博士論文

論文題目　　グレリン受容体インバースアゴニスト活性を有する

2-アミノニコチン酸誘導体の構造活性相関

氏　　名　　高橋　美徳

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東京大学に提出されたものである。

1）Takahashi, B., Funami, H., Iwaki, T., Maruoka, H., Nagahira, A., Koyama, M., Kamiide, Y., Matsuo, T., Muto, T., Annoura, H. 2-Aminoalkyl nicotinamide derivatives as pure inverse agonists of the ghrelin receptor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 25(13), 2707-2712, (2015)

2）Takahashi, B., Funami, H., Iwaki, T., Maruoka, H., Shibata, M., Koyama, M., Nagahira, A., Kamiide, Y., Kanki, S., Igawa, Y., Muto, T. Orally active ghrelin receptor inverse agonists and their actions on a rat obesity model. Bioorg. Med. Chem. 23(15), 4792-4803, (2015).

3）Takahashi, B., Funami, H., Shibata, M., Maruoka, H., Koyama, M., Kanki, S., Muto, T. Structural optimization of ghrelin receptor inverse agonists to improve lipophilicity and avoid mechanism-based CYP3A4 inactivation. Chem. Pharm. Bull. 63(10), 825-832, (2015).

略号

本論文において以下に示す略号を用いた。

BA	bioavailability
BID	twice daily
BW	body weight
BOP reagent	(benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophasphate
BSA	bovine serum albumin
CD	cyclodextrin
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CYP	cytochrome P450
DAST	*N,N*-dietylaminosulfur trifluoride
DIPEA	*N,N*-diisopropylethylamine
DMF	*N,N*-dimethylformamide
DMSO	*N,N*-dimethylsulfoxide
FBS	fetal bovine serum
GTPγS	guanosine 5'-*O*-[gamma-thio]triphosphate
HEK293	human embryonic kidney cell
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectroscopy
mCPBA	*m*-chloroperoxybenzoic acid
MW	molecular weight
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phasphate
PK/PD	pharmacokinetics / pharmacodynamics
rt	room temperature
RT	retension time
QD	once daily
SC	subcutaneous
THF	tetrahydrofuran

目次

第１章　緒論
　　第１節　グレリンとその生理機能
　　第２節　報告されているグレリン受容体リガンド
　　第３節　経口投与で評価可能なインバースアゴニスト創製の意義
第２章　ハイスループットスクリーニングによるヒット化合物の取得
　　第１節　化合物の評価に用いた*in vitro*評価系
　　第２節　ハイスループットスクリーニングとヒット化合物の選抜
　　第３節　合成展開の基本方針
第３章　ヒット化合物からの合成展開
　　第１節　2位、3位置換基の最適化
　　第２節　5位置換基の最適化
　　第３節　化合物**13**のプロファイリング
　　第４節　化合物の合成
第４章　経口吸収性のあるインバースアゴニストの取得
　　第１節　2位、3位の代謝安定化
　　第２節　5位置換基の変換
　　第３節　化合物**39**とMechanism-based CYP3A4 inactivation
　　第４節　2位置換基の変換を中心とした構造変換とMBI活性の回避
　　第５節　化合物の合成
第５章　ラット高脂肪食誘発肥満モデルでの薬効評価
第６章　総括
第７章　実験の部
　　第３章の化合物合成
　　第４章の化合物合成
　　化合物の評価実験
参照文献

第１章　緒論

第１節　グレリンとその生理機能

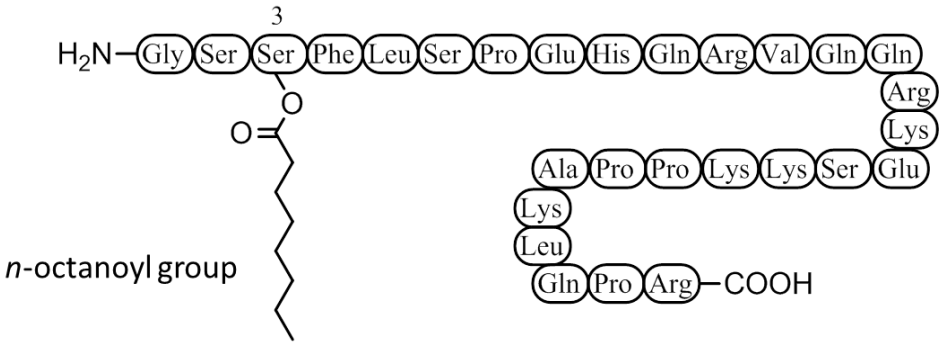
グレリンは1999年に国立循環器病センターの寒川らによって発見された28アミノ酸からなる生理活性ペプチドで、N末端側から3番目のセリンがオクタノイル化されているという構造的な特徴を持つ（図表1）[1]。グレリンはその受容体に結合することで生理学的機能を発揮するが、グレリンの受容体の発見には特殊な経緯がある。まず、成長ホルモンの分泌を促す低分子群が発見され、growth hormone secretagogue（GHS）と名付けられた。次いで、GHSの結合するG蛋白質共役受容体（GPCR）がクローニングされて“growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a)”と名付けられた[2]。永らくその内因性リガンドは不明であったが、寒川らはグレリンがその内因性リガンドであることを明らかにし、グレリンの多彩な生理的機能を解明してきた。内因性リガンドが明らかになったことから、受容体の名称もGHS-R1aからghrelin receptor (グレリン受容体、ghrelinR)と呼ぶのが一般的になっている。

グレリンは成長ホルモン分泌促進作用、食欲増進作用、消化管運動促進作用、エネルギー消費抑制作用などを介してエネルギーの取り込みと蓄積を促進することが明らかとなっている[3]。また、血中濃度が食事前に上昇し、食後低下することから、空腹シグナルの一つと考えられている。その特徴的な生理的作用に基づき、グレリン自体が神経性食欲不振症やCOPDカヘキシア（悪液質）の治療薬候補として医薬品開発され[4]、またグレリン受容体の低分子アゴニストが癌による食欲不振や悪液質の治療薬候補として医薬品開発された[5]。一方、グレリン受容体の機能阻害は肥満症や糖尿病の治療薬となる可能性があり、そのため多くの研究機関がグレリン受容体アンタゴニストの探索に取り組み、これまでに様々なアンタゴニストが報告されている[6-12]。以上のことから、グレリン受容体は作動薬、拮抗薬ともに創薬標的として非常に注目されている受容体であるといえる。

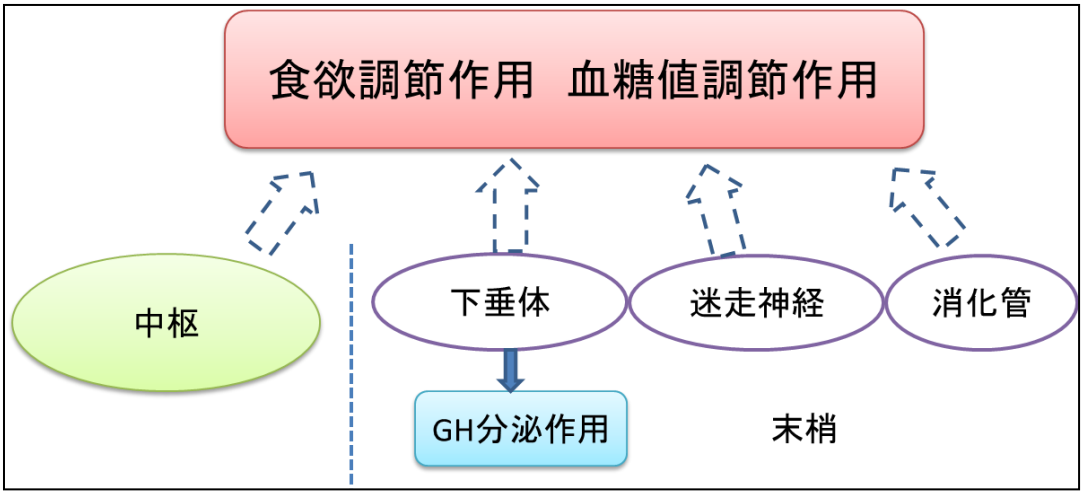
優れたグレリン受容体リガンド創製のためには、グレリン受容体の機能について十分理解する必要があるが、グレリン受容体の機能については未解明でかつ重要な点が二つある。一つはグレリン受容体の恒常的活性の生理的意義である。グレリン受容体はアゴニスト非存在下でも、蛋白質として発現するだけで恒常的活性を持つことが知られており、その恒常的活性のシグナルの強度はアゴニストであるグレリン依存的活性の最大応答とほぼ同程度である[13]。すなわち、グレリン受容体の最大活性の半分はアゴニスト依存的、半分は恒常的活性といえる。しかしながら、恒常的活性の生理的意義については明確になっていない。実験的事実として、リガンドであるグレリンのノックアウトマウスが高脂肪食誘発の肥満に対して抵抗性を持たないのに対してグレリン受容体ノックアウトマウスは高脂肪食誘発の肥満に対して抵抗性を持つという報告があり[14]、恒常的活性が肥満の病態に関連する可能性が示唆されている。しかしながら、実験条件によって異なった結果となるという報告もあり[15]、結論は出ていない。もう一つの未解明な点は中枢作用と末梢作用である。グレリン受容体は中枢神経と末梢組織（脳下垂体、迷走神経終末、消化管）に発現しており、グレリンの摂食シグナルには中枢神経、脳下垂体、迷走神経終末のシグナルが関与するという報告があるが、どのシグナルが中心的な役割を果たすかということについては結論

が出ていない（図表 2）。伊達らは迷走神経を切断した動物モデルを作製し、迷走神経終末のシグナルが中心であるという報告をしており [16]、Wren らはグレリンの脳室内投与の実験結果などから中枢神経でのシグナルが中心であると報告している [17]。おそらく、中枢、末梢のどちらの経路も食欲調節に関与すると考えられるが、末梢からの作用が十分に強ければ、グレリン受容体は既存の中枢作用に基づく抗肥満薬とは異なるタイプの抗肥満薬の創薬標的となる可能性がある。

上記の未解明課題の解決のためのツールとして低分子リガンドは重要な役割を果たすと考えられる。アンタゴニストとインバースアゴニストの比較、末梢選択的リガンドと中枢移行性の高いリガンドの比較により、グレリンシグナルの機能解明が進むとともに、治療効果の高い医薬品創製の方向性を見い出すことが期待出来る。



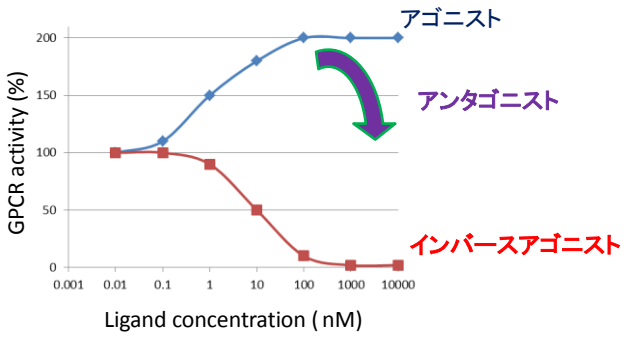
図表 1　グレリンの構造



図表 2　グレリンの発現部位と作用

第２節　報告されているグレリン受容体リガンド

まず、言葉の定義を明確にする。アゴニストとは受容体を活性化する内因性リガンド（今回の場合グレリン）そのもの、若しくは内因性リガンドと同じ結合部位に結合し、受容体を活性化する物質である。アンタゴニストとは、内因性リガンドと同じ結合部位に結合しアゴニストによる受容体の活性化を阻害する物質である。インバースアゴニストとは、内因性リガンドと同じ結合部位に結合し、受容体のアゴニスト非依存的な恒常的活性を阻害する物質である（図表 3）。インバースアゴニストは恒常的活性を持つ受容体にのみ定義できる。リガンド結合部位を競合する関係性から、インバースアゴニストはアゴニストの作用を阻害するアンタゴニスト活性を併せ持ち、アンタゴニストはインバースアゴニストによる恒常的活性の阻害を打ち消すことが出来る [35]。また、内因性リガンドと異なる部位に結合して受容体の活性を調節する物質はアロステリックモデュレーターと呼ぶ [36] が、本論文中で扱う化合物はこれに該当しない。

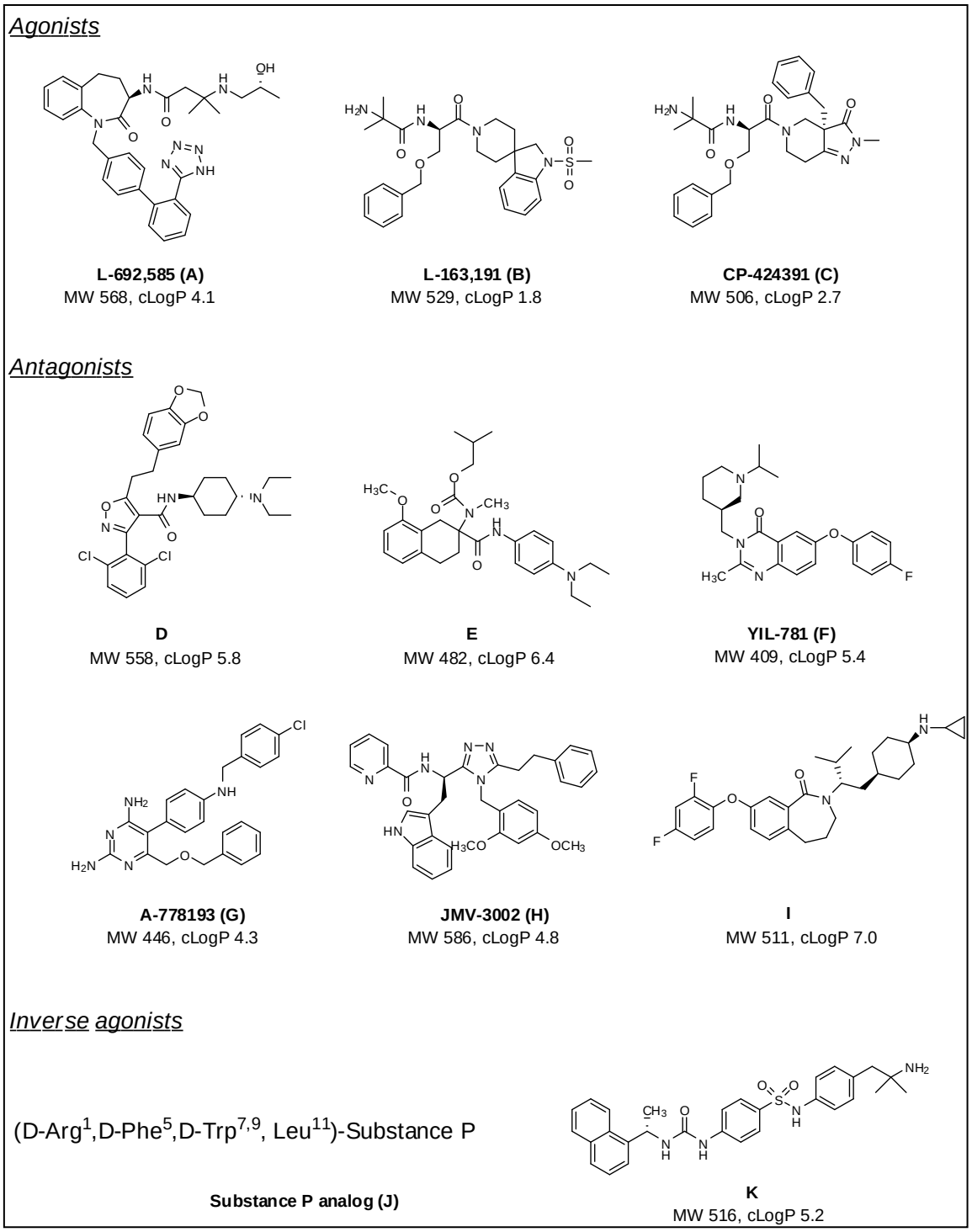


図表 3　アゴニスト、アンタゴニストとインバースアゴニスト

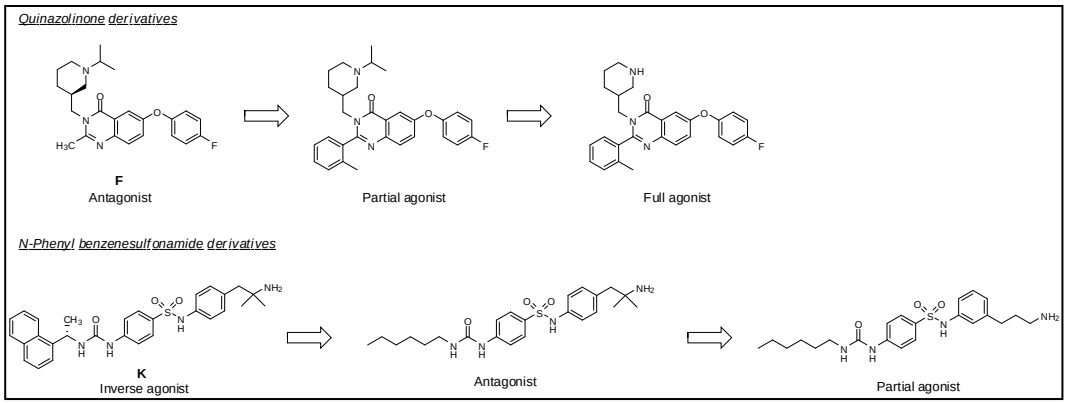
グレリン受容体のリガンドとして、図表 4 に示す化合物群が報告されている。アゴニスト、アンタゴニスト共に多様な構造の化合物が報告されていたものの、インバースアゴニストの報告はペプチド性の(D-Arg[1], D-Phe[5], D-Trp[7,9], Leu[11])-Substance P（**J**）と [13]、Pasternak らにより報告されている経口吸収性の無い低分子化合物（**K**）[18] の 2 種類のみであった。低分子化合物に限ると 1 種類のみである。また、それぞれの低分子アンタゴニスト、インバースアゴニストの分子量、cLogP に注目してみると、総じて分子量が大きい傾向があり、特にアンタゴニストでは cLogP も高い傾向にあった。これは、ペプチドであるグレリンを受容するという受容体の特性から、リガンド結合部位のキャビティが大きく、強い結合活性を示すためにはキャビティを占有しうる分子サイズが必要であること、オクタノイル基を持つグレリンを受容するという特性から、リガンドの結合に対する脂溶性相互作用の割合が大きいことが原因と考えられる。このように分子量が大きく cLogP が高い化合物において経口吸収性が良好な化合物を得ることは難しく、メディシナルケミストリーのチャレンジングな課題の一つである。

また、アンタゴニストとして報告されている化合物でも構造変換によりアゴニスト性が生じる化合物が多いことが知られている。例えば、図表 5 上のようにキナゾリノン骨格を持つアンタゴニストは構造変換の過程でパーシャルアゴニストにもフルアゴニストにもなることが知られており、*N*-フェニルベンゼンスルホンアミド母核を持つインバースアゴニスト（図表 5 下）でも、イ

ンバースアゴニスト、アンタゴニスト、パーシャルアゴニストと機能変換が起きることが報告されている。そのため、上述のような機能変換が起きない骨格を選ぶことが出来たら、特徴ある化合物として捉えることが期待される。



図表 4　報告されているグレリン受容体リガンド

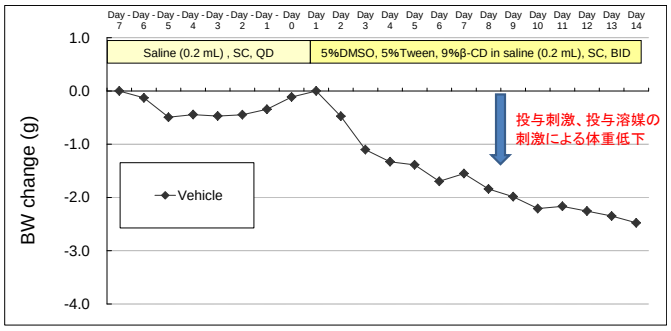


図表 5　構造変換による機能変換

第３節　経口投与で評価可能なインバースアゴニスト創製の意義

グレリン受容体の恒常的活性の生理的意義の解明のために低分子インバースアゴニストの創製が有用であることは第 1 節で述べたとおりである。一方、医薬品研究開発の観点から見ると、グレリン受容体が恒常的活性を持ちそれが摂食亢進、体重増加に関わっている可能性があることから、アンタゴニストよりインバースアゴニストの方が抗肥満薬としての作用が強い可能性がある。そのため、新規の低分子インバースアゴニストは研究ツールであると同時に有望な新規医薬品の候補化合物ともなりうる。経口投与で有効であることは、服薬コンプライアンスを考えると抗肥満薬の医薬品開発には必須の要素である。それと同時に、実験動物を用いた摂食行動の研究ツールとして見た場合、経口投与以外の投与ルート（静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与）では投与自体の刺激と投与溶媒の刺激が摂食行動に影響を与える場合がある。例えば、難溶性薬物を溶解させる投与溶媒（5% DMSO、5% tween、9%　β-CD の saline 溶液）を皮下投与したところ、投与溶媒の投与の影響のみでマウスの体重低下が観測されたという検討のデータがある（図表 6）。このような現象は経口投与では起こりにくいため、適切な *in vivo* 薬理評価で抗肥満作用を検討するために経口投与で行うことが好ましい。

以上のことから、経口投与で評価可能なインバースアゴニストを創製することは、グレリンシグナルの機能解明のためにも、新規の抗肥満薬の候補化合物を得るためにも非常に意義の大きい研究テーマである。



