

天然環状ペプチド オギペプチン及びその誘導体の合成研究

令和4年度

滝口 真伍

目次

Abstract.....	2
略語表.....	4
序論.....	6
第 1 章 アシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成とその抗菌活性・毒性評価.....	
第 1 節 アシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成ルートの確立.....	15
第 2 節 新規誘導体 45 化合物の合成.....	20
第 3 節 新規誘導体 45 化合物の MIC 測定・細胞毒性試験.....	22
第 4 節 新規誘導体 10 化合物の腎毒性試験.....	25
第 2 章 オギペプチン A への改良 Marfey 法の適用と絶対立体配置の推定.....	
第 1 節 オギペプチンの絶対立体配置についての考察と構造解析のための各種検討.....	28
第 2 節 オギペプチン A への改良 Marfey 法の適用.....	31
第 3 節 オギペプチン A の絶対立体配置の推定.....	37
第 3 章 オギペプチン A の全合成と絶対立体配置の決定.....	
第 1 節 固相全合成ルートの立案.....	38
第 2 節 β -OH Dab-(Δ)-Dhb ジペプチド中間体の合成.....	40
第 3 節 オギペプチン A の全合成.....	43
第 4 節 オギペプチン A の天然物標品との機器分析データの比較による絶対立体配置の決定 ..	45
第 4 章 骨格改変型オギペプチン誘導体の合成.....	
第 1 節 骨格改変型誘導体の合成方針.....	48
第 2 節 固相合成用ジペプチド中間体の合成.....	50
第 3 節 骨格改変型オギペプチン誘導体の合成.....	52
総括.....	55
参考文献.....	56
公表論文.....	60
実験の部.....	61
謝辞.....	

Synthetic studies towards natural cyclic peptide ogipeptins and their derivatives

Shingo Takiguchi

The spread of multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria is becoming a serious problem worldwide, for which the development of novel antibacterial drugs is strongly anticipated. Colistin (also known as polymyxin E) is a polypeptide antibiotic that is active against most Gram-negative bacteria and shows in vitro potency against organisms with the MDR phenotype. Since colistin has certain adverse effects, such as nephrotoxicity and neurotoxicity, its widespread use has been limited, and it is called the “antibiotic of last resort.”

Ogipeptins A–D were isolated from the culture broth of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903 by Daiichi Sankyo, and each of them showed antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. Ogipeptins are natural cyclic lipopeptides that exhibit the structural features of multiple basic side chains, which are similar to colistin. Ogipeptins are thus considered to have potential as lead compounds for antibacterial agents. In this research, the author conducted synthetic studies of ogipeptins and their derivatives with the aim of acquiring novel ogipeptin-based antibiotics with higher antibacterial activity and lower toxicity than colistin.

First, an examination of the synthesis of ogipeptin derivatives with acyl side-chain replacement was carried out. As a result of various trials, a four-step practical semisynthetic method for creating such derivatives was established, and 45 novel ogipeptin derivatives were obtained. Their antimicrobial activities, cytotoxicity, and nephrotoxicity were evaluated. Among these 45 derivatives, most of them showed good antimicrobial activities against Gram-negative bacteria and some exhibited significantly reduced nephrotoxicity compared with colistin.

Based on these results, acyl side-chain replacement appeared to be insufficient to enhance the antimicrobial activity of ogipeptin derivatives. Therefore, the author focused attention on amino acid residue replacement and skeleton modification. To obtain such derivatives, a total synthetic route using solid-phase peptide synthesis (SPPS) was required. However, the total synthesis of ogipeptins is associated with the limitation that the absolute configurations of ogipeptins are not elucidated. In particular, the stereochemistry of three residues of β -hydroxy- α,γ -diaminobutyric acids (β -OH Dabs) remained unknown. To determine the absolute configurations of ogipeptins, the crystallization of ogipeptins and their derivatives for X-ray structure analysis was attempted, but the author was unable to acquire satisfactory X-ray diffraction data. Next, the advanced Marfey's method was applied to determine the absolute configuration of β -OH Dabs in ogipeptin A. The results confirmed that (2*S*,3*S*)- and (2*S*,3*R*)- β -OH Dab isomers exist at a 2:1 ratio in ogipeptin A.

Based on that information, the author undertook the total synthesis of ogipeptin A. As the key starting materials for SPPS, two dipeptide blocks comprising *Z*-dehydrobutyrine (*Z*-Dhb) and (2*S*,3*S*)- or (2*S*,3*R*)- β -OH Dab were designed and synthesized via six steps from Fmoc- β -OH Dab (Boc, acetonide)-OH. SPPS using these blocks, macrocyclization, and deprotection afforded three diastereomers of ogipeptin A. The HPLC chart and ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of one synthetic diastereomer exactly matched those of authentic natural ogipeptin A. Therefore, the absolute configurations of ogipeptins were elucidated and the SPPS-based total synthetic route was established.

By using this route, the synthesis of skeleton-modified ogipeptin derivatives was carried out. In that synthesis, some amino acid residues were replaced as follows: 1) β -OH Dab to Dab; 2) *Z*-Dhb to glycine, α -aminoisobutyric acid, or L-valine; and 3) L-arginine to L-norleucine, L-glutamine, L-glutamic acid, or L-ornithine. Following this approach, eight ogipeptin derivatives with skeleton modifications were obtained.

The author believes that these results will greatly contribute to the development of novel antibiotics against MDR Gram-negative bacteria as alternatives to colistin.

略語表

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Alloc	Allyloxycarbonyl
AMR	Antimicrobial resistance
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Dab	2,4-Diaminobutanoic acid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCl	Deuterium chloride
DEPT	Distorsionless enhancement by polarization transfer
Dhb	Dehydrobutyrine
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNs	2,4-Dinitrobenzenesulfonyl
DQF-COSY	Double quantum filtered correlation spectroscopy
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Electrospray ionization
EtOAc	Ethyl acetate
FDLA	<i>N</i> ^ε -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
HATU	Hexafluorophosphate azabenzotriazole tetramethyl uronium
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HOESY	Heteronuclear Overhauser effect spectroscopy

HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LPS	Lipopolysaccharides
MIC	Minimum inhibitory concentration
MS	Mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOE	Nuclear Overhauser effect
Ns	2-Nitrobenzenesulfonyl (Nosyl)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
rt	room temperature
SEL-TOCSY	Selective total correlation spectroscopy
SPPS	Solid-phase peptide synthesis
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilane
TMSP	Trimethylsilyl propanoic acid
Troc	2,2,2-Trichloroethoxycarbonyl
UV	Ultraviolet

序論

近年、 β -ラクタム系抗菌薬が効かない多剤耐性グラム陰性菌の出現など、Antimicrobial Resistance (AMR) 対策が世界中で重要な課題となっている。¹⁾ 2014 年のイギリスの O'Neill のレポートでは、AMR に起因する死亡者数が 2013 年時では低く見積もって 70 万人とされていたが、このまま AMR について何も対策を講じなかった場合、2050 年には世界で 1000 万人の死亡が想定され、その数は 2013 年時のがんによる死亡者数を超えると試算されている (Figure 1)。²⁾

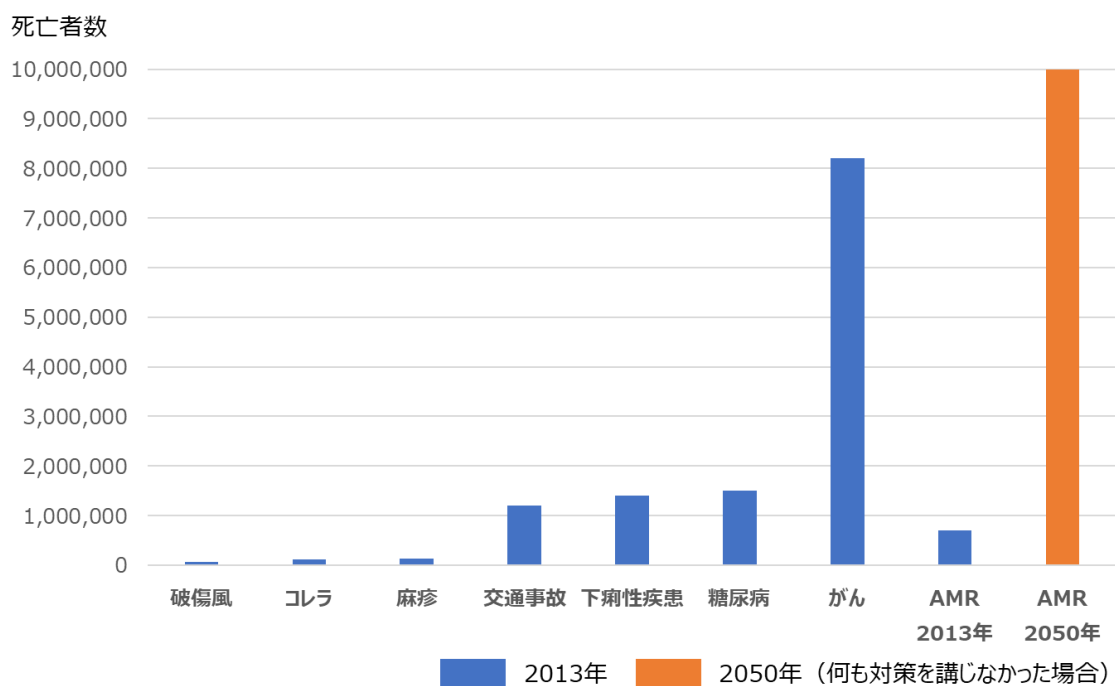


Figure 1. AMR を原因とする死者数とその他主要な死因との比較

特に問題となっている細菌類については、Table 1 に示した。カルバペネム耐性アシネトバクター、カンジダ・アウリス、クロストリジオイデス・ディフィシル、カルバペネム耐性腸内細菌、薬剤耐性淋菌のハザードレベルが”Urgent”、薬剤耐性カンピロバクター、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生腸内細菌、多剤耐性緑膿菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、薬剤耐性結核菌などがハザードレベル”Serious”に分類されており、多剤耐性グラム陰性菌を中心に人類の脅威となっている。³⁾

Table 1. 人類にとって特に脅威とされる細菌類(2019年現在)

Urgent Threats	Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter</i> (カルバペネム耐性アシネトバクター)
	<i>Candida auris</i> (カンジダ・アウリス)
	<i>Clostridioides difficile</i> (クロストリジオイデス・ディフィシル)
	Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE; カルバペネム耐性腸内細菌)
	Drug-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (薬剤耐性淋菌)
Serious Threats	Drug-resistant <i>Campylobacter</i> (薬剤耐性カンピロバクター)
	Drug-resistant <i>Candida</i> (薬剤耐性カンジダ)
	Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae (基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生腸内細菌)
	Vancomycin-resistant <i>Enterococci</i> (バンコマイシン耐性腸球菌)
	Multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (多剤耐性緑膿菌)
	Drug-resistant nontyphoidal <i>Salmonella</i> (薬剤耐性非チフス性サルモネラ)
	Drug-resistant <i>Salmonella</i> serotype Typhi (薬剤耐性チフス菌)
	Drug-resistant <i>Shigella</i> (薬剤耐性赤痢菌)
	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA; メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)
	Drug-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> (薬剤耐性肺炎球菌)
Drug-resistant Tuberculosis (薬剤耐性結核菌)	

現在、多剤耐性グラム陰性菌感染症に対する「最後の切り札」として、コリスチン、別名ポリミキシン E (Figure 2) が臨床で使用されている。⁴⁾ コリスチンは福島県掛田町の土壌中の芽胞桿菌 (*Bacillus polymyxa* var. *colistinus*) から単離された天然物で、日本国内では 1951 年に硫酸塩 (硫酸コリスチン) の形で抗菌薬として発売され、1960 年にはコリスチン誘導体であるコリスチンメタンスルホン酸ナトリウムが発売された。しかし、重篤な副作用として腎障害と神経障害が報告されており、「オールドレブ」の商品名で販売されているグラクソ・スミスクライン社の注射用コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム製剤のインタビ

ユーフォーム中には腎機能障害の発現頻度が 21%、神経系障害の発現頻度は 2%との記載がある。⁵⁾ そのため、本剤の投与中には腎障害の発現に特に注意する必要があるとされている。重篤な副作用により、日本では 2004 年に一旦承認が取り消されたが、薬剤耐性・多剤耐性グラム陰性菌感染症が世界的に増加している状況を受けて、2015 年に改めて希少疾病用医薬品として再承認された経緯がある。

⁶⁾ また、コリスチンは家畜用の抗菌剤としても大量に使用されていることで耐性化の問題が顕著であり、実際にコリスチン耐性を示すプラスミド遺伝子 *mcr-1*, *mcr-2* の存在が既に確認され、コリスチンも抗菌薬として効かなくなるのは時間の問題と推測されている。⁷⁻⁹⁾

コリスチンは、7 残基のアミノ酸から構成される環状ペプチド骨格にアシル側鎖が伸びた構造をしており、分子内に塩基性アミノ酸である Dab が 6 残基含まれた塩基性ペプチドである。

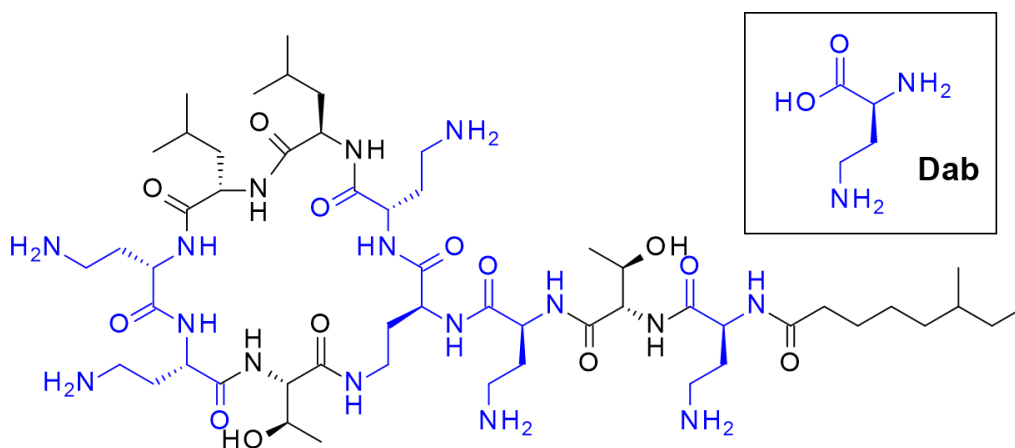
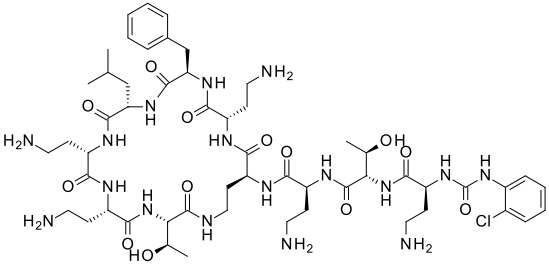
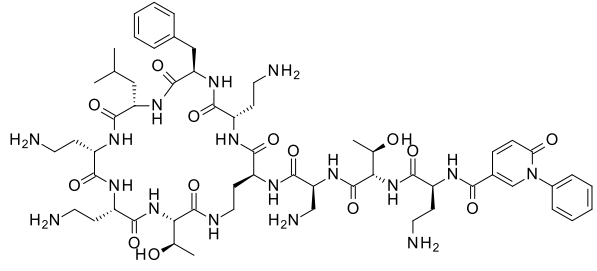
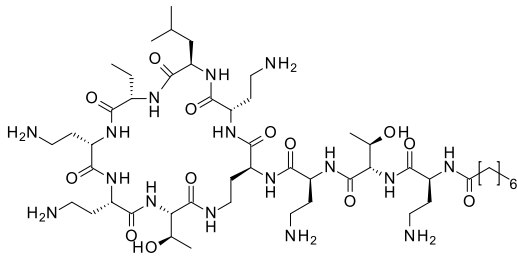
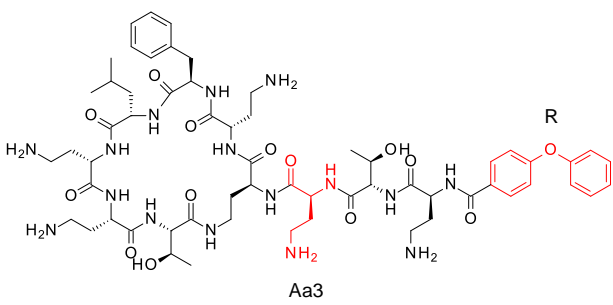
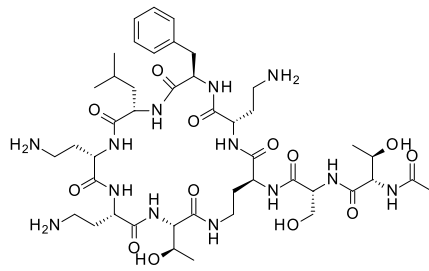
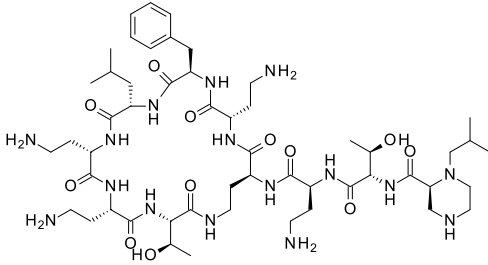
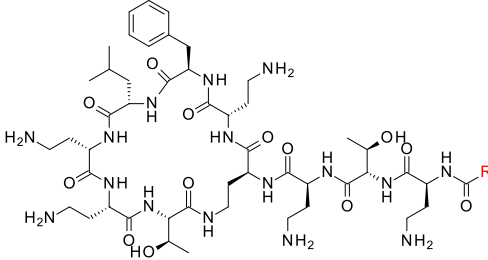
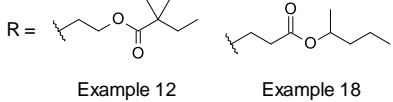
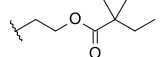
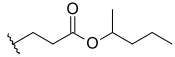
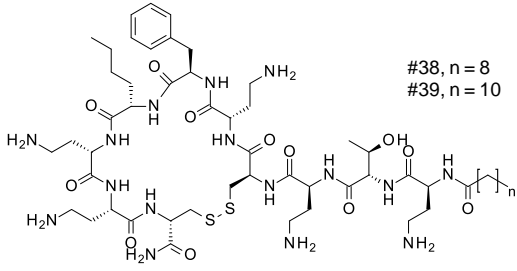


Figure 2. コリスチン(ポリミキシシン E)の構造

コリスチンの重篤な腎障害や神経障害などの副作用を回避する目的で、数多くのポリミキシシン様環状ペプチド誘導体の研究が報告されているが、いずれも未だ上市には至っていない (Table 2)。¹⁰⁾

Table 2. ポリキシン誘導体の構造と毒性プロファイル

Compound	Structure	Toxicological Profile
CB-182,804		<ul style="list-style-type: none"> •アミノ基 5 個 •サルモデルで腎毒性なし
Merck-Cubist		<ul style="list-style-type: none"> •2009 年 Phase1 試験 •2010 年 開発中止
Pfizer 5x		<ul style="list-style-type: none"> •アミノ基 5 個 •ラットモデルで腎毒性なし
Pfizer		<ul style="list-style-type: none"> •イヌモデルで腎毒性あり
FADDI-287		<ul style="list-style-type: none"> •アミノ基 5 個 •マウスモデルで腎毒性軽減
Monash Univ.		
Queensland analog 14		<ul style="list-style-type: none"> •アミノ基 5 個 •in vivo データなし
Univ. of Queensland		<ul style="list-style-type: none"> •R と Aa3 の違いにより、in vitro 細胞毒性に違い
SPR741 (NAB741)		<ul style="list-style-type: none"> •アミノ基 3 個 •2017 年 Phase1 試験 •直接の抗菌活性はなく、多剤の抗菌活性を高める
Spero Therapeutics		<ul style="list-style-type: none"> •ラットとサルモデルで腎毒性軽減

CA 824		<ul style="list-style-type: none"> ・アミノ基 6 個
Cantab Anti-Infectives		<ul style="list-style-type: none"> ・in vitro で腎毒性軽減
MicuRx analogs		<ul style="list-style-type: none"> ・アミノ基 5 個
MicuRx	 <p>R =  Example 12  Example 18</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ラットモデルで腎毒性軽減
Barcelona analogs		<ul style="list-style-type: none"> ・アミノ基 5 個
Univ. of Barcelona		<ul style="list-style-type: none"> ・マウスモデルで急性毒性軽減

コリスチンの副作用である腎障害のメカニズムに関しては、糸球体で濾過されたコリスチンが、腎近位尿細管細胞の管腔側膜に高発現している受容体タンパクであるメガリンによって腎臓内へ取り込まれ、腎障害をきたすことがわかっている (Figure 3)。さらに、メガリン拮抗薬として知られている薬剤のシラスチンを併用することによって腎毒性薬剤とメガリンの結合が阻害され、腎障害を軽減できることが明らかにされている。^{11, 12)}

ポリキシン類の腎障害については、アミノ基(正電荷)が少ないほど腎障害が軽減されるという研究報告もある。^{13, 14)}

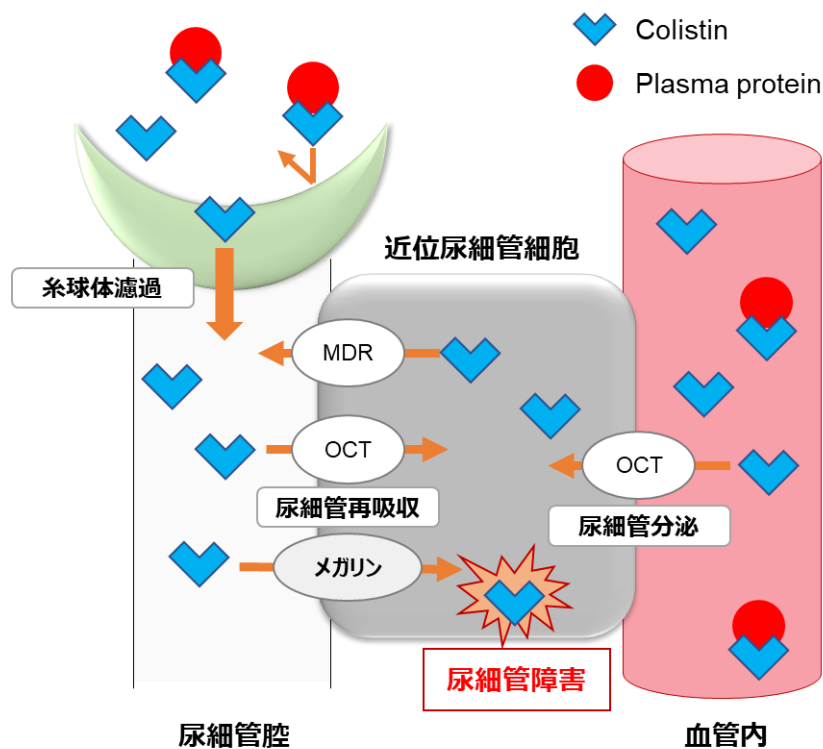


Figure 3. コリスチンの腎障害メカニズム

コリスチンをはじめとするポリミキシン類は、細菌の細胞質膜を障害することにより、殺菌的に作用することが知られている。その作用機序は、まずポリミキシンがグラム陰性菌外膜の LPS に結合する。この時、ポリミキシンのアシル側鎖と、LPS を構成する Lipid A の脂肪鎖との疎水性相互作用が、その結合に寄与しているとされている。次に、ポリミキシンの Dab 残基が Lipid A のリン酸基と相互作用するが、その際に元々 Lipid A に存在して外膜の安定化に寄与していたカルシウムイオン、マグネシウムイオンが追い出される。これにより、外膜が破壊される。続けて、内膜が破壊され、細胞内成分の漏出が起こり、結果としてグラム陰性菌が死滅することになる (Figure 4, 5)。^{15, 16)}

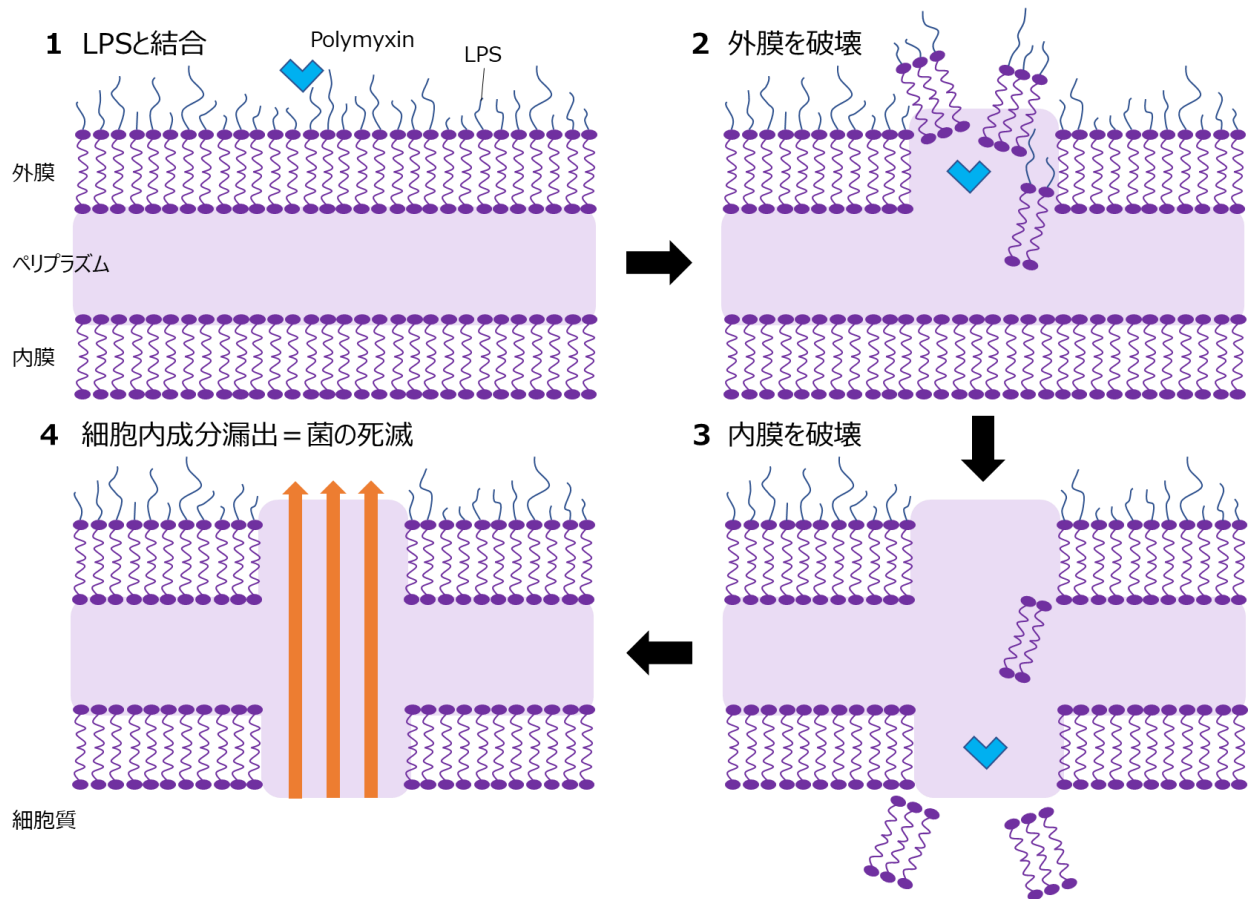


Figure 4. ポリミキシン類の推定抗菌活性メカニズム

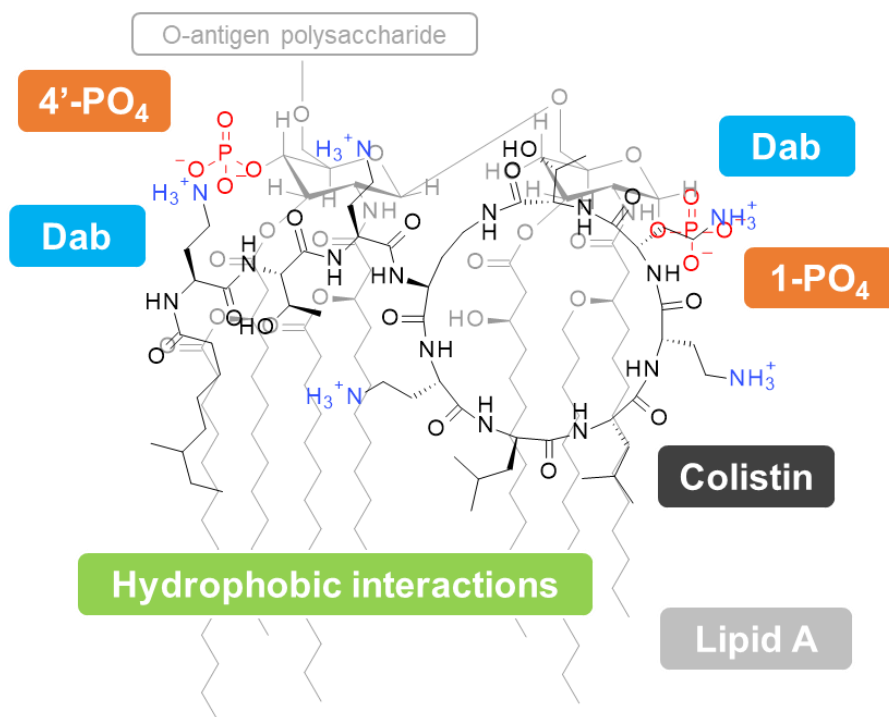


Figure 5. コリスチンと Lipid A の複合体分子モデル

第一三共(株)の LPS 阻害剤のスクリーニングにおいて、新潟県佐渡市小木町の海洋細菌 (*Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903 株)から単離・構造決定された天然環状ペプチドがオギペプチンである。環状ペプチド骨格から伸びるアシル側鎖の違いによって、オギペプチン A, B, C, D の 4 種が確認されており、その構造はコリスチンなどのポリミキシン類と類似した塩基性の環状リポペプチド構造となっている。オギペプチン中に含まれる塩基性アミノ酸残基として、アルギニン(Arg)と Dab に加えて、Dab の 3 位にヒドロキシ基を有する β -OH Dab という珍しいアミノ酸が 3 残基含まれている点が特徴的であるが、構造決定の先行研究では、 β -OH Dab の 3 位の不斉炭素の絶対立体配置は未決定であった (Figure 6)。また、オギペプチン A-D はグラム陰性菌に対する抗菌活性を有していることも報告されている。¹⁷⁻¹⁹⁾

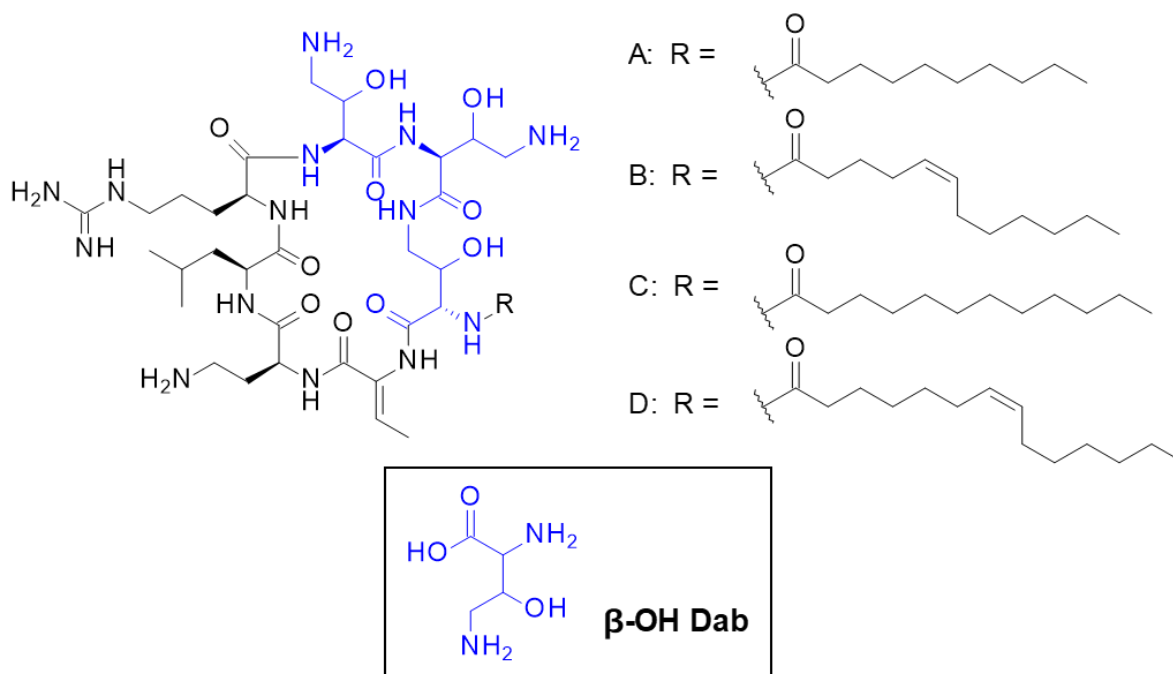


Figure 6. オギペプチン A-D の構造

Figure 7 にオギペプチン A-D のグラム陰性菌に対する抗菌活性を示す。アシネトバクター属菌、肺炎桿菌に対しての抗菌活性はコリスチンに劣るものの、多剤耐性緑膿菌 (Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP)、大腸菌に対してはコリスチンに匹敵する抗菌活性を有することが判った。

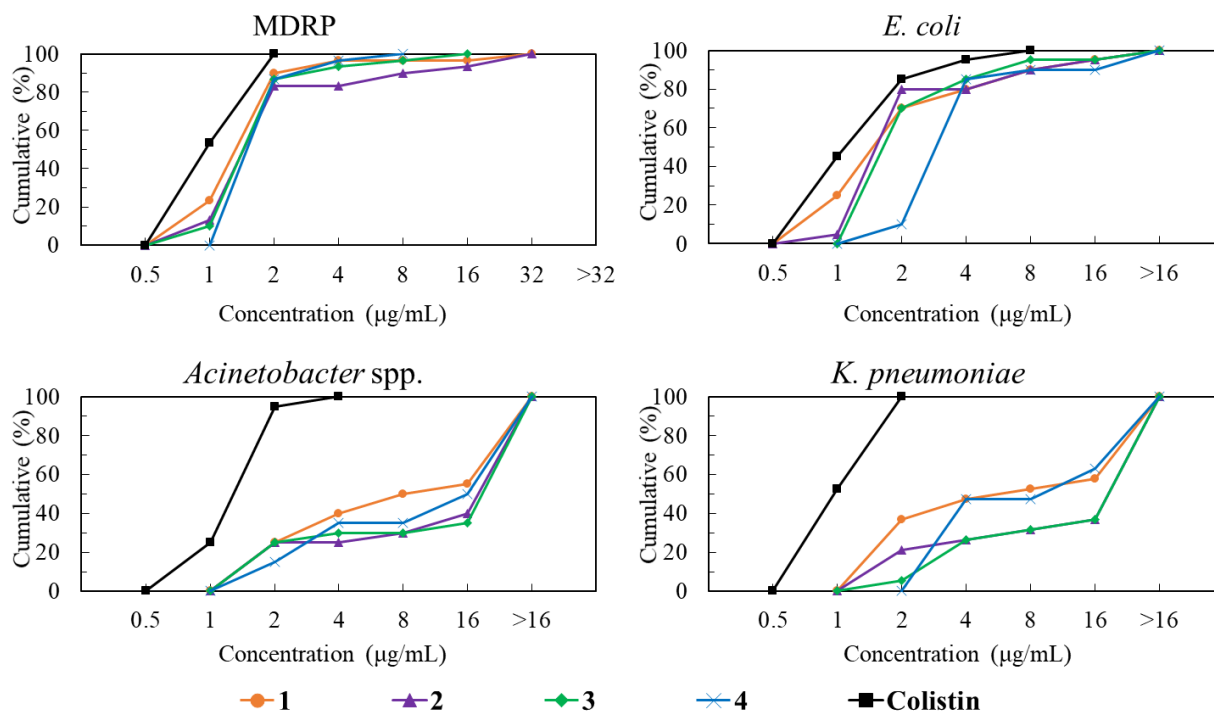


Figure 7. オギペプチン A-D (1-4) のグラム陰性菌に対する抗菌活性評価

オギペプチンはポリミキシン類と類似した構造的特徴を有し、上述のようにグラム陰性菌に対する抗菌活性を示すことから、新たな抗菌薬開発のリード化合物となりうると考えた。そこで本研究では、オギペプチンをリード化合物として、先行薬であるコリスチンより副作用が少なく、かつ十分な抗菌活性を有する新規抗菌薬を創製することを目的に、新規誘導体の合成やオギペプチン A の全合成研究を行った。

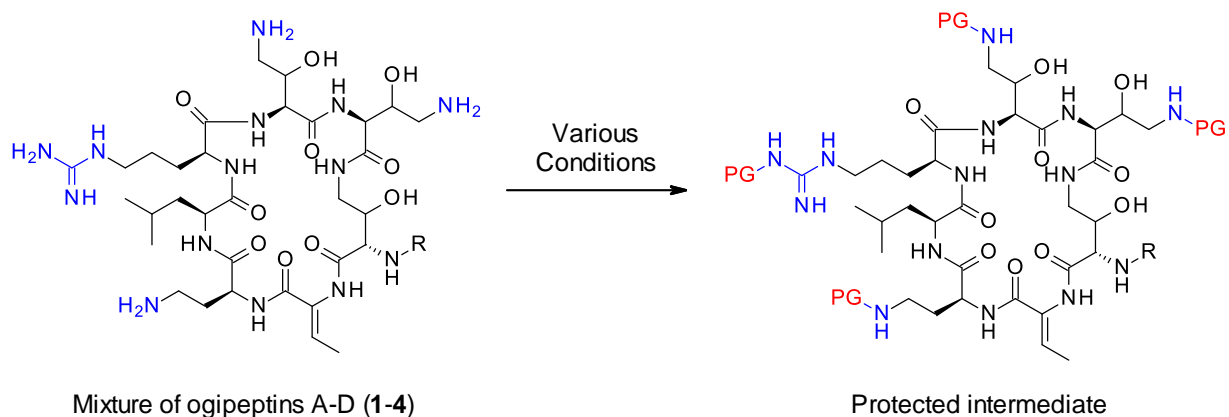
第 1 章

第 1 節 アシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成ルートの確立

ポリミキシン類の抗菌作用メカニズムから推測すると、オギペプチンも同様にそのアシル側鎖がグラム陰性菌の細胞壁を構成する LPS の Lipid A 部分と相互作用することで、抗菌活性を示していると思われた。したがって、アシル側鎖が抗菌活性において重要な役割を果たしていると考え、オギペプチンのアシル側鎖を変換した誘導体をデザイン・合成し、それらの抗菌活性を評価することとした。

アシル側鎖変換型オギペプチンの合成ルートを以下のように設計した。1) オギペプチン A-D 混合粗生成物に対して塩基性側鎖の保護を行い、2) オギペプチンのアシル側鎖を脱アシル化する。3) 任意のカルボン酸と縮合させ、4) 最後に保護基を除去する。

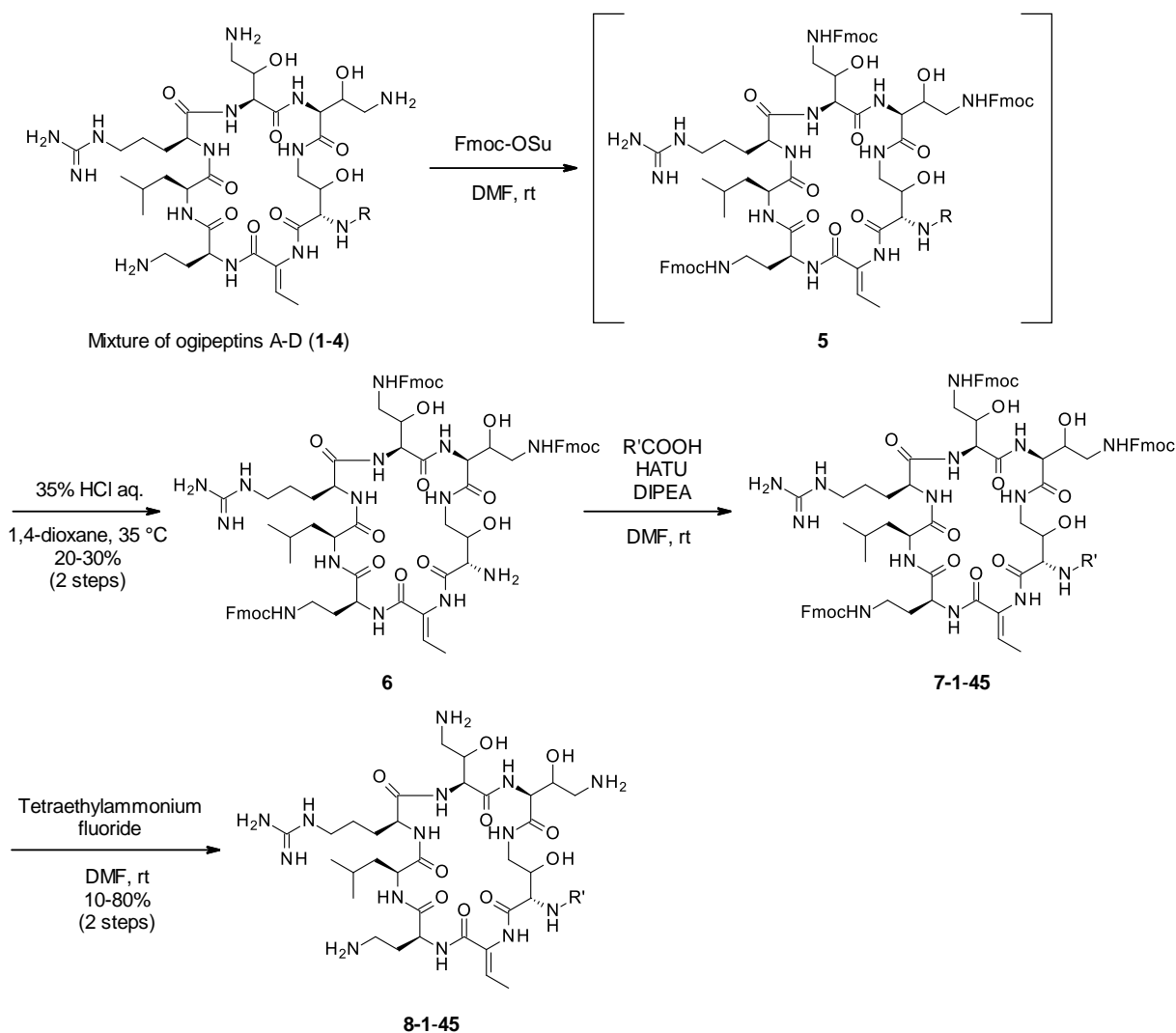
本合成ルートを確立するために、まず塩基性側鎖の保護基の検討を行った (Scheme 1)。オギペプチン生産菌株の Jar 培養によって得られたオギペプチン A-D を含む粗生成物を原料として用い、種々の保護基・反応条件を検討した (Table 2)。アシル系保護基として trifluoroacetyl 基 ($\text{CF}_3\text{CO}-$) または trichloroacetyl 基 ($\text{CCl}_3\text{CO}-$) を用いた場合、trifluoroacetyl 基は 3 個または 4 個保護体の混合物となった一方、trichloroacetyl 基は 3 個保護体のみを与える結果となった。Trichloroacetyl 保護体でその後の検討を進めたが、続くアシル側鎖の脱アシル化が進行しないことが判明し、アシル系保護基の利用は断念した。スルホンアミド系の保護基としては、2-(trimethylsilyl)ethanesulfonyl (SES) 基、quinoline-8-sulfonyl 基、2-thiophenesulfonyl 基、Ns 基、DNs 基を検討した。この中では Ns 基が収率とハンドリングの面で最も良い結果となり、詳細な検討を進めたが、最後の脱保護工程が進行しなかった。種々のチオールを用いた脱保護条件を試してみたが、反応が進行しないか、または反応系が複雑化するだけであった。カルバメート系保護基では、Boc 基、Troc 基、Alloc 基、Fmoc 基の検討を行った。その結果、Fmoc 基が最良であることが判明した。オギペプチン A-D 混合粗生成物の DMF 溶液に過剰量の *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyloxy]succinimide (Fmoc-OSu) を添加し、室温で一晩攪拌することで、3 個保護体のみが得られた。続く脱アシル化は、35% 塩酸-1,4-dioxane 混合溶液中、35 °Cで行い、所望の Fmoc 保護共通中間体 **6** を 20–30%の収率で得ることに成功した (Scheme 2)。



