

Title	1,2-環状スルファミデートを用いたピペラジンの合成 と生物活性物質への展開
Author(s)	塩川, 善右
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/59530
rights	© 2013. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by-nc- nd/4.0/
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

1,2-環状スルファミデートを用いたピペラジンの 合成と生物活性物質への展開

> 2016 塩川 善右

大阪大学大学院理学研究科

略語表

1

### 序論

第一節	ピペラジン環を持つヘテロ環化合物	3
第二節	環状スルファミデートのヘテロ環合成鍵中間体としての利用	4
第三節	アポトーシス阻害(Inhibitor of apoptosis: IAP)タンパク質拮抗薬	6
第四節	ブロモピロールアルカロイド Longamide B、longamide B methyl ester、	8
	hanishin	
第五節	インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ 1(IDO1)阻害剤	9

### 本論

第一章アポトーシス阻害タンパク質 (IAP) 阻害剤を指向したヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドドール誘導体のデザインと合成11第一節背景第二節合成第三節構造活性相関第四節結論23

第二章 ピペラジン含有天然物、Longamide B、Longamide B methyl ester、Hanishin の全 合成 第一節 背景 24 第二節 合成 25 第三節 結論 28

第三章 Longamide B からのインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1) 阻害剤の創製
第一節 背景
第二節 Longamide B を基盤とした IDO1 阻害剤のデザイン
第三節 合成
第四節 生物活性 (IDO1 阻害活性)の解析
33
第五節 結論

....

38

総括

40

参考文献

謝辞

68 73 略語表

本文中に使用した略語・略号をいかに記した。

略語・略号	正式名称
Ac	acetyl
Ala	alanine
Asp	aspartic acid
Bn	benzyl
BIR	baculovirus IAP repeat
Boc	t-butoxycarbonyl
brs	broad singlet
t-BuOK	potassium tert-butoxide
Z	benzyloxycarbonyl
mCPBA	<i>m</i> -chloroperoxybenzoic acid
CPME	cyclopentylmethylether
d	doublet
DIPEA	N,N-diisopropylethylamine
DMA	N,N-dimethylacetoamide
DMF	N,N-dimethylformamide
DMS	dimethylsulfide
EDC	(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
Et	ethyl
Gln	glutamine
Glu	glutamic acid
Gly	glycine
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium
	3-oxid hexafluorophosphate
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HTRF	homogeneous time resolved fluorescence
IFN	interferon
Ile	isoleucine
Leu	leucine
LPS	lipopolysaccaride
Lys	lysine
m	multiplet
MS	mass spectrometry
MDR1	multi-drug resistance 1

Me	methyl
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NCS	N-chlorosuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
P <sub>app</sub>	apparent permeability
Ph	phenyl
Pro	proline
q	quartet
RING	really interesting new gene
RSK	ribosomal S6 kinase
S	singlet
t	triplet
TBS	tert-butyldimethylsilyl
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
TNF	tumor necrosis factor
TRAF	TNF receptor associated factor
Trp	tryptophan
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
Tyr	tyrosine
Val	valine

序論

# 第一節 ピペラジン環を持つヘテロ環化合物

ヘテロ環化合物は窒素、酸素、硫黄等のヘテロ元素を含有する環状化合物であり、生物学的、 薬理学的に重要な構造が知られている。ヘテロ環化合物は植物や動物から抽出される天然物の構 成成分として多く見出されているだけでなく<sup>1,2)</sup>、市販されている薬の構成成分としても広く使用 されている<sup>3)</sup>。ヘテロ環の一つであるピペラジンは1,4 位に二つの窒素元素を有する6員環化合物 であり、その窒素、炭素に置換基導入が可能であることから様々な結合様式をとることができる という特徴を有する。また、ピペラジン誘導体は、抗菌活性<sup>4-6)</sup>、抗マラリア活性<sup>7-9)</sup>、抗癌活性 <sup>10-12)</sup>、駆虫作用<sup>13,14)</sup>など幅広い生物活性を示すことが知られており、現在、上市している医薬品 や農薬の部分構造として用いられている(Figure 1)<sup>15)</sup>。



生理活性を有するピペラジン誘導体

ピペラジンは、このような生物学的重要性から多くの有機合成化学者の関心を集めており、様々 な合成法がこれまでに数多く報告されている(Scheme 1)。古くは、エチレンジアミンに対しクロ ロ酢酸エステルを作用させピペラジノンを合成する方法<sup>16)</sup>(Scheme 1A)や、ジアミン3を加熱 し、アセトキシ基を脱離基としたアミンによる求核反応により閉環させる方法<sup>17)</sup>(Scheme 1B)、 ピラジンを還元してピペラジンへと変換する方法<sup>18)</sup>(Scheme 1C)などが報告されている。近年 では、前駆体 7 に対してパラジウムを用いた分子内環化反応により立体制御された置換基を有す るピペラジンの合成法<sup>19)</sup>(Scheme 1D)や2個のトルエンスルホニルオキシ基を有するアミンに アルキルアミンを作用させることでピペラジンを合成する方法<sup>20)</sup>(Scheme 1E)の報告例がある。 しかし、これら合成法の多くは、置換基の位置選択性、立体選択性を制御する利便性に乏しい。 一方で、複雑なピペラジンの新規合成法は、ピペラジン含有医薬品の効率的な合成に貢献するこ とから、創薬化学の発展に重要であると考えられる。そこで、私はピペラジン環を有する医薬品 シード化合物、および生物活性天然物化合物とその誘導体の合成研究を行い、複雑なピペラジン 環含有化合物の新規合成法を確立することとした。また、合成したピペラジン誘導体の生物学的 評価を行い、ピペラジン含有化合物の生物学的特徴を同時に精査することとした。

**Figure 1.** ピペラジンとその誘導体例



Scheme 1. ピペラジンの代表的な既知合成法

# 第二節 環状スルファミデートのヘテロ環合成鍵中間体としての利用

ヘテロ環合成法は数多く報告されているが、 近年、環状スルファミデートが置換ヘテロ環合 成の有用な前駆体として Gallagher らによって 報告されている<sup>21)</sup>。環状スルファミデートは 1,2-または 1,3-アミノアルコールのヒドロキシ 基とアミノ基をスルホンで架橋した構造であ る (Figure 2)。調製法として最も一般的な手法



1,2-環状スルファミデート 1,3-環状スルファミデート

Figure 2. 環状スルファミデートの構造

は、対応するアミノアルコール 11 に対し、塩化チオニルを作用させた後に、酸化剤によってスル ホキシドをスルホンに酸化して調製する方法である<sup>22)</sup> (Scheme 2)。酸化剤としては m-CPBA や 過マンガン酸カリウムも利用可能であるが、酸化ルテニウムまたは塩化ルテニウム触媒存在下、 過ヨウ素酸ナトリウムで酸化する方法が最も効率良く酸化することが知られている<sup>23-25)</sup>。一方、 塩化スルフリルによって、直接スルホンで架橋する方法も考えられるが、この場合、水酸基の塩 素化やアジリジン形成、ポリマー化等の副反応が引き起こされるため<sup>26)</sup>、前述の2工程による手 法が主流となっている。アミノアルコール以外からの調製法も報告されており、Nicolaou らは Burgess 試薬と 1,2-ジオール 14 またはエポキシドを作用させることで環状スルファミデート 15 の 合成に成功している<sup>27)</sup>。Du Bois らは鎖上のスルファミデートエステル 17 に対し、ロジウム触媒 でナイトレンを生成し、C-H 結合への挿入反応によって環状のスルファミデート 18 を合成する方 法を見出している<sup>28)</sup>。また Zhou らはα-ヒドロキシケトン 19 を原料として、塩化スルファモイル により環状のイミン 20 を形成し、その後、接触還元することで対応する環状スルファミデート 21 を合成している<sup>29)</sup>。 一般的な1.2-環状スルファミデートの合成法



Scheme 2. 1,2-環状スルファミデートの合成法

環状スルファミデートを用いることにより、様々な求核剤が環状スルファミデートの酸素原子が結合する炭素に S<sub>N</sub>2 反応で求核攻撃し、求核剤が導入された化合物 23 が容易に得られる<sup>21,22)</sup> (Scheme 3)。この反応において、求核剤側がエステル等の求電子基を有している場合、化合物 23 は塩基条件下、分子内反応を引き起こし、種々ヘテロ環 24 を形成することが可能となる<sup>21)</sup>。この 特徴をいかして、Gallagher らは環状スルファミデート 25 とマロン酸エステル 26 を水素化ナトリ ウム存在下、反応させ、3 位にエステル基を有するピロリジン、ピペリジンの合成法を報告して いる<sup>30)</sup>。なお、マロン酸エステルをフェニル酢酸エステルやフェニルチオ酢酸エステル等、カル ボニルのα位プロトンの pKa が 13-22 であれば、同様の反応が進行することも明らかとなってい る<sup>31,32)</sup>。一方、環状スルファミデート 25 にアミノ酸エステルやチオグリコール酸エステル 29 を 作用させると、多置換ピペラジノンやチオモルホリン-2-オン 31 が生成できることが Gallagher ら によって見出されている<sup>33)</sup>。



Pg=protective group, Nu=Nucleophile



Scheme 3. 1.2-環状スルファミデートを用いたヘテロ環化合物の合成例

Scheme 3 に示した環状スルファミデートを経たヘテロ環合成においては、窒素や硫黄が環状 スルファミデートに求核攻撃した後に、塩基条件下、分子内ラクタム化が引き起こされることで ヘテロ環が生成する。以上のような環状スルファミデートを経たヘテロ環合成を天然物や創薬シ ード化合物に用いる例も複数報告されている。天然物合成に関して、Hudlicky らは(±)-balanolの 合成において、スルファミデートを鍵中間体として用いている<sup>34)</sup>ほか、(-)-aphanorphine<sup>35)</sup>、 (-)-paroxetine、(+)-laccarin<sup>30)</sup>の合成にもスルファミデートが利用されている。創薬シード化合物に 関しては、RSK 阻害剤<sup>37)</sup>、aggrecanase 阻害剤<sup>38)</sup>、ヒスタミン H<sub>3</sub> 受容体逆作動薬<sup>39)</sup>など幅広い標 的タンパクに対する化合物合成に用いられている。しかし、天然物合成において含ピペラジン天 然物への応用例がほとんど無いこと、創薬シード化合物においては、ピペラジノン合成に多くの 場合に用いられていることなどから、環状スルファミデートの有用性を高める余地は残ると考え られた。そこで、私は創薬シード化合物合成および天然物合成を通して、環状スルファミデート を用いた複雑なピペラジン誘導体の新規合成法を確立することとした。創薬シード合成として、 アポトーシス阻害(inhibitor of apoptosis: IAP)因子阻害剤の創出を着手することとした。ここで 私は、環状スルファミデートを用いてヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール骨格の合成法を確 立した。一方、ピペラジン環を含む天然物合成として、longamide B、longamide B methyl ester、 hanishin の全合成を行うこととした。ここで私は、環状スルファミデートを用いてピロロピペラジ ノン誘導体合成に成功している。Longamide B に関しては、多様化合成により、その周辺化合物 も合成し、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (indoleamine 2,3-dioxygenase: IDO1) 阻害剤へ の展開を行った。

### 第三節 アポトーシス阻害 (Inhibitor of apoptosis: IAP) タンパク質拮抗薬

アポトーシスとは細胞自らが引き起こす自己の細胞死機構を指し、変異や傷害を負った生体に とって不要あるいは危険な細胞を除去することで、正常な生命活動の構築や維持に重要な役割を 果たしている。アポトーシス機構の破綻は、癌、自己免疫疾患、エイズ、肝炎、アルツハイマー 病など、多くの疾病の発症に深く関わっていることが明らかとなっている。例えば、癌ではアポトーシス阻害タンパク質である IAP (inhibitor of apoptosis) protein が癌細胞中に過剰発現しており、これは、細胞死するべき細胞が、IAP 発現によって残存し、DNA に変異が蓄積することで癌化した細胞が出現するためと理解されている<sup>4042)</sup>。また、IAP の発現は抗癌薬によるアポトーシス誘導を阻害し、治療抵抗性の要因ともなっていることが知られている<sup>43,44)</sup>。

ヒトには 8 種類の IAP ファミリータンパク質が存在し、アポトーシス実行において中心的な役 割を果たす Caspase と相互作用し、細胞死の制御に関与する<sup>45)</sup> (Figure 3)。その機能ドメインや 役割について最も解析されているのが、XIAP (X-chromosome linked IAP)、cIAP-1 (cellular IAP-1) および cIAP-2 (cellular IAP-2) である。XIAP は、N 末端に BIR ドメインを 3 つ保持し、C 末端に 一つの RING フィンガードメインをもつ 497 アミノ酸からなるタンパク質であり、末梢血リンパ 球を除くほとんど全ての臓器で発現を示し、細胞内では細胞質に局在する。XIAP の BIR3 ドメイ ンは Caspase-9 に、BIR2 ドメインとその N 末端側のリンカー領域は Caspase-3 及び-7 に結合し、 Caspase の活性を強力に阻害する<sup>46)</sup>。 一方、cIAP は XIAP と同様に Caspase-3/-7、及び Caspase-9 と結合可能であるが、XIAP ほど強くは結合しない。しかし、cIAP は TNF-α受容体複合体である TRAF1、TRAF2 などのデスレセプターと結合し、Caspase-8 とそれに続く Caspase-3/-7 の活性化を 阻害し、アポトーシスを抑制する<sup>47)</sup>。従って、XIAP 及び cIAP をいずれも阻害することで、Caspase による抑制を解除し、癌細胞の強力なアポトーシスが誘導可能であるため、IAP 拮抗薬は魅力的 な抗癌標的と考えられる。



**Figure 3.** IAP ファミリータンパク質 XIAP/cIAP が関与するアポトーシス経路<sup>48)</sup>

ミトコンドリアより放出される第 2 のミトコンドリア由来カスパーゼ活性化因子 (second mitochondria-drived activator of caspase/direct IAP binding protein with low p*I*; Smac/DIABLO) が XIAP、 cIAP に結合し、その活性を抑える働きがあることが 2000 年に報告された<sup>49,50)</sup>。結晶構造解析に より、Smac は *N* 末端の 4 残基 Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) のみで XIAP の BIR3 に結合可能であるこ とが明らかとなった<sup>51)</sup>。これらの研究成果が発端となり AVPI を模倣した低分子化合物の研究開 発が活発になっている<sup>48)</sup>。これまでに GDC-0917 (Genentech/Curis)<sup>52)</sup>、HGS1029 (Aegera/HGS)

<sup>53)</sup>、Birinapant (TetraLogic) <sup>54)</sup>、LCL-161 (Novartis) <sup>55)</sup>、AT-406 (Ascenta) <sup>56)</sup>の臨床試験が実施さ れている (Figure 4)。このうち、GDC-0917、LCL-161 と AT-406 が経口薬を指向し、それ以外は 注射薬として報告されている。



Figure 4. IAP 拮抗薬の現在の研究開発状況

私はFigure 4 に示した化合物よりも優れた IAP 拮抗薬を見出すことを目的として、AVPIと XIAP との共結晶構造解析を実施し、この共結晶構造を活用した立体構造情報に基づく薬剤設計 (Structure-Based Drug Design; SBDD)により、AVPIのペプチド模倣化合物をデザインすること とした。IAP 拮抗薬の探索の詳細に関しては第一章で述べる。

第四節 ブロモピロールアルカロイド longamide B、longamide B methyl ester、hanishin

Longamide B<sup>57)</sup>、longamide B methyl ester<sup>58)</sup>、 hanishin<sup>59)</sup>はブロモピロールアルカロイドに属 し、それぞれ海綿の一種である*Agelasdispar*, *Homaxinella* sp., *Acanthella* carteriから単離され ている(Figure 5)。ブロモピロールアルカロ イド類は幅広い生物活性を示すことが知られ





ており、例えば、longamide Bはグラム陽性菌に対して抗菌活性を示し<sup>57)</sup>(*Bacillus subtilis*; MIC 50  $\mu$ g/mL)、longamide B methyl esterはリンパ球白血病細胞株P388に対して抗腫瘍活性を示し<sup>58)</sup>(ED<sub>50</sub> 30  $\mu$ g/mL)、hanishinは非小胞肺癌細胞株NSCLC-N6に対して抗腫瘍活性を示すことが知られている<sup>59)</sup>(IC<sub>50</sub> 9.7 mg/mL)。ブロモピロールアルカロイドは上記の3つ以外に多くの種類が単離、構造決定されており、その多くが抗菌活性や細胞毒性など幅広い生物活性を示すことが明らかとなっている。また上記の3化合物を含め、ブロモピロールアルカロイドはピロロピペラジン骨格を有するものが複数存在し<sup>60)</sup>(Figure 6)、置換基の位置、立体をコントロールしたピロロピペリジン 骨格の新規合成法開発は、種々のピロールアルカロイド合成に寄与すると考えられる。一方、longamide B methyl ester、hanishinの活性発現機構は不明な点が多いことから、これら天然物の全合成法を確立するとともに、様々な類縁体の合成を可能とする合成手法を確立することにより、合成化合物を用いた生物活性機構の解明にも貢献できると考えられる。以上の背景から天然型のlongamide B methyl ester、hanishinおよびその類縁体合成と、特に免疫調節作用に焦点をあてた生物活性試験に着手することとした。詳細は第二章で述べる。



### 第五節 インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1) 阻害剤

インドールアミン 2.3-ジオキシゲナーゼ 1 (IDO1) はトリプトファンを酸化代謝し、N-ホルミ ルキヌレニンを生成するヘム含有酵素である<sup>61,62)</sup> (Figure 7)。IDO1 のヘム鉄が酸素を介して基質 であるトリプトファン(Trp)と相互作用し、その結果、インドールの 2-3 位が開裂することによ り N-ホルミルキヌレニンが生成される。キヌレニン経路は免疫反応の抑制に中心的な役割を果た しており<sup>63-65)</sup>、その一例として、胎児母体間免疫の免疫寛容を誘導することが知られている<sup>66,67)</sup>。 N-ホルミルキヌレニンはキヌレニン経路において、その後、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキ シアントラニル酸、アントラニル酸、キノリン酸へと代謝される。これら代謝物はT細胞の増殖、 分化を抑制し、アポトーシスを促す<sup>68)</sup>。一方、キヌレニン産生の増加は神経疾患に関わっている 報告もある<sup>69)</sup>。IDO1 は IFN-γ、IFN-α、TNF-α、LPS により誘導され、抗原提示細胞や樹状細胞、 上皮細胞に過剰発現している<sup>70-72)</sup>。炎症性サイトカインである IFN-γ が細胞膜上の受容体に結合 すると、JAK/STAT シグナル経路を通じて、IDO1の転写が引き起こされる。その結果、発現した IDO1 は Trp を代謝し、その細胞周辺は局所的に Trp の枯渇が起こる<sup>64)</sup>。 Trp の減少は、T 細胞内 の遊離 rRNAを増加させ、GCN2キナーゼを活性化することにより、細胞周期をG1期に停止させ る。これにより T 細胞の増殖は抑制される<sup>63)</sup>。一方、別のサイトカインである TGF-B1 が細胞膜 上の受容体に結合すると、PI3K/Aktシグナル経路を介し、IDO1、SHP 複合体形成を促す。その後、 IKKαが活性化し、核内に移行することで TGF-β1の転写が引き起こされる。TGF-β1 はナイーブT 細胞を免疫抑制に働く Treg 細胞への分化を促進する<sup>64)</sup>。以上の機構により IDO1 は免疫を抑制す る方向へと働く。IDO1 は大腸癌<sup>73,74)</sup>、胃癌<sup>75)</sup>など様々な腫瘍内でも過剰発現しており、IDO1 の 過剰発現と癌治療の予後不良の関連性も確認されている。これは、IDO1 が癌に対する免疫攻撃の 回避に寄与しているためと考えられている。この背景により IDO1 は癌治療の魅力的なターゲッ トとなっており、すでに複数の IDO1 阻害剤が報告されいる<sup>76-82)</sup>。今回、私は longamide B と IDO1 とのドッキング・シミュレーション結果を活用し、新規の IDO1 阻害剤を見出した。詳細につい ては、第三章で述べる。

9



Figure 7. IDO1 による免疫抑制経路

# 第一章 アポトーシス阻害タンパク質 (IAP) 阻害剤を指向したヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]イン ドール誘導体のデザインと合成

#### 第一節 背景

アポトーシス阻害タンパク質(IAP)阻害剤の設計においては、まず、内在性リガンドである SmacのN末端Ala-Val-Pro-Ile(AVPI)とXIAPとの共結晶についてX線結晶構造解析を実施した 結果(Figure 8)を基にIAPと基質間の詳細な相互作用を解析した。すなわち、結晶構造解析の結 果より、AVPIのそれぞれのアミノ酸残基について、下記のXIAPとの相互作用が重要と考えられ た。

<u>Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) の XIAP との相互作用:</u>

- <u>AVPIの</u>アラニン残基は、<u>XIAP</u>の Glu314、Gln319、Asp309 などのアミノ酸から形成され る狭いポケットと相互作用しており、主鎖の窒素原子は Glu314 と塩橋を、アミドカルボ ニル基は Trp323 と水素結合を形成している。
- 2) バリン残基は、主鎖の窒素原子が Thr308 と、カルボニル基が Leu307 とそれぞれ水素結合 している。イソプロピル基が溶媒側を向いているため、活性に大きな影響を与えずにイソ プロピル基を他の置換基に変換できると考えられる。物性調節に活用可能な部位である。
- 3) プロリン残基の近傍には Trp323 と Tyr324 からなる疎水性エリア(以後 North region と呼ぶ)が存在するが、プロリン骨格からは距離が離れているため、ファンデルワールス相互作用は弱いと考えられる。プロリンの2つのアミド結合に由来するターン構造はイソロイシン残基が脂溶性ポケットと相互作用するための方向を規定する重要な役割を果たしていると考えられる。
- 4) イソロイシン残基は、Leu292、Lys297、Gly306などのアミノ酸残基からなる疎水性ポケット(以後 East region と呼ぶ)と相互作用している。イソロイシン残基の極性基による水素結合は形成されておらず、脂溶性ポケットも深いため、導入可能な脂溶性置換基の許容範囲は広いと考えられる。

以上の知見から、狭いポケット内でアラニン残基と形成している塩橋と、強い水素結合を形成 しているバリン残基のアミド結合は保持し、①North regionの疎水性エリアとの相互作用を指向し てプロリン環を変換すること、②East region に存在する疎水性ポケットとの相互作用を指向して イソロイシンのイソブチル基をより脂溶性の高い置換基に変換すること、を合成方針とした。ま た、cIAP は XIAP との共通構造として類似の BIR2/3 ドメインを保持している<sup>40</sup>ため、本合成方 針により Dual 型 IAP 拮抗薬の創製が可能と推察した。



Figure 8. XIAP と AVPI の X 線共結晶構造

上記の考察を基にして、著者の所属するグループ(武田薬品工業株式会社)では以前に、オク タヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラジン構造を有する IAP 拮抗薬(化合物 36)を見出し、36 が強力な XIAP/cIAP-1 結合阻害活性を示すとともに、ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞に対して良 好な細胞増殖阻害活性を示すことを明らかにした<sup>83,84)</sup>(Figure 9)。本化合物は MDA-MB-231 移植 マウスの Xenograft モデルにおいて用量依存的に強力な抗腫瘍効果を示した。しかし、化合物 36 の Multi-drug resistance 1(MDR1)発現細胞における膜透過性を測定した結果、本化合物は MDR1 の基質(*P<sub>app</sub>=1.0 nm/sec*)であり、MDR1 トランスポーターによって排出されやすいことが明らか となった。一般的に腫瘍細胞は化学療法剤の処理により MDR1 の発現を亢進し、多剤耐性を獲得 する傾向があることから<sup>85)</sup>、化合物 36 の MDR1 発現細胞における薬剤排出の低減は重要な課題 と考えられた。そこで、化合物 36 の MDR1 による排出を低減し、かつ化合物 36 と同等の XIAP/cIAP-1 阻害活性を有する化合物の探索を行うこととした。



 $P_{app}^{b}$  (nm/sec)=1.0

ER<sup>c</sup> =24

<sup>a</sup> Metabolic stability. <sup>b</sup> Apical-to-basolateral apparent permeability across MDR1 expressing cells. <sup>c</sup> Efflux ratio.

