

博 士 論 文

創薬初期研究におけるケミカルプローブの創製
および機能解析
—DHPS を標的とするアロステリック阻害薬の発見と
Mcl-1/Bcl-xL に対する二重阻害薬の創出—

2021 年 3 月

田中雄太

目次

第一章 緒言

第一節 創薬研究におけるケミカルプローブの役割	3
第二節 DHPS の機能と癌との関連	4
第三節 Bcl-2 family タンパク質の機能と癌との関連	5
第四節 研究方針と概要	7

第二章 DHPS に対する新規ケミカルプローブの創製

第一節 薬剤標的としての DHPS および構造情報	12
第二節 新規 DHPS 阻害薬創製およびアロステリックサイトの発見	
第一項 ドラッグデザインおよび合成	15
第二項 構造活性相関研究	18
第三項 共結晶構造解析	21
第三節 強力な活性を有する新規アロステリック阻害薬の創製	
第一項 ドラッグデザインおよび合成	24
第二項 構造活性相関研究	28
第三項 共結晶構造解析	34
第四節 共結晶情報に基づく DHPS の機能解析	
第一項 DHPS 阻害薬の基質拮抗性解析	37
第二項 DHPS タンパク質の構造変化およびその機能	40
第五節 まとめ	41

第三章 新規 Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬の創製

第一節 薬剤標的としての Bcl-2 family および構造情報	43
第二節 Mcl-1 および Bcl-xL に対する選択的阻害薬の探索	

第一項 Mcl-1 選択的阻害薬の創出	44
第二項 Bcl-xL 選択的阻害薬の創出	47
第三節 ケミカルプローブの情報に基づく Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害剤の 創製	
第一項 ハイブリッドストラテジーによるドラッグデザイン	50
第二項 Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害剤の創製および共結晶構造解析	52
第四節 まとめ	55
第四章 結語	57
実験の部	59
第二章第二節に関する合成実験	60
第二章第三節に関する合成実験および低分子結晶 X 線解析	69
第二章の生物実験および共結晶 X 線解析	107
第三章に関する合成実験	117
第三章の生物実験および共結晶 X 線解析	127
引用文献	134

略号表

Ac	acetyl
AcOH	acetic acid
AUC	area under the concentration-time curve
Bu	butyl
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
C _{max}	maximum concentration
CL _{total}	total clearance
cpds	compounds
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DME	1,2-dimethoxyethane
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
dppf	1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
Et	ethyl
F	bioavailability
FITC	fluorescein isothiocyanate
FRET	fluorescence resonance energy transfer
Hex	hexyl
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high-performance liquid chromatography
HTS	high-throughput screening
IC ₅₀	50% inhibitory concentration

Me	methyl
MLM	mouse liver microsomes
MRT	mean residence time
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
Ph	phenyl
PPh ₃	triphenylphosphine
PPI	protein-protein interaction
Pr	propyl
SAR	structure-activity relationship
SBDD	structure based drug design
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
Tf ₂ O	trifluoromethanesulfonic anhydride
THF	tetrahydrofuran
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
V _{dss}	volume of distribution at steady state

第一章 緒言

第一節 創薬研究におけるケミカルプローブの役割

ケミカルプローブとは生物学的標的（最も一般的にはタンパク質）に結合してその機能を変化させる化合物であり、創薬ターゲットの特定やバリデーション、タンパク質のプロファイリング、イメージング等において有用なツール化合物の総称である¹⁾。薬剤を開発する上では、その生物学的標的に対する阻害薬や作動薬・拮抗薬といった薬理作用を有する分子が、ケミカルプローブとして薬剤標的の機能解析や新たな薬剤の分子設計に利用される²⁾。また、標的に対して高い選択性を有するケミカルプローブは病態解析等を目的とした細胞や動物モデルでの解析においてもツール化合物として利用される。First-in-class の標的分子に作用する薬剤を開発する際には、対象となる分子が薬剤の標的として有望か否かを判断するための適切なケミカルプローブが存在することが望ましい。その際、ケミカルプローブが具備すべき要件としては、標的分子に対して適切な親和性と薬理活性を示すこと、標的分子への送達やアッセイを行う上で良好な物性を有すること、可能であれば標的分子への薬理活性の作用機構が解明されていること、などが挙げられる³⁾。さらに、共結晶構造解析等により標的分子とケミカルプローブの結合様式が明らかである場合には、タンパク質の立体構造を基盤とした新たなケミカルプローブもしくは薬剤の設計ならびにその機能評価が可能となる。

一方、多くの First-in-class ターゲットにおいて、適切なケミカルプローブの欠如により、創薬標的としての評価が難しいことが課題になっている。また、ケミカルプローブとタンパク質の構造情報に基づいた、複数の標的分子に作用する薬剤の論理的創薬手法も未だ確立されていないのが現状である。そこで筆者は、First-in-class の標的分子として Deoxyhypusine synthase (DHPS) に注目し、強力な阻害活性を有するケミカルプローブの取得を目的とする合

成研究を実施し、DHPS との共結晶構造解析により標的分子との相互作用のメカニズムおよびコンフォメーション変化を検証した。また、ケミカルプローブによる構造情報を利用した創薬手法については、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)ファミリータンパク質を標的とする複数標的阻害薬を分子設計し、強力な阻害活性を有する低分子化合物の創出研究を実施した。

第二節 DHPS の機能と癌との関連

タンパク質翻訳制御の異常は、腫瘍の発生および進展において機軸となる役割を果たしている。その制御因子の一つとして真核生物翻訳開始因子 5A (eukaryotic translation initiation factor 5A: eIF5A)が知られており⁴⁾、ヒトにおいて卵巣癌⁵⁾や膵臓癌⁶⁾等、特に悪性度の高い様々な癌で過剰発現もしくは遺伝子増幅が確認されている。eIF5A は DHPS および deoxyhypusine hydroxylase (DOHH)によりハイプシン化という特徴的な修飾を受け、翻訳制御促進因子として活性化する (Fig. 1)^{7),8)}。ハイプシンとは、ヒドロキシル化されたアミノブチル基がリジンの側鎖アミノ基に置換した異常アミノ酸であり、翻訳後修飾によって形成される。eIF5A のハイプシン化における第一工程では、その修飾酵素である DHPS が eIF5A の 50 番目のリジン残基に、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)を補酵素として用い、生体内ポリアミンの一種である spermidine の 4-アミノブチル基部位を転移させ、デオキシハイプシン化された eIF5A を生じる。デオキシハイプシン-eIF5A は速やかに酸化酵素である DOHH により酸化され、ハイプシン-eIF5A を与える。ハイプシン化された eIF5A は特定の mRNA の翻訳伸長を促進し、癌の増殖に関与すると考えられている⁴⁾。このことから eIF5A は魅力的な抗がん剤の標的因子であるが、タンパク質の構造上、RNA 結合ドメインと S1-ribosome 結合ドメインを有しているのみで、低分子化合物で容易に制御できるような構造ではないと考えられている⁹⁾。そこで筆者は、eIF5A が翻訳制御促進因子として

の機能を発揮するために必須となるハイプシン化修飾の阻害に着目した。ハイプシン化を担う DHPS と DOHH の二種類の酵素の中で、DHPS が律速酵素であることから¹⁰⁾、DHPS 阻害薬は eIF5A 依存的に増殖する癌細胞のタンパク質翻訳過程を抑制する新しいタイプの抗癌薬として位置づけられる。

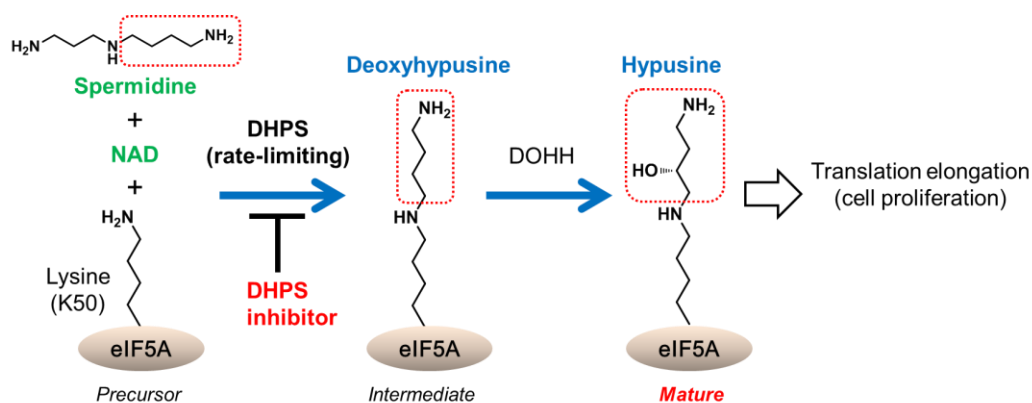
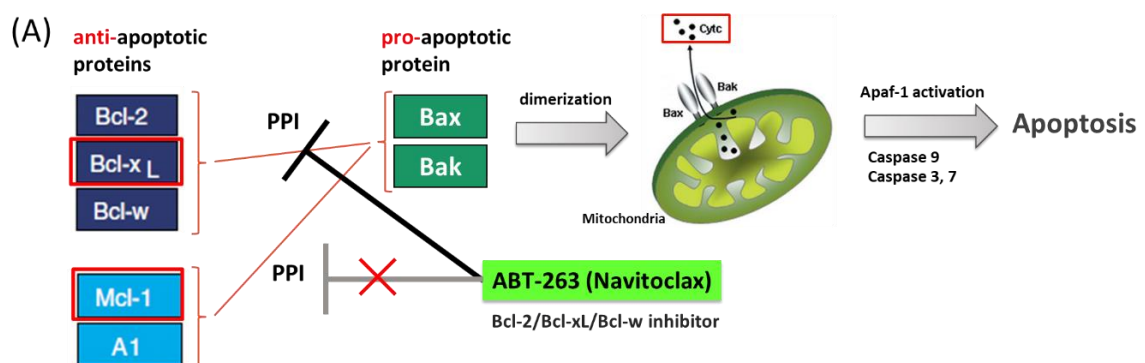


Figure 1. DHPS-eIF5A pathway as a therapeutic target for cancer.

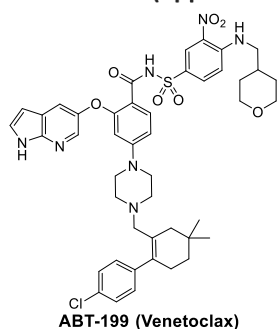
第三節 Bcl-2 family タンパク質の機能と癌との関連

アポトーシスは細胞死機構の一つを指し、個体発生や恒常性維持に欠かせないことが知られている¹¹⁾。アポトーシス機構の破綻は、癌¹²⁾、アルツハイマー型認知症¹³⁾、自己免疫疾患¹⁴⁾など、多くの疾患に関与する。アポトーシスは、主として TNF- α などを介する細胞外からのシグナルによって引き起こされるデスドメイン受容体経路と、細胞内のミトコンドリア上のタンパク質などが関与するシグナルによって引き起こされるミトコンドリア経路により誘導される¹⁵⁾。ミトコンドリア経路においては、アポトーシスを促進するタンパク質 Bak や Bax が活性化されることにより、ミトコンドリアからシトクロム c が漏出される。シトクロム c は apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1)を介在して、カスパーゼ-9 を活性化する。さらにカスパーゼ-9 が種々の細胞内構造物の破壊に直接関与するカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-7 を活性化することにより、細胞死に至る (Fig. 2 (A))¹⁶⁾。

ミトコンドリア経路の調節に重要な役割を果たしているのが、前述の Bax を含む Bcl-2 ファミリータンパク質である¹⁷⁾。これらは、Bcl-2 Homology (BH) ドメインを有し、3つのサブタイプに分類される。すなわち、BH1-BH4 で構成されるアポトーシスを抑制するタンパク質 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1)、アポトーシスを促進するタンパク質 (Bax, Bak)、および BH3 ドメインのみで構成されるペプチド (Bid, Bim, Noxa) である¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。Bax 等のアポトーシス促進タンパク質はミトコンドリア内でホモ重合体を形成し、ミトコンドリア外膜に存在する voltage-dependent anion channel (VDAC) を調節することで、細胞質へのシトクロム c 透過性を亢進し、カスパーゼの活性化を惹起する¹⁶⁾。Bcl-2 等のアポトーシス抑制タンパク質は、アポトーシス促進タンパク質と結合し、そのホモ重合体形成を妨げることにより、アポトーシスを抑制する。逆に BH3 ドメインのみを有する Bid、Bim 等は、アポトーシス抑制タンパク質と結合することによりその機能を制限し、アポトーシス促進タンパク質のホモ重合体形成を促進する²⁰⁾。癌細胞では一般に、アポトーシス抑制タンパク質が活性化されていると考えられている¹²⁾。したがって、アポトーシス抑制タンパク質と結合する化合物を創製できれば、癌細胞でのアポトーシス誘導が促進できると考えられるため、Bcl-2 ファミリー阻害薬は魅力的なターゲットとして注目されている^{21),22)}。



(B) Bcl-2 inhibitor (approved drug)



Mcl-1 inhibitor in clinical trials

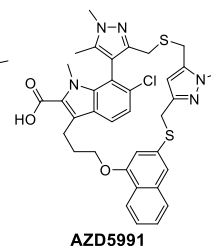
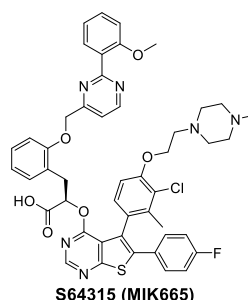
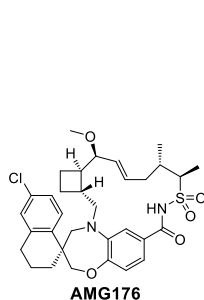



Figure 2. (A) Bcl-2 family proteins and pathway to apoptosis.

(B) Representatives of Bcl-2 family inhibitor in clinical use.


近年、Bcl-2 選択的阻害剤であるベネトクラクスが AbbVie 社によって臨床開発され、慢性リンパ性白血病を適応症として 2016 年にアメリカ食品医薬品局によって承認されている (Fig. 2 (B))²³⁾。また、Mcl-1 選択的阻害剤である AMG176²⁴⁾、S64315(MIK665)²⁵⁾および AZD5991²⁶⁾の血液癌に対する有効性が臨床試験において現在検討されている。一方で、非小細胞肺癌²⁷⁾等の固形癌においては、Mcl-1 および Bcl-xL を同時に阻害することが、アポトーシスの誘導に重要な条件であることが知られている^{28)–30)}。また、Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w 阻害剤である Abbott 社の ABT-263(Navitoclax)³¹⁾の抗癌活性が、Mcl-1 の発現上昇による耐性獲得により減少することも報告されている³²⁾。よって、固形癌を対象としたアポトーシス誘導を指向し、Mcl-1 および Bcl-xL を同時に阻害することは新しいタイプの治療法として期待される。

第四節 研究方針と概要

第二節で述べたように DHPS は新規抗癌剤の薬剤標的としての可能性があるものの、既存の阻害剤は GC-7³³⁾に代表される基質 spermidine を模倣した化合物のみであり (Fig. 3)^{34)–37)}、既に臨床試験に進んでいる化合物もしくは適切なケミカルプローブが無いために、創薬標的としての妥当性の評価が難



Spermidine
Substrate



1 (GC-7)
DHPS inhibitor

筆者は新規ケミカルプローブを創出すべく、強力な阻害活性を有する化合物の取得を目的として、武田薬品工業株式会社が保有するライブラリー化合物に対して DHPS 酵素阻害試験による high-throughput screening (HTS) を当研究グループ内で実施した(スクリーニングの詳細については第二章に記載)。

筆者は、得られたヒット化合物であるインドール誘導体 **2** からの構造活性相関研究を通じて、強力な酵素阻害活性を有するブロモベンゾチオフェン体 **13g** を創出した(Fig. 4)。さらに、化合物 **13g** とは異なるファーマコフォアを有する HTS ヒット化合物 **3** および **4** にも着目し、3-ピリジル基を有する二環性母核誘導体の構造活性相関研究を実施し、強力な酵素阻害活性を有するジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン誘導体 **38d** を創出した。これらケミカルプローブと DHPS タンパク質の共結晶構造解析を行った結果、化合物 **13g** および **38d** が結合様式は異なるもののアロステリック阻害薬であることを同定した。また、DHPS 酵素の擬似基質である GC-7 および補酵素 NAD との共結晶においては α -ヘリックスを形成していた部分が、これらアロステリック阻害薬との共結晶では解けて、ループ構造へと変化することを見出した。これら二つのケモタイプと標的分子の相互作用の解析結果は、今回発見したアロステリックポケットが汎用性の高い阻害剤の結合サイトであり、DHPS が有望な薬剤標的となり得ることを示している。さらに、筆者は DHPS タンパク質の活性・非活性型コンフォメーション解析を通じて新規ケミカルプローブによる酵素阻害メカニズムを明らかにした(第二章)。

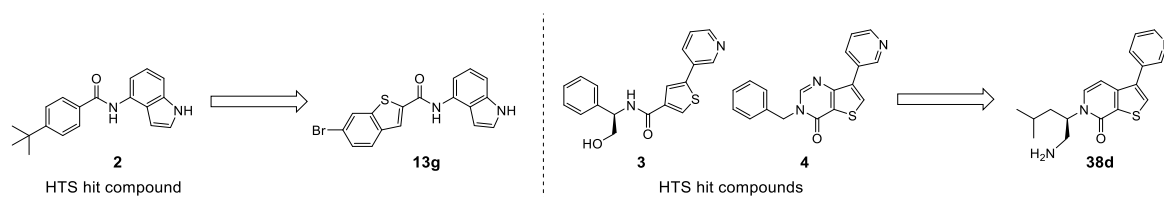


Figure 4. Discovery of novel chemical probes from HTS hit compounds

上記の DHPS 阻害薬の創製に加えて、ケミカルプローブの情報を利用した複数標的阻害薬の分子設計を目的に Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬の合成研究も実施した。前節で述べたように Mcl-1 および Bcl-xL を同時に阻害することで固形癌に対する有効性が期待できるが、その方法としては、それぞれに対する選択的阻害剤の併用もしくは二重阻害剤の単剤使用が考えられる。一般的に選択的阻害剤の併用は、それぞれの薬剤特性の理解が進んでいる場合、その併用効果の検証が容易になり臨床応用も期待できる。これに対して二重阻害剤の場合は、期待する阻害活性を両立する化合物の創出が難しい一方、単一化合物の薬物動態特性をもとに薬効や毒性の評価が可能であることが大きな利点である³⁸⁾。本研究開始当時、臨床試験に進んだ Mcl-1 阻害薬(Fig. 2(B))は無く薬剤特性が不明であったこと、さらには単一薬剤による治療の利点をふまえ、筆者は Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬の創製を目指すこととした。

Bcl-2 ファミリーの阻害薬はタンパク質間相互作用 (Protein-Protein interaction: PPI)を阻害する必要がある、二重阻害薬の創製には適切なケミカルプローブの情報に基づく論理的な分子設計が不可欠である。筆者は Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬の創製に向けて、Figure 5 に示す既知の Bcl-2 ファミリー阻害剤³⁹⁾⁻⁴¹⁾の構造を足掛かりに、個々のタンパク質の阻害に重要な構造の探索から開始した。

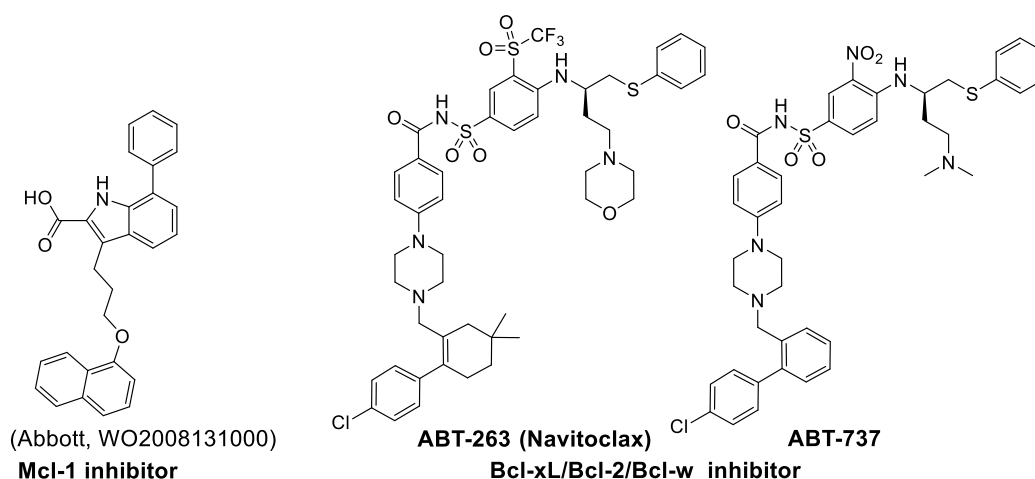


Figure 5. Reported Bcl-2 family inhibitors

Mcl-1 に関しては、Abbott 社が報告した Mcl-1 阻害剤³⁹⁾の構造に基づく骨格変換のデザインにより Mcl-1 選択的阻害活性を有するピラゾロ[1,5-*a*]ピリジン誘導体 **39** を創出した。得られた新規ケミカルプローブ **39** と Mcl-1 タンパク質との共結晶化および X 線結晶構造解析を当研究グループ内で実施し、**39** の結合様式を明らかにした。Bcl-xL に関しては、Abbott 社が創製した Bcl-xL/Bcl-2/Bcl-w 阻害薬 ABT-263⁴⁰⁾の部分構造探索により、Bcl-xL 阻害活性に重要な構造を有する化合物 **51** を特定した。これらケミカルプローブの情報から、筆者は Mcl-1 および Bcl-xL それぞれに対する選択的阻害化合物を部分構造に有するハイブリッド化合物をデザインし、強力な二重阻害活性を有する化合物 **61** を創出した (Fig. 6)。さらに、得られたハイブリッド化合物と Mcl-1 および Bcl-xL との共結晶構造解析を行い、ハイブリッド化合物のデザインコンセプトが達成されていることを実証した (第三章)。

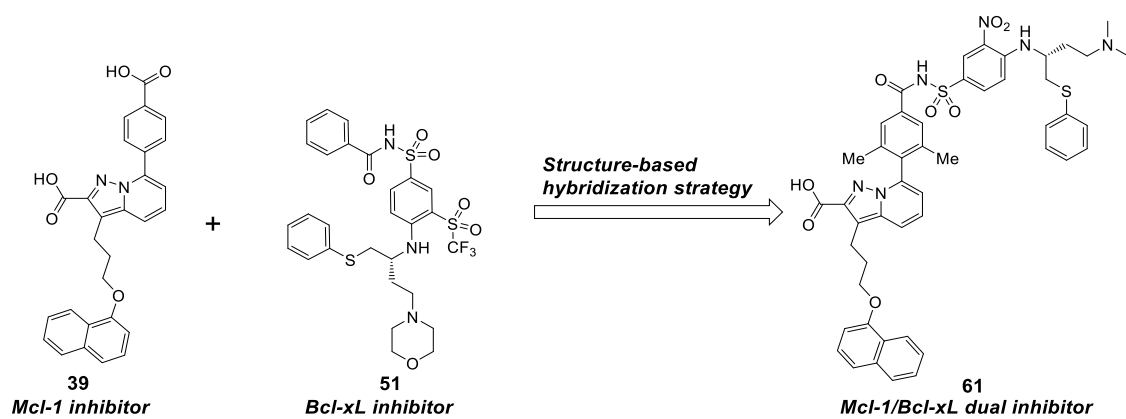


Figure 6. Discovery of Mcl-1/Bcl-xL dual inhibitor

第二章 DHPS に対する新規ケミカルプローブの創製

第一節 薬剤標的としての DHPS および構造情報

緒言で述べた通り、DHPS 阻害薬は eIF5A の機能の抑制により癌細胞のタンパク質翻訳過程を調節する First-in-class の抗癌薬として期待されるが、これまでのところ DHPS を標的とした薬剤が臨床試験に進んだ例は無い。また、その阻害薬としては GC-7 に代表される基質 spermidine の類縁体が知られているのみであり、補酵素 NAD 類縁体については報告例はない (Fig. 7)³³⁾⁻³⁷⁾。

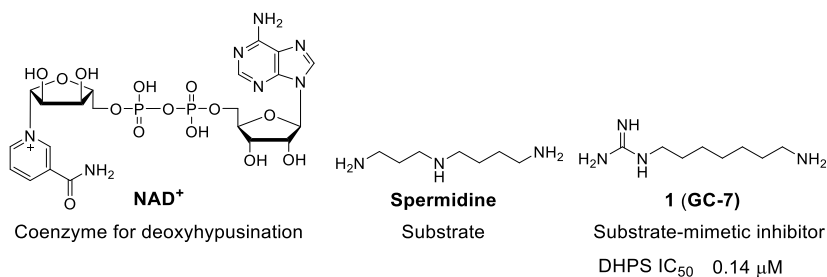


Figure 7. NAD⁺, spermidine, and GC-7 structures.

GC-7 に関しては NAD および DHPS タンパク質との三者複合体の共結晶情報が報告されており^{42),43)}、当研究グループ内においても再現性の確認を目的に同様の三者複合体の共結晶を作成して構造情報を取得した (Fig. 8)。DHPS は四量体を形成してその酵素機能を発揮すると考えられており (Fig. 8(A))、NAD の結合サイトは対面の DHPS タンパクにおける spermidine もしくは GC-7 結合サイトの近傍に位置する (Fig. 8(B))。生体内ではこのようなコンフォメーションを取ることで、NAD と spermidine がそれぞれの反応点が近くなるように結合し、酵素反応が進行すると考えられる。また、GC-7 は spermidine を模倣した結合様式を取ることで酵素反応を阻害する。

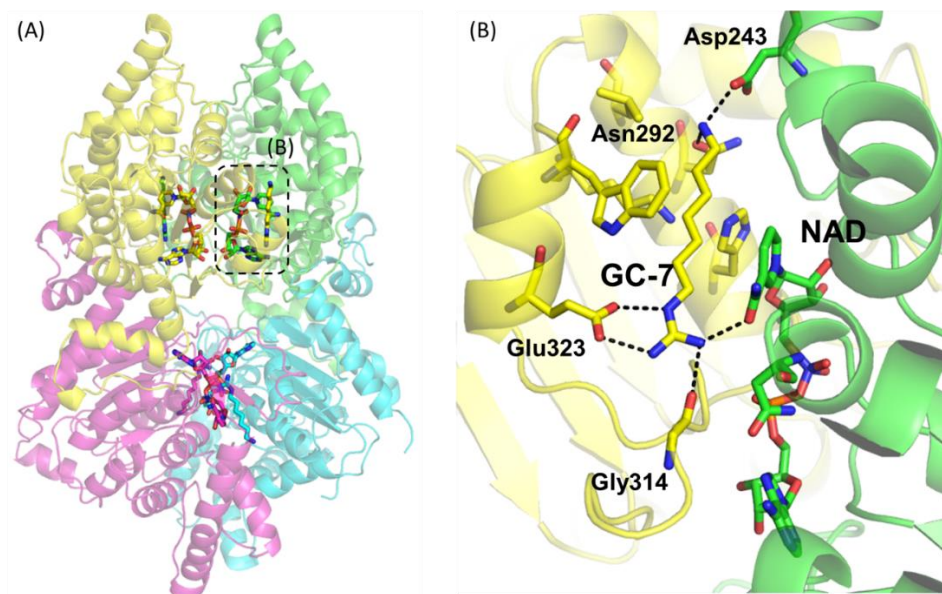


Figure 8. (A) Structure of DHPS in complex with NAD and GC-7 at a resolution of 1.65 Å (PDB ID 6P4V). The protein is colored by chain and shown as a cartoon. NAD and GC-7 are shown in sticks. (B) Closeup view highlighting the hydrogen bonds (dash lines) between GC-7 and DHPS/NAD. The all images were prepared using PyMOL.⁴⁴⁾

一方、GC-7 はグアニジン構造を有する塩基性の高い化合物であり、その低い膜透過性から、薬剤もしくは研究を進める上でのツール化合物としては適していない。また、各種ポリアミンを基質とする他の生体内タンパク質に対する選択性が低いことも懸念される^{45),46)}。よって、DHPS の薬剤標的としての評価が進んでいないことが課題であり、適切なケミカルプローブが望まれている。そこで、当研究グループにおいて、**drug-like** な構造を有する新規 DHPS 阻害薬の創製を目的とし、武田薬品工業株式会社が保有するライブラリー化合物を用いた HTS を実施した。試験方法としては、トリチウムラベル化した基質 spermidine を用いた DHPS の酵素活性測定法を利用した (Fig. 9(A))。ここでは、spermidine の放射性標識されたアミノブチル部位が DHPS 酵素により eIF5A へ転移し生成する、デオキシハイプシン-eIF5A (Fig. 1) の量

を指標にすることで DHPS の酵素活性を測定した。一つのウェルに 10 化合物を含むミックスライブラリープレートを使用し、約 100 万化合物に対して上記試験方法による最初のスクリーニングを実施し、3 μM の化合物濃度において DHPS 酵素阻害活性が認められたウェルのデコンボリューションにより 80 の DHPS 阻害化合物を得た。その後、濃度依存試験による精査および化合物純度の確認を経て、23 クラスター 76 化合物のヒットを同定した (Fig. 9(B))。筆者は、GC-7 のように spermidine を模倣したアルキルアミンではないことに加え、分子量が低く合成展開が容易である利点を有するインドール誘導体 **2** とチオフェン誘導体 **3** および **4** の二つのクラスターに着目し、合成研究を開始した。

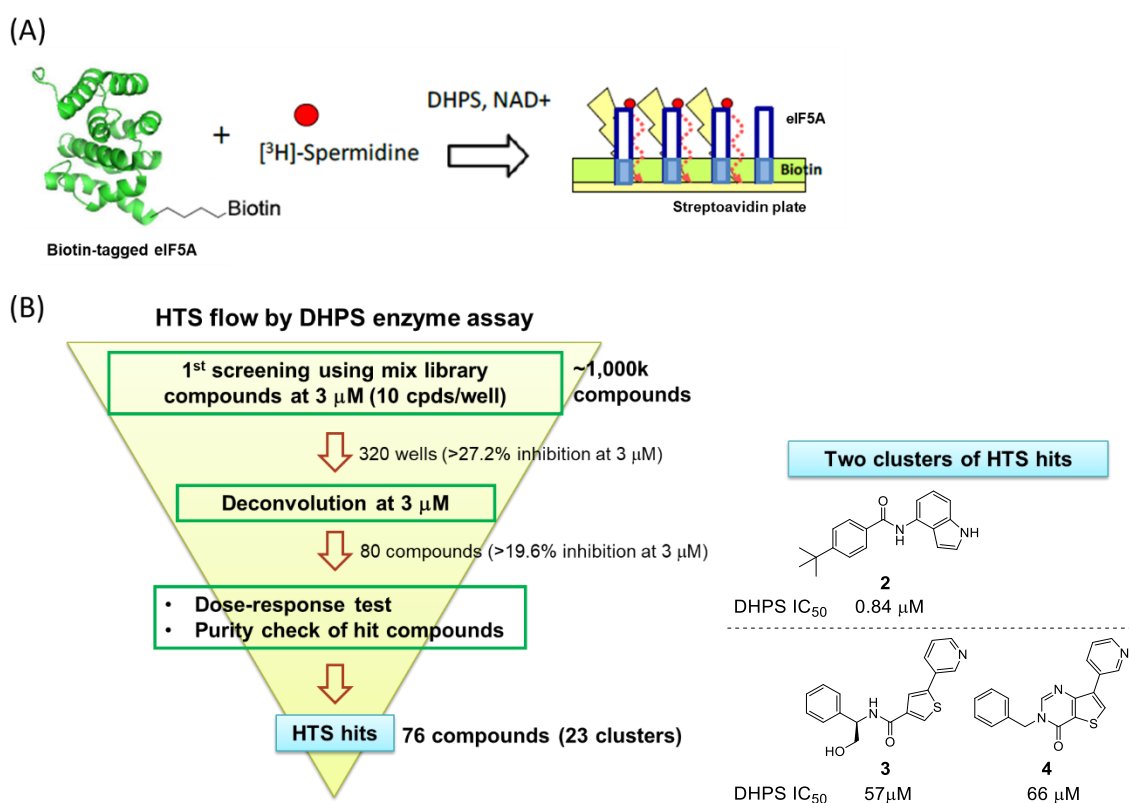


Figure 9. (A) Schematic diagram of DHPS enzyme assay. Radioactivity of deoxyhypusinated biotin-eIF5A captured by Streptavidin plate was measured to determine activity of DHPS enzyme. (B) HTS flow and chemical structures of hit compounds. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of

percent inhibition data.

本論文では、第二節でヒット化合物 **2** のケモタイプ¹、第三節でヒット化合物 **3** および **4** のケモタイプについて、新規誘導体の合成、構造活性相関を述べ、第四節で共結晶情報に基づく DHPS の機能解析について論じる。

第二節 新規 DHPS 阻害薬創製およびアロステリックサイトの発見

第一項 ドラッグデザインおよび合成

研究開始当初は、ヒット化合物 **2** と DHPS タンパク質との共結晶化検討において、望みの共結晶を得ることはできず、本ケモタイプの DHPS に対する結合様式は不明であった。また、当研究グループ内において、化合物 **2** が NAD 結合ポケットに結合することを仮定したドッキングモデルの作成を計算化学手法により検討したが、適切な結合様式を予測することは困難であった。そこで筆者は、ヒット化合物 **2** を出発点に、リガンドベースの構造活性相関研究として、アミド部位および母核インドールの変換体を各種デザインし、さらにアミド側鎖変換体についても種々合成し、活性増強を目指すこととした (Fig. 10)。

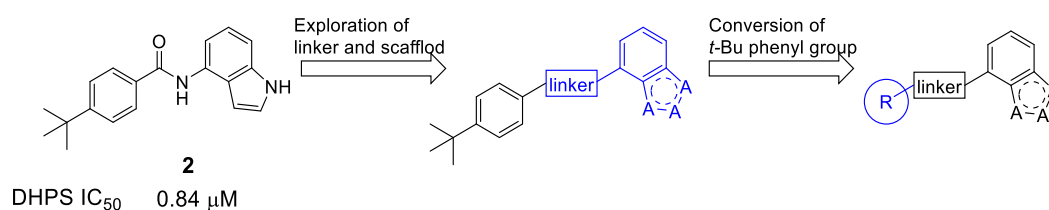
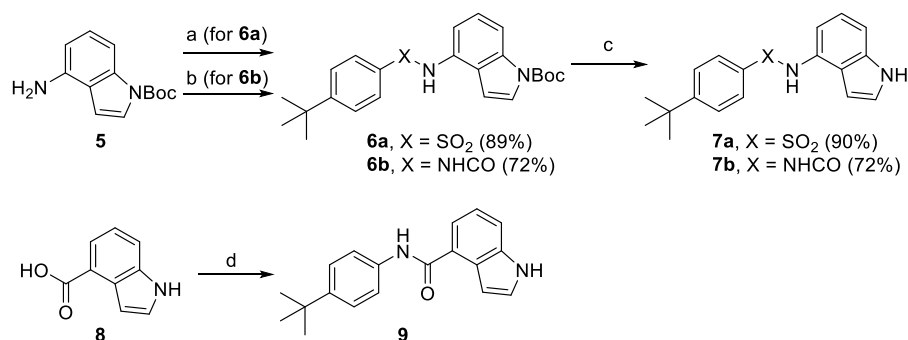


Figure 10. Synthetic plan from HTS hit compound **2**.