Scheme 1. 保護基の検討

Table 2. オギペプチン A-D 混合粗生成物 (1-4) への保護基の検討

保護基	結果	問題点
CF ₃ CO-	3-4 個保護体の混合物	(以降の反応は検討せず)
CCl ₃ CO-	3 個保護体	脱アシル化が進行せず
SES	原料のみ	保護がかからない
Quinoline-8-sulfonyl	1-3 個保護体の混合物	保護が不十分
2-Thiophenesulfonyl	3 個保護体	(最後の脱保護は検討せず)
Ns	3 個保護体	最後の脱保護が進行せず
DNs	3 個保護体	脱アシル化の反応後処理で分解した
Boc	4-6 個保護体の混合物	脱アシル化の酸加水分解に耐えられない
Troc	1-3 個保護体の混合物	保護が不十分
Alloc	>4 個保護体の混合物	脱アシル化が進行せず
Fmoc	3 個保護体	特になし



Scheme 2. アシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成ルート

中間体 **6** は Fmoc 基が 3 個かかった保護体であるが、その位置はおそらく 2 残基の β -OH Dab と Dab の第一級アミン上であると推測された。Arg 残基のグアニジノ基は無保護であるため、任意のカルボン酸との再アシル化が目的の位置で反応せず、グアニジノ基と反応してしまう可能性も考えられた。そこで、まずは中間体 **6** に対してオギペプチン A の側鎖であるデカン酸を縮合し、得られた半合成オギペプチン A の機器分析データが天然物と一致するかを確認することとした。

13 mg の中間体 **6** を DMF 1 mL に溶解し、デカン酸、HATU、DIPEA を添加して室温で一晩攪拌した。反応後処理とシリカゲルカラム精製により所望のアシル化体 (**7-1**) を 10.1 mg、収率 70% で得た。脱 Fmoc 反応は 20% piperidine/DMF 0.5 mL で行い、逆相 HPLC 精製と凍結乾燥により半合成オギペプチン A (**8-1**) を 5.8 mg、収率 99% で獲得した。得られた半合成品の ^1H -、 ^{13}C -NMR 測定を行い天然物と比較したところ、良い一致を示したので (Figure 8, 9)、目的の位置でアシル化が進行したこと

を確認した。以上の検討結果により、アシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成ルートが確立された。

なお、その後の検討で脱 Fmoc 反応は 20% piperidine/DMF を使用するよりも、tetraethylammonium fluoride を用いた方が逆相 HPLC 精製において脱保護された Fmoc 基由来の副生成物との分離が容易であることが判明したため、以降はその方法を採用した。

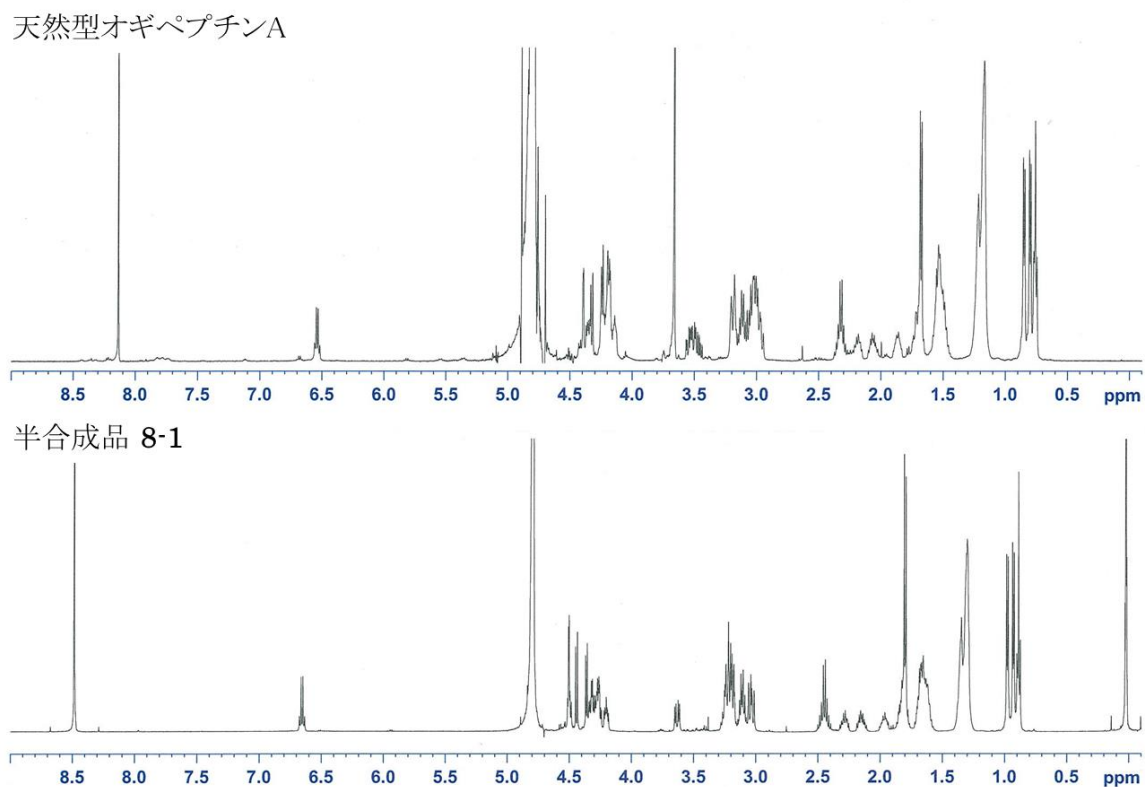
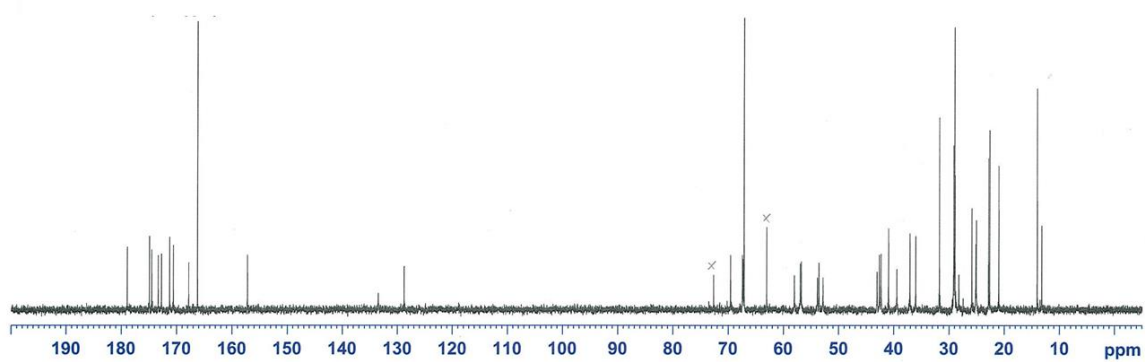


Figure 8. 天然型と半合成オギペプチン A の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

天然型オギペプチン A: 測定溶媒 0.04N DCl/D₂O

半合成オギペプチン A: 測定溶媒 D₂O+0.1% TMSP

天然型オギペプチンA



半合成品 8-1

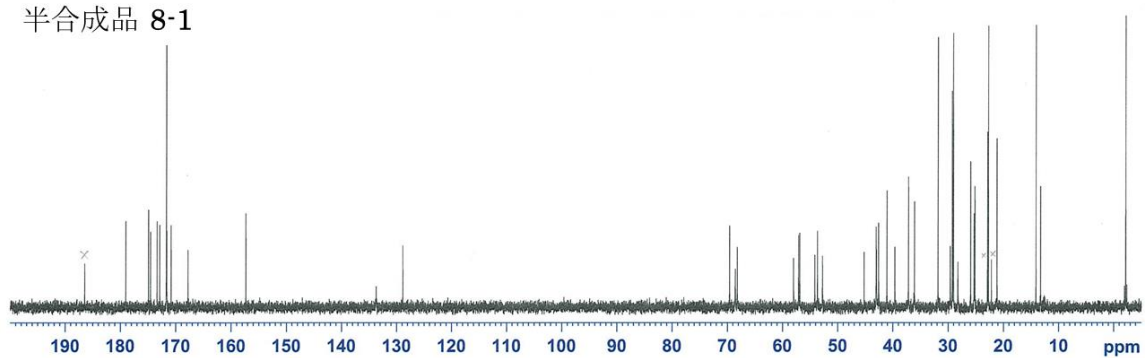


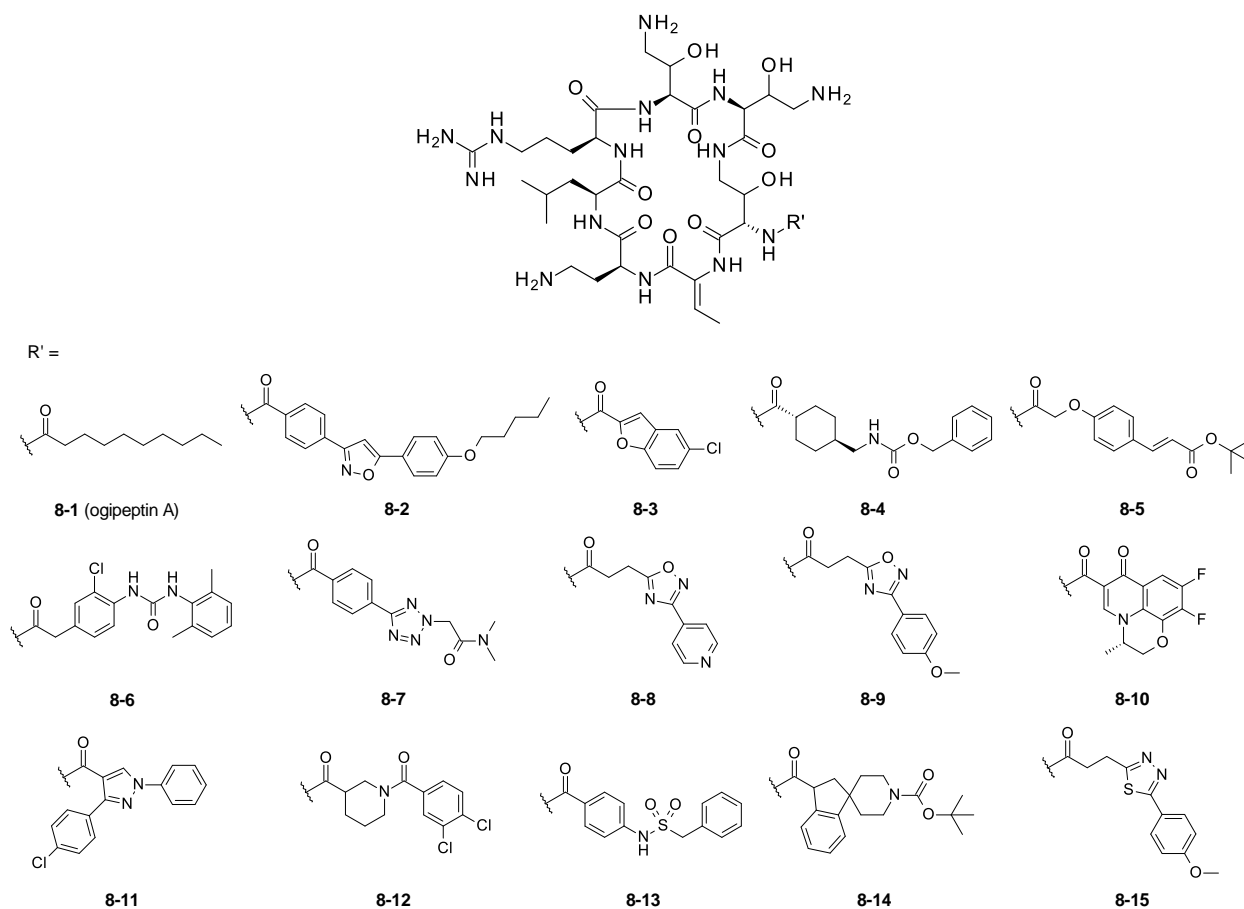
Figure 9. 天然型と半合成オギペプチン A の ^{13}C -NMR スペクトル

天然型オギペプチン A: 測定溶媒 0.04N DCl/D₂O

半合成オギペプチン A: 測定溶媒 D₂O+0.1% TMSP

第 2 節 新規誘導体 45 化合物の合成

前節で誘導体合成ルートが確立されたので、アシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成に着手した。アシル側鎖には、脂溶性や鎖長に多様性を持たせた様々なカルボン酸を使用することとし、市販で入手可能なカルボン酸から第一三共(株)における創薬研究の過程で得られたカルボン酸まで、多種多様なカルボン酸 45 種を選択した。カルボン酸については、第一三共(株)が保有するカルボン酸中間体ストックを、3D ファーマコフォアの類似度によってクラスタリングした後、各クラスターから LogD が高いものを中心に選抜した。LogD が高い、すなわち脂溶性が高いアシル側鎖を導入することで、Lipid A との疎水性相互作用向上を狙うこととした。合成はまず、中間体 **6** を原料として DMF 中、各種カルボン酸、HATU、DIPEA を用いてアシル化した。続く tetraethylammonium fluoride を用いた脱 Fmoc 反応後、逆相 HPLC 精製と凍結乾燥によって対応する誘導体 45 化合物を合成した (Figure 10)。



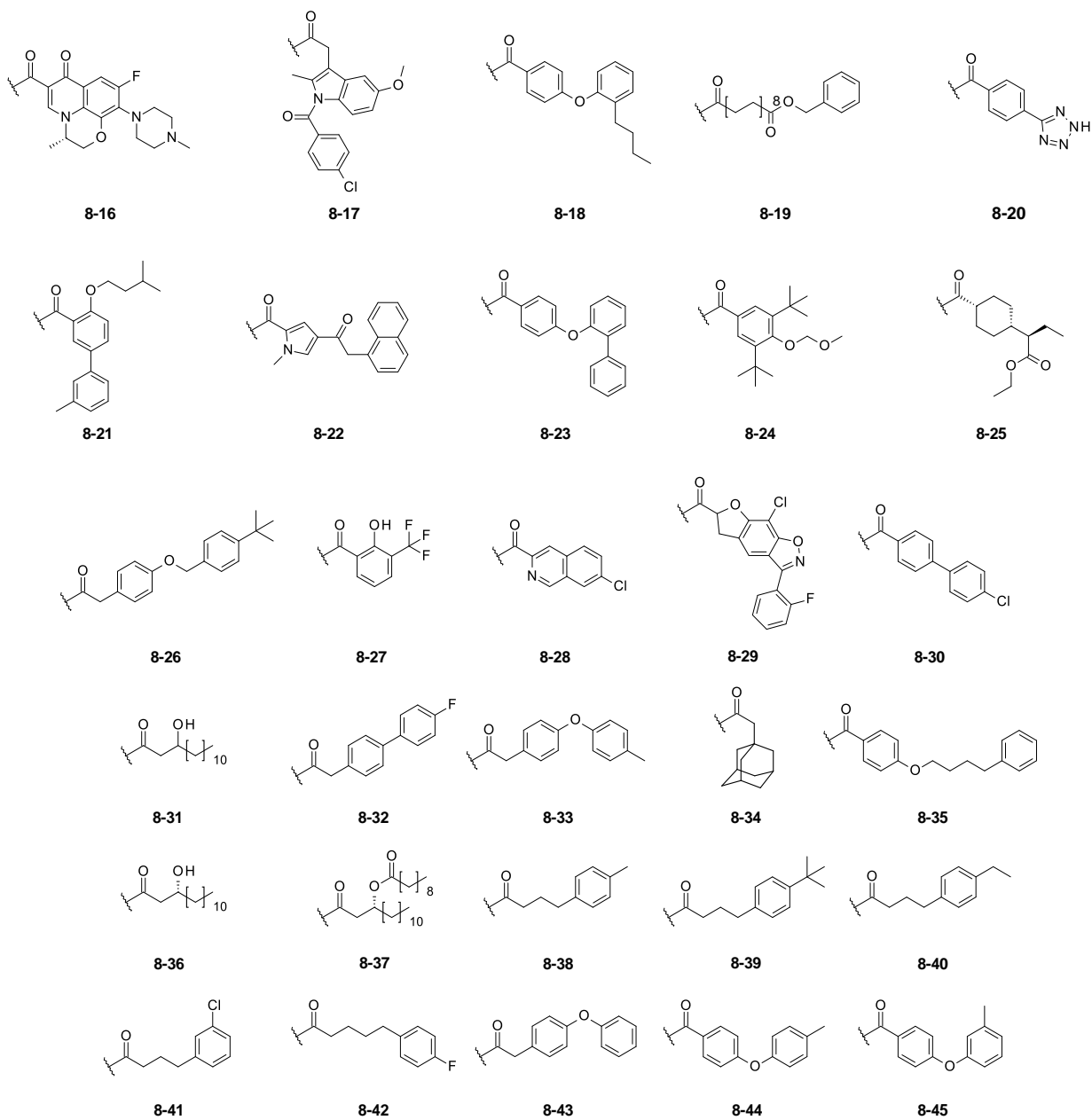


Figure 10. 新規誘導体 45 化合物の構造

第 3 節 新規誘導体 45 化合物の MIC 測定・細胞毒性試験

合成したオギペプチン誘導体 45 化合物の MIC(最小発育阻止濃度)測定を行い、各誘導体の抗菌活性を評価することとした。評価に用いるグラム陰性菌として以下に示す菌株を選択した。コリスチン感受性株として、*E. coli* ATCC 47076 株、*K. pneumoniae* ATCC 10031 株、*A. baumannii* ATCC 19606 株、*P. aeruginosa* ATCC 27853 株を選択し、オギペプチン A 耐性株には *K. pneumoniae* ATCC 700721 株、*K. pneumoniae* JCM 1662 株、*P. aeruginosa* ATCC 15692 株を使用した。これらの菌株は社内の抗菌活性試験で標準菌株として使用していたものである。なお、オギペプチン A 耐性株 3 種については、抗菌活性を上げるための指標となる菌株として使用することとした。その他の菌株には、コリスチン耐性株である *K. pneumoniae* IHMA 1387833 株、*A. baumannii* IHMA 1312713 株、*P. aeruginosa* IHMA 1375891 株を選択し、これらはスイスの International Health Management Associates (IHMA) 社から入手した。以上のグラム陰性菌株 10 種を用いた MIC 測定は、Clinical and Laboratory Standards Institute のガイドラインに従い、微量液体希釈法で行った。²⁰⁾ 各菌株を MHA(ミューラー・ヒントン寒天)培地に塗抹し、好気条件下、35 °Cで一晩培養した。培養した各菌株を 10% グリセロール溶液で濁度がマクファーランド濁度標準液 0.5 となるように調製したものをクラスタチューブに分注し、凍結シードとして超低温保存した。オギペプチン誘導体を 96 ウェルプレートに 2 µL/well ずつ分注した。Cation adjusted Mueller Hinton Broth に凍結シードが 250 倍になるように接種し、接種菌液を 98 µL/well ずつ分注し、好気条件下、35 °Cで 20 時間培養した。EnVision 2102 Multilabel Plate Reader(PerkinElmer)で濁度(OD₆₂₀)を測定し、各菌株の MIC を算出した。MIC 測定と並行して、各誘導体の細胞毒性を評価するために、HEK293 細胞(ヒト胎児腎細胞 293)と HepG2 細胞(ヒト肝がん由来細胞)を用いた細胞毒性試験も実施した。HEK293 細胞は一般的なヒトの培養細胞として選択し、HepG2 細胞は肝臓の代替モデルとして利用できるため in vivo での肝毒性と比較することを考えて用いた。各細胞株をダルベッコ改変イーグル培地(10%のウシ胎児血清を含む)で 37 °C、5% CO₂の条件で培養した後、様々な濃度の各誘導体サンプルを添加し、4 日間インキュベートした。その後、Cell-Titer-Glo®(Promega)を使用して、細胞の生存率をモニターした。MIC と細胞毒性試験の結果を Table 3 にまとめた。

Table 3. オギペプチン誘導体とコリスチンの抗菌活性・細胞毒性評価

	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											CC ₅₀ (μM)	
	Organism											Cell line	
	<i>E. coli</i> ATCC 47076	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700721	<i>K. pneumoniae</i> JCM 1662	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692	<i>K. pneumoniae</i> IHMA 1387833	<i>A. baumannii</i> IHMA 1312713	<i>P. aeruginosa</i> IHMA 1375891	HEK293 cell	HepG2 cell	
Colistin	1-2	1-2	2	2	1-2	4-16	2-4	32-64	8-16	64-128	>64	>64	
8-1	2	1	2	4	>256	>256	64	>256	>256	128	>64	>64	
8-2	8	8	16	16	128	256	64	256	32	128	N.D.	35	
8-3	2	2	2	4	8	>256	>256	>256	256	>256	>64	>64	
8-4	8	32	256	8	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-5	2	2	2	4	2	>256	8	>256	128	128	>64	>64	
8-6	4	128	>256	128	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-7	16	256	>256	128	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-8	2	8	256	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-9	2	2	8	8	2	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-10	32	>64	>64	16	64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	
8-11	4	4	8	8	>256	>256	128	>256	64	128	>64	>64	
8-12	8	>256	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-13	16	128	>256	256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-14	4	4	256	16	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-15	2	8	>256	8	16	>256	>256	>256	>256	>256	>64	>64	
8-16	128	64	>128	32	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>64	>64	
8-17	2	4	32	8	>256	>256	32	>256	>256	64	>64	>64	
8-18	2	4	2	4	4	4	64	>256	8	64	>64	>64	
8-19	8	8	4	16	8	16	16	>256	128	256	>64	>64	
8-20	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>128	>128	
8-21	8	16	128	4	>256	256	64	>256	32	8	>64	>128	
8-22	4	8	8	4	128	>256	128	>256	>256	128	>128	>128	
8-23	2	4	2	4	4	>256	64	>256	16	128	>128	>128	
8-24	4	8	>256	16	32	>256	>256	>256	>256	>256	>128	>128	
8-25	2	8	64	32	32	>256	>256	>256	>256	>256	>128	>128	
8-26	4	4	16	4	32	>256	16	>256	256	64	>128	>128	
8-27	2	4	16	>64	>64	>64	>64	>64	64	>64	>64	>64	
8-28	2	4	>256	2	4	>256	256	>256	>256	64	>128	>128	
8-29	2	2	32	4	256	256	64	>256	64	16	>128	>128	
8-30	2	2	2	4	2	256	256	>256	8	128	>64	>64	
8-31	4	2	4	4	256	>256	8	>256	32	32	57	>128	

8-32	2	2	16	4	>256	>256	128	>256	>256	128	>128>128
8-33	2	2	64	4	>256	>256	64	>256	>256	128	>128>128
8-34	2	2	>256	32	256	>256	>256	>256	>256	>256	>128>128
8-35	2	2	2	4	>256	>256	64	>256	64	256	>128>128
8-36	4	2	4	4	256	>256	8	>256	64	16	66 >128
8-37	16	64	>256	128	128	>256	256	>256	256	128	38 47
8-38	1	1	2	4	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>128>128
8-39	1	1	2	4	>256	>256	16	>256	>256	128	>128>128
8-40	1	1	2	4	>256	>256	256	>256	>256	256	>128>128
8-41	1	2	4	4	>256	>256	256	>256	>256	>256	>128>128
8-42	1	2	4	4	>256	>256	256	>256	>256	>256	>128>128
8-43	1	1	256	4	>256	>256	128	>256	>256	128	>128>128
8-44	1	1	2	2	>256	>256	4	>256	32	64	>128>128
8-45	1	1	2	4	256	>256	64	>256	64	128	>128>128

*N.D. = not determined

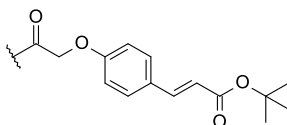
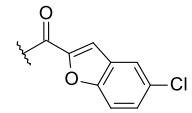
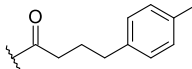
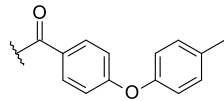
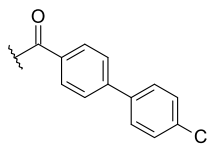
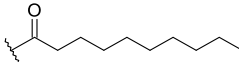
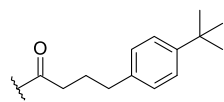
MIC 測定の結果より、ほとんどの誘導体がコリスチン感受性株に対して良好な抗菌活性を示すことがわかった。その一方で、オギペプチン A 耐性株とコリスチン耐性株に対しては弱い活性を示すか、またはほぼ活性を示さないという結果であった。この傾向はオギペプチン A (8-1)と同様であった。アシル側鎖の構造と抗菌活性の関係について考察すると、ヘテロ原子や極性官能基を持つもの、脂環式側鎖などは抗菌活性が弱まる傾向にあった(8-4, 8-7, 8-12, 8-13 など)。また、長鎖脂肪酸やフェニル基、フェノキシフェニル構造を持つものなどはより強い抗菌活性を示した(8-18, 8-23, 8-30, 8-38-45 など)。このことから、オギペプチンはポリミキシン類と同様に、アシル側鎖と Lipid A との相互作用が抗菌活性に重要であることが示唆された。

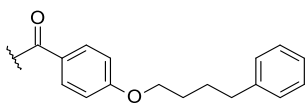
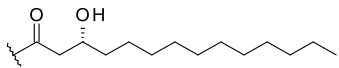
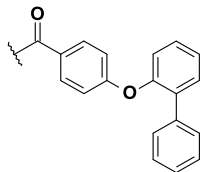
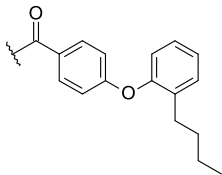
HEK293 細胞と HepG2 細胞に対する細胞毒性試験では、ほとんどの誘導体がコリスチンと同程度か、それよりも弱い細胞毒性値(CC₅₀)を示す結果となった。

第 4 節 新規誘導体 10 化合物の腎毒性試験

MIC 測定で良好な抗菌活性を示した誘導体 10 化合物 (8-3, 8-5, 8-18, 8-23, 8-30, 8-35, 8-36, 8-38, 8-39, 8-44) の腎毒性評価を行うこととした。その他の毒性評価については、良好な抗菌活性と低腎毒性を示す誘導体が得られた後で実施することとし、まずはコリスチンの副作用で最も懸念される腎毒性に主眼を置き、評価を行った。腎毒性試験は、LLC-PK1 細胞(ブタ腎尿細管細胞)を用いて、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) を利用した文献既知のプロトコール²¹⁾に従って行い、各化合物の LLC-PK1 細胞に対する毒性を腎毒性として評価した。各化合物の LD₂₀ 値 (20%細胞致死量) と対応するアシル鎖の LogD 値を Table 4 に示す。なお、各化合物はアシル側鎖の LogD 値が低い順に並べ、対応する LD₂₀ 値を記した。

Table 4. オギペプチン誘導体の LD₂₀ 値とアシル側鎖の LogD 値

Compound	Structure	LD ₂₀ [mg/mL]	LogD
8-5		265.30	2.65
8-3		>489.70	2.83
8-38		480.55	2.99
8-44		>252.78	3.62
8-30		89.37	3.75
8-1 (ogipeptin A)		119.40	3.76
8-39		250.80	3.91

8-35		131.65	4.37
8-36		16.06	4.48
8-23		48.29	4.65
8-18		36.86	4.98
Colistin sulfate	-	44.20	-

コリスチンの LD₂₀ 値は 44.2 mg/mL であったが、これよりも強いまたは同程度の腎毒性を示したものは 8-18, 8-23, 8-36 の 3 化合物であった。オギペプチン A (8-1) の腎毒性はコリスチンよりも低い LD₂₀ 値 119.4 mg/mL を示したが、これよりもさらに弱い腎毒性であったものは 6 化合物あり、その中でも特に 8-3 と 8-38 は格段に弱い値を示した。コリスチン、オギペプチン A (8-1)、8-3、8-38 の腎毒性試験結果を抜粋して Figure 11 にまとめた。コリスチンと誘導体を比較すると、明確に腎毒性が低減していることがわかる。アシル側鎖の LogD 値をみると、4 を超える誘導体は比較的強い腎毒性を示すことがわかり、その一方で 4 以下の誘導体は腎毒性が低減する傾向にあることが明らかとなった。このような結果から、オギペプチン誘導体がより強い抗菌活性を示すには、LPS と相互作用するためにアシル側鎖にはある程度の脂溶性が必要ではあるものの、高すぎる脂溶性は強い腎毒性を生じさせると推察された。

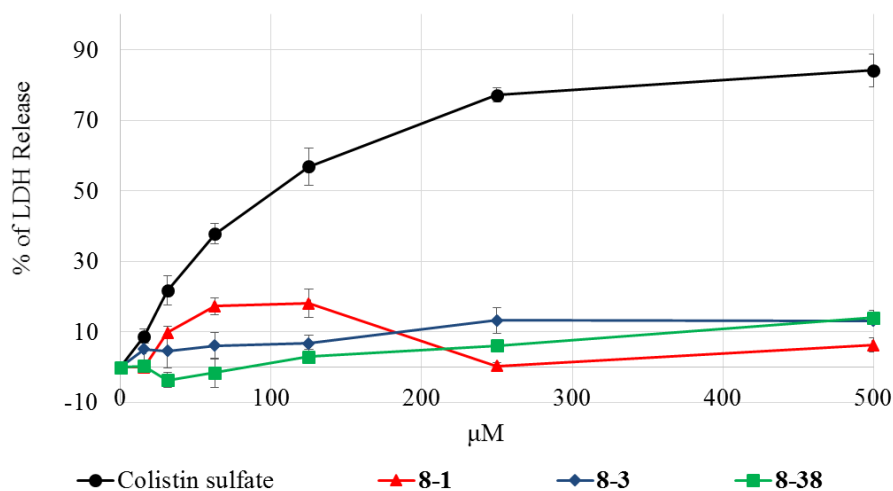


Figure 11. LLC-PK1 細胞を用いた *in vitro* 腎毒性スクリーニング結果

以上のように、本章ではアシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成ルートを確立し、新規誘導体 45 化合物の合成に成功した。それらの抗菌活性評価と腎毒性・細胞毒性試験を行ったところ、グラム陰性菌のコリスチン感受性株 4 種に対してほとんどの誘導体が良好な抗菌活性を示し、さらにその中からコリスチンと比較して格段に腎毒性が低減した誘導体 **8-3** や **8-38** を得ることができた (Figure 12)。抗菌活性と安全性のバランスを取るには、アシル側鎖の脂溶性度のチューニングが重要であることも見出した。

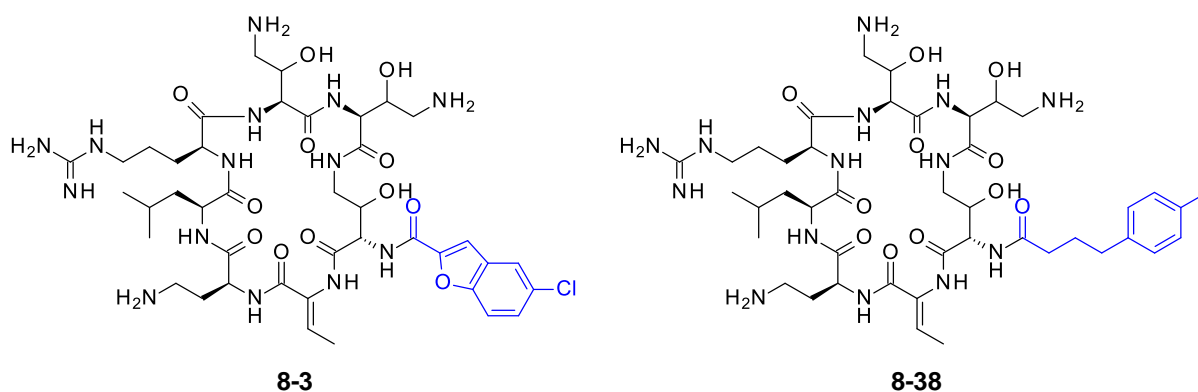


Figure 12. **8-3** 及び **8-38** の構造

第 2 章

第 1 節 オギペプチンの絶対立体配置についての考察と構造解析のための各種検討

前章にて、コリスチンと同程度の抗菌活性を示し、*in vitro* での腎毒性が軽減されたアシル側鎖変換型オギペプチン誘導体を複数化合物得ることに成功したが、コリスチンよりも強い抗菌活性を示す化合物を得るには至らなかった。この結果から、アシル側鎖の変換だけでは大幅な抗菌活性向上は見込めないと判断し、さらなる誘導体展開の方向としてオギペプチンの骨格自体を変換した誘導体の合成が必要と考えた。例えば、 β -OH Dab のヒドロキシ基を修飾または除去した誘導体や Dhb をグリシン (Gly) 等の他のアミノ酸残基に変換して構造を簡略したもの、強塩基性のグアニジノ基を有する Arg 残基を他のアミノ酸残基へ変換した誘導体などが挙げられる。このような誘導体を合成するには、ペプチド固相合成 (SPPS) の手法を用いてアミノ酸を 1 残基ずつ縮合させた後、環化させる合成ルートが最良であると考えられるため、まずはオギペプチンの全合成ルートの確立を目指して検討を開始した。

オギペプチンの全合成を行うにあたり、オギペプチンの絶対立体配置が未解明であることが問題であった。オギペプチンは 7 残基のアミノ酸で構成されているが、先行研究において Arg、ロイシン (Leu)、Dab は L 体であり、Dhb の立体化学は *Z* 配置であることが確認されている。その一方で、残りの 3 残基の β -OH Dab の絶対立体配置については不明であり、理論上 4 種類の立体異性体が考えられた (Figure 13)。

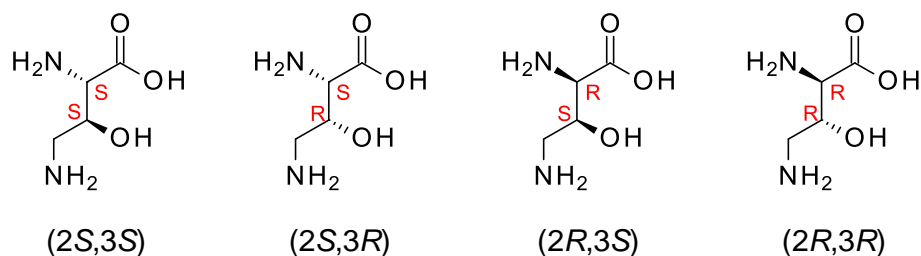


Figure 13. β -OH Dab の 4 種の立体異性体

そこで、オギペプチン生産菌株の生合成遺伝子解析を行った結果、オギペプチンの生合成遺伝子クラーター中には D-アミノ酸を生じさせる酵素は含まれなかったため、 β -OH Dab も他のアミノ酸残基と同様に L 体であることが判明した (天然物組合との共同研究のため詳細は非開示)。²²⁾ すなわち、 β -OH

Dab の 2 位の立体化学は *S* 配置であることが確定し、不明な立体化学は β -OH Dab のヒドロキシ基が結合した 3 位不斉炭素のみとなり、この位置が *S* または *R* 配置のどちらであるかが問題となった (Figure 14)。 β -OH Dab は 3 残基あるため、*S* または *R* 配置の組み合わせにより 8 種 ($2 \times 2 \times 2$) のジアステレオマーが考えられ、このうちの 하나가天然型の絶対立体配置を有すると考えられた。

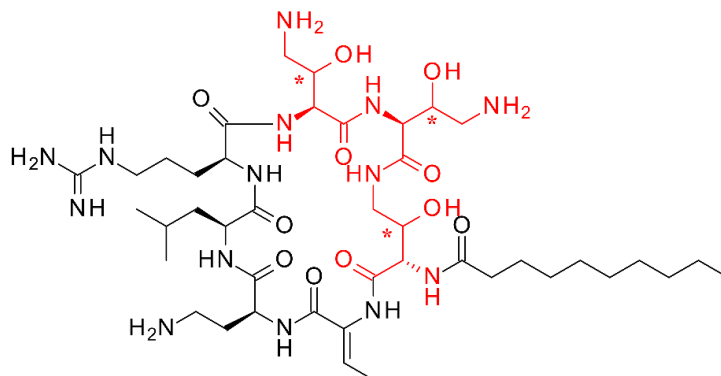


Figure 14. オギペプチン A(1) の構造と β -OH Dab の不明な絶対立体配置(*)

オギペプチンの絶対立体配置を解明するために、X 線結晶構造解析を検討することとした。第 1 章で合成した **8-44** から Ns 保護体 **9-1**、Boc 保護体 **9-2** をそれぞれ得た (Figure 15)。これらを用いて、溶媒蒸気暴露法による結晶化スクリーニングを行ったところ、**9-2** が酢酸溶媒中でのみ針状結晶を生じた。しかしながら、この結晶に X 線を照射してみたものの、構造解析に足るような X 線回折像は得られなかった。その後、Scheme 2 の Fmoc 保護共通中間体 **6** を用いて種々の溶媒系や温度で 30 を超える条件で結晶化検討を行ったが、良質な結晶は得られなかった。以上の結果を持って、オギペプチン誘導体の結晶化は困難であると判断し、X 線結晶構造解析の手法による検討は中止した。

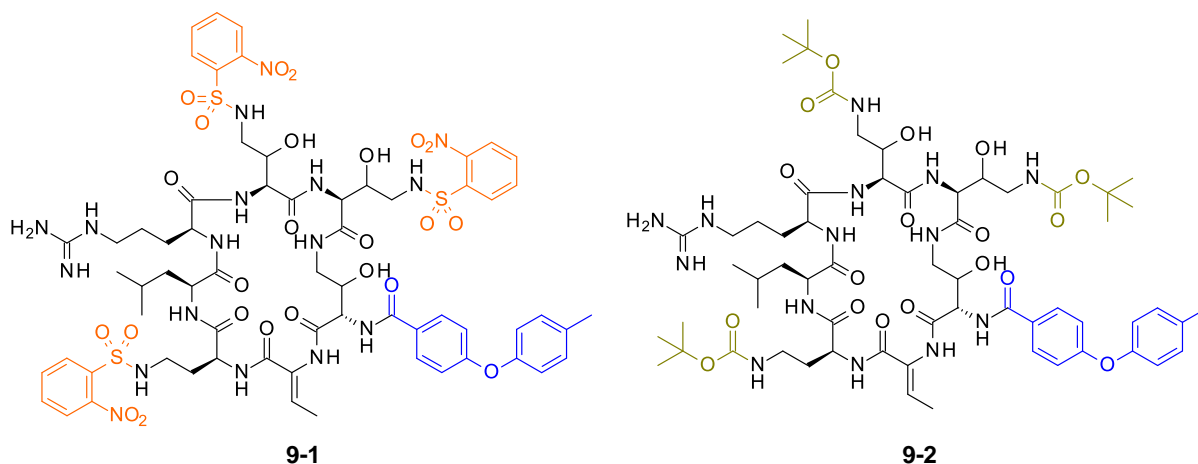




Figure 15. オギペプチン誘導体 **9-1** 及び **9-2** と得られた針状結晶の写真

次に、オギペプチン A の全合成による絶対立体配置の解明を検討することとした。オギペプチン中の 3 残基の β -OH Dab は単一の立体配置を有し、全て(2*S*,3*S*)-体または全て(2*S*,3*R*)-体で構成されている可能性が高いと推測した。そこで、実際に β -OH Dab が全て(2*S*,3*S*)-体または全て(2*S*,3*R*)-体で構成されたオギペプチン A のジアステレオマー 2 種 **10-1** 及び **10-2** を全合成し、天然型と機器分析データが一致するかを確認することとした (Figure 16)。

