

CFAフラグメントライブラリーを用いた細胞代謝フェ ノタイプスクリーニングによるコバレントリガンド 探索

井上, 和哉

<https://hdl.handle.net/2324/7157316>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士（臨床薬学）, 課程博士
バージョン :
権利関係 :



九州大学大学院薬学府臨床薬学専攻

博士論文

CFA フラグメントライブラリーを用いた
細胞代謝フェノタイプスクリーニングによる
コバレントリガンド探索

令和5年 3月

井上和哉

指導教官

王子田 彰夫 教授

目次

General Introduction

1. 序論.....	1
1-1. 研究背景.....	1
1-2. 本研究の目的.....	10
2. 参考文献.....	11

Chapter1. Construction of CA/CFA fragment libraries.

1. 序論.....	12
1-1. 背景.....	12
1-2. 目的.....	16
2. コバレント型フラグメント化合物の構築.....	17
2-1. CA/CFA ライブラリーの構築.....	17
2-2. まとめ.....	37
2-3. 実験項.....	38
3. 参考文献.....	49

Chapter2. Improvement of sensing ability of and its application to screening of fluorescent probe of covalent β -oxidation inhibitors

1. 序論.....	50
1-1. 背景.....	50
1-2. 目的.....	54
2. β 酸化検出用蛍光プローブの蛍光強度改善.....	55
2-1. プローブの分子設計.....	55
2-2. probe2 の特性評価.....	57
2-3. probe1 と probe2 の pKa 比較.....	58
2-4. イメージングによる probe2 の評価及び Probe1 との蛍光強度比較.....	60
2-5. HPLC を用いた probe2 の β 酸化追跡及び probe1 との代謝速度比較.....	62
2-6. probe1 及び 2 の細胞内滞留性の検討.....	64
2-7. まとめ.....	66

2-8. 実験項.....	67
3. β酸化検出用蛍光プローブを用いたβ酸化阻害剤スクリーニング.....	73
3-1. 序.....	73
3-2. 生細胞に対するフラグメント化合物の添加条件検討.....	75
3-3. β 酸化阻害剤の探索.....	77
3-4. ピペラジン・ピペリジン化合物の標的タンパク質に対する結合性.....	81
3-5. CFA-154 及び 157 の細胞毒性評価.....	82
3-6. ピペラジン・ピペリジン骨格を持つ化合物の合成・評価.....	83
3-7. CFA-154/157 添加時の probe2 の代謝挙動解析.....	85
3-8. まとめ.....	86
3-9. 実験項.....	87
4. 参考文献.....	93

Chapter3. Elucidation of inhibiting mechanism of hit compounds by chemical biology approach

1. ヒット化合物の作用機序解明.....	95
1-1. 序.....	95
1-2. Gel-based ABPP によるヒット化合物のラベル化挙動解析.....	96
1-3. モデル化合物とアルキンフラグメントとの競合 ABPP.....	98
1-4. 競合法を用いたケミカルプロテオミクス解析による標的タンパク質の同定.....	100
1-5. proteinX1 及び X2 抗体を用いた western blotting.....	104
1-6. まとめ.....	105
1-7. 実験項.....	106
2. proteinX の化学.....	109
2-1 序.....	109
2-2. proteinX1/2 の精製酵素を用いたラベル化検討.....	113
2-3. 精製酵素を用いたフラグメント化合物の阻害活性検討.....	116
2-4. まとめ.....	119
2-5. 実験項.....	120
3. proteinX と β酸化との関係.....	121
3-1. proteinX inhibitor を用いた β 酸化阻害スクリーニング.....	121

3-2. proteinX inhibitor と CFA-157, 160 の競合 gel based ABPP.....	124
3-3. 4-HNE による β 酸化への影響.....	126
3-4. まとめ.....	127
3-5. 実験項.....	128
4. 参考文献.....	130
結言.....	132
参考資料.....	134
謝辞.....	135

General Introduction

1. 序論

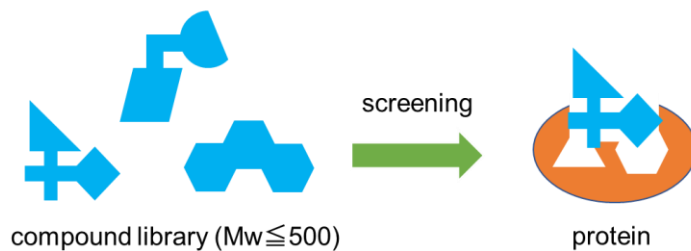
1-1. 研究背景

1-1-1. スクリーニング創薬

薬剤はタンパク質との相互作用により薬効を示す分子であり、これまで核酸や酵素、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR)、イオンチャネルに至るまで、様々な生体分子を標的とした薬剤が開発されている⁽¹⁾。これまで、これらの治療標的に対する低分子量の活性化合物またはヒット化合物を見つけるための重要なアプローチとしてハイスループットスクリーニング (HTS) が広く用いられてきた。HTS は一般的に詳細な情報がほとんどない標的に対して、分子量 500 以下からなる数十万もの大規模な化合物ライブラリーから活性分子を同定するための手段であり (Figure 1-1 (a))⁽²⁾、製薬企業やアカデミア業界で広く用いられている。また、ヒットとして得られた化合物が既存のターゲットの新規リガンドの発見に役立つこともあり、これまでの医薬品に取って代わる高い阻害活性を有する化合物の創薬に役立つことも期待される⁽³⁾。しかしながら、HTS はスクリーニングを行う化合物数が多く費用や期間を要することや、構造最適化を行う際に脂溶性が高くなる結果、経口吸収性が悪くなり医薬品として不適切な化合物ができてしまう⁽⁴⁾等、問題点も多いのが現状である。

そこで、HTS とは別の創薬アプローチ法として FBDD (Fragment based drug discovery) が提唱された。FBDD はフラグメントと呼ばれる分子量 300 以下からなる化合物を用いてスクリーニングを行い、構造の最適化により標的タンパク質に対して相互作用をするリード化合物を開発するための創薬方法である (Figure 1-1 (b))⁽⁵⁾。この方法では HTS で標的とすることが困難であった小さなケミカルスペースに対しても網羅性が高く、1 万程度のより少ない化合物群 (Fragment library) で高いヒット率を見出すことができる⁽⁶⁾。また、FBDD で用いられる化合物群は一般的に Rule of three、すなわち分子量 ≤ 300 、水素結合供与体及び受容体の数 ≤ 3 、 $\text{clogP} \leq 3$ 、回転可能結合数 ≤ 3 を基に構築される。そのため、構造的にシンプルで、水溶性が保たれていることからリード化合物への展開が行いやすいこともメリットとして挙げられる⁽⁷⁾。

(a). High Throughput Screening (HTS)



(b). Fragment-Based Drug Discovery (FBDD)

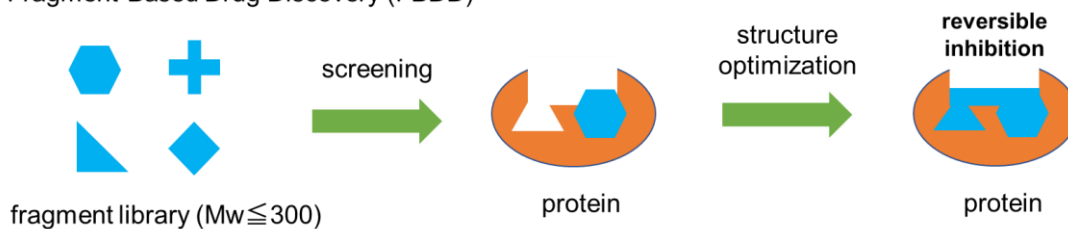


Figure 1-1. Schematic diagram of drug discovery method. (a). High Throughput Screening (HTS), (b). Fragment-Based Drug Discovery (FBDD).

しかしながら、FBDD では使用される化合物のサイズが小さいために、標的タンパク質との結合親和性が低いことが難点である。HTS アッセイでは通常、解離定数値 (K_d) が nM $\sim$ μM の範囲だが、FBDD でのヒット化合物は通常、 μM $\sim$ mM であると言われている⁽⁸⁾。そのため、スクリーニングの際には表面プラズモン共鳴 (SPR)、NMR、X 線結晶構造解析およびサーマルシフトアッセイなどの生物物理学的技術を駆使し、結合を測定することでヒット化合物を選定していく必要がある⁽⁹⁾。これらの理由から、FBDD は、HTS を取って代わるものではなく、HTS と相補的な役割で用いられる。

1-1-2. コバレントドラッグの現状

上述したようにこれまでのフラグメント化合物は親和性が弱いためにヒット化合物を得にくい現状がある。そこでフラグメント化合物の低親和性を補うために標的タンパク質と共有結合を形成するコバレントドラッグを用いたフラグメント創薬が行われるようになった。コバレントドラッグはタンパク質と相互作用をするリガンド部位に加え、標的の求核性アミノ酸残基と反応するための求電子的反応基 (Warhead) を併せ持ち、コバレントドラッグと標的タンパク質が相互作用することで、標的タンパク質表面の求核性アミノ酸から warhead に対する求核攻撃が誘起される (Figure 1-2 (a))。これらのフラグメントは非共有結合的な相互作用をする化合物とは異なり、タンパク質と解離しないことから強い結合性と長い作用時間を有するといった特徴を持つ⁽¹¹⁾。

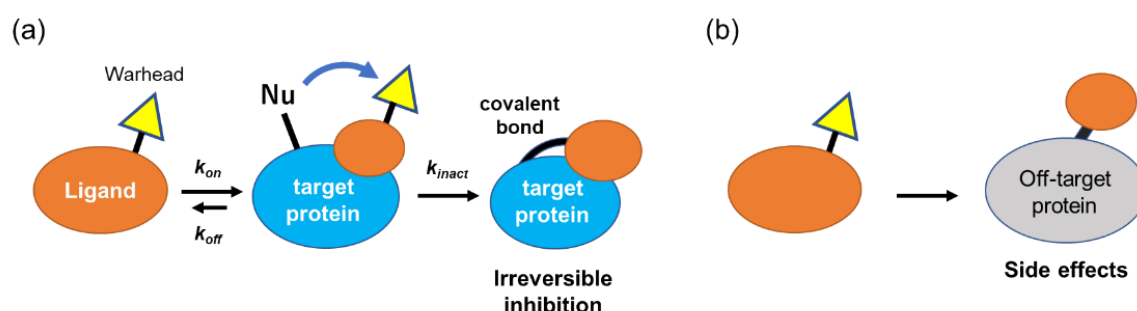


Figure 1-2 (a). Inhibitory mechanism of covalent inhibitor. (b). Off target labeling of covalent inhibitor.

このようにコバレントドラッグは多くのメリットを有する一方で、warhead の反応性が高い、もしくは標的特異性が低い場合には標的以外のタンパク質であるオフターゲットタンパク質と複合体を形成してしまう可能性がある (Figure 1-2 (b))⁽¹²⁾。このようにしてできた薬剤とタンパク質の複合体は様々な副作用を引き起こすことが懸念される。実際に薬物が薬物代謝酵素などにより高反応性代謝産物へと変換され、タンパク質や DNA など生体成分と反応し、その機能を阻害することで副作用を発現することが報告されている。また、代謝産物とタンパク質との複合体は抗原として認識され免疫系を活性化し、細胞障害や組織障害、さらに重篤な場合には臓器不全を引き起こすこともある⁽¹³⁾。例えば、解熱鎮痛薬として知られるアセトアミノフェンの主要な代謝物である *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンミン (NAPQI) は、肝臓の CYP 酵素系で生成され、肝臓に貯蔵されているグルタチオンにより解毒される。しかし急性過剰摂取等により肝臓のグルタチオンが枯渇した場合には NAPQI が蓄積し、肝細胞壊死等の傷害を引き起こす (Figure 1-3 (a))⁽¹⁴⁾。

また、反応基の反応性が生理学的条件下で安定性に欠く原因となる場合もある。例えば、Grygorenko らは、トリプシンを標的としたフラグメントスクリーニングを行うためにスル

ホニルフルオリドを反応基として持つ 62 種類のライブラリーを構築したが、オルト位にスルホンアミドを有する化合物はほとんどの場合、加水分解により対応するスルホン酸が主成分として観察され、1 日以内に多くが分解することを示唆している (Figure 1-3 (b))⁽¹⁵⁾。

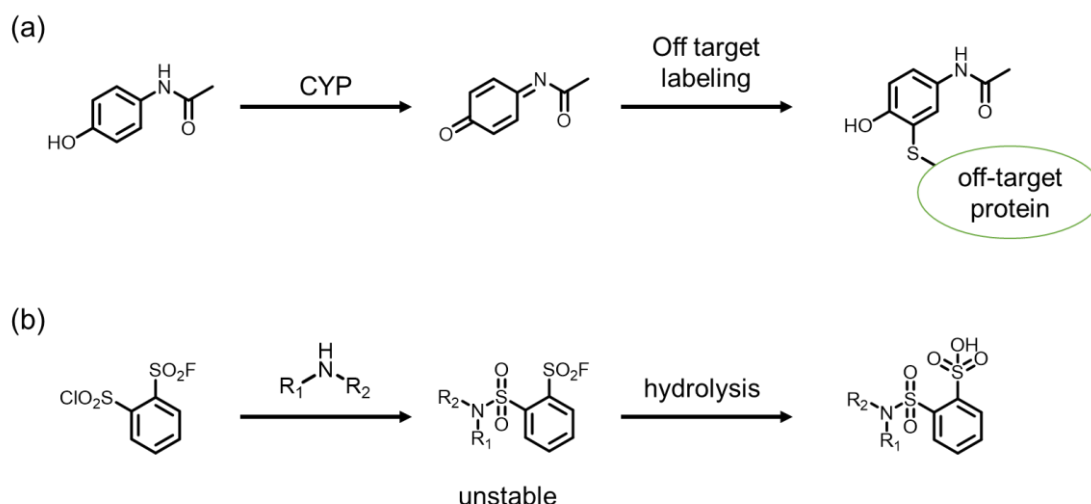
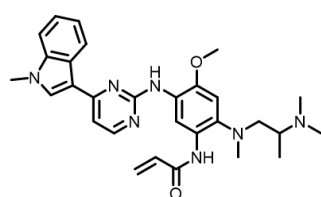
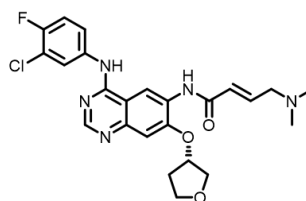


Figure 1-3. (a). Mechanism of hepatotoxicity by acetaminophen. (b). Decomposition mechanism of sulfonyl fluoride derivatives

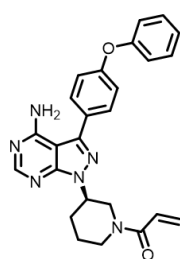
上述したような問題点を解決するために、反応基の反応性を適度に調節することが重要である。そのため近年では、タンパク質と強く相互作用するリガンド部位と、標的アミノ酸が近接した時にのみ反応するような適度に反応性が調節された反応基を有し、標的選択性の向上を志向したコバレントドラッグである Targeted Covalent Inhibitors (TCIs) の開発が盛んになっている。TCIs の特徴として、十分に近接した状態にあるアミノ酸残基とのみ特異的に反応するため、これまでのコバレントドラッグで見られた重篤な副作用の低減が期待される⁽¹⁶⁾。これまでアメリカ食品医薬品局 (US Food and Drug Administration : FDA) に承認され TCIs として上市されている医薬品は osimertinib や afatinib、ibrutinib、sotorasib などがある (Figure 1-4)。osimertinib や afatinib は上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼ阻害剤として知られており、Cys797 と共有結合を形成することで細胞の増殖を抑制し抗腫瘍効果を発揮する^(17,18)。また、ibrutinib は B 細胞の生存と増殖に重要な B 細胞受容体の下流にあるキナーゼであるブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の Cys481 共有結合を形成し、B 細胞受容体シグナル伝達の阻害、B 細胞の活性化の低下、およびアポトーシスの誘導をもたらす^(19,20)。sotorasib は癌遺伝子である KRAS の G12C 変異体に作用する covalent inhibitor であり、FBDD 創薬からリード化された医薬品である^(21,22)。



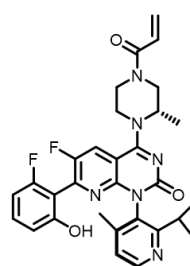
osimertinib
(EGFR inhibitor)



afatinib
(EGFR inhibitor)



ibrutinib
(BTK inhibitor)



sotorasib
(KRAS^{G12C} inhibitor)

Figure 1-4. The representative TCIs

しかしながら、先に示したように、TCIsにおいて求電子基に比較的反応性が高いマイケルアクセプター (MA) を導入するケースが殆どである。また、covalent FBDDにおける創薬においてもシステインを標的とした反応基としてはマイケルアクセプターやさらに反応性が高いクロロアセチル基 (CA) が汎用されている⁽¹⁰⁾。実際 Cravatt らのグループは、既存のマイケルアクセプターを反応基として有する TCIs にアルキンタグを導入したプローブを作製し、gel-based ABPP を行った。その結果、低濃度・短時間では標的特異的にプローブが作用するが、濃度及び時間が増加するにつれ、非特異反応が増加し標的選択性が失われることを報告している⁽²³⁾。

このような現状から、当研究室ではこれまでの CA 基や MA よりも穏やかな反応性を持つ反応基として α -クロロフルオロアセトアミド (CFA) 基を見出すこと成功した^(24, 25)。CFA 基はカルボニル基の α 位にハロゲンをもつ α -ハロアセトアミド基の中でも適度な反応性を有することから、非特異反応が少なく、かつ薬効の強いコバレント阻害剤への応用が期待される (Figure 1-5 (a))。実際に本手法で見出した CFA 基を EGFR 阻害剤へと応用した結果、EGFR に対して特異性の高いラベル化ができることが分かった (Figure 1-5 (b))。

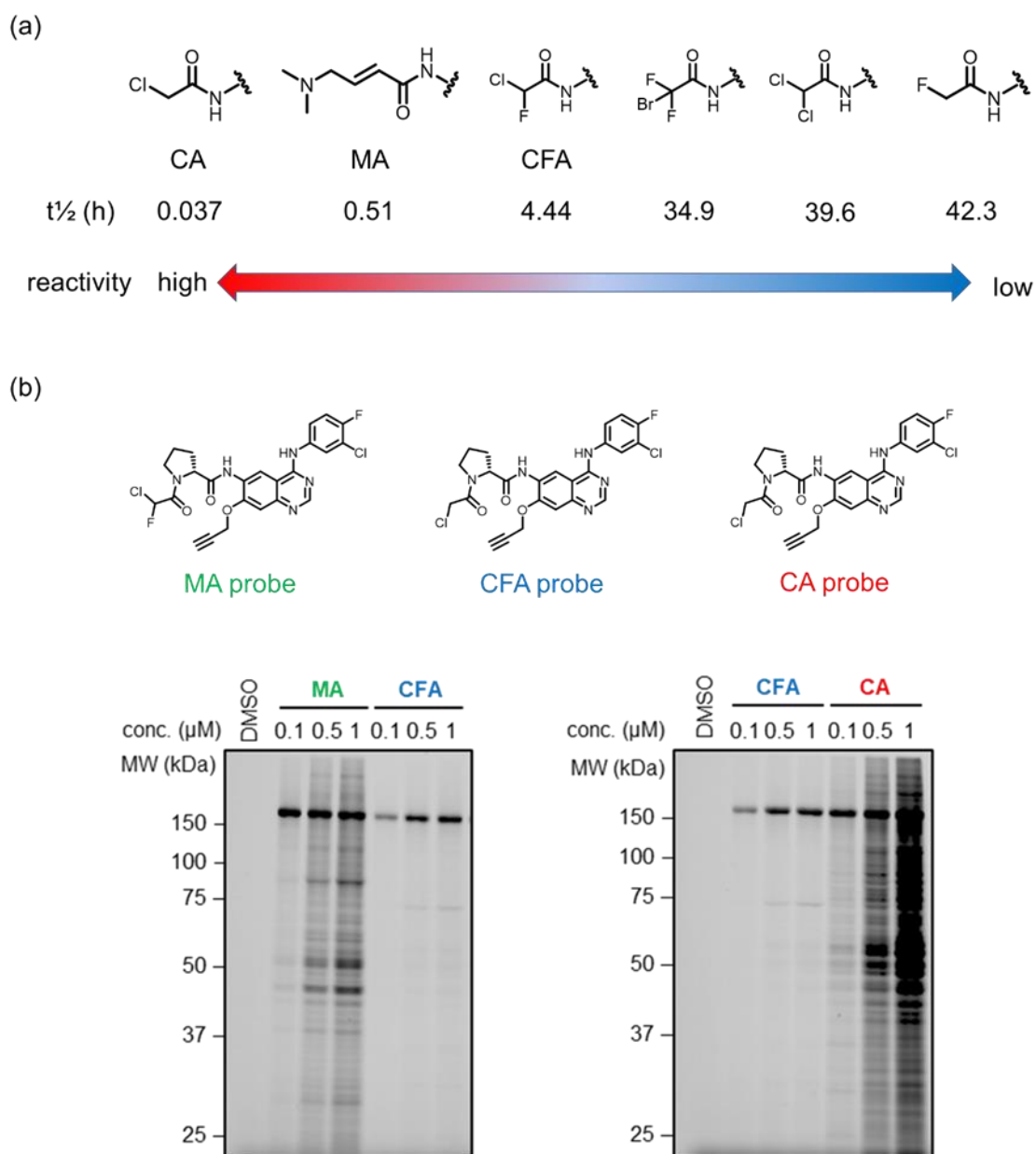


Figure 1-5. (a). Reactivity of electrophiles. (b). Gel-based ABPP. A431 cells were treated with MA probe, CFA probe, or CFA probe. (0.1-1 μ M, 2 h, 37 $^{\circ}$ C)⁽²⁵⁾.

1-1-3. コバレントドラッグのフラグメント創薬応用

コバレントドラッグを用いたフラグメント創薬は従来の非共有結合的なフラグメント創薬 (FBDD) と比較して、標的タンパク質との結合能が大幅に向上する。そのため、これまでに標的とすることが不可能とされてきたタンパク質に対しても創薬ターゲットとすることが可能となる。さらに、フラグメントが共有結合を形成することを利用し、活性ベースタンパク質プロファイリング (Activity-Based Protein Profiling) を用いた創薬研究が可能となる^(10, 26, 27)。実際に Backas らは CA 基 とアクリルアミドを反応基として有するシステインを標的とした共有結合型フラグメントライブラリー (Figure 1-6 (a)) を約 60 種類構築し、定量的なプロテオミクス解析手法である isoTOP-ABPP を行うことで生細胞中の反応性システイン残基を調べた。その結果彼らは 700 を超えるシステイン残基の共有リガンドを特定した (Figure 1-6 (b))。同定された反応性残基のいくつかは、これまでに標的化が難しいと考えられていた転写因子や足場タンパク質などが含まれており (Figure 1-6 (c))、covalent FBDD が創薬ターゲットとしては難しいとされてきたタンパク質であっても、リード化合物を見出すことができる強力な創薬手法となることを示唆している⁽²⁸⁾。

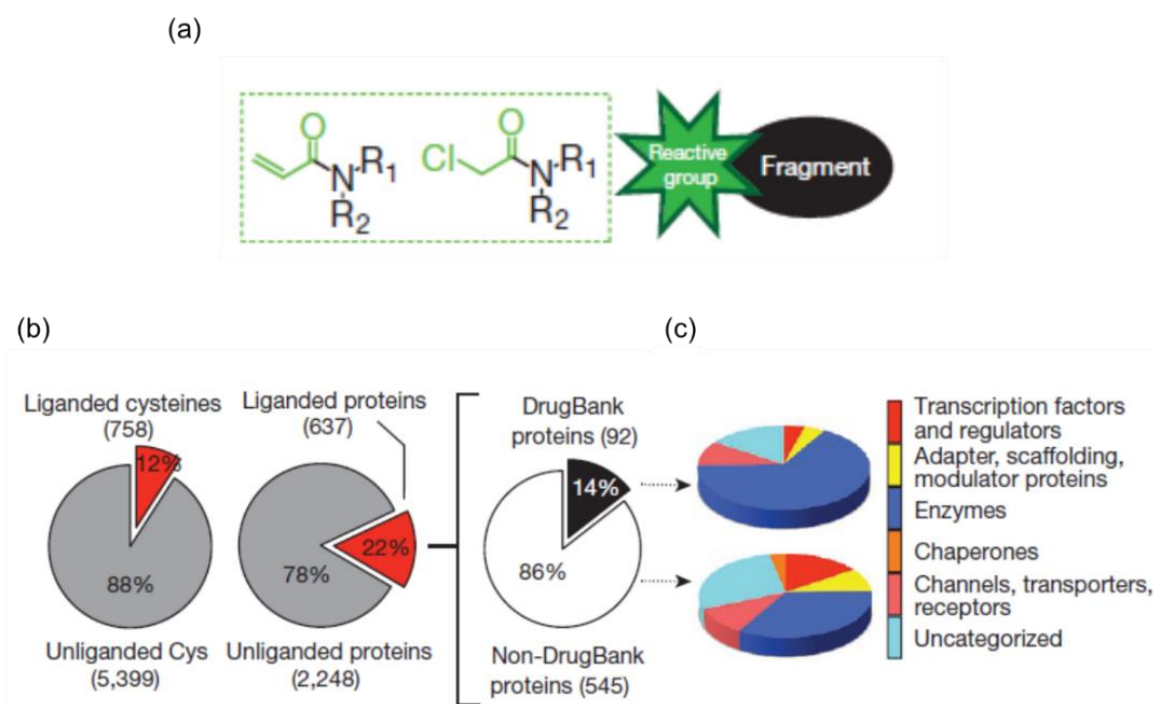


Figure 1-6. (a). General structure of electrophilic fragment library, (b). Analysis of cysteines and proteins liganded by fragment electrophiles, (c). Hit proteins by electrophilic fragment library⁽²⁸⁾.

また、近年フラグメント化合物を用いた阻害剤スクリーニングは頻繁に行われている。Dubiella らは、発癌過程に関与するリン酸化依存性プロリンイソメラーゼである Pin1 を標的とした共有結合フラグメントによるスクリーニングを行った。Pin1 は求核性システイン残基 (Cys113) を有することが知られている。そのため彼らはアクリルアミドと α -クロロアセトアミドを反応基として有する約 1000 個の求電子性フラグメントライブラリーを構築し、LC/MS 解析で Pin1 の精製酵素と共有結合を形成する化合物を同定した (Figure 1-7 (a))。その結果、111 個のフラグメントが Pin1 を 50 % 以上不可逆的に阻害し (Figure 1-7 (b))、構造活性相関による構造の最適化を経て、Pin1 の選択的阻害薬である sulfopin を見出した (Figure 1-7 (c))⁽²⁹⁾。

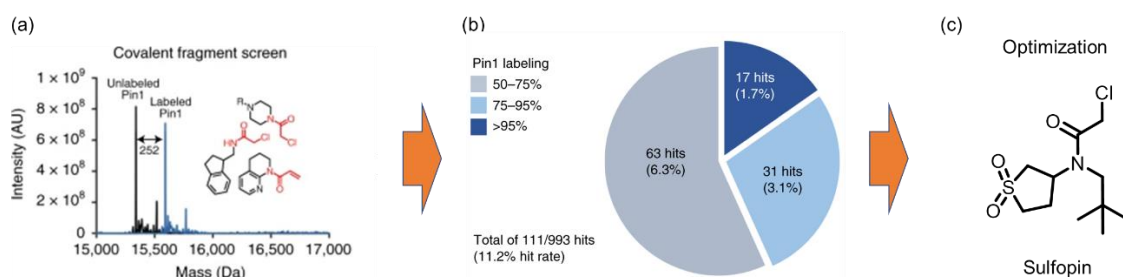


Figure 1-7. (a). Covalent fragment screening using CA and AA library, (b). Distribution of hits in the Pin1 screening campaign and their corresponding labeling. (c). Creation of hit compound (Sulfopin) by structural optimization⁽⁹⁾.

さらに、生細胞での共有結合型のフラグメント創薬も行われている。Daniel K. Nomura らは、CA 基とアクリルアミド基を反応基として有するフラグメント化合物を膵臓がん由来の細胞である PaCa2 細胞に対して添加し、生細胞でのスクリーニングを行った。その結果 PaCa2 細胞の生存を優位に減少させる DKM 2-67, DKM 2-83, DKM 2-93 を見出した (Figure 1-8 (a))。さらに isoTOP-ABPP を行うことで標的システインを調べたところ、DKM 2-93 はユビキチン様タンパク質である UFM1 を活性化する酵素であり、PaCa2 細胞の増殖に必要である UBA5 の cys250 と高選択的に結合することが分かった (Figure 1-8(b))⁽³⁰⁾。

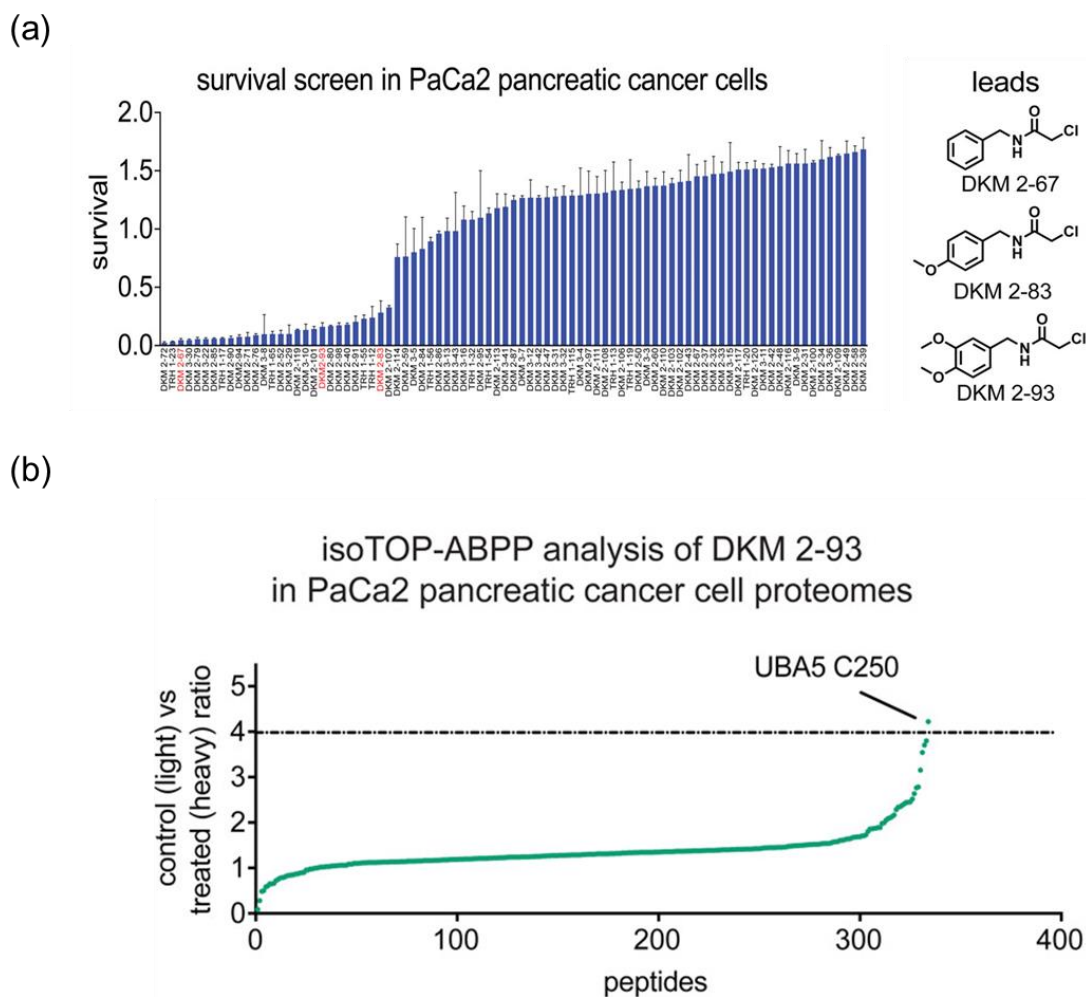


Figure 1-8. (a). Fragment screening of a library of cysteine-reactive acrylamides and chloroacetamides in PaCa2 pancreatic cancer cells. (b). isoTOP-ABPP analysis of DKM 2-93.

上述したように、標的タンパク質と共有結合を形成するコバレント型のフラグメント化合物を用いたスクリーニングが盛んとなっている。しかしながら、システインを標的としたフラグメント中の反応基としては CA 基や AA 基が多く用いられている。フラグメント化合物は一般的にタンパク質との親和力が低いため比較的高濃度の化合物を用いる必要がある。その一方で先に示した反応基を有する化合物を高濃度で用いることは off-target タンパク質とのラベル化や細胞毒性にもつながり、スクリーニング時に擬陽性が多くなる原因にもなる。そのため、穏やかな反応性を有する CFA フラグメント化合物を用いたフェノタイプスクリーニングは細胞毒性や非特異反応の抑制につながり、スループット性の高い創薬につながる事が期待される。

1-2. 研究目的

FBDD は標的タンパク質に対する新規の阻害剤候補化合物を見出すために有用な手段であるが、分子量が小さいためにタンパク質との相互作用が弱く、ヒット化合物探索を行うことが容易ではない。一方、フラグメントに反応基を導入した covalent fragment による FBDD 創薬においては結合親和性の改善が見込まれることから、阻害剤候補化合物の探索に非常に有用である。また、当研究室では代謝を検出する蛍光プローブの開発を行っている。そのため、当研究室で独自に開発した穏やかな反応性を有する CFA 基を導入したフラグメント化合物と、代謝を検出する蛍光プローブを組み合わせることで、オリジナリティの高い新規コバレント型の代謝阻害剤を開発できると考えた。

そこで、本研究では CFA 基を反応基として有するフラグメントライブラリーを用いた代謝を抑制する化合物の開発とその作用機序の解明を目的とした。

第一章では、当研究室で独自に開発した反応基である CFA 基を導入したフラグメントライブラリーの構築を行った。当研究室ではこれまでにパパインを標的とした阻害剤の開発に成功しているが、その際に構築した CFA ライブラリーの数 30 種類であり十分な数ではなかった。そこで新たに約 120 種類を構築することで構造の多様性に富んだ様々なフラグメント化合物を構築し、フェノタイプスクリーニングでヒット化合物を得るために必要な数を揃えた。

第二章では、以前当研究室で開発した β 酸化検出用蛍光プローブの蛍光強度の改善し、CFA 基を反応基として有するフラグメント化合物を用いた新規共有結合型 β 酸化阻害剤の開発を目指した。これまでの β 酸化阻害剤は非共有結合型の化合物が多く、薬効が弱いといった問題がある。そのため、 β 酸化を抑制する共有結合阻害剤の開発は非常に有用であることから、ヒット化合物の探索を行った。

第三章では第 2 章でヒットタンパク質と得られてきたピペラジン・ピペリジン骨格を有する化合物について、gel based-ABPP から細胞内での代謝挙動を追跡すると共に、ケミカルプロテオミクス解析によりヒットタンパク質を同定した。さらにヒットタンパク質として得られた、proteinX1/X2 について、精製酵素を用いて ABPP によるラベル化挙動の解析、阻害活性評価を行うと共に、proteinX と β 酸化との関係性を明らかにしたので記述した。

2. 参考文献

1. K. H. Bleicher, et. al. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 369
2. V. Blay, et. al. *Drug Discov. Today*, **2020**, *25(10)*, 1807
3. R. Macarron, et. al. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 188
4. S. Yamanobe, et. al. *Folia Pharmacol. Jpn.*, **2017**, *149*, 180
5. G. M. Keseru, et. al. *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 8189
6. P. J. Hajduk, et. al. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, *6*, 211
7. H. Jhoti, et. al. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2013**, *12*, 5
8. F. N.B. Edfeldt, et. al. *Drug Discov. Today*, **2011**, *16(7/8)*, 284
9. Z. Konteatis, *Expert Opin Drug Discov.*, **2021**, *16(7)*, 723
10. A. Keeley, et. al. *Drug Discov. Today*, **2020**, *25(6)*, 983
11. U. P. Dahal, et. al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2013**, *26*, 1739
12. X. Zhang, et. al. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **2011**, *26(1)*, 47
13. J. Uetrecht, *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, *22*, 24
14. R. A. Bauer, *Drug Discov. Today*, **2015**, *20(9)*, 1061
15. K. A. Tolmachova, et. al. *ACS Comb. Sci.*, **2018**, *20*, 672
16. T. A. Baillie, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 13408
17. X. Zhai, et. al. *Biochemistry*, **2020**, *59*, 1428
18. J. Lategahn, et. al. *Chem. Sci.*, **2019**, *10*, 10789
19. U. Gayko, et. al. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2015**, *1358*, 82
20. A. Wiestner, et. al. *J. Clin. Oncol.*, **2013**, *31(1)*, 128
21. H. A. Blair, *Drugs*, **2021**, *81*, 1573
22. I. J. P. de Esch, et. al. *J. Med. Chem.*, **2022**, *65*, 84
23. B. R. Lanning, et. al. *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, *10*, 760
24. 瀧田大和 九州大学博士論文 (2018).
25. N. Shindo, et. al. *Nat. Chem. Biol.*, **2019**, *15*, 250
26. K. McAulay, et. al. *Pharmaceuticals*, **2022**, *15*, 1366
27. R. Lonsdale, et. al. *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 3816
28. K. M. Backus, et. al. *Nature*, **2016**, *534*, 570
29. C. Dubiella, et. al. *Nat. Chem. Biol.*, **2021**, *17*, 954
30. A. M. Roberts, et. al. *ACS Chem. Biol.*, **2017**, *12*, 899

Chapter 1

Construction of CA/CFA fragment libraries.

1. 序論

1-1. 背景

コバレントドラッグは標的タンパク質と相互作用をするリガンド部位と求核性アミノ酸残基と反応基部位を有し、共有結合を形成することでタンパク質の機能を阻害することから、強い結合性と長い作用時間を有するといった特徴を持つ^(1,2)。従来、コバレントドラッグ創薬におけるアプローチ方法としては、すでに最適化されたリガンドに対して反応基を導入する方法 (Figure 1-1 (a)) が一般的である⁽³⁾が、近年では共有結合剤を発見するための別の方法として、標的タンパク質との相互作用をシミュレーション解析する In silico docking (Figure 1-1 (b)) が広く用いられている⁽⁴⁾。本手法では計算科学を用いて解析を行うためにスループット性の向上が見込まれる。その一方で、利用可能なターゲットタンパク質が限定されることに加え、タンパク質の柔軟性に効率的に対処できず求電子試薬の固有の反応性を予測できないために反応性の高い化合物が得られる可能性がある⁽⁵⁾。

また、その他の手法として分子量の大きな化合物を用いたコバレントドラッグによるスクリーニング創薬などもあるが、オフターゲットタンパク質との反応の増加や過度に高い化合物がヒット化合物として得られる可能性があることから、スクリーニング創薬として避けられる傾向にある^(6,7)。

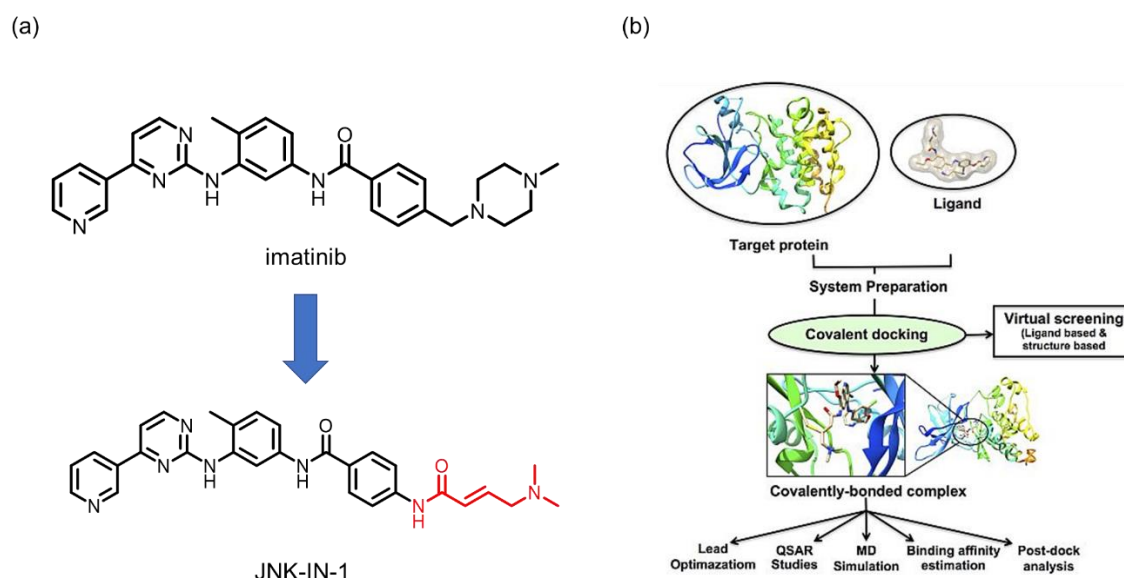


Figure 1-1. Drug Discovery Approach for Covalent Drugs. (a). Methods for introducing reactive groups into known ligands. (b). In silico docking⁽⁴⁾.

これらの背景から低分子量 ($M_w \leq 300$) の化合物を用いたコバレント型のフラグメント創薬 (Covalent fragment-based drug discovery; covalent FBDD) が広く用いられている。コバレント型のフラグメント化合物は親和性の弱いリガンド部位に対して反応基を導入することから、従来のフラグメント化合物の問題点である低親和性を補うことができる⁽⁸⁾。

実際に当研究室ではこれまでに従来の反応性の高い CA 基やマイケルアクセプターに代わる新しい反応基として CFA 基を開発した。CFA 基を導入したコバレント型のフラグメント化合物を約 30 種類構築し、システインプロテアーゼであるパパインを標的としたスクリーニングを行った。その結果、ベンゾチアゾール骨格を持つ **30** をパパインの阻害剤として見出した (Figure1-5 (a))。さらに **30** にアルキンを導入した化合物 **30-yne** を作製し ABPP を行った結果、パパインをラベル化し標的と共有結合を形成していることを確認した (Figure1-5 (b))⁽⁹⁾。また、パパイン以外の酵素としては、解糖系の酵素である GAPDH や、結核菌の主要分泌タンパク質である Ag85C を阻害するフラグメント化合物の探索に成功している。

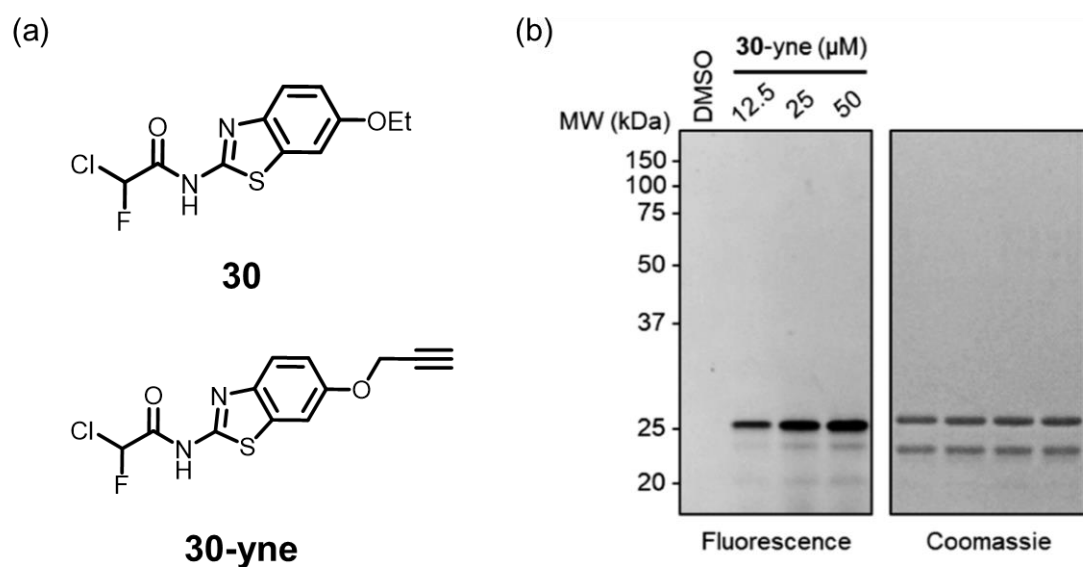


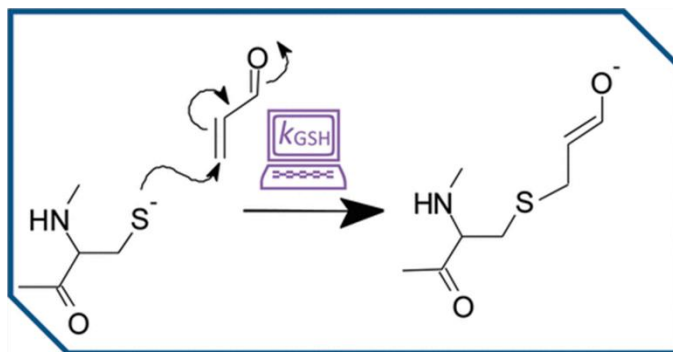
Figure 1-2. (a). Chemical structure of **30** and **30-yne**, (b). Concentration-dependent labeling of Papain using **30-yne**.