Figure 9. IAP 拮抗薬開発; 化合物 39 までのリード最適化

MDR1 による排出を抑える方法の一つとして水素結合アクセプター(Hydrogen Bond Acceptor: HBA)の効果を減弱させる手段が知られている<sup>85)</sup>。この知見を基に、化合物 **36** において HBA に なり得る母核窒素の塩基性を低下させることで、MDR1 による薬剤排出の低減が可能と考えた。 一方、化合物 **36** と XIAP、cIAP-1 の X 線共結晶構造の解析より、オクタヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラ ジン骨格の 6、7 位が溶媒接触領域を向いており、その周辺部に大きな空間が広がっていることが 明らかとなった<sup>83)</sup> (Figure 10)。



Figure 10. 化合物 36 と XIAP (a)、cIAP-1 (b) の共結晶構造解析結果

母核 6、7 位の変換は活性に与える影響が少なく、置換基の導入位置として適していると考えら れることから、オクタヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラジンの 6、7 位を基点にベンゼン環を縮環した三環 式化合物へキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール骨格をデザインした(Figure 11)。ベンゼン環を 縮環することにより、橋頭位の窒素が共鳴効果により窒素上の電子密度が低下し、MDR1 による 排出の低下が見込めると考えた。この際、骨格内不斉点の最適化(*R*体または*S*体)も念頭に置 いた(化合物 37)。さらに、橋頭位の窒素に対し、パラ位、オルト位へ電子吸引性基を導入する ことで、より窒素原子上の電子密度を低下させ、MDR1 発現細胞における薬剤排出の低減につな がると推定した。(化合物 38; R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>)。以上の考察に基づき、化合物 38 を新規 IAP 拮抗薬のター ゲット骨格として合成を行うこととした。



Figure 11. ヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール誘導体 38 のデザイン

### 第二節 合成

前節で述べたように、MDR1 発現細胞における薬剤排出低減のための新規骨格として設計した ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体 38 について、合成法構築を行った。化合物 36 の オクタヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラジン母核は、2,3-ジブロモプロピオン酸メチル 39 とジアミン 40 に よるピペラジン環形成反応を経る方法で合成しており、その反応機構は Scheme 4 のようになって いると推定している<sup>83)</sup>。すなわち、39 より生成した α-ブロモアクリル酸メチル 39' に対し、ジア ミン 40 の 2 つのアミンのうち求核性が高いと考えられるピロリジンの窒素原子が優先的に反応し、 ジアステレオマー混合物 41a が主生成物として得られたと推測した。一方、ベンジル位の窒素原 子はピロリジン環の窒素原子よりも求核性が低いため、対応する位置異性体 **42c** がほとんど生成しないと考察した。

この手法を三環式化合物ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール骨格の合成に応用した場合、 ジアミン 40 と異なり、ジアミン 43 はインドリンの 1 位アミンがアニリン構造をとるため、側鎖 アミンと比べて求核性が低いと考えられ<sup>87,88)</sup>、環形成反応においては位置異性体 45 が主生成物に なると予想した (Scheme 5)。以上の考察により、目的の母核を効率的に合成するためには新たな 合成法を確立する必要があると考えた。



Scheme 4. オクタヒドロピロロ[1,2-a]ピラジン骨格合成の推定反応機構



**Scheme 5.** ジアミン **40、43** と 2,3-ジブロモプロピオン酸メチルとの環化反応による推定生成物 <sup>*a*</sup> Reagents and Conditions: (a) **39**, Et<sub>3</sub>N, toluene.

以下にヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール骨格の逆合成スキームを示す (Scheme 6)。ベンゼ

ン環上の修飾は骨格形成後に行い(47→46)、三環式化合物のピペラジン環は分子内求核置換反応 により形成することとした(48→47)。その前駆体 48 は、インドリン誘導体 49 に対してセリンか ら誘導される環状スルファミデート 50<sup>89)</sup>を用いた *N*-アルキル化により合成することとした。化合 物 49、50 は、それぞれインドリンカルボン酸 51 およびセリンメチルエステル 52 から誘導可能で ある。本手法はキラル化合物を出発原料としているため、光学活性な目的化合物を合成すること が出来ると考えた。



Scheme 6. ヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール骨格の逆合成

実際の (3*S*, 10*aR*) 及び (3*S*, 10*aS*) のヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール骨格の合成法を Scheme 7 に示す。市販のインドールカルボン酸 51A (*R*-体)、51B (*S*-体)をボランジメチルスル フィド錯体存在下、THF 中で還元し、生成した水酸基を TBS 基で保護することでシリル保護体 49A、49B をそれぞれ 2 工程収率 93%、66%で得た。次に、得られた 49A、49B とセリンメチルエ ステルから調製した環状スルファミデート 50 とを DMF または DMA 中で反応し、続けて 6M 塩 酸で TBS 基を除去し、インドリン誘導体 54A、54B をそれぞれ 2 工程収率 46%、41%の収率で得 た。得られた 54A、54B を水酸基のヨウ素化を経た後、分子内環化反応に付し、ヘキサヒドロピ ラジノ[1,2-*a*]インドール母核を形成した。水酸化パラジウムを用いたベンジル基の脱保護は反応 の進行が遅かったものの、温度を 50℃ に上げる、もしくは水素圧を 3 気圧下で行うと、反応が加 速された。得られたアミンを Boc 基で保護し、Boc 保護体 55A、55B をそれぞれ 3 工程収率 43%、 62% で合成した。



<sup>*a*</sup>Reagents and Conditions: (a) BH<sub>3</sub>-DMS complex, THF, reflux, 93% (**53A**), 72% (**53B**); (b) TBSCl, pyridine, room temp, quant. (for **49A**); (c) TBSCl, imidazole, DMF, room temp, 91% (for **49B**); (d) **50**, DMF, room temp (for **54A**); (e) **50**, DMA, room temp (for **54B**); (f) 6N HCl, room temp, 46%, (**54A**) (2 steps), 41% (**54B**) (2 steps) ; (g) I<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, MeCN/toluene, 80 °C, 58% (**47A**), 86% (**47B**); (h) Pd(OH)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> (1 atom), 10% HCl in MeOH, 50 °C (for **55A**); (i) Pd(OH)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> (3 atom), MeOH, room temp (for **55B**); (j) (Boc)<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, room temp, 96% (**55A**) (2 steps), 72% (**55B**) (2 steps).

(3S, 10aS)-ヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール誘導体 55B の母核変換について以下示す。 (Scheme 8)。三環式化合物 55B に対し、NBS を用いたブロモ化を試みた。インドリンの窒素原 子に対して、オルト位(6位)、パラ位(8位)の電子密度が高く、反応点として考えられたもの の、室温で両者を反応させたところ、8位選択的にブロモ化が進行した。得られた8位ブロモ体 56 をシアン化銅、ヨウ化銅によりシアノ化<sup>90)</sup>することでシアノ体 57 を 29%の収率で得た。一方、 55B に対し、NCS(1当量)によるクロロ化を試みたが、室温では反応せず 45℃ に昇温すること で反応は進行した。しかし、クロロ化の位置選択性は低く、8位クロロ体 58 と6位クロロ体 59 がそれぞれ、33%、28%の収率で得られた。8位クロロ化の選択性向上を指向して、クロロ化剤、 溶媒の最適化検討を行ったものの、改善は見られなかった。6位クロロ体 59 は、さらに NCS(1 当量)でクロロ化し、60%の収率で 6,8 位ジクロロ体 60 へ導いた。



Scheme 8. ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体 55B の母核変換 <sup>*a*</sup> <sup>*a*</sup>Reagents and Conditions: (a) NBS, DMF, 0 °C to r.t., 94%; (b) CuCN, CuI, DMF, 180 °C,; (c) (Boc)<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, room temp, 29% (2 steps); (d) NCS, DMF, 0 °C to 45 °C, 33% (58), 28% (59); (e) NCS, DMF, 50 °C, 60%.

(3S, 10aR)-ヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール誘導体55Aの最終目的物への誘導について示す(Scheme 9)。化合物55Aのメチルエステルを水酸化リチウムで加水分解し、得られたカルボン酸と(R)-クロマニルアミンをEDC、HOBtで縮合し、アミド体61とした後、Boc基の脱保護、HATUを用いたシクロヘキシルグリシン62との縮合によりジアミド体63を4工程55%の収率で得た。次にアラニン誘導体、エチルグリシン誘導体64、65とそれぞれ縮合し、Boc基を脱保護することで目的の化合物67a、67bを3工程収率58%、57%で合成した。



Scheme 9. 化合物 55A の最終目的物への誘導とアラニン部位の変換"

<sup>*a*</sup>Reagents and Conditions: (a) LiOH-H<sub>2</sub>O, THF/H<sub>2</sub>O, 50 °C; (b) (*R*)-chroman-4-amine hydrochloride, EDC, HOBt, DIPEA, DMF, 0 °C to room temp, 72% (2 steps); (c) 4M HCl in cyclopentyl methyl ether, EtOAc/MeOH, room temp; (d) **62**, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C to room temp, 77%; (e) **64** or **65**, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C to room temp, 92% (**66a**, 2 steps), 76% (**66b**, 2 steps); (f) 4M HCl in EtOAc, EtOAc/MeOH, room temp, 63% (**67a**), 75% (**67b**).



<sup>a</sup>Reagents and Conditions: (a) LiOH-H<sub>2</sub>O, THF/H<sub>2</sub>O, 50 °C; (b) (*R*)-chroman-4-amine hydrochloride, EDC, HOBt, DIPEA, DMF, 0 °C to room temp (for **68**); (c) (*R*)-chroman-4-amine hydrochloride, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C to room temp (for **69-71**); (d) 4M HCl in cyclopentyl methyl ether, EtOAc/MeOH, room temp; (e) **62**, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C to room temp; (f) **65**, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C to room temp; (g) 4M HCl in cyclopentyl methyl ether, EtOAc, room temp (for **80**); (h) 4M HCl in EtOAc, EtOAc/MeOH, room temp (for **82**); (i) TFA, toluene, room temp (for **81**, **83**).

次に(3*S*, 10a*S*)-ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体 **55B** とその母核変換体(**57**、**58**、 **60**)のデザイン化合物への誘導について示す(Scheme 10)。 Scheme 9 の合成法と同様に脱保護、 縮合を繰り返し、6 工程収率 40-83%で Boc 保護体 **76-79** とした。最後の Boc 基の脱保護の段階に おいて、シアノ体 **77**、ジクロロ体 **79** では 4M 塩化水素の酢酸エチル溶液を作用させると一部、同 定困難な分解物が確認された。そこで、TFA を用いた温和な条件を適用し、目的化合物 **81**、**83** を 各々15%、31%の収率で合成した。無置換体 **76**、モノクロロ体 **78** は従来通り 4M 塩化水素の酢酸 エチル溶液で Boc 基を除去し、化合物 **80、82** を各々39%、48%の収率で得た。

三環式化合物ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体の比較対象としてオクタヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラジン誘導体 90,91 を合成した(Scheme 11)。既知であるオクタヒドロピロロ[1,2-*a*] ピラジン中間体 84、85<sup>83)</sup>の Boc 基を 4M 塩化水素の酢酸エチル溶液で脱保護し、HATU を用いた シクロヘキシルグリシン 62 との縮合により 86、87 を得た。次にアラニン誘導体、エチルグリシ ン誘導体 64、65 と縮合し、Boc 基を脱保護することで目的の化合物 90、91 をそれぞれ合成した。



#### Scheme 11. 対象化合物オクタヒドロピロロ[1,2-a]ピラジン骨格誘導体の合成"

<sup>*a*</sup> Reagents and Conditions: (a) 4M HCl in EtOAc, EtOAc, room temp; (b) **62**, HATU, DIPEA, DMF, room temp, 75% (**87**, 2 steps); (c) **64** or **65**, HATU, DIPEA, DMF, room temp, 70% (**89**, 2 steps); (d) 4M HCl in cyclopentyl methyl ether, room temp, 1.4% (5 steps) (for **90**); (e) 4M HCl in EtOAc, EtOAc, room temp, 86% (for **91**).

### 第三節 構造活性相関

Table 1 に、三環式化合物へキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体とその対象化合物であ る二環式オクタヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラジン誘導体の XIAP/cIAP-1 結合阻害活性 (IC<sub>50</sub>)、乳癌由 来細胞株 MDA-MB-231 での細胞増殖阻害活性 (GI<sub>50</sub>)、MDR1 発現細胞における頂端膜 (管腔) から基底膜 (血管) への膜透過性 (*P*<sub>app</sub>) および efflux ratio (MDR1 発現細胞の基底膜から頂端膜 への輸送/頂端膜から基底膜への輸送) (ER) を示す。三環式化合物 67a は期待通り二環式化合物 92<sup>83)</sup>と同等の XIAP/cIAP-1 結合阻害活性 (XIAP, 220 nM, cIAP-1, 2.8 nM) を示すともに、MDR1 発 現細胞における膜透過性が改善した。しかし、化合物 67a では MDA-MB-231 での細胞増殖阻害活 性 (GI<sub>50</sub>, 15 nM) がやや減弱した。

**Table 1.** 三環式ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体と二環式オクタヒドロピロロ [1,2-*a*]ピラジン誘導体の対比

Cmnd	Cmpd Structure	XIAP BIR3 <sup>a,b</sup>	cIAP1 BIR3 <sup>a,b</sup>	MDA-MB-231 b	$P_{\sf app}{}^c$	ER <sup>d</sup>
Cilipu	Siluciule	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	GI <sub>50</sub> (nM)	(nm/sec)	
67a		220 (220-250)	2.8 (2.6-3.2)	15 (12-19)	41	3.2
67b		140 (120-160)	1.7 (1.6-1.8)	4.4 (3.5-5.5)	86	1.2
80	Me <sup>-</sup> N H O N H O	19 (16-23)	1.4 (1.3-1.6)	1.8 (1.5-2.3)	25	8.2
92	$Me^{-N} \xrightarrow{Me^{-N}}_{Me} N \xrightarrow{H^{(R)}}_{N^{(R)}} N \xrightarrow{H^{(R)}}_{N^{(R)}} N \xrightarrow{H^{(R)}}_{N^{(R)}} N \xrightarrow{H^{(R)}}_{H^{(R)}} N \xrightarrow{H^{(R)}}_{H^{(R$	240 (190-300)	2.1 (1.8-2.4)	5.7 (4.9-6.7)	5	23
90		120 (82-180)	1.2 (1.1-1.3)	4.6 (2.4-8.6)	N.D.	N.D.
91		120 (83-160)	2.2 (2.1-2.3)	13 (10-16)	3	6.9

<sup>a</sup>As determined by HTRF assay. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> values and 95% confidence intervals (CI) were calculated by nonlinear regression analysis of the percentage inhibitions. <sup>c</sup>Apparent permeability. <sup>d</sup>Efflux ratio.

我々は、二環式化合物92のcIAP-1の共結晶構造解析を実施し、アラニン部位はcIAP-1のGlu325、 Asp320、Trp316などのアミノ酸から形成される狭いポケットと相互作用しているものの、アラニ ンのメチル基周辺にさらに活用可能な小さなスペースが存在することを確認した(Figure 12a)。 また文献より、この部位はエチル基も許容されることが判明したため<sup>48)</sup>、92のアラニンのアルキ ル基を一炭素伸張したエチルグリシン誘導体 90 に変換したところ、疎水性相互作用が向上し、活 性増強につながった。アルキル鎖を伸長させたことでエチルグリシンのアルキル鎖末端と cIAP-1 の Leu313のアルキル鎖、Trp316のインドール基との距離が近づき、疎水性相互作用、CH-π 相互 作用が容易となったため、活性が向上したと推測している(Figure 12b)。この結果を三環式化合 物に応用し、得られたエチルグリシン体 67b は XIAP/cIAP-1 結合阻害活性が向上し(XIAP, 140 nM, cIAP-1, 1.7 nM)、それに伴い細胞増殖阻害活性も向上した(GI<sub>50</sub>, 4.4 nM)。さらに MDR1 発現細胞 における膜透過性もより良好な値を示した。



**Figure 12.** 化合物 **92** と cIAP-1 共結晶構造解析結果(PDB ID 4LGU) (a), 化合物 **90** と cIAP-1 共結 晶構造解析結果(PDB ID 4MTI) (b)

次に二環式化合物 92、91 を比較すると、オクタヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラジン骨格の立体構造は、 (3*S*, 8*aR*)-体に比べ (3*S*, 8*aS*)-体が、XIAP 阻害活性を向上させることが明らかとなった。この知見 を活かし、ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール骨格の橋頭位(10*a* 位)の不斉中心を*S* 体に変 換した(3*S*, 10*aS*)-誘導体 80 を合成した。期待した通り、(3*S*, 10*aS*)-体 80 は(3*S*, 10*aR*)-体 67b と比較 し、XIAP 阻害活性が大幅に向上し(XIAP, 19 nM, cIAP-1, 1.4 nM)、それに伴い細胞増殖阻害活性 も向上した(GI<sub>50</sub>, 1.8 nM)。しかし、(3*S*, 10*aS*)-体 80 は、ジアステレオマー(3*S*, 10*aR*)-体 67b と比 較して ER が悪化した(ER: 1.2 →8.2)。

(35,10aS)-体 80 が極めて強い XIAP/cIAP-1 結合阻害活性を示したことから、我々は化合物 80 と cIAP-1 の共結晶構造解析を実施した (Figure 13)。その構造解析から、ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*] インドール母核の縮環ベンゼンは期待した通り溶媒側を向いており、cIAP-1 タンパクとの立体反 発が無く、活性に影響を与えずに縮合ベンゼン環上へのさらなる置換基導入が可能であることが 示唆された。



**Figure 13.** 三環式ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール化合物 80 と cIAP-1 の共結晶構造解析 結果 (PDB ID 4MU7)

(3*S*, 10a*S*)-体 80 の MDR1 による排出低減のため、橋頭位窒素の電子密度の低下を狙い、電子吸 引性基の導入を行った (Table 2)。しかし、*p*-シアノ体 81 では MDR1 による排出は低減しなかっ た。これはシアノ基が疎水性定数 <sup>91)</sup>π=-0.57 であり、化合物全体の脂溶性が低下したためと考え た。そこで、脂溶性の電子吸引性基としてクロロ基(疎水性定数 π=+0.71)を導入したところ、8 位クロロ体 82 は良好な *P*<sub>app</sub> と ER を示すとともに、高い XIAP/cIAP-1 阻害活性(XIAP, 23 nM, cIAP-1, 1.1 nM)と強い MDA-MB-231 細胞増殖阻害活性(GI<sub>50</sub>, 2.8 nM)を有していた。ジクロロ体 83 も 良好な膜透過性を示したものの、XIAP 阻害活性および細胞増殖阻害活性がやや減弱した。以上の 結果より、我々は(3*S*, 10a*S*)-8-クロロへキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体 82 を代表化合 物として選択した。

Cmpd	Hot	XIAP BIR3 <sup>a,b</sup>	cIAP1 BIR3 <sup>a,b</sup>	MDA-MB-231 b	$P_{app}$ <sup>c</sup>	ER <sup>d</sup>
Cmpa	Hel	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	GI <sub>50</sub> (nM)	(nm/sec)	
80		19 (16-23)	1.4 (1.3-1.6)	1.8 (1.5-2.3)	25	8.2
81		18 (16-19)	1.0 (0.89-1.1)	1.9 (1.5-2.4)	14	13
82		23 (21-25)	1.1 (0.98-1.2)	2.8 (2.3-3.5)	64	1.4
83		62 (56-68)	1.4 (1.2-1.6)	5.9 (4.7-7.4)	75	0.69
36		200 (140-280)	1.3 (1.2-1.5)	1.8 (1.6-2.0)	1.0	24

**Table 2.** ヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール母核の最適化

<sup>a</sup>As determined by HTRF assay. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> values and 95% confidence intervals (CI) were calculated by nonlinear regression analysis of the percentage inhibitions. <sup>c</sup>Apparent permeability. <sup>d</sup>Efflux ratio

#### 第四節 結論

化合物 36 の課題である低い MDR1 による排出を低減した化合物の探索を行った。化合物 36 を リード化合物として、脂溶性の付与、HBA の電子密度低下が MDR1 発現細胞における膜透過性改 善に効果的と判断し、また、化合物 36 の X 線結晶構造解析の結果より、6、7 位方向に化学修飾 が可能と考え、ヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール骨格をデザインした。ヘキサヒドロピラ ジノ[1,2-a]インドール骨格は環状スルファミデートを用いて、3 位エステルと 10a 位の橋頭位炭素 の立体制御可能な合成法として確立した。デザインした三環式化合物は、狙い通り活性を保持し つつ、MDR1 発現細胞における膜透過性を改善した。化合物 82 は当初の目的である MDR1 発現 細胞における良好な膜透過性と強力な XIAP/cIAP-1 結合阻害活性 (XIAP, 23 nM, cIAP-1, 1.1 nM)、 MDA-MB-231 細胞増殖阻害活性 (GI<sub>50</sub>, 2.8 nM)を達成した。

#### 第二章 Longamide B、longamide B methyl ester、hanishin の全合成

### 第一節 背景

前章において環状スルファミデートを経たピペリジン環形成反応を開発し、立体制御したピペ ラジン環形成に有効であることを示した。本章では、環状スルファミデートを鍵中間体として用 いたピペラジン環含有天然物合成へ展開した。環状スルファミデートを用いたピペラジン含有天 然物の報告例が少ないことから、ピペラジンを含む天然物の合成を行うことは環状スルファミデ ートの汎用性を見極めるのにより効果的と考えられた。この観点から、ピロロピペラジノン骨格 を母核とする longamide B (32)、longamide B methyl ester (33)、hanishin (34)の合成を行うこと とした。これらブロモピロールアルカロイドは序論で述べたとおり興味深い生物学的特徴から、 これまでに複数のグループによって、立体選択的合成が報告されている(Scheme 12)。Patel らは L-アスパラギン酸メチルエステルよりキラルプール法を用いて合成している<sup>92)</sup>。Trost らはパラジ ウム触媒による立体選択的環化反応により合成を達成した<sup>93,94)</sup>。一方、Cheng らは窒素上に置換 基を有する 2-カルボン酸ピロール 99 を調製し、この中間体を用いて合成に成功している<sup>95)</sup>。最 近では、Adhikary らが D-リボースからの合成法を報告している<sup>96)</sup>。本研究において、私は環状ス ルファミデートを経たピペラジン環形成反応を活用し、longamide B methyl ester、 hanishin の新規合成ルート確立を行った。





Scheme 12. Longamide Bとその類縁体の過去の合成例

### 第二節 合成

まず longamide B の合成法確立を行い,同様の手法を longamide B methyl ester、hanishin に適用 することとした。Scheme 13 に longamide B の逆合成スキームを示す。ピロール上のブロモ化は骨 格形成後に行うこととし (102→32)、ピロロピリジン骨格は環状スルファミデート 104 とピロー ルエステル 103 との反応により合成することとした (104→102)。前駆体 104 は公知のアミノアル コール誘導体 105 から調製可能である。



Scheme 13. Longamide B の逆合成スキーム

まず、ヒドロキシアミン 105 に対し、塩化チオニルとピリジンを反応させ、その後、塩化ルテ ニウムと過ヨウ素酸ナトリウムにより酸化し、化合物 106 への変換を試みた (Scheme 14)。この 際、アミノアルコール 105 とピリジンのジクロロメタン溶液に塩化チオニルを滴下すると、酸化 後に二量体 107 が生成し、目的物の収率は低かった。この二量体生成を抑えるため、塩化チオニ ルとピリジンのジクロロメタン溶液にアミノアルコール 105 のジクロロメタン溶液を滴下すると、 酸化後に目的のスルファミデート 106 が 82%の高収率で得られた。



Scheme 14. スルファミデート 106 の調製 "

<sup>*a*</sup>Reagents and Conditions: (a) SOCl<sub>2</sub>, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; (b) RuCl<sub>3</sub>, NaIO<sub>4</sub>, MeCN/H<sub>2</sub>O, 0 °C to room temp, 82% (2 steps).

