

ピラゾール骨格を有する  
新規低酸素誘導因子 HIF-1 阻害剤の  
開発研究

2021

氏 名  
酒井 麻利奈

<b>序論</b>	
第一節 がん治療の現状	4
第二節 がん微小環境と低酸素誘導因子	5
第三節 転写因子 HIF-1 が関与する分子間ネットワーク	6
第四節 HIF-1 阻害剤の開発動向	8
第五節 本研究の概要	9
<b>第一章 ピラゾール骨格を有する HIF-1 阻害剤 KUSC-5001 類の構造活性相関</b>	
第一節 HIF-1 活性の評価系とヒット化合物の取得	10
第二節 包括的構造活性相関を指向した合成戦略と合成	10
第三節 分子内芳香環数に関する初期検討	17
第四節 領域 1 ( <i>p</i> -ブromoアニリド部位) の変換	18
第五節 領域 2 (ニトロピラゾール部位) の変換	19
第六節 領域 3 (アルキルピラゾール部位) の変換	22
第七節 小括・考察	25
<b>第二章 新規 HIF-1 阻害剤 KUSC-5037 類の作用機序解析</b>	
第一節 HIF-1 阻害活性の生化学的解析	28
第二節 蛍光分子プローブ KUSC-5054 の細胞内局在の検討	31
第三節 標的タンパク質の探索・同定	32
第四節 KUSC-5037 の F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP synthase 害活性の検討	35
第五節 細胞内酸素消費への影響の検討	36
第六節 がん細胞増殖抑制試験	38
第七節 小括・考察	38
<b>第三章 総括</b>	40
<b>参考文献</b>	41
<b>謝辞</b>	45

実験の部

1. Chemistry	46
2. Biology	63
3. Supplementary Information (NMR spectra)	66

略語表

AcOEt	ethyl acetate
Akt	Rac- $\alpha$ serine/threonine protein kinase/protein kinase B
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
CA9	carbonic anhydrase 9
CPT	camptothecin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	<i>N,N</i> -dimethyl sulfoxide
DIPEA	diisopropylethylamine
Et <sub>3</sub> N	triethylamine
FCCP	carbonyl cyanide- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazone
GLUT1	glucose transporter 1
HATU	1-[Bis (dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo [4,5- <i>b</i> ] pyridinium3-Oxide Hexafluorophosphate
HIF	hypoxia-inducible factor
HPLC	high performance liquid chromatography
HRE	hypoxia response element
HRMS	high-resolution mass spectrometry
IL-6	interleukin 6
JAK	janus kinase
LC	liquid chromatography
Luc	luciferase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MeOH	methanol
mTOR	mammalian target of rapamycin
MS	mass spectrometry.
NMR	nuclear magnetic resonance
Ns	2-nitrobenzenesulfonyl
OCR	oxygen consumption rate
ODS	octadesylsilane
Pd/C	palladium on carbon
PHD	proline hydroxylase domain protein
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
S.E.M.	standard error measured
STAT3	signal transducers and activator of transcription 3
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau



## 序論

### 第一節 がん治療の現状

がん（悪性新生物）は、現在日本人の死因の第1位を占める疾患であり、毎年3人に1人の日本人ががんで死亡し、生涯に2人に1人の日本人が罹患するとされている<sup>1</sup>。がんの治療方法として、外科的切除、放射線治療、そしてがん化学療法がある。近年、分子標的薬が開発・上市され、その治療は多様化してきている。なかには、膵臓がんや神経膠芽腫のように、有効な薬剤が少なく治療が困難ながんも多くあり、新規骨格・新規作用機序を有する治療薬の開発が望まれている。さらに、抗がん剤の多くは、重篤な皮膚障害などの副作用が発現することが多く、副作用の軽減が望まれている。

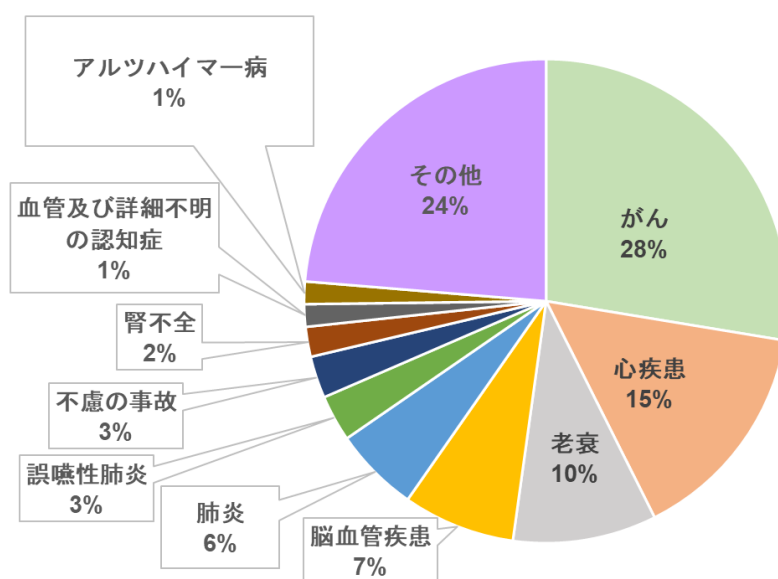
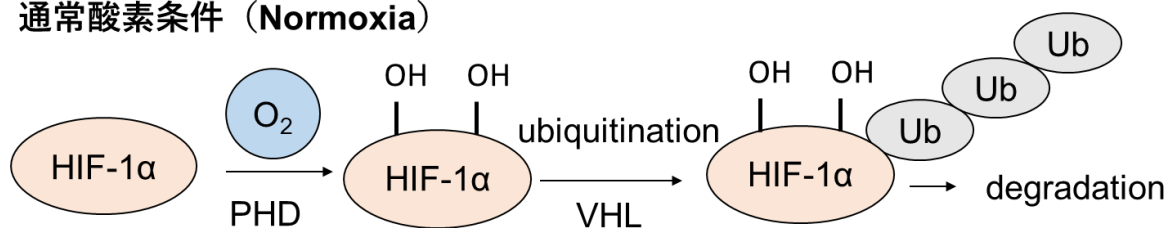


図 1.令和2年(2020)の日本人の死因の割合<sup>1</sup>  
(厚生労働省発行資料)を参考に作成

## 第二節 がん微小環境と低酸素誘導因子

がん細胞は特徴的な細胞応答を行うことで、低酸素・低栄養状態を生き抜くことができる。低酸素誘導因子-1 (Hypoxia-inducible factor 1; HIF-1)は、小児科医の Semenza G. L.博士によって発見された低酸素応答を担う転写因子である。HIF-1 は HIF-1 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  の 2 つのサブユニットから構成され、恒常的に発現する HIF-1 $\beta$  (ARNT)に対し、HIF-1 $\alpha$  は酸素応答配列 (oxygen-dependent degradation (ODD) domain)を有し、通常酸素条件 (21%O<sub>2</sub>) では、プロリン水酸化酵素(Prolyl Hydroxylase domain proteins; PHDs)によって 402 番目と 564 番目のプロリン残基が水酸化を受け、それを目印として E3 ユビキチンリガーゼ von Hippel Lindau (VHL)複合体によるユビキチン化修飾を受けた後、プロテアソームによって分解される (図 2)。一方、腫瘍組織内などの低酸素環境 (1%O<sub>2</sub>) では、HIF-1 $\alpha$  は、分解経路が機能しないため、核内へと移行し、HIF-1 $\beta$ (ARNT)とヘテロ 2 量体を形成して、低酸素応答に必要な遺伝子群 (血管新生、糖新生、細胞増殖、細胞死等に関する標的遺伝子) の転写を誘導する<sup>2</sup>。

### 通常酸素条件 (Normoxia)



### 低酸素条件 (Hypoxia)



\*HRE: hypoxia response element, Ub: Ubiquitin, HIF: hypoxia-inducible factor  
 PHD: prolyl hydroxylase domain, VHL: von Hippel Lindau,  
 VEGF: vascular epidermal growth factor, GLUT 1: glucose transporter 1

図 2. HIF-1 の分子機構

### 第三節 転写因子 HIF-1 が関与する分子間ネットワーク

転写因子 HIF-1 は表 1 に示すように様々な細胞応答に関わる遺伝子群の発現を誘導する<sup>2</sup>。HIF-1 を調節する分子間ネットワークとしてよく知られるのは、PI3K-Akt-mTOR 経路、MAPK 経路、IL-6 受容体経路があげられ、IL-6 受容体経路はがん細胞が誘起する炎症反応の応答を示す(図 3)。分子標的薬として上市している化合物として、MEK 阻害剤 (MAPK 経路) のトラメチニブやビニメチニブ、mTOR 阻害剤(PI3-Akt-mTOR 経路)のテムシロリムスなどがある。本研究では、KUSC-5001 類の HIF-1 阻害作用の経路選択性についての知見を得る目的で mTOR 経路と IL-6 受容体経路に着目した<sup>2a-c,3</sup>。

PI3K は、ヒト大腸がんの約 3 分の 1 で p110 $\alpha$  活性サブユニットの突然変異により過剰に活性化されている。PI3K は下流の Akt 経路などを恒常的に活性化することでがん化を誘発する。また、PTEN が機能欠損したがんにおいても PI3K は重要な分子標的となるため、薬剤開発が進められてきた。細胞レベルでは経路阻害剤としてワートマニンや LY294002 が知られている。Akt は PH ドメインを持つセリン/スレオニンキナーゼであり、308 番目のスレオニン残基と 473 番目のセリン残基のリン酸化によって活性化される。ワートマニンを投与すると、どちらのリン酸化も阻害されることが知られている。Akt は mTORC1 を活性化し、mTORC1 は、リボソーム S6 タンパク質をリン酸化する S6 キナーゼをリン酸化して活性化するとともに、翻訳抑制因子 4E-BP1 をリン酸化して抑制を解除することで多くのタンパク質の合成を促進する作用がある。Akt の機能が亢進することにより、アポトーシスの回避、細胞増殖・成長の促進、糖代謝の亢進などがん細胞の主要な形質発現を誘導する<sup>2</sup>。

IL-6 受容体経路はがん細胞のみでなく免疫応答でも炎症反応に関与する。活性化が起こると、下流にある JAK/STAT 経路が活性化され、炎症反応が誘起される。がん性の免疫応答に関わる STAT は STAT3( Signal transduction and activator of transcription 3)であり、STAT3 の活性化によって糖代謝が促進される。がん幹細胞においても、活性型 STAT3 の発現が誘導されている。STAT3 のリン酸化部位は 727 番目のセリン残基と 705 番目のチロシン残基であり、リン酸化され、2 量体となって転写因子として機能し、糖代謝を活性化する。HIF-1 は STAT3 の標的遺伝子の 1 つであり、活性化された STAT3 は、HIF-1 の mRNA への転写を活性化する。このため、STAT3 阻害剤は HIF-1 を阻害する<sup>3</sup>。

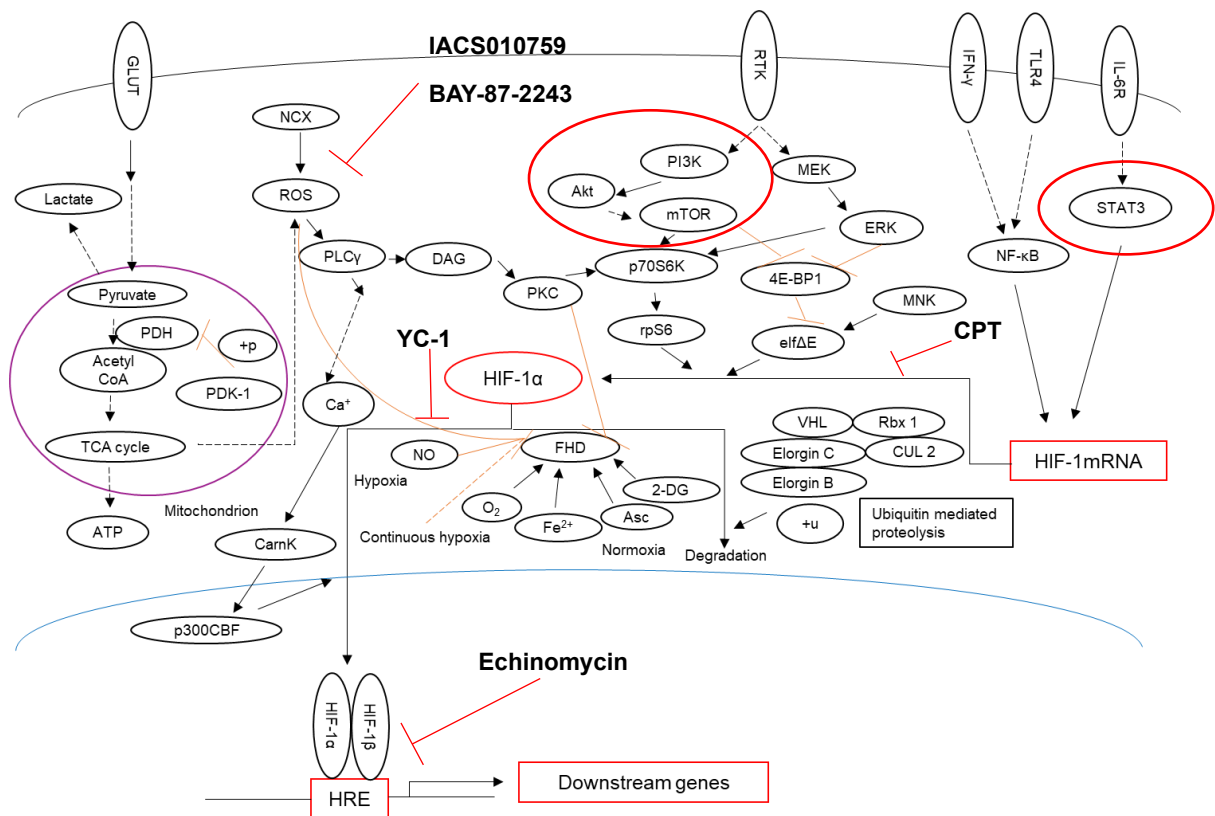


図 3. HIF-1 を調節する分子間ネットワーク

<https://www.cusabio.com/pathway/HIF-1-signaling-pathway.html> を参照

表 1. HIF によって転写上昇を受ける遺伝子群 (ref. 2a より抜粋)

細胞増殖	Cyclin G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-3, WAF-1, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 3
細胞生存	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, NOS2, TGF- $\alpha$ , VEGF
アポトーシス	NIP3, NIX, RTP801
運動	ANF/GPI, c-MET, LRP1, TGF- $\alpha$
細胞骨格	KRT14, KRT18, KRT19, VIM
細胞接着	MIC2
赤血球形成	EPO
血管新生	EG-VEGF, ENG, LRP1, TGF- $\beta$ 3, VEGF
血色	$\alpha$ 1B-アドレナリン受容体, ADM, ET1, Haem oxygenase-1, NOS2
転写制御	DEC1, DEC2, ETS-1, NUR77
pH制御	CA9
HIF-1活性の制御	p35srj
上皮ホメオスタシス	Intestinal trefoil factor
薬剤耐性	MDR1
ヌクレオチド代謝	Adenylate kinase 3, Ecto-5'-nucleotidase
鉄代謝	Ceruloplasmin, Transferrin, Transferrin receptor
糖代謝	HK1, HK2, AMF/GPI, ENO1, GLUT1, GAPDH, LDHA, PFKFB3, PFKL, PGK1, PKM, TPI, ALDA, ALDC
細胞外マトリクス代謝	CATHD, Collagen type V( $\alpha$ 1), FN1, MMP2, PAI1, Prolyl-4-hydroxylase $\alpha$ , UPAR
エネルギー代謝	LEP
アミノ酸代謝	Transglutaminase 2

#### 第四節 HIF-1 阻害剤の開発動向

HIF-1 阻害剤として最初に報告されたのが可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化剤 **YC-1** である<sup>2a</sup>。その後、HIF-1 阻害剤が数多く報告されており (図 4)、近年の報告例では、**Nagasawa** らの研究グループは、微生物代謝産物であるエキノマイシンの構造活性相関に関する研究を報告した<sup>4a</sup>。エキノマイシン類は、DNA と相互作用し、HIF-1 $\alpha$  の結合を阻害することで HIF-1 阻害作用を示す。他にも、強い HIF-1 阻害作用を持つ化合物として **Bayer** 社が **BAY-87-2243** を報告しており<sup>4b</sup>、この化合物は電子伝達系複合体 I の阻害剤である。この化合物については、後の構造活性相関研究の結果、**MD アンダーソンがんセンター**と**順天堂大学**が **IACS-010759** を報告している<sup>4c</sup>。これらの化合物は電子伝達系を阻害することで HIF-1 の転写と翻訳を抑制する。

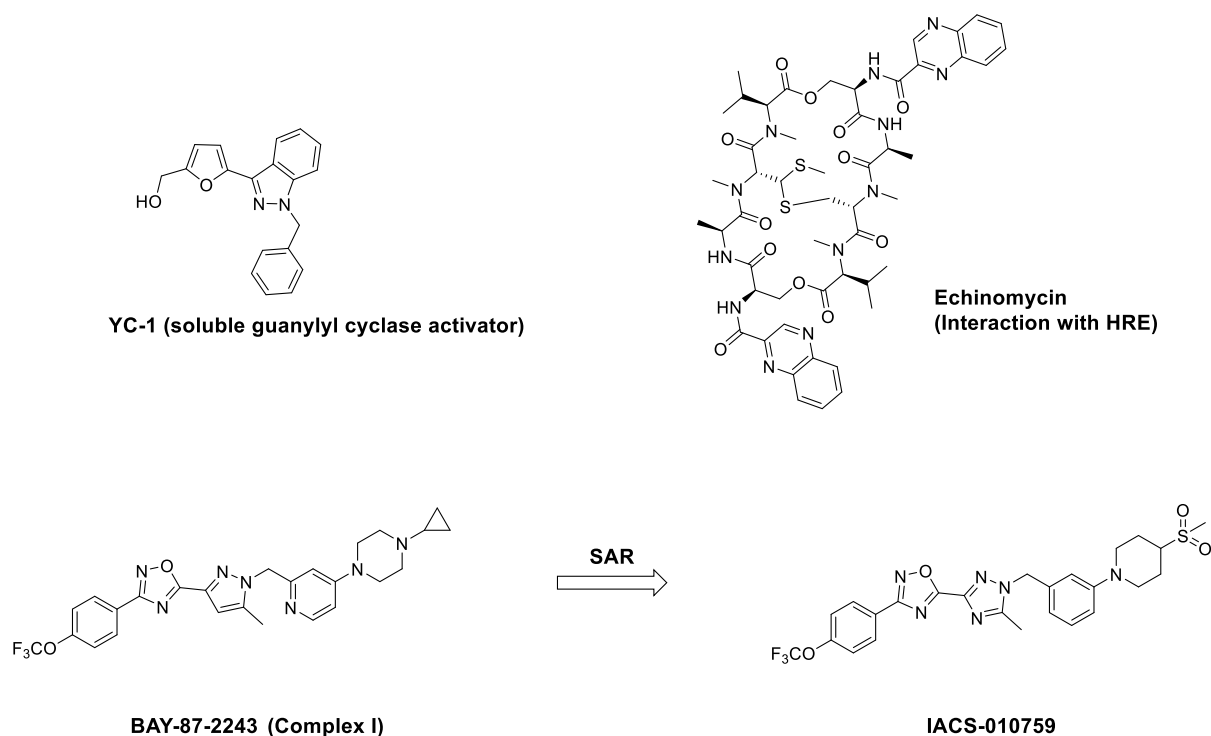


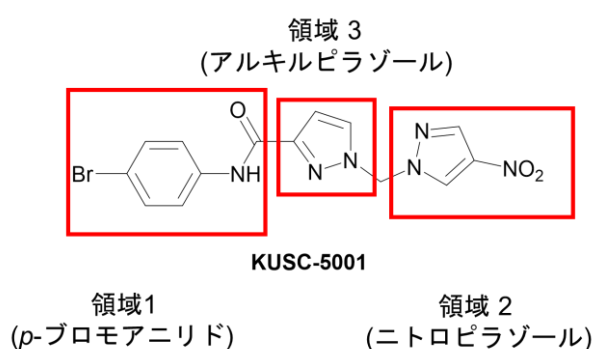
図 4. HIF-1 阻害剤 (抜粋)

括弧内は各阻害剤の作用標的/作用機構を示す。

## 第五節 本研究の概要

HIF-1 評価系を用いたスクリーニング研究からヒット化合物としてピラゾール骨格を有する **KUSC-5001** を得た ( $IC_{50} = 14.90 \pm 1.07 \mu M$ )。そこで、構造活性相関を行うことで優れた HIF-1 阻害剤の開発を目指し、またその作用機序解析を行うことで、未解明な部分が多い HIF-1 経路の解明に役立てたいと考えた。

第一章では、HIF-1 阻害剤として見出した **KUSC-5001** の HIF-1 阻害活性に関する構造活性相関研究を行い、活性に重要な構造情報を得た。まず、ベンゼン環上の置換基の変換から、*p*-トリフルオロメチル基を最適化構造とした (領域 1)。その後、ニトロピラゾール部位の変換から *N*-アシル誘導体が最も活性が高く、アシル鎖部位が構造許容性部位であることを見出した (領域 2)。また、アルキルピラゾール部位の変換から 1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを最適化構造とした (領域 3)。



**KUSC-5001** の構造活性相関に関する領域 1~3

第二章では、最適化誘導体 **KUSC-5037** を用いて作用機序解析研究へと展開した。qRT-PCR 法及び Western Blotting 法を用いた解析によって、まず **KUSC-5037** が HIF-1  $\alpha$  の転写を阻害することで HIF-1  $\alpha$  タンパク質量を阻害することを見出した。作用機構解析を論理的に行うために、化合物の化学構造類似性に着目することで STAT3 阻害活性を見出し、Akt 阻害活性を評価することで **KUSC-5037** の作用の経路選択性を評価した。さらに、蛍光プローブと二機能性分子プローブを用いて、標的タンパク質の探索・同定研究を行った。その結果、**KUSC-5037** はミトコンドリア電子伝達系における complex V を標的とする薬剤である可能性が強く示唆され、生細胞において、細胞内酸素消費を抑制することを明らかにした。また、**KUSC-5037** は、細胞系列依存的にがん細胞の増殖を阻害することを明らかにした。

## 第一章 ピラゾール骨格を有する HIF-1 阻害剤 KUSC-5001 類の構造活性相関

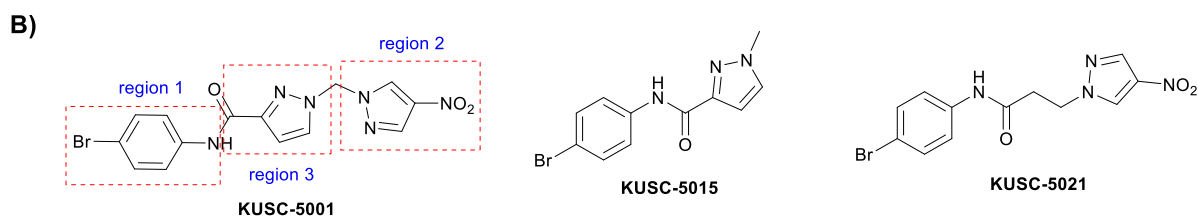
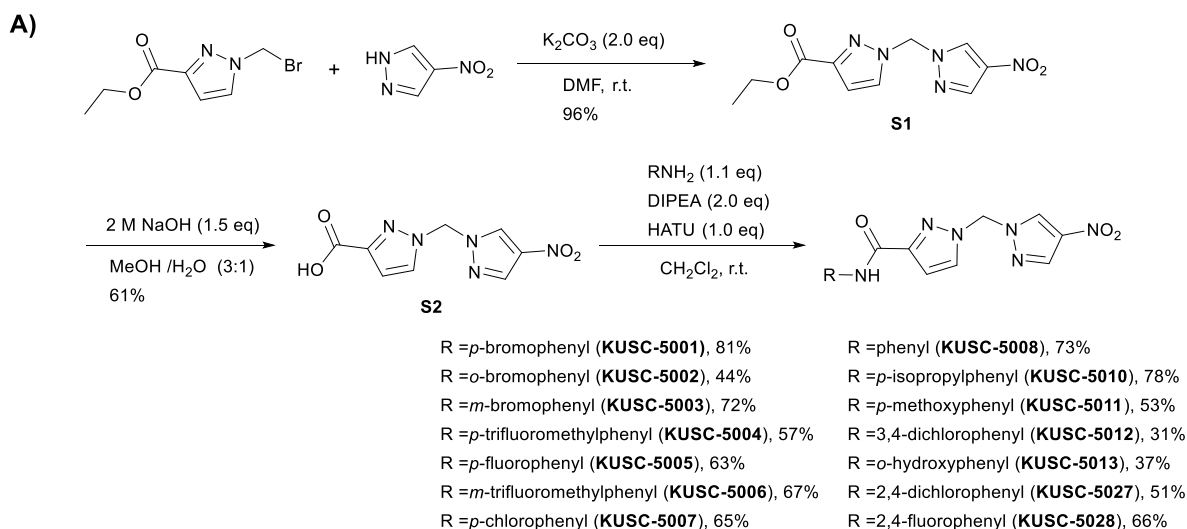
### 第一節 HIF-1 活性の評価系とヒット化合物の取得

所属研究室では、天然物・合成化合物ライブラリーを活用した HIF-1 阻害剤のスクリーニング研究が活発に行われている。これまでに、HIF-1 阻害剤として、微生物代謝産物ベルコペプチン<sup>2e</sup> や 1-エチルピラゾール-3-カルボキサミド類<sup>2f</sup> などが報告されている。そこで同様に、HIF-1 活性の評価系として、HIF-1 が認識する HRE (hypoxia response element) 配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入した HeLa/HRE/Luc 細胞を用いて HIF-1 阻害活性の評価を行った<sup>2g</sup>。ポジティブコントロールとして用いたカンプトテシン(トポイソメラーゼ阻害剤, 1  $\mu$ M)は、本評価系において 62%の阻害活性を示した。また、活性化化合物の HeLa/HRE/Luc 細胞抽出液中に含まれるルシフェラーゼに対する直接阻害活性を適宜測定して、偽陽性を排除した。in-house 化合物ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、ヒット化合物として構造中にピラゾール環を有する **KUSC-5001** を得た ( $IC_{50} = 14.90 \pm 1.07 \mu M$ )。ピラゾール環は医薬品開発において、privileged structure の 1 つであることなどから<sup>5f,5g</sup>、**KUSC-5001** の詳細な構造活性相関を行い HIF-1 阻害活性の向上を目指すこととした。

### 第二節 包括的構造活性相関を指向した合成戦略と合成

**KUSC-5001** は 3 つの芳香環を順次連結することで効率良く合成を行うことができる。環を 1 つ減らした誘導体はそれぞれ、市販の試薬から脱水縮合反応により、1 段階で合成が可能である。

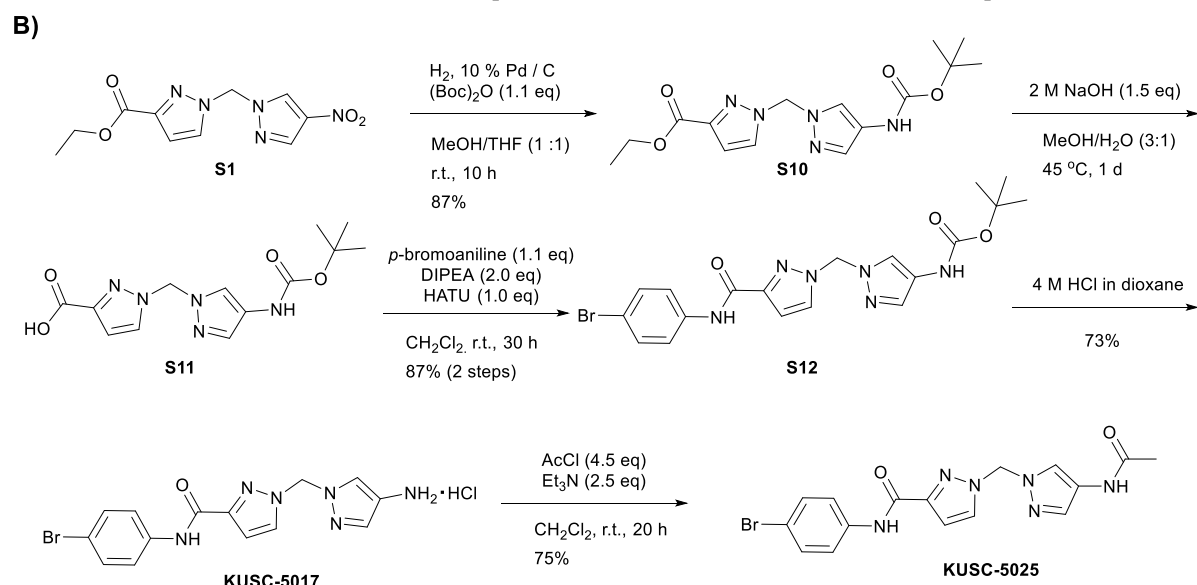
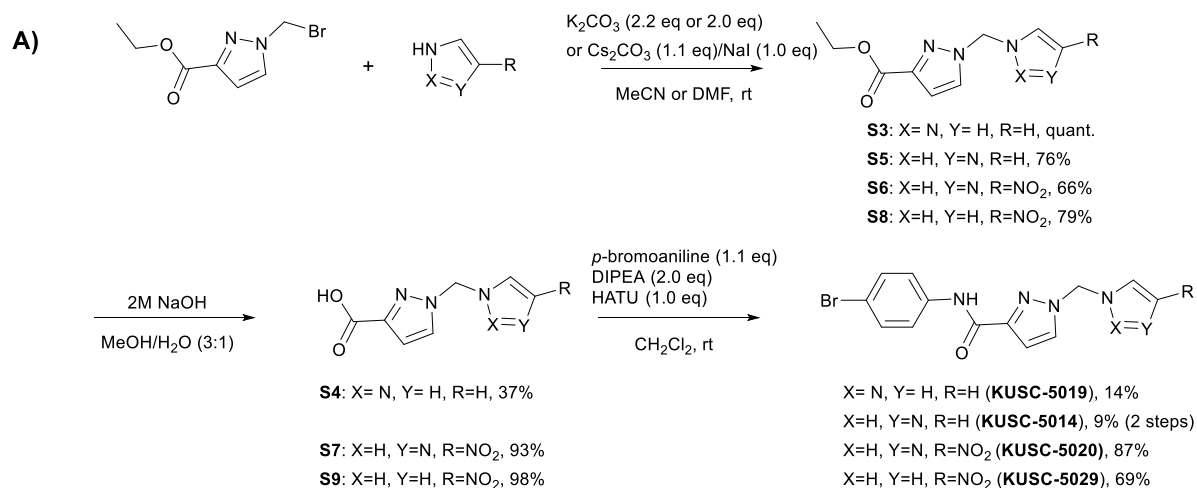
構造活性相関の戦略として、**KUSC-5001** のブロモアニリド部位 (領域 1) の置換基変換に必要なアニリン誘導体は購入可能であるため、アニリン誘導体と **KUSC-5001** の前駆体であるカルボン酸の脱水縮合反応を最終段階に置くことで誘導体の合成を容易にした<sup>5a-d</sup>。すなわち文献既知の方法に従って、1-(bromomethyl)-pyrazole-3-carboxylate を合成し、ニトロピラゾールとの求核置換反応に中間体を合成し、中間体のエステル部分を加水分解してカルボン酸とした後、各種アニリン誘導体と脱水縮合反応を行い、各種誘導体 (**KUSC-5001-5013**, **5023**, **5027**, **5028**) を得た (スキーム 1)。各誘導体は HPLC で最終精製を行った。



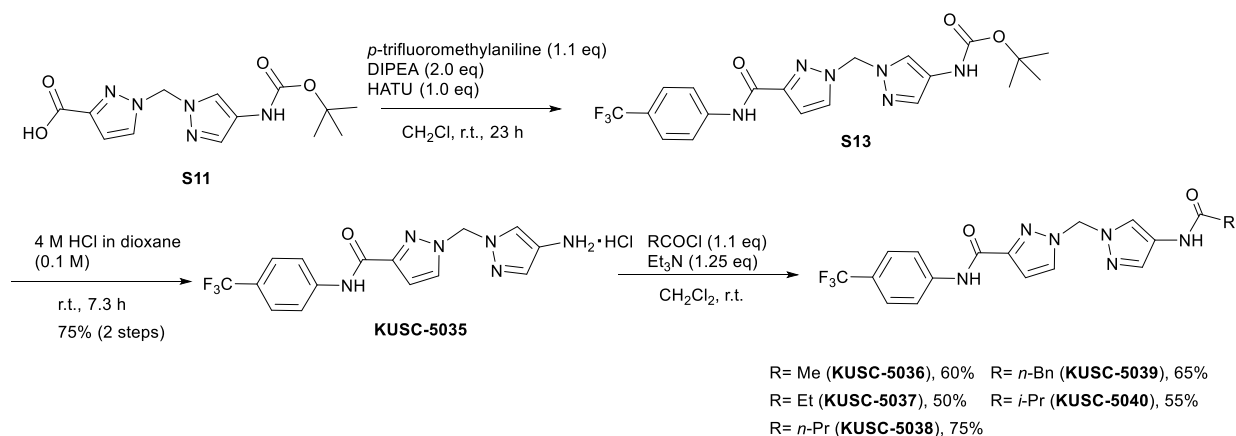
スキーム 1. 領域 1 (*p*-ブロモアニリド部位) の誘導体化を指向した合成経路

ニトロピラゾール部位 (領域 2) の変換を行うにあたり、無置換ピラゾール、無置換イミダゾール誘導体は、**KUSC-5001** と同様の経路で合成を行い、HPLC で精製を行った (スキーム 2A)。続いて、アシル鎖の検討を容易にするために以下のような合成戦略とした。すなわちエステル中間体のニトロ基部分を還元後、Boc で保護し、加水分解を行いカルボン酸とした。続いて、得られたカルボン酸をアニリン誘導体と脱水縮合反応を行い、その後、Boc を脱保護して、求核アシル置換反応により、アルキル側鎖の導入を行った (スキーム 2B)。さらに、ベンゼン環上の置換基を *p*-ブロモ基から *p*-トリフルオロメチル基に変え、アシル鎖部位の異なる各種誘導体を合成した (スキーム 3) <sup>6,7</sup>。



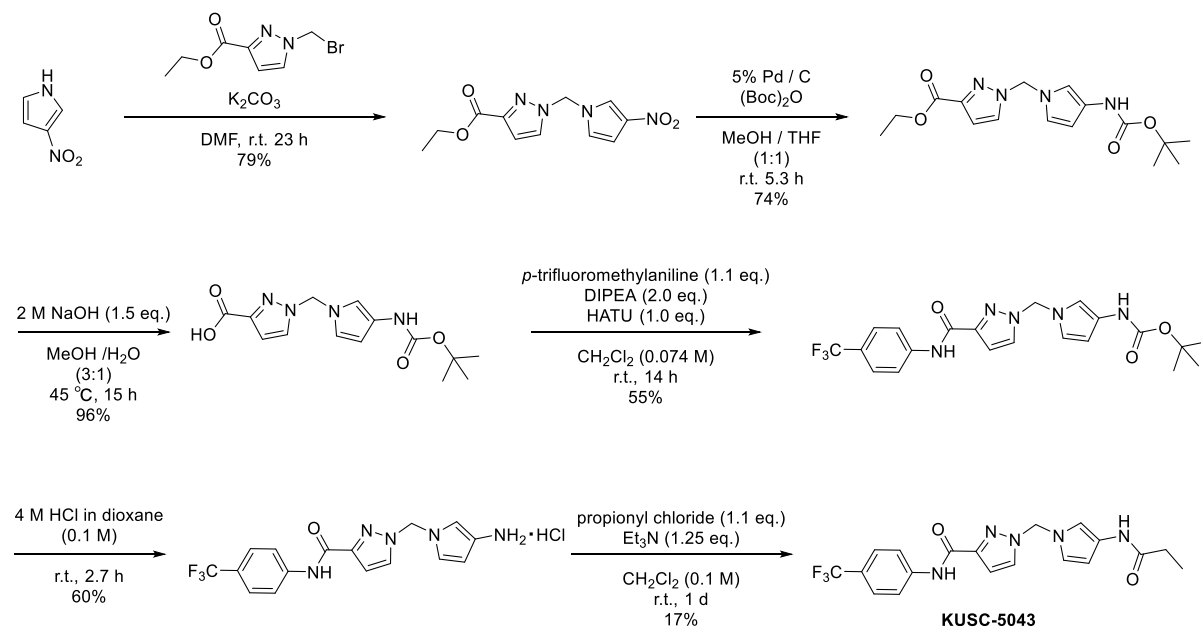


スキーム 2. 領域 2 (ニトロピラゾール部位) の変換を指向した合成経路

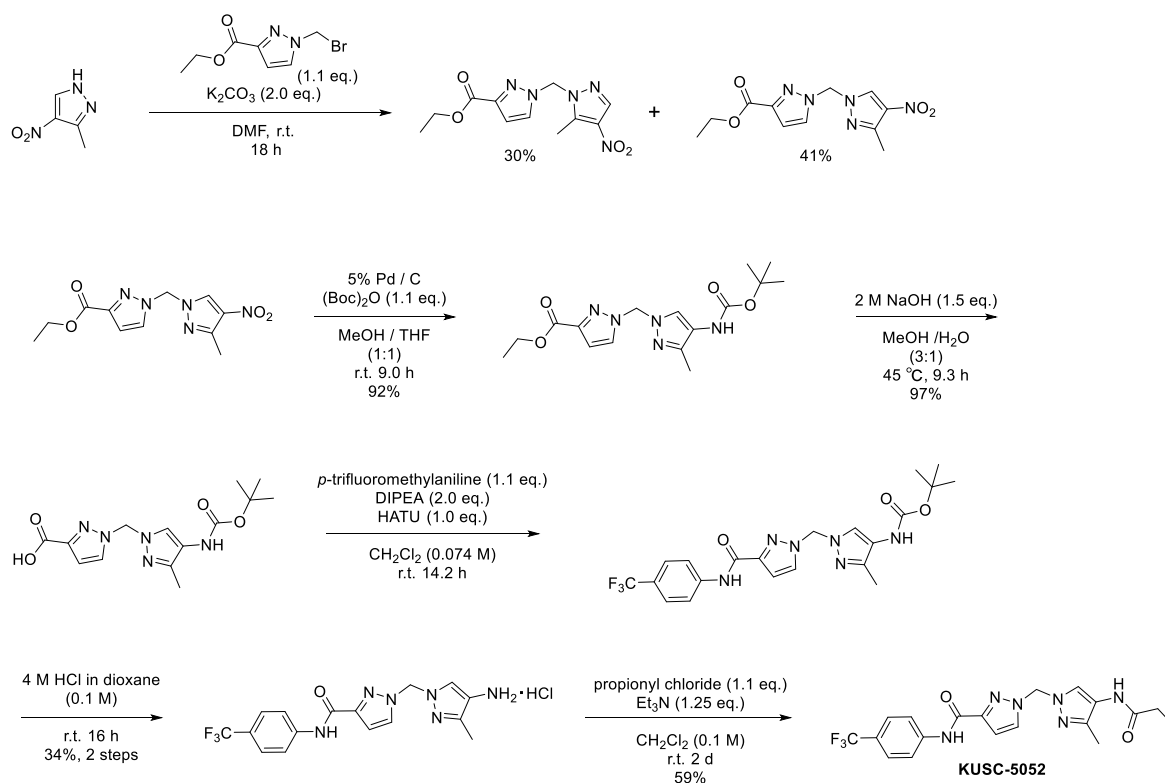


スキーム 3. 領域 2 (ニトロピラゾール部位) のアシル鎖部位の検討を指向した合成経路

**KUSC-5043, 5044, 5046~5050, 5052** は **KUSC-5037** の合成手法に従い、領域 1, 2 に対応する箇所をそれぞれ、各種芳香環、各種アニリン誘導体、塩化スルホニルに変えて合成を行った（スキーム 4, 5）。

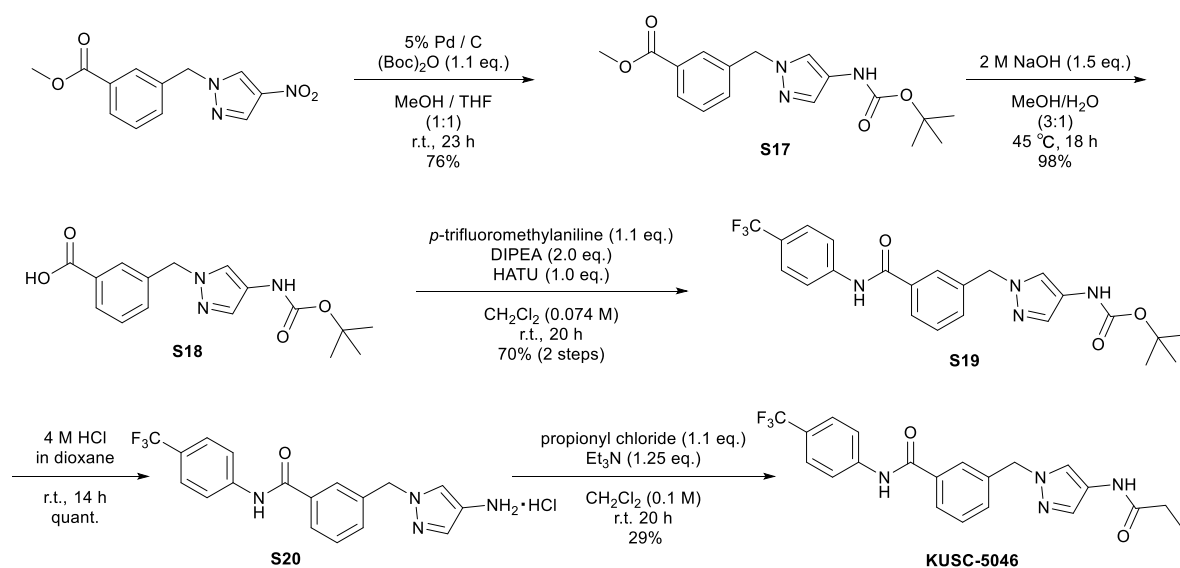


スキーム 4. 領域 2（ニトロピロール誘導体）の極性変換を指向した合成経路

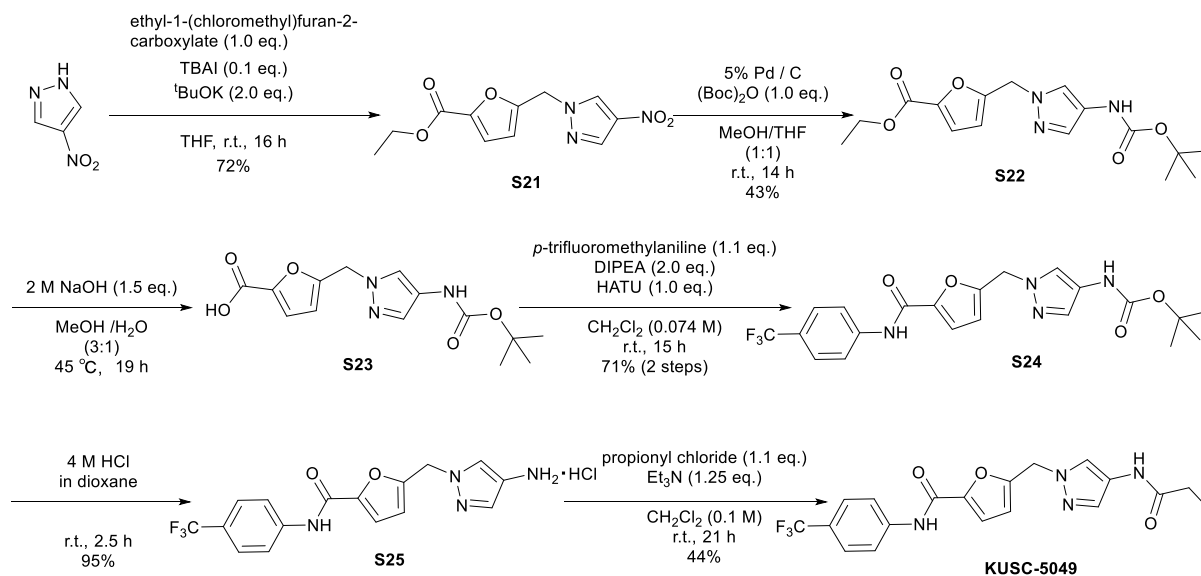


スキーム 5. 3-メチルニトロピラゾール誘導体 **KUSC-5052** の合成経路

アルキルピラゾール部位（領域 3）の変換を指向して、以下に示す合成経路を設計した。今回、容易に合成が達成可能で、電子密度と立体配座が異なる *m*-Bn 誘導体(**KUSC-5046**)と、フラン誘導体(**KUSC-5049**)の合成を行った（スキーム 6, 7）。