上述したように、コバレントドラッグのフラグメント創薬においては、ライブラリー化合物を標的タンパク質に作用させ阻害活性を示す化合物を直接的に探索する事が可能である。しかしながら、これらのスクリーニング創薬においては一般的に多量の精製タンパク質を用意する必要があり多額の費用を要することや、多くの酵素が関わる代謝系を標的とした阻害剤の開発には不向きである。そのため、これらの問題を解決するために生細胞を用いたフェノタイプスクリーニングを行うことが重要である。さらに先に示した研究では、用いた CFA フラグメント化合物は約 30 種類しかなく化合物の構造多様性という観点からは不十分である。そのため、さらなる CFA フラグメントライブラリーの拡張が必要である。しかしながら、生細胞におけるコバレントフラグメントを用いたスクリーニングやフラグメント化合物の拡張による大規模なスクリーニングを行うことで、オフターゲット反応による非特異反応が生じる可能性が増えることからスクリーニング時に偽陽性が増える可能性がある。そのため、フラグメント化合物の固有反応性を把握し非特異反応を抑えたターゲット創薬を行う必要がある。

これまで、システインを標的としたフラグメント化合物の反応性を評価する方法としては、グルタチオン (GSH) を用いた半減期の測定が主に用いられている (Figure 1-3 (a))。これは、システインに対する反応基の反応性をモニターすることにより、潜在的なオフターゲット反応性や細胞毒物に関する指標として用いられる^(10, 11)。しかしながら、生体内での環境の影響を受けやすいタンパク質性システインの反応性をどの程度反映できるかは未知数である。さらに、本測定法は HPLC を用いて評価を行うため、ライブラリー化合物のような大規模な評価には適していない。

また別の反応速度解析法として、Craven らは、定量的不可逆テザリング法 (qIT) を開発した⁽¹²⁾。この手法では、GSH やシステインを有するタンパク質と求電子性フラグメント化合物を一定時間反応させた後に、クマリンを蛍光色素として有する 7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) を未反応のチオールと反応させ、蛍光の変化率からチオールを定量的に測定する方法である (Figure 1-3 (b))。この手法では標的としたいタンパク質とフラグメント化合物を反応させることができることに加え、高感度で測定できることからチオールの反応性評価に用いられている。しかしながら、本手法においてはグルタチオンをモデルチオールとして使用すると、チオールが酸化されることにより、正確なチオール定量化が妨げられる他、可溶性ジスルフィド還元剤が CPM と反応し蛍光が生じてしまうなどの問題点があり使用条件に制限がある。

(a)



(b)

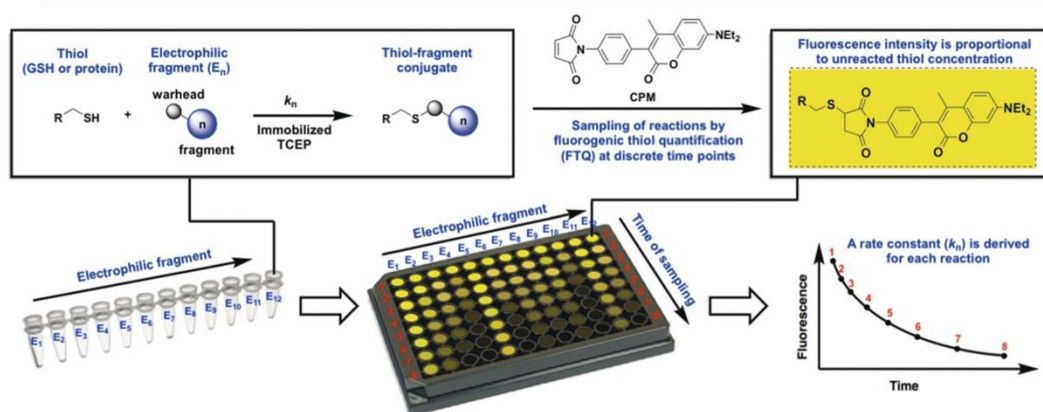


Figure 1-3. Thiol reactivity evaluation method. (a). GSH reactivity assay⁽¹¹⁾. (b). Assay overview of Quantitative irreversible tethering (qIT).

上述したように、従来の反応速度解析法においては測定条件に制限がある。また、チオールとの付加体形成後の化合物の溶解性が考慮されていないことに加え、穏やかな反応性を有することが予想される CFA ライブラリーにおいては反応性を正確に評価できない可能性があるため、これらの測定法に代わる新たな測定法が必要であると考えられる。

1-2. 目的

本章では、CFA フラグメント化合物の拡張しフェノタイプスクリーニングに用いることを目的とした。先述したようにこれまでに構築した CFA フラグメント化合物は 30 種類程度でしかいないため、構造多様性の観点からさらなる化合物の拡張が必要である。そのため、新たにライブラリーの構築を行い、構造の特徴を示したので報告する。

2. コバレント型フラグメント化合物の構築

2-1. CA/CFA ライブラリーの構築

FBDD は効率的に化学空間を網羅できるように、より低分子化合物を使用する創薬方法である⁽¹³⁻¹⁵⁾。低分子フラグメントを用いてスクリーニングする主な利点は、スクリーニング時のヒット率の向上であり、効率的に標的タンパク質と相互作用する化合物を見出すことができる点にある^(16,17)。その一方で、化合物には一定の水溶性などが不可欠であるため、フラグメントライブラリーを構築する際にはいくつかの指標が必要である⁽¹⁸⁾。Congreveらは、キナーゼ及びプロテアーゼなどのタンパク質に対するフラグメントライブラリーのスクリーニング、またその後の強力なリード化合物への構造最適化は、ヒット化合物が特定の物理化学的特性を示すことを主張している。このようなヒットは、平均して分子量が ≤ 300 、水素結合供与体の数が ≤ 3 、水素結合受容体の数が ≤ 3 、 clogP が ≤ 3 という特徴を持ち、これらはまとめて「rule of 3」と呼ばれ、効率的なリード発見のためのフラグメントライブラリーを構築する際の指標として広く用いられている⁽¹⁹⁾。

そのため、まず CFA を反応基として持つライブラリーの構築し、それら化合物が rule of 3 に適用されるかどうかを確かめた。様々な構造のアニリン及びアミン誘導体に反応基を導入することで 157 種類のライブラリー化合物を得た (Table 2-1)。合成は元々構築された 150 種類の化合物に加え、約 30 種類の化合物を新たに合成しその中の 157 種類を選別して表にまとめた。反応基の導入は sodium 2-chloro-2-fluoroacetate の propanephosphonic acid anhydride (T3P) を用いた縮合 (Figure 2-1. (a)) 又は 2-chloro-2-fluoroacetyl chloride による縮合反応 (Figure 2-1. (b)) で合成した。

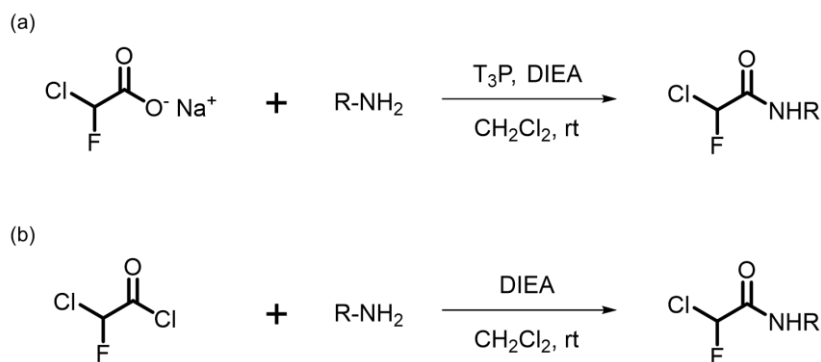


Figure 2-1. Synthesis of CFA fragments, (a). condensation reaction by sodium 2-chloro-2-fluoroacetate, (b). condensation reaction by 2-chloro-2-fluoroacetyl chloride.

Table 2-1. Synthesis of α -chlorofluoroacetamide fragment library.

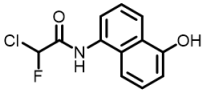
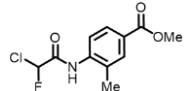
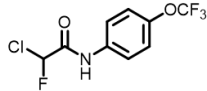
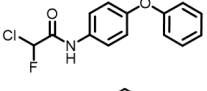
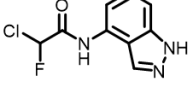
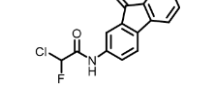
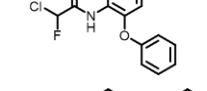
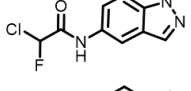
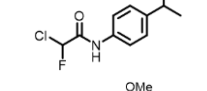
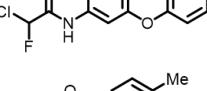
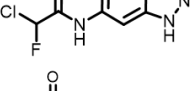
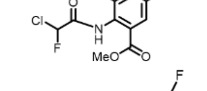
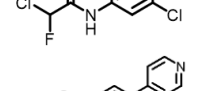
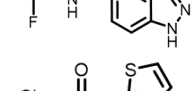
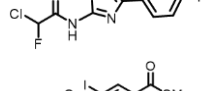
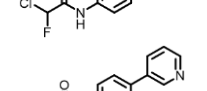
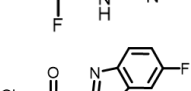
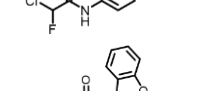
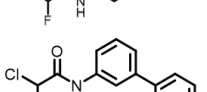
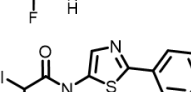
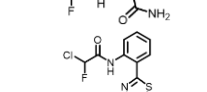
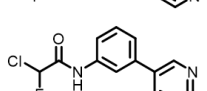
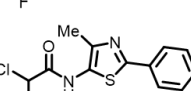
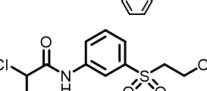
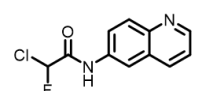
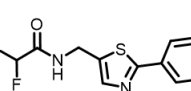
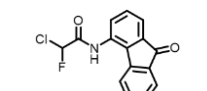
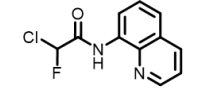
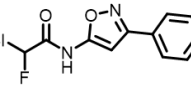
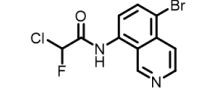
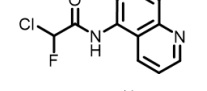
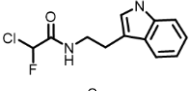
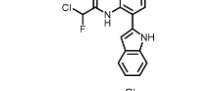
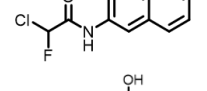
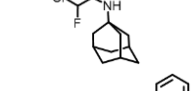
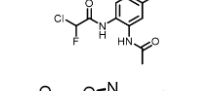
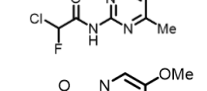
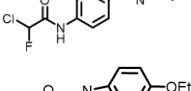
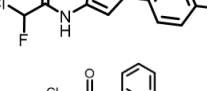
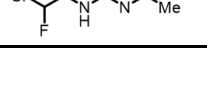
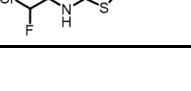
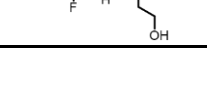
No.	Product	No.	Product	No.	Product
1		16		31	
2		17		32	
3		18		33	
4		19		34	
5		20		35	
6		21		36	
7		22		37	
8		23		38	
9		24		39	
10		25		40	
11		26		41	
12		27		42	
13		28		43	
14		29		44	
15		30		45	

Table 2-1. Synthesis of α -chlorofluoroacetamide fragment library.

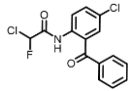
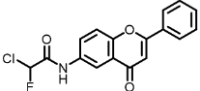
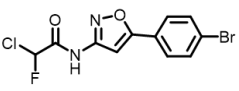
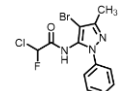
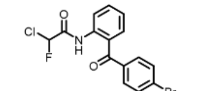
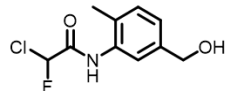
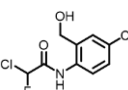
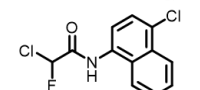
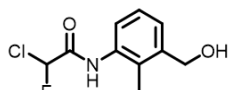
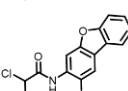
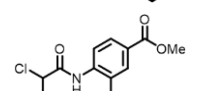
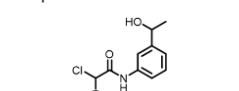
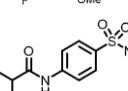
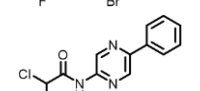
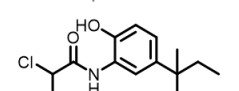
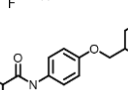
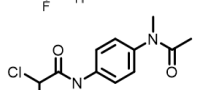
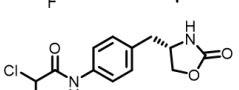
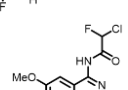
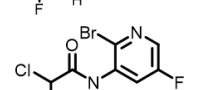
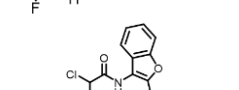
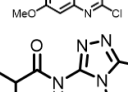
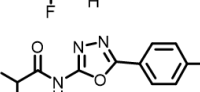
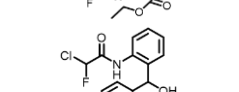
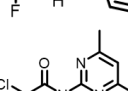
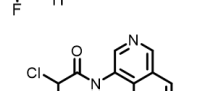
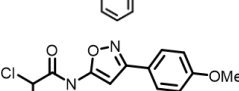
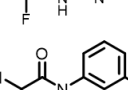
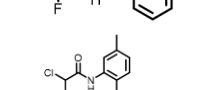
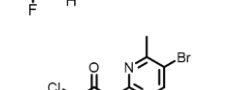
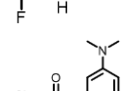
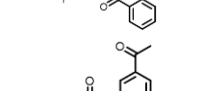
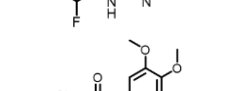
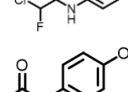
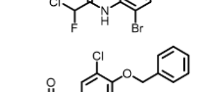
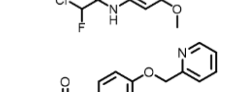
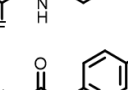
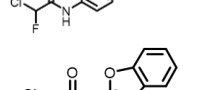
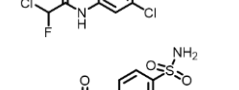
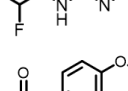
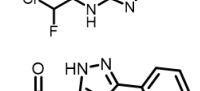
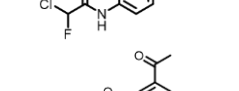
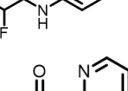
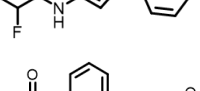
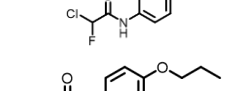
No.	Product	No.	Product	No.	product
46		61		76	
47		62		77	
48		63		78	
49		64		79	
50		65		80	
51		66		81	
52		67		82	
53		68		83	
54		69		84	
55		70		85	
56		71		86	
57		72		87	
58		73		88	
59		74		89	
60		75		90	

Table 2-1. Synthesis of α -chlorofluoroacetamide fragment library.

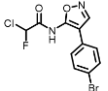
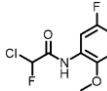
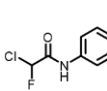
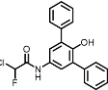
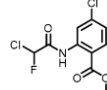
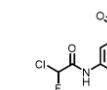
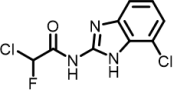
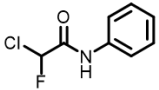
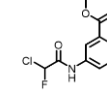
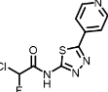
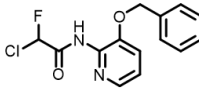
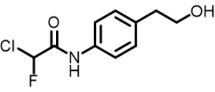
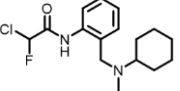
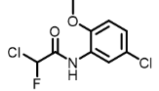
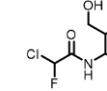
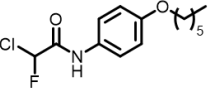
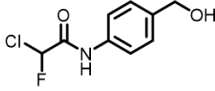
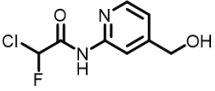
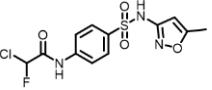
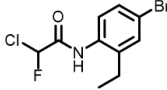
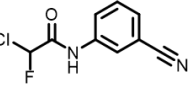
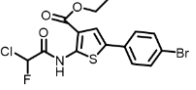
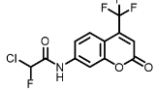
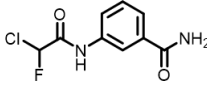
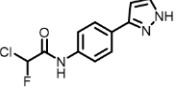
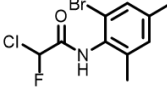
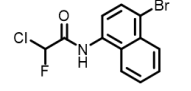
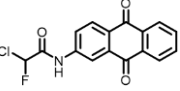
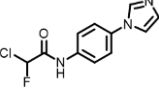
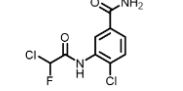
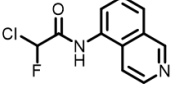
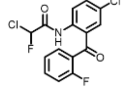
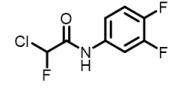
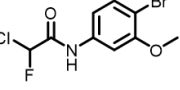
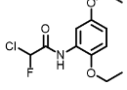
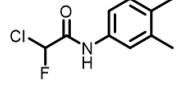
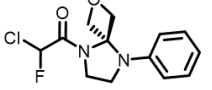
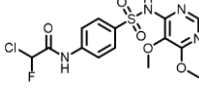
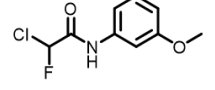
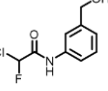
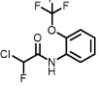
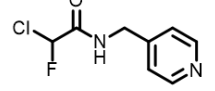
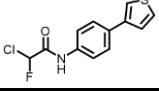
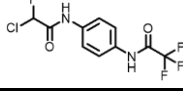
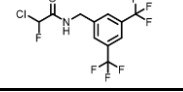
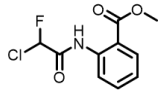
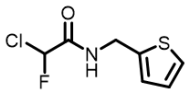
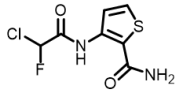
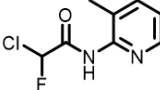
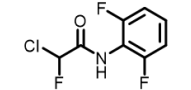
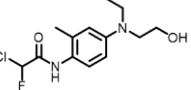
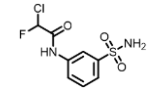
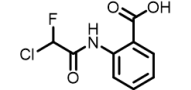
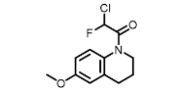
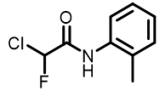
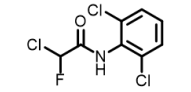
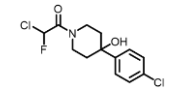
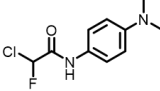
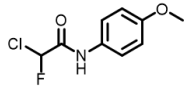
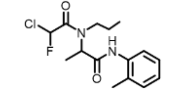
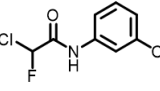
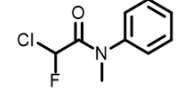
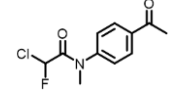
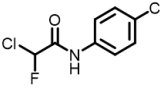
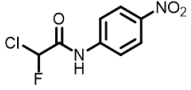
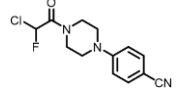
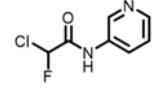
No.	Product	No.	Product	No.	Product
91		106		121	
92		107		122	
93		108		123	
94		109		124	
95		110		125	
96		111		126	
97		112		127	
98		113		128	
99		114		129	
100		115		130	
101		116		131	
102		117		132	
103		118		133	
104		119		134	
105		120		135	

Table 2-1. Synthesis of α -chlorofluoroacetamide fragment library.

No.	Product	No.	Product	No.	Product
136		144		151	
137		145		152	
138		146		153	
139		147		154	
140		148		155	
141		149		156	
142		150		157	
143					

また、作製したフラグメント化合物の Mw、clogP、HBA、HBD を Figure 2-2 に示した。Rule of 3 を満たした化合物、すなわち分子量 300 未満、水素結合受容体数 ≤ 3 、c Log P 値 ≤ 3 、及び回転可能結合数 (RB) ≤ 3 の化合物は約 61 % である。また、分子量に関しては反応基のハロゲン原子の寄与が大きい。そのため脱離基である塩素の分子量を除いた条件に関しても検討したところ約 67 % のフラグメント化合物が Rule of 3 を満たした。ライブラリー構築に用いるアニリンの選択は、入手のしやすさに重点をおいているため、脂溶性の高い化合物もいくつか含まれている。アミンフラグメントの構造的多様性に加え、反応性の弱い CFA 基においては、標的システインチオールとの効率的な反応が重要であり、反応基の配置が重要であるため、同じ構造的骨格を持つ、位置異性体をいくつか合成した。また、上に示した化合物の同リガンド骨格を有する CA 化合物に関しても作製した。

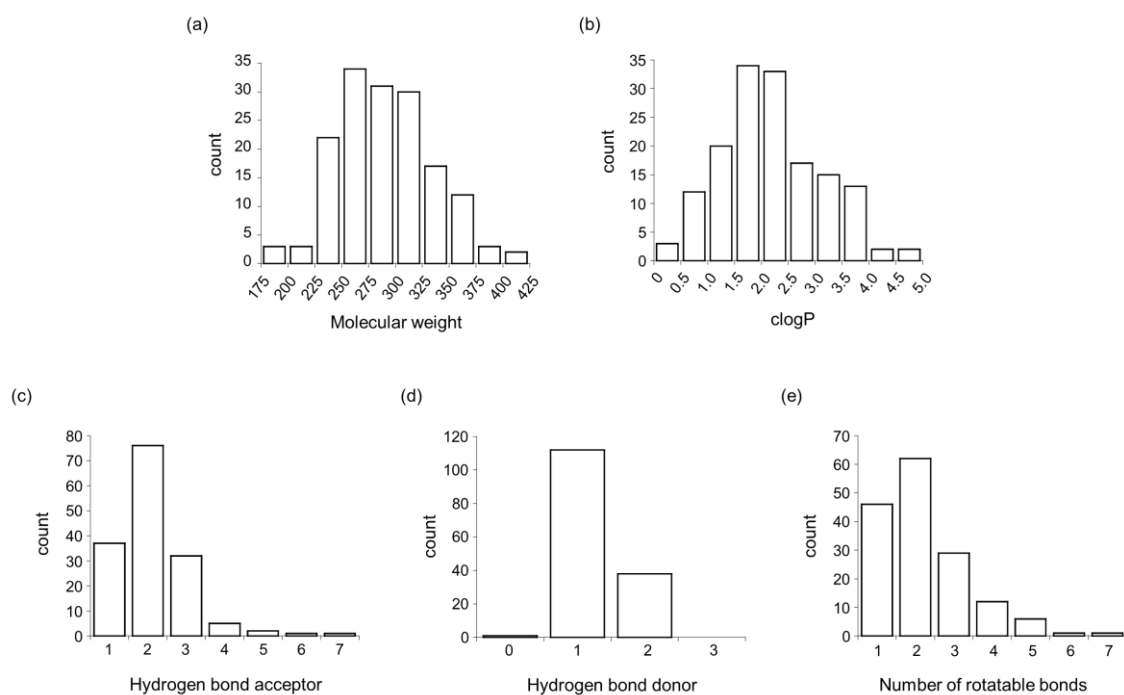


Figure 2-2. Electrophile-fragment library adheres to the rule-of-three. (a). molecular weights of the fragments, including the electrophile moiety, (b). clogP values, (c). number of hydrogen-bond acceptors, (d). number of hydrogen-bond donors.

2-2. まとめ

本章では、CFA フラグメント化合物の拡張を行った。以前に報告したアニリン誘導体に加え、アミン誘導体においても合成を行い約 160 種類程度まで拡張し、次章での生細胞スクリーニングでヒット化合物を得るために十分な数の、様々な骨格を有する CFA フラグメント化合物を得た。そのため、現在これらの化合物に関して同骨格の CA フラグメント化合物との反応性の比較を行い、CFA 化合物が CA 化合物よりも非特異反応が少なく、生細胞でのスクリーニングに有用であることを示すデータを集めている。

Synthetic Procedures

General synthetic methods

Reagents and solvents were obtained from commercial suppliers and used without further purification, unless otherwise stated. Reactions were carried out under a positive atmosphere of nitrogen, unless otherwise stated. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) carried out on Merck TLC Silica gel 60 F254, using shortwave UV light as the visualizing agent and phosphomolybdic acid in EtOH and heat as developing agent. Flash column chromatography was performed using Kanto Chemical Silica gel 60 N (spherical, 40-50 μm). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker or Agilent Avance III HD 500 MHz spectrometer and were calibrated using residual undeuterated solvent as the internal references (CDCl_3 : 7.26 ppm; $\text{DMSO}-d_6$: 2.50 ppm; D_2O : 4.79 ppm). The following abbreviations were used to explain NMR peak multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentet, m = multiplet, br = broad. Low-resolution and high-resolution mass spectra were recorded on Agilent or Bruker micrOTOF focus II mass spectrometer using electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) reflectron experiments.

2-chloro-2-fluoro-*N*-(5-hydroxy-naphthalen-1-yl)acetamide (CFA-1)

Pale purple solid. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (brs, 1H), 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.41-7.36 (m, 2H), 6.88-6.82 (m, 1H), 6.55 (d, J = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClFNO}_2\text{Na}$ 276.02; found 276.01

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-phenoxyphenyl)acetamide (CFA-2)

White solid. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.83 (brs, 1H), 7.52 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.10 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.04-6.96 (m, 4H), 6.41 (d, J = 51.2 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClFNO}_2\text{Na}$ 302.04; found 302.04

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2-phenoxyphenyl)acetamide (CFA-3)

Colorless oil. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.61 (brs, 1H), 8.41 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.41-7.36 (m, 2H), 7.20-7.02 (m, 5H), 6.88 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 50.5 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClFNO}_2\text{Na}$ 302.04; found 302.01

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-phenoxyphenyl)acetamide (CFA-4)

Yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.85 (brs, 1H), 7.40-7.29 (m, 4H), 7.28-7.24 (m, 1H), 7.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.87-6.82 (m, 1H), 6.39 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClFNO}_2\text{Na}$ 302.04; found 302.03

2-chloro-*N*-(3-chloro-4-methylphenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-5)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.85 (brs, 1H), 7.66 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{FNONa}$ 257.99; found 257.98

2-chloro-2-fluoro-*N*-[4-(pyridin-4-yl)phenyl]acetamide (CFA-6)

Yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.67 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 8.13 (brs, 1H), 7.73 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 6.45 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2\text{O}$ 265.05; found 256.06

2-Chloro-2-fluoro-*N*-[4-(pyridin-3-yl)phenyl]acetamide (CFA-7)

Yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.85 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.61 (dd, $J = 5.0, 1.5$ Hz, 1H), 8.06 (brs, 1H), 7.90 (dt, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.40 (dd, $J = 8.0, 5.0$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2\text{O}$ 265.05; found 256.06

2-Chloro-2-fluoro-*N*-[3-(pyridin-4-yl)phenyl]acetamide (CFA-8)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.67 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 8.32 (brs, 1H), 7.97 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.61 (dt, $J = 7.5, 2.0$ Hz, 1H), 7.52-7.46 (m, 4H), 6.46 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2\text{O}$ 265.05; found 256.06

2-chloro-2-fluoro-*N*-[3-(pyridin-3-yl)phenyl]acetamide (CFA-9)

Pale-brown solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.86 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.62 (d, $J = 5.0, 2.0$ Hz, 1H), 8.15 (brs, 1H), 7.92 (dt, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.88 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.62-7.59 (m, 1H), 7.50 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.45-7.39 (m, 2H), 6.46 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2\text{O}$ 265.05; found 256.05

2-chloro-2-fluoro-*N*-(quinolin-6-yl)acetamide (CFA-10)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.89 (dd, $J = 4.0, 1.5$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 2.5$

Hz, 1H), 8.20 (brs, 1H), 8.18 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.67 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 8.5, 4.0 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₁H₉ClFN₂O 239.04; found 239.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(quinolin-8-yl)acetamide (CFA-11)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 10.71 (brs, 1H), 8.85 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.73 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.62-7.53 (m, 3H), 6.53 (d, J = 50.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₁H₉ClFN₂O 239.04; found 239.04

2-chloro-2-fluoro-*N*-(quinolin-5-yl)acetamide (CFA-12)

White solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.98 (dd, J = 4.0, 1.5 Hz, 1H), 8.34 (brs, 1H), 8.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.75 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.5, 4.0 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₁H₉ClFN₂O 239.04; found 239.04

2-chloro-2-fluoro-*N*-(quinolin-3-yl)acetamide (CFA-13)

Orange solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.88 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.81 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.40 (brs, 1H), 8.10 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.71 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 50.5 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₁H₉ClFN₂O: 239.04; found 239.05

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl)acetamide (CFA-14)

Pale-brown solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.39 (d, J = 51.0 Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 2.26 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₇H₇ClFN₃O₂Na 242.01; found 242.00

2-chloro-2-fluoro-*N*-(5-methoxy-4-methylpyrimidin-2-yl)acetamide (CFA-15)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.08 (s, 1H), 7.08 (d, J = 52.0 Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.33 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₈H₉ClFN₃O₂Na 256.02; found 256.06

Methyl 4-(2-Chloro-2-fluoroacetamido)-3-methylbenzoate (CFA-16)

Off-white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.08 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.96-7.84 (m, 3H), 6.44 (d, J = 51.0 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₁ClFNO₃Na 282.03; found 282.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(1*H*-indazol-4-yl)acetamide (CFA-17)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.19 (brs, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.43-7.36 (m, 2H), 6.50 (d, $J = 51.2$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClFN}_3\text{ONa}$ 250.02; found 250.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(1H-indazol-5-yl)acetamide (CFA-18)

Pale-brown solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.12 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.97 (brs, 1H), 7.49 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for 250.02 $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClFN}_3\text{ONa}$ 250.02; found 250.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(1*H*-indazol-6-yl)acetamide (CFA-19)

Pale-yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.98 (brs, 1H), 10.73 (brs, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.21 (dd, $J = 8.8, 1.6$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 49.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClFN}_3\text{ONa}$: 250.02; found 250.00

***N*-[(1H-Indazol-5-yl)methyl]-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-20)**

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.0 (brs, 1H), 9.19 (brs, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 49.0$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClFN}_3\text{ONa}$: 264.03; found 264.04

2-chloro-2-fluoro-*N*-(thiazol-2-yl)acetamide (CFA-21)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.42 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J = 50.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_5\text{H}_5\text{ClFN}_2\text{O}$ 194.98; found 194.97

2-chloro-2-fluoro-*N*-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)acetamide (CFA-22)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.79 (dd, $J = 9.0, 4.5$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 7.5, 2.5$ Hz, 1H), 7.22 (td, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 50.5$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_5\text{ClF}_2\text{N}_2\text{OSNa}$ 284.97; found 284.96

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2-phenylthiazol-5-yl)acetamide (CFA-23)

Pale-yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.84 (brs, 1H), 7.95-7.90 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.49-7.41 (m, 3H), 6.54 (d, $J = 50.5$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClFN}_2\text{OSNa}$ 292.99; found 292.99

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-methyl-2-phenylthiazol-5-yl)acetamide (CFA-24)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.06 (brs, 1H), 7.89-7.86 (m, 2H), 7.43-7.39 (m, 3H), 6.52 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₀ClFN₂OSNa: 307.01; found 307.00

2-chloro-2-fluoro-*N*-[(2-phenylthiazol-5-yl)methyl]acetamide (CFA-25)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.91-7.89 (m, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.43-7.41 (m, 3H), 6.70 (brs, 1H), 6.33 (d, *J* = 51.2 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₀ClFN₂OSNa 307.01; found 307.00

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-phenylisoxazol-5-yl)acetamide (CFA-26)

Yellow solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.87 (brs, 1H), 7.85-7.80 (m, 2H), 7.50-7.46 (m, 3H), 6.83 (s, 1H), 6.52 (d, *J* = 50.5 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₈ClFN₂O₂Na: 277.02; found 277.02

***N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-27)**

Orange solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.05 (brs, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.23 (td, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 7.15 (td, *J* = 8.0, 0.5 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.37 (brs, 1H), 6.26 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 3.75-3.60 (m, 2H), 3.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₂ClFN₂ONa 277.05; found 277.06

***N*-adamantan-1-yl-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-28)**

White solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.15 (d, *J* = 51.5 Hz, 1H), 5.91 (brs, 1H), 2.12 (brs, 3H), 2.04 (d, *J* = 3.5 Hz, 6H), 1.70 (t, *J* = 3.5 Hz, 6H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₇ClFNONa 268.09; found 268.09

(*E*)-2-chloro-2-fluoro-*N*-[4-(phenyldiazenyl)phenyl]acetamide (CFA-29)

Orange solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.05 (brs, 1H), 7.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.54-7.46 (m, 3H), 6.45 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₁ClFN₃ONa 314.05; found 314.03

2-chloro-*N*-(6-ethoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-30)

Off-white solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.71 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 50.0 Hz, 1H), 4.10 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₀ClFN₂O₂SNa 311.00; found 310.99

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)acetamide (CFA-31)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.91 (brs, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 6.41 (d, *J* = 51.2 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₉H₆ClF₄NO₂Na 293.99; found 293.99

2-chloro-2-fluoro-*N*-(9-oxo-9*H*-fluoren-2-yl)acetamide (CFA-32)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.87 (brs, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.79 (s, 2H), 7.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.62-7.58 (m, 2H), 7.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 48.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₉ClFNO₂Na 312.02; found 312.01

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(1-hydroxyethyl)phenyl)acetamide (CFA-33)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.54 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 49.2 Hz, 1H), 5.09 (brs, 1H), 4.69-4.67 (m, 1H), 1.30 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₁ClFNO₂Na 256.03; found 256.04

Methyl 2-(2-chloro-2-fluoroacetamido)-3,4,5-trimethoxybenzoate (CFA-34)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.84 (brs, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.42 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₁₅ClFNO₆Na 358.05; found 358.03

2-chloro-*N*-(4-(3,4-difluorophenyl)thiazol-2-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-35)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.67-7.62 (m, 1H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.22-7.15 (m, 2H), 6.54 (d, *J* = 50.4 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₆ClF₃N₂OSNa 328.97; found 328.96

Methyl 4-(2-chloro-2-fluoroacetamido)-3-iodobenzoate (CFA-36)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.54 (brs, 1H), 8.49 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 50.4 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₈ClFINO₃Na 393.91; found 393.90

3-(2-chloro-2-fluoroacetamido)benzofuran-2-carboxamide (CFA-37)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.03 (brs, 1H), 8.22 (brs, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (brs, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 49.2 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{11}H_8ClFN_2O_3Na$ 293.01; found 293.01

***N*-(2-benzo[*d*]thiazol-2-yl)phenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-38)**

White solid. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.63 (brs, 1H), 8.72 (dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.77 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 7.45-7.41 (m, 2H), 7.36 (td, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), (td, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 50.5$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{15}H_{10}ClFN_2OSNa$ 343.01; found 343.01

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-((2-hydroxyethyl)sulfonyl)phenyl)acetamide (CFA-39)

Colorless oil. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.25 (brs, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.98-7.96 (m, 1H), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J = 51.2$ Hz, 1H), 4.02 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.38-3.36 (m, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{10}H_{11}ClFNO_4SNa$ 318.00; found 318.00

2-chloro-2-fluoro-*N*-(9-oxo-9*H*-fluoren-4-yl)acetamide (CFA-40)

Yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.83 (brs, 1H), 7.69-7.58 (m, 4H), 7.50-7.39 (m, 3H), 7.08 (d, $J = 49.2$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{15}H_9ClFNO_2Na$ 312.02; found 312.02

***N*-(5-bromoisquinolin-8-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-41)**

Pale yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.03 (brs, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.72 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 49.2$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{11}H_7BrClFN_2ONa$ 340.93; found 340.93

***N*-(2-(1*H*-indol-2-yl)phenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-42)**

White amorphous solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.85 (brs, 1H), 8.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.23 (brs, 1H), 7.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.38 (d, $J = 50.8$ Hz, 1H).

HRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}ClFN_2ONa$ 325.0514; found 325.0477

***N*-(2-acetamido-4,5-dichlorophenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-43)**

Yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.14 (brs, 1H), 9.67 (brs, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 6.90 (d, $J = 49.2$ Hz, 1H), 2.08 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{10}H_8Cl_3FN_2O_2Na$ 334.95; found 334.95

2-chloro-*N*-(3-(4-chlorophenyl)isoxazole-5-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-44)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.82 (brs, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.78 (s, 1H), 6.50 (d, *J* = 50.4 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₇Cl₂FN₂O₂Na 310.98; found 310.98

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2-(2-hydroxymethyl)phenyl)acetamide (CFA-45)

Colorless oil. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.32 (brs, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.30-7.17 (m, 3H), 6.96 (d, *J* = 49.2 Hz, 1H), 5.13 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.64-3.60 (m, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₁ClFNO₂Na 254.04; found 254.04

***N*-(2-benzoyl-4-chlorophenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-46)**

Off-white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.58 (brs, 1H), 8.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.64 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.40 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₁₀Cl₂FNO₂Na 348.00; found 348.00

***N*-(4-bromo-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-47)**

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.52 (brs, 1H), 7.46-7.35 (m, 5H), 6.42 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₀BrClFN₃ONa 369.96; found 369.95

2-chloro-*N*-(4-chloro-2-(hydroxymethyl)phenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-48)

Pale red solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.68 (brs, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 2.15 (brs, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₉H₈Cl₂FNO₂Na 273.98; found 273.98

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2-methoxydibenzo[*b*, *d*]furan-3-yl)acetamide (CFA-49)

Pale yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.04 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 50.0 Hz, 1H), 4.0 (s, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₁₁ClFNO₃Na 330.03; found 330.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-sulfamoylphenyl)acetamide (CFA-50)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.92 (brs, 1H), 7.80 (s, 4H), 7.29 (s, 2H), 6.89 (d, *J* = 49.2 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_8H_8ClFN_2O_3SNa$ 288.98; found 288.99

***N*-(4-(benzyloxy)phenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-51)**

White solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.78 (brs, 1H), 7.46 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.41-7.31 (m, 5H), 6.96 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.39 (d, J = 50.8 Hz, 1H), 5.05 (s, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{15}H_{13}ClFNO_2Na$ 316.05; found 316.06

2-chloro-*N*-(2-chloro-6,7-dimethoxyquinazolin-4-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-52)

Pale yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.78 (brs, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.12 (brs, 1H), 6.80 (d, J = 52.0 Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 4.00 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{12}H_{10}Cl_2FN_3O_3Na$ 356.00; found 356.00

***N*-([1,2,4]triazolo[4,3-*a*]-pyridin-3-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-53)**

Orange solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.20 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.38 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 6.87 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 51.6 Hz, 1H)

HRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_8H_6ClFN_4ONa$ 251.0106; found 251.0121

2-chloro-*N*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-54)

Orange oil. 1H -NMR (500MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.12 (s, 1H), 7.06 (d, J = 50.5 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 2.39 (s, 6H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_8H_9ClFN_3ONa$ 240.03; found 240.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(*m*-tolyl)acetamide (CFA-55)

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.82 (brs, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.24 (t, J = 15.6 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.39 (d, J = 51.2 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_9ClFNONa$ 224.02; found 224.02

2-chloro-*N*-(3-(dimethylamino)phenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-56)

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.78 (brs, 1H), 7.19 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.79 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 51.2 Hz, 1H), 2.95 (s, 6H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{10}H_{12}ClFN_2ONa$ 253.05; found 253.05

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-isopropoxyphenyl)acetamide (CFA-57)

Yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.78 (brs, 1H), 7.43 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.87

(d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.39 (d, J = 51.2 Hz, 1H) 4.50 (q, J = 5.9 Hz, 1H), 1.31 (d, J = 6.0 Hz, 6H)

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₃ClFNO₂Na 268.0511; found 268.0523

2-chloro-2-fluoro-*N*-(5-methylpyridin-2-yl)acetamide (CFA-58)

Pale yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.51 (brs, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 50.8 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₈H₈ClFN₂ONa 225.02; found 225.03

2-chloro-*N*-(4-ethoxyphenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-59)

Pale green solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.78 (brs, 1H), 7.44 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.39 (d, J = 51.2 Hz, 2H), 4.01 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.40 (t, J = 6.8 Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₁ClFNO₂Na 254.04; found 254.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-methylpyridin-2-yl)acetamide (CFA-60)

Pale yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.65 (brs, 1H), 8.17 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 6.95 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 50.4 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₈H₈ClFN₂O₃SNa 288.98; found 225.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-oxo-2-phenyl-4*H*-chromen-6-yl)acetamide (CFA-61)

Pale yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.32 (m, 1H), 8.29 (m, 1H), 8.14 (m, 1H), 7.93 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.54-7.53 (m, 3H), 6.82 (s, 1H), 6.46 (d, J = 50.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₇H₁₁ClFNO₃Na 354.03; found 354.01

***N*-(2-(4-bromobenzoyl)phenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-62)**

Pale yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.67 (brs, 1H), 8.63 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.63-7.59 (m, 4H), 7.58 (t, J = 3.6 Hz, 1H), 7.22-7.18 (m, 1H), 6.41 (d, J = 50.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₁₀BrClFNO₂Na 393.94; found 393.94

2-chloro-*N*-(4-chlorophthalen-1-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-63)

Light gray solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.36-8.34 (m, 1H), 8.30 (brs, 1H), 7.87-7.85 (m, 2H), 7.69-7.60 (m, 3H), 6.55 (d, J = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₈Cl₂FNONa 293.99; found 294.00

Methyl 3-bromo-4-(2-chloro-2-fluoroacetamido)benzoate (CFA-64)

Off-white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.69 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 51.2 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₈BrClFNO₃Na 347.92; found 347.91

2-chloro-2-fluoro-*N*-(5-phenylpyrazin-2-yl)acetamide (CFA-65)

Off-white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.54 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.59 (brs, 1H), 7.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.51-7.42 (m, 3H), 6.48 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₈H₈ClFN₂O₃SNa 288.03; found 288.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(*N*-methylacetamido)phenyl)acetamide (CFA-66)

Off-white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.32 (brs, 1H), 7.69 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.46 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H), 3.27 (s, 3H), 1.90 (s, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₂ClFN₂O₂Na 281.05; found 281.04

***N*-(2-bromo-5-fluoropyridin-3-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-67)**

Clear oil. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.58 (brs, 1H), 8.55-8.54 (m, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₇H₄BrClF₂N₂ONa 308.91; found 308.91

2-chloro-*N*-(5-(4-chlorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-68)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.59 (brs, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.50 (d, *J* = 51.6 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₆Cl₂FN₃O₂Na 311.97; found 311.97

2-chloro-2-fluoro-*N*-(isoquinoline-4-yl)acetamide (CFA-69)

Red solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.27 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.88 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 49.2 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₈ClFN₂ONa 261.02; found 261.02

***N*-(2-benzoyl-5-methylphenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-70)**

Yellow oil. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.96 (brs, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 51.2 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{16}H_{13}ClFNO_2Na$ 328.05; found 328.05

***N*-(5-acetyl-2-bromophenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-71)**

Pale yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.90 (s, 1H), 8.57 (brs, 1H), 7.68 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 6.46 (d, J = 50.8 Hz, 1H), 2.60 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{10}H_8BrClFNO_2Na$ 331.92; found 331.93

***N*-(4-(benzyloxy)-3-chlorophenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-72)**

Khaki solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.78 (brs, 1H), 7.65 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.32 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 50.8 Hz, 1H), 5.14 (s, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{15}H_{12}Cl_2FNO_2Na$ 350.01; found 350.01

***N*-(benzo[*d*]oxazol-2-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-73)**

Pale yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.69 (brs, 1H), 7.48-7.47 (m, 1H), 7.41-7.34 (m, 3H), 6.44 (d, J = 51.2 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_6ClFN_2O_2Na$ 251.00; found 251.00

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazol-5-yl)acetamide (CFA-74)

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 13.04 (s, 1H), 11.21 (s, 1H), 7.78 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 7.29 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.82 (d, J = 50.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{11}H_8ClF_2N_3ONa$ 294.02; found 294.02

Methyl 5-(3-(2-chloro-2-fluoroacetamido)phenyl)furan-2-carboxylate (CFA-75)

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.97 (brs, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.66 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 51.2 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{14}H_{11}ClFNO_4Na$ 334.03; found 334.02

***N*-(5-(4-bromophenyl)isoxazole-3-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-76)**

Pale yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 6.70 (d, J = 49.2 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{11}H_7BrClFN_2O_2Na$ 356.92; found 356.91

2-chloro-2-fluoro-*N*-(5-(hydroxymethyl)-2-methylphenyl)acetamide (CFA-77)

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.08 (brs, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.20 (d, J

= 7.6 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 49.6 Hz, 1H), 5.16 (t, J = 10.8 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.16 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₁ClFNO₂Na 254.04; found 254.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-(hydroxymethyl)-2-methylphenyl)acetamide (CFA-78)

Pale yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.15 (s, 1H), 7.30 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.19 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 49.6 Hz, 1H), 5.11 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.08 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₁ClFNO₂Na 254.04; found 254.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-(1-hydroxyethyl)phenyl)acetamide (CFA-79)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.56 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.28 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 49.2 Hz, 1H), 5.17 (q, J = 4.0 Hz, 1H), 4.69 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 1.30 (d, J = 6.4 Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₁ClFNO₂Na 254.04; found 254.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2-hydroxy-5-(*tert*-pentyl)phenyl)acetamide (CFA-80)

Cream yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.76 (s, 1H), 9.65 (brs, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.08 (m, 1H), 6.98 (m, 1H), 6.90 (d, J = 48.8 Hz, 1H), 1.55 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 1.18 (s, 6H), 0.62 (t, J = 7.4 Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₁₇ClFNO₂Na 296.08; found 296.07

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(((*S*)-2-oxooxazolidin-4-yl)methyl)phenyl)acetamide (CFA-81)

Pale yellow amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.56 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.56 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 48.8 Hz, 1H), 4.25 (s, 1H), 4.02-3.96 (m, 2H), 2.75 (m, 2H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₂ClFN₂O₃Na 309.04; found 309.03

Ethyl 3-(2-chloro-2-fluoroacetamido)benzofuran-2-carboxylate (CFA-82)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 10.26 (brs, 1H), 8.41 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.51-7.48 (m, 2H), 7.33 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 50.4 Hz, 1H), 4.50 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.46 (t, J = 4.8 Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₁₁ClFNO₄Na 322.03; found 322.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2-(hydroxy(phenyl)methyl)phenyl)acetamide (CFA-83)

Pale yellow oil. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.71 (brs, 1H), 8.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H),

7.38-7.26 (m, 6H), 7.15-7.14 (m, 2H), 6.21 (d, $J = 51.2$ Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 2.81 (brs, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{15}H_{13}ClFNO_2Na$ 316.05; found 316.05

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-(4-methoxyphenyl)isoxazol-5-yl)acetamide (CFA-84)

Cream yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.77 (brs, 1H), 7.74 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.74 (s, 1H), 6.49 (d, $J = 50.4$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{12}H_{10}ClFN_2O_3Na$ 307.03; found 307.03

***N*-(5-bromo-4-methylpyrimidin-2-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-85)**

Brown solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.61 (s, 1H), 8.51 (brs, 1H), 6.62 (d, $J = 51.6$ Hz, 1H), 2.60 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_7H_6BrClFN_3ONa$ 305.92; found 305.93

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acetamide (CFA-86)

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.01 (s, 1H), 6.85 (brs, 2H), 6.38 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 3.81 (d, $J = 7.2$ Hz, 9H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{11}H_{13}ClFNO_4Na$ 300.04; found 300.04

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(((*S*)-2-oxooxazolidin-4-yl)methyl)phenyl)acetamide (CFA-87)

White solid. 1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.7 (s, 1H), 7.87 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 49.0$ Hz, 1H), 5.26 (s, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{14}H_{11}Cl_2FN_2O_2Na$ 351.01; found 351.01

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-sulfamoylphenyl)acetamide (CFA-88)

White solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.9 (s, 1H), 7.80 (s, 4H), 7.29 (s, 2H), 6.95-6.83 (d, $J = 49.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_8H_8ClFN_2O_3SNa$ 288.98; found 288.98

***N*-(3-acetylphenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-89)**

Yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.10 (brs, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.77 ($J = 8.0$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 2.61 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{10}H_9ClFNO_2Na$ 252.02; found 252.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-propoxyphenyl)acetamide (CFA-90)

Green solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.78 (brs, 1H), 7.44 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 3.90 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.83-1.74 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₃ClFNO₂Na 268.05; found 268.05

***N*-(4-(4-bromophenyl)isoxazole-5-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-91)**

Brown solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.44 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H), 8.21 (brs, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.44 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₇BrClFN₂O₂Na 354.93; found 354.92

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2'-hydroxy-[1,1':3,1''-terphenyl]-5'-yl)acetamide (CFA-92)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.84 (brs, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.55-7.37 (m, 12H), 6.41 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₁₅ClFNO₂Na 378.07; found 378.06

2-chloro-*N*-(7-chloro-1H-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-93)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.60 (brs, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 49.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₉H₆Cl₂FN₃ONa 283.98; found 283.97

2-chloro-2-fluoro-*N*-(5-(pyridine-4-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide (CFA-94)

Pale-yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.72 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.52 (brs, 1H), 6.92 (d, *J* = 50.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₉H₆ClFN₄OSNa 294.98; found 294.98

2-chloro-*N*-(2-((cyclohexyl(methyl)amino)methyl)phenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-95)

Yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 12.40 (brs, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.32-7.29 (m, 1H), 7.11 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.07 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 50.5 Hz, 1H), (dd, *J* = 17.0, 17.0 Hz, 2H), 2.46 (tt, *J* = 13.0, 4.0 Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.84 (dd, *J* = 28.0, 10.5 Hz, 4H), 1.34-1.07 (m, 5H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₆H₂₂ClFN₂ONa 335.13; found 335.13

2-chloro-*N*-(2-((cyclohexyl(methyl)amino)methyl)phenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-96)

Beige solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.95 (brs, 1H), 7.45-7.42 (m, 2H), 6.88-6.85 (m, 2H), 6.38 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 3.92 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.78-1.73 (m, 2H), 1.45-1.41 (m,

2H), 1.35-1.31 (m, 4H), 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{14}H_{19}ClFNO_2Na$ 310.09; found 310.10

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(*N*-(5-methylisooxazol-3-yl)sulfamoyl)phenyl)acetamide (CFA-97)

Pink solid. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.11 (brs, 1H), 7.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.41 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.15 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{12}H_{11}ClFN_3O_4SNa$ 370.00; found 370.01

Ethyl 5-(4-bromophenyl)-2-(2-chloro-2-fluoroacetamido)thiophene-3-carboxylate (CFA-98)

Yellow solid. 1H -NMR (500MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.73 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 48.5$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.17 (s, 1H), 4.12 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.01-0.96 (t, $J = 12.5$ Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{15}H_{12}BrClFNO_3SNa$ 443.93; found 443.92

***N*-(4-(1*H*-pyrazol-3-yl)phenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-99)**

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.80 (s, 1H), 10.70 (s, 1H), 7.78-7.66 (m, 5H), 6.87 (d, $J = 49.0$ Hz, 1H), 6.66 (s, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{11}H_9ClFN_3ONa$ 276.03; found 276.04

2-chloro-*N*-(9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)-2-fluoroacetamide (CFA-100)

Orange solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.37-8.24 (m, 5H), 7.80 (t, $J = 3.6$ Hz, 2H), 6.46 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{16}H_9ClFNO_3Na$ 340.01; found 340.28

2-chloro-2-fluoro-*N*-(isoquinolin-5-yl)acetamide (CFA-101)

Orange amorphous solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.28 (s, 1H), 8.60 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.42 (brs, 1H), 8.17 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{11}H_9ClFN_2ONa$ 239.04; found 239.04

***N*-(4-bromo-3-methoxyphenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-102)**

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.86 (brs, 1H), 7.49 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 3.90 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_8BrClFNO_2Na$ 319.93; found 319.94

2-chloro-2-fluoro-1-(8-phenyl-2-oxa-5,8-diazapiro[3.4]octan-5-yl)ethan-1-one (CFA-103)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.37-7.35 (m, 2H), 7.24-7.22 (m, 2H), 7.04 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 5.45-5.42 (m, 2H), 5.07-5.02 (m, 2H), 3.93-3.84 (m, 2H), 3.60-3.50 (m, 2H)
LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{ClFN}_2\text{O}_2$ 285.08; found 285.08

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-hydroxymethyl)phenyl)acetamide (CFA-104)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.57 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 49.2$ Hz, 1H), 5.21 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H)
LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClFNO}_2\text{Na}$ 240.02; found 240.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(thiophen-3-yl)phenyl)acetamide (CFA-105)

Cream yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.66 (brs, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 49.2$ Hz, 1H)
LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClFNO}_2\text{Na}$ 292.00; found 291.99

2-chloro-2-fluoro-*N*-(5-fluoro-2-methoxyphenyl)acetamide (CFA-106)

Yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.62 (brs, 1H), 8.15-8.12 (m, 1H), 6.81-6.78 (m, 2H), 6.39 (d, $J = 50.8$ Hz, 1H), 3.88 (s, 3H)
LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_8\text{ClF}_2\text{NO}_2\text{Na}$ 258.01; found 258.01

Methyl 4-chloro-2-(chloro-2-fluoroacetamido)benzoate (CFA-107)

Cream yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.59 (brs, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 49.2$ Hz, 1H), 3.88 (s, 3H)
LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_8\text{ClF}_2\text{NO}_2\text{Na}$ 582.96; found 582.94

2-chloro-2-fluoro-*N*-phenylacetamide (CFA-108)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.85 (s, 1H), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.37 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 51.2$ Hz, 1H)
LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClFNO}$ 210.01; found 210.01

***N*-(3-(benzyloxy)pyridin-2-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-109)**

Pale yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.50 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J = 4.0$ Hz,

1H), 7.30 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{14}H_{12}ClFN_2O_2Na$ 317.05; found 317.05

2-chloro-*N*-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-110)

Brown solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.57 (brs, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.08 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.39 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_8Cl_2FNO_2Na$ 273.98; found 273.98

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-hydroxymethyl)phenyl)acetamide (CFA-111)

Orange solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.60 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 49.0$ Hz, 1H), 5.13 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_9ClFNO_2Na$ 240.02; found 240.02

***N*-(4-bromo-2-ethylphenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-112)**

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.76 (brs, 1H), 7.73 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 2.60 (q, $J = 15.0$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{10}H_{10}BrClFNONa$ 315.95; found 315.95

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2-oxo-4-(trifluoromethyl)-2*H*-chromen-7-yl)acetamide (CFA-113)

Yellow solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.20 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 49.0$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{12}H_6ClF_4NO_3Na$ 345.99; found 345.99

***N*-(2-bromo-4,6-dimethylphenyl)-2-chloro-fluoroacetamide (CFA-114)**

White solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.62 (brs, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.45 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.25 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{10}H_{10}BrClFNONa$ 317.9491; found 317.9488

***N*-(4-(1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-115)**

Beige solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.80 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 49.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{11}H_{10}ClFN_3O$ 254.05; found 254.05

2-chloro-*N*-(4-chloro-2-(2-fluorobenzoyl)phenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-116)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 12.0 (brs, 1H), 8.69 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.49 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.20 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₉Cl₂F₂NO₂Na 365.99; found 365.99

2-chloro-*N*-(2,5-dioethoxyphenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-117)

Beige solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.69 (brs, 1H), 8.01 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 4.07 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.00 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.41 (t, *J* = 8.4 Hz, 3H), 1.37 (t, *J* = 8.4 Hz, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₅ClFNO₃Na 298.06; found 298.06

2-chloro-*N*-(4-(*N*-(5,6-dimethoxypyrimidin-4-yl)sulfamoyl)phenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-118)

Off-white amorphous solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.10 (brs, 1H), 11.0 (brs, 1H), 8.10 (s, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 49.0 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H), 3.69 (s, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₄ClFN₄O₅SNa 427.03; found 427.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(trifluoromethoxy)phenyl)acetamide (CFA-119)

Off-white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.26 (brs, 1H), 7.32 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₉H₆ClF₄NO₂Na 293.99; found 293.99

***N*-(4-(2-chloro-2-fluoroacetamido)phenyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (CFA-120)**

Pale grey solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.66-7.62 (m, 4H), 6.49 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₇ClF₄N₂O₂Na 321.00; found 321.00

Methyl 4-(2-chloro-2-fluoroacetamido)-2-methoxybenzoate (CFA-121)

Pale yellow sticky solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.39 (brs, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 50.5 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₁ClFNO₄Na 298.03; found 298.02

Methyl 3-(2-chloro-2-fluoroacetamido)-4-methylbenzoate (CFA-122)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.39 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.80 (brs, 1H), 7.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 3.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 3H), 2.34 (d, *J*

= 1.6 Hz, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{11}H_{11}ClFNO_3Na$ 282.03; found 282.03

Dimethyl 5-(2-chloro-2-fluoroacetamido)isophthalate (CFA-123)

Off-white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.49 (s, 1H), 8.45 (d, J = 1.2 Hz, 2H), 8.28 (brs, 1H), 6.44 (d, J = 50.0 Hz, 1H), 3.84 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.93 (s, 6H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{12}H_{11}ClFNO_5Na$ 326.02; found 326.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)acetamide (CFA-124)

White solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.92 (brs, 1H), 7.50 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.40 (d, J = 51.0 Hz, 1H), 3.84 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.56 (brs, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{10}H_{11}ClFNO_2Na$ 254.04; found 254.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(2-(hydroxymethyl)phenyl)acetamide (CFA-125)

Yellow oil. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.64 (brs, 1H), 8.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.14 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.41 (d, J = 51.0 Hz, 1H), 4.79 (s, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_9ClFNO_2Na$ 240.02; found 240.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl)acetamide (CFA-126)

Colorless oil. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.10 (brs, 1H), 8.29 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.13 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 50.0 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_8H_8ClFN_2O_2Na$ 241.02; found 241.02

2-chloro-*N*-(3-cyanophenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-127)

Off white solid. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.99 (m, 2H), 7.75 (brs, 1H), 7.49 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 51.2 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_6ClFN_2ONa$ 235.00; found 235.01

3-(2-chloro-2-fluoroacetamido)benzamide (CFA-128)

White solid. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.73 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.76 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.87 (d, J = 48.8 Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_8ClFN_2O_2Na$ 253.02; found 253.02

***N*-(4-bromonaphthalen-1-yl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-129)**

Orange solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.32-8.31 (m, 1H), 8.27 (brs, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.82 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 7.65 (m, 2H), 6.53 (d, *J* = 51.6 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₈BrClFNONa 339.93; found 339.93

4-chloro-3-(2-chloro-2-fluoroacetamido)benzamide (CFA-130)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.75 (s, 1H), 8.57 (brs, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 50.8 Hz, 1H), 6.19 (brs, 1H), 5.61 (brs, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₉H₇Cl₂FN₂O₂Na 286.98; found 286.98

2-chloro-*N*-(3,4-difluorophenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-131)

Off-white solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.91 (brs, 1H), 7.66-7.62 (m, 1H), 7.17-7.11 (m, 1H), 6.40 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₈H₅ClF₃NONa 245.99; found 245.99

2-chloro-*N*-(3,4-dimethylphenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-132)

White solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.88 (brs, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.34-7.27 (m, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 2.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 6H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₁ClFNONa 238.04; found 238.04

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-methoxyphenyl)acetamide (CFA-133)

Pale yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.85 (brs, 1H), 7.28-7.23 (m, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 4H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₉H₉ClFNO₂Na 240.02; found 240.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(pyridine-4-ylmethyl)acetamide (CFA-134)

Brown oil. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.59 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 6.69 (brs, 1H), 6.42 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 4.61-4.48 (m, 2H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₈H₉ClFN₂O 203.04; found 203.04

***N*-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl)-2-chloro-2-fluoroacetamide (CFA-135)**

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.82 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 6.77 (brs, 1H), 6.37 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H), 4.70-4.63 (m, 2H)

LRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ calcd for C₉H₉ClFNO₂Na 336.00; found 336.01

Methyl 2-(2-chloro-2-fluoroacetamido)benzoate (CFA-136)

Beige solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.0 (brs, 1H), 8.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.18 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 3.95 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClFNO}_3$ 244.02; found 244.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-methylpyridin-2-yl)acetamide (CFA-137)

Clear oil. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.74 (brs, 1H), 8.30 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.28 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 49.6$ Hz, 1H), 2.17 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M+Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_8\text{ClFN}_2\text{ONa}$ 225.02; found 225.02

2-chloro-2-fluoro-*N*-(3-sulfamoylphenyl)acetamide (CFA-138)

Beige solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.25 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.82-7.79 (m, 1H), 7.71-7.69 (m, 1H), 7.53 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 50.0$ Hz, 1H), 4.55 (s, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M+Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_8\text{ClFN}_2\text{O}_3\text{SNa}$ 288.98; found 288.98

2-chloro-2-fluoro-*N*-(*o*-tolyl)acetamide (CFA-139)

Pale yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.10 (brs, 1H), 7.32 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.20 (t, $J = 14.0$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J = 49.6$ Hz, 1H), 2.19 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M+Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClFNONa}$ 224.02; found 224.02

2-chloro-*N*-(4-(dimethylamino)phenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-140)

Pale yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.73 (brs, 1H), 7.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.38 (d, $J = 50.8$ Hz, 1H), 2.93 (s, 6H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M+Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClFN}_2\text{ONa}$ 253.05; found 253.05

2-chloro-*N*-(3-chlorophenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-141)

Pale yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.79 (brs, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 48.8$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M+Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{FNONa}$ 243.97; found 243.97

2-chloro-*N*-(4-chlorophenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-142)

Off white solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.74 (brs, 1H), 7.67 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.42 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 48.8$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M+Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{FNONa}$ 243.97; found 243.97

2-chloro-2-fluoro-*N*-(pyridine-3-yl)acetamide (CFA-143)

Orange solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.84 (brs, 1H), 8.80 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.41 (q, $J = 4.4$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 48.8$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_7\text{H}_6\text{ClFN}_2\text{ONa}$ 211.00; found 211.01

2-chloro-2-fluoro-*N*-(thiophen-2-ylmethyl)acetamide (CFA-144)

Yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.27 (brs, 1H), 7.41 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 6.99 (brs, 1H), 6.96 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 49.6$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClFNOSNa}$ 229.98; found 229.98

2-chloro-*N*-(2,6-difluorophenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-145)

Yellow solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.52 (brs, 1H), 7.45-7.40 (m, 1H), 7.21 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 49.2$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_5\text{ClF}_3\text{NONa}$ 245.99; found 245.99

2-(2-chloro-2-fluoroacetamido)benzoic acid (CFA-146)

Beige solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.80 (brs, 1H), 8.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.65 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.23 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClFNO}_3$ 230.00; found 230.01

2-chloro-*N*-(2,6-dichlorophenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-147)

Beige solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.74 (brs, 1H), 7.40 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_4\text{Cl}_3\text{FNO}$ 253.93; found 253.94

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-methoxyphenyl)acetamide (CFA-148)

Off-white solid. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.79 (brs, 1H), 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.39 (d, $J = 51.0$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H)

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClFNO}_2\text{Na}$ 240.0198; found 240.0213

2-chloro-2-fluoro-*N*-methyl-*N*-phenylacetamide (CFA-149)

Pale yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.48-7.39 (m, 3H), 7.26 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.14 (d, $J = 50.0$ Hz, 1H), 3.33 (s, 3H)

LRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClFNONa}$ 224.02; found 224.03

2-chloro-2-fluoro-*N*-(4-nitrophenyl)acetamide (CFA-150)

Yellow solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.25 (dd, *J* = 7.0, 1.6 Hz, 2H), 8.21 (brs, 1H), 7.80 (dd, *J* = 7.0, 2.0 Hz), 6.46 (d, *J* = 51.0 Hz, 1H)

HRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ calcd for C₈H₅ClFN₂O₃ 230.9978; found 230.9985

3-(2-chloro-2-fluoroacetamido)thiophene-2-carboxiamide (CFA-151)

White solid. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.80 (brs, 1H), 8.14 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 50.0 Hz, 1H), 5.55 (brs, 2H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₇H₆ClFN₂O₂SNa 258.97; found 258.97

2-chloro-*N*-(4-(ethyl(2-hydroxyethyl)amino)-2-methylphenyl)-2-fluoroacetamide (CFA-152)

Yellow solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.79 (s, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 49.2 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.48 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.65 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.51 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.37-3.31 (m, 4H), 2.09 (s, 3H), 1.06 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

LRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₁₉ClFN₂O₂ 289.11; found 289.11

2-chloro-2-fluoro-1-(6-methoxy-3,4-dihydroquinolin-1(2*H*)-yl)ethan-1-one (CFA-153)

Yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.68-6.78 (m, 4H), 3.95-3.45 (m, 5H), 2.79-2.51 (m, 2H), 2.01-1.82 (m, 2H)

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₃ClFNO₂Na 280.0511; found 280.0508

2-chloro-1-(4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl)-2-fluoroethan-1-one (CFA-154)

White solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.40 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.50 and 6.49 (d, *J*_(H-F) = 51.0 Hz, 1H), 4.46-4.44 (m, 1H), 4.07-3.96 (m, 1H), 3.68-3.62 (m, 1H), 3.28-3.21 (m, 1H), 2.10-1.97 (m, 3H), 1.84-1.82 (m, 2H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.8 (d, *J*_(C-F) = 20.0 Hz), 145.6 × 2, 133.5, 132.0, 128.8, 125.9, 94.7 and 93.7 (d, *J*_(C-F) = 259.9 Hz), 71.2, 41.7, 41.6 × 2, 39.1, 38.5, 38.4, 37.7, 37.6, 22.9

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₁₄Cl₂FNO₂Na 328.0278; found 328.0292

2-(2-chloro-2-fluoro-*N*-propylacetamido)-*N*-(*o*-tolyl)propenamide (CFA-155)

Yellow oil. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.33 (d, *J* = 39.0 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 9.75 Hz, 1H), 7.18 (q, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.57 and 6.56 (d, *J*_(H-F) = 51.0 Hz, 1H), 5.02-4.96 (m, 1H), 3.44-3.31 (m, 2H), 2.24 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.82-1.53 (m, 5H), 0.931-0.890 (m, 3H)

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₂₀ClFN₂O₂Na 337.1090; found 337.1076

***N*-(acetylphenyl)-2-chloro-2-fluoro-*N*-methylacetamide (CFA-156)**

Brown solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.03 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.39-7.37 (m, 2H), 6.16 (d, $J_{(H-F)} = 50.0$ Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 2.60 (s, 3H)

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2\text{ONa}$ 266.0355; found 266.0354

4-(4-(2-chloro-2-fluoroacetyl)piperazin-1-yl)benzonitrile (CFA-157)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.53-7.51 (m, 2H), 6.89-6.86 (m, 2H), 6.50 (d, $J_{(H-F)} = 50.5$ Hz, 1H), 3.85-3.79 (m, 4H), 3.43-3.39 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ : 161.9 (d, $J_{(C-F)} = 22.5$ Hz), 152.8, 133.6, 119.3, 114.9, 94.5 (d, $J_{(C-F)} = 259.8$ Hz), 47.3, 47.0, 44.8×2 , 42.3

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClFN}_3\text{ONa}$ 304.0623; found 304.0639

3. 参考文献

1. S. De Cesco, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *138*, 96
2. Renato A. Bauer, *Drug Discov. Today*, **2015**, *20*(9),
3. A. Chaikuad, et. al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 4372
4. H. M. Kumalo, et. al. *Molecules*, **2015**, *20*, 1984
5. D. T. Warshaviak, et. al. *J. Chem. Inf. Model.*, **2014**, *54*, 1941
6. S. Sirois, et. al. *Comput Biol Chem*, **2005**, *29*, 55
7. J. T. Metz, et. al. *J. Comput.*, **2007**, *21*, 139
8. W. Lu, et. al. *RSC Chem. Biol.*, **2021**, *2*, 354
9. C. Miura, et. al. *Chem. Pharm. Bull.*, **2020**, *68*, 1074
10. A. Birkholz, et. al. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*, 11602
11. J. A. H. Schwobel, et. al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, *23*, 1576
12. G. B. Craven, et. al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 5257

Chapter 2

Improvement of sensing ability of fluorescent probe and its application to screening of covalent β -oxidation inhibitors.

1. 序論

1-1. 背景

代謝は生命維持活動に必須なエネルギーの獲得や、成長に必要な有機物の合成を行うために生体内で起こるすべての生化学的反応の総称であり、ヒトの生命活動において重要な役割を担っている。とりわけ、代謝活性経路に関しては、正常細胞とがん細胞で大きく異なっており、がん細胞において好氣的条件下でも解糖系が亢進されているという Warburg 効果がこの代表例である⁽¹⁾。また、がん細胞においては、ピルビン酸、ヒドロキシ酪酸、酢酸、グルタミン、および脂肪酸などの様々な化合物の産生が亢進されている⁽²⁾。そのため、代謝経路の活性を評価することは疾病メカニズムの理解や、創薬に極めて重要であり、この代謝活性経路の違いを利用して、近年では抗がん剤の開発が盛んになってきている⁽³⁾。

代謝経路を検出する蛍光プローブに関してはこれまで様々な報告がある。例えば、Jingmin Zhang らは、様々な環境毒素、プロドラッグ、及びエステル含有薬物の代謝除去において重要な役割を果たすことで知られる Carboxylesterase を検出する蛍光プローブである CE-1 の開発に成功した。CE-1 はエステル部位が酵素に認識され蛍光を発する on-off 型の蛍光プローブであり、100 nm を超える大きなストークスシフトを有する NIR 蛍光プローブであり、低細胞毒性で高感度および高選択性に in vitro 及び in vivo でのバイオイメージングの成功している (Figure. 1-1)⁽⁴⁾。

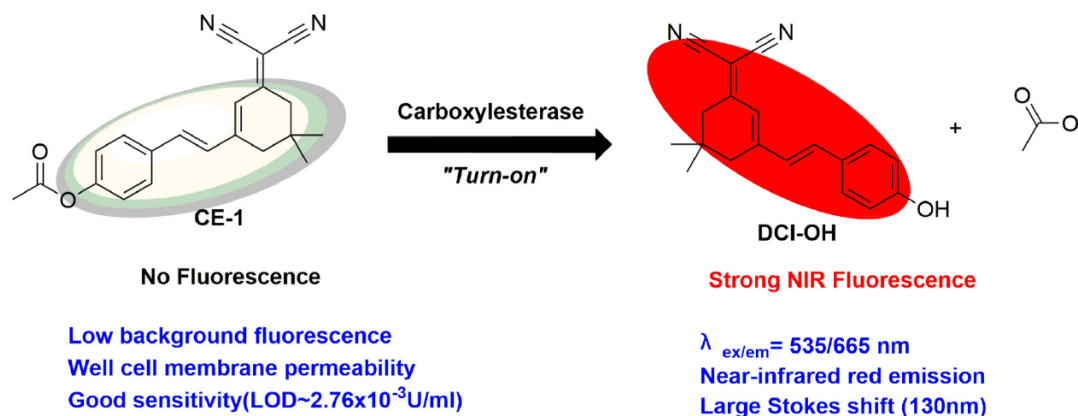


Figure 1-1. Fluorescent probe detecting Carboxylesterase⁽⁴⁾.

また、Xin-Fang Zhai らは、エトポシド、イリノテカンなど様々な薬物の抱合解毒にかかわる酵素である UGT1A1 を検出する蛍光プローブである NHPF を開発した。NHPF はナフタルイミドの骨格を持ち、ナフタルイミドのアミノ置換をイソブチル基に、酵素認識部位であるフェノール性ヒドロキシ基のオルト位をクロリドで置換することで、高い基質変換率(92 %)を達成した⁽⁵⁾。

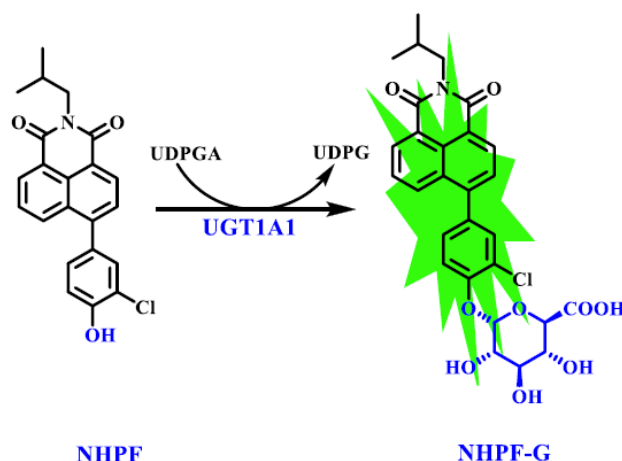


Figure 1-2. Fluorescent probe detecting UGT1A1⁽⁵⁾.

しかし、代謝経路を構成する酵素の基質選択性は一般的に高く、さらに代謝反応前後の基質の構造変化が小さいため、代謝経路の反応を元に蛍光変化を誘起するプローブの開発は一般的に困難である。さらに、これまで開発されてきた蛍光プローブはほとんど全てが上述したような単一の酵素反応を検出するためのものである。そこで、本研究では、これまでに例のない、連続する酵素反応からなる代謝経路全体を評価できるプローブの開発を目指し、代謝経路の一つである脂肪酸 β 酸化 (FAO) に着目したケミカルプローブの開発を目指した。

脂肪酸の β 酸化は、ミトコンドリア内で起こる、脂肪酸から ATP の原料となるアセチル CoA や NADH、FADH₂ を生み出す、ヒトにとって重要なエネルギー生産経路である。Figure 1-3 に β 酸化の概略図を示した。まず脂肪酸は Fatty acid transport proteins (FATPs) により細胞内に取り込まれた後に細胞質で CoA 化された後、カルニチンシャトルによってミトコンドリア内に輸送される。その後、脂肪酸の β 位において①. 酸化, ② 水和, ③ 酸化, ④ 開裂の4ステップの反応を経て2炭素短くなり、その過程でアセチル CoA や NADH、FADH₂ が生産される。2炭素分短くなった脂肪酸に関して再び β 酸化サイクルにより代謝を受け、最終的に全ての炭素がアセチル CoA へと変換される⁽⁶⁾。生成されたアセチル CoA や NADH、FADH₂ は電子伝達系や、クエン酸回路へと入り、好気性組織での酸化的リン酸化による ATP 産生につながる⁽⁷⁾。

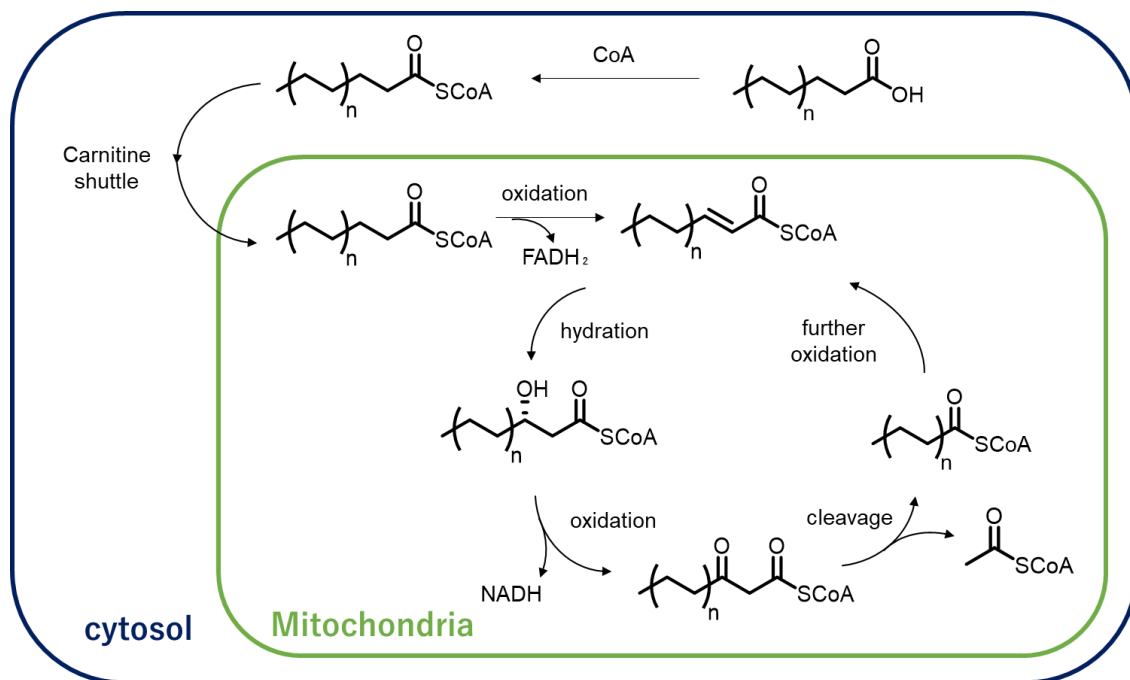


Figure 1-3. Mechanism of FAO

当研究室ではこれまでに脂肪酸 β 酸化を標的にしたケミカルプローブとして、蛍光色素であるクマリンに脂肪酸を導入したプローブを開発した。このプローブは Roser K. S.らの脂肪酸 β 酸化を標的としたドラッグデリバリーシステム(DDS)を基に設計を行っている⁽⁸⁾。このプローブは脂肪酸 β 酸化により C3 まで分解された後、水和反応を経てヘミアセタールが形成される。形成されたヘミアセタールは不安定なため、自発的な脱離が起こり、最終的にヒドロキシクマリンが遊離することで蛍光が回復する戦略となっている(Figure 1-4 (a))。このプローブは細胞に添加するという簡便な操作で、30 min という短時間で β 酸化活性を検出できること、及び添加後の洗浄操作が必要ないという利点を有し、これまでに様々な生細胞での β 酸化活性を検出することに成功している(Figure 1-4 (b))⁽⁹⁾。その一方で、骨格の大きな蛍光色素は β 酸化の基質にならないため、導入できる蛍光団が限られることや、細胞内で生成したヒドロキシクマリンの細胞内滞留性が悪く、検出感度が低いという問題点があった。とりわけ検出感度においては、自家蛍光の影響による活性評価の正確性の欠如やプローブを用いた活性化剤・阻害剤スクリーニング時に擬陽性の問題につながるため、プローブの構造設計を見直すことによる蛍光強度の改善が必要であった。

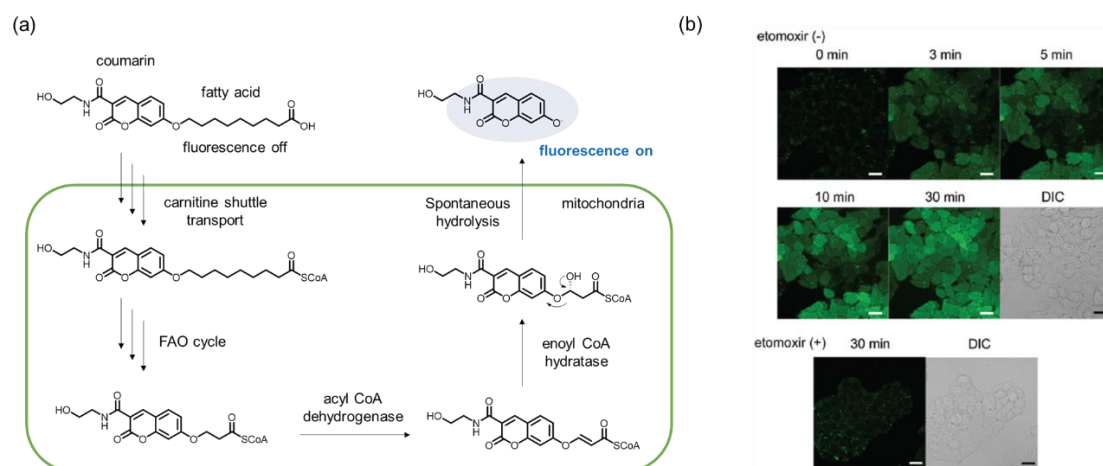


Figure 1-4. (a) Schematic mechanism of fluorescent probe detecting of FAO, (b) Fluorescence imaging in living cells⁽⁹⁾

β 酸化は横紋筋融解症⁽¹⁰⁾や脂肪肝⁽¹¹⁾など、様々な疾患と関連することから β 酸化の活性を制御する薬剤探索は先に示した疾患のリード化合物となることが期待される。また、既存の β 酸化阻害剤は、心疾患の治療薬として使用されている。そのメカニズムとして、心臓ではエネルギー生産を β 酸化に大きく依存しているが、心疾患においては β 酸化阻害剤を投与することで、酸素消費量が多い β 酸化から酸素消費量が少ない解糖系へ代謝シフトを起こし、心臓への負担を減らしている。これまで、 β 酸化阻害剤のいくつかは上市されており、partial inhibitor である trimetazidine⁽¹²⁾や ranolazine⁽¹³⁾が知られているが、薬効・作用時間の面では十分ではない。その一方、 β 酸化関連酵素として知られる CPT1 の共有結合阻害剤として etomoxir が知られているが、この薬剤に関しては反応部位である epoxide の反応性が高く副作用が強いことから医薬品としての開発は断念されている^(14, 15)。そのため、これらの薬剤に代わる薬効が強く、副作用の少ない薬剤の開発が必要とされている。

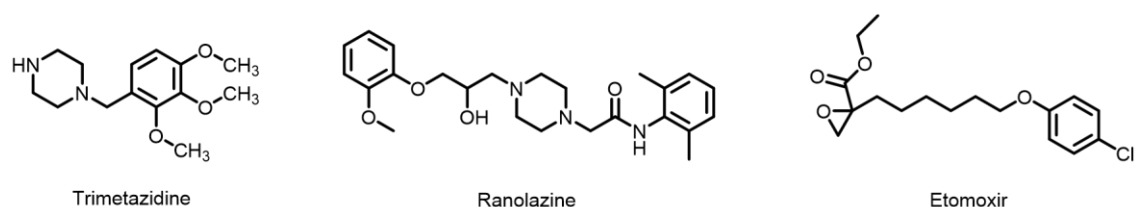
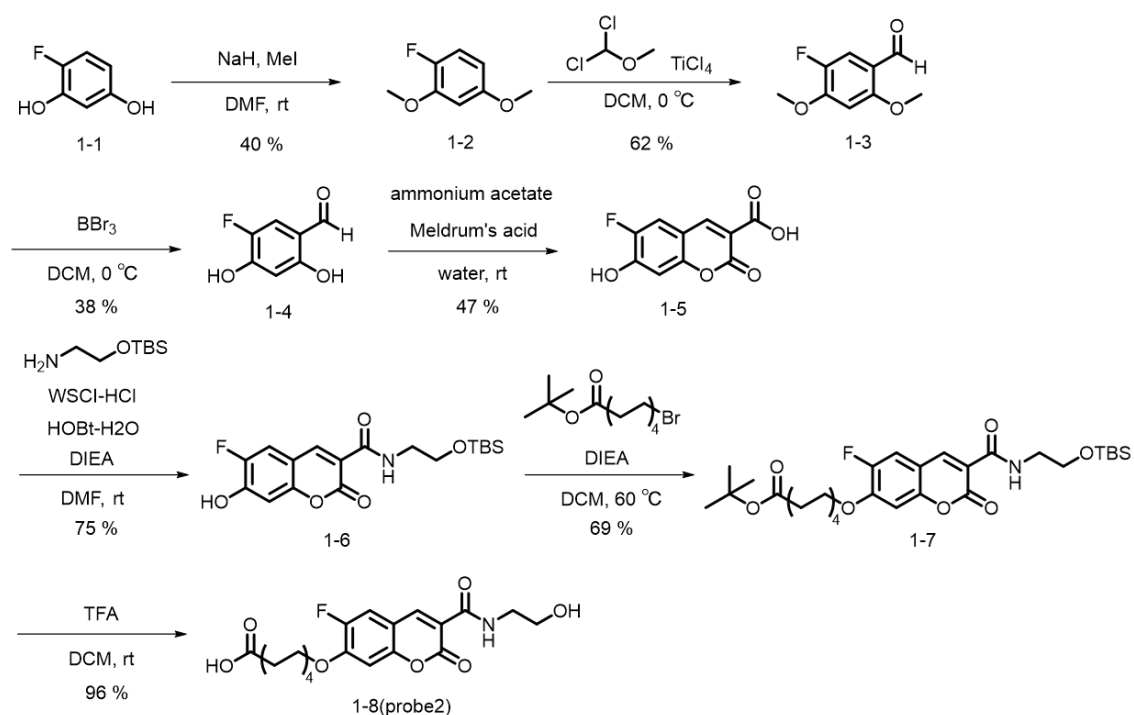


Figure 1-5. Chemical structure of FAO inhibitors.