次に、このスルファミデート 106 とピロール 103 との反応検討を行った。結果として、塩基性、酸性と様々な条件を試みたが目的の中間体 108 は得られず、化合物 109 が主生成物であることが明らかとなった(Table 3)。これはカルボニル基のαプロトンの酸性度が比較的高いために容易にβ脱離が引き起こされることに起因すると推測した。

EtO <sub>2</sub> C	0,0 N-Boc H 06 10	CO <sub>2</sub> Me <u>conditi</u> 03	ens EtO <sub>2</sub> C 108	NHBoc EtO <sub>2</sub> C NHBoc
Entry	Condition	Solvent	temp.	Results
1	t-BuOK	DMF	r.t.	<b>108</b> (5%), <b>109</b> (24%)
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	r.t.	only 109 (detected by TLC)
3	DIPEA	DMF	r.t.	only 109 (detected by TLC)
4	DBU	DMF	r.t.	only 109 (detected by TLC)
5	$Cs_2CO_3$	DMF	r.t.	N.D. <sup>a</sup>
6	TsOH	DMF	r.t.	N.D. <sup>a</sup>
7	none	DMF	r.t.–60 °C	N.D. <sup>a</sup>
8	none	CH₃CN	r.t.–60 °C	no reaction

~~ ...

Table 3. スルファミデート 106 とピロール 103 の反応検討

<sup>a</sup>Not detected; unidentified degradation by-product was obtained.

そこで、あらかじめエステルを有さないスルファミデートを調製すれば、上記のβ脱離は進行せ ず、ピロール 103 がスルファミデートに求核攻撃すると考え、最適なスルファミデートの調製を 行うこととした (Scheme 15)。ヒドロキシアミン 105 のエステルを水素化ホウ素ナトリウムで還 元し、生成した水酸基を TBS 基で保護し、化合物 111 とした。次に、先ほどと同様の方法でスル ファミデート化を試みたが、酸化の段階で同定困難な副生成物が生成し、収率は低かった。過ヨ ウ素酸ナトリウムの酸性によるものと推測し、緩衝液としてリン酸水素二カリウム水溶液を酸化 反応の際に加えたところ、2 工程 90%の収率で目的のスルファミデート 112 が得られた。



Scheme 15. スルファミデート 112 の調製 "

<sup>*a*</sup>Reagents and Conditions: (a) NaBH<sub>4</sub>, EtOH, reflux, 87%; (b) TBSCl, imidazole, DMF, 0 °C to room temp, 93%; (c) SOCl<sub>2</sub>, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; (d) RuCl<sub>3</sub>, NaIO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MeCN/H<sub>2</sub>O, 0 °C to room temp, 90% (2 steps).

得られたスルファミデート 112 に対し、ピロール 103 の導入を DMF 中 *t*-BuOK 存在下、試みた ところ、予想通りβ脱離した副生成物は生成せず、目的の中間体 113 を中程度の収率で得ることに 成功した (Table 4)。塩基を *t*-BuOK から炭酸カリウムや DIPEA のような弱い塩基に変えると反応 は進行しなかった。溶媒の最適化検討の結果、アセトニトリルが最も良好な結果を示した。

Table 4. スルファミデート 112 とピロール 103 の反応検討

	Q.O O-S N-B	oc (N-CO <sub>2</sub> Me	conditions	CO <sub>2</sub> Me N NHBoc R
	TBSO 112	103		113 (R=CH <sub>2</sub> OTBS) 114 (R=CH <sub>2</sub> OH)
Entry	Condition	Solvent	temp.	Results
1	<i>t</i> -BuOK	DMF	r.t.	<b>113</b> (46%)
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	r.t.	N.D. <sup>a</sup>
3	DIPEA	DMF	r.t.	N.D.
4	<i>t</i> -BuOK	$CH_2CI_2$	r.t.	N.D.
5	<i>t</i> -BuOK	CH₃CN	r.t.	<b>113</b> (74%), <b>114</b> (13%)
6	<i>t</i> -BuOK	THF	r.t.	N.D.
<sup>a</sup> Not detected				

次に分子内閉環反応を検討した (Scheme 16)。最適化された条件でスルファミデート 112 とピ ロール 103 を反応させた後、4M 塩化水素-ジオキサン溶液を用ることにより中間体 113 の TBS 基、 Boc 基を除去後、トリエチルアミンによって分子内環化を進行させた。その結果、目的のピロロ ピリジン誘導体 115 を 3 工程 75%の収率で得ることに成功した。中間体 115 を NBS でブロモ化し、 化合物 116 とし、最後に TEMPO と PhI(OAc)<sub>2</sub> で水酸基を酸化する<sup>94)</sup>ことで longamide B とした。 longamide B は報告されている条件<sup>92,97)</sup>により longamide B methyl ester、hanishin へと誘導した。



Scheme 16. Longamide B の合成<sup>a</sup>

<sup>*a*</sup>Reagents and Conditions: (a) **103**, t-BuOK, MeCN, 0 <sup>o</sup>C to room temp; (b) 4M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, room temp; (c) Et<sub>3</sub>N, MeOH, 50 <sup>o</sup>C, 75% (3 steps); (d) NBS, DMF, -20 <sup>o</sup>C to room temp, 87%; (e) TEMPO, PhI(OAc)<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, room teemp, 55%.

#### 第三節 結論

ブロモピロールアルカロイド化合物である longamide B、longamide B methyl ester および hanishin の合成法として、1,2-環状スルファミデートを鍵中間体として用いる事により効率的全合成法の確 立に成功した。本ルートでは、1,2-環状スルファミデート 112 とピロールエステル 103 から 4 位に 置換基を有するピロロピペラジノン骨格を立体制御して構築する反応を鍵反応としており、この ルートにより 9 工程 26%収率で longamide B の合成が可能となった。

本合成法においては、様々なアミノアルコールから 1,2-環状スルファミデートが調整可能であ ることから、ピロロピペラジノン誘導体の4位置換基を効率的に種々変換が可能であるほか、1,2-環状スルファミデート 112 と反応させるピロールエステルを他のヘテロ環エステルにすることに より、種々のヘテロ環導入も可能であると考えられる。以上の観点から、本ルートを用いること により、種々のピペラジノン骨格を持つ化合物の多様性指向型合成へも適応可能であると考えて いる。次章において、本手法を用いた類縁体・誘導体合成への展開を示す。

### 第三章 Longamide B 誘導体の合成と IDO 阻害活性試験

### 第一節 背景

前章において、longamide B、longamide B methyl ester、hanishin の新規合成法を確立することに 成功した。これらブロモアルカロイドはそれぞれ興味深い生物活性を示すが、その発現機構は不 明な点が多い。今回、これら天然型の longamide 類と、既に知られているインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1) 阻害剤との構造比較により、両者の構造類似性を見出し、longamide B が IDO1 阻害活性を示す可能性があると推測した。そこで longamide B の IDO1 阻害活性を測定 するとともに、前章で確立した合成ルートを用いて longamide B の類縁化合物を合成し、それらの IDO1 阻害活性についても評価し、新規骨格構造を持つ阻害剤の探索を行った。

これまでに複数の IDO1 阻害剤が報告されており<sup>76-82)</sup> (Figure 14)、一部の IDO1 阻害剤と IDO1 との共結晶構造も明らかとなっている<sup>79,81,82,98)</sup>。結晶構造が報告されている IDO1 阻害剤の中で、 4-フェニルイミダゾールはフェニル基が IDO1 の奥に存在するポケット A と呼ばれる脂溶性ポケ ットを占有しており、イミダゾール窒素がヘム鉄と相互作用している<sup>98)</sup>。別の IDO1 阻害剤であ るイミダゾチアゾール誘導体 Amg-1 では、母核窒素がヘム鉄と相互作用し、トリル基がポケット A と脂溶性相互作用を形成しているほか、フェネチル基がポケット B と呼ばれる溶媒側付近の脂 溶性ポケットを埋めている<sup>79)</sup>。さらに NLG919 誘導体と IDO1 との共結晶構造から、NLG919 は 母核窒素がヘム鉄と相互作用し、縮環ベンゼンがポケット A を占有し、ヒドロキシ基が溶媒側を 向き、ヘムのプロピオン酸と水素結合を形成していることが確認されている<sup>82)</sup>。これらの情報か ら IDO1 阻害活性には、ヘム鉄との相互作用とポケット A または B との疎水性相互作用が必要と 考えられた。また、極性基は溶媒側であれば許容されることが示唆された。実際に下記に示した IDO1 阻害剤はいずれもヘム鉄と相互作用可能な酸素原子または窒素原子(赤色)を有しており、 その付近にはポケット A との脂溶性相互作用獲得のための疎水性部位(青色)を有している。



**Figure 14.** 報告されている IDO1 阻害剤の例

これら構造解析情報を longamide B に重ね合わせると、IDO1 阻害剤と longamide B にいくつか の共通点が確認された(Figure 15)。まず、longamide B も IDO1 阻害剤が有する酸素原子、窒素原 子のようにヘム鉄との相互作用が可能と考えられるカルボニル基を母核に有しており、また、そ のカルボニル基の付近に疎水性部位であるジブロモピロールを有していることから、ポケット A との疎水性相互作用獲得が可能と考えられた。



Figure 15. Longamide B と IDO1 阻害剤の共通点

これらの仮説を確認するため、longamide B と IDO1 とのドッキング・シミュレーション計算を 行うこととした(Figure 16)。その結果、longamide B は前述通りの結合様式を示し、母核のカル ボニル基はヘム鉄の近くに配し、鉄と酸素の距離は 2.58Å と相互作用が示唆された。またジブロ モピロールはポケット A を埋めており、疎水性相互作用を獲得していることが考えられた。さら に longamide B の 4 位カルボン酸は IDO1 の溶媒側方向へ向き、タンパクとの反発は生じないと推 測された。この結果より、longamide B に IDO1 阻害活性がある可能性が期待されたので、実際に longamide B およびその誘導体の IDO1 阻害活性を測定することとした。加えて、このドッキング モデルを参考に、longamide B に対して IDO1 阻害活性が向上する構造変換を実施し、活性向上と 構造活性相関取得も同時に試みることとした。



**Figure 16.** 4-フェニルイミダゾール(橙色)、longamide B(水色)と IDO1 とのドッキングモデル ポケット A を構成するアミノ酸、Tyr126、Val130、Phe164、Leu234(緑色)、ポケット A の脂溶 性領域(薄緑)、ヘム鉄(黄色)、溶媒側のアミノ酸 Arg231(水色)

#### 第二節 longamide B を基盤とした IDO1 阻害剤デザイン

Longamide B と IDO1 のドッキング・シミュレーション結果より、longamide B のカルボニル基 はヘム鉄と相互作用し、ジブロモピロール部位はポケットAと疎水性相互作用し、4位カルボン 酸は溶媒側へ向いていることが推測された。この情報をもとに longamide B の構造を基盤とし、さ らに IDO1 阻害活性向上を指向した化合物デザインを行うこととした(Figure 17)。ドッキングモ デルより、longamide B のカルボン酸はポケットの入り口に面しており、その周辺には大きなスペ ースが空いていることが確認された。そこでカルボニル基付近にフェニル基のような大きな置換 基を導入すれば、そのスペースを埋め、疎水性相互作用により IDO1 阻害活性が向上すると考え た。一方、ポケットの入り口付近には Arg231 やヘムのプロピオン酸が存在しており、それぞれ水 素結合形成が可能と考えられた。そこで、longamide B のカルボン酸からリンカーを介して極性基 を導入することで、IDO1の Arg231 等との残基と水素結合を形成し、結合能が高まると推測した。 さらに、鉄と硫黄は相互作用することが知られていることから<sup>99,100)</sup>、longamide B の母核カルボ ニル基の酸素を硫黄に変換することによる活性向上を目指した化合物についても合成することと した。ドッキングモデルからの化合物デザインに加えて、前章で確立した longamide B の合成ルー トを用いることにより、ピロール環部分と4位置換基の変換が効率的に行えることから、構造活 性相関取得のため、longamide Bのジブロモピロール部位および4位置換基の変換も計画すること とした。



Figure 17. Longamide B 誘導体の構造設計

# 第三節 合成

ピロール部分の変換としてイミダゾール、インドール誘導体(119-121)を合成した(Scheme 17)。 メチルインドール-2-カルボキシレート(117)と前章で示した環状スルファミデート中間体 112 を *t*-BuOK 存在下、反応させた後、TBS 基と Boc 基を塩化水素-ジオキサン溶液で除去し、続けてト リエチルアミンによって分子内環化反応させることにより、ピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体 119 を80%の収率で合成した。化合物 119 の一部は TEMPO とジアセトキショードベンゼンで酸化し、 カルボン酸 120 を生成した。一方、イミダゾ[1,2-*a*]ピペラジン誘導体 121 もエチル イミダゾール -2-カルボキシレート 118 から同様の手法での合成を試みたが、ピロール、インドールに比べて収 率は低い結果となった。これは、イミダゾール窒素の求核性がピロール、インドールよりも低く、 環状スルファミデート 112 への求核反応が進行しにくいためと推測している。





<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) KO*t*Bu, CH<sub>3</sub>CN, 0 <sup>o</sup>C to room temperature; (b) 4M HCl in dioxane, metheanol, room temperature; (c) Et<sub>3</sub>N, methanol, 50 <sup>o</sup>C; (d) TEMPO, PhI(OAc)<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, room temperature, 57%.

4-メチル誘導体 123、124 および 4-ヒドロキシメチル誘導体 127 の合成を Scheme 18 に示す。既知 の環状スルファミデート 122<sup>39)</sup>から常法を用いてピロロピペラジノン誘導体 123 を 3 工程 51%収 率で合成した。得られた 123 の一部は NBS によりブロモ化し、124 を得た。一方、ヒドロキシメ チル誘導体 127 に関しては、既知のヒドロキシルアミン誘導体 125<sup>101)</sup>を 2 工程で環状スルファミ デート 126 に変換した。続いて、123 合成と同様の手法を用いて、126 から目的物 127 を 3 工程、 収率 31% で合成した。





<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) methyl pyrrole-2-carboxylate, KO*t*Bu, CH<sub>3</sub>CN, 0 °C to room temperature; (b) 4M HCl in dioxane, metheanol, room temperature; (c) Et<sub>3</sub>N, methanol, 50 °C, 51% (**123**, 3 steps), 31% (**127**, 3 steps); (d) NBS, DMF, -20 °C to room temperature, 79%; (e) SOCl<sub>2</sub>, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; (f) RuCl<sub>3</sub>, NaIO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 0 °C, 64% (2 steps).
アミド誘導体(129a-c、130)の合成法を以下に示す(Scheme 19)。導入するアミンとしては、 Arg231との水素結合を期待して末端にヒドロキシル基、アミノ基を配置できるヒドロキシエチル アミン、エチレンジアミン誘導体を選択した。またカルボン酸周辺のスペースを埋めることを目 的として、アニリンを縮合することとした。Longamide Bを各種アミン128a-cとEDC、HOBtを 用いて縮合し、129a-cを得た。129a-cに比べ129aは生成物の極性が高く、後処理、精製が他に比 べて困難であったため収率が低い結果となった。129bの一部は塩化水素-ジオキサン溶液により Boc 基を除去し、130とした。



**Scheme 19.** アミド誘導体の合成<sup>*a*</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) EDC, HOBt, Et<sub>3</sub>N, DMF, room temperature, 32% (**129a**), 61% (**129b**), 80% (**129c**); (b) 4M HCl in dioxane, methanol, room temperature, 76%.

Scheme 20 にチオカルボニル誘導体(131、132、133)の合成を示す。Longamide B methyl ester に対し、ローソン試薬を反応させ、母核のカルボニル酸素を硫黄に変換した(化合物 131)。次に 化合物 131 に対し、水酸化ナトリウムでエステルを加水分解し、化合物 132 へと導いた。最後に カルボン酸 132 とアニリンを EDC、HOBt で縮合し、化合物 133 を 75%の収率で得た。



Scheme 20. 1-チオキソピロロ[1,2-a]ピペラジン誘導体の合成<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) Lawesson's reagent, THF, room temperature, 69%; (b) 2M aqueous NaOH, THF, methanol, room temperature, quant; (c) aniline, EDC, HOBt, Et<sub>3</sub>N, DMF, room temperature, 75%.

## 第四節 生物活性(IDO1 阻害活性)の解析

合成した longamide B 誘導体について IDO1 酵素阻害活性(1mM での IDO1 阻害率)を測定した 結果を以下に示す(Table 5)。代表的な IDO1 阻害剤である 1-メチル-L-トリプトファン<sup>76)</sup>をコン トロールとして同時に測定した。測定法としては、IDO1 の基質である L-トリプトファンと IDO1 が共存した系中に各化合物を添加し、キヌレニンの産生を吸光により測定することによって阻害 率を算出している<sup>102)</sup>。ジブロモピロロピペラジノン誘導体において、longamide B (32)、longamide B methyl ester (33)、hanishin (34) は、弱い活性ではあるものの明確な IDO1 阻害活性を示した。 遊離のカルボン酸を持つ longamide B は対応するエステルを持つ longamide B methyl ester、hanishin に比べ、阻害活性が高いことが明らかとなった(Table 5)。カルボン酸よりも小さい置換基である 4-ヒドロキシエチル体(116) および 4-メチル体(124) に関しては、ほとんど活性を示さなかっ た。4 位アミド誘導体に関しては、Arg231 との相互作用を狙った 129a、130 は期待する活性向上 は見られなかった。しかし、カルボン酸周辺のスペースを埋め、疎水性相互作用獲得を図ったフ ェニルアミド体 129c はリード化合物である longamide B よりも高い活性を示した。この結果より、 アミド窒素上の置換基としてフェニル基のような脂溶性基を持つ誘導体構造が比較的高い阻害活 性を示すことが明らかとなった。

**Table 5.** Longamide B 誘導体の IDO1 阻害活性 I IDO1 阻害活性を持つ 1-メチル-L-トリプトファン (1-Me-L-Trp)を positive control として用いた。

Compd	Scaffold	R	Enzymatic assay % inhibition at 1mM (hIDO1)
32		CO <sub>2</sub> H	34.8%
33		CO <sub>2</sub> Me	22.1%
34		CO <sub>2</sub> Et	20.9%
116		CH <sub>2</sub> OH	8.2%
124	Q	Н	6.2%
129a	Br	М О	30.1%
129b	Bŕ ≞ R		24.0%
130			-4.2%
129c		H N <sub>Ph</sub> O	58.3%
1-Me-L-Trp	CO <sub>2</sub> H N NH <sub>2</sub> Mé		70.8%

次に母核変換体の構造活性相関について Table 6 に示す。ジブロモ基を持たないピロロピペラジ ノン誘導体 115、127、123 はいずれもほとんど活性を示さないことが明らかとなった。この結果 より、ジブロモ基は脂溶性ポケットであるポケット A との疎水性相互作用を獲得し、IDO1 とリ ガンドとの結合力を高めるのに寄与していることが示唆された。イミダゾール誘導体も低い活性 を示しており、これもジブロモ基を有さないことが関係していると考えられる。ピペラジノイン ドール誘導体では、カルボン酸体 120 が longamide B と同等の IDO1 阻害活性を示し、ヒドロキシ エチル体は活性が減弱する結果となった。特に着目すべき結果としては、チオアミド体 132 で大 幅に活性が向上し、代表的な IDO1 阻害剤である 1-メチル-L-トリプトファンに匹敵する活性を示 した。カルボン酸をメチルエステルに変換した 131 では活性が低下している。これまでの結果よ り、どの母核においても、4 位カルボン酸体が、それぞれ対応するヒドロキシメチル体やエステ ル体に比較して高い IDO1 阻害活性を示すことから、カルボン酸は IDO1 と相互作用しており活性 向上に寄与していることが示唆された。4-フェニルイミダゾールと IDO1 との結晶解析構造 (PDB code: 2DOT)を基に計算した longamide B と IDO1 のドッキングモデル (Figure 16) では、longamide B の 4 位側鎖末端のカルボン酸と Arg231 は離れているが、Arg231 の側鎖は可動範囲が広い可能 性があり、longamide B のカルボン酸と Arg231 のグアニジニル基は静電相互作用を形成している 可能性が考えられ、どの骨格構造の誘導体においてもカルボン酸体が対応する他の置換基に比べ て高い活性を示したと推察している。最後に、更なる活性向上を目指して、ジブロモピロロピペ ラジノン母核で最も高い活性を示したフェニルアミド体 (129c) とチオキソピロロ[1,2-a]ピペラ ジン誘導体 (132) を組み合わせた化合物 133 をデザインし合成した。しかし結果として、化合物 133 は化合物 129c、132 以上の活性を示すことはなかった。これは母核がピロロ[1,2-a]ピペラジノ ンとチオキソピロロ[1,2-a]ピペラジンで、4 位置換基のコンフォメーションが異なるためと推測し ている。

Compd	Scaffold	R	Enzymatic assay % inhibition at 1mM (hIDO1)
115	O H	CH <sub>2</sub> OH	7.2%
127	NH N	OH	5.8%
123	<sup>E</sup> R	Н	-8.4%
121	NH NN R	CH₂OH	13.9%
120		CO₂H	30.1%
119	R	CH <sub>2</sub> OH	21.9%
132	S	CO <sub>2</sub> H	66.5%
131		CO <sub>2</sub> Me	10.8%
133	ĸ	H N.Ph O	43.5%
1-Me-L-Trp	$ \begin{array}{c} & & CO_2H \\ & & & NH_2 \\ Me \end{array} $		70.8%

Table 6. Longamide B 誘導体の IDO1 阻害活性 II

次に、特に強い活性を示した化合物 132 の IDO1 阻害活性向上の理由を考察するために、IDO1 とのドッキング・シミュレーション解析を実施することとした(Figure18)。4-フェニルイミダゾ ールの結晶構造を基に Glide/Prime により longamide B の結合モードを予測した。得られた longamide B のドッキングモデルに対し、母核カルボニル酸素原子を硫黄原子に変換し、再度、最 適化を実行することにより、化合物 132 のドッキングモデルを得た。チオアミド体 132 の IDO1 とのドッキング・シミュレーション結果から、比較的安定な配置をとっているチオアミド体 132 は、longamide B 同様、ジブロモピロール部位が IDO1 のポケット A を埋め、カルボン酸が溶媒側 方向を向いていることが示唆された。また、チオカルボニル基はへム鉄を向いており、相互作用 していると考えられたが、longamide B に比べると硫黄と鉄の距離は長いことが確認された。これ は硫黄の原始半径が酸素よりも大きいことに起因すると考えられた。硫黄と鉄の距離が長くなっ たことにより、化合物 132 は longamide B に比べ、ポケット A の奥側に移動していることも確認 され、その結果、Ala264 の主鎖アミド NH と硫黄との距離が近くなり水素結合を形成しているこ とが明らかとなった。また、化合物全体がポケット A の奥側へ移動したことにより、ブロモ基と Gly262 との相互作用も見られた。したがって、硫黄とへム鉄との相互作用に加えて、Ala264 との 水素結合、Gly262 との相互作用により、化合物 132 の IDO1 結合能が高まったと推測した。



Figure 18. Longamide B(左)、化合物 132(右)と IDO1 とのドッキングモデルの比較

今回、longamide B よりも高い活性を示した化合物 132 と 129c については、longamide B との Glide score <sup>106</sup>の比較も行った(Table 7)。その結果、化合物 132、化合物 129c ともに longamide B よりも低い、Docking score、Glide score を示し、活性結果を反映させる結果となった。しかし、最 も活性が高い化合物 132 よりも化合物 129c のほうが Docking score、Glide score ともに低い値を示 した理由に関しては不明である。

Table 7. Longamide B 誘導体のドッキングスコア

	Docking score	Glide gscore
Longamide B	-4.525	-4.525
Compound 132	-5.556	-5.556
Compound 129c	-5.843	-5.843

