

博士論文

三環性 JAK 阻害剤の合成と  
構造活性相関に関する研究

山岸 尋亮

## 略語一覽

Ac	: acetyl
ATP	: adenosine triphosphate
AUC	: area under the blood concentration time curve
Bn	: benzyl
Boc	: <i>t</i> -butoxycarbonyl
Bu	: butyl
CDI	: carbonyldiimidazole
CL	: clearance
CL <sub>int</sub>	: intrinsic clearance
CNI	: calcineurin inhibitor
CSA	: 10-camphorsulfonic acid
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCE	: 1,2-dichloroethane
DIBAL	: diisobutylaluminium hydride
DIPEA	: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	: 4-(dimethylamino)pyridine
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMI	: 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DPPA	: diphenylphosphoryl azide
DPTTA	: <i>O,O'</i> -di- <i>p</i> -toluoyl-tartaric acid
Et	: ethyl
F	: bioavailability
HATU	: <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HBA	: hydrogen bond acceptor
HBD	: hydrogen bond donor
HOBt	: 1-hydroxybenzotriazole
<i>i</i> -	: iso-
<i>i.v.</i>	: intravenous
<i>i.m.</i>	: intramuscular
IMPDH	: inosine monophosphate dehydrogenase
IPE	: diisopropyl ether
LAH	: lithium aluminium hydride
<i>m</i> -CPBA	: <i>m</i> -chloroperbenzoic acid

Me	: methyl
Ms	: methanesulfonyl
<i>n</i> -	: normal-
NaMHDS	: sodium hexamethyldisilazide
NBS	: <i>N</i> -bromosuccinimide
NMP	: <i>N</i> -methylpyrrolidone
NT	: not tested
MMF	: mycophenolate mofetil
MST	: median survival time
PAMPA	: parallel artificial membrane permeability assay
$P_e$	: permeability
Ph	: phenyl
<i>p.o.</i>	: per os
PSA	: polar surface area
Py	: pyridine
<i>s</i> -	: secondary-
SAR	: structure–activity relationship
SEM	: 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl
STAT	: signal transducer and activator of transcription
<i>t</i> -	: tertiary-
TBAF	: tetrabutylammonium fluoride
TDI	: time dependent inhibition
TFA	: trifluoroacetic acid
TFAA	: trifluoroacetic anhydride
THF	: tetrahydrofuran
TIPS	: triisopropylsilyl
TPSA	: topological PSA
TsOH	: <i>p</i> -toluenesulfonic acid
$V_d$	: volume of distribution
WSCD	: 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide

# 目次

第一章	序論	1
	1-1. 臓器移植と免疫拒絶反応	
	1-2. Janus Kinase とその阻害剤	
	1-3. 本研究の目的	
第二章	主活性向上と CYP3A4 時間依存的阻害回避に向けた検討	6
	2-1. 主活性向上のための合成方針	
	2-2. イミダゾピロロピリジノン誘導体の合成	
	2-3. イミダゾピロロピリジノン誘導体の構造活性相関	
	2-4. CYP3A4 時間依存的阻害の回避	
	2-5. 化合物 <b>32a</b> のドッキング解析及び WaterMap 解析による考察	
	2-6. 小括	
第三章	経口吸収性向上に向けた検討	19
	3-1. 膜透過性改善のための合成方針	
	3-2. 各誘導体の合成	
	3-3. 膜透過性の改善	
	3-4. 化合物 <b>59a</b> 及び <b>78a</b> の薬物動態	
	3-5. 化合物 <b>59a</b> 及び <b>78a</b> のキナーゼ選択性	
	3-6. 化合物 <b>59a</b> のドッキング解析による考察	
	3-7. 化合物 <b>59a</b> の合成検討	
	3-8. ラット心移植モデルでの評価	
	3-9. 小括	
第四章	総括	43
	Experimental Section	44
	References	95
	謝辞	98

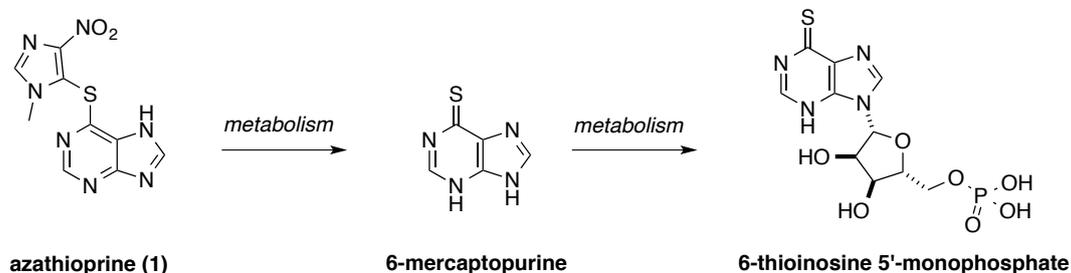
# 第一章 序論

## 1-1. 臓器移植と免疫拒絶反応

臓器移植は臓器が機能不全に陥った際の最終的な手段として選択される。その際に起きる免疫拒絶反応は臨床上しばしば問題となる。拒絶反応においては、IL-2 (interleukin-2) が重要な役割を担っている。臓器が移植されると、移植臓器由来の MHC (major histocompatibility complex) が認識され、抗原提示細胞による抗原提示が起きる。そして、ヘルパーT 細胞が活性化され、自身の分化・増殖に関わるサイトカインである IL-2 の産生を誘導する。このようにして産生された IL-2 により細胞傷害性 T 細胞、B 細胞、マクロファージ等の免疫細胞が活性化され、移植臓器が損傷される。このように拒絶反応においては IL-2 が深く関与しているため、IL-2 シグナル伝達を遮断し拒絶反応を抑制することが移植臓器の生着率を向上させる上で極めて重要である。

臓器移植は 20 世紀初頭より試みられるようになったが、免疫拒絶反応が障壁となり移植臓器を長期にわたり生着させることはできなかった<sup>1</sup>。この臓器移植治療に大きな進展がみられるようになったのは、免疫抑制剤であるアザチオプリン (azathioprine, **1**) が開発された 1960 年代に入ってからである (Figure 1.1)。アザチオプリンは、生体内でメルカプトプリン (6-mercaptopurine) さらにチオイノシンリン酸 (6-thioinosine 5'-monophosphate) に代謝される。メルカプトプリンは、生体内のプリン体合成経路である *de novo* 系を、チオイノシンリン酸は salvage 系を阻害することで核酸合成を抑制し、リンパ球を含む種々の細胞増殖を阻害する<sup>2</sup>。このアザチオプリンとステロイドとの併用療法が移植療法において有効性であることが確認されると、たちまち当時の標準療法となった。

Figure 1.1. Structure and metabolites of azathioprine.

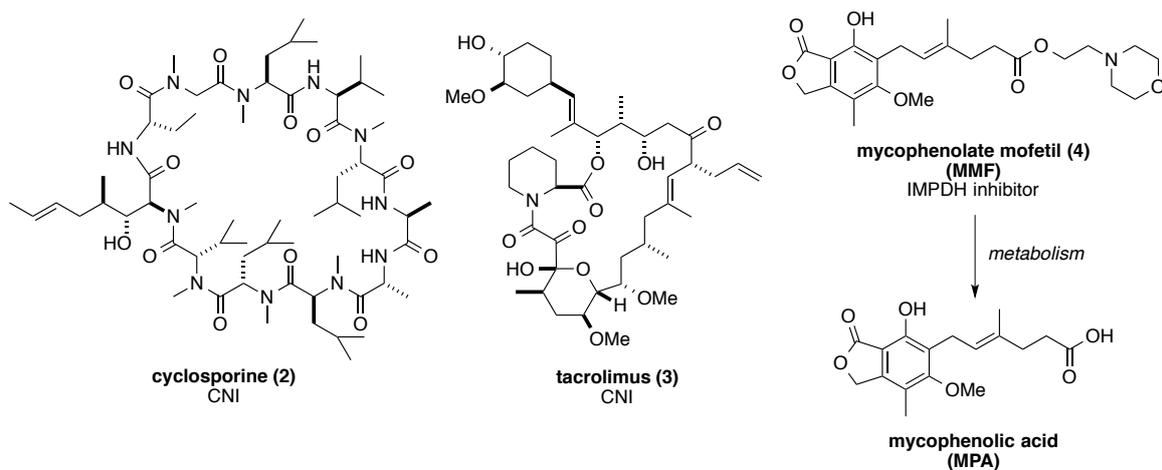


1970 年代に入り、カルシニューリン阻害剤 (calcineurin inhibitor, CNI) であるシクロスポリン (cyclosporine, **2**) の免疫抑制作用が発見されると、移植臓器の生着率は飛躍的に向上した (Figure 1.2)。そして、1990 年代には同じく CNI であるタクロリムス (tacrolimus, **3**) やイノ

シンーリン酸デヒドロゲナーゼ (inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH) 阻害剤であるミコフェノール酸モフェチル (mycophenolate mofetil, MMF, **4**) が臨床使用されるようになった。CNI は、カルシニューリンの脱リン酸化を阻害することで、NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) が核内移行し IL-2 が産生されるのを抑制する<sup>3</sup>。MMF は、生体内でミコフェノール酸 (mycophenolic acid, MPA) に代謝され、*de novo* 系の律速酵素である IMPDH を阻害する<sup>4</sup>。リンパ球におけるプリン体合成は *de novo* 系に強く依存していることから、アザチオプリンとは異なり、リンパ球選択的な増殖抑制効果を示す。

現在は CNI を主剤とした、MMF、ステロイドの 3 剤併用療法が標準治療となっており、2010~2014 年の日本での生体腎移植における移植後 1 年及び 5 年の生存率はそれぞれ 99.1%、97.2%にまで向上している<sup>5</sup>。しかしながら、CNI には腎障害や神経障害、MMF には消化管障害といった副作用があることから、長期間使用する上で問題となっている<sup>6</sup>。それゆえ、より副作用が低減された新たな作用機序の免疫調節剤が切望されている。

**Figure 1.2.** Structure of immunosuppressive agents.



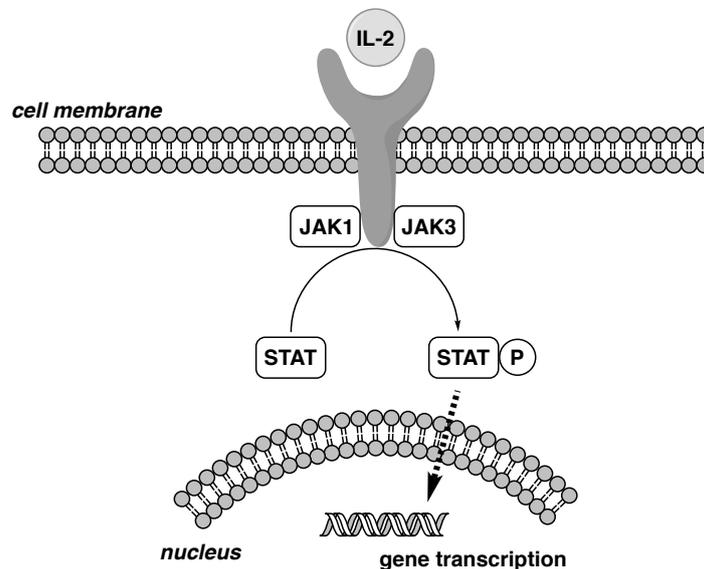
## 1-2. Janus Kinase とその阻害剤

Janus Kinase (JAK) はサイトカインのシグナル伝達において重要な役割を果たしているチロシンキナーゼである<sup>7</sup>。チロシンキナーゼは、ATP-binding site に結合した ATP (adenosine triphosphate) のリン酸基を用いて標的タンパクのチロシン残基をリン酸化する役割を担っている。JAK には JAK1、JAK2、JAK3、TYK2 の 4 種類のサブタイプが存在し、true kinase domain と pseud-kinase domain と呼ばれる 2 つの kinase domain を有していることから、ローマ神話の Janus 神\*に因んでその名がつけられた。

\* ローマ神話に登場する門の守護神である。頭の前後に顔を持っている。

サイトカインが受容体に結合すると細胞内の JAK が活性化され、STAT (signal transducer and activator of transcription) がリン酸化される。そして、リン酸化された STAT が核内移行することで、炎症性遺伝子の転写が促進される<sup>8</sup> (Figure 1.3)。JAK1 と JAK3 は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21 といった  $\gamma$  鎖ファミリーサイトカイン ( $\gamma$ -chain cytokines) のシグナル伝達を通して T 細胞の分化・増殖に関与している。JAK3 は他のサブタイプと異なり、リンパ球選択的に発現していることも知られている。また、JAK1、JAK2、TYK2 は IL-6 のシグナル伝達に関与している。さらに、JAK2 はエリスロポエチン等の造血サイトカインのシグナル伝達にも関与していることが知られている。

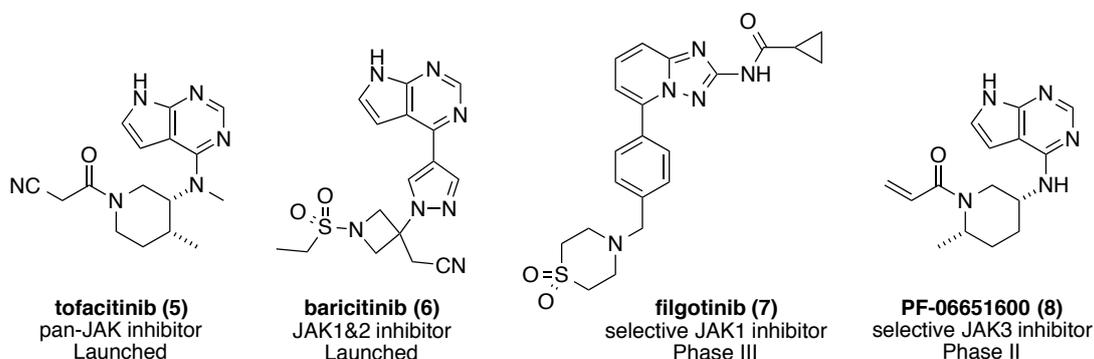
**Figure 1.3.** IL-2 signaling pathway via JAK1 and JAK3.



サイトカインのシグナル伝達系との強い関わりから、JAK は創薬ターゲットとして早くから注目されてきた。4 種類のサブタイプの中で最初に創薬ターゲットとして注目されたのは JAK3 である。JAK3 欠損患者は、重症複合免疫不全症 (severe combined immune deficient, SCID) の症状を示すことが知られている<sup>9</sup>。しかしながら、免疫系以外の機能は正常であり、また骨髄移植により治療可能であることが、JAK3 が選択的な免疫調節剤のターゲットとして注目されてきた理由である。これまで多くの JAK 阻害剤が報告されてきたが<sup>10</sup>、そのすべてが ATP-binding site の競合阻害を狙ったものである。その中で臨床開発段階から注目されてきたのが、ファイザー社によって見出された tofacitinib (**5**) である<sup>11</sup> (Figure 1.4)。**5** は JAK3、JAK2、JAK1 に対しそれぞれ、 $IC_{50} = 0.80$  nM、3.1 nM、3.7 nM と強力な阻害作用を示し、カニクイザルを用いた腎移植試験において生着延長効果を示すことが報告された。この報告は JAK 阻害剤の

免疫調節剤としての可能性を大いに期待させるものであった。その後、関節リウマチを適応症として開発が進められ、2012年に米国で承認された。

Figure 1.4. Structure of JAK inhibitors.



5 の臨床での薬理作用が報告されて以降、多くの JAK 阻害剤が報告されるようになった。インサイト社より見出された baricitinib<sup>12</sup> (6)は、JAK1 と JAK2 を選択的に阻害することが知られており、2017年に欧州で関節リウマチを適応とした承認を受けている。

JAK のサブタイプ間における相同性は高いとされ、サブタイプ選択的な阻害剤を見出すことは困難であるとされてきた。しかし近年、構造生物学の進歩により SBDD (structure-based drug design) によるアプローチが可能となったことから、JAK の特定のサブタイプを選択的に阻害する化合物の報告も増えている。ガラパゴス社より見出された filgotinib<sup>13</sup> (7)は、JAK1 を選択的に阻害することが報告されており、関節リウマチを適応に第三相臨床試験が進行中である。JAK2 を阻害することで懸念される貧血の発現頻度が 5 と比べて少なかったことが報告されている。ファイザー社より見出された PF-06651600<sup>14</sup> (8)は、共有結合型の JAK 阻害剤であり、JAK3 を選択的に阻害することが報告されている。現在、関節リウマチや円形脱毛症といった疾患を適応症として臨床開発が進められている。

このように多くの JAK 阻害剤が報告され、関節リウマチ、乾癬、クローン病、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) をはじめとする種々の自己免疫疾患に対して臨床試験が行われている。JAK サブタイプ間の阻害活性の違いによって自己免疫疾患に対する有効性が異なることから、各々の自己免疫疾患によって主に関与するサイトカインが異なっていることを示している<sup>10f</sup>。このことは、いまだ未解明なことが多い自己免疫疾患の発症機序の解明に役立つ可能性も期待される。

### 1-3. 本研究の目的

このように多くの JAK 阻害剤が報告されているが、臓器移植時の免疫拒絶反応の抑制を考えた場合、JAK3 及び JAK1 を阻害することにより IL-2 伝達シグナルを遮断することが重要であると考えられる。さらに JAK3 がリンパ球選択的に発現していることを考えると、JAK3 阻害は免疫抑制以外の副作用を低減できる可能性があると考えられる。実際、JAK3 阻害活性を有する **5** は当初臓器移植時の拒絶反応の抑制を適応とした臨床開発を進めていた。しかしながら、CNI の完全な置き換えを指向した、MMF 併用の臨床試験にて薬効は認められたものの、易感染性等の副作用がみられ現在も開発は中断したままである。開発中断の詳細な理由は明らかになっていないが、CNI の完全な置き換えを狙う上で併用薬の選択等の臨床試験のデザインに問題があった可能性も指摘されている<sup>15</sup>。そこで、筆者らは、完全な CNI の置き換えではなく、標準療法である CNI、MMF 等の併用療法に新たな薬剤を追加する手法を選択した。それによって同時併用する薬剤の総投与量を下げ、CNI、MMF の副作用を低減できるのではないかと考えた。目標とする JAK 阻害剤のプロファイルとしては、

- 1) 薬効に直接関与する JAK3 阻害活性は **5** の  $IC_{50} = 0.80 \text{ nM}$  を上回ること、
- 2) JAK2 阻害は貧血の副作用の懸念があるため JAK2/JAK3 選択性は **5** を下回らないこと\*

とし、これらのプロファイルを持つ化合物を見出すべく研究に着手した。

---

\* **5** の臨床試験においても貧血の副作用がみられたが、いずれも軽度であり回復性もあったと報告されていることから<sup>16</sup>、少なくとも **5** の JAK2/JAK3 選択性を下回らない化合物を目標とした。

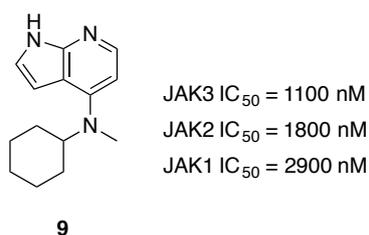
## 第二章 主活性向上と CYP3A4 時間依存的阻害回避に向けた検討

### 2-1. 主活性向上のための合成方針

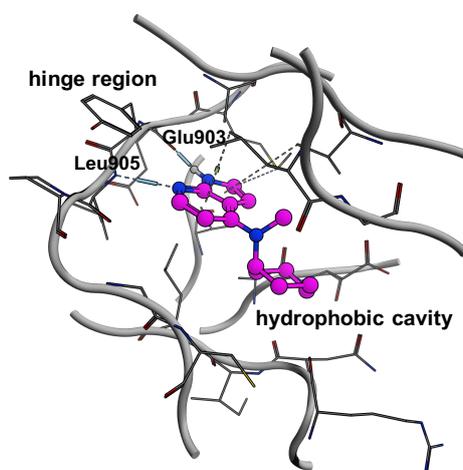
初期探索により、ピロロピリジン骨格を有する **9** を見出した<sup>17</sup> (Figure 2.1)。**9** は JAK3、JAK2、JAK1 に対しそれぞれ  $IC_{50} = 1100$  nM、1800 nM、2900 nM の阻害活性を示すが、**5** と比較し 1000 倍以上低活性であった。しかしながら、分子量が 229 とコンパクトであったことから構造変換の余地が高いと考え、**9** をリード化合物とした合成展開に着手した。

より高活性な化合物をデザインするにあたり、X 線共結晶の情報<sup>18</sup>を用いた。JAK3 の ATP-binding site は hinge 領域及び疎水性領域から構成されている。**9** のドッキング解析の結果、ピロロピリジン環は hinge 領域に位置する Glu903 及び Leu905 と水素結合を介して相互作用すること、シクロヘキサン環は疎水性領域と相互作用していることが推定された (Figure 2.2)。

**Figure 2.1.** Structure of lead compound **9**.



**Figure 2.2.** Predicted binding mode of **9** to human JAK3.



9にはピロロピリジン環とシクロヘキサン環の間に自由回転可能な単結合が存在しているため、シクロヘキサン環がより効果的に疎水性領域と相互作用するには、適切な位置に固定されている必要があると考えた。そこでコンフォメーションを固定させるべく、三環性イミダゾピロロピリジノン骨格を有する10をデザインし、そのJAK3阻害活性を評価した (Figure 2.3)。

その結果、10はJAK3に対し $IC_{50} = 54$  nMの阻害活性を示した。ドッキング解析を行ったところ、ピロロピリジン環がATP-binding siteのhinge領域と、固定されたシクロヘキサン環が疎水性領域と相互作用していることが推定された (Figure 2.4)。したがって、阻害活性の向上は環化によってコンフォメーションが固定されたためと考えられた。しかしながら、5と比較すると依然として低活性であったことから、三環性イミダゾピロロピリジノン誘導体の構造活性相関を検証し、主活性の向上を目指した。

Figure 2.3. Design of tricyclic imidazo-pyrrolopyridinone derivative.

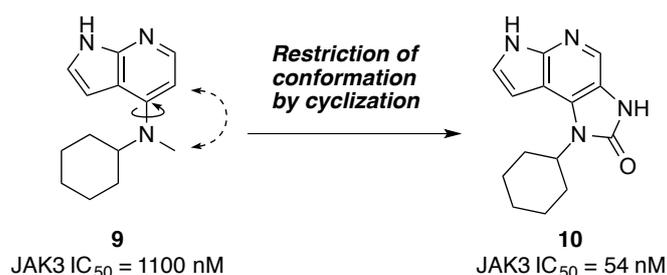
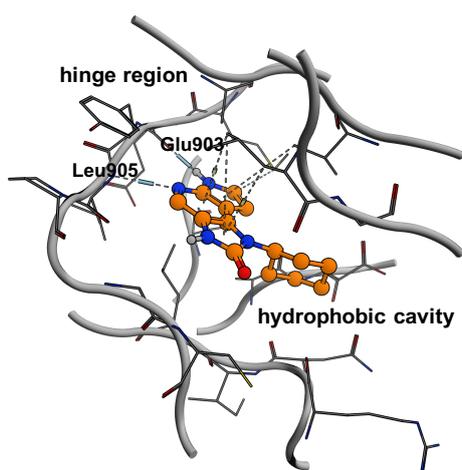


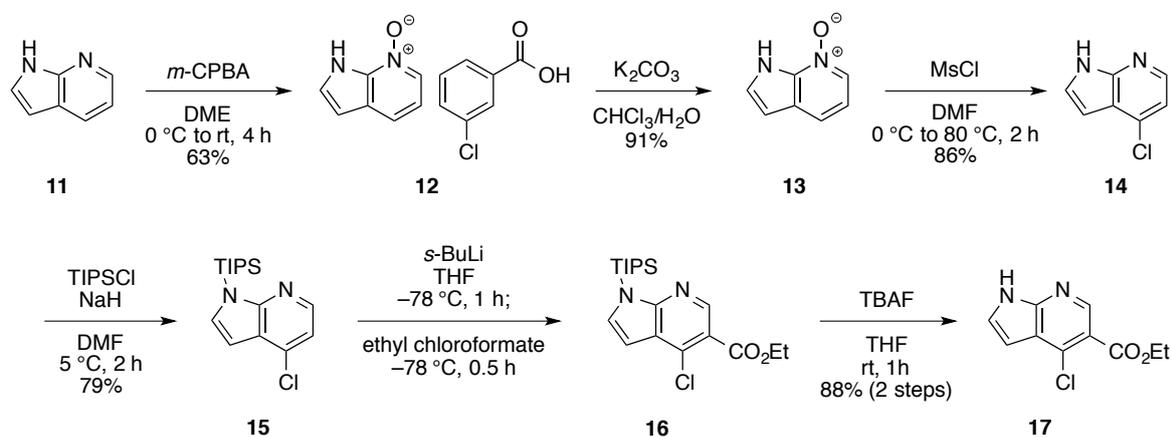
Figure 2.4. Predicted binding mode of 10 to human JAK3.



## 2-2. イミダゾピロピリジノン誘導体の合成

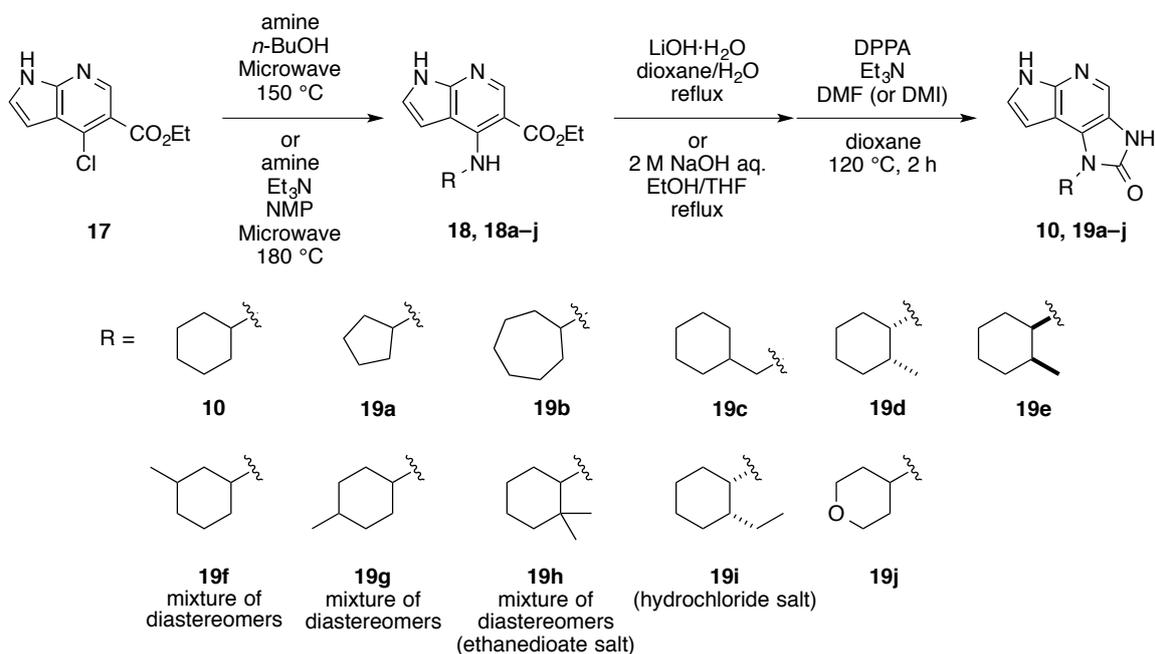
三環性イミダゾピロピリジノン誘導体の合成は市販のピロロピリジン **11** を出発原料として行った (Scheme 2.1)。まず、文献既知の方法に従い<sup>19</sup>、*m*-CPBA を作用させ *N*-オキシドとした後、*m*-クロロ安息香酸塩として **12** を単離した。その後、塩基による脱塩により **13** とした後、メシルクロリドを作用させることで 4-クロロピロロピリジン **14** に変換した。そして、ピロロピリジンの NH を TIPS 基で保護することで **15** とした。ここで、*s*-BuLi を用いる 5 位選択的オルトリチオ化を行い<sup>20</sup>、クロロギ酸エチルを作用させることでエステル基を導入し **16** とした。その後、TBAF を用いて TIPS 基を除去することで **17** とした。

Scheme 2.1. Synthesis of pyrrolopyridine **17**.