1-2. 目的

本章では既存の β 酸化検出プローブを改良することで高感度での活性検出を可能とし、さらに新規 β 酸化制御化合物の開発へと応用することを目的とする。これまでに β 酸化を阻害するコバレントドラッグの開発例はないため、共有結句型フラグメントを用いて阻害剤スクリーニングを行うことで、新たな阻害剤候補化合物を見出す。コバレントドラッグで問題となる反応基による非特異反応を抑制するために、当研究室で開発された CFA 基を用いることで、薬効の作用時間が長く、副作用の少ない化合物の創出を目指す。本章では既存の β 酸化検出用蛍光プローブの蛍光団であるクマリンの 6 位にフルオロ基をしたプローブを合成し、蛍光特性や代謝挙動を評価した。また、反応基として CFA 基を有するフラグメント化合物を用いて新規 β 酸化阻害剤探索を行い、細胞内での代謝挙動を追跡したため詳細を記述する。

probe2 の合成スキームを下に示した。原料である 4-fluororesorcinol の水酸基をメチル化した **1-2** を合成した。次に Dichloromethyl methyl ether を用いた Vismeyer-Haack 反応により、アルデヒド基を導入した **1-3** を得た。BBr₃ により脱メチル化して **1-4** を得た後、酢酸アンモニウムとメルドラム酸を Knoevenagel 縮合により反応させ、クマリン **1-5** を得た。次に縮合反応により **1-6** を得た後、C9 脂肪酸を導入した **1-7** を得た。最後に TFA 処理により tert-ブチルエステルと TBS 基の脱保護を行い、**1-8 (probe2)** を得た。



Scheme 2-1. Synthesis of **probe2**.

2-2. Probe2 の特性評価

フルオロ基を導入していない **probe1** に関して、生体条件下 (pH 7.4) において β 酸化を受ける以前では吸収極大が 350 nm 付近に位置するが、 β 酸化を受けた後に吸収が長波長化し、吸収のピークトップが共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) での励起波長である 405 nm に近づくことで、蛍光が回復する on-off 型の蛍光プローブであることが知られている⁽⁹⁾。そのため、**probe2** においてフルオロ基を導入することによる吸収スペクトルの変化について蛍光と吸収スペクトルの測定を行い、**probe1** との間のプローブの特性の違いを調べた。

Absorption measurement conditions:

[**probe1**, **1'** or **2**, **2'**] = 10 μ M, room temperature, 50 mM HEPES buffer (pH7.4)

Shimadzu UV-2600

Fluorescence measurement conditions:

[**probe1**, **1'** or **2**, **2'**] = 10 μ M, room temperature, 50 mM HEPES buffer (pH7.4)

λ_{ex} = 405 nm, Ex Slit: 15.0 nm, Em Slit: 3.0 nm, Scan Speed: 200 nm/min

PerkinElmer LS55

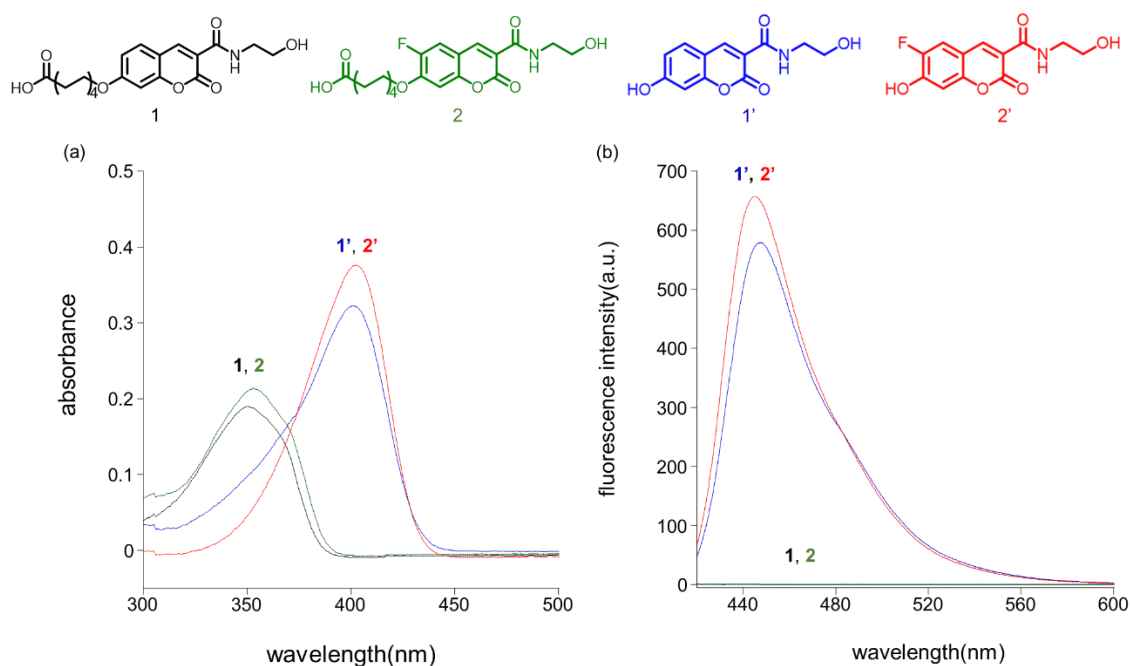


Figure 2-2. (a) Absorption spectrum of **1**, **1'**, **2**, **2'**. (b) Fluorescence spectrum of **1**, **1'**, **2**, **2'**.

吸収スペクトル・蛍光スペクトルの結果をそれぞれ Figure 2-2 に示した。(a) 吸収スペクトルに関して、脂肪酸を有する **1** と **2** では、360 nm 付近に極大吸収がみられた。一方で脂肪酸を持たないフェノール体 **1'** と **2'** については CLSM の励起波長である 405 nm 付近に極大吸収が見られ、**2'** の方が **1'** よりも吸光度が高かった。蛍光スペクトルに関して、励起波長を 405 nm として測定を行ったところ、脂肪酸を有する **1** と **2** でいずれも蛍光強度の上昇は見られなかった。一方で脂肪酸を持たないフェノール体 **1'** と **2'** では、450 nm 付近に極大を持つ蛍光スペクトルが得られ、**probe2** においても **probe1** と同様、初期状態では蛍光が off となっているが、 β 酸化を受けた後に蛍光が on になる挙動が得られた。また、同一濃度において **2'** の蛍光強度は **1'** より少し高いことが分かった。

2-3. Probe1 と Probe2 の pKa 比較

先述した通り、**probe2** に関しては、クマリンの 6 位にフルオロ基を導入することにより、 β 酸化を受けて最終的に形成されるヒドロキシクマリンの水酸基の pKa を低下させることでより、細胞内でのフェノレート体の存在比率を高め、より高感度で β 酸化活性を検出できることを期待している。そのため、in vitro 条件における **probe1** 及び **2** のフェノール体 **1'** と **2'** の pH を変化させた際の吸光度変化を調べることで、**probe2** の pKa が酸性側にシフトしているかどうかを確かめた。

様々な pH 下で測定した **1'** 及び **2'** の吸収スペクトル変化の結果を Figure. 2-3 の(a), (b)に示し、400 nm の吸光度の pH 依存曲線を(c)に示した。pH: 4.0 の酸性条件下においては、両化合物ともに 360 nm 付近に極大吸収を持ち、これはフェノール型のクマリンに由来する吸収であると推測された。一方で pH の上昇に伴って 350 nm 付近の吸収は減少し、次第に 400 nm 付近の吸収が増大した。この新しい吸収は、フェノレート型のクマリンに由来する吸収であると推測される。400 nm の吸光度変化をモニターすることで、クマリンの 7 位に位置するフェノール性水酸基の pKa を算出したところ、**1'** は 6.8 であるのに対し、**2'** は 5.4 であり、**probe2** が β 酸化を受けた後に生成するフェノール体 **2'** の pKa は **1'** よりも酸性側にシフトしていることが分かった。この結果から、クマリンの 6 位にフルオロ基を導入することでフェノール性水酸基の pKa が低下することが明らかとなった。

Absorption measurement condition

[**1'**, **2'**] = 10 μ M in HBS(+) buffer, pH: 4.0~9.0, room temperature

Shimadzu UV-2600

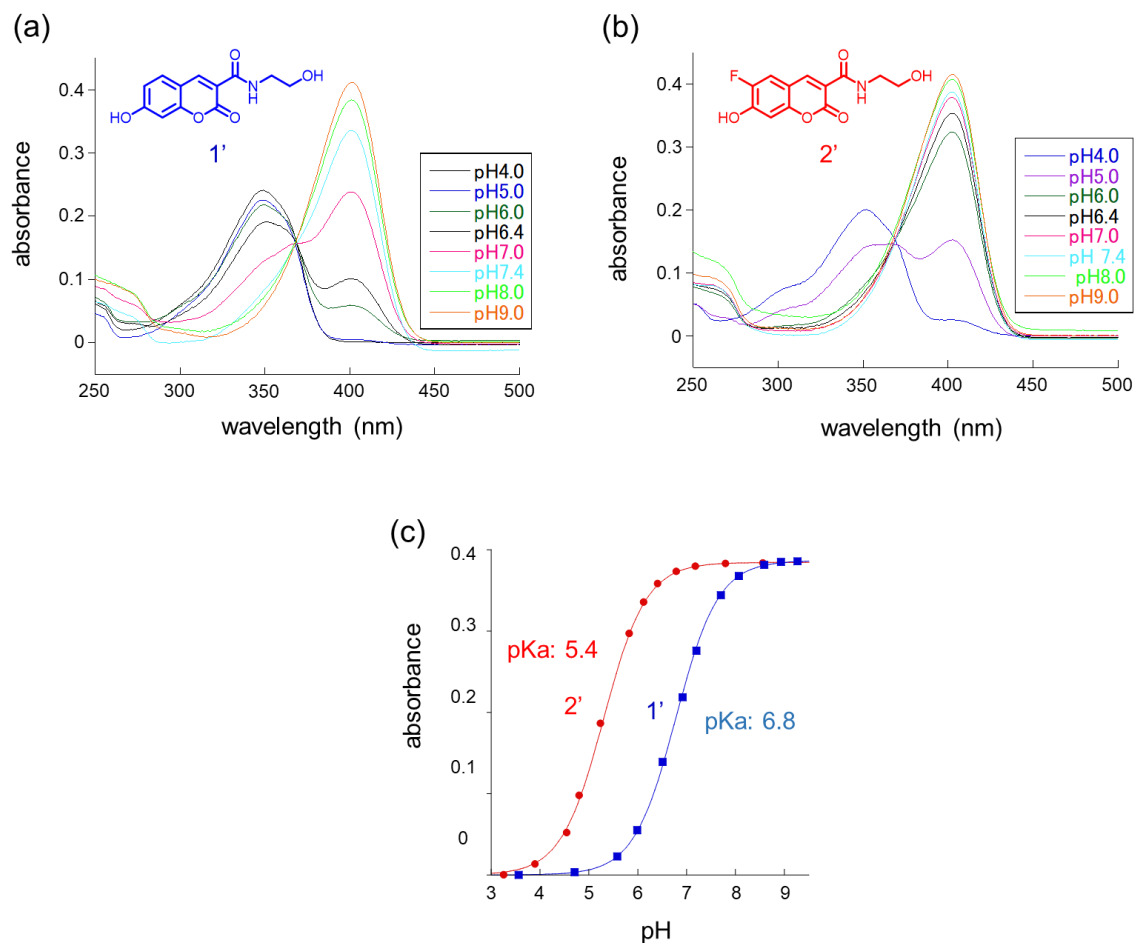


Figure 2-3. (a). Absorption spectrum of **1'**. (b). Absorption spectrum of **2'**. (c). pKa comparison of **1'** and **2'**.

2-4. イメージングによる probe2 の評価及び probe1 との蛍光強度比較

先に示した特性評価及び pKa の測定結果から、クマリンの 6 位にフルオロ基を導入することにより吸収・蛍光特性に大きな変化を与えることなく、 β 酸化を受けた後に生じるフェノール性水酸基の pKa を酸性側に大きくシフトすることができた。そのため、**probe2** を実際に生細胞に適用し、 β 酸化の基質になること及び **probe1** との蛍光強度の比較を行った。

Reaction conditions

HepG2 cells, [**probe1** or **2**] = 5 μ M in HBS(+)(pH: 7.4), 30 min, 37 °C, 5 % CO₂, λ_{ex} : 405 nm

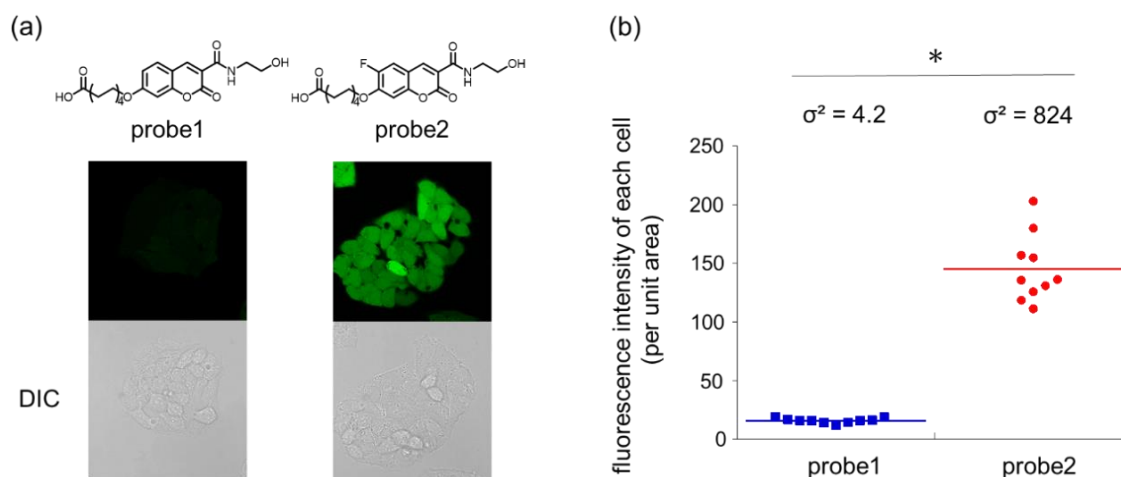


Figure. 2-4 (a). Fluorescence imaging of **probe1** and **probe2** in living cells. (b). Comparison of fluorescence intensity between **probe1** and **probe2**. *P<0.0001.

CLSM を用いた生細胞中の蛍光イメージングの結果を(a)に、**probe1** と **probe2** の蛍光強度の定量結果を(b)に示した。**probe2** を HepG2 細胞に添加し、30 分インキュベートすると、細胞内から強い蛍光が観察され、その強度は **probe1** よりも明らかに強かった。さらに、イメージングでの結果を基に蛍光強度に関して定量を行うと、**probe2** は **probe1** よりも約9倍高い蛍光強度で β 酸化を検出可能であることを確認した。

また、**probe2** を用いて β 酸化の活性・阻害による蛍光強度変化をモニターすることができかどうかを確かめた。今回、 β 酸化活性剤として ND630 を用いた。ND630 は脂肪酸の代謝の調節酵素として知られる ACC(acetyl-CoA carboxylase)を阻害することで β 酸化を活性化することが知られている⁽¹⁸⁾。また、 β 酸化の阻害剤としては、カルニチンシャトル

経路の阻害剤として知られる etomoxir を用いた (Figure 2-5)。HepG2 細胞に対し、ND630 及び etomoxir を用いて前処理を行い、その後、**probe2** を添加することにより蛍光強度変化をモニターした。その結果を Figure 2-5 に示す。ND630 を 50 μ M または 100 μ M 添加すると、活性化剤を添加していない時と比べて、プローブの蛍光強度が 1.3 倍程度に増加していた。その一方で、etomoxir を添加した際には **probe2** の蛍光が抑えられていることが分かった。これらの結果から、**probe2** はミトコンドリアの β 酸化の基質になることで、以前報告した **probe1** よりも強い蛍光を発することが示唆された。

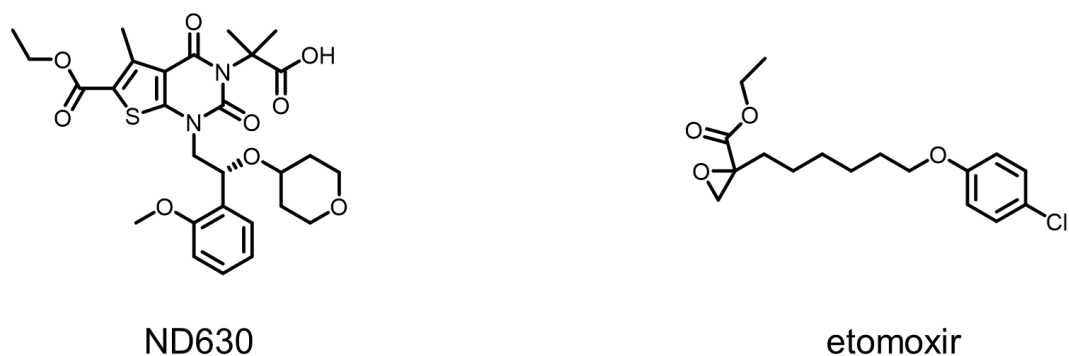


Figure 2-5. Chemical structure of ND630 and etomoxir.

Reaction conditions

Activation: HepG2 cells, [ND630]: 50 or 100 μM in DMEM(FBS(+)) for 4 hr, [probe2] = 5 μM in DMEM(FBS(-)) for 30 min, 37 °C, 5 % CO_2

Inhibition: HepG2 cells, [etomoxir]: 10 μM in DMEM(FBS(-)) for 24 hr, [probe2] = 5 μM in DMEM(FBS(-)) for 30 min, 37 °C, 5 % CO_2

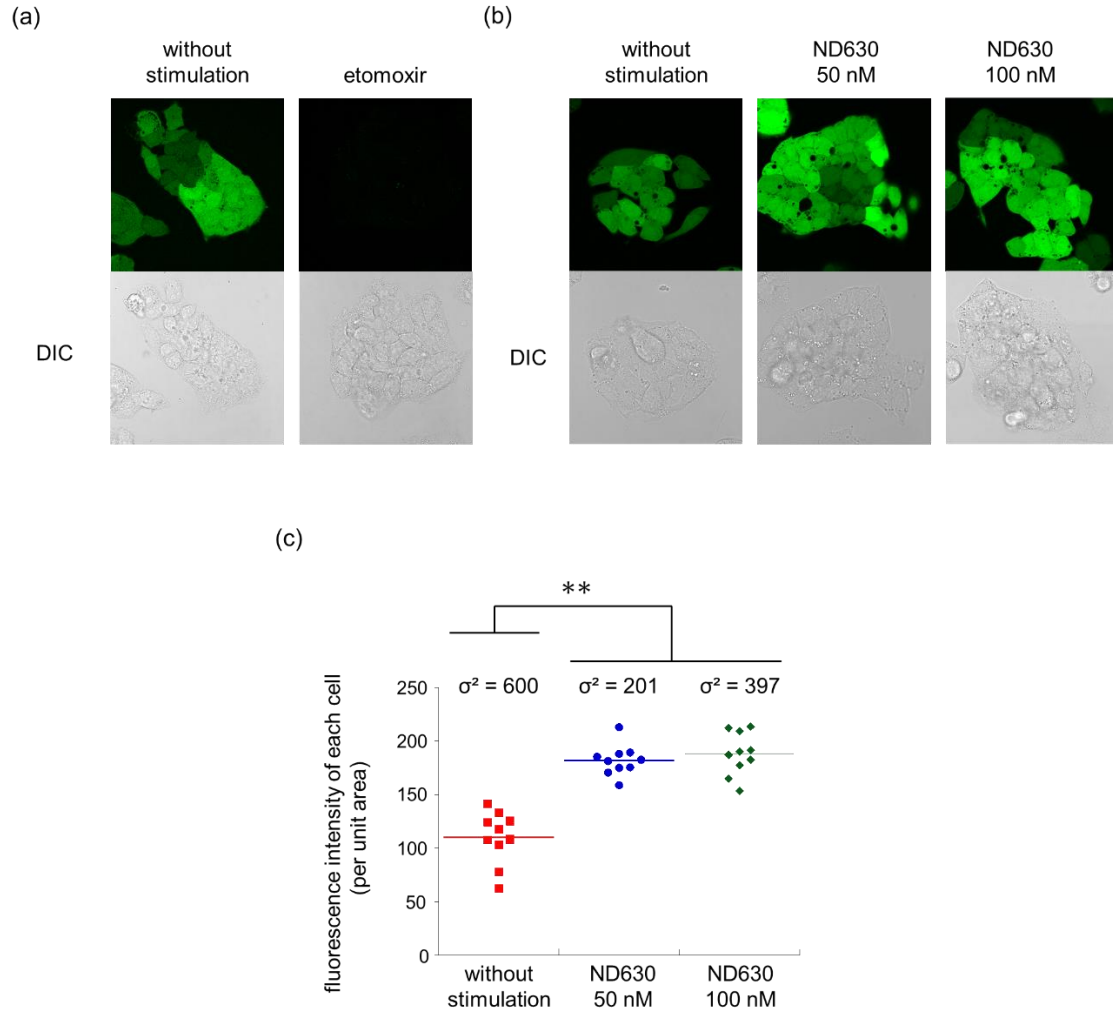


Figure 2-5. Fluorescence imaging of FAO activity in HepG2 cells upon treatment of etomoxir (a) or ND630 (b). (c). Statistical analysis of fluorescence intensity change in HepG2 cell (n = 10). The bar represents the mean value. σ^2 represents the dispersion value. **P<0.0001

2-5. HPLC を用いた probe2 の β 酸化追跡及び probe1 との代謝速度比較

β 酸化はミトコンドリア内で起こる脂肪酸の分解の主要な経路であり、脂肪酸が酵素によって代謝反応を受けた後に、アシル CoA は2つの炭素原子だけ短くなり、その過程でアセチル CoA が生成されることが知られている⁽¹⁹⁾。今回クマリンに脂肪酸を導入した蛍光プローブである **probe2** についても、細胞内の代謝酵素により脂肪酸が2炭素ずつ分解され、最終的にヒドロキシクマリンが放出されることが予想される。そのため **probe2** を細胞に添加した後、細胞を破碎しその溶解液を HPLC で分析することにより、脂肪酸部位が2炭素ずつ短くなったピークが実際に検出されるかどうかを確かめた。見えたピークに関しては ESI-TOF-MS により化合物の構造の同定を行った。

また、先述した通り **probe2** はクマリンの6位にフルオロ基を導入することで蛍光強度の増大に成功しているが、その要因の一つとして細胞内でプローブの代謝速度が増大していることが考えられる。そのため、脂肪酸が短くなったピークについて、**probe1** と **probe2** の強度比を算出することにより、各プローブの代謝速度の解析を行った。

Reaction conditions

HepG2 cells, [**probe1** or **2**] = 20 μ M in HBS(+)(pH: 7.4), 1~6 hr, 37 °C, 5 % CO₂

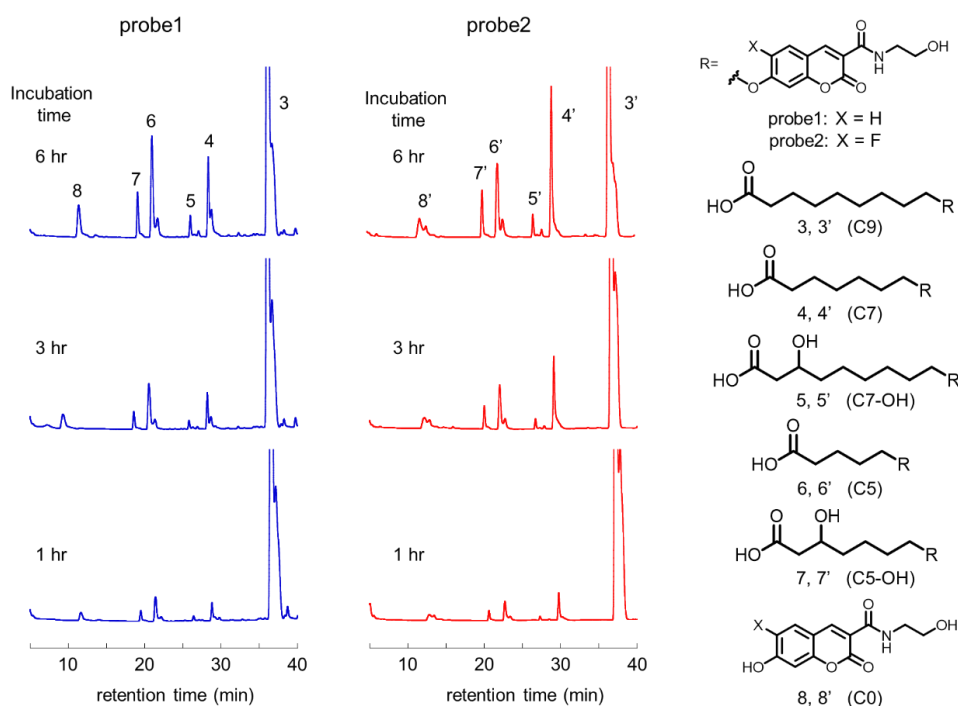


Figure 2-6. HPLC analysis of **probe1** or **probe2** metabolites in HepG2 cells.

各インキュベート時間における、**probe1** と **probe2** で処理したサンプルの HPLC 解析の結果を Figure 2-6 に示した。各プローブを 1 hr インキュベートした後に処理したサンプルに関しては、 β 酸化があまり進行しておらず、大部分が元の骨格である **3, 3'**であったが、6 hr インキュベートした際には **probe1** と **probe2** の代謝産物である C7、C5 及びその水和体である C7-OH, C5-OH のピークが確認された。さらに、プローブの最終代謝産物であるフェノール体 C0 の生成も確認できたことから、**probe2** は細胞内の酵素によって代謝反応を受けた後に 2 炭素ずつ短くなることによって、最終的にヒドロキシクマリンが放出されることで蛍光が on となることが分かった。

また、各インキュベート時間における、HPLC での **probe1** と **probe2** の代謝産物のピーク強度を基に各化合物の存在割合を Table 2-1 にまとめた。その結果、**probe1** と **probe2** の両方で化合物添加 6 hr 後でも 7 割以上が元の骨格のまま存在していることが明らかとなった。さらに最終代謝産物である **8, 8'**についても、化合物添加後 6 hr までで全体の 2 %ほどしか存在しておらず、二つのプローブ間の代謝速度に大きな差はないことが分かった。そのため、代謝速度については **probe2** の蛍光強度が増大しているファクターではないことが確認された。

Table 2-1. Summary of ratio of each peak analyzed by HPLC

Peak No.	Probe1, %			Peak No.	Probe2, %		
	1 h	3 h	6 h		1 h	3 h	6 h
3	89.3	84.7	75.0	3'	93.0	87.3	75.2
4	0.897	2.03	5.28	4'	1.11	3.32	7.36
5	0.171	0.301	0.766	5'	0.0195	0.294	0.758
6	1.40	3.69	7.19	6'	0.955	2.64	5.47
7	0.397	0.958	0.320	7'	0.387	0.720	2.18
8	0.492	1.08	2.20	8'	0.280	0.604	2.40

2-6. Probe1 及び 2 の細胞内滞留性の検討

クマリンの6位にフルオロ基を導入した **probe2** の生細胞中での蛍光強度がフルオロ基を導入していない **probe1** よりも増大している要因として、①. プローブの代謝速度が上がり、**probe2** の方がヒドロキシクマリンを多く遊離している、②. フルオロ基の導入によりプローブが β 酸化を受けた後にフェノール性水酸基の pKa が低下し、プローブの細胞内滞留性が高まっている、の2点が考えられるが、①の代謝速度に関しては、2つのプローブの間に大きな差は見られなかった。そのため、②のプローブの細胞内滞留性について **probe1** と **probe2** の間で比較を行った。実験方法としては生細胞に対して **probe1** ないし **2** を添加し、30 min インキュベートした後に wash を行い、CLSM 上で細胞をインキュベートすることにより、定点における細胞の蛍光を~30 min 観察し、各時間における細胞の蛍光強度を定量することにより、プローブが細胞外に流出する半減期を算出した。

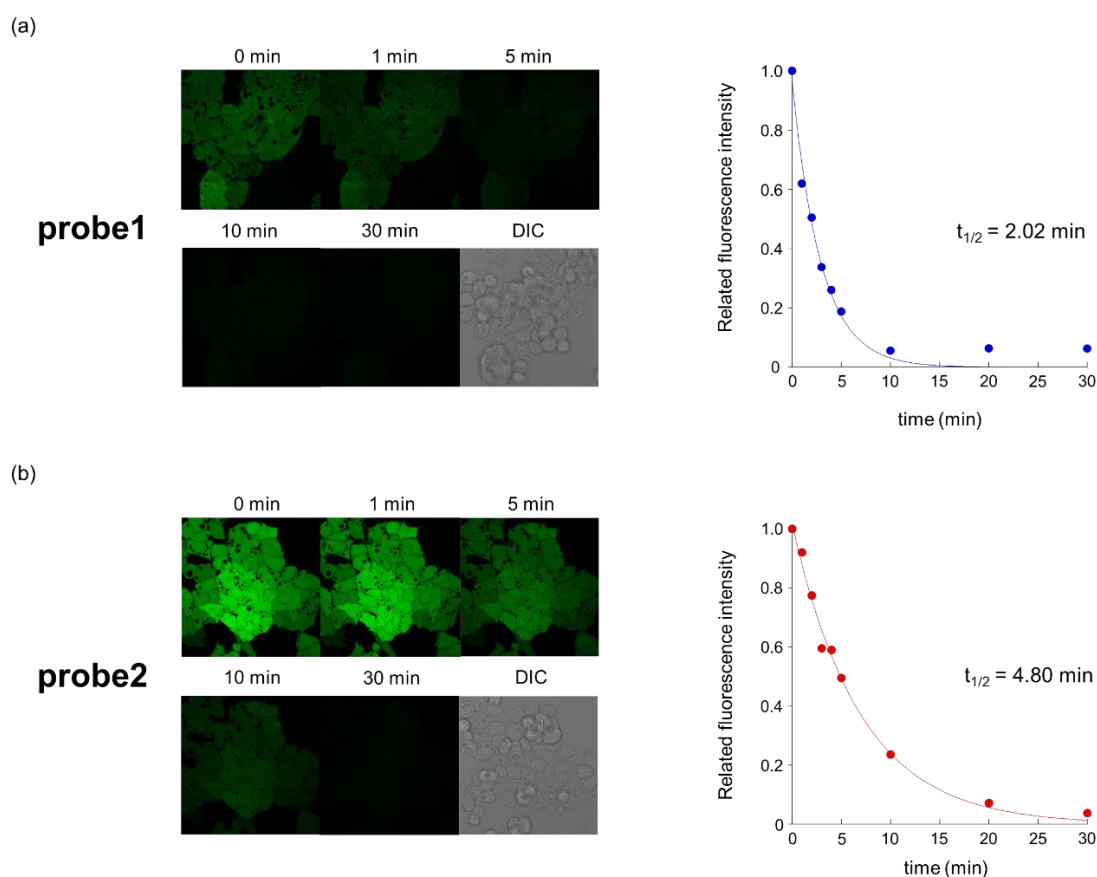


Figure 2-7. Comparison of intracellular retention of **probe1** and **2**. [**probe1** or **2**] = 5 μ M in DMEM(FBS(-)).

Figure 2-7 (a)に **probe1** のイメージング画像と各時間における蛍光の定量値を、(b)に **probe2** のイメージング画像と各時間における蛍光の定量値を示した。**probe1** と **probe2** の消失半減期はそれぞれ 2.02 min と 4.80 min となり、プローブの細胞外流出速度に大きな差はないことが分かった。そのため、**probe1** と **probe2** の蛍光強度に大きな差が出るのは代謝速度と細胞外流出速度以外の別の要因があることが示唆された。その原因の一つとして考えられるのは細胞内の pH が酸性側にシフトしていることである。以下の Figure 2-8 に示すのは脂肪酸を有さない **1'**、**2'** に関して、pH を変化させた際の蛍光強度の変化を示した結果である。この結果は pH が 7.4 付近であれば 2 つの化合物の間に蛍光強度の大きな差はないが、pH が 6.6 付近になると **1'** で蛍光強度が低下することを示している。そのため、細胞内の pH が酸性側にシフトすることで **probe1** と **probe2** の β 酸化の検出強度に差が出ていることが考えられた。

Fluorescence measurement conditions:

[**1'** or **2'**] = 5 μ M, room temperature, 25 mM MES buffer (pH 6.6), 25 mM MES buffer (pH 7.0 or 7.4)

λ_{ex} = 405 nm, Ex Slit: 15.0 nm, Em Slit: 3.0 nm, Scan Speed: 200 nm/min

PerkinElmer LS55

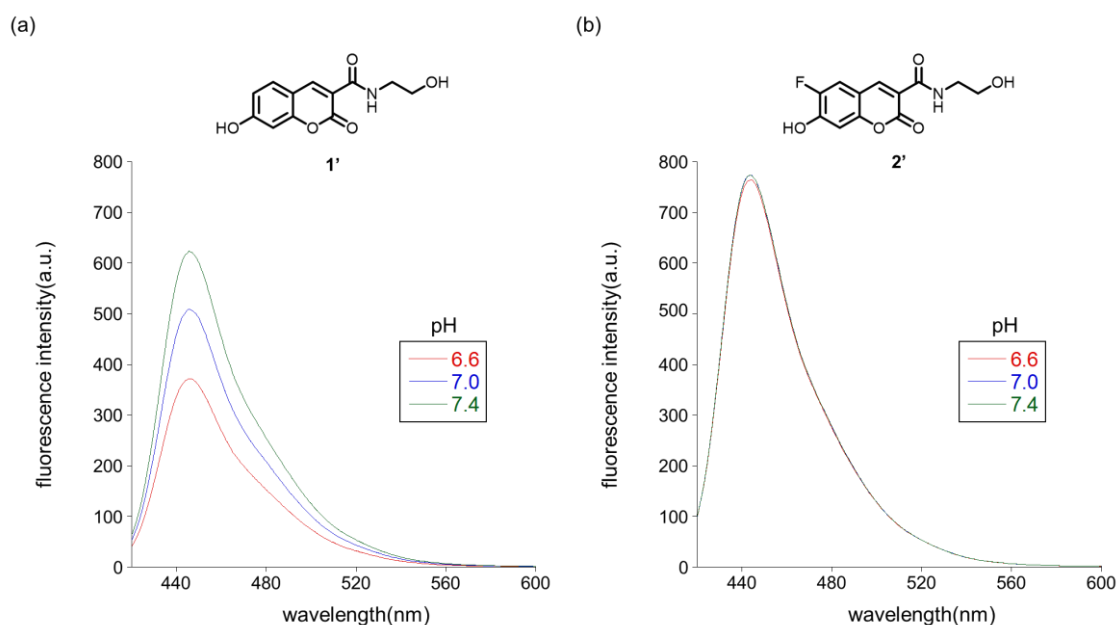


Figure 2-8. (a) Fluorescence spectrum of **1'**. (b) Fluorescence spectrum of **2'**

2-7. まとめ

本節では、新規 β 酸化制御化合物の開発を行うために β 酸化検出プローブの蛍光強度を改良することを目的とし、プローブの設計を行った。クマリンの 6 位にフルオロ基を導入した **probe2** を新たに設計し、フルオロ基を導入していない **probe1** との蛍光強度を比較した。その結果、蛍光強度が約 9 倍増大していることが分かった。さらに HPLC 解析や阻害剤・活性化剤添加時のプローブの挙動解析から、**probe2** が高感度で β 酸化を検出できることを確認した。また、蛍光強度が増大している原因を調べるために **probe1** と **probe2** の代謝速度と細胞外流出速度を検証した。代謝速度に関しては同濃度・同インキュベート時間において両プローブのヒドロキシクマリンの生成割合は 1~2 %程度であり、大きな差はないことが分かった。また、細胞外流出速度に関しても **probe1** の半減期は 2.02 min、**probe2** の半減期は 4.80 min であることから、2 つのプローブの間で大きな差はなかった。そのため、別の要因として細胞内の pH が酸性側にシフトすることにより、蛍光強度に差が出ていることが考えられた。蛍光強度の大きな増大により、阻害剤スクリーニングに用いるための十分な感度を得ることに成功した。

2-8. 実験項

Cell culture

HepG2 cells were grown at 37 °C under a humidified 5 % CO₂ atmosphere in a culture medium high-glucose DMEM (Wako). The media were supplemented with 10 % FBS (HyClone), penicillin (50 IU/mL) and streptomycin (50 µg/mL)

Fluorescence detection of FAO activity in living cells

HepG2 cells (2x10⁵ cells) were cultured on 3.5 cm glass-base dish (Iwaki) for 2-3 days at 37 °C in CO₂ incubator. The cells were washed with 1 mL HBS (+) buffer (pH = 7.4) twice and incubated with **probe1** or **probe2** (5 µM) for 30 min in HBS(+) buffer (pH = 7.4) at 37 °C. In control experiments, the cells were treated HBS(+) buffer (pH = 7.4) without **probe1** or **probe2** at 37 °C. The cells were then subjected to fluorescence imaging with confocal microscopy (TCS SP8, Leica microsystems) equipped with HyD detector. Fluorescence images were acquired using the 405 nm excitation derived from a semiconductor laser.

Evaluation of FAO activity change by the metabolite-related drugs in HepG2 cells

HepG2 cells (2 × 10⁵ cells) were cultured on 3.5 cm glass-based dish (Iwaki) for 2-3 days at 37 °C in CO₂ incubator. The cells were then pretreated with ND630 (50 or 100 nM) for 4h in DMEM (FBS(+)), etomoxir (10 µM) for 24 h in DMEM (FBS(-)). The cells were then incubated with **probe2** (5 µM) and in DMEM(FBS(-)) for 30 min at 37 °C, followed by subjection to fluorescence imaging with confocal microscopy (TCS SP8, Leica microsystems) equipped with HyD detector.

HPLC analysis of **probe1** or **probe2** metabolites in HepG2 cells.

HepG2 cells were cultured on 6 cm dish (NEST) for 3 days at 37 °C in CO₂ incubator. After washing with HBS (+) buffer (pH = 7.4) twice, the cells were incubated with **probe1** or **probe2** (20 µM) for 1~6 h at 37 °C in 2 mL HBS (+) buffer (pH = 7.4). After collecting the HBS(+), the cells were lysed by RIPA buffer (50 µL) on an ice bath. After placing the dish for 10 min, insoluble stuff was removed by centrifugation (16400 rcf, 10 min, 4 °C). Adding MeOH (300 µL) and centrifuged (16400 rcf, 10min, 4 °C) again. The combined solution of the cell lysate (350 µL) and the HBS(+) was subjected to HPLC analysis (YMC-Triart C18, 250 × 10 mmI.D., Flow rate: 1.0 mL/min, mobile phase gradient: CH₃CN (0.1% TFA) / H₂O (0.1% TFA) = 20/80 → 70/30 linear gradient over 60 min, Detection wavelength: 350 nm, Compound identification of each peak was performed with ESI-TOF-MS (Bruker micrOTOF II).

The evaluation of retention time of metabolites of probe2 in HepG2 cells.

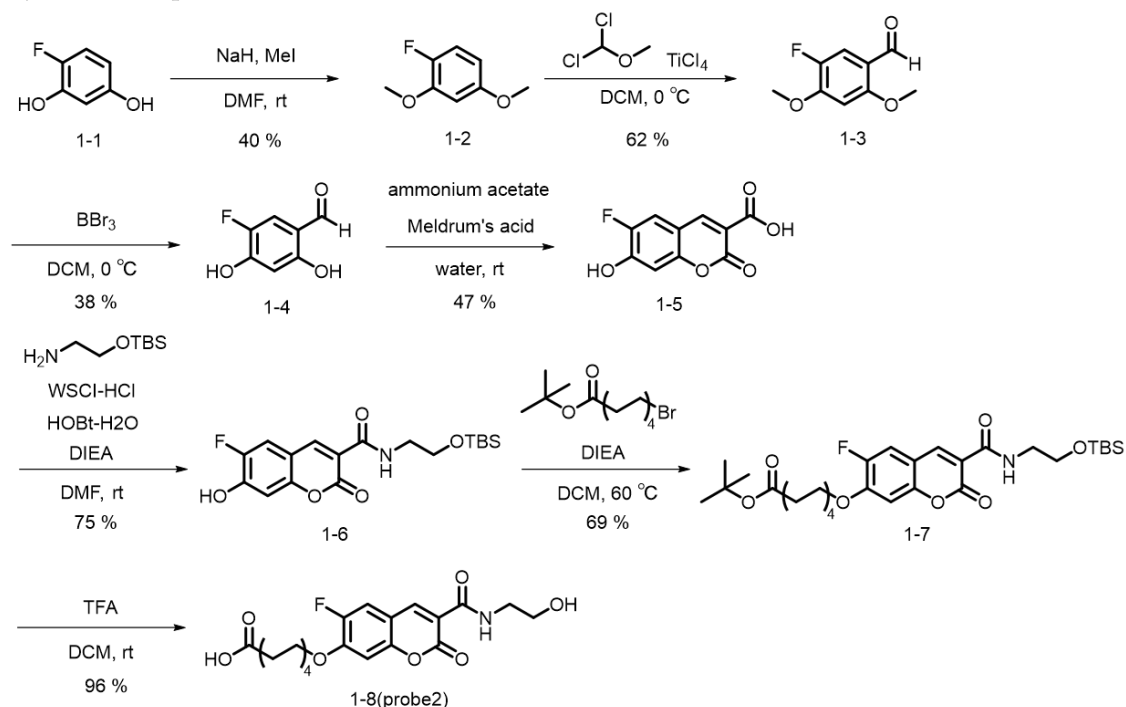
HepG2 cells were cultured on 3.5 cm dish (NEST) for 2 or 3 days at 37 °C in CO₂ incubator. After washing with HBS (+) buffer (pH = 7.4) twice, the cells were incubated with **probe1** or **probe2** (5 µM) for 30 min at 37 °C in 2 mL HBS (+) buffer. After washing with HBS(+) twice, the cells were HBS(+) (2 mL). The fluorescent intensity was monitored for 0~30 min at 37 °C with confocal microscopy (TCS SP8, Leica microsystems) equipped with HyD detector.

Synthetic Procedures

General synthetic methods

Reagents and solvents were obtained from commercial suppliers and used without further purification, unless otherwise stated. Reactions were carried out under a positive atmosphere of nitrogen, unless otherwise stated. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) carried out on Merck TLC Silica gel 60 F254, using shortwave UV light as the visualizing agent and phosphomolybdic acid in EtOH and heat as developing agent. Flash column chromatography was performed using Kanto Chemical Silica gel 60 N (spherical, 40-50 µm). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Agilent or Bruker Avance III HD 500 MHz spectrometer and were calibrated using residual undeuterated solvent as the internal references (CDCl₃: 7.26 ppm; DMSO-*d*₆: 2.50 ppm; D₂O: 4.79 ppm). The following abbreviations were used to explain NMR peak multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentet, m = multiplet, br = broad. Low-resolution and high-resolution mass spectra were recorded on Bruker micrOTOF focus II mass spectrometer using electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) reflectron experiments.