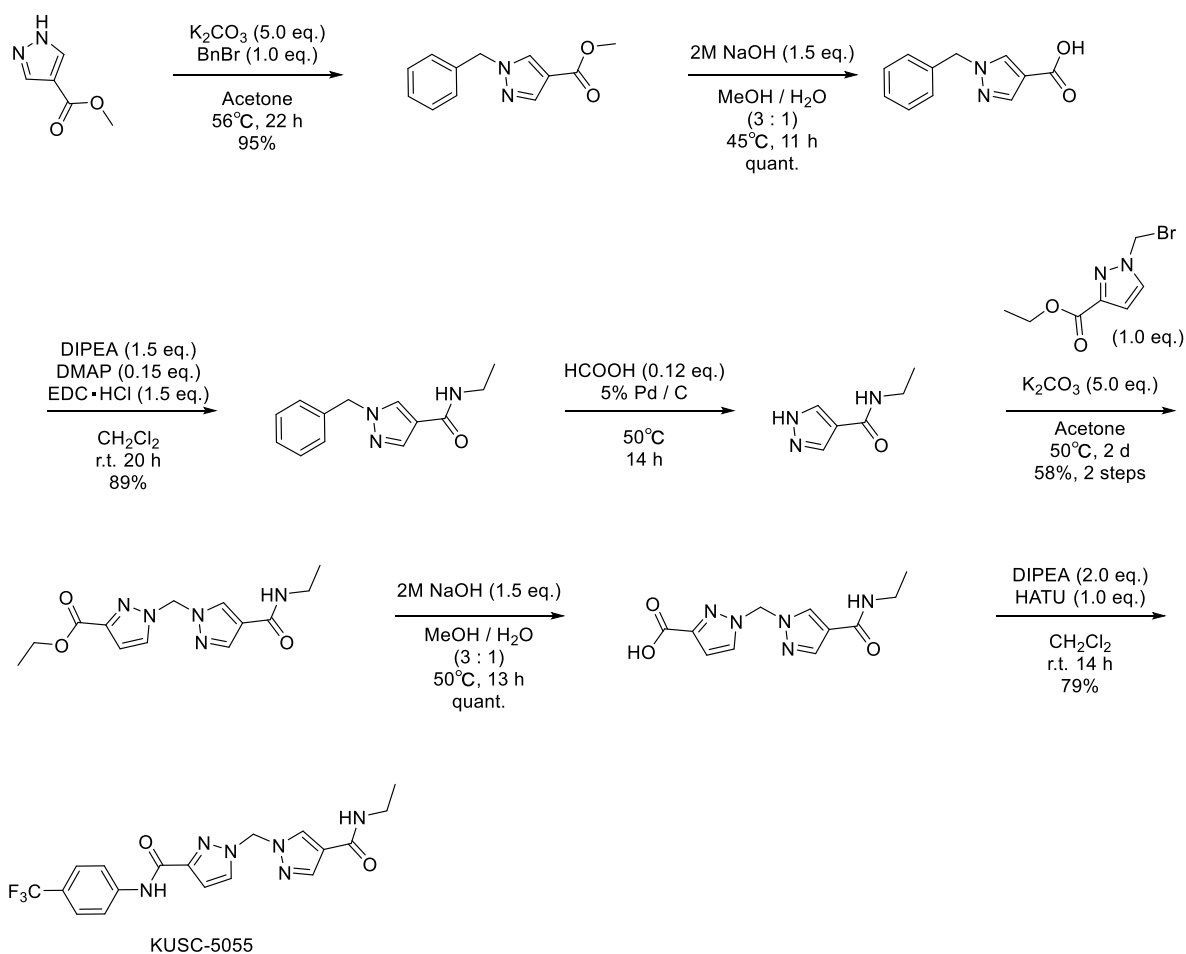


スキーム 6. 領域 3 (アルキルピラゾール部位) の変換を指向した合成経路-1 : **KUSC-5046** の合成経路



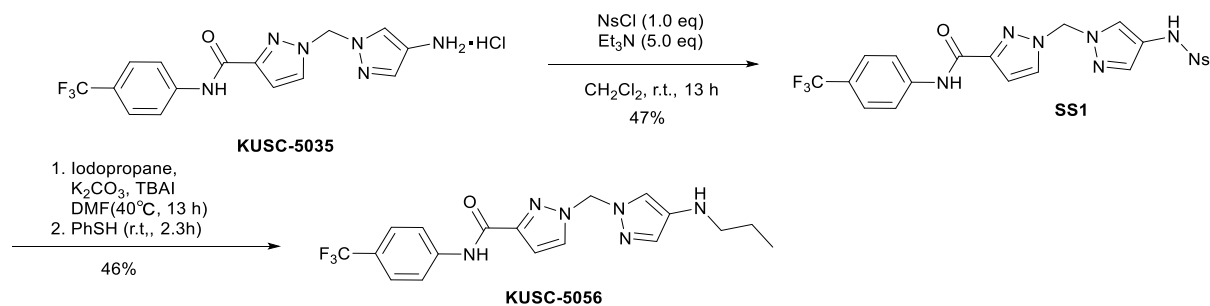
スキーム 7. 領域 3 (アルキルピラゾール部位) の変換を指向した合成経路-2 : **KUSC-5049** の合成経路

逆アミド誘導体 **KUSC-5055** は、出発原料を変えて、異なる合成経路で合成を行った（スキーム 8）。



スキーム 8. 逆アミド誘導体 **KUSC-5055** の合成

*N*-アルキル体 **KUSC-5056** は、**KUSC-5035** から福山アミン合成を用いて合成を行った（スキーム 9）<sup>8</sup>。



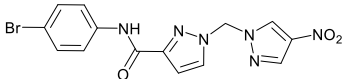
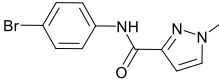
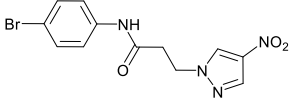
スキーム 9. 福山アミン合成法を用いた *N*-アルキル体 **KUSC-5056** の合成

### 第三節 分子内芳香環数に関する初期検討

構造活性相関を行うにあたり、芳香環の数に対する検討を行った。**KUSC-5001** が有する 3 つの芳香環の必要性の検討を行った結果、芳香環を 2 つにした誘導体 (**KUSC-5015**, **KUSC-5021**) では、いずれの場合も活性が消失したことから、3 つの芳香環は活性発現に重要であることが示唆された (表 2)。

そこで、以降の検討は、主に、領域 1 (ブロモアニリド部位)、領域 2 (ニトロピラゾール部位)、領域 3 (アルキルピラゾール部位) の 3 つの部位に分けて構造活性相関を展開した。

表 2. **KUSC-5001** 分子内芳香環の必要性の検討

KUSC-	Structure	IC <sub>50</sub> (μM)
5001		14.90±1.07
5015		62.71±0.49 (偽陽性)
5021		>100

**HeLa/5HRE/Luc** 細胞を播種し、24 時間後に、試験化合物を添加し、通常酸素条件 (21% O<sub>2</sub>) 下で 1 時間のプレインキュベーション後、低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) で培養した。24 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を評価した。(n=3, Mean±SE, 試験は 2 回実施)。

続いて、2 つのピラゾール環を結ぶアルキル鎖長に関する構造活性相関を行った。当該部位のアルキル鎖の長さを検討した結果、n=1 (**KUSC-5001**) の活性が最も高く、n=3 (**KUSC-5018**) はそれに次ぐ活性で n=2 (**KUSC-5024**) では活性がやや低下した。したがって、当該部位のアルキル鎖長は n=1 が最適であると判断した (表 3)。

3-アルキルピラゾールカルボキサミド合成時の副生成物を用いて、5-アルキルピラゾールカルボキサミド誘導体の活性評価を行ったところ、n=1 (**KUSC-5032**) の時はやや活性が低下し (HIF-1 IC<sub>50</sub> = 22.84±0.26 μM)、n=2 (**KUSC-5016**) の時にアルキルピラゾール-5-カルボキサミドで HIF-1 阻害活性が消失した (HIF-1 IC<sub>50</sub> >100 μM)。以上を踏まえ、3-アルキルピラゾールカルボキサミドを最適化構造とし、n=1 を最適とした。

表 3. **KUSC-5001** 分子内のアルキルピラゾール部位のアルキル鎖の検討

KUSC-	n	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>5001</b>	1	14.90±1.07
<b>5024</b>	2	35.33±9.62
<b>5018</b>	3	13.62±2.11

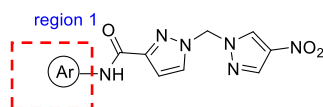
HeLa/5HRE/Luc 細胞を播種し、24 時間後に、試験化合物を添加し、通常酸素条件 (21% O<sub>2</sub>) 下で 1 時間のプレインキュベーション後、低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) で培養した。24 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を評価した。(n=3, Mean±SE, 試験は 2 回実施)。

#### 第四節 領域 1 (*p*-ブromoアニリド部位) の変換

続いて、**KUSC-5001** の *p*-ブromoアニリド部位の置換位置の検討を行った (表 4)。芳香環上の置換基の変換の経験則として、Topliss Tree が広く用いられている<sup>9</sup>。そこで、今回はこの経験則に則って構造活性相関研究を展開することとした。Topliss Tree では、まず、無置換体と 4-塩素置換体の活性の比較を行う。そこで、**KUSC-5008** と **KUSC-5007** の活性を比較したところ、塩素置換体への変換で活性が向上した。Topliss Tree に則って、次の変換である 3,4-ジクロロ置換体 (**KUSC-5012**) で活性評価を行った。その結果、**KUSC-5012** の活性はやや低下した。そこで、次の変換として、4-トリフルオロメチル置換体 (**KUSC-5004**) の活性を評価したところ、活性は **KUSC-5001** と同等となった。2,4-ジクロロ置換体 (**KUSC-5027**) の変換を行ったが、HIF-1 阻害活性は低下した。以上より、4-トリフルオロメチルが最適の置換であることが示唆された。トリフルオロメチル基で *p*-置換 (**KUSC-5004**) と *m*-置換 (**KUSC-5006**) の比較を行ったところ、臭素の場合と同様に、*p*-置換で最も活性が高くなった。また、**KUSC-5011** のように電子供与性基(メトキシ基)の導入を行ったところ活性が消失した。*p*-位に電子吸引性基が置換する時に活性が発現すると考え、4-フルオロ置換体でも評価を行ったところ、4-トリフルオロ置換体と比べると活性は高くないが HIF-1 阻害活性を示した。

以上の結果から、*p*-置換体の活性が最も高く、*p*-置換>*m*-置換>*o*-置換の順に活性は低下し、*p*-置換で活性が最も高くなることが示唆された。

表 4. **KUSC-5001** 分子内の領域 1 (*p*-ブロモアニリド部位) の置換基の検討



KUSC-	Ar	IC <sub>50</sub> (μM)	KUSC-	Ar	IC <sub>50</sub> (μM)
5001		14.90±1.07	5008		>100*
5002		44.28±2.65	5010		58.10±2.11*
5003		31.60±5.91	5011		>100
5004		19.76±0.88	5012		30.46±12.24 (毒性あり)
5005		41.19±9.49	5013		>100
5006		32.94±2.09	5027		54.88±0.09*
5007		27.52±5.08	5028		80.47±0.86

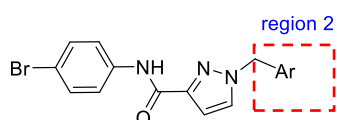
HeLa/5HRE/Luc 細胞を播種し、24 時間後に、試験化合物を添加し、通常酸素条件 (21% O<sub>2</sub>) 下で 1 時間のプレインキュベーション後、低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) で培養した。24 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を評価した。(n=3, Mean±SE, 試験は 2 回実施。\*HeLa / HRE / Luc / IDH3 α / RL#55 で評価。)

#### 第五節 領域 2 (ニトロピラゾール部位) の変換

続いて、**KUSC-5001** のニトロピラゾール部位 (領域 2) の変換を行った (表 5)。まず、ベンゼン環上の置換基を 4-臭素に固定して検討を行った。無置換ピラゾール(**KUSC-5019**)や無置換イミダゾール(**KUSC-5014**)への変換では活性は低下した。4-ニトロイミダゾール置換体(**KUSC-5020**)では、活性はやや低下した。過去に所属研究室で見出されたアルキルピラゾールカルボキサミドにおける構造活性相関研究<sup>10</sup>を踏まえて、4-塩素置換体(**KUSC-5033**)の検討も行ったが活性はやや低下した。続いて、ニトロ基部分の水溶性の向上を指向して極性変換を試みた。ニトロ基を還元したアミン塩酸塩では、水溶性は著しく向上したが活性は低下が見られた。そこで脂溶性の向上を目的にアセチル基を導入した **KUSC-5025** の活性を評価したところ活性の向上が見られた。しかしながら、**KUSC-5025** では、高濃度領域で、ルシフェラーゼの直接阻害活性が見られたことから(34% 阻害 at 30 μM)、偽陽性の可能性が考えられた。



表 5. **KUSC-5001** 分子内のニトロピラゾール部位の検討



KUSC-	Ar	IC <sub>50</sub> (μM)
5001		14.90±1.07
5019		43.72±2.68
5033		21.22±2.85
5020		52.69±3.87
5014		45.30±7.96
5029		27.03±0.04
5017		59.49±12.63
5025		8.98±2.11

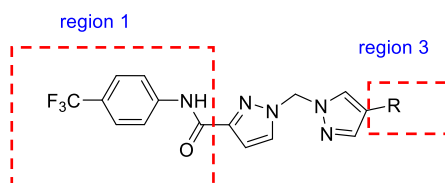
HeLa/5HRE/Luc 細胞を播種し、24 時間後に、試験化合物を添加し、通常酸素条件 (21% O<sub>2</sub>) 下で 1 時間のプレインキュベーション後、低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) で培養した。24 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を評価した。(n=3, Mean±SE, 試験は 2 回実施。)

そこで、ベンゼン環上の置換基を 4-トリフルオロメチル基へと変換し、さらなる検討を試みた (表 6)。4-臭素置換体の場合と同様に、アミン塩酸塩(**KUSC-5035**)への変換で活性がやや低下し、アセチル基を導入した **KUSC-5036** では HIF-1 阻害活性が向上した。また、**KUSC-5036** は、ホタルルシフェラーゼを直接阻害しなかったことから、偽陽性の可能性は排除された。以上を踏まえ、アシル鎖部位の検討に着手した。**KUSC-5036**、**KUSC-5037**、**KUSC-5038**、いずれの場合においても活性は保持されたが、**KUSC-5037** の時に最も高い阻害活性を示した。脂肪鎖側鎖の Topliss Tree<sup>9</sup> に従えば、**KUSC-5037** で活性が向上した時点で十分であったが、さらなる検討を行った。かさ高いベンジル基(**KUSC-5039**)やイソプロピル基(**KUSC-5040**)を導入しても大幅な活性の低下は見られず活性は保持したことから、この部位は構造許容性部位であることが強く示唆された。

アミド結合の結合様式の検討も行った。逆アミド誘導体である **KUSC-5055** では HIF-1 阻害活

性の低下が見られ、スルホンアミドへと変換した **KUSC-5050** やアルキルアミン誘導体 **KUSC-5056** を合成し検討を行ったところ、**KUSC-5037** とほぼ同等の活性を示した。

表 6. **KUSC-5037** 分子内のニトロピラゾール部位の変換（アシル鎖の検討と結合様式の変換）



KUSC-	R	IC <sub>50</sub> (μM)
5036		5.55±0.79
5037		1.23±0.25
5038		1.81±0.01
5039		1.42±0.17
5040		5.62±0.92
5050		1.73±0.10
5055		5.25±0.32
5056		2.27±0.64

HeLa/5HRE/Luc 細胞を播種し、24 時間後に、試験化合物を添加し、通常酸素条件（21% O<sub>2</sub>）下で 1 時間のプレインキュベーション後、低酸素条件（1% O<sub>2</sub>）で培養した。24 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を評価した。（n=3, Mean±SE, 試験は 2 回実施）。

上述の検討の結果、**KUSC-5001** が HIF-1 阻害剤としての活性を示すためには、ピラゾールの 4 位の置換基の脂溶性が重要であり、脂溶性側鎖の導入で活性が向上し、アシル鎖部位の検討から **KUSC-5037** の HIF-1 阻害活性が最も高くなった。

## 第六節 領域 3 (アルキルピラゾール部位)の変換

続いて、領域 3 (アルキルピラゾール部位)の検討を行った (表 7)。ベンゼン環(**KUSC-5046**)やフラン環(**KUSC-5049**)への変換では、HIF-1 阻害活性は低下した。初期検討で 3-アルキルピラゾールカルボキサミド(**KUSC-5001**,  $IC_{50} = 18 \mu M$ )の方が 5-アルキルピラゾールカルボキサミド (**KUSC-5032**,  $IC_{50} = 22 \mu M$ )よりも活性が高かったことも踏まえて、3-アルキルピラゾールカルボキサミド構造を有する **KUSC-5037** を最適化候補化合物とした。

表 7. **KUSC-5037** 分子内のアルキルピラゾール部位の検討

KUSC-	Ar	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
5037		1.23±0.25
5046		21.99±1.67
5049		14.65±3.02

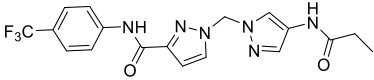
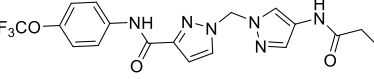
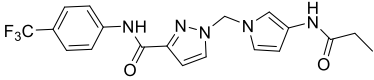
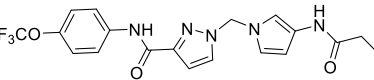
HeLa/5HRE/Luc 細胞を播種し、24 時間後に、試験化合物を添加し、通常酸素条件 (21%  $O_2$ ) 下で 1 時間のプレインキュベーション後、低酸素条件 (1%  $O_2$ ) で培養した。24 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を評価した。(n=3, Mean±SE, 試験は 2 回実施)。

最後に、最適化誘導体 **KUSC-5037** について芳香環や置換基の互換性や構造許容性の検討を行った (表 8-1, 8-2)。経験則に従って 4-トリフルオロメチル基(**KUSC-5037**)を 4-トリフルオロメトキシ基(**KUSC-5044**)へと変換したところ、HIF-1 阻害活性を保持した。また 2 つあるピラゾール環のキレート作用が活性発現に重要である可能性を考慮し、アミノピラゾール構造(**KUSC-5037**)をアミノピロール(**KUSC-5043**)へと置き換えたところ活性は保持した。この結果から、キレート作用は活性発現には関与せず、芳香環の最安定配座での空間配置が活性発現に重要だと考察した。そこで、アミノピラゾール部位にメチル基を導入する変換を行った。メチル基を導入した **KUSC-5052** では活性の低下が見られた。また、アミノ基の置換位置の異なるメチル基を導入した誘導体 (**KUSC-5048**)でも、HIF-1 阻害活性の低下が見られた。ピラゾールはピロールへの変換が可能であること、トリフルオロメチル基はトリフルオロメトキシ基と互換性があることが見出された。

作用機序解析にプローブ化を用いる場合、機能性官能基の導入が必要となる。**KUSC-5037** 合成前駆体である **KUSC-5035** を用いれば、機能性官能基のカルボン酸誘導体との脱水縮合反応を行うことで容易にプローブ化を行うことが可能になる。**KUSC-5056** は **KUSC-5037** と同等の活性を

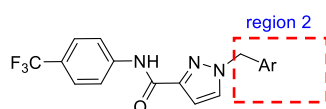
示したが、合成の容易さや対応する分プローブの合成経路などを考慮して、**KUSC-5037** を作用機序解析に用いる最適化化合物として選択した。

表 8-1. **KUSC-5037** の最適化検討-1

KUSC (ID)	Structure	HIF-1 IC <sub>50</sub> (μM)
5037		1.23±0.25
5044		1.44±0.36
5043		1.33±0.14
5047		1.36±0.11

HeLa/5HRE/Luc 細胞を播種し、24 時間後に、試験化合物を添加し、通常酸素条件 (21% O<sub>2</sub>) 下で 1 時間のプレインキュベーション後、低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) で培養した。24 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を評価した。(n=3, Mean±SE, 試験は 2 回実施)。

表 8-2. KUSC-5037 の最適化検討-2



KUSC-	Ar	IC <sub>50</sub> (μM)
5037		1.23±0.25
5052		5.23±0.29
5048		12.18±0.60

HeLa/5HRE/Luc 細胞を播種し、24 時間後に、試験化合物を添加し、通常酸素条件 (21% O<sub>2</sub>) 下で 1 時間のプレインキュベーション後、低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) で培養した。24 時間後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を評価した。(n=3, Mean±SE, 試験は 2 回実施)。

## 第七節 小括・考察

第一章では、**KUSC-5001** を 3 つの部位に分けて構造活性相関研究を展開した。**KUSC-5001** が有する 3 つの芳香環はすべて必要であることを初期検討で見出した。その後、領域 1 (*p*-ブromoアニリド部位) は、経験則として知られる Topliss Tree に基づいて変換を行い、結果として *p*-位に電子吸引性の置換基を持つ誘導体で活性が上昇し、*p*-トリフルオロメチル(**KUSC-5004**)を最適化構造とした。領域 2 (ニトロピラゾール部位) は極性変換を試みたところ、ニトロ基の還元 (**KUSC-5035**) により活性がやや低下し、アシル側鎖の導入(**KUSC-5036**)で HIF-1 阻害活性が向上したことから、アシル鎖部分の検討を行い、*n*-プロピオニル基を有する **KUSC-5037** を最適化構造とした。アミド結合は逆アミド(**KUSC-5055**)で活性が低下したが、スルホンアミド(**KUSC-5050**)やアルキルアミン(**KUSC-5056**)では活性が保持された。領域 3 (アルキルピラゾール部位) のベンゼン環、フラン環などの検討結果より、**KUSC-5037** を最適構造とした。

ところで、ベンゼン環やフラン環への変換では大きく活性が低下したが(**KUSC-5046** と **KUSC-5037**、**KUSC-5049** と **KUSC-5037**)、ピロール環とピラゾール環の比較では、活性はほとんど変化しなかった(**KUSC-5043** と **KUSC-5037**、図 5A, 5B)。各分子の最安定配座を比較した。結果として、フラン環への変換では、電子状態の変化と環のねじれが少し発生するために、空間配置はほぼ同じだが、活性は大きく低下した。ベンゼン環への変換では、大きな空間配置の変化が生じるため、活性が大きく変化した。このことから、空間配置と電子状態が活性の発現に寄与すると考えた。一方で、右側の環のピラゾール環をピロール環へと変換しても、空間配置は保持され、かつ電子状態の変化はほとんどないので、活性には影響しなかった。アルキルピラゾール骨格は、金属イオンとキレート作用を形成する可能性が考えられるが、ピロールへの変換で活性の変化が起きなかったことから、キレート作用は、活性発現に関与しないと考えた。

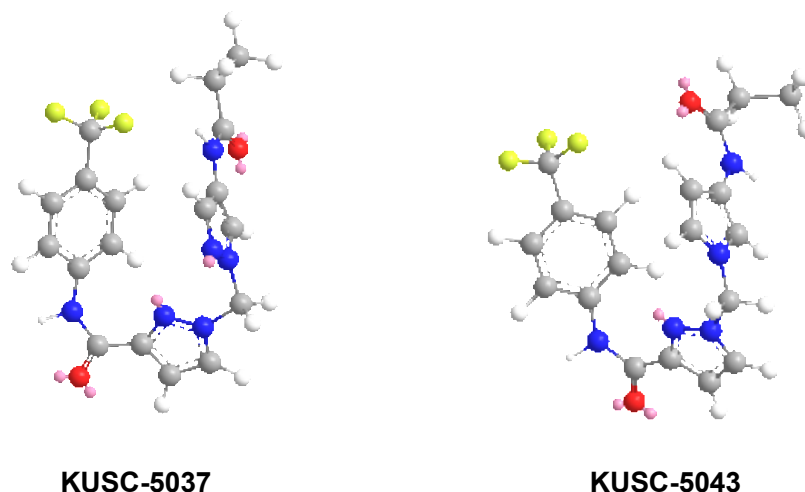
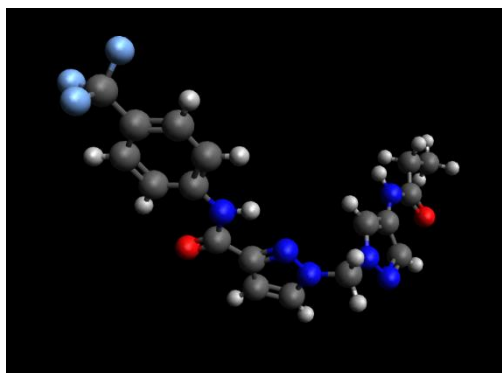
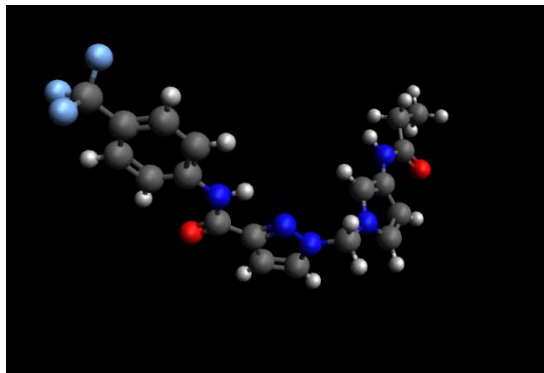


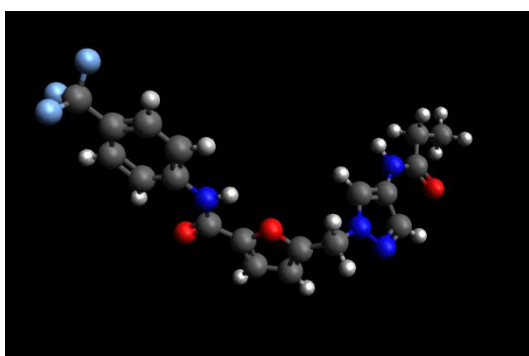
図 5A. **KUSC-5037** と **KUSC-5043** の水中での最安定配座の比較  
Chem 3D の MM2 計算パッケージで各化合物の水中での最安定配座を算出した。



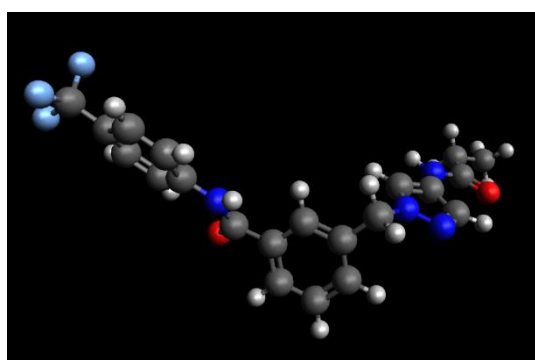
5037



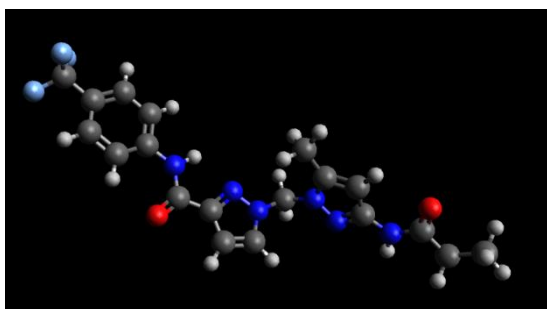
5043



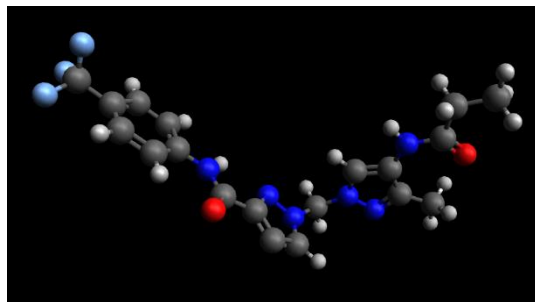
5049



5046



5048



5052

図 5B. MMFF94(Merck Molecular Force Field)を用いた最適化構造の算出と比較 Avogadro を用いて、最適化構造を算出した。(MMFF 94, Auto Optimization, calculation step by 4, movable, not static)

メチル基の導入とアミノ基の置換位置に関しても、考察を行った。5048 は空間配置が大きくずれるので、活性は大きく低下する。一方で、KUSC-5052 は空間配置に少しねじれが出るが、大きく変化してはいないので、活性は低下するが、KUSC-5048 への変換ほどは活性が変化しない。以上より、本化合物群の活性発現に重要なのは、電子状態の保持と空間配置の保持だと考えた (図

5B)。

以上、本構造活性相関研究の結果から、**KUSC-5037** を最適化構造とし、各種分子プローブの設計・創製を指向した機能性官能基の導入が可能な構造許容部位としてアシル鎖部位を見出した。



## 第二章 新規 HIF-1 阻害剤 KUSC-5037 類の作用機序解析

### 第一節 HIF-1 阻害活性の生化学的解析

HeLa/HRE/Luc 細胞において、**KUSC-5037** は HIF-1 転写活性を阻害したが、その作用機構は不明である。作用機構解析を始めるにあたり、まず HIF-1 を転写レベルで阻害しているのか、翻訳レベルで阻害しているのかを調べることにした。HeLa S3 細胞を用いて、**KUSC-5037** が *HIF-1 $\alpha$* 、*HIF-1 $\beta$* 、さらには、HIF-1 標的遺伝子である *CA9*、*VEGF* の mRNA レベルに与える影響を qRT-PCR 法を用いて検討した。すなわち、HeLa S3 細胞に化合物を処理し、低酸素条件で 4 時間培養後、細胞抽出液から RNA を抽出した後、cDNA を調製し、STEP ONE システムを用いて qRT-PCR で定量を行った<sup>2f</sup>。その結果、**KUSC-5037** 処理により、HIF-1 の標的遺伝子群である *CA9* 及び *VEGF* の mRNA レベルの減少を誘導しただけでなく、HIF-1 $\alpha$  の転写も抑制した (図 6)。したがって、**KUSC-5037** は、HIF-1 $\alpha$  を転写レベルで抑制することが示唆された。HeLa S3 細胞では、3  $\mu$ M の濃度 (4 時間処理) では細胞毒性を示していないため、この転写抑制活性は細胞増殖抑制に起因するものではない。

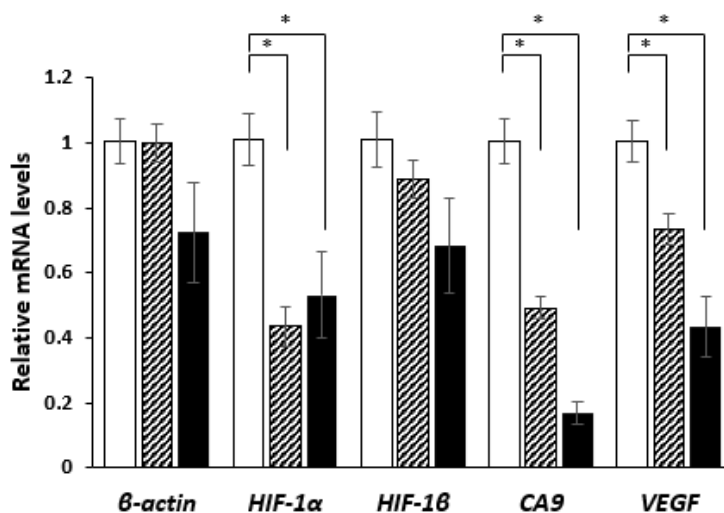


図 6. **KUSC-5037** の各遺伝子群の mRNA 量に与える影響

HeLa S3 細胞を播種し、定着後、試験化合物を投与し (DMSO (白), 3  $\mu$ M **KUSC-5037** (斜線), 0.5  $\mu$ M カンプトテシン (黒)), 1 時間通常酸素 (21% 酸素) 条件で培養した後、低酸素 (1% 酸素) 条件で 4 時間培養を行った。その後、細胞抽出液を調製後、qRT-PCR 法にて各遺伝子の mRNA レベルを定量した。\* $p < 0.05$  (Student's *t*-test). (n = 2, 実験は 2 回実施し、代表的なデータを記載)

続いて、**KUSC-5037** が低酸素環境で誘導される HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現に与える影響を検討した<sup>10</sup>。すなわち、**KUSC-5037** を各濃度で処理し細胞を低酸素条件で 24 時間培養後、western blot 解析にて、HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現を検討した。その結果、**KUSC-5037** は濃度依存的に HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現を抑制した (図 7)。したがって、**KUSC-5037** による *HIF-1 $\alpha$*  の転写阻害を介して HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現を抑制していることが示唆された。

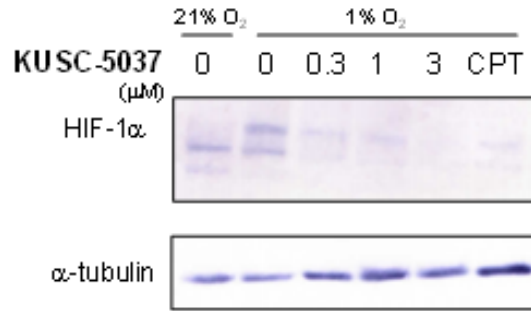


図 7. **KUSC-5037** による低酸素条件下における HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現阻害活性の評価

MDA-MB-231 細胞を播種し、定着させた後、試験化合物(**KUSC-5037**(0.3, 1, 3  $\mu$ M)、CPT (1  $\mu$ M)) を添加し、通常酸素 (21%酸素) 条件下で 1 時間培養を行い、さらに、24 時間、低酸素 (1%酸素) 条件下で培養を行った。その後、細胞抽出液を調製後、western blotting 法にて各タンパク質を検出した。(実験は 3 回実施し、代表的なデータを掲載。)

HIF-1 の発現を調節する経路には、序論第 3 節で記述したように PI3-Akt-mTOR 経路、MAP キナーゼ経路、IL-6 受容体経路があげられる。**KUSC-5037** の作用機序の経路選択性を検討するために PI3K 阻害活性を western blotting 法にて評価した。Akt の活性の指標となる被リン酸化部位 (Thr308, Ser473) のうち、ここでは **KUSC-5037** 処理による Thr308 のリン酸化に及ぼす影響を評価した。低酸素条件下で細胞を培養すると、Akt は Thr308 がリン酸化されて活性化する。この経路の選択的阻害剤として知られるのが、wortmanin である。そこで、wortmanin をポジティブコントロールとして検討した結果、**KUSC-5037** 処理は低酸素環境で誘導される Akt のリン酸化を阻害しなかった (図 8)。したがって、**KUSC-5037** は、wortmanin とは異なり、低酸素によって誘導される Akt の活性化には影響を与えないことが示唆された。

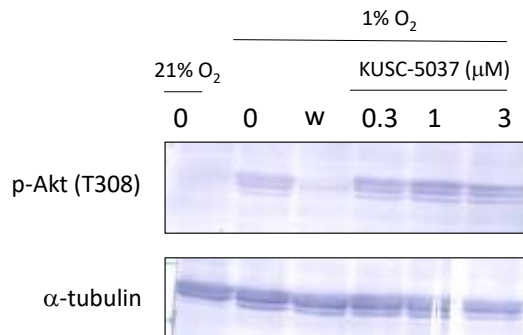


図 8. **KUSC-5037** の Akt 活性に与える影響の検討

HT-1080 細胞を播種し、定着後、試験化合物を投与し (DMSO, 1  $\mu$ M wortmannin (w) , **KUSC-5037** (0.3, 1, 3  $\mu$ M))、通常酸素条件下で 1 時間培養を行った後、低酸素条件下で、24 時間培養を行った。その後、細胞抽出液を調製後、western blotting 法にて各タンパク質を検出した。(実験は 2 回実施し代表的なデータを掲載)

次に、IL-6 受容体経路に着目した。IL-6 が関与する細胞応答は JAK/STAT3 経路の活性化であ

る。そこで、**KUSC-5037** が **STAT3** 活性化に与える影響を評価した。**STAT3** に着目したもう一つの理由は、化合物の化学構造類似性に着目したことに起因する。**STAT3** 阻害剤の1つである **5,15-DPP** は、**KUSC-5037** が細胞内で何らかの理由で2量体化したときに類似の空間配置を占めることができるのではないかと考えた。他にも、**KUSC-5037** の空間配置を考えたときに、ペプチドドミメティックな **STAT3** 阻害剤の結合部位のポケット構造を構成するアミノ酸配置と相互作用できる空間配置を取る可能性があるのではないかと考えた<sup>11</sup>。

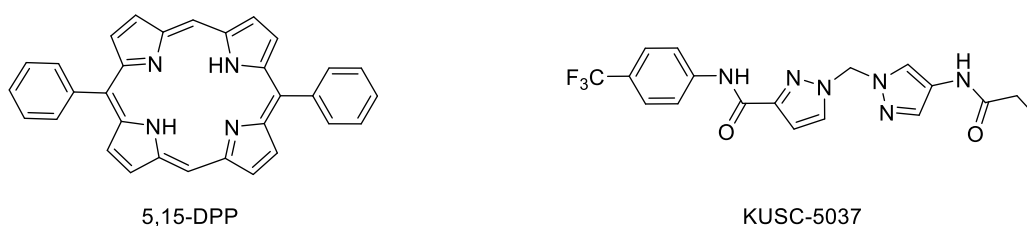


図 9. **STAT3** 阻害剤 **5,15-DPP** と **KUSC-5037** の構造比較

**JAK/STAT** 経路はインターフェロン  $\alpha$  の刺激で活性化される。そこで、インターフェロン刺激における、**KUSC-5037** の **STAT3** 阻害活性について western blotting 法により評価した。インターフェロン  $\alpha$  の投与によって **Tyr705** がリン酸化を受けて活性化されるが、このリン酸化を **KUSC-5037** は阻害した (図 10)。このことから、**KUSC-5037** は **STAT3** 阻害を介してインターフェロン応答を阻害することが示唆された。**HIF-1** は **STAT3** の標的遺伝子なので、**STAT3** を阻害することで、**HIF-1** の活性を制御することができると考えられる。

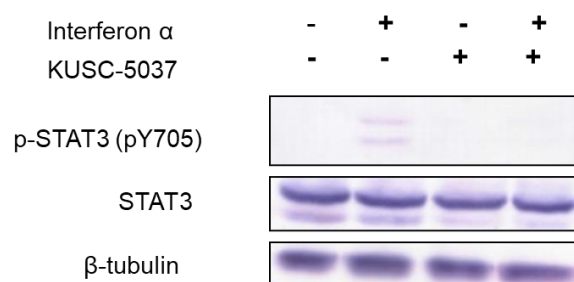


図 10. **KUSC-5037** によるインターフェロン  $\alpha$  刺激時の **STAT3** 活性化の阻害

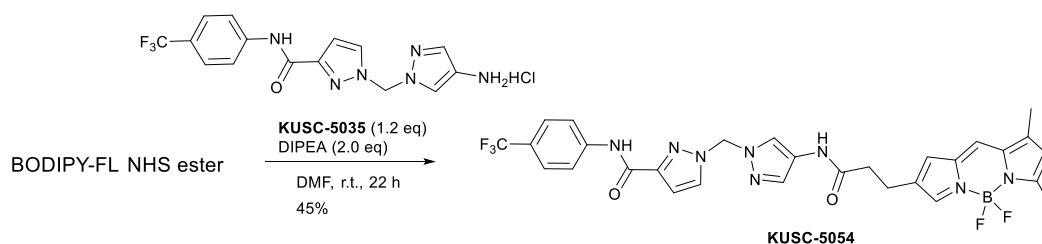
HeLa/5HRE/Luc 細胞を播種し、定着後に試験化合物(DMSO, 3  $\mu$ M **KUSC-5037**)を投与後、24 時間通常酸素 (21% 酸素) 条件で培養を行った。続いて、インターフェロン  $\alpha$  (10 ng/ml)を添加し、2 時間培養した。その後、細胞抽出液を調製し、western blotting 法にて各タンパク質を検出した。(実験は 2 回実施し、代表的なデータを掲載)

ここまでの作用機序解析で、**KUSC-5037** は、**STAT3** 阻害活性を持つが、**PI3K** を阻害しないことが示唆されたが、細胞内の作用点を推定するための十分な手がかりを得るには至らなかった。

