

計算機解析を活用したメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の探索ならびに  
その薬物構造からの抗ウイルス薬および抗がん薬の設計と合成展開

千葉大学大学院 医学薬学府 後期博士課程

先端創薬科学専攻 創薬科学講座 理論創薬研究室

加茂 大知

2023年2月

## 目次

I. 抗生物質と併用する新規メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の探索	p.2
II. インフルエンザウイルス治療薬を目的とした新規 PA <sub>N</sub> 阻害剤の探索	p.39
III. 小児がん治療薬を目的とした新規 TrkB 阻害剤の探索	p.67
IV. 総括	p.80
V. 実験項	p.81
VI. 出典	p.120
VII. 謝辞	p.141

# 第 I 章

## 抗生物質と併用する新規メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の探索

= 目次 =

<b>I. 1. 背景</b>	p.4
I. 1. 1. 薬剤耐性菌を取り巻く問題	
I. 1. 1. 1. 薬剤耐性菌の拡大	
I. 1. 1. 2. $\beta$ -ラクラム系抗菌薬と $\beta$ -ラクタマーゼ	
I. 1. 2. MBL   メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ	
I. 1. 2. 1. MBL について	
I. 1. 2. 2. IMP 型 MBL	
I. 1. 2. 3. NDM 型 MBL	
I. 1. 2. 4. VIM 型 MBL	
I. 1. 3. 既知の MBL 阻害剤	
I. 1. 4. 先行研究：当研究室における MBL 阻害剤の探索研究	
I. 1. 4. 1. スクリーニング試験によるヒット化合物の探索	
I. 1. 4. 2. ヒット化合物と MBL の相互作用解析	
I. 1. 4. 3. ヒット化合物 <b>1a</b> の構造改変	
<b>I. 2. 目的と方法</b>	p.18
<b>I. 3. 結果と考察</b>	p.19
I. 3. 1. 構造解析	
I. 3. 1. 1. MD シミュレーションによる結合構造の予測	

- I. 3. 1. 2. IMP-1 変異体への対応
- I. 3. 1. 3. 構造改変の戦略と化合物設計
- I. 3. 2. 化合物の構造改変
  - I. 3. 2. 1. C 領域の構造改変
  - I. 3. 2. 2. B 領域の構造改変
  - I. 3. 2. 3. A 領域の構造改変
  - I. 3. 2. 4. 化合物 22b と IMP-1 の相互作用解析
  - I. 3. 2. 5. 溶解性の改善
- I. 3. 3. 発展：抗がん剤を目指した K-Ras G12D 阻害剤への応用

## I. 4. 小括

p.37

## I.1. 背景

### I.1.1. 薬剤耐性菌を取り巻く問題

#### I.1.1.1. 薬剤耐性菌の拡大

薬剤耐性菌(AMR; antimicrobial resistance)とは、抗菌薬が効かなくなった、または、効きにくくなった細菌のことである。薬剤耐性菌の蔓延は、世界中で深刻な問題となっている。2019年に、薬剤耐性菌が直接の原因で死亡した人の数は全世界で約127万人であり、AIDSやマラリアによる死亡者数よりも多い。さらに、2014年にイギリス政府が出した報告書“オニール・レポート”の中で、このまま薬剤耐性菌への対策を講じなければ、2050年には薬剤耐性に起因する死者数が全世界で1000万人を超えるとの試算が出されている<sup>1</sup>。この数字は、がんによる死者数820万人を大幅に上回るものである。

感染症の治療薬は投与期間が短く、糖尿病など他の慢性疾患の治療薬と比べて、利益を生みにくい。そのため、多くの製薬企業が新規薬剤の開発から撤退している。特に日本では、多様な感染症への専門家の細分化と分野間の連携不足といった要因により、感染症領域の創薬は欧米諸国と比較して遅れを取っている。日本における薬剤耐性アクションプランの一環として、厚生労働省が感染症の新規治療薬の開発を推進している<sup>2</sup>。2014年、日本感染症学会などの6学会が合同で、薬剤耐性菌の現状と新規抗菌薬開発の必要性を訴える提言を出した。また、後述するIMP型MBL産生菌など、日本を中心とするアジア圏で広がりを見せる薬剤耐性菌<sup>3,4</sup>もあり、新規薬剤の開発は急務である。

#### I.1.1.2. $\beta$ -ラクタム系抗菌薬と $\beta$ -ラクタマーゼ

1,940年にペニシリンが単離されて以降、 $\beta$ -ラクタム骨格を有する抗菌薬は細菌感染症の治療に広く貢献してきた。この $\beta$ -ラクタム系抗菌薬は、ペニシリン系やセフェム系、カルバペネム系など、その骨格構造の違いからさらに分類することができる (Figure 1)。

ペニシリン系抗菌薬は、分子内の  $\beta$ -ラクタム骨格が薬理活性に関わる。細菌細胞壁のペプチドグリカンに架橋する、ペニシリン結合タンパク質(PBP; penicillin binding protein)のトランスペプチダーゼ活性を阻害して、殺菌作用を示す。PBP が阻害されると細胞壁に綻びが生じ、細菌細胞が破裂して溶菌してしまう。PBP は活性部位にセリン残基を持ち、それがペプチドグリカンの架橋に関わるが、抗菌薬  $\beta$ -ラクタム環のアミド結合も同様に切断し、自身に固定してしまう。そのため、ペプチドグリカンの架橋を行えなくなり、これにより細胞壁合成が阻害される。

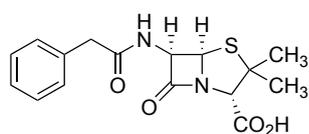
細菌の産生する  $\beta$ -ラクタマーゼという酵素は、立体構造が PBP と類似しており、活性部位のセリン残基が  $\beta$ -ラクタム骨格のアミド結合を加水分解し、開裂させることで抗菌薬を不活化させる。

1940 年代にペニシリン系抗菌薬が普及してから、ペニシリンを分解する  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌(ペニシリナーゼ産生菌)が次々に発見されている。ペニシリン系抗菌薬のうち、メチシリンは2つのメトキシ基を導入したことで、 $\beta$ -ラクタマーゼに結合しなくなり、薬剤耐性を回避している。しかし、現在、メチシリンに対する耐性菌のうち、黄色ブドウ球菌(MRSA; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)は院内感染が特に問題となっている。

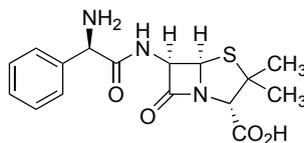
ペニシリン系抗菌薬の次に開発されたセファロスポリン系抗菌薬は、ペニシリン系とほとんど同じ作用機序を示す。改良が繰り返され、現在は第四世代まで開発されている。

カルバペネム系抗菌薬は、広い抗菌スペクトルと強い抗菌活性、 $\beta$ -ラクタマーゼに対する高い安定性を有しており、“抗菌薬最後の砦(last resort)”とも呼ばれる。

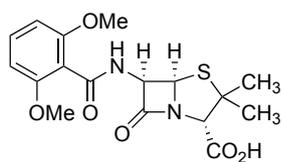
(a) Penicillins



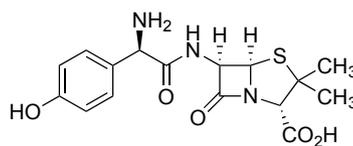
Penicillin G



Ampicillin

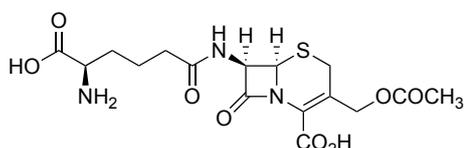


Methicillin

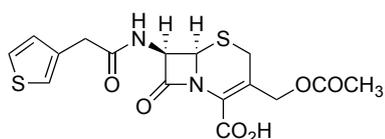


Amoxicillin

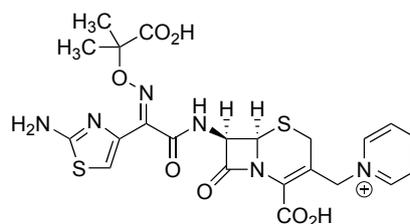
(b) Cephalosporins



Cephalosporin C

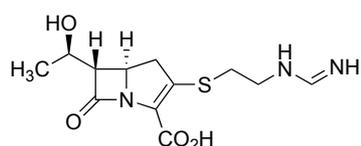


Cephalothin

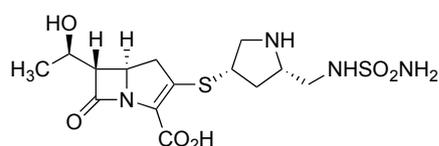


Ceftazidime

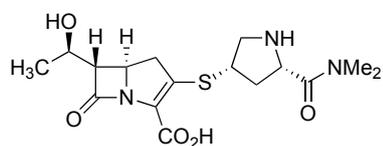
(c) Carbapenems



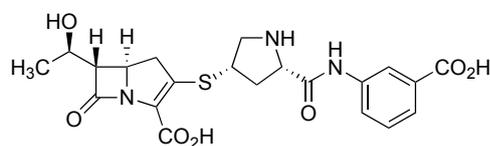
Imipenem



Doripenem



Meropenem



Ertapenem

Figure 1. 主なβ-ラクタム系抗菌薬の構造. (a) ペニシリン系抗菌薬の構造. (b) セファロsporin系抗菌薬の構造. (c) カルバペネム系抗菌薬の構造

抗菌薬を分解するβ-ラクタマーゼは、様々な菌種の細菌に発現しており、数多くの種類が存在する。また、β-ラクタマーゼはその性質などからいくつかの種類に分類することがで

きる<sup>5,6</sup>。Ambler はアミノ酸配列の相同性から  $\beta$ -ラクタマーゼを A から D の 4 クラスに分類した(Figure 2)。

“抗菌薬最後の砦”とも言われたカルバペネム系抗菌薬であるが、カルバペネマーゼと総称されるカルバペネム系抗菌薬を分解する酵素が出現しており、臨床で問題になっている。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE; carbapenem-resistant Enterobacteriaceae)が近年注目されており、アメリカの疾病対策予防センター(CDC; Centers for Disease Control and Prevention)も最高の危険レベルに指定している<sup>7,8</sup>。カルバペネマーゼの中でも、特にカルバペネム耐性が強いのが、クラス B メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(MBL)である。これまでの  $\beta$ -ラクタマーゼが活性中心にセリン残基を有するセリン- $\beta$ -ラクタマーゼ(SBL)であったのに対し、MBL は活性中心に 2 つまたは 1 つの金属イオン( $Zn^{2+}$ )を有する。

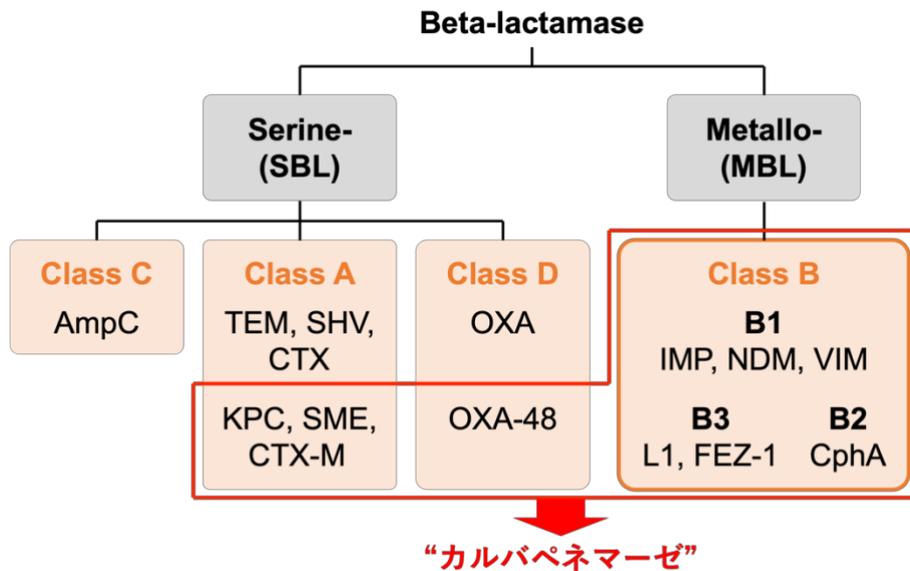


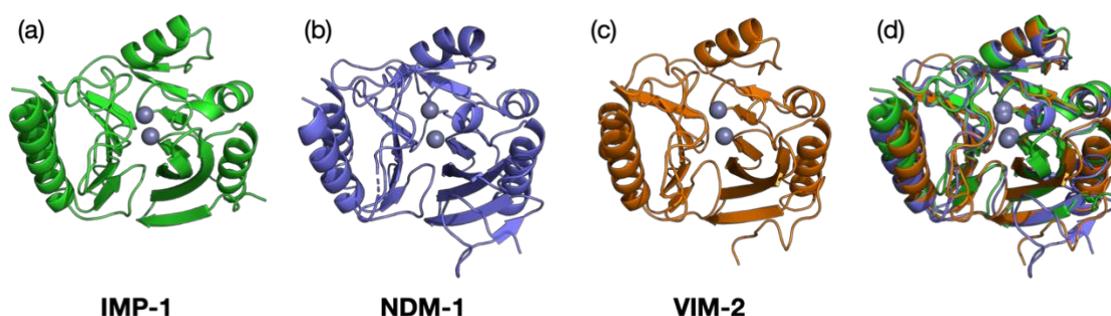
Figure 2. Ambler による  $\beta$ -ラクタマーゼのクラス分類とカルバペネマーゼ

## I. 1.2. MBL | メタロ-β-ラクタマーゼ

### I. 1.2.1. MBL について

クラス B の β-ラクタマーゼであるメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)は、プラスミドによる伝播で属を超えて水平伝播するため、院内感染だけでなく市中感染の危険性もある。さらに、ほぼ全ての β ラクタム系抗菌薬を分解するだけでなく、MBL 産生菌が非 β-ラクタム系抗菌薬を分解する酵素も併せ持つことが多い。そのため、MBL は臨床において多剤耐性の一因として危惧されているだけでなく、薬剤感受性試験での識別が困難になる問題も生じている。

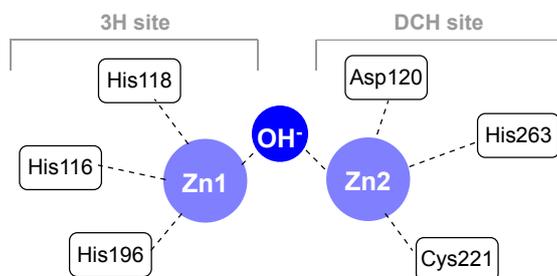
主な MBL に、IMP-1 (Imipenemase), NDM-1 (New Dehli Metallo-β-lactamase), VIM-2 (Verona Interogen-encoded Metallo-β-lactamase)がある(Figure 3)。これらの MBL はそれぞれ固有のアミノ酸配列と機能的特徴を持つが、Figure 3d に示す通り、それぞれの構造が非常に類似している<sup>9,10</sup>。また、2020 年 5 月の時点で、85 種類の IMP 変異体、29 種類の NDM 変異体、69 種類の VIM 変異体が報告されている。



**Figure 3.** MBL の構造 (a) IMP-1 の構造 (PDB#; 5EV6); (b) NDM-1 の構造 (PDB#; 5ZGE); (c) VIM-2 (PDB#; 1KO3); (d) IMP-1, NDM-1, VIM-2 を重ね合わせた図

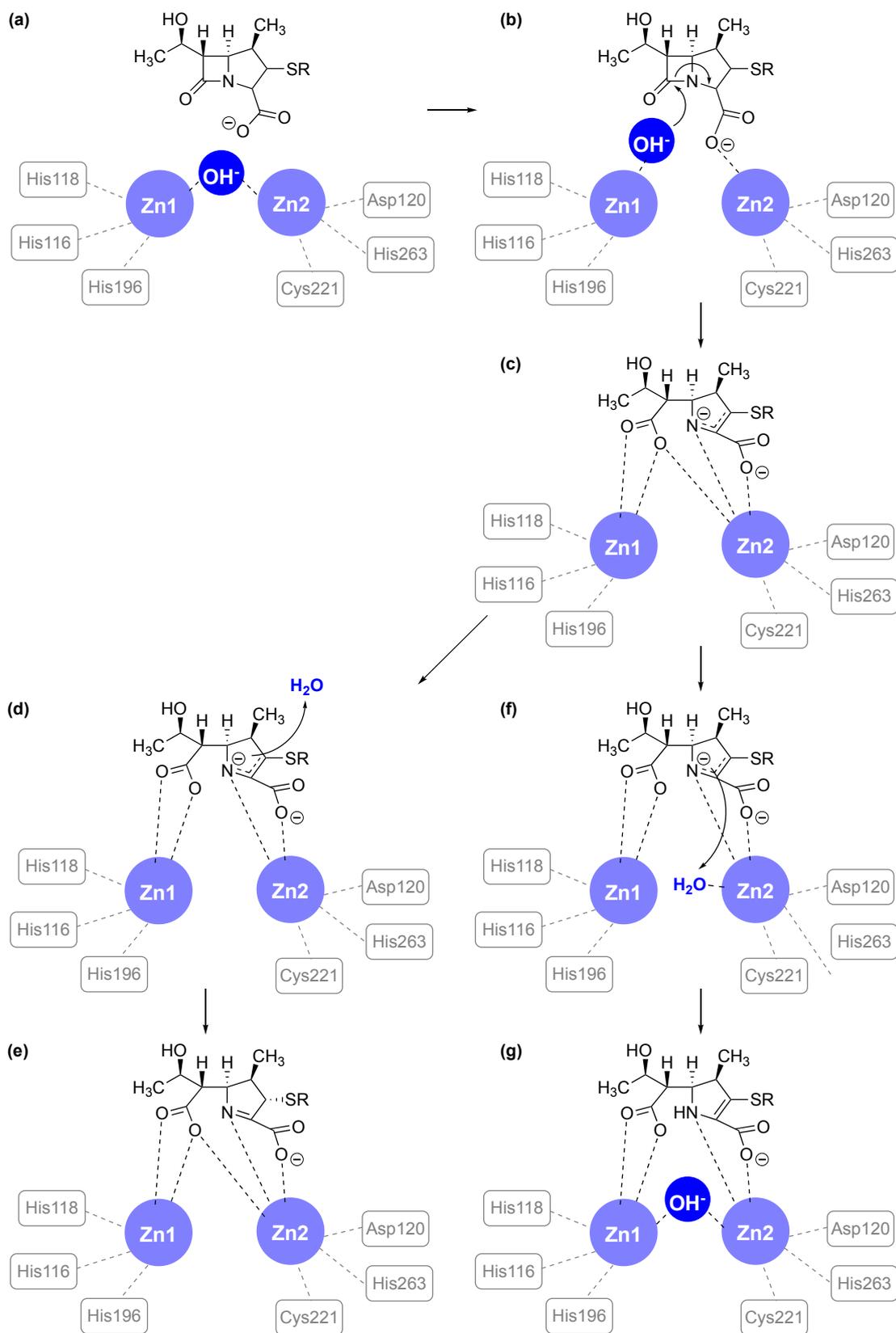
MBL の酵素活性中心の模式図を Figure 4 に示す。MBL を含め、β-ラクタマーゼの残基番号は Dideberg らによって標準化されており、本研究でもその番号を用いる<sup>11</sup>。MBL 活性中心に存在する 2 つの  $Zn^{2+}$  のうち、Zn1 には His116, His118, His196 の 3 つの His 残基が配位

しており、3H サイトと呼ばれる。もう一方の Zn2 の周辺は DCH サイトと呼ばれ、Asp120, Cys221, His263 が配位している。2 つの Zn<sup>2+</sup> は水分子または水酸化物イオンを介して結合しているが、IMP 型 MBL では、この水分子は確認されていない。



**Figure 4.** MBL 活性中心の模式図

Scheme 1 に MBL がカルバペネム系抗菌薬を加水分解するメカニズムを示す<sup>12</sup>。現在、2 つの反応経路が考えられている。MBL 活性中心の Zn<sup>2+</sup> に配位した水分子または水酸化物イオンが、カルバペネムのカルボニル炭素に求核攻撃をすることで、ラクタム環の加水分解が開始する。開環した N 原子が Zn2 に接近したのち、アニオンをプロトン化する段階で経路の分岐が生じる。溶媒の水分子、または Zn2 に配位している水分子に求核攻撃をすることでアニオンがプロトン化され、安定な結合状態を形成すると考えられている。



**Scheme 1.** MBL のカルバペネム加水分解メカニズム<sup>12</sup>

### I. 1. 2. 2. IMP 型 MBL

IMP-1 は、1991 年に愛知県内の病院でイミペネム耐性のセラチア・マルセッセンスから発見された、初めて報告された MBL である<sup>13</sup>。IMP-1 をコードする *bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子は伝達性プラスミド上のインテグロン構造により媒介され、主に緑膿菌などのブドウ糖非発酵グラム陰性菌から検出される。他の MBL と比較して、IMP 型 MBL はカルバペネム系抗菌薬を分解する活性が高い。また、IMP-1 は可溶性 MBL であり、4 つの Lys 残基(Lys87, Lys89, Lys145, Lys147)が細菌外膜と静電的相互作用を形成している。

IMP-1 の酵素活性に関わる残基のうち、Ser262 は IMP-1 とリガンド複合体の立体構造の安定化に寄与する残基であり、Val67 は基質との結合に関与する残基である。S262G 変異を有する IMP-3 や IMP-6、IMP-25 は、ペニシリン加水分解活性が低下するが、メロペネム加水分解活性が向上している<sup>14, 15</sup>。V67F 変異を有する IMP-10 でも、同様の加水分解活性の変化が見られる<sup>16, 17</sup>。IMP-6 と IMP-10 はどちらも、日本で発見された IMP-1 変異体である。Crowder らの研究グループらによって IMP-1 変異体の網羅的な解析が行われ、IMP-1 はカルバペネム系抗菌薬の使用によって、よりカルバペネム選択的な酵素への進化が促されることが明らかとなった<sup>18</sup>。さらに、IMP-1 変異体をコードする遺伝子は、ペニシリン系やセファロスポロン系抗菌薬を分解する  $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝子と共存していることが多く、多剤耐性の一因となっている。

### I. 1. 2. 3. NDM 型 MBL

NDM-1 は、2007 年にインドのニューデリーに旅行した患者より単離された肺炎桿菌から発見されたのが初の報告である<sup>19</sup>。日本でも、2010 年に獨協医科大学で NDM-1 産生菌大腸菌への感染が報告された<sup>20</sup>。

NDM 型 MBL は、IMP 型 MBL や VIM 型 MBL とは異なり、脂質化された Cys26 によって細菌外膜に固定されている膜固定型 MBL である<sup>21, 22, 23</sup>。膜アンカーである Cys26 に加

え、Arg45 と Arg52 が細菌外膜と静電相互作用を形成している。細菌外膜への固定により、グラム陰性菌の外膜小胞(OMV; outer membrane vesicle)に取り込まれやすくなり、薬剤耐性が拡大する一因となっている。NDM-1 産生大腸菌が、NDM-1 保有 OMV の放出を介し、メロペネム感受性緑膿菌をメロペネム処理から保護したという報告もある<sup>24</sup>。

NDM-1 は、宿主側の防御機構によって変異体の進化が促され、特に、M154L 変異を有する変異体では Zn 親和性が向上する<sup>25, 26, 27</sup>。

#### I. 1. 2. 4. VIM 型 MBL

VIM 型 MBL は、1997 年にイタリアのヴェローナで緑膿菌から VIM-1 が発見されたのち、フランスとイタリアで VIM-2 が報告された<sup>28, 29, 30</sup>。VIM は、NDM-1 と同様に宿主側の防御機構によって変異体への進化が促されるが、NDM-1 と異なり、特に H229R 変異で熱安定性が向上する<sup>31, 32</sup>。

#### I. 1. 3. 既知の MBL 阻害剤

クラブラン酸、タゾバクタム、スルバクタムが  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤として臨床で使用されているが、MBL に対してはほとんど有効でない(Figure 5)。現在、多くのグループによって MBL 阻害剤の開発研究が行われているが、上市された薬剤は未だない。また、新たな薬剤を開発しても、細菌が薬剤耐性を獲得する、いわば“いたちごっこ”の状態が続いており、継続的に新薬を開発する必要がある。



Figure 5. SBL 阻害剤の構造

MBL 阻害活性を示す化合物の一例を Figure 6 に示す。

明治製菓ファルマの開発した OP0595 ナキュバクタムは、CRE 株に対して、既存の  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬との併用で高い抗菌活性を示す<sup>33-38</sup>。さらに、OP0595 それ自体が抗菌薬としての役割も有する。また、VNRX-5133 タニボルバクタムは、ボロン酸構造を有し、SBL 産生菌と MBL 産生菌の両方に対して阻害活性を示す<sup>39-41</sup>。塩野義製薬の開発した S-649266 セフィデロコルは、セファロスポリン骨格を有する化合物であり、カルバペネマーゼに対し優れた安定性を示す<sup>42,43</sup>。これら 3 化合物は、現在臨床試験が行われているが、S-649266 と類似した構造を持つ FR295389 は開発が中止された<sup>44</sup>。

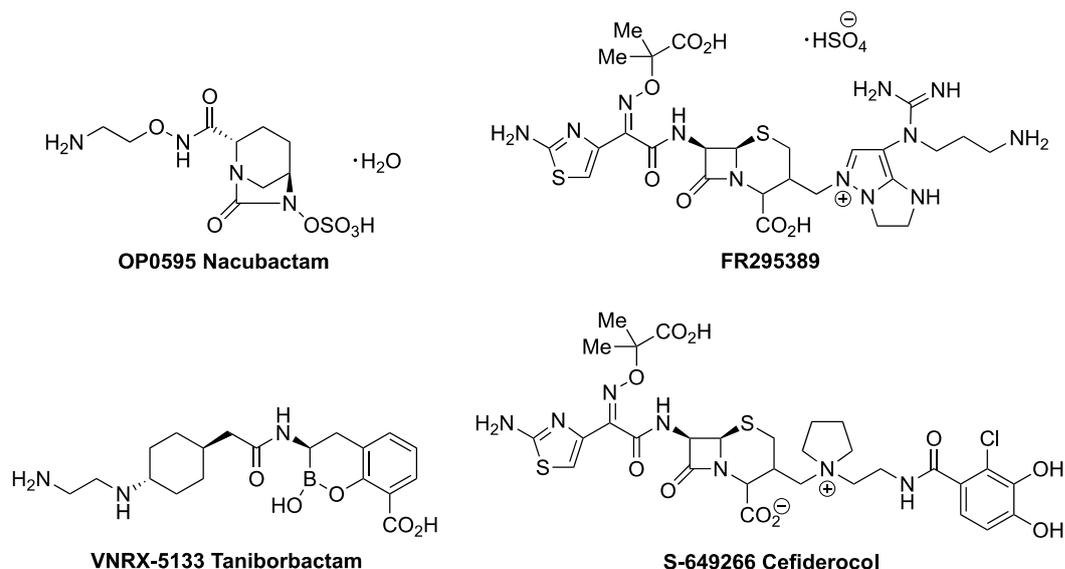


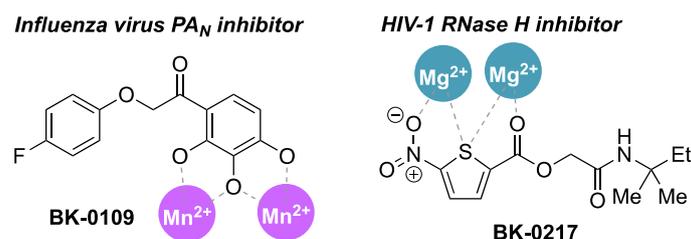
Figure 6. MBL 阻害剤の構造

#### I. 1.4. 先行研究：当研究室における MBL 阻害剤の探索研究

##### I. 1.4.1. スクリーニングによるヒット化合物の探索

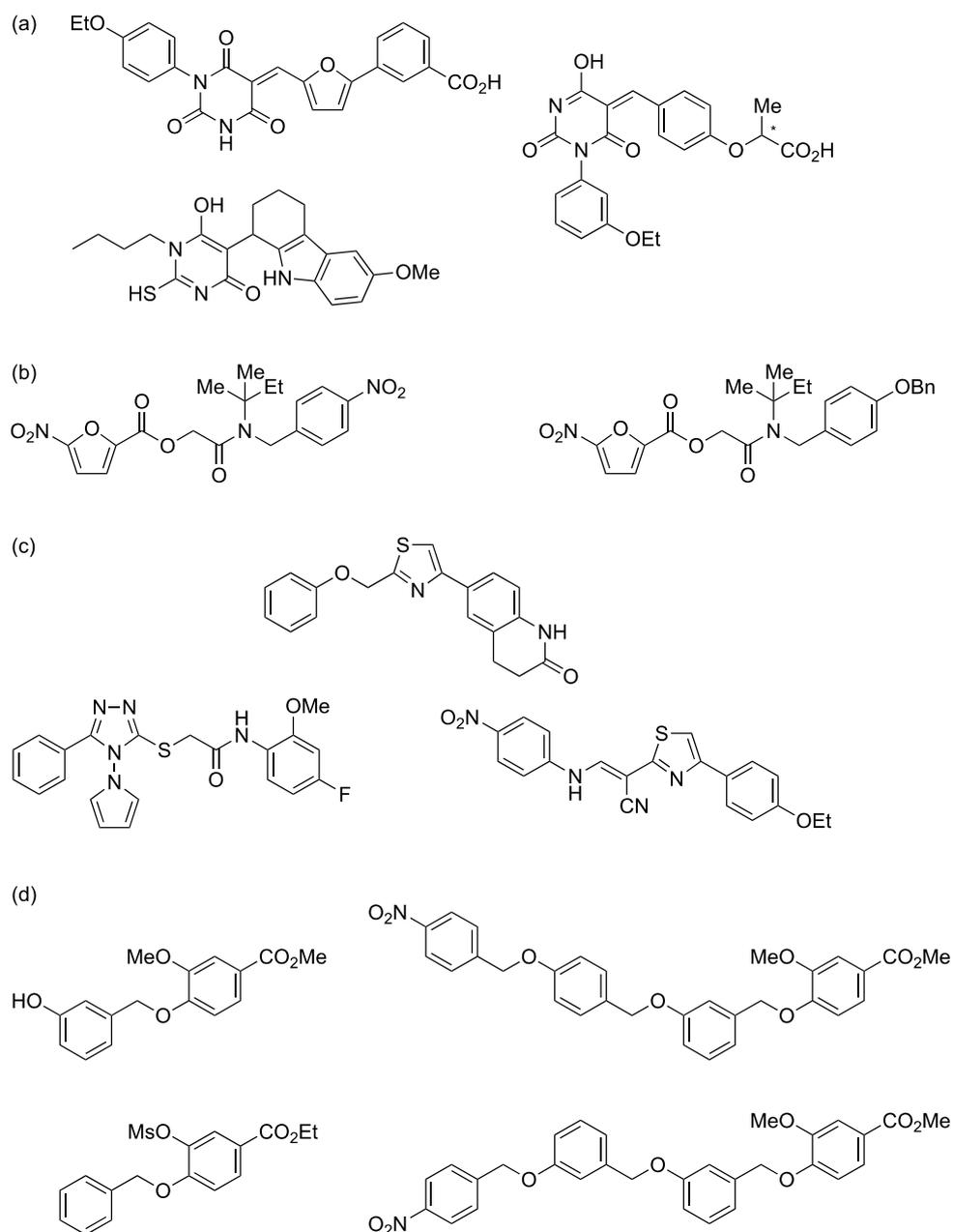
当研究室における先行研究で、MBL 阻害候補化合物の *in vivo* スクリーニング試験が行われた。所属研究室の約 600 種類の化合物について MBL 阻害率を測定した<sup>45</sup>。化合物ライブ

ラリは、ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)逆転写酵素の RNase H 活性や、インフルエンザウイルスポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を標的とした阻害剤の候補化合物を多く含んでいる(Figure 7)<sup>46-52</sup>。活性中心に 2 つの  $Zn^{2+}$  イオンを有する MBL と同様に、HIV-1 の逆転写酵素は活性中心に 2 つの  $Mn^{2+}$  イオンもしくは  $Mg^{2+}$  イオンを、インフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼ活性を有する PA サブユニットも 2 つの  $Mn^{2+}$  イオンもしくは  $Mg^{2+}$  イオンを有している<sup>53-56</sup>。活性中心に金属イオンを有する酵素はメタロエンザイムと総称されるが、メタロエンザイムの活性中心にある金属イオンを標的とした阻害剤は、異なる酵素間で対応する場合がある。そのため、化合物ライブラリには MBL の酵素活性を阻害する化合物が含まれていると期待した。



**Figure 7.** 当研究室で合成されたメタロエンザイム阻害剤の一例

スクリーニング試験は、まず化合物濃度 100  $\mu$ M におけるセファロsporin C の加水分解阻害率を測定し、47 化合物を抽出した。続いて、20  $\mu$ M の化合物濃度で阻害率を測定し、47 化合物から 12 化合物に絞り込んだ。この 12 化合物を、構造の類似性から 4 つのグループに分類した(Figure 8)。グループ B の化合物 2 種は、HIV-1 逆転写酵素の RNase H 活性の阻害剤候補化合物として報告されている。グループ C の化合物群には、小児がんの一種である神経芽腫の治療薬物として開発が進められている TrkB 阻害剤候補化合物が含まれていた<sup>57,58</sup>。当初はインフルエンザウイルスの  $PA_N$  を阻害する化合物が MBL とも相互作用すると予測したが、抽出した 12 化合物の中に関連する構造は含まれなかった。



**Figure 8.** *In vitro* スクリーニング試験で MBL 阻害活性を示した 12 の化合物

続いて、抽出した 12 化合物について、 $4.0\ \mu\text{M}$  と  $0.8\ \mu\text{M}$  の濃度における MBL 阻害率を調べた。その結果、3 つの化合物を MBL 阻害剤の候補化合物として抽出した (Figure 9)。この 3 化合物について詳細な阻害活性の測定を行い、 $\text{IC}_{50}$  値を算出した。このうち、IMP-1 と NDM-1 どちらに対してもより強い阻害活性を示した化合物 **1a** (BK-395) を、本研究における

ヒット化合物として構造の最適化を進めることとした。

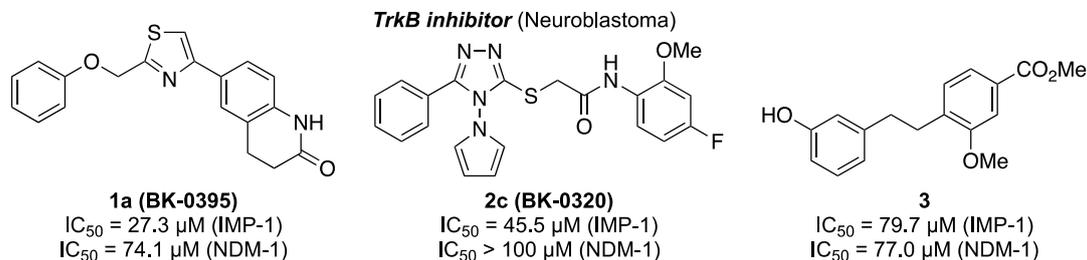
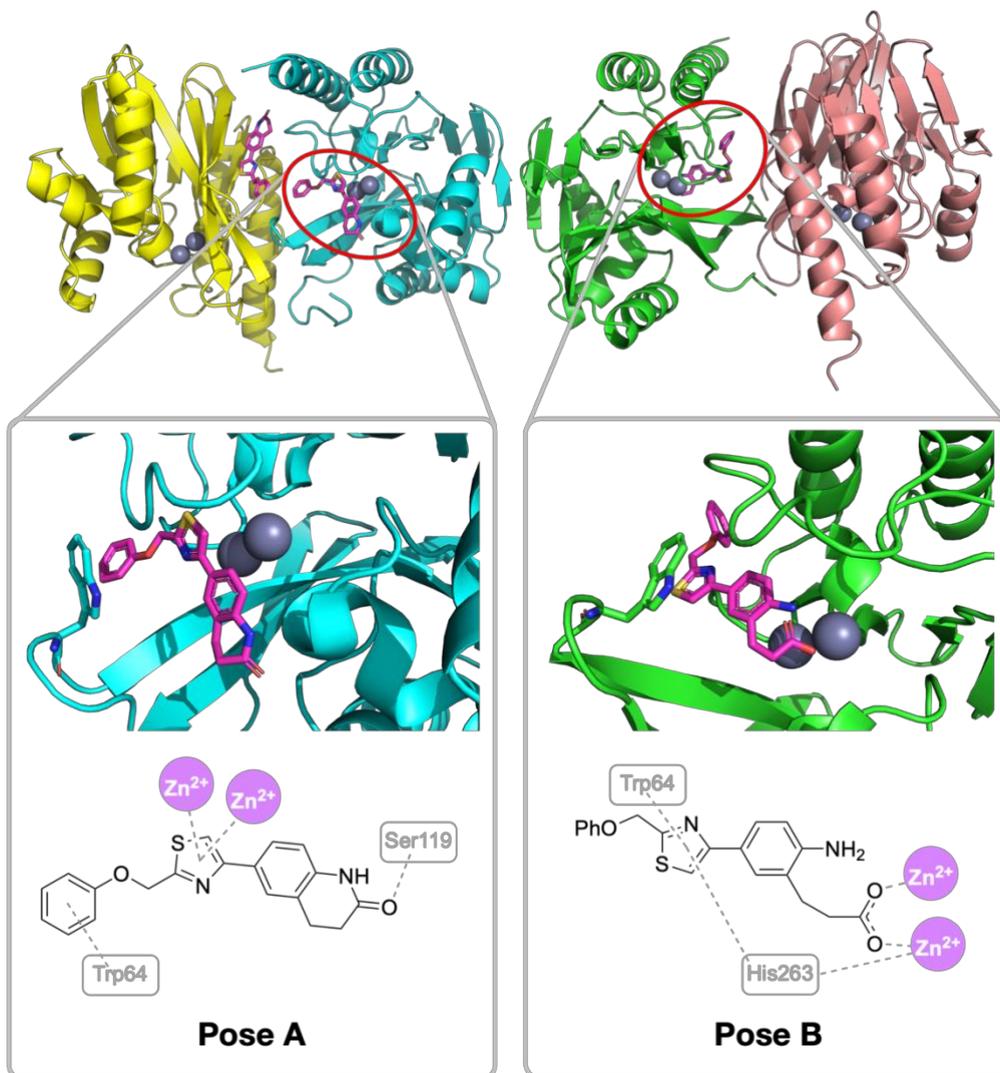