¹ ケモタイプ：薬理作用を示す上で必要な置換基や似通った母核を有し、化学構造上の特徴を共有する化合物群

初めに、アミド部位変換体の合成法を Scheme 1 に示す。4-アミノインドール体 **5** に 4-*tert*-ブチルベンゼンスルホニルクロリドもしくは 4-*tert*-ブチルフェニルイソシアナートを反応させた後、トリフルオロ酢酸による酸性条件下、Boc 基を脱保護し **7a, b** を得た。また、4-カルボキシインドール体 **8** から EDC-HCl および HOBt との反応によって得られる活性エステルに 4-*tert*-ブチルアニリンを縮合し、逆アミド体 **9** を合成した。

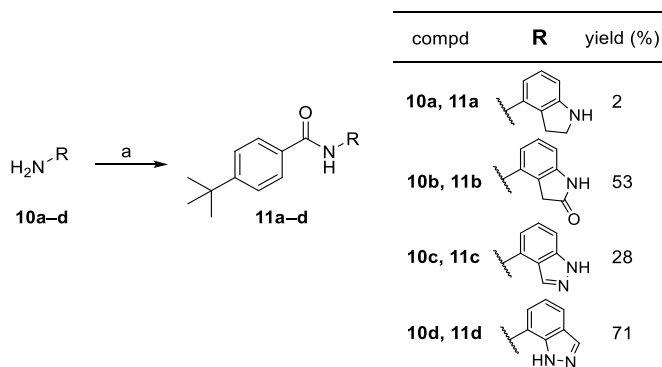
Scheme 1. Synthesis of Indole Derivatives **7a, b** and **9**^a



^aReagents and conditions: (a) 4-*tert*-butylbenzenesulfonyl chloride, pyridine, 0 °C; (b) 4-*tert*-butylphenyl isocyanate, THF; (c) TFA, MeCN; (d) 4-*tert*-butylaniline, EDC-HCl, HOBt-H₂O, Et₃N, DMF, 64%.

母核インドールの変換体 **11a-d** は Scheme 2 に示す通り、対応するアリールアミン **10a-d** と 4-*tert*-ブチルベンゼンカルボニルクロリドを縮合して合成した。

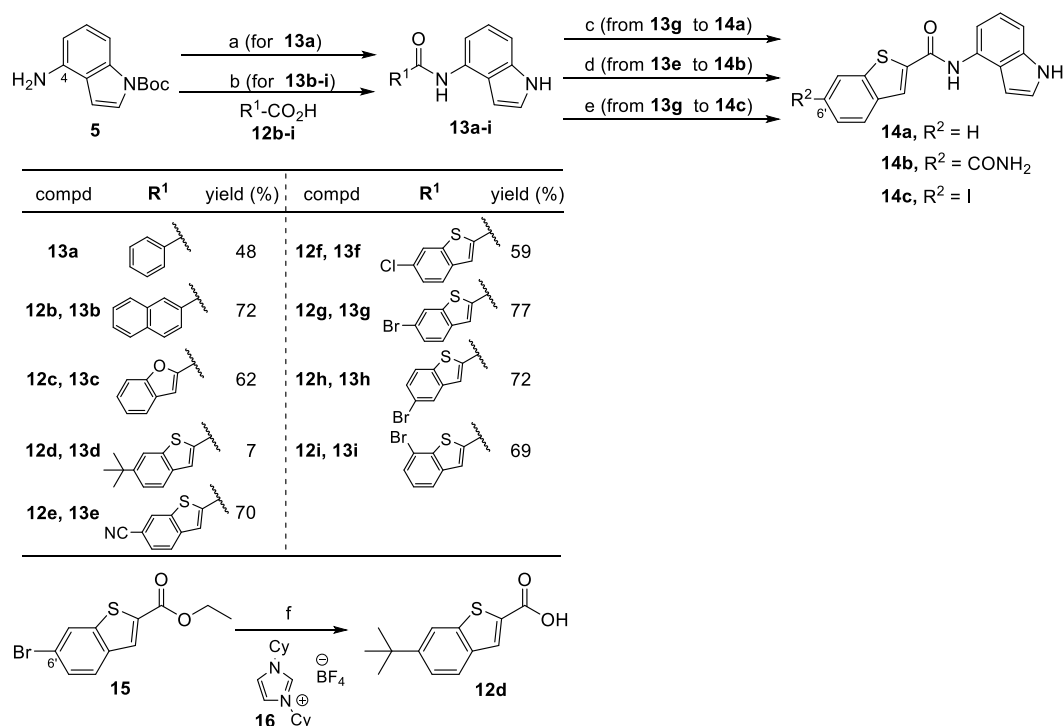
Scheme 2. Synthesis of Compounds 11a–d^a



^aReagents and conditions: (a) 4-*tert*-butylbenzoyl chloride, pyridine, 0 °C.

アミド側鎖変換体の合成法を Scheme 3 に示す。4-アミノインドール体 **5** と塩化ベンゾイルもしくはカルボン酸 **12b–i** を縮合した後、トリフルオロ酢酸による酸性条件下、Boc 基を脱保護し **13a–i** を得た。ここで用いたカルボン酸 **12d** は、ブロモベンゾチオフェン体 **15** に対しリガンド **16** を用いた熊田カップリング反応⁴⁷⁾により低収率(2%)ながら *tert*-ブチル基を導入し、得られたエステル体をアルカリ加水分解し合成することに成功した。6'位無置換ベンゾチオフェン体 **14a** はブロモ体 **13g** からパラジウム触媒を用いた加水素分解により合成した。6'-カルボキサミド体 **14b** は 6'-シアノ体 **13e** の加水分解反応により得た。また、ブロモ体 **13g** に *N,N'*-ジメチルエチレンジアミンおよびヨウ化ナトリウム存在下、ヨウ化銅を作用させることで 6'-ヨードベンゾチオフェン体 **14c** を得た。

Scheme 3. Synthesis of Compounds 13a–i and 14a–c^a



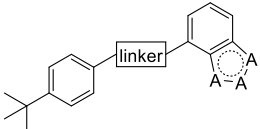





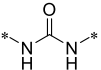











^aReagents and conditions: (a) (i) benzoyl chloride, THF; (ii) TFA, toluene; (b) (i) **12b–i**, oxalyl chloride, DMF, THF; (ii) TFA, toluene; (c) 10% Pd/C, H₂, EtOH, THF, 68%; (d) K₂CO₃, 35% H₂O₂, DMSO, 94%; (e) CuI, NaI, *N,N'*-dimethylethylenediamine, NMP, 120 °C, 18%; (f) (i) **16**, *tert*-butyl magnesium chloride, nickel(II) chloride hexahydrate, THF, –15 °C; (ii) 2 M NaOH, EtOH, 2%.

第二項 構造活性相関研究

第一項で述べた手法により合成した化合物の生物活性は、HTSと同様にトリチウムラベル化した spermidine を基質に用いた DHPS 酵素活性試験(Fig. 9(A))により測定し、IC₅₀ 値を指標にその阻害活性を評価した。Table 1 にアミド部位および母核インドールの変換体の阻害活性を示す。化合物デザインにおいて筆者は、初めに HTS ヒット化合物 **2** が有するアミド部位を生物学的等価体(バイオアイソスター)であるスルホンアミド(**7a**)、ウレア(**7b**)および逆アミド(**9**)への変換を検討したが、いずれも活性は大幅に減弱した。そこで、ヒ

ット化合物 **2** のアミド部位を維持したまま骨格変換を実施した。インドール環からインドリン環(**11a**)への変換では大幅な活性減弱がみられた一方、インドリノン体 **11b** は 42 μM の IC_{50} 値を示した。これは化合物 **2** のインドール窒素上の酸性プロトンが阻害活性発現に重要であることを示唆する結果である。実際に、窒素の位置が異なるインダゾール体 **11c** と **11d** では、化合物 **2** と同様の位置に酸性プロトンを有する **11c** の方が強い活性を示した。しかしながら、上記の検討からアミドリンカーとインドール骨格の変換でヒット化合物 **2** からの活性向上は認められなかったことから、これらの構造を維持したままさらなる検討を継続した。

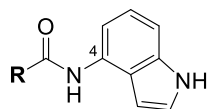
Table 1. SAR for Linkers and Scaffolds **7a–b**, **9**, and **11a–d**

			
compound	linker		DHPS IC_{50} (μM) ^a
2 (HTS hit)			0.84
7a			>100
7b			>100
9			99
11a			>100
11b			42
11c			22
11d			>100

^aDetermined by enzyme assay. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of percent inhibition data.

続いて、アミド側鎖変換体の酵素阻害試験結果を Table 2 に示す。ヒット化合物 **2** が有する *tert*-ブチル基の効果を調べるため、無置換体 **13a** を検証したが、大幅に活性が低下した。そこで筆者は脂溶性の高い構造が活性発現に重要であると仮定し、二環性構造を有するアミド側鎖に変換した。その結果、ナフチル体 **13b** およびベンゾフラン体 **13c** では大幅に活性が減弱したが、ベンゾチオフェン体 **14a** がヒット化合物と同程度の活性 (IC₅₀ = 2.3 μM) を示した。この段階において **14a** が活性を示す理由は不明であったが、*tert*-ブチル基を有する化合物 **2** がフェニル体 **13a** より大幅に活性が強い点を参考に、**14a** のベンゾチオフェン環への *tert*-ブチル基の導入を試みた。その結果、*tert*-ブチル体 **13d** に期待した活性向上は認められなかったものの、無置換体と同等の活性を示したことから、ベンゾチオフェン環 6'位は立体的に嵩高い置換基を許容することを見出した。そこで、この位置における置換基探索のため、極性が比較的高くタンパク質との水素結合の形成が可能な置換基としてシアノ基(**13e**)およびカルボキサミド基(**14b**)を、*tert*-ブチル基とは異なる脂溶性置換基としてハロゲノ基(**13f-g**, **14c**)をデザインし検証した。その結果、カルボキサミド体 **14b** では活性が減弱するものの、シアノ基(**13e**) およびハロゲノ基(**13f-g**, **14c**)の導入で活性が向上し、6'-ブromo体 **13g** が 0.062 μM という良好な IC₅₀ 値を示すことが判明した。一方、ブromo基の置換位置を検証したところ、5'-および 7'-ブromo体 (**13h** および **13i**)では無置換体 **14a** と比べても大幅に活性が減弱したことから、6'位へのブromo基の導入が著しく活性向上に寄与することが確認された。

Table 2. SAR for Left Hand Site **13a–i** and **14a–c**



compound	R	DHPS IC ₅₀ (μM) ^a	compound	R	DHPS IC ₅₀ (μM) ^a
2 (HTS hit)		0.84	13e		0.43
13a	phenyl	>100	14b		11
13b	2-naphthyl	>100	13f		0.12
13c		>100	13g		0.062
14a		2.3	14c		0.092
13d		5.4	13h		>100
			13i		>100

^aDetermined by enzyme assay. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of percent inhibition data.

以上の通り、アミド側鎖の変換を検討した結果、ヒット化合物から大幅に酵素阻害活性が向上した 6'-ブロモベンゾチオフエン体 **13g** を創出した。次項では本化合物と DHPS タンパク質との X 線共結晶構造解析について述べる。

第三項 共結晶構造解析

前項で得られた新規ケミカルプローブ **13g** の DHPS に対する結合様式を解明するため、当研究グループにおいて DHPS タンパク質との共結晶化および

X線結晶構造解析を実施し、1.95 Åの解像度にて共結晶構造の取得に成功した(Fig. 11)。その結果、前述の GC-7 および NAD との共結晶と同様に、DHPS タンパク単量体に対して1分子の **13g** が結合した DHPS 四量体の形成が確認された。一方で、**13g** の結合部位は spermidine および NAD 結合サイトに隣接するアロステリックポケットであることも判明した。(DHPS の構造変化によるアロステリックポケットの発現については第四節にて詳述する。)

続いて、筆者は **13g** と DHPS タンパク質の相互作用をもとに、前項で取得した構造活性相関の結果との比較検証を実施した。**13g** が結合したアロステリックポケット周辺を拡大した図を Figure 11 (B), (C)に示す。まず、インドール部位に関しては、His288 とインドール環との NH- π 相互作用、および Asn267 とインドール 1 位窒素との水素結合が確認され、活性発現に重要な構造であることを裏付ける結果であった。また、アミド部位に関しても、そのカルボニル酸素は Lys329⁴⁸⁾と、アミド窒素上の水素原子は水分子を介して Asp238 と高度に水素結合を形成していることが判明した。活性増強に重要であった 6'-ブロモベンゾチオフェン部位に関しては、硫黄原子とカルボニル酸素との分子内相互作用⁴⁹⁾により、ベンゾチオフェン環がタンパク質の阻害に適した角度をとっていると考えられる。また、ループ上の Leu281 の主鎖カルボニル酸素と 6'位ブロモ基との間に特異な相互作用 (C=O...Br) が確認された。この相互作用は C-Br 結合の延長線上の、臭素原子の末端にあたる部分が僅かに δ^+ 性を有することに起因する⁵⁰⁾。ブロモ基は全体としては δ^- 性であるが、この部位のみは、ちょうど“水素結合の donor”と同じような役割を有するためカルボニル酸素との相互作用を獲得できたと考えられる⁵¹⁾。また、6'位クロロおよびヨウ素体(**13f** および **14c**, Table 2) も同様の相互作用の影響で強力な酵素阻害活性を示したと考察した。

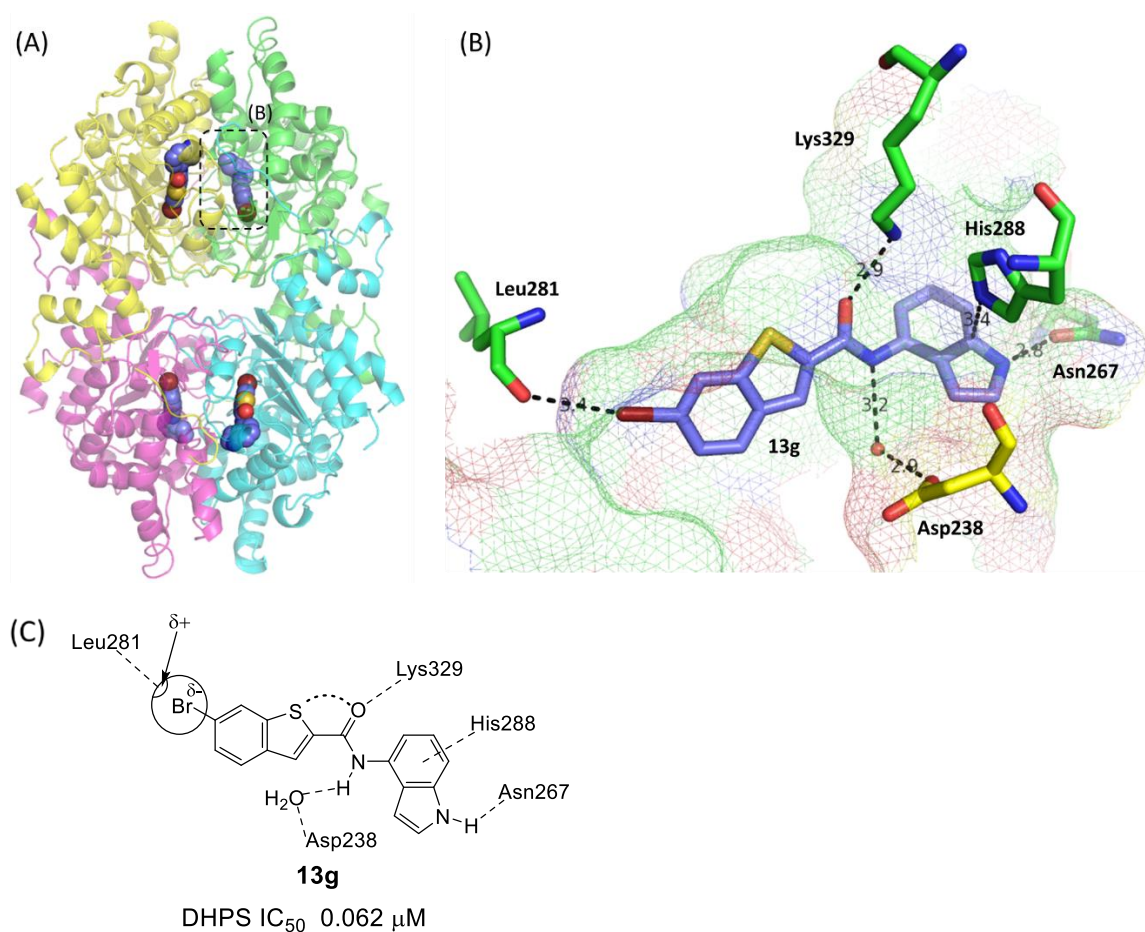


Figure 11. Co-crystal structure of compound **13g** with DHPS (PDB ID 6PGR). (A) Tetramer of the structure, with each monomer indicated by a different color. **13g** is shown as spheres. (B) The allosteric binding site of **13g**. DHPS is shown at the surface. **13g** and a part of the surrounding residues are shown in sticks. (C) Schematic diagram of interactions in stabilizing **13g** at the allosteric site.

以上の通り、筆者は spermidine を模倣した既知の阻害剤とは全く異なる構造と強力な阻害活性を有する新規ケミカルプローブ **13g** を創出した。本化合物の結合様式は共結晶構造解析により明らかとなり、DHPS は阻害剤の結合が可能なアロステリックサイトを有することを発見するに至った。そこで筆者は DHPS の薬剤標的としての更なる可能性を探索するため、異なるファーマコフォアを有するケモタイプについても合成研究を実施した。その結果を

次節に述べる。

第三節 強力な活性を有する新規アロステリック阻害薬の創製

第一項 ドラッグデザインおよび合成

HTS により得られたチオフエン誘導体 **3** および **4** は、DHPS タンパク質との共結晶を得ることはできず結合様式は不明であった。しかしながら、第二節で述べたインドール誘導体とは異なるファーマコフォア²を有することから、新規ケミカルプローブ創出の可能性に期待し、筆者はこれらをシード化合物として酵素阻害活性の増強を指向した合成研究を開始した。社内の化合物ライブラリーに含まれる類縁体を用い、第二章で示したスクリーニング法(Fig. 9(A))により初期構造活性相関を取得したところ、3-ピリジル基が活性発現に必須であった。また、Figure 12 に示すように両化合物の構造の特徴から、分子左側にベンジル基を有する二環性母核の構造を活性発現のために重要なファーマコフォアと推定し、二環性母核および母核窒素上置換基の最適化による酵素阻害活性増強を目指し検討を開始した。

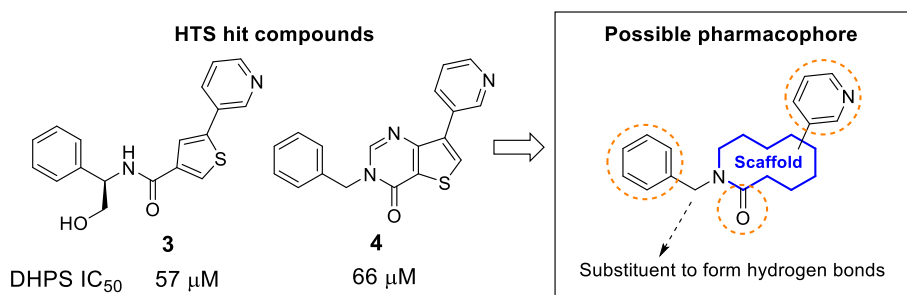


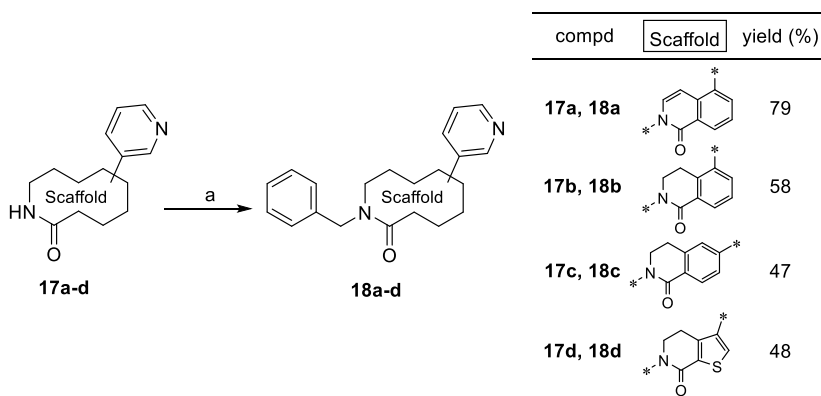
Figure 12. Structures of HTS hits (**3** and **4**), and a possible pharmacophore.

最適な二環性母核を探索するため、初めにベンジル誘導体 **18a-d** を、3-ピ

² ファーマコフォア: 薬剤がタンパク質等の標的分子と相互作用し薬理作用を示すために必要な官能基群およびその相対的な立体配置。

リジル基を有する **17a-d** から合成した (Scheme 4)。(**17a-d** の合成法は実験の部に示す。)

Scheme 4. Synthesis of Benzyl Derivatives **18a-d**^a



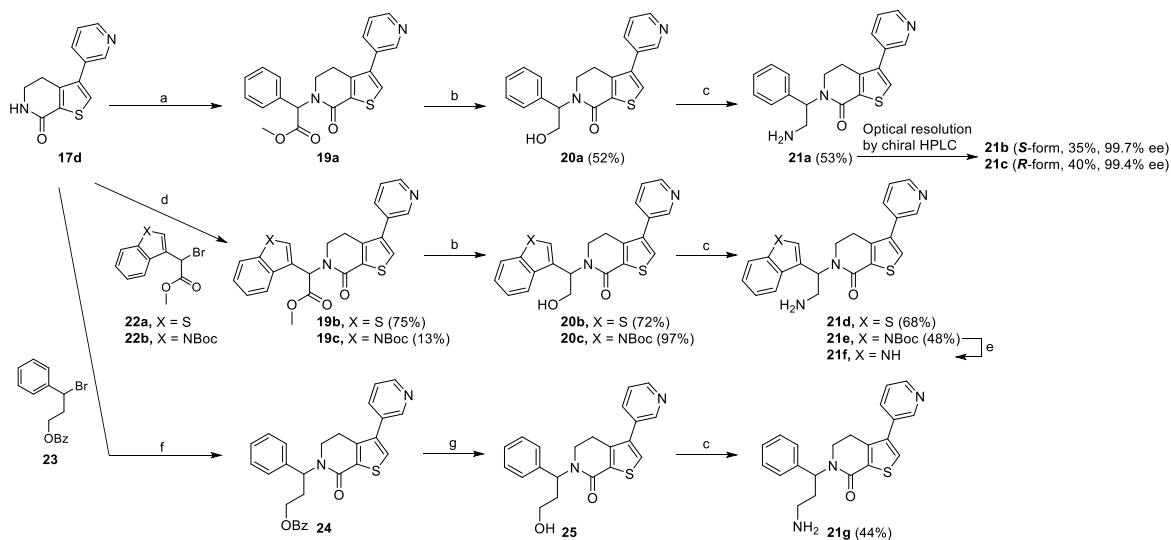
^aReagents and conditions: (a) benzyl bromide, NaH, DMF.

続いて筆者は、ジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン誘導体の 6 位置換基変換体の合成法を確立した (Scheme 5)。**17d** を用いて 2-ブロモ-2-フェニル酢酸メチルとの置換反応を行いエステル体 **19a** を合成した。**19a** のエステル基を塩化カルシウムによる活性化条件下、テトラヒドロホウ酸ナトリウムにより還元し⁵²⁾、アルコール体 **20a** とした後、光延反応によるフタルイミド体への変換、続くヒドラジンによる脱保護によりアミン **21a** をラセミ体として合成した。さらに、キラル分取 HPLC により光学分割を行った後、結晶化することで **21b** および **21c** を得た。いずれも低分子 X 線結晶構造解析により、その絶対配置がそれぞれ **S** および **R** であることを決定した。

ベンゾチオフェン体 **21d** および Boc 保護基を有するインドール体 **21e** は、対応するブロモ体 **22a,b** と **17d** から、**21a** の合成法と同様に、母核 6 位窒素との置換反応、エステル基の還元、およびヒドロキシ基のアミノ基への変換の 3 工程で合成した。また、インドール体 **21f** は **21e** の Boc 基を塩基性条件下脱保護することで得た。

21a と比べ炭素長いアミノアルキル基側鎖を有する化合物 **21g** は、末端にベンゾイルオキシ基を有する臭化物 **23** を用いることにより合成した。**23** および **17d** を塩基性条件下反応させ *N*-アルキル体 **24** を得た後、アルカリ加水分解によりベンゾイル基を除去しアルコール体 **25** とし、**21a** の合成法と同様に、光延反応によるアルコールのフタルイミド体への変換、続くヒドラジンによる脱保護により合成した。

Scheme 5. Synthesis of Compounds 19a, 20a and 21a–g^a



^aReagents and conditions: (a) methyl 2-bromo-2-phenylacetate, potassium *tert*-butoxide, THF, 90%; (b) NaBH₄, CaCl₂, MeOH; (c) (i) phthalimide, PPh₃, diisopropyl azodicarboxylate, toluene; (ii) hydrazine monohydrate, EtOH, 70 °C; (d) **22a–b**, potassium *tert*-butoxide, THF; (e) K₂CO₃, MeOH, H₂O, 80 °C, 62%; (f) **23**, potassium *tert*-butoxide, DMF, 52%; (g) 2 M NaOH, MeOH, 87%.

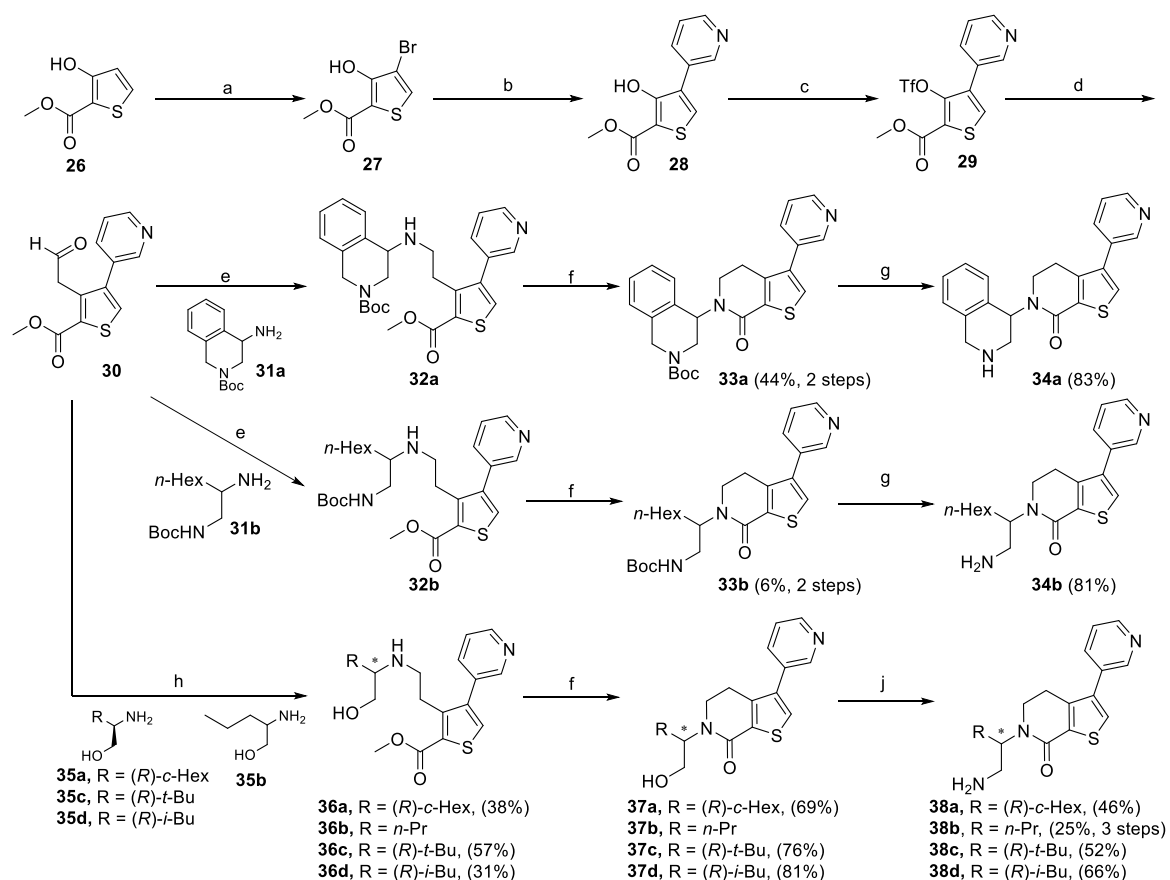
上述のように、中間体 **17d** を用いたジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジンの 6 位置換基変換体の合成経路は、**17d** の母核アミド窒素のアルキル化により、置換基を導入する必要がある。よって、前駆体であるブロモ体の合成が困難な場合、もしくは嵩高い側鎖により反応性が低下したブロモ体と **17d** との置換反応が進行しない場合等には目的の誘導体を得ることはできず、本合成経路

の汎用性は必ずしも高くない。そこで筆者は、ジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン骨格の構築前に 6 位置換基に相当する側鎖を導入した中間体を経る新たな合成法を確立した (Scheme 6)。

ヒドロキシチオフエン **26** を出発原料に、ブロモ化、続く鈴木カップリング反応により 3-ピリジル基を導入した後、遊離のヒドロキシ基をトリフラートとし **29** を得た。続いて、(*E*)-1-エトキシエテン-2-ボロン酸ピナコールエステルとの鈴木カップリング反応により得られるエノールエーテルを酸性条件下、加水分解しアルデヒド **30** を合成した。ここで、ジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン骨格の 6 位置換基に相当する側鎖を 3-アミノテトラヒドロイソキノリン **31a** との還元的アミノ化反応により導入し、環化前駆体 **32a** を得た。続いてナトリウムメトキシドを用いた塩基性条件下にて環化させることで、6 位に置換基を有するジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン骨格を構築することに成功した。得られた環化体 **33a** の Boc 基を酸性条件下で脱保護し **34a** を得た。同様の手法を用いて、アルデヒド **30** およびアルキルアミン **31b** から *n*-ヘキシル基を側鎖に有する **34b** を合成した。

ヒドロキシ基を側鎖に有するアミン **35a-d** (**35a,c,d** は *R* 体) とアルデヒド **30** の還元的アミノ化反応により得られた環化前駆体 **36a-d** は、ナトリウムメトキシドを用いて環化させ、得られたアルコール **37a-d** から光延反応によるフタルイミド体への変換、続くヒドラジンによる脱保護によりアミノ体 **38a-d** へと導いた。

Scheme 6. Synthesis of Compounds 34a–b and 38a–d^a



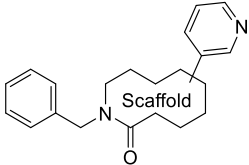
^aReagents and conditions: (a) bromine, AcOH, 61%; (b) 3-pyridineboronic acid, Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, DME, H₂O, 80 °C, 72%; (c) Tf₂O, pyridine; (d) (i) (*E*)-1-ethoxyethene-2-boronic acid pinacol ester, Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, DME, H₂O, 80 °C; (ii) 12M HCl, THF, 30% (two steps); (e) **31a–b**, 2-picoline borane, MeOH, AcOH; (f) NaOMe, MeOH; (g) 4 M HCl in EtOAc; (h) **35a–d**, 2-picoline borane, MeOH, AcOH; (j) (i) phthalimide, PPh₃, diisopropyl azodicarboxylate, toluene; (ii) hydrazine monohydrate, EtOH, 70 °C.

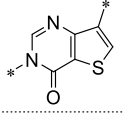
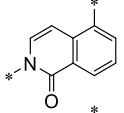
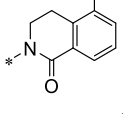
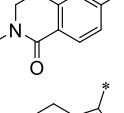
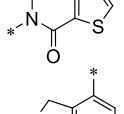
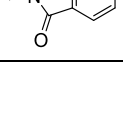
第二項 構造活性相関研究

合成した新規ケモタイプである二環性母核誘導体について、前節と同様に DHPS 酵素活性試験を用いて IC₅₀ 値を指標にその阻害活性を評価した。初めに筆者は、DHPS 阻害活性の発現に最適な母核を見い出すために、HTS ヒッ

ト化合物と同様にベンジル側鎖を有する母核変換体 **18a–d**, **39** を用いて阻害活性の比較検証を行った (Table 3)。ヒット化合物 **4** のチエノ [3,2-*d*]ピリミジン環をイソキノリン環 (**18a**) に変換したところ、酵素阻害活性の大幅な向上が確認された ($IC_{50} = 8.7 \mu M$)。さらに、ジヒドロイソキノリン体 **18b** も **18a** と同等の阻害活性を示したことから、二環性骨格の左側の環は芳香環である必要性はないことが分かった。一方、3-ピリジル基の置換位置を隣に変えた **18c** では大幅な活性減弱が確認されたことから、母骨格からの 3-ピリジル基の方向が適切かどうかは活性発現に重要であることが示唆された。以上の考察をふまえ、6,5-もしくは 5,6-縮環骨格の可能性を検証するため、ジヒドロチエノ [2,3-*c*]ピリジン体 **18d** およびイソインドリン体 **39** をデザインしたところ、**18d** が骨格変換体の中で最も強い活性を示した ($IC_{50} = 6.3 \mu M$)。

Table 3. SAR for Fused Ring Scaffolds **18a–d** and **39**



compound	Scaffold	DHPS IC_{50} (μM) ^a
4 (HTS hit)		66
18a		8.7
18b		8.2
18c		>100
18d		6.3
39		53

^aDetermined by enzyme assay. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of percent inhibition data.