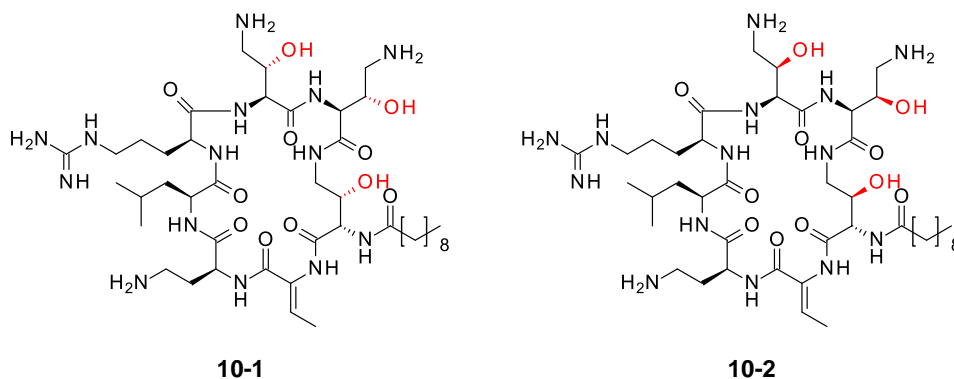


Figure 16. 単一の β -OH Dab で構成されるオギペプチン A の推定構造

10-1: 全て(2*S*,3*S*)-体、**10-2**: 全て(2*S*,3*R*)-体

全合成の詳細は第 3 章にて詳述するが、オギペプチン A の全合成ルートを確認し、所望の **10-1**, **10-2** をそれぞれ合成することに成功した。しかしながら、天然オギペプチン A と HPLC により比較分析を行ったところ、**10-1** と **10-2** はどちらも天然型と保持時間が一致しなかった。したがって、**10-1** と **10-2** はオギペプチン A の真の構造ではなく、他に考えられる 6 種のジアステレオマーの中に真の構造があると考えられた。残り 6 種のジアステレオマーを手掛かりなく全て合成し、一つずつ分析して天然型と比較していく方法は非常に手間がかかるため、別法でのアプローチを試みることにした。

第 2 節 オギペプチン A への改良 Marfey 法の適用

アミノ酸の立体化学 D-/L-配置を簡便に決定する手段として、1984 年に Peter Marfey がラベル化試薬 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (L-FDAA, Marfey 試薬) の合成とそれを用いたアミノ酸の標識、HPLC 分析を組み合わせた手法 (通称 Marfey 法) を発表した。²³⁾ Marfey 試薬と反応したアミノ酸は D 体と L 体のコンフォメーションの違いにより分子内水素結合の形成の仕方が異なり、続く HPLC 分析では D 体よりも先に L 体の方が溶出されてくるため、その分析結果と標品アミノ酸との HPLC 保持時間の比較により D-/L-配置を決定することが可能となっている。その後の分析機器の発展とともに、Marfey 法と GC, LC-MS, NMR 等の様々な分析手法を組み合わせた手法が報告され、多数の化合物の立体化学が明らかにされてきた。²⁴⁾ そのような発展的手法の一つとして、1995 年に原田らが発表したのが改良 Marfey 法である。^{25,26)} 改良 Marfey 法は Marfey 法と LC-MS を組み合わせた手法であり、FDAA の代わりに 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucine amide (L-FDLA) を利用することで、LC-MS 分析において標識アミノ酸のより高感度な検出が可能となった。原田らは実際に天然ペプチドに対して改良 Marfey 法を適用し、LC-MS の保持時間から *N*-メチル化アミノ酸などの非天然アミノ酸であってもその D-/L-を容易に判別できることを報告している。^{25,26)} また、最近では 2020 年に、京都大学の掛谷らが天然化合物ヤクアミド B の構造から着想を得たラベル化試薬 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-valine-*N,N*-dimethylethylenediamine-amide (L-FDVDA) と 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucine-*N,N*-dimethylethylenediamine-amide (L-FDLDA) を開発し、ごく微量の天然物サンプルに対して FDAA や FDLA を用いた場合よりも LC-MS 分析において標識アミノ酸を格段に高感度で検出できることを見出している (Figure 17)。²⁷⁾

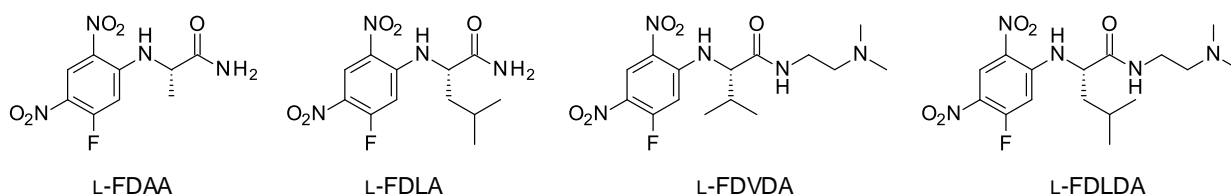
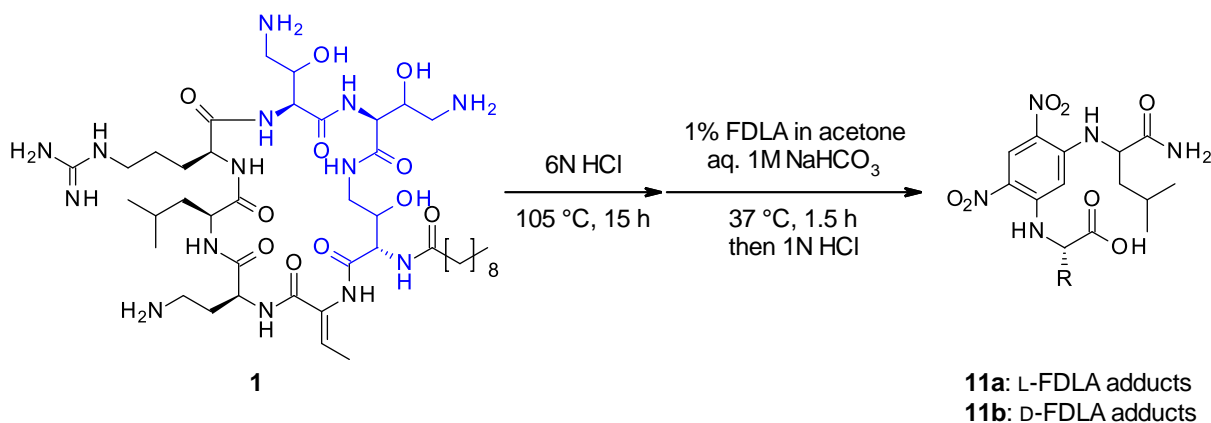


Figure 17. Marfey 試薬とその派生試薬

オギペプチンの構造決定に関する先行研究では、改良 Marfey 法と NMR 解析により構造解析を行ったが、 β -OH Dab の各ジアステレオマー標品の入手が困難なこともあり、絶対立体配置の完全決定に

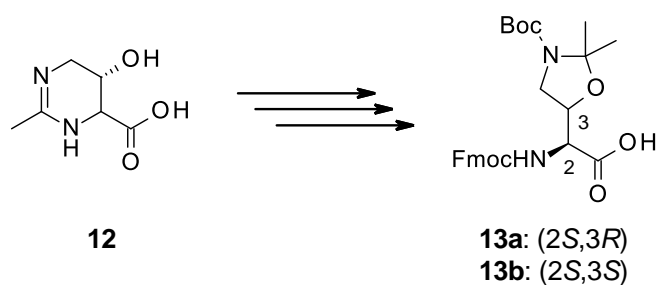
は至らなかった。¹⁹⁾ そこで、3位の立体化学が *S* または *R* 配置である L-β-OH Dab 標品を化学合成し
て用意し、改めて改良 Marfey 法を実施することとした。

はじめに、天然型オギペプチン A を用いて改良 Marfey 法を行った。オギペプチン A を 6N 塩酸に
よって酸加水分解し、1 アミノ酸単位に分解した後、L-FDLA または D-FDLA を反応させて各アミノ酸
のアミノ基を標識した (Scheme 3)。塩基性アミノ酸は反応点が α-アミノ基と側鎖のアミノ基の 2 か所ある
ため、2 分子の FDLA と反応したものが主生成物として得られた。続いて、LC-MS 及び HPLC 分析を
行い、最適な分離条件の探索を行った。また、この実験と並行して、オギペプチンの構成アミノ酸である
L-Arg、L-Leu、L-Dab、(2*S*)-Dhb の標品も同様に標識・分析して、各アミノ酸の HPLC における保持時
間も確認した。



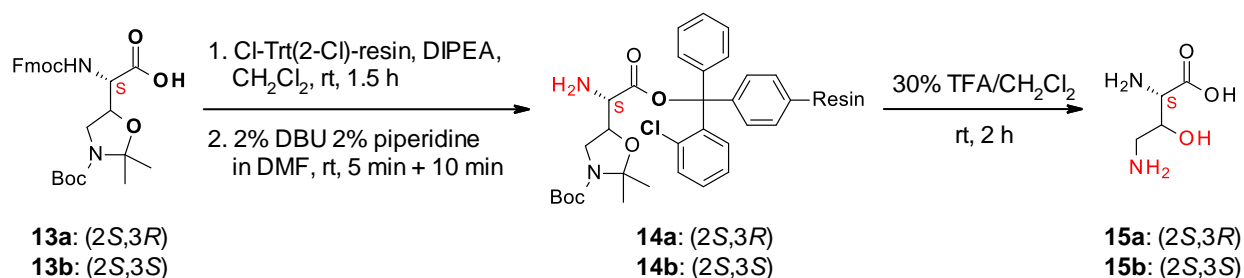
Scheme 3. オギペプチン A の酸加水分解と FDLA 標識

β-OH Dab については、その標品を得るために合成を行った。β-OH Dab 保護体の合成については
数例の報告があり、それらの文献を参考に合成を行った。^{28, 29)} ヒドロキシエクトシン (**12**) を出発原料とし
て多工程を経て、所望の β-OH Dab 保護体、(2*S*,3*R*)-または(2*S*,3*S*)-Fmoc-β-OH Dab(Boc,
acetonide)-OH (**13a**, **13b**) を合成した (Scheme 4)。



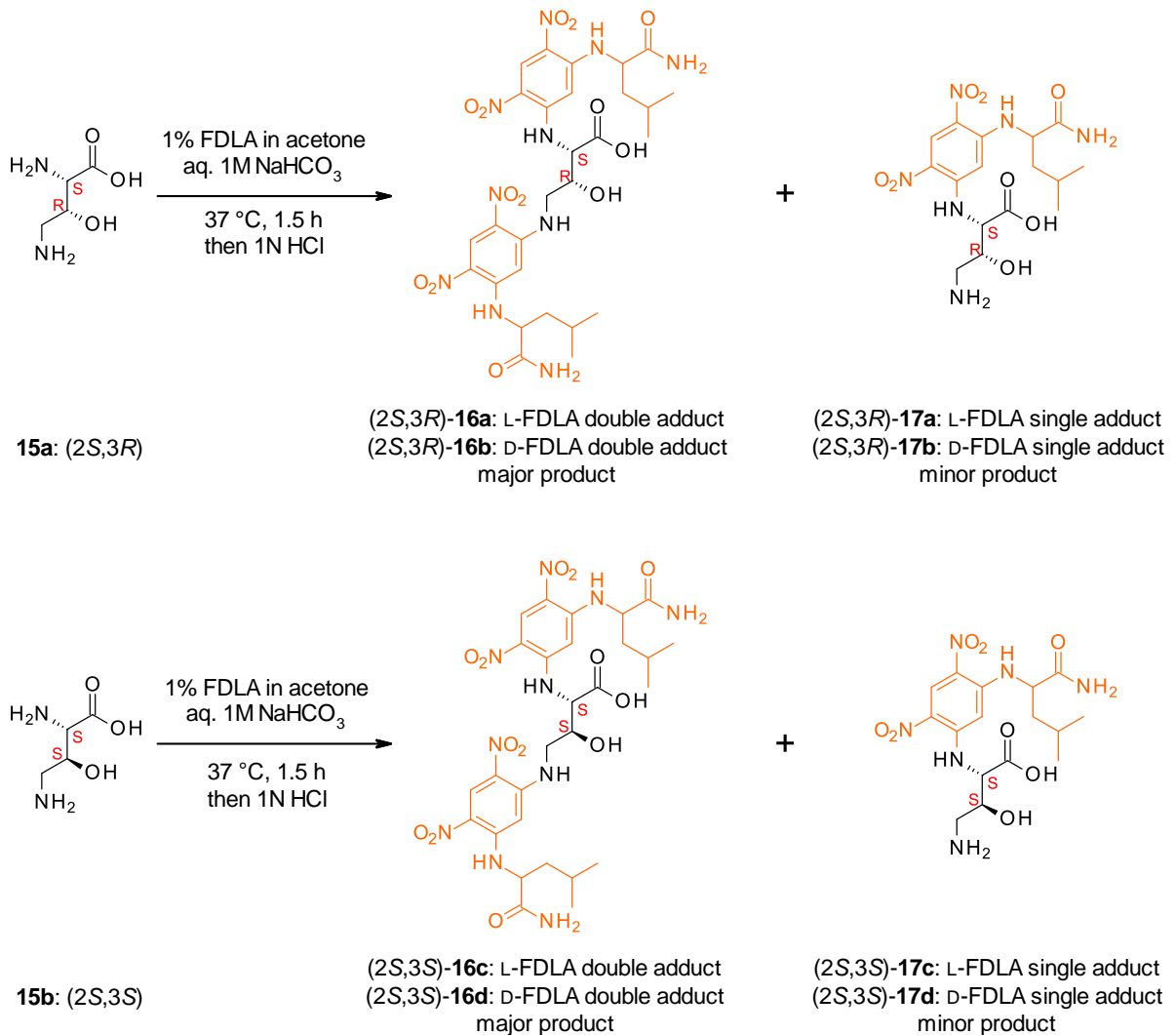
Scheme 4. Fmoc-β-OH Dab(Boc, acetonide)-OH の合成

続いて、**13** を用いて、標品となる β -OH Dab (**15**) の合成を行った。脱 Fmoc 反応の後処理・精製を簡単にするために、まず **13a**, **13b** をそれぞれ Cl-Trt(2-Cl)-resin 上に担持させた。次に、固相上で脱 Fmoc 反応を行い、DMF と CH_2Cl_2 によるレジンを洗浄を行うだけの簡便な操作で **14a**, **14b** を得た。TFA による酸処理で、レジンからの切り出し、及び Boc 基と acetonide 基の脱保護を同時に行い、 β -OH Dab 標品 **15a**, **15b** をそれぞれ合成した (Scheme 5)。



Scheme 5. β -OH Dab 標品の合成

得られた **15** は高極性かつ UV 吸収も乏しいため精製は行わず、粗生成物のまま FDLA 標識に用いた。Scheme 3 の反応条件と同様にして L-FDLA または D-FDLA を使用してそれぞれ標識を行った。 β -OH Dab は α 位と γ 位の 2 か所にアミノ基を有するため、前述の通り 2 分子の FDLA と反応したもの (**16a-d**) が主生成物として得られ、1 分子と反応したもの (**17 a-d**) はわずかに検出できる程度であった (Scheme 6)。**16** と **17** の混合サンプルを用いて、オギペプチン A 酸加水分解物の FDLA 標識サンプル **11** と同様に LC-MS 及び HPLC 分析を行い、最適な分離条件の探索のために種々条件検討を行った。



Scheme 6. β -OH Dab 標品の FDLA 標識

16 と **17** の混合サンプルの LC-MS 及び HPLC 分析を検討したところ、D-FDLA で標識した **16b**, **16d** よりも L-FDLA で標識した **16a**, **16c** の方が良好なピーク分離を示した。また、マイナー成分である L-FDLA の 1 個標識体 **17a**, **17c** は 2 個標識体の **16a**, **16c** に比べるとピーク強度が非常に弱く、かつ **17a**, **c** 間のピーク分離も悪かった。したがって、解析には β -OH Dab の L-FDLA・2 個標識体 **16a**, **16c** のピークを用いることにした。分析条件の検討を行った結果、以下の LC-MS 分析条件が最も良好なピーク分離を示すことを見出した。本条件で、 β -OH Dab の (2*S*,3*R*)-体または (2*S*,3*S*)-体、オギペプチン A 酸加水分解物の L-FDLA 標識サンプルを分析した LC-MS チャートを Figure 18 に示した。

<LC-MS 分析条件>

Instrument: AB SCIEX API2000 LC/MS

Column: Combi-RP (5 μm , 4.6 i.d. \times 50 mm, Nomura Chemical)

Flow rate: 2.5 mL/min

Mobile phase: A) 0.1% formic acid in H_2O ; B) 0.1% formic acid in CH_3CN

Gradient (B): 0 min 0%; 0–3.75 min 0% to 100%; 3.75–4.75 min 100%; 4.75–5.00 min 100% to 0%

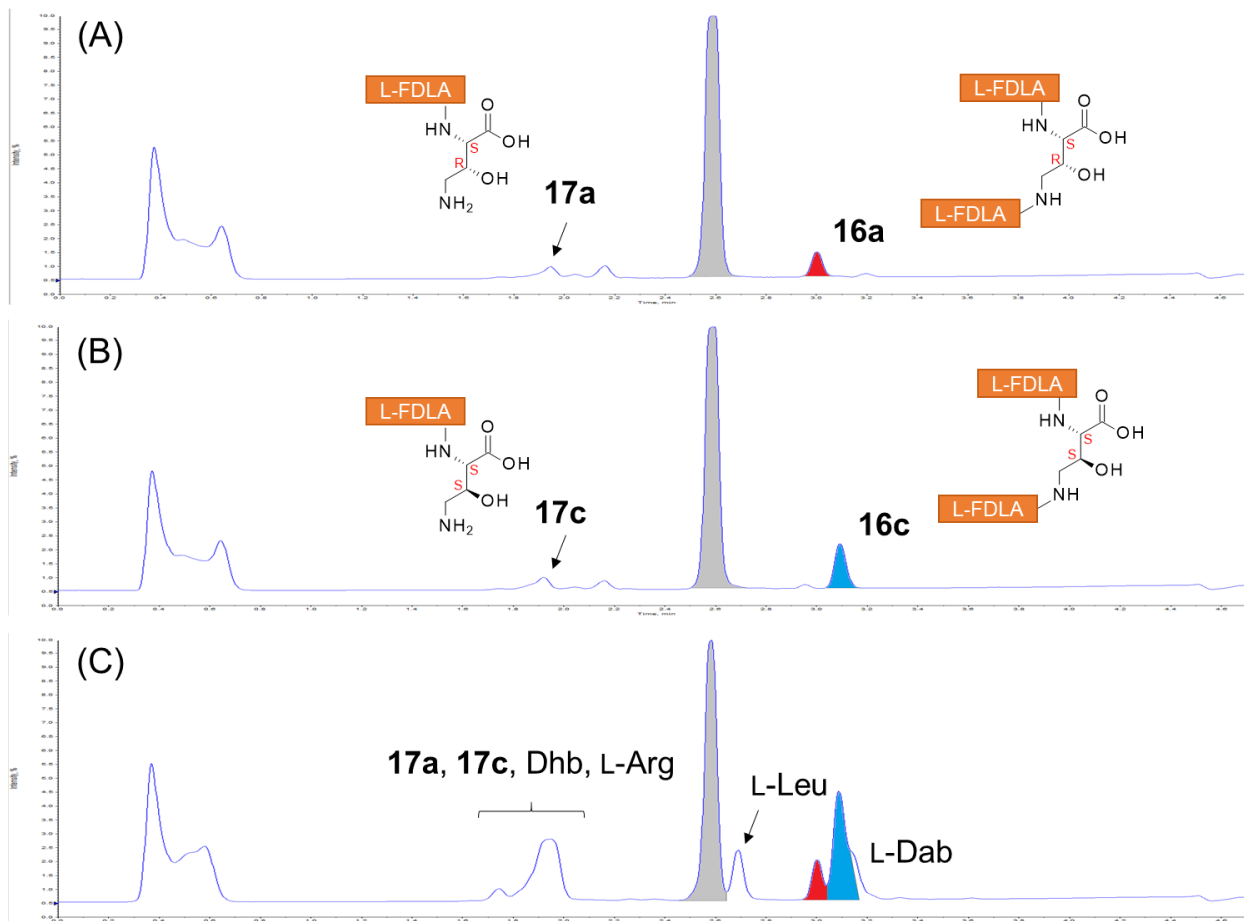


Figure 18. FDLA 標識サンプル 16, 17, 11a の LC-MS チャート*

*灰色のピークは反応後に残留した L-FDLA のピーク

Figure 18 の(A)は β -OH Dab の(2*S*,3*R*)-体の LC-MS チャートで、赤くマークしたピークが(2*S*,3*R*)体の L-FDLA・2 個標識体 16a であり、保持時間は 2.97 min であった。Figure 18 の(B)は同様に分析した β -OH Dab の(2*S*,3*S*)-体の LC-MS チャートで、青くマークしたピークが(2*S*,3*S*)-体の L-FDLA・2 個標識体 16c であり、保持時間は 3.06 min であった。Figure 18 の(C)のオギペプチン A 酸加水分解物 11a のチャートを見ると、オギペプチンを構成する各アミノ酸のピークが確認でき、さらに 16a と 16c

に該当するピークが両方検出された。(C)中の2つのピークの高さから判断すると、**16c**はL-Dabのピークと一部オーバーラップしているが、**16c**と**16a**は2:1の比率であることが確認できた。したがって、オギペプチン中の3残基のβ-OH Dabは(2*S*,3*S*)-体と(2*S*,3*R*)-体が2:1で存在していることが明らかとなった。

この結果は、β-OH Dabが全て(2*S*,3*S*)-体または全て(2*S*,3*R*)-体で構成されたオギペプチンAのジアステレオマー2種**10-1**、**10-2**が天然型と一致しなかったことを支持している。

第3節 オギペプチン A の絶対立体配置の推定

前節で詳述したように、オギペプチン A に改良 Marfey 法を適用したところ、3 残基の β -OH Dab の立体化学は(2*S*,3*S*)-体と(2*S*,3*R*)-体が 2:1 で存在していることが判明した。したがって、(2*S*,3*R*)-体が 3 残基の β -OH Dab のどの位置に存在するかがわかれば、オギペプチンの真の構造を解明できると考えた。

(2*S*,3*R*)-体の β -OH Dab がどの位置にあるかによって 3 種のジアステレオマーが考えられるため、オギペプチン A の真の構造は下記のジアステレオマー**18a**, **18b**, **18c** のいずれかである可能性が高いと推測した(Figure 19)。

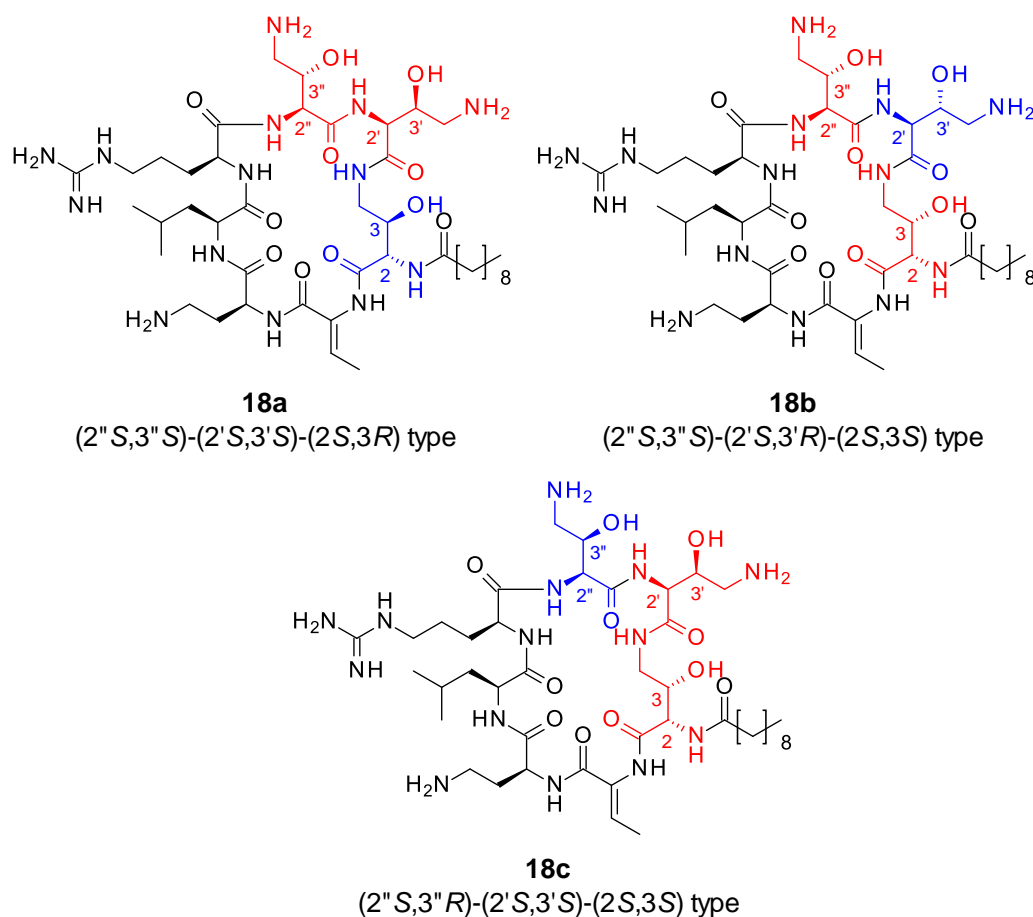


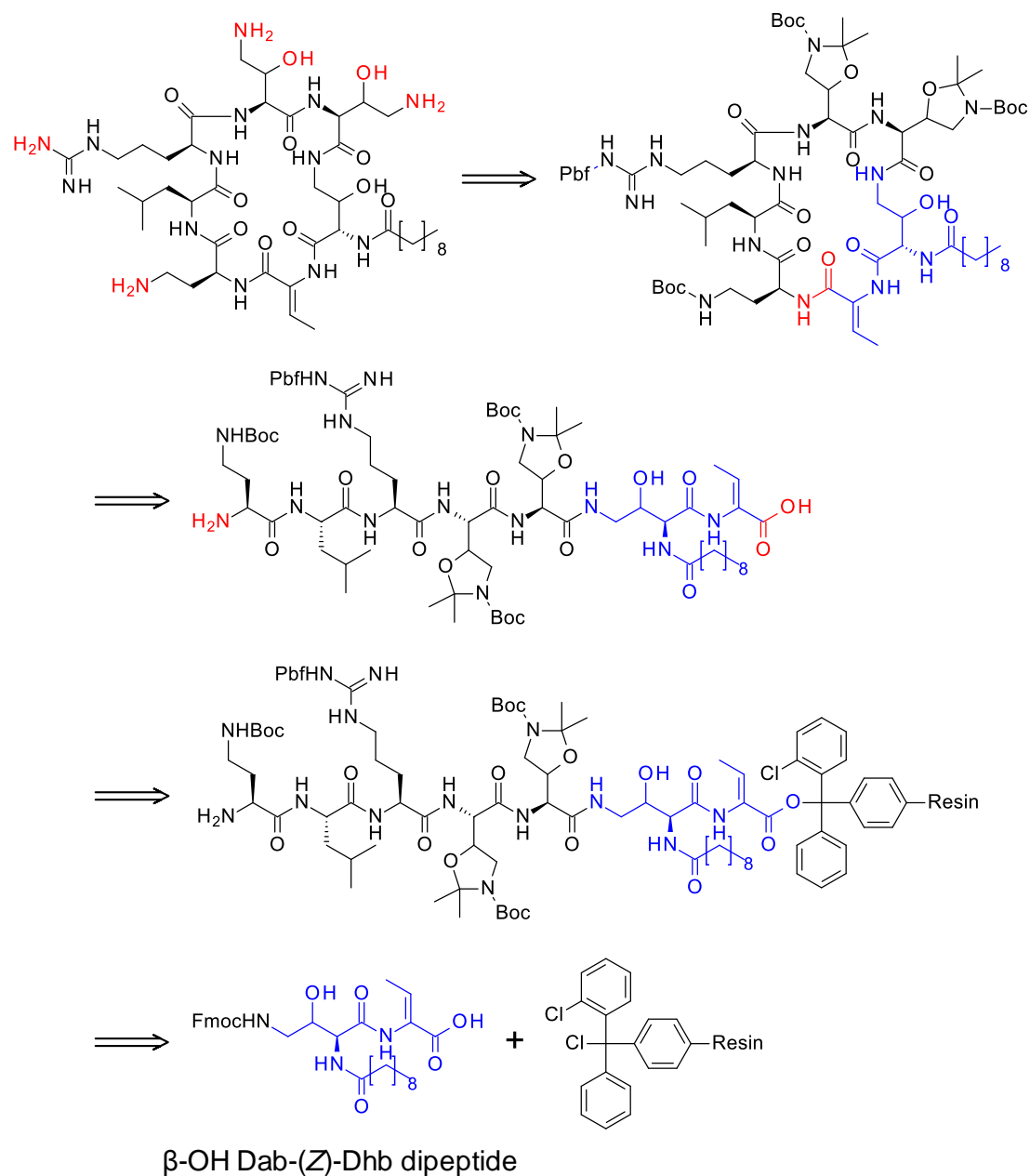
Figure 19. オギペプチン A の推定構造

オギペプチン A の真の構造を解明するために、実際にこのジアステレオマー 3 種を合成し、天然物との機器分析データの比較により構造決定を行うこととした。

第3章

第1節 固相全合成ルートの立案

オギペプチン A の全合成を開始するにあたり、逆合成解析を行った (Scheme 7)。



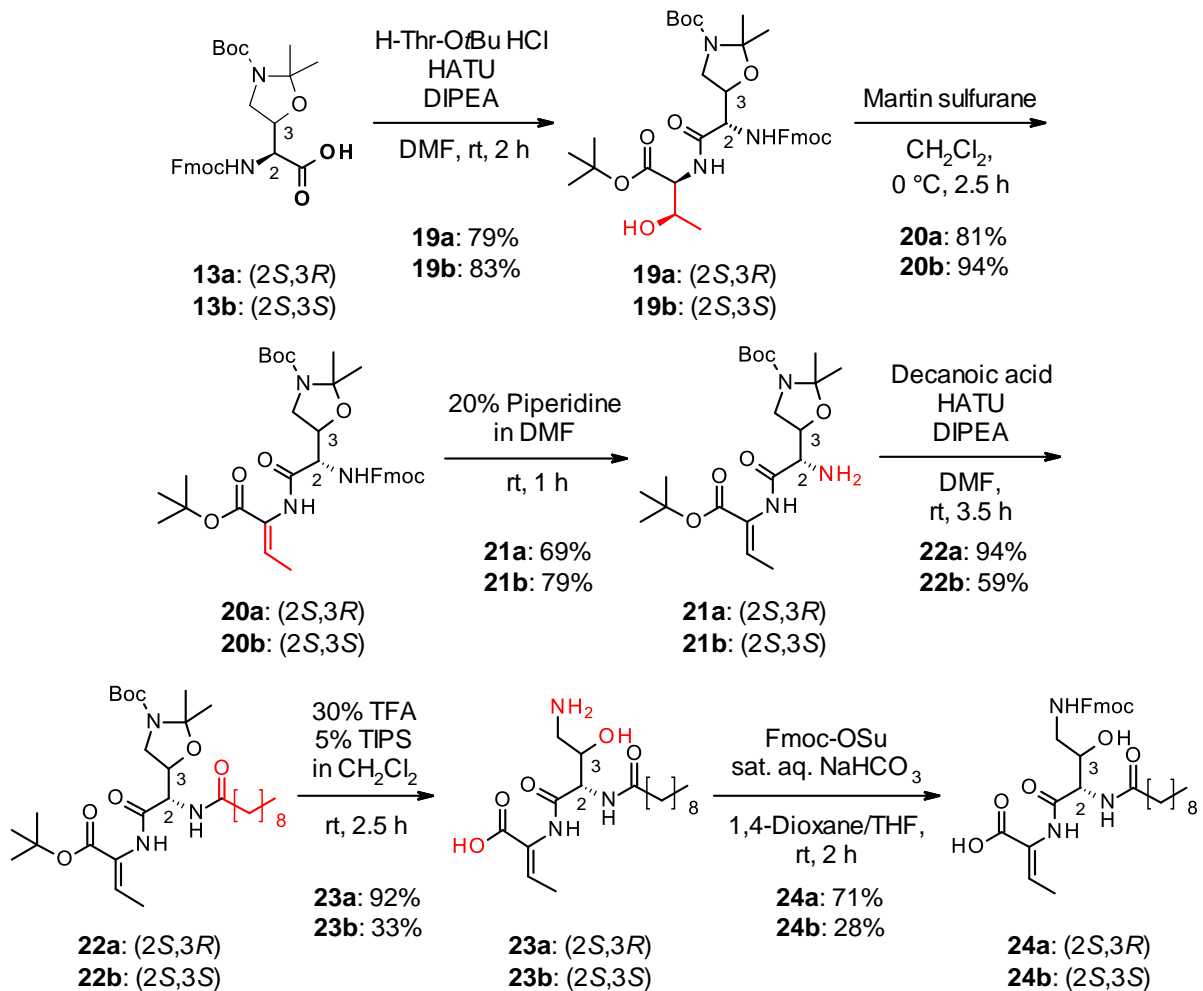
Scheme 7. オギペプチン A の逆合成解析

考案した本合成ルートではまず、 β -OH Dab と (Z)-Dhb のジペプチド中間体を合成しておき、これを

ペプチド固相合成の最初のアミノ酸残基として用いることにした。次に、固相合成でペプチド鎖を伸長した後、レジンから切り出して鎖状体を得る。得られた鎖状体を環化させ、最後にアミノ酸側鎖の保護基の脱保護を行うことでオギペプチン A に導くルートになっている。 β -OH Dab と (*Z*)-Dhb のジペプチド中間体を予め合成しておく方法を採用したのは以下の理由からである。まず、(*Z*)-Dhb の構造は通常スレオニン (Thr) を脱水反応に付すことで形成させるが、全合成の終盤になると、 β -OH Dab や他のアミノ酸残基が共存する中で、Thr のみを選択的に脱水させることは困難と思われたからである。また、(*Z*)-Dhb に隣接する β -OH Dab 残基は側鎖が環骨格に使われて、 α -アミノ基はアシル化されているという特殊な構造であるため、予めアシル化しておいた方が全合成終盤で選択的にアシル化する必要が無く、取り扱いやすいと考えた。本ルートを確立するために、ジペプチド中間体の合成検討から着手した。

第 2 節 β -OH Dab-(*Z*)-Dhb ジペプチド中間体の合成

β -OH Dab-(*Z*)-Dhb 中間体の合成は、改良 Marfey 法でも用いた β -OH Dab の(2*S*,3*R*)-体と(2*S*,3*S*)-体の保護体 **13a**, **13b** を原料に用いて開始した。まず **13a**, **13b** に対して、HATU と DIPEA を用いた縮合条件で Thr の *tert*-ブチルエステルを反応させて **19** とした。次に、Thr の脱水反応について種々の検討を行った。文献を参考にして、以下のような反応条件を試したが、目的の脱水体は低収率または得られない結果となった(条件 1. di-*tert*-butyl dicarbonate, 4-dimethylaminopyridine, CH₃CN, then 1,1,3,3-tetramethylguanidine,³⁰⁾ 条件 2. methanesulfonyl chloride, DBU, and EtOAc,³¹⁾ 条件 3. phenyl triflimide, triethylamine, and CH₂Cl₂.³²⁾ などの反応条件を検討)。塩基を利用したこれらの反応条件は、中間体 **19** の構造中に塩基に不安定な Fmoc 基が共存していることもあり、脱水反応と並行して Fmoc 基の脱保護も起きてしまうことから、目的の脱水体が低収率または全く生成しない結果になったと推察した。そこで、中性条件で進行する脱水試薬として Martin sulfurane に着目した。³³⁾ CH₂Cl₂ に溶解した **19** に対して、氷冷かつ窒素雰囲気下で Martin sulfurane の CH₂Cl₂ 溶液を滴下して反応を試みたところ、80%以上の高収率で所望の(*Z*)-Dhb 構造 **20** に導けることを見出した。驚くことに、望まない(*E*)-Dhb 構造と思われる副生成物は全く生じないことも確認された。生成した Dhb が *Z* 配置であることは NMR 解析によって以下の手順により確認した。まず、¹H, ¹³C, DEPT, HSQC, HMBC, DQF-COSY, SEL-TOCSY 測定を駆使して、**20a** の全てのプロトン及びカーボンシグナルを帰属した(Figure 20)。続く HOESY スペクトル解析により Dhb の 1 位カーボンと 3 位プロトンの相関を確認し、Dhb の 4 位プロトンに照射した差 NOE スペクトル解析により 4 位プロトンとアミド結合のプロトンとの相関を確認した(Figure 21, 22)。以上の解析結果から、**20a** 構造中の Dhb は *Z* 配置を有するものと判断した。**20b** についても同様の解析により、*Z* 配置であることを確認した。中間体 **20** の Fmoc 基の脱保護と、オギペプチン A の側鎖であるデカン酸との縮合により中間体 **22** を得た。TFA 処理による脱保護の後、 β -OH Dab 側鎖のアミノ基を Fmoc 基で保護し、所望のジペプチド中間体 **24a**, **24b** を得ることに成功した。(Scheme 8)



