無置換ベンゼン体である 5HPP-00 (**108**)は、同濃度で、ほとんど重合阻害活性を示さなかった (Figure 4-7, Table 4-2.)。これらの結果は、文献で報告されている結果とよく一致していた¹³³。新たに合成したトリメチルシリル基を有する化合物 **106** の阻害活性は、20 μ M で 22.9%であり、5HPP-33 (**105**)と比較し、阻害活性は大きく低下した。2 および 6 位に置換基を有する 5HPP-33 (**105**)と無置換ベンゼン体である 5HPP-00 (**108**)との比較より、本化合物群についてもフタルイミドとベンゼン環のねじれが活性に寄与していることが予想される。よって、トリメチルシリル基を有する化合物 **106** の活性の低下は、そのねじれ角が、5HPP-33 (**105**)のねじれ角と異なっていることに起因する可能性が示唆された。また、*t*-ブチル基を有する化合物 **107** の 20 μ M での阻害活性は、トリメチルシリル体 **106** とほぼ同じの 21.7%であった。このことから、本化合物群では、トリメチルシリル基は、*t*-ブチル基のバイオアイソスターとして働いていることが、示唆された。

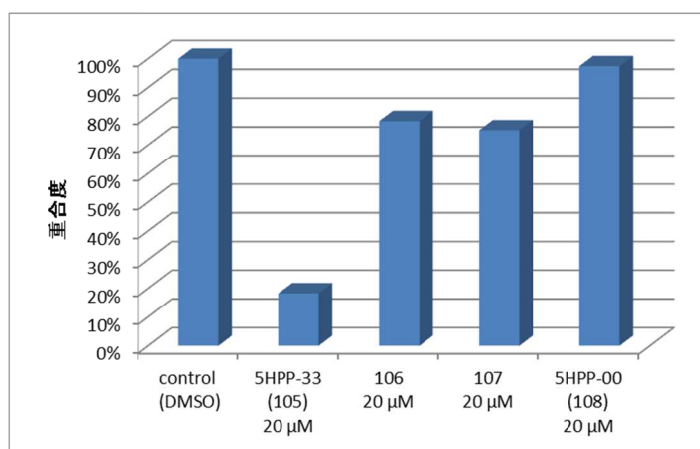


Figure 4-7. 5HPP-33 (**105**)および合成化合物 **106-108** のチューブリン重合阻害活性

Table 4-2. 5HPP-33 (**105**)および合成化合物 **106-108** のチューブリン重合阻害活性

compound	阻害率% (20 μ M)
5HPP-33 (105)	81.7
106	22.9
107	21.7
5HPP-00 (108)	2.6

第3節 環状アルキルシリル基を有する核内受容体 ROR リガンドの創製

3.1 研究背景

3.1.1 テトラメチルテトラヒドロナフタレン(TMN)骨格とケイ素置換体

テトラメチルテトラヒドロナフタレン (TMN) 骨格は、合成レチノイドであるタミバロテン(Am80)が有する骨格であり、*all-trans* retinoic acid (ATRA) が有する骨格を模倣してデザインされた構造である (Figure 4-8.)¹³⁵. Am80 は、核内受容体 RAR (retinoic acid receptor) アゴニスト活性を有し、*all-trans* retinoic acid (ATRA) より高い活性を示すことから、現在、骨髄球性白血病治療薬として用いられている¹³⁶.

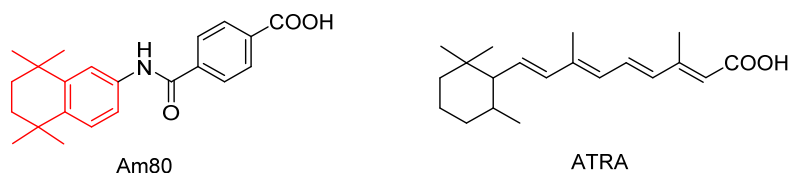


Figure 4-8. TMN 骨格を有する AM80 と ATRA の構造：赤線が TMN 骨格

近年、Am80 の TMN 骨格にケイ素を導入した Sila-Am80 が報告され、Sila-Am80 の RAR α に対する転写活性は Am80 と同等であったが、RAR β および γ に対する活性は Sila-Am80 の方が高いことが示された (Figure 4-9.)¹³⁷. また、Am80 の逆アミド構造を有する Am580 (113) のケイ素体 Sila-Am580 についても同様の傾向がみられた.

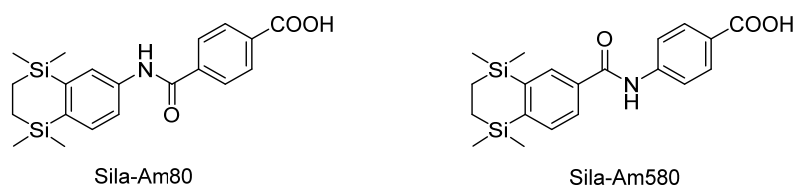


Figure 4-9. Sila-Am80 および Sila-Am580 の構造

¹³⁵ Kagechika, H.; Shudo, K. Synthetic retinoids: recent developments concerning structure and clinical utility. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5875-5883.

¹³⁶ アムノレイク インタビューフォーム (日本新薬) 2013 年 10 月 (改訂第 3 版)

¹³⁷ Tacke, R.; Müller, V.; Büttner, M.W.; Lippert, W.P.; Bertermann, R.; Daiss, J.O.; Khanwalkar, H.; Furst, A.; Gaudon, C.; Gronemeyer, H. Synthesis and pharmacological characterization of Disila-AM80 (Disila-tamibarotene) and Disila-AM580, silicon analogues of the RAR α -selective retinoid agonists AM80 (Tamibarotene) and AM580. *ChemMedChem.* **2009**, 4, 1797-802.

また、**Figure 4-10.**に示すようなケイ素または炭素の 5 員環を有する核内受容体 RXR (retinoid X receptor)リガンドが報告され、ケイ素体 **114** の活性は、対応する炭素体 **115** に比べ、10 倍程度高いことが報告されている。著者らは、活性の上昇の要因として、ケイ素置換による分子サイズおよび電子的作用の変化を挙げている¹³⁸。

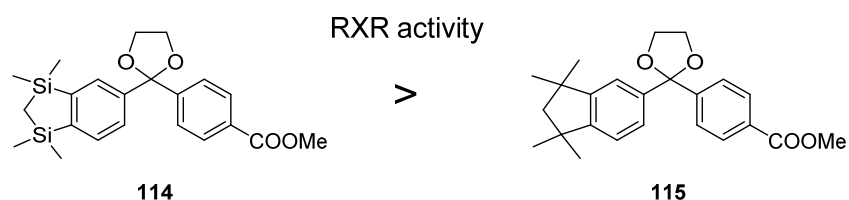


Figure 4-10. ケイ素含有 RXR リガンド

この様に、TMN 骨格およびその類似骨格にケイ素を導入した環状のアルキルシリル化合物は、対応する炭素体より高い核内受容体への活性を示す可能性があることが示唆される。

¹³⁸ Lippert, W.P.; Burschka, C.; Götz, K.; Kaupp, M.; Ivanova, D.; Gaudon, C.; Sato, Y.; Antony, P.; Rochel, N.; Moras, D.; Gronemeyer, H.; Tacke, R. Silicon analogues of the RXR-selective retinoid agonist SR11237 (BMS649): chemistry and biology. *ChemMedChem.* **2009**, *4*, 1143-1152.

3.1.2 核内受容体 ROR

核内受容体 ROR (Retinoid related Orphan Receptor)は、核内受容体ファミリーに属する受容体群であり、 α 、 β 、 γ の3種類のサブタイプが存在する。ヒトにおいて、ROR α 、 β 、 γ はそれぞれ 1-4、1、1-2 個のアイソフォームを持つことが知られている¹³⁹。ROR α は、特に脳に多く発現しており、腎臓、肝臓、睾丸、卵巣、心臓、筋肉などにも発現している¹⁴⁰。ROR β は、目、視床下部、下垂体などにみられ¹⁴¹、ROR γ は、骨格筋、胸腺、睾丸、膵臓、前立腺、心臓、肝臓などに発現していると言われている¹⁴²。

ROR の生物機能については、まだ明らかとなっていない部分が多いが、近年の研究により、ROR は、がん、自己免疫疾患、炎症疾患などのヒトの病気への関与も示唆されている (Figure 4-11.)¹⁴²。

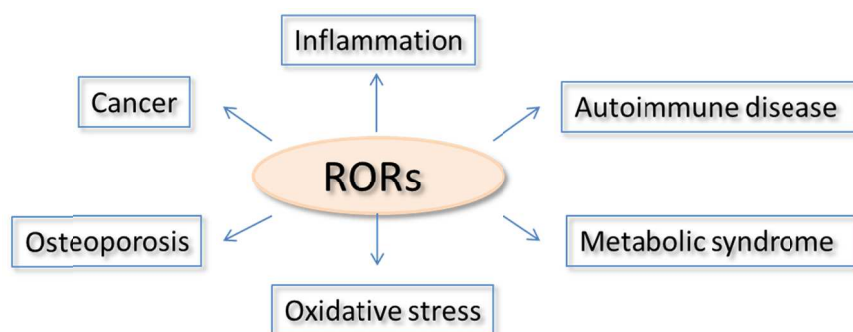


Figure 4-11. RORs と関連が予想される疾患¹⁴³

¹³⁹ Jetten, A.M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* **2009**, 7, e003

¹⁴⁰ Meyer, T.; Kneissel, M.; Mariani, J.; Fournier, B. *In vitro* and *in vivo* evidence for orphan nuclear receptor ROR α function in bone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9197-9202.

¹⁴¹ Srinivas, M.; Ng, L.; Liu, H.; Jia, L.; Forrest, D. Activation of the blue opsin gene in cone photoreceptor development by retinoid-related orphan receptor β . *Mol. Endocrinol* **2006**, 20, 1728-1741.

¹⁴² Ranhotra, H.S. The interplay between retinoic acid receptor-related orphan receptors and human diseases. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2012**, 32, 181-189.

¹⁴³ Ref. 23 記載の図を一部改編

ROR とがんとの関連は、これまでいくつかの研究で指摘されてきた。ROR α は、がんの発生と増殖に関与していると言われているが、詳細はまだ明らかとされていない¹⁴²。一方で、乳がんや肺がんの腫瘍組織で ROR α の転写の活性化が抑制されていることも明らかになっており、ROR α の関与についての研究が進められている¹⁴⁴。ROR γ とがんとの関連は、より直接的な関与が報告されている。ROR γ ノックアウトマウスの胸腺リンパ腫モデルにおいて、生存期間が短縮することが分かっており、肝臓や脾臓への転移がみられる傾向が強いことも分かっている¹⁴⁵。また、胃がん細胞において、ROR γ を含む Th-17 関連遺伝子の発現の増加がみられたことや¹⁴⁶、卵巣がん患者において、Th-17 細胞の増加している例の報告がある¹⁴⁷。Th-17 細胞は、炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン-17 (IL-17) の産生に関与していることから¹⁴⁸、がんの発生や増悪にもつながる可能性が示唆されている。近年、ROR α/γ inverse agonist である SR1001 が Th17 細胞の IL-17 を始めとするサイトカイン類の産生を抑制することが報告されている (Figure 4-12.)¹⁴⁹。よって、ROR γ (t) の転写の調節は、Th-17 細胞およびそれが産生する炎症性サイトカインの増減に関与し、結果として、がんの発生、増殖に関与する可能性があると言える。

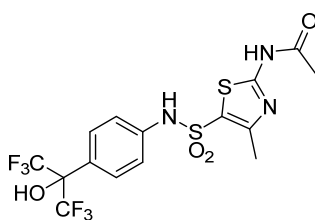


Figure 4-12. ROR α/γ inverse agonist SR1001 の構造

¹⁴⁴ Lu, Y.; Yi, Y.; Liu, P.; Wen, W.; James, M.; Wang, D.; You, M. Common human cancer genes discovered by integrated gene-expression analysis. *PLoS ONE* **2007**, 2, e1149.

¹⁴⁵ Jetten, A.M.; Ueda, E.; Retinoid-related orphan receptors (RORs): roles in cell survival, differentiation and disease. *Cell Death Differ.* **2002**, 9, 1167-1171.

¹⁴⁶ Zhang, F.; Meng, G.; Strober, W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* **2008**, 9, 1297-1306.

¹⁴⁷ Miyahara, Y.; Odunsi, K.; Chen, W.; Peng, G.; Matsuzaki, J.; Wang, R.F. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 15505-15510.

¹⁴⁸ Littman, D.R.; Rudensky, A.Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* **2010**, 140, 845-858.

¹⁴⁹ Solt, L.A.; Kumar, N.; Nuhant, P.; Wang, Y.; Lauer, J.L.; Liu, J. Istrate, M.A.; Kamenecka, T.M.; Roush, W.R.; Vidović, D.; Schürer, S.C.; Xu, J.; Wagoner, G.; Drew, P.D.; Griffin, P.R.; Burris, T.P. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* **2011**, 472, 491-494.

3.2 計画

RAR アゴニスト活性を有するレチノイドである *all-trans* retinoic acid (ATRA) は、ROR β リガンドとしても作用することが報告されている¹⁵⁰。しかしながら、その合成アナログである Am80 および Am580 (113) の ROR へ対する活性についての報告は現在までにされていない。

一方、橋本研究室の中村らは、TMN 骨格およびケイ素導入骨格有する化合物群に ROR に対するインバースアゴニスト活性があることを見出している¹⁵¹。

そこで、私は、TMN 誘導体およびそのケイ素導入体などの類縁化合物を合成し、化合物の構造と ROR 活性との関連について精査することを計画した。また、得られた情報を基に、より高活性な ROR リガンドの創製を試みることにした (Figure 4-13.)。

なお、本節に記載の内容は、外山大純との共同研究である。

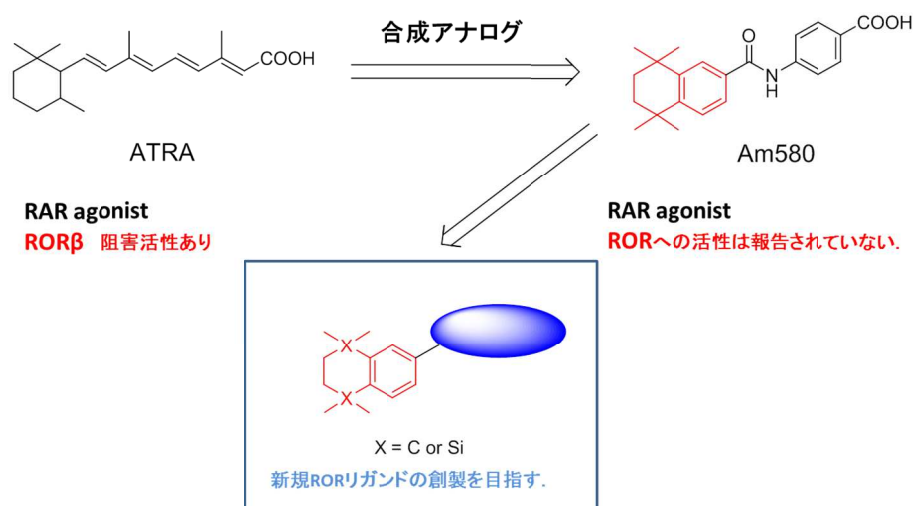


Figure 4-13. 新規 ROR リガンドのデザイン

¹⁵⁰ Stehlin-Gaon, C.; Willmann, D.; Zeyer, D.; Sanglier, S.; Van Dorselaer, A.; Renaud, J.P.; Moras, D.; Schüle, R. All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR beta. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 820-825.

¹⁵¹ 中村政彦 新規創薬テンプレートによる生理活性物質の創製研究 ~抗 HCV 薬および核内受容体 ROR リガンドの創製~ 東京大学大学院薬学系研究科 平成 25 年度博士論文

3.3 TMN 化合物の ROR 活性スクリーニング

はじめに, Am580 (**113**)と ROR γ (PDB ID : 3B0W)¹⁵²とのドッキングシミュレーションの結果 (data not shown) より, Am580 (**113**)および所有する化合物ライブラリーから TMN 骨格を有する化合物 **72** および **116-117** を選択し, ROR 活性のスクリーニングを実施した. ROR に対する活性は, レポータージーンアッセイを用いて評価し, 化合物を添加しない場合の値 (転写活性) を 100%とした.

Table 4-3. に示す通り, Am580 (**113**)は弱い ROR 転写阻害活性を示した. 興味深いことに, ベンゾイル基を有する化合物 **116** およびアセチル基を有する化合物 **72** は, Am580 (**113**)よりも強い活性を示した. また, 化合物 **116** は, ROR γ への阻害活性が, ROR α および β より弱い傾向があった. 一方, 化合物 **72** は, ROR β への阻害活性が弱い傾向がみられた. 即ち, 化合物 **72** は, 弱いながらも ROR α/γ 選択性を示すことが分かった. 化合物 **117** については, ほとんど活性は見られなかった. 以上の結果より, 弱いながら, ROR α/γ 選択性がみられたアセチル基を有する化合物 **72** をリード化合物として選択し, 以降の構造変換を行うこととした.

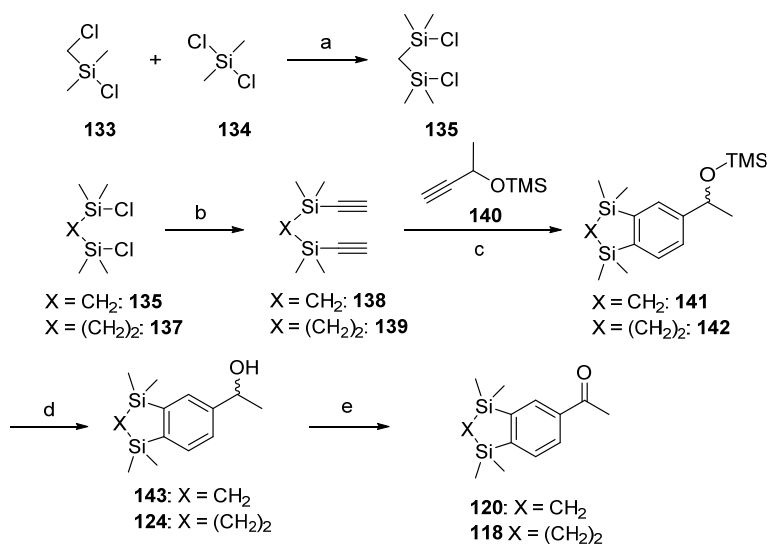
Table 4-3. ライブラリー化合物の ROR 活性スクリーニングの結果

compound	R =	ROR α inhibition		ROR β inhibition		ROR γ inhibition	
		1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M
Am580 (113)		<5.0%	12.2%	<5.0%	11.6%	5.8%	9.1%
116		12.8%	10.8%	6.6%	20.2%	<5.0%	18.4%
72		22.7%	27.6%	<5.0%	17.8%	7.0%	24.4%
117	H	<5.0%	<5.0%	<5.0%	<5.0%	<5.0%	<5.0%

¹⁵² Fujita-Sato, S.; Ito, S.; Isobe, T.; Ohyama, T.; Wakabayashi, K.; Morishita, K.; Ando, O.; Isono, F. Structural basis of digoxin that antagonizes ROR γ receptor activity and suppresses Th17 cell differentiation and interleukin (IL)-17 production. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 31409-31417.

3.4 化合物の合成

化合物 **72** の TMN 構造にケイ素を導入した化合物 **118** およびケイ素 5 員環化合物 **120** については、化合物 **135** および **137** よりそれぞれ 4 工程で合成した (Scheme 4-3). 即ち、化合物 **135** および **137** と ethynylmagnesium chloride (**136**) の反応により、dialkyne **138** および **139** を合成し、コバルト触媒下、3-trimethylsilyloxy-1-butyne (**140**) との環形成反応¹⁵³により、disila compounds **141** および **142** をそれぞれ合成した. 得られた化合物 **141** および **142** を酢酸酸性下で脱保護後、生じたアルコール **143** および **124** を MnO_2 で酸化し、目的のケトン体 **120** および **118** をそれぞれ合成した.

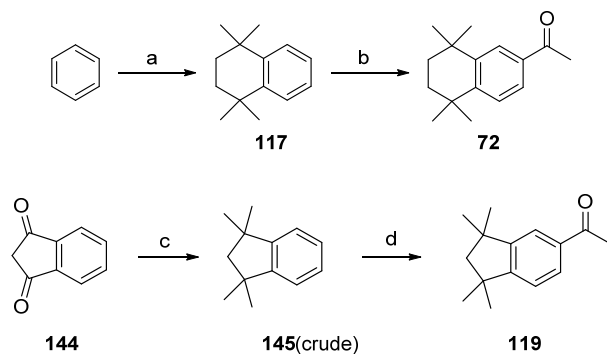


Scheme 4-3. ケイ素体 **118** および **120** の合成^a

^a Reagents and conditions: (a) Mg, THF, reflux, 60 °C, 20 h, 29%; (b) ethynylmagnesium chloride (**136**), THF, r.t. to reflux, 2 h, 21-87%; (c), CpCo(CO)₂, xylene, reflux, 9 h, crude; (d) AcOH, MeOH, reflux, 28 h, 1-14% (2 steps); (e) MnO₂, 0 °C to r.t., CH₂Cl₂, 1 h, 33%.

¹⁵³ Büttner, M.; Penka, M.; Doszczak, L.; Kraft, P.; Tacke, R. Silicon Analogues of the Musk Odorant Versalide *Organometallics*. **2007**, 26, 1295-1298.

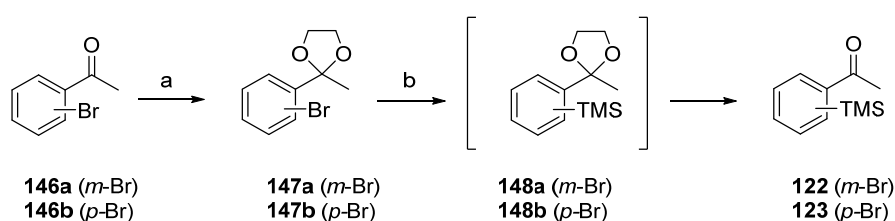
化合物 **72** は文献記載の方法で合成した¹¹⁶. 炭素五員環化合物 **119** は, ジケトン **144** をトリメチルアルミニウムでジメチル化後, フリーデルクラフツ - アシル化反応により合成した(Scheme 4-4).



Scheme 4-4. 炭素体 **72** および **119** の合成^a

^a Reagents and conditions: (a) 2,5-dichloro-2,5-dimethylhexane, AlCl₃, CH₂Cl₂, reflux, 12 h, 67%; (b) acetyl chloride, AlCl₃, CH₂Cl₂, reflux, 2 h, 78%; (c) trimethylaluminium, toluene, reflux, 24 h, crude; (d) acetyl chloride, AlCl₃, CH₂Cl₂, reflux, 2 h, 4% (2 steps).

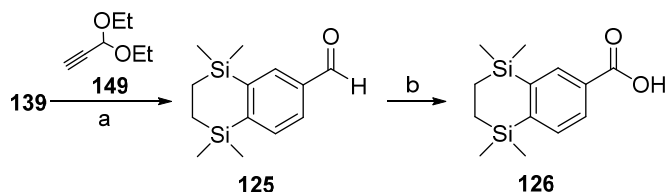
化合物 **122** および **123** は, **Scheme 4-5**. に示した方法で合成した. 初めに 3- または 4-bromoacetophenone (**146a-b**)をケタール **147a-b** とし, マグネシウムを用いてグリニャール試薬とした後, trimethylsilyl chloride と反応させることで, 中間体 **148a-b** とした. 中間体 **148a-b** は反応処理時に脱保護され, 目的の 3-または 4-(trimethylsilyl)acetophenone (**122** および **123**)が得られた.



Scheme 4-5. Synthesis of TMS compounds **122** and **123**.^a

^a Reagents and conditions: (a) trimethylaluminium, toluene, reflux, 24 h, crude; (b) acetyl chloride, AlCl₃, CH₂Cl₂, reflux, 2 h, 4% (2 steps).

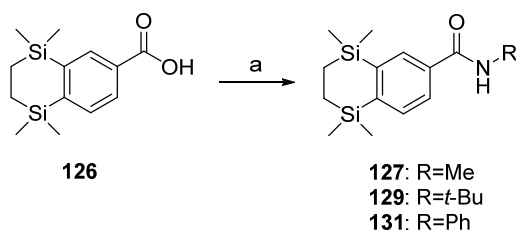
化合物 **125** および **126** は、**Scheme 4-6**. に示した方法で合成した。化合物 **139** とコバルト触媒下、propionaldehyde diethyl acetal (**149**)との環形成反応により、アルデヒド体 **125** を合成した。得られたアルデヒド体 **125** は、*Oxone*[®]を用いて酸化し、目的のカルボン酸 **126** とした。



Scheme 4-6. Synthesis of aldehyde **125** and carboxylic acid **126**.^a

^a Reagents and conditions: (a) 1. Propargylaldehyde diethylacetal (**149**), CoBr₂/Zn, MeCN, r.t., 16 h; 2. HCl/H₂O, r.t., 30 min, 28% (2 steps); (b) *Oxone*[®], DMF, rt, overnight, 32%.

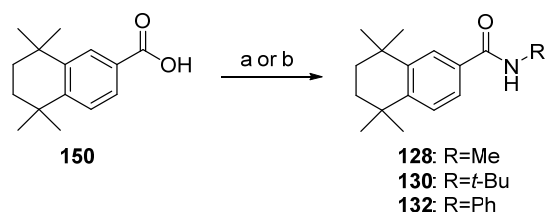
アミド化合物 **127**, **129** および **131** は、前駆体のカルボン酸 **126** と各種アミンを DMAP, または HOBt 存在下, EDC-HCl を用いて縮合する方法により合成した (**Scheme 4-7**).



Scheme 4-7. Synthesis of disila-amide compounds **127**, **129** and **131**.^a

^a Reagents and conditions: (a) amine reagent, EDC hydrochloride, DMAP or HOBt, DMF, r.t., overnight, 11-94%.

アミド化合物 **128**, **130** および **132** は、カルボン酸 **150**¹¹⁶ より、既知の方法で合成した (Scheme 4-8.)¹⁵⁰.



Scheme 4-8. Synthesis of amide compounds **128**, **130** and **132**.^a

^aReagents and conditions: (a) 1. NHS, EDC hydrochloride, CH₂Cl₂, r.t.; 2. amine reagent; 3. Et₃N, CH₂Cl₂, r.t., 55-63% (3 steps); (b) 1. (COCl)₂, DMF (cat.), CH₂Cl₂, 0 °C to r.t.; 2. concentration *in vacuo*; 3. amine reagent, Et₃N, pyridine, CH₂Cl₂, r.t., 59% (3 steps)

シランジオール **73**, **74**, シラノール **76** は、前章に記載の方法で合成した (Figure 4-14.).

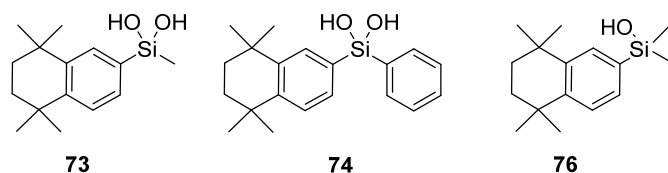


Figure 4-14. Chemical structures of silanediol and silanol derivatives

3.5 結果

3.5.1 化合物 72 誘導体 (TMN の変換化合物) の ROR 活性評価

はじめに, 化合物 72 の TMN 骨格の ROR 活性に及ぼす影響を調べる目的で, 化合物 72 の TMN 部分を変換した化合物 118-120 についての評価を行った. また, ポジティブコントロールとして, 既知の合成 ROR リガンドである T0901317 および SR1001 も同時に評価した. 化合物 72 の誘導体の評価結果を **Figure 4-15**. および **Table 4-4**. に示す.