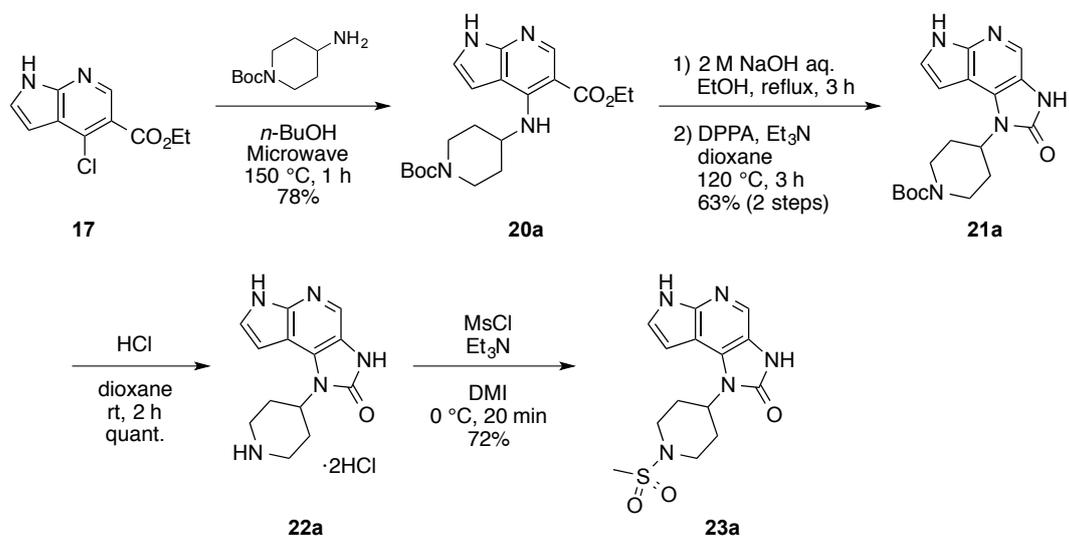
次に Microwave 反応装置を用いて、**17** と各種アミンとの芳香族求核置換反応を行い、**18**, **18a-j** へと導いた (Scheme 2.2)。続いて、塩基性条件下エステルを加水分解しカルボン酸とした後、DPPA を作用させることで Curtius 転位を経由したイソシアネートの生成と続く分子内での環化を経て、三環性イミダゾピロピリジノン骨格を有する **10**, **19a-j** を得た。

**Scheme 2.2.** Synthesis of imidazo-pyrrolopyridinone derivatives.



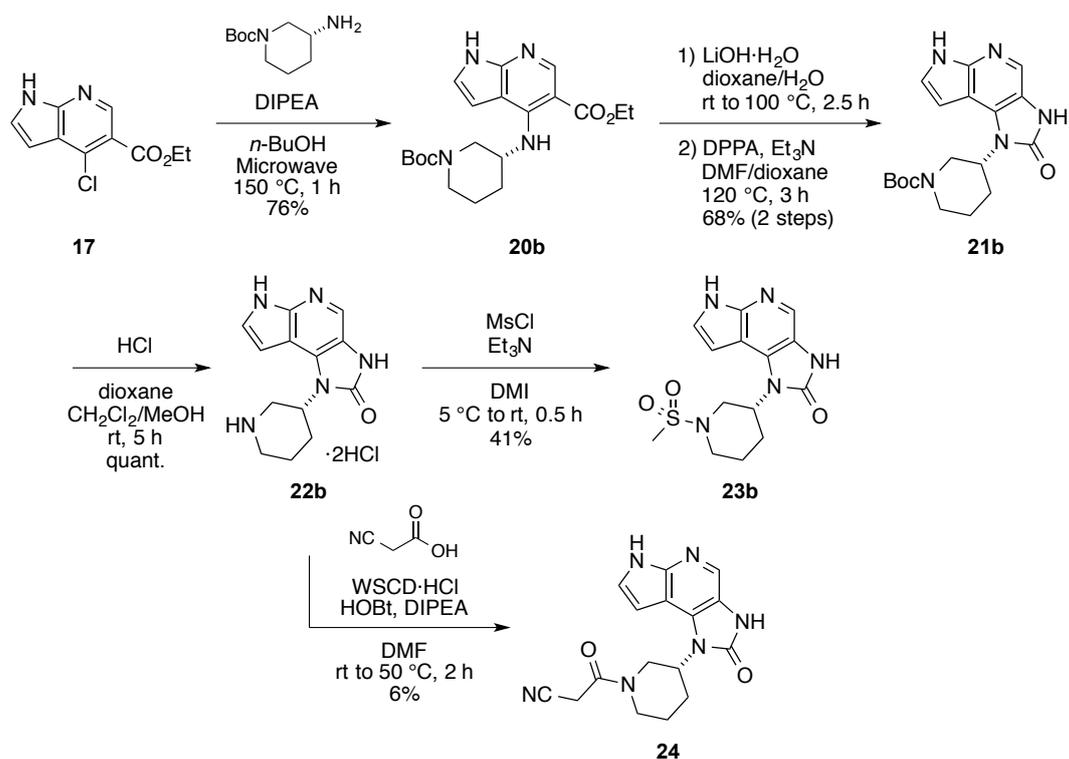
**23a** は Scheme 2.3 に示す合成法にて合成を行った。**17** と 4-アミノ-1-Boc-ピペリジンとの芳香族求核置換反応を行い **20a** とした。次に、エステルの加水分解を行った後、DPPA を作用させることで **21a** とした。その後、Boc 基の除去を行い **22a** へ変換した後に、メシルクロリドを作用させることで **23a** とした。

**Scheme 2.3.** Synthesis of **23a**.

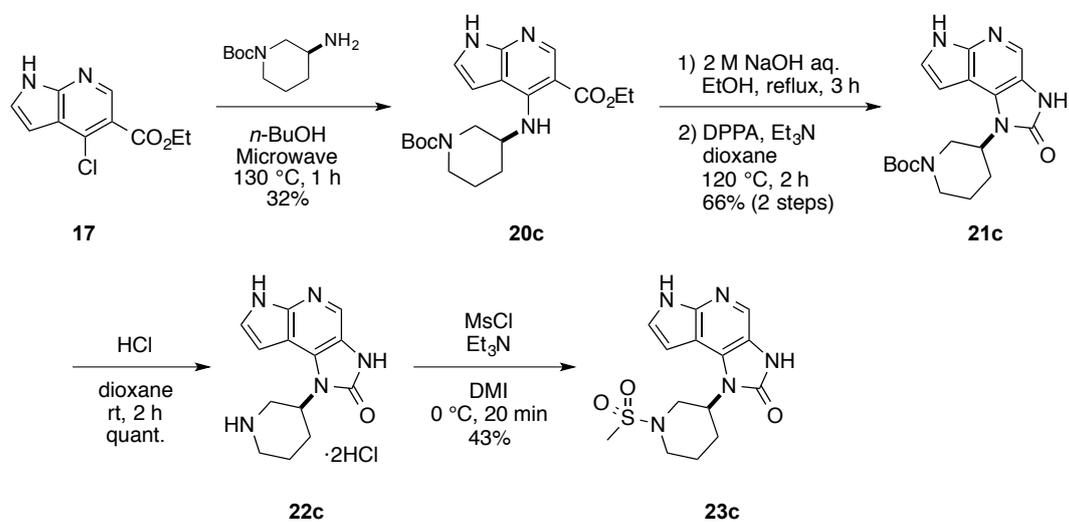


**23b, 23c** に関しても、3-アミノ-1-Boc-ピペリジンの *R* 体及び *S* 体をそれぞれ用いることで Scheme 2.3 と同様の方法にて合成を行った (Scheme 2.4, Scheme 2.5)。 **24** に関しては、**22b** とシアノ酢酸とを縮合させることで合成を行った。

**Scheme 2.4. Synthesis of 23b, 24.**

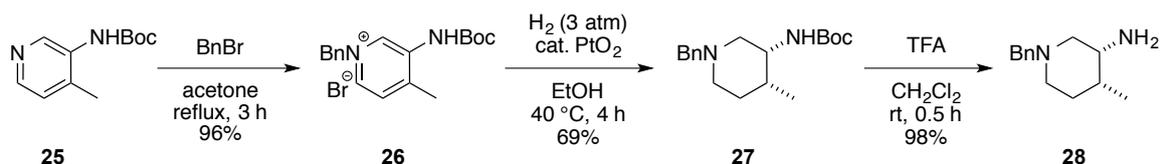


**Scheme 2.5. Synthesis of 23c.**



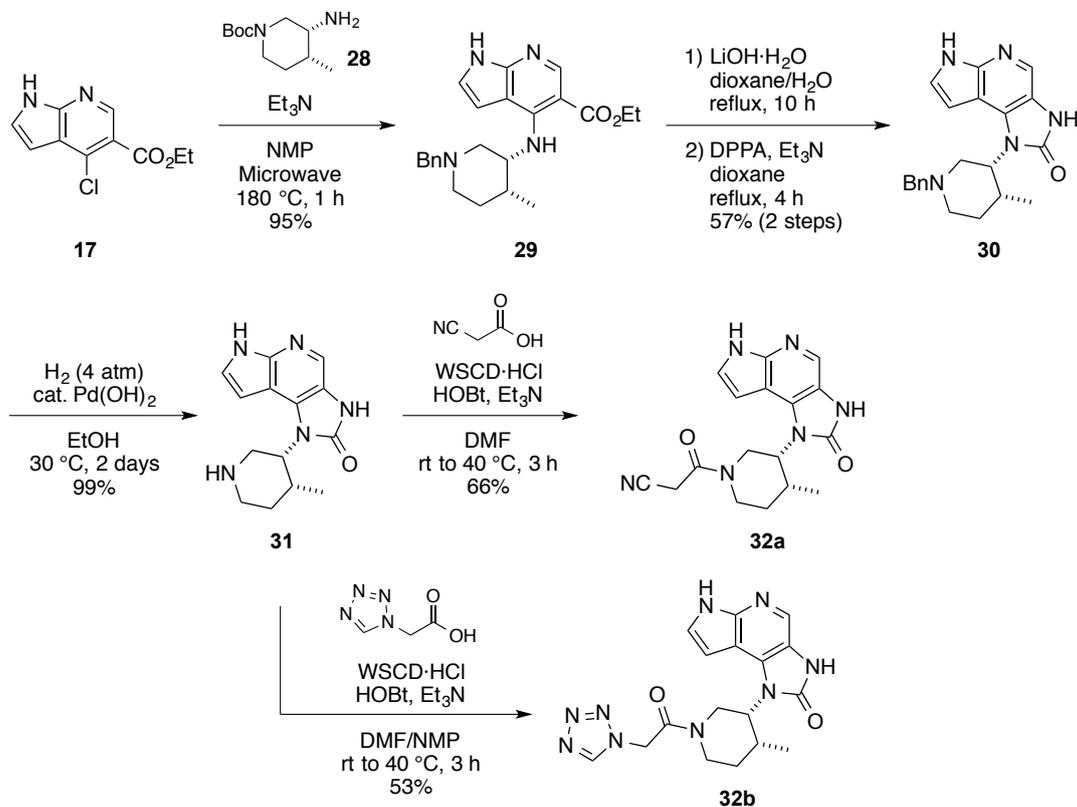
(±)-*cis*-3-アミノ-4-メチルピペリジン **28** は、Scheme 2.6 に示す方法にて合成した。文献既知の **25**<sup>21</sup> にベンジルブロミドを作用させ、ピリジニウム塩 **26** とした。続いて、酸化プラチナ存在下水素添加の条件に付すことでピリジン環の還元を行い、3-アミノ-ピペリジン **27** とした。次に、TFA を用いて Boc 基の除去を行い、目的の **28** を得た。

### Scheme 2.6. Synthesis of **28**.



**32a, b** の合成は Scheme 2.7 に示す方法にて行った。**17** と **28** との芳香族求核置換反応を行い **29** とした。続いて、加水分解とそれに続く、DPPA 処理により三環性イミダゾピロピリジノン骨格を構築し **30** とした。さらに、水酸化パラジウム存在下水素添加の条件に付すことで、Bn 基の除去を行い **31** とした。そして、カルボン酸との縮合反応を行い **32a, b** を得た。

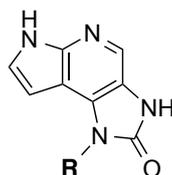
### Scheme 2.7. Synthesis of **32a, b**.



### 2-3. イミダゾピロピリジノン誘導体の構造活性相関

はじめに、**10**のシクロヘキサン環の環サイズのJAK3阻害活性への影響について検証した。五員環に変換した**19a**ではJAK3 IC<sub>50</sub> = 180 nMと阻害活性の低下、7員環へ変換した**19b**ではJAK3 IC<sub>50</sub> = 22 nMと阻害活性の向上がみられたことより、脂溶性と相関していることが示唆された (Table 2.1)。一方、シクロヘキシルメチルへ変換した**19c**では、**19b**と同程度の脂溶性を有するものの活性の向上はみられず、**10**とほぼ同程度であった。そのため、直結の環構造が活性の発現には重要であると考えられた。一方、代謝安定性試験\*では、脂溶性の増大とともに *in vitro* 代謝クリアランスの値の増大すなわち代謝安定性の悪化がみられた。阻害活性とのバランスを考慮し、以後の変換は**10**のシクロヘキサン環をもとに行うこととした。

**Table 2.1.** SARs of cycloalkyl groups.



No.	R	JAK3 IC <sub>50</sub> (nM)	<i>in vitro</i> CL <sub>int</sub> (mL/min/kg)	CLogP
<b>10</b>		54	153	3.1
<b>19a</b>		180	NT	2.5
<b>19b</b>		22	272	3.6
<b>19c</b>		60	802	3.6

続いて、疎水性領域との相互作用を期待し、シクロヘキサン環へのメチル基の導入を検討した (Table 2.2)。シクロヘキサン2位にメチル基を導入した**19d**ではJAK3 IC<sub>50</sub> = 3.0 nMと大幅に活性が向上することがわかった。一方、対応する光学異性体**19e**ではJAK3 IC<sub>50</sub> = 27

\* ラット肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験。ラット肝ミクロソームと化合物とをインキュベートし、インキュベート前後での化合物の未変化体の割合をもとに、代謝クリアランスの値 *in vitro* CL<sub>int</sub> (mL/min/kg) を見積もった。値が大きいほど代謝安定性が低いことを示す。

nM と阻害活性の向上は限定的であった。さらに、シクロヘキサン 3 位、4 位へのメチル基の導入も検討したが、**19f** 及び **19g** いずれにおいても大きな活性の増強には至らなかった。また、シクロヘキサン 2 位のジメチル体 **19h** においても活性向上はみられなかった。なお、シクロヘキサン 2 位へエチル基を導入した **19i** においても **19d** と同程度の阻害活性を示したものの、CLogP = 4.1 と脂溶性が増大したため代謝安定性の低下がみられた。

**Table 2.2.** SARs of substituted cyclohexyl groups.



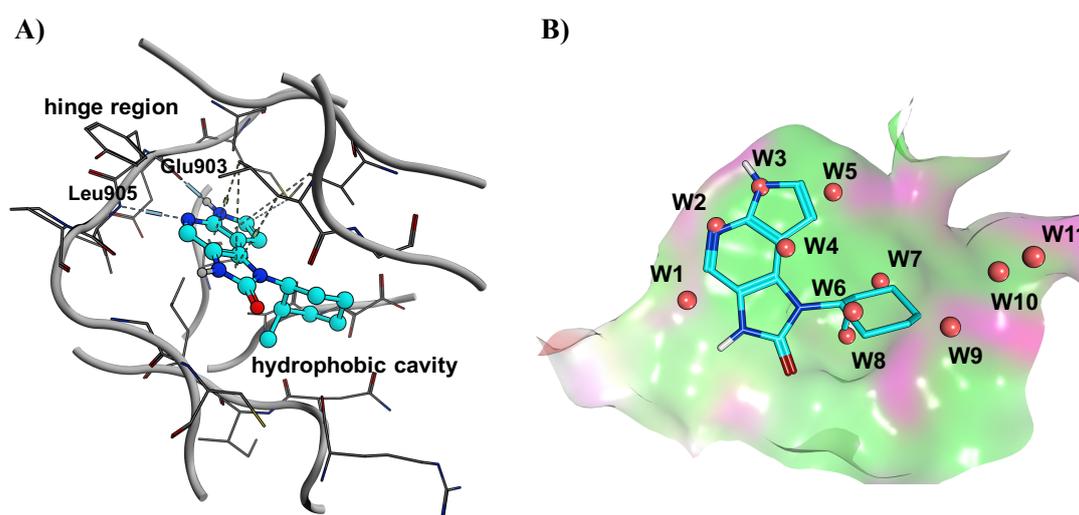
No.	R	JAK3 IC <sub>50</sub> (nM)	<i>in vitro</i> CL <sub>int</sub> (mL/min/kg)	CLogP
<b>10</b>		54	153	3.1
<b>19d</b>		3.0	300	3.5
<b>19e</b>		27	NT	3.5
<b>19f<sup>a</sup></b>		21	NT	3.5
<b>19g<sup>a</sup></b>		42	NT	3.5
<b>19h<sup>a, b</sup></b>		69	NT	4.1
<b>19i<sup>c</sup></b>		3.0	>1000	4.1

<sup>a</sup>Mixture of diastereomers. <sup>b</sup>Ethanediate salt. <sup>c</sup>Hydrochloride salt

5 のピペリジン環上のメチル基が疎水性ポケットを占有しているという報告<sup>18</sup>を考えると、この 2 位に導入したメチル基も同様のポケットと相互作用していることが示唆された。ドッキング解析において、**19d** のピロロピリジン環は **10** と同様に hinge 領域と相互作用していることが予測されたが (Figure 2.5.A)、2 位に導入したメチル基の効果をより深く検証するために、WaterMap<sup>22</sup>による解析を行った。

WaterMap はタンパク質のリガンド結合部位の水分子の熱力学的特性を評価する手法である。WaterMap では、リガンド結合部位に存在し、水素結合等の相互作用に関与しない、エネルギー的に不安定な水分子を算出する。そして、リガンドの結合によって起こる不安定な水分子の置換がどれだけ起きるかを計算し、タンパク質とリガンドとの結合によってどれだけエネルギー的に安定化されたかを見積もる。JAK3 の X 線構造情報 (PDB code 3LXK) より自由エネルギーを算出したところ、W1-W11 の 11 個の不安定な水分子 ( $\Delta G \geq 2.0$  kcal/mol) が算出された (Figure 2.5.B)。19d のピロロピリジン環によって W2, W3, W4 の水分子が、シクロヘキサン環によって W6, W7 の水分子が置換されている。これらの水分子の置換は **10** でも起きていると推察されるが、19d においては、さらにシクロヘキサン環 2 位に導入したメチル基によって W8 の水分子が置換されている。したがって、19d と JAK3 との結合がエネルギー的に有利になり活性の増強につながったと考えられる。

**Figure 2.5.** A) Predicted binding mode of **19d** to human JAK3. B) **19d** with unfavorable water molecules determined by WaterMap ( $\Delta G \geq 2.0$  kcal/mol).



## 2-4. CYP3A4 時間依存的阻害の回避

第一章で述べたように、筆者らは JAK 阻害剤をタクロリムスなどの薬剤と併用することを想定している。タクロリムスの主代謝酵素は CYP3A4 であるため<sup>23</sup>、CYP3A4 阻害による薬物間相互作用によってタクロリムスの血中濃度の上昇を招く可能性がある\*。

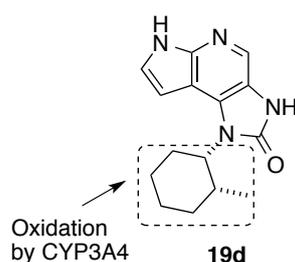
そこで、**19d** に薬物間相互作用の懸念がないかどうか確認するために、CYP3A4 阻害試験<sup>†</sup>を行った。その結果、**19d** は可逆阻害 (reversible inhibition) は示さないものの、CYP3A4 残存活性 49%と時間依存的阻害 (time dependent inhibition, TDI) を示すことが判明した (Table 2.3)。一般に、TDI は化合物それ自身の代謝物が CYP3A4 を不可逆的に阻害することが原因と考えられるため、その解決策としては代謝部位を特定しその代謝を抑えることが有効である。

**19d** の代謝物検索を行ったところ、シクロヘキサン環が酸化代謝されていることが明らかになった (Figure 2.6)。そこで、シクロヘキサン環をヘテロ環に変換し脂溶性を下げることで、CYP3A4 による代謝を抑制し TDI の回避を目指すこととした。

**Table 2.3.** CYP3A4 inhibition properties of **19d**.

No.	CYP3A4 reversible inhibition % remaining	CYP3A4 TDI % remaining
<b>19d</b>	95%	49%

**Figure 2.6.** Result of *in vitro* metabolite identification study on **19d**.



\* タクロリムス使用時には血中濃度を適切にコントロールする必要があるため、薬物間相互作用に特に注意する必要がある。

† 化合物と代謝酵素 CYP3A4 とを 30 分間インキュベートした場合 (TDI) としない場合 (可逆阻害) とで、CYP3A4 の残存活性を評価する試験である。残存活性は CYP3A4 の基質であるミダゾラムが 1-ヒドロキシルミダゾラムに代謝される割合をもとに見積もった。その残存活性が 80%未満の場合、TDI 及び可逆阻害の懸念ありと判断した。

シクロヘキサン環をテトラヒドロピラン環に変換した **19j** では、JAK3 IC<sub>50</sub> = 270 nM と阻害活性の低下こそみられるものの、代謝安定性と CYP3A4 残存活性に大幅な改善がみられた (Table 2.4)。したがって、CLogP を低下させる変換が有効であると考えられた。ペペリジン **22a** への変換においても JAK3 IC<sub>50</sub> = 1200 nM と阻害活性は低下傾向にあったが、ペペリジンの窒素原子からの伸長によって、**19d** の WaterMap 解析の結果算出された不安定な水分子 W9, W10, W11 の置換が可能ではないかと考えた (Figure 2.5.B)。そこで、スルホンアミドへ変換した **23a** の合成を行ったところ、**23a** では JAK3 IC<sub>50</sub> = 710 nM と阻害活性の改善がみられた。さらに、ペペリジンの窒素原子の位置の最適化を行い、*R* 異性体 **23b** が *S* 異性体 **23c** よりも高活性を示すことが明らかになった。続いて、スルホンアミド部分の最適化を行ったところ、シアノ酢酸アミドに変換した **24** において JAK3 IC<sub>50</sub> = 28 nM と阻害活性の向上がみられた。そして、**19d** でみられたメチル基の導入による活性向上の知見を活かし、ペペリジン環上にメチル基を導入した **32a** では、JAK3 IC<sub>50</sub> = 1.1 nM と大幅に活性が向上した。**32a** は代謝安定性、CYP3A4 残存活性に関しても良好であった。また、テトラゾールを導入した **32b** においても JAK3 IC<sub>50</sub> = 1.4 nM と高活性を示し、代謝安定性、CYP3A4 残存活性も良好であった。

**Table 2.4.** SARs of heterocycles.



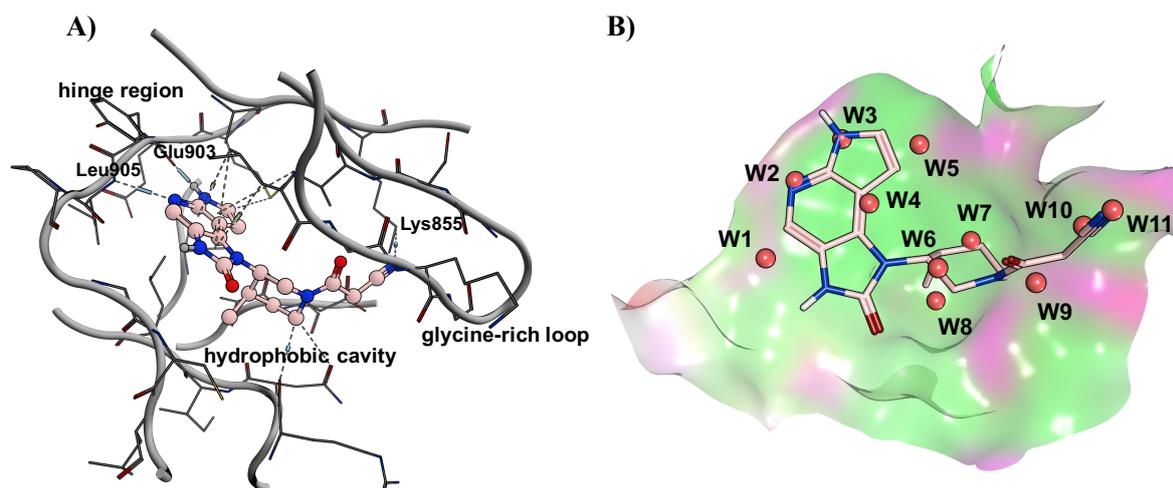
No.	R	JAK3 IC <sub>50</sub> (nM)	<i>in vitro</i> CL <sub>int</sub> (mL/min/kg)	CYP3A4 TDI % remaining	CLogP
<b>19d</b>		3.0	300	49%	3.5
<b>19j</b>		270	No Depletion	90%	1.2
<b>22a<sup>a</sup></b>		1200	NT	NT	1.3
<b>23a</b>		710	NT	NT	1.1
<b>23b</b>		63	NT	NT	1.1
<b>23c</b>		460	NT	NT	1.1
<b>24</b>		28	NT	NT	0.5
<b>32a</b> (racemate)		1.1	No Depletion	90%	1.0
<b>32b</b> (racemate)		1.4	No Depletion	88%	0.86

<sup>a</sup>Hydrochloride salt

## 2-5. 化合物 **32a** のドッキング解析及び WaterMap 解析による考察

**32a** において JAK3  $IC_{50} = 1.1$  nM と活性が向上した要因に関して JAK3 とのドッキング解析による考察を行った。JAK3 の hinge 領域及び疎水性領域との結合モードは **10**、**19d** と同様であったが、新たにシアノ基が glycine-rich loop の Lys855 との相互作用を獲得していることが予測された (Figure 2.7.A)。この相互作用が大幅に JAK3 阻害活性を向上させた要因になっているものと考えられる。また、WaterMap 解析においても、ピペリジンの窒素原子から伸長させたシアノ酢酸アミドが W9, W10, W11 の不安定な水分子を置換していることが推定され、活性の向上を裏付けているといえる (Figure 2.7.B)。

**Figure 2.7.** A) Predicted binding mode of **32a** to human JAK3. B) **32a** with unfavorable water molecules determined by WaterMap ( $\Delta G \geq 2.0$  kcal/mol).



## 2-6. 小括

リード化合物 **9** のコンフォメーションを固定し、シクロヘキサン環を JAK3 の疎水性領域と効果的に相互作用させるべく、新規三環性イミダゾピロロピリジノン骨格をデザインした。その結果、大幅に活性を向上させた **19d** を見出すことに成功した。しかしながら、**19d** は TDI を示したことから、代謝部位と考えられたシクロヘキサン環をヘテロ環に変換する検討を行った。その結果、高活性かつ良好な代謝安定性を示し、TDI の懸念が低減された、**32a** を見出すことに成功した。

### 第三章 経口吸収性向上に向けた検討

#### 3-1. 膜透過性改善のための合成方針

良好なプロファイルを示した **32a** を動物モデルで評価するにあたり、**32a** の薬物動態試験\*を行った。その結果、AUC 及びバイオアベイラビリティ (F) はいずれも低値であり、経口吸収性に問題があることが判明した (Table 3.1)。

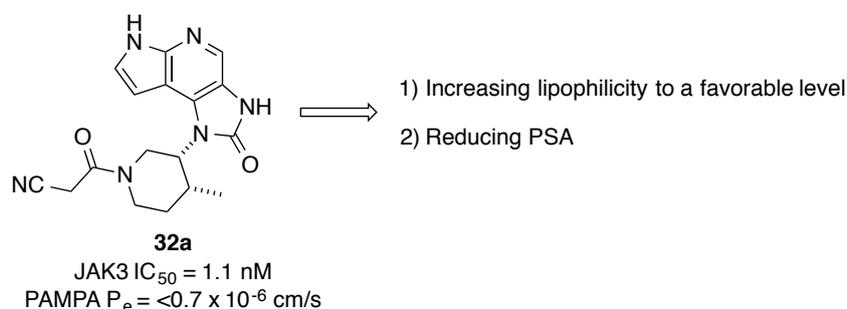
この低経口吸収性の原因を探るため、人工脂質膜を用いた膜透過性試験である parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) †を行ったところ、膜透過性が、Permeability ( $P_e$ ) =  $<0.7 \times 10^{-6}$  cm/s と検出限界以下であることが判明した。つまり、膜透過性の低さが低経口吸収性の原因であると考えられた。膜透過性を改善するための戦略として、1) 脂溶性を適切なレベルへ向上させること、2) 極性表面積‡ (polar surface area, PSA) を低下させることを考え、両アプローチからの膜透過性の改善を試みることにした (Figure 3.1)。

**Table 3.1.** Pharmacokinetic parameters<sup>a</sup> of **32a**.

<i>i.v.</i> (1 mg/kg)				<i>p.o.</i> (1 mg/kg)				
CL (mL/min/kg)	$V_d$ (L/kg)	$t_{1/2}$ (h)	AUC <sub>0-24h</sub> (ng·h/mL)	$C_{max}$ (ng/mL)	$T_{max}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC <sub>0-24h</sub> (ng·h/mL)	F (%)
113	3.62	1.13	148	2.98	0.25	11.8	11.8	11.2

<sup>a</sup>Pharmacokinetics were performed in SD rats (female).