Synthesis of probe2



1-fluoro-2,4-dimethoxybenzene (1-2)

To a flask with 4-fluorobenzene-1,3-diol (400 mg, 3.12 mmol) was added NaH (165 mg, 6.86 mmol) dissolved in dry DMF (4 mL) at 0 °C. The solution was stirred at 0 °C for 1 h and then was added MeI (1.17 mL, 18.72 mmol). The solution was stirred at rt for 22.5 h. After dilution with brine, the mixture was extracted with AcOEt and washed by brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and after filtration, the organic layer was concentrated in vacuo. The crude was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane /AcOEt = 4.5/1) to give **1-2** as a colorless oil (196 mg, 1.26 mmol, 40 %).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.96 (d, J = 20.0 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.77 (s, 1H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 156.2 $\times$ 2, 148.2, 148.2, 148.1, 146.3, 115.7, 115.6, 103.6, 103.6, 101.2, 56.1, 55.7

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₈H₉FO₂Na 179.0479; found 179.0485

5-fluoro-2,4-dimethoxybenzaldehyde (1-3)

To a solution of 1-fluoro-2,4-dimethoxybenzene (196 mg, 1.45 mmol) in dry DCM (3 mL) was added TiCl₄ (14 % in DCM) (3.19 mL, 3.19 mmol) slowly and dichloro(methoxy)methane (193.0 μ L, 2.18 mmol) at 0 °C. The solution was stirred at 0 °C for 45 min. The reaction was diluted by sat.NH₄Cl (6 mL) and DCM (10 mL) and was stirred at 0 °C for 45 min. The

reaction was extracted with AcOEt and then washed by sat. NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and after filtration, the organic layer was concentrated in vacuo. The crude was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane /AcOEt = 4/1) to give **4-3** as a colorless oil (166 mg, 0.9 mmol, 62.2 %)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 10.3 (d, *J*=3.0 Hz, 1H), 7.52 (d, *J*= 11.5 Hz, 1H), 6.52 (d, *J*= 6.5 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.93 (s, 3H),

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 187.4, 159.8, 159.8, 154.1, 154.0, 147.9, 146.0, 117.4 $\times$ 2, 114.4, 114.2, 97.0, 56.4, 56.2

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calcd for 207.0428; found 207.0438

5-fluoro-2,4-dihydroxybenzaldehyde (**1-4**)

To a solution of 5-fluoro-2,4-dimethoxybenzaldehyde (166.2 mg, 0.9 mmol) in dry DCM (3 mL) was added BBr₃ (1.0 mmol in DCM)(3 mL, 3.0 mmol) at 0 °C. The solution was stirred at 0 °C for 2 h. After dilution with brine, the mixture was extracted with AcOEt and washed by brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and after filtration, the organic layer was concentrated in vacuo. The crude was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane /AcOEt = 4/1) to give **1-4** as a white solid (53 mg, 0.34 mmol, 38 %).

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 9.72 (s, 1H), 7.34 (d, *J*= 10.5 Hz, 1H), 6.41 (d, *J*= 7.0 Hz, 1H)

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD) δ : 194.4 $\times$ 2, 161.3, 155.5, 155.3, 148.0, 146.2, 119.1, 118.9, 114.6, 114.5, 105.5, 105.5

HRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ calcd for 155.0150; found 155.0139

6-fluoro-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (**1-5**)

To a flask with 5-fluoro-2,4-dihydroxybenzaldehyde(53 mg, 0.34 mmol) was added Meldrum's acid(63 mg, 0.44 mmol) and ammonium acetate (8.0 mg, 0.10 mmol) and water(3 mL). The solution was stirred at rt for 1.5 h. The reaction was diluted by 1N HCl and then stirred at 0 °C for 1 h. After filtration the **1-5** was dried under vacuum as a pale yellow solid(36 mg, 0.16 mmol, 47 %)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8.71 (s, 1H), 7.54 (d, *J*= 10.5 Hz, 1H), 6.89 (d, *J*= 7 Hz, 1H)

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD) δ : 164.4, 160.5, 153.3, 153.0, 152.9, 150.3, 149.8 $\times$ 2, 148.3, 115.3, 115.2, 112.6, 110.4, 104.2 $\times$ 2

HRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ calcd for 223.0048; found 223.0073

N-(2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-6-fluoro-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (1-6)

To a solution of 6-fluoro-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (36 mg, 0.16 mmol) in dry DMF (2 mL) was added HOBt·H₂O (29 mg, 0.2 mmol), WSCI·HCl (37 mg, 0.19 mmol), DIEA (82.8 µL, 0.48 mmol) and 2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)ethan-1-amine (34 mg, 0.19 mmol) dissolved in dry DMF (1 mL). The solution was stirred at rt for 2 h. After dilution with 1N HCl and brine, the mixture was extracted with AcOEt and washed by brine and 1N HCl. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and after filtration, the organic layer was concentrated in vacuo. The crude was purified by flash column chromatography on silica gel (CHCl₃ / MeOH = 30/1) to give **1-6** as a yellow solid (46 mg, 0.12 mmol, 75 %)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 9.22 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.80 (t, *J* = 11.0 Hz, 2H), 3.54 (dd, *J* = 16.0 Hz, 2H), 0.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 9H), 0.087 (s, 6H)

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD) δ : 164.2, 162.8, 154.2 × 3, 151.8, 149.9, 149.2 × 2, 116.4, 116.3, 115.5, 111.9, 111.8, 105.5, 105.5, 62.6, 43.2, 30.7, 30.4, 26.3, 19.1

HRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ calcd for 380.1335; found 380.1346

tert-butyl 9-((3-((2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)carbamoyl)-6-fluoro-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)nonanoate (1-7)

To a solution of N-(2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-6-fluoro-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (46 mg, 0.12 mmol) in dry DMF (2 mL) was added tert-butyl 9-bromononanoate (70 mg, 0.24 mmol) dissolved in dry DMF (1 mL) and DIEA (209.0 µL, 1.2 mmol). The solution was stirred at 60 °C for 18 h. After dilution with brine, the mixture was extracted with AcOEt and washed with brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and after filtration, the organic layer was concentrated in vacuo. The crude was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane /AcOEt = 4/1) to give **1-7** as a white solid (49 mg, 0.08 mmol, 69 %)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.00 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 7.32 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.09 (t, *J* = 13.0 Hz, 2H), 3.77 (t, *J* = 11.0 Hz, 2H), 3.57 (dd, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.19 (t, *J* = 15.0 Hz, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.57-1.30 (m, 22H), 0.07 (s, 6H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 173.4, 161.8, 161.4, 153.2, 153.0, 152.6, 150.8, 148.9, 147.6 × 2, 116.1, 114.8, 114.6, 111.2, 111.1, 101.6 × 2, 80.1, 70.1, 61.7, 42.2, 35.7, 29.3, 29.2, 29.1, 28.8, 28.2, 26.0, 25.9, 25.2 × 2, 18.4

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for 594.3257; found 594.3273

[M+Na]⁺ calcd for 616.3076; found 616.3090

9-((6-fluoro-3-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)nonanoic acid (probe2)

To a solution of tert-butyl 9-((3-((2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)carbamoyl)-6-fluoro-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)nonanoate (49 mg, 0.08 mmol) in dry DCM (3 mL) was added TFA (1.3 mL) at 0 °C. The solution was stirred at rt for 2.5 h. The solvent was removed and DCM was added and evaporated (repeat for twice). The crude was purified by HPLC to give **probe2** as a white solid (34 mg, 0.08 mmol, 96 %).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.9 (brs, 1H), 8.81 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.18 (t, *J* = 13.0 Hz, 2H), 3.51-3.37 (m, 4H), 2.18-1.38 (m, 14H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.6, 161.2, 152.7, 148.1, 147.8, 116.3, 115.7, 115.5, 111.5, 102.5, 70.2, 60.0, 34.2, 29.1, 29.0, 28.6, 25.7, 25.0

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₂₆FNO₇ 424.1766; found 424.1761

3. β 酸化検出用蛍光プローブを用いた β 酸化阻害剤スクリーニング

3-1. 序

蛍光プローブはこれまで細胞内 pH 指示薬⁽²⁰⁾、金属センサー⁽²¹⁾、診断画像ツール⁽²²⁾等、様々な場面で使用されている⁽²³⁾。また、近年では活性化剤・阻害剤のスクリーニングのために使用されていることも多い。例えば、Kawaguchi らは乳がん及び膠芽腫の癌幹性に関連する II 型膜貫通糖タンパク質である ENPP1 を検出する蛍光プローブである TG-mAMP を開発した。彼らは開発した蛍光プローブと 9600 種類の化合物ライブラリーを用いて、3 種のスクリーニングを行うことでヒット化合物の同定を行い、新規 ENPP1 阻害剤 (compound A) の開発に成功している (Figure 3-1)⁽²⁴⁾。

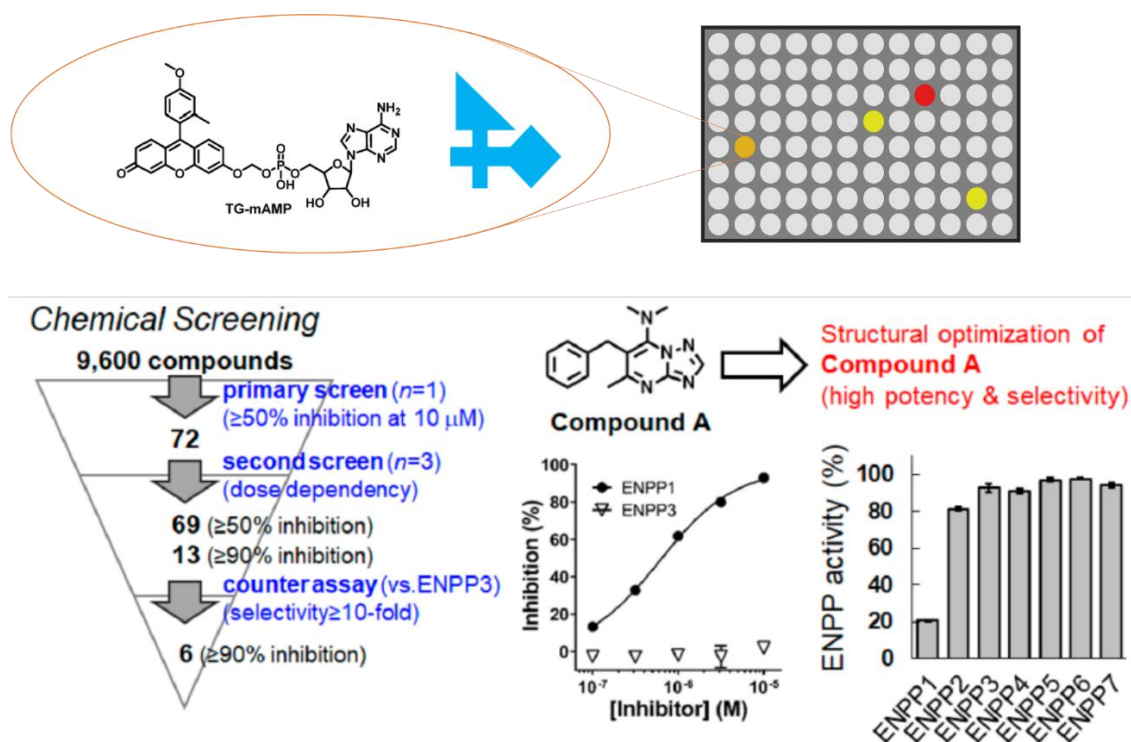


Figure 3-1. Inhibitor screening of ENPP1 using fluorescent probe⁽²⁴⁾.

また、蛍光プローブを用いた生細胞スクリーニングも行われている。例えば Hirayama らはローダミンを蛍光色素として有する、細胞内の Fe(II) を検出する蛍光プローブ RhoNox-4 を開発し (Figure 3-2 (a))、3399 種類の化合物ライブラリーを用いて生細胞スクリーニングを行ったところ、細胞内の Fe(II) をアップレギュレートさせる化合物である Lomofungin を見出すことに成功した (Figure 3-2(b))⁽²⁵⁾。

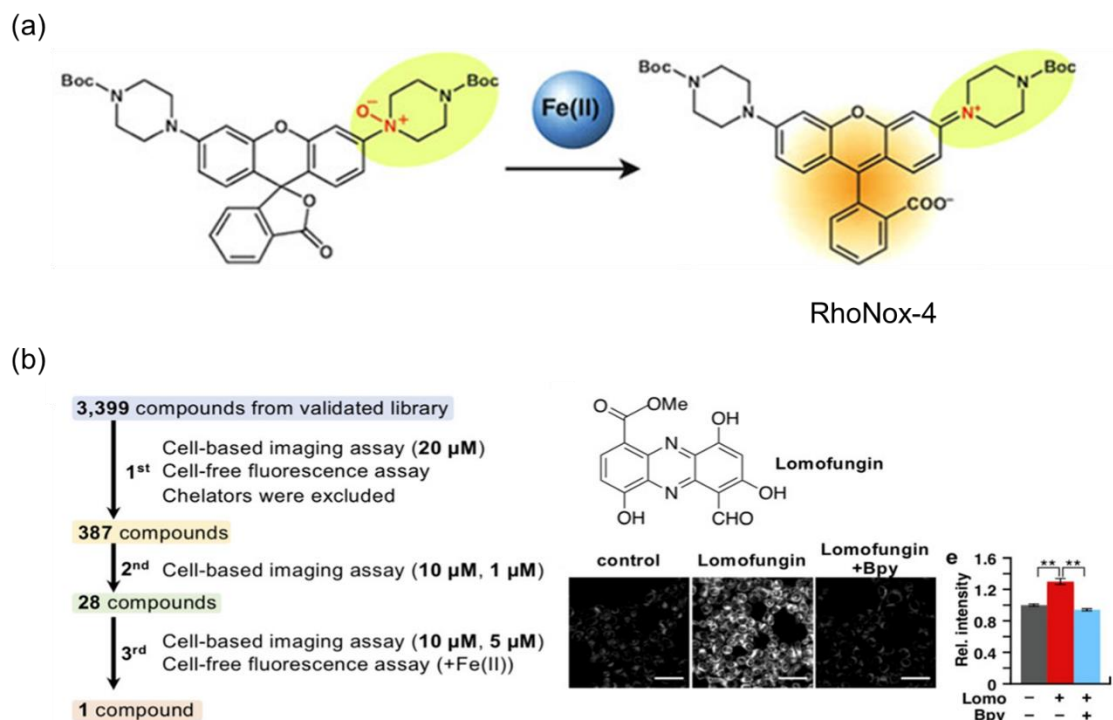


Figure 3-2. (a). Fluorescent probe detection Fe(II). (b). Inhibitor screening of GLS1 using fluorescent probe⁽²⁵⁾.

上述したように蛍光プローブは精製酵素や生細胞を用いたスクリーニングに広く用いられている。単一の酵素と反応して蛍光が on となるプローブに関しては精製酵素や生細胞でスクリーニングを行うことができるが、今回開発した β 酸化を検出する **probe2** は複数の酵素反応を経て蛍光が on となるため、精製酵素を用いた阻害剤スクリーニングには適さない。そのため本研究では、生細胞を用いたフェノタイプスクリーニングを行うこととした。

3-2. 生細胞に対するフラグメント化合物の添加条件検討

フェノタイプスクリーニングを行うにあたり、フラグメント化合物のインキュベート濃度・時間に関しては検討が必要である。以前、Jessica L. Counihan らは、CA 基、AA 基を反応基として有する共有結合リガンドライブラリーを用いた生細胞スクリーニングと ABPP をベースとしたケミカルプロテオミクス法を組み合わせ、肺がん細胞である A549 細胞の増殖を阻害するヒット化合物を特定した(Figure 3-3)⁽²⁶⁾。

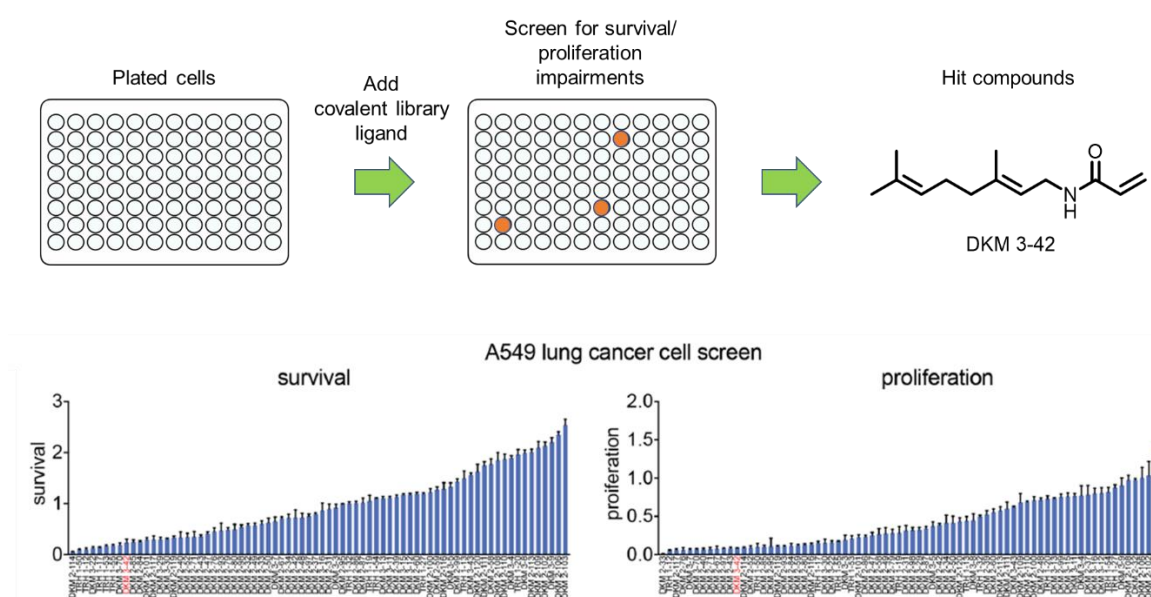


Figure 3-3. Covalent fragment screening in A549 lung cancer cells to identify ligands that impair lung cancer cell survival or proliferation⁽²⁶⁾.

彼らは共有結合リガンドを A549 細胞とともに、50 μ M で 48 時間インキュベートすることで、各化合物の細胞増殖阻害についてヘキスト染色によって評価している。これらの条件は細胞の生存率を議論するために検討された評価条件であり、本研究における阻害剤スクリーニングでは細胞生存に影響を与えることなく β 酸化を阻害する化合物の探索を行うため、評価条件としては適していない。そのため、生細胞に対するフラグメント化合物の β 酸化への影響を考慮する必要がある。そこで、特定のタンパク質と相互作用しないと思われるアニリンに反応基を導入した単純な骨格を持つフラグメント化合物である CA-108/CFA-108 に関して、濃度・インキュベート時間を検討することで、スクリーニングにおける適切な条件を探索した。条件を決める方法としては、生細胞中でフラグメント化合物を複数の濃度で添加し、その後 β 酸化検出用蛍光プローブである **probe2** を添加し、共焦

点レーザー顕微鏡 (CLSM) または蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定することで、各反応基の生細胞に対する影響を調べた。

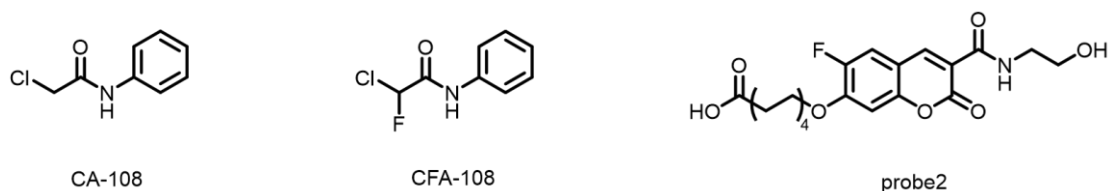


Figure 3-4. Chemical structure of CA/CFA-108 and probe.

Reaction conditions

- (a): HepG2 cell, [CA-108] = 1, 5 μ M, 3 hr, [CFA-108] = 5 or 50 μ M, 24 hr, [probe2] = 5 μ M, 30 min, 37 °C, 5 % CO₂
- (b): HepG2 cell, [CA-108] = 1~5 μ M, 3 hr, [CFA-108] = 1~50 μ M, 24 hr. [probe2] = 5 μ M, 1 or 2 hr, 37 °C, 5 % CO₂

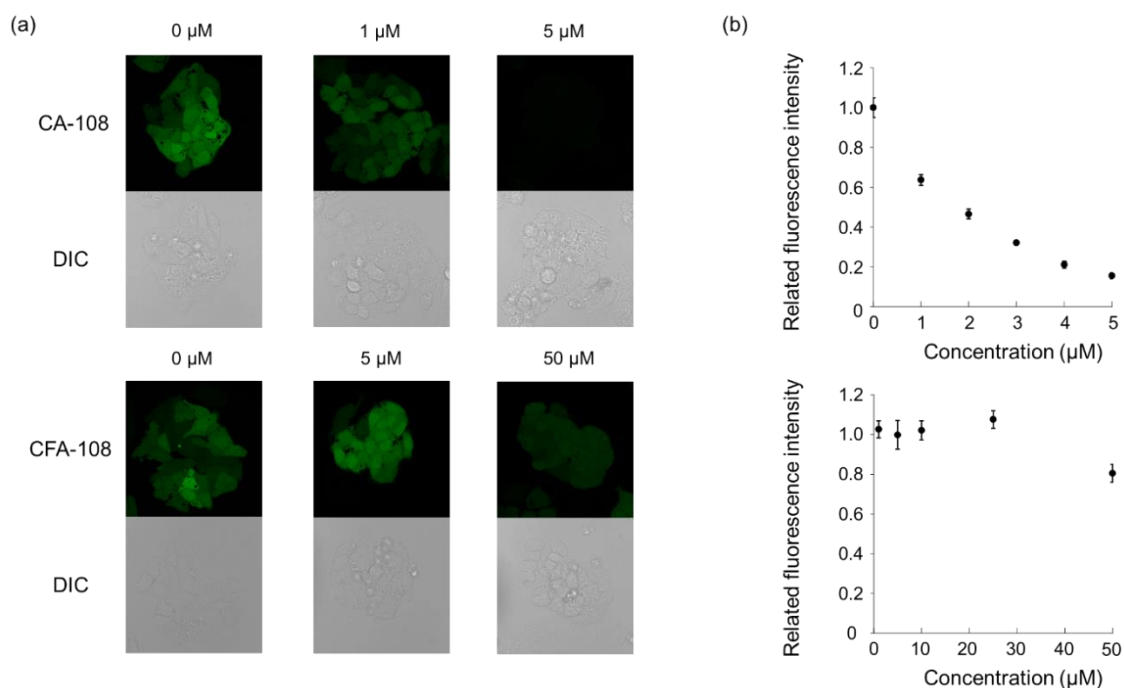


Figure 3-5 (a). Screening of FAO activity with CLSM, (b). Screening of FAO activity with plate reader.

Figure 3-5 (a)は、蛍光イメージングでの検討結果、(b)は蛍光プレートリーダーでの測定結果である。本実験ではフラグメント化合物の反応性及び化合物の毒性を考慮し、化合物のインキュベート時間を CA-108 に関しては 3 hr、CFA-108 に関しては 24 hr とした。その結果、CA-108 に関しては 1 μ M でも蛍光強度の減少が見られ、5 μ M では蛍光の消失が確認された。CA-108 は反応性が高く、低濃度・短時間でも非特異的にタンパク質と結合しているために蛍光の減少が見られたと考えられる。

その一方で、CFA-108 に関しては 50 μ M でも蛍光の大きな低下は見られず、反応基による非特異反応が少ないことが示唆された。そのため、CFA 基を反応基として持つフラグメント化合物でスクリーニングを行うに際し、50 μ M, 24 hr の条件でヒット化合物の探索が行えることが分かった。

3-3. β 酸化阻害剤の探索

CA-108/CFA-108 での条件検討及び第 1 章における CA/CFA 基での反応性の検討結果から CFA 基を反応基として持つフラグメント化合物は細胞に対する非特異反応が少なく、生細胞スクリーニングに有用であることが分かった。そのため CFA 基を導入した化合物約 150 種類を用いてスクリーニング実験を行った。実験の概略を Figure 3-6 に示す。生細胞 (HepG2 細胞) をプレートに播種した後、コバレント型のフラグメント化合物を添加する。その後、 β 酸化検出用の **probe2** を添加し、プローブの蛍光強度が減少する化合物を探索した。また、ヒット化合物は以下に示す蛍光強度比を基に決定した。

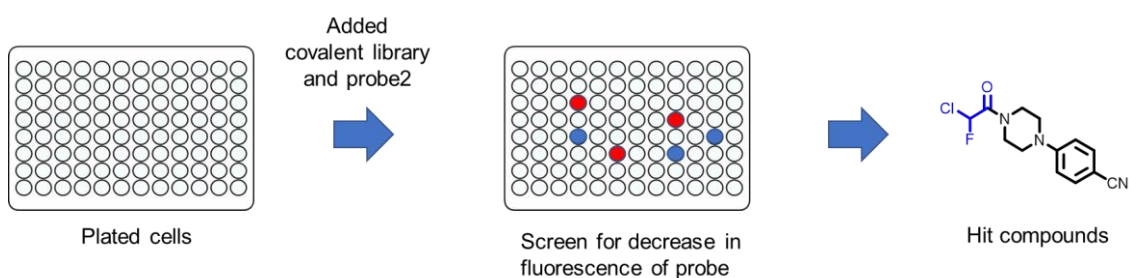


Figure 3-6. Inhibitor screening protocol. HepG2 cells were treated with CFA fragments (50 μ M) for 24 hr. After removing CFA fragments, **probe2** was added in each well and incubated for 2 hr. Plate was analyzed by plate reader.

$$\text{蛍光強度比} = \frac{\text{阻害剤} + \text{probe2の蛍光強度} - \text{blankの蛍光強度}}{\text{probe2のみの蛍光強度} - \text{blankの蛍光強度}}$$

Reaction conditions

HepG2 cell, [fragment compounds] = 50 μ M, 24 hr, [**probe2**] = 5 μ M, 2 hr, 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂

Ex: 405 nm, Em: 460nm.

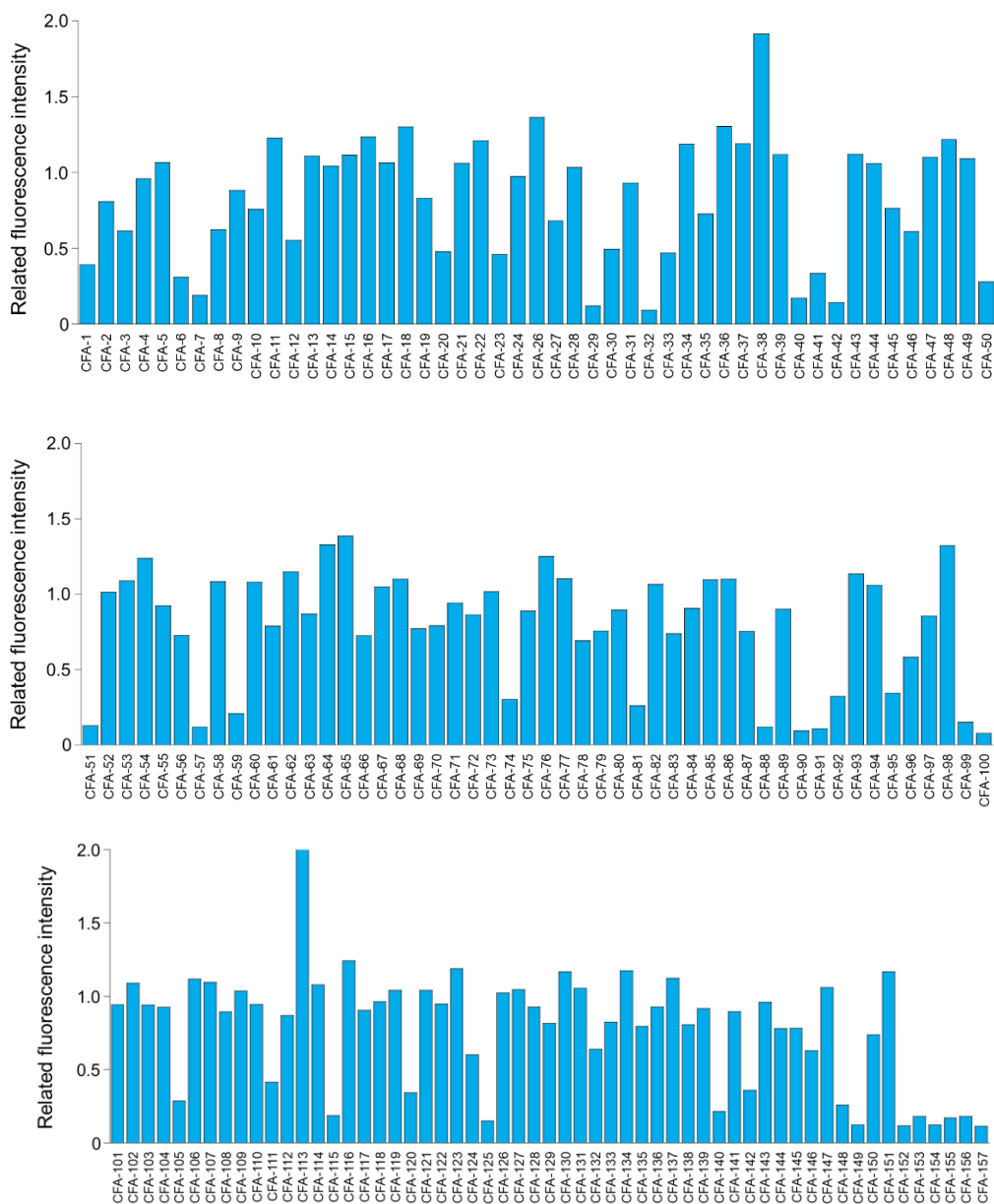


Figure 3-7. Screening of FAO activity screening (n = 2).

結果は Figure 3-7 に示した。スクリーニングにおいて蛍光強度比が ≤ 0.2 となる化合物をヒット化合物として選定した。その結果、20 種類の化合物がヒット化合物として得られ、それらの化合物に関してはさらに共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージングを行い、蛍光強度を定量した。蛍光プレートリーダー測定、及び蛍光イメージングでの定量値をまとめた結果を Table 2-1 に示す。プレートリーダーを用いたスクリーニングでヒット化合物として得られた化合物に関してイメージングを行ったところ、いくつかの化合物に関しては蛍光強度が減少せず、擬陽性であることが分かった。また、CFA-91 に関しては蛍光イメージングで明らかな細胞死が見られたためヒット化合物から除外した。さらに、蛍光プレートリーダー測定において、いくつかのヒット化合物に関しては CA 体との相関を調べた。その結果を Figure 3-8 に示す。多くの化合物では CA/CFA の両化合物で阻害活性が見られた。その一方で、CFA-100 においては、CFA 体でプローブの蛍光強度を抑える良好な結果を示したが、CA 体に関しては、**probe2** の蛍光強度の抑えず、擬陽性であることが示唆された。

probe2 の蛍光を抑制する化合物に関しては CFA-51、57、90 のように、反応基側から見てパラ位にエーテルを有しているなど、構造に共通性が見られたものもあった。特にピペリジン骨格を持つ CFA-154、ピペラジン骨格を持つ CFA-157 に関してはプレートリーダー測定、蛍光イメージングから良好な結果が得られたため、これらの化合物に関してさらに検討していくこととした。

Table 2-1. Summary of hit compound of FAO activity screening

$$R = \text{Cl}-\text{CH}(\text{F})-\text{C}(=\text{O})-$$

No.	structure	Relative fluorescence intensity		No.	structure	Relative fluorescence intensity	
		Plate reader	imaging			Plate reader	imaging
6		0.19	0.39	51		0.13	0.34
29		0.12	0.90	57		0.12	0.81
32		0.092	0.84	90		0.092	0.26
40		0.17	0.98	91		0.106	※ N.D.
42		0.14	0.99	99		0.15	0.62

Table 2-1. Summary of hit compound of FAO activity screening

$R = \text{Cl}-\text{CH}(\text{F})-\text{C}(=\text{O})-$

No.	structure	Relative fluorescence intensity		No.	structure	Relative fluorescence intensity	
		Plate reader	imaging			Plate reader	imaging
100		0.076	0.10	153		0.18	0.31
115		0.19	0.65	154		0.12	0.11
125		0.15	0.95	155		0.12	0.79
149		0.12	0.47	156		0.18	0.34
152		0.12	1.01	157		0.19	0.06

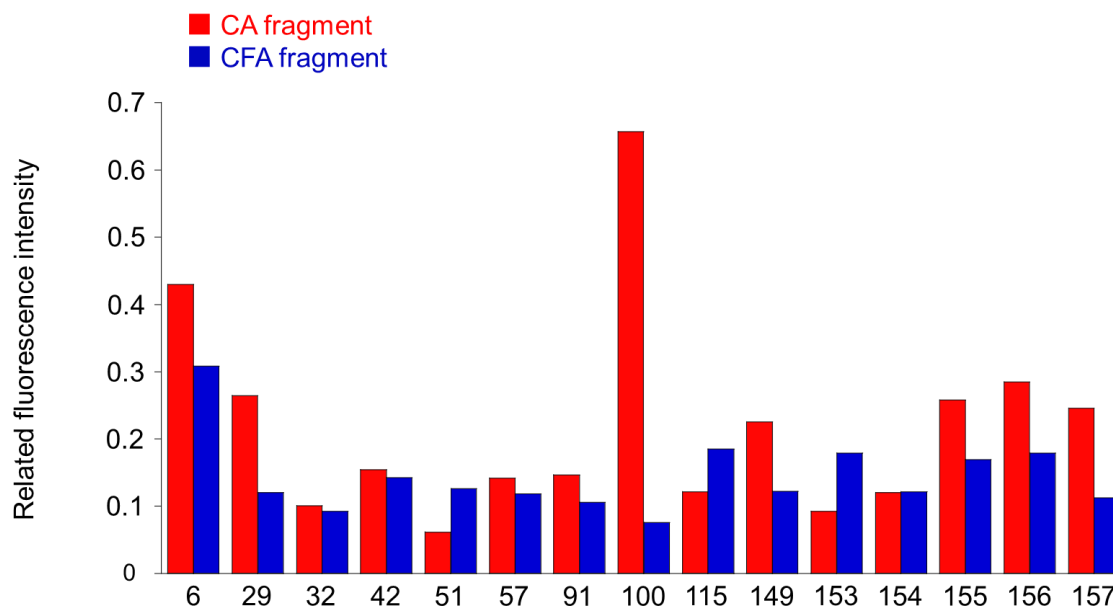


Figure 3-8. Screening of FAO activity by CA/CFA fragments. [CA fragment compound] = 1 μ M, 3 hr, [CFA fragment compound] = 10 μ M, 24 hr (n = 2).

3-4. ピペラジン・ピペリジン化合物の標的タンパク質に対する結合性

スクリーニングによりヒット化合物として得られたピペラジン・ピペリジン骨格を持つフラグメント化合物である CFA-154 及び 157 は、反応基として CFA 基を有し、標的タンパク質と共有結合を形成することで β 酸化を阻害していると考えられる。そこで実際に共有結合を形成することで、蛍光プローブの蛍光を抑えるかどうかを確かめることとした。CFA-154/157 と同様のリガンド骨格を持ち、反応基の位置を CFA 基から Ac 基に変更した、共有結合を形成しない化合物である Ac-154/157 を合成し、CFA-154/157 との間の β 酸化に対する影響を比較した。

Reaction condition

HepG2 cells, [CFA fragments] = 0.1~50 μ M, 24 hr, [Ac fragment] = 1~50 μ M, 24 hr, [probe2] = 5 μ M, 2 hr, 37 °C, 5 % CO₂

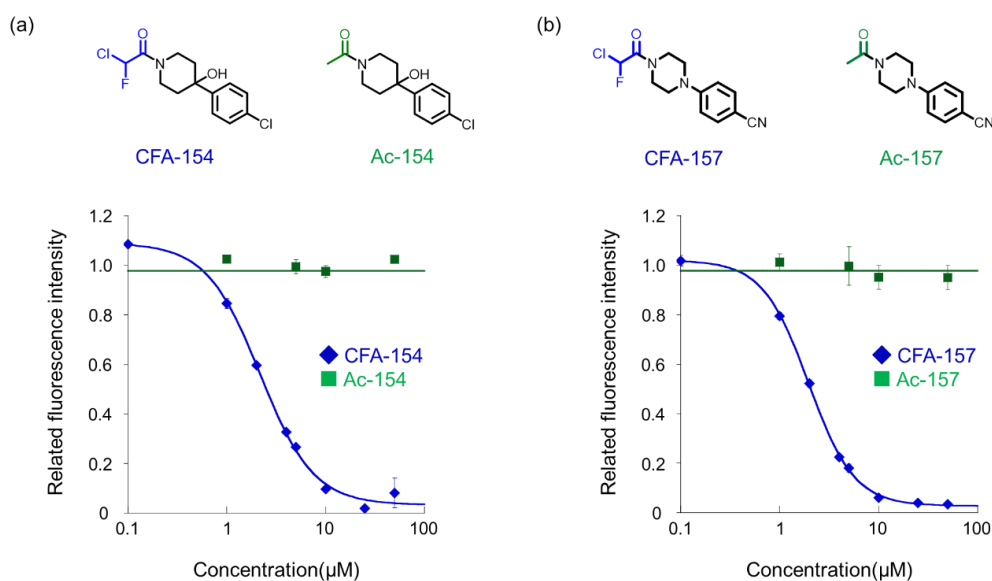


Figure 3-9. Reactivity comparison between CFA group and Ac group. (a). CFA-154 and Ac-154, (b) CFA-157 and Ac-157

結果を Figure 3-9 に示す。CFA-154/157 に関しては、>10 μ M でプローブの蛍光強度を抑えていることが確認された。その一方で、Ac 体に関しては 50 μ M の濃度で化合物を添加しても、プローブの蛍光強度の減少は見られなかったことから、CFA 基を反応基として持つ化合物が標的タンパク質と共有結合を形成していることが示唆された。

3-5. CFA-154 及び 157 の細胞毒性評価

先の検討で、CFA-154 や CFA-157 が β 酸化検出用蛍光プローブである **probe2** の蛍光を抑えることが分かった。しかしながら、**probe2** の蛍光を抑える原因が標的タンパク質の阻害によるものではなく、細胞死によるものであることも考えられる。そこで、細胞増殖阻害アッセイを行うことにより、フラグメント化合物の細胞に対する毒性評価を行った。評価方法は WST (water soluble tetrazolium) 試薬を用いて行い、阻害剤の各濃度における吸光度をモニターすることで化合物の毒性を調べた。

結果を Figure 3-10 に示した。CFA-154 及び 157 の両化合物で高濃度 (50 μ M) でも細胞増殖を阻害しなかったことから、フラグメント化合物が細胞毒性を与えることなく、タンパク質の機能を阻害することにより β 酸化を抑制していることが示唆された。また、前章での反応性の検討から、CFA-154 や 157 は $-\log(k)$ 値が小さく CFA 化合物の中でも反応性が高い傾向を示したが、細胞毒性は示さないことから、CFA 化合物のフェノタイプスクリーニングにおける有用性を示す結果が得られた。

Reaction condition

HepG2 cells, [CFA fragments] = 0.01~50 μ M, 72 hr in DMEM (FBS(+)), 37 °C, 5 % CO₂

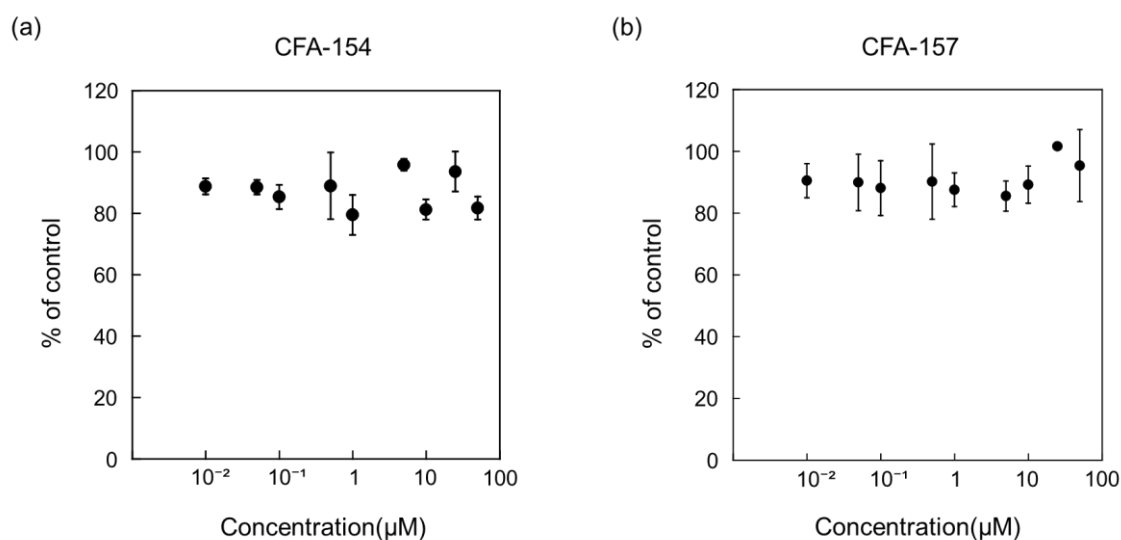


Figure 3-10. WST assay of CFA fragments. (a). CFA-154, (b). CFA-157

3-6. ピペラジン・ピペリジン骨格を持つ化合物の合成・評価

前の検討から、ピペラジン・ピペリジン骨格を持つ化合物が、生細胞での共有結合を形成することで β 酸化を阻害していることが示唆されたため、これらの骨格を持つ化合物を複数合成し、**probe2** に対する阻害活性を調べることで活性の向上を試みた。評価方法としては、HepG2 細胞に対して 0.1~50 μ M の CFA 化合物を添加し、各濃度での **probe2** の蛍光強度比を算出した。また縦軸に各濃度の蛍光強度比、横軸に化合物濃度を取り、以下に示す式にフィッティングすることで各化合物の IC_{50} を算出した。

$$y = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / 1 + (x / IC_{50})^n$$

x: 阻害剤の濃度 y: 濃度 x の時の酵素活性

$y_{\min}$: y の最小値 $y_{\max}$: y の最大値 n: 変化する部分の傾き

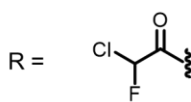
結果を Table 2-2 にまとめた。ほとんどの化合物で IC_{50} が 2~8 μ M で推移した。また、パラ位に CN 基を導入した CFA-157 に関しては高い阻害活性を示したが、ピペラジンとベンゼンの間にメチレンを挟んだ化合物 CFA-171 については大幅に阻害活性が低下した。さらにパラ位にアルキル鎖を導入した CFA-172 に関しても同様に阻害活性を示さなかったことから、パラ位には大きな置換基は導入できないことが示唆された。また、ピペラジン骨格をホモピペラジン骨格に変更した CFA-172 に関しても阻害活性が低下した。

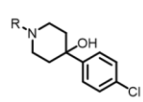
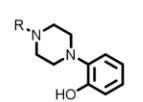
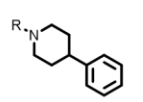
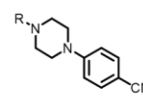
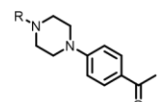
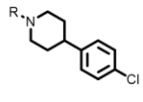
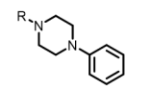
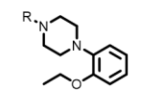
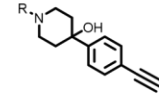
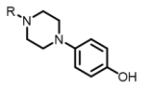
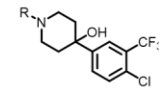
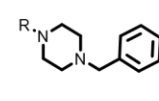
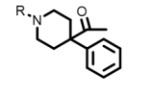
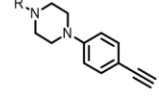
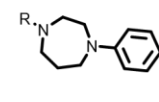
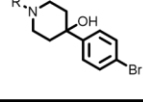
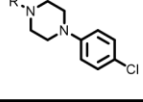
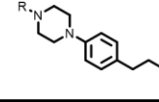
結論としてピペラジン・ピペリジン誘導体をいくつか合成したが顕著な阻害活性の増加は見られず、単純な置換基の導入では阻害活性は大きく変化しないことが分かった。これらの誘導体の中で、良好な阻害活性を示したピペリジン骨格を有する CFA-154 やピペラジン骨格を有する CFA-157 については β 酸化との関係性を調べるためにさらなる検討を行うこととした。

Reaction condition

HepG2 cells, [CFA fragments] = 0.1~50 μ M, 24 hr, [**probe2**] = 20 μ M, 2 hr, 37 °C, 5 % CO₂

Table 2-2. Summary of hit compounds of FAO activity screening (n = 3)

$R =$


No.	structure	IC ₅₀ (μ M)	No.	structure	IC ₅₀ (μ M)	No.	structure	IC ₅₀ (μ M)
154		2.17 $\pm$ 0.16	162		3.66 $\pm$ 0.31	168		6.59 $\pm$ 0.26
157		1.96 $\pm$ 0.04	163		4.26 $\pm$ 0.64	169		7.66 $\pm$ 2.19
158		4.44 $\pm$ 0.39	164		6.91 $\pm$ 0.64	170		1.94 $\pm$ 0.16
159		5.75 $\pm$ 1.02	165		3.8 $\pm$ 0.3	171		>20
160		7.26 $\pm$ 0.71	166		1.82 $\pm$ 0.1	172		>20
161		5.16 $\pm$ 0.42	167		3.66 $\pm$ 1.41	173		>20

3-7. CFA-154/157 添加時の probe2 の代謝挙動解析

ピペリジン骨格を持つ CFA-154 及びピペラジン骨格を持つ CFA-157 が **probe2** の蛍光を抑えることが分かったため、HPLC を用いて CFA 化合物を添加時の **probe2** の代謝挙動を追った。実験方法としては CFA 化合物を添加後に **probe2** を細胞に添加し、破碎した細胞の溶解液を HPLC で分析することにより、 β 酸化が阻害されているかを確認した。各ピークに関しては ESI-TOF-MS により化合物の構造の同定を行った。

結果を Figure 3-11 に示した。 β 酸化関連酵素である CPT1 の inhibitor として知られる etomoxir を添加したサンプルでは β 酸化が進行せず、脂肪酸の炭素数が C9 のままであった。その一方で、CFA-154 及び 157 を添加したサンプルに関しては β 酸化を受けたプローブのピークは見られたものの強度は小さく、さらに最終産物であるクマリンのピークが見えないことから、各フラグメント化合物がスクリーニング時に **probe2** の蛍光強度を抑制する結果と一致することが分かった。

Reaction condition

HepG2 cells, [etomoxir, CFA-154, CFA-157] = 10 μ M, 24 hr, [**probe2**] = 20 μ M, 2 hr, 37 °C, 5 % CO₂

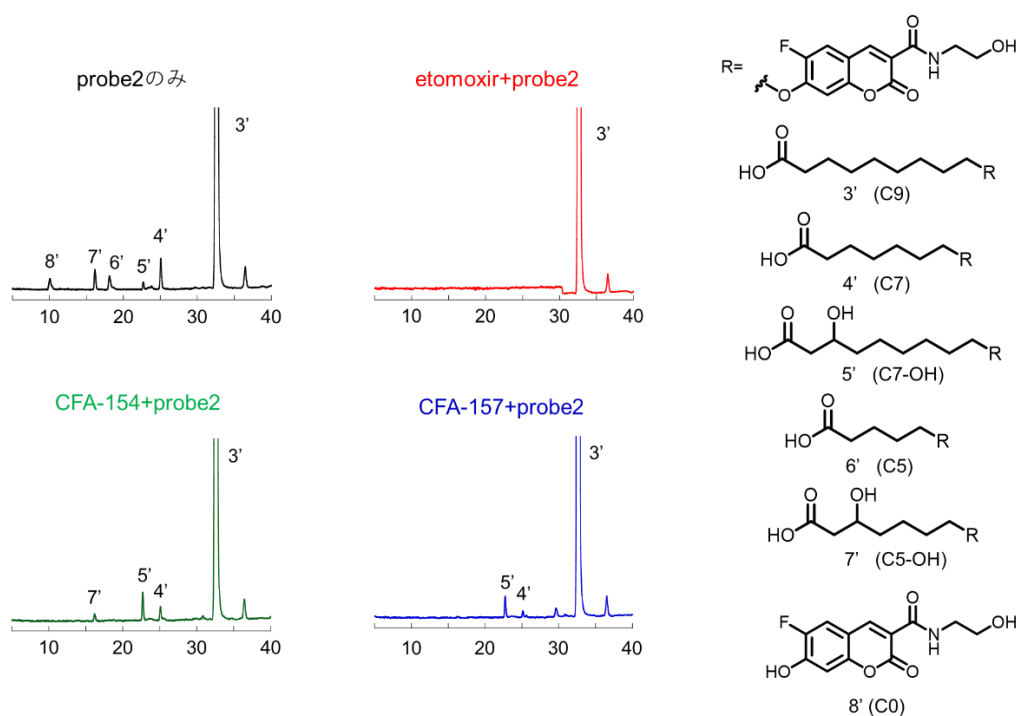


Figure 3-11. HPLC analysis of **probe2** metabolites with FAO inhibitor in HepG2 cells.