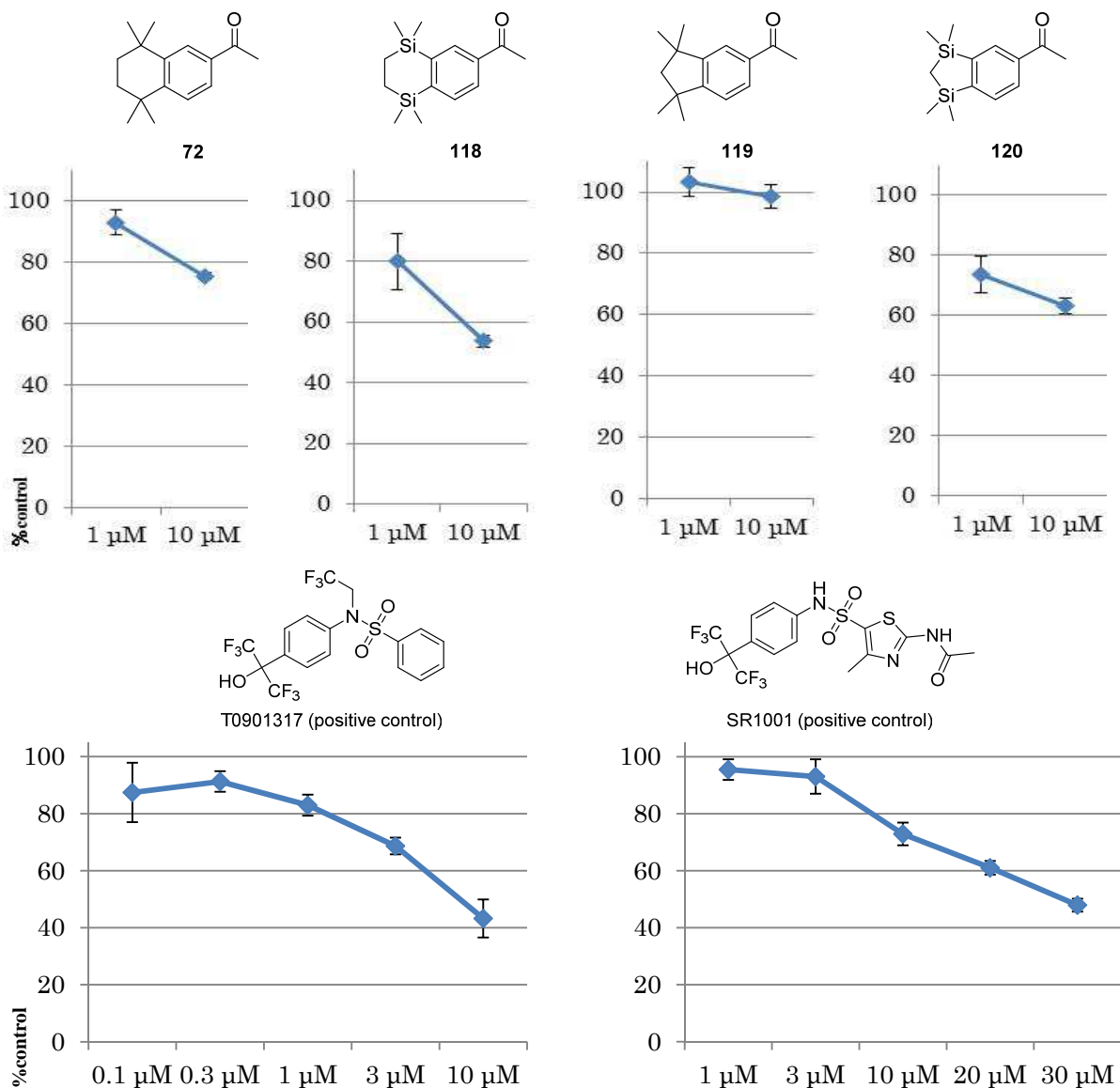


Figure 4-15. 化合物 72 およびその誘導体 (TMN の変換化合物) の ROR 活性

ケイ素 6 員環化合物 **118** の ROR 阻害活性は，対応する炭素体 6 員環化合物 **72** の阻害活性よりも高かった．同様にケイ素 5 員環を有する化合物 **120** の阻害活性は，対応する炭素体 5 員環化合物 **119** よりも高かった．これらの結果より，ベンゼンに結合した 4 級炭素をケイ素に置換することは，ROR 阻害活性の向上に効果的であることが示唆された．また，6 員環化合物 **118** および **72** の ROR α/γ 阻害活性は，5 員環化合物 **119** および **120** の活性より高い傾向にあった．評価した誘導体を ROR 阻害活性の強い順に並べると次の通りとなる．

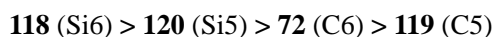
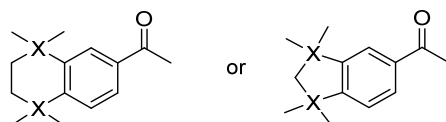


Table 4-4. 化合物 **72** およびそのの誘導体 (TMN の変換化合物) の ROR 活性



compound	X=		ROR α inhibition		ROR β inhibition		ROR γ inhibition	
			1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M
72	C	6 員環	22.7%	27.6%	<5.0%	17.8%	7.0%	24.4%
118	Si	6 員環	28.4%	37.4%	10.4%	22.4%	20.2%	46.2%
119	C	5 員環	11.3%	26.7%	10.4%	14.5%	<5.0%	<5.0%
120	Si	5 員環	24.5%	28.1%	22.7%	23.6%	26.4%	36.8%

3.5.2 分子計算

化合物 **72** および TMN 骨格を変換した化合物の ROR 活性の違いを考察する為、各化合物の分子サイズおよび静電ポテンシャルマップを計算した。モデル化合物の構造は、Gaussian09 program package¹¹⁸ を用い、B3LYP/6-31+G* level による構造最適化により得た。はじめに、モデル化合物の分子サイズに関する計算結果を **Figure 4-16** に示す。

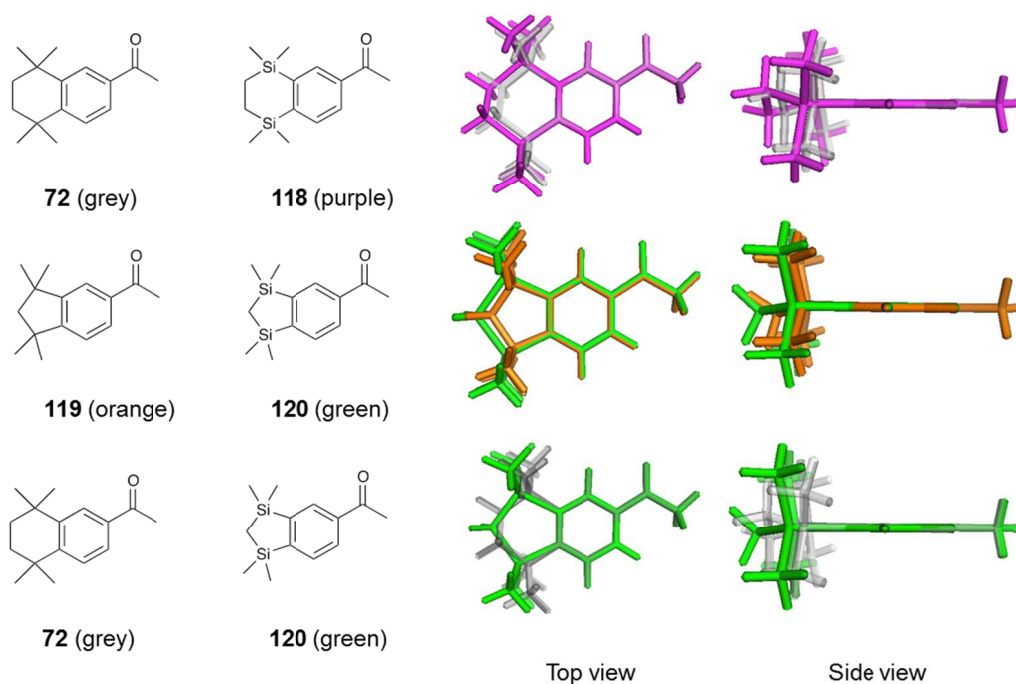
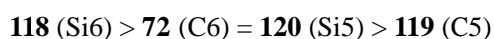


Figure 4-16. Superpositions of calculated structures of the model compounds

計算結果より、以下のことが分かった。

- 1) ケイ素原子は炭素原子より大きいことから、ケイ素 6 員環化合物 **118** の環の大きさは、対応する炭素体 6 員環化合物 **72** の環の大きさよりも大きい。
- 2) 同様の理由で、ケイ素 5 員環化合物 **119** の間の大きさは、対応する炭素 5 員環化合物 **120** の大きさよりも大きい。
- 3) 興味深いことに、炭素 6 員環化合物の **72** とケイ素 5 員環化合物 **120** の環の大きさは、類似していた。

これらのことから、それぞれの化合物の環の大きさは、以下の順であった。



この結果は、ROR 阻害活性の順列 (**118** (Si6) > **120** (Si5) > **72** (C6) > **119** (C5)) と類似の傾向はあるものの、ケイ素 5 員環化合物 **120** の活性は明らかに炭素 6 員環化合物 **72** より高いことから、環の大きさ以外に ROR 活性に影響を及ぼしている要素があると考えられた。

そこで次に、化合物 **72** および **118-120** の静電ポテンシャルマップを算出し、その結果を **Figure 4-17** に示した。ケイ素は炭素より電気陰性度が低いことから、ベンゼン環に結合したケイ素は正の電荷（青色）を帯びていることが分かる。一方、炭素体では、そのような効果は観察されない。ROR に対する阻害活性は、炭素化合物に比べケイ素化合物が高い活性を示すことから、炭素をケイ素に置換した際に生じるこのような電子的な効果が活性に影響を与えている可能性も示唆される。

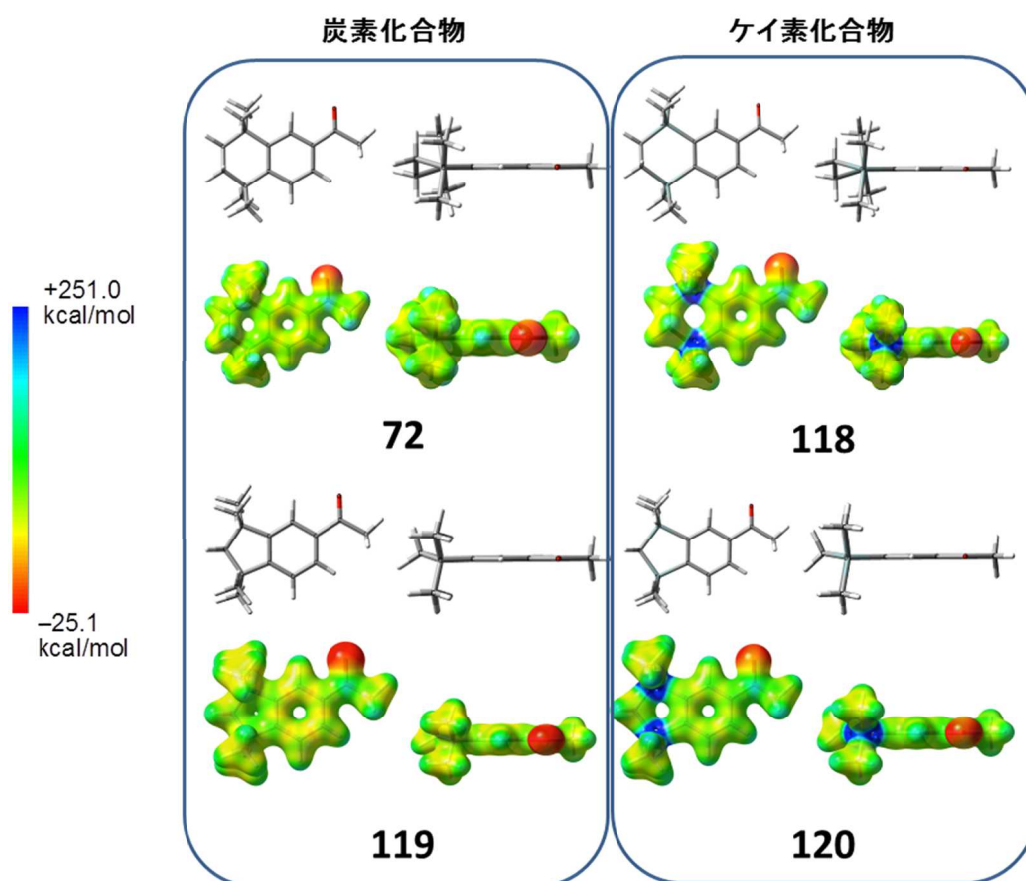


Figure 4-17. Electrostatic potential maps of calculated structures of the model compounds

3.5.3 ROR 活性評価

これまでの検討より、ベンゼン環上へのケイ素の導入が活性向上に寄与していることが示唆された。そこで置換基として、トリメチルシリル基を有する化合物 **122-123** についても、活性評価を行った (**Figure 4-18**)。しかしながら、化合物 **122-123** の ROR 阻害活性は、ケイ素 6 員環化合物 **118** より減弱した。また、同時に評価したアセトフェノン **121** は、ROR 阻害活性をほとんど示さなかった。このことより、ベンゼン環に結合した環構造が、ROR 阻害活性の発現、向上の為に重要であることが示唆された。

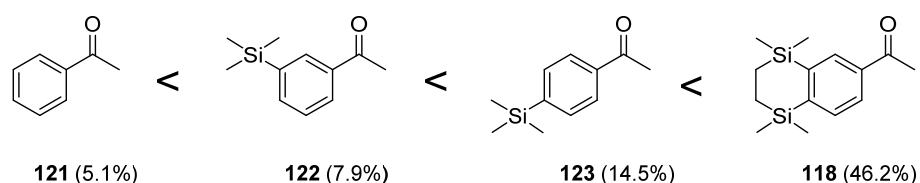


Figure 4-18. 化合物 **121-123** の 10 μ M における ROR γ に対する阻害活性

次に、ケイ素 6 員環構造を固定し、ケトン部位を変換した化合物の ROR 阻害活性を評価した。その結果、アルコール体 **124** で活性がみられたものの、カルボン酸体 **126** では活性が消失し、アルデヒド体 **125** については細胞毒性が観察された (**Figure 4-19**)。本結果より、ケトン構造が、ケイ素 6 員環構造を有する化合物の ROR 阻害活性の向上に、寄与していることが分かった。

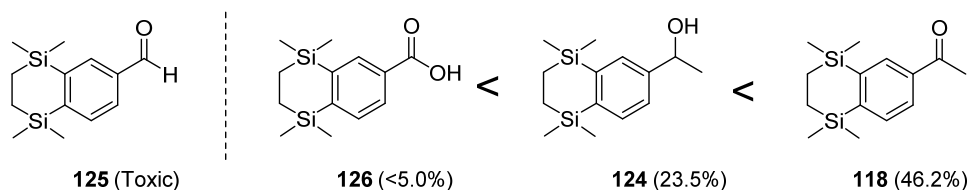
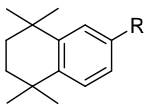

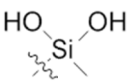
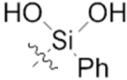



Figure 4-19. 化合物 **124-126** の 10 μ M における ROR γ に対する阻害活性

シランジオールは、炭素におけるケトンに対応する構造である為、シランジオールタイプの化合物 **73-74** の活性評価も実施した。同時にシラノール **76** の評価も行った。結果を **Table 4-5** に示す。化合物 **73** および **76** は、ケトン体化合物 **72** に比べ弱い活性を示した。一方、化合物 **74** の ROR α/γ に対する阻害活性は、化合物 **72** と同等であった。また、ROR β に対する阻害活性は、化合物 **72** よりも高かった。これらの結果から、化合物 **74** は弱いながら ROR β に対する選択性を有していると言える。

Table 4-5. ROR $\alpha/\beta/\gamma$ -inhibitory activity (percentage) of **72** and its silanediol and silanol derivatives at 1 and 10 μ M



Compound	R	ROR α inhibition		ROR β inhibition		ROR γ inhibition	
		1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M
72		22.7%	27.6%	<5.0%	17.8%	7.0%	24.4%
73		<5.0% ^a	<5.0% ^a	<5.0%	14.4%	<5.0%	17.5%
74		13.1%	22.5%	19.8%	40.9%	14.4%	27.9%
76		<5.0%	<5.0%	<5.0%	7.9%	<5.0%	<5.0%
118	-	28.4%	37.4%	10.4%	22.4%	20.2%	46.2%

^a this compound showed weak cytotoxicity

最後に、アミド構造を有する化合物 **127-132** の ROR 阻害活性評価を実施した (Table 4-6). 含ケイ素メチルアミド化合物 **127** は、化合物 **118** と同等の ROR α/γ 阻害活性を示した. 一方、化合物 **127** の ROR β に対する活性は化合物 **118** よりも高かった. 対応する炭素体のメチルアミド **128** は、活性をほとんど示さなかった. 含ケイ素 *t*-butyl アミド化合物 **129** の ROR 阻害活性は、化合物 **118** の活性より弱かった. 対応する炭素体の *t*-butyl アミド化合物 **130** の活性も同様に、化合物 **118** の活性より弱かった. 合成したアミドタイプの化合物の中で、ケイ素 6 員環構造を有しフェニルアミド構造を持つ化合物 **131** が、最も高い ROR 阻害活性を示した. これは、化合物 **118** の活性より高く、化合物 **131** の ROR α , ROR β および ROR γ に対する IC₅₀ 値は、それぞれ 1.3, >10 および 4.5 μ M であった. これに対し、対応する炭素体のフェニルアミド **132** の ROR α , ROR β および ROR γ に対する各 IC₅₀ 値は >10 μ M であった. 評価したアミドアミドタイプの化合物の ROR に対する阻害活性は、いずれの場合もケイ素体が炭素体よりも高い活性であった. これらは、4 級炭素のケイ素への置き換えが ROR 阻害活性の向上に効果的であることを支持する結果である.

Table 4-6. ROR $\alpha/\beta/\gamma$ -inhibitory percentage of **118** and its amide derivatives at 1 μ M and 10 μ M



Compound	X	R	ROR α inhibition		ROR β inhibition		ROR γ inhibition	
			1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M
118	-	-	28.4%	37.4%	10.4%	22.4%	20.2%	46.2%
127	Si	Me	<5.0%	37.6%	<5.0%	41.2%	6.3%	41.0%
128	C	Me	6.6%	<5.0%	<5.0%	<5.0%	<5.0%	6.7%
129	Si	<i>t</i> -Bu	35.2% ^a	38.6% ^a	14.0%	22.0%	15.5%	20.6%
130	C	<i>t</i> -Bu	23.7% ^a	27.9% ^a	<5.0%	11.2%	20.4%	15.5%
131	Si	Ph	49.4%	67.6%	21.2%	26.9%	27.1%	64.1%
132	C	Ph	<5.0%	20.7%	<5.0%	19.1%	<5.0%	34.6%

^a this compound showed weak cytotoxicity

3.6 第3節まとめ

Am580 (**113**)は、天然の ROR β インバーサゴニストである ATRA の合成アナログである。それ故、Am580 (**113**)およびその誘導体が新規な ROR リガンドとなりうると予想し、類縁化合物の活性スクリーニングを行った。その結果、Am580 (**113**)およびその誘導体に弱い、ROR 阻害活性があることを見出した。そこで、過去の事例を参考に、新規な TMN およびそのケイ素導入体をデザイン及び合成を行った。構造展開を行う過程で、私は、ケイ素化合物の ROR 阻害活性が炭素体より高い傾向にあることを発見した。これは、ケイ素の分子サイズおよび電子的な効果が、何らかの影響を及ぼしていると考えられる。また、合成したケイ素体および炭素体の中で、ケイ素 6 員環を有するフェニルアミド **131** が、最も高い ROR 阻害活性を示した (Figure 4-20.)。

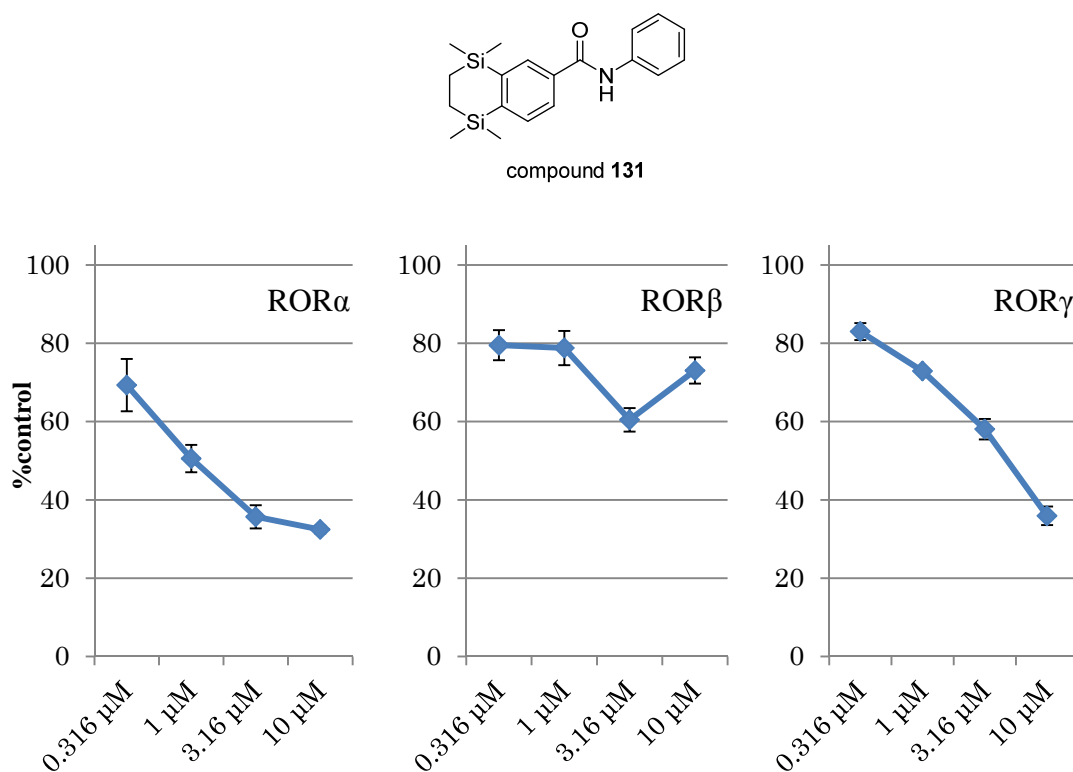


Figure 4-20. フェニルアミド **131** の ROR α , β および γ に対する阻害活性

第4節 小括

これまでに、トリメチルシリル基を有する生理活性物質がいくつか知られているが、創薬化学における化合物の構造展開、官能基変換において、トリメチルシリル基をはじめとしたアルキルシリル型置換基の導入を行うことは一般的ではなく、実際に導入した際の置換基効果も明確にはなっていない。そこで、本章では、トリメチルシリル基および環状アルキルシリル基を有する化合物の創製を試み、生物活性に及ぼす影響について考察した。

本章第2節の前半では、アルキルシリル型置換基として最も良く利用されているトリメチルシリル基導入した化合物として、ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (PSA) 阻害剤の創製を試み、高活性な化合物の取得に成功した。ケイ素導入化合物とハロゲン化合物の活性の比較から、本化合物群では、ケイ素の電子的な効果よりも立体的な効果が、活性に寄与していることが示唆された。第2節の後半では、フタルイミド系のチューブリン重合阻害剤の創製を試みた。結果、合成した TMS 導入化合物は、弱いながらチューブリン阻害活性を示すことが確認でき、その活性は対応する炭素体 (*t*-Bu) と同等であることが分かった。

第3節では、環状構造のアルキルシリル基を有する核内受容体 ROR リガンドの創製を行った。構造展開を行う過程で、私は、ケイ素化合物の ROR 阻害活性が炭素体より高い傾向にあることを見出した。これは、ケイ素の分子サイズおよび電子的な効果が、何らかの影響を及ぼしていると考えられる。また、合成したケイ素体および炭素体の中で、ケイ素6員環を有するフェニルアミド **131** が、最も高い ROR 阻害活性を示した。本章の結果から、化合物へのアルキルシリル基の導入は、立体的な影響だけではなく、電子的な影響を与える可能性があることも示唆された。

第5章 ケイ素リンカーによるオレフィン構造の置き換え

第1節 研究背景

本章では、ケイ素の原子の大きさ、結合距離の長さに着目し、ケイ素の創薬化学における新たな利用法について提案する。ケイ素原子は、炭素原子より大きいことから、炭素 - ケイ素 (C-Si) 結合および炭素 - 炭素 (C-C) 結合の平均距離はそれぞれ 1.87 Å, 1.54 Å となり、前者の方が約 20%長いことが知られている¹⁵⁴。一方、炭素 - 炭素二重結合 (オレフィン構造) を有する化合物は、異性化や生体内での代謝の標的となることから、その安定性が問題となることがある。

そこで、私は、ケイ素原子が炭素原子と比較して大きく、長い結合距離を有することから、炭素 - 炭素二重結合の代替構造としてケイ素リンカー (- Si -) が利用できると考え、検証を行うこととした (Figure 5-1.)。次節では、不安定な炭素 - 炭素二重結合を有するチューブリン重合阻害剤へのケイ素リンカーの導入の試みと、合成した化合物の生物活性および安定性の評価の結果について述べる。

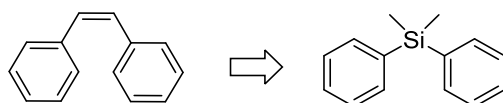


Figure 5-1. オレフィン構造のケイ素リンカーによる置き換え

¹⁵⁴ Franz, A.K.; Wilson, S.O. Organosilicon Molecules with Medicinal Applications. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 388–405.

第2節 ケイ素リンカーによるチューブリン重合阻害剤 combretastatin A-4 のオレフィン構造の置き換え

2.1 背景

コンブレタスタチン (Combretastatin) は、1980 年代に南アフリカの樹木である *Combretum caffrum* から単離された天然物である (Figure 5-2.)。コンブレタスタチンは、チューブリンのコルヒチンサイトに結合し、チューブリンの重合を阻害する活性を有することが明らかとなったことから¹⁵⁵、その後、多くの誘導体の単離・合成が試みられた。それらのうち、Combretastatin A-4 (CA-4 (**151**))が最も高いがん細胞増殖抑制活性を示すことが明らかとなった¹⁵⁶。また、CA-4 (**151**)は、血管内皮細胞に形態学的な変化を引き起こして血流抑制活性を有することも知られており¹⁵⁷、現在、CA-4 のリン酸プロドラッグである CA-4P (**152**)の臨床試験が、固形がんを対象に行われている¹⁵⁸。

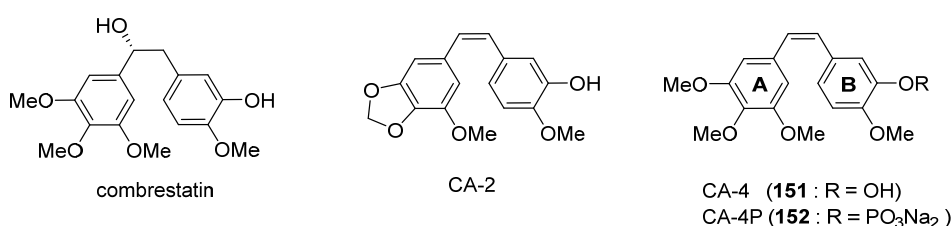


Figure 5-2. Chemical structures of combretastatins.

¹⁵⁵ Pettit, G.R.; Cragg, G. M.; Herald, D.L.; Schmidt, J.M.; Lohavanuaya, P. Isolation and structure of combretastatin. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 1374-1376.

¹⁵⁶ Pettit, G.R.; Singh, S.B.; Boyd, M.R.; Hamel, E.; Pettit, R.K.; Schmidt, J.M.; Hogan, F. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5, and A-6(1a). *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1666-1672.

¹⁵⁷ Nielsen, T.; Bentzen, L.; Pedersen, M.; Tramm, T.; Rijken, P.F.; Bussink, J.; Horsman, M.R.; Østergaard, L. Combretastatin A-4 phosphate affects tumor vessel volume and size distribution as assessed using MRI-based vessel size imaging. *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18, 6469-6477.

¹⁵⁸ Zweifel, M.; Jayson, G.C.; Reed, N.S.; Osborne, R.; Hassan, B.; Ledermann, J.; Shreeves, G.; Poupard, L.; Lu, S.P.; Balkissoon, J.; Chaplin, D.J.; Rustin, G.J. Phase II trial of combretastatin A4 phosphate, carboplatin, and paclitaxel in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Ann. Oncol.* **2011**, 22, 2036-2041.

一方で、CA-4 (**151**)は、分子内に *cis* 型の炭素 - 炭素二重結合を有しており、薬剤の保存時や投与時により化学的に安定な *trans* 型へと異性化することが知られている (**Figure 5-3.**)^{159, 160}。異性化した *trans* 型の CA-4 の抗腫瘍活性は低いことから、この異性化を防ぐべく、CA-4 (**151**)のオレフィン構造を他の構造へ変換した化合物の創製が試みられている¹⁶¹。なお、本研究とほぼ同時期に、Dos Santos Edos A らより、イオウやセレンを導入したチューブリン重合阻害剤についての報告が行われた¹⁶²。

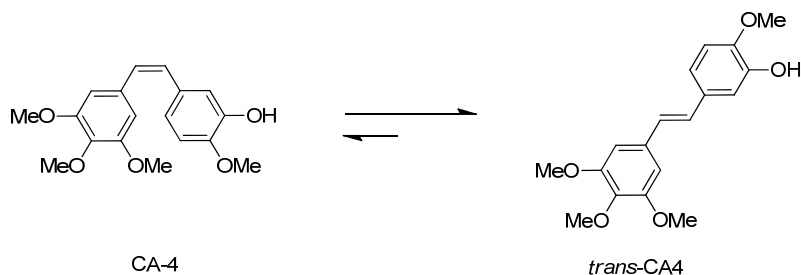


Figure 5-3. コンブレタスタチン A-4 の異性化

¹⁵⁹ Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Fujita, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Nihei, Y.; Suga, Y.; Morinaga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T. Syntheses and antitumor activity of *cis*-restricted combretastatins: 5-membered heterocyclic analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3153-3158.

¹⁶⁰ Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Chakraborti, A.K.; Lin, C.M.; Hamel, E. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2579-2588.

¹⁶¹ Tron, G.C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A.A. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3033-3044.

¹⁶² Dos Santos Edos A.; Hamel, E.; Bai, R.; Burnett, J.C.; Tozatti, C.S.; Bogo, D.; Perdomo, R.T.; Antunes, A.M.; Marques, M.M.; Matos Mde F.; de Lima, D.P. Synthesis and evaluation of diaryl sulfides and diaryl selenide compounds for antitubulin and cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 4669-4673.

2.2 化合物のデザイン・計算化学実験

一般的に、ケイ素原子は炭素原子より大きいことから、炭素 - ケイ素 (C-Si) 結合は炭素 - 炭素 (C-C) 結合よりも長いことが知られている。私は、このケイ素の特徴に注目し、ケイ素リンカーによる CA-4 (**151**) のオレフィンの置き換えを計画し、含ケイ素化合物 **153** をデザインした。

はじめに、私は、化合物 **153** 及び **154** の2つのベンゼン環間の距離 (d) を計算した。構造の最適化には、Gaussian 09 program を用い、MP2/6-31+G* level で計算を実施した¹¹⁸。計算結果を、Figure 5-4. に示す。期待した通り、ケイ素化合物 **153** の距離 (d) は、CA-4 (**151**) の *cis* 炭素 - 炭素二重結合の長さと同様であった。一方、対応する炭素体 **154** の距離 (d) は、CA-4 (**151**) およびケイ素体 **153** の距離より短かった。

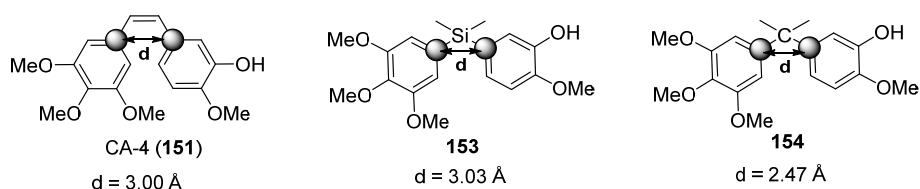


Figure 5-4. The distance between the two benzene rings (d) of CA-4 (**151**) and the designed compounds

次に、私は、デザインしたケイ素化合物 **153** および CA-4 (**151**) とチューブリンの結晶構造 (PDB ID: 1SA0)¹⁶³ のドッキングシミュレーションを、AutoDock 4.2^{74,75} を用いて実施した。結果は、Figure 5-5. に示した。結果の描画には、PyMOL software⁷⁶ を用いた。

コルヒチン結合サイトは、 α および β チューブリンのヘテロダイマーに存在する深い溝状の部分であることが知られている¹⁶⁴。期待した通り、ケイ素化合物 **153** および CA-4 (**151**) は、チューブリンのコルヒチン結合部位の同じ位置に結合し、両化合物ともチューブリンの Cys241 および Val181 と水素結合していることが示唆された。これらのことから、私は、デザインしたケイ素化合物 **153** は、高いチューブリン重合阻害活性を示すと考え、化合物 **153** およびその類縁体の合成、生物評価を行うこととした。

¹⁶³ Ravelli, R.B.; Gigant, B.; Curmi, P.A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, 428, 198-202.

¹⁶⁴ Massaroti, A.; Coluccia, A.; Silvestri, R.; Sorba, G.; Brancale, A. The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective. *ChemMedChem*. **2012**, 7, 33-42.

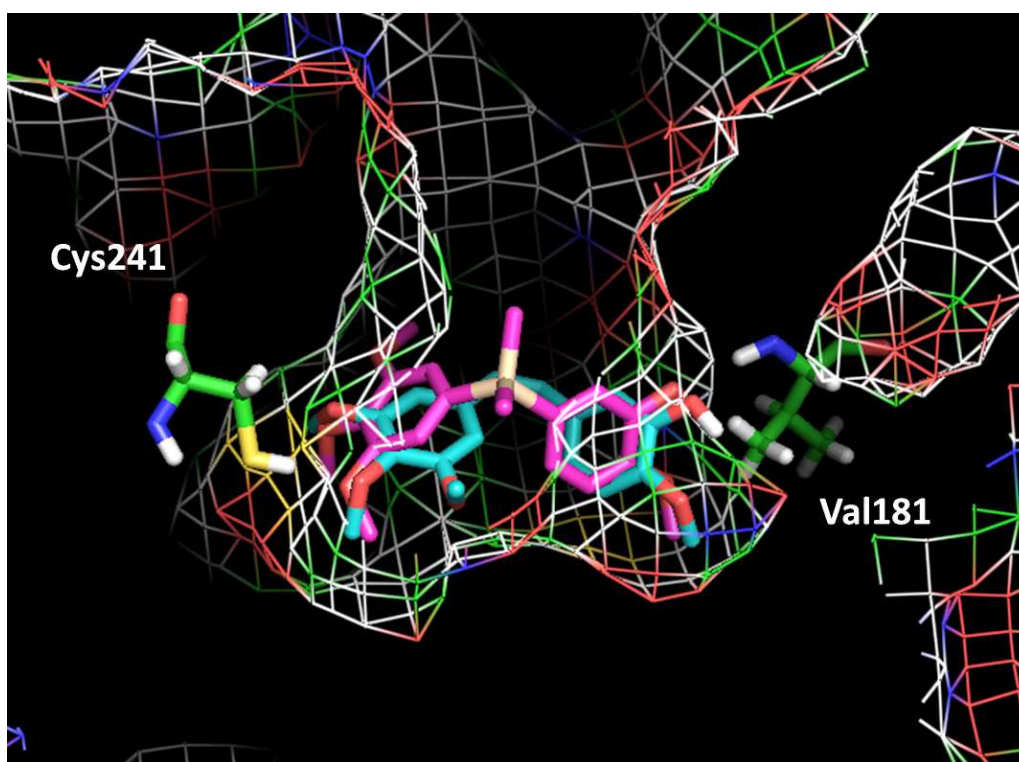
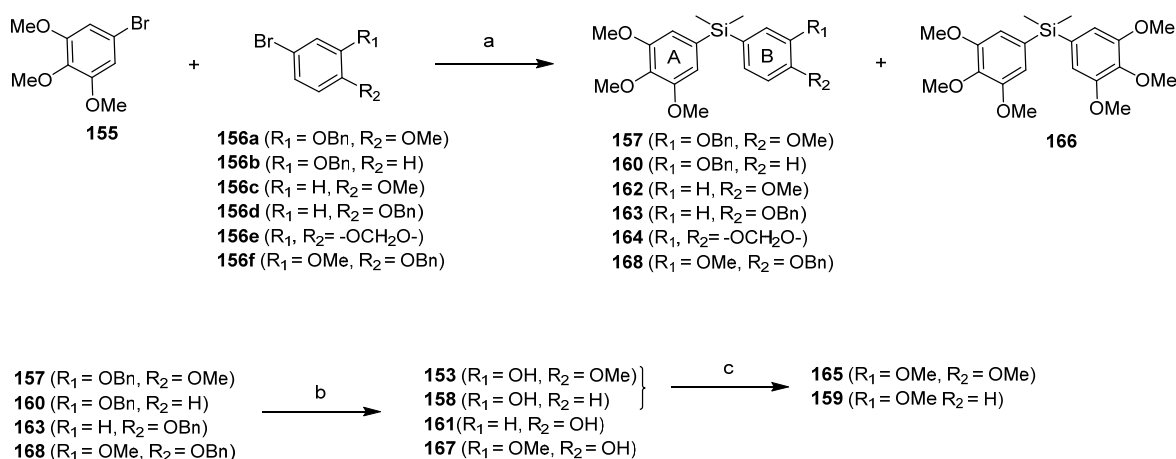


Figure 5-5. Binding models of CA-4 (**151**) (aqua) and the designed compound **153** (pink) at the colchicine-binding site of tubulin.

