

1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有する
新規低酸素誘導因子(HIF)阻害薬に関する研究

2014

安田 順信

目次

序論

第1節	低酸素誘導因子	1
第2節	がん悪性化への HIF-1 の関与機構	5
第3節	HIF-1 阻害剤の報告例	6

第1章 新規 HIF-1 阻害化合物のスクリーニング

第1節	化合物ライブラリーからの化合物抽出	8
第2節	HIF-1 阻害試験	9
第3節	ルシフェラーゼ阻害による偽陽性の排除	10
第4節	ヒット化合物の構造比較	11
第5節	HIF-1 阻害活性の確認	12
第6節	まとめ	13

第2章 CLB-016 の HIF-1 阻害活性における構造活性相関

第1節	構造活性相関解析の戦略	14
第2節	CLB-016 およびその誘導体の合成	14
第3節	中央部芳香環の検討	18
第4節	カルボキサミド部の検討	22
第5節	アルキル基の大きさの検討	24
第6節	アルキル基の置換位置変換	24
第7節	右セグメントの検討	26
第8節	まとめ	27

第3章 CLB-016 およびその誘導体の HIF-1 阻害機構の解析

第1節	HIF-1 標的遺伝子発現に及ぼす CLB-016 誘導体の影響	28
第2節	がん細胞の遊走阻害試験	30
第3節	HIF-1 α , HIF-1 β の mRNA およびタンパク質レベルの解析	31
第4節	HIF-1 α の核局在	33
第5節	HIF-1 の DNA 結合能に対する CLB-016 誘導体の影響	34
第6節	ヒトがん細胞パネル感受性試験	35
第7節	まとめ	36

結論	37
----------	----

実験項	39
-----------	----

参考文献	65
------------	----

本文中、以下の略語および用語を用いた。

Ac	acetyl
aq	aqueous
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
br	broad
Bu	butyl
calcd	calculated
d	doublet
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT	epithelial to mesenchymal transition
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
h	hour(s)
HRMS	high resolution mass spectrometry
Hz	hertz
<i>J</i>	coupling constant
Me	methyl
MET	mesenchymal to epithelial transition
MW	micro wave
<i>m/z</i>	mass to charge ration
<i>p</i>	para
Ph	phenyl
q	quartet
rt	room temperature
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
s	singlet
sat	saturated
SEM	2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl
t	triplet
<i>t</i>	tertiary
THF	tetrahydrofran
TLC	thin layer chromatography

序論

第1節 低酸素誘導因子

第1項 HIF-1 の分子構造

1992 年、Johns Hopkins 大学の小児科医 Gregg L. Semenza 博士らによって、低酸素環境下、造血促進因子であるエリスロポエチン(EPO)の発現を亢進させる因子として低酸素誘導因子 hypoxia inducible factor-1(HIF-1)遺伝子が発見された¹。続いて、1995 年には HIF-1 タンパク質が単離・精製された^{2a}。さらに同じ年に、HIF-1 は HIF-1 α と HIF-1 β から構成されており、ヘリックス-ループ-ヘリックス(basic helix-loop-helix, bHLH)構造を持つヘテロ二量体であることが報告された^{2b}。

HIF を構成する α および β サブユニットのうち、 α サブユニットのアイソフォームは 3 種類、 β サブユニットのアイソフォームは 2 種類存在する^{3a}。(図 1) HIF-1 α および β は、共に bHLH ドメイン、Per/Arnt/Sim (PAS)ドメイン、および Transactivation (TAD)ドメインを持つ。これに対し、Oxygen-dependent degradation (ODD)ドメインは、HIF-1 α のみ存在する。

bHLH ドメインでは、塩基性領域が DNA 結合に、そして HLH 領域が二量体形成に必要となる。PAS ドメインはタンパク質-タンパク質相互作用を媒介し、ヘテロ二量体形成に関与する。TAD ドメインは、転写共役因子と結合し、転写レベルで遺伝子発現を誘導している。そして、N-TAD ドメインと重なり合っている ODD ドメインは、環境の酸素濃度に依存して HIF-1 α の安定化に大きく関与している。

HIF-1 を構成する β サブユニットである Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)は、そのアイソフォームである ARNT-2 と比較すると、bHLH ドメインと PAS ドメインが 81%も類似している。そのため、ARNT および ARNT2 は HIF-1 α とヘテロ二量体を形成する^{3b}。また、ARNT は生体内で広く発現しているのに対し、ARNT-2 の発現は脳や腎臓などに限られている^{3b}。

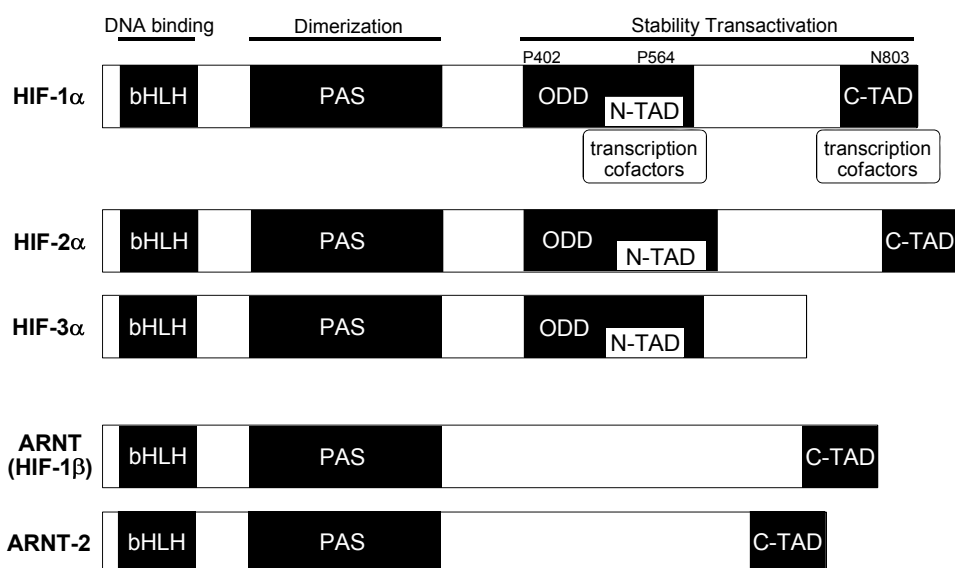


図 1. HIF ファミリータンパク質の一次構造.

bHLH; basic helix-loop-helix, PAS; Per/Arnt/Sim, ODD; Oxygen-dependent degradation, N-TAD; N-terminal transactivation, C-TAD; C-terminal transactivation.

第 2 項 HIF-1 の遺伝子発現調節機構（低酸素応答機構）

ODD ドメインを有する HIF-1α の発現は、環境中の酸素濃度に依存する（図 2）。

通常酸素環境下では Prolyl Hydroxylase (PHD)により HIF-1α の 402 および 564 番目のプロリン残基が水酸化を受ける。これが von Hippel-Lindau (VHL)を含むユビキチン添加酵素複合体によって認識され、HIF-1α にユビキチン鎖が付加される。そして、プロテアソームによる HIF-1α の分解が誘導される。

これに対し、腫瘍組織内などの低酸素環境下では、HIF-1α はプロリン残基の水酸化を受けないため、分解されずに安定化する。そして、HIF-1α は核内へ移行し、HIF-1β とヘテロ二量体を形成する。

ヘテロ二量体を形成した HIF-1 は、DNA のプロモーター領域に存在する 5'-RCGTG-3' (R=A/G) 配列の低酸素応答領域(Hypoxia response element, HRE)に結合する。そして、ヒストンアセチル基転移酵素である p300/CREB-binding protein (CBP)や Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1)^{4b}、または、ヒストン脱アセチル化酵素である Histone deacetylase7 (HDAC7)^{4c}などの転写共役因子がリクルートされ、近傍のヒストンを修飾する。さらにクロマチン・リモデリング因子により、クロマチンのリモデリングが誘導され、基本転写因子と RNA ポリメラーゼにより、様々な標的遺伝子の転写が促進される。

HIF-1 により転写亢進されている遺伝子は数多く報告されており、細胞増殖、アポト

ーシス、転移・浸潤、pH 制御、血管新生、薬剤耐性に関わる物質輸送、転写、エネルギー代謝など多岐にわたっており、がん細胞の機能調節に重要な役割を果たしている^{4a}。
(図 3)

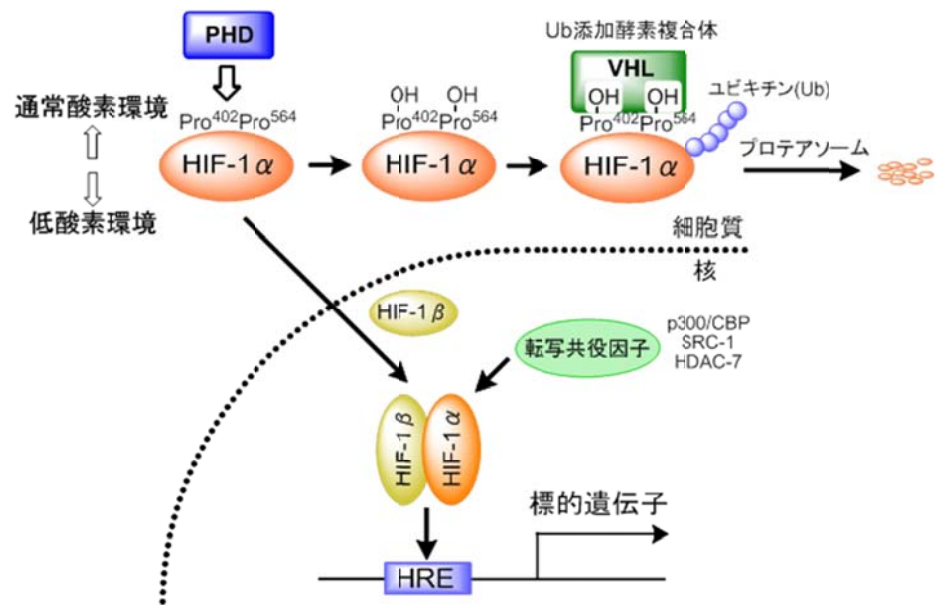


図 2. HIF-1 の酸素依存的な制御機構.

Glucose metabolism	Cell proliferation	Cell survival
HK1	Cyclin G2	ADM
HK2	IGF2	EPO
AMF/GPI	IGF-BP1	IGF2
ENO1	IGF-BP2	IGF-BP1
GLUT1	IGF-BP3	IGF-BP2
GAPDH	WAF1	IGF-BP3
LDHA	TGF- α	NOS2
PFKBF3	TGF- β 3	TGF- α
PFKL		VEGF
PGK1		
PKM	Angiogenesis	Extracellular-matrix metabolism
TPI	EG-VEGF	CATHD
Transcriptional regulation	ENG	Collagen type V (α 1)
1-Dec	LEP	FN1
2-Dec	LRP1	MMP2
ETS-1	TGF- β 3	PAI1
NUR77	VEGF	Prolyl-4-hydroxylase α (I)
		UPAR
Vascular tone	Cytoskeletal structure	Motility
α 1B-adrenergic receptor	KRT14	AMF/GPI
ADM	KRT18	c-MET
ET1	KRT19	LRP1
Haem oxygenase-1	VIM	TGF- α
NOS2		
Apoptosis	Iron metabolism	Nucleotide metabolism
NIP3	Ceruloplasmin	Adenylate kinase 3
NIX	Transferrin	Ecto-5'-nucleotidase
RTP801	Transferrin receptor	
pH regulation	Erythropoiesis	Amino-acid metabolism
Carbonic anhydrase 9	EPO	Transglutaminase 2
Epithelial homeostasis	Cell adhesion	Energy metabolism
Intestinal trefoil factor	MIC2	LEP
Drug resistance	Regulation of HIF-1 activity	
MDR1	p35srj	

図 3. HIF-1 によって転写亢進される遺伝子。^{4a}

ADM, adrenomedullin; ALDA, aldolase A; ALDC, aldolase C; AMF, autocrine motility factor; CATHD, cathepsin D; EG-VEGF, endocrinegland-derived VEGF; ENG, endoglin; ET1, endothelin-1; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; FN1, fibronectin 1; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT3, glucose transporter 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF2, insulin-like growth-factor 2; IGF-BP1, IGF-factor-binding-protein 1; IGF-BP2, IGF-factor-binding-protein 2; IGF-BP3, IGF-factor-binding-protein 3; KRT14, keratin 14; KRT18, keratin 18; KRT19, keratin 19; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance 1; MMP2, matrix metalloproteinase 2; NOS2, nitric oxide synthase 2; PFKBF3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PFKL, phosphofructokinase L; PGK 1, phosphoglycerate kinase 1; PAI1, plasminogen-activator inhibitor 1; PKM, pyruvate kinase M; TGF- α , transforming growth factor- α ; TGF- β 3, transforming growth factor- β 3; TPI, triosephosphate isomerase; VEGF, vascular endothelial growth factor; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; VEGFR2, VEGF receptor-2; VIM, vimentin.

第2節 がん悪性化への HIF-1 の関与機構

HIF-1 は、「がん細胞の微小環境への適応」、「組織への浸潤性・転移能の亢進」、「化学療法および放射線療法における治療抵抗性」などの現象を引き起こすことで、がんを悪性化へと導く。これらの現象と HIF-1 によって転写亢進される遺伝子群との関連を以下に概説する。

第1項 がん細胞の微小環境への適応

腫瘍組織内では血管が秩序無く形成されており、血管と離れている組織は十分な酸素や栄養の供給を受けることができない。また、腫瘍組織を構成するがん細胞は解糖系が亢進されており、過剰な乳酸を産生するため、細胞外へ排出された乳酸によりがん細胞の周辺環境は酸性に傾いている⁵。すなわち、がん細胞は低酸素・低栄養・低 pH の微小環境下で生存・増殖しなければならない。そのような環境において、血管新生を誘導する vascular endothelial growth factor (VEGF)、解糖系の亢進に関与する Glucose transporter-1 (GLUT1)、さらに pH 環境の調節を行う Carbonic anhydrase (CAIX)などの種々の遺伝子が HIF-1 により転写誘導されることで、がん細胞は微小環境に適応している⁴。

第2項 組織への浸潤性・転移能の亢進

上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)は、上皮性のがん細胞が間葉系細胞の表現型を獲得することで、より運動性が高くなり、転移を起こしやすくなった状態をいう。この EMT の獲得と癌細胞の転移能との関連が重要視されている⁶。HIF-1 は、EMT を制御する遺伝子である TWIST、SNAIL などの発現を誘導する⁷。また、HIF-1 によって、lysyl oxidase (LOX)が発現誘導され、細胞外マトリクスをリモデリングし、がん細胞の浸潤性を亢進することが、乳がん細胞を用いた研究により報告されている⁸。

第3項 化学療法および放射線療法における治療抵抗性

がん細胞では、HIF-1 により multi drug resistant protein 1 (MDR1) が発現誘導され、薬剤の細胞外排出能が高まる⁹。これにより、薬剤耐性が形成される。MDR1 は P 糖タンパク質(P-gp)としても知られており、広範な疎水性化合物や生体での異物などの排出ポンプとして ATP 依存的に機能する¹⁰。

一方、酸素の欠乏は、放射線照射により誘導される反応性・細胞毒性物質を直接阻害する。これは、酸素がないために DNA を壊す活性酸素種が生成しないためであると考え

12

療に対する創薬標的として注目されている。

第3節 HIF-1 阻害剤の報告例

(図 4.5)

テアソームによる HIF-1 α の分解が誘導される。

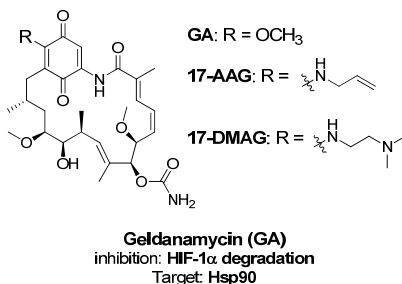
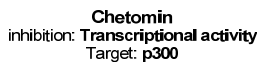
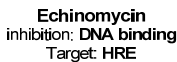


図 4. HIF-1 阻害剤の報告例（天然化合物）.

合成化合物では、HIF-1 α の分解を促進するCAY10585 (LW6, AC1-001)¹⁹がある(図7)。CAY10585 はクエン酸回路でリンゴ酸をオキサロ酢酸へと変換する酵素 malate dehydrogenase 2 (MDH2)を阻害する²⁰。ミトコンドリアの呼吸鎖が阻害されることで、ROS 産生が抑制され、Fe²⁺が ROS による酸化を受けずに安定化する。このため、Fe²⁺が PHD の基質となり、PHD が活性化されて、HIF-1 α の分解が促進される。

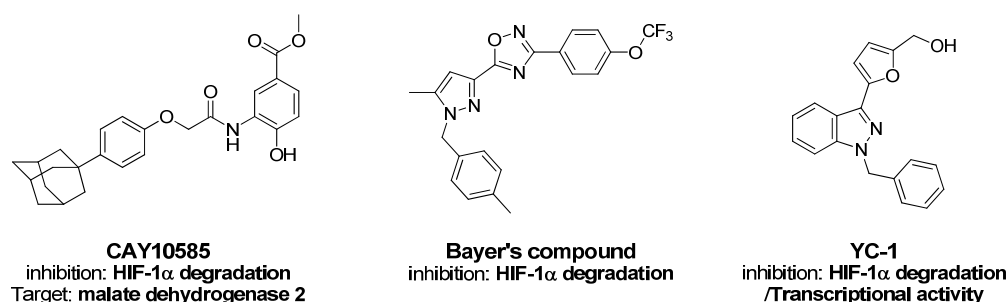


図 5. HIF-1 阻害剤の報告例（合成化合物）。

これに対し、Bayer 社報告の化合物²¹やYC-1²²のように直接的な作用点が不明な HIF-1 阻害剤も多く存在する(図 5)^{23, 24}。最も有望視されている YC-1 は、放射線治療後の腫瘍再発を有意に抑制することがマウスを用いて確認されているが²⁵、抗腫瘍薬として HIF 阻害剤が上市された例は現在のところない。

以上の様な背景のもと、著者は新たなケモタイプを有した新規 HIF-1 阻害薬開発を目的に、化合物ライブラリーを用いた探索研究（第 1 章）、構造活性相関研究（第 2 章）、ならびに作用機序に関する研究（第 3 章）を行った。

第1章 新規 HIF-1 阻害化合物のスクリーニング

第1節 化合物ライブラリーからの化合物抽出

あるタンパク質の阻害剤を取得したいとき、アッセイ系を用いて化合物ライブラリーをスクリーニングすることが定法である。ところが HIF の阻害剤の取得は容易ではなく、過去に所属研究室において、京都大学大学院薬学研究科保有のコアラボライブラリーよりランダム抽出した約 6000 個の化合物をアッセイした結果、ヒットしてきた十数個の化合物は殆どが偽陽性であるなど、新たな HIF-1 阻害活性を有する化合物を得ることはできなかった。そこで、本研究では、スクリーニングを行うにあたり、ランダム抽出ではなくヘテロ芳香環を起点とした化合物抽出を行った。

ヘテロ芳香環は、脂溶性が低く、水素結合形成や π - π スタッキング形成など生体内分子との親和性に優れており、多種多様な標的分子との結合能を有するプリビリッジド構造²⁶の一部にも含まれている。このことから、ヘテロ芳香環を導入することで、スクリーニングヒット率が向上することを期待した。

そこで、B-Raf kinase inhibitor²⁷、CB1 receptor antagonist²⁸、CARM1 inhibitor²⁹などにフェニルピラゾールがプリビリッジド構造として使用されている例を踏まえ、本研究ではアルキルピラゾールに着目した。(図 6)

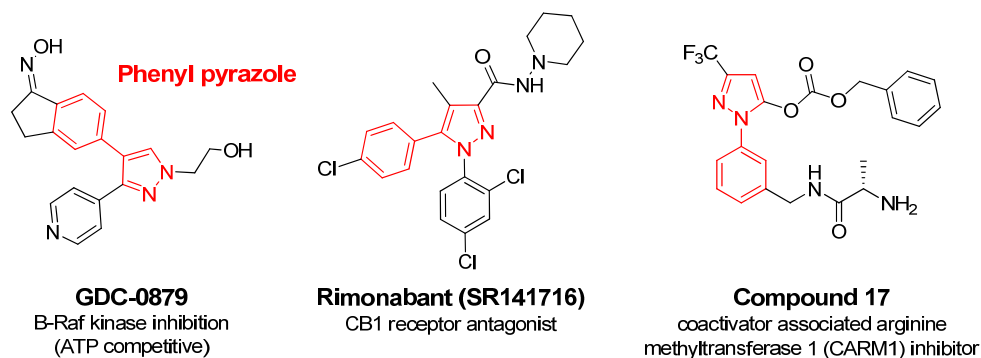


図 6. プリビリッジド構造としてのフェニルピラゾール.

