

博士論文

宿主因子を標的とした新規抗 HCV 剤の合成と
構造活性相関に関する研究

牧野 拓也

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成されたものである。

1. Takuya Makino, Seiji Yoshimura, Toshio Yamanaka, Masae Sawada, David Barrett., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 127251 (2020)
2. Takuya Makino, Seiji Yoshimura, Masahiro Neya, Toshio Yamanaka, Masae Sawada, Eisaku Tsujii, David Barrett., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 127251 (2020)
3. Takuya Makino, Junya Ishida, Toshio Yamanaka, Hidenori Ohki, Masao Uchida, Masae Sawada, David Barrett., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 127423 (2020)

目次

略語表

序論

第一節 本研究の背景	1
第二節 天然物創薬について	5
第三節 本研究の目的	7

本論

第一章 天然物スクリーニングより見出したシード化合物 **FR901459**の新規合成法開発

第一節 シード化合物 FR901459 の課題	8
第二節 研究方針	10
第三節 FR901459 の N, O-アシル転位反応に着目した新規合成法の開発方針	11
第四節 FR901459 における2位アミノ酸残基選択的 N, O-アシル転位反応の開発	13
第五節 抗 HCV 活性および免疫抑制活性の評価結果ならびに考察	17
第六節 本章のまとめ	18

第二章 開発候補化合物 **ASP5286**並びにその周辺化合物の構造活性相関

第一節 分子設計	19
第二節 FR901459 の4位および3,4 位アミノ酸残基での変換体のデザインと合成	20

第三節	4位および3,4位アミノ酸残基最適化によるリード化合物の創出ならびに考察	24
第四節	リード化合物の課題と方針および開発候補化合物 ASP5286の創出	31
第五節	開発候補化合物 ASP5286の高次評価結果	34
第六節	本章のまとめ	35
第三章	Bioconversion 誘導体から創出した開発候補化合物32並びにその周辺化合物の構造活性相関	
第一節	ASP5286の課題と方針	36
第二節	FR901459の9位および3,9位アミノ酸残基での変換体のデザインと合成	39
第三節	9位変換および3,9位アミノ酸残基最適化による開発候補化合物32の創出	44
第四節	本章のまとめ	49
結論		50
実験の部		52
参考文献		76
謝辞		80

略語表

本論文中における以下の用語、試薬は下記のように略記した。

Abu	2-aminobutyric acid
aq.	aqueous
Boc	tert-butoxycarbonyl
BOP-Cl	bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride
ChAla	cyclohexylalanine
Chg	cyclohexylglycine
CSA	camphorsulfonic acid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
Et	ethyl
Et ₂ O	diethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
FBS	fetal bovine serum
FKBP	FK506 binding protein
h	hour (s)
HCl	hydrochloric acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectra
HSA	human serum albumin
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
Ile	isoleucine
LCMS	liquid chromatography–mass spectrometry
Leu	leucine
M	mol/L
Me	methyl
MeBmt	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>E</i>)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-octenoic acid
min	minute (s)
MeCN	acetonitrile
MsOH	methanesulfonic acid
NCS	<i>N</i> -Chlorosuccimide

NS	non-structure
NT	not tested
PCR	polymerase chain reaction
Peg	polyethylene glycol
Ph	phenyl
Phg	phenylglycine
PK	pharmacokinetics
p.o.	per os
quant.	quantitative yield
Sar	sarcosine
SAR	structure-activity relationship
TBS	tert-butyldimethylsilyl
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
WSCD	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

序論

第一節 本研究の背景

肝炎とは肝臓に炎症が生じている状態と定義されるが、その原因はウイルス性肝炎からアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎に至るまで様々である。現在、ウイルス性肝炎については、A, B, C, D, E, G の6種類の原因ウイルスが報告されている。中でもC型肝炎ウイルス (HCV) に起因するC型肝炎は、日本における肝疾患の70~80%程度を占めるといわれ、今日も大きな社会問題になっている¹⁾。主に輸血などによる血液感染によりHCVに感染すると、一定の潜伏期間の後に急性肝炎を発症する。その後、慢性肝炎に移行し、肝繊維化、次いで肝硬変を経て最終的には肝ガンを発症する。

HCVは1本鎖プラス鎖RNAゲノムを有するフラビウイルス科に分類される。以前は、非A、非B肝炎ウイルスと呼ばれていたが、1989年にChooらにより肝炎血清よりウイルス遺伝子が同定されたことによりHCVと命名された²⁾。しかし、当時はHCVの*in vitro*増殖系が無く、またHCVはヒトを除くとチンパンジーにしか感染しないため、適切な*in vivo*モデルも無く、創薬研究としての進捗は十分ではなかった。この様な背景から、HCV治療として主に用いられたのが抗ウイルス作用と免疫賦活作用を併せ持つインターフェロン (IFN) 療法であった。しかし、IFN療法の有効性はHCVの遺伝子型に大きく依存し、genotype 2あるいはgenotype 3では70%以上の著効率を示すのに対し、日本人に最も多いgenotype 1での著効率は20%程度とその有効性に大きな課題を残していた。その後、リバビリンとの併用により有効性を増すことが報告され³⁾、さらにIFNをPegで化学修飾することにより持続性を増したペグインターフェロン (PegIFN) が開発された。この結果、PegIFN-リバビリン併用療法による著効率は、難治性である高ウイルス量の症例においても50%程度まで改善するに至った。しかし、その著効率はまだ十分とはいえ、さらに副作用あるいは服薬コンプライアンスの観点から、IFNを使用しない治療法が強く望まれてきた⁴⁾。

1999年にLohmannらにより、subgenomic HCV RNAを導入したヒト肝癌細胞株 (Huh7) においてHCV RNAが高率に複製されることが報告された⁵⁾。この細胞株でのHCV RNA複製は、HCV感染肝細胞における完全長のHCV RNAゲノムの複製系を模倣したものといえる。さらに、Wakitaらにより感染性ウ

ウイルスの培養系が確立され⁶⁾、様々な抗 HCV 剤を細胞レベルで評価することが可能になった。この成果は HCV 治療薬研究における大きな転機となった。医学における重要性から、HCV はウイルスゲノムについて最も詳細に同定されたウイルスの一つである。構造タンパク質 (E1, E2 エンベロープ) から非構造タンパク質 (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) に至るまで多くのタンパク質の機能が既に同定されている。そして、これらの機能研究を通じて、現在では HCV の生活環 (感染、翻訳、複製、粒子放出など) に関わる様々な創薬標的が明らかになっている⁷⁾。

創薬標的が同定され、また評価系が確立される中で、HCV の複製過程を標的とする創薬研究が先行した。熾烈な開発研究の中で、ウイルスの増殖に必須な酵素である HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤が最初に上市された⁸⁾。本阻害剤は良好な抗 HCV 効果を示したが、単剤では早期に耐性変異株の出現が確認されたことから、IFN あるいはリバビリンとの併用療法として承認されるに至った。更に、NS5B ポリメラーゼ阻害剤、および NS5A 阻害剤の誕生により、抗 HCV 治療プロトコールは一変した⁸⁾。すなわち、プロテアーゼ阻害剤、NS5A 阻害剤、あるいはポリメラーゼ阻害剤を 2 種または 3 種併用することにより、IFN を使用せずに 80%以上の高い著効率が達成された⁹⁾。

ところで、HCV 治療薬は HCV の生活環を標的とする直接的抗ウイルス薬 (direct-acting antivirals, DAAs) と宿主を標的とする宿主標的ウイルス薬 (host-targeting agents, HTAs) に分類される。プロテアーゼ阻害剤、NS5A 阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤はいずれも前者に分類され、単剤では耐性変異の出現が顕著であるため、複数の薬剤を併用することが必須である。さらに、治療前から耐性変異を有するウイルスの罹患者では DAAs による治療効果は顕著に低く、結果として新たな薬剤耐性変異が誘導され、この点は大きな課題の一つである。そのため、事前にウイルスの耐性変異の有無を検査した上で、患者に投与する DAAs を選択することが推奨されている。一方、宿主因子を標的とする HTAs では、DAAs と比べて耐性変異を起こしにくいことが期待される。そのため、IFN を使用しない DAAs 療法が標準療法になりつつある現状においても、耐性変異を生じにくい HTAs のニーズは依然として高い。

免疫抑制剤であるシクロスポリン A (CsA) には *in vitro* 抗 HCV 作用が報告されている¹⁰⁾。さらに CsA と IFN の併用では、HCV への著効率が改善するという臨床報告もなされている¹¹⁾。CsA の免疫抑制作用は、CsA が peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase 活性を持つシクロフィリン (CyP) と結合し、生じた CsA-CyP 複合体がカルシニューリン (CN) に結合することに因る。ところで、強力な免疫抑制作用を有

する医薬品タクロリムス（FK506）の作用メカニズムは、FK506-FKBP 複合体が CN に結合することに因るとされており、CsA と類似したメカニズムであるにも関わらず抗 HCV 作用を示さないことが報告されている¹²⁾。さらに、CsA と同様に CyP と結合するサングリフェリンは、CsA とは異なる母核構造を有しながら抗 HCV 作用を示すことが報告されている¹²⁾。以上の研究から CsA の有する抗 HCV 作用の標的因子は、CN ではなく CyP であることが強く示唆された。CsA が本来有する免疫抑制作用は、C 型肝炎治療においては重篤な副作用となるが、CsA と CyP の結合が抗 HCV 作用に関係するのであれば、抗 HCV 活性と免疫抑制活性を分離できる可能性が想定された。

しかし、抗 HCV 活性を免疫抑制活性から分離するには、CsA の有する CyP 親和性と抗 HCV 活性の関係を明らかにすることが必要であった。多くの精力的な研究の結果、宿主タンパク質である CyP と NS5B がウイルス複製に必要な複合体（複製複合体）を形成し、これに基づき HCV ウイルスは複製されることが明らかとなった¹³⁾。さらに、CsA は CyP と結合することでこの複製複合体の形成を妨げ、結果として HCV 複製を阻害することが解明された¹⁴⁾（Figure 1）。

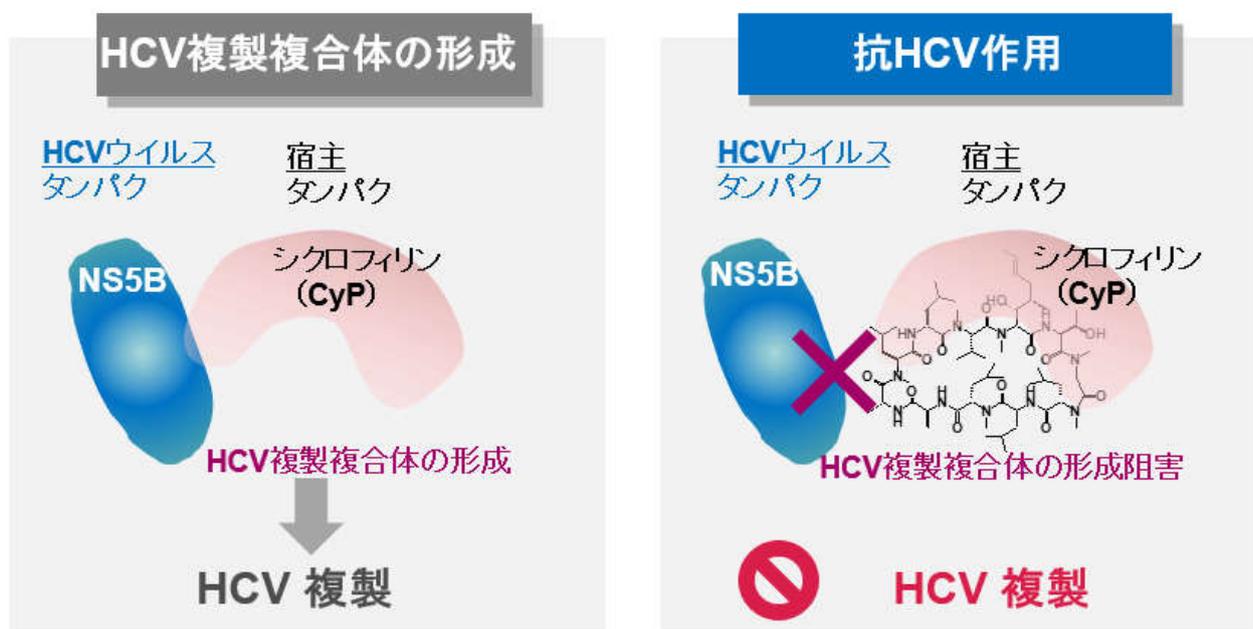


Figure 1. CsA の抗 HCV 作用メカニズム

これらの事実を踏まえて C 型肝炎治療における CyP の創薬標的としての妥当性を考察すると、CyP は生体分子であることから、その阻害剤は HTAs に分類され¹⁵⁾、耐性ウイルスの出現頻度は低値となることが予測された。したがって、CyP は創薬標的として有望であり、今後の新規抗 HCV 治療開発において重要な位置を占めると考えられた。ただし、CsA が本来有する強力な免疫抑制作用は、C 型肝炎治療においては重篤な副作用となる恐れがある。そこで、CsA からの C 型肝炎治療 (CyP 阻害剤) の創製においては、CsA の有する抗 HCV 活性を向上させつつ、その免疫抑制活性を低下させる必要がある。これが達成できれば、高い安全性と低耐性発現という特徴を併せ持つ有望な抗 HCV 剤の創製に繋がると考えられた。

以上の背景から、CyP 阻害剤は新規抗 HCV 剤の創薬標的として注目され、既に多くの研究開発が試みられている^{16, 17)}。Figure 2 に構造が報告されている代表的な CyP 阻害剤を示すが、その中で Debiopharma 社の開発した Debio-025 が最も先行しており、HCV を適応症とするフェーズ III 試験が実施されている¹⁸⁾。

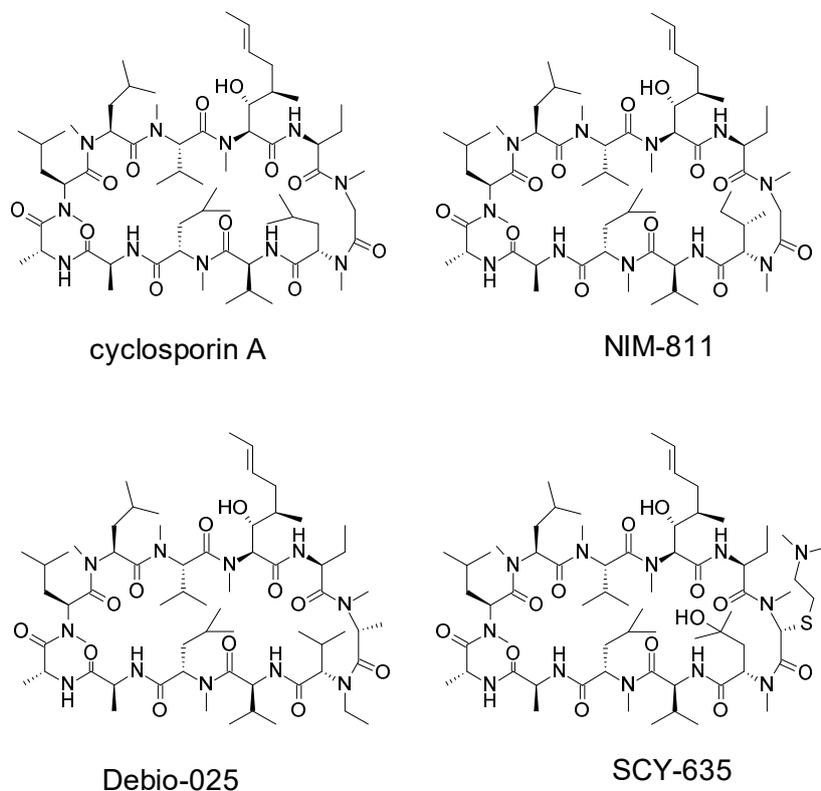


Figure 2. Representative CyP inhibitors

第二節 天然物創薬について

天然物創薬とは、その名の通り天然由来の化合物を用いた創薬を意味する。医薬品開発の歴史は天然物からの創薬を起源とし、生薬の様な天然由来の化合物の活用から始まり、ペニシリンやスタチンに代表される微生物由来の医薬品、更にはシクロスポリンやタクロリムスといった免疫抑制剤、タキソール等の抗がん剤など数多くの薬剤が上市されてきた。その後、ヒトゲノム解析による多様な創薬標的分子の同定、HTS (High Throughput Screening) 技術、あるいはコンビナトリアルケミストリーの進歩により低分子創薬研究が活発になった結果、多くの低分子医薬品が上市されるに至った。しかし、近年では低分子の創薬標的の枯渇が指摘され、低分子では難しい創薬標的に対して抗体をモダリティとする創薬研究の重要性が増している。

最近、分子量 500 以上 2000 未満程度の中分子化合物という新たなカテゴリーが創薬において再注目されている。中分子化合物は、低分子と抗体の両方の特徴を併せ持ち、タンパク質間相互作用の阻害等、低分子では困難な創薬標的を狙えること、さらに抗体医薬の課題である経口吸収性やコストの面においても、低分子医薬品や抗体医薬品に対し優位性があると考えられている。中でも、代表的な中分子化合物である天然物は、ユニークな生理活性を有していることから、医薬品開発において改めて注目を集めている。しかし、天然物一つひとつについて見ると、様々な生理活性を有するものが多く、医薬品として考えると多様な生物活性に起因する副作用が懸念される。また経口吸収性や水溶性など薬物動態や物性面での課題も多く、天然物そのものを医薬品とするのは困難な場合が多い。

その解決法として、天然物の構造変換による医薬品開発が挙げられる。一例を紹介すると (Figure 3)、著者の所属した旧藤沢薬品工業 (現アステラス製薬) は社内の発酵部門において多様な天然物ライブラリーを有しており、その中で新規深在性真菌症治療薬創出を目指したスクリーニングによりシード化合物として FR901379 を見出した¹⁹⁾。しかし、FR901379 は抗真菌活性スペクトルが狭く、また毒性面からも医薬品としての開発は困難であった。そこで、天然物の構造変換を実施することにより、真菌活性スペクトルの拡大、および毒性の回避に成功し、ミカファンギン (製品名 ファンガード) を上市するに至った。

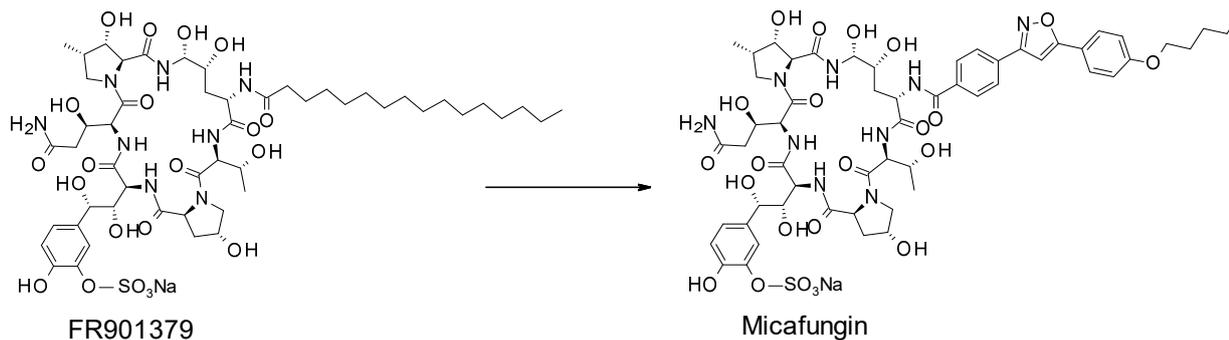


Figure 3. Examples of drug launched by structural transformation of natural product

一般に、天然物由来医薬品の開発において、構造変換に基づく医薬開発候補の創出は、大きく3つの手段に分類することができる。

(1) 全合成手法

安価な原料から全て化学合成により、天然物誘導体の開発を行う手法。

(2) 半合成手法

天然物を出発原料とする半合成により、天然物誘導体の開発を行う手法。

(3) 天然物の簡略化手法

計算化学的手法等を用いて Pharmacophore を同定し、天然物から合成しやすい誘導体へと構造変換する手法²⁰⁾。

いずれの手法にも良い面と悪い面があるが、天然物創薬を効率的に行うためには、天然物自体の構造の複雑さ、化学変換の容易さ、疾患の重篤度、投与形態など様々な点を考慮し、最適な開発手法を選択することが重要である。本論文においては、(2)に相当する半合成手法を利用した天然物創薬研究を行うこととした。

第三節 本研究の目的

著者は博士論文研究として、以下の二つの研究目標を設定した。第一は、天然物の構造的特徴を生かした多様な FR901459 誘導體合成手法の確立である。第二は、耐性懸念の低い HTAs としての新規 C 型肝炎治療薬 (CyP 阻害剤) の創製である。目標とする化合物のプロファイルとして以下の項目を設定した。

- (1) CyP 阻害剤に基づく抗 HCV 活性が強力であること
- (2) 免疫抑制活性が低いこと
- (3) 耐性懸念を低減するため、薬物動態 (PK) が良好であること
- (4) 製造コストが低いこと

本博士論文はその研究成果をまとめたもので、第一章では FR901459 のアミノ酸残基を容易に変換できる新規合成法の開発について、第二章ではこの合成法を用いた構造最適化研究による新規開発候補化合物 ASP5286 の創出について、そして、第三章では合成難易度の高い ASP5286 に代わる第二世代の新規開発候補化合物の創出について述べる。

本論

第一章 天然物スクリーニングより見出したシード化合物FR901459の新規合成法開発

第一節 シード化合物 FR901459 の課題

旧藤沢薬品工業（現アステラス製薬）において新規 CyP 阻害剤を創出するため、同社が所有する天然物ライブラリーのスクリーニングを実施した。その結果、免疫抑制剤として知られる CsA に類似した構造を有する天然物 FR901459 が見出された²¹⁾ (Figure 4)。CsA に対して FR901459 は 3 つのアミノ酸残基が異なり、特に 2 位アミノ酸残基にスレオニン(Threonine)を有している点が特徴的である。

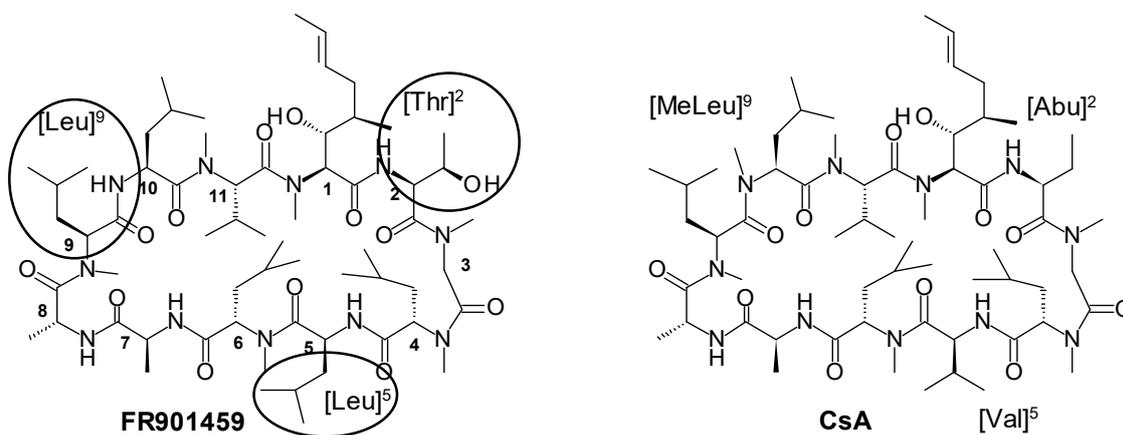


Figure 4. Structures of FR901459 and CsA

既知の CyP 阻害剤である CsA との比較を目的とし、FR901459 の抗 HCV 活性および免疫抑制活性を評価した (Table 1)。その結果、FR901459 は CsA より抗 HCV 活性が約 2 倍強く、かつ副作用である免疫抑制活性は約 1/2 であった。しかし、依然として強力な免疫抑制活性を示した。更にラットにおける経口投与での PK 試験を行ったところ、FR901459 の経口吸収性は著しく低いことが判明した。また、溶解性試験の結果、溶解度は 6.5 ug/mL と低値で、物性的にも課題があり FR901459 自体の医薬品としての開発は困難であると判断した。そして、FR901459 の免疫抑制活性のさらなる低減および経口吸収性や溶解度の向上による薬物動態の改善には、FR901459 の構造変換が必須であるとの考えに至った。次節では、この課題の解決に向けた研究の方針について述べる。

Table 1. Anti-HCV activity, immunosuppressive activity, pharmacokinetic properties, and aqueous solubility

Compound	Anti-HCV activity EC ₅₀ (µg/mL) ^a	Immunosuppressive activity IC ₅₀ (µg/mL) ^b	Rat PK, p.o. AUC _{24h} (ng·h/mL) ^c /F(%) ^d	Aqueous solubility JP2 (µg/mL) ^e
CsA	0.44	0.010	NT	NT
FR901459	0.096	0.026	140/4.3	6.5

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon replication in the presence of 5% fetal bovine serum (FBS).

^b Inhibitory effect of concanavalin A (ConA)-induced proliferation of mouse splenocytes.

^c Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 24 hours after dosing.

^d Absolute oral bioavailability.

^e Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid for disintegration test (JP2: pH=6.8).