2.3 化合物の合成

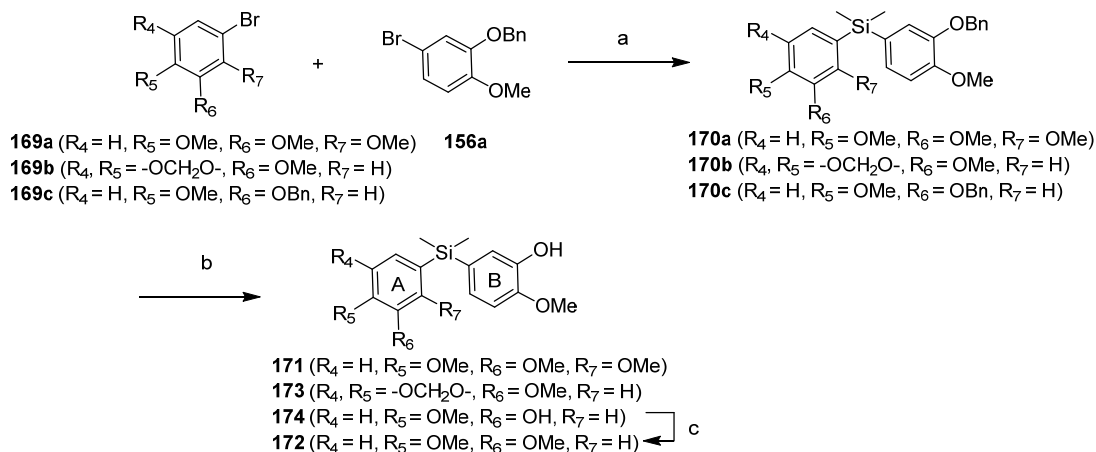
計算化学実験によって得られた結果から、私は、初めに、含ケイ素化合物 **153** の合成を行うことを計画した。また、コンプレタスタチン誘導体の A 環の置換基は、活性発現に重要であることが知られている為¹⁶¹、A 環の置換基は固定し、B 環上の置換基を変換した化合物の合成を計画した。これらの化合物は、Scheme 5-1. に示した一般的な有機合成手法で合成した。原料のブロモベンゼン **156a**, **156b** および **156f** は対応するフェノールのブロモ化によって合成した。ジアリルジメチルシラン (**157**, **160**, **162-164** および **168**) は、3,4,5-tribromobenzene (**155**) とブロモベンゼン (**156a-f**) を *n*-butyllithium (*n*-BuLi) で処理した後に、dichlorodimethylsilane と反応させることにより合成した。化合物 **153**, **158**, **161** および **167** は、化合物 **157**, **160**, **163** および **168** の脱ベンジル化により合成した。化合物 **165** および **159** は、化合物 **153** および **158** のメチル化によりそれぞれ合成した。



Scheme 5-1. Synthesis of silicon-containing compound **153** and its B-ring-modified derivatives **157-168**.^a

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

次に、私は、化合物 **153** の A 環状の最適化を計画した。化合物 **171-174** についても、B 環状を変換した化合物と同様の方法で合成した (Scheme 5-2.)。



Scheme 5-2. Synthesis of the A-ring modified derivatives **171-174**.^a

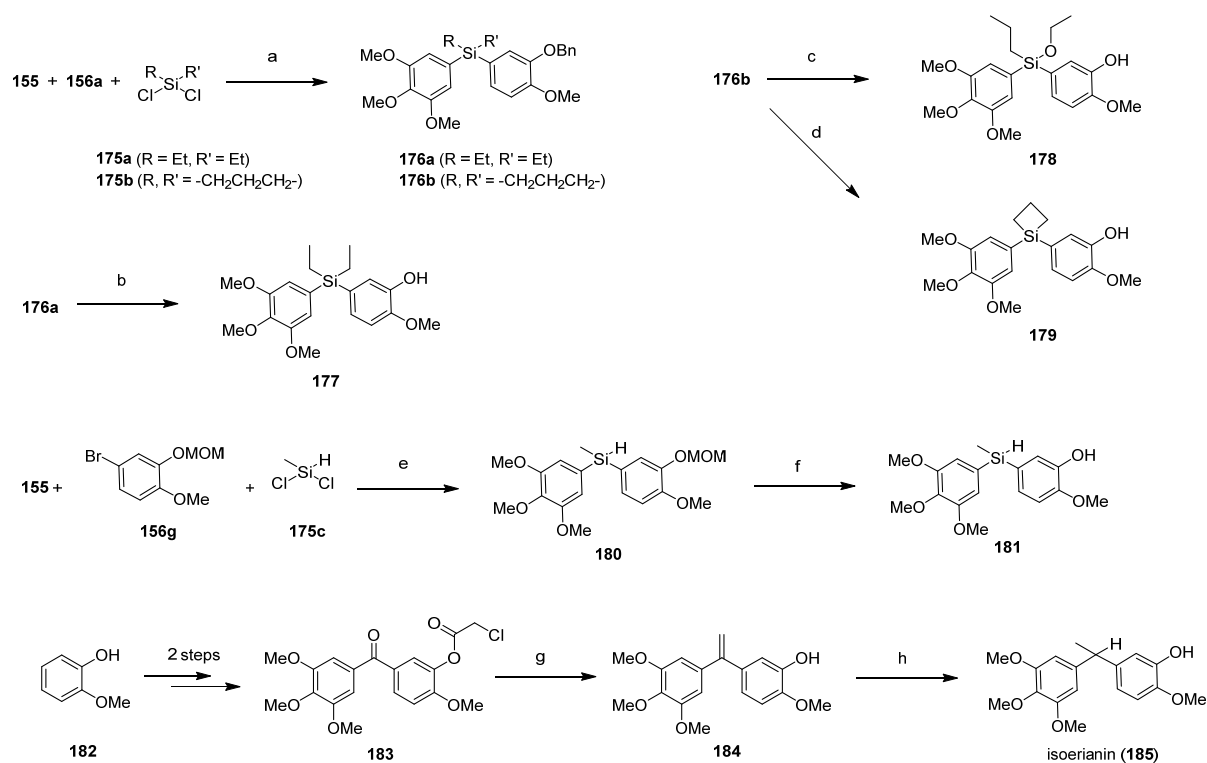
^aReagents and conditions: (a) dichlorodimethylsilane *n*-BuLi, THF, -70 °C to r.t.; (b) H₂, Pd/C, EtOH, r.t., 5-36% (2 steps); (c) iodomethane, K₂CO₃, acetone, reflux, 15%.

最後に、私はケイ素上の置換の変換を計画した。化合物 **176a-b** は、ジアリルジメチルシラン誘導体(**157, 160, 162-164** および **168**)の合成と同様の方法で、dichlorodiethylsilane **175a** および dichlorosilacyclobutane **175b** をそれぞれ原料に用い合成した (Scheme 5-3.)。

ジアリルジエチルシラン **177** は、化合物 **176a** の脱ベンジル化により容易に合成可能であった。一方、化合物 **176b** の脱ベンジル化を、エタノール/酢酸エチル混合溶媒下で実施したところ、エタノールが付加した開環体 **178** が得られた。そこで、化合物 **176b** の脱ベンジル化を酢酸エチル単独下で実施したところ、目的の化合物 **179** を得ることに成功した。

ジアリルメチルシラン **181** は methoxymethyl (MOM)エステル **156g** より、2工程で合成した。対応する炭素体 **185** は、isoerianin と呼ばれる既知化合物¹⁶⁵であり、原料の化合物 **183** を trimethylaluminium で処理することにより得られるオレフィン **184** を還元することによって合成した。

¹⁶⁵ Petrov, O.I.; Gerova, M.S.; Chanev, C.D.; Petrova, K.V. New Efficient Synthesis of Combretastatin A-4 via Colvin Rearrangement *Synthesis* **2011**, *22*, 3711-3715.



Scheme 5-3. Conversion of substituent groups on silicon. Synthesis of compounds **177-179**, **181** and isoerianin (**185**).^a

^a Reagents and conditions: (a) *n*-BuLi, THF, -70 °C to r.t., 10-33%; (b) H₂, Pd/C, EtOH, r.t., 94%; (c) H₂, Pd/C, EtOH / ethyl acetate, r.t., 30%; (d) H₂, Pd/C, ethyl acetate, r.t., 30%; (e) *n*-BuLi, THF, -70 °C to r.t.; (f) conc. HCl, MeOH, rt. 18% (2 steps); (g) trimethylaluminium in toluene, reflux, 11%; (h) H₂, Pd/C, EtOH, r.t., 83%.

2.4 チューブリン重合阻害活性および細胞増殖抑制活性評価

はじめに、合成した化合物のチューブリン重合阻害 (Tubulin polymerization-inhibitory: TPI) 活性のスクリーニングを実施した。TPI 活性の評価方法は、ブタ脳由来のチューブリンを用いる既知の評価方法^{166, 167}により行い、評価化合物の濃度は 30 μM に固定して評価を行った。次に、合成化合物のヒト乳がん MCF-7 細胞に対する細胞増殖抑制活性評価^{168, 169}を行った。なお、腫瘍細胞増殖抑制活性は、50%の細胞増殖を抑制する薬剤濃度として定義した IC₅₀ 値を用いて表した。

CA-4 (**151**), 化合物 **153** およびその B 環を変換した化合物 **157-168** の生物評価結果を, **Table 5-1**. に示した。薬剤濃度 30 μM に固定した TPI 活性評価において, CA-4 (**151**)は, 66%のチューブリン重合阻害活性を示した。期待した通り, デザインしたケイ素含有化合物 **153** は, 同薬剤濃度で 62%の阻害活性を示した。即ち, 化合物 **153** は, CA-4 (**151**)と同等の活性を示したと言える。化合物 **153** の誘導体においては, 化合物 **153** の水酸基をベンジルエーテルに変換した化合物 **157** は, 活性を示さなかった。化合物 **153** の B 環上の R₂ 部分のメトキシ基を除去した化合物 **158**, は活性を示さなかった。同じく, R₂ 部分のメトキシ基を持っていない化合物 **159** および **160** も, 活性を示さなかった。これらのことから, B 環上の R₂ 部分のメトキシ基は, TPI 活性発現に必須であると考えられた。化合物 **153** の R₁ 部分の水酸基の除去した化合物 **162** の活性は, 化合物 **153** の活性より減弱した (30% inhibition at 30 μM)。また, R₁ 部分に水酸基を持たない化合物 **161**, **163** および **165** は, 弱いながら活性を示した (2-11% inhibition)。メチレンジオキシ誘導体 **164** も, 弱い活性を示した (14% inhibition)。これらの結果から, B 環上の R₁ の変換は, 活性の低下につながると考えられた。R₃ 位にメトキシ基を新たに導入したトリメトキシ化合物 **166** は, 活性を示さなかった。化合物 **153** のメトキシ基と水酸基を逆転させた化合物 **167** の活性は, 大きく低下した (1% inhibition)。化合物 **167** の水酸基をベンジル化した化合物 **168** は, 弱い阻害活性を示した (4% inhibition)。

MCF-7 細胞の増殖抑制試験において, CA-4 (**151**)は, 非常に強い細胞増殖抑制活性を示し, その IC₅₀ 値は 0.004 μM であった。含ケイ素化合物 **153** も, 強い活性を示したが (IC₅₀ = 0.043 μM), CA-4 (**151**)の活性には及ばなかった。化合物 **153** のメトキシ基を除去した化合物 **158**

¹⁶⁶ Aoyama, H.; Noguchi, T.; Misawa, T.; Nakamura, T.; Miyachi, H.; Hashimoto, Y.; Kobayashi, H. Development of tubulin-polymerization inhibitors based on the thalidomide skeleton. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 944-949.

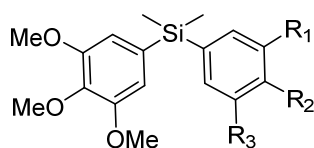
¹⁶⁷ Li, Y.; Kobayashi, H.; Tokiwa, Y.; Hashimoto, Y.; Iwasaki, S. Interaction of Phomopsin a with porcine brain tubulin: Inhibition of tubulin polymerization and binding at a rhizoxin binding. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 219-224.

¹⁶⁸ Borrel, C.; Thoret, S.; Cachet, X.; Guénard, D.; Tillequin, F.; Koch, M.; Michel, S. New antitubulin derivatives in the combretastatin A4 series: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3853-3864.

¹⁶⁹ O'Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Bergin, O.; Nathwani, S.M.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. Synthesis and evaluation of azetidinone analogues of combretastatin A-4 as tubulin targeting agents. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8569-8584.

は、TPI 評価の結果と同様に、活性を示さなかった ($IC_{50} > 30 \mu M$)。R₁ 部分の水酸基を除去した化合物 **162** の活性は、化合物 **153** と比較して減弱した ($IC_{50} = 0.15 \mu M$)。化合物 **164** および **165** の IC_{50} 値は、それぞれ 1.12 および $0.49 \mu M$ であった。トリメトキシ化合物 **166** は、活性を示さなかった ($IC_{50} > 30 \mu M$)。化合物 **153** のメトキシ基と水酸基を逆転させた化合物 **167** の活性も、細胞増殖抑制活性を示さなかった ($IC_{50} > 30 \mu M$)。これらの結果より、私が試験した化合物群においては、チューブリン重合阻害活性と腫瘍細胞増殖抑制活性は、良く相関していると言える。

Table 5-1. Tubulin polymerization-inhibitory activity and tumor cell growth-inhibitory activity of compound **153** and its B-ring modified derivatives **157-168**.



	R ₁	R ₂	R ₃	TPI assay ^a Inhibition (%) at 30 μM	MCF-7 assay ^b IC_{50} (μM)
CA-4 (151)	-	-	-	66	0.004
153	OH	OMe	H	62	0.043
157	OBn	OMe	H	NA ^c	>30
158	OH	H	H	NA ^c	>30
159	OMe	H	H	NA ^c	(52% at 30 μM)
160	OBn	H	H	NA ^c	(57% at 30 μM)
161	H	OH	H	2	>30
162	H	OMe	H	30	0.15
163	H	OBn	H	4	24.9
164	-OCH ₂ O-		H	14	1.12
165	OMe	OMe	H	11	0.49
166	OMe	OMe	OMe	NA ^c	>30
167	OMe	OH	H	1	>30
168	OMe	OBn	H	4	25.3

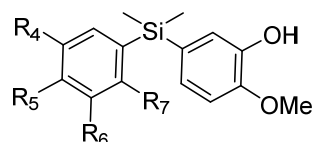
^a Tubulin polymerization-inhibitory activity.

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

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

次に、A環を変換した誘導体 **171-174** の評価を行った (Table 5-2.)。化合物 **153** の A 環の R₄ 部分のメトキシ基を R₇ 部分に移動した化合物 **171** の TPI 活性および細胞増殖抑制活性は、共に化合物 **153** と比較して低下した (25% inhibition at 30 μM および IC₅₀ = 0.74 μM)。ジメトキシ化合物 **172** は、弱い活性を示した (5% inhibition at 30 μM および IC₅₀ = 5.52 μM)。combrestatin A-2 (CA-2) タイプの化合物 **173** は、わずかに TPI 活性を示したが (27% inhibition at 30 μM)、細胞増殖抑制活性は化合物 **153** と比較して、大きく低下した。左右対称化合物 **174** も、弱い活性を示したのみだった (12% inhibition at 30 μM および IC₅₀ = 9.24 μM)。A 環の変換の結果から、化合物 **153** の 3,4,5-トリメトキシ基は、TPI および細胞増殖抑制活性の発現に重要であることが示唆された。

Table 5-2. Tubulin polymerization-inhibitory activity and tumor cell growth-inhibitory activity of the A-ring modified derivatives **171-174**.



	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	TPI assay ^a Inhibition (%) at 30 μM	MCF-7 assay ^b IC ₅₀ (μM)
CA-4 (151)	-	-	-	-	66	0.004
153	OMe	OMe	OMe	H	62	0.043
171	H	OMe	OMe	OMe	25	0.74
172	H	OMe	OMe	H	5	5.52
173	-OCH ₂ O-		OMe	H	27	(11% at 1 μM)
174	H	OMe	OH	H	12	9.24

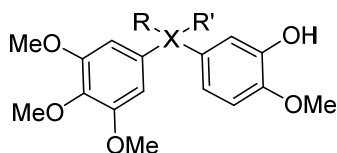
^a Tubulin polymerization-inhibitory activity.

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

化合物 **153** のケイ素上の置換基の変換の結果を Table 5-3. に示す。TPI 活性評価において、化合物 **153** (R = Me, R' = Me) は強い活性を示した (62% inhibition at 30 μM)。一方、化合物 **177** (R = Et, R' = Et) および **28** (R = *n*-Pr, R' = OEt) は、化合物 **153** と比較して弱い活性を示した (16% および 5% inhibition)。これらの結果から、私は、ケイ素上の嵩高い置換基の導入は、立体障害を生じ、活性の低下につながると考えた。そこで、私は、シラシクロブタン化合物 **179** およびメチルシラン化合物 **181** のデザイン及び評価を行った。ケイ素化合物 **181** と比較する為、isoerianin と呼ばれている対応する炭素体 **185** の合成も行った。期待した通り、化合物 **179** は非常に高い TPI 活性を示した (87% inhibition)。化合物 **181** および **185** の TPI 活性は、概ね保持された (51% および 54% inhibition)。

MCF-7 細胞に対する細胞増殖抑制活性試験において、化合物 **177** および **178** は、TPI 活性評価の際と同様に、化合物 **151** よりも弱い活性を示した ($IC_{50} = 1.71$ および $0.58 \mu M$)。シラシクロブタン化合物 **179** は、TPI スクリーニング評価において最も高い活性を示したが、化合物 **179** の細胞増殖抑制活性は、化合物 **153** よりも若干低い結果となった (compound **179**: $IC_{50} = 0.062 \mu M$)。メチルシラン化合物 **181** は、非常に強力な細胞増殖抑制活性を示し、その IC_{50} 値は $0.007 \mu M$ であった。興味深いことに、対応する炭素体 **185** の活性は、ケイ素化合物 **181** の活性よりも 10 倍程度低かった。本結果は、ケイ素リンカーが、*cis* 炭素 - 炭素二重結合の代替構造として作用するという私の仮説を支持していると言える。

Table 5-3. Effects of modification of substituent groups on silicon in **153**. Tubulin polymerization-inhibitory activity and tumor cell growth-inhibitory activity of compounds **177-179**, **181** and **185**.



	X	R	R'	TPI assay ^a Inhibition (%) at 30 μM	MCF-7 assay ^b IC_{50} (μM)
CA-4 (151)	-	-	-	66	0.004
153	Si	Me	Me	62	0.043
177	Si	Et	Et	16	1.71
178 ^c	Si	Pr	OEt	5	0.58
179	Si	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -		87	0.062
181 ^c	Si	Me	H	51	0.007
185 ^c	C	Me	H	54	0.075

^a Tubulin polymerization-inhibitory activity.

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

^c Racemic mixture

これまでに得られた構造活性相関 (SARs) の結果を, **Figure 5-6.**にまとめる. 合成したケイ素含有化合物の SARs の結果は, オレフィン構造を有する CA-4 誘導体の SARs の結果¹⁶¹ と類似していることが明らかとなった.

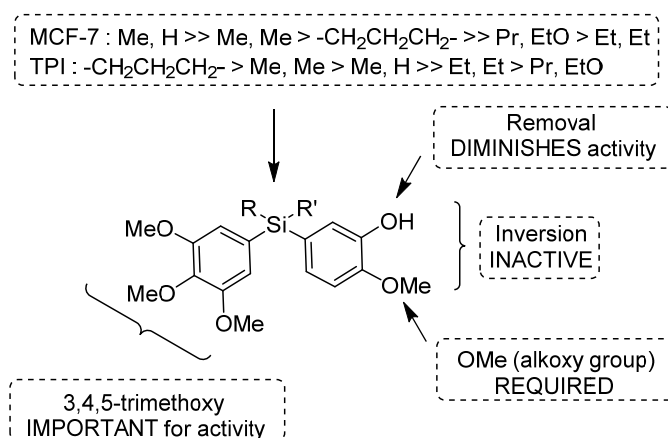


Figure 5-6. Structure-activity relationships (SARs) of the synthesized compounds.

2.5 コルヒチン結合部位への競合（結合）試験

私は、合成した化合物のチューブリン上の結合サイトを同定する目的で、トリチウム標識されたコルヒチン ($[^3\text{H}]$ colchicine) を用いた競合（結合）試験を実施した¹⁷⁰。代表的な合成化合物の結合試験および TPI 活性評価における IC_{50} 値を **Table 5-4** に示した。

コルヒチンとの競合結合評価試験において、CA-4 (**151**) は、コルヒチンのチューブリンに対する結合を非常に強く、競合的に阻害した (93.6% inhibition at 3 μM)。含ケイ素化合物 **153** および **179** は、3 μM でそれぞれ 46.6% および 88.1% の阻害活性を示した。これらの結果は、概ね TPI 活性評価における IC_{50} 値と関連していた。細胞増殖抑制活性試験において最も高い活性を示したメチルシラン化合物 **181** は、非常に強力にコルヒチンの結合を阻害した (90.7% inhibition at 3 μM)。対応する炭素化合物 **185** のコルヒチン結合阻害活性は、細胞増殖抑制活性試験の際と同様に、ケイ素化合物 **181** の活性よりも弱かった (30.9% inhibition at 3 μM)。

Table 5-4. Results of colchicine site competitive binding assay and IC_{50} in TPI assay.

	Y =	TPI assay ^a IC_{50} (μM)	Inhibition of $[^3\text{H}]$ colchicine binding ^b		
			3 μM	10 μM	30 μM
CA4 (151)		4.5	93.6%	-	-
153		16.0	46.6%	79.8%	90.8%
179		11.8	88.1%	99.0%	98.3%
181 ^c		28.0	90.7%	98.9%	99.6%
185 ^c		21.5	30.9%	73.5%	83.6%

^a Tubulin polymerization-inhibitory activity.

^b Assays were performed in triplicate.

^c Racemic mixture

¹⁷⁰ Romagnoli, R.; Baraldi, P.G.; Carrion, M.D.; Cara, C.L.; Cruz-Lopez, O.; Tolomeo, M.; Grimaudo, S.; Di Cristina, A.; Pipitone, M.R.; Balzarini, J.; Zonta, N.; Brancale, A.; Hamel, E. Design, synthesis and structure-activity relationship of 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]furan derivatives as a novel class of inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6862-6871.

確認の為、私は化合物 **181** および **185** の二つのベンゼン環間の距離(d)を計算した。計算の結果、それぞれの距離(d)は 3.04 \AA および 2.49 \AA であり、化合物 **185** の距離は CA-4 (**151**) の *cis* 炭素 - 炭素二重結合の距離 (3.00 \AA) と類似していることが確認された。これらの結果も、ケイ素リンカーが、*cis* 炭素 - 炭素二重結合の代替構造として作用するという私の仮説を支持している。

2.6 CA-4 および合成化合物の溶液安定性

分子内に *cis* 炭素 - 炭素二重結合を有する CA-4 (**151**)は、薬剤の保存、投与時により化学的に安定な *trans*-体へと異性化し、その結果、薬剤の有効性が低下することが知られている。そこで、私は、CA-4 (**151**) および合成した化合物 **153**, **181** および **185** の溶液安定性について、試験を行うことを計画した。CA-4 (**151**)のPBS緩衝液への溶解度が低かったことから、試験化合物をPBS緩衝液/アセトニトリル=1:1の混合溶液に溶解させ、室温で蛍光灯下に静置し、HPLCによりそれぞれの化合物の安定性を評価した。Figure 5-7.に、CA-4 (**151**)の溶液のHPLCチャートを示す。試験開始4時間後、CA-4 (**151**)の溶液には既に、2つ生成物が観察された。これらのうち1つは、CA-4 (**151**)の *trans*-体であると考えられる。24時間後、CA-4 (**151**)の濃度（純度）は、当初の値の84.5%まで減少していた (Table 5-5.)。一方、化合物 **153**, **181** および **185** は、同条件で新しい生成物は観察されず、本条件下では安定であることが分かった (data not shown)。

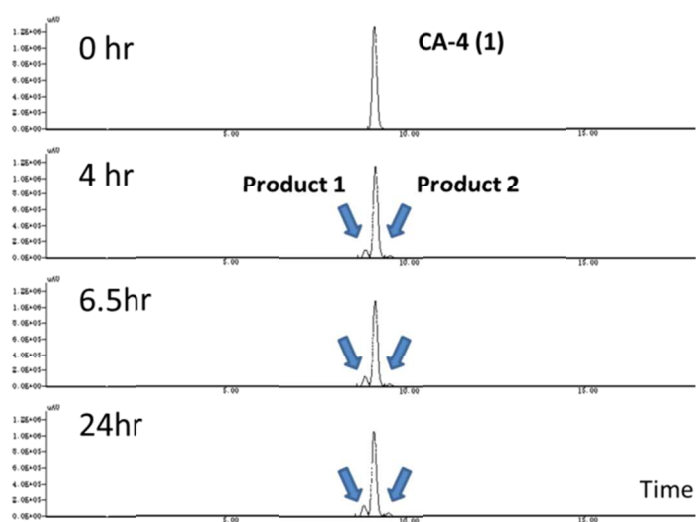


Figure 5-7. Stability test of CA-4 (**151**) (HPLC charts).

Table 5-5. Stability test of CA-4 (**151**) (remaining amount of **151**).

Time (hr)	0	4	6.5	24
CA-4 (151) (%)	100.0	90.0	87.9	84.5
Product 1 (%)	0.0	7.9	9.6	11.3
Product 2 (%)	0.0	2.1	2.5	4.2

2.7 本節のまとめ

コンブレタスタチンA-4 (**151**)は、保存、投与時に、低活性な *trans* 体に異性化することが知られていることから、私は、安定性及び腫瘍細胞増殖抑制活性の向上をめざし、ケイ素含有化合物部のデザインおよび合成を行った。

チューブリン重合阻害 (TPI) スクリーニング試験において、いくつかの合成化合物は、CA-4 (**151**)と同等の活性を示した。それらの化合物のうち、化合物 **181** は、非常に強いヒト乳がん MCF-7 細胞に対する細胞増殖抑制活性を示し、その IC₅₀ 値は、CA-4 (**151**)と同等の 0.007 μM であった。一方、対応する炭素体 **185** の活性は、ケイ素体 **181** よりも 10 倍程度低かった。コルヒチンとの競合試験においても、ケイ素体 **181** は炭素体 **185** よりも強い活性を示した。これらの結果は、ケイ素リンカーが、*cis* 炭素 - 炭素二重結合の代替構造として作用するという私の仮説を支持するものである。加えて、CA-4 (**151**)は、極性溶媒中で分解がみられたが、ケイ素化合物 **181** は同じ条件下で安定であった。

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

第3節 小括

本章では、ケイ素の原子の大きさ、結合距離の長さに着目し、炭素 - 炭素二重結合の代替構造としてケイ素リンカー (- Si -) が利用可能であるという仮説を立てた。本検証を行うにあたり、不安定な炭素 - 炭素二重結合を有するチューブリン重合阻害剤 CA-4 (**151**)のケイ素アナログを複数合成し、生物活性評価を行った。その結果、CA-4 (**151**)と同程度の生物活性を有し (IC_{50} (MCF-7) = 0.007 μ M), 尚且つ、安定性に優れたケイ素化合物 **181** の創製に成功した。本結果は、cis 炭素 - 炭素二重結合のケイ素リンカーによる置き換えは、チューブリン重合阻害剤の構造最適化の有用な手段になりうることが示唆される。更に、チューブリン重合阻害剤以外でも、不安定な cis 炭素 - 炭素二重結合を有する生理活性物質の構造最適化を行う際の手段の一つとなりうると思われる。

また、同様の考えに基づき、アミド構造 (-CO-NR-) のケイ素リンカー (- Si -) による置き換えも可能であると考えられる。例えば、環状アミド構造を有するフェナンスリジノン骨格と、ジベンゾシロール骨格を重ね合わせたところ、両構造が良く重なることが明らかとなった (**Figure 5-8**)。橋本研究室では、生理活性を有するフェナンスリジノン誘導体をいくつか見出し^{171, 172}、それらの誘導体展開にも本手法が利用できると考えている。

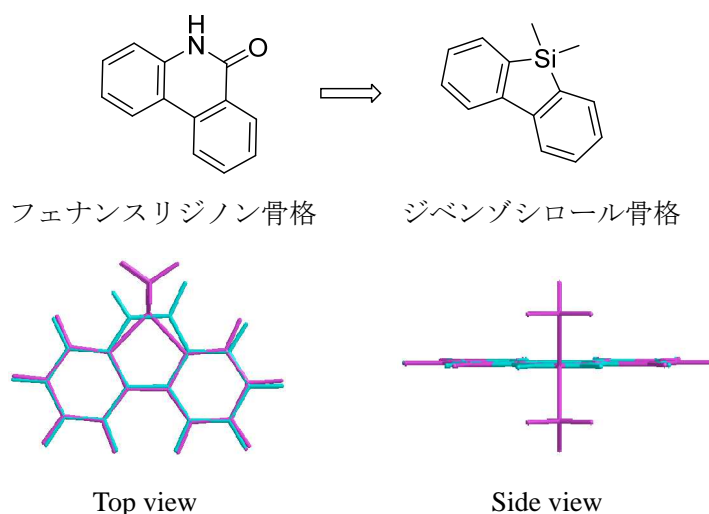


Figure 5-8. フェナンスリジノン骨格 (ピンク) とジベンゾシロール骨格 (水色) の重ね合わせ

¹⁷¹ Nishiyama, Y.; Nakamura, M.; Misawa, T.; Nakagomi, M.; Makishima, M.; Ishikawa, M.; Hashimoto, Y. Structure-activity relationship-guided development of retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR γ)-selective inverse agonists with a phenanthridin-6(5H)-one skeleton from a liver X receptor ligand. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, in press.