約 3 万化合物からなるコアラボライブラリーよりアルキルピラゾールの構造検索を行い、まず 557 化合物を得た。そこから類似構造を削除し、構造的多様性を持つ 65 化合物群を抽出した (図 7)。

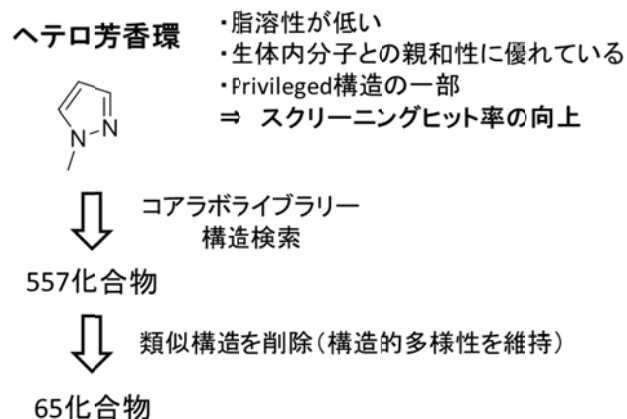


図 7. コアラポライブラリーからの化合物抽出.

第 2 節 HIF-1 阻害試験

次に、化合物ライブラリーより抽出した 65 化合物の HIF-1 阻害試験を行った。
当研究室では、HRE の下流にルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして導入したヒト線維芽肉腫 HT1080 細胞 (HRE-Luc/HT1080) を樹立している。そこで、この HRE-Luc/HT1080 細胞を用いたレポーター試験により HIF-1 阻害活性を評価した。(図 8)

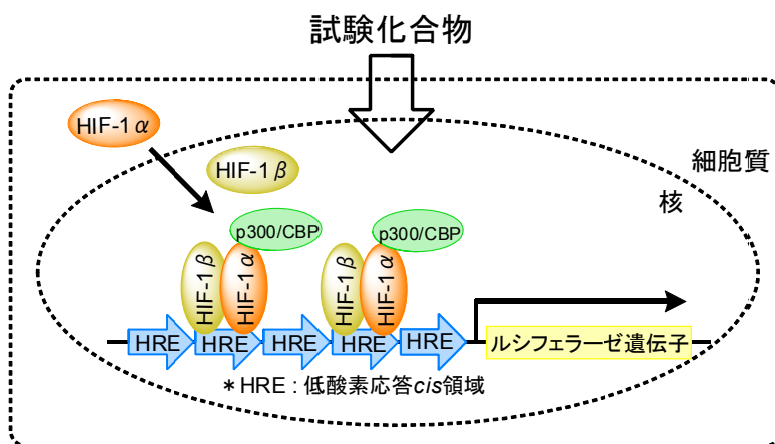


図 8. HRE-Luc/HT1080 細胞を用いたレポーター試験.

第3節 ルシフェラーゼ阻害による偽陽性の排除.

ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いたアッセイにおいては、ルシフェラーゼ阻害による偽陽性の検出事例がいくつか報告されている³⁰。そこで、本研究においても偽陽性の排除を行った。

ルシフェラーゼ阻害による偽陽性に関して考察するため、まずルシフェラーゼによる化学発光の原理について述べる³¹。ルシフェラーゼによる発光現象は、この励起カルボニル基の生成によるものである。まず、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリン(D-LH₂)のカルボキシル基が ATP の α 位のリン酸部位を攻撃し、ルシフェリル AMP 中間体(LH₂-AMP)を酵素中で生成する。次いで、酸素(O₂)が LH₂-AMP と反応し、励起状態のオキシルシフェリンが生成する。そして、基底状態のオキシルシフェリンへと変わる際、エネルギーを黄緑色の発光として放出する³²。(図 9)

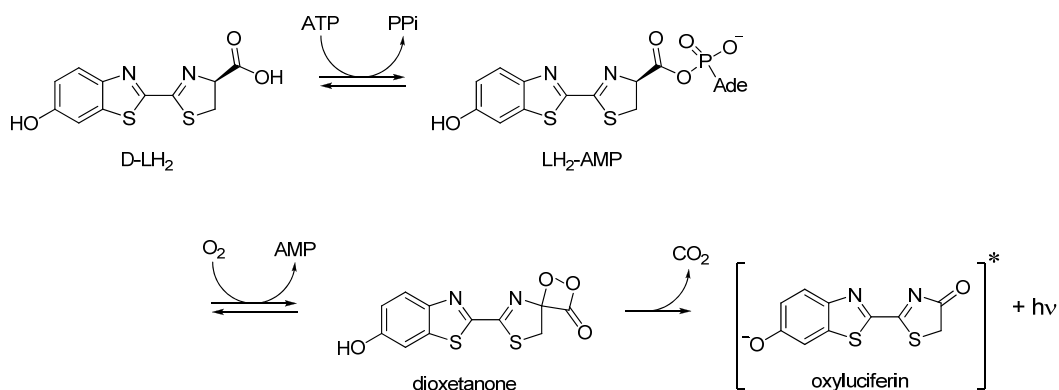
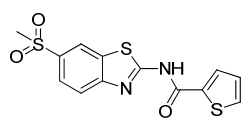


図 9. ルシフェリンの発光機構.

D-LH₂; ルシフェリン, PPI; ニリン酸(ピロリン酸、P₂O₇⁴⁻), Ade; Adenosine。

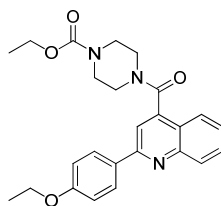
このようなルシフェリンの発光機構を阻害する化合物がいくつか報告されている³³。³⁴。主な特徴としては、(A) ルシフェリンと競合、(B) ルシフェリンおよび ATP と競合、(C) 非競合性を示す化合物がある³⁵ (図 10)。ルシフェリンと競合する化合物の特徴としては、①直線性、②平面性、③剛直性という共通の性質を持っている。実際に、所属研究室の過去の 6,000 化合物により行ったランダムスクリーニングでは、十数個の偽陽性を示す化合物が得られ、それらは直線性、平面性、剛直性というルシフェリンと類似の構造を有していた。

A. ルシフェリンと競合



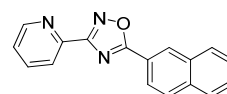
benzothiazole

B. ルシフェリンおよびATPと競合



quinoline

C. 非競合



oxadiazole

図 10. ルシフェラーゼ阻害作用を有する化合物の報告例.

(A) ルシフェリンと競合する化合物。(B) ルシフェリンおよび ATP と競合する化合物。(C) 非競合性の化合物。

そこで、本研究では、培養細胞の抽出液を用いて偽陽性の排除を行った (図 11)。すなわち、レポーター遺伝子を導入した HT1080 細胞を低酸素下で培養後、セルライセートにし、そこへ試験化合物を添加することで、ルシフェラーゼ活性を測定した。

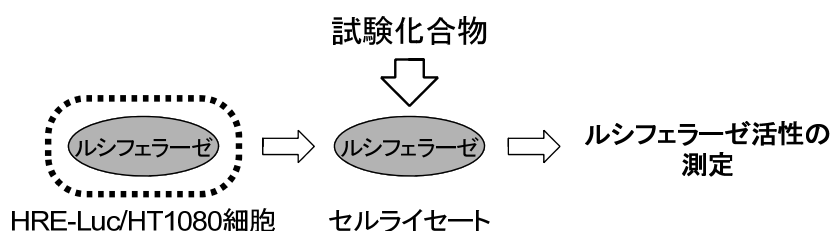


図 11. ルシフェラーゼ阻害による偽陽性の評価系.

第 4 節 ヒット化合物の構造比較

HIF-1 阻害試験、ならびにルシフェラーゼ活性測定を 10 μ M で試験した結果、以下の 4 化合物がヒット化合物として得られた。(図 12)

HIF-1 転写活性は、いずれの化合物も 50%程度阻害した。それに対して、ルシフェラーゼ活性の阻害はいずれの化合物でも見られなかったことから、偽陽性ではないと判断した。また、CLB-003 および CLB-008 は HIF-1 転写活性を阻害しても、ルシフェラーゼ活性の阻害も示したため、偽陽性と判断した。

このような偽陽性を示す化合物と比較すると、CLB-028 は CLB-008 と 5-6-5 の縮環構造部分が類似している。このことから、誘導体化の過程で CLB-028 類縁体が偽陽性を示す可能性が高いと考えられ、研究展開の優先度を下げた。

また、前述 (7 頁) の 2 つの HIF 阻害剤(Bayer's compound, YC-1)に共通するベンジルピラゾール骨格を持つ CLB-025、026 が得られた。これに対し、ベンジルピラゾールを持たず、かつ既存の HIF-1 阻害剤とは異なる新たなケモタイプである CLB-016 が得ら

れた。CLB-025、026 の研究展開により、作用点が不明な2つの HIF 阻害剤(Bayer's compound, YC-1)の作用点解明への足掛かりになり得る可能性が考えられるが、本研究では新規 HIF-1 阻害薬開発を目的としているため、CLB-016 を研究の対象候補とした。

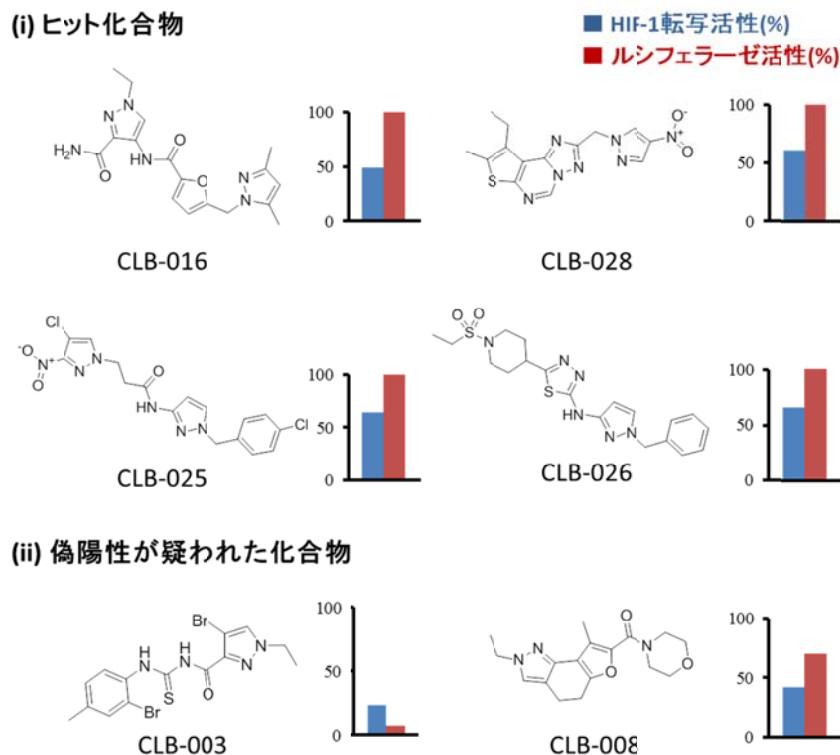


図 12. (i)ヒット化合物と(ii)偽陽性が疑われた化合物.

第5節 HIF-1 阻害活性の確認

スクリーニングした化合物溶液を HRMS により化合物の分子量を確認後、CLB-016 を再合成した。そして、HIF-1 阻害活性の再評価、ならびに HIF-1 標的遺伝子レベルへの影響を解析することで、HIF-1 阻害能を評価した。その結果、レポーター試験による HIF-1 阻害曲線と相関して、濃度依存的に HIF-1 標的遺伝子である *CAIX* mRNA レベルの低下を確認した (図 13)。以上の結果より、CLB-016 は HIF-1 阻害能を有することが明らかとなった。

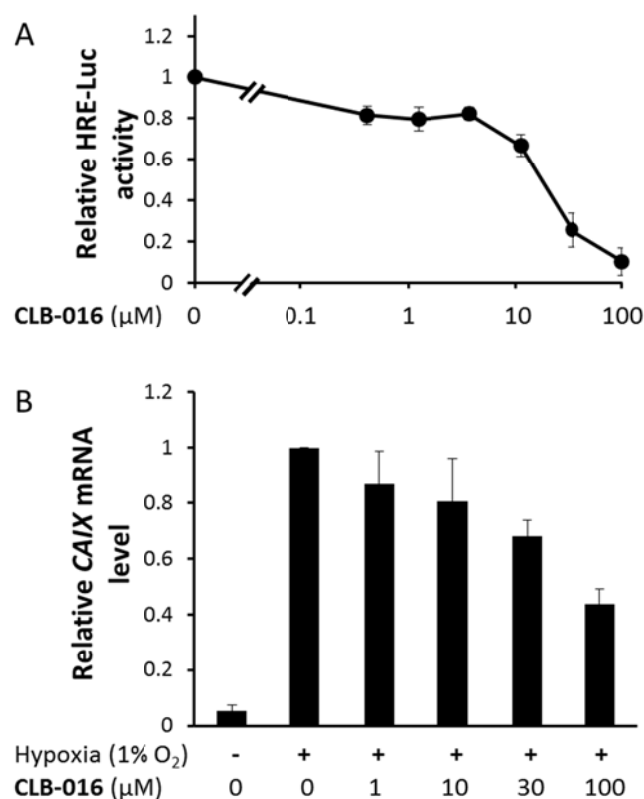


図 13. CLB-016 の HIF-1 阻害能の評価.

(A) HRE-Luc/HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼによる化学発光を測定し、HIF-1 阻害活性を算出した。(B) 低酸素環境下(1% O₂)の HT1080 細胞を各濃度の CLB-016 で 4 時間処理し、CAIX mRNA 量を定量 RT-PCR により解析した。

第 6 節 まとめ

新規 HIF-1 阻害剤のスクリーニングを行うにあたり、約 30,000 化合物を有する本学 研究科保有ライブラリーより、ヘテロ芳香環を起点として 65 化合物を抽出した。さらに HIF-1 阻害試験およびルシフェラーゼ阻害による偽陽性の排除を行うことで、既存の HIF-1 阻害剤とは異なる新たなケモタイプである CLB-016 を見出した。また、CLB-016 は HIF-1 阻害活性と相関して、濃度依存的に HIF-1 標的遺伝子である CAIX mRNA レベルを低下した。このことから、CLB-016 は HIF-1 阻害能を有することが分かった。

第2章 CLB-016 の HIF-1 阻害活性における構造活性相関

第1節 構造活性相関解析の戦略

CLB-016 の HIF-1 阻害活性における構造活性相関解析を、中央部芳香環（領域1）、カルボキサミド部（領域2）、ピラゾール環アルキル部（領域3）、そして右セグメント（領域4）の4つの領域に分割し、レポーター試験により HIF-1 阻害活性の変化を調べた。（図 14）

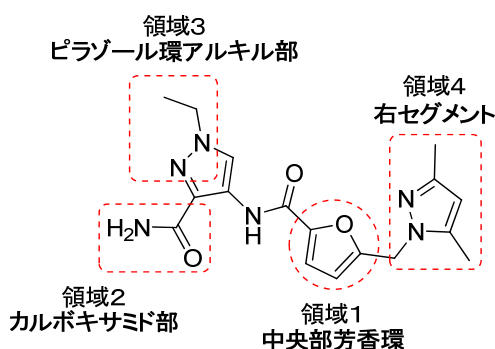
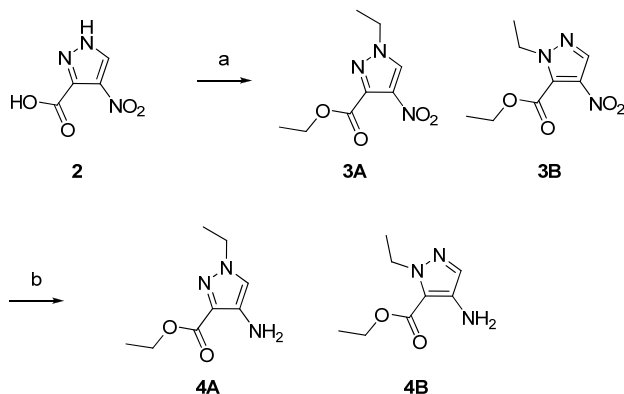


図 14. 構造活性相関解析の戦略.

第2節 CLB-016 およびその誘導体の合成

CLB-016 およびその誘導体の合成法を以下に示す。化合物 **2** をヨウ化エチルを用いてアルキル化後、生成した位置異性体を分離し、**3A**、**3B** を得た。続いて、それぞれの異性体を接触還元によりアミン体 **4A**、**4B** へと還元した。このとき、Et 基の水素原子とピラゾール 5 位の水素原子との NOESY 相関を観測することにより、位置異性体の構造を決定した。（スキーム 1）

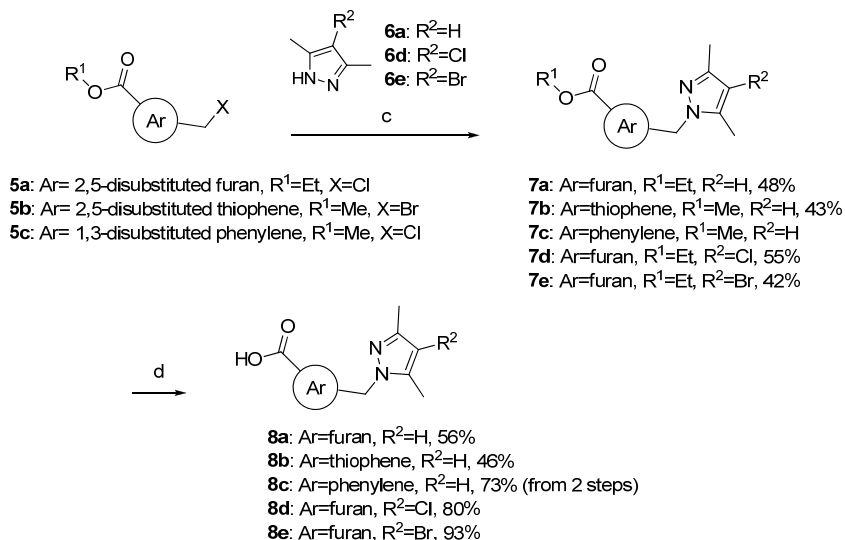


スキーム 1. CLB-016 およびその誘導体の合成.

試薬と条件: (a) Ethyl iodide, K_2CO_3 , DMF, rt, **3A** (34%), **3B** (21%); (b) Pd/C, H_2 , EtOH, rt, **4A**

(77%), **4B** (91%).

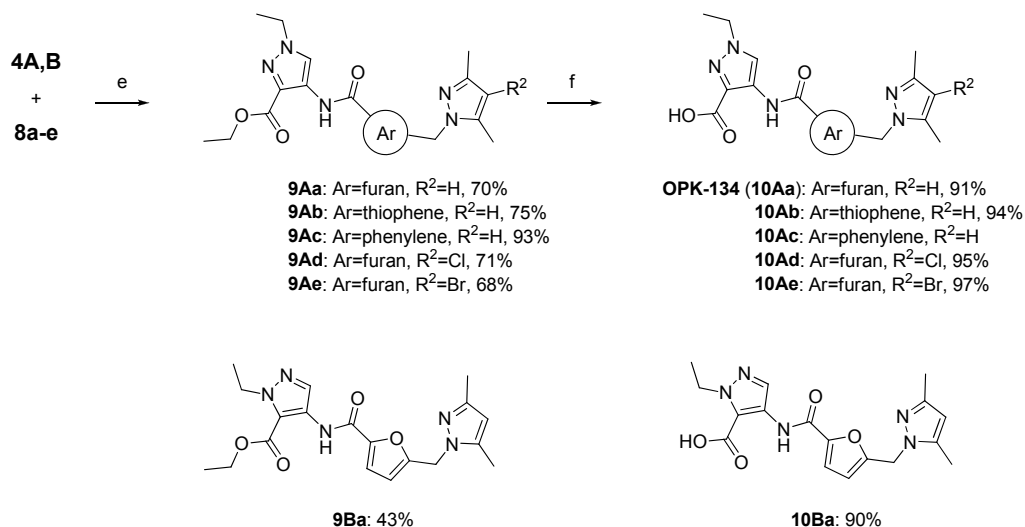
また、ハロアルカン **5** とジメチルピラゾール **6** よりエステル体 **7** を生成し、加水分解してカルボン酸 **8** を得た。(スキーム 2)



スキーム 2. CLB-016 およびその誘導体の合成.