**Figure 3.1.** Synthetic strategy for improving membrane permeability.



\* ラットに経口及び静脈内投与し、その血中濃度の経時変化をもとに各種パラメータを算出した。

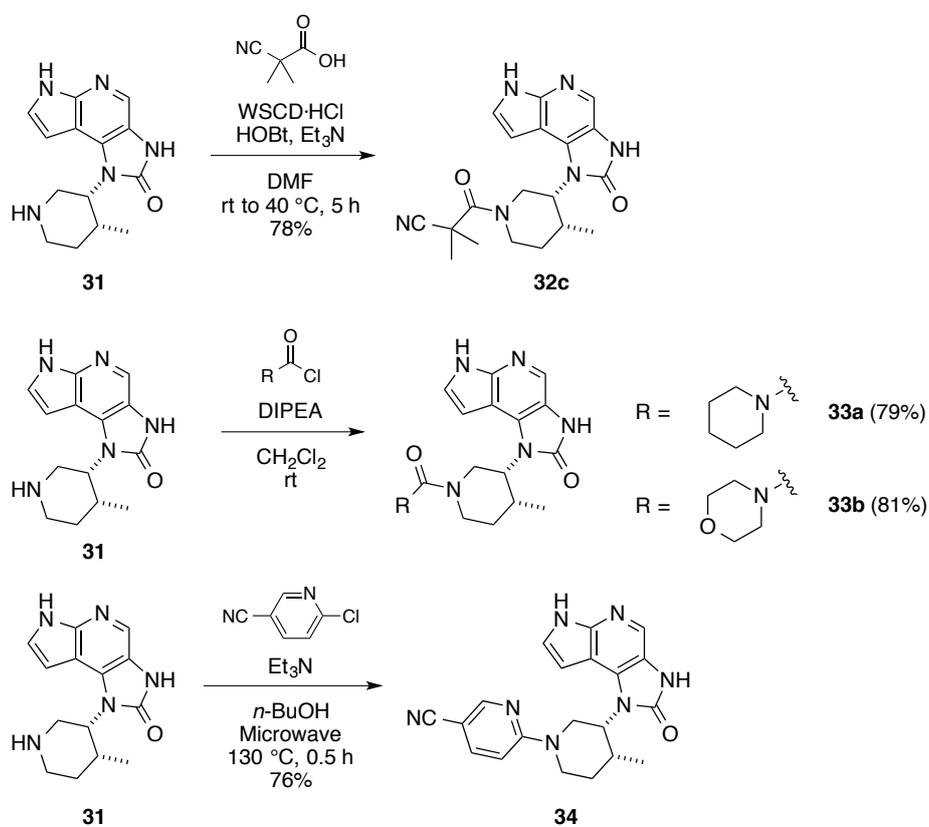
† 人工脂質膜を用いた膜透過性試験。ドナー溶液側に化合物を添加した後、120分後のアクセプター及びドナー溶液に含まれる化合物比を求め、専用ソフトを用いて、 $P_e$  (cm/s)を算出した。

‡ 分子表面のうち極性を帯びている部分の面積値 ( $\text{\AA}^2$ )。

### 3-2. 各誘導体の合成

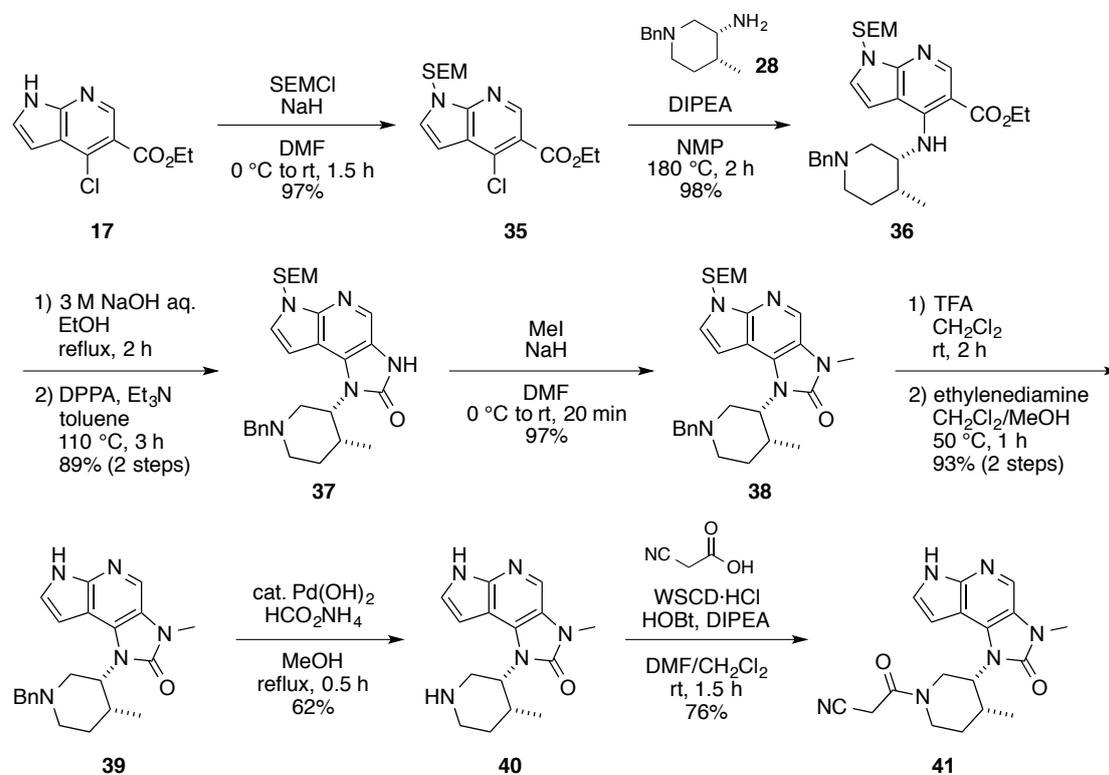
イミダゾピロロピリジノン誘導体のアミド部分変換は第二章で合成した中間体 **31** を用いて行った (Scheme 3.1)。 **31** と 2-シアノ-2-メチルプロパン酸との縮合反応を行うことで **32c** を得た。また、**31** に対してカルバモイルクロリドを作用させることで **33a, b** の合成を行った。さらに、6-クロロニコチンニトリルに対して芳香族求核置換反応を行うことで **34** を得た。

**Scheme 3.1.** Modification of amide linkage.



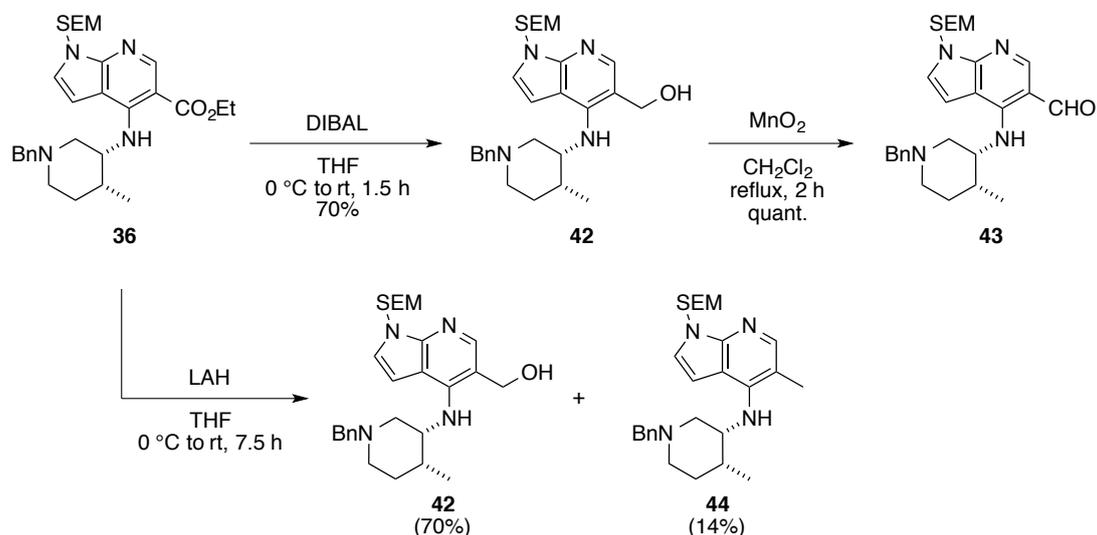
**41** の合成は Scheme 3.2 に示す方法にて行った。ピロロピジン **17** の NH を SEM 基で保護した後、**28** との芳香族求核置換反応を行い **36** とした。続いて、カルボン酸へ加水分解した後、DPPA を作用させることで **37** とした。ここで、NaH 存在下 MeI を作用させることで、NH のメチル化を行い **38** とした。続いて、TFA を作用させ、SEM 基の除去を試みた。TFA を作用させたのみでは、ヒドロキシルメチル基が残存していたことから、さらにエチレンジアミンを作用させることで保護基の完全な除去を行い **39** とした<sup>24</sup>。次に、水酸化パラジウム及びギ酸アンモニウム存在下加熱を行うことで Bn 基を除去し **40** とした。最後に、シアノ酢酸との縮合反応を行い **41** を得た。

**Scheme 3.2.** Synthesis of **41**.



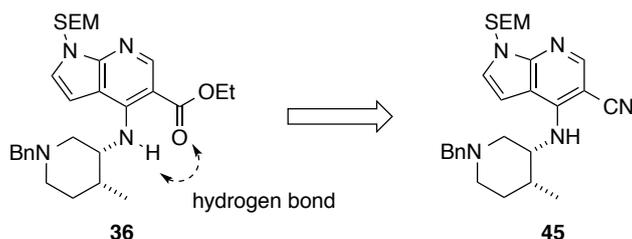
続いて、イミダゾピロピリジノン骨格の変換を行うべく、アルデヒド **43** の合成を検討した。まず、**36** のエステル基を還元し **42** へ変換するため、DIBAL を作用させた (Scheme 3.3)。

**Scheme 3.3.** Synthesis of aldehyde **43**.



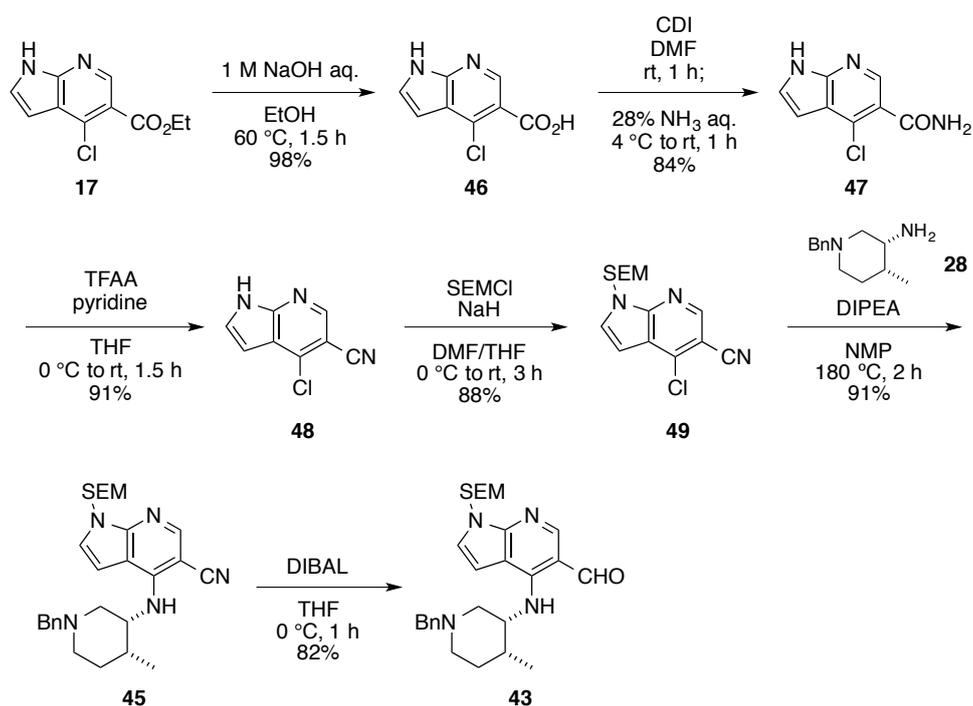
しかしながら、0 °C では反応が進行せず室温まで昇温させたところ、分解物と思われるスポットが確認され収率が中程度に留まった。LAH を用いた場合においても、0 °C では反応が進行せず、室温まで昇温させる必要があった。そしてその場合には副生成物であるメチル体 **44** の生成も確認された。このように、エステル基の還元が温和な条件で進行しないのは、エステルのカルボニル基が分子内で水素結合し DIBAL や LAH のアルミニウム原子が接近しにくくなっているためと考えられる (Figure 3.2)。アルコール **42** からアルデヒド **43** への変換は定量的に進行したものの、**43** が三環性骨格の変換を行う上で重要な中間体であったことから、より効率的な合成法が必要であった。そこで、分子内水素結合を形成しないと考えられる中間体 **45** を経由した別ルートでの合成を行うこととした。

**Figure 3.2.** Change of synthetic intermediate.



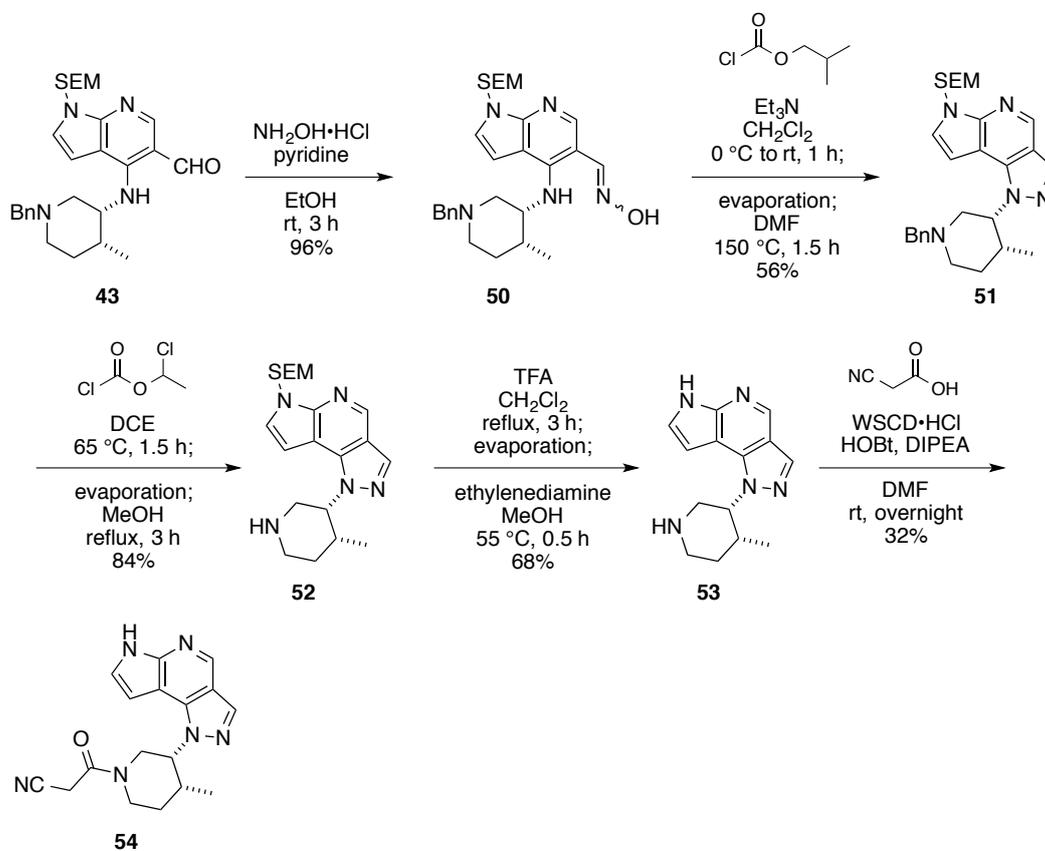
アルデヒド **43** の別ルートでの合成法を Scheme 3.4 に示す。 **17** のエステル基の加水分解を行い、カルボン酸 **46** とした。続いて、**46** を CDI で活性化した後アンモニア水を加えることで **47** へと変換した。そして、TFAA とピリジンと作用させ、カルバモイル基をシアノ基への変換し、ピロロピリジン **48** の NH を SEM 基で保護することで **49** とした。次に、**28** との芳香族求核置換反応を行い **45** とした後、DIBAL を作用させた。DIBAL による還元反応は円滑に進行し、目的とするアルデヒド **43** を良好な収率にて得ることに成功した。

**Scheme 3.4.** Improved synthesis of aldehyde **43**.



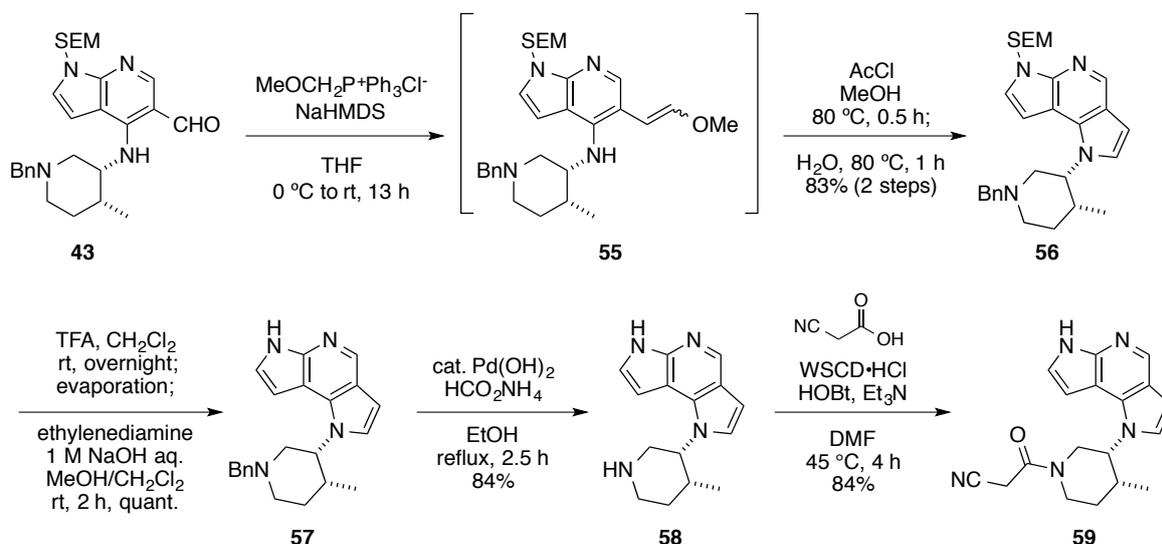
**54** の合成は Scheme 3.5 に示す方法にて行った。アルデヒド **43** にヒドロキシルアミン塩酸塩を作用させることで、オキシム **50** に導いた。そして、クロロギ酸イソブチルを作用させ加熱することでピラゾール環を構築し **51** とした。続いて、クロロギ酸 1-クロロエチルと続く MeOH による処理により Bn 基を除去し **52** とした。そして、TFA を作用させた後、エチレンジアミンを作用させることで SEM 基を除去し **53** とした。最後に、シアノ酢酸との縮合反応を行い **54** とした。

**Scheme 3.5.** Synthesis of **54**.

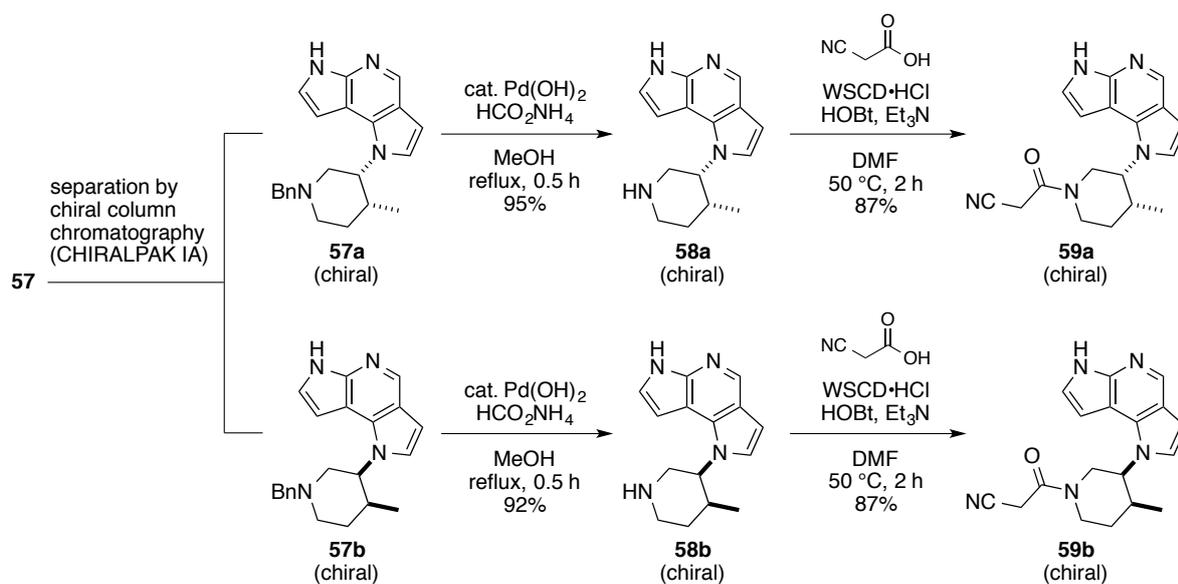


**59** の合成は Scheme 3.6 に示す方法にて行った。まずアルデヒド **43** を Wittig 反応により 1 炭素増炭シエノールエーテル **55** とした。その後、酸性条件下加熱することでピロール環を構築し、ジピロロピリジン **56** とした。さらに、SEM 基及び Bn 基を順次除去し **57** とした後に、シアノ酢酸との縮合反応を行うことで **59** を得た。続いて **59** の光学活性体 **59a, b** の合成を行った (Scheme 3.7)。**57** をキラルカラムにて分割し、**57a, b** を得た。そして、**59** と同様の変換を行うことで、**59a, b** を得た。

**Scheme 3.6.** Synthesis of **59**.

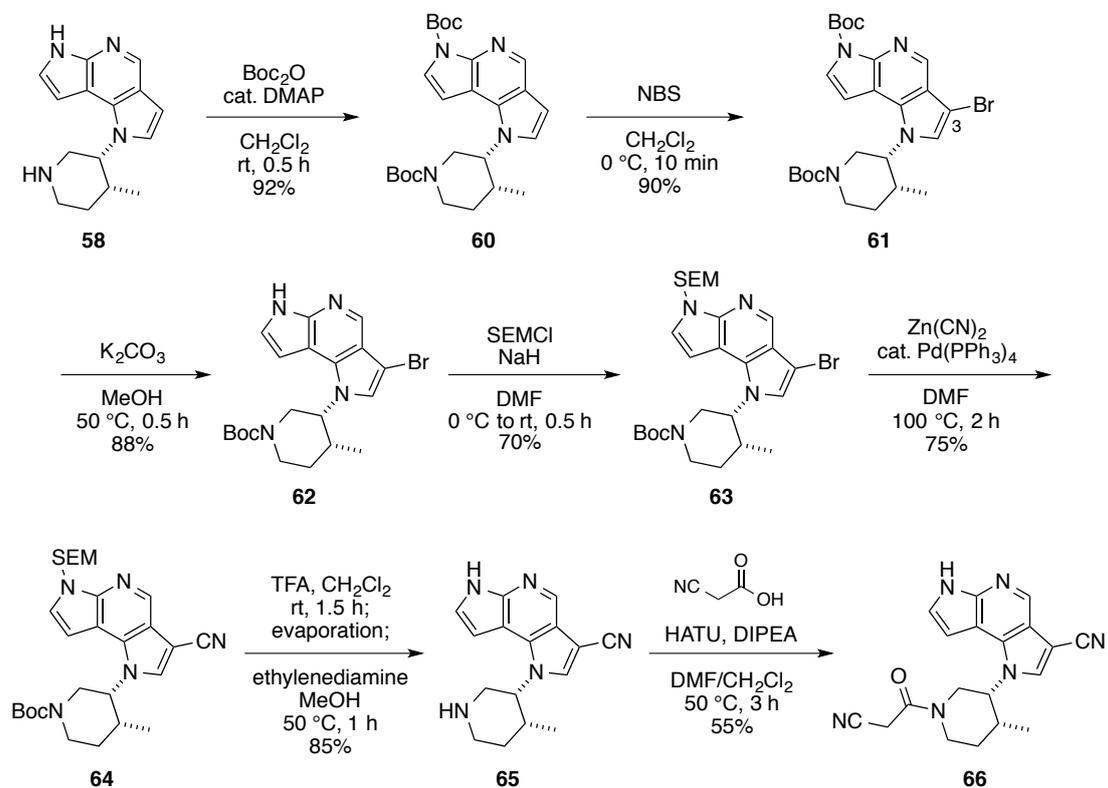


**Scheme 3.7.** Synthesis of **59a, b**.



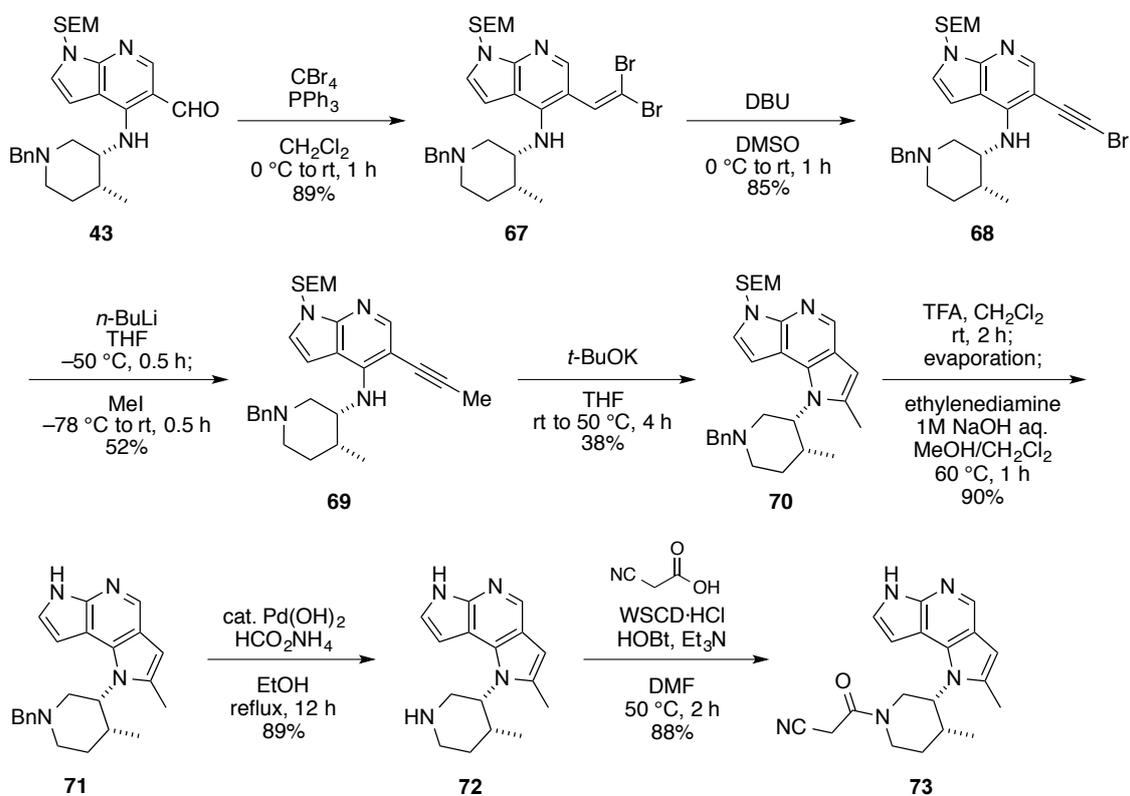
**66** の合成は Scheme 3.8 に示す方法にて行った。**58** の 2 箇所 NH を Boc 基で保護した後、NBS を作用させることで、ジピロロピリジン骨格の 3 位選択的にブromo基を導入し **61** とした。次に、ピロロピリジンの NH の Boc 基を塩基性条件下除去し **62** とした後、SEM 基への保護基の架け替えを行い **63** へ変換した。そして、 $\text{Zn}(\text{CN})_2$  を用いたカップリング反応によりシアノ基を導入し **64** を得た。続いて、酸性条件下 SEM 基及び Boc 基を同時に除去し **65** とした。最後に、シアノ酢酸アミドへの変換を行うことで **66** を得た。

**Scheme 3.8.** Synthesis of **66**.



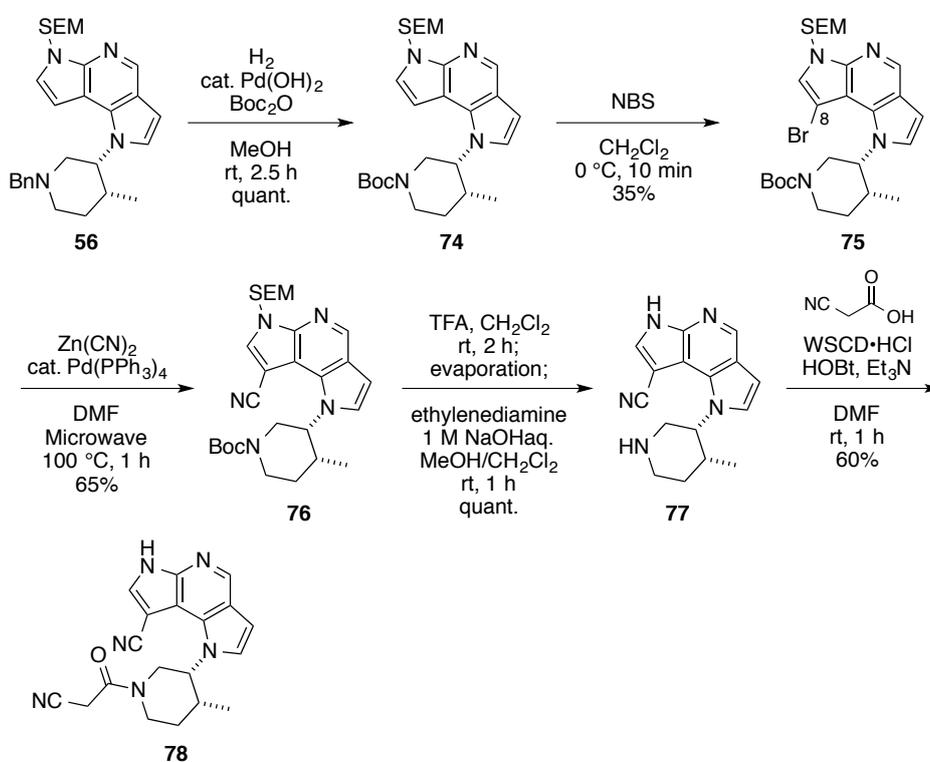
次に、Corey-Fuchs 反応を用いた **73** の合成を行った (Scheme 3.9)。 **43** に四臭化炭素とトリフェニルホスフィンを作用させることで、ジブロモオレフィン **67** へ変換した。続いて、DBU を作用させることで、プロモアルキン **68** に導き、*n*-BuLi を用いてアセチリドアニオンを生じさせた後、MeI にてトラップすることで **69** とした。その後、*t*-BuOK を塩基として用いることでピロール環を構築し **70** とした。そして、SEM 基と Bn 基を順次除去し、シアノ酢酸と縮合することで目的の **73** を得た。

**Scheme 3.9.** Synthesis of **73**.

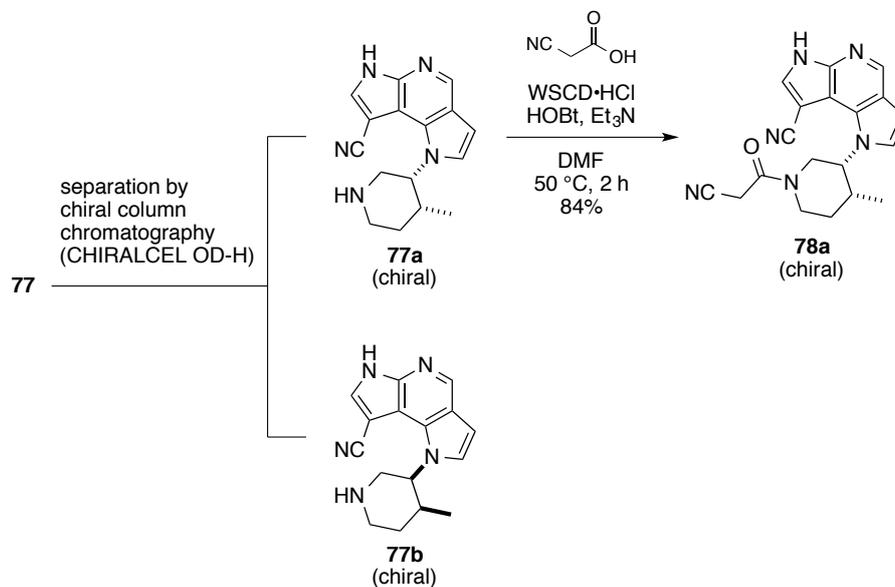


**78** の合成は Scheme 3.10 に示す方法にて行った。**56** に対して、 $\text{Boc}_2\text{O}$  及び水酸化パラジウム存在下水素添加の条件に付すことで、 $\text{Bn}$  基を  $\text{Boc}$  基へ変換し **74** とした。続いて、**74** に  $\text{NBS}$  を作用させることで、ジピロロピリジン骨格 8 位へのブロモ基の導入を行った。この際 8 位に加えて 3 位もブロモ化されたジブロモ体が副生したため低収率に留まった。その後の変換は、**66** の合成の場合と同様、シアノ基の導入と保護基の除去を行い **77** とした。そして最後に、シアノ酢酸アミドへ変換することで **78** を得た。続いて、**78** の光学活性体 **78a** の合成を行った (Scheme 3.11)。キラルカラムにて **77a** と **77b** を分離した後、**77a** に対し縮合反応を行うことで **78a** とした。

**Scheme 3.10.** Synthesis of **78**.

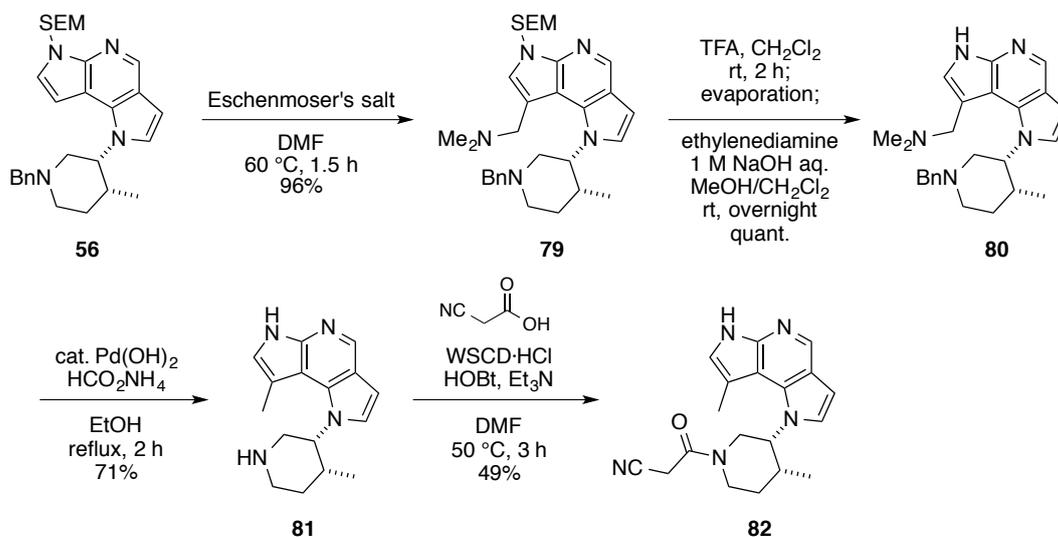


**Scheme 3.11.** Synthesis of **78a**.



**82** は Scheme 3.12 に示す手法にて合成した。**56** に Eschenmoser's salt を作用させることで、ジピロピリジン骨格 8 位選択的にジメチルアミノメチル基を導入し **79** とした。続いて、SEM 基の除去を行い **80** へ変換した。次に、水酸化パラジウム存在下ギ酸アンモニウムを加え加熱することで、Bn 基の除去及びジメチルアミノメチル基のメチル基への変換を行い **81** とした。最後に、シアノ酢酸アミドへ変換することで **82** を得た。

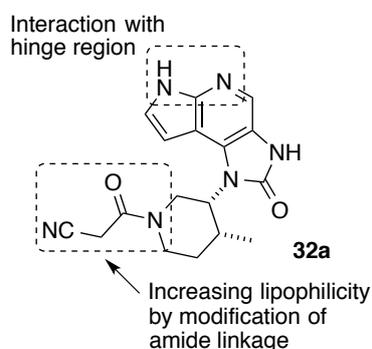
**Scheme 3.12.** Synthesis of **82**.