以上の結果を踏まえて筆者は、活性の強いジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン骨格を有する誘導体において、さらなる活性向上を目指して官能基の導入を実施した。前述の HTS ヒット化合物 **3** において、側鎖ベンジル位におけるヒドロキシメチル基が許容されていることから、ジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン誘導体においても同様の位置への極性基導入による活性向上を期待し検討を行った (Table 4)。その結果、カルボキシメチル基 (**19a**) の導入では酵素阻害活性が大幅に減弱するものの、化合物 **3** と同様のヒドロキシメチル基 (**20a**) の導入で大幅に活性が向上し、この置換位置における水素結合ドナーが活性向上に有用であることが示唆された。そこで、ヒドロキシ基をアミノ基へと変換した **21a** を評価したところ、さらなる活性向上が認められた (IC₅₀ = 0.018 μM)。 **21a** はラセミ体であることから、両エナンチオマー間の活性差の有無を確認するため光学分割して *S* 体 **21b** および *R* 体 **21c** を評価したところ、*R* 体が eutomer であることを見出した (**21b**: 0.16 μM, **21c**: 0.014 μM)。一方、アミノ基部位の最適な鎖長を探索するため、一炭素増炭した **21g** を合成したが活性は減弱した。また、側鎖ベンゼン環とアミノ基を環化して立体配座を固定化させた誘導体 **34a** においても活性は減弱し、アミノ基の位置によってその阻害活性に大きな違いが出ることも判明した。上記の検討ではアミノメチル基が最も強い阻害活性を示したことから、この部分構造を維持したまま末端ベンゼン環の変換による構造活性相関を検証することとした。

Table 4. SAR for Substituents of 5,6-Dihydrothieno[2,3-*c*]pyridine-7(4*H*)-one Derivatives

compound	R ¹	DHPS IC ₅₀ (μM) ^a
18d	Bn	6.3
19a^b		>100
20a^b		0.15
21a^b		0.018
21b		0.16
21c		0.014
21g^b		0.44
34a^b		16

^aDetermined by enzyme assay. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of percent inhibition data. ^bRacemate.

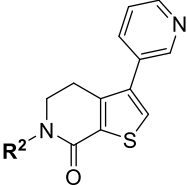
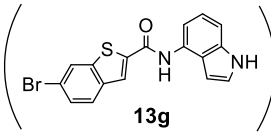
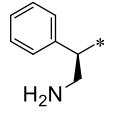
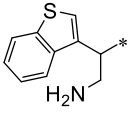
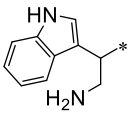
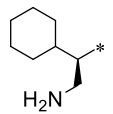
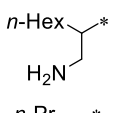
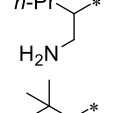
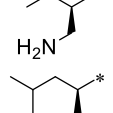
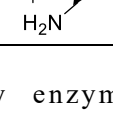
さらなる活性向上を目指すにあたり、酵素阻害試験の新たなアッセイ条件について当研究グループ内において検討した。本試験に用いている DHPS タンパク質の濃度は 0.024 μM であることから、DHPS 濃度の半分、すなわち

0.012 μM が阻害剤の IC_{50} 値の検出下限である。従って、**21c** のように強力な酵素阻害活性 ($\text{IC}_{50} = 0.014 \mu\text{M}$) を示す化合物は強結合阻害 (tight binding inhibition)⁵³⁾により正確に評価できていない可能性が考えられた。そこで、補酵素である NAD の濃度を変化させた時の IC_{50} 値の変化を **21c** および前節の代表化合物 **13g** で検討したところ、どちらの化合物も通常のアッセイ条件である 14 μM NAD ($=K_m$) 存在下に比べて 250 μM の高濃度 NAD 条件で IC_{50} 値の上昇が確認され (Table 5)、NAD 拮抗型の阻害様式を示すことが判明した。この原因については第四節で詳述する。以上の検討より、 IC_{50} 値が上昇する高濃度 NAD 条件においても化合物の阻害活性を評価することで、強結合阻害による影響の無い IC_{50} の濃度域で化合物間の活性の強弱を比較し考察することが可能になる。

そこで筆者は、上記の高濃度 NAD 条件での DHPS 酵素阻害活性測定結果を活用し、さらなる活性向上を目指して **21c** の末端ベンゼン環の変換を実施した (Table 5)。また、酵素阻害活性の評価に加えて、*in vivo* でも使用可能なケミカルプローブもしくは新薬に繋がるリード化合物の創出を見据えて、マウス肝ミクロソーム中での安定性 (代謝安定性) も評価した。初めに、フェニル基を二環性芳香環であるベンゾチオフェン (**21d**) もしくはインドール (**21f**) に変換したところ酵素阻害活性は減弱した。一方、シクロヘキシル体 **38a** は高濃度 NAD 条件下でも 0.17 μM の IC_{50} 値を示し、側鎖の非芳香環化による活性向上が認められたことから、アルキル側鎖の異なる誘導体についてさらに検討した。**38a** のシクロヘキシル基を直鎖型 (**34b**) に変換したところ、強い活性は示すものの、代謝安定性の低下が確認された。脂溶性の指標として用いた clogP 値は 3.67 を示し、脂溶性の高さが代謝安定性低下の一因と考えられる。そこで、脂溶性を低下させるために、より短鎖の *n*-プロピル体 **38b**、分枝状アルキル体 **38c,d** をデザインしたところ、期待通り代謝安定性が改善した。なかでも、イソブチル体 **38d** は良好な代謝安定性に加え、シクロヘキ

シル体 **38a** を上回る強力な活性 (高濃度 NAD IC₅₀ = 0.069 μ M) を示した。

Table 5. Conversion of Benzene Ring to Other Hydrophobic Substituents.

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>R^2</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>13g</p> </div> </div>					
compound	R^2	DHPS IC ₅₀ (μ M) ^a		MLM ^b (μ M/min/mg)	clogP ^c
		at 14 μ M NAD	at 250 μ M NAD		
13g	—	0.062	56	304	3.21
21c		0.014	0.41	71	2.54
21d^d		0.029	0.63	185	3.57
21f^d		0.11	N.D. ^e	59	2.53
38a		0.012	0.17	59	3.14
34b^d		0.030	0.58	114	3.67
38b^d		0.026	0.79	32	2.08
38c		0.011	0.23	37	2.35
38d		0.0092	0.069	44	2.48

^aDetermined by enzyme assay. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of percent inhibition data. ^bThe metabolism clearance of each compound was examined by using mice liver microsomes. ^cDetermined by using Daylight software. ^dRacemate. ^eNot determined.

そこで、**38d** の *in vivo* ツール化合物としての可能性を探索する目的で、汎用系統として使用される ICR マウスにおける薬物動態試験を実施したところ、経口吸収性($F = 11.7\%$)を有することが確認できた (Table 6)。本化合物からさらなる構造最適化を進めることで代謝安定性およびクリアランスや AUC 等の PK パラメータを改善することができれば、ケミカルプローブとしての役割に留まらず、新薬に繋がるリード化合物を創出することも可能であると考えられる。

Table 6. Pharmacokinetic Parameters of **38d** in ICR Mice^a

V_{dss}^b (mL/kg)	CL_{total}^b (mL/h/kg)	C_{max}^c (ng/mL)	AUC_{0-8h}^c (ng·h/mL)	MRT^c (h)	F^d (%)
8491	8965	4.8	13.1	2.46	11.7

^aCassette dosing. Male Institute of Cancer Research (ICR) mice (n=3). ^b0.1 mg/kg, iv. ^c1 mg/kg, po. ^dBioavailability.

以上の通り、ジヒドロチエノ [2,3-*c*] ピリジン 6 位置換基変換体を検討した結果、フェニル体 **21c** から大幅に酵素阻害活性が向上したイソブチル体 **38d** を見出すことに成功した。次項では本化合物と DHPS タンパク質との X 線共結晶構造解析について述べる。

第三項 共結晶構造解析

第二節で述べた **13g** と同様、当研究グループにおける検討により新規ケミカルプローブ **38d** についても DHPS タンパク質との共結晶化に成功したことから、X 線結晶構造解析結果およびそれに基づく筆者の考察を本項にて述べる。

DHPS タンパク質と **38d** の X 線結晶構造解析結果を Figure 13 に示した。

前述の **13g** と DHPS の共結晶構造と同様に、DHPS タンパク単量体に対して 1 分子の **38d** が結合した DHPS 四量体が確認され、**13g** と全く異なる化学構造を有する **38d** も、その結合部位は **13g** と同じアロステリックポケットであることが判明した。一方、その結合様式は大きく異なっており (Fig. 13(B))、それぞれ全く異なる構造活性相関を示すことと合致する。**38d** が結合したアロステリックポケット周辺を拡大した図を Figure 13(C)に示す。**38d** と DHPS タンパク質の相互作用をもとに、前項で取得した構造活性相関との比較検証を実施した。初めに、3-ピリジル部位に関しては、ピリジン環が非常に狭い脂溶性ポケットに結合するとともに、ピリジン環窒素が Ser233 および Asp262 との間で水を介した水素結合を形成しており、活性発現に重要な構造であることと窒素原子の位置が厳密に保たれていることの重要性を裏付ける結果であった。また、母核カルボニル基の酸素原子は Lys287 と水素結合を形成しており、二環性母核およびその側鎖伸長方向が活性発現に重要であった結果は、この相互作用に有利な配座を固定できたためと考えられる。さらに、活性増強に重要であった側鎖アミノ基は Asp238、Asp243 および水との 3 つの水素結合を獲得しており、他の官能基もしくは異なる鎖長を有する誘導体や光学異性体は、この水素結合を有効に形成できなかったため活性が大きく減弱したと考えられる。また、イソブチル側鎖は Phe100、Ala270、Met278、および Val286 で囲まれた脂溶性ポケットを占有することで DHPS との親和性向上に寄与していることが示唆された。

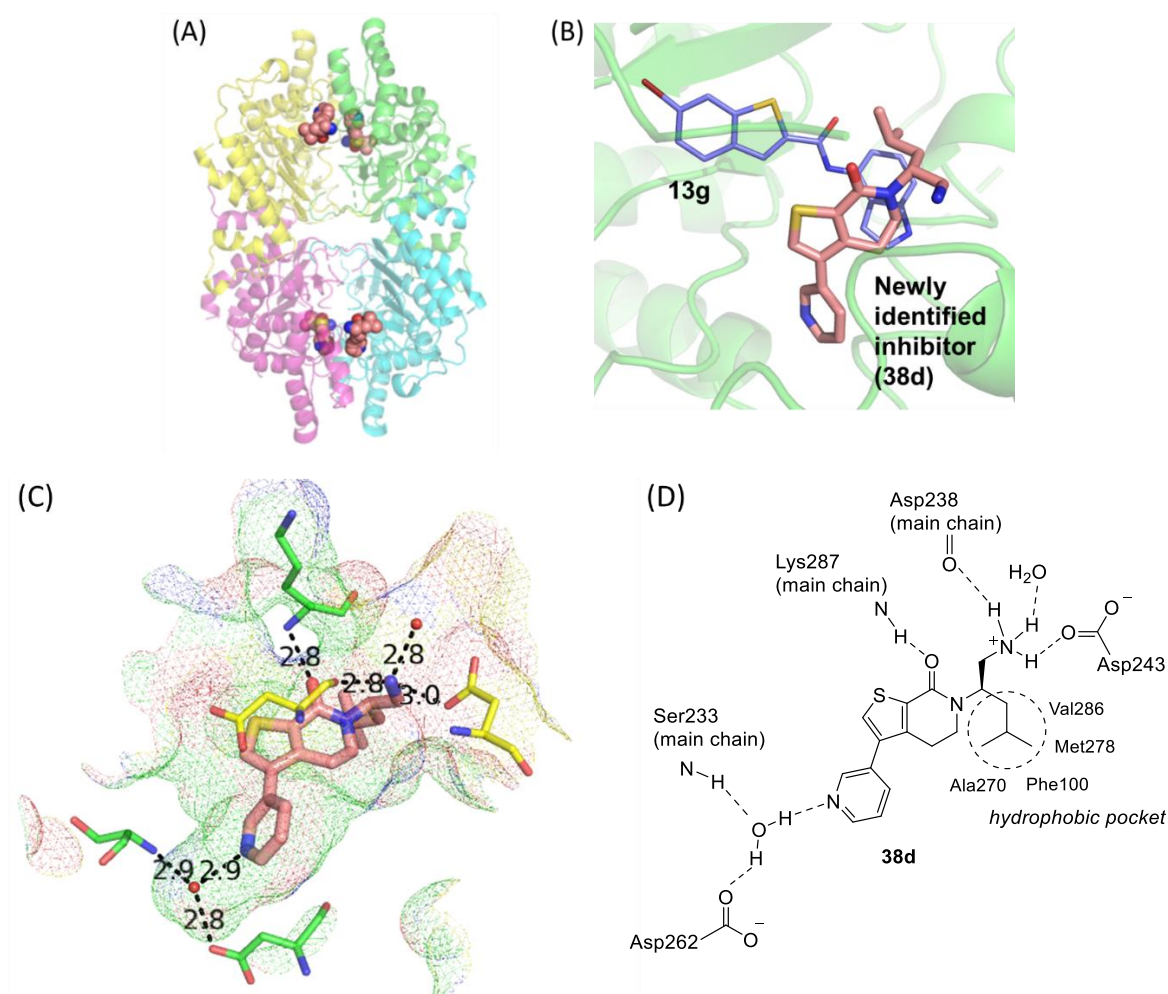


Figure 13. Co-crystal structure of compound **38d** with DHPS (PDB ID 6WL6). (A) Tetramer with each monomer indicated by a different color in cartoon model. Each **38d** molecule is represented as a sphere. (B) **38d** bound allosteric site. **38d** is shown as a stick model in salmon. The compound **13g** is shown by the superposition of the complex (PDB ID 6PGR), which is shown as a stick model in magenta. (C) The allosteric binding site of **38d**. DHPS is shown at the surface. (D) Schematic diagram of interactions in stabilizing **38d** at the allosteric site.

以上の考察の通り、ジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン誘導体**38d**は、前節の**13g**とは結合様式が異なる、新規アロステリック阻害薬であることが明らかとなった。これら二つのケモタイプと標的分子の相互作用の解析結果は、今回発

見されたアロステリックポケットが汎用性の高い阻害剤の結合サイトであり、DHPSが有望な薬剤標的となり得ることを示している。今後、本論文で示した共結晶構造をもとにしたStructure based drug design (SBDD)による創薬研究も可能であると考えられる。

第四節 共結晶情報に基づくDHPSの機能解析

第一項 DHPS 阻害薬の基質拮抗性解析

前節で述べた通り、創出した新規ケミカルプローブはいずれも DHPS のアロステリックサイトに結合する。また、これらは高濃度 NAD 条件における酵素活性試験で阻害活性の減弱が認められ、NAD 拮抗型の阻害様式を示したことから、筆者は前述の共結晶構造に基づくメカニズム解析を実施した。

13g が結合したアロステリックポケット周辺の拡大図に、GC-7 および NAD が結合した活性型コンフォメーションの DHPS 結晶構造を重ね合わせた図を作成した (Fig. 14(B))。その結果、**13g** の結合サイト周辺は、活性型コンフォメーションでは α -ヘリックスが形成されており、アロステリックポケット自体が存在しないことが判明した。すなわち、**13g** が結合する際には、DHPS タンパク質はその α -ヘリックスが解けたループ構造を有しており、タンパク質の二次構造に劇的な変化が生じていることを発見した。よって、**13g** はアロステリックサイトへの結合により、DHPS の構造変化後のコンフォメーションを安定化することで酵素阻害活性を発現すると考えられる。

続いて、この構造変化が NAD および spermidine(もしくは GC-7)の結合サイトに及ぼす影響について考察した (Fig. 14(C),(D))。 α -ヘリックスが解けて生じたループ上のアミノ酸残基 Gly282 は NAD 結合ポケット側に張り出しており、NAD の結合を妨げることが示唆された⁵⁴⁾。**13g** がアロステリックバインダーであるにもかかわらず NAD 拮抗型の阻害様式を示すのは、上記の構造変化が NAD 結合ポケットへの干渉を伴うためと考えられる。また、

spermidine 結合サイトにおいては、ループ上のアミノ酸残基 Lys287⁵⁵⁾がポケットを占有することが判明し、**13g** が基質 spermidine に対しても拮抗性を示すことが示唆された。実際に、酵素活性試験において高濃度の spermidine(100 μ M)を用いて **13g** の阻害活性を測定したところ、高濃度 NAD 条件と同様に活性の減弱が確認された(Fig. 14(A))。

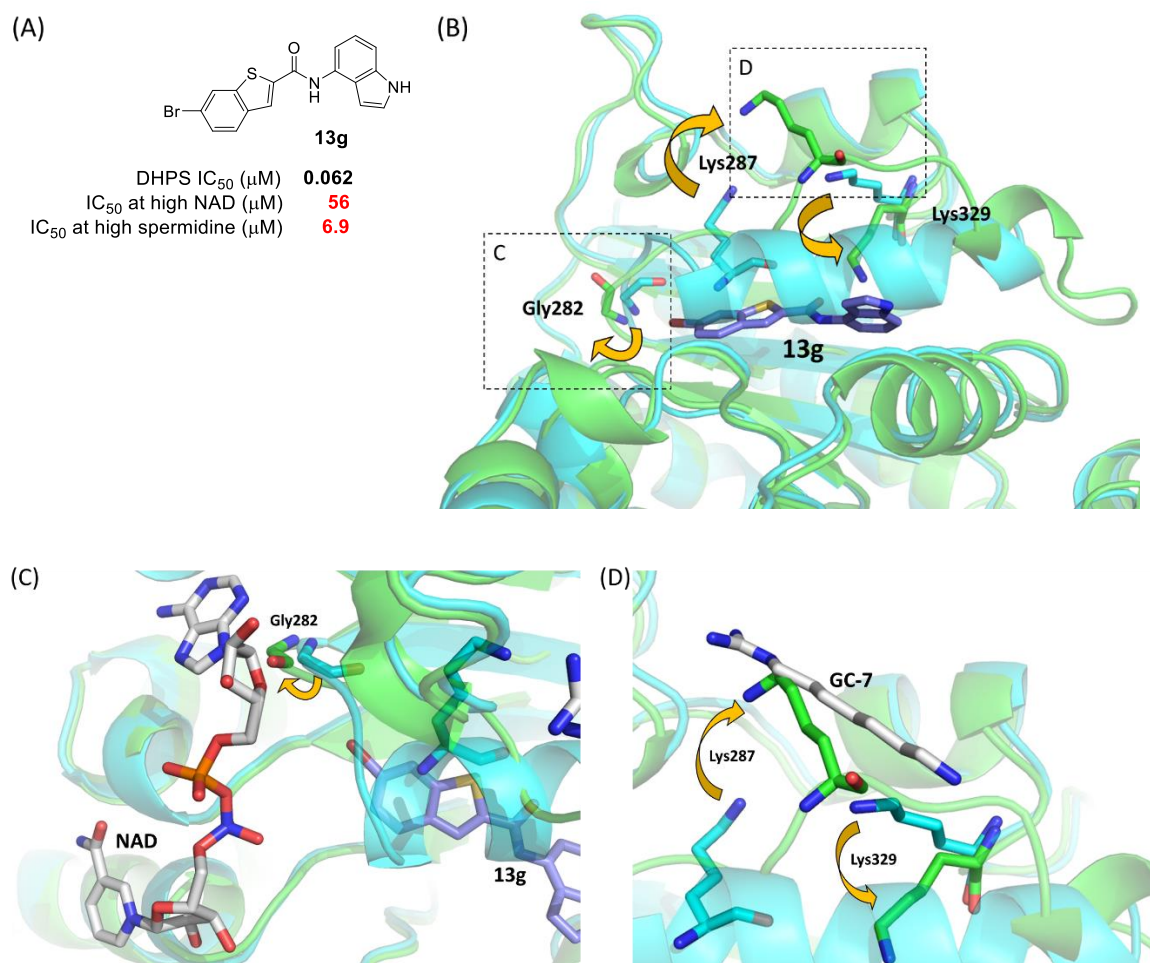


Figure 14. (A) The inhibitory activity under normal conditions was determined by enzyme assay at 14 μ M of NAD and 2 μ M of spermidine. NAD (250 μ M) or spermidine (100 μ M) were used at each condition of higher concentration, respectively. (B) Superposition of the co-crystal structures of **13g**-bound and GC-7-bound forms (PDB IDs 6P4V and 6PGR). The **13g**-bound protein, the GC-7-bound protein, and **13g** molecule are shown in green, cyan, and purple,

respectively. (C) Closeup view highlighting the NAD binding site. NAD in the GC-7 bound form is overlaid and shown as a white stick. (D) Closeup view highlighting the spermidine binding site. GC-7 is overlaid and shown as the white stick.

続いて、DHPS タンパク質と **38d** の共結晶構造についても、GC-7 および NAD が結合した活性型コンフォメーションとの比較検証を実施した (Fig. 15)。前項で述べた通り、**38d** は **13g** と同じアロステリックサイトに結合し、DHPS タンパク質の α -ヘリックスが解ける二次構造の変化も確認された。一方、**38d** の NAD 拮抗性を裏付ける NAD 結合ポケットへのコンフォメーション変化の影響は、**13g** の共結晶構造で確認された構造変化とは異なることが判明した。すなわち、**13g** の結合コンフォメーションで確認されたループ上の Gly282 の張り出しによる NAD 結合ポケットへの干渉ではなく、**38d** の結合コンフォメーションではループ上の Lys287 が NAD 結合サイトに干渉することが分かった。また、**38d** が結合したコンフォメーションにおける spermidine 結合サイトへの干渉は確認されなかった。

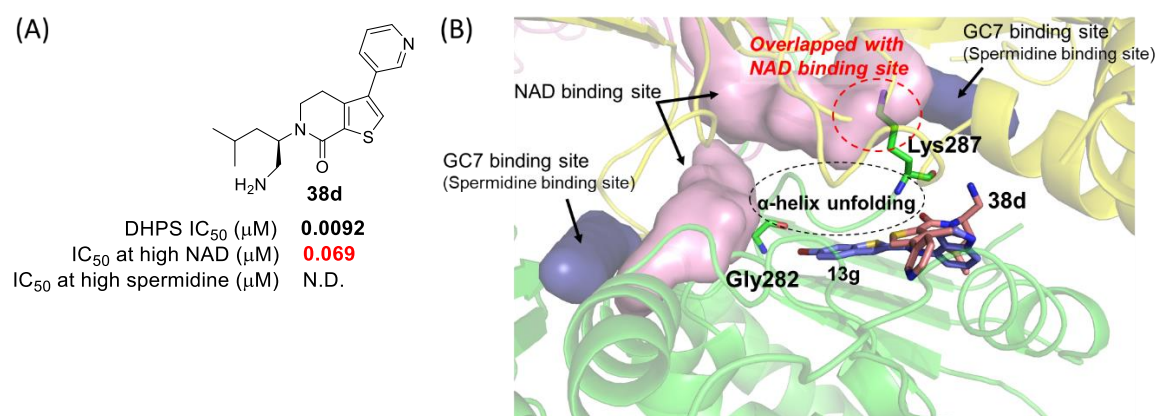


Figure 15. (A) The inhibitory activity under normal conditions was determined by enzyme assay at 14 μ M of NAD and 2 μ M of spermidine. NAD (250 μ M) was used at the condition of higher concentration. (B) **38d** bound allosteric site (PDB ID

6WL6). **38d** is shown as a stick model in salmon. The protein is colored by chain and shown as a cartoon, while the two residues, Gly282 and Lys287, are shown as stick models. NAD and GC-7 are shown in surface representation by superposition of the complex (PDB ID 6P4V) in pink and deep blue, respectively. The compound **13g** is shown by the superposition of the complex (PDB ID 6PGR), which is shown as a stick model in magenta.

第二項 DHPS タンパク質の構造変化およびその機能

前項における考察から、DHPS タンパク質は酵素反応が進行する活性型コンフォメーションに加えて、NAD もしくは spermidine が結合できない非活性型のコンフォメーションを有し、本論文で示した新規ケミカルプローブは後者を安定化することで酵素阻害活性を示すと考えられる (Fig. 16)。また、今回発見した、タンパク質の二次構造である α -ヘリックスが解けるような著しい構造変化が、低分子である阻害剤の誘導適合 (induced-fit) のみによって生じる可能性は低いと考えられることから、阻害剤が存在しない生体内においてもこのような活性・非活性型コンフォメーションの変化が存在していると考えられている⁵⁶⁾。どちらも非活性型である **13g** または **38d** の結合コンフォメーションにおいて、NAD もしくは spermidine 結合サイトヘループ構造が干渉する様式は異なっており、生体内では本論文で確認された非活性型コンフォメーション以外にも多様な構造を形成している可能性も考えられる。

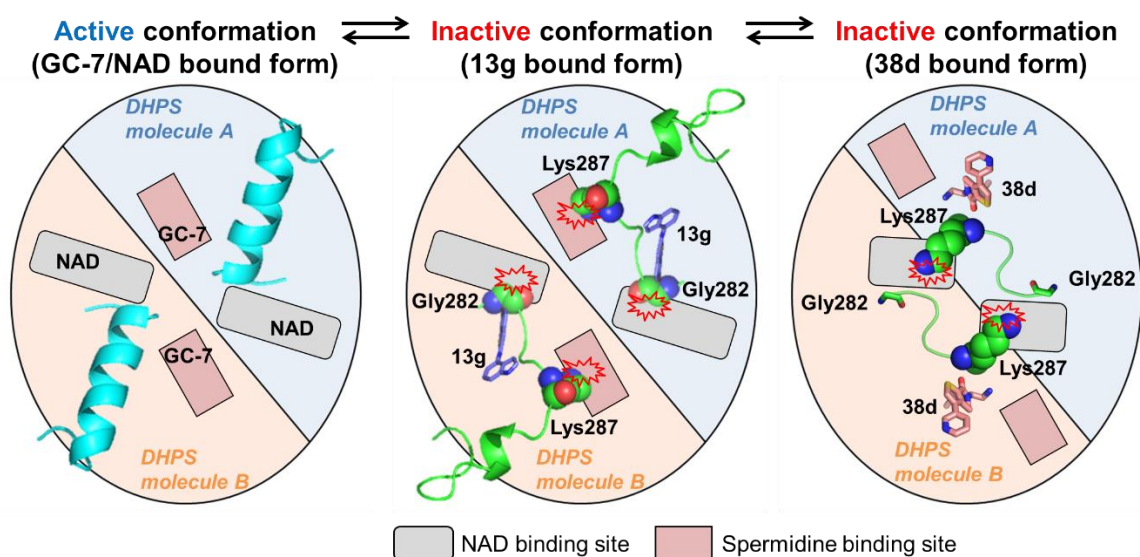


Figure 16. Schematic diagram of conformational change by **13g** or **38d** binding in one dimer of a tetramer of DHPS. The binding sites of spermidines are shown in the rectangle and NAD as the rectangle with rounded corners.

DHPS タンパク質が活性コンフォメーションを形成する動的なメカニズムの解明には NAD もしくは spermidine との詳細な kinetics 解析や、もう一つの基質である eIF5A との相互作用についても解析する必要がある。しかしながら、本研究で示された非活性型コンフォメーションの安定化による DHPS の阻害メカニズムの存在は DHPS が有望な薬剤標的となり得ることを示すものである。

第五節 まとめ

新規癌治療薬として期待される First-in-class ターゲットである DHPS に対する新規ケミカルプローブの創製研究を実施し、HTS より得られたヒット化合物からの構造活性相関研究を通じて、強力な酵素阻害活性を有するプロモベンゾチオフェン体 **13g** を創出した。本ケミカルプローブと DHPS タンパク質の共結晶構造解析を行った結果、**13g** が DHPS に対するアロステリック阻害薬

であることを明らかにするとともに、**13g**とDHPSタンパク質との相互作用は阻害剤の構造活性相関の結果を裏付けるものであった。

さらに、化合物**13g**とは異なるファーマコフォアを有するHTSヒット化合物にも着目し、3-ピリジル基を有する二環性母核誘導体の構造活性相関研究を実施し、強力な酵素阻害活性を有するジヒドロチエノ[2,3-*c*]ピリジン誘導体**38d**を創出した。本化合物の共結晶構造解析から、**38d**が**13g**とは異なる結合様式を有するアロステリック阻害薬であることを同定した。これら二つのケモタイプとDHPSとの相互作用の解析結果は、今回発見されたアロステリックポケットが汎用性の高い阻害剤の結合サイトであり、DHPSが有望な薬剤標的となり得ることを示している。

また、これらのケミカルプローブが結合したアロステリックサイトでは、酵素の擬似基質であるGC-7および補酵素NADとの共結晶において α -ヘリックスを形成していた部分が解けて、ループ構造へと変化していることを発見した。これはDHPSが非活性型コンフォメーションを有することを示すものであり、新規ケミカルプローブによる標的タンパク質の機能解析の有用性を実証した。

今後これらの情報をもとに新規抗癌薬を目指すにあたり、eIF5A依存的に増殖する癌細胞におけるDHPS阻害剤によるハイプシン化eIF5Aの抑制やそれに基づく増殖阻害活性を確認していく必要があると考えられる。また、本論文で示した共結晶構造および構造活性相関情報をもとにした新たな化合物デザインおよび構造最適化も可能と考えられることから、ケミカルプローブとしての役割に留まらない、薬効や薬物動態に優れたリード化合物、さらには新規抗癌薬の創出に向けたさらなる研究の展開が期待される。

第三章 新規 Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬の創製

第一節 薬剤標的としての Bcl-2 family および構造情報

第一章で述べたように、固形癌を対象としたアポトーシス促進誘導薬を指向した Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬は新しいタイプの抗癌薬として期待される一方、Bcl-2 ファミリーの阻害薬はタンパク質間相互作用 (PPI) を阻害する必要がある、その二重阻害薬を論理的に創出するにはそれぞれの標的の構造情報が必要不可欠である。

そこで、Abbott 社より報告された ABT-263 (Navitoclax) の類縁体である ABT-737 と Bcl-xL との共結晶構造^{57),58)}に基づいて、Bcl-2 ファミリーの PPI 部位について解析した (Fig. 17)。ABT-737 は、Bcl-xL と Bax 等のアポトーシス促進タンパク質との PPI 部位に結合しており、その結合サイトは二つの疎水性ポケットが溶媒側に面する浅い溝で繋がる構造を有している。ここで、溶媒側とはタンパク質のポケット奥ではなく表面側 (溶媒に触れる側) を意味し、また本論文では疎水性ポケットをそれぞれ East region および West region と呼ぶ (Fig 17)。ABT-737 はその分子右側の三つのベンゼン環が分子内で π - π 相互作用を形成する U 字型のコンフォメーションを取って Bcl-xL の East region に結合し、分子左側部分のビフェニル部位は West region に結合し疎水性相互作用を形成している。また、Mcl-1 については阻害ペプチドである Bim との共結晶構造解析が報告されており、Bcl-xL と同様に、二つの疎水性ポケット (East region および West region) が PPI 部位に存在すると考えられている⁵⁹⁾。

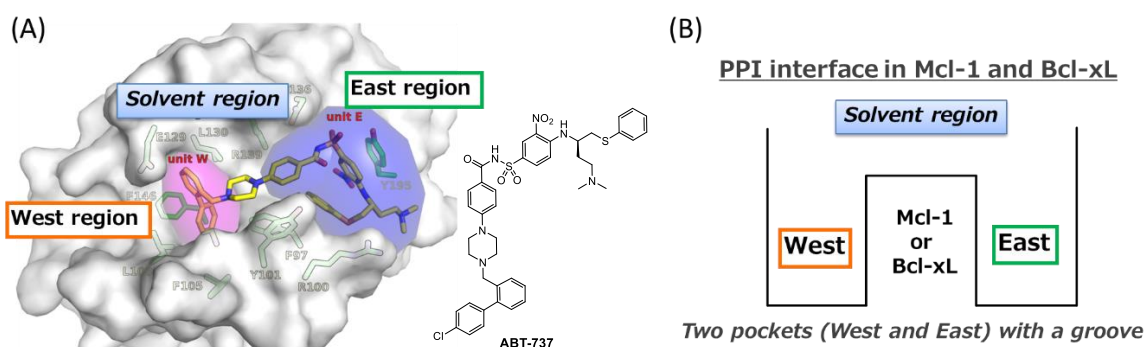


Figure 17. (A) Co-crystal structure of ABT-737 with Bcl-xL (PDB ID 2YXJ). (B) Structural image of binding sites in Mcl-1 and Bcl-xL

一方、本研究開始当時、臨床試験に進んだ Mcl-1 阻害薬 (Fig. 2(B)) や Mcl-1 と低分子との共結晶情報の報告は無く、PPI 阻害のためのホットスポットは不明であった。そこで、筆者は Mcl-1 の構造解析に有用な新規ケミカルプローブの創出を目的として Mcl-1 選択的阻害薬の探索から開始した。

第二節 Mcl-1/Bcl-xL の構造解析および選択的阻害薬の探索

第一項 Mcl-1 選択的阻害薬の創出

前述の通り、Abbott 社から Mcl-1 選択的阻害活性を有するインドール誘導体が報告されている³⁹⁾。その Mcl-1 に対する結合様式は不明だったことから、本化合物の構造を参考に新規二環性骨格を探索し、共結晶構造の取得を目指すこととした。そこで筆者は、インドール誘導体と同様の置換位置に側鎖を伸長可能な二環性骨格の中から、脂溶性が比較的 low、共結晶化の成功確率を上げる指標の一つである良好な溶解度が期待されるピラゾロ [1,5-*a*]ピリジン骨格をデザインした (Fig 18)。化合物の薬理活性は、Mcl-1 とフルオレセインイソチオシアネート (FITC) で標識された Bid ペプチドとの相互作用に対する阻害活性を、Time-Resolved FRET 法で評価した^{60),61)}。Bid ペプチドは前節で述べた Mcl-1 の PPI 部位に結合することから、本手法によって Mcl-1 と

アポトーシス促進タンパク質との PPI に対する化合物の阻害作用を確認できる。また、Bcl-xL に対する阻害活性も同様の手法で測定した。その結果、アリール基として、パラ位がカルボキシ基で置換されたフェニル基を有する誘導体 **39** が Mcl-1 選択的な阻害活性を有することを見出した。

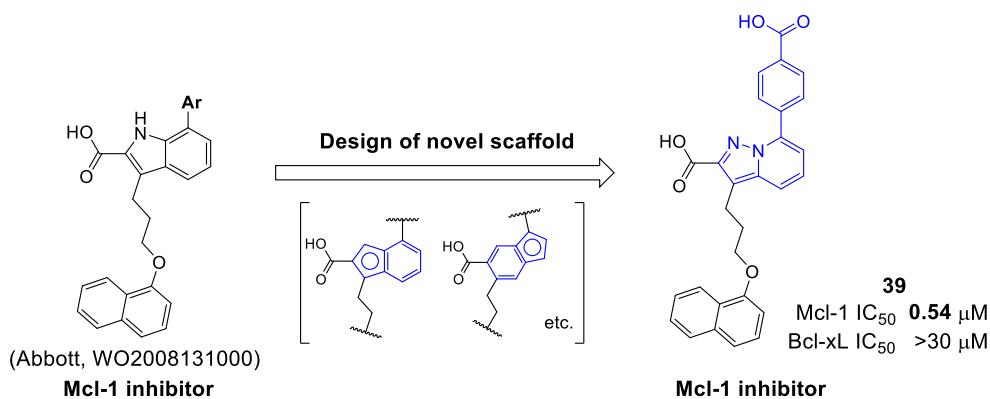
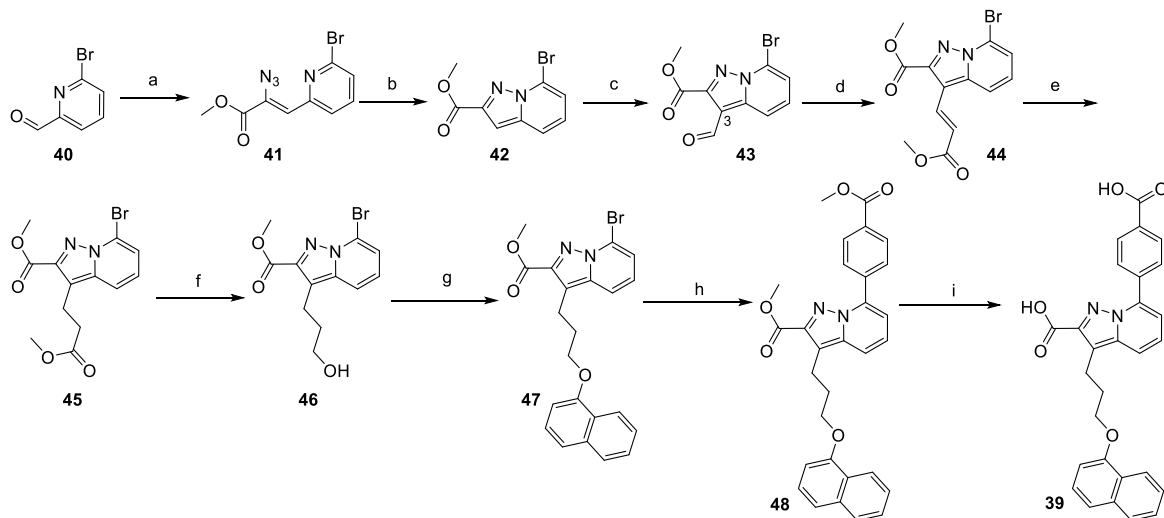


Figure 18. Novel selective Mcl-1 inhibitor designed from reported compound. The activities were determined by TR-FRET assays. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of percent inhibition data.