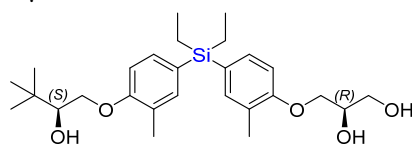
¹⁷² Aoyama, A.; Aoyama, H.; Makishima, M.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. Liver X Receptor (LXR) Modulators with Dibenz[b,f][1,4]oxazepin-11-one, (Z)-Dibenz[b,f]azocin-6-one, and 11,12-Dihydrodibenz[b,f]azocin-6-one Skeletons. *Heterocycles* **2009**, *78*, 2209-2216.

終章

本研究では、ケイ素の特徴を活かした医薬品候補化合物の創製、ケイ素の特徴を利用した創薬および化合物の構造最適化手法の提案を行うことを目標に検討を行い、ケイ素の創薬化学における有用性を示すことを目的とした。

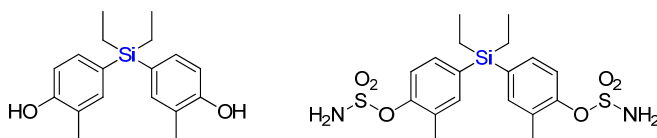
第 1 章では、研究背景としてケイ素と炭素の性質の比較と創薬化学におけるケイ素の利用の可能性について概説した。

第 2 章では、ステロイド骨格の代替骨格であるジフェニルメタン骨格にケイ素を導入した際の効果について述べた。ジフェニルメタン骨格を有する核内受容体 VDR アゴニストおよび AR アンタゴニスト活性を有する化合物にケイ素を導入することで、VDR 活性を低減し、AR 活性を向上させることに成功した。即ち、炭素/ケイ素置換を行うことにより、核内受容体への選択性の転換が生じることを見出した。合成した化合物のうち最も AR 選択的であった含ケイ素化合物 **(S,R)-3b** は、マウス乳がん SC-3 細胞の増殖抑制活性試験において強力な活性を示した ($IC_{50} = 0.072 \mu M$)。



(S, R)-3b
AR-antagonist (AR-selective ligand)
(SC-3 $IC_{50} = 72$ nM)

次に、エストロゲンアゴニストであるビスフェノール A (**19a**)の構造変換により、強力なエストロゲンアンタゴニスト活性を有するケイ素化合物 **8b** ($ER\alpha IC_{50} = 30$ nM) などの創製に成功した。また、ジフェニルメタン骨格を有する STS 阻害剤に、ケイ素を導入することにより、その活性を向上させることに成功した。これらの知見を合わせ、「STS 阻害活性」と「代謝物による ER アンタゴニスト活性」を有する 2 重阻害剤 **45b** の創製に成功した ($STS IC_{50} = 0.17 \mu M$)。本章の結果より、ジフェニルメタン骨格へケイ素を導入することにより、標的への選択性の転換や生理活性の変化が生じることを示した。即ち、標的に応じ、ジフェニルメタン化合物の炭素/ケイ素置換を行うことにより、目的に合った分子が創製することが可能であるといえる。

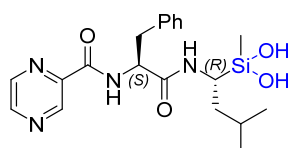


8b
ER α -antagonist
($IC_{50} = 30$ nM)

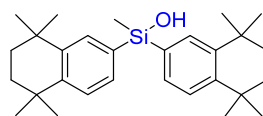
45b
STS inhibitor
($STS IC_{50} = 0.17 \mu M$)

第 3 章では、ケイ素の特徴的な構造であるシランジオールおよびシラノールを導入した化合物の創製について述べた。はじめに、新規なプロテアソーム阻害剤の創製を目指し、既存のプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブのボロン酸部位をシランジオールで置き換えを行うことを計画した。合成したシランジオール体 **59** の活性は、弱いながらも酵素阻害活性を示した (21% inhibition at 30 μM)。このことから、今後、シランジオールの周囲の構造を変換することにより、活性向上が行えると考えられる。

次に、シランジオールおよびシラノール構造を有する成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞増殖阻害剤の創製を試みた。検討の結果、リード化合物と同等の活性を有するシラノール誘導体 **81** を得ることに成功した (S1T IC₅₀ = 6.3 μM)。しかしながら、他のリンパ腫細胞に対する選択性は、リード化合物に劣っていた。本化合物群においては、細胞選択性の向上が次の課題であり、更なる構造最適化が必要である。本章の結果より、シランジオールおよびシラノール基を有する化合物も一定の活性を示したことから、化合物へのシランジオールおよびシラノール基の導入は、化合物の構造最適化を行う際の一つの選択肢となりうると考えられる。



59
Proteasome inhibitor
(21% Inhibition at 30 μM)

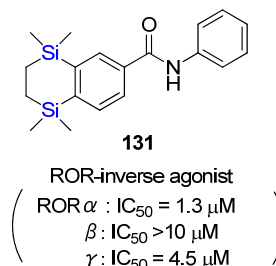
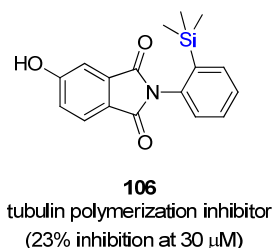
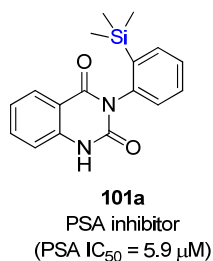


81
ATL cell proliferation inhibitor
(S1T IC₅₀ = 6.3 μM)

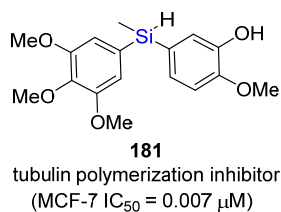
第 4 章では、トリメチルシリル (TMS) 基を導入した化合物及びテトラメチルテトラヒドロナフタレン骨格にケイ素を導入した核内受容体リガンドについて述べた。

はじめに、TMS 基導入した化合物として、ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (PSA) 阻害剤の創製を試み、高活性な化合物 **101a** の取得に成功した (PSA IC₅₀ = 5.9 μM)。次に、TMS 基を導入したフタルイミド系のチューブリン重合阻害剤の創製を試みた。結果、合成した TMS 導入化合物 **106** は、弱いながらチューブリン阻害活性を示すことが確認でき (23% inhibition at 30 μM)、その活性は対応する炭素体 (*t*-Bu) と同等であることが分かった。

環状構造のアルキルシリル基を有する核内受容体 ROR リガンドの創製を行った。構造展開を行う過程で、私は、ケイ素化合物の ROR 阻害活性が炭素体より高い傾向にあることを見出した。これは、ケイ素の分子サイズおよび電子的な効果が、何らかの影響を及ぼしていると考えられた。また、合成したケイ素体および炭素体の中で、ケイ素 6 員環を有するフェニルアミド **131** が、最も高い ROR 阻害活性を示した (ROR α IC₅₀ = 1.3 μM)。本章の結果から、化合物へのアルキルシリル基の導入は、立体的な影響だけではなく、電子的な影響を与える可能性があることも示唆された。



第 5 章では、ケイ素原子の結合の長さに注目し、ケイ素によるオレフィンおよびアミド構造の置き換えについての提案を行った。チューブリン重合阻害剤であるコンブレタスタチン A-4 (**151**)の有する不安定な *cis*-オレフィン構造をケイ素リンカーで置換することを計画し、生物活性を維持したまま、安定性を向上させた化合物 **181** の取得に成功した (TPI IC_{50} = 28 μ M, MCF-7 IC_{50} = 0.007 μ M)。比較の為に合成した炭素体 **185** は、ケイ素体より低活性であった。これらの結果は、ケイ素リンカーが、*cis* 炭素 - 炭素二重結合の代替構造として作用するという私の仮説を支持するものであると言える。また本章の最後に、ケイ素リンカーによるアミドの置き換えについても提案した。



以上の通り、本研究で得られた知見は、創薬化学におけるケイ素の有用性を示唆しており、今後の医薬化学および有機ケイ素化学の発展に寄与するものであると考えられる。

実験項

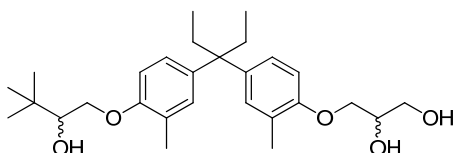
1. 有機合成

General :

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

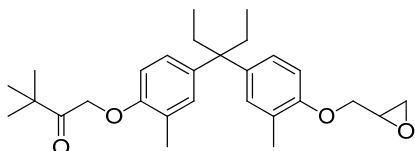
第 2 章 第 2 節

3-(4-(3-(4-(2-Hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)pentan-3-yl)-2-methylphenoxy)propane-1,2-diol: LG190178 (3a)



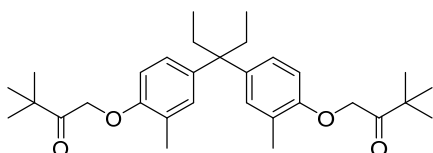
LG190178 (**3a**) was prepared according to the reported method.⁵⁸ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ6.96-6.94 (m, 2H), 6.91-6.89 (m, 2H), 6.70 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 4.12-4.07 (m, 2H), 4.03 (d, 2H, *J* = 4.9 Hz), 3.87-3.84 (m, 2H), 3.77 (dd, 1H, *J* = 11.6, 5.5 Hz), 3.70 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 2.17 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.04 (q, 4H, *J* = 7.3 Hz), 1.01 (s, 18H), 0.59 (t, 6H, *J* = 7.3 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ154.32, 154.01, 141.41, 141.09, 130.66, 130.63, 126.24, 126.12, 125.51, 125.38, 110.13, 110.10, 77.31, 70.47, 69.22, 63.90, 48.44, 33.56, 29.29, 26.05, 16.59, 16.52, 14.17, 8.42. MS (FAB+) *m/z* : 485 (M⁺).

3,3-Dimethyl-1-(2-methyl-4-(3-(3-methyl-4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl)pentan-3-yl)phenoxy)butan-2-one: LG190176 (4a)



LG190176 (**4a**) was prepared according to the reported method.⁵⁸ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ6.93-6.88 (m, 4H), 6.67 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.49 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 4.83 (s, 2H), 4.18 (dd, 1H, *J* = 9.4, 3.4 Hz), 3.95 (dd, 1H, *J* = 11.0, 5.4 Hz), 3.37-3.34 (m, 1H), 2.90-2.89 (m, 1H), 2.78-2.77 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.00 (q, 4H, *J* = 7.3 Hz), 1.25 (s, 18H), 0.58 (t, 6H, *J* = 7.3 Hz). MS (FAB+) *m/z* : 438 (M⁺).

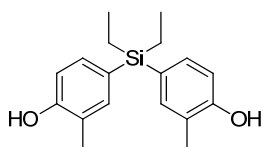
1,1'-((Pentane-3,3-diylbis(2-methyl-4,1-phenylene))bis(oxy))bis(3,3-dimethylbutan-2-one) : LG190155 (5a)



LG190155 (**5a**) was prepared according to the reported method.⁵⁸ white solid, mp : 106-108 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.27-7.25 (m, 2H), 6.89 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 6.49 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz),

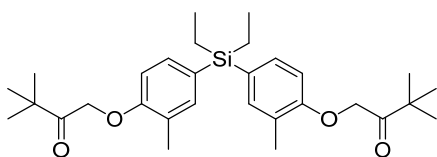
4.83 (s, 2H), 2.23 (s, 6H), 2.00 (q, 4H, $J = 7.3$ Hz), 1.24 (s, 18H), 0.58 (t, 6H, $J = 7.3$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 210.01, 153.99, 141.44, 130.77, 126.09, 125.95, 110.18, 69.62, 48.46, 43.22, 29.31, 26.35, 16.62, 8.49. MS (FAB+) m/z : 480 (M^+).

4,4'-(Diethylsilanediyl)bis(2-methylphenol) (8b) ⁶⁴

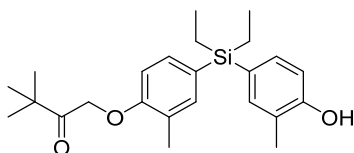


To a solution of 4-bromo-*o*-cresol (**7**) (6.0 g, 32 mmol) in dry THF (36 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (2.69 M, 27.6 mL, 75.6 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. The mixture was stirred at the same temperature for 1 h, and then added to a solution of dichlorodiethylsilane (1.6 mL, 10.6 mmol) in dry THF (1.6 mL) at -78 °C, and stirring was continued at room temperature for 5.5 h. The reaction was quenched with NH_4Cl aq, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 5/1) to give **8b** (1.24 g, 39.1%) as a white solid. mp : 110 - 112 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) : δ 7.15 (s, 2H), 7.11 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 6.73 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 2.16 (s, 6H), 0.96-0.94 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) : δ 157.51, 138.54, 134.85, 127.19, 124.92, 115.21, 16.22, 7.85, 5.32. MS (FAB+) m/z : 300 (M^+).

1,1'-(((Diethylsilanediyl)bis(2-methyl-4,1-phenylene))bis(oxy))bis(3,3-dimethylbutan-2-one) (5b)



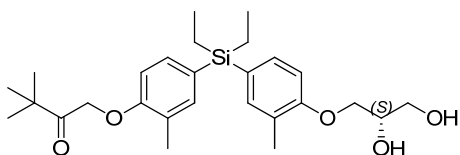
and **1-(4-(Diethyl(4-hydroxy-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-one (9)** ⁶⁴



To a solution of **8b** (1.03 g, 3.43 mmol) in dry DMF (8 mL) was added sodium hydride (137 mg of a 60% suspension in mineral oil, 3.43 mmol) and DMF (2 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at the same temperature for 0.5 h. To this was added 1-chloropinacolone (0.45 mL, 3.43 mmol), and

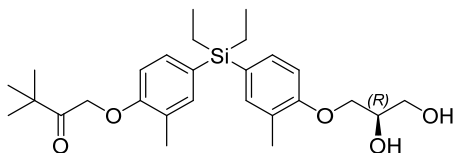
stirring was continued at room temperature for 5 h. The reaction was quenched with H₂O, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1) to give **5b** (347 mg, 20.4%) and **9** (304 mg, 22.2%). Compound **5b**: white solid, mp : 99-100 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.26 (s, 2H), 7.22 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 6.59 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 4.87 (s, 4H), 2.28 (s, 6H), 1.26 (s, 18H), 1.01-0.97 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ209.67, 157.18, 137.51, 133.80, 128.00, 126.43, 110.41, 69.17, 43.20, 26.34, 16.40, 7.45, 4.18. MS (FAB+) *m/z* : 497(M⁺). Compound **9**: white solid, mp : 117-119 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.26-7.22 (m, 2H), 7.19 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 6.76 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 6.59 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 4.87 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.26 (s, 9H), 1.01-0.95 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ209.84, 157.20, 154.82, 137.71, 137.52, 134.12, 133.77, 128.13, 127.52, 126.46, 123.09, 114.51, 110.42, 69.18, 43.20, 26.34, 16.40, 15.70, 7.46, 4.20. MS (FAB+) *m/z* : 398 (M⁺).

(S)-1-(4-((4-(2,3-Dihydroxypropoxy)-3-methylphenyl)diethylsilyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-one ((S)-10)



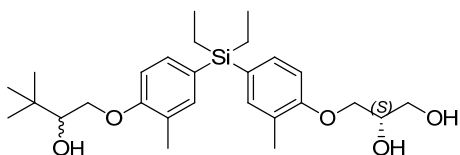
To a solution of **9** (245 mg, 0.62 mmol) in dry DMF (3 mL) was added sodium hydride (27 mg of a 60% suspension in mineral oil, 0.68 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 0.5 h. To this was added (*S*)-glycidol (0.044 mL, 0.68 mmol), and stirring was continued at 80 °C for 3 h. The reaction was quenched with H₂O, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1 to 1/1) to give (**S**)-**10** (134 mg, 46.2%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.29-7.22 (m, 4H), 6.81 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 6.59 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 4.87 (s, 2H), 4.14-4.10 (m, 1H), 4.05 (d, 2H, *J* = 4.9 Hz), 3.85 (dd, 1H, *J* = 11.0, 3.7 Hz), 3.76 (dd, 1H, *J* = 11.0, 5.5 Hz), 2.28 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.25 (s, 9H), 1.02-0.97 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ209.78, 157.30, 157.16, 137.47, 137.27, 134.02, 133.73, 127.97, 127.77, 126.42, 125.87, 110.49, 110.41, 70.43, 69.12, 68.85, 63.80, 43.20, 26.30, 16.37, 16.26, 7.42, 4.14. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₇H₄₀O₅Si 472.2645, found 472.2654 (M⁺).

(R)-1-(4-((4-(2,3-Dihydroxypropoxy)-3-methylphenyl)diethylsilyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-one ((R)-10)



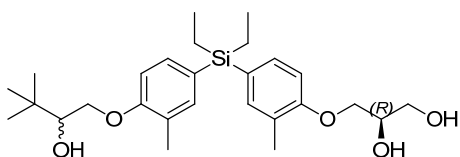
The title compound was prepared according to the procedure described for (*S*)-**10**, starting from compound **9** and (*R*)-glycidol. (132 mg, 39.1%), NMR spectra were the same as those of (*S*)-**10**. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $C_{27}H_{40}O_5Si$ 472.2645, found 472.2671 (M^+).

(2S)-3-(4-(Diethyl(4-(2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)-propane-1,2-diol [diastereomeric mixture] ((RS, S)-3b)



To a solution of (*S*)-**10** (103 mg, 0.22 mmol) in MeOH (2 mL) was added sodium borohydride (9.9 mg, 0.26 mmol) and MeOH (1 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction was quenched with NH_4Cl aq, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over $MgSO_4$. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1) to give (*RS,S*)-**3b** (86.6 mg, 84.1%). 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.28 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 7.25 (s, 2H), 6.81 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 4.12 (dd, 1H, $J = 9.2, 3.1$ Hz), 4.06 (d, 2H, $J = 4.9$ Hz), 3.91-3.84 (m, 2H), 3.78 (dd, 1H, $J = 5.5, 11.0$ Hz), 3.72 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 2.22 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.01 (s, 9H), 1.01-0.98 (m, 10H). ^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.63, 157.30, 137.33, 137.30, 134.06, 133.98, 127.94, 127.54, 126.03, 125.91, 110.62, 110.53, 77.26, 70.43, 69.11, 68.96, 63.83, 33.61, 26.05, 16.39, 16.31, 7.46, 4.17. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $C_{27}H_{43}O_5Si$ 475.2880, found 475.2871 ($M+H^+$).

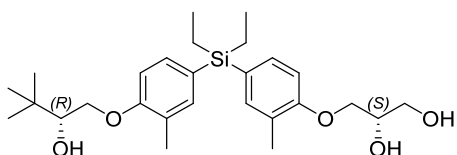
(2R)-3-(4-(Diethyl(4-(2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)-propane-1,2-diol [diastereomeric mixture] ((RS, R)-3b)



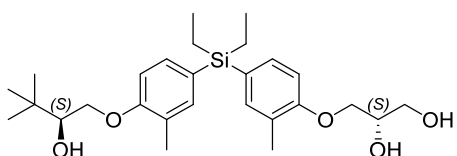
The title compound was prepared according to the procedure described for (*RS, S*)-**3b**, starting

from compound **(R)-10** (78.7 mg, 81.0%). NMR spectra were the same as those of **(RS, S)-3b**. HRMS(FAB+) m/z : calcd for $C_{27}H_{43}O_5Si$ 475.2880, found 475.2876 ($M+H^+$).

(S)-3-(4-(Diethyl(4-((R)-2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)propane-1,2-diol ((R, S)-3b)

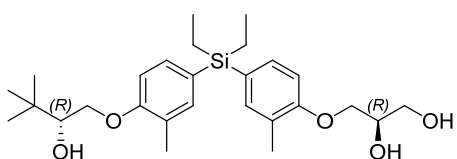


and **(S)-3-(4-(Diethyl(4-((S)-2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)propane-1,2-diol ((S, S)-3b)**

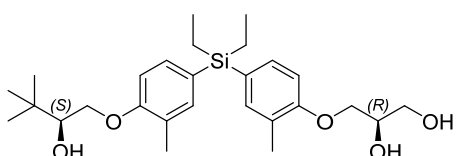


The diastereomeric mixture **(RS, S)-3b** was separated by chiral HPLC [Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, IPA/hexane = 15/85), 1.0 mL/min, 20 °C]. **(R, S)-3b**: NMR spectra were the same as those of **(RS, S)-3b**. HRMS (FAB+) : calcd for $C_{27}H_{43}O_5Si$ 475.2880, found 475.2883 ($M+H^+$). HPLC : Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, IPA/hexane = 15/85), 0.5 mL/min, 20 °C, retention time = 18.4 min, > 99% ee. **(S, S)-3b**: NMR spectra were the same as those of **(RS, S)-3b**. HRMS (FAB+) : calcd for $C_{27}H_{43}O_5Si$ 475.2880, found 475.2876 ($M+H^+$). HPLC : Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, IPA/hexane = 15/85), 0.5 mL/min, 20 °C, retention time = 35.8 min, > 99% ee.

(R)-3-(4-(Diethyl(4-((R)-2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)propane-1,2-diol ((R, R)-3b)



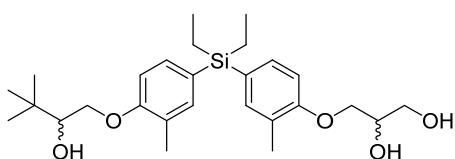
and **(R)-3-(4-(Diethyl(4-((S)-2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)propane-1,2-diol ((S, R)-3b)**



The diastereomeric mixture **(RS, R)-3b** was separated by chiral HPLC [Chiralpak IA (4.6 x 250

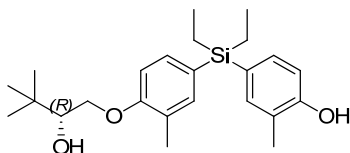
mm, IPA/hexane = 1/4), 1.0 mL/min, 20 °C]. **(R, R)-3b**: NMR spectra were the same as those of **(RS, R)-3b**. HRMS (FAB+) : calcd for C₂₇H₄₃O₅Si 475.2880, found 475.2883 (M+H⁺). HPLC : Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, IPA/hexane = 15/85), 0.5 mL/min, 20° C, retention time = 17.8 min, > 99% ee. **(S, R)-3b**: NMR spectra were the same as those of **(RS, R)-3b**. HRMS (FAB+) : calcd for C₂₇H₄₃O₅Si 475.2880, found 475.2880 (M+H⁺). HPLC : Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, IPA/hexane = 15/85), 0.5 mL/min, 20 °C, retention time = 38.0 min, > 99% ee.

3-(4-(Diethyl(4-(2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)-propane-1,2-diol [diastereomeric mixture] (3b)



A diastereomeric mixture **3b** was prepared by mixing equal amounts of pure optical isomers **(R, S)-3b**, **(S, S)-3b**, **(R, R)-3b** and **(S, R)-3b**.

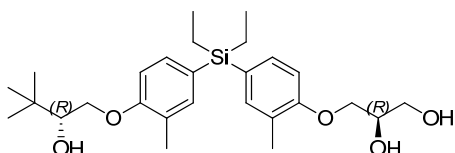
(R)-4-(Diethyl(4-(2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenol ((R)-11)



To a solution of **9** (104 mg, 0.26mmol) in dry THF (1.5 mL) was added a mixture of **(R)**-2-methyl-CBS-oxazaborolidine (1 M solution in toluene, 0.026 mL), borane *N*-ethyl-*N*-isopropylaniline complex (2 M solution in THF, 0.156 mL) and dry THF (1.5 mL) at 20 °C under an Ar atmosphere, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. The reaction was quenched with NH₄Cl aq, and the whole was evaporated. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 20/1 to 4/1) to give **(R)-11** (95.8 mg, 92.0%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.30-7.19 (m, 4H), 6.83 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 6.76 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 4.14 (dd, 1H, *J* = 9.5, 3.0 Hz), 3.92 (dd, 1H, *J* = 9.5, 8.5 Hz), 3.74 (dd, 1H, *J* = 8.5, 3.0 Hz), 2.24 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.03 (s, 9H), 1.01-0.97 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ157.67, 154.95, 137.82, 137.43, 134.20, 134.11, 127.80, 127.56, 126.11, 123.32, 114.61, 110.69, 77.45, 69.15, 33.73, 26.17, 16.52, 15.86, 7.59, 4.32. HRMS (FAB+) : calcd for C₂₄H₃₇O₃Si 401.2515, found 401.2503 (M+H⁺). HPLC : Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, IPA/hexane = 15/85), 0.5 mL/min, 20 °C, retention time = 13.1 min, 93% ee. ((*S*)-4-(diethyl(4-(2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenol : retention

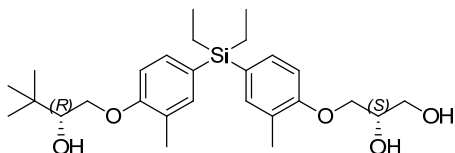
time = 33.9 min).

(*R*)-3-(4-(Diethyl(4-((*R*)-2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)propane-1,2-diol ((*R, R*)-3b')



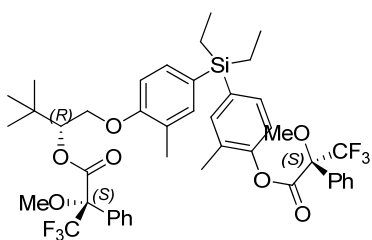
To a mixture of (***R***)-**11** (19.2 mg, 0.05 mmol), K₂CO₃ (9.9 mg, 0.07 mmol) and acetone (0.2 mL) was added (*R*)-glycidol (0.046 ml, 0.07 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 60 °C for 6 h and at room temperature for 16 h, and then evaporated. The residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 1/1) to give (***R, R***)-**3b'** (7.1 mg, 31.3%) as a colorless oil. NMR spectra were the same as those of (***RS, S***)-**3b**. HRMS (FAB+): calcd for C₂₇H₄₃O₅Si 475.2880, found 475.2890 (M+H⁺). HPLC : Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, IPA/hexane = 15/85), 0.5 mL/min, 20 °C, retention time was the same as that of (***R, R***)-**3b**. > 99% ee.

(*S*)-3-(4-(Diethyl(4-((*R*)-2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy)-3-methylphenyl)silyl)-2-methylphenoxy)propane-1,2-diol ((*R, S*)-3b')



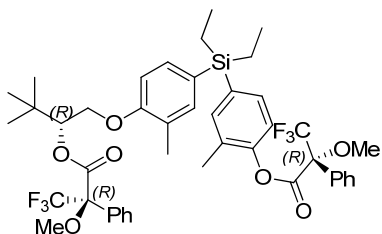
The title compound was prepared according to the procedure described for ((***R, R***)-**3b'**), starting from compound (***R***)-**11** and (*S*)-glycidol (4.5 mg, 19.9%). NMR spectra were the same as those of (***RS, S***)-**3b**. HRMS (FAB+): calcd for C₂₇H₄₃O₅Si 475.2880, found 475.2902 (M+H⁺). HPLC: Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, IPA/hexane = 15/85), 0.5 mL/min, 20 °C, retention time was the same as that of (***R, S***)-**3b**. > 99% ee.

(*S*)-(*R*)-1-(4-(Diethyl(3-methyl-4-(((*S*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoyl)oxy)-phenyl)silyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-yl-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoate (12)



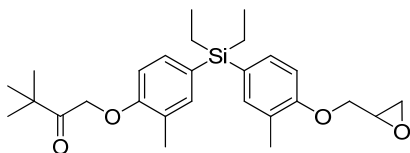
To a solution of **(R)-11** (9.5 mg, 0.024 mmol) in dichloromethane (0.2 mL) were added *(R)*-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoyl chloride (0.0098 mL, 0.072 mmol) and pyridine (0.2 mL) at room temperature. The mixture was stirred at same temperature for 20 h and then evaporated, and the residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 9/1) to give **12** (1.7 mg) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.69-7.66 (m, 2H), 7.54 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.47-7.44 (m, 3H), 7.33-7.31 (m, 3H), 7.28-7.21 (m, 4H), 7.04 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.72 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 5.34 (dd, 1H, *J* = 7.5, 3.0 Hz), 4.12 (dd, 1H, *J* = 10.5, 3.0 Hz), 4.05 (dd, 1H, *J* = 10.5, 7.5 Hz), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.03 (s, 9H), 1.03-0.96 (m, 10H). MS (FAB+) *m/z* : 833 (M+H⁺).

5.1.25. (R)-(R)-1-(4-(Diethyl(3-methyl-4-(((R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoyl)oxy)phenyl)silyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-yl-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-Phenylpropanoate (13)



The title compound was prepared according to the procedure described for **12**, starting from compound **(R)-11** (9.5 mg) and *(S)*-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoyl chloride (y. 2.6 mg). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.70-7.67 (m, 2H), 7.54 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.45-7.44 (m, 3H), 7.34-7.32 (m, 2H), 7.26-7.21 (m, 3H), 7.12-7.09 (m, 3H), 7.05 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.76 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 5.40 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 4.22 (dd, 1H, *J* = 10.0, 1.0 Hz), 4.15 (dd, 1H, *J* = 10.0, 8.0 Hz), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.00 (s, 9H), 1.07-0.96 (m, 10H). MS (FAB+) *m/z* : 833 (M+H⁺).

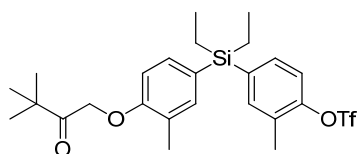
1-(4-(Diethyl(3-methyl-4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl)silyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-one (4b)



To a solution of **9** (149 mg, 0.37 mmol) in dry DMF (2 mL) was added sodium hydride (15 mg of a 60% suspension in mineral oil, 0.40 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 0.5 h. To this was added epichlorohydrin (0.029 mL, 0.40 mmol), and stirring was continued at 120 °C for 3 h. The reaction was quenched with H₂O, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified silica gel column chromatography

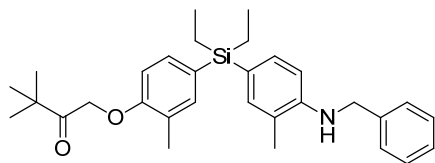
(hexane/ethyl acetate = 9/1) to give **4b** (108 mg, 63.6%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.27-7.21 (m, 4H), 6.79 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.59 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 4.87(s, 2H), 4.24-4.21 (m, 1H), 4.00-3.97 (m, 1H), 3.38-3.35 (m, 1H), 2.90 (dd, 1H, $J = 5.0, 4.0$ Hz), 2.77 (dd, 1H, $J = 5.0, 3.0$ Hz), 2.28 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.01-0.97 (m, 19H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 209.83, 157.59, 157.27, 137.61, 137.41, 134.03, 133.87, 128.13, 12.73, 126.54, 126.35, 110.63, 110.50, 69.26, 68.46, 50.40, 44.79, 43.34, 26.45, 16.53, 16.37, 7.57, 4.27. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{Si}$ 454.2539, found 454.2542 (M^+).

4-((4-(3,3-Dimethyl-2-oxobutoxy)-3-methylphenyl)diethylsilyl)-2-methylphenyl trifluoromethanesulfonate (14)



To a solution of **9** (366 mg, 0.92 mmol) in dichloromethane (3 mL) was added TEA (0.19 mL, 1.4 mmol) and trifluoromethanesulfonic anhydride (0.19 mL, 1.1 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1) to give a solid of **14** (427 mg, 87.5%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.38 (s, 1H), 7.35 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.24-7.18 (m, 2H), 7.19 (s, 1H), 6.60 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 4.89 (s, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 1.26 (s, 9H), 1.04-0.96 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 209.69, 157.54, 149.39, 138.63, 137.96, 137.41, 134.20, 133.77, 129.76, 126.81, 126.52, 120.37, 110.56, 69.07, 43.21, 26.36, 16.42, 16.34, 7.32, 3.91. MS (FAB+) m/z : 530 (M^+).