第二節 研究方針

CsA について、CyP および CN との複合体の X 線結晶構造が報告された²²⁾。すなわち、CsA の11のアミノ酸残基のうち、1位 [MeBmt]¹、2位 [Abu]²、10位 [MeLeu]¹⁰、11位 [MeVal]¹¹の各アミノ酸残基は CyP に結合し、さらに、4位 [MeLeu]⁴、5位 [Val]⁵、6位 [MeLeu]⁶、7位 [Ala]⁷の各アミノ酸残基は CN に結合することが示唆された (**Figure 5**)。このことから、CyP と結合するアミノ酸残基の変換で CyP との親和性向上により抗 HCV 活性を向上させ、さらに CN と結合するアミノ酸残基の変換で CN との親和性低下により免疫抑制活性を低下させることが可能ではないか考え、CsA の複合体結晶構造の詳細な解析を実施した。その結果から、筆者は CyP および CN との結合の境界領域にある3位のアミノ酸残基 [Sar]³の構造最適化が、抗 HCV 活性を向上させつつ免疫抑制活性を低減できるという作業仮説を立てた。すなわち、本研究においては、リード化合物である FR901459の3位アミノ酸残基 [Sar]³に対し側鎖構造の導入による構造最適化を検討することとした。

既存の CsA 誘導体の合成において3位アミノ酸残基誘導体の合成例が報告されているが^{17,18)}、汎用性の高い合成の報告例は無かった²³⁾。そこで、FR901459の3位アミノ酸残基を変換する新規合成法の開発に着手した。CsA の3位アミノ酸残基に D-MeAla を導入することにより CyP への親和性が向上するとの知見を基に^{16,17,18)}、FR901459の3位アミノ酸残基に D-MeAla を導入した[D-MeAla]³-FR901459を合成標的として設定した。

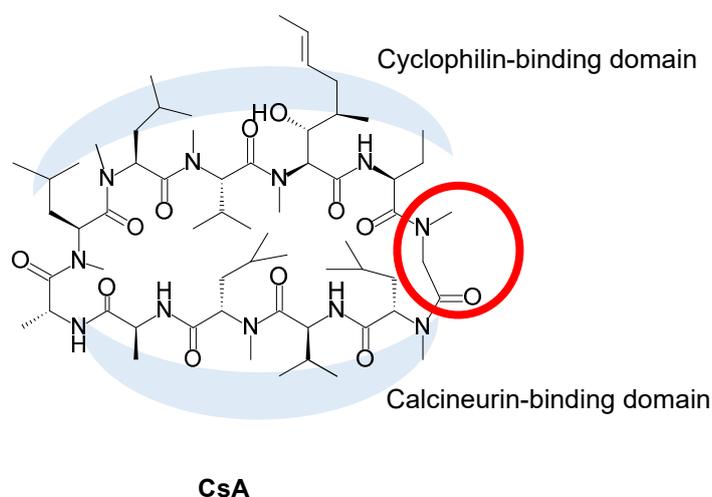
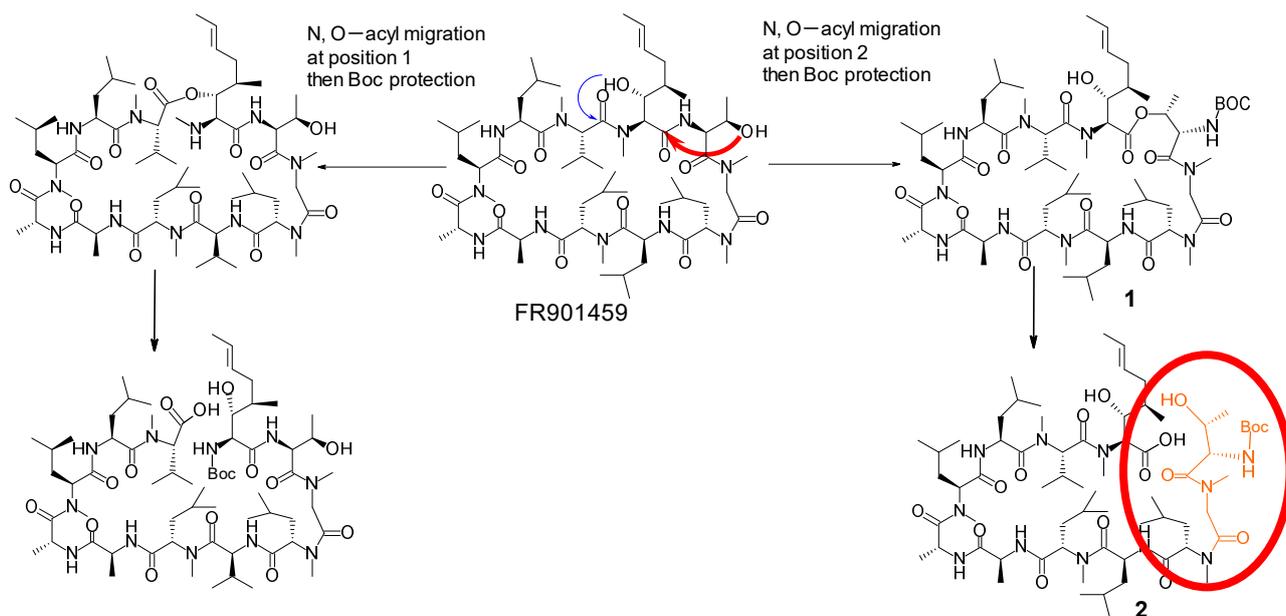


Figure 5. Binding domains of CsA

第三節 FR901459 の N,O-アシル転位反応に着目した新規合成法の開発方針

FR901459の3位アミノ酸残基[Sar]³の変換手法開発に当たって、CsA において報告されている1位アミノ酸残基[MeBmt]¹における N,O-アシル転位反応に着目した²⁴⁾。すなわち、CsA は分子内にヒドロキシ基を有しており、酸処理することにより[MeBmt]¹において分子内 N,O-アシル転位反応が進行し、デブシペプチドを生成することが報告されている。一方、FR901459では、CsA とは異なり同様な1位アミノ酸残基に加え、2位スレオニン残基についてもヒドロキシ基を有していることから、原理的には1位、2位両方のβ-ヒドロキシ基において N,O-アシル転位反応が進行する可能性がある (Scheme 1)。2位スレオニン残基選択的に N,O-アシル転位反応を起こすことができれば、生じたデブシペプチド (化合物1) から誘導される開環体 (化合物2) が、3位 Sar を変換する上で重要な鍵中間体になると考えた。

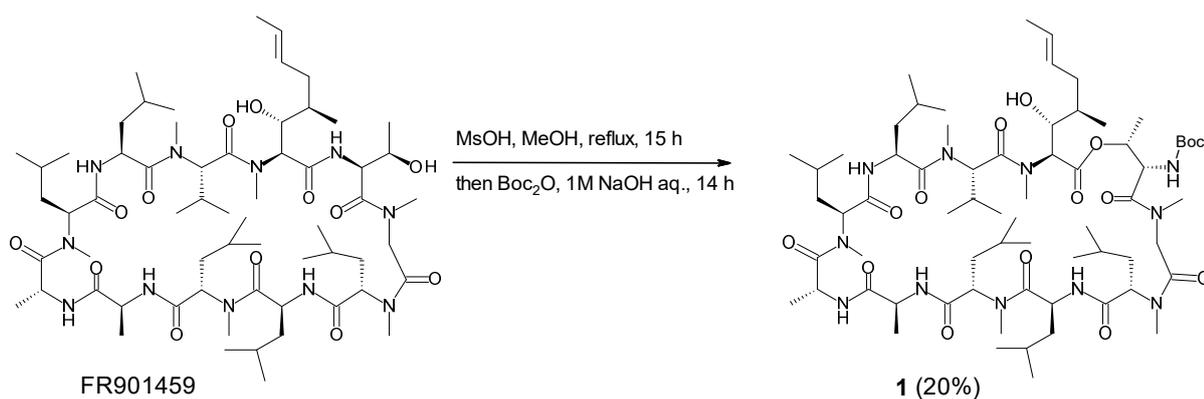


Scheme 1. Possible N, O-acyl migration of FR901459 at the amino acid residues 1 and 2.

第四節 FR901459 における 2 位アミノ酸残基選択的 N,O-アシル転位反応開発

N,O-アシル転位反応は、セリンあるいはスレオニン残基の様に β 位にヒドロキシ基を有するアミノ酸残基を含むペプチドを酸処理することにより、当該アミノ酸のアミノ基とアミド結合を形成するアシル基が β 位にヒドロキシ基へ転位し、O-ペプチド (デプシペプチド) を与える反応であり、多くの研究報告例がある²⁶⁾。当該転位反応により生じた O-ペプチドは、温和な反応条件下ラクトン部での加水分解が可能となる。通常、アミド結合の開裂には激しい反応条件が必要であるため、N,O-アシル転位反応は、 β 位にヒドロキシ基を有するアミノ酸残基を構成成分とする環状ペプチドを直鎖の開環体へと誘導する有用な手段である²⁷⁾。

FR901459の3位アミノ酸残基[Sar]³の変換手法開発に当たり、まず CsA において報告されている N,O-アシル転位反応の条件を適用することとした²⁴⁾。すなわち、MsOH 存在下 (5当量) メタノール溶媒中で15時間加熱還流することで、N,O-アシル転位反応の進行を確認した。しかし、この転位反応生成物は不安定であり、単離が困難であったため、生成した一級アミノ基を Boc 基で保護してから単離した (Scheme 2)。すなわち、1M NaOH 存在下に Boc₂O を用い室温にて14時間処理した。その結果、N,O-アシル転位反応が2位スレオニン部位で選択的に進行した生成物**1**を収率20%で得た。



Scheme 2. N,O-acyl migration reaction of FR901459 in the presence of MsOH in methanol.

上述の如く、1位および2位アミノ酸残基両方で N,O-アシル転位反応が進行する可能性があった。しかし、予想に反し反応は2位アミノ酸残基選択的に進行し、1位アミノ酸残基からの転位生成物は得られなかった。この選択性の発現は、おそらく分子内水素結合の存在で説明できると考えている²⁸⁾。すなわ

ち、1位アミノ酸残基のヒドロキシ基が分子内水素結合に関与することで1位ヒドロキシ基の反応性が低下し、1位からのN,O-アシル転位反応の反応性が低下したと推察される²⁹⁾。その結果、2位アミノ酸残基においてのみN,O-アシル転位反応が選択的に進行したと考えている。

以上、環状ペプチドFR901459の3位アミノ酸残基を変換する合成手法を確立する上で、酸処理により2位スレオニン残基選択的にN,O-アシル転位反応が進行するという知見を得ることができた。一方で、本反応の収率は20%程度に留まり、医薬品開発における合成手法とするには、更なる収率の改善が必要であった。そこで、収率向上のために当該反応の最適化に着手した。N,O-アシル転位反応は、用いる溶媒および酸の種類に大きく影響を受けることが報告されている³⁰⁾。したがって、まず文献において最も良好な収率が得られているTHFを溶媒として選択し、反応時間を固定して酸の種類の効果を検討した(**Table 2**)。すなわち、新たに*p*-TsOHおよびCSA、および3 M HCl (各5当量)を酸として用い、THF溶媒中で15時間加熱還流した。反応後、上述の如く、1M NaOH存在下にBoc₂Oを用い生成した一級アミノ基をBoc基で保護してから単離し、単離収率を求めた。その結果、検討した中で*p*-TsOHが最も良好な収率(63%)を示した。一方で、MsOH(59%)やCSA(56%)では若干収率が低く、さらに3 M HClでは21%と顕著に収率が低下した。尚、本反応ではいずれの条件においても原料は完全に消失しており、また化合物**1**を反応後に有機溶媒による抽出操作のみで純度の高い化合物**1**が得られている。収率が中程度である原因として、本反応中に副産物が生じているものの、その副産物が高極性の分解物であるため、抽出操作において水層に残存したためと思われる。

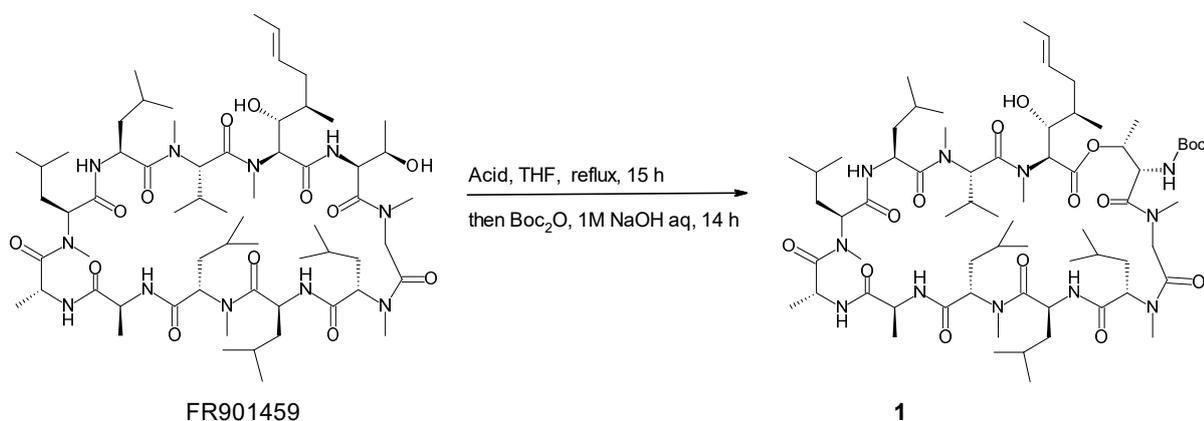


Table 2. Acid screening for the N, O-acyl migration reaction of FR901459

Entry	Acid (5 eq.)	1:Yield (%)
1	MsOH	59
2	<i>p</i> -TsOH	63
3	CSA	56
4	3 M HCl	21

上記結果から、酸として *p*-TsOH を用いることで、比較的良好な収率が得られたため、次に溶媒の最適化を行った (**Table 3**)。すなわち、N,O-アシル転位反応において報告例のある溶媒として dioxane、MeOH、EtOH、IPA を選択し、上記の反応条件下でその収率を検討した。その結果、上述の THF (63%) に比べ、dioxane ではより良好な収率 (70%) で目的物が得られた。一方、アルコール系溶媒では反応は複雑化し、MeOH (25%) および EtOH (42%)、IPA (44%) ではいずれも収率は顕著に低下した。いずれの反応においても原料の残存は見られないことから、高極性の分解産物の増加が収率の低下に繋がったと考えている。これらの結果から、反応溶媒として THF あるいは dioxane を、酸として *p*-TsOH を用いることで N,O-アシル転位反応に基づく化合物**1**の合成の収率を適度に改善できることが明らかとなった。

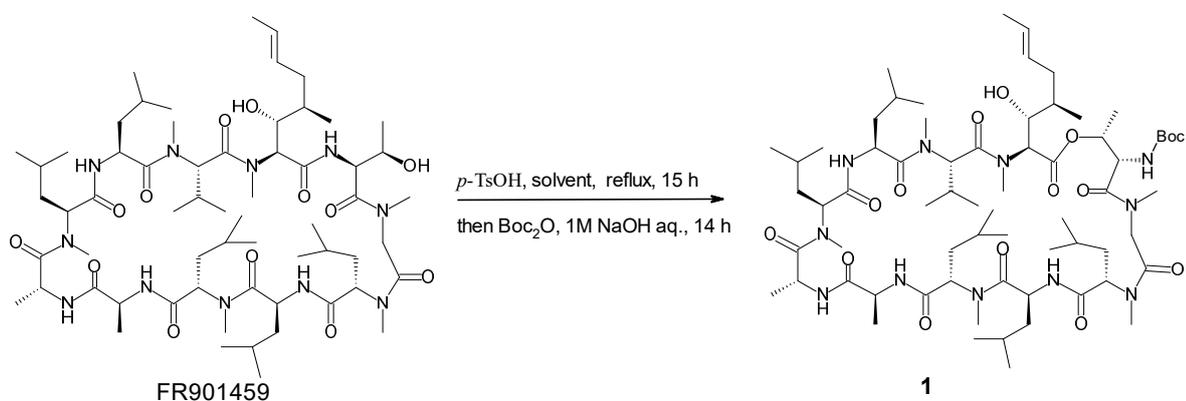
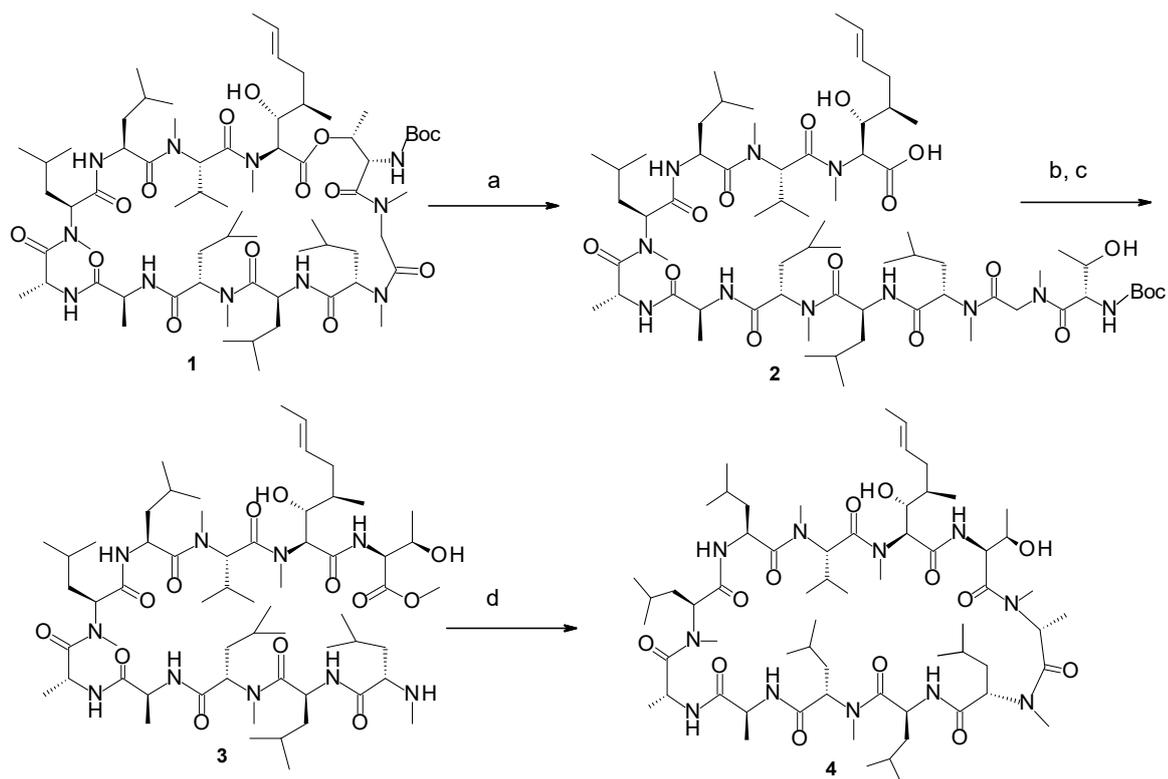


Table 3. Solvent screening for the N, O –acyl migration reaction of FR901459

Entry	Solvent	1:Yield (%)
1	THF	63
2	dioxane	70
3	MeOH	25
4	EtOH	42
5	IPA	44

3位アミノ酸残基誘導の鍵となる N,O–アシル転位反応を達成できたことから、FR901459の3位 Sar 残基を D-MeAla を置換した誘導体4の合成に着手した。その合成ルートを **Scheme 3**に示す。すなわち、先ずデプシペプチドである化合物1をメタノール中、1M NaOH で氷冷下2時間処理した。その結果、加水分解反応が容易に進行し、鎖状ペプチド2が収率90%で得られた。次いで、当該ペプチドの1位 [MeBmt]¹のカルボキシル基に2位アミノ酸としてスレオニンを経由して縮合した。すなわち、ジクロロメタン中 H-Thr-OMe 塩酸塩を HOAt 存在下にて WSCD により室温下、1.5時間反応させ縮合した。反応液を後処理後、得られた粗ペプチドを精製することなく、そのままジクロロメタン中 TFA で5時間処理し、さらに PhNCS によるチオウレア化と続く 1M HCl 処理によるエドマン分解を二度連続して行うことにより、3位のアミノ酸残基のみが欠落した鎖状ペプチド3を得た。ペプチド3は、3位アミノ酸を変換するための共通中間体である。化合物3と Fmoc-D-Me-Alanine の縮合反応、続く Fmoc 基およびメチルエステル基の除去を行い、CH₂Cl₂中での環化反応により [D-MeAla]³-FR901459 (4)を総収率30%で得た。N,O–アシル転位反応と一連のペプチドデグラデーション手法を検討した結果、FR901459の3位アミノ酸残基を変換することが可能となる半合成手法を確立することができた。ところで、NMR 解析の結果、化合物4は単一のコンフォメーションを有することが示唆された。複数のコンフォメーション混合物である FR901459との比較から、3位アミノ酸残基への置換基導入によりコンフォメーション変化を生じたと考えている。



Scheme 3. Synthesis of **4**, [D-MeAla]³-FR901459

Reagents and conditions: (a) 1 M NaOH aq., MeOH, ice cooling, 90%; (b) Thr-OMe HCl, HOAt, WSCD, CH₂Cl₂, then TFA, CH₂Cl₂; (c) PhNCS, EtOAc, 1 M HCl aq. then PhNCS, EtOAc, 1 M HCl aq.; (d) Fmoc-NMe-D-Ala, BOP-Cl, CH₂Cl₂, then 1 M NaOH aq., dioxane, then HOAt, WSCD, CH₂Cl₂, 50 °C, 48% in 3 steps.

第五節 抗 HCV 活性および免疫抑制活性の評価結果ならびに考察

合成した化合物**4**の *in vitro* 抗 HCV 活性は、real-time RT-PCR³¹⁾を用いて HCV レプリコン複製を50% 阻害する化合物濃度を EC₅₀値として算出した (Table 4)。3位アミノ酸残基[Sar]³側鎖に置換基を持たない FR901459と比較し、3位アミノ酸残基が D-MeAla に変換された化合物**4**の抗 HCV 活性は、約3倍上昇した。一方、免疫抑制活性については約1/3に減弱した。先に述べた様に、CsA の誘導において3位アミノ酸残基を D 体アミノ酸残基へ変換することによりコンフォメーションが変化し、CyP との親和性の向上が報告されている²⁷⁾。CsA とは異なる構造を有する FR901459においても、D 体アミノ酸残基への変換が抗 HCV 活性の向上に繋がったことから、同様なコンフォメーション変化が化合物**4**においても生じ、CyP との親和性が向上したものと推察される。さらに、FR901459の3位アミノ酸残基側鎖に D 体アミノ酸残基を導入することで免疫抑制作用が低下するという新たな知見が得られた意義は大きい。3位アミノ酸残基は CyP と CN との境界領域に位置するため、3位への置換基の導入は CN との親和性を減じ、その結果として免疫抑制活性を低減したと思われる。

化合物**4**は、*in vitro* 抗 HCV 活性の向上に加え、課題であった免疫抑制活性を低減した。しかし、化合物**4**は依然として強力な免疫抑制作用を有する。したがって、免疫抑制活性の低減を目指したさらなる構造変換が必要であると考えた。

Table 4. *In vitro* activity of FR901459 and **4**, [D-MeAla]³-FR901459

Compound	Anti-HCV activity EC ₅₀ (μg/mL) ^a	Immunosuppressive activity IC ₅₀ (μg/mL) ^b
FR901459	0.096	0.026
4	0.038	0.070

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon replication by qRT-PCR.

^b Inhibitory effect of concanavalin A (ConA)-induced proliferation of mouse splenocytes.

第六節 本章のまとめ

第一章では、先ず自社天然物ライブラリーのスクリーニングより見出したFR901459の課題を抽出し、これを解決するために、FR901459の構造変換に基づく創薬の研究方針を立案した。すなわち、FR901459におけるCyP結合部位に相当するアミノ酸残基の構造最適化による抗HCV活性の向上、およびCN結合部位に相当するアミノ酸残基の構造最適化による免疫抑制活性の低下である。ところで、複雑な構造を有する天然物を起点にする創薬では、効率的な化合物合成が鍵となる。そこで筆者は、時間のかかる全合成に代わる代替手法として、効率的かつ汎用性のあるFR901459の半合成手法の確立を目指した。すなわち、N,O-アシル転位反応に着目し、FR901459において2位アミノ酸残基選択的なデプシペプチド化を見出した。さらに反応条件の最適化を検討し、良好な収率でデプシペプチド体を得る反応条件の開発に成功した。続いて、3位のアミノ酸残基を自在に変換する合成手法を開発すべく、デプシペプチド1位アミノ酸残基C末端でのラクトンの加水分解、次いで、生じたペプチドC末端への2位スレオニン残基の再導入、2回のエドマン分解によるN末端からの2つのアミノ酸残基の除去、さらに新規3位アミノ酸残基としてのFmoc-NMe-D-Ala-OHの導入、Fmoc脱保護後のWSCD-HOAt法によるアミド形成反応による再環化反応を経る一連の反応工程により、FR901459からその3位アミノ酸残基をD-MeAlaへと置換した[D-MeAla]³-FR901459(4)の合成に成功した。化合物4の生物活性評価より、3位D-MeAla基置換は、*in vitro*抗HCV活性の向上に加え、懸案であった免疫抑制活性の低減をもたらした。しかし、化合物4は依然として強力な免疫抑制作用を示したことから、免疫抑制活性の低下を目指したさらなる構造変換が必要となった。次章では、免疫抑制活性の低下を目指したアミノ酸残基の更なる変換およびその最適化について述べる。

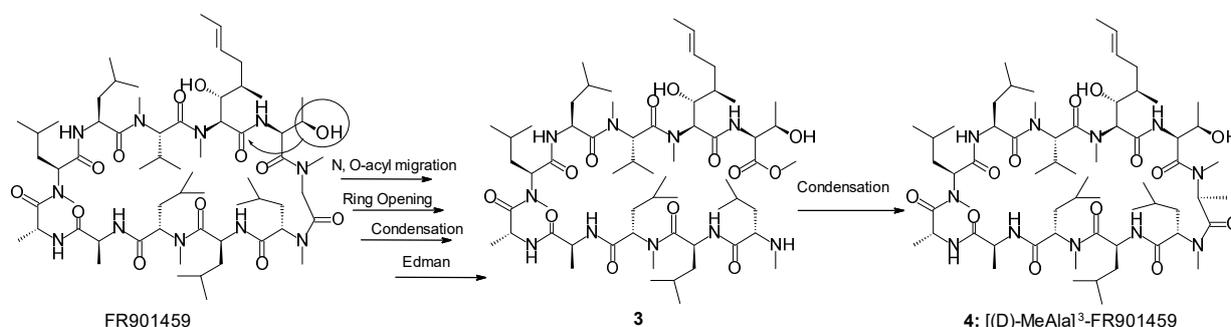


Figure 6. Synthesis of compound 4 ([D-MeAla]³-FR901459).