Scheme 8. β-OH Dab-(*Δ*)-Dhb ジペプチド中間体の合成

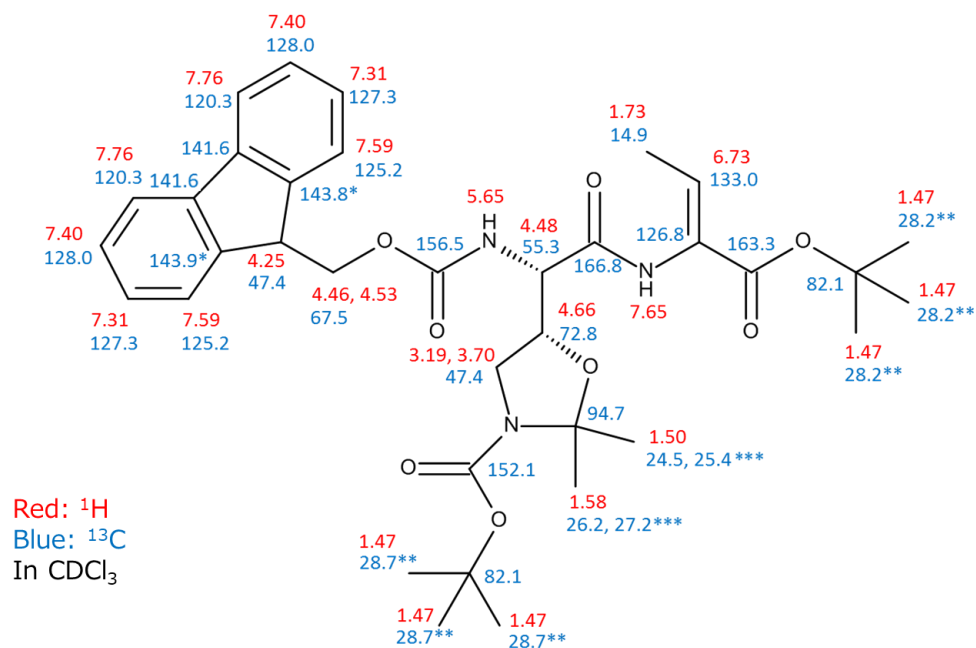


Figure 20. 中間体 **20a** の ¹H 及び ¹³C-NMR スペクトルのシグナル帰属

*, **: Interchangeable carbons; ***: 回転異性体由来と思われる 2 シグナルを検出

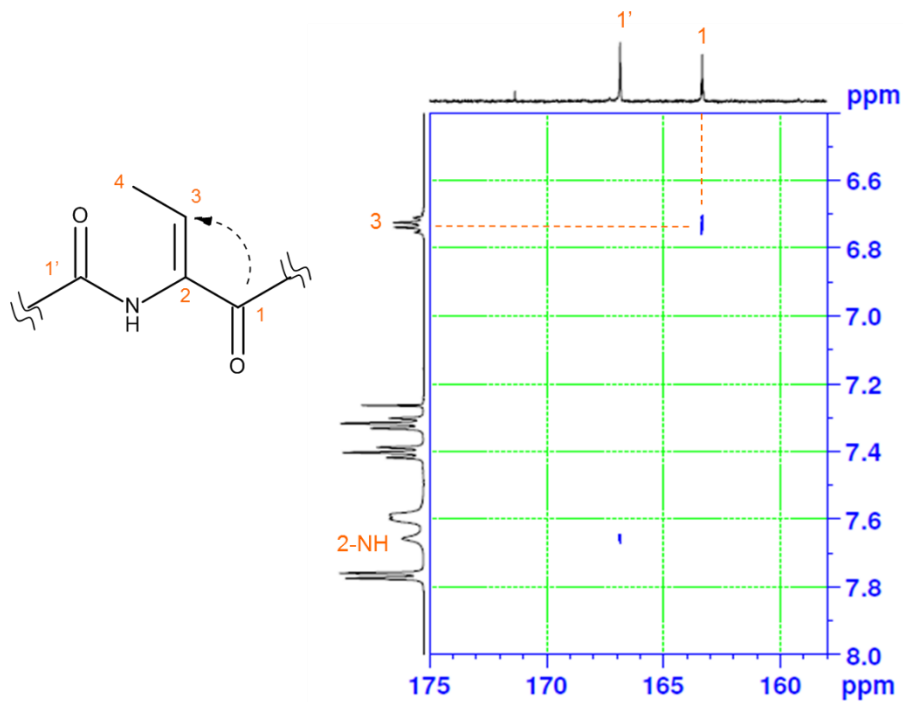


Figure 21. 中間体 20a の HOESY スペクトル

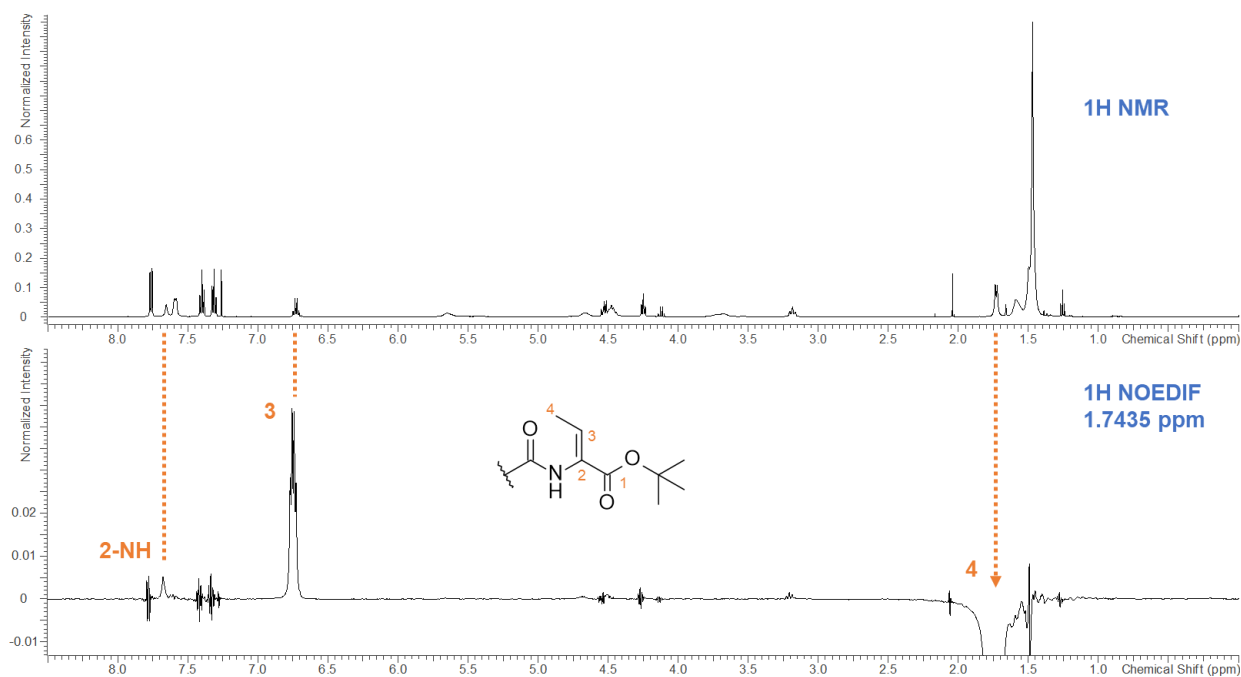
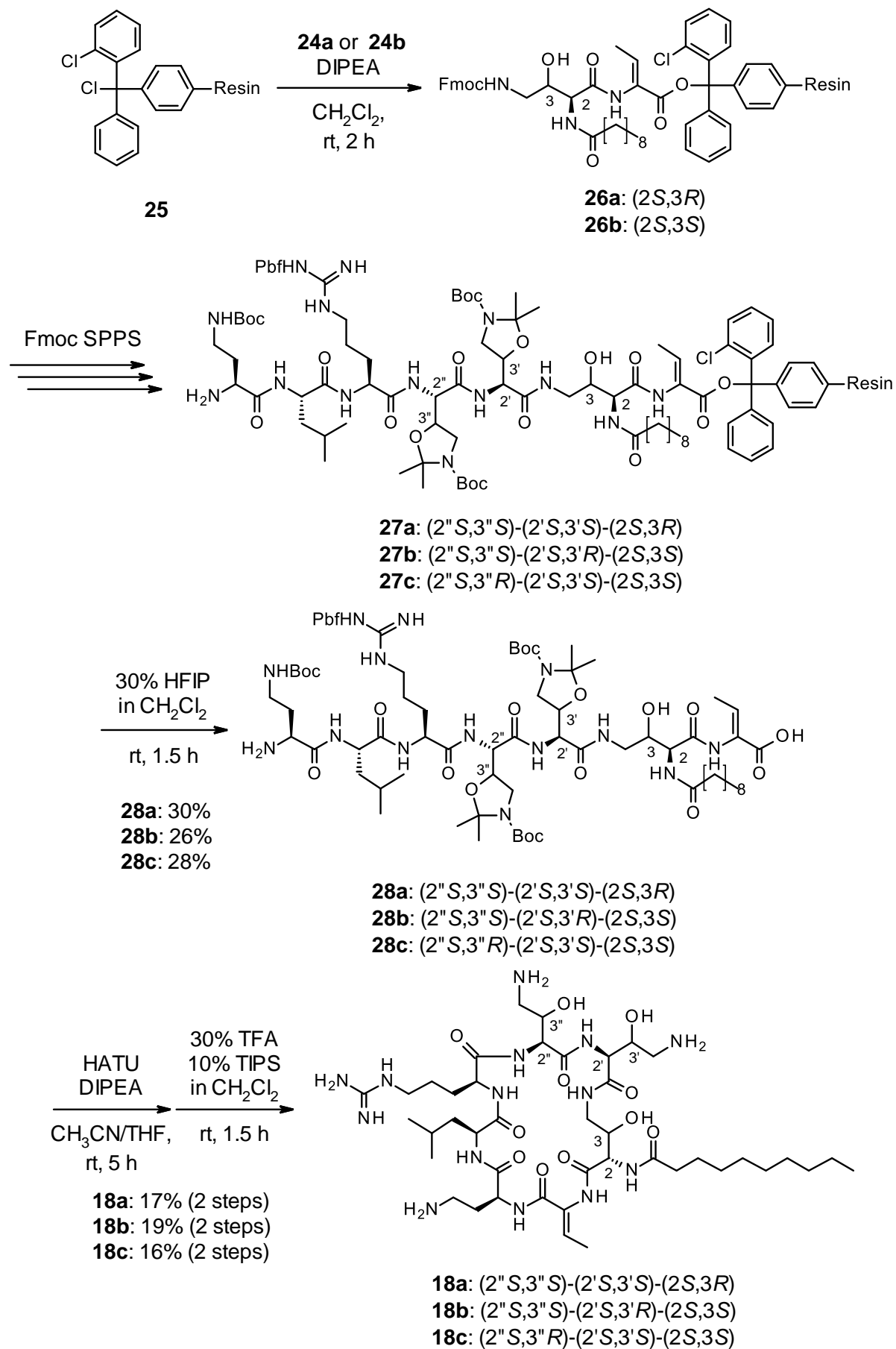


Figure 22. 中間体 20a の ^1H NMR スペクトルと 1.74 ppm を照射して得た差 NOE スペクトル

第 3 節 オギペプチン A の全合成

合成したジペプチド中間体 **24** を用いてペプチド固相合成に着手した。固相合成のレジンには Cl-Trt(2-Cl)-resin (**25**) を選択した。このレジンは、1% TFA/CH₂Cl₂ 溶液や弱酸である HFIP をペプチド鎖の切り出し時に用いることができるため、アミノ酸側鎖の保護基が保持されたペプチドを合成する際に最もよく用いられる。³⁴⁾ オギペプチンの全合成においては、得られた鎖状ペプチドを環化させる必要があるため、保護ペプチドを得るために本レジンを使用することにした。固相合成はまず、レジンにジペプチド中間体 **24** をローディングしてプレロードレジン **26** を得た後、Fmoc 基の脱保護とアミノ酸の縮合を繰り返す、一般的な Fmoc 法ペプチド固相合成によりペプチド鎖の伸長を行い、オギペプチン A として可能性のある 3 種のジアステレオマーに対応する配列 **27a-c** を得た。続いて、HFIP を用いた温和な条件でレジンからの切り出しを行い、逆相 HPLC 精製により鎖状体保護ペプチド **28a-c** を固相合成収率 30%程度で得ることに成功した。次の **28** の環化反応は、分子間反応を防ぐために CH₃CN/THF (1:1) 混合溶液を用いた高度希釈条件下で行った。各配列の環化は問題なく進行したため、反応溶液を濃縮した後、**28a-c** 環化体の単離精製を行うこととした。しかしながら、逆相 HPLC 精製と順相シリカゲルカラム精製の両方で検討を行ったものの、環化体を単離することはできなかった。この理由としては、アミノ酸側鎖に保護基を有する各環化体は脂溶性が非常に高いため、逆相カラム内に吸着して溶出されづらいことが原因と考えられた。また、順相シリカゲルカラム精製では CH₂Cl₂/MeOH 系において MeOH の割合を増やすことで環化体を溶出させることができたが、不純物との分離は悪く、環化体を単離できなかった。以上の検討結果から、側鎖保護基を有する環化体は単離せず、環化後に側鎖保護基の脱保護を行った後で精製する方法に変更することとした。環化反応溶液の濃縮後の残渣に対して、30% TFA 10% TIPS in CH₂Cl₂ 溶液を添加して側鎖保護基である Boc, acetonide, Pbf 基の脱保護を同時に行い、逆相 HPLC 精製と凍結乾燥によって所望のオギペプチン A のジアステレオマー 3 種、**18a**, **18b**, **18c** を合成することに成功した。環化・脱保護の 2 工程の収率は 20%弱という結果になったが、β-OH Dab や (Z)-Dhb 構造を有する特殊な天然化合物の合成としては比較的良い収率であると考えている。(Scheme 9)



Scheme 9. オギペプチン A のジアステレオマー3種の全合成

第 4 節 オギペプチン A の天然物標品との機器分析データの比較による絶対立体配置の決定

全合成したオギペプチン A の 3 種のジアステレオマー **18a-c** と天然型オギペプチン A を HPLC 分析で比較した結果、3 種のジアステレオマーのうち、**18a** の保持時間が天然型とよく一致することが確認された (Figure 23)。さらに、天然型オギペプチン A と **18a** の混合サンプルを各種条件で HPLC 分析したところピーク分離は見られず、同一化合物である可能性が高いことが示唆された。

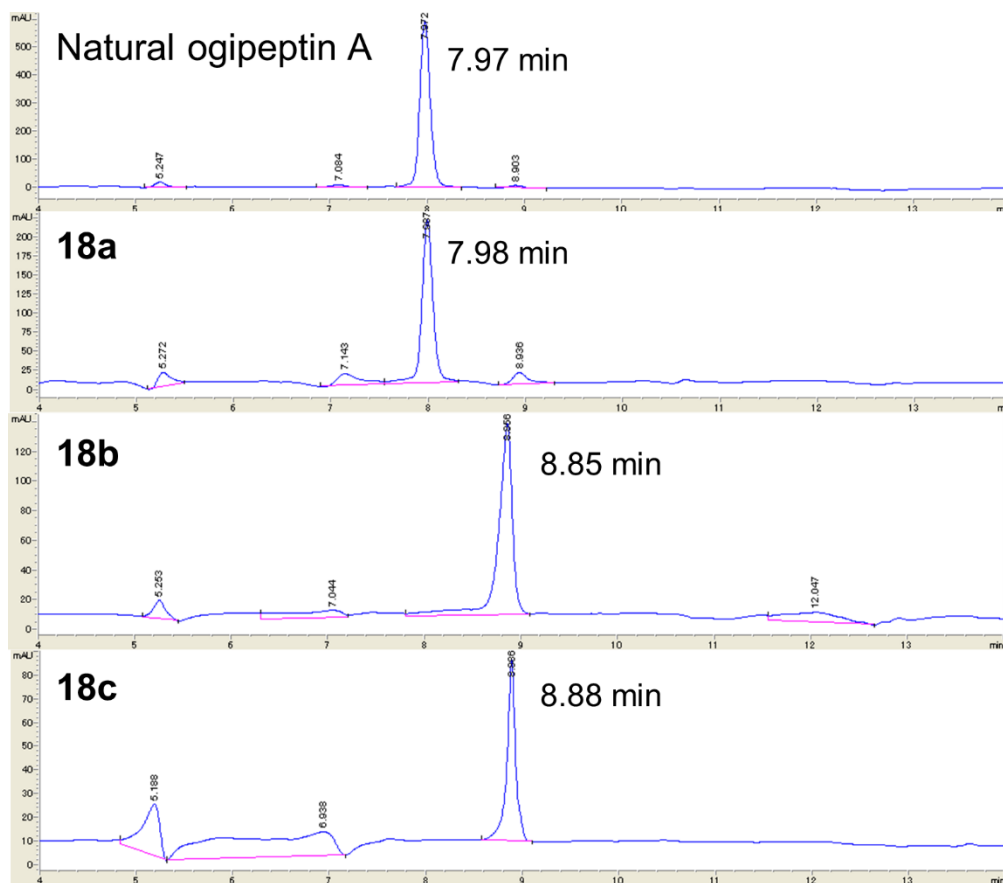


Figure 23. 天然型オギペプチン A と **18a-c** の HPLC 分析

<分析条件>

Instrument: Agilent 1100 LC system

Column: Inertsil ODS-3 column (5 μ m, 4.6 i.d. \times 150 mm, GL Science)

Flow rate: 1.0 mL/min

Mobile phase: a) 0.1% TFA in H₂O; b) 0.1% TFA in CH₃CN

Gradient (b): 0–2 min 10%; 2–4 min 20%; 4–6 min 30%; 6–8 min 40%; 8–10 min 50%; 10–15 min 80%; 15–20 min 10% (Figure 23 は 4–14 min を拡大表示した。)

続いて、**18a** の NMR 測定を行った。オギペプチンの構造解析についての先行研究¹⁹⁾ で用いられた測定溶媒を用い、サンプルを 0.04N DCI/D₂O + 0.1% 1,4-dioxane 溶液に溶解させ、¹H-及び ¹³C-NMR 測定を実施した。Figure 24 に示すように、合成した **18a** と天然のオギペプチン A の ¹H-NMR スペクトルは、非常に良い一致を示した。化学合成品である **18a** の方が各シグナルはシャープに検出される傾向が見られたが、ケミカルシフトや積分値は同じ値を示した。また、¹³C-NMR スペクトルについても **18a** と天然型でシグナルが完全に一致していることを確認した (Figure 25)。

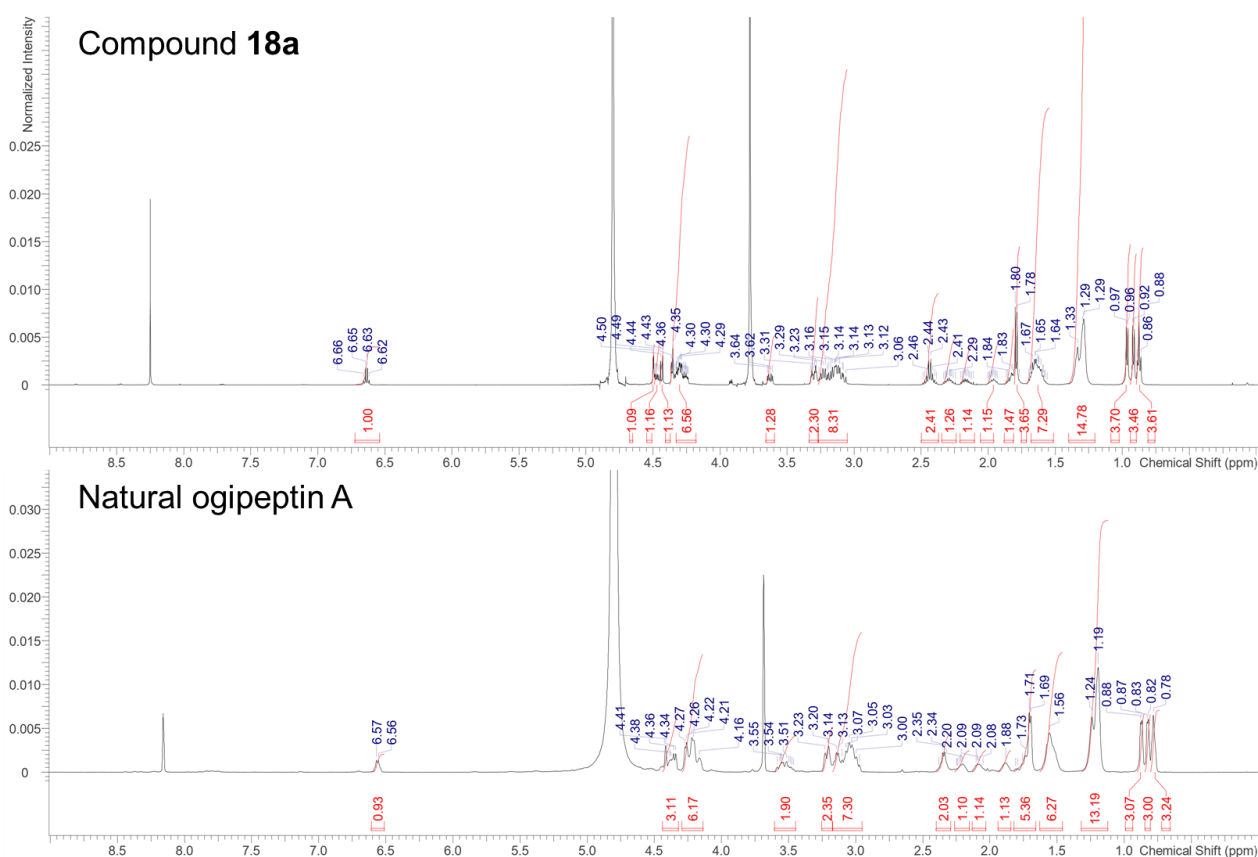


Figure 24. **18a** と天然型オギペプチン A の ¹H-NMR スペクトル (500 MHz)

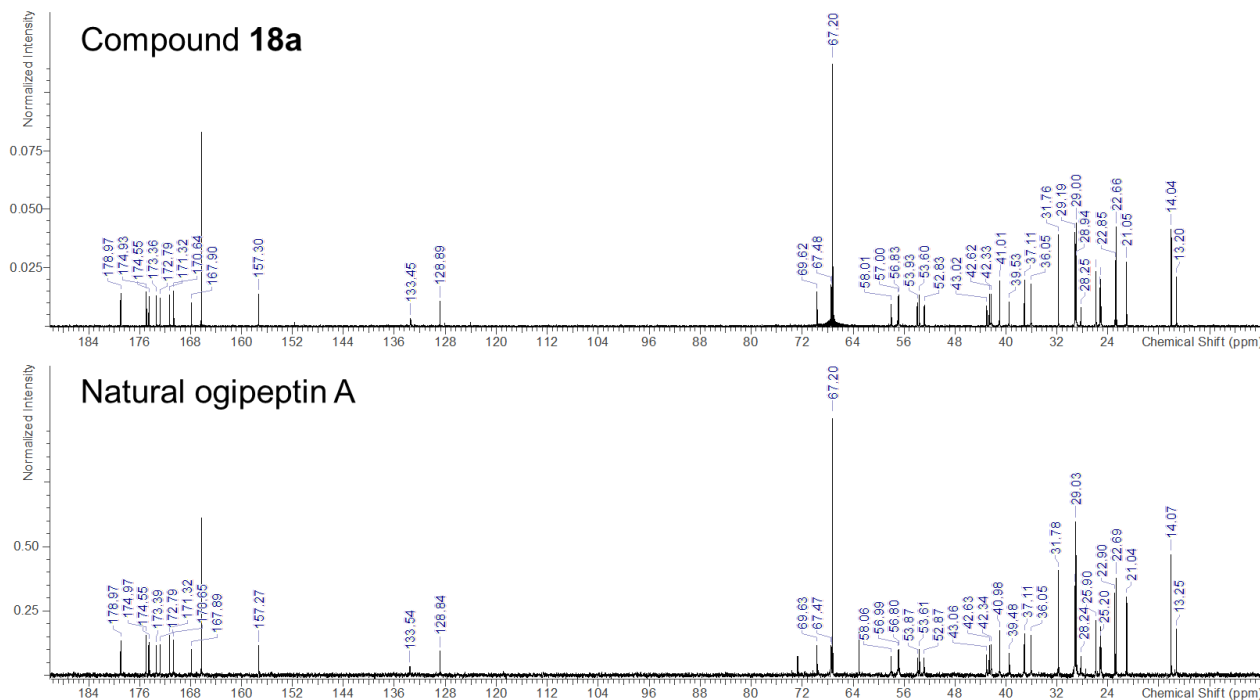


Figure 25. **18a** と天然型オギペプチン A の ^{13}C -NMR スペクトル (125 MHz)

以上の HPLC 分析、NMR 解析の結果から、オギペプチン A の真の構造は **18a** であることが判明し、オギペプチン A の絶対立体配置が解明された。3 残基の β -OH Dab のうち、側鎖が環骨格に含まれている β -OH Dab のみが(2*S*,3*R*)-体で、他の 2 残基は(2*S*,3*S*)-体で構成されていた。先行研究によってオギペプチン A,B,C,D は同じ環骨格を持つことがわかっていたため、以上の結果によりオギペプチン A,B,C,D 全ての絶対立体配置が解明された。(Figure 26)

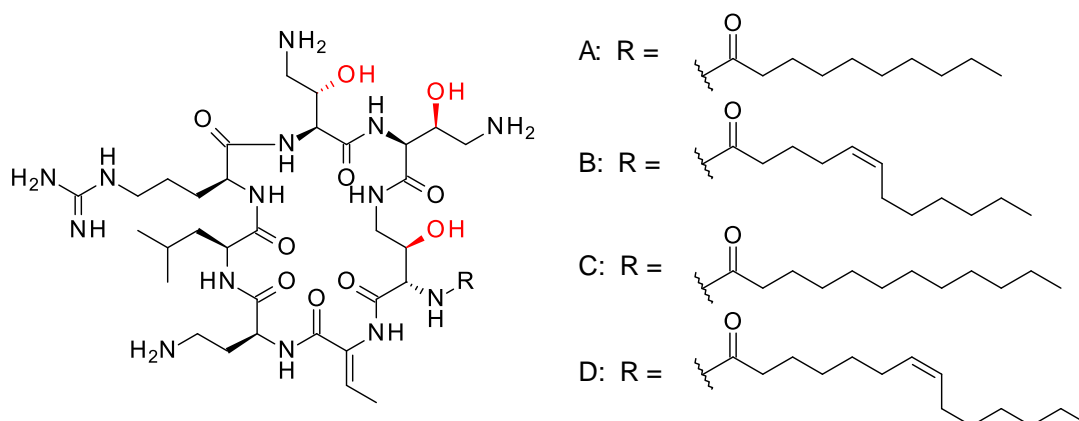


Figure 26. オギペプチン A-D の真の構造

第 4 章

第 1 節 骨格改変型誘導体の合成方針

前章で確立したオギペプチンの全合成ルートを利用して、骨格改変型誘導体の合成に着手することとした。誘導体の合成方針として、Figure 27 に示したような戦略を考案した。まず、 β -OH Dab のヒドロキシ基の除去による Dab への変換と、(Z)-Dhb 残基を Gly や 2-アミノイソ酪酸(Aib)、バリン(Val)などに変換する構造簡略化を試すことにした。 β -OH Dab や(Z)-Dhb の構造は、オギペプチン誘導体を化学合成で大量製造することを考えた際に、ハイコストとなることが想定される。したがって、構造を簡略化しても抗菌活性が保持されるのであれば、その骨格を採用した方が製造面で有利になると思われた。また、他の合成展開の方針として、Arg 残基の置換を考えた。コリスチンの構造と比較して、オギペプチンの特徴的な点が Arg 残基の存在であり、Arg 側鎖に存在する強塩基性のグアニジノ基が抗菌活性や腎毒性に対して何かしらの影響を与えている可能性は高いと推測した。そこで、Arg 残基を中性のアミノ酸であるノルロイシン(Nle)やグルタミン(Gln)、酸性のグルタミン酸(Glu)、塩基性のオルニチン(Orn)等に変えることで、その誘導体の活性・毒性がどのように変化するかは評価する価値があると考えた。したがって、上記のような合成方針で骨格を改変したオギペプチン誘導体が合成可能か検討を行うこととした。

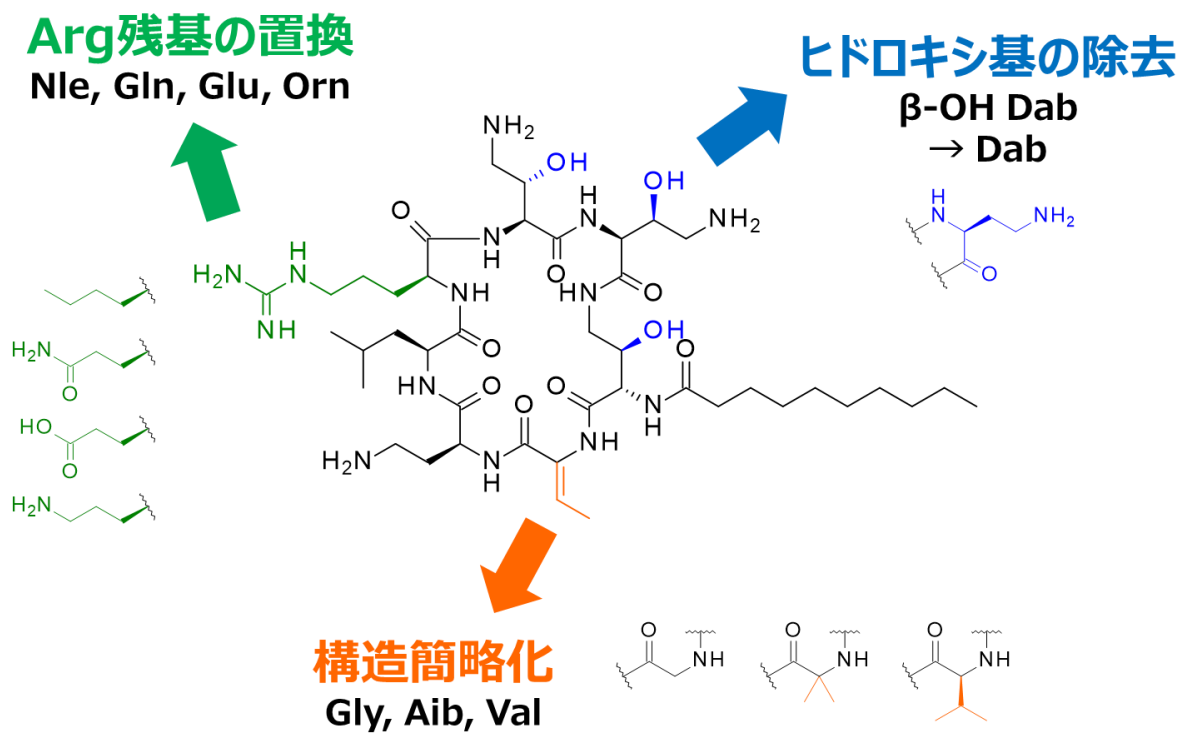
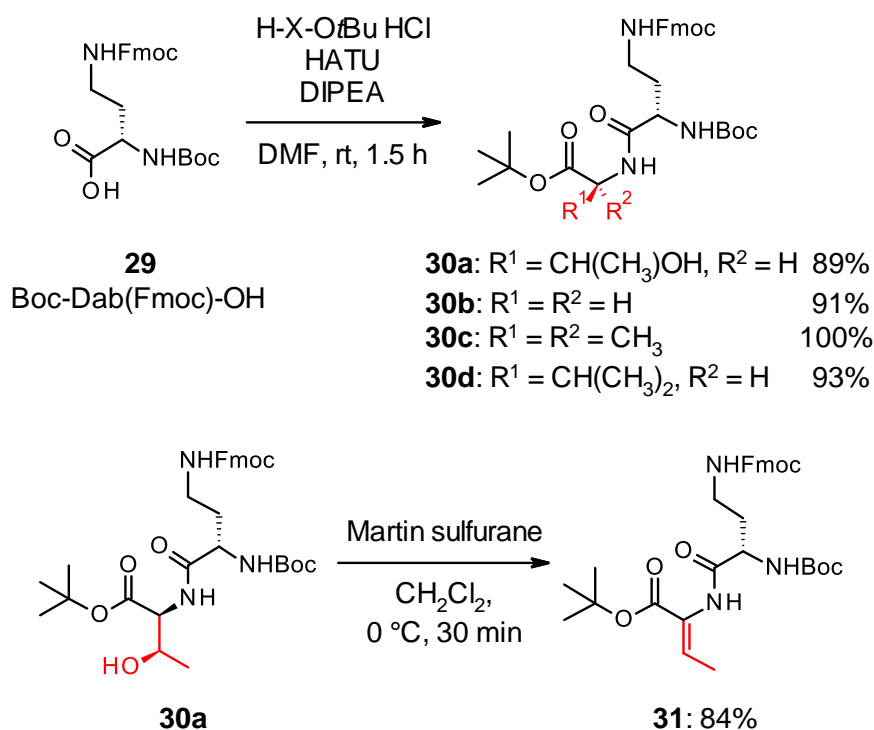


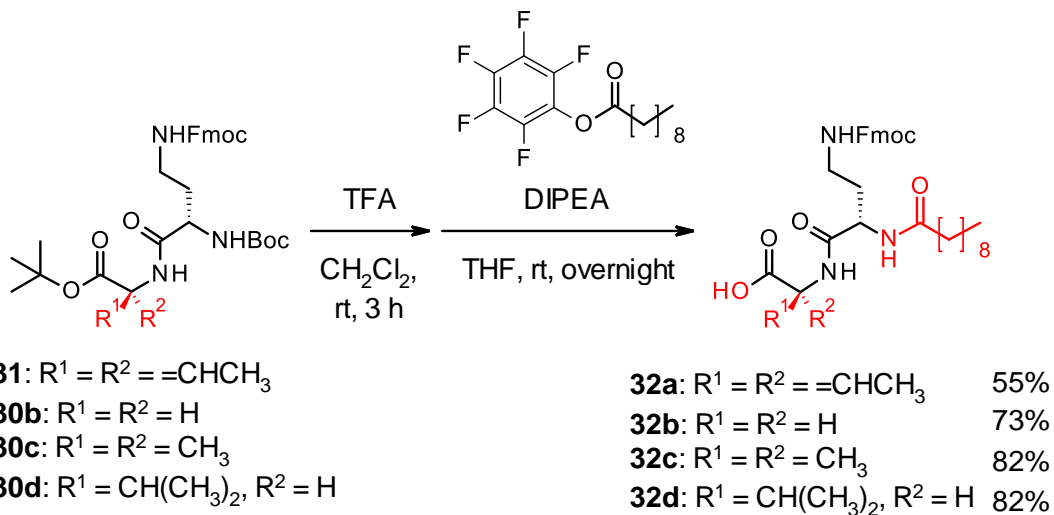
Figure 27. 骨格改変型オギペプチン誘導体の合成方針

第 2 節 固相合成用ジペプチド中間体の合成

前章のオギペプチン A の全合成ルートに従い、まず固相合成に用いるジペプチド中間体の合成から着手した (Scheme 10)。市販試薬である Boc-Dab(Fmoc)-OH (**29**) を原料にして、各アミノ酸の *tert*-ブチルエステルと縮合させて **30a-d** をそれぞれ得た。縮合させたアミノ酸には Thr、Gly、Aib、Val の 4 種を用いた。Thr とのジペプチド **30a** については、オギペプチン A の全合成用ジペプチドブロックの合成時と同様に、Martin sulfurane によって脱水反応を行い、所望の (*Z*)-Dhb 構造 **31** に導いた。Dhb の構造確認についても全合成時と同様に、**31** の差 NOE スペクトル解析によって *Z* 配置であることを確認した (Supporting information: Figure S1 参照)。得られた **31**、**30b-d** に対して、TFA 処理によって Boc 基と *t*Bu 基の脱保護を行った後、デカン酸を活性化したペンタフルオロフェニルエステルと反応させて Dab の α -アミノ基をアシル化し、所望のジペプチド中間体 **32a-d** を合成した。**32a-d** の各構造は Figure 28 に示した。全て β -OH Dab のヒドロキシ基は除去し、(*Z*)-Dhb 部位については Gly、Aib、Val に変換したものを用意した。



Scheme 10. 固相合成用ジペプチド中間体 **32a-d** の合成



Scheme 10. 固相合成用ジペプチド中間体 **32a-d** の合成

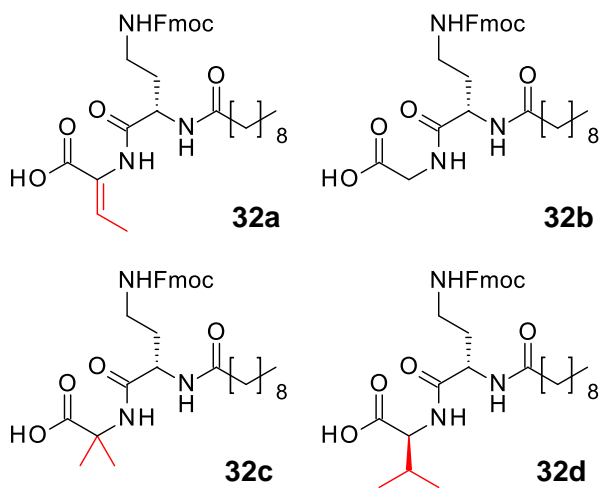
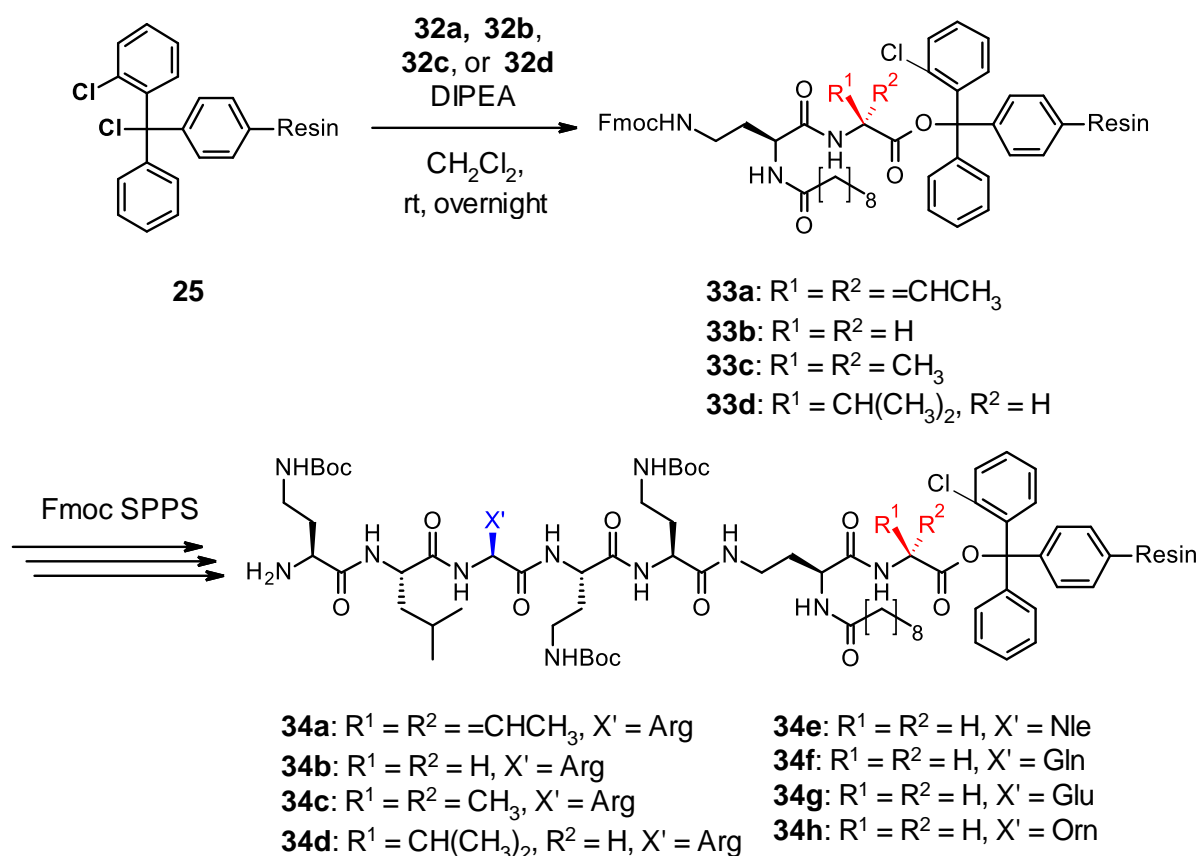


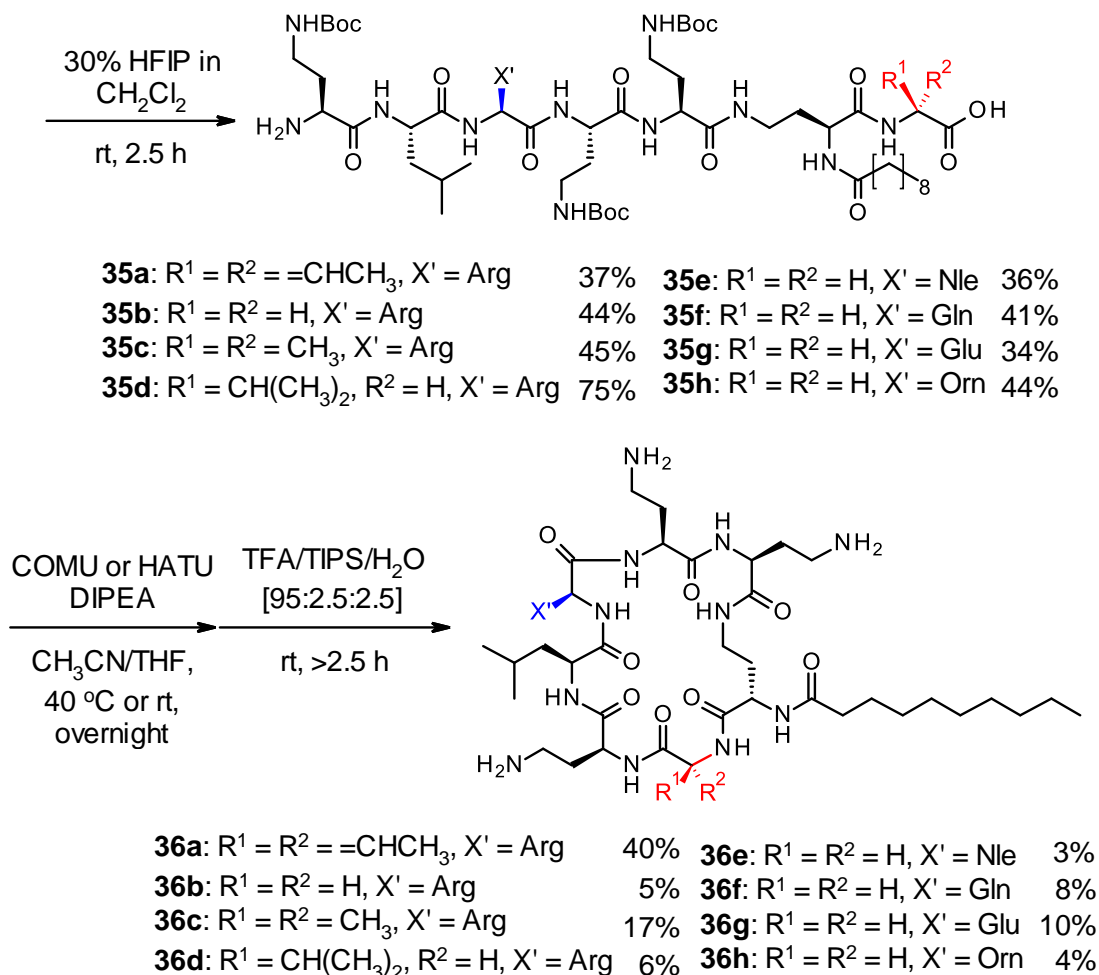
Figure 28. 固相合成用ジペプチド中間体 **32a-d** の構造

第3節 骨格改変型オギペプチン誘導体の合成

ジペプチド中間体 **32a-d** と Cl-Trt(2-Cl)-resin (**25**) を用いて、ペプチド固相合成に着手した (Scheme 11)。合成スキームの構造中、 R_1 , R_2 で示した部位には Dhb, Gly, Aib, または Val の側鎖が対応し、 X' を含むアミノ酸残基には Arg, Nle, Gln, Glu, または Orn が対応する。合計 8 配列のペプチド固相合成を行い、各配列の鎖状体保護ペプチドが収率 40%前後で得られた。続けて、環化・脱保護によりオギペプチン骨格の形成を行った。8 配列の中では β -OH Dab からヒドロキシ基を除いただけの誘導体 **36a** が最も良い収率で合成できた。低収率となった配列があるものの、それ以外の骨格改変型誘導体についても合成に成功した。



Scheme 11. 骨格改変型オギペプチン誘導体の合成



Scheme 11. 骨格改変型オギペプチン誘導体の合成

合成した 8 種の新規骨格改変型誘導体の構造を Figure 29 に示した。8 化合物全てで β -OH Dab のヒドロキシ基は除去し、その上で (*Z*)-Dhb 残基をそのまま、または変換したものが 4 種、(*Z*)-Dhb 残基を Gly にし、Arg 残基を他のアミノ酸残基に変換したものが 4 種得られた。 β -OH Dab からヒドロキシ基を除いただけの誘導体 **36a** は、天然型オギペプチン A よりも 3 倍ほど高い収率で合成できたため、この骨格でも抗菌活性を保持するのであればオギペプチン誘導体を製造する上で有利な結果になるものと思われた。また、(*Z*)-Dhb を Val に変換した **36d** は、環化時に C 末端である Val 残基がエピメリ化したと思われる 2 つのジアステレオマー混合物として得られたため、環化前駆体の C 末端にキラルなアミノ酸残基を設定したオギペプチン誘導体の合成は難しいことが示唆された。Arg 残基を別のアミノ酸に置換した誘導体 **36e-h** の合成では、最終体の精製時に未環化体が含まれていることが確認された。これはおそらく、Arg 残基はオギペプチンの環状骨格を形成する上でコンフォメーション的に何かしらの寄与をしていることを示す結果と考えている。合成した各化合物の評価は未実施ではあるが、オギペプチン