## 第五節 結論

ブロモピロールアルカロイドである longamide B と IDO1 阻害剤との構造比較から、双方ともに ヘム鉄と相互作用可能なヘテロ元素を有し、IDO1 の脂溶性ポケットを占有する脂溶性部位を保持 することなど共通点があることから、longamide 類にも IDO1 阻害活性があることを推測した、 longamide B と IDO1 のドッキング計算を実施したところ、longamide B が IDO1 に結合することが 示唆される計算結果が得られた。これらの情報より、longamide B が IDO1 に結合することが 示唆される計算結果が得られた。これらの情報より、longamide B とその周辺化合物が IDO1 阻害 活性を有している可能性が考えられたため、実際に合成し、その IDO1 阻害活性評価を行った。 Longamide B および longamide B methyl ester、hanishin の活性は弱かったものの、明確な阻害活性 を示した。一方、本研究で構造設計したフェニルアミド誘導体 129c とチオカルボニル誘導体 132 については、longamide B より高い IDO1 阻害活性を示した。特に化合物 132 の活性は代表的な IDO1 阻害剤である 1-メチル-L-トリプトファンに匹敵する活性を示した。化合物 132 と IDO1 のドッキ ングモデルから、化合物 132 はチオカルボニル基がへム鉄と Ala264 のアミドプロトンと相互作用 し、ブロモ基の 1 つが Gly262 のアミドプロトンと相互作用することにより活性が向上したと考え られた。本結果により、longamide B のピロロピペラジノン骨格について、創薬における新しい用 途の可能性を示した。 総括

私は 1,2-環状スルファミデートを用い、複数のピペラジン誘導体の新規合成法を確立し、それ ら誘導体の生物活性物質への展開を行った。創薬研究では IAP 拮抗薬の合成研究、天然物では 1 ongamideB、longamide B methyl ester、hanishin の合成研究を行った。

第一章での IAP 拮抗薬研究においては、アポトーシス阻害(IAP) 因子の一つである XIAP とそ の内因性リガンドである Smac のテトラペプチド AVPI との共結晶構造解析を活用した SBDD によ り三環式骨格を有する新規 IAP 拮抗薬を見出した。我々のグループにより以前見出されたオクタ ヒドロピロロ[1,2-a] ピラジン誘導体 36 は高い IAP 阻害活性を示しつつ、良好な PK プロファイル を有し、乳癌担癌マウスモデルにおいて、顕著な抗腫瘍効果を示した。しかし、MDR1 により排 出されやすいという課題があったため、改善を指向した構造変換を行った。MDR1 による排出を 抑制する方法の一つとして、HBA の効果を減弱させる手段が知られていた。そこで、化合物 **36** の HBA となり得る母核窒素の塩基性低下を図り、母核 6、7 位を起点にベンゼン環を縮環させた 三環式ヘキサヒドロピラジノ[1,2-a]インドール誘導体 67a を合成した。構造設計の意図どおり、 誘導体 67a は高い MDR1 発現細胞における薬剤排出が大幅に低減し、かつ高い XIAP/cIAP-1 結合 阻害活性を維持した。さらの母核の最適化を行った結果、MDR1 による薬剤排出が低く、高い XIAP/cIAP-1 結合阻害活性、強力な MDA-MB-231 細胞増殖抑制を示す化合物 82 を見出した。本 研究で見出された代表化合物は高い乳癌細胞 MDA-MB-231 の細胞増殖を抑制したことから、IAP を抑制することで癌にアポトーシスを誘導するという新しい作用機序による抗癌薬の可能性が示 唆された。また、IAP と caspase との相互作用のようなタンパク質間相互作用 (protein-protein interaction; PPI)を低分子で阻害することは、酵素や受容体の機能阻害とは異なり一般的に難し いとされている。今回、内因性リガンドである Smac の AVPI が強く IAP に結合するという知見を もとに SBDD を活用し、高い IAP 結合阻害を示す分子量 600 程度の化合物を見出せた。本研究を 通して今後の創薬研究における有益な知見が得られたと考える。

二章では、1,2-環状スルファミデートによるピペラジン環構築反応を応用し、longamideB (32)、 longamide B methyl ester (33)、hanishin (34)の全合成を行った。既知のアミノアルコール 105よ り誘導したエステルを持つ環状スルファミデート 106を用いて、ピロロピペラジノン骨格構築を まず試みたが、エステルのα位の酸性度が高く、β脱離が優先し、目的物は得られなかった。そ こで、エステルを含まない環状スルファミデート 112を用いたところ、反応はスムーズに進行し、 目的のピロロピペラジノン骨格形成に成功した。その後、種々官能基変換を行い、目的のブロモ ピロールアルカロドの合成に至った。本合成ルートにより、短工程で longamide B 類が合成できる だけでなく、ピロロピペラジノンのピロール部位や4位置換基の変換が効率的に行えることから 多様性指向合成への適応が可能と考えられる。

第三章では、合成した longamide B と公知の IDO1 阻害剤との構造比較、longamide B と IDO1 とのドッキングモデルの結果から、longamide B が IDO1 阻害活性を示すと推測し、longamide B 周 辺化合物の合成と評価を実施した。評価の結果、longamide B は IDO1 に対する阻害活性を示した。 一方、longamide B の 4 位カルボン酸にアニリンを縮合した 129c と母核のカルボニル基をチオカ ルボニルに変換した 132 は longamide B と比較して IDO1 阻害活性が向上した。特にチオアミド体 132 の活性向上した理由について、ドッキング計算で検証したところ、チオアミド体 132 は longamide B に比べ、ヘム鉄との相互作用距離が離れていることが明らかになり、それに伴い、化 合物 132 の硫黄原子と Ala264 との距離、ブロモ基と Gly262 との距離が近づいていることが確認 された。この結果、化合物 132 のみ硫黄と Ala264 との相互作用、ブロモ基と Gly262 との相互作 用が形成され、結合能が高まったと推察された。本研究により、longamide B のピロロピペラジノ ン骨格の用途における新しい可能性を示すことができたと考える。

以上、本研究を通して立体制御された置換基を含む複雑なピペラジン環骨格形成反応を複数見 出し、これらの反応を用い、創薬リード化合物あるいは天然物の新規合成法確立に成功した。本 研究で得られたピペラジン環含有化合物は、それぞれ、IAP 阻害活性、IDO1 阻害活性を示し、と もに抗腫瘍効果に関与する新規化合物を誘導体として得た。以上の結果から、複雑なピペラジン 環形成は様々な生物活性を示すリード化合物創出において高い可能性を有していることが示唆さ れた。コスト面での利点も多い低分子化合物による創薬において、特許取得の観点からも、より 複雑で新規性の高い骨格の有用性は高く、本研究におけるピペラジン環を含有する複雑な骨格形 成を達成したことは、創薬化学においても大きな意義を持つ成果であると考えている。

#### 実験項

<sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra was measured on a Bruker DPX-300 or a Bruker AV-600 spectrometer; chemical shifts are given in ppm with tetramethylsilane as an internal standard, and coupling constants (*J*) are measured in hertz (Hz). High-resolution mass spectrometry analyses were carried out by Takeda Analytical Research Laboratories, Ltd. Reaction progress was determined by thin layer chromatography (TLC) analysis on silica gel 60  $F_{254}$  plate (Merck Ltd) or NH TLC plates (Fuji Silysia chemical Ltd). Chromatographic purification was carried on silica gel columns 60 (0.063–0.200 mm or 0.040–0.063 mm, Merck Ltd), basic silica gel (Chromatorex NH, 100-200 mesh, Fuji silysia chemical Ltd) or Purif-Pack (SI 60  $\mu$ M or NH 60  $\mu$ M, Fuji Silysia chemical Ltd). Commercial reagents and solvents were used without additional purification.

### (2R)-2,3-Dihydro-1H-indole-2-ylmethanol (53A)

Borane dimethylsulfide (5.81 mL, 61.3 mmol) was added dropwise to a solution of (2*R*)-2,3-dihydro-1*H*-indole-2-carboxylic acid (**51A**, 5.00 g, 30.6 mmol) in THF (60 mL) at 0 °C, and the reaction mixture was refluxed at 70°C for 4 h. MeOH (25 mL) and conc. HCl (8.0 mL) were added successively to the mixture at 0 °C, and the mixture was refluxed at 70°C for 1 h. After the mixture was concentrated under reduced pressure, the concentrate was basified with 8M NaOH, and the mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **53A** (4.27 g, 93%) as pale yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.70–2.12 (1H, m), 2.72–2.93 (1H, m), 3.02-3.23 (1H, m), 3.46–3.64 (1H, m), 3.66–3.83 (1H, m), 3.86–4.28 (2H, m), 6.54–6.81 (2H, m), 6.90–7.20 (2H, m); MS (ESI): *m/z* 150.1 (M+H)<sup>+</sup>.

### (2S)-2,3-Dihydro-1*H*-indole-2-ylmethanol (53B)

To a solution of (2*S*)-2,3-dihydro-1*H*-indole-2-carboxylic acid (**51B**, 19.5 g, 119.5 mmol) in THF (150 mL) was added dropwise 10M borane dimethylsulfide in THF (35.9 mL, 358.5 mmol) at 0 °C, and the reaction mixture was stirred at 60 °C for 16 h. To the mixture were added MeOH (50 mL) and 6M HCl (50 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred at 50°C for 1 h. After the mixture was concentrated under reduced pressure, the residue was basified with 8M NaOH, and the mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **53B** (12.8 g, 72%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2.62 (1H, dd, *J* = 15.9, 6.8 Hz), 2.96 (1H, dd, *J* = 15.9, 9.3 Hz), 3.19-3.52 (2H, m), 3.65-3.89 (1H, m), 4.71 (1H, t, *J* = 5.4 Hz), 5.50 (1H, s), 6.36-6.57 (2H, m), 6.87 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 6.96 (1H, d, *J* = 7.2 Hz); MS (ESI): *m/z* 150.1 (M+H)<sup>+</sup>.

### (2*R*)-2-({[*tert*-Butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)-2,3-dihydro-1*H*-indole (49A)

*tert*-Butyl(chloro)dimethylsilane (4.56 g, 30.2 mmol) was added to a solution of **53A** (4.10 g, 27.5 mmol) in pyridine (30 mL) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 18 h, the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–20% EtOAc in *n*-hexane) to give **49A** (7.01 g, quant.) as pale yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.02–0.10 (6H, m), 0.84–0.97 (9H, m), 2.55–2.71 (1H, m), 2.95–3.19 (1H, m), 3.46–3.68 (2H, m), 3.82–4.02 (1H, m), 4.08–4.34 (1H, m), 6.51–6.76 (2H, m), 6.88–7.15 (2H, m); MS (ESI): *m/z* 264.2 (M+H)<sup>+</sup>.

### (2S)-2-({[tert-Butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)-2,3-dihydro-1H-indole (49B)

*tert*-Butyl(chloro)dimethylsilane (14.22 g, 94.4 mmol) was added to a mixture of **53B** (12.8 g, 85.8 mmol) and imidazole (6.42 g, 94.4 mmol) in DMF (100 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–15% EtOAc in *n*-hexane) to give **49B** (20.6 g, 91%) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.05 (6H, d, *J* = 3.2 Hz), 0.87 (9H, s), 2.64 (1H, dd, *J* = 15.9, 6.8 Hz), 2.98 (1H, dd, *J* = 15.9, 9.1 Hz), 3.38–3.65 (2H, m), 3.71–3.90 (1H, m), 5.48 (1H, d, *J* = 1.3 Hz), 6.41–6.57 (2H, m), 6.81–6.92 (1H, m), 6.97 (1H, d, *J* = 7.2 Hz); MS (ESI): *m/z* 264.2 (M+H)<sup>+</sup>.

### Methyl *N*-benzyl-3-[(2*R*)-2-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1*H*-indole-1-yl]-L-alaninate (54A)

A mixture of **49A** (2.00 g, 7.59 mmol) and methyl (4*S*)-3-benzyl-1,2,3-oxathiazolidine -4-carboxylate (**50**, 2.27 g, 8.35 mmol) in DMF (20 mL) was stirred at room temperature for 7 h. After being stirred at 40 °C for 16 h, 6M HCl (4.0 mL) was added dropwise to the mixture at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was neutralized with satd NaHCO<sub>3</sub>, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **54A** (1.0 g, 46%) as pale yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2.55–2.72 (2H, m), 2.94–3.10 (1H, m), 3.34–3.65 (9H, m), 3.68–3.89 (2H, m), 4.79 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 6.30 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 6.51 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 6.84–7.01 (2H, m), 7.09–7.41 (5H, m); MS (ESI): *m*/z 341.2 (M+H)<sup>+</sup>.

## Methyl N-benzyl-3-[(2S)-2-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1H-indole-1-yl]-L-alaninate (54B)

A mixture of **49B** (28.2 g, 107 mmol) and methyl (4*S*)-3-benzyl-1,2,3-oxathiazolidine-4-carboxylate (**50**, 34.8 g, 128 mmol) in *N*,*N*-dimethylacetoamide (280 mL) was stirred at room temperature for 18 h. 6M HCl (53.5 mL) was added dropwise to the mixture at 0  $^{\circ}$ C, and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was neutralized with 1M NaOH and extracted with EtOAc. The

organic layer was washed with water, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (5–50% EtOAc in *n*-hexane) and silica gel column chromatography (5–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **54B** (14.9 g, 41%) as pale yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 2.66–2.87 (2H, m), 2.89–3.06 (1H, m), 3.23–3.35 (1H, m), 3.35–3.67 (9H, m), 3.70–3.83 (1H, m), 4.80–4.98 (1H, m), 6.33 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 6.51 (1H, t, *J* = 7.1 Hz), 6.83–7.02 (2H, m), 7.13–7.39 (5H, m); MS (ESI): m/z 341.3 (M+H)<sup>+</sup>.

## Methyl (3S,10aR)-2-benzyl-1,2,3,4,10,10a-hexahydropyrazino[1,2-a]indole-3-carboxylate (47A)

A mixture of **54A** (1.0 g, 2.94 mmol), iodine (1.86 g, 7.34 mmol), triphenylphosphine (1.93 g, 7.34 mmol), triethylamine (1.43 mL, 10.3 mmol) in toluene/MeCN (1:1, 40 mL) was stirred at 80 °C for 16 h. The mixture was diluted with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–100% EtOAc in *n*-hexane) and NH silica gel column chromatography (0-10% EtOAc in *n*-hexane) to give **47A** (710 mg, 58%) as pale yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  2.57 (1H, dd, *J* = 15.0, 9.5 Hz), 2.68–3.04 (2H, m), 3.04–3.37 (2H, m), 3.38–3.62 (2H, m), 3.66 (3H, s), 3.84–4.15 (3H, m), 6.43 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.65 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.94–7.13 (2H, m), 7.19–7.58 (5H, m); MS (ESI): *m/z* 323.2 (M+H)<sup>+</sup>.

## Methyl (3S,10aS)-2-benzyl-1,2,3,4,10,10a-hexahydropyrazino[1,2-a]indole-3-carboxylate (47B)

Compound **47B** was prepared by the similar method to that described for **47A** using **54B** (14.9 g, 43.6 mmol), iodine (16.6 g, 65.4 mmol), triphenylphosphine (17.2 g, 65.4 mmol) and triethylamine (15.2 mL, 109 mmol). Pale yellow oil (12.2 g, 86%); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.88-2.03 (1H, m), 2.42 (1H, dd, J = 15.5, 5.3 Hz), 2.56 (1H, dd, J = 11.4, 3.5 Hz), 2.90 (1H, dd, J = 15.5, 8.1 Hz), 3.00–3.19 (3H, m), 3.47–3.61 (1H, m), 3.64–3.75 (4H, m), 3.77–3.93 (1H, m), 6.48–6.65 (2H, m), 6.91–7.07 (2H, m), 7.18–7.40 (5H, m); MS (ESI): m/z 323.3 (M+H)<sup>+</sup>.

# 2-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,10a*R*)-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2,3(1*H*)dicarboxylate (55A)

A mixture of **47A** (272 mg, 0.84 mmol), 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (157 mg) and 10% HCl in MeOH (10 mL) was stirred at 50 °C for 3 h under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered through a membrane filter, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. To the residue were added 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (157 mg) and 10% HCl in MeOH (10 mL), and the mixture was stirred at 50 °C for 4 h under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered through a membrane filter, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue and di*-tert*-butyl dicarbonate (184 mg, 0.84 mmol) were mixed in satd NaHCO<sub>3</sub>/THF (1:1, 5.0 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. The mixture was partitioned between EtOAc and water, and the organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (2–40% EtOAc in *n*-hexane) to give **55A** (269 mg,

96%) as yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.04–1.61 (9H, m), 2.38–2.64 (1H, m), 2.78–3.29 (4H, m), 3.53–3.74 (3H, m), 3.86–4.25 (2H, m), 4.61–4.88 (1H, m), 6.40–6.69 (2H, m), 6.92–7.37 (2H, m); MS (ESI): m/z 333.2 (M+H)<sup>+</sup>.

## 2-*tert*-Butyl 3-Methyl (3*S*,10a*S*)-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2,3(1*H*)dicarboxylate (55B)

A mixture of **47B** (9.00 g, 27.9 mmol), 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (3.92 g) and 10% HCl in MeOH (90 mL) was stirred at 50 °C for 1 h under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered through a membrane filter, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. To the residue were added 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (3.92 g) and 10% HCl in MeOH (90 mL), and the mixture was stirred at 50 °C for 2 h under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered through a membrane filter, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with satd NaHCO3 and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (3-30% EtOAc in *n*-hexane). To the residue were added 20%  $Pd(OH)_2/C$  (3.92 g) and 10% HCl in MeOH (90 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 2 h under hydrogen pressure (3atom). The mixture was filtered through a membrane filter, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue and di-tert-butyl dicarbonate (6.09 g, 27.9 mmol) were mixed in satd NaHCO<sub>3</sub>/THF (1:1, 180 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Additional di-tert-butyl dicarbonate (0.61 g, 2.79 mmol) was added to the mixture, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was partitioned between EtOAc and water, and the organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–40% EtOAc in *n*-hexane) to give 55B (4.37 g, 72%) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.22–1.43 (9H, m), 2.76 (1H, dd, J = 16.4, 5.1 Hz), 3.08–3.30 (2H, m), 3.49–3.77 (6H, m), 3.99–4.07 (1H, m), 4.41 (1H, t, *J* = 5.9 Hz), 6.55–6.75 (2H, m), 6.91–7.13 (2H, m); MS (ESI): *m/z* 333.3 (M+H)<sup>+</sup>.

# 2-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,10a*S*)-8-bromo-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2,3(1*H*)dicarboxylate (56)

A solution of *N*-bromosuccinimide (562 mg, 3.16 mmol) in DMF (5.0 ml) was added to a solution of **55B** (1.05 g, 3.16 mmol) in DMF (10 mL) at 0 °C, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 65 h. The mixture was diluted with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **56** (1.22 g, 94%) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.21–1.44 (9H, m), 2.65–2.86 (1H, m), 3.09–3.30 (2H, m), 3.49–3.74 (5H, m), 3.98–4.12 (2H, m), 4.42 (1H, t, *J* = 5.9 Hz), 6.62 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.10–7.25 (2H, m); MS (ESI): *m/z* 411.1 (M+H)<sup>+</sup>.

# 2-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,10a*S*)-8-cyano-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2,3(1*H*)dicarboxylate (57)

A mixture of 56 (1.20 g, 2.92 mmol), cupper cyanide (I) (784 mg, 8.75 mmol) and cupper iodide (1.67 g, 8.75 mmol) in DMF (10 mL) was stirred at 180 °C for 1 h under microwave irradiation. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. To the residue were added satd NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) and di-tert-butyl dicarbonate (955 mg, 4.38 mmol) in THF (10 mL) successively, and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. Additional di-tert-butyl dicarbonate (480 mg, 2.20 mmol) was added to the mixture, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Additional di-tert-butyl dicarbonate (480 mg, 2.20 mmol) was added to the mixture, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Further additional di-*tert*-butyl dicarbonate (480 mg, 2.20 mmol) was added to the mixture, and the reaction mixture was stirred at room temperature for additional 17 h. The mixture was diluted with EtOAc and water, filtered through Celite® and partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5–50% EtOAc in *n*-hexane) to give 57 (305 mg, 29%) as pale yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.33 (9H, s), 2.80 (1H, dd, J = 17.0, 5.1 Hz), 3.12–3.30 (2H, m), 3.54–3.84 (6H, m), 4.07–4.22 (1H, m), 4.47 (1H, t, J = 6.0 Hz), 6.75 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.32–7.43 (1H, m), 7.47 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz); MS (ESI): m/z 358.2 (M+H)<sup>+</sup>.

# 2-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,10a*S*)-8-chloro-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2,3(1*H*)dicarboxylate (58)

# 2-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,10a*S*)-6-chloro-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2,3(1*H*)dicarboxylate (59)

*N*-Chlorosuccinimide (771 mg, 5.78 mmol) was added to a solution of **55B** (1.92 g, 5.78 mmol) in DMF (40 mL) at 0 °C, and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 16 h. The mixture was diluted with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (1-15% EtOAc in *n*-hexane) to give **58** (800 mg, 33%) as pale yellow oil and **59** (500 mg, 28%) as pale yellow oil.

Compound **58**; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.22–1.44 (9H, m), 2.77 (1H, dd, J = 16.9, 4.6 Hz), 3.08–3.29 (2H, m), 3.47–3.76 (6H, m), 3.96–4.15 (1H, m), 4.34–4.50 (1H, m), 6.56–6.76 (1H, m), 6.97–7.14 (2H, m); MS (ESI): m/z 367.2 (M+H)<sup>+</sup>.

Compound **59**; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.21–1.57 (9H, m), 2.77–2.97 (1H, m), 3.07–3.26 (1H, m), 3.38–3.54 (1H, m), 3.62–3.80 (4H, m), 3.82–4.07 (2H, m), 4.17 (1H, brs.), 4.36 (1H, t, J = 5.7 Hz), 6.59–6.84 (1H, m), 6.95–7.23 (2H, m); MS (ESI): m/z 367.1 (M+H)<sup>+</sup>.

# 2-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,10a*S*)-6,8-dichloro-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2,3(1*H*)-dicarboxylate (60)

*N*-Chlorosuccinimide (178 mg, 1.33 mmol) was added to a solution of **59** (489 mg, 1.33 mmol) in DMF (20 mL), and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 2 h. The mixture was diluted with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (3–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **60** (484 mg, 60%) as pale yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.33 (9H, brs), 2.78–2.95 (1H, m), 3.10–3.26 (1H, m), 3.39–3.54 (1H, m), 3.63–3.80 (4H, m), 3.85–3.98 (2H, m), 4.19 (1H, brs.), 4.38 (1H, t, *J* = 5.7 Hz), 7.16 (2H, dd, *J* = 13.7, 1.8 Hz); MS (ESI): *m/z* 401.1 (M+H)<sup>+</sup>.

## *tert*-Butyl (3*S*,10a*R*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10atetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-carboxylate (61)

A mixture of **55A** (256 mg, 0.77 mmol) and lithium hydroxide monohydrate (97 mg, 2.31 mmol) in THF/water (5:1, 6.0 mL) was stirred at 50 °C for 20 h. The mixture was neutralized with 1M HCl, concentrated under reduced pressure, and the concentrate was coevaporated with toluene *in vacuo*. To the mixture of the residue, (4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-amine hydrochloride (172 mg, 0.92 mmol) and HOBt (156 mg, 1.16 mmol) in DMF (3.0 mL) were successively added DIPEA (0.402 mL, 2.31 mmol) and EDC (179 mg, 1.16 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 17 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **61** (280 mg, 72%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.33–1.50 (9H, m), 1.73–2.08 (2H, m), 2.52–2.58 (1H, m), 2.90–3.31 (4H, m), 3.78–4.36 (4H, m), 4.40–4.68 (1H, m), 4.86–5.11 (1H, m), 6.35–6.51 (1H, m), 6.60 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.70–6.86 (2H, m), 6.89–7.24 (4H, m), 8.22–8.68 (1H, m); MS (ESI): *m/z* 450.3 (M+H)<sup>+</sup>.