Figure 9. MBL 阻害活性を示した 3 化合物の構造

#### I. 1. 4. 2. ヒット化合物と MBL の相互作用解析

化合物 **1a** と IMP-1 の共結晶が得られた(Figure 10)。X 線結晶構造解析の結果、IMP-1 は単位格子中に 4 分子が含まれており、3 分子の化合物 **1a** が存在した。3 分子の化合物 **1a** のうち、2 分子が IMP-1 の活性部位に結合しており、もう 1 分子は 2 つの IMP-1 分子間に存在していた。IMP-1 活性部位に結合している化合物 **1a** のうち、1 分子は δ-ラクタム環の閉じたポーズ A の構造を、もう 1 分子は δ-ラクタム環の開裂したポーズ B の構造をとっていた。



**Figure 10.** 化合物 **1a** と IMP-1 複合体の結晶構造、ならびに化合物 **1a** の 2 つの結合ポーズ (PDB#; 6JKA)

#### I. 1. 4. 3. ヒット化合物 **1a** の構造改変

当研究室の近藤により、化合物 **1a** に対する初期の構造改変が行われた<sup>146</sup>。近藤は Figure 11 に示す化合物群を合成したが、化合物 **1a** より強い MBL 阻害活性を有する化合物は得られなかった。

化合物 **1a** の  $\delta$ -ラクタム環を  $\gamma$ -ラクタム環に置換した BK-も化合物 **1a** には及ばないが MBL 阻害活性を示した。一方で、ラクタム環のアミノ基を廃した化合物は MBL 阻害活性

を示さなかった。本章 3 節で述べた MD シミュレーションの結果と合わせ、化合物 **1a** は  $\delta$ -ラクタム環が MBL による加水分解を受け、生じたカルボキシ基が MBL 活性中心の  $Zn^{2+}$  と配位することで MBL 阻害活性を示すと示唆された。

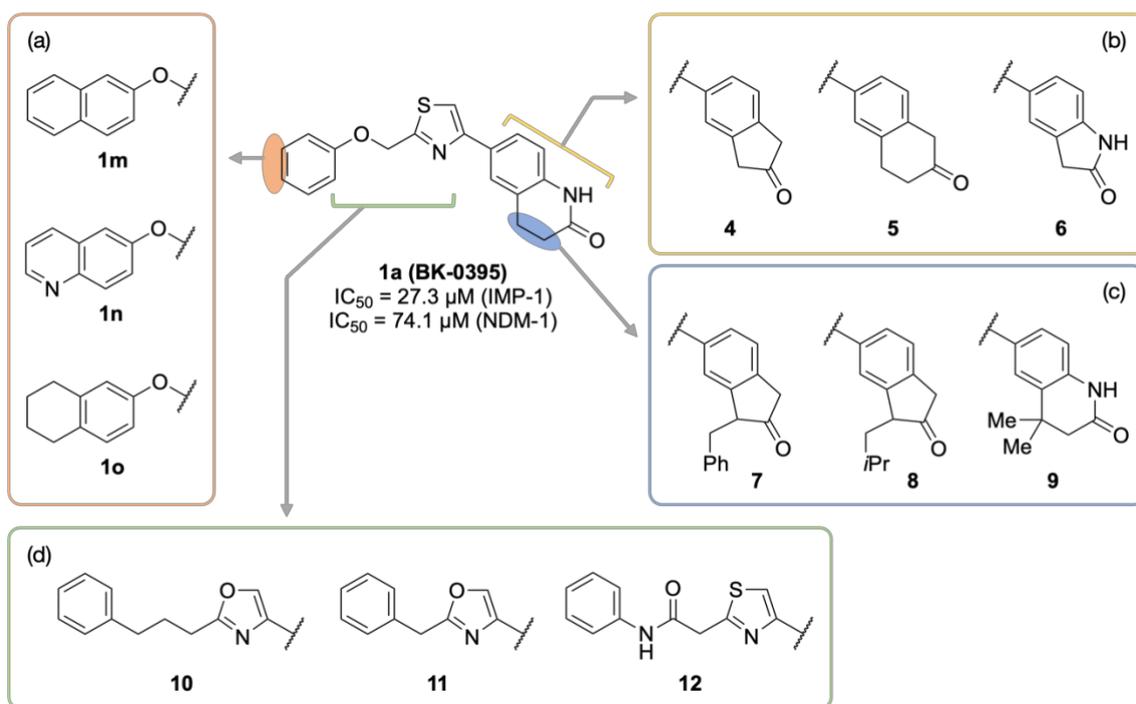


Figure 11. 先行研究で得られた化合物群<sup>146</sup>

## I.2. 目的と方法

「新規 MBL 阻害剤の創製」を目的とする。

当研究室における先行研究で得られた、MBL 阻害活性を示すヒット化合物 **1a** の構造を改変し、新規リード化合物を探索した。化合物設計には計算機解析を活用した。合成した候補化合物については、*in vitro* 試験により  $IC_{50}$  値を算出し、強く MBL を阻害する化合物については MBL との共結晶を作成し、構造活性相関を明らかにした。また、リード化合物の *in vivo* 試験も行い、実際に大腸菌内部で阻害剤がどのように作用するかの解析も進めた。本研究は、世界的な課題である薬剤耐性問題を解決する一助になるものである。

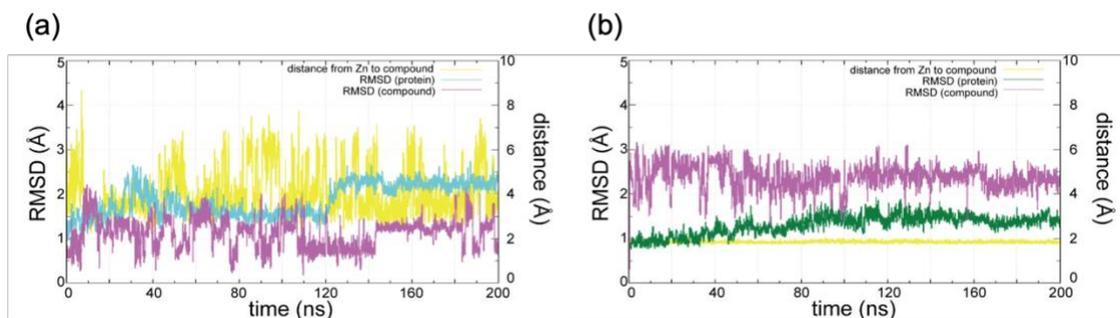
## I.3. 結果と考察

### I.3.1. 構造解析

#### I.3.1.1. MD シミュレーションによる結合構造の予測

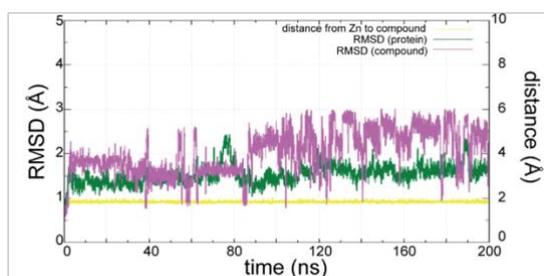
化合物 **1a** と IMP-1 複合体の分子動力学シミュレーションには Amber のソフトウェアを用いた<sup>59</sup>。X 線結晶構造解析の結果、化合物 **1a** は、IMP-1 の活性中心において、 $\delta$ -ラクタム環の閉じたポーズ A と、開裂したポーズ B の構造で結合していた。2 つの結合ポーズの安定性を比較し、IMP-1 との相互作用に寄与しているかを調べるため、それぞれの結晶構造から計算モデルを作成し、200 ns の MD シミュレーションを行った。化合物の原子価は、先行研究と同様、量子化学計算により決定した<sup>60-62</sup>。

200 ns のシミュレーション中、化合物 **1a** はポーズ A、B とともに IMP-1 の活性部位に留まっていたが、コンフォメーションは初期構造から変化していた。ポーズ A の相互作用が絶えず変化していたのに対し、ポーズ B の構造と  $Zn^{2+}$  間の最小距離の変動は小さく、ポーズ B の結合構造の安定性が示唆された。これらのシミュレーション結果から、化合物 **1a** は、 $\delta$ -ラクタム環の開裂したポーズ B が安定な結合構造であり、カルボキシル基と  $Zn^{2+}$  の結合が MBL 阻害活性に寄与していると結論付けた。カルボキシル基と金属イオンの結合は、当研究室で得られた、メタロエンザイムである炭酸脱水酵素 CA-II の結晶構造でも確認されている<sup>63</sup>。



**Figure 12.** (a) シミュレーション中の化合物 **1a**-ポーズ A と IMP-1 の RMSD および最も  $Zn^{2+}$  と近い原子の距離の変動. IMP-1 と化合物 **1a** の RMSD はそれぞれ水色と紫、最小距離は黄色で示す. (b) シミュレーション中の化合物 **1a**-ポーズ B と IMP-1 の RMSD および最も  $Zn^{2+}$  と近い原子の距離の変動. IMP-1 と化合物 **1a** の RMSD はそれぞれ緑と紫、最小距離は黄色で示す.

また、NDM-1 とアンピシリン複合体の結晶構造(PDB#; 6JKB)から、化合物 **1a** と NDM-1 の結合モデルを作成し、IMP-1 と同様に MD シミュレーションを行った。その結果、化合物 **1a** は NDM-1 中においても、ポーズ B の構造で安定に結合することが示唆された(Figure A3)。



**Figure 13.** シミュレーション中の化合物 **1a**-ポーズ A と NDM-1 の RMSD および最も  $Zn^{2+}$  と近い原子の距離の変動. NDM-1 と化合物 **1a** の RMSD はそれぞれ緑と紫、最小距離は黄色で示す.

先行研究において近藤の合成した、アミド結合を持たないケトン化合物 **4** および **5** は MBL

阻害活性を示さなかった(Figure 11b)。

以上の結果から、化合物 **1a** は MBL の酵素作用により  $\delta$ -ラクタム環が開裂し、MBL 活性中心の  $Zn^{2+}$  に配位することで MBL 阻害活性を示すと考えた。よって、化合物 **1a** の構造改変は、 $\delta$ -ラクタム環の閉じたポーズ A の構造で化合物を合成することとした。

### I. 3. 1. 2. IMP-1 変異体への対応

IMP-1 はカルバベネム系抗菌薬の使用で、より薬剤耐性の強い変異体への進化が促される。既知の MBL 阻害剤を用いた研究では、変異体によって基質の選択性が異なるという報告がある<sup>64</sup>。そこで、化合物 **1a** のポーズ B と IMP-1 の結晶構造を基に、IMP-1 変異体の計算モデルを作成し、Orientation プログラムによるドッキングシミュレーションを行った。

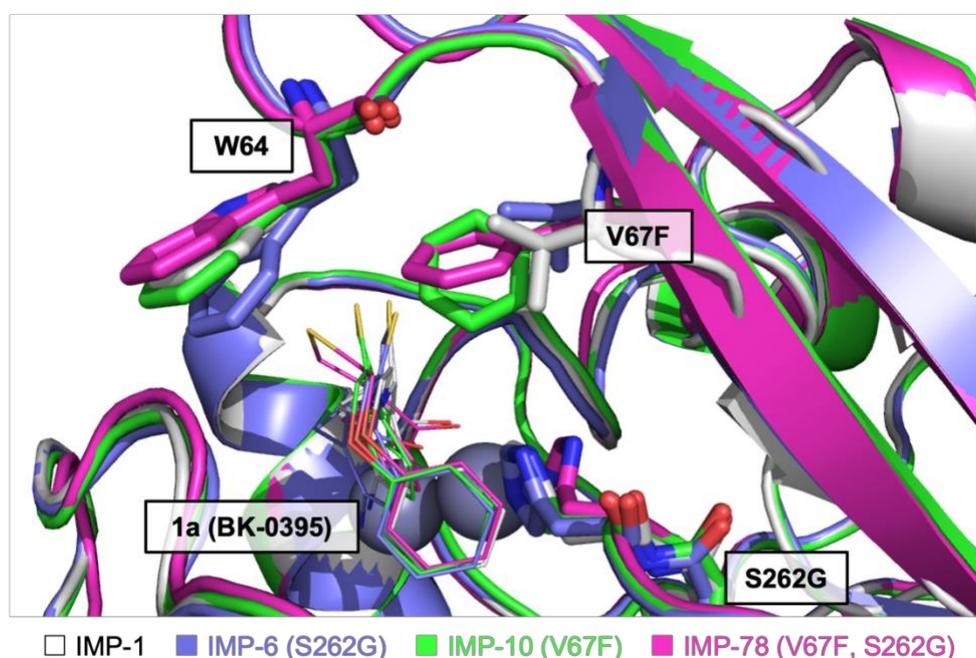
Orientation プログラムは、所属研究室で独自に開発された分子力場計算ソフトウェアである<sup>65</sup>。Orientation プログラムは、多数のモデルを並列して計算できる点、タンパク質全体の構造を最適化できる点に優位性があり、抗体と抗原の親和性予測や、HIV-1 の RNase H 阻害剤の相互作用解析にも活用された<sup>66,67</sup>。

シミュレーションには、IMP-6 (S262G), IMP-10 (V67F), IMP-78 (V67F, S262G) の 3 種類の変異体を用いた。これらの IMP 変異体産生菌は、それぞれ日本で初めて報告された<sup>18</sup>。シミュレーションの結果を Table 1 に示す。IMP-1 野生型と比較して、各変異体と化合物 **1a** の結合エネルギーに大きな違いはなかった。化合物 **1a** と IMP-1 各変異体の結合予測モデルを Figure 14 に示す。変異体のうち、IMP-10 と IMP-78 については、V67F 変異により化合物 **1a** のチアゾール環が押し出され、それに伴って Trp64 も外側に押し出されていた。チアゾール環と Trp64 の疎水性相互作用が消失しなかったことが、化合物とタンパク質の安定な結合の維持に寄与していると考えられる。S262G 変異により、隣接して  $Zn^{2+}$  に配位している His263 を不安定化させるが、IMP-6 と IMP-78 の結合モデルにおいて、化合物 **1a** の  $Zn^{2+}$  への配位には顕著な変化は見られなかった(資料未記載)。以上の結果から、ヒット化合物 **1a** は IMP-

1 変異体も均一に阻害し、MBL 阻害剤として有用であることが示唆された。

**Table 1.** Orientation プログラムを用いた IMP-1 変異体と化合物 **1a** の結合親和性比較

Variants	Mutations	Binding Score
IMP-1	-	-17.245
IMP-6	S262G	-17.782
IMP-10	V67F	-20.483
IMP-78	V67F, S262G	-18.946



**Figure 14.** 化合物 **1a** と IMP-1 変異体の結合予測モデル

### I. 3. 1. 3. 構造改変の戦略と化合物設計

近藤の研究から得られた構造活性相関の知見と、X線結晶構造解析の結果を踏まえ、新たな構造改変の戦略を立案した。Figure 15 に示すように、化合物 **1a** をその構造から A~C の 3 領域に分け、それぞれの構造改変を行うこととした。A 領域は MBL 活性中心と結合する  $\delta$ -ラクタム環を有する部位であり、IMP-1 との共結晶中において、メチレン部位の周辺にはス

ペースがある。B領域はチアゾール環を有し、周辺にはスペースがある。C領域は分子末端のフェノキシ部位であり、近藤の合成した化合物群にも、C領域に改変を加えた化合物が含まれていた(Figure 11a)。

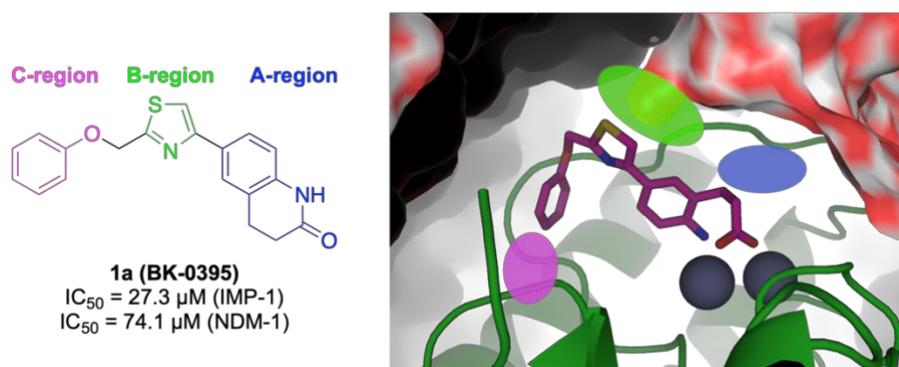


Figure 15. 化合物 1a の構造改変の戦略

リード化合物の設計には計算機解析を用いた。IMP-1 との共結晶構造データから抽出したヒット化合物 1a の構造を基に、OpenEye の構造設計ソフトウェア vBrood を用いて、数百から数千の化合物案を作成した。構造改変案を作成したのち、IMP-1 との大規模並列ドッキングシミュレーションによる *in silico* スクリーニング試験を行った。

ドッキングシミュレーションには、当研究室で独自に開発された分子力場計算ソフトウェアである Orientation プログラムを用いた。市販のドッキングシミュレーションソフトウェアと比較し、Orientation プログラムは、水分子の影響を考慮できる点、リガンドとタンパク質の複合体の構造全体を最適化できる点で優れている。

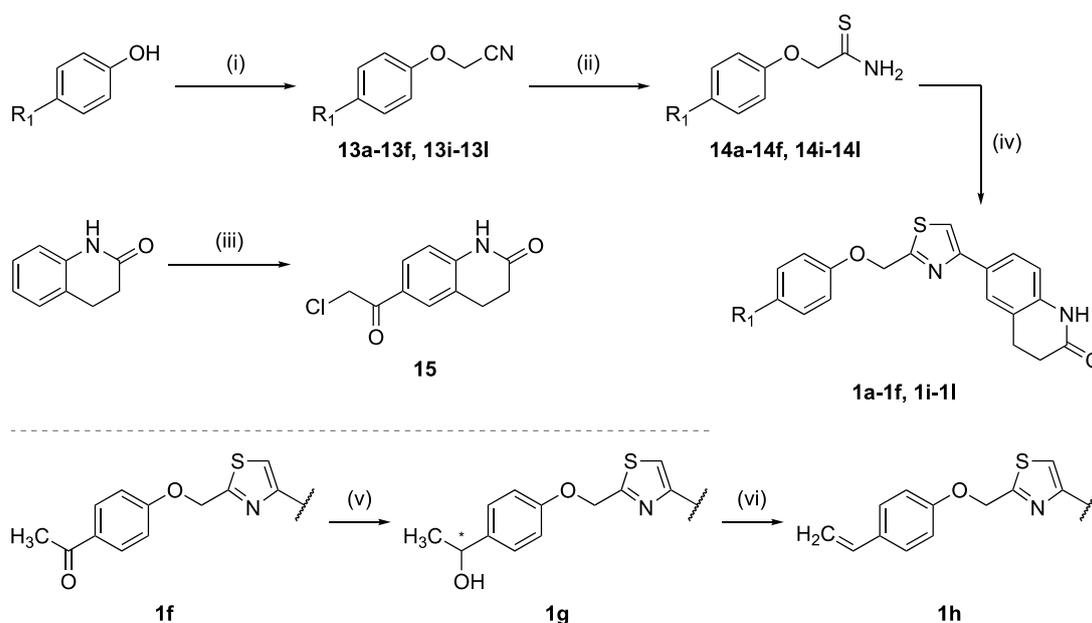
## I. 3. 2. 化合物の構造改変

### I. 3. 2. 1. C 領域の構造改変

化合物 1a と IMP-1 の X 線共結晶構造解析により、1a のベンゼン環パラ位周辺には空隙があることがわかっており、適切な置換基の導入で MBL 阻害活性が向上すると示唆された。

近藤はベンゼン環を二環構造に置換した類縁体 **1m**, **1n**, **1o** を合成したが、MBL 阻害活性は確認できなかったため、導入する置換基の検討が必要である(Figure 11a)。

化合物 **1a** およびその類縁体は、Scheme 2 の経路で合成した。フェノール誘導体とブロモアセトニトリルを用いた S<sub>N</sub>2 反応で化合物 **13** を得たのち、チオアセトアミドを用いてチオアミド化合物 **14** を得た。Friedel-Crafts 反応でキノリノン化合物 **15** を得たのち、化合物 **14** を用いて化合物 **1** を合成した。また、ビニル基を有する化合物 **1h** の合成には、ビニルポルフィリンの合成法である根矢法<sup>68</sup>を参考にした。アセチル基を有する化合物 **1f** を還元して化合物 **1g** を得たのち、脱水反応により化合物 **1h** を得た。



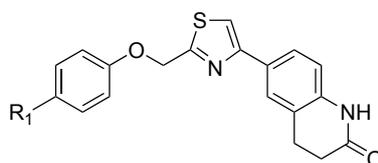
**Scheme 2.** 化合物 **1** の合成経路

Reagents and conditions: (i) Bromoacetonitrile (1.2 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq.), acetone, rt; (ii) thioacetamide (1.5 eq.), 4 M HCl, DMF, 1,4-dioxane, reflux; (iii) chloroacetyl chloride (1.7 eq.), AlCl<sub>3</sub> (3.0 eq.), CS<sub>2</sub>, reflux, 5 h, yield 98%; (iv) quinolinone **15** (1.0 eq.), EtOH, DMF, 80 °C; (v) NaBH<sub>4</sub> (10.0 eq.), CHCl<sub>3</sub>, MeOH, rt, 16 h, yield 90%; (vi) benzoyl chloride (25.0 eq.), dry DMF, 100 °C, 18 h under N<sub>2</sub>, yield 41%.

合成した化合物群の MBL 阻害活性を Table 2 に示す。ベンゼン環のパラ位にアルキル基、アルコキシド基、ハロゲン基を導入した類縁体と、二環構造を有する 4 つの類縁体の、計 15

個の類縁体を取得した。スクリーニング試験と同様の実験操作で MBL 阻害活性を測定したところ、エチル基を有する化合物 **1c** とビニル基を有する化合物 **1h** がより強い MBL 阻害活性を示した。電子供与性で水溶性のメトキシ基を有する **1b**、電子吸引性で脂溶性のプロモ基を有する **1k** が MBL 阻害活性を示さなかったことから、電子供与性かつ脂溶性置換基が有用であると示唆された。また、*tert*-ブチル基を有する **1d** が MBL 阻害活性を示さず、鎖状置換基が有用であると示唆された。以上の結果から、C 領域ベンゼン環のパラ位に、電子供与性かつ脂溶性の鎖状置換基を導入することで、MBL 阻害活性が向上するという有望な指針を得た。さらに、ビニル基を有する **1h** に比べ、エチル基を有する **1c** のほうが強い MBL 阻害活性を示したことから、置換基の回転の自由度が MBL との相互作用に寄与していると考えた。

**Table 2.** 化合物 **1a** およびその類縁体の MBL 阻害活性 (*in vitro*)



Compounds	R <sub>1</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)	
		IMP-1	NDM-1
<b>1a</b>	H	27.3	74.1
<b>1b</b>	Me	>100	>100
<b>1c</b>	Et	28.5	25.2
<b>1d</b>	<i>t</i> Bu	>100	>100
<b>1e</b>	OMe	>100	>100
<b>1f</b>	-COCH <sub>3</sub>	>100	>100
<b>1g</b>	-CH(OH)CH <sub>3</sub>	>100	>100
<b>1h</b>	-CH=CH <sub>2</sub>	52.0	58.6
<b>1i</b>	F	>100	>100
<b>1j</b>	Cl	>100	>100
<b>1k</b>	Br	>100	>100
<b>1l</b>	CF <sub>3</sub>	>100	>100

### I. 3. 2. 2. B 領域の構造改変

化合物 **1a** と IMP-1 の X 線結晶構造解析により、B 領域周辺の空隙を埋めることで MBL との相互作用が向上すると示唆された。チアゾール環 5 位への疎水性構造の導入は、分子全体の疎水性が向上し、化合物の溶解性が大幅に低下すると考えた。そのため、チアゾール部位を第三級アミンに置換し、ベンジル基を導入した化合物 **17a** を設計した(Figure 16)。

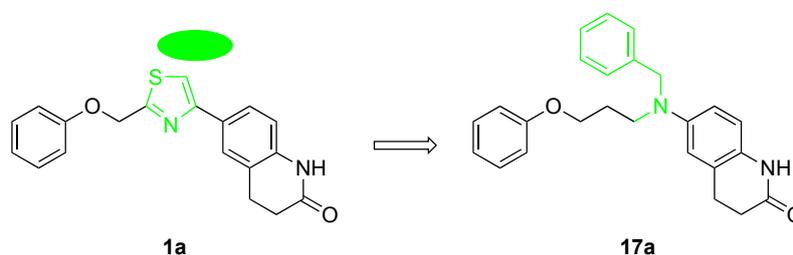
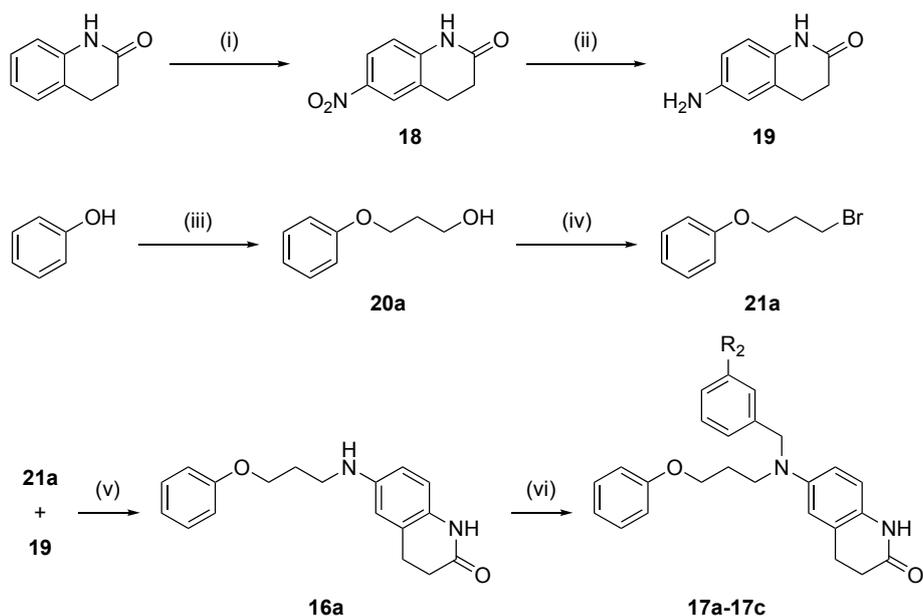


Figure 16. 化合物 **1a** および化合物 **17a** の構造

化合物 **17a** およびその類縁体は、Scheme 3 の経路で合成した。キノリノンのニトロ化と還元により、化合物 **19** を得た。フェノールと 3-ブロモ-1-プロパノールを用いた  $S_N2$  反応により化合物 **20a** を得たのち、三臭化リンを用いて臭素化した化合物 **21a** を得た。化合物 **19** と **21a** から前駆体 **16** を得たのち、塩化ベンジル誘導体を用いて化合物 **17** を合成した。



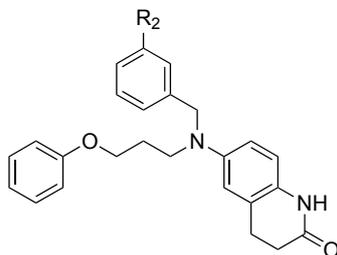
**Scheme 3.** 化合物 **17** の合成経路

Reagents and conditions: (i) 35% HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 0 °C, 30 min., yield 91%; (ii) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, MeOH, rt; (iii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.0 eq.), 3-bromo-1-phenol (1.0 eq.), acetone, 60 °C, 18 h, yield 92%; (iv) PBr<sub>3</sub> (0.5 eq.), dry Et<sub>2</sub>O, 0 °C, 18 h, yield 48%; (v) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 eq.), DMF, 60 °C, yield 11%; (vi) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 eq.), KI (1.0 eq.), DMF, 60 °C.

合成した化合物 **17a** は、ヒット化合物 **1a** よりも強い MBL 阻害活性を示した (Table 3)。化合物 **17a** の合成前駆体 **16a** は、化合物 **1a** と構造が似ているにも関わらず、MBL 阻害活性を示さなかった。また、化合物 **17a** では、IMP-1 の Trp64 と  $\pi$ - $\pi$  相互作用を形成していたチアゾール環構造を失ったにも関わらず、MBL 阻害活性を示した。そのため、B 領域の立体的な構造が、MBL との結合により重要な役割を果たしていると考えた。

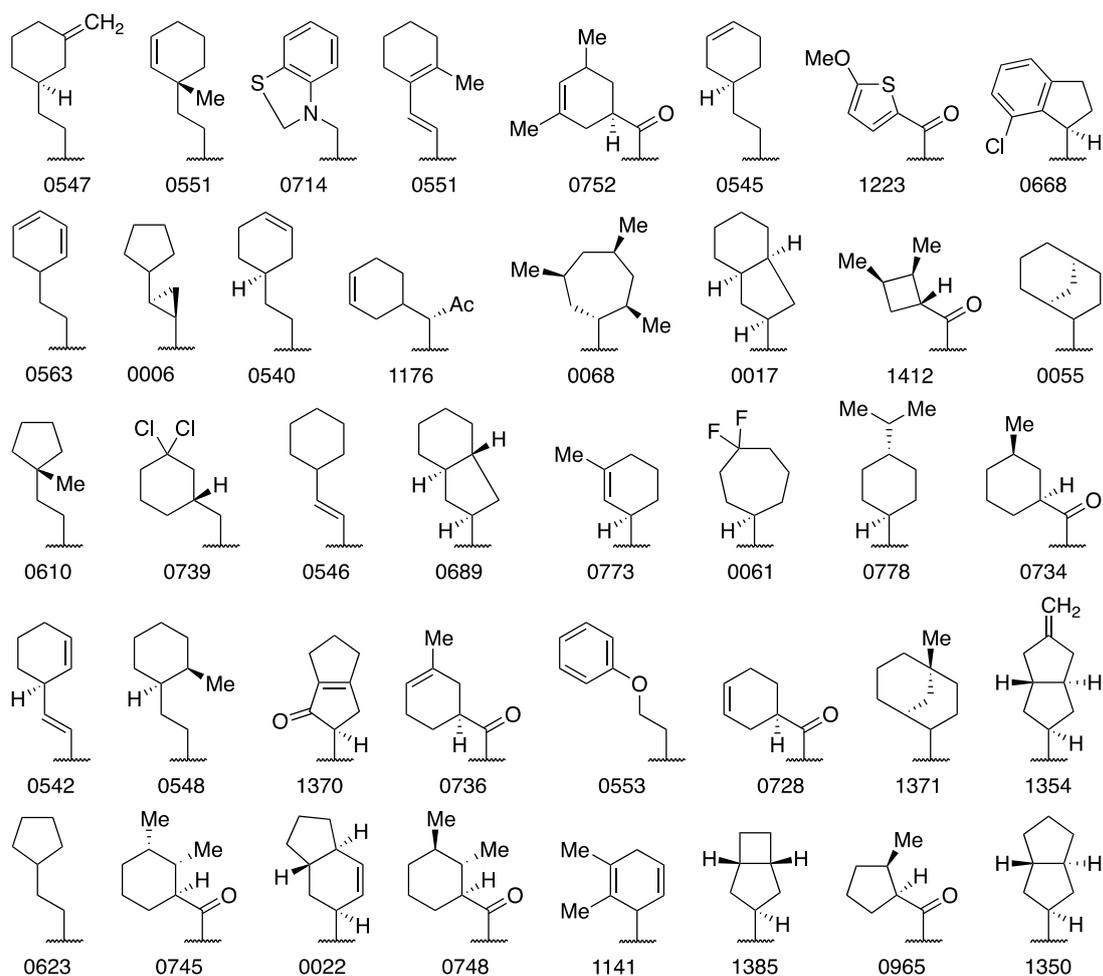
続いて、B 領域の構造を最適化するため、ベンジル基のベンゼン環メタ位にクロロ基とメトキシ基をそれぞれ導入した化合物 **17b** と **17c** を合成した。化合物 **17b** と **17c** は MBL 阻害活性を示さず、新たに導入したベンゼン環は、アミノ酸残基と  $\pi$ - $\pi$  相互作用を形成していないと考えた。

**Table 3.** 化合物 **17a** およびその類縁体の MBL 阻害活性 (*in vitro*)



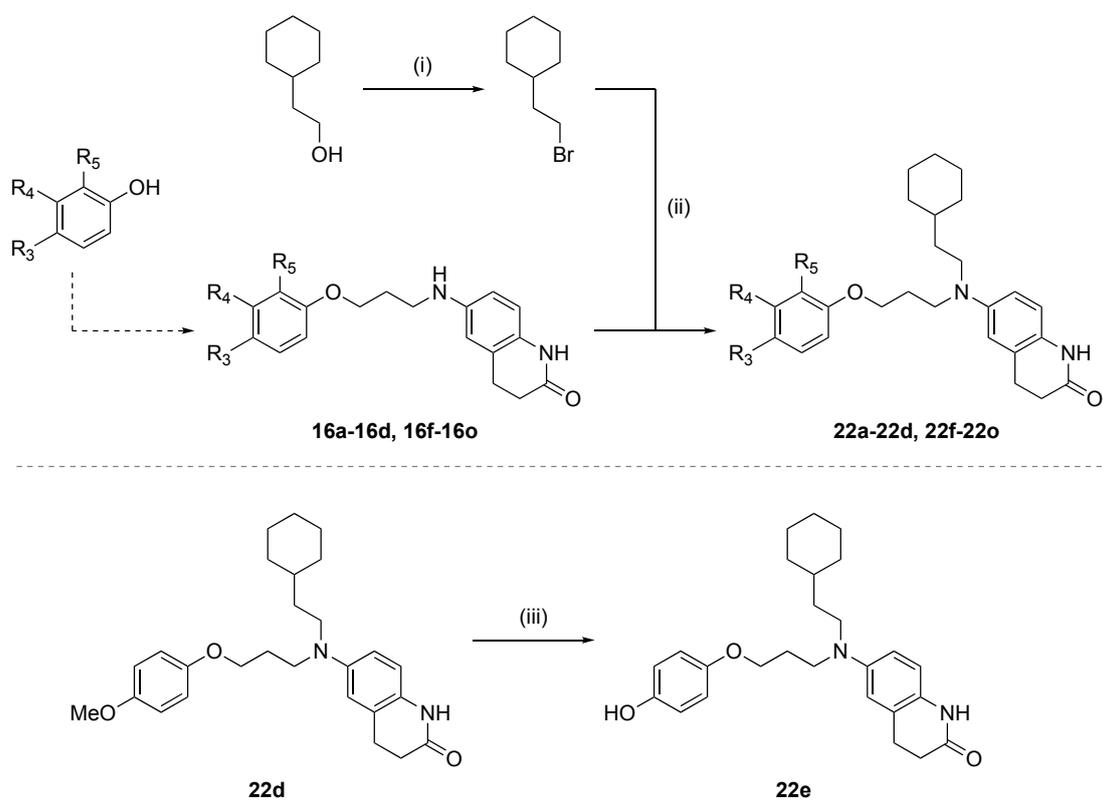
Compounds	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)	
		IMP-1	NDM-1
<b>1a</b>	-	27.3	74.1
<b>16a</b>	-	>100	>100
<b>17a</b>	H	28.5	25.2
<b>17b</b>	Cl	>100	>100
<b>17c</b>	OMe	11.6	98.9

そこで、化合物 **17a** の構造をベースに、B 領域のさらなる構造改変を行った。構造生成ソフトウェア vBrood を用いて、ベンジル基に改変を加えた 1421 個の構造改変案を作成したのち、Orientation プログラムを用いた並列ドッキングシミュレーションを行った。Orientation プログラムによる計算結果のうち、計算スコア上位の 40 構造を Figure 17 に示す。上位の 40 構造の中で、六員環構造とアミンを 2 つの炭素原子で繋いだ構造が多く見られたため、それらのベースとなるシクロヘキシル基を有する構造の化合物 **22a** を設計した。



**Figure 17.** Orientation プログラムで良好な結果を示した上位 40 個の構造。化合物番号は計算の際に用いたもの。

化合物 **22a** およびその類縁体は、Scheme 4 の経路で合成した。化合物 **17** の合成経路と同様、フェノール誘導体から前駆体 **16** を合成した。2-シクロヘキシルエタノールを臭素化したのち、前駆体 **16** との  $S_N2$  反応で化合物 **22** を合成した。ヒドロキシ基を有する化合物 **22e** は、メトキシ基を有する化合物 **22d** を脱メチル化することで得た。

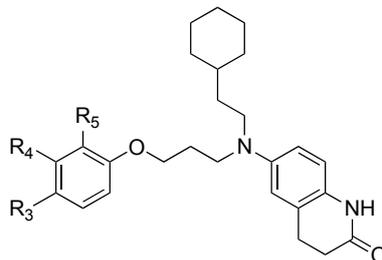


**Scheme 4.** 化合物 **22a** およびその類縁体の合成経路

Reagents and conditions: (i) PBr<sub>3</sub> (1.5 eq.), dry THF, 0 °C to rt, 6.5 h, yield 45%; (ii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq.), KI (1.0 eq.), DMF, 60 °C; (iii) BBr<sub>3</sub> (1.5 eq.), DCM, 0 °C, 15 min.