### 3-3. 膜透過性の改善

はじめに脂溶性を増大させることによって膜透過性の改善を目指した。脂溶性の増大は、代謝安定性の低下と TDI のリスクの増大を招く恐れがあるため、適切な範囲に脂溶性を調節する必要がある。これまでの筆者らの研究で、概ね  $CLogP=3.0$  を超えると、代謝安定性が悪化する傾向がみられたことより、 $CLogP=3.0$  を下回る化合物をデザインすることとした。脂溶性を増大させるために変換する箇所としては、アミド部分を選択した (Figure 3.3)。アミド部分が JAK の ATP-binding site の外側に位置し、置換基許容性が高いであろうと考えたためである。

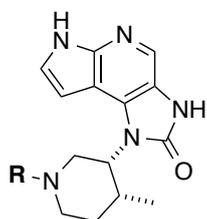
Figure 3.3. Modification strategy of **32a**.



アミドの  $\alpha$  位へジメチル基を導入した **32c** では、 $JAK3 IC_{50}=7.1$  nM と阻害活性の低下がみられた (Table 3.2)。一方、脂溶性増大により  $P_e=6.3 \times 10^{-6}$  cm/s と膜透過性の改善傾向を示した。しかしながら、CYP3A4 残存活性 18% と TDI を示すことも明らかになった。シアノメチル基をピペリジンに変換した **33a** においては、 $JAK3 IC_{50}=2.1$  nM と阻害活性は低下したものの、 $P_e=11 \times 10^{-6}$  cm/s と膜透過性の改善がみられた。しかし、**32c** と同様に、CYP3A4 残存活性は 11% と TDI を示すことが明らかになった。そこで、**33a** の脂溶性を調節するべく、モルホリンへ変換した **33b** を合成した。**33b** の CYP3A4 残存活性は 61% と改善したが、膜透過性が  $1.3 \times 10^{-6}$  cm/s と低値であり、 $JAK3$  阻害活性も  $IC_{50}=5.5$  nM と低下傾向であった。また、シアノピリジン<sup>25</sup>を導入した **34** においては  $JAK3 IC_{50}=1.6$  nM と阻害活性は保持し、膜透過性も良好ではあったが、CYP3A4 残存活性は 29% と TDI を示すことが明らかになった。

このように、アミド周辺の変換による脂溶性の調節は、膜透過性の改善には一定の効果がみられるものの、 $JAK3$  阻害活性と TDI のリスクとのバランスを取るのが困難であった。

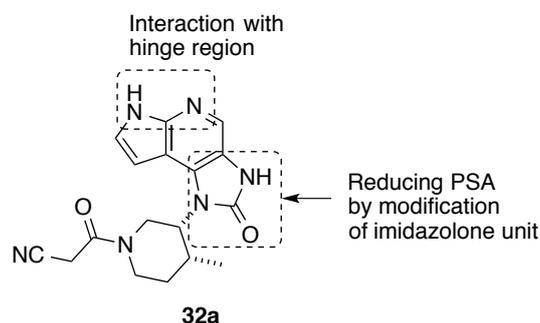
**Table 3.2.** Modification of amide linkage of **32a**.



No.	R	JAK3 IC <sub>50</sub> (nM)	CYP3A4 TDI % remaining	PAMPA P <sub>e</sub> (× 10 <sup>-6</sup> cm/s)	CLogP
<b>32a</b> (racemate)		1.1	90%	<0.7	1.0
<b>32c</b> (racemate)		7.1	18%	6.3	1.7
<b>33a</b> (racemate)		2.1	11%	11	3.0
<b>33b</b> (racemate)		5.5	61%	1.3	1.5
<b>34</b> (racemate)		1.6	29%	8.8	2.8

次に、PSA\*低減による膜透過性の改善を試みた。一般的に、PSAは水素結合ドナー（HBD）と水素結合アクセプター（HBA）の総数と比例することが知られている<sup>26</sup>。そこで、イミダゾピロロピリジノン骨格の変換を行うこととした。イミダゾピロロピリジノン骨格中のピロロピリジン環はJAKのhinge領域と水素結合を介して相互作用しているため変換許容性が低いと考えられる。そのため、イミダゾピロロピリジノン骨格中のイミダゾロン環の変換を行うこととした。

**Figure 3.4.** Modification of imidazolone unit.

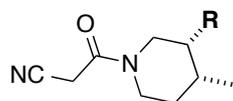


NHのメチル化によってHBDを削減した**41**においては、JAK3 IC<sub>50</sub> = 5.0 nMと阻害活性の低下を招いたものの、膜透過性はP<sub>e</sub> = 2.5 × 10<sup>-6</sup> cm/sと改善傾向を示した（Table 3.3）。イミダゾロンをピラゾールに変換しHBAを削減した**54**においても、JAK3 IC<sub>50</sub> = 4.1 nMと同様に阻害活性は低下したものの、P<sub>e</sub> = 5.9 × 10<sup>-6</sup> cm/sと膜透過性のさらなる改善がみられた。この結果より、HBD及びHBAの削減によるPSAの低減が膜透過性の改善に有効であると考えた。そして、イミダゾロンをピロールへ変換し、さらにPSAを低減させたジピロロピリジン**59**では、P<sub>e</sub> = 13 × 10<sup>-6</sup> cm/sと膜透過性のさらなる改善に加えて、JAK3 IC<sub>50</sub> = 0.44 nMと阻害活性の向上もみられた。

このように、HBDとHBAの総数を削減しPSAを低減させることで膜透過性を改善することに成功した。**59**はCLog P = 2.0と大きな脂溶性の増大を伴っていないため、CYP3A4残存活性も90%とTDIの懸念も低いことが判明した。以上の結果より、ジピロロピリジン骨格が有望であったことから、ジピロロピリジン骨格への置換基導入効果を検証することとした。

\* PSAの指標としてACD/Perceptaにて計算を行ったTPSA（topological PSA）を用いた。TPSAは三次元分子構造なしに近似計算したPSAの値である。

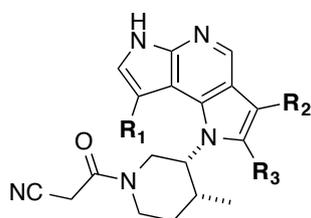
**Table 3.3.** Modification of imidazo-pyrrolopyridinone scaffold.



No.	R	JAK3 IC <sub>50</sub> (nM)	PAMPA P <sub>e</sub> (×10 <sup>-6</sup> cm/s)	CLogP	CYP3A4 TDI % remaining	HBD counts	HBA counts	TPSA (Å <sup>2</sup> )
<b>32a</b> (racemate)		1.1	<0.7	1.0	90%	2	8	105
<b>41</b> (racemate)		5.0	2.5	1.1	NT	1	8	96
<b>54</b> (racemate)		4.1	5.9	1.4	NT	1	7	91
<b>59</b> (racemate)		0.44	13	2.0	90%	1	6	78

**41** でのメチル基の導入においても活性の低下がみられたことを考えると、導入できる置換基の大きさには限界があると考えた。そこで、立体的に小さい置換基の導入を試みた。 $R_2$  にシアノ基を導入した **66** では、JAK3  $IC_{50} = 1.1$  nM と活性の低下がみられた (Table 3.4)。また、 $R_3$  へメチル基を導入した **73** では JAK3  $IC_{50} = 0.17$  nM と阻害活性は向上したものの、CYP3A4 残存活性 44%と TDI を示した。次に、 $R_1$  の変換を行った。シアノ基を導入した **78** では、JAK3  $IC_{50} = 0.38$  nM と **59** と同程度の阻害活性を示し、CYP3A4 残存活性も 90%と良好であった。一方、メチル基を導入した **82** では、阻害活性の低下及び TDI を示すことが明らかになった。以上の結果より、JAK3  $IC_{50} < 1.0$  nM かつ CYP3A4 残存活性 90%以上であり、良好な膜透過性を示した、**59** と **78** を選択してさらなる評価を行うこととした。

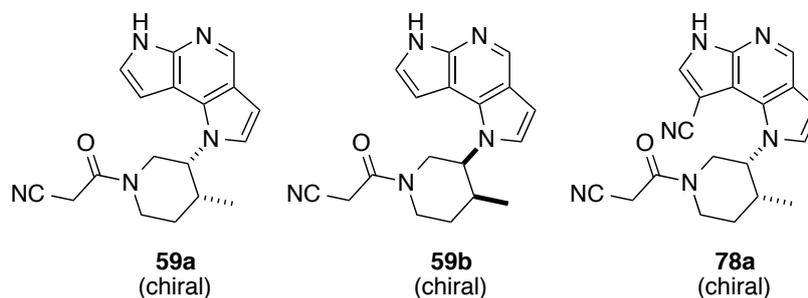
**Table 3.4.** SARs of dipyrrolopyridine scaffold.



No.	$R_1$	$R_2$	$R_3$	JAK3 $IC_{50}$ (nM)	CYP3A4 TDI % remaining	PAMPA $P_e$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)	CLogP
<b>59</b> (racemate)	H	H	H	0.44	90%	13	2.0
<b>66</b> (racemate)	H	CN	H	1.1	91%	3.8	1.5
<b>73</b> (racemate)	H	H	Me	0.17	44%	26	2.5
<b>78</b> (racemate)	CN	H	H	0.38	90%	13	2.2
<b>82</b> (racemate)	Me	H	H	2.5	62%	23	2.5

**59** 及び **78** はラセミ体であったので、それぞれの光学活性体の合成を行った。その結果、*3R,4R* 体である **59a** は JAK3  $IC_{50} = 0.14$  nM と、*3S,4S* 体である **59b** よりも 1000 倍以上高活性であることがわかった。そこで、**78** に関しても *3R,4R* 体である **78a** を合成したところ、JAK3  $IC_{50} = 0.11$  nM という高活性を示した。**59a**, **78a** の JAK3 阻害活性は目標とした **5** の JAK3 阻害活性を 5 倍程度上回っており、JAK2/JAK3 選択性も同等であった。**59a** に関しては、細胞系評価\*も行い、T-cell  $IC_{50} = 4.3$  nM と **5** を上回る T 細胞増殖阻害作用を示した。

**Table 3.5** Profiles of **59a**, **59b** and **78a**.



No.	JAK3 $IC_{50}$ (nM)	JAK2 $IC_{50}$ (nM)	JAK1 $IC_{50}$ (nM)	T-cell $IC_{50}$ (nM)	<i>in vitro</i> $CL_{int}$ (mL/min/kg)	CYP3A4 TDI % remaining	PAMPA $P_e$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)
<b>59a</b> ( <i>3R, 4R</i> )	0.14	0.30	0.46	4.3	138	89%	20
<b>59b</b> ( <i>3S, 4S</i> )	200	390	NT	NT	89	88%	21
<b>78a</b> ( <i>3R, 4R</i> )	0.11	1.4	3.2	NT	389	93%	14
<b>5</b>	0.80	3.1	3.7	23	63	100%	5.0

\* IL-2 による刺激を与えた T 細胞の増殖を化合物でどれだけ阻害するかを評価する系。IL-2 シグナル伝達は、JAK1 及び JAK3 を介して行われるので、JAK1 阻害活性と JAK3 阻害活性、化合物の細胞膜透過性を総合的に評価していることになる。

### 3-4. 化合物 **59a** 及び **78a** の薬物動態

良好なプロファイルを示した、**59a** 及び **78a** の薬物動態試験を行った。その結果、両化合物はそれぞれ  $F = 103\%$ 、 $82.4\%$ と良好なバイオアベイラビリティと十分な暴露を示した。以上の結果より、PSA 低減により膜透過性を改善させたことが経口吸収性の改善に寄与したといえる。

**Table 3.6** Pharmacokinetic parameters<sup>a</sup> of compound **59a** and **78a**.

No.	<i>i.v.</i> (1 mg/kg)				<i>p.o.</i> (1 mg/kg)				
	CL (mL/min/kg)	$V_d$ (L/kg)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-24h}$ (ng·h/mL)	$C_{max}$ (ng/mL)	$T_{max}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-24h}$ (ng·h/mL)	F (%)
<b>32a</b>	113	3.62	1.13	148	2.98	0.25	11.8	11.8	11.2
<b>59a</b>	18.8	1.52	1.64	889	260	0.50	2.58	917	103
<b>78a</b>	20.2	0.97	7.86	1110	178	0.33	3.99	916	82.4

<sup>a</sup>Pharmacokinetics were performed in SD rats (female).

### 3-5. 化合物 **59a** 及び **78a** のキナーゼ選択性

**59a** と **78a** に関して、32 種類のキナーゼに対する選択性を評価した。その結果を Table 3.7 にまとめた。**59a** の JAK2/JAK3 選択性は **5** と同程度の 2-4 倍程度であるのに対し、**78a** は 13 倍程度の JAK2/JAK3 選択性を有している (Table 3.5)。このことは、両化合物が違ったプロファイルを示していることを示唆しているが、キナーゼ選択性評価においても異なったプロファイルを示した。**59a** は JAK サブタイプ間の選択性は低かったものの、1000 nM の化合物濃度においても LCK、PKC $\alpha$ 、ROCK1 以外の 29 種類のキナーゼに対して阻害活性を示さなかった。このような高い選択性を有していた原因は、環化によりコンフォメーションを固定化したことで、JAK に対して特異的に相互作用するようになったためであると考えられる。一方、**78a** は 13 種類のキナーゼ (LCK、TRKA、AKT1、AurC、CaMK2 $\alpha$ 、CDK2、CHK1、GSK3 $\beta$ 、JNK1、MAP2K1、p70S6K、PKC $\alpha$ 、ROCK1) に関しては、50%以上の阻害を示した。このようにキナーゼ選択性が異なる理由は定かではないが、シアノ基導入による電子求引効果により hinge 領域とピロロピリジン環との相互作用に影響が出たためではないかと考えて

いる。実際、**59a** のピロロピリジン環の NH の pKa の計算値\*は 13.9±0.4 であるのに対し、**78a** の計算値は 11.5±0.4 と酸性度が上昇していることが予測された。これによって ATP-binding site の hinge 領域との水素結合に影響が出たのではないかと思われる。

このキナーゼ選択性評価の結果より、良好なキナーゼ選択性を有する **59a** を動物モデルにて薬効評価を行う化合物として選択した。

**Table 3.7.** Kinase selectivity<sup>a</sup> of compound **59a** and **78a**.

	<b>59a</b>	<b>78a</b>		<b>59a</b>	<b>78a</b>
ABL	>1000 nM	>1000 nM	BMPR1A	>1000 nM	>1000 nM
BTK	>1000 nM	>1000 nM	CaMK2α	>1000 nM	54% <sup>b</sup>
CSK	>1000 nM	>1000 nM	CDK2	>1000 nM	91% <sup>b</sup>
EGFR	>1000 nM	>1000 nM	CHK1	>1000 nM	59% <sup>b</sup>
EphA2	>1000 nM	>1000 nM	CK1δ	>1000 nM	>1000 nM
FAK	>1000 nM	>1000 nM	GSK3β	>1000 nM	92% <sup>b</sup>
IGF1R	>1000 nM	>1000 nM	IKKβ	>1000 nM	>1000 nM
ITK	>1000 nM	>1000 nM	JNK1	>1000 nM	59% <sup>b</sup>
LCK	55% <sup>b</sup>	88% <sup>b</sup>	MAP2K1	>1000 nM	90% <sup>b</sup>
SRC	>1000 nM	51% <sup>b</sup>	MAP3K1	>1000 nM	>1000 nM
SYK	>1000 nM	>1000 nM	MAPKAPK2	>1000 nM	>1000 nM
TIE2	>1000 nM	>1000 nM	P38β	>1000 nM	>1000 nM
TRKA	>1000 nM	67% <sup>b</sup>	p70S6K	>1000 nM	78% <sup>b</sup>
ZAP70	>1000 nM	>1000 nM	PKCα	67% <sup>b</sup>	98% <sup>b</sup>
AKT1	>1000 nM	80% <sup>b</sup>	RAF1	>1000 nM	>1000 nM
AurC	>1000 nM	77% <sup>b</sup>	ROCK1	75% <sup>b</sup>	101% <sup>b</sup>

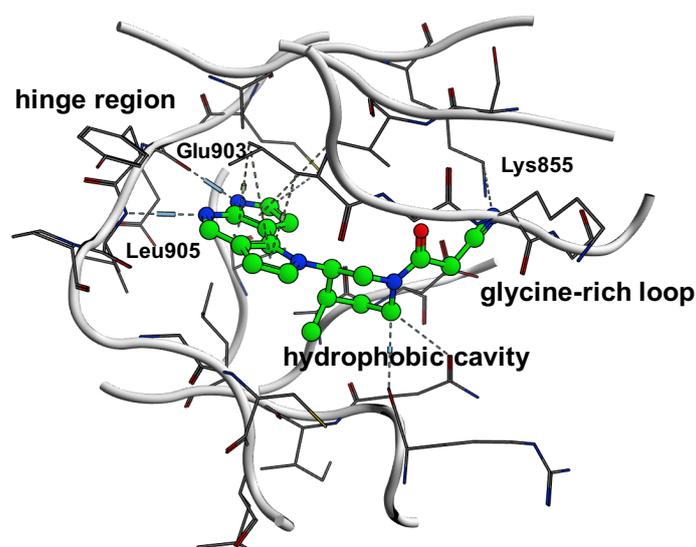
<sup>a</sup>Described as IC<sub>50</sub>. <sup>b</sup>Inhibition % at 1000 nM.

\* ACD/Percepta による計算値。

### 3-6. 化合物 **59a** のドッキング解析による考察

**59a** と JAK3 とのドッキング解析を行った。その結果を Figure 3.5 に示す。基本的なドッキング様式としては、**32a** と同様であった (Figure 3.5)。**32a** と **59a** の構造上相違点は、三環性骨格のうち一環がイミダゾロン環であるか、ピロール環であるかの違いである。**32a** から **59a** に変換したことで、阻害活性の向上がみられたため、ピロール環が JAK3 と新たな相互作用を獲得しているのではないかと推察されたが、ドッキング解析からは新たな相互作用を示唆するものはなかった。しかしながら、ピロール環周辺には疎水性領域が広がっており、イミダゾロン環からピロール環に変換することでヘテロ原子が減少し、疎水性領域との親和性が高まり阻害活性が向上したのではないかと考えている。

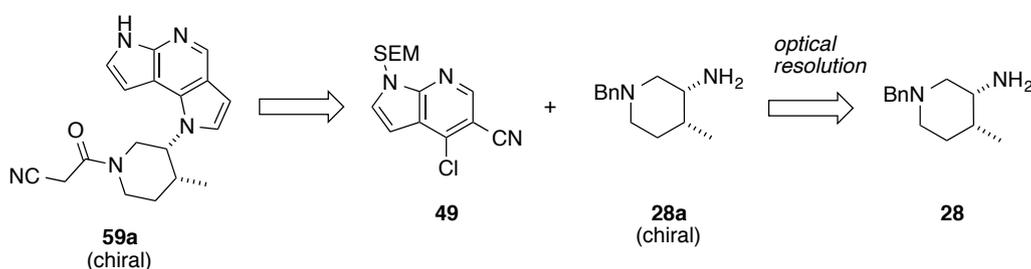
**Figure 3.5.** Predicted binding mode of **59a** to human JAK3.



### 3-7. 化合物 **59a** の合成検討

**59a** の合成は、**57** をキラルカラムを用いて光学分割した **57a** より行っているため (Scheme 3.7)、動物モデルでの薬効評価や毒性試験を実施する際の大量供給という観点では課題があった。そこで、効率的かつ大量に供給する合成法の検討を行った。キラルカラムに依存しない光学活性体の供給を考えた場合、光学活性な 3-アミノピペリジン **28a** を取得し、**49** との芳香族求核置換反応以降の反応を行えばよいと考えられる (Figure 3.6)。**28a** は **28** の光学分割により得ることとした。

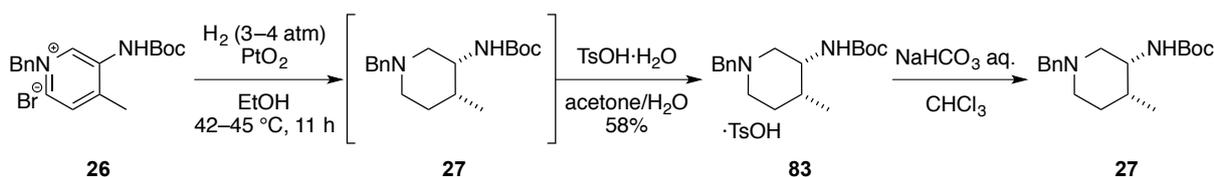
Figure 3.6. Synthetic plan for **59a**.



**28** は **26** のピリジン環を還元することで合成しているが (Scheme 2.6)、その精製にカラム精製を必要としており大量合成を指向した場合には課題であった。そこで、カラム精製を行わずに **27** を単離する方法の検討を開始した。

種々の精製法を検討した結果、**26** を水素添加の条件に付した後、得られた残渣にトシル酸一水和物を作用させることで **27** のトシル酸塩である **83** を白色固体として得ることに成功した (Scheme 3.13)。そして、得られた **83** を炭酸水素ナトリウム水溶液で中和しクロロホルムを用いて分液操作を行うことで、カラム精製を行うことなく **27** へ変換した。

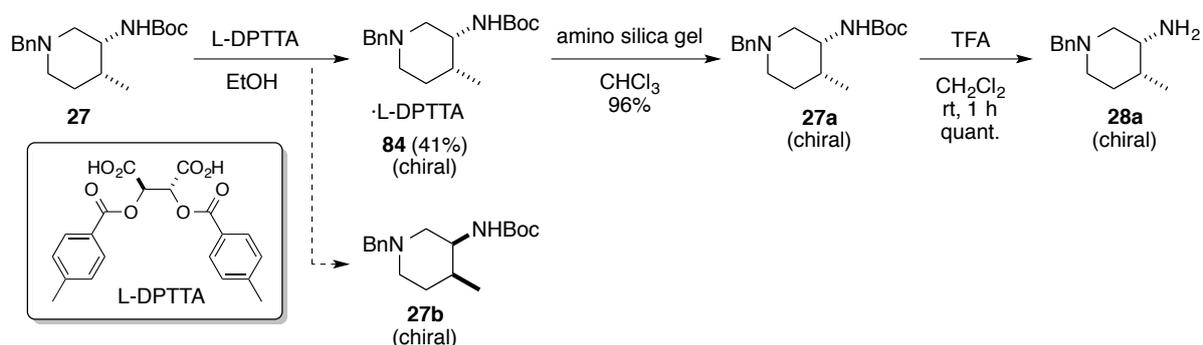
Scheme 3.13. Improved synthesis of **27**.



次に得られた **27** の光学分割を検討した。はじめに別途キラルカラムにより分割した光学活性体 **27a** に対して酒石酸、CSA、DPTTA、リンゴ酸を作用させ結晶が得られるかどうか検討を行った。そして結晶が得られた場合に、ラセミ体である **27** に得られた結晶を種晶として作

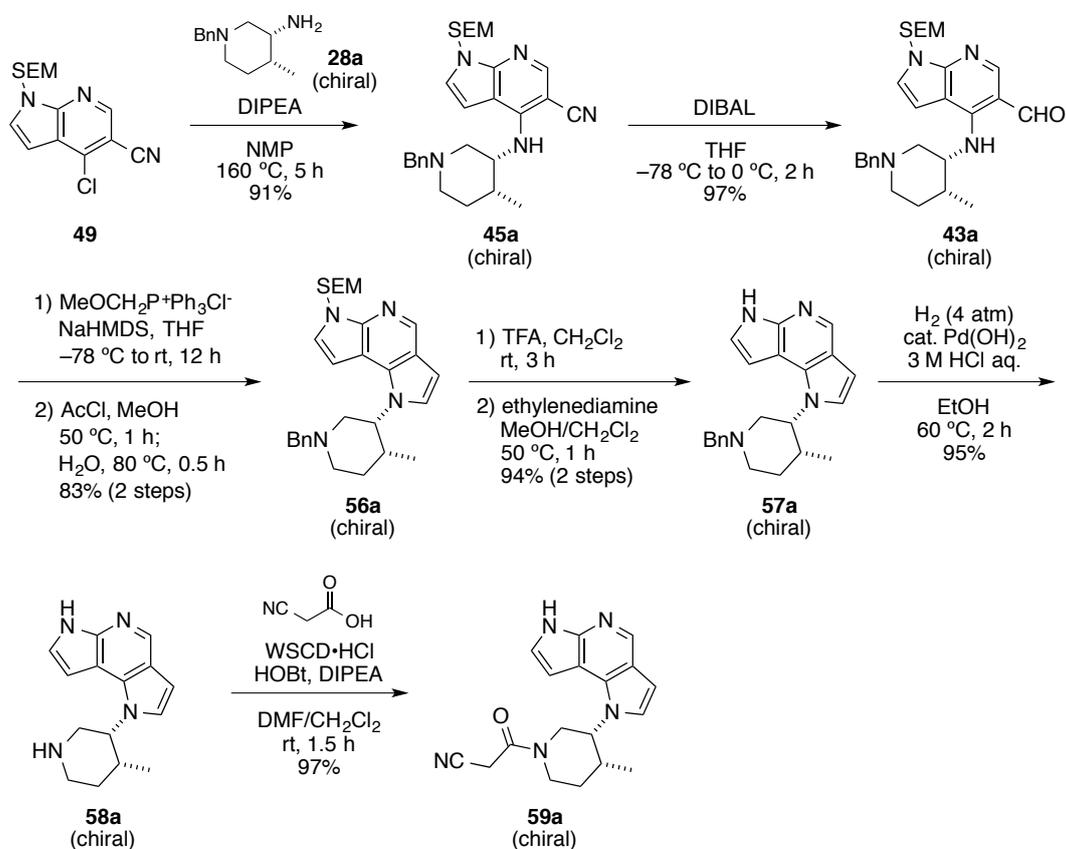
用させることで目的とする光学活性体のみを析出させることが可能かどうか検討を行った。その結果、L-DPTTA を用いた場合のみ目的とする **84** が単一な光学活性体として得られた (Scheme 3.14)。このようにして得られた **84** をアミノシリカゲルを用いて脱塩し **27a** とした後、TFA を用いて Boc 基を除去することで目的とする **28a** を得た。以上のように、光学活性体である **28a** をキラルカラム及び中性シリカゲルでの精製を行うことなく供給する手法の開発に成功した。

**Scheme 3.14.** Synthesis of **28a**.



続いて、**28a** を用いてその後の変換の検討を行った。その結果、Scheme 3.15 に示す合成ルートを構築した。基本的にはラセミ体の合成ルートを踏襲したものではあるが、**57a** から **58a** の Bn 基の除去において、ラセミ体の合成で用いた水酸化パラジウム及びギ酸アンモニウム存在下で加熱を行う手法は大量合成に不向きであったため検討を行った。その結果、塩酸水溶液を加えた上で、水酸化パラジウム存在下水素添加の条件に付すことで、良好に反応を進行させることに成功し、高収率にて **58a** が得られた。このようにして構築した合成ルートによって、動物モデルでの薬効評価を行うのに十分量の **59a** を供給することが可能となった。

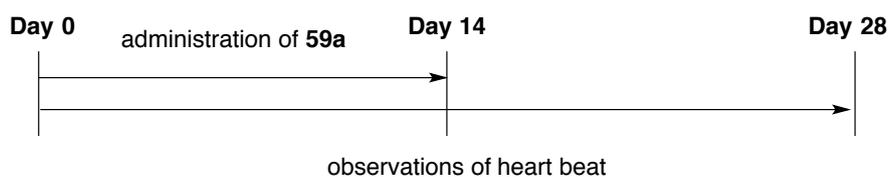
**Scheme 3.15.** Improved synthesis of **59a**.