誘導体の合成において、 β -OH Dab のヒドロキシ基の除去やアミノ酸残基の置換を行っても目的物を合成できた。

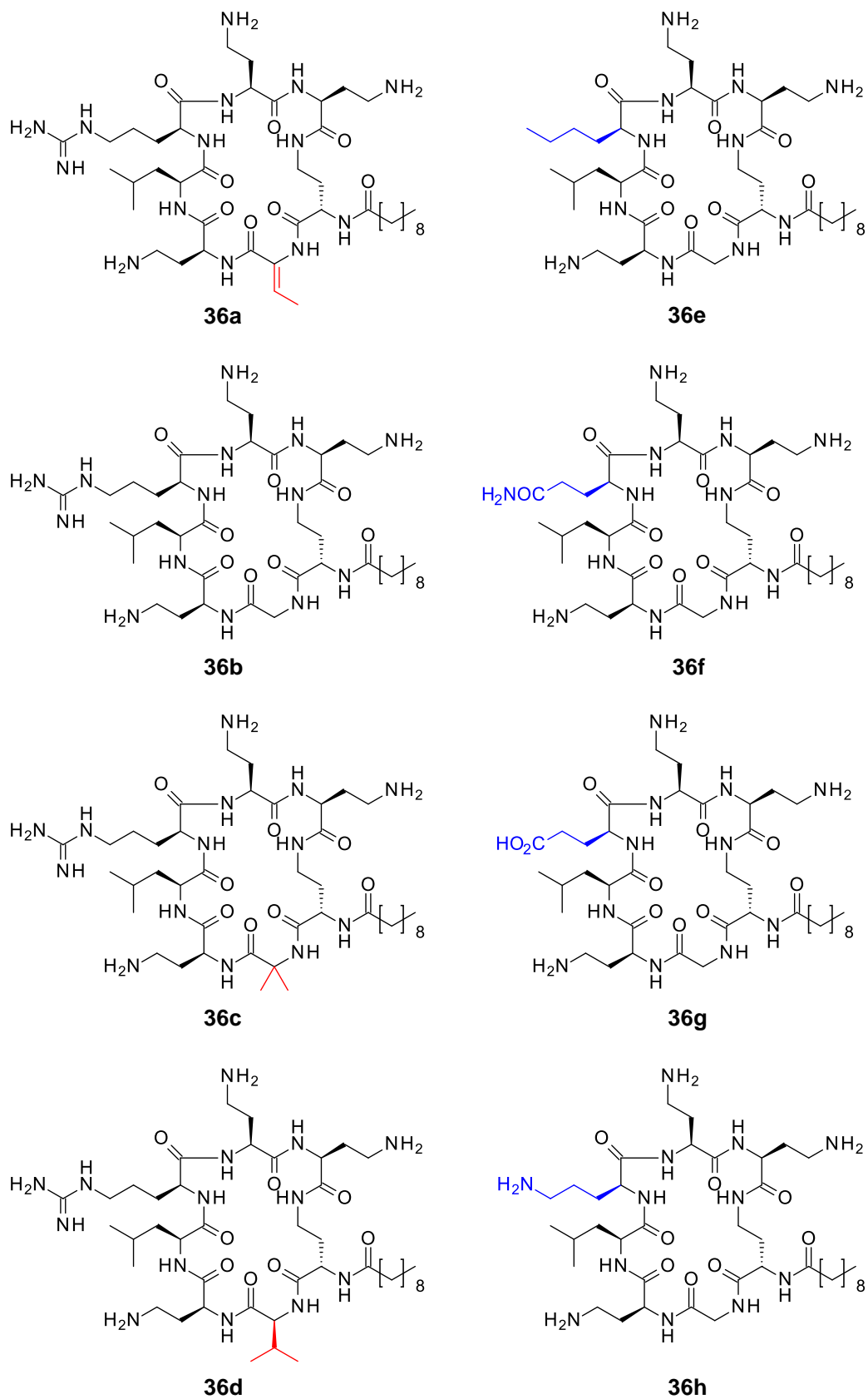


Figure 29. 骨格改変型オギペプチン誘導体 **36a-h** の構造

総括

本研究によって、アシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成ルートを確認し、新規誘導体 45 化合物を得ることに成功した。合成した新規誘導体の中で、コリスチンと同程度の抗菌活性を有し、腎毒性が格段に低減したアシル側鎖変換型誘導体 **8-3** や **8-38** を獲得した(第 1 章)。また、改良 Marfey 法をオギペプチン A に適用することで、これまで不明であったオギペプチンの絶対立体配置の推定を行った(第 2 章)。その推定情報を元にオギペプチン A として可能性のある 3 種のジアステレオマーの全合成を達成し、そのうちの **18a** が天然型オギペプチン A と機器分析データが完全一致することを確認した。これにより、オギペプチン A ,B, C, D の絶対立体配置を解明することに成功した(第 3 章)。さらに、オギペプチン A の全合成ルートを発展させ、骨格改変型オギペプチン誘導体の合成を行い、骨格改変型新規誘導体 8 化合物を獲得した(第 4 章)。以上の研究成果は、オギペプチンをリード化合物とした多剤耐性グラム陰性菌に対する新規抗菌薬開発に貢献するものと思われる。

参考文献

1. Cerceo, E.; Deitelzweig, S. B.; Sherman, B. M.; Amin, A. N. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. *Microb. Drug Resist.* **2016**, *22*, 412–431.
2. O'Neill, J. Review on Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations.* **2014**.
3. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); National Center for Emerging Zoonotic and Infectious Diseases (U.S.). Division of Healthcare Quality Promotion. Antibiotic Resistance Coordination and Strategy Unit. Antibiotic Resistance Threats in the United States, **2019**.
4. Pogue, J. M.; Ortwine, J. K.; Kaye, K. S. Clinical Considerations for Optimal Use of the Polymyxins: A Focus on Agent Selection and Dosing. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 229–233.
5. グラクソ・スミスクライン株式会社. 医薬品インタビューフォーム ポリペプチド系抗生物質製剤 オルドレブ®点滴静注用 150mg 注射用コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム. 2019年3月改訂(第5版).
6. 公益社団法人 日本化学療法学会 コリスチンの適正使用に関する指針 改訂委員会. コリスチンの適正使用に関する指針—改訂版—. *日化療会誌.* **2015**, *63*, 290–329.
7. Gao, R.; Hu, Y.; Li, Z.; Sun, J.; Wang, Q.; Lin, J.; Ye, H.; Liu, F.; Srinivas, S.; Li, D.; Zhu, B.; Liu, Y-H.; Tian, G-B.; Feng, Y. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005957.
8. Olaitan, A. O.; Morand, S.; Rolain, J-M. Mechanisms of Polymyxin Resistance: Acquired and Intrinsic Resistance in Bacteria. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 643.
9. Sun, J.; Xu, Y.; Gao, R.; Lin, J.; Wei, W.; Srinivas, S.; Li, D.; Yang, R-S.; Li, X-P.; Liao, X-P.; Liu, Y-H.; Feng, Y. Deciphering MCR-2 Colistin Resistance. *Mbio* **2017**, *8*, e00625-17.
10. Rabanal, F.; Cajal, Y. Recent Advances and Perspectives in the Design and Development

- of Polymyxins. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 886–908.
11. Hori, Y.; Aoki, N.; Kuwahara, S.; Hosojima, M.; Kaseda, R.; Goto, S.; Iida, T.; De, S.; Kabasawa, H.; Kaneko, R.; Aoki, H.; Tanabe, Y.; Kagamu, H.; Narita, I.; Kikuchi, T.; Saito, A. Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 1783–1791.
 12. Suzuki, T.; Yamaguchi, H.; Ogura, J.; Kobayashi, M.; Yamada, T.; Iseki, K. Megalin Contributes to Kidney Accumulation and Nephrotoxicity of Colistin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 6319–6324.
 13. Vaara, M.; Fox, J.; Loidl, G.; Siikanen, O.; Apajalahti, J.; Hansen, F.; Frimodt-Møller, N.; Nagai, J.; Takano, M.; Vaara, T. Novel Polymyxin Derivatives Carrying Only Three Positive Charges are Effective Antibacterial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3229–3236.
 14. Mingeot-Leclercq, M-P.; Tulkens, P. M.; Denamur, S.; Vaara, T.; Vaara, M. Novel Polymyxin Derivatives are Less Cytotoxic than Polymyxin B to Renal Proximal Tubular Cells. *Peptides* **2012**, *35*, 248–252.
 15. Velkov, T.; Thompson, P. E.; Nation, R. L.; Li, J. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1898–1916.
 16. Velkov, T.; Roberts, K. D.; Nation, R. L.; Thompson, P. E.; Li, J. Pharmacology of Polymyxins: New Insights into an 'Old' Class of Antibiotics. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 711–724.
 17. 中島(上妻) 志保. LPS に誘導される炎症を抑制する新規化合物 ペドペプチン、オギペプチンの発見と作用機序の解析. 博士論文 **2017** (東京大学)
 18. Kozuma, S.; Hirota-Takahata, Y.; Fukuda, D.; Kuraya, N.; Nakajima, M.; Ando, O. Identification and Biological Activity of Ogipeptins, Novel LPS Inhibitors Produced by Marine Bacterium. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 79–83.
 19. Hirota-Takahata, Y.; Kozuma, S.; Kuraya, N.; Fukuda, D.; Nakajima, M.; Takatsu, T.; Ando, O. Ogipeptins, Novel Inhibitors of LPS: Physicochemical Properties and Structural

- Elucidation. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 84–89.
20. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. 10th ed. Wayne, IN: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
 21. Smith, S. M.; Wunder, M. B.; Norris, D. A.; Shellman, Y. G. A Simple Protocol for Using a LDH-Based Cytotoxicity Assay to Assess the Effects of Death and Growth Inhibition at the Same Time. *PLoS One* **2011**, *6*, e26908.
 22. Miller, B. R.; Gulick, A. M. Structural Biology of Non-Ribosomal Peptide Synthetases. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1401*, 3–29.
 23. Marfey, P. Determination of D-Amino Acids. II. Use of a Bifunctional Reagent, 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591–596.
 24. Bhushan, R.; Brückner, H. Marfey's Reagent for Chiral Amino Acid Analysis: A Review. *Amino acids* **2004**, *27*, 231–247.
 25. Harada, K.; Fujii, K.; Mayumi, T.; Hibino, Y.; Suzuki, M. A Method Using LC/MS for Determination of Absolute Configuration of Constituent Amino Acids in Peptide – Advanced Marfey's Method –. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1515–1518.
 26. Fujii, K.; Shimoya, T.; Ikai, Y.; Oka, H.; Harada, K. Further Application of Advanced Marfey's Method for Determination of Absolute Configuration of Primary Amino Compound. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2579–2582.
 27. Kuranaga, T.; Minote, M.; Morimoto, R.; Pan, C.; Ogawa, H.; Kakeya, H. Highly Sensitive Labeling Reagents for Scarce Natural Products. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 2499–2506.
 28. Racine, E. Process for Preparing 2,4-Diamino-3-hydroxybutyric Acid Derivatives. US Patent 2017/0057936 A1. March 2, **2017**.
 29. Stepan, A. F.; Nguyen, T. T.; Anderson, D.; Liang, H.; Zhanshan, Q.; Magee, T. V. Stereoselective Synthesis of Orthogonally Protected β -Hydroxy- α,γ -diamino Butyric Acids. *Synlett* **2011**, *17*, 2499–2504.
 30. Tian, X.; Li, L.; Han, J.; Zhen, X.; Liu, S. Stereoselectively Synthesis and Structural Confirmation of Dehydrodipeptides with Dehydrobutyrine. *Springerplus.* **2016**, *5*, 400.

31. Lefranc, D.; Ciufolini, M. A. Total Synthesis and Stereochemical Assignment of Micrococccin P1. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4198–4201.
32. Torrini, I.; Zecchini, G. P.; Paradisi, M. P. Dehydration of β -Hydroxy- α -amino Acid Derivatives with Phenyltriflimide. *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 695–703.
33. Pooppanal, S. S. Martin Sulfurane – A Versatile Reagent for Organic Synthesis. *Synlett* **2009**, *5*, 850–851.
34. Merck Millipore. Novabiochem® Peptide Synthesis Anniversary Edition 2014/2015 30 Years of Innovation.

公表論文

1. Shingo Takiguchi, Hidehito Homma, Tetsunori Fujisawa, Yuki Hirota-Takahata, Yasunori Ono, Masaaki Kizuka, Yuki Ishii, Satomichi Yoshimura, Takahide Nishi. Syntheses and Antimicrobial Activities of Ogipeptin Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *42*, 128093.
2. Shingo Takiguchi, Yuki Hirota-Takahata, Takahide Nishi. Application of the Advanced Marfey's Method for the Determination of the Absolute Configuration of Ogipeptins. *Tetrahedron Lett.* **2022**, *96*, 153760.
3. Shingo Takiguchi, Yuki Hirota-Takahata, Takahide Nishi. Total Synthesis and Structural Elucidation of Ogipeptins. *Org. Lett.* **2022**, *24*, 4935–4938.
4. Shingo Takiguchi, Takahide Nishi. Practical Synthetic Method of Ogipeptin Derivatives. *Synlett* **2023**, *34*, 277–282.

General methods and materials

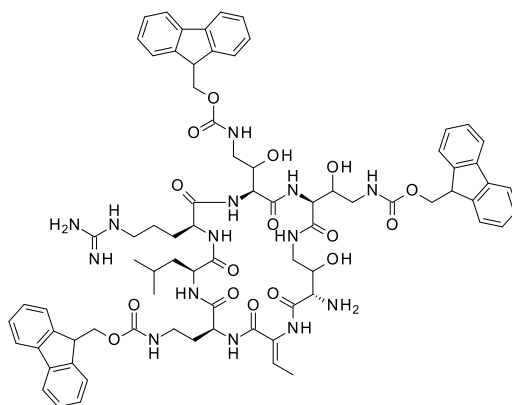
Materials were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC), AB SCIEX API2000 LC/MS, Agilent 1260 Infinity II Prime LC system with an LC/MSD XT detector, or Waters Acquity UPLC system with an SQ Detector 2. Analytical TLC was performed on Merck silica gel 60F₂₅₄ plates with visualization under ultraviolet (UV) light at 254 nm. Flash column chromatography was carried out using the SNAP Ultra (Biotage), SiliaSep (SiliCycle), Hi-Flash Premium (Yamazen), or CHROMATOREX Q-Pack (Fuji Silysia Chemical Ltd.). Reversed-phase HPLC purification was conducted using a Gilson purification system with a Develosil Combi-RP column (5 μ m, 20.0 or 28.0 mm/100 mm, Nomura Chemical). ¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded on a JEOL ECS400 instrument or a Bruker AVC500 instrument in the indicated solvent. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the internal standard. Multiplicity abbreviations include: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; and br, broad. Data are presented as follows: chemical shift (multiplicity, integration, coupling constant). High-resolution mass spectrometry (HRMS) was performed with a LTQ Orbitrap XL instrument (Thermo Fisher Scientific) or an Acquity UPLC/Xevo Q-Tof MS system (Waters). Analytical HPLC was conducted on an Agilent 1100 series LC system or an Agilent 1260 Infinity II LC system equipped with a diode array detector HS using an Inertsil ODS-3 column (5 μ m, 4.6 i.d. \times 150 mm, GL Science). The flow rate was 1.0 mL/min. The mobile phase and its gradient were as follows: a) 0.1% TFA in H₂O; b) 0.1% TFA in CH₃CN; gradient used for compounds in chapter 3 (b): 0–2 min 10%; 2–4 min 20%; 4–6 min 30%; 6–8 min 40%; 8–10 min 50%; 10–15 min 80%; 15–20 min 10%; gradient used for compounds **22a** and **22b** in chapter 3 (b): 0–2 min 10%; 2–4 min 25%; 4–6 min 40%; 6–8 min 55%; 8–10 min 70%; 10–15 min 90%; 15–20 min 10%; gradient used for compounds in chapter 4 (b): 0–12 min 10% to 50%; 12–15 min 50% to 90%; 15–18 min 90%; and 18–20 min 90% to 10%.

Experimental procedure conducted in chapter 1

Syntheses of compounds

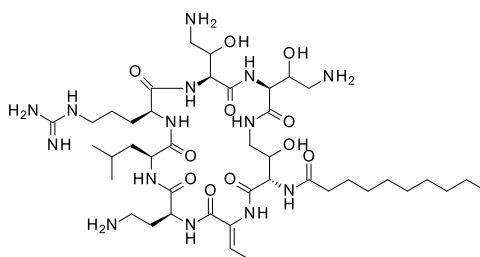
Compound 6

To a solution of the ogipeptin A–D mixture (14.3 g, 43.5% purity) in DMF (430 mL), Fmoc-OSu (64 g, 190 mmol) was added at room temperature. The mixture was stirred for 20 h and then diluted with water (1.5 L) and EtOAc (1 L). To the diluted mixture, K_2CO_3 was added until the solution's pH was 8. The insoluble matter was removed by filtration with a Celite pad. The Celite pad was washed with EtOAc (500 mL). The organic and aqueous layers were separated from the filtrate. The aqueous layer was extracted with EtOAc (500 mL). The combined organic layer was washed with brine (twice) and dried over Na_2SO_4 . The dried organic layer was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (EtOAc to 0–35% MeOH/ CH_2Cl_2) to afford compound **5** (12.9 g). Next, a mixture of compound **5** (12.9 g), 1,4-dioxane (800 mL), and 35% HCl aq. (400 mL) was stirred for 16 h at 35 °C. The reaction mixture was poured into the stirring mixture of $NaHCO_3$ (380 g), H_2O (1.5 L), and EtOAc (1 L), and then the resulting mixture was stirred for 1 h at room temperature. To the mixture, K_2CO_3 was added until the solution's pH was 8, and then NaCl was added until saturated. The organic and aqueous layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (1 L). The combined organic layer was washed with brine (twice) and dried over Na_2SO_4 . The dried organic layer was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (20–50% $CH_3CN/0.1\%$ TFA aq.) with a SiliaSep C18 cartridge (800 g). The collected fractions were concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOH (30 mL), and then the solution was poured into the stirring solution of *n*-hexane (1 L). The resulting suspension was stirred for 1 h at room temperature. The insoluble matter was collected by filtration and washed with *n*-hexane. After vacuum drying, compound **6** (3.13 g, about 34% yield, two steps) was obtained as a light brown powder. 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 9.45 (br, 1H), 8.63 (br, 1H), 8.28–8.10 (br, 4H), 7.90–7.86 (m, 8H), 7.70–7.63 (m, 8H), 7.54 (m, 1H), 7.43–7.36 (m, 8H), 7.33–7.26 (m, 8H), 7.23–7.16 (m, 3H), 7.05 (br, 2H), 6.64 (br, 1H), 5.99 (br, 1H), 5.32 (d, 2H, $J = 4.9$ Hz), 4.46 (br, 2H), 4.39–4.15 (m, 11H), 3.92 (br, 1H), 3.83 (br, 3H), 3.65 (br, 1H), 3.25 (br, 3H), 3.13–3.00 (br, 6H), 1.91 (br, 2H), 1.79 (br, 1H), 1.64 (d, 3H, $J = 10.7$ Hz), 1.44–1.39 (br m, 3H), 0.89 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz), 0.86 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz); HRMS (ESI): calcd. for $C_{77}H_{91}N_{14}O_{16}$ $[M+H]^+$ 1467.6738; found 1467.6697.

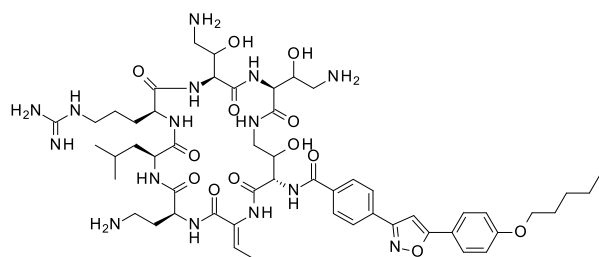


Compound 8-1 (ogipeptin A)

To a solution of compound **6** (30 mg, 0.020 mmol) in DMF (1 mL), decanoic acid (3.9 mg, 0.022 mmol), HATU (15.5 mg, 0.041 mmol), and DIPEA (14.0 μ L, 0.082 mmol) were added. The mixture was stirred for 15 h at room temperature and then diluted with EtOAc (5 mL) and water (5 mL). The organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (10 mL). The combined organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The dried organic layer was filtered and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was purified by flash silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ to 25% MeOH/CH₂Cl₂) to afford compound **7-1** (25.2 mg, 76%) as a white solid. To a solution of compound **7-1** (25.2 mg, 0.016 mmol) in DMF (1 mL), tetraethylammonium fluoride hydrate (34.8 mg, 0.23 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The reaction mixture was purified by reversed-phase HPLC. The obtained fractions were lyophilized to give compound **8-1** (11.7 mg, 79%) as a white solid. Compounds **8-2–45** were synthesized by this same procedure with a corresponding carboxylic acid. ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 6.63 (q, 1H, J = 7.3 Hz), 4.48 (br, 2H), 4.42 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 4.34–4.17 (m, 6H), 3.62 (d, 1H, J = 5.5 Hz), 3.59 (d, 1H, J = 5.5 Hz), 3.23–3.15 (m, 6H), 3.10–2.98 (m, 4H), 2.47–2.40 (m, 2H), 2.26 (br, 1H), 2.13 (br, 1H), 1.94 (br, 1H), 1.83–1.75 (m, 6H), 1.65 (br m, 6H), 1.32–1.28 (m, 13H), 0.96–0.84 (m, 10H); HRMS (ESI): calcd. for C₄₂H₇₉N₁₄O₁₁ [M+H]⁺ 955.6047; found 955.6037.

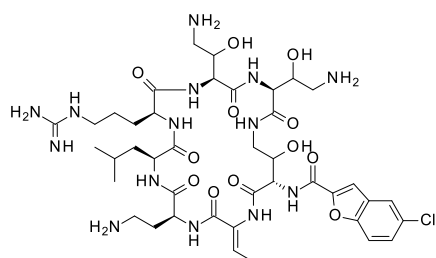


Compound 8-2



A total of 2.5 mg (26%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for C₅₃H₈₀N₁₅O₁₃ [M+H]⁺ 1134.6060; found 1134.6038.

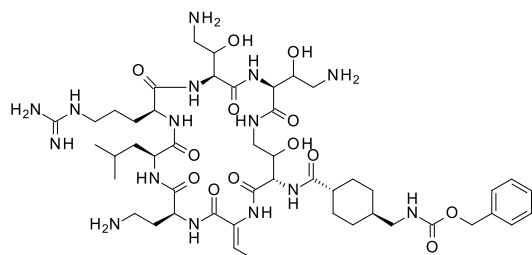
Compound 8-3



A total of 2.4 mg (36%, two steps) was obtained as a white solid. ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 7.85 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 7.66 (d, 2H, J = 10.4 Hz), 7.57 (dd, 1H, J = 8.9 Hz, 2.1 Hz), 6.69 (q, 1H, J = 6.7 Hz), 4.71 (br d, 1H, J = 1.8 Hz), 4.54 (dd, 1H, J = 9.8 Hz, 4.9 Hz), 4.44 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 4.40–4.38 (m, 2H), 4.30–4.24 (m, 5H), 3.77 (dd, 1H, J = 13.7 Hz, 6.4 Hz), 3.32–3.04 (m, 11H), 2.29 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.88–1.82 (m, 2H), 1.79 (d,

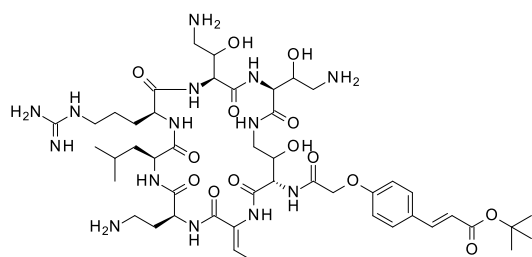
3H, $J = 6.7$ Hz), 1.71–1.57 (m, 5H), 0.96 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz), 0.91 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz); HRMS (ESI): calcd. for $C_{41}H_{64}ClN_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 979.4517 and 981.4482; found 979.4501 and 981.4487, respectively.

Compound 8-4



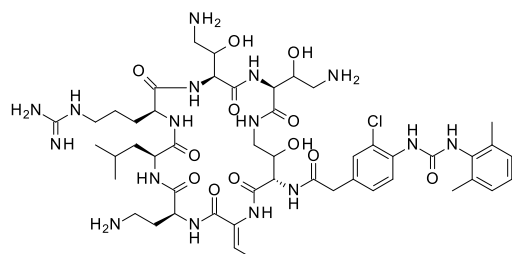
A total of 1.8 mg (12%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{48}H_{80}N_{15}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1074.6060; found 1074.6039.

Compound 8-5



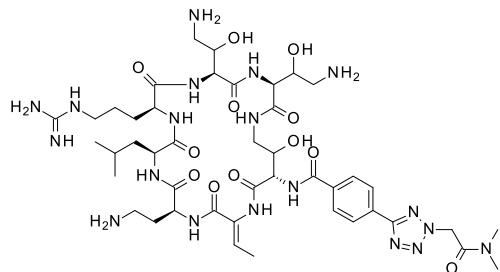
A total of 5.1 mg (35%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{47}H_{77}N_{14}O_{14}$ $[M+H]^+$ 1061.5744; found 1061.5723.

Compound 8-6



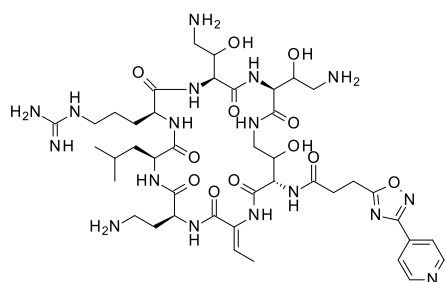
A total of 5.5 mg (36%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{49}H_{76}ClN_{16}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1115.5517; found 1115.5497.

Compound 8-7



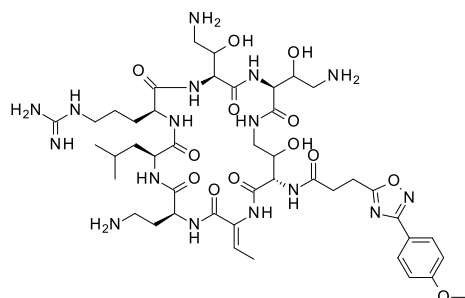
A total of 4.5 mg (31%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{44}H_{72}N_{19}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1058.5608; found 1058.5587.

Compound 8-8



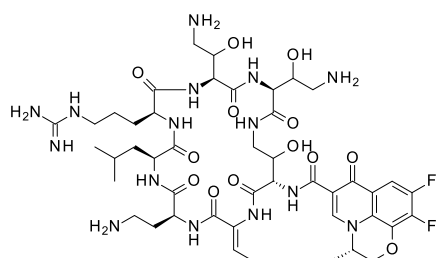
A total of 6.5 mg (48%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{42}H_{68}N_{17}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1002.5233; found 1002.5214.

Compound 8-9



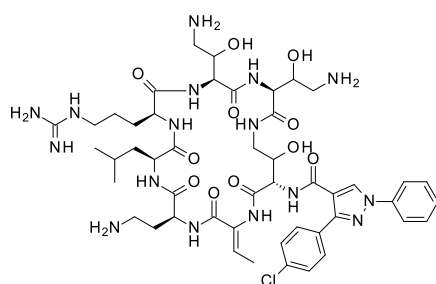
A total of 3.9 mg (28%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{44}H_{71}N_{16}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1031.5387; found 1031.5367.

Compound 8-10



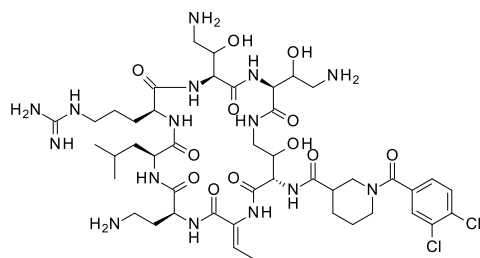
A total of 1.8 mg (12%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{45}H_{68}F_2N_{15}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1064.5089; found 1064.5068.

Compound 8-11



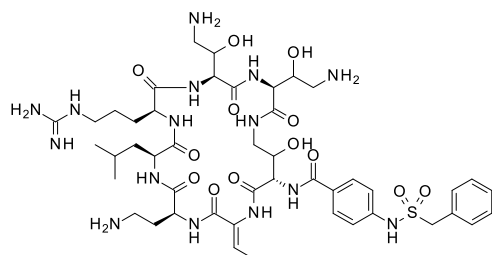
A total of 7.2 mg (35%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{48}H_{70}ClN_{16}O_{11}$ $[M+H]^+$ 1081.5099 and 1083.5064; found 1081.5078 and 1083.5068, respectively.

Compound 8-12



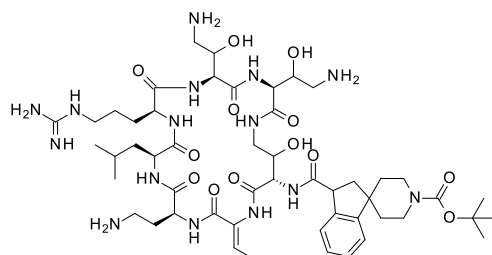
A total of 7.6 mg (37%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{45}H_{72}Cl_2N_{15}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1084.4862; found 1084.4844.

Compound 8-13



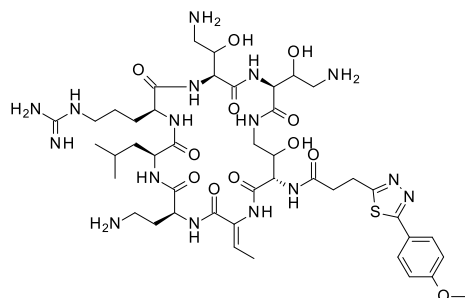
A total of 6.5 mg (30%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{72}N_{15}O_{13}S$ $[M+H]^+$ 1074.5155; found 1074.5133.

Compound 8-14



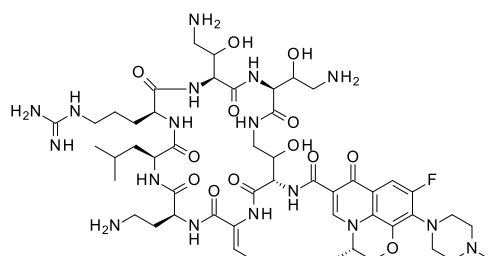
A total of 4.7 mg (31%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{51}H_{84}N_{15}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1114.6373; found 1114.6349.

Compound 8-15



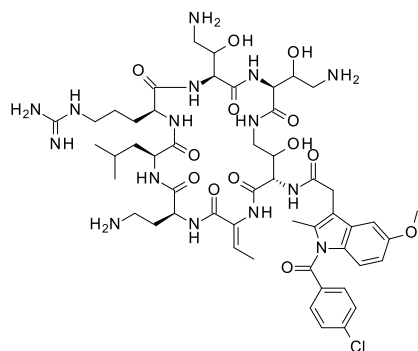
A total of 4.3 mg (30%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{44}H_{71}N_{16}O_{12}S$ $[M+H]^+$ 1047.5158; found 1047.5140.

Compound 8-16



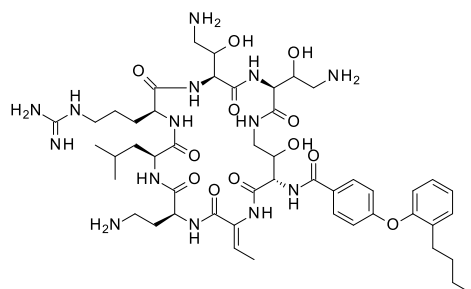
A total of 1.3 mg (8%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{50}H_{79}FN_{17}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1144.6027; found 1144.6012.

Compound 8-17



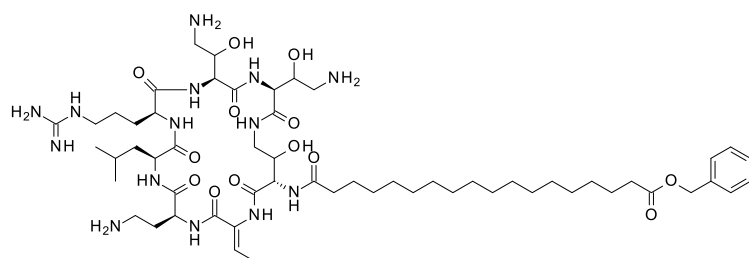
A total of 4.7 mg (30%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{51}H_{75}ClN_{15}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1140.5357; found 1140.5337.

Compound 8-18



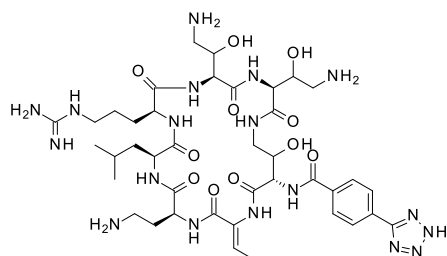
A total of 5.9 mg (41%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{49}H_{77}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1053.5845; found 1053.5825.

Compound 8-19



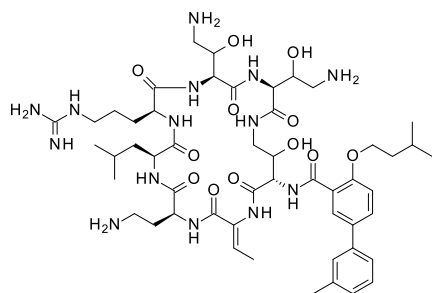
A total of 8.6 mg (53%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{57}H_{99}N_{14}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1187.7516; found 1187.7492.

Compound 8-20



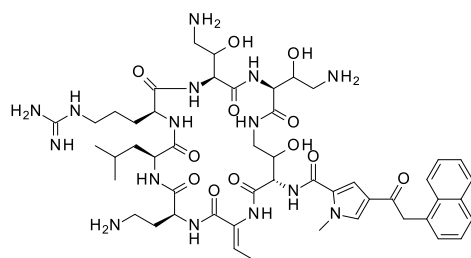
A total of 0.6 mg (5%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{40}H_{65}N_{18}O_{11}$ $[M+H]^+$ 973.5080; found 973.5069.

Compound 8-21



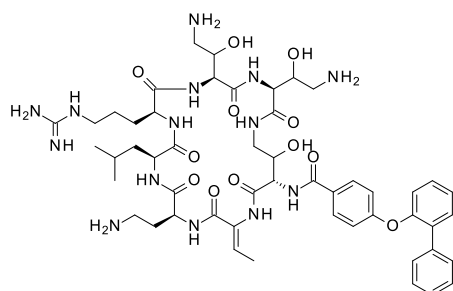
A total of 3.3 mg (22%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{51}H_{81}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1081.6158; found 1081.6138.

Compound 8-22



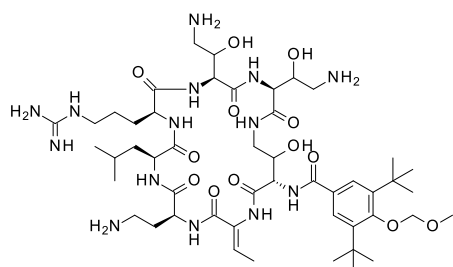
A total of 6.6 mg (45%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{50}H_{74}N_{15}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1076.5641; found 1076.5618.

Compound 8-23



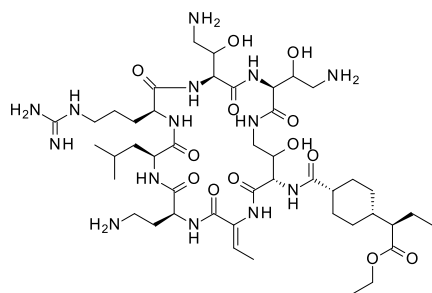
A total of 7.4 mg (51%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{51}H_{73}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1073.5532; found 1073.5513.

Compound 8-24



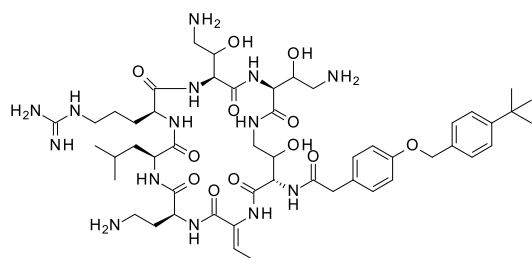
A total of 7.8 mg (48%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{49}H_{85}N_{14}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1077.6421; found 1077.6399.

Compound 8-25



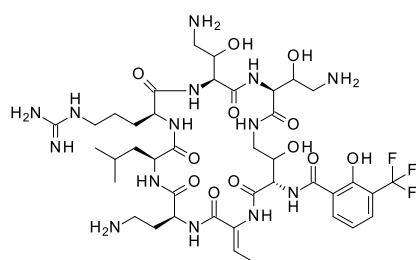
A total of 3.9 mg (28%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{45}H_{81}N_{14}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1025.6108; found 1025.6086.

Compound 8-26



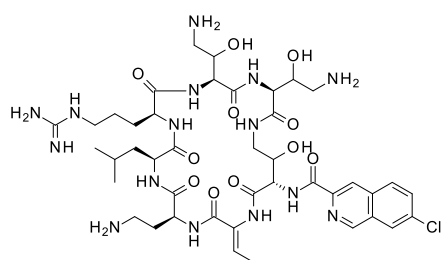
A total of 9.4 mg (64%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{51}H_{81}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1081.6158; found 1081.6135.

Compound 8-27



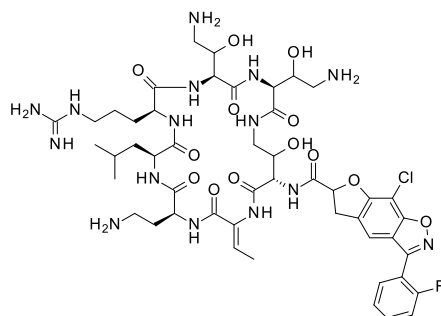
A total of 0.8 mg (6%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{40}H_{64}F_3N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 989.4780; found 989.4766.

Compound 8-28



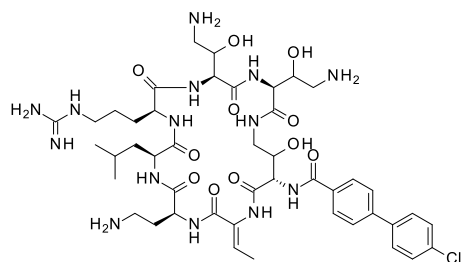
A total of 12.2 mg (85%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{42}H_{65}ClN_{15}O_{11}$ $[M+H]^+$ 990.4677 and 992.4642; found 990.4659 and 992.4647, respectively.

Compound 8-29



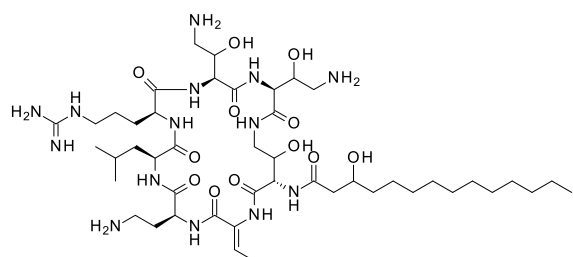
A total of 11.7 mg (76%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{48}H_{69}FCIN_{15}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1116.4794; found 1116.4772.

Compound 8-30



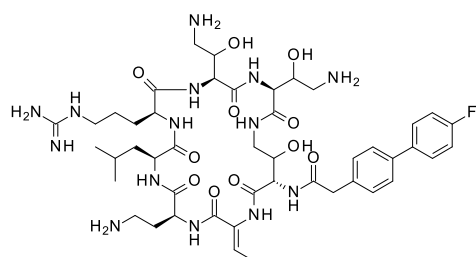
A total of 8.8 mg (57%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{45}H_{68}ClN_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$ 1015.4881 and 1017.4846; found 1015.4866 and 1017.4855, respectively.

Compound 8-31



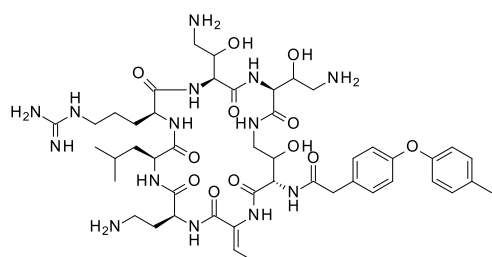
A total of 10.6 mg (55%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{87}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1027.6628; found 1027.6610.

Compound 8-32



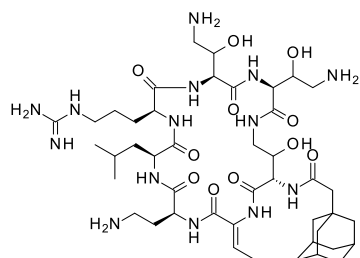
A total of 11.7 mg (83%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{70}FN_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$ 1013.5333; found 1013.5316.

Compound 8-33



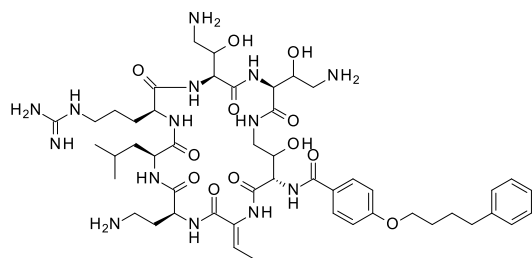
A total of 5.6 mg (57%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{47}H_{73}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1025.5532; found 1025.5514.

Compound 8-34



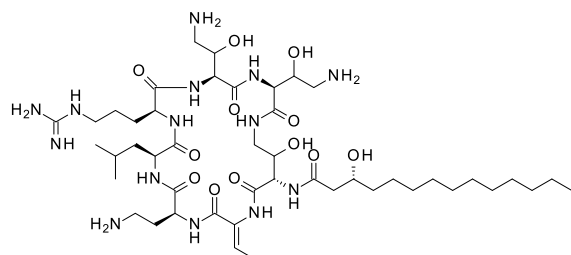
A total of 5.7 mg (30%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{44}H_{77}N_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$ 977.5896; found 977.5878.

Compound 8-35



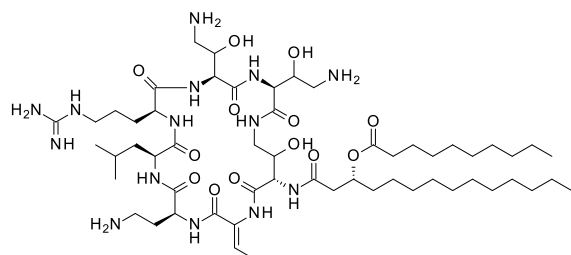
A total of 6.4 mg (32%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{49}H_{77}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1053.5845; found 1053.5826.

Compound 8-36



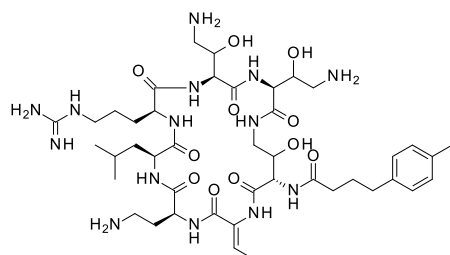
A total of 11.1 mg (57%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{87}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1027.6628; found 1027.6609.

Compound 8-37



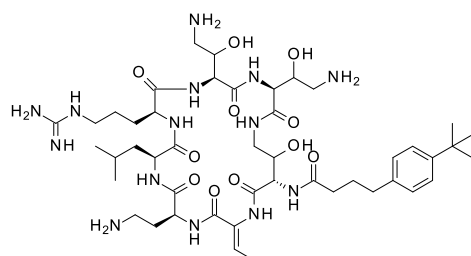
A total of 11.1 mg (49%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{56}H_{105}N_{14}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1181.7986; found 1181.7959.

