

Dimer 型構造を起点とした低分子 **PD-1/****PD-L1** 結合阻害剤の
設計，合成および構造活性相関研究

2023年1月

川下 誠司

Dimer 型構造を起点とした低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害剤の
設計，合成および構造活性相関研究

筑波大学大学院

理工情報生命学術院

生命地球科学研究群

生命産業科学学位プログラム

博士（生物工学）学位論文

川下誠司

目次

序論	1
第1章 研究の背景.....	1
第1節 がん免疫療法と免疫チェックポイント阻害薬	1
第2節 PD-1/PD-L1 経路	3
第3節 現行の抗体医療における問題点.....	4
第4節 低分子治療薬開発の意義.....	5
第5節 PD-1/PD-L1 複合体の X 線結晶構造.....	6
第6節 中分子および低分子の PD-1/PD-L1 阻害化合物.....	7
第7節 ビフェニル構造を有する低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤.....	8
第8節 「タンパク質-タンパク質相互作用を安定化する分子」の報告例.....	9
第9節 ビフェニル構造を有する化合物の評価結果	10
第10節 分子の対称性に着目したリガンド設計	11
第2章 研究目的	13
本論	15
第1章 複合体結晶構造の C_2 対称性に着目した, Dimer 型リガンドの設計, 合成 および評価結果.....	15
第1節 緒言	15
第2節 Dimer 型化合物の設計と計算化学的手法による考察	15
第3節 Dimer 型化合物の合成	20
第4節 評価方法	23
第5節 Dimer 型化合物の評価	26
第6節 化合物の作用様式の確認.....	30
第2章 Dimer 型化合物の構造活性相関	31
第1節 緒言	31

第2節	ビフェニル環 (A 環) 上の置換基 (R_1 , R_2) の変換.....	32
第3節	ジアルコキシフェニル環 (B 環) 上への置換基 (R_3 , R_4) の導入.....	41
第4節	リンカー部位の変換.....	47
第5節	タンパク質近傍の水の排除を企図した, B 環上への置換基 (R_5) の導入.....	52
第6節	分子内の電子反発によるコンホメーション規制を企図した, B 環内への窒素原子の導入...	58
第7節	細胞機能評価.....	62
第8節	Dimer 型化合物の作用様式の確認.....	63
第3章	高活性かつ分子量が低減した骨格の取得.....	65
第1節	緒言.....	65
第2節	低分子化を指向した化合物の設計.....	65
第3節	化合物の合成.....	67
第4節	低分子化を指向した化合物の評価結果.....	69
小括	74
結論	76
Experimental Section	82
参考文献	145
公表論文リスト		
謝辞		

Abbreviations

aAPCs: artificial antigen presenting cells

AMPA receptor: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor

APCs: antigen presenting cells

BET: bromodomain and extra-terminal domain

Boc: *tert*-butoxycarbonyl-

BRD4: bromodomain-containing protein 4

CD: cluster of differentiation

CPME: cyclopentyl methyl ether

CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen-4

DCs: dendritic cells

Dess-Martin periodinane: 1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1*H*)-on

DIAD: diisopropyl azodicarboxylate

DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine

DMF: dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

EC₅₀: half maximal effective concentration

GluR: glutamate receptor

HAC: heavy atom count

HRMS: high resolution mass spectrometry

ICOS: inducible costimulatory molecule

IFN- γ : interferon gamma

irAEs: immune-related adverse events

K_D : dissociation constant

LAG-3: lymphocyte activation gene-3

LE: ligand efficiency

mAbs: monoclonal antibodies

MD: molecular dynamics

MeI: iodomethane

MLR: mixed lymphocyte reaction

MOM: methoxymethyl-

MW: molecular weight

NaBH(OAc)₃: sodium triacetoxyborohydride

NBS: *N*-bromosuccinimide

NCS: *N*-chlorosuccinimide

NFAT: nuclear factor of activated T-cell

PBMCs: peripheral blood mononuclear cells

PCy₃: tricyclohexylphosphine

PDB: protein data bank

PD-1: programmed cell death-1

Pd₂(dba)₃: tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)

PD-L1: programmed cell death-ligand 1

Pd(OAc)₂: palladium(II) acetate

Pd(PPh₃)₄: tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)

PPh₃: triphenylphosphine

PPI: protein-protein interaction

PPTS: pyridinium *p*-toluenesulfonate

PROTAC: proteolysis targeting chimera

PTSA: *p*-toluenesulfonic acid monohydrate

SAR: structure-activity-relationship

SD: standard deviation

SEC: size exclusion chromatography

SPhos Pd G1: (2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxy-1,1'-biphenyl)[2-(2-aminoethylphenyl)]palladium(II) chloride - methyl-*t*-butyl ether adduct

SPR: surface plasmon resonance

TBAF: tetra-*n*-butylammonium fluoride

TBS: *tert*-butyldimethylsilyl-

TCR: T cell receptor

THF: tetrahydrofuran

THP: tetrahydropyranyl-

TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin protein-3

TLR: toll-like receptor

Vilsmeier reagent: (chloromethylene)dimethyliminium chloride

VISTA: V-domain Ig suppressor of T-cell activation

Xantphos: 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene

XPhos Pd G2: chloro(2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-tri-*i*-propyl-1,1'-biphenyl)(2'-amino-1,1'-biphenyl-2-yl) palladium(II)

序論

第1章 研究の背景

第1節 がん免疫療法と免疫チェックポイント阻害薬

近年、免疫系を利用して抗腫瘍免疫を回復させるがん免疫療法の登場により、がん治療の分野で大きな進展が見られる。がん免疫療法の歴史は古く、1950年代には免疫監視機構の概念によりがん免疫療法の理論的基礎が確立された¹。悪性腫瘍の進行における免疫細胞の重要性は、19世紀初頭から認識されていたが、免疫チェックポイント阻害療法の登場により免疫腫瘍学（immuno-oncology）に対する科学的関心が再び高まっており、近年では外科手術、細胞毒性化学療法、放射線療法、標的療法に続くがん治療の「5本目の柱」とも言われるほどに急速に発展している²。

がん免疫療法は、化学療法や放射線療法等の従来の治療法とは対照的に、免疫細胞やサイトカインを利用して宿主の防御システムを構築し、その抗腫瘍免疫作用によってがん細胞の排除を行う治療法である^{3,4}。がん免疫療法には、免疫賦活剤療法、サイトカイン療法、養子細胞移植（ATC: adoptive T cell transfer therapy）、遺伝子導入により改変したT細胞を投与するCAR-T細胞療法（chimeric antigen receptors T-cell therapy）、がんワクチン等が含まれるが、それらの中で最も大きな成功を収めているのが免疫チェックポイント阻害療法である。免疫チェックポイント阻害剤は、その有効性と比較的管理しやすい副作用のプロファイルにより、一部の固形がん（転移性メラノーマ、非小細胞がん）においては治療の第一選択となっている⁵⁻⁸。

免疫チェックポイントは、免疫応答の過程においてT細胞受容体（TCR: T cell receptor）の抗原認識を調節するための一種のシグナルである。免疫チェックポイントには共刺激免疫チェックポイントおよび共抑制免疫チェックポイントの2種類が含まれている（Table 1）。共刺激免疫チェックポイントは免疫の進行を刺激し亢進させる機能を担い、CD28, ICOS,

CD137 等の分子が該当する。一方、共抑制免疫チェックポイントは免疫の進行を阻害する機能を担い、PD-1,CTLA-4,VISTA 等の分子が含まれる。免疫系が病原体を攻撃しているとき、これらの免疫チェックポイント分子のはたらきにより正常組織を損傷から保護する。この制御機構は、腫瘍形成時にはその抗腫瘍免疫反応に対してブレーキの役割を果たす。すなわち、腫瘍細胞上に発現するこれらのチェックポイント分子のリガンドが結合すると、腫瘍細胞に対する T 細胞の攻撃が抑制される。免疫チェックポイント療法は、共刺激免疫チェックポイントに対するアゴニスト、または共抑制免疫チェックポイントに対する阻害剤を用いることにより免疫系を機能させ、抗腫瘍免疫反応を再活性化する治療法である⁹。このうち現在までに米国食品医薬品局（FDA: Food and Drug Administration）から承認された免疫チェックポイント阻害剤は、いずれも共抑制受容体あるいはそのリガンドへの結合を介して受容体—リガンド間の結合を阻害する抗体であり、抗 CTLA-4 抗体（Ipilimumab）、抗 PD-1 抗体（Nivolumab, Pembrolizumab, Cemiplimab, Dostarlimab）、抗 PD-L1 抗体（Avelumab, Durvalumab, Atezolizumab）および抗 LAG-3 抗体(Relatlimab)がある。

Table 1. T 細胞応答を制御する共刺激および共抑制免疫チェックポイント分子の例

	受容体 (T 細胞上に発現)	リガンド (APCs 上に発現)
共刺激 チェックポイント	CD28	CD80 / CD86
	ICOS	B7RP1
	CD137	CD137L
共抑制 チェックポイント	CTLA-4	CD80 / CD86
	PD-1	PD-L1 / PD-L2
	TIM-3	Galectin-9
	LAG-3	MHC class II

免疫チェックポイントの中で、その機能が最もよく研究されているのが細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CD152 としても知られる) と、プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1: programmed cell death-1, CD279 としても知られる) である。

CTLA-4 は T 細胞上に発現する共抑制チェックポイントである。マクロファージ、樹状細胞 (DCs: dendritic cells), B 細胞等の抗原提示細胞 (APCs: antigen presenting cells) からのシグナルによって開始される T 細胞の活性化に伴ってその表面への発現が亢進し¹⁰, その発現量は TCR (および CD28) による刺激の強度に依存する。CTLA-4 は CD28 と構造的に類似しており, リガンドである CD80 や CD86 を CD28 と共有することで, T 細胞の持続的な活性化と増殖を阻害して, 細胞周期の停止を引き起こす¹¹。また CTLA-4 欠損マウスは致死性の自己免疫疾患を発症しリンパ球増殖の表現型が見られることから, 生体において強力な免疫抑制機能をもつと考えられている¹²。このような CTLA-4 の機能によって, TCR に対するリガンドの濃度や親和性が大きく変化した場合にも T 細胞の活性化レベルが一定に保たれる。

CTLA-4 の作用を阻害することでがんに対する T 細胞の治療効果を高めることができるという考えのもと抗 CTLA-4 抗体の開発が実施され¹³, 2011 年に Ipilimumab が最初の免疫チェックポイント阻害剤として FDA から承認された^{14,15}。

第 2 節 PD-1/PD-L1 経路

PD-1 は T 細胞, B 細胞, NK 細胞等の表面に発現する共抑制チェックポイントであり, その主な役割は末梢組織で抗原を認識したエフェクター T 細胞による組織内の炎症反応の制御である。PD-1 は T 細胞の活性化により発現が誘導される¹⁶。そのリガンドとの結合によりホスファターゼ SHP250 の活性化を介して T 細胞の応答を遮断する¹⁷ ことで自己免疫を抑制する¹⁸⁻²³。その一方でそのはたらきにより腫瘍微小環境 (tumor microenvironment) においては主要な免疫抵抗性機構となる^{24,25}。

PD-1 は、そのリガンドである PD-L1 (programmed cell death-ligand 1, 別名 B7-H1 または CD274) および PD-L2 (programmed cell death-ligand 2) と結合する。PD-L2 は主に APC で発現しているのに対し、PD-L1 はリンパ系と非リンパ系組織²⁶⁻²⁸ および様々な腫瘍²⁹⁻³¹ に広く発現し、非造血組織において炎症性サイトカインによって誘導される³²⁻³⁴。腫瘍細胞に発現する PD-L1 は PD-1 との相互作用により腫瘍特異的な T 細胞の応答を抑制する³⁵⁻³⁷。この機構は腫瘍の免疫回避機構として知られている²⁶⁻²⁸。

このように、PD-1/PD-L1 経路はがん細胞に対する免疫反応を抑制する役割を担う。そのため、PD-1/PD-L1 の結合阻害によって免疫系を正常化し、T 細胞の抗腫瘍免疫反応の再活性化が期待される抗 PD-1 抗体の開発がなされた。その臨床における高い効果は広く認識されており、2014 年に抗 PD-1 モノクローナル抗体である Nivolumab と Pembrolizumab が FDA より承認された。また同じ PD-1/PD-L1 経路の阻害を標的とした抗 PD-L1 モノクローナル抗体の開発も進み、現在までに 4 種類の抗 PD-1 抗体と 3 種類の抗 PD-L1 抗体が承認され、臨床現場で治療に用いられている³⁸⁻⁴⁰。

第 3 節 現行の抗体医療における問題点

モノクローナル抗体 (mAbs) の抗がん剤としての高い治療効果は臨床における治療成績で示されている。その一方で、抗体医療におけるいくつかの問題点も顕在化している。

例えば、治療に関連した重篤な有害事象として、細胞毒性を引き起こし正常組織に影響を与える免疫関連有害事象 (irAEs: immune-related adverse events)⁴¹⁻⁴³ がある。

irAEs は薬剤投与による免疫系のバランス異常を原因として生じ⁴⁴、幅広い組織や臓器において発現が報告されている。最も重篤な合併症は皮疹として現れ、その他に肺炎、甲状腺機能低下症、膵炎、脳症、心筋炎、免疫細胞減少症等が報告されている⁴⁵。irAE 発現時には免疫抑制剤の投薬による対処が行われるが、同時に感染症の発症リスクが高まる可能性がある⁴⁶。mAbs は体内での消失半減期が長く持続的に標的を抑制するため、その持続的な標

的阻害作用が重篤な irAEs の原因となっている可能性があるとの指摘もある⁴⁷⁻⁴⁹。

また、mAbs は分子量が約 150 kDa と大きいため、経口吸収性が無く投与経路が静脈投与に限られるのに加え、腫瘍への浸透性が低く固形がんに対する有効性が限定的である点も指摘されている^{50,51}。加えて、高い生産コストに由来する高額な治療費も患者にとっての大きな負担となる。さらに、より高い効果を得るためには他の治療薬との併用が必要となるため、チェックポイント抗体療法は高額になることが指摘されている⁵²。

第4節 低分子治療薬開発の意義

これらの問題点に関して、抗体医療と一般的な低分子治療薬との比較を **Table 2** にまとめた。

低分子治療薬は抗体と比較して分子量が小さいため、医薬品候補としていくつかの利点がある。例えば、経口剤化が可能である点、腫瘍組織への浸透性を有する点、抗体と比較して半減期が短いため有害事象が発生した際の対処が比較的容易になる点、製造コストが低い点、保管・運搬時の管理が容易である点、免疫原性が無い点等である。これらの特徴は、治療を受ける患者の生活の質 (QOL: quality of life) の向上に大きく貢献すると考えられる。

このように、低分子治療薬は現行の抗体医療における諸課題を解決する可能性があり⁵³、その創出が望まれているものの⁵⁴⁻⁵⁶、現在までに承認薬は無い。それゆえ、低分子治療薬の開発は学術的にも、臨床的にも、また産業的にも意義があるといえる。

Table 2. 抗体医療と低分子治療薬の比較

	抗体医療		低分子治療薬
承認薬	抗 PD-1 抗体 Nivolumab Pembrolizumab Cemiplimab Dostarlimab	抗 PD-L1 抗体 Avelumab Durvalumab Atezolizumab	なし
投与経路	非経口投与に限定		経口剤化が可能
腫瘍分布	高分子量のため限定的		物性の調整により改善が可能
消失半減期	～数週間		～数時間 緊急の有害事象への対処が容易
コスト (製造・流通 ・品質管理)	高コスト 品質管理が難しい 輸送・保管時の 厳密な温度管理が必要		低コスト 品質管理・流通・保管が容易

第5節 PD-1/PD-L1 複合体の X 線結晶構造

Figure 1 に PD-1/PD-L1 複合体の X 線結晶構造を示す。PD-1 と PD-L1 は、多数の脂溶性残基および極性残基間での相互作用を形成して結合し、その相互作用面の広さは $1,970 \text{ \AA}^2$ と非常に広い⁵⁷。また、どちらのタンパク質も結合面が β シート構造領域であるため、その界面は平面的で低分子化合物が結合できるポケットが見られない。そのため、低分子化合物が阻害する標的分子としては非常に難しいことが予想された^{58,59}。

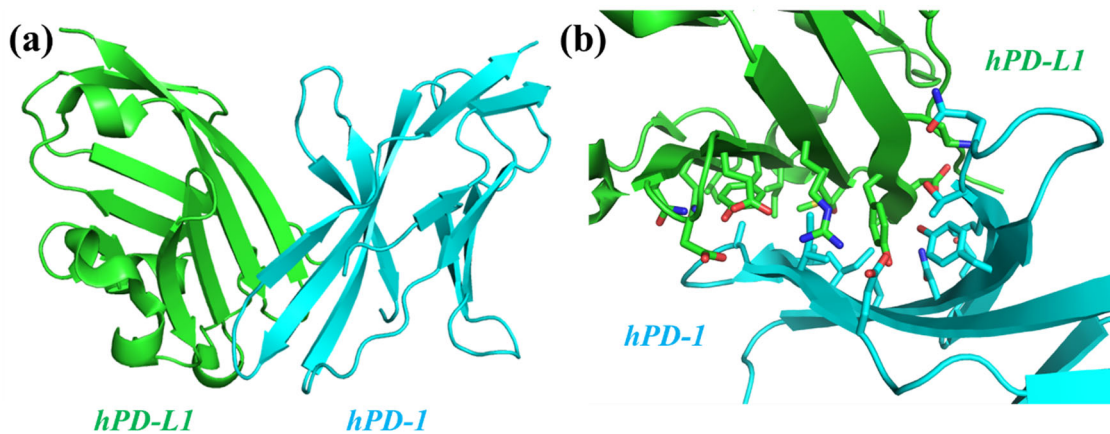


Figure 1. hPD-1-hPD-L1 複合体の X 線結晶構造 (PDB ID: 4ZQK)

緑: hPD-L1; 水色: hPD-1 でそれぞれ示す。(a) 全体構造 (b) PD-1 と PD-L1 の結合界面付近を拡大して表示し、相互作用に関与するアミノ酸残基の側鎖を stick で示す。

第 6 節 中分子および低分子の PD-1/PD-L1 阻害化合物

前述の通り、低分子治療薬は抗体医療におけるいくつかの問題を解決する可能性があるが、現在までに承認薬は無い。

2014 年、BMS 社と Peptidream 社が創製した大環状ペプチドの PD-1/PD-L1 阻害化合物が報告された (Figure 2)^{60, 61}。X 線結晶構造解析により、大環状ペプチド化合物は抗体と同様に PD-L1 上の PD-1 との結合界面部位 (epitope) に結合することにより PD-1/PD-L1 の結合を阻害することが示された⁶²。大環状ペプチドは、相互作用面が大きく低分子化合物では阻害が難しいタンパク質タンパク質相互作用を標的とした新しいモダリティーとして近年注目を集めている。分子量が大きいため経口剤での開発は不可能であり、抗体と比較した際の服薬上の利点は少ないものの、生産コストが低減するメリットがある。開発化合物である **BMS-986189** の臨床第 I 相試験が実施されたが、2017 年に開発が中止された。

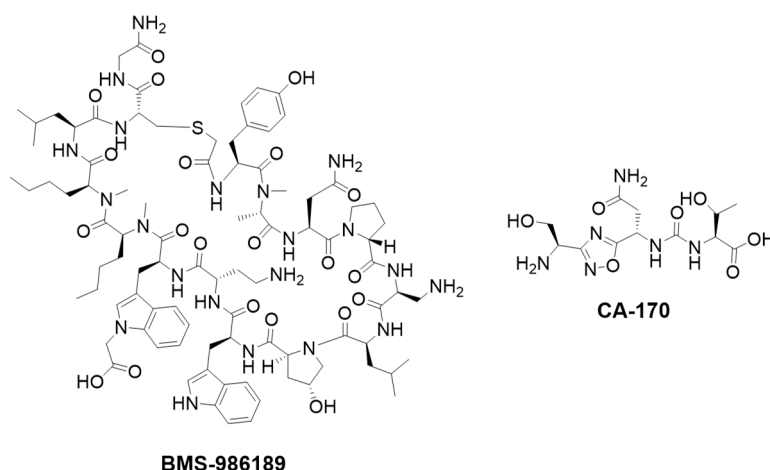


Figure 2. 大環状ペプチドとペプチドミメティック化合物の PD-1/PD-L1 阻害薬

低分子化合物としては、現在までに2つのクラスの化合物が報告されている。一つは、複素環をアミド結合の生物学的等価体として用いたペプチドミメティック化合物である。その中で、Aurigene 社が創製し Curis 社が開発する **CA-170** (**Figure 2**) は、PD-L1, PD-L2 および同じく共抑制免疫チェックポイント分子である VISTA (V-domain Ig suppressor of T cell activation) を標的分子とした経口剤の低分子化合物で、臨床試験を実施中である⁶³⁻⁶⁵。もう一つは、次節で述べるビフェニル構造を有する化合物である。

第7節 ビフェニル構造を有する低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤

2015年に、ビフェニル構造を有する低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤が報告された^{66,67} (**Figure 3**)。ビフェニル型化合物 **BMS-202** は、その公開出願の中で生化学的アッセイ (HTRF: homogeneous time-resolved fluorescence) による PD-1/PD-L1 結合阻害活性は $IC_{50} = 18 \text{ nM}$ であると報告された。次いで2016年、Zakらにより **BMS-202** と PD-L1 との複合体結晶構造が報告され、その作用様式は PD-L1 のホモ二量体 (homodimer) 化の誘導および安定化による PD-1/PD-L1 の結合阻害であることが、結晶構造と生化学的実験結果から明らかにされた

⁶⁸。

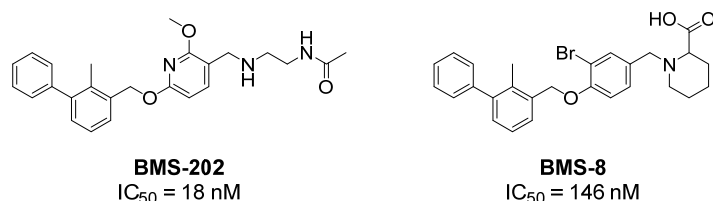


Figure 3. 低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤として報告された化合物
 化合物名と IC_{50} 値は公開特許に記載されたものを引用

第8節 「タンパク質-タンパク質相互作用を安定化する分子」の報告例

タンパク質-タンパク質相互作用を安定化する分子 (PPI Stabilizer) は、通常のタンパク質-タンパク質結合を直接的に阻害する分子 (PPI Inhibitor) とは異なる機構で PPI 阻害をする分子として、近年注目を集めている⁶⁹⁻⁷¹。PPI Stabilizer の報告例は多くないものの、それらに共通する特徴は複合体の対称性である。実際、報告のあるほとんどの例は単一分子のホモ二量体 (homodimer) か、あるいは相同性の高いヘテロ二量体 (heterodimer) のタンパク質に対し、対称性の高い PPI Stabilizer リガンドが結合して複合体を安定化している。

この特徴をリガンド設計に応用した例として、BET (bromodomain and extra-terminal domain) タンパク質阻害剤の **biBET**⁷²、AMPA 型グルタミン酸受容体の modulator である **(R, R)-2a**⁷³、TLR agonist である **Diprovocim**⁷⁴ 等が見られ、いずれも起点となるリガンドから (偽) 対称な構造にすることで高活性な PPI Stabilizer リガンドを得ている (**Figure 4**)。

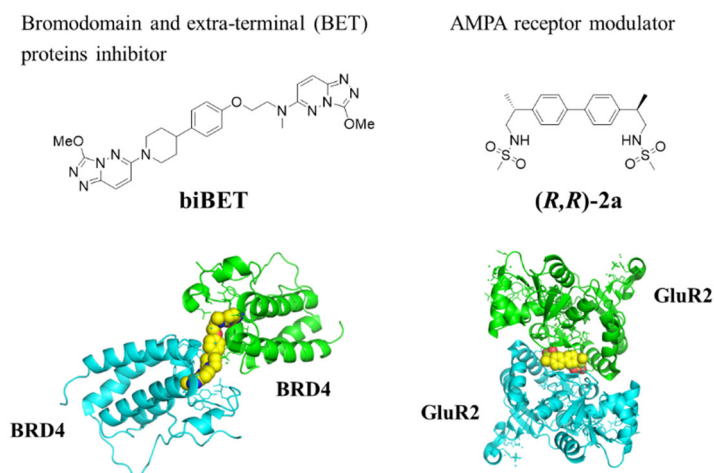


Figure 4. タンパク質-タンパク質相互作用を安定化する化合物の報告例

左上：**biBET** の構造，左下：BET ファミリーに含まれる BRD4 の homodimer と **biBET** の複合体構造 (PDB ID: 5AD3)，右上：**(R,R)-2a** の構造，右下：AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットである GluR2 の homodimer, (*S*)-グルタミン酸および**(R,R)-2a** の複合体構造 (PDB ID: 3BBR) をそれぞれ示す。

第9節 ビフェニル構造を有する化合物の評価結果

低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤を得る上での起点となる化合物の探索として，前述のペプチドミメティック化合物とビフェニル構造を有する **BMS-202** およびその類縁体を合成し，PD-1 および PD-L1 に対する結合評価を実施した。ペプチドミメティック化合物の公開特許に記載された類縁体化合物は，どちらに対しても結合を示さず，また研究開始時（2016 年）には PD-1/PD-L1 阻害メカニズムに関する報告は無く，不明であった。そのため，ペプチドミメティック化合物についてはそれ以上の検討は実施しなかった。一方で，**BMS-202** およびその類縁体は PD-L1 に対する結合 ($K_D = 8 \text{ nM}$) を示した。そこで，**BMS-202** を用いて細胞評価系における PD-1/PD-L1 阻害活性を評価したところ，40 μM まで阻害傾向を示さなかった。しかしながら，**1** の類縁体を複数合成し評価したところ，PD-L1 に対する結合強度が高い化合物は，弱いながらも細胞評価系で阻害傾向を示した (**Figure 5**)。この結果から，より結合強度が向上した化合物であれば，細胞評価系で阻害活性が発現することが期待された。

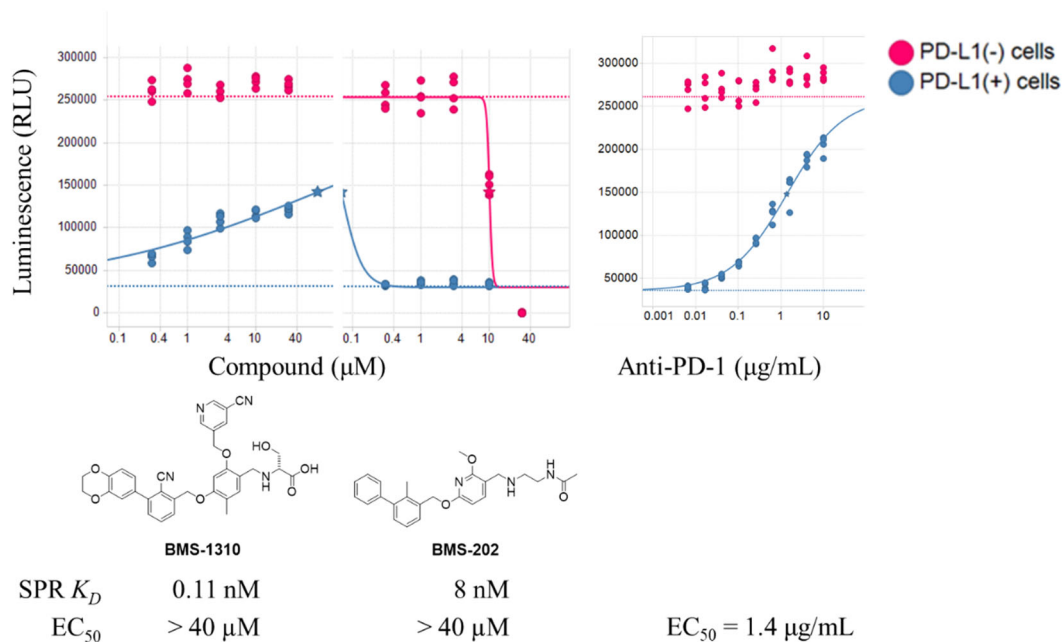


Figure 5. BMS-202, BMS-1310 および抗 PD-1 抗体の細胞評価系における PD-1/PD-L1 阻害活性評価結果

SPR K_D : hPD-L1 に対する結合強度, EC_{50} : Blockade bioassay における 50%阻害濃度, 赤丸: PD-L1(-)条件における発光強度, 青丸: PD-L1(+)条件における発光強度

第 10 節 分子の対称性に着目したリガンド設計

細胞評価系で活性発現する低分子化合物を得るために、ビフェニル化合物から構造変換を行い、より高い結合活性を示す化合物を得ることを計画した。そのための方策を以下に記す。

BMS-202 と hPD-L1 homodimer の複合体結晶構造を **Figure 6** に示す。全体構造は 2 分子の hPD-L1 が、PD-1 との相互作用面同士を会合面として homodimer を形成し、両者の間隙をリガンドである **BMS-202** が埋める形で位置する三者複合体である。この複合体は全体が C_2 対称構造の特徴的な構造であり、その複合体の C_2 対称軸はリガンドのビフェニル構造の中心付近に位置する。構造を詳細に観察すると、リガンドは PD-L1 homodimer の結合界面の中央付近から片方の末端（溶媒露出領域）の間の空間において両方の単量体（monomer）タンパク質表面と複数の相互作用を形成しているが、その一方で中央付近から反対側の溶

媒露出領域までの空間は未充填であった。

以上の観察から、活性向上のための方策として以下の仮説を考えた。すなわち、リガンドを対称構造である Dimer 型構造にすれば、伸長した構造が未充填の空間を充填し、かつ **BMS-202** が形成する相互作用と同じ作用が獲得できるため、PD-L1 に対する結合強度が増強し、その結果細胞評価系で阻害活性を示す化合物の取得につながる。このような「複合体の対称性に着目したリガンド設計」の手法は、前述の PPI Stabilizer の例にも見られ、上記の仮説の妥当性を支持するものであると考えられた。

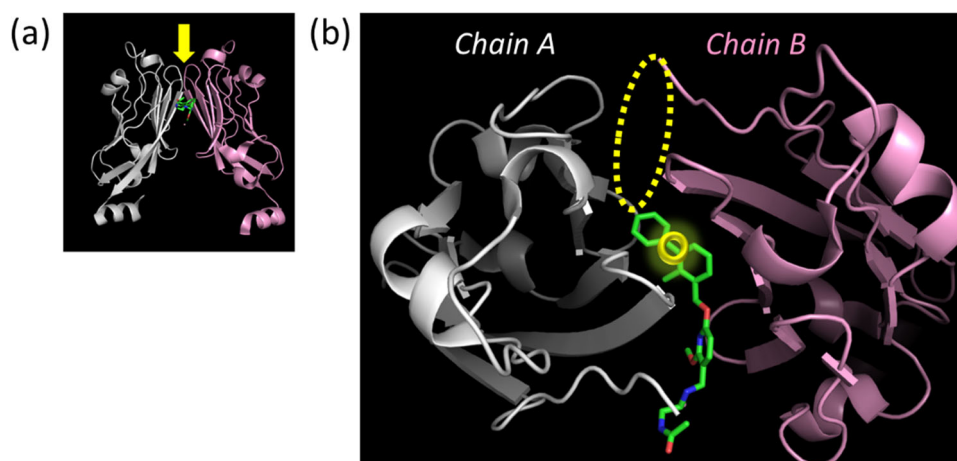


Figure 6. BMS-202 と hPD-L1 homodimer の複合体結晶構造 (PDB ID: 5J89)

白: hPD-L1 (chain A); ピンク: hPD-L1 (chain B); 緑: **BMS-202** をそれぞれ示す。(a) 全体構造
(b) 図(a)の黄色の矢印の方向から観察した構造を示す。黄色○印: 複合体構造の対称軸の位置; 黄色点線で囲んだ領域: 非占有空間をそれぞれ示す。

第2章 研究目的

第1章で述べた通り、低分子 PD-1/PD-L1 阻害薬は現行の抗体医療におけるいくつかの問題点を解決することが期待されるものの、未だ承認薬は無く、その開発によって治療を受ける患者に対する新たな選択肢を提供する観点から、臨床的な意義がある。また、阻害活性を示す新規骨格の創出、あるいは構造活性相関研究に関する知見を提供することは、低分子阻害剤の開発に資すると考えられ、学術面および産業面で意義がある。

本研究で標的とする PD-1/PD-L1 相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用 (PPI: protein-protein interaction) である。低分子化合物による PPI 阻害は、従来の単一のタンパク質分子とは異なる新たな創薬標的として近年注目を集めている一方で、低分子による阻害は一般的には難易度が高いと認識されている^{75,76}。それゆえ、PPI 阻害剤探索の方法論に関する知見を提供することにも学術的な意義がある。

加えて、本研究で起点化合物として選択したビフェニル型化合物 **BMS-202** はタンパク質-タンパク質相互作用の誘導および安定化を介した特徴的な阻害形式 (PPI Stabilizer) を示す。前述の通り PPI Stabilizer の報告は少なく、またその設計に複合体の対称性を考慮した分子設計の概念を適用した例は少ない。それゆえ、その方法論の適応性の検討および親和性向上の知見を提供することは、他の PPI Stabilizer の設計にも有用であると考えられる。

また、一般に低分子薬の創薬研究においては、高い活性を追求する過程で分子量が大きくなる傾向があり、そのことが原因で高活性と経口吸収性をはじめとする諸物性はしばしばトレードオフの関係になる。それゆえ、低い分子量で高い活性を示す化合物の設計は、創薬の領域において重要な命題であり続けている。そのための方法論と事例を提供することにも学術的な意義がある。

以上の背景に基づき、本研究では低分子の利点である経口吸収性を有する阻害薬の創出を指向して、そのための重要な課題として考えられる以下の2点を研究目的とした。

(1) 「細胞評価系で活性を示す低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤の探索」

(2) 「高活性かつ分子量が低減した骨格の取得」

(1) 「細胞評価系で活性を示す低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤の探索」では、分子の対称性に着目したリガンド設計の適用検討と、探索的な構造活性相関研究による低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害薬の開発に資する知見の提供に主眼を置いて研究を展開する。その方法としては、研究の背景で述べた既知情報の考察に基づき、複合体結晶構造の C_2 対称性に着目したリガンド設計を既知のビフェニル型化合物に適用した、Dimer 型リガンドを設計することによって活性な骨格の創出を目指す。続いて、得られた Dimer 型化合物の構造活性相関研究によってより活性が向上した化合物を取得することを計画した。

(2) 「高活性かつ分子量が低減した骨格の取得」では、低分子化の方法論の検討に主眼を置いて研究を展開する。その方法としては、(1) の検討で得られた知見を活用して、Dimer 型骨格から活性を維持しつつ部分構造を削除した新規骨格取得の検討を計画した。

以上述べた研究背景を踏まえ、低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害薬の探索研究を開始した。

本論は以下の 3 章で構成する。

第 1 章では、既知の低分子リガンドと PD-L1 homodimer との複合体結晶構造の C_2 対称性に着目した、Dimer 型リガンドの設計、合成および評価結果について記述した。

第 2 章では、Dimer 型化合物の構造活性相関研究の結果について記述した。

第 3 章では、活性と吸収性を併せ持つ低分子阻害剤の開発を指向して、高活性かつ分子量が低減した新規骨格取得の検討について記述した。

本論

第1章 複合体結晶構造の C_2 対称性に着目した, Dimer 型リガンドの設計, 合成および評価結果

第1節 緒言

本研究の目的である「細胞評価系で活性を示す低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害薬の探索」の起点として, 低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害剤であるビフェニル型化合物 **BMS-202** を選択した。序論第1章において, 類縁体の評価結果から, PD-L1 に対する結合強度の増強によって細胞評価系での阻害活性発現が期待されたことから, ビフェニル型化合物の構造変換によって結合強度の増強を考えたことを述べた。また, そのための方法として, **BMS-202**-PD-L1 homodimer の複合体結晶構造の観察に基づいた「複合体構造の対称性に着目したリガンド設計」を適用することも述べた。本章では, 上記の複合体構造とリガンド設計について詳述し, その合成と化合物の評価方法および評価結果について述べる。

第2節 Dimer 型化合物の設計と計算化学的手法による考察

本研究における対称性に基づくリガンド設計の概要を **Figure 7** に示す。テンプレート化合物として, (5-cyanopyridin-3-yl)methoxy 基を有し, 合成・評価したビフェニル型化合物の類縁体の中で高い結合親和性を示した **BMS-1327** を選択した。**BMS-1327** の PD-L1 に対する結合様式は, 構造的類似性が高く, 複合体構造情報が報告されている **BMS-202** と同じであると推定された。そこで, **BMS-1327** に対して「複合体分子の対称性に着目したリガンド設計」を適用し, 対称型の Dimer 型化合物を設計することを考えた。

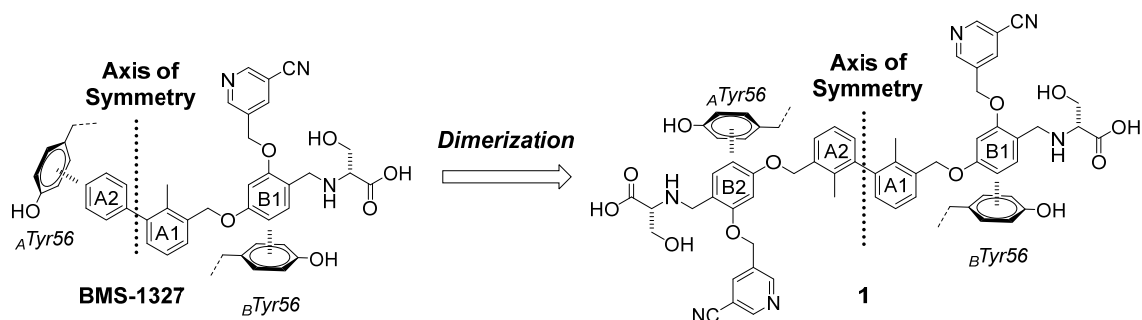


Figure 7. 複合体構造の対称性に着目したリガンド設計

ここで改めて **BMS-202** と hPD-L1 homodimer との三者複合体の構造について詳述する。全体構造はリガンドのビフェニル構造の中心付近に対称軸がある C_2 対称構造である。2 分子の hPD-L1 が、PD-1 との相互作用面同士を使用して互いに向かい合い、homodimer を形成する。両者の相互作用面にリガンドが結合し、両 monomer タンパク質との間に複数の相互作用を形成することで三者複合体の安定化に寄与していると推察される。実際、結晶構造の観察から、リガンド中の複数の部分構造がタンパク質との相互作用に関与することが確認できる。ビフェニル構造 (Figure 7 中で A1 および A2 環に対応する) は PD-L1 chain A の Tyr56 側鎖 (以下 $_A$ Tyr56) のベンゼン環との T-shaped π - π スタッキングに加え、 $_A$ Met115 および $_B$ Ala121 との CH- π 相互作用を形成している。A1 環上のメチル基は周辺の脂溶性残基で囲まれた空間を充填している。また、ジアルコキシピリジン環 (B1 環に対応する) は、 $_B$ Tyr56 と π - π 相互作用を形成している。加えて、末端のアミノ基を含む極性基は、chain A および B 両方の極性残基との間で、直接あるいは水を介した水素結合および静電的相互作用によって複数の極性相互作用を形成している。

2 分子の hPD-L1 monomer 間に見られる主なコンホメーションの相違点は、両者の Tyr56 側鎖のベンゼン環の位置である。 $_A$ Tyr56 のベンゼン環は、**1** のビフェニル構造の末端芳香環と直交する位置にあって、chain A-B 間の隙間に蓋をするように、脂溶性の壁を形成している (Figure 7 BMS-1327, Figure 8 (b), Figure 9 (b))。一方、 $_B$ Tyr56 のベンゼン環はタンパク質表面に沿うように位置している (Figure 7, Figure 9 (b))。リガンドを対称構造にするには

BMS-1327 のビフェニル部の末端芳香環 (A2) から先に置換基を伸長する必要があるが、上記の三者複合体の構造からは、その先に置換基伸長を許容する空間がなく、_ATyr56 の側鎖との衝突が懸念された (Figure 9 (b))。

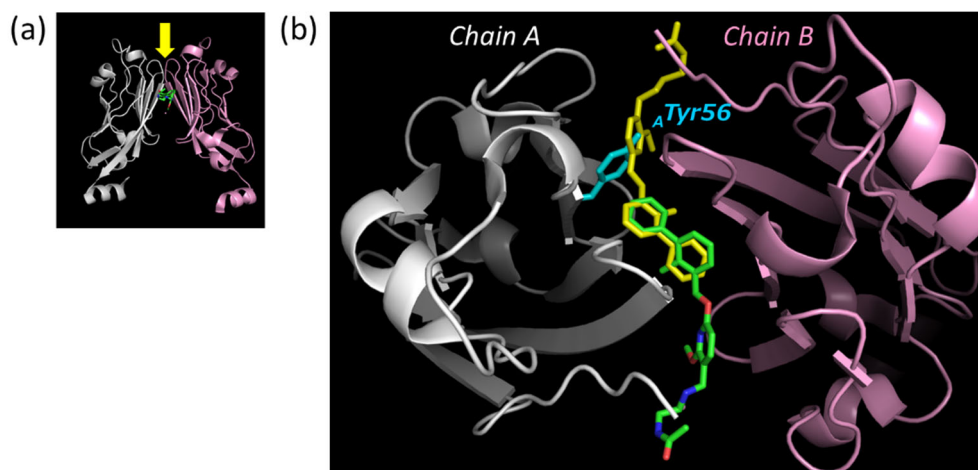


Figure 8. 複合体結晶を利用した Dimer 型リガンドの設計

(a) BMS-202 と hPD-L1 homodimer の複合体結晶構造 (PDB ID: 5J89)。白: hPD-L1 (chain A) ; ピンク: hPD-L1 (chain B) ; 緑: BMS-202 をそれぞれ示す。(b) 図(a)の黄色の矢印の方向から観察した構造を示す。黄色: 複合体構造の対称軸に対して Ligand を 180°回転させた構造; シアン: chain A における Tyr56 の側鎖をそれぞれ示す。

PDB (protein data bank) ⁷⁷ には、apo-hPD-L1 および PD-1 との複合体を含む hPD-L1 の結晶構造がいくつか報告されている ^{57,78,79}。そこで、既報の結晶構造における Tyr56 の配置を観察することでその配置の柔軟性を推定し、対称型のリガンド設計の妥当性を考察した。

Figure 9 (c)に、apo-hPD-L1 (PDB ID: 5C3T) の Tyr56, hPD-1/hPD-L1 複合体 (PDB ID: 4ZQK) における Tyr56, 三者複合体における _ATyr56 および chain B を chain A に重ねた場合の _BTyr56 を重ねて示す。apo-hPD-L1 と hPD-1/hPD-L1 複合体の結晶構造では、三者複合体の _BTyr56 の側鎖と同様、Tyr56 の側鎖がタンパク質表面に沿うような配置であり、三者複合体における _ATyr56 の位置とは異なっていた。これらの構造情報の観察から、Tyr56 の側鎖は十分に柔

軟で、どちらの配置を取ることも可能であると推定した。つまり、化合物の伸長の際に障害にはならないため、リガンドを対称構造にすることは可能であると考察した (Figure 9 (c))。実際、本研究を実施中に、Guzik らから置換基の導入によって $_A$ Tyr56 の位置が変化した複合体結晶構造 (PDB ID: 5NIU) の報告がなされ、上記の推定が裏付けられた⁸⁰。

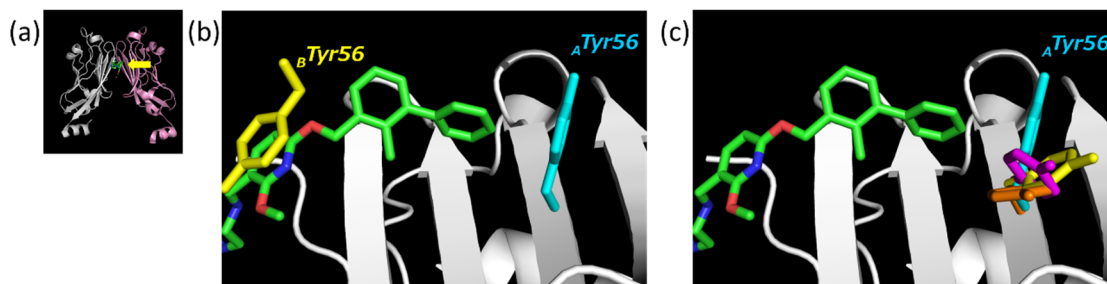


Figure 9. hPD-L1 における Tyr56 側鎖の位置

(a) BMS-202 と hPD-L1 homodimer の複合体結晶構造 (PDB ID: 5J89)。白: hPD-L1 (chain A) ; ピンク: hPD-L1 (chain B) ; 緑: BMS-202 をそれぞれ示す。(b) 図(a)の黄色の矢印の方向から観察した構造を示す。シアン: chain A における Tyr56 の側鎖; 黄色: chain B における Tyr56 の側鎖をそれぞれ示す。(c) 図(b)に対し以下の各残基を重ね合わせて表示した。黄色: chain B を chain A に対して重ね合わせた時の chain B の Tyr56 の側鎖; マゼンタ: apo-hPD-L1 (PDB ID: 5C3T) における Tyr56 の側鎖; 橙色: hPD-1-hPD-L1 複合体結晶 (PDB ID: 4ZQK) における Tyr56 の側鎖をそれぞれ表す。

以上の考察から、対称軸をビフェニル構造の中心に配置して全体を対称化した Dimer 型化合物 **1** を設計した。化合物 **1** は、Monomer 型化合物 BMS-1327 のビフェニル部の先への構造の伸長によって $_A$ Tyr56 側鎖の配置の変化を誘発して、PD-L1 homodimer の間隙に新しいトンネル状の空間を生成させ、生成した空間を伸長した構造によって充填し、かつ Monomer 型リガンドと同じ様式の相互作用を取得することによって PD-L1 homodimer に対する親和性を高めることを意図している。

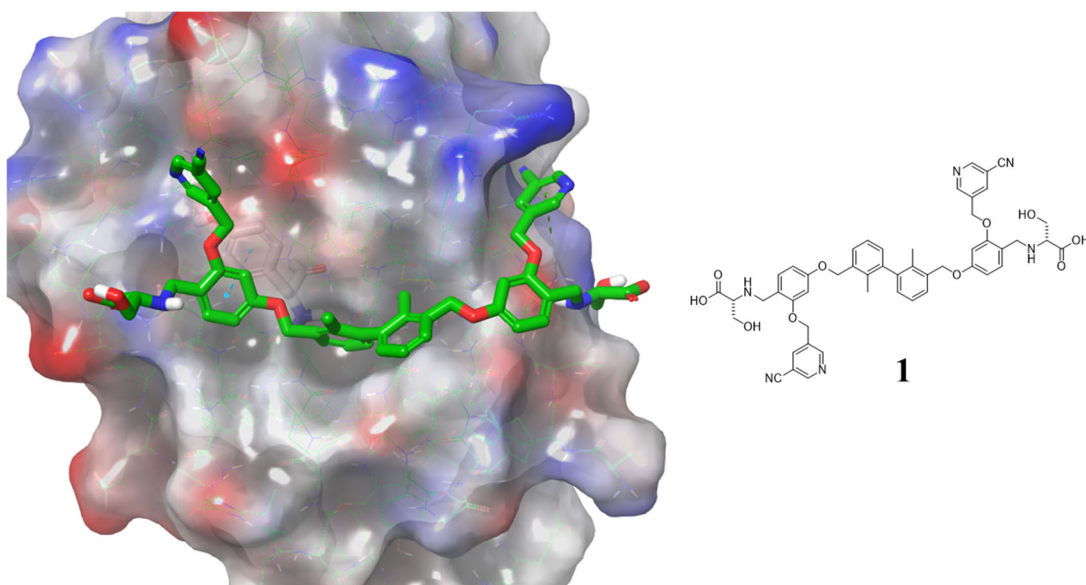


Figure 10. Dimer 型化合物 1 の docking pose

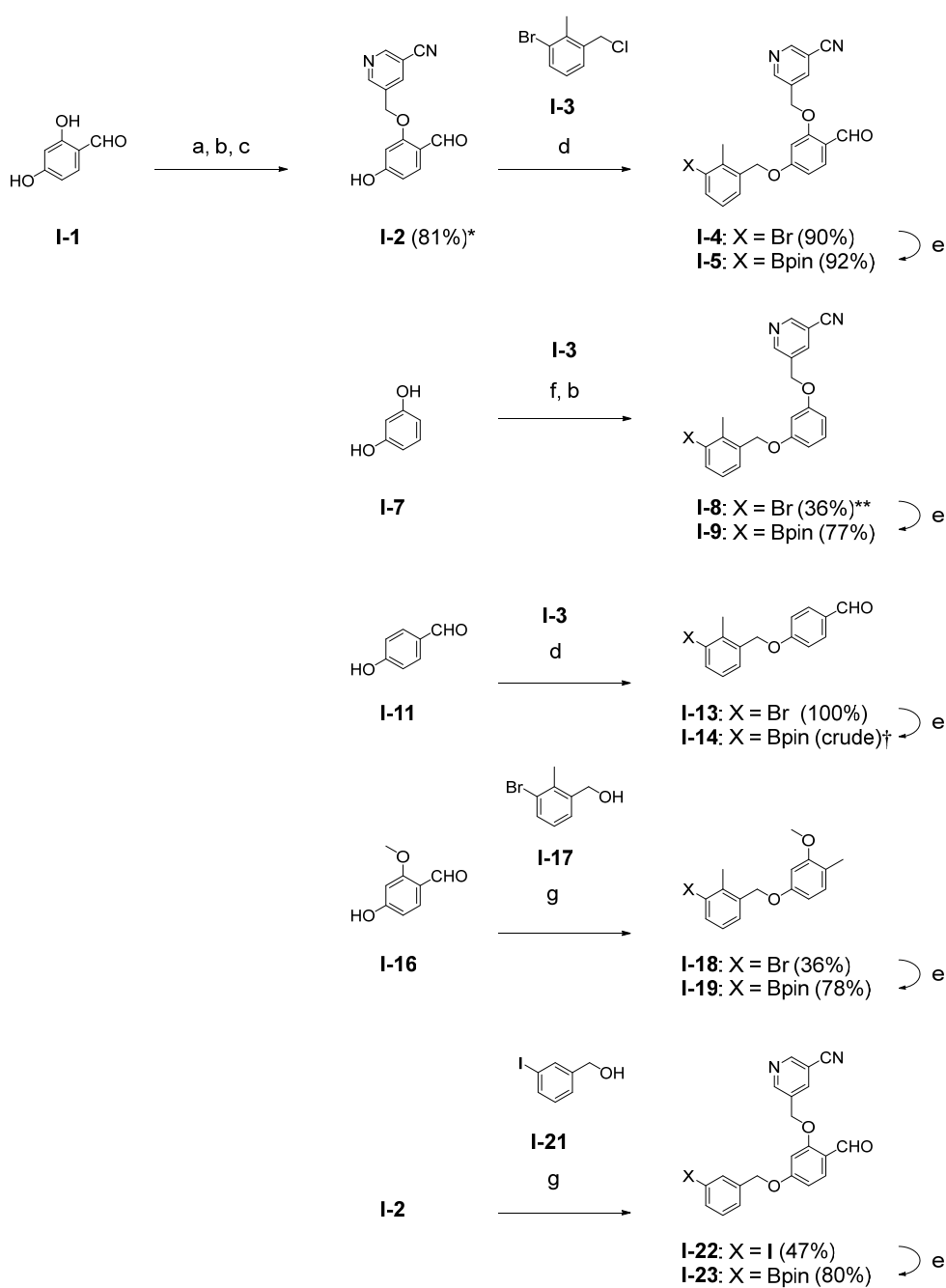
BMS-202 と hPD-L1 homodimer の複合体結晶構造 (PDB ID: 5J89) の chain B を chain A に重ね合わせ、2分子の chain B からなる PD-L1 homodimer を作成した。化合物 **1** の Ligand docking (Glide, Maestro, Schrödinger, LLC) を行い、docking pose を得た。図では化合物 **1** と片方の chain のみを表示している。

さらに Dimer 型化合物 **1** を、計算化学的手法 (docking simulation) を用いて考察した (**Figure 10**)。その結果、設計した化合物 **1** の PD-L1 homodimer に対する docking pose が得られ、Monomer 型化合物の結合様式から推定された通り、ビフェニル構造部位がリガンド-PD-L1 homodimer 三者複合体の中心軸付近に位置する結合様式を示した。

上記の検討を経て設計した化合物 **1** に加え、化合物の各部分構造の活性に対する寄与を明らかにする目的で、**BMS-1327** の一部のみを対称化した化合物の合成を計画した。**1** の複合体構造の観察から PD-L1 との結合に重要な要素と考えられた、① ビフェニル構造、② 末端のアミノ酸構造および③ ①-②間に位置するジアルコキシフェニル構造、の各部位の活性への寄与を明らかにするため、Monomer 型化合物の一部を対称化した化合物も設計し、合成した。

第3節 Dimer 型化合物の合成

化合物 **2** は、公開特許⁶⁷に記載された方法に従って合成した。化合物 **1** および **3-6** の合成経路を **Scheme 1** および **Scheme 2** に示す。2,4-Dihydroxybenzaldehyde (**I-1**) を出発物質として用い、PPTS 触媒存在下で4位の水酸基を選択的に THP 基で保護した (収率 88%)。次に K₂CO₃ 存在下で 5-(chloromethyl)nicotinonitrile を作用させることにより2位の水酸基を(5-cyano-3-pyridine)methoxy 基に収率 92%で変換した後、MeOH-H₂O 中 PTSA 触媒存在下で4位の THP 基を脱保護してフェノール中間体 **I-2** を定量的に得た。フェノール中間体 **I-2** に対して K₂CO₃ 存在下でベンジルクロリド体 **I-3** を作用させ、ハロゲン化アリール中間体 **I-4** を90%の収率で合成した。同様の方法によって 4-hydroxybenzaldehyde (**I-11**) から中間体 **I-13** を100%の収率で合成した。アルデヒド基を含まない中間体 **I-8** は、resolcinol (**I-7**) を原料として水素化ナトリウム存在下で一方の水酸基のみを **I-3** と反応させた中間体を収率 45%で得た後、K₂CO₃ 存在下で 5-(chloromethyl)nicotinonitrile を作用させることにより収率 79%で合成した。中間体 **I-18** および **I-22** は、4-hydroxy-2-methoxybenzaldehyde (**I-16**) および中間体 **I-2** から、ベンジルアルコール体 **I-17** および **I-21** との光延反応によって収率 36%および 47%でそれぞれ合成した。ハロゲン化アリール中間体 **I-4**, **I-8**, **I-13**, **I-18** および **I-22** を Pd 触媒存在下でアリールホウ素化体 **I-5**, **I-9**, **I-14**, **I-19** および **I-23** に 77-92%の収率で変換した。これらの各アリールホウ素化体とハロゲン化アリール中間体 **I-4** を用いて Pd(PPh₃)₄ あるいは Sphos Pd G1 を触媒とした鈴木-宮浦カップリング反応を行うことにより、ビフェニル構造を有する mono-もしくは bis-アルデヒド中間体 **I-6**, **I-10**, **I-15**, **I-20** および **I-24** を 22-100%の収率でそれぞれ合成した。各アルデヒド中間体に対して D-Serine を用いた還元的アミノ化反応を行い、化合物 **1-6** を 24-83%の収率で合成した。合成した化合物 **1** の構造は ¹H NMR および ¹³C NMR スペクトルと高分解能質量分析 (HRMS) により決定した。化合物 **3-6** については ¹H NMR スペクトルおよび質量分析 (MS) を測定し、化合物 **1** との比較により構造を帰属した。



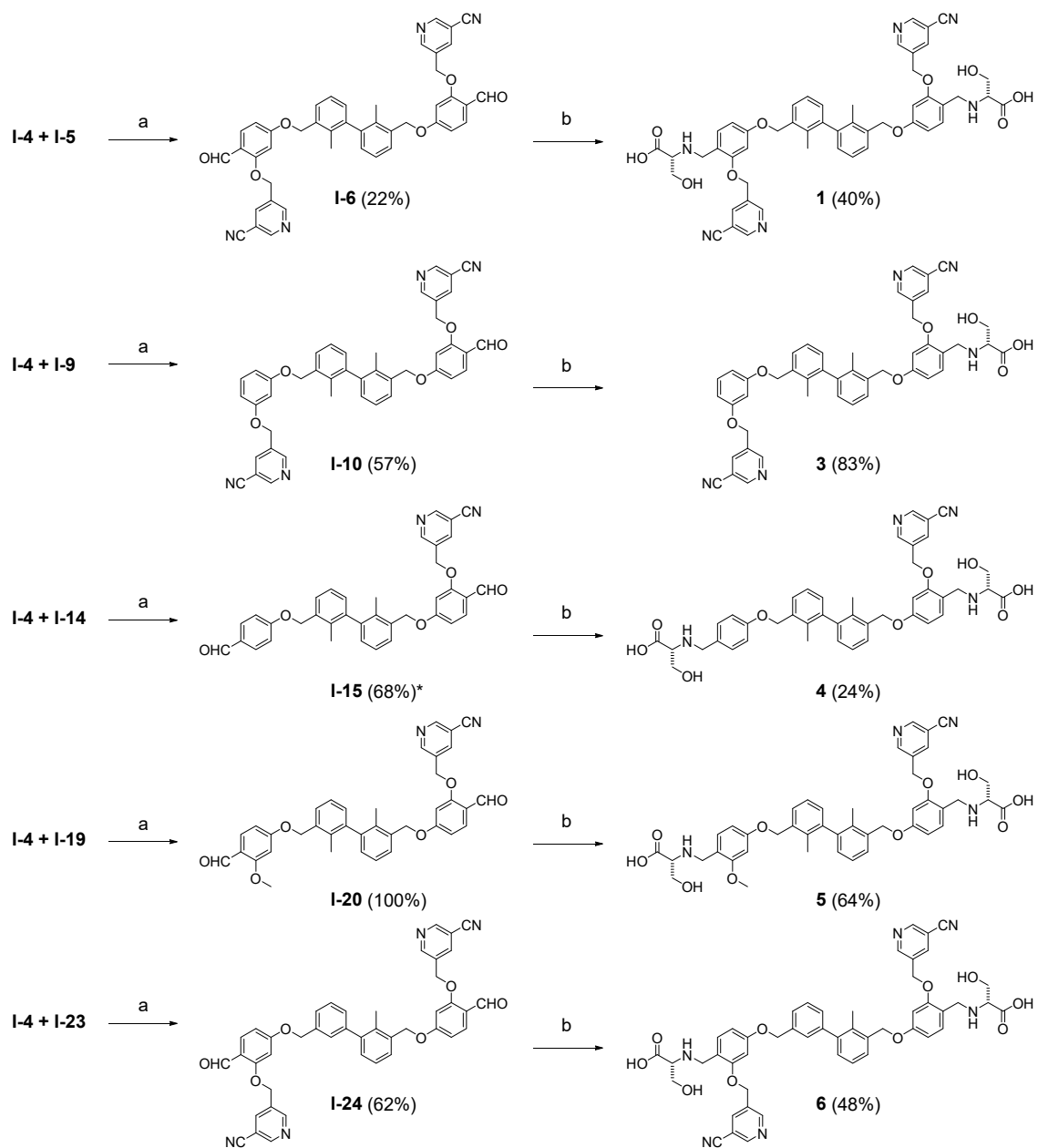
Scheme 1. Dimer 型化合物 1-6 の合成法 (1)

a) DHP, PPTS, CH_2Cl_2 , rt. b) 5-(Chloromethyl)nicotinonitrile, K_2CO_3 , DMF, rt. c) PTSA, $\text{MeOH-H}_2\text{O}$, rt. d) K_2CO_3 , DMF, rt. e) Bis(pinacolato)diboron, AcOK, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, Pcy_3 , Dioxane, 100°C . f) NaH, DMF, rt. g) DIAD, PPh_3 , THF, rt.