合成した化合物 **22a** は、化合物 **17a** よりも良好な MBL 阻害活性を示した (Table 4)。化合物 **22a** の構造に対し、C 領域のベンゼン環に置換基を導入した計 14 個の構造類縁体を合成したところ、パラ位にメチル基を有する化合物 **22b** が最も強い MBL 阻害活性を示した。

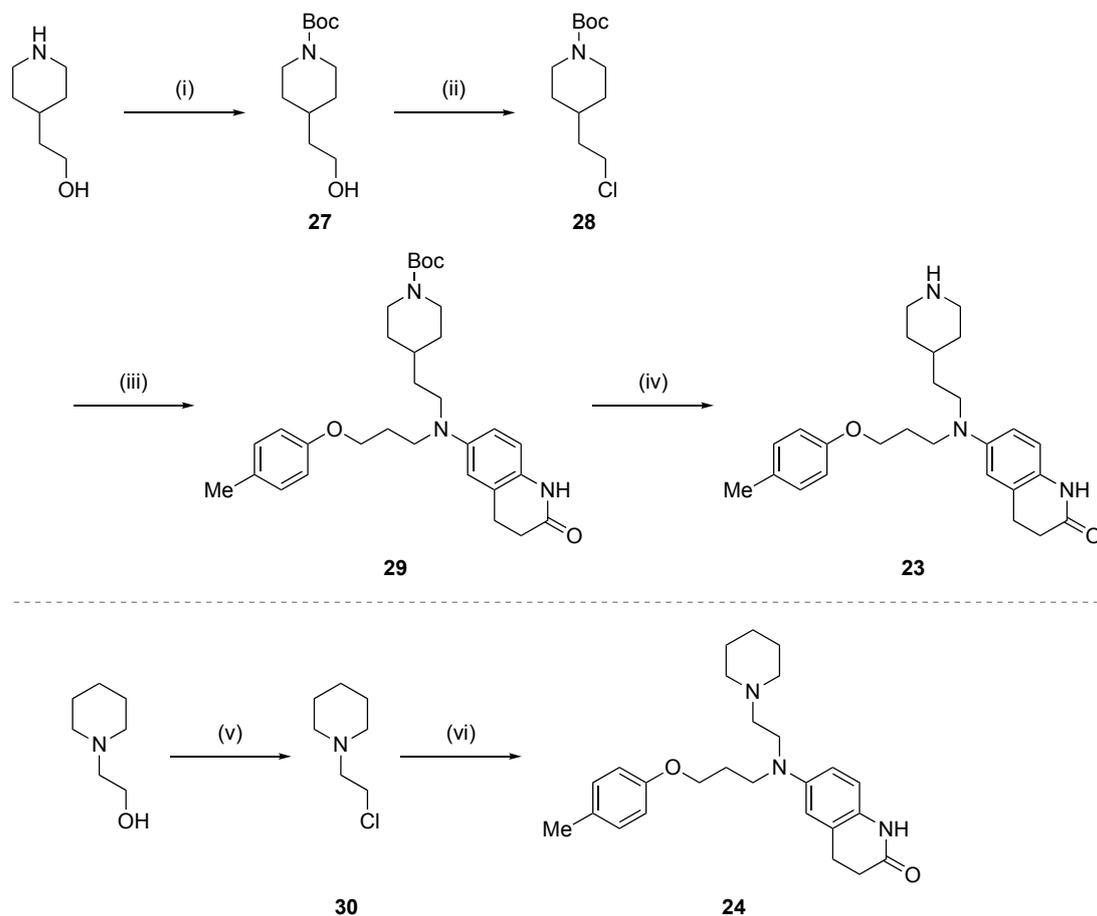
**Table 4.** 化合物 **22** およびその類縁体の MBL 阻害活性 (*in vitro*)



Compounds	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)	
				IMP-1	NDM-1
<b>1a</b>	-	-	-	27.3	74.1
<b>17a</b>	-	-	-	9.23	43.5
<b>22a</b>	H	H	H	4.14	38.6
<b>22b</b>	Me	H	H	4.81	33.0
<b>22c</b>	Et	H	H	22.9	43.3
<b>22d</b>	OMe	H	H	6.52	41.7
<b>22f</b>	NH <sub>2</sub>	H	H	>100	36.5
<b>22g</b>	CO <sub>2</sub> H	H	H	19.9	30.3
<b>22h</b>	F	H	H	7.14	27.4
<b>22i</b>	Cl	H	H	6.02	79.8
<b>22j</b>	Br	H	H	25.5	24.0
<b>22k</b>	I	H	H	8.69	17.7
<b>22l</b>	CF <sub>3</sub>	H	H	41.0	52.0
<b>22m</b>	H	Me	H	5.20	80.5
<b>22n</b>	H	H	Me	21.5	49.9
<b>22o</b>	Me	H	Me	25.9	26.1

化合物 **1a** と、C 領域と B 領域の改変で得られた化合物群は、溶解性が低いという問題があった。そのため、実際に大腸菌を用いた最小発育阻止濃度の測定ができていない。そこで、化合物 **22b** の構造をベースに、シクロヘキシル基に窒素原子を導入した 2 つの化合物 **23** と **24** を合成した(Scheme 5)。シクロヘキシル基の炭素一つを窒素に置換した化合物 **28** および **30** を得たのち、化合物 **22b** の合成と同様の経路で化合物 **23** および **24** をそれぞれ合成した。

化合物 **23** と **24** はいずれも MBL 阻害活性を示さず、B 領域周辺の結合ポケットを埋めるには、疎水性の高い構造が有用であるという知見を得た。



**Scheme 5.** 化合物 **23** および **24** の合成経路

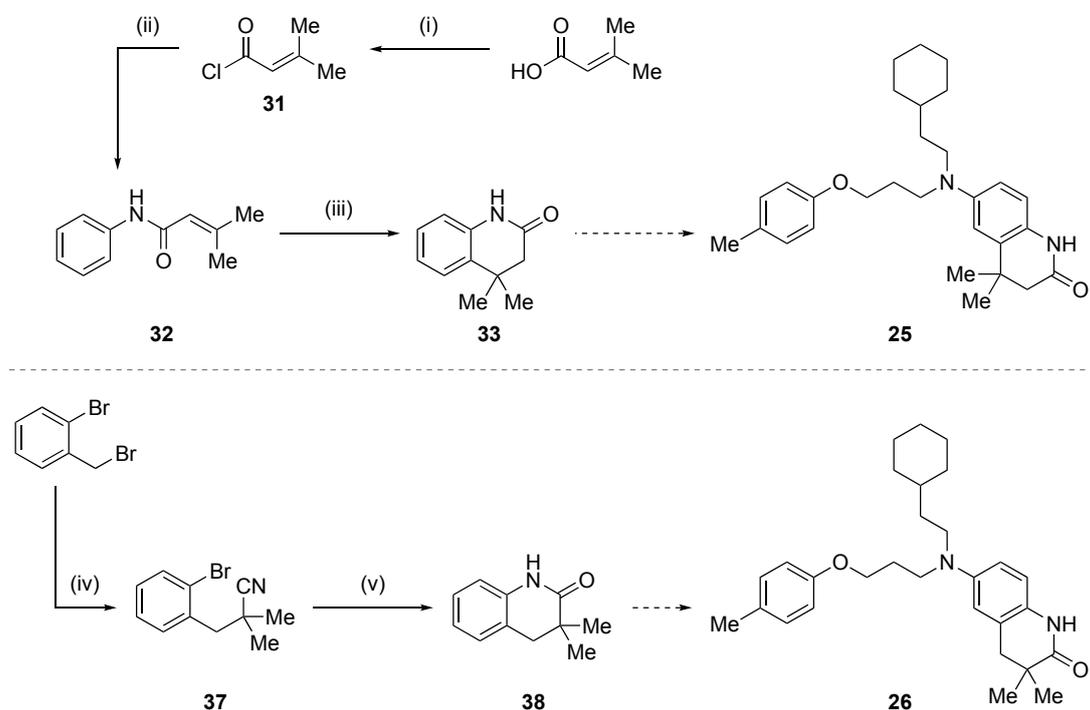
Reagents and conditions: (i)  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1.1 eq.), TEA (3.0 eq.), DCM, 0 °C to rt, 16 h, yield 97%; (ii)  $\text{CCl}_4$  (1.0 eq.),  $\text{PPh}_3$  (1.0 eq.), DCM, rt, 23 h, yield 63%; (iii)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2.0 eq.), KI (1.0 eq.), DMF, 60 °C, yield 62%; (iv) 4 N HCl, AcOEt, rt, 24 h, yield 71%; (v)  $\text{SOCl}_2$  (1.2 eq.), toluene, 0 °C to 60 °C, 3 h, yield 23%; (vi)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2.0 eq.), KI (1.0 eq.), DMF, 60 °C, yield 60%.

### I. 3. 2. 3. A 領域の構造改変

A 領域の構造改変は、化合物 **22b** の構造をベースに行った。近藤の先行研究から、A 領域の  $\delta$ -ラクタム環の周辺にある空隙を埋めると、MBL との相互作用が向上すると示唆され

た(Figure 11c)。そこで、化合物 **22b** の  $\delta$ -ラクタム環のメチレン部位にメチル基を2つずつ導入した化合物 **25** と **26** を合成した。

化合物 **25** および **26** は、Scheme 6 の経路で合成した。2つのメチル基を有するキノリノン化合物 **33** および **38** を得たのち、化合物 **22** の合成と同様の経路で化合物 **25** および **26** をそれぞれ合成した。



**Scheme 6.** 化合物 **25** および **26** の合成経路

Reagents and conditions: (i)  $\text{SOCl}_2$  (1.5 eq.), cat. DMF, dry DCM, 0 °C to 50 °C, 1 h; (ii) DIPEA (2.0 eq.), dry DCM, rt, 2.5 h, yield 70%; (iii)  $\text{AlCl}_3$  (2.0 eq.), dry DCM, reflux, 1 h, yield 65%; (iv) isobutyronitrile (1.3 eq.), LiHMDS (2.0 eq.), dry THF, rt, 15 h, yield 96%; (v)  $\text{CuI}$  (3.00 mol%), KI (1.00 mol%), *N*-acetylglycine (6.00 mol%), NaOH (3.0 eq.), *t*BuOH, 100 °C, 48 h, yield 30%.

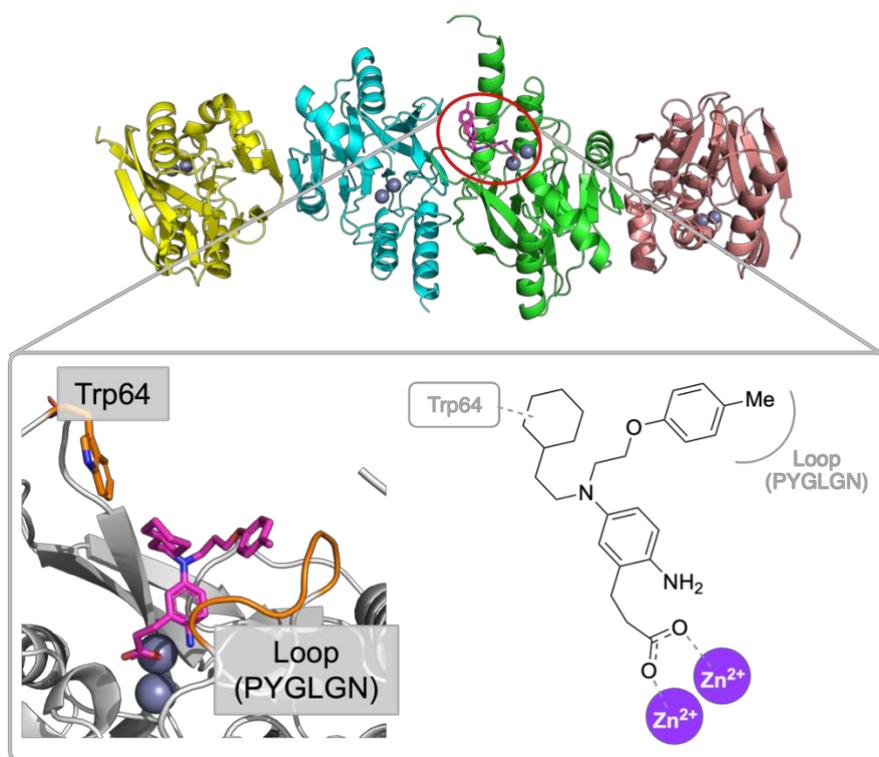
**Table 5.** 化合物 **23** – **26** の MBL 阻害活性 (*in vitro*)

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM)	
	IMP-1	NDM-1
<b>22b</b>	4.81	33.0
<b>23</b>	>100	>100
<b>24</b>	>100	>100
<b>25</b>	4.48	14.9
<b>26</b>	>100	7.73

#### I. 3. 2. 4. 化合物 **22b** と IMP-1 の相互作用解析

当研究室の郭によって、化合物 **22b** と IMP-1 の共結晶が取得された(Figure 18)。ヒット化合物 **1a** と IMP-1 の共結晶と同様、IMP-1 は単位格子中に 4 分子が含まれていた。化合物 **22b** は 1 分子が存在しており、 $\delta$ -ラクタム環が開裂した構造で活性中心の Zn<sup>2+</sup> と結合していた。Trp64 とループ構造(PYGLGN)に挟まれるような形で、結合ポケットに入り込んでおり、シクロヘキシル基が Trp64 と、*p*-メチルフェノキシ基がループ部位とそれぞれ疎水性相互作用を形成していた。このことは、B 領域には疎水性の構造が有用であるという知見と一致した。

今後は MD シミュレーションを行い、化合物 **22b** が MBL を阻害する詳細なメカニズムを明らかにする必要がある。



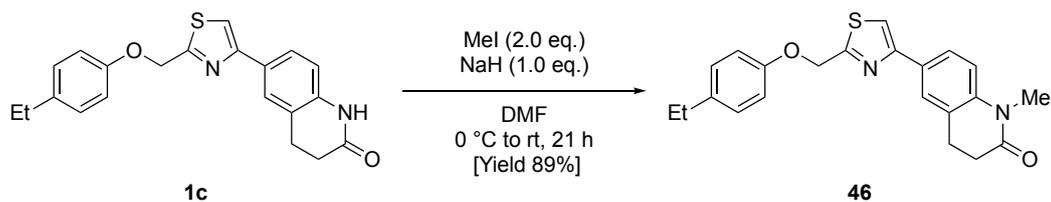
**Figure 18.** 化合物 **22b** と IMP-1 複合体の結晶構造、ならびに化合物 **22b** の結合構造

### I. 3. 2. 5. 溶解性の改善

前述の通り、ここまでで得られた化合物群は溶解性が低いという課題がある。そのため、MBL 阻害活性を維持しつつ、溶解性の向上を目指した構造改変を行った。

化合物 **1c** の  $\delta$ -ラクタム環アミド基をメチル化した化合物 **46** を合成した。アミド基をメチル化することで、融点が下がり、溶解性が向上すると期待したが、化合物 **46** は MBL 阻害活性を示さなかった(Table 6)。

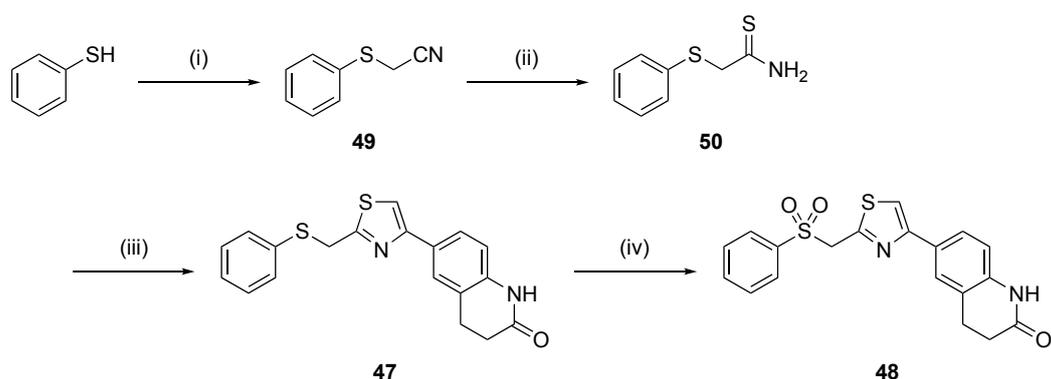
化合物 **46** の合成は Scheme 8 に示した。エチル基を有する化合物 **1c** の  $\delta$ -ラクタム環をメチル化し、化合物 **46** を得た。



**Scheme 7.** 化合物 **46** の合成

続いて、化合物 **1a** のエーテル部位をスルホキシドに変換した化合物 **48** を合成した。化合物 **1a** と IMP-1 の X 線結晶構造解析より、化合物 **1a** のエーテル部位は MBL の外側に位置しているため、親水性の構造に置き換えることで、溶媒との親和性が向上し、溶解性が改善すると期待した。当研究室で小児がん治療薬の創製を目的に行われている、TrkB 阻害剤の探索研究において、溶媒に面したスルフィド部位を酸化してスルホキシドにするアプローチがなされており、本研究でもそれを参考にした。なお、TrkB 阻害剤の探索研究については、本論文の第 III 章にて詳述する。

化合物 **48** は Scheme 8 の経路で合成した。チオフェノールを出発物質として、化合物 **1** の合成と同様の経路でスルフィド化合物 **47** を得たのち、酸化反応によってスルホキシド化合物 **48** を得た。



**Scheme 8.** 化合物 **48** の合成経路

Reagents and conditions: (i) bromoacetonitrile (1.2 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2.0 eq.), acetone, rt, 5 h, quant.; (ii) thioacetamide (1.5 eq.), 4 M HCl, DMF, 1,4-dioxane, reflux, 23 h, yield 3.9%; (iii) compound **15**, EtOH, DMF, reflux, 19 h, yield 75%; (iv) *m*CPBA (4.0 eq.), DCM, 0 °C, 14.5 h, yield 42%.

合成した化合物 **48** は、MBL 阻害活性は示さなかったものの、溶解性の改善が確認できた。そのため、MBL 阻害活性に寄与する化合物 **22** などの基本構造をベースとして、溶媒側に適切な親水性の構造を導入することで、MBL 阻害活性と溶解性を両立できると考えている<sup>69,70</sup>。

**Table 6.** 化合物 **46–48** の MBL 阻害活性 (*in vitro*)

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM)	
	IMP-1	NDM-1
<b>46</b>	>100	>100
<b>47</b>	>100	>100
<b>48</b>	>100	>100

### I. 3.3. 発展：抗がん剤を目指した K-Ras G12D 阻害剤への応用

Ras は、細胞の増殖関わるタンパク質であり、K-Ras, N-Ras, H-Ras が存在する<sup>71-74</sup>。なかでも、K-Ras 遺伝子の変異は、膵臓がん患者の 95%以上に認められている。当研究室では、抗がん剤の開発を目指した K-Ras G12D 変異体阻害剤の探索研究が進められている。スクリーニング試験において、化合物 **22g** がヒット化合物として同定された。現在、化合物 **22g** と K-Ras G12D 変異体の結合構造の解明、ならびに阻害剤の探索が当研究室で進められている。

## I.4. 小括

薬剤耐性菌の世界的な蔓延は、早急に取り組むべき課題である。本研究では、幅広い β-ラクタム系抗菌薬を分解する酵素である、メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)を阻害する化合物を合成した。

先行研究で得られたヒット化合物 **1a** は、分子内に δ-ラクタム環を持つ。X 線結晶構造解析および MD シミュレーションの結果から、化合物 **1a** は MBL の酵素作用で δ-ラクタム環

が開裂し、MBL 活性中心の  $Zn^{2+}$  に結合して阻害作用を示すと考えた。また、当研究室で独自に開発した Orientation プログラムを用いたドッキングシミュレーションを行い、化合物 **1a** は薬剤耐性の強い IMP-1 変異体にも対応できることが示唆された。

化合物 **1a** を ABC の 3 領域に分け、それぞれの領域の構造最適化を行なった。C 領域のベンゼン環パラ位にエチル基を導入した化合物 **1c** で MBL 阻害活性が向上し、脂溶性かつ電子供与性の置換基が有用であるとの知見を得た。B 領域のチアゾール環を第三級アミンに置換し、ベンジル基を導入した化合物 **17a** で MBL 阻害活性が向上した。計算機設計により、化合物 **17a** を改変した化合物 **22a** と **22b** は、さらに MBL 阻害活性が向上した。化合物 **22b** と IMP-1 複合体の X 線結晶構造解析の結果、化合物 **22b** のシクロヘキシル基と *p*-メチルフェノキシ基が IMP-1 と疎水性相互作用を形成していることがわかった。

また、取得した化合物群は溶解性が低いことが課題であり、溶解性を改善するための構造改変を行った。化合物 **1a** の IMP-1 結合構造において、溶媒側に位置するエーテル部位をスルホキシドに変換した化合物 **48** は、溶解性は向上したが、MBL 阻害活性を示さなかった。

本研究において、良好な MBL 阻害活性を示す化合物 **22b** が得られた。化合物の A 領域には構造を最適化する余地があり、また、溶解性の改善という課題を抱えている。今後は、化合物 **22b** の構造をベースにさらなる構造改変を進めていく。

## 第 II 章

### インフルエンザウイルス治療薬を目的とした新規 PA<sub>N</sub> 阻害剤の探索

#### == 目次 ==

<b>II. 1. 背景</b>	p.41
II.1. 1. インフルエンザウイルス	
II.1. 1. 1. インフルエンザ	
II.1. 1. 2. 既存の抗インフルエンザウイルス薬	
II.1. 1. 3. CEN   キャップ依存性エンドヌクレアーゼ活性	
II.1. 2. PA <sub>N</sub> 阻害剤の探索	
II.1. 2. 1. 既知の PA <sub>N</sub> 阻害剤	
II.1. 2. 2. BXM   バロキサビル・マルボキシル	
II.1. 3. 当研究室における PA <sub>N</sub> 阻害剤の探索研究	
II.1. 3. 1. ヒット化合物のスクリーニング試験	
II.1. 3. 2. ヒット化合物と PA <sub>N</sub> の相互作用解析	
II.1. 3. 3. 化合物 <b>51a</b> の部分構造の PA <sub>N</sub> 阻害活性	
II.1. 3. 4. 化合物 <b>51a</b> の類縁体構造	
<b>II. 2. 目的と方法</b>	p.53
II.2. 1. 目的	
II.2. 2. 方法：構造改変の戦略	
<b>II. 3. 結果と考察</b>	p.54
II.3. 1. 構造改変：芳香環構造の伸長	

II.3.2. Orientation プログラムを用いた予備検討

II.3.3. 化合物の設計

II.3.4. PAN 阻害剤の合成

II.3.4.1. チアゾール化合物 **64** の合成

II.3.4.2. トリアゾール化合物 **65** の合成

II.3.4.3. トリアゾール化合物 **66** の合成

II.3.4.4. オキサジアゾール化合物 **67** の合成

## II.4. 小括

p.66

## II.1. 背景

### II. 1.1. インフルエンザウイルス

#### II. 1.1.1. インフルエンザ

インフルエンザは、インフルエンザウイルスの感染により発症する急性呼吸器疾患であり、冬季に流行する<sup>75</sup>。38℃以上の発熱や頭痛、関節痛、筋肉痛といった諸症状に加え、喉の痛みや鼻汁、咳など感冒用症状も併せて見られる。約1週間の経過で軽快するが、高齢者は重篤化や死亡のリスクが、小児では中耳炎や熱性痙攣を併発するリスクが高まる。

インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルス科に属するRNAウイルスである (Figure 19)<sup>76</sup>。抗原の違いによりA, B, Cの3型に分類され、中でも世界的な大流行“パンデミック”を引き起こすのは、A型インフルエンザウイルスである。A型インフルエンザウイルスは、ウイルス表面に存在する抗原性の糖タンパク質であるヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)の違いにより、HA亜型(H1-H16)とNA亜型(N1-N9)に細かく分類される<sup>77,78</sup>。

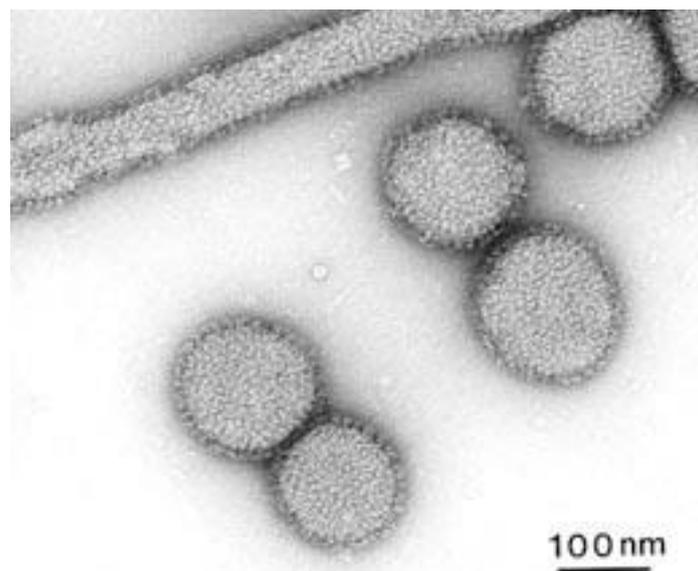
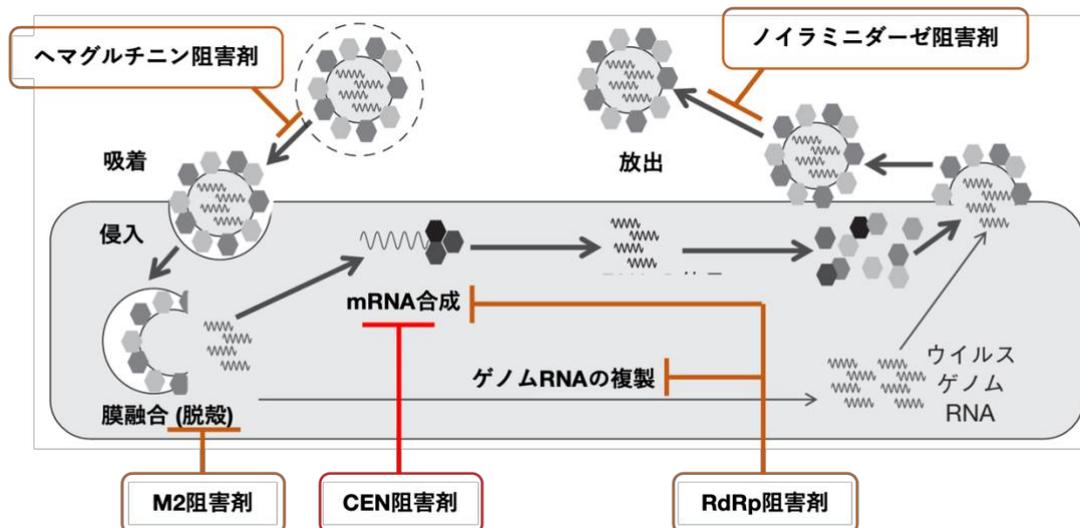


Figure 19. インフルエンザウイルスの電子顕微鏡図<sup>75</sup>

インフルエンザは数十年周期でパンデミックを引き起こす。古くは 1918 年の“スペインかぜ(A/H1N1)”に始まり、1968 年の香港インフルエンザ(A/H3N2)、1977 年のソ連インフルエンザ、2009 年のいわゆる“新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)”などを人類は経験してきた。新型のインフルエンザウイルスが出現し、免疫を持たない人々への感染が拡大することで、これらのパンデミックが引き起こされると言われている。既存の抗ウイルス薬には薬剤耐性変異株が出現しているため、次のパンデミックに備え、新規作用機序を有する治療薬の開発が急務である。インフルエンザウイルスの増殖メカニズムを以下に示す(Figure 20)<sup>79</sup>。

- i. 吸着：ウイルスがヘマグルチニン(HA)によって宿主細胞の表面に吸着し、HA は細胞表面の糖タンパク質当部分のシアル酸残基と結合する。
- ii. 侵入・脱殻：吸着したウイルスは、細胞のエンドサイトーシスによって細胞内に自然に取り込まれる。このとき、イオンチャネル型の M2 タンパク質がウイルス内部に H<sup>+</sup>を取り込み、ウイルス中の酸性度を上げることで、ウイルス外被を構成するタンパク質が破壊される。
- iii. 複製：細胞質に放出されたりボ核タンパク質は核内に移行し、ウイルス RNA の転写による mRNA 合成と、ウイルスゲノム RNA (vRNA)の複製が別々に行われる。
- iv. 放出：再構成・成熟したウイルスは、ノイラミニダーゼ(NA)が細胞表面の糖鎖をシアル酸残基で切り離すことで、細胞外に放出される。



**Figure 20.** インフルエンザウイルスのライフサイクルと創薬ターゲット. (文献 80 に記載の図を改変して使用)

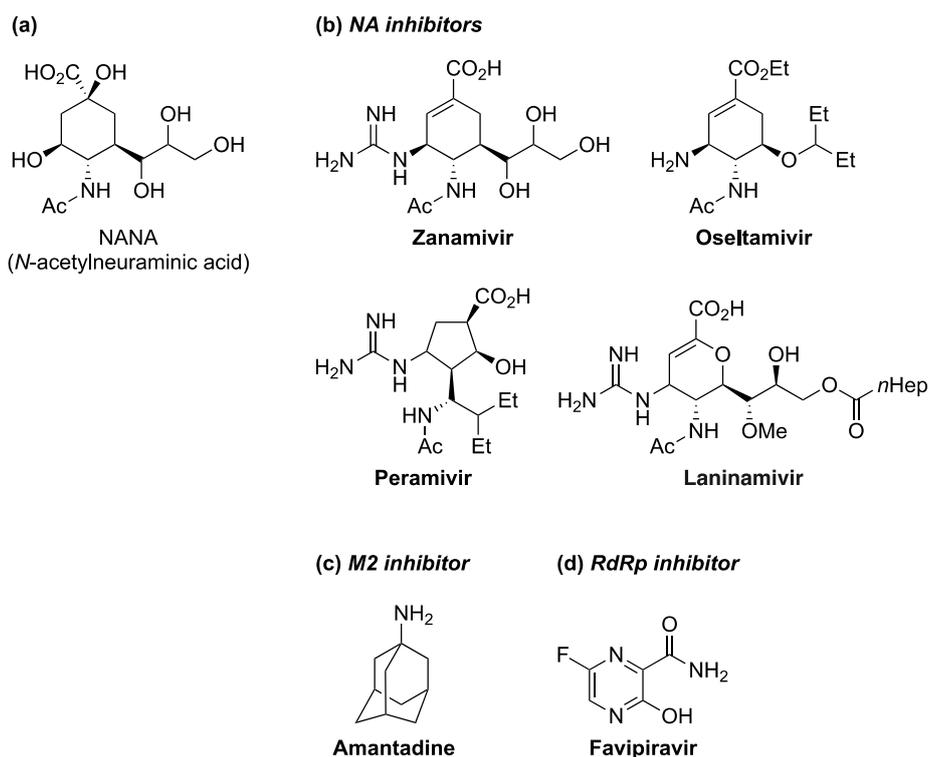
## II. 1.1.2. 既存の抗インフルエンザウイルス薬

日本で承認販売されている抗インフルエンザウイルス薬を Figure 21 に示した。

ヘマグルチニン(HA)は宿主細胞の表面に突き出た *N*-アセチルノイラミン酸(NANA)を認識して結合するので、NANA に似た分子があれば HA 阻害剤になりうるが、未だ開発されていない。

ノイラミナーゼ(NA)を阻害することで感染細胞からウイルスが放出されなくなるので、増殖を食い止めることができる。日本で承認されている抗インフルエンザウイルス薬の多くは NA 阻害剤である。ザナミビルは水溶性が高く、腸管膜を通過できないため経口投与できない<sup>81</sup>。オセルタミビルは疎水性を向上させた薬剤であり、使い勝手がよく汎用されたため、薬剤耐性変異株が多く報告された<sup>84</sup>。

M2 タンパク質を阻害することでウイルスは脱殻しないので、vRNA が宿主細胞に入らない。A 型インフルエンザの M2 阻害剤にアマンタジンがあるが、近年流行しているインフルエンザのほとんどはアマンタジン耐性であるため、ほとんど使用されていない<sup>82,83</sup>。



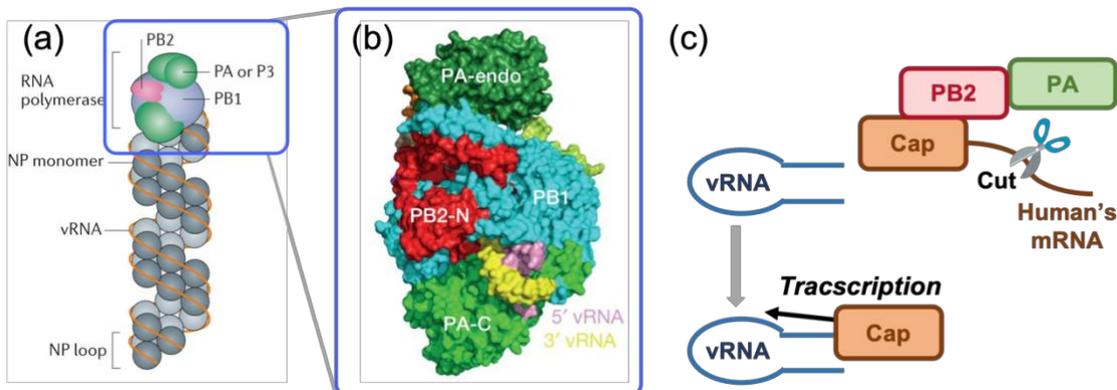
**Figure 21.** (a) NANA の構造. (b, c, d) 日本で承認されている抗インフルエンザウイルス薬

### II. 1. 1. 3. CEN | キャップ依存性エンドヌクレアーゼ活性

インフルエンザウイルスのゲノム(vRNA)は、8 本に分節化された一本鎖 RNA である。RNA 合成における基本ユニットである vRNP 複合体(vRNP; viral ribonucleoprotein complex)は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)とヌクレオキャプシドタンパク質(NP)が結合している(Figure 22a)。さらに、vRNP 複合体の RdRp 領域は、PB1, PB2, PA の 3 つのサブユニットから構成される(Figure 22b)。PB1 サブユニットの N 末端に PA サブユニットの C 末端が、PB1 サブユニットの C 末端に PB2 サブユニットの N 末端が結合している。RdRp 阻害剤としてファビピラビルが上市されたが、副作用として催奇形性があり、他の治療薬が無効または効果不十分の場合のみの使用に限られている(Figure 21d)<sup>89-91</sup>。

インフルエンザウイルスは、自身で RNA 合成を行うことができず、宿主細胞内で増殖を行う必要がある。RdRp の PB2 サブユニットが宿主の未成熟 RNA の 5'末端にあるキャップ構造を認識し、結合する。その後、PA サブユニットの N 末端(PA<sub>N</sub>)がエンドヌクレアーゼ活

性によりキャップ構造を切り離し、切断されたキャップ構造は mRNA 合成のためのプライマーとして PB1 サブユニットに利用される(Figure 22c)<sup>85, 86</sup>。この過程は“キャップ・スナッチング”と呼称され、PA サブユニットのエンドヌクレアーゼ活性は、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ活性(CEN; Cap-dependent Endonuclease)と言われる。CEN はインフルエンザウイルスの型/亜型間で保存性が高く、また、ヒトは PA サブユニットに相同する遺伝子を持たないため、PA サブユニットは抗インフルエンザウイルス薬の標的として有望である。

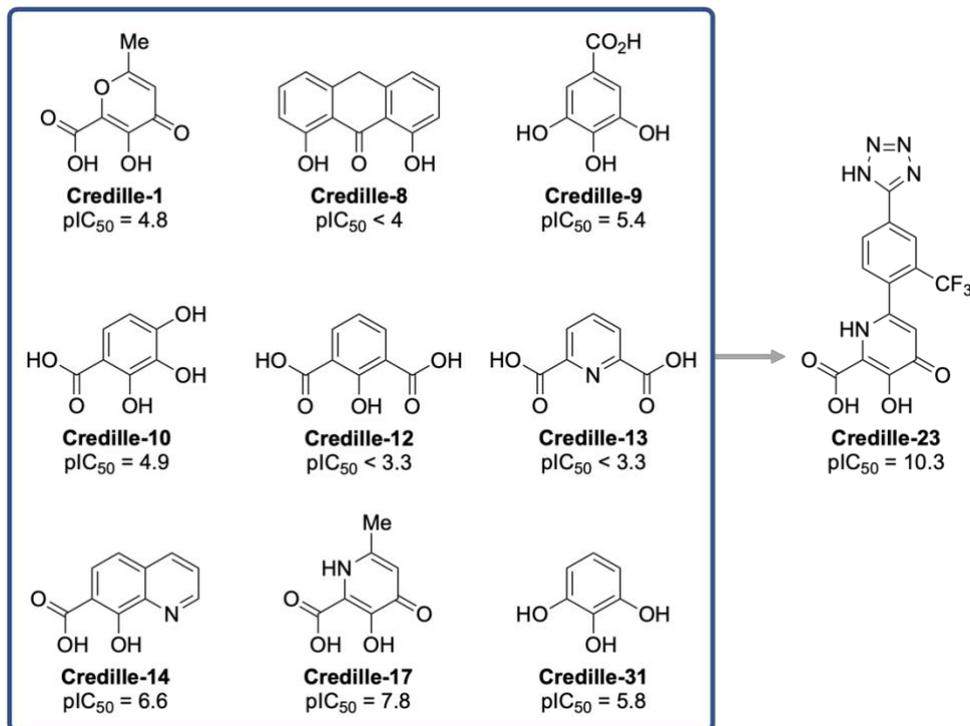


**Figure 22.** (a) vRNP の構造<sup>87</sup>. (b) RdRp の構造<sup>88</sup>. (c) キャップ・スナッチングの模式図.

## II. 1.2. PAN 阻害剤の探索

### II. 1.2.1. 既知の PAN 阻害剤

現在、多くのグループが PAN 阻害剤の開発研究に取り組んでいる。Cohen らのグループは、メタロエンザイムに作用する小分子のライブラリを構築した(Figure 23)<sup>93</sup>。ライブラリの中には、3 つのヒドロキシ基を有するピロガロールなどが含まれている。小さい分子(フラグメント)を足がかりにリード化合物を探索する、FBDD (Fragment-based Drug Design)に基づいた PAN 阻害剤の探索が行われ、リード化合物が取得された<sup>94-96</sup>。この小分子ライブラリを用いた MBL 阻害剤の探索研究も行われており、メタロエンザイム阻害剤の開発ノウハウを標的タンパク質間で活用できる可能性が示された<sup>97</sup>。

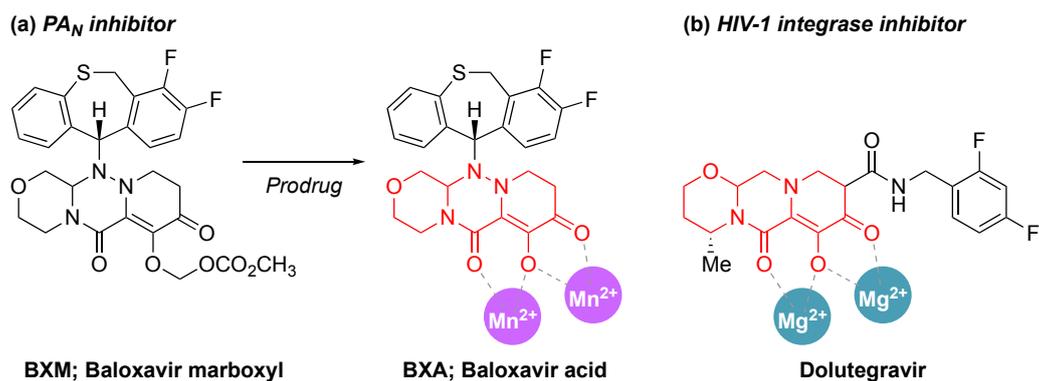


**Figure 23.** Cohen らの構築した  $PA_N$  と相互作用する小分子ライブラリの一例と  $PA_N$  阻害剤

## II. 1. 2. 2. BXM | バロキサビル・マルボキシル

2019 年、塩野義製薬から  $PA_N$  阻害作用を有するインフルエンザウイルス治療薬として、バロキサビル・マルボキシル(BXM; 商品名 ゾフルーザ)が上市された(Figure 24a)<sup>80, 98, 99</sup>。BXM はプロドラッグであり、メトキシカルボニロキシメチル基(-CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>)が外れてバロキサビル酸(BXA)となり、 $PA_N$  活性中心の  $Mn^{2+}$  イオンと結合する。

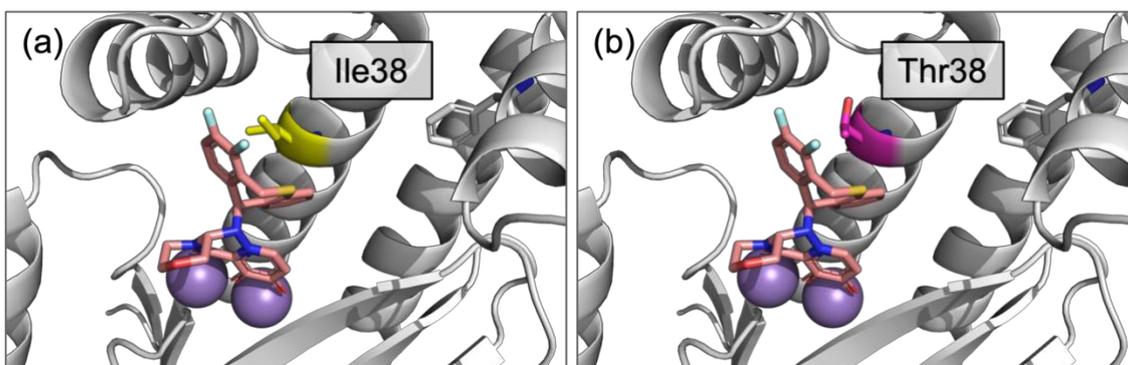
BXM の開発にあたり、塩野義製薬はドルテグラビルなどで蓄積したメタロエンザイム阻害剤のノウハウを活用した(Figure 24b)。HIV-1 インテグラーゼは、逆転写後の 2 本鎖ウイルス DNA を宿主細胞の DNA に挿入する酵素であり、活性中心に 2 つの  $Mg^{2+}$  を有するメタロエンザイムである。ドルテグラビルは、活性中心の 2 つの  $Mg^{2+}$  にキレートして酵素反応を阻害する<sup>100-107</sup>。



**Figure 24.** (a) バロキサビルマルボキシルの構造. (b) ドルテグラビルの構造.

新しい作用機序で脚光を浴びた BXM であるが、BXM 感受性が低下したインフルエンザウイルス株が報告されている<sup>108-109</sup>。分離されたウイルス株の解析を行ったところ、PA サブユニットにおける 38 番目のイソロイシンがスレオニンに置き換わった I38T 変異が認められた(Figure 25)。I38T 変異は A/H1N1 および A/H3N2 ウイルスにおいて最も大きな効果を示し、 $EC_{50}$  値が約 30-50 倍上昇した。イソロイシンがスレオニンに置換されたことで、BXA と  $PA_N$  の接触が減り、結合親和性が低下したと考えられる。また、I38F 変異と I38M 変異も確認されたが、BXM 感受性への影響は小さかった。さらに、B 型インフルエンザウイルスでは、I38T 変異による BXM 感受性の低下は、A 型インフルエンザウイルスに比べて小さかった。

現在、新たな  $PA_N$  阻害剤の開発のために、BXM の構造改変を行った研究の報告もあるが、BXM を超える薬理活性を示したものはない。薬剤耐性変異株にも対応できる、 $PA_N$  阻害剤の開発が望まれている。

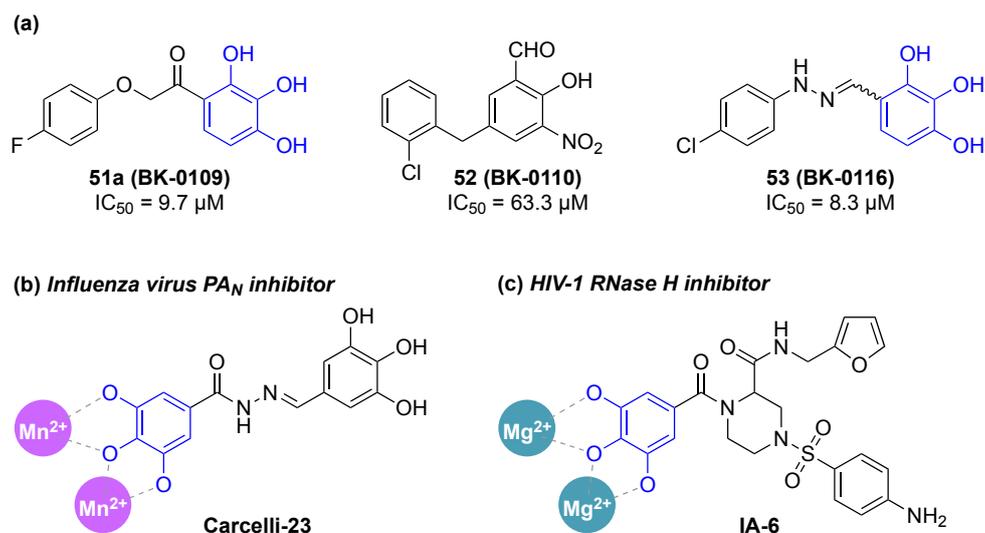


**Figure 25.** PA<sub>N</sub> 活性部位における BXA の結合構造. (a) PA/WT と BXA の結合構造 (PDB#, 6FS6). (b) PA/I38T と BXA の結合構造 (PDB#, 6FD7).