## 第二節 蛍光分子プローブ **KUSC-5054** の細胞内局在の検討

網羅的解析を用いた標的タンパク質の推定及び作用機序解析には膨大な時間とコストが必要になる。

そこで、構造活性相関研究の知見から、**KUSC-5037** の領域 2 の *N*-アシル鎖部位は構造許容部位であることを利用して、蛍光色素である BODIPY-FL を *N*-アシル鎖部位に導入した蛍光性分子プローブ **KUSC-5054** を合成し、細胞内における **KUSC-5054** の細胞内局在を調べることで標的タンパク質の推定の手がかりを得ることを試みた。蛍光性分子プローブは、**KUSC-5035** と BODIPY-FL NHS エステルとの縮合反応により合成し、HPLC で精製した(スキーム 10)<sup>12</sup>。合成した蛍光分子プローブ **KUSC-5054** は、HeLa S3 細胞を用いた活性試験において **KUSC-5037** とほぼ同程度に HIF-1 活性を阻害した( $IC_{50} = 0.60 \pm 0.02 \mu M$ )。そこで、HeLa S3 細胞に **KUSC-5054** を添加し 24 時間培養を行った。続いて、ミトコンドリア、核の染色試薬 MitoTracker® Red CMxRos および Hoechst 33342 を添加後、細胞を固定化し、プレパラートを作成して、蛍光顕微鏡で各蛍光像を観察した。その結果、**KUSC-5054** (緑色蛍光) は、ミトコンドリアの染色試薬 MitoTracker® Red CMxRos (赤色蛍光) と局在が比較的一致したことから、投与後、ミトコンドリアに存在するが示唆された(図 11)。したがって、**KUSC-5054** の細胞内標的は、ミトコンドリアに存在する可能性が示唆された。



スキーム 10. 蛍光プローブ **KUSC-5054** の合成

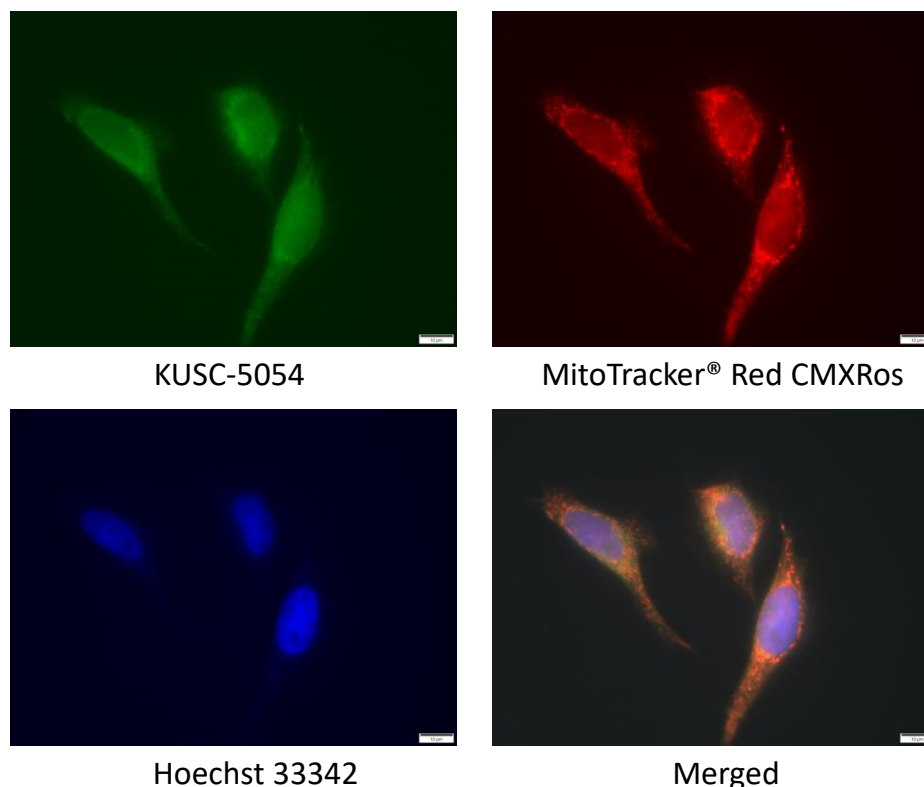


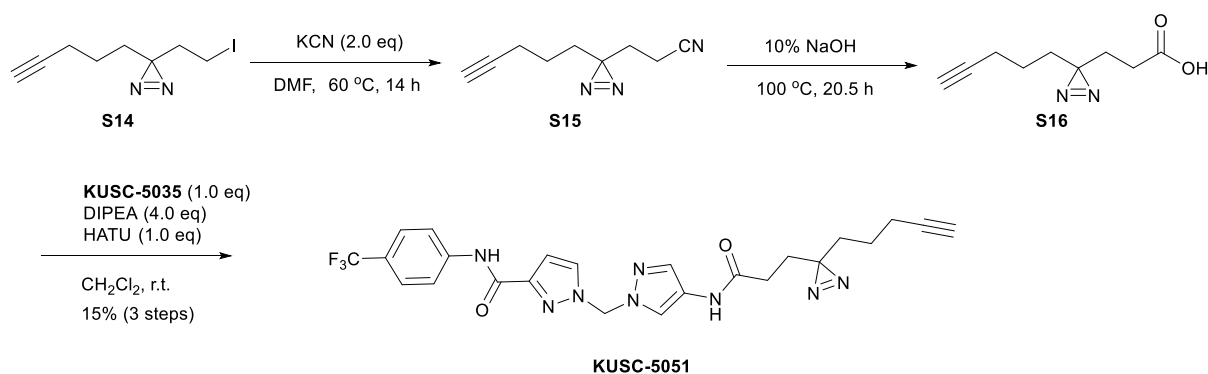
図 11. 蛍光プローブ **KUSC-5054** を用いた細胞内局在の解析

HeLa S3 細胞を播種して定着させた後、**KUSC-5054** (1  $\mu\text{M}$ )を添加し通常酸素条件で 3 時間培養を行った。ミトコンドリア、核を各マーカー(MitoTracker® Red CMXRos (100 nM)及び Hoechst 33342(10  $\mu\text{M}$ )で染色した。その後、蛍光顕微鏡で各蛍光プローブの局在を観察した(bar, 10  $\mu\text{m}$ )。(実験は 3 回実施し、代表的なデータを掲載)

### 第三節 標的タンパク質の探索・同定

前節において、**KUSC-5037**の作用部位がミトコンドリアの可能性が示唆された。そこで、**KUSC-5037**の標的タンパク質の探索・同定法として、Affinity-based protein profiling (AfBPP)法を行った<sup>13</sup>。化合物と標的タンパク質の親和性を利用して結合させ、その後、ビオチンタグをクリック反応によって導入し、ビオチン-Neutra アビジン系で標識化タンパク質をプルダウンし、LC-MS/MSで解析することで、標的タンパク質を同定する方法である。

前節の細胞内局在検討用分子プローブ **KUSC-5054**と同様に、アシル鎖部位の構造許容性部位を足掛かりとして、分子内にジアジリン基とアルキンタグを導入した分子プローブ **KUSC-5051**を設計した。5-ヘキシシ酸を原料として、ジアジリン基とアルキンタグを持つカルボン酸の合成を行い、その後、**KUSC-5035**との脱水縮合反応により、2機能性分子プローブ **KUSC-5051**を合成した(スキーム 10)。**KUSC-5051**は、HeLa/5HRE/Luc 細胞を用いた活性試験において **KUSC-5037**とほぼ同程度に HIF-1 活性を阻害した( $\text{IC}_{50} = 1.6 \mu\text{M}$ )。

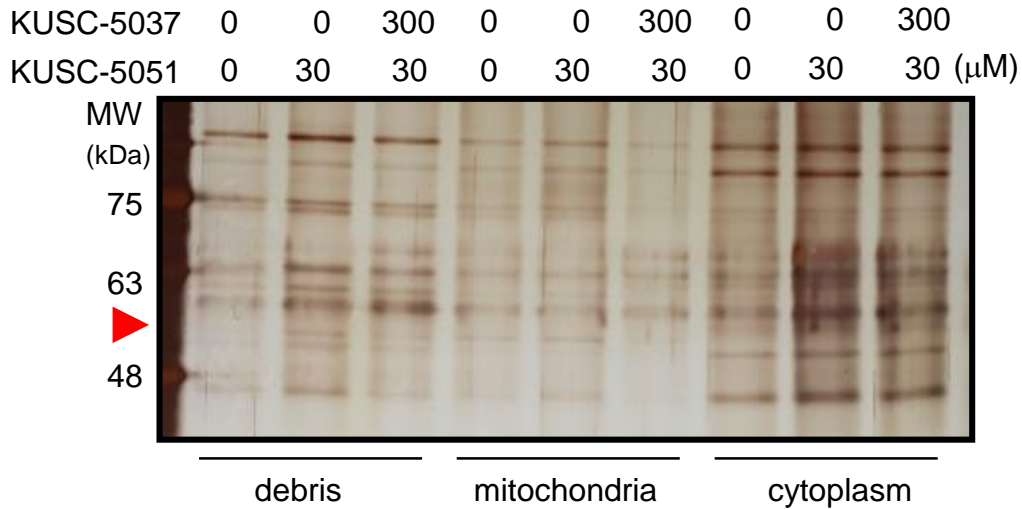


### スキーム 11. 分子プローブ **KUSC-5051** の合成経路

この結果を踏まえ、標的タンパク質のプルダウン実験に着手した<sup>13</sup>。細胞抽出液をミトコンドリア画分、細胞質画分、残渣(デブリ)に分画し、それぞれの画分に対して **KUSC-5051** 処理を行った。溶媒(1% DMSO)をコントロールとし、**KUSC-5051** 処理のみを行った群と、**KUSC-5037** で前処理を行った後に **KUSC-5051** 処理を行ったそれぞれの群に、365nm の波長で光照射を行い標的タンパク質と結合させた。その後、クリック反応により、ビオチンタグを導入し、クロロホルム/メタノール沈殿で余剰の試薬を除去後、各群を乾燥させた。続いて、ビオチン-Neutra Avidin の系で結合タンパク質をプルダウンし SDS-PAGE 電気泳動を行った。電気泳動ゲルを銀染色で染色を行ったところ、ミトコンドリア画分において、DMSO コントロール群に対して **KUSC-5051** 処理で分子量約 60kDa のバンドが検出された(図 12A)。この約 60kDa のバンド強度は、**KUSC-5037** の前処理により減弱したことから、**KUSC-5051** の結合タンパク質であることが示唆された。そこで、この約 60kDa のバンドを切り出し後、LC-MS/MS 解析を行った結果、ATP5B(FoF1-ATP synthase  $\beta$  サブユニット)であることが明らかになった(表 9)。さらに、同じサンプルを western blot 解析により検討したところ、約 60kDa のバンドは ATP5B であることが確認された(図 12B)。

さらに、**KUSC-5051** とリコンビナントヒト ATP5B との *in vitro* 結合実験を量比は一定 (**KUSC-5051**:ATP5B=5:1) で各因子の濃度依存性を検討した。その結果、ATP5B が 0.45  $\mu\text{M}$  以上の場合に、両者の結合が確認された(図 13)。

A)



B)

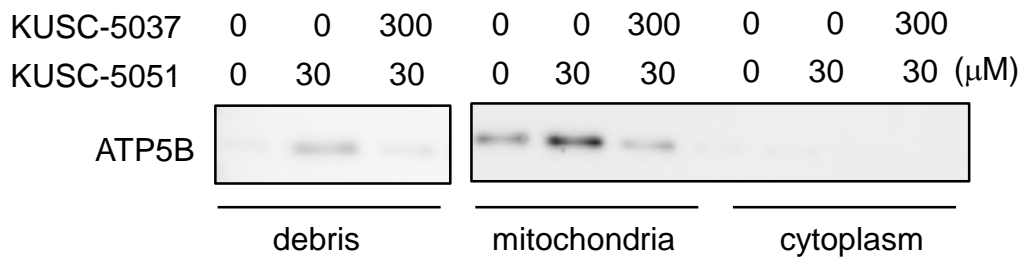


図 12. 分子プローブ **KUSC-5051** を用いた標的タンパク質の探索・同定

A) 細胞抽出液を 3 つの画分 (ミトコンドリア、細胞質、デブリ) に分画後、1% DMSO、**KUSC-5051**、**KUSC-5037** による競合阻害をかけた 3 群に分け、それぞれプルダウン実験を行い、SDS-PAGE 電気泳動後、銀染色により検出を行った。

B) 図 11-A のサンプルを用いて、抗 **ATP5B** 抗体でウェスタンブロット法により検出を行った。(実験は 3 回実施し、代表的なデータを記載)

表 9. LC-MS による **KUSC-5051** 結合タンパク質 (ca.60 kDa バンド) の定量解析

Protein name	Score	emPAI	Sequence coverage	GI	UniProt	MW theoretical
ATP5B	1779	3.03	56%	32189394	P06576	56525

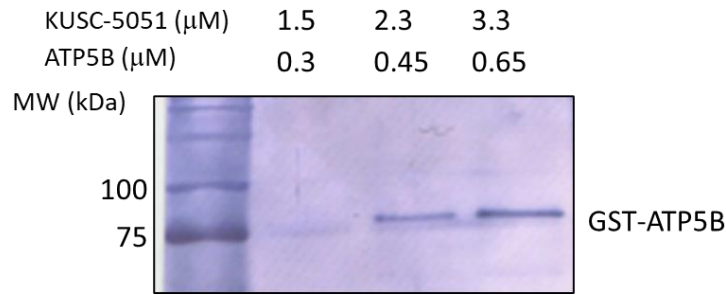


図 13. KUSC-5051 とリコンビナントヒト ATP5B との結合

リコンビナント GST-ATP5B (Abnova)の溶液を調製し、**KUSC-5051** を添加後、365nm の光を照射し、クリック反応でビオチンタグを導入後、ストレプトアビジン-Alkaline Phosphatase を用いて、KUSC-5051/GST-ATP5B 複合体の検出を行った。(実験は 2 回実施し、代表的データを記載)

#### 第四節 **KUSC-5037** の $F_0F_1$ -ATP synthase 阻害活性の検討

前節において、**KUSC-5037** の標的タンパク質(結合タンパク質)として  $F_0F_1$ -ATP synthase の  $\beta$  サブユニットである ATP5B を同定した。そこで、**KUSC-5037** が  $F_0F_1$ -ATP synthase 活性に与える影響を検討した。市販の牛ミトコンドリア画分を用いて、**KUSC-5037** が  $F_0F_1$ -ATP synthase 活性に与える影響を検討した結果、**KUSC-5037** は  $F_0F_1$ -ATP synthase 活性を抑制することが明らかになった (図 14)。したがって、**KUSC-5037** は、 $F_0F_1$ -ATP synthase の  $\beta$  サブユニットである ATP5B に結合して、酵素活性を阻害することが示唆された<sup>12a</sup>。

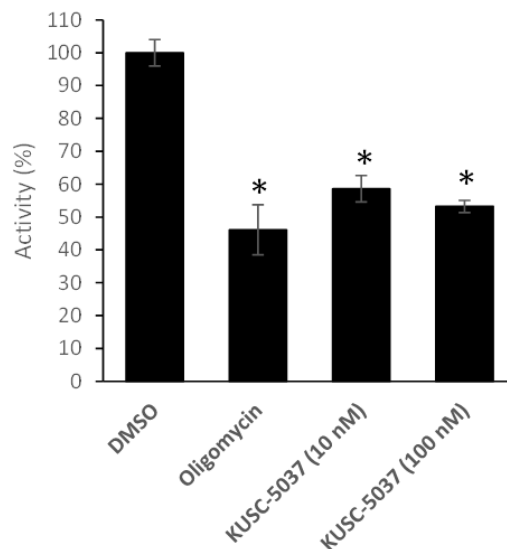


図 14. **KUSC-5037** の  $F_0F_1$ -ATP synthase 阻害活性の評価

Mitochek Complex V activity assay kit を用いて、**KUSC-5037** (10 nM, 100 nM) 及び oligomycin (12.6  $\mu\text{M}$ )の  $F_0F_1$ -ATP synthase 阻害活性の評価を行った。縦軸は ATP 合成酵素の酵素活性を表す。\* $p < 0.05$  (Student's *t*-test). (Mean  $\pm$  SD,  $n=3$ , 実験は 3 回実施し、代表的なデータを記載)



## 第五節 細胞内酸素消費への影響の検討

前節までに、**KUSC-5037** は、 $F_0F_1$ -ATP synthase のサブユニットである ATP5B に結合することで、 $F_0F_1$ -ATP synthase 活性を阻害することが示唆された。そこで、細胞外フラックスアナライザーを用いて<sup>14,15a</sup>、化合物の投与によるミトコンドリアの機能へ及ぼす影響を評価することとした。HeLa S3 細胞を播種し、定着後、アッセイ用の培地に交換して  $CO_2$  フリーのインキュベーターで培養を行い、薬剤を順次投与して酸素消費速度(Oxygen Consumption Rate; OCR)を比較した。**KUSC-5037** の投与によって、OCR は減少し、脱共役剤(FCCP)を投与することにより、減少した OCR は回復が見られた。これは ATP 合成酵素阻害剤オリゴマイシンと同じ挙動であるため、**KUSC-5037** は生細胞においても ATP synthase 阻害剤である可能性が示唆された (図 15)。

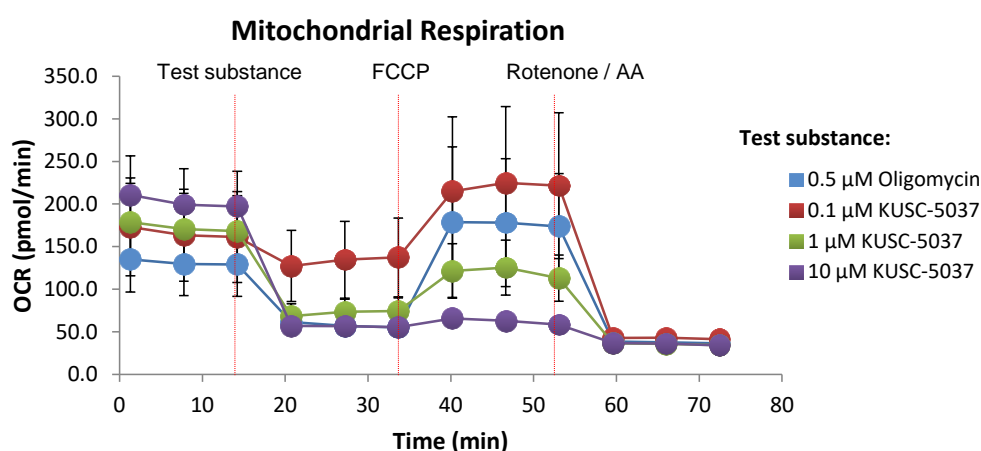


図 15. KUSC-5037 の細胞内酸素消費に与える影響

HeLaS3 細胞を播種し、定着後、 $CO_2$  フリーの培地で培養し、試験化合物を添加して細胞内酸素消費速度を、細胞外フラックスアナライザーを用いて測定した。FCCP (0.5  $\mu$ M), rotenone/antimycin (AA) (0.5  $\mu$ M each)。 (n=6, mean  $\pm$  S.E.) (実験は 3 回実施し代表的なデータを掲載)

続いて、オリゴマイシンとの作用機序の類似性を検討するために、オリゴマイシン処理細胞に対する **KUSC-5037** の細胞内酸素消費に与える影響を検討した。その結果、オリゴマシ処理細胞において、FCCP で回復した OCR はオリゴマイシンの再添加によって影響を受けなかったが、**KUSC-5037** 添加により減少した (図 16)。したがって、**KUSC-5037** の  $F_0F_1$ -ATP synthase 抑制メカニズムはオリゴマイシンとはやや異なることが示唆された。

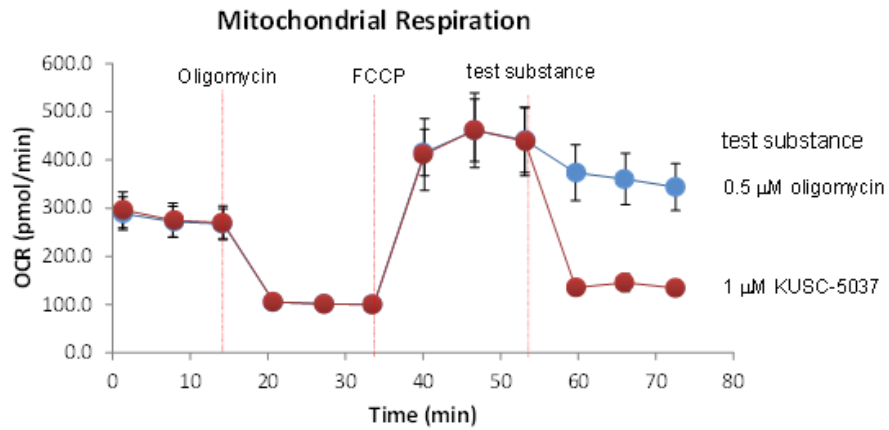


図 16. オリゴマイシン処理細胞における **KUSC-5037** の細胞内酸素消費に与える影響  
 HeLaS3 細胞を播種し、定着後、CO<sub>2</sub> フリーの培地で培養し、各試験化合物を添加して細胞内酸素消費速度を細胞外フラックスアナライザーにより測定した。FCCP (0.5 μM)。(n=6, mean±S.E.)  
 (実験は 3 回実施し、代表的なデータを掲載)

## 第六節 がん細胞増殖抑制試験

**KUSC-5037** の抗がん剤としての可能性を評価するために、がん細胞増殖抑制試験を行った (表 10)。**KUSC-5037** 処理すると、線維肉腫細胞(HT-1080 細胞)の増殖は強く抑制され、神経膠芽腫細胞 T98G 細胞の増殖は中程度に抑制された。しかし、**KUSC-5037** の子宮頸がん細胞(HeLa S3 細胞)の 50%増殖阻害濃度は 30  $\mu\text{M}$  以上であった。このことから、**KUSC-5037** は細胞系列依存的にがん細胞の増殖を抑制することが示唆されたが、各細胞の ATP synthase の発現や活性に依存しているか否かについては今後の検討課題である。

一方、**KUSC-5037** の HeLa/HRE/Luc 細胞における HIF-1 活性阻害の IC<sub>50</sub> 値は 1.2  $\mu\text{M}$  であり、HeLaS3 に対する増殖抑制濃度 (>30  $\mu\text{M}$ ) に比較して低濃度で薬効を示した。この結果は、細胞増殖抑制効果と比較して、**KUSC-5037** は低酸素条件におけるミトコンドリア呼吸鎖阻害を介した HIF-1 活性阻害に顕著な効果を示したことが示唆された。比較として、ATP synthase 阻害剤 oligomycin の HeLa/HRE/Luc 細胞における HIF-1 活性阻害を検討した結果、IC<sub>50</sub> 値は 1.7 nM であり、**KUSC-5037** の場合と同様に、HeLaS3 細胞に対する IC<sub>50</sub> 値 15  $\mu\text{M}$  より顕著な阻害効果を示した。したがって、ミトコンドリア呼吸鎖阻害による HIF-1 活性の阻害は、過剰な HIF-1 シグナルを標的とした治療戦略に有効性を示すことが示唆された。

表 10. **KUSC-5037** の細胞系列依存的がん細胞増殖抑制活性

	HT-1080		HeLa S3		T98G	
	Normoxia IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Hypoxia IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Normoxia IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Normoxia IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Normoxia IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Normoxia IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
5037	0.42 $\pm$ 0.10	1.72 $\pm$ 0.19	>30		2.26 $\pm$ 0.01	
Oligomycin	<0.3	5.56 $\pm$ 1.60	9.9 $\pm$ 3.71		0.13 $\pm$ 0.01	
Gboxin	1.34 $\pm$ 0.65	3.42 $\pm$ 0.43	4.37 $\pm$ 2.63		2.69 $\pm$ 0.74	
ADM	0.16 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.02	<0.3		0.19 $\pm$ 0.13	

HT-1080 細胞を播種後、翌日に試験化合物を添加し、3 日間通常酸素 (21% 酸素) あるいは低酸素 (1%酸素) 条件で培養を行った後、CCK-8 で染色し、細胞増殖抑制活性を評価した。(n=3, 試験は 2 回実施し、代表的なデータを掲載)

## 第七節 小括・考察

第一章で得られた活性誘導体 **KUSC-5037** を用いて、第二章では、作用機序解析研究を展開した。まず、HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現抑制を評価し、**KUSC-5037** が低酸素環境で誘導される HIF-1 $\alpha$  の量の増加を濃度依存的に抑制することを示した。また、HIF-1 $\alpha$  の転写抑制活性を qRT-PCR 法で評価し、低酸素環境で HIF-1 の転写を抑制する可能性が示唆された。

第一章で得られた知見から構造許容性部位であるアシル鎖部位に機能性官能基を導入したケミカルプローブを設計・創製した。蛍光性官能基を導入した蛍光性分子プローブ **KUSC-5054** を用いることで、活性誘導体 **KUSC-5037** がミトコンドリアに局在することが示唆された。次に、ジアジリン基とアルキン基を有する 2 機能性分子プローブ **KUSC-5051** を用いて、標的タンパク質のプルダウンを行った。**KUSC-5037** との競合阻害とプローブのみの単独添加の比較から、ATP synthase の $\beta$ サブユニットである ATP5B を標的タンパク質として同定した。今回合成した **KUSC-5051** と親化合物である **KUSC-5037** の水中での最安定配座を算出し、機能性官能基の空間的配座

の比較を行った (図 17)。これら 2 つの化合物では、機能的官能基の空間的配座は良好に保持された。つまり、**KUSC-5037** の空間的配座を保持したプローブを用いることで、活性誘導体 **KUSC-5037** の活性や標的タンパク質との親和性を保持したまま、標的タンパク質との相互作用に影響しない部分に機能的官能基を導入することができたと考えられる。

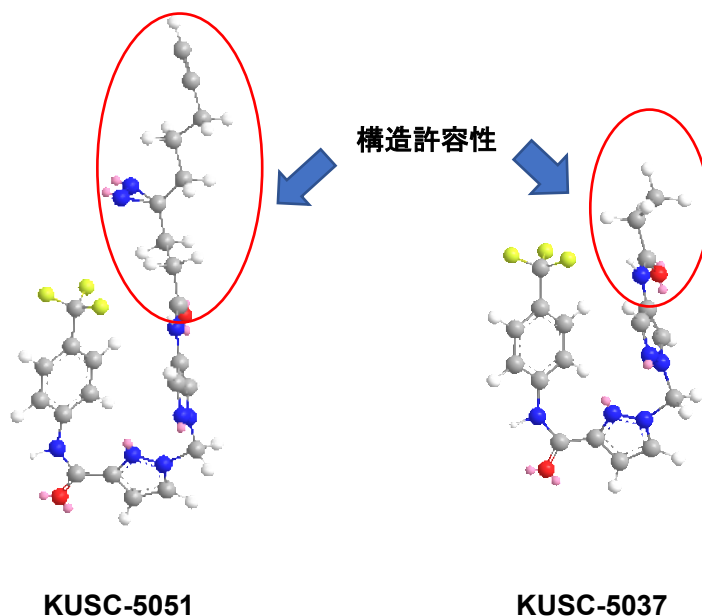


図 17. **KUSC-5051** と **KUSC-5037** の水中での最安定配座の比較  
MM2 計算を Chem 3D で行った。

一方、*in vitro* で、ATP synthase 阻害活性を評価し、**KUSC-5037** は ATP synthase の酵素活性を阻害することが示された。細胞外フラックスアナライザーを用いた細胞内酸素消費の評価において、**KUSC-5037** は ATP synthase 阻害剤であるオリゴマイシンとほぼ同じ挙動を示したことから、ATP synthase が標的タンパク質であることが強く示唆された。

**KUSC-5037** の HIF-1 活性阻害に関しては、低酸素条件下、**KUSC-5037** による HIF-1 $\alpha$  の転写阻害に加えて、**KUSC-5037** がミトコンドリア呼吸鎖を抑制することでミトコンドリアによる酸素消費が低下し、細胞内の局所酸素濃度が上昇することで、HIF-1 $\alpha$  の分解を促進する可能性も考察できる。また、Barrett 食道がんの微小環境では、ATP5B 発現と HIF-1 $\alpha$  発現の正の相関性も報告されており<sup>16</sup>、**KUSC-5037** はこれらの病態解明に向けての有用なツールになりうる可能性がある。

さらに、各種がん細胞を用いた細胞増殖抑制試験において、**KUSC-5037** は、繊維肉腫細胞 (HT-1080 細胞) や神経膠芽腫細胞 (T98G 細胞) の増殖を強く抑制したが、子宮頸がん細胞 (HeLa S3 細胞) の増殖は同濃度域では抑制しなかった。したがって、**KUSC-5037** は、細胞系列依存的に細胞増殖を抑制する可能性が示唆されたが、各細胞の ATP synthase や HIF-1 の発現・活性に依存しているか否かについては今後の検討課題である。

### 第三章 総括

がん化学療法には多くの課題があり、新規抗がん剤の開発が望まれている。世界的にも低酸素誘導因子(HIF)-1は有用な治療標的と考えられている。本研究では、HIF-1活性を阻害するヒット化合物として見出したピラゾール骨格を有する **KUSC-5001** の化学構造に着目して、包括的構造活性相関研究を行い新規 HIF-1 阻害剤の開発を行った。

第一章では、**KUSC-5001** の HIF-1 阻害活性に関する詳細な構造活性相関研究を展開した。**KUSC-5001** を 3 つのフラグメント (左 (領域 1)、中央 (領域 3)、右 (領域 2)) に分け、領域 1 の変換においては **Topliss Tree** に則して芳香環置換基の変換を行った。領域 2 及び領域 3 の変換においては、それぞれ、ニトロピラゾールの極性変換及びアルキルピラゾール部位の変換を行った。その結果、より高活性な新規 HIF-1 阻害剤 **KUSC-5037** の開発に成功し、かつ、細胞内局在や標的タンパク質探索・同定に適した分子プローブを設計するための重要な知見を得た。

第二章では、最適化誘導体 **KUSC-5037** を用いて、作用機序解析研究へと展開した。**western blotting** 法や **qRT-PCR** 法など各種生化学実験により、**KUSC-5037** は HIF-1 $\alpha$  遺伝子の転写活性を抑制することで HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現を阻害することが示唆された。また、構造活性相関の知見を活用して、細胞内局在を検討するための分子プローブ **KUSC-5054** 及び標的タンパク質探索・同定に適した分子プローブ **KUSC-5051** を設計・創製した。**KUSC-5054** を用いた検討の結果、**KUSC-5037** 類はミトコンドリアに局在することが示唆され、**KUSC-5051** を用いた検討の結果、**KUSC-5037** 類は **F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase** の  $\beta$  サブユニットである **ATP5B** に結合し、**F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase** 活性を抑制することを明らかにした。さらに、細胞外フラックスアナライザーを用いた検討の結果、**KUSC-5037** は細胞レベルでミトコンドリア電子伝達系 **complex V** の機能を抑制することが明らかになった。細胞増殖抑制試験を行い、**KUSC-5037** は細胞系列依存的にがん細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。

これまでに複数の **F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase** 阻害剤が天然物及び合成品より見出されている<sup>15</sup>が、**KUSC-5037** は、オリゴマイシンやオサマイシンのようなマクロライド系骨格を持たず、合成化合物として報告された **Gboxin** と異なる構造を有する。また、図 16 に示した通り、**KUSC-5037** の **F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase** 阻害機構は既存の **oligomycin** とはやや異なることが示唆された。一方、**F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase** 阻害と HIF-1 経路阻害との関連性については、**Barrett** 食道がんの微小環境で、**ATP5B** 発現と HIF-1 $\alpha$  発現の正の相関性も報告されている<sup>15d</sup>。**KUSC-5037** はこれらの病態解明に向けての有用なツールになりうる可能性がある。今後、**KUSC-5037** と **ATP5B** との複合体形成様式などが解明されれば、より論理的にさらなる構造最適化研究が可能になり、新規分子標的抗がん剤開発への貢献が期待される。

## 参考文献

- 厚生労働省 令和2年(2020)人口動態統計月報年計(概数)の概況
- G.L. Semenza. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 721-732; Targeting HIF-1 for cancer therapy.
  - G. L. Semenza. *Oncogene*, **2010**, *29*, 625-634; Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics.
  - D. Samanta, D.M. Gilkes, P. Chaturvedi, L. Xiang, G. L. Semenza. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2014**, *E5429-5438*; Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells.
  - がん増殖と悪性化の分子機構 宮澤 恵二、伊藤 進 編; 化学同人 2012年.
  - A. Yoshimura, S. Nishimura, S. Otsuka, A. Hattori, H. Kakeya; *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5364–5367; Structure Elucidation of Verucopeptin, a HIF-1 Inhibitory Polyketide–Hexapeptide Hybrid Metabolite from an Actinomycete.
  - Y. Yasuda, T. Arakawa, Y. Nawata, S. Shimada, S. Oishi, N. Fujii, S. Nishimura, A. Hattori, H. Kakeya. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23*, 1776-1787; Design, synthesis, and structure-activity relationships of 1-ethylpyrazole-3-carboxamide compounds as novel hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors.
  - H. Harada, M. Inoue, S. Itasaka, K. Hirota, A. Morinibu, K. Shinomiya, L. Zeng, G. Ou, Y. Zhu, M. Yoshimura, W.G. McKenna, R. J. Mushel, M. Hiraoka; *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 783; Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumor blood vessels.
- MR. Pawlus, L. Wang, C-J. Hu, *Oncogene*, **2014**, *33*, 1670-79 ; STAT3 and HIF-1  $\alpha$  cooperatively activate HIF-1 target genes.
  - R. L. Carpenter, H.-W. Lo; *Cancers*, **2014**, *6*, 897; STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers.
- K. Koike, M. Nagano, M. Ebihara, T. Hirayama, M. Tsuji, H. Suga, H. Nagasawa. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*, 4022–4046; Design, Synthesis, and Conformation–Activity Study of Unnatural Bridged Bicyclic Depsipeptides as Highly Potent Hypoxia Inducible Factor-1 Inhibitors and Antitumor Agents.
  - P. Ellinghaus, I. Heisler, K. Unterschemmann, M. Haerter, H. Beck, S. Greschat, A. Ehrmann, H. Summer, I. Flamme, F. Oehme, K. Thierauch, M. Michels, H. Hess-Stumpp, K. Ziegelbauer. *Cancer Med.*, **2013**, *2*, 611-624; BAY 87-2243, a highly potent and selective inhibitor of hypoxia-induced gene activation has antitumor activities by inhibition of mitochondrial complex I.
  - J. R. Molina, Y. Sun, M. Protopopova, S. Gera, M. Bandi, C. Bristow, T. McAfoos, P. Morlacchi, J. Ackroyd, A.-N., A. Agip, G. Al-Atrash, J. Asara, J., Bardenhagen, C., C. Carrilo, C., Carroll, E., Chang, S., Ciurea, J. B. Cross, B. Czako, A. Deem, N. Daver, J. F. de Groot, J.-W. Dong, N. Feng, G. Gao, J. Gay, M. G. Do, J. Greer, V. Giuliani, J. Han, L. Han, V. K. Henry, J. Hirst, S. Huang, Y. Jiang, Z. Kang, T. Khor, S. Konoplev, Y.-H. Lin, G. Liu, A. Lodi, T. Lofton, H. Ma, M. Mahendra, P. Matre, R. Mullinax, M. Peoples, A. Petrocchi, J. Rodriguez-Canale, R. Serreli, T. Shi, M. Smith, Y. Tabe, J. Theroff, S. Tiziani, Q. Xu, Q. Zhang, F. Muller, R. A. DePinho, C. Toniatti, G. F. Draetta, T. P. Heffernan, M. Konopleva, P. Jones, M. Emilia Di Francesco, J. R. Marszalek. *Nat. Med.*, **2018**, *24*, 1036-1046; An inhibitor of

oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability.

- (d) A. Tsuji, T. Akao, T. Masuya, M. Murai, H. Miyoshi. *J. Biol. Chem.*, **2020**, *295*, 7481-7491; IACS-010759, a potent inhibitor of glycolysis-deficient hypoxic tumor cells, inhibits mitochondrial respiratory complex I through a unique mechanism.
- (d) D. Bhattarai, X. Xu, K. Lee. *Med. Res. Rev.*, **2018**, *38*, 1404-1442; Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) inhibitors from the last decade (2007 to 2016): A “ structure-activity relationship “ perspective.
- (e) Y. Xia, H.-K. Choi, K. Lee. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *49*, 24-40; Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors.
- (f) H. Irannejad, *Med. & Analy. Chem. Int. J.*, **2018**, *2* (3), 000125; Nitrogen Rich Heterocycles as a Privileged Fragment in Lead Discovery.
- (g) G. M. Nitulescu, G. Nedelcu, A. Bezescu, O. T. Olaru, *Bulg. Chem. Commun.*, **2016**, *48*, 55.
5. (a) E. Brunet, O. Junes, M.J. de la Mata, J. C. Rodriguez-Ubis. *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 1913-1922; A Simple Polyheterotopic Molecular Receptor Derived from Bispyrazolylmethane Showing Ambivalent Allosteric Cooperation of Zinc (II).
- (b) G. Hoelzemann, D. Dorsch, W. A. Wegener, O. Poeschke, M. Busch, J. Seenisamy. *PCT Int. Appl.*, **2014**, WO2014135245 A1 20140912; 9-(Aryl or heteroaryl)-2-(pyrazolyl, pyrrolidinyl or cyclopentyl) aminopurine derivatives as anticancer agents.
- (c) C. P. Kordik, T. W. Lovenberg, A. B. Reltz. *PCT Int. Appl.*, **2000**, WO 2000069849 A1 20001123; Pyrazole carboxamides useful for the treatment of obesity and other disorders.
- (d) I. Bassanetti, M. Mattarozzi, M. Delferro, T. J. Marks, L. Marchio. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2016**, 2626-2633; Silver(I) Bis(pyrazolyl)methane Complexes and Their Implementation as Precursors for Metallic Silver Deposition.
6. (a) T. Yamanaka, H. Ohki, M. Ohgaki, S. Okuda, A. Toda, K. Kawabata, S. Inoue, K. Misumi, K. Itoh, K. Satoh. *PCT Int. Appl.*, **2004**, WO 200410157 A1 20041125; Cephem compounds.
- (b) F. H. Jung, P. Ple, *PCT Int. Appl.*, **2007**, WO 2007099326 A1 20070907; Quinoline derivatives.
- (c) B. C. Barlaam, K. M. Foote, M. Kevin, P. Ple. *PCT Int. Appl.*, **2009**, WO 2009153589A1 20091223; Pyridine compounds.
- (d) S. Boncel, K. Saletra, B. Hefczyc, K. Z. Walczak. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2011**, *7*, 173-178; Michael-type addition of azoles of broad-scale acidity to methyl acrylate.
- (e) M. E. Gurney, T. J. Hagen, X. Mo, A. Vellekoop, D. L. Romero, R. F. Campbell. *PCT Int. Appl.* **2014**, WO 2014066659 A1 20140501; Heteroaryl inhibitors of PDE4.
7. (a) T. S. Heuer, J. D. Oslob, R. S. McDowell, R. Johnson, H. Yang, M. Evanchik, C. A. Zaharia, H. Cai, L. W. Hu. *PCT Int. Appl.*, **2015**, WO 2015095767 A1 20150625; Heterocyclic modulators of lipid synthesis and combinations thereof.
- (b) A. J. Whitehouse, S.E. Thomas, K. P. Brown, A. Fanourakis, D. S.-H. Chan, M. D. J. Linbardo, V. Mendes, H.I. M. Bostoff, R. A. Floto, C. Abell, T. L. Blundell, A. G. Coyne. *J. Med. Chem.*, **2019**, *62*, 7210-7232; Development of inhibitors against Mycobacterium abscessus tRNA (m1G37) Methyltransferase (TrmD) Using Fragment-Based Approaches.

8. (a) D. Quiping, S. Ye, G. Cheng, P. Wang, M. E. Farmer, J.-Q. Yu. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 417-425; Ligand-Enabled meta-Selective C–H Arylation of Nosyl-Protected Phenethylamines, Benzylamines, and 2 Aryl Anilines.  
 (b) K. Okano, H. Tokuyama, T. Fukuyama. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 4987-4990; Synthesis of Secondary Arylamines through Copper-Mediated Intermolecular Aryl Amination.
9. J. G. Topliss. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1006-1011; Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design.
10. (a) D. Samanta, D. M. Gilkes, P. Chaturvedi, L. Xiang, G. L. Semenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2014**, *111*, E5429-5438. ; Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells.  
 (b) X. Li, A. Hattori, S. Takahashi, Y. Goto, H. Harada, H. Kakeya. *Cancer Sci*, **2020**, *111*, 239-252; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 promotes hypoxia inducible factor 1-dependent tumor cell malignancy in spheroid models.
11. (a) Y. Uehara, M. Mochizuki, K. Matsuno, T. Haino, A. Asai, *BBRC*, **2009**, *380*, 627-631. ; Novel high-throughput screening system for identifying STAT3-SH2 antagonists.  
 (b) Y-H. Yeh, H-F. Hsiao, Y-C. Yeh, T-W. Chen, T-K. Li, *J. Exp. Clinical Cancer Research*, **2018**, *37*(1); 70.; Inflammatory interferon activates HIF-1  $\alpha$  -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via PI3K/Akt/mTOR pathway.  
 (c) E. J. Azenne, J. Klostergaard, P. K. Mandal, W. S. Liao, Z. Lu, F. Gao, R. C. Bast Jr., F. M. Robertson, J. S. McMurray, *J. Exp. Ther. Oncol.*, **2012**, *10*, 155-162 ; A phosphopeptide mimetic prodrug targeting the SH2 domain of STAT3 inhibits tumor growth and angiogenesis.
12. (a) K. Kitamura, H. Itoh, K. Sakurai, S. Dan, M. Inoue. *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 12189-12199; Target Identification of Yaku'amide B and Its Two Distinct Activities against Mitochondrial FoF1 ATP Synthase.  
 (b) L. B. Tulloch, S. K. Menzies, A. L. Fraser, E. R. Gould, E. F. King, M. K. Zacharova, G. J. Florence, T. K. Smith. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005886; Photo-affinity labelling and biochemical analyses identify the target of trypanocidal simplified natural product analogues.
13. (a) B. R Lanning, L. R. Whitby, M. M. Dix, J. Douhan, A. M. Gilbert, E. C. Hett, T. O. Johnson, C. Joslyn, J. C. Kath, S. Niessen, L. R. Roberts, M. E. Schnute, C. Wang, J. J. Hulce, B. Wei, L. O. Whiteley, M. M. Hayward, B. F. Cravatt. *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, *10*, 760-767; A road map to evaluate the proteome-wide selectivity of covalent kinase inhibitors.  
 (b) S. Pan, S.-Y. Jang, D. Wang, S. S. Liew, Z. Li, J.-S. Lee, S. Q. Yao. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 11816-11821; A Suite of “Minimalist” Photo-Crosslinkers for Live-Cell Imaging and Chemical Proteomics: Case Study with BRD4 Inhibitors.  
 (c) P. Kleiner; W. Heydenreuter; M. Stahl; V. S. Korotkov, S. A. Sieber. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 1396-1401; A Whole Proteome Inventory of Background Photocrosslinker Binding.  
 (d) Z. Li, P. Hao, L. Li, Chelsea Y. J. Tan, Xiamin Cheng, Grace Y. J. Chen, Siu Kwan Sze, Han-Ming Shen, Shao Q. Yao. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 8551-8556; Design and Synthesis of Minimalist



Terminal Alkyne-Containing Diazirine Photo-Crosslinkers and Their Incorporation into Kinase Inhibitors for Cell- and Tissue-Based Proteome Profiling.