## *tert*-Butyl {(1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,10a*R*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl}carbamate (63)

A mixture of **61** (230 mg, 0.51 mmol) and 4M HCl in cyclopentylmethylether (5.0 mL) in EtOAc/MeOH (1:1, 5.0 mL) was stirred at room temperature for 1 h and then concentrated under reduced pressure. To a mixture of the residue, (2*S*)-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino](cyclohexyl)ethanoic acid (**62**, 197 mg, 0.77 mmol) and DIPEA (0.446 mL, 2.56 mmol) in DMF (3.0 mL) was added HATU (292 mg, 0.77 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 18 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5–35% EtOAc in *n*-hexane) to give **63** (345 mg, 77%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.85–1.27 (9H, m), 1.32–1.97 (15H, m), 2.53–3.26 (3H, m), 3.34–3.48 (1H, m), 4.09–4.66 (4H, m), 4.84–5.15 (2H, m), 6.42–6.66 (2H, m), 6.68–7.21 (7H, m), 8.28 (1H, d, *J* = 7.9 Hz); MS (ESI): *m/z* 589.4 (M+H)<sup>+</sup>.

## *tert*-Butyl [(1S)-2-({(1S)-1-cyclohexyl-2-[(3S,10aR)-3-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-

## ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl}amino)-1-methyl-2-oxoethyl]methylcarbamate (66a)

A mixture of **63** (301 mg, 0.51 mmol) and 4M HCl in cyclopentylmethylether (4.0 mL) in EtOAc/MeOH (1:1, 4.0 mL) was stirred at room temperature for 2 h and then concentrated under reduced pressure. To a mixture of the residue, *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-alanine (**64**, 156 mg, 0.77 mmol) and DIPEA (0.445 mL, 2.56 mmol) in DMF (3.0 mL) was added HATU (292 mg, 0.77 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (10–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **66a** (318 mg, 92%) as pale yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.80–1.47 (19H, m), 1.50–1.97 (7H, m), 2.54–3.07 (6H, m), 3.34–3.52 (1H, m), 3.86–3.99 (1H, m), 4.08–4.81 (5H, m), 4.86–5.15 (2H, m), 6.44–6.67 (2H, m), 6.68–6.81 (2H, m), 6.82–7.19 (4H, m), 7.51–8.03 (1H, m), 8.19–8.57 (1H, m); MS (ESI): *m/z* 674.5 (M+H)<sup>+</sup>.

# *tert*-Butyl [(1*S*)-1-({(1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,10a*S*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl}carbamoyl) propyl]methylcarbamate (66b)

Compound **66b** was prepared by the similar method to that described for **66a** using **63** (172 mg, 0.29 mmol), 4M HCl in cyclopentylmethylether (2.0 mL), 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)(methyl) amino]butanoic acid (**65**, 95 mg, 0.44 mmol), DIPEA (0.156 mL, 0.88 mmol) and HATU (113 mg, 0.44 mmol). White solid (152 mg, 76%); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.64–1.27 (9H, m), 1.28–1.98 (18H, m), 2.53–3.29 (7H, m), 3.35–3.52 (1H, m), 3.87–4.79 (6H, m), 4.85–5.14 (2H, m), 6.46–6.66 (2H, m), 6.70–7.18 (6H, m), 7.60–8.10 (1H, m), 8.21–8.59 (1H, m); MS (ESI): *m/z* 688.5 (M+H)<sup>+</sup>.

# (3*S*,10*aR*)-2-{(2*S*)-2-cyclohexyl-2-[(*N*-methyl-L-alanyl)amino]acetyl}-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-ch romene-4-yl]-1,2,3,4,10,10a-hexahydropyrazino[1,2-*a*]indole-3-carboxamide (67a)

A mixture of **66a** (310 mg, 0.46 mmol) and 4M HCl in EtOAc (4.0 mL) in EtOAc/MeOH (1:1, 4.0 mL) was stirred at room temperature for 2 h and then concentrated under reduced pressure. A mixture of the residue and Amberlyst A21<sup>®</sup> (500 mg) in MeOH (6.0 mL) was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (40–100% EtOAc in *n*-hexane) and reprecipitated from EtOAc–*n*-hexane to give **67a** (165 mg, 63%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.82–1.29 (8H, m), 1.49–2.25 (12H, m), 2.54–2.66 (1H, m), 2.79–3.09 (3H, m), 3.17–3.42 (1H, m), 3.43–3.58 (1H, m), 3.89–4.85 (5H, m), 4.86–5.26 (2H, m), 6.39–6.67 (2H, m), 6.68–6.86 (2H, m), 6.89–7.28 (4H, m), 7.82–8.13 (1H, m), 8.25–8.64 (1H, m); MS (ESI): *m/z* 574.4 (M+H)<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: C, 69.08; H, 7.55 N, 12.21. Found: C, 68.89; H, 7.65; N, 12.06.

# (3*S*,10a*S*)-2-[(2*S*)-2-cyclohexyl-2-{[(2*S*)-2-(methylamino)butanoyl]amino}acetyl]-*N*-[(4*R*)-3,4-dih ydro-2*H*-chromene-4-yl]-1,2,3,4,10,10a-hexahydropyrazino[1,2-*a*]indole-3-carboxamide (67b)

Compound **67b** was prepared by the similar method to that described for **67a** using **66b** (152 mg, 0.22 mmol), 4M HCl in EtOAc (2.0 mL) and Amberlyst A21<sup>®</sup> (500 mg). White solid (98 mg, 75%); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.67–1.28 (8H, m), 1.29–2.06 (11H, m), 2.09–2.23 (3H, m), 2.52–3.30 (5H, m), 3.35–3.61 (1H, m), 4.01–5.16 (7H, m), 6.45–6.66 (2H, m), 6.69–6.87 (2H, m), 6.92–7.20 (4H, m), 8.03 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 8.28–8.55 (1H, m); MS (ESI): *m*/*z* 588.4 (M+H)<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>34</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: C, 69.48; H, 7.72 N, 11.92. Found: C, 69.43; H, 7.61; N, 11.86.

## *tert*-Butyl (3*S*,10a*S*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10atetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-carboxylate (68)

A mixture of 55B (580 mg, 1.74 mmol) and lithium hydroxide monohydrate (183 mg, 4.36 mmol) in THF/water (2:1, 7.5 mL) was stirred at 50 °C for 1 h. The mixture was neutralized with 1M HCl at 0 °C and concentrated under reduced pressure. То a mixture of the residue, (4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-amine hydrochloride (485 mg, 2.61 mmol), HOBt (259 mg, 1.91 mmol) and DIPEA (1.22 mL, 6.96 mmol) in DMF (5.0 mL) was added EDC (540 mg, 3.48 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 18 h. Additional HOBt (235 mg, 1.74 mmol) and EDC (405 mg, 2.61 mmol) were added to the mixture, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with satd NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **68** (425 mg, 54%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.28 (9H, s), 1.78–2.13 (2H, m), 2.83 (1H, dd, J = 16.7, 4.6 Hz), 3.19 (1H, dd, J = 16.7, 10.2 Hz), 3.36-3.49 (2H, m),3.49–3.70 (2H, m), 4.08–4.27 (3H, m), 4.33 (1H, dd, J = 7.7, 6.2 Hz), 4.85–5.14 (1H, m), 6.55–6.71 (2H, m), 6.72–6.90 (2H, m), 6.94–7.22 (4H, m), 8.49 (1H, d, J = 7.9 Hz); MS (ESI): m/z 450.4  $(M+H)^{+}$ .

# *tert*-Butyl (3*S*,10a*S*)-8-cyano-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-carboxylate (69)

A mixture of 57 (290 mg, 0.81 mmol) and lithium hydroxide monohydrate (85 mg, 2.03 mmol) in THF/water (2:1, 7.5 mL) was stirred at 50 °C for 1 h. The mixture was neutralized with 1M HCl and concentrated under reduced pressure. То a mixture of the residue and (4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-amine hydrochloride (181 mg, 0.98 mmol) in DMF (4.0 mL) were added HATU (618 mg, 1.63 mmol) and DIPEA (0.568 mL, 3.25 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with satd NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5-60% EtOAc in *n*-hexane) to give **69** (285 mg, 74%) as pale yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.28 (9H, s), 1.78–2.14 (2H, m), 2.79–2.94 (1H, m), 3.17–3.31 (1H, m), 3.39–3.67 (3H, m), 3.78 (1H, dd, *J* = 13.6, 6.0 Hz), 4.10–4.34 (3H, m), 4.38 (1H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.87–5.11 (1H, m), 6.70 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.74–6.94 (2H, m), 7.05–7.22 (2H, m), 7.39 (1H, s), 7.48 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz), 8.51 (1H, d, *J* = 7.7 Hz); MS (ESI): *m/z* 475.3 (M+H)<sup>+</sup>.

# *tert*-Butyl (3*S*,10a*S*)-8-chloro-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-carboxylate (70)

Compound **70** was prepared by the similar method to that described for **69** using **58** (143 mg, 0.39 mmol), lithium hydroxide monohydrate (49 mg, 1.17 mmol), (4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-amine hydrochloride (87 mg, 0.47 mmol), DIPEA (0.272 mL, 1.56 mmol) and HATU (178 mg, 0.47 mmol). White solid (149 mg, 79%); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.28 (9H, s), 1.79–2.13 (2H, m), 2.75–2.91 (1H, m), 3.11–3.29 (1H, m), 3.34–3.70 (4H, m), 4.09–4.42 (4H, m), 4.92–5.09 (1H, m), 6.61 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 6.72–6.91 (2H, m), 6.98–7.22 (4H, m), 8.49 (1H, d, *J* = 8.3 Hz); MS (ESI): m/z 484.2 (M+H)<sup>+</sup>.

# *tert*-Butyl (3*S*,10a*S*)-6,8-dichloro-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-carboxylate (71)

Compound **71** was prepared by the similar method to that described for **69** using **60** (305 mg, 0.76 mmol), lithium hydroxide monohydrate (96 mg, 2.28 mmol), (4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-amine hydrochloride (169 mg, 0.91 mmol), DIPEA (0.530 mL, 3.04 mmol) and HATU (347 mg, 0.91 mmol). Pale yellow solid (367 mg, 93%); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.22–1.47 (9H, m), 1.78–2.11 (2H, m), 2.79–2.97 (1H, m), 3.05–3.24 (1H, m), 3.41–3.55 (1H, m), 3.64–4.01 (3H, m), 4.10–4.40 (4H, m), 4.88–5.12 (1H, m), 6.66–6.92 (2H, m), 7.02–7.25 (4H, m), 8.56 (1H, brs); MS (ESI): *m*/*z* 518.2 (M+H)<sup>+</sup>.

# *tert*-Butyl (*S*)-2-((3*S*,10a*S*)-3-((*R*)-chroman-4-ylcarbamoyl)-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino [1,2-*a*]indol-2(1*H*)-yl)-1-cyclohexyl-2-oxoethylcarbamate (72)

A mixture of 68 (410 mg, 0.91 mmol) and 4M HCl in cyclopentylmethylether (8.0 mL) in MeOH (2.0 mL) was stirred at room temperature for 2 h and then concentrated under reduced pressure. A solution of the residue in DMF (2.5)mL) was added to mixture а of (2S)-[(tert-butoxycarbonyl)amino](cyclohexyl)ethanoic acid (62, 235 mg, 0.91 mmol), DIPEA (0.724 mL, 4.14 mmol) and HATU (630 mg, 1.66 mmol) in DMF (2.5 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 15 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with water, satd NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to give 72 as crude amorphous solid. The compound was used for the next reaction without further purification.

# *tert*-Butyl (S)-2-((3S,10aS)-3-((R)-chroman-4-ylcarbamoyl)-8-cyano-3,4,10,10atetrahydropyrazino[1,2-*a*]indol-2(1*H*)-yl)-1-cyclohexyl-2-oxoethylcarbamate (73)

To a solution of 69 (280 mg, 0.59 mmol) in MeOH (1.5 mL) was added dropwise 4M HCl in cyclopentylmethylether (4.5 mL). After being stirred at room temperature for 1h, the mixture was concentrated under reduced pressure. То a mixture of the residue. (2S)-[(tert-butoxycarbonyl)amino](cyclohexyl)ethanoic acid (62, 167 mg, 0.65 mmol) and DIPEA (0.515 mL, 2.95 mmol) in DMF (5.0 mL) was added HATU (449 mg, 1.18 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 15 h. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, satd NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to give 73 as crude amorphous solid. The compound was used for the next reaction without further purification.

## *tert*-Butyl (*S*)-2-((3*S*,10a*S*)-8-chloro-3-((*R*)-chroman-4-ylcarbamoyl)-3,4,10,10atetrahydropyrazino[1,2-*a*]indol-2(1*H*)-yl)-1-cyclohexyl-2-oxoethylcarbamate (74)

A mixture of **70** (149 mg, 0.31 mmol) and 4M HCl in cyclopentylmethylether (2.0 mL) in EtOAc/MeOH (1:1, 2.0 mL) was stirred at room temperature for 2 h and then concentrated under reduced pressure. To a mixture of the residue, (2S)-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino](cyclohexyl)ethanoic acid (**62**, 95 mg, 0.37 mmol) and DIPEA (0.268 mL, 1.54 mmol) in DMF (3.0 mL) was added HATU (140 mg, 0.37 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 18 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure to give **74** as crude amorphous solid. The compound was used for the next reaction without further purification.

# *tert*-Butyl {(1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,10a*S*)-6,8-dichloro-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl}carbamate (75)

A mixture of **71** (367 mg, 0.71 mmol) and 4M HCl in cyclopentylmethylether (4.0 mL) in EtOAc/MeOH (1:1, 4.0 mL) was stirred at room temperature for 2 h and then concentrated under reduced pressure. To a mixture of the residue, (2*S*)-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino](cyclohexyl)ethanoic acid (**62**, 219 mg, 0.85 mmol) and DIPEA (0.493 mL, 2.83 mmol) in DMF (4.0 mL) was added HATU (269 mg, 0.71 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 17 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (10–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **75** (445 mg, 96%) as a pale yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.61–1.26 (6H, m), 1.29–2.10 (16H, m), 3.04–3.26 (2H, m), 3.39–3.71 (1H, m), 3.73–4.60 (8H, m), 4.84–5.09 (1H, m), 6.16–7.68 (7H, m), 8.40–8.89 (1H, m); MS (ESI): *m*/z 657.3 (M+H)<sup>+</sup>.

## tert-Butyl [(1S)-1-({(1S)-1-cyclohexyl-2-[(3S,10aS)-3-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-

# ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl}carbamoyl) propyl]methylcarbamate (76)

To a solution of **72** (489 mg, 0.83 mmol) in MeOH (2.5 mL) was added 4M HCl in cyclopentylmethylether (5.0 mL). After being stirred at room temperature for 1h, the mixture was concentrated under reduced pressure. A mixture of the residue and DIPEA (1.45 mL) in DMF (5.0 mL) was added to a mixture of 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)(methyl)amino]butanoic acid (**65**, 198 mg, 0.91 mmol) and HATU (631 mg, 1.66 mmol) in DMF (5.0 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 18 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with satd NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–60% EtOAc in *n*-hexane) to give **76** (452 mg, 79%) as pale yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.33–2.18 (27H, m), 2.55–4.77 (15H, m), 4.79–5.15 (1H, m), 6.36–7.75 (9H, m), 8.22–8.90 (1H, m); MS (ESI): *m/z* 688.4 (M+H)<sup>+</sup>.

# *tert*-Butyl [(1*S*)-1-({(1*S*)-2-[(3*S*,10a*S*)-8-cyano-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl] -3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-1-cyclohexyl-2-oxoethyl}carbamoyl) propyl]methylcarbamate (77)

To a solution of 73 (850 mg, 0.59 mmol) in MeOH (1.0 mL) was added dropwise 4M HCl in cyclopentylmethylether (3.0 mL). After being stirred at room temperature for 1h, the mixture was concentrated under reduced pressure. То a mixture of the residue. 2-[(tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino]butanoic acid (65, 141 mg, 0.65 mmol) and DIPEA (1.03 mL, 5.90 mmol) in DMF (5.0 mL) was added HATU (449 mg, 1.18 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with water, satd NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **77** (225 mg, 54%) as pale yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.35–2.17 (27H, m), 2.62-2.91 (3H, m), 3.00-3.61 (3H, m), 3.65-4.77 (9H, m), 4.79-5.08 (1H, m), 6.55-6.99 (3H, m), 7.04–7.83 (5H, m), 8.24–8.79 (1H, m); MS (ESI): m/z 613.4 (M+H-(Boc))<sup>+</sup>.

# *tert*-Butyl [(1*S*)-1-({(1*S*)-2-[(3*S*,10a*S*)-8-chloro-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl] -3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-1-cyclohexyl-2-oxoethyl}carbamoyl) propyl]methylcarbamate (78)

A mixture of **74** (192 mg, 0.31 mmol) and 4M HCl in cyclopentylmethylether (4.0 mL) in EtOAc/MeOH (1:6, 7.0 mL) was stirred at room temperature for 3 h and then concentrated under reduced pressure. To a mixture of the residue, 2-[(tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino]butanoic acid (**65**, 80 mg, 0.37 mmol) and DIPEA (0.268 mL, 1.54 mmol) in DMF (3.0 mL) was added HATU (141 mg, 0.37 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 2 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography

(10–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **78** (198 mg, 89%) as pale yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 0.38–2.11 (26H, m), 2.61–2.85 (5H, m), 2.99–3.30 (2H, m), 3.58–3.78 (2H, m), 3.80–4.76 (7H, m), 4.79–5.09 (1H, m), 6.51–7.74 (8H, m), 8.36–8.78 (1H, m); MS (ESI): *m/z* 722.4 (M+H)<sup>+</sup>.

# *tert*-Butyl [(1*S*)-1-({(1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,10*aS*)-6,8-dichloro-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl}carb amoyl)propyl]methylcarbamate (79)

A mixture of **75** (445 mg, 0.68 mmol) and 4M HCl in cyclopentylmethylether (4.0 mL) in EtOAc/MeOH (1:1, 4.0 mL) was stirred at room temperature for 2 h and then concentrated under reduced pressure. To a mixture of the residue, 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)(methyl)amino]butanoic acid (**65**, 176 mg, 0.81 mmol) and DIPEA (0.589 mL, 3.38 mol) in DMF (4.0 mL) was added HATU (257 mg, 0.68 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 5 h, and then partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **79** (476 mg, 89%) as pale yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.60–2.11 (27H, m), 2.64–2.91 (3H, m), 2.96–3.28 (2H, m), 3.46–4.74 (10H, m), 4.80–5.12 (1H, m), 6.63–7.24 (6H, m), 7.32–7.92 (1H, m), 8.43–8.92 (1H, m); MS (ESI): *m*/*z* 756.4 (M+H)<sup>+</sup>.

# $(3S,10aS)-2-[(2S)-2-Cyclohexyl-2-{[(2S)-2-(methylamino)butanoyl]amino}acetyl]-N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-yl]-1,2,3,4,10,10a-hexahydropyrazino[1,2-$ *a*]indole-3-carboxamide (80)

To a solution of **76** (269 mg, 0.39 mmol) in EtOAc (2.5 mL) was added 4M HCl in cyclopentylmethylether (5.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 h and then concentrated under reduced pressure. To the residue was added satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (0–70% EtOAc in *n*-hexane) to give **80** (89 mg, 39%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.48–1.74 (16H, m), 1.75–2.24 (7H, m), 2.64–3.55 (4H, m), 3.58–5.13 (8H, m), 6.42–7.28 (8H, m), 7.46–7.85 (1H, m), 8.30–8.92 (1H, m); MS (ESI): *m/z* 588.4 (M+H)<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>34</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>·0.4H<sub>2</sub>O: C, 68.64; H, 7.76; N, 11.77. Found: C, 68.73; H, 7.90; N, 11.55.

# $(3S,10aS)-8-Cyano-2-[(2S)-2-cyclohexyl-2-{[(2S)-2-(methylamino)butanoyl]amino}acetyl]-N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-yl]-1,2,3,4,10,10a-hexahydropyrazino[1,2-a]indole-3-carboxamide (81)$

To a solution of **77** (225 mg, 0.32 mmol) in toluene (1.5 mL) was added TFA (1.5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (5–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **81** (30 mg,

15%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.47–1.75 (16H, m), 1.77–2.09 (6H, m), 2.17 (1H, s), 2.65–2.89 (1H, m), 3.10–3.56 (3H, m), 3.71–4.82 (7H, m), 4.82–5.04 (1H, m), 6.47–7.01 (3H, m), 7.05–7.61 (4H, m), 7.62–7.82 (1H, m), 8.32–8.80 (1H, m); MS (ESI): m/z 613.4 (M+H)<sup>+</sup> ; HRMS-ESI (m/z): [M +H] calcd for C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, 613.3497; found. 613.3467.

# $(3S,10aS)-8-Chloro-2-[(2S)-2-cyclohexyl-2-{[(2S)-2-(methylamino)butanoyl]amino}acetyl]-N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-yl]-1,2,3,4,10,10a-hexahydropyrazino[1,2-$ *a*]indole-3-carboxamide (82)

A mixture of **78** (198 mg, 0.27 mmol) and 4M HCl in EtOAc (4.0 mL) in EtOAc/MeOH (1:3, 4.0 mL) was stirred at room temperature for 3 h and then concentrated under reduced pressure. A mixture of the residue and Amberlyst A21<sup>®</sup> (500 mg) in MeOH (8.0 mL) was stirred at room temperature for 10 min. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (10–100% EtOAc in *n*-hexane) and recrystallized from EtOAc-*n*-hexane to give **82** (72 mg, 48%) as colorless crystal; mp 188.2–189.8°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.47–2.24 (22H, m), 2.60–2.88 (1H, m), 3.06–3.50 (3H, m), 3.63–3.96 (2H, m), 4.00–4.37 (4H, m), 4.43–4.62 (1H, m), 4.68–5.07 (2H, m), 6.51–7.59 (7H, m), 7.63–7.83 (1H, m), 8.39–8.82 (1H, m); MS (ESI): *m*/*z* 622.4 (M+H)<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>·0.5H<sub>2</sub>O: C, 64.70; H, 7.19; N, 11.10. Found: C, 64.70; H, 7.26; N, 10.97.

# $(3S,10aS)-6,8-Dichloro-2-[(2S)-2-cyclohexyl-2-{[(2S)-2-(methylamino)butanoyl]amino}acetyl]-N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-yl]-1,2,3,4,10,10a-hexahydropyrazino[1,2-$ *a*]indole-3-carboxamide (83)

A mixture of **79** (476 mg, 0.63 mmol) and TFA (4.0 mL) in toluene (4.0 mL) was stirred at room temperature for 2 h and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (10–100% EtOAc in *n*-hexane) and reprecipitated from EtOAc-*n*-hexane to give **83** (126 mg, 31%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.66 –2.30 (23H, m), 2.69–3.29 (3H, m), 3.50–5.06 (9H, m), 6.59–7.23 (6H, m), 7.46–7.99 (1H, m), 8.47–8.94 (1H, m); MS (ESI): *m*/*z* 656.3 (M+H)<sup>+</sup>; HRMS-ESI (*m*/*z*): [M +H] calcd for C<sub>34</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>, 656.2765; found. 656.2755.

# *tert*-Butyl {(1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,8a*S*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl] hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl}carbamate (87)

To a solution of (3S,8aS)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]hexahydropyrrolo [1,2-*a*]pyrazine-2(1*H*)-carboxylate (**85**, 427 mg, 1.06 mmol) in EtOAc (5.0 mL) was added 4M HCl in EtOAc (25 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was triturated with EtOAc. The precipitating solid was collected by filtration, washed with EtOAc and dried *in vacuo* to give (3*S*,8a*S*)-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide

dihydrochloride (346 white solid. То of of mg) as a mixture а mixture (3S,8aS)-N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-yl]octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamidedihydrochloride (343 mg, 0.92 mmol), (2S)-[(tert-butoxycarbonyl)amino](cyclohexyl)ethanoic acid (62, 355 mg, 1.38 mmol) and DIPEA (0.961 mL, 5.52 mmol) in DMF (6.0 mL) was added HATU (699 mg, 1.84 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 18 h, and then diluted with EtOAc. The organic solution was washed with water, 5% aqueous NaHCO<sub>3</sub> and water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0-50% MeOH in EtOAc) and NH silica gel column chromatography (10–100% EtOAc in *n*-hexane) to give 87 (428 mg, 75%) as colorless amorphous solid; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.98–2.24 (25H, m), 2.66–3.00 (3H, m), 3.20–3.75 (3H, m), 4.06–4.48 (4H, m), 4.76 (1H, t, J = 5.4 Hz), 5.12–5.19 (2H, m), 6.32 (1H, d, J = 7.2 Hz), 6.79–6.89 (2H, m), 7.14–7.23 (3H, m).