## II. 1.3. 先行研究：当研究室における PA<sub>N</sub> 阻害剤の探索研究

### II. 1.3.1. スクリーニング試験によるヒット化合物の探索

当研究室の不動によって、PA<sub>N</sub> 阻害活性を示す化合物のスクリーニング試験が行われた<sup>51, 52</sup>。当研究室で保存されていた 410 の化合物ライブラリを用いた *in vitro* スクリーニング試験により、3 つの化合物を抽出した(Figure 26a)。このうち、BK-0109 と BK-0110 はピロガロール構造を有していた。Cohen らのグループが構築した MBP ライブラリにも、PA<sub>N</sub> と相互作用するフラグメント分子としてピロガロールとその類似化合物が含まれている。そのため、BK-0109 と BK-0110 のピロガロール部位が PA<sub>N</sub> 活性中心の Mn<sup>2+</sup> と相互作用していると示唆された。また、インフルエンザウイルスの PA<sub>N</sub> や HIV-1 の逆転写酵素など、ピロガロール骨格を有するメタロエンザイム阻害剤は既にいくつか報告があり、BK-0109 と BK-0110 も PA<sub>N</sub> 阻害剤の有望な足がかりになると期待できた(Figure 26b)<sup>111-113</sup>。



**Figure 26.** (a) 良好な PA<sub>N</sub> 阻害活性を示した 3 化合物の構造<sup>51</sup>. (b, c) ピロガロール構造を有する既知のメタロエンザイム阻害剤の一例.

続いて、3 化合物の *in vitro* における IC<sub>50</sub> 値の算出と、抗ウイルス活性試験による EC<sub>50</sub> 値と CC<sub>50</sub> 値の算出を行った (Table 7)。その結果、BK-0109 をヒット化合物 **51a** として同定した。

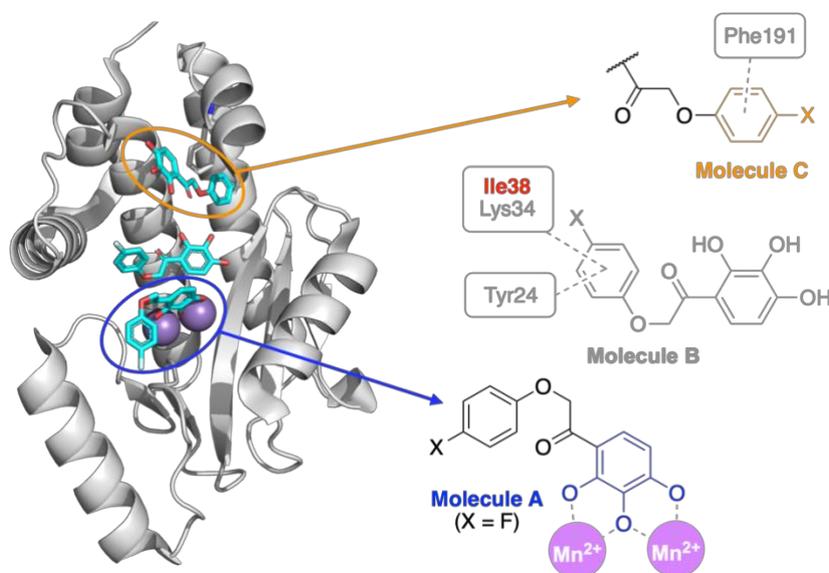
**Table 7.** 化合物 **51a**, **52**, **53** の PA<sub>N</sub> 阻害活性<sup>51</sup>

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM)	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
<b>51a</b>	9.68 ± 1.19	11.8 ± 2.27	>200
<b>52</b>	63.3 ± 5.72	11.5 ± 1.13	74.1 ± 1.61
<b>53</b>	8.26 ± 0.79	14.4 ± 3.85	>200

### II. 1.3.2. ヒット化合物と PA<sub>N</sub> の相互作用解析

不動によって得られたヒット化合物 BK-0109 と PA<sub>N</sub> 複合体の X 線結晶構造解析により、PA<sub>N</sub> 活性ポケットには、3 分子の化合物 **51a** が存在することがわかった (Figure 27)。分子 A はピロガロール部位の 3 つの水素原子が PA<sub>N</sub> 活性中心にある 2 つの Mn<sup>2+</sup> イオンと相互作用しており、*p*-フルオロフェニル基が Arg84、Trp88、Phe105、Leu106 の作るポケットに伸びていた。分子 B の *p*-フルオロフェニル基は Thr20、Tyr24、Glu26、Lys34、Ile38 が形成

するポケットと疎水性相互作用を形成していた。分子 C は *p*-フルオロフェニル基が、Val122、Arg124、Phe150、Trp188、Phe191、Arg192、Glu195 で構成される疎水性ポケットに深く入り込んでいた。分子 C のピロガロール部位にある 3 つのヒドロキシ基のうち、3 位にあるヒドロキシ基は Glu31 と水素結合を形成していた。

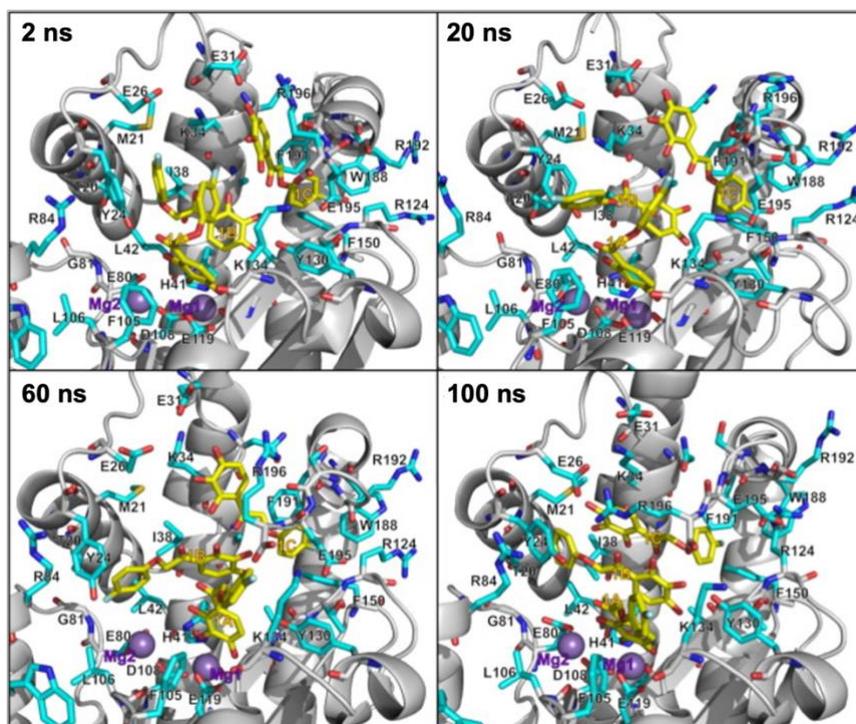


**Figure 27.** PA<sub>N</sub> と BK-0109 の結晶構造 (PDB#: 4YYL)

3 つの化合物 **51a** 分子と PA<sub>N</sub> の MD シミュレーションを行った(Figure 28)。100 ns のシミュレーション中、分子 A はピロガロール部位が PA<sub>N</sub> 活性中心の Mn<sup>2+</sup> との相互作用を維持し続けた一方で、*p*-フルオロフェニル部位は結晶構造からの揺らぎが大きかった。分子 B の *p*-フルオロフェニル部位は Tyr24 との相互作用を維持していたが、コンフォメーションが大きく変化した。分子 C の *p*-フルオロフェニル部位は、Phe191 との  $\pi$ - $\pi$  相互作用を安定に維持していた。

さらに、MM/GBSA 法により各分子と PA<sub>N</sub> の結合自由エネルギー  $\Delta G_{bind}$  を算出したところ、3 分子の中で分子 C と PA<sub>N</sub> の結合が最も安定であり、分子 A と PA<sub>N</sub> の親和性が最も低いことが予測された(Table 8)。

以上の結果から、化合物 **51a** の *p*-フルオロフェニル部位が PA<sub>N</sub> との結合に重要であると示唆された。



**Figure 28.** 化合物 **51a** と PA<sub>N</sub> の複合体中における MD シミュレーション中の化合物 **51a** の構造変化<sup>51</sup>. PA<sub>N</sub> 活性中心の金属イオンを Mn<sup>2+</sup> から Mg<sup>2+</sup> に置換している。

**Table 8.** MM/GBSA 法により算出した結合自由エネルギー<sup>51</sup>

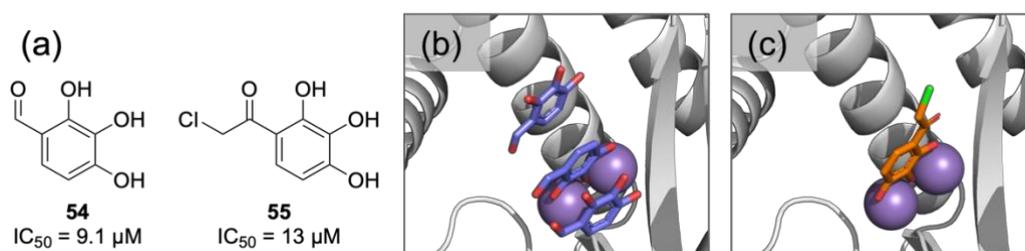
Molecules	$\Delta E_{ele}$ (kcal/mol)	$\Delta E_{vdw}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{sol}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)
A	$-17.209 \pm 2.591$	$-27.195 \pm 3.494$	$14.324 \pm 2.142$	$-30.080 \pm 3.068$
B	$-12.007 \pm 5.748$	$-35.694 \pm 5.735$	$12.871 \pm 3.945$	$-34.830 \pm 5.453$
C	$-21.142 \pm 11.68$	$-36.227 \pm 5.361$	$18.746 \pm 8.104$	$-38.623 \pm 3.602$

$\Delta E_{ele}$ : リガンド-タンパク質間の静電相互作用エネルギー,  $\Delta E_{vdw}$ : van der Waals 相互作用エネルギー  
 $\Delta G_{sol}$ : 溶媒和効果による安定化エネルギー,  $\Delta G_{bind}$ : 結合自由エネルギー

### II. 1.3.3. 化合物 **51a** の部分構造の PA<sub>N</sub> 阻害活性

続いて、当研究室の北原によって、化合物 **51a** の部分構造であるピロガロール体 **54** とそ

の誘導体 **55** が得られた<sup>147</sup>。これら 2 化合物は、 $\text{PA}_N$  阻害活性を示し、 $\text{PA}_N$  活性中心の  $\text{Mn}^{2+}$  との結合が確認された(Figure 29)。化合物 **54** と **55** はともにピロガロール骨格の 3 つのヒドロキシ基が 2 つの  $\text{Mn}^{2+}$  に配位していたが、隣接するカルボニル基の位置が異なっていた。この結果から、ピロガロール部位が  $\text{PA}_N$  阻害活性に寄与していることが明らかになった。



**Figure 29.** (a) 化合物 **54** および **55** の構造. (b) 化合物 **54** の  $\text{PA}_N$  結合構造. (c) 化合物 **55** の  $\text{PA}_N$  結合構造.

#### II. 1. 3. 4. 化合物 **51a** の類縁体構造

当研究室の北原および齋藤によって、化合物 **51a** の分子 A に着目した構造改変が行われた(Figure 30)<sup>147,148</sup>。取得された化合物のなかで、化合物 **51a** のフルオロ基をクロロ基に置換した化合物 **51b** で  $\text{PA}_N$  阻害活性が向上した。しかし、分子 A のみの構造改変では、 $\text{PA}_N$  阻害活性が大きく向上しなかったことから、より大掛かりな構造改変が必要であると示唆された。

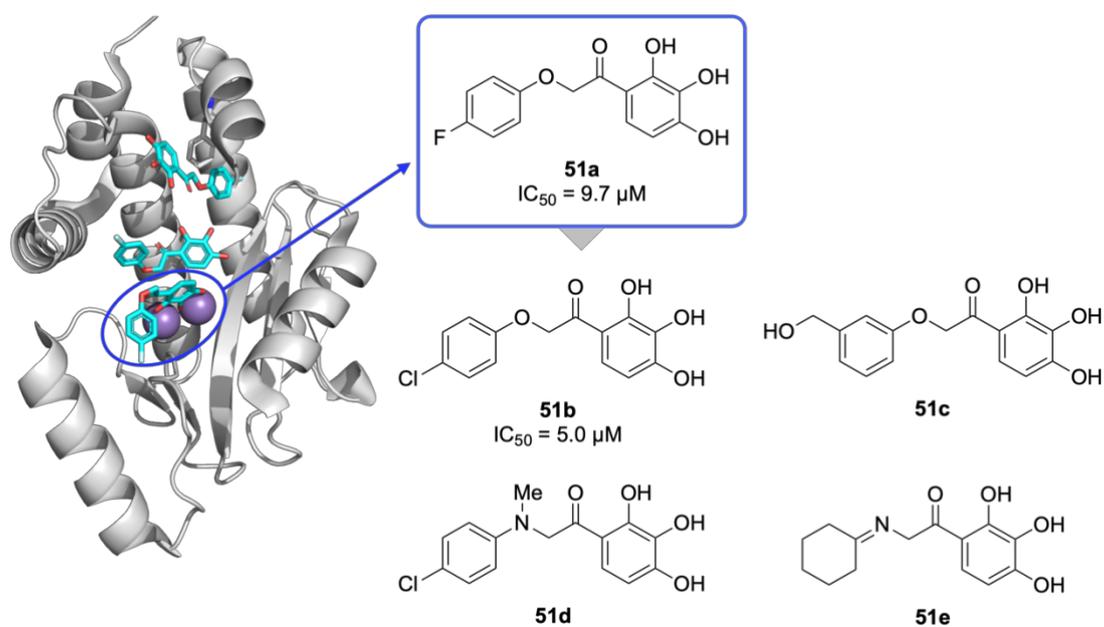


Figure 30. 分子 A に着目した化合物 51a の構造改変<sup>147, 148</sup>

## II.2. 目的と方法

### II.2.1. 目的

「新規 PA<sub>N</sub> 阻害剤の創製」を目的として本研究を進めた。当研究室における先行研究で得られたヒット化合物の構造改変を行い、PA<sub>N</sub> 阻害活性の向上ならびに、バロキサビル・マルボキシルで問題となった薬剤耐性変異株に対応できる薬物の開発を目指した。

### II.2.2. 方法：構造改変の戦略

ヒット化合物と PA<sub>N</sub> の結晶構造解析の結果を基に、計算機解析を活用した化合物設計ならびに、化合物の合成と活性評価を行い、リード探索を行った。

不動による化合物 51a と PA<sub>N</sub> の X 線結晶構造解析と MD シミュレーション、ならびに北原と齋藤による構造改変の結果から、PA<sub>N</sub> 活性部位に存在する分子 A と C が、PA<sub>N</sub> との相互作用に寄与していることが明らかになった。そこで、分子 A と C の、2 つの結合部位を繋いだ構造の化合物は、より強く PA<sub>N</sub> と相互作用すると考えた。

## II.3. 結果と考察

### II.3.1. 構造改変：芳香環構造の伸長

当研究室の大林によって、化合物 **56** – **58** が得られた(Figure 31)。これらの化合物のエンドヌクレアーゼ阻害活性を Table 9 に示す。得られた化合物のうち、化合物 **56** と **58** は  $PA_N$  阻害活性を示さなかった。また、2つの芳香環をビニレン架橋した化合物 **57a** はエンドヌクレアーゼ阻害活性を示さなかったが、中央のベンゼン環にメトキシ基とメチル基をそれぞれ導入した化合物 **57b** と **57c** はエンドヌクレアーゼ阻害活性を有していた。化合物 **57a** は平面性が高く、分子同士が重なったためにエンドヌクレアーゼ阻害活性を示さなかったと考えた。さらに、化合物 **57b** はヒット化合物 **51a** よりも良好な  $IC_{50}$  値を有し、化合物 **51a** の2つの  $PA_N$  結合部位を繋ぐアプローチが有用であると示唆された。現在、化合物 **57** をベースにした構造改変が大林によって進められている。

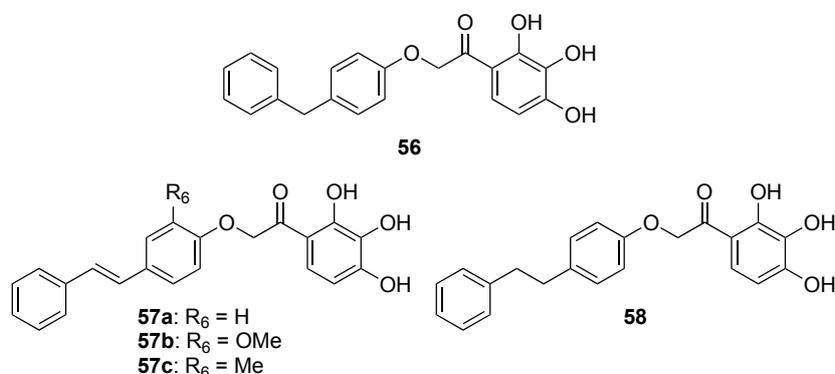


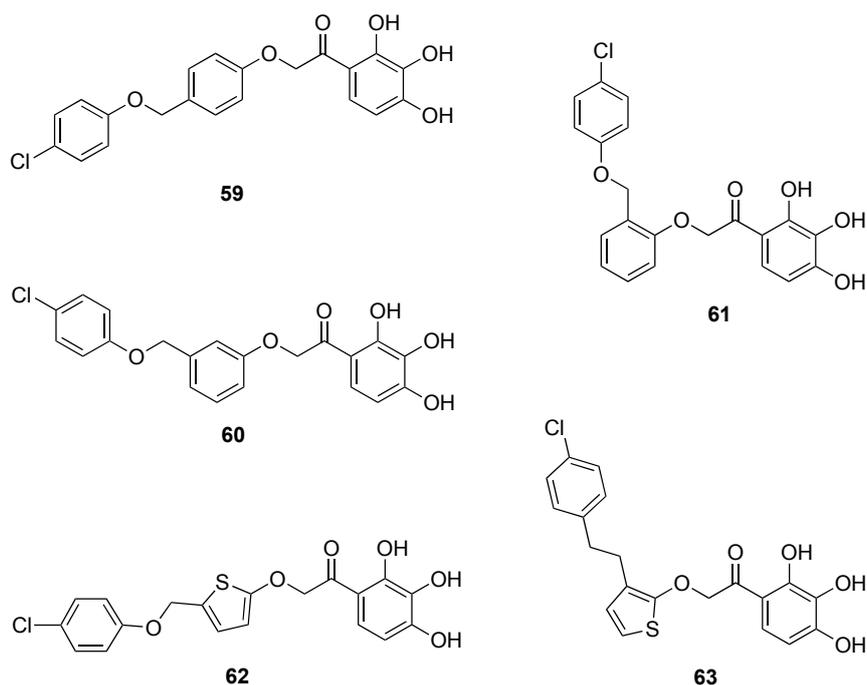
Figure 31. 化合物 **56** – **58** の構造

**Table 9.** 化合物 56 – 58 のエンドヌクレアーゼ阻害活性

Compounds	各化合物濃度における CEN 阻害活性		IC <sub>50</sub> (μM)
	20 μM	100 μM	
51a	+	+	9.7
56	-	-	-
57a	-	-	-
57b	+	+	27
57c	+	+	2.8
58	-	-	-

### II. 3.2. Orientation プログラムを用いた予備検討

リンカー構造の設計にあたり、Orientation プログラムを用いた予備検討を行った。リンカー構造としてベンゼン環を導入し、ピロガロール構造と *p*-クロロフェニル構造をパラ位、オルト位、メタ位での位置で繋いだ化合物 **59**, **60**, **61** の計算モデルを作成した(Figure 32)。また、ベンゼン環の生物学的等価体であるチオフェン環をリンカー構造に導入した化合物 **62** と **63** の計算モデルも作成した。



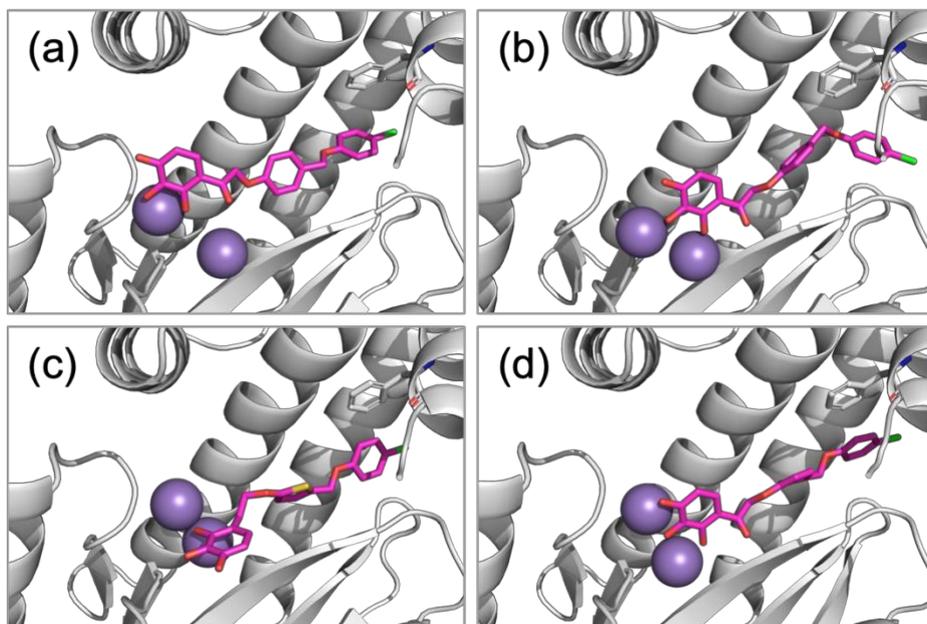
**Figure 32.** 予備検討に用いた化合物 **59** – **63** の構造

AutoDock Vina を用いて化合物と  $\text{PA}_N$  の結合構造の予測モデルを作成したのち、Orientation プログラムを用いて構造最適化計算を行った。続いて、 $\text{PA}_N$  の I38T 変異体とのドッキングシミュレーションも行った。計算結果は Table 10 に示す。

化合物 **51a** と  $\text{PA}_N$  複合体の構造解析から、ピロガロール部位と  $\text{Mn}^{2+}$ 、クロロフェニル基が Phe191 とそれぞれ結合していると期待したが、両方の部位で結合を形成しているのは、わずかであった。多くの結合予測モデルで、*p*-クロロフェニル基と Phe191 の疎水性相互作用が見られ、ピロガロール部位と  $\text{Mn}^{2+}$  が相互作用しているモデルは、Phe191 と相互作用しているモデルよりも少なかった。この結果は、先行研究<sup>51</sup>における、化合物 **51a** と  $\text{PA}_N$  の結合自由エネルギーの解析結果と一致した。また、一部のモデルでは、*p*-クロロフェニル基ではなく、リンカー構造として導入した芳香環が、Phe191 と結合していた。

それぞれの化合物で 6 つの結合ポーズの計算を行ったが、ピロガロール部位と  $\text{Mn}^{2+}$  の相互作用が多く確認できたのは化合物 **59** と **62** であった。また、I38T 変異を導入したことに

よる結合スコアの変化は、化合物 **59** と **62** で同程度であった。以上の結果から、ピロガロール部位と *p*-クロロフェニル部位の2つを、六員環の1位と4位、あるいは五員環の1位と3位で繋いだ構造が、新規 PA<sub>N</sub> 阻害剤の構造として有用であると示唆された(Figure 33)。六員環構造を有する化合物 **59** に類似した、化合物 **57** をベースにした構造最適化が大林によって進められており、本研究では、リンカー部位に五員環構造を導入してリード探索を行うこととした。



**Figure 33.** (a)  $PA_N$  と化合物 **59**-ポーズ 4 の結合予測構造. (b)  $PA_N$  と化合物 **59**-ポーズ 6 の結合予測構造. (c)  $PA_N$  と化合物 **62**-ポーズ 4 の結合予測構造. (d)  $PA_N$  と化合物 **62**-ポーズ 6 の結合予測構造.

Table 10. Orientation プログラムによる予備検討の計算結果

Compounds	Poses	Interactions <sup>a</sup>		Binding Score	
		Phe191	Mn <sup>2+</sup>	PA/WT	PA/I38T
59	1	+	+	-25.041	-20.185
	2	+	+	-24.115	-25.373
	3	-	+	-20.982	-18.807
	4	+	+	-29.495	-23.721
	5	-	+	-25.581	-25.898
	6	+	++	-23.635	-22.955
60	1	+	-	-22.073	-20.795
	2	-	-	-20.880	-17.907
	3	++	-	-24.244	-24.346
	4	-	-	-21.802	-20.852
	5	-	+	-23.076	-22.261
	6	++	++	-29.046	-23.025
61	1	++	++	-32.385	-29.455
	2	+	+	-28.399	-27.601
	3	++	-	-23.795	-21.759
	4	-	+	-22.386	-20.887
	5	+ <sup>b</sup>	-	-23.145	-22.747
	6	+	++	-29.896	-23.893
62	1	-	-	-18.145	-18.490
	2	-	+	-19.062	-17.357
	3	+	+	-21.060	-20.111
	4	++	+	-22.381	-23.842
	5	+	+	-26.263	-22.151
	6	++	++	-29.466	-23.007
63	1	-	-	-24.339	-22.925
	2	++	-	-23.770	-22.263
	3	-	+	-19.471	-17.646
	4	+ <sup>b</sup>	+	-23.347	-
	5	+	-	-25.620	-25.794
	6	++	++	-27.365	-21.746

(a) -は相互作用なし、+は相互作用あり、++は化合物 **51a** の結合構造と近い相互作用を表す。

(b) リンカー部位の芳香環と Phe191 が相互作用していた。

### II. 3.3. 化合物の設計

五員環を有する構造として、化合物 **64** – **67** を設計した(Figure 34)。化合物 **64** は MBL 阻害剤<sup>45</sup> の候補化合物 **1j**、化合物 **65** – **67** は TrkB 阻害剤の候補化合物 **2a** の構造<sup>57</sup> を応用した。当研究室で行っているそれぞれの研究テーマを関連付けて行うことで、効率的に研究を遂行できると考えた。

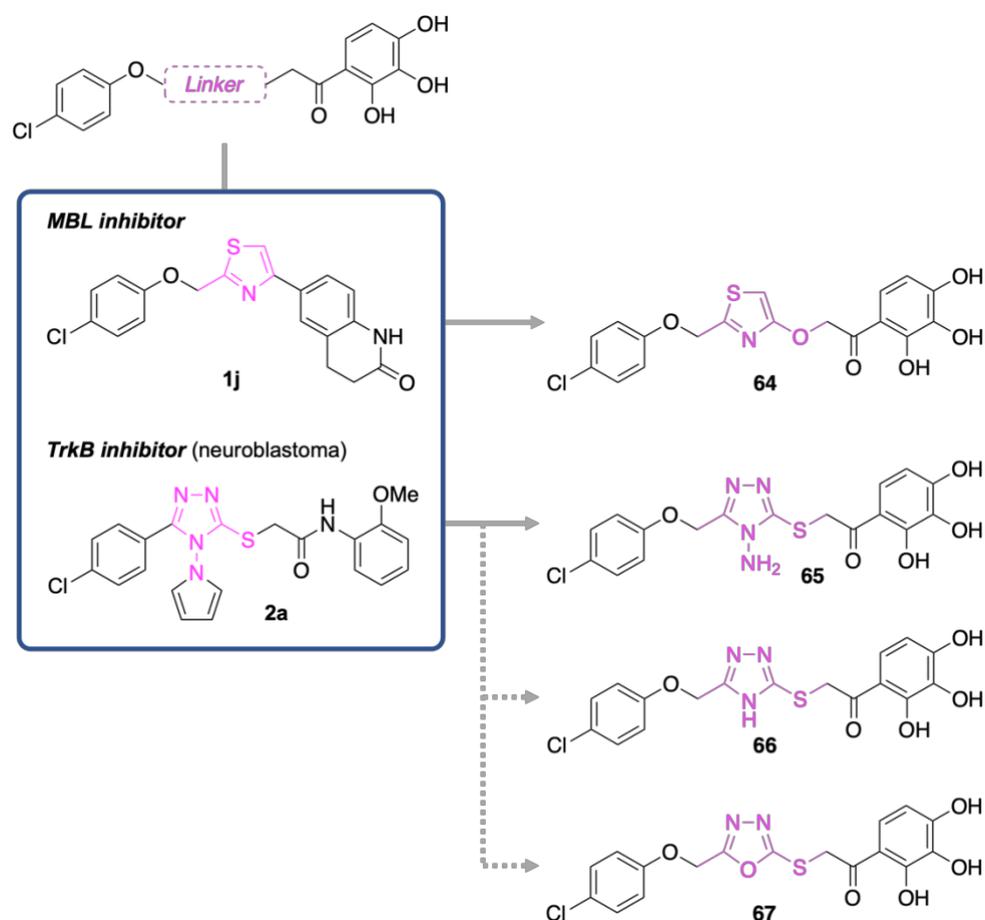


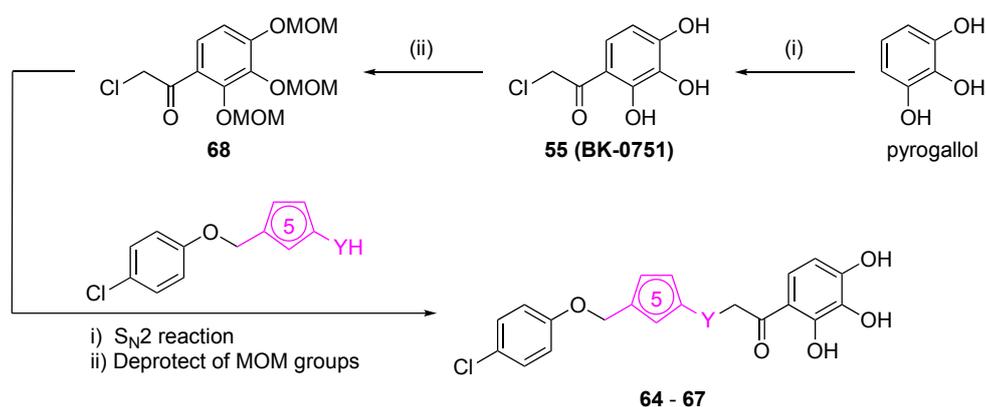
Figure 34. 化合物 **64** – **67** の構造と構造改変の戦略

### II. 3.4. PAn 阻害剤の合成

設計した化合物群の合成は、Scheme 9 の経路で進めた。ピロガロールに対し、Friedel-Crafts

反応により化合物 **55** を取得したのち、3つのヒドロキシ基をメトキシメチル基(-MOM)で保護して前駆体 **68** を得た。

化合物 **68** の合成に続き、目的の五員環構造を有する前駆体を合成し、 $S_N2$  反応に続く MOM 基の脱保護反応により、設計した目的物を取得することを考えた。

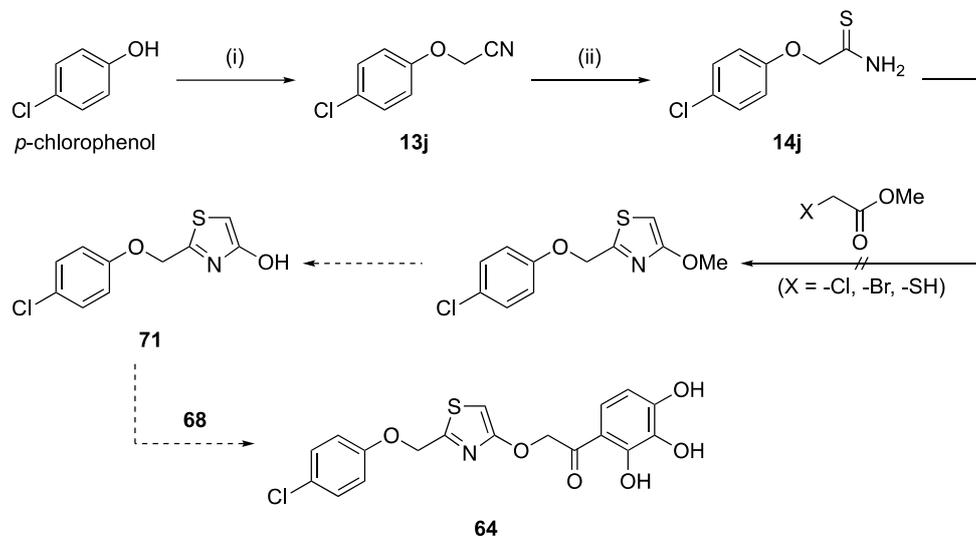


**Scheme 9.** 新規化合物の合成計画ならびに前駆体 **68** の合成

Reagents and conditions: (i) chloroacetyl chloride (1.7 eq.),  $AlCl_3$  (3.0 eq.),  $CS_2$ , rt, 2 h, yield 31%; MOMCl (4.0 eq.), NaCl (8.5 eq.), DIPEA (4.0 eq.), MeCN, 0 °C to rt, 17 h, yield 84%.