(e) R. Naik, M. Won, H. S. Ban, D. Bhattarai, X. Xu, Y. Eo, Y. S. Hong, S. Singh, Y. Choi, H.-C. Ahn, K. Lee. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 9522-9538; Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of Chemical Probes as Hypoxia Induced Factor-1 $\alpha$ /Malate Dehydrogenase 2 Inhibitors

(f) C.-L. Gao, G.-G. Hou, J. Liu, T. Ru, Y.-Z. Xu, S.-Y. Zhao, H. Ye, L.-Y. Zhang, K.-X. Chen, Y.-W. Guo, T. Pang, X.-W. Li. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 2429-2439; Synthesis and Target Identification of Benzoxepane Derivatives as Potential Anti-Neuroinflammatory Agents for Ischemic Stroke.

(g) L. L. Punzalan, L. Jiang, D. Mao, A. D. Mahapatra, S. Sato, Y. Takemoto, M. Tsujimura, K. Kusamori, M. Nishikawa, L. Zhou, M. Uesugi. *Cell. Chem. Biol.*, **2020**, *27*, 708-718.

; Chemoproteomic Profiling of a Pharmacophore-Focused Chemical Library.

(h) F. Ishikawa, S. Konno, T. Suzuki, N. Dohmae, H. Kakeya. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1989-1997.; Profiling nonribosomal peptide synthetase activities using chemical proteomic probes for adenylation domains.

(i) 基礎から学ぶケミカルバイオロジー 日本化学会 編, 上村 大輔, 袖岡 幹子, 阿部 孝宏, 闌闌 孝介, 中村 和彦, 宮本 憲二 著, 2016 年

14. (a) M. Nazari, J. D. Serrill, X. Wan, M. H. Nguyen, C. Anklin, D. A. Gallegos, A. B. Smith III, J. E. Ishmael, K. L. McPhail. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 7850-7862; New Mandelalides Expand a Macrolide Series of Mitochondrial Inhibitors.

(b) B. Tan, H. Xiao, F. Li, L. Zeng, Y. Yin. *Anim. Nutr.*, **2015**, *1*, 239-243; The profiles of mitochondrial respiration and glycolysis using extracellular flux analysis in porcine enterocyte IPEC-J2.

15. (a) Y. Shi, S. K. Lim, Q. Liang, S. V. Iyer, H.-Y. Wang, Z. Wang, X. Xie, D. Sun, Y.-J. Chen, V. Taber, P. Gutin, N. Williams, J. K. De Brabander, L. F. Parada. *Nature*, **2019**, *567*, 341-346; Gboxin is an oxidative phosphorylation inhibitor that targets glioblastoma.

(b) Y. Gong, F. H. Agani. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2005**, *288*, C1023-1029; Oligomycin inhibits HIF-1 $\alpha$  expression in hypoxic tumor cells.

(c) A. R. Salomon, D. W. Voehringer, L. A. Herzenberg, C. Khosla, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, *26*, 14766; Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase.

(d) J. J. Phelan, R. Feighery, O. S. Eldin, S. O. Meachair, A. Cannon, R. Byrne, F. MacCarthy, D. O'Toole, J. V. Reynolds, J. O'Sullivan. *Cancer Lett.*, **2016**, *371*, 334-346; Examining the connectivity between different cellular processes in the Barrett tissue microenvironment.

(e) Y. M. Mowery, S. V. Pizzo. *Cancer Biol. Ther.*, **2008**, *7*, 1836-1838; Targeting cell surface F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase in cancer therapy.

(f) B. A. Patal, T. L. D'Amico, B. S.J. Blagg. *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, *207*, 112779; Natural products and other inhibitors of F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase.

(g) C. Galber, M. J. Acosta, G. Minervini, V. Giorgio. *Biol. Chem.*, **2020**, *401* (11), 1199; The role of mitochondria ATP synthase in cancer.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導頂きました京都大学大学院薬学研究科 システムケモセラピー（制御分子学）分野 掛谷秀昭教授、生化学的試験を行う際、ご指導頂きました服部明准教授、野中元裕博士、合成面でご指導頂きました高橋伸明博士に深く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、ご協力を頂きましたシステムケモセラピー（制御分子学）分野 池田拓慧博士、小林清香さんに深く感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、ご協力・ご助言を頂きましたシステムケモセラピー（制御分子学）分野諸氏に深く御礼申し上げます。

本論文の執筆にあたり、ご指導・ご助言を賜りました高須清誠教授、二木史朗教授に深く感謝します。

化合物スクリーニング及び構造活性相関研究にご協力頂きました国立開発法人理化学研究所 故・小嶋聡一ユニットリーダー、古谷裕博士をはじめ、理化学研究所 肝がん予防ユニットの方々に深くお礼申し上げます。

質量分析を用いた標的タンパク質の解析にご協力頂きました理化学研究所 堂前直ユニットリーダー、鈴木健裕博士をはじめ、理化学研究所生命分子解析ユニットの方々に深くお礼申し上げます。

細胞株の提供、有益なご助言等を頂きました京都大学大学院生命科学研究科原田浩教授に深くお礼申し上げます。

## 実験の部

### 1. Chemistry

#### 1.1. General

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a JEOL ECA 500 (500 MHz for <sup>1</sup>H NMR and 125 MHz for <sup>13</sup>C NMR), or a JEOL ECZ600 (600 MHz for <sup>1</sup>H NMR and 150 MHz for <sup>13</sup>C NMR) spectrometer. Chemical shifts are denoted in  $\delta$  (ppm) relative to residual solvent peaks as internal standard (CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H  $\delta$  7.26, <sup>13</sup>C  $\delta$  77.16; CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H  $\delta$  3.31, <sup>13</sup>C  $\delta$  49.00; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO <sup>1</sup>H  $\delta$  2.05, <sup>13</sup>C 29.84; DMSO-*d*<sub>6</sub> <sup>1</sup>H  $\delta$  2.50, <sup>13</sup>C 39.52). ESI-MS and LC-MS experiments were recorded on a Shimadzu LCMS-IT-TOF. High performance liquid chromatography (HPLC) experiments were performed with SHIMADZU HPLC system equipped with LC-20AD intelligent pump. All reactions sensitive to air and/or moisture were conducted under nitrogen atmosphere using dry, freshly distilled solvents, unless otherwise noted. All reagents were used as supplied unless otherwise stated. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using E. Merck Silica gel 60 F<sub>254</sub> pre-coated plates. Column chromatography was performed using 40-50  $\mu$  m Silica Gel 60N (Kanto Chemical Co., Inc.).

#### 1.2. Synthesis of KUSC-5001~KUSC-5008, KUSC-5010~KUSC-5013, KUSC-5027 and KUSC-5028

##### 1.2.1. Ethyl 1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**S1**)

To a stirred solution of 4-nitro-1*H*-pyrazole (100.2 mg, 0.836 mmol) in DMF (0.49 mL) were added ethyl 1-(bromomethyl)-3-carboxylate (227.1 mg, 0.974 mmol) and potassium carbonate (244.9 mg, 1.77 mmol) at room temperature. After being stirred for 5.3 h, the reaction was quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20:1) to afford the carboxylate **S1** as a colorless solid (225.1 mg, 96%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 4.26 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.59 (s, 2H), 6.81 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 9.21 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  14.17, 60.50, 65.35, 109.16, 131.42, 133.40, 135.61, 136.82, 144.41, 161.29.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 288.0703; found, 288.0725.

##### 1.2.2. 1-((4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**S2**)

To a stirred solution of the carboxylate **S1** (53.0 mg, 0.20 mmol) in MeOH (3.0 mL) and water (1.0 mL), was added sodium hydroxide (11.2 mg, 0.28 mmol) at room temperature. After being stirred reflux for 18 h, the mixture was then cooled to room temperature. After the reaction solution was acidified with conc. HCl at pH 2, CHCl<sub>3</sub> was added and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to afford the carboxylic acid **S2** as a colorless solid (37.8 mg, 61%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  6.57 (s, 2H), 6.75 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 9.19 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  65.36, 109.15, 131.41, 133.19, 135.61, 136.79, 145.36, 162.76.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> 238.0532; found, 238.0536.

##### 1.2.3. *N*-(4-Bromophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**KUSC-5001**)

To a stirred solution of the carboxylic acid **S2** (10.0 mg, 0.042 mmol) in dichloromethane (0.57 mL) were added DIPEA (15.0  $\mu$ L, 0.086 mmol) and HATU (16.0 mg, 0.042 mmol) at room temperature. After being stirred for 30 minutes, *p*-bromoaniline (8.0 mg, 0.047 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 22 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous

layer was extracted with CHCl<sub>3</sub> and the combined organic layers were washed with 1M HCl and sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20:1) to afford **KUSC-5001** as a colorless solid (13.4 mg, 81%).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.33 (s, 2H), 6.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.57 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 66.44, 109.21, 117.15, 121.45, 129.03, 132.22, 132.71, 136.67, 137.18, 137.26, 149.08, 158.78.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 412.9968; found, 412.9983.

#### 1.2.4. *N*-(2-Bromophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**KUSC-5002**)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 6.73 (s, 2H), 6.89 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.09 (td, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.42 (td, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.48 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 9.05 (s, 1H), 9.38 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 66.94, 108.23, 114.03, 122.30, 126.12, 129.34, 131.62, 133.39, 134.57, 136.89, 137.37, 137.41, 148.98, 159.62.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 412.9968; found, 412.9980.

#### 1.2.5. *N*-(3-Bromophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**KUSC-5003**)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 6.66 (s, 2H), 6.87 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.27-7.31 (m, 2H), 7.73 (dd, *J* = 1.8, 9.0 Hz, 1H), 8.16-8.17 (m, 2H), 8.21 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 9.58 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 66.95, 108.55, 119.44, 122.71, 123.37, 127.32, 131.28, 131.33, 134.21, 137.20, 137.40, 141.13, 149.28, 160.30.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 412.9968; found, 412.9977.

#### 1.2.6. 1-((4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**KUSC-5004**)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 6.67 (s, 2H), 6.89 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.18 (d, *J* = 2.5 Hz), 8.22 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 9.76 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 66.97, 108.65, 120.65, 124.36, 125.56, 126.51, 126.83, 131.28, 134.29, 137.22, 137.41, 143.09, 160.50.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 403.0737; found, 403.0757.

#### 1.2.7. *N*-(4-Fluorophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**KUSC-5005**)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 6.65 (s, 2H), 6.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.11 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.81 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.15 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 9.48 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 66.94, 108.44, 115.99, 122.63, 131.24, 134.10, 135.85, 137.18, 149.56, 158.88, 160.07, 160.79.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 353.0769; found, 353.0774.

#### 1.2.8. 1-((4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**KUSC-5006**)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 6.57 (s, 2H), 6.90 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.92 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 66.96, 108.90, 118.11, 121.69, 124.45, 124.83, 126.60, 130.74, 131.60, 132.15, 134.30, 137.76, 140.28, 149.42, 162.08.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 403.0737; found, 403.0740.

#### 1.2.9. *N*-(4-Chlorophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5007)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.33 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.58 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 66.45, 109.20, 121.16, 129.03, 129.27, 129.55, 132.70, 136.17, 137.18, 137.28, 149.10, 158.79.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 369.0474; found, 369.0483.

#### 1.2.10. 1-((4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-phenyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5008)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.33 (s, 2H), 6.97 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.57 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 66.42, 109.12, 119.96, 124.61, 129.05, 129.25, 132.60, 137.12, 137.24, 137.58, 149.35, 158.83.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 335.0864; found, 335.0864.

#### 1.2.11. *N*-(4-Isopropylphenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5010)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.25 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 2.90 (septet, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.32 (s, 2H), 6.96 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.54 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 24.16, 33.76, 66.40, 109.08, 120.10, 127.13, 129.08, 132.54, 135.23, 137.10, 137.20, 145.37, 149.41, 158.76.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 377.1333; found, 377.1352.

#### 1.2.12. *N*-(4-Methoxyphenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5011)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 3.78 (s, 3H), 6.64 (s, 2H), 6.84 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.13 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 9.29 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 55.62, 66.90, 108.29, 114.64, 122.37, 131.22, 132.57, 133.99, 137.16, 137.38, 149.85, 157.08, 159.79.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 365.0969; found, 365.0990.

#### 1.2.13. *N*-(3,4-Dichlorophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5012)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.60 (s, 2H), 6.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 10.42 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 65.42, 107.84, 120.41, 121.58, 125.18, 130.51, 130.79, 131.28, 133.71,

135.70, 136.71, 138.74, 147.67, 159.84

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{14}H_{10}Cl_2N_6O_3Na^+$  403.0084; found, 403.0092.

**1.2.14. *N*-(2-Hydroxyphenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5013)**

A colorless solid.

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6.63 (s, 2H), 6.81 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.92 (m, 2H), 8.17 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.22 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 9.22 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 10.19 (s, 1H).

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  65.28, 107.32, 114.78, 119.22, 119.74, 124.06, 126.02, 131.31, 134.11, 135.66, 136.76, 146.41, 147.84, 158.43.

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{14}H_{12}N_6O_4Na^+$  351.0812; found, 351.0808.

**1.2.15. *N*-(2,4-Dichlorophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5027)**

A colorless solid.

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6.63 (2H, s), 6.89 (1H, s), 7.47 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.73 (1H, s), 7.96 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 8.23 (1H, s), 8.37 (1H, s), 9.21 (1H, s), 9.65 (1H, s).

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  65.40, 107.58, 125.89, 127.08, 127.87, 128.90, 129.47, 131.47, 133.55, 134.00, 135.71, 136.76, 147.07, 159.10.

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{14}H_{10}Cl_2N_6O_3Na^+$  403.0084; found, 403.0106.

**1.2.16. *N*-(2,4-Difluorophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5028)**

A colorless solid.

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6.61 (s, 2H), 6.86 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.10 (t,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 7.36 (t,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.66 (q,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 8.20 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.77 (s, 1H).

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  65.38, 104.29, 107.57, 111.19, 121.88, 127.64, 131.35, 133.68, 135.71, 136.71, 147.37, 154.59, 156.53, 159.53.

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{14}H_{10}F_2N_6O_3Na^+$  371.0675; found, 371.0683.

**1.3. Synthesis of KUSC-5015 and KUSC-5021**

**1.3.1. *N*-(4-bromophenyl)-1-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5015)**

To a stirred solution of 1-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (30.0 mg, 0.238 mmol) in dichloromethane (3.2 mL) were added DIPEA (83  $\mu$ L, 0.477 mmol) and HATU (90.5 mg, 0.238 mmol) at room temperature. After being stirred for 30 minutes, *p*-bromoaniline (45.0 mg, 0.262 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 21 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with  $CHCl_3$  and the combined organic layers were washed with 1M HCl, sat.  $NaHCO_3$  aq., and brine, dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated in vacuo. The residue was subjected to ODS HPLC on COSMOSIL 5C18 MS II ( $\phi$ 20 $\times$ 250 mm) with  $H_2O/CH_3CN$  (40 : 60) to afford **KUSC-5015** as a colorless solid (34.81 mg, 52%).

$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ): 3.97 (s, 3H), 6.88 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.46 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.68 (br, 1H).

$^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  39.56, 107.40, 116.50, 121.22, 132.06, 132.38, 137.20, 146.51, 159.84.

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{11}H_{10}BrN_3ONa^+$  303.9879; found, 303.9828.

**1.3.2. *N*-(4-bromophenyl)-3-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)propanamide (KUSC-5021)**

To a stirred solution of 3-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)propanoic acid (15.0 mg, 0.0810 mmol) in dichloromethane (1.1 mL) were added DIPEA (28.0  $\mu$ L, 0.161 mmol) and HATU (30.8 mg, 0.0810 mmol)

at room temperature. After being stirred for 30 minutes, *p*-bromoaniline (15.3 mg, 0.047 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 18.5 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with AcOEt and the combined organic layers were washed with 1M HCl, sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH= 20:1), and the purified fraction was further subjected to ODS HPLC on COSMOSIL 5C18 MS II (φ20×250 mm) with H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (40 : 60) to afford **KUSC-5021** as a colorless solid (20.3 mg, 74%).

<sup>1</sup>H NMR (600MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 3.08 (t, *J* = 6.0Hz, 2H), 4.60 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.10 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 9.43 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 36.72, 49.45, 116.18, 121.88, 131.07, 132.48, 132.65, 136.18, 139.26, 169.03.

HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup> 336.9942; found, 336.9963.

#### 1.4. Synthesis of **KUSC-5019**, **KUSC-5014**, **KUSC-5020**, and **KUSC-5029**

##### 1.4.1. Ethyl 1-((1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**S3**)

To a stirred solution of ethyl 1-(bromomethyl)-3-carboxylate (100.0 mg, 0.429 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (5.60 mL) were added 1*H*-pyrazole (66.0 mg, 0.969 mmol) and potassium carbonate (130.5 mg, 0.944 mmol). After being stirred at room temperature for 3.5 days, the reaction was quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH =20:1) to afford the carboxylate **S3** as a colorless solid (94.8mg, quant.).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 4.39 (q, *J* = 7.2Hz, 2H), 6.30 (s, 1H), 6.37 (s, 2H), 6.81 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.48, 61.30, 65.85, 107.71, 110.21, 130.20, 131.09, 141.38, 144.93, 162.07.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 221.1034; found, 221.1003.

##### 1.4.2. 1-((1*H*-Pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**S4**)

To a stirred solution of the carboxylate **S3** (30.0 mg, 0.136 mmol) in MeOH (2.1 mL) and water (0.7 mL) was added 2M NaOH (0.10 mL, 0.200 mmol). After being stirred at 48°C for 15 hours, the reaction solution was cooled to room temperature. After the reaction was quenched with conc. HCl at pH 5, added ethyl acetate and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to afford the carboxylic acid **S4** as a colorless solid (9.7 mg, 37%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 6.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.44 (s, 2H), 6.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 66.16, 107.99, 110.31, 132.21, 133.22, 142.20, 146.29, 164.93.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 215.0539; found, 215.0503.

##### 1.4.3. 1-((1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-bromophenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**KUSC-5019**)

To a stirred solution of the carboxylate **S4** (9.72 mg, 0.0506 mmol) in dichloromethane (0.68 mL) were added DIPEA (18 μL, 0.103 mmol) and HATU (19.43 mg, 0.0505 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, *p*-bromoaniline (9.60 mg, 0.0558 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 11 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the combined organic layers were washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and brine, respectively, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=100:3) to afford **KUSC-5019** as a colorless solid (15.9 mg, 14%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 6.31 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.50 (s, 2H), 6.81 (d, *J* = 2.5Hz, 1H), 7.49-51 (m, 3H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.99 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 9.55 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 66.17, 107.52, 108.20, 116.38, 122.56, 131.08, 132.45, 133.31, 139.10, 141.34, 148.58, 160.43.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>5</sub>ONa<sup>+</sup> 368.0117; found, 368.0093.

#### 1.4.4. Ethyl 1-((1*H*-imidazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**S5**)

To a stirred solution of ethyl 1-(bromomethyl)-3-carboxylate (50.0 mg, 0.215 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (2.8 mL) were added potassium carbonate (65.2 mg, 0.472 mmol) and 1*H*-imidazole (33.0mg, 0.485mmol). After being stirred at room temperature for 3 days, the reaction was quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH =20:1) to afford the carboxylate **S5** as a colorless solid (36.1 mg, 76%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 4.39 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.21 (s, 2H), 6.83 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.44, 61.43, 110.58, 118.36, 118.74, 130.25, 131.01, 137.14, 145.38, 161.85.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 221.1033; found, 221.1012.

#### 1.4.5. 1-((1*H*-imidazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-bromophenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**KUSC-5014**)

To a stirred solution of the carboxylate **S5** (36.1 mg, 0.164 mmol) in MeOH (2.4 mL) and water (0.8 mL) was added 2M NaOH (0.12 mL). After being stirred at 45°C for 20 h, the reaction mixture was cooled to room temperature. After the reaction solution was acidified with 1M HCl at pH 5, ethyl acetate was added, and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layers were concentrated in vacuo. The residue was used without further purification.

To a stirred solution of the residue (5.6 mg, 0.0291 mmol) in dichloromethane (0.39 mL) were added DIPEA (10.2 μL, 0.0586 mmol) and HATU (11.1 mg, 0.0292 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, *p*-bromoaniline (5.0 mg, 0.0291 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 22 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH =20:1) to afford **KUSC-5014** as a colorless solid (5.0 mg, 9% in 2 steps).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.42 (s, 2H), 6.84 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H) 7.40 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.23(1H, br).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz in DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 60.05, 107.60, 115.43, 119.30, 122.32, 129.23, 131.46, 132.83, 137.55, 138.04, 147.57, 159.83.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>5</sub>ONa<sup>+</sup> 368.0118; found, 368.0154.

#### 1.4.6. Ethyl 1-((4-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**S6**)

To a stirred solution of ethyl 1-(bromomethyl)-pyrazole-3-carboxylate (100.0 mg, 0.429 mmol) in DMF (4.3 mL) were added, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (153.8 mg, 0.472 mmol), NaI (64.3 mg, 0.429 mmol) and 4-nitro-1*H*-imidazole (72.8mg, 0.644mmol). After being stirred at 80°C for 19 h, the reaction was quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20:1) to afford the carboxylate **S6** as a colorless solid (74.8 mg, 66%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.27 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H), 4.27 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 6.54 (s, 2H), 6.83 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.23 (d, *J* = 2.5Hz, 1H), 8.59 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14.17, 60.53, 60.90, 109.36, 120.98, 133.09, 137.42, 144.59, 147.39, 161.24.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 288.0703; found, 288.0726.



#### 1.4.7. 1-((4-Nitro-1H-imidazol-1-yl)methyl)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (S7)

To a stirred solution of the carboxylate **S6** (30.0 mg, 0.113 mmol) in MeOH (1.8 mL) and water (0.6 mL) was added 2M NaOH (0.085 mL). After being stirred at 48 °C for 10 h, the reaction solution was cooled to room temperature. After the reaction was quenched with conc. HCl at pH 5, ethyl acetate was added and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to afford the carboxylic acid **S7** as a colorless solid (24.9 mg, 93%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.51 (s, 2H), 6.77 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.56 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 60.86, 109.23, 120.95, 132.84, 137.37, 145.54, 147.35, 162.68.

HRMS (ESI) *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> 238.0571; found, 238.0532.

#### 1.4.8. N-(4-bromophenyl)-1-((4-nitro-1H-imidazol-1-yl)methyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5020)

To a stirred solution of the carboxylic acid **S7** (18.2 mg, 0.0765 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 mL) were added DIPEA (27.0 μL, 0.155 mmol) and HATU (29.3 mg, 0.0770 mmol). After stirred for 30 minutes, *p*-bromoaniline (9.60 mg, 0.0558 mmol) was added, and the mixture was stirred for 12 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layer was washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 100:3) to afford **KUSC-5020** as a colorless solid (26.1 mg, 87%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.54 (s, 2H), 6.88 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.16 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 10.20 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 60.89, 107.74, 115.52, 120.98, 122.35, 131.46, 133.36, 137.41, 137.89, 147.36, 148.15, 159.59

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 412.9968; found, 412.9965.

#### 1.4.9. Ethyl 1-((3-nitro-1H-pyrrol-1-yl)methyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate (S8)

To a stirred solution of 3-nitro-1H-pyrrole (30.0 mg, 0.268 mmol) in DMF (1.5 mL) were added Ethyl 1-(bromomethyl)-pyrazole-3-carboxylate (68.6 mg, 0.294 mmol) and potassium carbonate (74.0 mg, 0.535 mmol). After being stirred at room temperature for 23 h, the reaction was quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub> and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 100:3) to afford the carboxylate **S8** as a colorless solid (55.7 mg, 79%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 4.39 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.18 (s, 2H), 6.71 (dd, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.82 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.25, 61.34, 64.33, 106.81, 110.55, 121.19, 121.30, 130.69, 138.13, 145.64, 161.63.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>, 287.0751; found, 287.0774.

#### 1.4.10. 1-((3-Nitro-1H-pyrrol-1-yl)methyl)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (S9)

To a stirred solution of the carboxylate **S8** (20.0 mg, 0.0757 mmol) in MeOH (1.20 mL) and water (0.40 mL) was added 2M NaOH (57.0 μL, 0.114 mmol). After being stirred at 45°C for 13 hours, the reaction solution was cooled to room temperature. After the reaction was quenched with conc. HCl at pH 3-4, was added ethyl acetate, and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to afford the carboxylic acid **S9** as a colorless solid (17.58 mg, 98%).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.39 (s, 2H), 6.71 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.15 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.20 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 63.19, 105.48, 109.25, 122.77, 123.01, 132.63, 136.66, 145.26, 162.83.  
HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 259.0438; found, 259.0437.

#### 1.4.11. *N*-(4-bromophenyl)-1-((3-nitro-1*H*-pyrrol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5029)

To a stirred solution of the carboxylic acid **S9** (17.58 mg, 0.0744 mmol) in dichloromethane (1.0 mL) were added DIPEA (26.0 μL, 0.149 mmol) and HATU (28.3 mg, 0.0744 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, *p*-bromoaniline (14.1 mg, 0.0820 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 14 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the combined organic layer was washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified with SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20:1). The purified fraction was further subjected to ODS HPLC on COSMOSIL <sub>5</sub>C<sub>18</sub> MS II (φ 20×250 mm) with H<sub>2</sub>O/MeCN (40:60) to afford **KUSC-5029** as a colorless solid (20.2 mg, 69%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 6.49 (s, 2H), 6.70 (s, 1H), 6.86 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 9.57 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz in Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 64.71, 106.43, 108.51, 116.52, 122.63, 122.98, 123.06, 132.47, 133.61, 138.46, 138.91, 149.27, 160.23.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 412.0016; found, 412.0037.

### 1.5. Synthesis of KUSC-5017 and KUSC-5025

#### 1.5.1. Ethyl 1-((4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**S10**)

To a stirred solution of the carboxylate **S1** (150.0 mg, 0.566 mmol) in MeOH (0.72 mL) and THF (0.72 mL) were added (Boc)<sub>2</sub>O (0.13 mL, 0.566 mmol) and 10% Pd/C (39.5 mg). After being stirred at room temperature for 10 h under H<sub>2</sub> atmosphere, the reaction solution was filtered with celite, and the solution was concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20:1) to afford the carboxylate **S10** as a colorless solid (164.9 mg, 87%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 4.39 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.27 (s, 2H), 6.38 (s, 1H), 6.79 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.47, 28.39, 61.31, 66.41, 80.81, 110.26, 120.14, 123.41, 130.85, 132.77, 144.87, 152.92, 162.12.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 358.1486; found, 358.1487.

#### 1.5.2. *tert*-Butyl (1-((3-((4-bromophenyl)carbonyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)carbamate (**S12**)

To a stirred solution of the carboxylate **S10** (50.0 mg, 0.149 mmol) in MeOH (3.0 mL) and water (1.0 mL) was added 2M NaOH (0.45 mL). After being stirred at 45 °C for 1 day, the reaction solution was cooled to room temperature. After the reaction was quenched with conc. HCl at pH 2, added CHCl<sub>3</sub> and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to afford 1-((4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**S11**) as colorless solid (51.1 mg).

To a stirred solution of the carboxylic acid **S11** (51.1 mg, 0.149 mmol) in dichloromethane (2.0 mL) were added DIPEA (52.0 μL, 0.299 mmol) and HATU (56.7 mg, 0.164 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, *p*-bromoaniline (28.2 mg, 0.164 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 30 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the combined organic layer was washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH= 20:1) to afford the carbamate **S12** as a colorless solid (60.0 mg, 87% in 2

steps).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.43 (s, 9H), 6.42 (s, 2H), 6.82 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.97 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.28 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 28.10, 65.09, 78.90, 107.53, 115.33, 119.44, 122.32, 123.27, 131.37, 132.81, 138.10, 147.32, 147.43, 152.69, 159.83.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 485.0751; found, 485.0727.

### 1.5.3. 1-((4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-bromophenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride (KUSC-5017)

A solution of the carbamate **S12** (24.1 mg, 0.0522 mmol) in 4M HCl in 1,4-dioxane (0.52 mL) was stirred at room temperature for 2.7 h, and concentrated in vacuo to afford **KUSC-5017** as a colorless solid (15.06 mg, 73%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.55 (s, 2H), 6.87 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.17 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 10.29 (br, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 65.05, 107.60, 114.41, 115.38, 122.32, 126.01, 131.38, 133.18, 135.32, 138.08, 147.65, 159.74.

HRMS (ESI) *m/z*: [M-HCl+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>6</sub>ONa<sup>+</sup> 383.0226; found, 383.0175.

### 1.5.4. 1-((4-acetamido-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-bromophenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5025)

To a stirred solution of **KUSC-5017** (15.1 mg, 0.0379 mmol) in dichloromethane (0.38 mL) was added Et<sub>3</sub>N (13.2 μL, 0.0950 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, acetyl chloride (12 μL, 0.169 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 20 h. The reaction was then quenched with MeOH, added water and AcOEt, and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified with preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 20:1) to afford **KUSC-5025** as a colorless solid (11.5 mg, 75%).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 2.07 (s, 3H), 6.42 (s, 2H), 6.83 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 22.73, 66.49, 108.57, 117.79, 122.78, 123.34, 124.06, 132.82, 133.48, 133.70, 138.77, 148.86, 162.10, 170.46.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 425.0332; found, 425.0314.

## 1.6. Synthesis of KUSC-5035~KUSC-5040

### 1.6.1. *tert*-Butyl (1-((3-((4-fluorophenyl)carbamoyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)carbamate (S13)

To a stirred solution of the carboxylic acid **S11** (24.1 mg, 0.0785 mmol) in dichloromethane (1.1 mL) at room temperature were added DIPEA (27.0 μL, 0.155 mmol) and HATU (29.9 mg, 0.0786 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, *p*-trifluoromethyl aniline (11.0 μL, 0.0876 mmol) was added, and the mixture was stirred for 23 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub> and the combined organic layers were washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to afford the crude solid **S13**. This crude **S13** was subjected to the next reaction without further purification.

### 1.6.2. 1-((4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride (KUSC-5035)

A solution of the carbamate **S13** (42.2 mg) was dissolved in 4M HCl in 1,4-dioxane (0.94 mL) and stirred at room temperature for 7.3 hours. After the reaction mixture was concentrated in vacuo, the residue was

subjected to ODS HPLC on COSMOSIL  $\mu$ S<sub>18</sub> MS II ( $\phi$ 20 $\times$ 250 mm) with 0.01% TFA in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (70:30) to afford **KUSC-5035** as a colorless solid (22.75 mg, 75% in 2 steps).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  6.53 (s, 2H), 6.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.70 (s, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  66.69, 108.77, 116.56, 121.27, 124.64, 126.78 (q), 127.06, 127.09, 133.92, 136.48, 142.98, 149.07, 162.09.

HRMS (ESI) *m/z*: [M-HCl+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>ONa<sup>+</sup> 373.0995; found, 373.1019.

### 1.6.3. 1-((4-acetamido-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5036)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  2.07 (s, 3H), 6.44 (s, 2H), 6.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.94-96 (m, 3H), 8.25 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  22.72, 66.52, 108.69, 121.29, 122.81, 124.08 (d), 126.83 (t), 127.03 (d), 133.57, 133.74, 143.09, 148.75, 162.29, 170.46

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 415.1101; found, 415.1071.

### 1.6.4. 1-((4-propionamido-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5037)

To a stirred solution of **KUSC-5035** (16.8 mg, 0.0435 mmol) in dichloromethane (0.44 mL) at room temperature was added Et<sub>3</sub>N (7.6  $\mu$ L, 0.0545 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, propionyl chloride (4.2  $\mu$ L, 0.0481 mmol) was added, and the mixture was stirred for 15 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH= 20:1) and the purified fraction was further subjected to ODS HPLC on COSMOSIL  $\mu$ S<sub>18</sub> MS II ( $\phi$ 20 $\times$ 250 mm) H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (50:50) to afford **KUSC-5037** as a colorless solid (8.8 mg, 50% ).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  1.18 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H), 2.34 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 6.45 (s, 2H), 6.86 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.94-96 (m, 3H), 8.26 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  10.25, 30.18, 66.51, 108.69, 121.27, 122.75, 124.11, 124.84, 126., 76 (q), 127.01 (d), 133.55, 133.79, 143.06, 148.73, 126.27, 174.24.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 429.1257; found, 429.1263.

### 1.6.5. 1-((4-butiramido-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5038)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  0.96 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.68 (sextet, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.43 (s, 2H), 6.86 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  13.97, 20.28, 39.01, 66.52, 108.70, 121.28, 122.78, 124.05, 124.66, 126.73 (q), 127.00 (d), 133.55, 133.81, 143.05, 148.74, 162.26, 173.39.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 443.1414; found, 443.1433.

### 1.6.6. 1-((4-(2-phenylacetamido)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5039)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3.56 (s, 2H), 6.46 (s, 2H), 6.85 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.22-24 (m, 1H), 7.28-7.31 (m, 4H), 7.52 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 10.30 (br, 1H), 10.51 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 42.49, 65.10, 107.73, 120.26, 120.77, 122.58, 123.51 (q), 125.34, 125.89, 126.58, 128.36, 129.04, 131.81, 132.98, 135.95, 142.38, 147.18, 160.18, 167.73.  
HRMS (ESI) *m/z*: [M + Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 491.1414; found, 491.1423.

### 1.6.7. 1-((4-isobutyramido-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5040)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 2.56 (septet, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.44 (s, 2H), 6.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.94-96 (m, 3H), 8.25 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 19.85, 36.39, 66.53, 108.70, 121.29, 122.78, 124.15, 124.68, 126.74 (q), 127.02 (d), 133.55, 133.87, 143.07, 148.74, 162.28, 177.43.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 443.1414; found, 443.1434.

## 1.7. Synthesis of KUSC-5046, KUSC-5049, and KUSC-5056

### 1.7.1. Synthesis of KUSC-5046

#### 1.7.1.1. Methyl 3-((4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)benzoate (S17)

To a stirred solution of methyl 3-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)benzoate (100.0 mg, 0.383 mmol) in MeOH (0.85 mL) and THF (0.85 mL) were added (Boc)<sub>2</sub>O (0.10 mL, 0.435 mmol) and 5% Pd / C (53.3 mg). After being stirred at room temperature under hydrogen at atmosphere for 23 h, the mixture was filtered with celite, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (*n*-hexane/ethyl acetate= 1:1) to afford the benzoate **S17** as a colorless solid (96.9 mg, 76%).

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.48 (s, 9H), 3.91 (s, 3H), 5.26 (s, 2H), 7.36 (s, 1H), 7.40-43 (m, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 28.17, 52.27, 54.39, 78.74, 119.63, 122.61, 128.27, 128.43, 129.09, 129.88, 129.93, 132.58, 138.61, 152.76, 166.08.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 354.1425; found, 354.1444.

#### 1.7.1.2. 3-((4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)benzoic acid (S18)

To a stirred solution of the benzoate **S17** (20.5 mg, 0.0618 mmol) in MeOH (1.2 mL) and water (0.4 mL) was added 2 M NaOH (46.0 μL, 0.0920 mmol). After being stirred at 45 °C for 24 h, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at pH 3, and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with AcOEt, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. Then we could obtain the benzoic acid **S18** as a colorless solid (19.2 mg, 98%).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.48 (s, 9H), 5.33 (s, 2H), 7.43-46 (m, 3H), 7.73 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 28.67, 56.26, 80.79, 121.70, 124.31, 129.72, 129.94, 130.25, 131.61, 132.49, 133.01, 138.99, 155.39, 169.36.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>, 340.1268; found, 340.1276.

#### 1.7.1.3. *tert*-Butyl (1-(3-((4-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)benzyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)carbamate (S19)

To a stirred solution of the benzoic acid **S18** (25.0 mg, 0.0788 mmol) in dichloromethane (1.1 mL) were added DIPEA (27.0 μL, 0.155 mmol) and HATU (30.0 mg, 0.0789mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, 4-trifluoromethyl aniline (11.0 μL, 0.0876 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 20 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=100:3) to afford the carbamate **S19** as a colorless solid (16.84 mg, 70%, 2 steps).

<sup>1</sup>H NMR (600MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.46 (s, 9H), 5.32 (s, 2H), 7.40 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 7.47 (t, *J* = 7.8 Hz,

1H), 7.62 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.84 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.89 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  28.66, 56.36, 80.81, 121.67, 121.81 (d), 124.26, 124.82, 126.71 (q), 126.98 (d), 128.09, 128.31, 130.17, 131.73, 132.27, 136.53, 139.01, 143.54, 155.43, 168.59.

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}^+$  483.1614; found, 483.1702.

#### 1.7.1.4. 3-((4-amino-1H-pyrazol-1-yl)methyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide hydrochloride (S20)

A solution of the carbamate **S19** (14.1 mg, 0.0307 mmol) was dissolved in 4 M HCl in 1,4-dioxane (0.6 mL) and stirred at room temperature for 14 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo to afford the compound **S20** as a colorless solid (12.7 mg, quant.).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  5.48 (s, 2H), 7.52 (d,  $J = 2.8$  Hz, 2H), 7.65-67 (d,  $J = 9.0$  Hz, 3H), 7.87 (s, 1H), 7.91 (m, 1H), 7.93 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 8.08 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  56.87, 114.47, 121.69, 124.82, 126.76 (q), 126.99, 127.07, 128.40, 128.44, 130.22, 132.51, 135.20, 136.60, 138.38, 143.50, 168.44.

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_4\text{ONa}^+$  383.1090; found, 383.1101.

#### 1.7.1.5. 3-((4-Propionamido-1H-pyrazol-1-yl)methyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide (KUSC-5046)

To a stirred solution of the compound **S20** (10.0 mg, 0.0252 mmol) in dichloromethane was  $\text{Et}_3\text{N}$  (4.4  $\mu\text{L}$ , 0.0317 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, propionyl chloride (2.4  $\mu\text{L}$ , 0.0275 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 20 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative TLC ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=20:1$ ), and the purified fraction was further subjected to ODS HPLC on COSMOSIL  $\text{C}_{18}$  MS II ( $\varphi 20 \times 250$  mm) with  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (40:60) to afford **KUSC-5046** as a colorless solid (2.87 mg, 27%).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  1.05 (t,  $J = 7.8$  Hz, 3H), 2.23 (q,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 5.37 (s, 2H), 7.42 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.52 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.89 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.99 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 8.02 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 10.61 (s, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9.84, 28.64, 54.57, 120.18, 120.59, 122.13, 123.69, 125.30, 125.95, 126.87, 127.19, 128.67, 130.17, 131.06, 134.76, 138.24, 142.76, 165.86, 170.27

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}^+$  439.1352; found, 439.1374.

### 1.7.2. Synthesis of KUSC-5049

#### 1.7.2.1. Ethyl 5-((4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylate (S21)

To a stirred solution of 4-nitro-1H-pyrazole in THF (4.5 mL) were added ethyl-1-(chloromethyl)furan-2-carboxylate (0.14 mL, 0.909 mmol),  $t\text{BuOK}$  (132.6 mg, 1.18 mmol) and TBAI (33.6 mg, 0.0910 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 16 hours, the reaction was quenched with sat.  $\text{NH}_4\text{HCl}$  aq. and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated in vacuo. The residue was purified by  $\text{SiO}_2$  flash column chromatography (Hexane/Ethyl acetate = 2:1) to afford the carboxylate **S21** (174.32 mg, 72%) as a yellow solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.35 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H), 4.34 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 5.37 (s, 2H), 6.56 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.22 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.21, 49.56, 61.30, 112.45, 118.42, 128.64, 136.15, 136.25, 145.69, 150.51, 158.20.

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{NaO}_5^+$  288.0591; found, 288.0587.

#### 1.7.2.2. Ethyl 5-((4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylate (S22)

To a stirred solution of the carboxylate **21** (100.0 mg, 0.377 mmol) in MeOH (0.84 mL) and THF (0.84 mL) was added (Boc)<sub>2</sub>O (95.0 μL, 0.414 mmol) and 5% Pd/C (52.2 mg). After being stirred at room temperature under H<sub>2</sub> atmosphere for 14 h, the reaction mixture was filtered with celite, and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative TLC (*n*-hexane/AcOEt =1:1) to afford the carboxylate **S22** (54.71 mg, 43%) as a deep red oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.35 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 4.33 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 5.26 (s, 2H), 6.35 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.71 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.43, 28.42, 49.22, 61.20, 110.96, 118.81, 120.40, 131.04, 144.93, 153.10, 153.59, 158.68.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup>, 358.1373; found, 358.1409.

#### 1.7.2.3. 5-((4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylic acid (**S23**)

To a stirred solution of the carboxylate **S22** (21.3 mg, 0.0635 mmol) in MeOH (1.2 mL) and H<sub>2</sub>O (0.4 mL) was added 2 M NaOH (48.0 μL, 0.0960 mmol) at room temperature. After being stirred at 45 °C for 19 h, the reaction solution was cooled to room temperature. The reaction mixture was acidified with 1 M HCl at pH 2, and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to afford the crude carboxylic acid **S23** as colorless solid (20.0 mg). The crude **S23** was used further purification.

#### 1.7.2.4. *tert*-butyl (1-((5-((4-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)furan-2-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)carbamate (**S24**)

To a stirred solution of the crude carboxylic acid **S23** (20.0 mg, 0.0650 mmol) in dichloromethane (0.88 mL) were added DIPEA (23.0 μL, 0.132 mmol) and HATU (24.7 mg, 0.0650 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, 4-trifluoromethyl aniline (9.0 μL, 0.0717 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 15 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layers were washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 100:3) to afford the carbamate **S24** as a colorless solid (20.8 mg, 71% in 2 steps).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.49 (s, 9H), 5.26 (s, 2H), 6.44 (br, 1H), 6.50 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H), 8.36 (br, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 28.27, 48.87, 80.72, 112.13, 116.80, 119.69, 120.33, 122.38, 123.14, 126.26, 126.52, 130.70, 140.40, 147.49, 151.43, 153.03, 155.82.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 473.1407; found, 473.1430.

#### 1.7.2.5. 5-((4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)furan-2-carboxamide hydrochloride (**S25**)

A solution of the carbamate **S24** (20.8 mg, 0.0461 mmol) was dissolved in 4 M HCl in 1,4-dioxane (0.46 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. The reaction solution was then concentrated in vacuo to afford the compound **S25** (17.0 mg, 95 %)

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 5.52 (s, 2H), 6.67 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.12 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 49.85, 113.04, 114.63, 117.46, 121.59, 123.00, 124.79, 126.65, 127.05, 135.46, 142.88, 148.95, 153.50, 158.47

HRMS (ESI) *m/z*: [M-HCl+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 373.0883; found, 373.0907.