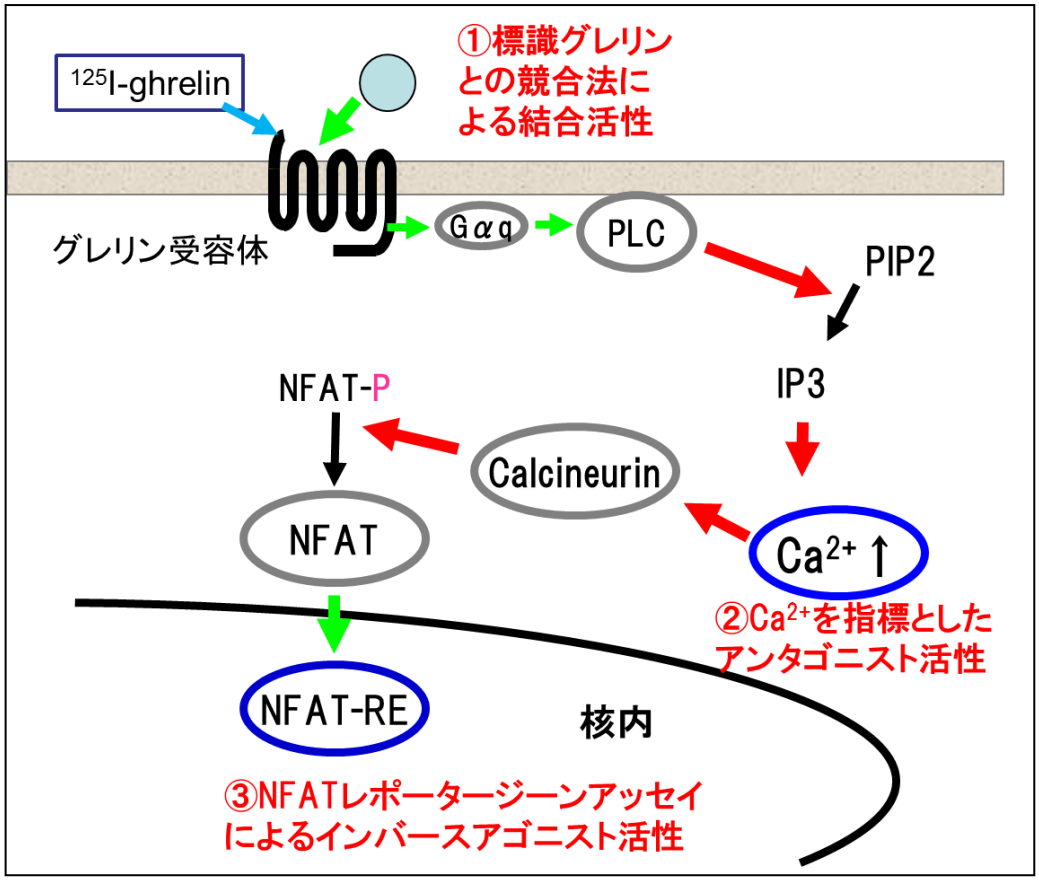
図表 6　難溶性化合物用の投与溶媒の皮下投与による体重減少効果

第２章　ハイスループットスクリーニングによるヒット化合物の取得

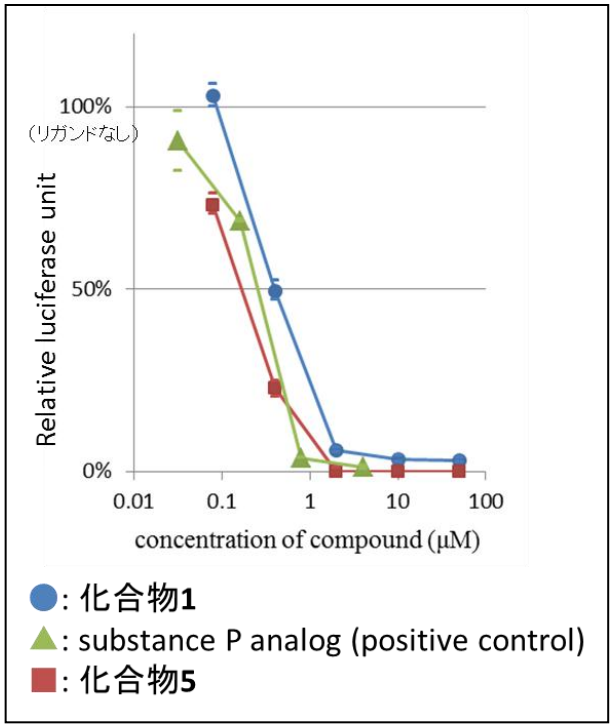
第１節　化合物の評価に用いた*in vitro*評価系

グレリン受容体のシグナル伝達経路の模式図を図表7に示す。アゴニストの結合または恒常的活性によりG_q蛋白が活性化され、次いでホスホリパーゼC（PLC）が活性化されることによりリン脂質が切断され、イノシトールトリスリン酸（IP_3）が生成する。IP_3は小胞体のカルシウムイオン（Ca^{2+}）放出を促し、細胞内カルシウム濃度が上昇する。細胞内カルシウム濃度の上昇によりカルシニューリンが活性化され、転写因子であるNuclear factor of activated T cells（NFAT）を脱リン酸化して核内に移行させる。核内に移行したNFATは対応する遺伝子の発現を誘導して細胞内シグナルが完結する。このシグナルカスケードを考慮して、①放射性同位体標識したグレリンとの競合法による受容体への結合活性、②Ca^{2+}上昇を指標としたアンタゴニスト活性評価、③NFAT応答配列（NFAT-RE）を利用したレポータージーンアッセイの3つの評価系を化合物の評価に用いた。過去の文献報告の通り[18]、Ca^{2+}上昇を指標とした場合には恒常的活性が見られなかったため、②のカルシウムアッセイはアンタゴニスト活性評価のみに用いた。

インバースアゴニスト活性評価系としては、IP_3を指標とする方法、及びGTPγSを用いてG蛋白の機能を評価する方法が一般的に知られている。一方、NFATを利用したレポータージーンアッセイは比較的新しい評価手法であるが、ルシフェラーゼの発光を測定する評価系であるためスループットがよく、放射性同位体を用いないという利点がある。そのため、まずレポータージーンアッセイで(D-Arg^1, D-Phe^5, D-Trp^{7,9}, Leu^{11})-Substance Pなど既知のインバースアゴニストの活性を評価し、IP_3を指標とした評価と比較して評価系の妥当性を検討した。IP_3評価、NFATレポータージーンアッセイの双方において、(D-Arg^1, D-Phe^5, D-Trp^{7,9}, Leu^{11})-Substance Pは高濃度で恒常的活性をほぼ完全に阻害し、そのIC_{50}値はIP_3アッセイで150 nM、NFATレポータージーンアッセイで250 nMであった。図表8に(D-Arg^1, D-Phe^5, D-Trp^{7,9}, Leu^{11})-Substance P、化合物**1**及び**5**のNFATレポータージーンアッセイにおける用量反応曲線を記す。複数の化合物においてIP_3アッセイとNFATレポータージーンアッセイでのインバースアゴニスト活性の相関が確認できたことから、本論文中の化合物のインバースアゴニスト活性はNFATレポータージーンアッセイを指標としている。また、この評価系は細胞毒性が擬陽性の原因になることから、化合物の細胞毒性をAlamar blue染色により確認した。さらに、グレリン受容体の選択性を検討するため、グレリン受容体ファミリーのGPCRの一つであり、恒常的活性を持つニューロテンシン受容体2（NTSR2）[19]を発現させた細胞のNFATレポータージーンアッセイを行った。以後、本論文中に登場する全ての化合物でIC_{50}濃度付近での細胞毒性の影響がないこと、NTSR2に対する選択性があることを確認している。



図表7　Gqカップリング GPCRの細胞内シグナルと評価指標

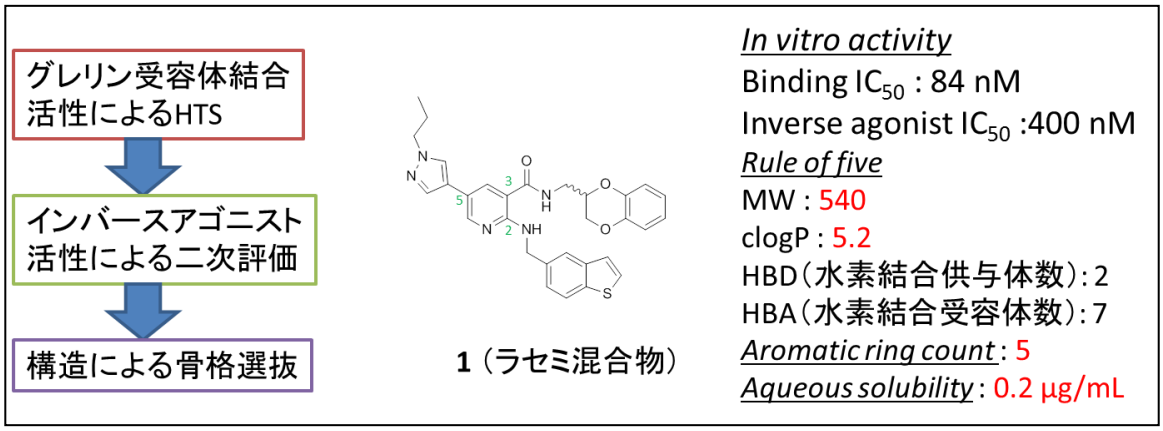


図表8　NFAT-レポータージーンアッセイの用量反応曲線

第２節　ハイスループットスクリーニングとヒット化合物の選抜

放射性同位体標識したグレリンとの競合法による受容体への結合活性を指標に、第一三共株式会社内の約9万化合物のハイスループットスクリーニング（HTS）を行った。ヒット化合物について濃度依存性を検討し、NFATレポータージーンアッセイ（またはIP_3）によるインバースアゴニスト活性評価で化合物を絞り込んだ。さらに、分子量、脂溶性、誘導体合成の可能性の広さから数種類の骨格を絞り込み、絞り込んだ骨格に対して構造類似化合物の評価を行って初期的な構造活性相関情報を得た。その結果、化合物**1**のような2-アミノニコチン酸誘導体をヒット化合物として見出した（図表9）。結合阻害活性のIC_{50}値が84 nM、インバースアゴニスト活性のIC_{50}値が400 nMと、ヒット化合物としては高活性であったことと、構造類似化合物の評価でアンタゴニスト、パーシャルアゴニストへの機能変換が起こらなかったことからこの骨格を選抜した。しかしながら、化合物**1**の分子量は540と大きく、脂溶性の指標であるcLogP値も5.2と高かった。また、水に対する溶解性も0.2 μg/mLと低く、物性的な問題が大きかった。

分子量が大きく、脂溶性が高くなるのは受容体の結合ポケットの性質上避け難いと考えられたが、そのような制約がある条件下でも目的としたプロファイルを有する化合物を見出すことはメディシナルケミストリーの重要な課題である。



図表9　HTSの流れとヒット化合物**1**の性質

第３節　合成展開の基本方針

分子量、脂溶性、水溶性に問題のある化合物から経口吸収性の良好な化合物を得るために、合成展開の指標を設定した。近年、統計解析により医薬品及び医薬品候補化合物の構造及び物理化学的性質と経口吸収性、医薬品開発の成功率の相関を研究した報告が幾つか成されている。その中から、信頼性が高く、今回の目的に合致する指標として、Lipinskiのルールオブファイブ[20]と芳香環数の指標[22]を選択した。

Lipinskiのルールオブファイブは、経口吸収性の良好な化合物の構造的な特徴を解析し法則化したもので、①分子量500未満、②cLogP値（水-オクタノール分配係数の計算値）5未満、③水素結合供与体数（HBD）5未満、④水素結合受容体数（HBA）10未満を満たす化合物は経口吸収性が良好である可能性が高いと報告されている。全ての基準を満たさなくても、基準外のものが少ないほど経口吸収性が良好である可能性が高いと言われている。今回のヒット化合物**1**については、HBDおよびHBAは問題がないものの、分子量とcLogP値が逸脱しているためそれらの値を減少させるような合成展開が必要である。

芳香環数※の指標は、臨床開発で成功した医薬品の構造的な特徴の解析から、芳香環数が少ないほど成功率が高いという結論が導き出されたことに端を発する[21]。その後の解析により、芳香環数の増加が脂溶性の上昇、溶解度の低下、毒性に関連するオフターゲット活性の上昇に繋がることが示され、さらに閾値として芳香環数が3を超えると医薬品開発に適さない体内動態プロファイル、毒性プロファイルを示す可能性が高いと結論付けられた[22]。そのような論理的なバックグラウンドが組み立てられたことから、創薬化学者の簡便で有用な指標として認識されている。今回のヒット化合物は芳香環数が5個と多く、水に対する溶解度が低いため、芳香環数を3個以下に抑える構造変換を行うことが有効と考えた。

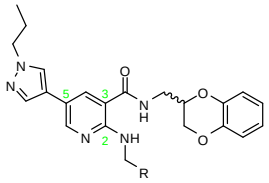
※芳香環数の数え方として、縮環構造を持つ芳香環の場合一つの環に対して一個と数える。（例：ベンゼン＝1、インドール＝2）

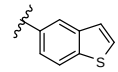
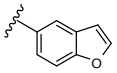
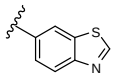
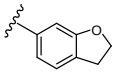
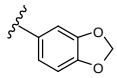
第３章　ヒット化合物からの合成展開

第１節　2位、3位置換基の最適化

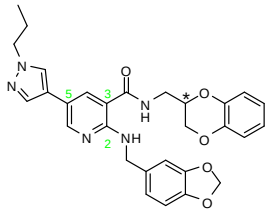
ヒット化合物**1**より、最初に2位置換基の変換による活性への影響を検討した（図表10）。2位ベンゾチオフェン部分の硫黄原子の必要性の検討と脂溶性低下のためベンゾフラン誘導体**2**やベンゾチアゾール誘導体**3**を合成したが、活性は向上せず溶解度も改善されなかった。次に、縮環構造の5員環部分を非芳香環化したジヒドロベンゾフラン誘導体**4**や1,3-ベンゾジオキソール誘導体**5**を合成したところ、活性の向上と脂溶性の低下を同時に達成することが出来た。この部分の構造は平面性が低い方が活性向上に寄与すると考えられる。

3位置換基について、ヒット化合物がラセミ体であったため立体化学の検討を行った（図表11）。光学活性な原料を用い、両鏡像体を合成して活性評価を行ったところ、結合活性、インバースアゴニスト活性共に*S*体の方が高活性で、*S*体がユートマーとなっていることが明らかとなった。



Cpd	R	binding IC_{50} (rat, nM)	inverse agonist IC_{50} (nM)	aqueous solubility (μg/mL)	clogP	MW
1		84	400	0.2	5.2	540
2		150	720	0.4	4.6	524
3		260	900	0.2	4.4	541
4		11	140	2.0	4.4	526
5		36	170	0.6	4.1	528

図表10　2位置換基の変換



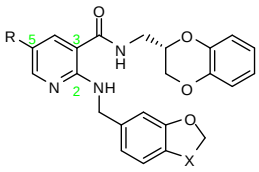
Cpd	Configuration at *	binding IC_{50} (rat, nM)	inverse agonist IC_{50} (nM)
5	*R/S*	36	170
6	R	180	5500
7	S	24	110

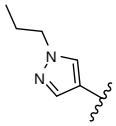
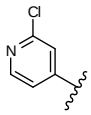
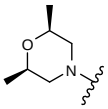
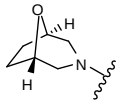
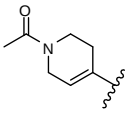
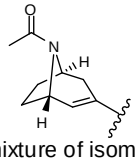
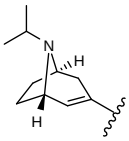
図表11　3位異性体の検討

第２節　5位置換基の最適化

2位をジヒドロベンゾフランまたは1,3-ベンゾジオキソールに、3位置換基を*S*体に固定し、5位置換基の検討を行った（図表12）。ピラゾール部分をピリジン環に変換した化合物**8**で活性が向上したが、脂溶性が高く、結晶性が高かったため*in vitro*および*in vivo*評価系で化合物の析出がみとめられた。このような物性化学的な問題が顕在化したことから、5位置換基の非芳香環化の検討を行った結果、化合物**9**のようなモルホリン環または化合物**12**のようなテトラヒドロピリジン環に変換しても活性が保たれることが明らかとなった。化合物**9**のモルホリン環をジメチル化することにより、さらに活性が向上し（化合物**10**）、メチル基同士を繋げたビシクロ環化合物**11**でも活性が高かった。同様の構造変換をテトラヒドロピリジン環化合物**12**でも行ったところ、化合物**13**において結合阻害活性のIC_{50}値が1 nM以下の高活性を示した。化合物**13**のビシクロ環橋頭位窒素上の置換基をアセチルからイソプロピル基などのアルキル基に変換（化合物**14**）しても活性は保たれたが、10 μM以上の高濃度で細胞毒性が確認された。窒素上にアセチル基を導入する前の合成中間体**33**（後述）でも細胞毒性が確認されたことから、細胞毒性は窒素原子の塩基性に起因すると考えられたため、アセチル基を持つ化合物**13**を有望化合物として選択することとした。

一連の5位置換基の変換において、結合活性のIC_{50}値とインバースアゴニスト活性のIC_{50}値の相関が必ずしも成立しない結果となった。2位、3位の置換基変換の場合はこのような変化が見られなかったことから、5位部分の構造が受容体の不活性コンフォメーションの安定化に影響を与えているためと考えられた[23]。すなわち、5位置換基部分が受容体の恒常的活性化に重要だと言われているArg^{281}やGlu^{124}と相互作用しうる位置に結合していると推定できる。



Cpd	R	X	binding IC_{50} (rat, nM)	inverse agonist IC_{50} (nM)	aq. solubility (μg/mL)	clogP	MW
7		O	24	110	0.6	4.4	526
8		CH_2	6.9	390	2.6	5.7	529
9		O	47	2000	39	2.9	505
10		CH_2	7.2	350	1.2	3.9	531
11		O	5.4	560	2.6	3.4	531
12		O	42	2500	15	2.9	543
13	 (mixture of isomers)	CH_2	0.96	47	2.4	3.7	567
14	 (mixture of isomers)	CH_2	0.23	4.1	N.D.	4.8	567

N.D., not determined,

図表12　5位置換基の変換

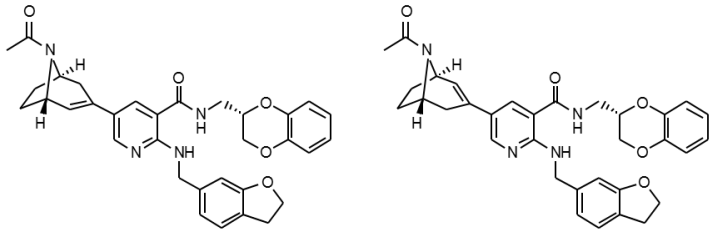
第３節　化合物13のプロファイリング

図表13に化合物**13**の*in vitro*活性、溶解性、経口投与でのバイオアベイラビリティ、*in vitro*での代謝速度を示す。化合物**13**はアンタゴニストとしてもインバースアゴニストとしても高活性を示すものの、バイオアベイラビリティが低いという問題があっ

た。化合物**13**の消化管吸収性をマウス門脈－静脈血同時採血法[37]により検討したところ、投与後5分の吸収速度で21 μg/min/kgという値であり、経口吸収性の高い市販薬の値と同等であった[38]。そのため、バイオアベイラビリティが低い原因として、肝臓中での代謝安定性が低いことが考えられた。実際に*in vitro*肝ミクロソーム中での代謝速度を検討したところ、302 pmol/min/mg proteinと非常に高い値※となった。そのため、今後さらなる構造変換によりバイオアベイラビリティの高い化合物を得るために、代謝安定性を高めることが必要と考えられた。

さらに、化合物**13**はジアステレオマーの混合物であったことから、両ジアステレオマーをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離することを試みたが困難であったため、キラルカラムHPLCにより分離した。両ジアステレオマーの^{1}H-NMRスペクトルは橋頭位アミド結合のシス、トランスに由来すると考えられるロータマーのピークが55:45の比で観測されたことを含めてほぼ一致しており、ピリジン環に由来するシグナルにわずかな違いがあるのみであった（図表14）。結合活性では両ジアステレオマーに違いはなく、インバースアゴニスト活性に10倍程度の差が見られた。ジアステレオマーの分離と構造決定が容易でないため、構造活性相関をジアステレオマー混合物で取得したが、異性体の問題の回避も以降の構造変換において重要な課題であると考えられた。

※文献の*in vitro*代謝速度と*in vivo*クリアランスの相関情報[39-41]と、この評価系での対照化合物を用いた検討から、100 pmol/min/mg protein以下であれば経口吸収性が高い可能性が高いと推定された。

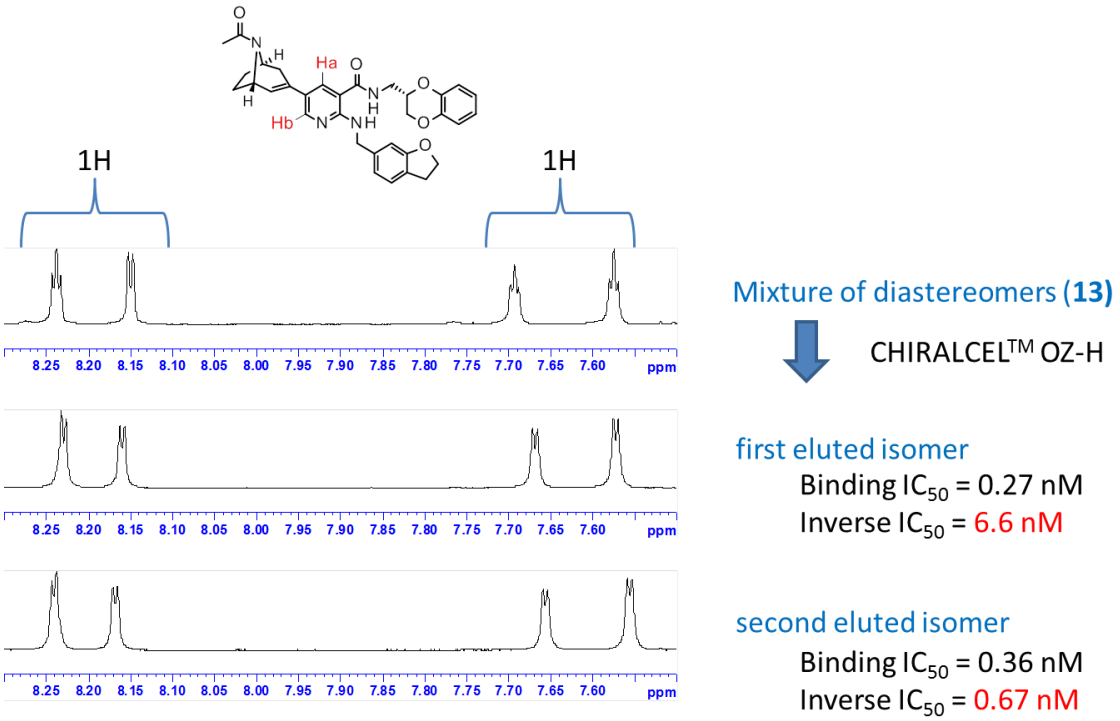


13
（ジアステレオマー混合物）

<u>主活性</u>
Binding IC_{50} : 0.96 nM (rat)
Inverse agonist IC_{50} : 47 nM
Antagonist IC_{50} : 31 nM

<u>体内動態･物性</u>
経口バイオアベイラビリティ（rat）: 0.6%
Aqueous solubility : 2.4 μg/mL
*In vivo*消化管吸収速度: 21 μg/min/kg
*In vitro*代謝速度（肝ミクロソーム中）: 302 pmol/min/mg protein

図表13　化合物13のプロファイル

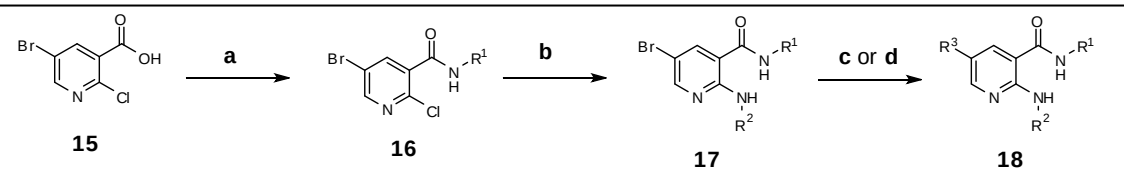


図表14　両異性体の分離と活性及びNMRチャート

第４節　化合物の合成

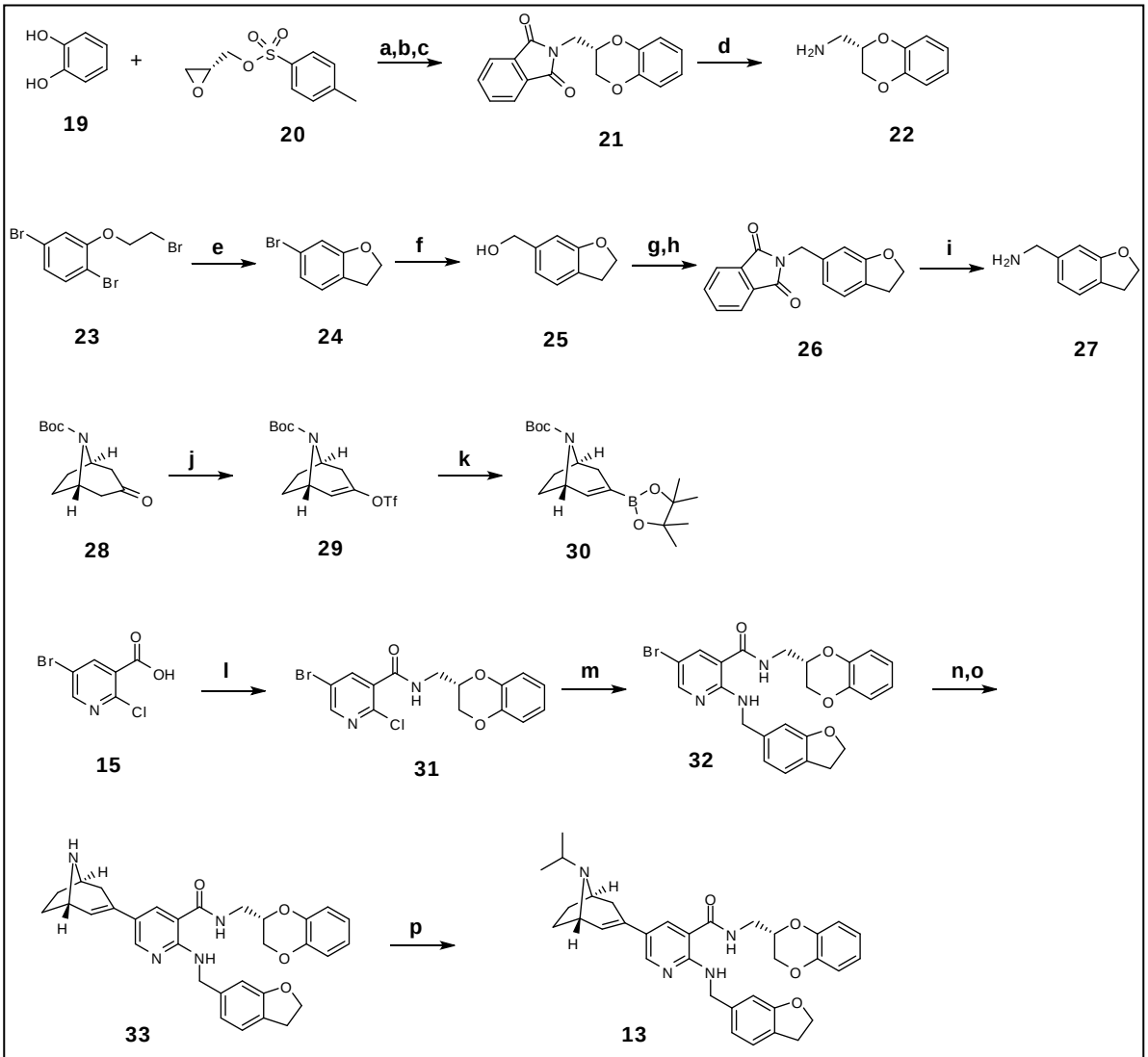
本章で合成した化合物の共通の合成法を図表15に示す。市販の5-ブロモ-6-クロロニコチン酸**15**からアミド化、加熱条件での2位クロロ基へのアミンの導入、Suzukiカップリング又はBuchwaldカップリングによる5位置換基の導入を経て最終化合物を得た。それぞれの反応ではシリカゲルカラム精製を要し、収率は60-90%程度で、探索合成としては問題の無い収率であった。

図表16に最大10グラムスケールでの合成を行った化合物**13**の合成スキームを示す。光学活性な1,4-ベンゾジオキサン中間体**22**を、光学活性グリシドール誘導体**20**とカテコール**19**のカップリングを経て合成した[24]。ジヒドロベンゾフラン中間体**27**は市販原料**23**より分子内環化反応を経て合成した[25]。アザビシクロ環のボロン酸エステル中間体**30**は*N*-Bocノルトロピン**28**から合成した[26]。それぞれの中間体を5-ブロモ-6-クロロニコチン酸**15**と順次カップリングさせることで化合物**13**を得ることが出来た。カラム精製を行ったのは化合物**29**、**30**、**32**、**33**、および**13**のみで、収率的にも問題なく10グラムスケールでの合成が可能であった。



Reagents and conditions: (a) R^1-NH_2, BOP reagent, DIPEA, DMF (66-98%); (b) R^2-NH_2, neat or EtOH, 80-100 ºC (58-90%); (c)R^3-boronic acids or boronic esters, $Pd(PPh_3)_4$, K_3PO_4, 1,4-dioxane, water, microwave irradiation 100 ºC (79-95%); (d) secondary amines, $Pd_2(dba)_3$, 2-(di-*tert*-butylphosphino)biphenyl, NaO^{t}Bu, toluene, 100 ºC (66-88%).