第二章 開発候補化合物ASP5286並びにその周辺化合物の構造活性相関

第一節 分子設計

第一章において、FR901459の3位アミノ酸残基側鎖に(*R*)-メチル基を導入した化合物**4** (Figure 7) の薬理活性評価から、免疫抑制活性を更に減弱させる必要性が明らかとなった。そこで、第一章第二節で述べた CsA の X 線結晶構造解析結果を基盤に、CN 結合部位に相当する4位アミノ酸残基を変換することで、CN への結合親和性を減弱させ、免疫抑制活性の低減を目指すことにした。加えて、抗 HCV 活性のさらなる向上を達成するためには、CyP 結合部位に関連するアミノ酸残基の変換も重要と考え、4位のみならず第一章で記載した3位アミノ酸残基も同時に変換した誘導体をデザインし、それらの半合成法開発に着手した。

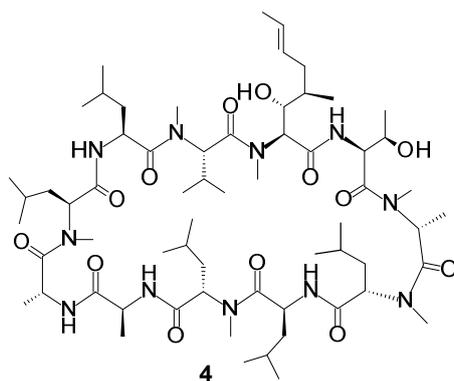


Figure 7. Structure of compound 4

第二節 FR901459 の 4 位および 3,4 位アミノ酸残基での変換体のデザインと合成

FR901459の4位および3,4 位でのアミノ酸残基変換体の構造を **Figure 8**に示す。免疫抑制活性の低減を検討するために、4位アミノ酸残基を変換した化合物**7, 8, 9, 10**をデザインした。さらに、抗 HCV 活性の向上と免疫抑制活性の低減の両立を目指し、3位および4位アミノ酸残基を同時に変換した化合物**6, 11, 12, 13, 14, 15**をデザインした。前者では、3位アミノ酸残基を Sar 残基の固定し、4位アミノ酸残基を FR901459に見られる NMe-Leu から、類似したアルキル鎖あるいは芳香環を有する NMe-ChAla (化合物**7**)、NMe-Ile (化合物**8**)、NMe-Chg (化合物**9**)、NMe-Phg (化合物**10**) に変換した。一方、後者では、3位アミノ酸残基を D-MeAla 残基に固定し、4位アミノ酸残基を NMe-Thr (Me)(化合物**6**)、NMe-Ile (化合物**11**)、NMe-Chg (化合物**12**)、NMe-Phg (化合物**13**)、NMe-Thr (tBu) (化合物**14**)、NMe-Thr (化合物**15**)に変換した。

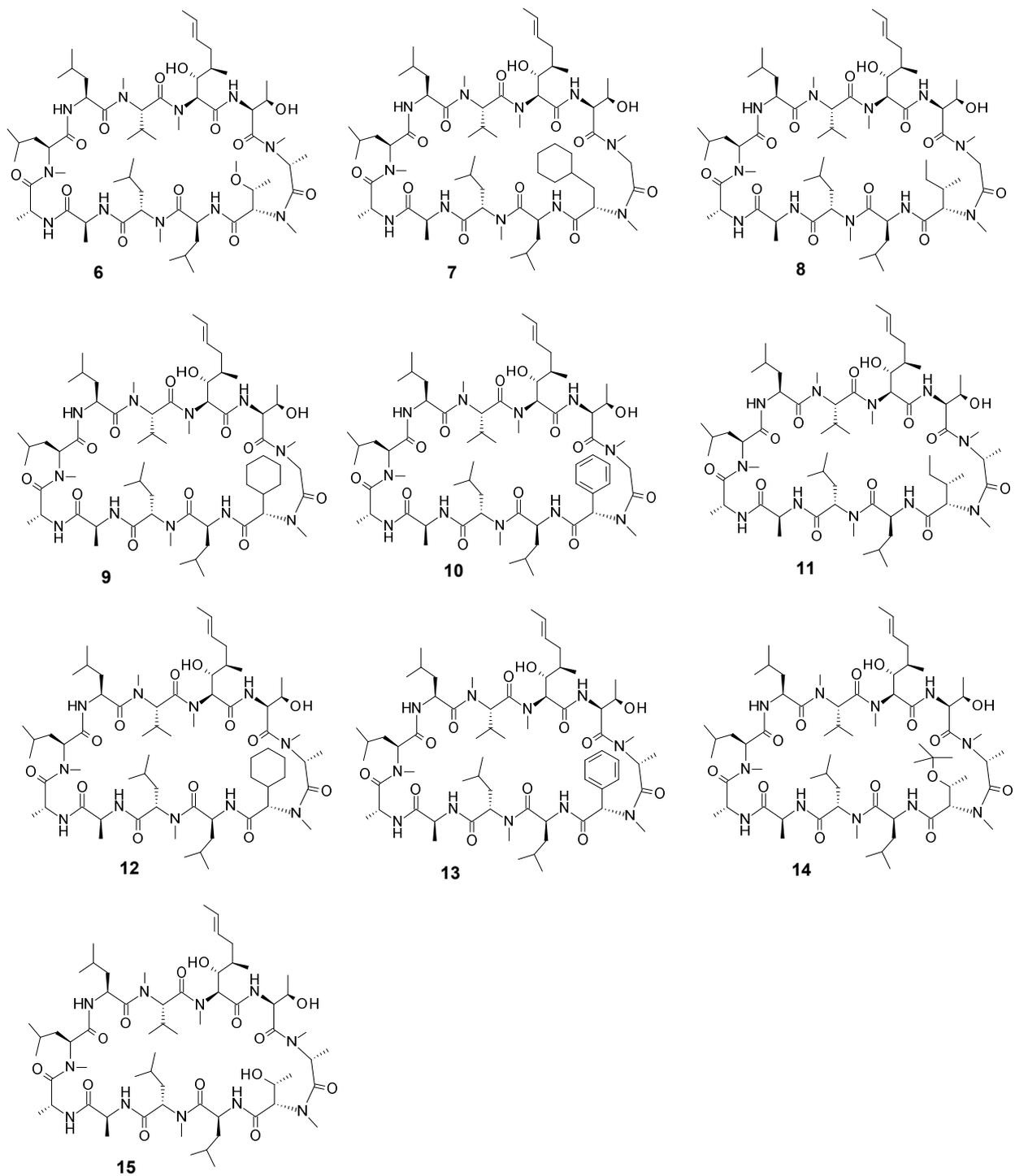
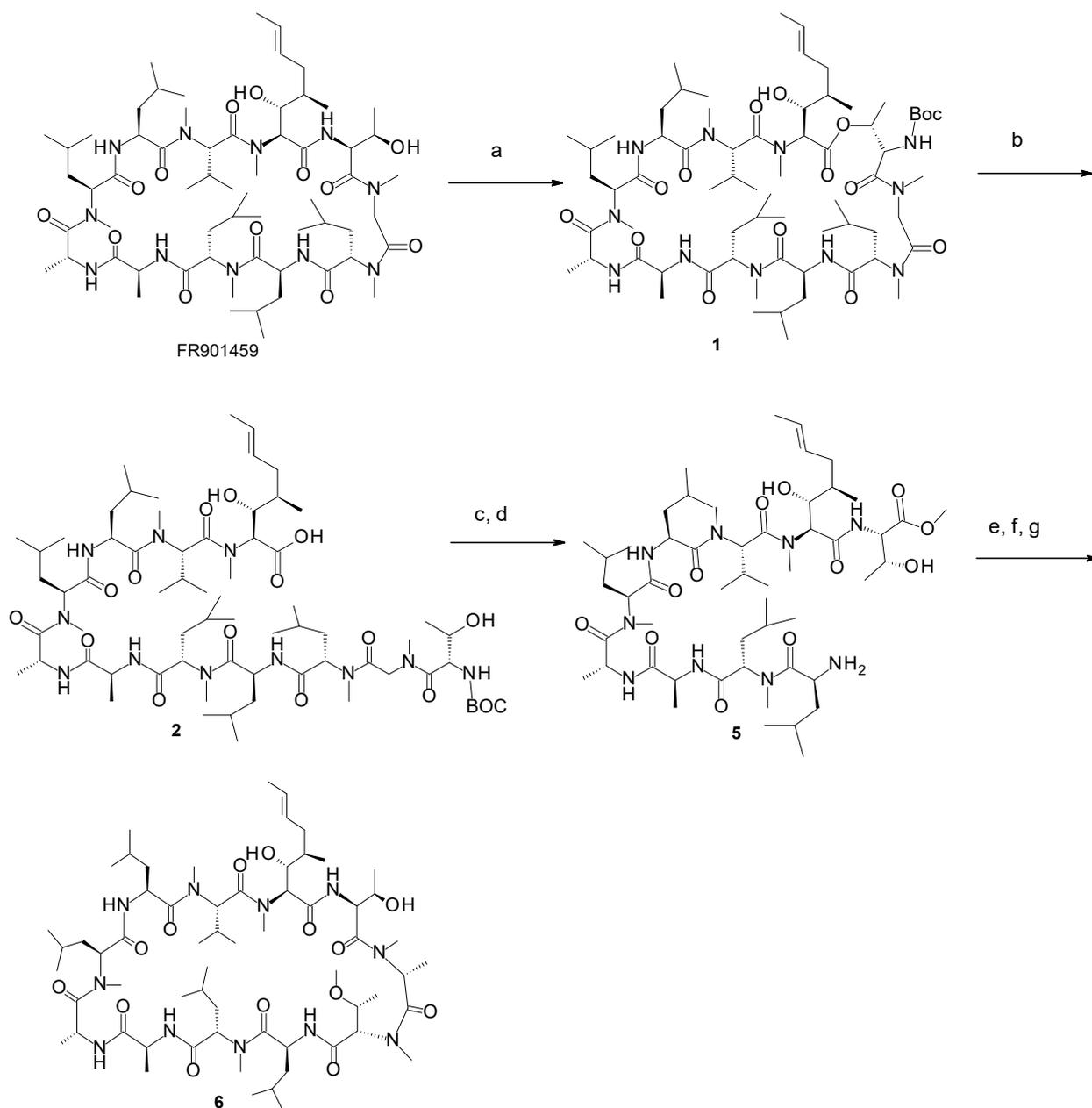


Figure 8. FR901459 の 4 位および 3,4 位アミノ酸残基誘導体の構造一覧

これらの誘導体は **Scheme 4**に示す合成ルートにより合成した。すなわち、第一章第四節で取得した中間体**2** (**Scheme 3**) に対し、**Scheme 3**に記載する合成方法と同様な反応工程を用い、ペプチド C 末端に 2 位アミノ酸残基に相当するアミノ酸残基 (スレオニン) を縮合し、続く脱 Boc 化後にペプチド N 末

端より3回のエドマン分解を連続して行うことで、3位および4位アミノ酸残基を欠いた鎖状ペプチド**5**を収率41%で得た。ペプチド**5**は、3位および4位アミノ酸残基を変換するための共通中間体である。以降は、4位アミノ酸残基の置換基とし NMe-Thr(Me)を有する化合物**6**の合成を例に取り記載する。すなわち、ペプチド**5**の N 末端である5位ロイシン残基のアミノ基に対して、4位アミノ酸残基として Boc-NMe-Thr(Me)-OH を WSCD-HOAt 法にて縮合後、その N-Boc 基を TFA にて脱保護した。次いで、生じた NMe-Thr(Me)の二級アミノ基に対して、3位アミノ酸として Fmoc-D-(Me)Ala-OH を縮合後、その Fmoc 基およびペプチド C 末端の2位スレオニン残基を保護しているメチルエステルの除去を行い、CH₂Cl₂中 WSCD-HOAt 法にて環化することで(29%, 3-steps)、3位および4位アミノ酸がそれぞれ NMe-DAla および NMe-Thr(Me)へ変換された化合物**6**を総収率11%で得た。NMR 解析の結果、化合物**6**は単一のコンフォメーションを有することが示唆された。複数のコンフォメーション混合物である FR901459との比較から、FR901459の3位アミノ酸が D-MeAla へと置換された[(*R*)-DMeAla]³-FR901459 (**4**)と同様に FR901459に対してコンフォメーションの変化が生じたと考えている。

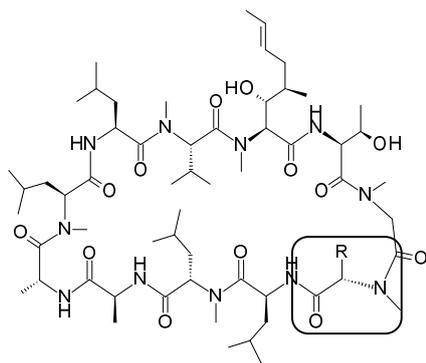


Scheme 4. Synthesis of 6

Reagents and conditions: (a) *p*-TsOH, THF, then Boc₂O, 63%; (b) 1 M NaOH aq., MeOH, ice cooling, 90%; (c) Thr-OMe HCl, HOAt, WSCD, CH₂Cl₂, then TFA; (d) PhNCS, EtOAc, 1 M HCl aq. then PhNCS, EtOAc, 1 M HCl aq. then PhNCS, EtOAc, 1 M HCl aq., 41% in 2 steps; (e) Boc-NMe-Thr(Me), HOAt, WSCD, EtOAc, ice cooling, then TFA, CH₂Cl₂, ice cooling, 53%; (f) Fmoc-NMe-D-Ala, BOP-Cl, EtOAc then 1 M NaOH aq., dioxane, ice cooling, 98%; (g) HOAt, WSCD, EtOAc, 56%.

第三節 4位および3,4位アミノ酸残基最適化によるリード化合物の創出ならびに考察

はじめに、3位アミノ酸残基を FR901459 と同等の Sar 残基に固定し、4位 NMe-Leu 残基の構造活性相関を検討した。Table 5 に示す様に、より嵩高い置換基である NMe-ChAla 残基へ置換した化合物7では、抗 HCV 活性を維持しつつ免疫抑制活性は FR901459 の1/3 と緩徐に低減した。次に β 分岐を有する NMe-Ile 残基へ置換した化合物8では、興味深いことに免疫抑制活性は約30倍低下した。NMe-Leu 残基と NMe-Ile 残基の比較から、免疫抑制活性の低下には4位アミノ酸残基の β 位へメチル基の挿入が重要であることが考察された。明確な理由は不明であるが、 β 位へメチル基の配置により化合物6と CN の間で立体的な反発が生じ、CN に対する親和性が減弱したのではないかと推察した³²⁾。そこで、4位に β 位に分岐構造を持つ他のアミノ酸残基を導入し、免疫抑制活性への効果を検証した。その結果、NMe-Chg 残基あるいは NMe-Phg 残基の様に β 位に環状構造を有するアミノ酸残基を導入した場合も、免疫抑制活性はそれぞれ約1/16および1/31と顕著に低下した。これらの結果から、4位アミノ酸残基の β 位に置換基を有するアミノ酸残基の導入が、免疫抑制活性の有意義な低減をもたらすことを見出した。しかし、Table 5 に示す通り、4位アミノ酸残基を変換した誘導体の抗 HCV 活性は、最高でも NMe-Chg 残基を有する化合物9の0.063 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に留まり、リード化合物 FR901459 (0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と同程度であった。したがって、抗 HCV 活性については、さらなる改善の必要があると考えた。

Table 5. Anti-HCV activity and immunosuppressive activity of 7-10

Compound	Residue 4 Side chain R	Anti-HCV activity EC ₅₀ (μg/mL) ^a	Immunosuppressive activity IC ₅₀ (μg/mL) ^b
FR901459	Leu	0.096	0.026
7	ChAla	0.086	0.065
8	Ile	0.15	0.77
9	Chg	0.063	0.41
10	Phg	0.12	0.80

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon replication by qRT-PCR.

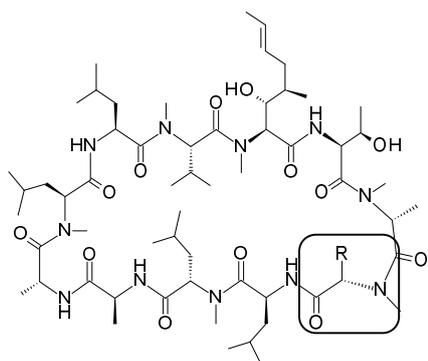
^b Inhibitory effect of concanavalin A (ConA)-induced proliferation of mouse splenocytes.

本研究では、既に第一章において、3位アミノ酸残基の誘導として(*R*)-メチル基を導入した化合物**4**において、抗 HCV 活性が上昇するという知見を得ている。そこで、3位アミノ酸残基を化合物**4**に特徴的な D-MeAla 残基に固定し、4位アミノ酸残基の誘導を行った。この誘導では、4位アミノ酸残基は **Table 5**で示した構造活性相関と同様に β 位に分岐構造を有する NMe-Ile, NMe-Chg, NMe-Phg 残基を導入し、その抗 HCV 活性に対する効果を検討した。その結果を **Table 6**に示す。その結果、化合物**11**が示す様に NMe-Ile への置換では、同様な置換において3位アミノ酸残基が Sar 残基である化合物**8** (**Table 5**)と比較して、抗 HCV 活性は約3.8倍上昇した。同様に NMe-Chg や NMe-Phg 残基への置換体である化合物**12**、**13**においても、3位に(*R*)-メチル基を有する化合物**4**を母核とした誘導では抗 HCV 活性がそれぞれ約1.5倍および約1.4倍上昇した。これらの結果から、β 位に分岐構造を有する4位アミノ酸残基誘導体におい

でも、3位アミノ酸残基への(R)-メチル基の導入が抗 HCV 活性の上昇をもたらす知見を得た。

以上のことから、本誘導体の中で弱い免疫抑制活性を有し、かつ抗 HCV 活性が最も強い化合物**11**をリード化合物に選択し、開発候補化合物選出のための評価へ進めた。

Table 6. Anti-HCV activity and immunosuppressive activity of **11-13**



Compound	Residue 4 Side chain R	Anti-HCV activity EC ₅₀ (μg/mL) ^a	Immunosuppressive activity IC ₅₀ (μg/mL) ^b
4	Leu	0.038	0.070
11	Ile	0.039	1.1
12	Chg	0.042	0.35
13	Phg	0.084	1.35

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon replication by qRT-PCR.

^b Inhibitory effect of concanavalin A (ConA)-induced proliferation of mouse splenocytes.

FR901459 と比較するため、3 位、4 位および両方のアミノ酸残基を変換した代表化合物 **4**、**8**、**11** の抗 HCV 活性、溶解度、PK プロファイルを検討した。その結果を **Table 7** に示す。さらに、抗 HCV 活性についてはヒト血清 (HSA) 条件下に評価した。ヒト血清にはアルブミンを含む多くのタンパク質が含まれており、スクリーニングとして用いる抗 HCV 活性評価系にヒト血清を添加することにより、精度高く *in vivo* 薬効を予測することが可能となることが知られているからである³³⁾。

Table 7. Anti-HCV activity (5%FBS/50%HSA), pharmacokinetic properties, and aqueous solubility

Compound	Modified position	Anti-HCV activity	Rat PK, p.o.	Aqueous
		5%FBS/50%HSA EC ₅₀ (μg/mL) ^a	AUC _{24h} (ng·h/mL) ^b /F(%) ^c	solubility JP2 (μg/mL) ^d
FR901459	None	0.096/3.7	140/4.3	6.5
4	3 position	0.038/0.35	4209/40	NT
8	4 position	0.15/2.0	111/2.1	0.2
11	3, 4 position	0.039/0.050	13297/49	<0.1

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon replication in the presence of 5% fetal bovine serum (FBS) or 50% human serum albumin (HSA).

^b Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 24 hours after dosing.

^c Absolute oral bioavailability.

^d Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid for disintegration test (JP2: pH=6.8).

上述のように、3位アミノ酸残基に(R)-メチル基が置換された化合物**4**および**11**は、いずれも FR901459と比較し大幅な抗 HCV 活性の向上が認められた。ところで、CsA の X 線構造解析により CsA 単独と標的タンパク質である CyP との結合時において各コンフォメーションは異なっているが、一方で、3位アミノ酸残基を D 体に置換した CsA 誘導体においては、化合物単独および CyP と結合時の化合物のコンフォメーションは一致するという結果が報告されている²⁹⁾。そこで、化合物**11**についても X 線構造解析を行い、今回得られた FR901459の構造誘導における抗 HCV 活性向上の理由について構造的側面から検証することとした。残念ながら FR901459については現時点で構造解析結果を得ていないが、化合物**11**については、化合物**11**単独および CyP との複合体の X 線構造解析に成功した (Figure 9および Figure 10)。その結果、化合物**11**単独のコンフォメーションは、CyP と結合時のコンフォメーションと完全に一致した (Figure 11)。厳密には FR901459と化合物**11**の構造情報の比較を必要とするが、3位アミノ酸残基の置換により化合物単体においても活性コンフォメーションを取れる様にコンフォメーションが変化したと推察している。これまでに得られた構造情報はあくまで X 線結晶構造の結果であり、溶液中のコンフォメーションを反映しているかは議論の余地がある。溶液中のコンフォメーションの観点から検証

するため NMR を比較した結果、FR901459が溶液中において複数のコンフォメーション混合物であるのに対し、化合物**11**は単一のコンフォメーションを有することが示唆された。これらの結果を踏まえると、化合物**11**は化合物単体においても活性コンフォメーションを取り、結果としてコンフォメーション変化のエネルギー障壁が無くなり、抗 HCV 活性が向上したのでは無いかと推察される。

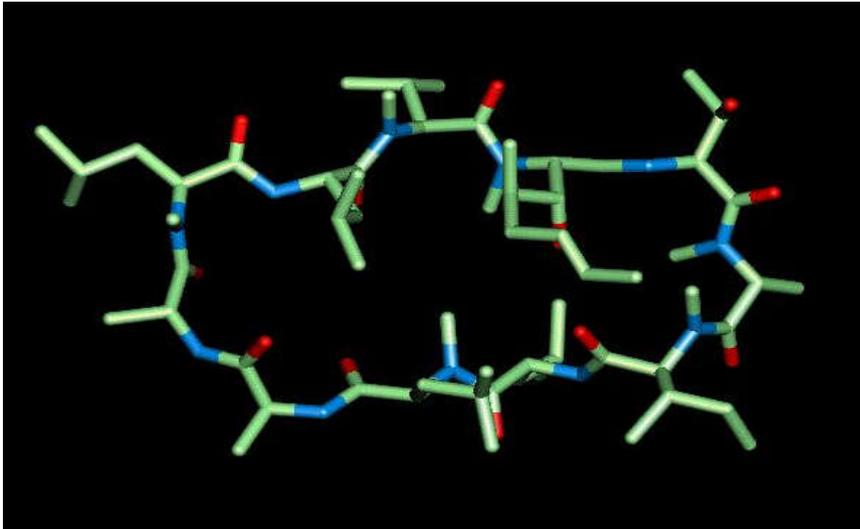


Figure 9 Crystal structure of **11**

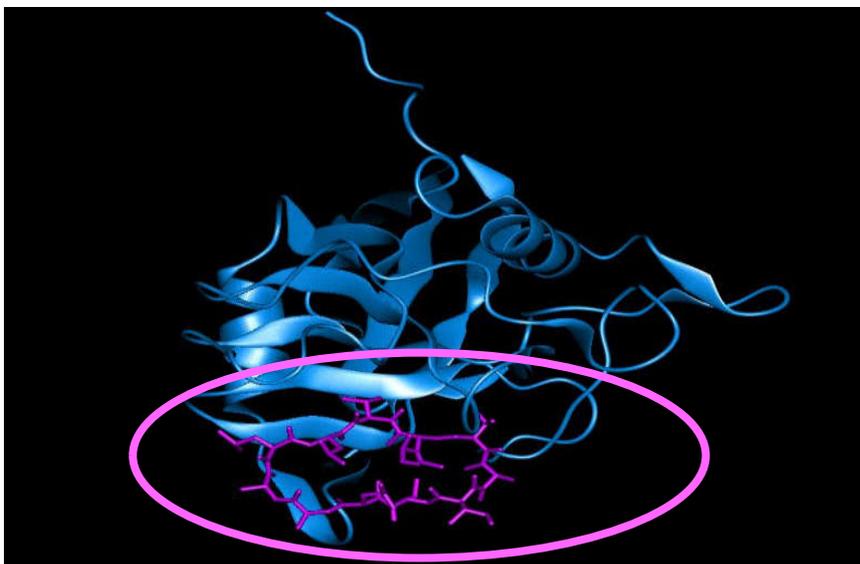


Figure 10. Crystal structure of **11/cyclophilin** complex

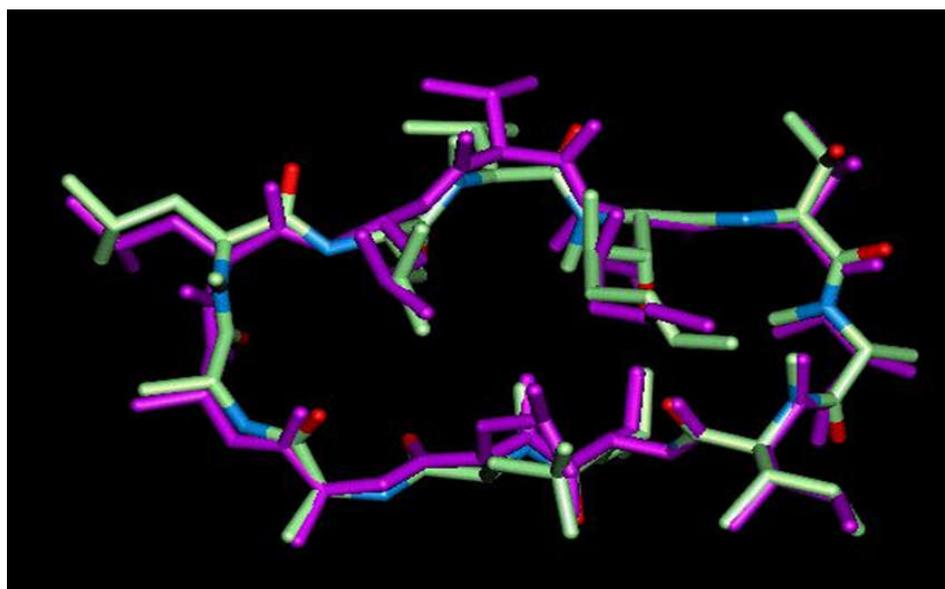


Figure 11. Superimposed crystal structure of **11** in free and cyclophilin bound form (Green : Crystal structure of **11**, Purple: Crystal structure of **11** / cyclophilin complex)