#### 1.7.2.6. 5-((4-propionamido-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)furan-2-carboxamide (**KUSC-5049**)

To a stirred solution of the compound **S25** (17.0 mg, 0.0438 mmol) in dichloromethane (0.44 mL) was added Et<sub>3</sub>N (6.7 μL, 0.0482 mmol). After being stirred at room temperature for 45 minutes, propionyl chloride (4.8 μL, 0.0549 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 21 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 20:1) and the purified fraction was further subjected to ODS HPLC on COSMOSIL <sub>5</sub>C<sub>18</sub> MS II (φ20×250 mm) with H<sub>2</sub>O/MeCN (70:30) to afford **KUSC-5049** as a colorless solid (7.92 mg, 44%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 1.18 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 2.34 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.41 (s, 2H), 6.61 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.06 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 10.28, 30.19, 49.52, 112.60, 117.63, 121.62, 122.94, 123.49, 124.64, 127.01(q), 127.15, 132.46, 142.92, 148.85, 154.16, 158.53, 174.20.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 429.1145; found, 429.1145.

### 1.7.3. Synthesis of KUSC-5056

#### S1.3.1. 1-((4-((2-Nitrophenyl)sulfonamido)-1H-pyrazol-1-yl)methyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (SS1)

To a stirred solution of **KUSC-5035** (9.5 mg, 0.0246 mmol) in dichloromethane (0.12 mL) was added triethylamine (17.1 μL, 0.123 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 25 minutes, 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (5.5 mg, 0.0248 mmol) was added, and the mixture was stirred for 13 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20:1) to afford the carboxamide **SS1** as a colorless solid (6.12 mg, 47%).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.32 (s, 2H), 6.94 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.55-63 (m, 4H), 7.72-79 (m, 5H), 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H), 8.32 (dd, *J* = 6.0, 1.5 Hz, 2H), 8.78 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 66.23, 108.75, 119.42, 119.71, 123.31, 125.11, 125.52, 126.13, 126.54, 131.81, 131.90, 132.20, 132.77, 134.35, 137.23, 140.75, 147.99, 148.21, 159.35.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>SNa<sup>+</sup> 558.0778; found, 558.0786.

#### S1.3.2. 1-((4-(propylamino)-1H-pyrazol-1-yl)methyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5056)

To a stirred solution of the carboxamide **SS1** (6.12 mg, 0.0114 mmol) in DMF (0.11 mL) were added potassium carbonate (5.1 mg, 0.0369 mmol), propyl iodide (1.67 μL, 0.0171 mmol), and TBAI (1.0 mg, 0.00271 mmol) at room temperature. After being stirred at 40 °C for 13 h, the reaction mixture was cooled to room temperature, and 0.1 M PhSH in DMF (0.29 mL, 0.029 mmol) was added. After being stirred for 2.3 h at room temperature, the reaction was quenched with water added CHCl<sub>3</sub>, and the layers were separated. The aqueous layers were extracted with CHCl<sub>3</sub> and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 20:1) and the purified fraction was further subjected to ODS HPLC on COSMOSIL <sub>5</sub>C<sub>18</sub> MS II (φ20×250 mm) H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (65:35) to afford **KUSC-5056** as a colorless solid (2.02 mg, 46%).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.59 (septet, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.34 (s, 2H), 6.85 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.89 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 11.89, 23.54, 50.79, 66.53, 108.58, 117.40, 121.24, 124.86, 126.65 (q), 126.95 (d), 132.87, 133.28, 136.81, 143.10, 148.49, 162.35

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>ONa<sup>+</sup> 415.1465; found, 415.1481.

## 1.8. Synthesis of KUSC-5054 and KUSC-5051



**1.8.1. 1-((4-(3-(5,5-difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-2-yl)propanamido)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5054)**

To a stirred solution of **KUSC-5035** (6.0 mg, 0.0155 mmol) in DMF (0.13 mL) were added DIPEA (4.5  $\mu$ L, 0.0258 mmol) and BODIPY FL NHS ester (5.0 mg, 0.0128 mmol) in DMF (0.13 mL). After being stirred at room temperature for 22 h, the reaction solution was concentrated in vacuo. The residue was subjected to ODS HPLC on COSMOSIL  $_5C_{18}$  MS II ( $\phi 20 \times 250$  mm) with H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (35:65) to afford **KUSC-5054** as a brown solid (3.63 mg, 45%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  2.27 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.75 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 4.60 (br, 1H), 5.49 (br, 1H), 6.20 (s, 1H), 6.31 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.44 (s, 2H), 6.86 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.94-95 (m, 3H), 8.28 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  11.16, 14.85, 25.41, 36.06, 66.53, 108.70, 117.51, 121.30, 122.92, 123.99, 124.68, 125.78, 126.78 (q), 127.02 (d), 129.55, 133.59, 133.88, 124.87, 136.56, 143.07, 145.90, 148.74, 158.23, 161.45, 162.29, 171.88.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>BF<sub>5</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>, 647.2084; found, 647.2071.

**1.8.3. 2-(3-(Pent-4-yn-1-yl)-3*H*-diazirin-3-yl)ethan-1-cyanide (S15)**

To a stirred solution of the iodide **S14** (17.38mg, 0.0663 mmol) in DMF (0.83 mL) was added KCN (8.7 mg, 0.132 mmol). After being stirred at 70 °C for 22 h, the reaction solution was cooled to room temperature. The reaction solution was diluted with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated in vacuo. The crude cyanide **S15** was afforded to the next reaction.

**1.8.4. 3-(3-(pent-4-yn-1-yl)-3*H*-diazirin-3-yl)propanoic acid (S16)**

To a solution of the crude cyanide **S15** (9.77mg) was added 10%NaOH (1.1 mL). After stirred reflux for 15 h, the reaction solution was cooled to room temperature, acidified with 1M HCl at pH 2, extracted with ethyl acetate, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The crude carboxylic acid **S16** was used without purification.

**1.8.5. 1-((4-(3-(3-(pent-4-yn-1-yl)-3*H*-diazirin-3-yl)propanamido)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5051)**

To a stirred solution of the crude carboxylic acid **S16** (10.6 mg, 0.0588 mmol) in dichloromethane (0.79 mL) were added DIPEA (41.0  $\mu$ L, 0.235 mmol) and HATU (22.4 mg, 0.0589 mmol). After being stirred at room temperature for 30 minutes, **KUSC-5035** (22.75 mg, 0.0598 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 13 h. The reaction was then quenched with water and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the combined organic layers were washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was purified by SiO<sub>2</sub> flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20:1), and the purified fraction was further subjected to ODS HPLC on COSMOSIL  $_5C_{18}$  MS II ( $\phi 20 \times 250$  mm) with H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (45:55) to afford the **KUSC-5051** as a brown solid (4.54 mg, 15%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.32 (pentet, *J* = 8.0Hz, 2H), 1.55 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 1.88 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.93 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.15 (td, *J* = 7.0, 2.0Hz, 2H), 6.25 (s, 2H), 6.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 2.0Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.27 (s, 1H), 8.82 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz in CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  17.82, 22.56, 27.87, 28.28, 30.42, 31.65, 66.10, 69.12, 83.23, 108.55, 119.33, 122.14, 122.99, 125.47, 126.29, 131.89, 132.28, 140.75, 147.60, 159.35, 168.48.

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>, 535.1788; found, 535.1769.

## 1.9. Physico-chemical Properties of KUSC-5016, 5018, 5024, 5032, 5033, 5043, 5047, 5048, 5050, 5052, and 5055

### 1.9.1. *N*-(4-bromophenyl)-1-(2-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)ethyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (KUSC-5016)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 4.63 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.98 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.53-55 (m, 3H), 7.66 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 8.13 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 10.27 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 50.38, 52.71, 108.67, 115.82, 122.39, 130.96, 131.48, 134.88, 135.33, 135.60, 137.70, 138.14, 157.78

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 427.0125, found, 427.0166.

### 1.9.2. *N*-(4-bromophenyl)-1-(3-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)propyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5018)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.54 (quintet, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.14 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.22 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 6.91 (s, 1H), 7.46-50 (m, 3H), 7.61 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.12 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.63 (br, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 30.30, 49.13, 49.94, 107.67, 116.76, 121.21, 121.30, 129.19, 132.16, 135.99, 136.34, 136.92, 147.14, 159.45

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 443.0261, found, 443.0248.

### 1.9.3. *N*-(4-bromophenyl)-1-(2-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)ethyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5024)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 4.79-84 (m, 4H), 6.71 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 8.15 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 9.39 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 52.28, 53.34, 107.41, 116.28, 122.38, 131.28, 132.47, 133.75, 136.48, 136.64, 139.06, 148.10, 160.46

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 429.0105, found, 429.0087.

### 1.9.4. *N*-(4-bromophenyl)-1-((4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (KUSC-5032)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.85 (s, 2H), 7.16 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.28 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 10.53 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 63.85, 109.79, 116.14, 122.53, 131.19, 131.62, 135.26, 136.03, 136.37, 137.52, 139.89, 157.68

HRMS (ESI) *m/z*: [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, 390.9982, found, 391.0004.

### 1.9.5. *N*-(4-bromophenyl)-1-((4-chloro-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5033)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 6.49 (s, 2H), 6.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 9.54 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>): δ 66.34, 108.32, 111.48, 116.43, 122.58, 129.23, 132.44, 133.60, 138.99, 139.69, 148.91, 160.31

HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>BrClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 401.9728, found, 401.9743.

### 1.9.6. 1-((3-propionamido-1*H*-pyrrol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5043)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.17 (t, *J* = 7.8 Hz, 3H), 2.30 (q, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.05-06 (m, 1H), 6.22 (s, 2H), 6.86 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.87 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 1.8 Hz), 7.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 10.52, 30.33, 65.03, 103.67, 108.63, 112.44, 120.37, 121.45, 124.86, 125.61, 126.68, 126.99, 132.91, 143.03, 148.25, 162.48, 173.90

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>, 428.1305, found, 428.1259 (error 10.7 ppm)

### 1.9.7. 1-((3-propionamido-1*H*-pyrrol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5047)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.17 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 2.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.05-06 (m, 1H), 6.20 (s, 2H), 6.84 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.86 (t, *J* = 2.0 Hz), 7.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.36 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 10.50, 30.32, 65.02, 103.68, 108.52, 112.45, 120.37, 120.97, 122.59, 123.14, 125.60, 132.83, 138.50, 146.56, 148.33, 162.37, 173.91

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 444.1254, found, 444.1246.

### 1.9.8. 1-((5-methyl-3-propionamido-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5048)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.16 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 2.36 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 6.33 (s, 2H), 6.40 (s, 1H), 6.87 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.89 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 10.07, 11.19, 30.36, 63.58, 100.34, 108.58, 121.40, 124.53, 126.86, 127.04, 133.38, 142.31, 142.99, 148.41, 149.04, 162.36, 174.91

HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>, 443.1414, found, 443.1420.

### 1.9.9. 1-((4-(ethylsulfonamido)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5050)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.02 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.44 (s, 2H), 6.87 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.94-96 (m, 4H)

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 8.41, 45.74, 66.56, 108.72, 121.27, 122.85, 124.85, 125.64, 126.70, 127.03, 133.68, 136.85, 143.06, 148.84, 162.22

HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S, 443.1108, found, 443.1139.

### 1.9.10. 1-((3-methyl-4-propionamido-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5052)

A colorless solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.23 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 2.39 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.90 (s, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.90 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 9.85, 11.19, 29.92, 66.01, 108.53, 119.52, 120.21, 122.86, 123.23, 125.83, 126.39, 131.95, 140.71, 140.99, 147.67, 159.66, 171.30

HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>, 443.1414, found, 443.1428.

### 1.9.11. 1-((4-(ethylcarbamoyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (KUSC-5055)

A colorless solid.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  1.17 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 3.33 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.64 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.94 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.99 (d,  $J = 2.4$  Hz), 8.37 (s, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  14.90, 35.28, 66.41, 108.82, 121.00, 121.30, 124.83, 126.80, 127.03, 133.37, 133.90, 141.21, 143.02, 149.06, 162.15, 164.36

HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}^+$ , 429.1258, found, 429.1289.

## 2. Biology

### 2.1. Reagents and antibodies

Mito Tracker Red CMXRos and Hoechst 33342 were purchased from Cell Signaling Technology and Nacalai Tesque, respectively. The antibodies used in this study are as follows: anti-human HIF-1 $\alpha$  mouse monoclonal antibody (54/HIF-1 $\alpha$ , BD Transduction Laboratories), anti- $\alpha$ -tubulin mouse monoclonal antibody (B-5-1-2, Sigma), anti-human ATP5B rabbit polyclonal antibody (Proteintech), alkaline phosphatase or horseradish peroxidase conjugated-secondary antibodies (Promega).

### 2.2. Cell-based HRE-driven luciferase reporter gene assay

HeLa/HRE/Luc cells, stably transfected with a luciferase gene driven by the hypoxia-responsive element, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum.<sup>8,11</sup> For the reporter assay, the cells ( $6.0 \times 10^3$ ) were seeded in 96-well plates (100  $\mu\text{L}$ ) and cultured for 48 h. After 48 h incubation, the cells were treated with test compounds and incubated for 1 h under normoxic conditions prior to the exposure to hypoxic conditions (1%  $\text{O}_2$ ). After further 24 h-incubation under hypoxic conditions, the cells were washed with PBS(-) and lysed in 30  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100). Twenty  $\mu\text{L}$  of the cell lysate was employed for the luciferin-luciferase assay (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.125 mM D-luciferin, 0.5 mM ATP, and 0.5 mM coenzyme A). Epiluminescence was measured using an EnVision luminometer (Perkin Elmer). Luciferase activity was determined in triplicate and showed as a relative activity normalized with protein concentration.

### 2.3. RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from HeLa S3 cells by using Total RNA Extraction kit (Viogene). The RNA (1.5  $\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed by random hexamer (ReverTra Ace with gDNA remover, TOYOBO). Quantitative real-time PCR analysis was carried out StepOne PCR Real Time System (Thermo Fisher Scientific) employing with SYBR Select. Master Mix. Primers used for PCR were as follows: human  $\beta$ -actin, 5'-CTCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC-3' (sense) and 5'-TGCGGATGTCCACGTCACA-3' (antisense); human HIF-1 $\alpha$ , 5'-TACTAGCTTTGCAGAATGCTC-3'(sense) and 5'-GCCTTGATAGGAGCATTAAC-3' (antisense); human HIF-1 $\beta$ , 5'-GGGGGCAGCTTACCTCTAAC-3' (sense) and 5'-GGGTAGAGGCACTCGAACTG-3' (antisense); human CA9, 5'-ACCCTCTCTGACACCCTGTG-3' (sense) and 5'-GGCTGGCTTCTCACATTCTC-3' (antisense); human VEGF, 5'-AATGACGAGGGCCTGGAGTGTG-3' (sense) and 5'-ATGTGCTGGCCTTGGTGAGGT-3' (antisense); human 18S rRNA, 5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3'(sense) and 5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3' (antisense). Relative expression level was calculated by the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method, and normalized with 18S rRNA level.

### 2.4. Subcellular localization analysis of KUSC-5054

HeLa S3 cells grown on cover glass were treated with KUSC-5054 (1  $\mu\text{M}$ ), MitoTracker Red CMXRos (100 nM) and Hoechst 33342 (10  $\mu\text{M}$ ). Epifluorescence was observed under IX81 fluorescence microscope (Olympus).

### 2.5. Western blot analysis

MDA-MB-231 cells were treated with KUSC-5037 (0.3, 1, 3  $\mu\text{M}$ ) or camptothecin (0.5  $\mu\text{M}$ ) under the

hypoxia (1% O<sub>2</sub>, 25h) and the cells were lysed in PBS(-) containing 0.5% Triton X-100. Whole cell lysate (20 µg) was subjected to SDS-PAGE followed by blotting onto a PVDF membrane (Pall Life Sciences). The membrane was briefly washed with PBST buffer [PBS(-) containing 0.1% Tween-20] and blocked with blocking buffer (PBST buffer containing 5% dry non-fat milk or 3% BSA). The membrane was incubated with the primary antibody in blocking buffer overnight. After three times wash with PBST, the membrane was incubated with the secondary antibody for 1 h. Bands were visualized with nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate *p*-toluidine salt colorimetric detection system (Nacalai Tesque).

## 2.6. Measurement of oxygen consumption rate (OCR)

OCR was measured by Seahorse XFe96 Flux Analyzer (Agilent Technologies), according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells (80-90% confluency) were equilibrated for 1.5 h in a 37 °C incubator lacking CO<sub>2</sub>. Oxygen concentration in media was measured at basal conditions and after sequential addition of compounds (KUSC-5037 (0.1, 1, and 10 µM), oligomycin (0.5 µM), FCCP (0.5 µM) and a mixture of rotenone (0.5 µM) and antimycin A (0.5 µM)). OCR was determined from at least 6 samples.

## 2.7. In vitro labeling and identification of KUSC-5037/KUSC-5051 binding proteins

HeLa S3 cells were lysed and fractionated by using Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Debris fraction (1 mg/mL), mitochondrial fraction (0.8 mg/mL) and cytosol fraction (0.6 mg/mL) were incubated with DMSO or 300 µM **KUSC-5037** in the absence or presence of 30 µM **KUSC-5051** for 1 h at 37 °C with agitation, followed by 365 nm UV irradiation for 30 min. A biotin moiety was conjugated to the covalent protein-compound complex by click chemistry at RT for 1 h [200 µM biotin azide, 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, Cayman), 100 µM Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl) methyl]amine (TBTA, Tokyo Chemical Industry) and 1 mM CuSO<sub>4</sub>]. After the removal of excess labeling reagents by CHCl<sub>3</sub>-MeOH precipitation,<sup>14</sup> the complexes were enriched on High Capacity NeutrAvidin agarose (Thermo Fisher Scientific) by overnight incubation in PBS(-) containing 0.1% SDS at 4°C. After a series of extensive wash of the beads at 4 °C with [PBS(-)+0.02% SDS/50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/PBS(-)], the assembled proteins were eluted into Laemmli SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE. The gel was used in either western blot analysis employing an anti-human ATP5B antibody or silver stain by using Pierce Silver Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) for the further mass analysis.

## 2.8. Analysis of KUSC-5037/KUSC-5051 binding proteins by LC-MS/MS

The SDS-PAGE separated band was excised and de-stained. The 60 Da protein band shown in Figure 12A was digested with trypsin (TPCK-treated, Worthington Biochemical) for 12 h at 37 °C. The digested mixture was analyzed by nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a Q Exactive HF-X mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled with Easy-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific). The peptides were separated on a nano ESI spray column (75 µm (inner diameter) × 150 mm (length), NTCC analytical column C18, 3 µm (particle diameter), Nikkyo Technos), with a gradient of 0-40% buffer B (80% aqueous acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid) in buffer A (MilliQ water with 0.1% (v/v) formic acid) at a flow rate of 300 nL min<sup>-1</sup> over 10 min. The mass spectrometer was operated in the positive-ion mode for mass spectrometry and tandem mass spectrometry, and the tandem mass spectrometry spectra were acquired using the data-dependent TOP 10 method. The acquired data were processed using Mascot (version 2.7.0, Matrix Science). The MSMS data were used to search the NCBI-nr protein database (20160711, Taxonomy: *H. sapiens* 326,427 sequences), using the following parameters: enzyme = trypsin; maximum missed cleavages = 3; variable modifications = Acetyl (Protein N-term), Gln- > pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M), Propionamide (C); product mass tolerance = ± 15 ppm; product mass tolerance = ± 30 milli mass unit; instrument type = ESI-TRAP. The quantitative data of **KUSC-5037/-5051**-binding protein from LC-MS/MS analysis are shown in Table 9.

### **2.9. ATP hydrolysis activity assay**

ATP hydrolysis activity of bovine F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase was measured by using Mito Check Complex V Activity Assay Kit (Cayman Chemical). Briefly, 10 and 100 nM of **KUSC-5037** was incubated with ATP synthase. The activity during the 2h-incubation at 25°C was monitored by measuring the absorbance at 340 nm which attributed to the consumption of the supplemented NADH. Oligomycin was used as a positive control.

### **2.10. Cell proliferation assay**

HeLa S3 cells, HT1080 cells, and T98G cells (3,000 cells / well) were plated in 96-well plates. After 12 h incubation, the cells were treated with test compounds. The cell viability at 72 h was determined by Cell Counting Kit-8 (Dojindo).

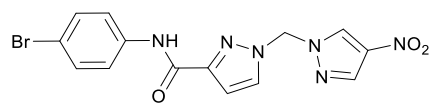
### **3.1. MM2 calculation**

All optimized chemical structures are calculated with MM2 automatic calculation package of Chem 3D. This package allowed us to calculate three-dimensional optimized structures in the water of all compounds. All calculations were conducted in 10-30 minutes.

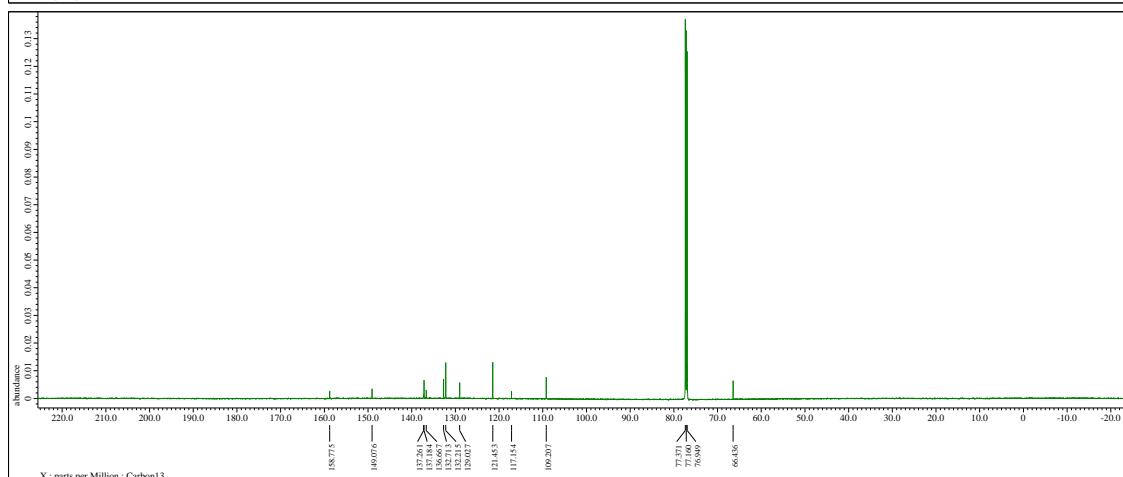
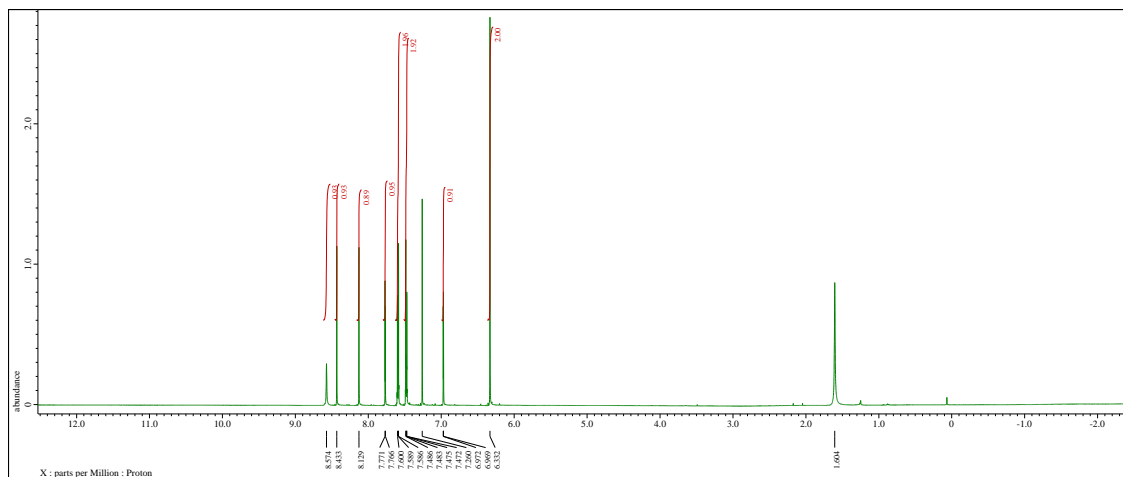
### **3.1. MM3 calculation**

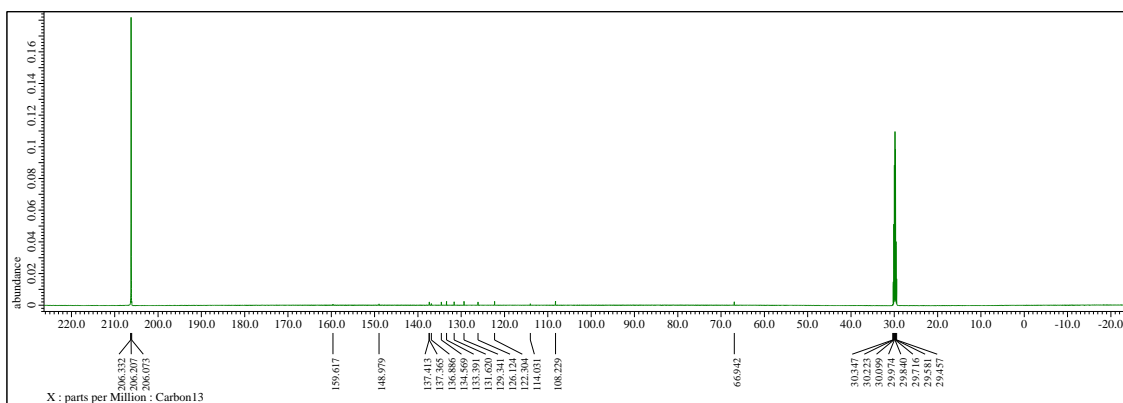
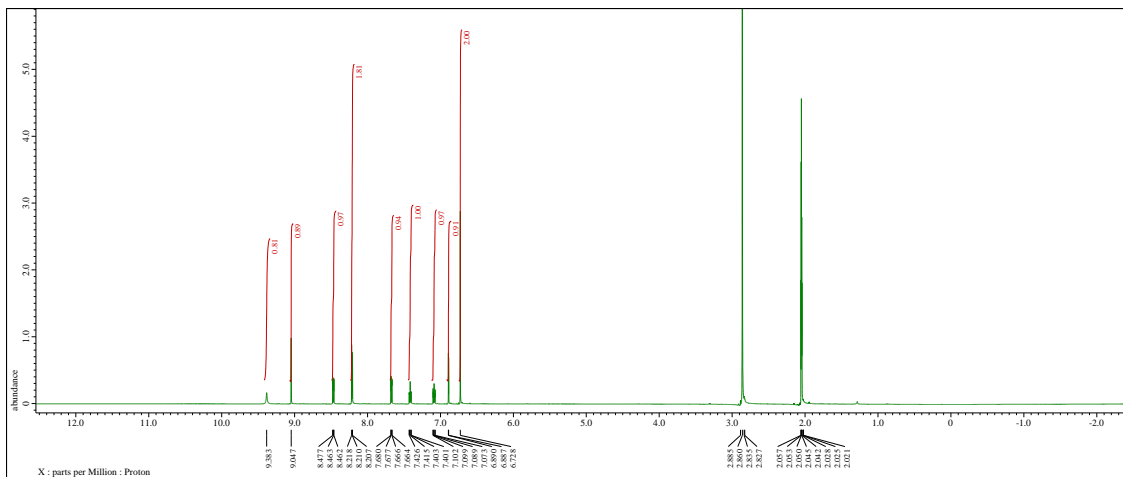
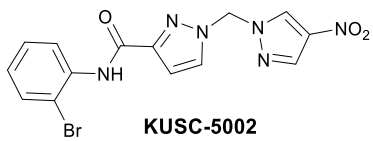
All optimized chemical structures are calculated with MMFF94 automatic calculations step by 4 with Avogadro. All bonds are flexible and all molecules are movable. Moreover, the calculations are not static. Avogadro allowed us to calculate three-dimensional optimized structures. All calculations were conducted in 10-30 minutes.

### 3. Supplementary Information (NMR spectra)

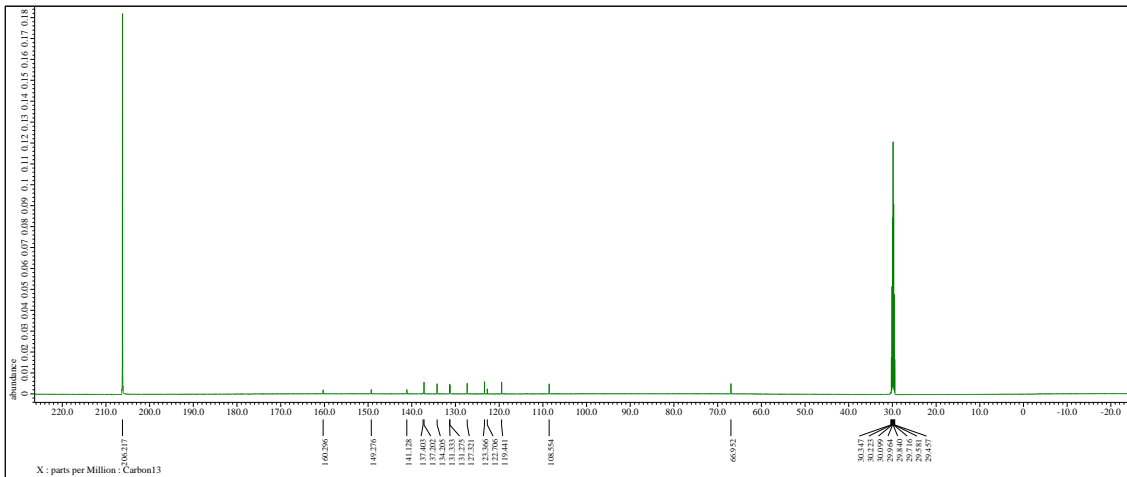
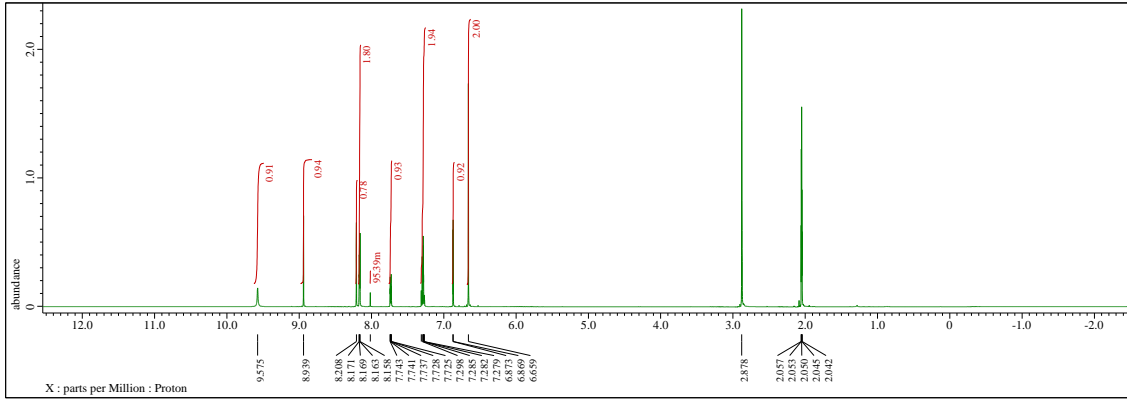
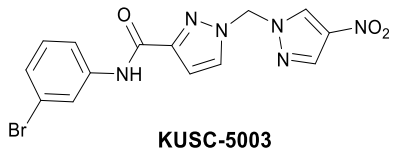


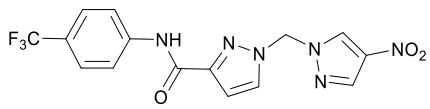
**KUSC-5001**



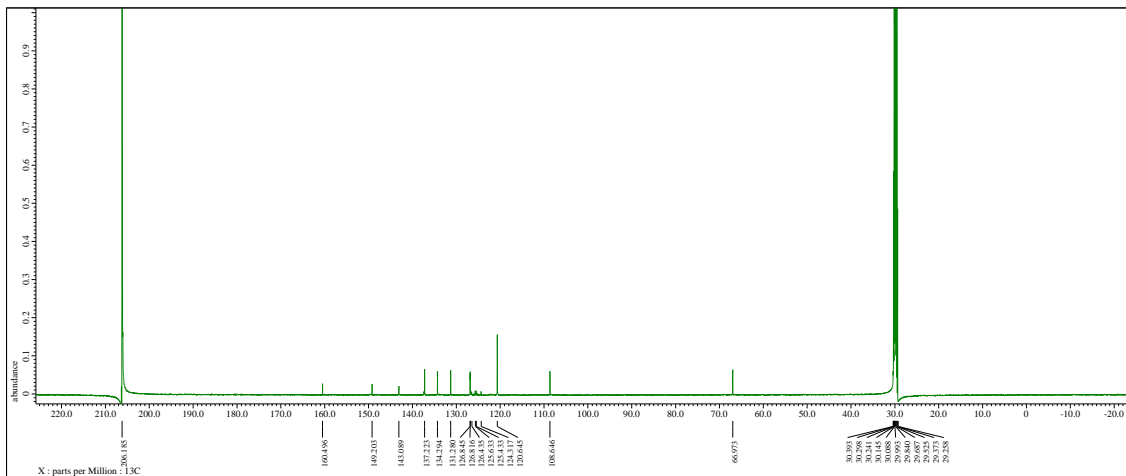
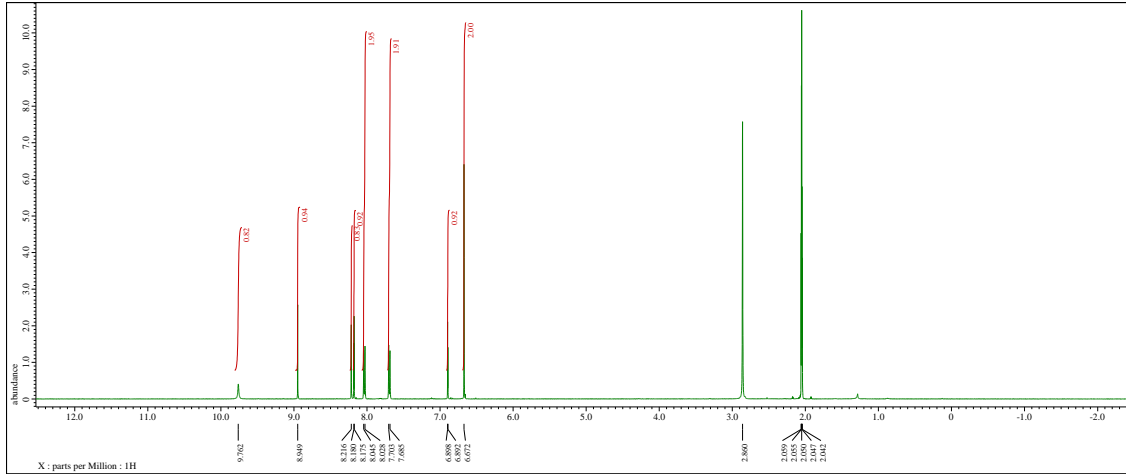




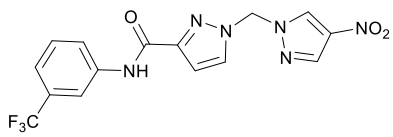




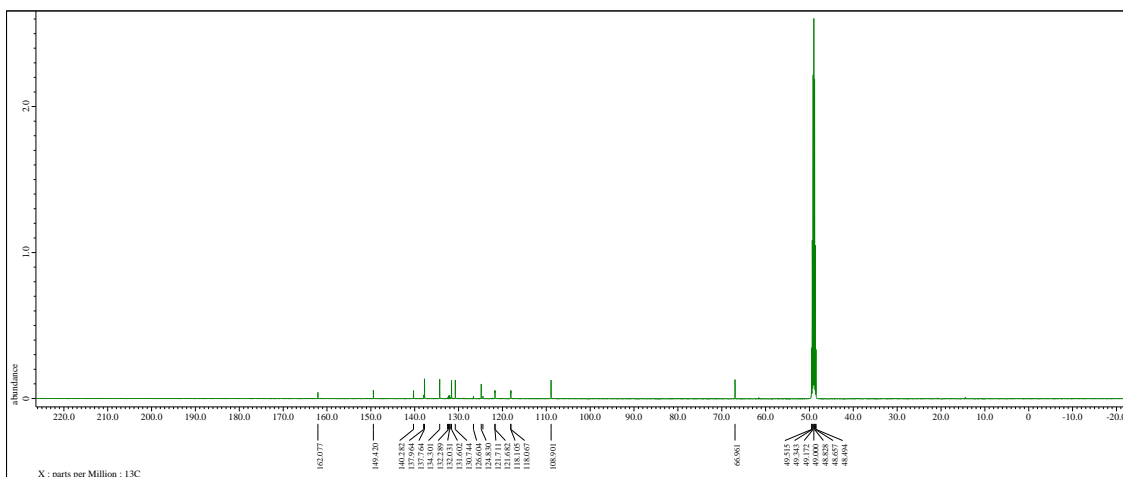
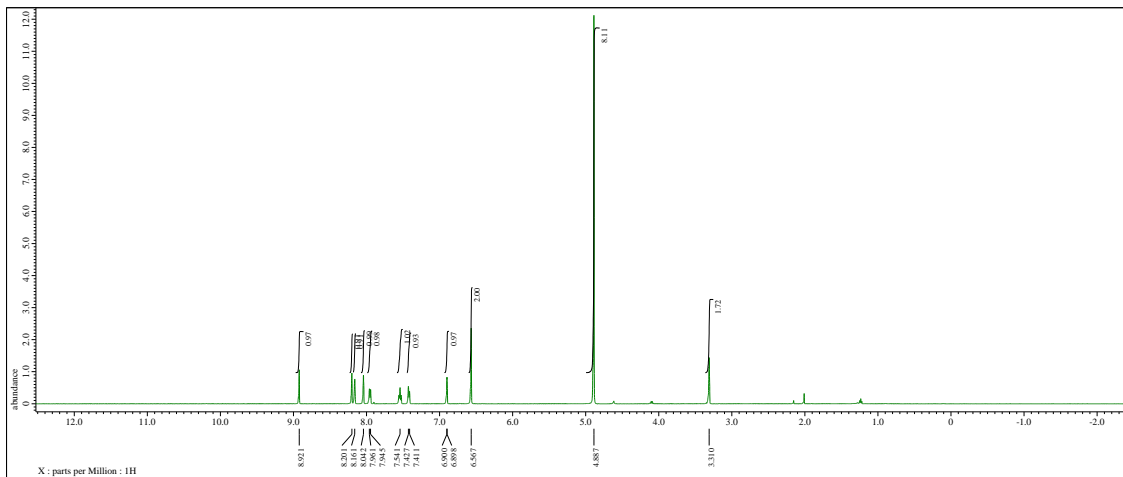
**KUSC-5004**

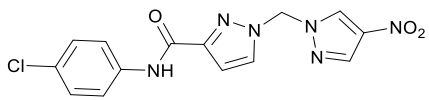




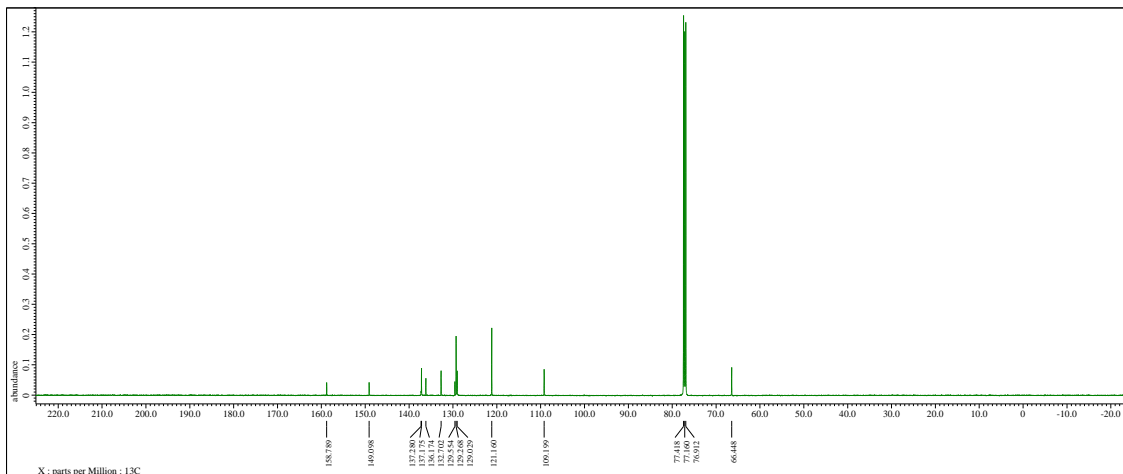
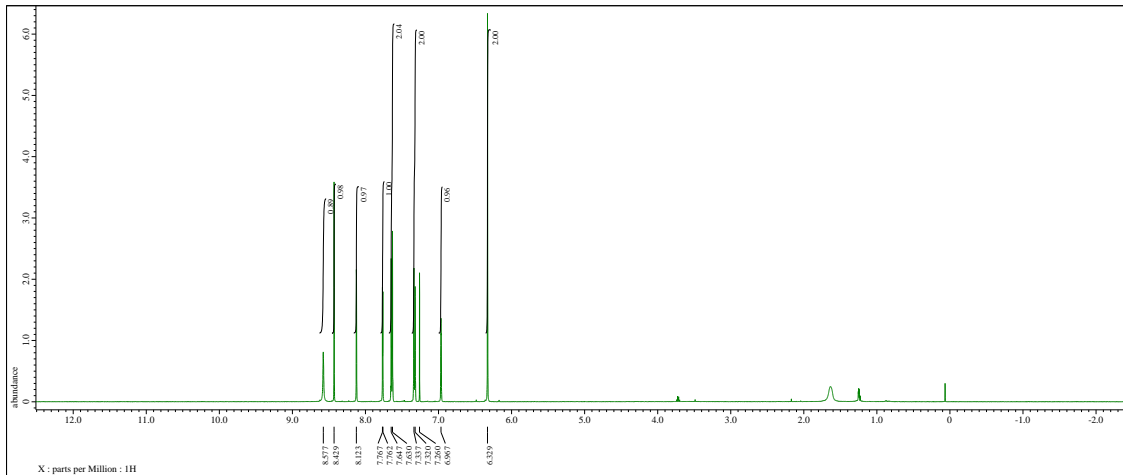