試薬と条件: (c) **6a/6d/6e**, KO^tBu, THF, rt; (d) NaOH, EtOH, rt.

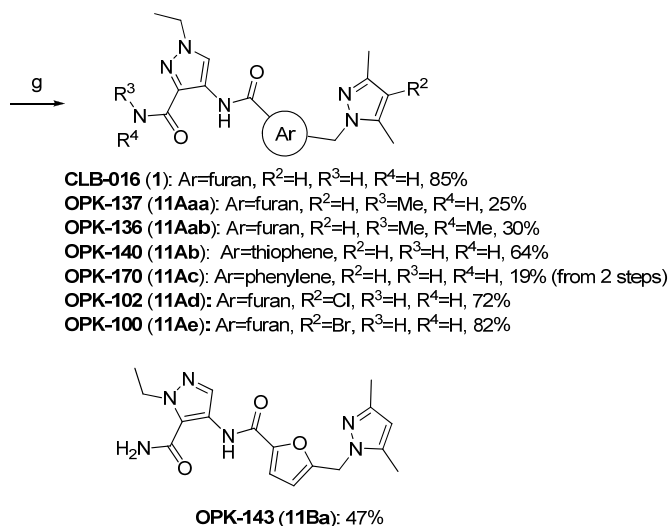
続いて、アミン体 **4** とカルボン酸 **8** を縮合させた後、得られたエチルエステル **9** を加水分解してカルボン酸 **10** を得た。(スキーム 3)



スキーム 3. CLB-016 およびその誘導体の合成.

試薬と条件: (e) HATU, Hunig's Base, DMF, rt; (f) NaOH, EtOH, rt.

最後にアミンと縮合することで CLB-016 (**1**)、OPK-137 (**11Aaa**)、OPK-136 (**11Aab**)、OPK-140 (**11Ab**)、OPK-170 (**11Ac**)、OPK-102 (**11Ad**)、OPK-100 (**11Ae**)、および OPK-143 (**11Ba**)を合成した。同様の合成法を用いて CLB-016 の誘導体を合成した。また、アルキル基（領域 3）の長さの異なる OPK-160、OPK-148 も同様の方法により合成した。（スキーム 4）

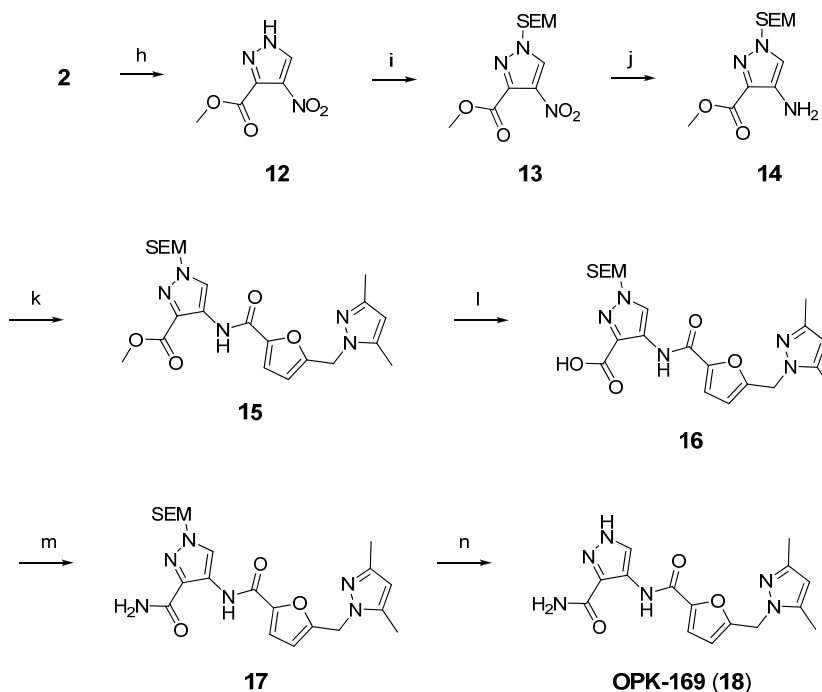


スキーム 4. CLB-016 およびその誘導体の合成.

試薬と条件: (g) HATU, Hunig's Base, DMF, rt or MW (50 °C).

次に OPK-169 の合成法を示す（スキーム 5）。

化合物 **2** をメチル化によりメチルエステル **12** に変換し、ピラゾールの NH を SEM で保護した。続いて、接触還元にてアミン体 **14** へと変換し、カルボン酸 **8a** と縮合することで化合物 **15** を得た。さらに、加水分解後、アンモニアと縮合することで化合物 **17** を得た。最後に HCl/EtOH を用いて脱保護することで、OPK-169 (**18**)を得た。

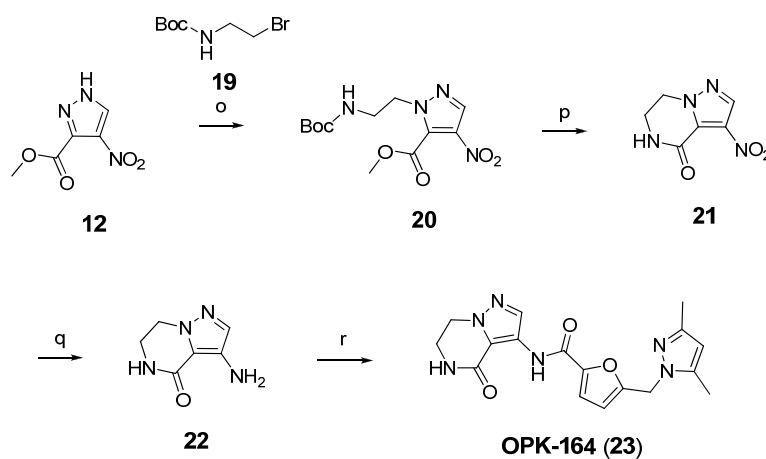


スキーム 5. OPK-169 (18)の合成.

試薬と条件: (h) Acetyl Chloride, MeOH, rt, 73%; (i) SEM-Cl, NaH, THF, rt, 54%; (j) H₂, Pd/C, 40 °C, 71%; (k) **8a**, HATU, Hunig's Base, DMF, MW 50 °C, 49%; (l) 5N NaOH aq, EtOH, rt, 95%; (m) NH₄Cl, HATU, Hunig's Base, DMF, MW 50 °C, 84%; (n) 2M HCl/EtOH, MW 80 °C, 52%.

次に、配座制限誘導体である OPK-164 (**23**)の合成法を示す (スキーム 6)。

化合物 **12** を **19** を用いてアルキル化後、生成した Boc アミン体 **20** を酸性条件下で脱 Boc し、続いて toluene 中、塩基性条件下で加熱することで環化体 **21** を得た。接触還元後、**8a** と縮合し、OPK-164 (**23**)を得た。



スキーム 6. OPK-164 (23)の合成.

試薬と条件: (o) K₂CO₃, TBAI, DMF, rt, 11%; (p) i. 2M HCl/EtOH, 50 °C; ii. Hunig's Base, toluene, 100 °C, 46%; (q) Pd/C, H₂, EtOH, 40 °C, 84%; (r) **8a**, HATU, Hunig's Base, DMF, MW 50 °C, 42%.

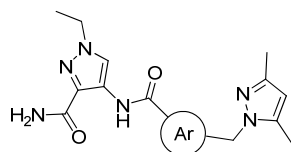
第3節 中央部芳香環の検討（領域1）

第1項 芳香環の変換

中央に位置する芳香環の両置換基間の角度変化は、化合物全体の構造を大きく変える^{36,37}。そこで、中央部芳香環の変換による活性の変化を検証した。CLB-016 (HRE-Luc : IC₅₀ = 19.1 μM) のフラン環を、両置換基間の角度が異なるチオフェン環やベンゼン環へと変換したところ、チオフェン環では HIF-1 阻害活性が消失し(OPK-140, HRE-Luc : IC₅₀ > 100 μM)、メタ位2置換のベンゼンでは活性が減弱した(OPK-170, HRE-Luc : IC₅₀ = 60.8 μM)。(表1)

次に、置換基間の角度以外の要因も検討するため、アミドと芳香環との二面角を 180 度回転させた両コンフォメーションの存在比率を DFT 計算(B3LYP/6-31G*)により算出した。その結果、フラン環 (ΔE = 2.86 kcal/mol)とチオフェン環 (ΔE = 1.17 kcal/mol)ではメジャーのコンフォメーションが異なることが示唆された。これは、フラン環では酸素同士の電荷の反発、チオフェンでは S-O 相互作用⁴⁰の寄与が要因であると考えられる。下記に示した furan-2-amide 部³⁸と thiophene-2-amide 部³⁹の安定コンフォメーションは、それぞれ類似構造を有する化合物の X 線結晶構造解析により支持されている。また、ベンゼン環では、両コンフォメーションの存在比率がほぼ等しいことから、フリップしやすいことが考えられる。以上の結果より、CLB-016 の HIF-1 阻害活性発現には、(i) 置換基間の角度(θ)、および(ii) アミドと芳香環との二面角への影響など、フラン環によるコンフォメーション制御が重要であることが示唆された。

表 1. 芳香環の変換. (領域 1)



化合物	Ar	置換基間の角度 θ^a	両コンフォメーションの ボルツマン分布 ^a	HIF-1阻害活性 IC_{50} (μM) ^b	増殖抑制活性 IC_{50} (μM) ^b	ALogP ^c
CLB-016		125.6°		19.1 ± 2.8	15.1 ± 1.8	1.18
OPK-140		147.5°		> 100	> 100	1.74
OPK-170		119.9°		60.8 ± 12.7	55.0 ± 16.9	1.71
YC-1				48.4 ± 2.3	30.9 ± 4.3	4.08

HIF-1 阻害活性: HRE-Luc/HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼによる化学発光を測定し、HIF-1 阻害活性(IC₅₀)を算出した。増殖抑制活性: HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 72 時間培養した。その後、WST-8 にて呈色後、吸光度を測定し、増殖抑制活性(IC₅₀)を算出した。

^a 置換基間の角度、および両コンフォメーションの存在比率は、密度汎関数理論(the density functional theory, DFT) B3LYP/6-31G*により算出した。^b 3 回の平均値、および標準誤差。^c ALogP は Pipeline pilot (Accelrys, Inc.)を用いて算出した。

第 2 項 アミド-チオフェン環における S-O 相互作用の考察

原子間の相互作用は、化合物全体のコンフォメーションや物性に大きな影響を与える。S-O 相互作用もその一つであり、1,5 type の S-O 相互作用については、Nagao らが、X 線結晶構造解析と Hartree-Fock 計算によって検証している⁴⁰。(図 15)

下記化合物の X 線結晶構造解析によると、S-O 間の原子間距離は 2.65 Å であり、報告されている van der Waals 半径の和は 3.32 Å⁴¹ と比較すると短くなっていることから、原子間で相互作用が働いていることが支持されている。

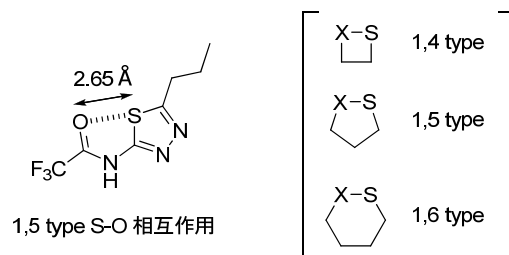


図 15. X 線結晶構造解析による S-O 間の原子間距離.

また、Hartree-Fock 計算により、アミドとチアジアゾール間の二面角を 90 度ずつ回転させた各状態のエネルギー差を比較し、S-O 相互作用を形成し得る状態 B がエネルギー的に安定であることを示している⁴⁰。(図 16)

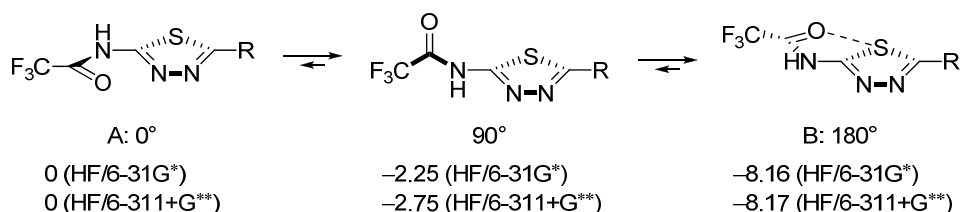


図 16. Hartree-Fock 計算による各状態のエネルギー差⁴⁰.

構造式下段の数字は、Hartree-Fock 計算により導かれた相対エネルギー(kcal/mol)であり、構造式 A を 0 kcal/mol としたもの。R = *n*-C₃H₇。

さらに、Nagao らは、S-O 相互作用の要因としては、カルボニル酸素 lone pair の非結合性軌道と S-C 結合の σ^* 軌道の相互作用が挙げられると述べている⁴⁰。(図 17)

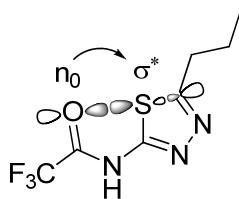


図 17. S-O 相互作用の要因⁴⁰.

本研究において、DFT(B3LYP/6-31G*)計算により得られた OPK-140 の S-O 原子間距離は 2.97 Å であり、Van der Waals 半径の和と比較すると 0.35 Å も短くなっている。このことから、OPK-140 の S-O 間には相互作用が働いていることが考えられる。(図 18)

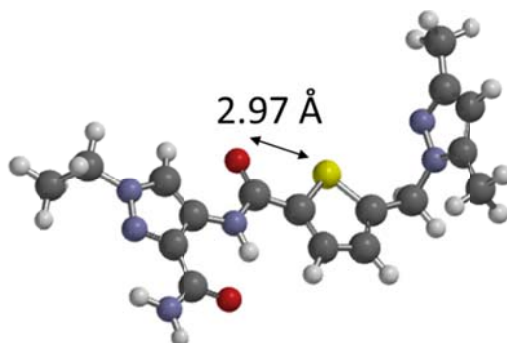


図 18. OPK-140 の S-O 原子間距離.

S-O 原子間距離は、密度汎関数理論(the density functional theory, DFT) B3LYP/6-31G*により算出した。

さらに、OPK-140 の HOMO と LUMO についても検証した。HOMO の軌道を算出したところ、カルボニル酸素上に HOMO の軌道があることが分かった。また、硫黄上には HOMO の軌道はないことも確認できた。それに対し、LUMO の軌道を算出したところ、硫黄上に LUMO の軌道があることを確認した。以上の結果より、HOMO にある酸素上の不対電子がひとつ上のエネルギー準位である LUMO へ遷移するとき硫黄の空軌道へと遷移することが示唆された。つまり S-O 間で相互作用が生じやすい状態であることが考えられる。(図 19)

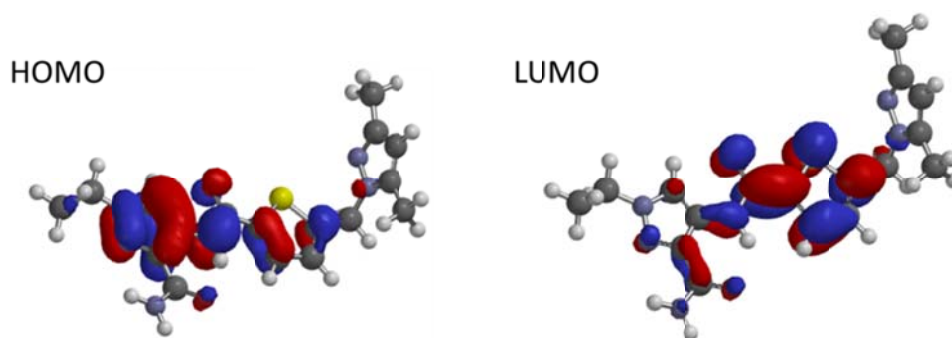


図 19. OPK-140 の HOMO および LUMO の軌道.

HOMO および LUMO の軌道は、密度汎関数理論(the density functional theory, DFT) B3LYP/6-31G*により算出した。

また、双極子モーメントおよび静電ポテンシャルを算出した。計算した 2 面角の変化によって分子の双極子モーメントのベクトル (黄色の矢印) が大きく変化していることから、この結合まわりの回転が分子全体に与える影響が大きいことが確認された。また、静電ポテンシャルを算出したところ、カルボニル基から硫黄周辺にかけて、電子密度が高いことを確認した。これは、電荷の分散が生じ、分子の安定化につながっていると考

えている（図 20）。したがって、OPK-140 ではカルボニル上の酸素原子とチオフェン環の硫黄原子との間には相互作用が働いていることが考えられる。

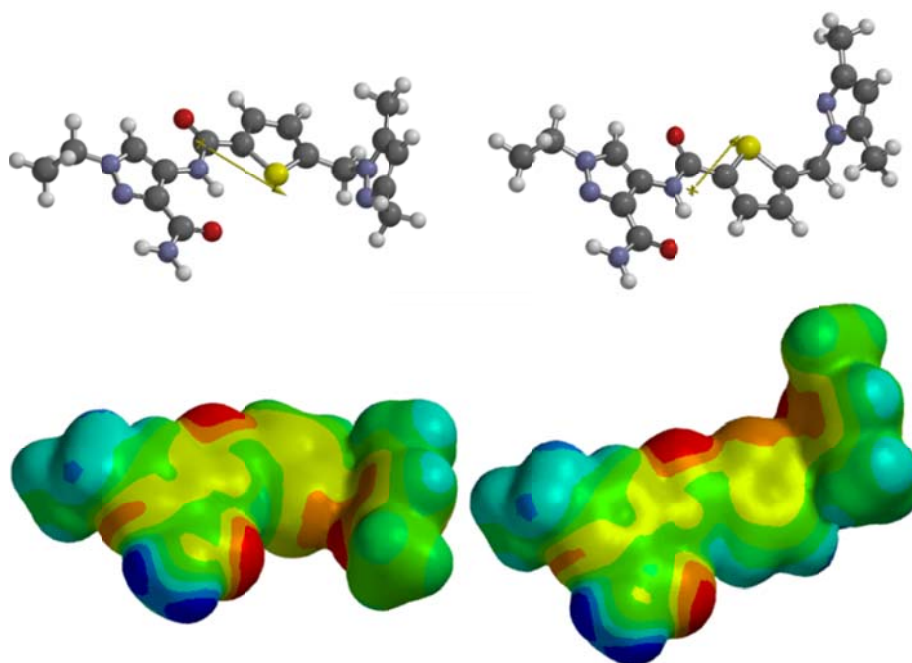


図 20. OPK-140 の双極子モーメントおよび静電ポテンシャル。

双極子モーメントおよび静電ポテンシャルは、密度汎関数理論(the density functional theory, DFT) B3LYP/6-31G*により算出した。静電ポテンシャル図：赤 = 電子密度が高い。青 = 電子密度が低い。

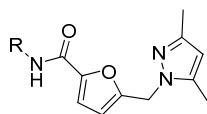
第 4 節 カルボキサミド部の検討（領域 2）

酸アミドは水素結合のドナーにもアクセプターにもなるため、活性発現には重要な置換基である。そこで、水素結合ドナーとなるアミドの水素原子と HIF-1 阻害活性発現の関係を検討するため、カルボキサミド部の変換を行った。（表 2）

CLB-016 のカルボキサミド部をアルキル化したところ、第二級アミドでは活性が保持したが、第三級アミドでは活性が消失した。また、アミド以外のプロトンドナー性のカルボン酸、第一級アルコールに変換しても活性は消失した。

これらの結果より、カルボキサミド部の水素原子は HIF-1 阻害活性発現に重要であることが示された。

表 2. カルボキサミド部の検討. (領域 2)



化合物	HIF-1阻害活性 IC ₅₀ (μM) ^a	増殖抑制活性 IC ₅₀ (μM) ^a	ALogP ^b
CLB-016 	19.1 ± 2.8	15.1 ± 1.8	1.18
OPK-137 	19.4 ± 6.2	18.1 ± 0.8	1.38
OPK-136 	> 100	75.0 ± 10.9	1.59
OPK-134 	> 100	> 100	1.81
OPK-167 	> 100	N.D.	1.36

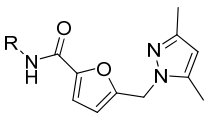
HIF-1 阻害活性: HRE-Luc/HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼによる化学発光を測定し、HIF-1 阻害活性(IC₅₀)を算出した。増殖抑制活性: HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 72 時間培養した。その後、WST-8 にて呈色後、吸光度を測定し、増殖抑制活性(IC₅₀)を算出した。