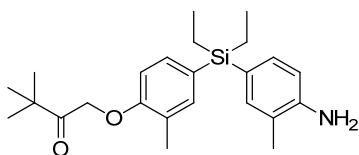
1-(4-((4-(Benzylamino)-3-methylphenyl)diethylsilyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-one (15)



To a mixture of cesium carbonate (468 mg, 1.44 mmol), palladium diacetate (13.9 mg, 0.06 mmol) and (2,2'- bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl) (57.6 mg, 0.09 mmol) was added a mixture of **14** (327 mg, 0.62 mmol), benzylamine (0.135 mL, 1.23 mmol) and toluene (2 mL) under an Ar atmosphere at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 0.5 h and at 100 °C for 6 h, and then filtered through a Celite pad. The filtrate was evaporated and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 20/1)

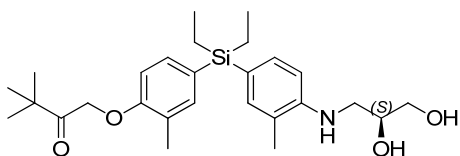
to give **15** (216 mg, 71.8%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.40-7.34 (m, 4H), 7.30-7.22 (m, 4H), 7.19 (s, 1H), 6.62 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.59 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 4.86 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.26 (s, 9H), 0.99-0.97 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 209.67, 157.07, 146.86, 139.41, 137.57, 136.55, 164.36, 133.57, 136.55, 134.36, 133.80, 128.66, 127.61, 127.30, 126.33, 122.58, 121.18, 110.39, 109.43, 69.24, 48.16, 43.20, 16.35, 17.57, 16.40, 7.55, 4.31. MS (FAB+) m/z : 487 (M^+).

1-(4-((4-Amino-3-methylphenyl)diethylsilyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-one (16)



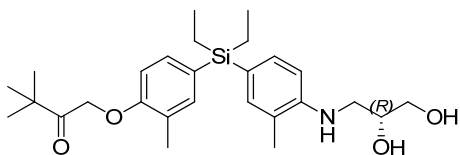
To a solution of **15** (195 mg, 0.40 mmol) in EtOH (3 mL) was added Pd/C (5%, 10 mg) at room temperature. The mixture was stirred at the same temperature for 12 h and then filtered through a Celite pad. The filtrate was evaporated and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1) to give crude **16** (96.4 mg, 60.8%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.27-7.11 (m, 2H), 7.15(s, 2H), 6.66 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 6.59 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 4.86 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.25 (s, 9H), 0.96-0.94 (m, 10H). MS (FAB+) m/z : 397 (M^+).

(S)-1-(4-((4-((2,3-Dihydroxypropyl)amino)-3-methylphenyl)diethylsilyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-one ((S)-17)



To a solution of crude **16** (38.1 mg, 0.10 mmol) in EtOH (0.4 mL) was added (*R*)-glycidol (0.044 mL, 0.68 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 75 °C for 11 h and at room temperature for 11 h, and then evaporated. The residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 1/1) to give (*S*)-**17** (19.2 mg, 42.0%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.26-7.23 (m, 2H), 7.16 (s, 1H), 6.64 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.59 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 4.87 (s, 2H), 4.02-4.00 (m, 1H), 3.80 (dd, 1H, $J = 11.3, 3.4$ Hz), 3.66 (dd, 1H, $J = 11.3, 5.3$ Hz), 3.35 (dd, 1H, $J = 13.1, 4.0$ Hz), 3.26-3.22 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.25 (s, 9H), 0.99-0.97 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 209.67, 157.07, 146.73, 137.55, 136.74, 134.30, 133.78, 128.55, 126.35, 123.25, 121.94, 110.40, 109.59, 70.21, 69.21, 64.89, 46.29, 43.19, 26.34, 17.53, 16.40, 7.52, 4.27. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_4\text{Si}$ 472.2883, found 475.2892 ($\text{M}+\text{H}^+$).

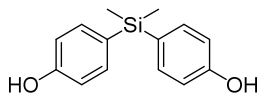
(R)-1-(4-((4-((2,3-Dihydroxypropyl)amino)-3-methylphenyl)diethylsilyl)-2-methylphenoxy)-3,3-dimethylbutan-2-one ((R)-17)



The title compound was prepared according to the procedure described for (*S*)-**17**, starting from compound **16** and (*S*)-glycidol (21.5 mg, 47.0%). NMR spectra were the same as those of (*S*)-**17**. HRMS (FAB+) m/z : calcd for C₂₇H₄₃NO₄Si 472.2883, found 475.2888 (M+H⁺).

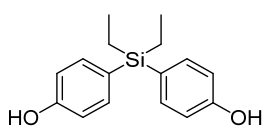
第 2 章 第 3 節

4,4'-(Dimethylsilanediyl)diphenol (**19b**)¹⁷³



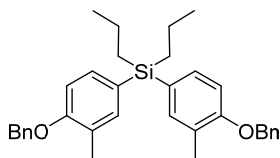
To a solution of 4-bromophenol (3.82 g, 22.1 mmol) in dry THF (25 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (2.69 M, 19 mL, 51.5 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. To this was added dichlorodimethylsilane (0.88 mL, 7.3 mmol) at -78 °C, and stirring was continued at room temperature for 5 h. The reaction was quenched with NH₄Cl aq, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 2/1) to give **19b** (0.81 g, 45.4%) as a white solid. mp : 172-174 °C (lit. 174 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.30 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 6.76 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 0.43 (6H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ159.41, 136.63, 129.22, 115.90. MS (FAB+) *m/z* : 245 (M+H⁺).

4,4'-(Diethylsilanediyl)diphenol (**20a**)¹⁷³



The title compound was prepared according to the procedure described for **19b**, starting from dichlorodiethylsilane (y. 11.8%). Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.36 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 6.82 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 4.88 (s, 2H), 1.02-0.97 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ156.44, 136.64, 127.63, 115.02, 7.51, 4.30. MS (FAB+) *m/z* : 272 (M⁺).

Bis(4-(benzyloxy)-3-methylphenyl)dipropylsilane (**38**)

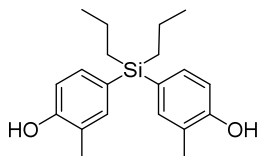


The title compound was prepared according to the procedure described for **19b**, starting from dichlorodi-*n*-propylsilane and 1-(benzyloxy)-4-bromo-2-methylbenzene (**37**) (y. 4.3%). Yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.45 (d, 4H, *J* = 7.4 Hz), 7.39 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 7.34-7.31 (m, 2H),

¹⁷³ Tagle, L.H.; Terraza, C.A.; Alvarez, P. Synthesis and Characterization of Poly(carbonates) and Poly(thiocarbonates) Derived from Diphenols Containing Silicon as Central Atom. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2006**, 181, 239-248.

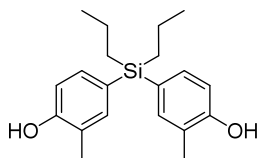
7.27 (m, 4H), 6.88 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 5.08 (s, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.44-1.34 (m, 4H), 1.03-0.95 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 157.75, 137.49, 137.18, 133.89, 128.49, 127.79, 127.72, 127.11, 126.25, 110.66, 69.52, 18.58, 17.47, 16.50, 15.75. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_2\text{Si}$ 508.2798, found 508.2758 (M^+).

4,4'-(Dipropylsilyl)bis(2-methylphenol) (21b)



To a mixture of bis(4-(benzyloxy)-3-methylphenyl)dipropylsilane (**38**) (747 mg, 1.47 mmol), EtOH (0.5 mL) and ethyl acetate (1.5 mL) was added 5% Pd/C (37.4 mg) at room temperature, and the mixture was stirred under an H_2 atmosphere at the same temperature for 18 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **21b** (18.4 mg, 3.8%) as a white solid. mp : 99-101 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) : δ 7.04 (s, 2H), 6.99 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.62 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 2.06 (s, 6H), 1.28-1.19 (m, 4H), 0.85 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) : δ 157.50, 138.49, 134.79, 127.46, 124.88, 115.15, 18.88, 18.57, 16.98, 16.27. MS (FAB+) m/z : 328 (M^+). HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{Si}$ 328.1859, found 328.1851 (M^+).

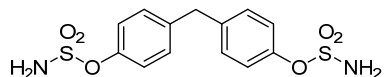
4,4'-(Dibutylsilyl)bis(2-methylphenol) (22b)



The title compound was prepared according to the procedure described for **19b**, starting from 4-bromo-*o*-cresol and dichlorodibutylsilane (y. 2%). Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 6.93 (s, 2H), 6.87 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.67 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 4.61 (s, 2H), 2.50 (t, 4H, $J = 8.0$ Hz), 2.22 (s, 6H), 1.58-1.51 (m, 4H), 1.38-1.29 (m, 4H), 0.91 (t, 6H, $J = 7.4$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 151.64, 135.13, 130.97, 126.78, 123.33, 114.67, 34.73, 33.95, 22.32, 15.73, 13.94. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{Si}$ 356.2172, found 356.2151 (M^+).

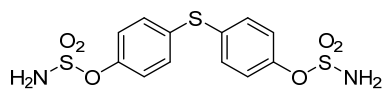
第 2 章 第 4 節

Methylenebis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (**39**)⁹⁵



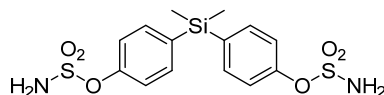
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-methylenediphenol (**18**) (y. 81.6%). Colorless crystals. mp : 173-175 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.26 (dd, 4H, *J* = 6.6, 2.3 Hz), 7.22 (dd, 4H, *J* = 6.6, 2.3 Hz), 3.99 (s, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ150.49, 141.10, 131.00, 123.45, 41.44. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

Thiobis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (**40**)



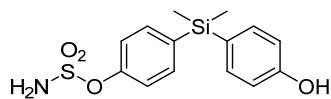
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-methylenediphenol (y. 4.6%). White solid. mp : 150-152 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.30 (dd, 4H, *J* = 6.3, 2.0 Hz), 7.19 (dd, 4H, *J* = 6.3, 2.0 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ151.49, 135.21, 133.51, 124.43. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₂H₁₂N₂O₆S₃ 375.9858, found 375.9897 (M⁺).

(Dimethylsilanediyl)bis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (**41b**)



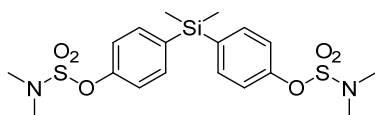
To a solution of 4,4'-(dimethylsilanediyl)diphenol (**19b**) (200 mg, 0.82 mmol) in DMA (1 mL) was added sulfamoyl chloride (283 mg, 2.46 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with H₂O aq., and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1 to 1/1) to afford a white solid. This was recrystallized from chloroform/hexane to give **41b** (154.4 mg, 46.8%) as colorless crystals. mp : 154-155 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.07 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 6.81 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 0.56 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ153.13, 137.66, 136.63, 122.84. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₄H₁₉N₂O₆S₂Si 403.0454, found 403.449 (M+H⁺).

4-((4-Hydroxyphenyl)dimethylsilyl)phenyl sulfamate (42)



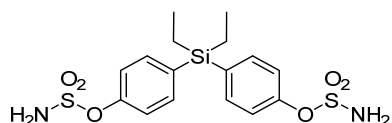
To a solution of 4,4'-(dimethylsilanediyl)diphenol (**19b**) (24 mg, 0.98 mmol) in DMA (1 mL) was added sulfamoyl chloride (135.9 mg, 1.18 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction was quenched with H₂O aq, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (chloroform/ MeOH = 40/1) and PTLC (hexane/ethyl acetate = 2/1) to give **42** (42.7 mg, 13.4%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.54 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 7.29 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 6.84 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 4.90 (brs, 3H), 0.52 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ156.78, 150.87, 138.54, 135.93, 135.89, 128.46, 121.41, 115.22, -2.16. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₄H₁₇NO₄SSiNa 346.0545, found 346.0558 (M+Na⁺).

(Dimethylsilanediyl)bis(4,1-phenylene) bis(dimethylsulfamate) (43)



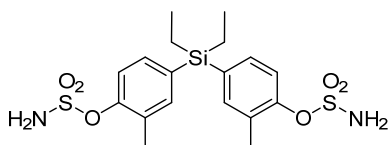
To a solution of (dimethylsilanediyl)bis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (**41b**) (70.2 mg, 0.17 mmol) in dry DMF (1 mL) was added sodium hydride (60% suspension in mineral oil, 34.4 mg, 0.79 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. To this was added methyl iodide (0.054 mL, 0.87 mmol), and stirring was continued at room temperature for 19 h. The reaction was quenched with H₂O, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1) to afford a white solid. This was recrystallized from hexane/ethyl acetate to give **43** (12.9 mg, 16.1%) as colorless needles. mp : 128-129 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.51 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 7.27 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 2.98 (s, 12H), 0.55 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ151.33, 136.46, 135.81, 121.20, 38.86, -2.25. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₇N₂O₆S₂Si 459.1080, found 459.1077 (M+H⁺).

(Diethylsilanediyl)bis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (44b)



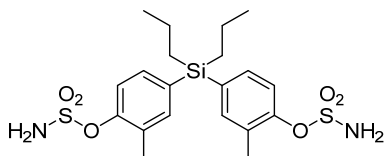
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(diethylsilanediyl)diphenol (**20b**) (y. 24.8%). Colorless crystals. mp : 175-176 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.55 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 7.32 (d, 4H, *J* = 8.6 Hz), 1.11 (t, 4H, *J* = 7.7 Hz), 0.98 (q, 6H, *J* = 7.7 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ153.17, 137.33, 135.52, 122.83, 7.57, 4.64. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₆H₂₃N₂O₆S₂Si 431.0769, found 431.0767 (M+H⁺).

(Diethylsilanediyl)bis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (45b)



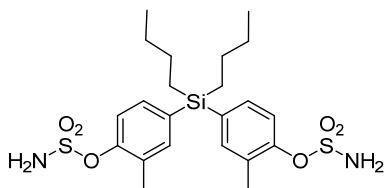
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(diethylsilanediyl)bis(2-methylphenol) (**8b**) (y. 25.1%). White solid. mp : 155-156 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.37 (s, 2H), 7.34-7.32 (m, 4H), 2.32 (s, 6H), 1.09-0.99 (m, 4H), 0.98-0.96 (m, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ151.68, 138.99, 135.57, 134.65, 132.15, 122.67, 16.65, 7.62, 1.62. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₆N₂O₆S₂SiNa 481.0899 found 481.0906 (M+Na⁺).

(Dipropylsilanediyl)bis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (46b)



The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(diethylsilanediyl)diphenol (**21b**) (y. 1.4%). White solid. mp : 100-102 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.27 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.25 (s, 2H), 7.23 (dd, 2H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 2.24 (s, 6H), 1.36 (m, 4H), 1.09 (m, 4H), 0.98 (t, 6H, *J* = 7.2 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ149.68, 138.21, 135.70, 133.72, 130.60, 121.11, 29.69, 18.44, 17.23, 16.59, 15.05. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₀H₃₀N₂O₆S₂Si 486.1315, found 486.1329 (M⁺).

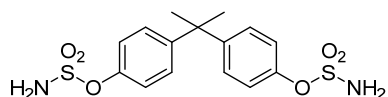
(Dibutylsilanediyl)bis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (47b)



The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(dibutylsilanediyl)bis(2-methylphenol) (**22b**) (y. 33.8%). White solid. mp : 55-56 °C. ¹H-NMR

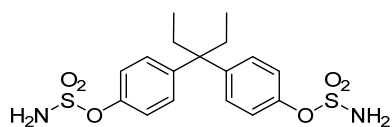
(500 MHz, CD₃OD) : δ 7.22 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.07 (2H, s), 7.01 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 2.57 (t, 4H, J = 7.7 Hz), 1.59-1.58 (m, 4H), 1.37-1.30 (m, 4H), 0.93 (t, 4H, J = 7.4 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 148.58, 142.49, 132.41, 132.40, 127.78, 123.01, 35.97, 34.97, 23.30, 16.67, 14.25. MS (FAB+) m/z : not detected.

Propane-2,2-diylbis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (41a)



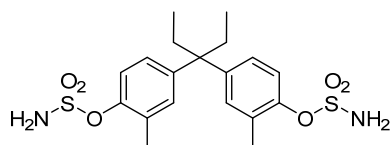
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol (y. 26%). White solid. mp : 199-201 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.30 (dd, 8H, J = 6.8, 2.2), 7.22 (dd, 8H, J = 6.8, 2.2), 1.69 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 148.85, 148.71, 127.74, 121.56, 42.25, 29.89. HRMS (FAB+) m/z : calcd for C₁₅H₁₈N₂O₆S₂ 386.0606, found 386.0621 (M⁺).

Pentane-3,3-diylbis(4,1-phenylene) bis(sulfamate) (44a)



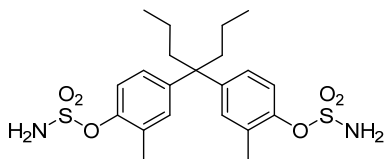
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(pentane-3,3-diyl)diphenol⁸³ (y. 26%). White solid. mp : 230-232 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.24 (d, 4H, J = 9.2 Hz), 7.21 (d, 4H, J = 9.2 Hz), 2.17 (q, 4H, J = 7.3 Hz), 0.64 (t, 6H, J = 7.3 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 147.89, 146.12, 128.91, 121.39, 48.86, 28.41, 8.26. HRMS (FAB+) m/z : calcd for C₁₇H₂₂N₂O₆S₂ 414.0919, found 414.0894 (M⁺).

Pentane-3,3-diylbis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (45a)



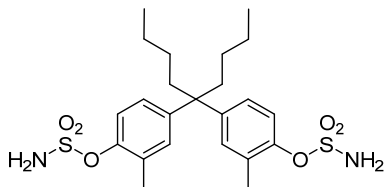
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(pentane-3,3-diyl)bis(2-methylphenol)⁸³ (y. 45%). Yellow solid. mp : 140-142 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.14 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 6.98-6.92 (m, 4H), 2.20 (s, 6H), 2.03 (q, 4H, J = 7.3 Hz), 0.52 (t, 6H, J = 7.3 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 176.57, 176.24, 160.20, 159.97, 155.82, 150.56, 78.46, 58.15, 45.07, 36.81. HRMS (FAB+) m/z : calcd for C₁₉H₂₆N₂O₆S₂ 442.1232, found 442.1255 (M⁺).

Heptane-4,4-diylbis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (46a)



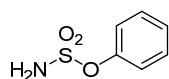
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(heptane-4,4-diyl)bis(2-methylphenol)⁸³ (y. 7.4%). White solid. mp : 180-182 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.14 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.98 (s, 2H), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 2.20 (s, 6H), 1.97-1.93 (m, 4H), 0.91-0.86 (m, 4H), 0.77 (t, 6H, *J* = 6.9 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 148.53, 148.40, 131.82, 131.79, 127.47, 122.44, 49.87, 41.06, 18.29, 16.92, 14.99. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₁H₃₀N₂O₆S₂ 470.1545, found 470.1541 (M⁺).

Nonane-5,5-diylbis(2-methyl-4,1-phenylene) bis(sulfamate) (47a)



The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4,4'-(nonane-5,5-diyl)bis(2-methylphenol)⁸³ (y. 31%). White solid. mp : 75-77 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 7.23 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.07 (d, 2H, *J* = 2.3 Hz), 7.02 (d, 2H, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 2.29 (s, 6H), 1.27 (m, 4H), 0.97-0.91 (m, 4H), 0.83 (t, 6H, *J* = 7.2). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 147.73, 146.51, 130.89, 130.33, 126.69, 120.96, 48.49, 37.14, 25.99, 23.27, 16.88, 14.01. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₃H₃₄N₂O₆S₂ 498.1858, found 498.1880 (M⁺).

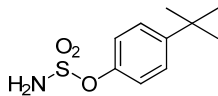
4-(*tert*-Butyl)phenyl sulfamate (48)¹⁷⁴



The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from phenol (y. 35.8%). White solid. mp : 80-81 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.44-7.37 (m, 2H), 7.34-7.29 (m, 3H), 4.95-4.88 (m, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 150.13, 130.03, 127.47, 122.18. MS (FAB+) *m/z* : 173 (M⁺).

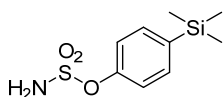
¹⁷⁴ Hanson, S.R.; Whalen, L.J.; Wong, C.H. Synthesis and evaluation of general mechanism-based inhibitors of sulfatases based on (difluoro)methyl phenyl sulfate and cyclic phenyl sulfamate motifs. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8386-8395.

4-(*tert*-Butyl)phenyl sulfamate (49)



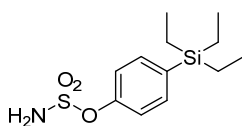
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4-(*tert*-butyl)phenol (y. 55.5%). White solid. mp : 98-100 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.42 (dd, 2H, *J* = 6.9, 2.3 Hz), 7.24 (dd, 2H, *J* = 6.9, 2.3 Hz), 4.95 (brs, 2H), 1.32 (9H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ150.57, 147.81, 126.91, 121.54, 34.70, 31.43. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₀H₁₅NO₃S 229.0773, found 229.0779 (M⁺).

4-(Trimethylsilyl)phenyl sulfamate (50)



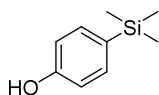
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4-(trimethylsilyl)phenol (**54**) (y. 54.2%). White solid. mp : 97-99 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.56 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 4.87 (brs, 2H), 0.24 (s, 9H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ150.71, 140.19, 135.07, 121.38, -1.08. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₉H₁₆NO₃SSi 246.0620, found 246.0617 (M+H⁺).

4-(Triethylsilyl)phenyl sulfamate (51)



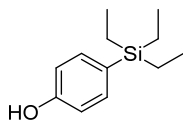
The title compound was prepared according to the procedure described for **41b**, starting from 4-(triethylsilyl)phenol (**55**) (y. 35.5%). White solid. mp : 73-75 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.53 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 4.87 (brs, 2H), 0.96 (t, 9H, *J* = 8.1 Hz), 0.79 (q, 6H, *J* = 8.1 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ150.71, 137.24, 135.87, 121.32, 7.39, 3.38, 3.17. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₂H₂₂NO₃SSi 288.1089, found 228.1089 (M+H⁺).

4-(Trimethylsilyl)phenol (54)



The title compound was prepared according to the reported method (y. 37.2%).²³ White solid. mp : 68-69 °C (lit. 73-75 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.41 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 4.77 (brs, 1H), 0.24 (9H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ156.23, 135.05, 131.72, 114.95, -0.85. MS (FAB+) *m/z* : 166 (M⁺).

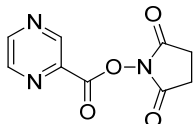
4-(Triethylsilyl)phenol (55)



The title compound was prepared according to the reported method (y. 66.7%).²³ Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.37 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 4.87 (brs, 1H), 0.95 (t, 9H, *J* = 7.9 Hz), 0.76 (q, 6H, *J* = 7.9 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ156.20, 135.88, 128.51, 114.95, 7.49, 3.58. MS (FAB+) *m/z* : 208 (M⁺).

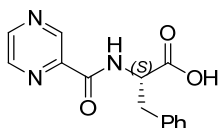
第3章 第2節

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl pyrazine-2-carboxylate (61)



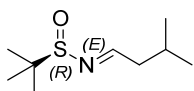
The title compound was prepared according to the reported method (y. 35.5%).¹⁰⁵ White solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ9.39 (d, 1H, *J* = 1.0 Hz), 8.88 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 8.81(dd, 1H, *J* = 2.5, 1.0 Hz), 2.94 (s, 4H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ168.62, 159.60, 149.25, 147.14, 145.09, 140.11, 25.77. MS (FAB+) *m/z* : 222 (M+H⁺).

(S)-3-Phenyl-2-(pyrazine-2-carboxamido)propanoic acid (63)



The title compound was prepared according to the reported method (y. 58.9%).¹⁰⁵ Pale yellow solid. mp :146-148 °C (lit.¹⁷⁵ 142-146 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ9.36 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 8.75 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 8.52 (dd, 1H, *J* = 2.9, 1.1 Hz), 8.29 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.30-7.20 (m, 5H), 5.12-5.08 (m, 1H), 3.35 (dd, 1H, *J* = 14.0, 5.4 Hz), 2.26 (d, 1H, *J* = 14.0, 6.6 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ174.69, 162.97, 147.49, 144.33, 143.99, 142.97, 135.58, 129.39, 128.82, 127.41, 53.29, 37.73. MS (FAB+) *m/z* : 272 (M+H⁺).

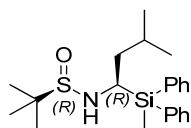
(R,E)-2-Methyl-N-(3-methylbutylidene)propane-2-sulfinamide (66)



The title compound was prepared according to the reported method (y. 61.8%).¹⁰⁶ Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ8.06 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz), 2.43-2.40 (m, 2H), 2.06 (dq, 1H, *J* = 26.9, 6.7 Hz), 1.21(s, 9H), 1.00 (dd, 1H, *J* = 6.7, 1.4 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ169.53, 56.63, 45.05, 26.27, 22.72, 22.64, 22.47. MS (FAB+) *m/z* : 190 (M+H⁺), 206(M+Li⁺).

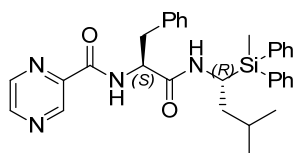
¹⁷⁵ Ivanov, A.S.; Zhálnina, A.A.; Shishkov, S.V. A convergent approach to synthesis of bortezomib: the use of TBTU suppresses racemization in the fragment condensation. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7105-7108.

(R)-2-Methyl-N-((R)-3-methyl-1-(methyldiphenylsilyl)butyl)propane-2-sulfinamide (68)



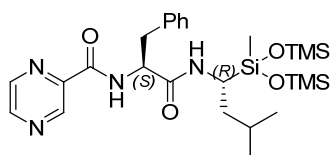
The title compound was prepared according to the reported method (y. 89.5%).¹⁰⁶ Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.57-7.55 (m, 4H), 7.53-7.25 (m, 6H), 3.42 (td, 1H, *J* = 9.7, 3.4 Hz), 2.65 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 2.00-19.8 (m, 1H), 1.57-1.51 (m, 1H), 1.45-1.39 (m, 1H), 0.99 (s, 9H), 0.89 (dd, 1H, *J* = 12.9, 6.6 Hz), 0.61(s, 9H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ135.11, 135.07, 134.63, 134.51, 129.80, 128.10, 56.43, 44.53, 42.80, 25.12, 23.67, 22.68, 21.36, -5.09. MS (FAB+) *m/z* : 388 (M+H⁺).

N-((S)-1-(((R)-3-Methyl-1-(methyldiphenylsilyl)butyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (70)



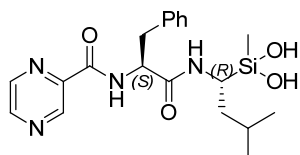
To a solution of (*R*)-2-methyl-*N*-((*R*)-3-methyl-1-(methyldiphenylsilyl)butyl)propane-2-sulfinamide (**68**) (0.22 g, 0.58 mmol) in MeOH (2 mL) was added 5% HCl MeOH solution at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 10 h, and then evaporated. To this was added (*S*)-3-phenyl-2-(pyrazine-2-carboxamido)propanoic acid (**63**) (0.16 mg 0.58 mmol), THF (3 mL), 4-methylmorpholine (0.19 mL) and 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (0.23 mg, 0.87 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 18.5 h. The reaction was quenched with H₂O, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 3/1 to 2/1) to give **70** (0.13 mg, 41.3%) as a pale yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ9.31 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 8.74 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 8.52 (dd, 1H, *J* = 2.9, 1.7 Hz), 8.16 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.46-7.18 (m, 15H), 5.42 (d, 1H, *J* = 10.3 Hz), 4.68 (dd, 1H, *J* = 15.2, 6.6 Hz), 4.29-4.27 (m, 1H), 3.07 (dd, 1H, *J* = 14.0, 6.3 Hz), 3.01 (dd, 1H, *J* = 14.0, 7.2 Hz), 1.44-1.37 (m, 1H), 1.28-1.24 (m, 2H), 0.85 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 0.72 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 0.47 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ169.55, 162.92, 147.54, 144.41, 144.01, 142.80, 136.59, 135.08, 134.93, 134.33, 129.77, 129.69, 129.34, 128.77, 128.06, 127.01, 55.06, 40.61, 38.17, 36.36, 25.03, 23.59, 21.21, -5.40. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₃₂H₃₇N₄O₂Si 537.2686, found 537.2693 (M+H⁺).

***N*-((*S*)-1-(((*R*)-1-(1,1,1,3,5,5,5-Heptamethyltrisiloxan-3-yl)-3-methylbutyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (**71**)**



To a solution of mercury(II) acetate (379 mg, 1.19 mmol) in H₂O (2 mL) added a solution of *N*-((*S*)-1-(((*R*)-3-methyl-1-(methyl-diphenylsilyl)butyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (**70**) (128 mg, 0.34 mmol) in THF (2 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 3 h, and then filtered. The filtrate was evaporated, and the residue was extracted with dichloromethane. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solution was evaporated to 2 mL, and to this was added TEA (0.4 mL) and chlorotrimethylsilane (0.21 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 2 h. The reaction mixture was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1 to 2/1) to give crude **71**. The crude **71** was purified twice by PTLC (hexane/ethyl acetate = 1:1) to give **71** (10.6 mg, 7.9%) as a pale yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ9.14 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 8.78 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 8.69 (dd, 1H, *J* = 2.9, 1.1 Hz), 7.30-7.16 (m, 5H), 4.93-4.89 (m, 1H), 3.40-3.37 (m, 1H), 3.22 (dd, 1H, *J* = 13.7, 5.7 Hz), 3.01 (dd, 1H, *J* = 13.7, 9.2 Hz), 1.59-1.56 (m, 1H), 1.55-1.45 (m, 1H), 1.29-1.21 (m, 1H), 0.88 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 0.85 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 0.09 (s, 18H), 0.02 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ172.25, 164.71, 148.83, 145.69, 144.82, 144.73, 138.25, 130.35, 129.56, 56.10, 40.32, 39.86, 39.54, 25.96, 24.01, 21.34, 1.96, -1.64. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₆H₄₅N₄O₄Si 561.2749, found 561.2748 (M+H⁺). HPLC : Purity 97.3%. Retention time = 19.7 min, [Inertsil ODS-4 (4.6 x 150 mm, 40%MeCN /H₂O to 90%MeCN /H₂O (15 min)), 1.0 mL/min, 30 °C, 254 nm].

***N*-((*S*)-1-(((*R*)-1-(Dihydroxy(methyl)silyl)-3-methylbutyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (**59**)**

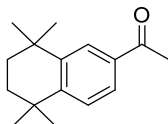


To a solution of *N*-((*S*)-1-(((*R*)-1-(1,1,1,3,5,5,5-heptamethyltrisiloxan-3-yl)-3-methylbutyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (**71**) (3.68 mg, 6.95 μmol) in CD₃OD (105 μL) was added 2%(wt) NaOD/D₂O (103 μL) at room temperature (31.6 mM). After 7 h, the analysis of the reaction using HPLC indicated a quantitative conversion to diol (**59**). ¹H-NMR (500

MHz, CD₃OD:D₂O=1:1) : δ 8.95 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.22-7.09 (m, 5H), 7.30-7.16 (m, 5H), 4.79-4.75 (m, 1H), 3.26-3.16 (m, 2H), 2.98 (dd, 1H, $J = 13.2, 9.7$ Hz), 1.42-1.36 (m, 2H), 1.27-1.22 (m, 1H), 0.74 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 0.71 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), -0.21 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD:D₂O = 1:1) : δ 172.20, 165.12, 148.26, 145.53, 145.22, 143.88, 137.86, 130.25, 129.56, 127.94, 56.35, 41.98, 39.44, 38.69, 25.94, 24.02, 21.54, -1.77. LC/MS (POS): 439 (M+Na⁺), 399 (M-H₂O+H⁺). LC/MS (NEG): 415 (M-H), 461 (M-H+2Na). HPLC : Retention time = 4.5 min, [Inertsil ODS-4 (4.6 x 150 mm, 40% MeCN / H₂O to 90% MeCN / H₂O (15 min)), 1.0 mL/min, 30 °C, 254 nm].