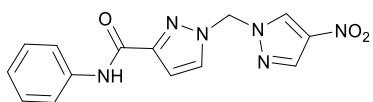
**KUSC-5006**



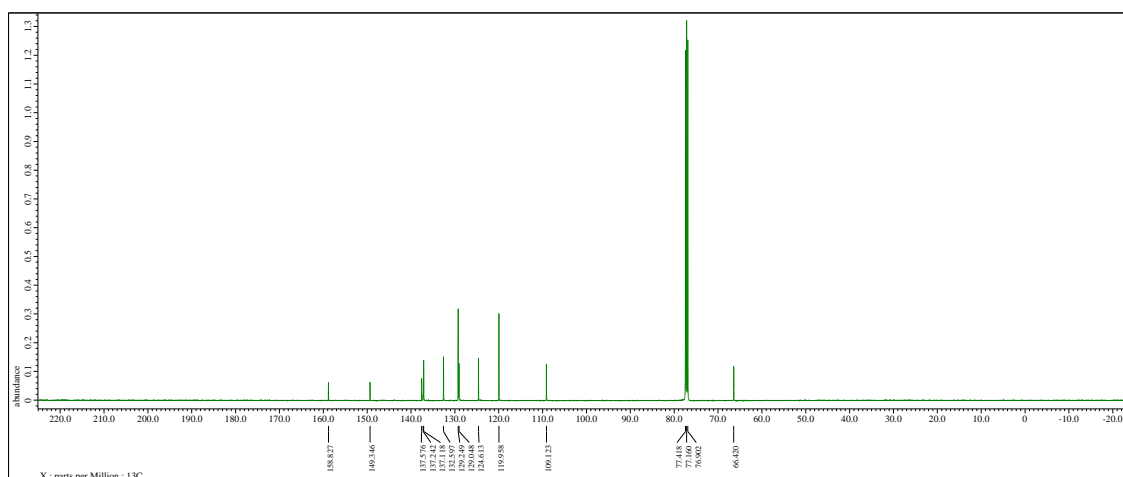
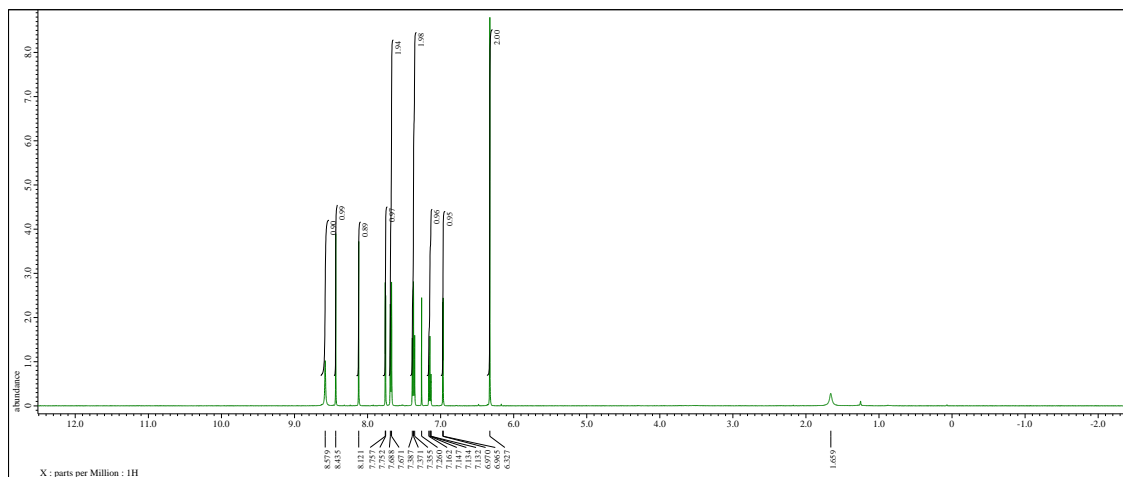


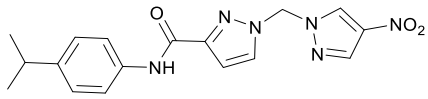
**KUSC-5007**



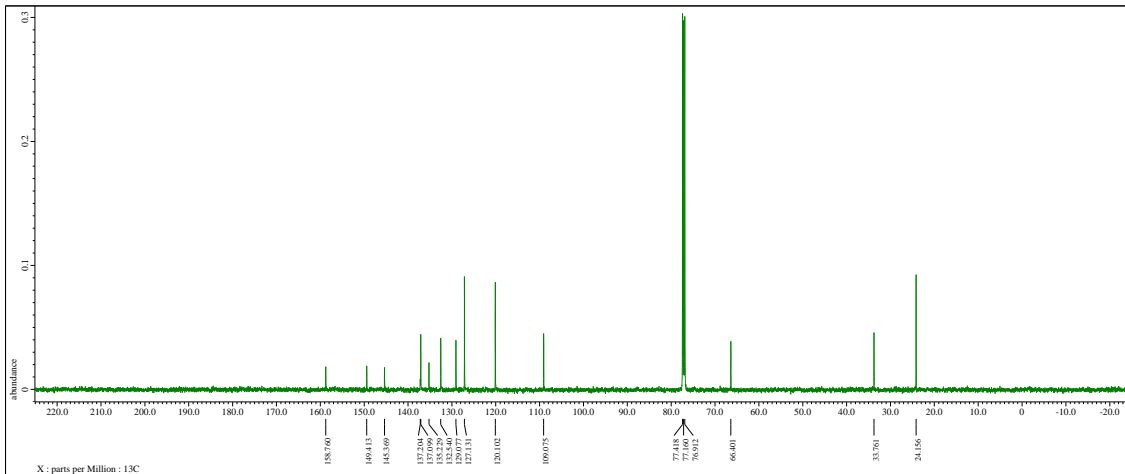
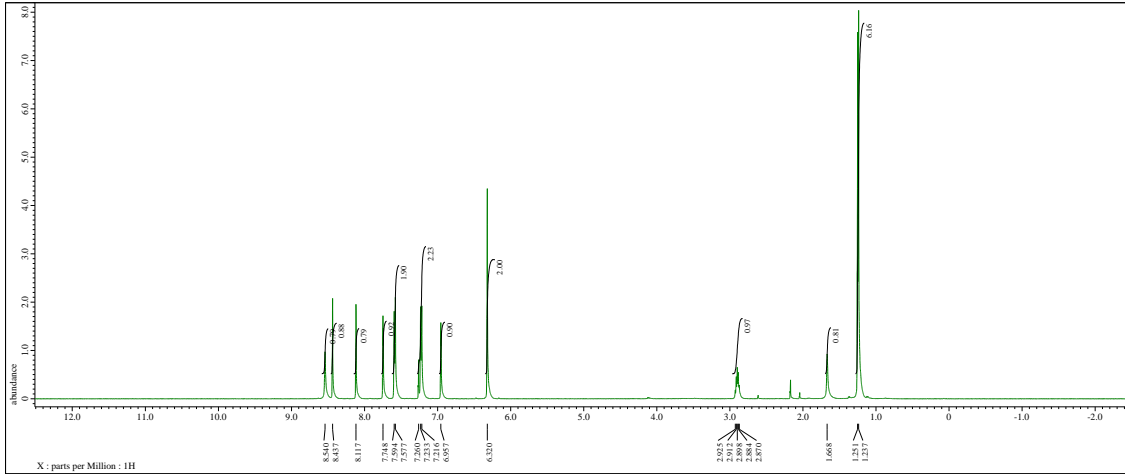


KUSC-5008



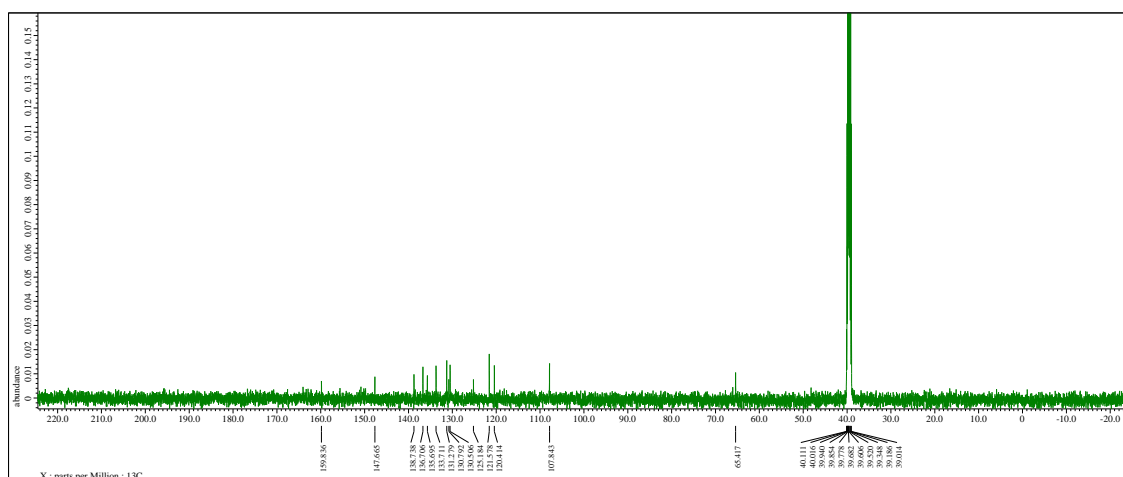
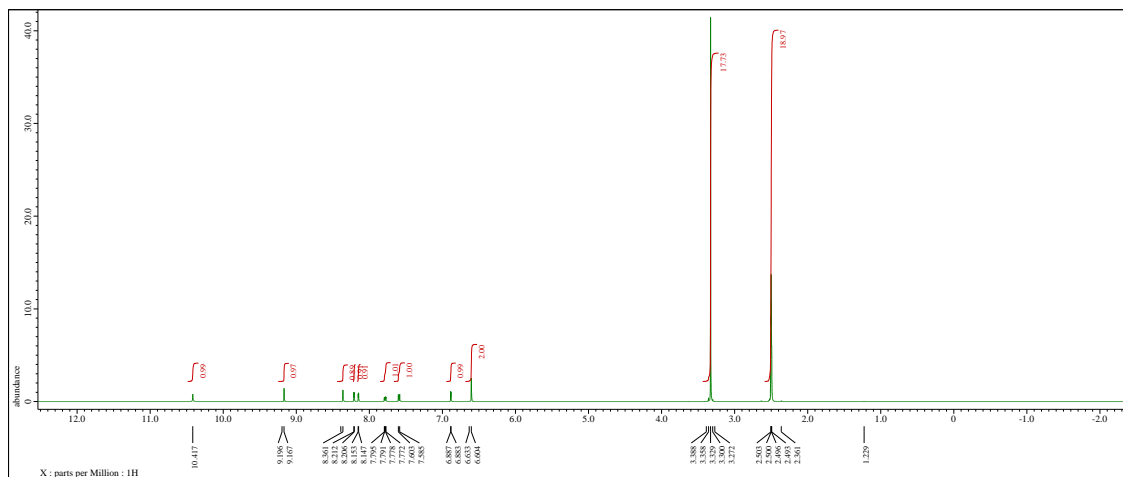
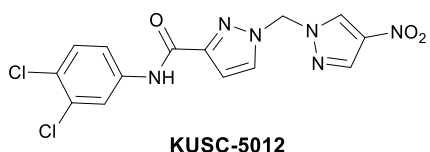


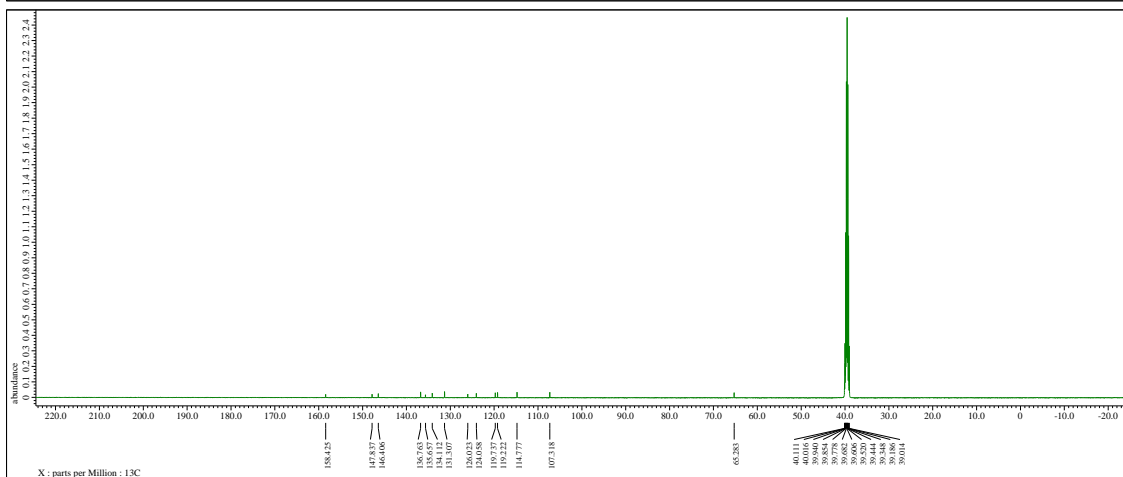
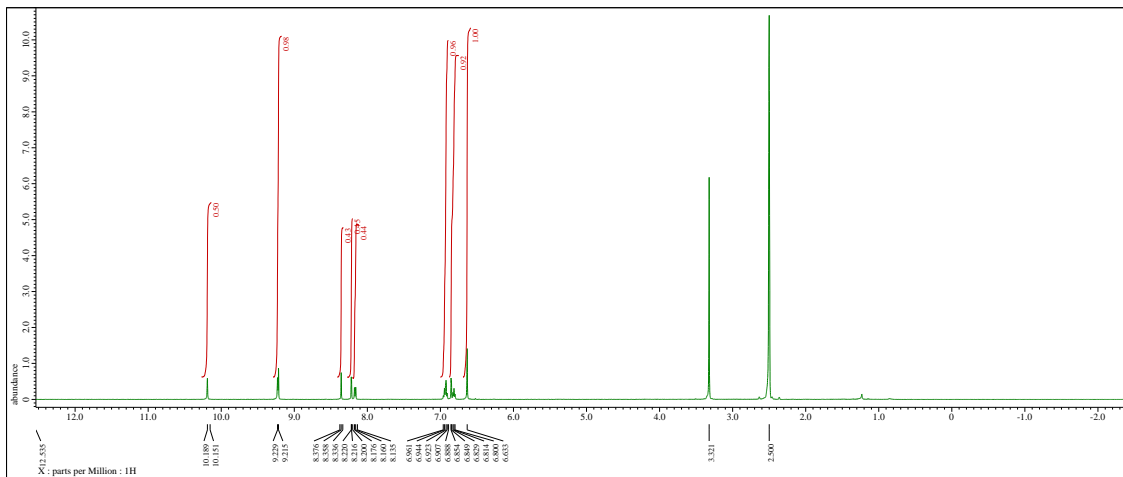
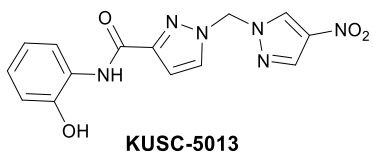
**KUSC-5010**

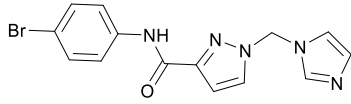




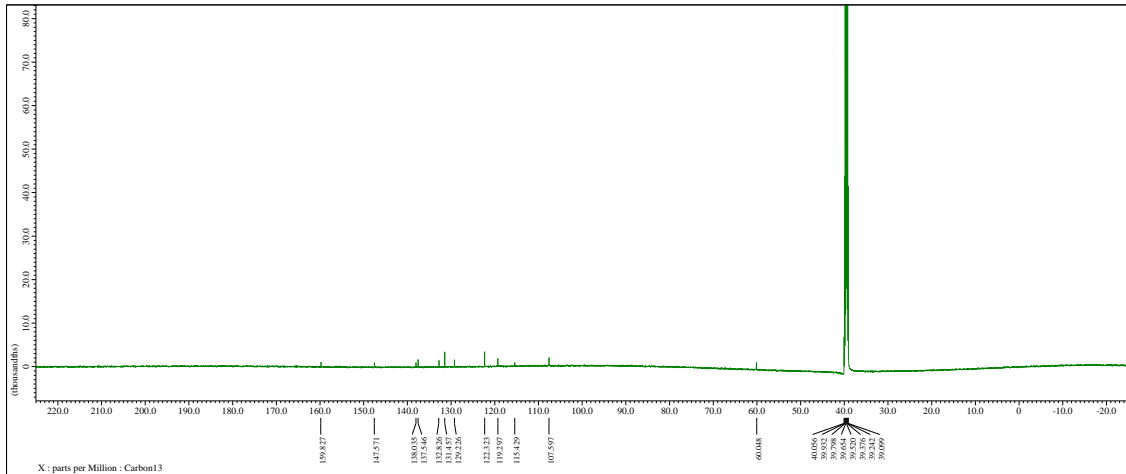
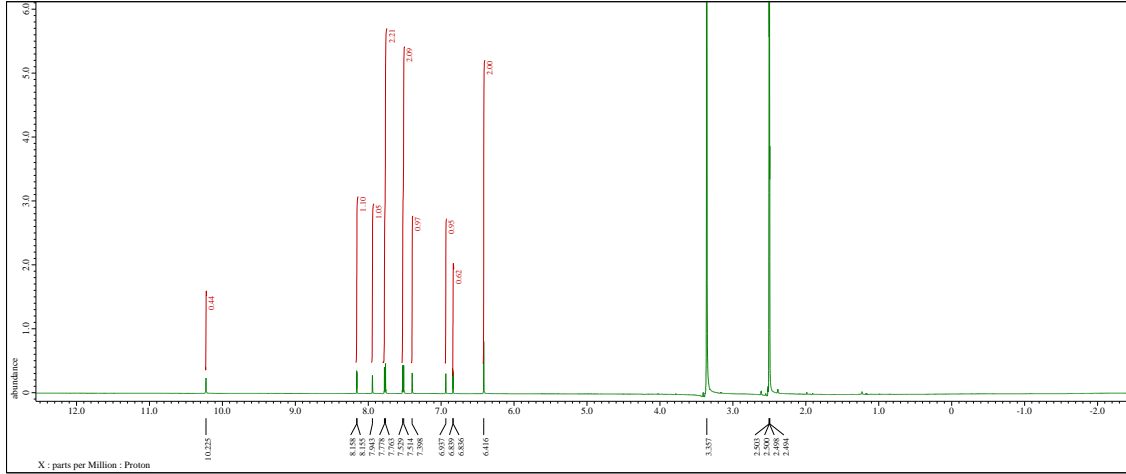


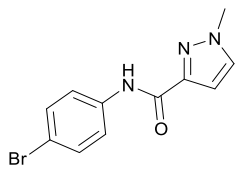




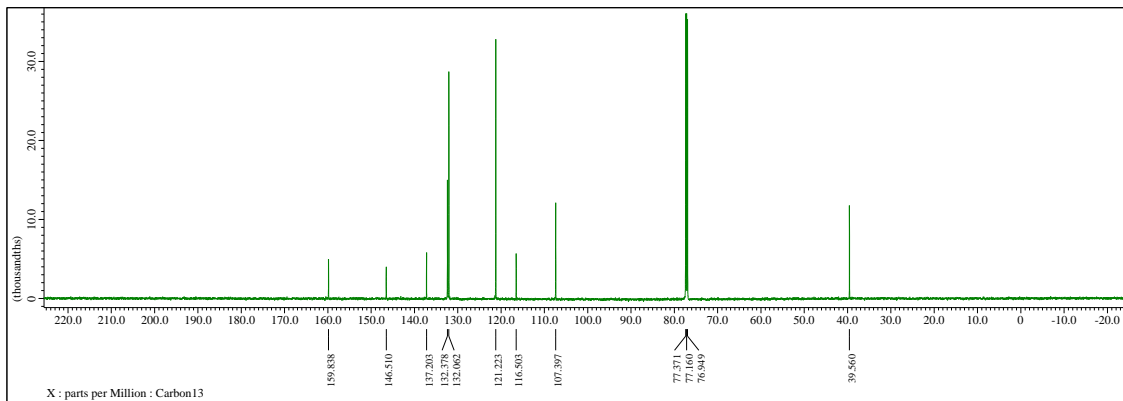
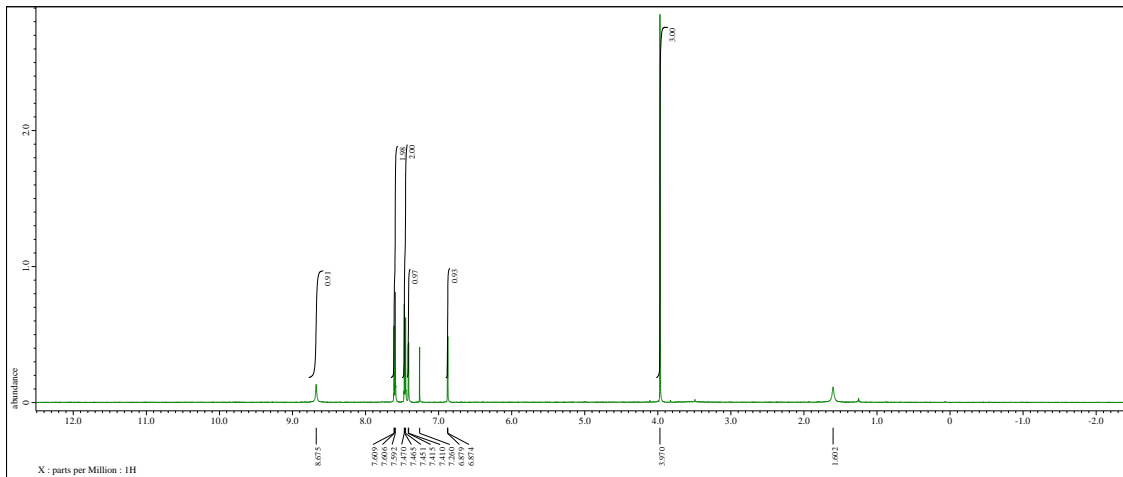


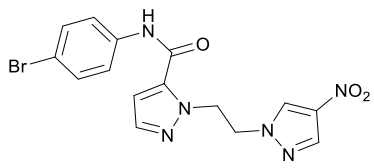
**KUSC-5014**



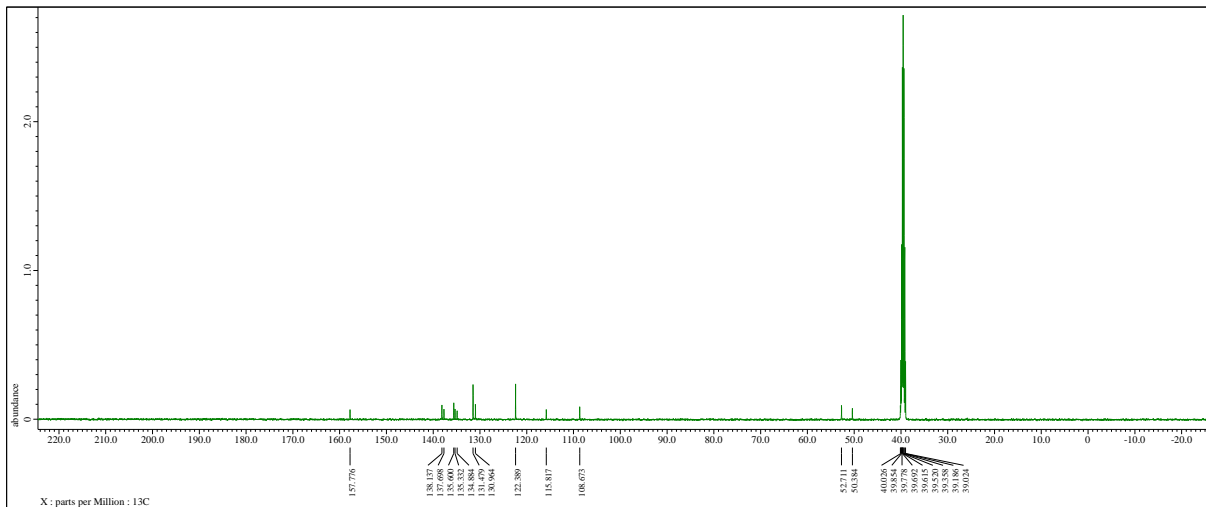
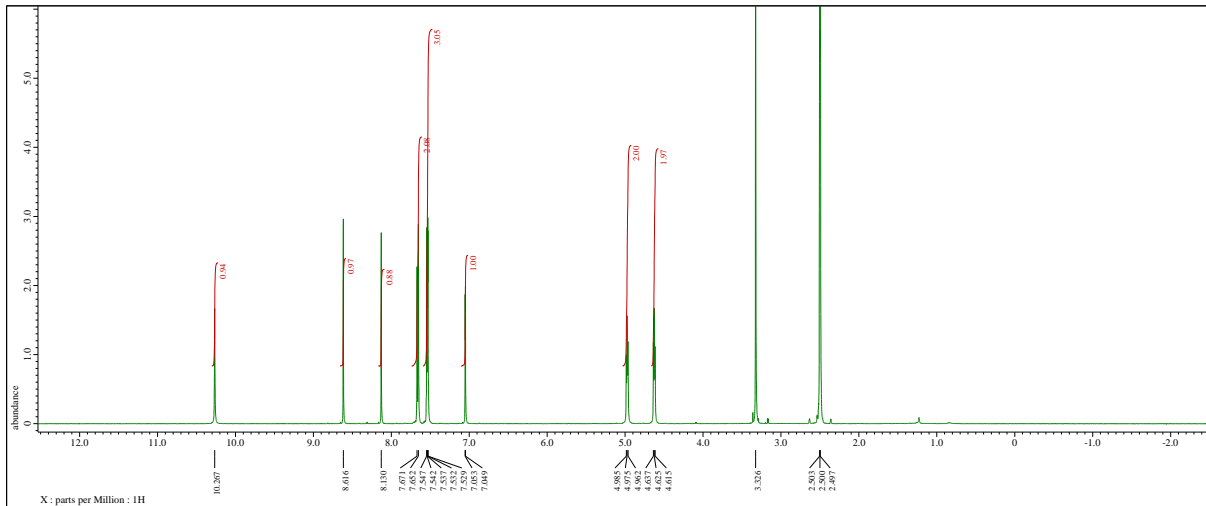


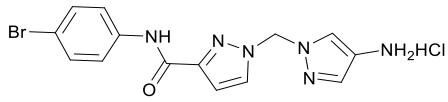
KUSC-5015



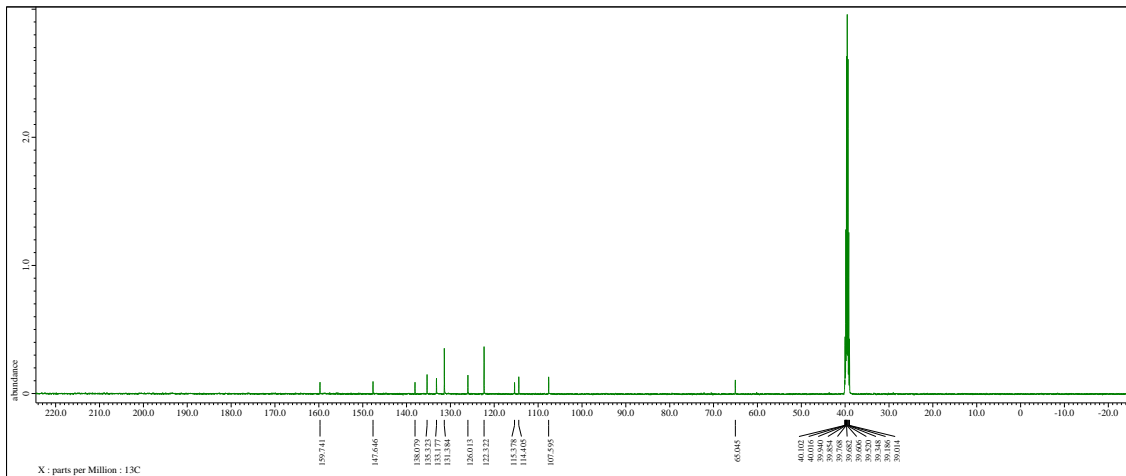
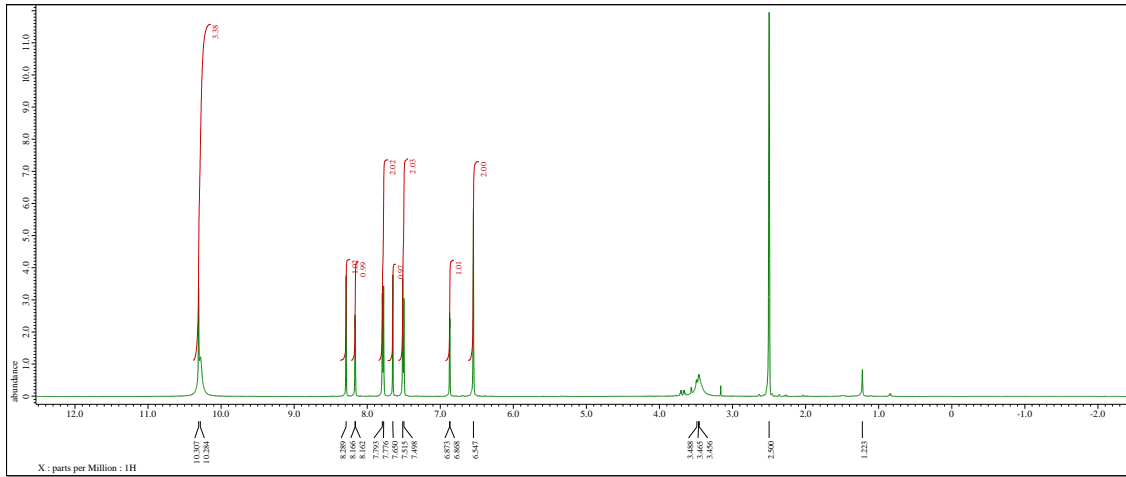


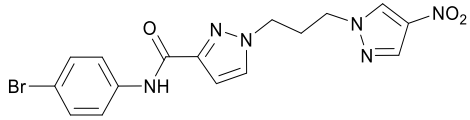
KUSC-5016



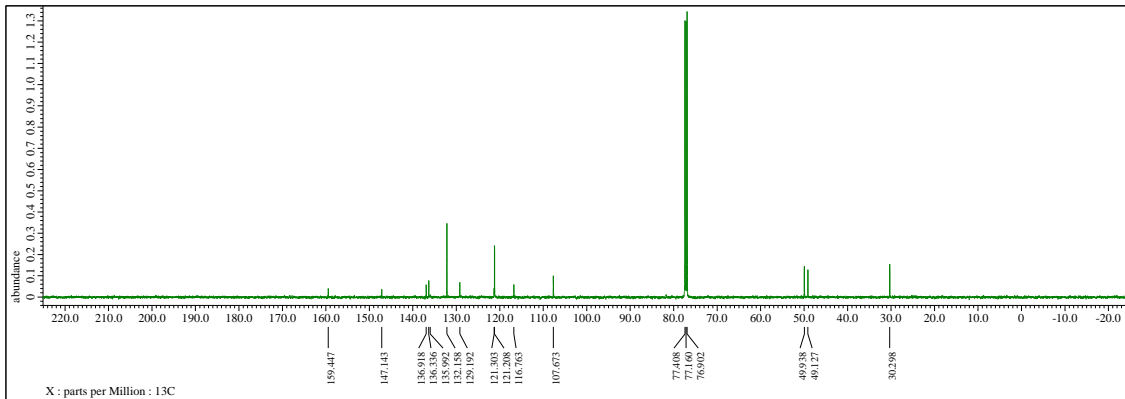
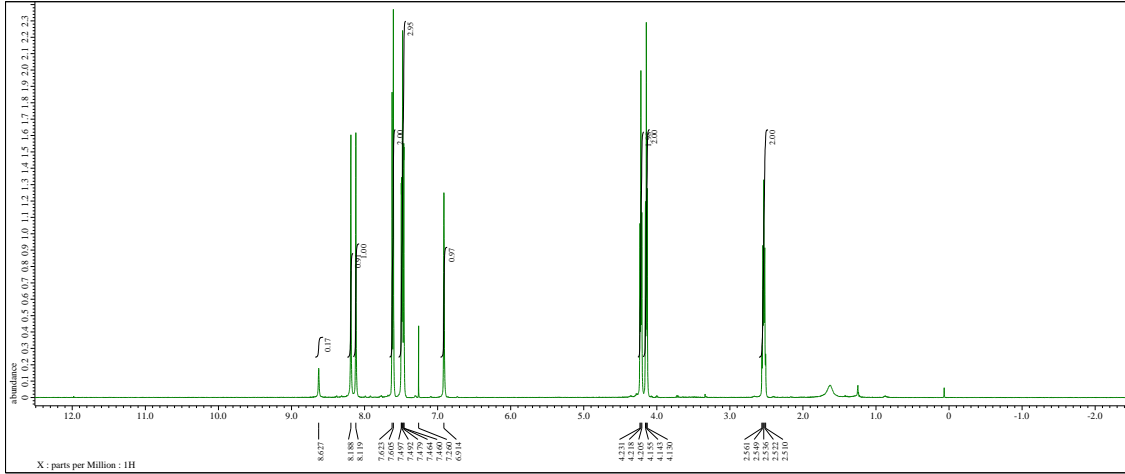


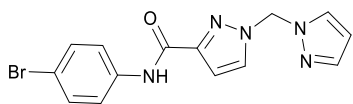
**KUSC-5017**



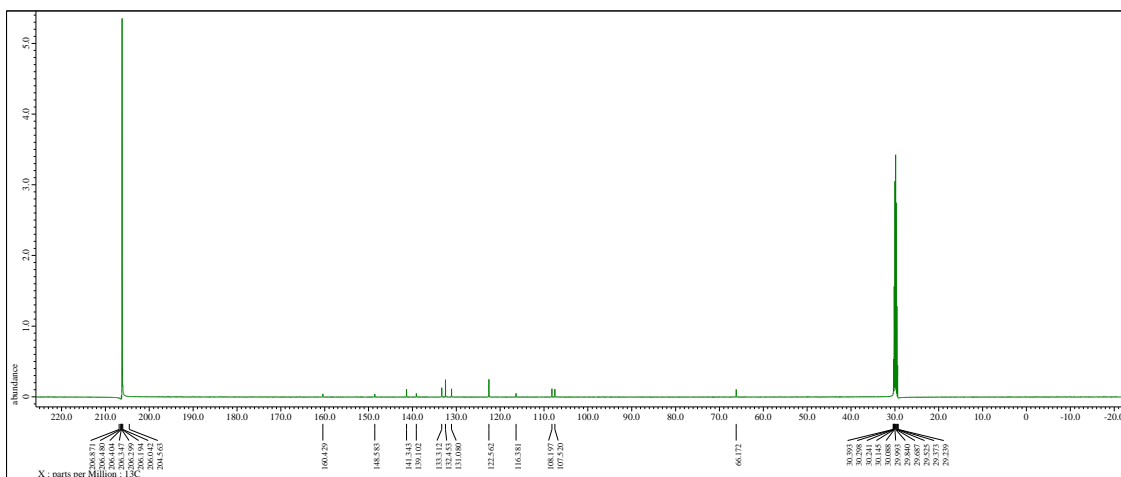
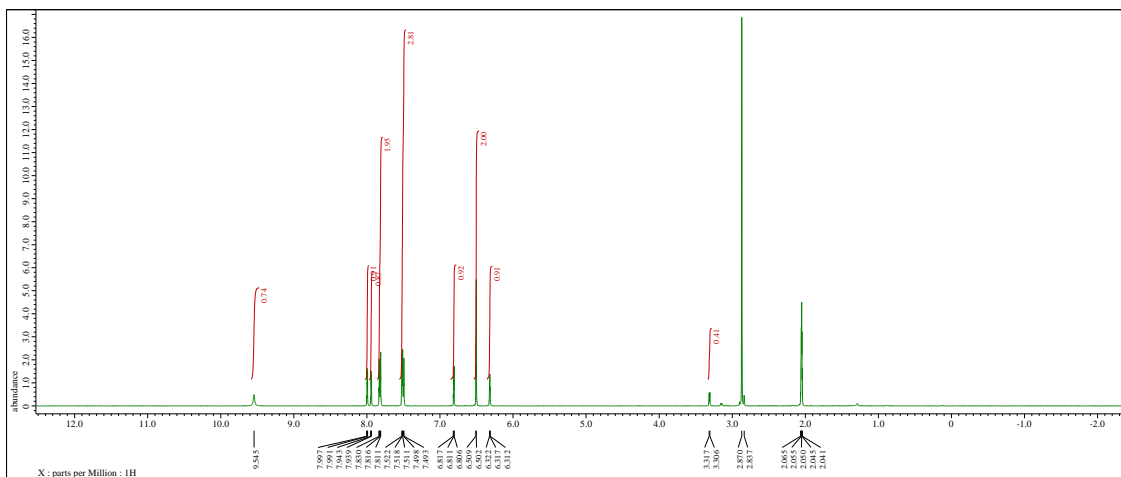


KUSC-5018

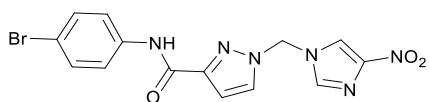




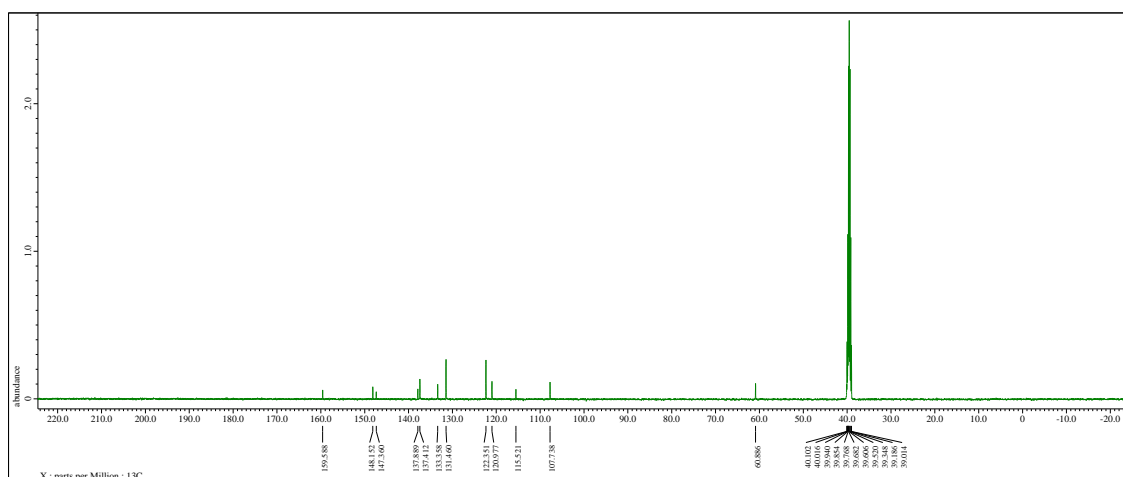
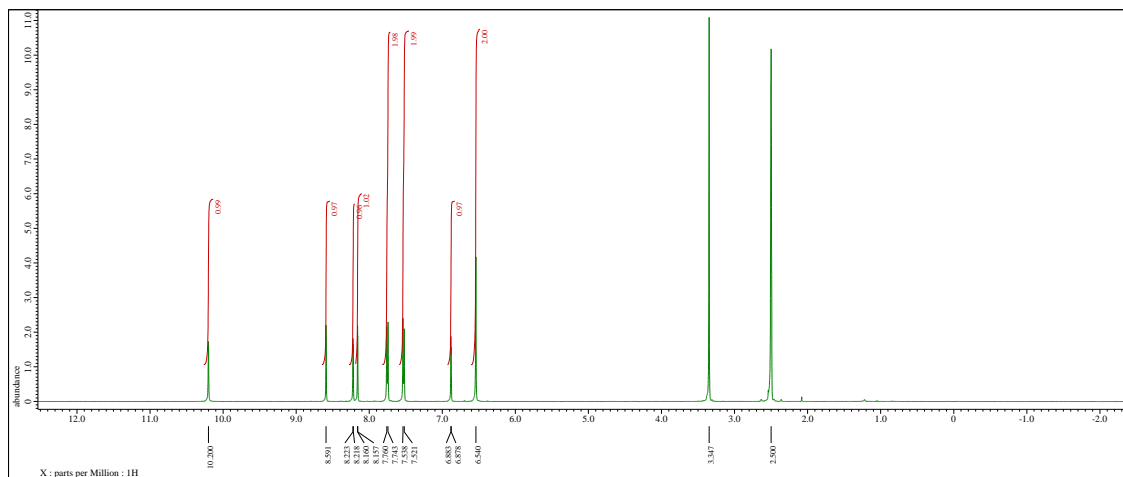
KUSC-5019

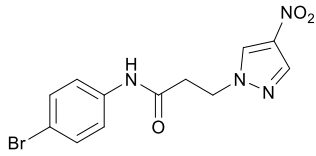




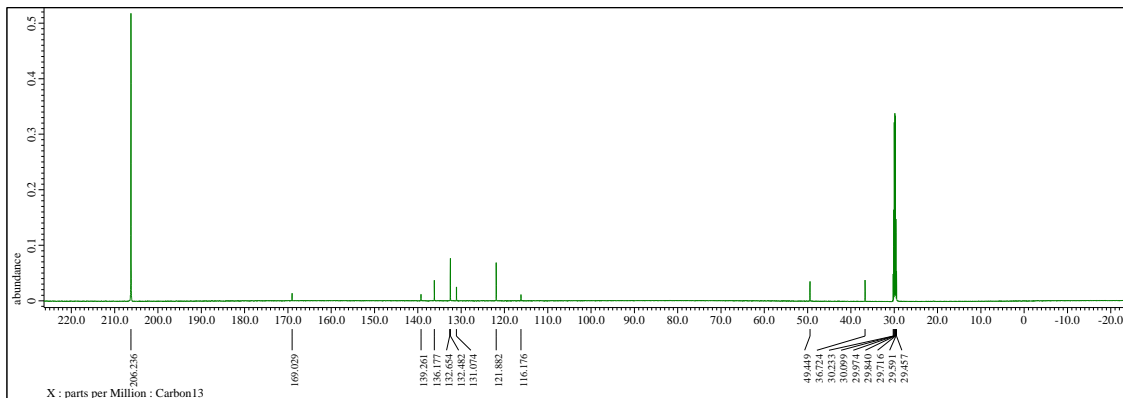
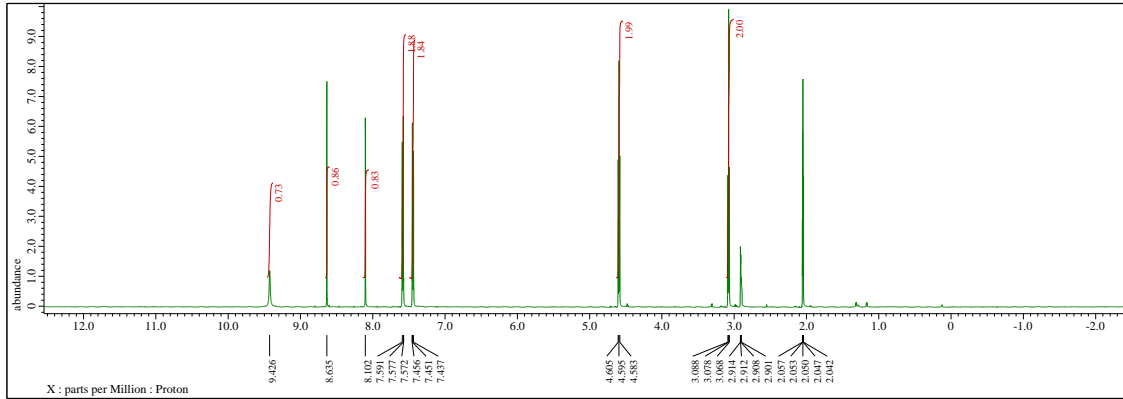