図表15　化合物の共通合成スキーム



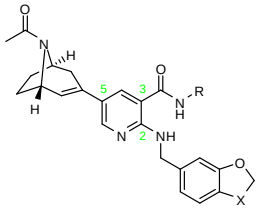
Reagents and conditions: (a) K_2CO_3, DMF, 60°C; (b) TsCl, pyridine, rt; (c) phthalimide potassium salt, DMF, 90°C, 57% (3 steps); (d) hydrazine hydrate, MeOH, reflux, 88%; (e) *n*-BuLi, THF, -76 °C, 76%; (f) *t*-BuLi, THF, paraformaldehyde, -74°C, 74%; (g) $SOCl_2$, CH_2Cl_2, rt; (h) phthalimide potassium salt, DMF, 90°C, 69% (2 steps); (i) hydrazine hydrate, MeOH, 77°C, 80%; (j) LDA, THF, -78°C, then, $PhNTf_2$, rt, 46%; (k) bis(pinacolato)diboron, $PdCl_2$(dppf), KOAc, dioxane, 80°C, 67%; (l) **22**, BOP reagent, DIPEA, DMF, 0°C-rt, 93%; (m) **27**, 160°C, 74%; (n) **30**, $Pd(pph_3)_4$, K_3PO_4, dioxane, H_2O, 100°C; (o) TFA, CH_2Cl_2, rt, 61% (2 steps); (p) AcCl, Et_3N, CH_2Cl_2, rt, 72%.

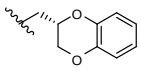
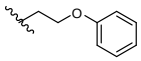
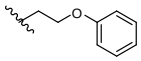
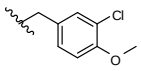
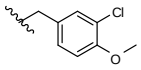
図表16　化合物**13**の合成スキーム

第４章　経口吸収性のあるインバースアゴニストの取得

第１節　2位、3位の代謝安定化

化合物**13**の*in vivo*での代謝物を解析したところ、3位置換基上の酸化体の生成量が多く、次いで2位置換基上の酸化体、5位ビシクロ環上の二重結合の還元体が生成していることが明らかとなった。そのため、2位及び3位置換基の変換を行うことで化合物の代謝安定化が達成されると考えた（図表17）。まず、代謝部位の削減を目指して1,4-ベンゾジオキサン構造の簡略化を試みたところ、炭素原子と酸素原子を一個ずつ除去してフェノキシエチルとしても活性が保たれることが明らかとなった（化合物**34**、**35**）。しかしながら、（不斉炭素が除去されるメリットがあったものの）目的とする代謝速度の改善には到らなかった。代謝反応を受けやすい電子豊富なベンゼン環が分子末端に存在することが代謝安定性の低さに繋がると考え、ベンゼン環上の置換基と環の配置を検討した結果、ベンゼン環とアミド結合を繋ぐリンカー部分を短縮し、ベンゼン環を3-クロロ-4-メトキシベンゼンに変換することで代謝速度を低下させながら活性が保たれることを見い出した（化合物**36**、**37**）。3位置換基と2位置換基との組み合わせを検討したところ、2位1,3-ベンゾジオキソールを持つ化合物の方が2位ジヒドロベンゾフランを持つ化合物より代謝速度が低い結果となった。分子の脂溶性が低くなること、代謝部位となりやすいベンジル位炭素が少ないことが原因と考えられた。



Cpd	R	X	binding IC_{50} (rat, nM)	inverse agonist IC_{50} (nM)	metabolic rate ($pmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)	oral BA (rat, %)	clogP	MW
13		CH_2	0.96	47	302	0.6	3.7	567
34		CH_2	2.1	28	358	N.D.	3.9	539
35		O	9.1	80	202	N.D.	3.6	541
36		CH_2	5.9	9.4	211	N.D.	4.5	573
37		O	5.6	9.8	39	7.2	4.2	575

N. D., not determined

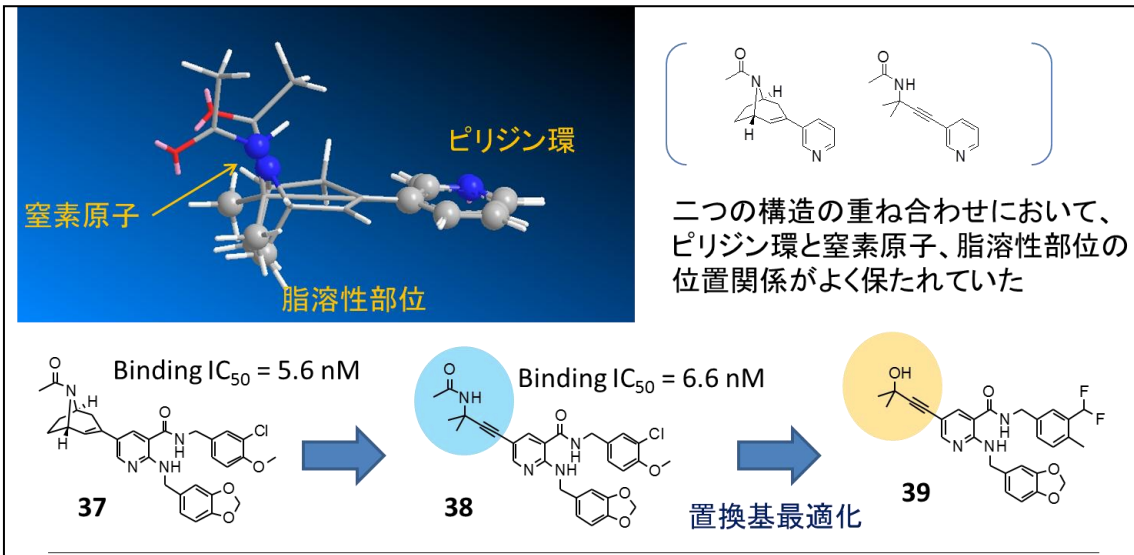
図表17　代謝安定化を目指した2位、3位置換基の変換

2位及び3位の代謝安定性の高い置換基の組み合わせである化合物**37**において*in vitro*での代謝速度は39 pmol/min/mg proteinと改善したものの、*in vivo*での経口バイオアベイラビリティは7.2%と十分な値ではなかった。化合物**13**の0.6%という値よりは大きく向上していたため、代謝安定化の効果はあったと考えられるが、*in vitro*の代謝速度試験では観測出来ていない要素が経口バイオアベイラビリティに影響している可能性が考えられた。

第２節　5位置換基の変換

化合物**37**をルールオブファイブに照らし合わせると、cLogPの逸脱は回避したものの、分子量は依然550を超えている。2位及び3位置換基の変換でのさらなる分子量低減は難しく、5位ビシクロ環構造の変換による分子量の削減が必要と考えられたため、5位ビシクロ環の等価体変換のための構造設計を行った。まず、MMFF94力場[27]を用いた計算により化合物**37**のピリジン環部分とビシクロ環部分の最安定コンフォメーションを導き出した（図表18上）。次に活性に重要と考えられるピリジン環とビシクロ環上の窒素原子、環内の脂溶性部分の位置関係が保たれるような分子構造を設計した。その結果、プロパルギル位をジメチル化したアルキン誘導体がビシクロ環とよく重なることを見出した。実際に合成して活性を検討したところ、アルキン誘導体**38**はアザビシクロ誘導体と同等の結合活性を有していた。さらにアセトアミド部分のヒドロキシル基への変換、3位ベンゼン環上の置換基の変換により高活性な化合物**39**を得ることが出来た。化合物**39**の結合活性はIC_{50}値で0.28 nMとこれまでに合成された化合物の中で最も強力であった。

化合物**37**、**38**及び**39**のプロファイルを図表18下に示す。両化合物とも、ラットグレリン受容体だけでなくヒトグレリン受容体にも高い親和性を示した。インバースアゴニスト活性のIC_{50}値は化合物**38**で26 nM、化合物**39**で5.4 nMであった。アンタゴニスト活性のIC_{50}値は化合物**38**で34 nM、化合物**39**で13 nMであった。アンタゴニスト活性及びインバースアゴニスト活性の両化合物の差（3-5倍）は結合活性の差（24倍）ほど大きくなく、第3章第2節での知見と同様に、結合活性とインバースアゴニスト活性が必ずしも相関しない結果となった。*In vitro*での代謝速度は両化合物ともアザビシクロ誘導体**37**より改善していなかったものの、経口投与でのバイオアベイラビリティは化合物**38**で46.4%、化合物**39**で23.8%と十分に高い値であった。その理由として、①アザビシクロ環上の代謝（二重結合の還元反応）が*in vitro*では十分検出できないものの*in vivo*では重要である、②環構造の変換による分子の形状の変化、分子量の低減により排泄トランスポーターへの親和性が変化したことなどが考えられた。これらの化合物の経口バイオアベイラビリティは経口投与での薬効評価に十分な値であった。



Cpd	binding IC_{50} (nM)		inverse agonist IC_{50} (nM)	antagonist IC_{50} (nM)	metabonic rate (pmol·min^{-1}·mg^{-1})	oral BA (rat, %)	aqueous solubility (μg / mL)	clogP	MW
	rat	human							
37	5.6	0.30	9.8	100	39	7.2%	11	4.2	575
38	6.6	3.0	26	34	81	46.4%	19	3.9	549
39	0.28	0.44	5.4	13	103	23.8%	2.5	4.6	508

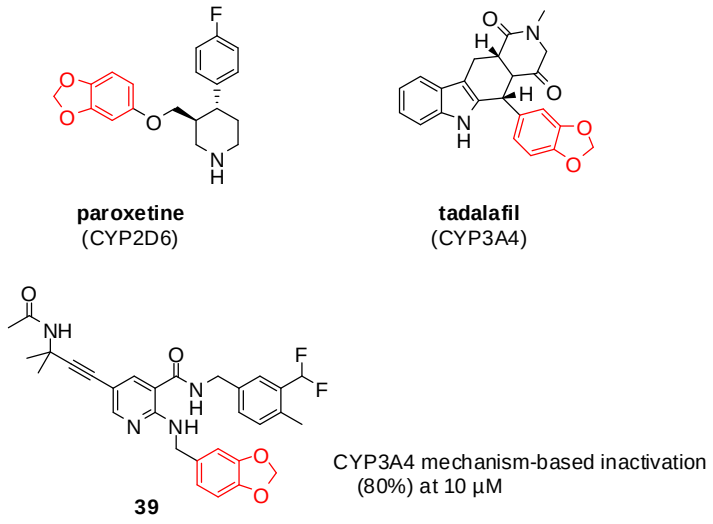
図表18　5位アザビシクロ環の変換と化合物のプロファイル

第３節　化合物39とMechanism-based CYP3A4 inactivation

化合物**39**は強いグレリン受容体インバースアゴニスト活性を持つが、構造に起因してCYP3A4の代謝的不活化を起こすという問題が明らかとなった。CYPの代謝的不活化とは、CYPでの代謝反応の中間体が反応性を持ち、CYP蛋白のアミノ酸残基と共有結合を形成すること、あるいはヘム鉄に強くキレートすることによりCYPの不活化を起こす現象（Mechanism-based inactivation, MBIと呼ばれる）であり、基質競合による可逆的なCYP阻害とは異なる[29]。これが問題となるのは、①CYPの阻害作用が長期間に渡るため、薬剤の蓄積性と薬物相互作用が問題となるため、②反応性代謝物との結合により異常コンフォメーションを取ったCYP蛋白が免疫原性を持ち、5,000人に1人から10,000人に1人の割合で重篤な（時に致死的な）有害作用を引き起こす可能性があることによる[30]。近年、この問題は特に投与期間の長い生活習慣病の薬剤を研究開発する上で大きなリスクと認識されており、本論のような抗肥満薬の研究開発では回避しなくてはならない問題である。

MBI活性には分子の部分構造が重要であると考えられている。例えば、paroxetineやtadalafilはそれぞれCYP2D6、CYP3A4のMBIを引き起こすことが知られており、共通の分子構造として1,3-ベンゾジオキソールを有する（図表19）。化合物**39**も同じようにピリジン環の2位置換基として1,3-ベンゾジオキソール構造を持ち、10 μMで

80%のCYP3A4のMBIを引き起こすことが明らかとなった（なお、CYP3A4の競合阻害作用は見られなかった）。そのため、活性を保ちつつ1,3-ベンゾジオキソール以外の構造に変換する必要があった。初期検討として、活性が保たれることが明らかである2位ジヒドロベンゾフランを持つ化合物（例えば化合物**36**）で検討したが、MBI活性は高かった。1,3-ベンゾジオキソールのような構造でなくても、電子リッチな芳香環が代謝的活性化を受けやすいと言われており[29]、MBIの回避には大きな構造変換が必要である可能性があった。また、CYP3A4の基質結合ポケットのサイズは大きく、構成アミノ酸における脂溶性アミノ酸の含量が多いことから、CYP3A4親和性と化合物脂溶性が相関するという報告がある[31]。そのため、分子の脂溶性を低下させることもCYP3A4への親和性低下を介してMBI活性の低下に繋がる可能性があり、cLogP値も構造変換の指標とした。



図表19　MBIを起こすことが知られている化合物

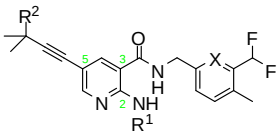
第４節　2位置換基の変換を中心とした構造変換とMBI活性の回避

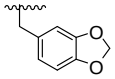
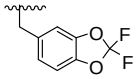
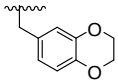
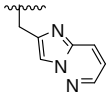
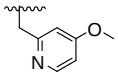
図表20に示すように、2位置換基の変換を中心とした誘導体合成を行い、3位及び5位置換基との組み合わせによる主活性、脂溶性、MBI活性の検討を行った。MBI活性については10 μMでの阻害活性の％で示し、20%以下の活性を目標値とした。

化合物**39**のMBI活性が80%であることと化合物**40**のMBI活性が10%であることの比較から、2位置換基の1,3-ベンゾジオキソール構造の酸素原子の間の炭素原子がMBI活性に重要であることが確認できた。そのことは化合物**41**、**42**でMBI活性がそれぞれ40%、20%と低下したこととも一致する。さらに、化合物**41**と**42**の比較から、5位置換基を*N*-メタンスルホニルプロパルギルアミンとし、3位置換基のベンゼン環をピリジン環に変換することでMBI活性が低下することが明らかとなった。この3位及

び5位の変換は、主活性、特にインバースアゴニスト活性向上にも有効であった。

次いで、脂溶性の低減を目指した2位置換基の構造変換の検討を行ったところ、化合物**43**のようなイミダゾピラジン環でも活性を大きく低下させずに脂溶性を低下させられることが明らかとなった。更なる検討の結果、4-メトキシピリジン環で高い結合活性とインバースアゴニスト活性を示した（化合物**44**、**45**）。3位がピリジン環、5位が*N*-メタンスルホニルプロパルギルアミンである化合物**45**ではcLogP値が3を切り、MBI活性も16%と低い値であった。化合物**45**のラット及びヒトのグレリン受容体結合活性のIC_{50}値はそれぞれ0.39 nMと0.38 nM、インバースアゴニスト活性のIC_{50}値が0.26 nMであり、この化合物のインバースアゴニスト活性は本論で合成された化合物の中で最も強かった。



Cpd	R^1	R^2	X	Binding IC_{50} (nM) rat	Binding IC_{50} (nM) human	Inverse agonist IC_{50} (nM)	cLogP	MBI
39		OH	CH	0.28	0.44	5.4	4.67	80%
40		$NHSO_2CH_3$	CH	55	N.D.	N.D.	6.23	10%
41		OH	CH	5.5	N.D.	34	4.69	40%
42		$NHSO_2CH_3$	N	2.0	1.4	0.51	4.48	20%
43		OH	CH	6.6	4.9	2.7	3.39	50%
44		$NHSO_2CH_3$	CH	0.35	0.41	0.36	3.48	50%
45		$NHSO_2CH_3$	N	0.39	0.38	0.26	2.97	16%

N.D., not determined

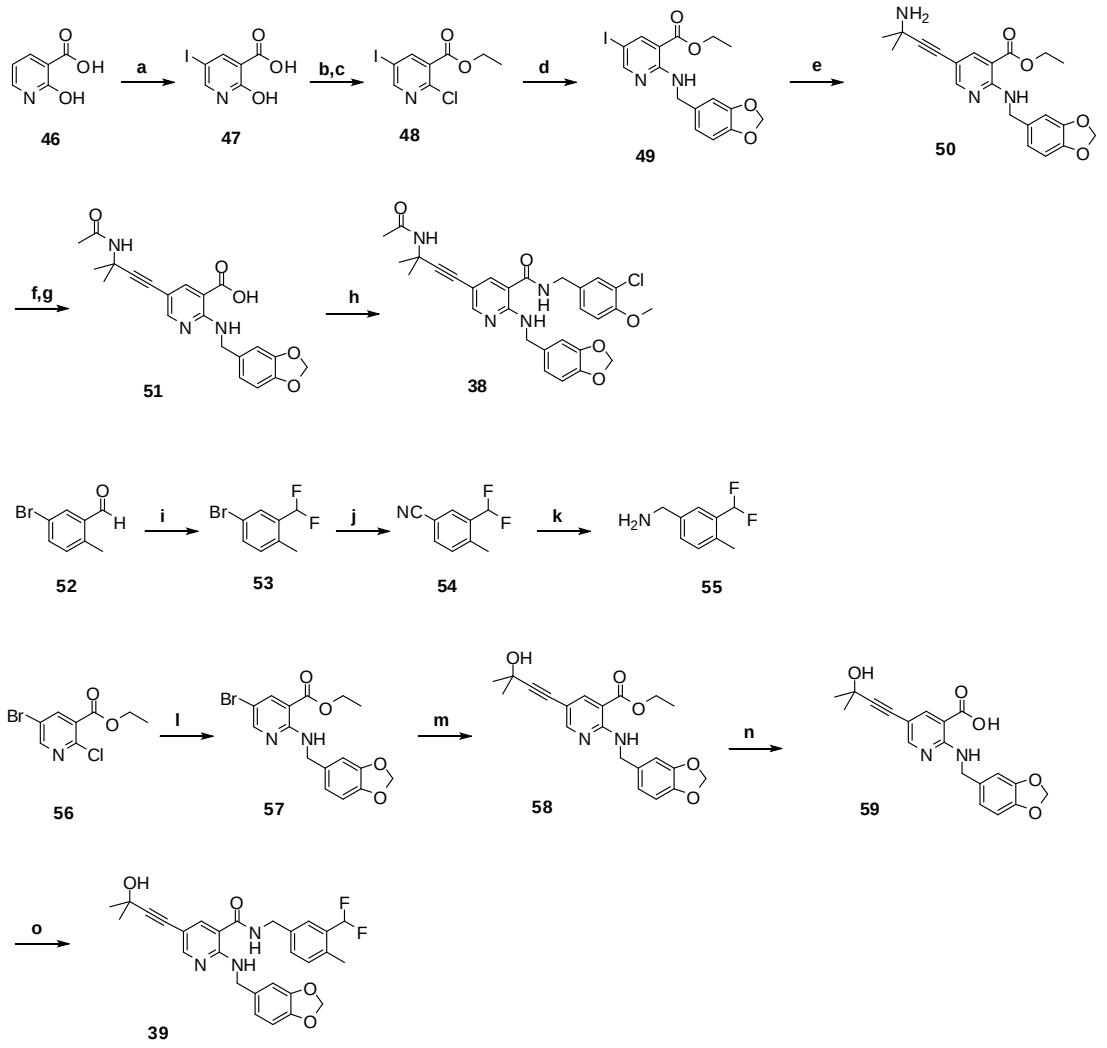
図表20　2位置換基変換を中心とした合成展開

第５節　化合物の合成

化合物**38**と**39**の合成法を図表21に示す。化合物**38**の合成は、市販の2-ヒドロキシニコチン酸を出発原料に用い、*N*-ヨードコハク酸イミドによるヨウ素化、塩化チオニルによる2位塩素化を経て化合物**48**とした。2位置換基を導入した後、5位アルキン部分は薗頭反応により導入した。薗頭反応においてプロパルギルアミンを保護する必要はなく、90%の収率で化合物**50**が得られた。次いで、プロバルギルアミンのアセチル

化、3位アミドの導入を経て化合物**38**を合成することができた。

化合物**39**の3位部分の中間体**55**は化合物**52**を出発原料とし、アルデヒドをフッ素化剤であるDAST（*N,N*-diethylaminosulfur trifluoride）でジフルオロ化した後、マイクロウェーブ条件下でシアン化銅によりブロモ基をシアノ基に置換し、シアノ基を還元することで合成した。化合物**39**の合成は、中間体**56**から2位置換基の導入、薗頭反応による5位置換基の導入、中間体**55**とのアミドカップリングを経て行った。いずれの反応も良好な収率で進行し、問題なく10グラムスケールでの合成が可能であった。