* **I-1** から **I-2** までの 3 工程での収率を示す。

** **I-7** から **I-8** までの 2 工程での収率を示す。

[†] crude のまま次工程に用いた。



Scheme 2. Dimer 型化合物 1-6 の合成法 (2)

a) method A: Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, CPME-H₂O, 100°C., method B: Sphos Pd G1, K₃PO₄, DMF, 80°C.

b) D-Serine, AcOH, NaBH(OAc)₃, DMF or DMSO, rt.

* **I-13** から **I-15** までの 2 工程での収率を示す。

第4節 評価方法

Surface plasmon resonance (SPR : 表面プラズモン共鳴)

化合物の PD-L1 に対する結合親和性の評価に用いた。SPR は高速・高感度・ラベルフリーという特長を持つ光バイオセンサー技術であり、高親和性のタンパク質-リガンド間相互作用の定量的な解析に利用される⁸¹。PD-L1-化合物間の相互作用解析に用いた報告例もある⁸²。

標的タンパク質を固定化したセンサーチップ上に、分析対象物質の希釈液を流し、分析物質の標的タンパク質上への結合/解離を表面プラズモン共鳴により定量的に測定する手法である。得られたセンサーグラムから結合速度定数 (k_{on} (1/M·s)), 解離速度定数 (k_{off} (1/s)) および結合解離定数 (K_D (M)) が算出される。本研究では、分析装置として BiacoreT200 を用いた。市販の PD-L1 Fc (52 kDa) を用い、アミンカップリングにより CM5 sensor chip 上に固定化した。化合物の希釈液 (in 5% DMSO in HBS-EP+) を sensor chip に添加し、Single cycle kinetics 法あるいは Multi cycle kinetics 法により分析を行った。得られたセンサーグラム (Figure 11) から結合解離定数 K_D を算出した。また解離速度定数から解離半減期 (h) を算出した。

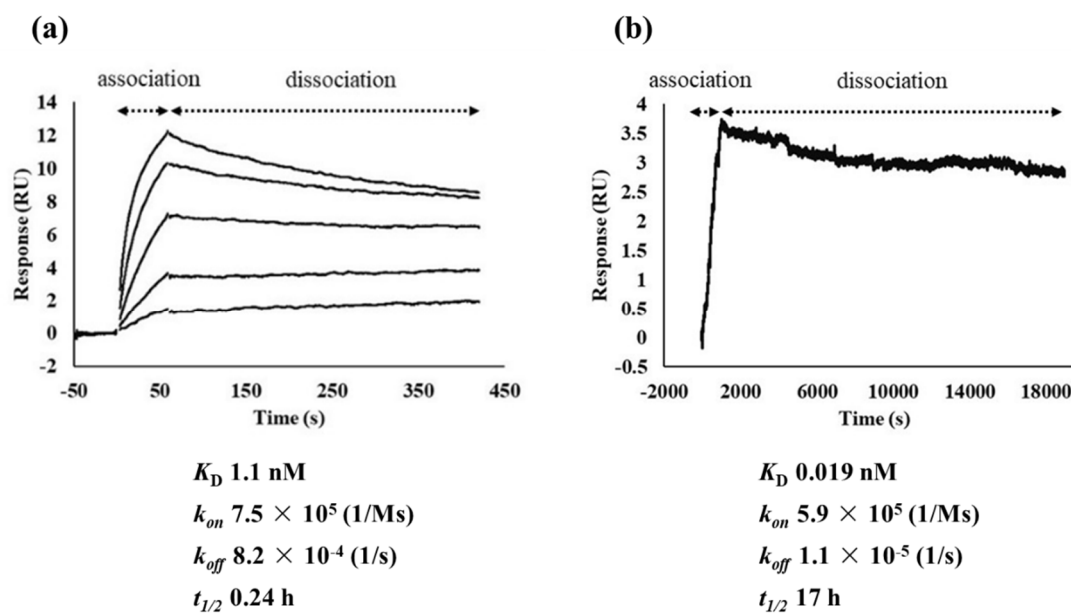


Figure 11. SPR による PD-L1 に対する結合評価

(a) BMS-202 を Multi-cycle kinetics 法により評価した時のセンサーグラムを示す。(b) 化合物 1 を Single-cycle kinetics 法により評価した時のセンサーグラムを示す。

PD-1/PD-L1 blockade bioassay^{83, 84}

細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害活性の評価に用いた。PD-1 および PD-L1 をそれぞれ発現させた 2 種類の細胞株を用い、阻害剤の添加による PD-1/PD-L1 結合阻害を、生物発光を利用して評価する手法である。用いる細胞の一方 (PD-1 effector cells) は、hPD-1 と、NFAT response element (NFAT-RE) によって駆動するルシフェラーゼレポーターを共発現させた Jurkat T 細胞である。もう一方の細胞 (PD-L1 aAPCs) は、hPD-L1 と、抗原非依存的に T 細胞受容体 (TCR) を活性化するように設計された細胞表面タンパク質を発現させた CHO-K1 細胞である。この 2 種類の細胞を共培養すると、PD-1/PD-L1 相互作用により、TCR シグナルと NFAT-RE を介した発光が阻害される。PD-1/PD-L1 相互作用を阻害する分子を添加すると、阻害シグナルが解除され、TCR の活性化および NFAT-RE を介した発光が得られる。

化合物の評価には Promega 社の評価用 Kit を用いて PD-1/PD-L1 結合阻害活性を測定した。384 well plate に PD-L1 aAPCs を播種し、18 時間培養後、培地を吸引した。抗 PD-1 抗体もしくは化合物の DMSO 溶液、および PD-1 effector cells を播種し、6 時間培養後に発光試薬を添加し、ルミノメーターで発光測定した。発光値から EC₅₀ 値を算出した。

Mixed lymphocyte reaction assay (MLR assay) ⁸⁵

化合物の T 細胞における細胞機能回復（再活性化）作用を評価する手法として用いた。MLR assay とは、PD-L1 を発現する樹状細胞（DCs: dendritic cells）と、PD-1 を発現する T 細胞（CD4⁺ T cells）との共培養を行い、産生される IFN- γ を T 細胞の活性化の指標として評価する手法である。阻害物質の非存在下では、PD-1/PD-L1 の結合により T 細胞の活性化抑制が起こり、IFN- γ の産生は抑制されている。阻害物質として抗体あるいは低分子阻害剤を共存させると、PD-1/PD-L1 の結合阻害により T 細胞の活性化抑制が解除（再活性化）され、IFN- γ の産生が促進される。評価に用いたのは、PBMCs より分離した monocyte に対し IL-4 および GM-CSF を加えて 6 日間培養して得た DCs と、PBMCs (allogenic) より分離した CD4⁺ T cells である。両者を抗 PD-1 抗体もしくは化合物存在下で 7 日間 co-culture し、上清中の IFN- γ 量を AlphaLISA Kit (PerkinElmer) にて測定した。

Size exclusion chromatography (SEC : サイズ排除クロマトグラフィー)

タンパク質等の高分子の分析対象物質を多孔性担体のカラムに通し、その保持時間の差によって分離・分析する手法である。分子量が小さい分子は、担体中の空孔への吸脱着をしやすい、その結果長い保持時間を示す。反対に分子量が大きいほど、分子の保持時間は短くなる。本研究では化合物が PD-L1 の homodimer 化を誘導するか否かを確認する目的で、高度架橋アガロースゲルを担体として用い、hPD-L1-Flag (3.8 μ M) を単独もしくは化合物 (12 μ M) 共存下で分析を実施した。

第5節 Dimer 型化合物の評価

PD-L1 に対する結合評価

BMS-1327 および Dimer 型化合物 **1-6** の PD-L1 に対する結合評価の結果を **Table 3** に示す。Monomer 型の **BMS-1327** と比較し、2つのアミノ酸構造を持つ化合物 **1** および **4-6** では結合強度 (K_D) が向上した。特に全体を対称化した化合物 **1** は、**BMS-1327** に比べて 50 倍の向上を示した。一方で **BMS-1327** の一部のみを対称化した化合物 **2** および **3** は結合強度の向上を示さなかった。化合物 **1** のジアルコキシフェニル環 (B 環) 上の(5-cyanopyridin-3-yl)methoxy 基を削除した化合物 **4** およびメトキシ基に変換した化合物 **5** は、サブナノモル単位の結合親和性を示したものの、両化合物とも化合物 **1** と比較して 10 倍の減弱が認められた。同様に、ビフェニル構造上の片方のメチル基を削除した化合物 **6** も、化合物 **1** から K_D が 10 倍減弱した。

Dimer 型化合物 **1** が Monomer 型化合物と比較して結合強度の大幅な増強を示した事実は、複合体構造の対称性に着目したりガンド設計が狙い通り機能したことを支持するものと考えられる。また化合物 **2** あるいは **3** が、**1** と比較して 100 倍以上の活性減弱を示したことから、末端アミノ酸構造が PD-L1 に対する結合親和性に大きく寄与することが明らかとなった。同時に、化合物 **1** の結合強度の増強は単純に分子量の増大によるものではなく、リガンドの両末端にあるアミノ酸構造が PD-L1 との相互作用を効果的に取得した結果と解釈される。加えて、B 環上の(5-cyanopyridin-3-yl)methoxy 基およびビフェニル環上のメチル基についても、末端アミノ酸構造に比べるとその効果は小さいものの、hPD-L1 との結合親和性向上に寄与することが明らかとなった。

細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害活性評価

BMS-1327, **1**, **3**, **5** および **6** の細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害を評価した。結果を **Table 3** に示す。陽性対象として用いた抗 PD-1 抗体の EC_{50} は 5.7–14 nM であった。Monomer 型の **BMS-1327** あるいはその一部のみを Dimer 化した **3** は、いずれも 10 μ M 以下

の EC₅₀ を示さなかった。一方で、全体を対称化した化合物 **1** と、2つのアミノ酸構造を持つ化合物 **5** および **6** は顕著に強い阻害活性を示した。その中で、化合物 **1** は EC₅₀ = 1.0 μM と、最も強い活性を示した。

PD-1/PD-L1 結合阻害活性と PD-L1 に対する結合強度 (K_D) との間には良好な相関が見られた。しかしながら、その EC₅₀ と K_D との間には 4.2×10^4 – 5.5×10^4 倍の乖離が見られた。その理由として、細胞評価系で添加する血清タンパク質 (10% FBS)、細胞膜上のタンパク質、あるいは細胞膜への非特異的結合等が影響している可能性が考えられるものの、上記の活性値の乖離の原因は現時点では不明である。

Table 3. Dimer 型化合物の評価結果

Compound	R	K_D (nM) [†]	EC ₅₀ (μM) [‡]
BMS-1327		1.1	> 30
2		3.0	NT [§]
3		3.7	> 100
4		0.29	NT [§]
5		0.21	9.5
6		0.20	8.4
1		0.019	1.0

[†] Binding affinities (K_D) were determined by surface plasmon resonance analysis.

[‡] PD-1/PD-L1 inhibitory activities were measured by blockade bioassay.

[§] Not tested.

細胞機能評価

細胞評価系で高い活性を示した化合物 **1** と抗 PD-1 抗体を用いて細胞機能評価を実施した。結果を **Figure 12** に示す。化合物 **1** は抗 PD-1 抗体と同様にして濃度依存的に IFN- γ 産生量の増加を示し、100 nM の濃度で抗 PD-1 抗体が示した最大薬効 (efficacy) と同程度の IFN- γ 産生量を示した。この結果から、化合物 **1** が T 細胞においても抗 PD-1 抗体と同様にして、免疫寛容の解除による細胞機能回復作用を示すことが確認された。

一方で、化合物 **1** と抗 PD-1 抗体との間には、薬効を示す濃度 (potency) の面で大きな差が認められた。低分子治療薬の創出を考えた際には、より低い濃度で抗体と同等の薬効を示す化合物を得ることが望ましく、そのためのさらなる探索と最適化が今後の課題として考えられた。

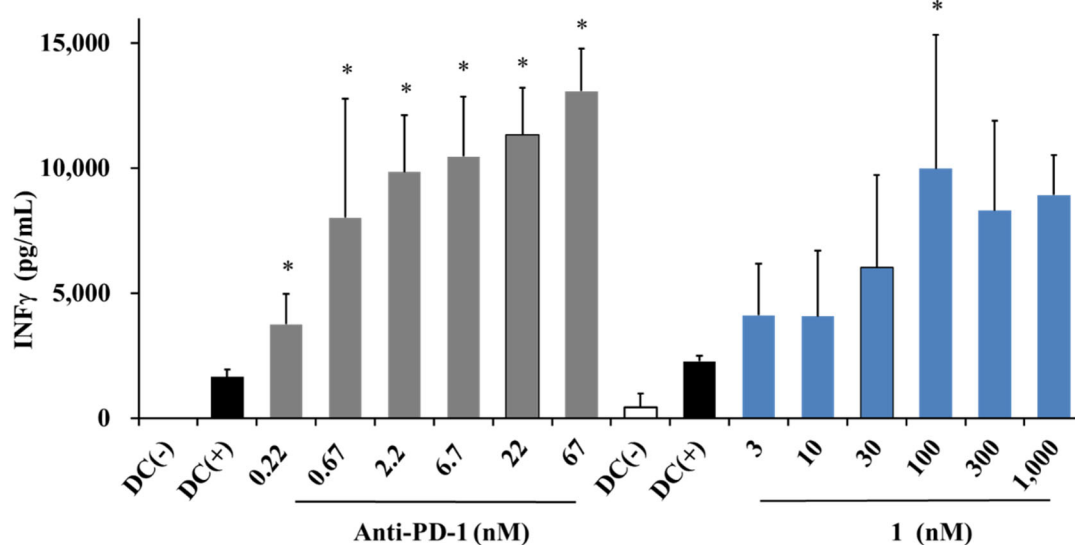


Figure 12. 抗 PD-1 抗体および化合物 **1 の細胞機能評価結果 (MLR assay)**

抗 PD-1 抗体および化合物 **1** の存在下もしくは非存在下で、CD4⁺ T 細胞と単球由来樹状細胞 (DC) を 7 日間共培養した。培養上清中の IFN- γ 分泌量を、細胞活性化の指標として測定した。グラフは、n=6 (Anti-PD-1)、n=3 (化合物 **1**) で行った実験の平均値 \pm SD を示す。* $P < 0.05$ Bartlett 検定後に DC(+)群との差について Dunnett 検定 (化合物 **1**) もしくは Steel 検定 (Anti-PD-1) により求めた。

第6節 化合物の作用様式の確認

Dimer 型化合物 **1** が溶液中で PD-L1 の homodimer 化を誘導するかを調べるため、**1** の存在下または非存在下における PD-L1 のサイズ排除クロマトグラフィー分析を行った(**Figure 13**)。その結果、**1** の存在下では PD-L1 ピークの保持時間の短縮が見られた。この事実から、化合物 **1** は PD-L1 の homodimer 体の形成を誘導することが示唆された。

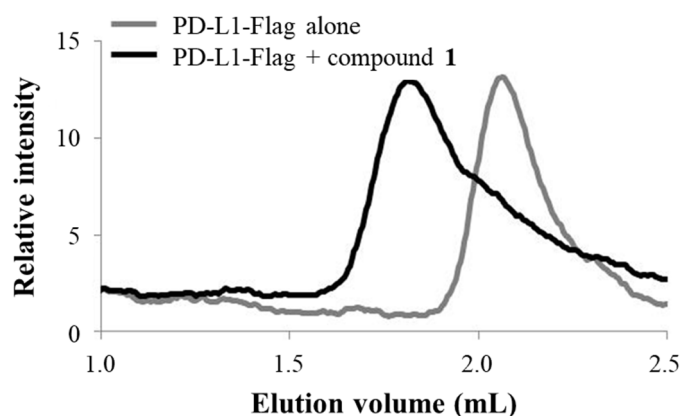


Figure 13. 化合物 **1** の存在下および非存在下における hPD-L1 のサイズ排除クロマトグラム

(横軸) 溶出量 (mL), (縦軸) 相対強度 (UV) をそれぞれ表す。高度架橋アガロースゲルを担体として用い、hPD-L1-Flag (3.8 μ M) を単独もしくは化合物 **1** (12 μ M) 共存下で分析を実施した。化合物 **1** の存在下 (黒色) では PD-L1 単独 (灰色線) の場合と比較してピークの保持時間の短縮が見られる。

第2章 Dimer 型化合物の構造活性相関

第1節 緒言

本章では、第1章で取得した高活性な Dimer 型化合物 **1** を起点とし、PD-1/PD-L1 結合阻害活性の向上を目的として構造活性相関 (SAR) 研究を行った結果について述べる。

Figure 14 に化合物 **1** を起点とした構造変換の概略を示す。Monomer 型化合物 **BMS-202**-PD-L1 複合体結晶構造および Dimer 型化合物 **1** の PD-L1 homodimer に対するドッキング計算から得られた結合様式の観察から、PD-L1 に対する結合親和性の向上が期待される置換基導入/変換箇所として以下の3か所の構造変換を計画した。

- a) ビフェニル構造 (A1 および A2 環) の *ortho* 位への置換基導入 (青色矢印, 以下 R₁ および R₂ 置換基とする)
- b) ジアルコキシフェニル環 (B1 および B2 環) の 5 位への置換基導入 (緑色矢印, 以下 R₃ および R₄ 置換基とする)
- c) ビフェニル構造とジアルコキシフェニル環の間の Linker 部の変換 (赤色点線囲み)

上記に加えて、複合体構造の分子シミュレーションを用いた解析の結果、タンパク質表面にエネルギー的に不安定な水の存在が示唆された。そこで水の排除による活性向上を企図して、

- d) ジアルコキシフェニル環 (B 環) の 6 位への置換基の導入 (橙色矢印, 以下 R₅ 置換基とする) を、

また分子内の電子反発を利用したコンホメーション規制による活性向上を企図して、

- e) ジアルコキシフェニル環 (B 環) 内への窒素原子の導入
- を追加で計画した。

本章ではそれらの構造変換を行った化合物の評価結果および考察について、化合物の変換部位ごとに述べる。

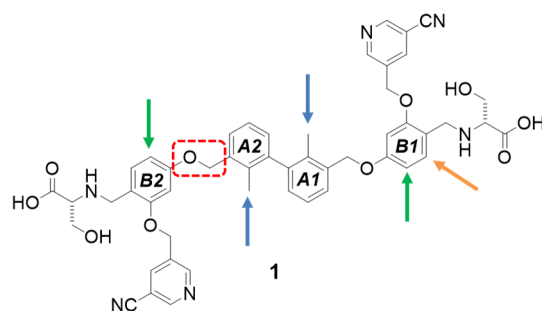


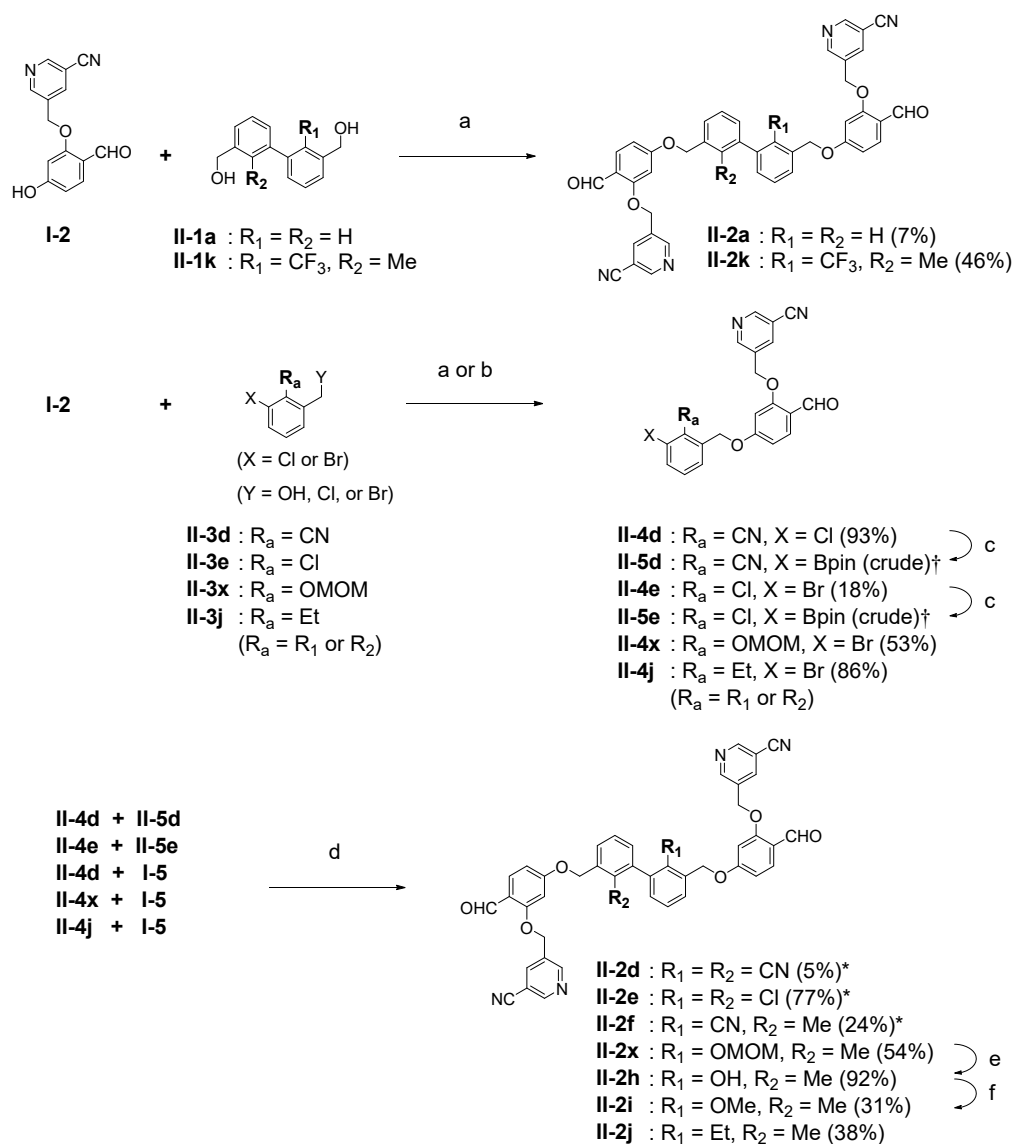
Figure 14. 化合物 1 の構造と置換基導入／変換部位

第 2 節 ビフェニル環 (A 環) 上の置換基 (R_1 , R_2) の変換

化合物の合成

A 環上の置換基 R_1 および R_2 を変換した化合物 7–15 の合成経路を **Scheme 3** および **Scheme 4** に示す。化合物 7 および 15 については、3,3'-bis(hydroxymethyl)biphenyl 中間体 **II-1a** および **II-1k** に対し、第 1 章で合成したフェノール中間体 **I-2** を 2 当量以上用いて光延反応条件下で作用させることにより bis-アルデヒド中間体 **II-2a** および **II-2k** を 7% および 46% の収率でそれぞれ合成した。化合物 8, 10 および 12–14 については、中間体 **I-2** と種々のハロゲン化ベンジル体 **II-3d** ($Y = Cl$), **II-3x** ($Y = Br$) および **II-3j** ($Y = Br$) を K_2CO_3 存在下で作用させて収率 53–93% でハロゲン化アリール中間体 **II-4d**, **II-4x** および **II-4j** を合成した。化合物 9 については中間体 **I-2** とベンジルアルコール体 **II-3e** ($Y = OH$) を用いた光延反応によりハロゲン化アリール中間体 **II-4e** を収率 18% で合成した。ハロゲン化アリール中間体 **II-4d** および **II-4e** は一部を Pd 触媒存在下でアリールホウ素化体 **II-5d** および **II-5e** へと変換し、精製せずに次の反応に用いた。これらハロゲン化アリール中間体 **II-4** とアリールホウ素化体 **II-5** もしくは第 1 章で合成した **I-5** を用いて、鈴木–宮浦カップリング反応により bis-アルデヒド中間体 **II-2d–f**, **II-2x** および **II-2j** を収率 5–77% で合成した。bis-アルデヒド中間体 **II-2x** から酸性条件で MOM 基の脱保護を行い R_1 が水酸基である中間体 **II-2h** に、また水酸基のメチル化により R_1 がメトキシ基である中間体 **II-2i** に収率 92% および 31% でそれぞれ誘導した。化合物 11 については、ヒドロキシメチル基を有するハロゲン化アリール

中間体 **II-3e** と、アリールホウ素化体 **I-5** を用いた鈴木–宮浦カップリング反応によりビフェニル構造を含む中間体 **II-6** を収率 14%で構築し、得られたヒドロキシメチル体の水酸基を塩素化して **II-7** へと誘導した。続いて crude の塩素化体 **II-7** に対しフェノール中間体 **I-2** を K_2CO_3 存在下で作用させ、bis-アルデヒド中間体 **II-2g** を収率 38%で得た。得られた bis-アルデヒド中間体 **II-2a** および **II-2d–k** に対して D-Serine を用いた還元的アミノ化反応を行い、化合物 **7–15** を収率 9–50%でそれぞれ合成した。

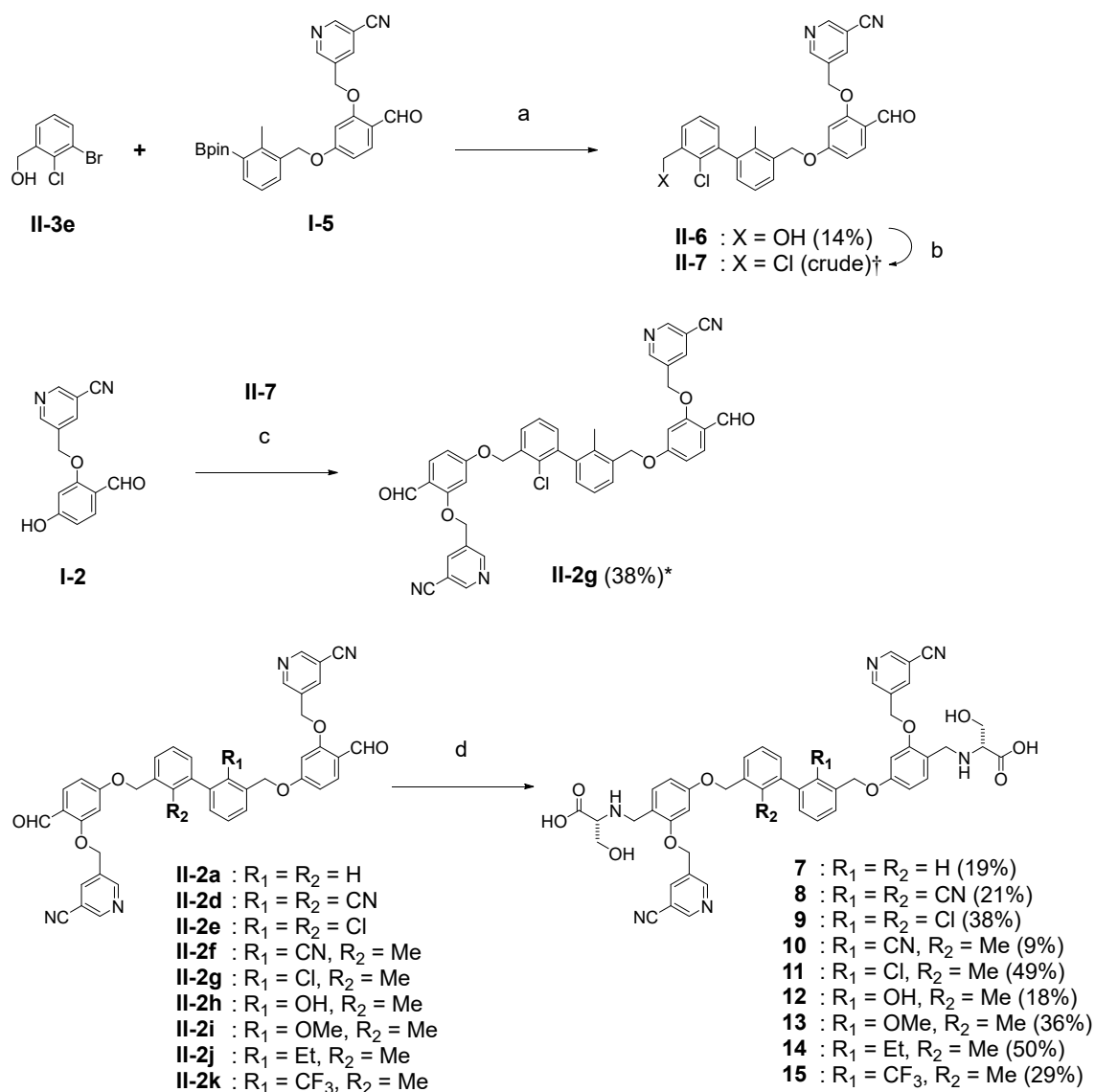


Scheme 3. 化合物 7-15 の合成法 (1)

a) DIAD, PPh₃, THF, rt-70°C. b) K₂CO₃, DMF, rt. c) Bis(pinacolato)diboron, KOAc, PCy₃, Pd₂(dba)₃, dioxane, 100°C. d) method A: SPhos Pd G1, K₃PO₄, toluene or dioxane, 110°C; method B: Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, CPME or dioxane, H₂O, 100°C; method C: XPhos Pd G2, K₃PO₄, THF-H₂O, rt. e) HCl, THF-H₂O, rt. f) MeI, K₂CO₃, DMF, rt.

* **II-4d-e** から **II-2d-f** までの 2 工程での各収率を示す。

[†] crude のまま次工程に用いた。



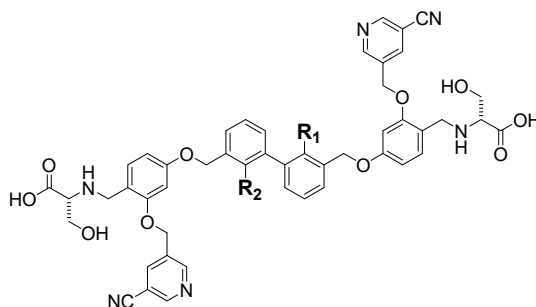
Scheme 4. 化合物 7-15 の合成法 (2)

a) Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, CPME-H₂O, 100°C. b) EtSO₂Cl, DIPEA, THF, rt. c) K₂CO₃, DMF, rt. d) D-Serine, AcOH, NaBH(OAc)₃, DMSO, rt.

* **I-6** から **II-2g** までの 2 工程での収率を示す。

[†] crude のまま次工程に用いた。

Table 4. A 環上に置換基 (R_1 , R_2) を導入した化合物の構造活性相関



Compound	R_1	R_2	K_D (nM) [†]	Residence time (h) [†]	EC_{50} (μ M) [‡]
7	H	H	8.5	0.089	NT [§]
6	Me	H	0.20	2.2	8.3
1	Me	Me	0.019	17	1.0
8	CN	CN	0.025	43	1.7
9	Cl	Cl	0.024	29	0.68
10	CN	Me	0.079	17	3.8
11	Cl	Me	0.014	47	1.8
12	OH	Me	0.30	7.7	>50
13	OMe	Me	1.6	0.82	NT [§]
14	Et	Me	0.16	1.6	5.2
15	CF ₃	Me	0.12	7.2	3.6

[†] Binding affinities (K_D) and residence time (h) were determined by surface plasmon resonance analysis.

[‡] PD-1/PD-L1 inhibitory activities were measured by blockade bioassay.

[§] Not tested.

A 環上に置換基 (R_1 , R_2) を導入した化合物の構造活性相関

化合物の評価結果を **Table 4** に示す。A 環上の置換基は結合強度 (K_D) に大きく寄与し、無置換体である化合物 **7** から、モノメチル体 **6**、そしてジメチル体 **1** とメチル基を導入するに従って顕著な K_D の向上が見られた。A 環上のメチル基を、塩素原子あるいはシアノ基に置換した場合にも同程度の結合親和性を示した (化合物 **8–11**)。一方、メチル基を水酸基や

メトキシ基等の極性置換基に変換した場合には K_D が顕著に低下した (化合物 **12-13**)。またメチル基の代わりにエチル基やトリフルオロメチル基を導入した場合にも K_D は 10 倍の低下を示した (化合物 **14, 15**)。この結果は A 環周辺の空間が狭く置換基伸長が許容されないことを示している。実際、前述の **BMS-202** や他の報告にある低分子リガンド-hPD-L1 複合体結晶構造 (PDB ID: 6RPG) においてもビフェニル構造の周辺領域は A, B Met115, A, B Ala121 等の脂溶性残基で囲まれており、A 環上のメチル基が周辺の空間を充填している。 R_1 および R_2 への置換基導入の結果は、これら観測された事実と一致した⁸⁶。

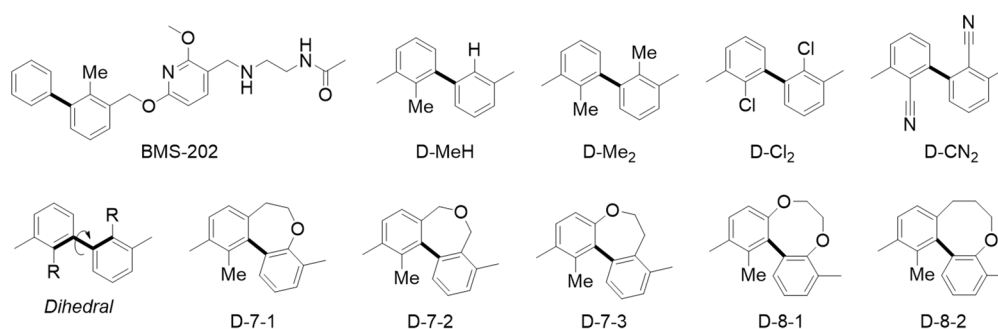
また、さらに結合強度を向上させる方策としてビフェニル構造における 2 つのベンゼン環が形成する二面角 (dihedral angle) に着目した構造変換が考えられた。複合体構造における化合物 **1** のビフェニル構造、すなわち Active form (= 活性発現コンホメーション) における二面角は -121.4° である。Active form の二面角を活性発現のための至適角度として仮定し、ビフェニル環への置換基導入によりビフェニル環の回転障壁を低下させて Active form の存在確率を上げるか、あるいは縮環構造への変換により Active form の二面角に近い角度に固定することで、活性向上の可能性が期待された。

そこで、ビフェニル構造の二面角と活性との関係を考察する目的で、化合物 **1, 6, 8** および **9** におけるビフェニル部分構造に対して最適化計算を行いその二面角を測定した (Figure **15**)。化合物 **1, 6, 8** および **9** に対応する **D-Me₂**, **D-MeH**, **D-CN₂** および **D-Cl₂** の各置換ビフェニルは、 -107.5 – -92.9° の二面角を示し、Active form と仮定した角度から 10 – 30° 程度の差が見られた。一方で、この二面角の差が活性にどのように影響するかを考える際には、Active form とのエネルギー差を考える必要がある。そこでこれら置換ビフェニルの回転障壁を簡便に計算した (Figure **16**)。その結果、いずれの置換ビフェニルも -60 – -120° にエネルギーの谷が存在し、その範囲において、評価条件下で自由に回転できると推察された。

以上の結果から活性について考察すると、上記の 2 置換ビフェニル体の間では活性に対する二面角の影響は非常に限定的であると考えられた。実際、最適化構造における二面角が

-92.9°と最も Active form の角度と乖離した bis-シアノ体 **8** は、化合物 **1** (-105.3°) と同等の活性を示した。その一方で、最適化構造における二面角が-107.5°と最も Active form の二面角に近く、かつ回転障壁が小さい化合物 **6** が最も低い活性を示したことから、置換基による空間充填効果の方が活性に対してより大きく寄与すると考えられた。

上記の 2 置換ビフェニル体の間では回転障壁が小さいため、二面角の活性に対する影響が見られなかったが、別の活性向上のアプローチとして二面角の固定が考えられた。そこで、ビフェニル構造の 2 つのベンゼン環を縮環して二面角を固定した構造を設計し、同様に二面角を測定した (**Figure 15**)。その結果、7 員環あるいは 8 員環で縮環した構造が-115.5°-130.2°の二面角を示した。特に 8 員環の **D-8-1** は、-115.5°と Active form の二面角に最も近い角度を示したため、その導入が空間的に許容される場合には、活性向上の可能性が期待された。しかしながら、上記の構造活性相関で見た通り A 環周辺の空間は狭く、エチル基以上の大きさで活性の減弱が見られる。実際、飽和 7 員環の縮環体 **D-7-2** を **BMS-202** の複合体構造と重ねたところ、タンパク質表面との衝突が見られた (**Figure 17**)。それゆえ、縮環構造の導入は活性向上につながる可能性は低いと考え実施しなかった。



化合物	Dihedral (°) [†]
BMS-202	-121.4 [‡]
1	-120.5 [§]
D-MeH	-107.5
D-Me₂	-105.3
D-Cl₂	-102.9
D-CN₂	-92.9
D-7-1	-128.2
D-7-2	-130.2
D-7-3	-128.5
D-8-1	-117.9
D-8-2	-115.5

Figure 15. BMS-202, 化合物 1 および *ortho*-2 置換ビフェニルの二面角

[†] Schrödinger Suite 2019-3 を用いて描画した構造に対して最適化計算 (minimization) を行い、二面角を測定した。

[‡] **BMS-202**-hPD-L1 複合体構造 (PDB ID: 5J89) より測定した。

[§] 化合物 **1** の Ligand docking (Glide, Maestro, Schrödinger, LLC) を行い、得られた docking pose より測定した。

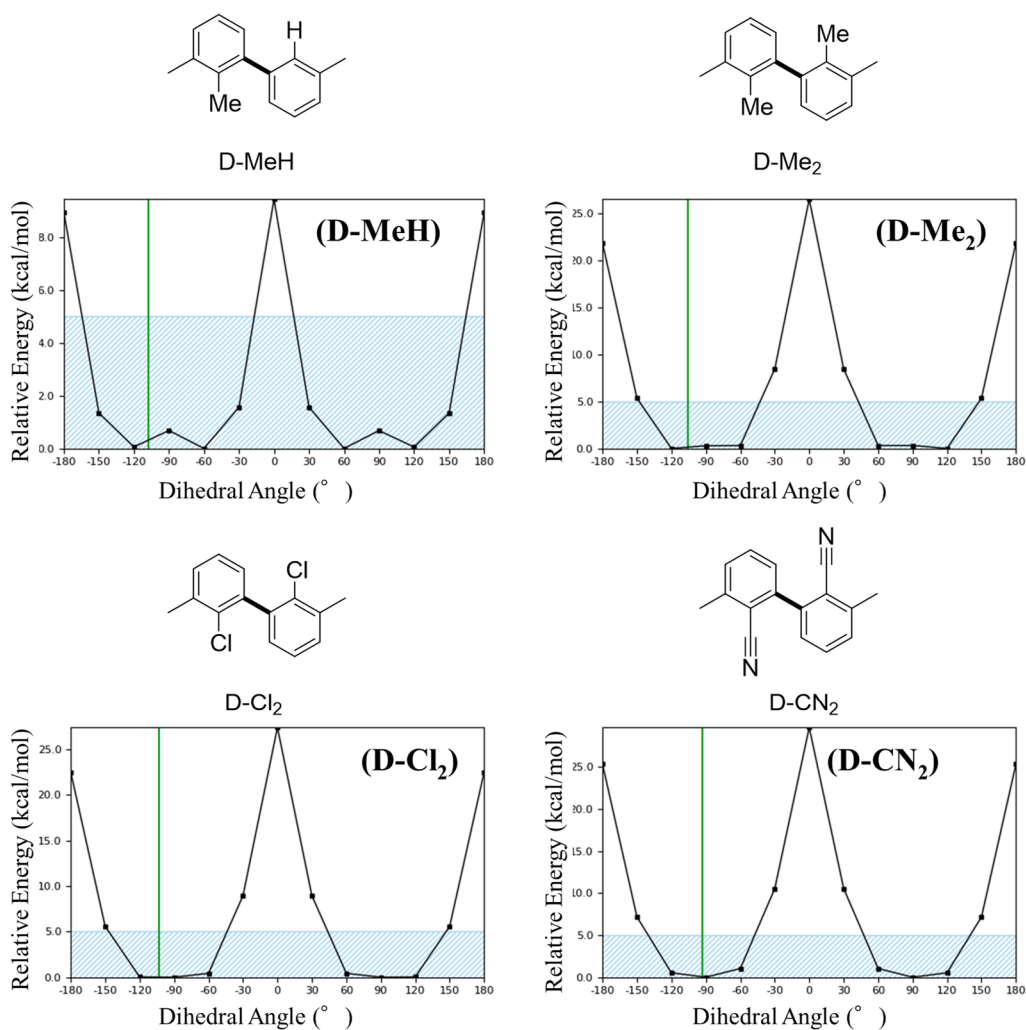


Figure 16. 置換ビフェニルの二面角と歪みエネルギーの関係

各構造の太字で示した結合を 30°毎に回転させた際の歪エネルギーをプロットした。計算は Schrödinger Suite 2019-3 上で Rapid torsion scan により行った。(横軸) 二面角 (°), (縦軸) Rapid torsion scan における最小エネルギー値からの差(kcal/mol)をそれぞれ表す。5.0 kcal/mol 以下を青色で色付けし、最安定構造における二面角を緑線で表す。

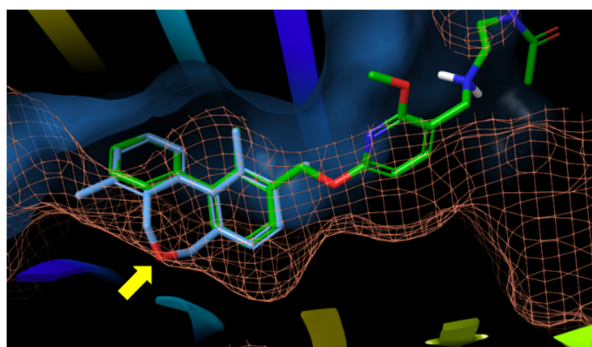


Figure 17. A 環周辺の空間的許容度

BMS-202 と hPD-L1 homodimer の複合体結晶構造 (PDB ID: 5J89) に対し縮環体 **D-7-2** を重ね合わせた図を示す。青: hPD-L1 (chain A) の surface; 橙色 mesh: hPD-L1 (chain B) の surface; 緑: **BMS-202**; 水色: **D-7-2** をそれぞれ示す。**D-7-2** では hPD-L1 (chain B) タンパク質表面との衝突が見られる (黄色矢印)。

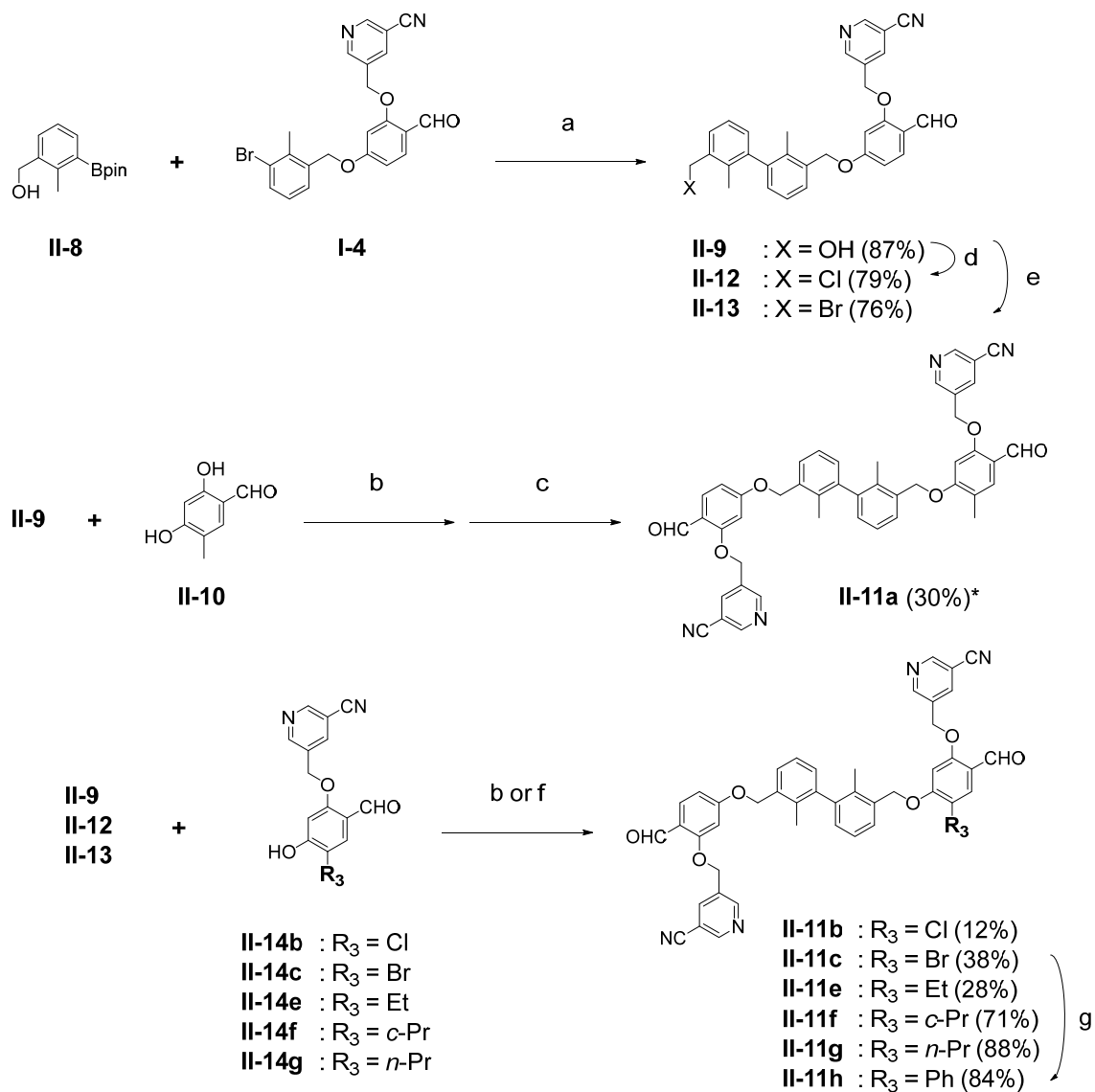
化合物 **8-12** および **14**, **15** の細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害活性の評価を行った。前章で述べた **BMS-1327** および化合物 **1-6** で見られた傾向と同様に, EC_{50} 値は K_D 値の 2.8×10^4 – 1.7×10^5 倍と大きな乖離が見られた。また, R_1 が水酸基である化合物 **12** は $50 \mu\text{M}$ まで阻害活性を示さなかったが, それ以外の化合物については EC_{50} 値と K_D 値の間に良好な相関が確認された。その中で, 両方の A 環に塩素原子を有する化合物 **9** は ($EC_{50} = 0.68 \mu\text{M}$) 最も強い活性を示した。

