

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

目次

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、 hanishin	8
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- <i>a</i>]インドール誘導体のデザインと合成	
第一節 背景	11
第二節 合成	13
第三節 構造活性相関	19
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	29
第二節 Longamide B を基盤とした IDO1 阻害剤のデザイン	31
第三節 合成	31
第四節 生物活性 (IDO1 阻害活性) の解析	33
第五節 結論	37
総括	38
実験項	40

参考文献

68

謝辭

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

Me	methyl
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NCS	<i>N</i> -chlorosuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
P_{app}	apparent permeability
Ph	phenyl
Pro	proline
q	quartet
RING	really interesting new gene
RSK	ribosomal S6 kinase
s	singlet
t	triplet
TBS	<i>tert</i> -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^{1,2)}、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³⁾。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⁴⁻⁶⁾、抗マラリア活性⁷⁻⁹⁾、抗癌活性¹⁰⁻¹²⁾、駆虫作用^{13, 14)}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)¹⁵⁾。

生理活性を有するピペラジン誘導体

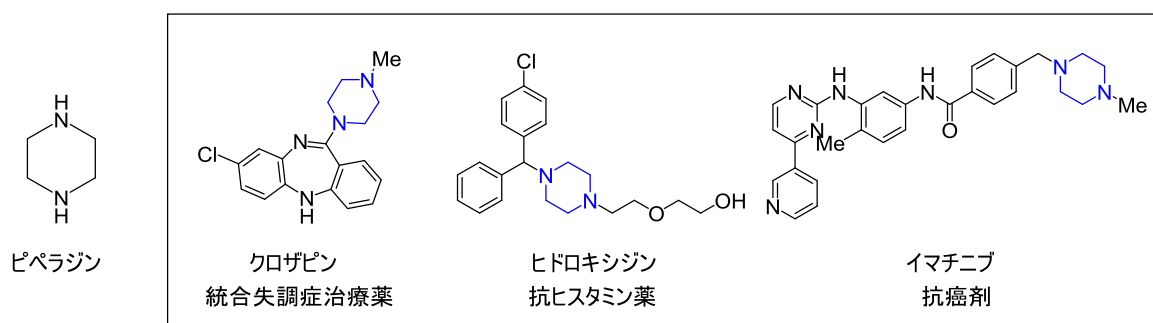
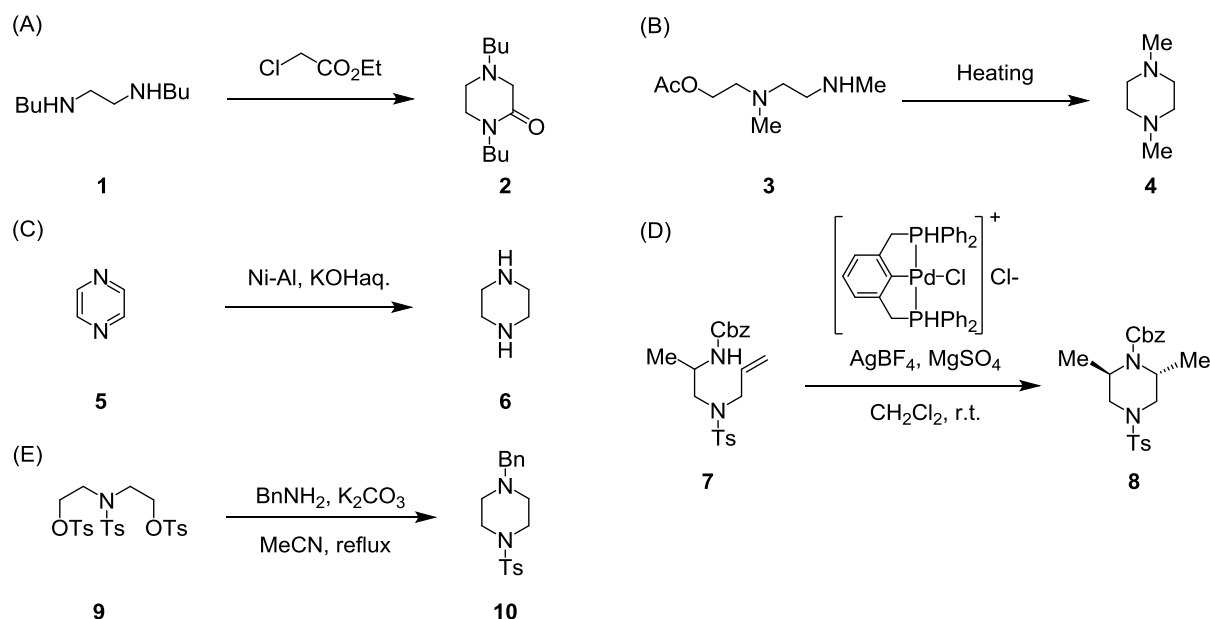


Figure 1. ピペラジンとその誘導体例

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経由してピペラジンを合成する方法¹⁶⁾ (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¹⁷⁾ (Scheme 1B)、ピラジンを還元してピペラジンへと変換する方法¹⁸⁾ (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¹⁹⁾ (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²⁰⁾ (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。



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²¹⁾。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)。

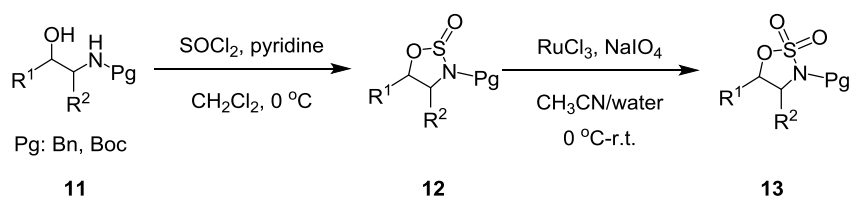


1,2-環状スルファミデート 1,3-環状スルファミデート

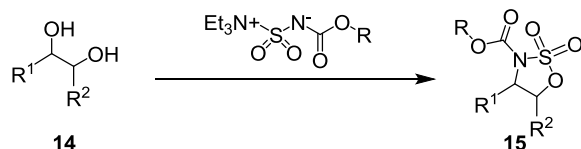
Figure 2. 環状スルファミデートの構造

調製法として最も一般的な手法は、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²²⁾ (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²³⁻²⁵⁾。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²⁶⁾、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²⁷⁾。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²⁸⁾。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²⁹⁾。

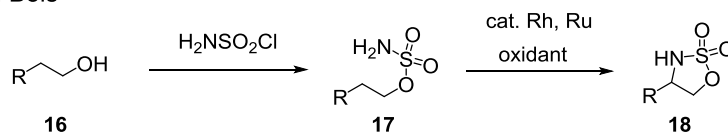
一般的な1,2-環状スルファミデートの合成法



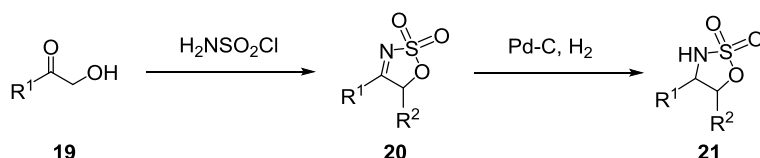
Nicolaouらの方法



Du Boisらの方法



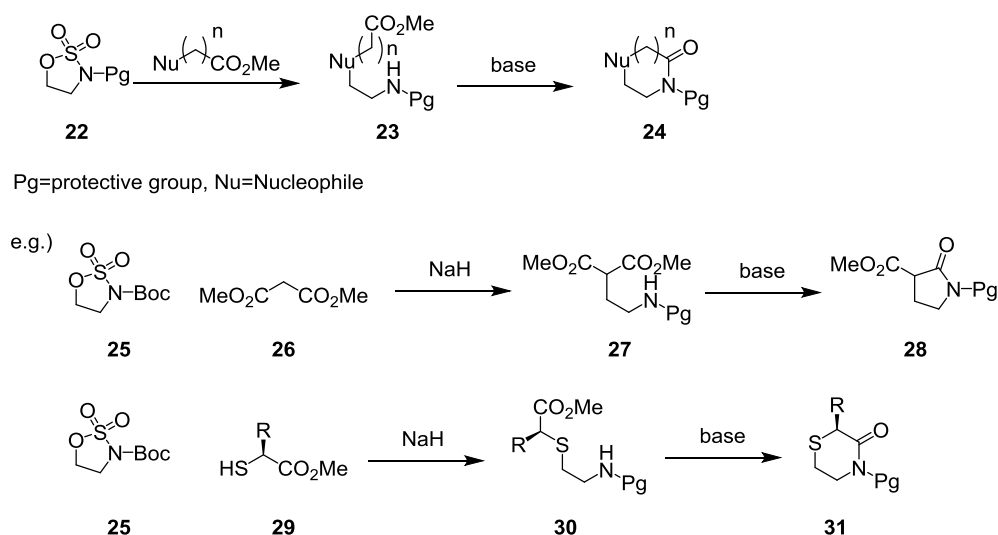
Zhouらの方法



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_N2 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^{21,22)}

(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²¹⁾。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³⁰⁾。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 pK_a 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^{31,32)}。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³³⁾。



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リ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³⁴⁾ほか、(-)-aphanorphine³⁵⁾、(-)-paroxetine、(+)-laccarin³⁶⁾の合成にもスルファミデートが利用されている。創薬リード化合物に関しては、RSK 阻害剤³⁷⁾、aggrecanase 阻害剤³⁸⁾、ヒスタミン H₃ 受容体逆作用薬³⁹⁾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、創薬リ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、私は創薬リ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。創薬リード合成として、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⁴⁰⁻⁴²⁾。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^{43,44)}。

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⁴⁵⁾ (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⁴⁶⁾。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⁴⁷⁾。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。

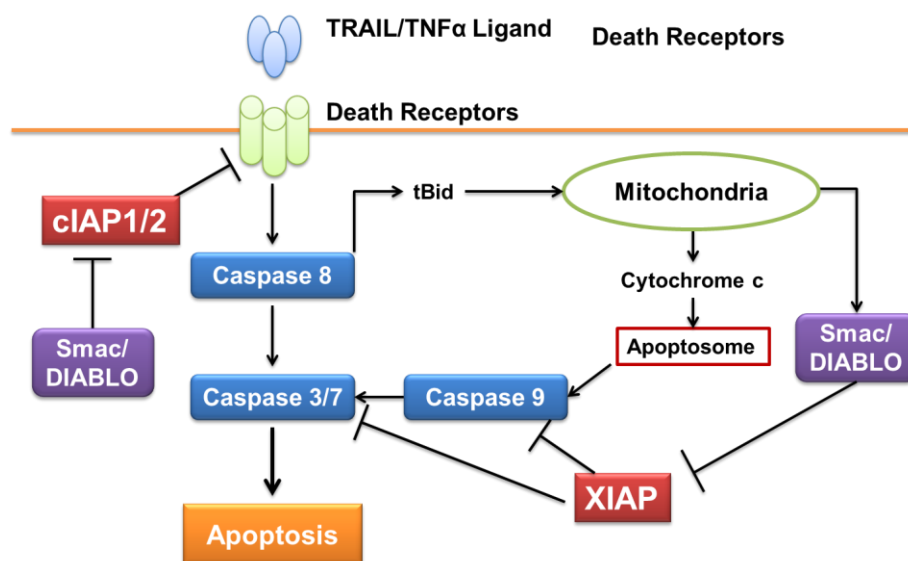


Figure 3. IAP ファミリータンパク質 XIAP/cIAP が関与するアポトーシス経路⁴⁸⁾

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-driven activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI; 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^{49,50)}。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⁵¹⁾。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⁴⁸⁾。これまでに GDC-0917 (Genentech/Curis)⁵²⁾、HGS1029 (Aegera/HGS)

⁵³⁾、Birinapant (TetraLogic) ⁵⁴⁾、LCL-161 (Novartis) ⁵⁵⁾、AT-406 (Ascenta) ⁵⁶⁾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。