Compound 8-38



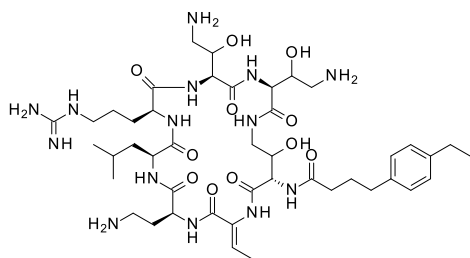
A total of 9.5 mg (51%, two steps) was obtained as a white solid. 1H -NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 7.21–7.20 (m, 4H), 6.63–6.61 (br, 1H), 4.44–4.40 (m, 3H), 4.33–4.21 (m, 6H), 3.58 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz), 3.29–3.03 (m, 9H), 2.65 (br, 2H), 2.43 (br, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.25 (br, 1H), 2.14 (br, 1H), 1.94 (br, 3H), 1.77–1.75 (br m, 5H), 1.64–1.58 (br m, 4H), 0.94 (s, 3H), 0.89 (s, 3H); HRMS (ESI): calcd. for $C_{43}H_{73}N_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$ 961.5583; found 961.5567.

Compound 8-39



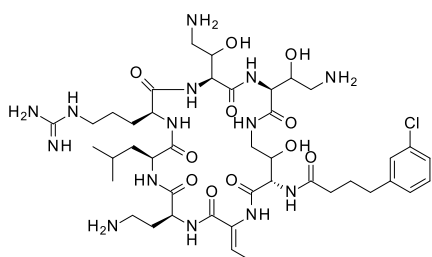
A total of 12.5 mg (65%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{79}N_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$ 1003.6053; found 1003.6035.

Compound 8-40



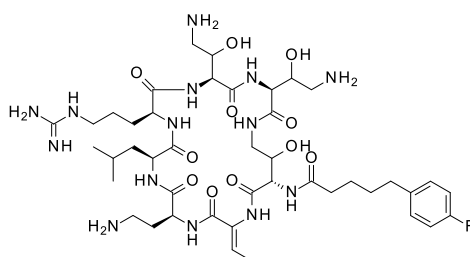
A total of 5.8 mg (33%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{44}H_{75}N_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$ 975.5740; found 975.5722.

Compound 8-41



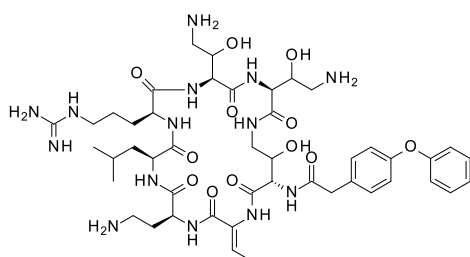
A total of 7.5 mg (39%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{42}H_{70}ClN_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$ 981.5037 and 983.5002; found 981.5023 and 983.5010, respectively.

Compound 8-42



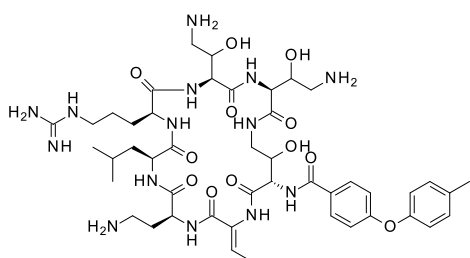
A total of 6.0 mg (32%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{43}H_{72}FN_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$ 979.5489; found 979.5473.

Compound 8-43



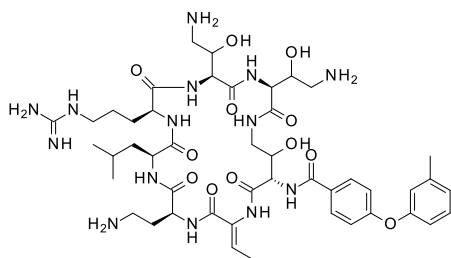
A total of 6.0 mg (32%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{71}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1011.5376; found 1011.5359.

Compound 8-44



A total of 10.6 mg (62%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{71}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1011.5376; found 1011.5360.

Compound 8-45



A total of 10.7 mg (62%, two steps) was obtained as a white solid. HRMS (ESI): calcd. for $C_{46}H_{71}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1011.5376; found 1011.5358.

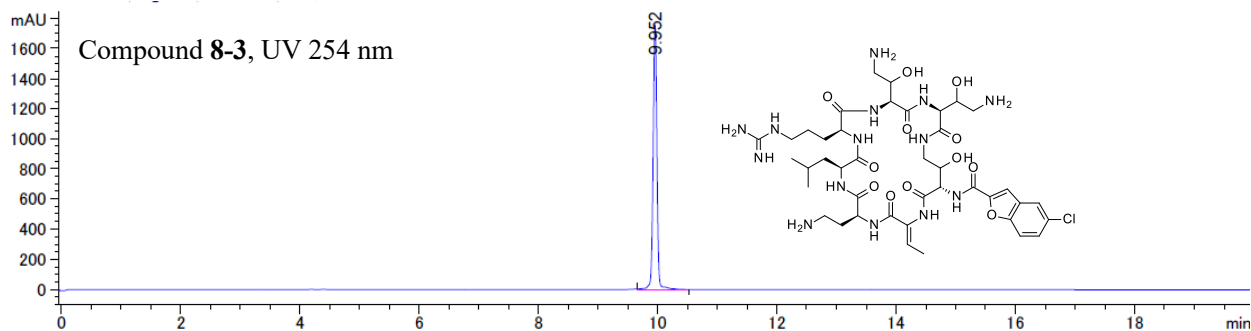
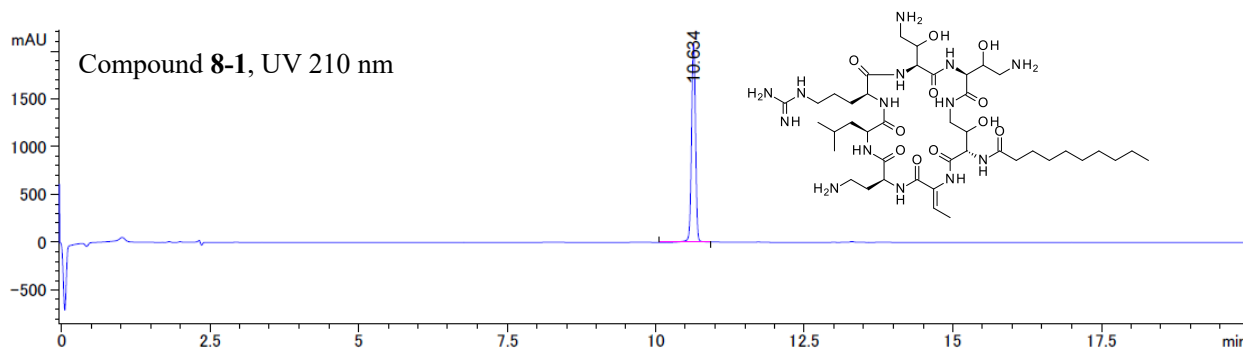
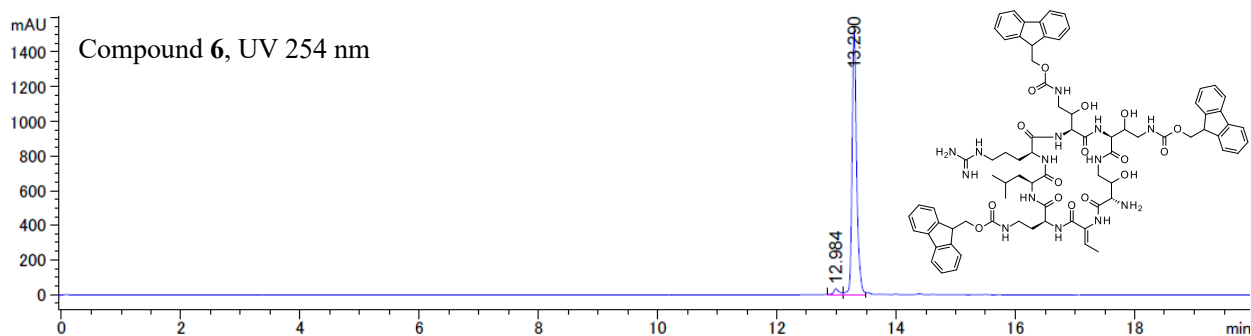
HPLC charts of compounds 6, 8-1, 8-3, and 8-38

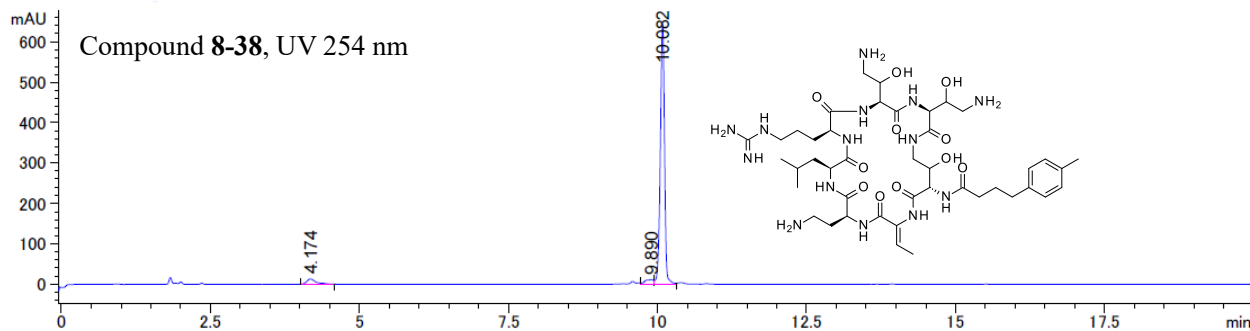
Column: Inertsil ODS-3, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm (GL Sciences)

Flow rate: 1.0 mL/min

Mobile phase: A) 0.1% TFA in H_2O ; B) 0.1% TFA in CH_3CN

Gradient: B (%) 0–5 min, 10%; 5–15 min, 10–95%; 15–20 min, 95%





Evaluation of antibacterial activity, cytotoxicity, and *in vitro* nephrotoxicity

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the medium microdilution method following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute. (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. 10th ed. Wayne, IN: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.)

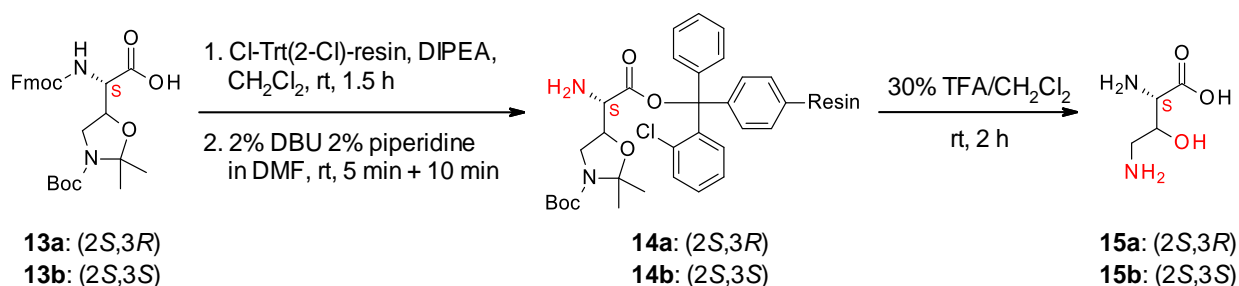
To test the cytotoxicity of the compounds, cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 10% fetal bovine serum in a 37 °C, 5% CO₂ humidified incubator. Test samples of various concentrations were added and incubated for 4 days. Cell-Titer-Glo (Promega, Madison, WI, USA) was used to monitor cell viability.

The *in vitro* nephrotoxicity study was conducted using porcine renal proximal tubular cells (LLC-PK1 cells). The protocol followed the method reported in *PLOS ONE* (2011;6:e26908).

Experimental procedure conducted in chapter 2

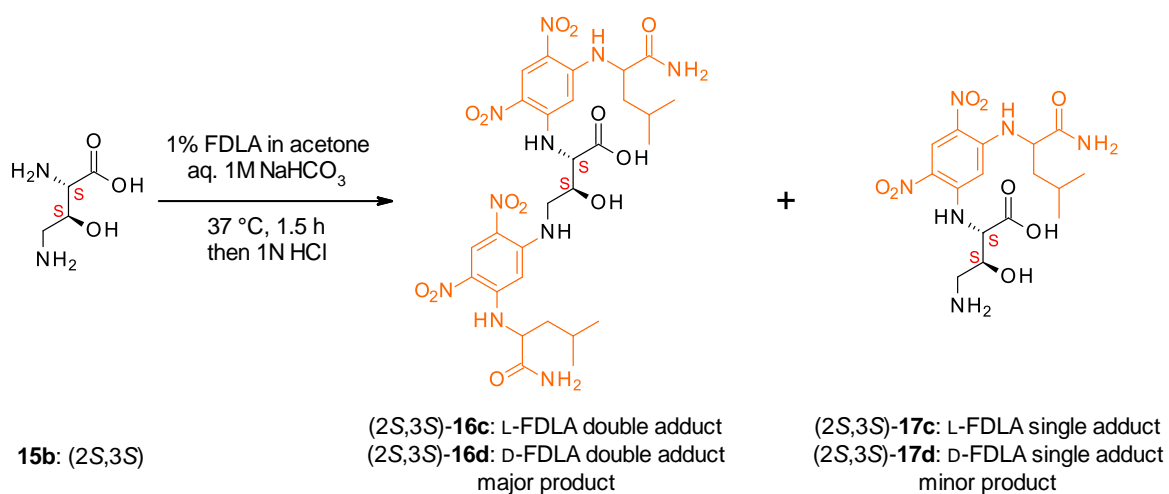
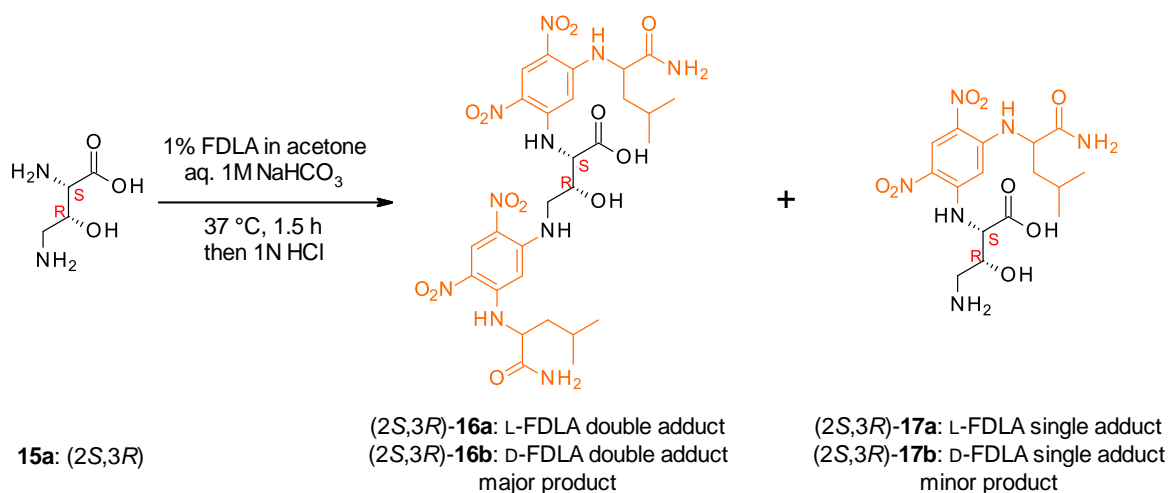
Syntheses of compounds

Compounds **15a**: (2*S*,3*R*) and **15b**: (2*S*,3*S*)



First, 2-chlorotrityl chloride resin (26 mg, 1.55 mmol/g, Watanabe Chemical Industries) was swelled with CH₂Cl₂ (0.5 mL) for 20 min. To the swelled resin, a mixture of (2*S*,3*S*)-**13b** (20 mg, 0.04 mmol) and DIPEA (13.8 μ L, 0.08 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added at room temperature. The reaction mixture was agitated in a reaction vessel for 1.5 h at room temperature, and then the solution was drained. The unreacted points on the resin were capped by washing five times with a cocktail of CH₂Cl₂/MeOH/DIPEA (17:2:1). After that, the resin was washed with CH₂Cl₂ (three times) and DMF (three times). To the washed resin, 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL) was added at room temperature. The reaction mixture was agitated in a reaction vessel for 5 min at room temperature, and then the solution was drained. This Fmoc deprotection procedure was repeated (10 min agitation), and then the resin was washed with DMF (five times) and CH₂Cl₂ (five times). After the resin was dried, 30% TFA in CH₂Cl₂ solution (1 mL) was added to the resin at room temperature. The reaction mixture was agitated in a reaction vessel for 2 h at room temperature, and then the solution was collected by filtration. The resin was washed with CH₂Cl₂ (three times), and the washing solution was also collected. The combined solution was dried by nitrogen gas flushing to give 9.49 mg (crude, 95% yield) of (2*S*,3*S*)-**15b** as a colorless solid. The crude product was confirmed by NMR and LRMS, and it was successively used for FDLA derivatization without purification. (2*S*,3*R*)-**15a** was prepared according to the same procedure to give 8.57 mg (crude, 86% yield) as a colorless solid. Data for (2*S*,3*S*)-**15b**: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 4.09 (dd, 1H, *J* = 7.9 Hz, 4.9 Hz), 3.64 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 3.30 (br, 2H), 3.07 (dd, 1H, *J* = 13.4 Hz, 6.1 Hz), 2.97 (dd, 1H, *J* = 12.8 Hz, 4.3 Hz); ESIMS-LR *m/z* 135.1 [M+H]⁺. Data for (2*S*,3*R*)-**15a**: ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 3.98 (dd, 1H, *J* = 11.9 Hz, 7.0 Hz), 3.42 (d, 1H, *J* = 6.1 Hz), 3.34 (br, 1H), 3.09 (dd, 1H, *J* = 12.8 Hz, 4.9 Hz), 2.90 (dd, 1H, *J* = 12.8 Hz, 7.3 Hz); ESIMS-LR *m/z* 135.1 [M+H]⁺.

Compounds (2*S*,3*R*)-16, 17 and (2*S*,3*S*)-16, 17



First, 2 mg/mL of (2*S*,3*R*)-**15a** aqueous solution was prepared, and 10 μ L of it was transferred to a vial. To the vial, aq. 1M NaHCO₃ (5 μ L) and 1% L- (or D-) FDLA in acetone (20 μ L) were added. The reaction mixture was warmed at 37 °C for 1.5 h with occasional stirring. To the vial, 1 N HCl (5 μ L) was added for neutralization, and then the mixture was diluted with acetonitrile (80 μ L). To another vial for LC-MS, 50 μ L of the resulting mixture was transferred, and it was further diluted with acetonitrile (50 μ L). The obtained sample mixtures of (2*S*,3*R*)-**16** and **17** were used for LC-MS or HPLC analysis. (2*S*,3*S*)-**16** and **17** were prepared according to the same procedure.

LC-MS charts of FDLA adducts of authentic amino acids composing ogipeptin A

Column: Combi-RP (5 μ m, 4.6 i.d. \times 50 mm, Nomura Chemical)

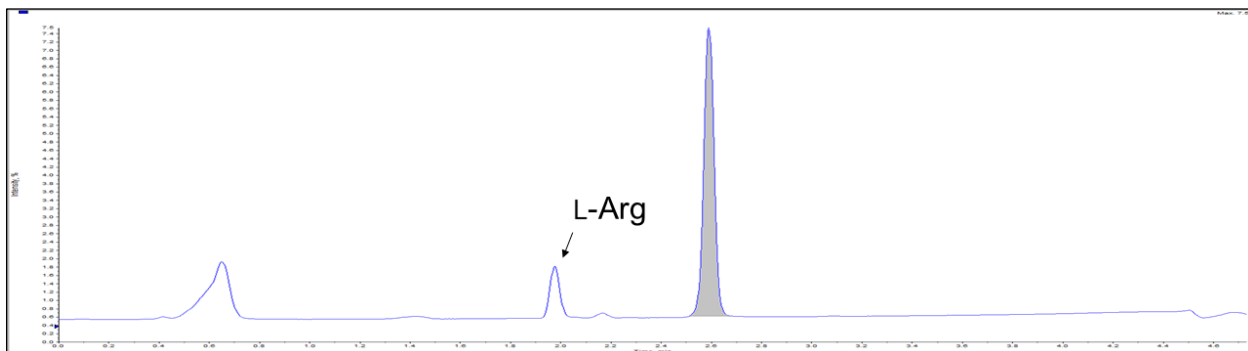
Flow rate: 2.5 mL/min

Mobile phase: A) 0.1% formic acid in H₂O; B) 0.1% formic acid in CH₃CN

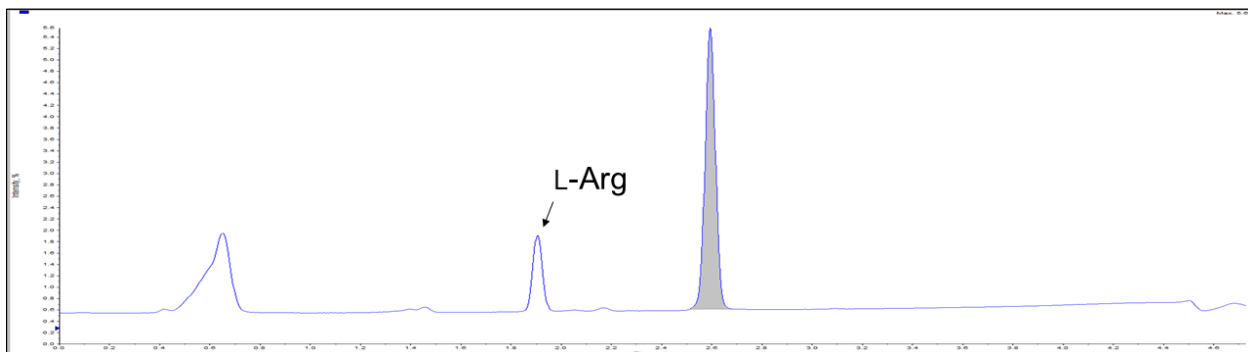
Gradient (B): 0 min 0%; 0–3.75 min 0% to 100%; 3.75–4.75 min 100%; 4.75–5.00 min 100% to 0%

*The gray peaks in all charts are residual L- or D-FDLA.

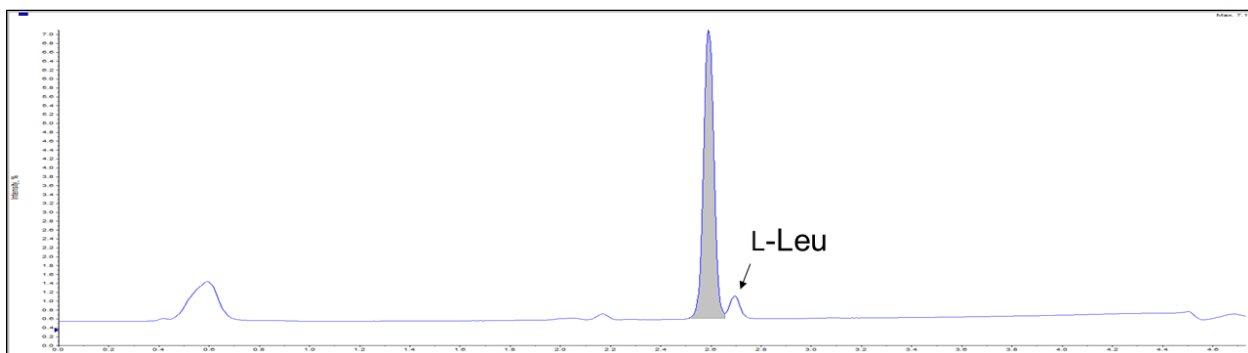
L-Arg derived with L-FDLA



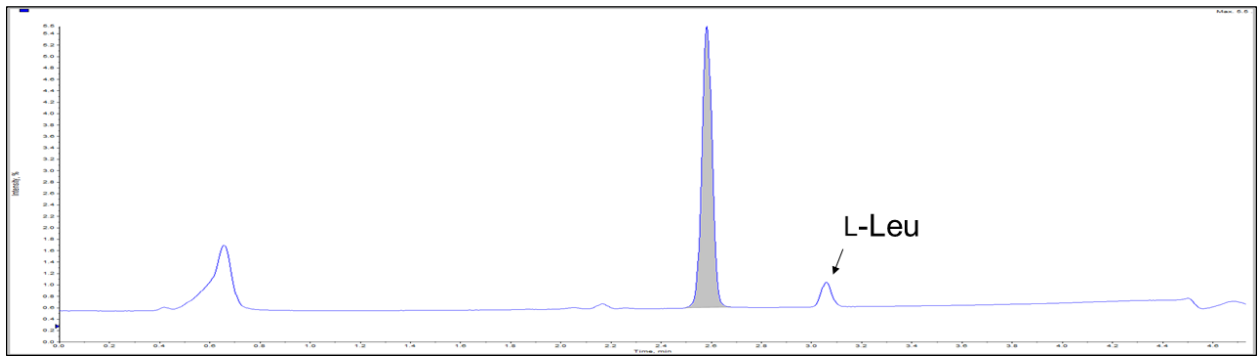
L-Arg derived with D-FDLA



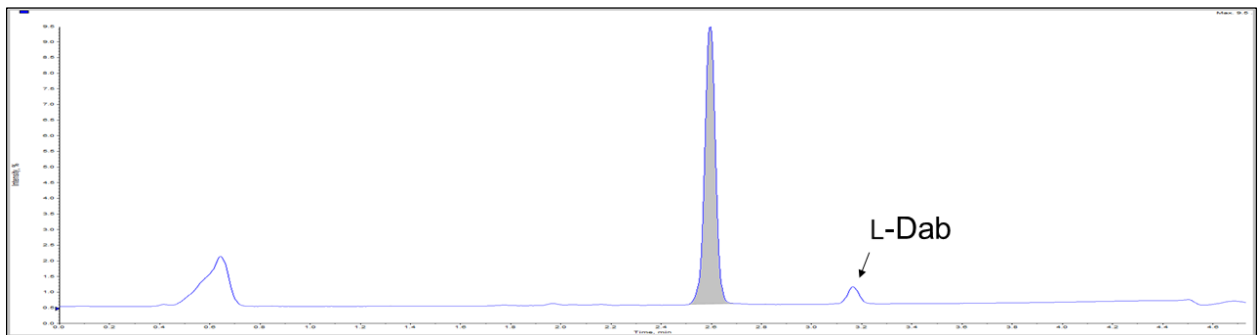
L-Leu derived with L-FDLA



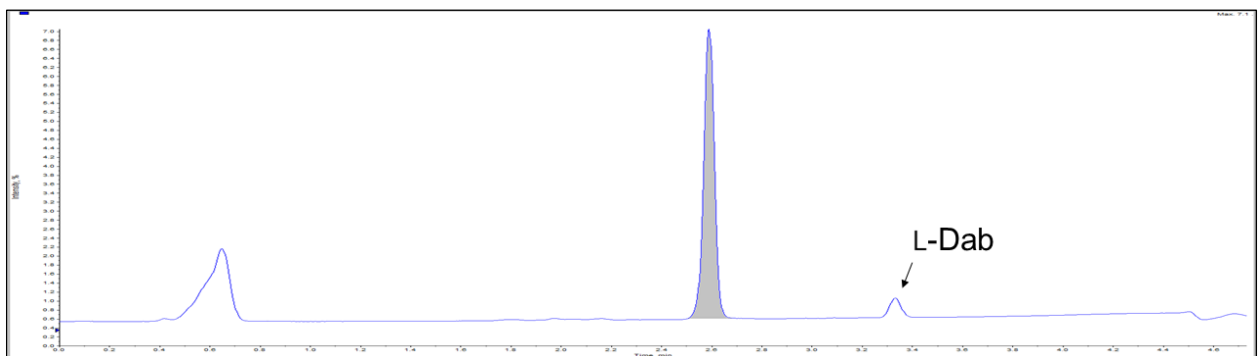
L-Leu derived with D-FDLA



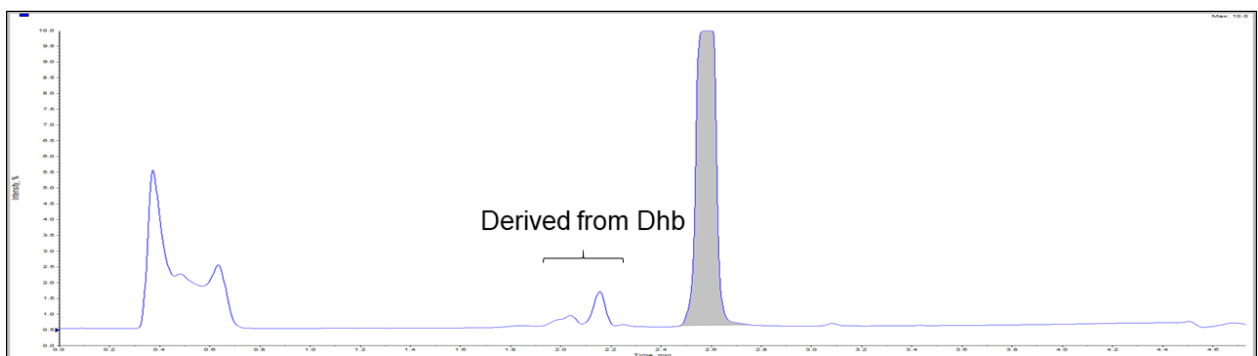
L-Dab derived with L-FDLA (double adduct)



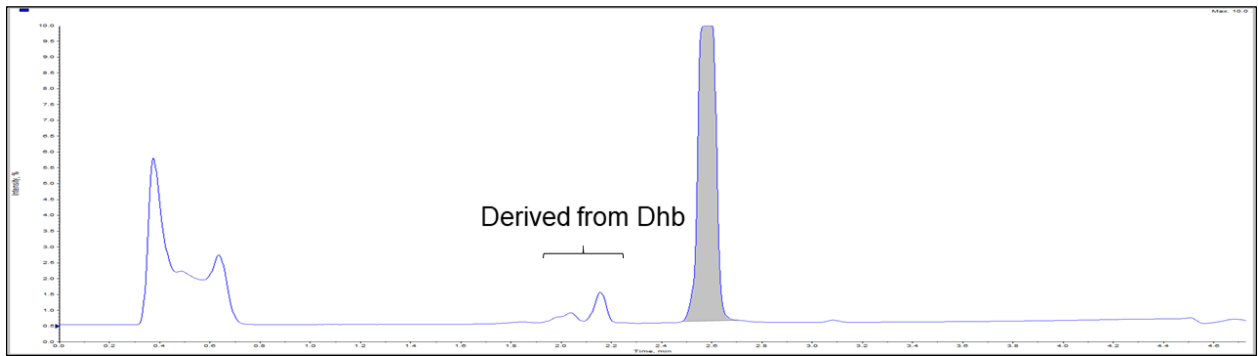
L-Dab derived with D-FDLA (double adduct)



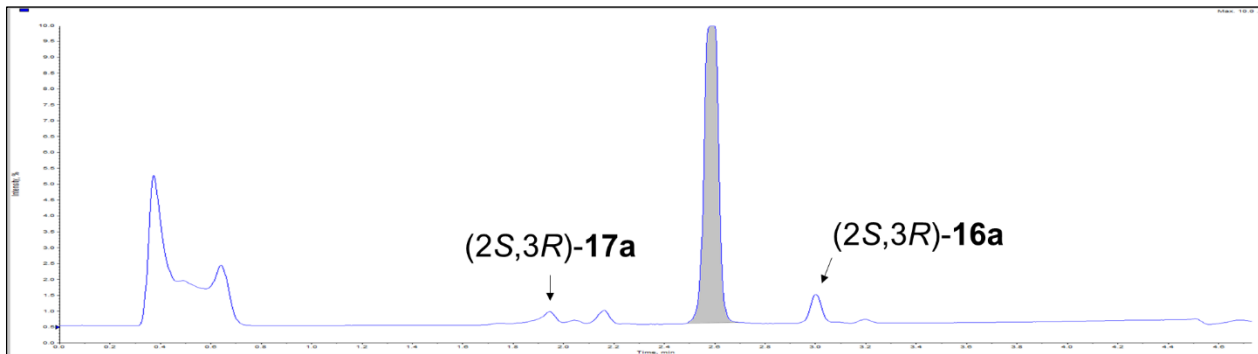
(Z)-Dhb derived with L-FDLA



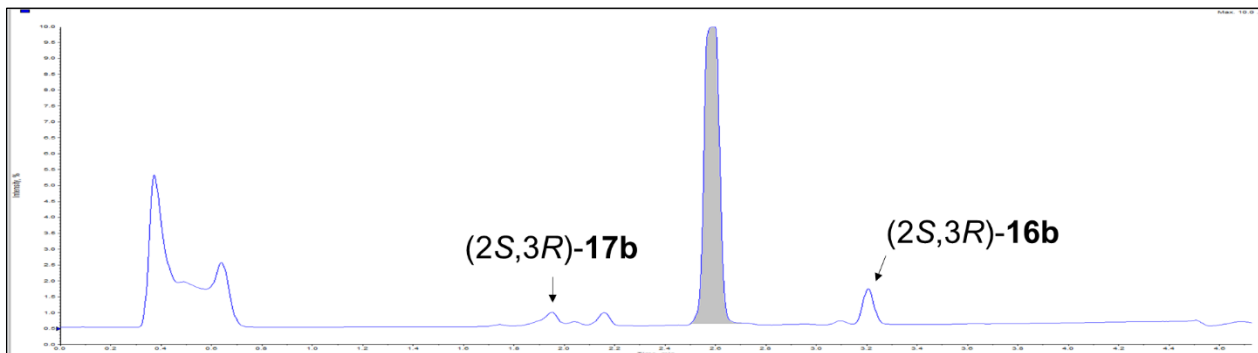
(Z)- Dhb derived with D-FDLA



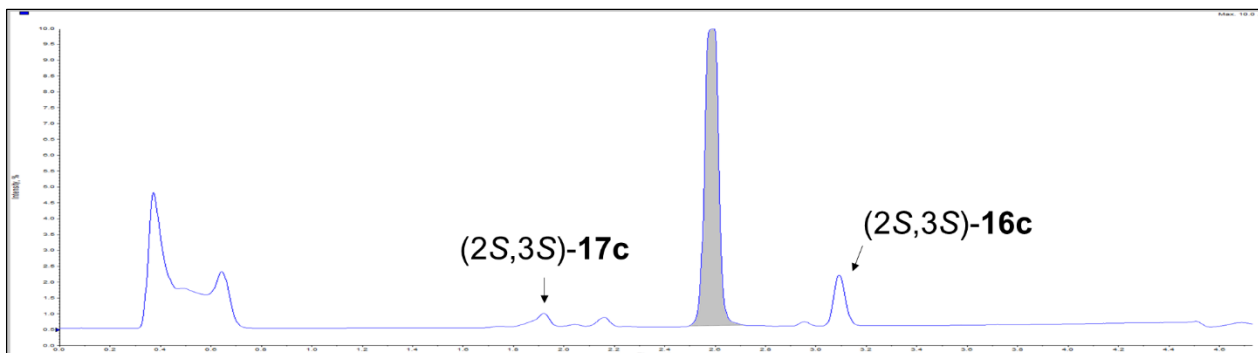
(2S,3R) β -OH Dab derived with L-FDLA



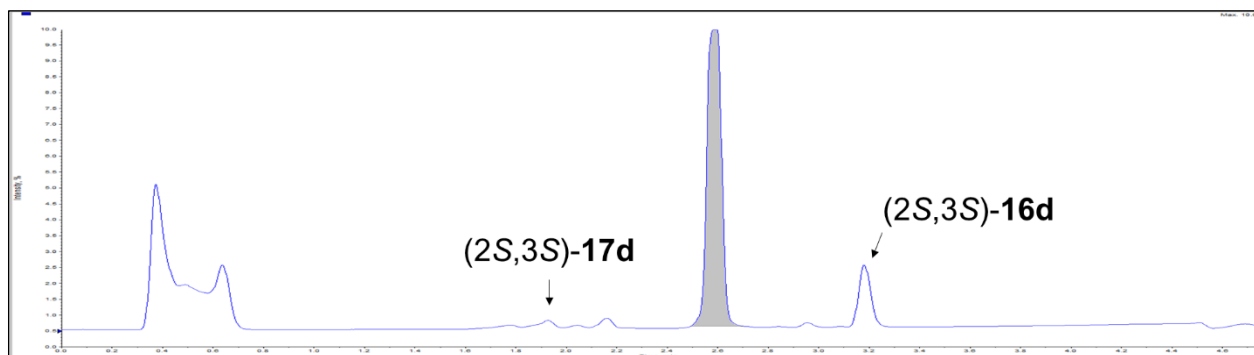
(2S,3R) β -OH Dab derived with D-FDLA



(2S,3S) β -OH Dab derived with L-FDLA



(2*S*,3*S*) β-OH Dab derived with D-FDLA



LC-MS chart of D-FDLA adducts of ogipeptin A hydrolysate (11b)

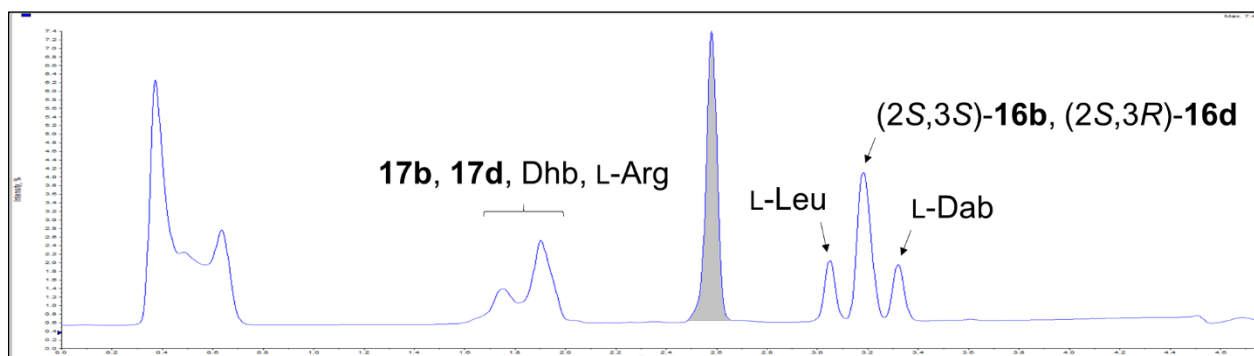


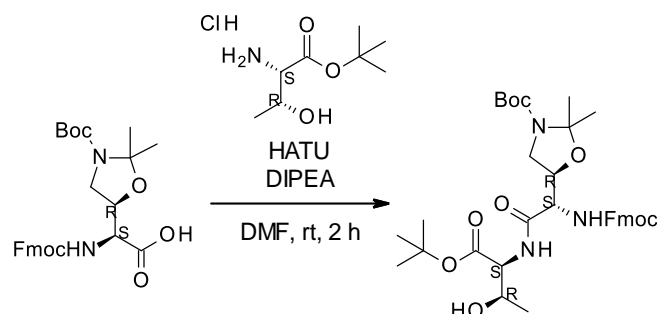
Table S1. Retention times of FDLA adducts of authentic amino acids

Amino acid	L- or D-FDLA	Retention time [min]
L-Arg	L	1.94
	D	1.88
L-Leu	L	2.68
	D	3.05
L-Dab	L	3.12 (double adduct)
	D	3.30 (double adduct)
Dhb	L	2.02–2.14
	D	2.03–2.15
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>) β-OH Dab	L	1.93 (17a), 2.97 (16a)
	D	1.94 (17b), 3.19 (16b)
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>) β-OH Dab	L	1.90 (17c), 3.06 (16c)
	D	1.92 (17d), 3.16 (16d)

Experimental procedure conducted in chapter 3

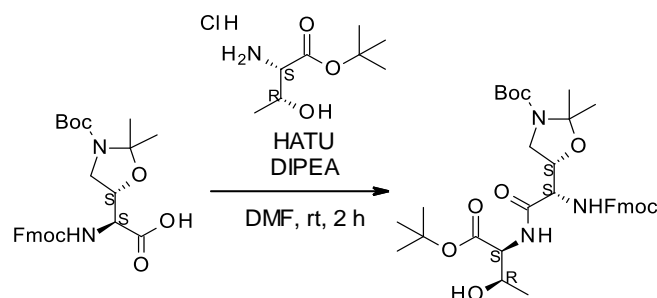
Syntheses of compounds

Compound 19a



To a solution of compound **13a** (1.00 g, 2.01 mmol) in DMF (20 mL), L-threonine *tert*-butyl ester hydrochloride (448 mg, 2.11 mmol), HATU (1.15 g, 3.02 mmol), and DIPEA (1.04 mL, 6.04 mmol) were added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature, and then it was diluted with EtOAc (80 mL), brine (20 mL), and water (20 mL). The organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (50 mL). The combined organic layer was washed with sat. aq. NaHCO₃ and brine, and then it was dried over Na₂SO₄. The dried organic layer was filtered and concentrated. The resulting residue was purified by flash silica gel column chromatography (hexane to 50% EtOAc/hexane) to afford compound **19a** (1.04 g, 79% yield) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 7.89 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.87 (br s, 1H), 7.73 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.67 (br s, 1H), 7.42 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 4.95 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.39–4.23 (m, 5H), 4.15–4.10 (m, 2H), 3.59 (dd, 1H, *J* = 10.3 Hz, 5.7 Hz), 1.50 (s, 3H), 1.42–1.40 (overlapped, 22H), 1.06 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 169.3, 169.2, 156.0, 151.2, 143.7, 140.7, 127.6, 127.1, 127.0, 125.3, 125.2, 120.1, 80.6, 66.3, 65.8, 58.4, 55.8, 47.3, 46.6, 28.0, 27.6, 20.3; HRMS (ESI): calcd. for C₃₅H₄₈N₃O₉ [M+H]⁺ 654.3385; found 654.3411.