3-8. ラット心移植モデルでの評価

拒絶反応抑制効果を確認すべく、**59a** のラット心移植モデルでの評価を行った。本モデルでは、腹部に ACI ラットの心臓を移植した Lewis ラットを用いる<sup>26</sup>。そして、薬物を 14 日間投与し移植心臓の拍動の有無を 28 日間観察することで拒絶反応が抑制されたか否かを判断する (Figure 3.7)。

**Figure 3.7.** Evaluation in rat heterotopic cardiac transplant model.



薬物非投与の場合には生着期間中央値 (median survival time, MST)は 5 days であるが<sup>27</sup>、タクロリムスを 0.02 mg/kg 筋肉内投与した場合には MST = 10 days に延長する\* (Table 3.8)。一方、タクロリムス併用下、**59a** を 0.25 mg/kg 及び 0.5 mg/kg 経口投与した場合には、MST = 21 days と生着延長効果を示した<sup>28</sup>。以上の結果より、**59a** を臓器移植における拒絶反応抑制を適応とした薬剤の開発候補品として選択した。

**Table 3.8.** Effect of compound **59a** on graft survival in a rat heterotopic cardiac transplant model.

Dose ( <i>p.o.</i> )	tacrolimus ( <i>i.m.</i> )	n	graft survival time (days)	MST (days)	P- value <sup>a</sup>
-	0.02 mg/kg	7	6, 7, 9, 10, 10, 11, 12	10	-
0.1 mg/kg	0.02 mg/kg	8	6, 7, 7, 8, 10, 10, 14, >28	9	-
0.25 mg/kg	0.02 mg/kg	7	12, 12, 15, 21, 22, 22, >28	21	P < 0.0001
0.5 mg/kg	0.02 mg/kg	7	8, 8, 16, 21, 22, 22, 24	21	P < 0.05

<sup>a</sup>P-value calculated by log-rank test compared to combination therapy with vehicle plus tacrolimus group

### 3-9. 小括

第二章で見出したイミダゾピロロピリジノン **32a** の薬物動態試験を行ったところ、低経口吸収性を示すことが判明した。膜透過性の低さがこの原因と考え、PSA 低減による膜透過性の改善を検討した。そこで、イミダゾピロロピリジノン骨格の変換を行い、高活性かつ良好な膜透過性を有し、TDI の懸念の少ないジピロロピリジン **59a**、**78a** を見出すことに成功した。**59a**、**78a** は良好な経口吸収性を示したことより、膜透過性の改善が経口吸収性の改善につながったと考えられた。なお、キナーゼ選択性評価において、**59a** は **78a** と比較し良好なキナーゼ選択性を有することが判明したため、**59a** をラット心移植モデルにて評価を行う化合物として選択した。そして、**59a** は移植臓器の生着延長効果を示したことから、**59a** を臓器移植における拒絶反応抑制を適応とした薬剤の開発候補品として選択した。

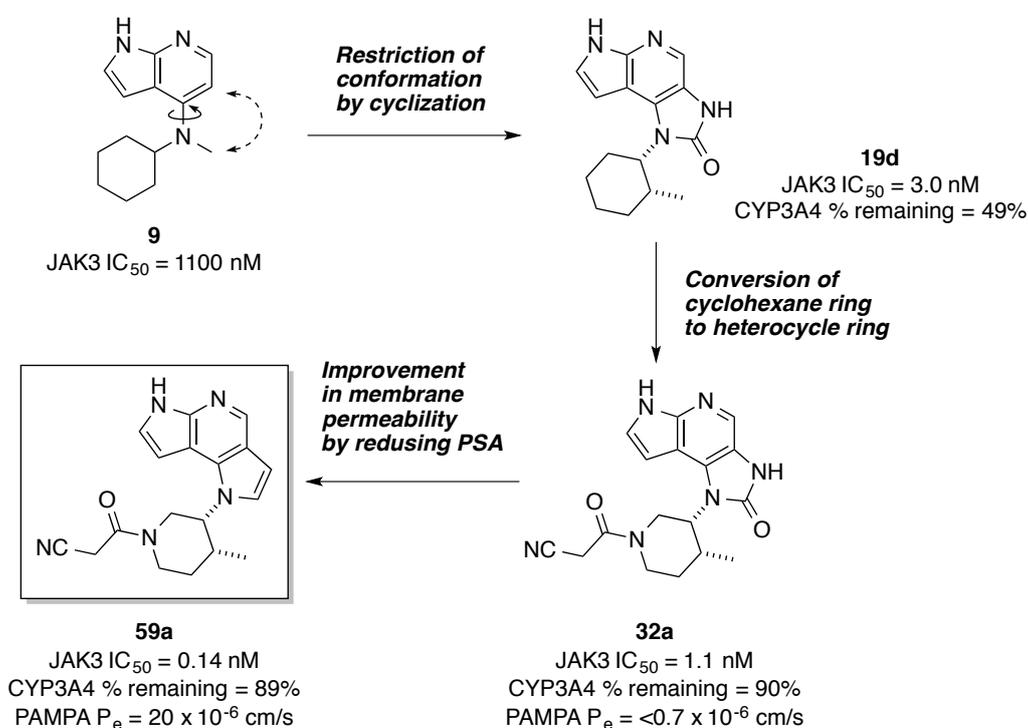
\* この場合のタクロリムスの投与量は sub-optimal dose である。本投与量のタクロリムスと JAK 阻害剤の併用によって移植臓器の生着延長効果が出た場合、タクロリムスの投与量の低減すなわち毒性懸念の低減が達成できたものと判断している。

## 第四章 総括

リード化合物 **9** のコンフォメーションを固定し、シクロヘキサン環を JAK3 の疎水性領域と効果的に相互作用させるべく、新規三環性イミダゾピロロピリジノン骨格をデザインした (Figure 4.1)。その結果、大幅に活性を向上させた **19d** を見出すことに成功した。**19d** は TDI を示したことから、代謝部位と考えられたシクロヘキサン環をヘテロ環に変換する検討を行った。その結果、高活性かつ良好な代謝安定性、TDI の懸念の少ない、**32a** を見出すことに成功した。

しかしながら、薬物動態試験において、**32a** は低経口吸収性を示すことが判明した。膜透過性試験の結果より、その原因は膜透過性の低さにあると考えられた。そこで、PSA を低減させるべく、イミダゾピロロピリジノン骨格からジピロロピリジン骨格への変換を行い、高活性かつ良好な経口吸収性を有する化合物 **59a** を見出すことに成功した。**59a** は良好なキナーゼ選択性を示し、ラット心移植モデルにおいても有効性を示したことより、臓器移植における拒絶反応抑制を適応とした薬剤の開発候補品として選択した。このように活性を向上させ、経口吸収性を改善させる分子をデザインする手法は創薬化学上有用な知見といえる。

Figure 4.1. Summary.

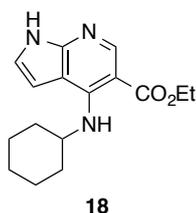


## Experimental section

### 1. Chemistry

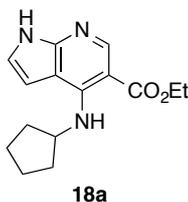
<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400, Bruker AV400M, Bruker Avance III HD, Varian VNS-400, or Varian 400 MR. Chemical shifts are expressed in  $\delta$  values (ppm) using tetramethylsilane as the internal standard (NMR peak description: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; and br, broad peak). Mass spectra (MS) were recorded using Agilent 1100, Thermo Electron LCQ Advantage, or Waters UPLC/SQD. Elemental analyses were performed using Yanaco MT-6 (C, H, N), Elementar Vario EL III (C, H, X), and Dionex ICS-3000 (S, halogens) and were within  $\pm 0.4\%$  of theoretical values. Electrospray ionization positive high resolution mass spectrum (HRMS) was conducted using Thermo Scientific Exactive Plus. Column chromatography was performed on silica gel (Kieselgel 60). Unless otherwise noted, all reagents and solvents obtained from commercial suppliers were used without further purification.

#### Ethyl 4-(cyclohexylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (**18**)



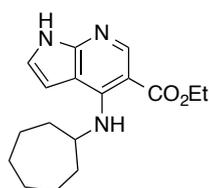
A mixture of ethyl 4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (**17**) (24 mg, 0.11 mmol) and cyclohexanamine (61  $\mu$ L, 0.53 mmol) in *n*-BuOH (120  $\mu$ L) was heated in a microwave reactor at 150 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on silica gel to give the product (17 mg, 56%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.33–1.77 (m, 8H), 1.99–2.08 (m, 2H), 3.95–4.08 (m, 1H), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.84–8.88 (m, 1H), 11.67 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 288 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Ethyl 4-(cyclopentylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (**18a**)



A mixture of **17** (112 mg, 0.50 mmol), cyclopentanamine (99  $\mu$ L, 1.0 mmol), and Et<sub>3</sub>N (209  $\mu$ L, 1.5 mmol) in NMP (3.0 mL) was heated in a microwave reactor at 180 °C for 1 h. After cooling to room temperature, to the reaction mixture was added water and the solids were collected by filtration and dried *in vacuo* to give the product (136 mg, quantitative yield) as a white solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.58–1.78 (m 6H), 1.99–2.11 (m, 2H), 4.25 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.46–4.55 (m, 1H), 6.62–6.70 (m, 1H), 7.16–7.19 (m, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.83 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 11.66 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 274 [M+H]<sup>+</sup>.

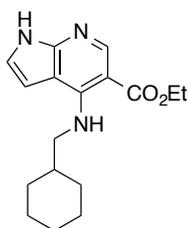
#### Ethyl 4-(cycloheptylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (**18b**)



**18b**

A mixture of **17** (112 mg, 0.50 mmol), cycloheptanamine (76  $\mu$ L, 0.60 mmol), and Et<sub>3</sub>N (209  $\mu$ L, 1.5 mmol) in NMP (3.0 mL) was heated in a microwave reactor at 180 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 100/0 to 90/10) to give the product (135 mg, 90%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.98–2.10 (m, 2H), 1.43–1.72 (m, 10H), 4.17–4.30 (m, 3H), 6.57–6.61 (m, 1H), 7.16–7.20 (m, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 11.67 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 302 [M+H]<sup>+</sup>.

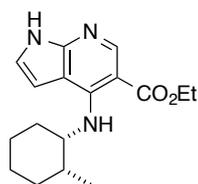
#### Ethyl 4-[(cyclohexylmethyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (**18c**)



**18c**

Compound **18c** was prepared from **17** in 62% yield as a white solid by a method similar to that described for **18b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.01–1.33 (m, 5H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.61–1.86 (m, 6H), 3.52 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.81 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 11.67 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 302 [M+H]<sup>+</sup>.

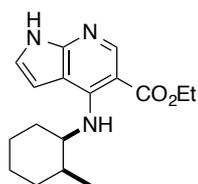
**Ethyl 4-[(1*S*,2*R*)-2-methylcyclohexyl]amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (18d)**



**18d**

Compound **18d** was prepared from **17** in 53% yield as a white solid by a method similar to that described for **18**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.35–2.16 (m, 9H), 4.23–4.34 (m, 3H), 6.59 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.02–9.06 (m, 1H), 11.66 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 302 [M+H]<sup>+</sup>.

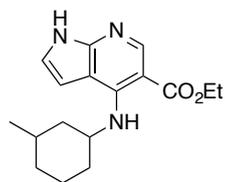
**Ethyl 4-[(1*R*,2*S*)-2-methylcyclohexyl]amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (18e)**



**18e**

Compound **18e** was prepared from **17** in 36% yield as a white solid by a method similar to that described for **18b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.35–2.16 (m, 9H), 4.23–4.34 (m, 3H), 6.59 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.02–9.06 (m, 1H), 11.66 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 302 [M+H]<sup>+</sup>.

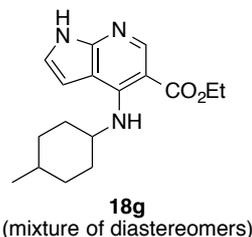
**Ethyl 4-[(3-methylcyclohexyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (18f)**



**18f**  
(mixture of diastereomers)

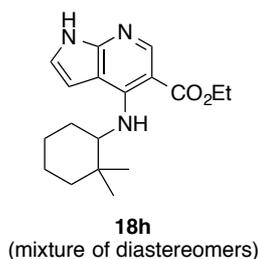
Compound **18f** was prepared from **17** in 82% yield by a method similar to that described for **18b**. MS (ESI) *m/z* 302 [M+H]<sup>+</sup>.

**Ethyl 4-[(4-methylcyclohexyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (18g)**



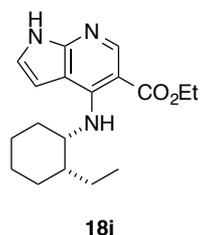
Compound **18g** was prepared from **17** in 44% yield by a method similar to that described for **18b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.88–0.96 (m, 3H), 1.11–1.27 (m, 2H), 1.28–1.35 (m, 4H), 1.38–1.64 (m, 2H), 1.67–1.86 (m, 3H), 2.06–2.14 (m, 1H), 3.82–4.37 (m, 3H), 6.52–6.59 (m, 1H), 7.15–7.21 (m, 1H), 8.51–8.59 (m, 1H), 8.73–9.14 (m, 1H), 11.66 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 302 [M+H]<sup>+</sup>.

**Ethyl 4-[(2,2-dimethylcyclohexyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (18h)**



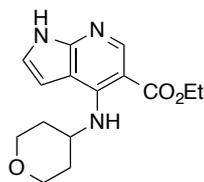
Compound **18h** was prepared from **17** in 86% yield as a white solid by a method similar to that described for **18b**. MS (ESI) *m/z* 316 [M+H]<sup>+</sup>.

**Ethyl 4-[(1*S*,2*R*)-2-ethylcyclohexylamino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (18i)**



Compound **18i** was prepared from **17** in 84% yield as a pale yellow powder by a method similar to that described for **18**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.21–1.39 (m, 8H), 1.53–1.72 (m, 5H), 1.86–1.94 (m, 1H), 4.36 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.47–4.51 (m, 1H), 6.84–6.86 (m, 1H), 7.34–7.36 (m, 1H), 8.61 (s, 1H), 9.67–9.72 (m, 1H), 12.44 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 316 [M+H]<sup>+</sup>.

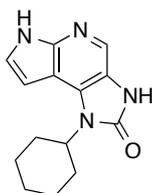
**Ethyl 4-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylamino)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxylate (18j)**



**18j**

Compound **18j** was prepared from **17** in quantitative yield as a white solid by a method similar to that described for **18b**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.32 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.42–1.63 (m, 2H), 1.98–2.11 (m, 2H), 3.50–3.65 (m, 2H), 3.81–3.93 (m, 2H), 4.19–4.35 (m, 3H), 6.62 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.86 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 11.72 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  290  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

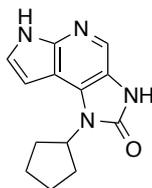
**1-Cyclohexyl-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2(1H)-one (10)**



**10**

To a solution of **18** (150 mg, 0.52 mmol) in 1,4-dioxane (2.1 mL) and water (1.2 mL) was added LiOH·H<sub>2</sub>O (88 mg, 2.1 mmol) and the mixture was refluxed for 3 h. After cooling to room temperature, to the reaction mixture was added 1 M HCl aqueous solution and the solids were collected by filtration and dried *in vacuo* to give the crude product (83 mg) as a white solid. To a mixture of the obtained crude product (77 mg, 0.30 mmol), Et<sub>3</sub>N (75  $\mu\text{L}$ , 0.53 mmol), 1,4-dioxane (1.5 mL) and DMF (0.39 mL) was added DPPA (96  $\mu\text{L}$ , 0.45 mmol) and the mixture was stirred under a nitrogen atmosphere at 120 °C for 2 h. After cooling to room temperature, water and CHCl<sub>3</sub> were added, and the organic layer was separated. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10/1) to give the product (30 mg, 24% from **18**) as an off-white solid.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.26–1.54 (m, 3H), 1.65–1.96 (m, 5H), 2.14–2.31 (m, 2H), 4.31–4.43 (m, 1H), 6.60 (m, 1H), 7.45 (t,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 10.88 (br s, 1H), 11.60 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  257  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 257.1402, Found: 257.1400.

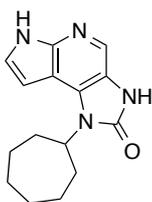
### 1-Cyclopentyl-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (19a)



19a

Compound **19a** was prepared from **18a** in 35% yield as a white solid by a method similar to that described for **10**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.68–1.79 (m, 2H), 1.91–2.02 (m, 4H), 2.11–2.02 (m, 2H), 4.86–4.97 (m, 1H), 6.53 (dd, *J* = 1.9, 3.5 Hz, 1H), 7.42–7.45 (m, 1H), 7.92 (s, 1H), 10.89 (br s, 1H), 11.58 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 243 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): 243.1246, Found: 243.1243.

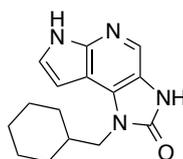
### 1-Cycloheptyl-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (19b)



19b

Compound **19b** was prepared from **18b** in 74% yield as a white solid by a method similar to that described for **10**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.52–2.37 (m, 12H), 4.47–4.61 (m 1H), 6.52–6.58 (m, 1H), 7.41–7.47 (m, 1H), 7.92 (s, 1H), 10.86 (br s, 1H), 11.58 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 271 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): 271.1559, Found: 271.1559.

### 1-(Cyclohexylmethyl)-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (19c)

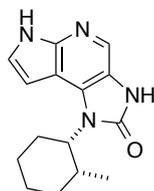


19c

Compound **19c** was prepared from **18c** in 53% yield as a white solid by a method similar to that described for **10**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.05–1.15 (m, 5H), 1.58–1.86 (m, 6H), 3.82 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.51–6.53 (m, 1H), 7.42 (t, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 10.86 (br s, 1H), 11.56 (br s, 1H); MS

(ESI)  $m/z$  271  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{15}H_{19}N_4O$  ( $[M+H]^+$ ): 271.1559, Found: 271.1561.

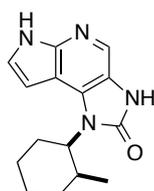
**1-[(1*S*,2*R*)-2-Methylcyclohexyl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (19d)**



**19d**

To a solution of **18d** (4.70 g, 15.6 mmol) in EtOH (38 mL) and THF (10 mL) was added 2 M NaOH aqueous solution (17 mL, 54.6 mmol) and the mixture was refluxed for 5 h. After cooling to room temperature, to the reaction mixture was 3 M HCl aqueous solution and the solids were collected by filtration and dried *in vacuo* to give the crude product (4.26 g) as a white solid. To a mixture of the obtained crude product (4.00 g, 14.6 mmol), Et<sub>3</sub>N (3.3 mL, 23.4 mmol) and 1,4-dioxane (40 mL) was added DPPA (3.8 mL, 17.6 mmol) and the mixture was stirred under a nitrogen atmosphere at 120 °C for 3 h. After cooling to room temperature, water and CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1 solution were added, and the organic layer was separated. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was suspended in hot 2-propanol. After cooling to room temperature, the precipitate was filtered and washed with EtOAc to give the product (2.10 g, 53% from **18d**) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.94 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.38–1.84 (m, 7H), 2.32 (m, 1H), 2.91–3.02 (m, 1H), 4.39–4.48 (m, 1H), 6.47–6.48 (m, 1H), 7.41–7.44 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 10.71 (br s, 1H), 11.56 (br s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.38, 19.25, 23.74, 26.06, 31.15, 33.29, 58.56, 95.51, 103.26, 118.31, 123.88, 125.18, 129.27, 145.37, 154.20; MS (ESI)  $m/z$  271  $[M+H]^+$ ; IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 3321, 2930, 1684, 716; Anal. Calcd for  $C_{15}H_{18}N_4O$ : C, 66.64; H, 6.71; N, 20.73. Found: C, 66.48; H, 6.64; N, 20.68.

**1-[(1*R*,2*S*)-2-Methylcyclohexyl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (19e)**

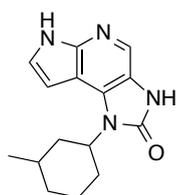


**19e**

Compound **19e** was prepared from **18e** in 90% yield as a yellow powder by a method similar to that described for **19d**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.94 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.38–1.84 (m, 7H), 2.32 (m, 1H),

2.91–3.02 (m, 1H), 4.39–4.48 (m, 1H), 6.47–6.48 (m, 1H), 7.41–7.44 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 10.71 (br s, 1H), 11.56 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  271  $[M+Na]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{15}H_{19}N_4O$  ( $[M+H]^+$ ): 271.1559, Found: 271.1567.

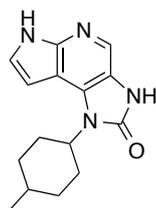
**1-(3-Methylcyclohexyl)-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (19f)**



**19f**  
(mixture of diastereomers)

Compound **19f** was prepared from **18f** in 24% yield as a white solid by a method similar to that described for **10**.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.96 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3/2H), 1.14 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3/2H), 1.44–2.54 (m, 9H), 4.37–4.66 (m, 1H), 6.55–6.58 (m, 1H), 7.44–7.46 (m, 1H), 7.91–7.92 (m, 1H), 10.88 (br s, 1H), 11.60 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  271  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{15}H_{19}N_4O$  ( $[M+H]^+$ ): 271.1559, Found: 271.1563.

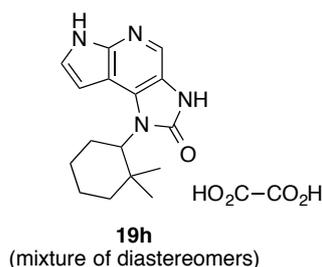
**1-(4-Methylcyclohexyl)-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (19g)**



**19g**  
(mixture of diastereomers)

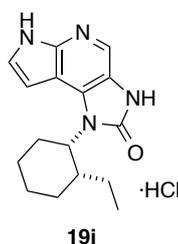
Compound **19g** was prepared from **18g** in 50% yield as a white solid by a method similar to that described for **10**.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.96 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3/2H), 1.12 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3/2H), 1.16–1.24 (m, 1H), 1.53–2.06 (m, 6H), 2.22–2.51 (m, 1H), 3.30–3.37 (m, 1H), 4.27–4.41 (m, 1H), 6.58–6.62 (m, 1H), 7.43–7.47 (m, 1H), 7.91–7.92 (m, 1H), 10.87–10.89 (m, 1H), 11.61 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  271  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{15}H_{19}N_4O$  ( $[M+H]^+$ ): 271.1559, Found: 271.1563.

**1-(2,2-Dimethylcyclohexyl)-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2(1H)-one ethanedioate (1:1) (19h)**



To a solution of **18h** (158 mg, 0.50 mmol) in 1,4-dioxane (4.0 mL) and water (2.0 mL) was added LiOH·H<sub>2</sub>O (105 mg, 2.5 mmol) and the mixture was refluxed for 12 h. After cooling to room temperature, to the reaction mixture was added 1 M HCl aqueous solution. The reaction mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10/1 solution, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated in *vacuo* to give a crude product as a pale brown solid. To a mixture of the obtained crude product (144 mg, 0.50 mmol), Et<sub>3</sub>N (139 μL, 1.0 mmol), 1,4-dioxane (3.0 mL) and DMI (3.0 mL) was added DPPA (162 μL, 0.75 mmol) and the mixture was stirred under a nitrogen atmosphere at 120 °C for 2 h. After cooling to room temperature, water and CHCl<sub>3</sub> were added, and the organic layer was separated. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by recrystallization from CHCl<sub>3</sub> and EtOAc to give a brown solid. The solid was dissolved in EtOH. To the solution was added oxalic acid (12 mg, 0.13 mmol) in EtOH and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. The precipitate was filtered to give the product (37.2 mg, 20% from **18h**) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.84 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.31–1.93 (m, 7H), 2.82–3.08 (m, 1H), 4.08–4.22 (m, 1H), 6.64–6.70 (m, 1H), 7.37–7.43 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 10.77 (br s, 1H), 11.56 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 285 [M+H-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): 285.1715, Found: 285.1717.

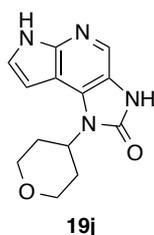
**1-[(1S,2R)-2-Ethylcyclohexyl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2(1H)-one hydrochloride (1:1) (19i)**



To a solution of **18i** (220 mg, 0.70 mmol) in EtOH (2.0 mL) was added 2 M NaOH (1.40 mL) and the mixture was stirred at 110 °C for 3h. After cooling to 4 °C, to the reaction mixture was added 1 M HCl aqueous. The reaction mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1 solution, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo* to give a crude product (185 mg) as a white powder. To a solution of the obtained

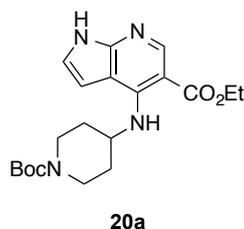
crude product (185 mg), Et<sub>3</sub>N (0.27 mL, 1.9 mmol) and 1,4-dioxane (1.9 mL) was added DPPA (0.28 mL, 1.3 mmol) and the mixture was stirred under a nitrogen atmosphere at 120 °C for 2 h. The mixture was cooled to room temperature and the precipitate was filtrated and washed with small amount of 1,4-dioxane to give a crude product (75 mg) as a white solid. The solid was dissolved in 2-propanol (1.5 mL) and 1 M HCl aqueous (0.47 mL, 0.47 mmol). To the mixture was added EtOAc and the mixture was stirred. The precipitate was filtrated and washed with acetonitrile to give the product (68 mg, 30% from **18i**) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 1.35–1.99 (m, 8H), 2.86–2.89 (m, 1H), 3.49 (m, 2H), 4.55–4.56 (m, 1H), 6.71–6.72 (m, 1H), 7.60–7.62 (m, 1H), 8.08 (s, 1H), 11.35 (br s, 1H), 12.26 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 285 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): 285.1715, Found: 285.1711.

**1-(Tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1H)-one (19j)**



Compound **19j** was prepared from **18j** in 21% yield as a white solid by a method similar to that described for **10**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.71 (dd, *J* = 4.4, 12.8 Hz, 2H), 2.44–2.55 (m, 2H), 3.51–3.59 (m, 2H), 4.04 (dd, *J* = 4.4, 11.6 Hz, 2H), 4.60–4.69 (m, 1H), 6.64 (dd, *J* = 2.0, 3.6 Hz, 1H), 7.46–7.48 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 10.94 (br s, 1H), 11.62 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 259 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 259.1195, Found: 259.1200.

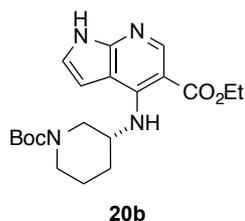
**Ethyl 4-[[1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]amino]-1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (20a)**



To a solution of **17** (500 mg, 2.23 mmol) in *n*-BuOH (2.0 mL) were added *tert*-butyl 4-amino-1-piperidinecarboxylate (1.34 g, 6.68 mmol). The mixture was heated in a microwave reactor at 150 °C for 1 h. After cooling to room temperature, to the reaction mixture was added water. The precipitate was

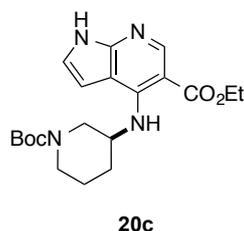
filtered and washed with water to give the product (673 mg, 78%) as a pale yellow powder.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.32 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.37–1.43 (m, 2H), 2.00–2.05 (m, 2H), 3.32 (m, 2H), 3.79–3.83 (m, 2H), 4.23–4.29 (m, 3H), 6.63–6.64 (m, 1H), 7.20–7.21 (m, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.83–8.85 (m, 1H), 11.72 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  389  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Ethyl 4-[[*(3R)*-1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-3-yl]amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (20b)**



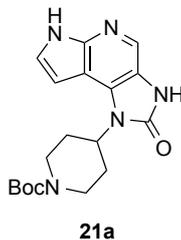
To a solution of **17** (400 mg, 1.78 mmol) in *n*-BuOH (2.0 mL) were added *tert*-butyl (*3R*)-3-aminopiperidine-1-carboxylate (712 mg, 3.56 mmol) and DIPEA (0.62 mL, 3.56 mmol). The mixture was heated in a microwave reactor at 150 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel (hexane/AcOEt = 60/40 to 25/75) to give the product (525 mg, 76%) as a white powder.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.00–2.12 (m, 13H), 1.30 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 3.17–3.79 (m, 4H), 4.07–4.34 (m, 1H), 4.26 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 6.64 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.96 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 11.71 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  389  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Ethyl 4-[[*(3S)*-1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-3-yl]amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (20c)**



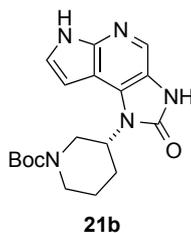
Compound **20c** was prepared from **17** in 32% yield as a white amorphous solid by a method similar to that described for **20b**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.03 (s, 9H), 1.15–1.99 (m, 8H), 1.30 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 3.58–3.62 (m, 1H), 4.23–4.27 (m, 2H), 6.62 (m, 1H), 7.20–7.22 (m, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.95–8.97 (m, 1H), 11.70 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  389  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**tert-Butyl 4-(2-oxo-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-1(2*H*)-yl)piperidine-1-carboxylate (21a)**



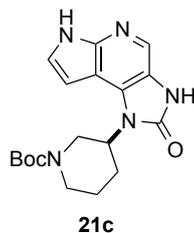
Compound **21a** was prepared from **20a** in 63% yield as a white powder by a method similar to that described for **19d**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.47 (s, 9H), 1.74–1.77 (m, 2H), 2.25–2.33 (m, 2H), 2.98 (m, 2H), 4.11 (m, 2H), 4.59–4.66 (m, 1H), 6.45–6.46 (m, 1H), 7.40–7.42 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 10.95 (br s, 1H), 11.63 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 358 [M+H]<sup>+</sup>.

**tert-Butyl (3*R*)-3-(2-oxo-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-1(2*H*)-yl)piperidine-1-carboxylate (21b)**



Compound **21b** was prepared from **20b** in 68% yield as a white powder by a method similar to that described for **10**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.07–2.05 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 2.66–3.03 (m, 1H), 3.25–3.58 (m, 1H), 3.90–4.19 (m, 2H), 4.19–4.49 (m, 1H), 6.54–6.66 (m, 1H), 7.41–7.52 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 10.98 (br s, 1H), 11.65 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 380 [M+Na]<sup>+</sup>.

**tert-Butyl (3*S*)-3-(2-oxo-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-1(2*H*)-yl)piperidine-1-carboxylate (21c)**



Compound **21c** was prepared from **20c** in 66% yield as a white powder by a method similar to that described for **19d**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.07–2.05 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 2.66–3.03 (m, 1H), 3.25–3.58 (m, 1H), 3.90–4.19 (m, 2H), 4.19–4.49 (m, 1H), 6.54–6.66 (m, 1H), 7.41–7.52 (m, 1H), 7.94 (s,

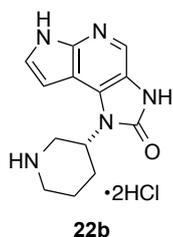
1H), 10.98 (br s, 1H), 11.65 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  380  $[M+Na]^+$ .

**1-(Piperidin-4-yl)-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1H)-one dihydrochloride (22a)**



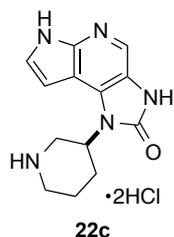
To a solution of **21a** (210 mg, 0.588 mmol) in 1,4-dioxane (2.1 mL) was added 4 M HCl in 1,4-dioxane (4.1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was evaporated *in vacuo* to give the product (194 mg, quantitative yield) as a white powder.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2.02–2.05 (m, 2H), 2.63–2.73 (m, 2H), 3.22–3.31 (m, 2H), 3.40–3.44 (m, 2H), 4.77–4.84 (m, 1H), 7.37–7.38 (m, 1H), 7.66–7.68 (m, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.85 (br s, 1H), 9.40–9.43 (m, 1H), 11.75 (br s, 1H), 12.54 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  258  $[M+H-2HCl]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}$  ( $[M+H-2HCl]^+$ ): 258.1355, Found: 258.1351.

**1-[(3R)-Piperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1H)-one dihydrochloride (22b)**



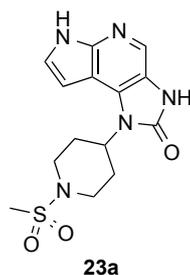
Compound **22b** was prepared from **21b** in quantitative yield as a white powder by a method similar to that described for **22a**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.83–2.22 (m, 3H), 2.31–2.63 (m, 1H), 2.77–4.50 (m, 4H), 4.94–5.19 (m, 1H), 7.21–7.33 (m, 1H), 7.61–7.72 (m, 1H), 8.15 (s, 1H), 9.s–9.37 (m, 1H), 9.76–10.06 (m, 1H), 11.74 (br s, 1H), 12.48 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  258  $[M+H-2HCl]^+$ .

**1-[(3*S*)-Piperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one dihydrochloride (22c)**



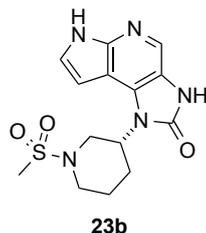
Compound **22c** was prepared from **21c** in quantitative yield as a white powder by a method similar to that described for **22a**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.97–2.02 (m, 3H), 2.41–2.46 (m, 1H), 3.00 (m, 1H), 3.33–3.43 (m, 3H), 4.96 (m, 1H), 7.04–7.05 (m, 1H), 7.60–7.61 (m, 1H), 8.08 (s, 1H), 9.09 (m, 1H), 9.50 (br s, 1H), 11.47 (br s, 1H), 12.14 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 258 [M+H-2HCl]<sup>+</sup>.