### II. 3. 4. 1. チアゾール化合物 **64** の合成

化合物 **64** の合成は、化合物 **1j** の合成を基にした経路で進めることを考えた(Scheme 10)。チオアミド化合物 **14j** からチアゾール化合物を合成する反応は、進行が確認できなかった。

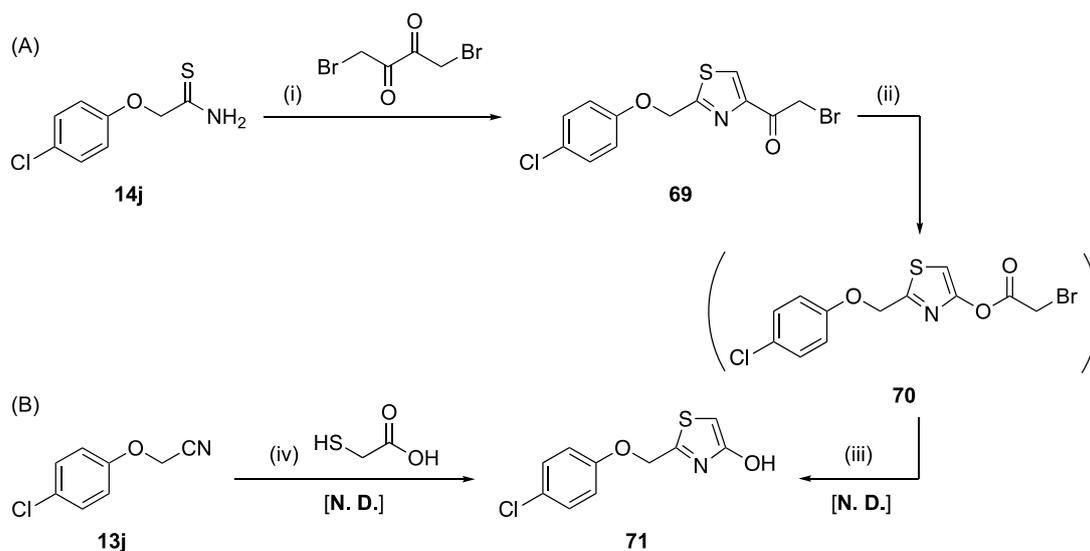


**Scheme 10.** チアゾール化合物 **64** の合成

Reagents and conditions: (i) bromoacetonitrile (1.2 eq.),  $K_2CO_3$  (2.0 eq.), acetone, rt, 5 h, yield 91%; (ii) thioacetamide (1.5 eq.), 4 M HCl, DMF, 1,4-dioxane, 100 °C, 28 h, yield 20%.

エステルを用いた化合物 **14j** のチアゾール環化反応は進行しなかったため、別の経路での合成を試みた。化合物 **14j** に対し、1,4-ジブロモブタン-2,3-ジオンを用いてチアゾール化合物 **69** を合成した(Scheme 11a)。原料である 1,4-ジブロモブタン-2,3-ジオンの当量を抑えることで、二環化合物の生成を防いだ。化合物 **69** に対し、Baeyer-Villiger 酸化反応と続くエステルの加水分解反応により、目的の化合物 **71** の取得を試みたが、合成中間体のエステル化合物 **70** のみ構造を確認できた。

また、同じく化合物 **1j** の合成中間体であるニトリル化合物 **13j** に対し、チオグリコール酸を用いてチアゾール化合物 **71** を得る反応を試みたが、目的物を得ることができなかった (Scheme 11b)。

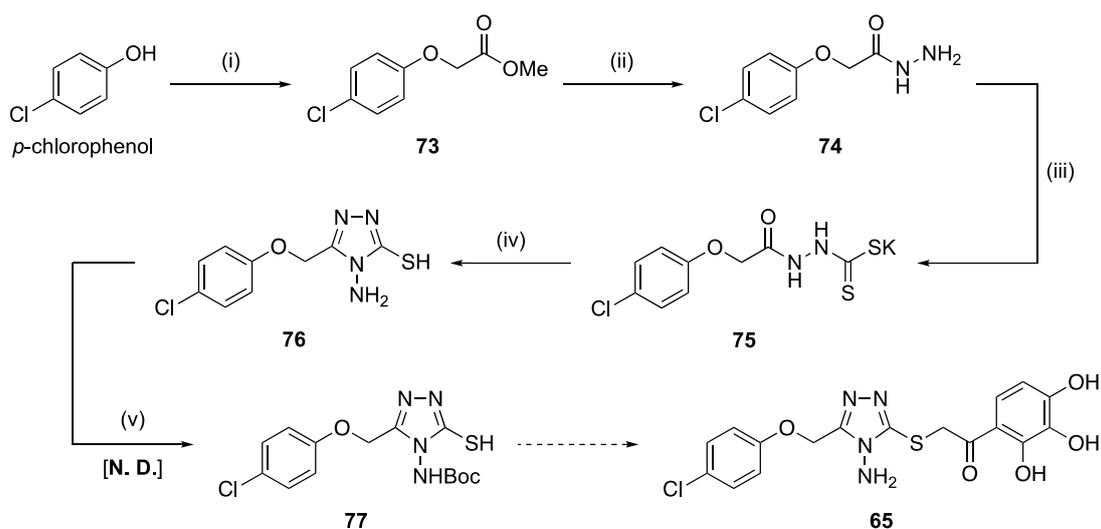


### Scheme 11. 合成中間体 71 の合成

Reagents and conditions; (i) 1,4-dibromobutane-2,3-dione (1.0 eq.), EtOH, reflux, 2 h, yield 33%; (ii) *m*CPBA (2.4 eq.), NaHCO<sub>3</sub> (4.0 eq.), DCM, 0 °C to rt, 1 d; (iii) 10% KOH, MeOH, rt; (iv) mercaptoacetic acid (1.0 eq.), pyridine (0.25 eq.), reflux, 2 h.

### II. 3.4.2. トリアゾール化合物 65 の合成

トリアゾール化合物 **65** の合成を行った(Scheme 12)。原料に *p*-クロロフェノールを用いて、メチルエステル化合物 **73** を得たのち、ヒドラジン-水和物を用いた加水分解反応により、アセトヒドラジド化合物 **74** を合成した。続いて、二硫化炭素を用いて化合物 **75** を得たのち、ヒドラジンを用いてアミノトリアゾール化合物 **76** を合成した。アミノ基を Boc 基で保護する反応を行ったが、目的の化合物 **77** を単離することができなかった。化合物 **77** の合成を達成したのちは、化合物 **68** との S<sub>N</sub>2 反応を行い、その後、酸性条件下で MOM 基と Boc 基を同時に脱保護して目的のトリアゾール化合物 **65** を得ることを考えている。

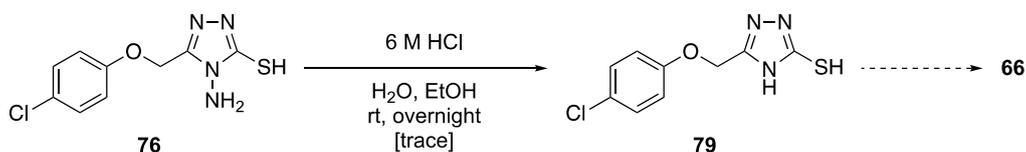


**Scheme 12.** トリアゾール化合物 **65** の合成

Reagents and conditions: (i) methyl bromoacetate (1.2 eq.),  $K_2CO_3$  (2.0 eq.), acetone, rt, 27 h, yield 99%; (ii)  $H_2N-NH_2 \cdot H_2O$  (1.0 eq.), MeOH, rt, 17 h, yield 64%; (iii)  $CS_2$  (2.0 eq.), KOH (1.5 eq.), EtOH, 45 °C, 10 h, yield 93%; (iv)  $H_2N-NH_2 \cdot H_2O$  (2.0 eq.),  $H_2O$ , reflux, 13 h, yield 68%; (v)  $Boc_2O$  (1.2 eq.),  $NEt_3$  (1.5 eq.), DCM, rt.

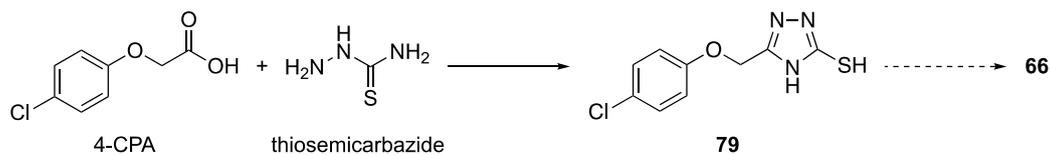
### II. 3.4.3. トリアゾール化合物 **66** の合成

トリアゾール化合物 **66** の合成は、化合物 **65** の合成中間体 **76** を用いて行った(Scheme 13)。化合物 **76** に対し、酸性条件下で脱アミノ化反応を行うことで、化合物 **79** の合成を試みたが、次の反応に十分な収量を得ることができなかった。



**Scheme 13.** トリアゾール化合物 **66** の合成

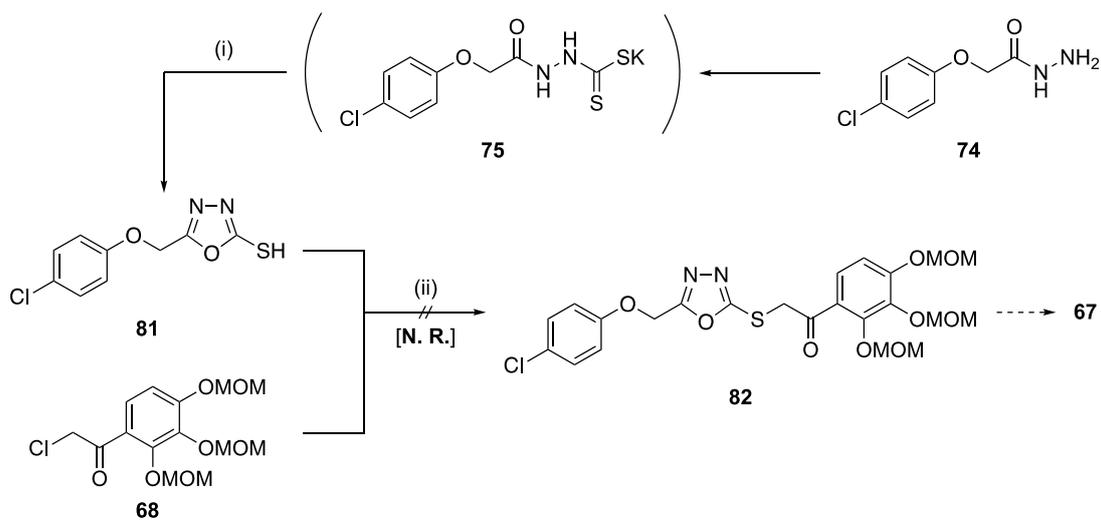
化合物 **79** の合成は、4-クロロフェノキシ酢酸(4-CPA)とチオセミカルバジドを用いて行うことを検討している(Scheme 14)。



**Scheme 14.** トリアゾール化合物 **66** の改良した合成計画

#### II. 3. 4. 4. オキサジアゾール化合物 **67** の合成

オキサジアゾール化合物 **67** の合成は、化合物 **65** および **66** の合成中間体であるアセトヒドラジド化合物 **74** を用いて行った(Scheme 15)。アセトヒドラジド化合物 **74** に対して、化合物 **75** の構造を中間体として経由し、オキサジアゾール化合物 **81** を得た。続いて、化合物 **68** と **81** を用いた  $S_N2$  反応を行ったが、反応の進行を確認できなかった。



**Scheme 15.** 化合物 **67** の合成

Reagents and conditions: (i)  $CS_2$  (2.0 eq.), KOH (1.5 eq.), EtOH, 45 °C, 10 h; 1 M HCl, yield 16%; (ii) NaH (1.0 eq.), NaI (1.0 eq.), THF, reflux.

## II.4. 小括

インフルエンザウイルスの次なる世界的大流行に備え、新規治療薬を開発する必要がある。本研究では、インフルエンザウイルスの RNA 合成に関わるタンパク質である、PA サブユニットの N 末端(PA<sub>N</sub>)を阻害する新規化合物を設計した。

先行研究で得られたヒット化合物 **51a** は、PA<sub>N</sub> 活性部位に 3 分子が結合しており、分子 A のピロガロール部位と、分子 C の *p*-フルオロフェニル部位が、PA<sub>N</sub> 阻害活性に寄与している。

本研究では、2つの結合部位をリンカーで繋いだ構造の化合物がより強い PA<sub>N</sub> 阻害活性を示すと考えた。ヒット化合物 **51a** の類縁体である化合物 **57c** で PA<sub>N</sub> 阻害活性が向上し、結合部位を繋ぐ戦略が有用であると示唆された。続いて、当研究室で開発された Orientation プログラムを用いた検討により、2つの結合部位をつなぐリンカーには五員環構造が有用であると示唆された。さらに、五員環構造のリンカーを有する化合物は、既存薬で問題となっている薬剤耐性変異株にも対応できると予測された。そこで、当研究室で行われている MBL 阻害剤、ならびに TrkB 阻害剤の探索研究で得られた化合物の構造を応用し、五員環構造を有する 4つの化合物を設計した。今後は設計した化合物群の合成を行い、新規 PA<sub>N</sub> 阻害剤の創出を目指す。

## 第 III 章

### 小児がん治療薬を目的とした新規 TrkB 阻害剤の探索

= 目次 =

<b>III. 1. 背景</b>	p.68
III. 1. 1. 神経芽腫	
III. 1. 1. 1. 神経芽腫について	
III. 1. 1. 2. TrkB と BDNF	
III. 1. 1. 3. TrkB と神経芽腫	
III. 1. 2. 神経芽腫治療薬	
III. 1. 3. 先行研究：当研究室における TrkB 阻害剤の探索研究	
III. 1. 3. 1. TrkB 阻害化合物のスクリーニング試験	
III. 1. 3. 2. ヒット化合物 <b>2a</b> の構造解析	
III. 1. 3. 3. 先行研究における化合物 <b>2a</b> の構造改変	
<b>III. 2. 目的と方法</b>	p.74
<b>III. 3. 結果と考察</b>	p.74
III. 3. 1. 新規化合物の設計ならびに合成戦略	
III. 3. 2. 化合物 <b>2b</b> の構造改変	
III. 3. 3. 化合物 <b>2d</b> の構造改変	
<b>III. 4. 小括</b>	p.78

## III.1. 背景

### III. 1.1. 神経芽腫

#### III.1.1.1. 神経芽腫について

神経芽腫(neuroblastoma; NB)は、脳腫瘍に次いで多い小児の固形がんである<sup>114,115</sup>。神経細胞に由来する発育中の不完全な前駆細胞から発生すると考えられている。生後 1 年以内に観察されたものは、自然に退縮することが多いが、生後 1 年を過ぎた患者の 5 年生存率は 50%以下であり、小児固形がんの中で最も予後の悪い腫瘍である<sup>116-120</sup>。予後不良の患者では、MYCN がん遺伝子の増幅や、1p36 と 11q 染色体の欠損などが見られる。

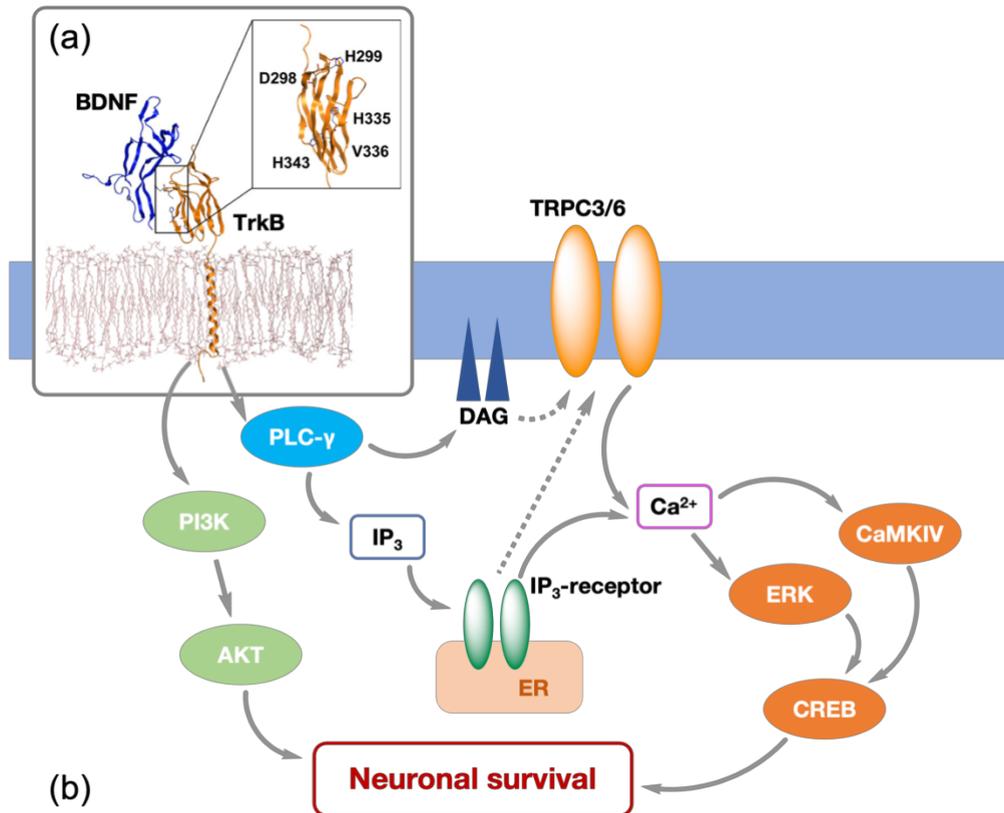
#### III.1.1.2. TrkB と BDNF

脳由来神経栄養因子(BDNF; brain-derived neurotrophic factor)は脳において重要な神経因子であり、神経成長因子(NGF; nerve growth factor)に続いて発見された<sup>121</sup>。その後、第 3・第 4 のニューロトロフィンファミリーとして NT-3 と NT-4 が同定された。BDNF は 112 アミノ酸残基からなる分子量 13.5 kDa のポリペプチドであり、ホモ二量体を形成して生理作用を示す。BDNF は神経細胞の生存の維持や分化誘導、シナプス形成などの作用を、BDNF に特異的な受容体であるトロポミオシン受容体キナーゼ B (TrkB; Tropomyosin receptor kinase / トラックビーと読む)を介して行う。

Trk ファミリーは神経系の発生と維持に重要な役割を担っているチロシンキナーゼ受容体であり、NGF に特異的な TrkA、BDNF と NT-4/5 に特異的な TrkB、NT-3 に特異的な TrkC で構成される。

Figure 35 に、BDNF/TrkB シグナル経路の概略図を示した。BDNF が TrkB に結合すると、ホスホリパーゼ C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ )が活性化され、イノシトール 1,4,5-三リン酸 IP<sub>3</sub> とジアシルグリセロール DAG が生成される。これにより、TRPC3/6 チャネルを介して細胞外シグナル制御

キナーゼ ERK とカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ CaMKIV が活性化され、続く CREB 転写経路の活性化が Akt 依存性経路と協働して神経細胞の生存を支援する<sup>122-124</sup>。



**Figure 35.** (a) BDNF と TrkB の結合モデル. (b) BDNF/TrkB シグナル伝達経路の概略図.

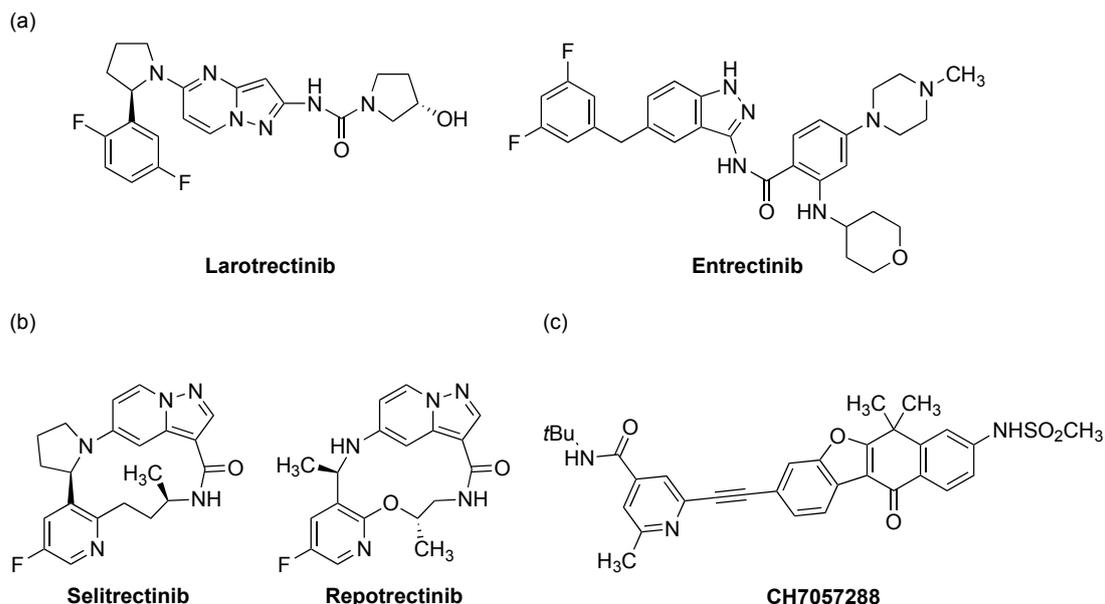
### III.1.1.3. TrkB と神経芽腫

神経芽腫のうち、予後良好なものでは TrkA が過剰発現しており、予後不良なものには TrkB が過剰に発現している。先行研究において、TrkB を過剰に発現させた神経細胞由来の細胞株をマウスに移植したところ、急速に腫瘍を形成し、腫瘍形成後 7 日以内に全てのマウスが死亡したという報告がある<sup>125</sup>。そのため、TrkB を標的とした薬物が、神経芽腫の治療薬として開発されてきた。

### III. 1.2. 神経芽腫治療薬

Figure 36 に、既知の Trk 阻害剤の構造を示す。第 1 世代の Trk 阻害剤として、ラロトレクチニブとエヌトレクチニブが臨床で使用されているが、これらはアミノ酸変異による薬剤耐性が問題となっている<sup>126, 127</sup>。第 2 世代の Trk 阻害剤として開発中のセリトレクチニブ、レポトレクチニブは、いくつかの薬剤耐性変異に対応したが、未だ克服していない変異もある<sup>128</sup>。中外製薬が Trk 融合細胞を阻害する CH7057288 を発表した。CH7057288 はラロトレクチニブで問題となっていた変異に対応し、CYP3A4 誘導の抑制に成功している<sup>129, 130</sup>。

これらの薬剤は、いずれも Trk の細胞内キナーゼドメインに作用するため、高濃度での治療が求められ、強い副作用が生じやすくなる。そのため、細胞外に位置する TrkB の BDNF 結合ドメインを標的とした、低い濃度で効果が得られる新しい抗がん剤の開発が求められている。



**Figure 36.** 既知の Trk 阻害剤の構造 (a) 第 1 世代 TrkB 阻害剤. (b) 第 2 世代 TrkB 阻害剤. (c) CH7057288 の構造.

### III. 1.3. 先行研究：当研究室における TrkB 阻害剤の探索研究

#### III.1.3.1. TrkB 阻害化合物のスクリーニング試験

先行研究においてスクリーニング試験が行われ、TrkB 阻害活性を示す 7 つの候補化合物 A-G が同定された<sup>57, 58</sup>。まず 300 万個の化合物ライブラリに対し、AutoDock を用いた *in silico* スクリーニング試験を行った。計算スコアが上位 100 個の構造の中から、さらにドラッグライクな 60 個の化合物を抽出した。続いて、抽出した 60 化合物のうち、入手できないものや DMSO に溶解しないものを除いた 37 化合物に対して、*in vitro* スクリーニング試験を行い、7 化合物を抽出した。神経芽腫細胞株において、化合物 A と G が特に良好な増殖抑制効果を示した(Figure 37)。これらの化合物は、BDNF の TrkB への結合を競合的に阻害し、TrkB 阻害活性を示すと明らかになった。また、化合物 A と G は、TrkB 発現細胞を移植したマウスの腫瘍サイズを減少させ、生体内での抗腫瘍活性も示した (Figure 38)。

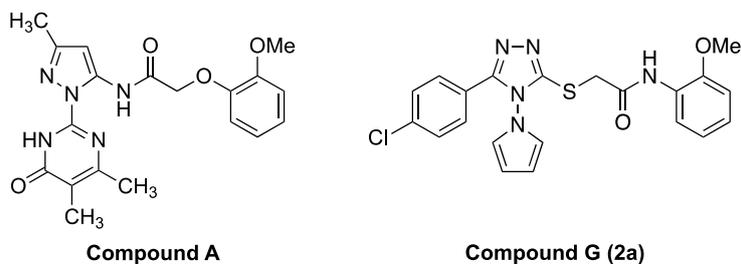
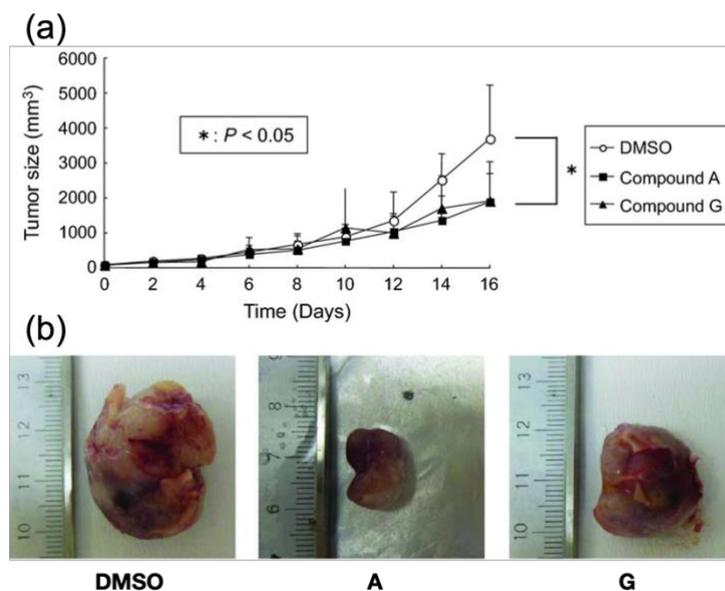


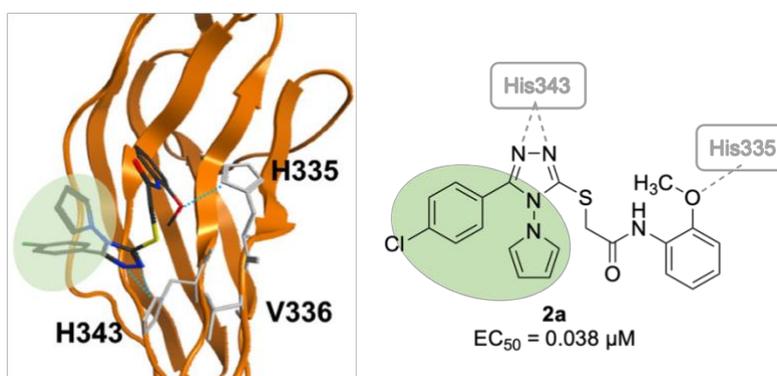
Figure 37. 先行研究で得られた化合物 A と G の構造



**Figure 38.** SCID マウスを用いた抗腫瘍活性試験. (a) 腫瘍サイズの変化. (b) 阻害剤投与 20 日後の腫瘍の写真.

### III.1.3.2. ヒット化合物 2a の構造解析

ヒット化合物 **2a** と TrkB の結合予測モデルは、AutoDock を用いたドッキングシミュレーションにより作成した(Figure 39)。TrkB の His335 および His343 が、化合物 **2a** のメトキシ基、トリアゾール環とそれぞれ水素結合を形成していると予測された。また、化合物 **2a** のピロール環とクロロフェニル基は、TrkB 結合ポケット外部の溶媒側に位置すると予測された。



**Figure 39.** TrkB と化合物 **2a** の結合予測モデル

### III.1.3.3. 先行研究における化合物 2a の構造改変

当研究室における先行研究において、化合物 **2a** の構造を改変し、TrkB 阻害活性を向上させる試みが行われた (Figure 40)。化合物 **2a** のクロロフェニル基からクロロ基を削除した化合物 **2b** と、ベンゼン環にヒドロキシ基とメトキシ基を導入した化合物 **2d** で TrkB 阻害活性が向上した。特に、化合物 **2d** は最も強い TrkB 阻害活性を示した。

化合物 **2a** およびその誘導体は溶解性の低さが課題であった。溶解性改善のため、スルホニル部位をスルホキッドに変換した化合物 **83a** および **83b** が得られたが、TrkB 阻害活性が低下した。また、トリアゾール環と繋がったピロール環への構造改変も行われたが、この部位には芳香環が望ましいと示唆された。

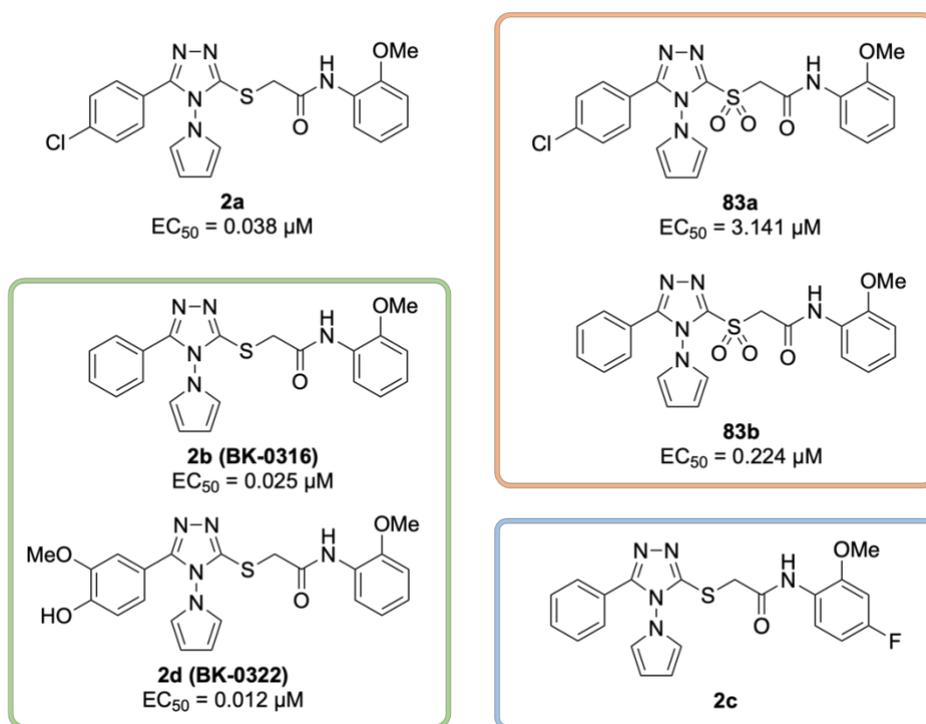


Figure 40. 先行研究における化合物 **2a** の構造改変

## III.2. 目的と方法

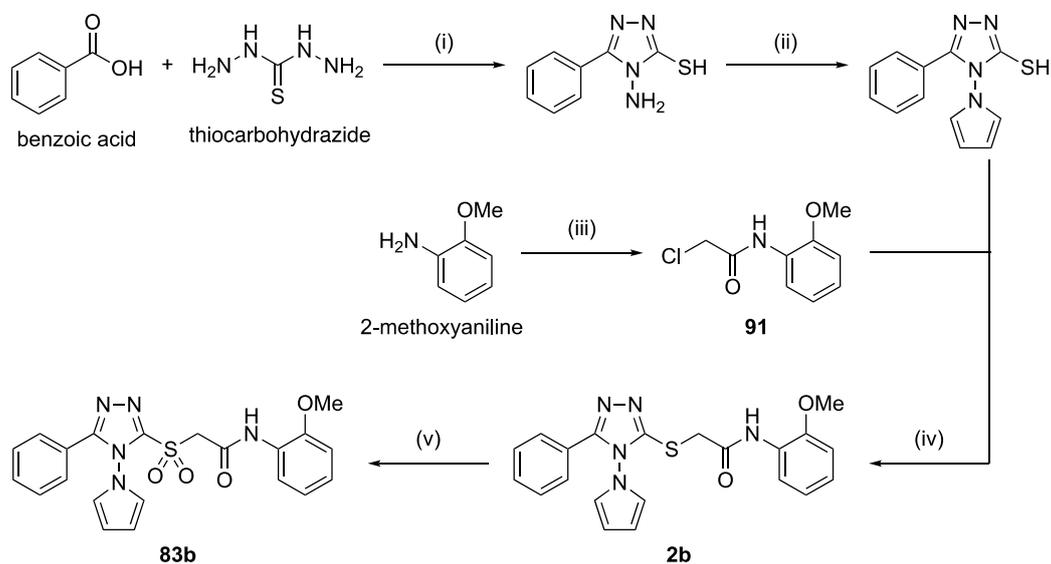
「新規 TrkB 阻害剤の創製」を目的に本研究を行った。

先行研究で得られた化合物 **2a** および **2d** の構造をベースとし、より強い TrkB 阻害活性を示す化合物の合成を目指した。

## III.3. 結果と考察

### III. 3.1. 新規化合物の設計ならびに合成戦略

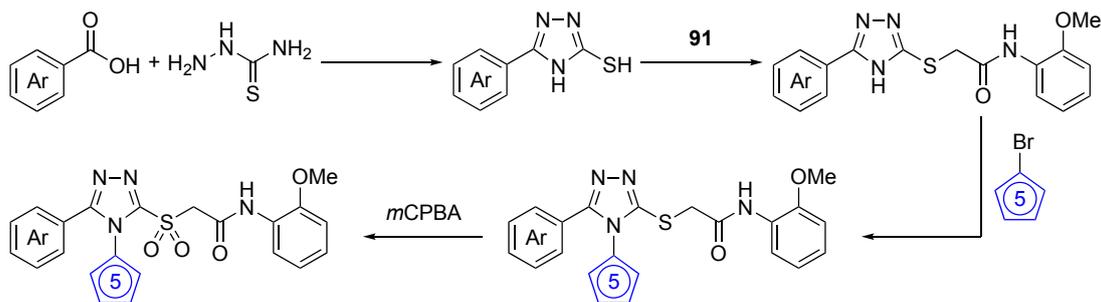
化合物 **2b** および化合物 **83b** の合成経路を Scheme 16 に示す。安息香酸とチオカルボヒドライドにより、アミノトリアゾール化合物を経由してトリアゾール-ピロール化合物を合成したのち、化合物 **91** との S<sub>N</sub>2 反応により、化合物 **2b** を合成した。化合物 **2b** に対し、*m*CPBA を用いた酸化反応により化合物 **83b** を合成した。



**Scheme 16.** 化合物 **2b** および **83b** の合成経路

Reagents and conditions: (i) H<sub>2</sub>O, reflux; (ii) 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (2.0 eq.), FeCl<sub>3</sub> (1.0 eq.), AcOH, 60 °C; (iii) chloroacetyl chloride (1.1 eq.), NEt<sub>3</sub> (1.0 eq.), DCM, rt; (iv) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.1 eq.), acetone, rt; (v) *m*CPBA (4.0 eq.), CHCl<sub>3</sub>, 50 °C.

本研究では、Scheme 16 を参考にして新規化合物の合成計画を立案した。新規化合物の合成計画を Scheme 17 に示す。

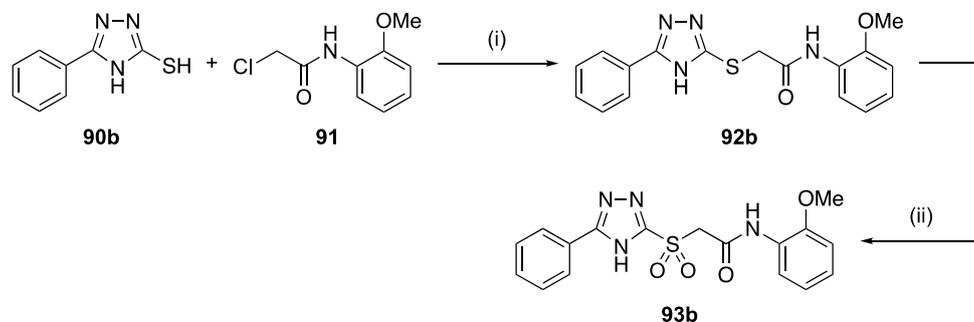


Scheme 17. 新規 TrkB 阻害剤の合成計画

### III. 3.2. 化合物 2b の構造改変

化合物 2a の誘導体合成展開の予備検討として、化合物 92b および 93b の合成を行った。市販されている化合物 90b を用いて、化合物 92b を取得したのち、酸化反応により化合物 93b を合成した(Scheme 18)。

取得した化合物 92b および 93b は TrkB 阻害活性を示さなかった。そのため、トリアゾール環に立体的な構造を導入することが、TrkB 阻害活性に有用であると明らかになった。

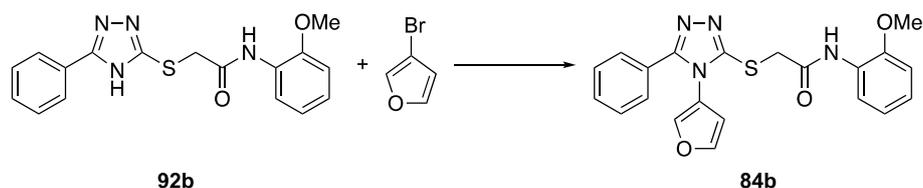


Scheme 18. 化合物 92b および 93b の合成経路

Reagents and conditions: (i)  $K_2CO_3$  (2.0 eq.), acetone, reflux, 14 h, quant.; (ii) *m*CPBA (4.0 eq.),  $CHCl_3$ , 50 °C, 30 min., yield 11%.

続いて、合成した化合物 **92b** のトリアゾール環 4 位に芳香族五員環構造を導入する反応を行った(Table 11)。文献調査を重ね、いくつかの反応条件で実験を行ったが、いずれも反応の進行が確認できなかった。

**Table 11.** 化合物 **84b** 合成の反応条件

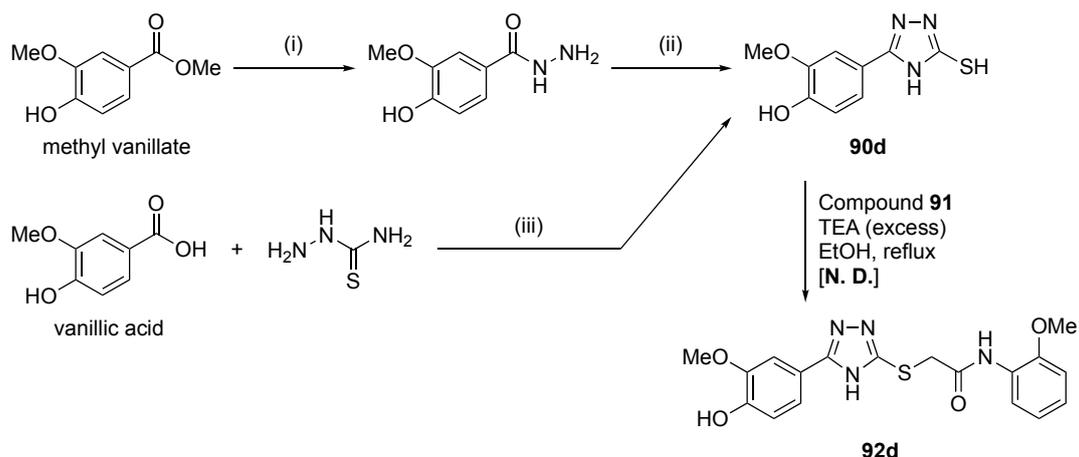


Entry	Reagents and conditions	Results
1 <sup>a</sup>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1.5 eq.), CuI (0.33 eq.), 1,10-phenanthroline (0.67 eq.), DMF, 120 °C	N. R.
2	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0 eq.), CuI (2.0 eq.), THF, 60 °C	N. R.
3	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0 eq.), CuI (2.0 eq.), THF, 60 °C	N. R.
4	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0 eq.), CuI (2.0 eq.), THF, 60 °C	N. R.
5 <sup>b</sup>	NEt <sub>3</sub> (2.0 eq.), <i>i</i> PrOH, reflux	N. R.
6 <sup>c</sup>	Fe(acac) <sub>3</sub> (20mol%), Cu(OAc) <sub>2</sub> (20mol%), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0 eq.), DMF, 135 °C	N. R.