第3節 ジアルコキシフェニル環 (B 環) 上への置換基 (R_3 , R_4) の導入

化合物の合成

B 環上へ置換基 R_3 および R_4 を導入した化合物 **16-23** の合成経路を **Scheme 5** および **Scheme 6** に示す。 R_3 がメチル基である化合物 **16** については, まず中間体 **I-4** とヒドロキシメチル基を有するアリールボウ素化体 **II-8** との鈴木–宮浦カップリング反応により収率 87%で中間体 **II-9** を合成した。これに対し, 2,4-dihydroxy-5-methylbenzaldehyde (**II-10**) との光延反応によりフェノール 4 位の水酸基が **II-9** のヒドロキシメチル基と反応した中間体を

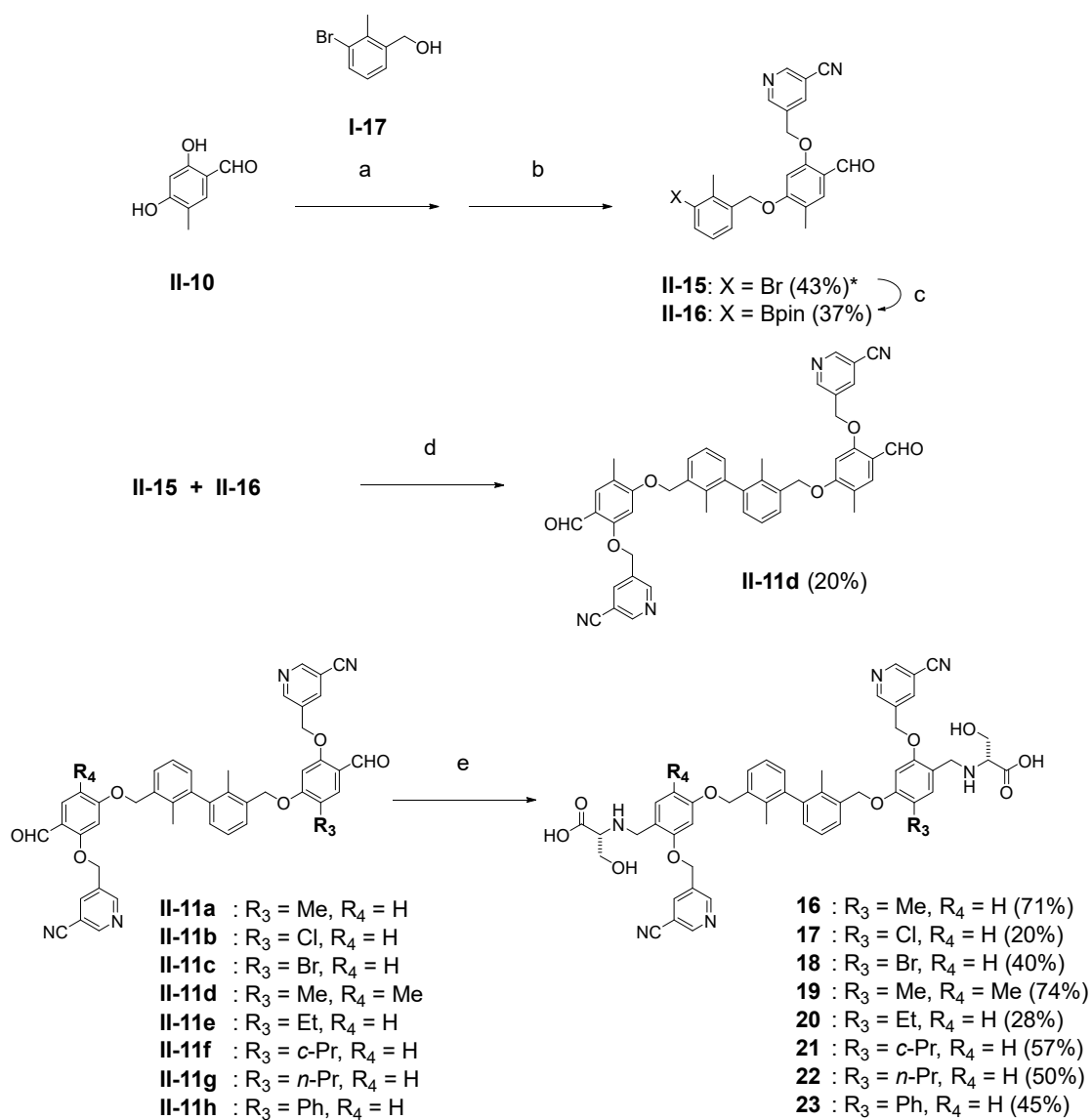
収率 46%で得た後、残った 2 位の水酸基を K_2CO_3 存在下にて(5-cyano-3-pyridine)methoxy 基へと変換し、収率 66%で bis-アルデヒド中間体 **II-11a** を合成した。化合物 **17**, **18**, **20**, **22** および **23** については、中間体 **II-9** のヒドロキシメチル基を塩素化体 **II-12** および臭素化体 **II-13** に収率 79%および 76%でそれぞれ変換し、それらのハライド中間体の一方を用いて、種々の R_3 基を導入したフェノール体 **II-14b**, **II-14c**, **II-14e** および **II-14g** を塩基条件下で反応させることにより bis-アルデヒド中間体 **II-11b**, **II-11c**, **II-11e** および **II-11g** を収率 12–88%で合成した。 R_3 がシクロプロピル基である化合物 **21** については、中間体 **II-9** と R_3 がシクロプロピル基であるフェノール中間体 **II-14f** との光延反応により bis-アルデヒド中間体 **II-11f** を収率 71%で合成した。また R_3 がフェニル基である中間体 **II-11h** は、 R_3 がブロモ基である中間体 **II-11c** からフェニルボロン酸を用いた Pd カップリング反応により収率 84%で合成した。メチル基を R_3 および R_4 の両方に導入した化合物 **19** については、中間体 **II-10** および **I-4** から光延反応および水酸基の(5-cyano-3-pyridine)methoxy 基への変換の 2 工程を経てハロゲン化アリール中間体 **II-15** を収率 43%で合成し、その一部を Pd 触媒存在下でアリールホウ素化体 **II-16** へと収率 37%で誘導した後、両者の鈴木–宮浦カップリング反応により bis-アルデヒド中間体 **II-11d** を収率 20%で合成した。得られた bis-アルデヒド中間体 **II-11a–h** に対して D-Serine を用いた還元的アミノ化反応により化合物 **16–23** を収率 20–74%で合成した。



Scheme 5. 化合物 16-23 の合成法 (1)

a) Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, CPME-H₂O, 100°C. b) DIAD, PPh₃, THF, rt. c) 5-(Chloromethyl)nicotinonitrile, K₂CO₃, DMF, rt-80°C. d) SOCl₂, CHCl₃, rt. e) NBS, PPh₃, CH₂Cl₂, rt. f) K₂CO₃, DMF, rt. g) PhB(OH)₂, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, CPME-H₂O, microwave, 100°C.

* **II-10** から **II-11a** までの 2 工程での収率を示す。



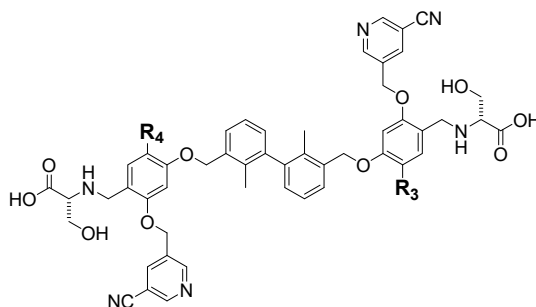
Scheme 6. 化合物 16–23 の合成法 (2)

a) DIAD, PPh₃, THF, rt. b) 5-(Chloromethyl)nicotinonitrile, K₂CO₃, DMF, rt–80°C. c)

Bis(pinacolato)diboron, KOAc, PCy₃, Pd₂(dba)₃, dioxane, 100°C. d) Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, CPME-H₂O, 100°C. e) D-Serine, AcOH, NaBH(OAc)₃, DMSO, rt.

* **II-10** から **II-15** までの 2 工程での収率を示す。

Table 5. B 環上に置換基 (R₃, R₄) を導入した化合物の構造活性相関



Compound	R ₃	R ₄	K_D (nM) [†]	Residence time (h) [†]	EC ₅₀ (μM) [‡]
1	H	H	0.019	17	1.0
16	Me	H	0.014	32	0.98
17	Cl	H	0.022	32	0.84
18	Br	H	0.016	48	0.35
19	Me	Me	0.017	51	0.49
20	Et	H	0.020	27	0.52
21	<i>c</i> -Pr	H	0.045	15	1.1
22	<i>n</i> -Pr	H	0.13	6.8	1.7
23	Ph	H	1.1	0.82	NT [§]

[†] Binding affinities (K_D) and residence time (h) were determined by surface plasmon resonance analysis.

[‡] PD-1/PD-L1 inhibitory activities were measured by blockade bioassay.

[§] Not tested.

B 環上に置換基 (R₃, R₄) を導入した化合物の構造活性相関

化合物の評価結果を **Table 5** に示す。全体として、比較的小さな脂溶性置換基を持つ化合物は、高い結合強度 (K_D) を示した。メチル基、塩素原子、臭素原子を導入した化合物 **16–18** は、無置換体である化合物 **1** と比較して同等あるいはわずかに向上した K_D を示した。一方で、比較的大きな置換基の導入は許容されなかった (化合物 **21–23**)。これらの結果は複合体構造から観察された通り、B 環の周辺領域には置換基を導入するスペースが限られてい

る事実と一致した (Figure 18)。

また、興味深いことに置換基導入によって顕著な結合解離速度の低下、すなわち解離半減期の延長が見られた。このような低解離速度プロファイル (slow-dissociation profile) を有する化合物は、標的分子に対して結合状態にある時間が長くなるため、血中の薬物濃度が減少あるいは消失した後も薬理作用が持続することが期待される。そのため、*in vivo* 評価における高い有効性に寄与する可能性がある^{87,88}。

これらの結果は、導入した脂溶性置換基が $_{\text{B}}\text{Ile54}$ 、 $_{\text{B}}\text{Tyr56}$ および $_{\text{B}}\text{Val68}$ 等の近隣の脂溶性残基との van der Waals 相互作用を獲得した結果によると考えられる。脂溶性置換基を導入した化合物が解離半減期の延長を示したことは、脂溶性相互作用の獲得が slow-dissociation profile につながるという Miller らと Schneider らの報告とも一致する^{89,90}。実際、化合物 **1** および **16–18** の解離半減期は、対応する R_3 置換基である水素原子、メチル基、塩素原子および臭素原子の非極性表面積と相関した (Table 6)。

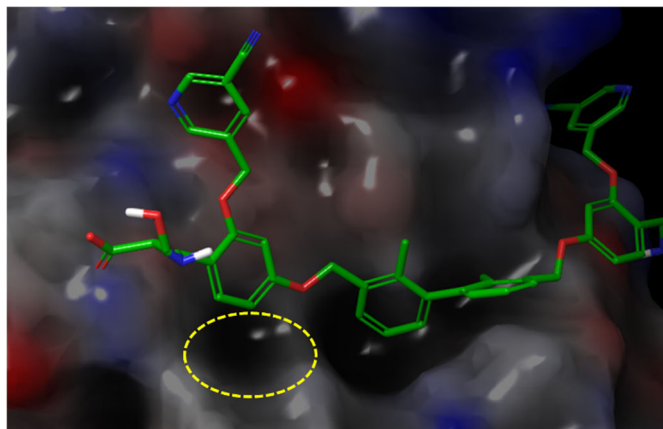
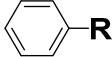


Figure 18. B 環周辺の空間的許容度

化合物 **1** と hPD-L1 との docking pose を示す。黄色囲みは置換基 R_3 方向の空間を示す。タンパク質の surface は、青が正電荷、赤が負電荷の局在を、グレーが電荷的に中性 (= 脂溶性領域) であることを表す。

Table 6. 置換ベンゼンの非極性表面積 (NPSA: non-polar surface area)



R	NPSA (Å ²) [†]	ΔNPSA (Å ²) [‡]
H	99.1	0
Me	116.4	17
Cl	116.7	18
Br	128.5	29

[†] ベンゼン, トルエン, クロロベンゼンおよびブロモベンゼンの非極性表面積 (NPSA) を, MOE (PEOE_VSA_HYD descriptors) を用いて計算した。

[‡] 各置換ベンゼンとベンゼンの NPSA の差分を算出して表示した。

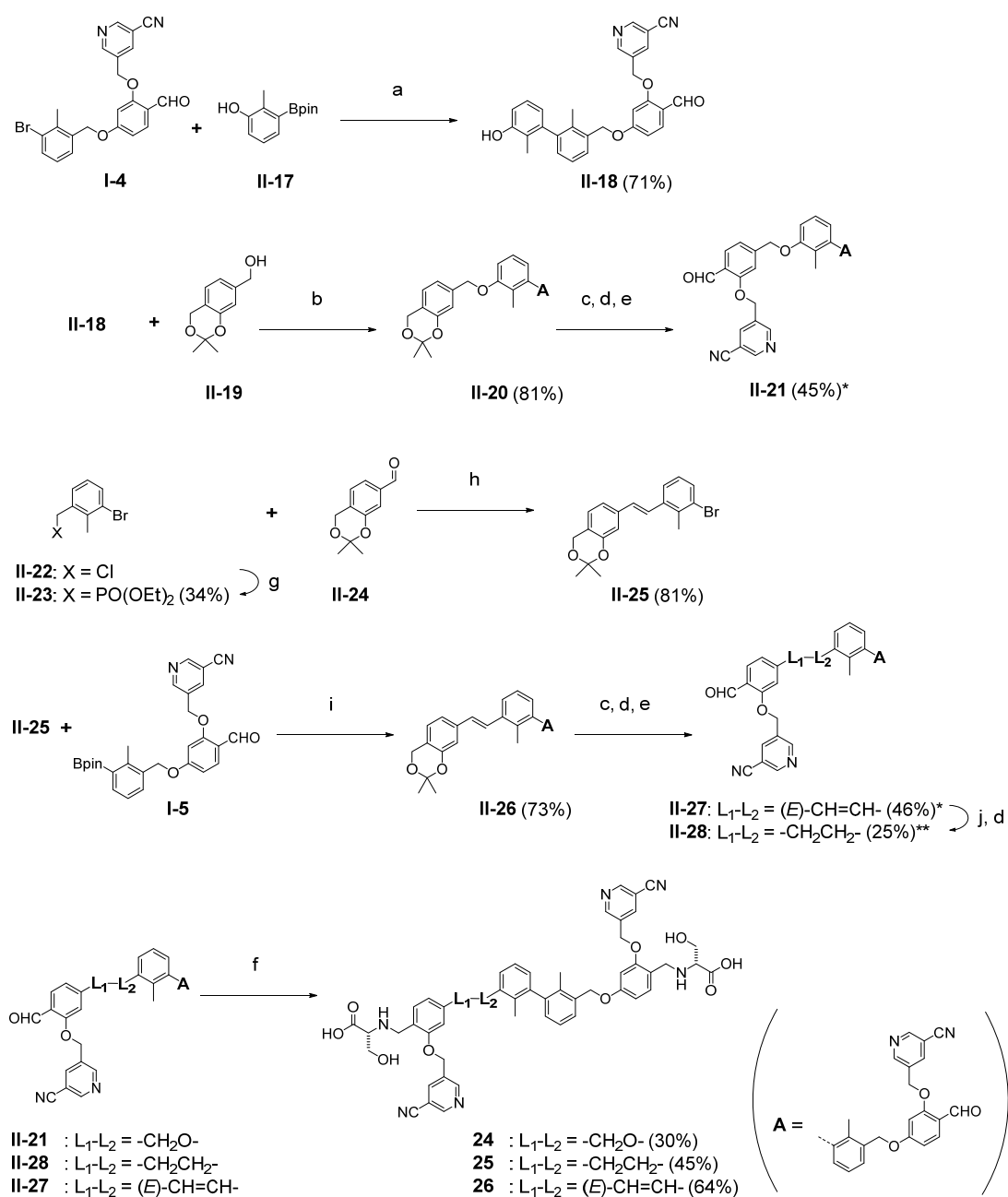
化合物 **16–22** の細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害活性の評価を行った (Table 5)。前節までの化合物で見られた傾向と同様, EC₅₀ 値と K_D 値の間の相関が確認された。B 環にメチル基, 塩素原子, 臭素原子およびエチル基を有する化合物 **16–20** はいずれも EC₅₀ < 1 μM と, 無置換体である **1** より強い活性を示した。その中でも化合物 **18** は最も強い活性を示した。

第4節 リンカー部位の変換

化合物の合成

リンカー部位を変換した化合物 **24–26** の合成経路を Scheme 7 に示す。エーテルの位置を変換した化合物 **24** については, 中間体 **I-4** とアリールホウ素化体 **II-17** を用いた鈴木-宮浦カップリング反応によって収率 71% でビフェニル構造を構築した。得られた中間体 **II-18** のフェノール性水酸基に対して, 既知の保護ベンジルアルコール体 **II-19** を光延反応条件下で作用させて中間体 **II-20** を収率 81% で得た。続いてアセトニドの脱保護, (5-cyano-3-pyridine)methoxy 基の導入および末端ベンジル位水酸基の Dess-Martin 酸化を経て, bis-アルデヒド体 **II-21** を 3 工程で 45% の収率で得た。リンカー部が (*E*)-アルケニル基である化合物

26 については、塩化ベンジル体 **II-22** から Arbuzov 反応によって収率 34%で調製した中間体 **II-23** と、既知の芳香族アルデヒド体 **II-24** との Horner-Emmons 反応によって、(*E*)-アルケニル構造を有するハロゲン化アリール中間体 **II-25** を収率 81%で合成した。続いてアリールホウ素化体 **I-5** との鈴木-宮浦カップリング反応によってビフェニル構造中間体 **II-26** を収率 73%で合成し、前述の **II-21** の合成経路と同様にして 3 工程で bis-アルデヒド中間体 **II-27** に収率 46%で誘導した。またリンカー部が飽和炭素鎖である化合物 **25** については、**II-27** に対して Pd 触媒存在下での水素添加反応により(*E*)-アルケニル構造を飽和炭素鎖構造へと収率 69%で変換し、続いて水素添加反応時に脱離した 2 つの(5-cyanopyridin-3-yl)methyl 基を前述の方法により収率 36%で再び導入し、bis-アルデヒド中間体 **II-28** を合成した。中間体 **II-21**, **II-28** および **II-27** と D-Serine との還元的アミノ化反応によって化合物 **24-26** を収率 30-64%で合成した。



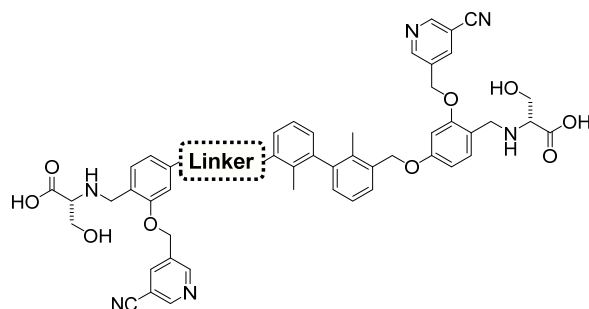
Scheme 7. 化合物 24-26 の合成法

a) Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, CPME-H₂O, 100°C. b) DIAD, PPh₃, THF, rt. c) HCl, THF-H₂O, rt. d) 5-(Chloromethyl)nicotinonitrile, K₂CO₃, DMF, 80°C. e) Dess-Martin, CH₂Cl₂. f) D-Serine, AcOH, NaBH(OAc)₃, DMSO, rt. g) P(OEt)₃. h) NaH, THF. i) XPhos Pd G2, K₃PO₄, THF-H₂O, rt. j) H₂, Pd/C, THF.

* II-20 から II-21 および II-26 から II-27 までの 3 工程での各収率を示す。

** II-27 から II-28 までの 2 工程での収率を示す。

Table 7. リンカー部位を変換した化合物の構造活性相関



Compound	Linker	K_D (nM) [†]	Residence time (h) [†]	EC ₅₀ (μM) [‡]
1		0.019	17	1.0
24		0.060	5.3	2.9
25		0.033	18	1.8
26		0.011	96	0.64

[†] Binding affinities (K_D) and residence time (h) were determined by surface plasmon resonance analysis.

[‡] PD-1/PD-L1 inhibitory activities were measured by blockade bioassay.

リンカー部位を変換した化合物の構造活性相関

リンカー部位を変換した化合物の評価結果を **Table 7** に示す。エーテル基の酸素原子の位置の変換（化合物 **24**）や、酸素原子から炭素原子への置換（化合物 **25**）により、結合強度 (K_D) はわずかに低下した。一方、エーテル基を(*E*)-アルケニル基に置換（化合物 **26**）すると K_D が向上した。

リンカー構造が結合親和性に及ぼす影響を活性コンホマー（以下 Active form）の歪みエネルギーの観点から考察するため、化合物 **24–26** および **1** の両末端のアミノ酸構造を削除した化合物に対してリンカー部分構造の歪みエネルギー計算を実施した (**Table 8**)。その結

果, (B-O-CH₂-A) リンカーと比較して, (B-CH₂-O-A), (B-CH₂-CH₂-A) および (B-CH=CH-A) リンカーの歪みエネルギーはそれぞれ $\Delta\Delta G = +0.6, -0.4, -5.3$ kcal/mol と計算された。この計算結果から化合物 **24** と **26** の評価結果が説明できる。すなわち, (B-O-CH₂-A) リンカーと比較して, Active form の歪みエネルギーがより大きい (B-CH₂-O-A) リンカーへの変換 (化合物 **24**) は K_D の減弱を, それとは反対により歪みエネルギーが小さい (B-CH=CH-A) リンカーへの変換 (化合物 **26**) は K_D の向上を示す。

また注目すべきことに, 化合物 **26** は非常に長い解離半減期を示した。前節で述べた通り標的分子への解離速度が低い, すなわち解離半減期が長い化合物は, *in vivo* 評価における高い有効性に寄与する可能性がある。化合物 **26** の解離速度が低い理由は不明であるが, リガンドの結合/解離過程はリンカー部分の回転を必要とする大きな構造変化を含む可能性が考えられた。そのように仮定すると, 他のリンカーと比較してフレキシビリティの低い(*E*-アルケニル基を含む化合物 **26** は, 結合/解離の両過程の速度が低く, その結果結合速度定数 (k_{on} (1/Ms), **1**: 5.9×10^5 , **26**: 1.9×10^5) と共に解離速度定数 (k_{off} (1/s), **1**: 1.1×10^{-5} , **26**: 2.0×10^{-6}) が低値を示した点を説明できる。

細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害は, 他の置換基の構造活性相関と同様に結合強度 (K_D) と相関傾向を示した。リンカー部位が(*E*-アルケニル基である化合物 **26** は $EC_{50} = 0.64 \mu\text{M}$ と高い阻害活性を示した。

Table 8. 活性コンホマーの歪みエネルギー

Compound [†]	Linker [‡]	Strain energy (ΔG , kcal/mol) [§]	$\Delta\Delta G$ from (B-O-CH ₂ -A) Linker (kcal/mol) [¶]
1	B-O-CH ₂ -A	17.8	0
24	B-CH ₂ -O-A	18.4	0.6
25	B-CH ₂ -CH ₂ -A	17.4	-0.4
26	B-CH=CH-A (<i>E</i>)	12.5	-5.3

[†] 対応するリンカー構造を有する化合物を表す。

[‡] A および B はそれぞれ A 環および B 環を意味する。

[§] 計算環境は[OPLS3e force field, MacroModel, Schrödinger Suite 2019-3]を用いた。(PDB ID: 6RPG) の PD-L1 に対して各化合物を配置して複合体を生成し、最適化計算を行って複合体中のリガンドのエネルギーを算出した。化合物単独で最適化計算を実施し、求めた最安定構造のエネルギーとの差を算出して表示した。

[¶] 各化合物と (B-O-CH₂-A) 体との Gibbs 自由エネルギーの差分を算出して表示した。

第5節 タンパク質近傍の水の排除を企図した、B環上への置換基 (R₅) の導入

近年計算機化学の領域ではタンパク質-化合物の複合体近傍の水に注目したリガンド設計手法として、Apo-タンパク質あるいは複合体タンパク質に対して分子動力学的手法 (MD; molecular dynamics) を用いて水の位置、エネルギー状態や挙動等を解析し、リガンド設計に活用する手法が報告されている⁹¹。方法としては、バルク水中にタンパク質を配置して MD シミュレーションを行い、水の配座をサンプリングする。十分に長い時間のシミュレーションを行うと、タンパク質表面に水が集積する位置や水分子の方向およびエネルギーに関する情報 (エンタルピー項とエントロピー項の各値) が得られる。エネルギーは、複合体のポケット内部あるいは複合体近傍に存在する水が、バルク中に存在する場合と比較した際のエネルギー差を表し、符号が正であれば複合体近傍に存在するほうが不安定であることを意味する。またエネルギーのうち、エンタルピー項が負である場合にはタンパク質分子と水分子が相互作用を形成して安定化していることを意味し、リガンドの置換基を伸長して水を排斥する場合には水と類似した相互作用を形成できる極性置換基によってか、あるいは

水は排斥しない方が親和性を向上する上で望ましい。反対にエンタルピー項が正である場合には、その水分子はタンパク質分子と安定化に寄与する（極性）相互作用を形成できない環境にいることを示し、脂溶性置換基の導入によって水を排除することが親和性を向上する上で望ましい。また、エントロピーは正の値であり、値が大きいほど不安定であることを意味する。リガンド設計においては、エネルギーの高い水分子に着目し、置換基による水の排斥によってタンパク質-リガンド複合体のエネルギーを安定化させ、親和性の向上を狙う目的で利用される。それゆえ、水解析の結果リガンド近傍にエネルギー的に不安定な水分子の存在が示唆される場合には、その排除を意図した置換基の設計が、活性向上のための有望な方法として考えられる。

そこで **BMS-202** と PD-L1 の複合体結晶構造 (PDB ID: 5J89) からリガンドを除いた PD-L1 homodimer を作成し、Watermap⁹² による水の挙動のシミュレーションを実施した。その結果、溶媒露出領域周辺の PD-L1 タンパク質の辺縁部に不安定水の存在が示唆された (**Figure 19 (a), (b)**)。エンタルピー項は大きく正の数値 (+6.92 kJ/mol) を示し、また周辺は脂溶性残基で囲まれた領域であるため、脂溶性基の伸長による水の排除によって結合活性が向上することが期待された。また、水へ向かう置換基伸長の足場として B 環の 6 位からの伸長が、また長さは 4-5 原子程度が適当と考えられた (**Figure 19 (c), (d)**)。以上の仮説に基づき化合物の合成を計画した。

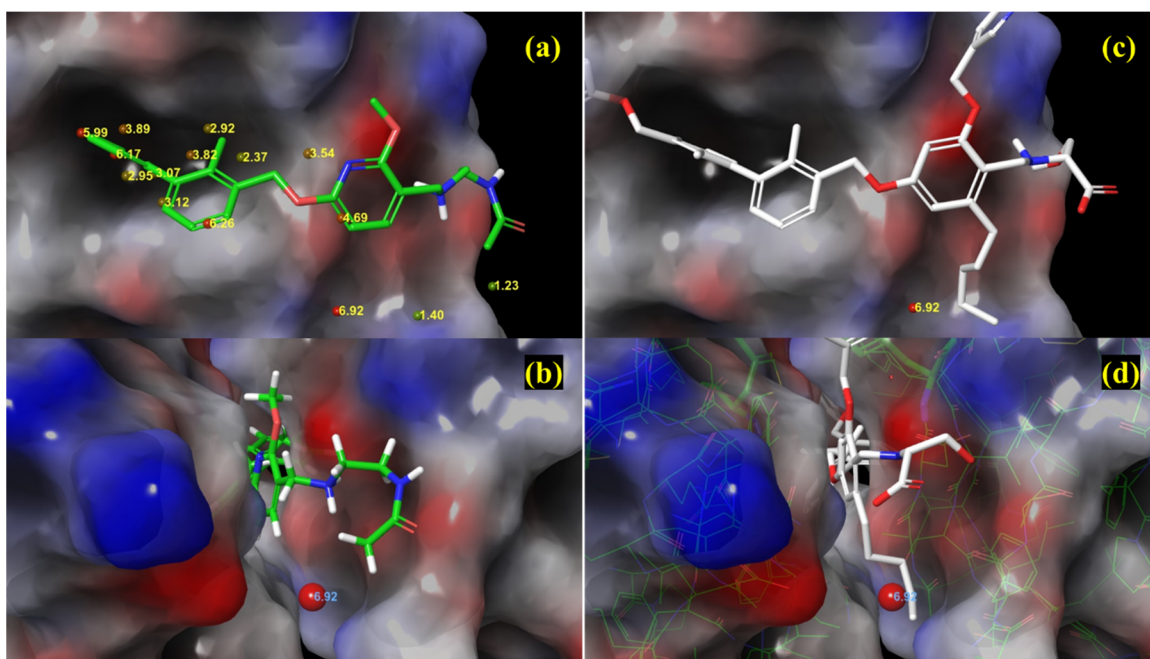


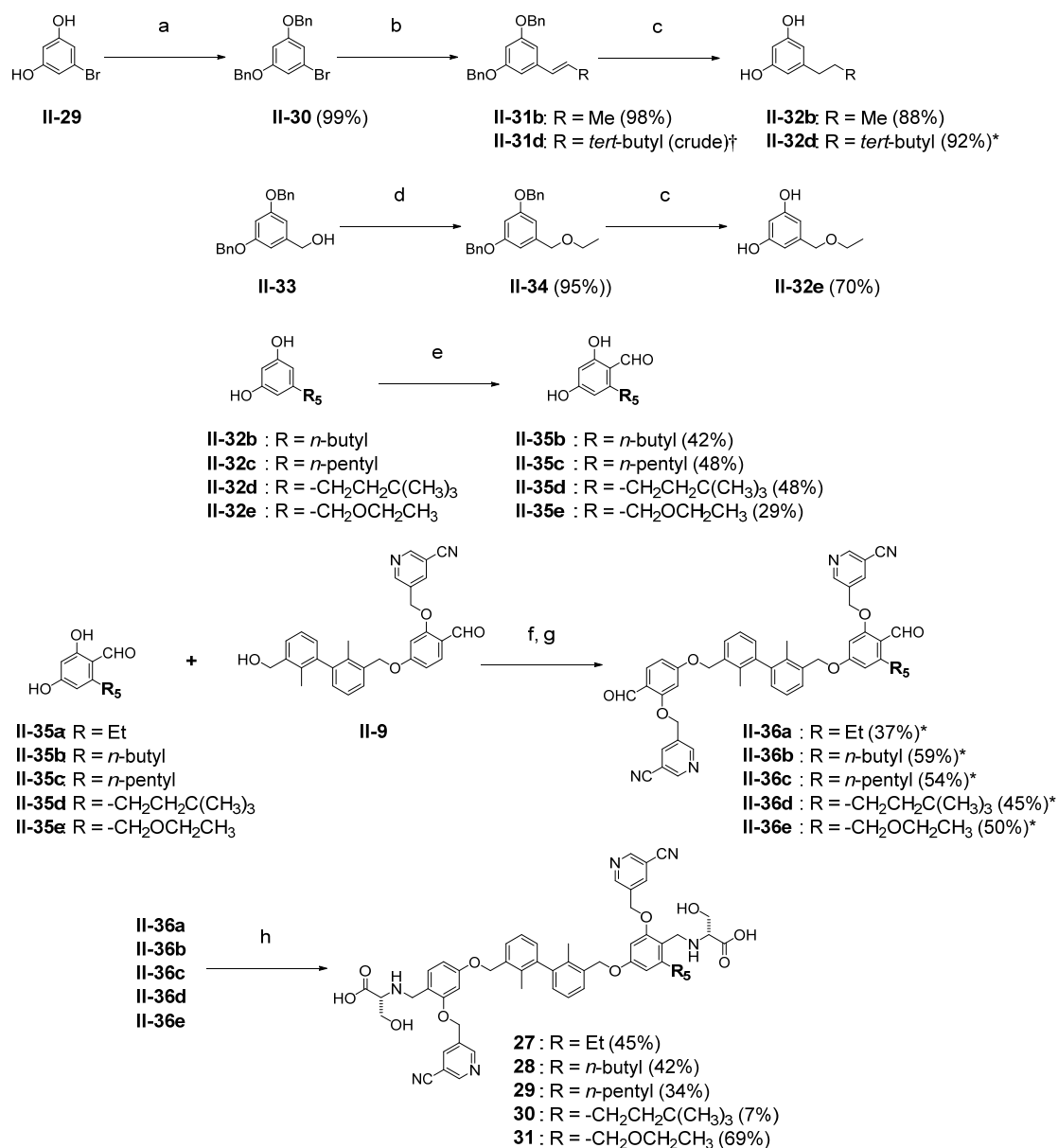
Figure 19. PD-L1 homodimer-化合物複合体近傍の水の分子動力的解析 (Watermap™, Schrödinger Suite 2019-3)

PDB ID: 5J89 から **BMS-202** を除いて作成した PD-L1 homodimer に対してシミュレーションを実施した。水分子の数字と色はエネルギー値 (ΔG (kJ/mol)); 緑:低値~赤:高値) を表す。(a) **BMS-202** を重ねて表示 (chain B のみを表示)。溶媒露出領域近傍 (図中央下部) に不安定な水が認められる。(b)(a)の図を溶媒領域方向からの視点で表示。(c) 化合物 **1** の docking pose をもとに B 環の 6 位から水方向に *n*-pentyl 基を伸長させた化合物 **29** を描画して表示。PD-L1 は chain B のみを表示。最大エネルギー値を示した水分子のみを表示。(d) (c)の図を溶媒領域方向からの視点で表示。

化合物の合成

B 環上へ置換基 (R_5) を導入した化合物 **27-31** の合成経路を **Scheme 8** に示す。B 環の 6 位に種々の R_5 を導入した 2,4-dihydroxybenzaldehyde 誘導体 **II-35a-e** は、既知である 2-ethyl-4,6-dihydroxybenzaldehyde (**II-35a**)を除き以下の方法で合成した。5-Bromobenzene-1,3-diol (**II-29**) を出発原料とし、 K_2CO_3 存在下に臭化ベンジルを作用させることでフェノール性水酸基のベンジル保護体 **II-30** を収率 99%で合成した。これに対し、 R_5 がエチル基と 3,3-dimethylbutyl 基である構造に対応した各アルケニルホウ酸を用いて Pd カップリング反応に

よりアルケニル基を導入した中間体 **II-31b** および **II-31d** を得た後、水素添加反応によりアルケニル基の還元とベンジル基の脱保護を同時に行うことで、 R_5 がエチル基および 3,3-dimethylbutyl 基である 3,5-dihydroxybenzene 中間体 **II-32b** および **II-32d** を 2 工程で収率 86% および 92% でそれぞれ合成した。また、 R_5 置換基にエーテル構造を含む中間体 **II-32e** は、保護ベンジルアルコール体 **II-33** を出発原料として、水素化ナトリウム存在下でヨウ化エチルを作用させて中間体 **II-34** を収率 95% で合成し、次いで Pd/C 触媒存在下の水素添加反応によりベンジル基の脱保護を行い R_5 がエトキシエチル基である 3,5-dihydroxybenzene 中間体 **II-32e** を収率 70% で合成した。2,4-Dihydroxybenzene 中間体 **II-32b**, **II-32d**, **II-32e** および既知である Olivetol (**II-32c**) から DMF 溶媒中、Vilsmeier 反応によってホルミル基の導入を行い 2,4-dihydroxybenzaldehyde 誘導体 **II-35b-e** へと収率 29–48% でそれぞれ変換した。ヒドロキシメチル基を有するビフェニル中間体 **II-9** に対して 2,4-dihydroxybenzaldehyde 誘導体 **II-35a-e** を光延条件下で反応させてフェノール 4 位の水酸基と中間体 **II-9** の水酸基の反応体を得た後、続いて前述の方法で 2 位のフェノール性水酸基を(5-cyano-3-pyridine)methoxy 基に変換して bis-アルデヒド中間体 **II-36a-e** を 2 工程の収率 37–59% でそれぞれ合成した。bis-アルデヒド中間体 **II-36a-e** に対して D-Serine との還元的アミノ化反応を行い化合物 **27-31** を収率 7–69% でそれぞれ合成した。



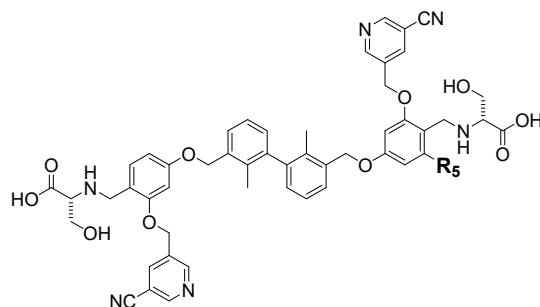
Scheme 8. 化合物 27-31 の合成法



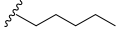


a) BnBr, K₂CO₃, DMF, rt. b) R-B(OH)₂, SPhos Pd G1, K₃PO₄, toluene, 100°C. c) H₂, Pd/C, THF or MeOH. d) EtI, NaH, CPME-DMF, rt. e) Vilsmeier reagent, DMF, 0°C–rt. f) DIAD, PPh₃, THF, rt. g) 5-(Chloromethyl)nicotinonitrile, K₂CO₃, DMF, 80°C. h) D-Serine, AcOH, NaBH(OAc)₃, DMSO, rt.

* II-30 から II-32d および II-9 から II-36a–e までの 2 工程での各収率を示す。

[†] crude のまま次工程に用いた。

Table 9. B 環上に置換基 (R₅) を導入した化合物の構造活性相関



Compound	R ₅	K _D (nM) [†]	Residence time (h) [†]	EC ₅₀ (μM) [‡]
1	H	0.019	17	1.0
27		0.037	23	3.1
28		0.30	4.9	NT [§]
29		0.21	9.3	12
30		0.65	1.3	NT [§]
31		0.37	3.1	NT [§]

[†] Binding affinities (K_D) and residence time (h) were determined by surface plasmon resonance analysis.

[‡] PD-1/PD-L1 inhibitory activities were measured by blockade bioassay.

[§] Not tested.

B 環上に置換基 (R₅) を導入した化合物の構造活性相関

化合物の評価結果を **Table 9** に示す。R₅ にエチル基を導入した化合物 **27** は、無置換体である化合物 **1** と比較して 2 倍減弱した結合強度 (K_D) を示した。しかしながら、水の排除に適すると考えられた 4-5 原子分の長さを有する置換基を導入した場合には (化合物 **28-31**), いずれも大幅な減弱が見られた。長さに加えて末端に立体的な大きさを持たせた化合

物 **30**, あるいは所望のコンホメーションをとる上で考慮すべき回転障壁が炭素鎖に比べて小さいエーテル構造を有する化合物 **31** においても大幅な減弱が見られた。置換基を導入した部位付近は溶媒露出領域であり, 置換基の導入によってタンパク質を取り囲む水のネットワークに対する破壊・再構築等の干渉が起こり, 無置換基に比べてエネルギー的に不利になったことが, 結合強度減弱の原因と考察している。

細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害は, 前節までの構造活性相関で見られた傾向と同様に結合強度 (K_D) と相関し, 置換基導入による活性増強効果は認められなかった。

第6節 分子内の電子反発によるコンホメーション規制を企図した, B 環内への窒素原子の導入

化合物 **1** の docking pose は **BMS-202** と PD-L1 の複合体結晶構造におけるリガンドとよく重なるが, 片方のエーテルリンカー部位のコンホメーションに **BMS-202** との相違点が見られた (**Figure 20**)。

BMS-202 は [A-CH₂-O-B] (A, B はそれぞれ A 環と B 環を意味する) がほぼ同一平面上に並ぶコンホメーションであるのに対し, 化合物 **1** では CH₂-O 結合の方向が A 環の面とおよそ直交する位置関係にある。化合物 **1** は構造から考えてどちらのコンホメーションを取ることも可能であると想定されたが, 結合状態で特定のコンホメーションをとる際のペナルティー (エントロピーロス) が生じ, その結果活性が減弱している可能性が考えられた⁹³。リンカー部が回転不可能な(*E*)-アルケニル基である化合物 **26** が高活性を示した事実もこの考えを支持する。一方で **BMS-202** では, B 環内の窒素原子と隣接位のエーテル酸素原子の孤立電子対同士の反発を避ける様に, 孤立電子対同士が逆方向に向いたコンホメーションに規制されるため, 当該結合に対するエントロピーロスは低減すると予想される。そこで B 環内へ窒素原子を導入した際の活性に対する影響を検討するため, 化合物 **5** の 2,4-ジヒドロキシフェニル環 (B 環) の 3 位の炭素原子を窒素原子に変換した化合物 **32** と, 比較のために 5 位の炭素原子を窒素原子に変換した化合物 **33** の合成と評価を行った (**Figure 21**)。

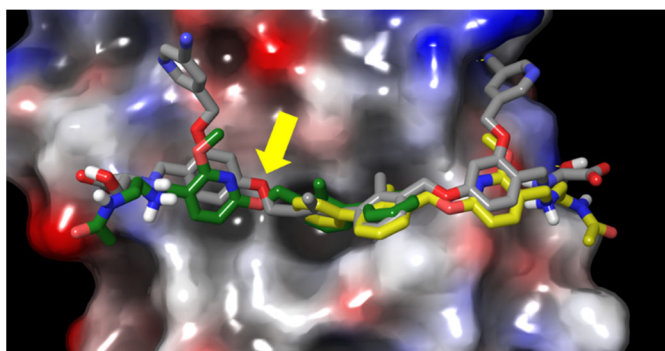


Figure 20. リガンド-PD-L1 複合体構造における化合物 1 と BMS-202 のコンホメーション
 化合物 1 の docking pose (グレー) に対して、**BMS-202** (PDB ID: 5J89, 黄色) および **BMS-202** を対称軸に対して 180°回転させた構造 (緑) を重ねて表示した。化合物 1 の片方のリンカー部位に、**BMS-202** とのコンホメーションの相違が見られる (黄色矢印)。図では PD-L1 homodimer のうち片方の chain のみを表示している。

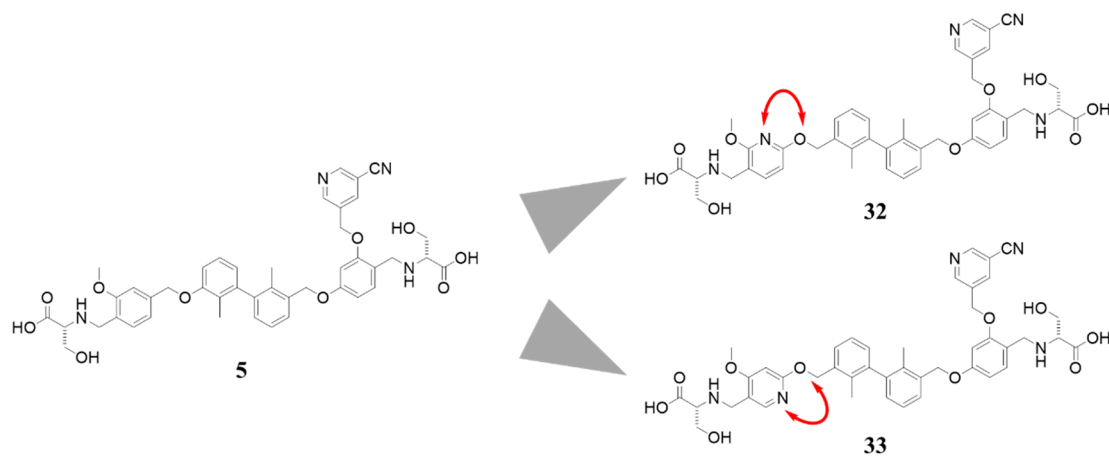
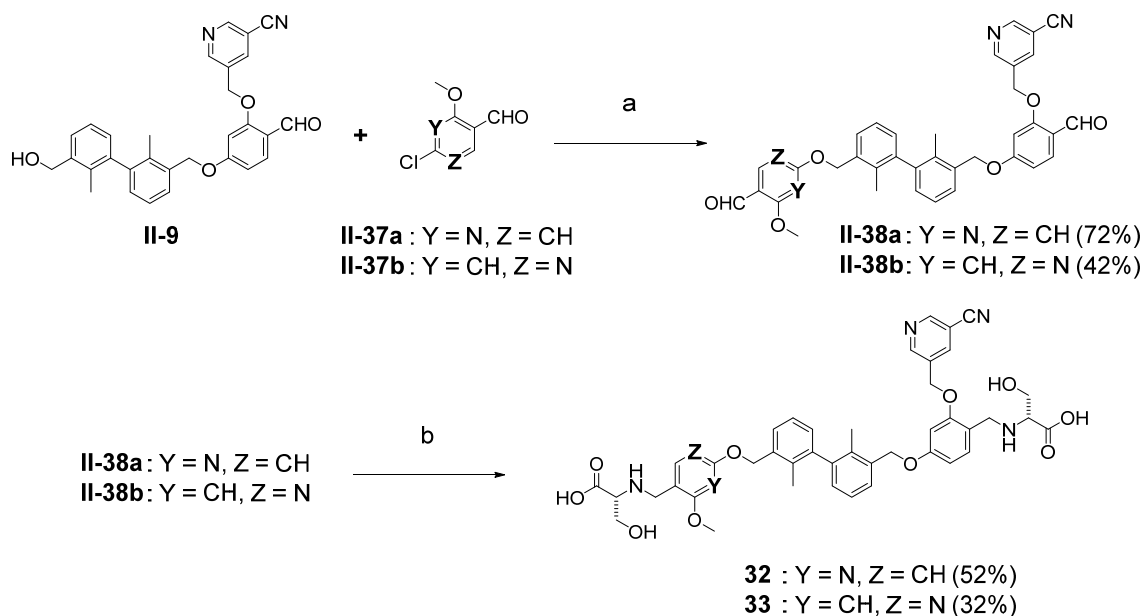


Figure 21. ジアルコキシフェニル環 (B 環) 内へ窒素原子を導入した化合物における窒素-酸素原子間の電子反発

化合物の合成

ジアルコキシフェニル環内へ窒素原子を導入した化合物 **32** および **33** の合成経路を **Scheme 9** に示す。ヒドロキシメチル基を有するビフェニル中間体 **II-9** に対し、既知の 6-chloro-2-methoxynicotinaldehyde (**II-37a**) もしくは 6-chloro-4-methoxynicotinaldehyde (**II-37b**) を Pd(OAc)₂-Xantphos 触媒条件下で反応させ、bis-アルデヒド中間体 **II-38a** および **II-38b** を収率 72% および 42% でそれぞれ得た後、D-Serine との還元的アミノ化反応によって化合物 **32** および **33** を収率 52% および 32% で合成した。



Scheme 9. 化合物 **32-33** の合成法

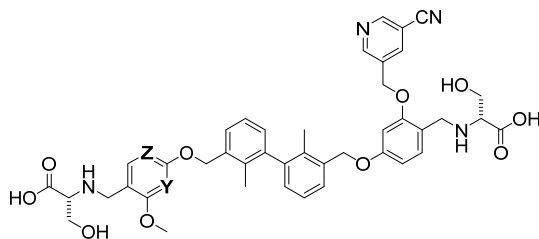
a) Pd(OAc)₂, Xantphos, Cs₂CO₃, toluene, 110°C. b) D-Serine, AcOH, NaBH(OAc)₃, DMSO, rt.

B 環内へ窒素原子を導入した化合物の構造活性相関

化合物の評価結果を **Table 10** に示す。B 環の 3 位が窒素原子 ($Y = N, Z = CH$) である化合物 **32** は、3 位, 5 位共に炭素原子である化合物 **5** と比較して 2 倍の結合強度 (K_D) の向上を示した。一方で、5 位が窒素原子 ($Y = CH, Z = N$) である化合物 **33** は、**5** から 2 倍の減弱を示した。化合物 **32** で活性向上が見られたのは、想定した通り B 環内の窒素原子と隣接するエーテル酸素の電子反発によるリンカー部位のコンホメーションに規制が起こり、エントロピーロスが減少したことが理由として考えられた。化合物 **33** は窒素-酸素原子間の電子反発が化合物 **1** の docking pose のコンホメーションの固定に寄与し、エントロピーロスの低減につながる事が考えられたが、活性は減弱した。5 位は前述の通り脂溶性置換基で活性が向上した部位である。周辺は脂溶性残基で囲まれており、極性基が好まれない環境であることが活性減弱の一因であると考えられた。

細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害は、前節までの構造活性相関で見られた傾向と同様に結合強度 (K_D) と相関した。

Table 10. B 環内へ窒素原子を導入した化合物の構造活性相関



Compound	Y	Z	K_D (nM) [†]	Residence time (h) [†]	EC ₅₀ (μM) [‡]
5	CH	CH	0.21	1.2	9.5
32	N	CH	0.11	10.2	3.2
33	CH	N	0.44	0.81	28

[†] Binding affinities (K_D) and residence time (h) were determined by surface plasmon resonance analysis.

[‡] PD-1/PD-L1 inhibitory activities were measured by blockade bioassay.