3-8. まとめ

本節では既存の β 酸化阻害剤に代わる、CFA 基を反応基とした共有結合型阻害剤の開発を目指し阻害剤スクリーニングを行った。当研究室で合成した約 150 種類の CFA フラグメント化合物を用いて β 酸化検出用蛍光プローブである **probe2** の蛍光強度を抑えるヒット化合物を探索したところ、ピペリジン・ピペラジン骨格を持つ CFA-154/157 を候補化合物として見出した。また、WST assay から CFA-154/157 は細胞に大きな毒性を与えず、反応基を CFA 基から Ac 基に変更した化合物である Ac-154/157 を評価したところ高濃度 (50 μ M) でも **probe2** の蛍光強度を抑制しなかったことから、見出した候補化合物は何らかのタンパク質共有結合を形成することで、 β 酸化の機能を抑制していることが分かった。さらに、HPLC を用いた代謝挙動の追跡を行ったところ、最終産物であるヒドロキシクマリンのピークが観察されなかったことから、CFA-154 及び 157 は β 酸化を抑制する機構が働いていることが分かった。

3-9. 実験項

CA/CFA-Screening

HepG2 cells (1×10^4 cells) were cultured on 96 well black plate (Thermo) for 2 days at 37 °C in CO₂ incubator. twice. After washing with DMEM (FBS(-)) (wako) (100 µL) twice, CA fragment (1 µM) / CFA fragment (50 µM) was preincubated in 200 µL DMEM(FBS(-)) for 3 h (CA fragment)/ 24 h (CFA fragment). After removing DMEM (FBS(-)), **probe2** (5 µM) was added in DMEM(FBS(-))(200 µL). The cells were incubated for 1 h (CA fragment) or 2 h (CFA fragment) and evaluated with plate reader (n = 2).

FAO activity assay

HepG2 cells (1×10^4 cells) were cultured on 96 well black plate (Thermo) for 2 days at 37 °C in CO₂ incubator. After washing with DMEM (FBS(-)) (wako) (100 µL) twice, CFA or Ac fragment (0.1~50 µM) was preincubated in 200 µL DMEM(FBS(-)) for 24 h. After removing DMEM (FBS(-)), **probe2** (5 µM) was added in DMEM(FBS(-))(200 µL) for 2 h and evaluated with plate reader (n = 3).

Cell proliferation assay (water soluble tetrazolium assay)

HepG2 cells were seeded into 96-well plates (IWAKI). The following day, inhibitors were added to the culture medium at the different concentrations. After incubation for 72 h at 37 °C, 15 µL of Cell Count Reagent SF (Nacalai tesque) were added to each well, and the cells were further incubated for several hours. Absorbance at 450 nm was measured with EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer). Triplicate wells were tested at each inhibitor concentration. The IC₅₀ value for the inhibitor was calculated from survival curve of the cells.

HPLC analysis of probe2 metabolites with inhibitors in HepG2 cells.

HepG2 cells were cultured on 6 cm dish (NEST) for 3 days at 37 °C in CO₂ incubator. After washing with HBS(+) buffer (pH = 7.4) twice, the cells were preincubated with inhibitors in 4 mL HBS(+). **probe2** (20 µM) were incubated for 2 h at 37 °C in 2 mL HBS, followed by the collecting of the HBS(+). The cells were lysed by RIPA buffer (50 µL) on an ice bath. After placing the dish for 10 min, MeOH (300 µL) was added and insoluble stuff was removed by centrifugation (17000 rcf, 10 min, 4 °C). The combined solution of the cell lysate (350 µL) and the HBS(+) was subjected to HPLC analysis (YMC-Triart C18, 250 × 10 mmI.D., Flow rate: 1.0 mL/min, mobile phase gradient: CH₃CN (0.1% TFA) / H₂O (0.1% TFA) = 20/80 → 70/30 linear gradient over 60 min, Detection wavelength: 350 nm, Compound

identification of each peak was performed with ESI-TOF-MS (Bruker micrOTOF II).

Synthetic Procedures

Piperazine derivative

2-chloro-2-fluoro-1-(4-phenylpiperazin-1-yl)ethan-1-one (CFA-158)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.28 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 6.91 (t, $J = 7.75$ Hz, 3H), 6.49 (d, $J_{(H-F)} = 50.5$ Hz, 1H), 3.80-3.78 (m, 4H), 3.23-3.20 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ : 161.8 (d, $J_{(C-F)} = 22.7$ Hz), 150.7, 129.3, 120.9, 116.8, 94.2 (d, $J_{(C-F)} = 259.6$ Hz), 49.5, 49.3, 45.4×2 , 42.7

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{ClFN}_2\text{O}$ 257.0851; found 257.0863

$[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClFN}_2\text{ONa}$ 279.0671; found 279.0683

2-chloro-2-fluoro-1-(4-(4-hydroxyphenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-one (CFA-159)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.96 (d, $J_{(H-F)} = 49.5$ Hz, 1H), 6.85-6.84 (m, 2H), 6.70-6.67 (m, 2H), 3.74-3.71 (m, 2H), 3.65 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.28-3.26 (m, 2H), 3.04-3.00 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ : 162.8 (d, $J_{(C-F)} = 23.9$ Hz), 152.1, 144.2, 119.3, 115.3, 91.5 (d, $J_{(C-F)} = 248.2$ Hz), 51.0, 50.8, 45.3, 42.5

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{Na}$ 295.0620; found 295.0637

1-(4-acetyl-4-phenylpiperidin-1-yl)-2-chloro-2-fluoroethan-1-one (CFA-160)

Colorless oil. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.40-7.27 (m, 5H), 6.48 and 6.47 (d, $J = 50.5$ Hz, 1H), 4.17-4.10 (m, 1H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.55-3.48 (m, 1H), 3.27-3.19 (m, 1H), 2.53-2.42 (m, 2H), 2.18-1.98 (m, 2H), 1.94 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ : 208.5×2 , 161.7 (d, $J_{(C-F)} = 25.3$ Hz), 140.3, 140.2, 127.8×2 , 126.2, 126.1, 94.4 and 93.8 (d, $J_{(C-F)} = 259.6$ Hz), 54.8, 42.8×2 , 40.2, 33.1, 33.0, 31.7, 31.6, 25.5, 25.4

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClFNO}_2\text{Na}$ 320.0824; found 320.0839

1-(4-(4-bromophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl)-2-chloro-2-fluoroethan-1-one (CFA-161)

White solid. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.45-7.41 (m, 2H), 7.39 and 7.29 (d, $J_{(H-F)} = 49.0$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 4.26-4.24 (m, 1H), 3.73-3.70 (m, 1H), 3.49-3.37 (m, 1H), 3.12-3.04 (m, 1H), 2.01-1.76 (m, 2H), 1.67-1.58 (2H, m)

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.7 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 22.7$ Hz), 131.0, 130.9, 126.5, 126.4, 120.4 $\times 2$, 91.6 and 91.4 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 247.0$ Hz), 41.6, 41.4, 38.8, 38.7, 37.8, 37.6, 37.0, 36.9
HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrClFNO}_2\text{Na}$ 373.9753; found 373.9773

2-chloro-2-fluoro-1-(4-(2-hydroxyphenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-one (CFA-162)

Yellow solid. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.13-7.10 (m, 2H), 6.98-6.96 (m, 1H), 6.90-6.86 (m, 1H), 6.82 (brs, 1 H), 6.52 (d, $J_{\text{(H-F)}} = 51.0$ Hz, 1H), 3.84-3.82 (m 4H), 2.97- 2.92 (m, 4H)

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 161.9 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 22.4$ Hz), 151.2, 137.8, 127.2, 121.4, 120.4, 114.6, 94.4 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 259.4$ Hz), 52.3, 52.1, 46.1 $\times 2$, 43.4

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{Na}$ 295.0620; found 295.0658

1-(4-(4-acetylphenyl)piperazin-1-yl)-2-chloro-2-fluoroethan-1-one (CFA-163)

Yellow solid. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.88 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.55 and 6.45 (d, $J_{\text{(H-F)}} = 51.0$ Hz, 1H), 3.83-3.78 (m, 4H), 3.45-3.39 (m, 4H), 2.51 (s, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 196.5, 161.9 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 22.7$ Hz), 153.5, 130.4, 128.7, 114.1, 94.3 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 258.3$ Hz), 47.5, 47.2, 44.9 $\times 2$, 42.4, 26.2

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{Na}$ 321.0777; found 321.0816

2-chloro-1-(4-(2-ethoxyphenyl)piperazin-1-yl)-2-fluoroethan-1-one (CFA-164)

Yellow oil. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.03-7.00 (m, 1H), 6.94-6.87 (m, 3H), 6.51 (d, $J_{\text{(H-F)}} = 51.0$ Hz, 1H), 4.11-4.07 (m, 2H), 3.83 (t, $J = 4.75$ Hz, 4H), 3.16-3.13 (m, 4H), 1.47 (t, $J = 6.75$ Hz, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 161.9 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 21.9$ Hz), 151.6, 140.3, 123.6, 121.1, 118.5, 112.5, 94.2 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 258.6$ Hz), 63.7, 50.5, 50.2, 45.8, 45.8, 43.0, 15.0

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{Na}$ 323.0933; found 323.0928

2-chloro-1-(4-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl)-2-fluoroethan-1-one (CFA-165)

White solid. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.83 (s, 1H), 7.57-7.54 (m, 1H), 7.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 3H), 6.51 and 6.50 (d, $J_{\text{(H-F)}} = 51.0$ Hz, 1H), 4.52-4.49 (m, 1H), 4.14-4.03 (m, 1H), 3.69-3.62 (m, 1H), 3.29-3.22 (m, 1H), 2.09-2.03 (m, 2H), 1.90 (brs, 1H), 1.86-1.82 (m, 2H)

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 161.8 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 23.9$ Hz), 146.4, 146.3, 131.7, 131.6, 129.1, 128.7, 128.5, 128.2, 124.0 $\times 2$, 123.9 $\times 2$, 121, 94.6 and 93.7 (d, $J_{\text{(C-F)}} = 259.6$ Hz), 71.2, 41.5 $\times 2$, 41.4, 39.0, 38.4, 38.3, 37.6, 37.5

HRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{14}H_{13}Cl_2F_4NONa$ 396.0152; found 396.0195

2-chloro-1-(4-(4-ethynylphenyl)piperazin-1-yl)-2-fluoroethan-1-one (CFA-166)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.42-7.40 (m, 2H), 6.85-6.83 (m, 2H), 6.50 (d, $J_{(H-F)} = 50.5$ Hz, 1H), 3.83-3.78 (m, 4H), 3.31-3.26 (m, 4H), 3.01 (s, 1H)

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 161.9 (d, $J_{(C-F)} = 22.7$ Hz), 150.5, 133.3, 115.7, 113.4, 94.4 (d, $J_{(C-F)} = 258.3$ Hz), 83.8, 76.0, 48.5, 48.3, 45.1×2 , 42.5

HRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{14}H_{14}ClFN_2ONa$ 303.0671; found 303.0676

2-chloro-1-(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)-2-fluoroethan-1-one (CFA-167)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.24-7.22 (m, 2H), 6.86-6.84 (m, 2H), 6.55 and 6.45 (d, $J_{(H-F)} = 50.5$ Hz, 1H), 3.83-3.78 (m, 4H), 3.22-3.17 (m, 4H)

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 161.8 (d, $J_{(C-F)} = 22.4$ Hz), 149.3, 129.2, 125.9, 118.1, 94.4 (d, $J_{(C-F)} = 259.4$ Hz), 49.5, 49.3, 45.3, 45.2, 42.6

HRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{12}H_{13}Cl_2FN_2ONa$ 313.0281; found 313.0291

2-chloro-2-fluoro-1-(4-phenylpiperidin-1-yl)ethan-1-one (CFA-168)

Yellow oil. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.32 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.24-7.19 (m, 3H), 6.52 (d, $J_{(H-F)} = 51.0$ Hz, 1H), 4.68-4.65 (m, 1H), 4.69-4.66 (m, 1H), 4.23-4.21 (m, 1H), 3.25-3.16 (m, 1H), 2.82-2.76 (m, 2H), 1.94 (d, $J = 13.0$ Hz, 2H), 1.79-1.61 (m, 2H)

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 161.7 (d, $J_{(C-F)} = 21.4$ Hz), 144.7, 144.6, 128.7, 126.7, 94.4 and 93.9 (d, $J_{(C-F)} = 259.6$ Hz), 46.11, 46.1×2 , 46.0×2 , 43.7×2 , 42.4, 33.5, 33.2, 32.7, 32.6

HRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{13}H_{15}ClFNONa$ 278.0718; found 278.0736

2-chloro-1-(4-(4-chlorophenyl)piperidin-1-yl)-2-fluoroethan-1-one (CFA-169)

White solid. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.13 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz), 6.512 and 6.510 (dd, $J_{(H-F)} = 51.0$ Hz, 1H), 4.69-4.66 (m, 1H), 4.23-4.21 (m, 1H), 3.25-3.16 (m, 1H), 2.82-2.76 (m, 2H), 1.94 (d, $J = 13.0$ Hz, 2H), 1.79-1.61 (m, 2H)

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 161.7 (d, $J_{(C-F)} = 22.4$ Hz), 143.0×2 , 140.3, 132.4, 128.8, 128.1, 95.2 and 93.9 (d, $J_{(C-F)} = 259.6$ Hz), 46.0×2 , 45.9×2 , 43.6, 41.9, 33.4, 33.2, 32.7, 32.5

HRMS (ESI) m/z $[M+Na]^+$ calcd for $C_{13}H_{14}Cl_2FNONa$ 312.0329; found 312.0347

2-chloro-1-(4-(4-ethynylphenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl)-2-fluoroethan-1-one (CFA-170)

Yellow oil. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.43 (dd, $J = 8.5, 3.0$ Hz), 6.519 and 6.508 (d, $J_{(H-F)} = 51.0$ Hz, 1H), 4.50-4.48 (m, 1H), 4.10-3.99 (m, 1H), 3.69-3.62 (m, 1H), 3.29-3.23 (m, 1H), 3.08 (s, 1H), 2.10-2.01 (m, 2H), 1.85-1.83 (m, 2H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 161.8 (d, $J_{(C-F)}=22.7$ Hz), 147.6, 132.4, 131.8, 126.2, 124.4, 121.5, 116.2, 94.7 and 93.8 (d, $J_{(C-F)}=259.6$ Hz), 83.1, 71.4, 41.7, 41.6 $\times$ 2, 39.1, 38.4, 38.3, 37.6, 37.5

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for 318.0668; found 318.0713

1-(4-(4-acetylphenyl)piperazin-1-yl)-2-chloro-2-fluoroethan-1-one (CFA-171)

Yellow solid. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.31-7.22 (m, 4H), 6.52 (d, $J_{(H-F)} = 49.0$ Hz, 1H), 3.62-3.52 (m, 6H), 2.52-2.46 (m, 4H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 161.7 (d, $J_{(C-F)} = 22.7$ Hz), 129.2, 128.5, 127.6, , 94.1 (d, $J_{(C-F)} = 258.3$ Hz), 62.6, 52.5, 52.3, 45.3 $\times$ 2, 42.6

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₁₇ClFN₂O 271.1008; found 271.0988

[M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₁₆ClFN₂ONa 293.0827; found 293.0801

2-chloro2-fluoroethan-1-(4-phenyl-1,4-diazepan-1-yl)ethan-1-one (CFA-172)

Yellow solid. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.25-7.22 (m, 2H), 6.73-6.70 (m, 3H), 6.50 and 6.39 (d, $J_{(H-F)} = 44.5$ Hz, 1H), 3.95-3.38 (m, 10 H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 163.2 and 163.1 (d, $J_{(C-F)} = 35.3$ Hz), 147.2, 146.7, 129.8, 129.7, 117.0, 112.0, 111.8, 112.0, 111.8, 94.0 and 93.5 (d, $J_{(C-F)} = 258.3$ Hz), 50.9, 48.8, 48.1, 47.5, 47.4, 47.0 $\times$ 2, 46.8, 46.7, 46.3, 26.8, 23.9

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₁₆ClFN₂ONa 293.0827; found 293.0828

1-(4-(4-butylphenyl)piperazin-1-yl)-2-chloro-2-fluoroethan-1-one (CFA-173)

Brown solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.11 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.88-6.86 (m, 2H), 6.52 (d, $J_{(H-F)} = 51.0$ Hz, 1H), 3.81-3.79 (m, 4H), 3.22-3.17 (m, 4H), 2.55 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.61-1.55 (m, 2H), 1.38-1.33 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 161.8 (d, $J_{(C-F)} = 22.7$ Hz), 148.7, 135.6, 129.4, 129.2, 129.0, 117.0, 116.8, 94.0 (d, $J_{(C-F)} = 258.3$ Hz), 49.9, 49.7, 45.5, 45.4, 42.8, 34.8, 33.8, 22.4, 14.0

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₆H₂₂ClFN₂ONa 335.1297; found 335.1316

1-4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl)ethan-1-one (Ac-154)

White solid. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.42-7.39 (m, 2H), 7.35-7.32 (m, 2H), 4.59-4.56 (m, 1H), 3.73-3.70 (m, 1H), 3.62-3.57 (m, 1H), 3.09-3.05 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.02-1.91 (m, 2H), 1.90-1.74 (m, 2H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 168.9, 146.2, 133.3, 128.7, 126.0, 42.6, 38.9, 37.8, 37.6, 30.9, 21.4

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₁₆ClNO₂Na 276.0762; found 276.0746

4-(4-acetylpiperazin-1-yl)benzonitrile (Ac-157)

White solid. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.54-7.51 (m, 2H), 6.88-6.85 (m, 2H), 3.78 (t, J = 5.25 Hz, 2H), 3.38-3.32 (m, 4H), 2.15 (s, 3H)

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 169.1, 153.0, 133.6, 119.7, 114.5, 101.2, 47.3, 47.1, 45.6, 40.8, 21.3

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{ONa}$ 252.1107; found 252.1122

4. 参考文献

1. M. G. Vander Heiden, et. al. *SCIENCE*, **2009**, *324*(22), 1029
2. U. E. Martinez-Outschoorn, et. al. *Nat. Rev. Clin.*, **2017**, *14*, 11
3. J. Yin, et. al. *Anal. Chem.*, **2021**, *93*, 2072
4. J. Zhang, et. al. *Dyes Pigm.*, **2022**, *198*, 10999
5. X.-F. Zhai, et al. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, **2022**, *364*, 131826
6. K. Bartlett, et al. *Eur. J. Biochem.*, **2004**, *271*, 462
7. K. G. Sim, et al. *Clin. Chim. Acta.*, **2002**, *323*, 37
8. K. S. Roser, et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 1441
9. S. Uchinomiya, et al. *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 3023
10. S. M. Houten, et al. *J Inherit Metab Dis.*, **2010**, *33*, 469
11. M. Chegary, et al. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*, **2009**, *1791*, 806
12. J. A. Kennedy, et al. *Cardiovasc Drugs Ther.*, **1998**, *12*, 359
13. J. G. McCormack, et al. *Gen. Pharmac.*, **1998**, *5*(30), 639
14. A. S. Divakaruni, et al. *Cell Metab.*, **2018**, *28*, 490
15. C. Yao, et al. *PLOS Biol.*, **2018**, *16*(3), e2003782.
16. W. C. Sun, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 3107
17. A. Blicher, et al. *Biophys. J.*, **2009**, *96*, 4581
18. G. Harrimana, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2016**, *113*, E1796
19. M. M. Adeva-Andany, et al. *Mitochondrion*, **2019**, *46*, 73
20. J. Han, et al. *K. Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2709
21. Z. Xu, et al. *D. R. Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 1996.
22. H. Kobayashi, et al. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2620
23. M. Vendrell, et al. *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 4391
24. M. Kawaguchi, et al. *J. Med. Chem.*, **2019**, *62*, 9254
25. T. Hirayama, et al. *ACS Sens.*, **2020**, *5*, 2950
26. Jessica L. Counihan, et al. *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*, 197

Chapter 3

Elucidation of inhibiting mechanism of hit compounds by chemical biology approach.

1. ヒット化合物の作用機序解明

1-1. 序

従来、化合物ライブラリーを用いたスクリーニング時に得られたヒット化合物の代謝挙動を追跡する方法として gel-based ABPP やケミカルプロテオミクス解析が広く用いられている。多くの薬剤・生理活性化合物は、標的タンパク質との相互作用によってその機能を発揮するが、複数のタンパク質を標的とすることで薬効を発揮する薬剤が増えており、標的同定は創薬や生物医学研究の分野で重要な役割を果たす (Figure 1-1)⁽¹⁾。そのため、本章では前章で得られた β 酸化を抑制するヒット化合物に関して、先に示した解析手法を用いることで、ヒット化合物の作用機序の解明を行った。

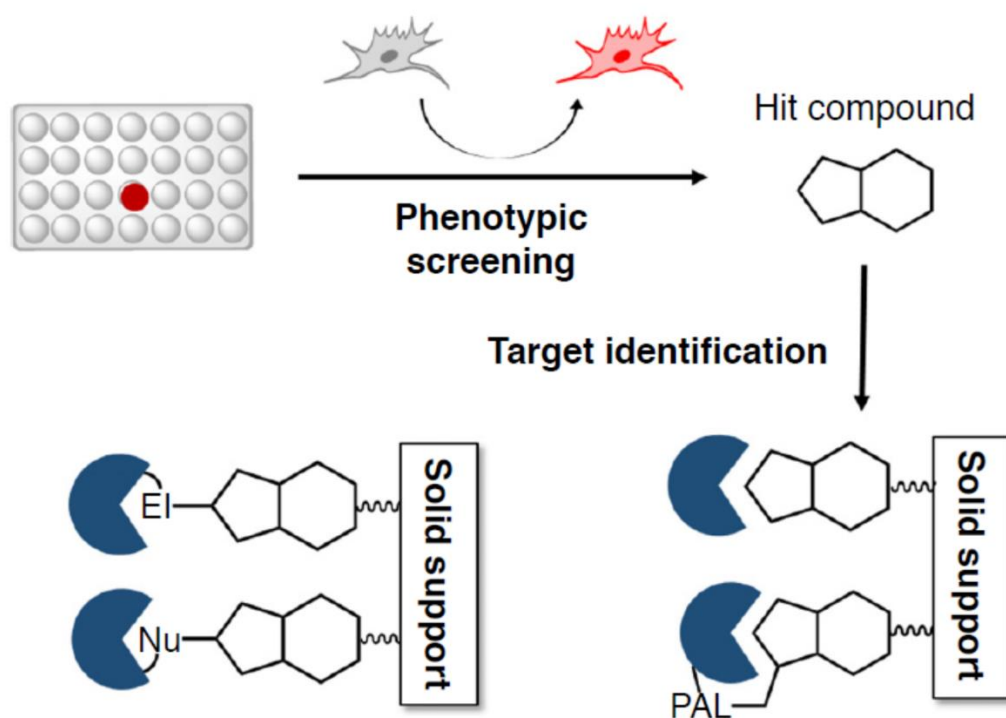


Figure 1-1. Target identification in drug discovery via phenotypic screening.⁽²⁾

1-2. gel-based ABPP によるヒット化合物のラベル化挙動解析

β 酸化は複数の酵素反応を経て 2 炭素ずつ分解される連続反応であり、スクリーニングにより見出した化合物は β 酸化関連酵素のいずれかと反応することでその機能を阻害していることが考えられるが、実際にどのようなタンパク質と結合しているかの選択性に関しては確かめる必要がある。そのため、見出したフラグメント化合物の細胞内におけるラベル化挙動を gel-based ABPP を用いて評価を行った。アルキンを導入したフラグメントである CFA-166、170 を HepG2 細胞に添加した後に、回収した細胞を可溶化し CuAAC を用いて蛍光団を導入し SDS-PAGE で解析を行った。反応条件についてはまず、インキュベーション時間を 24 hr に固定し、化合物濃度を 1~50 μ M とすることでラベル化挙動を追跡した。

Reaction condition

HepG2 cell line, [CFA-166, 170] = 1~50 μ M, 24 hr, 37 °C, 5 % CO₂

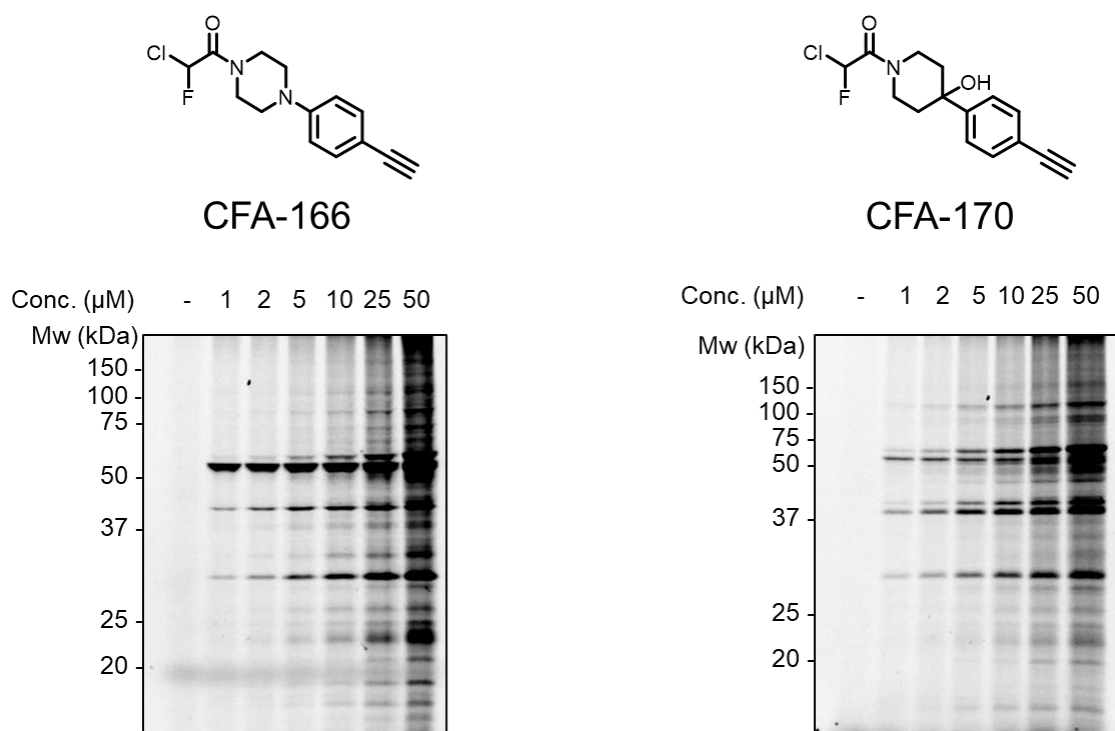


Figure 1-2. Concentration-dependent reactivity profile of CFA-166/170 in HepG2 cells.

結果を Figure 1-2 に示した。CFA-167、170 の両化合物において、低濃度で 50 kDa のタンパク質をラベル化することが分かった。30、40 kDa 付近についても両化合物でラベル化はしているが、50 kDa 付近のタンパク質と比べてラベル化率が低いため、50 kDa のタンパク質がターゲットのタンパク質で β 酸化に影響を及ぼしていることが示唆された。そのため、以降、50 kDa 付近のタンパク質に関して追跡していくことにした。1 μ M の低濃度条件で 50 kDa のタンパク質を十分にラベル化していることを考慮し、この濃度条件を用いて、1~24 hr の経時変化におけるラベル化挙動を追跡した。

結果を Figure 1-3 に示した。両化合物で 1 μ M, 1 hr で 50 kDa 付近のタンパク質を選択的にラベル化していることが確認された。CFA-166 に関しては 1 hr でバンドの蛍光強度が飽和しており、ラベル化がほとんど進行している挙動を示したが、CFA-170 では 6 hr 程度でバンド強度が飽和することから、ピペラジン骨格とピペリジン骨格の間で反応速度に違いがあることが示唆された。また、CFA-170 では長時間インキュベートすると、30 kDa 付近のバンドが濃くなり、CFA-166 よりも非特異反応が進行した。

Reaction condition

HepG2 cell line, [CFA-166, 170] = 1 μ M, 1~24 hr, 37 °C, 5 % CO₂

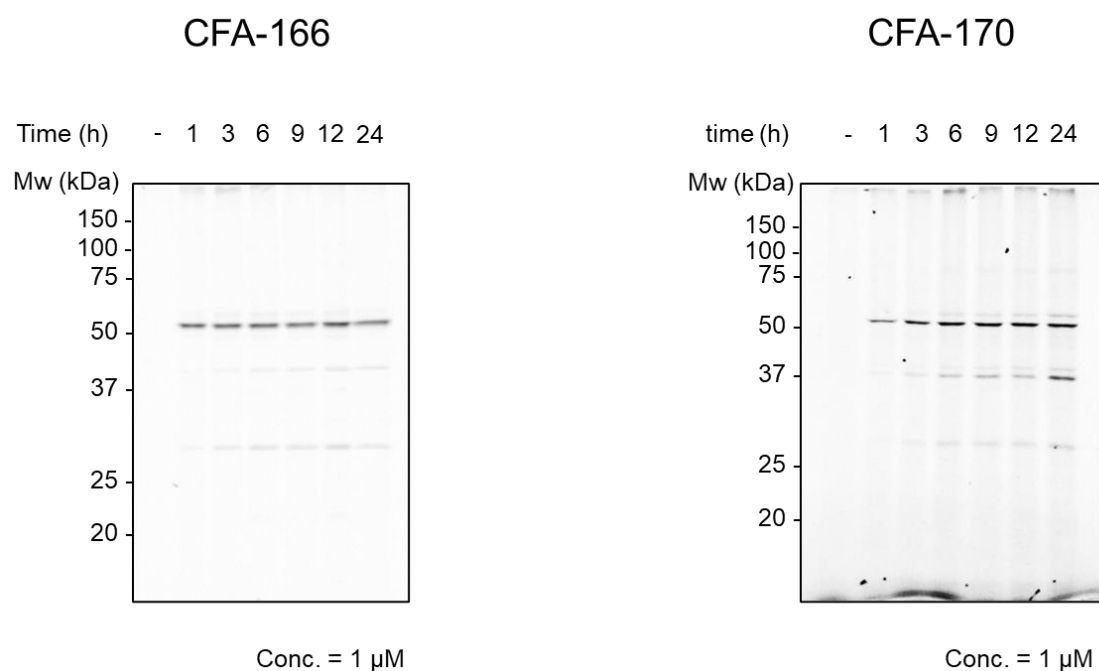


Figure 1-3. Time-dependent reactivity profile of CFA-166/170 in HepG2 cells.

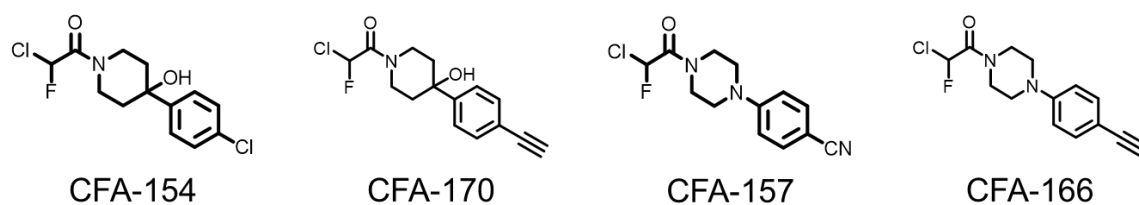
1-3. モデル化合物とアルキンフラグメントとの競合 ABPP

CFA-166 及び 170 は 1 μ M, 1 hr の条件で 50 kDa のタンパク質をラベル化することが分かったが、フラグメント化合物は構造が単純なためアルキンの導入によりプローブの挙動が変化する恐れがある。そのため CFA-170 とそのモデル化合物である CFA-154、CFA-166 とそのモデル化合物である CFA-157 に関して、競合法による ABPP を行うことで検討対象である 50 kDa 付近のタンパク質バンドが消失すること、及び競合させた二つの化合物の間の標的選択性を調べた。

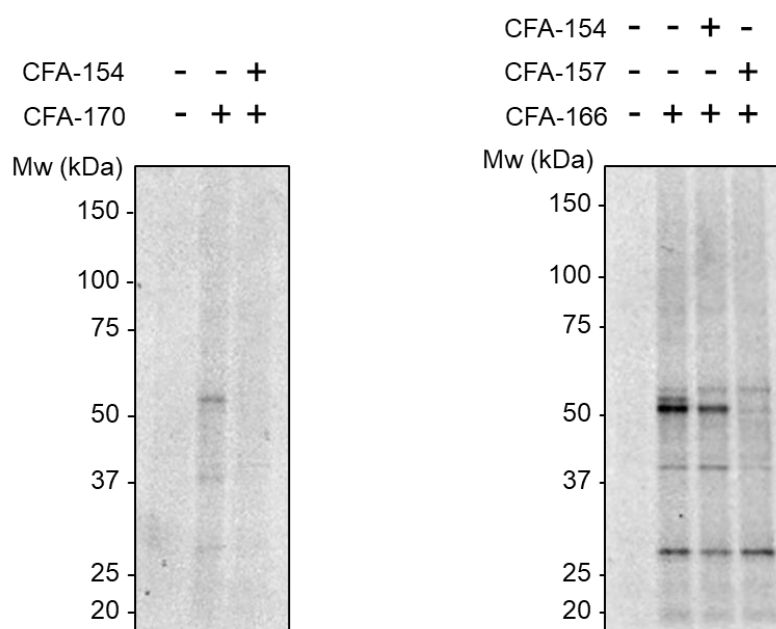
結果を Figure 1-4 に示した。ピペリジン骨格を持つ CFA-154 と CFA-170、ピペラジン骨格を持つ CFA-157 と CFA-166 の化合物を競合させたサンプルで 50 kDa のバンドが消失したことから、2 つのモデル化合物はアルキン体と同様のターゲットタンパク質をラベル化することが分かった。その一方で、ピペラジン骨格とピペリジン骨格の化合物で選択性の違いが見られることも分かった。CFA-170 は 50 kDa 付近の単一のバンドをラベル化しているが、CFA-166 は複数のバンドをラベル化していた。また、(b) については CFA-166 と CFA-154 及び 157 を競合させたゲル画像について 50 kDa 付近のバンドを拡大したものであるが、ピペリジン骨格を持つ CFA-154 とピペラジン骨格を持つ CFA-166 を競合させたサンプルでは、50 kDa 付近にある①のバンドのみが消失しており、CFA-166 で主にラベル化しているバンド②は CFA-154 ではラベル化しなかった。これらの結果から、CFA-154、170 でラベル化している 50 kDa 付近のタンパク質①が β 酸化の阻害に関与していることが示唆され、CFA-166 でラベル化している 30、40 kDa 付近のタンパク質は非特異的にラベル化していることが示唆された。

Reaction condition

HepG2 cell line, [CFA-154, 157] = 10 μ M, 24 hr, [CFA-166, 170] = 10 μ M, 1 hr, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂



(a)



(b)

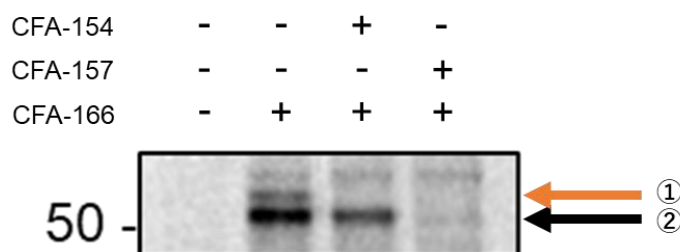


Figure 1-4. Competitive protein labeling in HepG2 cells

1-4. 競合法を用いたケミカルプロテオミクス解析による標的タンパク質の同定

ABPP での検討から、CFA-166 及び CFA-170 が共通の 50 kDa 付近に存在するタンパク質をラベル化している結果が得られた。そのため、このタンパク質が β 酸化に影響を及ぼしていると考え、標的タンパク質を同定するためにケミカルプロテオミクス解析を行った。具体的な手法を Figure 1-5 に示した。アルキンタグを有するフラグメントを添加した細胞ライセートに対して CuAAC により desithiobiotin を導入し、タンパク質の濃縮・サンプル調製を施し、LC-MS/MS 解析を行うことにより、フラグメントによりラベル化されたタンパク質の同定を行うことができる⁽³⁾。また、CuAAC により導入する desithiobiotin はビオチン結合タンパク質に対する結合性がビオチンよりも弱いことが知られ、ビオチンによって容易にかつ穏やかな条件で置換されるビオチン類似体である⁽⁴⁾。そのため、これらの親和性の差を利用して、タンパク質濃縮後に高濃度のビオチンでアビジンビーズとの結合を置換することで、標的タンパク質のみを感度良く検出できることを期待した。

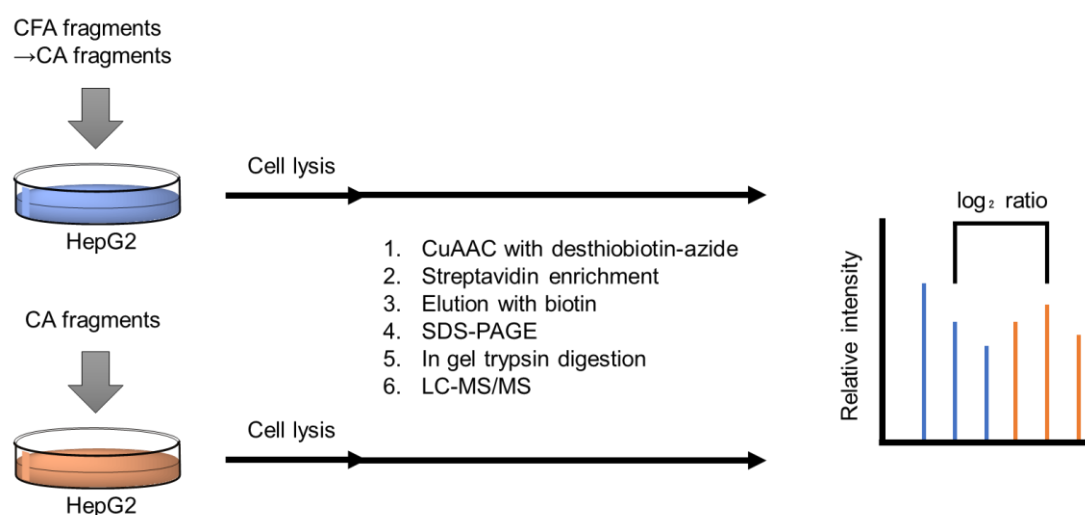


Figure 1-5. Schematic illustration of chemical proteomics analysis.