ピラゾロ[1,5-*a*]ピリジン誘導体 **39** は Scheme 7 に示す方法で合成した。出発原料のピリジアルデヒド **40** にアジド酢酸エチルをナトリウムメトキシド存在下で反応させることで、アルデヒドに対する縮合およびエステル交換が進行し、メチルエステル基を有するアジド **41** を得た。続いて、アジド **41** をキシレン中で 120℃に加熱することでピラゾロ[1,5-*a*]ピリジン骨格を構築した⁶²⁾。得られた環化体 **42** の 3 位を Vilsmeier-Haack 反応でホルミル化し、ホスホノ酢酸トリエチルを用いた Horner-Wadsworth-Emmons 反応により増炭し、アルケン **44** を得た。ベンゼンスルホニルヒドラジドを用いて二重結合を還元した後、得られたエステル **45** をボランにより還元し、1-ナフトールとの光延反応でナフチルエーテル **47** を合成した。さらに、鈴木カップリング反応により安息香酸エステルを導入した後、ジエステル **48** をアルカリ加水分解することで **39** を合成した。

Scheme 7. Synthesis of compound **39^a**



^aReagents and conditions: (a) ethyl azidoacetate, NaOMe, MeOH, 60%; (b) xylene, 120 °C, 41%; (c) phosphoric trichloride, DMF, 100 °C, 72%; (d) trimethyl phosphonoacetate, NaH, THF, 0 °C, 96%; (e) benzenesulfonohydrazide, toluene, 100 °C, 84%; (f) borane-THF, THF, 85%; (g) 1-naphthol, PPh₃, di-*tert*-butyl azodicarboxylate, toluene, 97%; (h) 4-(methoxycarbonyl)phenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DMF, microwave, 140 °C, 45%; (i) 2 M NaOH, MeOH, 45%.

続いて、得られた Mcl-1 選択的阻害活性を有する新規ケミカルプローブ **39** の結合様式を明らかにするため、Mcl-1 タンパク質との共結晶化および X 線結晶構造解析を当研究グループ内で実施し、1.9 Å の解像度にて共結晶構造の取得に成功した (Fig. 19)。その結果、**39** が Mcl-1 の West region に結合することが明らかとなり、**39** のナフチル基は Met250、Leu267、Phe270 および Ile294 の側鎖で構成される West region の脂溶性ポケットの奥深くに結合することが分かった。また、ピラゾロ[1,5-*a*]ピリジン 2 位のカルボン酸は Arg263 の側鎖グアニジンと水素結合を形成し、ピラゾロ[1,5-*a*]ピリジン骨格自体は Phe228、Met231 および Val253 の側鎖で囲まれた West region の浅い位置に結合することが確認された。安息香酸部位のカルボン酸は溶媒側に露出し Mcl-

1 との水素結合は形成していないものの、ベンゼン環は母核との二面角が大きなコンフォメーションで結合し、Ala227 の側鎖と相互作用していることが分かった。

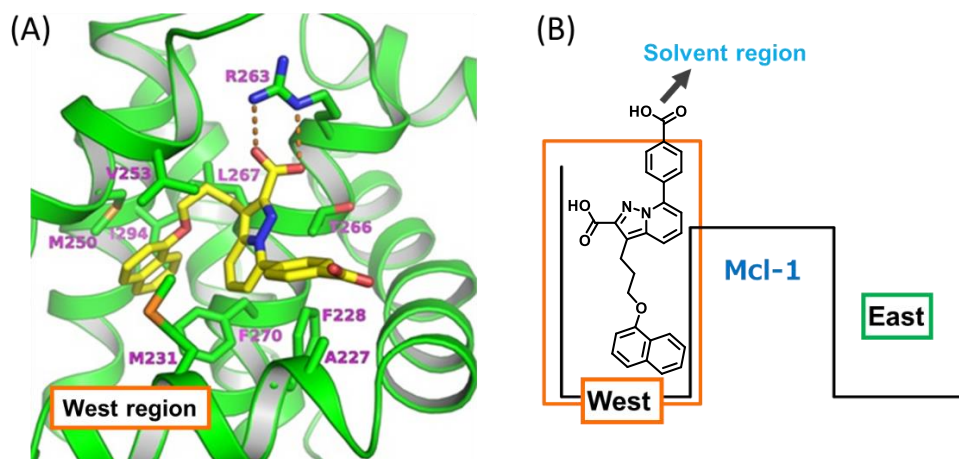


Figure 19. (A) Co-crystal structure of pyrazolo[1,5-*a*]pyridine derivative **39** with Mcl-1 (PDB ID 3WIX). (B) Structural image of binding mode of **39** in Mcl-1.

上述のように、Mcl-1 と新規ケミカルプローブとの共結晶構造解析により、その結合様式を明らかにすることができたことから、Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬の創出に向けて、次項において Bcl-xL についてもその阻害に重要な構造を探索した。

第二項 Bcl-xL 選択的阻害薬の創出

第一節で述べた ABT-733 と同様に、Bcl-xL 阻害活性を有する ABT-263(Navitoclax)の分子左側 *p*-クロロフェニル部位は Bcl-xL の West region に結合し、分子右側部位は East region に結合すると考えられる^{57),58)}。そこで筆者は、これらの構造情報をもとに、ABT-263 のどの部分構造が Bcl-xL 阻害活性に重要かを探索する目的で、分子左側の *p*-クロロフェニル部位を有する化合物 **49** および **50**、分子右側の部分構造を有する **51** および **52** の阻害活性を確認することとした (Fig. 20)。

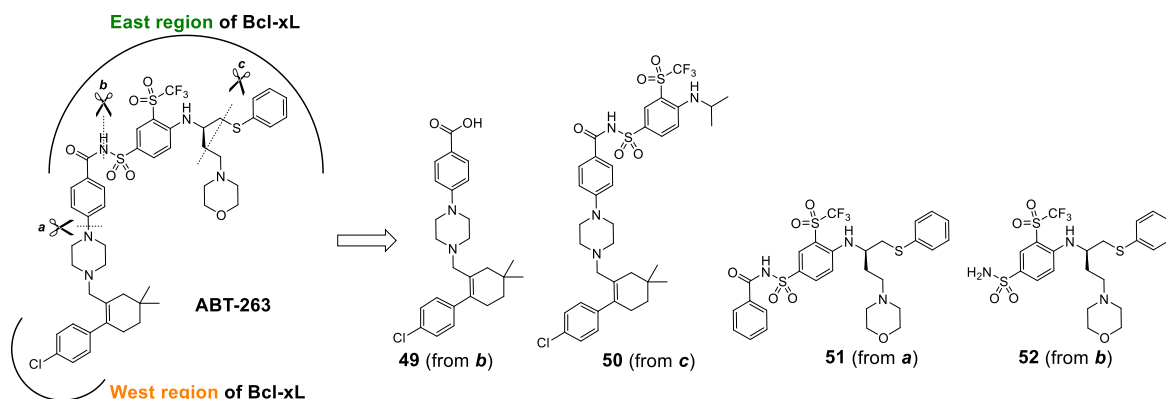
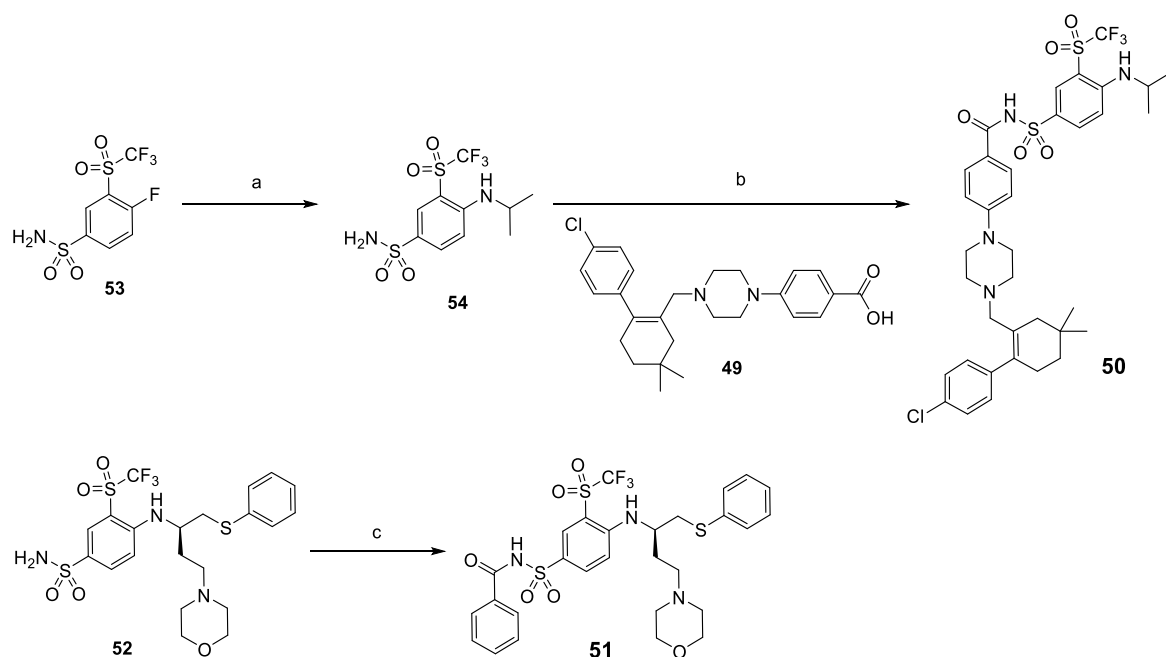


Figure 20. Substructures of compound ABT-263.

ABT-263 の部分構造である化合物 **50** および **51** は文献既知の **49** および **52** を用いて Scheme 8 に示す方法で合成した。出発原料のフッ素体 **53** に対して DIPEA 存在下、イソプロピルアミンを置換させることでスルホンアミド **54** を得た。続いて、カルボン酸 **49**⁴⁰⁾ を化学量論量の EDC-HCl および DMAP 存在下で縮合させることでアシルスルホンアミド **50** を合成した。同様に、化合物 **51** はスルホンアミド **52**⁴⁰⁾ に安息香酸を縮合させ合成した。

Scheme 8. Synthesis of compounds **50** and **51**^a



^aReagents and conditions: (a) isopropylamine, DIPEA, THF, 50 °C, 93%; (b) **49**, EDC-HCl, DMAP, DMF, 15%; (c) benzoic acid, EDC-HCl, DMAP, DMF, 92%.

得られた ABT-263 の部分構造化合物の Bcl-xL および Mcl-1 に対する阻害活性を Figure 21 に示した。Bcl-xL の West region に結合すると考えられる部分構造 **49** および **50** はそれぞれ 22 μ M および 8.0 μ M の IC₅₀ 値を示し、弱い Bcl-xL 阻害活性を有することが分かった。一方、East region に結合する部分構造 **51** は 0.15 μ M の IC₅₀ 値を示し、West region 結合構造に比べて強い Bcl-xL 阻害活性を示すことを見い出した。第一節で述べたように、**51** に含まれる三つのベンゼン環は分子内 π - π 相互作用を形成し U 字型のコンフォメーションを取ると考えられ、実際にベンゼン環一つを除去した化合物 **52** の Bcl-xL 阻害活性は大きく減少した。また、ABT-263 と同様に、いずれの部分構造を有する誘導体も Mcl-1 に対する阻害活性は非常に弱いことが確認された。

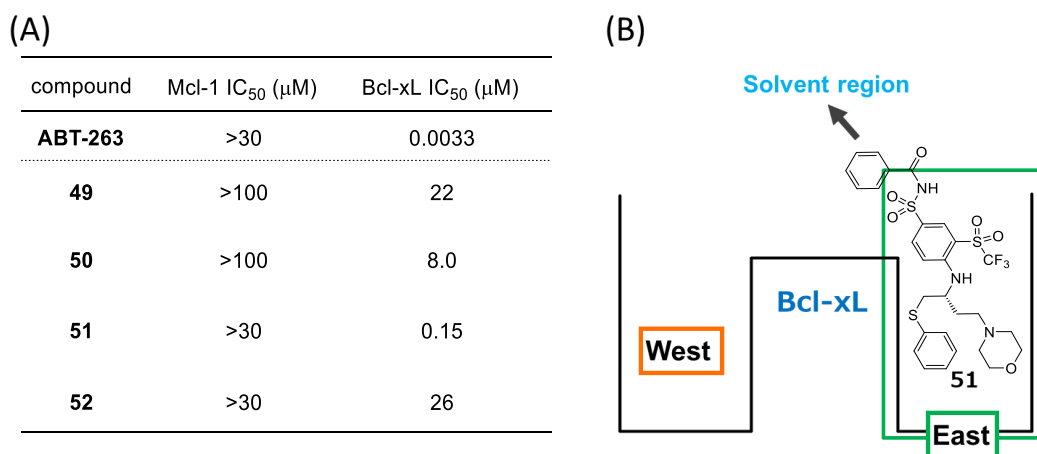


Figure 21. (A) Inhibitory activities of substructures of ABT-263. The activities were determined by TR-FRET assays. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of percent inhibition data. (B) Structural image of binding mode of **51** in Bcl-xL.

以上の検討から、East region に結合すると考えられる部分構造 **51** が Bcl-xL の阻害活性発現に重要な構造であると特定できた。第一章で述べたように、選択的阻害剤の併用に比べ、二重阻害剤は単一化合物の薬物動態特性をもとに薬効や毒性の評価が可能であるという利点を有する。そこで筆者は、Mcl-1 および Bcl-xL の阻害に重要なそれぞれの構造情報をもとに Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害剤をデザインすることとした。

第三節 ケミカルプローブの情報に基づく Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害剤の創製

第一項 ハイブリッドストラテジーによるドラッグデザイン

第二節で述べたように、ピラゾロ[1,5-*a*]ピリジン誘導体 **39** は Mcl-1 の West region に結合し Mcl-1 選択的阻害活性を示す。また、ABT-263 の部分構造 **51** は Bcl-xL の East region に結合し Bcl-xL 選択的阻害活性を示す。さらに、これらのケミカルプローブと Mcl-1 もしくは Bcl-xL との共結晶構造情報から、**39** の安息香酸部位 (ring A) と **51** のアシルスルホンアミド側鎖ベンゼン環 (ring B) はそれぞれが溶媒側に位置すると考えられる。そこで筆者は、ring A と ring B を適切なリンカーで結合させたハイブリッド化合物とすることで、Mcl-1 に対しては **39** に相当する部分構造が Mcl-1 の West region に、**51** に相当する部分構造が Bcl-xL の East region に結合し二重阻害活性を示すと考えた。さらに、ring A、ring B はそれぞれ Mcl-1、Bcl-xL に対する阻害活性発現に重要であり、どちらもベンゼン環を有する構造であることから、ベンゼン環自体をリンカーとして使用することで分子量の低減が図れると考えた。すなわち、このベンゼン環をリンカーとしての機能に加えて、Mcl-1 と Bcl-xL どちらに対しても阻害活性を発現させるための構造として共有させることによりハイブリッド化合物をデザインした (Fig. 22)。

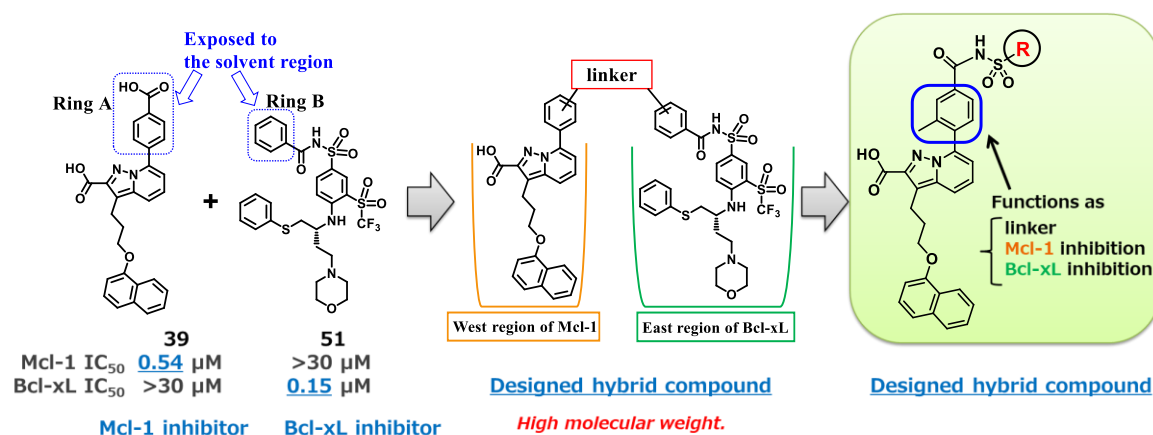
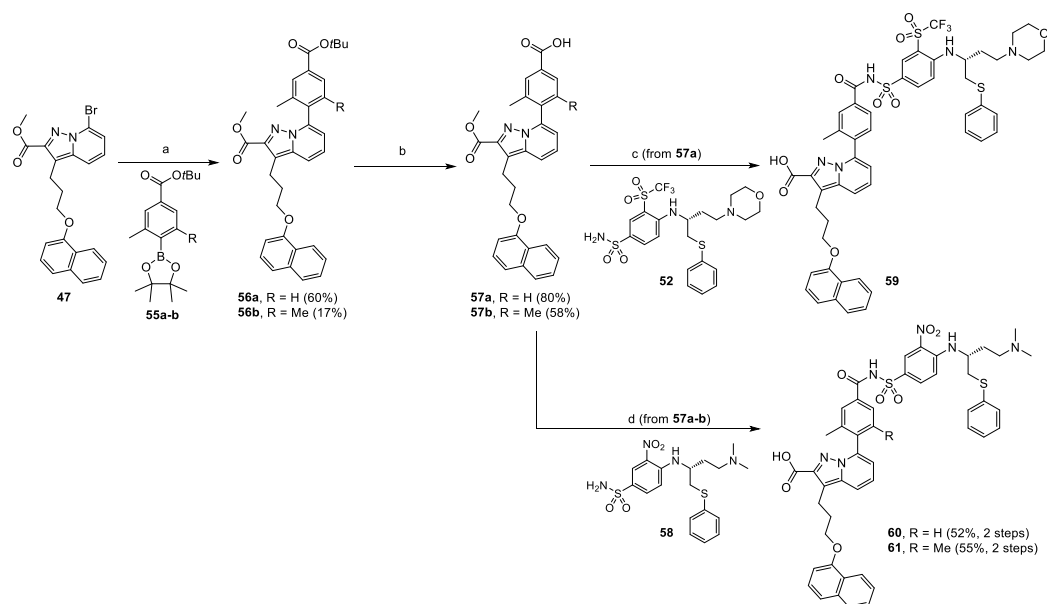


Figure 22. Hybridization strategy used to design Mcl-1/Bcl-xL dual inhibitors.

上述のようにデザインしたハイブリッド化合物は Scheme 9 に示した方法で合成した。ブロモ体 **47** とボロン酸ピナコールエステル **55a-b** との鈴木カップリング反応により *tert*-ブチルエステル **56a-b** を得た後、アセトニトリル中で TFA により処理することで *tert*-ブチルエステルを選択的にカルボン酸へと変換し **57a-b** を合成した。続いて、**57a** に対してスルホンアミド **52** を縮合させた後、メチルエステルを加水分解することで化合物 **59** を得た。同様の方法で **57a-b** とスルホンアミド **58**⁶³⁾ から化合物 **60** および **61** を合成した。

Scheme 9. Synthesis of hybrid compounds 59–61^a



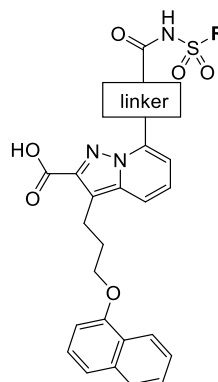
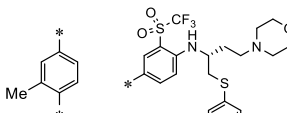
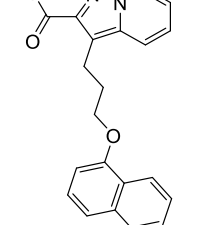
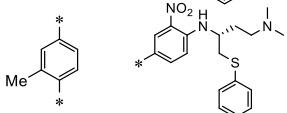
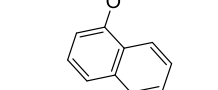
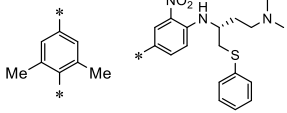
^aReagents and conditions: (a) **55a–b**, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DMF, microwave, 160 °C; (b) TFA, acetonitrile; (c) (i) **52**, EDC-HCl, DMAP, DMF; (ii) 2 M NaOH, MeOH, THF, 49% (two steps); (d) (i) **58**, EDC-HCl, DMAP, DMF; (ii) 2 M NaOH, MeOH, THF.

第二項 Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害剤の創製および共結晶構造解析

前項でデザイン、合成したハイブリッド化合物の Mcl-1 および Bcl-xL に対する阻害活性を評価した (Table 7)。その結果、モノメチルフェニル基をリンカーに有するハイブリッド化合物 **59** が Bcl-xL に対して IC₅₀ 値 0.0072 μM、Mcl-1 に対しても IC₅₀ 値 3.2 μM の阻害活性を示し、二重阻害活性を有することを確認した。また、ABT-737 と同様の East region 結合部位を有する化合物 **60** も二重阻害活性を示した (Mcl-1 IC₅₀ = 0.61 μM; and Bcl-xL IC₅₀ = 0.0044 μM)。第二節で述べたように、Mcl-1 選択的阻害剤 **39** の安息香酸部位は母核とねじれたコンフォメーションをとっていることから、ハイブリッド化合物におけるリンカー部位を *o*-ジメチルフェニル基へと変換し、そのねじれを安定化させることで Mcl-1 阻害活性の向上を期待した。その結果、ジメチルフ

エニルリンカー体 **61** の Mcl-1 阻害活性は IC₅₀ 値 0.088 μ M に増強され、強力な二重阻害活性を有する化合物を創出することに成功した。

Table 7. Mcl-1/Bcl-xL Dual Inhibitory Activities of Hybrid Compounds

compound	linker	R	Mcl-1 IC ₅₀ (μ M) ^a	Bcl-xL IC ₅₀ (μ M) ^a
ABT-263	—	—	>30	0.0033
59			3.2	0.0072
60			0.61	0.0044
61			0.088	0.0037

^aDetermined by TR-FRET assays. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of percent inhibition data.

以上のように、Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬を見出したことから、ハイブリッド化合物と Mcl-1 および Bcl-xL に対する結合様式を明らかにするため、当研究グループにおいて共結晶化検討を実施した。その結果、両標的とも共結晶化に成功したことから、X 線結晶構造解析結果およびそれに基づく筆者の考察を以下に示す。

Mcl-1 については、2.2 Å の解像度にて化合物 **60** との共結晶構造を取得した (Fig. 23(A),(C))。前項で述べたデザインコンセプトの通り、ハイブリッド化合物 **60** のピラゾロ[1,5-*a*]ピリジン部位は Mcl-1 選択的阻害剤 **39** と同様の結合様式で West region に位置し、Bcl-xL 選択的阻害剤の部分構造は溶媒側に露出していることが確認された。続いて、**60** と Bcl-xL との共結晶は 2.5 Å の解像度にて取得した (Fig. 23(B),(D))。その結果、予期した通り Bcl-xL 選択

的阻害剤の部分構造は分子内 π - π 相互作用に基づく U 字型のコンフォメーションをとりながら Bcl-xL の East region に結合することが確認された。さらに、Mcl-1 阻害活性発現に重要なピラゾロ[1,5-a]ピリジン部位は溶媒側に位置するのではなく、Bcl-xL においても West region に結合することが判明した。その結合様式は、ピラゾロ[1,5-a]ピリジン 2 位のカルボン酸が Arg139 と水素結合を形成し、ナフチル基が Leu108、Val126、Leu130、および Phe146 に囲まれた脂溶性のポケットを占有するものである。この結果は、本論文で検証したハイブリッド化合物が Bcl-xL との結合においては East および West region の両方に分子全体で強く結合することを意味し、Bcl-xL に対しては nM オーダーの強力な阻害活性を有する結果と合致するものである。Mcl-1 に対しても West region だけでなく East region にも結合し、さらに強力な阻害活性を示す化合物をデザインするためには、Mcl-1 の East region に結合するケミカルプローブの探索によってホットスポットを明らかにする必要があると考えられる。

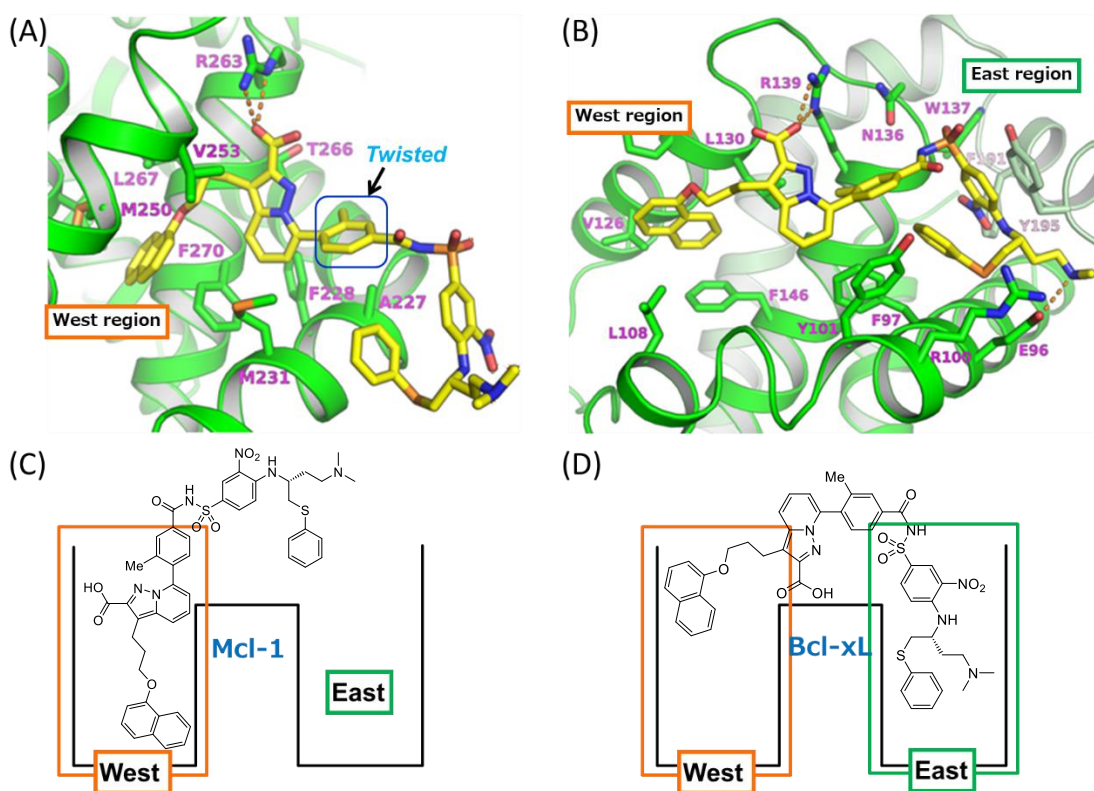


Figure 23. (A) Co-crystal structure of compound **60** with Mcl-1 (PDB ID 3WIY). (B) Co-crystal structure of compound **60** with Bcl-xL (PDB ID 3WIZ). (C) Structural image of binding mode of **60** in Mcl-1. (D) Structural image of binding mode of **60** in Bcl-xL.

以上の結果から、ハイブリッド化合物のデザインコンセプトが達成されていることを実証し、Mcl-1 および Bcl-xL に対する選択的なケミカルプローブとの共結晶構造情報が二重阻害薬のデザインに応用可能であることを示すことに成功した。

第四節 まとめ

アポトーシスに深く関与する Mcl-1 および Bcl-xL の二重阻害薬は、強力な抗腫瘍活性を示す新規抗癌薬として期待される。Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬の創製に向けて、それぞれのタンパク質の阻害に重要な構造の探索から開始した。Mcl-1 に関しては、Mcl-1 選択的阻害活性を有するピラゾロ[1,5-*a*]ピリジン誘導体を見い出し、Mcl-1 タンパク質との X 線共結晶構造解析によって、その結合様式を明らかにした。Bcl-xL に関しては、Abbott 社が創製した Bcl-xL/Bcl-2/Bcl-w 阻害薬 ABT-263 の部分構造探索により、Bcl-xL 阻害活性に重要な構造を特定した。

それぞれのケミカルプローブの構造情報から、強い Mcl-1 阻害活性を有する化合物 **39** と、強い Bcl-xL 阻害活性を有する化合物 **51** を部分構造に有するハイブリッド化合物をデザインした。得られたハイブリッド化合物 **60** と Mcl-1 および Bcl-xL との X 線共結晶構造解析を行い、両タンパクにおける結合様式を明らかにした。また、Mcl-1 の構造情報をもとにリンカー部位にジメチルフェニル基を導入することで、両タンパク質に対し強力な阻害活性を有する化合物 **61** の創出に成功した (Mcl-1, $IC_{50} = 0.088 \mu M$; Bcl-xL, $IC_{50} = 0.0037$

μM)。この結果は Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬の初めての例であり、ケミカルプローブの共結晶構造情報を活用する創薬手法が、複数の標的分子に作用する新薬の創出への応用が可能であることを示すものである。

今回創出した Mcl-1/Bcl-xL dual 阻害薬をリード化合物として新規抗癌薬を目指すには、Mcl-1 と Bcl-xL の両方の発現によってアポトーシス機能が抑制された非小細胞肺癌等の固形癌細胞における増殖阻害活性を確認していくことが求められる。そのためには、細胞膜透過性や溶解度といった物性プロファイルの改善を指向したさらなる構造最適化が必要であり、今後の発展研究が期待される。

第四章 結語

本研究で筆者は、抗癌剤の標的分子として DHPS および Mcl-1/Bcl-xL に着目し、創薬初期研究における新規ケミカルプローブの創製および機能解析を実施した。DHPS に対してはその薬剤標的としての有望性を判断すること、Mcl-1/Bcl-xL に対してはケミカルプローブの情報を利用した複数標的阻害薬の分子設計を可能とすることを目的とした。本研究で得られた知見を以下にまとめる。

DHPSに対する新規ケミカルプローブの創製

1. HTSヒット化合物であるインドール誘導体からの構造活性相関研究を通じて、強力なDHPS酵素阻害活性を有する新規ケミカルプローブ **13g**を見出し、DHPSタンパク質との共結晶構造解析から本化合物がアロステリック部位に結合することを発見した。
2. 別ケモタイプのHTSヒット化合物であるチオフェン誘導体からの構造活性相関研究により創出した新規ケミカルプローブ **38d**が、DHPSに対して **13g**とは異なる結合様式を有するアロステリック阻害薬であることを見出した。
3. 上記ケミカルプローブおよび疑似基質 GC-7と DHPSタンパク質との共結晶構造の比較検証により、DHPSがタンパク質の二次構造変化により非活性型コンフォメーションを有すること、その構造変化の安定化によってアロステリックバインダーである **13g**もしくは**38d**が酵素阻害活性を発現するメカニズムを解明した。
4. 以上の検討から、今回発見したアロステリックポケットが汎用性の高い阻害剤の結合サイトであり、DHPSが有望な薬剤標的となり得ることを示した。

ケミカルプローブの情報に基づく Mcl-1/Bcl-xL dual阻害薬の創製

1. Mcl-1選択的阻害活性を有する新規ケミカルプローブ創出を目的に、Abbott社より報告されたインドール誘導体からの母骨格変換によりピラゾロ [1,5-*a*]ピリジン誘導体 **39**を見出した。本化合物はMcl-1選択的阻害活性を示すとともに、Mcl-1との共結晶構造解析により、その結合様式を明らかにした。
2. Bcl-xL阻害活性に重要な化学構造を検証するため、ABT-263の部分構造探索を実施し、Bcl-xLのEast regionに結合する化合物 **51**を同定した。
3. Mcl-1、Bcl-xLそれぞれの阻害に重要な化合物およびその結合様式に基づき分子設計したハイブリッド化合物が強力なMcl-1/Bcl-xL dual阻害活性を示すことを見出した。
4. ハイブリッド化合物とMcl-1およびBcl-xLとの共結晶構造解析によりデザインコンセプトが達成されていることを実証した。

以上の通り、新規DHPS阻害薬の創製研究を通じて、First-in-classターゲットにおけるケミカルプローブがタンパク質のコンフォメーションおよびその機能解析に非常に有用であること、薬剤標的として有望か否かを判断するための重要なツールとなることを実証した。また、新規Mcl-1/Bcl-xL dual阻害薬の創製研究を通じて、Mcl-1およびBcl-xLに対する選択的なケミカルプローブとの共結晶構造情報が二重阻害薬のデザインに応用可能であることを示した。本研究で示された論理的創薬手法は、First-in-classの標的分子や複数の標的分子に対する新薬創出への応用が可能であり、今後更なる発展が期待される。

実験の部

Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectra were measured with Bruker DPX-300 (300 MHz), AVANCE II-300 (300 MHz) spectrometers. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) with tetramethylsilane as an internal standard, and coupling constants (J values) are given in Hertz (Hz). Splitting patterns and apparent multiplicities are designated as s (singlet), d (doublet), dd (doublet doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), and brs (broad singlet). Elemental analyses and high-resolution mass spectrometry (HRMS) were carried out by Sumika Chemical Analysis Service or Toray Research Center and were within 0.4% of the theoretical values. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) or NH TLC plate (Fuji Silysia Chemical Ltd.). Column chromatography was carried out using silica gel (70–230 mesh, Merck), basic silica gel (100–200 mesh, Fuji Silysia Chemical, Ltd.) or Purif-Pack (SI ϕ 60 μM or NH ϕ 60 μM , Fuji Silysia Chemical, Ltd.). Preparative HPLC was performed on a Waters 2525 separations module (L-column2 ODS (20 x150 mm I.D., CERI, Japan); 0.1% TFA in distilled water–acetonitrile gradient; MS spectra were recorded using a Waters ZQ2000 with electrospray ionization. The purities of all tested compounds were determined to be $\geq 95\%$ by Shimadzu UFLC/MS (Prominence UFLC high pressure gradient system/LCMS-2020) operating in electron spray ionization mode (ESI+). The column used was an L-column 2 ODS (3.0 x 50 mm I.D., 3 μm , CERI, Japan) with a temperature of 40 °C and a flow rate of 1.2 or 1.5 mL/min. Mobile phase A was 0.05% TFA in ultrapure water. Mobile phase B was 0.05% TFA in acetonitrile which was increased linearly from 5% to 90% over 2 minutes, 90% over the next 1.5 minutes, after which the column was equilibrated to 5% for 0.5 minutes. All commercially available

solvents and reagents were used without further purification, unless otherwise stated. Yields were not optimized.