### tert-Butyl [(1S)-2-({(1S)-1-cyclohexyl-2-[(3S,8aS)-3-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-

# ylcarbamoyl]hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl}amino)-1-methyl-2-oxoethyl ]methylcarbamate (89)

To a solution of 87 (425 mg, 0.79 mmol) in EtOAc (5.0 mL) was added 4M HCl in EtOAc (25 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was triturated with EtOAc. The precipitating solid was collected by filtration, washed with EtOAc and dried in vacuo to give (3S,8aS)-2-[(2S)-2-amino-2-cyclohexylacetyl]-N-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide dihydrochloride (345 mg) white solid. То а mixture of а of as mixture (3S,8aS)-2-[(2S)-2-amino-2-cyclohexylacetyl]-N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-yl]octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide dihydrochloride (342 mg, 0.67 mmol), N-(tert-butoxycarbonyl)-N-methyl-L-alanine (65, 203 mg, 1.00 mmol) and DIPEA (0.696 mL, 4.00 mmol) in DMF (6.0 mL) was added HATU (506 mg, 1.33 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 18 h, and then diluted with EtOAc. The organic solution was washed with water, 5% aqueous NaHCO<sub>3</sub> and water. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0-70% MeOH in EtOAc) and NH silica gel column chromatography (0-30% MeOH in EtOAc) to give 89 (341 mg, 70%) as colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.96–1.31 (7H, m), 1.42–2.26 (23H, m), 2.63–2.98 (6H, m), 3.16–3.24 (1H, m), 3.29–3.36 (1H, m), 3.43–3.57 (1H, m), 3.71–3.77 (1H, m), 3.94-4.27 (2H, m), 4.45-4.76 (3H, m), 5.10-5.24 (1H, m), 6.28-6.31 (1H, m), 6.65-6.92 (2H, m), 7.14–7.26 (3H, m).

# (3*S*,8*aR*)-2-[(2*S*)-2-Cyclohexyl-2-{[(2*S*)-2-(methylamino)butanoyl]amino}acetyl]-*N*-[(4*R*)-3,4dihydro-2*H*-chromene-4-yl]-octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide dihydrochloride (90)

A mixture of (3S,8aR)-3-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-ylcarbamoyl]hexahydropyrrolo[1,2-a] pyrazine-2(1H)-carboxylate (84, 290 mg, 0.72 mmol) and 4M HCl in EtOAc (5.0 mL) was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was triturated with diethylether and MeOH to give (3S,8aR)-N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-y]octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamide dihydrochloride (168 mg) as colorless amorphous. A mixture of (3S,8aR)-N-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-yl]octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine -3-carboxamide dihydrochloride (160 mg, 0.427 mmol) and DIPEA (0.155 ml, 1.28 mmol) in DMF (1.0 mL) was added to a mixture of (2S)-[(tert-butoxycarbonyl)amino](cyclohexyl)ethanoic acid (62, 121 mg, 0.440 mmol) and HATU (325 mg, 1.28 mmol) in DMF (2.0 ml) at room temperature. After being stirred at room temperature for 3 h, the mixture was partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in 4M HCl in EtOAc (2.0 mL) and stirred at room temperature for 2 h. The mixture was neutralized with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. A mixture of the residue and DIEPA (0.155 mL, 1.28 mmol) in DMF (1.0)mL) was added to a mixture of 2-[(tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino]butanoic acid (65, 111 mg, 0.51 mmol) and HATU (325 mg, 0.854 mmol) in DMF (2.0 mL) at room temperature. After being stirred at room temperature for 18 h, the mixture was partitioned between EtOAc and water. The organic layer was washed with satd NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–100% EtOAc in *n*-hexane) and preparative reverse phase HPLC (C-18RS, 50×20 mm S-5 µm, CombiPrepPro) [Solvent A (0.1% TFA/water), Solvent B (0.1%TFA/MeCN) 99-0% A/B over 7.5 min]. The collected fractions were concentrated under reduced pressure to remove MeCN, the residue was basified with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic extracts were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in 4M HCl in cyclopentylmethylether (3.0 mL) and stirred at room temperature for 1 h. The insoluble material was collected by filtration and dried in vacuo to give 90 (17 mg, 1.4%) as colorless amorphous; <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  0.86 (3H, t, J = 7.6 Hz), 0.98–1.26 (5H, m), 1.40–2.33 (16H, m), 2.56 (3H, s), 3.05–3.18 (1H, m), 3.44–3.81 (4H, m), 3.93–4.20 (3H, m), 4.53–4.73 (3H, m), 4.91–5.02 (1H, m), 6.63–6.79 (2H, m), 7.05 (1H, t, J = 7.6 Hz), 7.17 (1H, brs), 8.59 (1H, brs); HRMS-ESI (m/z): [M +H] calcd for C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>, 540.3472; found. 540.3495.

# (3*S*,8a*S*)-2-{(2*S*)-2-cyclohexyl-2-[(*N*-methyl-L-alanyl)amino]acetyl}-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]-octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide dihydrochloride (91)

To a solution of **89** (338 mg, 0.54 mmol) in EtOAc (5.0 mL) was added 4M HCl in EtOAc (25 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was triturated with EtOAc. The precipitating solid was collected by filtration, washed with EtOAc and dried *in vacuo* to give **91** (278 mg, 86%) as white solid; <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  0.90–2.30 (20H, m), 2.40–2.50 (3H, m), 2.95–5.10 (13H, m), 6.70–6.95 (2H, m),

7.10–7.60 (2H, m), 8.60–9.00 (3H, m), 9.25–9.60 (1H, m), 11.00–11.40 (1H, m); Anal. Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>-1</sup>.3H<sub>2</sub>O: C, 56.00; H, 7.71; N, 11.26. Found: C, 56.04; H, 7.70; N, 11.01.

### Preparations of proteins, peptides and reagents

The recombinant BIR3 domain (residues 250–350) of human cIAP-1 protein fused to His-tag (cIAP-1\_BIR3) was prepared in Discovery Research Center. The *N*-terminal His-tagged BIR3 domain (residues 252-356) of recombinant human XIAP protein (XIAP\_BIR3) and Smac-N7 peptide (AVPIAQK; Smac-N7) were purchased from R&D Systems, Inc., and EMD Chemicals Inc. (Calbiochem), respectively. A C-terminally biotinated Smac-N7 peptide (AVPIAQ-K(biotin)-NH<sub>2</sub>; biotinyl-Smac) was synthesized at Peptide Institute Inc. Europium cryptate (Eu<sup>3+</sup> cryptate)-conjugated mouse monoclonal antibody anti-6-Histidine (Anti-6HIS Cryptate), high grade XL665-conjugated streptavidin (SA-XL<sup>ent!</sup>), and HTRF detection buffer were purchased from Sceti Medical Labo K.K. (cisbio). Anti-6HIS Cryptate and SA-XL<sup>ent!</sup> were dissolved in distillated water, and stored at -30 °C, according to the manufacture's protocol. Other reagents used were obtained from Wako Pure Chemicals and were of analytical grade or comparable.

# Binding activities using homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer (HTRF) technology

Binding experiments were performed in white low-volume 384-well plates (Greiner, #784075). A 5  $\mu$ L of IAP proteins (40 nM for XIAP\_BIR3, 8 nM for cIAP-1\_BIR3) and 5  $\mu$ L of increasing concentration of compounds were added to wells in the assay buffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% BSA, 0.1% Triton X-100, pH 7.5). After shaking at room temperature, 5  $\mu$ L of biotinyl-Smac (20 nM for XIAP\_BIR3 and 80 nM for cIAP-1\_BIR3, dissolved in assay buffer) added to the well, followed by adding 5  $\mu$ L of mixture of Anti-6HIS Cryptate and SA-XL<sup>ent!</sup>, 100 times diluted with HTRF detection buffer, respectively. In some case, the condition of 40 nM cIAP-1\_BIR3 and 20 nM biotinyl-Smac was used for the compound evaluation.

After overnight incubation at room temperature in the dark, HTRF measurement was carried out on a multi-label reader (EnVision, PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc.) with the following settings:

Measurement mode: Time-Resolved Fluorescence Excitation: 320 nm Emission Donor: 615 nm Emission Acceptor: 665 nm Measurement Height: 6.5 mm Cycle: 2000 Delay: 90 ms Number of flashes: 280 µs.

Fluorescence collected at 615 nm (F<sub>615nm</sub>) is the total europium cryptate signal, and fluorescence

collected at 665 nm ( $F_{665nm}$ ) is the FRET signal. The ratio = ( $F_{665nm}$ /  $F_{615nm}$ ) × 10000 was calculated and IC<sub>50</sub> values were determined using the ratio by nonlinear regression curve fitting with the program Prism (GraphPad Software).

### **Preparation of cell lines**

For *in vitro* assay, MDA-MB-231 cancer cell line was obtained from ATCC. The culture medium recommended by suppliers was used for cultivation of each cell line.

### Measurement of cell viability

MDA–MB–231 cells were seeded in triplicate 96-well plates in 100  $\mu$ L complete media at a density of 3×10<sup>3</sup> cells/well. Compounds were added to each well to give a range of concentrations (0.0001–0.1  $\mu$ M) in a final volume of 200  $\mu$ L. Cell viability was measured using CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega) at 72 hours of incubation. The IC<sub>50</sub> value (concentration providing 50% growth inhibition) and the 95% confidence interval were calculated from a dose-response curve generated by nonlinear least-squares regression of the response using Pre-clinical package (PCP) software.

#### Transcellular transport study using transporter-expression system

Human MDR1-expressing LLC-PK1 cells were cultured with minor modification as reported previously.<sup>104</sup> The transcellular transport study was performed as reported previously.<sup>105</sup> In brief, the cells were grown for 7 days in HTS Transwell<sup>®</sup> 96 well permeable support (pore size 0.4  $\mu$ m, 0.143 cm<sup>2</sup> surface area) with polyethylene terephthalate membrane (Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA) at a density of  $1.125 \times 10^5$  cells/well. The cells were preincubated with M199 at 37 °C for 30 minutes. Subsequently, transcellular transport was initiated by the addition of M199 either to apical compartments (75  $\mu$ L) or to the basolateral compartments (250  $\mu$ L) containing 10  $\mu$ mol/L digoxin, 200  $\mu$ mol/L lucifer yellow as a marker for the tightness of monolayer, and 10  $\mu$ mol/L test compounds and terminated by the removal of each assay plate after 2 hours. The aliquots (25  $\mu$ L) in the opposite compartments was mixed with MeCN containing alprenolol and diclofenac as internal standard and then centrifuged. The supernatants were diluted with 10 mmol/L ammonium formate/formic acid (500: 1, v/v) and measured in a LC-MS/MS analysis (API4000, AB SCIEX, Foster City, CA, USA). The apparent permeability (*P*<sub>app</sub>) of test compounds in the receiver wells was determined and the efflux ratio (ER) for MDR1 membrane permeability test was calculated using the following equation: ER = R<sub>BtoA</sub> / R<sub>AtoB</sub>

where *RAtoB* and *RBtoA* are ratio of peak area of test compounds to that of internal standard in A to B and B to A, respectively.

### cIAP-1 molecular biology, protein expression, purification and crystallography

The BIR 3 domain of human cIAP-1 (residues 260–352) was over-expressed as a 6xHis protein in E. coli. The cIAP-1 protein was purified by immobilized Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography, followed by cleavage of the 6xHis tag with TEV protease and size exclusion with a Superdex 75 column (GE Healthcare). The final protein buffer was 25 mM HEPES pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.25 mM TCEP. Prior to crystallization, purified protein mixed with 1 mM inhibitor compound was co -concentrated to 18 mg/ml.

Crystals suitable for data collection were obtained by vapor diffusion in sitting drops at 20 °C. Reservoirs contained 2.8-3.5 M NaCl and 100 mM TRIS (pH 8.2–8.8) for **80** and **90** complexes. Crystals were immersed in mother liquor solution containing 22% ethylene glycol for cryoprotection and flash frozen in liquid nitrogen. Crystals of all three cIAP-1 complexes grew in the orthorhombic space group  $P2_12_12_1$  with similar unit cell dimensions and contain two molecules in the asymmetric unit.

Diffraction data were collected from single cryogenically protected crystals at beam line 5.0.3 of the Advanced Light Source at Lawrence Berkeley National Laboratory. Data were reduced using the HKL2000 software package.<sup>106</sup> The structures were determined by molecular replacement with either MOLREP<sup>107</sup> or PHASER<sup>108</sup> of the CCP4 program suite utilizing PDB code 3D9T as a search model and refined with the program REFMAC.<sup>109</sup> Several cycles of model building with XtalView<sup>110</sup> or COOT<sup>111</sup> and refinement were performed for improving the quality of the model. Data reduction and refinement statistics are summarized in Table3. The coordinates and structure factors have been deposited in Protein Data Bank with accession code 4MTI (compound **90**/cIAP-1 complex) and 4MU7 (compound **80**/cIAP-1 complex).

Data Collection					
Protein		cIAP-1		cIAP-1	
	Compound	80		90	
	Wavelength (Å)	0.98		0.98	
	Space group	$P2_{1}2_{1}2_{1}$		$P2_{1}2_{1}2_{1}$	
Unit ce (Å)	Unit call dimensions	a=31.0,	b=68.3,	a=31.1,	b=68.5,
		c=121.6,		c=122.4,	
	(A)	α=90°, β=90°, γ	γ=90°	α=90°, β=90°, γ	γ=90°
	Resolution (Å)	1.79		2.15	
Unique reflections Redundancy Completeness (%)		25323		14985	
		7.2		4.3	
		98.0 (80.9)		95.2 (92.0)	

Table 3. Data reduction and refinement statistics for the cIAP-1 X-ray structures

Ι/σ(I)	24.1 (2.3)	7.8 (1.7)
$\mathbf{R}_{\mathrm{sym}}^{a}$	0.067 (0.575)	0.150 (0.550)
Refinement		
Molecules in	2	2
asymmetric unit	2	Z
Reflections used	23487	13442
RMS Bonds (Å)	0.010	0.011
RMS Angles (°)	1.21	1.11
Average B value ( $Å^2$ )	26.9	7.7
R-value <sup>b</sup>	0.181	0.188
R free b	0.203	0.262

<sup>a</sup>Rsym =  $\Sigma h\Sigma j |<I(h)> - I(h)j | / \Sigma h\Sigma j <I(h)>$ , where <I(h)> is the mean intensity of symmetry-related reflections. <sup>b</sup>R-value =  $\Sigma ||Fobs| - |Fcalc|| / \Sigma |Fobs|$ . Rfree for 5% of reflections excluded from refinement. Values in parentheses are for the highest resolution shell.

All moisture-sensitive reactions were performed using syringe-septum cap techniques under an argon atmosphere and all glassware was dried in an oven at 80 °C for 2 h prior to use. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on Silica gel 60 F254 Plates (Merck, 0.25 mm thickness). For flash chromatography, Silica gel 60 N [spherical neutral (Kanto Chemical Co., 40–50  $\mu$ m)] was employed. Melting points were measured by a hot stage melting point apparatus (uncorrected). Optical rotations were measured with a JASCO DIP-1000 polarimeter. All NMR spectral data were recorded on a JEOL ECX-400 spectrometer for <sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz). Chemical shifts are reported in  $\delta$  (ppm) relative to TMS in CDCl<sub>3</sub> as internal standard (<sup>1</sup>H NMR) or the residual CHCl<sub>3</sub> signal (<sup>13</sup>C NMR). <sup>1</sup>H NMR spectra are tabulated as follows: chemical shift, multiplicity, number of protons, and coupling constant(s). Exact mass (HRMS) spectra were recorded on an electronspray ionization quadrupole time of flight (ESI-QTOF) mass spectrometer (microTOF-QII-HC; BRUKER).

## tert-Butyl (5R)-5-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1,2,3-oxathiazolidine-3-carboxylate 2,2-dioxide (106)

To a solution of pyridine (81  $\mu$ L, 1.01 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL) was added SOCl<sub>2</sub> (18  $\mu$ L, 0.24 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 15 min. A solution of **105** (50 mg, 0.20 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) was added dropwise to the mixture at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 20 min. After stirred at room temperature, for 20 min, the mixture was quenched with water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extracts were washed with 0.5M HCl, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. RuCl<sub>3</sub> (2.5 mg, 0.012 mmol) and a solution of NaIO<sub>4</sub> (52 mg, 0.24 mmol) in water (2.0 mL) were added to a solution of the residue in CH<sub>3</sub>CN (2.0 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred 0 °C for 10 min. After stirred at room temperature for 10 min, the mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The extracts

were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (30% EtOAc in *n*-hexane) to give **106** (51 mg, 82%) as a colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  =1.29 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.56 (9H, s), 2.84 (1H, dd, *J* = 17.2, 7.6 Hz), 3.03 (1H, dd, *J* = 16.8, 6.4 Hz), 3.78 (1H, dd, *J* = 10.4, 8.4 Hz), 4.18–4.27 (3H, m), 5.16–5.23 (1H, m); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 14.06, 27.89, 37.30, 50.06, 61.66, 85.65, 148.46, 167.87; MS (ESI): *m/z* 348.0 (M+H)<sup>+</sup>.

## tert-Butyl ((2R)-2,4-dihydroxybutyl)carbamate (110)

To a solution of **105** (233 mg, 0.94 mmol) in EtOH (5.0 mL) was added NaBH<sub>4</sub> (57 mg, 1.51 mmol) at 0 °C, and the mixture was refluxed at 80 °C for 1 h. The mixture was quenched with 10% aqueous citric acid at 0 °C, and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (20–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **110** (168 mg, 82%) as a colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  =1.45 (9H, s), 1.64–1.75 (2H, m), 4.98 (1H, brs), 3.27–3.34 (1H, m), 3.83–3.97 (3H, m); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  =28.33, 35.70, 46.70, 60.96, 71.22, 79.76, 157.01; MS (ESI): *m*/*z* 228.1 (M+H)<sup>+</sup>; HRMS-ESI (*m*/*z*): [M +H] calcd for C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>4</sub>, 228.1206; found. 228.1210.

## tert-Butyl ((2R)-4-((tert-butyl(dimethyl)silyl)oxy)-2-hydroxybutyl)carbamate (111)

To a mixture of **110** (48 mg, 0.23 mmol) and imidazole (32 mg, 0.46 mmol) in DMF (2.0 mL) was added TBSCl (37 mg, 0.24 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at 0 °C for 2 h. The mixture was quenched with water at 0 °C, and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (20% EtOAc in *n*-hexane) to give **111** (70 mg, 93%) as a colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  =0.08 (6H, s), 0.89 (9H, s), 1.44 (9H, s), 1.61–1.74 (2H, m), 3.03–3.10 (1H, m), 3.25–3.36 (1H, m), 3.76 (1H, s), 3.80–3.93 (3H, m), 5.00 (1H, brs); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = -5.57, 18.07, 25.81, 28.38, 35.57, 46.35, 62.47, 71.55, 79.24, 156.45; MS (ESI): *m/z* 342.2 (M+H)<sup>+</sup>; HRMS-ESI (*m/z*): [M +H] calcd for C<sub>15</sub>H<sub>33</sub>NNaO<sub>4</sub>Si, 342.2071; found. 342.2074.

# *tert*-Butyl (5*R*)-5-(2-((*tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy)ethyl)-1,2,3-oxathiazolidine-3-carboxylate 2,2-dioxide (112)

To a solution of pyridine (247  $\mu$ L, 3.07 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL) was added SOCl<sub>2</sub> (53  $\mu$ L, 0.74 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 5 min. A solution of **111** (196 mg, 0.61 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL) was added dropwise to the mixture at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 30 min. The mixture was quenched with water and 10% aqueous citic acid, and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extracts were washed with 10% aqueous citic acid, satd NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. RuCl<sub>3</sub> (7.6 mg, 0.037 mmol) and a solution of NaIO<sub>4</sub> (157 mg, 0.74 mmol) in water (8.0 mL) were added to a mixture of the

residue and satd. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in CH<sub>3</sub>CN (8.0 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred 0 °C for 1 h. Additional RuCl<sub>3</sub> (3.8 mg, 0.019 mmol) and a solution of NaIO<sub>4</sub> (64 mg, 0.30 mmol) in water (2.0 mL) were added to the mixture at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 20 min. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10% EtOAc in *n*-hexane) to give **112** (211 mg, 90%) as a colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.07 (6H, s), 0.89 (9H, s), 1.55 (9H, s), 1.95–2.03 (1H, m), 2.09–2.14 (1H, m), 3.74–3.79 (3H, m), 4.10 (1H, dd, *J* = 10.0, 6.0 Hz), 4.99–5.06 (1H, m); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = -5.57, 18.16, 25.81, 27.91, 35.36, 50.73, 58.09, 77.46, 85.23, 148.65; MS (ESI): *m/z* 348.0 (M+H)<sup>+</sup>.

### (4S)-4-(2-hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrolo[1,2-a]pyrazin-1(2H)-one (115)

To a mixture of **112** (101 mg, 0.27 mmol) and methyl pyrrole-2-carboxylate (**103**) (33 mg, 0.32 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (5.0 mL) was added potassium tert-butoxide (33 mg, 0.29 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was quenched with 10% aqueous citric acid and extracted with EtOAc. The extracts were washed with satd NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. To a mixture of the residue in MeOH (2.0 mL) was added 4M HCl in dioxane (2.0 mL) at room temperature and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was evaporated under reduced pressure, the residue was washed with Et<sub>2</sub>O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and Et<sub>3</sub>N (0.22 mL, 1.6 mmol) in MeOH (7.0 mL) was stirred at room temperature for 1.5 h. After stirred at 50 °C overnight, the mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (10% MeOH in EtOAc) to give 115 (36 mg, 75%) as an off-white solid; mp 130–134 <sup>o</sup>C;  $[\alpha]^{27}_{D} = -76.8$  (c 0.59, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 1.81 - 1.94$  (2H, m), 3.35–3.42 (2H, m), 3.51–3.57 (1H, m), 3.72 (1H, dd, *J* = 13.2, 4.4 Hz), 4.34–4.38 (1H, m), 6.11 (1H, dd, *J* = 3.6, 2.4 Hz), 6.75 (1H, dd, J = 4.0, 1.2 Hz), 6.93 (1H, dd, J = 2.8, 1.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta =$ , 36.43, 45.43, 52.47, 59.06, 110.27, 114.84, 123.94, 125.33, 163.38; HRMS-ESI (m/z): [M+Na] calcd for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 203.0791; found, 203.0794.

### (4S)-6,7-dibromo-4-(2-hydroxyethyl)-3,4-dihydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-1(2H)-one (116)

NBS (87 mg, 0.49 mmol) was added to a solution of **115** (44 mg, 0.24 mmol) in DMF (4.0 mL) at -20 °C and the mixture was stirred at the same temperature for 15 min. After stirred at room temperature overnight, the mixture was quenched with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The extracts were washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5% MeOH in EtOAc) to give **116** (72 mg, 87%) as a colorless solid; mp 139–142 °C;  $[\alpha]^{27}_{D}$ =–25.6 (c 0.23, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 1.80–1.87 (1H, m), 1.94–2.02 (1H, m), 3.63–3.69 (3H, m), 3.80 (1H, ddd, *J* = 13.8, 4.4, 0.8 Hz), 4.57–4.60 (1H, m), 6.91 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 34.39, 43.10, 52.34,

59.12, 100.72, 106.89, 115.85, 124.63, 159.72; HRMS-ESI (m/z): [M+Na] calcd for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>, 360.9005; found, 360.8996.