測定条件に関しては、アルキンフラグメントの非特異反応の影響を考慮し、CFA-154 とそのアルキン体である CA-170 の競合法、及び CFA-157 とアルキン体である CA-166 の競合法を用いて CFA 化合物でラベル化しているタンパク質を調べた。アルキン体として CA 化合物を用いているのは、事前の検討において CFA のアルキン体ではタンパク質が十分に精製されず、反応基による加水分解の影響が考えられたためである。上に示した競合法でケミカルプロテオミクス解析を行うにあたり、まず CFA 化合物と CA 化合物での競合 ABPP を行うことで、50 kDa 付近のバンドの減少が見られるかを確かめた。

Reaction condition

HepG2 cell line, [CFA-154, 157] = 10 μ M, 24 hr, [CA-157] = 1 μ M, 3 hr, [CA-166] = 2 μ M, 3 hr, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂

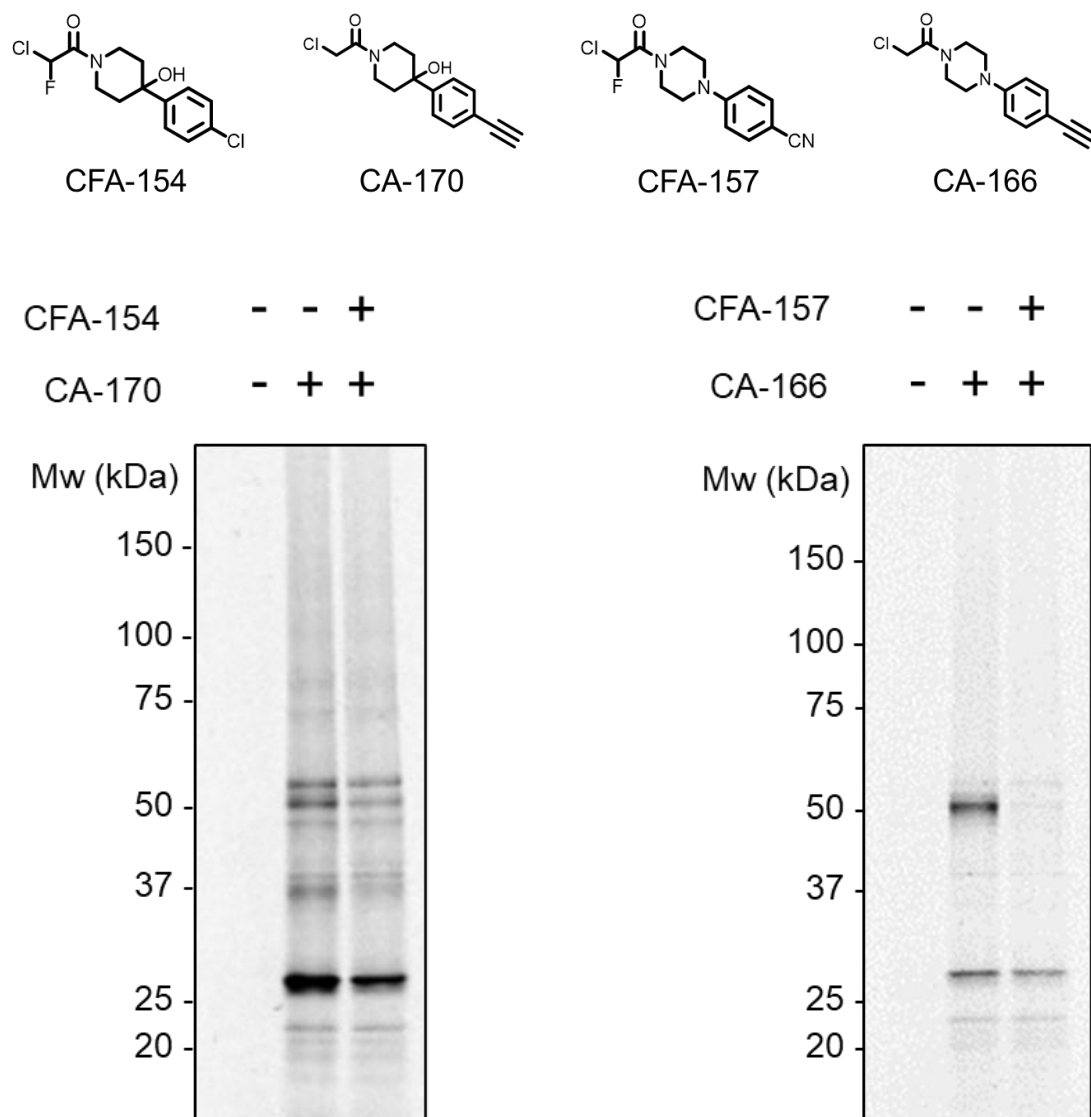


Figure 1-6. Competitive protein labeling in HepG2 cells.

結果を Figure 1-6 に示した。フラグメント化合物の反応条件としては、クマリンプローブを用いたスクリーニングでの検討から、 β 酸化を完全に抑える高濃度・長時間条件 (10 μ M, 24 hr)で行った。CFA-154 と CA-170 の競合ではバンドが完全には消えてはいないが、50 kDa 付近のバンドが薄くなっていることから、CFA 体で標的とするタンパク質をラベル化している挙動を得た。また、CFA-154 と CA-170 の競合では 50 kDa のバンドが消失したため、同一のタンパク質をラベル化していることが分かった。そのため、2 つの化合物を競合させることで、特異的にラベル化しているタンパク質を同定できることが示唆された。

以上の結果を加味し、先での ABPP と同様の条件でケミカルプロテオミクス解析を行った。その結果を Figure 1-7 に示した。横軸がヒットタンパク質数で縦軸がラベル化効率である。本実験は CFA フラグメントでラベル化した後、CA フラグメントをラベル化する競合法であり、 $\log_2$ ratio ($e1/e2$) の値がマイナスのタンパク質は CFA 体でヒットしてきたという意味になる。本実験は 3 回測定を行い、 $\log_2$ ratio 値の平均値をプロットしている。その結果両化合物で proteinX1 が高いスコアでヒットした (CFA-154: -3.30, CFA-157: -4.75)。proteinX は 50 ~ 55 kDa 付近に存在するタンパク質であることが知られている⁽⁵⁾ため、先の gel-based ABPP による 50 kDa 付近の特異的なバンドは proteinX であることが示唆された。また、それぞれの化合物で proteinX に対する選択性は異なり、CFA-154 が proteinX1 を特異的にラベル化する一方で、CFA-157 は proteinX1 及び X2 をラベル化した。一方で、 β 酸化関連酵素は優位にヒットしてきておらず、CFA-157 では 3 回の測定で $\log_2$ ratio ($e1/e2$) の値がマイナスとなったタンパク質はなかった。また CFA-154 では β 酸化関連酵素として、脂肪酸の開裂を触媒する酵素である Trifunctional enzyme subunit beta が $\log_2$ ratio ($e1/e2$) = 0.23 となりマイナスとはなかったが、3 回全ての測定で値がマイナスとはなかった。以上のことから、proteinX が β 酸化の抑制に関与していることが示唆された。

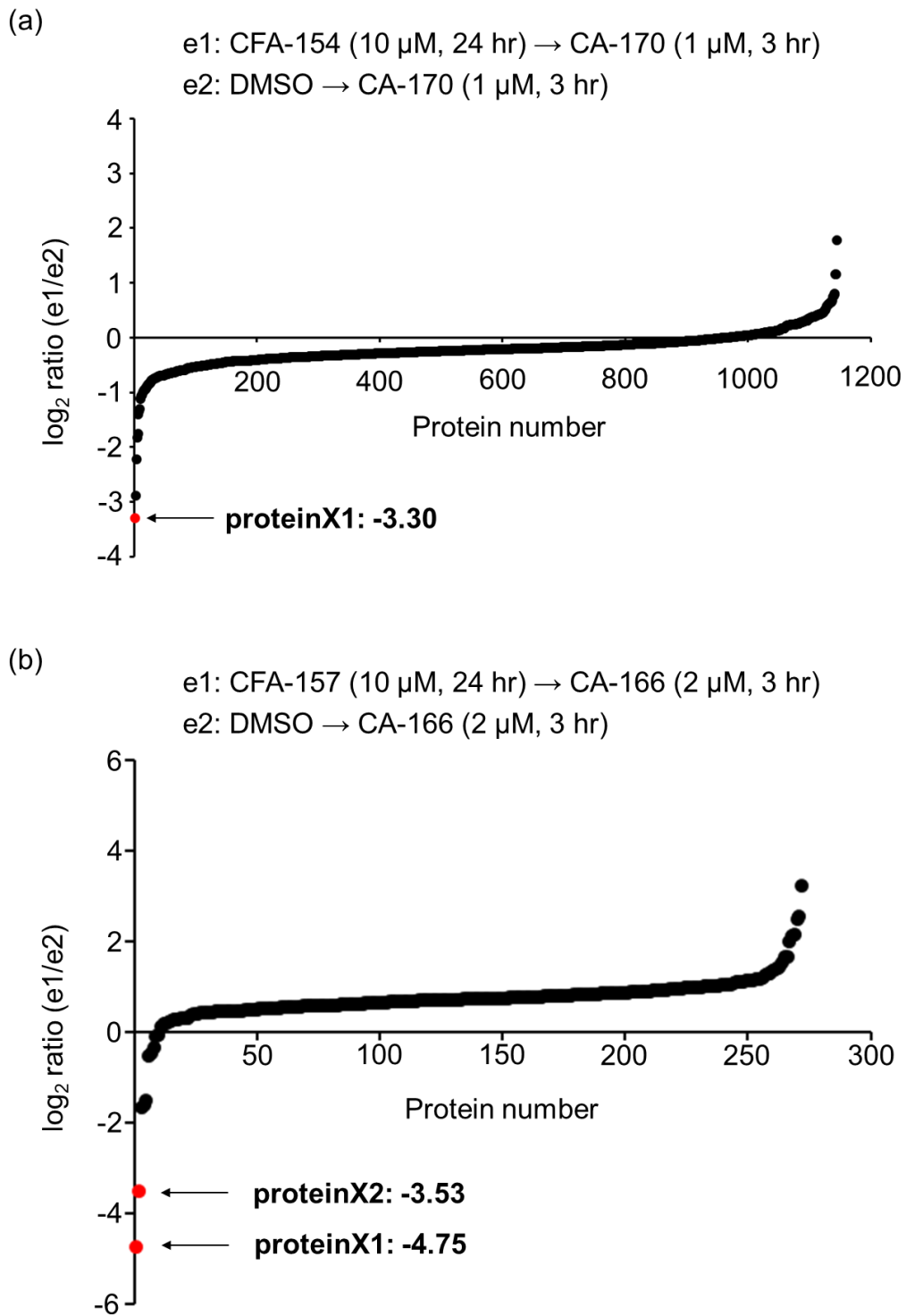


Figure 1-7. Log₂ ratio plots for proteins detected in e1 -versus- e2. (a) e1: CFA-154 (10 μ M, 24 hr) $\rightarrow$ CA-170 (1 μ M, 3 hr), (b). e1: CFA-157 (10 μ M, 24 hr) $\rightarrow$ CA-166 (2 μ M, 3 hr). n = 3

1-5. proteinX1 及び X2 抗体を用いた western blotting

先のケミカルプロテオミクス解析での検討から、CFA-154 では proteinX1 を、CFA-157 は高選択的にラベル化する結果が得られた。そのため、さらなる検証としてプルダウンアッセイを行い western blotting による proteinX の抗体検出を行うこととした。実験方法としてはケミカルプロテオミクス解析の時と同様、タンパク質と結合したフラグメント化合物に対して、CuAAC を用いてビオチンを導入し、ストレプトアビジンビーズとの相互作用を用いてアフィニティー精製を行い目的のタンパク質を溶出した。その後 SDS-PAGE を行い、western blotting により抗体検出を行った。

結果を Figure 1-8 に示した。条件についてはケミカルプロテオミクス解析の時と同様、 β 酸化検出用蛍光プローブである **probe2** の蛍光を抑える濃度・インキュベート時間で行い、CFA-154 と CA-170 の競合に関しては proteinX1 抗体で、CFA-157 と CA-166 の競合については proteinX1 及び X2 抗体で検出を行った。CA 化合物のみでラベル化した 2, 5, 8 のサンプルではバンドが検出されたが、競合をかけたサンプル 3, 6, 9 についてはバンドが見られず、CFA-154 では proteinX1 を、CFA-157 では proteinX1 及び X2 をラベル化していることが分かった。この結果と先のケミカルプロテオミクス解析及び gel-based ABPP の結果から、ヒットとして得られた化合物が proteinX と特異的に共有結合を形成していることが明らかとなった。

Reaction condition

HepG2 cells, [CFA-154] = 10 μ M, 24 hr, [CA-170] = 1 μ M, 3 hr,
[CFA-157] = 10 μ M, 24 hr, [CA-166] = 2 μ M, 3 hr, 37 °C, 5 % CO₂

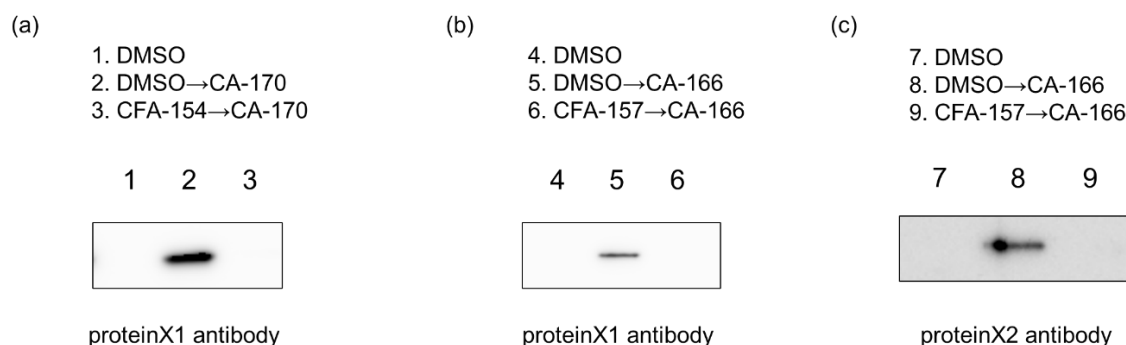


Figure 1-8. Western blotting analysis detecting proteinX1 (a, b) and proteinX2 (c). Proteins were labeled by competition with CFA-154 and CA-157 (a) or CFA-157 and CA-166 (b, c).

1-6. まとめ

β 酸化を検出する蛍光プローブの蛍光を抑える化合物としてピペラジン・ピペリジン骨格を持つフラグメント化合物を見出した。それぞれの骨格の中で β 酸化に対する阻害活性の高い CFA-154/157 に対して、アルキン部位を導入した化合物である CFA-167/170 を合成・評価した。その結果、両化合物は低濃度条件下 (1 μ M) で 50 kDa 付近のタンパク質を特異的にラベル化することが分かった。また、 β 酸化を抑える高濃度・長時間 (10 μ M, 24 hr) の条件においてケミカルプロテオミクス解析及びウェスタンブロッティングを行った。その結果 CFA-154 では proteinX1 が、CFA-157 では proteinX1 及び X2 が高いスコアでヒットした。このことから、50 kDa 付近のタンパク質は proteinX であると考えられ、proteinX が β 酸化に対して影響を及ぼしていることが考えられた。

1-7. 実験項

In cell protein labeling

The HepG2 cells were cultured in a 3.5 or 6 cm or 10 cm dish (NEST or Corning). After the cells were washed with PBS(-) or DMEM (FBS(-)) twice, CFA fragments or DMSO was preincubated in DMEM (FBS(-)). After incubation at 37 °C in a CO₂ incubator for the indicated time, the DMEM (FBS(-)) was aspirated off, alkyne fragments were incubated for any length of time. The cells were washed twice with cold PBS(-) and lysed with cold RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Roche). The cells were lysed on ice over 20 min and then the lysate was centrifuged (17000 × g, 4 °C). The supernatant was retrieved and stored at -30 °C overnight.

Sample processing for in-gel fluorescence analysis

Protein concentrations for each sample were determined using the DC protein assay (BioRad) and then normalized to 1.5 mg/mL in a volume of 42 µL. Click chemistry was performed on each sample using final concentrations of 25 µM TAMRA azide, 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, Sigma-Aldrich), 100 µM Tris [(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl) methyl]amine (TBTA, Sigma-Aldrich) and 1 mM CuSO₄ in a final volume of 50 µL. The samples were incubated for 37 °C for 1 h, followed by addition of 10 µL 5 × SDS loading buffer (with 5 % 2-ME) the samples were incubated at 37 °C for 1 h. The samples (10 µL) were loaded and resolved on a 12 % acrylamide SDS-PAGE gel. The in-gel fluorescence was imaged using ImageQuant800 (Amersham).

Enrichment for proteomic analysis

All lysate samples were treated with prewashed streptavidin resin (10 µL, Thermo) for 1 h at 4 °C and normalized to 2 mg/mL protein. The equal amounts of samples were combined in a 5 mL microfuge tube (total volume 870 µL) and CuAAC reaction was performed with desthiobiotin-PEG3-azide (200 µM, TCI) for 1 h at 37 °C. The excess reagents were removed by CHCl₃ - MeOH precipitation. The protein pellet was air-dried and resuspended in 0.5 mL of buffer solution (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% SDS, pH 7.4) using a probe sonicator in a 5 mL microfuge tube. The suspension was diluted with 4 mL of RIPA buffer and dissolved using a probe sonicator (total volume 4.5 mL). Proteins were enriched over prewashed streptavidin resin (50 µL) for 2 h at 4 °C on a rotator. The resin was sequentially washed with 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 M urea, pH 7.4 (3 mL × 3), 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% SDS, pH 7.4 (3 mL × 3), and 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (3 mL × 3).

The resin was transferred to a 1.5 mL microfuge tube (PROKEEP low protein binding tube, Watson) with 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (0.5 mL $\times$ 2) and the supernatant was removed by centrifugation (2500 g, 5 min). The collected resin was added with 15 μ L RIPA buffer containing 4 mM biotin, and then incubated for 1 h at 37 °C. 5 $\times$ SDS-PAGE loading buffer (20 μ L), and then heated for 5 min at 95 °C. The supernatant was collected by centrifugation (2500 g, 5 min) for in-gel digestion. SDS-PAGE was carried out according to the method described by Laemmli. S2 IP samples were separated partially (~1 cm) using slab gel. Each lane was excised, and the obtained gel pieces were subjected to in-gel tryptic digestion and subsequent MS analysis.

Pull down assay

Lysate samples were prepared as described above for in-cell labeling. All samples were treated with prewashed streptavidin resin (10 μ L, Thermo) for 1 h at 4 °C and normalized to 2 mg/mL protein. The equal amounts of samples were combined in a 5 mL microfuge tube (total volume 850 μ L) and CuAAC reaction was performed with biotin-PEG3-azide (200 μ M, TCI) for 1 h at 37 °C. The excess reagents were removed by CHCl₃ - MeOH precipitation. The protein pellet was air-dried and resuspended in 0.5 mL of buffer solution (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% SDS, pH 7.4) using a probe sonicator in a 5 mL microfuge tube. The suspension was diluted with 4 mL of RIPA buffer and dissolved using a probe sonicator (total volume 4.5 mL). Proteins were enriched over prewashed streptavidin resin (50 μ L) overnight at 4 °C on a rotator. The resin was sequentially washed with 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 M urea, pH 7.4 (3 mL $\times$ 3), 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% SDS, pH 7.4 (3 mL $\times$ 3), and 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (3 mL $\times$ 3). The resin was transferred to a 1.5 mL microfuge tube (PROKEEP low protein binding tube, Watson) with 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (0.5 mL $\times$ 2) and the supernatant was removed by centrifugation (2500 g, 5 min). The collected resin was added with 5 $\times$ SDS loading buffer (with 5 % 2-ME), and then heated for 10 min at 95 °C.

Western Blots

Proteins treated by pull down assay were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes with the semi-dry system (ATTA). The blots were blocked with 5 % skim milk in Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween 20 (TBS-T) solution for 1 h at room temperature, and then washed with TBS-T. The blots were probed overnight at 4 °C with primary antibodies ($\times$ 1000) diluted in 5 % skim milk in TBS-T. Following washes with TBS-T, the blots were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies ($\times$ 5000). Blots were visualized using LAS-4000 lumino image analyzer (FUJIFILM).

Primary antibodies: anti-proteinX1 (Proteintech, AG8665), anti-proteinX2 (Proteintech, AG7452), secondary antibodies: anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz, G2622).

Synthetic Procedures

2-chloro-1-(4-(4-ethynylphenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-one (CA-166)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.42-7.39 (m, 2H), 6.85-6.82 (m, 2H), 4.11 (s, 2H), 3.78 (t, J = 5.25 Hz, 2H), 3.68 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.29 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.24 (t, J = 5.25 Hz, 2H), 3.01 (s, 1H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 165.1, 148.0, 146.4, 132.3, 131.7, 126.3, 124.8, 124.5, 121.5, 121.3, 83.2, 71.3, 71.2, 42.7, 41.0, 38.6, 38.6, 38.4, 37.5, 29.7

HRMS (ESI) m/z : [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₅ClN₂ONa 285.0765; found 285.0755

2-chloro-1-(4-(4-ethynylphenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl)ethan-1-one (CA-170)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.50-7.49 (m, 2H), 7.43-7.42 (m, 2H), 4.52-4.49 (m, 1H), 4.15-4.04 (m, 2H), 3.78-3.63 (m, 2H), 3.20-3.14 (m, 1H), 3.08 (s, 1H), 2.07-1.97 (m, 3H), 1.86-1.77 (m, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 165.2, 150.6, 133.5, 133.3, 124.8, 115.7, 113.2, 83.8, 48.7, 48.3, 46.0, 41.9, 40.8

HRMS (ESI) m/z : [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₁₆ClN₂ONa 300.0762; found 300.0763

References

S1. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**, *227*, 680

2. puroteinX の化学

2-1 序

proteinX は異なる内因性および外因性アルデヒド基質の解毒または生体内変換のための多様で重要な酵素のクラスをコードする 19 の機能メンバーを持つ多重遺伝子ファミリーからなるタンパク質として知られる⁽⁶⁾。proteinX はサブタイプの違いにより、細胞質やミトコンドリア等、様々な場所に発現していることが知られており、その機能は多岐にわたっている⁽⁷⁾。例えば、proteinX1、proteinX2、proteinX3 および proteinX4 はエステル加水分解を触媒することが知られている (Figure 2-1)⁽⁸⁾。また、proteinX1 は、正常幹細胞および癌幹細胞を同定および単離するためのマーカーとして使用されており、近年では、いくつかのヒト悪性腫瘍の有害な予後に関連していることが報告されている⁽⁹⁻¹²⁾。

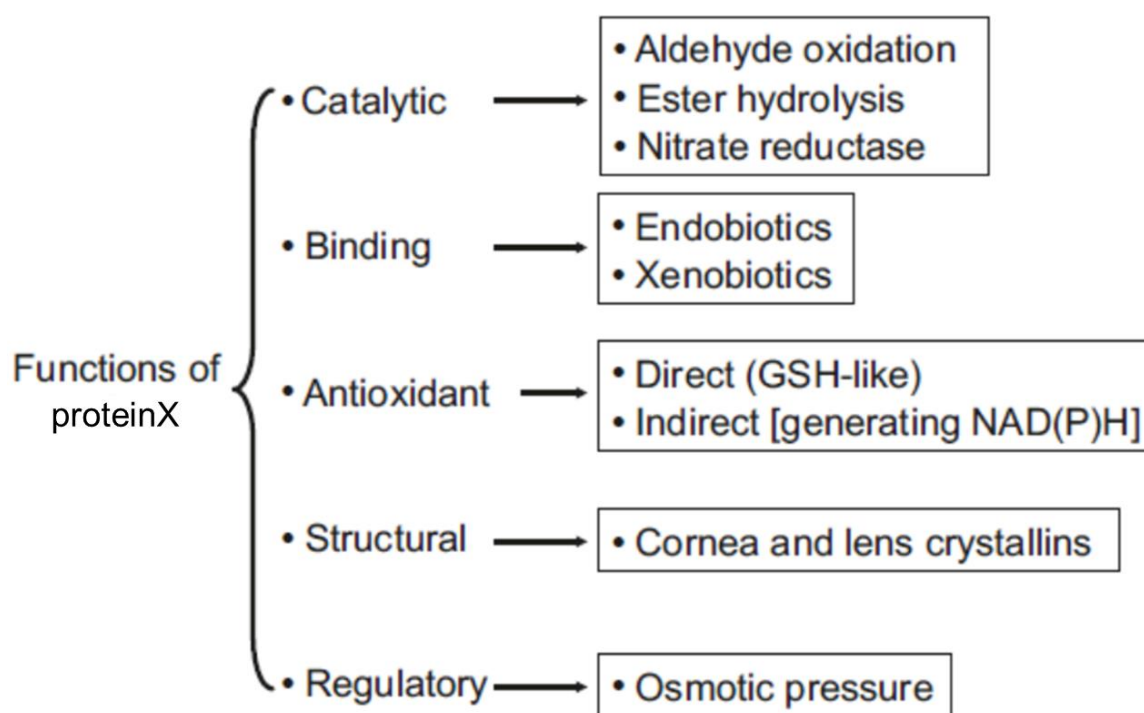


Figure 2-1. Functions of aldehyde dehydrogenase (proteinX) enzyme.⁽⁸⁾

proteinX は通常約 450~500 アミノ酸のサブユニットによって形成されるホモ四量体またはホモ二量体として機能し、その分子量は 50~60 kDa である⁽¹³⁾。全体の構造は、NAD(P)結合ドメイン、触媒ドメイン、及び架橋ドメインの 3 つの異なる保存されたドメインで構成される。また、proteinX1 や proteinX2 においては触媒部位に活性システインを有することが知られている⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。

proteinX の酵素反応メカニズムを以下に示す。酵素反応は主に 5 つのステップからなる。まず、① H₂O によるプロトンの引き抜きで触媒システインの活性化が起こる。続いて、② 活性化システインのカルボニル炭素に対する求核攻撃、③ 脱アセチル化による四面体チオヘミアセタール中間体の生成及び NAD(P)⁺の中間体からピリジン環へのヒドリド転移、④ チオエステル中間体の加水分解、⑤ NAD(P)H を生成する還元補因子の解離、及び NAD(P)結合による酵素の再生の過程を経て、proteinX は初期の状態に戻る^(13, 17)。これらの過程を通し、proteinX は体内に蓄積する様々な有毒アルデヒドを分解する役割を果たす (Figure 2-2)。

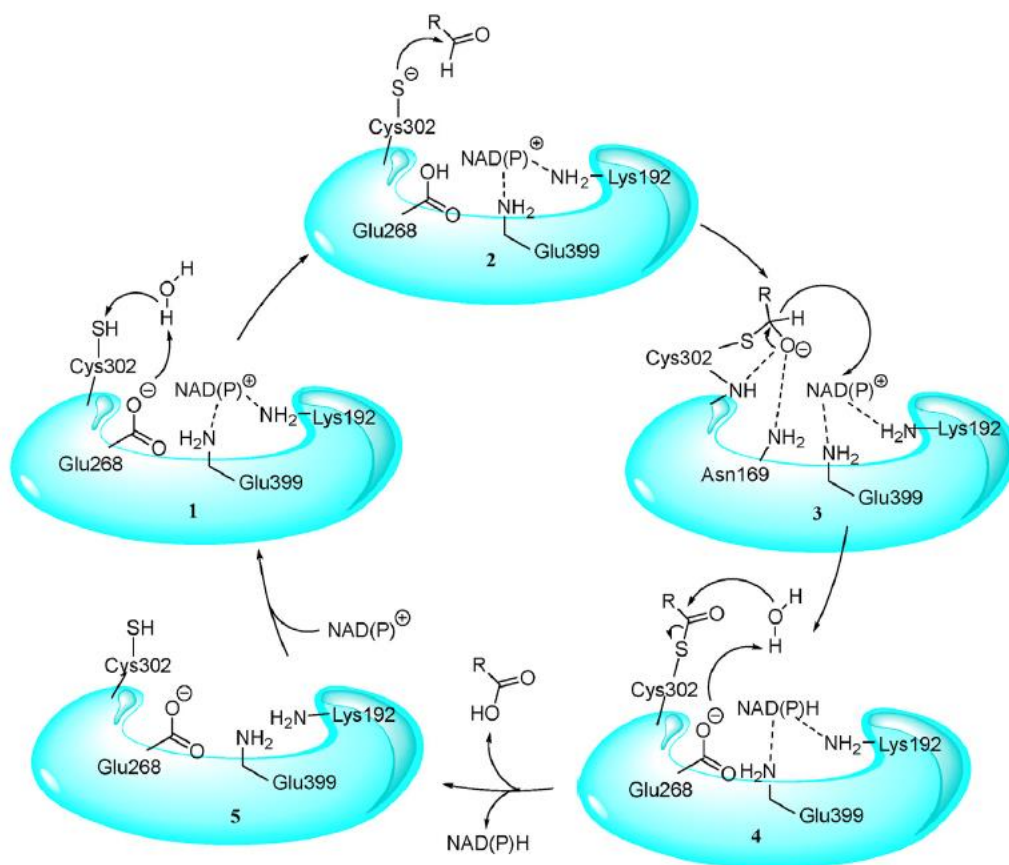


Figure 2-2. Functions of aldehyde dehydrogenase (proteinX) enzyme.⁽¹⁷⁾

proteinX は上述したように様々な機能を有し、癌の発生にもつながる酸化的損傷、ROS、脂質過酸化、および有毒アルデヒドの蓄積を減少させる解毒酵素としての役割を果たす⁽¹⁸⁾。その一方で、proteinX の過剰発現においては、代謝バランスの乱れにより発生する酸化ストレスが ROS の生成、脂質過酸化、および有毒なアルデヒドの蓄積につながるため、癌細胞に生存上の利点をもたらすとの報告がある⁽¹⁹⁾。また、proteinX1 においてはがん幹細胞 (Cancer Stem Cell; CSC) のステージ進行とも関連していることから、proteinX に関する研究、及び阻害剤開発は現在盛んに行われている⁽²⁰⁾。

proteinX を阻害する薬剤に関しては、様々な報告がある。例えばキサンテン骨格を有する CM026 は proteinX1 の精製酵素を $IC_{50} \approx 800$ nM で阻害する inhibitor として知られており、CM026 のキサンテン環は、Tyr297 と疎水性 π スタッキング相互作用を介して相互作用をするとの報告がある。また、キサンテン環は His293、Cys302、及び Gly458 と水素結合形成し、Trp178 はピペラジンの環横のケトン基と水素結合を形成する (Figure 2-3 (a))。さらにキサンテン骨格上に位置するイソペンチル基は Cys302 に向かって突出し、疎水性ポケットを満たしている (Figure2-3 (b))⁽²¹⁾。

別の proteinX1 の選択的阻害剤である CM037⁽¹⁷⁾ はピリミドンを含む 3 つの環の大部分が Phe171、Val460、および Phe466 によって形成された疎水性ポケットに位置している (Figure2-3 (d))。また、ピリミドン上のカルボニル酸素原子と Cys302 との間に潜在的な水素結合が形成される (Figure2-3 (c))⁽¹⁷⁾。

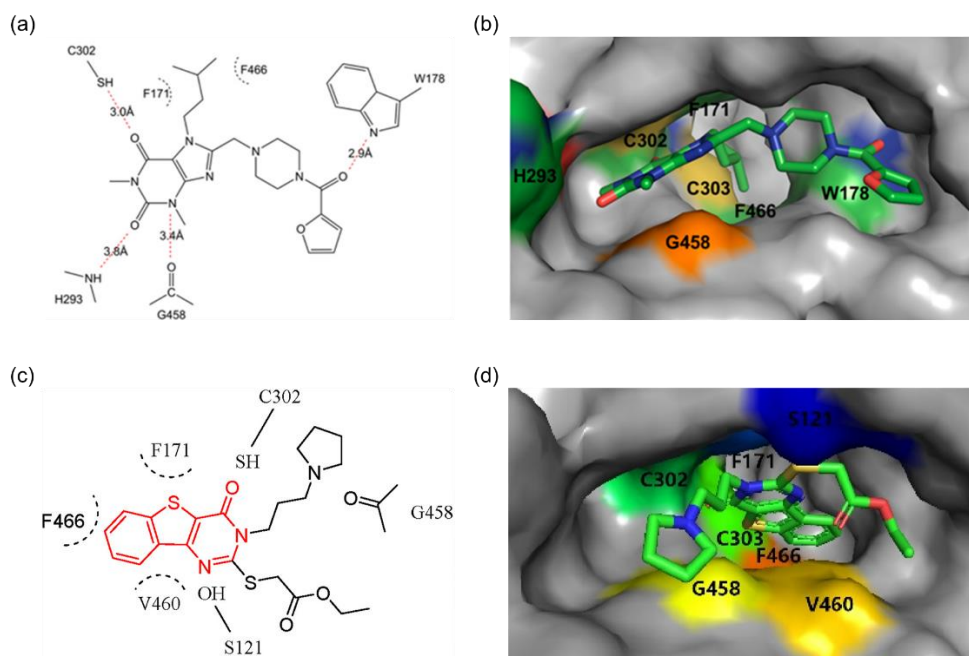
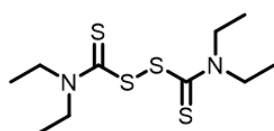


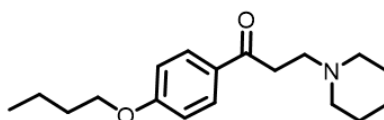
Figure 2-3. (a). Chemical structure of CM026 and (b). interaction with proteinX1⁽²¹⁾. (c). Chemical structure of CM037 and (d). interaction with proteinX1⁽¹⁷⁾.

先に示した 2 つの薬剤は proteinX の非共有結合阻害剤として知られているが、proteinX のコバレントドラッグとしての報告もいくつかなされている。例えば Disulfiram はアルコール依存症の治療に古くから使用されている proteinX1/2 を阻害する薬剤である。活性システインである Cys302 と共有結合を形成することで proteinX の機能を阻害し、体内のアセトアルデヒドのレベルを上昇させる。その結果、吐き気、嘔吐、頻脈、低血圧を特徴とする一連の不快感の身体的反応をもたらす⁽²³⁾。また、proteinX2/X5 の阻害剤として知られる Dyclonine は、スルファサラジンとの併用により頭頸部 SCC および胃癌マウスモデルにおいて腫瘍縮小効果があるとの報告がある^(24, 25)。DEAB は proteinX3 及び X2 共有結合阻害剤として知られ、proteinX1 や X4 に対しては可逆的阻害剤として機能する⁽²⁶⁾。DEAB は悪性黒色腫において腫瘍増殖を減少させるだけでなく、腫瘍形成が可能な残存細胞の数の有意な減少ももたらすとされている⁽²⁷⁾。

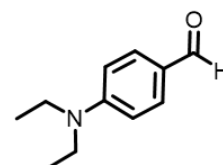
proteinX inhibitor



Disulfiram



Dyclonine



DEAB

Figure 2-4. Chemical structure of proteinX inhibitors.

2-2. proteinX1/2 の精製酵素を用いたラベル化検討

第 2 章では生細胞を用いたフラグメントスクリーニングから β 酸化阻害剤を探索した。ヒットとして得られた CFA-154 や 157 は直接 β 酸化関連酵素を阻害しているのではなく、proteinX を阻害することで間接的に β 酸化を阻害していることが示唆された。 β 酸化検出用蛍光プローブを用いた阻害剤スクリーニングでは、プローブの蛍光強度の減少割合から間接的に proteinX の阻害活性を算出することができると考えられるが、フラグメント化合物が非特異的に β 酸化関連酵素を阻害した場合には proteinX の阻害活性を検出することはできない。そのため、proteinX の精製酵素を用いた検討を行うこととした。

前節でのケミカルプロテオミクスの結果から、CFA-154 は HepG2 細胞の proteinX1 を選択的にラベル化する一方で、CFA-157 は proteinX1/2 をラベル化している結果を得ている。また、CFA-154 vs 170、CFA-157 vs 166 の競合 gel based ABPP の結果から、CFA-170 は proteinX1 を、CFA-166 は proteinX1/2 を同様にラベル化する結果が示唆されている。これらの結果を基に精製酵素を用いたラベル化を検討することにした。具体的には proteinX1/2 の精製酵素に対して CFA-170 及び 166 を添加し、CuAAC による蛍光色素を導入することで、各化合物の標的選択性に関して議論した。

結果を Figure2-5 に示した。ピペリジン骨格を有する CFA-170 は proteinX1 をラベル化した。proteinX2 に関してもラベル化していたが、同濃度の proteinX1 に比べるとごくわずかであり、CFA-170 が proteinX1 選択的であることが分かった。また、ピペラジン骨格を有する CFA-166 に関しては proteinX1 及び X2 の両方をラベル化していた。精製酵素を用いた評価においても 2 つの化合物の間でタンパク質に対する選択性の違いを見て取れた。

Reaction condition

Recombinant Human protein of proteinX1 or X2, [CFA-166, 170] = 0.5 μ M, 0.25~3 hr, 37 $^{\circ}$ C

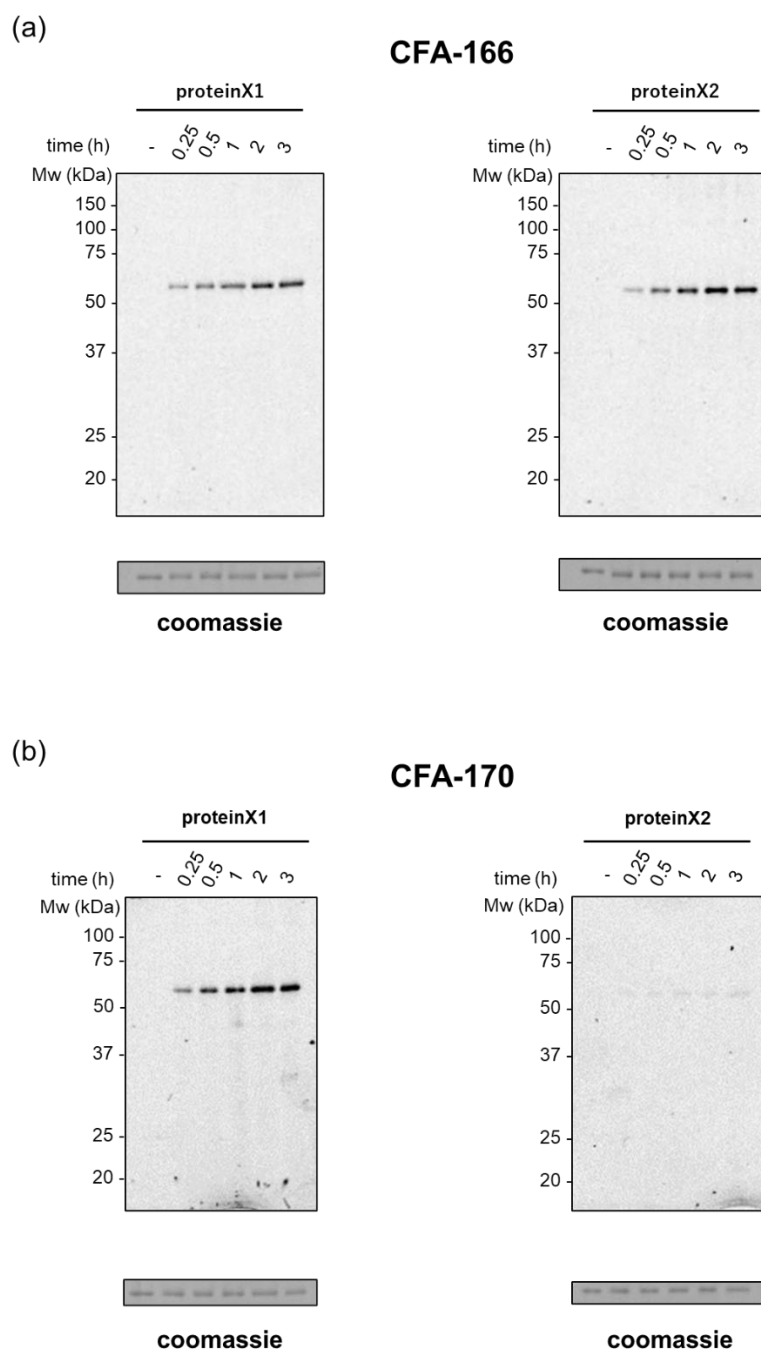


Figure 2-5. Time-dependent reactivity profile of (a). CFA-166 or (b). CFA-170 in Recombinant Human protein.

また、ピペラジン・ピペリジン骨格でアルキン体を持たない CFA-154 と 157 について、精製 proteinX2 を用いて CFA-166 との競合試験を行うことで、それぞれの化合物の proteinX 選択性を調べた。その結果を Figure 2-6 に示した。ピペラジン骨格を有する CFA-157 については CFA-166 との競合により蛍光が見えないことから、proteinX2 をラベル化することが示唆された。また、ピペリジン骨格を有する CFA-154 については競合によりバンド強度の減少は見られたが、CFA-166 によってラベル化されていることから、proteinX2 に対する選択性は低いことが分かった。これらの結果は前章でのケミカルプロテオミクスの結果と一致しており、CFA-157 が proteinX1/X2 をラベル化する一方で、CFA-154 が proteinX1 選択的であることを示唆する結果を得た。

Reaction condition

Recombinant Human protein of X2, [CFA-154, 157] = 0.5 μ M, 1 hr, [CFA-166] = 0.5 μ M, 1 hr, 37 °C

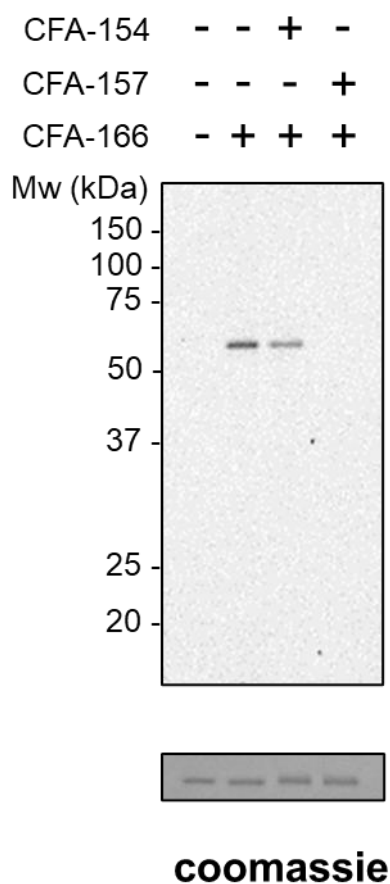


Figure 2-6. Competitive protein labeling in Recombinant Human protein of proteinX2.