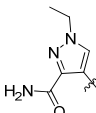
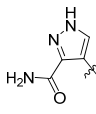
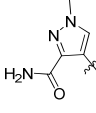
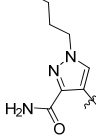
^a 3 回の平均値、および標準誤差。^b ALogP は Pipeline pilot (Accelrys, Inc.)を用いて算出した。

第5節 アルキル基の大きさの検討（領域3）

CLB-016 の窒素上のアルキル置換基を最適化するため、アルキル基の大きさの検討を行った（表3）。CLB-016 のエチル基を除去し無置換にした OPK-169、もしくはメチル基に短縮した OPK-160、また逆に、ノルマルブチル基へと伸長した OPK-148 を合成した。しかしながら、いずれの場合も活性は減弱した。以上の結果より、CLB-016 の窒素上のアルキル基の大きさとしてはエチル基が適していることが分かった。

表3. アルキル基の大きさの検討.（領域3）



化合物		HIF-1阻害活性 IC ₅₀ (μM) ^a	増殖抑制活性 IC ₅₀ (μM) ^a	ALogP ^b
CLB-016		19.1 ± 2.8	15.1 ± 1.8	1.18
OPK-169		71.6 ± 1.1	66.6 ± 2.9	0.62
OPK-160		79.3 ± 1.9	41.6 ± 2.7	0.83
OPK-148		50.1 ± 4.6	37.9 ± 3.3	2.16

HIF-1 阻害活性: HRE-Luc/HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼによる化学発光を測定し、HIF-1 阻害活性(IC₅₀)を算出した。増殖抑制活性: HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 72 時間培養した。その後、WST-8 にて呈色後、吸光度を測定し、増殖抑制活性(IC₅₀)を算出した。

^a 3 回の平均値、および標準誤差。^b ALogP は Pipeline pilot (Accelrys, Inc.)を用いて算出した。

第6節 アルキル基の置換位置変換（領域3）

活性発現に重要な置換基は、その大きさと方向が重要である。そこで、エチル基の方向による HIF-1 阻害活性発現への影響を検討するため、アルキル基の置換位置変換を行った（表4）。

CLB-016 の位置異性体である OPK-143 を合成したところ、活性が消失した。両異性体を比較すると、カルボキサミド部とピラゾール環との二面角が、CLB-016 では 0 度、OPK-143 では 11 度と変化することが、DFT 計算により算出された。この二面角変化は、置換位置変換されたアルキル基との立体障害によるものであると考えられる。

そこで、カルボキサミド部を固定し、CLB-016 とほぼ同じ二面角である配座制限誘導体 OPK-164 を合成したところ、活性は消失した。すなわち、CLB-016 と同じ領域（ピラゾール 1 位）へのアルキル基の導入が HIF-1 阻害活性発現に重要であることが考えられる。さらに、CLB-016 と OPK-137 はカルボキサミド水素原子(NH)とピラゾール窒素原子間で分子内水素結合形成が示唆されたことから⁴²、OPK-164 と比較するとアミド結合上の水素原子の向きも HIF-1 阻害活性発現に重要であることが考えられる。

よって、CLB-016 のような 1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミド骨格が HIF-1 阻害活性発現に重要であることが確認された。(図 21)

表 4. アルキル基の置換位置変換。(領域 3)

化合物	R	HIF阻害活性 IC ₅₀ (μM) ^a	増殖抑制活性 IC ₅₀ (μM) ^a	ALogP ^b
CLB-016		19.1 ± 2.8	15.1 ± 1.8	1.18
OPK-143		> 100	> 100	1.04
OPK-164		> 100	> 100	0.72

HIF-1 阻害活性: HRE-Luc/HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼによる化学発光を測定し、HIF-1 阻害活性(IC₅₀)を算出した。増殖抑制活性: HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 72 時間培養した。その後、WST-8 にて呈色後、吸光度を測定し、増殖抑制活性(IC₅₀)を算出した。

^a 3 回の平均値、および標準誤差。^b ALogP は Pipeline pilot (Accelrys, Inc.)を用いて算出した。

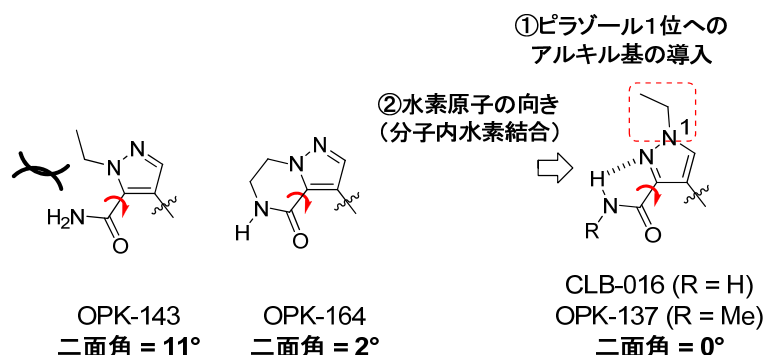


図 21. アルキル基の置換位置変換による HIF-1 阻害活性の消失の要因。

二面角は、密度汎関数理論(the density functional theory, DFT) B3LYP/6-31G*により算出した。

第 7 節 右セグメントの検討 (領域 4)

CLB-016 の右セグメントのピラゾール環は、ジメチル基を有した脂溶性の高い構造となっている。そこで、脂溶性に着目した右セグメントの変換を行い、活性への影響を調べた (表 5)。

CLB-016 のジメチル基を無くした OPK-161 は活性が減弱した。また、ジメチル基は有するもののヘテロ原子が外側を向いたジメチルイソキサゾール(OPK-095)では活性が消失した。この時、CLB-016 と OPK-095 では AlogP は変化していない。このことから、右セグメントでは、CLB-016 に含まれるジメチルピラゾールのようなある程度嵩高い脂溶性を有する構造が HIF-1 阻害活性発現に重要であると考えられた。

そこで、脂溶性置換基であるハロゲンをピラゾール 4 位に導入したところ、期待通り活性が向上した OPK-102 および OPK-100 が得られた。これは、リガンドのハロゲン導入により標的分子の脂溶性領域に対する占有率が上がり、その分だけ脱溶媒和によるエントロピーが増大したことが考えられる。

表 5. 右セグメントの検討. (領域 4)

化合物	R	HIF阻害活性 IC ₅₀ (μM) ^a	増殖抑制活性 IC ₅₀ (μM) ^a	ALogP ^b
CLB-016		19.1 ± 2.8	15.1 ± 1.8	1.18
OPK-161		81.8 ± 6.9	75.1 ± 0.2	0.75
OPK-095		> 100	> 100	1.17
OPK-102		8.7 ± 0.6	7.4 ± 0.2	1.84
OPK-100		8.1 ± 0.2	7.0 ± 0.3	1.93

HIF-1 阻害活性: HRE-Luc/HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼによる化学発光を測定し、HIF-1 阻害活性(IC₅₀)を算出した。増殖抑制活性: HT1080 細胞を薬剤処理し、低酸素下(1% O₂)で 72 時間培養した。その後、WST-8 にて呈色後、吸光度を測定し、増殖抑制活性(IC₅₀)を算出した。

^a 3 回の平均値、および標準誤差。^b ALogP は Pipeline pilot (Accelrys, Inc.)を用いて算出した。

第 8 節 まとめ

CLB-016 の構造活性相関研究の結果、HIF-1 阻害活性発現には、①フラン環によるコンフォメーション制御、②カルボキサミド部の水素原子(NH)、③左セグメントのピラゾール上のアルキル基の長さや位置、④右セグメントの大きさと脂溶性置換基の存在が重要であることが分かった。さらに、領域 4 の検討より得られた知見を基に右セグメント部に脂溶性置換基であるハロゲンを導入したところ、CLB-016 よりも HIF-1 阻害活性が増強した OPK-100、102 を見出した。

第3章 CLB-016 およびその誘導体の HIF-1 阻害機構の解析

本章では CLB-016 およびその誘導体の HIF-1 阻害機構について次のように解析した。

まず、本化合物の HIF-1 標的遺伝子発現に及ぼす影響を調べることで、第2章で示した HIF-1 阻害活性との相関を確認した（第1節）。さらに、本化合物により HIF-1 標的遺伝子の発現を阻害することで、HIF-1 によって誘導される表現型に及ぼす影響を調べた（第2節）。

次に、HIF-1 阻害機構として可能性のある作用点を順に検証した（図22）。つまり、本化合物による HIF-1 α 、HIF-1 β の遺伝子およびタンパク質発現への影響（第3節）、HIF-1 α の核移行（第4節）、HIF-1 の DNA 結合能（第5節）に対する影響を調べた。最後に、ヒトがん細胞パネル感受性試験を行い、HIF-1 阻害剤である YC-1、および既存の抗腫瘍薬との比較による作用機序の推測を行った。

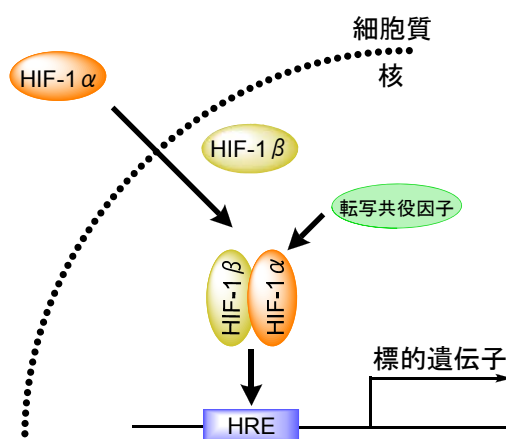


図22. 第3章で検証した HIF-1 阻害機構.

第1節 HIF-1 標的遺伝子発現に及ぼす CLB-016 誘導体の影響

第2章で見出した CLB-016 誘導体が、HIF-1 標的遺伝子発現に及ぼす影響を定量 RT-PCR 法により解析した。その結果、レポーター試験により評価した HIF-1 阻害活性と相関して、HIF-1 標的遺伝子である *CAIX* mRNA レベルの低下が確認された。さらに、構造活性相関解析より見出した OPK-100 および OPK-102 で処理した場合は、CLB-016 処理に比べて高い *CAIX* 転写抑制効果が認められた。（図23）

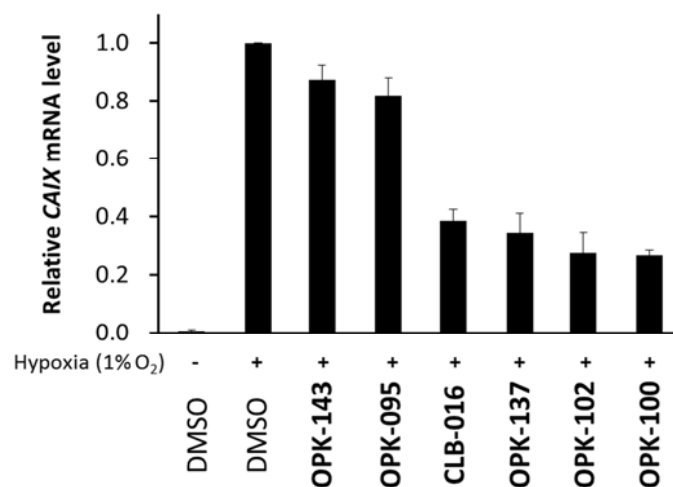


図 23. CAIX 遺伝子発現に及ぼす CLB-016 誘導体の影響.

低酸素環境下(1% O₂)の HT1080 細胞を CLB-016 誘導体で処理し(100 μM, 16 h)、CAIX mRNA 量を定量 RT-PCR 法により解析した。

さらに、CAIX 以外の HIF-1 標的遺伝子発現に対する影響を調べた。その結果、HIF-1 標的遺伝子である VEGF も、CLB-016 による転写抑制効果が認められた。(図 24)

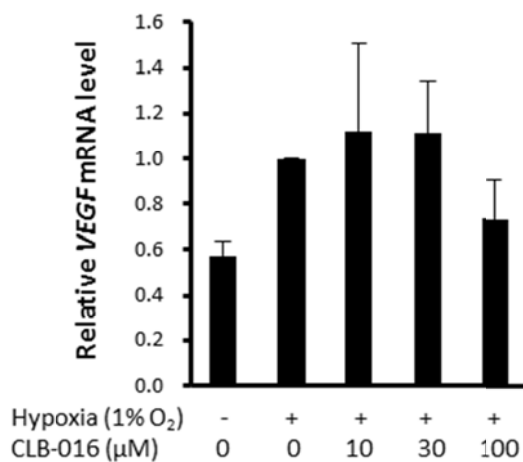


図 24. VEGF 遺伝子発現に及ぼす CLB-016 の影響.

低酸素環境下(1% O₂)の HT1080 細胞を各濃度の CLB-016 で 4 時間処理し、VEGF mRNA 量を定量 RT-PCR 法により解析した。

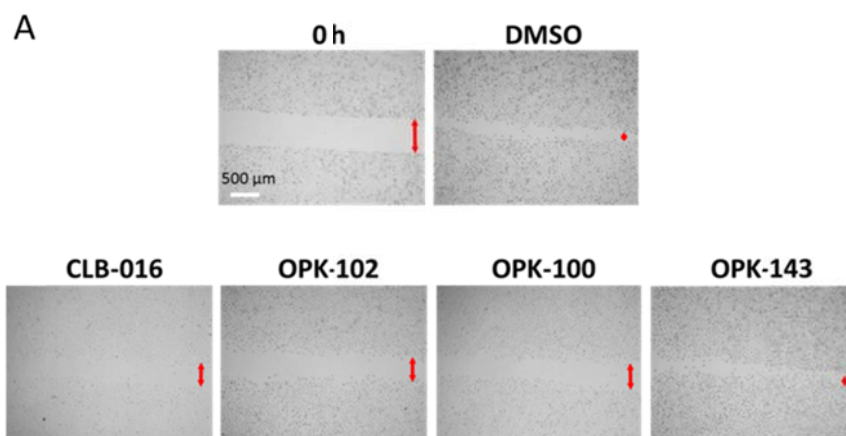
以上の結果より、CLB-016 およびその活性誘導体は、HIF-1 阻害活性を有することが明らかとなった。

第2節 がん細胞の遊走阻害試験

序論で述べたように、HIF-1により転写亢進された遺伝子が、がん細胞の遊走を誘導することが知られている。そこで、HIF-1によって誘導される表現型として、がん細胞の遊走に対する CLB-016 およびその活性誘導体の影響を観察した。(図 25)

試験方法は wound-healing assay を用いた。この試験は、コンフルエントな状態まで培養した単層細胞に引っかき傷（創傷）を作り、その治癒度合いを測定する方法である。HIF-1 下流の遺伝子発現が抑制され、細胞外マトリックスの再構築や接着による細胞骨格構造構築などが影響を受けると、がん細胞の遊走能は創傷の治癒の遅れとして反映される。

本化合物を wound-healing assay で試験した結果、コントロールの創傷残存率は 43.3%、また HIF-1 阻害活性をもたない化合物 OPK-143 では 39.9%であった。これに対し、HIF-1 阻害活性を有する化合物 CLB-016（創傷残存率 72.3%）、およびその誘導体である OPK-102（同 72.5%）と OPK-100（同 77.8%）は、創傷の治癒度合いをコントロールに比べ有意に阻害した。このことから、CLB-016 およびその活性誘導体は、低酸素環境下におけるがん細胞の遊走を抑制することが示された。



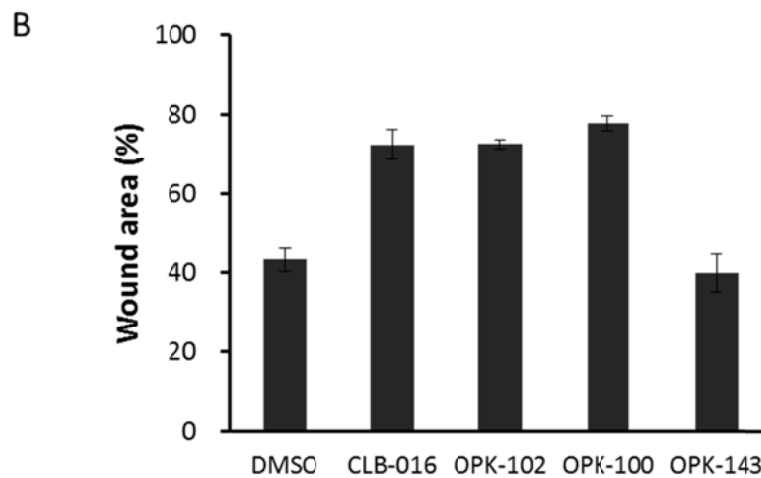


図 25. 遊走阻害試験.

(A) 培養した HT1080 細胞の単層をピペットチップを用いて傷を形成させた。その後、薬剤で処理し(100 μ M)、低酸素環境下(1% O_2)培養し 24 時間後の創傷治癒の度合いを位相差顕微鏡で観察した。赤色矢印は 創傷の治癒度合を示す。スケールバーの長さは 500 μ m である。(B) 化合物処理前に対する、化合物処理後 24 時間における創傷の残存比率(%)。

第 3 節 HIF-1 α 、HIF-1 β の mRNA およびタンパク質レベルの解析

本節から第 5 節にわたって、現在知られている HIF-1 遺伝子発現機構に対する本化合物が及ぼす影響を検証した。

まず、HIF-1 α 、HIF-1 β の mRNA およびタンパク質レベルに対する CLB-016 の影響を解析した。定量 RT-PCR 解析の結果、HIF-1 による転写促進を受けない *HIF-1 α* と *HIF-1 β* の mRNA レベルに対して、CLB-016 は影響を及ぼさないことが分かった。(図 26)

以上の結果から、前節で示した *CAIX* mRNA レベルの低下は、RNA ポリメラーゼ II や基本転写因子の阻害による遺伝子発現の非特異的な阻害によるものではないことが確認された。

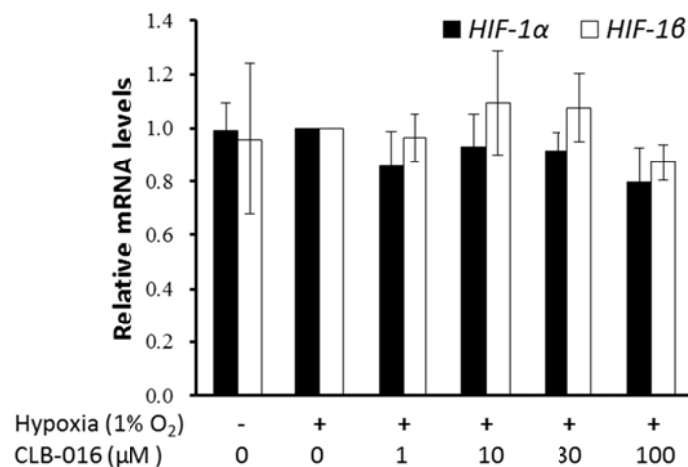


図 26. HIF-1α、HIF-1β 遺伝子発現に及ぼす CLB-016 の影響。

低酸素環境下(1% O₂)の HT1080 細胞を各濃度の CLB-016 で 4 時間処理し、HIF-1α および HIF-1β mRNA 量を定量 RT-PCR 法により解析した。

また、ウェスタンブロット法により HIF-1α と HIF-1β タンパク質発現を解析した。HIF-1α の分解を誘導するゲルダナマイシン誘導体である 17-AAG は、報告通りに HIF-1α タンパク質レベルを抑制した。それに対し、CLB-016 およびその活性誘導体は、HIF-1α および HIF-1β タンパク質レベルにも影響を及ぼさないことが確認された。(図 27)

このことから、CLB-016 およびその活性誘導体は、非特異的に遺伝子発現を阻害することなく HIF-1 標的遺伝子の転写を阻害することが明らかとなった。

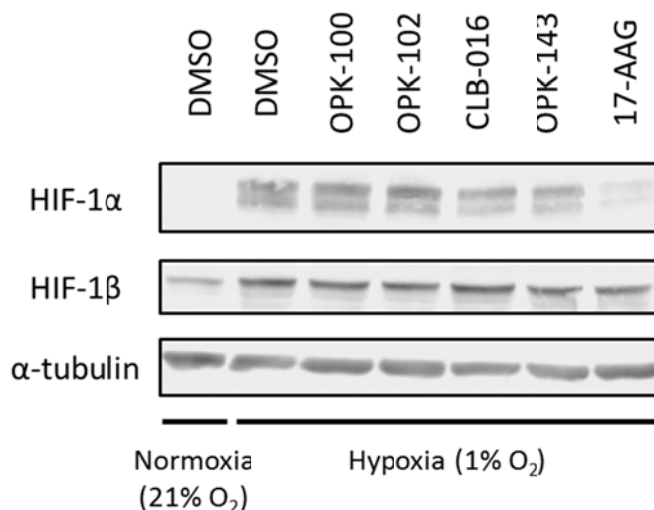


図 27. HIF-1α、HIF-1β タンパク質発現に及ぼす CLB-016 誘導体の影響。

HT1080 細胞を低酸素環境下(1% O₂)で 2 時間培養した後、CLB-016 誘導体で処理した(100 μM、4 時間)。HIF-1α、HIF-1β タンパク質レベルの変化を抗 HIF-1α 抗体、抗 HIF-1β 抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。

第4節 HIF-1 α の核局在

HIF-1 α は核内へ移行し、HIF-1 β とヘテロ二量体を形成する。そこで、HIF-1 α の核内局在を、細胞免疫染色法により調べた。(図 28)

その結果、HIF-1 阻害活性を示す化合物 OPK-100、活性を示さない OPK-143 で処理した場合、HIF-1 α は核内のみに局在していることが確認された。以上の結果より、CLB-016 誘導体は HIF-1 α の核移行に影響を及ぼさないことが分かった。すなわち、本化合物による HIF-1 標的遺伝子発現の抑制は、HIF-1 α の核移行後であることが示唆された。

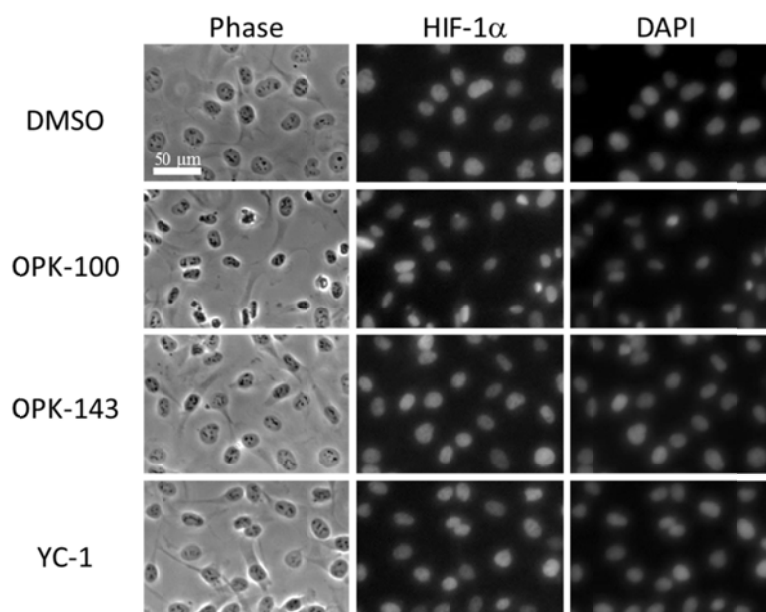


図 28. HIF-1 α の核局在に及ぼす CLB-016 誘導体の影響.