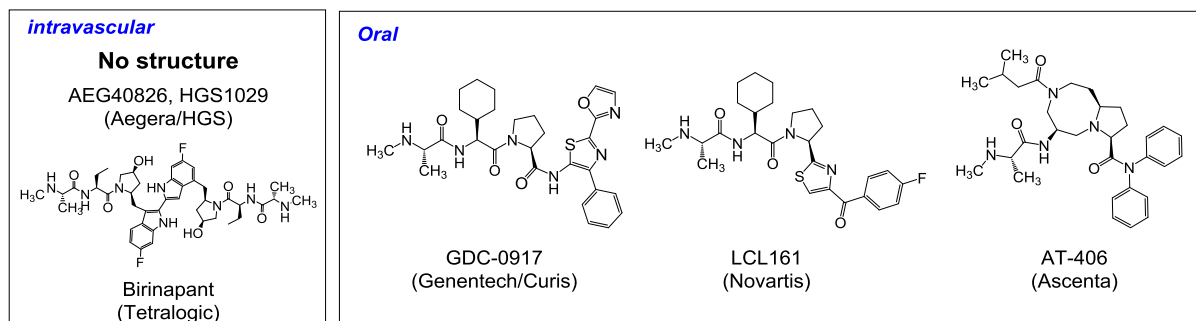


Figure 4. IAP 拮抗薬の現在の研究開発状況

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

Longamide B⁵⁷⁾、longamide B methyl ester⁵⁸⁾、hanishin⁵⁹⁾はプ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)。プ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⁵⁷⁾ (*Bacillus subtilis*; MIC 50 μg/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⁵⁸⁾ (ED₅₀ 30 μg/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⁵⁹⁾ (IC₅₀ 9.7 mg/mL)。プ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、プ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⁶⁰⁾ (Figure 6)、置換基の位置、立体をコントロールしたピロロピペラジン骨格の新規合成法開発は、種々のピロロアルカロイド合成に寄与すると考えられる。一方、longamide B、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、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。

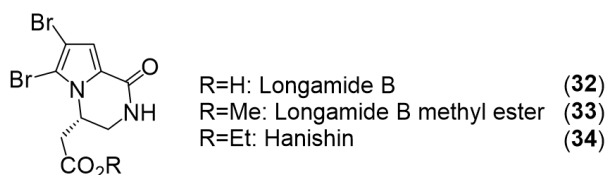


Figure 5. Longamide 類の構造

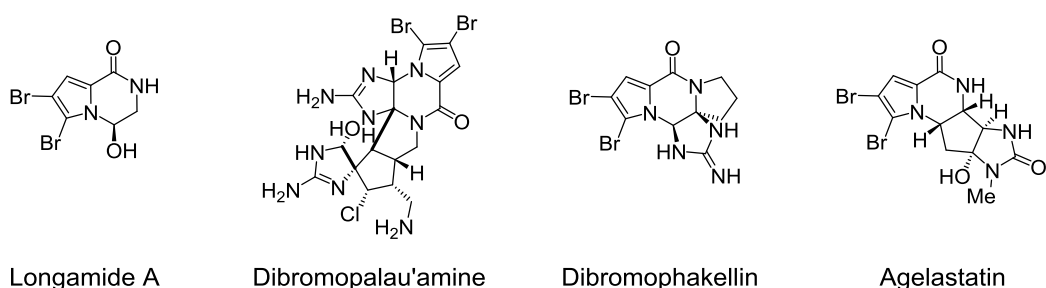


Figure 6. 種々のプロモピロールアルカロイド

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産するヘム含有酵素である^{61,62)} (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⁶³⁻⁶⁵⁾、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^{66,67)}。*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⁶⁸⁾。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⁶⁹⁾。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⁷⁰⁻⁷²⁾。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⁶⁴⁾。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⁶³⁾。一方、別のサイトカインである TGF- β 1 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、IKK α が活性化し、核内に移行することで TGF- β 1 の転写が引き起こされる。TGF- β 1 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⁶⁴⁾。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^{73,74)}、胃癌⁷⁵⁾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 阻害剤が報告されている⁷⁶⁻⁸²⁾。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。

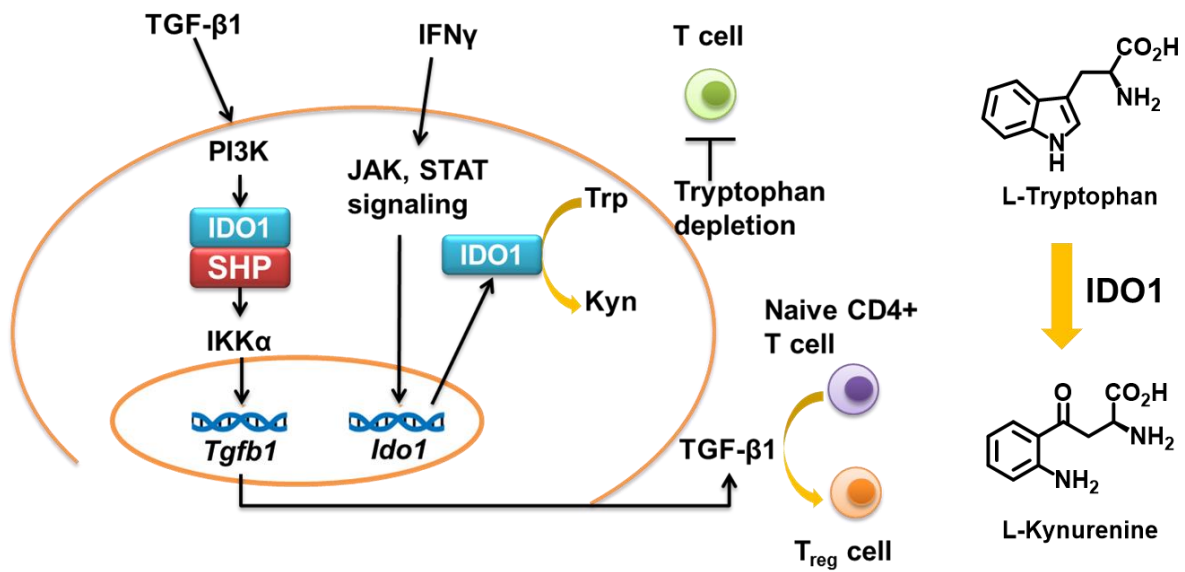


Figure 7. IDO1 による免疫抑制経路

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

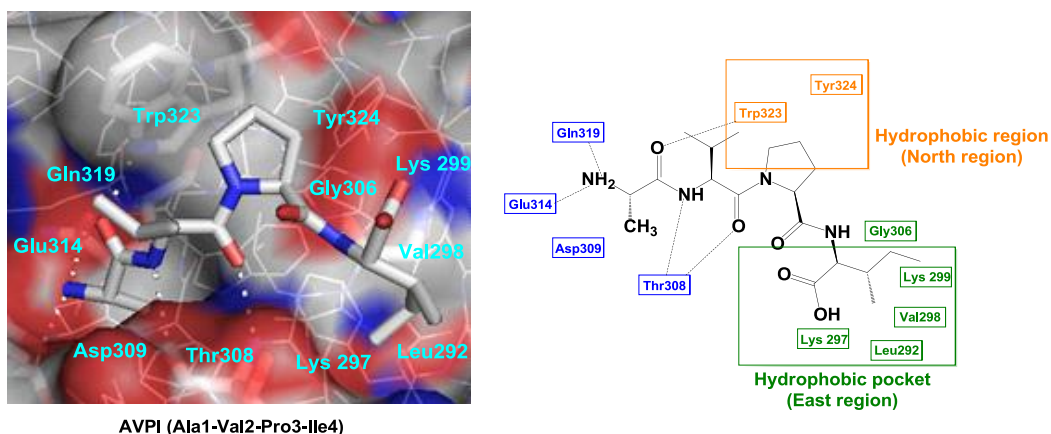
第一節 背景

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。

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

- 1) AVPI のアラニン残基は、XIAP 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。

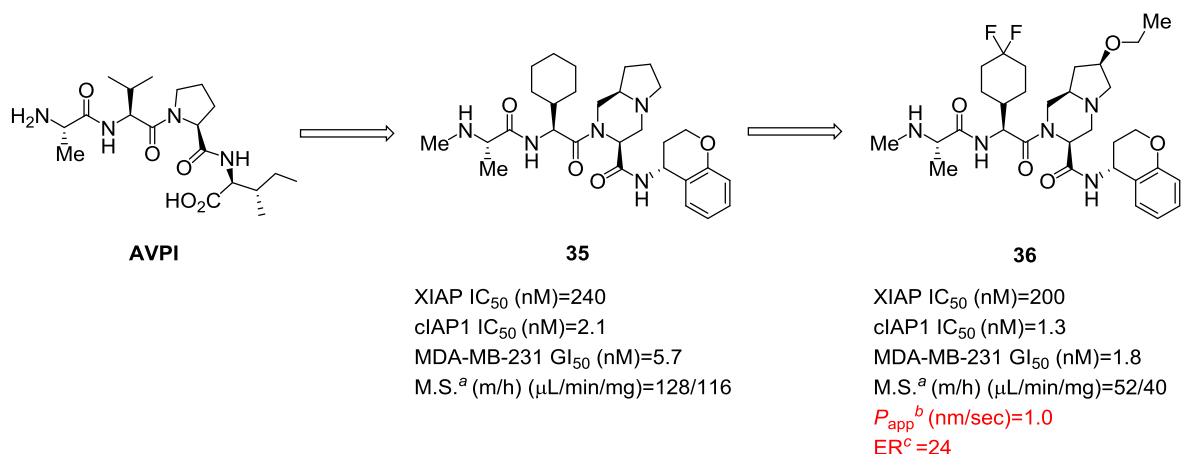
以上の知見から、狭いポケット内でアラニン残基と形成している塩橋と、強い水素結合を形成しているバリン残基のアミド結合は保持し、①North region の疎水性エリアとの相互作用を指向してプロリン環を変換すること、②East region に存在する疎水性ポケットとの相互作用を指向してイソロイシンのイソブチル基をより脂溶性の高い置換基に変換すること、を合成方針とした。また、cIAP は XIAP との共通構造として類似の BIR2/3 ドメインを保持している⁴⁰⁾ため、本合成方針により Dual 型 IAP 拮抗薬の創製が可能と推察した。



AVPI (Ala1-Val2-Pro3-Ile4)

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同時に、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^{83,84}（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 ($P_{app}=1.0$ 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⁸⁵、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。



^a Metabolic stability. ^b Apical-to-basolateral apparent permeability across MDR1 expressing cells. ^c 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⁸⁵。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⁸³⁾ (Figure 10)。

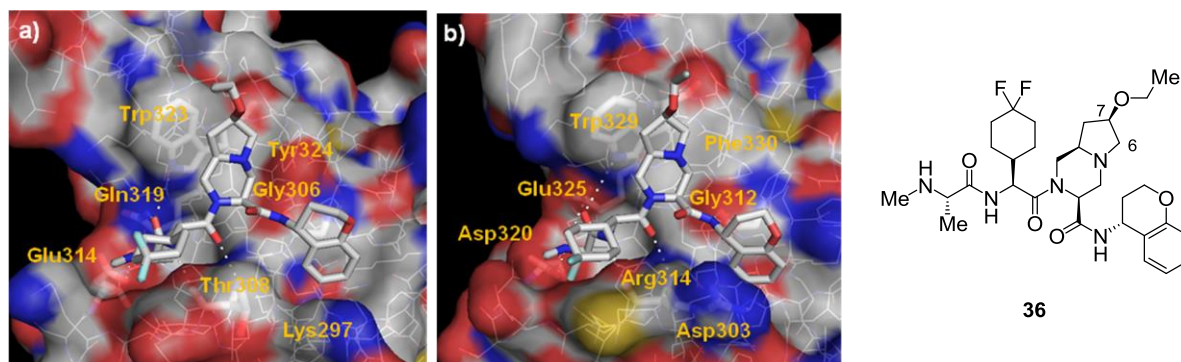


Figure 10. 化合物 **36** と XIAP (a)、cIAP-1 (b) の共結晶構造解析結果

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 (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^1 , R^2)。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。