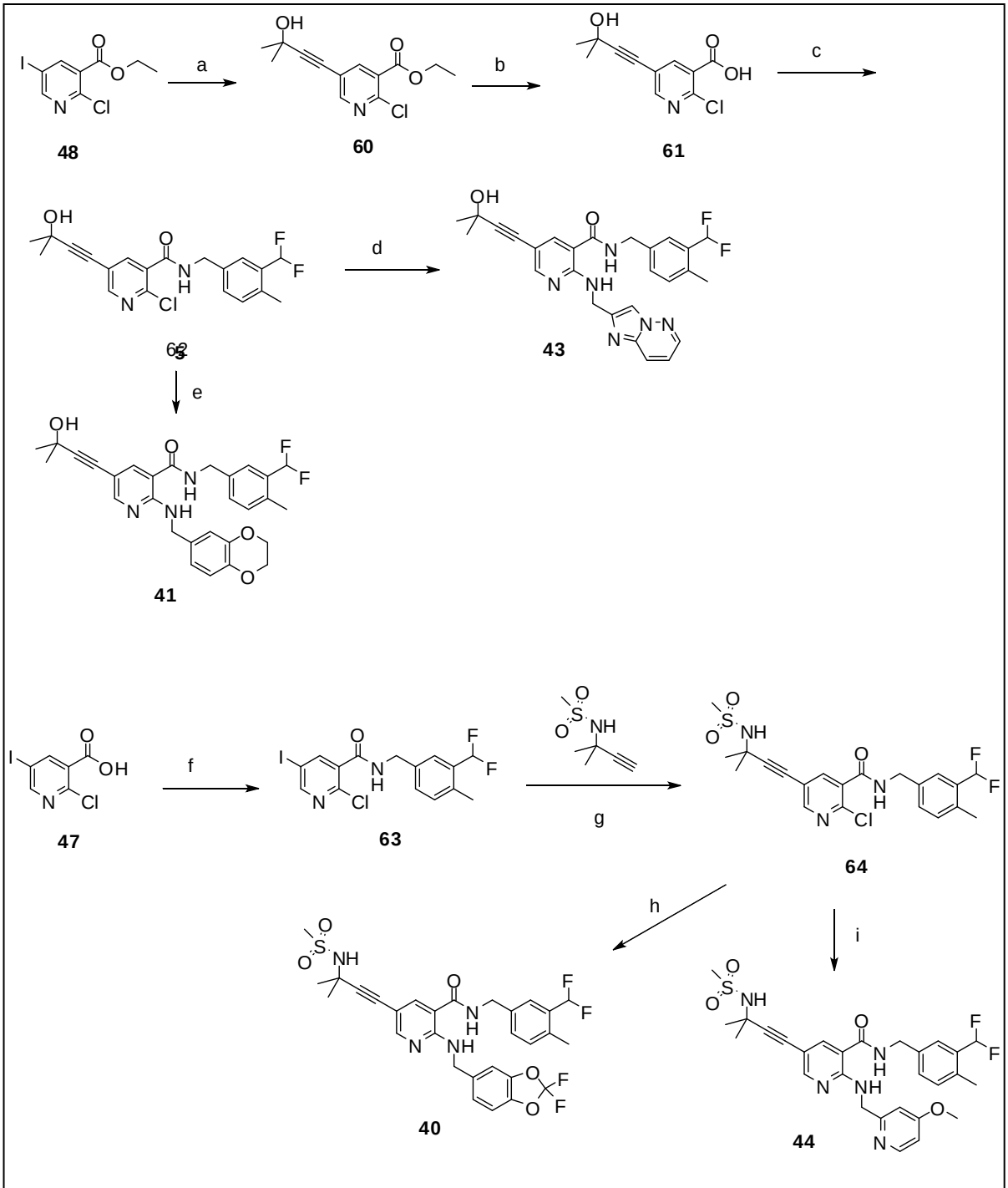


Reagents and conditions: (a) *N*-iodosccinimide, DMF, 50°C, 76%; (b) $SOCl_2$, DMF, 70°C; (c) $SOCl_2$, DMF, EtOH, 80°C, 95% (2 steps); (d) 3,4-(methylenedioxy)-benzylamine, 110°C, then, CH_3CN, H_2O, 80°C-rt, 96%; (e) 2-methyl-3-butyn-2-amine, $PdCl_2(PPh_3)_2$, CuI, Et_3N CH_3CN, 60°C, 90%; (f) AcCl, Et_3N, $CHCl_3$, 0°C; (g) 1N-NaOH, MeOH, 50°C, 95% (2 steps); (h) 3-chloro-4-methoxybenzylamine, BOP reagent, DIPEA, DMF, 0°C, 85%; (i) DAST, CH_2Cl_2, 0°, 79%; (j) CuCN, pyridine, DMF, microwave (190°C), 87%; (k) Pd-C, H_2, MeOH, rt, 97%; (l) 3,4-(methylenedioxy)-benzylamine, 110°C, 45%; (m) 3-methyl-1-butyn-3-ol, $PdCl_2(PPh_3)_2$, CuI, Et_3N, 110°C, 85%; (n) 1N-NaOH, MeOH, 60°C, 88%, (o) **55**, BOP reagent, DIPEA, DMF, 0°C-rt, 89%.

図表21　化合物**38**及び**39**の合成スキーム

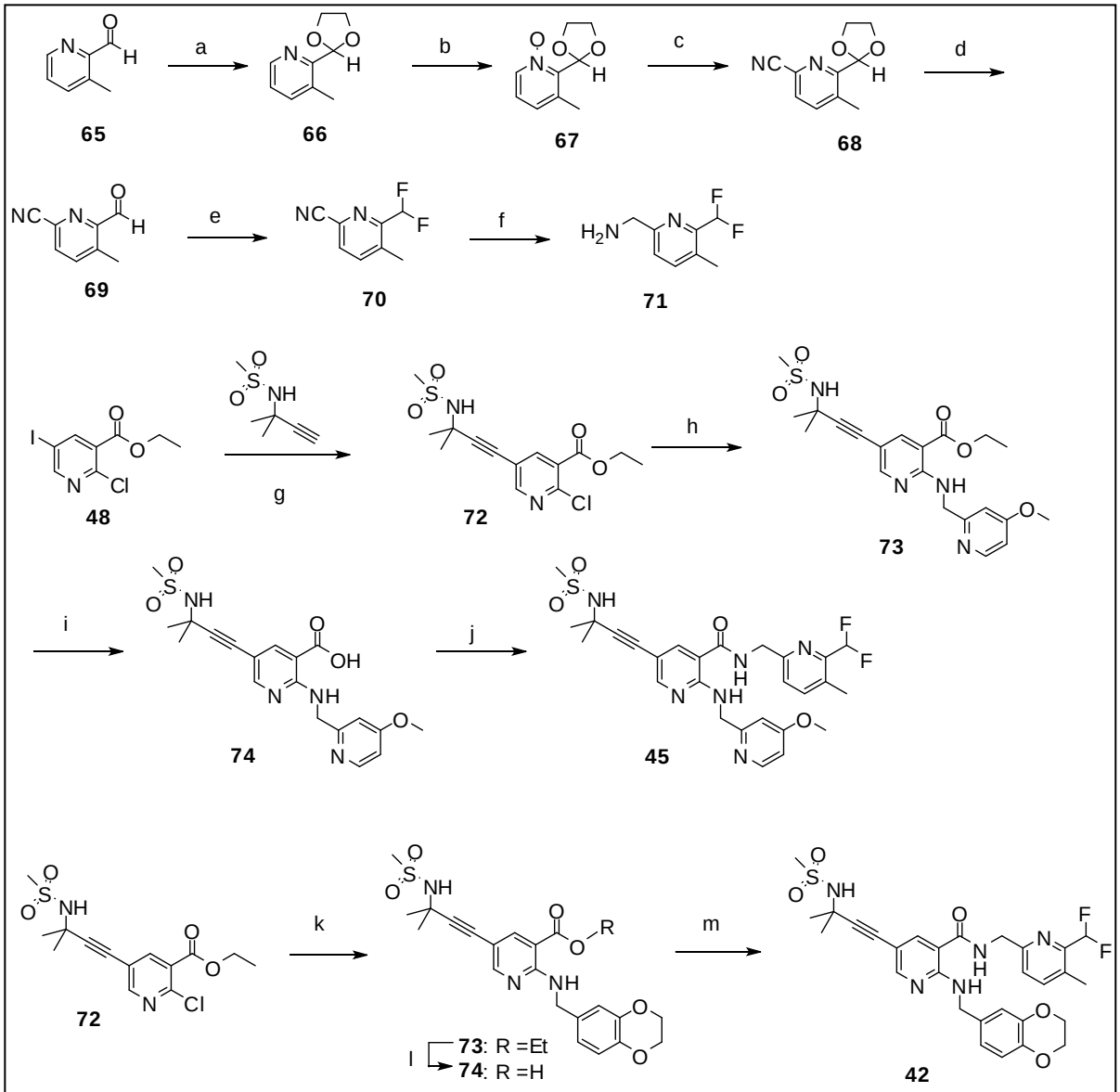
化合物**40**、**41**、**43**、**44**の合成法を図表22に示す。中間体**48**から、薗頭反応とエステル加水分解により得られたカルボン酸**61**と、3-ジフルオロメチル-4-メチルベンジルアミン**55**とを縮合することにより化合物**62**を得た。さらに高温条件下で2位置換基を導入することで化合物**41**、**43**とした。同様に中間体**47**から、アミドカップリング、薗頭反応により化合物**64**とし、加熱条件で2位置換基を導入することで化合物**40**、**44**を合成した。

化合物**42**、**45**の合成法を図表23に示す。市販の3-メチルピコリンアルデヒド**65**を出発原料に用い、アルデヒドをアセタールで保護し、ピリジン環の窒素原子を*m*CPBAで酸化して**67**を得た。次いで、Reissert-Henze型反応[32]によりシアノ基を導入して**68**とした。この反応には大過剰量のトリメチルシリルシアニドと*N,N*-ジメチルカルバモイルクロライドが必要であり、反応時間も長時間で収率は28%と高くなかった。2-シアノ-3-メチルピリジンが主な副生成物として生成することが明らかとなったが、反応温度、反応溶媒、試薬量、反応時間の検討による収率の改善は達成できなかった。得られた化合物**68**のアセタール保護を除去し、アルデヒドに強力なフッ素化試薬であるdeoxofluorを反応させてジフルオロ化した化合物**70**を得た。最後にシアノ基を還元することで中間体**71**を合成することが出来た。出発原料の**65**のアルデヒドをジフルオロ化してReissert-Henze型の反応を行えば、アルデヒドの保護、脱保護の工程が必要なく合成が完了するが、先にジフルオロ化を行った場合Reissert-Henze型の反応が全く進行しなかったことから、保護、脱保護を含むこのスキームで合成を行うことが妥当と考えられた。中間体**48**からこれまでと同様に薗頭反応で5位置換基を導入し、2位置換基の導入とアミドカップリングを経て化合物**42**、**45**を合成した。2位置換基の導入と3位置換基の導入の順番で収率に大きな違いが無く、必要となる中間体に応じて入手困難な方を最後に導入する合成スキームを選択した。



(a) 3-Methyl butyn-3-ol, $PdCl_2(PPh_3)_2$, CuI, Et_3N, 60°C, 64%; (b) 1M NaOHaq., MeOH, 50°C, 100%; (c) 3-(difluoromethyl)-4-methyl-benzylamine, BOP reagent, DIPEA, DMF, 0°C, 94%; (d) imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-ylmethanamine, Et_3N, EtOH, 100°C, 86%; (e) (2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)methanamine, DIPEA, EtOH, 160°C (microwave irradiation), 30%; (f) 3-(difluoromethyl)-4-methyl-benzylamine, BOP reagent, DIPEA, DMF, 0°C, 76%; (g) $PdCl_2(PPh_3)_2$, CuI, Et_3N, 60°C, 100%; (h) (2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methanamine, Et_3N, *N*-methylpyrrolidone,150°C (microwave irradiation), 29%; (i) 2-(aminomethyl)-4-methoxypyridine, Et_3N, *N*-methylpyrrolidone150°C (microwave irradiation), 69%.

図表22　化合物40、41、43、44の合成スキーム



(a) ethylene glycol, *p*-TsCl, toluene, reflux, 73%; (b) *m*-CPBA, $CHCl_3$, rt, 65%; (c) trimethylsilyl cyanide, dimethylcarbamoyl chloride, CH_2Cl_2, rt, 28%; (d) 2N HClaq., 1,4-dioxane, 60 °C, 77%; (e) deoxofluor, $CHCl_3$, rt, 73%; (f) Pd-C, H_2, 4M HCl in dioxane, MeOH, rt, 89%; (g) $PdCl_2(PPh_3)_2$, CuI, Et_3N, 60°C, 65%; (h) 2-(aminomethyl)-4-methoxypyridine, Et_3N, *N*-methylpyrrolidone, 150°C (microwave irradiation), 64%; (i) 1M aq. NaOH, MeOH, 50°C, 71%; (j) **71**, BOP reagent, DIPEA, DMF, rt, 100%; (k)(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)methanamine, DIPEA, EtOH, 155°C (microwave irradiation), 84%; (l) 4M aq. NaOH, MeOH, 50°C, 71%; (m) **71**, BOP reagent, DIPEA, DMF, rt, 53%.

図表23　化合物**42**、**45**の合成スキーム

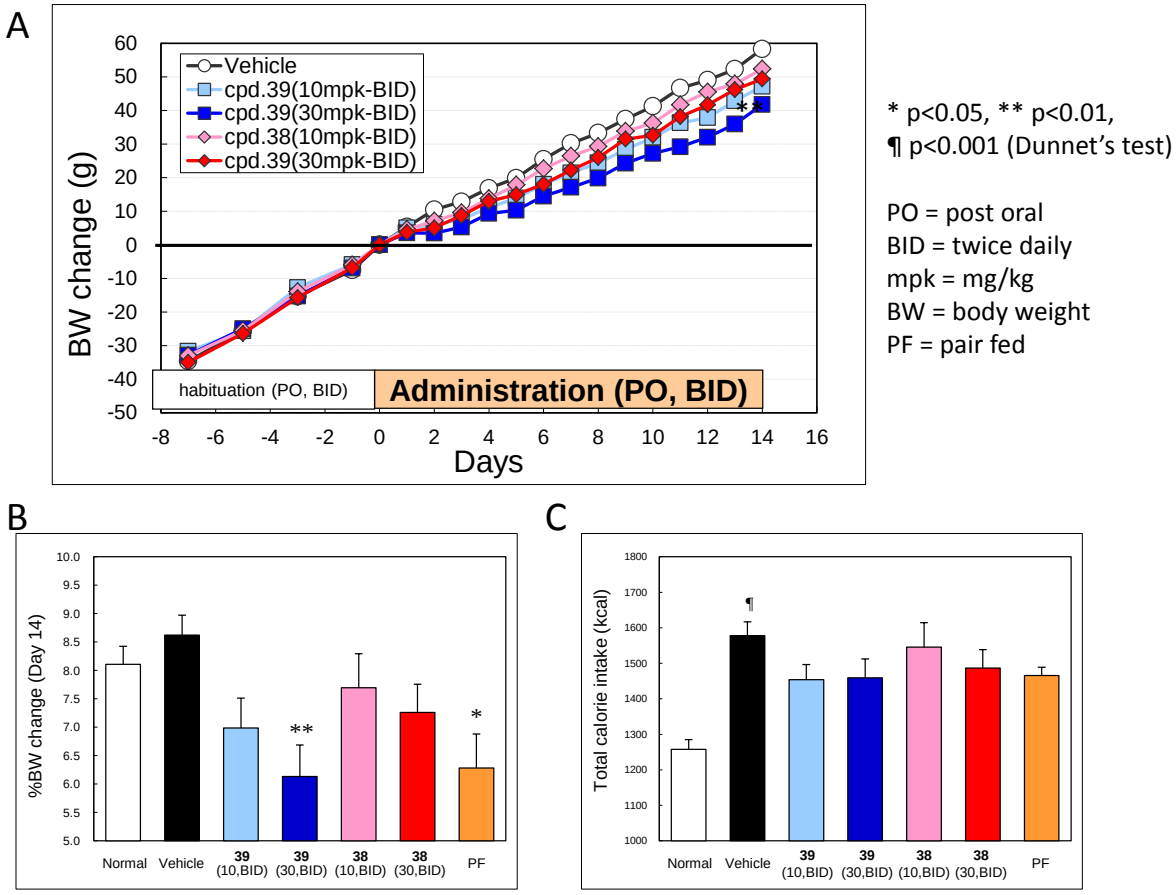
第５章　ラット高脂肪食誘発肥満モデルでの薬効評価

結合阻害活性とインバースアゴニスト活性が強く、体内動態が良好な化合物**38**及び**39**を用いてコンセプト証明のための薬効評価を行うこととした。グレリン受容体インバースアゴニストの抗肥満作用の薬効評価系として、ラット高脂肪食誘発肥満モデルを採用した。迷走神経でのグレリンシグナルの関与が実験的に示されていること[16]、グレリン受容体のmRNAの発現が増えているラットは高脂肪食下で肥満になりやすいと報告されていること[28]から、グレリンシグナルの阻害効果を観察するのに適したモデルであると考えられたためである。1週間の投与馴化の後、化合物10 mg/kg、30 mg/kgまたは投与溶媒（vehicle）の1日2回投与を2週間継続して行った。投与群は自由に食餌を摂取できる状況で飼育した。薬効評価は、2週間の摂餌量の合計と体重増加を指標にして行った。また、体重増加抑制作用が摂餌量の抑制によるものか、代謝亢進によるものか判定するためPair-fed群（PF）を設定した。すなわち、化合物**39**の30 mg/kg投与群の1日の摂餌量の平均値を記録し、それと同じ量の食餌を2週間与えた群を設定した。なお、肥満を誘発していないラットをNormal群とした。

図表24Aに投与溶媒（vehicle）及び化合物投与群の1日毎の体重変動を示す。投与溶媒群では投与馴化期間と同様のペースで体重増加が見られたが、化合物投与群では体重増加が抑制される傾向にあった。図表24Bに投与14日目での体重変化の値（%）を示す。化合物**39**の30 mg/kg投与群とPair-fed群で有意な（$p<0.05$）体重増加抑制作用を示し、化合物**39**の10 mg/kg群、化合物**38**の30 mg/kg群で体重増加抑制傾向を示した。14日間の摂餌量の合計を図表24Cに示す。化合物**39**投与群及びPair-fed群で投与溶媒群に比較して摂餌量の抑制傾向が見られたものの、統計的に有意な差ではなかった。しかしながら、体重増加抑制作用がPair-fed群でも見られたことから、化合物**39**の体重増加抑制作用は、摂餌量抑制効果に起因するものと考えられた。

上記の結果をPK-PD解析により考察した（図表25）。両化合物では24時間のAUC（$AUC_{0\text{-}24}$）の差が大きく、化合物**38**の方が23倍程度高い暴露量を示した。しかしながら、中枢移行性（brain/plasma ratio）では化合物**39**の方が3倍高く、結合活性では化合物**39**の方が24倍高い。化合物**38**が末梢で高暴露されているにも関わらず体重増加抑制作用を示さなかったことから、体重増加抑制作用には結合活性と中枢移行性が重要であると考えることが出来る。そのことをさらに明確にするため、”血中平均フリー体濃度／結合活性のIC_{50}値”という指標と、”脳内平均フリー体濃度／結合活性のIC_{50}値”という指標を算出した。脳内、血中とも、この値が1であれば平均的にIC_{50}の濃度で暴露されていることになり、それ以下であれば暴露不足ということができる。血中の指標では化合物**39**の30 mg/kgで97、化合物**38**の30 mg/kgで86という値であり、末梢血中の暴露は十分であると考えられた。脳内の指標では化合物**39**の30 mg/kgで2.0、化合物**38**の30 mg/kgで0.6という値であり、脳内の暴露は化合物**39**で十分であると考えられるのに対し、体重増加抑制作用の見られなかった化合物**38**では不十分であると考えられた。確定的なデータをするためには更なる検討が必要であるものの、グレリン受容体のインバースアゴニストによる体重増加抑制作用は、摂餌量抑制に基づ

いており、摂餌量抑制効果にインバースアゴニストの中枢移行性が重要であるということを示唆するデータが得られた。



図表24　化合物38及び39の高脂肪食誘発肥満ラットでの薬効評価

	Compound 39		Compound 38	
	10 mg/kg BID	30 mg/kg BID	10 mg/kg BID	30 mg/kg BID
rGhrelinR binding IC_{50} (nM)	0.28		6.6	
Brain/Plasma ratio (B/P ratio)	0.21		0.07	
Plasma protein binding (%)	99		99	
$AUC_{0\text{-}24}$ (ng*h/mL)	1105	3314	24901	74704
Mean Plasma conc (nM)[a]	91	272	1890	5670
Mean brain conc (nM)[b]	19	57	132	370
Mean plasma conc/Binding IC_{50}	324	972	286	859
Mean brain conc/Binding IC_{50}	68	203	19	58
Mean plasma free conc/Binding IC_{50}	3.2	97	2.9	86
Mean brain free conc/Binding IC_{50}	0.7	2.0	0.2	0.6

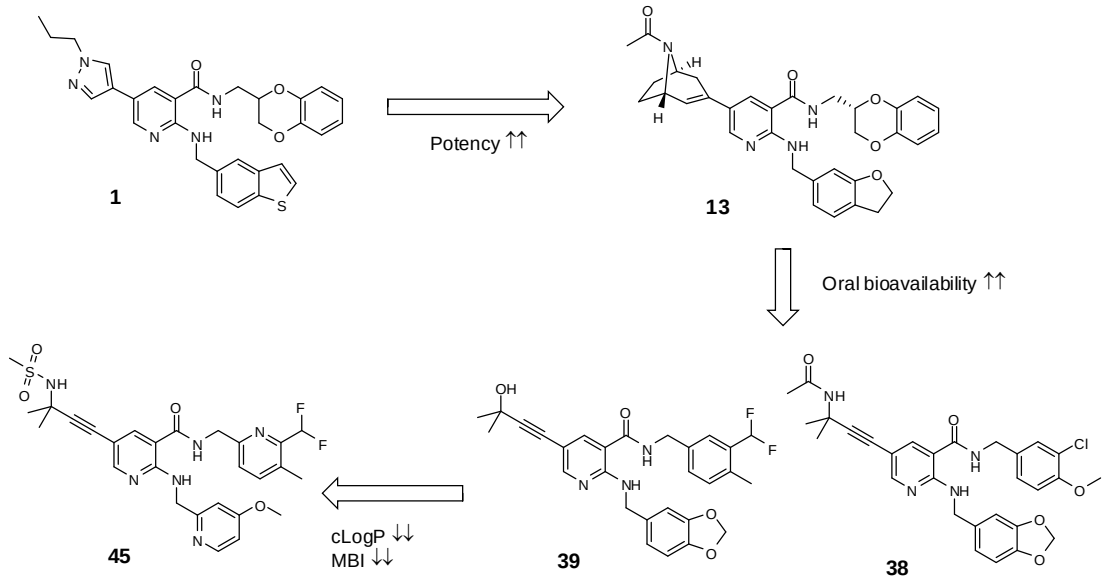
[a]Calculated by $AUC_{0\text{-}24}$/24 (h). [b]Calculated by (mean plasma conc)*(B/P ratio).