### (S)-(-)-Longamide B (32).

TEMPO (6.1 mg, 0.039 mmol) was added to a mixture of **116** (66 mg, 0.20 mmol), diacetoxyiodobenzene (251 mg, 0.78 mmol) and NaHCO<sub>3</sub> (44 mg, 1.17 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with satd Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, acidified with 10% aqeous citric acid and extracted with EtOAc. The organic layer was extracted with 1M NaOH. The aqueous layer was acidified with 1M HCl and extracted with EtOAc. The extracts were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography over silica gel with CHCl<sub>3</sub>–MeOH–AcOH (80:20:0.5) to give **32** (51 mg, 74%) as an white solid; mp 225–227 °C;  $[\alpha]^{28}_{D}$ =–5.6 (c 0.40, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 2.53 (1H, ddd, *J* = 16.6, 3.2, 1.2 Hz), 2.84 (1H, dd, *J* = 16.8, 11.2 Hz), 3.66 (1H, dd, *J* = 14.0, 0.8 Hz), 3.88 (1H, ddd, *J* = 13.8, 4.4, 1.6 Hz), 4.78–4.81 (1H, m), 6.93 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 36.71, 43.76, 52.14, 101.66, 107.98, 116.59, 126.21, 161.08, 173.45; HRMS-ESI (m/z): [M-H] calcd for C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>79</sup>Br<sup>81</sup>Br, 350.8881; found, 350.8803.

## (4S)-4-(2-Hydroxyethyl)-3,4-dihydropyrazino[1,2-a]indol-1(2H)-one (119).

To a mixture of tert-butyl (5R)-5-(2-((tert-butyl(dimethyl)silyl)oxy)ethyl)-1,2,3-oxathiazolidine -3-carboxylate 2,2-dioxide (112, 82 mg, 0.215 mmol) and ethyl indole-2-carboxylate (117, 49 mg, 0.257 mmol) in MeCN (4.0 mL) was added t-BuOK (27 mg, 0.237 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was quenched with 10% aqueous citric acid and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. A mixture of the residue and 4M HCl in dioxane (2.0 mL) in MeOH (2.0 mL) was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was washed with Et<sub>2</sub>O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and Et<sub>3</sub>N (0.18 mL, 1.29 mmol) in MeOH (7.0 mL) was stirred at 65 °C overnight. The mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (0-10%)MeOH in EtOAc) to give **119** (39 mg, 80%) as an off-white solid; mp 65–71 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$  –13.3 (*c* 0.72, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 1.91–2.03 (2H, m), 3.53–3.69 (3H, m), 3.92 (1H, dd, J = 13.6, 4.8 Hz), 4.87–4.90 (1H, m), 7.10–7.14 (1H, m), 7.18 (1H, s), 7.30–7.34 (1H, m), 7.55 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.66 (1H, d, J = 8.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 34.9, 44.4, 48.0, 59.0, 106.5,$ 110.1, 120.8, 122.8, 124.9, 126.9, 127.6, 136.4, 162.3; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub>: 253.0947; found: 253.0948.

## ((4S)-1-Oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indol-4-yl)acetic acid (120).

TEMPO (2.7 mg, 0.0174 mmol) was added to a mixture of **119** (20 mg, 0.0869 mmol), diacetoxyiodobenzene (112 mg, 0.348 mmol) and NaHCO<sub>3</sub> (44 mg, 0.521 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.0 mL)

at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with satd Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, acidified with 10% aqeous citric acid and extracted with EtOAc. The organic layer was extracted with 1M NaOH. The aqueous layer was acidified with 1M HCl and extracted with EtOAc. The extracts were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography over silica gel with CHCl<sub>3</sub>–MeOH–AcOH (90:10:0–90:10:0.5) to give **120** (12 mg, 57%) as an off-white solid; mp 236.0–237.3 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$ –1.61 (*c* 0.34, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 2.46–2.51 (1H, m) 2.73 (1H, dd, *J* = 16.0, 8.8 Hz), 3.53 (1H, dd, *J* = 13.2, 4.4 Hz), 3.84 (1H, dd, *J* = 13.6, 4.0 Hz), 5.02–5.06 (1H, m), 7.04 (1H, s), 7.08–7.12 (1H, m), 7.27–7.31 (1H, m), 7.54 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 4.8 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 36.2, 43.2, 47.1, 104.8, 110.9, 120.5, 122.1, 124.2, 126.6, 128.7, 135.2, 159.9, 171.7; HRMS-ESI m/z [M – H] calcd for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 243.0775; found: 243.0780.

### (5S)-5-(2-Hydroxyethyl)-6,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-8(5H)-one (121).

To a mixture of *tert*-butyl (5*R*)-5-(2-((*tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy)ethyl)-1,2,3-oxathiazolidine-3carboxylate 2,2-dioxide (**112**, 51 mg, 0.134 mmol) and ethyl imidazole-2-carboxylate (**118**, 22.5 mg, 0.160 mmol) in MeCN (3.0 mL) was added *t*-BuOK (16.5 mg, 0.147 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was quenched with 10% aqueous citric acid and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. A mixture of the residue and 4M HCl in dioxane (1.5 mL) in MeOH (1.5 mL) was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was washed with Et<sub>2</sub>O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and Et<sub>3</sub>N (0.11 mL, 0.804 mmol) in MeOH (6.0 mL) was stirred at 65 °C overnight. The mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (0–20% MeOH in EtOAc) to give **121** (5.3 mg, 22%) as an white solid; mp 164.2–168.3 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$ -48.5 (*c* 0.21, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 1.99–2.10 (1H, m), 3.52–3.59 (1H, m), 3.67–3.72 (1H, m), 3.92 (1H, dd, *J* = 13.6, 4.4 Hz), 4.63–4.91 (1H, m), 7.21 (1H, s), 7.41 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD,)  $\delta$  = 9.2, 36.0, 45.0, 53.1, 77.1, 105.7, 150.7, 160.2; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>: 204.0743; found: 204.0745.

## (4S)-4-Methyl-3,4-dihydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-1(2*H*)-one (123).

To a mixture of **122** (59 mg, 0.249 mmol) and methyl pyrrole-2-carboxylate (**103**, 37 mg, 0.298 mmol) in MeCN (4.0 mL) was added *t*-BuOK (31 mg, 0.274 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was quenched with 10% aqueous citric acid and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. A mixture of the residue and 4M HCl in dioxane (2.0 mL) in MeOH (2.0 mL) was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was washed with Et<sub>2</sub>O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and

Et<sub>3</sub>N (0.208 mL, 1.49 mmol) in MeOH (5.0 mL) was stirred at 50 °C overnight. The mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (80–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **123** (19 mg, 51%) as an off-white solid; mp 172.3–174.7 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$  16.2 (*c* 0.35, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 1.54$  (3H, d, *J* =6.8 Hz), 3.39–3.44 (1H, m), 3.67 (1H, dt, *J* = 12.4, 3.6 Hz), 4.27–4.35 (1H, m), 6.26 (1H, dd, *J* = 4.0, 2.4 Hz), 6.72 (1H, brs), 6.86 (1H, dd, *J* = 2.4, 1.6 Hz), 6.97 (1H, dd, *J* = 3.6, 1.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 17.8$ , 46.9, 49.6, 109.8, 113.9, 121.5, 123.8, 161.5; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>NaO: 173.0685; found: 173.0690.

### (4S)-6,7-Dibromo-4-methyl-3,4-dihydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-1(2H)-one (124).

NBS (27.7 mg, 0.156 mmol) was added to a solution of **123** (11.7 mg, 0.0779 mmol) in DMF (2.0 mL) at -20 °C, and the mixture was stirred at -20 °C for 1 h. After stirred at room temperature for 4 h. The mixture was diluted with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (50–100% EtOAc in *n*-hexane) to give **124** (19 mg, 79%) as an white solid; mp 171.8–175.0 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$ –33.1 (*c* 0.79, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  =1.43 (3H, d, *J* =6.8 Hz), 3.40 (1H, ddd, *J* =13.0, 5.6, 1.2 Hz), 3.95 (1H, dd, *J* = 13.2, 4.4 Hz), 4.45–4.51 (1H, m), 6.72 (1H, brs), 6.82 (1H, brs), 6.99 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 18.5, 45.4, 50.0, 100.6, 106.5, 115.8, 124.4, 159.4; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>8</sub>H<sub>8</sub><sup>79</sup>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO: 328.8896; found: 328.8894.

# *tert*-Butyl (5*S*)-5-(((*tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy)methyl)-1,2,3-oxathiazolidine-3-carboxylate 2,2-dioxide (126).

SOCl<sub>2</sub> (0.046 mL, 0.628 mmol) was added to a solution of pyridine (0.211 mL, 2.62 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7.0 mL) at 0 °C dropwise. A solution of **125** (160 mg, 0.523 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.0 mL) was added to the mixture at 0 °C dropwise. After stirred at 0 °C for 30 min, the mixture was quenched with 10% aqueous citric acid and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extracts were washed with 10% aqueous citric acid, satd NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. A solution of NaIO<sub>4</sub> (134 mg, 0.628 mmol) in water (4.0 mL) was added to a mixture of the residue, RuCl<sub>3</sub> (6.5 mg, 0.0314 mmol) and satd K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.0 mL) in MeCN (4.0 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The mixture was quenched with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–15% EtOAc in *n*-hexane) to give **126** (123 mg, 64%) a colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.093 (6H, s), 0.85 (9H, s), 0.88–0.91 (9H, m), 3.84–3.94 (2H, m), 3.97–4.04 (2H, m), 4.79–5.29 (1H, m); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = –2.97, 18.2, 25.7, 27.9, 61.6, 78.5, 85.7, 148.7.

## (4S)-4-Hydroxymethyl-3,4-dihydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-1(2H)-one (127).

To a mixture of **126** (113 mg, 0.307 mmol) and methyl pyrrole-2-carboxylate (**103**, 46 mg, 0.369 mmol) in MeCN (4.0 mL) was added *t*-BuOK (38 mg, 0.334 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was quenched with 10% aqueous citric acid and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. A mixture of the residue and 4M HCl in dioxane (2.0 mL) in MeOH (2.0 mL) was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was washed with Et<sub>2</sub>O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and Et<sub>3</sub>N (0.256 mL, 1.84 mmol) in MeOH (5.0 mL) was stirred at 50 °C overnight. The mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (3–5% MeOH in EtOAc) to give **127** (16 mg, 31%) as a colorless oil; mp 146.5–152.0 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$ –72.9 (*c* 0.37, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 3.66–3.82 (4H, m), 3.86–3.88 (1H, m), 4.20–4.24 (1H, m), 6.23 (1H, dd, *J* = 4.0, 2.8 Hz), 6.88–6.92 (2H, m), 6.99 (1H, d, *J* = 3.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 41.2, 55.3, 62.1, 109.9, 114.0, 122.9, 123.9, 161.6; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub>: 189.0634; found: 189.0636.

# 2-((4*S*)-6,7-Dibromo-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-yl)-*N*-(2-hydroxyethyl)acet amide (129a).

EDC-HCl (16 mg, 0.0852 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.024 mL, 0.170 mmol) were added to a mixture of Longamide B (**32**, 20 mg, 0.0568 mmol) 2-aminoethanol (**128a**, 6.8 µL, 0.114 mmol) and HOBt (12 mg, 0.0852 mmol) in DMF (2.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. After concentration, the residue was purified by flash column chromatography over silica gel with CHCl<sub>3</sub>–MeOH–AcOH (100:0:0–80:20:1) to give **129a** (7.1 mg, 32%) as a white solid; mp 159.0–164.1 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$  2.0 (*c* 0.29, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 1.94–2.00 (4H, m), 2.51 (1H, dd, *J* = 15.2, 4.0 Hz), 2.74 (1H, dd, *J* = 15.2, 10 Hz), 3.56–3.60 (3H, m), 3.85 (1H, dd, *J* = 14.0, 3.6 Hz), 6.92 (1H, s), 7.37–7.44 (1H, m), 7.74 (1H, dd, *J* = 34.4, 8.4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD,)  $\delta$  = 38.2, 43.0, 61.4, 101.6, 108.1, 112.2, 116.7, 126.2, 155.2, 161.0, 171.4; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>11</sub>H<sub>13</sub><sup>81</sup>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>: 419.9165; found: 419.9175.

# *tert*-Butyl (2-((((4*S*)-6,7-dibromo-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-yl)acetyl) amino)ethyl)carbamate (129b).

EDC-HCl (16 mg, 0.0852 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.024 mL, 0.170 mmol) were added to a mixture of Longamide B (**32**, 20 mg, 0.0568 mmol), *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,2-diaminoethane (**128b**, 18 µL, 0.114 mmol) and HOBt (12 mg, 0.0852 mmol) in DMF (2.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–10% MeOH in EtOAc) to give **129b** (17 mg, 61%) as a white solid; mp 178.8–182.0 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$  6.55 (*c* 0.47, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1.43 (9H, s), 1.94–2.05 (2H, m), 2.48–2.70 (2H, m), 3.50–3.67 (2H, m),

3.84–3.87 (1H, m), 4.81–4.83 (1H, m), 5.18 (1H, brs), 6.61 (1H, brs), 6.95 (1H, s), 7.20 (1H, brs), 7.27 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  =14.7, 26.6, 28.8, 40.6, 43.9, 52.5, 58.4, 101.2, 116.7, 126.2, 142.5, 161.0, 171.4; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub><sup>79</sup>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>4</sub>: 514.9900; found: 514.9898.

# 2-((4*S*)-6,7-dibromo-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-yl)-*N*-phenylacetamide (129c).

EDC-HCl (16 mg, 0.0852 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.024 mL, 0.170 mmol) were added to a mixture of Longamide B (**32**, 20 mg, 0.0568 mmol), aniline (**128c**, 10 µL, 0.114 mmol) and HOBt (12 mg, 0.0852 mmol) in DMF (2.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–20% MeOH in EtOAc) to give **129c** (20 mg, 80%) as a white solid; mp 215.9–218.1 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$  8.77 (*c* 0.84, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 2.67 (1H, dd, *J* = 15.2, 4.4 Hz), 2.85–2.98 (1H, m), 3.64 (1H, d, *J* = 14.0 Hz), 3.90 (1H, dd, *J* = 14.0, 4.0 Hz), 4.92–4.94 (1H, m), 6.95 (1H, s), 7.09 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.30 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.52 (1H, dd, *J* = 8.8, 1.2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 38.9, 44.1, 52.5, 101.7, 108.2, 116.7, 121.2, 125.4, 126.3, 129.8, 139.5, 161.1, 169.4; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub><sup>79</sup>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>: 447.9267; found: 447.9266.

# *N*-(2-aminoethyl)-2-((4*S*)-6,7-dibromo-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-yl)aceta mide hydrochloride (130).

A mixture of **129b** (9.6 mg, 0.0194 mmol) and 4M HCl in dioxane (1.0 mL) in MeOH (0.50 mL) was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was evaporated under reduced pressure and recrystallized from MeOH–Et<sub>2</sub>O to give **130** (6.4 mg, 76%) as a white solid; mp 239.9–244.4 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$  6.40 (*c* 0.30, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 2.55 (1H, dd, *J* = 15.2, 4.4 Hz), 2.76 (1H, dd, *J* = 14.8, 9.6 Hz), 3.04 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.29–3.34 (1H, m), 3.41–3.50 (2H, m), 3.62 (1H, d, *J* = 14.0 Hz), 3.87 (1H, dd, *J* = 13.6, 4.0 Hz), 6.94 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 38.2, 40.8, 44.1, 52.3, 80.1, 99.4, 101.7, 108.1, 116.7, 126.3, 161.0. HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub><sup>79</sup>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>2</sub>: 414.9376; found: 414.9377.

### Methyl ((4S)-6,7-dibromo-1-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-yl)acetate (131).

Lawesson's reagent (21 mg, 0.0525 mmol) was added to a solution of Longamide B methyl ester (**33**, 16 mg, 0.0437 mmol) in THF (2.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with satd NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **131** (11.6 mg, 69%) as a pale yellow solid; mp 87.2–95.0 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$ –17.2 (*c* 0.060, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2.56–2.62 (1H, m), 2.88 (1H, dd, *J* = 17.2, 11.6 Hz), 3.75–3.79 (4H, m), 3.88–3.93 (1H, m), 4.79–4.83 (1H, m), 7.31 (1H, s), 7.69 (1H, brs); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 35.2, 45.0, 50.0, 52.3, 102.5, 108.7, 120.7, 129.8, 170.0, 182.1; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub>S: 406.8705; found: 406.8698.

## ((4S)-6,7-Dibromo-1-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-yl)acetic acid (132).

2M NaOH (1.0 mL) was added to a solution of **131** (9.3 mg, 0.0243 mmol) in THF/MeOH (1:1, 1.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature 30 min. The mixture was acidified with 1M HCl at 0 °C and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography over silica gel with CHCl<sub>3</sub>–MeOH–AcOH (160:40:1) to give **132** (9.0 mg, quant.) as a yellow solid; mp 115.3–120.3 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$ –56.2 (*c* 0.29, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 2.50–2.54 (1H, m), 2.74 (1H, dd, *J* = 16.8, 11.2 Hz), 3.29–3.34 (1H, m), 3.70–3.84 (2H, m), 7.15 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 36.3, 45.7, 51.5, 102.4, 109.3, 120.4, 131.5, 172.8, 183.1; HRMS-ESI m/z [M - H] calcd for C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 364.8600; found: 364.8597.

# 2-((4*S*)-6,7-Dibromo-1-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-yl)-*N*-phenylacetamide (133).

EDC-HCl (4.8 mg, 0.0249 mmol) and Et<sub>3</sub>N (7.0 µL, 0.0498 mmol) were added to a mixture of **132** (6.1 mg, 0.0166 mmol), aniline (3 µL, 0.0331 mmol) and HOBt (3.4 mg, 0.0249 mmol) in DMF (2.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **133** (5.5 mg, 75%) as a pale yellow solid; mp 179.7–187.3 °C;  $[\alpha]_{25}^{D}$  –52.6 (*c* 0.22, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2.64 (1H, dd, *J* = 16.0, 3.6 Hz), 2.85 (1H, dd, *J* = 16.0, 11.2 Hz), 3.80–3.93 (2H, m), 4.98–5.01 (1H, m), 7.16 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.27–7.41 (4H, m), 7.49–7.54 (3H, m); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 37.9, 45.2, 50.4, 55.7, 75.7, 102.5, 109.0, 120.0, 120.8, 125.1, 129.2, 166.3, 182.1; HRMS-ESI m/z [M + Na] calcd for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaOS: 463.9038; found: 463.9049.

## Inhibition Assays with IDO.

The inhibition assays were performed in a 96 well microtiter plate as described by Littlejohn et al.<sup>102</sup> with a small modification. Briefly, the reaction mixture (100  $\mu$ L) contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 20 mM ascorbic acid (neutralized with 1M NaOH solution), 175  $\mu$ g/mL catalase, 10  $\mu$ M methylene blue, 200  $\mu$ M L-Trp and purified recombinant IDO1 optimized based on its activity. The reaction mixture was added to 1mM inhibitor. The reaction was carried out at 37 °C for 60 min and stopped by adding 20  $\mu$ L of 30% (w/v) trichloroacetic acid. The plate was heated at 65 °C for 20 min to convert formylkynurenine to kynurenine and then was spun (4000 rpm, 4 °C for 25 min).

Finally, 80  $\mu$ L of supernatant from each well was transferred to a new 96 well plate and mixed with 80  $\mu$ L of 2% (w/v) p-(dimethylamino)benzaldehyde in acetic acid. The yellow color generated from the reaction with kynurenine was measured at 490 nm using Infinite 200 PRO plate reader (TECAN).

## **Docking Calculations.**

Docking was performed using the crystal structure of IDO with 4-phenyl-1-imidazole (pdb code 2D0T). The 2-[N-cyclohexylamino]ethanesulfonic acid and 4-phenyl-1-imidazole ligands were removed from the active site prior to docking. Docking calculations performed with Longamide B and compound **132** were carried out using Schrödinger Suite 2016-1. Glide (version 7.0) and Prime (version 4.3) were used with default parameters to predict the binding mode of Longamide B.After obtained the docking result of Longamide B, scaffold oxygen atom was transformed to sulfur atom. Minimization process of the residues within 10 Å around the ligand was carried out to predict the binding mode of compound **132**. The force field of the minimization process is OPLS3.

- 1) Harwood, L. M.; Brickwood, A. C.; Morrison, V.; Robertson, J.; Swallow, S. J. Heterocyclic. Chem., **1999**, *36*, 1391–1408.
- Kaushik, N. K.; Kaushik, N.; Attri, P.; Kumar, N.; Kim, C. H.; Verma, A. K.; Choi, E. H. Molecules 2013, 18, 6620–6662.
- 3) Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. J. Med. Chem. 2014, 57, 10257–10274.
- 4) Chen, Y.-L.; Fang, K.-C.; Sheu, J.-Y.; Hsu, S.-L.; Tzeng, C.-C. J. Med. Chem. 2001, 44, 2374–2377.
- 5) Kerms, R. J.; Rybak, M. J.; Kaats, G. W.; Vaka, F.; Cha, R.; Grucz, R. G.; Diwadkar, V. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2109–2112.
- 6) Phillips, O. A.; Udo, E. E.; Ali, A. A. M.; Samuel, S. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4113–4123.
- Ryckebusch, A.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Mouray, E.; Grellier, P.; Sergheraert, C.; Melnyk, P. Bioorg. Med Chem. Lett. 2005, 15, 297–302.
- 8) Auffret, G.; Labaied, M.; Frappier, F.; Rasoanaivo, P.; Grelliew, P.; Lewin, G. *Bioorg. Med Chem. Lett.* **2007**, *17*, 959–963.
- 9) Cunico, W.; Gomes, C. R. B.; Moreth, M.; Manhanini, D. P.; Figueiredo, I. H.; Penido, C.; Henriques, M. G. M. O.; Varotti, F. P.; Krettli, A. U. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1363–1368.
- Schindler, T.; Bornmann, W.; Pellicena, P.; Miller, W. T.; Clarkson, B.; Kuriyan, J. Science 2000, 289, 1938–1942.
- 11) Hu, W.-X.; Zhou, W.; Xia, C.-N.; Wen, X. Bioorg. Med Chem. Lett. 2006, 16, 2213–2218.
- 12) Huang, W.; Liu, M.-Z.; Li, Y.; Tan, Y.; Yang, G.-F. Bioorg. Med Chem. 2007, 15, 5191–5197.
- 13) Rips, R.; Boschi, G.; Trinh, M. C.; Cavier, R. J. Med. Chem. 1973, 16, 725-728.
- 14) Sloan, J. E. N.; Kingsbury, P. A.; Jolly, D. W. J. Pharm. Pharmacol. 1954, 6, 718–724.
- 15) Shauiquzzaman, M.; Verma, G.; Marella, A.; Akhter, M.; Akhtar, W.; Khan, M. F.; Tasneem, S.; Alam, M. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *102*, 487–529.
- 16) Martin Jr, W. B.; Martell, A. E. J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 4301-4302.
- 17) Nakajima, K. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1961, 34, 655–659.
- 18) Lunn, G. J. Org. Chem. 1987, 52, 1043–1046.
- 19) Cochran, B. M.; Michael, F. E. Org. Lett. 2008, 10, 329-332
- 20) Hunag, J.; Xu, W.; Xie, H.; Li, S. J. Org. Chem. 2012, 77, 7506-7511
- 21) Bower, J. F.; Rujirawanich, J.; Gallagher, T. Org. Biomol. Chem. 2010, 8, 1505–1519.
- 22) Melendez, R. E.; Lubell, W. D. Tetrahedron 2003, 59, 2581-2616.
- 23) Baldwin, J. E.; Spivey, A. C.; Schofield, C. J. Tetrahedron Asymmetry 1990, 1, 881–884.
- 24) VanDort, M. E.; Jung, Y.-W.; Sherman, P. S.; Kilbourn, M. R.; Wieland, D. M. J. Med. Chem. 1995, 38, 810–815.
- 25) Cohen, S. B.; Halcomb, R. L. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 2534-2543.
- 26) Kuyl-Yeheskiely, E.; Lodder, M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3013–3016.
- 27) Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Nalbandian, A. Z.; Longbottom, D. A. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 6234–6235.
- 28) Zalatan, D. N.; Du Bois, J. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 9220-9221.
- 29) Wang, Y. Q.; Yu, C. B.; Wang, D. W.; Wang, X. B.; Zhou, Y. Q. Org. Lett. 2008, 10, 2071–2074.
- 30) Bower, J. F.; Svenda, J.; Williams, A. J.; Charmant, J. P. H.; Lawrence, R. M.; Szeto, P.; Gallagher, T. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4727–4730.
- 31) Bower, J. F.; Chakthong, S.; Svenda, J.; Williams, A. J.; Lawrence, R. M.; Szeto, P.; Gallagher, T. *Org. Biomol. Chem.* 2006, *4*, 1868–1877.
- 32) Bordwell, F. G.; Fried, H. E. J. Org. Chem. 1981, 46, 4327-4331.
- 33) Williams, A. J.; Chakthong, S.; Gray, D.; Lawrence, R. M.; Gallagher, T. Org. Lett. 2003, 5, 811–814.
- 34) Gilmet, J.; Sullivan, B.; Hudlicky, T. Tetrahedron 2009, 65, 212–220.
- 35) Bower, J. F.; Szeto, P.; Gallagher, T. Chem. Commun. 2005, 46, 5793–5795.
- Bower, J. F.;Riis-Johannessen, T.; Szeto, P.; Whitehead, A. J.; Gallagher, T. Chem. Commun. 2007, 7, 728–730.
- 37) Boyer, S. J.; Burke, J.; Guo, X.; Kirrane, T. M.; Snow, R. J.; Zhang, Y.; Sarko, C.; Soleymanzadeh,
  L.; Swinamer, A.; Westbrook, J.; DiCapua, F.; Padyana, A.; Kugler, S.; O'Neill, M. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 733–737.
- 38) Shiozaki, M.; Maeda, K.; Miura, T.; Kotoku, M.; Yamasaki, T.; Matsuda, I.; Aoki, K.; Yasue, K.;Imai, H.; Ubukata, M.; Suma, A.; Yokota, M.; Hotta, T.; Tanaka, M.; Hase, Y.; Haas, J.; Fryer, A. M.; Laird, E. R.; Littmann, N. M.; Andrew, S. W.; Josey, J. A.; Mimura, T.; Shinozaki, Y.; Yushiuchi, H.; Inaba, T. J. Med. Chem. 2011, 54, 2839–2863.
- Richter, H. G. F.; Freichel, C.; Huwyler, J.; Nakagawa, T.; Nettekoven, M.; Plancher, J.-M.; Raab, S.; Roche, O.; Schuler, F.; Taylor, S.; Ullmer, C.; Weigand, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 5713–5717.
- 40) Salvesen, G. S.; Duckett, C. S. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002, 3, 401-410.
- 41) Gyrd-Hansen, M.; Meier, P. Nat. Rev. Cancer 2010, 10, 561-574.
- 42) Mannhold, R.; Fulda, S.; Carosati, E. Drug Discovery Today 2010, 15, 210–219.
- 43) Tamm, I.; Kornblau, S. M.; Segall, H.; Krajewski, S.; Welsh, K.; Kitada, S.; Scudiero, D. A.; Tudor, G.; Qui, Y. H.; Monks, A.; Andreeff, M.; Reed, J. C. *Clin. Cancer. Res.* 2000, *6*, 1796–1803.
- 44) Dineen, S. P.; Roland, C. L.; Greer, R.; Carbon, J. G.; Toombs, J. E.; Gupta, P.; Bardeesy, N.; Sun, H.; Williams, N.; Minna, J. D.; Brekken, R. A. *Cancer Res.* 2010, *70*, 2852–2861.
- 45) Holcik, M.; Korneluk, R. G. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2001, 2, 550-556.
- 46) Deveraux, Q. L.; Takahashi, R.; Salvesen, G. S.; Reed, J. C. Nature 1997, 388, 300-304.
- 47) Rothe, M.; Pan, M.-G.; Henzel, W. J.; Ayres, T. M.; Goeddel, D. V. Cell 1995, 83, 1243–1252.