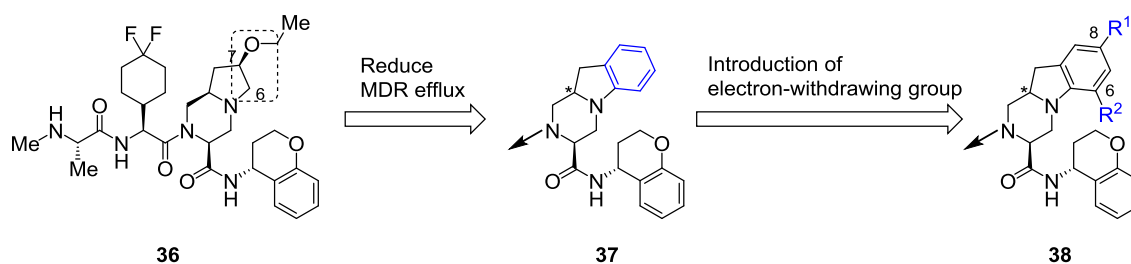


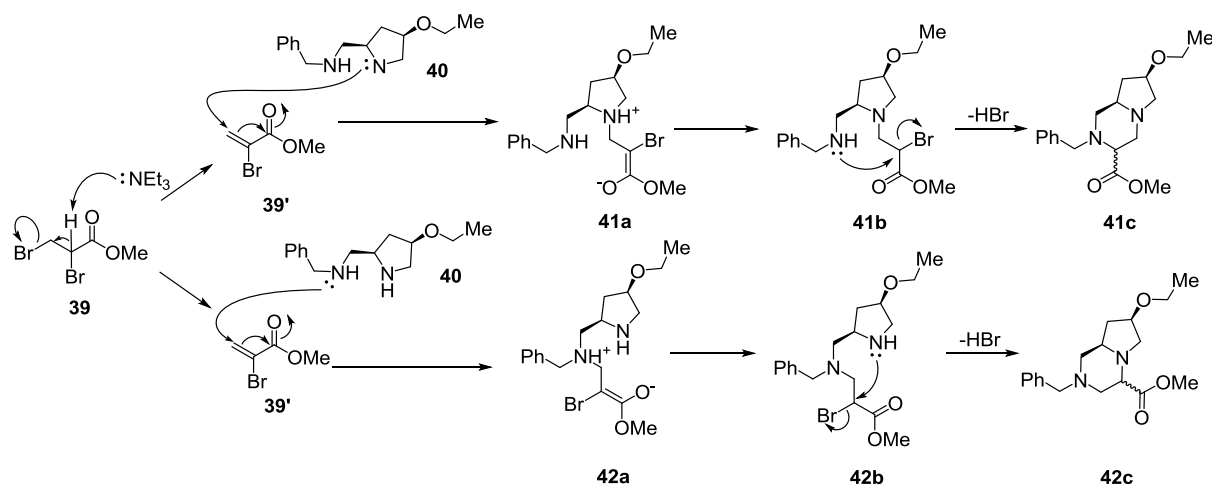
Figure 11. ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体 **38** のデザイン

第二節 合成

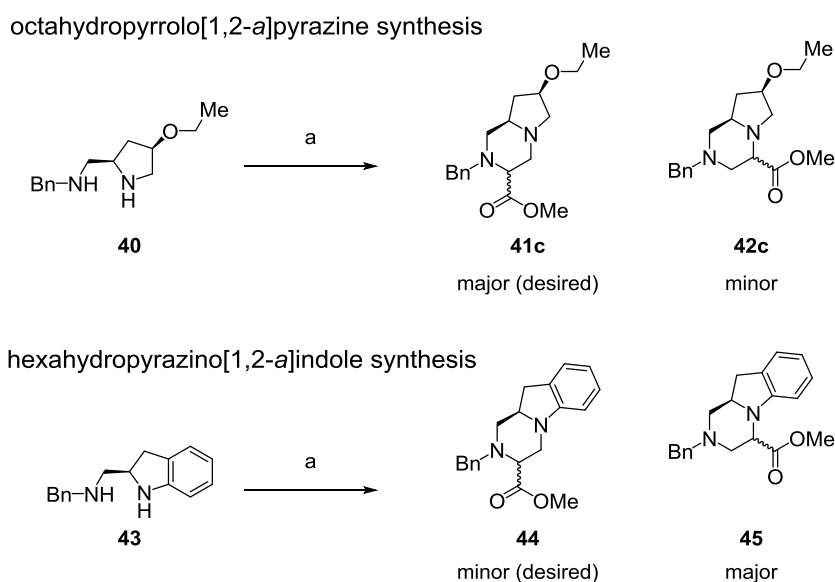
前節で述べたように、MDR1 発現細胞における薬剤排出低減のための新規骨格として設計したヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体 **38** について、合成法構築を行った。化合物 **36** のオクタヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラジン母核は、2,3-ジブロモプロピオン酸メチル **39** とジアミン **40** によるピペラジン環形成反応を経る方法で合成しており、その反応機構は Scheme 4 のようになっていると推定している⁸³⁾。すなわち、**39** より生成した α -ブromoアクリル酸メチル **39'** に対し、ジアミン **40** の2つのアミン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astereomer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^{87,88)}、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

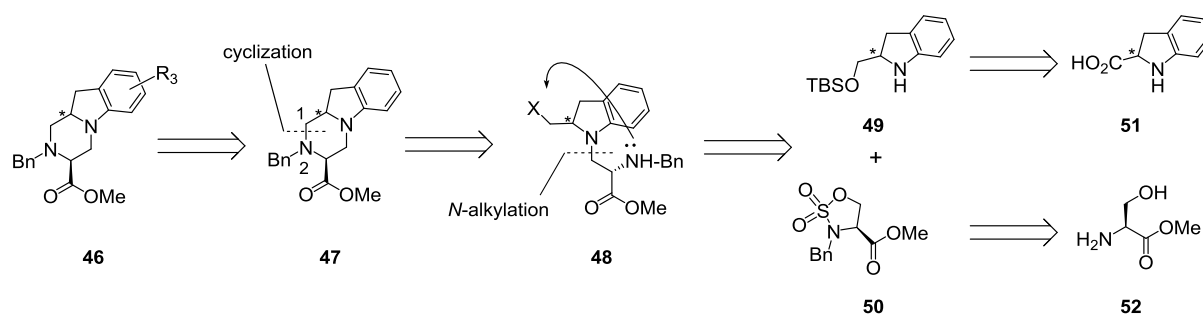


Scheme 5. ジアミン **40**、**43** と 2,3-ジブロモプロピオン酸メチルとの環化反応による推定生成物^a

^a Reagents and Conditions: (a) **39**, Et₃N, toluene.

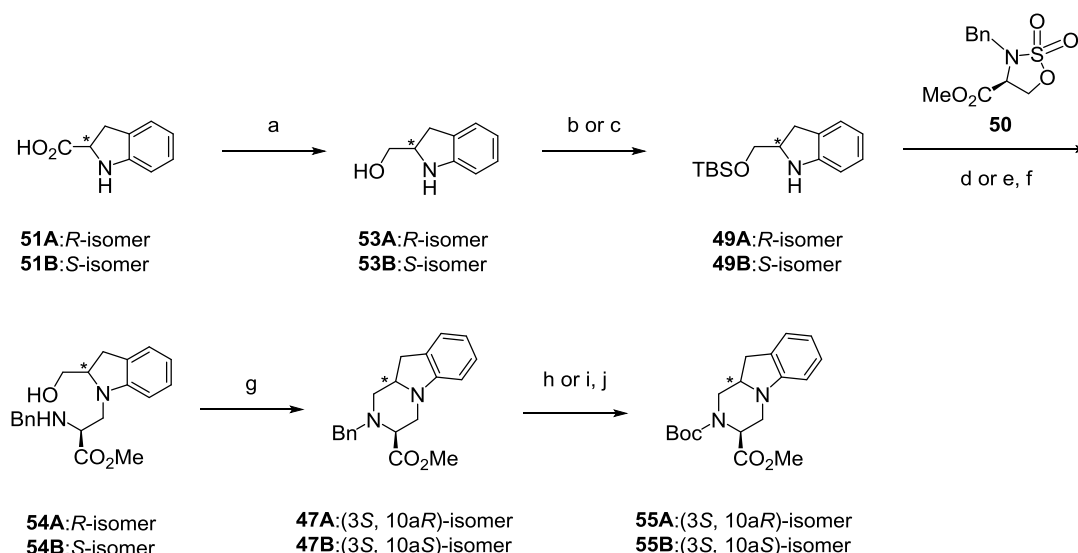
以下にヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール骨格の逆合成スキームを示す (Scheme 6)。ベンゼ

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 50⁸⁹⁾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 6*M* 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°C 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。

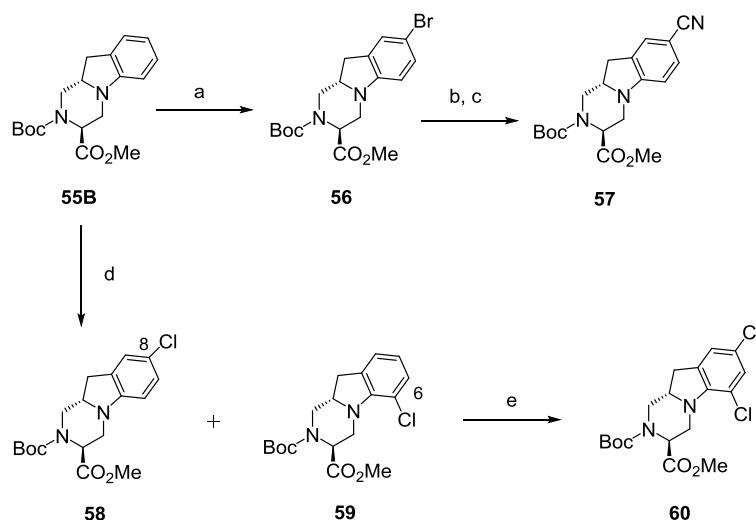


Scheme 7. ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体 **55A**、**55B** の合成^a

^aReagents and Conditions: (a) BH₃-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) I₂, PPh₃, Et₃N, MeCN/toluene, 80 °C, 58% (**47A**), 86% (**47B**); (h) Pd(OH)₂, H₂ (1 atom), 10% HCl in MeOH, 50 °C (for **55A**); (i) Pd(OH)₂, H₂ (3 atom), MeOH, room temp (for **55B**); (j) (Boc)₂O, NaHCO₃, THF/H₂O, room temp, 96% (**55A**) (2 steps), 72% (**55B**) (2 steps).

(3*S*, 10*aS*)-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。

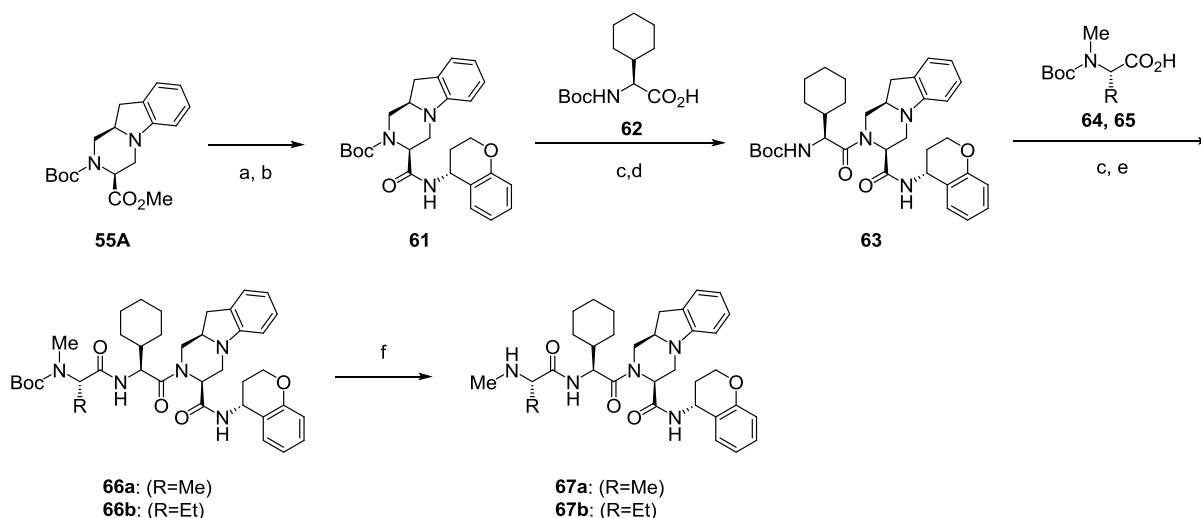
(Scheme 8)。三環式化合物 **55B** に対し、NBS を用いたブロモ化を試みた。インドリンの窒素原子に対して、オルト位 (6 位)、パラ位 (8 位) の電子密度が高く、反応点として考えられたものの、室温で両者を反応させたところ、8 位選択的にブロモ化が進行した。得られた 8 位ブロモ体 **56** をシアン化銅、ヨウ化銅によりシアノ化⁹⁰⁾することでシアノ体 **57** を 29% の収率で得た。一方、**55B** に対し、NCS (1 当量) によるクロロ化を試みたが、室温では反応せず 45 °C に昇温することで反応は進行した。しかし、クロロ化の位置選択性は低く、8 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^a