**1-[1-(Methylsulfonyl)piperidin-4-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (23a)**



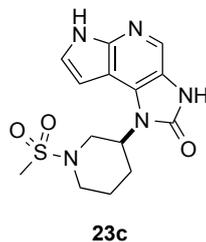
To a solution of **22a** (30 mg, 0.091 mmol) in DMI (1.0 mL) was added Et<sub>3</sub>N (38 μL, 0.27 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 min. The mixture was cooled under ice bath and methanesulfonyl chloride (7.7 μL, 0.10 mmol) was added. The mixture was stirred at the same temperature for 20 min and water was added. The precipitate was filtered and washed with water to give the product (22 mg, 72%) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.87–1.91 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.99–3.20 (m, 4H), 3.73–3.76 (m, 2H), 4.53–4.59 (m, 1H), 6.65–6.66 (m, 1H), 7.47–7.49 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 10.96 (br s, 1H), 11.63 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 336 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S ([M+H]<sup>+</sup>): 336.1130, Found: 336.1129.

**1-[(3R)-1-(Methylsulfonyl)piperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2(1H)-one (23b)**



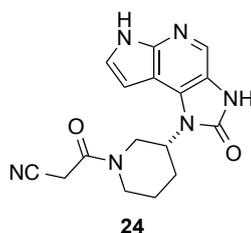
Compound **23b** was prepared from **22b** in 41% yield as a white solid by a method similar to that described for **23a**.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.69–1.85 (m, 1H), 1.90–2.03 (m, 2H), 2.39–2.56 (m, 1H), 2.86 (dd,  $J = 11.3, 11.3$  Hz, 1H), 2.94 (s, 3H), 3.42 (dd,  $J = 11.3, 11.3$  Hz, 1H), 3.61–3.77 (m, 2H), 4.46–4.59 (m, 1H), 6.59–6.64 (m, 1H), 7.44–7.50 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 11.00 (br s, 1H), 11.66 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  336  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 336.1130, Found: 336.1136.

**1-[(3S)-1-(Methylsulfonyl)piperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2(1H)-one (23c)**



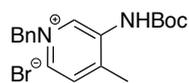
Compound **23c** was prepared from **22c** in 43% yield as a white powder by a method similar to that described for **23a**.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.23 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.95–1.98 (m, 4H), 2.85–2.88 (m, 1H), 2.94 (s, 3H), 3.65–3.73 (m, 1H), 4.50–4.54 (m, 1H), 6.55–6.67 (m, 1H), 7.49–7.51 (m, 1H), 7.97 (s, 1H), 11.12 (br s, 1H), 11.78 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  336  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 336.1130, Found: 336.1135.

**3-Oxo-3-[(3R)-3-(2-oxo-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-1(2H)-yl)piperidin-1-yl]propanenitrile (24)**



A mixture of **22b** (38 mg, 0.12 mmol), cyanoacetic acid (13 mg, 0.15 mmol), HOBt (23 mg, 0.17 mmol), DIPEA (44  $\mu$ L, 0.25 mmol), and WSCD·HCl (33 mg, 0.17 mmol) in DMF (1.4 mL) was stirred at room temperature for 1 h and then stirred at 50 °C for 1 h. The mixture was diluted with AcOEt and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 15/1 to 10/1) to give the product (2.3 mg, 6%) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.15–3.91 (m, 7H), 4.02–4.11 (m, 2H), 4.27–4.58 (m, 2H), 6.60–6.65 and 6.74–6.80 (each m, total 1H), 7.42–7.49 (m, 1H), 7.93 and 7.94 (each s, total 1H), 10.99 (br s, 1H), 11.61 and 11.65 (each br s, total 1H); MS (ESI) *m/z* 325 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z*. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 325.1413, Found: 325.1413.

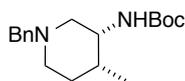
### 1-Benzyl-3-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-4-methylpyridinium bromide (**26**)



**26**

To a solution of *tert*-butyl (4-methylpyridin-3-yl)carbamate (**25**) (12.0 g, 57.62 mmol) in acetone (480 mL) was added benzyl bromide (6.98 mL, 58.77 mmol), followed by refluxing for 3 h. After cooling to room temperature, the resulting solid was collected by filtration and washed with acetone (120 mL) to obtain the product (21.0 g, 96%) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.50 (s, 9H), 2.50 (s, 3H), 5.84 (s, 2H), 7.40–7.52 (m, 5H), 8.00 (dd, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 6.3, 1.4 Hz, 1H), 9.30 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 9.57 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 299 [M-Br]<sup>+</sup>.

### *tert*-Butyl ( $\pm$ )-*cis*-[1-benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]carbamate (**27**)

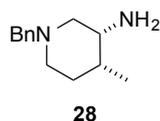


**27**

To a solution of **26** (1.20 g, 3.16 mmol) in EtOH (48 mL) was added PtO<sub>2</sub> (Adam's Catalyst) (36 mg, 0.16 mmol), followed by catalytic reduction at 40 °C under 3 atm of hydrogen gas for 4 h. The reaction mixture was separated by filtration through a Celite pad and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained residue was neutralized with a saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution, and the mixture was then extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and then filtered and concentrated *in vacuo*. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel silica gel (hexane/EtOAc = 90/10/ to 87/13) to obtain the product (664 mg, 69%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR

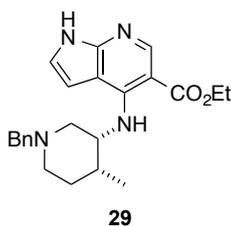
(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.80 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 1.30–1.36 (m, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.42–1.55 (m, 1H), 1.56–1.68 (m, 1H), 1.92–2.10 (m, 2H), 2.53–2.70 (m, 2H), 3.38–3.49 (m, 2H), 3.51–3.59 (m, 1H), 6.12–6.23 (m, 1H), 7.20–7.26 (m, 1H), 7.27–7.33 (m, 4H); MS (ESI)  $m/z$  305 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-amine (28)**



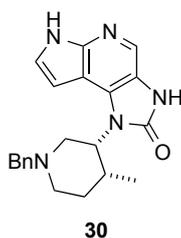
To a solution of **27** (2.00 g, 6.57 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) was added TFA (5.0 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was evaporated *in vacuo* and the residue was quenched with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo* to give the product (1.31 g, 98%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.85 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.29–1.47 (m, 2H), 1.47–1.58 (m, 1H), 1.91–2.01 (m, 1H), 2.05–2.14 (m, 1H), 2.54–2.66 (m, 2H), 2.66–2.71 (m, 1H), 3.33 (br s, 2H), 3.37–3.47 (m, 2H), 7.20–7.26 (m, 1H), 7.27–7.34 (m, 4H); MS (ESI)  $m/z$  205 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-Ethyl 4-([1-benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]amino)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxylate (29)**



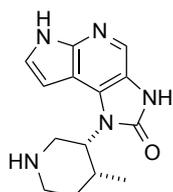
Compound **29** was prepared from **17** in 95% yield as a white solid by a method similar to that described for **18b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.87 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.37 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.52–4.43 (m, 12H), 6.62 (dd,  $J = 2.0, 3.6$  Hz, 1H), 7.09 (dd,  $J = 2.8, 3.6$  Hz, 1H), 7.13–7.35 (m, 5H), 8.56 (s, 1H), 9.33 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 11.59 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  393 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2(1H)-one (30)**



Compound **30** was prepared from **29** in 57% yield as a white solid by a method similar to that described for **10**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.94 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.58–1.66 (m, 1H), 2.01–2.13 (m, 1H), 2.25–2.35 (m, 1H), 2.36–2.44 (m, 1H), 2.62–2.70 (m, 1H), 2.83–2.91 (m, 1H), 3.48–3.68 (m, 3H), 4.54–4.61 (m, 1H), 6.43–6.47 (m, 1H), 7.19–7.26 (m, 1H), 7.28–7.37 (m, 4H), 7.42–7.47 (m, 1H), 7.58 (s, 1H), 10.77 (br s, 1H), 11.60 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 362 [M+H]<sup>+</sup>.

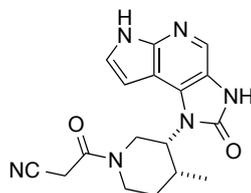
**(±)-cis-1-[4-Methylpiperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (31)**



**31**

To a solution of **30** (8.10 g, 22.4 mmol) in EtOH (486 mL) was added 20% Pd(OH)<sub>2</sub> on carbon (6.29 g, 4.48 mmol) at room temperature under nitrogen. Hydrogen gas was purged and stirred for 2 days at 30 °C under 4 atm. The mixture was filtered through a Celite pad. The filtrate was evaporated *in vacuo* to give the crude product (6.00 g, 99%). The crude residue was used without further purification. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.54–1.62 (m, 1H), 1.75–1.86 (m, 1H), 2.31–2.41 (m, 1H), 2.61–2.70 (m, 1H), 2.76–2.86 (m, 1H), 2.94–3.02 (m, 1H), 3.35–3.51 (m, 1H), 3.78–3.86 (m, 1H), 4.48–4.55 (m, 1H), 6.51–6.55 (m, 1H), 7.42–7.45 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 10.78 (br, 1H), 11.56 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 272 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-3-[4-Methyl-3-(2-oxo-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-1(2*H*)-yl)piperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (32a)**

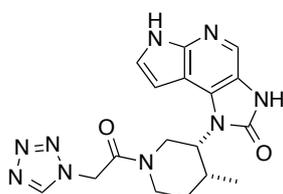


**32a**

A mixture of **31** (40 mg, 0.15 mmol), cyanoacetic acid (16 mg, 0.19 mmol), HOBt (30 mg, 0.22 mmol), Et<sub>3</sub>N (45 μL, 0.32 mmol), and WSCD·HCl (57 mg, 0.29 mmol) in DMF (0.96 mL) was stirred at room temperature for 1 h and then stirred in a hot bath for 2 h. The mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1 and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH

= 97/3 to 80/20) to give the product (33 mg, 66%) as a white solid.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.93–1.01 (m, 3H), 1.63–1.77 (m, 1H), 1.84–2.11 (m, 1H), 2.40–2.56 (m, 1H), 2.98–3.56 (m, 2H), 3.80–4.25 (m, 3H), 4.33–4.45 (m, 1H), 4.52–4.65 (m, 1H), 6.51–6.55 (m, 1H), 7.41–7.47 (m, 1H), 7.89–7.92 (m, 1H), 10.86 (br s, 1H), 11.54–11.64 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 120 °C)  $\delta$  12.70, 24.66, 30.22, 32.05, 55.79, 95.69, 103.62, 115.63, 119.01, 124.44, 125.28, 129.56, 145.95, 154.55, 161.57; MS (ESI)  $m/z$  339  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3252, 2967, 2886, 2259, 1703, 710; Anal. Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2 \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$ : C, 60.02; H, 5.39; N, 24.71. Found: C, 59.64; H, 5.27; N, 24.33.

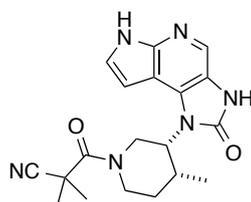
**(±)-cis-1-[4-Methyl-1-(1H-tetrazol-1-ylacetyl)piperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2(1H)-one (32b)**



**32b**

Compound **32b** was prepared from **31** in 53% yield as a white solid by a method similar to that described for **32a**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.99–1.05 (m, 3H), 1.66–2.19 (m, 2H), 3.02–3.59 (m, 1H) 3.68–4.51 (m, 4H) 4.63–4.76 (m, 1H) 5.54–5.90 (m, 2H), 6.52–6.58 (m, 1H), 7.45–7.48 (m, 1H), 7.90–7.94 (m, 1H), 9.24–9.31 (m, 1H), 10.85–10.92 (m, 1H), 11.58–11.67 (m, 1H); MS (ESI)  $m/z$  382  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; Anal. Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_9\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : C, 51.12; H, 5.30; N, 31.56. Found: C, 51.23; H, 5.33; N, 31.24.

**(±)-cis-2,2-Dimethyl-3-[4-methyl-3-(2-oxo-3,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-1(2H)-yl)piperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (32c)**

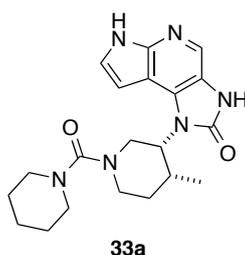


**32c**

A mixture of **31** (80 mg, 0.29 mmol), 2-cyano-2-methylpropanoic acid (43 mg, 0.38 mmol), HOBt (60 mg, 0.44 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (90  $\mu\text{L}$ , 0.65 mmol), and WSCD·HCl (113 mg, 0.59 mmol) in DMF (1.0 mL) was stirred at room temperature for 1 h and then stirred at 40 °C for 4 h. The mixture was quenched with saturated  $\text{NaHCO}_3$  aqueous solution and extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The organic layer was washed with brine,

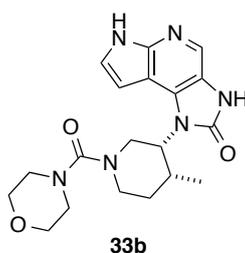
dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 99/1 to 80/20) to give the product (84.7 mg, 78%) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.01 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.55 (br s, 6H), 1.66–2.10 (m, 2H), 3.40–4.83 (m, 6H), 6.52–6.55 (m, 1H), 7.42–7.44 (m, 1H), 7.92 (s, 1H), 10.88 (br s, 1H), 11.61 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 367 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 367.1877, Found: 367.1868.

**(±)-*cis*-1-[4-Methyl-1-(piperidin-1-ylcarbonyl)piperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (33a)**



To a solution of **31** (80 mg, 0.30 mmol) and DIPEA (103 μL, 0.59 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.4 mL) was added 1-piperidinecarbonyl chloride (52 mg, 0.35 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. To the solution was added H<sub>2</sub>O (4.0 mL) and the mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 98/2 to 92/8) to obtain a clear solid. The solid was washed with a small amount of CHCl<sub>3</sub> and a large amount of IPE to give the product (89 mg, 79%) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.99 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.39–1.56 (m, 6H), 1.64–1.72 (m, 1H), 1.92–2.03 (m, 1H), 2.39–2.55 (m, 1H), 3.05–3.21 (m, 5H), 3.28–3.39 (m, 1H), 3.62–3.69 (m, 1H), 4.17–4.27 (m, 1H), 4.49–4.57 (m, 1H), 6.42–6.45 (m, 1H), 7.42–7.45 (m, 1H), 7.91 (s, 1H), 10.82 (br s, 1H), 11.61 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 383 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 383.2190, Found: 383.2179.

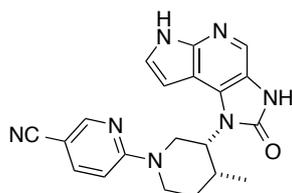
**(±)-*cis*-1-[4-Methyl-1-(morpholin-4-ylcarbonyl)piperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (33b)**



Compound **33b** was prepared from **31** in 81% yield as a white powder by a method similar to that described for **33a**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.99 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.65–1.74 (m, 1H), 1.93–2.05 (m,

1H), 2.39–2.54 (m, 1H), 3.09–3.22 (m, 5H), 3.36–3.44 (m, 1H), 3.49–3.61 (m, 4H), 3.68–3.77 (m, 1H), 4.20–4.29 (m, 1H), 4.49–4.58 (m, 1H), 6.43–6.45 (m, 1H), 7.43–7.45 (m, 1H), 7.91 (s, 1H), 10.83 (br s, 1H), 11.61 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  385  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{19}H_{25}N_6O_3$  ( $[M+H]^+$ ): 385.1983, Found: 385.1970.

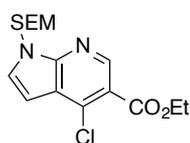
**(±)-cis-6-[4-Methyl-3-(2-oxo-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-1(*2H*)-yl)piperidin-1-yl]nicotinonitrile (34)**



**34**

A mixture of **31** (80 mg, 0.30 mmol), 6-chloronicotinonitrile (61 mg, 0.44 mmol) and  $Et_3N$  (123  $\mu L$ , 0.89 mmol) in *n*-BuOH (0.99 mL) was stirred under microwave irradiation at 130 °C for 0.5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with EtOAc/THF and washed with water. The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude product was recrystallized from EtOAc and *n*-hexane to give the product (84 mg, 76%) as a white solid.  $^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$  1.06 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.74–1.82 (m, 1H), 1.97–2.07 (m, 1H), 2.45–2.56 (m, 1H), 3.28–3.43 (m, 1H), 4.20–4.29 (m, 1H), 4.42–4.56 (m, 2H), 4.60–4.70 (m, 1H), 6.40–6.44 (m, 1H), 7.03 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.37–7.41 (m, 1H), 7.81 (dd,  $J = 2.0, 9.2$  Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 8.43–8.45 (m, 1H), 10.87 (br s, 1H), 11.59 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  374  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{20}H_{20}N_7O$  ( $[M+H]^+$ ): 374.1724, Found: 374.1714.

**Ethyl 4-chloro-1-([2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl)-1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (35)**

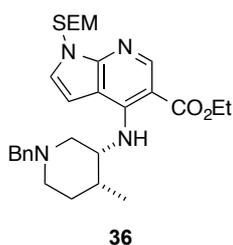


**35**

To a solution of **17** (2.00 g, 8.90 mmol) in DMF (30 mL) was added NaH (60% dispersion in mineral oil, 427 mg, 10.7 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. To the solution was added SEMCl (1.72 mL, 9.79 mmol) and the resulting solution was allowed to stir for 30 min at room temperature. The mixture was quenched with saturated  $NaHCO_3$  aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over  $Na_2SO_4$ , and evaporated *in*

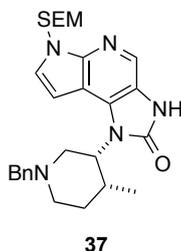
*vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/AcOEt = 100/0 to 90/10) to give the product (3.07 g, 97%) as colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.10 (s, 9H), 0.82 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.52 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.36 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 5.67 (s, 2H), 6.75 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 8.75 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 355 [M+H]<sup>+</sup>.

**Ethyl (±)-*cis*-4-[[1-benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]amino]-1-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (36)**



A mixture of **35** (1.05 g, 2.96 mmol), **28** (725 mg, 3.55 mmol), and DIPEA (1.55 mL, 8.88 mmol) in NMP (3.0 mL) was heated at 180 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel (hexane/AcOEt = 95/5 to 85/15) to give the product (1.51 g, 98%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.11 (s, 9H), 0.79 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 0.86 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.50–1.63 (m, 2H), 1.81–1.94 (m, 1H), 2.08–2.17 (m, 1H), 2.23–2.31 (m, 1H), 2.72–2.88 (m, 2H), 3.38–3.60 (m, 4H), 4.28–4.45 (m, 3H), 5.51 (s, 2H), 6.72 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.11–7.23 (m, 3H), 7.28 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.30–7.35 (m, 2H), 8.61 (s, 1H), 9.36 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H); MS (ESI) *m/z* 523 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-*cis*-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-6-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (37)**



Compound **37** was prepared from **36** in 89% yield by a method similar to that described for **19d**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.10 (s, 9H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.93 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.57–1.65 (m, 1H), 2.02–2.15 (m, 1H), 2.25–2.43 (m, 2H), 2.61–2.69 (m, 1H), 2.84–2.93 (m, 1H), 3.47–3.55 (m, 3H), 3.59–

3.64 (m, 2H), 4.54–4.61 (m, 1H), 5.60 (s, 2H), 6.55 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 7.19–7.26 (m, 1H), 7.28–7.37 (m, 4H), 7.63 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 10.86 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  492  $[M+H]^+$ .

**(±)-cis-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-3-methyl-6-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (38)**



To a solution of **37** (262 mg, 0.53 mmol) in DMF (5.0 mL) was added NaH (60% dispersion in mineral oil, 26 mg, 0.64 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred at the same temperature for 5 min. To the solution was added MeI (40  $\mu$ L, 0.64 mmol) and the resulting solution was allowed to stir for 15 min at room temperature. The mixture was quenched with water and extracted with  $CH_2Cl_2$ . The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$  and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel ( $CHCl_3 = 100/0$ ) to give the product (260 mg, 97%).  $^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$  -0.09 (s, 9H), 0.81 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 0.92 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.58–1.67 (m, 1H), 2.04–2.15 (m, 1H), 2.26–2.44 (m, 2H), 2.62–2.74 (m, 1H), 2.83–2.91 (m, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.48–3.68 (m, 5H), 4.57–4.64 (m, 1H), 5.62 (s, 2H), 6.57 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 7.19–7.25 (m, 1H), 7.27–7.36 (m, 4H), 7.66 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 8.12 (s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  506  $[M+H]^+$ .

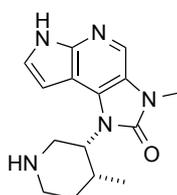
**(±)-cis-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-3-methyl-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (39)**



To a solution of **38** (260 mg, 0.51 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (2.0 mL) was added TFA (2.0 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was evaporated *in vacuo* and the residue was quenched with saturated  $NaHCO_3$  aqueous solution and extracted with  $CHCl_3$  and MeOH. The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$  and evaporated *in vacuo*. To the resulting residue in  $CH_2Cl_2$  (2.0 mL) and MeOH (2.0 mL) was added ethylenediamine (69  $\mu$ L, 1.03 mmol) and the mixture was stirred at 50 °C

for 1 h. The mixture was quenched with water, extracted with CHCl<sub>3</sub> and MeOH. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 100/0 to 95/5) to give the product (180 mg, 93%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.92 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.58–1.67 (m, 1H), 2.06–2.14 (m, 1H), 2.26–2.44 (m, 2H), 2.62–2.71 (m, 1H), 2.82–2.91 (m, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.48–3.69 (m, 3H), 4.57–4.65 (m, 1H), 6.47 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.19–7.25 (m, 1H), 7.27–7.37 (m, 4H), 7.46–7.50 (m, 1H), 8.07 (m, 1H), 11.65 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 376 [M+H]<sup>+</sup>.

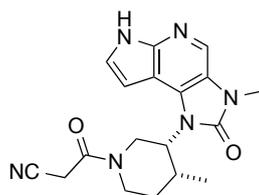
**(±)-*cis*-3-Methyl-1-[4-methylpiperidin-3-yl]-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-2(1*H*)-one (40)**



**40**

To a solution of **39** (180 mg, 0.48 mmol) in MeOH (5.0 mL) were added 20% Pd(OH)<sub>2</sub> on carbon (34 mg, 0.048 mmol) and ammonium formate (302 mg, 4.8 mmol) at room temperature. The mixture was refluxed for 30 min. After cooling to room temperature, the mixture was filtered through a Celite pad. The filtrate was partitioned between saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 100/0 to 95/5) to give the product (85 mg, 62%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.89 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.53–1.63 (m, 1H), 1.76–1.86 (m, 1H), 2.31–2.47 (m, 2H), 2.61–2.71 (m, 1H), 2.76–2.87 (m, 1H), 2.94–3.02 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.77–3.89 (m, 1H), 4.51–4.59 (m, 1H), 6.54–6.58 (m, 1H), 7.45–7.49 (m, 1H), 8.70 (s, 1H), 11.63 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 286 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-*cis*-3-[4-Methyl-3-(3-methyl-2-oxo-3,6-dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-1(2*H*)-yl)piperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (41)**

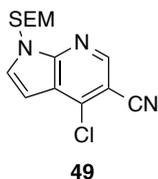


**41**

A mixture of **40** (80 mg, 0.28 mmol), cyanoacetic acid (36 mg, 0.42 mmol), HOBT (45 mg, 0.34 mmol),

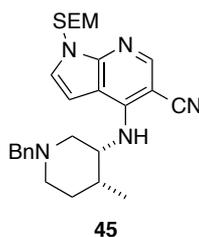
WSCD·HCl (64 mg, 0.34 mmol) and DIPEA (98  $\mu$ l, 0.56 mmol) in DMF (1.5 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 mL) was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 100/0 to 95/5) to give the product (75 mg, 76%) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.95 (d, *J* = 7.1 Hz, 3/2H), 0.96 (d, *J* = 7.1 Hz, 3/2H), 1.62–1.76 (m, 1H), 1.85–1.96 (m, 1/2H), 2.01–2.13 (m, 1/2H), 2.93–3.11 (m, 1H), 3.14–3.19 (m, 1H), 3.378 (s, 3/2H), 3.381 (s, 3/2H), 3.47–3.56 (m, 1/2H), 3.80–3.89 (m, 1/2H), 3.95–4.26 (m, 3H), 4.34–4.41 (m, 1/2H), 4.43–4.49 (m, 1/2H), 4.52–4.60 (m, 1/2H), 4.63–4.69 (m, 1/2H), 6.53–6.58 (m, 1H), 7.44–7.57 (m, 1H), 8.10 (s, 1H), 11.63 (br s, 1/2H), 11.67 (br s, 1/2H); MS (ESI) *m/z* 353 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 353.1726, Found: 353.1732.

#### 4-Chloro-1- $\{2\text{-}(\text{trimethylsilyl})\text{ethoxy}\}\text{methyl}\}$ -1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (**49**)



To a suspension of NaH (60% dispersion in mineral oil, 2.70 g, 67.6 mmol) in THF (50 mL) and DMF (100 mL) was slowly added 4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (**48**) (10.0 g, 56.3 mmol) in an ice bath and the mixture was stirred at the same temperature for 20 min. To the solution was added SEMCl (13.8 mL, 78.8 mmol) and the resulting solution was allowed to stir for 3 h at room temperature. The mixture was quenched with saturated NH<sub>4</sub>Cl aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel to give the product (15.2 g, 88%) as a white solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  -0.10 (s, 9H), 0.82 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.52 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.68 (s, 2H), 6.82 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 8.77 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 308 [M+H]<sup>+</sup>.

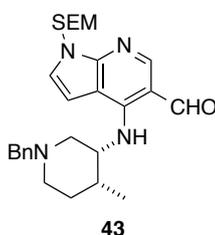
#### (±)-*cis*-4- $\{[1\text{-}(\text{benzyl})\text{-4-methylpiperidin-3-yl}]\text{amino}\}$ -1- $\{2\text{-}(\text{trimethylsilyl})\text{ethoxy}\}\text{methyl}\}$ -1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (**45**)



A mixture of **49** (5.05 g, 16.4 mmol), **28** (3.69 g, 18.0 mmol), and DIPEA (8.57 mL, 49.2 mmol) in

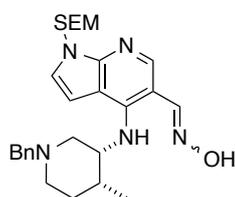
NMP (15 mL) was stirred at 180 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 90/10 to 70/30) to give the product (7.08 g, 91%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.11 (s, 9H), 0.78 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.44–1.60 (m, 2H), 1.84–1.95 (m, 1H), 2.08–2.18 (m, 1H), 2.26–2.33 (m, 1H), 2.75–2.88 (m, 2H), 3.43–3.51 (m, 3H), 3.56–3.62 (m, 1H), 4.42–4.48 (m, 1H), 5.53 (s, 2H), 6.32 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.16–7.29 (m, 3H), 7.34–7.39 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 476 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-*cis*-4-([1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]amino)-1-{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carbaldehyde (43)**



To a mixture of **45** (13.0 g, 27.3 mmol) and THF (74 mL) was added DIBAL (1.0 M *n*-hexane solution, 68.0 mL, 68.0 mmol) in an ice bath. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h. After consumption of the starting material, the reaction mixture was cooled to -78 °C and then quenched by addition of MeOH (10 mL). To the resulting mixture was added 1 M HCl aqueous solution (40 mL) and the resulting solution was allowed to stir for 20 min in an ice bath. To the mixture was added 1 M NaOH aqueous solution (45 mL). The reaction mixture was filtered and the filtrate was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 4/1 to 2/1) to give the product (10.7 g, 82%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.10 (s, 9H), 0.77–0.85 (m, 5H), 1.49–1.58 (m, 2H), 1.83–1.93 (m, 1H), 2.05–2.14 (m, 1H), 2.27–2.34 (m, 1H), 2.77–2.88 (m, 2H), 3.43–3.58 (m, 4H), 4.39–4.45 (m, 1H), 5.54 (s, 2H), 6.79 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.12–7.25 (m, 3H), 7.30–7.38 (m, 3H), 8.28 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 10.02 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H); MS (ESI) *m/z* 479 [M+H]<sup>+</sup>.

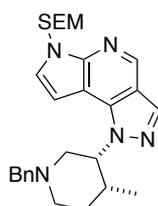
**(±)-cis-N-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-5-[(hydroxyimino)methyl]-1-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-amine (50)**



**50**

To a mixture of **43** (4.00 g, 8.36 mmol) and EtOH (20 mL) was added NH<sub>2</sub>OH·HCl (871 mg, 12.5 mmol) and pyridine (2.02 mL, 25.1 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was evaporated *in vacuo* and the residue was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel. The obtained solid was washed with a mixture of EtOAc and *n*-hexane to give the product (3.95 g, 96%) as a white solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.10 (s, 9H), 0.76–0.82 (m, 2H), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.54–1.76 (m, 2H), 1.84–1.97 (m, 1H), 2.14–2.34 (m, 2H), 2.69–2.82 (m, 2H), 3.37–3.57 (m, 4H), 4.29–4.36 (m, 1H), 5.49 (s, 2H), 6.56 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.08–7.18 (m, 3H), 7.21–7.27 (m, 3H), 7.93 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 10.80 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 494 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-6-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (51)**

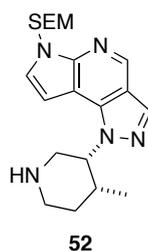


**51**

To a mixture of **50** (500 mg, 1.01 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) and Et<sub>3</sub>N (0.17 mL, 1.22 mmol) was added isobutyl chloroformate (0.16 mL, 1.22 mmol) in an ice bath. The reaction mixture was stirred at same temperature for 30 min and was allowed to warm to room temperature for 30 min. The mixture was evaporated *in vacuo*. To the residue was added DMF (5.0 mL) and the mixture was stirred at 150 °C for 1.5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica

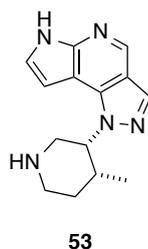
gel (*n*-hexane/EtOAc = 85/15 to 83/17) to give the product (268 mg, 56%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.11 (s, 9H), 0.76–0.81 (m, 2H), 0.85 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.46–1.59 (m, 2H), 1.85–1.95 (m, 1H), 2.09–2.18 (m, 1H), 2.26–2.32 (m, 1H), 2.75–2.87 (m, 2H), 3.44–3.51 (m, 3H), 3.56–3.62 (m, 1H), 4.42–4.48 (m, 1H), 5.53 (s, 2H), 6.31 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.17–7.22 (m, 1H), 7.23–7.29 (m, 2H), 7.34–7.39 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 476 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-*cis*-1-[4-Methylpiperidin-3-yl]-6-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (52)**



To a mixture of **51** (300 mg, 0.63 mmol) and DCE (3.0 mL) was added 1-chloroethyl chloroformate (86 μL, 0.79 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at 65 °C for 1.5 h. The solution was concentrated *in vacuo* and to the residue was added MeOH (6.0 mL). The mixture was refluxed for 3 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/*n*-hexane = 50/50 to 100/0) to give the product (204 mg, 84%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.10 (s, 9H), 0.76–0.87 (m, 5H), 1.31–1.51 (m, 2H), 1.88–1.99 (m, 1H), 2.35–2.45 (m, 1H), 2.47–2.57 (m, 1H), 2.71–2.78 (m, 1H), 2.87–3.00 (m, 2H), 3.49 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.32–4.38 (m, 1H), 5.54 (s, 2H), 6.37 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 386 [M+H]<sup>+</sup>.