第二章第二節の合成実験

***tert*-Butyl 4-(4-(*tert*-butyl)phenylsulfonamido)-1*H*-indole-1-carboxylate (6a).**

To a solution of **5** (317 mg, 1.36 mmol) in pyridine (5.0 mL) was added 4-*tert*-butylbenzenesulfonyl chloride (333 mg, 1.43 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 3–20% EtOAc in *n*-hexane) to give **6a** (520 mg, 89%) as a white powder. MS (ESI⁺): 429.1 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.23 (9H, s), 1.59 (9H, s), 6.82 (1H, dd, *J* = 3.8, 0.6 Hz), 7.06–7.13 (1H, m), 7.15–7.24 (1H, m), 7.47–7.56 (3H, m), 7.61–7.68 (2H, m), 7.78 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 10.22 (1H, s).

***tert*-Butyl 4-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)-1*H*-indole-1-carboxylate (6b).**

To a solution of **5** (329 mg, 1.42 mmol) in THF (4.0 mL) was added 4-*tert*-butylphenyl isocyanate (0.302 mL, 1.70 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 5 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 3–20% EtOAc in *n*-hexane) to give **6b** (415 mg, 72%) as a white powder. MS (ESI⁺): 408.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.27 (9H, s), 1.63 (9H, s), 6.83 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 7.24 (1H, t, *J* = 8.2

Hz), 7.28–7.35 (2H, m), 7.36–7.44 (2H, m), 7.63–7.74 (2H, m), 7.87 (1H, d, J = 7.4 Hz), 8.65 (1H, s), 8.78 (1H, s).

4-(*tert*-Butyl)-*N*-(1*H*-indol-4-yl)benzenesulfonamide (7a). To a solution of **6a** (230 mg, 0.54 mmol) in MeCN (2.0 mL) was added TFA (2.0 mL, 26.0 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO₃ and saturated aqueous NH₄Cl at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was filtered through silica gel pad using EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo*, and the resulting solid was collected by filtration to give **7a** (159 mg, 90%) as a white solid. MS (ESI⁺): 328.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.23 (9H, s), 6.61 (1H, t, J = 2.2 Hz), 6.85–6.96 (2H, m), 7.07–7.12 (1H, m), 7.16–7.22 (1H, m), 7.46–7.55 (2H, m), 7.66–7.75 (2H, m), 10.01 (1H, s), 11.07 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₂₀N₂O₂S: C, 65.83; H, 6.14; N, 8.53. Found: C, 65.65; H, 6.20; N, 8.29.

1-(4-(*tert*-Butyl)phenyl)-3-(1*H*-indol-4-yl)urea (7b). Compound **7b** was synthesized from **6b** by the procedure described for **7a**. Yield 72%, a white solid. MS (ESI⁺): 308.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.27 (9H, s), 6.55 (1H, t, J = 2.2 Hz), 6.95–7.07 (2H, m), 7.27–7.34 (3H, m), 7.37–7.44 (2H, m), 7.66 (1H, dd, J = 7.2, 1.2 Hz), 8.43 (1H, s), 8.82 (1H, s), 11.12 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₂₁N₃O·0.20H₂O: C, 73.38; H, 6.94; N, 13.51. Found: C, 73.64; H, 7.04; N, 13.27.

***N*-(4-(*tert*-Butyl)phenyl)-1*H*-indole-4-carboxamide (9).** EDC-HCl (860 mg, 4.49 mmol), HOBT-H₂O (687 mg, 4.49 mmol) and Et₃N (1.25 mL, 8.97 mmol) were added to a solution of **8** (482 mg, 2.99 mmol) and 4-*tert*-butylaniline (0.572 mL, 3.59 mmol) in DMF (4.0 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at room

temperature overnight. The reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (NH silica gel, eluted with 35–75% EtOAc in *n*-hexane) to give **9** (560 mg, 64%) as a white solid. MS (ESI⁺): 239.1 [M + H]⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.30–1.39 (9H, m), 6.93–7.07 (1H, m), 7.23–7.33 (1H, m), 7.33–7.48 (3H, m), 7.48–7.69 (4H, m), 7.91 (1H, brs), 8.48 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀N₂O·0.50H₂O: C, 75.72; H, 7.02; N, 9.29. Found: C, 75.73; H, 6.83; N, 9.41.

4-(tert-Butyl)-N-(indolin-4-yl)benzamide (11a). To a solution of **10a** (91 mg, 0.68 mmol) in pyridine (3.0 mL) was added 4-*tert*-butylbenzoyl chloride (0.13 mL, 0.68 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 30 min. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 3–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **11a** (3.9 mg, 2%) as a white solid. MS (ESI⁺): 295.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.32 (9H, s), 2.86 (2H, t, *J* = 8.5 Hz), 3.35–3.46 (2H, m), 5.51 (1H, s), 6.35 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 6.64 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.86–6.94 (1H, m), 7.52 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.87 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 9.71 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₂₂N₂O·0.20H₂O: C, 76.58; H, 7.58; N, 9.40. Found: C, 76.69; H, 7.61; N, 9.29.

4-(tert-Butyl)-N-(2-oxoindolin-4-yl)benzamide (11b). Compound **11b** was synthesized from **10b** by the procedure described for **11a**. Yield 53%, a white solid. MS (ESI⁺): 309.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.32 (9H, s), 3.47 (2H, s), 6.67 (1H, dd, *J* = 7.0, 1.5 Hz), 7.09–7.24 (2H, m), 7.50–7.60 (2H, m), 7.83–7.93 (2H, m), 9.95 (1H, s), 10.42 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀N₂O₂·0.30H₂O: C, 72.73; H, 6.62; N, 8.93. Found: C, 72.76; H, 6.59; N, 8.77.

4-(*tert*-Butyl)-*N*-(1*H*-indazol-4-yl)benzamide (11c). Compound **11c** was synthesized from **10c** by the procedure described for **11a**. Yield 28%, a white solid. MS (ESI⁺): 294.2 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.34 (9H, s), 7.24–7.43 (2H, m), 7.44–7.70 (3H, m), 7.87–8.03 (2H, m), 8.22 (1H, s), 10.33 (1H, s), 13.05 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₁₉N₃O: C, 73.70; H, 6.53; N, 14.32. Found: C, 73.35; H, 6.59; N, 14.21.

4-(*tert*-Butyl)-*N*-(1*H*-indazol-7-yl)benzamide (11d). Compound **11d** was synthesized from **10d** by the procedure described for **11a**. Yield 71%, a white solid. MS (ESI⁺): 294.2 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.34 (9H, s), 7.12 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.54–7.69 (4H, m), 7.98 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.10 (1H, d, *J* = 1.1 Hz), 10.19 (1H, s), 12.84 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₈H₁₉N₃O: C, 73.70; H, 6.53; N, 14.32. Found: C, 73.57; H, 6.56; N, 14.34.

6-*tert*-Butyl-1-benzothiophene-2-carboxylic acid (12d). To a solution of **15** (3.10 g, 10.9 mmol) in THF (30 mL) were added **16** (0.348 g, 1.09 mmol), nickel(II) chloride hexahydrate (0.258 g, 1.09 mmol) and a 1.7M solution of *tert*-butylmagnesium chloride in THF (12.5 mL, 21.3 mmol) at -15 °C. The mixture was stirred at -15 °C under Ar for 4 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–3% EtOAc in *n*-hexane) to give a crude product. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the product in EtOH (20 mL) was added 2M NaOH (10 mL, 20.0 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the resulting solid was dissolved in water. The solution was acidified with 1M HCl at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried

over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **12d** (0.054 g, 2%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.35 (9H, s), 7.50–7.57 (1H, m), 7.90 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.97–8.03 (2H, m), 12.88 (1H, brs).

***N*-(1*H*-Indol-4-yl)benzamide (13a).** To a solution of **5** (80 mg, 0.34 mmol) in pyridine (2.0 mL) was added benzoyl chloride (0.048 mL, 0.41 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, and dried over Na₂SO₄. The mixture was filtered through silica gel pad using EtOAc and the filtrate was concentrated *in vacuo*. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the crude product in toluene (5.0 mL) was added TFA (2.0 mL, 26.0 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h, and then concentrated *in vacuo*. The residue was neutralized with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 3–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **13a** (35 mg, 48%) as a white solid. MS (ESI⁺): 236.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.56–6.62 (1H, m), 7.01–7.12 (1H, m), 7.24 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.28–7.32 (1H, m), 7.38 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.49–7.63 (3H, m), 7.96–8.05 (2H, m), 10.06 (1H, s), 11.12 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₅H₁₂N₂O: C, 76.25; H, 5.12; N, 11.86. Found: C, 75.98; H, 5.05; N, 11.75.

***N*-(1*H*-Indol-4-yl)-2-naphthamide (13b).** To a solution of **12b** (77 mg, 0.45 mmol) in THF (3.0 mL) were added (COCl)₂ (0.039 mL, 0.45 mmol) and DMF (2.7 μL, 0.03 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was concentrated *in vacuo*. The mixture was added to a

solution of **5** (80.0 mg, 0.34 mmol) in pyridine (3.0 mL) at room temperature and stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, and dried over Na₂SO₄. The mixture was filtered through silica gel pad using EtOAc and the filtrate was concentrated *in vacuo*. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the crude product in toluene (5.0 mL) was added TFA (2.0 mL, 26.0 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h, and then concentrated *in vacuo*. The mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, and dried over Na₂SO₄. The mixture was filtered through silica gel pad using EtOAc and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The resulting solid was collected by filtration to give **13b** (61.8 mg, 72%) as a white solid. MS (ESI⁺): 286.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.65 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.05–7.14 (1H, m), 7.26 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.29–7.35 (1H, m), 7.43 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.58–7.69 (2H, m), 7.98–8.15 (4H, m), 8.64 (1H, s), 10.23 (1H, s), 11.15 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄N₂O · 0.10H₂O: C, 79.20; H, 4.97; N, 9.72. Found: C, 79.15; H, 4.88; N, 9.59.

***N*-(1*H*-Indol-4-yl)-1-benzofuran-2-carboxamide (13c).** Compound **13c** was synthesized from **5** and **12c** by the procedure described for **13b**. Yield 62%, a white solid. MS (ESI⁺): 276.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.54–6.61 (1H, m), 7.05–7.13 (1H, m), 7.28 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.31–7.42 (3H, m), 7.47–7.56 (1H, m), 7.74 (1H, dd, *J* = 8.3, 0.8 Hz), 7.79–7.87 (2H, m), 10.25 (1H, s), 11.18 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₇H₁₂N₂O₂: C, 73.90; H, 4.38; N, 10.14. Found: C, 74.02; H, 4.46; N, 9.91.

6-*tert*-Butyl-*N*-(1*H*-indol-4-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (13d). Compound **13d** was synthesized from **5** and **12d** by the procedure described for

13b. Yield 7%, a white solid. MS (ESI+): 349.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.37 (9H, s), 6.61 (1H, brs), 7.04–7.13 (1H, m), 7.27 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.30–7.39 (2H, m), 7.56 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz), 7.91 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.03 (1H, s), 8.38 (1H, s), 10.29 (1H, s), 11.17 (1H, brs). HRMS-ESI (*m/z*): [M + Na] calcd for C₂₁H₂₀N₂NaOS, 371.1194; found. 371.1197.

6-Cyano-*N*-(1*H*-indol-4-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (13e).

Compound **13e** was synthesized from **5** and **12e** by the procedure described for **13b**. Yield 70%, a white solid. MS (ESI+): 317.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.61 (1H, brs), 7.05–7.17 (1H, m), 7.24–7.42 (3H, m), 7.85 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.20 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.54 (1H, s), 8.72 (1H, s), 10.54 (1H, s), 11.20 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₁₁N₃O₂·0.25H₂O: C, 67.17; H, 3.60; N, 13.05. Found: C, 67.39; H, 3.67; N, 12.68.

6-Chloro-*N*-(1*H*-indol-4-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (13f).

Compound **13f** was synthesized from **5** and **12f** by the procedure described for **13b**. Yield 59%, a yellow solid. MS (ESI+): 326.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.61 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 7.05–7.13 (1H, m), 7.28 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.31–7.38 (2H, m), 7.51 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 8.02 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.25 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 8.44 (1H, s), 10.40 (1H, s), 11.18 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₇H₁₁N₂OSCl: C, 62.48; H, 3.39; N, 8.57. Found: C, 62.24; H, 3.51; N, 8.37.

6-Bromo-*N*-(1*H*-indol-4-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (13g).

Compound **13g** was synthesized from **5** and **12g** by the procedure described for **13b**. Yield 77%, a yellow solid. MS (ESI+): 370.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.61 (1H, brs), 7.04–7.15 (1H, m), 7.24–7.38 (3H, m), 7.63 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz), 7.96 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.35–8.47 (2H, m), 10.41 (1H, s), 11.18 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₇H₁₁N₂OSBr: C, 55.00; H, 2.99; N, 7.55. Found: C, 55.03; H, 2.92; N, 7.44.

5-Bromo-*N*-(1*H*-indol-4-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (13h).

Compound **13h** was synthesized from **5** and **12h** by the procedure described for **13b**. Yield 72%, a white solid. MS (ESI⁺): 370.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.55–6.64 (1H, m), 7.03–7.15 (1H, m), 7.23–7.40 (3H, m), 7.63 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 8.05 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.26 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 8.39 (1H, s), 10.47 (1H, s), 11.18 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₇H₁₁N₂OSBr: C, 55.00; H, 2.99; N, 7.55. Found: C, 55.01; H, 3.12; N, 7.44.

7-Bromo-*N*-(1*H*-indol-4-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (13i).

Compound **13i** was synthesized from **5** and **12i** by the procedure described for **13b**. Yield 69%, a white solid. MS (ESI⁺): 370.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.58–6.65 (1H, m), 7.06–7.14 (1H, m), 7.29 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.32–7.38 (2H, m), 7.45 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.76 (1H, dd, *J* = 7.6, 0.8 Hz), 8.06 (1H, dd, *J* = 8.0, 0.7 Hz), 8.60 (1H, s), 10.46 (1H, s), 11.19 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₇H₁₁N₂OSBr: C, 55.00; H, 2.99; N, 7.55. Found: C, 54.95; H, 3.04; N, 7.37.

***N*-(1*H*-Indol-4-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (14a).** A mixture of **13g** (50.0 mg, 0.13 mmol) and 10% Pd-C (160 mg, 0.13 mmol) in EtOH (1.0 mL) and THF (1.0 mL) was hydrogenated under balloon pressure at room temperature for 3 h. The catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 3–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **14a** (26.6 mg, 68 %) as a pale yellow solid. MS (ESI⁺): 292.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.59–6.64 (1H, m), 7.05–7.13 (1H, m), 7.27 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.31–7.38 (2H, m), 7.44–7.54 (2H, m), 7.96–8.10 (2H, m), 8.45 (1H, s), 10.35 (1H, s), 11.18 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₇H₁₂N₂OS·0.30H₂O: C, 68.57; H, 4.27; N, 9.41. Found: C, 68.61; H, 4.16; N, 9.30.

***N*²-(1*H*-indol-4-yl)-1-benzothiophene-2,6-dicarboxamide (14b).** To a solution of **13e** (30.0 mg, 0.095 mmol) in DMSO (1.0 mL) were added K₂CO₃ (16 mg, 0.11 mmol) and 35% H₂O₂ (0.025 mL, 0.28 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was collected by filtration to give **14b** (29.8 mg, 94 %) as a yellow solid. MS (ESI⁺): 335.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.62 (1H, brs), 7.05–7.15 (1H, m), 7.24–7.39 (3H, m), 7.49 (1H, brs), 7.91–7.99 (1H, m), 8.02–8.18 (2H, m), 8.49 (1H, s), 8.56 (1H, s), 10.44 (1H, s), 11.19 (1H, brs). HRMS-ESI (*m/z*): [M + Na] calcd for C₁₈H₁₃N₃NaO₂S, 358.0626; found. 358.0643.

***N*-(1*H*-indol-4-yl)-6-iodo-1-benzothiophene-2-carboxamide (14c).** To a solution of **13g** (100 mg, 0.27 mmol) in NMP (2.0 mL) were added NaI (202 mg, 1.35 mmol), *N,N'*-dimethyl-1,2-ethanediamine (0.029 mL, 0.27 mmol) and copper(I) iodide (25.6 mg, 0.13 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 120 °C under N₂ overnight. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 3–50% EtOAc in *n*-hexane) to give a crude product. The product was purified by preparative HPLC (L-Column 2 ODS, eluted with H₂O in acetonitrile containing 0.1% TFA) to give **14c** (20.7 mg, 18%) as a pale yellow solid. MS (ESI⁺): 418.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.57–6.63 (1H, m), 7.05–7.13 (1H, m), 7.27 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.31–7.37 (2H, m), 7.73–7.84 (2H, m), 8.41 (1H, s), 8.53 (1H, s), 10.40 (1H, s), 11.18 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₇H₁₁N₂OSI: C, 48.82; H, 2.65; N, 6.70. Found: C, 48.66; H, 2.61; N, 6.68.

第二章第三節に関する合成実験および低分子結晶X線解析

2-Benzyl-5-(pyridin-3-yl)isoquinolin-1(2H)-one (18a). To a solution of **17a** (70.0 mg, 0.31 mmol) in DMF (2.0 mL) were added NaH (15 mg, 0.38 mmol) and benzyl bromide (0.045 mL, 0.38 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 5–60% EtOAc in *n*-hexane) to give **18a** (78 mg, 79%) as a white powder. MS (ESI⁺): 313.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 5.21 (2H, s), 6.39 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.22–7.39 (5H, m), 7.50–7.66 (3H, m), 7.67–7.74 (1H, m), 7.86–7.94 (1H, m), 8.36 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 8.59–8.72 (2H, m). Anal. Calcd for C₂₁H₁₆N₂O·0.10H₂O: C, 80.28; H, 5.20; N, 8.92. Found: C, 80.11; H, 5.22; N, 8.79.

2-Benzyl-5-(pyridin-3-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one (18b). Compound **18b** was synthesized from **17b** by the procedure described for **18a**. Yield 58%, a white solid. MS (ESI⁺): 315.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.90 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.41 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 4.73 (2H, s), 7.22–7.40 (5H, m), 7.44–7.57 (3H, m), 7.81–7.89 (1H, m), 8.04 (1H, dd, *J* = 6.6, 2.5 Hz), 8.57–8.66 (2H, m). Anal. Calcd for C₂₁H₁₈N₂O·0.10H₂O: C, 79.77; H, 5.80; N, 8.86. Found: C, 79.88; H, 5.78; N, 8.84.

2-Benzyl-6-(pyridin-3-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one (18c). Compound **18c** was synthesized from **17c** by the procedure described for **18a**. Yield 47%, a white solid. MS (ESI+): 315.2 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.05 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.54 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 4.74 (2H, s), 7.23–7.40 (5H, m), 7.47–7.55 (1H, m), 7.66–7.77 (2H, m), 8.03 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.09–8.18 (1H, m), 8.61 (1H, dd, *J* = 4.7, 1.6 Hz), 8.95 (1H, d, *J* = 1.8 Hz). Anal. Calcd for C₂₁H₁₈N₂O: C, 80.23; H, 5.77; N, 8.91. Found: C, 80.11; H, 5.78; N, 8.84.

6-Benzyl-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4H)-one (18d). Compound **18d** was synthesized from **17d** by the procedure described for **18a**. Yield 48%, a white solid. MS (ESI+): 320.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.97 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 3.54 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 4.68 (2H, s), 7.22–7.41 (5H, m), 7.44–7.52 (1H, m), 7.86–7.93 (1H, m), 8.06 (1H, s), 8.57 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz), 8.71 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz). Anal. Calcd for C₁₉H₁₆N₂OS: C, 71.22; H, 5.03; N, 8.74. Found: C, 71.08; H, 5.05; N, 8.76.

Methyl 2-(7-oxo-3-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(7H)-yl)-2-phenylacetate (19a). To a solution of **17d** (500 mg, 2.17 mmol) in THF (5.0 mL) were added potassium *tert*-butoxide (365 mg, 3.26 mmol) and methyl 2-bromo-2-phenylacetate (0.513 mL, 3.26 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was

separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–60% EtOAc in *n*-hexane) to give **19a** (743 mg, 90%) as a yellow oil. MS (ESI⁺): 379.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.85–2.94 (2H, m), 3.16–3.27 (1H, m), 3.59–3.71 (1H, m), 3.75 (3H, s), 6.24 (1H, s), 7.30–7.51 (6H, m), 7.85–7.94 (1H, m), 8.11 (1H, s), 8.57 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.70 (1H, d, *J* = 1.5 Hz). HRMS-ESI (*m/z*): [M + Na] calcd for C₂₁H₁₈N₂NaO₃S, 401.0936; found. 401.0953.

Methyl 2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)-2-(7-oxo-3-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)acetate (19b).

Compound **19b** was synthesized from **17d** and **22a** by the procedure described for **19a**. Yield 75%, a yellow oil. MS (ESI⁺): 435.1 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.66–2.80 (1H, m), 2.83–2.97 (1H, m), 3.06–3.18 (1H, m), 3.64–3.77 (1H, m), 3.81 (3H, s), 6.67 (1H, d, *J* = 0.8 Hz), 7.39–7.51 (3H, m), 7.72–7.80 (1H, m), 7.82–7.90 (2H, m), 8.02–8.10 (1H, m), 8.11 (1H, s), 8.54 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.67 (1H, d, *J* = 1.6 Hz).

***tert*-Butyl 3-(2-methoxy-2-oxo-1-(7-oxo-3-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)ethyl)-1*H*-indole-1-**

carboxylate (19c). Compound **19c** was synthesized from **17d** and **22b** by the procedure described for **19a**. Yield 13%, a yellow solid. MS (ESI⁺): 518.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.65 (9H, s), 2.73–2.98 (2H, m), 3.22–3.31 (1H, m), 3.60–3.74 (1H, m), 3.78 (3H, s), 6.53 (1H, s), 7.25–7.33 (1H, m), 7.35–7.48 (2H, m), 7.54 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.79 (1H, s), 7.83–7.90 (1H, m), 8.05–

8.13 (2H, m), 8.55 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz), 8.68 (1H, d, $J = 1.6$ Hz).

6-(2-Hydroxy-1-phenylethyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one (20a). To a solution of **19a** (735 mg, 1.94 mmol) in MeOH (10 mL) were added CaCl_2 (1.08 g, 9.71 mmol) and NaBH_4 (735 mg, 19.4 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO_3 at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–100% EtOAc in *n*-hexane) to **20a** (355 mg, 1.01 mmol, 52 %) as a white amorphous powder. MS (ESI⁺): 351.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 2.91 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.32–3.38 (1H, m), 3.53–3.67 (1H, m), 3.86–4.05 (2H, m), 4.96–5.06 (1H, m), 5.75 (1H, dd, $J = 8.3, 6.2$ Hz), 7.24–7.42 (5H, m), 7.44–7.51 (1H, m), 7.85–7.93 (1H, m), 8.05 (1H, s), 8.57 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz), 8.67–8.72 (1H, m). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} \cdot 0.20\text{H}_2\text{O}$: C, 67.85; H, 5.24; N, 7.91. Found: C, 67.87; H, 5.35; N, 7.84.

6-(1-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)-2-hydroxyethyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one (20b). Compound **20b** was synthesized from **19b** by the procedure described for **20a**. Yield 72%, a white solid. MS (ESI⁺): 407.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 2.58–2.75 (1H, m), 2.79–2.94 (1H, m),

3.07–3.19 (1H, m), 3.51–3.66 (1H, m), 3.94–4.17 (2H, m), 5.00–5.19 (1H, m), 6.13 (1H, t, $J = 6.8$ Hz), 7.32–7.48 (3H, m), 7.79–7.92 (3H, m), 7.96–8.08 (2H, m), 8.54 (1H, dd, $J = 4.7, 1.4$ Hz), 8.65 (1H, d, $J = 1.8$ Hz).

***tert*-Butyl 3-(2-hydroxy-1-(7-oxo-3-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)ethyl)-1*H*-indole-1-carboxylate (20c).** Compound **20c** was synthesized from **19c** by the procedure described for **20a**. Yield 97%, a white solid. MS (ESI+): 490.1 $[M + H]^+$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.65 (9H, s), 2.60–2.76 (1H, m), 2.78–2.94 (1H, m), 3.10–3.22 (1H, m), 3.50–3.65 (1H, m), 3.92–4.06 (2H, m), 5.11 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 6.00 (1H, t, $J = 6.6$ Hz), 7.20–7.29 (1H, m), 7.30–7.38 (1H, m), 7.44 (1H, dd, $J = 7.9, 5.5$ Hz), 7.55 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.78 (1H, s), 7.80–7.88 (1H, m), 8.00–8.09 (2H, m), 8.54 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz), 8.65 (1H, d, $J = 1.6$ Hz).

6-(2-Amino-1-phenylethyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one (21a). To a solution of **20a** (3.05 g, 8.70 mmol) in toluene (30 mL) were added phthalimide (1.67 g, 11.3 mmol), diisopropyl azodicarboxylate (5.96 mL, 11.3 mmol) and PPh_3 (2.97 g, 11.3 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–60% EtOAc in *n*-hexane) to give a crude product. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the product in EtOH (100 mL) was added hydrazine monohydrate (10 mL, 205

mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C for 3 h. The precipitate was removed by filtration, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (amino silica gel, eluted with 40–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **21a** (1.72 g, 53%) as a white powder. MS (ESI⁺): 349.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.95 (2H, brs), 2.79–3.03 (2H, m), 3.06–3.26 (3H, m), 3.50–3.65 (1H, m), 5.68 (1H, dd, *J* = 9.3, 5.9 Hz), 7.24–7.40 (5H, m), 7.44–7.51 (1H, m), 7.84–7.92 (1H, m), 8.05 (1H, s), 8.57 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.67–8.72 (1H, m). Anal. Calcd for C₂₀H₁₉N₃OS·0.50H₂O: C, 67.01; H, 5.62; N, 11.72. Found: C, 66.97; H, 5.67; N, 11.61.

Optical Resolution of 21a. The racemic compound **21a** (1.60 g, 4.58 mmol) was purified by chiral preparative HPLC (CHIRALCEL OJ 50 mm x 500 mm column, eluted with a flow rate of 80 mL/min *n*-hexane/EtOH/diethylamine = 50/50/0.1 at 30 °C) to give the first eluting enantiomer **21b** (*t*_R1, 558 mg) and the second eluting enantiomer **21c** (*t*_R2, 645 mg). Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ 4.6 mm x 250 mm column, eluted with a flow rate of 1 mL/min *n*-hexane/EtOH/diethylamine = 70/30/0.1 at 30 °C) was performed. For *t*_R1; *t*_R = 10.87 min and 99.7% ee, For *t*_R2; *t*_R = 15.44 min and 99.4% ee. Absolute configuration of each enantiomer was determined by X-ray structure analysis. For (*S*)-**21b**: [α]²⁵_D = +30.6° (*c* = 0.225, CHCl₃). MS (ESI⁺): 350.0 [M + H]⁺. ¹H NMR

(DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.51 (2H, brs), 2.80–3.03 (2H, m), 3.04–3.27 (3H, m), 3.51–3.65 (1H, m), 5.66 (1H, dd, J = 9.3, 5.9 Hz), 7.23–7.40 (5H, m), 7.44–7.51 (1H, m), 7.84–7.92 (1H, m), 8.05 (1H, s), 8.57 (1H, dd, J = 4.8, 1.6 Hz), 8.68–8.72 (1H, m). Anal. Calcd for C₂₀H₁₉N₃OS·0.10H₂O: C, 68.39; H, 5.51; N, 11.96. Found: C, 68.38; H, 5.49; N, 11.85. For (*R*)-**21c**: $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -36.3^{\circ}$ (c = 0.225, CHCl₃). MS (ESI+): 350.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.56 (2H, brs), 2.79–3.03 (2H, m), 3.04–3.27 (3H, m), 3.51–3.66 (1H, m), 5.66 (1H, dd, J = 9.3, 5.9 Hz), 7.23–7.41 (5H, m), 7.43–7.51 (1H, m), 7.84–7.92 (1H, m), 8.04 (1H, s), 8.57 (1H, dd, J = 4.8, 1.6 Hz), 8.67–8.71 (1H, m). Anal. Calcd for C₂₀H₁₉N₃OS: C, 68.74; H, 5.48; N, 12.02. Found: C, 68.53; H, 5.52; N, 11.83.

6-(2-Amino-1-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)ethyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one (21d). Compound **21d** was synthesized from **20b** by the procedure described for **21a**. Yield 68%, a white solid. MS (ESI+): 406.1 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.66 (2H, brs), 2.57–2.70 (1H, m), 2.81–2.96 (1H, m), 3.00–3.12 (1H, m), 3.23 (2H, d, J = 7.5 Hz), 3.48–3.62 (1H, m), 6.04 (1H, t, J = 7.4 Hz), 7.32–7.47 (3H, m), 7.78–7.95 (3H, m), 7.96–8.07 (2H, m), 8.54 (1H, dd, J = 4.8, 1.6 Hz), 8.64 (1H, d, J = 1.8 Hz). Anal. Calcd for C₂₂H₁₉N₃OS₂: C, 65.16; H, 4.72; N, 10.36. Found: C, 64.88; H, 4.81; N, 10.20.

***tert*-Butyl 3-(2-amino-1-(7-oxo-3-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)ethyl)-1*H*-indole-1-carboxylate (21e).** Compound **21e** was synthesized from **20c** by the procedure described for **21a**. Yield 48%, a white solid. MS (ESI+):

489.1 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.65 (9H, s), 1.89 (2H, s), 2.59–2.71 (1H, m), 2.83–3.00 (1H, m), 3.03–3.24 (3H, m), 3.47–3.62 (1H, m), 5.91 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.19–7.28 (1H, m), 7.29–7.37 (1H, m), 7.44 (1H, dd, *J* = 7.8, 5.0 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.73 (1H, s), 7.80–7.87 (1H, m), 8.00–8.07 (2H, m), 8.54 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.65 (1H, d, *J* = 1.6 Hz).

6-(2-Amino-1-(1H-indol-3-yl)ethyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one (21f). To a solution of **21e** (35.0 mg, 0.072 mmol) in MeOH (3.0 mL) and H₂O (1.0 mL) was added K₂CO₃ (29.7 mg, 0.21 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C for 3 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was collected by filtration to give **21f** (17.2 mg, 62%) as a white powder. MS (ESI⁺): 389.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.78 (2H, brs), 2.56–2.69 (1H, m), 2.83–2.96 (1H, m), 2.97–3.09 (1H, m), 3.10–3.25 (2H, m), 3.41–3.55 (1H, m), 5.97 (1H, dd, *J* = 8.9, 6.3 Hz), 6.91–7.01 (1H, m), 7.03–7.12 (1H, m), 7.35 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.39–7.46 (2H, m), 7.49 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.78–7.88 (1H, m), 8.02 (1H, s), 8.54 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.65 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 11.06 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀N₄OS·0.30H₂O: C, 67.08; H, 5.27; N, 14.22. Found: C, 66.97; H, 5.23; N, 14.06.