図表25　化合物38及び39のPK-PD解析

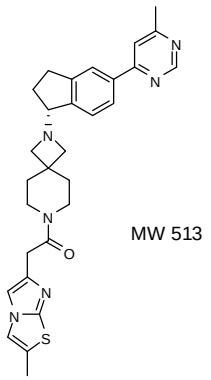
第６章　総括

以上の研究から、私は経口投与でラット病態モデルにおいて薬効を示す新規のグレリン受容体インバースアゴニストを見い出し、①グレリン受容体インバースアゴニストに抗肥満作用があること、②抗肥満作用は摂食抑制作用に基づくこと、③中枢でのグレリン受容体インバースアゴニスト作用が抗肥満作用に重要であることを明らかにした。

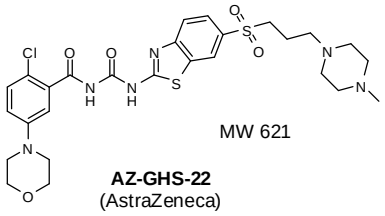
ハイスループットスクリーニングから2-アミノニコチン酸骨格の化合物**1**を取得し、構造変換により結合活性のIC_{50}値が1 nM以下である化合物**13**を得た。経口吸収性が低い化合物**13**から、代謝安定性の向上と5位の構造変換により経口バイオアベイラビリティの良好な化合物**38**、**39**へと展開した。さらなる構造変換により、インバースアゴニスト活性向上とCYP3A4に対するMBI活性の乖離を果たし、化合物**45**を得ることが出来た。ラット肥満モデルにおいて化合物**38**及び**39**を評価したところ、化合物**39**で有意な体重増加抑制作用が見られた。摂餌量を投与群と同量としたPair-fed群でも同様の体重増加抑制作用が見られたことから、この作用は食欲調節作用に基づくと考えられた。中枢移行性の異なる化合物**38**と**39**のラット肥満モデルにおける抗肥満作用の比較とPK/PD解析から、末梢での暴露量が十分に高くても抗肥満作用には繋がらず、中枢での暴露量が結合活性のIC_{50}値を十分に上回った場合に抗肥満作用が示されることを明らかにした。これらの知見は、グレリン受容体を介した食欲調節作用において、中枢のグレリン受容体の関与が大きいことを示している。以上のことから、本研究により創製されたツール化合物は活性や体内動態が良好なだけでなく、グレリン受容体の機能解明のツールとしても有用であることが明らかである。グレリン受容体の恒常的活性の生理的意義やグレリンの食欲調節以外の作用に対する中枢・末梢のグレリン受容体関与など、グレリン受容体の機能解明の課題は多く存在するが、本研究によって創製されたツール化合物を用いてそれらのことは解明可能であると考えられ、今後の研究の発展が期待できる。



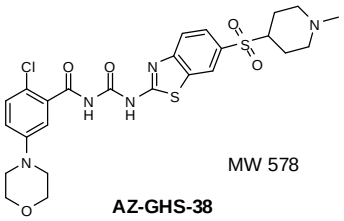
ほぼ同時期に、Pfizer社[33]、AstraZeneca社[34]の研究者から相次いで経口吸収性のあるグレリン受容体インバースアゴニストが報告された（図表26）。文献からの引用値との比較ではあるが、本論で合成された代表化合物**39**は文献の代表化合物と結合活性、インバースアゴニスト活性共に同等かより強いと考えられる。経口バイオアベイラビリティも遜色なく、*in vivo*試験では文献化合物よりも低い用量で有効性を示している。このように有効性の高い化合物を得ると同時に、優れた抗肥満薬創製のためには中枢移行性の向上が重要であるということが本研究で明らかとなったことから、更なる構造活性相関研究により有効な医薬品候補化合物を得られる可能性は十分にあると考えられる。



PF-5190457
(Pfizer)



AZ-GHS-22
(AstraZeneca)



AZ-GHS-38
(AstraZeneca)

	hGhrelinR binding IC_{50}	Inverse agonist IC_{50} (efficary)	Oral BA	*in vivo* pharmacology
PF-5190457	4.9[a]	6.6[b] (29%)	29.4% (rat)	No data
AZ-GHS-22	0.77	-[c] (84%@10 μM)	50% (mouse)	Reduction of food intake at 100 mg/kg in mice
AZ-GHS-38	6.7	-[c] (92%@10 μM)	28% (mouse)	Reduction of food intake at 50 mg/kg in mice
39	0.44	5.4 (>95%)	23.8% (rat)	Reduction of weight gain at 30 mg/kg in rats
45	0.38	0.26 (>95%)	No data	No data

[a] Ki値から換算、[b] GTPγS指標、[c] βアレスチン指標・IC_{50}値の記載なし

図表26　文献報告されたグレリン受容体インバースアゴニストとの比較

第７章　実験の部

水素核磁気共鳴（^{1}H-NMR）スペクトル及び炭素核磁気共鳴（^{13}C-NMR）スペクトルはBrucker ARX-400型（400MHz）またはBrucker Avance III型（400MHz）を用い、テトラメチルシランを内部標準物質として測定した。分裂多重度の記載はsinglet, doublet, triplet, quartet, multipletをそれぞれs, d, t, q, mと略す。質量分析（MS）スペクトルはAgilent G1956A MSD質量分析計を用いてエレクトロスプレーイオン化（ESI）法で測定した。高分解能質量分析（HRMS）スペクトルはJEOL JMS-700型質量分析計を用いて高速原子衝撃（FAB）イオン化法で測定した。化合物の純度測定はAgilent 1100 HPLCシステムを用い、リテンションタイム（t_R, min）とUV 210nmのピーク面積（%）を記録した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーの吸着剤にはMerck Silica Gel60（230-400 mesh）、富士シリシア化学Chromatorex NH（100-200 mesh）もしくは昭光サイエンティフィックPurif-Pack SI 30 μmを用いた。

第３章の化合物合成

(*S*)-2-((2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (21)

カテコール**19**（24.12 g, 219 mmol）と*p*-トルエンスルホン酸(2*R*)グリシジルエステル**20**（50 g, 219 mmol）を500 mLのDMFに溶解させ、炭酸カリウム（45.4 g, 329 mmol）を加えて60℃で48時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、反応液に水を加えた後、混合物を*n*-ヘキサン：酢酸エチル=1:1の溶液で抽出した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後溶媒を減圧除去し、粗生成物を固体として得た（36.4 g）。粗生成物をピリジン（145 mL）に溶解させ、塩化*p*-トルエンスルホニル（50.1 g, 263 mmol）を加えた。反応液を室温で2時間攪拌し、0℃に冷却した後3 M塩酸（1000 mL）をゆっくり加えた。反応液をエーテルで抽出した後、有機層を水、飽和食塩水で洗浄して無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を減圧除去することにより淡黄色の油状物質を得た（60.45 g）。油状物質をDMF（300 mL）に溶解させ、フタルイミドカリウム（45.4 g, 245 mmol）を加えた。反応液を90度で20時間攪拌し、室温に冷却した後、拡販しながらメタノール（1.5 L）を加えた。生成した固体をろ取し、メタノールで洗浄し、減圧下で乾燥させることで化合物**21**を白色固体として得た（36.9 g, カテコールより収率57%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.88 (m, 2H), 7.75 (m, 2H), 6.86 (m, 4H), 4.51 (dq, *J* = 2.4, 6.4, 1H), 4.31 (dd, *J* = 2.4, 12.0 Hz, 1H), 4.10 (dd, *J* = 6.4, 14.4 Hz, 1H), 4.05 (dd, *J* = 6.4, 12.0 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 6.0, 14.4 Hz, 1H); MS (ESI+) 296.1 $(M+H)^+$

(*S*)-(2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methanamine (22)

化合物**4**（15 g, 50.8 mmol）のメタノール（300 mL）溶液にヒドラジン水和物（12.7 g, 254 mmol）を加え、反応液を2時間加熱還流した。反応液を室温に冷却し、クロロホルム（500 mL）を加えて攪拌し、不溶物をろ過して除去した。ろ液を減圧下で濃

縮し、0.5 M水酸化ナトリウム（200 mL）を加えた後、エーテルで抽出した。有機層を0.5 M水酸化ナトリウム、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、ろ液を減圧下濃縮し、乾燥することで化合物**22**を無色油状物質として得た（7.36 g, 88%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 6.86 (m, 4H), 4.27 (dd, *J* = 2.4, 11.4 Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.02 (dd, *J* = 7.8, 11.2 Hz, 1H), 2.99 (dd, *J* = 3.2, 5.6 Hz, 2H); MS (ESI+) 166.1 $(M+H)^+$

6-Bromo-2,3-dihydrobenzofuran (24)

化合物**23**（22.3 g, 62.2 mmol）のTHF溶液を－76℃に冷却し、アルゴン置換下*n*-BuLi（1.57 M, 40 mL, 62.8 mmol）を加えて－76℃で一晩攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過して溶媒を減圧留去した後、残渣をエタノール（28 mL）と水（3 mL）から再結晶することで化合物**24**を白色固体として得た（9.4 g, 76%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.03 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 1.6, 7.6 Hz, 1H), 4.59 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.15 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H); MS (ESI+) 200.1 $(M+H)^+$

(2,3-Dihydrobenzofuran-6-yl)methanol (25)

化合物**24**（4.29 g, 21.6 mmol）のTHF（43 mL）溶液にアルゴン置換下－74℃で*t*-BuLi（1.76 M, 25.7 mL, 45.2 mmol）を加え攪拌した。パラホルムアルデヒド（0.97 g, 32.3 mmol）を－74℃のまま加え、室温に昇温しながら一晩攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧除去し、残渣をジクロロメタン（6.5 mL）と*n*-ヘキサン（25.9 mL）から再結晶することで化合物**25**を淡赤色固体として得た（2.39 g, 74%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.16 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.63 (bs, 2H), 4.58 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.20 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H); MS (ESI+) 151.1 $(M+H)^+$

2-((2,3-Dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (26)

化合物**25**（2.38 g, 15.8 mmol）のジクロロメタン（15.8 mL）溶液を氷冷し、塩化チオニル（9.44 g, 79 mmol）をゆっくりと加えた。反応液を室温で1時間攪拌し、溶媒を減圧留去した。残渣にDMF（15.8 mL）とフタルイミドカリウム（3.23 g, 17.4 mmol）を加え90℃で2時間攪拌した。反応液に酢酸エチル（80 mL）と水（60 mL）を加えて攪拌し、有機層と水層を分離した。水層をさらに酢酸エチルで抽出し、有機層と合わせて、飽和食塩水、1 M水酸化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をメタノール（58 mL）、酢酸エチル（27 mL）から再結晶することで化合物**26**を赤色固体として得た（3.07 g, 69%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 1.6, 7.6 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.53 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.15 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H); MS (ESI+) 280.2 $(M+H)^+$

(2,3-Dihydrobenzofuran-6-yl)methanamine (27)

化合物**26**（3.07 g, 11 mmol）とヒドラジン水和物（2.75 g, 55 mmol）のメタノール（45 mL）溶液を77℃で3時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、酢酸エチル（60 mL）と水（58 mL）を加えて攪拌した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物**27**を赤色固体として得た（1.31 g, 80%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.56 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.18 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H); MS (ESI+) 150.1 $(M+H)^+$

***tert*-Butyl 3-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-ene-8-carboxylate (29)**

ジイソプロピルアミン（0.34 mL, 2.74 mmol）のTHF（10 mL）溶液にアルゴン置換下、－78℃で*n*-BuLi（1.6 M, 1.72 mL, 2.74 mmol）を加え、－78℃で30分攪拌した。次いで、*N*-Bocノルトロピン**28**（411 mg, 1.83 mmol）のTHF溶液を加え、－78℃で3時間攪拌した。さらに、*N*,*N*-ビストリフルオロメタンスルホニルアニリン（717 mg, 2 mmol）のTHF（5 mL）溶液を加え、室温で一晩攪拌した。反応液に水を加え、エーテルで抽出した。有機層を炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン：酢酸エチル=2:1）で精製し化合物**29**を白色固体として得た（297 mg, 46%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 6.10 (s, 1H), 4.46 (m, 2H), 3.08 (m, 1H), 2.24 (bs, 1H), 2.08 (m, 1H), 2.01 (m, 2H), 1.74 (bs, 1H), 1.45 (s, 9H); MS (ESI+) 258.0 $(M-Boc+H)^+$

***tert*-Butyl 3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-ene-8-carboxylate (30)**

化合物**29**（296mg, 0.83 mmol）、ビスピナコレートジボロン（252 mg, 0.99 mmol）、$PdCl_2$(dppf)（60.6 mg, 0.083 mmol）と酢酸カリウム（244 mg, 2.49 mmol）の1,4-ジオキサン（5 mL）懸濁液をマイクロウェーブ照射条件下、120℃で20分加熱した。冷却後、反応液に酢酸エチルと水を加えて攪拌し、有機層を分離した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン：酢酸エチル=4:1）で精製することで化合物**30**を無色油状物質として得た（186 mg, 67%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 6.76 (s, 1H), 4.30 (m, 2H), 3.08 (m, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.92 (m, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.25 (s, 12H); MS (ESI+) 236.0 $(M-Boc+H)^+$

(*S*)-5-Bromo-2-chloro-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)nicotinamide (31)

5-ブロモ-2-クロロニコチン酸**15**（5 g, 21.2 mmol）と化合物**22**（4.19 g, 25.4 mmol）のDMF（50 mL）溶液に0℃でジイソプロピルエチルアミン（11.08 mL, 63.4 mmol）とBOP試薬（10.29 g, 23.3 mmol）を加えた。反応液を室温で1時間攪拌し、水（200 mL）を加えた後、酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:1溶液で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチルと*n*-ヘキサンから再結晶することで化合物**31**を白色固体として得た（4.82 g, 93%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.53 (d, *J* = 2.4 Hz,1H), 8.21 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.96 (bs, 1H), 6.87 (m, 4H), 4.43 (m, 1H), 4.35 (dd, *J* = 2.2, 11.8 Hz, 1H), 4.05 (dd, *J* = 7.0, 11.8 Hz, 1H), 3.92 (ddd, *J* = 4.0, 6.4, 14.4 Hz, 1H), 3.71 (ddd, *J* = 1.2, 6.4, 14.4 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 163.6, 152.1, 145.6, 143.0, 142.5, 142.1, 131.7, 121.9, 119.6, 117.4, 117.3, 71.6, 65.6, 40.6; MS (ESI+) 385.0 $(M+H)^+$

(*S*)-5-Bromo-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-2-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)nicotinamide (32)

化合物**31**（192 mg, 0.5 mmol）と化合物**27**（90 mg, 0.6 mmol）の混合物を160℃で2時間攪拌した。冷却後、酢酸エチル（6 mL）と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（2 mL）を加えて攪拌し、有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン：酢酸エチル=3:2）で精製することで化合物**32**を黄色固体として得た（184 mg, 74%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.32 (t, *J* = 7.4 Hz,1H), 8.24 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.4 Ha, 1H), 7.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.85-6.95 (m, 4H), 6.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.54 (t, *J* = 8.8, 2H), 4.36 (m, 1H), 4.30 (dd, *J* = 2.4, 11.4 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J* = 6.8, 11.4 Hz, 1H), 3.80 (ddd, *J* = 4.0, 6.4, 14.4 Hz, 1H), 3.61 (ddd, *J* = 6.2, 6.6, 14.4 Hz, 1H), 3.17 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 167.5, 160.5, 156.3, 152.7, 143.0, 142.6, 139.6, 137.2, 125.8, 124.8, 121.8, 121.8, 119.6, 117.3, 117.3, 110.7, 108.6, 104.2, 71.8, 71.3, 65.7, 44.9, 40.2, 29.5; MS (ESI+) 498.0 $(M+H)^+$

5-(8-Azabicyclo[3.2.1]oct-3-en-3-yl)-N-(((*S*)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-2-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)nicotinamide (33)

化合物**32**（3.24 g, 6.53 mmol）、化合物**30**（2.63 g, 7.83 mmol）、$Pd(PPh_3)_4$（0.377 g, 0.326 mmol）とリン酸三カリウム（2.77 g, 13.1mmol）を1,4-ジオキサン（40 mL）と水（20 mL）の溶液に懸濁させ、100℃で7時間攪拌した。室温に冷却後、反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を減圧留去することにより淡黄色固体を得た。固体

をジクロロメタン（50 mL）に溶解させ、トリフルオロ酢酸（10 mL）を加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（N-Hシリカ、メタノール：ジクロロメタン=1:20）で精製することにより化合物**33**を淡黄色固体として得た（2.1 g, 61%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.55 (q, *J* = 5.6 Hz,1H), 8.18 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.67 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.56 (bs, 1H), 7.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.80-6.85 (m, 4H), 6.76 (s, 1H), 6.02 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.49 (t, *J* = 8.8, 2H), 4.23-4.30 (m, 1H), 4.20-4.23 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.90 (dd, *J* = 7.2, 11.4 Hz, 1H), 3.57 (m, 1H), 3.11 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.03 (m, 1H), 2.20-2.32 (m, 2H), 2.07-2.15 (m, 2H), 1.71-1.79 (m, 1H); MS (ESI+) 525.2 $(M+H)^+$

5-(8-Acetyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-en-3-yl)-*N*-(((*S*)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-2-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)nicotinamide (13)

化合物**33**（2.2 g, 4.19 mmol）のジクロロメタン溶液に、トリエチルアミン（0.88 mL, 6.29 mmol）と塩化アセチル（0.358 mL, 5.03 mmol）を加えて室温で30分攪拌した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノール：酢酸エチル：*n*-ヘキサン=3:48.5:48.5）で精製することにより化合物**13**を淡黄色固体として得た（1.72 g, 72%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.33 (m,1H), 8.25 (s, 0.54H), 8.18 (s, 0.46H), 7.61 (s, 0.46H), 7.53 (s, 0.54H), 7.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.81-6.91 (m, 5H), 6.78 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.94 (m, 0.46H), 4.87 (m, 0.54H), 4.64 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.34-4.41 (m, 2H), 4.32 (dd, *J* = 2.0, 12.0 Hz, 1H), 4.00 (dd, *J* = 7.6, 11.2 Hz, 1H), 3.75-3.84 (m, 1H), 3.60-3.68 (m, 1H), 3.15 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.06-3.13 (m, 0.54H), 2.86-2.91 (m, 0.46H), 2.27-2.37 (m, 1H), 2.07-2.17 (m, 2H), 2.10 (s, 1.38H), 2.07 (s, 1.62H), 1.67-1.83 (m, 1H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 168.7, 167.1 [166.2], 160.4, 157.0 [157.1], 148.7 [148.2], 143.1, 142.8 [142.8], 139.9, 132.1 [130.0], 131.8 [132.2], 125.6, 124.7, 124.5 [126.0], 122.6 [122.3], 121.7, 121.6, 119.5, 117.3, 117.3, 109.0 [109.4], 108.5, 72, 71.3, 65.9 [65.9], 55.0 [53.6], 50.0 [50.9], 44.9, 40.3, 35.9 [37.3], 35.3 [33.9], 29.5, 28.7 [30.5], 21.6 [20.8], the minor counterparts of doubled signals due to rotamers are in the brackets; MS (ESI+) 567.2 $(M+H)^+$; HRMS (FAB) Calc.d for $C_{33}H_{35}N_4O_5^+$: 567.2607; Found: 567.2574. ; HPLC purity 93.4 % (4.95 min).

2-((Benzo[b]thiophen-5-ylmethyl)amino)-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-5-(1-propyl-1*H*-pyrazol-4-yl)nicotinamide (1)

化合物**13**と同様の合成方法で、化合物**22**のラセミ体、ベンゾチオフェン-5-イルメチルアミン、*N*-プロピルピラゾール-5-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.40 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.32-8.36 (m, 1H), 7.80-7.84 (m, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.82-6.90 (m, 4H), 6.51-6.54 (m, 1H), 4.84 (d, *J* =

5.6 Hz, 2H), 4.38-4.44 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.0, 11.6 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.02 (dd, *J* = 7.4, 11.6 Hz, 1H), 3.81-3.88 (m, 1H), 3.60-3.69 (m, 1H), 1.87-1.96 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 540.1 $(M+H)^+$

2-((Benzofuran-5-ylmethyl)amino)-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-5-(1-propyl-1*H*-pyrazol-4-yl)nicotinamide (2)

化合物**13**と同様の合成方法で、化合物**22**のラセミ体、ベンゾフラン-5-イルメチルアミン、*N*-プロピルピラゾール-5-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.40 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.34 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.81-7.84 (m, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 1.2, 8.4 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.82-6.90 (m, 4H), 6.53 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.84 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.37-4.42 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.4, 11.6 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.00 (dd, *J* = 7.2, 11.6 Hz, 1H), 3.81-3.88 (m, 1H), 3.60-3.69 (m, 1H), 1.87-1.96 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 524.1 $(M+H)^+$

2-((Benzo[d]thiazol-6-ylmethyl)amino)-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-5-(1-propyl-1*H*-pyrazol-4-yl)nicotinamide (3)

化合物**13**と同様の合成方法で、化合物**22**のラセミ体、ベンゾチアゾール-5-イルメチルアミン、*N*-プロピルピラゾール-5-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.94 (s, 1H), 8.53 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.52-7.56 (m, 1H), 6.85-6.92 (m, 4H), 6.52 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.39-4.43 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.4, 11.6 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.02 (dd, *J* = 7.2, 11.6 Hz, 1H), 3.83-3.90 (m, 1H), 3.63-3.71 (m, 1H), 1.87-1.96 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 541.1 $(M+H)^+$

***N*-((2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-2-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)-5-(1-propyl-1*H*-pyrazol-4-yl)nicotinamide (4)**

化合物13と同様の合成方法で、化合物**22**のラセミ体、*N*-プロピルピラゾール-5-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.58 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.35-8.39 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.93 (dd, *J* = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 6.80-6.90 (m, 3H), 6.71-6.78 (m, 2H), 5.93 (dd, *J* = 1.2, 11.4 Hz, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.30-4.33 (m, 1H), 4.25 (dd, *J* = 2.4, 11.6 Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.90 (dd, *J* = 7.2, 11.6 Hz, 1H), 3.77-3.84 (m, 1H), 3.67-3.76 (m, 1H), 1.87-1.98 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 528.2 $(M+H)^+$

2-((Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-5-(1-propyl-1*H*-pyrazol-4-yl)nicotinamide (5)

化合物**13**と同様の合成方法で、化合物**22**のラセミ体、1,3-ベンゾジオキソール-5-イルメチルアミン、*N*-プロピルピラゾール-5-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.39 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.22 (m, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.85-6.89 (m, 5H), 6.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.53 (m, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.62 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.39-4.41 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.4, 11.2 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.02 (dd, *J* = 6.8, 12.0 Hz, 1H), 3.81-3.88 (m, 1H), 3.61-3.70 (m, 1H), 1.88-1.97 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 528.1 $(M+H)^+$

(*R*)-2-((Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-5-(1-propyl-1*H*-pyrazol-4-yl)nicotinamide (6)

化合物**13**と同様の合成方法で、化合物**22**の*R*体、*N*-プロピルピラゾール-5-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.13-8.25 (m, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.83-6.88 (m, 5H), 6.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.53 (m, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.63 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.39-4.41 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.4, 11.2 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.02 (dd, *J* = 6.8, 12.0 Hz, 1H), 3.80-3.88 (m, 1H), 3.61-3.70 (m, 1H), 1.88-1.97 (m, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 528.2 $(M+H)^+$

(*S*)-2-((Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-5-(1-propyl-1*H*-pyrazol-4-yl)nicotinamide (7)

化合物**13**と同様の合成方法で、*N*-プロピルピラゾール-5-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.12-8.22 (m, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.82-6.90 (m, 6H), 6.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.50-6.55 (m, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.61 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.40-4.42 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.4, 11.2 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.02 (dd, *J* = 6.8, 12.0 Hz, 1H), 3.80-3.88 (m, 1H), 3.61-3.68 (m, 1H), 1.86-1.95 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 528.3 $(M+H)^+$

(*S*)-2'-Chloro-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-6-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)-[3,4'-bipyridine]-5-carboxamide (8)

化合物**13**と同様の合成方法で、2-クロロピリジン-4-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.59-8.64 (m, 1H), 8.52 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.75-6.91 (m, 7H), 4.70 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.55 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 4.39-4.45 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.0, 11.6 Hz, 1H), 4.03 (dd, *J* = 7.2, 11.6 Hz, 1H), 3.82-3.89 (m, 1H), 3.63-3.72 (m, 1H), 3.17 (t, *J* = 9.8 Hz, 2H); MS (ESI+) 528.1 $(M+H)^+$