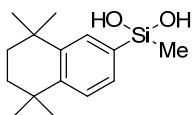
第 3 章 第 3 節

5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl-ethanone (72)



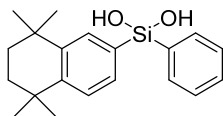
The title compound was prepared according to the reported method¹¹⁶. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ7.92 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 7.70 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.9 Hz), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 2.55 (s, 3H), 1.69 (s, 4H), 1.30 (s, 6H), 1.28 (s, 6H). HRMS (FAB+) calcd for C₁₆H₂₃O: 231.1749; found: 231.1780 (M+H⁺).

Methyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silenediol (73)



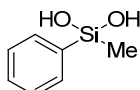
To a solution of 6-bromo-1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (**91**) (300 mg, 1.11 mmol) in dry THF (2 mL) was added isopropylmagnesium chloride lithium chloride complex solution (1.3 M, 1.44 mL, 1.44 mmol) under an Ar atmosphere at -20 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. To this was added solution of methyltrichlorosilane (0.66 mL, 2.22 mmol) in THF (1 mL) at -20 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 22 h. This was added to suspension of lithium aluminium hydride (210 mg, 5.55 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. After reaction mixture was cooled down to -78 °C, and the reaction was quenched by adding H₂O (0.21 mL), 20% NaOH aq (0.21 mL), and H₂O (0.63 mL). The reaction mixture was filtered through a Celite pad and extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane) to give a crude oil of methyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silane (73.8 mg). To solution of crude oil of methyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silane (73.8 mg) in 1,4-dioxane (1 mL) was added suspension of 5% Pd/C (10.5 mg) in H₂O (0.1 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 7 h. The reaction mixture was filtered through a celite pad and evaporated. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 2/1) to give **73** (10.1 mg, 3.4%) as a white paste. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.60 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 2.98 (s, 2H), 1.68 (s, 4H), 1.29 (s, 6H), 1.28 (s, 6H), 0.39 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ147.31, 144.36, 132.66, 131.85, 130.51, 126.16, 35.11, 34.93, 34.34, 34.18, 31.84, 31.72. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₅H₂₄O₂SiLi 271.1706, found 271.1693 (M+Li⁺).

Phenyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silane-1,3-diol (**74**)



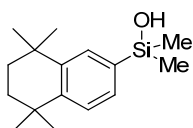
The title compound was prepared according to the procedure described for **73**, starting from phenyltrichlorosilane (y. 6.3%). White solid. mp : 98-100 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.70 (d, 2H, *J* = 6.7 Hz), 7.66 (s, 1H), 7.44-7.31 (m, 4H), 7.30 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 1.68 (s, 4H), 1.27 (s, 6H), 1.26 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ147.50, 144.35, 134.54, 134.45, 134.35, 132.75, 131.34, 130.66, 130.36, 127.90, 126.16, 35.10, 34.93, 34.36, 34.18, 31.83, 31.70. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₀H₂₆O₂SiLi 333.1862, found 333.1872 (M+Li⁺).

Methyl(phenyl)silane-1,3-diol (**75**)



To a solution of methyl(phenyl)silane (**93**) (700 μL, 5.1 mmol) in 1,4-dioxane (10 mL) was added suspension of 5% Pd/C (100 mg) in H₂O (1.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 3 h. The reaction mixture was filtered through a celite pad and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by recrystallization from hexane to give **75** (599 mg, 76.1%) as colorless crystals. mp : 83-84 °C (lit.85-86 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.61 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.42 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 7.37-7.35 (m, 2H), 3.41 (s, 2H), 0.38 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ136.03, 133.46, 130.29, 127.96, -1.80. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₇H₁₀O₂Si 154.0450, found 154.0443 (M⁺).

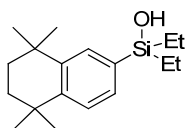
Dimethyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silanol (**76**)



To a solution of 6-bromo-1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (**91**) (200 mg, 0.74 mmol) in dry THF (2 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (1.62 M, 0.5 mL, 0.81 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. The reaction mixture was added to solution of dichlorodimethylsilane (0.17 mL, 1.48 mmol) in dry THF (2 mL) at -78 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. After reaction mixture was warmed up to room temperature, the mixture was stirred at the same temperature for 10 h. The reaction was quenched by adding 20% NaOH aq, and extracted with hexane. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated,

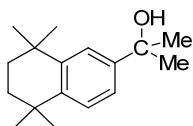
and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1) to give **76** (32.5 mg, 16.5%) as a white solid. mp : 57-59 °C. ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) : δ7.55 (s, 1H), 7.35 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 1.70 (s, 4H), 1.30 (s, 6H), 1.29 (s, 6H), 0.40 (s, 6H). ¹³C-NMR (500MHz, CDCl₃) : δ146.60, 144.23, 135.54, 131.47, 130.20, 126.06, 35.19, 35.01, 34.32, 34.21, 31.90, 31.77, 0.00. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₆H₂₆OSi 262.1753, found 262.1749 (M⁺).

Diethyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silanol (**77**)



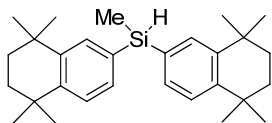
The title compound was prepared according to the procedure described for **76**, starting from dichlorodiethylsilane (y. 63.6%). Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.51 (s, 1H), 7.31 (m, 2H), 1.68 (s, 4H), 1.29 (s, 6H), 1.28 (s, 6H), 1.03 (t, 6H, *J* = 7.9 Hz), 0.85 (q, 4H, *J* = 7.9 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ146.32, 144.03, 133.64, 131.97, 130.55, 125.90, 35.15, 35.01, 34.26, 34.12, 31.88, 31.73, 6.67, 6.34. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₈H₃₀OSi 290.2066, found 290.2061 (M⁺).

Dimethyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silanol (**78**)



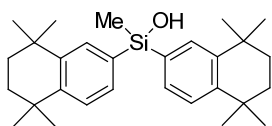
To a solution of 1-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)ethanone (**72**) (182 mg, 0.79 mmol) in dry THF (2 mL) was added methylmagnesium bromide in THF (1 M, 2.2 mL, 2.2 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred at 60 °C for 7.5 h. The reaction was quenched by adding saturated aqueous NH₄Cl, and extracted with hexane. The extract was washed with brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 20/1) to give **78** (112 mg, 57.5%) as a pale yellow solid. mp : 89-90 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.44 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.27 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.8 Hz), 7.21 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 1.68 (s, 4H), 1.57 (s, 6H), 1.29 (s, 6H), 1.28 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ145.97, 144.57, 143.23, 126.26, 122.27, 121.82, 72.46, 35.23, 35.08, 34.40, 33.98, 31.90, 31.84, 31.6. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₇H₂₆O 246.1984, found 246.1972 (M⁺).

Methylbis(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silane (**80**)



To a solution of 6-bromo-1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (**91**) (300 mg, 1.11 mmol) in dry THF (2 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (1.62 M, 0.75 mL, 1.22 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. The reaction mixture was added to a solution of phenyltrichlorosilane (0.33 mL, 2.22 mmol) in dry THF (2 mL) at -78 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. After reaction mixture was warmed up to room temperature, the mixture was stirred at the same temperature for 10.5 h. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in dry THF (2 mL). The solution was added to suspension of lithium aluminium hydride (210 mg, 5.55 mmol) in dry THF (2 mL) under an Ar atmosphere at -78 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. After reaction mixture was cooled down to -78 °C, and the reaction was quenched by adding H₂O (0.21 mL), 20% NaOH aq (0.21 mL), and H₂O (0.63 mL). The reaction mixture was filtered through a celite pad and extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane) to give **80** (42 mg, 18.1%) as a white solid. mp : 96-97 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.51 (s, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.30 (s, 2H), 4.88 (q, 1H, *J* = 3.7 Hz), 1.67 (s, 8H), 1.27 (s, 12H), 1.26 (s, 12H), 0.59 (d, 3H, *J* = 3.7 Hz). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ146.17, 144.15, 133.29, 131.94, 131.81, 126.02, 35.18, 35.04, 34.27, 34.17, 31.87, 31.76, -4.78. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₉H₄₁Si 417.2978 found 417.2976 (M-H⁺). calcd for C₂₉H₄₂Si 418.3056, found 418.3035 (M⁺).

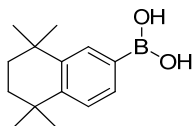
Methylbis(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silanol (**81**)



To a solution of methylbis(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)silane (**80**) (34 mg, 0.081 mmol) in 1,4-dioxane (1.5 mL) was added suspension of Pd/C (5%, 5mg) in H₂O (0.15 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 3 h. The reaction mixture was filtered through a celite pad, and evaporated. The residue was by means of purified silica gel column chromatography (hexane to hexane/ethyl acetate = 9/1) to give **81** (34 mg, 96.6%) as a white solid. mp : 131-132 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.58 (s, 2H), 7.36 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.31 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 1.68 (s, 8H), 1.28 (s, 12H), 1.27 (s, 12H), 0.64 (s, 3H). ¹³C-NMR (500

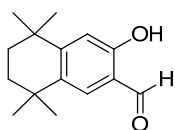
MHz, CDCl₃) : δ146.61, 144.11, 133.74, 132.40, 131.03, 125.97, 35.18, 35.01, 34.31, 34.18, 31.88, 31.74, -1.09. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₉H₄₂OSi 434.3005, found 434.3001 (M⁺).

(5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)boronic acid (82)¹⁷⁶



To a solution of 6-bromo-1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (**91**) (200 mg, 0.74 mmol) in dry THF (2 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (1.62 M, 0.5 mL, 0.81 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 0.5 h. To this was added solution of triisopropyl borate (0.34 mL, 1.48 mmol) in dry THF (2 mL) at -78 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. After reaction mixture was warmed up to room temperature, the mixture was stirred at the same temperature for 15.5 h. The reaction was quenched by adding 1N HCl, and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with brine twice, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane to hexane/ethyl acetate = 1/1) to give a solid of **82** (119.7 mg). The solid (54.9 mg) was purified by recrystallization from H₂O to give **82** (41.6 mg, 24.2%) as colorless crystals. mp : 192-193 °C (lit.190-192 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ8.21 (s, 1H), 7.96 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 1.75 (s, 4H), 1.39 (s, 6H), 1.34 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ149.77, 144.26, 134.19, 132.43, 126.24, 35.08, 35.03, 34.65, 34.18, 31.90, 31.75. MS (FAB+) *m/z* : 233 (M+H⁺).

3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carbaldehyde (94)

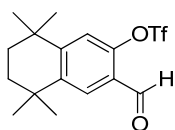


A solution of 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-ol¹¹⁶ (786 mg, 3.85 mmol) in dry THF (30 mL) was added to a mixture of dry paraformaldehyde (2.43 g, 26.95 mmol), dry magnesium chloride (2.2 g, 23.1 mmol), TEA (3.25 mL, 23.1 mmol) and dry THF (40 mL) under an Ar atmosphere at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 12.5 h and then heated under reflux for 11 h. After reaction mixture was cooled down to 60 °C, the mixture was stirred at the same temperature for 12 h. The reaction was quenched by adding 1N HCl, and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with brine twice, and then dried over MgSO₄.

¹⁷⁶ Dawson, M.I.; Jong, L.; Hobbs, P.D.; Cameron, J.F.; Chao, W.R.; Pfahl, M.; Lee, M.O.; Shroot, B.; Pfahl, M. Conformational effects on retinoid receptor selectivity. 2. Effects of retinoid bridging group on retinoid X receptor activity and selectivity. *J Med Chem.* **1995**, 38, 3368-3383.

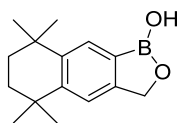
The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 2/1) to give a solid of **94** (230 mg, 25.7%) as a yellow solid. mp : 88-90 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ10.62 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 1.69 (s, 4H), 1.29 (s, 6H), 1.28 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ196.05, 158.68, 156.17, 137.32, 132.08, 119.32, 114.82, 35.25, 34.71, 34.59, 33.68, 32.01, 31.55. MS (FAB+) *m/z* : 233 (M+H⁺).

3-Formyl-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl-trifluoromethane-sulfonate (83m)



To a solution of 3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carbaldehyde (**94**) (209 mg, 0.9 mmol) in dichloromethane (2 mL) was added pyridine (0.36 mL, 4.5 mmol) and trifluoromethanesulfonic anhydride (0.33 mL, 1.98 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at the room temperature for 2 h. The reaction was quenched by adding H₂O, and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with brine twice, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane to hexane/ethyl acetate = 9/1) to give a solid of **83m** (166 mg, 50.5%) as a yellow oil. mp : 57-60 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ10.17 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 1.72 (s, 4H), 1.32 (s, 6H), 1.30 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ186.60, 154.88, 147.47, 146.38, 129.63, 125.92, 120.35, 35.37, 34.45, 34.37, 34.18, 31.59, 31.37. MS (FAB+) *m/z* : 365 (M+H⁺).

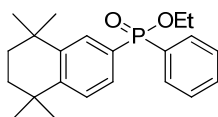
5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphtho[2,3-c][1,2]oxaborol-1(3H)-ol (83)



1,4-dioxane (3 mL) was added to a mixture of 3-formyl-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl-trifluoromethanesulfonate (**83m**) (158 mg, 0.434 mmol), bis(pinacolato)diboron (165 mg, 0.65 mmol), dichlorobis(triphenylphosphine) palladium (30 mg, 0.043mmol) and potassium acetate (128 mg, 1.3 mmol) under an Ar atmosphere at room temperature, and the mixture was stirred at 80 °C for 13 h and then at room temperature for 10.5 h. The reaction was evaporated, and the residue was purified silica gel column chromatography (hexane to hexane/ethyl acetate = 10/1) to give a crude oil of 5,5,8,8-tetramethyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carbaldehyde (80.8 mg). To a suspension of sodium borohydride (9.8 mg) in MeOH (1 mL) was added solution of crude 5,5,8,8-tetramethyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-

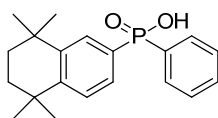
1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carbaldehyde (80.8 mg) in MeOH (1 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 2.5 h, and then 1N HCl was added to adjust pH 1-3 at 0 °C. After being stirred for 1h, the mixture was extracted with ethyl acetate and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **83** (8.8 mg, 8.3%) as a pale white solid. mp : 157-159 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.74 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 5.07 (s, 2H), 1.71 (s, 4H), 1.32 (s, 6H), 1.31 (s, 6H), 0.39 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ150.88, 148.72, 144.28, 128.74, 118.94, 71.16, 35.06, 34.99, 34.87, 34.42, 32.19, 32.01. MS (FAB+) *m/z* : 378 (M+MBA-H⁺).

Ethyl phenyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)phosphinate (**84**)



A mixture of TEA (0.47 mL, 3.33 mmol) and toluene (1.5 mL) was added to a mixture of 6-bromo-1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (**91**) (300 mg, 1.11 mmol), tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (0.26 mg 0.22 mmol), ethyl phenylphosphinate (0.21 mL, 1.39 mmol) and toluene (1.5 mL) under an Ar atmosphere at room temperature, and the mixture was stirred under reflux for 11.5 h and then at room temperature for 13.5 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane) to give **84** (38.3 mg, 9.7%) as a yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.84-7.82 (m, 3H), 7.52-7.42 (m, 4H), 7.36-7.33 (m, 1H), 4.11 (m, 2H), 1.68 (s, 4H), 1.36 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz), 1.27 (s, 6H), 1.26 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : 149.38, 149.37, 145.31, 145.22, 131.84, 131.84, 131.62, 161.54, 130.31, 130.22, 128.70, 128.42, 128.32, 127.58, 126.85, 126.75, 60.94, 60.90, 34.87, 34.75, 34.52, 34.37, 31.73, 31.61, 16.53, 16.48. MS(FAB+) *m/z* : 357 (M+H⁺). HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₂H₃₀O₂P 357.1983, found 357.1982 (M+H⁺).

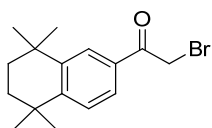
Phenyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)phosphinic acid (**85**)



A solution of ethyl phenyl(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)phosphinate (**84**) (26 mg, 0.074 mmol) in 6N HCl was stirred at 90 °C for 5 h, and then at room temperature for 11 h. The mixture was extracted with ethyl acetate and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography

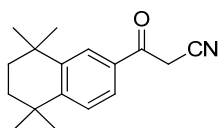
(hexane/ethyl acetate = 1/1 to EtOH/ ethyl acetate = 1/1) to give **85** (5.8 mg, 23.9%) as a pale yellow solid. mp : 153-155 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.74-7.70 (m, 3H), 7.44-7.40 (m, 2H), 7.35-7.26 (m, 3H), 7.29-7.26 (m, 1H), 1.65 (s, 4H), 1.23 (s, 6H), 1.20 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ131.52, 131.22, 131.13, 129.69, 129.60, 128.20, 128.10, 127.99, 126.68, 126.57, 34.90, 34.79, 34.48, 34.31, 31.70, 31.62. MS (FAB+) *m/z* : 329 (M+H⁺). HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₀H₂₆O₂P 329.1670, found 329.1690 (M+H⁺).

2-Bromo-1-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)ethanone (**89**)



To a solution of 1-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)ethanone (**72**) (357 mg, 1.55 mmol) in MeCN (6 mL) was added *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (442 mg, 2.32 mmol) and *N*-bromosuccinimide (276 mg, 1.55 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred under reflux for 2 h. After reaction mixture was cooled down to room temperature, the solvent was evaporated. The residue was dissolved in hexane (10 mL), washed with water (10 mL x 2) and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 99/1 to 50/1) to give **89** (420 mg, 87.6%) as a pale yellow solid. mp : 59-60 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.97 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.71 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.8 Hz), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 4.42 (s, 2H), 1.71 (s, 4H), 1.32 (s, 6H), 1.30 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ191.19, 151.92, 145.79, 131.41, 127.63, 127.12, 125.99, 34.81, 34.76, 34.66, 34.43, 31.73, 31.54, 30.89. MS (FAB+) *m/z* : 309 (M+H⁺).

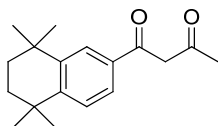
3-Oxo-3-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)propanenitrile (**86**)



To a solution of 2-bromo-1-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)-ethanone (**89**) (200 mg, 0.749 mmol) in 95% EtOH (1 mL) was added a solution of potassium cyanide (146 mg, 2.25 mmol) in H₂O (1 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 17 h. The reaction mixture was extracted with dichloromethane. The extract was washed with brine and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1) to give **86** (93.5 mg, 48.9%) as a pale yellow solid. mp : 61-63 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.90 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.62 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.8 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 4.04 (s, 2H), 1.71 (s, 4H), 1.31 (s, 6H), 1.30 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ186.82, 152.87, 146.21, 13.81, 127.44, 127.15,

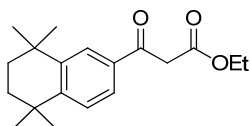
125.48, 114.00, 34.90, 34.65, 34.54, 34.46, 31.72, 31.50, 29.20. MS(FAB+) m/z : 256 ($M+H^+$). HRMS (FAB+) m/z : calcd for $C_{17}H_{22}NO$ 256.1701, found 256.1708 ($M+H^+$).

1-(5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)butane-1,3-dione (87)



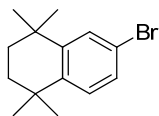
To a suspension of sodium hydride (50 mg of a 50% suspension in mineral oil, 1.05 mmol) in ethyl acetate (0.5 mL) was added a solution of 1-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)-ethanone (**72**) (242 mg, 1.05 mmol) in ethyl acetate (0.25 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 12 h. Saturated aqueous NH_4Cl was then carefully added and mixture was acidified to pH 5 with 1N HCl. The mixture was extracted with ethyl acetate and then dried over $MgSO_4$. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 20/1) to give **87** (71 mg, 24.8%) as a pale yellow solid. mp : 64-66 °C. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.85 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.5, 1.8$ Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 6.13 (s, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.70 (s, 4H), 1.31 (s, 6H), 1.29 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 192.92, 184.11, 150.01, 145.40, 132.18, 126.90, 125.50, 124.11, 96.36, 34.91, 34.79, 34.63, 34.41, 31.79, 31.63, 25.67. MS(FAB+) m/z : 273 ($M+H^+$). HRMS (FAB+) m/z : calcd for $C_{18}H_{25}O_2$ 273.1855, found 273.1871 ($M+H^+$).

Ethyl 3-oxo-3-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)propanoate (88)



To a suspension of sodium hydride (153 mg of a 50% suspension in mineral oil, 3.19 mmol) in toluene (2 mL) was added diethyl carbonate (404 mg, 3.42 mmol) and a solution of 1-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)ethanone (**72**) (263 mg, 1.14 mmol) in toluene (1 mL) at room temperature, and the mixture was stirred under reflux for 5h. To this was added glacial AcOH (0.9 mL) and ice-water. The mixture was extracted with ethyl acetate and then dried over $MgSO_4$. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 20/1) to give **88** (250 mg, 72.7%) as a pale yellow solid. mp : 51-52 °C. 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) : δ 7.87 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 7.66 (dd, 1H, $J = 8.5, 1.8$ Hz), 7.48 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 4.14 (s, 2H), 4.10 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz), 1.65 (s, 4H), 1.26 (s, 6H), 1.25 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) : δ 193.06, 167.79, 150.82, 144.94, 133.42, 127.05, 126.70, 125.48, 60.52, 45.55, 34.39, 34.26, 34.14, 34.02, 31.37, 31.18, 13.98. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $C_{19}H_{27}O_3$ 303.1960, found 303.7069 ($M+H^+$).

6-Bromo-1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (91)¹¹⁹

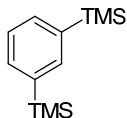


A solution of NaNO₂ (1.78 g, 29.5 mmol) in H₂O (5.16 mL) was added to a mixture of 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-amine¹¹⁹ (**90**) (6 g, 29.5 mmol) in 48% HBr (5.16 mL) and H₂O (51.6 mL) at 0 °C and stirred for 0.5 h. The mixture was added to a mixture of CuBr (9.0g 73.8 mmol) in 48% HBr (25 mL) and H₂O (30 mL). After being stirred at 60 °C for 0.5 h, the mixture was extracted with ethyl acetate and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by Kugelrohr distillation to give **91** (2.66 g, 33.7%) as a colorless oil.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.40 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 7.22 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.9 Hz), 7.16 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 1.67 (s, 4H), 1.26 (s, 6H), 1.25 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ147.41, 143.87, 129.43, 128.64, 128.46, 119.35, 34.87, 34.83, 34.48, 34.08, 31.87, 31.73. MS (FAB+) *m/z* : 268 (M+H⁺).

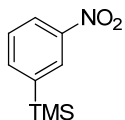
第 4 章 第 2 節

1,3-Bis(trimethylsilyl)benzene (**97b**)



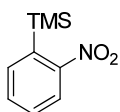
To a solution of 1,3-dibromobenzene (2.0 g 8.48 mmol) in THF (5 ml) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (1.62 M, 15.7 mL, 25.4 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. To this was added Trimethylsilyl chloride (2.93 ml, 33.9 mmol) at -78 °C. After reaction mixture was warmed up to room temperature, the mixture was stirred at the same temperature for 14 h. The reaction was quenched by adding 1N HCl aq, and extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified silica gel column chromatography (hexane) to give **97b** (1.28 g, 67.2%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (s, 1H), 7.52 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 7.34-7.33 (m, 1H), 0.27 (s, 1H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 139.45, 138.09, 133.85, 127.03, -1.09. MS (FAB+) *m/z*: not detected.

Trimethyl(3-nitrophenyl)silane (**98b**)¹²⁶



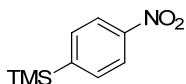
To solution of 1,3-bis(trimethylsilyl)benzene (**97b**) (1.1 g, 4.94 mmol) in acetic anhydride (3 ml) was added mixture of fuming HNO₃ (1.18 ml) and acetic anhydride (3.66 ml) at 130 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. The reaction was quenched by 0.1 N NaOH aq, and extracted with dichloromethane. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified silica gel column chromatography (hexane : ethyl acetate = 1 : 0 to 9 : 1) to give **98b** (313 mg, 32.4%) as a pale yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.20-8.17 (m, 1H), 7.82 (dd, 1H, *J* = 7.3, 1.2 Hz), 7.54-7.51 (m, 1H), 0.33 (9H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 147.80, 143.30, 139.32, 128.68, 127.74, 123.66, -1.37. MS (FAB+) *m/z*: not detected.

Trimethyl(2-nitrophenyl)silane (**98a**)¹²⁶



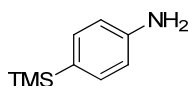
The title compound was prepared according to the procedure described for **98b**, starting from compound 1,2-bis(trimethylsilyl)benzene (**97a**) (y. 72.7%). pale yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 8.17 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.73 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.64-7.62 (m, 1H), 7.54-7.52 (m, 1H), 0.36 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 154.06, 136.88, 136.64, 133.56, 130.45, 124.39, 0.00. MS(FAB+) m/z : not detected.

Trimethyl(4-nitrophenyl)silane (**98c**)¹²⁶



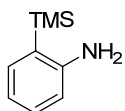
The title compound was prepared according to the procedure described for **98b**, starting from compound 1,3-bis(trimethylsilyl)benzene (**97c**) (y. 24.8%). pale yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 8.17 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.68 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 0.32 (9H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 149.87, 148.16, 134.16, 122.25, -1.42. MS (FAB+) m/z : not detected.

4-(Trimethylsilyl)aniline (**99c**)¹⁷⁷



To a solution of trimethyl(4-nitrophenyl)silane (**98c**) (417.7 mg, 2.14 mmol) in EtOH (5 mL) was added 5% Pd/C (42 mg) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 3 h under H_2 atmosphere. The reaction mixture was filtered through a celite pad and evaporated, and the residue was purified silica gel column chromatography (hexane : ethyl acetate = 1 : 0 to 9 : 1) to give **99c** (197 mg, 55.6%) as a pale yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.31 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 6.68 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 3.69 (brs, 2H), 0.22 (9H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 147.94, 135.46, 126.32, 115.47, 0.00. MS (FAB+) m/z : 165 (M^+).

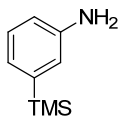
2-(Trimethylsilyl)aniline (**99a**)¹⁷⁷



The title compound was prepared according to the procedure described for **99c**, starting from compound trimethyl(2-nitrophenyl)silane (**98a**) (y. 52.9%). pale yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 6.29 (dd, 1H, $J = 7.3, 1.2$ Hz), 7.17-7.14 (m, 1H), 6.77-6.75 (m, 1H), 6.60 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 3.74 (brs, 2H), 0.33 (9H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 152.11, 135.76, 131.27, 123.36, 119.08, 116.06, 0.00. MS (FAB+) m/z : 165 (M^+).

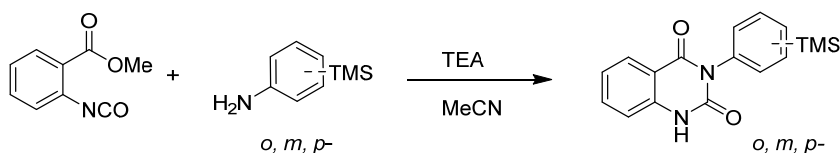
¹⁷⁷ Felix, G.; Dunogues, J.; Calas, R. Regiospecific synthesis of disubstituted benzene derivatives. *Angewandte Chemie* **1979**, 91, 430-432.

3-(Trimethylsilyl)aniline (**99b**)¹⁷⁷



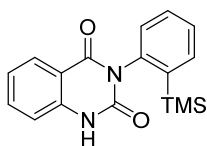
The title compound was prepared according to the procedure described for **99c**, starting from compound trimethyl(3-nitrophenyl)silane (**98b**) (y. 64.5%). pale yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.16-7.13 (m, 1H), 6.91 (dd, 1H, *J* = 7.3, 1.2 Hz), 6.83 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 6.60 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 3.60 (brs, 2H), 0.24 (9H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ145.62, 141.51, 128.66, 123.46, 119.82, 115.62, -1.19. MS (FAB+) *m/z* :165 (M⁺).

General procedure for TMS compounds **101a-c**



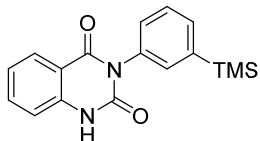
To solution of trimethylsilylaniline in MeCN was added methyl 2-isocyanatobenzoate (1.05 eq) and TEA (1.0 eq) at room temperature, and the mixture was stirred at 80 °C for 4 h. The reaction was evaporated. The residue was washed with hexane and, if necessary, recrystallized from chloroform to give **101a-c** (54.8 -91.2%).

3-(2-(Trimethylsilyl)phenyl)quinazoline-2,4(1H,3H)-dione (**101a**)



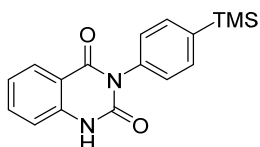
White solid (y. 54.8%), mp : 272-273 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ9.23 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.71 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.61-7.47 (m, 3H), 7.26-7.23 (m, 1H), 7.18 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 6.97 (s, 1H), 0.16 (9H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ163.47, 152.55, 140.42, 139.55, 139.23, 136.38, 135.77, 131.03, 129.51, 129.04, 128.91, 123.96, 115.87, 115.42, 0.00. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₇H₁₉N₂O₂Si 311.1216, found 311.1217 (M+H⁺).

3-(3-(Trimethylsilyl)phenyl)quinazoline-2,4(1H,3H)-dione (101b)



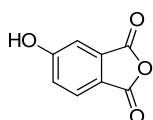
White solid (y. 89.6%), mp : >300 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ10.04 (s, 1H), 8.14 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.64 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.50-7.47 (m, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.31-7.29 (m, 1H), 7.26-7.20 (m, 1H), 6.80 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 0.28(9H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : 162.60, 151.78, 142.24, 138.77, 135.30, 134.35, 133.80, 133.13, 128.85, 128.80, 128.63, 123.43, 115.20, 114.86, 1.17. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₇H₁₉N₂O₂Si 311.1216, found 311.1219 (M+H⁺).

3-(4-(Trimethylsilyl)phenyl)quinazoline-2,4(1H,3H)-dione (101c)



White solid (y. 91.2%), mp : >300 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ9.82 (s, 1H), 8.14 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.69 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.54-7.51 (m, 1H), 7.30 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.26-7.20 (m, 1H), 6.92(d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 0.31 (9H, s). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : 162.50, 151.59, 141.51, 138.69, 135.28, 135.18, 134.45, 128.70, 127.61, 123.47, 115.22, 114.84, -1.11. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₇H₁₉N₂O₂Si 311.1216, found 311.1223 (M+H⁺).

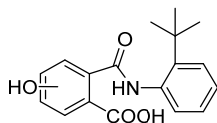
5-Hydroxyisobenzofuran-1,3-dione (110)¹⁷⁸



A solution of 4-hydroxyphthalic acid (992 mg, 5.45 mmol) in 1,2-dichlorobenzene (5 mL) was stirred under reflux for 3 h. The resulting solid was filtered and purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/1) to give **110** (753 mg, 84.2%) as a white solid. mp : 169-170 °C (lit. 171-173 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.90 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.38 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.30 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 6.36 (1H, brs). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ165.19, 163.35, 162.91, 134.26, 127.17, 122.87, 121.35, 110.70. MS (FAB+) *m/z* : 165 (M+H⁺).

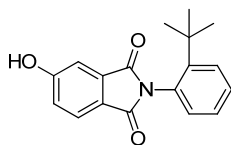
¹⁷⁸ Bentley, W.H.; Weizmann, C. IX. 4-Hydroxyphthalic and 4-methoxyphthalic acids. *J. Chem. Soc., Trans.* **1907**, 91, 98-104.