第7節 細胞機能評価

細胞評価系で高い活性を示した化合物 **9**, **11**, **17**, **18** および **26** と抗 PD-1 抗体を用いて細胞機能評価を実施した。結果を **Figure 22** に示す。いずれの化合物も抗 PD-1 抗体と同様にして濃度依存的に IFN- γ 産生量の増加を示した。第1章の第5節で示した化合物 **1** の結果と同様に、上記の化合物と抗 PD-1 抗体との間には potency の面で大きな差が認められた。その一方で、化合物 **9** および **18** は 300 nM の濃度で、化合物 **11**, **17** および **26** は 3,000 nM の濃度で抗 PD-1 抗体が示した最大薬効 (efficacy) と同程度の IFN- γ 産生量を示した。その中で、化合物 **18** は 3,000 nM の濃度で抗 PD-1 抗体と比較してさらに高いレベルの有効性を示した。以上の結果から、これらの化合物が T 細胞においても抗 PD-1 抗体と同様にして、免疫寛容の解除による細胞機能回復作用を示すことが確認された。

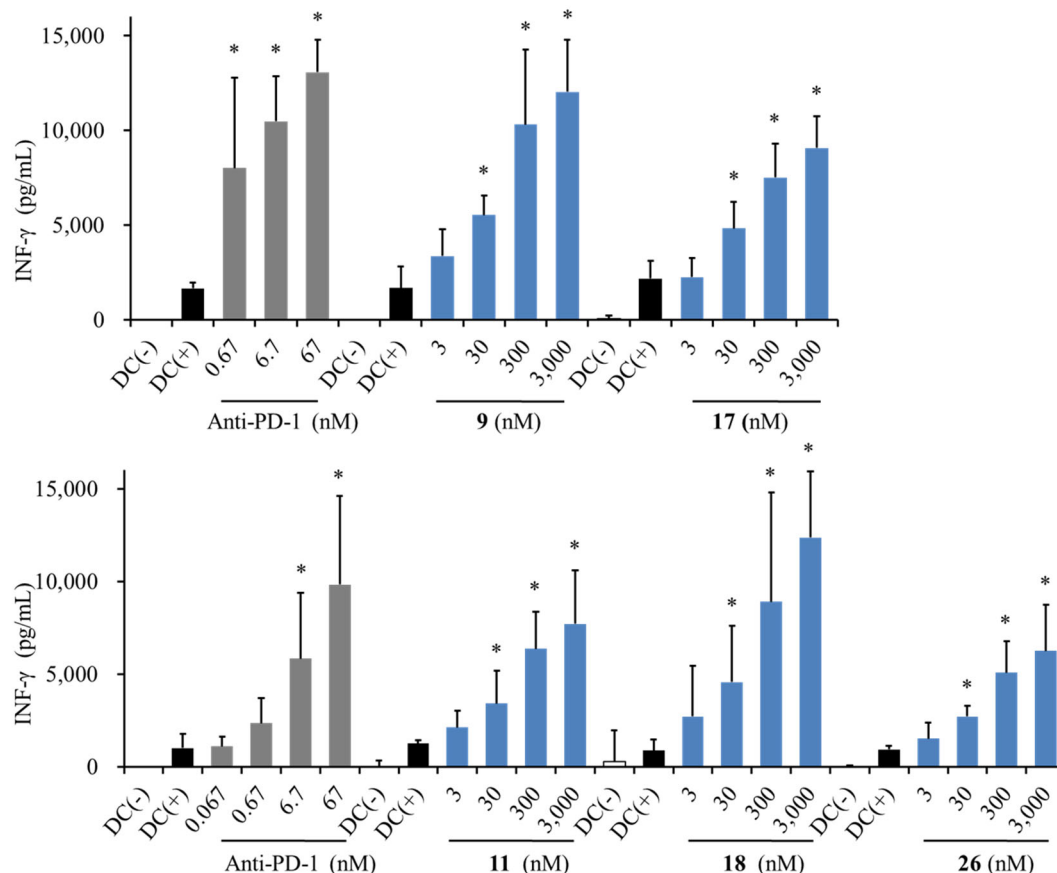


Figure 22. 抗 PD-1 抗体と化合物 9, 11, 17, 18 および 26 の細胞機能評価結果 (MLR assay)

抗 PD-1 抗体および化合物の存在下もしくは非存在下で、CD4⁺ T 細胞と単球由来樹状細胞 (DC) を 7 日間共培養した。培養上清中の INF- γ 分泌量を、細胞活性化の指標として測定した。実験回毎に抗 PD-1 抗体の結果と並べて表示した。グラフは、n=6 で行った実験の平均値 \pm SD を示す。* P<0.05 Bartlett 検定後に DC(+)群との差について Dunnett 検定 (化合物 17) もしくは Steel 検定 (化合物 9, 11, 18, 26 および Anti-PD-1) により求めた。

第 8 節 Dimer 型化合物の作用様式の確認

Dimer 型化合物が PD-L1 の homodimer 化を誘導するかを確認する目的で、化合物 18 存在下および非存在下における hPD-L1 のサイズ排除クロマトグラフィー分析を実施した (Figure 23)。その結果、化合物 18 の存在下では非存在下における hPD-L1 の溶出ピークと比較して保持時間の短縮が見られた。このことから化合物 18 は PD-L1 の homodimer 化を誘導することが示唆された。

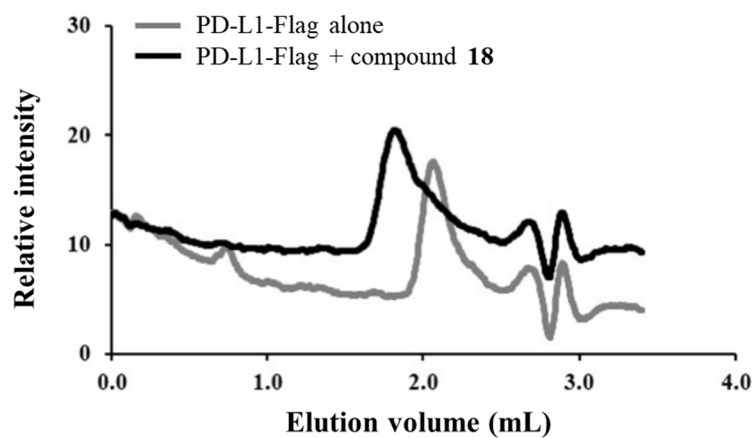


Figure 23. 化合物 **18** の存在下および非存在下における hPD-L1 のサイズ排除クロマトグラム (横軸) 溶出量 (mL), (縦軸) 相対強度 (UV) をそれぞれ表す。高度架橋アガロースゲルを担体として用い, hPD-L1-Flag (3.8 μ M) を単独もしくは化合物 **18** (12 μ M) 共存下で分析を実施した。化合物 **18** の存在下 (黒色) では PD-L1 単独 (灰色線) の場合と比較してピークの保持時間の短縮が見られる。

第3章 高活性かつ分子量が低減した骨格の取得

第1節 緒言

第1章および第2章の検討で見出した Dimer 型化合物は、細胞評価系での PD-1/PD-L1 阻害活性を示し、また細胞機能評価においても抗体と同程度の薬効を示した。当初研究目的の一点目として設定した「細胞評価系で阻害活性を示す低分子化合物の創出」については達成したといえる。その一方でより臨床的な意義が高い経口治療薬の開発を想定した場合には、Dimer 型化合物は分子量が大きいために経口吸収性や組織への透過性が低いことが予想され、その開発の困難が懸念された。このことは、抗体医療と比較して低分子治療薬の大きな利点の一つを喪失することから、臨床面においても産業面においてもきわめて重要な点である。

一般に経口剤に適した分子量は 500 程度以下とされる⁹⁴。近年上記の範囲から逸脱する例^{95, 96}も見られるものの、化合物 **1** の分子量は 893 と、一般的な経口薬の水準を大きく超える。それゆえ、Dimer 型化合物からさらなる置換基の導入や変換を行ったとしても、経口治療薬として望ましい物性を有する化合物の取得の可能性は非常に低いと考えられた。

本章では、上記の課題の解決を指向した二点目の研究目的である「高活性かつ分子量が低減した骨格の取得」の検討について述べる。

第2節 低分子化を指向した化合物の設計

高い薬理活性に加えて吸収性を併せ持つ低分子阻害剤の開発には、より分子量が小さく、かつ活性な骨格の取得が望ましい。そこで、第1章および第2章の検討で得られた構造活性相関情報を活用して Dimer 型化合物の部分削除を行い、活性発現最小構造を探索する方法で分子量の低減を検討した。

第1章で述べた通り、Monomer 型化合物 **BMS-1327** の全体を対称化した化合物と一部の

みを対称化した化合物の評価結果の比較から、各部分構造が結合強度に対してどの程度寄与するのかについての情報を得た (Figure 24)。全体を対称化した化合物 **1** と比較し、末端のアミノ酸構造を削除した化合物 **3** では、195 倍の減弱が見られた。その一方で B 環上の (5-cyano-3-pyridine)methoxy 基を削除した化合物 **4** では減弱幅が 15 倍であった。この結果から末端のアミノ酸構造は活性発現に大きく寄与するが、B 環上の (5-cyano-3-pyridine)methoxy 基の寄与は限定的であることがわかる。また、アミノ酸構造を持たない **BMS-202** が **BMS-1327** と同程度の結合活性を示す事実と、その複合体構造における結合様式の観察から、末端のアミノ酸構造は必須ではなく、アミノ基を含む他の構造に変換可能であることが推察された。

以上の考察から、活性発現に重要である末端のアミノ基を維持しつつ、Dimer 型化合物の片方の部分構造の削除による分子量の低減を計画した。具体的には、比較的活性に対する寄与が低い B 環および環上の (5-cyano-3-pyridine)methoxy 基を削除する観点から、末端にアミノ基を配置し、それと Monomer 型化合物のビフェニル構造とを様々な長さの直鎖でつないだ化合物を設計した。また比較のため、アミノ基の代わりに水酸基を用いた化合物の合成も計画した。

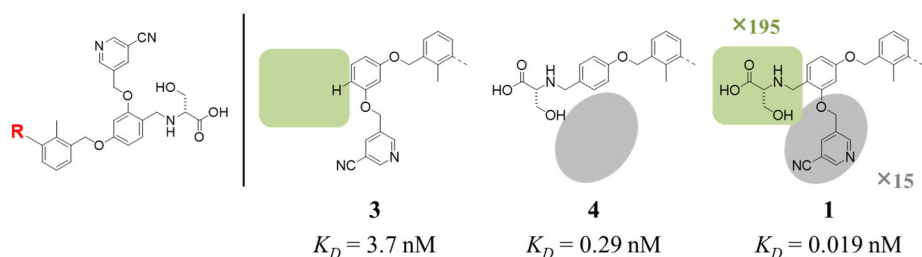
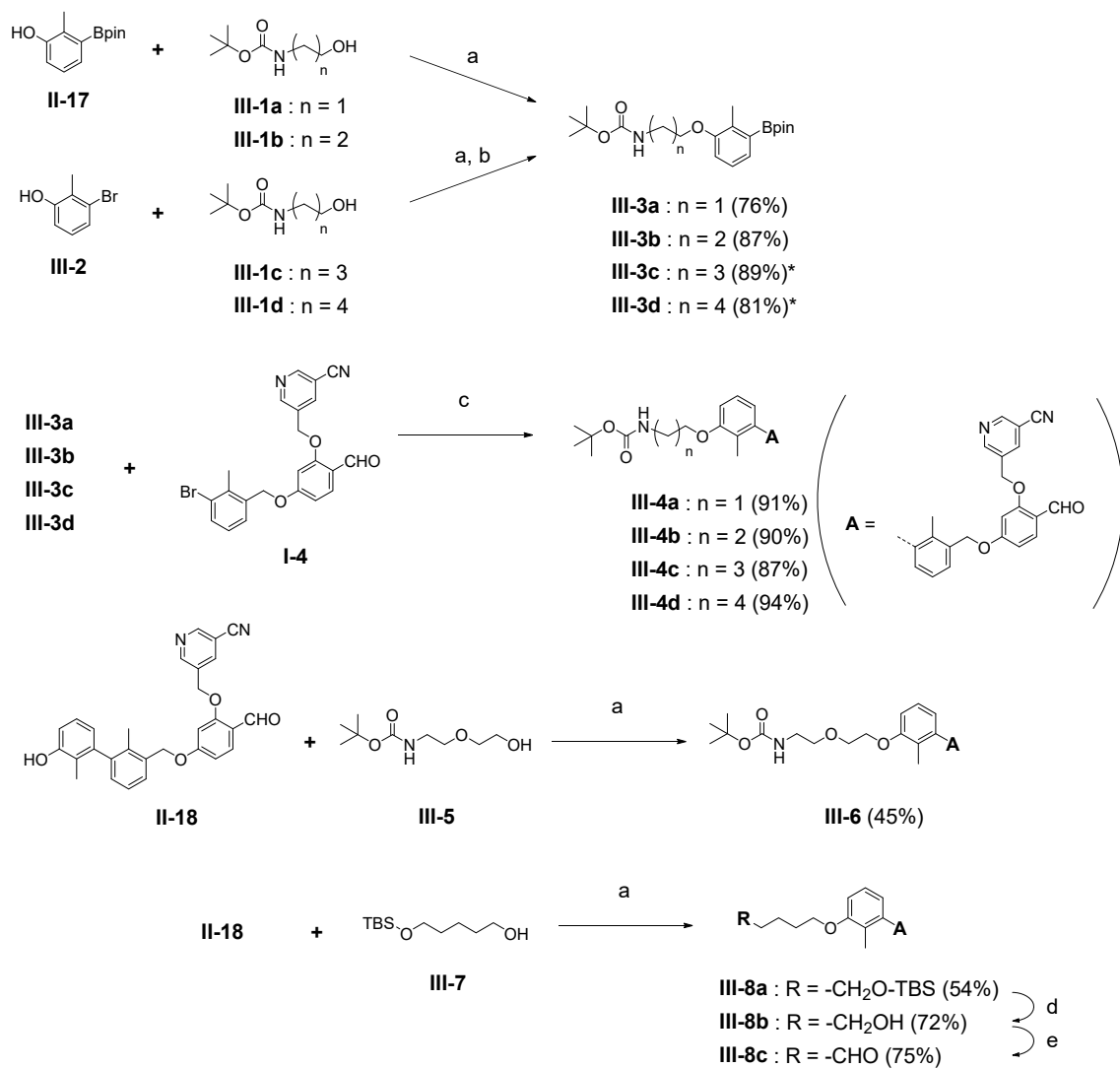


Figure 24. Dimer 型化合物における各部分構造の結合強度 (K_D) に対する寄与

第3節 化合物の合成

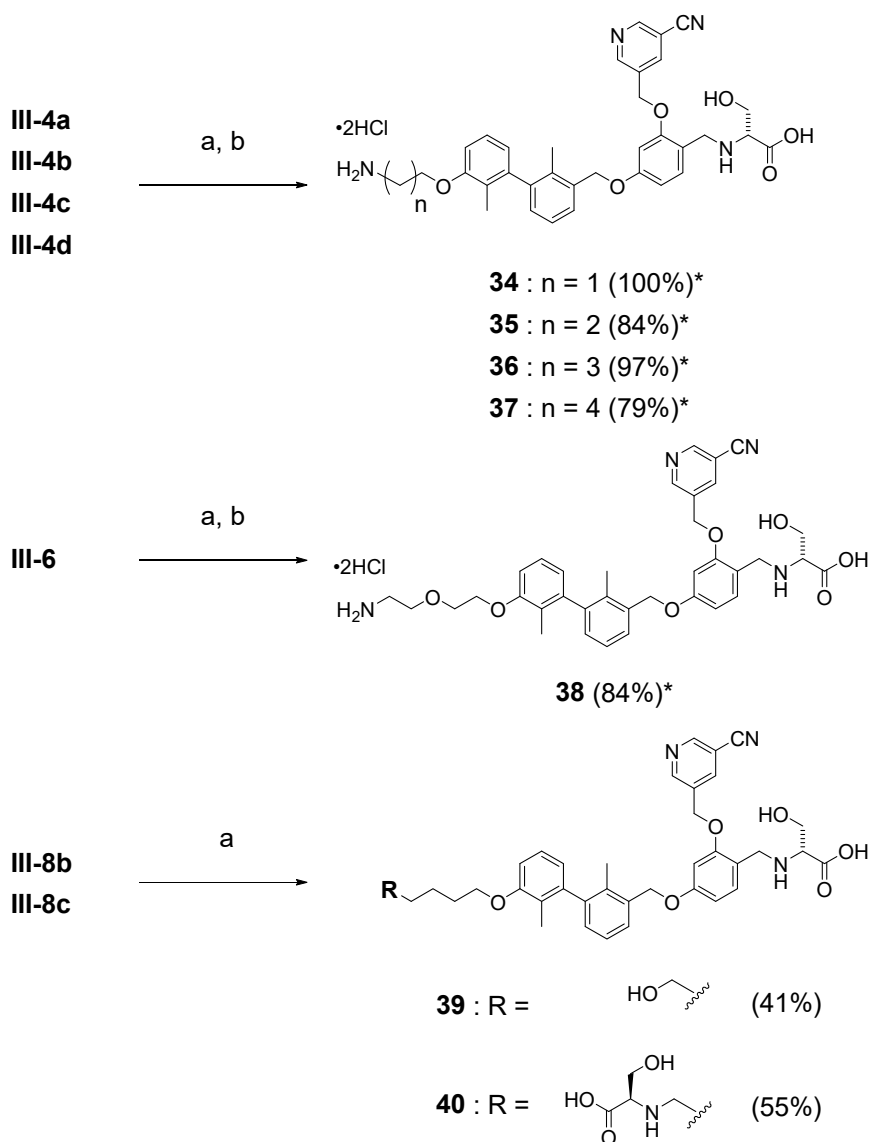
低分子化を指向した化合物 **34-40** の合成経路を **Scheme 10** および **Scheme 11** に示す。炭素鎖長の異なる直鎖アミノアルコールの Boc 保護体 **III-1a** および **III-1b** に対し、アリールホウ素化体 **II-17** を用いて光延条件下でエーテル化を行い、炭素鎖長が 2-3 である中間体 **III-3a** および **III-3b** を収率 76% および 87% で得た。炭素鎖長が 4-5 である中間体 **III-3c** および **III-3d** については、**III-1c** および **III-1d** に対しハロゲン化アリール体 **III-2** を用いて光延反応を行った後に、Pd 触媒存在下でホウ素化反応を行い 2 工程で収率 89% および 81% で合成した。中間体 **I-4** とアリールホウ素化体 **III-3a-d** を用いた Pd(PPh₃)₄ 触媒存在下での鈴木-宮浦カップリング反応によってビフェニル構造を構築し、mono-アルデヒド中間体 **III-4a-d** を収率 87-94% でそれぞれ得た。直鎖部分にエーテル構造を含む化合物 **38** については、フェノール性水酸基を有するビフェニル中間体 **II-18** と Boc 保護アミノアルコール体 **III-5** との光延反応によって mono-アルデヒド中間体 **III-6** を収率 45% で合成した。また末端部分が水酸基あるいはアミノ酸構造である化合物 **39** および **40** については、中間体 **II-18** と直鎖ジオールの mono-保護体である 5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)pentan-1-ol (**III-7**) から同様にして中間体 **III-8a** を収率 54% で合成した。TBS 基の脱保護を行い、収率 72% で mono-アルデヒド中間体 **III-8b** へと誘導し、さらに末端の水酸基を Dess-Martin 試薬で酸化して bis-アルデヒド中間体 **III-8c** を収率 75% で得た。末端に Boc 保護アミノ基を有する mono-アルデヒド中間体 **III-4a-d** および **III-6** は、D-Serine との還元的アミノ化反応に続いて TFA による脱 Boc 化と塩酸添加により収率 79-100% で化合物 **34-38** を塩酸塩として合成した。また末端が水酸基である mono-アルデヒド中間体 **III-8b** と bis-アルデヒド中間体 **III-8c** に対し、D-Serine との還元的アミノ化反応を行い化合物 **39** および **40** を収率 41% および 55% でそれぞれ合成した。



Scheme 10. 化合物 34–40 の合成法(1)

a) DIAD, PPh₃, THF, rt. b) Bis(pinacolato)diboron, KOAc, PCy₃, Pd₂(dba)₃, dioxane, 120°C. c) Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, CPME-H₂O, 100°C. d) TBAF, THF, rt. e) Dess-Martin, CH₂Cl₂.

* **III-2** から **III-3c** および **III-3d** までの 2 工程での各収率を示す。



Scheme 11. 化合物 34–40 の合成法 (2)

a) D-Serine, AcOH, NaBH(OAc)₃, DMSO, rt. b) (i) TFA, CH₂Cl₂, rt. (ii) HCl / AcOEt.

* III-4a–d から 34–37 および III-6 から 38 までの 2 工程での各収率を示す。

第 4 節 低分子化を指向した化合物の評価結果

化合物の評価結果を **Table 11** に示す。(5-Cyano-3-pyridine)methoxy 基を含めて、B 環は適切な長さの直鎖構造に変換しても比較的高い結合強度 (K_D) を維持した。また、末端のアミノ基と中央のビフェニル構造の間の鎖長は K_D に大きく影響した。鎖長として 4–6 原子を有する化合物 **35–37** は、3 原子を有する化合物 **34** と比較して、結合親和性の顕著な向上を示

した。鎖長が6原子である化合物**37**の炭素鎖の一部をエーテル基に変換した化合物**38**は、化合物**37**と比較して K_D が3倍程度減弱した。また、アミノ基を水酸基に置換した化合物**39**は、予想通り結合親和性が著しく低下した。この結果から高い結合親和性にはアミノ基が大きく寄与していることが確認された。さらなる活性向上を目指して、化合物**37**の末端アミノ基をアミノ酸構造に変換した化合物**40**は、化合物**37**と比較して結合強度が5倍向上し($K_D=0.034$ nM)、第1章および第2章で見出したDimer型化合物と同程度の高い活性を示した。

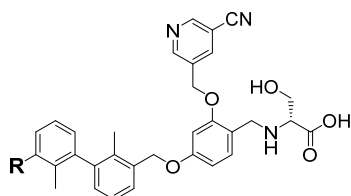
BMS-202とPD-L1の複合体結晶構造(PDB ID: 5J89)から、活性発現に重要な末端アミノ基はAsp122との静電的相互作用を形成していると推察される。鎖長が3原子である化合物**34**および直鎖構造上にアミノ基を持たない化合物**39**がDimer型化合物や化合物**35-37**と比較して弱い活性を示すのは、これらの化合物がAsp122との相互作用を形成していないことが原因として考えられた。その一方で鎖長が4原子である化合物**35**では末端アミノ基がAsp122と静電的相互作用を形成できる距離にあり、相互作用を獲得した結果活性が大幅に向上したと考えられた。また興味深いことに、化合物**35-37**の K_D には大きな差が見られなかった。正負の電荷間の作用である静電的相互作用は水素結合やその他の極性相互作用とは異なり、その形成に官能基間の厳密な方向性が要求されない。そのため、鎖長が5-6原子である化合物**36-37**では直鎖部分の柔軟性によって末端アミノ基を化合物**35**と同様の位置に配置できたか、あるいは化合物**36-37**の末端アミノ基は化合物**35**のそれと比較してより溶媒露出領域側(タンパク質外側)に位置するものの、Asp122との間で静電的相互作用を形成するのに適切な相対距離を保持したためと考察された。

低分子化を指向した変換の結果を、リガンド効率⁹⁷(LE: ligand efficiency)を用いて評価した。LEは活性強度と重原子数との比から算出される値であり、同じ強度(potency)の薬理活性を示す複数の化合物を比較した場合には、重原子数が少ない化合物の方が高値を示す。前述の通り経口治療薬の開発には溶解性や吸収性の観点から「低分子量で高活性を示す」

化合物が望ましい。そのため、LE は化合物の相互作用獲得あるいは薬理活性発現の効率を測る指標として創薬化学分野で広く用いられている。化合物 **35-37** の LE はいずれも 0.29 であり、鎖長が 4 から 6 への変換の際には元のリガンド効率を維持したまま 2 原子の追加による活性の向上効果を得られた。さらに活性が向上した化合物 **40** の LE は 0.27 と、**37** からやや低下したものの、前章で見出した最も高活性な Dimer 型骨格化合物 **26** (LE = 0.23) と比較して、顕著な改善が見られた。それゆえ、上記の構造変換で新たに見出した直鎖型のリガンドは、高活性と吸収性および溶解性を両立する薬剤分子探索のための有望な骨格であると考えられる。

比較的高い結合強度を示した化合物 **35-37** および **40** の、細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害活性評価を行った。前章で評価した Dimer 型化合物の結果と同様に、EC₅₀ 値は K_D と相関傾向を示した。また両者の間には 5.2×10^4 – 1.2×10^5 倍と大きな乖離が見られたものの、いずれの化合物も阻害活性を示した。その中で、化合物 **40** (EC₅₀ = 4.0 μM) は起点とした Dimer 型化合物 **1** と同程度の阻害活性を示した。

Table 11. 低分子化を指向した化合物の評価結果



Compound	R	K_D (nM) [†]	Residence time (h) [†]	EC ₅₀ (μM) [‡]	LE [¶]
34		3.4	0.24	NT [§]	0.26
35		0.26	0.81	16	0.29
36		0.19	0.57	10	0.29
37		0.16	0.82	10	0.29
38		0.41	0.44	NT [§]	0.27
39		2.5	0.99	NT [§]	0.25
40		0.034	4.1	4.0	0.27

[†] Binding affinities (K_D) and residence time (h) were determined by surface plasmon resonance analysis.

[‡] PD-1/PD-L1 inhibitory activities were measured by blockade bioassay.

[§] Not tested.

[¶] Expressed in units of kcal/mol per HAC and calculated with $R = 0.001987 \text{ kcal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $T = 300 \text{ K}$.

細胞機能評価

化合物 **40** の細胞機能評価を実施した。結果を **Figure 25** に示す。化合物 **40** は抗 PD-1 抗体と同様にして濃度依存的に IFN- γ 産生量の増加を示した。この結果から、化合物 **40** が T 細胞においても抗 PD-1 抗体と同様にして、免疫寛容の解除による細胞機能回復作用を示すことが確認された。

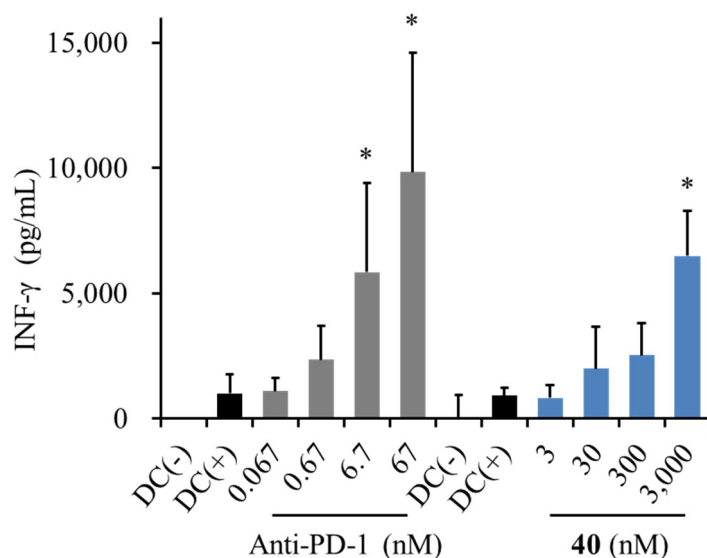


Figure 25. 抗 PD-1 抗体および化合物 40 の細胞機能評価結果 (MLR assay)

抗 PD-1 抗体および化合物 **40** の存在下もしくは非存在下で、CD4⁺ T 細胞と単球由来樹状細胞 (DCs) を 7 日間共培養した。培養上清中の IFN- γ 分泌量を、細胞活性化の指標として測定した。グラフは、n=6 で行った実験からの平均値 \pm SD を示す。* $P < 0.05$ Bartlett 検定後に DC(+)群との差について Steel 検定により求めた。

小括

本論では、Dimer 型構造を起点とした低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害薬の設計、合成および構造活性相関について述べてきた。

第 1 章では、既知の低分子リガンドと PD-L1 homodimer との複合体結晶構造の C_2 対称性に着目し、リガンドの対称化による結合強度の増強および細胞評価系での活性発現を指向した Dimer 型の化合物の設計、合成および評価結果について述べた。その結果、テンプレートとして用いた Monomer 型化合物の全体を C_2 対称化した Dimer 型化合物 **1** が、PD-L1 に対する結合親和性の大幅な向上と、細胞評価系における PD-1/PD-L1 阻害活性を示した。加えて、Monomer 型化合物の一部のみを対称化した化合物と、全体を対称化した **1** の評価結果の比較から、各部分構造の活性に対する寄与を明らかにした。化合物 **1** は細胞機能評価においても濃度依存的に IFN- γ の産生促進作用を示し、抗 PD-1 抗体と同程度の薬効 (efficacy) を示した。さらに Dimer 型化合物の作用様式は PD-L1 タンパク質の homodimer 化の誘導および安定化による PD-1/PD-L1 結合阻害であることが、**1** 存在下における PD-L1 のサイズ排除クロマトグラフィーの結果から示唆された。

第 2 章では、第 1 章での検討の結果見出した Dimer 型化合物からさらなる活性の向上を指向して、構造活性相関研究を行った結果について述べた。化合物 **1** の各部位に対して置換基の導入および変換を実施した結果、ジアルコキシフェニル環上への脂溶性置換基の導入、リンカー部位の (*E*)-アルケニル基への変換およびジアルコキシフェニル環内への窒素原子の導入により細胞評価系での阻害活性が向上する知見を得た。また PD-L1 に対して顕著に長い結合解離半減期を示す化合物を見出し、その理由について考察した。代表的な化合物は細胞機能評価においても濃度依存的な IFN- γ の産生促進作用を示し、複数の化合物が抗 PD-1 抗体と同等以上の efficacy を示した。化合物 **18** の存在下における PD-L1 のサイズ排除クロマトグラフィーの結果から、これらの化合物の作用様式は化合物 **1** と同様に PD-L1 タンパク質の homodimer 化の誘導および安定化によると示唆された。

第3章では、活性と吸収性を併せ持つ低分子阻害剤の開発を指向して、高活性かつ分子量が低減した骨格の取得の検討について述べた。第1章で得た構造活性相関情報を利用して Dimer 型化合物の部分構造削除による分子量の低減を計画し、活性発現に重要である末端のアミノ基とビフェニル構造とを様々な長さの直鎖でつないだ化合物の設計と合成を実施した。評価の結果、アミノ基とビフェニル構造との間に 4-6 原子を有する化合物はいずれも良好な結合親和性を示した。さらに末端をアミノ酸構造に変換した化合物 **40** は Dimer 型化合物と同程度の結合親和性および細胞評価系における PD-1/PD-L1 阻害活性を示し、細胞機能評価においても濃度依存的に IFN- γ の産生促進作用を示した。これらの直鎖型の化合物は、Dimer 型化合物と比較してリガンド効率 (LE) が向上しており、高活性と吸収性および溶解性を両立する薬剤分子探索のための有望な骨格であると考えられた。

結論

序論では、本研究に着手するに至った背景と本研究の目的について述べた。近年大きな進展が見られる免疫チェックポイント阻害によるがん免疫療法と、その中で特に注目される PD-1/PD-L1 経路について概説するとともに、抗体医療における課題を提起し、低分子治療薬開発の社会的意義について述べた。低分子 PD-1/PD-L1 阻害の先行研究を概説し、ビフェニル構造を有する低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害化合物を研究開始の起点として、「細胞評価系において阻害活性を示す化合物の取得」および「高活性かつ分子量が低減した骨格の取得」を研究目的と設定した。そのための方法論として、その阻害様式であるタンパク質-タンパク質相互作用の安定化の特徴と、タンパク質-タンパク質相互作用を安定化する低分子の先行研究について触れ、対称性に着目したリガンド設計を提起した。

本論では、対称性に着目したリガンド設計の方法論を適用した Dimer 型化合物の合成研究について、その設計、合成および評価結果を詳述した。その結果、Dimer 型化合物 **1** は起点としたビフェニル型化合物と比較して PD-L1 に対する結合親和性が大きく向上し、細胞評価系で活性を示したことを述べた。加えて、創出した Dimer 型化合物の構造活性相関研究を実施した結果、置換基の導入あるいは変換により活性が向上する知見を得るとともに、解離半減期が顕著に延長した化合物を取得した。さらに、活性と経口吸収性の両立を指向して高活性かつ分子量が低減した骨格の取得を検討した。そのための方策として、Dimer 型骨格の部分削除による新規構造の探索を実施した結果、リガンド効率が高く細胞評価系で活性を示す新規の直鎖型骨格を見出したことを述べた。

本研究の進展と時を同じくして、世界中の研究者が PD-1/PD-L1 経路を標的とした研究に取り組んでおり、新たな知見が報告されている。以下に最近の動向を記す。

抗 PD-1 抗体および抗 PD-L1 抗体は、2022 年現在 7 品目が FDA より承認を受けており、

様々な種類のがんに適応が拡大されている³⁸⁻⁴⁰。

また、低分子治療薬の開発や薬効評価、あるいは作用機序解析にも進展が見られる。低分子 PD-1/PD-L1 阻害薬の論文および学会報告は特に 2019 年以降多数⁹⁸ なされており、複数の低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤が報告された (**Figure 26**)⁹⁹⁻¹⁰⁸。2022 年現在、Incyte 社の INCB086550¹⁰⁹ (2022 年開発中止) や Gilead Sciences 社の GS-4224¹¹⁰ (2022 年開発中止)、あるいは Chemocentryx 社の CCX-559¹¹¹ 等複数の化合物が臨床開発段階に入った¹¹²ものの、現在までに承認された化合物は無い。

Chemocentryx 社の CCX-6569¹¹³、前出の INCB086550、GS-4224¹¹⁴ 等複数の化合物に関して、MC-38 マウス腫瘍モデルを用いた *in vivo* 評価結果が示され、抗体と同様に抗腫瘍効果が確認されている。

PD-L1 の homodimer 化を誘導し、安定化する化合物の作用機序の研究に関しての新たな知見として、対称型の化合物である ARB-272572 が、PD-L1 の homodimer 化を誘導し、内在化を経て細胞内で分解を受ける機構が報告された¹¹⁵。その他に偽対称型の低分子化合物である INCB086550、CCX-6569 等複数の化合物に関して同様の作用機序が実験的に確かめられ、報告されている¹¹⁶。

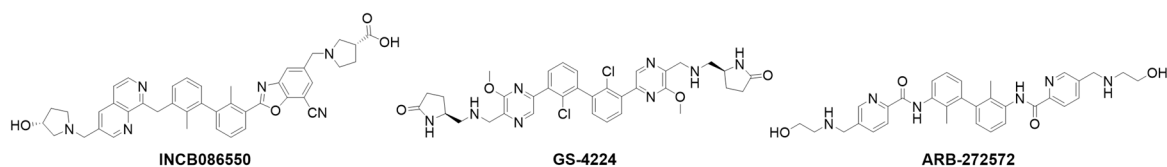


Figure 26. 低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害薬の例

また、PD-1/PD-L1 結合阻害剤とは異なる、PD-L1 の分解促進 (degrader) や発現抑制 (downregulator) 等のメカニズムを有する化合物も報告されている (Figure 27)。

Zhang らは SA-49 が非小細胞肺癌細胞において、リソソームで human PD-L1 の分解を促進することを示した¹¹⁷。その作用メカニズムは PKC α (protein kinase C α) の活性化と、それに次ぐ GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) の抑制により、転写因子 MITF (microphthalmia-associated transcription factor) の核内移行が促進され、リソソームの生合成を活性化する。その結果 PD-L1 の分解が誘起されるというものである。

また、近年注目を集めているユビキチン-プロテアソーム系での標的タンパク質分解を誘導する化合物 (PROTAC) を PD-L1 の分解に応用した例として、PD-L1 リガンドと Cereblon リガンドである Pomalidomide をリンカーで繋いだ化合物が Cheng らにより報告された¹¹⁸。代表化合物である P22 は T 細胞とがん細胞の共培養試験において IFN- γ の産生を促進し、さらに PD-L1 の蛋白質質量も減少させた。

異なる機能を有する化合物を組み合わせたアプローチも報告されている。Ofori らは BRCA1/2 遺伝子に変異を有する抗腫瘍治療薬であるポリ ADP-リボースポリメラーゼ (PARP) の阻害剤と PD-L1 リガンドである BMS-001 を組み合わせた PARP/PD-L1 ハイブリッド化合物を合成した。このハイブリッド化合物はがん細胞に対するアポトーシスや細胞毒性作用が個々の化合物に比べて増強しており、ハイブリッドによるシナジー効果を示した。さらに、PD-L1 の蛋白質質量の減少作用も示している¹¹⁹。

PD-L1 の発現抑制作用を示す化合物 (downregulator) も報告されている。Zhu らは、アセチル化ヒストンと結合しクロマチンの構造や遺伝子発現を制御する機能を有するタンパク質である BRD4 が、PD-L1 をコードする遺伝子である CD274 を直接標的とすることを明らかにした。さらに BRD4 阻害剤である JQ-1 が、マウス卵巣がんモデルにおいてがん細胞や腫瘍随伴マクロファージにおける PD-L1 の発現を顕著に低下させ、細胞障害性 T 細胞の活性を増強してがんの進行を抑制することを示した¹²⁰。

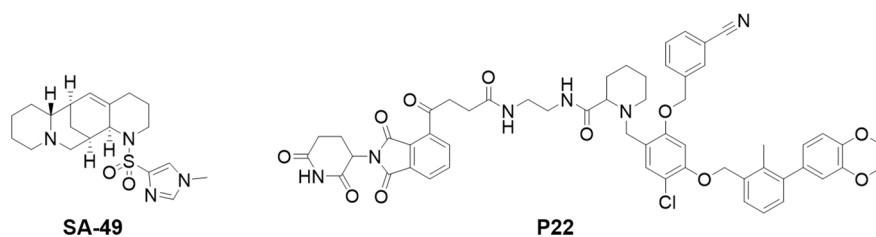


Figure 27. PD-L1 の分解を誘導する化合物の報告例

これらの PD-L1 の分解促進や発現抑制の報告はまだ前臨床での研究段階ではあるが、抗体あるいは低分子による PD-1/PD-L1 結合阻害とは異なるアプローチとして、その進展が注目される。

上記の通り、世界中の大学や研究機関あるいは製薬企業から、PD-1/PD-L1 経路を阻害する低分子化合物に関する研究が報告されている。低分子 PD-1/PD-L1 阻害薬の開発にも進展が見られるものの、現在までに承認された低分子治療薬は無い。また低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤の構造活性相関研究が複数報告されているが、その中で対称型あるいは偽対称型の骨格の構造活性相関に関する報告は数例^{89, 121-123}に留まり、その内容も限定的である。

本研究では、 C_2 対称な骨格を有する新規の活性な Dimer 型低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤を設計した。このリガンド設計は、リガンド-PD-L1 homodimer の三者複合体結晶構造の対称性への着目のみならず、その複合体構造から予測されるタンパク質残基のシフトの可能性の両方を考慮した点で独創的である。また、本研究でその有用性を示した対称性に基づくリガンド設計の方法論は、一般的に難度が高いとされるタンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) の広い結合界面を低分子化合物で阻害あるいは安定化する分子設計の有力な方法論の一つとなることが期待される。

また、Dimer 型骨格を有する低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤を起点として、PD-L1 に対する結合親和性と、細胞評価系における PD-1/PD-L1 結合阻害活性の向上に主眼を置いた探索的な構造活性相関を初めて明らかにした。本研究で得られた知見は、より強力な PD-1/PD-L1 結合阻害剤の設計への応用が期待される。

加えて、構造変換により結合-解離プロファイルが大きく変化する知見を取得すると共に、PD-L1 に対する解離半減期が非常に長く *in vivo* 評価において高い効果が期待される化合物を見出した。この結果は、構造-キネティクス相関 (SKR: structure-kinetics relationship) 研究における事例を提供するとともに、解離半減期が長い化合物を得るための化合物スクリーニングにおける SPR アッセイの有用性を示している。

また分子量が低減した骨格探索を検討した結果、末端アミノ基とビフェニル構造との間に直鎖状のリンカーを有する化合物を見出した。これらの化合物は Dimer 型の化合物と比較して高い LE を示すため、新たな構造最適化の起点として有望であり、高活性と吸収性および溶解性を併せ持つ低分子 PD-1/PD-L1 阻害薬の開発において有用であると考えられる。

本研究で設計および合成した代表的な化合物は、細胞機能評価 (MLR assay) において用量依存的に IFN- γ の産生を促進し、抗体と同等の薬効 (efficacy) を示した。これは、MLR アッセイで細胞機能を検証した低分子 PD-1/PD-L1 阻害剤の最初の例であり、低分子阻害剤の細胞における機能を検証し、低分子創薬の可能性を実証した点で学術的および産業的な意義があると考えられる。

本研究の中で見出した化合物は、細胞評価系における活性発現濃度が 10^{-8} M 程度である点や、化合物の分子量が大きい (MW > 700) 等、いくつかの側面で改善の余地がある。したがって、今後の研究では高い活性と経口投与可能な溶解性や吸収性等の諸物性を併せ持つ化合物を得るために、分子量が低減した骨格のさらなる探索と最適化に焦点を当てる必要がある。その方法としては、ジアルコキシル化フェニル環 (B 環) への脂溶性置換基の導入あるいはリンカー部分の (*E*)-アルケニル基への変換等の、Dimer 型化合物の構造活性相関で得られた情報の応用が有望である。

しかしながら、本研究の主眼は対称性に着目したりガンド設計の適用検討と探索的な構造活性相関研究による低分子 PD-1/PD-L1 結合阻害薬の開発に資する知見の提供および低分子化の方法論の検討にある。得られた知見の応用検討は本研究の範囲外であり、今後の研究

の進展に期待したい。

最後に、PD-1/PD-L1 の結合を阻害する低分子治療薬が一日も早く創出され、治療の選択肢が増えることを切に願う。

Experimental Section

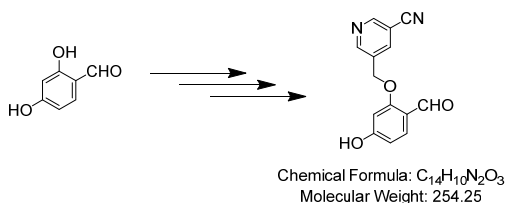
General Chemistry

Reagents were obtained from commercial suppliers and used without further purification unless otherwise noted. TLC was performed using silica-gel 60 F₂₅₄ plates purchased from Merck. Flash chromatography was performed with silica-gel 60N (spherical, neutral, 40–100 μm) purchased from KANTO CHEMICAL CO.,INC. or pre-packed columns of silica gel (25–50 μm) purchased from Biotage Japan Ltd., or Fuji-Silyria chemical Ltd., or YMC Co.Ltd. Reversed phase preparative chromatography was performed using pre-packed columns of ODS (25 μm) purchased from YMC Co.Ltd. or Biotage Japan Ltd. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCEIII 400, Varian MERCURYplus 400, or JEOL JNM-AL400 spectrometer. ¹³C NMR spectra was recorded on an Agilent DD2-500 spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm downfield to that of internal tetramethylsilane. High resolution mass spectrometry (HRMS) spectra were recorded on an LC/MS system composed of an Agilent 1290 Infinity LC and a Thermo Fisher LTQ-Orbitrap Velos. Analytical UPLC/MS analyses were performed on a Shimadzu LCMS-2020 system under the following conditions (Column: Phenomenex, 50 x 2.1 mm, KinetexC18, Particle Size 1.7 μm, Pore Size 100 Å; Column Temp.: 40°C; mobile phase A: 0.1% HCO₂H in water; mobile phase B; CH₃CN; gradient: 20%B to 100%B from 0 to 1.8 min, 100%B from 1.8 to 2.3 min, 20%B from 2.3 to 2.8 min; flow rate: 0.5 mL/min; detection wavelength: 220–360 nm; Ionization: ESI, positive/negative; MS detection range: *m/z* 100–700, 200–800, 300–1,200, or 700–1,300).

Synthetic procedures and analytical data of compounds

Synthesis of compound 1

5-((2-Formyl-5-hydroxyphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-2**)



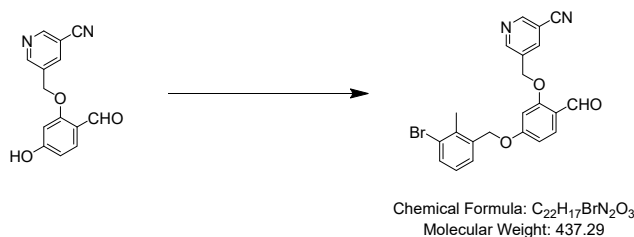
To a stirred mixture of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (**I-1**, 7.10 g, 51.4 mmol) and 3,4-dihydro-2*H*-pyran (5.64 mL, 61.7 mmol) in CHCl₃ (150 mL), PPTS (1.29 g, 5.14 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. Sat. NaHCO₃(aq) was added to the reaction mixture followed by extraction with CHCl₃. The organic phase was concentrated. The residue was purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane: AcOEt = 95:5 to 70:30) to give 2-hydroxy-4-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)benzaldehyde as a colorless oil (11.0 g, 45.1 mmol, 88% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 11.37 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 7.44 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.66 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.1 Hz), 6.63 (d, 1H, *J* =

2.1 Hz), 5.51 (t, 1H, $J = 3.2$ Hz), 3.86–3.80 (m, 1H), 3.66–3.61 (m, 1H), 2.04–1.94 (m, 1H), 1.89–1.85 (m, 2H), 1.76–1.57 (m, 3H).

To a stirred mixture of 2-hydroxy-4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzaldehyde (11.0 g, 45.1 mmol), 5-(chloromethyl)nicotinonitrile (7.23 g, 47.4 mmol) in DMF (110 mL), K_2CO_3 (7.49 g, 54.2 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt. The organic phase was washed twice with H_2O and concentrated. *n*-Hexane and AcOEt were added to the residue and the resulting suspension was stirred for 1 h at room temperature. Solid was collected by suction filtration on a Kiriya funnel, rinsed with *n*-hexane-AcOEt, and dried under reduced pressure to give 5-((2-formyl-5-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile as a pale brown solid (14.0 g, 41.4 mmol, 92% yield). UPLC/MS Retention time = 1.49 min; MS (ESI): m/z 339 $[M+H]^+$.

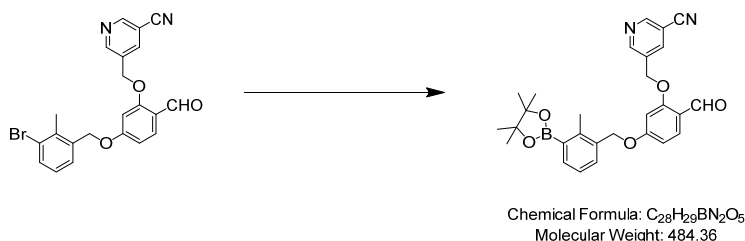
To a mixture of 5-((2-formyl-5-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (14.0 g, 41.4 mmol) in THF (160 mL), MeOH (80 mL), and H_2O (40 mL), PTSA (394 mg, 2.07 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 90 h. The reaction mixture was concentrated and water was added to the residue. The resulting suspension was filtered and washed with water. The obtained solid was dried under reduced pressure to give the titled compound as a pale brown solid (10.8 g, 42.5 mmol, 103% yield). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ : 10.73 (br s, 1H), 10.20 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.62 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.59 (s, 1H), 6.52 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 5.31 (s, 2H). UPLC/MS Retention time = 1.11 min; MS (ESI): m/z 255 $[M+H]^+$.

5-((5-((3-Bromo-2-methylbenzyl)oxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-4**)



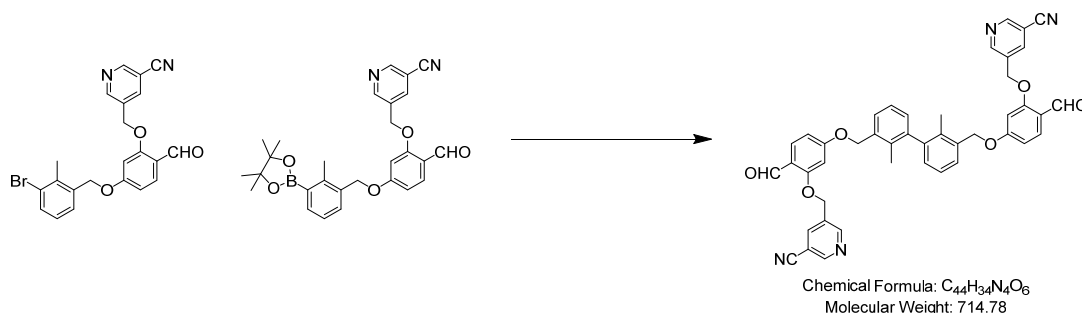
To a stirred mixture of intermediate **I-2** (2.00 g, 7.87 mmol) and 1-bromo-3-(chloromethyl)-2-methylbenzene (**I-3**, 2.04 g, 9.28 mmol) in DMF (20 mL), K_2CO_3 (2.17 g, 15.73 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 68 h. After consumption of starting material, water and *n*-hexane were added to the reaction mixture. The resulting suspension was filtered and washed with water and *n*-hexane. The obtained solid was dried under reduced pressure to give the titled compound as a pale brown solid (3.10 g, 7.09 mmol, 90% yield). 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 10.33 (s, 1H), 8.90 (t, 2H, $J = 2.2$ Hz), 8.09 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.90 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.60 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.33 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.10 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.73 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.2$ Hz), 6.56 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 5.21 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 2.45 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.78 min; MS (ESI): m/z 437, 439 $[M+H]^+$.

5-(((2-Formyl-5-(((2-methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-5**))



To a stirred mixture of intermediate **I-4** (120 mg, 0.274 mmol), bis(pinacolato)diboron (77 mg, 0.302 mmol), and potassium acetate (40.4 mg, 0.412 mmol) in dioxane (1.2 mL), PCy_3 (11.5 mg, 0.041 mmol) and $Pd_2(dba)_3$ (12.6 mg, 0.014 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 120°C for 2.5 h under a N_2 atmosphere. The reaction mixture was filtered through Celite[®], then the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 75:25 to 40:40) to give the titled compound as a pale brown solid (128 mg, 0.253 mmol, 92% yield). 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 10.32 (s, 1H), 8.90 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.89 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.09 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.88 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.79 (dd, 1H, $J = 7.5, 1.5$ Hz), 7.43 (dd, 1H, $J = 7.5, 1.5$ Hz), 7.22 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.73 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.1$ Hz), 6.55 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 5.20 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 2.57 (s, 3H), 1.36 (s, 12H). UPLC/MS Retention time = 1.93 min; MS (ESI): m/z 485 $[M+H]^+$.

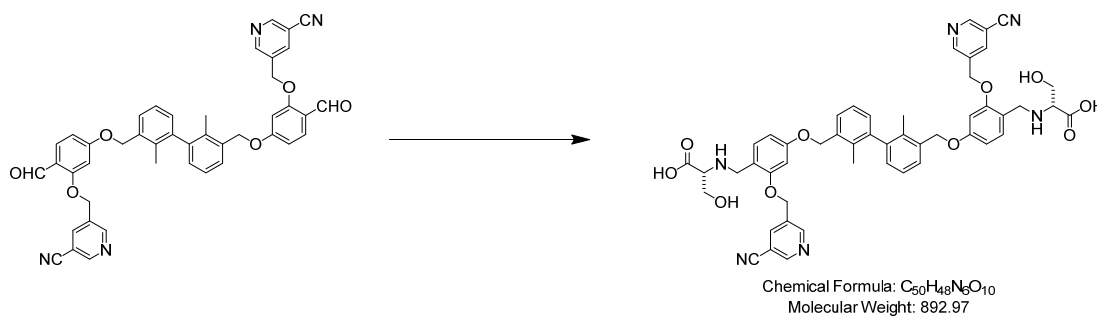
5,5'-((((2,2'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(6-formyl-3,1-phenylene))bis(oxy))bis(methylene))dinicotinonitrile (**I-6**)



To a 10 mL round-bottomed flask, intermediate **I-4** (35 mg, 0.079 mmol), **I-5** (40 mg, 0.079 mmol), K_3PO_4 (34 mg, 0.158 mmol), SPhos Pd G1 (3.0 mg, 3.96 μ mol), and DMF (767 μ L) were added and the reaction mixture was stirred at 80°C for 2.5 h under a N_2 atmosphere. The reaction mixture was directly loaded onto a reversed phase preparative chromatography column (CH_3CN :0.1% $HCO_2H(aq)$ = 30:70 to 100:0) and purified. Fractions containing target compound were concentrated under reduced pressure to give the titled compound as a pale brown solid (14 mg, 0.017 mmol, 22% yield). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ : 10.27 (s, 2H), 9.02 (d, 4H, $J = 3.9$ Hz), 8.52 (s, 2H), 7.74 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.50 (d,

2H, $J = 7.8$ Hz), 7.31 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.13 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz), 6.99 (s, 2H), 6.87 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 5.40 (s, 4H), 5.30 (s, 4H), 2.02 (s, 6H). UPLC/MS Retention time = 2.08 min; MS (ESI): m/z 715 $[M+H]^+$.