HSA 添加条件下での抗 HCV 活性の評価の結果、FR901459、化合物**4**および**8**においては、抗 HCV 活性が顕著に低下するのに対し、HSA 添加条件下化合物**11**では活性が低下していないことから、より強力な *in vivo* 薬効が期待された (Table 7)。

一般に高分子量化合物は、低経口吸収性であることが報告されている³⁴⁾。分子量が比較的大きくかつ環状ペプチド構造からなる FR901459誘導体を用いる本研究においては、早期に経口吸収性を確認することが重要である。さらに、ウイルスに対する化学療法において、抗ウイルス剤の血中濃度が不十分であると、耐性ウイルスの出現頻度が一般に高値になるため、高い薬物血中濃度の維持が重要となる³⁵⁾。シーズ化合物である FR901459および4位アミノ酸残基変換体**8**では、ラット PK 試験からそれらの生物学的利用率 (F) は、それぞれ4.3%および2.1%と著しく低値であった (Table 7)。一方、3位アミノ酸残基変換体**4**および3、4位アミノ酸残基変換体**11**では、それぞれ40%および49%と良好な F 値を示すことが分かった。3位変換により経口吸収性が改善した要因として、コンフォメーション変化による分子内水素結合の獲得に因るのではないかと推察している。すなわち、分子内水素結合の獲得によって、極性の高いアミド構造に由来する低膜透過性を改善し、結果として経口吸収性が向上したと考えられる。

一般に難水溶性の化合物は消化管内で析出するため、消化管から薬物が吸収され難くなり、十分な薬物血漿濃度の獲得に至らない場合がある³⁴⁾。そこで、腸管 pH 付近における化合物**11**の溶解度を評価し

た。評価の結果、化合物**11**の溶解度は<0.1 µg/mL と著しく低値であった (Table 7)。このことから、化合物**11**を開発候補化合物とすることを断念した。しかし、良好な抗 HCV 活性を有し、さらに経口吸収性に優れていることから、これらを保持しつつ高い水溶性を有する開発化合物の取得を目指して、更なる構造変換を計画した。

第四節 リード化合物の課題と方針および開発候補化合物 ASP5286 の創出

一般に、化合物の脂溶性を低下することにより水溶性の改善に繋がることが知られており³⁶⁾、多くの脂溶性アミノ酸から構成される化合物**11**においても、その脂溶性の低減が必要と思われた。しかし、脂溶性低減を目的とする極性基の導入は、一方で標的分子との疎水的な相互作用の減弱に起因する薬理活性の低下や膜透過性の低下に起因する経口吸収性の低下もたらすことが知られている³⁷⁾。実際に CsA においても、分子内への極性基の導入は抗 HCV 活性を大きく低下させた³⁸⁾。したがって、薬理活性および膜透過性を維持しながら脂溶性を抑制するためには、詳細な SAR の検討が必要である。第二章第二節において示した FR901459 のアミノ酸残基を変換する手法を用いて、FR901459 誘導体の脂溶性を調整し、薬理活性と膜透過性を保ちながら水溶性を改善すべく、誘導体合成の検討を開始した。

前節において、 β 位に置換基を有するアミノ酸を4位アミノ酸残基に導入することにより免疫抑制活性が低下することを示した。そこで極性基であるヒドロキシ基を β 位に有するアミノ酸残基としてスレオニンに着目した。すなわち、スレオニンのエーテル置換基の脂溶性を詳細に調整することにより、活性と膜透過性を保持しつつ、水溶性が改善できるのではないかと考えたわけである。

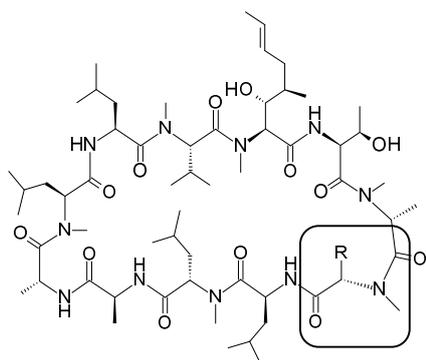
Table 8に、4位アミノ酸残基をスレオニン誘導体へと変換した化合物の活性等の評価結果を示す。4位 Ile を Thr(^tBu)に置換した化合物**14**は、0.030 $\mu\text{g/mL}$ と化合物**11** (0.039 $\mu\text{g/mL}$) に勝る強い抗 HCV 活性を示したが、溶解度は <0.1 $\mu\text{g/mL}$ と改善しなかった。そこで、^tBu エーテル構造よりさらに高極性のメチルエーテル構造を持つ Thr(Me)に置換した化合物**6**を検証した。その結果、化合物**6**は、0.040 $\mu\text{g/mL}$ と化合物**11** (0.039 $\mu\text{g/mL}$) と同程度の強い抗 HCV 活性を示し、さらに予想通りその溶解度は117 $\mu\text{g/mL}$ と顕著に改善された。そこで、ヒドロキシ基を有するスレオニン残基を含有する化合物**15**を検証したところ、>122 $\mu\text{g/mL}$ とさらに良好な溶解度を示した。化合物**6**および**15**において、溶解度が改善した要因の一つとして脂溶性の低減が考えられるが、これほどの劇的な改善の詳細は不明である。ところで、前節の化合物**11**の X 線結晶構造で示した通り、4位アミノ酸残基は CyP との結合領域とは離れた位置で分子の外側に大きく張り出している。化合物**6**および**15**は、NMR 解析により化合物**11**と類似のコンフォメーションを取ることが示唆されており、化合物**11**と同様に4位アミノ酸残基が CyP との結合領域とは離れた位置にあるために、抗 HCV 活性を減じなかったと考えている。以上、4位アミノ酸残基に対して親水性の

スレオニン誘導体を導入することで、強力な抗 HCV 活性を維持しつつ、溶解度の改善を図れることを見出した。

ラットにおける PK 試験の結果、化合物**14**および**6**の生物学的利用率 (F) それぞれ74%および36%と良好な経口吸収性を示した。一方でヒドロキシ基を有する化合物**15**の F は32%と**6**と同等であったが、その血中濃度は5681 ng·h/mL と、化合物**6**の約1/3まで低下することが分かった。これは、ヒドロキシ基を導入したことによる膜透過性の低下が原因ではないかと推察している。

以上、4位アミノ酸残基の構造を精密に変換した結果、溶解度および薬物動態プロファイルが大きく改善することが明らかになった。いい換えると、活性と溶解度および経口吸収性の両立を図る上で、4位アミノ酸残基における脂溶性の調整が有効であった。本誘導体中、化合物**6**は強力な抗 HCV 活性と弱い免疫抑制活性を有し、かつ良好な水溶性と経口吸収性を獲得できていることから、開発候補化合物 ASP5286として更なる高次薬理評価試験へと進めることとした。

Table 8. Anti-HCV activity (5%FBS/50%HSA), immunosuppressive activity, pharmacokinetic properties, and aqueous solubility



Compound	Residue 4 Side chain R	Anti-HCV activity 5%FBS/50%HSA EC ₅₀ (μg/mL) ^a	Immunosuppressive activity IC ₅₀ (μg/mL) ^b	Rat PK, p.o. AUC _{24h} ^c (ng·h/mL)/F(%) ^d	Aqueous solubility JP2 (μg/mL) ^e
11	Ile	0.039/0.050	1.1	13297/49	<0.1
14	Thr(^t Bu)	0.030/0.11	1.6	9451/74	<0.1
6	Thr(Me)	0.040/0.061	0.97	16082/36	117
15	Thr	0.061/0.086	1.9	5681/32	>122

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon replication in the presence of 5% fetal bovine serum (FBS) or 50% human serum albumin (HSA).

^b Inhibitory effect of concanavalin A (ConA)-induced proliferation of mouse splenocytes.

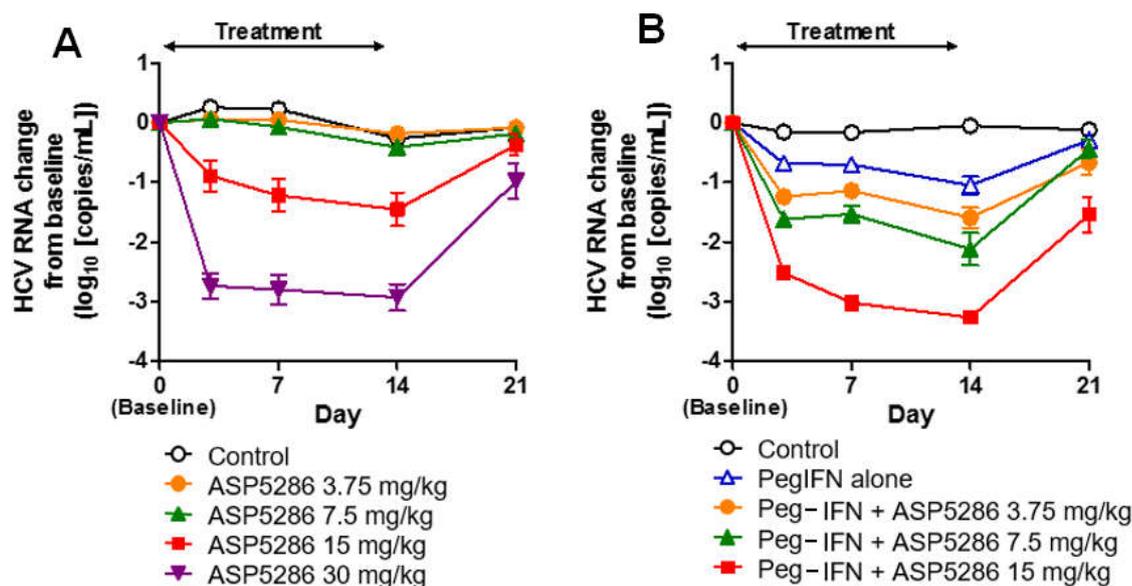
^c Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 24 hours after dosing.

^d Absolute oral bioavailability.

^e Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid for disintegration test (JP2: pH=6.8).

第五節 開発候補化合物 ASP5286 の高次評価結果

医薬品開発において創製した化合物を臨床試験に進めるには、前臨床試験において動物感染モデルによる抗ウイルス作用の確認が必須である。しかしHCVはヒトとチンパンジーにしか感染しないため、従来薬効評価には高いハードルがあった。しかし、HCV感染キメラマウスモデルが最近開発され、多くの抗HCV剤について、当該病態モデルを用いた抗ウイルス活性評価が実現している³⁹⁾。著者も、本モデルを用いて開発候補化合物であるASP5286の*in vivo*抗HCV活性を評価した。その結果をFigure 12に示す。ASP5286を経口投与にて3.75, 7.5, 15, 30 mg/kgの投与量で14日間反復投与した。ASP5286は、30 mg/kg投与群において血中のHCV量を検出限界以下まで低下させ、顕著な*in vivo*抗HCV活性を示した。さらに、ペグインターフェロン (PegIFN) との併用においては、15 mg/kg投与群においてもASP5286単剤における30 mg/kg投与群と同等以上に血中のHCV量を低下させた。これらの結果から、ASP5286は、単剤およびPegIFNとの併用投与のいずれの条件においても、*in vivo*において強力な抗HCV作用を示すことが示唆された。



^a ASP5286 was administered to chimeric mice by oral gavage twice a day for 14 days (Days 0–13) with or without peginterferon alfa-2a (PegIFN) at 10 µg/kg subcutaneously twice a week. The last dose was followed by a 7-day follow-up period with no drug administration. Blood samples were collected on Days 0, 3, 7, 14, and 21. Serum HCV RNA levels were measured, and changes from baseline (Day 0) were determined. Each data point represents group mean ± standard error. Animal number is 5 for PegIFN + ASP5286 7.5 mg/kg and PegIFN + ASP5286 15 mg/kg groups, respectively and the others are 6.

Figure 12. Antiviral effects of ASP5286 (6) for genotype 1b HCV in chimeric mice with humanized liver, A) monotherapy, B) Combination with Peg-IFN.

第六節 本章のまとめ

FR901459 の 3 位 D-MeAla 基置換体 **4** は、抗 HCV 活性が向上したものの、依然として強力な免疫抑制活性を示した。X 線結晶構造解析の結果を基に、CN 結合部位に相当する 4 位アミノ酸残基を変換することで、CN への結合親和性を減弱させ、免疫抑制活性を低減できると考えた。そこで著者は、第一章の半合成手法を活用して、3 位及び 4 位のアミノ酸残基を同時に変換できる合成法の開発に成功した。そして、3 位及び 4 位のアミノ酸残基での構造最適化研究を実施した結果、抗 HCV 活性が向上し、さらに免疫抑制活性が減弱した化合物 **11** を見出した。さらに、本化合物は良好な経口吸収性を示した (**Figure 13**)。しかし、化合物 **11** は難水溶性であったために、次に水溶性の改善を目的として、化合物 **11** の更なる構造最適化を行った。すなわち、 β 位に置換基を有するアミノ酸構造を有しながら水溶性が期待できるスレオニン誘導体に着目して構造変換を実施した。その結果、強力な HCV 活性と良好な経口吸収性を保持しながら水溶性が大幅に改善された開発候補化合物 ASP5286 の創製に成功した。

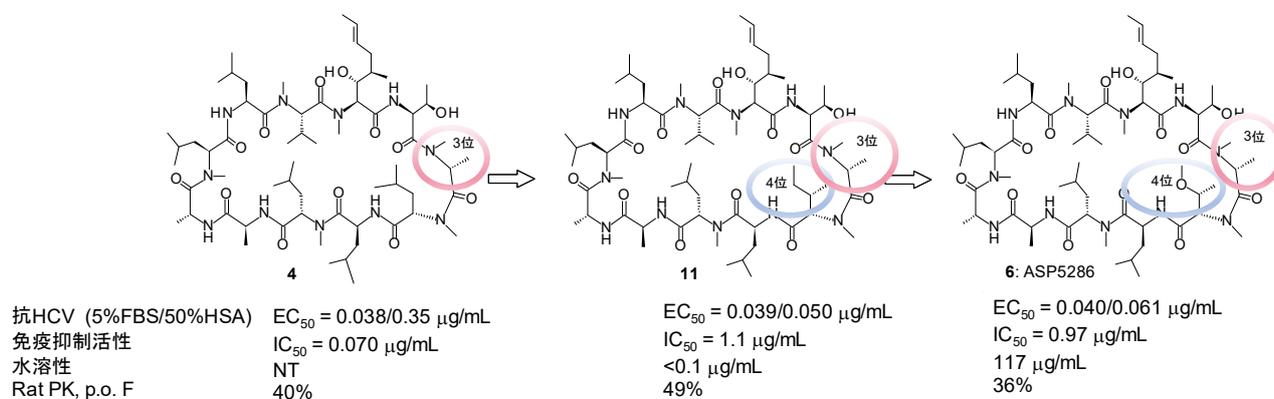


Figure 13. Discovery of development candidate ASP5286

第三章 Bioconversion誘導体から創出した開発候補化合物32並びにその周辺化合物の構造活性相関

第一節 ASP5286 の課題と方針

序論で述べたように、複数の DAAs を組み合わせた経口剤カクテル療法が C 型肝炎の標準療法となっている。しかし、本療法は薬価が高額で、医療経済上の大きな課題となっている。そのため、製造コストの低減が、新規 C 型肝炎治療薬に求められる重要な要件の一つとなっている。ASP5286 の製造には多工程を要することから、製造コストは高額になることが想定され、今後医薬品開発を進める上で課題となる可能性があると考えた。そこで著者は、短工程で合成可能な第二世代の候補化合物の開発を計画した。

筆者は、第二章において、X 線結晶構造解析による CsA の構造情報に基づき、FR901459 の構造活性相関研究を行った。そして CN 結合部位と相互作用する 4 位アミノ酸残基の変換により免疫抑制活性を低減できることを見出した。しかし、4 位アミノ酸残基の変換には、環状ペプチドの開環反応やペプチドのデグラデーションなど、多工程を要する合成が必要であり、製造コストの抜本的改善は困難と思われた。そこで、4 位アミノ酸残基の変換を代替し、免疫抑制活性を減弱できる新たな誘導体の開発を計画した。前述の如く、免疫抑制活性の低減には CN との親和性の低減が有効である。したがって、FR901459 の構造における CN 結合部位を再度探索した。

FR901459 の構造上、容易に化学修飾が可能な部位としては、ヒドロキシ基の存在に立脚して変換できる 1 位及び 2 位アミノ酸残基がある。しかし、これらはいずれも CyP 結合部位であり、免疫抑制活性を低減できる可能性は低いと考えられた。(Figure 14)。

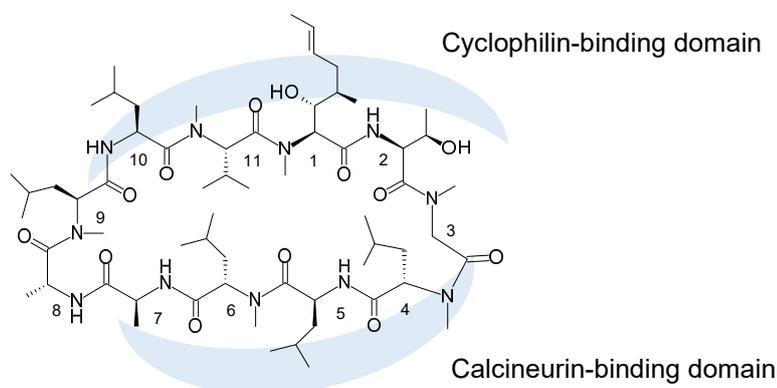
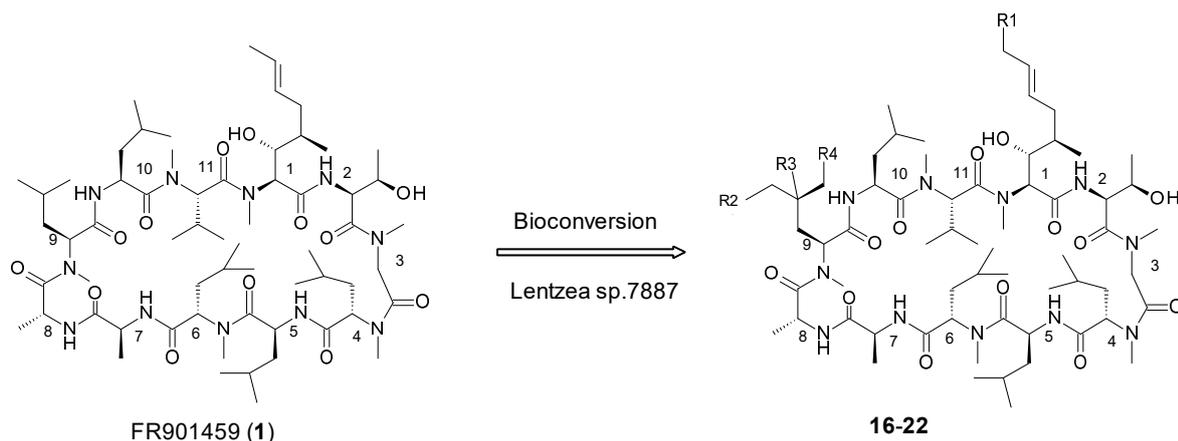


Figure 14. Binding domains of FR901459

そこで、微生物によるバイオコンバージョンに着目した。バイオコンバージョンでは、ヒドロキシ基などの官能基を分子に付与することが可能である。旧藤沢薬品工業（現アステラス製薬）は、化合物の様々な部位をヒドロキシ化するバイオコンバージョンの技術を保有しており、*Lentzea* sp. 7887 という菌種と 180g の FR901459 によるバイオコンバージョンの結果、**Figure 15** に化学構造を示す複数のヒドロキシ体（化合物 **16-22**）を単離している⁴⁰⁾。



Compound	16	17	18	19	20	21	22
R ₁	OH	H	H	H	OH	OH	OH
R ₂	H	OH	H	H	H	OH	H
R ₃	H	H	OH	H	OH	H	H
R ₄	H	H	H	OH	H	H	OH
Yield (%)	6.2	28.0	5.6	2.6	2.6	17.0	4.6

Figure 15. Structures of bioconversion products (Compounds **16-22**)

シード化合物として、9位アミノ酸残基[MeLeu]⁹の末端 Me 基がヒドロキシ化された化合物 **17** を選択した。**17** は、一級アルコールを有しているため、他の二つの二級アルコールとの化学的反応性の差が期待できると考えた。また、FR901459 からの生産効率という点においても **17** の収率は 28% と最も高く、低い製造コストが期待された⁴¹⁾。さらに、**17** のヒドロキシ化部位である 9 位アミノ酸残基は、CyP および CN との相互作用の境界領域に位置するため、免疫抑制活性の低減も期待できると考えた⁴²⁾。実際に化合物 **17** の免疫抑制活性は 0.28 μg/mL と弱く、9 位アミノ酸残基への極性基の導入が免疫抑制活性の低下をもたらすことが示唆された (**Table 9**)。

Table 9. *in vitro* activity of FR901459 and **17**

Compound	Anti-HCV activity	Immunosuppressive activity IC ₅₀
	EC ₅₀ (μg/mL) ^a	(μg/mL) ^b
FR901459	0.096	0.026
17	0.85	0.28

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon replication by qRT-PCR.

^b Inhibitory effect of concanavalin A (ConA)-induced proliferation of mouse splenocytes.