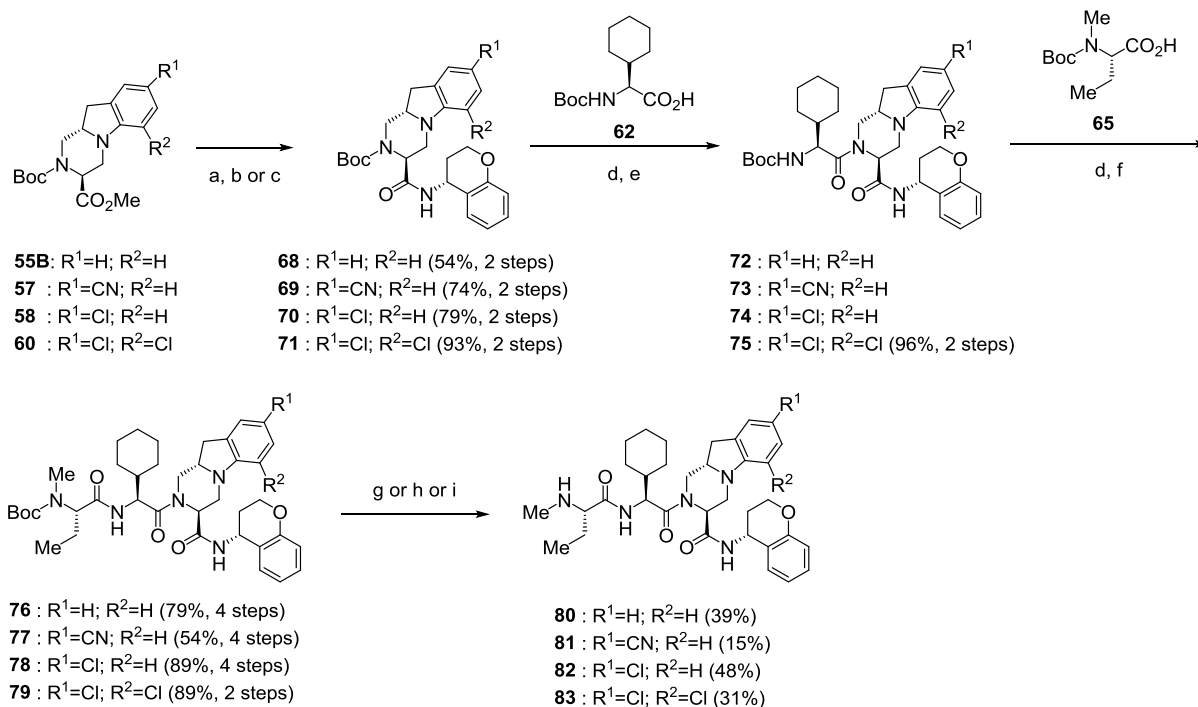
^aReagents and Conditions: (a) NBS, DMF, 0 °C to r.t., 94%; (b) CuCN, CuI, DMF, 180 °C.; (c) (Boc)₂O, NaHCO₃, THF/H₂O, room temp, 29% (2 steps); (d) NCS, DMF, 0 °C to 45 °C, 33% (**58**), 28% (**59**); (e) NCS, DMF, 50 °C, 60%.

(3*S*, 10*aR*)-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*)-クロマン4-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^a

^aReagents and Conditions: (a) LiOH-H₂O, THF/H₂O, 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**).

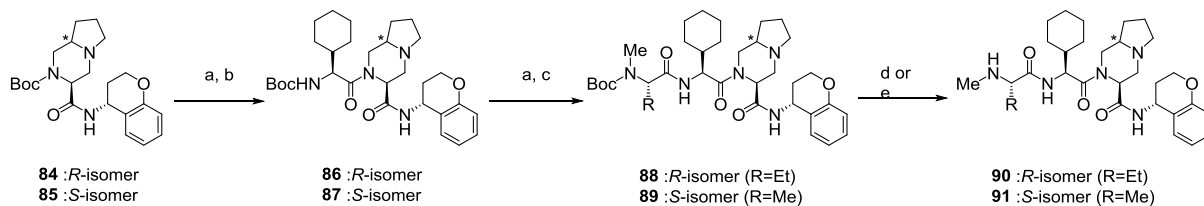


Scheme 10. (3*S*, 10*aS*)-ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール誘導体の合成^a

^aReagents and Conditions: (a) LiOH-H₂O, THF/H₂O, 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*, 10*aS*)-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*]ピラジノ誘導体 **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*]ピラジノ中間体 **84, 85**⁸³⁾ 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。



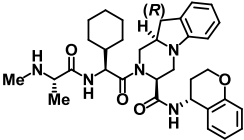
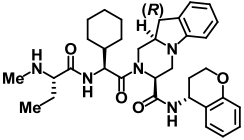
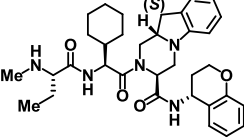
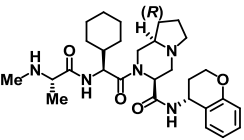
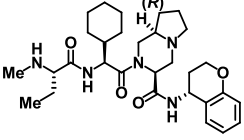
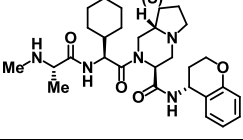
Scheme 11. 対象化合物オクタヒドロピロロ[1,2-*a*]ピラジン骨格誘導体の合成^a

^a 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、三環式化合物ヘ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_{50})、乳癌由来細胞株 MDA-MB-231 での細胞増殖阻害活性 (GI_{50})、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_{app}) 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**⁸³⁾ 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_{50} , 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*]ピラジジン誘導体の対比

Cmpd	Structure	XIAP BIR3 ^{a,b}	cIAP1 BIR3 ^{a,b}	MDA-MB-231 ^b	<i>P</i> _{app} ^c	ER ^d
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (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		19 (16-23)	1.4 (1.3-1.6)	1.8 (1.5-2.3)	25	8.2
92		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

^aAs determined by HTRF assay. ^bIC₅₀ values and 95% confidence intervals (CI) were calculated by nonlinear regression analysis of the percentage inhibitions. ^cApparent permeability. ^dEfflux 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⁴⁸⁾、**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 (GI₅₀, 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。

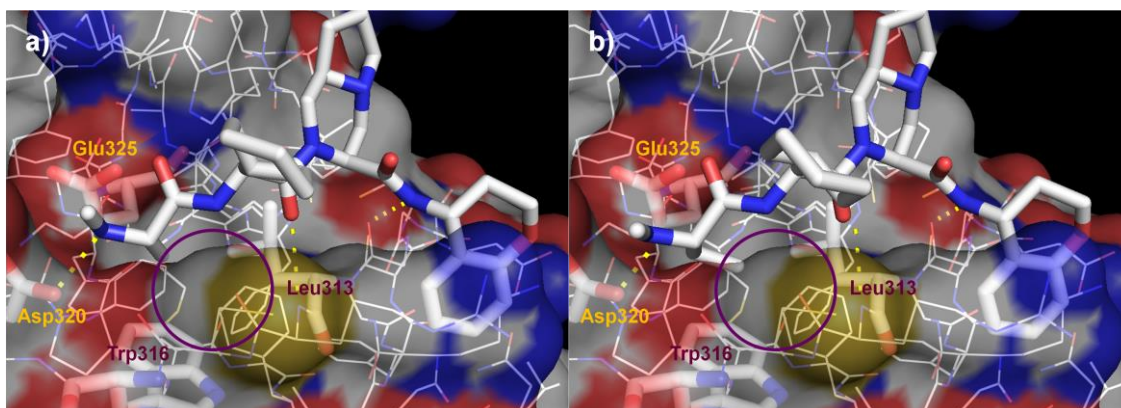


Figure 12. 化合物 **92** と cIAP-1 共結晶構造解析結果(PDB ID 4LGU) (a), 化合物 **90** と cIAP-1 共結晶構造解析結果(PDB ID 4MTI) (b)

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*)-体と比べ (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 (GI₅₀, 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)。

(3*S*, 10*aS*)-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。

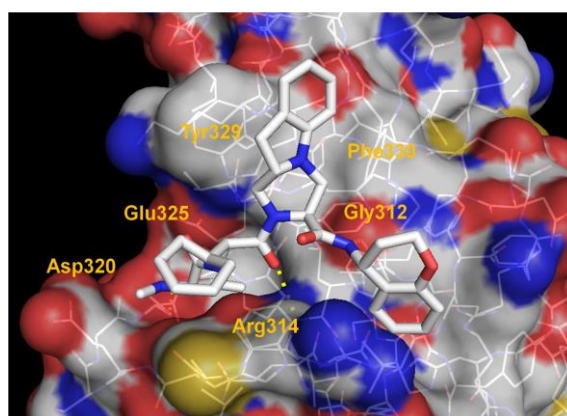
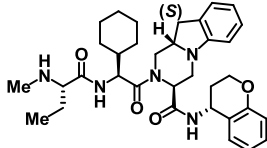
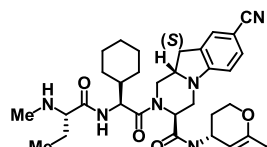
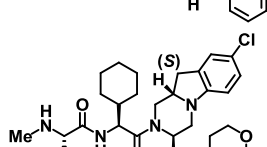
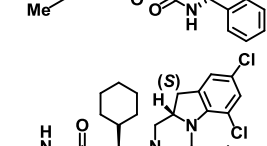


Figure 13. 三環式ヘキサヒドロピラジノ[1,2-*a*]インドール化合物 **80** と cIAP-1 の共結晶構造解析結果 (PDB ID 4MU7)

(3*S*, 10*aS*)-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⁹¹⁾ $\pi=-0.57$ 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 $\pi=+0.71$) を導入したところ、8位クロロ体 **82** は良好な P_{app} 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_{50} , 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*, 10*aS*)-8-クロロヘ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。

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

Cmpd	Het	XIAP BIR3 ^{a,b}	cIAP1 BIR3 ^{a,b}	MDA-MB-231 ^b	P_{app} ^c	ER ^d
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (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

^aAs determined by HTRF assay. ^bIC₅₀ values and 95% confidence intervals (CI) were calculated by nonlinear regression analysis of the percentage inhibitions. ^cApparent permeability. ^dEfflux ratio