- 48) Srinivasula, S. M.; Hegde, R.; Saleh, A.; Datta, P.; Shiozaki, E.; Chai, J.; Lee, R.-A.; Robbins, P. D.; Fernandes-Alnemri, T.; Shi, Y.; Alnemri, E. S. *Nature* 2001, *410*, 112–116.
- 49) Liu, Z.; Sun, C.; Olejniczak, E. T.; Meadows, R. P.; Betz, S. F.; Oost, T.; Herrmann, J.; Wu, J. C.; Fesik, S. W. *Nature* **2000**, *408*, 1004–1008.
- 50) Wu, G.; Chai, J.; Suber, T. L.; Wu, J.-W.; Du, C.; Wang, X.; Shi, Y. *Nature* **2000**, *408*, 1008–1012.
- 51) Sun, H.; Nikolovska-Coleska, Z.; Yang, C.-Y.; Qian, D.; Lu, J.; Qiu, S.; Bai, L.; Peng, Y.; Cai, Q.; Wang, S. Acc. Chem. Res. **2008**, *41*, 1264–1277.
- 52) Wong, H.; Gould, S. E.; Budha, N.; Darbonne, W. C.; Kadel III, E. E., La, H.; Alicke, B.; Halladay, J. S.; Erickson, R.; Portera, C.; Tolcher, A. W.; Infante, J. R.; Mamounas, M.; Flygare, J. A.; Hop, C. E. C. A.; Fairbrother, W. J. *Drug Metab. Dispos.* 2013, *41*, 2104–2113.
- 53) Eckhardt, S. G.; Gallant, G.; Sikic, B. I.; Camidge, D. R.; Burris III, H. A.; Wakelee, H. A.; Messersmith, W. A.; Jones, S. F.; Colevas, A. D.; Infante, J. R. J. Clin. Oncol. 2010, 28, 15s (suppl; abstr 2580).
- 54) Klepler, C.; Chunduru, S.; Halloran, B. M.; He, X.; Xiao, M.; Vultur, A.; Villanueva, J.;
  Mithsuchi, Y.; Neiman, M. E.; Benetatos, C.; Nathanson, L. K.; Amaravadi, K. R.; Pehamberger, H.; Mckinlay, M.; Herlyn, M. *Clin. Cancer Res.* 2013, *19*, 1784–1794.
- 55) Infante, J. R.; Dees, E. C.; Olszansly, A. J.; Dhuria, S. V.; Sen, S.; Cameron, S.; Cohen, R. B. J. *Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 3103–3110.
- 56) Cai, Q.; Sun, H.; Peng, Y.; Lu, J.; Nikolovska-Coleska, Z.; McEachern, D.; Liu, L.; Qiu, S.; Yang, C.-Y.; Miller, R.; Yi, H.; Zhang, T.; Sun, D.; Kang, S.; Guo, M.; Leopold, L.; Yang, D.; Wang, S. J. *Med. Chem.* **2011**, *54*, 2714–2726.
- 57) Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O. J. Nat. Prod. 1998, 61, 122–125.
- 58) Umeyama, A.; Ito, S.; Yuasa, E.; Arihara, S.; Yamada, T. J. Nat. Prod. 1998, 61, 1433–1434.
- 59) Mancini, I.; Guella, G.; Amade, P.; Roussakis, C.; Pietra, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6271–6274.
- 60) Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O. Tetrahedron Lett. 2000, 41, 9917–9922.
- 61) Cheng, Y.; Guillemin, G. Int. J. Tryptophan. Res. 2009, 2, 1–19.
- 62) Takikawa, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 12–19.
- 63) Mellor, A. L.; Munn, D. H. Nat. Rev. Immunol. 2004, 4, 762–774.
- 64) Chen, W. Nat. Immunol. 2011, 12, 809-811.
- 65) Mbongue, J. C.; Nicholas, D. A.; Torrez, T. W.; Kim, N.-S.; Firek, A. F.; Langridge, W. H. R. *vaccines* **2015**, *3*, 703–729.
- 66) Munn D. H.; Zhou, M.; Attwood, J. T.; Bondarev, I.; Conway, S. J.; Marshall, B.; Brown, C.; Mellor, A. L. Science **1998**, 281, 1191–1193.
- 67) Liu, H.; Liu, L.; Liu, K.; Bizargity, P.; Hancock, W. W.; Visner, G. A. J. Immunol. 2009, 183, 1022–1031.
- 68) Fallarino, F.; Grohmann, U.; Vacca, C.; Bianchi, R.; Orabona, C.; Spreca, A.; Fioretti, M. C.;

Puccetti, P. Cell Death and Differentiation 2002, 9, 1069–1077.

- 69) Vécsei, L.; Szalárdy, L.; Fülöp, F.; Toldi, J. Nat. Rev. Drug Discov. 2013, 12, 64-82.
- 70) Taylor, M. W.; Feng, G. FASEB J. 1991, 5, 2516–2522.
- 71) Wichers, M. C.; Koek, G. H.; Robaeys, G.; Verkerk, R.; Scharpe, S.; Maes, M. *Mol. Psychiatr.* 2005, 10, 538–544.
- 72) Shirey, K. A.; Jung, J.-Y.; Maeder, G. S.; Carlin. J. M. J. Interf. Cytok. Res. 2006, 26, 53-62.
- 73) Brandacher, G.; Perathoner, A.; Ladurner, R.; Schneeberger, S.; Obrist, P.; Winkler, C.; Werner, E.
  R.; Werner-Felmayer, G.; Weiss, H. G.; Göbel, G.; Margreiter, R.; Königsrainer, A.; Fuchs, D.;
  Amberger, A. *Clin. Cancer Res.* 2006, *12*, 1144–1151.
- 74) Ferdinande, L.; Decaestecker, C.; Verset, L.; Mathieu, A.; Lopez, X. M.; Negulescu, A.-M.;
  Maerken, T. V.; Salmon, I.; Cuvelier, C. A.; Demetter, P. *Brit. J. Cancer* 2012, *106*, 141–147.
- 75) Liu, H.; Shen, Z.; Wang, Z.; Wang, X.; Zhang, H.; Qin, J.; Qin, X.; Xu, J.; Sun, Y. *Sci. rep.* **2016**, *6*, srep 21319.
- 76) Cady, S. G.; Sono, M. Arch. Biochem. Biophys. 1991, 291, 326–333.
- 77) Kumar, S.; Jaller, D.; Patel, B.; LaLonde, J. M.; DuHadaway, J. B.; Malachowski, W. P.;
   Prendergast, G. C.; Muller, A. J. J. Med. Chem. 2008, 51, 4968–4977.
- 78) Röhrig, U. F.; Majjigapu, S. R.; Grosdidier, A.; Bron, S.; Stroobant, V.; Pilotte, L.; Colau, D.;
  Vogel, P.; Van den Eynde, B. J.; Zoete, V.; Michielin, O. *J. Med. Chem.* 2010, *53*, 1172–1189.
- 79) Meininger, D.; Zalameda, L.; Liu, Y.; Stepan, L. P.; Borges, L.; McCarter, J. D.; Sutherland, C. L. Biochim. Biophys. Acta 2011, 1814, 1947–1954.
- 80) Yue, E. W.; Douty, B.; Wayland, B.; Bower, M.; Liu, X.; Leffet, L.; Wang, Q.; Bowman, K. J.;
  Hansbury, M. J.; Liu, C.; Wei, M.; Li, Y.; Wynn, R.; Burn, T. C.; Koblish, H. K.; Fridman, J. S.;
  Metcalf, B.; Scherle, P. A.; Combs, A. P. J. Med. Chem. 2009, 52, 7364–7367.
- 81) Tojo, S.; Kohno, T.; Tanaka, T.; Kamioka, S.; Ota, Y.; Ishii, T.; Kamimoto, K.; Asano, S.; Isobe, Y. ACS Med. Chem. Lett. 2014, 5, 1119–1123.
- 82) Peng, Y.-H.; Ueng, S.-H.; Tseng, C.-T.; Hung, M.-S.; Song, J.-S.; Wu, J.-S.; Liao, F.-Y.; Fan, Y.-S.;
  Wu, M.-H.; Hsiao, W.-C.; Hsueh, C.-C.; Lin, S.-Y.; Cheng, C.-Y.; Tu, C.-H.; Lee, L.-C.; Cheng,
  M.-F.; Shia, K.-S.; Shih, C.; Wu, S.-Y. J. Med. Chem. 2016, 59, 282–293.
- 83) Hashimoto, K.; Saito, B.; Miyamoto, N.; Oguro, Y.; Tomita, D.; Shiokawa, Z.; Asano, M.; Kakei, H.; Taya, N.; Kawasaki, M.; Sumi, H.; Yabuki, M.; Iwai, K.; Yoshida, S.; Yoshimatsu, M.; Aoyama, K.; Kosugi, Y.; Kojima, T.; Morishita, N.; Dougan, D. R.; Snell, G. P.; Imamura, S.; Ishikawa, T. J. *Med. Chem.* 2013, *56*, 1228–1246
- 84) Sumi, H.; Yabuki, M.; Iwai, K.; Morimoto, M.; Hibino, R.; Inazuka, M.; Hashimoto, K.; Kosugi, Y.; Aoyama, K.; Yamamoto, S.; Yoshimatsu, M.; Yamasaki, H.; Tozawa, R.; Ishikawa, T.; Yoshida, S. *Mol. Cancer Ther.* 2013, *12*, 230–240
- 85) Michael, M. G. Cancer Res. 1993, 53, 747-754
- 86) Seeling, A. Eur. J. Biochem. 1998, 251, 252-261
- 87) Ding, K.; Chen, J.; Ji, M.; Wu, X.; Varady, J.; Yang, C.-Y.; Lu, Y.; Deschamps, J. R.; Levant, B.;

Wang, S. J. Med. Chem. 2005, 48, 3171–3181.

- 88) El-Hamouly, W.; Pica-Mattoccia, L.; Cioli, D.; Schwartz, H. M.; Archer, S. J. Med. Chem. 1988, 31, 1629–1631.
- 89) Kim, B. M.; So, S. M. Tetrahedron Lett. 1999, 40, 7687–7690.
- 90) Daniel, J. S.; Ann, E. A.; Jolie, A. B.; Michael, L. D.; Cathy, S. H.; Jefferson, R. M.; John, M. M.; Jack, W. R.; Robert, M. S.; Mark, S. S.; Suzane, L. U.; Barbara, G. U.; Robert, T. V.; James, H. W.; Virginia, L. W.; Joseph, A. J. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2843–2857.
- 91) Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C. J. Am. Chem. Soc. 1964, 86, 5175-5180.
- 92) Patel, J.; Pelloux-Léon, N.; Minassian, F.; Vallée, Y. J. Org. Chem. 2005, 70, 9081–9084.
- 93) Trost, B. M., Osipov, M., Dong, G. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 15800-15807.
- 94) Trost, B. M.; Dong, G. Org. Lett. 2007, 9, 2357-2359.
- 95) Cheng, G.; Wang, X.; Bao, H.; Cheng, C.; Liu, N.; Hu, Y. Org. Lett. 2012, 14, 1062–1065.
- 96) Adhikary, N. D.; Kwon, S.; Chung, W.-J.; Koo, S. J. Org. Chem. 2015, 80, 7693–7701.
- 97) Banwell, M. G.; Bray, A. M.; Willis, A. C.; Wong, D. J. New J. Chem. 1999, 23, 687-690.
- 98) Sugimoto, H.; Oda, S.; Otsuki, T.; Hino, T.; Yoshida, T.; Shiro, Y. Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103, 2611–2616.
- 99) Kiley, P. J.; Beinert, H. Curr. Opin. Microbiol. 2003, 6, 181-185.
- 100) Rees, D. C.; Howard, J. B. Science, 2003, 300, 929-931.
- 101) Wolf, E.; Kennedy, I. A.; Himmeldirk, K.; Spenser, I. D. Can. J. Chem. 1997, 75, 942-948.
- 102) Littlejohn, T. K.; Takikawa, O.; Skylas, D.; Jamie, J. F.; Walker, M. J.; Truscott, R. J. W. *Protein Expression Purif.* **2000**, *19*, 22–29.
- 103) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shaw, D. E.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Francis, P.; Shenkin, P. S. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1739–1749.
- 104) Sugimoto, H.; Hirabayashi, H.; Kimura, Y.; Furuta, A.; Amano, N.; Moriwaki, T. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, *39*, 8–14.
- 105) Takeuchi, T.; Yoshitomi, S.; Higuchi, T.; Ikemoto, K.; Niwa, S.; Ebihara, T.; Katoh, M.; Yokoi, T.; Asahi, S. *Pharm. Res.* 2006, *23*, 1460–1472.
- 106) Otwinowski, Z.; Minor, W. Methods Enzymol. 1997, 276, 307-326.
- 107) Vagin, A.; Teplyakov, A. J. Appl. Cryst. 1997, 30, 1022-1025.
- 108) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. J. Appl. Cryst. 2007, 40, 658–674.
- 109) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Acta Crystallogr. Sect. D 1997, 53, 240-255.
- 110) McRee, D. E. J. Struct. Biol. 1999, 125, 156-165.
- 111) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Acta Crystallogr. Sect. D 2010, 66, 486–501.

## 謝辞

本論文の執筆に際し、大阪大学大学院理学研究科 深瀬浩一教授、慶應義塾大学大学院理工学 研究科 藤本ゆかり教授には終始懇篤なご指導、ご高配を賜りました。ここに厚くお礼申し上げ ます。

第二章、第三章の longamide 類に関する研究の遂行にあたり、日々有益な御助言、ご指導を賜 りました慶應義塾大学院理工学研究科 井貫晋輔助教に深く感謝致します。

本論文の審査をして頂き、有益なるご教示、ご助言を賜りました大阪大学大学院理学研究科 加藤修雄教授、村田道雄教授に深謝致します。

Longamide B と IDO1 の分子モデリングに関して有益なご助言とご援助頂きましたシュレーティンガー株式会社 吉留大輔氏に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて下さいました武田薬品工業株式会社 元医薬研究本部長 大川滋紀博士 に厚くお礼申し上げます。

第一章の IAP 阻害剤研究は終始、元癌創薬ユニットリサーチマネージャー 石川智康博士の指 導のもとに遂行されたものであり、研究遂行および論文作成にあたり熱心なご指導を賜りました。 心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言とご指導を頂きました元炎症創薬ユニットリサーチ マネージャー 神山圭司博士、化学研究所所長 一川隆史博士に深謝申し上げます。

IAP 阻害剤研究の共同研究者であり、実験遂行および論文作成に際して有益なご助言と多大なご協力を頂きました橋本健太郎博士、斎藤文内博士、宮本直樹氏、大黒裕哉博士、冨田大介博士、 浅野壮輝博士、筧広行博士、田家直博氏、川崎昌紀博士、今村真一博士に深く感謝致します。

生物試験を担当して頂きました、角紘幸氏、矢吹仁人博士、岩井謙一氏、吉田聖氏、吉松美恵 氏に深謝致します。薬物動態試験を担当して頂きました、青山和誠氏、小杉洋平氏、出堀泰之氏、 濱田輝基氏に深く感謝致します。物性試験を担当して頂きました、小島隆史氏に深謝致します。 結晶構造解析を担当して頂きました森下奈央氏、Douglas R. Dougan 氏、Gyorgy P. Snell 氏に深く 感謝致します。

## 主論文リスト

- <u>Shiokawa, Z.</u>; Hashimoto, K.; Saito, B.; Oguro, Y.; Sumi, H.; Yabuki, M.; Yoshimatsu, M.; Kosugi, Y.; Debori, Y.; Morishita, N.; Dougan, R. D.; Snell, P. G.; Yoshida, S.; Ishikawa, T. Design, synthesis, and biological activities of novel hexahydropyrazino[1,2-*a*]indole derivatives as potent inhibitors of apoptosis (IAP) proteins antagonists with improved membrane permeability across MDR1 expressing cells. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, *21*, 7938–7954.
- <u>Shiokawa, Z.</u>; Inuki, S.; Fukase, K.; Fujimoto, Y. Efficient Synthesis of (–)-Hanishin, (–)-Longamide B, and (–)-Longamide B Methyl Ester via Piperazine Formation with 1,2-Cyclic Sulfamidates. *Synlett* 2016, 27, 616–620.
- <u>Shiokawa, Z.</u>; Yoshidome, D.; Fukase, K.; Inuki, S.; Fujimoto, Y. Discovery of Novel Scaffold as Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Based on Pyrrolopiperazinone Alkaloid, Longamide B.

## 参考論文リスト

- Ohashi, T.; Tanaka, Y.; <u>Shiokawa, Z.</u>; Banno, H.; Tanaka, T.; Shibata, S.; Satoh, Y.; Yamakawa, H.; Yamamoto, Y.; Hattori, H.; Kondo, S.; Miyamoto, M.; Tojo, H.; Baba, A.; Sasaki, S. Synthesis and evaluation of hedgehog signaling inhibitor with novel core system. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, *23*, 4777–4791.
- Asano, M.; Hashimoto, K.; Saito, B.; <u>Shiokawa, Z.</u>; Sumi, H.; Yabuki, M.; Yoshimatsu, M.; Aoyama, K.; Hamada, T.; Morishita, N.; Dougan, D. R.; Mol, C. D.; Yoshida, S.; Ishikawa, T. Design, stereoselective synthesis, and biological evaluation of novel tri-cyclic compounds as inhibitor of apoptosis proteins (IAP) antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5725–5737.
- Hashimoto, K.; Saito, B.; Miyamoto, N.; Oguro, Y.; Tomita, D.; <u>Shiokawa, Z.</u>; Asano, M.; Kakei, H.; Taya, N.; Kawasaki, M.; Sumi, H.; Yabuki, M.; Iwai, K.; Yoshida, S.; Yoshimatsu, M.; Aoyama, K.; Kosugi, Y.; Kojima, T.; Morishita, N.; Dougan, D. R.; Snell, G. P.; Imamura, S.; Ishikawa, T. Design and Synthesis of Potent Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins Antagonists Bearing an Octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine Scaffold as a Novel Proline Mimetic. *J. Med. Chem.* 2013, *56*, 1228-1246.
- 4) Ohashi, T.; Oguro, Y.; Tanaka, T.; <u>Shiokawa, Z.</u>; Tanaka, Y.; Shibata, S.; Sato, Y.; Yamakawa, H.; Hattori, H.; Yamamoto, Y.; Kondo, S.; Miyamoto, M.; Nishihara, M.; Ishimura, Y.; Tojo, H.; Baba, A.; Sasaki, S. Discovery of the investigational drug TAK-441, a pyrrolo[3,2-*c*]pyridine derivative, as a highly potent and orally active hedgehog signaling inhibitor: modification of the core skeleton for improved solubility. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5507–5517.
- Ohashi, T.; Oguro, Y.; Tanaka, T.; <u>Shiokawa, Z.</u>; Shibata, S.; Sato, Y.; Yamakawa, H.; Hattori, H.; Yamamoto, Y.; Kondo, S.; Miyamoto, M.; Tojo, H.; Baba, A.; Sasaki, S. Discovery of pyrrolo[3,2-*c*]quinoline-4-one derivatives as novel hedgehog signaling inhibitors. *Bioorg. Med.*

Chem. 2012, 20, 5496–5506.

- 6) Bongat, A. F. G.; Saksena, R.; Adamo, R.; Fujimoto, Y.; <u>Shiokawa, Z.</u>; Peterson, D. C.; Fukase, K.; Vann, W. F.; Kovac, P. Multimeric bivalent immunogens from recombinant tetanus toxin HC fragment, synthetic hexasaccharides, and a glycopeptide adjuvant. *Glycoconjugate J.* **2010**, *27*, 69-77.
- Fujimoto, Y.; Inamura, S.; Kawasaki, A.; <u>Shiokawa, Z.</u>; Shimoyama, A.; Hashimoto, T.; Kusumoto, S.; Fukase, K. Chemicals synthess of peptidoglycan fragments for elucidation of the immunostimulating mechanism. *J. Endotoxin. Res.* **2007**, *13*, 189-196.
- Inamura, S.; Fujimoto, Y.; Kawasaki, A.; <u>Shiokawa, Z.</u>; Woelk, E.; Heine, H.; Lindner, B.; Inohara, N.; Kusumoto, S.; Fukase, K. Synthesis of peptidoglycan fragments and evaluation of their biological activity. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 232-242.