2-((2-(*tert*-Butyl)phenyl)carbamoyl)-4 or 5-hydroxybenzoic acid (**112**)



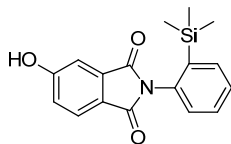
To a solution of 5-hydroxyisobenzofuran-1,3-dione (**110**) (90 mg, 0.55 mmol) in toluene (4 mL) was added 2-*tert*-butylbenzenamine (**111**) (0.1 mL, 0.66 mmol) at room temperature. The mixture was stirred under reflux for 2 h. The resulting solid was filtered and washed with hexane to give **112** (150 mg, 89.5%) as white solid. mp : 214-215 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.90 (dd, 1H, *J* = 8.6, 4.6 Hz), 7.63-7.61 (m, 1H), 7.49-7.47 (m, 1H), 7.27-7.25 (m, 2H), 6.95-6.90 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ171.28, 171.00, 167.32, 161.34, 147.10, 141.79, 135.43, 132.90, 130.81, 127.43., 126.46, 119.19, 115.45, 113.53, 34.75, 30.08. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₀NO₄ 314.1392, found 314.1388 (M+H⁺).

2-(2-(*tert*-Butyl)phenyl)-5-hydroxyisoindoline-1,3-dione (**107**)



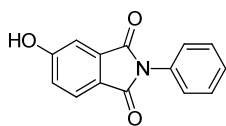
A solution of 2-((2-(*tert*-butyl)phenyl)carbamoyl)-4 or 5-hydroxybenzoic acid (**112**) (124.7 mg, 0.40 mmol) in 1,2-dichlorobenzene (2 mL) was stirred under reflux for 6 h. The resulting solid was filtered and purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 2/1) to give **107** (37.4 mg, 31.8%) as a white solid. mp : 186-188 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.80 (d, 1H, *J*=8.6 Hz), 7.62 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.4Hz), 7.44-7.40 (m, 1H), 7.34 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 7.31-7.29 (m, 1H), 7.00 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.4 Hz), 1.32 (s, 9H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ169.13, 169.11, 162.38, 149.47, 134.90, 131.44, 130.07, 129.68, 128.92, 127.48, 126.14, 123.64, 121.18, 111.18, 35.68, 31.72. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₈H₁₈NO₃ 296.1287, found 296.1299 (M+H⁺).

5-Hydroxy-2-(2-(trimethylsilyl)phenyl)isoindoline-1,3-dione (**106**)



and 5-Hydroxy-2-phenylisoindoline-1,3-dione (**108**)¹⁷⁹

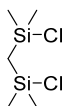
¹⁷⁹ Tetsuhashi, M.; Ishikawa, M.; Hashimoto, M.; Hashimoto, Y.; Aoyama, H. Development of tryptase inhibitors derived from thalidomide. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5323-5338.



To a solution of 5-hydroxyisobenzofuran-1,3-dione (**110**) (102 mg, 0.62 mmol) in toluene (4 mL) was added 2-(trimethylsilyl)aniline (108 mg, 0.65 mmol) at room temperature. The mixture was stirred under reflux for 5 h. The resulting solid was filtered and washed with hexane to give **108** (106 mg, 44.4%) as white solid. The filtrate was evaporated, and the residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 2/1) to give **106** (6.7 mg, 3.5%) as a pale yellow oil. Compound **106** : mp : 187-188 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.81 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.68 (dd, 1H, *J* = 7.4, 1.7 Hz), 7.51-7.44 (m, 2H), 7.35 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 7.15-7.11 (m, 2H), 0.17 (s, 9H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ168.30, 168.30, 161.78, 140.40, 136.35, 135.97, 134.83, 130.49, 129.32, 129.04, 126.07, 123.89, 121.05, 111.00, -0.36. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₇H₁₇NO₃Si 312.1056, found 312.1061(M+H⁺). Compound **108** : mp : 260-261 °C (lit. 260-261 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ7.75(d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.48-7.46 (m, 2H), 7.39-7.37 (m, 3H), 7.24-7.23 (m, 1H), 7.16-7.14 (m, 1H). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ167.46, 167.43, 164.00, 134.55, 132.23, 128.56, 127.60, 126.75, 125.30, 122.05, 120.58, 109.79. MS (FAB+) *m/z* : 312 (M+H⁺).

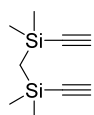
第3章 第3節

Bis(chlorodimethylsilyl)methane (**135**)¹⁸⁰



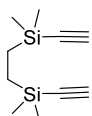
A mixture of dimethylchloromethylchlorosilane (**135**) (20.1 mL, 0.153 mol) and Me_2SiCl_2 (**133**) (55.3 mL, 0.460 mol) in THF (32.5 mL) was added dropwise to a solution of Mg (chips, 4.06 g, 0.167 mol) in THF (10 mL) at 60 °C. The reaction mixture was refluxed with stirring for 20 h and the precipitate was removed by filtration. The solvent and unconsumed Me_2SiCl_2 were distilled off. Then the reaction mixture was distilled and the fraction with bp 75-80 °C (10 mmHg) was collected (8.98 g, 29%). This material was used in the next step without further purification. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 0.51 (s, 12H), 0.58 (s, 2H).

Bis(ethynyldimethylsilyl)methane (**138**)¹⁸¹



To a solution of bis(chlorodimethylsilyl)methane (**135**) (5.79 g) in THF was added 130 mL of ethylmagnesium chloride solution in THF (0.5 M). The mixture was stirred for 1 h at room temperature, refluxed at 95 °C for 1 h, then poured into sat. NH_4Cl aq and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water, sat. NaHCO_3 aq and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 , concentrated *in vacuo* and distilled. The fraction with bp 40-45 °C (5 mmHg) was collected. Bis(ethynyldimethylsilyl)methane (**138**) was isolated in a yield of 1.09 g (21%). $^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3) δ 2.40 (s, 2H), 0.26 (s, 12H), 0.04 (s, 2H). MS (FAB+) m/z : not detected.

Bis(ethynyldimethylsilyl)ethane (**139**)¹⁵³



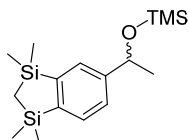
To a solution of bis(chlorodimethylsilyl)ethane (**137**) (5.0 g) in THF was added 104 mL of ethylmagnesium chloride solution in THF (0.5 M). The reaction mixture was stirred for 1 h at room

¹⁸⁰ Chizhova, N.V.; Astapova, T.V.; Petrovskii, P.V.; Makarova, N.N. Synthesis of difunctional organooxasilacycloalkanes. *Russian Chemical Bulletin* **2000**, 49, 1430-1435.

¹⁸¹ 特許文献 WO 2005005443 A1

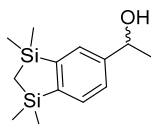
temperature, refluxed at 95 °C for 1 h, then poured into sat. NH₄Cl aq and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water, sat. NaHCO₃ aq and brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. Bis(ethynyldimethylsilyl)ethane (**139**) was isolated in quantitative yield. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ2.38 (s, 2H), 0.62 (s, 4H), 0.18 (s, 12H). MS (FAB+) *m/z* : not detected.

1,1,3,3-Tetramethyl-5-[1-(trimethylsilyloxy)ethyl]-2,3-dihydrobenzo[d][1,3]disilole (141)



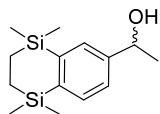
To a solution of **138** (0.516 g, 2.86 mmol) and 3-trimethylsilyloxy-1-butyne (0.249 mL, 1.43 mmol) in xylene (2 mL) was added dicarbonylcyclopentadienyl cobalt (I) (38.1 μL, 0.286 mmol). The reaction mixture was refluxed at 170 °C for 9 h, and then concentrated *in vacuo*. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate=20:1) and the product was used in the next step without further purification. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.51 (s, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.28 (dd, 1H, *J* = 7.0, 2.0 Hz), 4.87 (s, 1H), 2.30 (d, 3H, *J* = 25 Hz), 0.29 (s, 12H), 0.09 (s, 9H), -0.05 (s, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ136.68, 133.48, 131.65, 128.67, 126.06, 125.87, 70.96, 26.87, 0.72, 0.60, 0.27, -0.08, -2.20, -2.38. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

1-(1,1,3,3-Tetramethyl-2,3-dihydrobenzo[1,3]disilol-5-yl)ethanol (143)



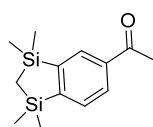
The oil **141** was diluted with MeOH (2 mL) and AcOH (0.5 mL) was added to the solution. The mixture was refluxed for 28 h at 95 °C, poured into sat. NaHCO₃ aq and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford a colorless oil. This oil was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 4:1) to give **142** as a colorless oil (32.3 mg, 14% (2 steps)). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.56 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 4.91 (m, 1H), 1.52 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 0.29 (m, 12H), -0.04 (s, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ155.14, 149.90, 145.97, 132.08, 128.71, 126.03, 70.81, 25.14, 0.65, -2.22. MS (FAB+) *m/z* : 233 (M-OH⁺).

1-(1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[b][1,4]disilin-6-yl)ethan-1-ol (124)¹⁸²



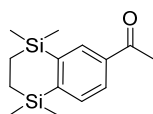
The title compound was prepared according to the procedure described for compound **143**, starting from compound **137**. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ7.49 (m, 2H), 7.36 (dd, 1H, *J* = 7.5, 2.0 Hz), 4.88 (q, 1H, *J* = 6.0 Hz), 1.51 (d, 3H, *J* = 6.5), 1.01 (s, 4H), 0.23 (s, 6H), 0.22 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ146.34, 145.27, 145.15, 133.86, 130.48, 125.29, 70.74, 25.06, 7.65, 7.58, -1.38, -2.39. MS (FAB+) *m/z*: 247 (M-OH⁺).

1-(1,1,3,3-Tetramethyl-2,3-dihydrobenzo[1,3]disilol-5-yl)ethanone (120)¹⁸³



To a solution of **143** (35.0 mg, 0.699 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL), MnO₂ (250.4 mg, 1.44 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature, then filtered and the solvents were removed under vacuum. The residue was purified by means of silica gel chromatography, affording 1-(1,1,3,3-tetramethyl-2,3-dihydrobenzo[1,3]disilol-5-yl)ethanone (**120**) in a yield of 10.4 mg (33%) as a yellow solid. mp: 34-36 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ8.10 (d, 1H, *J* = 1.0 Hz), 7.91 (dd, 1H, *J* = 7.3, 2.0 Hz), 7.65 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 2.62 (s, 3H), 0.33 (s, 6H), 0.31 (s, 6H), 0.01 (s, 2H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ199.16, 157.21, 151.16, 136.94, 131.99, 131.08, 128.24, 26.87, 0.56, 0.37, -2.35. MS (FAB+) *m/z*: 249 (M+H⁺).

1,1,4,4-Tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo-1,4-disilin-6-yl-ethanone (118)¹⁵³

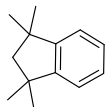


The title compound was prepared according to the procedure described for compound **120**, starting from compound **124**. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ8.05 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.86 (dd, 1H, *J* = 7.0, 2.0 Hz), 7.59 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 2.60 (s, 3H), 1.03 (s, 4H), 0.26 (s, 6H), 0.24 (s, 6H). HRMS (FAB+) *m/z*: calcd for C₁₄H₂₃OSi₂: 263.1287; found: 263.1284 (M+H)⁺.

¹⁸² Doszczak, L.; Reinhold Tacke, R. Syntheses of 1,3-Disilaindanes, 1,4-Disilatetralines, and 1,3-Disila-1,3-dihydroisobenzofuranes Using Cobalt-Catalyzed [2+2+2] Cycloadditions. *Organometallics* **2007**, *26*, 5722-5723.

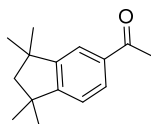
¹⁸³ Metz, S.; Natscher, J.B.; Burschka, C.; Gotz, K.; Kaupp, M.; Kraft, P.; Tacke, R. Disila-Phantolide and Derivatives: Synthesis and Olfactory Characterization of Silicon-Containing Derivatives of the Musk Odorant Phantolide *Organometallics* **2009**, *28*, 4700-4712.

1,1,3,3-Tetramethyl-2,3-dihydro-1H-indene (145)



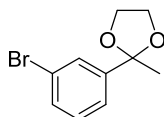
To a solution of trimethylaluminium in toluene (23.3 mL, 42 mmol, 1.8 M) was added dropwise a solution of 1,3-indanedione (**144**) (3.07 g, 21.0 mmol) in toluene (80 mL). The reaction mixture was refluxed at 130 °C for 24 h. The reaction was quenched with ice-water and the whole was extracted with hexane. The organic layer was washed with water and brine, and dried over MgSO₄. The organic layer was concentrated *in vacuo* and purified by means of silica gel column chromatography using hexane. The product was used in the next step without further purification.

1-(1,1,3,3-Tetramethyl-2,3-dihydro-1H-inden-5-yl)ethanone (**119**)¹⁸⁴



To a solution of **145** (393.0 mg) in dehydrated CH₂Cl₂ (4 mL) was added AlCl₃ (451.0 mg, 3.38 mmol) and acetyl chloride (0.240 mL, 3.38 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C for 2 h, then poured into water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water, sat. NaHCO₃ aq and brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 50:1) to give a colorless oil (198.3 mg, 4.4% (2 steps)). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.82 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 7.73 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 7.19 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 2.60 (s, 3H), 1.95 (s, 2H), 1.34 (s, 6H), 1.32 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ198.26, 157.27, 151.99, 136.52, 127.83, 122.69, 56.54, 42.81, 42.57, 31.55, 31.32, 26.84. MS (FAB+) *m/z* : 217(M+H⁺).

2-(3-Bromophenyl)-2-methyl-1,3-dioxolane (**147a**)

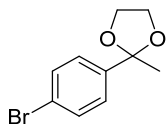


A mixture of 3-bromoacetophenone **146a** (3.30 mL, 25.0 mmol), ethylene glycol (2.33 g, 37.5 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid (238 mg, 1.25 mmol) in 180 mL of dry benzene was heated at reflux in a flask equipped with a Dean-Stark apparatus. After 8 h, ethylene glycol (1.55 g, 25 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 31 h, then washed with 1 N NaHCO₃, H₂O, and brine, and dried over Na₂SO₄. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 20:1) to give 2-(3-bromophenyl)-2-methyl-1,3-

¹⁸⁴ 特許文献 US 20050148590 A1

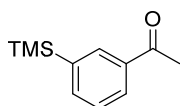
dioxolane (**147a**) as a colorless liquid (2.42g, 40%). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.64 (m, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.21 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.04 (m, 2H), 3.77 (m, 2H), 1.63 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ145.93, 131.01, 129.99, 128.62, 124.08, 122.49, 108.24, 64.63, 27.65. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

2-(4-Bromophenyl)-2-methyl-1,3-dioxolane (**147b**)¹⁸⁵



A mixture of 4-bromoacetophenone **146b** (4.98 g, 25.0 mmol), ethylene glycol (2.33 g, 37.5 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid (238 mg, 1.25 mmol) in 180 mL of dry benzene was heated at reflux in a flask equipped with a Dean-Stark apparatus. After 8 h, ethylene glycol (1.55 g, 25 mmol) was added and the mixture was refluxed for 31 h. The mixture was washed with 1 N NaHCO₃, H₂O, and brine and dried over Na₂SO₄. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 20:1) to give 2-(4-bromophenyl)-2-methyl-1,3-dioxolane (**147b**) as colorless prisms (1.86 g, 31%). mp : 34-36 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.46 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.36 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 4.03 (m, 2H), 3.75 (m, 2H), 1.63 (s, 3H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ142.54, 131.41, 127.26, 121.98, 108.56, 64.57, 27.62. MS (FAB+) *m/z* : not detected.

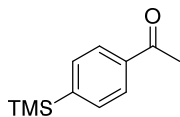
3-(Trimethylsilyl)acetophenone (**122**)¹⁸⁵



To a solution of Mg powder (55.7 mg, 2.29 mmol) and trimethylsilyl chloride (0.33 mL, 2.58 mmol) was added a solution of **147a** (500 mg, 2.07 mmol) in 6 mL of THF. The mixture was heated at reflux for 1.5 h, and stirred overnight at room temperature, then diluted with ether and washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 50:1) to give 3-(trimethylsilyl)acetophenone (**122**) (24.5 mg, 6%) as colorless crystals. mp : 194-200 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ8.10 (s, 1H), 7.93 (dt, 1H, *J* = 8.0, 1.5 Hz), 7.72 (dt, 1H, *J* = 7.5, 1.5 Hz), 7.45 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 2.62 (s, 3H), 0.30 (s, 9H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ198.76, 141.37, 138.12, 136.40, 133.00, 128.89, 128.00, 26.76, -1.12. MS (FAB+) *m/z* : 193 (M+H⁺).

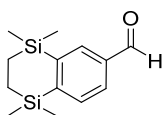
¹⁸⁵ Yamakawa, T.; Kagechika, H.; Kawachi, E.; Hashimoto, Y.; Shudo, K. Retinobenzoic acids. 5. Retinoidal activities of compounds having a trimethylsilyl or trimethylgermyl group(s) in human promyelocytic leukemia cells HL-60. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1430-1437.

4-(Trimethylsilyl)acetophenone (**123**)¹⁸⁵



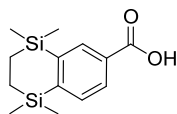
To a solution of Mg powder (55.7 mg, 2.29 mmol) and trimethylsilyl chloride (0.33 mL, 2.58 mmol) was added a solution of **147b** (500 mg, 2.07 mmol) in 6 mL of THF. The mixture was heated at reflux for 1.5 h, stirred overnight at room temperature, then diluted with ether, and washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 50:1) to give 4-(trimethylsilyl)acetophenone (**123**) (91.7 mg, 23%) as a colorless liquid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.93 (dd, 2H, *J* = 6.5, 1.5 Hz), 7.62 (dd, 2H, *J* = 6.5, 1.5 Hz), 2.60 (s, 3H), 0.29 (s, 9H), ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ198.46, 147.30, 137.19, 133.60, 133.55, 127.30, 127.24, 26.73, 26.67, -1.25, -1.32. MS (FAB+) *m/z* : 193 (M+H⁺).

1,1,4,4-Tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[1,4]disilole-6-carbaldehyde (**125**)



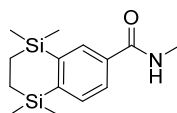
A mixture of iodine (96.8 mg, 381 μmol of I₂), zinc (249 mg, 3.80 mmol) and MeCN (18 mL) was stirred at 20 °C until the brown coloration disappeared and a grey suspension was obtained. Compound **139** (3.70 g, 19.0 mmol), **149** (3.80 mL, 26.6 mmol) and cobalt (II) bromide in 9 mL of MeCN (415.6 mg, 1.90 mmol) were then added sequentially in single portions to the stirred mixture. The resulting dark green solution was stirred at 20 °C for 16 h. Then, hydrochloric acid (2 M, 18.5 mL) was added and the reaction mixture was stirred at 20 °C for 30 min. Ethyl acetate was added and the organic phase was separated and washed with brine. The aqueous phases were combined, extracted with a further portion of ethyl acetate and discarded. The organic phases were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The resulting brown oil was purified by means of flash column chromatography (*n*-hexane/CH₂Cl₂ = 50:1) to yield 1.32 g of a yellow oil. This material was used in the next step without further purification. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 10.01 (s, 1H), 7.95 (d, 1H, *J* = 1.0 Hz), 7.79 (dd, 1H, *J* = 7.5, 2.0 Hz), 7.66 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 1.04 (s, 4H), 0.27 (s, 6H), 0.26 (s, 6H) ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ193.21, 154.78, 147.11, 135.44, 134.44, 134.06, 128.63, 7.41, 7.31, -1.54, -1.66. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₃H₂₀OSi₂: 248.1053; found: 249.1045 (M+H⁺).

1,1,4,4-Tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[1,4]disilole-6-carboxylic acid (**126**)¹⁸⁶



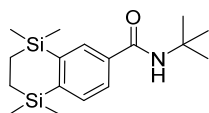
A mixture of Oxone[®] (6.53 g, 10.6 mmol), **125** (1.32 g, 5.31 mmol) in 20 mL of DMF was stirred overnight at room temperature, then diluted with ethyl acetate, and washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 5:1) to give **126** as a white solid (448.1 mg, 9%). mp : 134-136 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ8.20 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 8.02 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.5 Hz), 7.61 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 1.04 (s, 4H), 0.27 (s, 6H), 0.25 (s, 6H) ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ172.70, 153.58, 146.53, 134.65, 133.63, 129.12, 128.47, 7.47, 7.36, -1.55, -1.64. MS (FAB+) *m/z* : 264 (M+H⁺).

1,1,4,4-Pentamethyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo-1,4-disilole-6-carboxamide (**127**)



Methylamine solution in 40% MeOH (0.341 mmol, 34.8 μL) was added to a solution of **126** (0.227 mmol, 60 mg), EDC hydrochloride (0.341 mmol, 65.4 mg), HOBt (0.341 mmol, 52.2 mg) in DMF (5 mL) and stirred at room temperature overnight, then diluted with ethyl acetate, and washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 5:1) to give **127** as a white solid (8.2 mg, 11%). mp : 132-134 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.86 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 7.66 (dd, 1H, *J* = 7.8, 2.0 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.24 (s, 1H), 3.01 (d, 3H, *J* = 4.0 Hz), 1.02 (s, 4H), 0.24 (s, 6H), 0.23 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ168.78, 150.20, 146.62, 133.88, 133.67, 131.49, 125.97, 26.92, 7.53, 7.40, -1.49, -1.55. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₄H₂₃OSi₂: 277.1318; found: 278.1337 (M+H⁺).

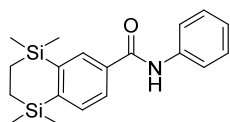
N-tert-Butyl-1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo-1,4-disilole-6-carboxamide (**129**)



¹⁸⁶ Gluyas, J.B.; Burschka, C.; Dörrich, S.; Vallet, J.; Gronemeyer, H.; Tacke, R. Disila-analogues of the synthetic retinoids EC23 and TTNN: synthesis, structure and biological evaluation. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6914-6929.

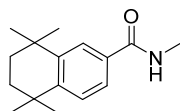
tert-Butylamine (0.341 mmol, 35.9 μ L) was added to a solution of **126** (0.227 mmol, 60 mg), EDC hydrochloride (0.341 mmol, 65.4 mg) and DMAP (0.341 mmol, 41.7 mg) in DMF (5 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight, diluted with , ethyl acetate and washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 5:1) to give **129** as a white solid (12.2 mg, 17%). mp : 154-157 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.87 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 7.56 (dd, 1H, *J* = 7.8, 2.0 Hz), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 5.92 (s, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.02 (s, 4H), 0.25 (s, 6H), 0.22 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 167.49, 149.87, 146.68, 135.08, 133.49, 131.68, 125.52, 51.68, 28.97, 7.56, 7.41, -1.52, -1.55. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₇H₂₉OSi₂: 319.1788; found: 320.1808 (M+H⁺).

1,1,4,4-Tetramethyl-*N*-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo-1,4-disilole-6-carboxamide (**131**)



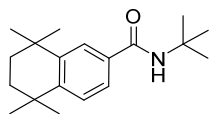
Aniline (0.341 mmol, 31.0 μ L) was added to a solution of **126** (0.227 mmol, 60 mg), EDC hydrochloride (0.341 mmol, 65.4 mg), DMAP (0.341 mmol, 41.7 mg) in DMF (5 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight, then diluted with , ethyl acetate and washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (*n*-hexane / ethyl acetate = 5:1) to give **131** as a white solid (72.3 mg, 94%). mp : 149-152 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.99 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 7.76 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.5 Hz), 7.71 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.36 (t, 2H, *J* = 7.5, 7.0 Hz) 7.15 (t, 1H, *J* = 7.5, 7.3 Hz) 1.05 (s, 4H), 0.27 (s, 6H), 0.26 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 166.45, 150.92, 147.02, 138.12, 134.27, 133.79, 131.83, 129.15, 125.96, 124.61, 120.36, 7.53, 7.39, -1.50, -1.53. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₉H₂₅OSi₂: 339.1475; found: 340.1496 (M+H⁺).

5,5,8,8-Pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carboxamide (**128**)



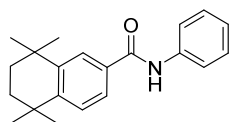
The title compound was prepared according to the reported method.¹⁵¹ mp: 137-138 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.74(d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.44 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.04 (brs, NH), 1.69 (s, 4H), 1.30 (s, 6H), 1.28 (s, 6H). HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₆H₂₃NO: 246.1858; found: 246.1822 (M+H⁺).

***N*-tert-Butyl-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carboxamide (130)**



The title compound was prepared according to the reported method.¹⁵¹ mp: 154-156 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.77 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.36 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 5.89 (brs, NH), 1.69 (s, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.30 (s, 6H), 1.27 (s, 6H). MS (FAB+) *m/z* : 288 (M+H⁺).

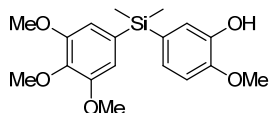
5,5,8,8-Tetramethyl-*N*-phenyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2-carboxamide (132)



The title compound was prepared according to the reported method.¹⁵¹ mp: 124-127°C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.86 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.72 (brs, NH), 7.64 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 7.55 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.37 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 7.15 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz), 1.72 (s, 4H), 1.33 (s, 6H), 1.30 (s, 6H). HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₁H₂₅NO: 308.2014; found: 308.1980 (M+H⁺).

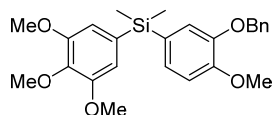
第 5 章 第 2 節

5-(Dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (**153**)

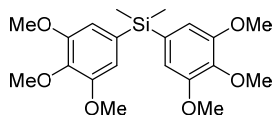


To a solution of (3,4-dimethoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**157**) (144.6 mg, 0.33 mmol) in EtOH (4 mL) was added 5% Pd/C (14.5 mg) at room temperature, and the mixture was stirred under an H₂ atmosphere at the same temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **153** (94.7 mg, 82.4%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.08 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.00 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.71 (s, 2H), 5.57 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 0.51 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ153.05, 147.67, 145.30, 139.18, 133.51, 130.49, 126.54, 119.89, 110.91, 110.50, 60.86, 56.25, 55.86, -2.02. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₅O₅Si 349.1471, found 349.1478 (M+H⁺).

(3,4-Dimethoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**157**)



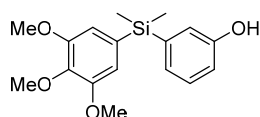
and Diethylbis(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**166**)



To a solution of 5-bromo-1,2,3-trimethoxyphenol (543.6 mg, 2.2 mmol) in dry THF (5 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (2.65 M, 0.83 mL, 2.2 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. The mixture was stirred at same temperature for 1 h, and then added to a solution of dichlorodimethylsilane (0.3 mL, 2.0 mmol) in dry THF (2.5 mL) at -78 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, and cooled to -78 °C. To this was added a solution of (3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)lithium (2.0 mmol) in dry THF at -78 °C. The mixture was stirred at the same temperature for 2 h, and at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with NH₄Cl aq, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 19/1 to 4/1) to give **157** and **166**. Compound **157** (187.2 mg, y. 21.3%), white solid. mp : 57-59 °C, ¹H-NMR (500 MHz,

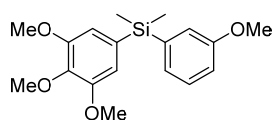
CDCl₃) : δ 7.38 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.29-7.27 (m, 1H), 7.09 (dd, 1H, J = 8.0, 1.1 Hz), 7.00 (d, 1H, J = 1.1 Hz), 6.92 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.65 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 6H), 0.47(s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.05, 150.91, 147.76, 139.16, 137.30, 133.48, 129.39, 128.56, 128.02, 127.90, 127.49, 119.91, 111.64, 110.86, 71.30, 60.86, 56.23, 55.89, -1.96. HRMS (FAB+) m/z : calcd for C₂₅H₃₀O₅Si 438.1863, found 438.1871 (M⁺). Compound **156** (218.1 mg, y. 27.8%), white solid. mp : 39-41 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 6.72 (s, 4H), 3.87 (s, 6H), 3.85 (s, 12H), 0.54 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 153.12, 139.32, 133.09, 110.99, 60.88, 56.30, -1.86. HRMS (FAB+) m/z : calcd for C₂₀H₂₉O₆Si 393.1733, found 393.1732 (M+H⁺).

3-(Dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)phenol (**158**)



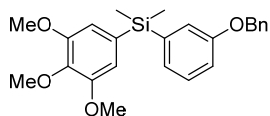
The title compound was prepared according to the procedure described for **153**, starting from compound **160**. Yield : 87.9%. White solid. mp : 104-106 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.27-7.23 (m, 1H), 7.08 (d, 1H, J = 7.0 Hz), 6.95 (d, 1H, J = 3.0 Hz), 6.85-6.83 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 4.81 (brs, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 0.53 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 155.09, 153.09, 140.33, 139.26, 133.01, 129.38, 126.55, 120.71, 116.25, 110.98, 60.87, 56.26, -2.18. HRMS (FAB+) m/z : calcd for C₁₇H₂₂O₄Si 318.1287, found 318.1291 (M⁺).

(3-Methoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**159**)



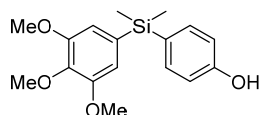
Methyl iodide (16 μ L, 0.25 mmol) was added to a mixture of 3-(dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)phenol (**158**) (61 mg, 0.19 mmol), sodium hydride (60% suspension in mineral oil, 8.4 mg, 0.21 mmol) and DMF (1 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. The reaction was quenched with H₂O, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of PTLC (hexane/ethyl acetate = 5/1) to give **159** (49.1 mg, 66.4%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.33-7.29 (m, 1H), 7.11 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 7.06 (d, 1H, J = 2.3 Hz), 6.93-6.90 (m, 1H), 6.71 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 3.80 (s, 3H), 0.54 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 159.07, 153.10, 139.90, 139.27, 133.09, 129.17, 126.51, 119.93, 114.29, 110.97, 60.87, 56.26, 55.19, -2.13. HRMS (FAB+) m/z : calcd for C₁₈H₂₅O₄Si 333.1522, found 333.1524 (M+H⁺).

(3-(Benzyloxy)phenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**160**)



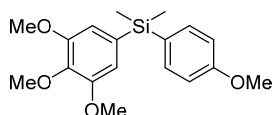
To a solution of 5-bromo-1,2,3-trimethoxyphenol (494.1 mg, 2 mmol) and 1-(benzyloxy)-3-bromobenzene (**156b**) (526.3 mg, 2 mmol) in dry THF (15 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (2.65 M, 1.51 mL, 4 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. This was stirred at the same temperature for 1 h, and then dichlorodimethylsilane (0.27 mL, 2.2 mmol) was added. The mixture was stirred at -78 °C for 2 h, and at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with NH₄Cl aq, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1) to give **160** (327.5 mg, 40.1%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.42-7.29 (m, 6H), 7.14-7.11 (m, 2H), 7.00-6.97 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.04 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 0.53 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ158.35, 153.10, 140.00, 139.27, 137.08, 133.06, 129.19, 128.68, 128.08, 127.67, 126.74, 120.86, 115.24, 110.96, 70.00, 60.87, 56.26, -2.14. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₄H₂₈O₄Si 408.1757, found 408.1762 (M⁺).

4-(Dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)phenol (**161**)



The title compound was prepared according to the procedure described for **153**, starting from compound **163**. Yield : 32.7%. White solid. mp : 97-99 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.39 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.70 (s, 2H), 5.38 (brs, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 0.51 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ156.87, 153.01, 139.03, 135.91, 133.88, 128.90, 115.16, 110.96, 60.89, 56.25, -1.91. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₇H₂₃O₄Si 319.1366, found 319.1373 (M+H⁺).