低酸素環境下(1% O₂)で 1 時間培養した HT1080 細胞を、OPK-100 と OPK-143 で処理した (30 μ M、3 時間)。細胞を固定後、抗 HIF-1 α 抗体を用いた蛍光細胞免疫染色を行った。

第5節 HIF-1 の DNA 結合能に対する CLB-016 誘導体の影響

核内でヘテロ二量体形成した HIF-1 は、HRE 領域に結合し、様々な標的遺伝子の転写を促進する。そこで、HIF-1 の DNA 結合能に対する CLB-016 誘導体の影響を検討した。

試験方法には、HRE を含む二本鎖 DNA がコートされたプレートを用いた ELISA 法を使用した。このプレートに低酸素培養した HeLa 細胞の核抽出液と試験化合物を添加し、プレートに捕捉された HIF-1 α を抗 HIF-1 α 抗体および HRP 標識二次抗体を使用して比色法により測定した。(図 29)

その結果、HRE へ結合する Echinomycin は、報告通り HIF-1 の DNA への結合を阻害した。ところが、CLB-016 誘導体は DNA 結合阻害活性が見られなかった。このことから、本化合物は HIF-1 の HRE 領域への結合を阻害しないことが示唆された。

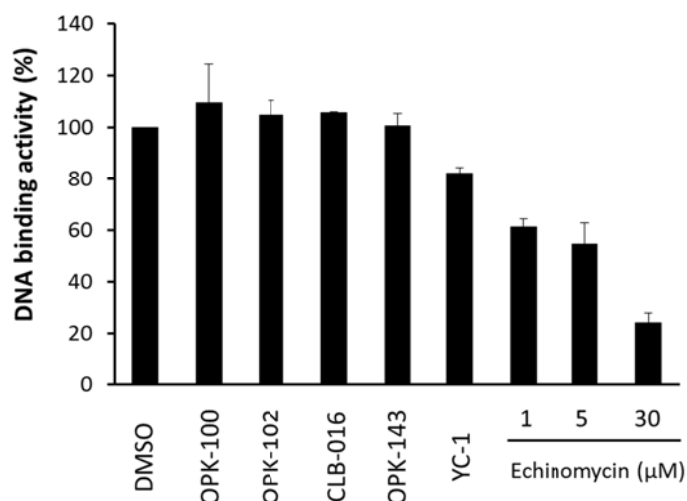


図 29. ELISA 法による HIF-1 の DNA 結合阻害試験。

HIF-1 の DNA 結合能に対する CLB-016 誘導体(100 μ M)の影響を、低酸素応答配列(5'-ACGTG-3')を含む二本鎖 DNA を用いた ELISA 法により検討した。

以上の作用点解析の結果より、CLB-016 およびその活性誘導体は、転写共役因子との相互作用など、核内でのイベントに作用している可能性が考えられる。(図 30)

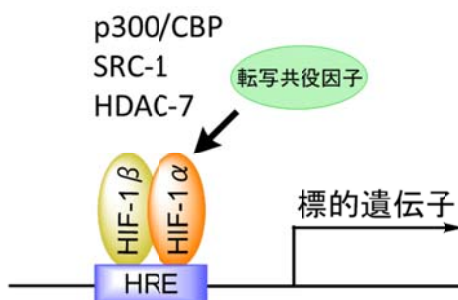


図 30. 第3章での検討により考えられる本化合物の HIF-1 阻害機構。

第6節 ヒトがん細胞パネル感受性試験

1990 年頃から、ヒトがん細胞パネルによる抗がん剤スクリーニングは、米国国立癌研究所(NCI)で実施されている⁴³。この方法は、60 種類の細胞での薬剤感受性試験とデータベースプログラムによる解析手法を組み合わせることで、化合物の作用機序を推測する評価系である。

この方法に基づき、(財)がん研究会の矢守らは、独自にヒトがん細胞パネルによるスクリーニング系を確立した⁴⁴。このパネルは、乳がん 5 株、胃がん 6 株、大腸がん 5 株、肺がん 7 株、メラノーマ 1 株、卵巣がん 5 株、腎がん 2 株、脳腫瘍 6 株、前立腺がん 2 株の計 39 株より構成されている。がん細胞の種類により、1 つの薬剤に対する増殖抑制作用などの感受性が異なる。この表現型を利用し、薬剤に対する感受性の強弱を波形(finger print)で表すと、作用機序と相関する。また、「COMPARE」と呼ばれる類似性検索プログラムにより、試験化合物の finger print と既存の抗腫瘍薬を含んだ約 100 種類以上の薬剤の finger print との相関性を解析することで、化合物の作用機序が予測可能となる。

そこで、本化合物の作用機序を予測するため、OPK-100 のヒトがん細胞パネル試験および COMPARE 解析を(財)がん研究会に依頼した。その結果、OPK-100 は COMPARE に収録されているいずれの薬剤とも相関係数が 0.5 以下であり、新規メカニズムを有する薬剤の可能性があることが示唆された。また、HIF-1 転写活性阻害作用を有する YC-1⁴⁵ と OPK-100 との作用機序比較を COMPARE にて解析したところ、相関係数が 0.034 であり類似性は認められなかった。(図 31)

以上の結果より、CLB-016 およびその活性誘導体は、既存の薬剤とは異なるメカニズムを有した HIF-1 阻害剤である可能性が高いことが明らかとなった。

OPK-100

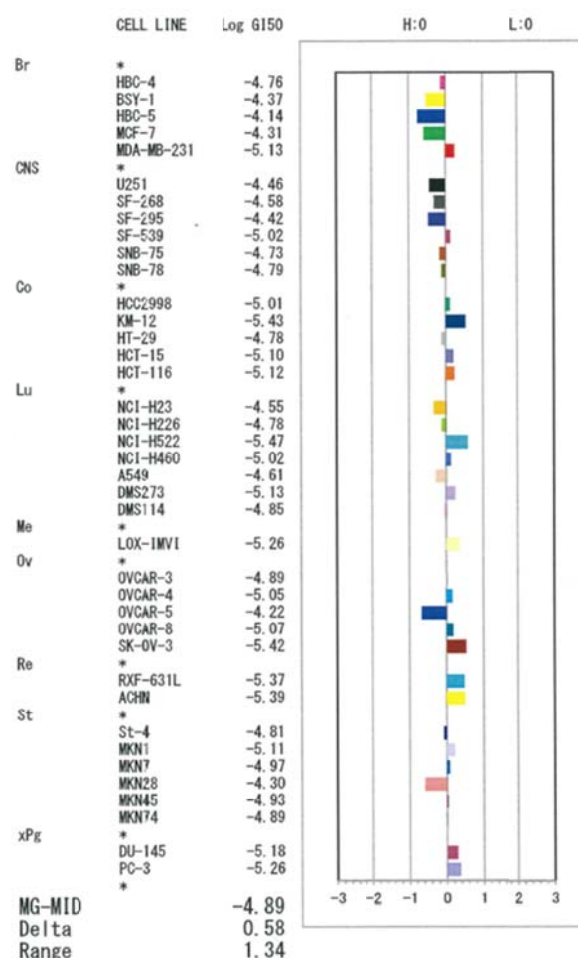


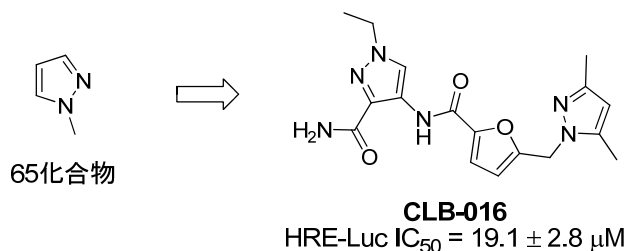
図 31. ヒトがん細胞パネル感受性試験による OPK-100 のフィンガープリント解析。
中央のラインに対し、右が感受性株、左が非感受性株。GI₅₀: コントロールに比べ増殖を 50% に抑制する濃度。

第 7 節 まとめ

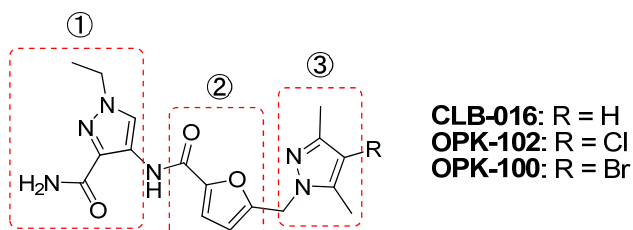
CLB-016 およびその活性誘導体は、*HIF-1α* および *HIF-1β* mRNA には影響を及ぼさなかった。このことから、本化合物は general に遺伝子発現を阻害することなく HIF-1 標的遺伝子の転写を阻害することが明らかとなった。また、HIF-1 阻害機構として可能性のある作用点を順に検証したところ、CLB-016 およびその活性誘導体は核内において HIF-1 標的遺伝子の転写促進段階で作用している可能性が考えられた。さらに、ヒトがん細胞パネル感受性試験の結果、COMPARE に収録されているいずれの薬剤とも相関が認められなかったことから、本化合物は新規作用機序を有する HIF-1 阻害剤であることが示唆された。

結論

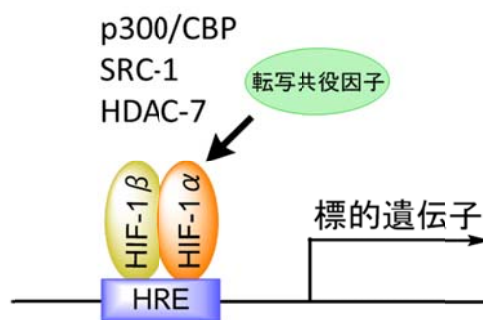
本研究にて、著者は、1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有する化合物を HIF-1 活性阻害剤として創製した。すなわち、本学研究科保有ライブラリーより、ヘテロ芳香環を起点として 65 化合物を抽出し、HIF-1 阻害試験および偽陽性の排除を行うことで、既存の HIF-1 阻害剤とは異なる新たなケモタイプである CLB-016 を見出した。



そして CLB-016 の構造活性相関研究の結果、HIF-1 阻害活性発現には、①1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミド骨格、②フラン環によるコンフォメーション制御、③右セグメントの大きさと脂溶性置換基の存在が重要であることが分かった。さらに、CLB-016 よりも HIF-1 阻害活性が増強した OPK-100、102 を見出した。



既存の HIF-1 阻害剤とは異なったケモタイプである本化合物群は、**general** に遺伝子発現を阻害することなく HIF-1 標的遺伝子の転写を阻害することが明らかとなった。また、作用点解析を行ったところ、本化合物は転写共役因子との相互作用への影響など HIF-1 標的遺伝子の転写促進段階で作用している可能性が考えられた。さらに、ヒトがん細胞パネル感受性試験の結果、COMPARE に収録されているいずれの薬剤とも相関が認められなかったことから、CLB-016 およびその活性誘導体は新規な作用機序を有することが示唆された。



これまでに報告されている HIF-1 阻害剤の作用点は、PI3K や mTOR による翻訳段階の阻害、HIF-1 の DNA 結合阻害、FIH (factor-inhibiting-HIF)の活性化による HIF-1 と転写共役因子 p300/CBP との結合阻害などが知られているが、CLB-016 およびその活性誘導体はこれらの作用点とは異なる可能性が示唆された。本化合物の HIF-1 阻害機構の詳細な解析は必要であるものの、1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミド誘導体が新しい作用点を持った HIF-1 阻害剤として機能し得る可能性が考えられる。HIF-1 阻害剤である YC-1 により放射線治療後のがんの再発を抑制した報告例もあり、既存の HIF 阻害剤とは作用点異なる本化合物をリードとした新しい抗腫瘍薬の開発が期待できる。

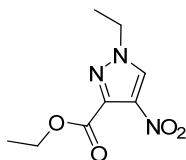
Experimental Section.

General Remarks:

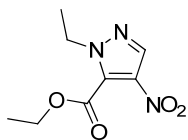
Reactions in microwave reactors were performed by single-node heating in an Initiator (Biotage). Flash column chromatography was performed manually or using a Biotage SP-1 Flash. Low-resolution mass spectra were measured on JMS-700 (JEOL) or LCMS-2020 (Shimadzu) mass spectrometer. High-resolution mass spectra were measured on LC-IT-TOF MS (Shimadzu) mass spectrometer. The ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) spectra were recorded on JEOL AL-400, JEOL ECS-400 with tetramethylsilane as an internal standard. Abbreviations are as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; sept, septet; m, multiplet; br, broad. Melting points were measured by BÜCHI Melting Point B-545 (BÜCHI Labortechnik AG). IR spectra were measured on a SHIMADZU FTIR-8400S spectrometer. OPK-095 and **YC-1** was purchased from Princeton BioMolecular Research, Inc. and Santa Cruz Biotechnology, Inc., respectively.

Ethyl 1-ethyl-4-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**3A**) and ethyl 1-ethyl-4-nitro-1*H*-pyrazole-5-carboxylate (**3B**)

4-Nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**1**) (300 mg, 1.91 mmol) was added to a stirred solution of ethyl iodide (324 μl , 4.01 mmol) and K_2CO_3 (660 mg, 4.77 mmol) in DMF (9 ml). The reaction mixture was stirred for 3 h at rt, and then the mixture was filtrated and concentrated. The residue was suspended in H_2O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H_2O and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc) to give **3A** (140 mg, 0.656 mmol, 34%) as a pale brown oil and **3B** (84 mg, 0.395 mmol, 21%) as a pale brown oil.



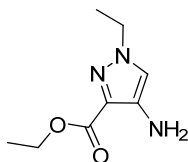
Compound **3A**: ^1H -NMR (CDCl_3) δ 8.16 (s, 1H), 4.47 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.26 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.41 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 160.3, 138.8, 134.1, 129.1, 62.5, 48.9, 14.9, 14.0; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$: 236.0642, found: 236.0643.



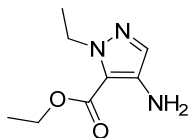
Compound **3B**: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.03 (s, 1H), 4.50 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.31 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.50 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 158.6, 135.2, 134.4, 131.2, 63.4, 47.7, 15.3, 13.8; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$: 236.0642, found: 236.0639.

Ethyl 4-amino-1-ethyl-1H-pyrazole-3-carboxylate (4A) and Ethyl 4-amino-1-ethyl-1H-pyrazole-5-carboxylate (4B)

After purging with N_2 gas, to a solution of compound **3A** (140 mg, 0.657 mmol) in MeOH (1.3 ml) was added 10% Pd/C (6.99 mg, 6.57 μmol). The reaction mixture was purged with H_2 gas and stirred for 22 h at rt. The mixture was filtrated through celite and concentrated. The residue was subjected to column chromatography using amino-functionalized silica gel (EtOAc/MeOH) to furnish **4A** (92 mg, 77%) as a colorless oil. The isomer **4B** was synthesized in a similar way (66 mg, 91%).



Compound **4A**: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 6.99 (1H, s), 4.41 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.13 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 4.07 (2H, br s), 1.46 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.41 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 163.7, 135.0, 129.6, 115.8, 60.4, 48.1, 15.4, 14.5; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$: 206.0900, found: 206.0904.

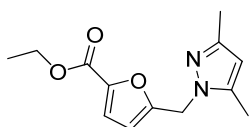


Compound **4B**: a colorless oil; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.09 (1H, s), 4.45 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.39 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.10 (2H, br s), 1.41 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.36 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 160.4, 137.2, 126.9, 116.3, 60.4, 47.5, 15.7, 14.4; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2$: 184.1081, found: 184.1083.

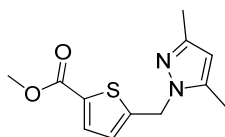
Synthesis of pyrazoles 7a-e: ethyl

5-((3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylate (7a)

Ethyl 5-(chloromethyl)furan-2-carboxylate (**5a**, 2.0 g, 10.60 mmol) was added to a solution of 3,5-dimethyl-1H-pyrazole (**6a**) (1.019 g, 10.60 mmol), KO^tBu (1.547 g, 13.79 mmol) and TBAI (0.392 g, 1.060 mmol) in THF (53 ml) at 0 °C. The mixture was allowed to warm up to rt and was stirred at rt for 24 h. To the reaction mixture was added sat. NH₄Cl aq, and then the mixture was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, washed with H₂O and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was subjected to silica gel column chromatography (hexane/EtOAc), which yielded the pyrazole **7a** (1.25 g, 48 %) as a brown oil. Pyrazoles **7b**, **7c**, **7d** and **7e** were synthesized in a similar way.

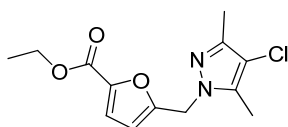


Compound **7a**: yield, 48%; a brown oil; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.07 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.21 (s, 2H), 4.34 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 158.6, 154.7, 148.3, 144.4, 139.5, 118.7, 109.7, 105.8, 60.9, 46.0, 14.3, 13.5, 11.0; HRMS-ESI *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₁₆N₂O₃Na: 271.1053, found: 271.1046.



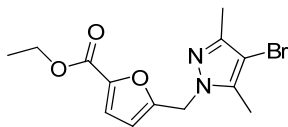
Methyl 5-((3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)thiophene-2-carboxylate (**7b**): yield, 43%; a white solid; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.63 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.86-6.84 (m, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.33 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.23 (s, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 162.4, 148.3, 147.4, 138.9, 133.5, 133.0, 125.8, 106.0, 52.1, 47.8, 13.5, 11.0; HRMS-ESI *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₁₂H₁₅N₂O₂S: 251.0849, found: 251.0845.