以上、FR901459 のバイオコンバージョン体を用いることにより、免疫抑制活性の低下を期待できる CN 結合部位に、ヒドロキシ基が導入された化合物 **17** を取得することができた。さらに、化学修飾が可能な官能基としてヒドロキシ基を有する **17** を起点にして合成展開を行うことで、短工程で標的化合物の合成が可能になることが期待された。この様な背景の下、第二世代の医薬品候補化合物の開発に着手した。

第二節 FR901459 の 9 位および 3,9 位アミノ酸残基での変換体のデザインと合成

FR901459の9位および3,9位でのアミノ酸残基変換体の構造を **Figure 16**に示す。第三章第一節で述べた通り、第三章の目的は短工程かつ安価に合成可能な第二世代の医薬品候補化合物の創製である。そのため、短工程で合成可能な化合物に注力する必要がある。9位アミノ酸残基については、一級アルコールを有する**17**から短工程で合成可能であることを条件に、9位アミノ酸残基に極性基を有するアミン誘導体（化合物**23**）およびカルバモイル誘導体（化合物**24, 25, 26**）をデザインした。加えて、抗 HCV 活性の向上を達成するためには、9位のみならず CyP 結合部位に関連する3位アミノ酸残基も同時に変換する必要があると考えた。短工程で合成可能という観点から、3位アミノ酸残基はメキシメチル基に固定し、9位アミノ酸残基に極性基を導入したアミン誘導体（化合物**31, 32**）およびカルバモイル誘導体（化合物**29, 30**）をデザインした。

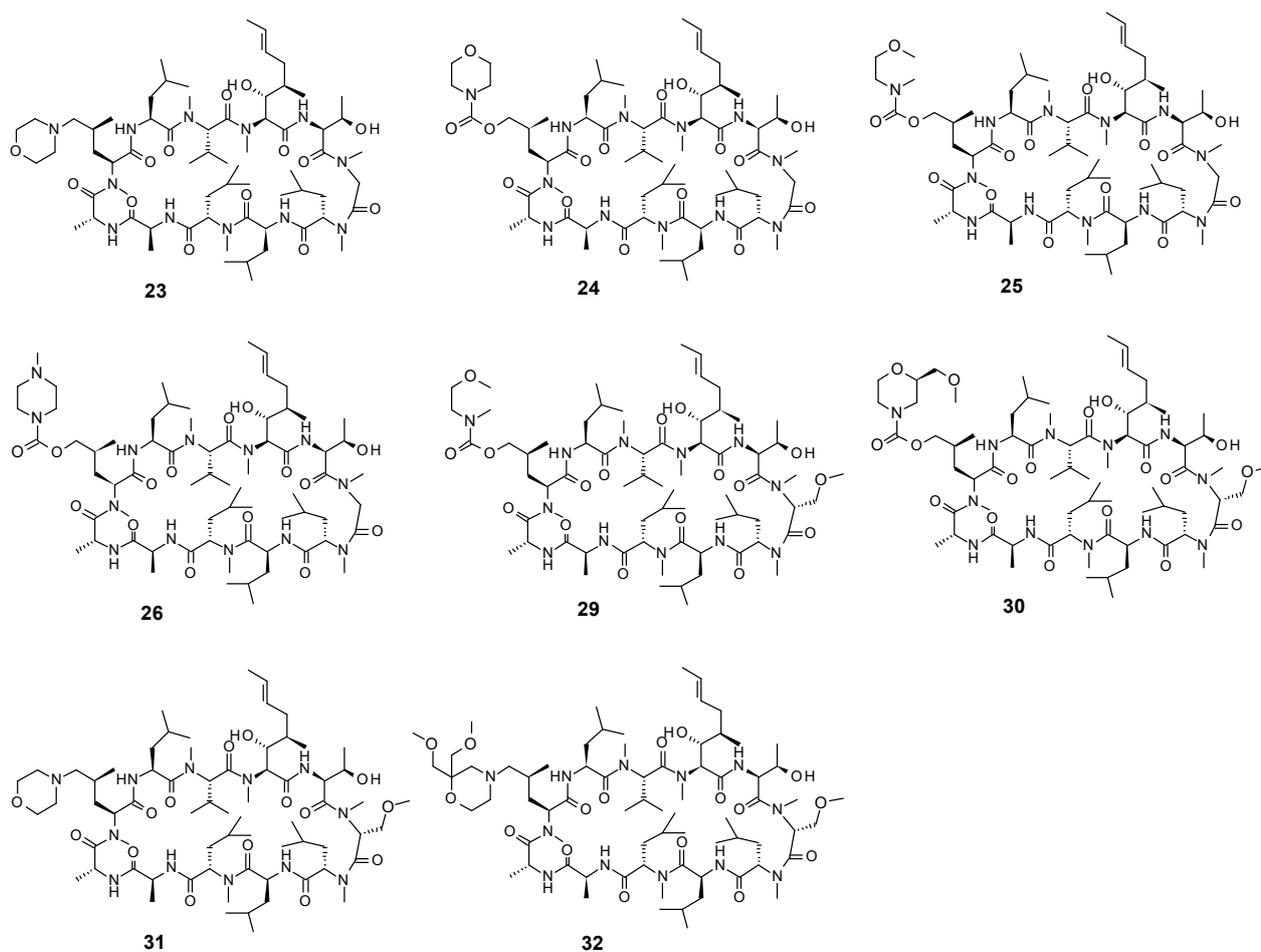
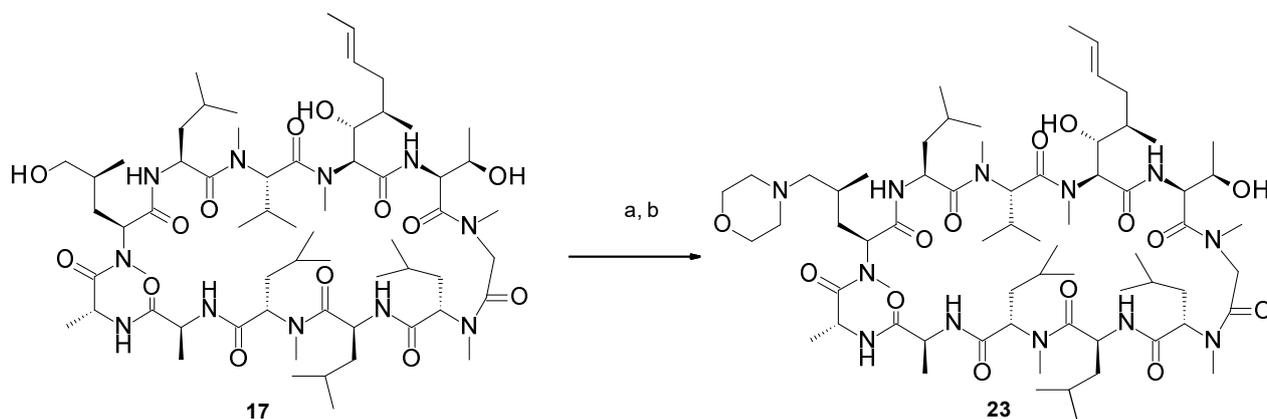


Figure 16. FR901459の9位および3,9 位アミノ酸残基誘導体の構造一覧

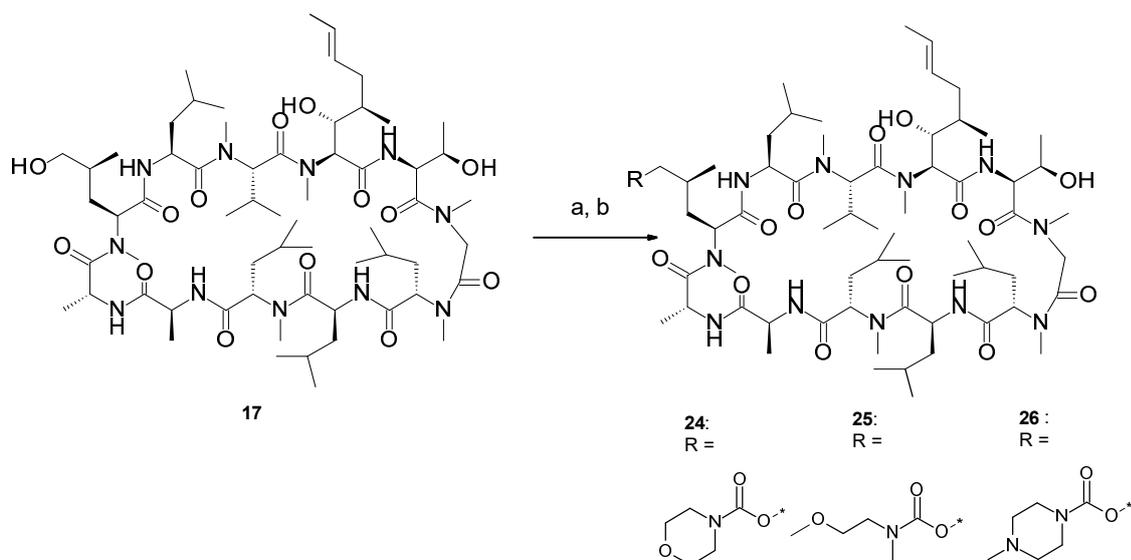
化合物**23**は、以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 5**)。化合物**17**をジクロロメタン中、NCS と Bu_4NCl 存在下で TEMPO 酸化⁴³⁾により9位アミノ酸残基においてアルデヒドとした後、さらにジクロロメタン中 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ を用いたモリホリンとの還元的アミノ化により**23**を収率51%で得た。



Scheme 5. Synthesis of **23**

Reagents and conditions: (a) TEMPO, NCS, Bu_4NCl , CH_2Cl_2 , rt, 9%; (b) morpholine, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, CH_2Cl_2 , rt, 51%.

化合物**24-26**は、以下に示す合成ルートにより合成した (**Scheme 6**)。化合物**17**をジクロロメタン中4-nitrophenyl chloroformate を用いて収率77%で活性カルボナートとした後、活性カルボナートに対してアミンとしてモルホリンを作用させることにより**24**を収率73%で得た。**25**および**26**は、**24**の合成と同様に活性カルボナートに対して対応するアミン誘導体を作用させることで合成した。



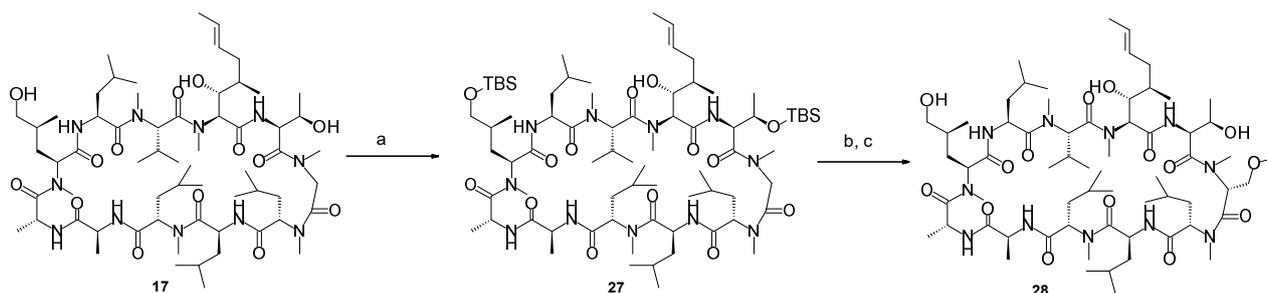
Scheme 6. Synthesis of 24–26

Reagents and conditions: (a) **24**: 4-nitrophenyl chloroformate, CH₂Cl₂, rt, 77%; (b) morpholine, rt, 73%; **25** and **26** were synthesized in a similar manner to **24**.

続いて、3位および9位アミノ酸残基を同時に変換した化合物の合成法開発の検討を開始した。3位に置換基を有する化合物の汎用性の高い合成手法を開発するに当たって、Seebach らにより報告されている CsA の C-alkyl 化反応に着目した⁴⁴⁾。Seebach らは CsA に対して様々な求電子剤を用いることで、3位に置換基を導入できることを報告している。CsA と化合物**17**では N-Me アミノ酸の数、およびヒドロキシ基の数も異なっているが、まずは Seebach と同様の反応条件が化合物**17**に適応可能かの検討を行った。

基質として化合物**17**を用いてヒドロキシメチル化を検討したが複雑な混合物を与え、目的とする化合物を得るに至らなかった (Data not shown)。そこで、化合物**17**の酸性プロトンの数を減らすため、一度化合物**17**のヒドロキシ基を保護することとした (Scheme 7)。ジクロロメタン中、室温下 TBSCl とイミダゾールを用いることで、2位および9位アミノ酸残基のヒドロキシ基が選択的に TBS 基で保護された化合物**27**を収率97%で得た。アルゴン雰囲気下、化合物**27**の THF 溶液に対して−60°C にて 8等量の LHMDS を加え、同温度にて2時間作用させ、その後パラホルムアルデヒドを加えて1時間かけて0°C まで徐々に昇温することで、3位アミノ酸残基において選択的なヒドロキシメチル化が進行した。複数の反応点を有する天然物におけるアルキル化反応における位置、および立体選択性についての詳細な考察

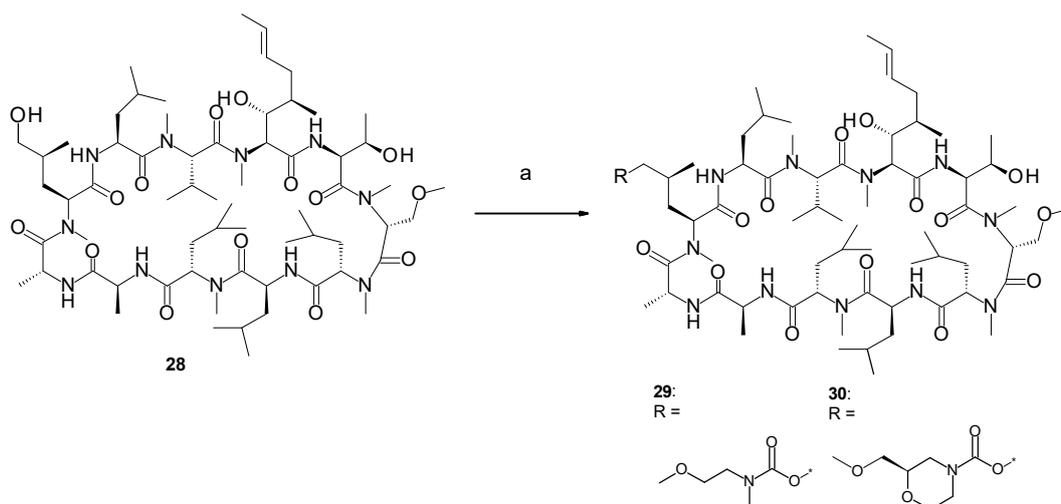
は困難ではあるが、化合物**17**のヒドロキシ基を保護したことで、CsAにおいてSeebachにより検討された結果と同様の結果が得られたと考えている。3位アミノ酸残基側鎖に生じたヒドロキシ基をCH₂Cl₂中氷冷下Meerwein試薬で2.5時間反応させることでメチル化を行い、続いて1MHClで1時間処理することによりTBS基の脱保護を行い、化合物**28**を収率64%で得た。化合物**28**は、3, 9位アミノ酸残基を変換するための共通中間体である。化合物**28**において、別法により合成された化合物との各種スペクトルデータを比較し、所望の立体化学を有することを確認した (WO2008/139986)。



Scheme 7. Synthesis of **28**

Reagents and conditions: (a) TBSCl, imidazole, DMF, rt, 97%; (b) LHMDS, THF, paraformaldehyde, -60°C to 0°C, 44%; (c) Me₃OBF₄, 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene, CH₂Cl₂, ice cooling, then 1 M HCl aq., MeOH, rt, 64%.

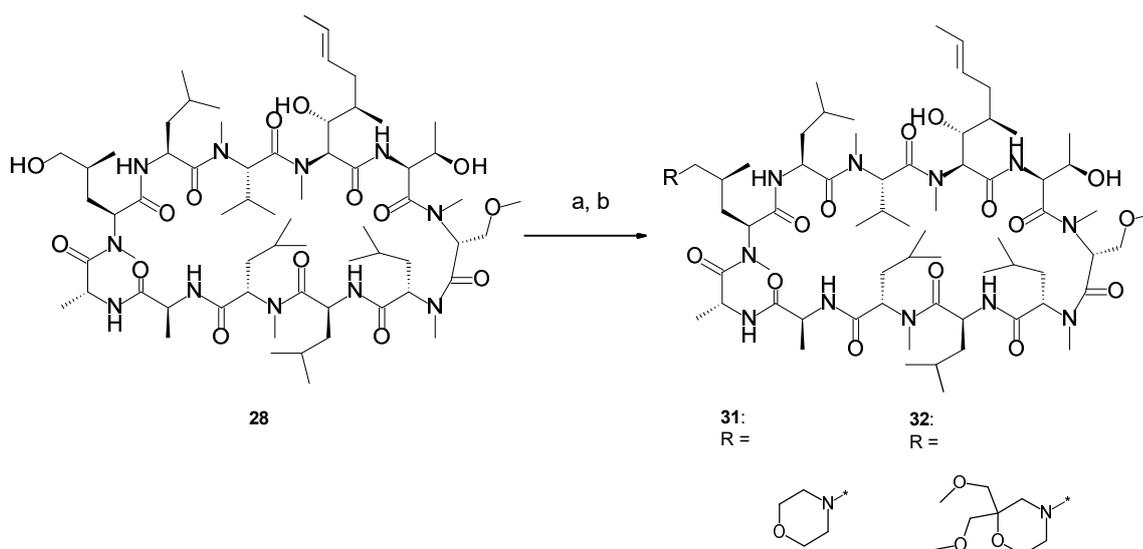
化合物**29-30**は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 8)。共通中間体である**28**を氷冷下ジクロロメタン中4-nitrophenyl chloroformateにより収率84%で活性カルボナートとした後、続いてDMF中活性カルボナートに対してアミンとして(R)-2-(methoxymethyl)morpholineを作用させることにより**30**を収率72%で得た。**29**は、**30**と同様に活性カルボナートに対して対応するアミンを作用させることで合成した。



Scheme 8. Synthesis of 29-30

(a) **30**: 4-nitrophenyl chloroformate, CH_2Cl_2 , ice cooling, 84% then (R)-2-(methoxymethyl)morpholine, DMF, rt, 72%; **29** was synthesized in a similar manner to **30**.

化合物**31-32**は、以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 9)。共通中間体**28**をジクロロメタン中、NCS と Bu_4NCl 存在下で TEMPO 酸化により収率50%でアルデヒドとした後、続いて DMF 中 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ を用いた還元的アミノ化により **32**を収率59%で得た。**31**は、**32**の合成と同様にアルデヒドに対して対応するアミン誘導体を用いて合成した。



Scheme 9. Synthesis of 31 and 32

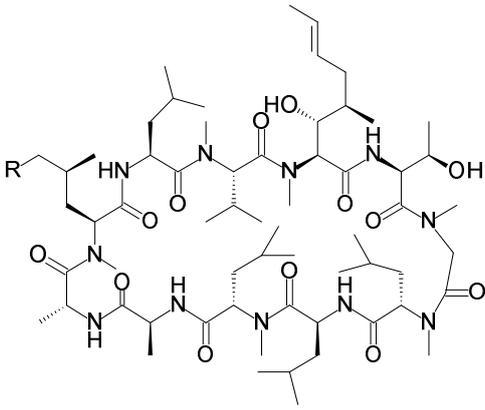
Reagents and conditions: **32**: (a) TEMPO, NCS, Bu_4NCl , CH_2Cl_2 , rt, 50 %; (b) 2,2-bis(methoxymethyl)morpholine hydrochloride, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, CH_2Cl_2 , rt, 59%; **31** was synthesized in a similar manner to **32**.

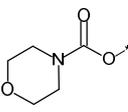
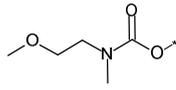
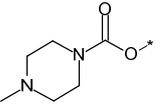
第三節 9位変換および3,9位アミノ酸残基最適化による開発候補化合物32の創出

第一節で述べた通り、第三章の目的は、短工程かつ安価に合成可能な第二世代の候補化合物の創製である。そのため、誘導体の創製においては、工程数が短いことを念頭にした合成展開を行った。得られた誘導体の有効性を評価するために、先ず9位アミノ酸残基の変換が免疫抑制活性へ及ぼす効果を検討した (Table 10)。バイオコンバージョンにより得られた化合物 17 の一級アルコールを起点にして、メルホリノ基を導入したところ、該当する化合物 23 では、化合物 17 と比較して抗 HCV 活性は約 4 倍上昇したものの、化合物 17 よりも免疫抑制活性が増強してしまった。次にカルバモイル基を導入した化合物 24 では、抗 HCV 活性は約 9 倍上昇し、興味深いことに免疫抑制活性は約 1/3 に低下することが解った。さらに、直鎖のカルバモイル構造を導入した化合物 25 でも、抗 HCV 活性が約 9 倍上昇し、免疫抑制活性も約 1/3 に低下した。一方、塩基性を有するピペラジン誘導体 26 では、抗 HCV 活性は化合物 24 や 25 と比較してやや低下したが、免疫抑制活性は化合物 17 と比較して約 1/7 と大幅に減弱することに成功した。以上の結果から、9位へのカルバモイル構造の導入は、抗 HCV 活性を向上しつつ免疫抑制活性を低下させるのに有意義であることが分かった。

第二章五節でも述べた通り、HCV *in vivo* 評価系は HCV 感染キメラマウスモデルのみであり、多くの化合物の *in vivo* 評価を実施するのは困難であった。そこで、精度高く *in vivo* での薬効を予測するため、HSA 添加条件下に抗 HCV 活性を評価した³³⁾。最も有望な化合物24および25の抗 HCV 活性は、HSA の添加条件下いずれも約1/6に低下した。*in vivo* での強力な薬効を目指す上で、HSA 添加の影響を受けない薬物プロファイルを有する化合物の創製が必須である。そこで、良好な抗 HCV 活性と弱い免疫抑制活性を保持したまま、HSA 添加条件下での抗 HCV 活性を向上させるため、更なる構造の最適化を行うこととした。

Table 10. Anti-HCV activity and immunosuppressive activity of **23–26**



Compound	R	Anti-HCV activity	
		5%FBS/50%HSA EC ₅₀ (μg/mL) ^a	Immunosuppressive activity IC ₅₀ (μg/mL) ^b
17	HO—*	0.85/2.4	0.28
23		0.22/N.T. ^c	0.12
24		0.099/0.56	0.92
25		0.097/0.55	0.75
26		0.16/0.22	1.9

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon (#50-1) replication in the presence of 5% fetal bovine serum (FBS) or 50% human serum albumin (HSA).

^b Inhibitory effect of concanavalin A (ConA)-induced proliferation of mouse splenocytes.

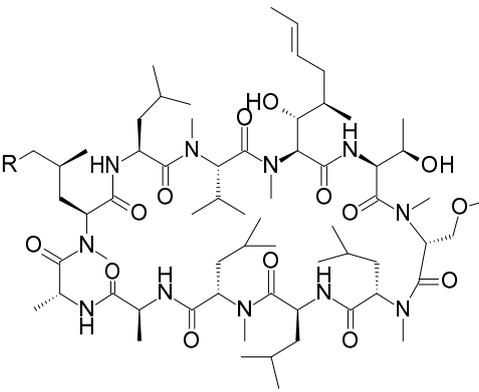
^c N.T. = not tested.

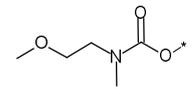
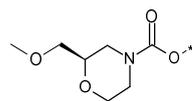
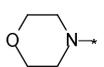
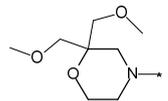
二章三節で述べた通り、詳細な理由は不明であるが、3位アミノ酸残基への(*R*)-メチル基の導入では、HSA 添加下に抗 HCV 活性を減じないことを確認している。この結果を踏まえて、免疫抑制活性の低下に加え、HSA 添加条件下での抗 HCV 活性の向上を目指し、3位および9位のアミノ酸残基を同時に変換

した化合物の創製を検討することとした。ただし、本章の目的は、短工程で合成可能な候補化合物の創製であることから、3位アミノ酸残基としては短工程で合成可能なメトキシメチル基に固定することとした。次に、9位アミノ酸残基については、Table 10で示した構造活性相関を基盤に、アミン、およびカルバモイル誘導体を合成し、その抗 HCV 活性および免疫抑制活性への効果を検討することとした。

Table 11 に、3 位アミノ酸残基の置換基をメトキシメチル基に固定し、9 位を変換した化合物の評価結果を示す。9 位に直鎖のカルバモイル基を有する化合物 29 は、HSA 添加条件下において 0.097 $\mu\text{g/mL}$ と強力な抗 HCV 活性を示した。また、化合物 30 は HSA 添加により抗 HCV 活性はほぼ低下せず 0.064 $\mu\text{g/mL}$ とさらに強力な抗 HCV 活性を示した。また、化合物 30 は、0.88 $\mu\text{g/mL}$ と非常に弱い免疫抑制活性を示し、目指すプロファイルを両立した。

ところで、第 1 章および第 2 章において 3 位に置換基を導入することにより免疫抑制活性が低下することを確認している。0.12 $\mu\text{g/mL}$ と強力な免疫抑制活性を有するアミン誘導体 23 (Table 10) の免疫抑制活性の低減を目的に、3 位アミノ酸残基の置換基をメトキシメチル基とした化合物 31 を合成した。その結果、HSA 添加条件下において、化合物 31 の抗 HCV 活性は 0.25 $\mu\text{g/mL}$ と減弱したため、免疫抑制活性の評価へ進めなかった。続いて化合物 32 では、HSA 添加条件下における抗 HCV 活性は 0.10 $\mu\text{g/mL}$ と強力であり、さらに期待通りに本誘導体の中で最も弱い免疫抑制活性 (1.7 $\mu\text{g/mL}$) を示した。強力な抗 HCV 活性に加え、高い *in vivo* 効果が期待できるプロファイルを併せ持つ化合物 30 および 32 を見出したため、開発候補化合物選出のため、これらの化合物をさらなる薬学的評価に付した。

Table 11. Anti-HCV activity and immunosuppressive activity of **29–32**


Compound	R	Anti-HCV activity 10%FBS/50%HSA EC ₅₀ (μg/mL) ^a	Immunosuppressive activity IC ₅₀ (μg/mL) ^b
29		0.060/0.097	0.85
30		0.058/0.064	0.88
31		0.11/0.25	N.T. ^c
32		0.063/0.10	1.7

^a Inhibitory effect of HCV subgenomic replicon (FLR-1) replication using the luciferase reporter gene system in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) or 50% human serum albumin (HSA).

^b Inhibitory effect of concanavalin A (ConA)-induced proliferation of mouse splenocytes.

^c N.T. = not tested.

化合物**30**および**32**の *in vivo* における体内動態を評価する目的で、ラット PK 試験を実施した (**Table 12**)。化合物**30**の生物学的利用率 (F) は12.9%と開発候補化合物 ASP5286 (36%) と比べて劣る結果であったが、化合物**32**の F 値は28%と ASP5286と同等の良好な経口吸収性を示した。次に、腸管 pH 付近における溶解度を評価した。その結果、化合物**32**は54 μg/mL と良好な溶解度を示した。これらの結果を踏まえ、化合物**32**は強力な抗 HCV 活性と弱い免疫抑制活性を有し、さらに体内動態プロファイルにつ

いても ASP5286 と同等の良好なプロファイルを示したことから、当該化合物を第二世代開発候補として選択した。

Table 12. Pharmacokinetic and physiochemical profiles of compounds **30** and **32**

Compound	Modified position	Rat PK, p.o. AUC _{24h} (ng·h/mL) ^a	Rat PK, p.o. F (%) ^b	Aqueous solubility JP2 (µg/mL) ^c
ASP5286	3,4 position	16082	36	117
30	3,9 position	12409	12.9	73
32	3,9 position	16898	28	54

^a Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 24 hours after dosing.

^b Absolute oral bioavailability.

^c Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid for disintegration test (JP2: pH=6.8).