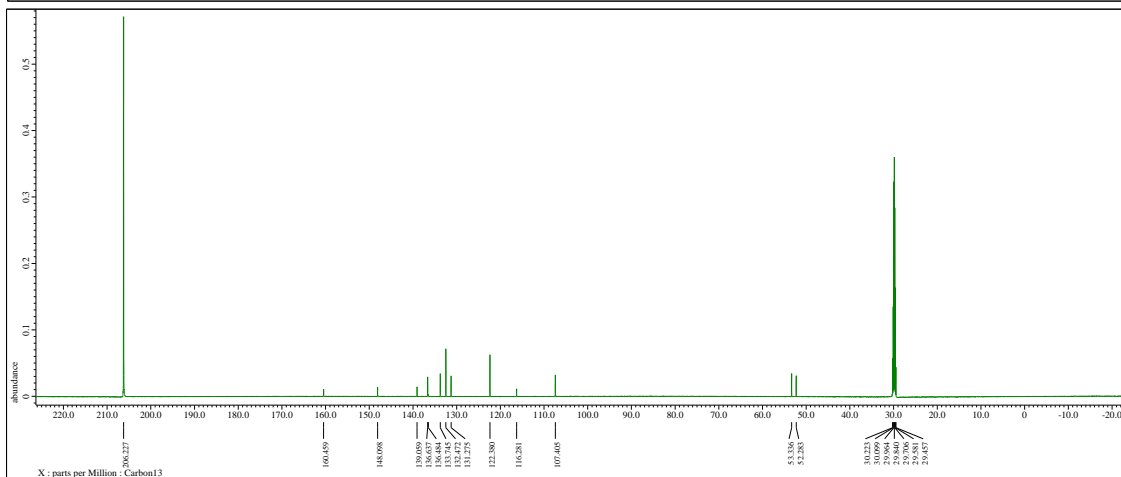
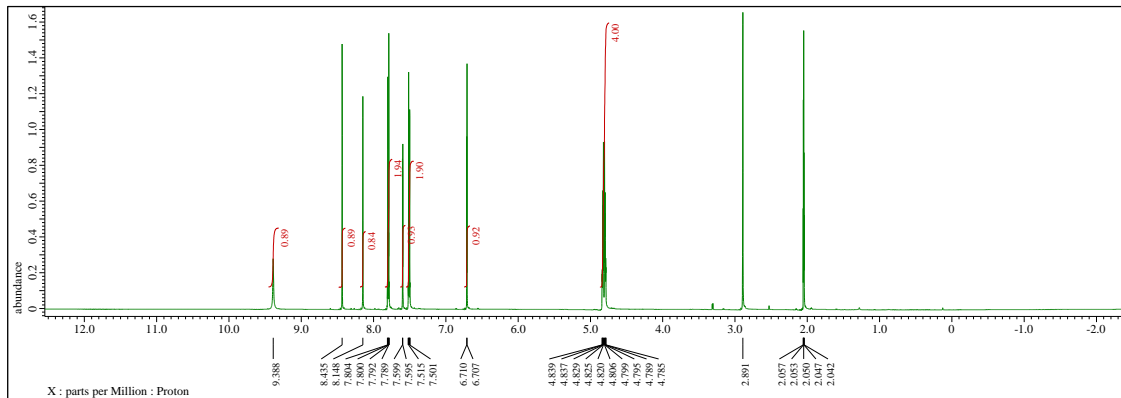
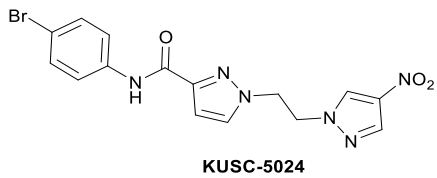
KUSC-5020

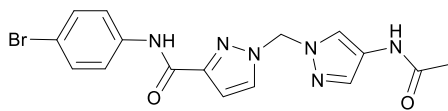




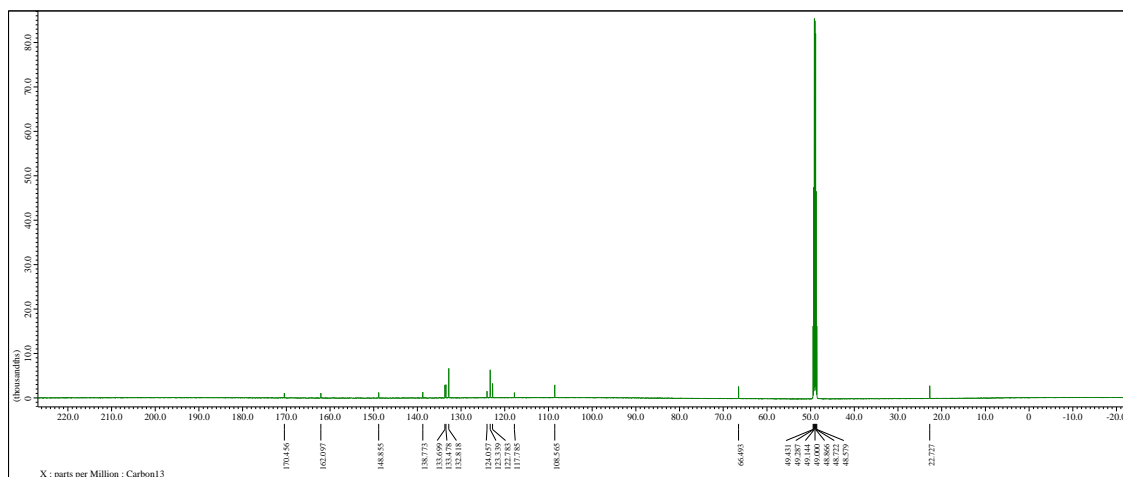
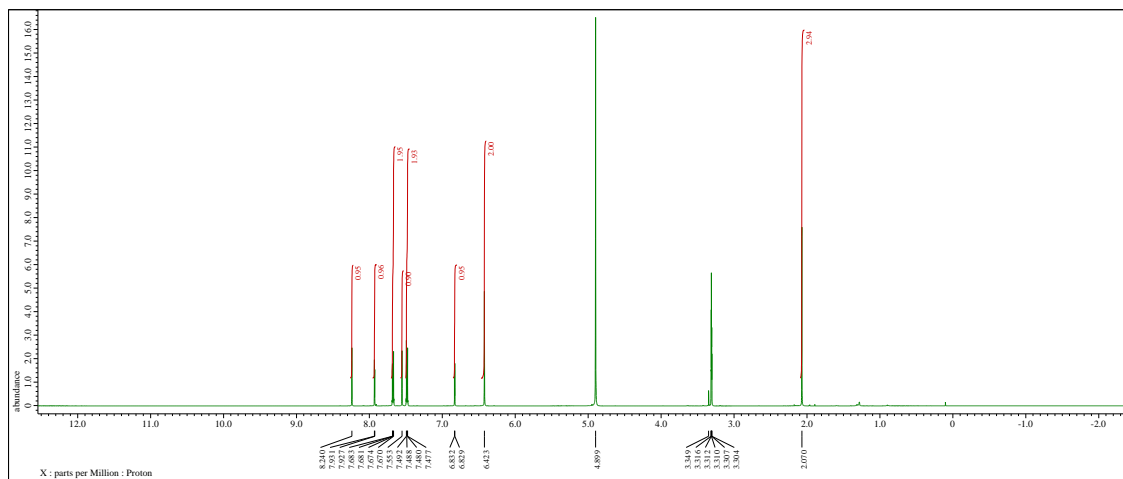
**KUSC-5021**

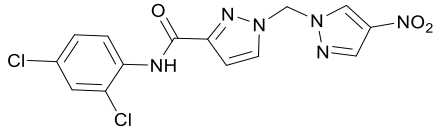




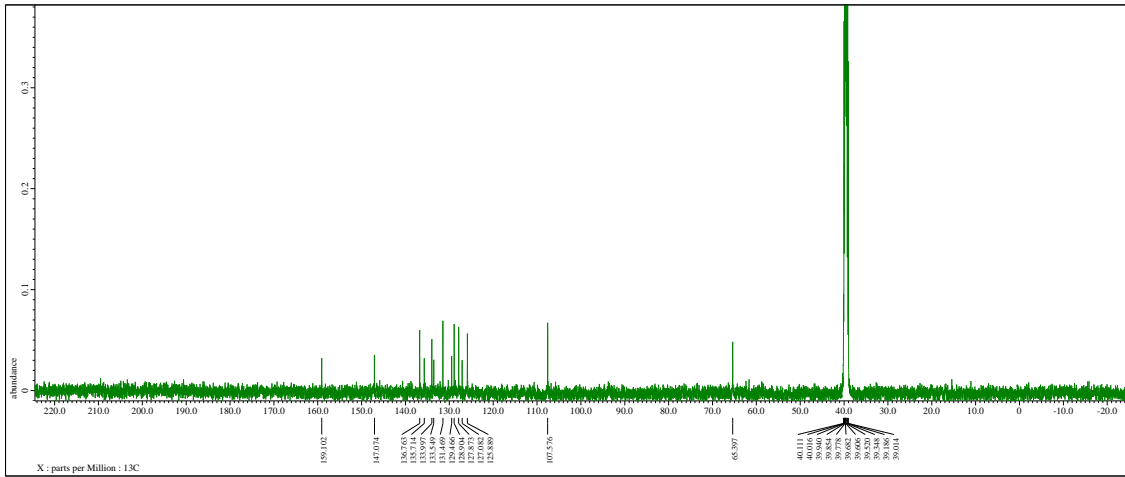
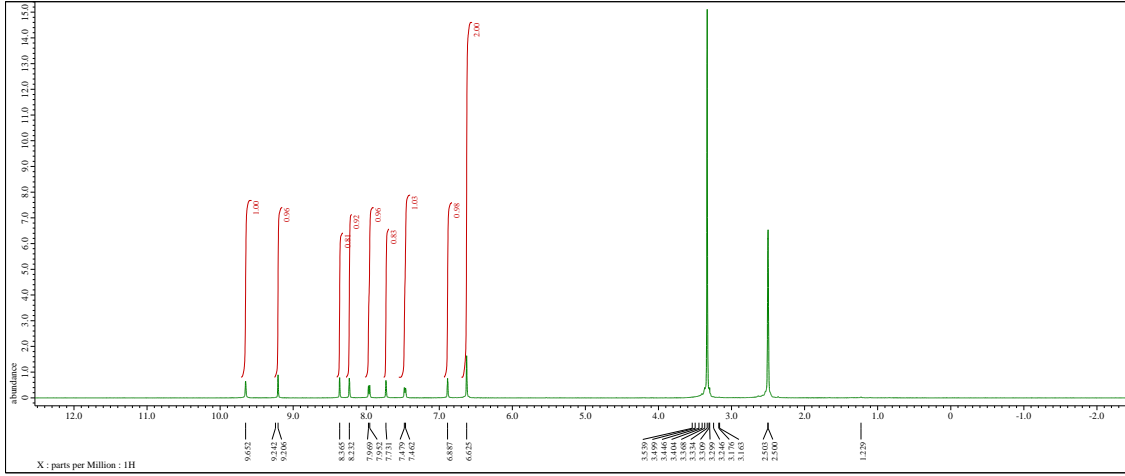


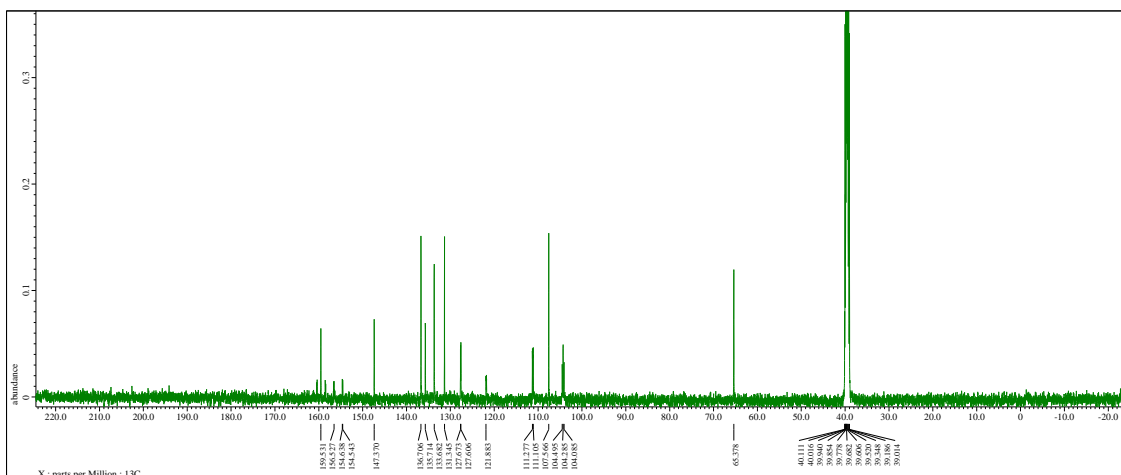
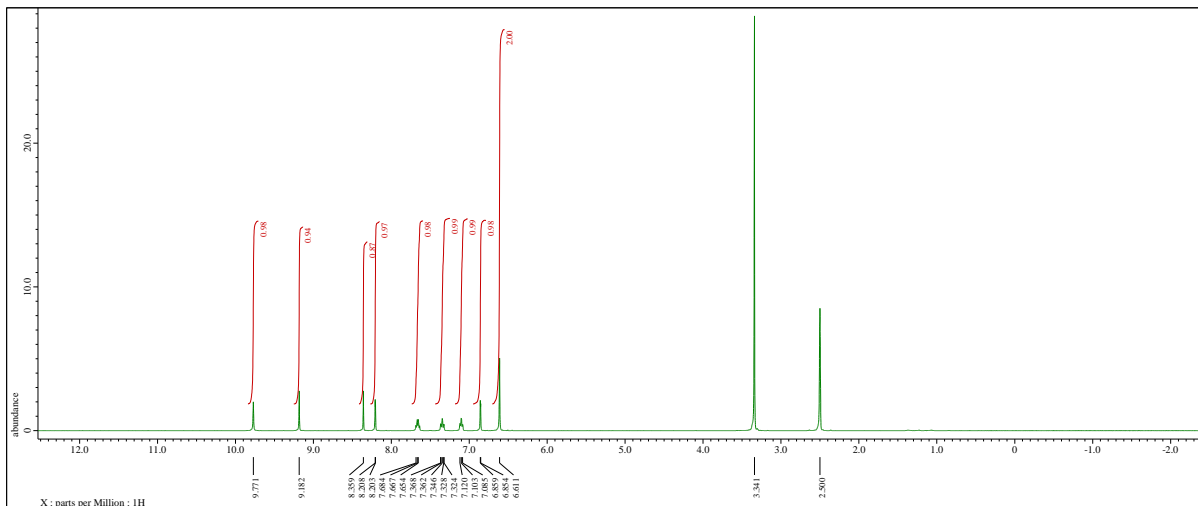
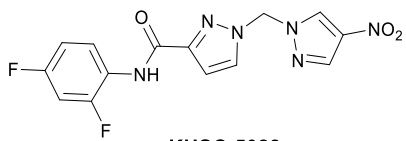
**KUSC-5025**

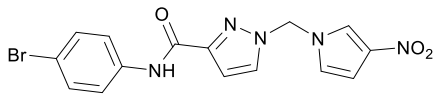




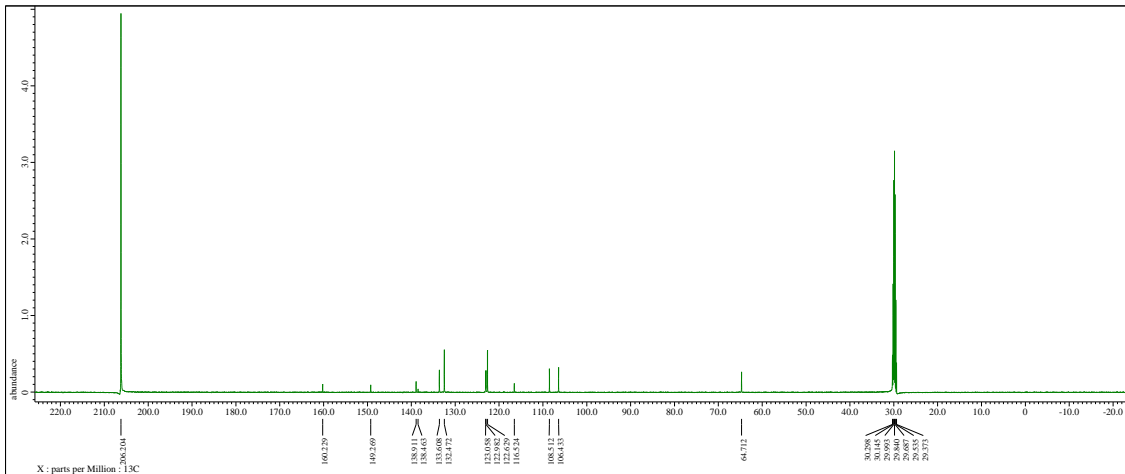
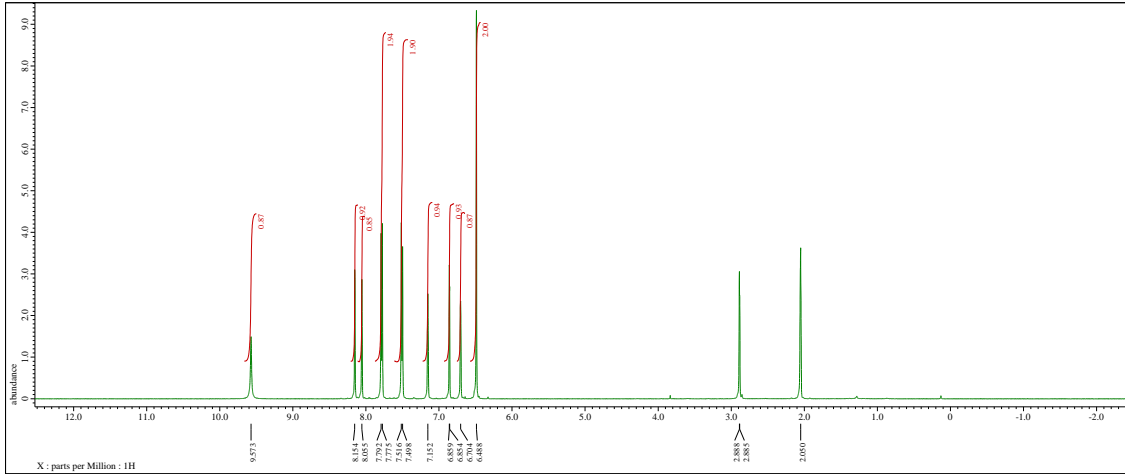
**KUSC-5027**

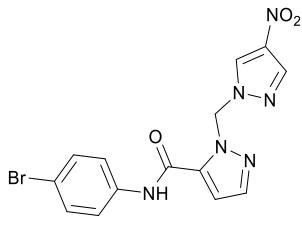




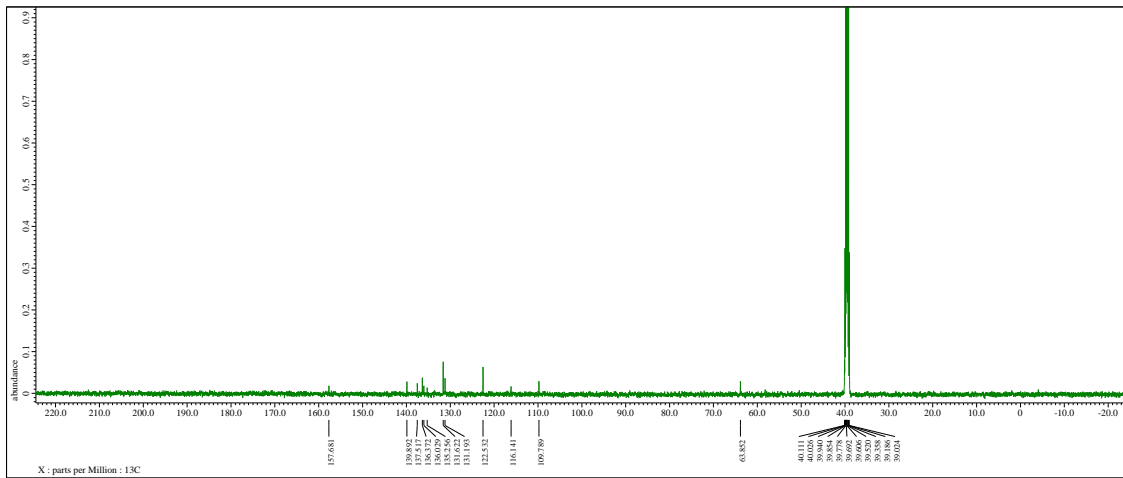
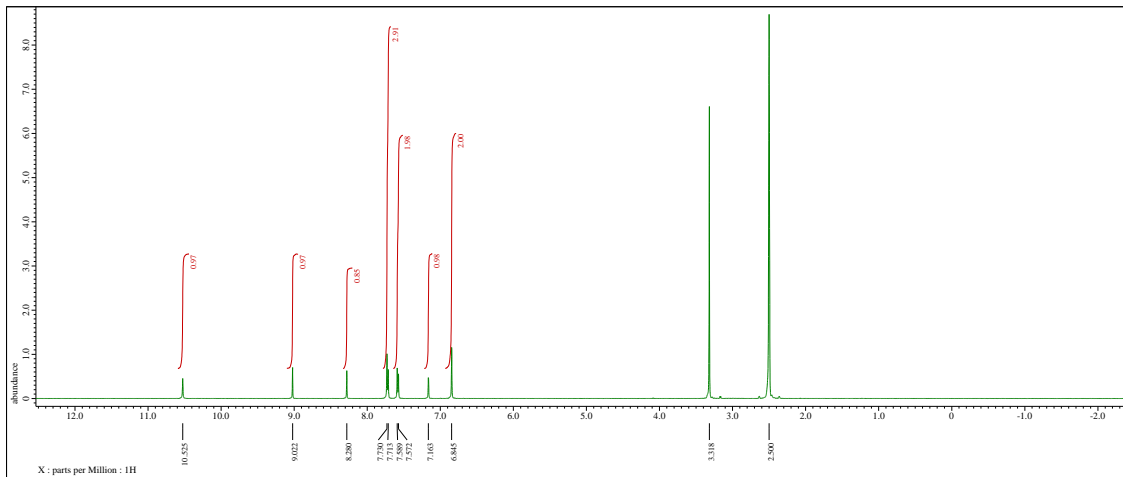


**KUSC-5029**

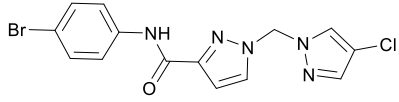




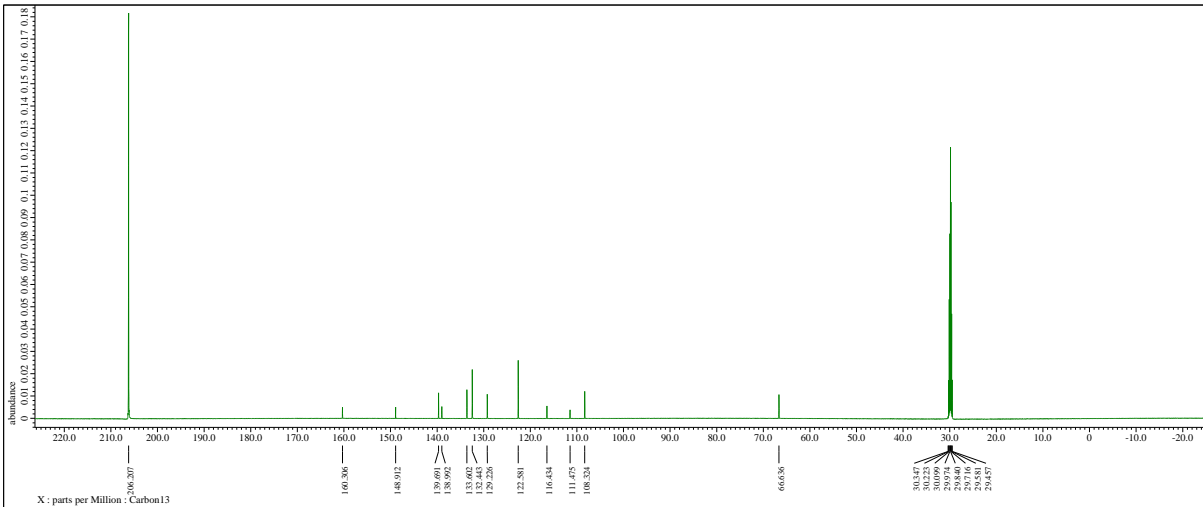
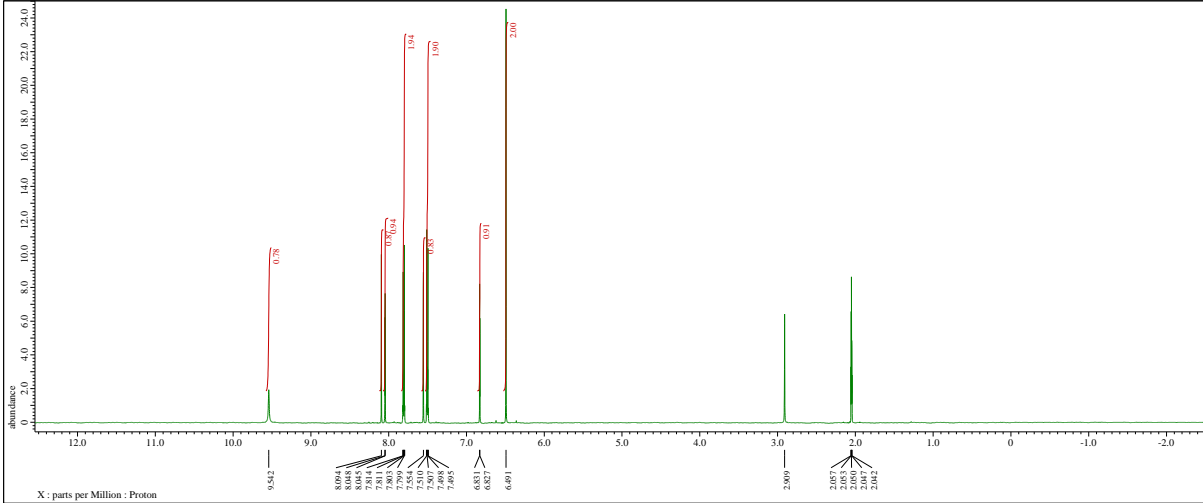
KUSC-5032

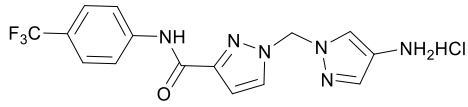




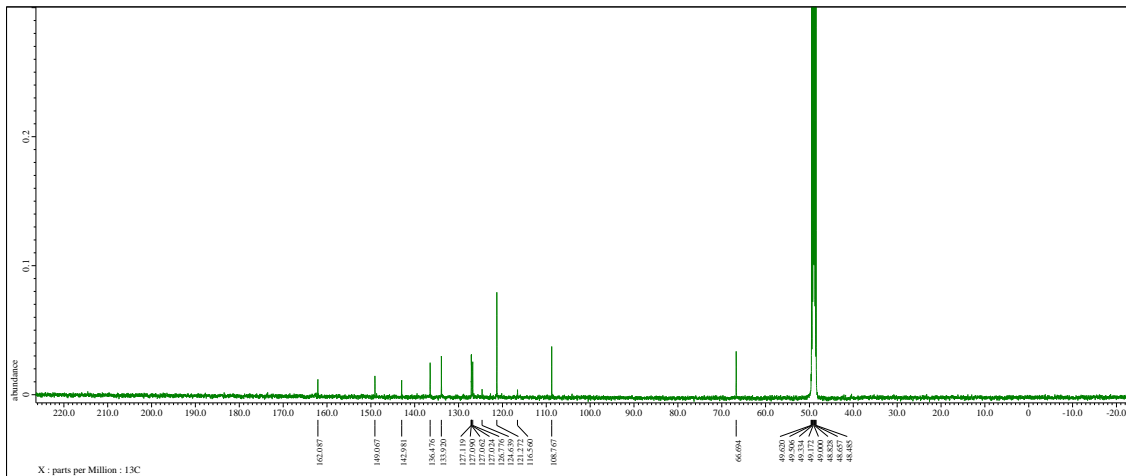
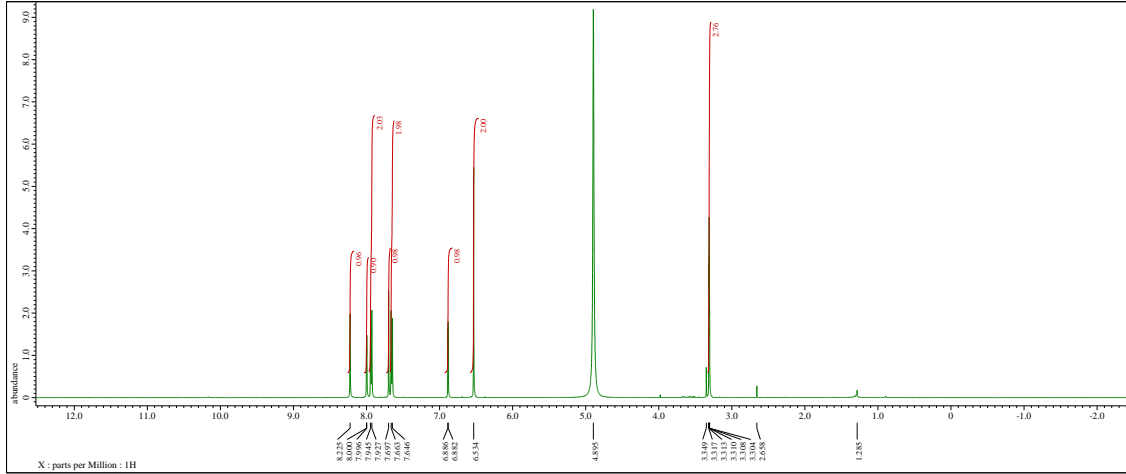


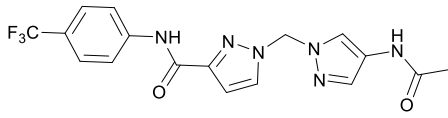
**KUSC-5033**



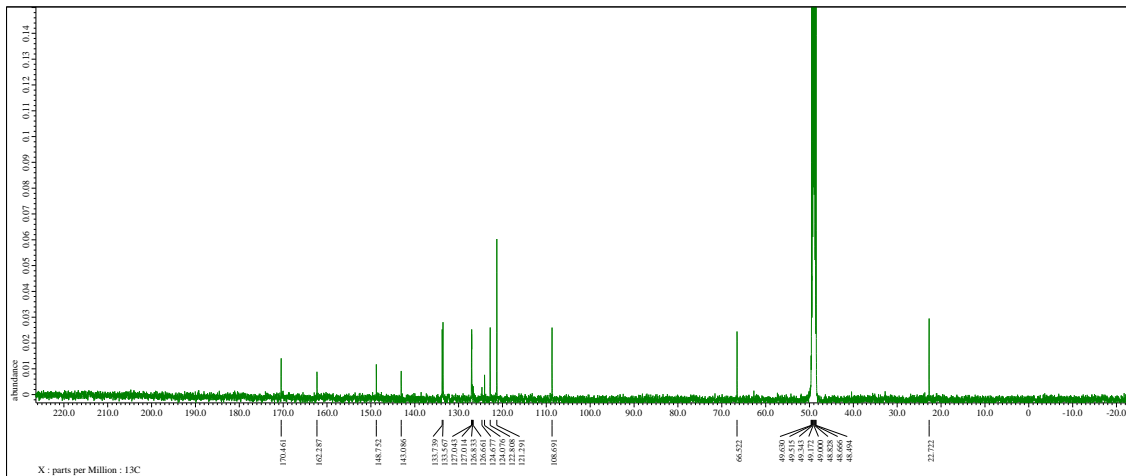
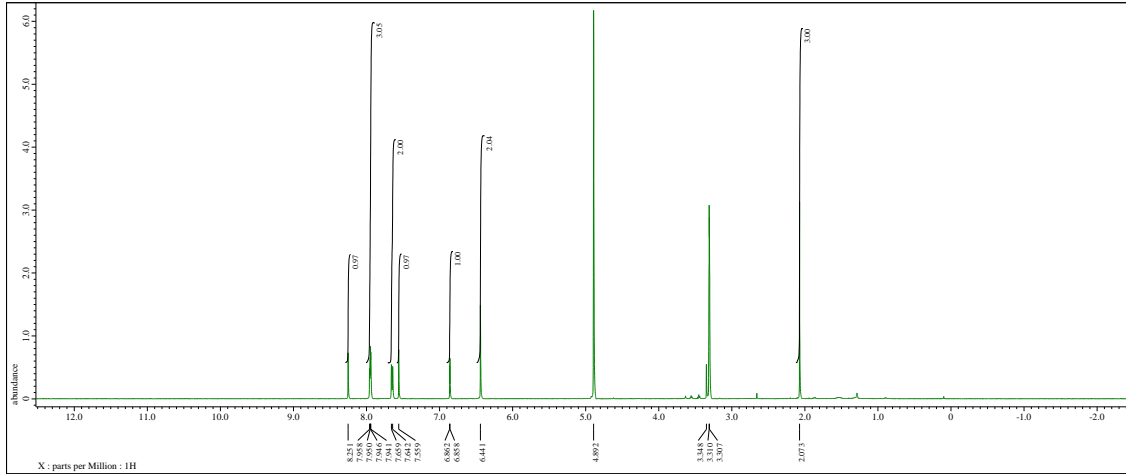


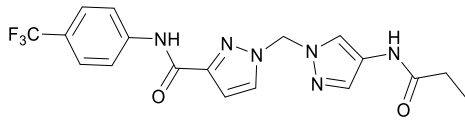
KUSC-5035



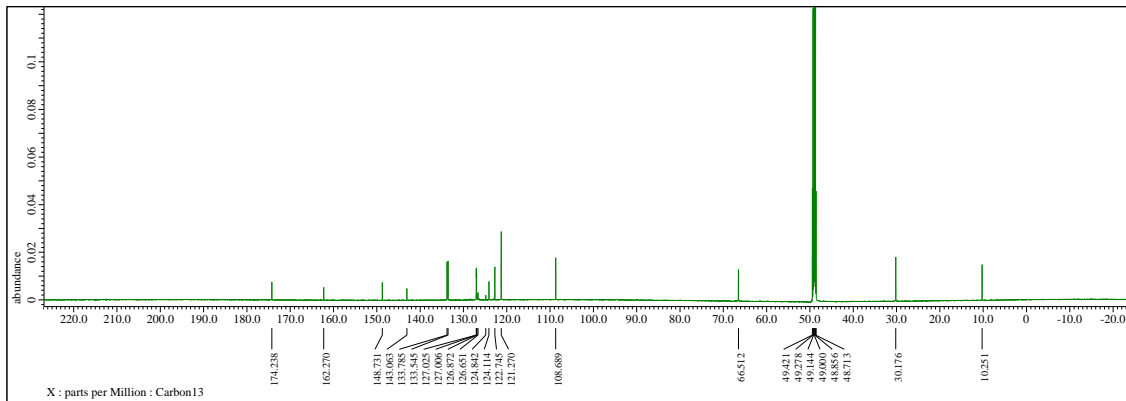
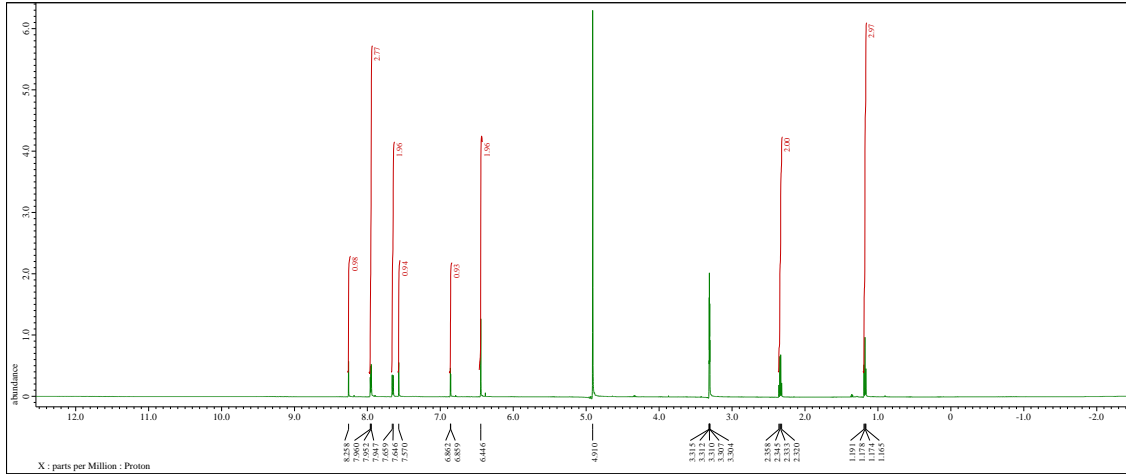


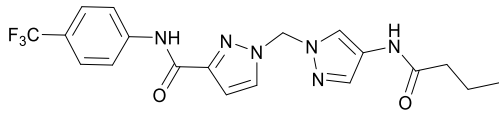
KUSC-5036



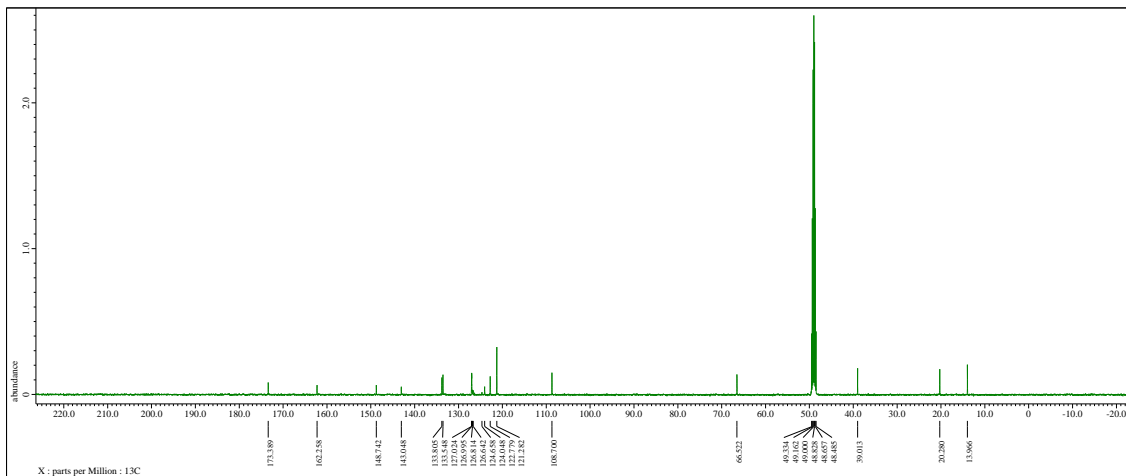
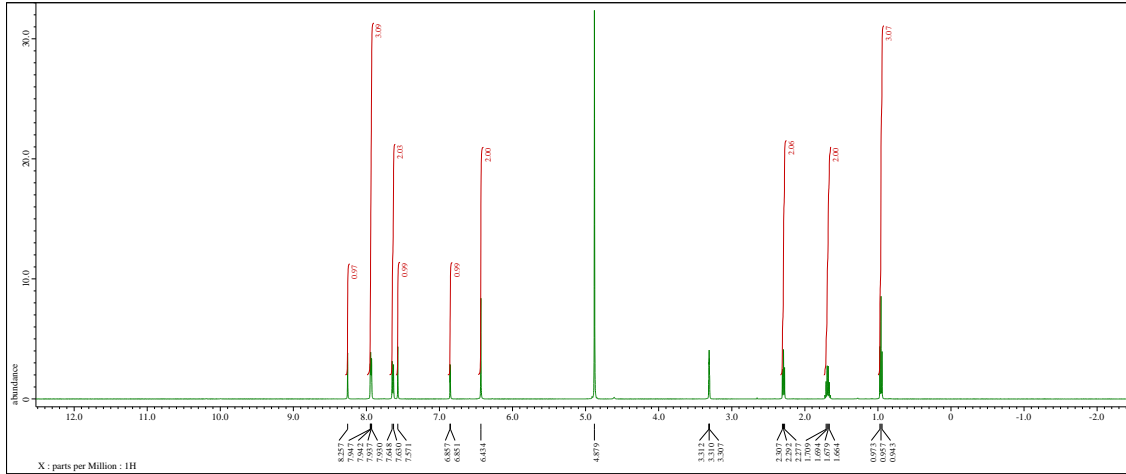