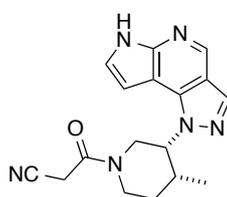
**(±)-*cis*-1-[4-Methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (53)**



To a solution of **52** (250 mg, 0.65 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.0 mL) was added TFA (1.5 mL) and the mixture was stirred at 40 °C for 3 h. The mixture was evaporated *in vacuo* and the residue was dissolved in

MeOH (5.0 mL). To the mixture was added ethylenediamine (300  $\mu$ L, 4.49 mmol) and the mixture was stirred at 55  $^{\circ}$ C for 0.5 h. The mixture was evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 97/3 to 96/4) to give the product (113 mg, 68%) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.79 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.33–1.55 (m, 2H), 1.81–1.93 (m, 1H), 2.09–2.29 (m, 2H), 2.87–3.01 (m, 2H), 3.40–3.50 (m, 1H), 4.43–4.53 (m, 1H), 6.01 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 6.65–6.73 (m, 1H), 7.12–7.22 (m, 1H), 7.30–7.43 (m, 1H), 11.67 (br, 1H); MS (ESI) *m/z* 256 [M+H]<sup>+</sup>.

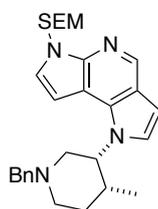
**(±)-cis-3-[4-Methyl-3-(pyrazolo[3,4-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-1(6*H*)-yl)piperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (54)**



**54**

Compound **54** was prepared from **53** in 32% yield as a white powder by a method similar to that described for **32c**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.85–1.08 (m, 4H), 1.52–1.70 (m, 2H), 2.13–2.27 (m, 1H), 3.14–3.83 (m, 3H), 3.98–4.12 (m, 2H), 4.28–4.47 (m, 1H), 5.77–6.28 (m, 1H), 6.71–6.86 (m, 1H), 7.30 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 11.89 (br, 1H); MS (ESI) *m/z* 323 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O·0.6H<sub>2</sub>O: C, 61.28; H, 5.81; N, 25.22. Found: C, 61.37; H, 5.66; N, 24.83.

**(±)-cis-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-6-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1,6-dihydropyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (56)**

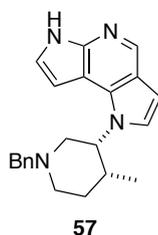


**56**

To a mixture of (methoxymethyl)(triphenyl)phosphonium chloride (8.42 g, 24.6 mmol) and THF (50 mL) was added NaHMDS (1.07 M THF solution, 23.0 mL, 24.6 mmol) in an ice bath and the reaction mixture was stirred at the same temperature for 30 min. To the solution was added **43** (5.88 g, 12.3 mmol) in THF (20 mL). The mixture was warmed to room temperature and was stirred for 13 h. To the

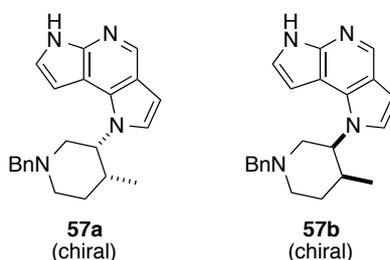
solution was added saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aqueous solution and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 85/15 to 80/20) to give the product (5.6 g, 11.1 mmol) as a yellow oil. To a mixture of the obtained product and MeOH (40 mL) was slowly added AcCl (2.36 mL, 33.2 mmol) at room temperature. The resulting mixture was stirred at 80 °C for 0.5 h. To the solution was added water (5.0 mL) and the mixture was stirred at 80 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. To the residue was added saturated  $\text{NaHCO}_3$  aqueous solution. The mixture was extracted with EtOAc, washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 87/13 to 83/17) to give the product (4.85 g, 83%) as a pale yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -0.13 (s, 9H), 0.50 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 0.75–0.82 (m, 2H), 1.56–1.67 (m, 2H), 2.12–2.29 (m, 2H), 2.63–2.70 (m, 1H), 2.85–2.96 (m, 1H), 3.02–3.09 (m, 1H), 3.49–3.62 (m, 4H), 5.00–5.05 (m, 1H), 5.67 (s, 2H), 6.66 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1H), 6.89 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 7.19–7.24 (m, 1H), 7.28–7.37 (m, 4H), 7.49 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 8.04–8.11 (m, 1H), 8.50 (s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  475  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**(±)-*cis*-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (57)**



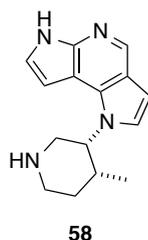
Compound **57** was prepared from **56** in quantitative yield as a white powder by a method similar to that described for **53**.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  0.51 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H), 1.57–1.69 (m, 2H), 2.13–2.32 (m, 2H), 2.63–2.72 (m, 1H), 2.82–2.95 (m, 1H), 3.00–3.07 (m, 1H), 3.50–3.62 (m, 2H), 4.97–5.04 (m, 1H), 6.61 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1H), 6.73–6.78 (m, 1H), 7.19–7.25 (m, 1H), 7.26–7.38 (m, 5H), 7.94–8.03 (m, 1H), 8.43 (s, 1H), 11.57 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  345  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

1-[(3*R*,4*R*)-1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (**57a**)  
and 1-[(3*S*,4*S*)-1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (**57b**)



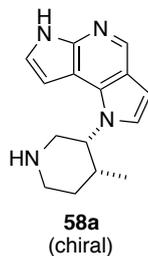
The racemate **57** (310 mg) was separated by chiral column chromatography (DAICEL CHIRALPAK IA 5  $\mu$ m, 20 mm  $\phi$   $\times$  250 mm, *n*-hexane/EtOH = 95/5, flow rate: 8 mL/min) to give **57a** (112 mg, 100% ee,  $t_R$  = 9.341 min) and **57b** (119 mg, 99.6% ee,  $t_R$  = 10.678 min), respectively.

( $\pm$ )-*cis*-1-[4-Methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (**58**)



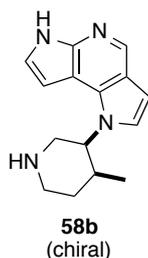
To a solution of **57** (2.20 g, 6.39 mmol) in EtOH (44 mL) were added 20% Pd(OH)<sub>2</sub> on carbon (448 mg, 0.64 mmol) and ammonium formate (4.03 g, 63.9 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 90 °C for 2.5 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. To the residue was added saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and the mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>/2-propanol. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 99/1 to 98/2). The obtained solid was washed with a mixture of EtOH and IPE to give the product (1.36 g, 84%) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.59 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.50–1.60 (m, 1H), 1.66–1.76 (m, 1H), 2.27–2.36 (m, 1H), 2.43 (br s, 1H), 2.65–2.75 (m, 1H), 2.91–3.00 (m, 1H), 3.04–3.11 (m, 1H), 3.25–3.32 (m, 1H), 4.86–4.92 (m, 1H), 6.58 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 1H), 6.70–6.72 (m, 1H), 7.29–7.33 (m, 1H), 7.74–7.80 (m, 1H), 8.44 (s, 1H), 11.58 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  255 [M+H]<sup>+</sup>.

**1-[(3*R*,4*R*)-4-Methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (58a)**



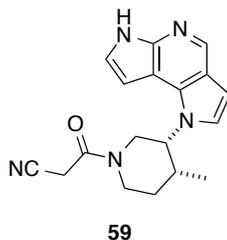
Compound **58a** was prepared from **57a** in 95% yield by a method similar to that described for **58**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.50–1.60 (m, 1H), 1.66–1.76 (m, 1H), 2.27–2.36 (m, 1H), 2.43 (br s, 1H), 2.65–2.75 (m, 1H), 2.91–3.00 (m, 1H), 3.04–3.11 (m, 1H), 3.25–3.32 (m, 1H), 4.86–4.92 (m, 1H), 6.58 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.70–6.72 (m, 1H), 7.29–7.33 (m, 1H), 7.74–7.80 (m, 1H), 8.44 (s, 1H), 11.58 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 255 [M+H]<sup>+</sup>.

**1-[(3*S*,4*S*)-4-Methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (58b)**



Compound **58b** was prepared from **57b** in 92% yield by a method similar to that described for **58**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.50–1.60 (m, 1H), 1.66–1.76 (m, 1H), 2.27–2.36 (m, 1H), 2.43 (br s, 1H), 2.65–2.75 (m, 1H), 2.91–3.00 (m, 1H), 3.04–3.11 (m, 1H), 3.25–3.32 (m, 1H), 4.86–4.92 (m, 1H), 6.58 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.70–6.72 (m, 1H), 7.29–7.33 (m, 1H), 7.74–7.80 (m, 1H), 8.44 (s, 1H), 11.58 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 255 [M+H]<sup>+</sup>.

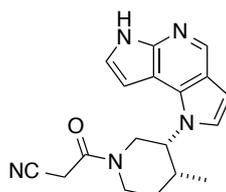
**(±)-*cis*-3-[3-(Dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl)-4-methylpiperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (59)**



Compound **59** was prepared from **58** in 84% yield as a white powder by a method similar to that

described for **32c**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.57–0.71 (m, 3H), 1.59–1.76 (m, 1H), 1.81–1.93 (m, 1H), 2.37–2.54 (m, 1H), 3.34–4.36 (m, 6H), 4.94–5.10 (m, 1H), 6.62–6.69 (m, 1H), 6.74–6.79 (m, 1H), 7.17–7.31 (m, 1H), 7.32–7.36 (m, 1H), 8.44–8.49 (m, 1H), 11.65 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  322  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 322.1662, Found: 322.1653.

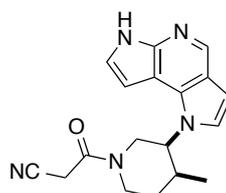
**3-[(3*R*,4*R*)-3-(Dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl)-4-methylpiperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (59a)**



**59a**  
(chiral)

Compound **59a** was prepared from **58a** in 87% yield as a white powder by a method similar to that described for **32c**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.57–0.71 (m, 3H), 1.59–1.76 (m, 1H), 1.81–1.93 (m, 1H), 2.37–2.54 (m, 1H), 3.34–4.36 (m, 6H), 4.94–5.10 (m, 1H), 6.62–6.69 (m, 1H), 6.74–6.79 (m, 1H), 7.17–7.31 (m, 1H), 7.32–7.36 (m, 1H), 8.44–8.49 (m, 1H), 11.65 (br s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 80 °C)  $\delta$  13.97, 24.76, 29.26, 32.22, 43.52, 47.03, 54.66, 96.87, 101.94, 104.25, 115.67, 117.77, 121.91, 123.44, 134.55, 137.20, 144.79, 161.88; MS (ESI)  $m/z$  322  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  +50.1 (c 0.733, 0.1 M HCl aq.); IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3294, 2934, 2263, 1643, 710; Anal. Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}$ : C, 67.27; H, 5.96; N, 21.79. Found: C, 67.22; H, 6.06; N, 21.70.

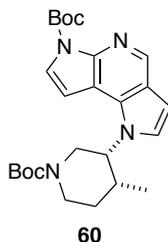
**3-[(3*S*,4*S*)-3-(Dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl)-4-methylpiperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (59b)**



**59b**  
(chiral)

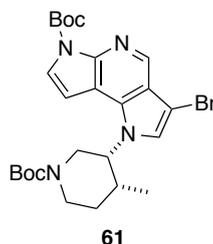
Compound **59b** was prepared from **58b** in 87% yield as a white powder by a method similar to that described for **32c**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.57–0.71 (m, 3H), 1.59–1.76 (m, 1H), 1.81–1.93 (m, 1H), 2.37–2.54 (m, 1H), 3.34–4.36 (m, 6H), 4.94–5.10 (m, 1H), 6.62–6.69 (m, 1H), 6.74–6.79 (m, 1H), 7.17–7.31 (m, 1H), 7.32–7.36 (m, 1H), 8.44–8.49 (m, 1H), 11.65 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  322  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  –52.3 (c 0.723, 0.1 M HCl aq.); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 322.1662, Found: 322.1654.

*tert*-Butyl (±)-*cis*-1-[1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methylpiperidin-3-yl]dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-6(1*H*)-carboxylate (**60**)



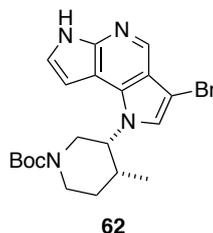
To a mixture of **58** (103 mg, 0.41 mmol), DMAP (4.9 mg, 0.040 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL) was added Boc<sub>2</sub>O (221 mg, 1.01 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 0.5 h. The mixture was quenched with saturated NH<sub>4</sub>Cl aqueous solution and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 70/30 to 50/50) to give the product (170 mg, 92%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.54–0.66 (m, 3H), 1.14–1.52 (m, 9H), 1.63 (s, 9H), 1.57–1.80 (m, 2H), 2.30–2.40 (m, 1H), 3.17–3.39 (m, 1H), 3.60–3.69 (m, 1H), 3.73–3.89 (m, 1H), 4.00–4.12 (m, 1H), 4.93–4.99 (m, 1H), 6.73 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 8.63 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 455 [M+H]<sup>+</sup>.

*tert*-Butyl (±)-*cis*-3-bromo-1-[1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methylpiperidin-3-yl]dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-6(1*H*)-carboxylate (**61**)



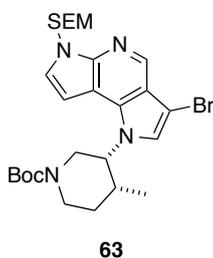
To a mixture of **60** (170 mg, 0.37 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.0 mL) was slowly added NBS (67 mg, 0.37 mmol) in an ice bath. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 10 min. The mixture was quenched with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution, warmed to room temperature, and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 70/30 to 50/50) to give the product (179 mg, 90%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.57–0.73 (m, 3H), 1.08–1.50 (m, 9H), 1.63 (s, 9H), 1.68–1.80 (m, 2H), 2.29–2.39 (m, 1H), 3.13–3.26 (m, 1H), 3.55–3.62 (m, 1H), 3.81–3.93 (m, 1H), 4.06–4.13 (m, 1H), 4.98–5.03 (m, 1H), 7.16 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 533, 535 [M+H]<sup>+</sup>.

*tert*-Butyl (±)-*cis*-3-(3-bromodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-1(6*H*)-yl)-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**62**)



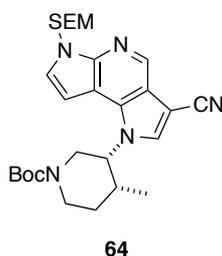
A mixture of **61** (700 mg, 1.31 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (544 mg, 3.94 mmol) and MeOH (7.0 mL) was stirred at 50 °C for 0.5 h. To the solution was added water and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 95/5) to give the product (500 mg, 88%) as a white solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.63–0.76 (m, 3H), 1.14–1.81 (m, 11H), 2.31–2.44 (m, 1H), 3.12–3.49 (m, 2H), 3.77–3.91 (m, 1H), 4.02–4.14 (m, 1H), 4.92–5.00 (m, 1H), 6.80–6.85 (m, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.40–7.45 (m, 1H), 8.34 (s, 1H) 11.84 (br s, 1H) ; MS (ESI) *m/z* 433, 435 [M+H]<sup>+</sup>.

*tert*-Butyl (±)-*cis*-3-[3-bromo-6-{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl}dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl]-4-methylpiperidine-1-carboxylate (**63**)



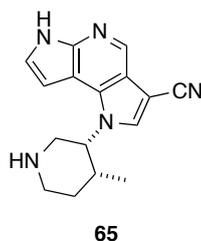
Compound **63** was prepared from **62** in 70% yield as a colorless amorphous solid by a method similar to that described for **49**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.10 (s, 9H), 0.60–0.77 (m, 3H), 0.78–0.86 (m, 2H), 1.07–1.81 (m, 11H), 2.32–2.45 (m, 1H), 3.13–3.31 (m, 1H), 3.48–3.66 (m, 3H), 3.78–3.98 (m, 1H), 4.06–4.16 (m, 1H), 4.96–5.03 (m, 1H), 5.68–5.78 (m, 2H), 6.95 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H) ; MS (ESI) *m/z* 563, 565 [M+H]<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl (±)-*cis*-3-[3-cyano-6-{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl}dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl]-4-methylpiperidine-1-carboxylate (64)**



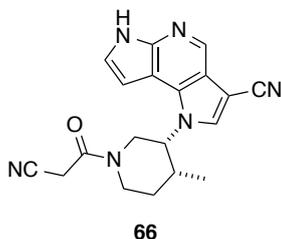
A mixture of **63** (455 mg, 0.81 mmol),  $\text{Zn}(\text{CN})_2$  (143 mg, 1.22 mmol),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (186 mg, 0.16 mmol) and DMF (2.5 mL) was stirred at 100 °C for 2 h. After cooling to room temperature, to the reaction mixture was added saturated  $\text{NaHCO}_3$  aqueous solution and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 70/30 to 50/50) to give the product (310 mg, 75%) as a colorless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -0.11 (s, 9H), 0.65–0.84 (m, 5H), 0.96–1.53 (m, 9H), 1.72–1.84 (m, 2H), 2.35–2.53 (m, 2H), 3.49–3.56 (m, 2H), 3.58–3.68 (m, 1H), 3.75–3.93 (m, 1H), 4.00–4.11 (m, 1H), 5.02–5.07 (m, 1H), 5.70–5.78 (m, 2H), 6.99 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 7.71 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.63 (s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  510  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**(±)-*cis*-1-[4-Methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-3-carbonitrile (65)**



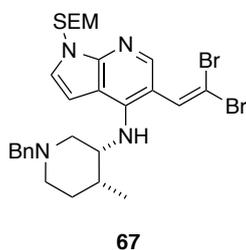
Compound **65** was prepared from **64** in 85% yield as a white powder by a method similar to that described for **53**.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  0.59 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.49–1.58 (m, 1H), 1.63–1.72 (m, 1H), 2.27–2.38 (m, 1H), 2.47–2.73 (m, 2H), 2.97–3.03 (m, 1H), 3.07–3.12 (m, 1H), 3.25–3.33 (m, 1H), 4.97–5.01 (m, 1H), 6.85–6.88 (m, 1H), 7.48–7.50 (m, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 11.97 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  280  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**(±)-cis-1-[1-(cyanoacetyl)-4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-3-carbonitrile (66)**



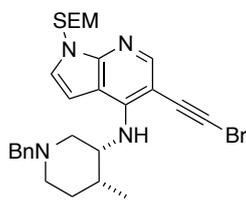
Compound **66** was prepared from **65** in 55% yield by a method similar to that described for **32c**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.57–0.70 (m, 3H), 1.60–1.76 (m, 1H), 1.80–1.97 (m, 1H), 2.36–2.52 (m, 1H), 3.25–4.38 (m, 6H), 5.06–5.20 (m, 1H), 6.84–6.94 (m, 1H), 7.50–7.54 (m, 1H), 8.20–8.25 (m, 1H), 8.52–8.57 (m, 1H), 12.02 (br s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 80 °C) δ 14.15, 24.90, 28.74, 31.80, 43.66, 55.65, 85.39, 97.22, 104.43, 115.38, 115.69, 116.50, 123.79, 132.44, 134.57, 134.82, 145.68, 162.26; MS (ESI) *m/z* 347 [M+H]<sup>+</sup>; IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 3273, 2959, 2259, 2224, 1622, 727; Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O·1.4H<sub>2</sub>O: C, 61.41; H, 5.64; N, 22.62. Found: C, 61.76; H, 5.53; N, 22.40.

**(±)-cis-N-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-5-(2,2-dibromovinyl)-1-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-amine (67)**



To a mixture of **43** (1.75 g, 3.66 mmol), triphenylphosphine (5.75 g, 21.9 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (17.5 mL) was added CBr<sub>4</sub> (3.64 g, 11.0 mmol) in an ice bath. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 h. The mixture was quenched with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 100/0 to 90/10) to give the product (2.07 g, 89%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.10 (s, 9H), 0.77–0.82 (m, 2H), 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.44–1.57 (m, 2H), 1.79–1.88 (m, 1H), 2.01–2.12 (m, 1H), 2.25–2.31 (m, 1H), 2.65–2.83 (m, 2H), 3.43–3.55 (m, 4H), 4.24–4.31 (m, 1H), 5.33–5.38 (m, 1H), 5.50 (s, 2H), 6.68 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.19–7.25 (m, 1H), 7.30–7.38 (m, 5H), 7.57 (s, 1H), 7.84 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 633, 635, 637 [M+H]<sup>+</sup>.

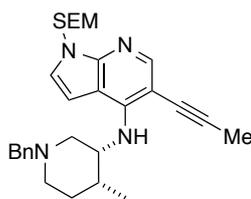
**(±)-cis-N-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-5-(bromoethynyl)-1-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amine (68)**



**68**

To a mixture of **67** (2.06 g, 3.25 mmol) and DMSO (20 mL) was added DBU (1.46 mL, 9.74 mmol) in an ice bath. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 h. The mixture was cooled in an ice bath, quenched with 1 M HCl aqueous solution, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 100/0 to 90/10) to give the product (1.53 g, 85%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.12 (s, 9H), 0.74–0.82 (m, 5H), 1.39–1.55 (m, 2H), 1.78–1.91 (m, 1H), 1.98–2.09 (m, 1H), 2.27–2.34 (m, 1H), 2.78–2.87 (m, 2H), 3.43–3.53 (m, 4H), 4.37–4.44 (m, 1H), 5.49 (s, 2H), 6.19–6.24 (m, 1H), 6.73 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.19–7.24 (m, 1H), 7.29–7.40 (m, 5H), 8.00 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 553, 555 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-N-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-5-(prop-1-yn-1-yl)-1-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amine (69)**

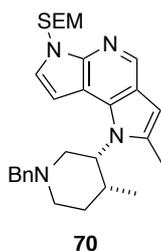


**69**

To a mixture of **68** (500 mg, 0.90 mmol) and THF (5.0 mL) was slowly added *n*-BuLi (1.65M THF solution, 1.2 mL, 2.0 mmol) at -50 °C. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 0.5 h. The mixture was cooled to -78 °C. To the solution was added MeI (67 μl, 1.1 mmol). The mixture was warmed to room temperature and stirred for 0.5 h. The solution was quenched with saturated NH<sub>4</sub>Cl aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 100/0 to 93/7) to give the product (229 mg, 52%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.12 (s, 9H), 0.74–0.82 (m, 5H), 1.44–1.53 (m, 2H), 1.78–1.90 (m, 1H), 2.00–2.10 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.27–

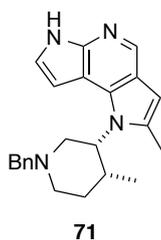
2.33 (m, 1H), 2.79–2.86 (m, 2H), 3.43–3.52 (m, 4H), 4.34–4.40 (m, 1H), 5.48 (s, 2H), 6.18–6.24 (m, 1H), 6.68 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H), 7.18–7.23 (m, 1H), 7.26–7.31 (m, 3H), 7.33–7.37 (m, 2H), 7.92 (s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  489  $[M+H]^+$ .

**(±)-cis-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-2-methyl-6-[[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (70)**



To a mixture of **69** (70 mg, 0.14 mmol) and THF (0.7 mL) was added *t*-BuOK (24 mg, 0.21 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and at 50 °C for 1 h. To the solution was added *t*-BuOK (56 mg, 0.50 mmol) and the mixture was stirred at 50 °C for 1 h. The mixture was quenched with saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aqueous solution and extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The organic layer was washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 100/0 to 80/20) to give the product (26 mg, 38%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -0.10 (s, 9H), 0.77–0.86 (m, 5H), 1.59–1.66 (m, 1H), 2.09–2.20 (m, 1H), 2.30–2.54 (m, 5H), 2.66–2.73 (m, 1H), 3.01–3.16 (m, 2H), 3.49–3.55 (m, 2H), 3.68 (s, 2H), 5.08–5.16 (m, 1H), 5.68 (s, 2H), 6.37 (s, 1H), 6.61 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 7.21–7.27 (m, 1H), 7.30–7.40 (m, 4H), 7.54 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 8.39 (s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  489  $[M+H]^+$ .

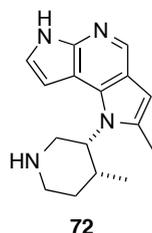
**(±)-cis-1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-2-methyl-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (71)**



Compound **71** was prepared from **70** in 90% yield as by a method similar to that described for **53**.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  0.83 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.60–1.67 (m, 1H), 2.07–2.18 (m, 1H), 2.31–2.40 (m, 1H), 2.40–2.54 (m, 4H), 2.66–2.74 (m, 1H), 2.98–3.05 (m, 1H), 3.07–3.16 (m, 1H), 3.67 (s, 2H), 5.09–5.17 (m, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.50–6.54 (m, 1H), 7.20–7.26 (m, 1H), 7.29–7.39 (m, 5H), 8.32 (s, 1H), 11.59 (br

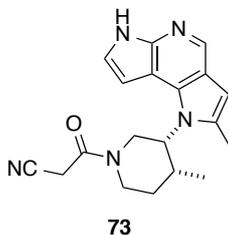
s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  359 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-2-Methyl-1-[4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (72)**



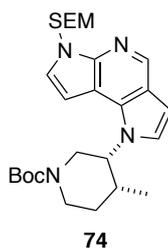
Compound **72** was prepared from **71** in 89% yield by a method similar to that described for **58**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.87 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.53–1.60 (m, 1H), 1.99–2.10 (m, 1H), 2.33–2.59 (m, 5H), 2.71–2.83 (m, 2H), 3.08–3.19 (m, 1H), 3.53–3.63 (m, 1H), 5.03–5.11 (m, 1H), 6.31 (s, 1H), 6.58–6.62 (m, 1H), 7.32–7.36 (m, 1H), 8.32 (s, 1H), 11.55 (br s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  269 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-3-[4-Methyl-3-(2-methyldipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl)piperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (73)**



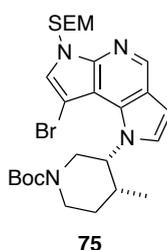
Compound **73** was prepared from **72** in 88% yield by a method similar to that described for **32c**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.81–0.97 (m, 3H), 1.58–1.69 (m, 1H), 1.92–2.27 (m, 1H), 2.45–2.57 (m, 3H), 2.90–4.70 (m, 7H), 4.79–5.14 (m, 1H), 6.34–6.39 (m, 1H), 6.53–6.59 (m, 1H), 7.30–7.37 (m, 1H), 8.32–8.36 (m, 1H), 11.54–11.64 (m, 1H); MS (ESI)  $m/z$  336 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): 336.18189, Found: 336.18143.

***tert*-Butyl (±)-cis-4-methyl-3-[6-{{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl}dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl}piperidine-1-carboxylate (74)**



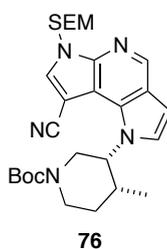
To a solution of **56** (14.5 g, 30.5 mmol) in MeOH (60 mL) were added 20% Pd(OH)<sub>2</sub> on carbon (2.14 g, 3.05 mmol) and Boc<sub>2</sub>O (7.33 g, 33.6 mmol) at room temperature. Hydrogen gas was purged and the mixture was stirred for 2.5 h at room temperature under 1 atm and filtered through a Celite pad. The filtrate was evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 85/15 to 70/30) to give the product (14.8 g, quantitative yield). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.11 (s, 9H), 0.57–0.71 (m, 3H), 0.76–0.85 (m, 2H), 1.11–1.53 (m, 9H), 1.57–1.68 (m, 1H), 1.72–1.82 (m, 1H), 2.32–2.43 (m, 1H), 3.18–3.40 (m, 1H), 3.48–3.56 (m, 2H), 3.61–3.70 (m, 1H), 3.72–3.86 (m, 1H), 4.01–4.13 (m, 1H), 4.92–4.98 (m, 1H), 5.65–5.73 (m, 2H), 6.68 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 485 [M+H]<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl (±)-*cis*-3-[8-bromo-6-{{2-(trimethylsilyl)ethoxy}methyl}dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl]-4-methylpiperidine-1-carboxylate (75)**



Compound **75** was prepared from **74** in 35 % yield by a method similar to that described for **61**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.11 (s, 9H), 0.65–0.73 (m, 3H), 0.76–0.88 (m, 2H), 1.20–1.64 (m, 10H), 1.83–1.95 (m, 1H), 2.39–2.58 (m, 1H), 3.38–3.59 (m, 4H), 3.75–4.08 (m, 2H), 5.65–5.77 (m, 3H), 6.78 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 8.61 (s, 1H) ; MS (ESI) *m/z* 563, 565 [M+H]<sup>+</sup>.

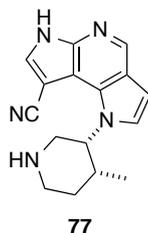
***tert*-Butyl (±)-*cis*-3-[8-cyano-6-{{2-(trimethylsilyl)ethoxy}methyl}dipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl]-4-methylpiperidine-1-carboxylate (76)**



Compound **76** was prepared from **75** in 65% yield by a method similar to that described for **64**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.11 (s, 9H), 0.66–0.74 (m, 3H), 0.78–0.86 (m, 2H), 1.14–1.63 (m, 10H), 1.92–2.12 (m, 1H), 2.36–2.57 (m, 1H), 3.40–3.62 (m, 4H), 3.72–3.89 (m, 1H), 3.94–4.12 (m, 1H), 5.25–5.32

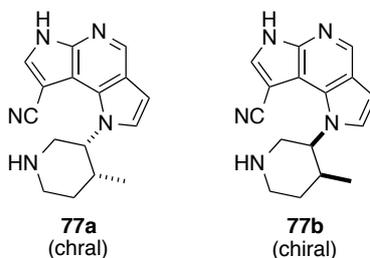
(m, 1H), 5.75 (s, 2H), 6.84 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 7.45 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.73 (s, 1H); MS (ESI)  $m/z$  510  $[M+H]^+$ .

(±)-*cis*-1-[4-Methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-8-carbonitrile (**77**)



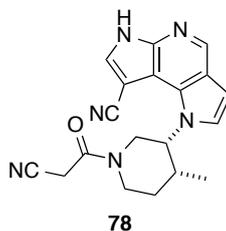
Compound **77** was prepared from **76** in quantitative yield by a method similar to that described for **53**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.59 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.44–1.55 (m, 1H), 1.79–1.90 (m, 1H), 2.23–2.35 (m, 1H), 2.66–2.73 (m, 1H), 2.92–3.01 (m, 1H), 3.05–3.13 (m, 1H), 3.27–3.39 (m, 1H), 4.06–4.13 (m, 1H), 5.25–5.31 (m, 1H), 6.74 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 8.01 (br s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 12.85 (br, 1H); MS (ESI)  $m/z$  280  $[M+H]^+$ .