(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((((2,2'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediyl))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**1**)

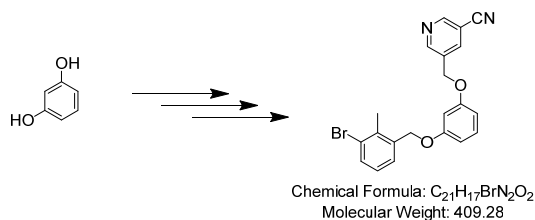


To a solution of intermediate **I-6** (14 mg, 0.017 mmol) in DMF (560 μ L), D-Serine (10.9 mg, 0.104 mmol) and AcOH (5.96 μ L, 0.104 mmol) were added at room temperature, and the mixture was stirred for 5 min. $NaBH(OAc)_3$ (22.1 mg, 0.104 mmol) was added to the reaction mixture and stirred overnight at room temperature. UPLC/MS analysis showed consumption of the starting material. The reaction mixture was directly loaded onto a reversed phase preparative chromatography column ($CH_3CN:0.1\%$ $HCO_2H(aq) = 20:80$ to $70:30$) and purified. Fractions containing target compound were concentrated under reduced pressure to give the titled compound as a white solid (6.2 mg, 6.94 μ mol, 40% yield). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ : 9.01 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz), 8.99 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz), 8.50 (br s, 2H), 7.45 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.33 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.27 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.08 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 6.86 (d, 2H, $J = 1.8$ Hz), 6.72 (dd, 2H, $J = 8.4, 1.8$ Hz), 5.29 (d, 2H, $J = 12.8$ Hz), 5.25 (d, 2H, $J = 12.8$ Hz), 5.17 (d, 2H, $J = 12.8$ Hz), 5.14 (d, 2H, $J = 12.8$ Hz), 4.08 (d, 2H, $J = 13.2$ Hz), 4.02 (d, 2H, $J = 13.2$ Hz), 3.72 (dd, 2H, $J = 11.2, 4.4$ Hz), 3.61 (dd, 2H, $J = 11.2, 6.8$ Hz), 3.15 (dd, 2H, $J = 6.8, 4.4$ Hz), 1.99 (s, 6H) (protons of NH, OH, and CO_2H groups are not displayed). ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$) δ : 168.42, 160.05, 157.10, 152.35, 151.75, 141.63, 138.90, 135.01, 134.36, 132.89, 132.03, 129.15, 127.85, 125.40, 116.75, 114.68, 108.92, 106.32, 100.50, 68.56, 66.42, 62.06, 60.23, 45.04, 15.24. UPLC/MS Retention time = 1.24 min. HRMS (ESI): m/z calcd. for $C_{50}H_{49}N_6O_{10}$, $[M+H]^+$ 893.3505, found, 893.3505 $[M+H]^+$.

Compound **2** was synthesized according to the method described in the patent⁵³.

Synthesis of compound **3**

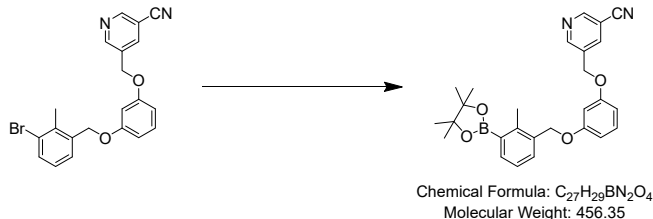
5-((3-((3-Bromo-2-methylbenzyl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-8**)



Sodium hydride (49 mg, 2.05 mmol, 60% suspension in mineral oil) was added to a solution of resorcinol (**I-7**, 226 mg, 2.05 mmol) in DMF (3.0 mL) at room temperature and the resulting mixture was stirred for 10 min. 1-Bromo-3-(chloromethyl)-2-methylbenzene (**I-3**, 300 mg, 1.367 mmol) was then added to the reaction mixture and stirred for 18 h at room temperature. After the completion of the reaction, water was added to the reaction mixture, then it was extracted with AcOEt. The organic phase was washed twice with water, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 90:10 to 40:60) to give 3-((3-bromo-2-methylbenzyl)oxy)phenol (200 mg, 0.621 mmol, 45% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.55 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.35 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.15 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.07 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.56 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 2.2, 0.7 Hz), 6.49–6.44 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.81 (br s, 1H), 2.43 (s, 3H).

To a solution of 3-((3-bromo-2-methylbenzyl)oxy)phenol (200 mg, 0.621 mmol) in DMF (2.0 mL), 5-(chloromethyl)nicotinonitrile (99 mg, 0.652 mmol) and K₂CO₃ (103 mg, 0.745 mmol) were successively added at room temperature. Then, the reaction mixture was stirred for 20 h. After the completion of the reaction, water was added to the reaction mixture, then it was extracted with AcOEt. The organic phase was concentrated and purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 30:70) to give the titled compound (200 mg, 0.489 mmol, 79% yield). UPLC/MS Retention time = 1.91 min; MS (ESI): *m/z* 409 [M+H]⁺.

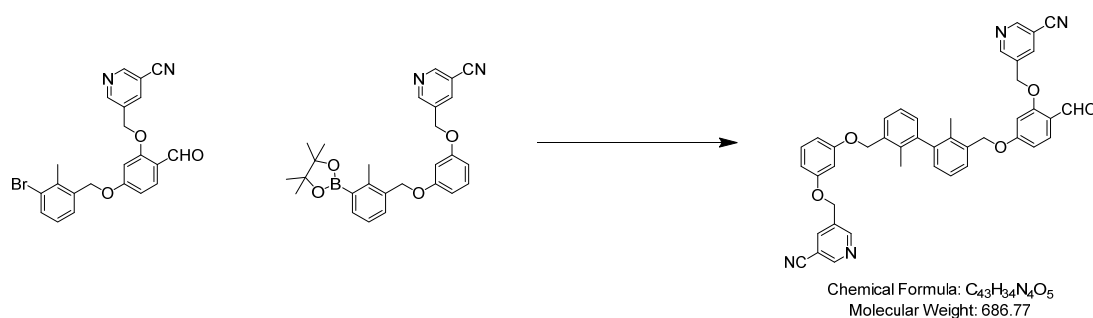
5-((3-((2-Methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-9**)



To a 2.0–5.0 mL microwave vial, intermediate **I-8** (200 mg, 0.489 mmol), bis(pinacolato)diboron (136 mg, 0.538 mmol), Pd₂(dba)₃ (22.4 mg, 0.024 mmol), PCy₃ (20.6 mg, 0.073 mmol), potassium acetate (72 mg, 0.733 mmol), and 1,4-dioxane (4.0 mL) were added. Then, the mixture was purged with Ar gas for 30 sec. The reaction mixture was stirred under microwave irradiation for 4 h (Biatage Initiator⁺, 120°C). The reaction mixture was filtered through Celite[®], and evaporated. Purification by silica-gel

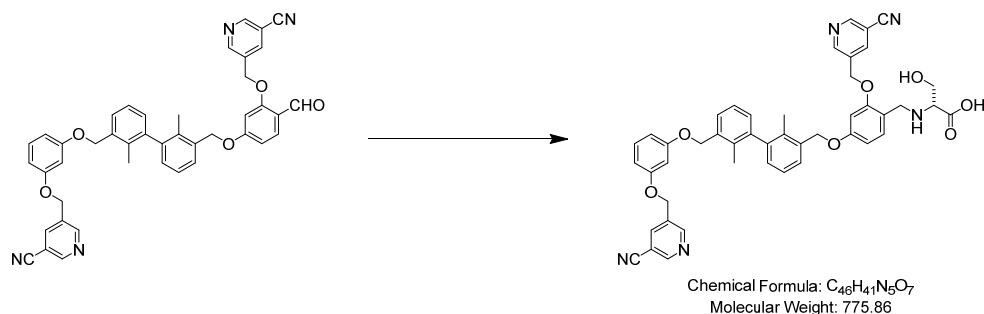
chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 45:55) gave the titled compound (205 mg, 0.377 mmol, 77% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.86 (dd, 1H, *J* = 2.0, 3.9 Hz), 8.08 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.76 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.47 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 7.25-7.19 (m, 2H), 6.67 (dd, 1H, *J* = 2.2, 8.3 Hz), 6.61 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.59 (dd, 2H, *J* = 2.2, 8.3 Hz), 5.11 (s, 2H), 5.04 (s, 2H), 2.56 (s, 3H), 1.36 (s, 12H). UPLC/MS Retention time = 2.02 min; MS (ESI): *m/z* 457 [M+H]⁺.

5-((3'-((3'-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-10**)



To a 2.0–5.0 mL microwave vial, intermediate **I-4** (50 mg, 0.114 mmol), **I-9** (68 mg, 0.126 mmol), Pd(PPh₃)₄ (13 mg, 0.011 mmol), Na₂CO₃ (36 mg, 0.343 mmol), and H₂O (0.4 mL) were added to CPME (4.0 mL). Then, the mixture was purged with Ar gas for 30 sec. The reaction mixture was stirred for 2 h under microwave irradiation (Biatage Initiator+, 100°C). Water was added to the reaction mixture and the phases were separated. The organic phase was filtered through Celite[®], and evaporated. Purification by reversed phase chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 10:90 to 100:0) gave the titled compound (45 mg, 0.066 mmol, 57% yield). UPLC/MS Retention time = 2.00 min; MS (ESI): *m/z* 687 [M+H]⁺.

(2-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-((3'-((3'-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**3**)

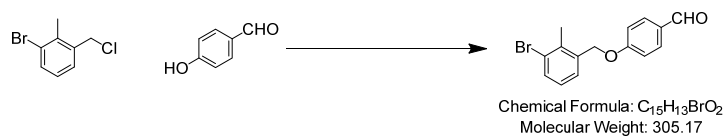


Intermediate **I-10** (45 mg, 0.066 mmol), D-Serine (21 mg, 0.197 mmol), AcOH (4.13 μL, 0.072 mmol), and NaBH(OAc)₃ (42 mg, 0.197 mmol) were added to DMSO (0.8 mL) and the resulting solution was stirred at room temperature for 50 h. UPLC/MS analysis showed consumption of the starting material.

The reaction mixture was directly loaded onto reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) and purified. Fractions containing the target compound were concentrated under reduced pressure. Water was added to the residue, and the resulting precipitate was collected by filtration. The solid obtained was dried under reduced pressure to give the titled compound as a white solid (42 mg, 0.055 mmol, 83% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 9.00 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.95 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.53 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.41 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.48-7.46 (m, 2H), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.30-7.22 (m, 3H), 7.11-7.08 (m, 2H), 6.87 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz), 6.78 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.74 (dd, 1H, *J* = 2.0, 8.3 Hz), 6.70 (dd, 1H, *J* = 2.4, 8.3 Hz), 6.67 (dd, 1H, *J* = 2.9, 8.6 Hz), 5.31 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.26 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.21 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.10 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz), 4.03 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz), 3.73 (dd, 1H, *J* = 4.6, 11.5 Hz), 3.62 (dd, 1H, *J* = 6.8, 11.5 Hz), 3.15 (br s, 1H), 2.00 (s, 6H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.67 min; MS (ESI): *m/z* 776 [M+H]⁺.

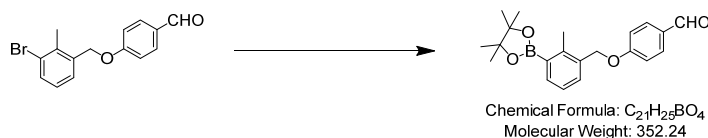
Synthesis of compound 4

4-((3-Bromo-2-methylbenzyl)oxy)benzaldehyde (**I-13**)



To a stirred mixture of 1-bromo-3-(chloromethyl)-2-methylbenzene (**I-3**, 100 mg, 0.456 mmol) and 4-hydroxy benzaldehyde (**I-11**, 67 mg, 0.547 mmol) in DMF (1 mL), K₂CO₃ (126 mg, 0.911 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 22 h. UPLC/MS analysis showed consumption of the starting material. The reaction mixture was directly loaded onto a silica-gel chromatography column and purified (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 45:55) to give the titled compound as a white solid. (140 mg, 0.459 mmol, 100% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.91 (1H, s), 7.88-7.85 (2H, m), 7.58 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.11-7.07 (3H, m), 5.14 (2H, s), 2.45 (3H, s). UPLC/MS Retention time = 1.80 min; MS (ESI): *m/z* 305, 307 [M+H]⁺.

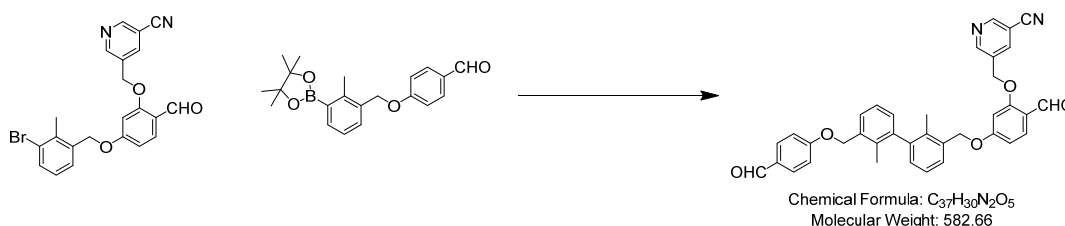
4-((2-Methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)benzaldehyde(**I-14**)



4-((3-Bromo-2-methylbenzyl)oxy)benzaldehyde (**I-13**, 140 mg, 0.459 mmol), bis(pinacolato)diboron (128 mg, 0.505 mmol), Pd₂(dba)₃ (21 mg, 0.023 mmol), PCy₃ (19 mg, 0.069 mmol), and potassium acetate (68 mg, 0.688 mmol) were added to 1,4-dioxane (3 mL). Then, the mixture was purged with Ar gas for 30 sec. The reaction mixture was stirred for 3 h under microwave irradiation (Biatage

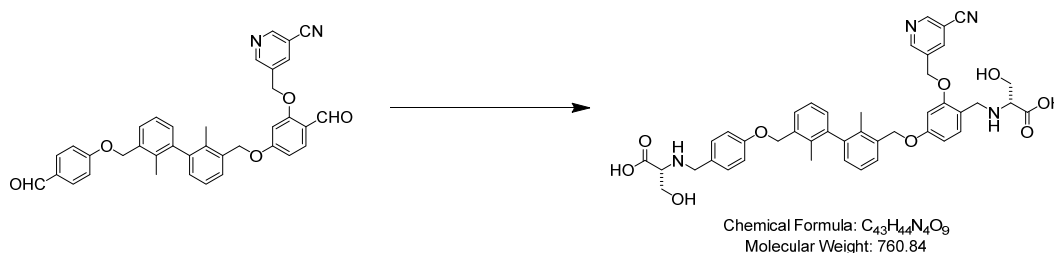
Initiator+, 120°C). The reaction mixture was filtered through Celite[®], and evaporated. Purification by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 45:55) gave a crude product of the titled compound which was used without further purification (180 mg). UPLC/MS Retention time = 1.96 min; MS (ESI): *m/z* 353 [M+H]⁺.

5-((2-Formyl-5-((3'-((4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-15**)



5-((5-((3-Bromo-2-methylbenzyl)oxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-4**, 50 mg, 0.114 mmol), 4-((2-methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)benzaldehyde (**I-14**, 44 mg, 0.126 mmol), Pd(Ph₃)₄ (13 mg, 0.011 mmol), Na₂CO₃ (36 mg, 0.343 mmol), and H₂O (0.4 mL) were added to CPME (4 mL). Then, the mixture was purged with Ar gas for 30 sec. The reaction mixture was stirred for 8 h under microwave irradiation (Biatage Initiator+, 100°C). Water was added to the reaction mixture and the phases were separated. The organic phase was filtered through Celite[®], and evaporated. Purification by reversed phase chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 5:95 to 100:0) gave the titled compound (45 mg, 0.077 mmol, 68% yield). UPLC/MS Retention time = 1.95 min; MS (ESI): *m/z* 583 [M+H]⁺.

4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**4**)

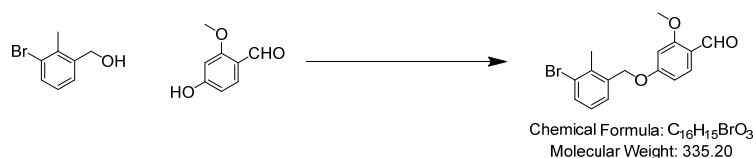


To a solution of 5-((2-formyl-5-((3'-((4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-15**, 45mg, 0.077 mmol) in DMSO (0.5 mL), D-Serine (49 mg, 0.463 mmol) and AcOH (9.73 μL) were added at room temperature, and the mixture was stirred for 5 min. NaBH(OAc)₃ (98 mg, 0.463 mmol) was added to the reaction mixture and stirred 22 h at room temperature. The reaction mixture was directly loaded onto a reversed phase preparative chromatography column (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) and purified. Fractions

containing target compound were concentrated under reduced pressure to give the titled compound as a white solid (14 mg, 0.018 mmol, 24% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 9.00 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 8.53 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.46 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.38 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.28 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.11-7.07 (m, 2H), 7.06 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.73 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.1 Hz), 5.31 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.26 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.19-5.13 (m, 4H), 4.09 (d, 1H, *J* = 13.4 Hz), 4.02 (d, 1H, *J* = 13.4 Hz), 3.97 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 3.93 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 3.74-3.60 (m, 4H), 3.15-3.09 (m, 2H), 1.99 (s, 6H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.18 min; MS (ESI): *m/z* 761 [M+H]⁺.

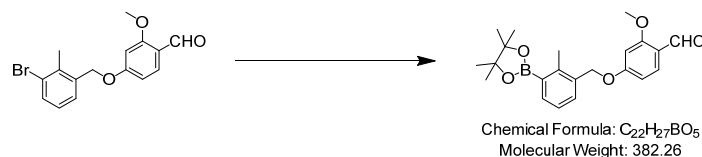
Synthesis of compound 5

4-((3-Bromo-2-methylbenzyl)oxy)-2-methoxybenzaldehyde (**I-18**)



(3-Bromo-2-methylphenyl)methanol (**I-17**, 450 mg, 2.238 mmol), 4-hydroxy-2-methoxybenzaldehyde (**I-16**, 409 mg, 2.69 mmol), and PPh₃ (881 mg, 3.36 mmol) were added to THF (6.0 mL). DIAD (0.653 mL, 3.36 mmol) was added dropwise to the reaction mixture, and stirred at room temperature for 23 h. Sat. NH₄Cl (aq.) was added to the reaction mixture, and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with water and concentrated under reduced pressure. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 65:35) followed by crystallization from *n*-hexane-AcOEt (2:1, 9 mL) gave the titled compound (270 mg, 0.805 mmol, 36% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.31 (d, 1H, *J* = 0.5 Hz), 7.83 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.59 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.34 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.09 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.62 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 6.53 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 5.12 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.46 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.99 min; MS (ESI): *m/z* 335, 337 [M+H]⁺.

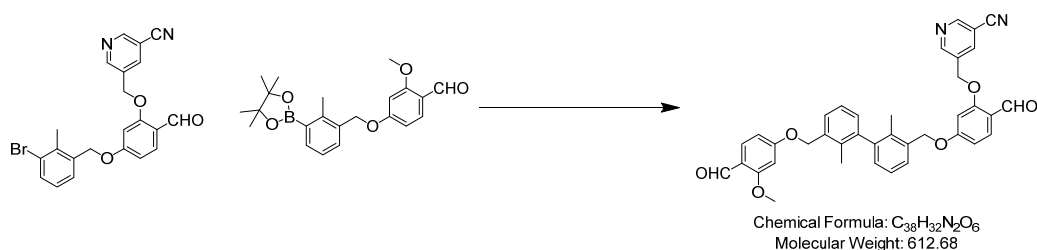
2-Methoxy-4-((2-methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)benzaldehyde (**I-19**)



In a 2.0–5.0 mL microwave vial, 4-((3-bromo-2-methylbenzyl)oxy)-2-methoxybenzaldehyde (**I-18**, 270 mg, 0.805 mmol), bis(pinacolato)diboron (225 mg, 0.886 mmol), Pd₂(dba)₃ (37 mg, 0.040 mmol), PCy₃ (34 mg, 0.121 mmol), potassium acetate (119 mg, 1.208 mmol), and 1,4-dioxane (4.0 mL) were

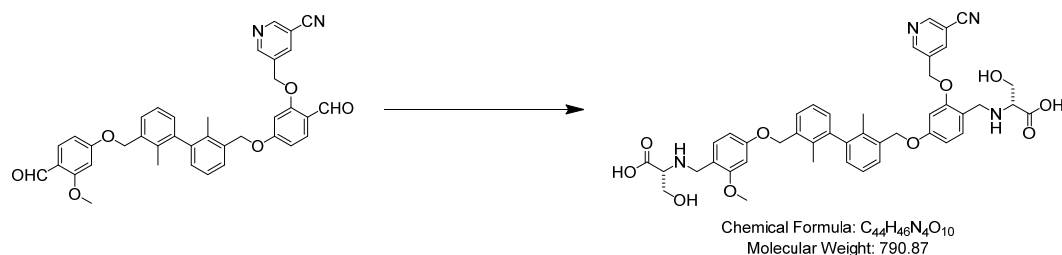
added and the reaction vessel was placed under an Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 4 h under microwave irradiation (Biatage Initiator+, 120°C). After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered through Celite[®]. Then, the filtrate was concentrated under reduced pressure. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 90:10 to 65:35) gave the titled compound (240 mg, 0.628 mmol, 78% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.30 (s, 1H), 7.82 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.78 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.2 Hz), 7.45 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.22 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.63 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 6.53 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 5.12 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 1.36 (s, 12H). UPLC/MS Retention time = 1.98 min; MS (ESI): *m/z* 383 [M+H]⁺.

5-((2-Formyl-5-((3'-((4-formyl-3-methoxyphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-20**)



In a 2.0–5.0 mL microwave vial, 2-methoxy-4-((2-methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)benzaldehyde (**I-19**, 48 mg, 0.126 mmol), 5-((5-((3-bromo-2-methylbenzyl)oxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-4**, 50 mg, 0.114 mmol), Na₂CO₃ (36 mg, 0.343 mmol), CPME (3.0 mL), H₂O (0.3 mL), and Pd(Ph₃)₄ (13.2 mg, 0.011 mmol) were added and the reaction vessel was placed under an Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 12 h under microwave irradiation (Biatage Initiator+, 100°C). After cooling to room temperature, water was added to the reaction mixture and organic phase was filtered through Celite[®]. Then, filtrate was concentrated under reduced pressure. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 70:30 to 0:100) gave a titled compound (70 mg, 0.114 mmol, 100% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.10 (br s, 1H), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.84 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.70–7.65 (m, 1H), 7.49–7.41 (m, 3H), 7.30 (t, 2H, *J* = 8.1 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.2 Hz), 6.67 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.2 Hz), 6.61 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.57 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 5.23 (s, 2H), 5.17 (s, 4H), 3.91 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.96 min; MS (ESI): *m/z* 613 [M+H]⁺.

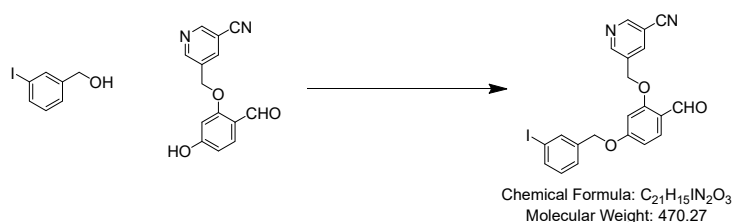
4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-methoxybenzyl)-D-Serine (**5**)



5-((2-Formyl-5-((3'-((4-formyl-3-methoxyphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-20**, 40 mg, 0.065 mmol), D-Serine (41 mg, 0.392 mmol), AcOH (8.22 μ L, 0.144 mmol), and NaBH(OAc)₃ (83 mg, 0.392 mmol) were added to DMSO (0.5 mL) and the resulting solution was stirred at room temperature for 20 h. UPLC/MS analysis showed consumption of the starting material. The reaction mixture was directly loaded onto reversed phase preparative chromatography column (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 10:90 to 55:45) and purified. Fractions containing the target compound were concentrated under reduced pressure. Water was added to the residue, and the resulting precipitate was collected by filtration. The solid obtained was dried under reduced pressure to give the titled compound as a white solid (33 mg, 0.042 mmol, 64% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 9.01 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.99 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.51 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.46 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.29-7.25 (m, 3H), 7.08 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 6.85 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.73–6.70 (m, 2H), 6.66 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.1 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.24 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.15 (s, 4H), 4.08 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 4.00 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz), 4.00 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 3.96 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz), 3.80 (s, 3H), 3.74-3.69 (m, 2H), 3.60 (dd, 2H, *J* = 11.1, 6.9 Hz), 3.14-3.10 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.20 min; MS (ESI): *m/z* 791 [M+H]⁺.

Synthesis of compound 6

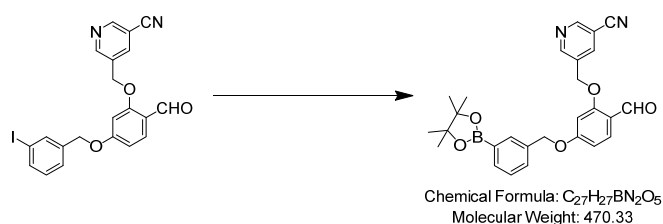
5-((2-Formyl-5-((3-iodobenzyl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-22**)



To an ice-cooled mixture of 5-((2-formyl-5-hydroxyphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-2**, 1.00 g, 3.93 mmol), 3-iodobenzyl alcohol (**I-21**, 0.999 mL, 7.87 mmol), and PPh₃ (1.55 g, 5.90 mmol) in THF (30 mL) under a N₂ atmosphere, DIAD (1.15 mL, 5.90 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 22 h. The reaction mixture was concentrated and purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 35:65). Fractions containing the target compound were concentrated under reduced pressure. *n*-Hexane-AcOEt (4:1) was added to the residue,

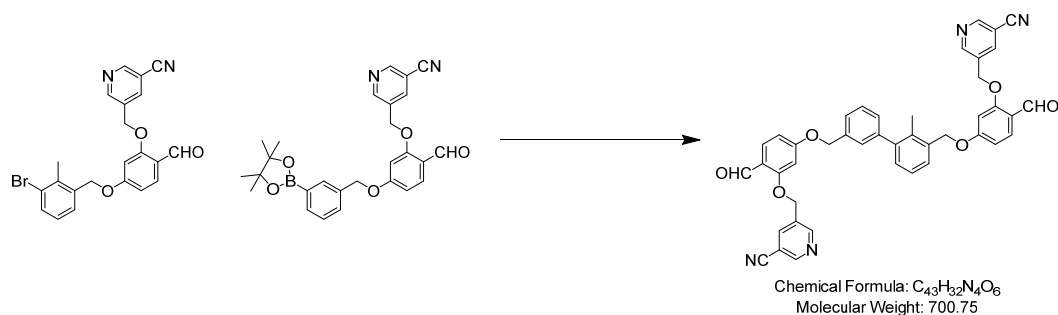
and the resulting precipitate was collected by filtration. The solid obtained was dried under reduced pressure to give the titled compound as a white solid (863 mg, 1.835 mmol, 47% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.33 (d, 1H, *J* = 0.5 Hz), 8.91 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.90 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.09 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.88 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.79 (br s, 1H), 7.71 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.37 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.15 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.69 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.2 Hz), 6.57 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 5.22 (s, 2H), 5.08 (s, 2H). UPLC/MS Retention time = 1.75 min; MS (ESI): *m/z* 471 [M+H]⁺.

5-((2-Formyl-5-((3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-23**)



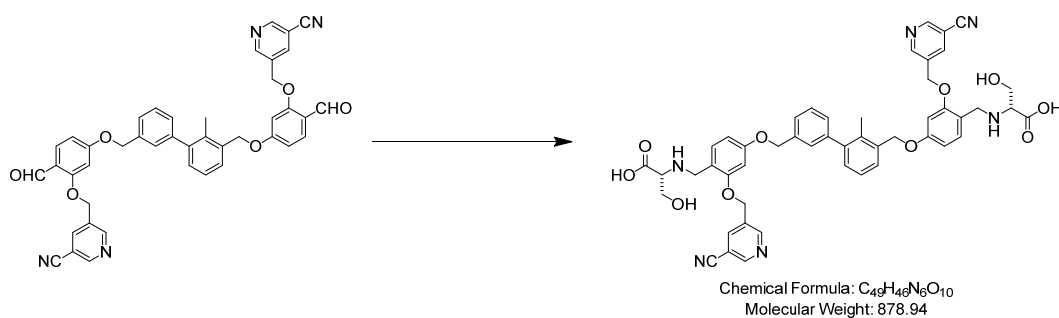
In a 2.0–5.0 mL microwave vial, 5-((2-formyl-5-((3-iodobenzyl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-22**, 400 mg, 0.851 mmol), bis(pinacolato)diboron (238 mg, 0.936 mmol), Pd₂(dba)₃ (39 mg, 0.043 mmol), PCy₃ (36 mg, 0.128 mmol), potassium acetate (125 mg, 1.276 mmol), and 1,4-dioxane (4.0 mL) were added and the reaction vessel was placed under an Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 4 h under microwave irradiation (Biatage Initiator+, 120°C). After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered through Celite[®]. Then, the filtrate was concentrated under reduced pressure. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 90:10 to 60:40) gave the titled compound (400 mg, 0.680 mmol, 80% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.32 (s, 1H), 8.90 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.89 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.10–8.08 (m, 1H), 7.89–7.79 (m, 3H), 7.53–7.48 (m, 1H), 7.44–7.36 (m, 1H), 6.72 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 6.56 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 5.20 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 1.25–1.23 (m, 12H). UPLC/MS Retention time = 2.00 min; MS (ESI): *m/z* 471 [M+H]⁺.

5,5'-((((2-Methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(6-formyl-3,1-phenylene))bis(oxy))bis(methylene))dinicotinonitrile (**I-24**)



In a 2.0–5.0 mL microwave vial, 5-((5-((3-bromo-2-methylbenzyl)oxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-4**, 50 mg, 0.114 mmol), 5-((2-formyl-5-((3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**I-23**, 74 mg, 0.126 mmol), Pd(Ph₃)₄ (13 mg, 0.011 mmol), Na₂CO₃ (36 mg, 0.343 mmol), H₂O (0.4 mL), and CPME (4.0 mL) were added and the reaction vessel was placed under an Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 8 h under microwave irradiation (Biatage Initiator+, 100°C). After cooling to room temperature, water was added to the reaction mixture, and the mixture was filtered through Celite[®]. The filtrate was concentrated under reduced pressure. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 75:25 to 0:100) gave the titled compound (83 mg, 0.071 mmol, 62% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.33–10.32 (m, 2H), 8.90–8.87 (m, 4H), 8.10–8.06 (m, 2H), 7.92–7.84 (m, 2H), 7.70–7.37 (m, 13H), 5.23–5.17 (m, 8H), 1.94 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.88 min; MS (ESI): *m/z* 701 [M+H]⁺.

(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((2-Methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediyl))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**6**)



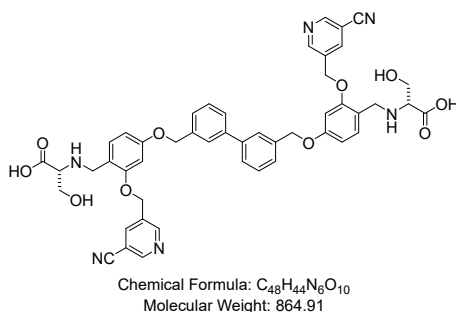
To a solution of 5,5'-((((2-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(6-formyl-3,1-phenylene))bis(oxy))bis(methylene))dinicotinonitrile (**I-24**, 83 mg, 0.071 mmol) in DMSO (0.7 mL), D-Serine (45 mg, 0.426 mmol) and AcOH (8.95 μL, 0.156 mmol) were added at room temperature, and the mixture was stirred for 5 min. NaBH(OAc)₃ (90 mg, 0.426 mmol) was added to the reaction mixture and stirred 86 h at room temperature. UPLC/MS analysis showed consumption of the starting material. The reaction mixture was directly loaded onto a reversed phase preparative chromatography column (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 10:90 to 60:40) and purified. Fractions containing the target compound were concentrated under reduced pressure. Water was added to the residue, and the resulting precipitate was collected by filtration. The solid obtained was dried under reduced pressure to give the titled compound as a white solid (30 mg, 0.034 mmol, 48% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.01–8.97 (m, 4H), 8.52–8.47 (m, 2H), 7.50–7.42 (m, 4H), 7.35–7.25 (m, 4H), 7.19 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.82 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 6.71 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.1 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.1 Hz), 5.31–5.14 (m, 8H), 4.11–3.97 (m, 4H), 3.73–3.69 (m, 2H), 3.63–3.57 (m, 2H), 3.15–3.11 (m, 2H), 2.11 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed).

UPLC/MS Retention time = 1.22 min; MS (ESI): m/z 879 $[M+H]^+$.

Synthesis of compound 7

Intermediate **II-2a** was synthesized from intermediate **I-2** and [1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl dimethanol (**II-1a**, CAS RN[®] 66888-79-7) in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-2k**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 95:5 to 0:100) (7% yield). UPLC/MS Retention time = 1.83 min; MS (ESI): m/z 687 $[M+H]^+$.

(4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**7**)



Synthesized from **II-2a** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (19%). ¹H NMR δ : 8.87 (s, 2H), 8.81 (s, 2H), 8.30 (s, 2H), 7.60 (s, 2H), 7.53 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.44-7.36 (m, 4H), 7.31 (dd, 2H, $J = 8.3, 1.8$ Hz), 6.80 (s, 2H), 6.70 (dd, 2H, $J = 8.3, 1.8$ Hz), 5.24 (s, 4H), 5.18 (s, 4H), 4.30 (d, 2H, $J = 12.3$ Hz), 4.23 (dd, 2H, $J = 12.3, 3.0$ Hz), 3.96-3.92 (m, 2H), 3.88-3.82 (m, 2H), 3.70-3.61 (m, 2H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.28 min; MS (ESI): m/z 865 $[M+H]^+$.

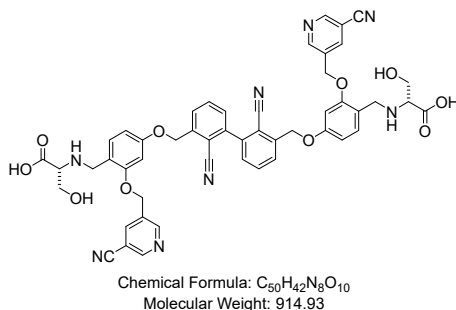
Synthesis of compound 8

Intermediate **II-4d** was synthesized from intermediate **I-2** and 2-(bromomethyl)-6-chlorobenzonitrile (**II-3d**, CAS RN[®] 863676-23-7) in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-4**. (93% yield).

Intermediate **II-5d** was synthesized from **II-4d** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-5**, which was used without purification.

Intermediate **II-2d** was synthesized from intermediate **I-4d** and **II-5d** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-6**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 30:70 to 80:20) (5% yield). UPLC/MS Retention time = 1.71 min; MS (ESI): m/z 737 $[M+H]^+$.

(4-((3'-((4-(((R)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dicyano-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-(2-(5-cyanopyridin-3-yl)ethyl)benzyl)-D-Serine (**8**)



Synthesized from **II-2d** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (21%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03-8.99 (br m, 4H), 8.52-8.43 (m, 2H), 7.94-7.87 (m, 3H), 7.75-7.68 (m, 2H), 7.52-7.35 (m, 3H), 6.89 (br s, 2H), 6.78-6.71 (m, 2H), 5.36-5.24 (m, 8H), 4.08 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 4.02 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 3.74-3.70 (m, 2H), 3.64-3.59 (m, 2H), 3.16-3.13 (m, 2H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.13 min; MS (ESI): *m/z* 915 [M+H]⁺.

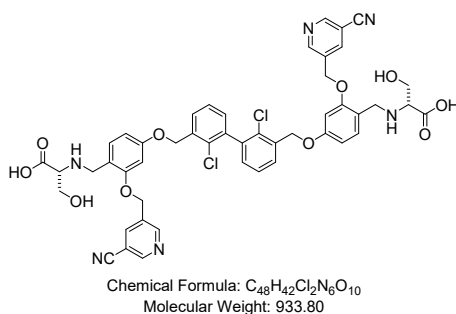
Synthesis of compound **9**

Intermediate **II-4e** was synthesized from **II-3e** and **I-2** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-18**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 75:25 to 30:70) (18% yield). UPLC/MS Retention time = 1.79 min; MS (ESI): *m/z* 457, 459 [M+H]⁺.

Intermediate **II-5e** was synthesized from **II-4e** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-5**, which was used without purification. UPLC/MS Retention time = 1.91 min; MS (ESI): *m/z* 505 [M+H]⁺.

Intermediate **II-2e** was synthesized from intermediate **II-4e** and **II-5e** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-6**. The product was purified by recrystallization from DMSO-AcOEt (77% yield). UPLC/MS Retention time = 1.91 min; MS (ESI): *m/z* 756 [M+H]⁺.

(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((2,2'-Dichloro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediy))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**9**)

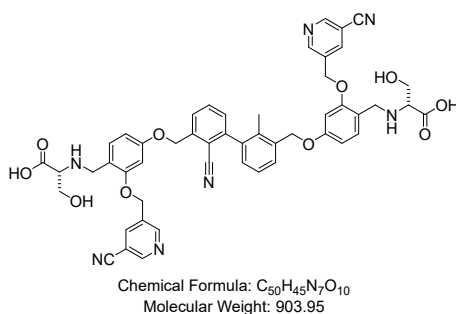


Synthesized from **II-2e** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (38%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03 (s, 2H), 9.01 (s, 2H), 8.53 (s, 2H), 7.69 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.50 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.38 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.36 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.88 (s, 2H), 6.73 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 5.32 (d, 2H, *J* = 12.9 Hz), 5.27 (d, 2H, *J* = 12.9 Hz), 5.25 (s, 4H), 4.10 (d, 2H, *J* = 13.2 Hz), 4.03 (d, 2H, *J* = 13.2 Hz), 3.74 (dd, 2H, *J* = 11.2, 4.2 Hz), 3.62 (dd, 2H, *J* = 11.2, 6.9 Hz), 3.16 (dd, 2H, *J* = 4.2, 6.9 Hz) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.25 min; MS (ESI): *m/z* 933, 935 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **10**

Intermediate **II-2f** was synthesized from intermediate **I-5** and **II-4d** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-6**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) (24% yield). UPLC/MS Retention time = 1.80 min; MS (ESI): *m/z* 726 [M+H]⁺.

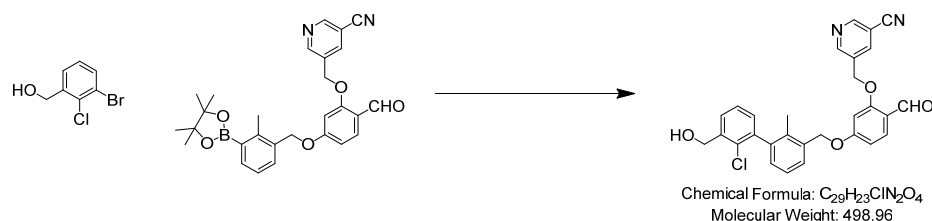
(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((((2-Cyano-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediyloxy))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**10**)



Synthesized from **II-2f** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (9%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03-9.00 (m, 4H), 8.52 (br s, 2H), 7.83-7.75 (m, 2H), 7.57 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.40-7.19 (m, 4H), 6.86-6.80 (m, 2H), 6.74-6.67 (m, 2H), 5.33-5.09 (m, 8H), 4.04-3.93 (m, 4H), 3.67-3.56 (m, 4H), 3.07-3.03 (m, 2H), 2.11 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.18 min; MS (ESI): *m/z* 904 [M+H]⁺.

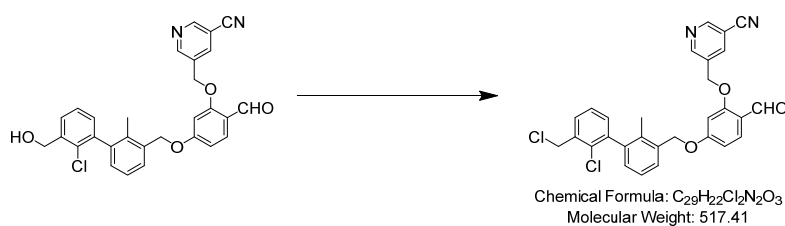
Synthesis of compound **11**

5-((5-((2'-Chloro-3'-(hydroxymethyl)-2-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-6**)



Synthesized from **II-6** and (3-bromo-2-chlorophenyl)methanol (**II-3e**) according to the procedure for the synthesis of **II-9**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 20:80 to 80:20) (14% yield).

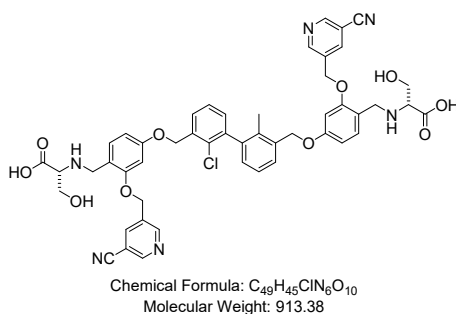
5-((5-((2'-Chloro-3'-(chloromethyl)-2-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-7**)



To an ice-cooled mixture of **II-6** (30 mg, 0.060 mmol) and DIPEA (15.8 μL, 0.090 mmol) in THF (0.9 mL), ethanesulfonyl chloride (8.53 μL, 0.090 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After evaporation of the solvent, crude product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 20:80 to 80:20) to give the mixture of the product containing titled compound (14.8 mg) which was used in the next step without further purification.

Intermediate **II-2g** was synthesized from intermediate **I-2** and **II-7** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-11c**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 20:80 to 80:20) (38% yield). UPLC–MS Retention time = 1.88 min; MS (ESI): *m/z* 735 [M+H]⁺.

(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((((2-Chloro-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediyl))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**11**)



Synthesized from **II-2g** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (49%). ¹H NMR (CD₃OD) δ: 8.96 (s, 2H), 8.88 (s, 2H), 8.41 (s, 2H), 7.59 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.46-7.36 (m, 4H), 7.28-7.24 (m, 2H), 7.12 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.85 (dd, 2H, *J* = 10.8, 1.2 Hz), 6.75 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz), 5.33 (s, 2H), 5.32 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.36 (d, 2H, *J* = 13.2 Hz), 4.26 (d, 2H, *J* = 13.2 Hz), 3.97 (dd, 2H, *J* = 12.0, 3.9 Hz), 3.81 (dd, 2H, *J* = 12.0, 7.2 Hz), 3.53 (dd, 2H, *J* = 7.2, 3.9 Hz), 2.15 (s, 3H), 2.08 (s, 2H) (protons of NH or OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.25 min; MS (ESI): *m/z* 913 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **12**

(3-Bromo-2-(methoxymethoxy)phenyl)methanol (**II-3x-1**)

To a suspension of sodium hydride (0.478 g, 11.9 mmol, 60% oil suspension) in THF (30 mL), 3-bromo-2-hydroxybenzaldehyde (2.00 g, 9.95 mmol) was added at 0°C and stirred at room temperature for 10 minutes. Then, the reaction mixture was cooled to 0°C and chloromethyl methyl ether (0.831 mL, 10.9 mmol) was dropwisely added. The reaction mixture was gradually warmed to room temperature and stirred overnight. Ice-water was added to the reaction mixture and extracted with *n*-hexane-AcOEt (1:1). Organic phase was concentrated and the resulting residue was dissolved in THF (20 mL). Then a solution of NaBH₄ (188 mg, 4.97 mmol) in 0.01 M NaOH(aq) (5.0 mL, 0.050 mmol) was dropwisely added to the mixture at 0°C over 5 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 0.5 h. The reaction mixture was cooled with ice-water bath and quenched with acetone (1.80 mL, 24.4 mmol). Water was added to the reaction mixture and it was extracted with AcOEt. Organic phase was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 80:20 to 50:50) to give (3-bromo-2-(methoxymethoxy)phenyl)methanol (2.35 g, 8.71 mmol, 88% yield).

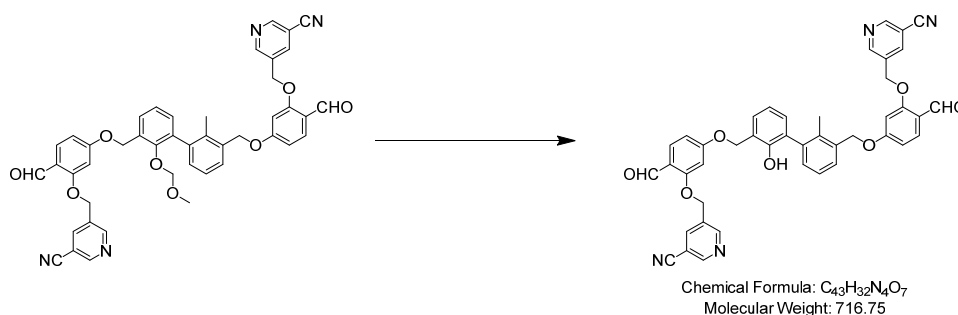
1-Bromo-3-(bromomethyl)-2-(methoxymethoxy)benzene (**II-3x**)

To an ice-cooled mixture of (3-bromo-2-(methoxymethoxy)phenyl)methanol (**II-3x-1**, 500 mg, 1.85 mmol) and PPh₃ (608 mg, 2.31 mmol) in CH₂Cl₂ (4.6 mL), NBS (412 mg, 2.31 mmol) was added portionwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was directly loaded onto silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 95:5 to 75:25) and purified to give intermediate **II-3x** (280 mg, 0.614 mmol, 33% yield).

Intermediate **II-4x** was synthesized from intermediate **I-2** and **II-3x** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-4**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 30:70 to 80:20) (53% yield). UPLC/MS Retention time = 1.70 min; MS (ESI): *m/z* 483, 485 [M+H]⁺.

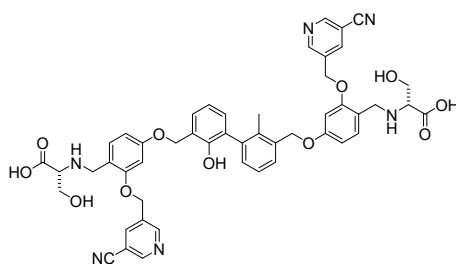
Intermediate **II-2x** was synthesized from intermediate **I-5** and **II-4x** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-6**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 30:70 to 100:0) (54% yield). UPLC/MS Retention time = 1.88 min; MS (ESI): *m/z* 761 [M+H]⁺.

5,5'-((((((2-Hydroxy-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(6-formyl-3,1-phenylene))bis(oxy))bis(methylene))dinicotinonitrile (**II-2h**)



To a stirred mixture of **II-2x** (58 mg, 0.076 mmol) in THF (3.0 mL), H₂O (1.0 mL) and AcOH (1.0 mL) were successively added and the reaction mixture was stirred at room temperature for four days. 1.0 M HCl(aq) was added to the reaction mixture and was stirred at room temperature for three days. Water was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt, then organic phase was concentrated to give a crude product of the titled compound (50 mg, 0.070 mmol, 92% yield) which was used for the next step without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.27 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 9.02–9.00 (m, 4H), 8.68 (s, 1H), 8.53–8.51 (m, 2H), 7.75 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz), 7.73 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.40 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.27 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.19 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.07–7.05 (m, 1H), 6.98–6.94 (m, 3H), 6.86 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.82 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.41–5.39 (m, 4H), 5.30–5.27 (m, 4H), 2.11 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.82 min; MS (ESI): *m/z* 717 [M+H]⁺.

(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((((2-Hydroxy-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediyl))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**12**)

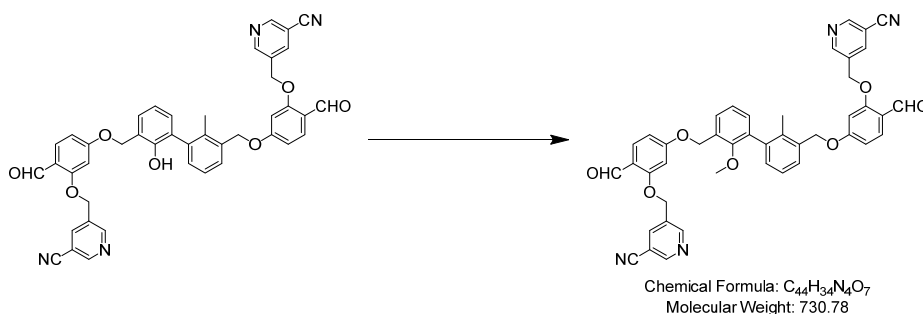


Chemical Formula: C₄₉H₄₆N₆O₁₁
Molecular Weight: 894.94

Synthesized from **II-2h** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (18%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.01 (br s, 4H), 8.61 (br s, 1H), 8.52 (s, 2H), 7.44 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.38-7.32 (m, 3H), 7.28-7.24 (m, 1H), 7.16 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.04-7.01 (m, 1H), 6.97-6.92 (m, 1H), 6.85 (br s, 2H), 6.75-6.68 (m, 2H), 5.31-5.26 (m, 4H), 5.16 (s, 4H), 4.11 (d, 2H, *J* = 13.2 Hz), 4.04 (d, 2H, *J* = 13.2 Hz), 3.76-3.72 (m, 2H), 3.65-3.60 (m, 3H), 3.16 (br s, 2H), 2.09 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.20 min; MS (ESI): *m/z* 895 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **13**

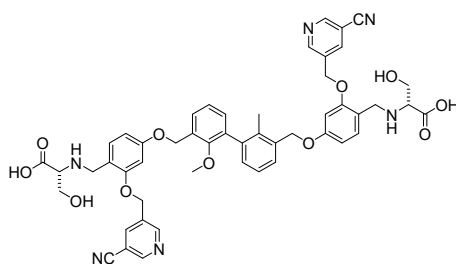
5,5'-((((2-Methoxy-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(6-formyl-3,1-phenylene))bis(oxy))bis(methylene))dinicotinonitrile (**II-2i**)



Chemical Formula: C₄₄H₃₄N₄O₇
Molecular Weight: 730.78

To a stirred mixture of **II-2h** (25 mg, 0.035 mmol) and K₂CO₃ (7.2 mg, 0.052 mmol) in DMF (1.0 mL), methyl iodide (2.62 μL, 0.042 mmol) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction mixture was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 30:70 to 100:0) to give the titled compound (8.0 mg, 0.011 mmol, 31% yield). UPLC/MS Retention time = 1.89 min; MS (ESI): *m/z* 731 [M+H]⁺

(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((2-Methoxy-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediyl))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**13**)



Chemical Formula: C₅₀H₄₈N₆O₁₁
Molecular Weight: 908.97

Synthesized from **II-2i** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (36%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.02 (br s, 2H), 9.01 (br s, 2H), 8.52 (s, 2H), 7.55-7.46 (m, 2H), 7.35-7.18 (m, 6H), 6.86-6.84 (m, 2H), 6.74-6.70 (m, 2H), 5.30 (d, 2H, *J* = 12.9 Hz), 5.25 (d, 2H, *J* = 12.9 Hz), 5.19-5.15 (m, 4H), 4.10-3.99 (m, 4H), 3.73-3.68 (m, 2H), 3.63-3.58 (m, 2H), 3.14-3.10 (m, 2H), 3.27 (s, 3H), 2.09 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.25 min; MS (ESI): *m/z* 909 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **14**

(3-Bromo-2-ethylphenyl)methanol (**II-3j-1**)

To an ice-cooled mixture of 3-bromo-2-ethylbenzoic acid (500 mg, 2.183 mmol) in THF (5.0 mL) under a N₂ atmosphere, borane tetrahydrofuran complex (7.28 mL, 6.55 mmol) was dropwisely added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. 4.0 M NaOH(aq) (5 mL) was added to the reaction mixture, and it was stirred at room temperature for 1 h. Then 2.0 M HCl(aq) (10 mL) was added to the reaction mixture and it was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 95:5 to 60:40) gave the titled compound (445 mg, 2.07 mmol, 95% yield). UPLC/MS Retention time = 1.41 min; MS (ESI): *m/z* 197, 199 [M+H]⁺.

1-Bromo-3-(bromomethyl)-2-ethylbenzene (**II-3j**)

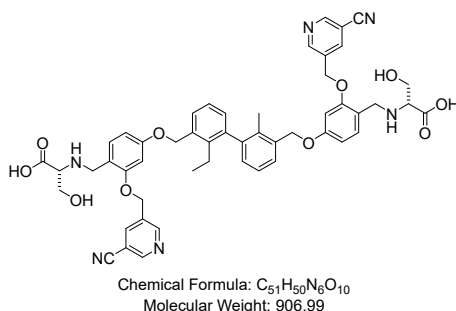
To an ice-cooled mixture of (3-bromo-2-ethylphenyl)methanol (172 mg, 0.800 mmol) and PPh₃ (262 mg, 1.00 mmol) in THF (2.0 mL), NBS (178 mg, 1.00 mmol) was added and The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was directly loaded onto a silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 100:0 to 85:15) and purified to give the titled compound (246 mg, 0.779 mmol, 97% yield).