6-(3-Amino-1-phenylpropyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one (21g). Compound **21g** was synthesized from **25** by the procedure described for **21a**. Yield 44%,

a white solid. MS (ESI⁺): 364.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.75–2.16 (4H, m), 2.54–2.68 (2H, m), 2.74–2.98 (2H, m), 3.04–3.19 (1H, m), 3.41–3.60 (1H, m), 5.89 (1H, dd, *J* = 9.6, 5.9 Hz), 7.23–7.53 (6H, m), 7.88 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.06 (1H, s), 8.56 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 8.69 (1H, d, *J* = 1.6 Hz). Anal. Calcd for C₂₁H₂₁N₃OS·0.70H₂O: C, 67.07; H, 6.00; N, 11.17. Found: C, 67.26; H, 6.09; N, 10.98.

3-(7-Oxo-3-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)-3-phenylpropyl benzoate (24). To a solution of **17d** (300 mg, 1.30 mmol) in DMF (1.0 mL) were added potassium *tert*-butoxide (292 mg, 2.61 mmol) and **23** (624 mg, 1.95 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–60% EtOAc in *n*-hexane) to give **24** (315 mg, 0.672 mmol, 52 %) as a colorless oil. MS (ESI⁺): 469.1 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.53–2.63 (2H, m), 2.75–3.01 (2H, m), 3.06–3.19 (1H, m), 3.52–3.65 (1H, m), 4.31–4.45 (2H, m), 6.05 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.13–7.54 (8H, m), 7.60–7.68 (1H, m), 7.81–7.88 (1H, m), 7.91–7.99 (2H, m), 8.04 (1H, s), 8.56 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.66 (1H, d, *J* = 1.6 Hz).

6-(3-Hydroxy-1-phenylpropyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one (25). To a solution of **24** (315 mg, 0.67 mmol) in MeOH (5.0 mL) was added 2 M NaOH (1.0

mL, 2.00 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **25** (212 mg, 87%) as a white amorphous solid. MS (ESI⁺): 365.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.07–2.25 (2H, m), 2.70–3.01 (2H, m), 3.08–3.22 (1H, m), 3.40–3.60 (3H, m), 4.53 (1H, t, *J* = 5.1 Hz), 5.84–5.93 (1H, m), 7.25–7.43 (5H, m), 7.46 (1H, dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz), 7.84–7.93 (1H, m), 8.04 (1H, s), 8.56 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.69 (1H, d, *J* = 1.7 Hz).

Methyl 4-bromo-3-hydroxythiophene-2-carboxylate (27). To a solution of **26** (23.0 g, 145 mmol) in AcOH (50 mL) was added bromine (8.20 mL, 160 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–10% EtOAc in *n*-hexane) to give **27** (21.0 g, 61%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.80 (3H, s), 7.98 (1H, s), 10.38 (1H, brs).

Methyl 3-hydroxy-4-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (28). A mixture of **27** (4.04 g, 32.9 mmol), Cs₂CO₃ (14.3 g, 43.9 mmol), Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂ (0.896 g, 1.10 mmol), DME (150 mL) and H₂O (30 mL) was stirred at 80 °C for 1 h. The mixture was poured into

saturated aqueous NaHCO_3 and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **28** (3.69 g, 72%) as a white solid. MS (ESI⁺): 235.8 [$\text{M} + \text{H}$]⁺. ¹H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 3.85 (3H, s), 7.43–7.52 (1H, m), 8.04–8.13 (1H, m), 8.19 (1H, s), 8.54 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz), 8.90 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 10.22 (1H, brs).

Methyl 3-(2-oxoethyl)-4-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (30). To a solution of **28** (6.48g, 27.5 mmol) in pyridine (70 mL) was added Tf_2O (5.58 mL, 33.1 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into saturated aqueous NaHCO_3 and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo* to give a crude product. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the product in DME (150 mL) and H_2O (20 mL) were added (*E*)-1-ethoxyethene-2-boronic acid pinacol ester (8.17 g, 41.2 mmol), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1.12 g, 1.37 mmol) and Cs_2CO_3 (17.9 g, 55.0 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C under Ar for 5 h. The mixture was poured into saturated aqueous NaHCO_3 and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 20–60% EtOAc in *n*-hexane) to give a crude product. To a solution of the product in THF (150 mL) was added 12 M HCl

(6.53 mL, 78.4 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was basified with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 5–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **30** (2.02 g, 30%) as a white powder. MS (ESI⁺): 261.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.82 (3H, s), 4.06 (2H, s), 7.45–7.53 (1H, m), 7.69–7.75 (1H, m), 8.05 (1H, s), 8.50–8.55 (1H, m), 8.61 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 9.65 (1H, s).

***tert*-Butyl 4-(7-oxo-3-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylate (33a).** To a solution of **30** (90.0 mg, 0.34 mmol) in MeOH (3.0 mL) and AcOH (0.30 mL) was added **31a** (94 mg, 0.38 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 20 min, 2-picoline borane (48 mg, 0.38 mmol) was added to the reaction mixture. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was basified with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 5–60% EtOAc in *n*-hexane) to give a crude product. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the product in MeOH (3.0 mL) was added NaOMe (664 mg, 3.44 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into water and

extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 5–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **33a** (69.9 mg, 44%) as a white powder. MS (ESI⁺): 462.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.39 (9H, brs), 2.75–2.93 (2H, m), 3.03–3.17 (1H, m), 3.34–3.40 (1H, m), 3.68–3.88 (2H, m), 4.50–4.71 (2H, m), 5.61–5.72 (1H, m), 7.23–7.35 (4H, m), 7.47 (1H, dd, *J* = 7.5, 5.1 Hz), 7.83–7.90 (1H, m), 8.10 (1H, s), 8.56 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.68 (1H, d, *J* = 1.8 Hz).

***tert*-Butyl (2-(7-oxo-3-(pyridin-3-yl)-4,5-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)octyl)carbamate (33b).** Compound **33b** was synthesized from **30** and **31b** by the procedure described for **33a**. Yield 6%, a white solid. MS (ESI⁺): 458.1 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.78–0.91 (3H, m), 1.12–1.54 (19H, m), 2.82–3.18 (4H, m), 3.35–3.62 (2H, m), 4.47–4.65 (1H, m), 6.87 (1H, t, *J* = 6.3 Hz), 7.50 (1H, dd, *J* = 7.3, 4.8 Hz), 7.82–7.93 (1H, m), 8.02 (1H, s), 8.58 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.68 (1H, d, *J* = 1.9 Hz).

3-(Pyridin-3-yl)-6-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-4-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one Hydrochloride (34a). To a solution of **33a** (65.0 mg, 0.14 mmol) in EtOAc (4.0 mL) was added 4 M HCl in EtOAc (1.00 mL, 4.00 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The resulting solid was collected by filtration and washed with EtOAc to give **34a** (50.8 mg, 83 %) as a white powder. MS (ESI⁺): 362.0 [M + H]⁺.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 2.90–3.06 (2H, m), 3.21–3.37 (1H, m), 3.43–3.68 (3H, m), 4.25–4.51 (2H, m), 6.01–6.16 (1H, m), 7.24–7.42 (4H, m), 7.54–7.67 (1H, m), 8.04 (1H, d, J = 7.5 Hz), 8.18 (1H, s), 8.60–8.69 (1H, m), 8.78 (1H, d, J = 1.9 Hz), 9.40 (1H, brs), 9.56 (1H, brs), (HCl proton included). Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{OS} \cdot \text{HCl} \cdot 2.80\text{H}_2\text{O}$: C, 56.25; H, 5.75; N, 9.37. Found: C, 56.19; H, 5.55; N, 9.18.

6-(1-Aminooctan-2-yl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one, Dihydrochloride (34b). Compound **34b** was synthesized from **33b** by the procedure described for **34a**. Yield 81%, a white solid. MS (ESI+): 358.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 0.76–0.91 (3H, m), 1.11–1.38 (8H, m), 1.42–1.70 (2H, m), 2.85–3.15 (4H, m), 3.39–3.65 (2H, m), 4.62–4.76 (1H, m), 7.79–7.88 (1H, m), 8.00 (3H, brs), 8.21 (1H, s), 8.29 (1H, d, J = 8.2 Hz), 8.77 (1H, d, J = 5.2 Hz), 8.90 (1H, s), (HCl proton included). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{OS} \cdot 2\text{HCl} \cdot 1.20\text{H}_2\text{O}$: C, 53.14; H, 7.00; N, 9.30. Found: C, 53.44; H, 7.15; N, 8.94.

(*R*)-Methyl 3-(2-((1-cyclohexyl-2-hydroxyethyl)amino)ethyl)-4-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (36a). To a solution of **30** (90.0 mg, 0.34 mmol) in MeOH (4.0 mL) and AcOH (0.400 mL) were added (*R*)-2-amino-2-cyclohexylethanol **35a** (54.3 mg, 0.38 mmol) and 2-picoline borane (55.3 mg, 0.52 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was basified with saturated aqueous NaHCO_3 and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified

by column chromatography (silica gel, eluted with 0–20% MeOH in EtOAc) to give **36a** (50.5 mg, 38%) as a colorless oil. MS (ESI⁺): 389.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.73–0.92 (2H, m), 0.97–1.13 (3H, m), 1.14–1.29 (2H, m), 1.41–1.70 (6H, m), 2.03–2.13 (1H, m), 2.39–2.48 (1H, m), 2.52–2.65 (1H, m), 2.97–3.17 (2H, m), 3.25–3.31 (1H, m), 3.83 (3H, s), 7.49 (1H, dd, *J* = 7.5, 5.2 Hz), 7.81–7.88 (1H, m), 7.91 (1H, s), 8.56–8.64 (2H, m).

(R)-Methyl 3-(2-((1-hydroxy-3,3-dimethylbutan-2-yl)amino)ethyl)-4-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (36c).

Compound **36c** was synthesized from **30** and **35c** by the procedure described for **36a**. Yield 57%, a white solid. MS (ESI⁺): 363.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.72 (9H, s), 1.84 (1H, dd, *J* = 6.6, 4.1 Hz), 2.40–2.48 (1H, m), 2.68–2.83 (1H, m), 2.99–3.19 (3H, m), 3.46 (1H, dd, *J* = 11.0, 4.0 Hz), 3.83 (3H, s), 4.22 (1H, brs), 7.45–7.52 (1H, m), 7.81–7.88 (1H, m), 7.90 (1H, s), 8.57–8.64 (2H, m).

(R)-Methyl 3-(2-((1-hydroxy-4-methylpentan-2-yl)amino)ethyl)-4-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (36d).

Compound **36d** was synthesized from **30** and **35d** by the procedure described for **36a**. Yield 31%, a white solid. MS (ESI⁺): 363.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.79 (6H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.98–1.27 (3H, m), 1.45–1.61 (1H, m), 2.56–2.73 (1H, m), 2.96–3.24 (3H, m), 3.28–3.31 (3H, m), 3.85 (3H, s), 7.50 (1H, dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz), 7.82–7.88 (1H, m), 7.94 (1H, s), 8.58–8.65 (2H, m).

(R)-6-(1-Cyclohexyl-2-hydroxyethyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4H)-one (37a). To a solution of

36a (50.0 mg, 0.13 mmol) in MeOH (3.0 mL) was added NaOMe (248 mg, 1.29 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–90% EtOAc in *n*-hexane) to give **37a** (31.6 mg, 69%) as (a) colorless oil. MS (ESI⁺): 357.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.82–1.09 (2H, m), 1.09–1.30 (3H, m), 1.52–1.89 (6H, m), 2.83–3.03 (2H, m), 3.42–3.53 (1H, m), 3.54–3.68 (3H, m), 4.20–4.32 (1H, m), 4.63 (1H, t, *J* = 5.2 Hz), 7.44–7.53 (1H, m), 7.87–7.95 (1H, m), 8.01 (1H, s), 8.58 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.72 (1H, d, *J* = 1.6 Hz).

(R)-6-(1-Hydroxy-3,3-dimethylbutan-2-yl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4H)-one (37c). Compound **37c** was synthesized from **36c** by the procedure described for **37a**. Yield 76%, a white solid. MS (ESI⁺): 331.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.95 (9H, s), 2.81–2.93 (1H, m), 2.96–3.11 (1H, m), 3.53–3.76 (4H, m), 4.49 (1H, dd, *J* = 10.0, 4.7 Hz), 4.59 (1H, t, *J* = 5.3 Hz), 7.46–7.53 (1H, m), 7.89–7.96 (1H, m), 8.02 (1H, s), 8.58 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.73 (1H, d, *J* = 1.6 Hz).

(R)-6-(1-Hydroxy-4-methylpentan-2-yl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4H)-one (37d). Compound **37d** was synthesized from **36d** by the procedure described for **37a**. Yield 81%, a white solid. MS (ESI⁺): 331.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.83–0.95 (6H, m), 1.16–1.29 (1H, m), 1.42–1.61

(2H, m), 2.84–2.97 (2H, m), 3.36–3.54 (4H, m), 4.57–4.69 (1H, m), 4.73 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 7.44–7.53 (1H, m), 7.87–7.95 (1H, m), 8.02 (1H, s), 8.58 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz), 8.71 (1H, d, $J = 1.6$ Hz).

(*R*)-6-(2-Amino-1-cyclohexylethyl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one, Dihydrochloride (38a).

Compound **38a** was synthesized from **37a** by the procedure described for **21a**. Yield 46%, a white solid. MS (ESI+): 356.0 $[M + H]^+$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 0.76–1.32 (6H, m), 1.50–1.85 (5H, m), 2.96–3.19 (4H, m), 3.40–3.52 (1H, m), 3.54–3.68 (1H, m), 4.34–4.45 (1H, m), 7.66–7.74 (1H, m), 7.84 (3H, brs), 8.08–8.18 (2H, m), 8.69 (1H, d, $J = 5.0$ Hz), 8.81 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), (HCl proton included). Anal. Calcd for $C_{20}H_{25}N_3OS \cdot 2HCl \cdot 1.30H_2O$: C, 53.16; H, 6.60; N, 9.30. Found: C, 53.45; H, 6.86; N, 9.00.

6-(1-Aminopentan-2-yl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one, Dihydrochloride (38b).

To a solution of **30** (100 mg, 0.38 mmol) in MeOH (4.0 mL) and AcOH (0.400 mL) were added 2-amino-1-pentanol **35b** (0.045 mL, 0.40 mmol) and 2-picoline borane (61 mg, 0.57 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was basified with saturated aqueous $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–20% MeOH in EtOAc) to give a crude product. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a

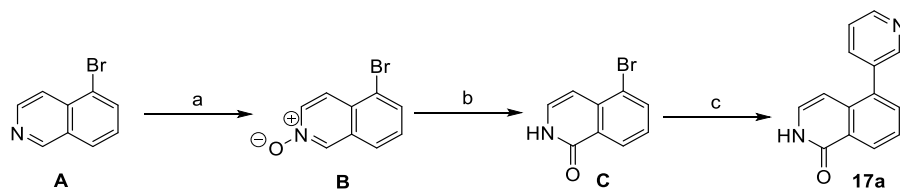
solution of the crude product in MeOH (3.0 mL) was added NaOMe (292 mg, 1.52 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to give a cyclized product. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the product in toluene (3.0 mL) were added phthalimide (56.3 mg, 0.38 mmol), diisopropyl azodicarboxylate (0.201 mL, 0.38 mmol) and PPh₃ (101 mg, 0.38 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–60% EtOAc in *n*-hexane) to give a crude product. To a solution of the product in EtOH (3.0 mL) was added hydrazine monohydrate (0.50 mL, 10.3 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C for 2 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (amino silica gel, eluted with 40–100% EtOAc in *n*-hexane). The obtained free form was dissolved with MeOH (2.0 mL), then 4M HCl in EtOAc (0.2 mL) was added. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was co-evaporated with EtOAc to give **38b** (37.0 mg, 25%) as a white powder. MS (ESI⁺): 315.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.79–0.95 (3H, m), 1.10–1.38 (2H, m), 1.41–1.69 (2H, m), 2.83–3.16 (4H, m), 3.38–3.68 (2H, m), 4.65–

4.81 (1H, m), 7.65–7.80 (1H, m), 7.96 (3H, brs), 8.12–8.22 (2H, m), 8.67–8.77 (1H, m), 8.83 (1H, s), (HCl proton included). Anal. Calcd for $C_{17}H_{21}N_3OS \cdot 2HCl \cdot 3.00H_2O$: C, 46.15; H, 6.61; N, 9.50. Found: C, 46.02; H, 6.56; N, 9.71.

(R)-6-(1-Amino-3,3-dimethylbutan-2-yl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4H)-one, Dihydrochloride (38c). Compound **38c** was synthesized from **37c** by the procedure described for **21a**. Yield 52%, a white solid. MS (ESI+): 330.0 $[M + H]^+$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 0.98 (9H, s), 2.97–3.30 (4H, m), 3.52–3.76 (2H, m), 4.64–4.73 (1H, m), 7.70–7.80 (1H, m), 7.93 (3H, brs), 8.14–8.24 (2H, m), 8.72 (1H, dd, $J = 5.1, 1.4$ Hz), 8.85 (1H, d, $J = 1.7$ Hz). Anal. Calcd for $C_{18}H_{23}N_3OS \cdot 2HCl \cdot 1.00H_2O$: C, 51.43; H, 6.47; N, 10.00. Found: C, 51.70; H, 6.69; N, 9.76.

(R)-6-(1-amino-4-methylpentan-2-yl)-3-(pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4H)-one, Dihydrochloride (38d). Compound **38d** was synthesized from **37d** by the procedure described for **21a**. Yield 66%, a white solid. MS (ESI+): 330.0 $[M + H]^+$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 0.80–0.98 (6H, m), 1.20–1.35 (1H, m), 1.41–1.71 (2H, m), 2.82–3.13 (4H, m), 3.37–3.65 (2H, m), 4.77–4.91 (1H, m), 7.09–7.30 (1H, m), 7.75 (1H, dd, $J = 7.8, 5.1$ Hz), 7.93 (3H, brs), 8.13–8.24 (2H, m), 8.72 (1H, dd, $J = 5.1, 1.4$ Hz), 8.85 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), (2HCl proton included). Anal. Calcd for $C_{18}H_{23}N_3OS \cdot 2HCl \cdot 1.00H_2O$: C, 51.43; H, 6.47; N, 10.00. Found: C, 51.26; H, 6.61; N, 9.88.

Synthesis of 17a^a



^aReagents and Conditions: (a) 3-chloroperoxybenzoic acid, acetonitrile, 96%; (b) (i) Ac₂O, 140 °C; (ii) 2 M NaOH, THF, 83%; (c) 3-pyridineboronic acid, Pd(Ph₃P)₄, K₂CO₃, DMF, 100 °C, 66%.

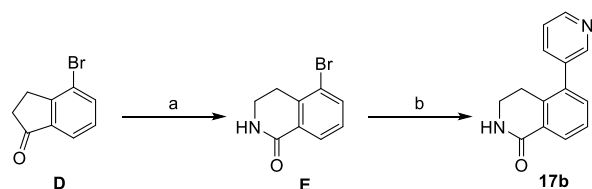
5-Bromoisoquinoline 2-oxide (B). To a solution of 5-bromoisoquinoline (2.00 g, 9.61 mmol) in CH₃CN (50 mL) was added 3-chloroperoxybenzoic acid (3.55 g, 14.42 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was quenched with saturated aqueous Na₂S₂O₃ at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was collected by filtration to give **B** (2.06 g, 96%) as a white solid. MS (ESI⁺): 225.7 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 7.52–7.63 (1H, m), 7.88–8.02 (3H, m), 8.26 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.9 Hz), 9.03 (1H, d, *J* = 1.8 Hz).

5-Bromoisoquinolin-1(2H)-one (C). A solution of **B** (2.05 g, 9.15 mmol) in Ac₂O (40 mL, 424 mmol) was stirred at 140 °C for 3 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ at room temperature. The resulting solid was collected by filtration. 2 M NaOH (10 mL, 20.00 mmol) was added to a solution of the mixture in THF (30 mL) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 h and concentrated *in vacuo*. The mixture was neutralized with 1 M

HCl at 0 °C, and the precipitate was collected by filtration to give **C** (1.70 g, 83%) as a light brown solid. MS (ESI+): 225.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.66 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.33 (1H, dd, *J* = 7.3, 5.9 Hz), 7.40 (1H, t, *J* = 7.9 Hz), 8.02 (1H, dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz), 8.21 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 11.53 (1H, brs).

5-(Pyridin-3-yl)isoquinolin-1(2H)-one (17a). To a solution of **C** (1.65 g, 7.36 mmol) in DMF (20 mL) were added 3-pyridineboronic acid (1.09 g, 8.84 mmol), Pd(Ph₃P)₄ (0.851 g, 0.74 mmol) and K₂CO₃ (3.05 g, 22.1 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 100 °C under Ar for 3 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **17a** (1.08 g, 66%) as a pale orange solid. MS (ESI+): 222.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.28 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.51–7.62 (2H, m), 7.66–7.72 (1H, m), 7.84–7.92 (1H, m), 8.26–8.34 (1H, m), 8.59–8.71 (2H, m), 11.39 (1H, brs).

Synthesis of 17b^a

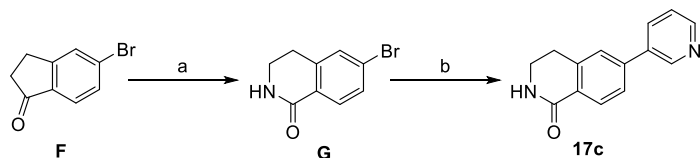


^aReagents and Conditions: (a) azidotrimethylsilane, TFA, 63%; (b) 3-pyridineboronic acid pinacol ester, Pd(Ph₃P)₄, K₂CO₃, toluene, EtOH, 80 °C, 98%.

5-Bromo-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one (E). To a solution of **D** (5.08 g, 24.1 mmol) in TFA (20 mL) was added azidotrimethylsilane (4.79 mL, 36.1 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 2 days. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **E** (3.45 g, 63%) as a white solid. MS (ESI+): 227.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.96 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.35–3.46 (2H, m), 7.31 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.78 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz), 7.89 (1H, dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz), 8.08 (1H, brs).

5-(Pyridin-3-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one (17b). To a solution of **E** (3.70 g, 16.4 mmol) in toluene (50 mL) and EtOH (50.0 mL) were added 3-pyridineboronic acid (2.62 g, 21.3 mmol), Pd(Ph₃P)₄ (1.89 g, 1.64 mmol) and K₂CO₃ (6.79 g, 49.1 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C under Ar overnight. The insoluble material was removed by filtration, and the filtrate was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **17b** (3.60 g, 16.1 mmol, 98 %) as a pale yellow solid. MS (ESI+): 224.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.83 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 3.23–3.31 (2H, m), 7.42–7.54 (3H, m), 7.82–7.89 (1H, m), 7.95 (1H, dd, *J* = 7.0, 2.1 Hz), 8.02 (1H, brs), 8.56–8.67 (2H, m).

Synthesis of 17c^a



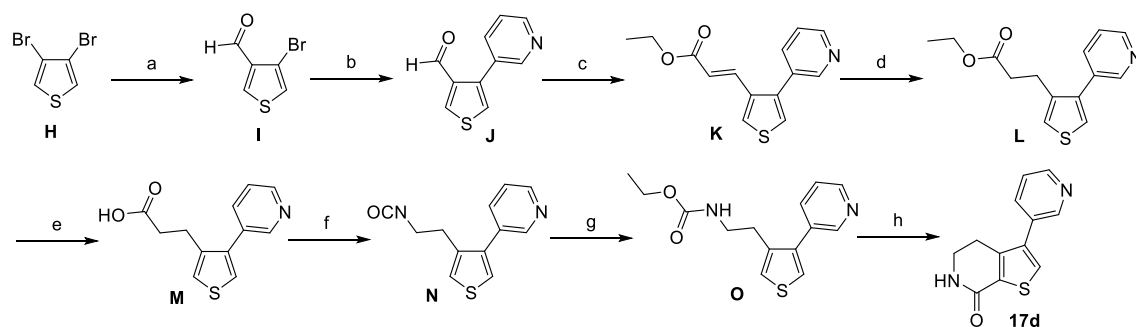
^aReagents and Conditions: (a) sodium azide, methanesulfonic acid, toluene, 39%; (b) 3-pyridineboronic acid pinacol ester, Pd(Ph₃P)₄, K₂CO₃, toluene, EtOH, 80 °C, 89%.

6-Bromo-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one (G). To a solution of **F** (5.08 g, 24.1 mmol) and methanesulfonic acid (27.8 mL, 428 mmol) in toluene (100 mL) was added sodium azide (6.36 g, 97.8 mmol) portionwise at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with 1 M NaOH and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **G** (5.40 g, 39%) as a white solid. MS (ESI⁺): 227.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.91 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.33–3.41 (2H, m), 7.50–7.60 (2H, m), 7.75 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.01 (1H, brs).

6-(Pyridin-3-yl)-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one (17c). To a solution of **G** (800 mg, 3.54 mmol) in toluene (8.0 mL) and EtOH (8.0 mL) were added 3-pyridineboronic acid pinacol ester (871 mg, 4.25 mmol), Pd(Ph₃P)₄ (818 mg, 0.71 mmol) and K₂CO₃ (1.47 g, 10.6 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C under Ar for 1 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with

brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 50–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **17c** (705 mg, 89%) as a pale yellow solid. MS (ESI⁺): 224.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 2.99 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.38–3.47 (2H, m), 7.47–7.55 (1H, m), 7.67–7.74 (2H, m), 7.90–8.03 (2H, m), 8.10–8.17 (1H, m), 8.61 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz), 8.94 (1H, d, $J = 1.7$ Hz).

Synthesis of **17d**^a



^a Reagents and conditions: (a) *n*-butyllithium, DMF, Et_2O , -78°C , 75%; (b) 3-pyridineboronic acid, $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, K_2CO_3 , toluene, EtOH , 70°C , 94%; (c) triethyl phosphonoacetate, NaH, THF, 0°C , 98%; (d) 10% Pd/C, H_2 , EtOAc, 98%; (e) 2 M NaOH, EtOH, 86%; (f) diphenylphosphoryl azide, Et_3N , DME; (g) EtOH, toluene, 80°C , 87% (two steps); (h) polyphosphoric acid, trifluoromethylbenzene, 100°C , 63%.

4-Bromothiophene-3-carbaldehyde (I). *n*-Butyllithium (14.6 mL, 23.6 mmol) was added to a solution of **H** (5.20g, 21.49 mmol) in Et_2O (20 mL) at -78°C . After being stirred at -78°C for 10 min, DMF (2.50 mL, 32.24 mmol) in Et_2O (20 mL) was slowly added to the reaction mixture. The mixture was stirred at -78°C under Ar

for 10 min. The mixture was quenched with 1M HCl at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–1% EtOAc in *n*-hexane) to give **I** (3.10 g, 75%) as a yellow oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 7.88 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 8.60 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 9.87 (1H, s).

4-(Pyridin-3-yl)thiophene-3-carbaldehyde (J). To a solution of **I** (2.90g, 15.2 mmol) in toluene (20 mL) and EtOH (20 mL) were added 3-pyridineboronic acid (2.24 g, 18.2 mmol), Pd(Ph₃P)₄ (1.75 g, 1.52 mmol) and K₂CO₃ (6.29 g, 45.5 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C under Ar for 4 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 3–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **J** (2.71 g, 94%) as a white powder. MS (ESI+): 189.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 7.41–7.48 (1H, m), 7.81 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.84–7.92 (1H, m), 8.57 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.65 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.7 Hz), 8.71 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 9.88 (1H, s).

(E)-Ethyl 3-(4-(pyridin-3-yl)thiophen-3-yl)acrylate (K). To a suspension of NaH (0.630 g, 15.8 mmol) in THF (30 mL) was added triethyl phosphonoacetate (3.41 mL, 17.2 mmol) at 0 °C. After being stirred at 0 °C for 20 min, **J** (2.71g, 14.3 mmol) was added to the reaction mixture. The mixture was stirred at 0 °C for 20 min. The

mixture was poured into saturated aqueous NH_4Cl at $0\text{ }^\circ\text{C}$ and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 5–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **K** (3.64 g, 98%) as a colorless oil. MS (ESI+): 259.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 1.21 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.14 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 6.47 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 7.39 (1H, dd, $J = 15.9, 0.5$ Hz), 7.53 (1H, s), 7.75–7.83 (2H, m), 8.35 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 8.58 (1H, dd, $J = 2.3, 0.8$ Hz), 8.63 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz).

Ethyl 3-(4-(pyridin-3-yl)thiophen-3-yl)propanoate (L). A mixture of **K** (10.1g, 39.0 mmol) and 10% Pd-C (3.0g, 28.2 mmol) in EtOAc (100 mL) was hydrogenated under balloon pressure at room temperature overnight. The catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give **L** (10.0 g, 98%) as a colorless oil. MS (ESI+): 262.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 1.13 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.56–2.64 (2H, m), 2.80–2.90 (2H, m), 4.01 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 7.72 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 7.79 (1H, dd, $J = 7.7, 5.4$ Hz), 8.20–8.27 (1H, m), 8.74 (1H, dd, $J = 5.2, 1.5$ Hz), 8.82 (1H, d, $J = 1.6$ Hz).

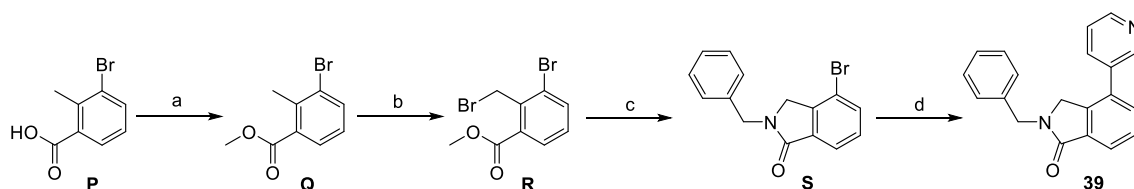
3-(4-(Pyridin-3-yl)thiophen-3-yl)propanoic acid (M). To a solution of **L** (3.22g, 12.3 mmol) in EtOH (20 mL) was added 2M NaOH (6.78 mL, 13.55 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the resulting solid was dissolved in water. The solution was neutralized with 1 M HCl at $0\text{ }^\circ\text{C}$, and the precipitate

was collected by filtration to give **M** (2.46 g, 86%) as a white powder. MS (ESI+): 233.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.43–2.51 (2H, m), 2.75–2.85 (2H, m), 7.38 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.44–7.50 (1H, m), 7.59 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.81–7.87 (1H, m), 8.57 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.62 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 12.15 (1H, brs).

Ethyl (2-(4-(pyridin-3-yl)thiophen-3-yl)ethyl)carbamate (O).
To a solution of **M** (2.28g, 9.77 mmol) in DME (50 mL) were added diphenylphosphoryl azide (2.21 mL, 10.3 mmol) and Et₃N (1.43 mL, 10.3 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was quenched with 5% aqueous KHSO₄ at 0 °C. The mixture was basified with saturated aqueous NaHCO₃ at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated to half volume. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the crude mixture in toluene (50 mL) was added EtOH (50 mL, 9.77 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C for 2 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 10–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **O** (2.35 g, 87%) as a colorless oil. MS (ESI+): 276.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.11 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.66–2.76 (2H, m), 3.07–3.20 (2H, m), 3.92 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 7.12 (1H, t, *J* = 5.8 Hz), 7.39 (1H, s), 7.46 (1H, dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 3.1 Hz), 7.78–7.86 (1H, m), 8.51–8.64 (2H, m).

3-(Pyridin-3-yl)-5,6-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-7(4*H*)-one (17d). A solution of **O** (2.30 g, 8.32 mmol) in trifluoromethylbenzene (50 mL) was added dropwise to polyphosphoric acid (23 g, 129 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 110 °C overnight. The organic layer was removed by decantation using toluene. The residue was dissolved in H₂O at 0 °C. The mixture was basified with 8 M NaOH and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 30–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **17d** (1.21 g, 63%) as a pale brown solid. MS (ESI⁺): 231.1 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.89 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.44 (2H, s), 7.49 (1H, s), 7.83 (1H, brs), 7.87–7.93 (1H, m), 8.03 (1H, s), 8.58 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz), 8.71 (1H, dd, *J* = 2.4, 0.8 Hz).

Synthesis of 39^a



^a Reagents and conditions: (a) MeI, K₂CO₃, DMF, 97%; (b) *N*-bromosuccinimide, 2,2'-azobis(isobutyronitrile), EtOAc, 70 °C, 59%; (c) benzyl amine, Et₃N, THF, H₂O, 55%; (d) 3-pyridineboronic acid, Pd(Ph₃P)₄, K₂CO₃, toluene, EtOH, 70 °C, 79%.

Methyl 3-bromo-2-methylbenzoate (Q). To a solution of **P** (3.00 g, 14.0 mmol) in DMF (20 mL) were added MeI (1.75 mL, 27.9 mmol) and

K₂CO₃ (5.78 g, 41.9 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–2% EtOAc in *n*-hexane) to give **Q** (3.11 g, 97%) as a colorless oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.52 (3H, s), 3.85 (3H, s), 7.20–7.30 (1H, m), 7.72 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz), 7.82 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz).

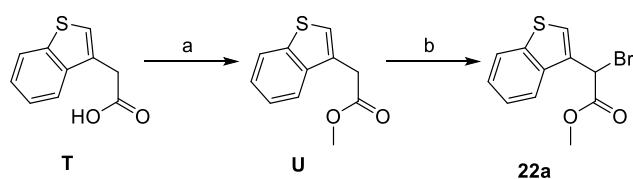
Methyl 3-bromo-2-(bromomethyl)benzoate (R). To a solution of **Q** (3.11g, 13.6 mmol) in EtOAc (30 mL) were added *N*-bromosuccinimide (2.90 g, 16.3 mmol) and 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (0.223 g, 1.36 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C under N₂ for 3 h. The mixture was poured into saturated aqueous Na₂S₂O₃ at room temperature and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–2% EtOAc in *n*-hexane) to give **R** (2.48 g, 59%) as a colorless oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.89 (3H, s), 5.04 (2H, s), 7.42 (1H, t, *J* = 7.9 Hz), 7.87 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz), 7.93 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz).

2-Benzyl-4-bromoisoindolin-1-one (S). To a solution of **R** (350 mg, 1.14 mmol) in THF (4.0 mL) and H₂O (1.0 mL) were added benzylamine (0.248 ml, 2.27 mmol) and Et₃N (0.475 ml, 3.41 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature

overnight. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–20% EtOAc in *n*-hexane) to give **S** (190 mg, 55%) as a white powder. MS (ESI⁺): 303.8 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 4.30 (2H, s), 4.75 (2H, s), 7.25–7.41 (5H, m), 7.45–7.53 (1H, m), 7.76 (1H, dd, *J* = 7.5, 0.8 Hz), 7.82 (1H, dd, *J* = 7.9, 0.8 Hz).