1-[(3*R*,4*R*)-4-Methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-8-carbonitrile (**77a**) and 1-[(3*S*,4*S*)-4-Methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-8-carbonitrile (**77b**)



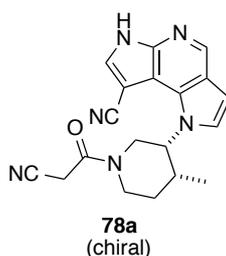
The racemate **77** (3.2 g) was separated by chiral column chromatography (DAICEL CHIRALCEL OD-H 0.46 cm I.D.  $\times$  25 cmL, MeCN/MeOH/*i*-PrNH<sub>2</sub> = 95/5/0.1, flow rate: 1.0 mL/min) to give **77a** (1.0 g, >98% ee,  $t_R = 5.752$  min) and **77b** (1.2 g, >98% ee,  $t_R = 8.224$  min).

**(±)-cis-1-[1-(Cyanoacetyl)-4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-8-carbonitrile (78)**



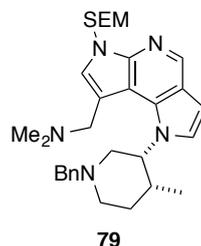
Compound **78** was prepared from **77** in 60% yield as a white powder by a method similar to that described for **32c**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.60–0.78 (m, 3H), 1.53–1.75 (m, 1H), 1.92–2.14 (m, 1H), 2.38–2.57 (m, 1H), 3.39–3.64 (m, 1H), 3.77–3.97 (m, 2H), 4.00–4.34 (m, 3H), 5.28–5.43 (m, 1H), 6.77–6.82 (m, 1H), 7.37–7.45 (m, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.63–8.66 (m, 1H), 12.90 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 347 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): 347.16149, Found: 347.16115.

**1-[(3*R*,4*R*)-1-(Cyanoacetyl)-4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine-8-carbonitrile (78a)**



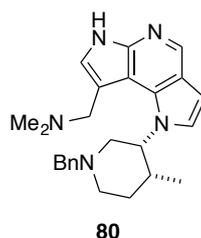
Compound **78a** was prepared from **77a** in 84% yield as a white powder by a method similar to that described for **32c**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.60–0.78 (m, 3H), 1.53–1.75 (m, 1H), 1.92–2.14 (m, 1H), 2.38–2.57 (m, 1H), 3.39–3.64 (m, 1H), 3.77–3.97 (m, 2H), 4.00–4.34 (m, 3H), 5.28–5.43 (m, 1H), 6.77–6.82 (m, 1H), 7.37–7.45 (m, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.63–8.66 (m, 1H), 12.90 (br s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 80 °C) δ 14.02, 24.66, 29.22, 32.33, 43.21, 55.50, 80.80, 102.85, 103.46, 115.58, 118.57, 119.93, 125.21, 132.89, 133.76, 139.89, 144.21, 161.89; MS (ESI) *m/z* 347 [M+H]<sup>+</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +5.95 (c 0.507, 0.1 M HCl aq.); IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 3184, 3146, 2938, 2261, 2218, 1634, 743; Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O: C, 65.88; H, 5.24; N, 24.26. Found: C, 65.95; H, 5.39; N, 23.94.

(±)-*cis*-1-(1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-6-{{2-(trimethylsilyl)ethoxy}methyl}-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-8-yl)-*N,N*-dimethylmethanamine (79)



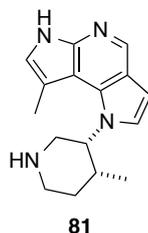
To a mixture of **56** (160 mg, 0.34 mmol) and DMF (3.2 mL) was added Eschenmoser's salt (81 mg, 0.44 mmol) at room temperature. The reaction mixture stirred at 60 °C for 1.5 h. The mixture was quenched with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 100/0 to 92/8) to give the product (172 mg, 96%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -0.13 (s, 9H), 0.48 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.73–0.82 (m, 2H), 1.59–1.67 (m, 2H), 2.11–2.34 (m, 2H), 2.25 (s, 6H), 2.57–2.64 (m, 1H), 2.94–3.05 (m, 2H), 3.41–3.54 (m, 3H), 3.63–3.79 (m, 3H), 4.95–5.00 (m, 1H), 5.66 (s, 2H), 6.87 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.18–7.23 (m, 1H), 7.25–7.30 (m, 2H), 7.33–7.37 (m, 2H), 7.48 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.93–8.08 (m, 1H), 8.57 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 532 [M+H]<sup>+</sup>.

(±)-*cis*-1-{1-[1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-8-yl}-*N,N*-dimethylmethanamine (80)



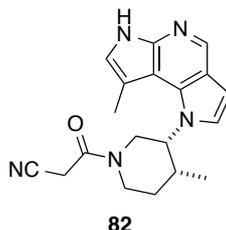
Compound **80** was prepared from **79** in quantitative yield as a white amorphous solid by a method similar to that described for **53**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.51 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.59–1.69 (m, 2H), 2.19 (s, 6H), 2.10–2.35 (m, 2H), 2.58–2.68 (m, 1H), 2.91–3.04 (m, 2H), 3.41–3.48 (m, 1H), 3.57–3.70 (m, 3H), 4.93–4.99 (m, 1H), 6.71–6.83 (m, 1H), 7.17–7.23 (m, 1H), 7.25–7.43 (m, 5H), 7.86–8.01 (m, 1H), 8.48–8.57 (m, 1H), 11.54 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 402 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-8-Methyl-1-[4-methylpiperidin-3-yl]-1,6-dihydrodipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridine (81)**



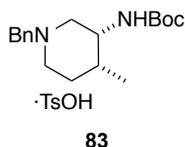
Compound **81** was prepared from **80** in 71% yield as a white amorphous solid by a method similar to that described for **58**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.60 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.50–1.60 (m, 1H), 1.64–1.73 (m, 1H), 2.24–2.31 (m, 1H), 2.34 (d, *J* = 0.92 Hz, 3H), 2.43–2.58 (m, 1H), 2.65–2.73 (m, 1H), 2.92–3.01 (m, 1H), 3.02–3.09 (m, 1H), 3.21–3.28 (m, 1H), 4.79–4.85 (m, 1H), 6.66–6.76 (m, 1H), 7.29 (t, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.54 (br s, 1H), 8.39 (s, 1H), 11.54 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 269 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-cis-3-[4-Methyl-3-(8-methyldipyrrolo[2,3-*b*:2',3'-*d*]pyridin-1(6*H*)-yl)piperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile (82)**



Compound **82** was prepared from **81** in 49% yield as a white powder by a method similar to that described for **32c**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.59–0.74 (m, 3H), 1.59–1.94 (m, 2H), 2.30–2.64 (m, 4H), 3.25–3.44 (m, 1H), 3.52–3.96 (m, 3H), 4.00–4.34 (m, 2H), 4.86–5.04 (m, 1H), 6.71–6.75 (m, 1H), 6.94–7.04 (m, 1H), 7.29–7.35 (m, 1H), 8.37–8.45 (m, 1H), 11.60 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z* 336 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) *m/z*. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): 336.1819, Found: 336.1810.

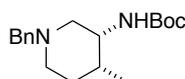
***tert*-Butyl (±)-cis-[1-benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]carbamate 4-methylbenzene-1-sulfonic acid salt (1:1) (83)**



To a solution of **26** (70.0 g, 185 mmol) in MeOH (210 mL) was added PtO<sub>2</sub> (1.05 g, 4.61 mmol), followed by catalytic reduction at 42 °C under 3 atm of hydrogen gas for 7 h. The reaction mixture was separated by filtration through a Celite pad and the filtrate was concentrated under reduced pressure.

The obtained residue was neutralized with a saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution, and the mixture was then extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and then filtered and concentrated *in vacuo*. To a solution of the obtained residue in MeOH was added PtO<sub>2</sub> (180 mg), followed by catalytic reduction at 45 °C under 4 atm of hydrogen gas for 4 h. The reaction mixture was separated by filtration through a Celite pad and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained residue was neutralized with a saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution, and the mixture was then extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and then filtered and concentrated *in vacuo*. To a solution of the obtained residue in acetone was added TsOH·H<sub>2</sub>O (35.1 g, 185 mmol) dissolved in a small amount of H<sub>2</sub>O. After stirring for 5 min at room temperature, the mixture was concentrated under reduced pressure. The obtained residue was washed with acetone/AcOEt to obtain the product (51.4 g, 58%) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 120 °C) δ 0.89 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.34–1.40 (m, 9H), 1.55–1.79 (m, 2H), 1.84–2.08 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.73–3.22 (m, 4H), 3.81–3.90 (m, 1H), 4.19–4.40 (m, 2H), 6.16–6.51 (m, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.41–7.51 (m, 5H), 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.39–9.59 (m, 1H); MS (ESI) *m/z* 305 [M+H]<sup>+</sup>.

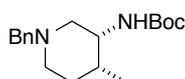
***tert*-Butyl (±)-*cis*-[1-benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]carbamate (27)**



**27**

To a solution of **83** (310 g, 650 mmol) in CHCl<sub>3</sub> was added saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution. The mixture was vigorously stirred and was neutralized. The mixture was then extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and then filtered and concentrated *in vacuo* to obtain the product (196 g, 99%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.80 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.30–1.36 (m, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.42–1.55 (m, 1H), 1.56–1.68 (m, 1H), 1.92–2.10 (m, 2H), 2.53–2.70 (m, 2H), 3.38–3.49 (m, 2H), 3.51–3.59 (m, 1H), 6.12–6.23 (m, 1H), 7.20–7.26 (m, 1H), 7.27–7.33 (m, 4H); MS (ESI) *m/z* 305 [M+H]<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl [(3*R*,4*R*)-1-benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]carbamate  
(2*R*,3*R*)-2,3-bis[(4-methylbenzoyl)oxy]butanedioic acid salt (1:1) (84)**

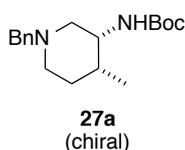


·L-DPTTA

**84**  
(chiral)

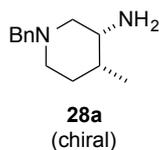
To a solution of **27** (2.00 g, 6.57 mmol) in EtOH (10 mL) was added L-DPTTA (2.54 g, 6.57 mmol). After stirring for 15 min at room temperature, to the mixture was added small amount of **84**. The mixture was stirred for 30 min and was allowed to stand overnight. The solid was collected and was washed with EtOH to obtain the product (1.88 g, 41%) as a white powder.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.74 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 1.22–1.54 (m, 11H), 1.61–1.76 (m, 1H), 2.38 (s, 6H), 2.41–2.59 (m, 2H), 2.71–2.98 (m, 2H), 3.61–3.73 (m, 1H), 3.74–3.94 (m, 2H), 5.75 (s, 2H), 6.50–6.66 (m, 1H), 7.28–7.41 (m, 9H), 7.88 (d,  $J = 8.2$  Hz, 4H); MS (ESI)  $m/z$  305  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### *tert*-Butyl [(3*R*,4*R*)-1-benzyl-4-methylpiperidin-3-yl]carbamate (**27a**)



Compound **84** (12.0 g, 17.4 mmol) was dissolved in  $\text{CHCl}_3$ . The solution was passed through a short wash column of amino functionalized silica gel (100%  $\text{CHCl}_3$ ) to obtain the product (5.07 g, 96%) as a colorless oil.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.80 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 1.30–1.36 (m, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.42–1.55 (m, 1H), 1.56–1.68 (m, 1H), 1.92–2.10 (m, 2H), 2.53–2.70 (m, 2H), 3.38–3.49 (m, 2H), 3.51–3.59 (m, 1H), 6.12–6.23 (m, 1H), 7.20–7.26 (m, 1H), 7.27–7.33 (m, 4H); MS (ESI)  $m/z$  305  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### (3*R*,4*R*)-1-Benzyl-4-methylpiperidin-3-amine (**28a**)



Compound **28a** was prepared from **27a** in quantitative yield by a method similar to that described for **28**.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.85 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.29–1.47 (m, 2H), 1.47–1.58 (m, 1H), 1.91–2.01 (m, 1H), 2.05–2.14 (m, 1H), 2.54–2.66 (m, 2H), 2.66–2.71 (m, 1H), 3.33 (br s, 2H), 3.37–3.47 (m, 2H), 7.20–7.26 (m, 1H), 7.27–7.34 (m, 4H); MS (ESI)  $m/z$  205  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## 2. Biology

### 2.1. Kinase assay

Human JAK1, JAK2, and JAK3 kinase-domains were purchased from Carna Biosciences, Inc. (Kobe,

Japan) and assays were performed using streptavidin-coated 96-well plates. Reaction mixtures contained 15 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.01% Tween 20, 2 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 nM Biotin-Lyn-Substrate-2 (for JAK1, 2 and 3, Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan), and ATP at final concentrations of 200 μM for JAK1, 10 μM for JAK2, and 8 μM for JAK3. A test compound was dissolved in DMSO and the reaction was initiated by adding the kinase domain, followed by incubation at room temperature for 1 h. Kinase activity was measured as the rate of phosphorylation of Biotin-Lyn-Substrate-2 using an HRP-conjugated anti-phosphotyrosine antibody (HRP-PY-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and a phosphotyrosine-specific ELISA. Experiments were performed in duplicate for all test compounds except for **5**, and the IC<sub>50</sub> value for each experiment was calculated using linear regression analysis. The assay of **5** was performed in four experiments, and the IC<sub>50</sub> value was calculated using Sigmoid-Emax non-linear regression analysis. Twenty-nine other human kinase assays were performed at Carna Biosciences Inc. using standard conditions.

## 2.2. Rat T-cell proliferation

Splenocytes from male Lewis rats were suspended in RPMI1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 μM 2-mercaptoethanol at a density of 1.5×10<sup>6</sup> cells/mL. Splenocytes were cultured with Concanavalin A (Sigma) for 24 h at 37 °C to induce IL-2 receptor expression and then incubated with IL-2 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and test compounds at designated concentrations in 96-well tissue culture plates. After a 3-day incubation, alamarBlue<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was added to each test well and incubated for 6 h. Fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 545 nm and an emission wavelength of 590 nm. Experiments were performed in duplicate for all test compounds except for **5**, and the IC<sub>50</sub> value for each experiment was calculated using linear regression analysis. The assay of **5** was performed in four experiments, and the IC<sub>50</sub> value was calculated using Sigmoid-Emax non-linear regression analysis.

## 2.3. Rat cardiac transplantation model

ACI rats (Japan SLC, Inc.) were used as cardiac donors and Lewis rats (Charles River Japan Inc.) as cardiac recipients. All procedures were conducted under aseptic conditions. Rats were intraperitoneally anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg). Abdominal vascularized heterotopic cardiac transplantation was conducted in accordance with a previously reported method.<sup>13</sup> Compound **59a** was dissolved in propylene glycol. Compound **59a** at 0.1, 0.25 and 0.5 mg/kg was orally administered in combination studies with tacrolimus. Tacrolimus (0.02 mg/kg) was diluted with saline and intramuscularly

administered. Beginning on the operation day, all test compounds were administered once a day for 14 consecutive days. Cardiac allograft function was assessed by daily palpation for 28 days, and graft rejection was defined as the cessation of palpable cardiac graft beats.

#### 2.4. *In vitro* liver microsomal stability

To estimate stability against rat hepatic CYPs, test compound (0.2  $\mu$ M) was incubated with male SD rat liver microsomes (0.2 mg protein/mL) with NADPH (1 mM) and EDTA (0.1 mM) in phosphate buffer (100 mM) at 37 °C. Incubations were conducted for 45 min. The peak area ratio of unchanged compound was determined by LC-MS/MS. Intrinsic clearance values ( $CL_{int}$ ) were calculated on the basis of the rate of substrate disappearance within the reaction time.

#### 2.5. CYP3A4 reversible and time-dependent inhibition assay

For the CYP3A4 inhibition assay, midazolam was used as a probe substrate to monitor changes in CYP3A4 activity during exposure to each test compound. Reaction mixtures containing 0.1 mg protein/mL human liver microsomes (HLM), 1 mM NADPH, 0.1 mM EDTA, 100 mM  $Na^+K^+$  phosphate buffer (pH 7.4) and 5  $\mu$ M test compounds were prepared and pre-incubated for 0 or 30 min at 37 °C. Reactions were initiated by the addition of 2  $\mu$ M of midazolam and incubated for 20 min and then terminated by addition of 80% acetonitrile with an internal standard. The peak area ratio of 1'-hydroxymidazolam and the internal standard was measured by LC-MS/MS. Residual metabolic activities for reversible (eq. 1) and time-dependent (eq. 2) inhibition were calculated using the following equations:

$$\% \text{ Remaining Activity} = A_{c,0} / A_{v,0} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

$$\% \text{ Remaining Activity} = (A_{c,30} / A_{v,30}) / (A_{c,0} / A_{v,0}) \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

where,  $A_{c,0}$  denotes peak area ratio obtained in the presence of a compound and without 30 min pre-incubation,  $A_{v,0}$  denotes peak area ratio obtained in the absence of a compound and without 30 min pre-incubation,  $A_{c,30}$  denotes peak area ratio obtained in the presence of a compound and with 30 min pre-incubation and  $A_{v,30}$  denotes peak area ratio obtained in the absence of a compound and with 30 min pre-incubation.

#### 2.6. Pharmacokinetic study

The pharmacokinetic studies of compound **32a**, **59a**, and **78a** were conducted in female SD rats. Compound **32a**, **59a**, and **78a** were intravenously administered at 1.0 mg/kg in a mixture of

DMF/propylene glycol/saline (1/1/8) solution for injection, and orally at 1.0 mg/kg in a mixture of DMF/propylene glycol/water (1/1/8) solution. Blood samples were taken at multiple time points up to 24 h after a single administration of the compounds. Concentrations of unchanged compound in plasma were determined using LC-MS/MS. The AUC and pharmacokinetic parameters after i.v. and p.o. administration were calculated using a program developed in house.

## **2.7. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA)**

PAMPA was conducted using the PAMPA Evolution from pION Inc. (Billerica, MA). In this assay, a 'sandwich' is formed by a 96-well microtiter plate (pION Inc.) and a 96-well filter plate (pION Inc.) such that each composite well is divided into two chambers, with donor at the bottom and acceptor at the top, separated by a lipid (pION Inc.) coated microfilter disc. Drug stock solutions (5  $\mu$ L, 10 mM DMSO solution) in a 96-well polypropylene microtiter plate were introduced by the robotic liquid handling system and mixed into an aqueous buffer solution of 10% (v/v) DMSO to attain a final sample concentration of 50  $\mu$ M. The drug solutions were filtered through a 96-well filter plate (polyvinylidene fluoride; Corning Inc., Corning, NY) and added to the donor compartments. The donor solution was adjusted to pH 6.5 (NaOH-treated buffer; pION Inc.), whereas the acceptor solution had a pH of 7.4 (pION Inc.). The plates were sandwiched together and incubated at room temperature for 2 h in a humidity-saturated atmosphere. After incubation, the sandwiched plates were separated, and both the donor and acceptor compartments were assayed for the amount of material present by comparison of the peak heights by HPLC. Mass balance, which is the difference between the reference and sum of the donor and acceptor, was used to determine the amount of material remaining in the membrane barrier. Permeability was calculated using PAMPA Evolution software (pION Inc.).

## **3. Molecular Modeling and Calculation of Chemical properties**

### **3.1. Docking study**

Docking calculation was done on the crystal structure of tofacitinib (**5**) bound to JAK3 (PDB code: 3LXK<sup>18</sup>). The protein-ligand complex was prepared with the Protein Preparation Wizard in Maestro (version 9.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.), improp applying the appropriate side-chain protonation states, refine, and structure minimization. Docking grids were generated and defined based on the centroid of tofacitinib in the ATP binding site incorporating hydrogen-bond constraints to the hinge and hydrophobic regions. Ligands were prepared using LigPrep (version 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012) and ConfGen (version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012), energy-

minimized conformation of each ligands were used to docking calculation input molecules. Ligand receptor docking was conducted using XP mode in Glide (version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012). The top-scoring pose assessed by GlideScore was employed for discussions.

### **3.2. WaterMap**

WaterMap (version 1.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012) calculation was done on the crystal structure of tofacitinib bound to JAK3 (PDB code: 3LXK), the structure preparation method is as described above. WaterMap was run in the default mode using tofacitinib structure to define the binding site but removed in the MD simulation.  $\Delta G_{\text{pred}}$  of binding and ligand strain energies were calculated using the ab initio form of the displaced-solvent functional as described by Abel et al.<sup>22</sup>

### **3.3. Calculation of Chemical properties**

The value of CLogP, HBD counts, HBA counts and TPSA were calculated by ACD/Percepta.

## References

1. 深尾立 診断と治療 **2014**, *102*, 1451.
2. 藤原大海 編著 新移植免疫学 中外医学社
3. Ho, S.; Clipstone, N.; Timmermann, L.; Northrop, J.; Graef, I.; Fiorentino, D.; Nourse, J.; Crabtree, G. R. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *80*, S40.
4. Mele, T. S.; Halloran, P. F. *Immunopharmacology* **2000**, *47*, 215.
5. 日本移植学会広報委員会編 臓器移植ファクトブック 2016
6. (a) Naesens, M.; Kuypers, D. R. J.; Sarwal, M. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 481; (b) Gummert, J. F.; Ikonen, T.; Morris, R. E. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, *10*, 1366.
7. (a) Imada, K.; Leonard, W. J. *Mol. Immunol.* **2000**, *37*, 1; (b) Leonard, W. J.; Lin, J.-X. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *105*, 877.
8. (a) O'Shea, J. J.; Pesu, M.; Borie, D. C.; Changelian, P. S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 555; (b) Ghoreschi, K.; Laurence, A.; O'Shea, J. J. *Immunol. Rev.* **2009**, *228*, 273; (c) O'Shea, J. J.; Plenge, R. *Immunity* **2012**, *36*, 542.
9. Russell, S. M.; Tayebi, N.; Nakajima, H.; Riedy, M. C.; Roberts, J. L.; Aman, M. J.; Migone, T. S.; Noguchi, M.; Markert, M. L.; Buckley, R. H.; O'Shea, J. J.; Leonard, W. J. *Science* **1995**, *270*, 797.
10. (a) Kiss, R.; Sayeski, P. P.; Keserű, G. M. *Expert Opin. Thera. Pat.* **2010**, *20*, 471 (b) Wilson, L. J. *Expert Opin. Thera. Pat.* **2010**, *20*, 609; (c) Norman, P. *Expert Opin. Thera. Pat.* **2012**, *22*, 1233; (d) Dymock, B. W.; See, C. S. *Expert Opin. Thera. Pat.* **2013**, *23*, 449. (e) Clark, J. D.; Flanagan, M. E. Telliez, J.-B. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5023. (f) Schwartz, D. M.; Kanno, Y.; Villarino, A.; Ward, M.; Gadina, M.; O'Shea, J. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 843.
11. (a) Changelian, P. S.; Flanagan, M. E.; Ball, D. J.; Kent, C. R.; Magnuson, K. S.; Martin, W. H.; Rizzuti, B. J.; Sawyer, P. S.; Perry, B. D.; Brissette, W. H.; McCurdy, S. P.; Kudlacz, E. M.; Conklyn, M. J.; Elliott, E. A.; Koslov, E. R.; Fisher, M. B.; Strelevitz, T. J.; Yoon, K.; Whipple, D. A.; Sun, J.; Munchhof, M. J.; Doty, J. L.; Casavant, J. M.; Blumenkopf, T. A.; Hines, M.; Brown, M. F.; Lillie, B. M.; Subramanyam, C.; Shang-Poa, C.; Milici, A. J.; Beckius, G. E.; Moyer, J. D.; Su, C.; Woodworth, T. G.; Gaweco, A. S.; Beals, C. R.; Littman, B. H.; Fisher, D. A.; Smith, J. F.; Zagouras, P.; Magna, H. A.; Saltarelli, M. J.; Johnson, K. S.; Nelms, L. F.; Des Etages, S. G.; Hayes, L. S.; Kawabata, T. T.; Finco-Kent, D.; Baker, D. L.; Larson, M.; Si, M. S.; Paniagua, R.; Higgins, J.; Holm, B.; Reitz, B.; Zhou, Y. J.; Morris, R. E.; O'Shea, J. J.; Borie, D. C. *Science* **2003**, *302*, 875; (b) Flanagan, M. E.; Blumenkopf, T. A.; Brissette, W. H.; Brown, M. F.; Casavant, J. M.; Shang-Poa, C.; Doty, J. L.; Elliott, E. A.; Fisher, M. B.; Hines, M.; Kent, C.; Kudlacz, E. M.; Lillie, B. M.; Magnuson, K. S.; McCurdy, S. P.; Munchhof, M. J.; Perry, B. D.; Sawyer, P. S.; Strelevitz,

- T. J.; Subramanyam, C.; Sun, J.; Whipple, D. A.; Changelian, P. S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8468.
12. Fridman, J. S.; Scherle, P. A.; Collins, R.; Burn, T. C.; Li, Y.; Li, J.; Covington, M. B.; Thomas, B.; Collier, P.; Favata, M. F.; Wen, X.; Shi, J.; McGee, R.; Haley, P. J.; Shepard, S.; Rodgers, J. D.; Yeleswaram, S.; Hollis, G.; Newton, R. C.; Metcalf, B.; Friedman, S. M.; Vaddi, K. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 5298.
  13. Menet, C. J.; Fletcher, S. R.; Van Lommen, G.; Geney, R.; Blanc, J.; Smits, K.; Jouannigot, N.; Deprez, P.; van der Aar, E. M.; Clement-Lacroix, P.; Lepescheux, L.; Galien, R.; Vayssiere, B.; Nelles, L.; Christophe, T.; Brys, R.; Uhring, M.; Ciesielski, F.; Van Rompaey, L. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9323.
  14. Thorarensen, A.; Dowty, M. E.; Banker, M. E.; Juba, B.; Jussif, J.; Lin, T.; Vincent, F.; Czerwinski, R. M.; Casimiro-Garcia, A.; Unwalla, R.; Trujillo, J. I.; Liang, S.; Balbo, P.; Che, Y.; Gilbert, A. M.; Brown, M. F.; Hayward, M.; Montgomery, J.; Leung, L.; Yang, X.; Soucy, S.; Hegen, M.; Coe, J.; Langille, J.; Vajdos, F.; Chrencik, J.; Telliez, J.-B. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1971.
  15. Baan, C. C.; Kannegieter, N. M.; Felipe, C. R.; Tedesco Silva, H., Jr. *Transplantation* **2016**, *100*, 1833.
  16. Wollenhaupt, J.; Silverfield, J.; Lee, E. B.; Curtis, J. R.; Wood, S. P.; Soma, K.; Nduaka, C. I.; Benda, B.; Gruben, D.; Nakamura, H.; Komuro, Y.; Zwillich, S. H.; Wang, L.; Riese, R. J. *J. Rheumatol.* **2014**, *41*, 837.
  17. Nakajima, Y.; Tojo, T.; Morita, M.; Hatanaka, K.; Shirakami, S.; Tanaka, A.; Sasaki, H.; Nakai, K.; Mukoyoshi, K.; Hamaguchi, H.; Takahashi, F.; Moritomo, A.; Higashi, Y.; Inoue, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2015**, *63*, 341.
  18. Chrencik, J. E.; Patny, A.; Leung, I. K.; Korniski, B.; Emmons, T. L.; Hall, T.; Weinberg, R. A.; Gormley, J. A.; Williams, J. M.; Day, J. E.; Hirsch, J. L.; Kiefer, J. R.; Leone, J. W.; Fischer, H. D.; Sommers, C. D.; Huang, H. C.; Jacobsen, E. J.; Tenbrink, R. E.; Tomasselli, A. G.; Benson, T. E. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 413.
  19. Serge, B.; Stephane, G.; Nachimuthu, S. WO2003082289, **2003**.
  20. L'Heureux, A.; Thibault, C.; Ruel, R. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2317.
  21. Tucker, T. J.; Sisko, J. T.; Tynebor, R. M.; Williams, T. M.; Felock, P. J.; Flynn, J. A.; Lai, M.-T.; Liang, Y.; McGaughey, G.; Liu, M.; Miller, M.; Moyer, G.; Munshi, V.; Perlow-Poehnel, R.; Prasad, S.; Reid, J. C.; Sanchez, R.; Torrent, M.; Vacca, J. P.; Wan, B.-L.; Yan, Y. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6503.
  22. (a) Abel, R.; Young, T.; Farid, R.; Berne, B. J.; Friesner, R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2817;  
(b) Yang, Y.; Lightstone, F. C.; Wong, S. E., *Expert Opin. Drug. Discov.* **2013**, *8*, 277.
  23. Shiraga, T.; Matsuda, H.; Nagase, K.; Iwasaki, K.; Noda, K.; Yamazaki, H.; Shimada, T.; Funae, Y. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 727.

24. Muchowski, J. M.; Solas, D. R., *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 203.
25. Nakajima, Y.; Inoue, T.; Nakai, K.; Mukoyoshi, K.; Hamaguchi, H.; Hatanaka, K.; Sasaki, H.; Tanaka, A.; Takahashi, F.; Kunikawa, S.; Usuda, H.; Moritomo, A.; Higashi, Y.; Inami, M.; Shirakami, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 4871.
26. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615.
27. Nakanishi, T.; Morokata, T.; Kubo, K.; Umeno, H.; Eikyu, Y.; Kozuki, Y.; Seki, N. *Int. Immunopharm.* **2010**, *10*, 91.
28. Nakamura, K.; Inami, M.; Morio, H.; Okuma, K.; Ito, M.; Noto, T.; Shirakami, S.; Hirose, J.; Morokata, T. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *796*, 69.

## 謝 辞

本論文の発表及び作成にあたり御指導を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 教授 井上 将行 博士に謹んで御礼申し上げます。

また、本論文に関し審査及び貴重な御教示を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 教授 大和田 智彦 博士、同研究科 教授 金井 求 博士、分子細胞生物学研究所 教授 橋本 祐一 博士、同研究所 准教授 石川 稔 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究は、アステラス製薬株式会社研究本部モダリティ研究所にて行われたものであり、モダリティ研究所 所長 平野 祐明 博士のご指導に深謝いたします。

本論文を作成にあたり常に有益な御助言を頂き終始御激励を賜りました、モダリティ研究所機能分子第1研究室 室長 四月朔日 晋 博士、同研究所先端化学研究室 室長 松嶋 雄司 博士に厚く御礼申し上げます。本研究の実施にあたり一方ならぬご支援を賜りました、アステラスリサーチテクノロジー株式会社企画総務部 部長 大久保 充 博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり多くの有益な御助言を賜りました、白神 昇平 博士、井上 隆 幸 博士、中島 豊 博士、前田 純 氏、富永 博章 博士、高橋 史江 氏、田中 明 博士、畑中 恵子 博士、濱口 壽雄 博士、本渡 猛 博士、臼田 裕之 博士に心より感謝致します。

各種薬理試験を実施頂きました、稲見 真倫 博士、東 康之 博士、伊藤 美聖 氏、森尾 浩樹 氏、中村 康次 氏に心より感謝致します。

ドッキング解析を行って頂きました、森友 紋子 博士、薬物動態試験を行って頂きました、中森 文洋 博士に感謝申し上げます。

各種データを測定して頂きました、アステラス製薬株式会社ならびにアステラスリサーチテクノロジー株式会社の方々に心より感謝致します。

研究者としての研究の進め方や考え方についてご指導頂きました、名古屋大学大学院創薬科学研究科 特任教授 福山 透 博士に心より感謝致します。

本論文の発表及び作成にあたり筆者のことを支えてくれた家族に感謝致します。

2018年3月  
山岸 尋亮