(*S*)-2-((Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-*N*-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-5-morpholinonicotinamide (9)

化合物**13**と同様の合成方法で、1,3-ベンゾジオキソール-5-イルメチルアミン、モルホリンを用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.40 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.79-7.82 (m, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.78-6.91 (m, 6H), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.42-6.55 (m, 1H), 5.94 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 4.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.35-4.41 (m, 1H), 4.31 (dd, *J* = 2.4, 11.6 Hz, 1H), 3.86 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.78-3.86 (m, 3H), 3.60-3.67 (m, 1H), 3.00 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.96-3.00 (m, 2H); MS (ESI+) 505.1 $(M+H)^+$

N-(((S)-2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-2-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)-5-(2,6-*cis*-dimethylmorpholino)nicotinamide (10)

化合物**13**と同様の合成方法で、2,6-シスジメチルモルホリンを用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.02 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.82-6.92 (m, 6H), 6.44 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.54 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.36-4.42 (m, 1H), 4.31 (dd, *J* = 2.4, 11.6 Hz, 1H), 4.00 (dd, *J* = 7.0, 11.4 Hz, 1H), 3.74-3.85 (m, 4H), 3.60-3.67 (m, 1H), 3.12-3.21 (m, 5H), 2.39 (t, *J* = 10.4 Hz, 2H), 1.25 (s, 3H), 1.24 (s, 3H); MS (ESI+) 530.4 $(M+H)^+$

2-((Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-5-(8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)-N-(((S)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)nicotinamide (11)

化合物**13**と同様の合成方法で、1,3-ベンゾジオキソール-5-イルメチルアミン、8-オキソ-3-アザビシクロ[3.2.1]オクタンを用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.97 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.63 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.85-6.92 (m, 5H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.48 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 4.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.46 (brs, 1H), 4.36-4.42 (m, 1H), 4.33 (dd, *J* = 2.2, 11.4 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 7.2, 11.4 Hz, 1H), 3.79-3.86 (m, 1H), 3.60-3.68 (m, 1H), 3.09 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 2.97 (dd, J = 2.0, 11.2 Hz, 2H), 2.00 (s, 2H), 1.99 (s, 2H); MS (ESI+) 531.1 $(M+H)^+$

(S)-1'-Acetyl-6-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-N-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-1',2',3',6'-tetrahydro-[3,4'-bipyridine]-5-carboxamide (12)

化合物**13**と同様の合成方法で、1,3-ベンゾジオキソール-5-イルメチルアミン、1-アセチル-3,6-ジヒドロ-2H-ピリジン-4-ボロン酸を用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.29-8.33 (m, 1H), 8.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 0.5H), 8.26 (d, *J* = 2.0 Hz, 0.5H), 7.62 (d, *J* = 2.0 Hz, 0.5H), 7.58 (d, *J* = 2.0 Hz, 0.5H), 6.79-6.91 (m, 6H), 6.68-6.77 (m, 2H), 5.92 (s, 2H), 4.61 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.35-4.45 (m, 1H), 4.32 (dd, *J* = 2.4, 11.6 Hz, 1H), 4.20-4.23 (m, 1H), 4.10-4.13 (m, 1H), 4.01 (dd, *J* = 7.2, 11.6 Hz, 1H), 3.76-3.85 (m, 2H), 3.60-3.69 (m, 2H), 2.43-2.55 (m, 2H), 2.16 (s, 1.5H), 2.13 (s, 1.5H); MS (ESI+) 543.1 $(M+H)^+$

N-(((S)-2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)methyl)-2-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)-5-(8-isopropyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-en-3-yl)nicotinamide (14)

化合物**13**と同様の合成方法で、最終工程で*N*-イソプロピル化を行うことで合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.29 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.23-8.26 (m,1H), 7.56 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.77-6.92 (m, 6H), 6.44-6.74 (m, 1H), 6.12 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 4.54 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.37-4.42 (m, 1H), 4.32 (dd, *J* = 2.4, 11.6 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 6.8, 11.6 Hz, 1H), 3.80-3.87 (m,1H), 3.69-3.77 (m, 2H), 3.61-3.67 (m, 1H), 4.32 (dd, *J* = 2.0, 12.0 Hz, 1H), 4.00 (dd, *J* = 7.6, 11.2 Hz, 1H), 3.75-3.84 (m, 1H), 3.60-3.68 (m, 1H), 3.17 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 2.76-2.82 (m, 1H), 1.86-1.94 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 1.13 (s, 3H); MS (ESI+) 567.4 $(M+H)^+$

化合物13に含まれるジアステレオマーの分離

化合物**13**（2.0 g）をダイセル社のCHIRALCEL™ OZ-Hカラム（50 mmφ×250 mmL）に1インジェクション当り0.3 gずつロードし、アセトニトリル/メタノール/ジエチルアミン=90/10/0.1を移動相溶媒として流速59 mL/minで溶出させることで異性体を分離した。保持時間7.24分をピークとする画分と、保持時間9.44分をピークとする画分を減圧下乾燥させることでそれぞれ**first eluted isomer**（590 mg, 30%）、**second eluted isomer**（610 mg, 31%）として取得した。

First eluted isomer

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.30 (m,1H), 8.23 (s, 0.55H), 8.16 (s, 0.45H), 7.66 (s, 0.45H), 7.57 (s, 0.55H), 7.08 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.79-6.90 (m, 5H), 6.76 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.95 (m, 0.45H), 4.84 (m, 0.55H), 4.65 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.50 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.30-4.40 (m, 2H), 4.32 (dd, *J* = 2.0, 12.0 Hz, 1H), 3.96 (dd, *J* = 7.8, 11.2 Hz, 1H), 3.70-3.83 (m, 1H), 3.55-3.65 (m, 1H), 3.15 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.03-3.13 (m, 0.55H), 2.83-2.93 (m, 0.45H), 2.23-2.35 (m, 1H), 2.07-2.18 (m, 2H), 2.11 (s, 1.35H), 2.07 (s, 1.65H), 1.60-1.78 (m, 1H)

Second eluted isomer

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.32 (m,1H), 8.24 (s, 0.55H), 8.17 (s, 0.45H), 7.65 (s, 0.45H), 7.56 (s, 0.55H), 7.10 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.80-6.95 (m, 5H), 6.79 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.94 (m, 0.45H), 4.90 (m, 0.55H), 4.64 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.32-4.41 (m, 2H), 4.32 (dd, *J* = 2.0, 12.0 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 7.6, 11.2 Hz, 1H), 3.72-3.85 (m, 1H), 3.56-3.68 (m, 1H), 3.14 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.04-3.15 (m, 0.55H), 2.84-2.91 (m, 0.45H), 2.24-2.37 (m, 1H), 2.08-2.17 (m, 2H), 2.10 (s, 1.35H), 2.07 (s, 1.65H), 1.63-1.80 (m, 1H)

第４章の化合物合成

2-Hydroxy-5-iodonicotinic acid (47)

2-ヒドロキシニコチン酸**46**（24 g, 173 mmol）と*N*-ヨードスクシンイミド（50.5 g, 224 mmol）のDMF（300 mL）溶液を遮光しながら室温で1時間攪拌し、50℃で20時間攪拌した。約250 mLのDMFを減圧留去し、水（400 mL）を加え室温で1時間、0℃

で1時間攪拌した。不溶物をろ過にて回収し、メタノール（200 mL）に懸濁して2時間攪拌した。固体をろ取し、メタノール（40 mL）で洗浄し、乾燥させることで化合物**47**を淡黄色固体として得た（38.4 g, 76%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.41 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H); MS (ESI+) 265.9 $(M+H)^+$

Ethyl 2-chloro-5-iodonicotinate (48)

化合物**47**（29.8 g, 107 mmol）、塩化チオニル（78 mL,）、DMF（1.5 mL）の混合物を70℃で4時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、反応液にDMF（6 mL）を加えた。水（200 mL）、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（200 mL）を順番にゆっくりと加えた。反応液を1 M塩酸でpH4として、室温で2時間、0℃で一晩攪拌した。不溶物をろ取し、水で洗浄し、乾燥させることで固体（2-クロロ-5-ヨードニコチン酸、27 g）を得た。固体をクロロホルム（135 mL）に懸濁し塩化チオニル（13.9 mL）を加えて30分加熱還流した。DMF（0.5 mL）と塩化チオニル（27.8 mL）をさらに加えることにより反応液が透明となり、その反応液を1.5時間加熱還流した。反応液を冷却し、溶媒を減圧留去した後、エタノール（135 mL）を0℃でゆっくりと加え、0℃で15分、室温で30分攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、酢酸エチル（270 mL）と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（135 mL）を加えて攪拌した。有機層を分離し、水層を酢酸エチル（135 mL）で抽出した後、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=0:100⇒20:80）で精製することにより化合物**48**を白色固体として得た（27.25 g, 95%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.70 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.42 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H) ; MS (ESI+) 311.9 $(M+H)^+$

Ethyl 2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-5-iodonicotinate (49)

化合物**48**（26.2 g, 84 mmol）と3,4-メチレンジオキシベンジルアミン（25.4 g, 168 mmol）の混合物を110℃で30分攪拌し、さらに110℃で3時間静置した。反応液を80℃に冷却し、アセトニトリル（260 mL）と水（260 mL）を加えて80℃で1時間攪拌した。反応液を室温に自然冷却した後、0℃で1時間攪拌し、不溶物をろ取してアセトニトリルと水の1:1混合物（30 mL）で洗浄した。減圧下乾燥させることで化合物**49**を淡灰色固体として得た（32.42 g, 96%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.41 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.25 (bs, 1H), 6.84 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.31 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H) ; ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 166.4, 158.9, 157.0, 147.8, 146.9, 146.7, 133.0, 120.8, 108.5, 108.3, 100.9, 61.2, 44.6, 14.2; MS (ESI+) 427.0 $(M+H)^+$

Ethyl 5-(3-amino-3-methylbut-1-yn-1-yl)-2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-amino)nicotinate (50)

化合物**49**（25 g, 58.7 mmol）、2-メチル-3-ブチン-2-アミン（6.34 g, 76 mmol）、$PdCl_2(PPh_3)_2$（1.24 g, 1.76 mmol）、ヨウ化銅（I）（0.335 g, 1.76 mmol）とトリエチルアミン（125 mL）のアセトニトリル（125 mL）懸濁液を60℃で3時間攪拌した。反応液に酢酸エチル（500 mL）と水（500 mL）を加えて攪拌し、ろ過した。ろ液に酢酸エチル（500 mL）を加えて有機層を分離し、28%アンモニウム水溶液、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後ろ過して溶媒を減圧留去し、残渣をアセトニトリル（125 mL）－水（125 mL）から再結晶することで化合物**50**を淡灰色固体として得た（20.2 g, 90%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.35 (bs, 1H), 8.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.64 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.31 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.49 (s, 6H),1.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)；^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 167.0, 157.0, 156.1, 147.8, 146.7, 142.4, 133.1, 120.8, 108.3, 108.2, 107.4, 105.6, 100.9, 97.1, 77.0, 61.0, 45.8, 44.7, 32.0, 14.3; MS (ESI+) 382.1 $(M+H)^+$

5-(3-Acetamido-3-methylbut-1-yn-1-yl)-2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino) nicotinic acid (51)

化合物**50**（20.2 g）のクロロホルム（190 mL）及びトリエチルアミン（29.5 mL）溶液を0℃に冷却し、塩化アセチル（4.9 mL, 68.7 mmol）を15分かけてゆっくりと加えた。反応液を0℃で15分、室温で2時間攪拌し、溶媒を減圧留去した。残渣に酢酸エチル（600 mL）と水（300 mL）を加えて分液し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、半飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、半飽和食塩水で順次洗浄した。溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水してろ過後、減圧濃縮し、残渣にTHF（100 mL）を加えてさらに減圧濃縮することで赤色油状物質（23.84 g）を得た。油状物質をメタノール（106 mL）とTHF（106 mL）に溶かし、1 M水酸化ナトリウム水溶液（106 mL）を加えた。反応液を50℃で1時間攪拌し、0℃に冷却した後1 M塩酸（106 mL）をゆっくり加えて中和した。有機溶媒を減圧留去し、酢酸エチル（660 mL）で抽出して有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水してろ過した。溶媒を減圧留去した残渣をアセトニトリル（210 mL）に懸濁し80℃に加熱して1時間攪拌した。懸濁液を攪拌しながら0℃まで冷却し、0℃でさらに1時間攪拌した。固体をろ取し、氷冷したアセトニトリルで洗浄し、減圧下乾燥させることで化合物**51**を淡黄色固体として得た（19.87 g, 95%）。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.52 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 6.90 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.4 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 4.59 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.56 (s, 6H)；^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 169.5, 168.1, 156.7, 155.0, 147.3, 146.1, 142.3, 133.4, 120.5, 108.1,

108.0, 106.6, 106.0, 100.8, 94.3, 76.5, 46.7, 43.6, 29.0, 23.3; MS (ESI+) 396.1 $(M+H)^+$

5-(3-Acetamido-3-methylbut-1-yn-1-yl)-2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-*N*-(3-chloro-4-methoxybenzyl)nicotinamide (38)

化合物**51**（12.7 g, 32.1 mmol）と3-クロロ-4-メトキシベンジルアミン塩酸塩（8.02 g, 38.5 mmol）のDMF（127 mL）溶液に0℃でジイソプロピルエチルアミン（16.8 mL）とBOP試薬（15.63 g, 35.3 mmol）を加えて0℃で2時間攪拌した。反応液を酢酸エチル（900 mL）と*n*-ヘキサン（450 mL）で希釈し、有機層を水（600 mL）、半飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（300 mL）、水（600 mL）、飽和食塩水（600 mL）で順次洗浄した。溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過して溶媒を減圧留去した後、残渣にアセトニトリル（88 mL）を加えて加熱した。懸濁液に水（88 mL）を加え、80℃で1時間攪拌した後、攪拌したままゆっくりと0℃まで冷却した。固体をろ取し、氷冷したアセトニトリル：水 ＝1:1溶液で洗浄して、減圧下乾燥させることで化合物**38**を淡黄色固体として得た（16 g, 91%）

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.60 (bs, 1H), 8.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.53 (bs, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.65 (bs, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.69 (s, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 169.7, 167.6, 156.5, 154.8, 154.5, 147.7, 146.6, 137.8, 133.2, 131.3, 129.9, 127.4, 122.6, 120.8, 112.2, 109.1, 108.3, 108.2, 106.2, 100.9, 93.0, 78.2, 56.2, 48.2, 44.7, 42.8, 29.4, 24.2; MS (ESI+) 549.1 $(M+H)^+$; HRMS (FAB) Calc.d for $C_{20}H_{30}ClN_4O_5^+$: 549.1905; Found: 549.1935; HPLC purity 97.2 % (5.84 min).

4-Bromo-2-(difluoromethyl)-1-methylbenzene (53)

氷冷した5-ブロモ-2-メチルベンズアルデヒド**52**（3.0 g, 15.1 mmol）のジクロロメタン（60 mL）溶液にDAST（6 mL, 45.4 mmol）をゆっくり加え、反応液を0℃で1時間、室温で2時間攪拌した。反応液をジクロロメタン（60 mL）で希釈し、0℃に冷却した後、水（30 mL）を加えた。有機層を分離して飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ろ過後溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン= 0:100⇒4:96）で精製することで化合物**53**を無色油状物質として得た（2.62 g, 79%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.64 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 0.8, 8.0 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.70 (t, *J* = 55.0 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H) ; MS (ESI+): compound did not ionize under the condition.

3-(Difluoromethyl)-4-methylbenzonitrile (54)

化合物**53**（ 2.62 g, 11.85 mmol）、シアン化銅（2.12 g, 23.7 mmol）のピリジン

（1.3 mL）、DMF（1.3 mL）懸濁液をマイクロウェーブ照射条件下で190℃1.5時間攪拌した。反応液を0℃に冷却し、不溶物を濾別し、酢酸エチル（200 mL）で洗浄した。ろ液を*n*-ヘキサン（65 mL）で希釈し、水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=0:100⇒27:73）で精製することで化合物**54**を白色固体として得た（1.73 g, 87%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.81 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.76 (t, *J* = 55.0 Hz, 1H), 2.51 (s, 3H) ; MS (ESI+) 186.1 $(M+H_2O+H)^+$

(3-(Difluoromethyl)-4-methylphenyl)methanamine (55)

化合物**54**（1.92 g, 11.52 mmol）、5%パラジウム炭素（386 mg）、4 M塩酸のジオキサン溶液（7.7 mL）、メタノール（77 mL）の混合物を水素雰囲気下、室温で6時間攪拌した。反応液をろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣をジエチルエーテル（26 mL）に懸濁し、室温で一晩攪拌した。固体をろ取し、ジエチルエーテルで洗浄した後減圧下乾燥させることで化合物**55**を白色固体として得た（2.33 g, 97%）。

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.63 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 55.0 Hz, 1H), 4.13 (s, 2H), 2.50 (s, 3H); MS (ESI+) 172.1 $(M+H)^+$

Ethyl 2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-5-bromonicotinate (57)

5-ブロモ-2-クロロニコチン酸エチル**56**（27 g, 102 mmol）と3,4-メチレンジオキシベンジルアミン（30.9 g, 204 mmol）の混合物を110℃で15分攪拌した。反応が進行するにつれ、淡茶色の反応液が黒色固体へと変化した。黒色固体を乳鉢ですり潰し、酢酸エチル（500 mL）に懸濁させた。懸濁液を30分攪拌し、不溶物を濾去した。ろ液を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過して溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン）にて精製することで化合物**57**を白色固体として得た（17.34 g, 45%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.30 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.24 (bs, 1H), 8.21 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.61 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.32 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 381.0 $(M+H)^+$

Ethyl 2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-5-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yn-1-yl)nicotinate (58)

化合物**57**（18.2 g, 48 mmol）、3-メチル-1-ブチン-3-オール（12.11 g, 144 mmol）のトリエチルアミン（182 mL）溶液に$PdCl_2(PPh_3)_2$（1.68 g, 2.4 mmol）とヨウ化銅(I)（0.914 g, 4.8 mmol）を加えてアルゴン雰囲気下2時間加熱還流した。反応液を冷却し、減圧下濃縮した。濃縮液を40℃で酢酸エチル（364 mL）に懸濁し、セライトろ過した後、ろ液を飽和塩化アンモニウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄した。

無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過した後溶媒を減圧留去し、残渣をアセトニトリル（91 mL）－水（46 mL）から再結晶することで化合物**58**を白色固体として得た（15.56 g, 85%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.40 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.64 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.31 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.01 (s, 1H), 1.62 (s, 6H), 1.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 166.9, 157.2, 156.2, 147.8, 146.8, 142.6, 133.0, 120.8, 108.3, 108.3, 106.8, 105.7, 100.9, 94.1, 79.2, 65.7, 61.1, 44.7, 31.6, 14.2; MS (ESI+) 383.1 $(M+H)^+$

2-((Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-5-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yn-1-yl)nicotinic acid (59)

化合物**58**（15.54 g, 40.6 mmol）のメタノール（22.4mL）溶液に1 M水酸化ナトリウム水溶液（81 mL）を加えて60℃で2時間攪拌した。有機溶媒を減圧留去した後、1 M塩酸水溶液（81 mL）で中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後溶媒を減圧留去した。残渣をアセトニトリルから再結晶することで化合物**59**を淡黄色固体として得た（12.7 g, 88%）。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 13.4 (bs, 1H), 8.62 (bs, 1H), 8.26 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 4.58 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H); MS (ESI+) 355.1 $(M+H)^+$

3-(Difluoromethyl)-4-methylbenzyl 2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-5-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yn-1-yl)nicotinate (39)

化合物**59**（12.65 g, 35.7 mmol）、化合物**55**（8.9 g, 42.8 mmol）とジイソプロピルエチルアミン（18.7 mL, 107 mmol）のDMF（126 mL）溶液に0℃でBOP試薬（17.37 g, 39.3 mmol）を10分間かけて加え、反応液を0℃で1時間、室温で1時間攪拌した。反応液を酢酸エチル：*n*-ヘキサン=2:1溶液で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄した。溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を減圧留去した。残渣をアセトニトリル（65 mL）から再結晶することで化合物**39**を白色固体として得た（16.08 g, 89%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.60 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.32 (dd, *J* = 3.2, 8.0 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 0.8, 8.0 Hz, 1H), 6.76 (t, *J* = 55.4 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.31 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.61 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.55 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.56 (s, 3H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 167.4, 156.6, 154.8, 147.8, 146.7, 137.7, 135.9 (t, $^3J_{C\text{-}F}$ = 4.4 Hz), 135.7, 133.1, 132.8 (t, $^2J_{C\text{-}F}$ = 20.8 Hz), 131.7, 130.1, 125.3 (t, $^3J_{C\text{-}F}$ = 7.4 Hz), 120.9, 114.1(t, $^1J_{C\text{-}F}$ = 238 Hz), 108.9, 108.4, 108.2, 106.1, 100.9, 94.4, 79.2, 65.7, 44.8, 43.4, 31.5, 18.2; MS (ESI+) 508.1 $(M+H)^+$; HRMS (FAB) Calc.d for $C_{28}H_{28}F_2N_3O_4^+$: 508.2048; Found: 508.2013; HPLC purity 99.6 % (6.30 min).

5-(8-Acetyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-en-3-yl)-2-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)-*N*-(2-phenoxyethyl)nicotinamide (34)

化合物**13**と同様の合成方法で、2-フェノキシエチルアミンを用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.34 (m, 1H), 8.24 (d, *J* = 2.4 Hz, 0.55H), 8.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 0.45H), 7.58 (d, *J* = 2.4 Hz, 0.45H), 7.51 (d, J = 2.4 Hz, 0.55H), 7.28-7.35 (m, 2H), 7.11 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.95-7.00 (m, 1H), 6.92 (dd, J = 1.2, 8.8 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.74 (t, *J* = 6.0 Hz, 0.45H), 6.64 (t, *J* = 6.0 Hz, 0.55H), 6.22 (dd, *J* = 1.2, 5.6 Hz, 1H), 4.94 (t, *J* = 4.8 Hz, 0.45H), 4.87 (t, *J* = 4.8 Hz, 0.55H), 4.64 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.54 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.33-4.37 (m, 1H), 4.14 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.81 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.16 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.11 (dd, *J* = 4.0, 17.2 Hz, 0.55H), 2.86 (dd, *J* = 4.0, 16.8 Hz, 0.45H), 2.25-2.37 (m, 1H), 2.11-2.19 (m, 2H), 2.10 (s, 1.35H), 2.07 (s, 1.65H), 1.89-1.97 (m, 1H), 1.70-1.85 (m, 1H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 168.4, 167.1 [166.2], 160.4, 158.5, 157.0 [157.1], 148.6 [148.3], 140, 132.1 [130.1], 131.5 [131.9], 129.6 [129.6], 125.6, 124.7, 124.6 [126.3], 122.6 [122.5], 121.3 [121.3], 119.6, 114.6, 109.4 [109.7], 108.6, 71.3, 66.6 [66.6], 55.0 [50.8], 49.9 [53.6], 44.9, 39.5, 36.0 [37.4], 35.3 [33.9], 29.5, 28.7 [30.6], 21.7 [20.8], the minor counterparts of doubled signals due to rotamers are in the brackets; MS (ESI+) 539.2 $(M+H)^+$; HPLC purity 92.2 % (4.87 min).