第四節 本章のまとめ

著者は、第三章において、より短工程で合成可能な第二世代の抗 HCV 剤の開発のため、X 線結晶構造解析の結果を基に 4 位アミノ酸残基に代わる CN 結合部位を探索した。そして、FR901459 のバイオコンバージョンによる代謝産物の中から、免疫抑制活性の低減が期待できる 9 位アミノ酸残基にヒドロキシ基を有する化合物 **17** をシーズ化合物に選択した。化合物 **17** の構造変換を行った結果、抗 HCV 活性を大きく向上させ、さらに免疫抑制活性を大幅に減じた 9 位アミノ酸残基変換体 **24** を見出した (Figure 17)。しかし、*in vivo* 薬効を予測する上で有用な評価である HSA 添加条件下に抗 HCV 活性の評価を行ったところ、化合物 **24** の活性は大幅に低下することが明らかとなった。

第二章で得た知見を基に、3 位に置換基を導入することにより、HSA 添加条件下における抗 HCV 活性の向上が図れるという作業仮説を立てた。Seebach らにより報告されている CsA の C-alkyl 化反応に着目し、FR901459 の 3 位アミノ酸残基における選択的なアルキル化反応を検討し、3 位及び 9 位のアミノ酸残基を同時に変換できる合成法の開発に成功した。本手法を用いることにより、強力な抗 HCV 活性と良好な経口吸収性および水溶性を有する化合物 **32** を見出し、第二世代開発候補化合物として選択した。

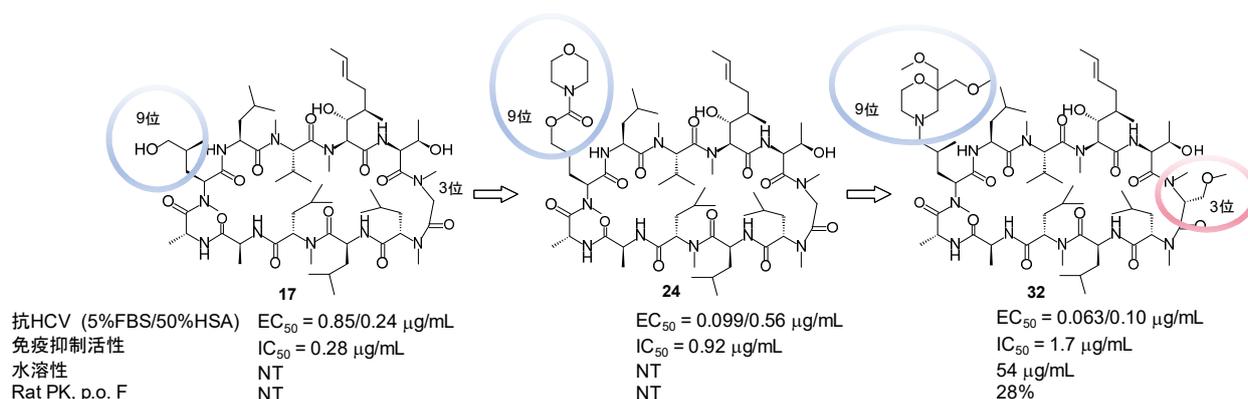


Figure 17. Discovery of development candidate 32

結論

本博士論文研究では、以下の二つの研究目的を設定した。第一に天然物の構造的特徴を生かした多様な合成手法の確立であり、第二に耐性懸念の低い新規 C 型肝炎治療薬の創製である。

第一章では、自社天然物ライブラリーのスクリーニングより見出したシクロスポリン誘導体 FR901459 の評価を進め、抗 HCV 活性の向上および免疫抑制活性の低下を課題として抽出した。課題を解決する化合物を取得するために、N,O-アシル転位反応と一連のペプチドデグラデーション手法を検討し、FR901459 の効率的な半合成法を確立した。本合成法を用いることにより、FR901459 の 3 位アミノ酸が D-MeAla へと置換された [(R)-D-MeAla]³-FR901459 (**4**) の合成に成功した。3 位への D-MeAla の導入により、*in vitro* 抗 HCV 活性の向上に加え、懸念であった免疫抑制活性の低下が可能であるという知見を得た。

第二章では、開発したスレオニン残基に基づく環状ペプチドの開環反応を利用し、FR901459 の 3 位及び 4 位のアミノ酸残基の 2 カ所同時変換法を確立した。X 線結晶構造情報を基に 4 位アミノ酸残基の構造最適化研究を実施した。その結果、β 位に置換基を有するアミノ酸残基への変換が、大幅な免疫抑制活性の低下をもたらすことを発見した。さらに、第一章で得た知見を導入し、3 位及び 4 位のアミノ酸残基を同時変換することにより、強力な抗 HCV 活性、弱い免疫抑制活性および良好な経口吸収性を有するリード化合物 **11** を見出した。化合物 **11** は著しく低い溶解度を示したことから、強力な抗 HCV 活性と経口吸収性を保持しながら、溶解度の改善を目的とし、化合物 **11** の更なる最適化を行った。スレオニン誘導体に着目し詳細な構造変換を行うことにより、強力な HCV 活性と良好な経口吸収性を保持しながら溶解度が大幅に改善された開発候補化合物 ASP5286 の創製に成功した。

第三章では、ASP5286 の優れた薬理プロファイルを保持しながら、より短工程で合成可能な第二世代の開発候補化合物の創製を目指した。容易に化学修飾可能な官能基を有する FR901459 のバイオコンバージョン体であれば、上記目的を達成できるとの作業仮説を立てた。そして、免疫抑制活性の低下が期待できる 9 位アミノ酸残基に一級アルコールを有する化合物 **17** をシーズ化合物に選択した。化合物 **17** の抗 HCV 活性の向上を目的とし構造変換を行い、抗 HCV 活性を大きく向上しながら免疫抑制活性を大幅に減弱した化合物 **24** を見出した。しかし、*in vivo* 薬効を予測する上で有用な評価である HSA 添

加条件下において、化合物 **24** の抗 HCV 活性は大幅に低下することが明らかとなった。そこで、第一章、第二章で得た知見を基に、3 位に置換基を導入することにより HSA 添加条件下における抗 HCV 活性の向上が図れるのではないかと考えた。3 位及び 9 位のアミノ酸残基を同時にかつ短工程で変換可能な合成法を確立し、ASP5286 と同等の抗 HCV 活性、経口吸収性および水溶性を有する第二世代開発候補化合物 **32** の創製に成功した。

複雑な構造を扱う天然物創薬は、低分子創薬と比べて創薬展開の難度が高く、効率性が課題とされてきた。著者は本研究の中で、天然物の構造的特徴に合わせて複数の創薬手法を開発し、天然物創薬においても効率的な創薬が可能であることを示した。具体的には、天然由来環状ペプチドの分子内 N,O-アシル転位反応を起点とする新規ペプチドデグラデーション法の開発により環状ペプチドを構成するアミノ酸残基を任意のアミノ酸残基へ変換する合成法を確立した。さらに、微生物によるバイオコンバージョン工程の導入により、複雑な骨格を有する天然物の化学変換を容易にし、低分子創薬と遜色ない効率的な天然物創薬が可能になることを示した。本知見が、今後の天然物創薬研究に対して一助となることを期待する。

実験の部

Chemistry

¹H NMR spectra were recorded on a Varian VNS-400, JEOL JNM-LA400, Varian 400-MR, or BRUKER AV-III HD500, and the chemical shifts were expressed in δ (ppm) values with tetramethylsilane as an internal reference (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, dd = double doublet, dt = double triplet, ddd = double double doublet, and br = broad peak). Mass spectra (MS) were recorded on a Waters UPLC/SQD and Waters Acquity UPLC/ZQ. Elemental analyses were performed using a Yanaco JM10 or Yanaco MT-6 (C, H, N), Elementar Vario EL III (C, H, X), and Dionex ICS-3000 (S, halogene) and were within $\pm 0.4\%$ of theoretical values. Electrospray ionization positive high-resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Thermo EXACTIVE-Plus Waters LCT Premier. Specific rotation was obtained using Horiba SEPA-500 and OHM Electric OCE-TCR12075WL. Melting points were determined on a BÜCHI M-565 melting point apparatus and are uncorrected. Unless otherwise noted, all reagents and solvents obtained from commercial suppliers were used without further purification.

Tert-butyl [(3S,6S,9S,12S,15R,18S,21S,24S,27S,33S,34R)-3-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-4,7,13,15,18,22,28,31,34-nonamethyl-9,12,21,24,27-pentakis(2-methylpropyl)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxo-6-(propan-2-yl)-1-oxa-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-decaazacyclotetraatriacontan-33-yl]carbamate (1)

To a solution of FR901459 (15.6 g, 12.8 mmol) in THF (156 mL) was added *p*-TsOH (11.0 g, 64.0 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 14 h. To the mixture was added 1 M NaOH aq. and the mixture was neutralized while cooling in an ice bath. To the solution was added Boc₂O (4.2 g, 19.2 mmol), and the pH of the mixture was adjusted to 8 with 1 M NaOH aq. while cooling in an ice bath. The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. The resulting mixture was then concentrated *in vacuo* and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with brine, and dried over MgSO₄. The solvent was removed *in vacuo* to afford **1** (10.6 g, 63%). MS (ESI) *m/z*

[M+H]⁺ 1320; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₇H₁₂₀N₁₁O₁₅ [M+H]⁺ 1318.8960, found 1318.8936.

4-[(2E)-but-2-en-1-yl]-2-{[N-(tert-butoxycarbonyl)-L-threonyl-N-methylglycyl-N-methyl-L-leucyl-L-leucyl-N-methyl-L-leucyl-L-alanyl-D-alanyl-N-methyl-L-leucyl-L-leucyl-N-methyl-L-valyl](methylamino)}-2,4,5-trideoxy-L-xylonic acid (2)

To a solution of **1** (5.1 g, 3.9 mmol) in MeOH (77 mL) was added 1 M NaOH aq. (39 mL) while cooling in an ice bath, and the mixture was stirred for 2 h. The resulting mixture was neutralized with 1 M HCl aq. and concentrated *in vacuo*. The residual solution was acidified (pH=3) with 1 M HCl aq. and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 1 M HCl aq. and brine, and dried over MgSO₄. The solvent was removed *in vacuo* to afford **2** (4.7 g, 90%). MS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ 1359; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₇H₁₂₂N₁₁O₁₆ [M+H]⁺ 1336.9066, found 1336.9056.

Methyl (3S,6S,9S,12S,15R,18S,21S,24S,27S,30S)-30-[(1R)-1-hydroxyethyl]-27-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-8,12,15,17,23,26-hexamethyl-3,6,9,18,21-pentakis(2-methylpropyl)-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxo-24-(propan-2-yl)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-decaazahentriacontan-31-oate (3):

To a solution of **2** (71.0 g, 53.0 mmol) in CH₂Cl₂ (1 l) was added methyl (2S,3R)-2-amino-3-hydroxybutanoate hydrochloride (10.8 g, 63.9 mmol) and HOAt (10.8 g, 79.2 mmol) at room temperature. To the mixture was added WSCD (9.9 g, 63.7 mmol) while cooling in an ice bath. The mixture was stirred for 1.5 h at ambient temperature. The resulting mixture was concentrated *in vacuo* and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 0.5 N HCl aq., saturated NaHCO₃, and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. To a solution of the residue in CH₂Cl₂ (1 l) was added TFA (205 mL) while cooling in an ice bath. The mixture was stirred for 5 h while cooling in an ice bath. The pH of the solution was then adjusted with Na₂CO₃ and NaHCO₃ aq. while cooling in an ice bath. The resulting solution was extracted with CHCl₃. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ aq. and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* to give the desired deprotected intermediate. To a solution of the intermediate in a solvent mixture (AcOEt 750 mL and pyridine 67.5

mL) was added isothiocyanatobenzene (19.8 mL, 167 mmol), and the mixture was stirred for 13 h. To the mixture was added pyridine (67.5 mL) and diisopropylethylamine, and the pH of the mixture was adjusted to 8. The mixture was stirred for 3 h. To the resulting solution was added *N,N*-dimethylpropanediamine (19.8 g, 194 mmol), and the mixture was stirred for 5 minutes. The reaction mixture was added to 0.5 N HCl aq. and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 0.5 N HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. To a solution of the residue in MeCN (1 l) was added 1 M HCl aq. (1 l) while cooling in an ice bath. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 4 h. The resulting mixture was neutralized with Na₂CO₃ aq., and concentrated *in vacuo*. The pH of the residual solution was adjusted to 8 with saturated NaHCO₃ aq., and then extracted with AcOEt. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ aq. and brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. Subsequently, to a solution of the residue dissolved in AcOEt (690 mL) was added isothiocyanatobenzene (11.3 g, 83.6 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred for 1 h. To the solution was added diisopropylethylamine (5 mL), and the mixture was additionally stirred for 1.5 h. To the resulting solution was added *N,N*-dimethylpropanediamine (9.1 g, 89 mmol), and the mixture was stirred for 5 minutes. The reaction mixture was added to 0.5 N HCl aq. and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 0.5 N HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. To a solution of the residue in MeCN (555 mL) was added 1 M HCl aq. (555 mL) while cooling in an ice bath. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 3 h. The resulting mixture was neutralized with Na₂CO₃ aq., and concentrated *in vacuo*. The pH of the residual solution was adjusted to 8 with saturated NaHCO₃ aq., and the solution was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ aq. and brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* to afford **3** (65.5 g). MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 1180; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₀H₁₁₁N₁₀O₁₃ [M+H]⁺ 1179.8327, found 1179.8325.

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,3,4,10,13,19,21,24,28-nonamethyl-15,18,27,30,33-pentakis(2-methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (4)

To a solution of **3** (87 mg, 0.073 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) was added (2R)-2-[[9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl](methyl)amino}propanoic acid (36 mg, 0.12 mmol), BOP-Cl (28 mg, 0.12 mmol), and diisopropylethylamine (39 μ l, 0.22 mmol) while cooling in an ice bath. The mixture was stirred for 13 h at room temperature and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 10% citric acid aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was purified by preparative thin layer chromatography (CHCl₃:MeOH = 90:10). To a solution of the residue in dioxane (2.4 mL) was added 1 M NaOH aq. (0.6 mL) at ambient temperature and the mixture was stirred for 2 h. To the reaction mixture was added 10% citric acid aq. to adjust the pH to 4, and the solution was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was triturated with Et₂O. To a solution of the residue in CH₂Cl₂ (63 mL) was added HOAt (10 mg, 0.076 mmol) and WSCD (12 mg, 0.075 mmol) while cooling in an ice bath, and the mixture was stirred at 50 °C for 13 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with H₂O, 10% citric acid aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was purified by preparative thin layer chromatography (CHCl₃:MeOH = 95:5) to afford **4** (43 mg, 48%). ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.15 (1H, brd, J = 9.0 Hz), 7.78 (1H, brd, J = 9.0 Hz), 6.95 (1H, d, J = 9.0 Hz), 6.90 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.72 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.67 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.40-5.60 (2H, m), 5.32-5.39 (2H, m), 5.15 (1H, dd, J = 10.0 and 4.0 Hz), 5.07 (1H, dd, J = 10.0 and 4.0 Hz), 4.90-4.95 (1H, m), 4.75-5.05 (3H, m), 4.71-4.75 (1H, m), 4.55-4.59 (1H, m), 4.30-4.33 (1H, m), 4.20-4.22 (1H, m), 3.88 (1H, brs), 3.17 (3H, s), 3.06 (3H, s), 3.04 (3H, s), 2.98 (3H, s), 2.90 (3H, s), 2.76 (3H, s), 2.51 (1H, brd, J = 5.0 Hz), 2.30-2.40 (2H, m), 1.80-2.20 (4H, m), 0.80-1.90 (46H, m), 1.66 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.38 (3H, d, J = 7.5 Hz), 1.33 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.14 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.09 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.08 (3H, d, J = 6.0 Hz), 0.74 (3H, d, J = 7.0 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.6, 174.3, 174.0, 173.7, 172.8, 172.3, 172.1, 171.9, 171.1, 170.4, 170.3, 128.5, 127.4, 76.1, 67.8, 59.6, 59.4, 55.1, 54.9, 54.8, 53.9, 51.1, 48.6, 47.9, 46.5, 45.6, 41.2, 39.5, 36.2, 36.1, 35.8, 35.7, 35.3, 34.2, 31.1, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 27.6, 27.3, 25.1, 25.1, 25.0, 24.9, 24.8, 23.6, 23.4, 23.4, 22.9, 22.5, 21.2, 21.2, 21.1, 20.9, 20.3, 19.5, 18.3, 18.0, 16.1, 16.0, 14.8, 13.9; MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 1233; HRMS (ESI) m/z calc. for C₆₃H₁₁₃N₁₁NaO₁₃ [M+Na]⁺ 1254.8417, found 1254.8423; mp 140 °C; [α]_D²³ -140.4 (c 0.75, MeOH).

Methyl (2S,5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S)-26-amino-2-[(1R)-1-hydroxyethyl]-5-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-6,9,15,17,20,24,28-heptamethyl-11,14,23-tris(2-methylpropyl)-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxo-8-(propan-2-yl)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaazanonacosan-1-oate (5):

To a solution of **2** (71.0 g, 53.0 mmol) in CH₂Cl₂ (1 l) was added methyl (2S,3R)-2-amino-3-hydroxybutanoate hydrochloride (10.8 g, 63.9 mmol) and HOAt (10.8 g, 79.2 mmol) at room temperature. To the mixture was added WSCD (9.9 g, 63.7 mmol) while cooling in an ice bath. The mixture was stirred for 1.5 h at ambient temperature. The resulting mixture was concentrated *in vacuo* and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 0.5 N HCl aq., saturated NaHCO₃, and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. To a solution of the residue in CH₂Cl₂ (1 l) was added TFA (205 mL) while cooling in an ice bath. The mixture was stirred for 5 h while cooling in an ice bath. The pH of the solution was adjusted with Na₂CO₃ and NaHCO₃ aq. while cooling in an ice bath. The resulting solution was extracted with CHCl₃. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ aq. and brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* to give the desired deprotected intermediate. To a solution of the intermediate in a solvent mixture (AcOEt 750 mL and pyridine 67.5 mL) was added isothiocyanatobenzene (19.8 mL, 167 mmol), and the mixture was stirred for 13 h. To the mixture was added pyridine (67.5 mL) and diisopropylethylamine, and the pH of the mixture was adjusted to 8. The mixture was stirred for 3 h. To the resulting solution was added *N,N*-dimethylpropanediamine (19.8 g, 194 mmol) and the mixture was stirred for 5 minutes. The reaction mixture was added to 0.5 N HCl aq. and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 0.5 N HCl, saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. To a solution of the residue in MeCN (1 l) was added 1 M HCl aq. (1.1 l) while cooling in an ice bath. The mixture was warmed to 30 °C and stirred at the same temperature for 4 h. The resulting mixture was neutralized with Na₂CO₃ aq., and concentrated *in vacuo*. The pH of the residual solution was adjusted to 8 with saturated NaHCO₃ aq., and the solution was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ aq. and brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. Subsequently, to a solution of the residue dissolved in AcOEt (690 mL) was added isothiocyanatobenzene (11.3 g, 83.6 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred for 1 hr. To the solution was added diisopropylethylamine (5 mL), and the mixture was

additionally stirred for 1.5 h. To the resulting solution was added *N,N*-dimethylpropanediamine (9.1 g, 89 mmol) and the mixture was stirred for 5 minutes. The reaction mixture was added to 0.5 N HCl aq. and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 0.5 N HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. To a solution of the residue in MeCN (555 mL) was added 1 M HCl aq. (555 mL) while cooling in an ice bath. The mixture was warmed to 30 °C and stirred at the same temperature for 3 h. The resulting mixture was neutralized with Na₂CO₃ aq., and concentrated *in vacuo*. The pH value of the residual solution was adjusted to 8 with saturated NaHCO₃ aq., and the solution was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ aq. and brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo*. Subsequently, to a solution of the residue dissolved in AcOEt (660 mL) was added isothiocyanatobenzene (10 mL, 88.8 mmol) at ambient temperature, and the pH of the mixture was adjusted to 7.5 with diisopropylethylamine. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1.5 h. To the resulting solution was added *N,N*-dimethylpropanediamine (9.1 g, 89 mmol) and the mixture was stirred for 5 minutes. The reaction mixture was added to 0.5 N HCl aq. (1 l) and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 0.5 N HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified with silica-gel column chromatography, eluting with hexane:AcOEt (2:1-1:1-1:2) to give the desired intermediate. To a solution of the residue in MeCN (337 mL) was added 1 M HCl aq. (337 mL) and the mixture was stirred at 30 °C for 2 h. The resulting mixture was neutralized with Na₂CO₃ (58.8 g in H₂O 300 mL) and concentrated *in vacuo*. The pH of the residual solution was adjusted to 8 with saturated NaHCO₃ aq., and the solution was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ and brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified with silica-gel column chromatography, eluting with CHCl₃:MeOH (100:0-97:3) to afford **5** (29.1 g, 41%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.27 (0.5H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.38 (0.5H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.00 (0.5H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.93 (0.5H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.84 (0.5H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.80 (0.5H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.52–5.53 (2H, m), 5.14–5.51 (5H, m), 4.86–5.04 (1H, m), 4.66–4.81 (2H, m), 4.55–4.56 (2H, m), 4.30–4.31 (1H, m), 4.00–4.01 (1H, m), 3.75–3.77 (1H, m), 3.76 (1.5H, s), 3.75 (1.5H, s), 3.25 (1.5H, s), 3.14 (1.5H, s), 3.06 (1.5H, s), 3.02 (1.5H, s), 3.01 (1.5H, s), 3.00 (3H, s), 2.71 (1.5H, s), 2.35 (2H, m), 1.24–2.03 (61H, m); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1054; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₅₃H₉₈N₉O₁₂ [M+H]⁺ 1052.7329, found 1052.7326.

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-33-[(1R)-1-methoxyethyl]-1,3,4,10,13,19,21,24,28-nonamethyl-15,18,27,30-tetrakis(2-methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (6)

To a solution of **5** (20.0g, 19.0 mmol) in EtOAc (300 mL) was added N-(tert-butoxycarbonyl)-N,O-dimethyl-L-threonine (5.9g, 23.8 mmol) and HOAt (3.2 g, 23.8 mmol) at room temperature. To the mixture was added WSCD (3.7 g, 23.8 mmol) in EtOAc (10 ml) while cooling in an ice bath, and the mixture was stirred for 3 h while cooling in an ice bath. The resulting mixture was concentrated *in vacuo* and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 10% KHSO₄ aq., H₂O, 5% NaHCO₃ aq., and brine, and dried over MgSO₄. The solvent was removed *in vacuo*. To a solution of the residue in CH₂Cl₂ (185 ml) was added TFA (55.6 mL) while cooling in an ice bath. The mixture was stirred for 4 h while cooling in an ice bath. The pH of the solution was adjusted with a solution of 10% Na₂CO₃ aq. while cooling in an ice bath. The resulting solution was extracted with CH₂Cl₂ and dried over MgSO₄. The residue was purified by HPLC to give the desired deprotected intermediate (12.0g, 53%).

MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1182

To a solution of the intermediate (1.0 g, 0.85 mmol) was added (2R)-2-[[[9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl](methyl)amino}propanoic acid (303 mg, 0.93 mmol), BOP-Cl (430.9 mg, 1.7 mmol), and diisopropylethylamine (590 µl, 3.4 mmol) while cooling in an ice bath. The mixture was stirred overnight at room temperature and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with 0.3 N HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over MgSO₄. The solvent was removed *in vacuo*. To a solution of the residue in dioxane (12.5 mL) was added 1 M NaOH aq. (5.9 mL, 5.9 mmol) while cooling in an ice bath, and the mixture was stirred for 2 h. To the reaction mixture was added 1 M HCl aq. to adjust the pH to 5, and the solution was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was triturated with IPE to afford the desired undecapeptide (0.96g, 98%).

MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1253

To a solution of HOAt (26.1 mg, 0.19 mmol) and WSCD (36.7 mg, 0.19 mmol) in EtOAc (80 mL) was added the

intermediate undecapeptide (0.2 g, 0.16 mmol) in portion, and the mixture was stirred at room temperature overnight. To the reaction mixture was added 0.3 N HCl aq., and the residue was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with H₂O, 20% NaCl aq., brine, and dried over MgSO₄. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was purified with silica-gel column chromatography (hexane : acetone = 2 : 1) to afford **13** (111 mg, 56%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.20 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 7.60 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 6.95 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.62 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.65 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 5.40–5.54 (2H, m), 5.29–5.33 (2H, m), 5.08 (1H, dd, *J* = 10.0 and 4.0 Hz), 4.88–5.01 (4H, m), 4.78–4.85 (2H, m), 4.67–4.73 (1H, m), 4.50–4.55 (1H, m), 4.13–4.28 (3H, m), 3.32 (3H, s), 3.23 (3H, s), 3.20 (3H, s), 3.06 (6H, s), 3.04 (3H, s), 2.90 (3H, s), 2.27–2.41 (4H, m), 1.91–2.12 (3H, m), 1.17–1.86 (10H, m), 1.66 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.41 (3H, d, *J* = 7.5 Hz), 1.32 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.13 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.09 (6H, d, *J* = 7 Hz), 0.74–1.04 (30H, m) 0.72 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 176.6, 174.5, 174.0, 173.7, 172.8, 172.3, 172.0, 172.0, 171.1, 170.4, 168.4, 128.5, 127.4, 76.1, 74.2, 67.9, 60.6, 59.6, 59.4, 57.1, 55.2, 54.9, 53.9, 50.8, 48.6, 47.9, 46.5, 45.5, 41.1, 39.6, 36.4, 36.1, 35.8, 35.3, 34.2, 33.7, 31.1, 30.6, 30.5, 30.4, 27.3, 25.2, 25.1, 25.1, 24.9, 23.6, 23.4, 23.4, 23.0, 22.5, 21.2, 21.2, 21.2, 20.4, 19.5, 18.3, 18.0, 16.1, 16.0, 15.8, 14.8, 14.1; MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1236; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₂H₁₁₂N₁₁O₁₄ [M+H]⁺ 1234.8385, found 1234.8371; mp 172 °C; [α]_D²² -198.3 (*c* 0.75, MeOH).

(3S,6S,9S,12R,15S,18S,21S,24S,30S,33S)-24-(cyclohexylmethyl)-30-[(1R)-1-hydroxyethyl]-33-[(E,1R,2R)-1-hydroxy-2-methylhex-4-enyl]-1,4,10,12,15,19,25,28-octamethyl-6,9,18,21-tetrakis(2-methylpropyl)-3-propan-2-yl-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (7)

Compound **7** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.03 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.67 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.98 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.84 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.83 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.26–5.55 (5H, m), 5.14–5.23 (1H, m), 4.49–5.08 (5H, m), 4.15–4.30 (2H, m), 3.94–4.05 (1H, m), 3.45 (3H, s), 3.03–3.30 (2H, m), 3.16 (3H, s), 3.15 (3H, s), 3.05 (3H, s), 2.96 (3H, s), 2.90 (3H, s), 2.24–2.45 (2H, m), 0.75–2.10 (61H, m), 1.19 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.05 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.80 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.72 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1259 ; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₅H₁₁₅N₁₁NaO₁₃ [M+Na]⁺ 1280.8573,

found 1280.8568.