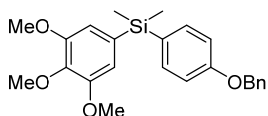
(4-Methoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (**162**)



The title compound was prepared according to the procedure described for **160**, starting from 4-bromoanisole. Yield : 11.9%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.45 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 6.91 (dd, 1H, *J* = 6.6, 2.0 Hz), 6.70 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 3.82 (s, 6H), 0.52 (s,

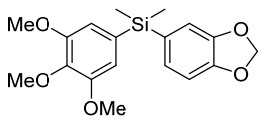
6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 160.64, 153.06, 139.16, 135.70, 133.73, 128.93, 113.71, 110.93, 60.84, 56.25, 55.12, -1.91. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{Si}$ 333.1522, found 333.1522 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(4-(Benzyloxy)phenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (163)



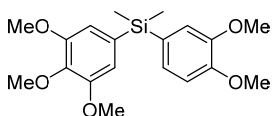
The title compound was prepared according to the procedure described for **160**, starting from 1-(benzyloxy)-4-bromobenzene. Yield : 41.5%. Colorless oil. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.46-7.24 (m, 1H), 6.99 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.70 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 0.52 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 159.87, 153.07, 137.02, 135.74, 133.70, 129.30, 128.70, 128.09, 127.58, 114.60, 110.92, 105.30, 69.85, 60.87, 56.25, 56.17, -1.90. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Si}$ 408.1757, found 408.1765 (M^+).

Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (164)



The title compound was prepared according to the procedure described for **160**, starting from 5-bromobenzo[d][1,3]dioxole. Yield : 35.6%. White solid. mp : 75-76 °C. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.00 (dd, 2H, $J = 7.6, 1.1$ Hz), 6.96 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 6.85 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 5.94 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 0.51 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 153.10, 148.64, 147.50, 139.27, 133.33, 131.18, 128.31, 113.52, 110.91, 108.71, 100.67, 60.87, 56.27, -1.92. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{Si}$ 347.1315, found 333.1524 ($\text{M}+\text{H}^+$).

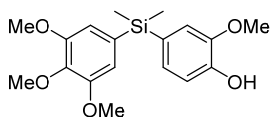
(3,4-Dimethoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (165)



Methyl iodide (21 μL , excess) was added to a mixture of 5-(dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (**153**) (30 mg, 0.086 mmol), potassium carbonate (11.9 mg, 0.172 mmol) and acetone (2 mL) at room temperature. The mixture was stirred under reflux for 11 h and at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **165** (79.1 mg, 40.8%) as a white solid. mp : 73-74 °C. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.10 (dd, 1H, $J =$

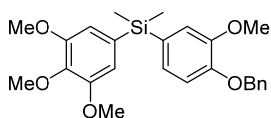
8.0, 1.1 Hz), 7.00 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 6.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.71 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 6H), 3.84 (s, 6H), 0.53 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 153.08, 150.19, 148.66, 139.20, 133.58, 129.35, 127.60, 116.51, 111.08, 110.94, 60.87, 56.26, 55.98, 55.80, -1.83. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{Si}$ 362.1550, found 362.1540 (M^+).

4-(Dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (167)



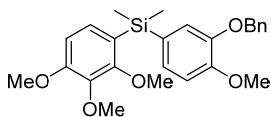
The title compound was prepared according to the procedure described for **153**, starting from compound **168**. Yield : 74.1%. White solid. mp : 123-125 °C. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.06 (dd, 1H, $J = 7.7, 1.4$ Hz), 6.94-6.96 (m, 2H), 6.70 (s, 2H), 5.73 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 0.52 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 152.97, 146.83, 146.33, 139.09, 133.56, 128.69, 127.96, 115.72, 114.40, 110.84, 60.78, 56.16, 55.88, -1.90. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Si}$ 348.1393, found 348.1411 (M^+).

(4-(Benzyloxy)-3-methoxyphenyl)dimethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (168)



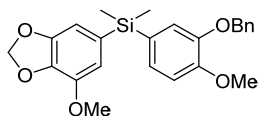
The title compound was prepared according to the procedure described for **160**, starting from compound **156f**. Yield : 12.4%. Colorless oil. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.44 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.36 (td, 2H, $J = 6.6, 1.7$ Hz), 7.28-7.31 (m, 1H), 7.01-7.03 (m, 2H), 6.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.69 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 0.52 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 152.95, 149.30, 149.11, 137.07, 133.45, 129.82, 128.54, 127.81, 127.42, 127.17, 117.13, 113.43, 110.80, 70.67, 60.77, 56.13, 56.08, 30.93, -1.98. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Si}$ 438.1863, found 438.1867 (M^+).

(3-(Benzyloxy)-4-methoxyphenyl)dimethyl(2,3,4-trimethoxyphenyl)silane (170a)



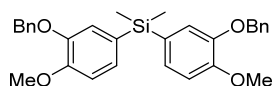
The title compound was prepared according to the procedure described for **160**, starting from compound **169a**. Colorless oil (crude). This was used in the next step without further purification.

(3-(Benzyloxy)-4-methoxyphenyl)(7-methoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-dimethylsilane (170b)



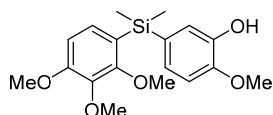
The title compound was prepared according to the procedure described for **160**, starting from compound **169b**. Colorless oil (crude). This was used in the next step without further purification.

Bis(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)dimethylsilane (170c)



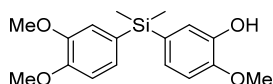
The title compound was prepared according to the procedure described for **160**, starting from compound **169c**. Yield : 38.5%. White solid. mp : 82-84 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.39 (d, 4H, *J* = 6.9 Hz), 7.33 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 7.28 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.01 (dd, 2H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.95 (d, 2H, *J* = 1.7 Hz), 6.88 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 5.08 (s, 4H), 3.89 (s, 6H), 0.39 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ150.65, 147.59, 137.24, 129.63, 128.45, 127.81, 127.74, 127.45, 119.69, 111.48, 71.10, 55.79, -2.13. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₃₀H₃₂O₄Si 484.2070, found 484.2034 (M⁺).

5-(Dimethyl(2,3,4-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (171)



The title compound was prepared according to the procedure described for **153**, starting from compound **170a**. Yield : 4.8% (2 steps). Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.09 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.02 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.7 Hz), 6.96 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.86 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 0.51 (s, 6H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ158.42, 155.39, 147.15, 144.98, 141.37, 131.59, 130.23, 126.35, 123.15, 119.87, 110.23, 107.13, 60.47, 60.36, 55.89, 55.71, -1.78. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₁₈H₂₄O₅Si 348.1393, found 348.1411 (M⁺).

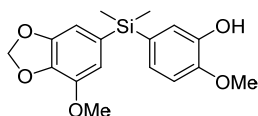
5-((3,4-Dimethoxyphenyl)dimethylsilyl)-2-methoxyphenol (172)



The title compound was prepared according to the procedure described for **159**, starting from compound **174**. Yield : 15.0%. Colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.07-7.09 (m, 2H), 6.99-7.00 (m, 2H), 6.85-6.89 (m, 2H), 5.56 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 0.50 (s,

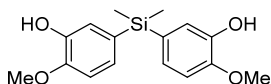
6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 149.95, 148.51, 147.37, 145.15, 130.80, 129.68, 127.40, 126.41, 119.80, 116.39, 110.93, 110.37, 55.83, 55.73, 55.67, -2.08. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{Si}$ 318.1287, found 318.1288 (M^+) .

2-Methoxy-5-((7-methoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)dimethylsilyl)phenol (173)



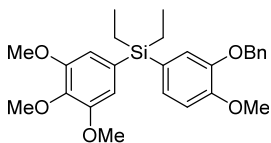
The title compound was prepared according to the procedure described for **153**, starting from compound **170b**. Yield : 8.4% (2 steps). Colorless oil. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.06 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 6.99 (dd, 1H, $J = 1.7, 8.0$ Hz), 6.86 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.66 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.95 (s, 2H), 5.56 (s, 1H), 3.890 (s, 3H), 3.886 (s, 3H), 0.48 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 148.78, 147.46, 145.18, 143.72, 136.19, 132.21, 130.36, 126.39, 119.76, 113.48, 110.39, 107.44, 101.13, 56.66, 55.74, -2.11. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Si}$ 332.1080, found 332.1076 (M^+) .

5,5'-(Dimethylsilanediyl)bis(2-methoxyphenol) (174)



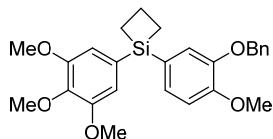
The title compound was prepared according to the procedure described for **153**, starting from compound **170c**. Yield : 85.8%. White solid. mp : 130-133 $^\circ\text{C}$. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.06 (d, 2H, $J = 1.7$ Hz), 6.99 (dd, 2H, $J = 1.7, 8.0$ Hz), 6.85 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 5.54 (s, 2H), 3.88 (s, 6H), 0.48 (s, 6H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 147.36, 145.12, 130.74, 126.42, 119.82, 110.37, 55.75, -2.21. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$ 304.1131, found 304.1155 (M^+) .

(3-(Benzyloxy)-4-methoxyphenyl)diethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silane (176a)



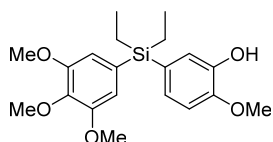
The title compound was prepared according to the procedure described for **157**, starting from dichlorodiethylsilane. Yield : 32.6%. White solid. mp : 61-62 $^\circ\text{C}$. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.38 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.33-7.30 (m, 2H), 7.27-7.25 (m, 1H), 7.07 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.1$ Hz), 6.98 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.63 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.80 (s, 6H), 0.99-0.94 (m, 10H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 152.97, 150.83, 147.61, 139.12, 137.34, 131.43, 128.77, 128.56, 127.86, 127.40, 127.21, 120.60, 111.54, 71.24, 60.87, 56.22, 58.84, 7.54, 4.31. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{Si}$ 466.2176, found 466.2184 (M^+) .

1-(3-(Benzyloxy)-4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)siletane (176b)



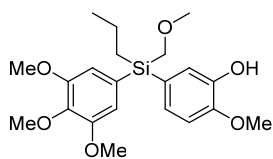
The title compound was prepared according to the procedure described for **157**, starting from 1,1-dichlorosilacyclobutane. Yield : 10.1%. White solid. mp : 95-97 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.39-7.37 (m, 2H), 7.35-7.32 (m, 2H), 7.29-7.25 (m, 1H), 7.20 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 7.10 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.96 (d, 1H, *J* = 8.0Hz), 6.77 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 2.22-2.19 (m, 2H), 1.45-1.40 (m, 4H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ153.22, 151.34, 147.92, 129.58, 137.20, 131.50, 128.59, 127.93, 127.56, 127.47, 119.89, 111.71, 111.10, 71.24, 60.91, 56.27, 55.93, 18.24, 14.42. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₆H₃₀O₅Si 450.1863, found 450.1863 (M⁺).

5-(Diethyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (177)



The title compound was prepared according to the procedure described for **153**, starting from compound **176a**. Yield : 94.0%. White solid. mp : 62-63 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.07 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 6.99 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.69 (s, 2H), 5.57 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 1.05-0.99 (m, 10H). ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ152.98, 147.53, 145.25, 139.14, 131.48, 128.34, 127.34, 120.54, 111.60, 110.43, 60.87, 56.24, 55.80, 7.56, 4.23. HRMS (FAB+) *m/z* : calcd for C₂₀H₂₉O₅Si 377.1784, found 377.1777 (M+H⁺).

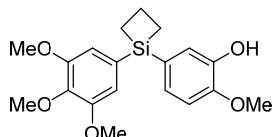
5-(Ethoxy(propyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)-2-methoxyphenol (178)



To a mixture of 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)siletane (**176b**) (79.7 mg, 0.18 mmol), EtOH (5 mL) and ethyl acetate (1 mL) was added 5% Pd/C (14.5 mg) at room temperature, and the whole was stirred under an H₂ atmosphere at the same temperature for 14 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1) and PTLC (hexane/ethyl acetate = 4/1) to give **178** (21.8 mg, 30.3%) as a colorless oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ7.14 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.08 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 6.89 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.78 (s,

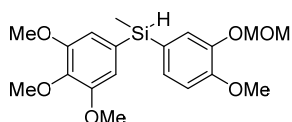
2H), 5.60 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 3.75 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 1.48-1.43 (m, 2H), 1.21 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.11-1.07 (m, 2H), 0.98 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 153.04, 148.04, 145.29, 139.58, 130.70, 127.58, 127.33, 120.35, 111.31, 110.43, 60.86, 59.28, 56.24, 55.82, 18.54, 18.34, 16.85, 16.74. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_6\text{Si}$ 407.890, found 407.1895 ($\text{M}+\text{H}^+$).

2-Methoxy-5-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)siletan-1-yl)phenol (**179**)



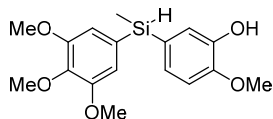
To a mixture of 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)siletane (**176b**) (201.9 mg, 0.45 mmol) and ethyl acetate (5 mL) was added 5% Pd/C (20 mg) at room temperature, and the whole was stirred under an H_2 atmosphere at the same temperature for 13 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 4/1) to give **179** (48.5 mg, 30.0%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.19 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 7.11 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.1$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.82 (s, 2H), 5.66 (brs, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 6H), 2.26-2.22 (m, 2H), 1.47 (t, 4H, $J = 8.3$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 153.23, 148.08, 145.49, 139.58, 131.60, 128.60, 127.11, 120.20, 111.15, 110.63, 60.90, 56.29, 55.89, 18.25, 14.34. HRMS(FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Si}$ 360.1393, found 360.1394 (M^+).

(4-Methoxy-3-(methoxymethoxy)phenyl)(methyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)-silane (**180**)



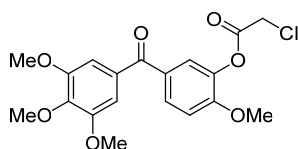
To a solution of 4-bromo-2-(methoxymethoxy)phenol (**156g**) (494.18 mg, 2 mmol) and 5-bromo-1,2,3-trimethoxyphenol (494.1 mg, 2 mmol) in dry THF (15 mL) was added *n*-butyl lithium in *n*-hexane (1.76 M, 2.5 mL, 4 mmol) under an Ar atmosphere at -78 °C. This was stirred at same temperature for 1.5 h, and then methylchlorosilane (0.23 mL, 2.2 mmol) was added. Stirring was continued at -78 °C for 2 h and at room temperature for 13.5 h. The reaction was quenched with NH_4Cl aq, and the whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1 to 4/1) to give crude (**180**) (426.7 mg) as a colorless oil, which was used in the next step without further purification.

2-Methoxy-5-(methyl(3,4,5-trimethoxyphenyl)silyl)phenol (**181**)



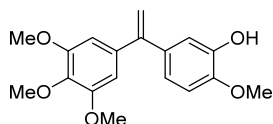
To a solution of crude (4-methoxy-3-(methoxymethoxy)phenyl)(methyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)-silane (**180**) (31 mg) in MeOH (1 mL) was added one drop of conc. HCl aq at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then evaporated, and the residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 3/1) to give **181** (8.8 mg, 18.1% (2 steps)) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.10 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 7.05 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.1$ Hz), 6.89 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.75 (s, 2H), 5.60 (s, 1H), 4.87 (q, 1H, $J = 3.6$ Hz), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 0.59 (d, 3H, $J = 3.6$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 153.21, 147.94, 145.45, 139.45, 130.62, 127.42, 127.32, 120.36, 110.64, 110.41, 60.89, 56.25, 55.88, -4.51. HRMS (FAB+) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{Si}$ 335.1315, found 335.1306 ($\text{M}+\text{H}^+$).

2-Methoxy-5-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)phenyl 2-chloroacetate (**183**)



The title compound was prepared according to the reported method²⁹. Yield : 71.7%. White solid. mp : 149-151 °C (lit. 149-151 °C). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.79 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.3$ Hz), 7.62 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 7.07 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.03 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 193.67, 165.49, 154.53, 153.00, 141.88, 138.82, 132.75, 130.47, 130.33, 124.93, 111.79, 107.49, 61.07, 56.42, 56.31, 40.61. MS (FAB+) m/z : 395 ($\text{M}+\text{H}^+$).

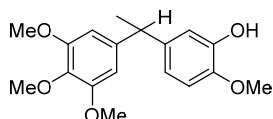
2-Methoxy-5-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)vinyl)phenol (**184**)



To a solution of 2-methoxy-5-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)phenyl 2-chloroacetate (**183**) (197.4 mg, 0.5 mmol) in dry toluene (2 mL) was added a solution of trimethylaluminium in toluene (1.8 M, 0.56 mL) under an Ar atmosphere at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 6 h and at 100 °C for 3 h, and then poured into ice water. The whole was extracted with ethyl acetate. The extract was successively washed with water and brine, and then dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated, and the residue was purified by means of silica gel column chromatography

(hexane/ethyl acetate = 10/1 to 0/1) to give **184** (17.5 mg, 11.1%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 6.97 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 6.85 (dd, 1H, $J = 8.6, 1.7$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 6.55 (s, 2H), 5.60 (s, 1H), 5.38 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 5.31 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz), 3.91 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 152.90, 149.63, 146.50, 145.28, 137.79, 137.53, 134.78, 120.27, 114.55, 112.96, 110.23, 105.80, 61.01, 56.22, 56.06. MS (FAB+) m/z : 317 ($\text{M}+\text{H}^+$).

2-Methoxy-5-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethyl)phenol (**185**)



To a solution of 2-methoxy-5-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)vinyl)phenol (**184**) (17.5 mg, 0.043 mmol) in EtOH (2 mL) was added 5% Pd/C (14.5 mg) at room temperature, and the mixture was stirred under an H_2 atmosphere at the same temperature for 13 h. The reaction mixture was filtered through a Celite pad and the solvent was evaporated. The residue was purified by PTLC (hexane/ethyl acetate = 2/1) to give **185** (11.7 mg, 83.3%) as a colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 6.81 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.78 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 6.71 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.3$ Hz), 6.43 (s, 2H), 5.58 (s, 1H), 3.99 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 9H), 1.58 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 153.12, 145.47, 144.94, 142.34, 139.79, 136.26, 118.86, 113.84, 110.56, 104.63, 60.91, 56.15, 56.05, 44.54, 22.14. MS (FAB+) m/z : 319 ($\text{M}+\text{H}^+$).

2. 生物実験

第2章 第2節

AR and VDR Reporter gene assays¹⁸⁷

Human embryonic kidney (HEK 293) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic-antimycotic (Nacalai) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Transfections were performed by the calcium phosphate coprecipitation method. Test compounds were added at 22 h after transfection. Cells were harvested approximately 16-20 h after the treatment, and luciferase and β -galactosidase activities were assayed using a luminometer and a microplate reader (ARVO-SX, Perkin Elmer, USA). In the VDR-reporter assay, DNA cotransfection experiments were done with 50 ng of reporter plasmid (TK-MH100x4-Luc), 10 ng of pCMX-s-galactosidase, and 15 ng of each receptor expression plasmid (CMX-GAL4N-hVDR) per well in a 96-well plate. In the AR-reporter assay, DNA cotransfection experiments were done with 33 ng of reporter plasmid (ARE-tlc-Luc), 10 ng pCMX-s-galactosidase and 33 ng of each receptor expression plasmid (pSG5-hAR) per well in a 96-well plate. Luciferase data were normalized to an internal β -galactosidase control, and reported values are means of triplicate assays.

Androgen-antagonistic activity (SC-3 cell)⁸³

Androgen-antagonistic activity of the compounds was evaluated by measurement of inhibition of androgen-induced SC-3 (Shionogi Carcinoma-3) cell growth, as described previously.^{32, 33} Briefly, SC-3 cells were cultured in Minimum Essential Medium, Alpha Modification (MEM-Alpha) supplemented with 2% FBS and 10 nM testosterone in the presence or absence of a test compound for three days at 37 °C under 5% CO₂. The number of cells with testosterone alone was defined as 100%. The concentration of test compounds that inhibited by 50% the increase of the cell number induced by 10 nM testosterone was quantified (IC₅₀) (Table 4). Androgen-agonistic activity can be evaluated in the same cell line, but none of the prepared compounds showed androgen-agonistic activity (growth promotion of SC-3 cells).

¹⁸⁷ Choi, M.; Ozeki, J.; Hashizume, M.; Kato, S.; Ishihara, H.; Makishima, M. Vitamin D receptor activation induces peptide YY transcription in pancreatic islets. *Endocrinology* **2012**, *153*, 5188-5199.

VDR binding assay

VDR binding assay was performed according to the reported method.⁴² Bovine thymus VDR (Yamasa Biochemical, Japan) was dissolved in 40 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.3 M KCl, and 1 mM dithiothreitol. To this solution (190 μ L) was added 41.2 nM [³H]-1,25-VD₃ (Perkin Elmer, Inc.) dissolved in 5 μ L of DMSO and various concentrations of test compound. This mixture was incubated for 18 h at 4 °C. After treatment with 1.5% dextran-coated charcoal solution, they were further incubated for 20 min at 4 °C and centrifuged. The amount of radiolabeled 1,25-VD₃ bound to the VDR was determined with a scintillation counter. The inhibitory activity in the presence of added cold 1,25-VD₃ (final : 1 μ M) was defined as 100%. The assay was performed in triplicate.

AR binding assay

AR binding assay was performed essentially according to the reported method.¹⁸⁸ Briefly, SC-3 cells were plated onto 24 well plate in MEM-Alpha (700 μ L/well) supplemented with 2% FBS and 10 nM testosterone. After two days, the medium was changed to MEM-Alpha (300 μ L/well) supplemented with 2% DCC-FBS. The next day, to this was added various concentrations of test compound and [³H]-testosterone (final: 6.6 nM, Perkin Elmer, Inc.). This was incubated for 1 h at 37 °C. Then, the medium was removed, and each well was washed with MEM-Alpha supplemented with 2% DCC-FBS. After the medium was removed, 600 μ L of ethanol was added. The amount of radiolabeled testosterone bound to the AR was determined with a scintillation counter. The inhibitory activity in the presence of added cold testosterone (final : 10 μ M) was defined as 100%. The assay was performed in duplicate.

¹⁸⁸ Yamanishi, H.; Nonomura, N.; Tanaka, A.; Yasui, T.; Nishizawa, Y.; Matsumoto, K.; Sato, B. Roles of transforming growth factor beta in inhibition of androgen-induced growth of Shionogi carcinoma cells in serum-free medium. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6179-6183.

第 2 章 第 3 節

ER Reporter gene assay^{83, 189}

ER-agonistic and antagonistic activities of compounds were evaluated by means of reporter gene assay using a Gal4-human ER α or ER β reporter system²⁵. A fragment of human ER α / β was inserted into the pCMX-GAL4 vector to obtain pCMX-GAL4-hER (pCMX-flag vector to make pCMX-ER α / β). GAL4-responsive MH100 (USA)x4-tk-LUK reporter was used. Human embryonic kidney (HEK 293) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM without Phenol Red) containing 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic-antimycotic (Nacalai) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Transfections were performed by the calcium phosphate coprecipitation method. Test compounds were added at 8 h after transfection. Cells were harvested 16-20 h after the treatment, and luciferase and β -galactosidase activities were assayed using a luminometer and a microplate reader. DNA cotransfection experiments were done with 50 ng of reporter plasmid, 15-20 ng pCMX-s-galactosidase, 10-15 ng of each receptor expression plasmid and pGEM carrier DNA to make a total of 150 ng DNA per well in a 96-well plate. Luciferase data were normalized to an internal β -galactosidase control, and reported values are means of triplicate assays. Antagonist activity was measured in the presence of 0.3 nM 17 β -estradiol.

¹⁸⁹ Noguchi-Yachide, T.; Sugita, K.; Hashimoto, Y. Estrogen Receptor α / β Ligands Derived from Thalidomide. *Heterocycles* **2011**, *83*, 2137-2147.

第 2 章 第 4 節

STS-inhibitory activity assay

The STS-inhibitory activity assay was performed essentially according to the reported method¹⁹⁰. Briefly, MCF-7 cells were cultured in D-MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 10% FBS at 37 °C under 5% CO₂ in air. Homogenate of MCF-7 cells was prepared by repeated (five times) freezing and thawing of the combined cell pellets from several culture flasks, followed by homogenization in a homogenizer. The homogenate was diluted with Tris-EDTA (TE) buffer and centrifuged (15000 g, 4 °C, 15 minutes). We quantified the protein concentration of the supernatant by the Bradford method, and adjusted the concentration to 0.2 mg/mL by adding TE buffer. We used this solution as the STS solution.

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

第 3 章 第 2 節

20S proteasome assay

Proteasome chymotrypsin-like activity was determined by using 20S proteasome assay kit for drug discovery (BML-AK740, Enzo Life Science). Assay buffer and 20S proteasome (0.1 μg per well) were added to 1/2 volume microplate. To this was added inhibitor or test samples, and the plate was incubated for 10 min at room temperature. The reaction was started by the addition of succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (7-amino-4-methylcoumarin). The AMC product formation was monitored with microplate reader (1.5 min time intervals for 20 min).

¹⁹⁰ Boivin, R.P.; Luu-The, V.; Lachance, R.; Labrie, F.; Poirier, D. Structure-activity relationships of 17α-derivatives of estradiol as inhibitors of steroid sulfatase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4465-4448.

第4章 第2節前半

Aminopeptidase-inhibitory activity assay¹²⁷

Cells

MOLT-4 cells or HL-60 cells were maintained in RPMI1640 medium supplemented with 10% v/v fetal bovine serum at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂ in air.

Assay of Enzyme Activities

PSA and APN activities were evaluated in the usual way, by measuring 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) liberated from *L*-alanine 4-methylcoumaryl-7-amide (Ala-MCA). Cell suspension: Cells were collected by centrifugation (2000 rpm, 5 min, 4°C) and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at 2×10^6 cells/mL. Briefly, to Tris-HCl buffer (pH = 7.4, 395 μL/well) were added cell suspension (50 μL/well) and a test inhibitor (various concentrations, 5 μL/well) or DMSO, and the resulting suspension was pre-incubated at 37 °C for exactly 10 min. Then, Ala-MCA (1 mM in Tris-HCl buffer, 50 μL/well) was added. The suspension was further incubated at 37 °C for exactly 30 min, and AcONa-AcOH buffer (1 M, pH 4.0, 1.5 mL/well) was added. The amounts of liberated AMC were measured in terms of fluorescence intensity (excitation at 355 nm, emission at 460 nm). The assay was performed at least in duplicate, and the mean value was taken.

第4章 第2節後半

Tubulin polymerization inhibition (TPI) assay

The TPI assay was performed according to the reported method.¹³⁴ Briefly, microtubule protein was prepared from porcine brain by several cycles of assembly-disassembly, as described.¹⁹¹ Tubulin solution was prepared at a concentration of 1.8-2.0 mg/ml. Tubulin polymerization was followed by means of turbidity measurements (absorbance at 400 nm) at 37 °C in microtubule assemble buffer containing 100 mM MES, 1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol, and 1 mM GTP (pH 6.5).

¹⁹¹ Li, Y.; Kobayashi, H.; Tokiwa, Y.; Hashimoto, Y.; Iwasaki, S. Interaction of Phomopsin a with porcine brain tubulin: Inhibition of tubulin polymerization and binding at a rhizoxin binding site. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 219-224.

第 4 章 第 3 節

ROR Reporter gene assay¹⁵¹

Cell culture conditions

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were cultured in DMEM containing 5% FBS, penicillin and streptomycin mixture at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Plasmids

CMX-GAL4N-hRAR α , CMX-GAL4N-hRAR β , CMX-GAL4N-hRAR γ , CMX-GAL4N-hLXR α , CMX-GAL4N-hLXR β , TK-MH100 \times 4-Luc and CMX- β -GAL were provided by Prof. Dr. Makishima. pcDNA3.1(-)-hROR α 1, pcDNA3.1(-)-hROR β 1, pcDNA3.1(-)-hROR γ 1 and RORE-TK-Luc were provided by Itsuu Laboratory.

Transfection

HEK293 cells were seeded at a density of 20% confluence / 96-well plate 24 h prior to transfection. One well of cells was cotransfected with 150 ng of a nuclear receptor expression plasmid, 500 ng of a luciferase reporter and 10 ng of CMX- β -GAL expression vector. Transfections were performed by the calcium phosphate co-precipitation method. After 8 h, transfected cells were treated with test compounds or DMSO for 16 h. Treated cells were assayed for luciferase activity in a luminometer. The luciferase activity of each sample was normalized by the level of β -galactosidase activity. Each transfection was carried out in triplicate.

第 5 章 第 2 節

MCF-7 cell proliferation assay

The tumor cell growth-inhibitory activity of the compounds was evaluated by measurement of inhibition of MCF-7 cell growth, as described previously.^{192, 193} Briefly, MCF-7 cells were cultured in D-MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 10% FBS in the presence or absence of a test compound for three days at 37 °C under 5% CO₂ in air. The number of cells with vehicle alone was defined as 100%. The concentration of test compounds that inhibited by 50% the increase of the cell number was quantified (IC₅₀). The assay was performed in triplicate.

Colchicine competitive binding assay¹⁹⁴

Mixtures of 1.0 μM (0.1 mg/mL) tubulin, 1.5 μM [³H]colchicine (20 pCi/μL) and test compounds at 3, 10, or 30 μM were prepared and incubated for 30 min at 37 °C. After treatment with 1.5% dextran-coated charcoal solution, they were further incubated for 20 min at 4 °C and centrifuged. The amount of radiolabeled colchicine bound to the tubulin was determined with a scintillation counter. The inhibitory activity in the presence of added 10 μM CA-4 (**1**) was defined as 100%. The assay was performed in triplicate.

¹⁹² Borrel, C.; Thoret, S.; Cachet, X.; Guénard, D.; Tillequin, F.; Koch, M.; Michel, S. New antitubulin derivatives in the combretastatin A4 series: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 3853-3864.

¹⁹³ O'Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Bergin, O.; Nathwani, S.M.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. Synthesis and evaluation of azetidinone analogues of combretastatin A-4 as tubulin targeting agents. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 8569-8584.

¹⁹⁴ Romagnoli, R.; Baraldi, P.G.; Carrion, M.D.; Cara, C.L.; Cruz-Lopez, O.; Tolomeo, M.; Grimaudo, S.; Di Cristina, A.; Pipitone, M.R.; Balzarini, J.; Zonta, N.; Brancale, A.; Hamel, E. Design, synthesis and structure-activity relationship of 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]furan derivatives as a novel class of inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6862-6871.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，多大なるご指導，ご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 教授に心より感謝致します。

本論文の審査にあたり，有益なご指導ならびにご助言を賜りました東京大学大学院 薬学系研究科 大和田 智彦 教授，金井 求 教授，松永 茂樹 准教授，分子細胞生物学研究所 藤井 晋也 講師に深く感謝いたします。

生体有機化学研究分野での研究生活を送るうえで，石川 稔 准教授，谷内出 友美 助教，橋本 真梨子 技術補佐員，小林 久芳 博士には，日頃より暖かいご指導，サポートをして頂きました。厚く御礼申し上げます。

本研究の計算化学実験に関して，多大なご協力を頂きました帝京大学 薬学部 松本 洋太郎 講師に深く感謝いたします。

化合物の生物評価に関して，日本大学 医学部 榎島 誠 教授，鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科附属 難治ウイルス病態制御研究センター 馬場 昌範 教授，外山 政明 博士に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり，多くのご助言，ご協力を頂きました星薬科大学 薬学部 杉田 和幸 教授，国立医薬品食品衛生研究所 三澤 隆史 博士に心より感謝申し上げます。

社外での研究の機会を与えて下さいました日本化薬株式会社 医薬事業本部 鈴木 政信 本部長，研究開発本部 医薬研究所 市川 裕一郎 所長，化学グループ 増田 亮 グループ長に感謝致します。また，橋本教授を紹介して下さいました生物グループ 関根 啓子 博士に感謝いたします。

本研究に関する実験を共同で実施して頂いた生体有機化学研究分野の卒業生 丸山 慶輔 博士，大学院生の梶田 大資 学士，外山 大純 学士に感謝いたします。また，本研究に関する議論に参加してくれた，生体有機化学研究分野の関係諸氏に感謝いたします。

最後に，本研究を行うにあたり，私生活面での支援をしてくれた家族，両親に感謝いたします。

平成 26 年 6 月
中村 雅陽