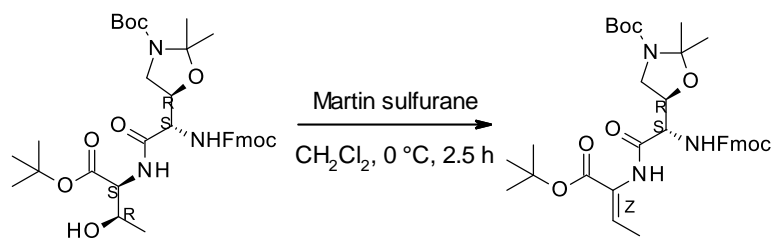
Compound 19b



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **19a**, compound **19b** (1.09 g) was obtained in 83% yield from compound **13b** (1.00 g, 2.01 mmol). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 8.10 (br s, 1H), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.75 (d, 3H, *J* = 7.8 Hz), 7.44–7.40 (m, 2H), 7.34–7.29 (m, 2H), 4.93 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.62 (br s, 1H), 4.43–4.38 (m, 1H), 4.29–4.22 (m, 3H), 4.14–4.08 (m, 2H), 3.42 (br s, 2H), 2.69 (s, 1H), 1.46–1.40 (overlapped, 23H), 1.07 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 169.4, 169.0, 156.1, 151.2, 143.8,

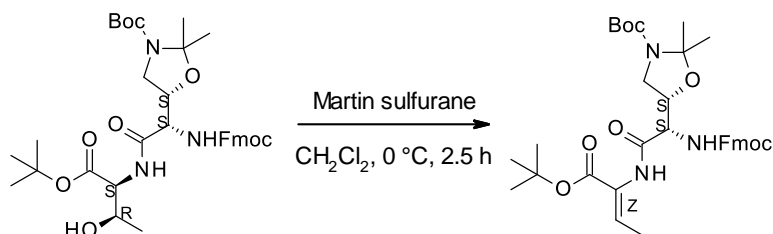
143.7, 140.7, 127.6, 127.1, 125.4, 120.1, 93.0, 80.6, 66.2, 66.0, 46.6, 38.2, 28.0, 27.6, 25.7, 24.5, 20.3; HRMS (ESI): calcd. for C₃₅H₄₈N₃O₉ [M+H]⁺ 654.3385; found 654.3427.

Compound 20a



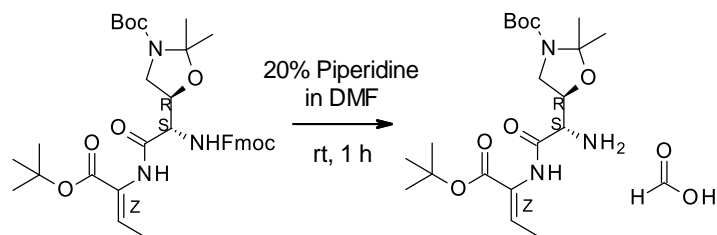
To a solution of compound **19a** (909 mg, 1.39 mmol) in dry CH₂Cl₂ (14 mL), Martin sulfurane (1.03 g, 1.53 mmol) was added at 0 °C under N₂ atmosphere. The mixture was stirred for 2.5 h at 0 °C under N₂ atmosphere, and then it was concentrated. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (hexane to 20% EtOAc/hexane) to afford compound **20a** (719 mg, 81% yield) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 9.32 (s, 1H), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.75 (m, 2H), 7.70 (br s, 1H), 7.42 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 6.44 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz), 4.38–4.22 (m, 5H), 3.62 (dd, 1H, *J* = 10.1 Hz, 6.0 Hz), 1.66 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.50 (br s, 3H), 1.43–1.39 (overlapped, 22H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 167.8, 162.9, 156.0, 151.2, 143.8, 143.7, 140.7 (2 carbons), 131.3, 128.8, 127.6, 127.0, 125.3 (2 carbons), 120.1, 80.3, 78.9, 73.2, 65.8, 56.2, 47.4, 46.6, 28.0, 27.6, 25.9, 24.1, 13.2; HRMS (ESI): calcd. for C₃₅H₄₆N₃O₈ [M+H]⁺ 636.3279; found 636.3287.

Compound 20b



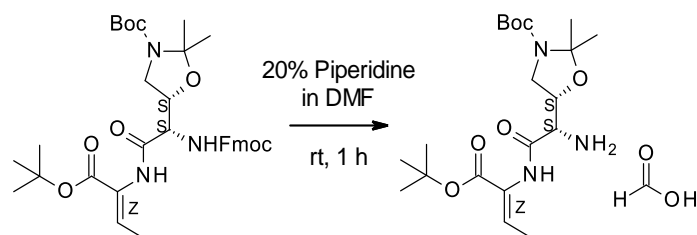
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **20a**, compound **20b** (0.97 g) was obtained in 94% yield from compound **19b** (1.07 g, 1.63 mmol). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 8.94 (s, 1H), 7.85 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.70 (m, 2H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.30 (m, 2H), 6.46 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz), 4.45 (dd, 1H, *J* = 8.9 Hz, 6.6 Hz), 4.38–4.29 (m, 3H), 4.23 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz), 3.57 (dd, 1H, *J* = 10.5 Hz, 6.4 Hz), 3.39 (dd, 1H, *J* = 10.3 Hz, 8.5 Hz), 1.65 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz), 1.49 (s, 3H), 1.43–1.40 (overlapped, 22H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 167.8, 163.1, 156.0, 143.8, 143.7, 140.7, 131.2, 129.0, 127.7, 127.0, 125.4, 120.1, 80.2, 73.1, 66.0, 46.6, 28.0, 27.6, 13.2; HRMS (ESI): calcd. for C₃₅H₄₆N₃O₈ [M+H]⁺ 636.3279; found 636.3311.

Compound 21a



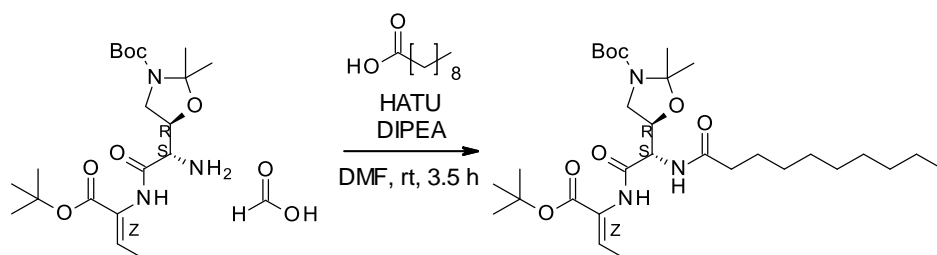
Compound **20a** (102 mg, 0.16 mmol) was treated with 20% piperidine in DMF (1 mL) at room temperature, and the mixture was stirred for 1 h. The mixture was purified by reversed phase HPLC (CH₃CN/H₂O + 0.1% formic acid) and lyophilized to afford compound **21a** (51 mg, a formate, 69% yield) as a white solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 8.19 (s, 1H, formic acid), 6.43 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz), 4.33 (br s, 1H), 3.57 (br s, overlapped, 2H), 3.55 (dd, 1H, $J = 10.1$ Hz, 6.4 Hz), 3.39 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz), 3.35 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz), 1.64 (d, 3H, $J = 7.3$ Hz), 1.48 (s, 3H), 1.42–1.40 (overlapped, 22H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 170.6, 163.5, 163.2, 151.3, 130.5, 128.5, 92.9, 80.4, 74.8, 55.7, 47.3, 28.1, 27.6, 25.8, 24.1, 13.6; HRMS (ESI): calcd. for C₂₀H₃₆N₃O₆ [M+H]⁺ 414.2599; found 414.2607; HPLC ($\lambda = 210$ nm) $t_R = 10.67$ min.

Compound 21b



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **21a**, compound **21b** (538 mg) was obtained in 79% yield from compound **20b** (939 mg, 1.48 mmol). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 8.18 (s, 1H, formic acid), 6.44 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz), 4.27 (br s, overlapped, 2H), 4.24 (m, 1H), 3.60 (br s, 1H), 3.46 (dd, 1H, $J = 10.4$ Hz, 6.1 Hz), 3.33 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz), 1.65 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.50 (s, 3H), 1.42–1.40 (overlapped, 22H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 170.3, 163.5, 163.1, 151.3, 131.0, 128.7, 93.0, 80.3, 78.8, 74.6, 55.3, 45.9, 28.1, 27.6, 25.8, 25.1, 24.2, 13.4; HRMS (ESI): calcd. for C₂₀H₃₆N₃O₆ [M+H]⁺ 414.2599; found 414.2614; HPLC ($\lambda = 210$ nm) $t_R = 10.67$ min.

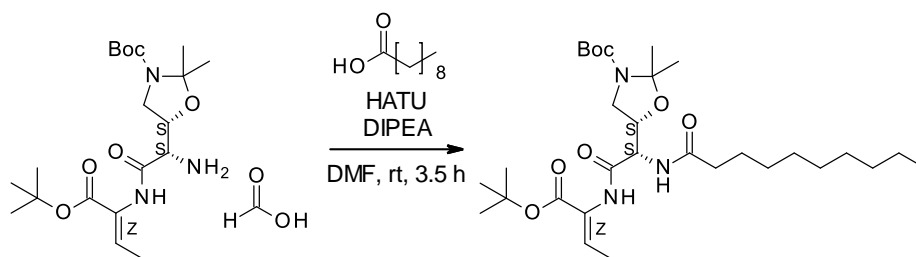
Compound 22a



To a solution of compound **21a** (50 mg, 0.11 mmol) in DMF (1.5 mL), decanoic acid (20 mg,

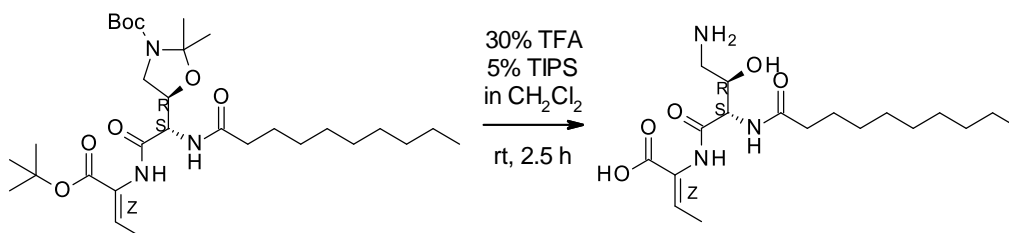
0.12 mmol), HATU (61 mg, 0.16 mmol), and DIPEA (74 μ L, 0.43 mmol) were added. The mixture was stirred for 3.5 h at room temperature, and then the mixture was directly purified by reversed phase HPLC (CH₃CN/H₂O + 0.1% formic acid). Sat. aq. NaHCO₃ was added to the combined fractions until the solution's pH was basic. The resulting mixture was concentrated to remove CH₃CN, and the residual aqueous mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with sat. aq. NaHCO₃ and brine, and then it was dried over Na₂SO₄. The dried organic layer was filtered, concentrated, and dried in vacuo to afford compound **22a** (58 mg, 94% yield) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.73 (s, 1H), 6.68 (q, 1H, J = 7.1 Hz), 6.37 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 4.75 (m, 1H), 4.68 (br s, 1H), 3.67 (br s, 1H), 3.20 (t, 1H, J = 9.8 Hz), 2.28 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 1.71 (d, 3H, J = 7.3 Hz), 1.65 (m, 1H), 1.57 (br s, 2H), 1.49–1.44 (overlapped, 23H), 1.36–1.24 (overlapped, 12H), 0.86 (t, 3H, J = 6.4 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 173.8, 166.8, 163.1, 151.9, 132.6, 126.7, 94.2, 81.8, 80.0, 72.2, 53.4, 47.3, 36.6, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 28.4, 28.0, 25.6, 22.6, 14.6, 14.1; HRMS (ESI): calcd. for C₃₀H₅₄N₃O₇ [M+H]⁺ 568.3956; found 568.3955; HPLC (λ = 210 nm) t_R = 14.92 min.

Compound 22b



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **22a**, compound **22b** (375 mg) was obtained in 59% yield from compound **21b** (514 mg, 1.12 mmol). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.72 (s, 1H), 6.68 (q, 1H, J = 7.1 Hz), 6.26 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 4.77 (t, 1H, J = 7.9 Hz), 4.22 (q, 1H, J = 7.5 Hz), 3.69 (br s, 1H), 3.51 (t, 1H, J = 9.8 Hz), 2.24 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 1.73 (d, 3H, J = 7.3 Hz), 1.62 (overlapped, 3H), 1.51–1.46 (overlapped, 22H), 1.28–1.26 (overlapped, 13H), 0.88 (t, 3H, J = 6.4 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 173.6, 167.4, 163.0, 151.9, 132.2, 127.1, 81.6, 74.1, 54.4, 48.5, 36.6, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.4, 28.0, 25.6, 22.6, 14.4, 14.1; HRMS (ESI): calcd. for C₃₀H₅₄N₃O₇ [M+H]⁺ 568.3956; found 568.3972; HPLC (λ = 210 nm) t_R = 14.90 min.

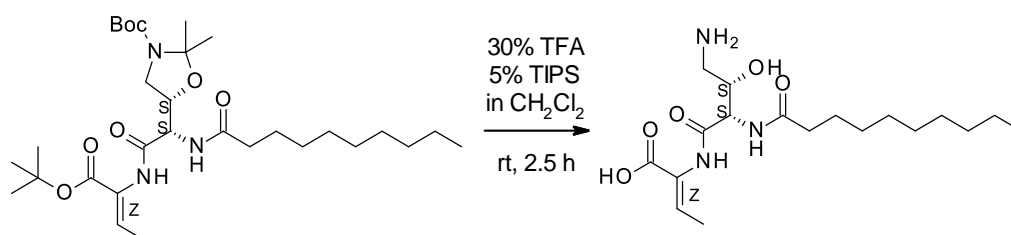
Compound 23a



Compound **22a** (68 mg, 0.12 mmol) was treated with 30% TFA and 5% TIPS in CH₂Cl₂ (2 mL) at room temperature, and the mixture was stirred for 2.5 h. The mixture was concentrated, purified

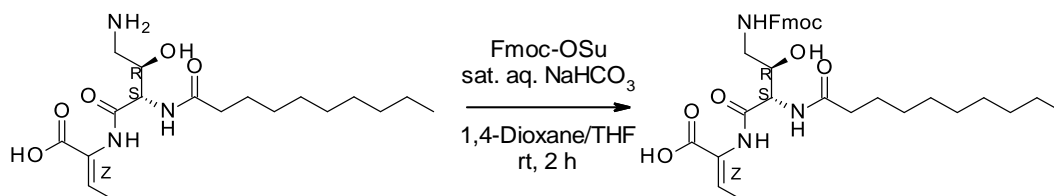
by reversed phase HPLC (CH₃CN/H₂O + 0.1% formic acid), and lyophilized to afford compound **23a** (41 mg, 92% yield) as a white solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 7.91 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 6.25 (q, 1H, *J* = 6.9 Hz), 4.67 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 4.11 (s, 1H), 2.74–2.67 (m, 2H), 2.33 (m, 1H), 2.23 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 1.54 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.49 (m, 2H), 1.24 (overlapped, 14H), 0.86 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz); HRMS (ESI): calcd. for C₁₈H₃₄N₃O₅ [M+H]⁺ 372.2493; found 372.2483; HPLC (λ = 210 nm) *t*_R = 13.85 min. In the ¹H-NMR spectrum, the two protons derived from a carboxylic acid and an amide could not be observed due to the very low solubility of compound **23a** in DMSO-*d*₆. Besides, compound **23a** was too insoluble to record a ¹³C-NMR spectrum.

Compound 23b



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **23a**, compound **23b** (73 mg) was obtained in 33% yield from compound **22b** (343 mg, 0.60 mmol). HRMS (ESI): calcd. for C₁₈H₃₄N₃O₅ [M+H]⁺ 372.2493; found 372.2515; HPLC (λ = 210 nm) *t*_R = 13.76 min. Compound **23b** was too insoluble in DMSO-*d*₆, D₂O, and CDCl₃ to record ¹H- and ¹³C-NMR spectra.

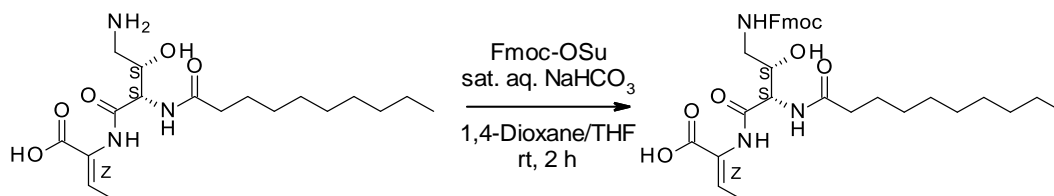
Compound 24a



To a suspension of compound **23a** (40 mg, 0.11 mmol) in 1,4-dioxane/THF (6 mL/4 mL), sat. aq. NaHCO₃ (2 mL) and Fmoc-OSu (38 mg, 0.11 mmol) in 1,4-dioxane (1 mL) were added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature, and then it was diluted with Et₂O (10 mL) and 1N HCl aq. (3 mL). The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, then it was dried over Na₂SO₄. The dried organic layer was filtered and concentrated. The resulting residue was purified by reversed phase HPLC (CH₃CN/H₂O + 0.1% formic acid) and lyophilized to afford compound **24a** (45 mg, 71% yield) as a white solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.52 (br s, 1H), 8.92 (s, 1H), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.70 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.44–7.40 (m, 2H), 7.33 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.13 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz), 6.58 (q, 1H, *J* = 7.1 Hz), 5.07 (br s, 1H), 4.50 (dd, 1H, *J* = 8.9 Hz, 3.4 Hz), 4.30–4.20 (m, 3H), 4.00 (m, 1H), 3.04 (m, 2H), 2.22 (m, 2H), 1.64 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz), 1.50 (m, 2H), 1.22 (overlapped, 12H), 0.84 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 172.8, 168.7, 165.6, 156.1, 143.9 (2 carbons), 140.7, 132.4, 127.9, 127.6, 127.1, 125.3, 120.1, 69.7, 65.6, 55.0, 46.7, 43.7, 35.2, 31.3, 28.9 (2 carbons),

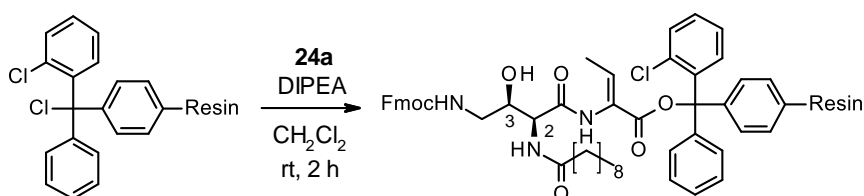
28.7 (2 carbons), 25.2, 22.1, 14.0; HRMS (ESI): calcd. for $C_{33}H_{44}N_3O_7$ $[M+H]^+$ 594.3174; found 594.3187; HPLC ($\lambda = 210$ nm) $t_R = 14.75$ min.

Compound 24b



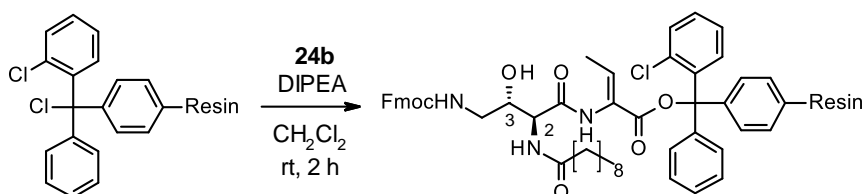
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **24a**, compound **24b** (26 mg) was obtained in 28% yield from compound **23b** (59 mg, 0.16 mmol). 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.48 (br s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.97 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.89 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 7.71 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.42 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.33 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.14 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 6.57 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz), 5.04 (br s, 1H), 4.49 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 4.31–4.20 (m, 3H), 3.74 (dd, 1H, $J = 10.7$ Hz, 6.4 Hz), 3.28–3.24 (m, 1H), 3.07–3.01 (m, 1H), 2.22–2.10 (m, 2H), 1.65 (d, 3H, $J = 7.3$ Hz), 1.49 (br s, 2H), 1.22 (overlapped, 12H), 0.83 (t, 3H, $J = 6.4$ Hz); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 172.3, 168.2, 165.5, 156.3, 143.9, 140.7, 132.4, 127.9, 127.6, 127.1, 125.2, 120.1, 70.5, 65.5, 55.2, 46.7, 43.7, 35.1, 31.3, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 25.2, 22.1, 13.9 (2 carbons); HRMS (ESI): calcd. for $C_{33}H_{44}N_3O_7$ $[M+H]^+$ 594.3174; found 594.3179; HPLC ($\lambda = 210$ nm) $t_R = 14.76$ min.

Compound 26a



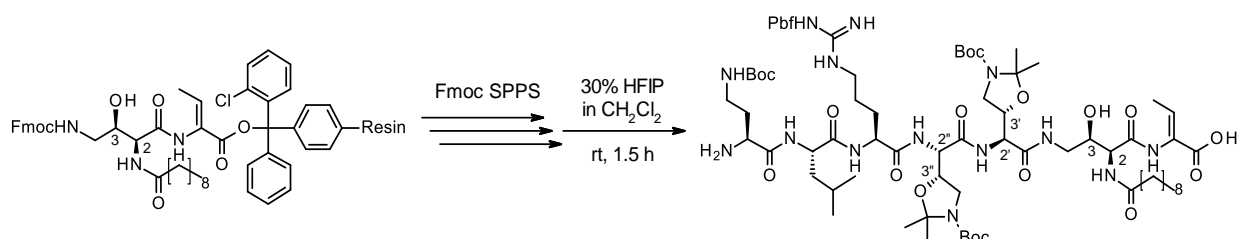
Cl-Trt(2-Cl)-resin (**25**, loading = 1.55 mmol/g, 32.3 mg, 0.05 mmol) in a reactor vessel was swelled with dry CH_2Cl_2 (1 mL) for 1 h at room temperature. A mixture of compound **24a** (34.1 mg, 0.06 mmol) and DIPEA (25.7 μ L, 0.15 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2.5 mL) and dry DMF (1.5 mL) was added to the swelled resin, and the mixture was agitated for 2 h at room temperature. After draining the reaction solution, the unreacted sites were capped with CH_2Cl_2 /MeOH/DIPEA (17:2:1, 4 mL \times 5 times). Washing the resin with CH_2Cl_2 (1 mL \times 3 times), DMF (1 mL \times 3 times), and CH_2Cl_2 (1 mL \times 3 times) afforded the pre-loaded resin **26a** (0.05 mmol).

Compound 26b



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **26a**, the pre-loaded resin **26b** (0.10 mmol) was prepared from Cl-Trt(2-Cl)-resin (**25**, loading = 1.55 mmol/g, 64.5 mg, 0.10 mmol) and compound **24b** (89 mg, 0.15 mmol).

Compound 28a



A linear acyl heptapeptide **28a** was synthesized manually by Fmoc solid-phase peptide synthesis using the pre-loaded resin **26a** (0.05 mmol). The procedures are described below.

Fmoc deprotection

All Fmoc deprotections were carried out with 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL, 5 min and 10 min). After the deprotection, the resin was washed with DMF (1 mL×5 times).

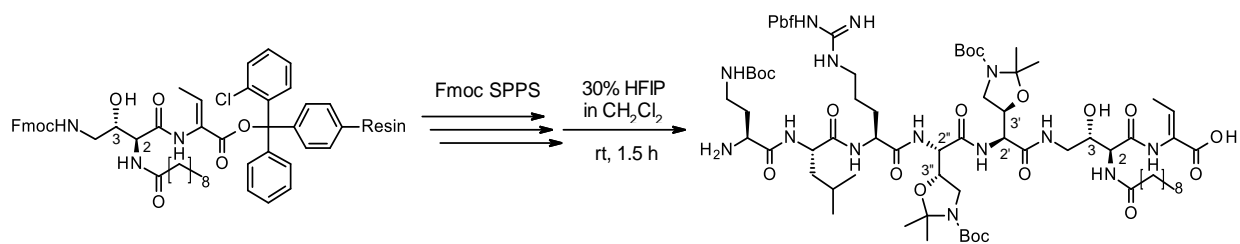
Coupling reaction

A mixture of Fmoc amino acids (3 eq. for compound **13a/b** or 4 eq. for commercially available amino acids), HATU (4 eq.), and DIPEA (8 eq.) in DMF (1.5 mL) was added to the resin, and the mixture was agitated for 1.5 h at room temperature. After draining the reaction solution, the resin was washed with DMF (1 mL×3 times).

Cleavage from resin

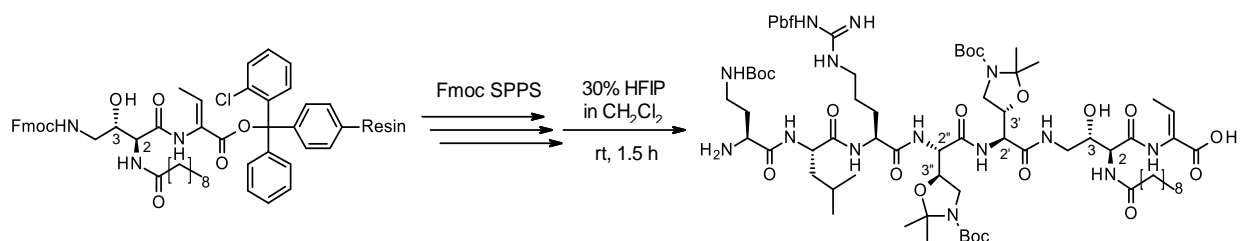
To the dried resin **27a**, 30% HFIP in CH₂Cl₂ (1.5 mL) was added. The mixture was agitated for 1.5 h at room temperature, and then the reaction solution was drained and collected into a test tube. The resin was washed with 30% HFIP in CH₂Cl₂ (1 mL) and CH₂Cl₂ (1 mL×3 times), and all washing solution was collected into the same test tube. The collected solution was concentrated by N₂ gas flushing at room temperature. The resulting residue was purified by reversed phase HPLC (CH₃CN/H₂O + 0.1% formic acid) and lyophilized to afford compound **28a** (24 mg, 30% yield) as a white solid. LRMS (ESI): calcd. for C₇₆H₁₃₀N₁₄O₂₁S [M+2H]²⁺ 803.4622; found 803.6; HPLC (λ = 210 nm) *t*_R = 13.37 min. Compound **28a** was successively used for the synthesis of compound **18a**.

Compound 28b



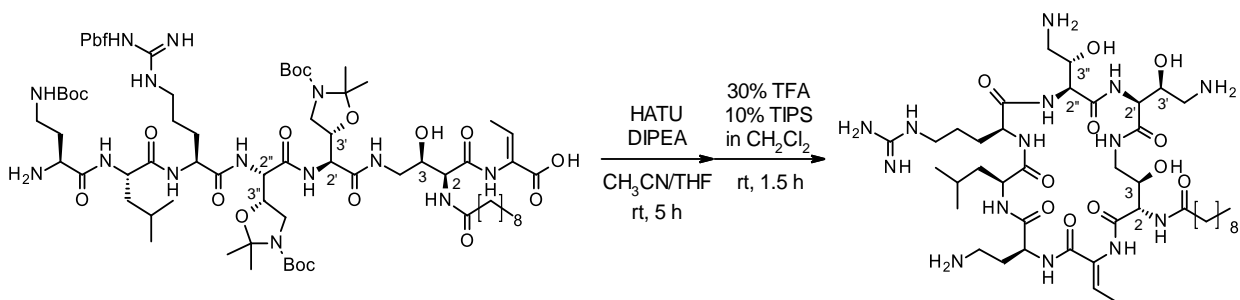
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **28a**, compound **28b** (21 mg) was obtained in 26% yield from compound **26b** (0.05 mmol). LRMS (ESI): calcd. for C₇₆H₁₃₀N₁₄O₂₁S [M+2H]²⁺ 803.4622; found 803.5; HPLC (λ = 210 nm) t_R = 13.40 min. Compound **28b** was successively used for the synthesis of compound **18b**.

Compound 28c



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **28a**, compound **28c** (22 mg) was obtained in 28% yield from compound **26b** (0.05 mmol). LRMS (ESI): calcd. for C₇₆H₁₃₀N₁₄O₂₁S [M+2H]²⁺ 803.4622; found 803.5; HPLC (λ = 210 nm) t_R = 13.32 min. Compound **28c** was successively used for the synthesis of compound **18c**.

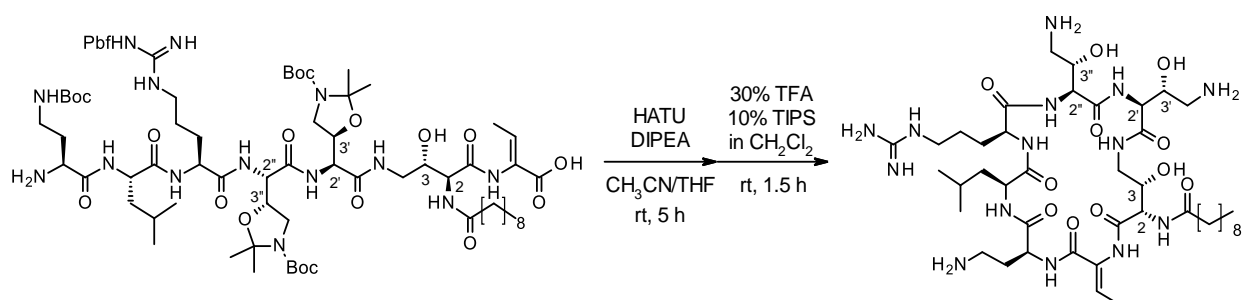
Compound 18a



To a solution of HATU (3.8 mg, 0.010 mmol) in CH₃CN/THF (1:1, 5 mL), a mixture of compound **28a** (10.6 mg, 0.007 mmol) and DIPEA (4.5 μ L, 0.026 mmol) in CH₃CN/THF (1:1, 2 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 5 h at room temperature, and then TFA (2.1 μ L, 0.028 mmol) was added for quenching after the vanishing of compound **28a** was confirmed by LC-MS. The mixture was concentrated, and the deprotection reaction was successively conducted. The residue including the cyclic form of compound **28a** was treated with 30% TFA and 10% TIPS in CH₂Cl₂ (0.5 mL) at room temperature, and it was stirred for 1.5 h. The mixture was concentrated, purified by reversed phase HPLC (CH₃CN/H₂O + 0.1% formic acid), and lyophilized to afford compound **18a** (1.08 mg, 17% yield) as a white solid. ¹H-NMR (0.04N DCI/D₂O + 0.1% 1,4-

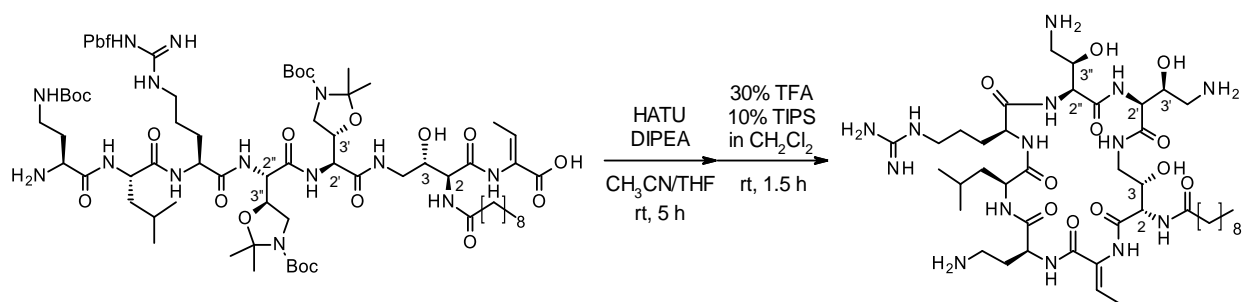
dioxane, 500 MHz) δ : 6.64 (q, 1H, $J = 7.0$ Hz), 4.50 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz), 4.49–4.45 (m, 1H), 4.44 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 4.37–4.23 (m, 6H), 3.65–3.61 (m, 1H), 3.30 (dt, 2H, $J = 13.4$ Hz, 3.4 Hz), 3.26–3.06 (m, 8H), 2.49–2.39 (m, 2H), 2.33–2.25 (m, 1H), 2.20–2.13 (m, 1H), 2.00–1.93 (m, 1H), 1.87–1.82 (m, 2H), 1.79 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz), 1.70–1.56 (m, overlapped, 7H), 1.33–1.29 (overlapped, 15H), 0.96 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz), 0.92 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz), 0.88 (br t, 3H); ^{13}C -NMR (0.04N DCl/D₂O + 0.1% 1,4-dioxane, 125 MHz) δ : 179.0, 174.9, 174.6, 173.4, 172.8, 171.3, 170.6, 167.9, 157.3, 133.5, 128.9, 69.6, 67.5, 67.4, 58.0, 57.0, 56.8, 53.9, 53.6, 52.8, 43.0, 42.6, 42.3, 41.0, 39.5, 37.1, 36.1, 31.8, 29.2–29.0 (4 carbons), 28.9, 28.3, 25.9, 25.2, 25.1, 22.9, 22.7, 21.1, 14.0, 13.2; HRMS (ESI): calcd. for C₄₂H₇₉N₁₄O₁₁ [M+H]⁺ 955.6047; found 955.6057; HPLC ($\lambda = 210$ nm) $t_R = 7.98$ min.

Compound 18b



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **18a**, compound **18b** (2.40 mg) was obtained in 19% yield from compound **28b** (21.2 mg, 0.013 mmol). ^1H -NMR (0.04N DCl/D₂O + 0.1% 1,4-dioxane, 500 MHz) δ : 6.82 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz), 4.58 (br dd, 1H, $J = 10.5$ Hz, 4.2 Hz), 4.51–4.49 (m, 1H), 4.49–4.45 (m, 1H), 4.43 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz), 4.36 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz), 4.33–4.25 (m, 3H), 4.12 (td, 1H, $J = 7.2$ Hz, 3.5 Hz), 3.68–3.62 (m, 1H), 3.40 (dd, 1H, $J = 14.2$ Hz, 3.4 Hz), 3.30–3.19 (m, 5H), 3.16–3.03 (m, 5H), 2.36 (br t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 2.30–2.24 (m, 1H), 2.14–2.06 (m, 1H), 2.04–1.97 (m, 1H), 1.92–1.84 (m, 1H), 1.81–1.74 (m, overlapped, 2H), 1.79 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.68–1.58 (m, overlapped, 7H), 1.34–1.23 (overlapped, 15H), 0.96 (br d, 3H, $J = 5.9$ Hz), 0.92 (br d, 3H, $J = 5.8$ Hz), 0.87 (br t, 3H, $J = 6.7$ Hz); ^{13}C -NMR (0.04N DCl/D₂O + 0.1% 1,4-dioxane, 125 MHz) δ : 178.4, 175.3, 174.8, 172.7, 172.5, 171.4, 171.2, 177.0, 157.3, 136.5, 128.0, 70.0, 67.5, 67.1, 57.5, 57.3 (2 carbons), 54.5, 53.7, 51.8, 43.6, 42.6, 42.5, 41.0, 39.8, 37.0, 35.9, 31.8, 29.6, 29.2, 29.0 (2 carbons), 28.9, 27.8, 25.9, 25.4, 25.1, 22.7 (2 carbons), 21.3, 14.1, 13.5; HRMS (ESI): calcd. for C₄₂H₇₉N₁₄O₁₁ [M+H]⁺ 955.6047; found 955.6062; HPLC ($\lambda = 210$ nm) $t_R = 8.85$ min.

Compound 18c

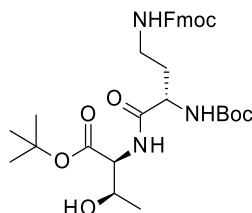


Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **18a**, compound **18c** (2.11 mg) was obtained in 16% yield from compound **28c** (22.3 mg, 0.014 mmol). ¹H-NMR (0.04N DCl/D₂O + 0.1% 1,4-dioxane, 500 MHz) δ: 6.80 (q, 1H, *J* = 7.1 Hz), 4.61–4.55 (m, 2H), 4.50–4.45 (m, 1H), 4.40–4.34 (m, 4H), 4.32–4.28 (m, 1H), 4.12 (td, 1H, *J* = 7.0 Hz, 4.1 Hz), 3.68 (dd, 1H, *J* = 14.2 Hz, 6.9 Hz), 3.36 (dd, 1H, *J* = 14.2 Hz, 4.0 Hz), 3.31–3.19 (m, 5H), 3.12–3.01 (m, 5H), 2.39–2.33 (m, 3H), 2.29–2.24 (m, 1H), 2.14–2.00 (m, 3H), 1.91–1.82 (m, 2H), 1.81–1.76 (m, overlapped, 2H), 1.79 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.70–1.59 (m, 8H), 1.35–1.21 (overlapped, 17H), 0.96 (br d, 3H, *J* = 6.2 Hz), 0.92 (br d, 3H, *J* = 6.0 Hz), 0.89–0.84 (m, overlapped, 4H); ¹³C-NMR (0.04N DCl/D₂O + 0.1% 1,4-dioxane, 125 MHz) δ: 178.3, 175.4, 174.6, 172.8, 172.5, 171.1, 171.0, 167.0, 157.3, 136.2, 128.0, 69.7, 67.9, 67.3, 57.8, 57.6, 57.0, 54.3, 53.9, 51.9, 43.5, 42.5, 42.3, 41.0, 40.4, 37.0, 36.0, 31.8, 29.7, 29.2, 29.0 (2 carbons), 28.9, 28.1, 26.0, 25.5, 25.1, 22.7 (2 carbons), 21.2, 14.0, 13.5; HRMS (ESI): calcd. for C₄₂H₇₉N₁₄O₁₁ [M+H]⁺ 955.6047; found 955.6068; HPLC (λ = 210 nm) *t*_R = 8.88 min.

Experimental procedure conducted in chapter 4

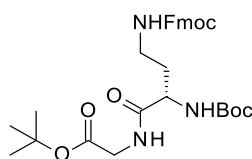
Syntheses of compounds

Compound 30a



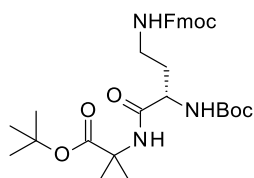
To a solution of Boc-Dab(Fmoc)-OH (**29**, 1.00 g, 2.27 mmol) in DMF (23 mL) were added L-threonine *tert*-butyl ester hydrochloride (0.53 g, 2.50 mmol), HATU (1.29 g, 3.41 mmol), and DIPEA (1.56 mL, 9.08 mmol). The mixture was stirred for 1.5 h at room temperature, followed by dilution with EtOAc (50 mL), brine (25 mL), and water (25 mL). The organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (50 mL). The combined organic layer was washed with sat. aq. NaHCO₃ (50 mL) and brine (50 mL), after which it was dried over Na₂SO₄. The dried organic layer was filtered and concentrated. The resulting residue was purified by flash silica gel column chromatography (hexane to 50% EtOAc/hexane) to afford compound **30a** (1.21 g, 89% yield) as a white solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 7.89 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.73 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.69 (dd, 2H, *J* = 7.6 Hz, 2.1 Hz), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.35–7.30 (m, 3H), 7.02 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 4.96 (d, 1H, *J* = 4.9 Hz), 4.30–4.20 (m, 3H), 4.17–4.04 (m, 3H), 3.11–3.02 (m, 2H), 1.86–1.79 (m, 1H), 1.64–1.59 (m, 1H), 1.38 (overlapped, 18H), 1.05 (d, 3H, *J* = 6.1 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 172.2, 169.6, 156.0, 155.3, 143.9, 140.7, 127.6, 127.1, 125.1, 120.1, 80.5, 78.1, 66.4, 65.3, 58.0, 52.0, 46.7, 37.3, 32.0, 28.2, 27.7, 20.2; HRMS (ESI): calcd. for C₃₂H₄₄N₃O₈ [M+H]⁺ 598.3123; found 598.3141.

Compound 30b



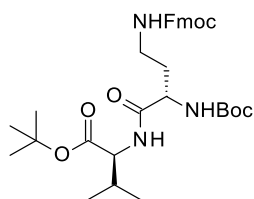
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **30a**, compound **30b** (2.30 g, white solid) was obtained in 91% yield from Boc-Dab(Fmoc)-OH (**29**, 2.00 g, 4.54 mmol) and glycine *tert*-butyl ester hydrochloride (0.84 g, 4.99 mmol). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 8.12 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.68 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.33 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.26 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 6.95 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 4.29 (m, 1H), 4.22 (q, 1H, *J* = 6.9 Hz), 3.98 (dd, 1H, *J* = 13.7 Hz, 8.2 Hz), 3.78 (dd, 1H, *J* = 17.7 Hz, 6.1 Hz), 3.67 (dd, 1H, *J* = 17.4 Hz, 5.2 Hz), 3.05 (m, 2H), 1.82 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.39–1.38 (overlapped, 19H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 172.2, 168.9, 156.0, 155.3, 143.9, 140.7, 137.4, 128.9, 127.6, 127.3, 127.1, 125.1, 121.4, 120.1, 120.0, 109.8, 80.6, 78.1, 65.3, 51.9, 46.7, 41.4, 37.3, 32.1, 28.2, 27.7; HRMS (ESI): calcd. for C₃₀H₄₀N₃O₇ [M+H]⁺ 554.2861; found 554.2850.

Compound 30c



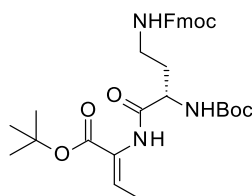
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **30a**, compound **30c** (1.36 g) was obtained in quantitative yield from Boc-Dab(Fmoc)-OH (**29**, 1.00 g, 2.27 mmol) and *tert*-butyl 2-amino-2-methylpropanoate hydrochloride (0.49 g, 2.50 mmol). The purification of crude **30c** was conducted by flash silica gel column chromatography (hexane to 40% EtOAc/hexane) to afford compound **30c** as a white solid. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 8.03 (s, 1H), 7.89 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.68 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.42 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.33 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.25 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 6.82 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 4.30 (br d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 4.22 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz), 3.92 (m, 1H), 3.03 (m, 2H), 1.74 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.37–1.29 (overlapped, 24H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 172.8, 170.9, 156.1, 155.2, 143.9, 142.6, 140.7, 139.4, 137.4, 128.9, 127.6, 127.3, 127.1, 125.1, 121.4, 120.1, 120.0, 109.8, 79.5, 78.0, 65.3, 55.3, 51.7, 46.7, 37.3, 32.8, 32.3, 28.2, 27.4, 24.7; HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 582.3174; found 582.3198.