(3S,6S,9S,12R,15S,18S,21S,24S,30S,33S)-24-[(2S)-butan-2-yl]-30-[(1R)-1-hydroxyethyl]-33-[(E,1R,2R)-1-hydroxy-2-methylhex-4-enyl]-1,4,10,12,15,19,25,28-octamethyl-6,9,18,21-tetrakis(2-methylpropyl)-3-propan-2-yl-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (8)

Compound **8** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.13 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.05 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.00 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.91 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.90 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.28–5.53 (5H, m), 4.79–5.07 (4H, m), 4.66–4.77 (2H, m), 4.50–4.64 (2H, m), 4.21 (2H, d, *J* = 11.0 Hz), 3.47 (3H, s), 3.45 (3H, s), 3.17 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.04 (3H, s), 2.75–2.82 (1H, m), 2.74 (3H, s), 2.26–2.39 (2H, m), 0.78–2.15 (54H, m), 1.63 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.18 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.14 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.78 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.76 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1219 ; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₂H₁₁₂N₁₁O₁₃ [M+H]⁺ 1218.8441, found 1218.8411.

(3S,6S,9S,12R,15S,18S,21S,24S,30S,33S)-24-cyclohexyl-30-[(1R)-1-hydroxyethyl]-33-[(E,1R,2R)-1-hydroxy-2-methylhex-4-enyl]-1,4,10,12,15,19,25,28-octamethyl-6,9,18,21-tetrakis(2-methylpropyl)-3-propan-2-yl-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (9)

Compound **9** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.16 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 8.01 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.12 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.87 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.27–5.54 (5H, m), 4.87–5.06 (4H, m), 4.68–4.77 (2H, m), 4.54–4.61 (1H, m), 4.14–4.32 (2H, m), 3.92–3.98 (1H, m), 3.70–3.77 (1H, m), 3.47 (3H, s), 3.45 (3H, s), 3.17 (3H, s), 3.07–3.16 (2H, m), 3.09 (3H, s), 3.05 (3H, s), 2.75 (3H, s), 2.20–2.45 (3H, m), 0.75–2.10 (53H, m), 1.64 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.35 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.18 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.00 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.95 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1245 ; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₄H₁₁₄N₁₁O₁₃ [M+H]⁺ 1244.8598, found 1244.8579.

(3S,6S,9S,12R,15S,18S,21S,24S,30S,33S)-30-[(1R)-1-hydroxyethyl]-33-[(E,1R,2R)-1-hydroxy-2-methylhex-

4-enyl]-1,4,10,12,15,19,25,28-octamethyl-6,9,18,21-tetrakis(2-methylpropyl)-24-phenyl-3-propan-2-yl-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (10)

Compound **10** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.33 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 8.14 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 7.98 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.15–7.52 (5H, m), 7.12 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.00 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.42 (1H, brs), 5.17–5.57 (5H, m), 4.82–5.07 (4H, m), 4.50–4.78 (3H, m), 4.15–4.34 (2H, m), 3.97–4.08 (1H, m), 3.75 (1H, brs), 3.42 (3H, s), 3.24 (3H, s), 2.93–3.22 (2H, m), 3.16 (3H, s), 3.12 (3H, s), 3.06 (3H, s), 2.92 (3H, s), 2.22–2.55 (3H, m), 0.80–2.17 (44H, m), 1.67 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.34 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.82 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.72 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1239 ; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₄H₁₀₈N₁₁O₁₃ [M+H]⁺ 1238.8128, found 1238.8011.

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-33-[(2S)-butan-2-yl]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,3,4,10,13,19,21,24,28-nonamethyl-15,18,27,30-tetrakis(2-methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (11) Compound **11** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.45 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 7.78 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 6.95 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.62 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.67 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 5.4–5.6 (3H, m), 5.31 (1H, dd, *J* = 12 and 4.0 Hz), 5.12 (1H, dd, *J* = 10 and 4.0 Hz), 4.8–5.0 (4H, m), 4.65–4.75 (2H, m), 4.53 (1H, m), 4.27 (1H, m), 4.21 (1H, m), 3.88 (1H, brs), 3.13 (3H, s), 3.11 (3H, s), 3.05 (3H, s), 3.01 (3H, s), 2.98 (3H, s), 2.92 (3H, s), 2.51 (1H, brd, *J* = 5.0 Hz), 2.3–2.4 (2H, m), 1.9–2.2 (5H, m), 1.1–1.9 (11H, m), 1.66 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.38 (3H, d, *J* = 7.5 Hz), 1.33 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.13 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.09 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.09 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 0.8–1.0 (34H, m), 0.74 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.3, 174.4, 173.7, 173.5, 172.9, 172.1, 172.0, 171.6, 171.0, 170.3, 169.1, 128.3, 127.6, 75.9, 67.9, 60.5, 59.4, 55.3, 54.5, 53.7, 51.1, 48.0, 47.8, 46.5, 45.6, 45.5, 41.6, 41.3, 36.1, 35.8, 35.3, 35.2, 34.2, 34.1, 31.7, 31.2, 31.0, 30.6, 30.4, 30.3, 27.3, 25.1, 25.1, 24.9, 24.8, 24.7, 23.6, 23.4, 23.4, 22.9, 22.4, 21.3, 21.2, 20.2, 19.2, 18.3, 18.0, 16.5, 16.1, 16.0, 14.8, 14.0, 10.3; MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1233; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₃H₁₁₄N₁₁O₁₃ [M+H]⁺ 1232.8592, found 1232.8572; mp 182 °C; [α]_D²³ -160.2 (*c* 0.75, MeOH).

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-33-cyclohexyl-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,3,4,10,13,19,21,24,28-nonamethyl-15,18,27,30-tetrakis(2-methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (12) Compound **12** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.54 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 7.76 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.95 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.88 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.61 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.66 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 5.18–5.56 (4H, m), 5.05–5.15 (1H, m), 4.80–5.03 (4H, m), 4.64–4.76 (2H, m), 4.45–4.58 (1H, m), 4.15–4.30 (2H, m), 3.86 (1H, brs), 3.12 (3H, s), 3.09 (3H, s), 3.04 (3H, s), 3.02 (3H, s), 2.97 (3H, s), 2.92 (3H, s), 2.51 (1H, brd, *J* = 5.0 Hz), 2.25–2.42 (2H, m), 0.85–2.20 (52H, m), 1.62 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.38 (3H, d, *J* = 8.0 Hz), 1.32 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.13 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.09 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.80 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.73 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1259 ; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₅H₁₁₆N₁₁O₁₃ [M+H]⁺ 1258.8749, found 1258.8743.

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,3,4,10,13,19,21,24,28-nonamethyl-15,18,27,30-tetrakis(2-methylpropyl)-33-phenyl-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (13) Compound **13** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.28 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.52 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.15–7.43 (5H, m), 7.12 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.42 (1H, s), 5.69 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 5.21–5.57 (4H, m), 5.08–5.10 (1H, m), 4.82–4.90 (4H, m), 4.72–4.73 (1H, m), 4.54–4.56 (1H, m), 4.25–4.27 (2H, m), 3.69–3.70 (1H, m), 3.24 (3H, s), 3.13 (3H, s), 3.09 (3H, s), 3.07 (3H, s), 2.92 (3H, s), 2.73 (3H, s), 2.52 (1H, d, *J* = 5.0 Hz), 2.36–2.38 (2H, m), 0.68–2.04 (62H, m); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1253 ; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₅H₁₁₀N₁₁O₁₃ [M+H]⁺ 1252.8279, found 1252.8273.

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-33-[(1R)-1-tert-butoxyethyl]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,3,4,10,13,19,21,24,28-nonamethyl-15,18,27,30-tetrakis(2-

methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-

2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (14) Compound **14** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.38 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 7.52 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.68 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.66 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 5.2–5.6 (4H, m), 5.04 (1H, m), 4.8–5.0 (5H, m), 4.71 (1H, m), 4.4–4.6 (2H, m), 4.2–4.3 (2H, m), 3.74 (1H, brs), 3.30 (3H, s), 3.21 (3H, s), 3.06 (3H, s), 3.05 (3H, s), 3.03 (3H, s), 2.89 (3H, s), 2.51 (1H, brd, *J* = 5.0 Hz), 2.25–2.45 (2H, m), 1.9–2.2 (4H, m), 1.1–1.9 (10H, m), 1.66 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.41 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.33 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.19 (9H, s), 1.12 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.09 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.09 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.85–1.04 (27H, m), 0.82 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 0.72 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1277; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₅H₁₁₈N₁₁O₁₄ [M+H]⁺ 1276.8854, found 1276.8846.

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-6,33-bis[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,3,4,10,13,19,21,24,28-nonamethyl-15,18,27,30-tetrakis(2-methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (15)

Compound **15** was prepared from **5** using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.71 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.67 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.92 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 5.66 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 4.78–5.56 (11H, m), 4.47–4.75 (2H, m), 4.15–4.32 (3H, m), 3.69 (1H, brs), 3.28 (3H, s), 3.19 (3H, s), 3.08 (3H, s), 3.06 (6H, s), 2.99 (1H, d, *J* = 5.0 Hz), 2.91 (3H, s), 2.51 (1H, brd, *J* = 6.0 Hz), 2.25–2.45 (2H, m), 1.50–2.20 (11H, m), 1.66 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.16–1.48 (9H, m), 1.45 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.14 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.10 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 0.80–1.05 (26H, m), 0.82 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 0.72 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1221; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₁H₁₁₀N₁₁O₁₄ [M+H]⁺ 1220.8228, found 1220.8215.

(3S,6S,9S,12R,15S,18S,21S,24S,30S,33S)-30-[(1R)-1-hydroxyethyl]-33-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,4,10,12,15,19,25,28-octamethyl-9-[(2S)-2-methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]-6,18,21,24-tetrakis(2-methylpropyl)-3-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (23):

To a solution of **17** (1.0 g, 0.8 mmol), N,N,N,N-tetrabutylammonium chloride (45 mg, 0.16 mmol) and TEMPO (25 mg, 0.16 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) and an aqueous solution of NaHCO₃ (0.5 M) and K₂CO₃ (0.05 M) (10 mL) was added N-chlorosuccinimide (162 mg, 1.2 mmol) portion-wise. After stirring at room temperature overnight, N,N,N,N-tetrabutylammonium chloride (18 mg, 0.065 mmol), TEMPO (25 mg, 0.16 mmol) and N-chlorosuccinimide (160 mg, 1.2 mmol) were added portion-wise. After the starting compound had been consumed, the mixture was extracted twice with CH₂Cl₂. The combined extracts were dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was subjected to chromatography on silica gel (CH₂Cl₂:acetone = 4:1 to 2:3) to give the desired aldehyde (86 mg, 9%).

MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1232

To a solution of the intermediate (38 mg, 0.03 mmol) and morpholine (10 μl, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (30 mg, 0.14 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with NaHCO₃ aq. and extracted three times with CH₂Cl₂. The combined extracts were dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was subjected to ODS purification to afford **23** (20 mg, 51%).

¹H NMR (pyridine-d₅, 80 °C) δ 8.37–8.38 (1H, m), 8.29–8.31 (1H, m), 8.21–8.23 (1H, m), 7.43–7.52 (2H, m), 6.85–6.87 (1H, m), 6.28–6.29 (1H, m), 5.27–5.77 (9H, m), 4.87–4.98 (4H, m), 4.46–4.65 (2H, m), 3.93–4.07 (5H, m), 3.65–3.66 (5H, m), 3.21–3.43 (14H, m), 2.91 (3H, brs), 2.84–2.87 (1H, m), 2.70–2.76 (1H, m), 2.57–2.64 (1H, m), 2.31–2.49 (5H, m), 1.65–2.18 (9H, m), 1.61 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.47–1.56 (3H, m), 1.40 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.30–1.36 (10H, m), 1.19 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.15 (3H, d, *J* = 5.5 Hz), 0.99–1.08 (15H, m), 0.87–0.94 (9H, m), 0.75 (3H, d, *J* = 6.5 Hz) for a major conformer; MS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺: 1326; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₆₆H₁₁₉N₁₂O₁₄ [M+H]⁺ 1303.8963, found 1303.8958.

(2S)-3-[(2S,5S,8S,11S,14S,20S,23S,26S,29S,32R)-14-[(1R)-1-hydroxyethyl]-11-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,7,10,16,19,25,29,32-octamethyl-5,20,23,26-tetrakis(2-methylpropyl)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undeca-oxo-8-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazaacyclotritriacontan-2-yl]-2-methylpropyl morpholine-4-carboxylate (24**):**

To a solution of **17** (500 mg, 0.41 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) were added 4-nitrophenyl chloroformate (98 mg, 0.49

mmol) and N-methylmorpholine (89 μ l, 0.81 mmol). After stirring overnight, three further portions of 4-nitrophenyl chloroformate (294 mg, 1.5 mmol) and N-methylmorpholine (267 μ l, 2.4 mmol) were added at intervals of 1 h. After the starting compound had been consumed, the mixture was diluted with ethyl acetate, washed with 1 M aqueous hydrochloric acid and aqueous sodium hydrogen carbonate, dried over magnesium sulfate and concentrated. The residue was subjected to chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate = 1/4 and then dichloromethane/methanol = 9/1) to give the desired intermediate (438 mg, 77%).

MS (ESI) m/z $[M+H]^+$: 1399

To a solution of the intermediate (50 mg, 0.036 mmol) in N,N-dimethylformamide (1 mL) was added morpholine (16 μ l, 0.19 mmol), and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was subjected by ODS purification to afford **24** (35 mg, 73%). ^1H NMR (pyridine- d_5 , 80 $^\circ\text{C}$) δ 8.41 (1H, d, J = 5.0 Hz), 8.30 (1H, d, J = 8.0 Hz), 8.22 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.50–7.53 (1H, m), 7.44–7.45 (1H, m), 6.85–6.86 (1H, m), 6.28–6.30 (1H, m), 5.27–5.88 (9H, m), 4.86–4.98 (4H, m), 4.45–4.63 (2H, m), 3.96–4.13 (6H, m), 3.54–3.56 (4H, m), 3.42–3.43 (6H, m), 3.23–3.36 (10H, m), 2.91 (3H, brs), 2.86–2.89 (1H, m), 2.67–2.76 (1H, m), 2.57–2.64 (1H, m), 2.28–2.49 (3H, m), 1.66–2.15 (9H, m), 1.61 (3H, d, J = 5.5 Hz), 1.47–1.56 (3H, m), 1.40 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.34–1.37 (10H, m), 1.18 (3H, d, J = 7.5 Hz), 1.13–1.14 (3H, m), 0.98–1.06 (15H, m), 0.91–0.94 (9H, m), 0.75 (3H, d, J = 6.0 Hz) for a major conformer; MS (ESI) m/z $[M+Na]^+$: 1370; HRMS (ESI) m/z calc. for $\text{C}_{67}\text{H}_{119}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$ $[M+H]^+$ 1347.8862, found 1347.8871.

(2S)-3-[(2S,5S,8S,11S,14S,20S,23S,26S,29S,32R)-14-[(1R)-1-hydroxyethyl]-11-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,7,10,16,19,25,29,32-octamethyl-5,20,23,26-tetrakis(2-methylpropyl)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxo-8-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontan-2-yl]-2-methylpropyl (2-methoxyethyl)methylcarbamate (25):

Compound **25** was prepared from **17** and 2-methoxy-N-methyl-1-ethanamine using a similar approach to that described for **24**. ^1H NMR (pyridine- d_5 , 80 $^\circ\text{C}$) δ 8.37–8.38 (1H, m), 8.29–8.30 (1H, m), 8.21 (1H, d, J = 9.8 Hz), 7.49–7.52 (1H, m), 7.44–7.45 (1H, m), 6.83–6.84 (1H, m), 6.27–6.29 (1H, m), 5.29–5.76 (9H, m), 4.86–4.98 (4H, m), 4.45–4.63 (2H, m), 3.96–4.09 (6H, m), 3.42–3.47 (6H, m), 3.31–3.36 (3H, m), 3.20–3.28 (10H, m), 2.91–2.92

(6H, m), 2.85–2.88 (1H, m), 2.70–2.75 (1H, m) 2.57–2.63 (1H, m), 2.26–2.48 (3H, m), 1.67–2.13 (9H, m), 1.60 (3H, d, $J = 5.5$ Hz), 1.46–1.55 (3H, m), 1.39 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 1.33–1.37 (10H, m), 1.19 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.13–1.14 (3H, m), 0.98–1.05 (15H, m), 0.91–0.94 (9H, m), 0.75 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) for a major conformer; MS (ESI) m/z $[M+Na]^+$: 1372; HRMS (ESI) m/z calc. for $C_{67}H_{121}N_{12}O_{16}$ $[M+H]^+$ 1349.9018, found 1349.9026.

(2S)-3-[(2S,5S,8S,11S,14S,20S,23S,26S,29S,32R)-14-[(1R)-1-hydroxyethyl]-11-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,7,10,16,19,25,29,32-octamethyl-5,20,23,26-tetrakis(2-methylpropyl)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaaxo-8-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontan-2-yl]-2-methylpropyl 4-methylpiperazine-1-carboxylate (26):

Compound **26** was prepared from **17** and using 1-methyl-piperazine using a similar approach to that described for **24**.

1H NMR (pyridine- d_5 , 80 °C) δ 8.40–8.41 (1H, m), 8.29–8.31 (1H, m), 8.21–8.23 (1H, m), 7.49–7.53 (1H, m), 7.44–7.45 (1H, m), 6.85–6.86 (1H, m), 6.28–6.30 (1H, m), 5.27–5.78 (9H, m), 4.86–4.98 (4H, m), 4.45–4.64 (2H, m), 3.96–4.12 (8H, m), 3.43–3.49 (7H, m), 3.23–3.36 (10H, m), 2.91 (3H, brs), 2.84–2.88 (1H, m), 2.70–2.75 (1H, m) 2.57–2.63 (1H, m), 2.29–2.48 (3H, m), 2.20–2.22 (4H, m), 1.67–2.13 (9H, m), 1.61 (3H, d, $J = 5.5$ Hz), 1.47–1.57 (3H, m), 1.40 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 1.34–1.37 (10H, m), 1.19 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.13–1.14 (3H, m), 0.98–1.06 (15H, m), 0.88–0.94 (9H, m), 0.75 (3H, d, $J = 6.6$ Hz) for a major conformer; MS (ESI) m/z $[M+H]^+$: 1362; HRMS (ESI) m/z calc. for $C_{68}H_{122}N_{13}O_{15}$ $[M+H]^+$ 1360.9178, found 1360.9166.

(3S,6S,9S,12R,15S,18S,21S,24S,30S,33S)-30-[(1R)-1-{{tert-butyl(dimethyl)silyl}oxy}ethyl]-9-[(2S)-3-{{tert-butyl(dimethyl)silyl}oxy}-2-methylpropyl]-33-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-1,4,10,12,15,19,25,28-octamethyl-6,18,21,24-tetrakis(2-methylpropyl)-3-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (27):

To a solution of **17** (10.0 g, 8.1 mmol) and 1H-imidazole (5.5 g, 80.8 mmol) in N,N-dimethylformamide (100 mL) was added tert-butylchlorodimethylsilane (9.8 g, 65.0 mmol) at room temperature. After stirring for 21 h at room temperature, the reaction mixture was added to a mixture of ethyl acetate and water. The organic layer was

successively washed with brine and dried over magnesium sulfate. The solvent was evaporated *in vacuo*, and the residue was purified by column chromatography on silica gel, eluting with a mixture of hexane and acetone (100:0 →50:50). The eluted fractions containing the desired product were collected and evaporated *in vacuo* to afford **27** (11.5g, 97%). ¹H NMR (Pyridine-d₅, 80 °C) δ 8.36–8.39 (1H, m), 8.23–8.26 (1H, m), 8.19 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), 7.48–7.50 (1H, m), 7.36–7.38 (1H, m), 6.91 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 6.26–6.30 (1H, m), 5.25–5.79 (8H, m), 4.87–4.95 (4H, m), 4.51–4.60 (2H, m), 4.07 (3H, s), 3.47–3.58 (5H, m) 3.38 (3H, s), 3.32–3.35 (1H, m), 3.24–3.28 (6H, m), 2.83–2.89 (3H, m), 2.65–2.74 (1H, m) 2.54–2.61 (1H, m), 2.42–2.49 (1H, m), 2.17–2.36 (3H, m), 1.61–2.14 (9H, m), 1.59 (3H, d, *J* = 5.5 Hz), 1.44–1.51 (3H, m), 1.24–1.39 (13H, m), 1.18 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.13 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.07 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.89–1.15 (39H, m), 0.83 (3H, d, *J* = 5.5 Hz), 0.06–0.21 (12H, m) for a major conformer; MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1464; HRMS (ESI) *m/z* calc. for C₇₄H₁₄₀N₁₁O₁₄Si₂ [M+H]⁺ 1463.0114, found 1463.0109.

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-18-[(2S)-3-hydroxy-2-methylpropyl]-3-(methoxymethyl)-1,4,10,13,19,21,24,28-octamethyl-15,27,30,33-tetrakis(2-methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (28):

A mixture of cesium chloride (31.1 g, 185.0 mmol) in THF (390 mL) was stirred for 30 minutes at room temperature under argon atmosphere. To the above mixture was added **27** (30.0 g, 20.5 mmol), and THF (60 mL) at room temperature. To the mixture was added Lithium bis(trimethylsilyl)amide in THF (158 mL, 164.0 mmol) dropwise over 30 minutes under -60 °C and stirred for 2 h at the same temperature. To the resulting yellow solution was added paraformaldehyde (3.7g, 123.0 mmol) at the same temperature, and the mixture was gradually warmed up under ice-bath cooling over 20 minutes. After stirring at 0 °C for 1 h, to the mixture was added AcOH (30 mL) over 15 minutes at 0.4 °C and stirred for 30 minutes To the mixture was added 5%NaHCO₃ aq., EtOAc, and stirred for 10 minutes, then extracted with EtOAc. The organic phase was washed with 5% citric acid aq., 25% NaCl aq., 10% NH₄Cl aq., 25% NaCl aq., and dried over Na₂SO₄, and concentrated. The residue was dissolved in THF (150 mL) and MeOH (30 mL) was added ethylene diamine (13.7 mL, 204.0 mmol) dropwise in an ice bath, and stirred at

room temperature for 22 h. To the mixture of EtOAc (300 mL) and 10% citric acid (300 mL) was added the above reaction mixture and stirred for 30 minutes. The organic phase was washed with 10% NH₄Cl aq., 25% NaCl aq., and dried over Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / acetone = 70/30) to afford the desired hydroxymethylated intermediate (13.5 g, 44%).

MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 1493

To a solution of the intermediate (5.1 g, 3.4 mmol) in dichloromethane (100 mL) were added 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene (4.6 g, 21.5 mmol) and molecular sieves 3A (3.3 g). To this mixture was added trimethyloxonium tetrafluoroborate (2.6 g, 17.6 mmol) portion-wise while cooling on ice. The mixture was stirred while cooling in an ice bath for 2.5 h. After filtering off insoluble materials, to the filtrate was added sat. sodium hydrogen carbonate aq., and dichloromethane was evaporated off. The residue was extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed twice with 5% citric acid aq., then sat. sodium hydrogen carbonate aq. and brine, dried over magnesium sulfate, filtered, and evaporated off. The residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol = chloroform only to 90/10) to give the intermediate. To a solution of the intermediate in methanol (40 mL) was added 1 M hydrochloric acid (20 mL, 20.7 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. After removing methanol *in vacuo*, the residue was extracted with EtOAc. The extract was washed with sat. sodium hydrogen carbonate aq., and brine, dried over magnesium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol = chloroform only to 80/20) to afford **28** (2.8g, 64%). The configuration at the 3 position of this compound was determined to be (R) by comparing with the NMR, [α]_D and HPLC spectra of the authentic known compound whose configuration was confirmed to be (R), synthesized using an alternative fragment condensation synthetic method, as described in WO2008/139986.

¹H NMR (CDCl₃) δ 9.12 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.75 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.64 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 5.29–5.51 (4H, m), 5.14 (1H, dd, *J* = 4.0, 11.5 Hz), 5.08 (1H, dd, *J* = 5.0, 10.0 Hz), 4.91–5.01 (3H, m), 4.75–4.86 (2H, m), 4.69 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 4.49–4.53 (1H, m), 4.25–4.28 (1H, m), 4.19–4.21 (1H, m), 3.72–3.78 (1H, m), 3.52–3.56 (1H, m), 3.46–3.49 (1H, m), 3.37–3.41 (2H, m), 3.37 (3H, s), 3.16 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.05 (3H, s), 3.01–3.04 (7H, m), 2.95 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 2.89 (3H, s),

2.26–2.38 (2H, m), 1.71–2.12 (12H, m), 1.65 (3H, d, $J = 5.5$ Hz), 1.31–1.60 (9H, m), 1.13–1.21 (1H, m), 1.11 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.09 (3H, d, $J = 5.2$ Hz), 0.96–1.04 (9H, m), 0.90–0.94 (6H, m), 0.85–0.88 (9H, m), 0.80 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.70 (3H, d, $J = 6.0$ Hz); MS (ESI) m/z $[M+Na]^+$: 1301; HRMS (ESI) m/z calc. for $C_{64}H_{116}N_{11}O_{15}$ $[M+H]^+$ 1278.8647, found 1278.8641; $[\alpha]_D^{22}$ -151.5 (c 0.750, MeOH); Retention time: 5.9 minutes (HPLC, ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1x50mm, 1.8-Micron), eluent: 0.1% HCO_2H-H_2O /0.1% $HCO_2H-MeCN = 98/2$ to 0/100 (10 min, gradient), flow rate: 1.0 mL/minute, column temperature: 40 °C.