Methyl 3-((3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)benzoate (**7c**): After extraction, washing and drying, evaporation of the solvent gave a residue that was used without further purification in the next step.



Ethyl 5-((4-chloro-3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylate (**7d**): yield, 55%, a pale yellow solid; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.08 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.25-6.22 (m, 1H),

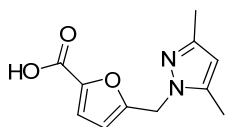
5.21 (s, 2H), 4.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 158.6, 153.7, 145.4, 144.7, 136.1, 118.6, 110.2, 61.1, 46.8, 29.7, 14.3, 11.2, 9.4; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{Na}$: 305.0663, found: 305.0666.



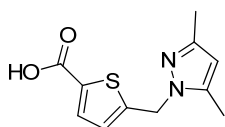
Ethyl 5-((4-bromo-3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylate (**7e**): yield, 42%, a pale yellow powder; ^1H -NMR (CDCl_3) δ 7.08 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 158.5, 153.8, 146.9, 144.7, 137.7, 118.6, 110.2, 95.0, 61.1, 47.0, 14.3, 12.3, 10.4; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{Na}$: 349.0158, found: 349.0149.

Synthesis of carboxylic acids **8a-e**: 5-((3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylic acid (**8a**)

A solution of 5N NaOH (7.25 ml, 36.2 mmol) was added to a solution of compound **7a** (3.0 g, 12.08 mmol) in EtOH (60.4 ml), which was stirred at rt for 24 h. The aqueous phase was acidified to a pH of approx. 3 with 6 N HCl on ice. The majority of the solvent was removed on a rotary evaporator. After the precipitate was filtrated and washed with H_2O , the carboxylic acid **8a** was obtained as a pale yellow powder (1.50 g, 6.81 mmol, 56 %). Carboxylic acids **8b-e** were synthesized in a similar way.

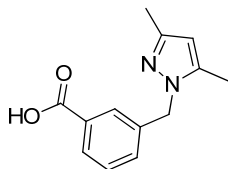


Compound **8a**: yield, 56%; a pale yellow powder; ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 13.07 (s, 1H), 7.14 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.25 (s, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.07 (s, 3H); ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 159.1, 154.7, 146.3, 144.4, 139.0, 118.5, 110.3, 105.2, 45.0, 13.2, 10.5; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$: 219.0775, found: 219.0769.

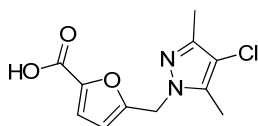


5-((3,5-Dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)thiophene-2-carboxylic acid (**8b**): yield, 46%; a pale yellow powder; ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 13.0 (s, 1H), 7.56 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.01

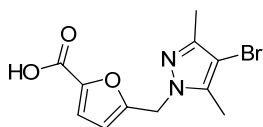
(d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.38 (s, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.09 (s, 3H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 162.7, 147.6, 146.6, 138.7, 133.9, 132.9, 126.6, 105.3, 46.8, 13.3, 10.5; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 235.0546, found: 235.0539.



3-((3,5-Dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)benzoic acid (**8c**): yield, 73% (from 2 steps); a white powder; ^1H -NMR (DMSO- d_6) δ 13.00 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.46 (dd, $J = 8.1, 7.5$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.26 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 167.1, 146.2, 138.8, 138.5, 131.3, 131.0, 128.8, 128.2, 127.6, 105.1, 51.1, 13.3, 10.6; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$: 229.0982, found: 229.0974.



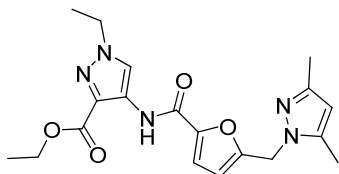
5-((4-Chloro-3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylic acid (**8d**): yield, 80%; a white powder; ^1H -NMR (DMSO- d_6) δ 13.09 (s, 1H), 7.15 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.33 (s, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.08 (s, 3H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 159.1, 153.8, 144.7, 143.5, 135.7, 118.5, 110.8, 106.5, 46.1, 11.0, 9.0; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_3$: 253.0385, found: 253.0378.



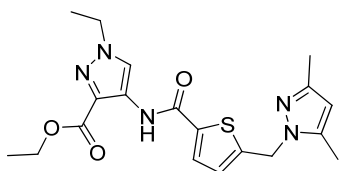
5-((4-Bromo-3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylic acid (**8e**): yield, 93%; a white powder; ^1H -NMR (DMSO- d_6) δ 13.12 (s, 1H), 7.15 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.08 (s, 3H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 159.1, 153.8, 145.0, 144.7, 137.4, 118.5, 110.8, 93.4, 46.2, 11.9, 9.9; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{BrN}_2\text{O}_3$: 296.9880, found: 296.9880.

Synthesis of carboxamids 9Aa-e and 9Ba: ethyl 4-(5-((3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1H-pyrazole-3-carboxylate (9Aa)

To a solution of compound **4A** (150 mg, 0.819 mmol) and compound **8a** (180 mg, 0.819 mmol) in DMF (1637 μ l) were added HATU (374 mg, 0.982 mmol) and Hunig's base (214 μ l, 1.228 mmol). The mixture was stirred for 5 min at 50 °C in a microwave instrument. The reaction mixture was diluted with H₂O and stirred for 0.5 h. The precipitate was filtrated to give the carboxylic acid **9Aa** (221 mg, 0.57 mmol, 70%) as a white powder. Carboxylic acids **9Ab-e** and **9Ba** were synthesized in a similar way.

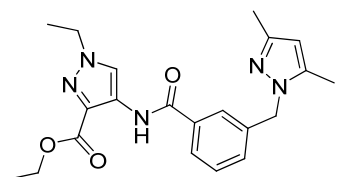


Compound **9Aa**: yield, 70%; a white cotton; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.90 (1H, s), 8.29 (1H, s), 7.13 (1H, d, J = 3.4 Hz), 6.31 (1H, d, J = 3.4 Hz), 5.86 (1H, s), 5.25 (2H, s), 4.49 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.25 (2H, q, J = 7.3 Hz), 2.39 (3H, s), 2.22 (3H, s), 1.53 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.47 (3H, t, J = 7.1 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 163.8, 155.1, 153.2, 148.4, 147.0, 139.6, 130.1, 124.7, 121.1, 116.2, 110.5, 105.9, 61.3, 48.5, 45.8, 15.4, 14.5, 13.5, 11.1; HRMS-ESI m/z : [M+Na]⁺ calcd for C₁₉H₂₃N₅O₄Na: 408.1642, found: 408.1646.



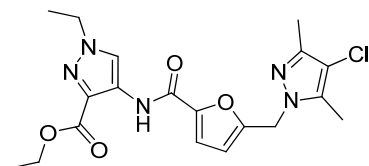
Ethyl

4-(5-((3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)thiophene-2-carboxamido)-1-ethyl-1H-pyrazole-3-carboxylate (**9Ab**): Purified by column chromatography over silica gel (hexane/EtOAc). yield, 75%; a white powder; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.74 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.49 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.35 (s, 2H), 4.47 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.24 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 1.52 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.45 (t, J = 7.0 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 164.1, 158.6, 148.4, 146.1, 139.0, 137.9, 129.8, 128.6, 126.2, 125.2, 121.0, 106.1, 61.4, 48.5, 47.8, 15.4, 14.5, 13.5, 11.1. HRMS-ESI m/z : [M+Na]⁺ calcd for C₁₉H₂₃N₅O₃SNa: 424.1414, found: 424.1416.



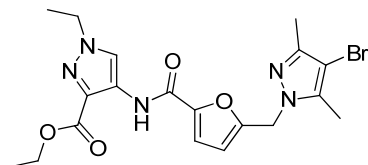
Ethyl

4-(3-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)benzamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**9Ac**): Purified by column chromatography over silica gel (hexane/EtOAc). yield, 93%; a pale yellow oil; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.98 (1H, s), 8.37 (1H, s), 7.81 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.69 (1H, s), 7.44 (1H, dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz), 7.22 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.88 (1H, s), 5.30 (2H, s), 4.49 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.26 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 2.26 (3H, s), 2.18 (3H, s), 1.54 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.47 (3H, t, $J = 7.1$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 164.2, 163.8, 148.0, 139.2, 138.5, 133.8, 130.2, 130.0, 129.3, 126.0, 125.6, 125.5, 121.1, 105.8, 61.4, 52.2, 48.5, 15.4, 14.4, 13.5, 11.1. HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_3\text{Na}$: 418.1849, found: 418.1841.



Ethyl

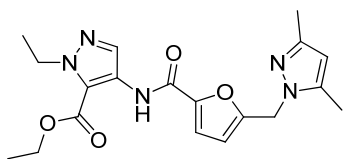
4-(5-((4-chloro-3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**9Ad**): yield, 71%; a white powder; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.94 (1H, s), 8.28 (1H, s), 7.13 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 6.37 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 5.25 (2H, s), 4.50 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.25 (2H, q, $J = 7.4$ Hz), 2.40 (3H, s), 2.21 (3H, s), 1.53 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.47 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 163.9, 154.9, 152.3, 147.2, 145.5, 136.0, 130.1, 124.7, 121.0, 116.1, 110.9, 108.5, 61.4, 48.5, 46.7, 15.4, 14.5, 11.4, 9.5; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_4\text{ClNa}$: 442.1252, found: 442.1266.



Ethyl

4-(5-((4-bromo-3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**9Ae**): yield, 68%; a white powder; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.94 (1H, s), 8.28 (1H, s), 7.13 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 6.37 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 5.27 (2H, s), 4.50 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.25 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 2.42 (3H, s), 2.22 (3H, s), 1.53 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.47 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 163.9, 154.9, 152.2, 147.2, 147.0, 137.8, 130.1, 124.7, 121.0, 116.1, 110.9, 94.9, 61.4, 48.5, 46.8, 15.4, 14.5, 12.3, 10.4; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for

C₁₉H₂₂N₅O₄BrNa: 486.0747, found: 486.0742.

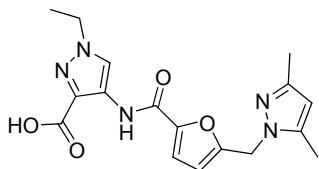


Ethyl

4-(5-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxylate (**9Ba**): Purified by column chromatography over silica gel (hexane/EtOAc). yield, 43%; a white powder; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.67 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.54 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 1.50 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 159.9, 155.1, 152.9, 148.3, 147.2, 139.4, 130.3, 127.6, 118.4, 116.3, 110.7, 106.0, 61.5, 48.1, 45.9, 15.8, 14.4, 13.5, 11.1; HRMS-ESI *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₁₉H₂₃N₅O₄Na: 408.1642, found: 408.1649.

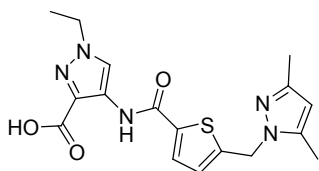
Synthesis of carboxylic acids 10Aa-e and 10Ba:
4-(5-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (10Aa)

5N NaOH aq (311 μl, 1.557 mmol) was added to a solution of compound **9Aa** (200 mg, 0.519 mmol) in EtOH (5 ml), and then the mixture was stirred at rt for 9 h. The reaction mixture was adjusted to a pH of approx.3 with 5N HCl aq on ice. The majority of the solvent was removed on a rotary evaporator. After the precipitate was filtrated and washed with H₂O, the carboxylic acid **10Aa** was obtained as a white powder (169 mg, 0.47 mmol, 91%). Carboxylic acids **10Ab-e** and **10Ba** were synthesized in a similar way.

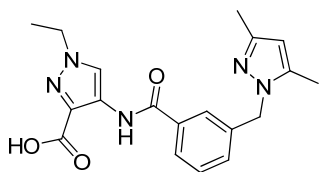


Compound **10Aa**: yield, 91%; a white powder; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 13.37 (br s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.19 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.28 (s, 2H), 4.22 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.39 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 165.0, 153.8, 153.8, 146.5, 146.3, 139.2, 130.2, 123.3, 121.3, 116.1, 111.1, 105.1, 47.4, 44.7, 15.2, 13.3, 10.6; HRMS-ESI *m/z*: [M-H]⁻ calcd for C₁₇H₁₈N₅O₄:

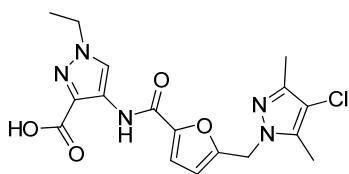
356.1364, found: 356.1369.



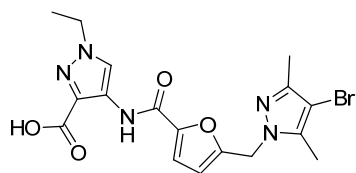
4-(5-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)thiophene-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**10Ab**): yield, 94%; a white powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 13.30 (br s, 1H), 9.84 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.55 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.20 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 164.7, 157.6, 146.5, 146.3, 138.6, 137.4, 130.9, 128.5, 126.8, 123.4, 121.7, 105.2, 47.3, 46.7, 15.2, 13.2, 10.5; HRMS-ESI m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$: 372.1136, found: 372.1132.



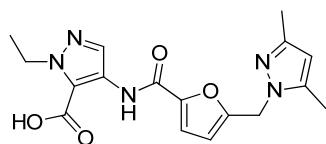
4-(3-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)benzamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**10Ac**): After the reaction mixture was adjusted to a pH of approx. 3, evaporation of the solvent gave a white powder that was used without further purification to use in the next step.



4-(5-((4-chloro-3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**10Ad**): yield, 95%; a white powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 13.37 (br s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.23 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.39 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 165.0, 153.8, 152.9, 146.5, 143.6, 135.9, 130.2, 123.3, 121.4, 116.1, 111.6, 106.5, 47.4, 45.8, 15.2, 11.0, 9.1; HRMS-ESI m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{Cl}$: 390.0974, found: 390.0972.



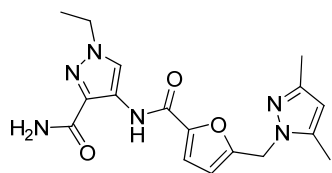
4-(5-((4-bromo-3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**10Ae**): yield, 97%; a white powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 13.38 (br s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.39 (s, 2H), 4.23 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.39 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 165.0, 153.8, 152.9, 146.5, 145.2, 137.6, 130.2, 123.3, 121.4, 116.1, 111.6, 93.4, 47.4, 45.9, 15.2, 11.9, 10.0; HRMS-ESI m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{BrN}_5\text{O}_4$: 434.0469, found: 434.0462.



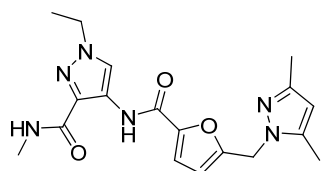
4-(5-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxylic acid (**10Ba**): yield, 90%; a pale yellow powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 9.75 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.48 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 161.1, 154.2, 153.8, 146.4, 146.2, 139.1, 129.3, 126.2, 119.4, 116.2, 111.0, 105.1, 47.0, 44.6, 15.5, 13.2, 10.6; HRMS-ESI m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4$: 356.1364, found: 356.1359.

Synthesis of carboxamides **1**, **11Aaa**, **11Aab**, **11Ab-e** and **11Ba**

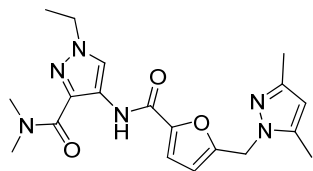
To a solution of compound **10Aa** (90 mg, 0.252 mmol) and ammonium chloride (67.4 mg, 1.259 mmol) in DMF (1.5 ml) were added HATU (115 mg, 0.302 mmol) and Hunig's base (286 μl , 1.637 mmol). The mixture was stirred for 5 min at 50 $^\circ\text{C}$ in a microwave instrument. The reaction mixture was diluted with H_2O and stirred for 0.5 h. The precipitate was filtrated, and then purified by column chromatography over amino-functionalized silica gel (hexane/EtOAc) to give the carboxamide **1** (76 mg, 0.21 mmol, 85% yield) as a white powder. Carboxamides **11Aaa**, **11Aab**, **11Ab-e** and **11Ba** were synthesized in a similar way.



CLB-016 (**1**): yield, 85%; a white powder; mp 209.7-210.2 °C; IR (cm⁻¹) 3522, 3404, 3346, 3009, 1668, 1605, 1583, 1553, 1420, 1375, 1331, 1236, 1221, 1213, 1138, 1016, 964; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.27 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.74 (br s, 1H), 6.29 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.62 (br s, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.16 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 165.7, 155.2, 153.2, 148.3, 147.1, 139.7, 131.6, 123.4, 121.4, 116.0, 110.5, 105.8, 48.1, 45.8, 15.3, 13.5, 11.1; HRMS-ESI *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₂₁N₆O₃: 357.1669, found: 357.1670.

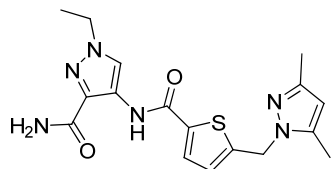


4-(5-((3,5-Dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-*N*-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**11Aaa**): The reaction mixture was stirred for 5 h at rt. yield, 25%; a white powder; mp 178.9-179.0 °C; IR (cm⁻¹) 3431, 3335, 3009, 1655, 1584, 1554, 1437, 1373, 1223, 1209, 1173, 1146, 1016, 962; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.39 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.82-6.75 (m, 1H), 6.21 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.25 (s, 2H), 4.15 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.01 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 1.50 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 164.3, 155.2, 153.4, 148.3, 147.1, 139.7, 132.3, 122.9, 121.3, 115.8, 110.2, 105.8, 48.0, 46.0, 25.4, 15.3, 13.5, 11.1; HRMS-ESI *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₂₃N₆O₃: 371.1826, found: 371.1812.

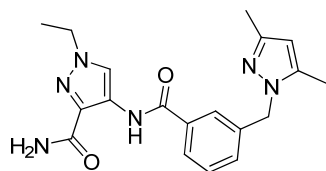


4-(5-((3,5-Dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-*N,N*-dimethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**11Aab**): The reaction mixture was stirred for 5 h at rt. yield, 30%; a white powder; mp 185.8-186.3 °C; IR (cm⁻¹) 3319, 3002, 2955, 1661, 1618, 1603, 1576, 1551, 1533, 1425, 1367, 1213, 1191, 1163, 1136, 1084, 1016, 966; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.84 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.24 (s, 2H),

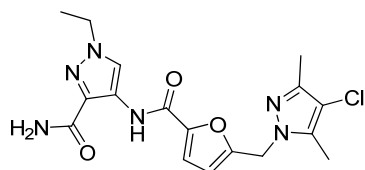
4.17 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.51 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 164.5, 155.1, 153.1, 148.3, 147.4, 139.8, 133.4, 124.9, 120.5, 115.5, 110.2, 105.8, 47.9, 45.9, 39.0, 36.5, 15.2, 13.5, 11.1; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_3$: 385.1982, found: 385.1975.



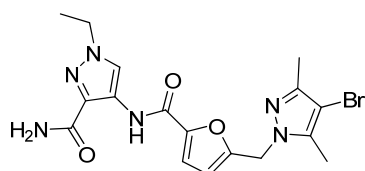
4-(5-((3,5-Dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)thiophene-2-carboxamido)-1-ethyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (**11Ab**): The reaction mixture was stirred for 13 h at rt. Recrystallized from EtOH. yield, 64% ; a white cotton ; mp 230.0-230.2 °C; IR (cm^{-1}) 3522, 3402, 3346, 3009, 2959, 1666, 1583, 1545, 1487, 1420, 1375, 1223, 1213, 1171, 1132, 1022, 960, 901; ^1H -NMR (CDCl_3) δ 10.18 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.68 (br s, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.34 (s, 3H), 4.16 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.51 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 165.9, 158.7, 148.3, 145.9, 139.0, 138.1, 131.3, 128.5, 126.1, 124.0, 121.3, 106.0, 48.1, 47.8, 15.3, 13.5, 11.1; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$: 373.1441, found: 373.1441.



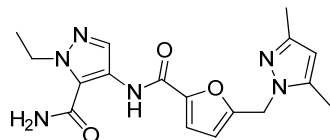
4-(3-((3,5-Dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)benzamido)-1-ethyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (**11Ac**): Purified by column chromatography over silica gel (hexane/EtOAc). yield, 19% (from 2 steps); a white powder; mp 152.6-153.5 °C; IR (cm^{-1}) 3522, 3402, 3354, 3018, 1666, 1583, 1539, 1420, 1375, 1329, 1219, 1211; ^1H -NMR (CDCl_3) δ 10.41 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.72 (br s, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.41 (br s, 1H), 5.29 (s, 2H), 4.18 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.52 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 165.9, 163.9, 147.9, 139.3, 138.4, 133.9, 131.6, 130.2, 129.3, 126.1, 125.7, 124.3, 121.4, 105.8, 52.3, 48.1, 15.3, 13.5, 11.2; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}$: 389.1696, found: 389.1681.