2-Benzyl-4-(pyridin-3-yl)isoindolin-1-one (39). To a solution of **S** (100 mg, 0.33 mmol) in toluene (2.0 mL) and EtOH (2.0 mL) were added 3-pyridineboronic acid (48.8 mg, 0.40 mmol), Pd(Ph₃P)₄ (76 mg, 0.07 mmol) and K₂CO₃ (137 mg, 0.99 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C under Ar for 1 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 30–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **39** (78 mg, 79%) as a white powder. MS (ESI⁺): 300.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 4.55 (2H, s), 4.74 (2H, s), 7.22–7.38 (5H, m), 7.45–7.55 (1H, m), 7.62–7.76 (2H, m), 7.81 (1H, dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz), 7.97–8.05 (1H, m), 8.61 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.78 (1H, d, *J* = 1.6 Hz). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆N₂O: C, 79.98; H, 5.37; N, 9.33. Found: C, 79.93; H, 5.37; N, 9.29.

Synthesis of **22a**^a



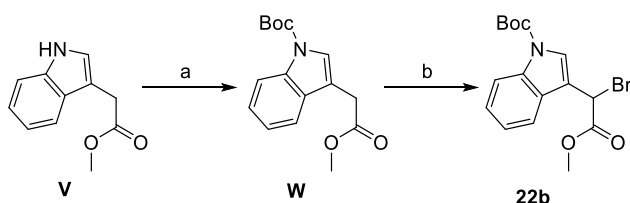
^aReagents and Conditions: (a) dimethyl sulfate, K₂CO₃, acetone, 50 °C, 100%; (b) *N*-bromosuccinimide, 2,2'-azobis(isobutyronitrile), EtOAc, 70 °C, 82%.

Methyl 2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetate (U). To a solution of **T** (1.00 g, 5.20 mmol) in acetone (10 mL) were added dimethyl sulfate (0.591 mL, 6.24 mmol) and K₂CO₃ (1.44 g, 10.4 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 50 °C for 1 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–10% EtOAc in *n*-hexane) to give **U** (1.07 g, 100%) as a pale yellow oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.63 (3H, s), 3.97 (2H, s), 7.33–7.45 (2H, m), 7.62 (1H, s), 7.73–7.81 (1H, m), 7.95–8.03 (1H, m).

Methyl 2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)-2-bromoacetate (22a). To a solution of **U** (4.32 g, 20.9 mmol) in EtOAc (100 mL) were added *N*-bromosuccinimide (4.10 g, 23.0 mmol) and 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (0.344 g, 2.09 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C for 3 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–3% EtOAc in *n*-hexane) to give **22a** (4.92 g, 82%) as (a) pale yellow oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆,

300 MHz): δ 3.77 (3H, s), 6.45 (1H, s), 7.39–7.52 (2H, m), 7.92–8.08 (3H, m).

Synthesis of 22b^a



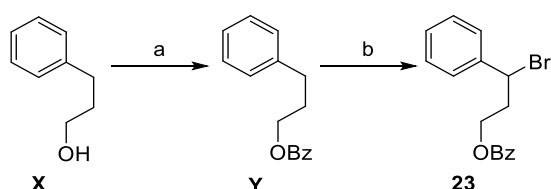
^aReagents and Conditions: (a) Boc_2O , 4-dimethylaminopyridine, THF, 98%; (b) *N*-bromosuccinimide, 2,2'-azobis(isobutyronitrile), EtOAc, 70 °C, 36%.

***tert*-Butyl 3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1*H*-indole-1-carboxylate (W).** To a solution of **V** (3.00 g, 15.9 mmol) in THF (50 mL) were added Boc_2O (4.42 mL, 19.0 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (0.194 g, 1.59 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was poured into saturated aqueous NH_4Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–5% EtOAc in *n*-hexane) to give **W** (4.51 g, 98%) as a colorless oil. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 1.63 (9H, s), 3.63 (3H, s), 3.82 (2H, d, $J = 0.6$ Hz), 7.20–7.29 (1H, m), 7.30–7.38 (1H, m), 7.55 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.63 (1H, s), 8.05 (1H, d, $J = 8.1$ Hz).

***tert*-Butyl 3-(1-bromo-2-methoxy-2-oxoethyl)-1*H*-indole-1-carboxylate (22b).** To a solution of **W** (4.51 g, 15.6 mmol) in EtOAc (50 mL) were

added *N*-bromosuccinimide (3.05 g, 17.2 mmol) and 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (0.256 g, 1.56 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C for 1 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–3% EtOAc in *n*-hexane) to give **22b** (2.05 g, 36%) as a yellow oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.64 (9H, s), 3.76 (3H, s), 6.33 (1H, s), 7.31–7.45 (3H, m), 7.76–7.82 (1H, m), 8.09 (1H, d, *J* = 8.3 Hz).

Synthesis of **23**^a



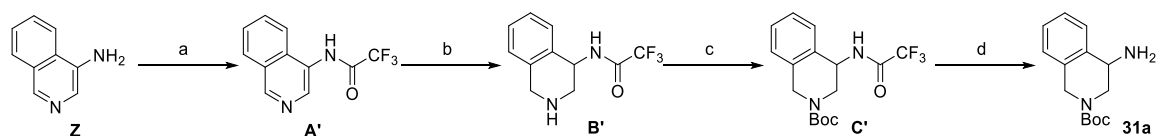
^aReagents and Conditions: (a) benzoyl chloride, Et₃N, THF, 100%; (b) *N*-bromosuccinimide, 2,2'-azobis(isobutyronitrile), EtOAc, 70 °C, 75%.

3-Phenylpropyl benzoate (Y). To a solution of **X** (5.25 mL, 38.9 mmol) in THF (50 mL) were added Et₃N (10.9 mL, 77.8 mmol) and benzoyl chloride (5.38 mL, 46.7 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with *n*-hexane) to give **Y** (9.35 g, 100%) as a colorless oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.96–2.09 (2H, m),

2.69–2.79 (2H, m), 4.27 (2H, t, $J = 6.5$ Hz), 7.15–7.34 (5H, m), 7.48–7.58 (2H, m), 7.62–7.71 (1H, m), 7.91–8.01 (2H, m).

3-Bromo-3-phenylpropyl benzoate (23). To a solution of **Y** (9.35 g, 38.9 mmol) in EtOAc (100 mL) were added *N*-bromosuccinimide (7.62 g, 42.8 mmol) and 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (0.639 g, 3.89 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C for 3 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with *n*-hexane) to give **23** (9.32 g, 75%) as a colorless oil. MS (ESI⁺): 319.9 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.56–2.81 (2H, m), 4.27–4.41 (2H, m), 5.49 (1H, dd, $J = 8.5, 6.6$ Hz), 7.28–7.43 (3H, m), 7.46–7.58 (4H, m), 7.63–7.70 (1H, m), 7.88–7.97 (2H, m).

Synthesis of 31a^a



^aReagents and Conditions: (a) trifluoroacetic anhydride, pyridine, 50 °C, 86%; (b) PtO₂, H₂, AcOH, 46%; (c) Boc₂O, Et₃N, THF, 100%; (d) K₂CO₃, MeOH, H₂O, 50 °C, 99%.

2,2,2-Trifluoro-*N*-(isoquinolin-4-yl)acetamide (A'). To a solution of **Z** (635 mg, 4.40 mmol) in pyridine (5.0 mL) was added trifluoroacetic anhydride (0.684 mL, 4.84 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at 50 °C for 1 h. The mixture was poured into saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was separated,

washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The mixture was filtered through silica gel pad using EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo* to **A'** (908 mg, 86%) as a white powder. MS (ESI⁺): 240.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 7.74–7.82 (1H, m), 7.85–7.95 (2H, m), 8.24 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 8.56 (1H, s), 9.34 (1H, s), 11.62 (1H, s).

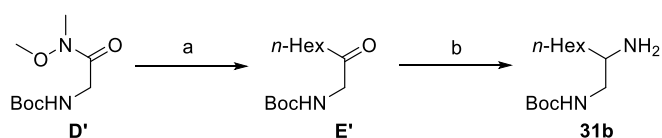
2,2,2-Trifluoro-*N*-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-4-yl)acetamide (B'). A mixture of **A'** (908 mg, 3.78 mmol) and PtO_2 (300 mg, 1.32 mmol) in AcOH (30 mL) was hydrogenated under balloon pressure at room temperature for 5 h. The catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO_3 at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 5–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **B'** (428 mg, 46%) as a white powder. MS (ESI⁺): 244.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 2.70 (1H, brs), 2.88 (1H, dd, $J = 12.9, 6.6$ Hz), 3.10 (1H, dd, $J = 12.9, 5.1$ Hz), 3.76–3.94 (2H, m), 4.91–5.03 (1H, m), 7.05–7.26 (4H, m), 9.71 (1H, brs).

***tert*-Butyl 4-(2,2,2-trifluoroacetamido)-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylate (C')**. To a solution of **B'** (428 mg, 1.75 mmol) in THF (10 mL) were added Boc_2O (0.448 mL, 1.93 mmol) and Et_3N (0.293 mL, 2.10 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue

was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 3–20% EtOAc in hexane) to give **C'** (603 mg, 100%) as a white powder. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.39 (9H, brs), 3.35–3.64 (1H, m), 3.68–4.11 (1H, m), 4.24–4.59 (1H, m), 4.60–5.03 (2H, m), 7.18–7.36 (4H, m), 9.94 (1H, brs).

***tert*-Butyl 4-amino-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylate (**31a**)**. To a solution of **C'** (603 mg, 1.75 mmol) in MeOH (8.0 mL) and H₂O (2.0 mL) was added K₂CO₃ (484 mg, 3.50 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 50 °C overnight. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to give **31a** (430 mg, 99%) as a colorless oil. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.43 (9H, s), 1.89 (2H, brs), 3.11 (1H, brs), 3.67–3.87 (2H, m), 4.48 (2H, brs), 7.09–7.27 (3H, m), 7.46–7.56 (1H, m).

Synthesis of **31b**^a



^aReagents and Conditions: (a) *n*-hexyllithium, THF, 0 °C, 36%; (b) (i) hydroxylammonium chloride, Et₃N, EtOH; (ii) 5% Pt/C, H₂, MeOH, 73%.

***tert*-Butyl (2-oxooctyl)carbamate (**E'**)**. To a solution of **D'** (1.00g, 4.58 mmol) in THF (10 mL) was added *n*-hexyllithium (7.97 mL, 18.33

mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C under N₂ for 2 h. The mixture was quenched with saturated aqueous NH₄Cl at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–10% EtOAc in *n*-hexane) to give **E'** (0.403 g, 36%) as a colorless oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.78–0.91 (3H, m), 1.14–1.51 (17H, m), 2.37 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 3.71 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 7.02 (1H, t, *J* = 5.6 Hz).

tert-Butyl (2-aminooctyl)carbamate (31b). To a solution of **E'** (400 mg, 1.64 mmol) in EtOH (5.0 mL) were added hydroxylammonium chloride (148 mg, 2.14 mmol) and Et₃N (0.298 mL, 2.14 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. This product was subjected to the next reaction without further purification. A mixture of the crude product and 5% Pt/C (200 mg, 0.05 mmol) in MeOH (5.0 mL) was hydrogenated under balloon pressure at room temperature overnight. The catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (amino silica gel, eluted with 0–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **31b** (290 mg, 73%) as a colorless oil. MS (ESI⁺): 245.0 [M + H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.78–0.91 (3H, m), 1.30–1.50 (19H, m), 2.65–2.73 (1H, m), 2.82–2.96 (2H, m), 6.71 (1H, t, *J* = 6.1 Hz).

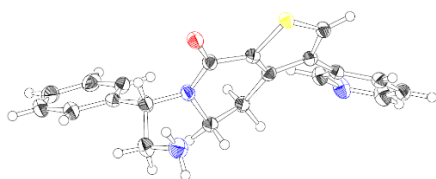
X-ray Structure Analysis of 21b–c

Crystal data for 21b (CCDC Number 2009266): $C_{20}H_{19}N_3OS$, $MW = 349.45$; crystal size, 0.18 x 0.17 x 0.09 mm; colorless, block; monoclinic, space group $P2_1$, $a = 9.00229(18)$ Å, $b = 7.34628(14)$ Å, $c = 13.3996(3)$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 102.798(8)^\circ$, $V = 864.14(4)$ Å³, $Z = 2$, $D_x = 1.343$ g/cm³, $T = 100$ K, $\mu = 1.760$ mm⁻¹, $\lambda = 1.54187$ Å, $R_1 = 0.026$, $wR_2 = 0.073$, Flack Parameter⁶⁴⁾ = 0.016(14).

Crystal data for 21c (CCDC Number 2009267): $C_{20}H_{19}N_3OS$, $MW = 349.45$; crystal size, 0.24 x 0.23 x 0.14 mm; colorless, block; monoclinic, space group $P2_1$, $a = 9.00337(16)$ Å, $b = 7.34742(13)$ Å, $c = 13.3926(3)$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 102.828(8)^\circ$, $V = 863.83(4)$ Å³, $Z = 2$, $D_x = 1.343$ g/cm³, $T = 100$ K, $\mu = 1.760$ mm⁻¹, $\lambda = 1.54187$ Å, $R_1 = 0.024$, $wR_2 = 0.064$, Flack Parameter⁶⁴⁾ = 0.005(11).

All measurements were made on a Rigaku R-AXIS RAPID-191R diffractometer using graphite monochromated Cu-K α radiation. The structure was solved by direct methods with SHELXS-97⁶⁵⁾ and was refined using full-matrix least-squares on F^2 with SHELXL-97. All non-H atoms were refined with anisotropic displacement parameters.

(A)



(B)

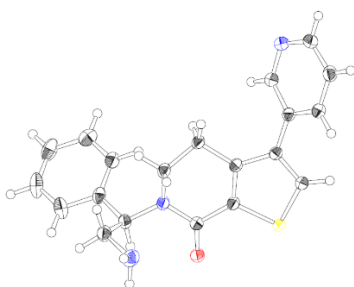


Figure 24. ORTEP of **21b** (A) and **21c** (B), thermal ellipsoids are drawn at 50 % probability.

第二章の生物実験および共結晶X線解析

In vitro enzyme assay. The reaction mixture contained 1 μ M eIF5A, 2 μ M [3 H]-spermidine trihydrochloride (38.5 Ci/mmol), 14 μ M nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)(K_m), 1 mM DTT, various concentrations of the inhibitor, and 24 nM DHPS in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. For analysis of higher concentrations of NAD^+ , the enzyme reactions were performed in buffer containing 1 μ M eIF5A, 2 μ M [3 H]-spermidine trihydrochloride, and 250 μ M NAD^+ ($\times 18 K_m$). After a 120-min incubation at room temperature, incorporation of radio-labeled aminobutylidene was terminated by the addition of 20 μ L of 300 μ M GC-7; 25 μ L of the stopped reaction was transferred to a streptavidin (SA) plate (NeutrAvidin Coated Plates, Thermo Scientific Cat. No. 15512), and incubated for 90–120 min at room temperature to allow complete binding of all proteins to the plates. Plates were washed three times with PBS, and 50 μ L of scintillation cocktail was added (OptiPhase“SuperMix” from PerkinElmer). The plate was measured with TOP count (PerkinElmer).

In vitro metabolic clearance in mouse hepatic microsomes. In vitro oxidative metabolic studies of the tested compounds were carried out using hepatic microsomes obtained from mice. The reaction mixture with a final volume of 0.05 mL consists of 0.2 mg/mL hepatic microsome in 50 mM KH_2PO_4 – K_2HPO_4 phosphate buffer (pH 7.4) and 1 μ M test compound. The reaction was initiated by the addition of an NADPH-generating system containing 50 mM MgCl_2 , 50 mM glucose 6-phosphate, 5 mM β - NADP^+ , and 15 unit/mL glucose 6-phosphate

dehydrogenase at 10% volume of reaction mixture. After the addition of the NADPH-generating system, the mixture was incubated at 37 °C for 0, 15, and 30 min. The reaction was terminated by the addition of an equivalent volume of CH₃CN. After the samples were mixed and centrifuged, the supernatant fractions were analyzed using liquid chromatography tandem mass spectrometry. For metabolic clearance determinations, chromatograms were analyzed for parent compound disappearance rate from the reaction mixtures. All incubations were made in duplicate.

Pharmacokinetic analysis in mouse cassette dosing. Test compounds were administered intravenously (0.1 mg/kg) or orally (1 mg/kg, suspended in 0.5% methylcellulose aqueous solution) by cassette dosing to nonfasted ICR mice. The blood samples were collected at 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 4, and 8 h after intravenous administration and at 15, 30 min, 1, 2, 4 and 8 h after oral administration. The blood samples were centrifuged to obtain the plasma fraction. The plasma samples were deproteinized by mixing with acetonitrile followed by centrifugation. The compound concentrations in the supernatant were measured by LC/MS/MS.

The care and use of the animals and the experimental protocols were approved by the Experimental Animal Care and Use Committee of Takeda Pharmaceutical Company Limited. Animals were kept under standard laboratory conditions (12:12 h light/dark cycle) with food and water available *ad libitum*.

Protein Expression and Purification. The cDNA encoding the entire open reading frame of the human DHPS (GenBank accession number: NM_001930) gene was amplified by PCR and engineered to contain an *N*-terminal hexahistidine affinity tag and a recognition site for the TEV protease to facilitate purification. The product was cloned into a modified pET28a+ vector and verified by DNA sequence analysis. For expression, the plasmid was transformed into BL21(DE3)

E. coli (Life Technologies). Cells were cultured at 37 °C and induced with 0.5 mM IPTG when the culture reached an O.D. of 0.8. After 4 h of induction the cells were isolated by centrifugation, and the pellets were stored at -80 °C.

The biomass obtained from a 6 L culture was lysed in 150 mL of buffer containing 25 mM TRIS (pH 7.6), 1 M NaCl, 10 mM imidazole (buffer components were routinely purchased from Sigma-Aldrich), 0.5 mM TCEP (Thermo Scientific), 20 U/ml benzonase, 0.1 mg/mL lysozyme, and EDTA-free protease inhibitors (Roche) by homogenization and sonication (Sonics Vibra-Cell). The lysate was clarified by centrifugation at 14,000 RPM for 90 min in a JA-14 fixed angle rotor (Beckman Coulter).

DHPS was isolated from the lysate using a 5 mL HisTALON superflow cartridge (Clontech) connected to an AKTApurify FPLC system (GE Healthcare Life Sciences). After loading, the cartridge was washed with 100 column volumes of 25 mM TRIS (pH 7.6), 1 M NaCl, 10 mM imidazole, and 0.5 mM TCEP, followed by elution in buffer supplemented with 300 mM imidazole. The eluate from the Ni-affinity column was concentrated to 10 mL and treated with TEV protease during an overnight dialysis against 1 L of buffer composed of 25 mM TRIS (pH 7.6), 0.5 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 0.5 mM TCEP. The cleaved product was passed over a HisTALON cartridge, the flow-through was collected and concentrated using Amicon Ultra centrifugal filter units (EMD-Millipore). A final purification step was conducted using size exclusion chromatography with a HiLoad 16/600 Superdex 200 column (GE Healthcare Life Sciences) in a buffer containing 25 mM Tris (pH 7.9) and 100 mM KCl. Peak fractions were analyzed by SDS-PAGE and the fractions containing DHPS were pooled and concentrated to 11 mg/mL before aliquoting and storage at -80 °C. Protein concentration was estimated using a NanoDrop instrument.

Crystallography. Prior to crystallization ligands were added at a concentration of 1–3 mM. All crystallization was performed using the hanging drop vapor diffusion method. The NAD-DHPS complex was initially crystallized using published methods⁴³⁾ in a reservoir solution containing 0.1 mM Tris (pH 8.0) and 65% MPD (Hampton Research) at room temperature. To obtain the NAD/GC7-DHPS ternary complex, the NAD-DHPS crystals were soaked with reservoir solution containing 10 mM GC-7 for three days, after which the crystals were flash-frozen directly into ALS-style pucks submerged in liquid nitrogen.

The DHPS-**13g** complex was obtained by co-crystallization at room temperature using a reservoir solution composed of 1.6 M sodium/potassium phosphate (pH 6.8), prepared by mixing sodium phosphate monobasic monohydrate and potassium phosphate dibasic (Hampton Research). These crystals were quickly transferred into reservoir solution supplemented with 30% sucrose for cryo-protection and immediately flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at Advanced Light Source beamlines 5.0.3 and 5.02 (NAD-GC-7 and **13g** complexes, respectively) (Lawrence Berkeley's National Laboratory, Berkeley, CA) and processed with HKL2000.⁶⁶⁾ The structure was solved by molecular replacement with Phaser⁶⁷⁾ using the coordinates of human DHPS (PDB code: 1RLZ) as a search model. The graphics program COOT⁶⁸⁾ was used for model building, and refinement was performed with REFMAC5.⁶⁹⁾ Phaser and REFMAC5 were distributed as part of CCP4.⁷⁰⁾ Structure validation was performed using Molprobit.⁷¹⁾ Refinement statistics as reported in Table 8 and images of the omit electron density of the ligands are shown in Figure 25.

The DHPS-**38d** complex was obtained by a soaking method. DHPS was crystallized in a solution composed of 100 mM Hepes (pH 7.0) and 2 M sodium/potassium phosphate (pH 5.0) prepared by mixing sodium phosphate

monobasic monohydrate and potassium phosphate dibasic (Hampton Research). These crystals were transferred into mother liquor supplemented with 1 mM compound (**38d**) for soaking. Cryo-protection was performed with mother liquor supplemented with 30% sucrose and crystals were immediately flash-cooled in liquid nitrogen into ALS-style pucks. Diffraction data were collected at the Advanced Photon Source beamline 23-ID-B operated by GM/CA(Argonne National Laboratory) and processed with HKL2000. The structure was solved by the procedure described for DHPS-**13g** complex. Refinement statistics are reported in Table 9 and images of the omit electron density for the ligand are shown in Figure 26.

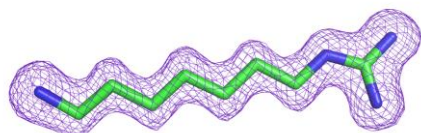
Table 8. Data collection and refinement statistics

<u><i>X-Ray Structure</i></u>	DHS-NAD-GC7 / PDB: 6P4V	DHS-13g / PDB: 6PGR
<u><i>Data collection</i></u>		
Resolution range (Å)	50-1.65 (1.68-1.65)	50-1.95(1.98-1.95)
Space group	P3 ₂ 2 ₁	P3 ₂ 2 ₁
Cell dimensions:		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	104.5, 104.5, 159.5	104.6, 104.6, 160.5
α , β , γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
R_{sym}	10.1 (94.2)	9.1(91.9)
<I / σI>	12.0 (1.9)	20.3(2.6)
Completeness (%)	99.9 (100)	100(100)
Redundancy	5.6 (5.6)	7.3 (7.3)
<u><i>Structure Refinement</i></u>		
Resolution (Å)	43.7-1.65	49.8-1.95
No. reflections	113,578	70,577
No. reflections Rfree test set	6,006	3,744
Rwork / Rfree	16.1/17.4	16.8 /19.4
No. atoms:		
Protein	5,172	5,421
NAD	88	-
Inhibitor	24	44
MPD	8	-
Waters	328	359
Mean B Value (Å²):		
Protein B Value	29.0	31.5

NAD B Value	21.2	-
Inhibitor B Value	18.0	27.7
MPD B Value	36.3	-
Water B Value	34.5	35.6
RMS Bond lengths (Å)	0.007	0.008
RMS Bond angles (°)	1.317	1.28
Ramachandran statistics:		
Favored (%)	98.3	98.5
Outliers (%)	0	0

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

(A)



(B)

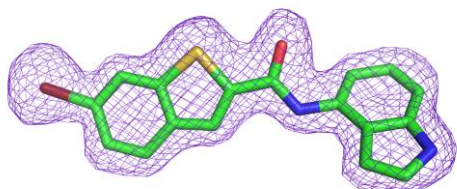


Figure 25. Omit electron density Fo-Fc map (rendered as mesh) corresponding to (A) GC7 and (B) the compound **13g**. Map is contoured at $\pm 3.0 \sigma$. Figure was created using Pymol.

Table 9. Data collection and refinement statistics

<u>X-Ray Structure</u>	DHS-38d/PDB: 6WL6
<u>Data collection</u>	
Resolution range (Å)	50-2.12(2.16-2.12)
Space group	P3 ₂ 2 ₁
Cell dimensions:	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	106.0, 106.0, 157.1
α , β , γ (°)	90.0, 90.0, 120.0
R_{sym}	13.5 (94.0)
<I / σI>	15.4 (1.8)
Completeness (%)	100 (99.9)
Redundancy	6.1 (6.0)
<u>Structure Refinement</u>	
Resolution (Å)	44-2.15
No. reflections	53,246
No. reflections Rfree test set	2,845
Rwork / Rfree	17.9/19.4
No. atoms:	
Protein	4,579
Inhibitor	46
Waters	192
Mean B Value (Å²):	
Protein B Value	34.8
Inhibitor B Value	24.5
Water B Value	35.5
RMS Bond lengths (Å)	0.008

RMS Bond angles (°)	1.212
Ramachandran statistics:	
Favored (%)	98.2
Outliers (%)	0

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

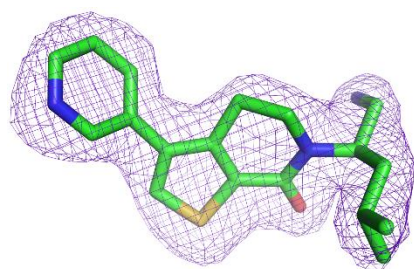


Figure 26. Omit electron density Fo-Fc map (rendered as mesh) corresponding to the compound **38d**. Map is contoured at $\pm 3.0 \sigma$. Figure was created using PyMOL.

第三章に関する合成実験

Methyl (2Z)-2-azido-3-(6-bromopyridin-2-yl)acrylate (41).

Sodium methoxide (25% MeOH solution, 56.6 g, 262 mmol) was added dropwise to a solution of 6-bromopicolinaldehyde (**40**, 19.5 g, 105 mmol) and ethyl 2-azidoacetate (33.8 g, 262 mmol) in MeOH (150 mL) over 30 min at -30 °C (acetone-H₂O-dry ice, slurry). The mixture was stirred at -20 °C to 5 °C with a CaCl₂ tube overnight. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl solution at 0 °C. The precipitate was collected by filtration, and washed with water to give **41** (17.8 g, 60%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.88 (3H, s), 6.79 (1H, s), 7.60 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.83 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 8.20 (1H, d, *J* = 7.7 Hz).

Methyl 7-bromopyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (42). A solution of **41** (65.3 g, 231 mmol) in xylene (1.1 L) was stirred at 120 °C for 6 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 5–50% EtOAc in hexane) to give **42** (23.8 g, 41%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.93 (3H, s), 7.27 (1H, dd, *J* = 8.9, 7.4 Hz), 7.35 (1H, s), 7.53 (1H, dd, *J* = 7.3, 1.0 Hz), 7.89 (1H, dd, *J* = 8.9, 1.1 Hz).

Methyl 7-bromo-3-formylpyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (43). To a solution of **42** (10.0 g, 39.2 mmol) in anhydrous DMF (100 mL) was added phosphoryl trichloride (18.3 mL, 196 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 100 °C for 1 h. The reaction mixture was basified with saturated

aqueous NaHCO₃ solution at 0 °C and extracted with EtOAc and THF. The organic layer was separated, washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was washed with hexane to give **43** (8.00 g, 72%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.98 (3H, s), 7.58-7.73 (1H, m), 7.81 (1H, dd, *J* = 7.4, 0.9 Hz), 8.28-8.37 (1H, m), 10.42 (1H, s).

Methyl 7-bromo-3-((1*E*)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (44). To a suspension of 55% NaH (1.29 g, 29.5 mmol) in anhydrous THF (100 mL) was added trimethyl phosphonoacetate (5.87 g, 32.2 mmol) at 0 °C. After being stirred at 0 °C for 30 min, a solution of **43** (7.60 g, 26.9 mmol) in anhydrous THF (200 mL) was added to the reaction mixture. The resulting mixture was stirred at room temperature with a CaCl₂ tube for 1 h. The mixture was quenched with saturated aqueous NH₄Cl solution at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was collected by filtration to give **44** (8.70 g, 96%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.76 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 16.6 Hz), 7.47 (1H, dd, *J* = 8.9, 7.4 Hz), 7.70 (1H, dd, *J* = 7.4, 0.9 Hz), 8.24-8.35 (2H, m).

Methyl 7-bromo-3-(3-methoxy-3-oxopropyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (45). To a solution of **44** (3.39 g, 10.0 mmol) in toluene (60 mL) was added benzenesulfonohydrazide (12.1 g, 70.0 mmol) at 100 °C. The mixture was stirred at 100 °C for 7 h. The reaction mixture was poured into saturated aqueous NaHCO₃

solution and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The precipitate was removed by filtration, washed with toluene, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 3–20% EtOAc in hexane) to give **45** (2.88 g, 84%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.65 (2H, t, *J* = 7.4 Hz) 3.23 (2H, t, *J* = 7.4 Hz) 3.53 (3H, s) 3.91 (3H, s) 7.22 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.3 Hz) 7.49 (1H, dd, *J* = 7.2, 0.9 Hz) 7.91 (1H, dd, *J* = 9.1, 1.1 Hz).

Methyl 7-bromo-3-(3-hydroxypropyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (46). To a solution of **45** (6.50 g, 19.1 mmol) in anhydrous THF (120 mL) was added borane–THF (1.1 M THF solution, 106 mL, 95.3 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature with a CaCl₂ tube for 7 h. The mixture was acidified with aqueous 1 M HCl solution at 0 °C, and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO₃ solution at room temperature and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 10–70% EtOAc in hexane) to give **46** (5.10 g, 85%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.65–1.80 (2H, m), 3.01 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 3.34–3.43 (2H, m), 3.90 (3H, s), 4.45 (1H, t, *J* = 5.1 Hz), 7.20 (1H, dd, *J* = 8.9, 7.2 Hz), 7.48 (1H, dd, *J* = 7.2, 0.9 Hz), 7.87 (1H, dd, *J* = 8.9, 1.1 Hz).

Methyl 7-bromo-3-(3-(1-naphthyloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (47). To a solution of **46** (2.00 g, 6.39 mmol) in toluene (100 mL) were added 1-naphthol (1.01 g, 7.03 mmol), PPh₃ (1.84 g, 7.03 mmol) and di-*tert*-butyl azodicarboxylate (1.62 g, 7.03 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 5 h. The reaction mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 3–30% EtOAc in hexane) to give crude mixture. To a solution of the mixture in acetonitrile (5.0 mL) was added TFA (20 mL) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was basified with saturated aqueous NaHCO₃ solution at room temperature, and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 3–10% EtOAc in hexane) to give **47** (2.72 g, 97%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.20 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.28 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 3.87 (3H, s), 4.14 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.06 (1H, dd, *J* = 8.9, 7.4 Hz), 7.33–7.55 (5H, m), 7.80–7.87 (2H, m), 7.99–8.04 (1H, m).

Methyl 7-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)-3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (48). A mixture of **47** (200 mg, 0.46 mmol), 4-(methoxycarbonyl)phenylboronic acid (107

mg, 0.59 mmol), Pd(Ph₃P)₄ (105 mg, 0.091 mmol) and K₂CO₃ (189 mg, 1.37 mmol) in DMF (3.0 ml) was heated at 140 °C for 1 h under microwave irradiation. The mixture was poured into saturated aqueous NH₄Cl solution and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 3–15% EtOAc in hexane) to give **48** (102 mg, 45%) as a white powder. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.17-2.28 (2H, m), 3.31 (2H, d, *J* = 14.4 Hz), 3.81 (3H, s), 3.92 (3H, s), 4.17 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.15-7.33 (2H, m), 7.34-7.59 (4H, m), 7.80-7.90 (2H, m), 8.00-8.07 (2H, m), 8.08-8.16 (3H, m).

7-(4-Carboxyphenyl)-3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (39). To a solution of **48** (95.0 mg, 0.19 mmol) in THF (2.0 ml) and MeOH (2.0 ml) was added 2 M NaOH (0.50 ml, 1.00 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The mixture was acidified with 1 M HCl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was collected by filtration to give **39** (40.5 mg, 45%) as a white powder. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.13-2.30 (2H, m), 3.21-3.31 (2H, m), 4.17 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.12-7.28 (2H, m), 7.34-7.56 (4H, m), 7.76-7.89 (2H, m), 7.98-8.18 (5H, m), 13.13 (2H, br s). Anal. Calcd

for $C_{28}H_{22}N_2O_5 \cdot 0.8H_2O$: C, 69.93; H, 4.95; N, 5.83. Found C, 69.98; H, 4.94; N, 5.53.

4-(Isopropylamino)-3-

((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide (54). To a solution of 4-fluoro-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide (**53**, 330 mg, 1.07 mmol) and DIPEA (0.563 ml, 3.22 mmol) in THF (10 ml) was added isopropylamine (0.129 ml, 1.50 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 50 °C for 2 h. The reaction mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 30–100% EtOAc in hexane) to give **54** (347 mg, 93%) as a white solid. 1H NMR ($DMSO-d_6$, 300 MHz): δ 1.22 (6H, d, J = 6.4 Hz), 3.89–4.02 (1H, m), 6.62 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.25 (1H, d, J = 9.3 Hz), 7.39 (2H, s), 7.97 (1H, dd, J = 9.2, 2.0 Hz), 8.02 (1H, d, J = 2.1 Hz).

4-(4-((4'-Chloro-4,4-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2-yl)methyl)piperazin-1-yl)-N-((4-(isopropylamino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)phenyl)sulfonyl)benzamide (50). A mixture of **54** (80 mg, 0.231 mmol), **49** (112 mg, 0.254 mmol), EDC-HCl (73.1 mg, 0.381 mmol) and DMAP (46.6 mg, 0.381 mmol) in DMF (5.0 mL) was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into saturated aqueous $NaHCO_3$ solution at room temperature and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated

in vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 10–100% EtOAc in hexane) to give **50** (27.2 mg, 15%) as a white amorphous solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.97 (6H, s), 1.21 (6H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.43 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 1.88–2.01 (2H, m), 2.39–2.60 (9H, m), 3.00–3.24 (4H, m), 3.79–4.01 (1H, m), 6.56 (1H, br s), 6.83 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.05–7.21 (3H, m), 7.38 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 8.04 (1H, dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz), 8.13 (1H, s). Anal. Calcd for C₃₆H₄₂ClF₃N₄O₅S₂·1.25H₂O: C, 54.74; H, 5.68; N, 7.09. Found C, 54.77; H, 5.49; N, 7.10.