(a) ref. 131; (b) ref. 132; (c) ref. 133.

### III. 3.3. 化合物 **2d** の構造改変

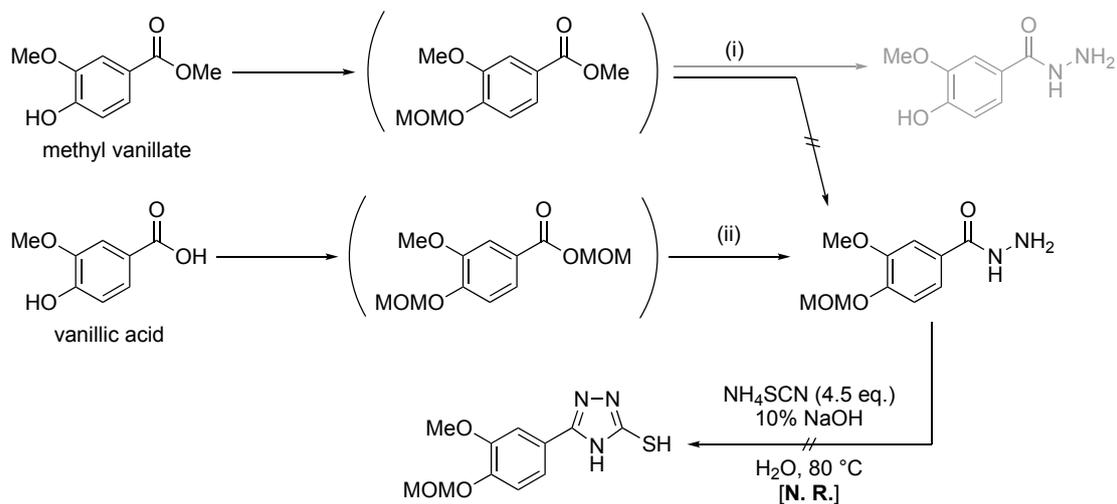
化合物 **2b** の構造改変と並行して、化合物 **2d** の構造改変を行った。構造類縁体の合成は、化合物 **2b** 誘導体と同様の経路で行うこととした。バニリン酸とチオセミカルバジドを原料に化合物 **90d** を取得したのち、化合物 **91** との S<sub>N</sub>2 反応によって化合物 **92b** の合成を試みた。が、目的でない反応が多数進行し、**92d** を得ることができなかった(Scheme 19)。そこで、ヒドロキシ基を保護して合成を行う計画を立てた。



**Scheme 19.** 化合物 **92d** の合成

Reagents and conditions: (i)  $\text{H}_2\text{N-NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (8.0 eq.), MeOH, reflux, 2.5 d, yield 58%; (ii) KSCN (2.0 eq.), conc. HCl,  $\text{H}_2\text{O}$ , reflux, 7 h; (iii)  $\text{H}_2\text{O}$ , reflux, 12 h.

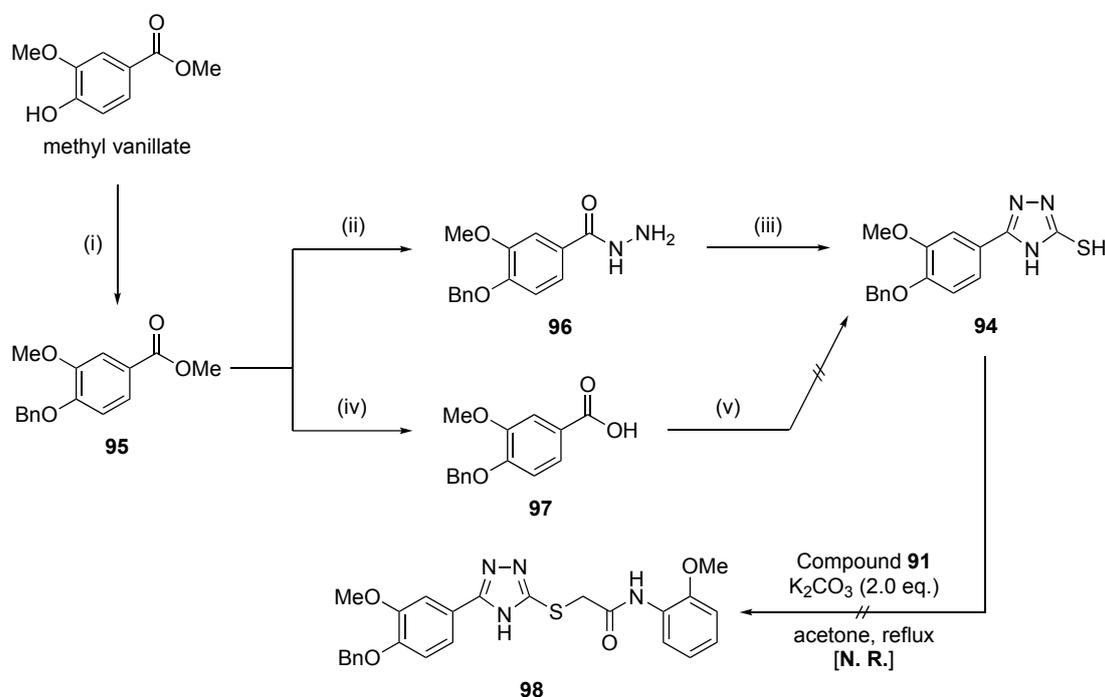
まず、メトキシメチル基(-MOM)による保護を試みた(Scheme 20)。バニリン酸を原料に、MOM 保護反応を行ったのち、MOM エステルを有する中間体を経由して、ヒドラジド化合物を得た。



**Scheme 20.** MOM 保護基を用いた化合物 **2d** 誘導体の合成

Reagents and conditions: (i) MOMCl (1.5 eq.), DIPEA (1.0 eq.), DCM, 0 °C to rt, 20 h;  $\text{H}_2\text{N-NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (10 eq.), MeOH, reflux, 1.5 h; (ii) MOMCl (5.5 eq.), DIPEA (5.5 eq.), DCM, 0 °C to rt, 5 h;  $\text{H}_2\text{N-NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (10 eq.), MeOH, reflux, 4 h, yield 37%.

続いて、ベンジル基による保護を試みた(Scheme 21)。バニリン酸メチルのヒドロキシ基をベンジル基で保護して化合物 **95** を得たのち、ヒドラジド化合物 **96** を経由し、トリアゾール化合物 **94** を得た。化合物 **95** のメチルエステルを加水分解して得た化合物 **97** から、チオセミカルバジドを用いて化合物 **94** を合成する反応は進行しなかった。化合物 **94** と **91** の  $S_N2$  反応による化合物 **98** の合成は、反応の進行を確認できなかった。ベンジル保護基を導入したことで分子全体の極性が変化し、反応性が低下したと考えた。



**Scheme 21.** ベンジル保護を用いた化合物 **2d** 誘導体の合成

Reagents and conditions: (i) benzylbromide (1.2 eq.),  $K_2CO_3$  (2.0 eq.), acetone, rt, 14 h, yield 98%; (ii)  $H_2N-NH_2 \cdot H_2O$  (excess), MeOH, reflux, 2 d, yield 13%; (iii) KSCN (2.0 eq.), cat. HCl,  $H_2O$ , EtOH, reflux, 1.5 d, yield 45%; (iv) NaOH (2.0 eq.), MeOH, reflux, 13 h, yield 98%; (v) thiosemicarbazide (1.1 eq.), EtOH, reflux.

### III.4. 小括

神経芽腫は小児がんの一種であり、予後不良の患者では TrkB が過剰発現している。本研

究では、神経芽腫治療薬の開発を目指し、新規 TrkB 阻害剤の探索研究を行った。TrkB の BDNF 結合ドメインは細胞外に位置するため、低濃度で使用できる薬物開発の有望な標的である。先行研究のスクリーニング試験で得られたヒット化合物 **2a** およびその誘導体の構造を基に、TrkB 阻害活性と溶解性を両立できる新規化合物を設計した。

ヒット化合物 **2a** とその誘導体の合成経路を基に、化合物 **92b** と **93b** を合成した。化合物 **92b** は、1,2,4-トリアゾール環の 4 位がフリーのアミンになった構造を持ち、化合物 **93b** は化合物 **92b** を酸化して得た化合物である。化合物 **92b** と **93b** は TrkB 阻害活性を示さず、化合物のトリアゾール部位への立体構造導入が TrkB との相互作用形成に重要であると明らかになった。今後は、1,2,4-トリアゾール環の 4 位にヘテロ五員環構造を導入した化合物を合成し、TrkB 阻害活性の向上を目指す。

## IV. 総括

本研究では、薬剤耐性菌の産生するメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(MBL)、インフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼ活性を有する PA<sub>N</sub>、小児がんの一種である神経芽腫に過剰発現している TrkB をそれぞれ標的とした阻害剤の探索を行った。

特に MBL と PA<sub>N</sub> は活性中心に金属イオンを有するメタロエンザイムであり、それぞれの構造活性相関の知見を活用し、効果的に研究を進めることができると考えた。いずれの研究テーマも、ヒット化合物の構造改変で計算機による化合物設計を活用している。低分子の新規薬物が開発されにくくなっている昨今において、理論に基づいて創薬ができるのは大きな優位点であり、本研究の完成は論理的な薬物創製のモデルケースの一つになる。本研究のように、アカデミアからの薬物創製の実例が増えれば、企業の取り組みにくい感染症や希少疾患などに対する治療薬の開発研究が進むことも期待できる。

## V. 実験項

### V.1. 化合物の合成

#### General Experimental

All chemical reagents were commercially available. Silica gel column chromatography was performed on Wakogel C-200 and C-400. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on aluminium sheets coated with silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck 5554). <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on a JEOL ECZ-400 spectrometer (operating as 399.78 MHz for <sup>1</sup>H) using tetramethylsilane (TMS) as the internal reference for <sup>1</sup>H ( $\delta = 0$  ppm). High-resolution electrospray-ionization time-of-flight mass spectroscopy was performed by a BRUKER microTOF model using positive or negative mode for methanol solutions of samples.

The following abbreviations are used for the notation of the <sup>1</sup>H-NMR spectrum data. (s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet, br: broad)

#### Organic Synthesis Procedure

**Method A; phenoxyacetonitrile (13a).** A 30 mL acetone solution containing phenol (2.82 g, 30.0 mmol) and potassium carbonate (8.28 g, 2.0 eq.) was added to bromoacetonitrile (2.52 mL, 1.2 eq.). The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with water (200 mL) and extracted with chloroform (2×100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was concentrated *in vacuo* to yield **3** as a yellow oil (3.82 g, 96%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.34 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.08 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.97 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 4.73 (s, 2H)

**2-(4-methylphenoxy)acetonitrile (13b).** Following method A, compound **13b** was synthesized

using 4-methylphenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.09 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.83 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 4.60 (s, 2H), 2.27 (s, 3H)

**2-(4-ethylphenoxy)acetonitrile (13c).** Following method A, compound **13c** was synthesized using 4-ethylphenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.18 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 4.73 (s, 2H), 2.63 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.23 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**2-(4-(*tert*-butyl)phenoxy)acetonitrile (13d).** Following method A, compound **13d** was synthesized using 4-*tert*-butylphenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.60 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 4.74 (s, 2H), 1.32 (s, 9H).

**2-(4-methoxyphenoxy)acetonitrile (13e).** Following method A, compound **13e** was synthesized using 4-methoxyphenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.93 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.86 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.68 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).

**2-(4-acetylphenoxy)acetonitrile (13f).** Following method A, compound **13f** was synthesized using 4-acetylphenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.00 (s,  $J = 10.6$  Hz, 2H), 7.03 (d,  $J = 10.6$  Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 2.58 (s, 3H).

**2-(4-fluorophenoxy)acetonitrile (13i).** Following method A, compound **13i** was synthesized using 4-fluorophenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.03-6.98 (m, 2H), 6.94-6.90 (m, 2H), 4.68 (s, 2H).

**2-(4-chlorophenoxy)acetonitrile (13j).** Following method A, compound **13j** was synthesized

using 4-chlorophenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.30 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.73 (s, 2H).

**2-(4-bromophenoxy)acetonitrile (13k).** Following method A, compound **13k** was synthesized using 4-bromophenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.46 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 4.75 (s, 2H).

**2-(4-(trifluoromethyl)phenoxy)acetonitrile (13l).** Following method A, compound **13l** was synthesized using 4-(trifluoromethyl)phenol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.07 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 4.82 (s, 2H).

**Method B; 2-phenoxyethanethioamide (14a).** The mixture of phenoxyacetonitrile **3** (2.32 g, 17.4 mmol) and thioacetamide (1.96 g, 1.5 eq.) was dissolved in DMF (15 mL)/1,4-dioxane (15 mL) at 100 °C. A conc. HCl (8.2 mL) was added to the solution and stirred overnight at the same temperature. The reaction was quenched with saturated aqueous sodium bicarbonate (200 mL) and extracted with AcOEt (100 mL $\times$ 2). The combined organic layers were washed with water (200 mL $\times$ 2), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (hexane/AcOEt = 3/1 v/v) to yield **4** as a colorless solid (218 mg, 7.5%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.90 (br, 2H), 7.32 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.04 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.93 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 4.87 (s, 2H)

**2-(4-methylphenoxy)ethanethioamide (14b).** Following method B, compound **14b** was synthesized using compound **13b**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.95 (br, 1H), 7.53 (br, 1H), 7.12 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.82 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.85 (s, 2H), 2.30 (s, 3H)

**2-(4-ethylphenoxy)ethanethioamide (14c).** Following method B, compound **14c** was synthesized using compound **13c**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.96 (br, 1H), 7.57 (br, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.85 (s, 2H), 2.60 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.21 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H).

**2-(4-(*tert*-butyl)phenoxy)ethanethioamide (14d).** Following method B, compound **14d** was synthesized using compound **13d**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.96 (br, 1H), 7.56 (br, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.86 (s, 2H), 1.30 (s, 9H)

**2-(4-methoxyphenoxy)ethanethioamide (14e).** Following method B, compound **14e** was synthesized using compound **13e**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.12 (br, 2H), 6.84 (s, 4H), 4.80 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).

**2-(4-acetylphenoxy)ethanethioamide (14f).** Following method B, compound **14f** was synthesized using compound **13f**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.97 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.87 (br, 1H), 7.58 (br, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.94 (s, 2H), 2.57 (s, 3H).

**2-(4-fluorophenoxy)ethanethioamide (14i).** Following method B, compound **14i** was synthesized using compound **13i**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.91 (br, 1H), 7.55 (br, 1H), 7.04-7.00 (m, 2H), 6.90-6.86 (m, 2H), 4.84 (s, 2H).

**2-(4-chlorophenoxy)ethanethioamide (14j).** Following method B, compound **14j** was synthesized using compound **13j**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.97 (br, 1H), 7.17-7.46 (m, 2H), 6.76-7.09 (m, 2H), 4.79 (s, 2H).

**2-(4-bromophenoxy)ethanethioamide (14k).** Following method B, compound **14k** was synthesized using compound **13k**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.87 (br, 1H), 7.59 (br, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.84 (s, 2H).

**2-(4-(trifluoromethyl)phenoxy)ethanethioamide (14l).** Following method B, compound **14l** was synthesized using compound **13l**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.85 (br, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H), 7.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.92 (s, 2H).

**6-(2-chloroacetyl)-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone (15).** Aluminum chloride (20.0 g, 150 mmol) was dissolved in carbon disulfide (200 mL), and chloroacetyl chloride (6.8 mL, 85.0 mmol) was added at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 15 minutes, and 3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone (7.40 g, 50.0 mmol) dissolved in carbon disulfide (200 mL) was added to the mixture. After the mixture was refluxed for 5 hours, the resulting mixture was cooled to room temperature. The solvent was removed by decantation, and water (500 mL) was added to the residual solid. Quinolinone **5** was collected by filtration as a brown solid (11.0 g, 98%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.45 (s, 1H), 7.83-7.79 (m, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 2.95 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.50 (overlapped with DMSO-*d*<sub>5</sub>, 2H)

**Method C; compound 1a.** The mixture of thioamide **14a** (520 mg, 3.11 mmol) and quinolinone **15** (650 mg, 1.0 eq.) was dissolved in EtOH (30 mL)/DMF (10 mL) and stirred at 80 °C for 24 hours. The reaction was monitored by TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt = 3/1 v/v). After the solvents were removed, MeOH was added to residue and precipitated **1** was collected as a colorless solid (355 mg, 34%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.18 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz,

1H), 7.33 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.00 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 2.94 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.49 (overlapped with DMSO- $d_5$ , 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{19}H_{17}N_2O_2S^+$ : 337.10107, found: 337.10153.

**Compound 1b.** Following method C, compound **1b** was synthesized using compounds **14b** and **15**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.19 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.73 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.12 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.97 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.90 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 2.93 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.49 (overlapped with DMSO- $d_5$ , 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{20}H_{19}N_2O_2S^+$ : 351.11672, found: 351.11648.

**Compound 1c.** Following method C, compound **1c** was synthesized using compounds **14c** and **15**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K, DMSO- $d_6$ , 298 K):  $\delta$  10.18 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.99 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 2.94 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 2.55 (overlapped with DMSO- $d_5$ , 2H), 2.47 (overlapped with DMSO- $d_5$ , 2H), 1.15 (t,  $J = 7.8$  Hz, 3H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{21}H_{21}N_2O_2S^+$ : 365.13237, found: 365.13150.

**Compound 1d.** Following method C, compound **1c** was synthesized using compounds **14d** and **15**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K, DMSO- $d_6$ , 298 K):  $\delta$  10.19 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 7.00 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 5.44 (s, 2H), 2.95 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.51 (overlapped with DMSO- $d_5$ , 2H), 1.25 (s, 9H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{23}H_{25}N_2O_2S^+$ : 393.16367, found: 393.16271.

**Compound 1e.** Following method C, compound **1e** was synthesized using compounds **14e** and **15**.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.21 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.02 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 5.40 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.94 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.49 (overlapped with DMSO-*d*<sub>5</sub>, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc'd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ : 367.11164, found: 367.10997.

**Compound 1f.** Following method C, compound **1c** was synthesized using compounds **14f** and **15**.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298 K):  $\delta$  10.19 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.96 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 5.59 (s, 2H), 2.95 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.53 (overlapped with DMSO-*d*<sub>5</sub>, 3H), 2.47 (overlapped with DMSO-*d*<sub>5</sub>, 2H) ESI-HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc'd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ : 379.11164, found: 379.11159.

**Compound 1g.** Compound **1f** (1.00 mg 2.64 mmol) was dissolved in chloroform (40 mL)/methanol (5 mL) mixture. Nitrogen was bubbled to the solution for 10 min, and  $\text{NaBH}_4$  was added before the container was closed with a glass stopper. The solution was stirred in the dark at room temperature for 16 h. The solution was washed with 1 M hydrochloric acid (100 mL), and then with 1 M aqueous NaOH (100 mL). The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated *in vacuo* to yield compound **1g** as a colorless solid (2.38 mmol, 90%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298 K):  $\delta$  10.19 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.28 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.02 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.12 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 4.67 (qq,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 2.95 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.47 (overlapped with DMSO-*d*<sub>5</sub>, 2H), 1.30 (d,  $J = 5.1$  Hz, 3H); ESI-HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc'd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ : 381.12729, found: 381.12846

**Compound 1h.** Compound **1g** (200 mg, 0.526 mmol) was dissolved in DMF containing benzoyl chloride (1.51 mL, 25 eq.), and the solution was stirred under nitrogen at 100 °C for 18 h. At room

temperature, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) and trimethylamine (2 mL) were added to the solution, and the mixture was washed with water (200 mL×2) to remove DMF. The organic layer was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was purified via column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ethyl acetate = 80:20 v/v) to yield compound **1h** as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298 K): δ 10.19 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 11.0, 6.4 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 5.15 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.47 (overlapped with DMSO-*d*<sub>5</sub>, 2H); ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup>: 363.11672, found: 363.11766.

**Compound 1i.** Following method C, compound **1i** was synthesized using compounds **14i** and **15**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.19 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.19-7.09 (m, 4H), 6.90 (d, *J* = 8.6 Hz), 5.46 (s, 2H), 2.49 (overlapped, 2H); ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup>: 355.09165, found: 355.09089

**Compound 1j.** Following method C, compound **1j** was synthesized using compounds **14j** and **15**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298 K): δ 10.18 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H), 2.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.47 (overlapped with DMSO-*d*<sub>5</sub>, 2H); ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup>: 371.06210, found: 371.06018.

**Compound 1k.** Following method C, compound **1k** was synthesized using compounds **14k** and **15**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298 K): δ 10.18 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.48 (s,

2H), 2.94 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.50 (overlapped with DMSO- $d_5$ , 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{19}H_{16}BrN_2O_2S^+$ : 415.01159, found: 415.01163.

**Compound 11.** Following method C, compound **11** was synthesized using compounds **141** and **15**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K, DMSO- $d_6$ , 298 K):  $\delta$  10.19 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.71 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.29 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 2.95 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 2.47 (overlapped with DMSO- $d_5$ , 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{20}H_{16}F_3N_2O_2S^+$ : 405.08846, found: 405.08807.

**Method D; 6-nitro-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (18).** 3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one (6.49 g, 44.1 mmol) was dissolved in sulfuric acid (135 mL) and cooled to 0 °C. Water (32 mL) was added dropwise, followed by 35% nitric acid (10.4 mL, 70.6 mmol) dropwise following this, retaining temperature below 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 15 min. The reaction mixture then poured into ice water (500 mL) and extracted ethyl acetate (100 mL $\times$ 4). The combined organic layers dried over  $MgSO_4$ , and concentrated *in vacuo* to yield compound **5** as a yellow solid (7.77 g, 91%).  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.67 (s, 1H), 8.10-8.04 (m, 2H), 6.99 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 3.00 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.51 (overlapped with DMSO- $d_5$ , 2H)

**Method E; 6-amino-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (19).** A round-bottomed flask on ice bath was charged with compound **18**, 10% Pd/C dissolved with DMF/ethanol. The mixture was stirred at room temperature under  $H_2$ . After removing 10% Pd/C by filtration, the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in ethyl acetate, and the precipitated solid was removed by filtration. The solvent was removed by evaporation to yield compound **19** as a brown solid (392 mg, 69%).  $^1H$

NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.62 (s, 1H), 6.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.35-6.30 (m, 2H), 4.68 (s, 2H), 2.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H)

**Method F; 3-phenoxypropan-1-ol (20a).** A mixture of phenol (5.00 g, 53.1 mmol), 3-bromo-1-propanol (4.77 mL, 53.1 mmol) and potassium carbonate (7.33 g, 53.1 mmol) in acetone (50 mL) was stirred for 18 h at 60 °C. After completion of reaction, the solvent was removed by evaporation, and water (100 mL) was added to the resulting mixture. The organic layers were extracted with ethyl acetate (50 mL $\times$ 3), washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (hexane/ethyl acetate=3:1) to yield compound **20a** as colorless liquid (7.44 g, 92%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.28 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.96-6.90 (m, 2H), 4.11 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.85 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.04 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H)

**Method G; (3-bromopropoxy)benzene (21a).** Compound **20a** (7.40 g, 48.6 mmol) was dissolved in dry diethyl ether (50 mL) and cooled to 0 °C, phosphorus tribromide (1.54 mL, 16.0 mmol) was added. After stirring for 18 h under nitrogen, the reaction mixture was poured into water (200 mL) and extracted diethyl ether (50 mL $\times$ 3). The combined organic layers were washed with brine (50 mL $\times$ 1), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (hexane/ethyl acetate=30:1) to yield compound **20a** as a colorless liquid (5.06 g, 48%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.30-7.24 (m, 2H), 6.97-6.90 (m, 3H), 4.10 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 6.4 Hz), 2.31 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H)

**Method H; compound 16a.** Compound **19** (400 mg, 2.46 mmol) was dissolved in DMF (20 mL). potassium carbonate (510 mg, 3.69 mmol) and compound **21a** (259 mg, 1.23 mmol) were added. After the mixture was stirred for 6 h at 60 °C, the mixture was extracted with ethyl acetate (30 mL $\times$ 3). The

combined organic layers were washed with brine (30 mL×1), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (ethyl acetate/hexane = 2:1 v/v) to yield compound **5** as a yellow oil (163 mg, 11%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.94 (s, 1H), 7.30-7.25 (m, 2H), 6.97-6.89 (m, 3H), 6.67-6.65 (m, 1H), 6.45-6.44 (m, 2H), 4.07 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.31 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.08 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H)

**Method I; Compound 17a.** Compound **16a** (163 mg, 0.551 mmol) was dissolved in DMF (7 mL). potassium carbonate (115 mg, 0.827 mmol), KI (91.5 mg, 0.551 mmol) and benzyl chloride (69.7 mg, 0.551 mmol) were added. After the mixture was stirred for 1 h at 60 °C, the mixture was extracted with ethyl acetate (15 mL×2). The combined organic layers were washed with brine (15 mL×1), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (ethyl acetate/hexane = 1:1 v/v) to yield compound **4a** as a yellow solid (106 mg, 50%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.41 (s, 1H), 7.32-7.20 (m, 7H), 6.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.57-6.53 (m, 3H), 4.51 (s, 1H), 4.01 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.09 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H). ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 387.2073, found: 387.2064

**Compound 17b.** Following method I, compound **17b** was synthesized using **16a** and 1-(bromomethyl)-3-chlorobenzene. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.51 (br s, 1H), 7.31-7.27 (m, 2H), 7.26-7.20 (m, 3H), 7.09-7.08 (m, 1H), 6.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.57-6.55 (m, 2H), 6.51-6.48 (m, 1H), 4.47 (s, 1H), 4.00 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.09 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H). ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 421.1683, found: 421.1688

**Compound 17c.** Following method I, compound **17c** was synthesized using **16a** and 1-(bromomethyl)-3-methoxybenzene. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.41 (br s, 1H), 7.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.81-6.76 (m, 3H), 6.57-6.51 (m, 3H), 4.48 (s, 1H), 4.01 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.61 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.10 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H). ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 417.2178, found: 417.2152

**3-(4-methylphenoxy)propan-1-ol (20b).** Following method F, compound **20b** was synthesized using 4-methylphenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.10 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.86 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.29 (s, 1H), 2.03 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.94 (br s, 1H).

**3-(4-ethylphenoxy)propan-1-ol (20c).** Following method F, compound **20c** was synthesized using 4-ethylphenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.11 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.87 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.59 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.04 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.21 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H).

**3-(4-methoxyphenoxy)propan-1-ol (20d).** Following method F, compound **20d** was synthesized using 4-methoxyphenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.85-6.84 (m, 4H), 4.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.87 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.03 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.72 (br, 1H).

**3-(4-nitrophenoxy)propan-1-ol (20f).** Following method F, compound **20f** was synthesized using 4-nitrophenol. Synthesized in the same procedure as compound 3 with substituting 4-nitrophenol (5.00 g, 35.9 mmol) for phenol; yield: 5.51 g (27.9 mmol, 78%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K,

CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.19 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.95 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.21 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.87 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.08 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**ethyl 4-(3-hydroxypropoxy)benzoate (20g).** Following method F, compound **20g** was synthesized using ethyl 4-hydroxybenzoate. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.98 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.34 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 4.17 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.87 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.06 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 1.37 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H)

**3-(4-fluorophenoxy)propan-1-ol (20h).** Following method F, compound **20h** was synthesized using 4-fluorophenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.96 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.85-6.82 (m, 2H), 4.08 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.85 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.03 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 1.86 (s, 1H).

**3-(4-chlorophenoxy)propan-1-ol (20i).** Following method F, compound **20i** was synthesized using 4-fchlorophenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.23 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.83 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.09 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.86 (t,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 2.04 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 1.81 (s, 1H).

**3-(4-bromophenoxy)propan-1-ol (20j).** Following method F, compound **20j** was synthesized using 4-bromophenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.37 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.78 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.08 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.85 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.03 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 1.77 (br, 1H).

**3-(4-iodophenoxy)propan-1-ol (20k).** Following method F, compound **20k** was synthesized using 4-iodophenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.55 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.68 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.09 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.85 (q,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 2.04 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 1.65 (br, 1H)

**3-(4-(trifluoromethyl)phenoxy)propan-1-ol (20l).** Following method F, compound **20l** was synthesized using 4-(trifluoromethyl)phenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.54 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.17 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.88 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.06 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H).

**3-(3-methylphenoxy)propan-1-ol (20m).** Following method F, compound **20m** was synthesized using 3-methylphenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.17 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.74-6.73 (m, 1H), 6.71-6.70 (m, 1H), 4.12 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.87 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.04 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.89 (br, 1H).

**3-(2-methylphenoxy)propan-1-ol (20n).** Following method F, compound **20n** was synthesized using 2-methylphenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.18-7.14 (m, 2H), 6.89-6.83 (m, 2H), 4.13 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.90 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.08 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H).

**3-(2,4-dimethylphenoxy)propan-1-ol (20o).** Following method F, compound **20o** was synthesized using 2,4-dimethylphenol. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.96-6.94 (m, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.10 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.89 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.07 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.95 (s, 1H).

**1-(3-bromopropoxy)-4-methylbenzene (21b).** Following method G, compound **21b** was synthesized using compound **20b**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.08 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.30 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H).

**1-(3-bromopropoxy)-4-ethylbenzene (21c).** Following method G, compound **21c** was synthesized using compound **20c**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.60 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.31 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.22 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H).

**1-(3-bromopropoxy)-4-methoxybenzene (21d).** Following method G, compound **21d** was synthesized using compound **20d**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.86-6.84 (m, 4H), 4.06 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.60 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.30 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H).

**1-(3-bromopropoxy)-4-nitrobenzene (21f).** Following method G, compound **21f** was synthesized using compound **20f**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.21 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.37 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H).

**ethyl 4-(3-bromopropoxy)benzoate (21g).** Following method G, compound **21g** was synthesized using compound **20g**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.00 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.35 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.17 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.35 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.38 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

**1-(3-bromopropoxy)-4-fluorobenzene (21h).** Following method G, compound **21h** was synthesized using compound **20h**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.98 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.87-6.83 (m, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.31 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H).

**1-(3-bromopropoxy)-4-chlorobenzene (21i).** Following method G, compound **21i** was synthesized using compound **20i**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.05 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.29 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H).

**1-bromo-4-(3-bromopropoxy)benzene (21j).** Following method G, compound **21j** was synthesized using compound **20j**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.37 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.31 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H).

**1-(3-bromopropoxy)-4-iodobenzene (21k).** Following method G, compound **21k** was synthesized using compound **20k**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.55 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.69 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.31 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H).

**1-(3-bromopropoxy)-4-(trifluoromethyl)benzene (21l).** Following method G, compound **21l** was synthesized using compound **20l**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.35 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H).

**1-(3-bromopropoxy)-3-methylbenzene (21m).** Following method G, compound **21m** was synthesized using compound **20m**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.17 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.73-6.70 (m, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.12 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H).

**1-(3-bromopropoxy)-2-methylbenzene (21n).** Following method G, compound **21n** was synthesized using compound **20n**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.18-7.14 (m, 2H), 6.90-6.83 (m, 2H), 4.11 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.35 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H).

**1-(3-bromopropoxy)-2,4-dimethylbenzene (21o).** Following method G, compound **21o** was synthesized using compound **20o**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.97-6.95 (m, 2H), 6.74 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 4.09 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.64 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.34 (q,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.21 (s, 3H).

**Compound 16b.** Following method H, compound **16b** was synthesized using compound **21b**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.23 (s, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.81 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.55 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.46-6.43 (m, 2H), 4.60 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.78 (s, 1H), 3.32 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.86 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.57 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.29 (s, 1H), 2.07 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**Compound 16c.** Following method H, compound **16c** was synthesized using compound **21c**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.68 (s, 1H), 7.12 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.83 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.58 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.46-6.44 (m, 2H), 4.07 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.32 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.86 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.59 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.07 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.21 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

**Compound 16d.** Following method H, compound **16d** was synthesized using compound **21d**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.89 (s, 1H), 6.85-6.83 (m, 4H), 6.61-6.56 (m, 1H), 6.46-6.44 (m, 2H), 4.04 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.12 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.87 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.07 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**Compound 16f.** Following method H, compound **16f** was synthesized using compound **21f**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  9.67 (s, 1H), 8.20 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 7.15 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.60 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.40-6.36 (m, 2H), 4.21 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.13 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.72 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.33 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.99 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**Compound 16g.** Following method H, compound **16g** was synthesized using compound **21g**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.97 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.07-7.04 (m, 2H), 6.85 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.76 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.34 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 4.08 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.92 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.96 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.65 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.15 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.38 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H).

**Compound 16h.** Following method H, compound **16h** was synthesized using compound **21h**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.86 (s, 1H), 6.99-6.95 (m, 2H), 6.85-6.82 (m, 2H), 6.61-6.59 (m, 1H), 6.46-6.44 (m, 2H), 4.04 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.32 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.87 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.07 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**Compound 16i.** Following method H, compound **16i** was synthesized using compound **21i**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.65 (s, 1H), 7.24-7.22 (m, 2H), 6.84-6.82 (m, 2H), 6.65 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.46-6.44 (m, 2H), 4.05 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.74 (br s, 1H), 3.31 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.86 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.07 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H).

**Compound 16j.** Following method H, compound **16j** was synthesized using compound **21j**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.15 (s, 1H), 7.36 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.78 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.63-6.60 (m, 1H), 6.45-6.43 (m, 2H), 4.04 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.73 (br, 1H), 3.31 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.86 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 2.57 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.07 (q,  $J = 5.6$  Hz, 2H).

**Compound 16k.** Following method H, compound **16k** was synthesized using compound **21k**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.92 (s, 1H), 7.57-7.54 (m, 2H), 6.69-6.67 (m, 2H), 6.58-6.56 (m,

1H), 6.45-6.44 (m, 2H), 4.05 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.31 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.86 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.08 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**Compound 16l.** Following method H, compound **16l** was synthesized using compound **21l**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.83 (s, 1H), 7.54 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.96 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.60 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.46-6.45 (m, 2H), 4.13 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.71 (br, 1H), 3.33 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.86 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.11 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**Compound 16m.** Following method H, compound **16m** was synthesized using compound **21m**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.84 (s, 1H), 7.17 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.74-6.71 (m, 2H), 6.68-6.66 (m, 1H), 6.46-6.45 (m, 2H), 4.07 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.32 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.86 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.08 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**Compound 16n.** Following method H, compound **16n** was synthesized using compound **21n**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.71 (s, 1H), 7.15 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 6.87 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 6.82-6.80 (m, 1H), 6.70-6.66 (m, 1H), 6.54-6.52 (m, 2H), 4.09 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.36 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.87 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.15 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**Compound 16o.** Following method H, compound **16o** was synthesized using compound **21o**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.65 (s, 1H), 6.97-6.93 (m, 2H), 6.71-6.66 (m, 2H), 6.51-6.49 (m, 2H), 4.06 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.35 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 2.87 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.12 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

**(2-bromoethyl)cyclohexane.** Cyclohexaneethanol (10.0 g, 78.0 mmol) was dissolved in dry diethyl ether (50 mL) and cooled to 0 °C, phosphorus tribromide (2.59 mL, 27.3 mmol) was added. After stirring for 18 h under nitrogen, the reaction mixture was poured into water (150 mL) and extracted diethyl ether (50 mL×3). The combined organic layers were washed with brine (50 mL×1), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (hexane) to yield (2-bromoethyl)cyclohexane as colorless liquid (6.64 g, 45%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.44 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.76 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.72-1.69 (m, 5H), 1.51-1.41 (m, 1H), 1.30-1.09 (m, 3H), 0.95-0.86 (m, 2H).

**Method J; compound 22a.** Compound **16a** (121 mg, 409 μmol) was dissolved in DMF (10 mL), and (2-bromoethyl)cyclohexane (118 mg, 614 μmol), potassium carbonate (113 mg, 818 μmol) and KI (67.9 mg, 409 μmol) were added. After the mixture was stirred for 60 h at 60 °C, the mixture was extracted with ethyl acetate (10 mL×2). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (ethyl acetate/hexane = 3/1 v/v) to yield compound **22a** as a yellow solid (29.1 mg, 18%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.47 (s, 1H), 7.31-7.27 (m, 2H), 6.95 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.51-6.49 (m, 2H), 4.00 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.45 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.25 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.02 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.72-1.64 (m, 5H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.28-1.13 (m, 4H), 0.98-0.89 (m, 2H). ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 407.2699, found: 407.2712.

**Compound 22b.** Following method J, compound **22b** was synthesized using compound **16b**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.54 (br s, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.59 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.50-6.48 (m, 2H), 3.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.44 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H),

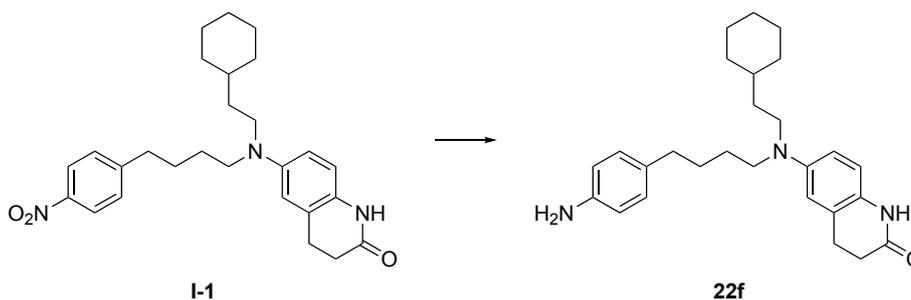
3.25 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.82 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.56 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.00 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.72-1.64 (m, 5H), 1.46-1.40 (m, 2H), 1.27-1.13 (m, 4H), 0.98-0.88 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{27}H_{37}N_2O_2^+$ : 421.2855, found: 421.2851.

**Compound 22c.** Following method J, compound **22c** was synthesized using compound **16c**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.47 (s, 1H), 7.11 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.83 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.67 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.51-6.50 (m, 2H), 3.98 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 3.45 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.25 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.82 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.62-2.55 (m, 4H), 2.01 (q,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 1.72-1.64 (m, 5H), 1.45- 1.43 (m, 2H), 1.28-1.17 (m, 4H), 1.21 (t,  $J = 8.0$  Hz, 3H), 0.98-0.90 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{28}H_{39}N_2O_2^+$ : 435.3012, found: 435.3013.