Intermediate **II-4j** was synthesized from intermediate **I-2** and **II-3j** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-4**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 40:60 to 100:0) (86% yield). UPLC/MS Retention time = 1.85 min; MS (ESI): *m/z* 451, 453 [M+H]⁺.

Intermediate **II-2j** was synthesized from intermediate **I-5** and **II-4j** in a similar procedure for the

synthesis of intermediate **I-6**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 40:60 to 100:0) (38% yield). UPLC/MS Retention time = 1.93 min; MS (ESI): *m/z* 729 [M+H]⁺.

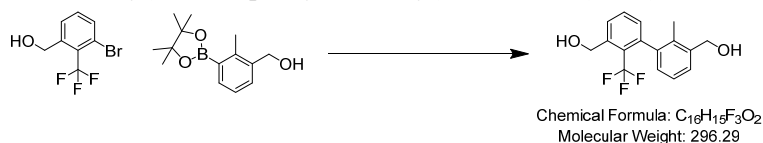
(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((2-Ethyl-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediyl))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**14**)



Synthesized from **II-2j** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (50%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.02 (s, 2H), 9.01 (s, 2H), 8.53 (s, 2H), 7.48 (dd, 2H, *J* = 6.6, 3.9 Hz), 7.35 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.16-7.05 (m, 2H), 6.86 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 6.74 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 5.31 (d, 2H, *J* = 12.9 Hz), 5.26 (d, 2H, *J* = 12.9 Hz), 5.17 (s, 4H), 4.11 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 4.04 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 3.74 (dd, 2H, *J* = 11.1, 4.8 Hz), 3.63 (dd, 2H, *J* = 11.1, 6.9 Hz), 3.18-3.14 (m, 2H), 2.60-2.51 (m, 1H), 2.32-2.24 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 0.85 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.26 min; MS (ESI): *m/z* 907 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **15**

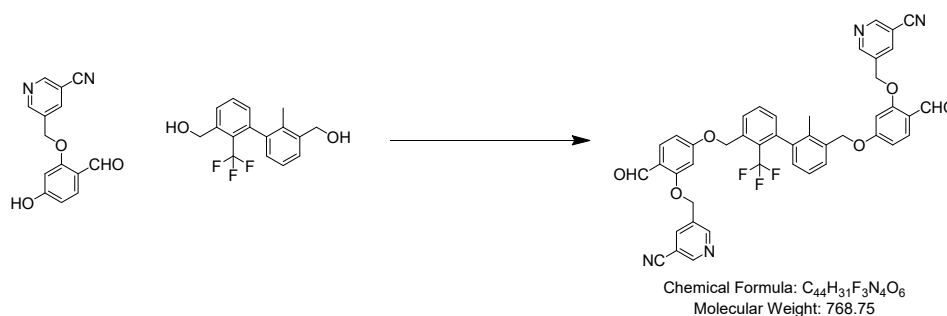
(2-Methyl-2'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)dimethanol (**II-1k**)



To a stirred mixture of **II-8** (300 mg, 1.209 mmol), (3-bromo-2-(trifluoromethyl)phenyl)methanol (278 mg, 1.088 mmol), Na₂CO₃ (513 mg, 4.84 mmol), and H₂O (2.4 mL) in CPME (5 mL), Pd(PPh₃)₄ (70 mg, 0.060 mmol) was added and The reaction mixture was stirred at 100°C for 2 h. SPhos Pd G1 (46 mg, 0.060 mmol) and K₃PO₄ (513 mg, 2.418 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 100°C overnight. The reaction mixture was filtered through Celite[®], and the filtrate was evaporated. Water was added to the residue and it was extracted with CH₂Cl₂. Organic phase was concentrated and purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 75:25 to 50:50). Fractions of the major peaks (UV 254 nm) were concentrated and dissolved in MeOH (4.0 mL) and cooled to 0°C. NaBH₄ (40 mg, 1.057 mmol) was added to the solution, and the reaction mixture was stirred at

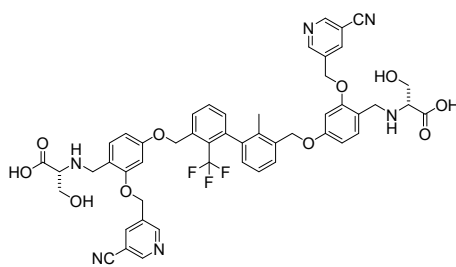
room temperature for 20 min. The reaction mixture was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 80:20 to 50:50) to afford the titled compound (61 mg, 0.206 mmol, 17% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.76 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.39 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.21 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.12 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.04 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 4.95 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 2.03 (d, 3H).

5,5'-((((2-Methyl-2'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(6-formyl-3,1-phenylene))bis(oxy))bis(methylene))dinicotinonitrile (**II-2k**)



To an ice-cooled mixture of intermediate **I-2** (124 mg, 0.486 mmol), **II-1k** (60 mg, 0.203 mmol), and PPh₃ (159 mg, 0.608 mmol) in THF (2.0 mL) under a N₂ atmosphere, DIAD (0.094 mL, 0.486 mmol) was dropwisely added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. PPh₃ (159 mg, 0.608 mmol), and DIAD (0.094 mL, 0.486 mmol) were successively added and the reaction mixture was stirred at 70°C for 7 h. Chromatographic purification on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 40:60 to 100:0) gave the titled compound (71 mg, 0.092 mmol, 46% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (s, 2H), 8.92–8.89 (m, 4H), 8.11–8.09 (m, 2H), 7.90 (dd, 2H, *J* = 8.7, 1.5 Hz), 7.73 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.60 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.29–7.23 (m, 2H), 7.15 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.76 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.9 Hz), 6.73 (dd, 1H, *J* = 8.7, 1.8 Hz), 6.61 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.58 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 5.39 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 5.20 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz), 5.15 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz), 2.07 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.91 min; MS (ESI): *m/z* 769 [M+H]⁺.

(*R*)-3-((4-((3'-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2'-methyl-2-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenyl)amino)-2-(hydroxymethyl)propanoic acid (**15**)

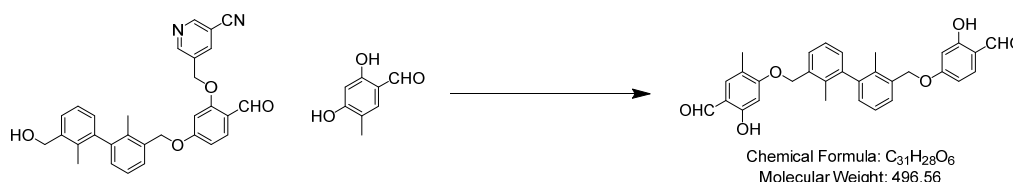


Chemical Formula: $C_{50}H_{45}F_3N_6O_{10}$
Molecular Weight: 946.94

Synthesized from **II-2k** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (29%). 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 9.03 (s, 2H), 9.01 (s, 2H), 8.53 (s, 2H), 7.81 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.73 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.48 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.35 (dd, 2H, $J = 8.4, 2.4$ Hz), 7.29-7.25 (m, 2H), 7.11 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.86 (dd, 2H, $J = 6.6, 1.8$ Hz), 6.75-6.68 (m, 2H), 5.33-5.25 (m, 6H), 5.18 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 5.15 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 4.10 (dd, 2H, $J = 13.2, 3.9$ Hz), 4.03 (d, 2H, $J = 13.2$ Hz), 3.73 (dd, 2H, $J = 11.7, 4.8$ Hz), 3.62 (dd, 2H, $J = 11.7, 6.3$ Hz), 3.17-3.14 (m, 2H), 2.00 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.24 min; MS (ESI): m/z 947 $[M+H]^+$.

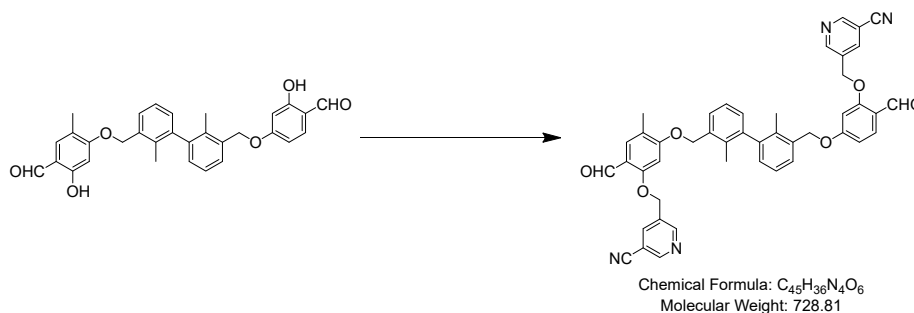
Synthesis of compound **16**

5-((2-Formyl-5-((3'-((4-formyl-5-hydroxy-2-methylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-11a-1**)



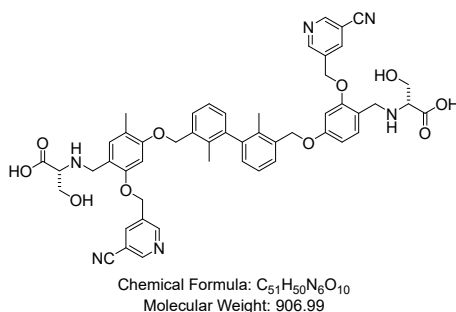
Synthesized from **II-9** and 2,4-dihydroxy-5-methylbenzaldehyde (**II-10**) according to the procedure for the synthesis of **II-36b-1**. The product was purified on silica-gel chromatography (n -hexane:AcOEt = 85:15 to 40:60) (46% yield).

5-((5-((3'-((5-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formyl-2-methylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-11a**)



Synthesized from **II-11a-1** according to the procedure for the synthesis of **II-36b**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 30:70 to 100:0) (66% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 8.91 (d, 2H, *J* = 2.1 Hz), 8.89 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz), 8.11–8.09 (m, 2H), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.71 (s, 1H), 7.45–7.42 (m, 2H), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.19 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.7, 1.8 Hz), 6.60 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.56 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.19 (d, 2H, *J* = 11.1 Hz), 5.16 (d, 2H, *J* = 11.1 Hz), 2.22 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.99 min; MS (ESI): *m/z* 729 [M+H]⁺.

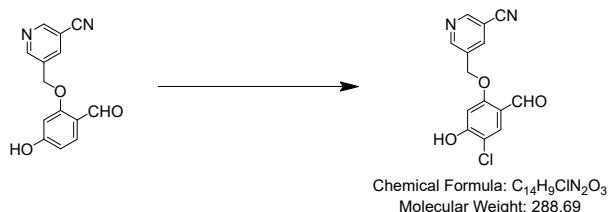
(4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-methylbenzyl)-D-Serine (**16**)



Synthesized from **II-11a** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (71%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.04 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 9.01 (br s, 2H), 8.55 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.48 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.20 (s, 1H), 7.13-7.09 (m, 2H), 6.99 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.74 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 5.37-5.24 (m, 4H), 5.22 (d, 2H, *J* = 12.9 Hz), 5.16 (d, 2H, *J* = 12.9 Hz), 4.13-3.99 (m, 4H), 3.77-3.72 (m, 2H), 3.63 (dd, 2H, *J* = 11.1, 6.9 Hz), 3.17-3.15 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.99 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.29 min; MS (ESI): *m/z* 907 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **17**

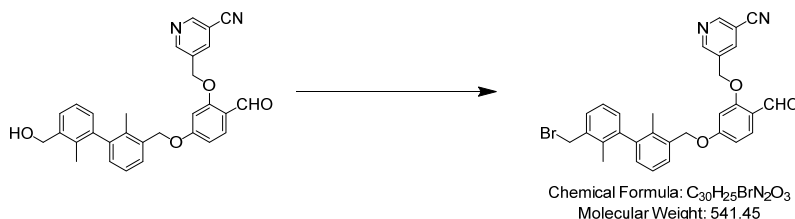
5-((4-Chloro-2-formyl-5-hydroxyphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14b**)



To a stirred mixture of intermediate **I-2** (500 mg, 1.97 mmol) in CH₃CN (5.0 mL), NCS (276 mg, 2.07 mmol) and AcOH (3.0 mL) were added and the reaction mixture was stirred at 80°C for 8 h. The resulting suspension was filtered and the solid was washed with CH₃CN. Solid obtained was dried

under reduced pressure to give the titled compound as a white solid (313 mg, 1.084 mmol, 55% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 11.55 (br s, 1H), 10.17 (br s, 1H), 9.03 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 9.02 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.66 (s, 1H), 8.53-8.51 (m, 1H), 6.78 (br s, 1H), 5.32 (s, 2H). UPLC/MS Retention time = 1.23 min; MS (ESI): *m/z* 289 [M+H]⁺.

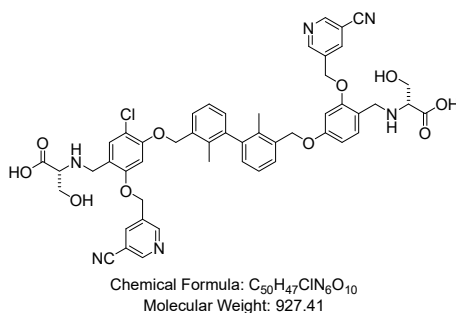
5-((5-((3'-(Bromomethyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-13**)



To an ice-cooled mixture of **II-9** (200 mg, 0.418 mmol) and PPh₃ (137 mg, 0.522 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL), NBS (93 mg, 0.522 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was concentrated and purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 80:20 to 50:50) to give the titled compound as a white solid (173 mg, 0.320 mmol, 76% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (s, 1H), 8.91–8.89 (m, 2H), 8.10 (s, 1H), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.42 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.37-7.09 (m, 4H), 6.81–6.75 (m, 2H), 6.61 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 5.30–5.14 (m, 4H), 4.60 (s, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.09-2.00 (m, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.97 min; MS (ESI): *m/z* 541, 543 [M+H]⁺.

Intermediate **II-11b** was synthesized from intermediate **II-13** and **II-14b** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-11c**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 30:70 to 100:0) (12% yield). UPLC/MS Retention time = 2.00 min; MS (ESI): *m/z* 541, 543 [M+H]⁺.

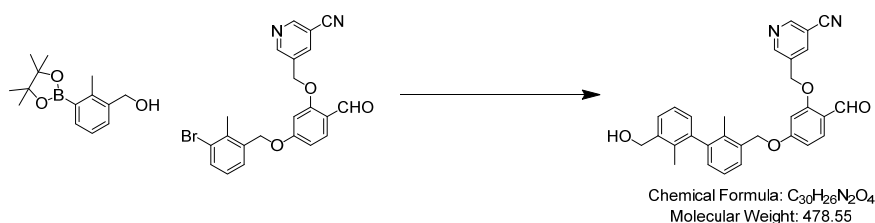
(4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-2-chloro-5-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**17**)



Synthesized from **II-11b** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (20%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03-9.00 (m, 4H), 8.52 (br s, 2H), 7.52-7.46 (m, 3H), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.29 (dt, 2H, *J* = 2.7, 7.3 Hz), 7.16 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz), 7.12-7.10 (m, 2H), 6.87 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 6.75-6.72 (m, 1H), 5.39-5.24 (m, 6H), 5.17 (s, 2H), 4.10 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz), 4.02 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz), 3.96 (s, 2H), 3.75-3.70 (m, 2H), 3.67-3.58 (m, 2H), 3.16-3.11 (m, 2H), 2.03 (br s, 3H), 1.99 (br s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.31 min; MS (ESI): *m/z* 927 [M+H]⁺.

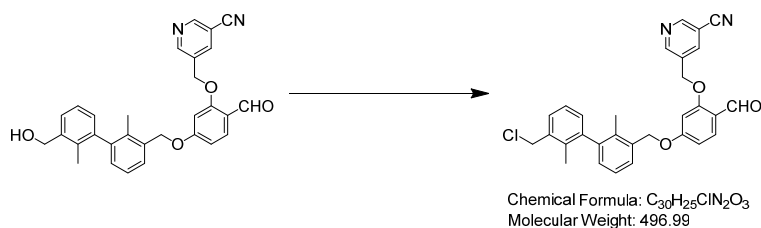
Synthesis of compound **18**

5-((2-Formyl-5-((3'-(hydroxymethyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-9**)



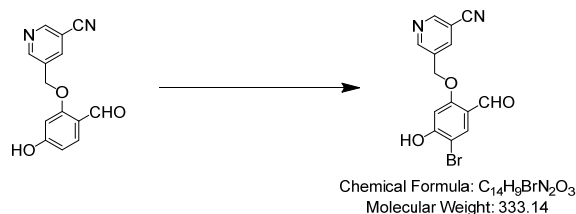
To a stirred mixture of intermediate **I-4** (200 mg, 0.46 mmol), (2-methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)methanol (**II-8**, 125 mg, 0.50 mmol), Na₂CO₃ (145 mg, 1.37 mmol), and H₂O (0.5 mL) in CPME (5.0 mL), Pd(PPh₃)₄ (53 mg, 0.046 mmol) were added and the reaction mixture was stirred for 7 h under microwave irradiation (Biatage Initiator+, 100°C). Water was added to the reaction mixture, then the reaction mixture was filtered through Celite[®] and the filtrate was evaporated. Chromatographic purification on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) afforded the titled compound (190 mg, 0.40 mmol, 87% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.27 (s, 1H), 9.02 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 8.53 (dd, 1H, *J* = 2.2, 2.0 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.47 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.41 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.24 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.08 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.99 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 6.98 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.86 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.2 Hz), 5.40 (s, 2H), 5.30 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.27 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.13 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz), 4.55 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz), 2.00 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.07 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.64 min; MS (ESI): *m/z* 479 [M+H]⁺.

5-((5-((3'-(Chloromethyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-12**)



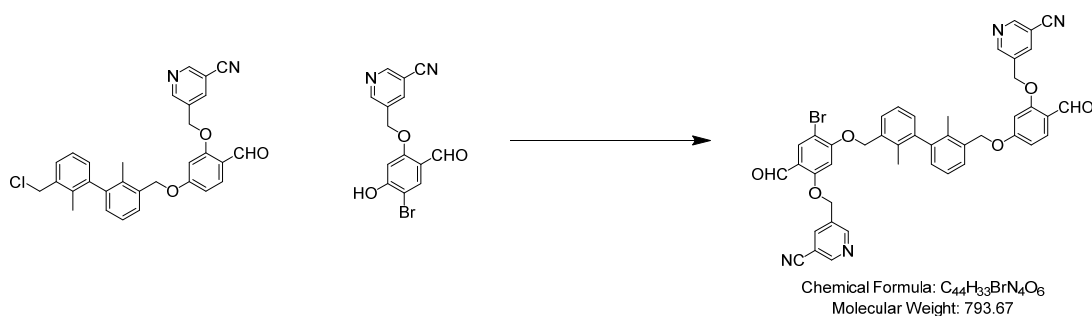
To a stirred mixture of **II-9** (1.00 g, 2.09 mmol) in CHCl₃ (35 mL), thionyl chloride (0.168 mL, 2.23 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 19 h. After evaporation of the solvent, *n*-hexane-AcOEt (4:1) was added to the residue to give a suspension. The solid was collected by suction filtration on a Kiriya funnel, rinsed with *n*-hexane-AcOEt, and dried under reduced pressure to give the titled compound (750 mg). The filtrate was evaporated and purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 60:40) to give the titled compound (70 mg) (820 mg, 1.65 mmol, 79% yield, as total). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.27 (s, 1H), 9.02 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 8.53 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.49 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.5 Hz), 7.45 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 7.30 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.11 (dt, 1H, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 6.99 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 6.87 (dd, 1H, *J* = 8.8, 1.5 Hz), 5.40 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.95 min; MS (ESI): *m/z* 497 [M+H]⁺.

5-((4-Bromo-2-formyl-5-hydroxyphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14c**)



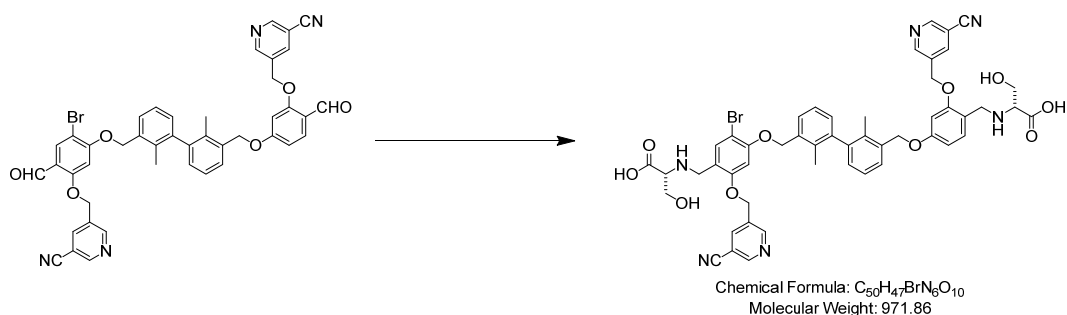
To a stirred mixture of intermediate **I-2** (1.00 g, 3.93 mmol) and AcOH (20 mL) in CH₂Cl₂ (40 mL), a solution of bromine (0.203 mL, 3.93 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added dropwise over 50 minutes, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The resulting suspension was filtered and the solid was washed with CHCl₃. Solid obtained was dried under reduced pressure to give the titled compound as a white solid (1.47 g, 3.93 mmol, 99% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 11.62 (br s, 1H), 10.15 (s, 1H), 9.03 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 9.02 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.52 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.80 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.32 (s, 2H). UPLC/MS Retention time = 1.28 min; MS (ESI): *m/z* 333, 335 [M+H]⁺.

5-((4-Bromo-5-((3'-((3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-11c**)



To a stirred mixture of intermediate **II-12** (400 mg, 0.805 mmol) in DMF (6.0 mL), **II-14c** (322 mg, 0.966 mmol) and K₂CO₃ (222 mg, 1.61 mmol) were successively added at room temperature. Then, the reaction mixture was stirred for 20 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 18:82 to 100:0) to give the titled compound (240 mg, 0.302 mmol, 38% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 8.92–8.89 (m, 4H), 8.11–8.09 (m, 3H), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 7.32 (dd, 1H, *J* = 7.6, 3.7 Hz), 7.30 (dd, 1H, *J* = 7.8, 3.9 Hz), 7.19 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 6.64 (s, 1H), 6.60 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 5.28–5.21 (m, 6H), 5.19 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz), 5.16 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.92 min; MS (ESI): *m/z* 793, 795 [M+H]⁺.

(4-((3'-((2-Bromo-4-(((*R*)-1-carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-5-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**18**)



To a mixture of **II-11c** (40 mg, 0.050 mmol) in DMSO (800 μL), D-Serine (32 mg, 0.30 mmol) and AcOH (17.3 μL, 0.30 mmol) were added at room temperature, and the mixture was stirred for 5 min. NaBH(OAc)₃ (64 mg, 0.30 mmol) was added to the reaction mixture and stirred for 21 h at room temperature. UPLC/MS analysis showed consumption of the starting material. The reaction mixture was purified by reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0). Fractions containing target compound were concentrated under reduced pressure. Water was added to the residue, and the resulting precipitate was collected by filtration. The solid obtained was

dried under reduced pressure to give compound **18** as a white solid (19.4 mg, 0.020 mmol, 40% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.02–9.00 (m, 3H), 8.99 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 8.50 (br s, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.51 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.12 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz), 7.10 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.72 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.36 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 5.32 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz), 5.28 (s, 2H), 5.25 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz), 5.17 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 5.15 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 4.09 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 4.02 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 3.96 (s, 2H), 3.74–3.68 (m, 2H), 3.64–3.59 (m, 2H), 3.18–3.15 (m, 2H), 2.03–2.02 (m, 3H), 1.98 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 170.15, 168.93, 160.59, 157.65, 156.98, 155.70, 152.89, 152.88, 152.41, 152.30, 142.22, 142.13, 139.49, 139.45, 135.56, 135.18, 135.02, 134.93, 134.70, 133.43, 133.26, 132.60, 129.77, 129.66, 128.40, 128.17, 125.98, 125.97, 118.27, 117.29, 117.28, 115.14, 109.52, 109.46, 106.91, 102.35, 101.04, 100.81, 70.17, 69.12, 67.49, 66.97, 62.83, 62.57, 61.24, 60.73, 45.55, 44.86, 15.89, 15.73. UPLC/MS Retention time = 1.29 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. For C₅₀H₄₈N₆O₁₀Br, [M+H]⁺ 971.2610, found 971.2609 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **19**

4-((3-Bromo-2-methylbenzyl)oxy)-2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde (**II-15-1**)

Synthesized from intermediate **II-10** and **I-17** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-36b-1**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 95:5 to 60:40) (48% yield). UPLC/MS Retention time = 1.97 min; MS (ESI): *m/z* 335, 337 [M+H]⁺.

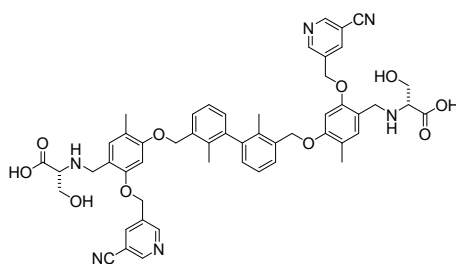
5-((5-((3-Bromo-2-methylbenzyl)oxy)-2-formyl-4-methylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-15**)

Synthesized from intermediate **II-15-1** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-36b**. After the completion of the reaction, water was added to the reaction mixture, and resulting precipitate was collected by filtration to give the titled compound as a white solid (89% yield).

Intermediate **II-16** was synthesized from intermediate **II-15** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-5**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 80:20 to 40:60) (37% yield). UPLC/MS Retention time = 2.02 min; MS (ESI): *m/z* 499 [M+H]⁺.

Intermediate **II-11d** was synthesized from intermediate **II-15** and **II-16** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **I-10**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 75:25 to 0:100) (20% yield). UPLC/MS Retention time = 1.97 min; MS (ESI): *m/z* 743 [M+H]⁺.

(2*R*,2'*R*)-2,2'-((((((2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(methylene))bis(oxy))bis(2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-methyl-4,1-phenylene))bis(methylene))bis(azanediyl))bis(3-hydroxypropanoic acid) (**19**)

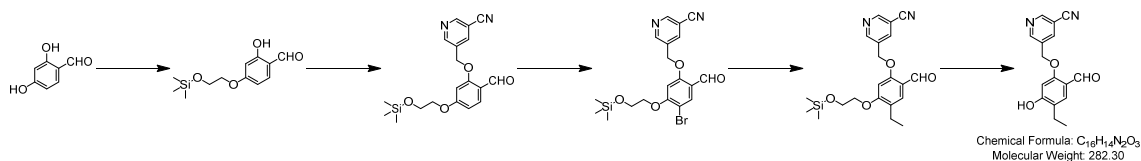


Chemical Formula: C₅₂H₆₂N₆O₁₀
Molecular Weight: 921.02

Synthesized from **II-11d** according to the procedure for the synthesis of **18**. The product was purified on Diol-functionalized silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 95:5 to 0:100). Yield (74%). ¹H NMR (CD₃OD) δ: 9.27-8.77 (br m, 4H), 8.47-8.35 (br m, 2H), 7.35 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.18-7.14 (m, 4H), 7.01 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 6.84-6.82 (m, 2H), 5.30-5.24 (m, 4H), 5.14 (s, 4H), 4.28-4.17 (m, 4H), 4.01-3.87 (m, 6H), 2.55 (s, 3H), 2.08 (s, 6H), 1.96 (br s, 5H) (two protons of NHs or OHs, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.32 min; MS (ESI): *m/z* 921 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **20**

Synthesis of intermediate **II-14e**



Chemical Formula: C₁₈H₁₄N₂O₃
Molecular Weight: 282.30

2-Hydroxy-4-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)benzaldehyde (**II-14e-4**)

To a stirred mixture of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (**I-1**, 2.00 g, 14.48 mmol) and DIPEA (7.57 mL, 43.4 mmol) in CHCl₃ (20 mL), 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl chloride (3.08 mL, 17.38 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. After the completion of the reaction, the reaction mixture was concentrated. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 99:1 to 85:15) afforded the titled compound (4.00 g, 12.67 mmol, 87% yield). UPLC/MS Retention time = 1.89 min; MS (ESI): *m/z* 269 [M+H]⁺.

5-((2-Formyl-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14e-3**)

To a stirred mixture of **II-14e-4** (4.00 g, 12.67 mmol), 5-(chloromethyl)nicotinonitrile (2.03 g, 13.30 mmol) in DMF (40 mL), K₂CO₃ (3.50 g, 25.3 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 22 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt. The organic phase was washed twice with H₂O and concentrated. The residue was purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 80:20 to 20:80) to afford the titled compound (4.50 g, 11.70 mmol, 92% yield). UPLC/MS Retention time = 1.81 min; MS (ESI): *m/z* 385 [M+H]⁺.

5-((4-Bromo-2-formyl-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14e-2**)

To a stirred mixture of **II-14e-3** (4.30 g, 11.18 mmol) in THF (50 mL), NBS (2.19 g, 12.30 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Sat. NaHCO₃(aq) was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt, then organic phase was washed with water and concentrated. The residue was dissolved in THF (50 mL), and NBS (2.19 g, 12.30 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Sat. NaHCO₃(aq) was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt, then organic phase was washed with water and concentrated. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 80:20 to 20:80) afforded the titled compound (4.60 g, 8.93 mmol, 80% yield). UPLC/MS Retention time = 1.95 min; MS (ESI): *m/z* 463, 465 [M+H]⁺.

5-((4-Ethyl-2-formyl-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14e-1**)

To a stirred mixture of **II-14e-2** (50 mg, 0.108 mmol), ethylboronic acid (12.0 mg, 0.162 mmol) and K₃PO₄ (46 mg, 0.216 mmol) in toluene (4.0 mL), Sphos Pd G1 (8.2 mg, 10.8 μmol) was added and the reaction mixture was stirred at 110°C for 3 h under an Ar atmosphere. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 90:10 to 50:50) to give the titled compound (35 mg, 0.085 mmol, 79% yield). UPLC/MS Retention time = 1.99 min; MS (ESI): *m/z* 413 [M+H]⁺.

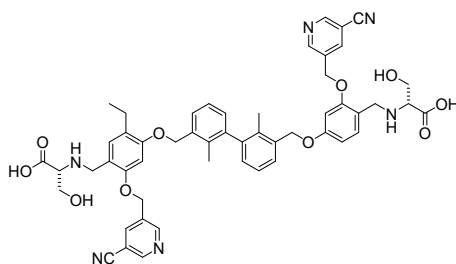
5-((4-Ethyl-2-formyl-5-hydroxyphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14e**)

To a stirred mixture of **II-14e-1** (35 mg, 0.085 mmol) in THF (1.0 mL), 1.0 M TBAF in THF (0.170 mL, 0.170 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 25 h. 1.0 M TBAF in THF (0.340 mL, 0.340 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for additional 71 h. The reaction mixture was concentrated and purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) to give the titled compound (10 mg, 0.035 mmol, 42% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.31 (s, 1H), 8.90–8.88 (m, 3H), 8.09 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 2.59 (q, 2H, *J* = 7.4 Hz), 1.24 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz). UPLC/MS Retention time = 1.29 min; MS (ESI): *m/z* 283 [M+H]⁺.

Intermediate **II-11e** was synthesized from intermediate **II-12** and **II-14e** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-11c**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) (28% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 8.91 (d, 2H, *J* = 2.2 Hz), 8.89 (d, 2H, *J* = 1.5 Hz), 8.11–8.09 (m, 2H), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.73 (s, 1H), 7.44 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.19 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.1 Hz), 6.60 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.57 (s, 1H), 5.25 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.18–5.16 (m, 4H), 2.65 (q, 2H, *J* = 7.4 Hz), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz).

4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-

yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-ethylbenzyl)-D-Serine (**20**)



Chemical Formula: C₅₂H₆₂N₆O₁₀
Molecular Weight: 921.02

Synthesized from **II-11e** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (28%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 9.00 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.99 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.53 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.51 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.47 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.27 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.19 (s, 1H), 7.10 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.08 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 6.97 (s, 1H), 6.85 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.72 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.1 Hz), 5.34 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.24 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.20 (d, 2H, *J* = 13.4 Hz), 5.14 (d, 2H, *J* = 13.4 Hz), 4.09 (d, 2H, *J* = 13.4 Hz), 4.01 (d, 2H, *J* = 13.4 Hz), 3.75-3.70 (m, 2H), 3.64-3.58 (m, 2H), 3.16-3.11 (m, 2H), 2.54-2.48 (m, 2H), 2.00 (br s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.08 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.32 min; MS (ESI): *m/z* 921 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **21**

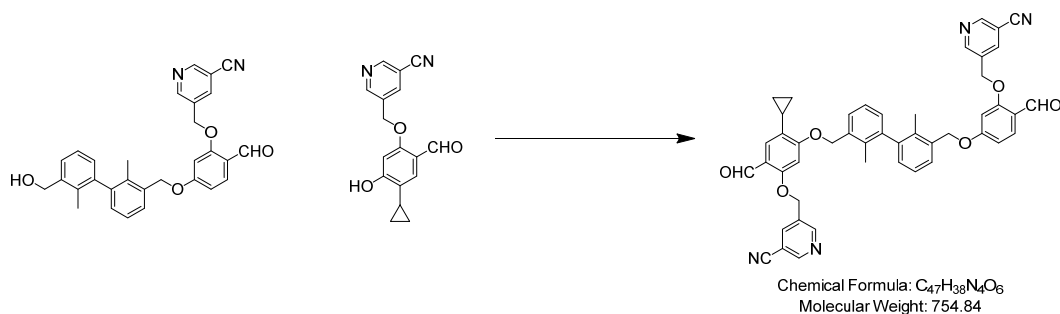
5-((4-Cyclopropyl-2-formyl-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14f-1**)

Synthesized from **II-14e-2** and cyclopropylboronic acid according to the procedure for the synthesis of **II-14e-1**. The product was purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 90:10 to 50:50) to afford the titled compound (93% yield). UPLC/MS Retention time = 1.97 min; MS (ESI): *m/z* 425 [M+H]⁺.

5-((4-Cyclopropyl-2-formyl-5-hydroxyphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14f**)

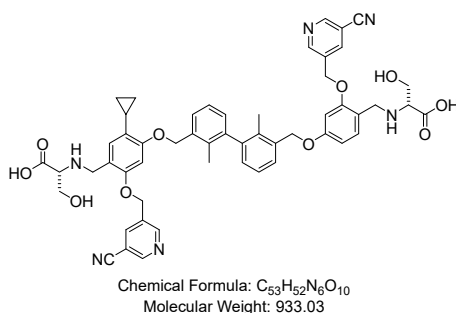
Synthesized from **II-11f-1** according to the procedure for the synthesis of **II-14e**. The product was purified by reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) to afford the titled compound (37% yield). UPLC/MS Retention time = 1.30 min; MS (ESI): *m/z* 295 [M+H]⁺.

5-((5-((3'-((5-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-2-cyclopropyl-4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-11f**)



To a stirred mixture of **II-14f** (22 mg, 0.075 mmol), **II-9** (39 mg, 0.082 mmol), and PPH₃ (24 mg, 0.090 mmol) in THF (4.0 mL) under a N₂ atmosphere, DIAD (0.017 mL, 0.090 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 53 h. The reaction mixture was concentrated and purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) to afford the titled compound (40 mg, 0.053 mmol, 71% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 8.91–8.89 (m, 4H), 8.10–8.09 (m, 2H), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.48 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.46 (s, 1H), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.19 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 6.60 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 6.57 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 5.20 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 5.16 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.26–1.20 (m, 1H), 0.92–0.87 (m, 2H), 0.69–0.65 (m, 2H). UPLC/MS Retention time = 2.02 min; MS (ESI): *m/z* 755 [M+H]⁺

(4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-cyclopropylbenzyl)-D-Serine (**21**)



Synthesized from **II-11f** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (57%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.02 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 9.00 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.99 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.53 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.51 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.50 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.45 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.27 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.11–7.07 (m, 2H), 6.96 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.85 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.72 (dd, 1H, *J* = 8.1, 2.1 Hz), 5.33 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.28 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 5.24 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.23 (d, 2H, *J* = 13.4 Hz), 5.14 (d, 2H, *J* = 13.4 Hz), 4.11–3.96 (m, 4H), 3.74–3.69 (m, 2H), 3.61 (dd, 2H, *J* = 11.0, 7.1 Hz), 3.15–3.09 (m,

3H), 2.03-1.97 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 0.83-0.79 (m, 2H), 0.57-0.53 (m, 2H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.31 min; MS (ESI): *m/z* 933 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **22**

5-((2-Formyl-4-propyl-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14g-1**)

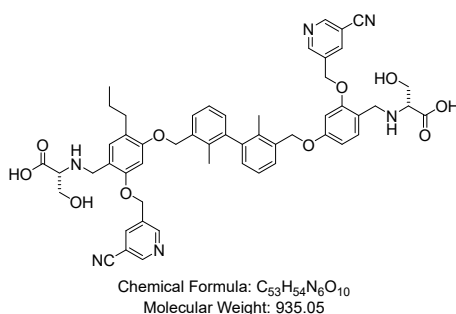
Synthesized from **II-14e-2** and propylboronic acid according to the procedure for the synthesis of **II-14e-1**. The product was purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 50:50) to afford the titled compound (96% yield). UPLC/MS Retention time = 2.07 min; MS (ESI): *m/z* 427 [M+H]⁺.

5-((2-formyl-5-hydroxy-4-propylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-14g**)

Synthesized from **II-14g-1** according to the procedure for the synthesis of **II-14e**. The product was purified by silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 70:30 to 15:85) to afford the titled compound (33% yield). UPLC/MS Retention time = 1.38 min; MS (ESI): *m/z* 297 [M+H]⁺.

Intermediate **II-11g** was synthesized from intermediate **II-12** and **II-14g** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-11c**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) (88% yield).

4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-propylbenzyl)-D-Serine (**22**)

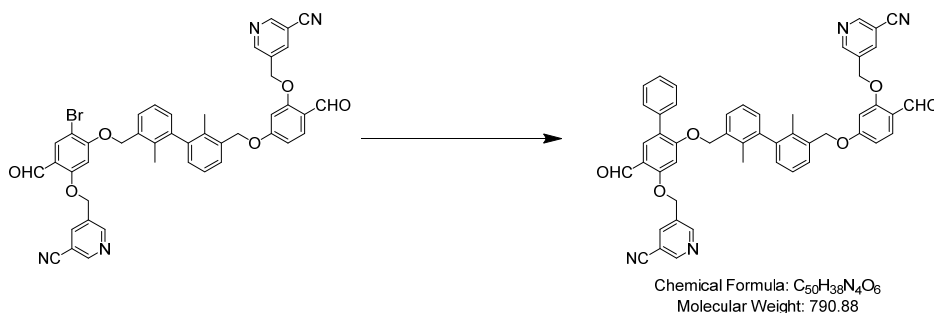


Synthesized from **II-11g** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (50%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 9.01 (t, 2H, *J* = 2.1 Hz), 8.99 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.53 (t, 2H, *J* = 2.1 Hz), 8.51 (t, 2H, *J* = 2.1 Hz), 7.46 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.28 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.17 (s, 1H), 7.09 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 6.97 (s, 1H), 6.85 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.72 (dd, 1H, *J* = 8.1, 2.1 Hz), 5.35-5.23 (m, 4H), 5.18 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.08 (d, 2H, *J* = 12.5 Hz), 4.03-3.98 (m, 2H), 3.74-3.69 (m, 2H), 3.63-3.58 (m, 2H), 3.14-3.11 (m, 2H), 2.51-2.44 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.98

(s, 3H), 1.54-1.44 (m, 2H), 0.83 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.36 min; MS (ESI): m/z 935 [M+H]⁺.

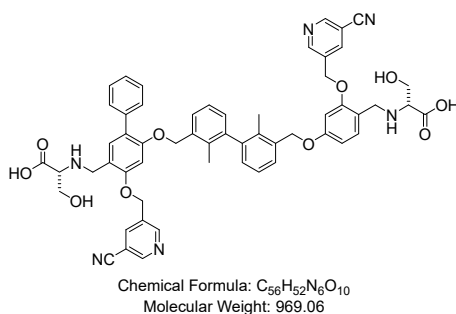
Synthesis of compound **23**

5-(((2-(((3'-((3-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-5-formyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)methyl)nicotinitrile (**II-11h**)



To a 2.0–5.0 mL microwave vial, **II-11c** (60 mg, 0.076 mmol), phenylboronic acid (9 mg, 0.076 mmol), Pd(PPh₃)₄ (8.7 mg, 7.56 μmol), Na₂CO₃ (24 mg, 0.227 mmol), H₂O (0.4 mL) and CPME (4.0 mL) were added and the reaction mixture was stirred for 1 h under microwave irradiation (Biatage Initiator⁺, 100°C). The reaction mixture was filtered through Celite[®] and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified by reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 18:82 to 100:0) to give the titled compound as a white solid (50 mg, 0.063 mmol, 84% yield). UPLC/MS Retention time = 2.04 min; MS (ESI): m/z 791 [M+H]⁺.

((6-(((3'-(((R)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-4-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)-D-Serine (**23**)

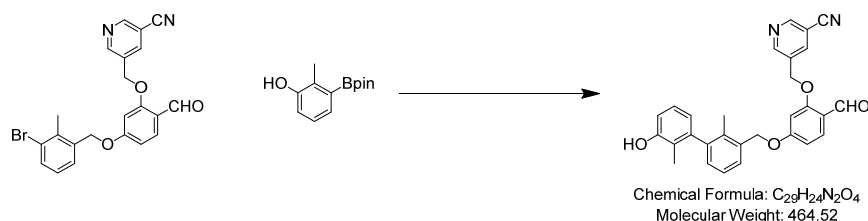


Synthesized from **II-11h** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (45%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.06 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.47-7.42 (m, 4H), 7.35-7.31 (m, 4H), 7.28-7.18 (m, 3H), 7.10 (s, 1H), 7.04 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 6.85 (s, 1H), 6.72 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 5.42 (d, 1H, $J = 12.7$ Hz), 5.37 (d, 1H, $J = 12.7$ Hz), 5.29 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 5.24 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 5.22-5.18 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.16-4.00 (m, 4H), 3.74-

3.69 (m, 2H), 3.65-3.58 (m, 2H), 3.19-3.13 (m, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.87 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.46 min; MS (ESI): *m/z* 969 [M+H]⁺.

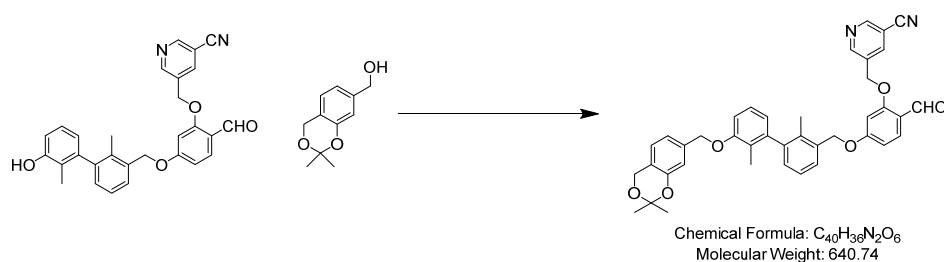
Synthesis of compound **24**

5-((2-Formyl-5-((3'-hydroxy-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-18**)



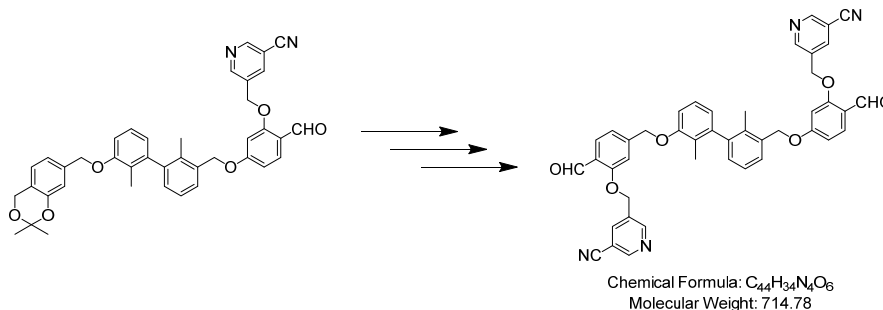
Synthesized from **I-4** and 2-methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenol (**II-17**) according to the procedure for the synthesis of **II-9**. Aqueous workup of the reaction mixture followed by the crystallization from AcOEt gave the titled compound (71% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.32 (br s, 1H), 8.89 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.88 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.09-8.08 (m, 1H), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.38 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.4 Hz), 7.27 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.15 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.4 Hz), 7.11 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.80 (dd, 1H, *J* = 8.1, 0.9 Hz), 6.76 (dd, 1H, *J* = 8.7, 1.7 Hz), 6.72 (dd, 1H, *J* = 7.6, 0.9 Hz), 6.59 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 5.21 (s, 2H), 5.17 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz), 5.14 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz), 4.78 (s, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.94 (s, 3H).

5-((5-((3'-((2,2-Dimethyl-4*H*-benzo[d][1,3]dioxin-7-yl)methoxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-20**)



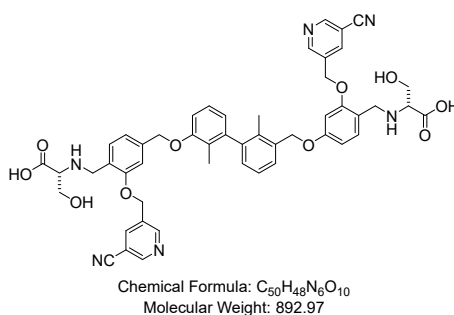
Synthesized from **II-18** and (2,2-dimethyl-4*H*-benzo[d][1,3]dioxin-7-yl)methanol (**II-19**, CAS RN[®] 71780-42-2) according to the procedure for the synthesis of **II-11f**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane: AcOEt = 67:33 to 33:67) (81% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.33 (s, 1H), 8.91 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.90 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.11-8.10 (m, 1H), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.40 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.28 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.18 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.00 (s, 2H), 6.95-6.91 (m, 2H), 6.79-6.75 (m, 2H), 6.61 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 5.22 (s, 2H), 5.19 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz), 5.15 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz), 5.07 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.56 (s, 6H).

5-((5-((3'-((3-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formylbenzyl)oxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-21**)



Synthesized from **II-20** according to the procedure for the synthesis of **II-27**. The product was purified on reversed phase chromatography ($CH_3CN:0.1\% HCO_2H(aq) = 20:80$ to $80:20$) (45% yield for 3 steps). 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 10.49 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 8.91 (d, 2H, $J = 2.1$ Hz), 8.89 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.88 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.11-8.08 (m, 2H), 7.93 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.91 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz), 7.41 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.29 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.23-7.16 (m, 4H), 6.88 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.77 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.1$ Hz), 6.61 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 5.30 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.21-5.14 (m, 4H), 2.08 (s, 3H), 1.98 (s, 3H).

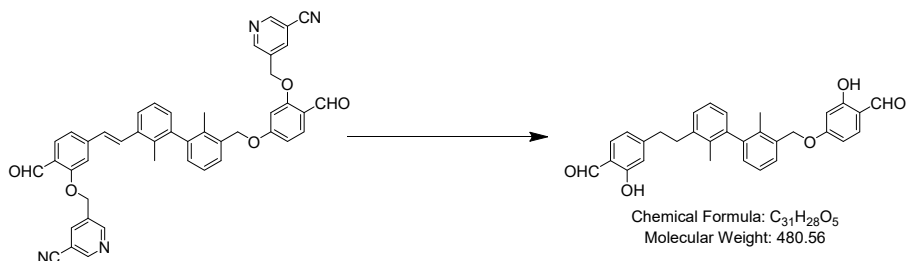
(4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)oxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**24**)



Synthesized from **II-21** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (30%). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ : 9.02 (s, 2H), 9.00 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 8.99 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.52 (br s, 1H), 8.50 (br s, 1H), 7.46-7.43 (m, 2H), 7.35 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.28-7.24 (m, 2H), 7.21 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.13 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.08-7.04 (m, 2H), 6.87 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 6.73 (dd, 2H, $J = 8.4, 1.8$ Hz), 6.71 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz), 5.34 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz), 5.31 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz), 5.29 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz), 5.26 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz), 5.19-5.10 (m, 4H), 4.12-4.01 (m, 4H), 3.76-3.71 (m, 2H), 3.62 (dd, 2H, $J = 11.1, 7.2$ Hz), 3.21-3.14 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.84 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO_2H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.23 min; MS (ESI): m/z 893 $[M+H]^+$.

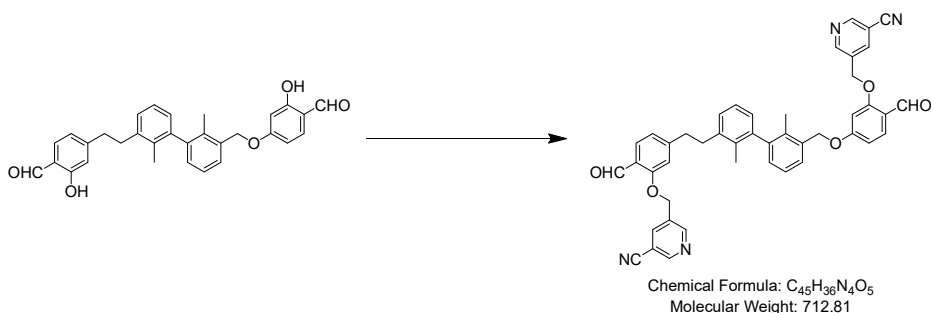
Synthesis of compound 25

4-((3'-(4-Formyl-3-hydroxyphenethyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-hydroxybenzaldehyde (**II-28-1**)



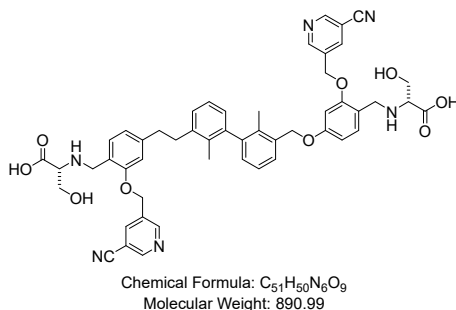
To a suspension of 10% Pd/C (58 mg, 0.055 mmol) (N.E. CHEMCAT CORPORATION, type NX) in THF (3.0 mL), **II-27** (56 mg, 0.079 mmol) was added and the reaction mixture was stirred under a H₂ atmosphere (1 atm) at room temperature for 3 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 95:5 to 40:60) to give the titled compound as a pale brown solid (26 mg, 0.054 mmol, 69% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 11.50 (s, 1H), 11.05 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 7.47 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.29–7.25 (m, 1H), 7.20–7.13 (m, 3H), 7.01 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.85 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.82 (s, 1H), 6.65 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.57 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.02–2.91 (m, 4H), 2.02 (s, 2H), 1.96 (s, 2H). UPLC/MS Retention time = 2.14 min; MS (ESI): *m/z* 481 [M+H]⁺.

5-((5-((3'-(3-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formylphenethyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-28**)



To a mixture of **II-28-1** (26 mg, 0.054 mmol) in DMF (520 μL), 5-(chloromethyl)nicotinonitrile (20 mg, 0.130 mmol) and K₂CO₃ (19 mg, 0.141 mmol) were added at room temperature, and the reaction mixture was stirred at 80°C for 45 minutes. After cooling to room temperature, the reaction mixture was directly loaded onto reverse phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 20:80 to 100:0) and purified to give the titled compound (14 mg, 0.020 mmol, 36% yield). UPLC/MS Retention time = 1.98 min; MS (ESI): *m/z* 713 [M+H]⁺.