***N*-(((4-(((2*R*)-4-(Morpholin-4-yl)-1-(phenylsulfanyl)butan-2-yl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)phenyl)sulfonyl)benzamide (51).** To a solution of **52** (500 mg, 0.903 mmol) in DMF (5.0 mL) was added benzoic acid (143 mg, 1.17 mmol), EDC-HCl (346 mg, 1.81 mmol) and DMAP (221 mg, 1.81 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 h. The mixture was poured into saturated aqueous NaHCO₃ solution at room temperature and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 10–100% EtOAc in hexane and then 3% MeOH in EtOAc) to give **51** (545 mg, 92%) as a yellow amorphous solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.76–2.14 (2H, m), 2.54–3.02 (4H, m), 3.21–3.42 (4H, m), 3.44–4.78 (4H, m), 3.96–4.11 (1H, m), 6.76 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.15–7.47 (9H, m), 7.83–7.91

(2H, m), 7.93-8.02 (1H, m), 8.12 (1H, d, $J = 2.1$ Hz). Anal. Calcd for $C_{28}H_{30}F_3N_3O_6S_3 \cdot 0.25H_2O$: C, 50.78; H, 4.64; N, 6.34. Found C, 50.78; H, 4.63; N, 6.20.

Methyl 7-(4-(tert-butoxycarbonyl)-2-methylphenyl)-3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (56a). The mixture of **47** (2.00 g, 4.55 mmol), *tert*-butyl 3-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoate (**55a**, 1.74 g, 5.46 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (0.526 g, 0.46 mmol) and potassium carbonate (1.57 g, 11.4 mmol) in DMF (12 ml) was stirred 160 °C for 1 h under microwave irradiation. The reaction mixture was poured into saturated aqueous NH_4Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (silica gel, eluted with 1–20% EtOAc in hexane) to give **56a** (1.5 g, 60%) as a yellow amorphous solid. 1H NMR ($DMSO-d_6$, 300 MHz): δ 1.59 (9H, s), 2.04 (3H, s), 2.17-2.28 (2H, m), 3.26-3.32 (2H, m), 3.77 (3H, s), 4.17 (2H, t, $J = 5.9$ Hz), 6.81-7.02 (2H, m), 7.27 (1H, dd, $J = 9.0, 6.9$ Hz), 7.35-7.65 (5H, m), 7.82-7.93 (4H, m), 8.17-8.23 (1H, m).

Methyl 7-(4-(tert-butoxycarbonyl)-2,6-dimethylphenyl)-3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylate (56b). Compound **56b** was synthesized from **47** and **55b** by the procedure described for **56a**. Yield 17%, a colorless oil. 1H NMR ($DMSO-d_6$, 300 MHz): δ 1.58 (9H, s), 1.94 (6H, s), 2.17-2.26 (2H, m), 3.23-3.31 (2H, m), 3.75 (3H, s), 4.10-4.20 (2H, m), 6.83-6.97 (2H, m), 7.06 (1H, dd, J

= 8.9, 7.2 Hz), 7.25-7.57 (3H, m), 7.73 (2H, s), 7.82-7.91 (2H, m), 7.98-8.05 (1H, m), 8.19-8.28 (1H, m).

4-(2-(Methoxycarbonyl)-3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridin-7-yl)-3-methylbenzoic acid (57a). To a solution of **56a** (1.40 g, 2.54 mmol) in acetonitrile (4.0 ml) was added TFA (20.0 ml, 260 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO₃ at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with water and brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 10–100% EtOAc in hexane) to give **57a** (1.00 g, 80%) as a white amorphous solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.04 (3H, s), 2.16-2.28 (2H, m), 3.26-3.34 (2H, m), 3.76 (3H, s), 4.17 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.00 (1H, dd, *J* = 6.9, 1.2 Hz), 7.28 (1H, dd, *J* = 9.0, 6.8 Hz), 7.35-7.59 (5H, m), 7.81-7.99 (4H, m), 8.14-8.23 (1H, m).

4-(2-(Methoxycarbonyl)-3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridin-7-yl)-3,5-dimethylbenzoic acid (57b). Compound **57b** was synthesized from **56b** by the procedure described for **57a**. Yield 58%, a white powder. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.95 (6H, s), 2.17-2.26 (2H, m), 3.24-3.31 (2H, m), 3.75 (3H, s), 4.17 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 6.86-7.00 (2H, m), 7.25-7.60 (5H, m), 7.78 (2H, s), 7.82-7.92 (2H, m), 8.21-8.29 (1H, m), 13.03 (1H, br s).

(*R*)-7-(2-Methyl-4-(((4-((4-morpholino-1-(phenylthio)butan-2-yl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)phenyl)sulfonyl)carbamoyl)phenyl)-

3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (59). To a solution of **57a** (50.0 mg, 0.10 mmol) in DMF (2.0 ml) were added **52** (44.9 mg, 0.063 mmol), EDC-HCl (38.8 mg, 0.20 mmol) and DMAP (24.7 mg, 0.20 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. This product was subjected to the next reaction without further purification. To a solution of the crude product in THF (2.0 ml) and MeOH (2.0 ml) was added 2 M NaOH (0.50 mL, 1.00 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was neutralized with 1 M HCl aq. at 0 °C and extracted with EtOAc. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative HPLC (L-Column 2 ODS, eluted with H₂O in acetonitrile containing 0.1% TFA) to give **59** (50.3 mg, 49%) as a white amorphous solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.71-2.06 (5H, m), 2.10-2.47 (8H, m), 3.08-3.51 (8H, m), 3.98-4.11 (1H, m), 4.16 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.81-6.94 (3H, m), 7.13-7.57 (11H, m), 7.71-7.92 (5H, m), 8.16-8.25 (1H, m), 8.36-8.52 (2H, m). Anal. Calcd for C₅₀H₄₈F₃N₅O₉S₃ · 2H₂O: C, 57.08; H, 4.98 N, 6.66. Found: C, 57.17; H, 4.81; N, 6.50.

(*R*)-7-(4-(((4-((4-(Dimethylamino)-1-(phenylthio)butan-2-yl)amino)-3-nitrophenyl)sulfonyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (60). Compound **60** was synthesized from **57a** and

58 by the procedure described for **59**. Yield 52%, a yellow amorphous solid. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.92-2.13 (7H, m), 2.16-2.25 (2H, m), 2.88-3.12 (2H, m), 3.18-3.31 (4H, m), 3.46-3.74 (4H, m), 3.99-4.11 (1H, m), 4.16 (2H, t, J = 5.8 Hz), 6.68-7.06 (4H, m), 7.16-7.58 (11H, m), 7.75-7.91 (4H, m), 8.00 (1H, d, J = 9.3 Hz), 8.11-8.24 (2H, m), 12.99 (1H, br s). HRMS-ESI (m/z): [M + H] calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$, 887.2891; found. 887.2898.

(R)-7-(4-(((4-((4-(Dimethylamino)-1-(phenylthio)butan-2-yl)amino)-3-nitrophenyl)sulfonyl)carbamoyl)-2,6-dimethylphenyl)-3-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)pyrazolo[1,5- α]pyridine-2-carboxylic acid (61). Compound **61** was synthesized from **57b** and **58** by the procedure described for **59**. Yield 55%, a yellow amorphous solid. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.71-2.01 (9H, m), 2.12 (6H, s), 2.17-2.45 (5H, m), 3.16-3.30 (2H, m), 3.97-4.21 (3H, m), 6.61-6.74 (1H, m), 6.82-6.91 (2H, m), 7.04-7.72 (13H, m), 7.74-7.91 (2H, m), 8.22-8.30 (1H, m), 8.44-8.52 (2H, m). HRMS-ESI (m/z): [M + H] calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$, 901.3048; found. 901.3048.

第三章の生物実験および共結晶X線解析

Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) assay. Glutathion-S-Transferase (GST) tagged Mcl-1 (GST-Mcl-1), GST tagged Bcl-xL (GST-Bcl-xL) were expressed in *E. coli*. and purified using affinity and gel-filtration chromatography. Fluoresceinisothiocyanate (FITC) labeled Bid

peptide (F-Bid) was synthesized by Scrum (Tokyo, Japan). F-Bid was synthesized with the sequence of FITC-Ahx-EDIIRNIARHLAQVGDSMDR-OH. All peptides were dissolved in DMSO and stocked at -30 °C until use. The concentration of F-Bid was determined by 495 nm absorbance of the conjugated FITC using the molar extinction coefficient of 70,000 M⁻¹cm⁻¹. Terbium labeled anti-GST antibody (Tb-anti GST) and D-PBS were purchased from Life technologies (Carlsbad, CA). Tween-20 was obtained from Bio-Rad (Hercules, CA). The other reagents were from Wako (Osaka, Japan). Throughout this study, TR-FRET assay was performed using assay buffer (PBS containing 0.01% (v/v) Tween-20 and 1 mM DTT). Tb-anti GST and Mcl-1 or Bcl-xL were mixed and incubated for over 1 h. The premix was added to the assay buffer containing F-Bid and various concentrations of inhibitor in 384-well white flat-bottom plates (Greiner Bio-one Inc., Frickenhausen, Germany). Subsequently, the plate was incubated for 2 h at room temperature and FRET signal was measured using an Envision reader (Perkin Elmer, Waltham, MA). The solution in each well was excited with a laser ($\lambda = 337$ nm) or a flash lamp through an excitation filter (UV2 (TRF) 320, (Perkin Elmer)) and fluorescence signals from terbium (Tb) and FITC were detected using emission filters (Emission 520 (Perkin Elmer) for FITC and CFP 486 (Perkin Elmer) for Tb). The inhibitory activities of compounds against Mcl-1 and Bcl-xL were measured at the concentration of F-Bid almost equal to K_d (35 nM for Mcl-1 and 10 nM for Bcl-xL). The final concentration of Tb-anti GST, Mcl-1, and Bcl-xL were 1, 1.2 and 2 nM, respectively. The values of 0% and 100% inhibition control were set to the FRET ratio in the presence and absence of Mcl-1 or Bcl-xL, respectively. All assays were performed with 2

replicates of each inhibitor concentration and IC_{50} was determined using a sigmoidal dose-response curve using GraphPad Prism (GraphPad, CA).

Crystallography. Human Mcl-1 gene encoding residues 172–327 was cloned into a pGEX-6P-1 vector to acquire a GST tag with a containing PreScission protease site at the N-terminus. Soluble Mcl-1 protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. Cells were grown at 37 °C in 2xYT and protein expression was induced by 1 mM IPTG at 16 °C for 16 hours. Cells were harvested and lysed by sonication. Cell debris was removed by centrifugation at 30,000 × g for 30 min. The Mcl-1 protein was purified from the soluble fraction of the cell lysate by GST affinity chromatography. The His tag was removed by incubation with PreScission protease and the protein was purified by a cation-exchange chromatography. The peak fraction was further purified by gel filtration chromatography in a buffer containing 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl and 1 mM DTT. The purified proteins were concentrated by ultrafiltration to a protein concentration of 10 mg/ml.

Human Bcl-xL gene encoding amino-acid residues 1–209 with an internal deletion for residues 45–84 was cloned into a pET-21a vector to acquire a hexa-histidine tag at the C-terminus. Soluble Bcl-xL protein was produced in *E. coli* BL21 (DE3) cells. Cells were grown at 37 °C in 2xYT and protein expression was induced by 1 mM IPTG at 30 °C for 16 h. Cells were harvested and rapidly frozen for storage at –80 °C. The thawing cell pellets were suspended and lysed with a high-pressure fluids processor. The Bcl-xL protein was purified from the soluble fraction by Ni affinity

chromatography. The protein was further purified by size exclusion chromatography in a buffer containing 25 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl and 0.5 mM DTT. The purified proteins were concentrated up to 15 mg/ml by ultrafiltration and flash-frozen in liquid nitrogen for storage at -80°C .

The Proteins were complexed by incubation of with a 3-fold molar excess of compound on ice for a few hours prior to crystallization experiments. Crystals of Mcl-1 complexed with compound **39** grew against a reservoir solution containing 0.1 M Tris pH 8.0, 0.2 M sodium isothiocyanate, 20% PEG 3350 at 20°C , by the sitting drop vapor diffusion method. Crystals of Mcl-1 with compound **60** were grown from a reservoir containing 0.1 M Bis-tris pH 6.5, 22% PEG 3350 at 20°C , whereas crystals of Bcl-xL complexed with compound **60** were obtained from a reservoir solution of 0.1 M Na-K phosphate pH 6.5, 0.72 M sodium malonate pH 7.0, 0.84% MEGA-8 at 20°C . Prior to data collection, crystals were immersed in the reservoir solution with addition of a cryoprotectant such as PEG 3350, ethylene glycol or glycerol and were flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected from a single crystal using the CCD detector Quantum 270 (ADSC) at beamline NE3A, Quantum 210 (ADSC) at beamline NW12A of Photon Factory (KEK, Japan) or Quantum 315 (ADSC) at beamline 5.0.3 of the Advanced Light Source (Berkeley, CA) under a 100 K nitrogen cryostream. The data were reduced and scaled with HKL2000.⁶⁶⁾ The structures were solved by the molecular replacement method with Molrep⁷²⁾ of the CCP4 program suites⁷⁰⁾ using the Mcl-1 or Bcl-xL structures (PDB

code: 2PQK or 2YXJ) as a search model. The structures were refined through an iterative procedure utilizing REFMAC⁷³⁾ followed by model building in COOT.⁷⁴⁾ The dictionary files for the ligands were prepared using AFITT (OpenEye Scientific Software). The final models were validated using Molprobity.⁷¹⁾ Crystallographic processing and refinement statistics are summarized in Table 10. All structural figures were generated using PyMOL.

Table 10. Data collection and refinement statistics

Crystal	Mcl-1/ 39	Mcl-1/ 60	Bcl-xL/ 60
Data collection			
Beamline	NE3A (PF)	NW12A (PF)	5.0.3 (ALS)
Space group	P2 ₁	P1	I23
Unit cell dimensions			
a, b, c (Å)	38.2, 133.8, 58.2	37.3, 65.5, 97.8	152.7, 152.7, 152.7
α , β , γ (°)	90, 89.9, 90	101.9, 89.8, 99.3	90, 90, 90
Resolution (Å)	50–1.90 (1.93–1.90)	50–2.15 (2.19–2.15)	50–2.45 (2.49–2.45)
Observed reflections	142808	97993	120900
Unique reflections	41960	46298	21817
Redundancy	3.4 (3.1)	2.1 (2.1)	5.5 (5.6)
Completeness (%)	91.3 (93.7)	95.0 (95.7)	99.9 (100.0)
I/ σ	18.8 (1.9)	12.1 (1.8)	22.4 (2.0)
R _{sym} ^a	0.072 (0.524)	0.081 (0.481)	0.072 (0.892)
R _{pim} ^a	0.045 (0.337)	0.074 (0.443)	0.034 (0.335)
CC _{1/2} ^b	0.996 (0.616)	0.993 (0.643)	0.998 (0.754)
Molecules in ASU	4	6	2
Refinement			
Resolution (Å)	40–1.90 (1.95–1.90)	40–2.15 (2.20–2.15)	40–2.45 (2.52–2.45)
Reflections	39802	43840	20655
R _{work} ^c	0.243 (0.292)	0.211 (0.238)	0.196 (0.285)
R _{free} ^c	0.291 (0.316)	0.283 (0.368)	0.238 (0.295)
Number of atoms			
Protein	4735	7291	2228
Ligand/Ion	140	378	136
Water	79	138	5
Average B factor (Å ²) ^d	38.1	39.0	67.7
Rms deviation from ideal geometry			
bond lengths (Å)	0.010	0.009	0.008
bond angles (°)	1.428	1.443	1.455
Ramachandran plot (%) ^e			
Preferred regions	96.8	96.3	97.1
Allowed regions	2.8	3.0	2.2
Outliers	0.4	0.7	0.7

PDB code	3WIX	3WIY	3WIZ
-----------------	-------------	-------------	-------------

^a $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$, where $\langle I(h) \rangle$ is the mean intensity of symmetry-related reflections. $R_{\text{pim}} = \sum_h [1/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$.
^bCC1/2, Pearson correlation coefficient between independently merged halves of the data set. ^c $R_{\text{work}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$. R_{free} was calculated for randomly chosen 5% of reflections excluded from refinement. ^dB-factor includes contributions from TLS parameters. ^eCalculated with Coot. Values in parentheses are for the highest resolution shell.

引用文献

- 1) Arrowsmith, C. H.; Audia, J. E.; Austin, C.; Baell, J.; Bennett, J.; Blagg, J.; Bountra, C.; Brennan, P. E.; Brown, P. J.; Bunnage, M. E.; Buser-Doepner, C.; Campbell, R. M.; Carter, A. J.; Cohen, P.; Copeland, R. A.; Cravatt, B.; Dahlin, J. L.; Dhanak, D.; Edwards, A. M.; Frederiksen, M.; Frye, S. V.; Gray, N.; Grimshaw, C. E.; Hepworth, D.; Howe, T.; Huber, K. V.; Jin, J.; Knapp, S.; Kotz, J. D.; Kruger, R. G.; Lowe, D.; Mader, M. M.; Marsden, B.; Mueller-Fahrnow, A.; Muller, S.; O'Hagan, R. C.; Overington, J. P.; Owen, D. R.; Rosenberg, S. H.; Roth, B.; Ross, R.; Schapira, M.; Schreiber, S. L.; Shoichet, B.; Sundstrom, M.; Superti-Furga, G.; Taunton, J.; Toledo-Sherman, L.; Walpole, C.; Walters, M. A.; Willson, T. M.; Workman, P.; Young, R. N.; Zuercher, W. J. The promise and peril of chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 536-541.
- 2) Garbaccio, R. M.; Parmee, E. R. The impact of chemical probes in drug discovery: A pharmaceutical industry perspective. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 10-17.
- 3) Blagg, J.; Workman, P. Choose and Use Your Chemical Probe Wisely to Explore Cancer Biology. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 9-25.
- 4) Mathews, M. B.; Hershey, J. W. The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1849*, 836-44.
- 5) Guan, X. Y.; Fung, J. M.; Ma, N. F.; Lau, S. H.; Tai, L. S.; Xie, D.; Zhang, Y.; Hu, L.; Wu, Q. L.; Fang, Y.; Sham, J. S. Oncogenic role of eIF-5A2 in the development of ovarian cancer. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4197-4200.
- 6) Wang, Z.; Jiang, J.; Qin, T.; Xiao, Y.; Han, L. EIF5A regulates proliferation and chemoresistance in pancreatic cancer through the sHH signalling pathway.

- J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 2678–2688.
- 7) Park, M. H.; Wolff, E. C. Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 18710–18718.
 - 8) Dever, T. E.; Gutierrez, E.; Shin, B. S. The hypusine-containing translation factor eIF5A. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 413–25.
 - 9) Tong, Y.; Park, I.; Hong, B. S.; Nedyalkova, L.; Tempel, W.; Park, H. W. Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins* **2009**, *75*, 1040–1045.
 - 10) Nishimura, K.; Ohki, Y.; Fukuchi-Shimogori, T.; Sakata, K.; Saiga, K.; Beppu, T.; Shirahata, A.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K. Inhibition of cell growth through inactivation of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by deoxyspergualin. *Biochem. J.* **2002**, *363*, 761–768.
 - 11) Fuchs, Y.; Steller, H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* **2011**, *147*, 742–758.
 - 12) Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*, 87.
 - 13) Dickson, D. W. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 23–27.
 - 14) Eguchi, K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern. Med.* **2001**, *40*, 275–284.
 - 15) Rastogi R.P.; Richa; Sinha R. P. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal* **2009**, *8*, 155–181.
 - 16) Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* **2004**, *116*, 205–219.
 - 17) Kale, J.; Osterlund, E. J.; Andrews, D. W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 65–80.

- 18) Adams, J. M.; Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **2007**, *26*, 1324–1337.
- 19) Labi, V.; Erlacher, M.; Kiessling, S.; Villunger, A. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1325–1338.
- 20) Youle, R. J.; Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 47–59.
- 21) Warren, C. F. A.; Wong-Brown, M. W.; Bowden, N. A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 177.
- 22) Brown, S. P.; Taygerly, J. P. Small-Molecule Antagonists of Bcl-2 Family Proteins. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2012**, *47*, 253–266.
- 23) Souers, A. J.; Levenson, J. D.; Boghaert, E. R.; Ackler, S. L.; Catron, N. D.; Chen, J.; Dayton, B. D.; Ding, H.; Enschede, S. H.; Fairbrother, W. J.; Huang, D. C.; Hymowitz, S. G.; Jin, S.; Khaw, S. L.; Kovar, P. J.; Lam, L. T.; Lee, J.; Maecker, H. L.; Marsh, K. C.; Mason, K. D.; Mitten, M. J.; Nimmer, P. M.; Oleksijew, A.; Park, C. H.; Park, C. M.; Phillips, D. C.; Roberts, A. W.; Sampath, D.; Seymour, J. F.; Smith, M. L.; Sullivan, G. M.; Tahir, S. K.; Tse, C.; Wendt, M. D.; Xiao, Y.; Xue, J. C.; Zhang, H.; Humerickhouse, R. A.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 202–208.
- 24) Caenepeel, S.; Brown, S. P.; Belmontes, B.; Moody, G.; Keegan, K. S.; Chui, D.; Whittington, D. A.; Huang, X.; Poppe, L.; Cheng, A. C.; Cardozo, M.; Houze, J.; Li, Y.; Lucas, B.; Paras, N. A.; Wang, X.; Taygerly, J. P.; Vimolratana, M.; Zancanella, M.; Zhu, L.; Cajulis, E.; Osgood, T.; Sun, J.; Damon, L.; Egan, R. K.; Greninger, P.; McClanaghan, J. D.; Gong, J.;

- Moujalled, D.; Pomilio, G.; Beltran, P.; Benes, C. H.; Roberts, A. W.; Huang, D. C.; Wei, A.; Canon, J.; Coxon, A.; Hughes, P. E. AMG 176, a selective MCL1 Inhibitor, is effective in hematological cancer models alone and in combination with established therapies. *Cancer Discovery* **2018**, *8*, 1582–1597.
- 25) Szlavik, Z.; Csekei, M.; Paczal, A.; Szabo, Z. B.; Sipos, S.; Radics, G.; Proszenyak, A.; Balint, B.; Murray, J.; Davidson, J.; Chen, I.; Dokurno, P.; Surgenor, A. E.; Daniels, Z. M.; Hubbard, R. E.; Le Toumelin-Braizat, G.; Claperon, A.; Lysiak-Auvity, G.; Girard, A. M.; Bruno, A.; Chanrion, M.; Colland, F.; Maragno, A. L.; Demarles, D.; Geneste, O.; Kotschy, A., Discovery of S64315, a potent and selective Mcl-1 inhibitor. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 13762–13795.
- 26) Tron, A. E.; Belmonte, M. A.; Adam, A.; Aquila, B. M.; Boise, L. H.; Chiarparin, E.; Cidado, J.; Embrey, K. J.; Gangl, E.; Gibbons, F. D.; Gregory, G. P.; Hargreaves, D.; Hendricks, J. A.; Johannes, J. W.; Johnstone, R. W.; Kazmirski, S. L.; Kettle, J. G.; Lamb, M. L.; Matulis, S. M.; Nooka, A. K.; Packer, M. J.; Peng, B.; Rawlins, P. B.; Robbins, D. W.; Schuller, A. G.; Su, N.; Yang, W. Z.; Ye, Q.; Zheng, X. L.; Secrist, J. P.; Clark, E. A.; Wilson, D. M.; Fawell, S. E.; Hird, A. W. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5341.
- 27) Shen, Q.; Li, J.; Mai, J.; Zhang, Z.; Fisher, A.; Wu, X.; Li, Z.; Ramirez, M. R.; Chen, S.; Shen, H., Sensitizing non-small cell lung cancer to BCL-xL-targeted apoptosis. *Cell Death Dis* **2018**, *9* (10), 986.
- 28) Vogler, M. Targeting BCL2-proteins for the treatment of solid tumours. *Adv. Med.* **2014**, *2014*, 943648.
- 29) Lee, E. F.; Harris, T. J.; Tran, S.; Evangelista, M.; Arulananda, S.; John, T.;

- Ramnac, C.; Hobbs, C.; Zhu, H.; Gunasingh, G.; Segal, D.; Behren, A.; Cebon, J.; Dobrovic, A.; Mariadason, J. M.; Strasser, A.; Rohrbeck, L.; Haass, N. K.; Herold, M. J.; Fairlie, W. D. BCL-XL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 342.
- 30) Tahir, S.; Yang, X.; Anderson, M.; Morgan-Lappe, S.; Sarthy, A.; Chen, J.; Warner, R.; Ng, S.; Fesik, S.; Elmore, S.; Rosenberg, S.; Tse, C. Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1176–1183.
- 31) Tse, C.; Shoemaker, A. R.; Adickes, J.; Anderson, M. G.; Chen, J.; Jin, S.; Johnson, E. F.; Marsh, K. C.; Mitten, M. J.; Nimmer, P.; Roberts, L.; Tahir, S. K.; Xiao, Y.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 3421–3428.
- 32) Lam, L.; Lu, X.; Zhang, H.; Lesniewski, R.; Rosenberg, S.; Semizarov, D. A microRNA screen to identify modulators of sensitivity to BCL2 inhibitor ABT-263 (navitoclax). *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 2943–2950.
- 33) Jakus, J.; Wolff, E. C.; Park, M. H.; Folk, J. E. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13151–13159.
- 34) Lee, Y. B.; Park, M. H.; Folk, J. E. Diamine and triamine analogs and derivatives as inhibitors of deoxyhypusine synthase; synthesis and biological activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3053–3061.
- 35) Lee, Y. B.; Folk, J. E. Branched-chain and unsaturated 1,7-diaminoheptane derivatives as deoxyhypusine synthase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 253–270.

- 36) Ziegler, P.; Chahoud, T.; Wilhelm, T.; Pallman, N.; Braig, M.; Wiehle, V.; Ziegler, S.; Schroder, M.; Meier, C.; Kolodzik, A.; Rarey, M.; Panse, J.; Hauber, J.; Balabanov, S.; Brummendorf, T. H. Evaluation of deoxyhypusine synthase inhibitors targeting BCR-ABL positive leukemias. *Invest. New Drugs*. **2012**, *30*, 2274–2283.
- 37) Schroeder, M.; Kolodzik, A.; Pfaff, K.; Priyadarshini, P.; Krepstakies, M.; Hauber, J.; Rarey, M.; Meier, C. In silico design, synthesis, and screening of novel deoxyhypusine synthase inhibitors targeting HIV-1 replication. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 940–952.
- 38) Anighoro, A.; Bajorath, J.; Rastelli, G. Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7874–7887.
- 39) Elmore, S. W.; Souers, A. J.; Bruncko, M.; Song, X.; Wang, X.; Hasvold, L. A.; Wang, L.; Kunzer, A. R.; Park, C.; Wendt, M. D.; Tao, Z. 7-Substituted indole Mcl-1 inhibitors. WO2008131000A2, 2008.
- 40) Park, C. M.; Bruncko, M.; Adickes, J.; Bauch, J.; Ding, H.; Kunzer, A.; Marsh, K. C.; Nimmer, P.; Shoemaker, A. R.; Song, X.; Tahir, S. K.; Tse, C.; Wang, X.; Wendt, M. D.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. Discovery of an orally bioavailable small molecule inhibitor of prosurvival B-cell lymphoma 2 proteins. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6902–6915.
- 41) Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg,

- S. H. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **2005**, *435*, 677–681.
- 42) Liao, D. I.; Wolff E. C.; Park, M. H.; Davies, D. R. Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. *Structure* **1998**, *6*, 23–32.
- 43) Umland, T. C.; Wolff, E. C.; Park, M. H.; Davies, D. R. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme·NAD·inhibitor ternary complex. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 28697–28705.
- 44) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4.1 Schrödinger, LLC.
- 45) Marton, L. J.; Pegg, A. E. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1995**, *35*, 55-91.
- 46) Sugiyama, S.; Vassilyev, D. G.; Matsushima, M.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K.; Morikawa, K. Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9519–9525.
- 47) Joshi-Pangu, A.; Wang, C. Y.; Biscoe, M. R. Nickel-catalyzed Kumada cross-coupling reactions of tertiary alkylmagnesium halides and aryl bromides/triflates. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8478–8481.
- 48) Joe, Y. A.; Wolff, E. C.; Lee, Y. B.; Park, M. H. Enzyme-substrate intermediate at a specific lysine residue is required for deoxyhypusine synthesis. The role of Lys329 in human deoxyhypusine synthase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32679–32685.
- 49) Nagao, Y.; Hirata, T.; Goto, S.; Sano, S.; Kakehi, A.; Iizuka, K.; Shiro, M. Intramolecular nonbonded S···O interaction recognized in (acylimino)thiadiazoline derivatives as angiotensin II receptor antagonists and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3104–3110.

- 50) Clark, T.; Hennemann, M.; Murray, J. S.; Politzer, P.; Halogen bonding: the σ -hole. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 291–296.
- 51) Auffinger, P.; Hays, F. A.; Westhof, E.; Ho, P. S. Halogen bonds in biological molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 16789–16794.
- 52) Fujii, H.; Oshima, K.; Utimoto, K. Stereoselective reduction of α,β -epoxy ketones into erythro- α,β -epoxy alcohols with sodium borohydride in the presence of calcium chloride *Chem. Lett.* **1992**, *21*, 967–970.
- 53) Murphy, D. J. Determination of accurate KI values for tight-binding enzyme inhibitors: an in silico study of experimental error and assay design. *Anal. Biochem.* **2004**, *327*, 61–67.
- 54) Lee, C. H.; Park, M. H. Human deoxyhypusine synthase: interrelationship between binding of NAD and substrates. *Biochem. J.* **2000**, *352*, 851–857.
- 55) Lee, C. H.; Um, P. Y.; Park, M. H. Structure-function studies of human deoxyhypusine synthase: identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 841–849.
- 56) Arai, M. Unified understanding of folding and binding mechanisms of globular and intrinsically disordered proteins. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 163–181.
- 57) Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Smith, B. J.; Deshayes, K.; Zobel, K.; Colman, P. M.; Fairlie, W. D. Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-x_L: implications for selectivity of antagonists of Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1711–1713.
- 58) Petros, A. M.; Dinges, J.; Augeri, D. J.; Baumeister, S. A.; Betebenner, D. A.; Bures, M. G.; Elmore, S. W.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Landis, S. K.; Nettlesheim, D. G.; Rosenberg, S. H.; Shen, W.; Thomas, S.; Wang, X.; Zanze, I.; Zhang, H.; Fesik, S. W. Discovery of a potent inhibitor of the antiapoptotic

- protein Bcl-xL from NMR and parallel synthesis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 656–663.
- 59) Stewart, M. L.; Fire, E.; Keating, A. E.; Walensky, L. D. The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nat. Chem. Biol.*, **2010**, *6*, 595-601
- 60) Rega, M. F.; Reed, J. C.; Pellecchia, M. Robust lanthanide-based assays for the detection of anti-apoptotic Bcl-2-family protein antagonists. *Bioorg. Chem.* **2007**, *35*, 113-120.
- 61) Zhai, D.; Godoi, P.; Sergienko, E.; Dahl, R.; Chan, X.; Brown, B.; Rascon, J.; Hurder, A.; Su, Y.; Chung, T. D.; Jin, C.; Diaz, P.; Reed, J. C. High-throughput fluorescence polarization assay for chemical library screening against anti-apoptotic Bcl-2 family member Bfl-1. *J. Biomol. Screen.* **2012**, *17*, 350-360.
- 62) Hickey, D. M. B.; Moody, C. J.; Rees, C. W. Vinyl azides in heterocyclic synthesis. Part 3. Isolation of azirine trimers (1,3,8-triazatricyclo[4.3.0.0^{3,5}]non-7-enes) and intramolecular interception of nitrile ylides by neighbouring π -bonds or nucleophiles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1986**, 1119–1122.
- 63) Wendt, M. D.; Shen, W.; Kunzer, A.; McClellan, W. J.; Bruncko, M.; Oost, T. K.; Ding, H.; Joseph, M. K.; Zhang, H.; Nimmer, P. M.; Ng, S. C.; Shoemaker, A. R.; Petros, A. M.; Oleksijew, A.; Marsh, K.; Bauch, J.; Oltersdorf, T.; Belli, B. A.; Martineau, D.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. Discovery and structure–activity relationship of antagonists of B-cell lymphoma 2 family proteins with chemopotential activity in vitro and in vivo. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1165–1181.

- 64) Flack, H. D. On enantiomorph-polarity estimation. *Acta Cryst. A* **1983**, *39*, 876–881.
- 65) Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Cryst. A* **2008**, *64*, 112–122.
- 66) Otwinowski, Z.; Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
- 67) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **2007**, *40*, 658–674.
- 68) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.
- 69) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240–255.
- 70) Collaborative computing project. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760–763.
- 71) Chen, V. B.; Arendall III, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21.
- 72) Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022–1025.
- 73) Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355–367.
- 74) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development

of coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.

本論文の内容は下記の文献で公開された。

- 75) Tanaka, Y.; Kurasawa, O.; Yokota, A.; Klein, M. G.; Ono, K.; Saito, B.; Matsumoto, S.; Okaniwa, M.; Ambrus-Aikelin, G.; Morishita, D.; Kitazawa, S.; Uchiyama, N.; Ogawa, K.; Kimura, H.; Imamura, S. Discovery of Novel Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3215–3226.
- 76) Tanaka, Y.; Kurasawa, O.; Yokota, A.; Klein, M. G.; Saito, B.; Matsumoto, S.; Okaniwa, M.; Ambrus-Aikelin, G.; Uchiyama, N.; Morishita, D.; Kimura, H.; Imamura, S. New Series of Potent Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase. *ACS MedChem. Lett.* **2020**, *11*, 1645-1652.
- 77) Tanaka, Y.; Aikawa, K.; Nishida, G.; Homma, M.; Sogabe, S.; Igaki, S.; Hayano, Y.; Sameshima, T.; Miyahisa, I.; Kawamoto, T.; Tawada, M.; Imai, Y.; Inazuka, M.; Cho, N.; Imaeda, Y.; Ishikawa, T. Discovery of potent Mcl-1/Bcl-xL dual inhibitors by using a hybridization strategy based on structural analysis of target proteins. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9635-9645.