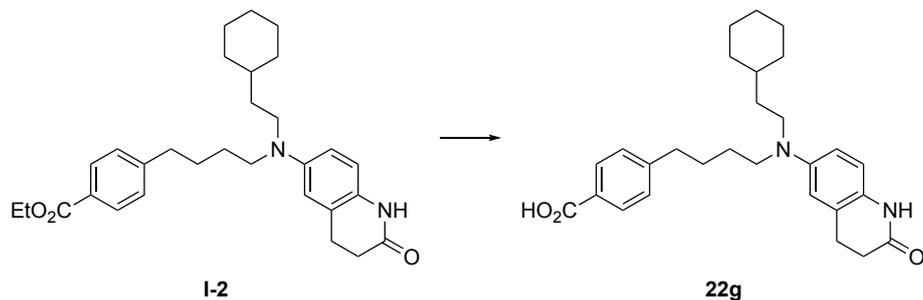
**Compound 22d.** Following method J, compound **22d** was synthesized using compound **16d**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.96 (s, 1H), 6.85-6.83 (m, 4H), 6.72-6.69 (m, 1H), 6.52-6.51 (m, 2H), 3.95 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.44 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.25 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.84 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.57 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.00 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.73-1.65 (m, 5H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.28-1.15 (m, 4H), 0.99-0.91 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{27}H_{37}N_2O_3^+$ : 437.2804, found: 437.2815.

**Compound 22e.** Compound **22d** (20.0 mg, 0.0458 mmol) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (2 mL), and  $BBr_3$  (17.6 mg, 0.0687 mmol) was added on ice bath. After the mixture was stirred at 0 °C for 40 min., methanol (2 mL) was added to quench the reaction. The resulting mixture was poured into  $H_2O$  (20 mL), and organic layers were extracted with AcOEt (20 mL $\times$ 2). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated *in vacuo* to yield compound **22e** as a light green solid (12.8 mg, 66%).  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.68 (br, 1H), 6.77 (s, 4H),

6.58 (s, 1H), 6.50 (s, 2H), 5.31 (br, 1H), 3.93 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H), 3.44 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.24 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 2.83 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.57 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.98 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 1.65 (overlapped with H<sub>2</sub>O, 4H) 1.43 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.26-1.19 (m, 5H), 0.95 (t,  $J = 11.0$  Hz, 2H); ESI-LRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 423.2648, found: 423.2426.



**Compound 22f.** Intermediate 1 (**I-1**) was synthesized following method J from compound **16f**. Intermediate 1 was dissolved in DMF (3.0 mL), saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl (0.50 mL) was added, followed by addition of iron powder (62.2 mg). The mixture was stirred at 100 °C for 6 h. After cooled to room temperature, the mixture was filtered, and the filtrate was extracted CHCl<sub>3</sub> (25 mL×3). The combined organic layers were washed with brine (25 mL×1), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (ethyl acetate/Hexane=2/1 v/v) to yield compound **22f** as a brown oil (1.24 g, 37%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.68 (s, 1H), 6.67-6.63 (m, 3H), 6.51-6.45 (m, 4H), 4.59 (s, 2H), 3.84 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.20 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.74 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.34 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.83 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.70-1.59 (m, 5H), 1.37-1.32 (m, 2H), 1.26-1.07 (m, 4H), 0.94-0.85 (m, 2H). ESI-HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 422.2808, found: 422.2798.



**Compound 22g.** Intermediate 2 (**I-2**) was synthesized following method J from compound **16g**. Intermediate 2 (47.5 mg, 99.2  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in ethanol (3.0 mL), and NaOH (93.7 mg, 2.34 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (1.0 mL) was added. The mixture was stirred at 80  $^\circ\text{C}$  for 1 h. After the reaction, the mixture was neutralized with 1 N HCl, and extracted with ethyl acetate (15 mL $\times$ 3). The combined organic layers were washed with brine (15 mL $\times$ 1), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo* to yield compound **22g** as yellow oil (43.6 mg, 98%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.69 (s, 1H), 7.88 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 7.01 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.66 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.50-6.46 (m, 2H), 4.07 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.20 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.72 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.92 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.68-1.61 (m, 5H), 1.37-1.31 (m, 2H), 1.23-1.09 (m, 4H), 0.92-0.87 (m, 2H). ESI-HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc'd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4^+$ : 451.2597, found: 451.2556.

**Compound 22h.** Following method J, compound **22h** was synthesized using compound **16h**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.57 (s, 1H), 6.97 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 8.86-8.82 (m, 2H), 6.78-6.76 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.54-6.52 (m, 2H), 3.96 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.45 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.26 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.85 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.59 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.02 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.73-1.66 (m, 5H), 1.48-1.42 (m, 2H), 1.28-1.15 (m, 4H), 0.99-0.89 (m, 2H); ESI-HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc'd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{FN}_2\text{O}_2^+$ : 425.2604, found: 425.2583.

**Compound 22i.** Following method J, compound **22i** was synthesized using compound **16i**.  $^1\text{H}$

NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.58 (br s, 1H), 7.23 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 6.83 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.61- 6.59 (m, 1H), 6.50-6.49 (m, 2H), 3.97 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 3.43 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 3.24 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 2.84 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.57 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 2.01 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 1.71-1.64 (m, 5H), 1.45- 1.40 (m, 2H), 1.27-1.10 (m, 4H), 0.97-0.88 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 441.2309, found: 441.2334.

**Compound 22j.** Following method J, compound **22j** was synthesized using compound **16j**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9.37 (s, 1H), 7.36 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 6.78 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 6.74 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.52-6.50 (m, 2H), 3.96 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 3.43 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 3.24 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 2.84 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.58 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.01 (q,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 1.72-1.65 (m, 5H), 1.46-1.41 (m, 2H), 1.28-1.15 (m, 4H), 0.98-0.88 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 487.1787, found: 487.1847.

**Compound 22k.** Following method J, compound **22k** was synthesized using compound **16k**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9.23 (s, 1H), 7.54 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 6.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.67 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 2H), 6.52-6.49 (m, 2H), 3.95 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 3.43 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 3.23 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 2.83 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.58 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.01 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 1.72-1.64 (m, 5H), 1.46-1.40 (m, 2H), 1.28-1.14 (m, 4H), 0.98-0.90 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 533.1665, found: 532.1662.

**Compound 22l.** Following method J, compound **22l** was synthesized using compound **16l**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.95 (s, 1H), 7.55 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 2H), 6.96 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.71 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.53-6.51 (m, 2H), 4.04 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 3.45 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 3.25 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 2.83 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.57 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.05 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 1.71-1.68

(m, 5H), 1.46-1.41 (m, 2H), 1.28-1.14 (m, 4H), 0.97-0.89 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{27}H_{34}F_3N_2O_2^+$ : 475.2572, found: 475.2580.

**Compound 22m.** Following method J, compound **22m** was synthesized using compound **16m**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.89 (s, 1H), 7.16 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.77 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.72-6.69 (m, 2H), 6.65-6.61 (m, 1H), 6.54-6.47 (m, 2H), 3.98 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.45 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.25 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.84 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.57 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.01 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.70-1.63 (m, 5H), 1.43-1.41 (m, 2H), 1.26-1.14 (m, 4H), 0.98-0.90 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{27}H_{37}N_2O_2^+$ : 420.2855, found: 420.2852.

**Compound 22n.** Following method J, compound **22n** was synthesized using compound **16n**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.76 (s, 1H), 7.16-7.12 (m, 2H), 6.86 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.63-6.52 (m, 3H), 4.01 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.49 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.26 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.83 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.57 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.05 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.70-1.64 (m, 5H), 1.46-1.44 (m, 2H), 1.28-1.14 (m, 4H), 0.98-0.87 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{27}H_{37}N_2O_2^+$ : 421.2855, found: 421.2860

**Compound 22o.** Following method J, compound **22o** was synthesized using compound **16o**.  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.46 (brs, 1H), 6.96-6.88 (m, 2H), 6.67-6.63 (m, 2H), 6.56-6.49 (m, 2H), 3.95 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.46 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.24 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.81 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.55 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.15 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.68-1.62 (m, 2H), 1.45-1.41 (m, 2H), 1.24-1.13 (m, 4H), 0.96-0.83 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{28}H_{39}N_2O_2^+$ : 435.3012, found: 435.3067.

***tert*-butyl 4-(2-hydroxyethyl)piperidine-1-carboxylate (27).** 4-piperidine ethanol (500 mg, 3.87 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). A solution of di-*tert*-butyl-dicarbonate (929 mg, 4.26 mmol) and triethylamine (1.61 mL, 11.6 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 mL) was added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h and subsequently stirred at room temperature for 16 h. A saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) was added, the organic layer was collected, and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL×2). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to yield compound **27** as a colorless oil (861 mg, 97%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.09-4.06 (m, 2H), 3.71 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.73-2.65 (m, 2H), 1.68- 1.49 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.17-1.07 (m, 2H).

***tert*-butyl 4-(2-chloroethyl)piperidine-1-carboxylate (28).** Compound **27** (861 mg, 3.75 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL), and carbontetrachloride (363 μL, 3.75 mmol) was added. A solution of triphenylphosphine (984 mg, 3.75 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) was added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. A further carbontetrachloride (182 μL, 1.88 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 20 h. After the reaction, the mixture was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (40 mL×2) and brine (40 mL×1). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (Hexane/AcOEt = 7/1 v/v) to yield compound **28** as a colorless oil (586 mg, 63%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.11-4.07 (m, 2H), 3.58 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.73-2.66 (m, 2H), 1.74-1.61 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.15-1.05 (m, 2H).

**Compound 23.** Following method J, compound **29** was synthesized using compounds **16b** and **28**. Then, compound **29** (94.1 mg, 0.180 mmol) was dissolved in AcOEt (8.0 mL), and 4 N HCl (2 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was neutralized with

saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with CHCl<sub>3</sub> (20 mL×3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL×1), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to yield compound **23** as a yellow oil (54.0 mg, 71 %). Compound **29**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.69 (s, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.51-6.47 (m, 2H), 4.34 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.95 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.91-3.88 (m, 4H), 3.20 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H) 2.22 (s, 3H), 1.89-1.85 (m, 2H), 1.62-1.59 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.00-0.90 (m, 1H); Compound **23**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.70 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.66 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.51-6.47 (m, 2H), 3.95 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.09-3.06 (m, 2H), 2.73 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.67-2.62 (m, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.88 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.72-1.69 (m, 2H), 1.41-1.38 (m, 4H), 1.23-1.12 (m, 3H); ESI-HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 422.2808, found: 422.2820

**1-(2-chloroethyl)piperidine (30)**. A solution of 4-piperidineethanol (500 mg, 3.87 mmol) in toluene (5.0 mL) was cooled to 0 °C under nitrogen, and SOCl<sub>2</sub> (337 μL, 4.64 mmol) was added. The reaction mixture was allowed to warm to 60 °C and stirred for 3 h. The solvent was removed *in vacuo*. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and water were added, and the mixture was neutralized with a 1 M NaOH aqueous solution. The mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL×3). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to yield compound **30** as a yellow liquid (129 mg, 23%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.43-2.42 (m, 4H), 1.59- 1.53 (m, 4H), 1.42-1.38 (m, 2H)

**Compound 24**. Following method J, compound **24** was synthesized using compounds **16b** and **30**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.71 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.4 Hz,

2H), 6.66 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.56-6.51 (m, 2H), 3.95 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.39 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 3.27 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.73 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.60-2.45 (m, 6H), 2.32 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.23 (t, 3H), 1.91 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 1.57-1.51 (m, 4H), 1.43-1.38 (m, 2H); ESI-HRMS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{26}H_{36}N_3O_2^+$ : 422.2808, found: 422.2791

**3-methylbut-2-enoyl chloride (31).** A mixture of 3-methylbut-2-enoic acid (3.00 g, 30.0 mmol) in dry  $CH_2Cl_2$  (100 mL) at 0 °C under nitrogen was added  $SOCl_2$  (3.3 mL, 45.0 mmol) followed by a catalytic amount of DMF (3 drops). The reaction mixture was allowed to warm to 50 °C and stirred for 1 h. The solvent was removed *in vacuo* to yield compound **31** as a colorless liquid. The whole amount of compound **31** was directly used for the next reaction.

**3-methyl-N-phenylbut-2-enamide (32).** Compound **31** was dissolved in dry  $CH_2Cl_2$  (70 mL), and aniline (2.79 g, 30.0 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature under nitrogen and added dropwise of diisopropylethylamine (7.74 g, 60.0 mmol). After the mixture was stirred for 2.5 h, the solvent was removed *in vacuo*. The residue was added saturated aqueous  $NaHCO_3$  and extracted with AcOEt (100 mL $\times$ 3). The combined organic layers were washed with 1 N aqueous HCl (100 mL $\times$ 1) and brine (100 mL $\times$ 1), dried over  $MgSO_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column ( $CH_2Cl_2$ /hexane = 3/1 v/v) to yield compound **32** as a colorless solid (3.75 g, 70%).  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.54-7.52 (m, 2H), 7.32 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.10-7.08 (m, 2H), 5.71 (s, 1H), 2.23 (s, 3H), 1.90 (s, 3H).

**4,4-dimethyl-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (33).** Compound **32** (2.22 g, 12.6 mmol) was dissolved in dry  $CH_2Cl_2$  (30 mL), and aluminium chloride (3.39 g, 25.2 mmol) was added. The mixture was stirred at 50 °C for 1 h under nitrogen. After the reaction was completed, the solvent was removed

*in vacuo*. The residue was added 1 N HCl (90 mL×1) and extracted with AcOEt (90 mL×3). The combined organic layers were washed with brine (90 mL×1), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt = 10/1 v/v) to yield compound **33** as a colorless solid (1.45 g, 65%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.05 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.18 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.50 (s, 2H), 1.34 (s, 6H).

**4,4-dimethyl-6-nitro-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (34)**. Following method D, compound **34** was synthesized using compound **33**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.01 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 2.57 (s, 2H), 1.41 (s, 6H).

**6-amino-4,4-dimethyl-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (35)**. Following method E, compound **35** was synthesized using compound **34**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.67 (s, 1H), 6.50-6.48 (m, 2H), 6.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 2.62 (s, 2H), 1.09 (s, 6H).

**Compound 36**. Following method H, compound **36** was synthesized using compounds **21b** and **35**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.40 (br s, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H), 6.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.68- 6.65 (m, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.43 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.12 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.29 (s, 6H).

**Compound 25**. Following method J, compound **25** was synthesized using compound **36**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.66 (br s, 1H), 7.08 (d, 8.4 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.66-6.65 (m, 1H), 6.62-6.59 (m, 1H), 6.52-6.49 (m, 1H), 3.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.46 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.43 (s, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.02 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.72-1.60 (m, 5H), 1.47-1.42

(m, 2H), 1.30-1.14 (m, 4H), 1.28 (s, 6H), 0.98-0.93 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z):  $[M+H]^+$  calc'd for  $C_{29}H_{41}N_2O_2^+$ : 449.3168, found: 449.3247.

**3-(2-bromophenyl)-2,2-dimethylpropanenitrile (37).** A solution of isobutyronitrile (0.716 g, 10.4 mmol) in dry THF (6 mL) was added LiHMDS (16 mmol) at 0 °C under nitrogen, stirred for 20 min, and added 1-bromo-2-(bromomethyl)benzene (2.00 g, 8.00 mmol) in dry THF (14 mL). After stirring for 15 h at rt, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous  $NH_4Cl$ , extracted with AcOEt (50 ml $\times$ 3). The combined organic layers were washed with brine (50 ml $\times$ 1), dried over  $MgSO_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (Hexane/AcOEt = 30/1 v/v) to yield compound **37** as yellow liquid (1.83 g, 96%).  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.59 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.32 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.15 (t,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 3.08 (s, 2H), 1.43 (s, 6H).

**3,3-dimethyl-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (38).** A mixture of compound **37** (2.00 g, 8.40 mmol), CuI (48.0 mg, 3.0 mol%), KI (13.9 mg, 1.0 mol%), *N*-acetylglycine (59.0 mg, 6.0 mol%), NaOH (1.01 g, 25.2 mmol) in *tert*-BuOH (10 mL) was added to screw-capped bial. The mixture was stirred at 100 °C for 48 h and diluted with  $CH_2Cl_2$ . The crude reaction mixture was filtered through celite pad and concentrated *in vacuo*. The residue was extracted with  $CH_2Cl_2$  (60 mL $\times$ 3). The combined organic layers were washed with brine (60 mL $\times$ 1), dried over  $MgSO_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified via silica gel column (Hexane/AcOEt = 3/1 v/v) to yield compound **38** as a colorless solid (0.446 g, 30%).  $^1H$  NMR (400 MHz, 298 K,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.06 (s, 1H), 7.19-7.13 (m, 2H), 6.98 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.75 (d, 1H), 2.81 (s, 2H), 1.21 (s, 6H).

**3,3-dimethyl-6-nitro-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (39).** Following method D, compound **39**

was synthesized using compound **38**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.01 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 2.57 (s, 2H), 1.41 (s, 6H).

**6-amino-3,3-dimethyl-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (40)**. Following method E, compound **40** was synthesized using compound **39**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.67 (s, 1H), 6.50-6.48 (m, 2H), 6.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 2.62 (s, 2H), 1.09 (s, 6H).

**Compound 41**. Following method H, compound **41** was synthesized using compounds **21b** and **40**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.40 (br s, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H), 6.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.68-6.65 (m, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.43 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.12 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.29 (s, 6H).

**Compound 26**. Following method J, compound **26** was synthesized using compound **41**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.66 (br s, 1H), 7.08 (d, 8.4 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.66-6.65 (m, 1H), 6.62-6.59 (m, 1H), 6.52-6.49 (m, 1H), 3.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.46 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.43 (s, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.02 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.72-1.60 (m, 5H), 1.47-1.42 (m, 2H), 1.30-1.14 (m, 4H), 1.28 (s, 6H), 0.98-0.93 (m, 2H); ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> calc'd for C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 449.3168, found: 449.3247.

**Compound 46**. Compound **1c** (50.0 mg, 0.137 mmol) was dissolved in DMF, and MeI (2.0 eq.) and NaH (1.0 eq.) were added on ice bath. After stirring at rt for 21 h, the resulting mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O (20mL), brine (20 mL), dried over with MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo* to yield compound **46** as a beige solid (46.0 mg, 89%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.81-7.77 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.05 (d,

$J = 9.2$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 5.48 (s, 2H), 3.39 (s, 3H), 2.99 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 2.69 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 2.61 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**2-(phenylthio)acetonitrile (49).** Following method A, compound **49** was synthesized using benzenethiol.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.56 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.39 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 3.57 (s, 2H).

**2-(phenylthio)ethanethioamide (50).** Following method B, compound **50** was synthesized using compound **49**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.17 (br, 1H), 7.56 (br, 1H), 7.24-7.14 (m, 5H), 4.11 (s, 2H).

**Compound 47.** Following method C, compound **47** was synthesized using compound **15** and **50**.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.16 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.67 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.42 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.32 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.21 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 6.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 4.65 (s, 2H), 2.92 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 2.47 (overlapped with  $\text{DMSO-}d_5$ , 2H); ESI-HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc'd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{OS}_2^+$ : 353.07823, found: 353.07852.

**Compound 48.** The mixture of compound **47** (50.0 mg, 0.142 mmol) and *m*CPBA (4.0 eq.) was dissolved with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and stirred at 0 °C for 14.5 h. The resulting mixture was poured into sat.  $\text{NaHCO}_3$  aqueous to quench the reaction. Organic layer was extracted with AcOEt, washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , brine, and dried over  $\text{MgSO}_4$ . The residue was concentrated *in vacuo* to yield compound **48** as a yellow solid (22.9 mg, 42%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 298 K,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.16 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.82-7.74 (m, 3H), 7.63 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J = 10.1$  Hz, 2H), 6.85 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 2.89 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 2.50 (overlapped with  $\text{DMSO-}d_5$ , 2H); ESI-HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc'd for

C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>: 385.06806, found: 385.07010.

## V.2. MBL タンパク質の発現精製

**Expression.** The DNA sequence encoding NDM-1 or IMP-1 was introduced into pET48b(+) plasmid vector (Novagen). NDM-1 or IMP-1 was expressed as a 6×His-fused Trx-tag-conjugated form. The *Escherichia coli* competent cell, Rosetta (DE3) pLysS, was transformed with the vector. The transformed cells were picked up from the colony grown on the agar medium containing Kanamycin at the concentration of 35 µg/mL. After a pre-incubation with 10 mL LB medium at 30 °C, the cell culture was scaled up to 2 L medium. The protein was expressed at 30 °C overnight after the induction with 0.2 mM IPTG at an OD<sub>600</sub> value of 0.8. The cultured cells were pelleted down by a 15 minute centrifuge at 5000×G.

The cell pellet was re-suspended with 40 mL of buffer solution (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF). The cells in the re-suspended solution were disrupted by the ultrasonic homogenizer (SONIFIER 250, BRANSON). The lysate was centrifuged at 14000×G for 30 minutes, and the remaining debris was removed from the supernatant by passing through the 0.45 µm micro-filter.

**Purification.** The Trx-conjugated protein was first purified by HisTrap HP 5 mL column (GE Healthcare), using a solution consisting of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole as a starting buffer and a solution consisting of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole as an elution buffer. The concentration of imidazole was gradually increased up to 500 mM in elution.

The collection tubes containing the target protein were chosen by the SDS-PAGE, and the collected fraction was dialyzed against 1 L of buffer solution (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) overnight

at 4 °C to remove imidazole. The 6×His-fused Trx-tag was cleaved by HRV-3C protease. The protease at the concentration of 1 mg/mL was added to the sample after dialysis by 10 µL per 1 mg target protein. The mixture of the sample and HRV-3C protease was incubated at 4 °C for 24 hours.

The concentration of protein was measured by the adsorption of ultra-violet at 280 nm. The extinction coefficient was 1.28 AU·(mg/mL)<sup>-1</sup> for IMP-1 and 0.98 AU·(mg/mL)<sup>-1</sup> for NDM-1. After cleavage of Trx-tag, the coefficient was changed to 1.72 AU·(mg/mL)<sup>-1</sup> for IMP-1 and 1.09 AU·(mg/mL)<sup>-1</sup> for NDM-1.

The cleaved Trx-tag, HRV-3C protease, and uncleaved conjugated protein were removed by Ni-NTA resin. The cleaved target protein was further purified by TALON<sup>®</sup> metal affinity resin column (Clontech) using a solution consisting of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole as a starting buffer and a solution consisting of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole as an elution buffer. The target protein was collected from the flow-through fractions.

Since the iso-electric point of IMP-1 is 8.73 and that of NDM-1 is 5.88, IMP-1 was further purified by cation exchange chromatography, and NDM-1 was by anion exchange chromatography. The starting buffer for IMP-1 was 50 mM MES pH 6.5, and the elution buffer was 50 mM MES pH 6.5, 1000 mM NaCl. The starting buffer for NDM-1 was 50 mM Tris-HCl pH 8.0, and the elution buffer was 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1000 mM NaCl. The concentration of NaCl was elevated in the gradient manner.

The protein was finally purified by gel filtration using HiLoad 16/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) with a running buffer of 20 mM HEPES at pH 7.5, 200 mM NaCl, and 2 mM mercapto-ethanol.

**Evaluation of purity.** The purity of the sample protein was evaluated by SDS-PAGE. A small aliquot of the sample (15 µL) was taken, and 5 µL of 4×SDS buffer 2ME(+) was added to the sample

solution, and then, incubated at 95 °C for 5 minutes. The reaction product was applied to a 10 % acrylamide gel by 10 µL for electrophoresis. The molecular weight marker, Precision plus protein™ Dual-color standard, was also applied for reference. The protein was stained by Coomassie Brilliant Blue (CBB) or Oriole fluorescent agent.

**Concentration.** Finally, the protein was concentrated to 0.52 mg/mL for IMP-1 and 0.54 mg/mL for NDM-1. The concentrated protein was mixed with glycerol in a ratio of 1:1 for the compound screening. The protein was further concentrated to 43.2 mg/mL for IMP-1 and 76.6 mg/mL for NDM-1 for the protein crystallization for X-ray structure analysis.

### V.3. MBL 阻害活性の測定 (*in vitro*)

#### Measurement of enzymatic reaction rate

An antibiotic, Cephalosporin C, is one of the substrates of metallo- $\beta$ -lactamases; IMP-1 and NDM-1. The reaction rate of the hydrolysis of Cephalosporin C by IMP-1 or NMD-1 was monitored by the UV-vis absorption (Shimadzu UV-1800) at 260 nm. The  $\beta$ -lactam ring of Cephalosporin C shows a specific peak at 260 nm in UV absorption, and the peak height is diminished due to the hydrolysis of the ring. If an inhibitory compound is present in the solution, the hydrolysis reaction becomes slow.

#### Experimental procedure

1. Preparation of stock solution: Buffer A (50 mM HEPES, 10 µM Zn Acetate, pH 7.0), buffer B (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.0), and an aqueous solution of 100 mM Cephalosporin C were prepared.
2. Baseline measurement: The UV absorption was measured for 1 mL of buffer A with a quartz cell.

3. Background measurement: The UV absorption was measured for 10 minutes at 25 °C for a mixture of 953 μL of buffer A, 45 μL of buffer B, and 2 μL of Cephalosporin C solution.
4. Measurement of control: The UV absorption was measured for 10 minutes for a mixture of 953 μL of buffer A, 43 μL of buffer B plus 2 μL of IMP-1 or NDM-1 solution, and 2 μL of Cephalosporin C solution.
5. Preparation of sample: A 45 μL sample solution was prepared by mixing 33 μL of buffer B, 10 μL of a compound solution, and 2 μL of IMP-1 or NDM-1 solution.
6. Measurement of sample: UV absorption was measured for 10 minutes at 25 °C for a mixture of 953 μL of buffer A, 45 μL of the solution prepared in 5, and 2 μL of Cephalosporin C solution.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = 100 \times \left( 1 - \frac{S_0 - S_{300}}{C_0 - C_{300}} \right)$$

**Figure D1.** Calculation of inhibitory activity.  $S_0$  is the absorbance of the sample at the initial time point (0 s),  $S_{300}$  is the absorbance of the sample at the final time point (300 s),  $C_0$  is the absorbance of the control at the initial time point (0 s),  $C_{300}$  is the absorbance of the control at the final time point (300 s).

## V.4.X 線結晶構造解析

### Crystal Growth

The single crystal of the complex of IMP-1 and compound **1** was grown by the sitting drop vapor diffusion method at 18 °C. First, 0.8 μL of 43.2 mg/mL protein solution was mixed with 0.2 μL of a solution containing 4 mM ZnCl<sub>2</sub> and 2 mM compound **1**, followed by incubation at room temperature for 10 min. Then, 1.0 μL of the mixed solution was combined with 1.0 μL of the well solution consisting of 100 mM sodium citrate, 200 mM sodium acetate, and 28% polyethylene glycol (PEG) 8000 at pH 6.2. The combined solution was placed on the plate for setting up a droplet for

crystallization. The crystals grown were cryo-protected by brief immersion in a solution containing 25% (v/v) glycerol, followed by freezing in liquid nitrogen.

The single crystal of the complex of NDM-1 and ampicillin was also grown by the sitting drop method at 18°C. First, 0.5  $\mu$ L of 76.6 mg/mL protein solution was mixed with 0.5  $\mu$ L of a solution of 100 mg/mL ampicillin containing 0.5 mM ZnCl<sub>2</sub>, followed by incubation at room temperature. Then, 1.0  $\mu$ L of the mixed solution was combined with 1.0  $\mu$ L of the well solution consisting of 100 mM Bis-Tris, 25% PEG3350, and 250 mM ammonium sulfate at pH 7.2 for crystallization. The crystals were cryo-protected by brief immersion in a solution containing 25% (v/v) glycerol before freezing in liquid nitrogen.

### Structure Determination

X-ray diffraction data were collected at 100 K on AR-NE3A or AR-NW12A beamlines of Photon-Factory (PF, Tsukuba, Japan). The diffraction data were indexed, scaled, and merged with HKL2000<sup>134</sup>. Intensities were converted into structure factors, and 5% of the reflections were flagged for  $R_{\text{free}}$  calculations. The complex structure of IMP-1 and compound **1a** was determined by the molecular replacement method<sup>135</sup> using a crystal structure of PDB code: 2DOO<sup>136</sup> as a search model, and that of NDM-1 and ampicillin was determined using a structure of 5ZGE<sup>137</sup>. Molecular replacement, structure refinement, and model building were carried out using PHENIX<sup>138</sup> and COOT<sup>139</sup>.

## V.5. 計算機解析

### Model building

Two binding structures obtained in the X-ray crystal analysis of IMP-1 were used as templates for building the models for MD simulation. The IMP-1 – compound **1** complex of the template structure was placed in a rectangular periodic boundary box filled with TIP3P waters<sup>140</sup>, and counter ions were

added to neutralize the model system using the leap module in AmberTools16<sup>59</sup>. The closest distance from the protein to the boundary edge was set to 12.0 Å. The final model size was ca. 73 Å × 70 Å × 64 Å and the total number of atoms was about 33,000. Two model systems were built for simulations to compare the stability of the respective binding structures. Furthermore, the predicted binding structure of compound **1** in the catalytic site of NDM-1 was built from the crystal structure of the NDM-1 – ampicillin complex. The calculation model was set up in the same manner above.

### **Molecular Dynamics (MD) Simulation**

Minimization, heating, and pre-equilibration were carried out using the sander module of AMBER16<sup>59</sup>. Production run of MD simulation was carried out using the pmemd module that was compiled as a graphics processing unit (GPU) executable code. Energy minimization was achieved in two steps. The first step was for the relaxation of the protein structure only. The second step was for the relaxation of the whole system. In each step, energy minimization was done for 10,000 cycles. The minimization method was switched from the steepest descent method to the conjugate gradient method after 3,000 cycles. The model system was heated to 300 K for 0.1 ns under the NVT-ensemble condition, and subsequent 0.4 ns pre-equilibrating calculation was executed under the NPT-ensemble condition. Then the production run of MD simulation was carried out for 200 ns at 300 K. The cutoff distance for the electrostatic and van der Waals energy terms was set to 12.0 Å. The periodic boundary condition was applied, and the integration time step was 2 fs.

The ff14SB force field<sup>141</sup> was applied to the protein molecules, the general AMBER force field (GAFF2)<sup>142</sup> was to the compound, TIP3P<sup>140</sup> was to waters, and ionsjc\_tip3p<sup>143</sup> was to counter ions. The partial atom charges of the compound were determined by performing a quantum chemical calculation using the Gaussian16 program<sup>144</sup>. The stable structure of the compound was determined through geometry optimization at the B3LYP/6-31G(d,p) level, and the electrostatic potential was

subsequently calculated at the HF/cc-pVTZ level under the ether-phase condition.

### **Analysis of Molecular Dynamics Simulation**

The ptraj module of AmberTools16 was utilized to obtain the representative structures of the last 40 ns simulations. The atom coordinates were stored every 0.1 ns in every MD simulation. First, the average structure was obtained from the 400 snapshot structures for the last 40 ns. Next, the root mean square deviation (RMSD) values between the average structure and the respective snapshots were calculated. Then, the snapshot that had the least RMSD value among the 400 was selected as the representative structure. The representative structure was depicted by PyMOL <sup>145</sup>.

## VI. 出典

### VI. 1. 参考文献

1. Review on Antimicrobial Resistance: Tackling drug-resistant infections globally (<https://amr-review.org/home.html>)
2. 厚生労働省 薬剤耐性(AMR)について  
(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>)
3. Tsutsui, A.; Yahara, K.; Shibayama, K. Trends and Patterns of National Antimicrobial Consumption in Japan from 2004 to 2016. *J. Infect. Chemother.* **2018**, *24* (6), 414–421.
4. Yano, H.; Ogawa, M.; Endo, S.; Kakuta, R.; Kanamori, H.; Inomata, S.; Ishibashi, N.; Aoyagi, T.; Hatta, M.; Gu, Y.; Yamada, M.; Tokuda, K.; Kunishima, H.; Kitagawa, M.; Hirakata, Y.; Kaku, M. High Frequency of IMP-6 among Clinical Isolates of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Escherichia Coli in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (8), 4554–4555.
5. Ambler, R. P. The Structure of Beta-Lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1980**, *289* (1036), 321–331.
6. Bush, K. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (10).
7. Antibiotic Resistance Threats in the United States: Stepping Back from the Brink  
(<https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2014/0615/p938.html>)
8. Gu, Y.; Ohmagari, N. The Global Status of Antimicrobial-Resistant Bacteria and Antimicrobial Consumption. *Jpn. J. Chemother.* **2019**, *67* (1), 13–22.
9. Ju, L.-C.; Cheng, Z.; Fast, W.; Bonomo, R. A.; Crowder, M. W. The Continuing Challenge of Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibition: Mechanism Matters. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39* 7 (7), 635–647.

10. Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B. I. Beta-Lactamase Database (BLDB) - Structure and Function. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32* (1), 917–919.
11. Garau Gianpiero; García-Sáez Isabel; Bebrone Carine; Anne Christine; Mercuri Paola; Galleni Moreno; Frère Jean-Marie; Dideberg Otto. Update of the Standard Numbering Scheme for Class B  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (7), 2347–2349.
12. Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431* (18), 3472–3500.
13. Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F.; Kato, N. Molecular Characterization of an Enterobacterial Metallo Beta-Lactamase Found in a Clinical Isolate of *Serratia Marcescens* That Shows Imipenem Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (1), 71–78.
14. Yamamoto, K.; Tanaka, H.; Kurisu, G.; Nakano, R.; Yano, H.; Sakai, H. Structural Insights into the Substrate Specificity of IMP-6 and IMP-1 Metallo- $\beta$ -Lactamases. *J. Biochem.* **2022**, *173* (1), 21–30.
15. Oelschlaeger, P.; Aitha, M.; Yang, H.; Kang, J. S.; Zhang, A. L.; Liu, E. M.; Buynak, J. D.; Crowder, M. W. Meropenem and Chromacef Intermediates Observed in IMP-25 Metallo- $\beta$ -Lactamase-Catalyzed Hydrolysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (7), 4326–4330.
16. Iyobe Shizuko; Kusadokoro Haruko; Takahashi Ayako; Yomoda Sachie; Okubo Toyoji; Nakamura Akio; O'Hara Koji. Detection of a Variant Metallo- $\beta$ -Lactamase, IMP-10, from Two Unrelated Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* and an *Alcaligenes Xylosoxidans* Strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (6), 2014–2016.
17. LaCuran, A. E.; Pegg, K. M.; Liu, E. M.; Bethel, C. R.; Ai, N.; Welsh, W. J.; Bonomo, R. A.;

- Oelschlaeger, P. Elucidating the Role of Residue 67 in IMP-Type Metallo- $\beta$ -Lactamase Evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (12), 7299–7307.
18. Cheng, Z.; Bethel, C. R.; Thomas, P. W.; Shurina, B. A.; Alao, J.-P.; Thomas, C. A.; Yang, K.; Marshall, S. H.; Zhang, H.; Sturgill, A. M.; Kravats, A. N.; Page, R. C.; Fast, W.; Bonomo, R. A.; Crowder, M. W. Carbapenem Use Is Driving the Evolution of Imipenemase 1 Variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65* (4), e01714–e01720.
19. Yong, D.; Toleman, M. A.; Giske, C. G.; Cho, H. S.; Sundman, K.; Lee, K.; Walsh, T. R. Characterization of a New Metallo-Beta-Lactamase Gene, bla(NDM-1), and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella Pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (12), 5046–5054.
20. Chihara, S.; Okuzumi, K.; Yamamoto, Y.; Oikawa, S.; Hishinuma, A. First Case of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase 1-Producing *Escherichia Coli* Infection in Japan. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *52* (1), 153–154.
21. González, L. J.; Bahr, G.; Nakashige, T. G.; Nolan, E. M.; Bonomo, R. A.; Vila, A. J. Membrane Anchoring Stabilizes and Favors Secretion of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (7), 516–522.
22. Prunotto, A.; Bahr, G.; González, L. J.; Vila, A. J.; Dal Peraro, M. Molecular Bases of the Membrane Association Mechanism Potentiating Antibiotic Resistance by New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase 1. *ACS Infect Dis* **2020**, *6* (10), 2719–2731.
23. López, C.; Prunotto, A.; Bahr, G.; Bonomo, R. A.; González, L. J.; Dal Peraro, M.; Vila, A. J. Specific Protein-Membrane Interactions Promote Packaging of Metallo- $\beta$ -Lactamases into Outer Membrane Vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65* (10), e0050721.
24. Makena, A.; Brem, J.; Pfeffer, I.; Geffen, R. E. J.; Wilkins, S. E.; Tarhonskaya, H.; Flashman, E.; Phee, L. M.; Wareham, D. W.; Schofield, C. J. Biochemical Characterization of New Delhi

- Metallo- $\beta$ -Lactamase Variants Reveals Differences in Protein Stability. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70* (2), 463–469.
25. Makena, A.; Brem, J.; Pfeffer, I.; Geffen, R. E. J.; Wilkins, S. E.; Tarhonskaya, H.; Flashman, E.; Phee, L. M.; Wareham, D. W.; Schofield, C. J. Biochemical Characterization of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase Variants Reveals Differences in Protein Stability. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70* (2), 463–469.
26. Stewart, A. C.; Bethel, C. R.; VanPelt, J.; Bergstrom, A.; Cheng, Z.; Miller, C. G.; Williams, C.; Poth, R.; Morris, M.; Lahey, O.; Nix, J. C.; Tierney, D. L.; Page, R. C.; Crowder, M. W.; Bonomo, R. A.; Fast, W. Clinical Variants of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase Are Evolving To Overcome Zinc Scarcity. *ACS infectious diseases* **2017**, *3* 12 (12), 927–940.
27. Cheng, Z.; Thomas, P. W.; Ju, L.; Bergstrom, A.; Mason, K.; Clayton, D.; Miller, C.; Bethel, C. R.; VanPelt, J.; Tierney, D. L.; Page, R. C.; Bonomo, R. A.; Fast, W.; Crowder, M. W. Evolution of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase (NDM) in the Clinic: Effects of NDM Mutations on Stability, Zinc Affinity, and Mono-Zinc Activity. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293* (32), 12606–12618.
28. Lauretta Laura; Riccio Maria Letizia; Mazzariol Annarita; Cornaglia Giuseppe; Amicosante Gianfranco; Fontana Roberta; Rossolini Gian Maria. Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene from a Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (7), 1584–1590.
29. Poirel Laurent; Naas Thierry; Nicolas Delphine; Collet Louis; Bellais Samuel; Cavallo Jean-Didier; Nordmann Patrice. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- $\beta$ -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (4), 891–897.
30. Pallecchi, L.; Riccio, M. L.; Docquier, J. D.; Fontana, R.; Rossolini, G. M. Molecular Heterogeneity of bla(VIM-2)-Containing Integrons from Pseudomonas Aeruginosa Plasmids

- Encoding the VIM-2 Metallo-Beta-Lactamase. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *195* (2), 145–150.
31. Makena, A.; Düzgün, A. Ö.; Brem, J.; McDonough, M. A.; Rydzik, A. M.; Abboud, M. I.; Saral, A.; Çiçek, A. Ç.; Sandalli, C.; Schofield, C. J. Comparison of Verona Integron-Borne Metallo- $\beta$ -Lactamase (VIM) Variants Reveals Differences in Stability and Inhibition Profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *60* (3), 1377–1384.
32. Cheng, Z.; Shurina, B. A.; Bethel, C. R.; Thomas, P. W.; Marshall, S. H.; Thomas, C. A.; Yang, K.; Kimble, R. L.; Montgomery, J. S.; Orischak, M. G.; Miller, C. M.; Tennenbaum, J. L.; Nix, J. C.; Tierney, D. L.; Fast, W.; Bonomo, R. A.; Page, R. C.; Crowder, M. W. A Single Salt Bridge in VIM-20 Increases Protein Stability and Antibiotic Resistance under Low-Zinc Conditions. *MBio* **2019**, *10* (6).
33. Morinaka, A.; Tsutsumi, Y.; Yamada, M.; Suzuki, K.; Watanabe, T.; Abe, T.; Furuuchi, T.; Inamura, S.; Sakamaki, Y.; Mitsuhashi, N.; Ida, T.; Livermore, D. M. OP0595, a New Diazabicyclooctane: Mode of Action as a Serine  $\beta$ -Lactamase Inhibitor, Antibiotic and  $\beta$ -Lactam “Enhancer.” *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70* (10), 2779–2786.
34. Morinaka, A.; Tsutsumi, Y.; Yamada, K.; Takayama, Y.; Sakakibara, S.; Takata, T.; Abe, T.; Furuuchi, T.; Inamura, S.; Sakamaki, Y.; Tsujii, N.; Ida, T. In Vitro and In Vivo Activities of OP0595, a New Diazabicyclooctane, against CTX-M-15-Positive Escherichia Coli and KPC-Positive Klebsiella Pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (5), 3001–3006.
35. Morinaka, A.; Tsutsumi, Y.; Yamada, K.; Takayama, Y.; Sakakibara, S.; Takata, T.; Abe, T.; Furuuchi, T.; Inamura, S.; Sakamaki, Y.; Tsujii, N.; Ida, T. In Vitro and in Vivo Activities of the Diazabicyclooctane OP0595 against AmpC-Derepressed Pseudomonas Aeruginosa. *J. Antibiot.* **2017**, *70* (3), 246–250.
36. Kaku, N.; Kosai, K.; Takeda, K.; Uno, N.; Morinaga, Y.; Hasegawa, H.; Miyazaki, T.; Izumikawa, K.; Mukae, H.; Yanagihara, K. Efficacy and Pharmacokinetics of the Combination

- of OP0595 and Cefepime in a Mouse Model of Pneumonia Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (7).
37. Jin, W.; Wachino, J.-I.; Yamaguchi, Y.; Kimura, K.; Kumar, A.; Yamada, M.; Morinaka, A.; Sakamaki, Y.; Yonezawa, M.; Kurosaki, H.; Arakawa, Y. Structural Insights into the TLA-3 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase and Its Inhibition by Avibactam and OP0595. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (10).
38. Hagihara, M.; Kato, H.; Sugano, T.; Okade, H.; Sato, N.; Shibata, Y.; Sakanashi, D.; Hirai, J.; Asai, N.; Suematsu, H.; Yamagishi, Y.; Mikamo, H. In Vivo Pharmacodynamics of  $\beta$ -Lactams/Nacubactam against Carbapenem-Resistant And/or Carbapenemase-Producing *Enterobacter Cloacae* and *Klebsiella Pneumoniae* in Murine Pneumonia Model. *Antibiotics (Basel)* **2021**, *10* (10).
39. Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopiña, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J. J. A. G.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Seward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J.; Schofield, C. J. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- $\beta$ -Lactamases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (18), 8544–8556.
40. Liu, B.; Trout, R. E. L.; Chu, G.-H.; McGarry, D.; Jackson, R. W.; Hamrick, J. C.; Daigle, D. M.; Cusick, S. M.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Docquier, J.-D.; Weiss, W. J.; Pevear, D. C.; Xerri, L.; Burns, C. J. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- and Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (6), 2789–2801.
41. Hamrick, J. C.; Docquier, J.-D.; Uehara, T.; Myers, C. L.; Six, D. A.; Chatwin, C. L.; John, K. J.; Vernacchio, S. F.; Cusick, S. M.; Trout, R. E. L.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Liu, B.; Jackson, R. W.; Moeck, G.; Xerri, L.; Burns, C. J.; Pevear, D. C.; Daigle,

- D. M. VNRX-5133 (Taniborbactam), a Broad-Spectrum Inhibitor of Serine- and Metallo- $\beta$ -Lactamases, Restores Activity of Cefepime in Enterobacterales and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (3).
42. Aoki, T.; Yoshizawa, H.; Yamawaki, K.; Yokoo, K.; Sato, J.; Hisakawa, S.; Hasegawa, Y.; Kusano, H.; Sano, M.; Sugimoto, H.; Nishitani, Y.; Sato, T.; Tsuji, M.; Nakamura, R.; Nishikawa, T.; Yamano, Y. Cefiderocol (S-649266), A New Siderophore Cephalosporin Exhibiting Potent Activities against *Pseudomonas Aeruginosa* and Other Gram-Negative Pathogens Including Multi-Drug Resistant Bacteria: Structure Activity Relationship. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 847–868.
43. Aoki, T.; Yamawaki, K.; Sato, T.; Nishitani, Y.; Yamano, Y. The Discovery of a Novel Siderophore Cephalosporin Cefiderocol. *MEDCHEM NEWS* **2021**, *31* (2), 75–80.
44. Takeda, S.; Ikeda, F.; Hatano, K. In Vitro Antibacterial Activity of a New Cephalosporin, FR295389, against IMP-Type Metallo-Beta-Lactamase-Producers. *J. Antibiot.* **2008**, *61* (1), 36–39.
45. Kamo, T.; Kuroda, K.; Kondo, S.; Hayashi, U.; Fudo, S.; Yoneda, T.; Takaya, A.; Nukaga, M.; Hoshino, T. Identification of the Inhibitory Compounds for Metallo- $\beta$ -Lactamases and Structural Analysis of the Binding Modes. *Chem. Pharm. Bull.* **2021**, *69* (12), 1179–1183.
46. Fuji, H.; Urano, E.; Futahashi, Y.; Hamatake, M.; Tatsumi, J.; Hoshino, T.; Morikawa, Y.; Yamamoto, N.; Komano, J. Derivatives of 5-Nitro-Furan-2-Carboxylic Acid Carbamoylmethyl Ester Inhibit RNase H Activity Associated with HIV-1 Reverse Transcriptase. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (5), 1380–1387.
47. Yanagita, H.; Urano, E.; Matsumoto, K.; Ichikawa, R.; Takaesu, Y.; Ogata, M.; Murakami, T.; Wu, H.; Chiba, J.; Komano, J.; Hoshino, T. Structural and Biochemical Study on the Inhibitory Activity of Derivatives of 5-Nitro-Furan-2-Carboxylic Acid for RNase H Function of HIV-1

- Reverse Transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (2), 816–825.
48. Yanagita, H.; Fudo, S.; Urano, E.; Ichikawa, R.; Ogata, M.; Yokota, M.; Murakami, T.; Wu, H.; Chiba, J.; Komano, J.; Hoshino, T. Structural Modulation Study of Inhibitory Compounds for Ribonuclease H Activity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. *Chem. Pharm. Bull.* **2012**, *60* (6), 764–771.
49. Qi, F.; Fudo, S.; Neya, S.; Hoshino, T. A Cluster Analysis on the Structural Diversity of Protein Crystals, Exemplified by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62* (6), 568–577.
50. Urano, E.; Miyauchi, K.; Kojima, Y.; Hamatake, M.; Ablan, S. D.; Fudo, S.; Freed, E. O.; Hoshino, T.; Komano, J. A Triazinone Derivative Inhibits HIV-1 Replication by Interfering with Reverse Transcriptase Activity. *ChemMedChem* **2016**, *11* (20), 2320–2326.
51. Fudo, S.; Yamamoto, N.; Nukaga, M.; Odagiri, T.; Tashiro, M.; Neya, S.; Hoshino, T. Structural and Computational Study on Inhibitory Compounds for Endonuclease Activity of Influenza Virus Polymerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (17), 5466–5475.
52. Fudo, S.; Yamamoto, N.; Nukaga, M.; Odagiri, T.; Tashiro, M.; Hoshino, T. Two Distinctive Binding Modes of Endonuclease Inhibitors to the N-Terminal Region of Influenza Virus Polymerase Acidic Subunit. *Biochemistry* **2016**, *55* (18), 2646–2660.
53. Davies, J. F., 2nd; Hostomska, Z.; Hostomsky, Z.; Jordan, S. R.; Matthews, D. A. Crystal Structure of the Ribonuclease H Domain of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Science* **1991**, *252* (5002), 88–95.
54. Katayanagi, K.; Miyagawa, M.; Matsushima, M.; Ishikawa, M.; Kanaya, S.; Nakamura, H.; Ikehara, M.; Matsuzaki, T.; Morikawa, K. Structural Details of Ribonuclease H from *Escherichia Coli* as Refined to an Atomic Resolution. *J. Mol. Biol.* **1992**, *223* (4), 1029–1052.
55. Yuan, P.; Bartlam, M.; Lou, Z.; Chen, S.; Zhou, J.; He, X.; Lv, Z.; Ge, R.; Li, X.; Deng, T.;

- Fodor, E.; Rao, Z.; Liu, Y. Crystal Structure of an Avian Influenza Polymerase PA(N) Reveals an Endonuclease Active Site. *Nature* **2009**, *458* (7240), 909–913.
56. Dias, A.; Bouvier, D.; Crépin, T.; McCarthy, A. A.; Hart, D. J.; Baudin, F.; Cusack, S.; Ruigrok, R. W. H. The Cap-Snatching Endonuclease of Influenza Virus Polymerase Resides in the PA Subunit. *Nature* **2009**, *458* (7240), 914–918.
57. Nakamura, Y.; Suganami, A.; Fukuda, M.; Hasan, M. K.; Yokochi, T.; Takatori, A.; Satoh, S.; Hoshino, T.; Tamura, Y.; Nakagawara, A. Identification of Novel Candidate Compounds Targeting TrkB to Induce Apoptosis in Neuroblastoma. *Cancer Med.* **2014**, *3* (1), 25–35.
58. Fukuda, M.; Takatori, A.; Nakamura, Y.; Suganami, A.; Hoshino, T.; Tamura, Y.; Nakagawara, A. Effects of Novel Small Compounds Targeting TrkB on Neuronal Cell Survival and Depression-like Behavior. *Neurochem. Int.* **2016**, *97*, 42–48.
59. Case, D. A., Betz, R. M., Botello-Smith, W., Cerutti, D. S., T.E. Cheatham, I., Darden, T. A., Duke, R. E., Giese, T. J., Gohlke, H., Goetz, A. W., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P., Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T. S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Mermelstein, D., Merz, K. M., Monard, G., Nguyen, H., Nguyen, H. T., Omelyan, I., Onufriev, A., Roe, D. R., Roitberg, A., Sagui, C., Simmerling, C. L., Swails, J., Walker, R. C., Wang, J., Wolf, R. M., Wu, X., Xiao, L., York, D. M., and Kollman, P. A., *Amber16*; University of California: San Francisco. (2016)
60. Mahmood, I.; Liu, X.; Neya, S.; Hoshino, T. Influence of Lipid Composition on the Structural Stability of G-Protein Coupled Receptor. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61* (4), 426–437.
61. Qi, F.; Fudo, S.; Neya, S.; Hoshino, T. A Cluster Analysis on the Structural Diversity of Protein Crystals, Exemplified by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62* (6), 568–577.
62. Qi, F.; Fudo, S.; Neya, S.; Hoshino, T. A Dominant Factor for Structural Classification of

- Protein Crystals. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (8), 1673–1685.
63. Kitahara, M.; Fudo, S.; Yoneda, T.; Nukaga, M.; Hoshino, T. Anisotropic Distribution of Ammonium Sulfate Ions in Protein Crystallization. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19* (11), 6004–6010.
  64. Zhang, H.; Yang, K.; Cheng, Z.; Thomas, C.; Steinbrunner, A.; Pryor, C.; Vulcan, M.; Kemp, C.; Orea, D.; Paththamperuma, C.; Chen, A. Y.; Cohen, S. M.; Page, R. C.; Tierney, D. L.; Crowder, M. W. Spectroscopic and Biochemical Characterization of Metallo- $\beta$ -Lactamase IMP-1 with Dicarboxylic, Sulfonyl, and Thiol Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *40* (116183), 116183.
  65. Fuji, H.; Qi, F.; Qu, L.; Takaesu, Y.; Hoshino, T. Prediction of Ligand Binding Affinity to Target Proteins by Molecular Mechanics Theoretical Calculation. *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, *65* (5), 461–468.
  66. Qu, L.; Qiao, X.; Qi, F.; Nishida, N.; Hoshino, T. Analysis of Binding Modes of Antigen-Antibody Complexes by Molecular Mechanics Calculation. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61* (5), 2396–2406.
  67. Lu, H.; Komukai, Y.; Usami, K.; Guo, Y.; Qiao, X.; Nukaga, M.; Hoshino, T. Computational and Crystallographic Analysis of Binding Structures of Inhibitory Compounds for HIV-1 RNase H Activity. *J. Chem. Inf. Model.* **2022**.
  68. Neya, S.; Yoneda, T.; Hoshino, T.; Kawaguchi, A. T.; Suzuki, M. Synthesis of Type III Isomers of Diacetyldeutero-, Hemato-, and Protoporphyrins with the Use of Knorr's Pyrrole. *Tetrahedron* **2016**, *72* (27), 4022–4026.
  69. Leiris, S.; Coelho, A.; Castandet, J.; Bayet, M.; Lozano, C.; Bougnon, J.; Bousquet, J.; Everett, M.; Lemonnier, M.; Sprynski, N.; Zalacain, M.; Pallin, T. D.; Cramp, M. C.; Jennings, N.; Raphy, G.; Jones, M. W.; Pattipati, R.; Shankar, B.; Sivasubrahmanyam, R.; Soodhagani, A. K.;

- Juventhala, R. R.; Pottabathini, N.; Pothukanuri, S.; Benvenuti, M.; Pozzi, C.; Mangani, S.; De Luca, F.; Cerboni, G.; Docquier, J.-D.; Davies, D. T. SAR Studies Leading to the Identification of a Novel Series of Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibitors for the Treatment of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections That Display Efficacy in an Animal Infection Model. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5* (1), 131–140.
70. Davies, D. T.; Leiris, S.; Sprynski, N.; Castandet, J.; Lozano, C.; Bousquet, J.; Zalacain, M.; Vasa, S.; Dasari, P. K.; Pattipati, R.; Vempala, N.; Gujjewar, S.; Godi, S.; Jallala, R.; Sathyap, R. R.; Darshanoju, N. A.; Ravu, V. R.; Juventhala, R. R.; Pottabathini, N.; Sharma, S.; Pothukanuri, S.; Holden, K.; Warn, P.; Marcocchia, F.; Benvenuti, M.; Pozzi, C.; Mangani, S.; Docquier, J.-D.; Lemonnier, M.; Everett, M. ANT2681: SAR Studies Leading to the Identification of a Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibitor with Potential for Clinical Use in Combination with Meropenem for the Treatment of Infections Caused by NDM-Producing Enterobacteriaceae. *ACS Infect Dis* **2020**, *6* (9), 2419–2430.
71. Cox, A. D.; Fesik, S. W.; Kimmelman, A. C.; Luo, J.; Der, C. J. Drugging the Undruggable RAS: Mission Possible? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (11), 828–851.
72. Futatsugi, N.; Hata, M.; Hoshino, T.; Tsuda, M. Ab Initio Study of the Role of Lysine 16 for the Molecular Switching Mechanism of Ras Protein p21. *Biophys. J.* **1999**, *77* (6), 3287–3292.
73. Mori, K.; Hata, M.; Neya, S.; Hoshino, T. A Study on the Role of Mg<sup>2+</sup> in a Ras Protein by MD Simulation. *Chem-Bio Inf. J.* **2002**, *2* (4), 147–155.
74. Mori, K.; Hata, M.; Neya, S.; Hoshino, T. Common Semiopen Conformations of Mg<sup>2+</sup>-Free Ras, Rho, Rab, Arf, and Ran Proteins Combined with GDP and Their Similarity with GEF-Bound Forms. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (43), 15127–15137.
75. NIID 国立感染症研究所 インフルエンザとは  
(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/219-about-flu.html>)

76. Palese, P.; Young, J. F. Variation of Influenza A, B, and C Viruses. *Science* **1982**, *215* (4539), 1468–1474.
77. Skehel, J. J.; Wiley, D. C. Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 531–569.
78. Russell, R. J.; Haire, L. F.; Stevens, D. J.; Collins, P. J.; Lin, Y. P.; Blackburn, G. M.; Hay, A. J.; Gamblin, S. J.; Skehel, J. J. The Structure of H5N1 Avian Influenza Neuraminidase Suggests New Opportunities for Drug Design. *Nature* **2006**, *443* (7107), 45–49.
79. 平山令明；『やさしい分子薬理学：分子構造から薬理活性へ』 共立出版 (2010)
80. Kawai, M. Discovery of an Anti-Influenza Agent with a Novel Mechanism. *MEDCHEM NEWS* **2019**, *29* (2), 75–81.
81. von Itzstein, M.; Wu, W. Y.; Kok, G. B.; Pegg, M. S.; Dyason, J. C.; Jin, B.; Van Phan, T.; Smythe, M. L.; White, H. F.; Oliver, S. W. Rational Design of Potent Sialidase-Based Inhibitors of Influenza Virus Replication. *Nature* **1993**, *363* (6428), 418–423.
82. Cady, S. D.; Schmidt-Rohr, K.; Wang, J.; Soto, C. S.; Degrado, W. F.; Hong, M. Structure of the Amantadine Binding Site of Influenza M2 Proton Channels in Lipid Bilayers. *Nature* **2010**, *463* (7281), 689–692.
83. Dong, G.; Peng, C.; Luo, J.; Wang, C.; Han, L.; Wu, B.; Ji, G.; He, H. Adamantane-Resistant Influenza A Viruses in the World (1902-2013): Frequency and Distribution of M2 Gene Mutations. *PLoS One* **2015**, *10* (3), e0119115.
84. Hurt, A. C.; Hui, D. S.; Hay, A.; Hayden, F. G. Overview of the 3rd Isirv-Antiviral Group Conference--Advances in Clinical Management. *Influenza Other Respi. Viruses* **2015**, *9* (1), 20–31.
85. Dias, A.; Bouvier, D.; Crépin, T.; McCarthy, A. A.; Hart, D. J.; Baudin, F.; Cusack, S.; Ruigrok, R. W. H. The Cap-Snatching Endonuclease of Influenza Virus Polymerase Resides in the PA

- Subunit. *Nature* **2009**, *458* (7240), 914–918.
86. Naito, T.; Kawaguchi, A.; Nagata, K. Function of Influenza virus RNA polymerase on the structural basis. *Virus* **2009**, *59* (1), 1–12.
87. Te Velthuis, A. J. W.; Fodor, E. Influenza Virus RNA Polymerase: Insights into the Mechanisms of Viral RNA Synthesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14* (8), 479–493.
88. Pflug, A.; Lukarska, M.; Resa-Infante, P.; Reich, S.; Cusack, S. Structural Insights into RNA Synthesis by the Influenza Virus Transcription-Replication Machine. *Virus Res.* **2017**, *234*, 103–117.
89. Pflug, A.; Lukarska, M.; Resa-Infante, P.; Reich, S.; Cusack, S. Structural Insights into RNA Synthesis by the Influenza Virus Transcription-Replication Machine. *Virus Res.* **2017**, *234*, 103–117.
90. Furuta, Y.; Gowen, B. B.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L. Favipiravir (T-705), a Novel Viral RNA Polymerase Inhibitor. *Antiviral Res.* **2013**, *100* (2), 446–454.
91. Furuta, Y. Discovery of Favipiravir (T-705) as Anti-Viral RNA Polymerase Inhibitor. *MEDCHEM NEWS* **2018**, *28* (3), 115–121.
92. Imai, Y.; Shimori, M.; Ichida, Y. インフルエンザウイルス感染症の病態. *Farumashia* **2019**, *55* (12), 1105–1110.
93. Jacobsen, J. A.; Fullagar, J. L.; Miller, M. T.; Cohen, S. M. Identifying Chelators for Metalloprotein Inhibitors Using a Fragment-Based Approach. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (2), 591–602.
94. Credille, C. V.; Chen, Y.; Cohen, S. M. Fragment-Based Identification of Influenza Endonuclease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (13), 6444–6454.
95. Credille, C. V.; Dick, B. L.; Morrison, C. N.; Stokes, R. W.; Adamek, R. N.; Wu, N. C.; Wilson, I. A.; Cohen, S. M. Structure–Activity Relationships in Metal-Binding Pharmacophores for

- Influenza Endonuclease. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (22), 10206–10217.
96. Credille, C. V.; Morrison, C. N.; Stokes, R. W.; Dick, B. L.; Feng, Y.; Sun, J.; Chen, Y.; Cohen, S. M. SAR Exploration of Tight-Binding Inhibitors of Influenza Virus PA Endonuclease. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (21), 9438–9449.
97. Chen, A. Y.; Thomas, C. A.; Thomas, P. W.; Yang, K.; Cheng, Z.; Fast, W.; Crowder, M. W.; Cohen, S. M. Iminodiacetic Acid as a Novel Metal-Binding Pharmacophore for New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase Inhibitor Development. *ChemMedChem* **2020**, *15* (14), 1272–1282.
98. Miyagawa, M.; Akiyama, T.; Taoda, Y.; Takaya, K.; Takahashi-Kageyama, C.; Tomita, K.; Yasuo, K.; Hattori, K.; Shano, S.; Yoshida, R.; Shishido, T.; Yoshinaga, T.; Sato, A.; Kawai, M. Synthesis and SAR Study of Carbamoyl Pyridone Bicycle Derivatives as Potent Inhibitors of Influenza Cap-Dependent Endonuclease. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (17), 8101–8114.
99. Taoda, Y.; Miyagawa, M.; Akiyama, T.; Tomita, K.; Hasegawa, Y.; Yoshida, R.; Noshi, T.; Shishido, T.; Kawai, M. Dihydrodibenzothiepine: Promising Hydrophobic Pharmacophore in the Influenza Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (22), 127547.
100. Kawasuji, T.; Yoshinaga, T.; Sato, A.; Yodo, M.; Fujiwara, T.; Kiyama, R. A Platform for Designing HIV Integrase Inhibitors. Part 1: 2-Hydroxy-3-Heteroaryl Acrylic Acid Derivatives as Novel HIV Integrase Inhibitor and Modeling of Hydrophilic and Hydrophobic Pharmacophores. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (24), 8430–8445.
101. Kawasuji, T.; Fuji, M.; Yoshinaga, T.; Sato, A.; Fujiwara, T.; Kiyama, R. A Platform for Designing HIV Integrase Inhibitors. Part 2: A Two-Metal Binding Model as a Potential Mechanism of HIV Integrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (24), 8420–8429.
102. Boros, E. E.; Edwards, C. E.; Foster, S. A.; Fuji, M.; Fujiwara, T.; Garvey, E. P.; Golden, P. L.; Hazen, R. J.; Jeffrey, J. L.; Johns, B. A.; Kawasuji, T.; Kiyama, R.; Koble, C. S.; Kurose, N.;

- Miller, W. H.; Mote, A. L.; Murai, H.; Sato, A.; Thompson, J. B.; Woodward, M. C.; Yoshinaga, T. Synthesis and Antiviral Activity of 7-Benzyl-4-Hydroxy-1,5-Naphthyridin-2(1H)-One HIV Integrase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (9), 2754–2761.
103. Kawasuji, T.; Johns, B. A.; Yoshida, H.; Taishi, T.; Taoda, Y.; Murai, H.; Kiyama, R.; Fuji, M.; Yoshinaga, T.; Seki, T.; Kobayashi, M.; Sato, A.; Fujiwara, T. Carbamoyl Pyridone HIV-1 Integrase Inhibitors. 1. Molecular Design and Establishment of an Advanced Two-Metal Binding Pharmacophore. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (20), 8735–8744.
104. Kawasuji, T.; Yoshinaga, T. Discovery of Dolutegravir: The next Generation HIV-1 Integrase Inhibitor. *MEDCHEM NEWS* **2012**, *22* (4), 19–24.
105. Johns, B. A.; Kawasuji, T.; Weatherhead, J. G.; Taishi, T.; Temelkoff, D. P.; Yoshida, H.; Akiyama, T.; Taoda, Y.; Murai, H.; Kiyama, R.; Fuji, M.; Tanimoto, N.; Jeffrey, J.; Foster, S. A.; Yoshinaga, T.; Seki, T.; Kobayashi, M.; Sato, A.; Johnson, M. N.; Garvey, E. P.; Fujiwara, T. Carbamoyl Pyridone HIV-1 Integrase Inhibitors 3. A Diastereomeric Approach to Chiral Nonracemic Tricyclic Ring Systems and the Discovery of Dolutegravir (S/GSK1349572) and (S/GSK1265744). *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (14), 5901–5916.
106. Kawasuji, T. Analysis on Superior Resistance Profile of Dolutegravir: The next Generation HIV-1 Integrase Inhibitor. *MEDCHEM NEWS* **2016**, *26* (2), 71–75.
107. Yoshinaga, T. HIV-1 インテグラーゼ阻害剤 ドルテグラビルの創薬と開発. *Farumashia* **2017**, *53* (6), 565–569.
108. Omoto, S.; Speranzini, V.; Hashimoto, T.; Noshi, T.; Yamaguchi, H.; Kawai, M.; Kawaguchi, K.; Uehara, T.; Shishido, T.; Naito, A.; Cusack, S. Characterization of Influenza Virus Variants Induced by Treatment with the Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–15.
109. Ivashchenko, A. A.; Mitkin, O. D.; Jones, J. C.; Nikitin, A. V.; Koryakova, A. G.; Ryakhovskiy,

- A.; Karapetian, R. N.; Kravchenko, D. V.; Aladinskiy, V.; Leneva, I. A.; Falynskova, I. N.; Glubokova, E. A.; Govorkova, E. A.; Ivachtchenko, A. V. Non-Rigid Diarylmethyl Analogs of Baloxavir as Cap-Dependent Endonuclease Inhibitors of Influenza Viruses. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (17), 9403–9420.
110. Tang, L.; Yan, H.; Wu, W.; Chen, D.; Gao, Z.; Hou, J.; Zhang, C.; Jiang, Y. Synthesis and Anti-Influenza Virus Effects of Novel Substituted Polycyclic Pyridone Derivatives Modified from Baloxavir. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (19), 14465–14476.
111. Carcelli, M.; Rogolino, D.; Gatti, A.; De Luca, L.; Sechi, M.; Kumar, G.; White, S. W.; Stevaert, A.; Naesens, L. N-Acylhydrazone Inhibitors of Influenza Virus PA Endonuclease with Versatile Metal Binding Modes. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31500.
112. Gao, P.; Wang, X.; Sun, L.; Cheng, X.; Poongavanam, V.; Kongsted, J.; Álvarez, M.; Luczkowiak, J.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H.; Liu, H.; Menéndez-Arias, L.; Liu, X.; Zhan, P. Design, Synthesis, and Biologic Evaluation of Novel Galloyl Derivatives as HIV-1 RNase H Inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **2019**, *93* (4), 582–589.
113. Zhang, L.; Wei, F.; Borrego, D.; Zhao, F.; Río, J. M. D.; Frutos-Beltrán, E.; Zhang, J.; Xu, S.; López-Carrobles, N.; Gao, S.; Kang, D.; Pannecouque, C.; Clercq, E. D.; Liu, X.; Menéndez-Arias, L.; Zhan, P. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Double-Winged Galloyl Derivatives as HIV-1 RNase H Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *240*, 114563.
114. Maris, J. M. Recent Advances in Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362* (23), 2202–2211.
115. Nakagawara, A.; Li, Y.; Izumi, H.; Muramori, K.; Inada, H.; Nishi, M. Neuroblastoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2018**, *48* (3), 214–241.
116. Nakagawara, A. Topical Topic: The NGF Story and Neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* **1998**, *31* (2), 113–115.
117. Nakagawara, A. Trk Receptor Tyrosine Kinases: A Bridge between Cancer and Neural

- Development. *Cancer Lett.* **2001**, *169* (2), 107–114.
118. Nakagawara, A.; Arima, M.; Azar, C. G.; Scavarda, N. J.; Brodeur, G. M. Inverse Relationship between Trk Expression and N-Myc Amplification in Human Neuroblastomas. *Cancer Res.* **1992**, *52* (5), 1364–1368.
119. Ohira, M.; Kageyama, H.; Mihara, M.; Furuta, S.; Machida, T.; Shishikura, T.; Takayasu, H.; Islam, A.; Nakamura, Y.; Takahashi, M.; Tomioka, N.; Sakiyama, S.; Kaneko, Y.; Toyoda, A.; Hattori, M.; Sakaki, Y.; Ohki, M.; Horii, A.; Soeda, E.; Inazawa, J.; Seki, N.; Kuma, H.; Nozawa, I.; Nakagawara, A. Identification and Characterization of a 500-Kb Homozygously Deleted Region at 1p36.2-p36.3 in a Neuroblastoma Cell Line. *Oncogene* **2000**, *19* (37), 4302–4307.
120. Attiyeh, E. F.; London, W. B.; Mossé, Y. P.; Wang, Q.; Winter, C.; Khazi, D.; McGrady, P. W.; Seeger, R. C.; Look, A. T.; Shimada, H.; Brodeur, G. M.; Cohn, S. L.; Matthay, K. K.; Maris, J. M.; Children's Oncology Group. Chromosome 1p and 11q Deletions and Outcome in Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353* (21), 2243–2253.
121. Binder, D. K.; Scharfman, H. E. Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* **2004**, *22* (3), 123–131.
122. Nakagawara, A.; Azar, C. G.; Scavarda, N. J.; Brodeur, G. M. Expression and Function of TRK-B and BDNF in Human Neuroblastomas. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14* (1), 759–767.
123. Sossin, W. S.; Barker, P. A. Something Old, Something New: BDNF-Induced Neuron Survival Requires TRPC Channel Function. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10* (5), 537–538.
124. Huang, E. J.; Reichardt, L. F. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 609–642.
125. Yin, B.; Ma, Z. Y.; Zhou, Z. W.; Gao, W. C.; Du, Z. G.; Zhao, Z. H.; Li, Q. Q. The TrkB+ Cancer Stem Cells Contribute to Post-Chemotherapy Recurrence of Triple-Negative Breast

Cancers in an Orthotopic Mouse Model. *Oncogene* **2015**, *34* (6), 761–770.

126. Drilon, A.; Nagasubramanian, R.; Blake, J. F.; Ku, N.; Tuch, B. B.; Ebata, K.; Smith, S.; Lauriault, V.; Kolakowski, G. R.; Brandhuber, B. J.; Larsen, P. D.; Bouhana, K. S.; Winski, S. L.; Hamor, R.; Wu, W.-I.; Parker, A.; Morales, T. H.; Sullivan, F. X.; DeWolf, W. E.; Wollenberg, L. A.; Gordon, P. R.; Douglas-Lindsay, D. N.; Scaltriti, M.; Benayed, R.; Raj, S.; Hanusch, B.; Schram, A. M.; Jonsson, P.; Berger, M. F.; Hechtman, J. F.; Taylor, B. S.; Andrews, S.; Rothenberg, S. M.; Hyman, D. M. A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Cancer Discov.* **2017**, *7* (9), 963–972.
127. Drilon, A.; Siena, S.; Ou, S.-H. I.; Patel, M.; Ahn, M. J.; Lee, J.; Bauer, T. M.; Farago, A. F.; Wheler, J. J.; Liu, S. V.; Doebele, R.; Giannetta, L.; Cerea, G.; Marrapese, G.; Schirru, M.; Amatu, A.; Bencardino, K.; Palmeri, L.; Sartore-Bianchi, A.; Vanzulli, A.; Cresta, S.; Damian, S.; Duca, M.; Ardini, E.; Li, G.; Christiansen, J.; Kowalski, K.; Johnson, A. D.; Patel, R.; Luo, D.; Chow-Maneval, E.; Hornby, Z.; Multani, P. S.; Shaw, A. T.; De Braud, F. G. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov.* **2017**, *7* (4), 400–409.
128. Drilon, A.; Ou, S.-H. I.; Cho, B. C.; Kim, D.-W.; Lee, J.; Lin, J. J.; Zhu, V. W.; Ahn, M.-J.; Camidge, D. R.; Nguyen, J.; Zhai, D.; Deng, W.; Huang, Z.; Rogers, E.; Liu, J.; Whitten, J.; Lim, J. K.; Stopatschinskaja, S.; Hyman, D. M.; Doebele, R. C.; Cui, J. J.; Shaw, A. T. Repotrectinib (TPX-0005) Is a Next-Generation ROS1/TRK/ALK Inhibitor That Potently Inhibits ROS1/TRK/ALK Solvent-Front Mutations. *Cancer Discov.* **2018**, *8* (10), 1227–1236.
129. Tanaka, H.; Sase, H.; Tsukaguchi, T.; Hasegawa, M.; Tanimura, H.; Yoshida, M.; Sakata, K.; Fujii, T.; Tachibana, Y.; Takanashi, K.; Higashida, A.; Hasegawa, K.; Ono, Y.; Oikawa, N.; Mio,

- T. Selective TRK Inhibitor CH7057288 against TRK Fusion-Driven Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17* (12), 2519–2529.
130. Ito, T.; Kinoshita, K.; Tomizawa, M.; Shinohara, S.; Nishii, H.; Matsushita, M.; Hattori, K.; Kohchi, Y.; Kohchi, M.; Hayase, T.; Watanabe, F.; Hasegawa, K.; Tanaka, H.; Kuramoto, S.; Takanashi, K.; Oikawa, N. Discovery of CH7057288 as an Orally Bioavailable, Selective, and Potent Pan-TRK Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (18), 12427–12444.
131. Xiong, K.-T.; Li, M.-L.; Jiang, Y.; Xu, H.-B.; Zeng, M.-H. Imidazole Diarylethene Switches: An Alternative to Acid-Gated Photochromism. *New J. Chem.* **2020**, *44* (19), 8061–8067.
132. *Khimicheskaya Tekhnologiya* **2000**, *43* (1), 120-124.
133. Liu, X.; Zhang, S. Efficient Iron/Copper Cocatalyzed *N*-Arylation of Arylamines with Bromoarenes. *Synlett* **2011**, *2011* (08), 1137–1142.
134. Otwinowski, Z.; Minor, W. Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology* **1997**, *276*, 307–326.
135. Vagin, A.; Teplyakov, A. Molecular Replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (Pt 1), 22–25.
136. Kurosaki, H.; Yamaguchi, Y.; Yasuzawa, H.; Jin, W.; Yamagata, Y.; Arakawa, Y. Probing, Inhibition, and Crystallographic Characterization of Metallo-Beta-Lactamase (IMP-1) with Fluorescent Agents Containing Dansyl and Thiol Groups. *ChemMedChem* **2006**, *1* (9), 969–972.
137. Zhang, H.; Ma, G.; Zhu, Y.; Zeng, L.; Ahmad, A.; Wang, C.; Pang, B.; Fang, H.; Zhao, L.; Hao, Q. Active-Site Conformational Fluctuations Promote the Enzymatic Activity of NDM-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (11), e01579-18.
138. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L.-W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner,

- R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (Pt 2), 213–221.
139. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (Pt 4), 486–501.
140. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935.
141. Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (8), 3696–3713.
142. Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157–1174.
143. Joung, I. S.; Cheatham, T. E., 3rd. Determination of Alkali and Halide Monovalent Ion Parameters for Use in Explicitly Solvated Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (30), 9020–9041.
144. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A. V., Bloino, J., Janesko, B. G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H. P., Ortiz, J. V., Izmaylov, A. F., Sonnenberg, J. L., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V. G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery, J. A., Jr., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J., Heyd, J. J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T. A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C.,

Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J. M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J. B., and Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2016**.

145. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC. New York, NY, **2016**.

146. 近藤翔太『抗生物質併用剤としてのメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤の探索研究』**2016**

千葉大学大学院医学薬学府総合薬品科学専攻 修士論文(未刊行)

147. 北原真理子『インフルエンザウイルスエンドヌクレアーゼ活性阻害化合物の合成と結合構造解析』**2018** 千葉大学大学院医学薬学府総合薬品科学専攻 修士論文(未刊行)

148. 齋藤聡『インフルエンザエンドヌクレアーゼ活性阻害化合物の構造展開と活性評価』**2020** 千葉大学大学院医学薬学府総合薬品科学専攻 修士論文(未刊行)

## VI. 2. 主論文目録

- Kamo, T.; Kuroda, K.; Kondo, S.; Hayashi, U.; Fudo, S.; Yoneda, T.; Takaya, A.; Nukaga, M.; Hoshino, T. Identification of the Inhibitory Compounds for Metallo-β-Lactamases and Structural Analysis of the Binding Modes. *Chem. Pharm. Bull.* **2021**, 69 (12), 1179–1183.

## VI. 謝辞

本研究の遂行にあたり、熱心で温かいご指導を賜りました、千葉大学大学院 理論創薬研究室 星野忠次准教授に深く御礼申し上げます。

本論文の審査をしていただき、またご助言を賜りました、千葉大学大学院 中分子化学研究室 石川勇人教授、千葉大学大学院 薬品合成化学研究室 荒井秀准教授、千葉大学大学院 活性構造化学研究室 高屋明子准教授に厚く御礼申し上げます。

千葉大学大学院 薬品物理化学研究室内の根矢三郎前教授、米田友貴前助教には、有機化学実験の基礎について多大な助言を賜りました。心より感謝申し上げます。

城西国際大学薬学部の額賀路嘉教授からは結晶構造の解析について多くの助言を賜りました。ありがとうございました。

また、千葉大学大学院 薬品物理化学研究室内の西田紀貴教授、趙慶慈助教からは多くの助言を賜りました。ありがとうございました。

そして、理論創薬研究室・薬品物理化学研究室内の卒業生・学生の皆様からは多くの刺激をいただきました。本当にありがとうございました。