4-(5-((4-Chloro-3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**11Ad**): yield, 72%; a white powder; mp 220.1-220.8 °C; IR (cm⁻¹) 3522, 3404, 3344, 2997, 1668, 1605, 1583, 1553, 1477, 1421, 1377, 1331, 1223, 1209, 1140, 1088, 1016, 962; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.29 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.70 (br s, 1H), 6.33 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.44 (br s, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.17 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 165.6, 155.0, 152.4, 147.3, 145.4, 136.0, 131.6, 123.4, 121.4, 115.9, 110.9, 108.5, 48.1, 46.8, 15.3, 11.4, 9.5; HRMS-ESI *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₂₀ClN₆O₃: 391.1280, found: 391.1282.



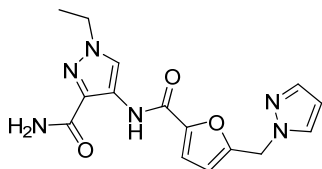
4-(5-((4-Bromo-3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (**11Ae**): yield, 82%; a white powder; mp 229.8-230.2 °C; IR (cm⁻¹) 3522, 3404, 3344, 3009, 1668, 1605, 1585, 1553, 1477, 1421, 1377, 1331, 1221, 1209, 1140, 1072, 1016, 964; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.30 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.72 (br s, 1H), 6.34 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.49 (br s, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.17 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 165.6, 155.0, 152.3, 147.3, 146.9, 137.8, 131.6, 123.4, 121.4, 115.9, 110.9, 94.9, 48.1, 46.9, 15.3, 12.3, 10.5; HRMS-ESI *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₂₀BrN₆O₃: 435.0775, found: 435.0783.



4-(5-((3,5-Bimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (**11Ba**): The reaction mixture was stirred for 5 h at rt. yield, 47%; a white powder; mp 189.9-190.5 °C; IR (cm⁻¹) 3468, 3404, 3292, 2999, 1676, 1604, 1585, 1551, 1474, 1379, 1221, 1209, 1148, 1090, 1016, 970; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.09 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 3.5, 1.2 Hz, 1H), 6.42 (br s, 2H), 6.33 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.45 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃)

δ 161.6, 157.2, 152.9, 148.5, 146.9, 139.3, 133.4, 127.4, 121.3, 116.8, 110.7, 106.0, 47.3, 45.6, 15.6, 13.4, 11.1; HRMS-ESI m/z : $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{21}N_6O_3$: 357.1669, found: 357.1665.

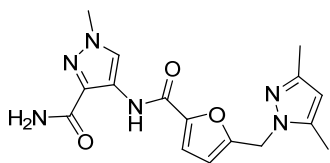
4-(5-((1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide



OPK-161 was prepared according to the synthetic procedure in a similar way of CLB-016 (**1**) starting from a commercially available 5-((1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylic acid.

Yield: 33% in 3 steps as a white powder; mp 199.5-200.3 °C; IR (cm^{-1}) 3522, 3402, 3344, 3009, 1668, 1607, 1585, 1555, 1420, 1375, 1330, 1217, 1209, 1135, 1088, 1016, 962; 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 10.33 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.74 (br s, 1H), 6.40 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.32 (dd, $J = 2.1, 2.1$ Hz, 1H), 5.58 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.17 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.51 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 165.7, 155.1, 152.2, 147.4, 140.0, 131.6, 129.6, 123.4, 121.4, 115.8, 111.1, 106.5, 48.7, 48.1, 15.3; HRMS-ESI m/z : $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{17}N_6O_3$: 329.1356, found: 329.1348.

4-(5-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide



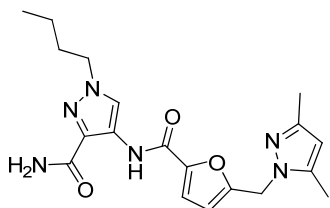
OPK-160 was prepared according to the synthetic procedure in a similar way of CLB-016 (**1**) starting from a commercially available 5-((1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylic acid.

Yield: 8% in 4 steps as a white powder.

1H -NMR ($CDCl_3$) δ 10.24 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.10 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.66 (br s, 1H), 6.28 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.37 (br s, 1H), 5.23 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.21 (s, 3H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 165.4, 155.2, 153.3, 148.3, 147.0, 139.7, 131.8, 123.6, 123.0, 116.1, 110.5, 105.8, 45.8, 39.8, 13.5, 11.1; HRMS-ESI m/z : $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{19}N_6O_3$: 343.1513, found: 343.1498.

1-butyl-4-(5-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1*H*-pyrazole-3-

carboxamide

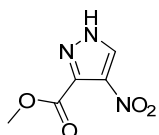


OPK-148 was prepared according to the synthetic procedure in a similar way of CLB-016 (**1**) starting from a commercially available 5-((1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxylic acid.

Yield: 3% in 5 steps as a white powder.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.26 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.10 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 6.70 (br s, 1H), 6.29-6.27 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.48 (br s, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.10 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.39 (d, J = 0.5 Hz, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.90-1.81 (m, 2H), 1.40-1.29 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 165.7, 155.2, 153.2, 148.3, 147.1, 139.7, 131.6, 123.3, 121.9, 116.0, 110.4, 105.8, 53.0, 45.8, 32.1, 19.7, 13.5, 13.5, 11.1; HRMS-ESI m/z : [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₂₅N₆O₃: 385.1982, found: 385.1973.

Methyl 4-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**12**)



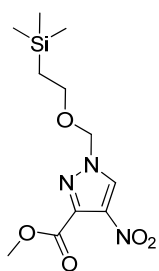
Acetyl chloride (6.34 ml, 89 mmol) was added to the mixture of 4-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (**2**, 7 g, 44.6 mmol) in MeOH (223 ml) at 0 °C. The mixture was stirred at rt for 16 h. After concentrated *in vacuo*, the residue was azeotroped with MeOH two times. The residue was diluted with MeOH and EtOAc, and the mixture was adjusted to a pH of approx. 9 with sat. NaHCO₃ aq. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated to give the compound **12** (5.55 g, 32.4 mmol, 73%) as a white powder.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 14.39 (br s, 1H), 8.99 (s, 1H), 3.89 (s, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 160.9, 137.5, 133.2, 131.4, 52.8; HRMS-ESI m/z : [M-H]⁻ calcd for C₅H₄N₃O₄: 170.0207, found: 170.0200.

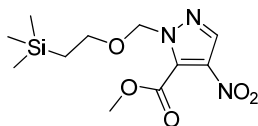
Methyl 4-nitro-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**13**)

To a solution of methyl 4-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**12**, 3.0 g, 17.53 mmol) in THF (88

ml) was added NaH (1.052 g, 26.3 mmol) at 0 °C in an Ar atmosphere. After being stirred for 10 min, SEM-Cl (3.73 ml, 21.04 mmol) was added to the reaction at 0 °C and stirred for another 20 min at rt. The reaction was quenched with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. After filtration and concentration, the residue was subjected to silica gel column chromatography to give the compound **13** (2.83 g, 9.39 mmol, 54%) as a colorless oil and methyl 4-nitro-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxylate **13'** (1.60 g, 5.31 mmol, 30%) as a colorless oil.

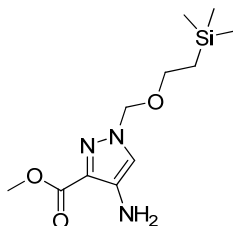


Compound **13**: ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.32 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.66-3.62 (m, 2H), 0.97-0.93 (m, 2H), 0.00 (s, 9H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 160.3, 138.4, 135.2, 129.7, 82.1, 68.4, 53.2, 17.8, -1.5; HRMS-ESI *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₉N₃O₅SiNa: 324.0986, found: 324.0982.



Compound **13'**: ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.06 (1H, s), 5.61 (2H, s), 4.03 (3H, s), 3.59-3.54 (2H, m), 0.92-0.86 (2H, m), -0.02 (9H, s); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 158.6, 135.3, 135.2, 131.4, 80.8, 67.9, 53.9, 17.6, -1.5; HRMS-ESI *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₉N₃O₅SiNa: 324.0986, found: 324.0986.

Methyl 4-amino-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (**14**)



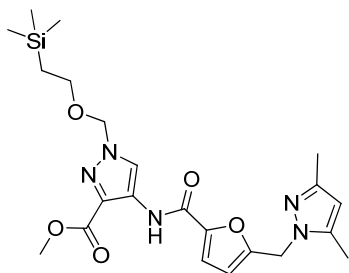
After purging with N₂ gas, 10 % Pd/C (32 mg, 0.030 mmol) was added to the solution of

compound **13** (913 mg, 3.02 mmol) in EtOH (15 ml). The reaction mixture was purged with H₂ gas and stirred for 1 h at 40 °C. The mixture was filtrated and concentrated. The residue was subjected to column chromatography over amino-functionalized silica gel (EtOAc/MeOH) to give the compound **14** (581 mg, 2.14 mmol, 71%) as a colorless oil.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.16 (1H, s), 5.37 (2H, s), 4.12 (2H, br s), 3.94 (3H, s), 3.55-3.51 (2H, m), 0.92-0.88 (2H, m), -0.02 (9H, s); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 164.1, 135.6, 130.3, 115.8, 81.6, 67.0, 51.7, 17.9, -1.4; HRMS-ESI *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₂₁N₃O₃SiNa: 294.1244, found: 294.1235.

Methyl

4-(5-((3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate (**15**)

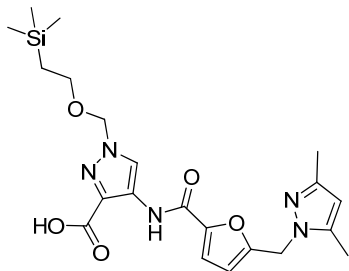


To a solution of compound **14** (0.58 g, 2.137 mmol) and compound **8a** (0.471 g, 2.137 mmol) in DMF (10 ml) were added HATU (0.97 g, 2.56 mmol) and Hunig's Base (0.560 ml, 3.21 mmol). The mixture was stirred for 5 min at 50 °C, 3 times in a microwave instrument. The reaction mixture was diluted with water and sat. NaHCO₃ aq. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine, and dried over Na₂SO₄, and evaporated. The residue was subjected to silica gel column chromatography (hexane/EtOAc) to give the compound **15** (493 mg, 1.04 mmol, 49%) as a white powder.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.86 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.59-3.55 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 0.94-0.90 (m, 2H), -0.03 (s, 9H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 164.1, 155.1, 153.2, 148.4, 146.9, 139.6, 130.7, 125.2, 121.6, 116.3, 110.6, 105.9, 81.8, 67.3, 52.2, 45.8, 17.8, 13.5, 11.1, -1.5; HRMS-ESI *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₂₂H₃₁N₅O₅SiNa: 496.1986, found: 496.1989.

4-(5-((3,5-Dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-((2-(trimethylsilyl)et

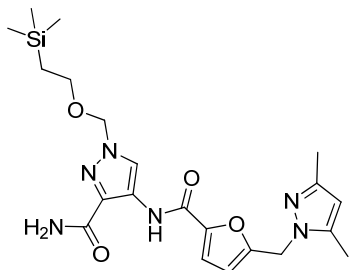
hoxy)methyl)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (16)



An aqueous solution of 5N NaOH (624 μ l, 3.12 mmol) was added to a solution of compound **15** (493 mg, 1.04 mmol) in EtOH (5 ml), and then the mixture was stirred at rt for 2 h. The pH of the reaction mixture was adjusted to approx. 3 with 6 N HCl on ice. The majority of solvent was removed on a rotary evaporator. After the precipitate was filtrated, the solid was washed with H₂O to give the compound **16** (455 mg, 0.990 mmol, 95%) as a white powder.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.90 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.49 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.57-3.54 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 0.86-0.82 (m, 2H), -0.05 (s, 9H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 171.7, 165.0, 154.0, 153.8, 146.5, 146.2, 139.3, 123.5, 122.2, 116.2, 111.1, 105.1, 80.5, 66.1, 44.7, 17.1, 13.3, 10.7, -1.4; HRMS-ESI *m/z*: [M-H]⁻ calcd for C₂₁H₂₈N₅O₅Si: 458.1865, found: 458.1869.

4-(5-((3,5-Dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (17)

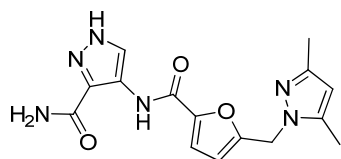


To a solution of compound **16** (90 mg, 0.196 mmol) and ammonium chloride (52.4 mg, 0.979 mmol) in DMF (1 ml) were added HATU (89 mg, 0.235 mmol) and Hunig's base (0.222 ml, 1.273 mmol). The mixture was stirred for 5 min at 50 °C in a microwave instrument. The reaction mixture was diluted with H₂O. The precipitate was filtrated and washed with H₂O to give the compound **17** (75 mg, 0.16 mmol, 84%) as a white powder.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.27 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.12 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.76 (br s, 1H), 6.30 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.47 (br s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 3.59-3.54 (m, 2H), 2.40

(d, $J = 0.7$ Hz, 3H), 2.21 (s, 3H), 0.95-0.91 (m, 2H), -0.01 (s, 9H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 165.4, 155.2, 153.3, 148.3, 147.0, 139.7, 132.8, 123.9, 122.2, 116.1, 110.5, 105.8, 81.2, 67.2, 45.8, 17.7, 13.5, 11.1, -1.4; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_4\text{Si}$: 459.2170, found: 459.2151.

4-(5-((3,5-Dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1H-pyrazole-3-carboxamide (18)



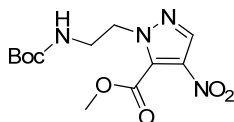
To a suspension of compound **17** (40 mg, 0.087 mmol) in EtOH (174 μl) was added 2M HCl/EtOH (436 μl , 0.872 mmol). The mixture was stirred for 1.5 h at 80 $^\circ\text{C}$ in a microwave instrument. After the white precipitate was filtrated, the solid was washed with EtOH. The resultant pellet was suspended in sat. NaHCO_3 aq, and stirred for 0.5 h. After the white precipitate was filtrated, the solid was washed with H_2O . The residue was subjected to column chromatography over amino-functionalized silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) to give the compound **18** (15 mg, 0.05 mmol, 52%) as a white powder.

Mp 234.6-235.1 $^\circ\text{C}$; IR (cm^{-1}) 3676, 3522, 3447, 3404, 3344, 3007, 1670, 1605, 1583, 1555, 1448, 1420, 1375, 1340, 1300, 1236, 1103, 1016, 968, 943, 881; ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 13.26 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.14 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.28 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.06 (s, 3H); ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 165.7, 153.7, 153.5, 146.5, 146.4, 139.2, 132.6, 121.7, 119.8, 115.6, 110.9, 105.0, 44.6, 13.2, 10.6; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_3$: 329.1356, found: 329.1362.

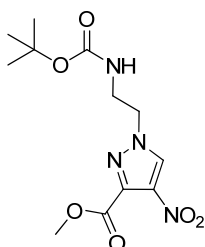
Methyl 1-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-4-nitro-1H-pyrazole-5-carboxylate (20)

To a solution of compound **12** (1.333 g, 7.79 mmol), K_2CO_3 (1.615 g, 11.68 mmol) and TBAI (0.288 g, 0.779 mmol) in DMF (39 ml) was added *tert*-butyl (2-bromoethyl)carbamate (**19**) (1.92 g, 8.57 mmol). The mixture was stirred at rt for 2 h, and then filtrated on Celite. After concentration, the pellet was suspended in EtOAc and H_2O , and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H_2O and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was subjected to column chromatography over silica gel (hexane/EtOAc) to yield

compound **20** (271 mg, 0.863 mmol, 11%) as a white powder and Methyl 1-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)-4-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylate **20'** (701 mg, 2.228 mmol, 29%) as a white powder.

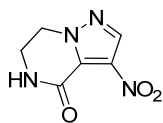


Compound **20**: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.06 (1H, s), 4.85-4.77 (1H, m), 4.40 (2H, t, J = 5.5 Hz), 4.02 (3H, s), 3.60 (2H, q, J = 5.5 Hz), 1.42 (9H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 158.8, 155.7, 135.8, 134.7, 131.8, 80.0, 53.9, 52.0, 40.2, 28.3; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$: 337.1118, found: 337.1114.



Compound **20'**: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.18 (1H, s), 4.91-4.81 (1H, m), 4.39-4.30 (2H, m), 3.99 (3H, s), 3.64-3.56 (2H, m), 1.43 (9H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 160.5, 155.9, 138.8, 134.2, 131.0, 80.4, 53.2, 53.2, 40.1, 28.3; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$: 337.1118, found: 337.1113.

3-Nitro-6,7-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4(5*H*)-one (21)

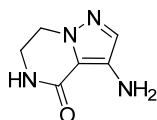


2M HCl/EtOH (3.6 ml, 7.22 mmol) were added to a solution of compound **20** (227 mg, 0.722 mmol) in EtOH (1.5 ml) at rt. The mixture was stirred at 50 °C for 1 h. The precipitate was collected by filtration as a white powder, and subjected to the next reaction. The mixture of the white powder and Et_3N (0.150 ml, 1.077 mmol) in toluene (5 ml) was stirred at 100 °C for 1h. After cooling to room temperature, H_2O was added to the reaction mixture. The precipitate was filtered, and dried *in vacuo* to give the compound **21** (60 mg, 0.329 mmol, 46%) as a white powder.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 8.71 (1H, br s), 8.35 (1H, s), 4.41-4.38 (2H, m), 3.67-3.61 (2H, m);

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 154.6, 136.3, 134.0, 129.4, 47.3, 38.4; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$: 205.0332, found: 205.0333.

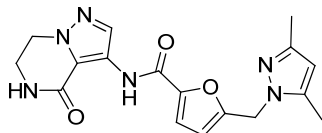
3-Amino-6,7-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4(5*H*)-one (22)



After being purged with N_2 gas, 10% (w/w) Pd/C (3.80 mg, 3.57 μmol) was added to a solution of compound **21** (65 mg, 0.357 mmol) in EtOH (2 ml). The reaction mixture was purged with H_2 gas and stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 1.5 h. The mixture was filtrated and concentrated. The residue was subjected to column chromatography over amino-functionalized silica gel (EtOAc/MeOH) to give the compound **22** (46 mg, 0.298 mmol, 84%) as a white powder.

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ 7.75 (1H, s), 6.99 (1H, s), 4.67 (2H, s), 4.10-4.05 (2H, m), 3.54-3.48 (2H, m); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 160.9, 134.9, 126.9, 117.1, 45.8, 39.4; HRMS-ESI m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_4\text{ONa}$: 175.0596, found: 175.0589.

5-((3,5-Dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*-(4-oxo-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-3-yl)furan-2-carboxamide (23)

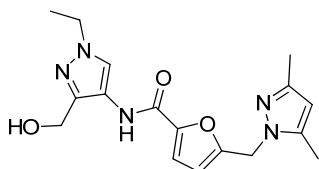


HATU (135 mg, 0.355 mmol) and Hunig's base (77 μl , 0.444 mmol) were added to a solution of compound **22** (45 mg, 0.296 mmol) and compound **8a** (65.1 mg, 0.296 mmol) in DMF (1.5 ml) at rt. The mixture was stirred at 50 $^\circ\text{C}$ for 5 min (automatically controlled in a microwave instrument). The mixture was diluted in H_2O and sat. NaHCO_3 aq, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H_2O and brine, and dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was subjected to a column chromatography over silica gel (hexane/EtOAc) to give the compound **23** (44 mg, 0.123 mmol, 42%) as a yellow powder.

Mp 288.4-289.6 $^\circ\text{C}$; IR (cm^{-1}) 3418, 3254, 2997, 1668, 1610, 1551, 1491, 1429, 1379, 1354, 1335, 1304, 1223, 1209, 1142, 1055, 1016, 970; ^1H -NMR (DMSO- d_6) δ 9.56 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.83 (s, 1H), 5.28 (s, 2H), 4.32-4.25 (m, 2H), 3.68-3.61 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.06 (s, 3H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ 160.0,

154.1, 153.8, 146.4, 146.1, 139.2, 129.4, 123.0, 120.4, 116.2, 111.0, 105.0, 45.6, 44.6, 13.2, 10.5; HRMS-ESI m/z : $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{19}N_6O_3$: 355.1513, found: 355.1501.