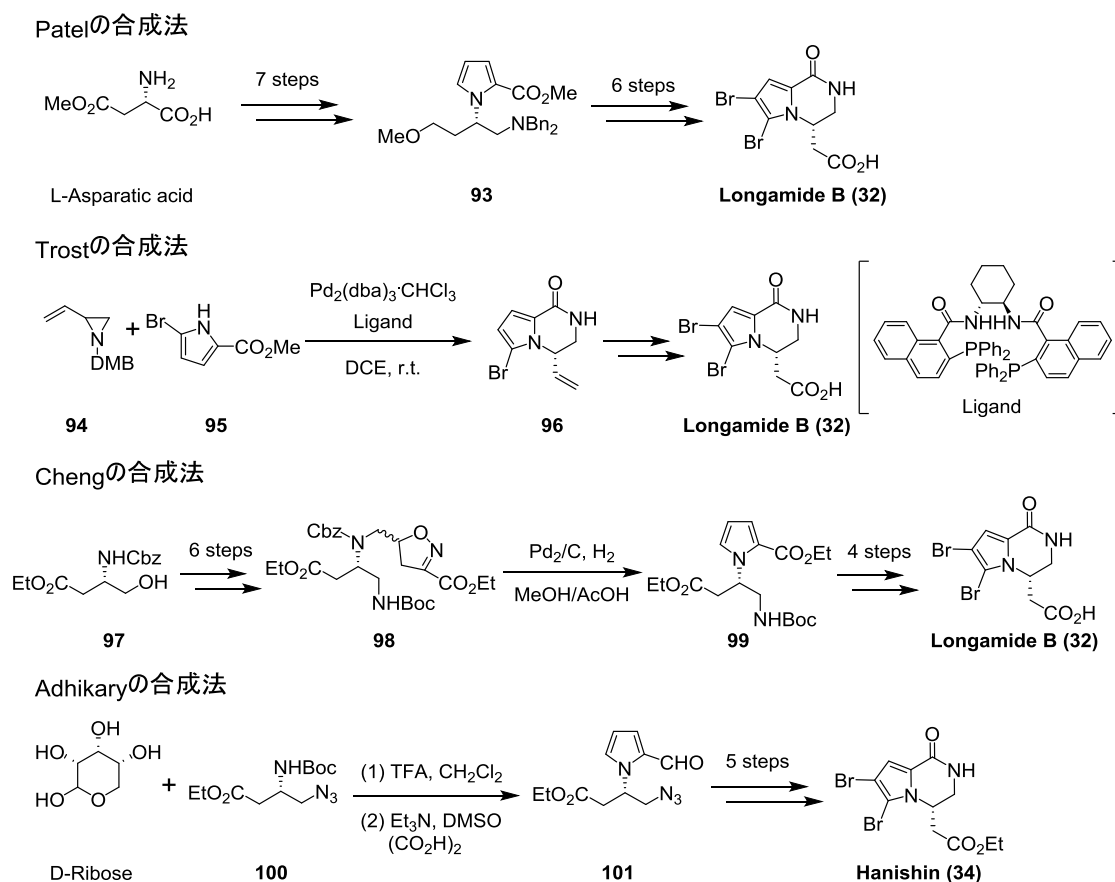
第四節 結論

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 (GI₅₀, 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

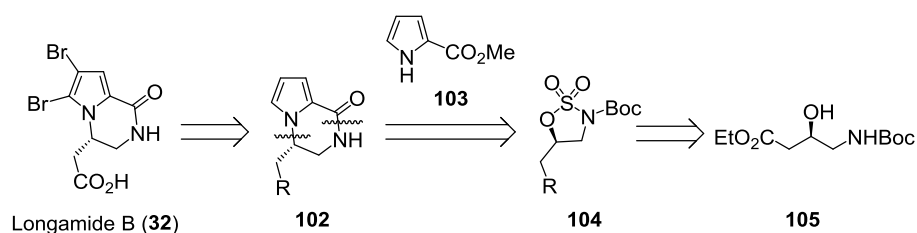
前章において環状スルファミデートを経たピペラジン環形成反応を開発し、立体制御したピペラジン環形成に有効であることを示した。本章では、環状スルファミデートを鍵中間体として用いたピペラジン環含有天然物合成へ展開した。環状スルファミデートを用いたピペラジン含有天然物の報告例が少ないことから、ピペラジンを含む天然物の合成を行うことは環状スルファミデートの汎用性を見極めるのにより効果的と考えられた。この観点から、ピロロピペラジノン骨格を母核とする longamide B (**32**)、longamide B methyl ester (**33**)、hanishin (**34**) の合成を行うこととした。これらプ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⁹²⁾。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^{93,94)}。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⁹⁵⁾。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⁹⁶⁾。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、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

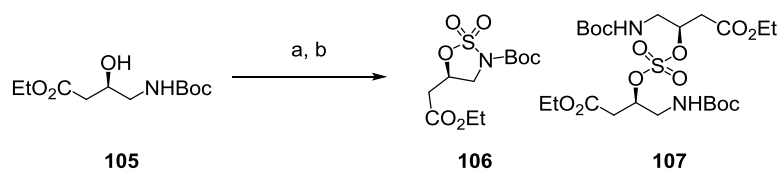
第二節 合成

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。ピロール上のプ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とを反応させ、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。

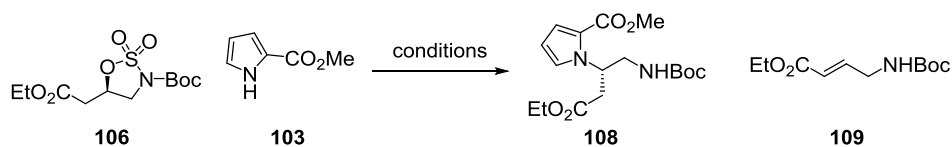


Scheme 14. スルファミデート 106 の調製^a

^aReagents and Conditions: (a) SOCl₂, pyridine, CH₂Cl₂, 0 °C; (b) RuCl₃, NaIO₄, MeCN/H₂O, 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。

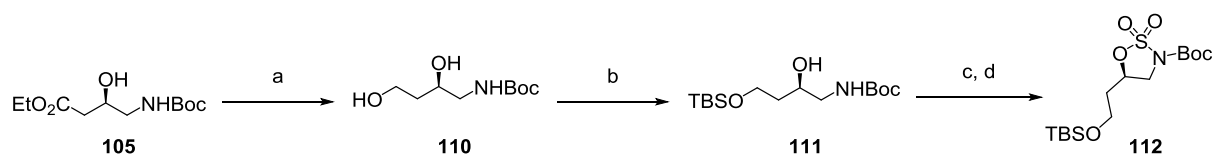
Table 3. スルファミデート **106** とピロール **103** の反応検討



Entry	Condition	Solvent	temp.	Results
1	<i>t</i> -BuOK	DMF	r.t.	108 (5%), 109 (24%)
2	K ₂ CO ₃	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 ₂ CO ₃	DMF	r.t.	N.D. ^a
6	TsOH	DMF	r.t.	N.D. ^a
7	none	DMF	r.t.–60 °C	N.D. ^a
8	none	CH ₃ CN	r.t.–60 °C	no reaction

^aNot 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。

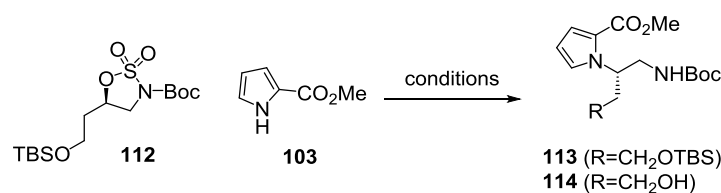


Scheme 15. スルファミデート **112** の調製^a

^aReagents and Conditions: (a) NaBH₄, EtOH, reflux, 87%; (b) TBSCl, imidazole, DMF, 0 °C to room temp, 93%; (c) SOCl₂, pyridine, CH₂Cl₂, 0 °C; (d) RuCl₃, NaIO₄, K₂HPO₄, MeCN/H₂O, 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。

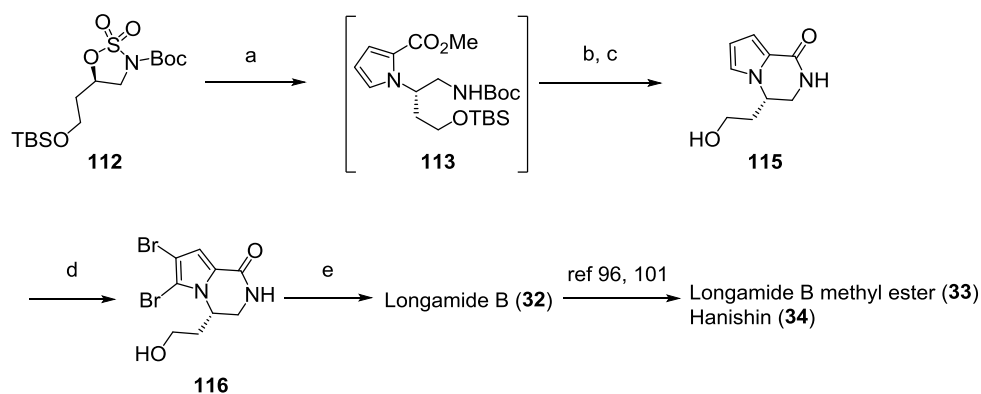
Table 4. スルファミデート **112** とピロール **103** の反応検討



Entry	Condition	Solvent	temp.	Results
1	<i>t</i> -BuOK	DMF	r.t.	113 (46%)
2	K ₂ CO ₃	DMF	r.t.	N.D. ^a
3	DIPEA	DMF	r.t.	N.D.
4	<i>t</i> -BuOK	CH ₂ Cl ₂	r.t.	N.D.
5	<i>t</i> -BuOK	CH ₃ CN	r.t.	113 (74%), 114 (13%)
6	<i>t</i> -BuOK	THF	r.t.	N.D.

^aNot 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 でプロモ化し、化合物 **116** とし、最後に TEMPO と PhI(OAc)₂ で水酸基を酸化する⁹⁴⁾ ことで longamide B とした。longamide B は報告されている条件^{92,97)}により longamide B methyl ester、hanishin へと誘導した。



Scheme 16. Longamide B の合成^a

^aReagents and Conditions: (a) **103**, *t*-BuOK, MeCN, 0 °C to room temp; (b) 4M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, room temp; (c) Et₃N, MeOH, 50 °C, 75% (3 steps); (d) NBS, DMF, -20 °C to room temp, 87%; (e) TEMPO, PhI(OAc)₂, NaHCO₃, CH₂Cl₂, room temp, 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⁷⁶⁻⁸²⁾ (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^{79,81,82,98)}。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⁹⁸⁾。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⁷⁹⁾。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⁸²⁾。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。

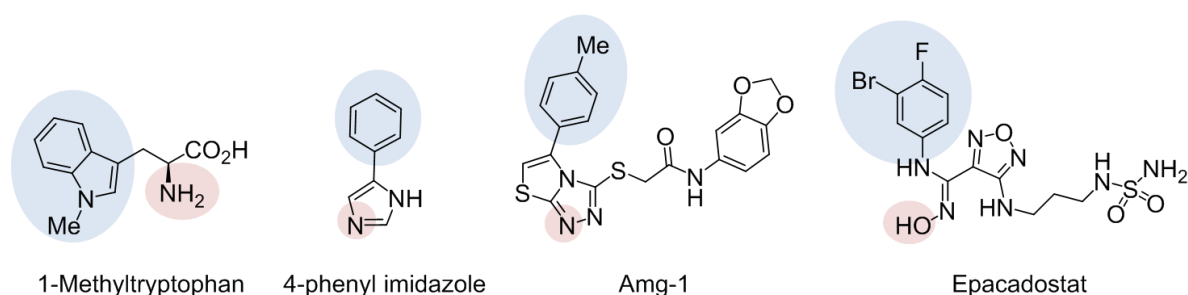


Figure 14. 報告されている IDO1 阻害剤の例

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。

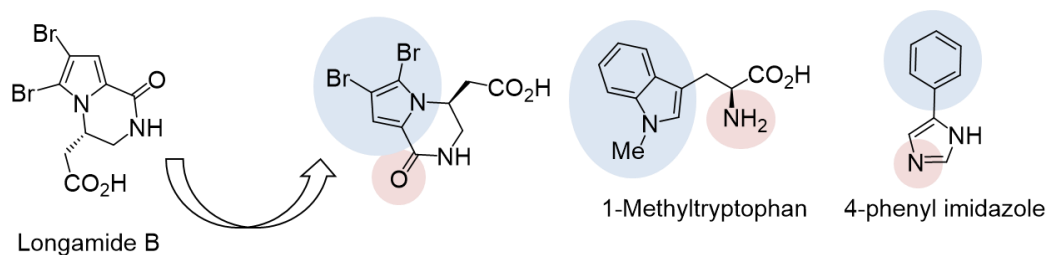


Figure 15. Longamide B と IDO1 阻害剤の共通点

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 2.58\AA 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にした。