5-(8-Acetyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-en-3-yl)-2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-*N*-(2-phenoxyethyl)nicotinamide (35)

化合物**13**と同様の合成方法で、2-フェノキシエチルアミン、3,4-メチレンジオキシベンジルアミンを用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.33 (m, 1H), 8.24 (s, 0.55H), 8.17 (s, 0.45H), 7.61 (s, 0.45H), 7.53 (s, 0.55H), 7.26-7.32 (m, 2H), 6.95-7.00 (m, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.85 (s, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.72-6.82 (m, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.22 (bs, 1H), 5.91 (s, 2H), 4.92 (t, *J* = 4.8 Hz, 0.45H), 4.85 (t, *J* = 4.8 Hz, 0.55H), 4.60 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.33-4.37 (m, 1H), 4.09-4.16 (m, 2H), 3.75-3.83 (m, 2H), 3.06 (d, *J* = 16.0 Hz, 0.55H), 2.88 (d, *J* = 16.0 Hz, 0.45H), 2.25-2.37 (m, 1H), 2.08-2.19 (m, 2H), 2.09 (s, 1.35H), 2.06 (s, 1.65H), 1.89-1.97 (m, 1H), 1.70-1.85 (m, 1H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 169.4, 167.1 [166.2], 158.5, 157.0 [156.9], 148.5 [148.2], 147.7, 146.6, 133.5, 131.7 [132.1], 129.6 [129.6], 129.6 [130.9], 124.6 [126.3], 122.7 [122.5], 121.3 [121.3], 120.7, 114.6, 109.4 [109.7], 108.3, 108.2, 100.9, 66.6 [66.6], 55.0 [50.8], 49.9 [53.6], 44.8, 39.5, 35.9 [37.4], 35.3 [33.8], 28.7 [30.5], 21.7 [20.8], the minor counterparts of doubled signals due to rotamers are in the brackets; MS (ESI+) 541.2 $(M+H)^+$; HPLC purity 99.1 % (4.85 min).

5-(8-Acetyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-en-3-yl)-*N*-(3-chloro-4-methoxybenzyl)-2-(((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methyl)amino)nicotinamide (36)

化合物**13**と同様の合成方法で、3-クロロ-4-メトキシベンジルアミンを用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.33 (q, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 0.55H), 8.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 0.45H), 7.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 0.45H), 7.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 0.55H), 7.34 (s, 1H), 7.20 (dt, *J* = 2.0, 8.8 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.86 (t, *J* = 5.4 Hz, 0.45H), 6.82 (dd, *J* = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.68 (t, *J* = 5.4 Hz, 0.55H), 6.20 (dd, *J* = 5.2, 12.0 Hz, 1H), 4.86 (t, *J* = 5.6 Hz, 0.45H), 4.80 (t, *J* = 5.2 Hz, 0.55H), 4.64 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H),

4.53 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.47 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.25-4.35 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.16 (t, *J* = 8.8Hz, 2H), 3.03 (d, *J* = 16.0 Hz, 0.55H), 2.85 (d, *J* = 16.0 Hz, 0.45H), 2.25-2.37 (m, 1H), 2.09-2.16 (m, 1H), 2.02-2.09 (m, 1H), 2.06 (s, 1.35H), 2.03 (s, 1.65H), 1.89-1.97 (m, 1H), 1.70-1.85 (m, 1H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 167.9, 167.1 [166.3], 160.4, 154.6, 139.9 (br), 132.1 (br), 131.8 [132.5], 131.2, 129.9 [129.9], 127.4 [127.4], 125.6, 124.7, 124.7 [126.5], 122.8, 122.6 [122.4], 119.6, 112.4, 108.6, 71.3, 56.2, 55.0 [50.8], 50.0 [53.6], 44.9, 42.9, 36.0 [37.4], 35.3 [33.8], 29.5, 28.7 [30.5], 21.6 [20.8], the minor counterparts of doubled signals due to rotamers are in the brackets (3 signals corresponding to pyridine ring were not observed due to line broadening most possibly caused by amide rotation), MS (ESI+) 573.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 92.8 % (5.03 min).

5-(8-Acetyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-en-3-yl)-2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)amino)-*N*-(3-chloro-4-methoxybenzyl)nicotinamide (37)

化合物**13**と同様の合成方法で、3-クロロ-4-メトキシベンジルアミン、3,4-メチレンジオキシベンジルアミンを用いて合成した。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.46 (q, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 2.4 Hz, 0.55H), 8.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 0.45H), 7.65 (d, *J* = 2.4 Hz, 0.45H), 7.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 0.55H), 7.35 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.20 (dt, *J* = 2.0, 8.8 Hz, 1H), 7.15 (m, 0.45H), 6.95 (m, 0.55H), 6.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.21 (d, *J* = 5.2 Hz, 0.55H), 6.17 (d, *J* = 5.2 Hz, 0.45H), 5.91 (s, 2H), 4.82 (t, *J* = 5.2 Hz, 0.45H), 4.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 0.55H), 4.60 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.70 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.29-4.36 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.99 (d, *J* = 16.8 Hz, 0.55H), 2.85 (d, *J* = 16.8 Hz, 0.45H), 2.07-2.35 (m, 2H), 2.02-2.07 (m, 1H), 2.04 (s, 1.35H), 2.02 (s, 1.65H), 1.65-1.92 (m, 2H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 168.0, 167.1 [166.3], 156.9 (br), 154.6, 148.5 (br), 147.8, 146.6, 133.4, 132.0 [130.1], 131.8 [132.6] (br), 131.2, 129.9 [129.9], 127.4 [127.4], 124.8 [126.5] (br), 122.7 [122.4], 122.7, 120.7 [120.8], 112.3, 109.3 (br), 108.3, 108.2, 100.8, 56.2, 55.0 [50.9], 50.0 [53.6], 44.8, 42.9, 36.0 [37.3], 35.3 [33.8], 28.7 [30.5], 21.6 [20.8], the minor counterparts of doubled signals due to rotamers are in the brackets; MS (ESI+) 575.2 $(M+H)^+$; HPLC purity 97.4 % (4.97 min).

Ethyl 2-chloro-5-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yn-1-yl)nicotinate (60)

化合物**48**（2.0 g, 6.42 mmol）のトリエチルアミン（20 mL）溶液に3-メチル-1-ブチン-3-オール（0.65 g, 7.7 mmol）、$PdCl_2(PPh_3)_2$（0.135 g, 0.19 mmol）とヨウ化銅(I)（0.037 g, 0.19 mmol）を順次加えて反応液をアルゴン雰囲気下、60℃で6時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液を濃縮してシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:4）で精製することで化合物**60**を淡黄色油状物質として得た（1.1 g, 64%）.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.50 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* =2.4 Hz, 1H), 4.43 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 1.63 (s, 6H), 1.42 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 268.0 $(M+H)^+$; HPLC purity >99 % (4.05 min).

2-Chloro-5-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yn-1-yl)nicotinic acid (61)

化合物**60**（1.22 g, 4.56 mmol）と1 M水酸化ナトリウム水溶液（9.11 mL）をメタノール（12 mL）中で50℃1時間攪拌した。反応液を室温に冷却し、有機溶媒を減圧

留去した後、1N塩酸水溶液で中和して酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過、濃縮することで化合物**61**を淡黄色固体として得た（1.1 g, 100%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.49 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.21 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 1.56 (s, 6H); MS (ESI+) 240.0 $(M+H)^+$; HPLC purity 95.6 % (3.19 min)

2-Chloro-*N*-(3-(difluoromethyl)-4-methylbenzyl)-5-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yn-1-yl)nicotinamide (62)

化合物**61**（800 mg, 3.34 mmol）、3-ジフルオロメチル-4-メチルベンジルアミン（762 mg, 3.67 mmol）、ジイソプロピルエチルアミン（1.75 mL）のDMF（16 mL）溶液にBOP試薬（1.62 g, 3.67 mmol）を0℃で加え、反応液を0℃で2時間攪拌した。反応液を酢酸エチル（100 mL）、*n*-ヘキサン（50 mL）で希釈し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:4）で精製し、化合物**62**を白色固体として得た（1.27 g, 97%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.45 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.21 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.50 (s,1H), 7.37 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.21 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 6.75 (t, *J*=55.4 Hz, 1H), 6.72 (br.s, 1H), 4.66 (d, *J*=6.0 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.05 (s, 1H), 1.62 (s, 6H,); MS (ESI+) 393.0 $(M+H)^+$; HPLC purity 92.9 % (4.35 min,).

***N*-(3-(Difluoromethyl)-4-methylbenzyl)-5-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yn-1-yl)-2-((imidazo[1,2-b]pyridazin-2-ylmethyl)amino)nicotinamide (43)**

化合物**62**（50 mg, 0.127 mmol）、イミダゾ[1,2-b]ピリダジン-2-イルメタンアミン（28 mg, 0.191 mmol）とトリエチルアミン（0.177 mL, 1.27 mmol）のエタノール（0.4 mL）溶液を封管中100℃で96時間攪拌した。室温に冷却後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノール：クロロホルム=3:97）で精製し化合物**43**を淡黄色固体として得た（55.1 mg, 86%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.22 (t, *J*=5.2 Hz, 1H), 8.28 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J*=4.4, 1.6 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.85 (dd, *J*=8.8, 1.6 Hz, 1H), 7.61 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.33 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.22 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J*=9.2, 4.4 Hz, 1H), 6.60 (t, *J*=55.2 Hz, 1H), 6.51 (br.s, 1H), 4.92 (d, *J*=5.2 Hz, 2H), 4.56 (d, *J*=5.6 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.21 (s, 1H), 1.60 (s, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 167.3, 156.6, 154.7, 145.4, 142.7, 138.8, 137.8, 135.8 (t, J = 4.2 Hz), 135.8, 132.7 (t, J = 20.9 Hz), 131.7 (t, *J* = 2.1 Hz), 130.1 (t, *J* = 7.4 Hz), 125.4, 125.0, 116.6, 114.3 (t, *J* = 238 Hz), 114.2, 109.3, 106.4, 94.5, 79.1, 65.6, 43.4, 39.8, 31.5, 18.2; MS (ESI+) 505.1 $(M+H)^+$; HRMS (FAB) 505.2141 (Calcd for $C_{27}H_{27}F_2N_6O_2^+$: 505.2164). HPLC purity 99.7 % (4.55 min).

***N*-(3-(Difluoromethyl)-4-methylbenzyl)-2-(((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)methyl)amino)-5-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yn-1-yl)nicotinamide (41)**

化合物**62**（50 mg, 0.127 mmol）、（2,3-ジヒドロベンゾ[b]-1,4-ジオキシン-6-イル）

メタンアミン（40 mg, 0.242 mmol）とジイソプロピルエチルアミン（0.1 mL, 0.127 mmol）のエタノール（0.6 mL）溶液をマイクロウェーブ照射下で160℃1時間攪拌した。反応液を冷却し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:3）で生成することで化合物**41**を白色固体として得た（20 mg, 30%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.60 (br.s, 1H), 8.28 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.45 (br.s, 1H), 7.34 (d, *J*=8.8, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.23 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 6.87 (d, *J*=1.2 Hz, 1H), 6.82 (d, *J*=1.2 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.61 (t, *J*=55.2 Hz, 1H), 6.27 (br.s, 1H), 4.60 (d, *J*=5.2 Hz, 2H), 4.56 (d, *J*=5.6 Hz, 2H), 4.24 (s, 4H), 2.43 (s, 3H), 1.94 (s, 1H), 1.59 (s, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 167.3, 156.7, 154.9, 143.5, 142.7, 137.6, 135.9 (t, *J* = 4.3 Hz), 135.7, 132.8 (t, *J* = 20.9 Hz), 132.5, 131.7, 130.1 (t, *J* = 2.1 Hz), 125.4 (t, *J* = 7.4 Hz), 120.7, 117.3, 116.6, 114.1 (t, *J* = 238 Hz), 108.9, 106.0, 94.3, 79.2, 65.7, 64.4, 64.3, 44.4, 43.5, 31.6, 18.2; MS (ESI+) 522.1 $(M+H)^+$; HRMS(FAB) 522.2230 (Calcd for $C_{29}H_{30}F_2N_3O_4^+$: 522.2204). HPLC purity 95.1 % (6.14 min).

2-Chloro-N-(3-(difluoromethyl)-4-methylbenzyl)-5-iodonicotinamide (63)

2-クロロ-5-ヨードニコチン酸**47**（1 g, 3.38 mmol）、3-ジフルオロメチル-4-メチルベンジルアミン（876 mg, 4.22 mmol）、ジイソプロピルエチルアミン（1.8 mL）のDMF（10 mL）溶液に0℃でBOP試薬（1.65 g, 3.73 mmol）を加え、0℃で2時間、室温で1時間攪拌した。反応液を酢酸エチル（100 mL）と*n*-ヘキサン（50 mL）で希釈し、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧除去後、残渣に2-プロパノール（15 mL）を加え、懸濁液を室温で1時間攪拌した。不溶物をろ過にて回収することで化合物**63**（1.11 g, 76%）を淡黄色固体として得た。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) = 9.17 (t, *J*=6.0 Hz,1H), 8.73 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.29 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.52 (br. S, 1H), 7.41 (br. d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.15 (t, *J*=55.0 Hz, 1H), 7.29 (br. d, *J*=7.7 Hz, 1H), 4.46 (d, *J*=6.0 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H); MS (ESI+) 436.9 $(M+H)^+$; HPLC purity 94.8 % (4.37 min)

2-Chloro-*N*-(3-(difluoromethyl)-4-methylbenzyl)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinamide (64)

化合物**63**（584 mg, 1.34 mmol）のトリエチルアミン（6 mL）溶液に、*N*-(2-メチルブチン-2-イル)メタンスルホンアミド（237 mg, 1.47 mmol）、$PdCl_2(PPh_3)_4$（29 mg, 0.041 mmol）、ヨウ化銅(I)（8 mg, 0.042 mmol）を加えて、アルゴン雰囲気下60℃で2.5時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、酢酸エチル（50 mL）と*n*-ヘキサン（25 mL）で希釈した後、水、飽和アンモニア水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過して溶媒を減圧留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノール：クロロホルム=3:97⇒10:90）で精製することで化合物**64**を淡黄色アモルファスとして得た（629 mg, 100%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.47 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.13 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.51 (br. S, 1H), 7.38 (br. d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.24 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 6.76 (t, *J*=57.5 Hz, 2H), 6.74 (br. t, *J*=4.5 Hz, 1H), 4.67 (d, *J*=5.8 Hz, 2H), 4.52 (s, 1H), 3.13 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.73 (s, 6H); MS (ESI+) 470.0 $(M+H)^+$; HPLC purity 98.7 % (4.14 min)

2-(((2,2-Difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl)amino)-*N*-(3-(difluoromethyl)-4-methylbenzyl)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinamide (40)

化合物**64**（60 mg, 0.131 mmol）、(2,2-ジフルオロベンゾ[d][1,3]ベンゾジオキソ-5-イル)メチルアミン（59 mg, 0.264 mmol）とトリエチルアミン（0.2 mL, 1.44 mmol）の*N*-メチルピロリドン（0.4 mL）溶液をマイクロウェーブ照射下、150℃で3時間攪拌した。反応液を酢酸エチル（20 mL）と*n*-ヘキサン（10 mL）で希釈し、水と飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥して溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=36:64⇒57:43）で精製することで化合物**40**を白色固体として得た（23 mg, 29%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.91 (br.s, 1H), 8.27 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.63 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.47 (s,1H), 7.34 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.05 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.99 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 6.62 (t, *J*=54.4 Hz, 1H), 6.41 (br.s, 1H), 4.70 (d, *J*=5.6 Hz, 2H), 4.57 (d, *J*=5.6 Hz, 2H), 4.42 (s, 1H), 3.13 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.69 (s, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ: 167.2, 156.8, 154.6, 143.9, 142.8, 138.0, 135.8, 135.8 (t, *J* = 4.4 Hz), 135.7, 132.7 (t, *J* = 20.5 Hz), 131.6 (t, *J* = 255 Hz), 131.6, 130.1 (t, *J* = 2.1 Hz), 125.2 (t, *J* = 7.4 Hz), 122.6, 114.1 (t, *J* = 238 Hz), 109.2, 109.1, 109.0, 105.9, 91.7, 80.6, 50.8, 44.4, 43.4, 43.0, 31.2, 18.1; MS (ESI+) 621.1 $(M+H)^+$; HRMS(FAB) 621.1776 (Calcd for $C_{29}H_{29}F_4N_4O_5S^+$: 621.1795); HPLC purity 98.1 % (7.57 min).

***N*-(3-(Difluoromethyl)-4-methylbenzyl)-2-(((4-methoxypyridin-2-yl)methyl)amino)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinamide (44)**

化合物**64**（60 mg, 0.131 mmol）、2-アミノメチル-4-メトキシピリジン（45 mg, 0.316 mmol）、トリエチルアミン（0.2 mL, 1.44 mmol）の*N*-メチルピロリドン（0.4 mL）溶液をマイクロウェーブ照射下、150℃で3時間攪拌した。反応液を酢酸エチル（20 mL）と*n*-ヘキサン（10 mL）で希釈し、水と飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで脱水した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（N-Hシリカ、メタノール：クロロホルム=0:100⇒4:96、次いで、酢酸エチル：*n*-ヘキサン：メタノール=10:10:1）で精製し、化合物**44**を淡黄色アモルファスとして得た（50.5 mg, 69%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 9.02 (t, *J*=5.2 Hz, 1H), 8.40 (d, *J*=5.2 Hz, 1H), 8.25 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.63 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.36 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.23 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 6.75 (t, *J*=55.2 Hz), 6.70 (1H, dd, *J*=5.6, 2.4 Hz), 6.56 (1H, br.s), 4.80 (1H, d, *J*=5.2 Hz, 1H), 4.61 (d, *J*=5.6 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.68 (s, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ = 167.2, 166.3, 160.0, 156.8, 154.6, 150.5, 137.9, 135.9, 135.8 (t, *J* = 4.4 Hz), 132.7 (t, *J* = 20.7 Hz), 131.6, 130.2 (t, *J* = 2.2 Hz), 125.4 (t, *J* = 7.4 Hz), 114.2 (t, *J* = 238 Hz), 109.7, 108.2, 107.5, 105.6, 91.5, 80.8, 55.1, 50.8, 46.6, 43.4, 42.9, 31.3, 18.2; MS (ESI+) 572.1 $(M+H)^+$; HRMS(FAB) 572.2131 (Calcd for $C_{28}H_{32}F_2N_5O_4S^+$: 572.2143). HPLC purity 98.6 % (4.72 min).

2-(1,3-Dioxolan-2-yl)-3-methylpyridine (66)

3-メチルピコリンアルデヒド**65**（2.0 g, 16.5 mmol）、エチレングリコール（10 mL）、

p-トルエンスルホン酸1水和物（50 mg）のトルエン（15 mL）溶液をDean-Stark装置を用いて一晩加熱還流した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル）で精製することで化合物**66**を無色オイルとして得た（2.63 g, 97%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.46 (dd, *J*=4.6, 1.0 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J*=8.0, 0.8 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J*=8.0, 4.6 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.23-4.27 (m, 2H), 4.06-4.10 (m, 2H), 2.44 (s, 3H); MS (ESI+) 166.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 98.3 % (1.98 min,)

2-(1,3-Dioxolan-2-yl)-3-methylpyridine 1-oxide (67)

化合物**66**（2.63 g, 15.9 mmol）のクロロホルム溶液に0℃で*m*-CPBA（4.19 g, 16.5 mmol）を加え、反応液を室温で3時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル）で精製することで化合物**67**を白色固体として得た（1.86 g, 65%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.10 (d, *J*=6.4 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J*=8.0, 6.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.17-4.21 (m, 2H), 4.05-4.09 (m, 2H), 2.45 (s, 3H). MS (ESI+) 182.0 $(M+H)^+$; HPLC purity 97.2 % (2.47 min).

6-(1,3-Dioxolan-2-yl)-5-methylpicolinonitrile (68)

化合物**67**（1.86 g, 10.3 mmol）のジクロロメタン溶液にトリメチルシリルシアニド（1.76 mL, 13.1 mmol）と*N,N*-ジメチルカルバモイルクロリド（1.1 g, 10.3 mmol）を加えて室温で48時間加えた。反応が完結していなかったため、トリメチルシリルシアニド（1.76 mL, 13.1 mmol）と*N,N*-ジメチルカルバモイルクロリド（1.1 g, 10.3 mmol）をさらに加え、8時間攪拌した。再びトリメチルシリルシアニド（1.76 mL, 13.1 mmol）と*N,N*-ジメチルカルバモイルクロリド（1.1 g, 10.3 mmol）を加えて一晩攪拌することで原料の消失が見られたため、反応液をクロロホルムで希釈し水、飽和食塩水で洗浄した。溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過、濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:2）で精製し、副生成物である2-シアノ-3-メチルピリジンを除くためにさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム）で精製することで化合物**68**を白色固体として得た（543 mg, 28%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.63 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J*=8.0, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.22-4.26 (m, 2H), 4.07-4.11 (m, 2H), 2.52 (s, 3H). MS (ESI+) 191.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 98.0 % (3.40 min).

6-Formyl-5-methylpicolinonitrile (69)

化合物**68**（2.7 g, 14.2 mmol）と2 M塩酸水溶液（40 mL）を1,4-ジオキサン（40 mL）中で60℃6時間攪拌した。有機溶媒を減圧留去し、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液でアルカリ性とした後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥して溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマト

グラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:2）で精製することで化合物**69**を白色固体として得た（1.6 g, 77%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 10.14 (s, 1H), 7.79 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.75 (d, *J*=8.0, 1H), 2.75 (s, 3H); MS (ESI+) 147.1 $(M+H)^+$; HPLC purity could not be determined due to peak broadening probably caused by hydration of aldehyde.

6-(Difluoromethyl)-5-methylpicolinonitrile (70)

化合物**69**（173 mg, 1.18 mmol）のジクロロメタン溶液に0℃でDeoxofluor（0.87 mL, 4.7 mmol）を加えた。反応液を0℃から室温に昇温し、一晩攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。有機層を分離して溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:2）で精製することで化合物**70**を白色固体として得た（146 mg, 73%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.75 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.69 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.67 (t, *J*=54 Hz, 1H), 2.61 (s, 3H); MS (ESI+) 169.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 97.0 % (3.89 min).