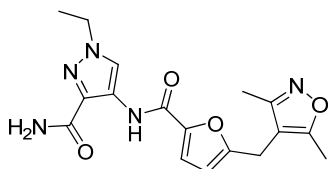
5-((3,5-Dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)-N-(1-ethyl-3-(hydroxymethyl)-1H-pyrazol-4-yl)furan-2-carboxamide (OPK-167)



To a suspension of $LiAlH_4$ (52.3 mg, 1.378 mmol) in THF (3ml) was added **9 Aa** (177 mg, 0.459 mmol) in THF at 0 °C for 3 h. After stirring for 30 min at rt, the reaction mixture was cooled at 0 °C and water, 5N NaOH aq and water was added. The mixture was dried over Na_2SO_4 and then filtered and concentrated on a rotary evaporator. The crude was purified by silica gel column chromatography ($CHCl_3/MeOH$) to give 5-((3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)methyl)-N-(1-ethyl-3-(hydroxymethyl)-1H-pyrazol-4-yl)furan-2-carboxamide (OPK-167, 70 mg, 0.193 mmol, 44%) as a white solid.

1H -NMR ($CDCl_3$) δ 8.86 (1H, s), 8.04 (1H, s), 7.07 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 6.29 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 5.84 (1H, s), 5.17 (2H, s), 4.87 (2H, d, $J = 5.1$ Hz), 4.10 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 2.99-2.93 (1H, m), 2.30 (3H, s), 2.21 (3H, s), 1.46 (3H, t, $J = 7.3$ Hz); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 155.0, 152.3, 148.3, 147.4, 140.5, 139.4, 122.0, 118.6, 115.6, 110.5, 105.9, 59.0, 47.3, 45.7, 15.4, 13.4, 11.1; HRMS-ESI m/z : $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{22}N_5O_3$: 344.1717, found: 344.1707.

4-(5-((3,5-Dimethylisoxazol-4-yl)methyl)furan-2-carboxamido)-1-ethyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (25)



OPK-095 (25) was purchased from Princeton BioMolecular Research, Inc.

White powder; ; mp 218.2-218.9 °C; IR (cm^{-1}) 3522, 3404, 3346, 3009, 1668, 1603, 1583, 1549, 1421, 1375, 1331, 1222, 1209, 1196, 1138, 1015, 962, 891; 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 10.25 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.09 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.71 (br s, 1H), 6.06-6.05 (m, 1H), 5.47 (br s, 1H), 4.17 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.52 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR

(CDCl₃) δ 166.3, 165.6, 159.6, 155.5, 155.3, 146.7, 131.6, 123.5, 121.3, 116.0, 109.1, 108.7, 48.1, 21.7, 15.3, 11.0, 10.1; HRMS-ESI m/z: [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₂₀N₅O₄: 358.1510, found: 358.1516.

細胞培養

ヒト線維芽肉腫 HT1080 細胞の培養は、10% ウシ胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)にて行った。低酸素応答領域 (Hypoxia responsive elements ; HRE) 下流にルシフェラーゼ遺伝子を安定発現させたヒト線維芽肉腫 5×HRE / HT1080 細胞の培養は、10%ウシ胎児血清、1% Penicillin /Streptomycin、50 µg /mL Zeocin を添加したダルベッコ変法イーグル培地にて行った。いずれも 37℃、20% O₂、5% CO₂ 下で行った。低酸素での培養は 1% O₂ 下で行った。

HRE-Luc レポーター遺伝子アッセイ

HRE の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを安定に保持するヒト線維芽肉腫 HT1080 細胞 (5×HRE/HT1080) を用いて、HIF-1 阻害活性を評価した。5×HRE/HT1080 細胞を 96 well plate に播種し(1.0×10⁴ cells/well)、通常酸素濃度下で 24 時間前培養した。試験化合物を添加し (DMSO 終濃度 : 0.5%)、通常酸素濃度下で 1 時間培養した後、低酸素濃度 (1% O₂) 下で 24 時間培養した。細胞を PBS で洗浄し、lysis buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) を加え (30 µL/well)、10 分振とうして細胞抽出液を得た。細胞抽出液 10 µL に Coomassie Brilliant Blue (CBB)溶液を 100 µL 添加し、吸光度 (595 nm) を測定してタンパク質濃度を定量した。一方、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性は、細胞抽出液 20 µL に Luc reaction buffer (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM MgSO₄, 0.125 mM D-ルシフェリン, 0.5 mM ATP, 0.5 mM CoA) を加え、化学発光を EnVision (Perkin Elmer 社) を用いて測定した。

細胞増殖抑制試験

HT1080 細胞を 96 well plate に播種し(1.0×10⁴ cells/well)、低酸素条件下で 24 時間前培養した。試験化合物を添加し、低酸素下で 72 時間培養した。WST-8 cell counting kit (同仁化学社) を添加して 37 °C で保温した。3 時間後、マイクロプレートリーダー (Bio-rad 社) を用いて吸光度 (450 nm) を測定した。

ウェスタンブロット解析

各化合物処理した HT1080 細胞抽出液 (抽出 buffer: 50mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, タンパク質 10 µg) を SDS-PAGE (8%ゲル) によって分離

した後、PVDF 膜へと転写した。転写後の膜は、3% BSA / 0.1% Tween 20-PBS 溶液にてブロッキング（室温、1 時間）した。続いて一次抗体、二次抗体と反応させ、洗浄後、NBT/BCIP により目的のタンパク質を可視化した。一次抗体には、マウス抗 HIF-1 α モノクローナル抗体（1:2000）（Becton, Dickinson 社）、ウサギ抗 HIF-1 β モノクローナル抗体（1:1000）（Cell Signaling Technology 社）、ウサギ抗 α チューブリンモノクローナル抗体（1:5000）（Cell Signaling Technology 社）、ウサギ抗 CA-IX ポリクローナル抗体（1:1000）（Abcam 社）、二次抗体には、ヤギ抗マウス IgG 抗体（1:10000）（Promega 社）、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（1:10000）（Promega 社）を用いた。

定量 RT-PCR 解析

Total RNA Extraction kit（Viogene 社）を用いて、HT1080 細胞の全 RNA を抽出した。cDNA への逆転写は、HT1080 細胞全 RNA 0.5 μ g を鋳型に、プライマーとして Random 9 mer を用いて、ReverTra Ace- α （東洋紡社）により、42 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させることで行った。定量 PCR 解析は Fast Start Universal SYBR Green Master（Roche Diagnostics 社）を用い、ABI StepOne Plus（Applied Biosystems）にて行った。以下の primer を PCR で用いた。内部標準は human *18S rRNA* とした。

各遺伝子の primer 配列

	Sense	Antisense
Human <i>CAIX</i>	5'-ACCCTCTCTGACACCCTGTG-3'	5'-GGCTGGCTTCTCACATTCTC-3'
human <i>HIF-1α</i>	5'-TACTAGCTTTGCAGAATGCTC-3'	5'-GGGTAGAGGCACTCGGAACTG-3'
human <i>HIF-1β</i>	5'-GGGGGCAGCTTACCTCTAAC-3'	5'-GGGTAGAGGCACTCGGAACTG-3'
Human <i>VEGF</i>	5'-GCAGCTTGAGTTAAACGAACG-3'	5'-GGTTCCCGAAACCCTGAG-3'
Human <i>18S rRNA</i>	5'-GCAATTATTCCCATGAACG-3'	5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3'

Wound healing assay

HT1080 細胞を 6 well plate に播種し(7.5×10^3 cells/well)、コンフルエントに達するまで培養した。培養細胞の単層を、200 μ L ピペットチップを用いて引っかき傷（創傷）を形成した。培地交換後、試験化合物を添加し、低酸素環境下で培養した。24 時間後の創傷治癒の度合いを位相差顕微鏡で観察した。

細胞免疫染色法

試験化合物を 1 時間前処理した HT1080 細胞を、低酸素下で 3 時間培養した。4%パラホルムアルデヒドを含む PBS 中でカバーガラス上の細胞を固定した（4 $^{\circ}$ C、15 分）。細胞を固定したカバーガラスを PBS で洗浄後、3%BSA と 0.3% Triton-X100 を含む PBS でブロッキングした（室温、30 分）。一次抗体と反応（室温、90 分）させた後、Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体と反応させた（室温、60 分）。

HIF-1 の DNA 結合試験

HIF-1 alpha Transcription Factor Assay Kit（abcam 社）を用い、添付のプロトコールに従って行った。すなわち、HRE 応答配列（5'-ACGTG-3'）を含む二本鎖 DNA オリゴがコートされた 96 ウェルプレートに、試験化合物を加え 15 分間室温で静置した。続いて、 NiCl_2 存在下で培養した HeLa 細胞の核抽出液を加え、4 $^{\circ}$ C で 12 時間静置した。一次抗体（抗 HIF-1 α 抗体）、二次抗体（HRP 抗ウサギ）と反応させ、Developing Solution にて呈色反応を行い、マイクロプレートリーダー（Thermo 社）を用いて吸光度（450 nm）を測定した。

参考文献

1. Semenza, G. L.; Wang, G. L. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 5447-5454.
2. (a) Wang, G. L.; Semenza, G. L. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1230-1237. (b) Wang, G. L.; Jiang, B. H.; Rue, E. A.; Semenza, G. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 5510-5514.
3. (a) Rankin, E. B.; Giaccia, A. J. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 678-685. (b) Hirose, K.; Morita, M.; Ema, M.; Mimura, J.; Hamada, H.; Fujii, H.; Saijo, Y.; Gotoh, O.; Sogawa, K.; Fujii-Kuriyama, Y. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 1706-1713.
4. (a) Semenza, G. L. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 721-732. (b) Carrero, P.; Okamoto, K.; Coumailleau, P.; O'Brien, S.; Tanaka, H.; Poellinger, L. *Mol. cell. Biol.* **2000**, *20*, 402-415. (c) Kato, H.; Tamamizu-Kato, S.; Shibasaki, F. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 41966-41974.
5. Xie, J.; Wu, H.; Dai, C.; Pan, Q.; Ding, Z.; Hu, D.; Ji, B.; Yan Luo, Y.; Hu, X. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4927.
6. Thiery, J. P. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 442-54.
7. Jiang, J.; Tang, Y. L.; Liang, X. H. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11*, 714-723.
8. Semenza, G. L. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 534-543.
9. Ji, Z.; Long, H.; Hu, Y.; Qiu, X.; Chen, X.; Li, Z.; Fan, D.; Ma, B.; Fan, Q. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2010**, *29*, 158.
10. Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 361-398.
11. Brown, J. M.; Wilson, W. R. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 437-447.
12. Harada, H.; Inoue, M.; Itasaka, S.; Hirota, K.; Morinibu, A.; Shinomiya, K.; Zeng, L.; Ou, G.; Zhu, Y.; Yoshimura, M.; McKenna, W.G.; Muschel, R. J.; Hiraoka, M. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 783.
13. Kong, D.; Park, E. J.; Stephen, A. G.; Calvani, M.; Cardellina, J. H.; Monks, A.; Fisher, R. J.; Shoemaker, R. H.; Melillo, G. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9047-9055.
14. Van Dyke, M. W.; Dervan, P. B. *Science*, **1984**, *255*, 1122-1127.
15. Kung, A. L.; Zabudoff, S. D.; France, D. S.; Freedman, S. J.; Tanner, E. A.; Vieira, A.; Cornell-Kennon, S.; Lee, J. Wang, B.; Wang, J.; Memmert, K.; Naegeli, H.U.; Petersen, F.; Eck, M.J.; Bair, K.W.; Wood, A.W.; Livingston, D.M. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 33-43.
16. Isaacs, J. S.; Jung, Y.; Mimnaugh, E. G.; Martinez, A.; Cuttitta, F.; Neckers, L. M. *J. Biol.*

- Chem.* **2002**, 277, 29936-29944.
17. Mabjeesh, N. J.; Post, D. E.; Willard, M. T.; Kaur, B.; Van Meir, E. G.; Simons, J. W.; Zhong, H. *Cancer Res.* **2002**, 62, 2478-2482.
 18. Porter, J. R.; Ge, J.; Lee, J.; Normant, E.; West, K. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, 9, 1386-1418.
 19. Lee, K.; Lee, J. H.; Boovanahalli, S. K.; Jin, Y.; Lee, M.; Jin, X.; Kim, J. H.; Hong, Y. S.; Lee, J. J. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 1675-1684.
 20. Lee, K.; Ban, H. S.; Naik, R.; Hong, Y. S.; Son, S.; Kim, B. K.; Xia, Y.; Song, K. B.; Lee, H. S.; Won, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 10286-10289.
 21. Härter, M.; Thierauch, K. H.; Boyer, S.; Bhargava, A.; Ellinghaus, P.; Beck, H.; Greschat-Schade, S.; Hess-Stumpp, H.; Unterschemmann, K. *Chem. Med. Chem.*, **2014**, 9, 61-66.
 22. Li, S. H.; Shin, D. H.; Chun, Y. S.; Lee, M. K.; Kim, M. S.; Park, J. W. *Mol. Cancer Ther.*, **2008**, 7, 3729-3738.
 23. Xia, Y.; Choi, H. K.; Lee, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 49, 24-40.
 24. Ban, H. S.; Uto, Y.; Nakamura, H. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, 21, 131-146.
 25. Harada, H.; Inoue, M.; Itasaka, S.; Hirota, K.; Morinibu, A.; Shinomiya, K.; Zeng, L.; Ou, G.; Zhu, Y.; Yoshimura, M.; McKenna, W.G.; Muschel, R. J.; Hiraoka, M. *Nat. Commun.* **2012**, 3, 783.
 26. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 2235-2246.
 27. Hansen, J. D.; Grina, J.; Newhouse, B.; Welch, M.; Topalov, G.; Littman, N.; Callejo, M.; Gloor, S.; Martinson, M.; Laird, E.; Brandhuber, B. J.; Vigers, G.; Morales, T.; Woessner, R.; Randolph, N.; Lyssikatos, J.; Olivero, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 4692-4695.
 28. Srivastava, B. K.; Soni, R.; Patel, J. Z.; Jha, S.; Shedage, S. A.; Gandhi, N.; Sairam, K. V.; Pawar, V.; Sadhwani, N.; Mitra, P.; Jain, M. R.; Patel, P. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 3882-3886.
 29. Purandare, A. V.; Chen, Z.; Huynh, T.; Pang, S.; Geng, J.; Vaccaro, W.; Poss, M. A.; Oconnell, J.; Nowak, K.; Jayaraman, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 4438-4441.

30. Thorne, N.; Shen, M.; Lea, W. A.; Simeonov, A.; Lovell, S.; Auld, D. S.; Inglesse, J. *Chem.Biol.* **2012**, *19*, 1060-1072.
31. 本吉谷 二郎, 有機合成化学協会誌, **2012**, *10*, 1018-1029.
32. Thorne, N.; Inglesse, J.; Auld, D. S. *Chem.Biol.* **2010**, *17*, 646-657.
33. Poutiainen, P.K.; Palvimo, J.J.; Hinkkanen, A. E.; Valkonen, A.; Väisänen, T.K.; Laatikainen, R.; Pulkkinen, J. T. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1064–1073.
34. Aulda, D. S.; Lovellb, S.; Thornea, N.; Leaa, W. A.; Maloneya, D. J.; Shena, M.; Raia, G.; Battailec, K. P.; Thomasa, C. J.; Simeonova, A.; Hanzlikb, R. P.; Inglessea, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 4878-4883.
35. Auld, D. S.; Southall, N. T.; Jadhav, A.; Johnson, R. L.; Diller, D. J.; Simeonov, A.; Austin, C. P.; Inglesse, J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2372-2386.
36. Mallena, S.; Lee, M. P.; Bailly, C.; Neidle, S.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13659-13669.
37. Wai, J. S.; Egbertson, M. S.; Payne, L. S.; Fisher, T. E.; Embrey, M. W.; Tran, L. O.; Melamed, J. Y.; Langford, H. M.; Guare, J. P. Jr.; Zhuang, L.; Grey, V. E.; Vacca, J. P.; Holloway, M. K.; Naylor-Olsen, A. M.; Hazuda, D. J.; Felock, P. J.; Wolfe, A. L.; Stillmock, K. A.; Schleif, W. A.; Gabryelski, L. J.; Young, S. D. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4923-4926.
38. Hynes, J. Jr.; Wu, H.; Pitt, S.; Shen, D. R.; Zhang, R.; Schieven, G. L.; Gillooly, K. M.; Shuster, D. J.; Taylor, T. L.; Yang, X.; McIntyre, K. W.; McKinnon, M.; Zhang, H.; Marathe, P. H.; Doweiko, A. M.; Kish, K.; Kiefer, S. E.; Sack, J. S.; Newitt, J. A.; Barrish, J. C.; Dodd, J.; Leftheris, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1762-1767.
39. Meegalla, S. K.; Wall, M. J.; Chen, J.; Wilson, K. J.; Ballentine, S. K.; Desjarlais, R. L.; Schubert, C.; Crysler, C. S.; Chen, Y.; Molloy, C. J.; Chaikin, M. A.; Manthey, C. L.; Player, M. R.; Tomczuk, B. E.; Illig, C. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3632-3637.
40. Nagao, Y.; Hirata, T.; Goto, S.; Sano, S.; Takehi, A.; Iizuka, K.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3104-3110.
41. Bondi, A. *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441-451.
42. CLB-016 の ¹H-NMR 解析において、2 つあるカルボキサミド部 NH のうち、片方のプロトンピークの低磁場シフトが観測された。このことから、カルボキサミド NH とピラゾール N 原子との間で分子内水素結合形成していると考えられる。また、五員環分子内水素結合に関しては、次の文献でもその存在が支持されている。Kuhn, B.; Mohr, P.; Stahl, M.; *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2601-2611.

43. Weinstein, J. N.; Myers, T. G.; O'Connor, P. M.; Friend, S. H.; Fornace, A. J. Jr.; Kohn, K. W.; Fojo, T.; Bates, S. E.; Rubinstein, L. V.; Anderson, N. L.; Buolamwini, J. K.; van Osdol, W.W.; Monks, A. P.; Scudiero, D. A.; Sausville, E. A.; Zaharevitz, D. W.; Bunow, B.; Viswanadhan, V. N.; Johnson, G. S.; Wittes, R. E.; Paull, K. D. *Science*, **1997**, *275*, 343-349.
44. Yamori, T. *Cancer Chemother. Pharmacol*, **2003**, *52* (Suppl. 1), 74–79.
45. Chen, C. J.; Hsu, M. H.; Huang, L. J.; Yamori, T.; Chung, J. G.; Lee, F. Y.; Teng, C. M.; Kuo, S.C. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 360-368.

発表論文

“Design, synthesis, and structure-activity relationships of 1-ethylpyrazole-3-carboxamide compounds as novel hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors.”

Yorinobu Yasuda, Takeaki Arakawa, Yumi Nawata, Sayaka Shimada, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Shinichi Nishimura, Akira Hattori, Hideaki Kakeya.

Bioorg. Med. Chem. in press.

謝 辞

終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました、京都大学大学院薬学研究科・掛谷秀昭教授に謹んで感謝致します。

本研究にあたり、実験技術・研究姿勢を御指導下さいました、京都大学大学院薬学研究科・服部明准教授、西村慎一助教、石川文洋特定助教に心より御礼申し上げます。

多大なる御助言、御協力を頂いた長崎大学 創薬研究教育センター・酒井佑宜助教、京都大学大学院薬学研究科・高橋伸明博士、嶋田清香様、森吉英子様、森吉英子様に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行に御協力頂きました、荒川武明修士、縄田有美学士（現 薬品動態制御学分野）、並びに京都大学大学院薬学研究科制御分子学分野の諸氏に心より感謝致します。

京都大学大学院薬学研究科・高須清誠教授、並びに大野浩章教授には、本論文の査読をして頂き多くの御教示を賜りました。深甚なる感謝の意を表します。

化合物ライブラリーより化合物の提供、並びに論文作成においてご指導頂きました、京都大学大学院薬学研究科・藤井信孝特別教授、並びに大石真也講師に、心より御礼申し上げます。

ヒトがん細胞パネル感受性試験および COMPARE 解析をして頂きました、公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター・矢守隆夫博士、並びに旦慎吾博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、日頃より私を支えてくれている妻・紀恵、そして両親、家族、友人に深く感謝致します。

2015 年 3 月

安田 順信