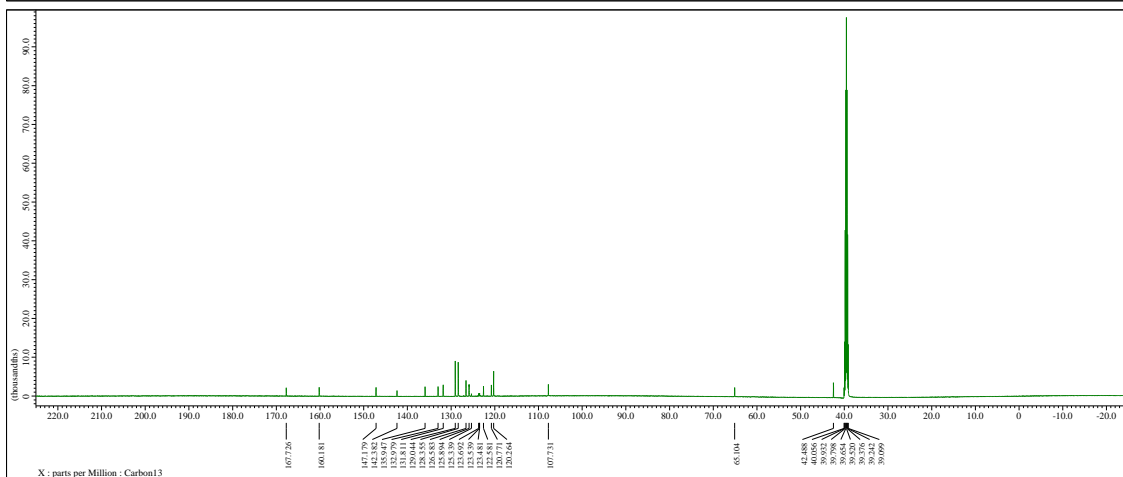
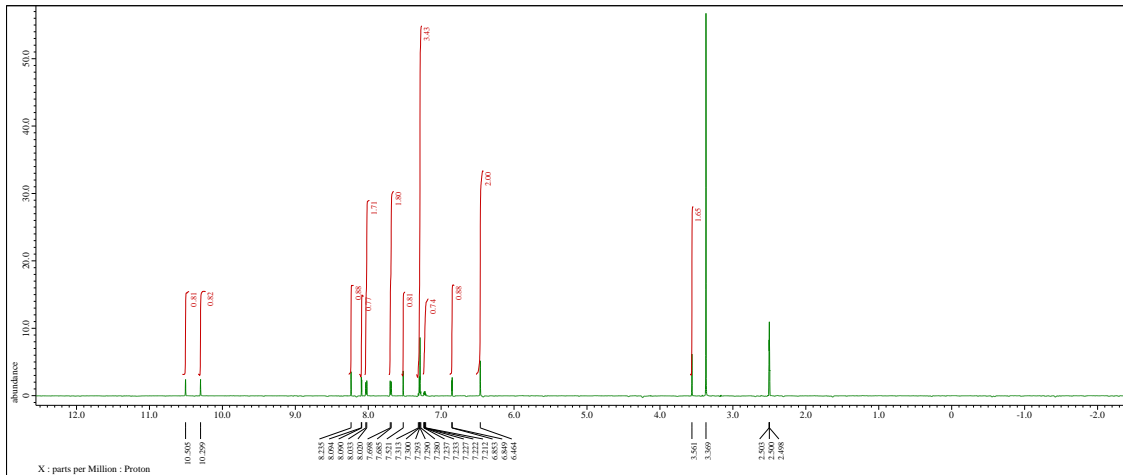
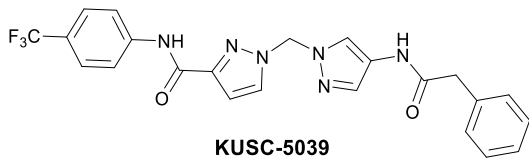
KUSC-5037

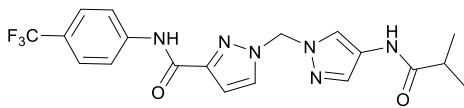




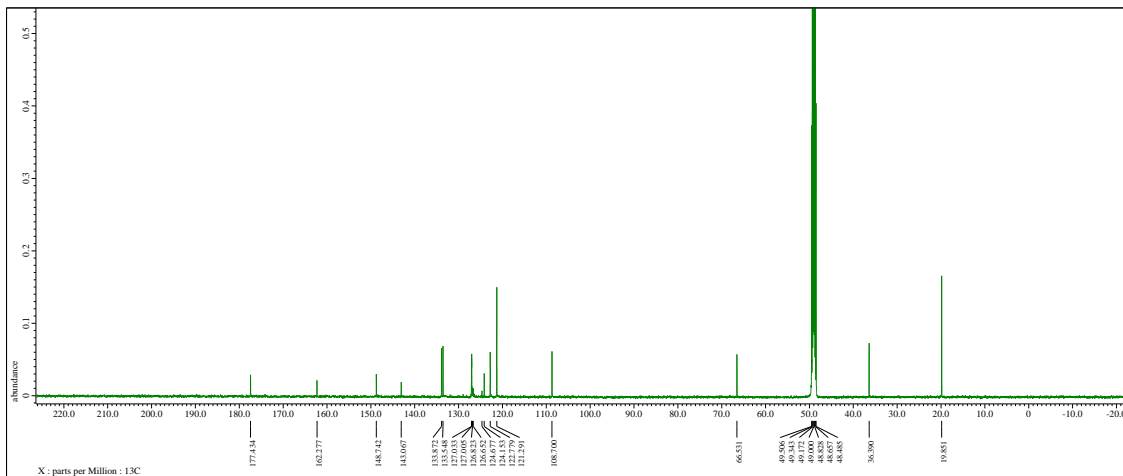
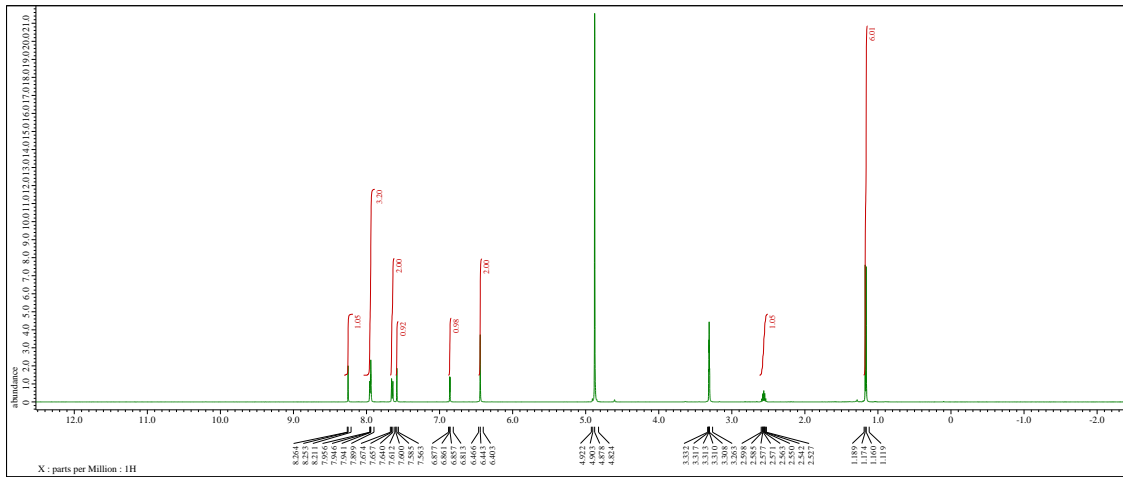
**KUSC-5038**

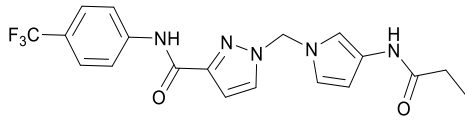




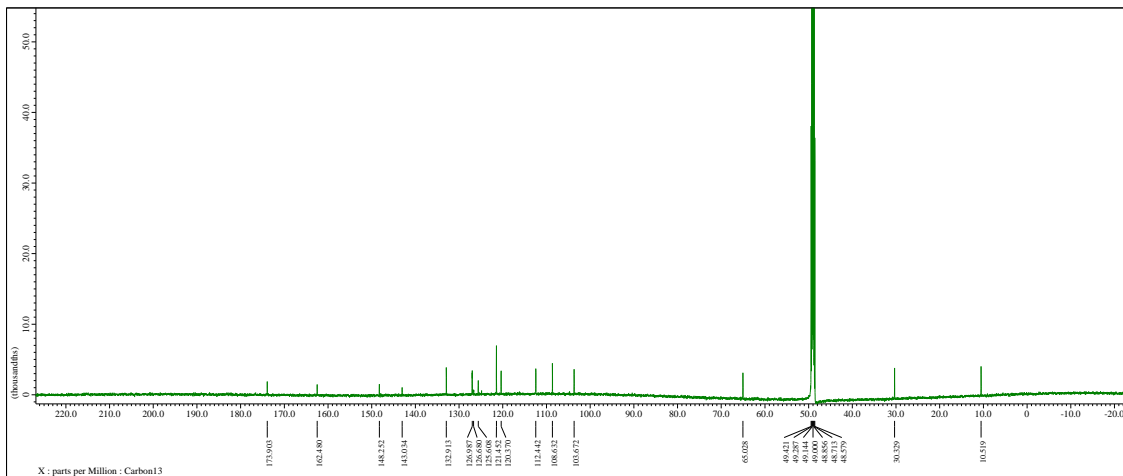
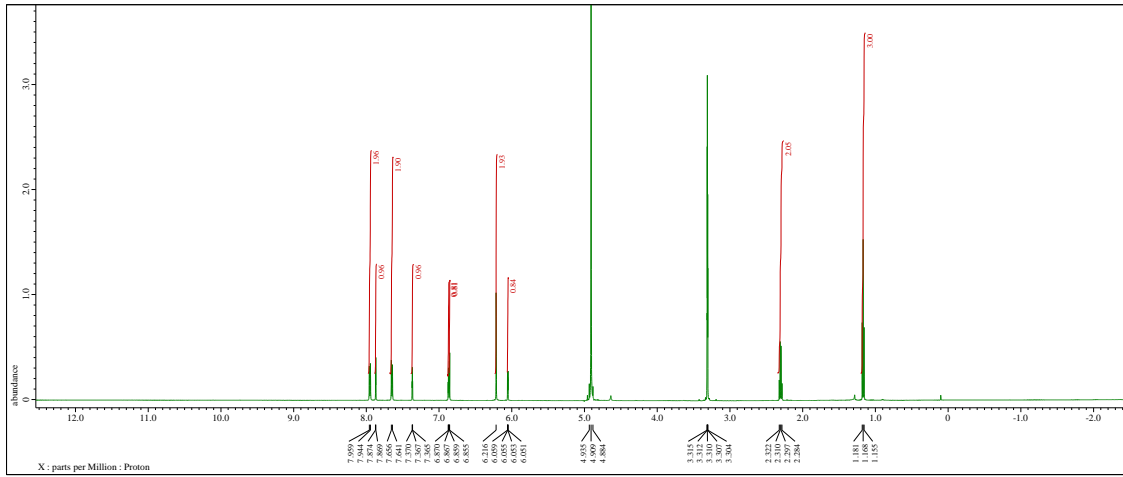


KUSC-5040

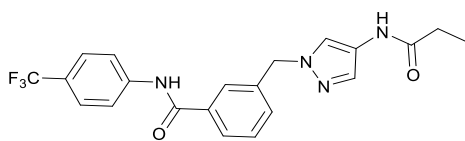




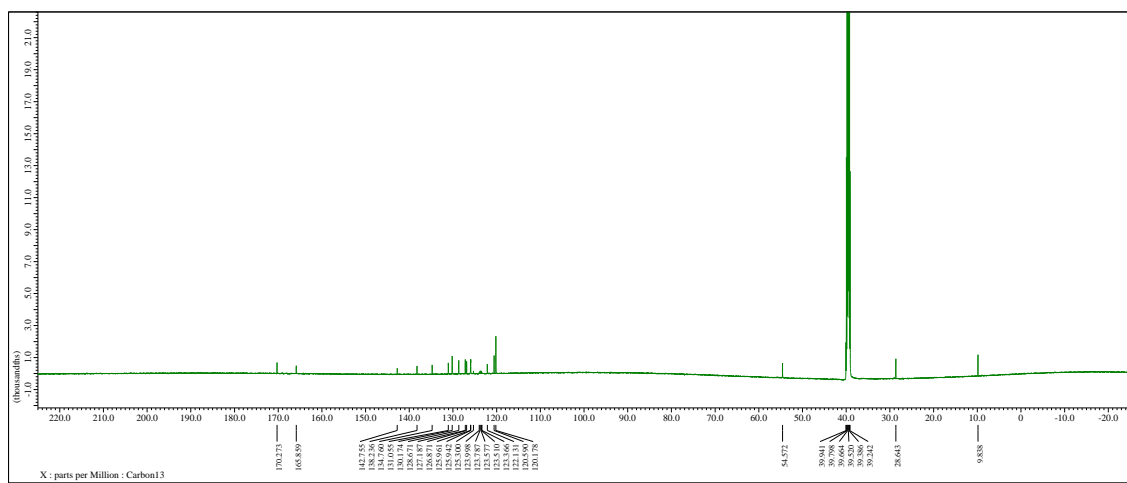
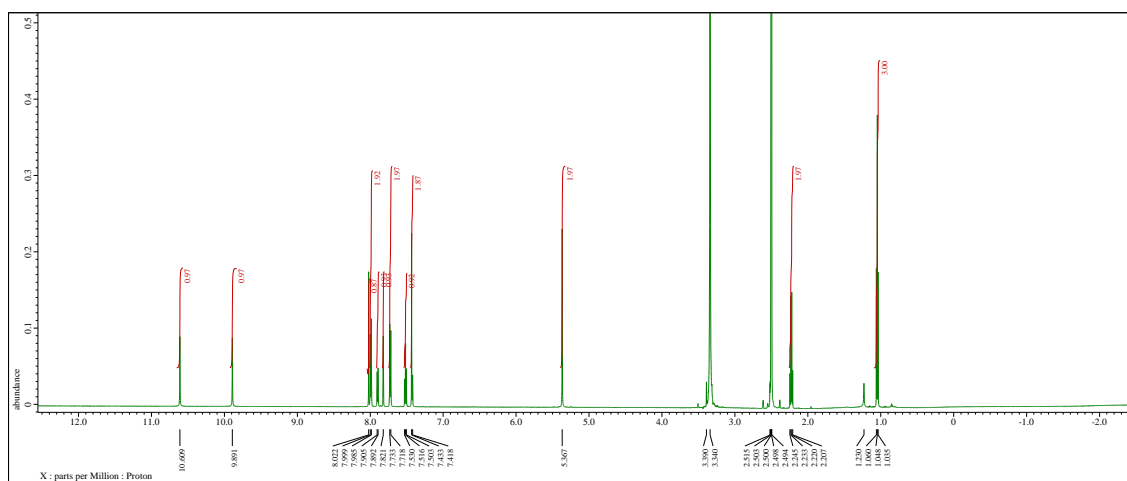
KUSC-5043

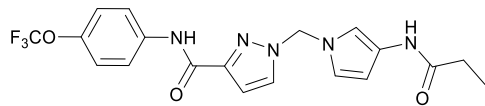




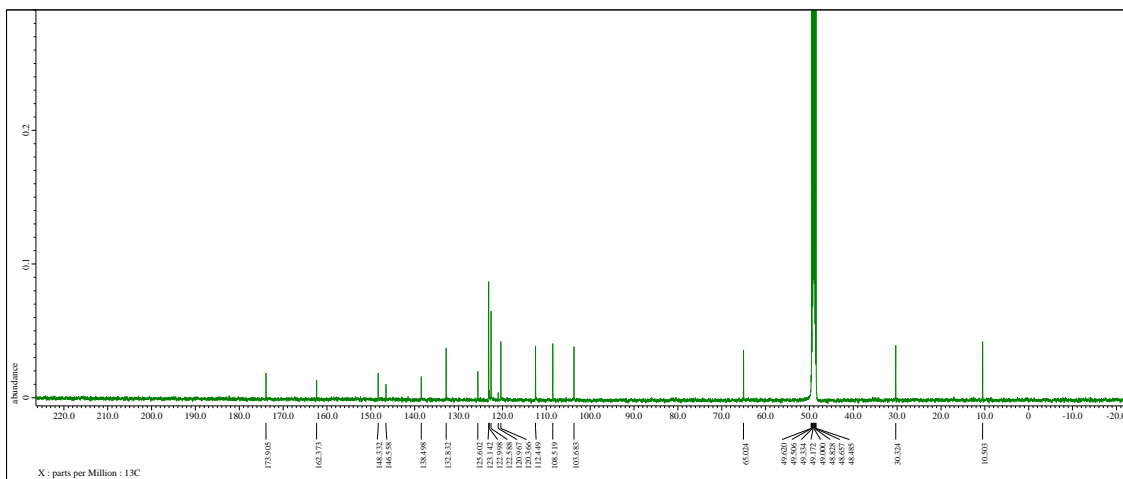
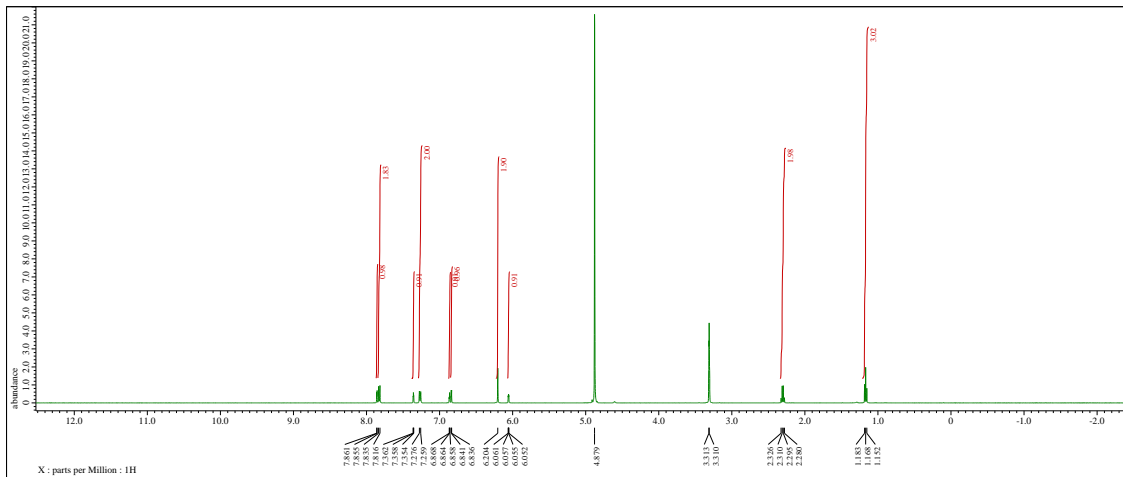


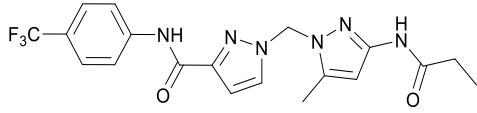
KUSC-5046



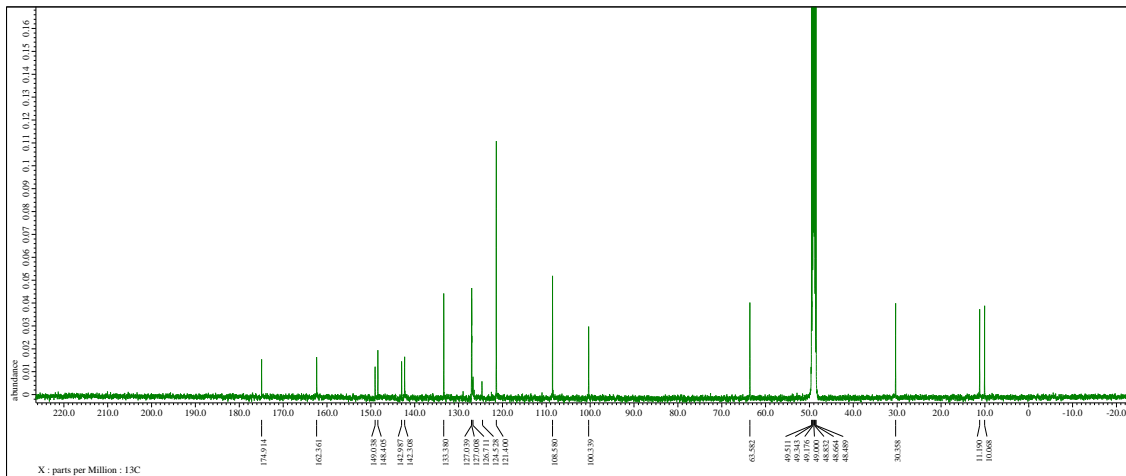
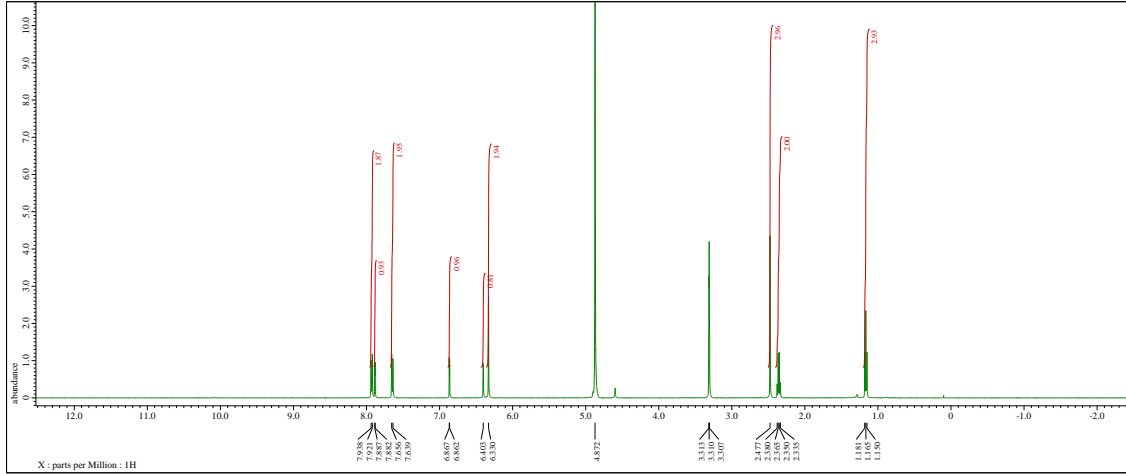


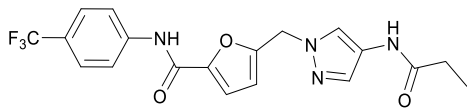
KUSC-5047



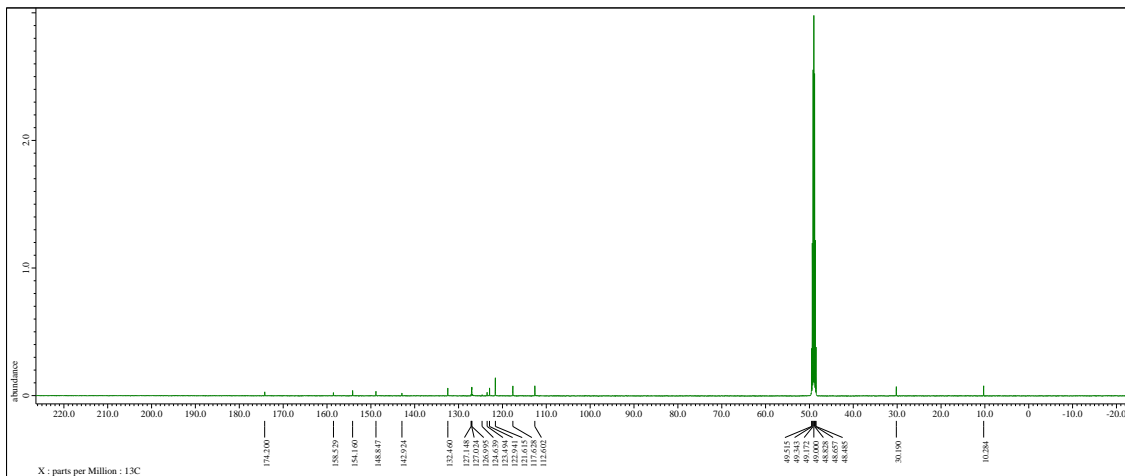
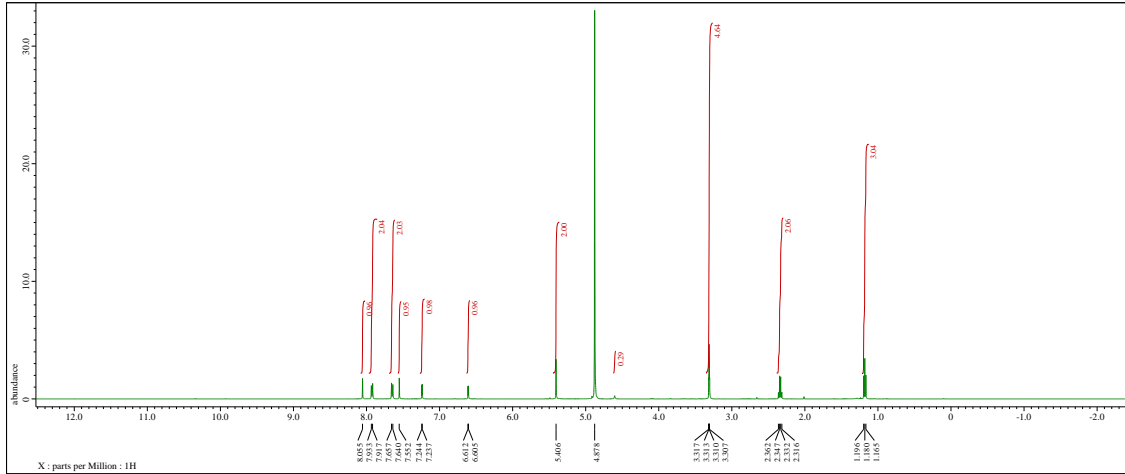


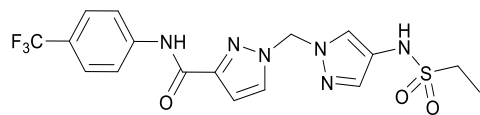
KUSC-5048



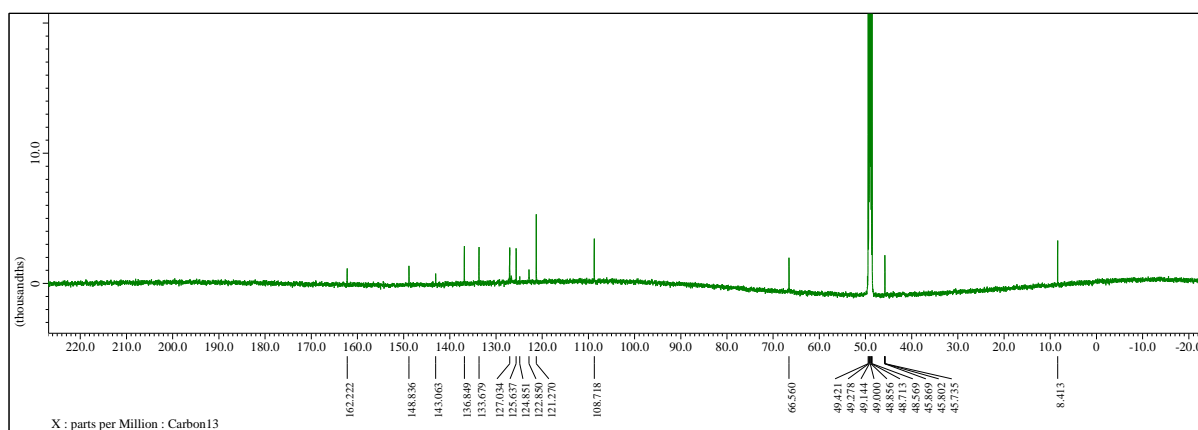
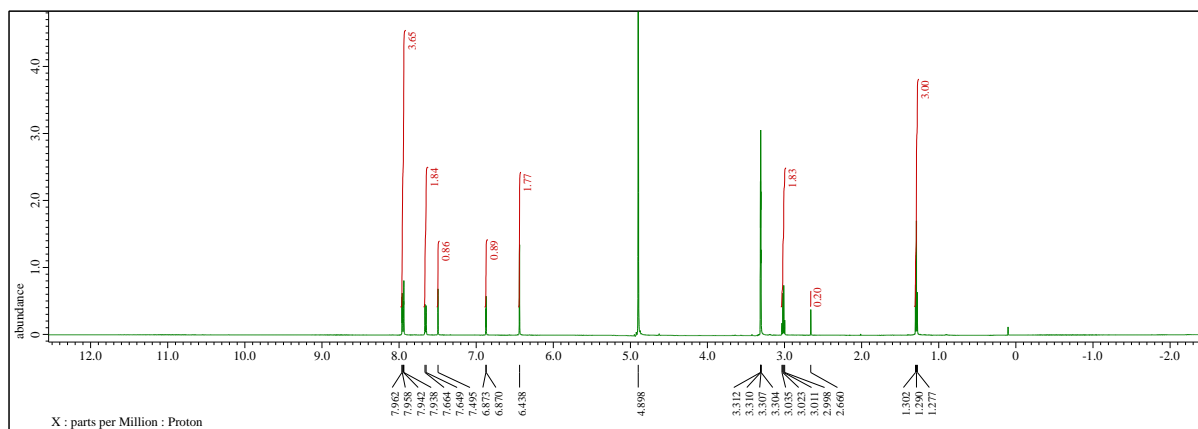


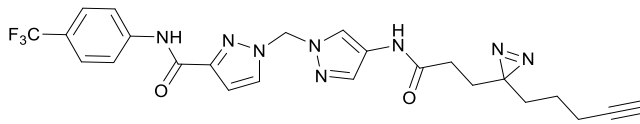
**KUSC-5049**



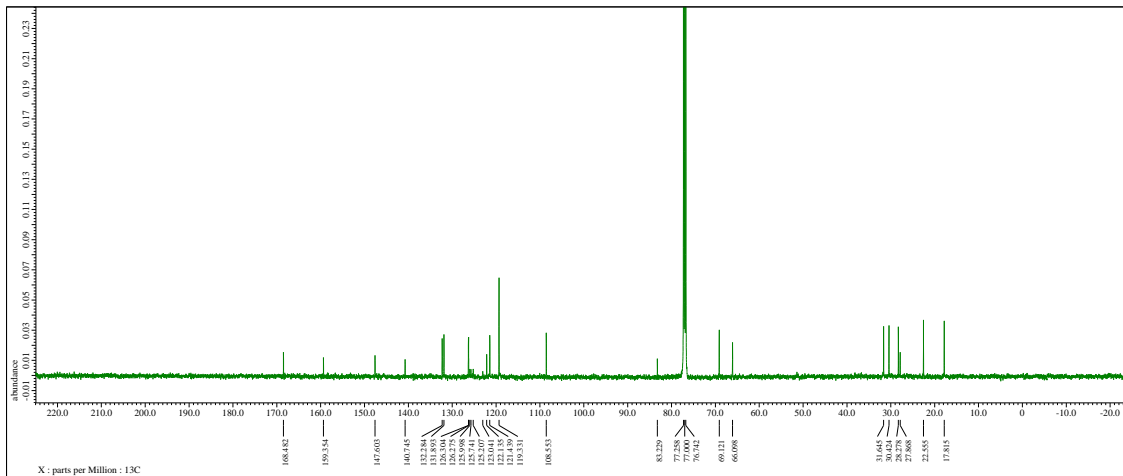
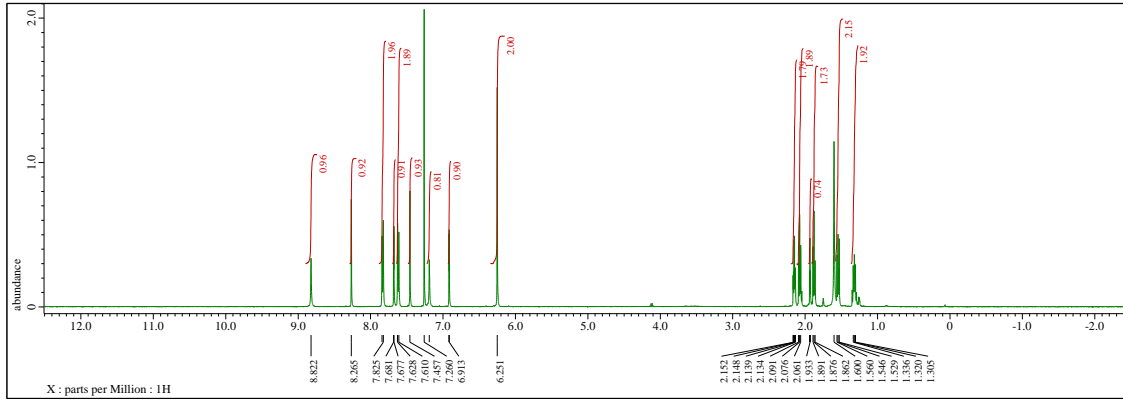


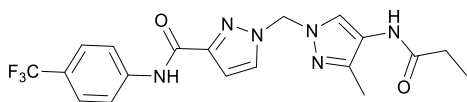
KUSC-5050



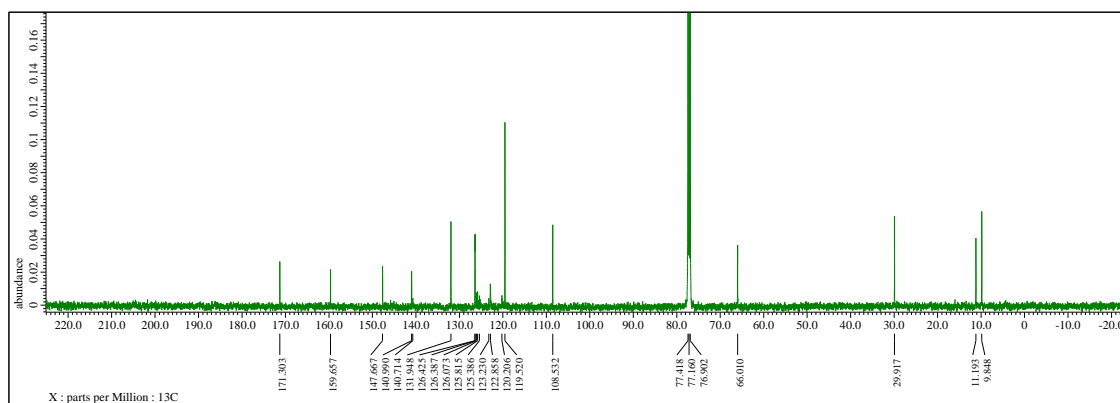
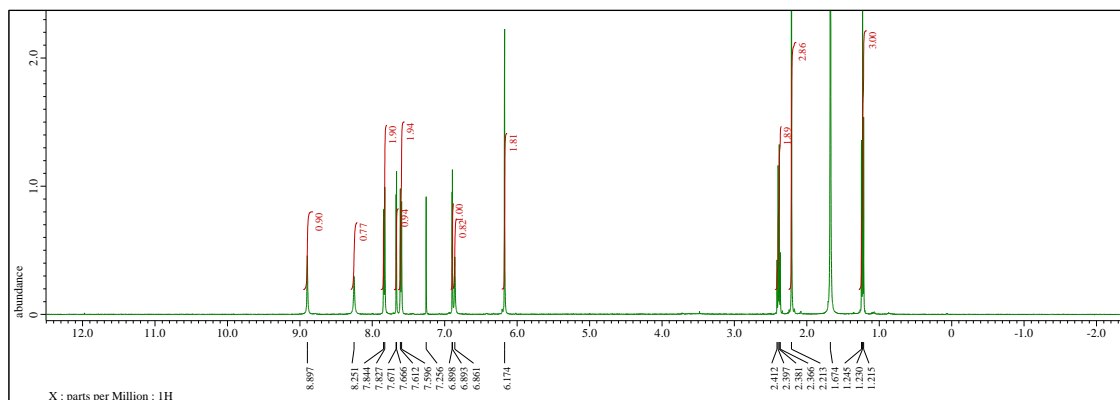


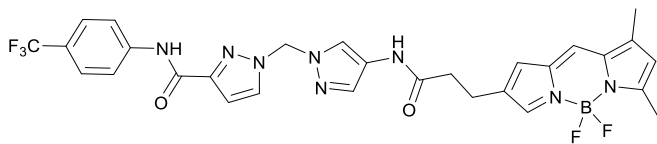
KUSC-5051



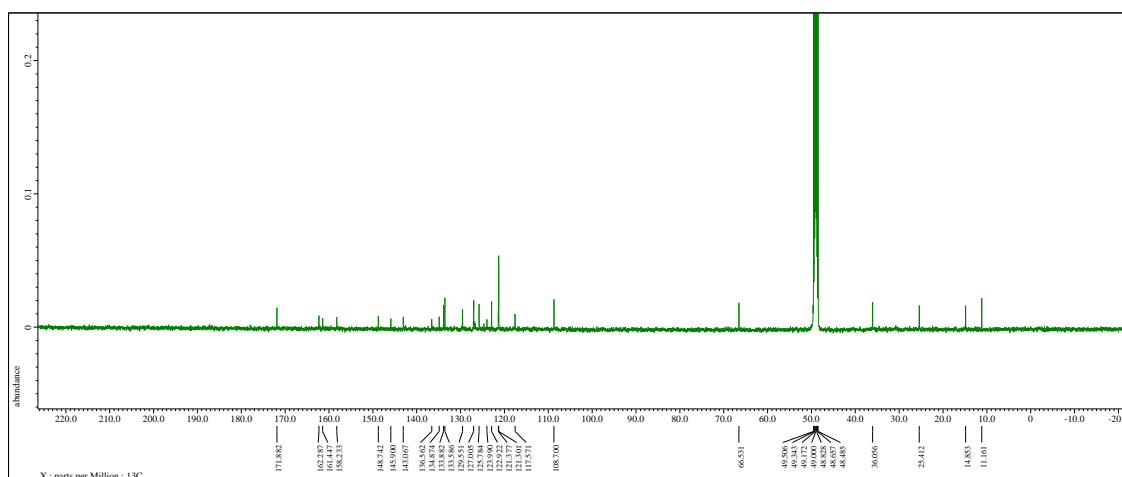
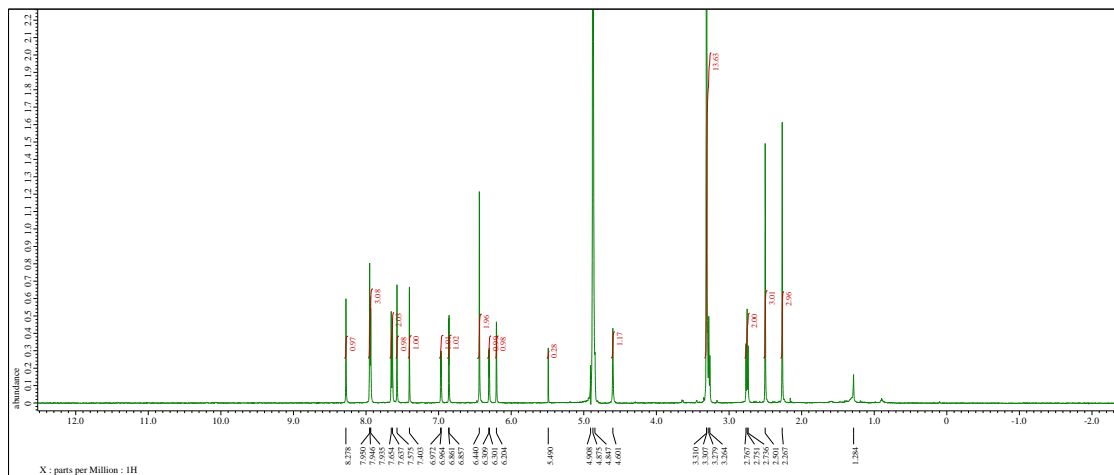


KUSC-5052

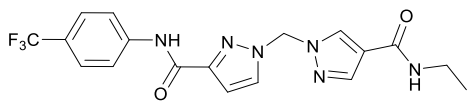




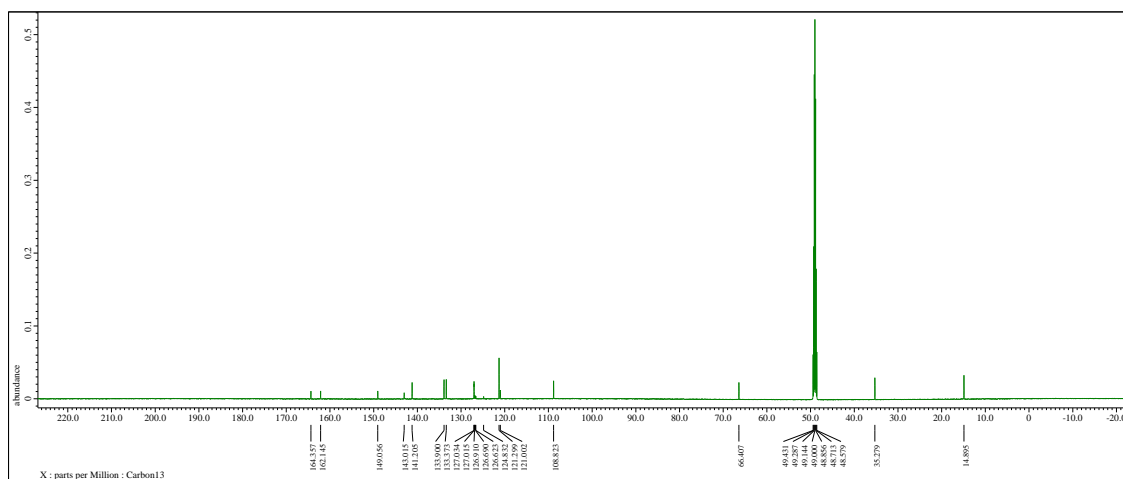
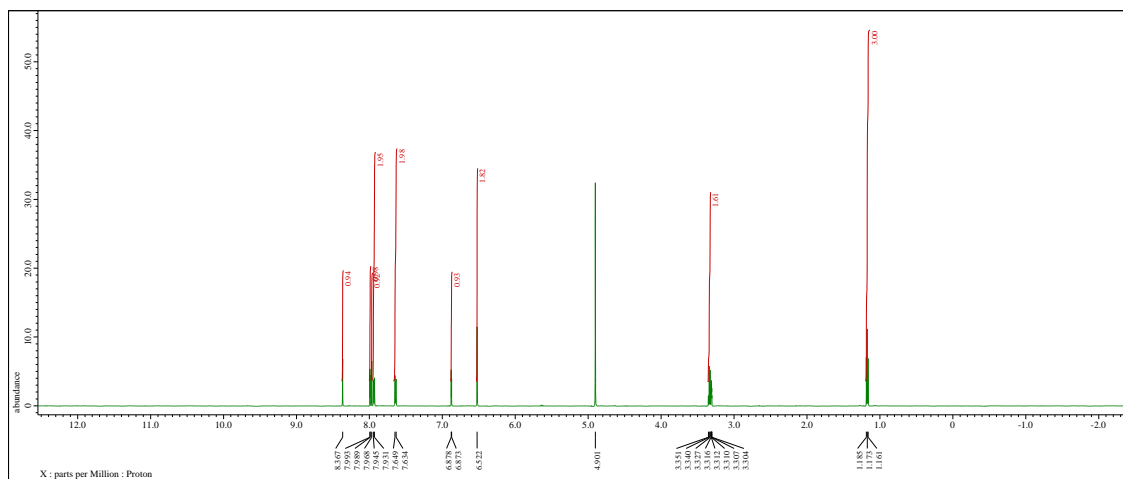
KUSC-5054

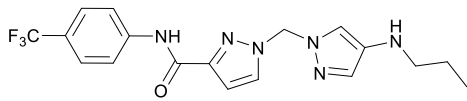






KUSC-5055





**KUSC-5056**