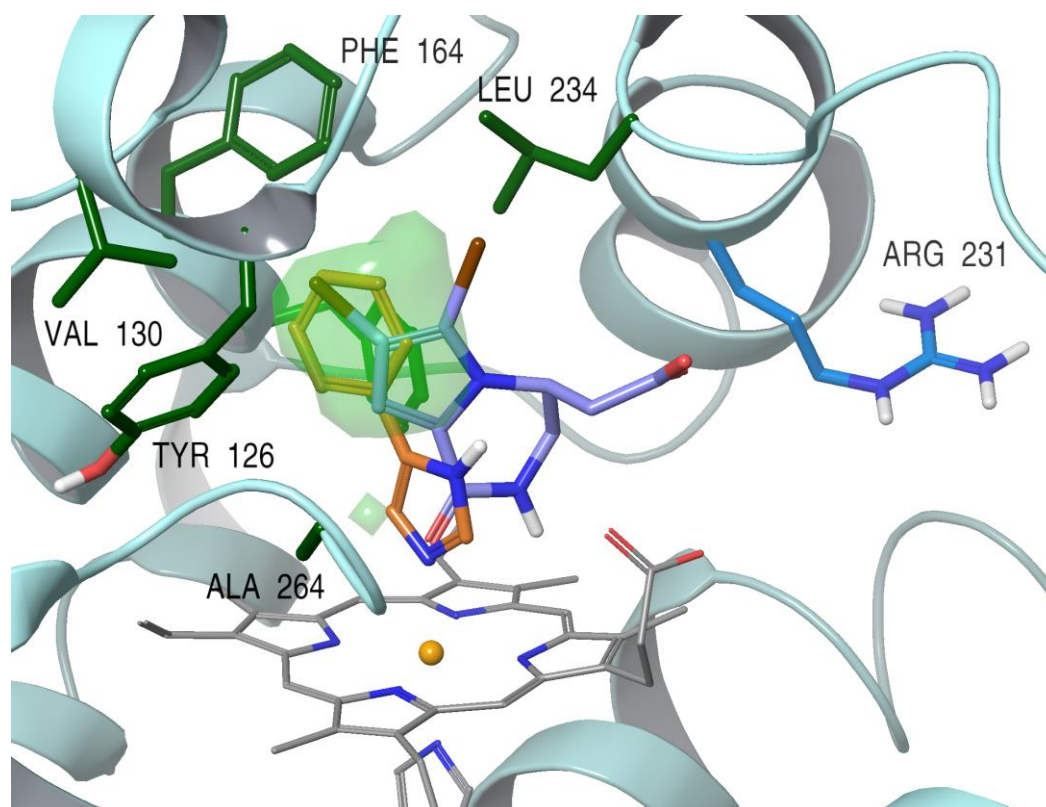


Figure 16. 4-フェニルイミダゾール (橙色)、longamide B (水色) と IDO1 とのドッキングモデル
 ポケット A を構成するアミノ酸、Tyr126、Val130、Phe164、Leu234 (緑色)、ポケット A の脂溶性領域 (薄緑)、ヘム鉄 (黄色)、溶媒側のアミノ酸 Arg231 (水色)

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^{99,100}、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。

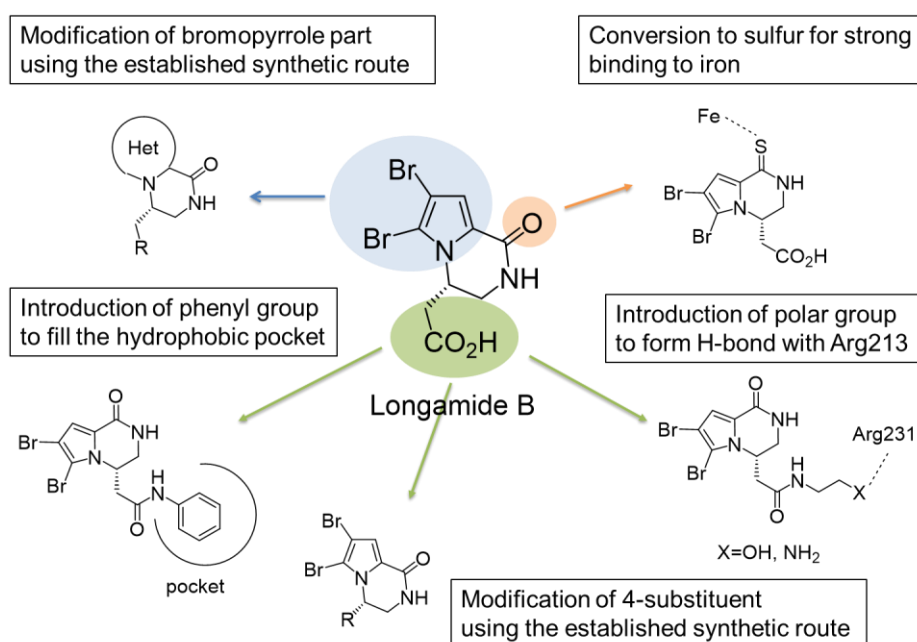
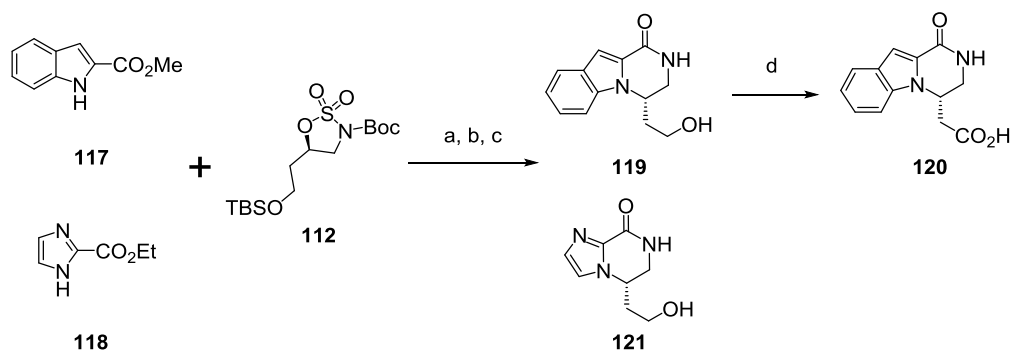


Figure 17. Longamide B 誘導体の構造設計

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

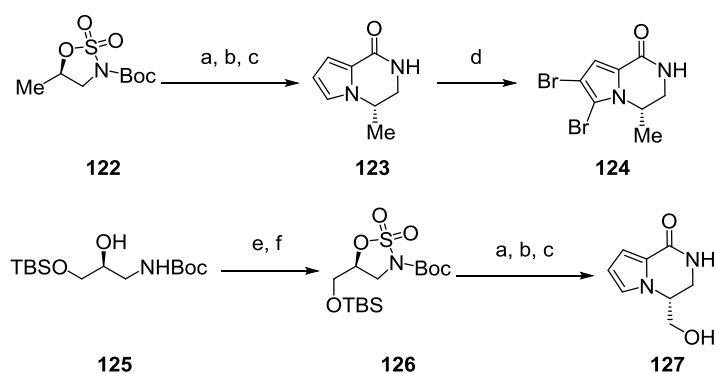
を 80% の収率で合成した。化合物 **119** の一部は TEMPO とジアセトキシオードベンゼンで酸化し、カルボン酸 **120** を生成した。一方、イミダゾ[1,2-*a*]ピペラジン誘導体 **121** もエチル イミダゾール-2-カルボキシレート **118** から同様の手法での合成を試みたが、ピロール、インドールに比べて収率は低い結果となった。これは、イミダゾール窒素の求核性がピロール、インドールよりも低く、環状スルファミデート **112** への求核反応が進行しにくいためと推測している。



Scheme 17. ピロール部位の変換^a

^aReagents and conditions: (a) KO^tBu, CH₃CN, 0 °C to room temperature; (b) 4M HCl in dioxane, methanol, room temperature; (c) Et₃N, methanol, 50 °C; (d) TEMPO, PhI(OAc)₂, NaHCO₃, CH₂Cl₂, room temperature, 57%.

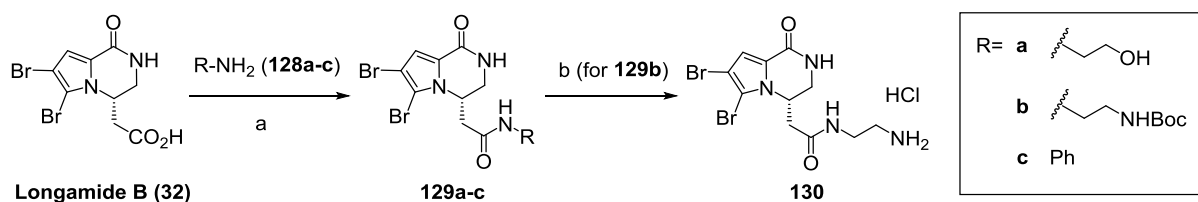
4-メチル誘導体 **123**、**124** および 4-ヒドロキシメチル誘導体 **127** の合成を Scheme 18 に示す。既知の環状スルファミデート **122**³⁹⁾ から常法を用いてピロロピペラジノン誘導体 **123** を 3 工程 51% 収率で合成した。得られた **123** の一部は NBS によりブロモ化し、**124** を得た。一方、ヒドロキシメチル誘導体 **127** に関しては、既知のヒドロキシルアミン誘導体 **125**¹⁰¹⁾ を 2 工程で環状スルファミデート **126** に変換した。続いて、**123** 合成と同様の手法を用いて、**126**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



Scheme 18. 4-メチル、4-ヒドロキシメチル誘導体の合成^a

^aReagents and conditions: (a) methyl pyrrole-2-carboxylate, KO^tBu, CH₃CN, 0 °C to room temperature; (b) 4M HCl in dioxane, methanol, room temperature; (c) Et₃N, methanol, 50 °C, 51% (**123**, 3 steps), 31% (**127**, 3 steps); (d) NBS, DMF, -20 °C to room temperature, 79%; (e) SOCl₂, pyridine, CH₂Cl₂, 0 °C; (f) RuCl₃, NaIO₄, K₂HPO₄, CH₃CN/H₂O, 0 °C, 64% (2 steps).

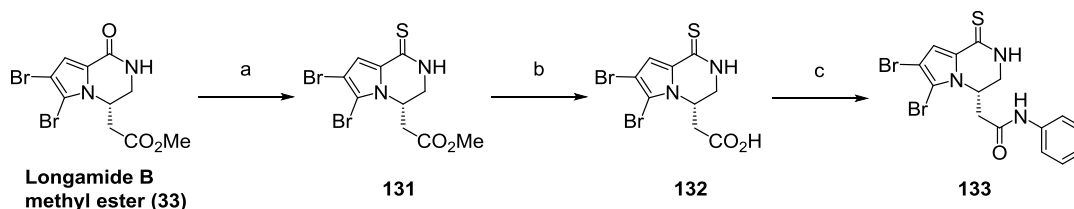
アミド誘導体 (**129a-c**, **130**) の合成法を以下に示す (Scheme 19)。導入するアミンとしては、Arg231 との水素結合を期待して末端にヒドロキシル基、アミノ基を配置できるヒドロキシエチルアミン、エチレンジアミン誘導体を選択した。またカルボン酸周辺のスペースを埋めることを目的として、アニリンを縮合することとした。Longamide B を各種アミン **128a-c** と EDC、HOBt を用いて縮合し、**129a-c** を得た。**129a-c** に比べ **129a** は生成物の極性が高く、後処理、精製が他に比べて困難であったため収率が低い結果となった。**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^a

^aReagents and conditions: (a) EDC, HOBt, Et₃N, 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-チオキノピロロ[1,2-a]ピペラジン誘導体の合成^a

^aReagents and conditions: (a) Lawesson's reagent, THF, room temperature, 69%; (b) 2M aqueous NaOH, THF, methanol, room temperature, quant; (c) aniline, EDC, HOBt, Et₃N, DMF, room temperature, 75%.