(6-(Difluoromethyl)-5-methylpyridin-2-yl)methanamine hydrochloride (71)

化合物**70**（1.42 g, 8.45 mmol）、5%パラジウム炭素（1.6 g）、4 M塩酸1,4-ジオキサン溶液（7 mL）とメタノール（50 mL）の混合物を水素雰囲気下3時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した後、残渣を酢酸エチル（10 mL）中で懸濁、攪拌した。不溶物をろ取して乾燥させることで化合物**71**を白色固体として得た（1.85 g, 89%）。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.50 (br.s, 2H), 7.88 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.62 (d, *J*=8.0, 1H), 7.02 (t, *J*=54 Hz, 1H), 4.15-4.20 (m, 2H), 2.46 (s, 3H); MS (ESI+) 173.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 94.3 % (2.57 min)

Ethyl 2-chloro-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinate (72)

化合物**48**（3.25 g, 10.4 mmol）と*N*-(2-メチルブチン-2-イル)メタンスルホンアミド（2.52 g, 15.6 mmol）のトリエチルアミン（30 mL）溶液に$PdCl_2(PPh_3)_2$（0.22 g, 0.31 mmol）とヨウ化銅(I)（0.12 g, 0.63 mmol）を加えて、反応混合物をアルゴン雰囲気下60℃で10時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液を濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:4）で精製することで化合物**72**を淡黄色固体として得た（2.35 g, 65%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.51 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.14 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 4.56 (br.s, 1H), 4.44 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 3.14 (s, 3H), 1.74 (s, 6H), 1.42 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 345.0 $(M+H)^+$; HPLC purity 99.0 % (4.16 min)

Ethyl 2-(((4-methoxypyridin-2-yl)methyl)amino)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinate (73)

化合物**72**（800 mg, 2.32 mmol）、2-(アミノメチル)-4-メトキシピリジン（481 mg, 3.48 mmol）、トリエチルアミン（1.5 mL）と*N*-メチルピロリドン（3 mL）の反応混合物をマイクロウェーブ照射下、150℃で3時間攪拌した。反応液を冷却後、酢酸エチルと*n*-ヘキサンの2:1混合液（150 mL）で希釈し、水、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過、エバポレーションの後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン：メタノール=49.5:49.5:1）で精製することで化合物**73**を淡黄色固体として得た（658 mg, 64%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.98 (br.s, 1H), 8.43 (d, *J*=6.0 Hz, 1H), 8.32 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.17 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 6.80 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J*=5.6, 2.4 Hz, 1H), 4.82 (d, *J*=5.2 Hz, 2H), 4.48 (br.s, 1H), 4.38 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 1.72 (s, 6H), 1.41 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 447.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 98.3 % (3.23 min)

2-(((4-Methoxypyridin-2-yl)methyl)amino)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinic acid (74)

化合物**73**（650 mg, 1.46 mmol）と1 M水酸化ナトリウム水溶液（2.91 mL）のメタノール（13 mL）溶液を50℃で2時間攪拌した。有機溶媒を減圧留去し、1 M塩酸水溶液で中和した。析出した固体をろ取し、水で洗い乾燥させることで化合物**74**を白色固体として得た（432 mg, 71%）。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 13.31 (br.s, 1H), 8.98 (br.s, 1H), 8.35 (d, *J*=5.6 Hz, 1H), 8.29 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.05 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 6.86-6.91 (m, 2H), 4.73 (d, *J*=5.2 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 1.72 (s, 6H); MS (ESI+) 419.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 97.2 % (2.93 min)

***N*-((6-(Difluoromethyl)-5-methylpyridin-2-yl)methyl)-2-(((4-methoxypyridin-2-yl)methyl)amino)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinamide (45)**

化合物**74**（30 mg, 0.072 mmol）、化合物**71**（21.2 mg, 0.086 mmol）とジイソプロピルエチルアミン（0.05 mL）のDMF（1 mL）溶液にBOP試薬（34.9 mg, 0.079 mmol）を加えて室温で2時間攪拌した。反応液に酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:2溶液（10 mL）を加え、水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノール：クロロホルム=3:97）で精製することで化合物**45**を白色固体として得た（41 mg, 100%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 9.03 (br.s, 1H), 8.40 (d, *J*=5.6 Hz, 1H), 8.27 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.78 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.61 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.52 (br.s, 1H), 7.33 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 6.73 (t, *J*=54.4 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J*=5.6, 2.4 Hz, 1H), 4.80 (d, *J*=2.0 Hz, 2H), 4.70 (d, *J*=0.8 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 1.71 (s, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ: 167.2, 166.3, 160.1, 156.8, 154.5, 152.8, 150.6, 149.3 (t, *J* = 25.3 Hz), 140.7, 138.2, 131.5, 123.7, 116.2 (t, *J* = 240 Hz), 110.0, 108.2, 107.4, 105.8, 91.6, 80.9, 55.1, 50.8, 46.6, 43.9, 42.9,

31.3, 16.8; MS (ESI+) 573.1 $(M+H)^+$; HRMS (FAB) 573.2098 (Calcd for $C_{27}H_{31}F_2N_6O_4S^+$: 573.2096); HPLC purity 95.7 % (4.27 min).

Ethyl 2-(((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)methyl)amino)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinate (73)

化合物**72**（200 mg, 0.58 mmol）、(2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-6-イル)メタンアミン（250 mg, 1.51 mmol）とジイソプロピルエチルアミン（0.2 mL）のエタノール（1.5 mL）溶液をマイクロウェーブ照射下155℃で2.5時間攪拌した。反応液を冷却後、直接シリカゲルカラム上に添加してクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:1）で精製することで化合物**73**を得た（230 mg, 84%）。

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.44 (t, *J*=5.5 Hz, 1H), 8.33 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.14 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 6.80-6.87 (m, 3H), 4.63 (d, *J*=5.6 Hz, 2H), 4.46 (br. S, 1H), 4.32 (q, J=7.2 Hz, 3H), 4.24 (s, 4H), 3.17 (s, 3H), 1.71 (s, 6H), 1.38 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); MS (ESI+) 474.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 97.1 % (4.61 min)

2-(((2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)methyl)amino)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinic acid (74)

化合物**73**（230 mg, 0.486 mmol）と4 M水酸化ナトリウム水溶液（0.5 mL）のメタノール（2.5 mL）溶液を50℃で2時間攪拌した。有機溶媒を減圧留去し、1 M塩酸水溶液でpH3とした後、酢酸エチル（0.5 mL）を加えて攪拌した。不溶物をろ取し、乾燥させることで化合物**74**を淡黄色固体として得た（175 mg, 81%）。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.61 (t, *J*=5.8 Hz, 1H), 8.30 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.03 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 6.74-6.87 (m, 3H), 4.56 (d, *J*=5.8 Hz, 2H), 4.20 (s, 4H), 3.06 (s, 3H), 1.57 (s, 6H); MS (ESI+) 446.1 $(M+H)^+$; HPLC purity 95.7 % (3.86 min).

***N*-((6-(Difluoromethyl)-5-methylpyridin-2-yl)methyl)-2-(((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)methyl)amino)-5-(3-methyl-3-(methylsulfonamido)but-1-yn-1-yl)nicotinamide hydrochloride (42)**

化合物**74**（50 mg, 0.112 mmol）、化合物**71**（33 mg, 0.135 mmol）とジイソプロピルエチルアミン（0.1 mL）、BOP試薬（70 mg, 0.158 mmol）のDMF（3 mL）溶液を室温で2時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水と飽和食塩水で洗浄した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：*n*-ヘキサン=1:1）で精製することでフリーベース（60 mg）を得た。フリーベースを酢酸エチルに溶解し、攪拌しながら4 M塩酸酢酸エチル溶液を加え、析出した固体をろ取し乾燥させることで塩酸塩**42**を淡黄色固体として得た（40 mg, 53%）。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 9.34 (t, *J*=6.0 Hz, 1H), 8.87 (br.s, 1H), 8.24 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 8.12 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.75 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.40 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.97 (t, *J*=54.4 Hz, 1H), 6.75-6.80 (m, 3H), 4.51 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.42 (s, 1H), 4.19 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 1.58 (s, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, DMSO-d_6) δ: 166.9, 155.8, 155.6, 152.8, 148.4 (t, *J* = 23.5 Hz), 143.2, 142.4, 140.6, 139.1, 132.2, 130.3, 123.0, 120.3, 116.9, 116.1, 115.3 (t, *J* =

238 Hz), 109.6, 105.3, 92.8, 79.5, 64.0, 63.9, 49.3, 44.1, 43.5, 42.2, 31.0, 16.1; MS (ESI+) 600.2 $(M+H)^+$; HRMS (FAB) 600.2075 (Calcd for $C_{29}H_{32}F_2N_5O_5S^+$: 600.2092); HPLC purity 94.1 % (4.27 min).

化合物の評価実験

放射性リガンド結合試験

ラットまたはヒトのグレリン受容体を安定発現したCHO細胞を用いて、^{125}I標識したグレリンとの競合法で化合物の結合能を測定した。3.34 μgの蛋白を含む膜画分、0.04 nMの[^{125}I]グレリンと様々な濃度の化合物を、50 mM HEPES（pH 7.5）、1 mM $CaCl_2$、5 mM $MgCl_2$、75 mM NaClと0.5% w/v BSA溶液を含む96穴プレート（0.01%ポリエチレンイミン処理済）中で30分インキュベーションした。膜画分を回収し、バキュームマニフォールドを用いて50 mM HEPES（pH 7.5）、1 mM $CaCl_2$、5 mM $MgCl_2$、75 mM NaCl水溶液で洗浄した。さらに、Microscint™-Oを添加した後、シンチレーションカウンタにて放射線量を測定した。

NFATインバースアゴニストアッセイ

HEK293細胞をコラーゲンコートした96穴プレートに15,000細胞/ウェルで播種し、10%FBSを含むRPMI1640培地中37℃で一晩インキュベーションした。培地を除去し、37℃のOpti-MEM（Life Technologies）培地を加えた。1ウェルあたり10 ngのグレリン受容体発現ベクター、100 ngのPathDetect pNFAT-Luc plasmid（Agilent Technologies）と0.3 μLのLipofectamine 2000（Life Technologies）をそれぞれOpti-MEM倍地で希釈し、5分間静置した後、混合して20分静置した。トランスフェクション混合物をプレートに添加し、37℃で5時間インキュベーションした。プラスミド入りの培地を除去し、0.1%の透析FBSを含むRPMI1640培地で任意の濃度の化合物を希釈し、プレートに添加した。一晩インキュベーションした後、Steadylite HTS™ assayを用いてLuciferase反応による発光を測定した。細胞の生存率をAlabarBlue法で測定した。

IP_3を指標としたインバースアゴニストアッセイ

グレリン受容体を安定発現させたCHO細胞を24穴プレートに70,000細胞/ウェルで播種し、10%FBSを含むF-12培地で37℃48時間インキュベーションした。培地を除去し、myo-[^{3}H]inositol（9.25 kBq/well）を含むHank's balanced salt solution（HBSS）を加え、37℃で24時間インキュベーションした。バッファーを除去し、HBSSで2回洗浄した後、20 mMのLiClと様々な濃度の試験化合物を含む溶液を添加し、37℃で60分インキュベーションした。溶液を除去し、氷冷下10%過塩素酸溶液を加え0℃で30分インキュベーションした。KOHを含むHEPESバッファーで中和し、細胞溶解液をBioRad AG 1-X8陰イオン交換樹脂カラムで精製し、イノシトールリン酸画分をクリアゾルと混合して液体シンチレーションカウンタにて放射線量を測定した。

Caを指標としたアンタゴニストアッセイ

グレリン受容体を安定発現させたCHO細胞を96穴の透明底黒色プレートに20,000細胞/ウェルで播種し、10%FBSを含むF-12培地で一晩インキュベーションした。培地を除去し、カルシウムバッファー（Hank's balanced solution with 20 mM HEPES, 2.5 mM probenecid and 1mg/mL BSA）で洗浄した。モレキュラーデバイス社のFLIPR Calsium 3 Assay KitとFLEX stationを用いてCa濃度の上昇を観測した。化合物と1nMのグレリンを添加して蛍光の上昇の阻害活性を観測し、阻害活性をIC_{50}値として算出した。

肝ミクロソーム中での代謝安定性

1 μMの化合物をヒト肝ミクロソーム（0.5 mg protein/mL）と1 mM NADPHを含む50 mMリン酸バッファー（pH 7.4）中、37℃で30分インキュベーションした。5倍量のアセトニトリルで酵素反応を終了させ、反応液を4000 rpmで5分間遠心した。上清中の化合物量をLC-MS/MSで定量し、反応速度をpmol/min/mg proteinとして算出した。また、同様のサンプルから代謝物の推定を行った。

MBI活性の評価

ヒト肝ミクロソーム（0.5 mg/mL）と10 μMの化合物を1 mMのNADPHを含む条件または含まない条件でリン酸バッファー（pH 7.4）中、37℃で30分インキュベーションした。テストステロン（CYP3A4の基質）を含むバッファー中に反応液を添加し、37度で10分インキュベーションした。アセトニトリルを加えて反応を停止した後、LC-MS/MSにてテストステロンを定量した。NADPHあり/NADPHなしのCYP3A4活性を%で算出し、MBI活性とした。NADPHなし条件でのCYP3A4活性から、CYP3A4の競合阻害が起こらないことを確認した。

薬物動態試験

非絶食下のSDラット（n=3）に化合物を10 mg/kgの経口投与または1 mg/kgの静注にて投与した。投与溶媒として、5% DMSOと10% 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを含む生理食塩水を用いた。凝固防止剤としてヘパリンを用い、静注後0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8時間後と経口投与後0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24時間後に血液を採取した。血液を遠心分離し、血漿を回収して測定まで-80度で保存した。サンプル中の化合物濃度をLC-MS/MSにて定量し、薬物動態パラメーターをノンパラメトリック解析によって算出した。消化管吸収速度の検討においては、経口投与後5分での門脈血及び静脈血を採取し、同様の方法で化合物濃度の測定を行い吸収速度を算出した。

高脂肪食誘発肥満モデルでの薬効評価

雄性SDラットを60%の脂肪を含む高脂肪食下で10週間飼育した。試験1週間前から投与溶媒を1日2回経口投与することで投与馴化を行った。この過程で異常行動を示す個体は試験から除外した。体重が平均±2SDの範囲内である個体を採用し、無作為にVehicle群、投与群、Pair-fed群に割り付けた。化合物またはVehicleを午前9時半と午後6時に0.5 %ヒドロキシプロピルセルロースに懸濁させて経口投与した。体重と摂餌量を朝の投与前に測定した。Pair-fed群には前日の化合物投与群の摂餌量の平均値の餌を与え、1日2回投与溶媒を経口投与した。

参照文献

[1] Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 402(6762), 656-660, 1999.
[2] Pomés A., Pong SS., Schaeffer JM., Solubilization and characterization of a growth hormone secretagogue receptor from porcine anterior pituitary membranes. Biochem. Biophyhs. Res. Commun. 225(3), 939-945, 1996.
[3] Kojima M., Kangawa K., Ghrelin: structure and function. Physiol. Rev. 85(2), 495-522, 2005.
[4] Levinson B., Gertner J., Randomized study of the efficacy and safety of SUN11031 (synthetic human ghrelin) in cachexia associated with chronic obstructive pulmonary disease. e-SPEN J. 7(5), e171-e175, 2012.
[5] (a) Garcia J, Boccia RV, Graham C, Kumor K, Polvino W., A phase II randomized, placebo controlled, double-blind study of the efficacy and safety of RC-1291 (RC) for the treatment of cancer cachexia. ASCO annual meeting. J Clin Oncol. 25, 9133, 2007.
(b) Lasseter KC., Shaughnessy L., Cummings D., Pezzullo JC., Wargin W., Gagnon R., Oliva J., Kosutic G., Ghrelin agonist (TZP-101): safety, pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation in healthy volunteers: a phase I, first-in-human study., J. Clin. Pharmacol. 48(2), 193-202, 2008.
[6] Zhao H., Xin Z., Patel JR., Nelson LT., Liu B., Szczepankiewicz BG., Schaefer VG., Falls HD., Kaszubska W., Collins CA., Sham HL, Liu G., Structure-activity relationship studies on tetralin carboxamide growth hormone secretagogue receptor antagonists. Bioorg. Med. Chem. Lett. 15(7), 1825-1828, 2005.
[7] Serby MD., Zhao H., Szczepankiewicz BG., Kosogof C., Xin Z., Liu B., Liu M., Nelson LT., Kaszubska W., Falls HD., Schaefer V., Bush EN., Shapiro R., Droz BA., Knourek-Segel VE., Fey TA., Brune ME., Beno DW., Turner TM., Collins CA., Jacobson PB., Sham HL., Liu G., 2,4-diaminopyrimidine derivatives as potent growth hormone secretagogue receptor antagonists. J. Med. Chem. 49(8), 2568-2578, 2006.
[8] Moulin A., Demange L., Ryan J., Mousseaux D., Sanchez P., Bergé G., Gagne D., Perrissoud D., Locatelli V., Torsello A., Galleyrand J.-C., Fehrentz J.-A., Martinez J., New trisubstituted 1,2,4-triazole derivatives as potent ghrelin receptor antagonists. 3. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. J. Med. Chem. 51(3), 689-693, 2008.
[9] Rudolph J., Esler W.P., O'Connor S., Coish P.D.G., Wickens P.L., Brands M., Bierer D.E., Bloomquist B.T., Bondar G., Chen L., Chuang C.-Y., Claus T.H., Fathi Z., Fu W., Khire U.R., Kristie J.A., Liu X.-G., Lowe D.B., McClure A.C., Michels M., Ortiz A.A., Ramsden P.D., Schoenleber R.W., Shelekhin T.E., Vakalopoulos A., Tang W., Wang L., Yi L., Gardell S.J., Livingston J.N., Sweet L.J., Bullock W.H., Quinazolinone derivatives as orally available ghrelin receptor antagonists for the treatment of diabetes and obesity. J. Med. Chem. 50(21), 5202-5216, 2007.

[10] Hanrahan P., Bell J., Bottomley G., Bradley S., Clarke P., Curtis E., Davis S., Dawson G., Horswill J., Keily J., Moore G., Rasamison C., Bloxham J., Substituted azaquinazolinones as modulators of GHSr-1a for the treatment of type II diabetes and obesity. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22(6), 2271-2278, 2012.
[11] Mihalic J.T., Kim Y.-J., Lizarzaburu M., Deignan J., Wanska M., Yu M., Fu J., Chen X., Zhang A., Connors R., Liang L., Lindstrom M., Ma J., Tang L., Dai K., Li L., Chen X., Discovery of a new class of ghrelin receptor antagonists. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22(5), 2046-2051, 2012.
[12] Puleo L., Marini P., Avallone R., Zanchet M., Bandiera S., Baroni M., Croci T., Synthesis and pharmacological evaluation of indolinone derivatives as novel ghrelin receptor antagonists. Bioorg. Med. Chem. 20(18), 5623-5636, 2012.
[13] Holst B., Cygankiewicz A., Jensen T.H., Ankersen M., Schwartz T.W., High Constitutive Signaling of the Ghrelin Receptor - Identification of a Potent Inverse Agonist. Mol. Endocrinol. 17(11), 2201-2210, 2003.
[14] Zigman JM., Nakano Y., Coppari R., Balthasar N., Marcus JN., Lee CE., Jones JE., Deysher AE., Waxman AR., White RD., Williams TD., Lachey JL., Seeley RJ., Lowell BB., Elmquist JK., Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. J. Clin. Invest. 115(12), 3564-3572, 2005.
[15] Sun Y., Butte NF., Garcia JM., Smith RG., Characterization of Adult Ghrelin and Ghrelin Receptor Knockout Mice under Positive and Negative Energy Balance. Endocrinology 149(2), 843-850, 2008.
[16] Date Y., Murakami N., Toshinai K., Matsukura S., Niijima A., Matsuo H., Kangawa K., Nakazato M., The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. Gstroenterol. 123(4), 1120-1128, 2002.
[17] Wren AM., Small CJ., Ward HL., Murphy KG., Dakin CL., Taheri S., Kennedy AR., Roberts GH., Morgan DG., Ghatei MA., Bloom SR., The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. Endocrinology 141(11), 4325-4328, 2000.
[18] Pasternak A., Goble S.D., deJesus R.K., Hreniuk D.L., Chung C.C., Tota M.R., Mazur P., Feighner S.D., Howard A.D., Mills S.G., Yang, L., Discovery and optimization of novel 4-[(aminocarbonyl)amino]-N-[4-(2-aminoethyl)phenyl]benzenesulfonamide ghrelin receptor antagonists. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19(21), 6237-6240, 2009.
[19] Richard F., Barroso S., Martinez J., Labbe-Jullie C., Kitabgi P., Agonism, Inverse Agonism, and Neutral Antagonism at the Constitutively Active Human Neurotensin Receptor 2. Mol. Pharmacol., 60(6), 1392-1398, 2001.
[20] Lipinski CA., Lombardo F., Dominy BW., Feeney PJ., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Delivery Rev. 23, 3-25, 1997.

[21] Feher M., Schmidt JM., Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 43(1), 218-227, 2003.
[22] Ritchie TJ., Macdonald SJF., The impact of aromatic ring count on compound developability – are too many aromatic rings a liability in drug design? Drug Discovery Today, 14(21-22), 1011-1020, 2009.
[23] Holst B., Frimurer TM., Mokrosinski J., Halkjaer T., Cullberg KB., Underwood CR., Schwartz TW., Overlapping Binding Site for the Endogenous Agonist, Small-Molecule Agonists, and Ago-allosteric Modulators on the Ghrelin Receptor., Mol. Pharmacol., 75, 44-59, 2009.
[24] Delgado A., Leclerc G., Lobato M., Mauleona D., Short and enantioselective syntheses of (Full-size image (R)- and (Full-size image (S)-2-hydroxymethyl-1,4-benzodioxan., Tetrahedron Lett., 29(30), 3671-3674, 1988.
[25] Mertinell PM., Navarro MI., Soler LM., Mormeneo JD., Rosol M., Llebaria SA., Aymami BJ., New compounds as hsp90 inhibitors., PCT Int. Appl. WO2009007399 A1.
[26] Ghosh S., Kinney WA., Gauthier DA., Lawson EC., Hudicky T., Maryanoff BE., Can. J. Chem., 84(4), 555-560, 2006.
[27] Halgren TA., Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94., J. Comp. Chem., 17(5-6), 490-519, 1996.
[28] Paulino G., Barbier de la Serre C., Knotts TA., Oort PJ., Newman JW., Adams SH., Raybould HE., Increased expression of receptors for orexigenic factors in nodose ganglion of diet-induced obese rats., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 296(4), E898-E903, 2009.
[29] Orr STM., Ripp SL., Ballard TE., Henderson JL., Scott DO., Obach RS., Sun H., Kalgutkar AS., Mechanism-Based Inactivation (MBI) of Cytochrome P450 Enzymes: Structure–Activity Relationships and Discovery Strategies To Mitigate Drug–Drug Interaction Risks., J. Med. Chem., 55(11), 4896-4933, 2012.
[30] Kalgutkar AS., Obach RS., Maurer TS., Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P450 Enzymes: Chemical Mechanisms, Structure-Activity Relationships and Relationship to Clinical Drug-Drug Interactions and Idiosyncratic Adverse Drug Reactions., Curr. Drug Metab., 8(5), 407-447, 2007.
[31] Williams PA., Cosme J., Vinkovic DM., Ward A., Angove HC., Day PJ., Vonrhein C., Tickle IJ., Jhoti H., Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metyrapone and Progesterone., Science, 305(5684), 683-686, 2004.
[32] Fife WK., Regioselective cyanation of pyridine 1-oxides with trimethylsilanecarbonitrile: a modified Reissert-Henze reaction, J. Org. Chem., 48(8), 1375-1377, 1983.
[33] Bhattacharya SK., Andrew K., Beveridge R., Cameron KO., Chen C., Dunn M., Fernando D., Gao H., Hepworth D., Jackson VM., Khot V., Kong J., Kosa RD., Lapham K., Loria PM., Londregan AT., McClure KF., Orr STM., Patel J., Rose C., Saenz J., Stock IA., Storer G., VanVolkenburg M., Vrieze D., Wang G., Xiao J., Zhang Y., Discovery of PF-5190457, a Potent,

Selective, and Orally Bioavailable Ghrelin Receptor Inverse Agonist Clinical Candidate., ACS Med. Chem. Lett., 5, 474-479, 2014.
[34] McCoull W., Barton P., Brown AJH., Bowker SS., Cameron J., Clarke JL., Davies RDM., Dossetter AG., Ertan A., Fenwick M., Green C., Holmes JL., Martin N., Masters D., Moore JE., Newcombe NJ., Newton C., Pointon H., Robb GR., Sheldon C., Stokes S., Morgan D., Identification, Optimization, and Pharmacology of Acylurea GHS-R1a Inverse Agonists., J. Med. Chem., 57(14), 6128-6140, 2014.
[35] Khilnani G., Khilnani AK., Inverse agonism and its therapeutic significance., Ind. J. Pharmacol., 43(5), 492-501, 2011.
[36] Leach K., Sexton PM., Christopoulos A., Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology., Trends Pharmacol. Sci., 28(8), 382-389, 2007.
[37] Fujieda Y., Yamaoka K., Ito T., Nakagawa T., Local Absorption Kinetics of Levofloxacin from Intestinal Tract into Portal Vein in Conscious Rat Using Portal-Venous Concentration Difference., Pharma. Res., 13(8), 1201-1201, 1996.
[38] 藤枝祐介、神吉智美、古賀美千子、緒方淳人　「マウス門脈 - 循環血同時採血法を用いた消化管吸収スクリーニング系の確立」、日本薬学会第 124 年会要旨集、第 4 号、63 ページ
[39] Obach RS., Prediction of Human Clearance of Twenty-Nine Drugs from Hepatic Microsomal Intrinsic Clearance Data: an Examination of in Vitro Half-Life Approach and Nonspecific Binding to Microsomes., Drug Metabol. Dispos., 27(11), 1350-1359, 1999.
[40] Mandagere AK., Thompson TN., Hwang KK., Graphical Model for Estimating Oral Bioavailability of Drugs in Humans and Other Species from Their Caco-2 Permeability and in Vitro Liver Enzyme Metabolic Stability Rates., J. Med. Chem., 45, 304-311, 2002.
[41] Asha S., Vidyavathi M., Role of Human Liver Microsomes in in Vitro Metabolism of Drugs – A Review., Appl. Biochem. Bitotechnol., 160, 1699-1722, 2010.