Compound 30d



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **30a**, compound **30d** (1.26 g) was obtained in 93% yield from Boc-Dab(Fmoc)-OH (**29**, 1.00 g, 2.27 mmol) and L-valine *tert*-butyl ester hydrochloride (0.52 g, 2.50 mmol). The purification of crude **30d** was conducted by flash silica gel column chromatography (hexane to 30% EtOAc/hexane) to afford compound **30d** as a white solid. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7.89 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.82 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.68 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.41 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.33 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.28 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 6.99 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 4.30 (br d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 4.22 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz), 4.10–3.99 (m, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.03 (td, 1H, $J = 13.4$ Hz, 6.9 Hz), 1.81–1.74 (m, 1H), 1.63–1.55 (m, 1H), 1.39–1.33 (overlapped, 18H), 0.88 (overlapped, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 172.0, 170.4, 156.1, 155.3, 143.9, 140.7, 128.9, 127.6, 127.3, 127.1, 125.1, 121.4, 120.1, 120.0, 109.8, 80.7, 78.1, 65.3, 57.6, 52.0, 46.7, 37.3, 32.1, 30.2, 28.1, 27.6, 18.8, 17.8; HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 596.3330; found 596.3322.

Compound 31



To a solution of compound **30a** (477 mg, 0.80 mmol) in dry CH_2Cl_2 (9.5 mL) was added a solution of Martin sulfurane (966 mg, 1.44 mmol) in dry CH_2Cl_2 (4.5 mL) in a dropwise manner at $0\text{ }^\circ\text{C}$ under a N_2 atmosphere. The mixture was stirred for 30 min at $0\text{ }^\circ\text{C}$ under a N_2 atmosphere, after which it was diluted with sat. aq. NaHCO_3 (30 mL). The mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with brine, followed by drying over Na_2SO_4 . The dried organic layer was filtered and concentrated. The resulting residue was purified by flash silica gel column chromatography (hexane to 40% EtOAc/hexane) to afford compound **31** (387 mg, 84% yield) as a colorless solid. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ : 9.07 (s, 1H), 7.89 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.69 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.42 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.35–7.27 (m, 3H), 6.99 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.42 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz), 4.31 (br d, 2H, $J = 6.1$ Hz), 4.22 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz), 4.04 (q, 1H, $J = 7.3$ Hz), 3.08 (m, 2H), 1.83 (m, 1H), 1.68 (m, overlapped, 1H), 1.65 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz), 1.40–1.38 (overlapped, 18H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) δ : 170.8, 163.3, 156.1, 155.3, 143.9, 140.7, 130.9, 128.9, 127.6, 127.3, 127.1, 125.1, 121.4, 120.1, 120.0, 80.2, 78.1, 65.3, 52.2, 46.7, 37.4, 32.0, 28.2, 27.6, 13.3; HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 580.3017; found 580.3053.

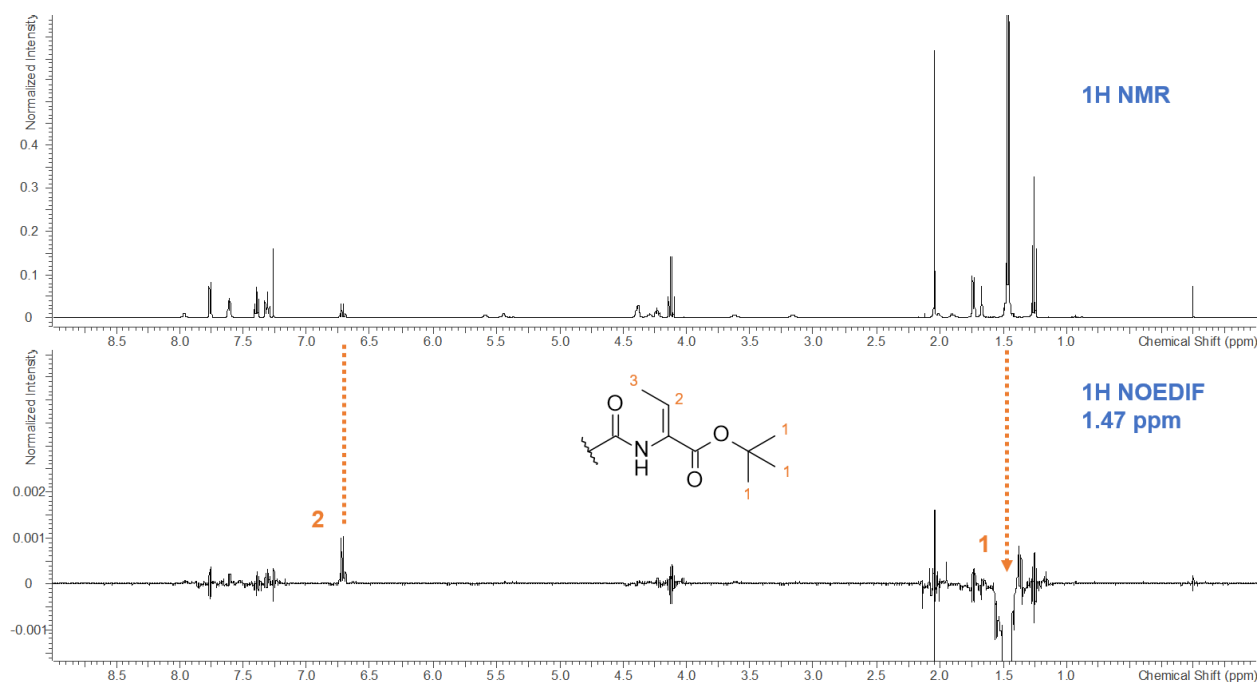
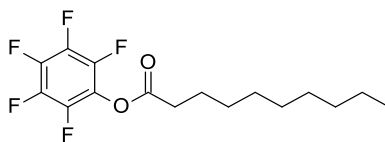


Figure S1. $^1\text{H-NMR}$ and NOE difference spectra at 1.47 ppm of compound **31** in CDCl_3

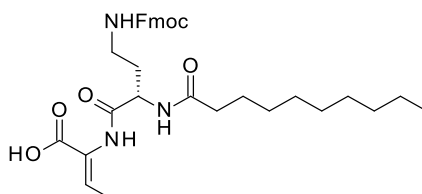
The correlation between 1-H and 2-H was observed.

Decanoic acid pentafluorophenyl ester



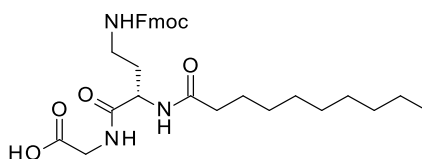
Decanoic acid pentafluorophenyl ester was prepared by following the preestablished procedure reported in US Patent WO 03/014147 A1. Decanoic acid (10.0 g) as a starting material afforded decanoic acid pentafluorophenyl ester (16.4 g) with 84% yield.

Compound 32a



Compound **31** (500 mg, 0.86 mmol) was treated with 30% TFA in CH₂Cl₂ (10 mL) at room temperature, and the mixture was stirred for 3 h. The mixture was concentrated and dried in vacuo. The residue was dissolved in THF (9 mL), and decanoic acid pentafluorophenyl ester (350 mg, 1.04 mmol) and DIPEA (1.48 mL, 8.63 mmol) were added at 0 °C. The mixture was stirred overnight at room temperature, after which it was diluted with EtOAc and water. To the diluted mixture was added 1N HCl until the solution's pH was 1. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, followed by drying over Na₂SO₄. The dried organic layer was filtered and concentrated. The resulting residue was purified by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 60% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in 90% CH₃CN/H₂O), and the collected fractions were concentrated and dried in vacuo to afford compound **32a** (275 mg, 55% yield) as a white solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 9.06 (s, 1H), 8.02 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.69 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.33 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.26 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 6.57 (q, 1H, *J* = 7.1 Hz), 4.43 (dd, 1H, *J* = 14.0 Hz, 8.5 Hz), 4.30–4.20 (m, 3H), 3.08 (q, 2H, *J* = 6.5 Hz), 2.13 (ddd, 2H, *J* = 15.7 Hz, 8.4 Hz, 6.0 Hz), 1.88 (m, 1H), 1.69 (m, 1H), 1.64 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz), 1.48 (br t, 2H, *J* = 5.8 Hz), 1.22 (overlapped, 12H), 0.83 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 172.4, 170.3, 165.5, 156.0, 143.9, 140.7, 132.2, 128.1, 127.6, 127.1, 125.1, 120.1, 65.3, 50.4, 46.7, 37.3, 35.1, 32.3, 31.3, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 25.2, 22.1, 13.9, 13.7; HRMS (ESI): calcd. for C₃₃H₄₄N₃O₆ [M+H]⁺ 578.3225; found 578.3227.

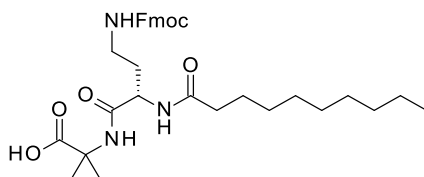
Compound 32b



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **32a**, compound **32b** (363 mg) was obtained in 73% yield from compound **30b** (500 mg, 0.90 mmol). The

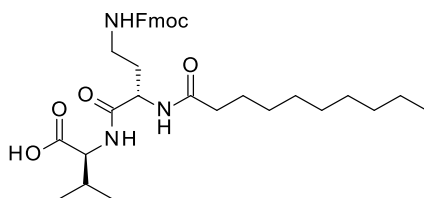
purification of crude **32b** was conducted by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 60% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in 90% CH₃CN/H₂O) to afford compound **32b** as a white solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 8.13 (br s, 1H), 7.99 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.68 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 7.33 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.25 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.36–4.19 (m, 4H), 3.73 (m, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.83 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.47 (br m, 2H), 1.22 (overlapped, 12H), 0.83 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 172.3, 171.8, 171.1, 156.0, 143.9 (2 carbons), 140.7, 127.6, 127.1, 125.2, 125.1, 120.1, 65.4, 50.1, 46.7, 40.6, 37.3, 35.1, 32.3, 31.3, 28.9, 28.8, 28.7, 25.2, 22.1, 14.0; HRMS (ESI): calcd. for C₃₁H₄₂N₃O₆ [M+H]⁺ 552.3068; found 552.3064.

Compound 32c



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **32a**, compound **32c** (408 mg) was obtained in 82% yield from compound **30c** (500 mg, 0.86 mmol). The purification of crude **32c** was conducted by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 65% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in 90% CH₃CN/H₂O) to afford compound **32c** as a white solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.25 (br s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.92–7.88 (m, 3H), 7.68 (m, 2H), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 7.33 (dd, 2H, *J* = 10.4 Hz, 4.3 Hz), 7.22 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.35–4.20 (m, 4H), 3.01 (q, 2H, *J* = 6.5 Hz), 2.17–2.05 (m, 2H), 1.78 (td, 1H, *J* = 13.4 Hz, 6.7 Hz), 1.59 (td, 1H, *J* = 14.3 Hz, 6.7 Hz), 1.47 (m, 2H), 1.35 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.22 (overlapped, 12H), 0.83 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 175.3, 172.1, 170.5, 156.0, 143.9, 140.7, 127.6, 127.1, 125.1 (2 carbons), 120.1, 65.3, 54.8, 49.9, 46.7, 37.1, 35.1, 32.6, 31.3, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 25.3, 24.9, 24.6, 22.1, 13.9; HRMS (ESI): calcd. for C₃₃H₄₆N₃O₆ [M+H]⁺ 580.3381; found 580.3384.

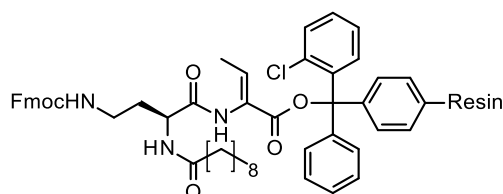
Compound 32d



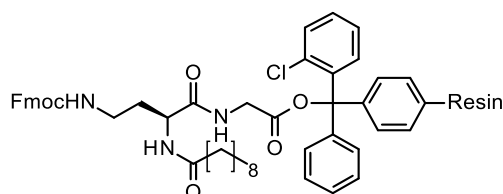
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **32a**, compound **32d** (406 mg) was obtained in 82% yield from compound **30d** (500 mg, 0.84 mmol). The purification of crude **32d** was conducted by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 65% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in 95% CH₃CN/H₂O) to afford compound **32d** as a white solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 7.93 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.83 (m, overlapped, 3H), 7.61 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.34 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.26 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.19 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.33 (q, 1H,

$J = 7.5$ Hz), 4.23 (br d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 4.15 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz), 4.08 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, 5.5 Hz), 2.97 (q, 2H, $J = 6.5$ Hz), 2.07–1.97 (m, 3H), 1.74 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.40 (m, 2H), 1.14 (overlapped, 12H), 0.81–0.74 (m, overlapped, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 172.8, 172.3, 171.7, 156.0, 143.9 (2 carbons), 140.7, 127.6, 127.1, 125.1 (2 carbons), 120.1, 65.3, 57.0, 50.1, 46.7, 37.2, 35.1, 32.2, 31.3, 29.9, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 25.3, 22.1, 19.0, 17.8, 13.9; HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 594.3538; found 594.3553.

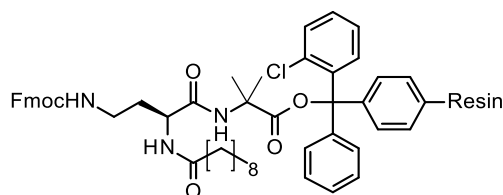
Compounds 33a–d



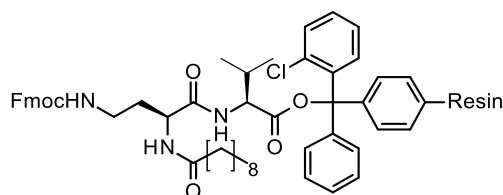
33a



33b



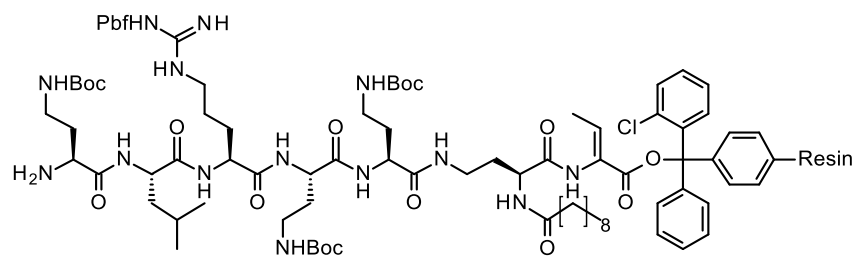
33c



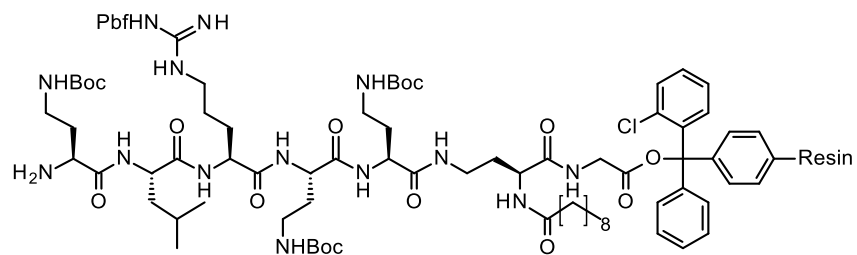
33d

Cl-Trt(2-Cl)-resin (**25**, loading = 1.60 mmol/g, 68 mg, 0.11 mmol) in a reactor vessel was swelled with dry CH_2Cl_2 (2 mL) for 3 h at room temperature. A mixture of compound **32a** (146 mg, 0.25 mmol) and DIPEA (148 μL , 0.86 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2.5 mL) and dry DMF (2 mL) was added to the swelled resin, and the mixture was agitated overnight at room temperature. After draining the reaction solution, the unreacted sites were capped with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1, 5 mL \times 4 times). Washing the resin with CH_2Cl_2 (3 mL \times 3 times), DMF (3 mL \times 3 times), and CH_2Cl_2 (3 mL \times 3 times) afforded the pre-loaded resin **33a** (0.11 mmol). Following this procedure, the pre-loaded resins **33b–d** (0.10–0.11 mmol) were similarly prepared from Cl-Trt(2-Cl)-resin and compounds **32b–d**.

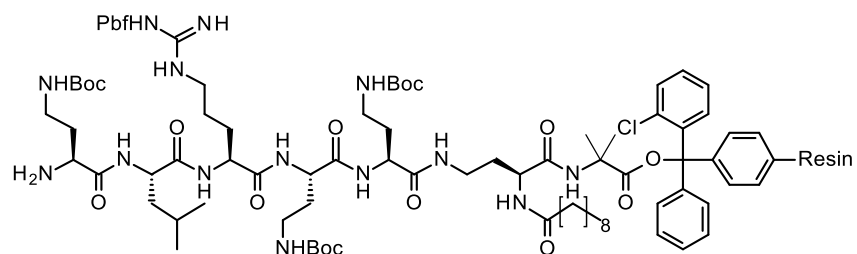
Compounds 34a–h



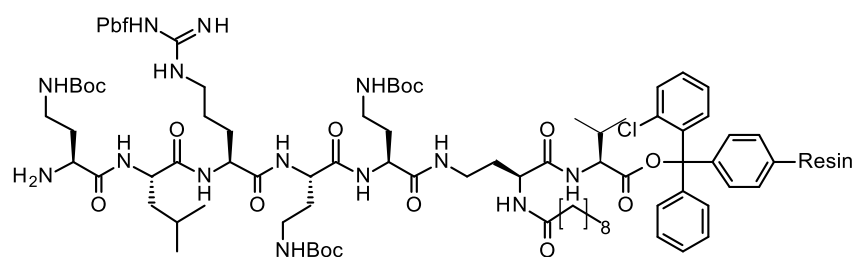
34a



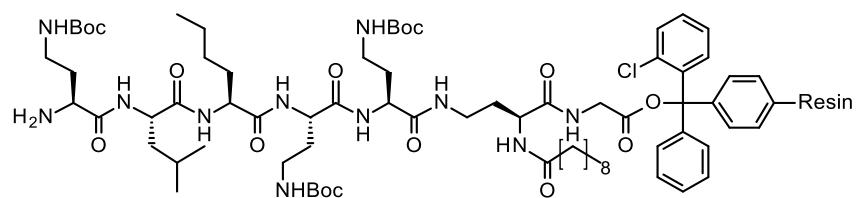
34b



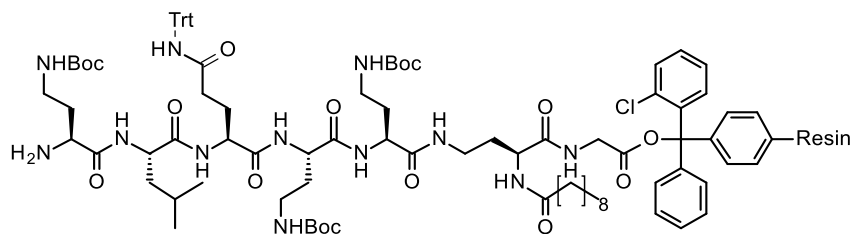
34c



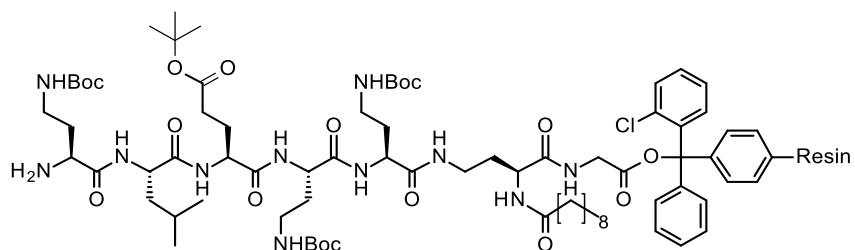
34d



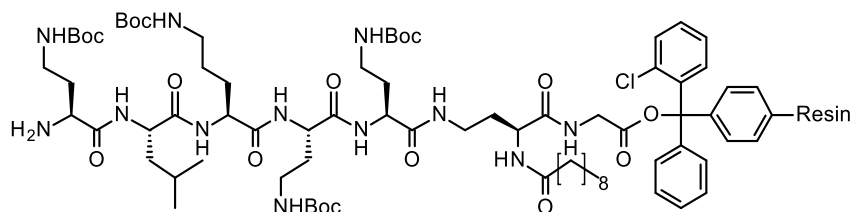
34e



34f



34g



34h

Linear acyl heptapeptides **34a–d** were synthesized manually by Fmoc solid-phase peptide synthesis using the pre-loaded resins **33a–d** (0.11 mmol). The procedures are described below.

Fmoc deprotection

All Fmoc deprotections were carried out with 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL, 5 min and 10 min). After the deprotection, the resin was washed with DMF (1 mL×5 times).

Coupling reaction

A mixture of Fmoc amino acids (4 eq.), HATU (4 eq.), and DIPEA (8 eq.) in DMF (1.5 mL) was added to the resin, and the mixture was agitated for 1.5 h at room temperature. After draining the reaction solution, the resin was washed with DMF (1 mL×3 times).

Linear acyl heptapeptides **34e–h** were synthesized automatically by Fmoc solid-phase peptide synthesis using the pre-loaded resin **33b** (0.10 mmol) and Syro I parallel peptide synthesizer (Biotage). The procedures are described below.

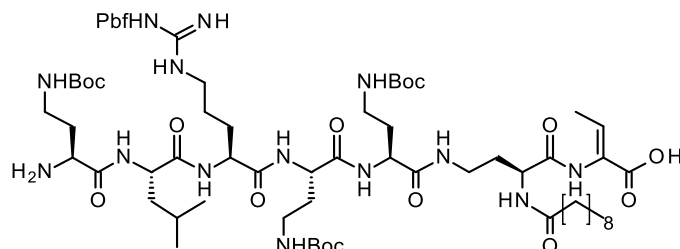
Fmoc deprotection

All Fmoc deprotections were carried out with 20% piperidine in DMF (2 mL, 3 min and 10 min). After the deprotection, the resin was washed with DMF (2.1 mL×5 times).

Coupling reaction

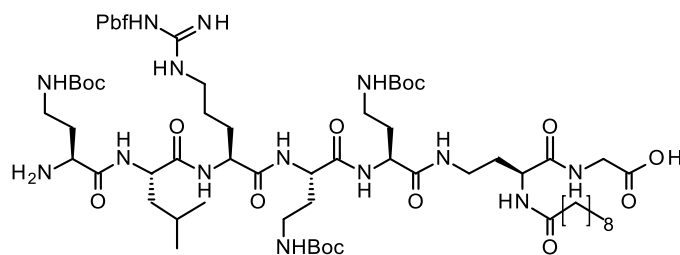
Fmoc amino acids (0.5 M in DMF, 800 μ L), HATU (0.48 M in DMF, 840 μ L), and DIPEA (2 M in DMF, 400 μ L) were successively added to the resin, and the mixture was agitated for 45 min at room temperature. After draining the reaction solution, the resin was washed with DMF (2.1 mL \times 3 times).

Compound 35a



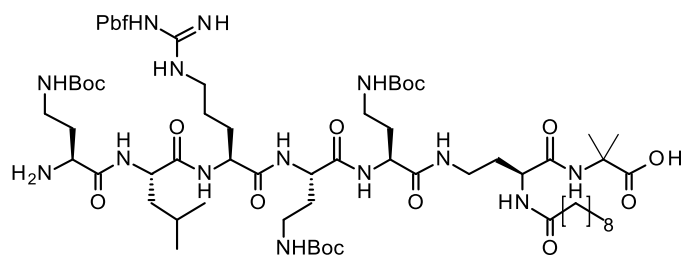
To the dried resin **34a** (0.11 mmol) was added 30% HFIP in CH₂Cl₂ (4 mL). The mixture was agitated for 2.5 h at room temperature, and then the reaction solution was drained and collected into a round-bottom flask. The resin was washed with 30% HFIP in CH₂Cl₂ (2 mL \times 2 times) and CH₂Cl₂ (2 mL \times 3 times), and all washing solution was collected into the same flask. The collected solution was concentrated. The resulting residue was purified by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 35% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in CH₃CN) and lyophilized to afford compound **35a** (59 mg, 37% yield) as a white solid. LRMS (APCI): calcd. for C₇₀H₁₂₁N₁₄O₁₈S [M+H]⁺ 1477.8698; found 1478.2. Compound **35a** was successively used for the synthesis of compound **36a**.

Compound 35b



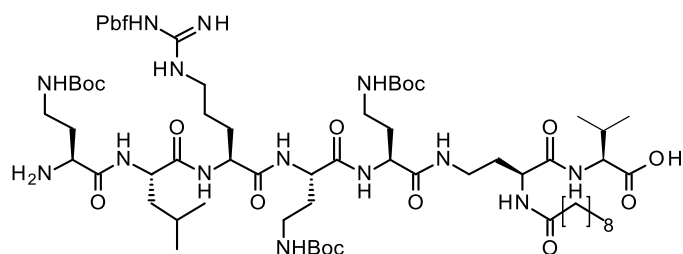
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **35a**, compound **35b** (68 mg) was obtained in 44% yield from compound **34b** (0.11 mmol). The purification of crude **35b** was conducted by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 40% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in CH₃CN) to afford compound **35b** as a white solid. LRMS (APCI): calcd. for C₆₈H₁₁₉N₁₄O₁₈S [M+H]⁺ 1451.8542; found 1452.4. Compound **35b** was successively used for the synthesis of compound **36b**.

Compound 35c



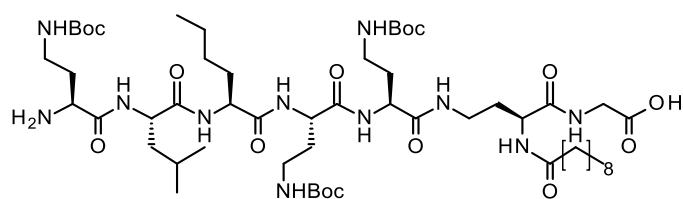
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **35a**, compound **35c** (71 mg) was obtained in 45% yield from compound **34c** (0.11 mmol). The purification of crude **35c** was conducted by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 40% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in CH₃CN) to afford compound **35c** as a white solid. LRMS (APCI): calcd. for C₇₀H₁₂₃N₁₄O₁₈S [M+H]⁺ 1479.8855; found 1480.4. Compound **35c** was successively used for the synthesis of compound **36c**.

Compound 35d



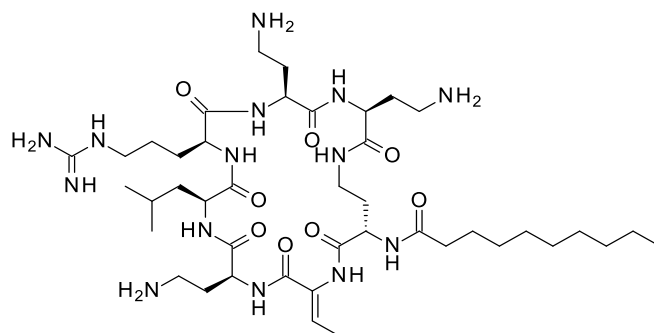
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **35a**, crude compound **35d** (121 mg, brown solid) was obtained in 75% yield from compound **34d** (0.11 mmol). LRMS (APCI): calcd. for C₇₁H₁₂₅N₁₄O₁₈S [M+H]⁺ 1493.9012; found 1494.2. Compound **35d** was successively used for the synthesis of compound **36d** without purification.

Compound 35e



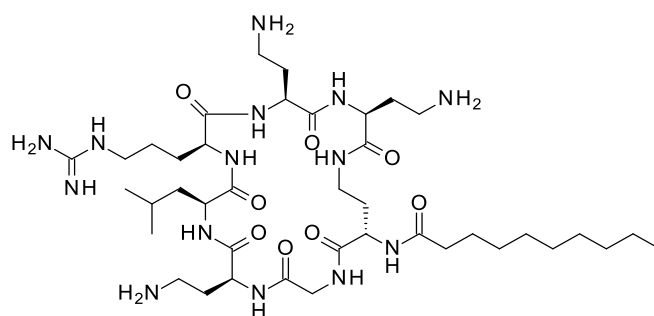
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **35a**, crude compound **35e** (41 mg, colorless solid) was obtained in 36% yield from compound **34e** (0.10 mmol). LRMS (ESI): calcd. for C₅₅H₁₀₂N₁₁O₁₅ [M+H]⁺ 1156.7551; found 1156.6. Compound **35e** was successively used for the synthesis of compound **36e** without purification.

Compound 36a



To a solution of COMU (51 mg, 0.12 mmol) in CH₃CN/THF (1:1, 30 mL) was added a mixture of compound **35a** (59 mg, 0.040 mmol) and DIPEA (41 μL, 0.24 mmol) in CH₃CN/THF (1:1, 10 mL) in a dropwise manner. The mixture was stirred overnight at 40 °C, after which it was concentrated. The residue was purified by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 65% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in CH₃CN) and lyophilized to afford the cyclic form of compound **35a** (24 mg, 40% yield, yellowish white solid). LRMS (ESI): calcd. for C₇₀H₁₁₉N₁₄O₁₇S [M+H]⁺ 1459.8593; found 1460.4. The cyclic compound was successively treated with a deprotection cocktail of TFA/TIPS/H₂O (95:2.5:2.5, 1 mL) at room temperature, and the mixture was stirred for 3.5 h. The mixture was concentrated, purified by reversed-phase HPLC (0.1% formic acid in 5% CH₃CN/H₂O to 0.1% formic acid in CH₃CN), and lyophilized to afford compound **36a** (20 mg, quantitative yield, four formic acid salts) as a white solid. ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ: 6.67 (q, 1H, *J* = 7.1 Hz), 4.53 (dd, 1H, *J* = 10.1 Hz, 5.2 Hz), 4.36–4.25 (m, 6H), 3.56 (m, 1H), 3.26–3.01 (m, 12H), 2.35 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.30–1.82 (m, 2H), 1.77 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.62 (m, overlapped, 8H), 1.29 (overlapped, 17H), 0.96 (d, 3H, *J* = 6.1 Hz), 0.91 (d, 3H, *J* = 6.1 Hz), 0.86 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz); HRMS (ESI): calcd. for C₄₂H₇₇N₁₄O₈ [M-H]⁻ 905.6054; found 905.6017; HPLC (λ = 220 nm) *t*_R = 9.30 min.

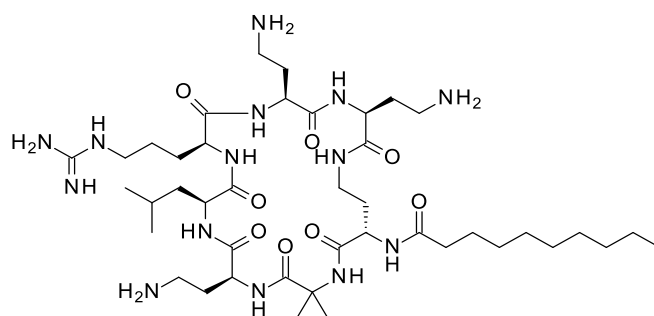
Compound 36b



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **36a**, compound **36b** (2.7 mg, white solid) was obtained in 5% yield from compound **35b** (68 mg, 0.047 mmol). ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ: 4.43 (dd, 1H, *J* = 9.8 Hz, 4.9 Hz), 4.35–4.32 (m, 5H), 4.25 (dd, 1H, *J* = 10.1 Hz, 4.0 Hz), 4.07 (d, 1H, *J* = 17.1 Hz), 3.90 (d, 1H, *J* = 17.1 Hz), 3.51 (m, 1H), 3.25–3.00 (m, 12H), 2.33 (dd, 2H, *J* = 7.6 Hz, 6.4 Hz), 2.27–2.02 (m, 7H), 1.96–1.75 (m, 4H), 1.69–1.59 (m, 8H), 1.30 (overlapped, 16H), 0.96 (d, 3H, *J* = 6.1 Hz), 0.91 (d, 3H, *J* = 6.1 Hz), 0.87 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz); HRMS (ESI): calcd. for C₄₀H₇₅N₁₄O₈ [M-H]⁻ 879.5898; found 879.5897; HPLC (λ = 220 nm) *t*_R =

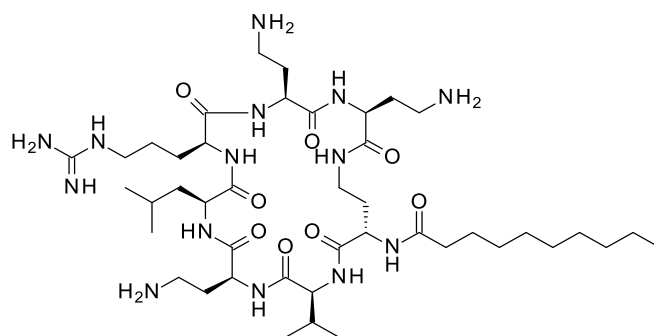
8.91 min.

Compound 36c



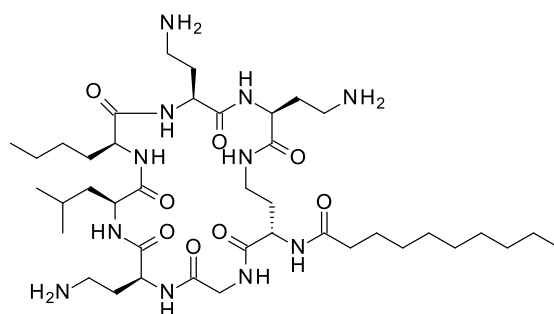
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **36a**, compound **36c** (9.0 mg, white solid) was obtained in 17% yield from compound **35c** (71 mg, 0.048 mmol). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz) δ : 4.46–4.33 (m, 5H), 4.28 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, 6.1 Hz), 4.18 (dd, 1H, $J = 10.7$ Hz, 4.0 Hz), 3.55 (m, 1H), 3.23 (td, 2H, $J = 7.0$ Hz, 3.1 Hz), 3.19–3.00 (m, 8H), 2.35 (br t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 2.31–2.04 (m, 3H), 2.02–1.89 (m, 3H), 1.84–1.74 (m, 2H), 1.68–1.58 (m, overlapped, 8H), 1.49 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.30–1.26 (overlapped, 17H), 0.96 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz), 0.92 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz), 0.86 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz); HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{N}_{14}\text{O}_8$ $[\text{M-H}]^-$ 907.6211; found 907.6218; HPLC ($\lambda = 220$ nm) $t_{\text{R}} = 9.41$ min.

Compound 36d



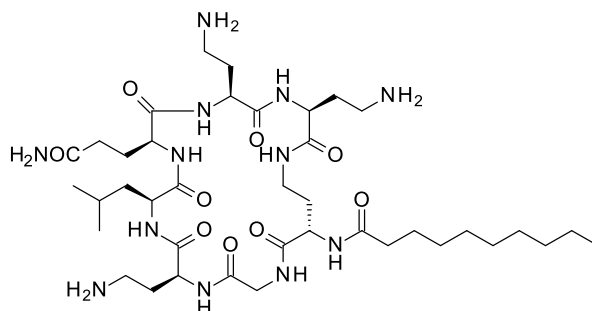
Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **36a**, compound **36d** (4.6 mg, two diastereomers, white solid) was obtained in 6% yield from compound **35d** (121 mg, 0.081 mmol). HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{43}\text{H}_{83}\text{N}_{14}\text{O}_8$ $[\text{M+H}]^+$ 923.6513; found 923.6512; HPLC ($\lambda = 220$ nm) $t_{\text{R}} = 9.55$ min and 9.73 min (two diastereomers).

Compound 36e



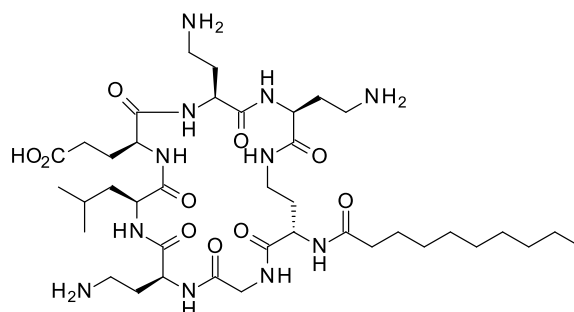
To a mixture of compound **35e** (41 mg, 0.036 mmol) and DIPEA (37 μ L, 0.22 mmol) in CH₃CN/THF (1:1, 24 mL) was added a solution of HATU (41 mg, 0.11 mmol) in CH₃CN/THF (1:1, 4.8 mL) in a dropwise manner. The mixture was stirred overnight at room temperature, after which it was concentrated. The residue was successively treated with a deprotection cocktail of TFA/TIPS/H₂O (95:2.5:2.5, 1 mL) at room temperature, and the mixture was stirred for 2.5 h. The mixture was diluted with cold diethyl ether (10 mL), and the resulting suspension was centrifuged by a manual centrifuge. After removal of the supernatant, the precipitate was dried by N₂ gas flushing. Then, the dried crude product was purified by reversed-phase HPLC (0.1% TFA in 20% CH₃CN/H₂O to 0.1% TFA in 50% CH₃CN/H₂O) and lyophilized to afford compound **36e** (3.4 mg, 3%, three TFA salts) as a white solid. ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 4.41–4.25 (m, 7H), 4.04 (d, 1H, J = 16.5 Hz), 3.94 (d, 1H, J = 17.1 Hz), 3.49 (m, 1H), 3.23–3.04 (m, 9H), 2.33 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 2.29–2.01 (m, 5H), 1.94–1.67 (m, 1H), 1.61 (overlapped, 3H), 1.30–1.28 (overlapped, 22H), 0.96 (d, 3H, J = 6.1 Hz), 0.91–0.85 (m, overlapped, 9H); HRMS (ESI): calcd. for C₄₀H₇₆N₁₁O₈ [M+H]⁺ 838.5873; found 838.5876; HPLC (λ = 220 nm) t_R = 10.63 min.

Compound 36f



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **36e**, compound **36f** (10 mg) was obtained in 8% yield from compound **35f** (58 mg, 0.041 mmol). The purification of crude **36f** was conducted by reversed-phase HPLC (0.1% TFA in 10% CH₃CN/H₂O to 0.1% TFA in 40% CH₃CN/H₂O) to afford compound **36f** as a white solid. ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 4.40–4.27 (m, 7H), 4.02 (d, 2H, J = 4.3 Hz), 3.46 (m, 1H), 3.22–3.02 (m, 9H), 2.36–2.30 (m, 4H), 2.27–1.90 (m, 8H), 1.82–1.65 (m, 1H), 1.60 (overlapped, 3H), 1.27 (overlapped, 16H), 0.95 (d, 3H, J = 6.7 Hz), 0.90–0.85 (m, overlapped, 6H); HRMS (ESI): calcd. for C₃₉H₇₃N₁₂O₉ [M+H]⁺ 853.5618; found 853.5622; HPLC (λ = 220 nm) t_R = 9.25 min.

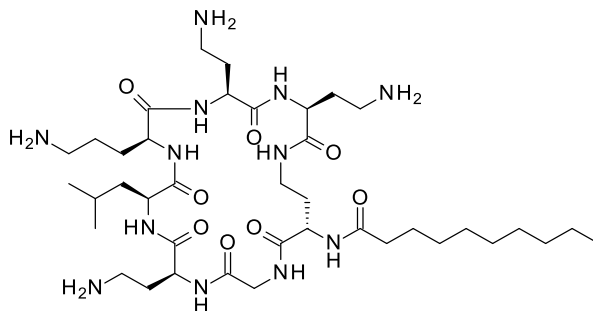
Compound 36g



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **36e**, compound

36g (4.0 mg, white solid) was obtained in 10% yield from compound **35g** (42 mg, 0.034 mmol). However, LC-MS/HPLC analyses of **36g** indicated that it was a mixture of **36g** and its linear form. The reversed-phase HPLC purification with both the gradient condition (0.1% TFA in 10% CH₃CN/H₂O to 0.1% TFA in 40% CH₃CN/H₂O) and the isocratic condition (0.1% TFA in 40% CH₃CN/H₂O) could not achieve their complete separation. Therefore, **36g** and its linear form were obtained as a mixture. HRMS (ESI): calcd. for C₃₉H₇₂N₁₁O₁₀ [M+H]⁺ 854.5458; found 854.5472; HPLC (λ = 220 nm) t_R = 9.28 min (linear form) and 9.52 min (**36g**).

Compound 36h



Following a procedure similar to the one used for the synthesis of compound **36e**, compound **36h** (3.7 mg, free form, white solid) was obtained in 4% yield from compound **35h** (55 mg, 0.044 mmol). The reversed-phase HPLC (0.1% TFA in 10% CH₃CN/H₂O to 0.1% TFA in 40% CH₃CN/H₂O) afforded a mixture of **36h** and its linear form, and then the mixture was treated with a basic resin VariPure IPE (Agilent Technologies) to give pure **36h** as a free form. HRMS (ESI): calcd. for C₃₉H₇₅N₁₂O₈ [M+H]⁺ 839.5825; found 839.5883; HPLC (λ = 220 nm) t_R = 8.95 min.

謝辞

本論文提出の機会をお与えいただき、本研究の遂行にあたって終始ご指導を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科創薬化学分野 西剛秀 教授に深く感謝いたします。本論文の作成にあたりご助言を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科創薬化学分野 小林健一 教授、北海道医療大学大学院薬学研究科創薬化学分野 高上馬希重 准教授、北海道医療大学大学院薬学研究科衛生薬学分野 浜上尚也 教授に心より感謝いたします。

本研究の遂行を支えてくださり、多くの有益なご助言を賜りました第一三共 RD ノバーレ株式会社 丸本真志博士、松橋範一氏に感謝の意を表します。

本研究において、アシル側鎖変換型オギペプチン誘導体の合成にご協力いただきました第一三共 RD ノバーレ株式会社 藤沢哲則博士、本間英仁氏、並びに、各誘導体の抗菌活性・細胞毒性・腎毒性評価にご協力いただきました小野泰典氏、木塚正明氏、石井由紀氏、山口大学 大学研究推進機構 吉村聡通博士に心より感謝いたします。また、NMR 測定・構造解析にご協力いただきました第一三共 RD ノバーレ株式会社 高畑(廣田)由紀博士、並びに、結晶化検討・中間体の合成検討にご協力いただきました丸岡博博士に心より感謝いたします。

最後に、研究生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

令和 5 年 3 月

滝口 真伍