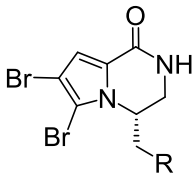
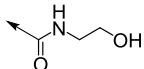
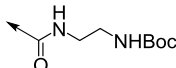
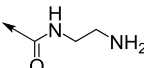
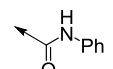
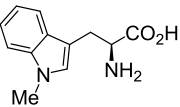
第四節 生物活性 (IDO1 阻害活性) の解析

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⁷⁶⁾ 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¹⁰²⁾。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

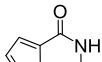
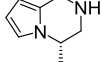
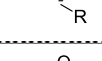
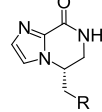
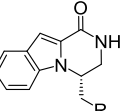
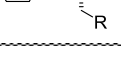
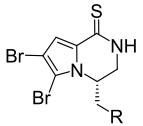

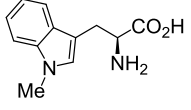
IDO1 阻害活性を持つ 1-メチル-L-トリプトファン (1-Me-L-Trp) を positive control として用いた。

Compd	Scaffold	R	Enzymatic assay % inhibition at 1mM (hIDO1)
32		CO ₂ H	34.8%
33		CO ₂ Me	22.1%
34		CO ₂ Et	20.9%
116		CH ₂ OH	8.2%
124		H	6.2%
129a			30.1%
129b			24.0%
130			-4.2%
129c			58.3%
1-Me-L-Trp			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: 2D0T) 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。

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

Compd	Scaffold	R	Enzymatic assay % inhibition at 1mM (hIDO1)
115		CH ₂ OH	7.2%
127		OH	5.8%
123		H	-8.4%
121		CH ₂ OH	13.9%
120		CO ₂ H	30.1%
119		CH ₂ OH	21.9%
132		CO ₂ H	66.5%
131		CO ₂ Me	10.8%
133			43.5%
1-Me-L-Trp			70.8%

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ヘム鉄を向いており、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、硫黄とヘ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。

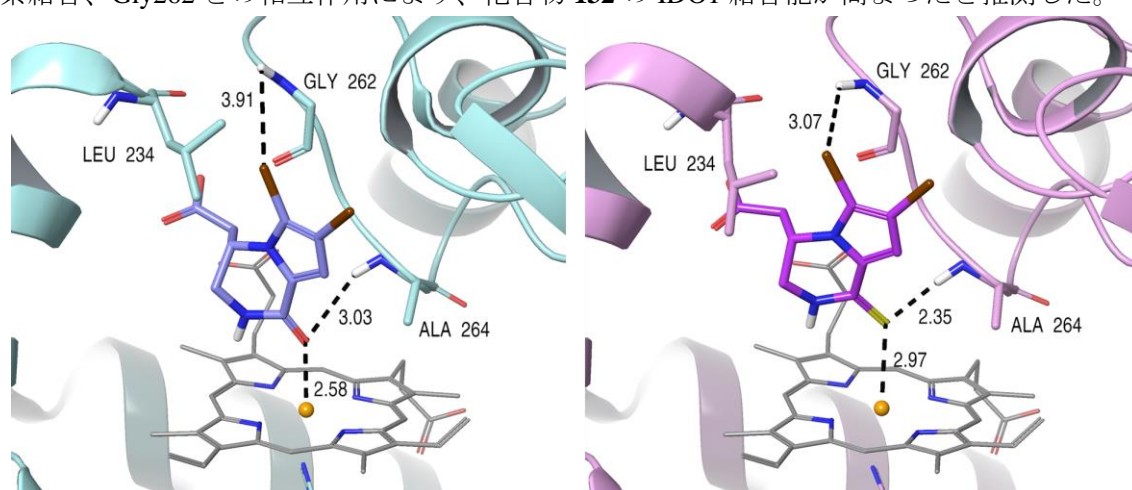


Figure 18. Longamide B (左)、化合物 **132** (右) と IDO1 とのドッキングモデルの比較

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 score¹⁰⁶⁾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 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ヘム鉄と 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 longamideB、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、目的のプロモピロールアルカロイドの合成に至った。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

¹H 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 F₂₅₄ 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 μM or NH 60 μM, Fuji Silysia chemical Ltd). Commercial reagents and solvents were used without additional purification.

(2*R*)-2,3-Dihydro-1*H*-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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 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)⁺.

(2*S*)-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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

(2R)-2-([tert-Butyl(dimethyl)silyloxy]methyl)-2,3-dihydro-1H-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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 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)⁺.

(2S)-2-([tert-Butyl(dimethyl)silyloxy]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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

Methyl *N*-benzyl-3-[(2R)-2-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1H-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 NaHCO₃, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

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*-dimethylacetamide (280 mL) was stirred at room temperature for 18 h. 6M HCl (53.5 mL) was added dropwise to the mixture at 0 °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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 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)⁺.

Methyl (3*S*,10*aR*)-2-benzyl-1,2,3,4,10,10*a*-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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 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)⁺.

Methyl (3*S*,10*aS*)-2-benzyl-1,2,3,4,10,10*a*-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%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

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

A mixture of **47A** (272 mg, 0.84 mmol), 20% Pd(OH)₂/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)₂/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 NaHCO₃/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 MgSO₄, 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; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 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) $^+$.

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

A mixture of **47B** (9.00 g, 27.9 mmol), 20% Pd(OH) $_2$ /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) $_2$ /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 NaHCO $_3$ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO $_4$, 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 (3atm). 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 $_3$ /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 $_4$, 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; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 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) $^+$.

2-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,10*aS*)-8-bromo-3,4,10,10*a*-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 $_3$ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO $_4$, 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; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 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) $^+$.

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

A mixture of **56** (1.20 g, 2.92 mmol), copper cyanide (I) (784 mg, 8.75 mmol) and copper 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 NaHCO₃ (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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

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

2-tert-Butyl 3-methyl (3S,10aS)-6-chloro-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-a]indole-2,3(1H)-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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, 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**; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

Compound **59**; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

2-tert-Butyl 3-methyl (3S,10aS)-6,8-dichloro-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-a]indole-2,3(1H)-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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***tert*-Butyl (3*S*,10*aR*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10*a*-tetrahydropyrazino[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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***tert*-Butyl {(1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,10*aR*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10*a*-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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***tert*-Butyl [(1*S*)-2-((1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,10*aR*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10*a*-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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***tert*-Butyl [(1*S*)-1-((1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,10*aS*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10*a*-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%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

(3*S*,10*aR*)-2-((2*S*)-2-cyclohexyl-2-[(*N*-methyl-L-alanyl)amino]acetyl)-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]-1,2,3,4,10,10*a*-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[®] (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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺; Anal. Calcd for C₃₃H₄₃N₅O₄: C, 69.08; H, 7.55 N, 12.21. Found: C, 68.89; H, 7.65; N, 12.06.

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

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® (500 mg). White solid (98 mg, 75%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺; Anal. Calcd for C₃₄H₄₅N₅O₄: C, 69.48; H, 7.72 N, 11.92. Found: C, 69.43; H, 7.61; N, 11.86.

***tert*-Butyl (3*S*,10*aS*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10*a*-tetrahydropyrazino[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. To a mixture of the residue, (4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-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 NaHCO₃, brine, dried over MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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*,10*aS*)-8-cyano-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10*a*-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. To a mixture of the residue and (4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-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 NaHCO₃, brine, dried over MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***tert*-Butyl (3*S*,10*aS*)-8-chloro-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10*a*-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%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***tert*-Butyl (3*S*,10*aS*)-6,8-dichloro-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10*a*-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%); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***tert*-Butyl (S)-2-((3*S*,10*aS*)-3-((*R*)-chroman-4-ylcarbamoyl)-3,4,10,10*a*-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 a mixture of (2*S*)-[(*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 NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄ 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-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indol-2(1H)-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. To 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 NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄ 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-((3S,10aS)-8-chloro-3-((R)-chroman-4-ylcarbamoyl)-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indol-2(1H)-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 MgSO₄, 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 {(1S)-1-cyclohexyl-2-[(3S,10aS)-6,8-dichloro-3-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-ylcarbamoyl]-3,4,10,10a-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1H)-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, (2S)-[(*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 MgSO₄, 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***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 NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄ 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

***tert*-Butyl [(1*S*)-1-((1*S*)-2-[(3*S*,10*aS*)-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. To 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 NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄ 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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))⁺.

***tert*-Butyl [(1*S*)-1-((1*S*)-2-[(3*S*,10*aS*)-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 MgSO₄ 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 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)⁺.

***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]-3,4,10,10*a*-tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indole-2(1*H*)-yl]-2-oxoethyl)carbamoyl)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 MgSO₄ 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺.

(3*S*,10*aS*)-2-[(2*S*)-2-Cyclohexyl-2-[(2*S*)-2-(methylamino)butanoyl]amino}acetyl]-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]-1,2,3,4,10,10*a*-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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ 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; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 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)⁺; Anal. Calcd for C₃₄H₄₅N₅O₄·0.4H₂O: C, 68.64; H, 7.76; N, 11.77. Found: C, 68.73; H, 7.90; N, 11.55.

(3*S*,10*aS*)-8-Cyano-2-[(2*S*)-2-cyclohexyl-2-[(2*S*)-2-(methylamino)butanoyl]amino}acetyl]-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]-1,2,3,4,10,10*a*-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; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 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) $^+$; HRMS-ESI (m/z): [M +H] calcd for C₃₅H₄₄N₆O₄, 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[®] (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; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 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) $^+$; Anal. Calcd for C₃₄H₄₄ClN₅O₄·0.5H₂O: 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; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 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) $^+$; HRMS-ESI (m/z): [M +H] calcd for C₃₄H₄₃N₅O₄³⁵Cl₂, 656.2765; found. 656.2755.

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

To a solution of (3S,8aS)-3-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-ylcarbamoyl]hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-2(1H)-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 (3S,8aS)-*N*-[(4R)-3,4-dihydro-2H-chromene-4-yl]octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamide

dihydrochloride (346 mg) as white solid. To a mixture of a mixture of (3*S*,8*aS*)-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide dihydrochloride (343 mg, 0.92 mmol), (2*S*)-[(*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 NaHCO₃ and water. The organic layer was dried over MgSO₄, 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; ¹H NMR (CDCl₃, 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 [(1*S*)-2-((1*S*)-1-cyclohexyl-2-[(3*S*,8*aS*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-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 (3*S*,8*aS*)-2-[(2*S*)-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) as white solid. To a mixture of a mixture of (3*S*,8*aS*)-2-[(2*S*)-2-amino-2-cyclohexylacetyl]-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-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 NaHCO₃ and water. The organic layer was dried over MgSO₄, 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; ¹H NMR (CDCl₃, 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*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]-octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide dihydrochloride (90**)**

A mixture of (3*S*,8*aR*)-3-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-ylcarbamoyl]hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-2(1*H*)-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 (3*S*,8*aR*)-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-4-yl]octahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide dihydrochloride (168 mg) as colorless amorphous. A mixture of (3*S*,8*aR*)-*N*-[(4*R*)-3,4-dihydro-2*H*-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 (2*S*)-[(*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 MgSO₄, 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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over MgSO₄ 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 NaHCO₃, brine, dried over MgSO₄ 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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic extracts were dried over MgSO₄ 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; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 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 C₃₀H₄₅N₅O₄, 540.3472; found. 540.3495.

(3*S*,8*aS*)-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; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 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 $C_{29}H_{45}Cl_2N_5O_4 \cdot 1.3H_2O$: 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 biotinylated Smac-N7 peptide (AVPIAQ-K(biotin)-NH₂; biotinyl-Smac) was synthesized at Peptide Institute Inc. Europium cryptate (Eu³⁺ cryptate)-conjugated mouse monoclonal antibody anti-6-Histidine (Anti-6HIS Cryptate), high grade XL665-conjugated streptavidin (SA-XL^{entl}), and HTRF detection buffer were purchased from Sceti Medical Labo K.K. (cisbio). Anti-6HIS Cryptate and SA-XL^{entl} were dissolved in distilled 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 μL of IAP proteins (40 nM for XIAP_BIR3, 8 nM for cIAP-1_BIR3) and 5 μL 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 μL 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 μL of mixture of Anti-6HIS Cryptate and SA-XL^{entl}, 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_{615nm}) is the total europium cryptate signal, and fluorescence

collected at 665 nm ($F_{665\text{nm}}$) is the FRET signal. The ratio = $(F_{665\text{nm}}/F_{615\text{nm}}) \times 10000$ was calculated and IC_{50} 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 μL complete media at a density of 3×10^3 cells/well. Compounds were added to each well to give a range of concentrations (0.0001–0.1 μM) in a final volume of 200 μL . Cell viability was measured using CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) at 72 hours of incubation. The IC_{50} 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.¹⁰⁴ The transcellular transport study was performed as reported previously.¹⁰⁵ In brief, the cells were grown for 7 days in HTS Transwell[®] 96 well permeable support (pore size 0.4 μm , 0.143 cm^2 surface area) with polyethylene terephthalate membrane (Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA) at a density of 1.125×10^5 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 μL) or to the basolateral compartments (250 μL) containing 10 $\mu\text{mol/L}$ digoxin, 200 $\mu\text{mol/L}$ lucifer yellow as a marker for the tightness of monolayer, and 10 $\mu\text{mol/L}$ test compounds and terminated by the removal of each assay plate after 2 hours. The aliquots (25 μL) 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_{app}) 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:

$$ER = R_{BtoA} / R_{AtoB}$$

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 Ni²⁺ 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 MgCl₂, 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 P2₁2₁2₁ 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.¹⁰⁶ The structures were determined by molecular replacement with either MOLREP¹⁰⁷ or PHASER¹⁰⁸ of the CCP4 program suite utilizing PDB code 3D9T as a search model and refined with the program REFMAC.¹⁰⁹ Several cycles of model building with XtalView¹¹⁰ or COOT¹¹¹ and refinement were performed for improving the quality of the model. Data reduction and refinement statistics are summarized in Table 3. 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).