(2S)-3-[(2S,5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32R)-14-[(1R)-1-hydroxyethyl]-11-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-17-(methoxymethyl)-1,7,10,16,19,25,29,32-octamethyl-5,20,23,26-tetrakis(2-methylpropyl)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxo-8-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontan-2-yl]-2-methylpropyl (2R)-2-(methoxymethyl)morpholine-4-carboxylate (30):

To a solution of **28** (2.83 g, 2.2 mmol) and *N*-methylmorpholine (730 μ l, 6.6 mmol) in dichloromethane (60 mL) was added 4-nitrophenyl chloroformate (585 mg, 2.9 mmol) in dichloromethane (9 mL) while cooling in an ice bath. After stirring for 30 min, *N*-methylmorpholine (730 μ l, 6.6 mmol) and 4-nitrophenyl chloroformate (916 mg, 4.5 mmol) in dichloromethane (9 mL) were added slowly and the mixture was stirred for 30 min. *N*-methylmorpholine (730 μ l, 6.6 mmol) and 4-nitrophenyl chloroformate (580 mg, 2.9 mmol) in dichloromethane (9 mL) were again added slowly, and the mixture was stirred for 15 min. The mixture was diluted with 1 M hydrochloric acid, extracted with CH_2Cl_2 , dried over magnesium sulfate, and concentrated. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol = chloroform only to 90/10) to give the desired intermediate (2.68 g, 84%). To a solution of the intermediate (2.68 g, 1.9 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (28 mL) was added (R)-2-(methoxymethyl)morpholine hydrochloride (380 mg, 2.3 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (770 μ L, 4.5 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. (R)-2-(methoxymethyl)morpholine hydrochloride (143 mg, 0.85 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (200 μ L, 1.2 mmol) were again added and the mixture was stirred at room temperature for 15 min. The reaction was diluted with EtOAc, washed with sat. sodium hydrogen carbonate aq. and brine, dried over magnesium sulfate and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 3/1 to 0/1) to afford **30** (1.9g,

72%).

^1H NMR (CDCl_3) δ 9.21 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.64 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.01 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.65 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.33–5.53 (4H, m), 5.15 (1H, dd, $J = 4.0, 11.5$ Hz), 5.08 (1H, dd, $J = 5.0, 10.0$ Hz), 4.93–5.01 (3H, m), 4.76–4.87 (2H, m), 4.69 (1H, t, $J = 5.0$ Hz), 4.49–4.55 (1H, m), 4.19–4.23 (2H, m), 3.80–4.00 (5H, m), 3.74–3.81 (1H, m), 3.51–3.61 (3H, m), 3.38–3.46 (2H, m), 3.38 (3H, s), 3.37 (3H, s), 3.17 (3H, s), 3.05 (9H, s), 3.01–3.04 (4H, m), 2.90 (3H, s), 2.28–2.46 (2H, m), 1.72–2.14 (15H, m), 1.66 (3H, d, $J = 5.5$ Hz), 1.31–1.61 (9H, m), 1.18–1.22 (1H, m), 1.12 (3H, d, $J = 7.5$ Hz), 1.10 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.97–1.05 (9H, m), 0.91–0.95 (9H, m), 0.86–0.89 (6H, m), 0.81 (6H, d, $J = 6.0$ Hz), 0.71 (3H, d, $J = 6.5$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 174.6, 174.1, 173.7, 173.1, 172.8, 172.5, 172.0, 171.8, 171.0, 170.3, 169.9, 155.4, 128.4, 127.5, 77.2, 76.8, 76.1, 73.3, 70.6, 69.3, 67.8, 66.5, 66.5, 59.6, 59.4, 59.4, 59.1, 55.5, 55.2, 54.7, 54.6, 53.7, 48.7, 47.9, 46.5, 45.5, 41.0, 39.4, 36.3, 36.1, 35.8, 35.2, 34.1, 31.6, 31.1, 30.5, 30.5, 30.4, 30.3, 29.8, 27.3, 25.2, 25.0, 24.8, 24.6, 23.6, 23.5, 23.4, 23.0, 22.5, 21.2, 21.0, 20.9, 20.4, 19.5, 18.3, 18.0, 16.1, 16.0, 15.6, 14.7; MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1436; HRMS (ESI) m/z calc. for $\text{C}_{71}\text{H}_{127}\text{N}_{12}\text{O}_{18}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1435.9386, found 1435.9351; mp 131 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -169.1 (c 0.75, MeOH).

(2S)-3-[(2S,5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32R)-14-[(1R)-1-hydroxyethyl]-11-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-17-(methoxymethyl)-1,7,10,16,19,25,29,32-octamethyl-5,20,23,26-tetrakis(2-methylpropyl)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undeca-oxo-8-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontan-2-yl]-2-methylpropyl (2-methoxyethyl)methylcarbamate (29):

Compound **29** was prepared from **28** and 2-methoxy-N-methyl-1-ethanamine using a similar approach to that described for **30**. ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.19 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.65 (1H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.00 (1H, d, $J = 8.9$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 5.65 (1H, d, $J = 3.1$ Hz), 5.20–5.60 (3H, m), 5.16 (1H, dd, $J = 10.0, 5.3$ Hz), 4.90–5.05 (4H, m), 4.70–4.90 (2H, m), 4.69 (1H, t, $J = 7.0$ Hz), 4.52 (1H, t, $J = 7.0$ Hz), 4.10–4.30 (2H, m), 3.91 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 3.76 (1H, t, $J = 9.2$ Hz), 3.20–3.60 (10H, m), 3.17 (3H, s), 3.06 (6H, s), 3.02 (3H, s), 2.95 (3H, s), 2.90 (3H, s), 1.20–2.70 (26H, m), 1.11 (6H, t, $J = 7.7$ Hz), 0.89–1.05 (26H, m), 0.88 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.87 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.81 (6H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.71 (3H, d, $J = 6.8$ Hz) for the major conformer; MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1393; HRMS (ESI) m/z calc. for $\text{C}_{69}\text{H}_{125}\text{N}_{12}\text{O}_{17}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1393.9280, found 1393.9264.

(3S,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-18-[(2S)-3-[2,2-bis(methoxymethyl)morpholin-4-yl]-2-methylpropyl]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-3-(methoxymethyl)-1,4,10,13,19,21,24,28-octamethyl-15,27,30,33-tetrakis(2-methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (32):

To a solution of **28** (2.5 g, 2.0 mmol), N,N,N,N-tetrabutylammonium chloride (109 mg, 0.39 mmol) and TEMPO (61 mg, 0.39 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) and an aqueous solution of NaHCO₃ (0.5 M) and K₂CO₃ (0.05 M) (25 mL) was added N-chlorosuccinimide (522 mg, 3.9 mmol) portion-wise in an ice bath. After stirring at room temperature for 3 h, N,N,N,N-tetrabutylammonium chloride (108 mg, 0.39 mmol), TEMPO (61 mg, 0.39 mmol) and N-chlorosuccinimide (522 mg, 3.9 mmol) were added. After the starting compound had been consumed, the mixture was extracted twice with CH₂Cl₂. The combined extracts were dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was subjected to chromatography on silica gel (CH₂Cl₂:acetone = 1:1) to give the desired aldehyde (1.3 g, 50%).

MS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺: 1298

To a solution of the aldehyde (0.15 g, 0.12 mmol) and 2,2-bis(methoxymethyl)morpholine hydrochloride (99.5 mg, 0.47 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (161.9 mg, 0.76 mmol), DIPEA (0.14 mL, 0.8 mmol), and AcOH (0.067 mL, 1.1 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with NaHCO₃ aq. and extracted three times with CH₂Cl₂. The combined extracts were dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was subjected to ODS purification to give **32** (0.1 g, 59 %).

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.96 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.67 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.76 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 5.65 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 5.23–5.57 (3H, m), 5.15 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.0 Hz), 5.09 (1H, dd, *J* = 10.2, 5.1 Hz), 4.91–5.03 (3H, m), 4.86 (1H, dd, *J* = 9.4, 2.4 Hz), 4.75–4.84 (1H, m), 4.70 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.53 (1H, dd, *J* = 8.8, 7.1 Hz), 4.25–4.31 (1H, m), 4.17–4.25 (1H, m), 3.70–3.83 (3H, m), 3.45–3.64 (6H, m), 3.37 (3H, s), 3.36 (3H, s), 3.34 (3H, s), 3.17 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.06 (3H, s), 3.02 (3H, s), 2.91 (3H, s), 2.45 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 2.25–2.43 (12H, m), 2.19 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 1.68–2.15 (12H, m), 1.66 (3H, d, *J* = 5.6 Hz), 1.49–1.63 (3H, m), 1.17–1.49 (10H, m), 1.12 (3H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.10 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.92–0.97 (8H, m), 0.90 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.87 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.85 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.81 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.80 (3H, d, *J*

= 6.5 Hz), 0.71 (3H, d, $J = 6.7$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 174.4, 174.1, 173.7, 173.1, 172.9, 172.5, 172.1, 171.8, 171.1, 170.4, 170.3, 128.4, 127.5, 76.1, 74.8, 72.8, 72.0, 69.3, 67.8, 65.9, 61.9, 59.6, 59.5, 59.4, 59.4, 59.0, 55.8, 55.5, 55.2, 54.7, 54.6, 54.1, 53.7, 48.6, 47.9, 46.5, 45.5, 41.0, 39.4, 36.2, 36.1, 35.8, 35.2, 34.1, 31.8, 31.6, 31.1, 30.5, 30.5, 30.3, 27.3, 26.9, 25.2, 25.0, 24.8, 24.6, 23.6, 23.5, 23.4, 23.0, 22.5, 21.2, 21.0, 20.9, 20.5, 19.5, 18.3, 18.0, 17.2, 16.1, 16.0, 14.7; MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1436; HRMS (ESI) m/z calc. for $\text{C}_{72}\text{H}_{131}\text{N}_{12}\text{O}_{17}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1435.9750, found 1435.9692; mp 135 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -157.0 (c 0.75, MeOH).

(3R,6S,9S,12S,15S,18S,21R,24S,27S,30S,33S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-9-[(1R,2R,4E)-1-hydroxy-2-methylhex-4-en-1-yl]-3-(methoxymethyl)-1,4,10,13,19,21,24,28-octamethyl-18-[(2S)-2-methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]-15,27,30,33-tetrakis(2-methylpropyl)-12-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazacyclotritriacontane-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecone (31):

Compound **31** was prepared from **28** and morpholine using a similar approach to that described for **32**.

^1H NMR (CDCl_3) δ 9.26 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.67 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 6.99 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 5.65 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 5.30–5.56 (3H, m), 5.15 (1H, dd, $J = 11.4, 3.9$ Hz), 5.09 (1H, dd, $J = 10.0, 5.2$ Hz), 4.91–5.03 (3H, m), 4.86 (1H, dd, $J = 9.3, 2.1$ Hz), 4.74–4.83 (1H, m), 4.70 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 4.53 (1H, dd, $J = 8.9, 7.0$ Hz), 4.18–4.31 (2H, m), 3.52–3.80 (7H, m), 3.37 (3H, s), 3.17 (3H, s), 3.05 (9H, s), 3.03 (3H, s), 2.90 (3H, s), 2.50 (1H, d, $J = 4.8$ Hz), 1.68–2.46 (25H, m), 1.66 (3H, d, $J = 5.4$ Hz), 1.49–1.63 (3H, m), 1.16–1.49 (10H, m), 1.12 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.10 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.84–1.07 (17H, m), 0.81 (6H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.71 (3H, d, $J = 6.8$ Hz) for the major conformer; MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1348; HRMS (ESI) m/z calc. for $\text{C}_{68}\text{H}_{123}\text{N}_{12}\text{O}_{15}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1347.9225, found 1347.9202.

***In vitro* 評価**

Assay for anti-HCV activity (qRT-PCR)

Inhibitory activity against replication of the HCV subgenomic replicon was evaluated by determining the amount of replicon RNA using real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). HCV replicon cells (#50-1) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum (FBS) or 50% human serum (HS) and 300 µg/mL G418 at 37 °C in 5% CO₂ with test compound. After this incubation, total RNA was extracted using the RNeasy 96 kit (Qiagen, Tokyo, Japan). The levels of HCV replicon RNA and cellular total RNA were determined by real-time qRT-PCR using ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)²³. HCV replicon RNA was normalized against the amount of cellular total RNA. The degree of HCV replicon RNA reduction for each treatment was calculated as the percentage of inhibition relative to the DMSO-treated control. 50% effective concentration (EC₅₀), defined as the respective concentrations at which the amount of HCV replicon RNA was reduced by 50%, were determined by sigmoid-Emax non-linear regression analysis using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Assay for anti-HCV activity (luciferase assay)

HCV activity of compounds was evaluated in FLR-1 HCV subgenomic replicon cells carrying the luciferase reporter gene. FLR-1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) containing 10% FBS or 50% HS and 300 µg/mL G418 at 37 °C in 5% CO₂ with test compound. After this incubation, the cell culture medium was removed, and the luciferase activity was determined using the Steady-Glo luciferase assay system (Promega, Tokyo, Japan). Luminescence was measured in triplicate using the EnVision multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The degree of HCV replicon RNA reduction for each treatment was calculated as the percentage of inhibition relative to the DMSO-treated control. EC₅₀, defined as the concentration of compounds at which the luciferase signal diminished by 50%, were determined by sigmoid-Emax non-linear regression analysis using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Assay for Concanavalin A induced proliferation of mouse splenocytes

Balb/c spleen cells (1.5×10^5 cells) suspended in 100 μ L RPMI1640 supplemented with 10% FBS, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 units/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, containing 5 μ g/mL concanavalin A (ConA) were cultured in 96-well microplates at 37 °C for 72 hours in a CO₂ incubator with or without the test compound. After this incubation, a 1/10 volume of Alamar Blue (BioSource; Camarillo, CA, USA) was added. After incubating for 3 h at 37 °C, fluorescence was measured using the EnVision multilabel Plate Reader. 50% inhibitory concentration (IC₅₀) value was defined as the concentration at which the growing of splenocytes was inhibited by 50%, as determined by sigmoid-Emax non-linear regression analysis using SAS software.

Aqueous Solubility

The test compounds in 10 mmol/L DMSO solution (13 μ L) were diluted to 130 μ mol/L by adding the fluid for disintegration test (JP2: pH=6.8). After incubation at 25°C for 20 h, precipitates were separated by filtration. The filtrate and a standard solution comprising a 100 μ mol/L DMSO solution of the test compound were examined using liquid chromatography. The ratio of the peak area of the sample solution to the peak area of the standard solution was calculated to determine the aqueous solubility.

***in vivo* 評価**

All animal experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Astellas Pharma Inc. Further, Astellas Pharma Inc. Tsukuba Research Center was awarded Accreditation Status by the AAALAC International. All efforts were made to minimize the number of animals used and to avoid suffering and distress.

• Assay for chimeric mouse model

uPA^{+/+}/SCID mice engrafted with human hepatocytes and infected with HCV genotype 1b were purchased from and kept at PhoenixBio (Hiroshima, Japan). ASP5286 solution or study vehicle was orally administered twice a day

for 14 days, from Day 0 to Day 13. The dosing volume of ASP5286 was 5 mL/kg. Peginterferon alfa-2a (PegIFN) at a dose of 10 µg/kg or saline was subcutaneously administered on the treatment initiation day (Day 0) and Days 3, 7, and 10. The dosing volume of PegIFN was 10 mL/kg. The last dose was followed by a 7-day follow-up period with no drug administration. Viral RNA was extracted from 5 µL of mouse serum using a SepaGene RV-R kit (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan). Isolated RNA was dissolved in 10 µL nuclease-free water containing 1 mM dithiothreitol (Promega, Tokyo, Japan) and 0.4 U/µL ribonuclease inhibitor (Takarabio, Shiga, Japan) and stored at 80 ± 10 °C until use. The copy number of HCV RNA was quantified using real-time qRT-PCR, as described above. Changes in serum HCV RNA level from baseline (Day 0) were calculated.

参考文献

1. (a) Paula, T.; Pablo, R.; Eugenia, V.; Pablo, B.; Sabino, P.; Jose, M.; Antonio, M.; Dolores, H. M.; Pablo, L.; Javier, G. S.; Vincente, S. *Infect. Disord. Drug Targets* **2009**, 9, 133;(b) Smith, R. E. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, 5, 715.
2. Choo, Q. L.; Kuo, G.; Weiner A. J. *Science* **1989**, 244, 359.
3. Fried, M.W. ; Shiffman, M. L. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 364, 975.
4. (a) Davis, G.; Balart, L.; Schiff, E.; Lindsay, K.; Bodenheimer, H.; Perrillo, R.; Carey, W.; Jacobson, I.; Payne, J.; Dienstag, J.; Vanthiel, D. *N. Engl. J. Med.* **1989**, 321, 1501; (b) Sy, T.; Jamal, M. *Int. J. Med. Sci.* **2006**, 3, 41.
5. Lohmann, V.; Körner, F.; Koch, J.; Herian, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager, R. *Science* **1999**, 285,110.
6. Wakita, T.; Pietschmann, T.; Kato, T.; Date, T.; Miyamoto, M.; Zhao, Z.; Murthy, K.; Habermann, A.; Kräusslich, H. G.; Mizokami, M.; Bartenschlager, R.; Liang, T. *Nat. Med.* **2005**, 1,791.
7. Manns, P. M.; Hahn, T. *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, 12, 595.
8. Pawlotsky, J. M. *Gastroenterology* **2016**, 151 (1), 70.
9. (a) Neyts, J. *Antiviral Res.* **2006**, 71, 363; (b) Philippe, A. Galloway. *Immunol. Res.* **2012**, 52, 200; (c) David, L. Wyles.; Anne, F. L. *Top Antivir. Med.* **2017**, 25(3), 103.
10. Faulds, D.; Goa, K. L.; Benfield, P. *Drugs* **1993**, 45, 953, and references cited therein.
11. Watashi, K.; Hijikata, M.; Hosaka, M.; Yamaji, M.; Shimotohno K. *Hepatology* **2003**, 38, 1282.
12. Sweeney, Z. K.; Fu, J.; Wiedmann, B. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 7145.
13. (a) Watashi, K.; Shimotohno, K. *Rev. Med. Virol.* **2007**, 17, 245; (b) Feng, Y.; Robotham, J. M.; Nelson, H. B.; Irsigler, A.; Kenworthy, R.; Tang, H. *J. Virol.* **2008**, 82, 5269; (c) Zhe, L.; Yang, F.; Robotham, J. M.; Tang, H. *J. Virol.* **2009**, 83, 6554; (d) Chatterji, U.; Bobardt, M.; Selvarajah, S.; Yang, F.; Tang, H.; Sakamoto, N.; Vuagniaux, G.; Parkinson, T.; Galloway, P. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 16998; (e) Gaither, L. A.; Borawski, J.; Anderson, L. J.; Balabanis, K. A.; Devay, P.; Joberty, G.; Rau, C.; Schirle, M.; Bouwmeester, T.; Mickanin, C.; Zhao, S.; Vickers, C.; Lee, L.; Deng, G.; Baryza, J.; Fujimoto, R. A.; Lin, K.; Compton, T.; Wiedmann, B.

- Virology* **2010**, 397, 43; (f) Baugh, J.; Gallay, P. *Biol. Chem.* **2012**, 393, 579.
14. Dandri, M.; Petersen, J.; Dandri, M. *Hepatology* **2005**, 42, 6, 1455.
 15. Wang, P.; Heitman, J. *Genome Biol.* **2005**, 6, 226.
 16. (a) Ma, S.; Boerner, J. E.; TionYip, C.; Weidmann, B.; Ryder, N. S.; Cooreman, M. P.; Lin, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 2976; (b) Mathy, J. E.; Ma, S.; Compton, T.; Lin, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 3267.
 17. Hopkins, S.; Scorneaux, B.; Huang, Z.; Murray, M. G.; Wring, S.; Smitley, C.; Harris, R.; Erdmann, F.; Fischer, G.; Ribeill, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 660.
 18. (a) Paeshuyse, J.; Kaul, A.; De Clerq, E.; Rosenwirth, B.; Dumont, J. M.; Scalfaro, P.; Bartenschlager, R.; Neyts, J. *Hepatology* **2006**, 43, 761; (b) Coelmont, L.; Kaptein, S.; Paeshuyse, J.; Vliegen, I.; Dumont, J. M.; Vuagniaux, G.; Neyts, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 967.
 19. Tomishima, M.; Ohki, H.; Yamada, A.; Maki, K.; Ikeda, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2886.
 20. Roth, B. D. *Prog. Med. Chem.* **2002**, 40, 1.
 21. Sakamoto, K.; Tsujii, E.; Miyauchi, M.; Nakanishi, T.; Yamashita, M.; Shigematsu, N.; Tada, T.; Izumi, S.; Okuhara, M. *J. Antibiot.* **1993**, 46, 1788.
 22. (a) Huai, Q.; Kim, H. Y.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Mondragon, A.; Liu, J. O.; Ke, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 12037; (b) Jin, L.; Harrison, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 13522.
 23. (a) Hubler, F.; Ru, T.; Patiny, L.; Muamba, T.; Guichou, È.; Mutter, M.; Wenger, R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7193; (b) Seebach, D. Patent Application EP 194972; (c) Fu, J.; Tjandra, M.; Becker, C.; Bednarczyk, D.; Capparelli, M.; Elling, R.; Hanna, I.; Fujimoto, R.; Furegati, M.; Karur, S. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 8503.
 24. Oliyai, R. G.; Stella, V. J. *Pharm. Res.* **1992**, 9, 617.
 25. Eberle, M. K.; Jutzieme, A. M.; Nuninger, F. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7249.
 26. (a) Bergmann, M.; Brand, E.; Weinmann, F. *Physiol. Chem.* **1923**, 131, 1; (b) Iwai, K.; Ando, T. *Methods Enzymol.* **1967**, 11, 263; (c) Desnuelle, P.; Casal, A. *Biochim. Biophys. Acta.* **1948**, 2, 64; (d) Strickley, R.; Brandl, M. *Pharm. Res.* **1990**, 7, 530.
 27. Belshaw, P. J.; Schoepfer, J. G.; Liu, K. Q.; Morrison, K. L.; Schreiber, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**,

- 34, 19, 2129.
28. (a) Traber, R.; Kuhn, M.; Lichti, H.; Lossli, H. *Helv. Chim. Acta* **1977**, 60, 1247; (b) Oliyai, R.; Safadi, M.; Meier, P. G.; Hu M. K.; Rich D. H.; Stella V. J. *Pharm. Res.* **1994**, 43, 239.
29. (a) Wenger, R. M.; France, J.; Bovermann, G.; Walliser, L.; Widmer, H. *FEBS Lett.* **1994**, 340, 255.; (b) Zeder-Lutz, G.; Van Regenmortel, M. H.; Wenger, R.; Altschuh, D. *J. Chromatogr.* **1994**, 662, 301.
30. Wakayama, T.; Tarumi, Y.; Shiba, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1974**, 47, 2686.
31. Takeuchi, T.; Katsume, A.; Tanaka, T.; Abe, A.; Inoue, K.; Kohara, K. *Gastroenterology* **1999**, 116, 636.
32. Papageorgiou, C.; Florineth, A.; Mikol, V. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 367.
33. Rosenquist, A.; Samuelsson, B.; Johansson, P. O.; Cummings, M. D.; Lenz, O.; Raboisson, P.; Simmen, K.; Vendeville, S.; de Kock, H.; Nilsson, M.; Horvath, A.; Kalmeijer, R.; de la Rosa, G.; Beumont-Mauviel, M. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 1673.
34. Lipinski, C. A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **2000**, 44, 235.
35. Lynne, S.; Sunwen, C. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2010**, 24, 413.
36. (a) Cisneros, J. A.; Robertson, M. J.; Mercado, B. Q.; Jorgensen, W. L. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 8, 124; (b)Valvani, S. C.; Yalkowsky, S. H.; Roseman, T. J. *J. Pharm. Sci.* **1981**, 70, 502.
37. Fujita, Y.; Yonehara, M.; Tetsuhashi, M.; Noguchi, T.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 1194.
38. Papageorgiou, C.; Traber, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 6, 23.
39. a) Inoue, K.; Umehara, T.; Ruegg, U. T.; Yasui, F.; Watanabe, T.; Yasuda, H. *Hepatology* **2007**, 45, 92; (b) Kneteman, N. M.; Weiner, A. J.; O'Connell, J.; Collett, M.; Gao, T.; Aukerman L. *Hepatology* **2006**, 43, 1346.
40. Kobayashi, M.; Sato, K.; Yoshimura, S; Yamaoka, M; Takas, S; Ohkubo, M; Fujii, T. *J. Antibiot.* **2005**, 58, 64.
41. Kobayashi, M.; Sasamura, S.; Muramatsu, H.; Tsurumi, Y.; Takase, S. WO2006/054801; (b) Sasamura, S.; Kobayashi.; M., Muramatsu, H. *J. Antibiot.* **2015**. 68, 511.
42. Scribner, A.; Houck, D.; Huang, Z.; Mosier, S.; Peel, M.; Scorneaux, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 6542.
43. Epp, J. B.; Widlanski, T. S. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2564.

44. Seebach, D.; Beck, A. K.; Bossler, H. G.; Gerber, C.; Ko, S. Y.; Murtiashaw, C. W.; Naef, R.; Shoda, S. I.; Thaler, A.; Krieger, M.; Wenger, R. *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1564.

・謝辞

本論文の発表および作成にあたり、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部教授 林良雄博士に心より御礼申し上げます。

また、本論文に関して審査および貴重な御教示と御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部教授 三浦剛博士、松本隆司博士ならびに高木教夫博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さり、御指導と御助言を賜りましたキャンディデートディスカバリー研究所京都大学アライアンスステーション担当部長（元モダリティ研究所所長）増田典之博士に謹んで感謝申し上げます。本研究の作成にあたり、御支援を賜りました四月朔日晋博士、松嶋雄司博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の実施および遂行において、終始ご協力いただきました吉村誠司博士、山中敏夫博士、澤田昌依博士、関正博博士、辻井栄作博士、内田征男博士、石田淳也氏、大木秀徳博士、バレットディビッド博士に心より感謝いたします。

合成研究に御協力頂きました安田実氏、奥田真也氏、襲田一彦博士、田名部大輔氏、岡田章宏博士、原山悠博士、國川茂輝氏、各種薬理試験を行っていただきました深田陽子氏、堤剛博士、森下佳彦博士、牧克之博士、薬物動態試験を行っていただきました松村康弘博士、宮尾泰寛博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文の作成にあたり、支え励ましてくれた家族に心より感謝致します。