2-3. 精製酵素を用いたフラグメント化合物の阻害活性検討

先の結果から、スクリーニングにより見出した CFA-154、157 が proteinX をラベル化することを精製酵素でも確認した。そこで、proteinX1 及び X2 の精製酵素を用いて阻害活性を調べることにした。proteinX 活性を検出する方法はいくつか報告がなされている。その一つは基質であるアルデヒド化合物と NAD⁺ を酵素とインキュベートし、生成した NADH を蛍光検出する方法 (Figure 2-7 (a)) である。また、proteinX が *p*-nitrophenyl acetate を *p*-nitrophenol に変換することを利用した測定法 (Figure 2-7 (b)) なども知られている⁽¹⁵⁾。本検討では (a) proteinX を検出する方法で酵素活性を測定した。

実験方法としては、精製酵素と CFA-154、157 をインキュベートした後に、基質である Propionaldehyde と NAD を添加し、生成する NADH を蛍光検出によりモニターした。

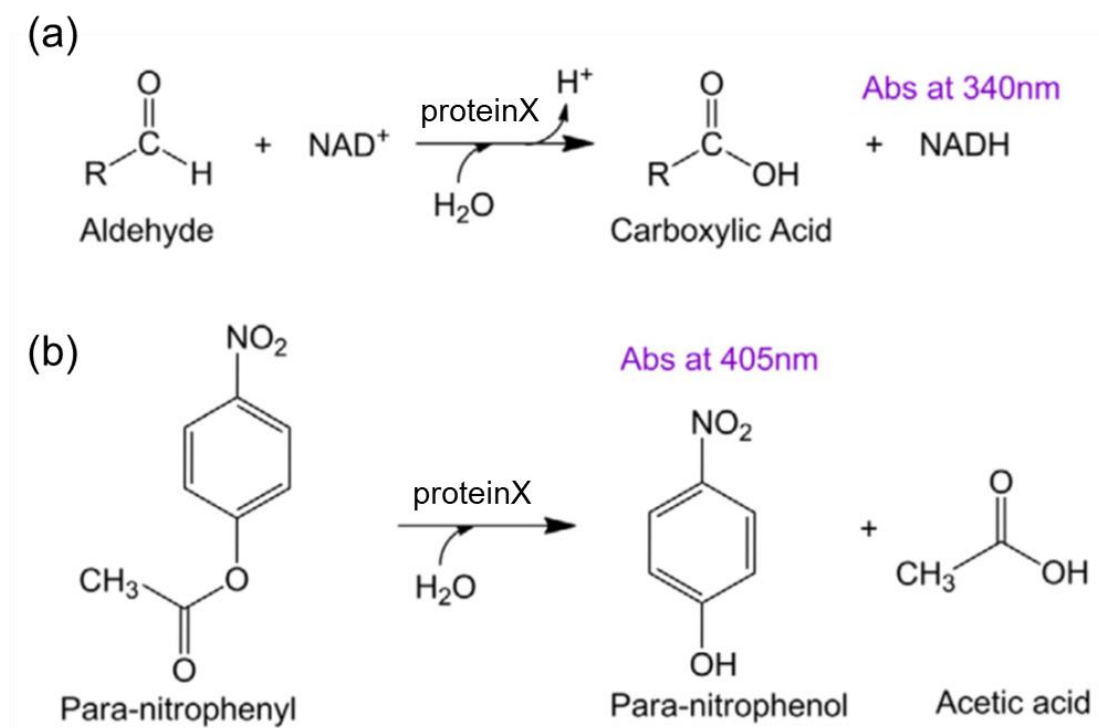


Figure 2-7. proteinX activity measurement mechanism. (a). NAD⁺ dependent aldehyde oxidation reaction monitored formation of NADH. (b). NAD⁺ independent esterase reaction that monitored the formation of *p*-nitrophenol.⁽¹⁵⁾

Reaction condition

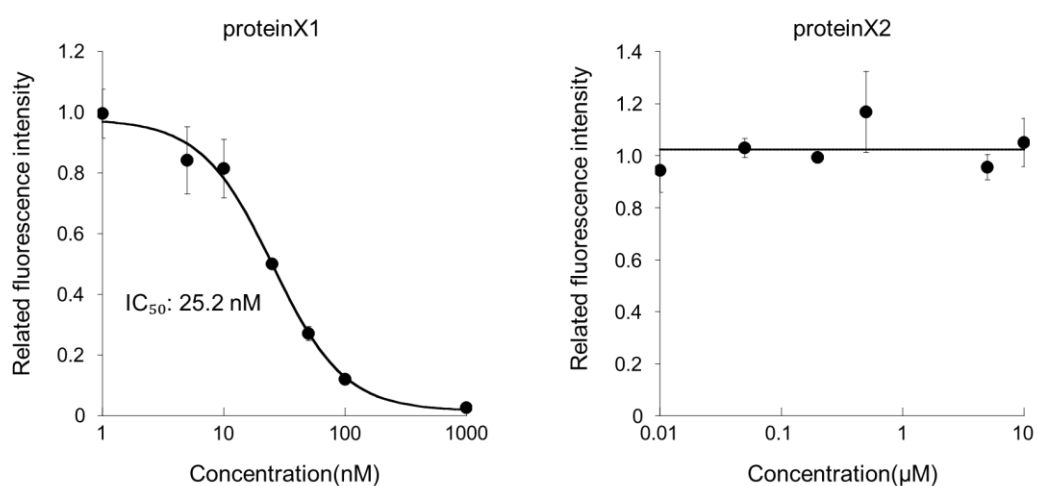
[proteinX1 or X2] = 0.05 μ M in 20 mM HEPES, 0.5 mM TCEP (pH: 7.4)

[CFA-154, 157] = 0.1 ~ 10 nM, 3 hr

150 μ M propionaldehyde, 150 μ M NAD+

(a)

CFA-154



(b)

CFA-157

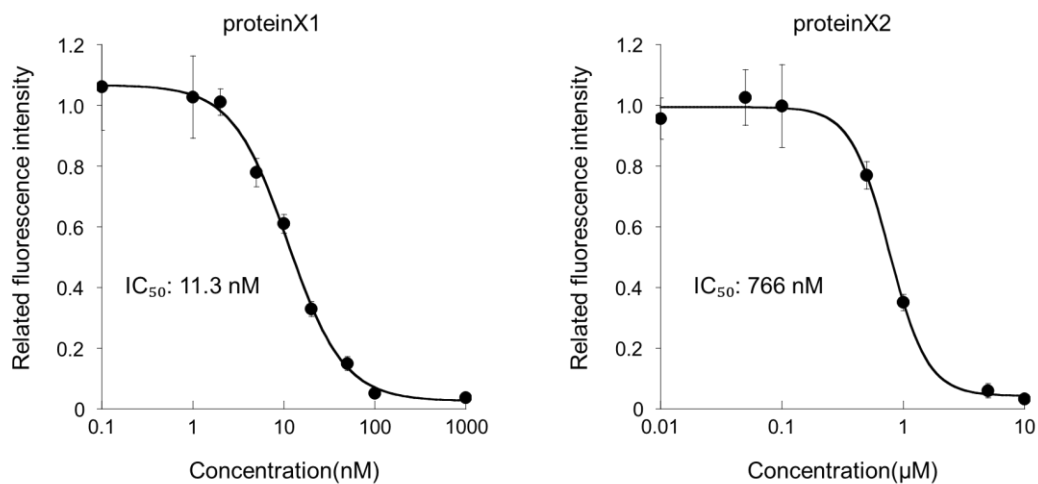


Figure 2-8. proteinX1 and proteinX2 activity of (a). CFA-154 and (b). CFA-157 against human recombinant proteins.

結果を Figure 2-8 に示した。ラベル化した時と同様、ピペリジン骨格を有する CFA-154 は proteinX2 の酵素活性を阻害しない一方で、ピペラジン骨格を有する CFA-157 は proteinX2 の酵素活性を阻害し、比較的高い阻害活性を示した (766 nM)。また、二つの化合物の proteinX1 に対する阻害活性は非常に高く、10~30 nM の IC₅₀ 値となった。酵素濃度が 50 nM に対して IC₅₀ 値がそれよりも低い濃度となっているのは酵素が一部失活しているためだと考えられる。しかしながら、先の精製酵素を用いた ABPP の結果から 500 nM、3 hr の条件で CFA-166/170 をインキュベートすることで高いラベル化率を達成していることを踏まえても、CFA-154/157 が proteinX1 に対して十分な阻害活性を有していることが示唆された。

2-4. まとめ

本節では前節のケミカルプロテオミクス解析の結果からヒットした proteinX に着目し、ピペラジン・ピペリジン骨格を有する CFA フラグメント化合物の精製 proteinX に対する反応性を調べた。CFA-154、157 及びそれらのアルキン体である CFA-170、166 に関して精製 proteinX1、X2 を用いた機能評価を行った。その結果ピペラジン骨格を持つ CFA-157、166 に関しては proteinX1 及び X2 の機能を阻害するのに対し、ピペリジン骨格を持つ CFA-154、170 では proteinX1 選択的に作用することが分かった。これは先のケミカルプロテオミクス解析を支持する結果である。また、CFA-154、157 の proteinX1 に対する IC₅₀ 値はそれぞれ 26.4 nM、11.3 nM となり、非常に高い阻害活性を有することも分かった。

以上のことから CFA-154、170 は proteinX に対する共有結合阻害剤として非常に有用な化合物であることが分かった。しかしながら、見出した化合物は proteinX に対して構造最適化を行っていないため、細胞中での長時間インキュベートにより非特異反応が散見されることが課題である。そのため、今後はこれらの化合物を誘導体化することで proteinX に標的選択性を高めることが必要である。

2-5. 実験項

In vitro labeling of human recombinant protein of proteinX1 and proteinX2

Human recombinant protein of proteinX1 or X2 (0.5 μM) and the CFA fragments (0.5 μM) were incubated for 0.25 ~ 3 h at 37 °C in 10.6 μL of 20 mM HEPES (pH: 7.4) containing 0.5 mM TCEP. To the mixture (10.6 μL) was added the reaction buffer (2 μL) containing 6 mM *N*-ethylmaleimide (final conc. 10 mM). The mixture was incubated at 37 °C for 0.5 h and then click chemistry was performed on each sample using final concentrations of 25 μM TAMRA azide, 1 mM TCEP, 100 μM TBTA and 1 mM CuSO_4 in a final volume of 13 μL . The mixture was incubated at 37 °C for 1 h. After addition of 3.75 μL of 5 $\times$ SDS-PAGE loading buffer, the mixture was further incubated at 37 °C for 1 h and the sample (10 μL) was resolved on 12 % SDS-PAGE gel. The in-gel fluorescence imaging was performed using ImageQuant800 (Amersham).

proteinX1 and proteinX2 activity assay

Human recombinant protein of proteinX1 or X2 was dissolved in 20 mM HEPES (pH: 7.4) containing 0.5 mM TCEP. The mixture was added to 1/2 area 96 well plate (Perkin Elmer), followed by rotary shaking for 5 min. CFA fragments (0.01~10 μM) were added to each well and incubated for 3 h at 37 °C. After 150 μM NAD^+ and 150 μM propionaldehyde in reaction buffer were added, plate was incubated for 1 h at 37 °C (final enzymes conc.: 0.05 μM). The changes in fluorescence were monitored through excitation at 350 nm and emission at 465 nm with a plate reader (Perkin Elmer). Each sample was contained 0.05 % (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO). IC_{50} values were determined by varying the concentration under the same reaction conditions.

3. proteinX と β 酸化との関係

3-1. proteinX inhibitor を用いた β 酸化阻害スクリーニング

ケミカルプロテオミクス解析及びプルダウンアッセイによる抗体検出の結果から、proteinX1 が β 酸化に影響を及ぼしていることが示唆されたため、生細胞中の proteinX を阻害することによる β 酸化への影響を調べた。proteinX は NAD(P)依存的なアルデヒドのカルボン酸への酸化に関与し、解毒、生合成、抗酸化および調節機能に関与していることが知られている⁽¹³⁾。とりわけ解毒に関しては酸化ストレス経路の有毒な副産物である(±)-4-ヒドロキシ-2E-ノネナール (4-HNE) の基質として機能することが知られている⁽²⁸⁾。

4-HNE は多価不飽和脂肪酸の酸化ストレスおよび過酸化条件下で生成される反応性の高い α, β -不飽和アルデヒドである⁽²⁹⁾。4-HNE は通常、アルデヒド官能基の還元や proteinX を含む細胞内酵素によって代謝される(Figure 3-1)⁽³⁰⁾。しかしながら、酸化ストレスと脂質過酸化が上昇している状態では、4-HNE は求核性タンパク質残基、特にシステイン、ヒスチジン、リジンの脱プロトン化された側鎖と付加体を形成する⁽³¹⁾。

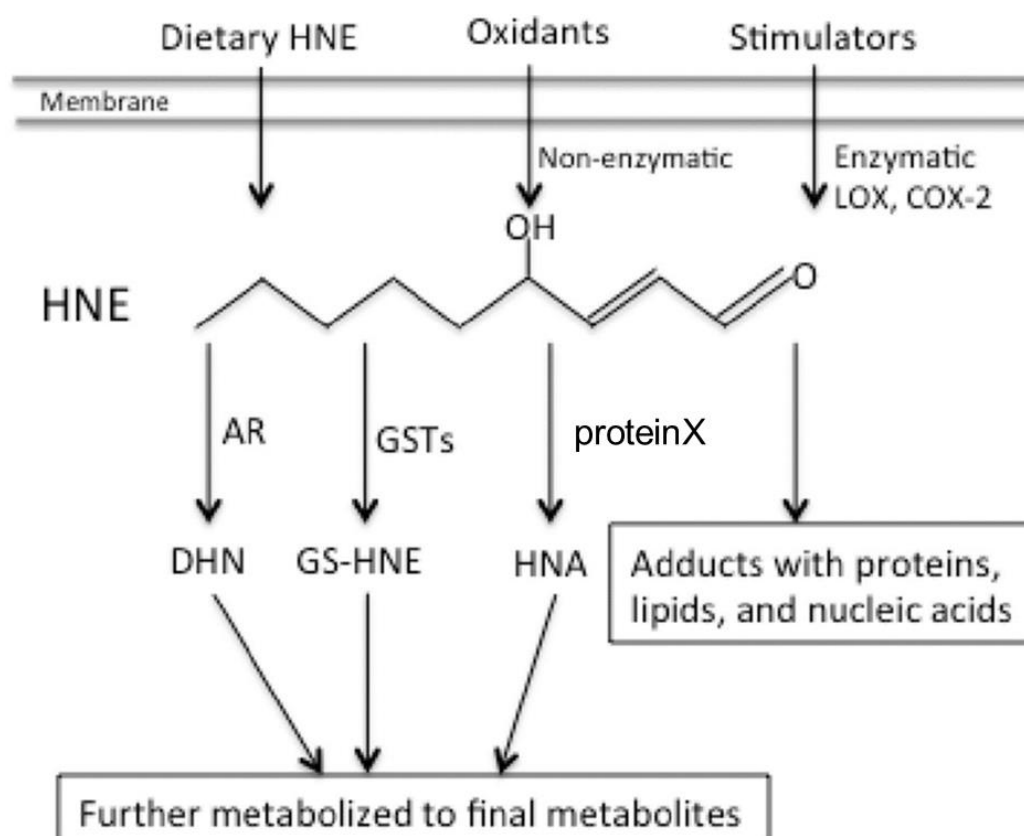


Figure 3-1. Formation and pathways of 4-HNE⁽³²⁾.

実際に 4-HNE と付加体を形成するタンパク質の中には、 β 酸化関連酵素として知られる HADHA が報告されている⁽³³⁾。また、4-HNE は AMPK 経路を阻害することで、マロニル CoA を上昇し、脂肪酸 β 酸化を抑制するという報告もある (Figure 3-2)⁽³⁴⁾。

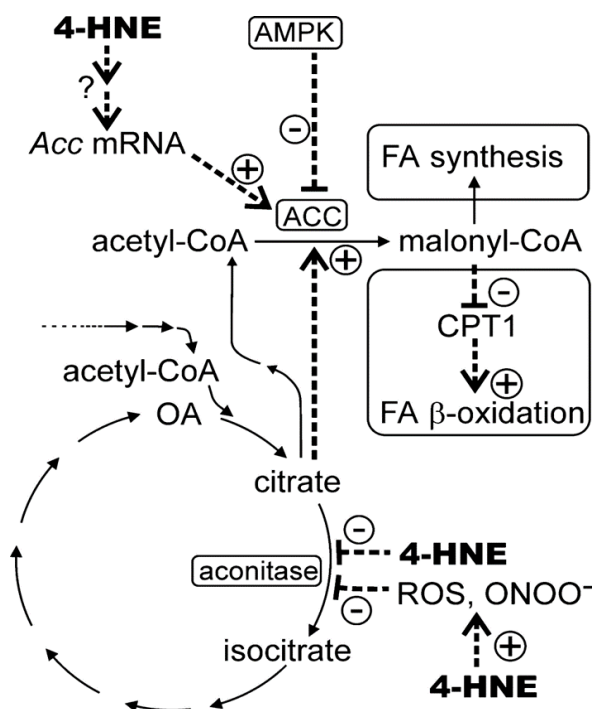


Figure 3-2. Scheme of the mechanism by which an elevated level of 4-HNE leads to an increase in malonyl-CoA levels and to fat accumulation. Dashed arrows with a plus or minus sign denote activation or inhibition, respectively⁽³⁴⁾.

そのため前章のスクリーニングで見出したヒット化合物においては、 β 酸化関連酵素を直接阻害しているのではなく、proteinX を阻害することで β 酸化を間接的に阻害している可能性が高い。そこで、proteinX inhibitor が β 酸化に与える影響について調べた。

既存の proteinX1 inhibitor に関してはいくつか報告例がある⁽²⁶⁾。その中でも Disulfiram (DSF) や Aldi-6 は proteinX1 の活性システインと反応することで酵素機能を阻害する共有結合阻害剤として知られている (Figure 3-3 (a))。それぞれ反応メカニズムは異なる。Disulfiram は活性システインとの間に分子間ジスルフィドを形成することによる proteinX の阻害、もしくは不安定な混合ジスルフィドを介した、活性部位のシステインと別のシステインとの間の分子内ジスルフィド結合の形成によって proteinX の阻害が起こるとされている (Figure 3-2 (b))⁽³⁵⁾。また、Aldi-6 は近傍のアミノ酸と反応した後に反応性の高い α , β -不飽和カルボニルが生成し、proteinX の活性システインと共有結合を形成することで酵素の機能を不可逆的に阻害する (Figure 3-3 (c))^(36, 37)。

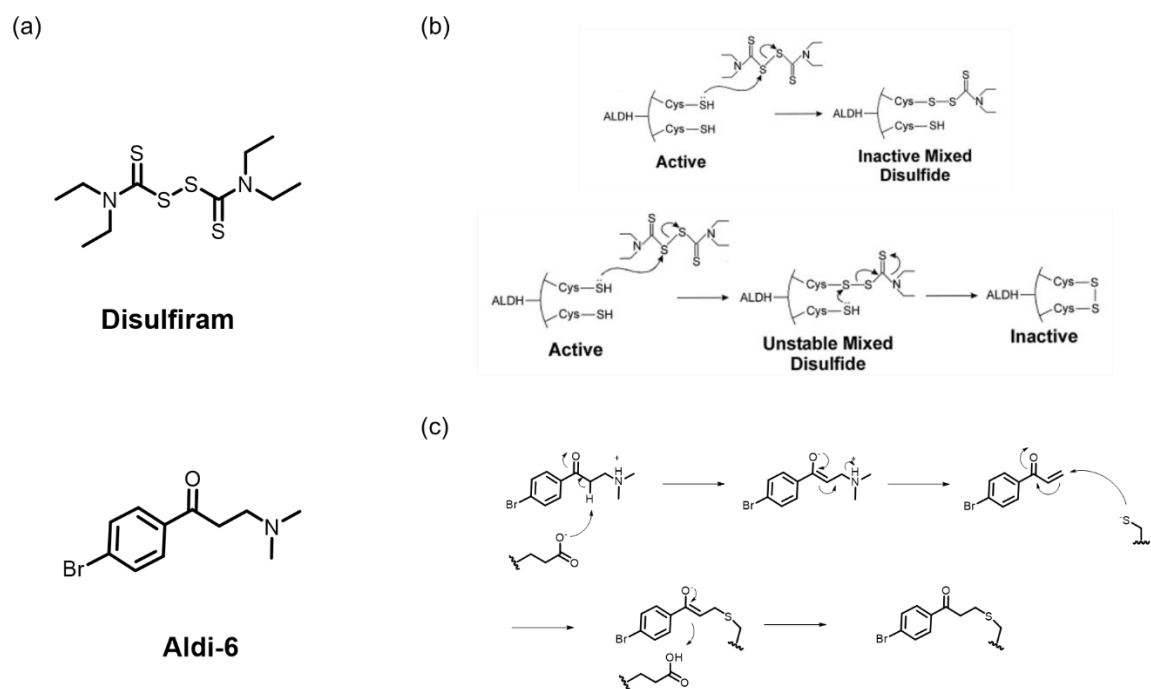


Figure 3-3. (a). Chemical structure of DSF and Aldi-6, (b). Reactivity mechanism of DSF⁽³⁵⁾, (c). Reactivity mechanism of Aldi-6

これらの作用メカニズムが異なる 2 つの阻害剤に関して、前章で開発したクマリン骨格を有する β 酸化検出用蛍光プローブを用いて β 酸化への影響を調べた (Figure 3-4)。その結果を Figure 3-4 に示す。DSF 及び Aldi-6 の濃度を 0.1~200 μM の範囲でインキュベートし、スクリーニングを行ったところ、DSF $\div$ 25.3 μM 、Aldi-6 $\div$ 31.2 μM の IC_{50} 値が得られた。また、50 μM 以上では両化合物で蛍光強度の有意な減少が見られた。このことから、proteinX を阻害することにより β 酸化が阻害される機構が働いていることが考えられた。

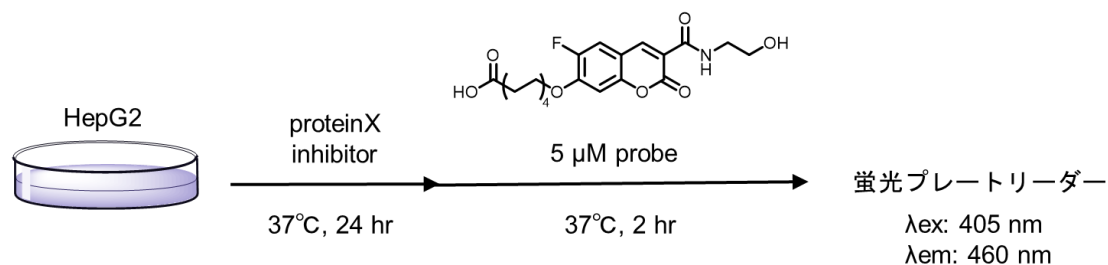


Figure 3-4. Schematic illustration of FAO activity assay with proteinX inhibitor.

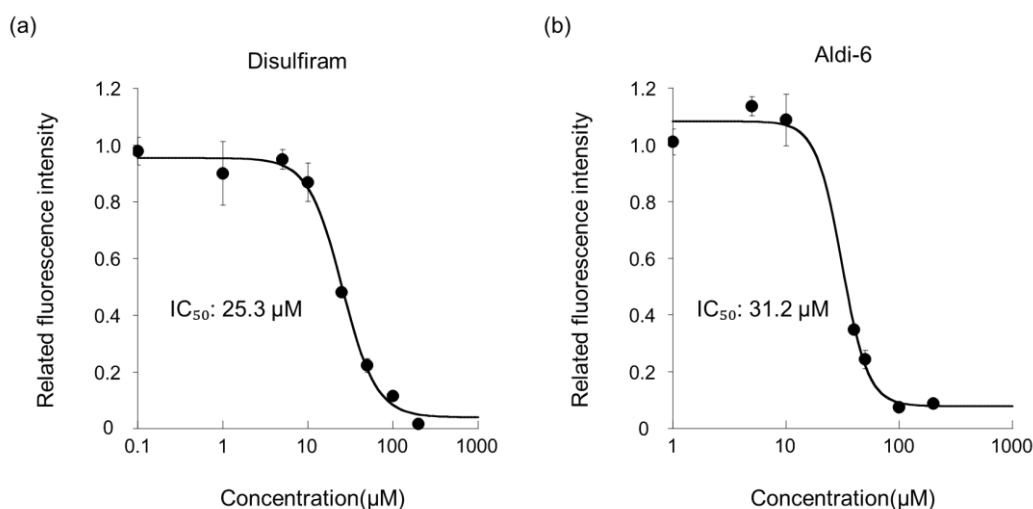


Figure 3-5. FAO activity of (a) DSF and (b) Aldi-6 against HepG2 cells.

3-2. Protein X inhibitor と CFA-157, 160 の競合 gel based ABPP

上記の検討から、既存の protein X inhibitor が β 酸化に対して影響を与えていることが分かった。そのため、第 2 章でのスクリーニングにより見出したアルキン骨格を有する CFA-166、CFA-170 と既存の protein X inhibitor を競合させることで 50 kDa 付近のバンドが消失することを確認した。

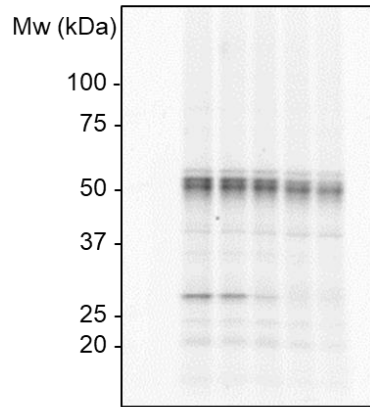
その結果を Figure 3-6 に示した。50 kDa のバンドに関して、DSF と CFA-170 との競合試験では濃度依存的にバンド強度の減少が見られ、二つの化合物で proteinX1 がラベル化していることが示唆された。また、CFA-166 との競合試験においても CFA-166 でラベル化される主に 2 つの 50 kDa 付近のバンドのうち、上に位置するバンドは濃度依存的に蛍光強度の減少が見られることから、このタンパク質が proteinX1 であることが考えられた。その一方で、50 kDa 付近のバンドのうち、下に位置するバンドは蛍光強度の減少が見られなかった。このことから、下のバンドはピペラジン化合物でラベル化される proteinX2 であることが考えられる。DSF は proteinX1 の他に proteinX2 を阻害する proteinX の inhibitor として知られている⁽²²⁾。その一方で proteinX2 の触媒作用領域には 3 つのシステインが連続している⁽³⁸⁾ことから、CFA-166 は DSF が結合したシステインとは別のシステインと結合していることが考えられる。同様に、Aldi-6 に関して、10 μM 添加すると CFA-166、170 の両方でバンド強度が小さくなった、さらに β 酸化活性を阻害する濃度である 50 μM ではバンドがほとんど消失した。このことから、CFA-166/170 が proteinX の活性システインをラベル化し、酵素機能を阻害していることが考えられた。

Reaction condition

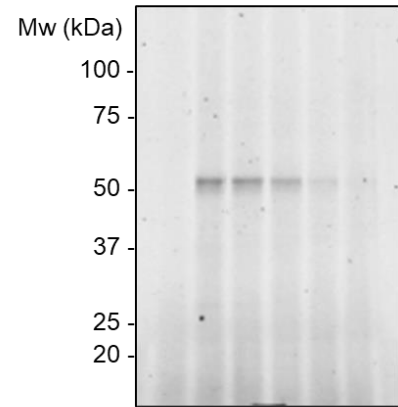
HepG2 cells, [DSF] = 1~100 μ M, 24 hr, [Aldi-6] = 1~100 μ M, 24 hr, [CFA-166, 170] = 10 μ M, 1 hr, 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂

(a)

DSF (μ M)	-	-	1	10	50	100
166 (10 μ M)	-	+	+	+	+	+

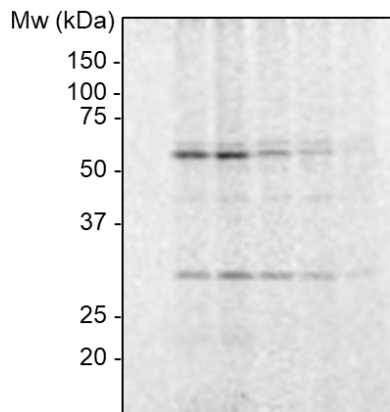


DSF (μ M)	-	-	1	10	50	100
170 (10 μ M)	-	+	+	+	+	+



(b)

Aldi-6 (μ M)	-	-	1	10	50	100
166 (10 μ M)	-	+	+	+	+	+



Aldi-6 (μ M)	-	-	1	10	50	100
170 (10 μ M)	-	+	+	+	+	+

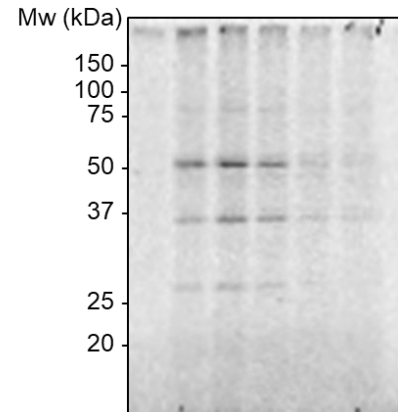


Figure 3-6. Competitive protein labeling between proteinX inhibitor ((a). DSF, (b). Aldi-6) and CFA fragments in HepG2 cells.

3-3. 4-HNE による β 酸化への影響

先述したように、proteinX inhibitor が β 酸化を阻害する原因としては、4-HNE が細胞内に蓄積することで様々なタンパク質と付加体を形成し、その機能を阻害していることが考えられる。そのため、proteinX を阻害することで 4-HNE を生成していると考えられる CFA-154、157 に関して、細胞内での 4-HNE の蓄積について調べた。実験はドットブロット法によって行った。細胞ライセートを直接メンブレン膜に吸着させ、4-HNE 抗体で検出することで、各サンプルの発光強度を比較した。また、化合物の添加条件については、先での β 酸化蛍光プローブ 1 の蛍光強度を抑える濃度及びインキュベーション時間とした。

結果を Figure 3-7 に示した。(a) が実際に得られた結果であり、各ドットの強度を定量した結果を (b) に示した。(a) に関しては同一のメンブレンで処理している。既存の proteinX inhibitor として知られる Aldi-6 や CFA-154、157 に関しては Inhibitor (-) と比べてドットの発光強度が 1.3~1.5 倍となり、細胞内での 4-HNE の蓄積が示唆された。また、この結果から、4-HNE が β 酸化の阻害に関与していることが考えられた。

Reaction condition

HepG2 cells, [Aldi-6] = 50 μ M, 24 hr, [CFA-154, 157] = 10 μ M, 24 hr, 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂

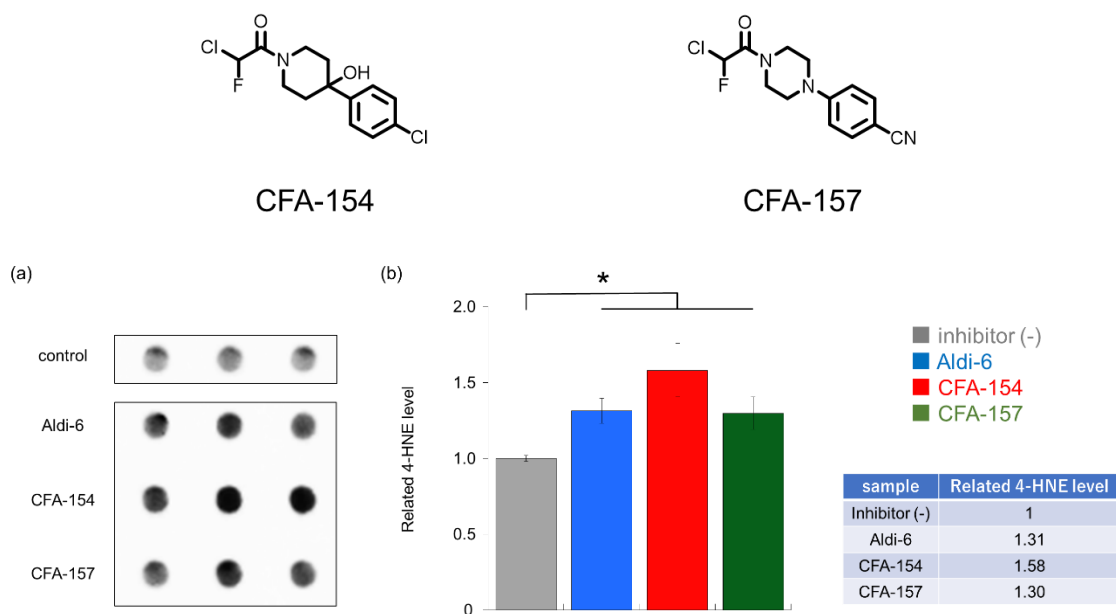


Figure 3-7. Luminescence intensity analysis of 4-HNE. *P<0.05.

3-4. まとめ

本節ではケミカルプロテオミクス解析の結果からヒットした proteinX に着目し、proteinX と β 酸化との関連性を明らかにした。既存の proteinX inhibitor である DSF や Aldi-6 は β 酸化検出用蛍光プローブの蛍光を抑えることから、proteinX を阻害することにより β 酸化を抑制する機構が働いていることが示唆された。さらに 4-HNE 抗体を用いたドットブロット法による検証から、CFA-154 と 157 を生細胞に添加することで細胞内での 4-HNE の優位な上昇が認められた。そのため CFA-154 及び 157 は proteinX を阻害することにより、細胞内に蓄積された 4-HNE が β 酸化関連酵素と付加体を形成していることが示唆された。また、AMPK 経路を阻害することで β 酸化関連酵素の機能を抑制していることも考えられた。

3-5. 実験項

Cell culture

HepG2 cells were grown at 37 °C under a humidified 5 % CO₂ atmosphere in a culture medium high-glucose DMEM (Wako). The media were supplemented with 10 % FBS (HyClone), penicillin (50 IU/mL) and streptomycin (50 µg/mL).

FAO activity assay with proteinX inhibitor

HepG2 cells (1x10⁴ cells) were cultured on 96 well black plate (Thermo) for 2 days at 37 °C in CO₂ incubator. twice. After washing with DMEM (FBS(-)) (wako) (100 µL) twice, proteinX inhibitor (DSF or Aldi-6) (0.1~200 µM) was preincubated in 200 µL DMEM(FBS(-)) for 24 h. After removing DMEM (FBS(-)), coumarin probe (5 µM) was added in DMEM(FBS(-))(200 µL) for 2 h and evaluated with plate reader (n = 3).

In cell protein labeling with proteinX inhibitor

HepG2 cells were grown to ~80% confluence in 4 mL of growth medium in 6 cm culture dishes (NEST). The growth medium was aspirated off, and the cells were washed twice with PBS (2 mL), followed by treatment with the proteinX inhibitor (1~100 µM) in culture medium (4 mL, FBS(-)). After incubation at 37 °C in a CO₂ incubator for 24 h, the medium was aspirated off, and the alkyne fragment in culture medium (4 mL, FBS(-)) was added to the cells. After incubation at 37 °C in a CO₂ incubator for the indicated time, the medium was aspirated off. The cells were washed twice with cold PBS (2 mL) and lysed with cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 w/v% Nonidet P40 substitute, 0.5 w/v% sodium deoxycholate, 0.1 w/v% SDS, 50 µL) containing protease inhibitor cocktail (Roche). The lysed cells were collected with a plastic scraper, transferred to a separated microfuge tube, and centrifuged (17,000 g, 10 min, 4 °C). The supernatant was transferred to a microfuge tube and stored at -30 °C.

Sample processing for in-gel fluorescence analysis

Protein concentrations for each sample were determined using the DC protein assay (BioRad) and then normalized to 1.0 or 1.5 mg/mL in a volume of 42 µL. Click chemistry was performed on each sample using final concentrations of 25 µM TAMRA azide, 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, Sigma-Aldrich), 100 µM Tris [(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl) methyl]amine (TBTA, Sigma-Aldrich) and 1 mM CuSO₄ in a final volume of 50 µL. The samples were incubated for 37 °C for 1 h, followed by addition of 10 µL 5× SDS loading buffer

(with 5 % 2-ME) the samples were incubated at 37 °C for 1 h. The samples (10 µL) were loaded and resolved on a 12 % acrylamide SDS-PAGE gel. The in-gel fluorescence was imaged using ImageQuant800 (Amersham).

Dot blot

Protein concentrations for each sample were determined using the DC protein assay (BioRad) and then normalized to 1.0 mg/mL in a volume of 120 µL. Nitrocellulose membrane (BioRad, 0.45 µm, cat: 1620114) was soaked in 1 × TBS and shaken for 10 min. The membrane was set on the dot blot device (biodot, #1706545), followed by addition of 100 µL of 1 × TBS to each well. After the 1 × TBS was aspirated off, 100 µL of sample was added in each well and incubated at room temperature for 2 hr. The sample was aspirated off, and the blots were washed with Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween 20 (TBS-T) solution. The blots were blocked with 1 % BSA in TBS-T for 1 h at room temperature, and then washed with TBS-T. The blots were probed overnight at 4 °C with primary antibodies (× 4000) diluted in TBS-T. Following washes with TBS-T, the blots were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies (× 5000). The blots were washed with TBS-T, and then visualized using ImageQuant800 (Amersham).

Primary antibodies: anti-4-HNE (abcam), secondary antibodies: anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz, G2622).

4. 参考文献

1. J. Wang, et. al. *Pharmacol. Ther.*, **2016**, 162, 10
2. H. Park, et. al. *Curr Opin Chem Biol*, **2018**, 50, 66
3. X. Chen, et al. *Signal Transduct Target Ther*, **2020**, 5, 72
4. J. D. Hirsch, et al, *Anal. Biochem.*, **2002**, 308, 343
5. L. Zhang, et al. *Biochemistry*, **2000**, 39, 14409
6. C. Chen, et. al. *Biomolecules*, **2021**, 11, 1423
7. W. Jelski, et. al. *Clin. Chim. Acta.*, **2008**, 395, 1
8. V. Vasilou, et al. *Hum.*, **2005**, 2, 138
9. C. Ginestier, et al. *Cell Stem Cell*, **2007**, 1, 555
10. S. Deng, et al. *PLoS ONE*, **2010**, 5, e10277
11. F. Jiang, et al. *Mol Cancer Res*, **2009**, 7, 330
12. Y. Wang, et al. *Dis. Esophagus*, **2012**, 25, 560
13. K. Shortal, et al. *Front. Mol. Biosci.*, **2021**, 8, 1
14. Z. Liu, et al. *Nat. Struct.*, **1997**, 4, 317
15. C. A. Morgan, et al. *Chem. Biol. Interact*, **2015**, 234, 29
16. R. A. Munoz-Clares, et al. *Chem. Biol. Interact*, **2017**, 276, 52
17. B. Li, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **2021**, 209, 112940
18. J. Rodríguez-Zavala, et al. *Chem. Res. Toxicol*, **2019**, 32, 405
19. S. S. Dinavahi, et al. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2019**, 40, 774
20. H. Tomita, et al. *Oncotarget*, **2016**, 7, 11018
21. C. A. Morgan, et al. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 1964
22. J. P. Lam, et al. *Biochemistry*, **1997**, 36, 13748
23. J. J. Lipsky, et al. *Chem. Biol. Interact.*, **2001**, 130, 81
24. J. Xia, et al. *MedComm.*, **2023**, 4, e195
25. S. Okazaki, et al. *Oncotarget*, **2018**, 9(73), 33832
26. L. Yue, et al. *Melanoma Res.*, **2015**, 25, 138
27. Y. Li, et al. *J. Immunol.*, **2022**, 2022, 1
28. K. K. Andringa, et al. *Redox. Biol.*, **2014**, 2, 1038
29. D. P. Hartley, et al. *Arch. Biochem.*, **1995**, 316(1), 197
30. S.B. Wall, et al. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, **2014**, 1840, 913
31. H. Zhang, et al. *Arch. Biochem.*, **2017**, 617, 145
32. Y. Zhao, et al. *Free Radic.*, **2014**, 72, 55
33. K. L. Liu, et al. *Free Radic. Biol. Med.*, **2018**, 121, 1

- 34. S. P. Singh, et al. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 3900
- 35. M. L. Shen, et al. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, *60*, 947
- 36. S. T. A. Koenders, et al. *ChemBioChem*, **2020**, *21*, 1911
- 37. M. Khanna, et al. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*(50), 43486
- 38. C. G. Steinmetz, et al. *Structure*, **1997**, *5*(5), 701

結言

本研究では CFA フラグメントライブラリーを用いた細胞代謝フェノタイプスクリーニングによるコバレントリガンドの探索を行った。

第 1 章では当研究室で独自に開発した反応基である CFA 基を導入したフラグメントライブラリーの構築を行った。これまでに報告した 30 種類の化合物に加え、新たに約 120 種類を構築することで構造の多様性に富んだ様々なフラグメント化合物を構築した。その結果フェノタイプスクリーニングでヒット化合物を得るために十分なフラグメント化合物を得ることに成功した。

第 2 章では当研究室で開発した β 酸化を検出する蛍光プローブの蛍光強度を改善し、CFA 基を有するフラグメント化合物を用いた β 酸化阻害剤スクリーニングを行った。これまでに開発した β 酸化検出用蛍光プローブである **probe1** は蛍光強度が弱く、蛍光変化が追いつくことから、阻害剤スクリーニングには用いることが困難であった。そこでクマリンに置換基を導入することで蛍光強度の改善を図った。クマリンの 6 位にフルオロ基を導入した **probe2** を作製し、フルオロ基を有さない **probe1** との蛍光強度の比較を行ったところ、約 9 倍高い蛍光強度で β 酸化を検出することに成功した。また、それぞれのプローブのフェノール体 **1'** と **2'** の pKa を算出したところ、**1'** の pKa は 6.8 であるのに対し、**2'** の pKa は 5.4 であった。このことから、以前の報告にあった通りクマリンにフルオロ基を導入することで pKa が酸性側にシフトし、pKa の変化がクマリンの蛍光強度の違いに関与していることが示唆された。

また、**probe2** と第 1 章で構築した CFA 基を有するフラグメント化合物を用いて新規共有結合型 β 酸化阻害剤のスクリーニングを行った。その結果ピペラジン・ピペリジン骨格を有する CFA-154 及び CFA-157 がヒット化合物として見出された。WST assay 及び CFA-154/157 のアセチル体である Ac-154/157 との比較検討から、CFA-154/157 は細胞に毒性を与えることなく、タンパク質と共有結合を形成することで β 酸化の機能を抑制していることが分かった。

第 3 章では第 2 章でヒット化合物として得られた CFA-154/157 の作用機序の解明を行った。CFA-154/157 にアルキンを導入した化合物である CFA-166 及び 170 を合成し、gel-based ABPP による評価を行ったところ、これらの化合物は 50 kDa のバンドを特異的にラベル化した。さらにケミカルプロテオミクス解析による標的タンパク質の同定を行ったところ、CFA-154 及び 157 で共通のヒット化合物としてアルデヒド脱水素酵素である proteinX1 が高いスコアでヒットしてきたことから、proteinX を阻害することにより β 酸

化の機能を抑制していることが考えられた。さらに CFA-154/157 の proteinX に対する阻害活性を調べるために精製酵素を用いた検討を行った。CFA-154/157 にアルキンを導入した CFA-170 や 166 は proteinX1 をラベル化する一方で、CFA-166 については proteinX2 もラベル化することから、ピペラジン・ピペリジン骨格の違いで proteinX のサブタイプに対する選択性の違いがあることが分かった。また、CFA-154/157 の proteinX1 に対する阻害活性を調べたところ IC_{50} が ~ 50 nM と非常に高い阻害剤として機能することが分かり、生細胞及び精製酵素で proteinX のラベル化を確認することができた。

また、proteinX と β 酸化の関係について調べた。既存の proteinX inhibitor である DSF や Aldi-6 を生細胞に添加した後に β 酸化検出用蛍光プローブを添加すると蛍光の回復が見られないことから、proteinX を阻害することにより β 酸化の機能が抑制されることが分かった。さらに、ドットプロットによる検討から、ヒット化合物として見出した CFA-154 や CFA-157 は proteinX を阻害することで高反応性アルデヒドである 4-HNE を細胞内に蓄積させ、さらに 4-HNE が β 酸化関連酵素と付加体を形成することで β 酸化の機能を抑制している機構が働いていることが考えられた。

proteinX の阻害剤として有用な化合物を見出すことに成功したが、これら化合物の構造最適化は行っていない。そこで現在は CFA-154/157 のさらなる誘導体の合成を行い、proteinX1 に対する阻害活性を向上させることを目指している。また、阻害活性を向上させた後には生細胞での proteinX の阻害活性を検討し、最終的にはマウス等の *in vivo* における検討も行いたいと考えている。

参考資料

発表論文

[1] Trimethyl-Substituted Carbamate as a Versatile Self-Immolative Linker for Fluorescence Detection of Enzyme Reactions.

Nakamura, N.; Uchinomiya, S.; Inoue, K.; Ojida, A.

Molecules, **2020**, *25*, 2153

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました九州大学薬学研究院創薬ケミカルバイオロジー分野 王子田 彰夫 教授に心より感謝の意を表します。

本研究の細部にわたりご指導をいただき、様々な便宜を図っていただきました 内之宮 祥平 助教, 進藤 直哉 助教, 川西 英治 講師に深く感謝致します。

LC-MS/MS による質量分析の実施やご指導、ご助言を賜りました京都大学大学院工学研究科 浜地 格 教授, 田村 朋則 講師, 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM) の三城 恵美 特任講師、加納 恵子 技術員に深く感謝いたします。

ドットプロットの実験でお世話になりました、九州大学大学院薬学研究院 分子病態解析学 山田 健一 教授、森本 和志 助教 に深く感謝いたします。

研究生生活全般において多大なるご支援を賜りました先輩, 同級生, 後輩の皆様方に深く感謝申し上げます。

研究を陰で支えてくださいました 北田 真理子 秘書, 安河内 麗子 秘書, 福山 可八子 女史に感謝を申し上げます。

大学での研究を支援してくださいました両親に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究が私の中の誇りあるものになったことに対し、私に関わった全ての人に心より感謝致します。