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

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 cell dimensions (Å)	a=31.0, c=121.6, α=90°, β=90°, γ=90°	b=68.3,	a=31.1, c=122.4, α=90°, β=90°, γ=90°
Resolution (Å)	1.79		2.15
Unique reflections	25323		14985
Redundancy	7.2		4.3
Completeness (%)	98.0 (80.9)		95.2 (92.0)

I/σ(I)	24.1 (2.3)	7.8 (1.7)
R _{sym} ^a	0.067 (0.575)	0.150 (0.550)
Refinement		
Molecules asymmetric unit	in 2	2
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 ^b	0.181	0.188
R _{free} ^b	0.203	0.262

^aR_{sym} = $\sum h \sum j | \langle I(h) \rangle - I(h)_{j} | / \sum h \sum j \langle I(h) \rangle$, where $\langle I(h) \rangle$ is the mean intensity of symmetry-related reflections. ^bR-value = $\sum | |F_{obs}| - |F_{calc}| | / \sum |F_{obs}|$. R_{free} 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 μm)] 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 ¹H (400 MHz) and ¹³C (100 MHz). Chemical shifts are reported in δ (ppm) relative to TMS in CDCl₃ as internal standard (¹H NMR) or the residual CHCl₃ signal (¹³C NMR). ¹H NMR spectra are tabulated as follows: chemical shift, multiplicity, number of protons, and coupling constant(s). Exact mass (HRMS) spectra were recorded on an electrospray 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 μL, 1.01 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) was added SOCl₂ (18 μL, 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 CH₂Cl₂ (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 CH₂Cl₂. The extracts were washed with 0.5M HCl, brine, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. RuCl₃ (2.5 mg, 0.012 mmol) and a solution of NaIO₄ (52 mg, 0.24 mmol) in water (2.0 mL) were added to a solution of the residue in CH₃CN (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 MgSO₄ 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; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 14.06, 27.89, 37.30, 50.06, 61.66, 85.65, 148.46, 167.87; MS (ESI): *m/z* 348.0 (M+H)⁺.

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

To a solution of **105** (233 mg, 0.94 mmol) in EtOH (5.0 mL) was added NaBH₄ (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 MgSO₄ 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; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 28.33, 35.70, 46.70, 60.96, 71.22, 79.76, 157.01; MS (ESI): *m/z* 228.1 (M+H)⁺; HRMS-ESI (*m/z*): [M +H] calcd for C₉H₁₉NNaO₄, 228.1206; found. 228.1210.

***tert*-Butyl ((2*R*)-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 MgSO₄ 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; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = -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)⁺; HRMS-ESI (*m/z*): [M +H] calcd for C₁₅H₃₃NNaO₄Si, 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 μL, 3.07 mmol) in CH₂Cl₂ (4.0 mL) was added SOCl₂ (53 μL, 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 CH₂Cl₂ (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 citric acid, and extracted with CH₂Cl₂. The extracts were washed with 10% aqueous citric acid, satd NaHCO₃ brine, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. RuCl₃ (7.6 mg, 0.037 mmol) and a solution of NaIO₄ (157 mg, 0.74 mmol) in water (8.0 mL) were added to a mixture of the

residue and satd. K_2HPO_4 in CH_3CN (8.0 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred 0 °C for 1 h. Additional RuCl_3 (3.8 mg, 0.019 mmol) and a solution of NaIO_4 (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_4 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; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 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); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = -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 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(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_3CN (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_3 , brine, dried over MgSO_4 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_2O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and Et_3N (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 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -76.8$ (c 0.59, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 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); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ = 36.43, 45.43, 52.47, 59.06, 110.27, 114.84, 123.94, 125.33, 163.38; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, 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_3 and extracted with EtOAc. The extracts were washed with water and brine, dried over MgSO_4 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; $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -25.6$ (c 0.23, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 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); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ = 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 C₉H₁₀N₂O₂Br₂, 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 NaHCO₃ (44 mg, 1.17 mmol) in CH₂Cl₂ (5.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with satd Na₂S₂O₃, acidified with 10% aqueous 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 MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography over silica gel with CHCl₃-MeOH-AcOH (80:20:0.5) to give **32** (51 mg, 74%) as a white solid; mp 225–227 °C; [α]_D²⁸ = -5.6 (c 0.40, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ = 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 C₉H₈N₂O₃⁷⁹Br⁸¹Br, 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 (5*R*)-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 MgSO₄ 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 Et₂O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and Et₃N (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; [α]_D²⁵ = -13.3 (c 0.72, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ = 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 C₁₃H₁₄N₂NaO₂: 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 NaHCO₃ (44 mg, 0.521 mmol) in CH₂Cl₂ (8.0 mL)

at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with satd $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, acidified with 10% aqueous 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_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography over silica gel with CHCl_3 -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); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 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); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 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 $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$: 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-3-carboxylate 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_4 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_2O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and Et_3N (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 a white solid; mp 164.2-168.3 °C; $[\alpha]_{25}^D$ -48.5 (*c* 0.21, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 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); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ = 9.2, 36.0, 45.0, 53.1, 77.1, 105.7, 150.7, 160.2; HRMS-ESI *m/z* [*M* + Na] calcd for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{NaO}_2$: 204.0743; found: 204.0745.

(4S)-4-Methyl-3,4-dihydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-1(2H)-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_4 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_2O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and

Et₃N (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; [α]₂₅^D 16.2 (*c* 0.35, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 17.8, 46.9, 49.6, 109.8, 113.9, 121.5, 123.8, 161.5; HRMS-ESI *m/z* [M + Na] calcd for C₈H₁₀N₂NaO: 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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO₄ 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 a white solid; mp 171.8–175.0 °C; [α]₂₅^D –33.1 (*c* 0.79, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 18.5, 45.4, 50.0, 100.6, 106.5, 115.8, 124.4, 159.4; HRMS-ESI *m/z* [M + Na] calcd for C₈H₈⁷⁹Br₂N₂NaO: 328.8896; found: 328.8894.

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

SOCl₂ (0.046 mL, 0.628 mmol) was added to a solution of pyridine (0.211 mL, 2.62 mmol) in CH₂Cl₂ (7.0 mL) at 0 °C dropwise. A solution of **125** (160 mg, 0.523 mmol) in CH₂Cl₂ (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 CH₂Cl₂. The extracts were washed with 10% aqueous citric acid, satd NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. A solution of NaIO₄ (134 mg, 0.628 mmol) in water (4.0 mL) was added to a mixture of the residue, RuCl₃ (6.5 mg, 0.0314 mmol) and satd K₂HPO₄ (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 NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO₄ 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; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = –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 MgSO₄ 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 Et₂O and dried under reduced pressure. A mixture of the residue and Et₃N (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; [α]₂₅^D –72.9 (*c* 0.37, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 41.2, 55.3, 62.1, 109.9, 114.0, 122.9, 123.9, 161.6; HRMS-ESI *m/z* [M + Na] calcd for C₈H₁₀N₂NaO₂: 189.0634; found: 189.0636.

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

EDC-HCl (16 mg, 0.0852 mmol) and Et₃N (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 μ L, 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 CHCl₃–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; [α]₂₅^D 2.0 (*c* 0.29, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ = 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 C₁₁H₁₃⁸¹Br₂N₃NaO₃: 419.9165; found: 419.9175.

***tert*-Butyl (2-(((4S)-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 Et₃N (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 μ L, 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 MgSO₄ 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; [α]₂₅^D 6.55 (*c* 0.47, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ = 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 [$\text{M} + \text{Na}$] calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}^{79}\text{Br}_2\text{N}_4\text{NaO}_4$: 514.9900; found: 514.9898.

2-((4S)-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_3N (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_4 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 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{25}^{\text{D}}$ 8.77 (c 0.84, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 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); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ = 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 [$\text{M} + \text{Na}$] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}^{79}\text{Br}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$: 447.9267; found: 447.9266.

***N*-(2-aminoethyl)-2-((4S)-6,7-dibromo-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-yl)acetamide 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_2O to give **130** (6.4 mg, 76%) as a white solid; mp 239.9–244.4 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{25}^{\text{D}}$ 6.40 (c 0.30, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 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); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ = 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 [$\text{M} + \text{Na}$] calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}^{79}\text{Br}_2\text{N}_4\text{NaO}_2$: 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_3 and extracted with EtOAc. The extracts were washed with brine, dried over MgSO_4 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 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{25}^{\text{D}}$ –17.2 (c 0.060, CH_2Cl_2); ^1H NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 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 C₁₀H₁₀Br₂N₂NaO₂S: 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 MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography over silica gel with CHCl₃–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); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ = 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 C₉H₇Br₂N₂O₂S: 364.8600; found: 364.8597.

2-((4S)-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 Et₃N (7.0 μ L, 0.0498 mmol) were added to a mixture of **132** (6.1 mg, 0.0166 mmol), aniline (3 μ L, 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 MgSO₄ 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, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 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); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 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 C₁₅H₁₃Br₂N₃NaOS: 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.¹⁰² with a small modification. Briefly, the reaction mixture (100 μ L) contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 20 mM ascorbic acid (neutralized with 1M NaOH solution), 175 μ g/mL catalase, 10 μ M methylene blue, 200 μ 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 μ 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 μL of supernatant from each well was transferred to a new 96 well plate and mixed with 80 μL 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.

参考文献

- 1) Harwood, L. M.; Brickwood, A. C.; Morrison, V.; Robertson, J.; Swallow, S. *J. Heterocyclic Chem.*, **1999**, *36*, 1391–1408.
- 2) 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.
- 7) 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.
- 10) 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) Shauquzzaman, 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.
- 36) 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.
- 39) 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.; Olszansky, 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.; Tagliatalata-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.; Tagliatalata-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.; Robaey, 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.; Koblisch, 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グ株式会社 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、富田大介博士、浅野壮輝博士、笥広行博士、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

- 1) Shiokawa, Z.; 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.
- 2) Shiokawa, Z.; 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.
- 3) Shiokawa, Z.; Yoshidome, D.; Fukase, K.; Inuki, S.; Fujimoto, Y. Discovery of Novel Scaffold as Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Based on Pyrroloperazinone Alkaloid, Longamide B.

参考論文リスト

- 1) Ohashi, T.; Tanaka, Y.; Shiokawa, Z.; 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.
- 2) Asano, M.; Hashimoto, K.; Saito, B.; Shiokawa, Z.; 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.
- 3) 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. 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.; Shiokawa, Z.; 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.
- 5) Ohashi, T.; Oguro, Y.; Tanaka, T.; Shiokawa, Z.; 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.; Shiokawa, Z.; 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.
- 7) Fujimoto, Y.; Inamura, S.; Kawasaki, A.; Shiokawa, Z.; Shimoyama, A.; Hashimoto, T.; Kusumoto, S.; Fukase, K. Chemicals synthesis of peptidoglycan fragments for elucidation of the immunostimulating mechanism. *J. Endotoxin. Res.* **2007**, *13*, 189-196.
- 8) Inamura, S.; Fujimoto, Y.; Kawasaki, A.; Shiokawa, Z.; 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.