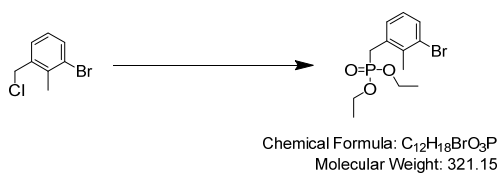
4-((3'-(4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenethyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**25**)



Synthesized from **II-28** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (45%). ¹H NMR at 30°C (DMSO-*d*₆) δ: 9.03-8.99 (m, 4H), 8.52 (br s, 1H), 8.50 (br s, 1H), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.30-7.16 (m, 4H), 7.06-7.02 (m, 2H), 6.91 (d, 1H, *J* = 6.6 Hz), 6.87 (br s, 1H), 6.85-6.82 (m, 1H), 6.74-6.70 (m, 1H), 5.33-5.22 (m, 4H), 5.15 (s, 2H), 4.12-3.96 (m, 4H), 3.77-3.69 (m, 2H), 3.66-3.59 (m, 2H), 3.21-3.14 (m, 2H), 2.96-2.82 (m, 4H), 1.94 (s, 1.5H), 1.91 (s, 1.5H), 1.88 (s, 1.5H), 1.83 (s, 1.5H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). ¹H NMR at 120°C (DMSO-*d*₆) δ: 8.94 (br s, 2H), 8.89 (br s, 2H), 8.34-8.31 (m, 2H), 7.41 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.28-7.20 (m, 4H), 7.16-7.12 (m, 2H), 7.02 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.94 (s, 1H), 6.90-6.88 (m, 1H), 6.83-6.80 (m, 1H), 6.67 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.25 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 3.90 (dd, 2H, *J* = 13.8, 4.2 Hz), 3.85 (d, 2H, *J* = 13.8 Hz), 3.69-3.64 (m, 2H), 3.59 (dd, 2H, *J* = 10.5, 6.3 Hz), 3.23-3.19 (m, 2H), 2.96-2.88 (m, 4H), 1.90 (s, 3H), 1.98 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.49 min; MS (ESI): *m/z* 891 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **26**

Diethyl (3-bromo-2-methylbenzyl)phosphonate (**II-23**)



To a 20 mL round bottomed flask, 1-bromo-3-(chloromethyl)-2-methylbenzene (**II-22**, 300 mg, 1.37 mmol) and triethyl phosphite (2.39 mL, 13.7 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 160°C overnight. After cooling to room temperature, the reaction mixture was directly loaded onto a silica-gel chromatography and purified (*n*-hexane:AcOEt = 70:30 to 20:80) to give the titled compound as a colorless oil (186 mg, 0.463 mmol, 34% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.46 (dq, 1H, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 7.21 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.9 Hz), 6.99 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 4.06-3.95 (m, 4H), 3.23 (d, 2H, *J* = 22.1 Hz), 2.48 (d, 3H, *J* = 1.5 Hz), 1.25 (dt, 6H, *J* = 19.0, 6.2 Hz). UPLC/MS Retention time = 1.52

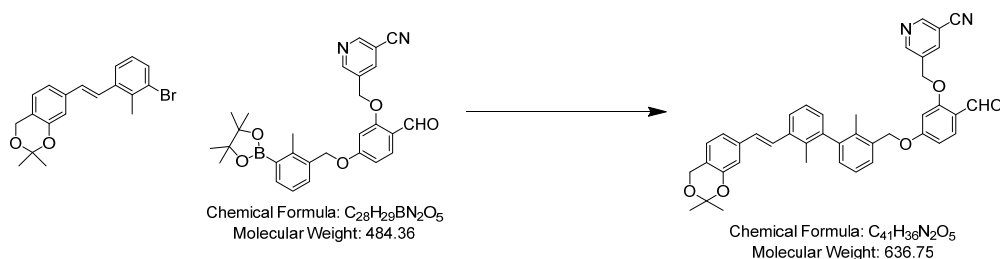
min; MS (ESI): m/z 321, 323 $[M+H]^+$.

(*E*)-7-(3-Bromo-2-methylstyryl)-2,2-dimethyl-4*H*-benzo[d][1,3]dioxine (**II-25**)



To an ice-cooled suspension of sodium hydride (20 mg, 0.50 mmol, 60% oil suspension) in THF (1.0 mL), a solution of **II-23** (183 mg, 0.456 mmol) in THF (2.0 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 10 min. The reaction mixture was cooled to 0°C and a solution of 2,2-dimethyl-4*H*-benzo[d][1,3]dioxine-7-carbaldehyde (**II-24**, CAS RN[®] 121925-12-0, 88 mg, 0.456 mmol) in THF (1.0 mL) was dropwise added. The reaction mixture was gradually warmed to room temperature and stirred for 3 days. The reaction mixture was directly loaded onto a silica-gel chromatography column and purified (*n*-hexane:AcOEt = 98:2 to 75:25) to give the titled compound (142 mg, 0.368 mmol, 81% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.48 (dd, 2H, *J* = 7.8, 1.8 Hz), 7.30 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.07–6.96 (m, 4H), 6.85 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 4.87 (s, 2H), 2.49 (s, 3H), 1.57 (s, 6H).

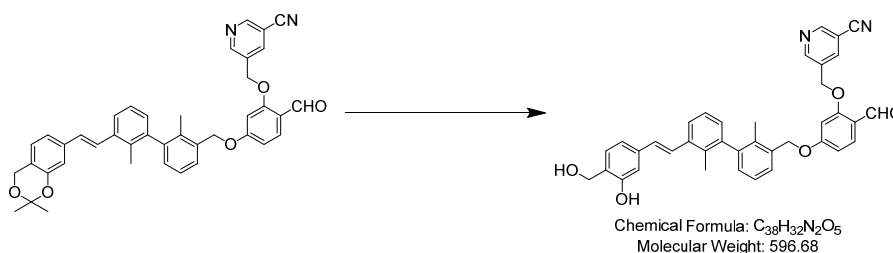
(*E*)-5-((5-((3'-(2-(2,2-Dimethyl-4*H*-benzo[d][1,3]dioxin-7-yl)vinyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-26**)



To a stirred mixture of **I-5** (211 mg, 0.435 mmol), **II-25** (140 mg, 0.362 mmol), and K₃PO₄ (185 mg, 0.870 mmol) in H₂O (0.87 mL)-THF (2.6 mL), Xphos Pd G2 (14 mg, 0.018 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. 1-Pyrrolidinecarbodithioic acid ammonium salt (6.0 mg, 0.037 mmol) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®], washed with AcOEt, and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 20:80) to give the titled compound (201 mg, 0.265 mmol, 73% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (s, 1H), 8.91 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.90 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.10 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.60 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.42–7.35 (m, 2H), 7.31–7.24 (m, 2H), 7.18 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.2 Hz), 7.08–7.05 (m, 2H), 7.03 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.95 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.78 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.9 Hz), 6.61 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 5.22 (s, 2H), 5.19 (d, 1H, *J* = 10.5

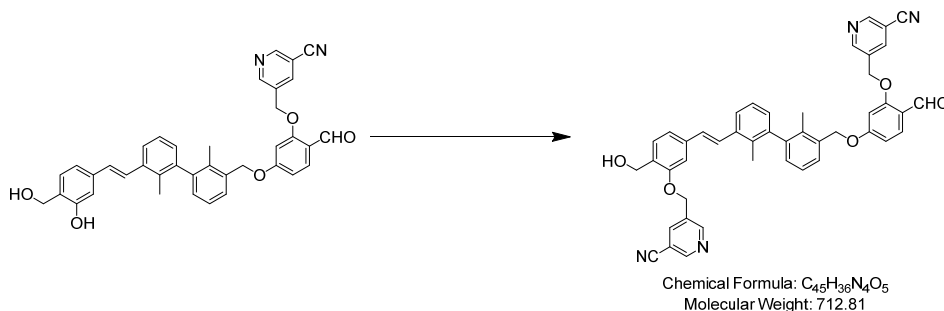
Hz), 5.16 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 4.87 (s, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.57 (s, 6H). UPLC/MS Retention time = 2.20 min; MS (ESI): m/z 579 $[M+H-58]^+$.

(*E*)-5-((2-Formyl-5-((3'-(3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)styryl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-27-2**)



To a stirred solution of **II-26** (201 mg, 0.265 mmol) in THF (5.0 mL), 2.0 M HCl(aq) (2.0 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Water was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt. The organic phase was washed with brine, dried over $MgSO_4$, and concentrated. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane: AcOEt = 70:30 to 0:100) gave the titled compound (166 mg, 0.239 mmol, 90% yield). 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 10.33 (s, 1H), 8.91 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.89 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.10 (t, 1H, $J = 1.8$ Hz), 7.90 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.61 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.41-7.36 (m, 3H), 7.30-7.24 (m, 2H), 7.18 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.11 (s, 1H), 7.07-6.95 (m, 4H), 6.78 (dd, 1H, $J = 8.7, 1.8$ Hz), 6.61 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 5.22 (s, 2H), 5.20 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz), 5.16 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 4.90 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz), 2.23 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.79 min; MS (ESI): m/z 579 $[M+H-18]^+$, 595 $[M-H]^-$.

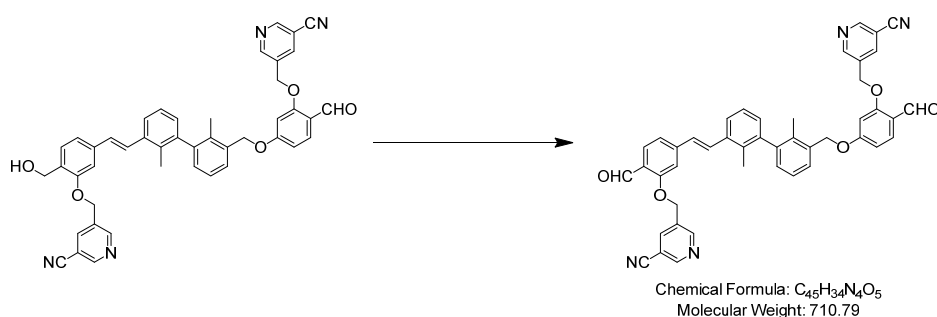
(*E*)-5-((5-((3'-(3-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-(hydroxymethyl)styryl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-27-1**)



To a mixture of **II-27-2** (164 mg, 0.236 mmol) in DMF (1.41 mL), 5-(chloromethyl)nicotinonitrile (43 mg, 0.284 mmol) and K_2CO_3 (49 mg, 0.355 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 80°C for 2 h. Water was added to the reaction mixture and it was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with brine, dried over $MgSO_4$, and concentrated. Chromatographic purification on

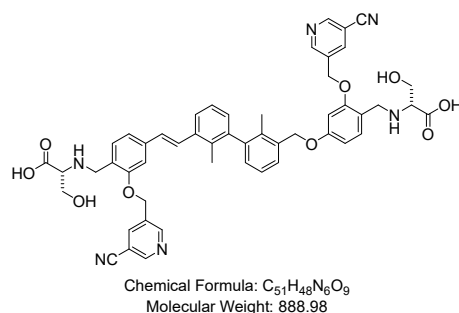
silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 60:40 to 0:100) gave the titled compound (180 mg, 0.187 mmol, 79% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.34 (br s, 1H), 8.93 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.91 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.89 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.89 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.10 (br s, 2H), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.60 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.43–7.39 (m, 3H), 7.35–7.23 (m, 4H), 7.18 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 7.08 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.2 Hz), 7.04 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.7, 1.8 Hz), 6.61 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 5.27 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.20 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz), 5.16 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz), 4.78 (d, 2H, *J* = 3.3 Hz), 2.12 (s, 3H), 2.08 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.90 min; MS (ESI): *m/z* 713 [M+H]⁺.

(*E*)-5-((5-(2-(3'-((3-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)vinyl)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-27**)



To an ice-cooled solution of **II-27-1** (180 mg, 0.187 mmol) in CH₂Cl₂ (1.33 mL), Dess-Martin periodinane (103 mg, 0.243 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. DMSO (1.0 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was concentrated. Crude product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 30:70 to 100:0) to give the titled compound (86 mg, 0.121 mmol, 65% yield). UPLC/MS Retention time = 2.01 min; MS (ESI): *m/z* 711 [M+H]⁺.

4-((*E*)-2-(3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)vinyl)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**26**)



Synthesized from **II-27** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (64%). ¹H NMR

(DMSO-*d*₆) δ : 9.05 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 9.00 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 8.99 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 8.53 (t, 1H, *J* = 1.8 Hz), 8.51 (t, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.53 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.41-7.39 (m, 2H), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.30-7.25 (m, 3H), 7.13 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.09 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.03 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.74-6.72 (m, 1H), 5.38 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.33 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.30 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.25 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 5.18 (d, 1H, *J* = 13.9 Hz), 5.15 (d, 1H, *J* = 13.9 Hz), 4.10-4.01 (m, 4H), 3.72 (dt, 2H, *J* = 11.0, 4.4 Hz), 3.62 (ddd, 2H, *J* = 11.0, 6.6, 1.8 Hz), 3.19-3.14 (m, 2H), 2.08 (d, 3H, *J* = 2.2 Hz), 2.01 (s, 3H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 169.86, 168.92, 160.59, 157.64, 156.77, 153.00, 152.90, 152.31, 152.30, 142.48, 142.28, 139.53, 139.45, 139.45, 136.85, 135.53, 134.88, 133.85, 133.61, 133.44, 132.58, 131.58, 130.54, 129.67, 129.21, 128.38, 127.94, 126.28, 125.97, 125.15, 123.33, 120.28, 117.30, 117.29, 115.20, 110.45, 109.48, 109.46, 106.88, 101.04, 69.13, 66.96, 66.89, 62.86, 62.60, 61.17, 60.77, 45.90, 45.60, 16.67, 15.77. UPLC/MS Retention time = 1.29 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₅₁H₄₉N₆O₉, [M+H]⁺ 889.3556, found 889.3558 [M+H]⁺.

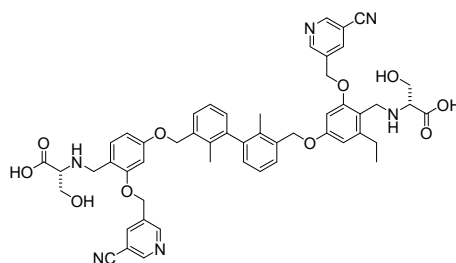
Synthesis of compound **27**

5-((3-Ethyl-2-formyl-5-((3'-((4-formyl-3-hydroxyphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-36a-1**)

Synthesized from intermediate **II-9** and 2-ethyl-4,6-dihydroxybenzaldehyde (**II-35a**, CAS RN[®] 39503-15-6) in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-36b-1**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane: AcOEt = 75:25 to 50:50) (67% yield).

Intermediate **II-36a** was synthesized from intermediate **II-36a-1** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-36b**. (55% yield).

(4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-ethylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-serine (**27**)



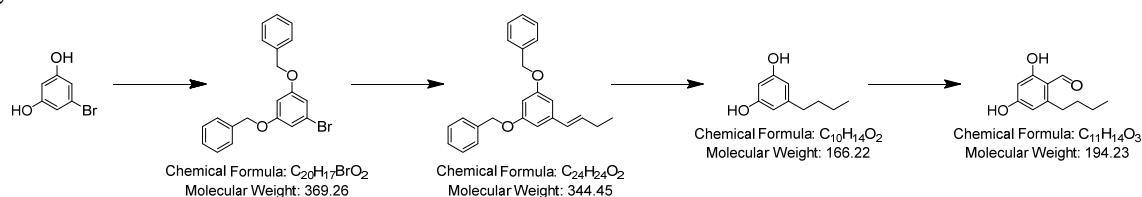
Chemical Formula: C₅₂H₅₂N₆O₁₀
Molecular Weight: 921.02

Synthesized from **II-36a** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (45%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 9.03 (2H, br s), 9.01 (2H, s), 8.53 (2H, s), 7.47 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 8.4

Hz), 7.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.10 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 6.87 (1H, s), 6.75-6.73 (2H, m), 6.64 (1H, s), 5.31 (2H, d, $J = 12.9$ Hz), 5.26 (2H, d, $J = 12.9$ Hz), 5.17 (4H, s), 4.12 (2H, br s), 4.10 (1H, d, $J = 13.8$ Hz), 4.03 (1H, d, $J = 13.2$ Hz), 3.81-3.71 (2H, m), 3.64-3.55 (2H, m), 3.20-3.13 (2H, m), 2.73-2.65 (2H, m), 2.00 (6H, s), 1.14 (3H, t, $J = 7.5$ Hz) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.30 min; MS (ESI): m/z 921 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **28**

Synthesis of Intermediate **II-35b**



((5-Bromo-1,3-phenylene)bis(oxy))bis(methylene)dibenzene (**II-30**)

To an ice-cooled mixture of 5-bromobenzene-1,3-diol (**II-29**, 5.27 g, 27.9 mmol) and K₂CO₃ (11.6 g, 84 mmol) in DMF (50 mL), benzyl bromide (7.64 ml, 64.2 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Water was added to the reaction mixture and extracted with *n*-hexane–AcOEt. The organic phase was washed with H₂O followed by brine, and concentrated. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane: AcOEt = 98:2 to 80:20) gave the titled compound (10.3 g, 27.8 mmol, 99% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.43-7.30 (10H, m), 6.77 (2H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.54 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 5.00 (4H, s). UPLC/MS Retention time = 2.12 min; MS (ESI): m/z 367, 369 [M-H]⁻.

(*E*)-(((5-(But-1-en-1-yl)-1,3-phenylene)bis(oxy))bis(methylene))dibenzene (**II-31b**)

To a stirred mixture of intermediate **II-30** (1.00 g, 2.71 mmol), 1-butenylboronic acid (0.406 g, 4.06 mmol), and K₃PO₄ (1.15 g, 5.42 mmol) in toluene (10 mL), SPhos Pd G1 (0.103 g, 0.135 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 100°C for 2.5 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®], washed with AcOEt, and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 98:2 to 80:20) to give the titled compound (913 mg, 2.65 mmol, 98 % yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.44-7.30 (10H, m), 6.61 (2H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.49 (1H, t, $J = 2.4$ Hz), 6.30 (1H, d, $J = 15.8$ Hz), 6.24 (1H, dt, $J = 15.8, 5.4$ Hz), 5.03 (4H, s), 2.22 (2H, dq, $J = 5.4, 7.5$ Hz), 1.08 (3H, t, $J = 7.5$ Hz). UPLC/MS Retention time = 2.20 min; MS (ESI): m/z 345 [M+H]⁺.

5-Butylbenzene-1,3-diol (**II-32b**)

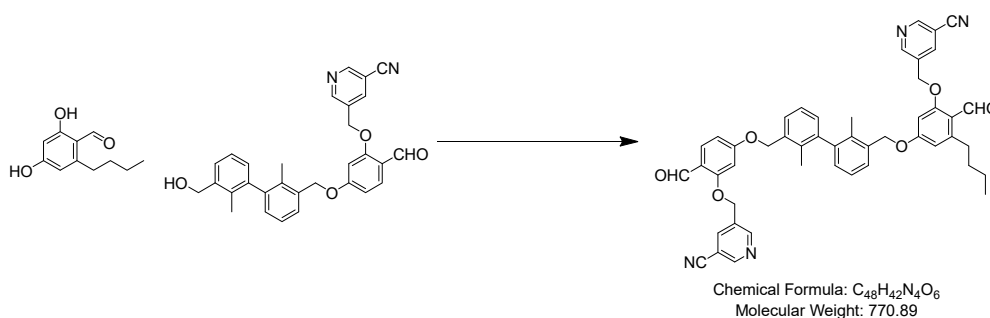
To a suspension of 5% Pd/C (281 mg, 50% water wet) in THF (20 mL), intermediate **II-31b** (910 mg, 2.64 mmol) was added and the reaction mixture was stirred under a H₂ atmosphere (1 atm) at room temperature for 4 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 50:50)

to give the titled compound (487 mg, 2.32 mmol, 88% yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.25-6.24 (2H, m), 6.18-6.17 (1H, m), 5.15-4.73 (1H, br m), 2.51-2.47 (2H, m), 1.60-1.48 (2H, m), 1.33 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz), 0.91 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). UPLC/MS Retention time = 1.26 min; MS (ESI): m/z 167 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Butyl-4,6-dihydroxybenzaldehyde (**II-35b**)

To an ice-cooled solution of intermediate **II-32b** (480 mg, 2.28 mmol) in DMF (5 mL), Vilsmeier reagent (380 mg, 2.97 mmol) was added under a N_2 atmosphere, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 6 days. The reaction mixture was quenched with ice-water. Then, 4.0 M NaOH(aq) (4.0 mL) was added at 0°C and the resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was cooled to 0°C and 2.0 M HCl(aq) (8.0 mL) was added. The mixture was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (n -hexane: AcOEt = 98:2 to 75:25) gave the titled compound (206 mg, 0.955 mmol, 42% yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 12.42 (1H, s), 10.08 (1H, s), 6.23 (2H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.22 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.62-5.56 (1H, br m), 2.83 (2H, dd, $J = 8.1, 7.6$ Hz), 1.66-1.58 (2H, m), 1.40 (2H, sext, $J = 7.5$ Hz), 0.94 (3H, t, $J = 7.5$ Hz). UPLC/MS Retention time = 1.45 min; MS (ESI): m/z 195 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthesis of intermediate **II-36b**



5-((3-Butyl-2-formyl-5-((3'-((4-formyl-3-hydroxyphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-36b-1**)

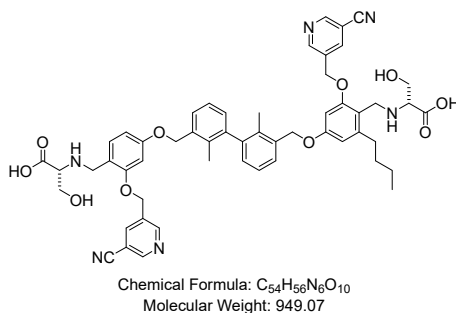
To an ice-cooled mixture of intermediate **II-9** (80 mg, 0.167 mmol), **II-35b** (43 mg, 0.201 mmol), and PPh_3 (66 mg, 0.251 mmol) in THF (0.8 mL) under a N_2 atmosphere, DIAD (0.039 mL, 0.201 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was concentrated and purified by silica-gel chromatography (n -hexane:AcOEt = 80:20 to 40:60) to give the titled compound (76 mg, 0.116 mmol, 69% yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 12.52 (1H, s), 10.34 (1H, s), 10.10 (1H, s), 8.91 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 8.90 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 8.10 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 7.91 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.42 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.29 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.29 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.18 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.16 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 6.77 (1H, dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.40 (2H, s), 5.23 (2H, s), 5.19 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 5.16 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 5.12 (2H, s), 2.84 (2H, dd, $J = 7.5, 8.4$ Hz), 2.07 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.67-1.59 (2H, m), 1.40 (2H, sext, $J = 7.5$ Hz).

Hz), 0.94 (3H, t, $J = 7.5$ Hz). UPLC/MS Retention time = 2.23 min; MS (ESI): m/z 655 $[M+H]^+$.

5-((3-Butyl-5-((3'-((3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-36b**)

To a mixture of intermediate **II-36b-1** (73 mg, 0.111 mmol) in DMF (0.73 mL), 5-(chloromethyl)nicotinonitrile (20 mg, 0.134 mmol) and K_2CO_3 (23 mg, 0.167 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 80°C for 1.5 h. The reaction mixture was directly loaded onto a reversed phase preparative chromatography column ($CH_3CN:0.1\% HCO_2H(aq) = 40:60$ to 100:0) and purified. Fractions containing target compound were concentrated under reduced pressure to give the titled compound as a pale brown solid (73 mg, 0.095 mmol, 85% yield). 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 10.53 (1H, s), 10.34 (1H, s), 8.91 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 8.90-8.88 (3H, m), 8.10 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 8.08 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 7.91 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.43 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.30 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.18 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 6.77 (1H, dd, $J = 8.7, 1.5$ Hz), 6.60 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.55 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.46 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 5.23 (2H, s), 5.19 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 5.19 (1H, d, $J = 13.5$ Hz), 5.19 (2H, s), 5.14 (1H, d, $J = 13.8$ Hz), 5.14 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 3.00 (2H, dd, $J = 7.8, 7.5$ Hz), 2.08 (3H, s), 2.07 (3H, s), 1.67-1.56 (2H, m), 1.42 (2H, sext, $J = 7.5$ Hz), 0.94 (3H, t, $J = 7.5$ Hz). UPLC/MS Retention time = 2.16 min; MS (ESI): m/z 771 $[M+H]^+$.

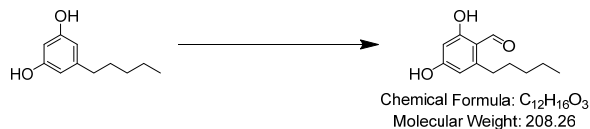
(4-((3'-((3-Butyl-4-(((*R*)-1-carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-5-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-serine (**28**)



Synthesized from **II-36b** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (42%). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ : 9.03 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 9.02 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 9.00 (2H, d, $J = 1.8$ Hz), 8.52 (2H, t, $J = 2.0$ Hz), 7.47 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.35 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.29 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.28 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.09 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.75 (1H, s), 6.74 (1H, dd, $J = 6.9, 2.3$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 5.32-5.24 (4H, m), 5.17 (4H, s), 4.16-4.02 (4H, m), 3.79 (1H, dd, $J = 11.3, 4.9$ Hz), 3.74 (1H, dd, $J = 11.8, 4.2$ Hz), 3.63 (1H, dd, $J = 11.1, 6.7$ Hz), 3.58 (1H, dd, $J = 11.1, 7.9$ Hz), 3.23-3.16 (2H, m), 2.73-2.61 (2H, m), 2.00 (6H, s), 1.46 (2H, quint, $J = 7.2$ Hz), 1.33 (2H, sext, $J = 7.2$ Hz), 0.89 (3H, t, $J = 7.3$ Hz) (protons of NH, OH, and CO_2H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.39 min; MS (ESI): m/z 949 $[M+H]^+$.

Synthesis of compound **29**

2,4-Dihydroxy-6-pentylbenzaldehyde (**II-35c**)



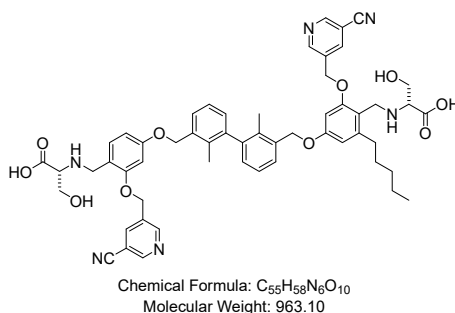
Synthesized from olivetol (**II-32c**, CAS RN[®] 500-66-3) according to the procedure for the synthesis of **II-35b**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 20:80) (48% yield). UPLC/MS Retention time = 1.56 min; MS (ESI): *m/z* 209 [M+H]⁺.

5-((2-formyl-5-((3'-((4-formyl-3-hydroxyphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-3-pentylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-36c-1**)

Synthesized from intermediate **II-9** and **II-35c** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-36b-1**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane: AcOEt = 80:20 to 50:50) (65% yield).

Intermediate **II-36c** was synthesized from intermediate **II-36c-1** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-36b**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 30:70 to 100:0) (83% yield).

4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-pentylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-serine (**29**)



Synthesized from **II-36c** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (34%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.03 (2H, br s), 9.01 (2H, s), 8.53 (2H, s), 7.47 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.28 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.10 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.87 (1H, s), 6.75-6.73 (2H, m), 6.61 (1H, s), 5.33-5.24 (4H, m), 5.17 (4H, s), 4.12 (2H, s), 4.11 (1H, d, *J* = 13.5 Hz), 4.03 (1H, d, *J* = 13.5 Hz), 3.79 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.2 Hz), 3.73 (1H, dd, *J* = 11.7, 4.2 Hz), 3.65-3.55 (2H, m), 3.20-3.14 (2H, m), 2.70-2.61 (2H, m), 2.00 (6H, s), 1.50-1.46 (2H, m), 1.32-1.27 (4H, m), 0.86 (3H, t, *J* = 6.9 Hz) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.46 min; MS (ESI): *m/z* 963 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **30**

Intermediate **II-31d** was prepared from intermediate **II-30** and *trans*-(3,3-dimethylbuten-1-yl)boronic acid pinacol ester in the same procedure for the synthesis of intermediate **II-31b**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 98:2 to 80:20) and obtained as a mixture with unknown impurities which was used in the next step without further purification. UPLC/MS Retention time = 2.29 min; MS (ESI): *m/z* 373 [M+H]⁺.

Intermediate **II-32d** was prepared from intermediate **II-31d** in the same procedure for the synthesis of intermediate **II-32b**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 50:50) (92% yield for two steps). UPLC/MS Retention time = 1.42 min; MS (ESI): *m/z* 195 [M+H]⁺.

2-(3,3-dimethylbutyl)-4,6-dihydroxybenzaldehyde (**II-35d**)

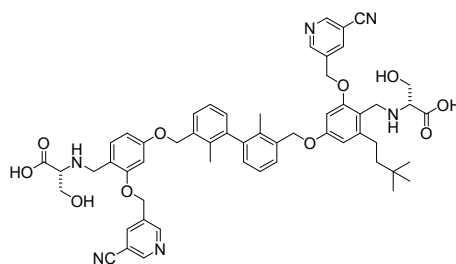
Synthesized from intermediate **II-32d** in the same procedure for the synthesis of intermediate **II-35b**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 95:5 to 75:25) (48% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 12.39 (1H, s), 10.06 (1H, s), 6.23 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.21 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 5.55-5.51 (1H, m), 2.79 (1H, dd, *J* = 8.4, 4.8 Hz), 2.78 (1H, dd, *J* = 8.4, 4.8 Hz), 1.51 (1H, dd, *J* = 8.4, 4.8 Hz), 1.50 (1H, dd, *J* = 8.4, 4.8 Hz), 0.98 (9H, s). UPLC/MS Retention time = 1.62 min; MS (ESI): *m/z* 223 [M+H]⁺.

5-((5-((3'-((3-(3,3-Dimethylbutyl)-4-formyl-5-hydroxyphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-36d-1**)

Synthesized from intermediate **II-9** and **II-35d** in the same procedure for the synthesis of intermediate **II-36b-1**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 80:20 to 40:60) (63% yield). UPLC/MS Retention time = 2.33 min; MS (ESI): *m/z* 683 [M+H]⁺.

Intermediate **II-36d** was synthesized from intermediate **II-36d-1** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-36b**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 40:60 to 100:0) (71% yield).

(4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-(3,3-dimethylbutyl)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-serine (**30**)

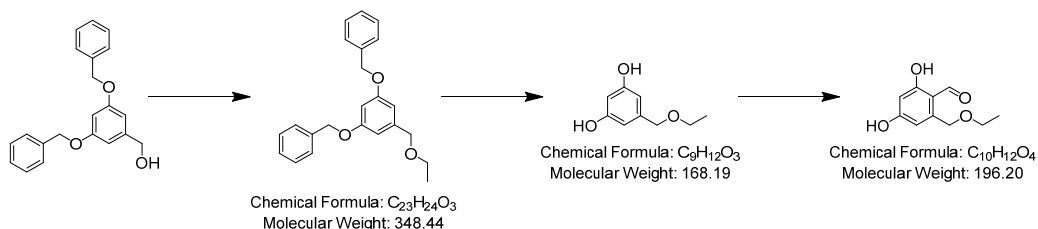


Chemical Formula: C₅₆H₆₀N₆O₁₀
Molecular Weight: 977.13

Synthesized from **II-36d** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (7%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.04 (2H, br s), 9.02 (2H, br s), 9.01 (2H, s), 8.53 (2H, s), 7.47 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.28 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.10 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 6.87 (1H, s), 6.75-6.72 (2H, m), 6.61 (1H, s), 5.33-5.24 (4H, m), 5.17 (4H, s), 4.10 (1H, d, *J* = 14.3 Hz), 4.09 (2H, s), 4.03 (1H, d, *J* = 13.8 Hz), 3.79 (1H, dd, *J* = 11.4, 3.9 Hz), 3.73 (1H, dd, *J* = 11.4, 3.9 Hz), 3.64-3.54 (2H, m), 3.19-3.13 (2H, m), 2.67-2.58 (2H, m), 2.00 (6H, s), 1.34 (2H, t, *J* = 8.7 Hz), 0.94 (9H, s) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.49 min; MS (ESI): *m/z* 977 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **31**

Synthesis of Intermediate **II-35e**



(((5-(Ethoxymethyl)-1,3-phenylene)bis(oxy))bis(methylene))dibenzene (**II-34**)

To an ice-cooled suspension of sodium hydride (0.249 g, 6.23 mmol, 60% oil suspension) in CPME (20 mL), (3,5-bis(benzyloxy)phenyl)methanol (**II-33**, 2.00 g, 6.24 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 min. The reaction mixture was cooled to 0°C and iodoethane (0.710 ml, 8.74 mmol) was dropwise added. The reaction mixture was gradually warmed to room temperature and stirred for 1 h. DMF (10 mL), sodium hydride (83 mg, 2.08 mmol, 60% oil suspension), and iodoethane (252 μL, 3.12 mmol) were added and the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was quenched with water at room temperature, and the mixture was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 98:2 to 80:20) gave the titled compound (2.20 g, 5.93 mmol, 95% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.43-7.30 (10H, m), 6.61 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.54 (1H, t, *J* = 2.4 Hz), 5.03 (4H, s), 4.45 (2H, s), 3.51 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.23 (3H, t, *J* = 7.2 Hz). UPLC/MS Retention time = 2.02 min; MS (ESI): *m/z* 349 [M+H]⁺.

5-(Ethoxymethyl)benzene-1,3-diol (**II-32e**)

To a suspension of 5% Pd-C (400 mg, 50% water wet) in MeOH (40 mL), **II-34** (2.0 g, 5.74 mmol) was added and the reaction mixture was stirred under a H₂ atmosphere (1 atm) at room temperature for 7 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 50:50) to give the titled compound (866 mg, 4.02 mmol, 70% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 6.42-6.39 (2H, m), 6.26-6.24

(1H, m), 5.47-5.09 (2H, br m), 4.41 (2H, s), 3.58-3.52 (2H, m), 1.25 (3H, t, $J = 6.9$ Hz). UPLC/MS Retention time = 0.71 min; MS (ESI): m/z 169 $[M+H]^+$.

2-(Ethoxymethyl)-4,6-dihydroxybenzaldehyde (**II-35e**)

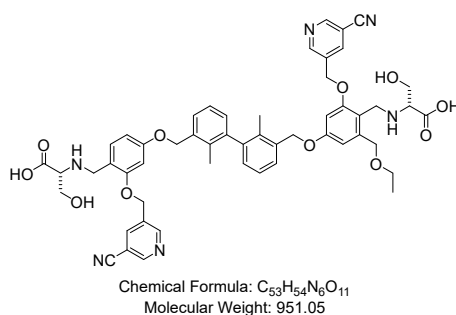
Synthesized from **II-32e** according to the procedure for the synthesis of **II-35b**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane: AcOEt = 95:5 to 60:40) (29% yield). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 12.36 (1H, s), 10.12 (1H, s), 6.41 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.31 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.92-5.76 (1H, m), 4.67 (2H, br s), 3.58 (2H, q, $J = 6.9$ Hz), 1.25 (3H, t, $J = 6.9$ Hz). UPLC/MS Retention time = 0.64 min; MS (ESI): m/z 195 $[M-H]^-$.

5-(((5-((3'-((3-(Ethoxymethyl)-4-formyl-5-hydroxyphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-36e-1**)

Synthesized from intermediate **II-9** and **II-35e** in the same procedure for the synthesis of intermediate **II-36b-1**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane: AcOEt = 80:20 to 40:60) (56% yield). UPLC/MS Retention time = 2.08 min; MS (ESI): m/z 657 $[M+H]^+$.

Intermediate **II-36e** was synthesized from intermediate **II-36e-1** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-36b**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH_3CN :0.1% HCO_2H (aq) = 30:70 to 100:0) (89% yield). UPLC/MS Retention time = 2.03 min; MS (ESI): m/z 773 $[M+H]^+$.

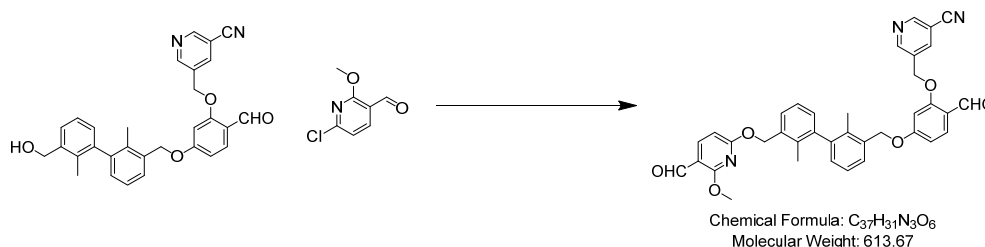
4-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-5-(ethoxymethyl)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-serine (**31**)



Synthesized from **II-36e** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (69%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.03 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 9.02 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 9.01 (2H, d, $J = 2.1$ Hz), 8.56 (1H, t, $J = 2.0$ Hz), 8.53 (1H, t, $J = 2.0$ Hz), 7.47 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.35 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.29 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.10 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 6.88 (2H, dd, $J = 6.5, 2.1$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.74 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz), 5.33-5.24 (4H, m), 5.19 (2H, s), 5.17 (2H, s), 4.57-4.46 (2H, m), 4.21-4.02 (4H, m), 3.77-3.71 (2H, m), 3.65-3.59 (2H, m), 3.57-3.50 (2H, m), 3.22 (1H, dd, $J = 6.9, 4.6$ Hz), 3.15 (1H, dd, $J = 4.6, 6.5$ Hz), 2.00 (6H, s), 1.16 (3H, t, $J = 6.9$ Hz) (protons of NH, OH, and CO_2H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.30 min; MS (ESI): m/z 951 $[M+H]^+$.

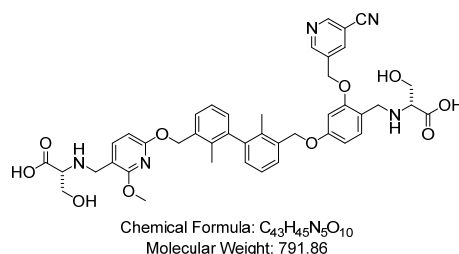
Synthesis of compound **32**

5-((2-Formyl-5-((3'-(((5-formyl-6-methoxypyridin-2-yl)oxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)nicotinonitrile (**II-38a**)



Intermediate **II-9** (50 mg, 0.104 mmol), 6-chloro-2-methoxynicotinaldehyde (**II-37a**, 22 mg, 0.125 mmol), CS_2CO_3 (136 mg, 0.418 mmol), Xantphos (12.1 mg, 0.021 mmol), and $Pd(OAc)_2$ (2.3 mg, 10.5 μ mol) were added to toluene (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 110°C under an Ar atmosphere for 18 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®], and evaporated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 20:80) to give the titled compound (54 mg, 0.076 mmol, 72% yield). ¹H NMR ($CDCl_3$) δ : 10.34 (1H, d, J = 0.6 Hz), 10.22 (1H, d, J = 0.6 Hz), 8.91 (1H, d, J = 2.1 Hz), 8.90 (1H, d, J = 2.1 Hz), 8.10 (1H, t, J = 2.1 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.91 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.45 (1H, dd, J = 7.5, 1.2 Hz), 7.42 (1H, dd, J = 7.5, 1.2 Hz), 7.29 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.27 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.18 (1H, dd, J = 7.8, 1.2 Hz), 7.15 (1H, dd, J = 7.8, 1.2 Hz), 6.77 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Hz), 6.61 (1H, d, J = 2.1 Hz), 6.46 (1H, dd, J = 8.4, 0.6 Hz), 5.53 (1H, d, J = 12.9 Hz), 5.50 (1H, d, J = 12.9 Hz), 5.23 (2H, s), 5.19 (1H, d, J = 11.1 Hz), 5.16 (1H, d, J = 11.4 Hz), 4.08 (3H, s), 2.09 (3H, s), 2.07 (3H, s). UPLC/MS Retention time = 2.04 min; MS (ESI): m/z 614 $[M+H]^+$.

((6-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-methoxypyridin-3-yl)methyl)-D-serine (**32**)



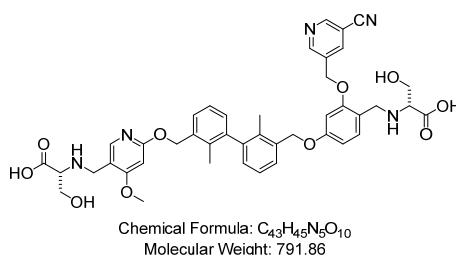
Synthesized from **II-38a** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (52%). ¹H NMR ($DMSO-d_6$) δ : 9.03 (1H, s), 9.01 (1H, s), 8.53 (1H, s), 7.71 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.46 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.35 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.27 (2H, td, J = 7.7, 3.4 Hz), 7.08 (2H, t, J = 6.6 Hz), 6.87 (1H, s), 6.74

(1H, d, $J = 6.9$ Hz), 6.48 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.43 (2H, s), 5.31 (1H, d, $J = 12.6$ Hz), 5.26 (1H, d, $J = 12.6$ Hz), 5.17 (2H, s), 4.11 (1H, d, $J = 13.2$ Hz), 4.04 (1H, d, $J = 13.2$ Hz), 3.94-3.86 (2H, m), 3.90 (3H, s), 3.76-3.68 (2H, m), 3.65-3.59 (2H, m), 3.17-3.14 (2H, m), 2.02 (3H, s), 1.99 (3H, s) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.21 min; MS (ESI): m/z 792 [M+H]⁺.

Synthesis of compound **33**

Intermediate **II-38b** was synthesized from intermediate **II-9** and **II-37b** in a similar procedure for the synthesis of intermediate **II-38a**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 85:15 to 20:80) (42% yield). UPLC/MS Retention time = 1.93 min; MS (ESI): m/z 614 [M+H]⁺.

((6-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-4-methoxypyridin-3-yl)methyl)-D-serine (**33**)



Synthesized from **II-38b** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (32%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.02 (1H, s), 9.01 (1H, s), 8.53 (1H, s), 8.00 (1H, s), 7.46 (1H, d, $J = 6.6$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 6.3$ Hz), 7.35 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.30-7.25 (2H, m), 7.09 (1H, d, $J = 5.7$ Hz), 7.08 (1H, d, $J = 6.3$ Hz), 6.87 (1H, s), 6.74 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.54 (1H, s), 5.40 (2H, s), 5.31 (1H, d, $J = 12.6$ Hz), 5.26 (1H, d, $J = 12.6$ Hz), 5.17 (2H, s), 4.11 (1H, d, $J = 13.2$ Hz), 4.04 (1H, d, $J = 13.2$ Hz), 3.91 (2H, br s), 3.85 (3H, s), 3.72 (2H, dt, $J = 4.2, 12.3$ Hz), 3.65-3.59 (2H, m), 3.19-3.15 (2H, m), 2.00 (6H, s) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). UPLC/MS Retention time = 1.17 min; MS (ESI): m/z 792 [M+H]⁺.

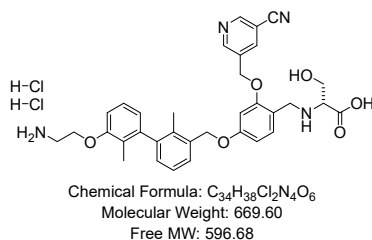
Synthesis of compound **34**

Intermediate **III-3a** was synthesized from intermediate **III-1a** and **II-17** by applying Step1. of the procedure for the synthesis of **III-4d**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 97:3 to 100:0) (76% yield). UPLC/MS Retention time = 1.93 min; MS (ESI): m/z 378 [M+H]⁺.

Intermediate **III-4a** was synthesized from intermediate **III-3a** and **I-4** according to the procedure for

the synthesis of **II-31b**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) (91% yield). UPLC/MS Retention time = 1.95 min; MS (ESI): *m/z* 608 [M+H]⁺.

(4-((3'-(2-Aminoethoxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine dihydrochloride (**34**)



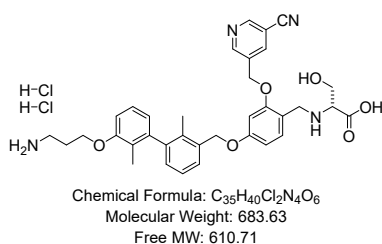
Synthesized from **III-4a** according to the procedure for the synthesis of **37**. Yield (100%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.08 (br s, 1H), 9.03 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.47 (s, 1H), 8.12 (br s, 2H), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.27 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.24 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.06 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.88 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.2 Hz), 6.73 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 5.30 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.26 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.20 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz), 5.16 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz), 4.24-4.19 (m, 4H), 3.90-3.82 (m, 2H), 3.72-3.47 (m, 1H), 3.29-3.25 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.91 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.12 min; MS (ESI): *m/z* 597 [M+H]⁺ (as a free form).

Synthesis of compound **35**

Intermediate **III-3b** was synthesized from intermediate **III-1b** and **II-17** by applying Step 1. of the procedure for the synthesis of **III-4d**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 83:17 to 50:50) (87% yield).

Intermediate **III-4b** was synthesized from intermediate **III-3b** and **I-4** according to the procedure for the synthesis of **II-9**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 80:20 to 50:50) (90% yield).

(4-((3'-(3-Aminopropoxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine dihydrochloride (**35**)



Synthesized from **III-4b** according to the procedure for the synthesis of **37**. Yield (84%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.06 (br s, 1H), 9.02 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.47 (s, 1H), 7.91 (br s, 2H), 7.45 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.27 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.23 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.06 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.88 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.1, 2.1 Hz), 6.69 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.58 (br s, 1H), 5.30 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz), 5.26 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz), 5.21-5.14 (m, 2H), 4.24-4.19 (m, 2H), 4.14-4.08 (m, 3H), 3.93-3.79 (m, 2H), 3.04-2.97 (m, 2H), 2.07 (quint, 2H, *J* = 6.9 Hz), 2.00 (s, 3H), 1.85 (br s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.15 min; MS (ESI): *m/z* 611 [M+H]⁺ (as a free form).

Synthesis of compound **36**

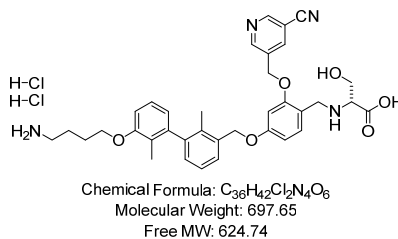
tert-butyl (4-(3-bromo-2-methylphenoxy)butyl)carbamate (**III-3c-1**)

Synthesized from intermediate **III-1c** and **III-2** by applying Step1. of the procedure for the synthesis of **III-4d**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 98:2 to 80:20) (94% yield). UPLC/MS Retention time = 1.96 min; MS (ESI): *m/z* 258, 260 [M+H-100]⁺, 302, 304 [M+H-56]⁺.

Intermediate **III-3c** was synthesized from intermediate **III-1c** and **III-2** by applying Step2. of the procedure for the synthesis of **III-4d**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 98:2 to 80:20) (95% yield). UPLC/MS Retention time = 2.04 min; MS (ESI): *m/z* 406 [M+H]⁺.

Intermediate **III-4c** was synthesized from intermediate **III-3c** and **I-4** according to the procedure for the synthesis of **II-9**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) (87% yield). UPLC/MS Retention time = 2.03 min; MS (ESI): *m/z* 636 [M+H]⁺.

(4-((3'-(4-Aminobutoxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine dihydrochloride (**36**)

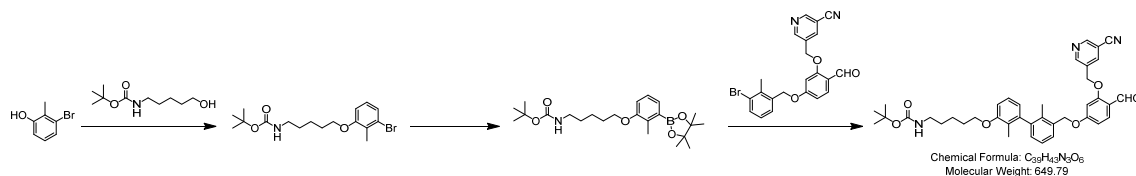


Synthesized from **III-4c** according to the procedure for the synthesis of **37**. Yield (97%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.11 (br s, 1H), 9.01 (s, 2H), 8.48-8.47 (m, 1H), 7.98 (s, 2H), 7.44 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.20 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz), 6.96 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.75 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.2 Hz), 6.66 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.9

Hz), 5.25 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz), 5.19-5.13 (m, 2H), 4.23-4.17 (m, 2H), 4.06-3.97 (m, 2H), 3.91-3.79 (m, 3H), 2.88-2.82 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.82-1.72 (m, 4H). UPLC/MS Retention time = 1.20 min; MS (ESI): m/z 625 $[M+H]^+$ (as a free form).

Synthesis of compound **37**

Synthesis of intermediate **III-4d**



Step1. *tert*-Butyl (5-(3-bromo-2-methylphenoxy)pentyl)carbamate (**III-3d-1**)

Synthesized from 3-bromo-2-methylphenol (**III-2**) and *tert*-butyl (5-hydroxypentyl)carbamate (**III-1d**) according to the procedure for the synthesis of **II-11f**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 98:2 to 80:20) (92% yield). UPLC/MS Retention time = 2.03 min; MS (ESI): m/z 272, 274 $[M+H-100]^+$, 316, 318 $[M+H-56]^+$.

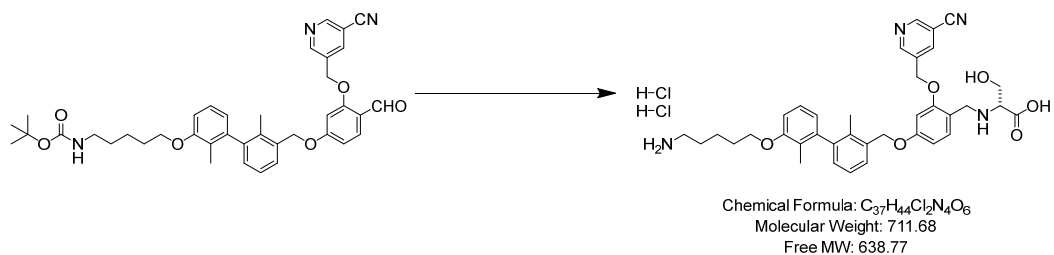
Step2. *tert*-Butyl (5-(2-methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenoxy)pentyl)carbamate (**III-3d**)

To a 10–20 mL microwave vial, intermediate **III-3d-1** (700 mg, 1.73 mmol), bis(pinacolato)diboron (483 mg, 1.90 mmol), PCy₃ (73 mg, 0.259 mmol), Pd₂(dba)₃ (79 mg, 0.086 mmol), potassium acetate (170 mg, 2.59 mmol), and 1,4-dioxane (12.0 mL) were added and the reaction mixture was stirred for 5 h under microwave irradiation (Biatage Initiator+, 120°C). The reaction mixture was filtered through Celite[®], then filtrate was evaporated. Chromatographic purification on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 98:2 to 80:20) afforded the titled compound (720 mg, 1.52 mmol, 88% yield). UPLC/MS Retention time = 2.11 min; MS (ESI): m/z 420 $[M+H]^+$.

Step3. *tert*-Butyl (5-((3'-((3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-formylphenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pentyl)carbamate (**III-4d**)

Synthesized from intermediate **III-3d** and **I-4** according to the procedure for the synthesis of **II-9**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) (94% yield). UPLC/MS Retention time = 2.25 min; MS (ESI): m/z 650 $[M+H]^+$.

(4-((3'-((5-Aminopentyl)oxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine dihydrochloride (**37**)



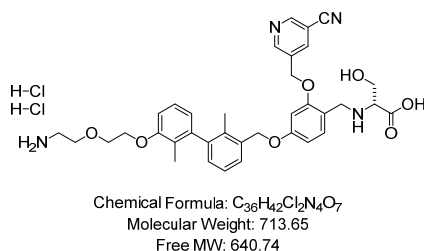
Step1. 4-((3'-((5-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)pentyl)oxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**37'**) was synthesized from **III-4d** according to the procedure for the synthesis of compound **18**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) (93% yield). UPLC/MS Retention time = 1.75 min; MS (ESI): *m/z* 739 [M+H]⁺.

Step2. To a mixture of **37'** (180 mg, 0.201 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 ml), trifluoroacetic acid (2.0 ml) was added at room temperature. The reaction mixture was stirred for 1 h, and it was concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in AcOEt, and 4.0 M HCl/AcOEt was added to the solution to give white precipitate. Solid was collected by filtration, and dried under reduced pressure to give compound **37** as a white solid (114 mg, 0.16 mmol, 79% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.10 (br s, 1H), 9.01 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 9.00 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 8.47-8.46 (m, 1H), 7.87 (br s, 1H), 7.44-7.42 (m, 2H), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.19 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.05 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.94 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.76 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.2 Hz), 6.65 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 5.28 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 5.24 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz), 5.19-5.13 (m, 2H), 4.21-4.18 (m, 2H), 4.03-3.95 (m, 2H), 3.89-3.77 (m, 3H), 2.82-2.74 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.80-1.74 (m, 2H), 1.66-1.58 (m, 2H), 1.53-1.46 (m, 2H). UPLC/MS Retention time = 1.28 min; MS (ESI): *m/z* 639 [M+H]⁺ (as a free form).

Synthesis of compound **38**

Intermediate **III-6** was synthesized from intermediate **III-5** and **II-18** in a similar procedure for the synthesis of **III-8a**. The product was purified on reversed phase preparative chromatography (CH₃CN:0.1% HCO₂H(aq) = 15:85 to 100:0) (45% yield). UPLC/MS Retention time = 1.95 min; MS (ESI): *m/z* 652 [M+H]⁺.

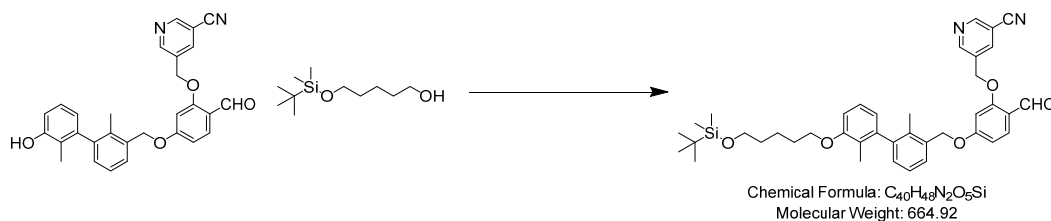
4-((3'-((2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine dihydrochloride (**38**)



Synthesized from **III-6** according to the procedure for the synthesis of **37**. Yield (84%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.20 (br s, 1H), 9.11 (br s, 1H), 9.01 (d, 2H, *J* = 2.1 Hz), 8.48 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.05 (br s, 3H), 7.45 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.44 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.21 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.05 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.75 (dd, 1H, *J* = 8.2, 2.2 Hz), 6.68 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz), 5.25 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz), 5.18 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz), 5.15 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz), 4.23-4.12 (m, 4H), 3.93-3.79 (m, 5H), 3.71 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz), 3.01-2.94 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.84 (s, 3H). UPLC/MS Retention time = 1.14 min; MS (ESI): *m/z* 641 [M+H]⁺ (as a free form).

Synthesis of compound **39**

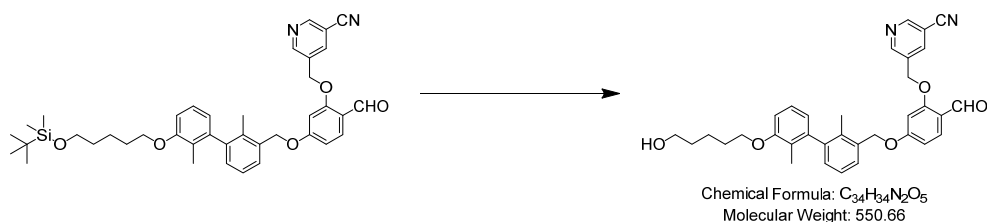
5-((5-((3'-((5-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)pentyl)oxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)methyl)nicotinonitrile (**III-8a**)



To a stirred mixture of **II-18** (200 mg, 0.431 mmol), 5-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-pentanol (**III-7**, CAS RN[®] 83067-20-3, 0.159 mL, 0.646 mmol), and PPh₃ (158 mg, 0.603 mmol) in THF (4.0 mL) under a N₂ atmosphere, DIAD (0.117 mL, 0.603 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 92:8 to 40:60) to give the titled compound (54% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.33 (s, 1H), 8.91 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.90 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.11 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.4 Hz), 7.27 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.18 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.16 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.4 Hz), 6.85 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.2 Hz), 6.72 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.61 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 5.22 (s, 2H), 5.19 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 5.15 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 4.07-3.97 (m, 2H), 3.65 (t, 2H, *J* = 5.9 Hz), 2.07 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.86 (quint, 2H, *J* = 7.6 Hz), 1.64-1.53 (m, 2H), 0.89 (s, 9H), 0.05 (s, 6H). UPLC/MS Retention time = 2.57 min; MS (ESI): *m/z* 665 [M+H]⁺.

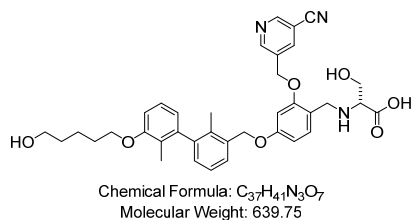
5-((2-Formyl-5-((3'-((5-hydroxypentyl)oxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenoxy)-

methyl)nicotinonitrile (**III-8b**)



To a stirred mixture of **III-8a** (260 mg, 0.235 mmol) in THF (5 mL), 1.0 M TBAF in THF (0.704 mL, 0.704 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. Water was added to the reaction mixture and it was extracted with AcOEt. The organic phase was washed with H_2O , dried over $MgSO_4$, and concentrated. The resulting residue was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 92:8 to 40:60) to give the titled compound (93 mg, 0.169 mmol, 72% yield). 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 10.33 (s, 1H), 8.91 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.90 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.10 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.90 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.39 (dd, 1H, $J = 7.6, 1.2$ Hz), 7.27 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.18 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.16 (dd, 1H, $J = 7.6, 1.2$ Hz), 6.85 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.77 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.2$ Hz), 6.73 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 6.60 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 5.22 (s, 2H), 5.19 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz), 5.15 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz), 4.08-3.99 (m, 2H), 3.71-3.69 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.91-1.85 (m, 2H), 1.71-1.58 (m, 4H). UPLC/MS Retention time = 1.84 min; MS (ESI): m/z 551 $[M+H]^+$.

(2-((5-Cyanopyridin-3-yl)methoxy)-4-((3'-((5-hydroxypentyl)oxy)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)benzyl)-D-Serine (**39**)

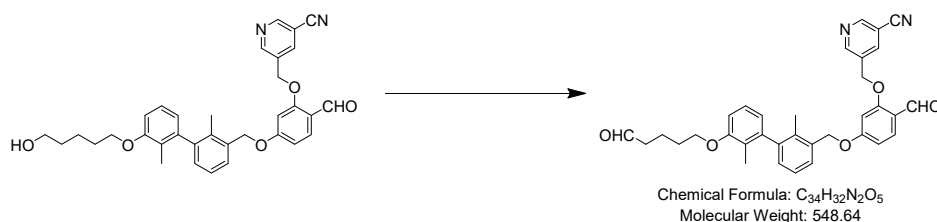


Synthesized from **III-8b** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (41%). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ : 9.03 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 9.01 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.53 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.44 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.34 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.26 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.20 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.06 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 6.95 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 6.86 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.73 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.3$ Hz), 6.66 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 5.31 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz), 5.26 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz), 5.17 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 5.14 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 4.11-3.97 (m, 4H), 3.72 (dd, 1H, $J = 11.2, 4.6$ Hz), 3.61 (dd, 1H, $J = 11.2, 6.8$ Hz), 3.43-3.40 (m, 2H), 3.14-3.11 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.78-1.75 (m, 2H), 1.51-1.47 (m, 4H). UPLC/MS Retention time = 1.43 min; MS (ESI): m/z 640 $[M+H]^+$.

Synthesis of compound **40**

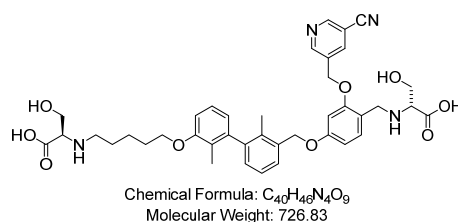
5-((5-((2,2'-Dimethyl-3'-((5-oxopentyl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-formylphenoxy)meth-

yl)nicotinonitrile (**III-8c**)



Synthesized from **III-8b** according to the procedure for the synthesis of **II-27**. The product was purified on silica-gel chromatography (*n*-hexane:AcOEt = 90:10 to 30:70) (75% yield). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.33 (s, 1H), 9.82 (t, 1H, *J* = 1.6 Hz), 8.91 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.90 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.10 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 7.27 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.21-7.15 (m, 2H), 6.84 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.77 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 6.74 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.60 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 5.22 (s, 2H), 5.19 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 5.15 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 4.07-4.01 (m, 2H), 2.59-2.55 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.90-1.87 (m, 4H). UPLC/MS Retention time = 1.94 min; MS (ESI): *m/z* 549 [M+H]⁺.

(5-((3'-((4-(((*R*)-1-Carboxy-2-hydroxyethyl)amino)methyl)-3-((5-cyanopyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-2,2'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pentyl)-D-Serine (**40**)



Synthesized from **III-8c** according to the procedure for the synthesis of **18**. Yield (55%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.01 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.99 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.50 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.24 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.18 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.04 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 6.94 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.85 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 6.71 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.2 Hz), 6.65 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz), 5.25 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz), 5.16 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz), 5.13 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz), 4.09-3.96 (m, 4H), 3.77-3.70 (m, 2H), 3.64 (dd, 1H, *J* = 11.4, 7.0 Hz), 3.61 (dd, 1H, *J* = 11.4, 6.6 Hz), 3.20 (dd, 1H, *J* = 6.6, 4.4 Hz), 3.16-3.13 (m, 1H), 2.90-2.86 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.79-1.73 (m, 2H), 1.71-1.65 (m, 2H), 1.50-1.44 (m, 2H) (protons of NH, OH, and CO₂H groups are not displayed). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 168.47, 167.50, 160.02, 157.08, 156.55, 152.35, 151.75, 142.08, 141.56, 138.91, 134.91, 134.27, 132.90, 132.00, 129.02, 127.76, 126.16, 125.27, 123.66, 121.13, 116.75, 114.70, 109.96, 108.92, 106.35, 100.51, 68.59, 67.21, 66.42, 63.19, 62.08, 60.25, 59.95, 45.98, 45.03, 28.27, 25.45, 22.78, 15.17, 12.66. UPLC/MS Retention time = 1.18 min; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₄₀H₄₇N₄O₉, [M+H]⁺ 727.3338, found 727.3324 [M+H]⁺.

Calculation of non-polar surface area (NPSA)

All the calculation were performed using MOE2015.1001 (Chemical Computing Group (CCG), Montreal, Canada). Chemical structures of benzene, toluene, chlorobenzene, and bromobenzene were generated in MOE. PEOE_VSA_HYD* descriptors for each compound were calculated as 99.1, 116.4, 116.7, and 128.5, respectively. Non-polar surface areas of -Me, -Cl, and -Br groups were calculated by subtracting the PEOE_VSA_HYD value of benzene as a reference molecule from PEOE_VSA_HYD values of toluene, chlorobenzene, and bromobenzene.

* PEOE_VSA_HYD describes the total hydrophobic van der Waals surface area. This is the sum of the v_i such that $|q_i|$ is less than or equal to 0.2. The v_i are calculated using a connection table approximation.

Calculation of strain energy for linkers

Strain energy of the compounds **1**, **24**, **25**, and **26** were calculated based on the complex model created from Protein Data Bank (PDB): 6RPG coordinate. Hydrogen atoms were added to 6RPG using the protein preparation facility in Schrödinger Suite. The two terminal N-(2-(methylamino)ethyl)acetamide groups and two methyl groups in the 1,3-dimethoxy-6-methylphenyl groups of the compound (PDB Chemical Component ID: KDW) were eliminated. Binding site of the modified complex was energy minimized using the substructure facility in MacroModel with OPLS3e force field in combination with the Generalized Born/Surface Area (GB/SA) continuum water solvation model at the following condition: the ligand was freely moved, a shell with a radius of 5 Å from the ligand was constrained with a force field constant of 200 kJ/mol·Å² and the outer shell with a radius of 5 Å surrounding the constrained area was fixed. For the complex model of the compounds **1**, **24**, **25**, and **26**, linker part of the resultant structure above was modified as in the respective compounds. The binding site of the complex were then energy minimized again according to the above procedure. Strain energy of the compounds were calculated from the difference between the energy of the lowest energy conformer of the conformation sampling and current energy of the compound in the complex. Conformation sampling was performed using the mixed torsional/low mode sampling in MacroModel. The maximum number of total steps for conformational search was 10,000, energy window for saving structure was set at 42.0 kJ/mol and RMSD cutoff for eliminating the redundant conformer was set at 0.2 Å. Each enumerated conformation was energy minimized using the OPLS3e force field in combination with the Generalized Born/Surface Area (GB/SA) continuum water solvation model. Current energy of the ligand in the complex model was calculated by current energy facility in MacroModel. All the calculation were performed using Schrödinger Suite 2019-3.

Surface plasmon resonance (SPR) assay

SPR experiments were conducted using a Biacore T200 system (GE Healthcare, Little Chalfont,

Buckinghamshire, UK). hPD-L1-Fc (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA) was immobilized on a CM5 sensor chip (GE Healthcare) at 25°C using standard amine coupling chemistry at a flow rate of 10 μ L/min. HBS-EP+ (GE Healthcare) was used as a running buffer for immobilization. The dextran surface was activated by a 7 min injection of a mixture of 0.1 M N-hydroxysuccinimide (NHS) and 0.4 M N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) followed by an injection of PD-L1-Fc in 50 mM sodium acetate, pH 5.0. To minimize mass transport effects, the targeted immobilization amount was set to 600 RU. All unreacted groups on the surface were blocked by a 7 min injection of 1 M ethanolamine, pH 8.5.

Compound binding experiments were carried out using the single-cycle or multi-cycle kinetics method. HBS-EP+ containing 5% DMSO was used as a running buffer for binding experiments. Compounds were solubilized in 100% DMSO in a stock concentration of up to 10 mM and then diluted further in DMSO and running buffer. Compounds were injected for 2 min at a flow rate of 30 μ L/min followed by a 10–300 min dissociation. To obtain binding constants, the measured raw data were DMSO corrected, double-referenced, and fitted to a 1:1 binding model including a mass transfer limitation term using Biacore Evaluation software (GE Healthcare).

PD-1/PD-L1 blockade bioassay

PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay was carried out using the Kit containing all cells and reagents (Promega, Madison, WI, USA) following protocols recommended by the manufacturer. One vial (0.5 mL) of PD-L1 aAPC/CHO-K1 Cells or aAPC/CHO-K1 Cells (PD-L1 Negative Cells) was added to 14.5 mL of cell recovery medium (90% Ham's F-12, 10% FBS) and cell suspension (25 μ L) was transferred to 384-well white, flat-bottom assay plates (Corning Cat.# 3570, NY, USA) 18 h prior to the assay. On the day of the assay, serial dilutions of the test compounds were prepared in DMSO and then further diluted by 1,000-fold in fresh assay buffer for a final DMSO concentration of 0.1%. Serial dilutions of the anti-PD-1 antibody were also prepared in assay buffer. Culture medium was removed and anti-PD-1 (Promega, 10 μ L) or test compounds (10 μ L) in assay buffer (99% RPMI 1640, 1% FBS) was added to the assay plates. One vial (0.5 mL) of PD-1 Effector Cells was added to 5.9 mL of assay buffer and an aliquot (10 μ L) of cell suspension was transferred to the assay plates. After 6 h incubation, Bio-Glo Reagent (20 μ L) was added and incubated at ambient temperature for 10 min. Luminescence was measured by EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). EC₅₀ values and maximal luminescence values (RLU_{max}) were determined by fitting the Hill equation to the experimental data.

Mixed lymphocyte reaction (MLR) assay

CD4⁺ T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) using a CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Dendritic

cells (DCs) were generated by culturing monocytes isolated from a healthy volunteer's peripheral blood using LymphoprepTM and a Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for 6 days with 20 ng/mL interleukin-4 (IL-4) and GM-CSF in a 37°C, 5% CO₂ incubator. In each well of a 96-well plate, CD4⁺ T cells and DCs were mixed, and co-cultured for 7 days with or without dose titrations of anti-PD-1 or compounds added at the initiation of the assay. IFN- γ secretion in culture supernatants was analyzed by Human IFN- γ AlphaLISA Kit (PerkinElmer). Fluorescence was measured by EnVision Multilabel Plate Reader.

Groups were compared by Bartlett's test followed by Dunnett's test or Steel's test. A *P* value <0.05 was considered significant.

Size exclusion chromatography

AKTATMpurifier 10 fast protein liquid chromatography (FPLC) system and Superdex 200 5/150 column were obtained from GE Healthcare. Human PD-L1-Flag was purchased from BPS Bioscience, Inc. (San Diego, CA, USA). Superdex 200 5/150 HR was equilibrated with PBS and calibrated using globular proteins of known molecular weight. PD-L1-Flag (3.8 μ M) alone or a mixture of 3.8 μ M PD-L1-Flag and 12 μ M compound were incubated in 50 μ L of PBS containing 5% DMSO for 10 min at 4°C. The samples were loaded on the column, and analytical gel filtration was performed at 4°C, with the flow rate held at 0.16 mL/min.

参考文献

- ¹ Burnet, F. M. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* **1967**, *289*, 1171–1174.
- ² Oiseth, S. J.; Aziz, M. S. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* **2017**, *3*, 250–261.
- ³ Waldman, A.D.; Fritz, J. M.; Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology* **2020**, *20*, 651–668.
- ⁴ Kubli, S. P.; Berger, T.; Araujo, D. V.; Siu, L. L.; Mak, T. W. Beyond immune checkpoint blockade: emerging immunological strategies. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20*, 899–919.
- ⁵ Alsaab, H. O.; Sau, S.; Alzhrani, R.; Tatiparti, K.; Bhise, K.; Kashaw, S. K.; Iyer, A. K. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: Mechanism, combinations, and clinical outcome. *Frontiers in Pharmacology* **2017**, *8*, 561.
- ⁶ Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **2011**, *480*, 480–489.
- ⁷ Fésüs, V. Recent advances of immunooncology in the treatment of solid tumours and haematological malignancies: the immune checkpoint inhibitors. *Magyar Onkologia* **2017**, *61*, 116–125.
- ⁸ <https://www.cancerresearch.org/en-us/immunotherapy/timeline-of-progress>
- ⁹ Nirschl, C. J.; Drake, C. G. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* **2013**, *19*, 4917–4924.
- ¹⁰ O'Day, S. J.; Hamid, O.; Urba, W. J. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer* **2007**, *110*, 2614–2627.

- ¹¹ Poust J. Targeting metastatic melanoma. *American Journal of Health-System Pharmacy* **2008**, *65(24 Suppl 9)*, S9–S15.
- ¹² Waterhouse, P.; Penninger, J. M.; Timms, E.; Wakeham, A.; Shahinian, A.; Lee, K. P.; Thompson, C. B.; Griesser, H.; Mak, T. W. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4. *Science* **1995**, *270*, 985–988.
- ¹³ Grosso, J. F.; Jure-Kunkel, M. N. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immunity* **2013**, *13*, 5.
- ¹⁴ Liu, X.; Guo, C. Y.; Tou, F. F.; Wen, X. M.; Kuang, Y. K.; Zhu, Q.; Hu, H. Association of PD-L1 expression status with the efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors and overall survival in solid tumours: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* **2020**, *147*, 116–127.
- ¹⁵ Hodi, F. S.; O'Day, S. J.; McDermott, D. F.; Weber, R. W.; Sosman, J. A.; Haanen, J. B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J. C.; Akerley, W.; van den Eertwegh, A. J.; Lutzky, J.; Lorigan, P.; Vaubel, J. M.; Linette, G. P.; Hogg, D.; Ottensmeier, C. H.; Lebbé, C.; Peschel, C.; Quirt, I.; Clark, J. I.; Wolchok, J. D.; Weber, J. S.; Tian, J.; Yellin, M. J.; Nichol, G. M.; Hoos, A.; Urba, W. J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 711–723.
- ¹⁶ Ishida, Y.; Agata, Y.; Shibahara, K.; Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO Journal* **1992**, *11*, 3887–3895.
- ¹⁷ Chemnitz, J. M.; Parry, R. V.; Nichols, K. E.; June, C. H.; Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *Journal of Immunology* **2004**, *173*, 945–954.

- ¹⁸ Nishimura, H.; Okazaki, T.; Tanaka, Y.; Nakatani, K.; Hara, M.; Matsumori, A.; Sasayama, S.; Mizoguchi, A.; Hiai, H.; Minato, N.; Honjo, T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **2001**, *291*, 319–322.
- ¹⁹ Nishimura, H.; Nose, M.; Hiai, H.; Minato, N.; Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **1999**, *11*, 141–151.
- ²⁰ Okazaki, T.; Honjo, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunology* **2007**, *19*, 813–824.
- ²¹ Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L. J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M. C.; Horton, H. F.; Fouser, L.; Carter, L.; Ling, V.; Bowman, M. R.; Carreno, B. M.; Collins, M.; Wood, C. R.; Honjo, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, **2000**, *192*, 1027–1034.
- ²² Keir, M. E.; Butte, M. J.; Freeman, G. J.; Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology* **2008**, *26*, 677–704.
- ²³ Keir, M. E.; Liang, S. C.; Guleria, I.; Latchman, Y. E.; Qipo, A.; Albacker, L. A.; Koulmanda, M.; Freeman, G. J.; Sayegh, M. H.; Sharpe, A. H. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine* **2006**, *203*, 883–895.
- ²⁴ Dong, H.; Strome, S. E.; Salomao, D. R.; Tamura, H.; Hirano, F.; Flies, D. B.; Roche, P. C.; Lu, J.; Zhu, G.; Tamada, K.; Lennon, V. A.; Celis, E.; Chen, L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* **2002**, *8*, 793–800.
- ²⁵ Blank, C.; Brown, I.; Peterson, A. C.; Spiotto, M.; Iwai, Y.; Honjo, T.; Gajewski, T. F. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic

- CD8+ T cells. *Cancer Research*, **2004**, *64*, 1140–1145.
- ²⁶ Okazaki, T.; Honjo, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in Immunology* **2006**, *27*, 195–201.
- ²⁷ Dong, H.; Zhu, G.; Tamada, K.; Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine* **1999**, *5*, 1365–1369.
- ²⁸ Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L. J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M. C.; Horton, H. F.; Fouser, L.; Carter, L.; Ling, V.; Bowman, M. R.; Carreno, B. M.; Collins, M.; Wood, C. R.; Honjo, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine* **2000**, *192*, 1027–1034.
- ²⁹ Tamura, H.; Ishibashi, M.; Yamashita, T.; Tanosaki, S.; Okuyama, N.; Kondo, A.; Hyodo, H.; Shinya, E.; Takahashi, H.; Dong, H.; Tamada, K.; Chen, L.; Dan, K.; Ogata, K. Marrow stromal cells induce B7-H1 expression on myeloma cells, generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia* **2013**, *27*, 464–472.
- ³⁰ Kondo, A.; Yamashita, T.; Tamura, H.; Zhao, W.; Tsuji, T.; Shimizu, M.; Shinya, E.; Takahashi, H.; Tamada, K.; Chen, L.; Dan, K.; Ogata, K. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2010**, *116*, 1124–1131.
- ³¹ Yamamoto, R.; Nishikori, M.; Kitawaki, T.; Sakai, T.; Hishizawa, M.; Tashima, M.; Kondo, T.; Ohmori, K.; Kurata, M.; Hayashi, T.; Uchiyama, T. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* **2008**, *111*, 3220–3224.
- ³² Latchman, Y.; Wood, C. R.; Chernova, T.; Chaudhary, D.; Borde, M.; Chernova, I.; Iwai, Y.;

- Long, A. J.; Brown, J. A.; Nunes, R.; Greenfield, E. A.; Bourque, K.; Boussiotis, V. A.; Carter, L. L.; Carreno, B. M.; Malenkovich, N.; Nishimura, H.; Okazaki, T.; Honjo, T.; Sharpe, A. H.; Freeman, G. J. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology* **2001**, *2*, 261–268.
- ³³ Francisco, L. M.; Sage, P. T.; Sharpe, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews* **2010**, *236*, 219–242.
- ³⁴ Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L. J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M. C.; Horton, H. F.; Fouser, L.; Carter, L.; Ling, V.; Bowman, M. R.; Carreno, B. M.; Collins, M.; Wood, C. R.; Honjo, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine* **2000**, *192*, 1027–1034.
- ³⁵ Seliger B. Basis of PD1/PD-L1 Therapies. *Journal of Clinical Medicine*, **2019**, *8*, 2168.
- ³⁶ Akinleye, A.; Rasool, Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *Journal of Hematology & Oncology* **2019**, *12*, 92.
- ³⁷ Viteri, S.; González-Cao, M.; Barrón, F.; Riso, A.; Rosell, R. Results of clinical trials with anti-programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitors in lung cancer. *Translational Lung Cancer Research* **2015**, *4*, 756–762.
- ³⁸ Vaddepally, R. K.; Kharel, P.; Pandey, R.; Garje, R.; Chandra, A. B. Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers* **2020**, *12*, 738.
- ³⁹ Lee, H. T.; Lee, S. H.; Heo, Y. S. Molecular interactions of antibody drugs targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in immuno-oncology. *Molecules* **2019**, *24*, 1190.
- ⁴⁰ <https://www.cancerresearch.org/en-us/scientists/immuno-oncology-landscape/fda-approval-timeline-of-active-immunotherapies>

- ⁴¹ Sasikumar, P. G.; Ramachandra, M. Small-molecule antagonists of the immune checkpoint pathways: concept to clinic. *Future Medicinal Chemistry* **2017**, *9*, 1305–1308.
- ⁴² Mondanelli, G.; Volpi, C.; Orabona, C.; Grohmann, U. Challenges in the design of reliable immuno-oncology mouse models to inform drug development. *Future Medicinal Chemistry* **2017**, *9*, 1313–1317.
- ⁴³ Chen, T.; Li, Q.; Liu, Z.; Chen, Y.; Feng, F.; Sun, H. Peptide-based and small synthetic molecule inhibitors on PD-1/PD-L1 pathway: A new choice for immunotherapy? *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *161*, 378–398.
- ⁴⁴ Pardoll D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12*, 252–264.
- ⁴⁵ Ghosh, A.; Barba, P.; Perales, M. A. Checkpoint inhibitors in AML: are we there yet?. *British Journal of Haematology* **2020**, *188*, 159–167.
- ⁴⁶ Redelman-Sidi, G.; Michielin, O.; Cervera, C.; Ribi, C.; Aguado, J. M.; Fernández-Ruiz, M.; Manuel, O. ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts (ESGICH) Consensus Document on the safety of targeted and biological therapies: an infectious diseases perspective (Immune checkpoint inhibitors, cell adhesion inhibitors, sphingosine-1-phosphate receptor modulators and proteasome inhibitors). *Clinical Microbiology and Infection* **2018**, *24*(Suppl 2), S95–S107.
- ⁴⁷ Brahmer, J. R.; Tykodi, S. S.; Chow, L. Q.; Hwu, W. J.; Topalian, S. L.; Hwu, P.; Drake, C. G.; Camacho, L. H.; Kauh, J.; Odunsi, K.; Pitot, H. C.; Hamid, O.; Bhatia, S.; Martins, R.; Eaton, K.; Chen, S.; Salay, T. M.; Alaparthi, S.; Grosso, J. F.; Korman, A. J.; Parker, S. M.; Agrawal, S.; Goldberg, S. M.; Pardoll, D. M.; Gupta, A.; Wigginton, J. M. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine* **2012**, *366*, 2455–2465.

- ⁴⁸ Brahmer, J. R.; Drake, C. G.; Wollner, I.; Powderly, J. D.; Picus, J.; Sharfman, W. H.; Stankevich, E.; Pons, A.; Salay, T. M.; McMiller, T. L.; Gilson, M. M.; Wang, C.; Selby, M.; Taube, J. M.; Anders, R.; Chen, L.; Korman, A. J.; Pardoll, D. M.; Lowy, I.; Topalian, S. L. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of Clinical Oncology* **2010**, *28*, 3167–3175.
- ⁴⁹ Topalian, S. L.; Hodi, F. S.; Brahmer, J. R.; Gettinger, S. N.; Smith, D. C.; McDermott, D. F.; Powderly, J. D.; Carvajal, R. D.; Sosman, J. A.; Atkins, M. B.; Leming, P. D.; Spigel, D. R.; Antonia, S. J.; Horn, L.; Drake, C. G.; Pardoll, D. M.; Chen, L.; Sharfman, W. H.; Anders, R. A.; Taube, J. M.; McMiller, T.L.; Xu, H.; Korman, A. J.; Jure-Kunkel, M.; Agrawal, S.; McDonald, D.; Kollia, G. D.; Gupta, A.; Wigginton, J. M.; Sznol, M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine* **2012**, *366*, 2443–2454.
- ⁵⁰ Akbari, O.; Stock, P.; Singh, A. K.; Lombardi, V.; Lee, W. L.; Freeman, G. J.; Sharpe, A. H.; Umetsu, D. T.; Dekruyff, R. H. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunology* **2010**, *3*, 81–91.
- ⁵¹ Maute, R. L.; Gordon, S. R.; Mayer, A. T.; McCracken, M. N.; Natarajan, A.; Ring, N. G.; Kimura, R.; Tsai, J. M.; Manglik, A.; Kruse, A. C.; Gambhir, S. S.; Weissman, I. L.; Ring, A. M. Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, E6506–E6514.
- ⁵² Andrews A. Treating with checkpoint inhibitors-figure \$1 million per patient. *American Health & Drug Benefits* **2015**, *8(Spec Issue)*, 9.

- 53 Yang, J.; Hu, L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules. *Medicinal Research Reviews* **2019**, *39*, 265–301.
- 54 Wang, T.; Wu, X.; Guo, C.; Zhang, K.; Xu, J.; Li, Z.; Jiang, S. Development of inhibitors of the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 signaling pathway. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62*, 1715–1730.
- 55 Zhan, M. M.; Hu, X. Q.; Liu, X. X.; Ruan, B. F.; Xu, J.; Liao, C. From monoclonal antibodies to small molecules: the development of inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 pathway. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 1027–1036.
- 56 Konstantinidou, M.; Zarganes-Tzitzikas, T.; Magiera-Mularz, K.; Holak, T. A.; Dömling, A. Immune Checkpoint PD-1/PD-L1: Is there life beyond antibodies?. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2018**, *57*, 4840–4848.
- 57 Zak, K. M.; Kitel, R.; Przetocka, S.; Golik, P.; Guzik, K.; Musielak, B.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A. Structure of the complex of human programmed death 1, PD-1, and its ligand PD-L1. *Structure* **2015**, *23*, 2341–2348.
- 58 Smith, M. C.; Gestwicki, J. E. Features of protein-protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2012**, *14*, e16.
- 59 Ivanov, A. A.; Khuri, F. R.; Fu, H. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends in Pharmacological Sciences* **2013**, *34*, 393–400.
- 60 Zhong, Y.; Li, X.; Yao, H.; Lin, K. The characteristics of PD-L1 inhibitors, from peptides to small molecules. *Molecules* **2019**, *24*, 1940.
- 61 Guzik, K.; Tomala, M.; Muszak, D.; Konieczny, M.; Hec, A.; Błaszkiwicz, U.; Pustuła, M.; Butera, R.; Dömling, A.; Holak, T. A. Development of the inhibitors that target the PD-1/PD-L1 interaction-a brief look at progress on small molecules, peptides and

- macrocycles. *Molecules* **2019**, *24*, 2071.
- ⁶² Magiera-Mularz, K.; Skalniak, L.; Zak, K. M.; Musielak, B.; Rudzinska-Szostak, E.; Berlicki, Ł.; Kocik, J.; Grudnik, P.; Sala, D.; Zarganes-Tzitzikas, T.; Shaabani, S.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A. Bioactive macrocyclic inhibitors of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2017**, *56*, 13732–13735.
- ⁶³ Sasikumar, P. G. N.; Ramachandra, M.; Naremaddepalli, S. S. S. 1,3,4-Oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives as immunomodulators. Patent: WO2015/033301, **2015**.
- ⁶⁴ Lee, J. J.; Powderly, J. D.; Patel, M. R.; Brody, J.; Hamilton, E. P.; Infante, J. R.; Gerald Steven Falchook, G. S.; Wang, H.; Adams, L.; Gong, L.; Ma, A. W.; Wyant, T.; Lazorchak, A.; Agarwal, S.; Tuck, D. P.; Daud, A. Phase 1 trial of CA-170, a novel oral small molecule dual inhibitor of immune checkpoints PD-1 and VISTA, in patients (pts) with advanced solid tumor or lymphomas. *Journal of Clinical Oncology* **2017**, *35(15_suppl)*, TPS3099–TPS3099.
- ⁶⁵ Musielak, B.; Kocik, J.; Skalniak, L.; Magiera-Mularz, K.; Sala, D.; Czub, M.; Stec, M.; Siedlar, M.; Holak, T. A.; Plewka, J. CA-170 - A potent small-molecule PD-L1 inhibitor or not? *Molecules* **2019**, *24*, 2804.
- ⁶⁶ Chupak, L. S.; Zheng, X. Compounds useful as immunomodulators. Patent: WO2015/034820, **2015**.
- ⁶⁷ Louis S. Chupak.; Ding, M.; Martin, S. W.; Zheng, X.; Hewawasam, P.; Connolly, T. P.; Xu, N.; Yeung, K.; Zhu, J.; Langley, D. R.; Tenney, D. J.; Scola, P. M. Compounds useful as immunomodulators. Patent: WO2015/160641, **2015**.
- ⁶⁸ Zak, K. M.; Grudnik, P.; Guzik, K.; Zieba, B. J.; Musielak, B.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A. Structural basis for small molecule targeting of the programmed death ligand 1 (PD-L1). *Oncotarget* **2016**, *7*, 30323–30335.
- ⁶⁹ Andrei, S. A.; Sijbesma, E.; Hann, M.; Davis, J.; O'Mahony, G.; Perry, M. W. D.; Karawajczyk,

- A.; Eickhoff, J.; Brunsveld, L.; Doveston, R. G.; Milroy, L. G.; Ottmann, C. Stabilization of protein-protein interactions in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2017**, *12*, 925–940.
- ⁷⁰ Petta, I.; Lievens, S.; Libert, C.; Tavernier, J.; De Bosscher, K. Modulation of protein-protein interactions for the development of novel therapeutics. *Molecular Therapy* **2016**, *24*, 707–718.
- ⁷¹ Zarzycka, B.; Kuenemann, M. A.; Miteva, M. A.; Nicolaes, G. A. F.; Vriend, G.; Sperandio, O. Stabilization of protein-protein interaction complexes through small molecules. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 48–57.
- ⁷² Waring, M. J.; Chen, H.; Rabow, A. A.; Walker, G.; Bobby, R.; Boiko, S.; Bradbury, R. H.; Callis, R.; Clark, E.; Dale, I.; Daniels, D. L.; Dulak, A.; Flavell, L.; Holdgate, G.; Jowitt, T. A.; Kikhney, A.; McAlister, M.; Méndez, J.; Ogg, D.; Patel, J.; Petteruti, P.; Robb, G. R.; Robers, M. B.; Saif, S.; Stratton, N.; Svergun, D. I.; Wang, W.; Whittaker, D.; Wilson, D. M.; Yao, Y. Potent and selective bivalent inhibitors of BET bromodomains. *Nature Chemical Biology* **2016**, *12*, 1097–1104.
- ⁷³ Kaae, B. H.; Harpsøe, K.; Kastrop, J. S.; Sanz, A. C.; Pickering, D. S.; Metzler, B.; Clausen, R. P.; Gajhede, M.; Sauerberg, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. Structural proof of a dimeric positive modulator bridging two identical AMPA receptor-binding sites. *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 1294–1303.
- ⁷⁴ Morin, M. D.; Wang, Y.; Jones, B. T.; Mifune, Y.; Su, L.; Shi, H.; Moresco, E. M. Y.; Zhang, H.; Beutler, B.; Boger, D. L. Diprovocims: A new and exceptionally potent class of Toll-like receptor agonists. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 14440–14454.
- ⁷⁵ Wells, J. A.; McClendon, C. L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **2007**, *450*, 1001–1009.
- ⁷⁶ Scott, D. E.; Bayly, A. R.; Abell, C.; Skidmore, J. Small molecules, big targets: drug discovery

- faces the protein-protein interaction challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, *15*, 533–550.
- 77 RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB). <https://www.rcsb.org/>
- 78 Lin, D. Y.; Tanaka, Y.; Iwasaki, M.; Gittis, A. G.; Su, H. P.; Mikami, B.; Okazaki, T.; Honjo, T.; Minato, N.; Garboczi, D. N. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 3011–3016.
- 79 Chen, Y.; Liu, P.; Gao, F.; Cheng, H.; Qi, J.; Gao, G. F. A dimeric structure of PD-L1: functional units or evolutionary relics? *Protein & Cell* **2010**, *1*, 153–160.
- 80 Guzik, K.; Zak, K. M.; Grudnik, P.; Magiera, K.; Musielak, B.; Törner, R.; Skalniak, L.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A. Small-molecule inhibitors of the programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 (PD-1/PD-L1) interaction via transiently induced protein states and dimerization of PD-L1. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 5857–5867.
- 81 Nguyen, H. H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors* **2015**, *15*, 10481–10510.
- 82 Han, Y.; Gao, Y.; He, T.; Wang, D.; Guo, N.; Zhang, X.; Chen, S.; Wang, H. PD-1/PD-L1 inhibitor screening of caffeoylquinic acid compounds using surface plasmon resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry* **2018**, *547*, 52–56.
- 83 https://www.promega.jp/Products/Biologics/Functional-Bioassays/PD1_PDL1-Blockade-Bioassays/?fq=blockade%20bioassay&catNum=J1250
- 84 https://www.promega.jp/products/reporter-bioassays/immune-checkpoint-bioassays/pd1_pdl1-blockade-bioassays/?catNum=J1250
- 85 Wang, C.; Thudium, K. B.; Han, M.; Wang, X. T.; Huang, H.; Feingersh, D.; Garcia, C.; Wu, Y.; Kuhne, M.; Srinivasan, M.; Singh, S.; Wong, S.; Garner, N.; Leblanc, H.; Bunch, R. T.;

- Blanset, D.; Selby, M. J.; Korman, A. J. *In vitro* characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and *in vivo* toxicology in non-human primates. *Cancer Immunology Research* **2014**, *2*, 846–856.
- ⁸⁶ Basu, S.; Yang, J.; Xu, B.; Magiera-Mularz, K.; Skalniak, L.; Musielak, B.; Kholodovych, V.; Holak, T. A.; Hu, L. Design, synthesis, evaluation, and structural studies of C_2 -symmetric small molecule inhibitors of programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 protein-protein interaction. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62*, 7250–7263.
- ⁸⁷ Copeland R. A. The dynamics of drug-target interactions: drug-target residence time and its impact on efficacy and safety. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2010**, *5*, 305–310.
- ⁸⁸ Walkup, G. K.; You, Z.; Ross, P. L.; Allen, E. K.; Daryaei, F.; Hale, M. R.; O'Donnell, J.; Ehmann, D. E.; Schuck, V. J.; Buurman, E. T.; Choy, A. L.; Hajec, L.; Murphy-Benenato, K.; Marone, V.; Patey, S. A.; Grosser, L. A.; Johnstone, M.; Walker, S. G.; Tonge, P. J.; Fisher, S. L. Translating slow-binding inhibition kinetics into cellular and *in vivo* effects. *Nature Chemical Biology* **2015**, *11*, 416–423.
- ⁸⁹ Miller, D.; Lunn, G.; Jones, P.; Sabnis, Y.; Davies, N.; Driscoll, P. Investigation of the effect of molecular properties on the binding kinetics of a ligand to its biological target. *MedChemComm* **2012**, *3*, 449–452.
- ⁹⁰ Schneider, E. V.; Böttcher, J.; Huber, R.; Maskos, K.; Neumann, L. Structure–kinetic relationship study of CDK8/CycC specific compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 8081–8086.
- ⁹¹ Yang, Y.; Lightstone, F. C.; Wong, S. E. Approaches to efficiently estimate solvation and explicit water energetics in ligand binding: the use of WaterMap. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2013**, *8*, 277–287.
- ⁹² Cappel, D.; Sherman, W.; Beuming, T. Calculating water thermodynamics in the binding site

- of proteins - applications of WaterMap to drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2017**, *17*, 2586–2598.
- ⁹³ Chang, C. E.; Chen, W.; Gilson, M. K. Ligand configurational entropy and protein binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 1534–1539.
- ⁹⁴ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23*, 4–25.
- ⁹⁵ DeGoey, D. A.; Chen, H. J.; Cox, P. B.; Wendt, M. D. Beyond the rule of 5: lessons learned from AbbVie's drugs and compound collection. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61*, 2636–2651.
- ⁹⁶ Shultz M. D. Two decades under the influence of the rule of five and the changing properties of approved oral drugs. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62*, 1701–1714.
- ⁹⁷ Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 430–431.
- ⁹⁸ Wang, Y.; Kun Huang, Gao, Y.; Yuan, D.; Ling, L.; Liu, J.; Wu, S.; Chen, R.; Li, H.; Xiong, Y.; Liu, H.; Ma, J. Discovery of quinazoline derivatives as novel small-molecule inhibitors targeting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 (PD-1/PD-L1) interaction. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, *229*, 113998.
- ⁹⁹ OuYang, Y.; Gao, J.; Zhao, L.; Lu, J.; Zhong, H.; Tang, H.; Jin, S.; Yue, L.; Li, Y.; Guo, W.; Xu, Q.; Lai, Y. Design, synthesis, and evaluation of *o*-(biphenyl-3-ylmethoxy)nitrophenyl derivatives as PD-1/PD-L1 inhibitors with potent anticancer efficacy *in vivo*. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *64*, 7646–7666.
- ¹⁰⁰ Song, Z.; Liu, B.; Peng, X.; Gu, W.; Sun, Y.; Xing, L.; Xu, Y.; Geng, M.; Ai, J.; Zhang, A.

- Design, synthesis, and pharmacological evaluation of biaryl-containing PD-1/PD-L1 interaction inhibitors bearing a unique difluoromethyleneoxy linkage. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *64*, 16687–16702.
- ¹⁰¹ Cao, H.; Cheng, B.; Liu, T.; Chen, J. Synthesis and pharmacological evaluation of novel resorcinol biphenyl ether analogs as small molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 with benign toxicity profiles for cancer treatment. *Biochemical Pharmacology* **2021**, *188*, 114522.
- ¹⁰² Muszak, D.; Surmiak, E.; Plewka, J.; Magiera-Mularz, K.; Kocik-Krol, J.; Musielak, B.; Sala, D.; Kitel, R.; Stec, M.; Weglarczyk, K.; Siedlar, M.; Dömling, A.; Skalniak, L.; Holak, T. A. terphenyl-based small-molecule inhibitors of programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 protein-protein interaction. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *64*, 11614–11636.
- ¹⁰³ Qin, M.; Cao, Q.; Zheng, S.; Tian, Y.; Zhang, H.; Xie, J.; Xie, H.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Gong, P. Discovery of [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyridines as potent inhibitors targeting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62*, 4703–4715.
- ¹⁰⁴ Guo, J.; Luo, L.; Wang, Z.; Hu, N.; Wang, W.; Xie, F.; Liang, E.; Yan, X.; Xiao, J.; Li, S. Design, synthesis, and biological evaluation of linear aliphatic amine-linked triaryl derivatives as potent small-molecule inhibitors of the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction with promising antitumor effects *in vivo*. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 13825–13850.
- ¹⁰⁵ Wang, T.; Cai, S.; Wang, M.; Zhang, W.; Zhang, K.; Chen, D.; Li, Z.; Jiang, S. Novel biphenyl pyridines as potent small-molecule inhibitors targeting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *64*, 7390–7403.
- ¹⁰⁶ Zhang, H.; Xia, Y.; Yu, C.; Du, H.; Liu, J.; Li, H.; Huang, S.; Zhu, Q.; Xu, Y.; Zou, Y. Discovery

- of novel small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 interaction via structural simplification strategy. *Molecules* **2021**, *26*, 3347.
- ¹⁰⁷ Cheng, B.; Ren, Y.; Niu, X.; Wang, W.; Wang, S.; Tu, Y.; Liu, S.; Wang, J.; Yang, D.; Liao, G.; Chen, J. Discovery of novel resorcinol dibenzyl ethers targeting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction as potential anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 8338–8358.
- ¹⁰⁸ Deng, J.; Cheng, Z.; Long, J.; Dömling, A.; Tortorella, M.; Wang, Y. Small molecule inhibitors of programmed cell death ligand 1 (PD-L1): A patent review (2019-2021). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2022**, *32*, 575–589.
- ¹⁰⁹ Koblish, H. K.; Wu, L.; Wang, L. S.; Liu, P. C. C.; Wynn, R.; Rios-Doria, J.; Spitz, S.; Liu, H.; Volgina, A.; Zolotarjova, N.; Kapilashrami, K.; Behshad, E.; Covington, M.; Yang, Y. O.; Li, J.; Diamond, S.; Soloviev, M.; O'Hayer, K.; Rubin, S.; Kanellopoulou, C.; Yang, G.; Rupar, M.; DiMatteo, D.; Lin, L.; Stevens, C.; Zhang, Y.; Thekkat, P.; Geschwindt, R.; Marando, C.; Yeleswaram, S.; Jackson, J.; Scherle, P.; Huber, R.; Yao, W.; Hollis, G. Characterization of INCB086550: a potent and novel small-molecule PD-L1 inhibitor. *Cancer Discovery* **2022**, *12*, 1482–1499.
- ¹¹⁰ <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04049617>
- ¹¹¹ <https://www.chemocentryx.com/pipeline/>
- ¹¹² Sasikumar, P. G.; Ramachandra, M. Small molecule agents targeting PD-1 checkpoint pathway for cancer immunotherapy: mechanisms of action and other considerations for their advanced development. *Frontiers in Immunology* **2022**, *13*, 752065.
- ¹¹³ Li, S. C.; Vilalta, M.; Ertl, L. S.; Wang, Y.; Zeng, Y.; Fan, P.; Lange, C.; McMurtrie, D.; Yang, J.; Lui, R.; Ong, R.; Chhina, V.; Kumamoto, A.; Yau, S.; Dang, T.; Easterday, A.; Liu, S.; Singh, R.; Charo, I.; Schall, T. J.; Zhang, P. Anti-tumor effect of orally available small

- molecule PD-L1 inhibitors in a murine model of colon adenocarcinoma. *Cancer Research* **2020**, *80(16_Supplement)*, 5693.
- ¹¹⁴ Graupe, M.; Medley, J.; Cho, A.; Guerrero, J.; Phillips, B.; Simonovich, S.; Watkins, W.; Yang, K.; Appleby, T.; Villasenor, A.; Mukherjee, P.; Lad, L.; Wang, A.; Odegard, J.; Belzile, J. P.; Morar, M.; Nazareno, J.; Stapleton, L. GS-4224: A potent, oral small molecule PD-L1 inhibitor. *ACS FALL 2022*, **2022**.
- ¹¹⁵ Park, J. J.; Thi, E. P.; Carpio, V. H.; Bi, Y.; Cole, A. G.; Dorsey, B. D.; Fan, K.; Harasym, T.; Iott, C. L.; Kadhim, S.; Kim, J. H.; Lee, A. C. H.; Nguyen, D.; Paratala, B. S.; Qiu, R.; White, A.; Lakshminarasimhan, D.; Leo, C.; Suto, R. K.; Rijnbrand, R.; Tang, S.; Sofia, M. J.; Moore, C. B. Checkpoint inhibition through small molecule-induced internalization of programmed death-ligand 1. *Nature Communications* **2021**, *12*, 1222.
- ¹¹⁶ Wang, T.; Cai, S.; Cheng, Y.; Zhang, W.; Wang, M.; Sun, H.; Guo, B.; Li, Z.; Xiao, Y.; Jiang, S. Discovery of small-molecule inhibitors of the PD-1/PD-L1 axis that promote PD-L1 internalization and degradation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, *65*, 3879–3893.
- ¹¹⁷ Zhang, N.; Dou, Y.; Liu, L.; Zhang, X.; Liu, X.; Zeng, Q.; Liu, Y.; Yin, M.; Liu, X.; Deng, H.; Song, D. SA-49, a novel aloperine derivative, induces MITF-dependent lysosomal degradation of PD-L1. *EBioMedicine* **2019**, *40*, 151–162.
- ¹¹⁸ Cheng, B.; Ren, Y.; Cao, H.; Chen, J. Discovery of novel resorcinol diphenyl ether-based PROTAC-like molecules as dual inhibitors and degraders of PD-L1. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *199*, 112377.
- ¹¹⁹ Ofori, S.; Awuah, S. G. Small-molecule poly(ADP-ribose) polymerase and PD-L1 inhibitor conjugates as dual-action anticancer agents. *ACS Omega* **2019**, *4*, 12584–12597.
- ¹²⁰ Zhu, H.; Bengsch, F.; Svoronos, N.; Rutkowski, M. R.; Bitler, B. G.; Allegrezza, M. J.; Yokoyama, Y.; Kossenkov, A. V.; Bradner, J. E.; Conejo-Garcia, J. R.; Zhang, R. BET

- bromodomain inhibition promotes anti-tumor immunity by suppressing PD-L1 expression. *Cell Reports* **2016**, *16*, 2829–2837.
- ¹²¹ Yang, Y.; Wang, K.; Chen, H.; Feng, Z. Design, synthesis, evaluation, and SAR of 4-phenylindoline derivatives, a novel class of small-molecule inhibitors of the programmed cell death-1/ programmed cell death-ligand 1 (PD-1/PD-L1) interaction. *European journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *211*, 113001.
- ¹²² Wu, Y.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Pan, Z.; Zhong, S.; Jin, X.; Zhuang, W.; Chen, S.; Gao, J.; Huang, W.; Dong, X.; Che, J. Discovery of phenyl-linked symmetric small molecules as inhibitors of the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *223*, 113637.
- ¹²³ Fang, L.; Tian, J.; Zhang, K.; Zhang, X.; Liu, Y.; Cheng, Z.; Zhou, J.; Zhang, H. Discovery of 1,3,4-oxadiazole derivatives as potential antitumor agents inhibiting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2021**, *46*, 116370.

公表論文リスト

- (1) Kawashita, S.; Aoyagi, K.; Yamanaka, H.; Hantani, R.; Naruoka, S.; Tanimoto, A.; Hori, Y.; Toyonaga, Y.; Fukushima, K.; Miyazaki, S.; Hantani, Y. Symmetry-based ligand design and evaluation of small molecule inhibitors of programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 interaction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *29*, 2464–2467.

- (2) Kawashita, S.; Aoyagi, K.; Fukushima, K.; Hantani, R.; Naruoka, S.; Tanimoto, A.; Hori, Y.; Toyonaga, Y.; Yamanaka, H.; Miyazaki, S.; Hantani, Y. SAR study of small molecule inhibitors of the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction. *Chemical Biology & Drug Design* **2021**, *98*, 914–929.

謝辞

本論文の作成にあたり、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系 繁森英幸教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、御指導ならびに御助言を賜りました筑波大学生命環境系 内海真生教授、山田小須弥准教授、宮前友策准教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の学会発表と論文発表を後押しし、また筆者の学位取得を支援して下さった、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所化学研究所の橋本宏正博士、佐藤元秀博士、塩崎真博士、原田一人博士に心よりお礼申し上げます。

本研究を合成面で共に推進してくれた共同研究者である、同化学研究所の青柳幸一博士、山中浩研究員、足達馨研究員、須磨陽研究員、評価系の構築と化合物の薬理評価で研究を推進してくれた同生物研究所の成岡詩織研究員、堀裕治博士、豊永幸代研究員、谷本敦男博士、研究の推進と論文の執筆にあたり、計算機化学の視点から多くの議論をさせて頂き、助言を下された同化学研究所の福島響子博士に深く感謝いたします。

筆者が本研究を開始する機会を与えていただき、研究の推進を力強く支援して下さった同化学研究所の宮崎将博士に深く感謝いたします。

本研究を結合親和性評価の面から推進してくれた共同研究者であり、筆者の筑波大学大学院入学のきっかけを与えて下さった同生物研究所の判谷理恵博士に深く感謝いたします。

本研究の実施を力強く支援して下さった共同研究者であり、また論文の執筆に際して多大なるご助言とご支援を下された同生物研究所の判谷吉嗣博士に深く感謝いたします。

最後に、筆者の学位取得への想いを理解し、精一杯の支援と勇気をくれた家族に感謝いたします。

2023年1月 川下誠司