

博士論文

抗肥満薬 bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) アゴニスト

および抗糖尿病薬 fatty acid transport protein 1 (FATP1)

阻害剤の創製研究

2015年7月

静岡県立大学

薬食生命科学総合学府

薬学研究院

松藤 哲義

Discovery of novel chiral diazepines, bombesin receptor subtype-3
(BRS-3) agonists as anti-obesity agents
and
novel fatty acid transport protein 1 (FATP1) inhibitors
as anti-diabetes agents

July, 2015

Tetsuyoshi MATSUFUJI

目次

略語表	1
第一部 抗肥満薬 bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) アゴニストの創製研究	3
第一章 序論	4
第一節 世界人口の増加に伴う肥満症患者数の急増	4
第二節 肥満症患者に対する治療薬の現状	6
第三節 本研究の概要	9
第二章 新規 BRS-3 アゴニストの化合物探索	10
第一節 抗肥満薬ターゲットとしての BRS-3	10
第二節 自社 HTS ヒット化合物からの化合物デザイン	12
第三節 新規二、三環性ジアゼピン化合物の合成	13
第四節 新規二、三環性ジアゼピン化合物の生物学的評価	15
第五節 小括	18
第三章 低中枢移行性 BRS-3 アゴニストの開発	19
第一節 極性基を導入したジアゼピン化合物の合成	19
第二節 極性基を導入したジアゼピン化合物の生物学的評価	21
第三節 計算化学を用いたキラル酢酸ユニットの役割に関する考察	24
第四節 小括	24
第四章 アンテドラッグ型 BRS-3 アゴニスト	29
第一節 さらになる中枢移行性低減を志向したアンテドラッグ手法の採用	29
第二節 アンテドラッグ型ジアゼピン化合物の合成	30
第三節 アンテドラッグ型ジアゼピン化合物の生物学的評価	31
第四節 アンテドラッグ型ジアゼピン化合物の薬物動態的評価	32
第五節 アンテドラッグ型化合物 35c の薬効評価	35
第六節 アンテドラッグ型化合物 35c の心血管系リスク評価	36
第七節 小括	39
総括	40

第二部 抗糖尿病薬 FATP1 阻害剤の創製研究	42
第一章 序論	43
第一節 糖尿病とは	43
第二節 糖尿病におけるインスリン抵抗性と標的臓器としての骨格筋	45
第三節 Fatty acid transport protein 1 (FATP1) 阻害剤について	47
第四節 本研究の概要	49
第二章 トリアゾール系化合物の合成探索	50
第一節 自社ヒット化合物 38, 39 をリードとしたトリアゾール誘導体の合成法	50
第二節 自社ヒット化合物 38, 39 をリードとしたトリアゾール誘導体の生物学的評価 ..	54
第三節 小括	60
第三章 フェニルピペラジン系化合物の合成探索	61
第一節 HTS ヒット化合物 58, 59 をリードとしたフェニルピペラジン誘導体の合成法 ..	61
第二節 HTS ヒット化合物 58, 59 をリードとしたフェニルピペラジン誘導体の生物学的評価 ..	64
第三節 有望化合物 65k, 71a の物性・薬物動態プロファイル	69
第四節 化合物 71a のマウス <i>in vivo</i> 薬効評価 (高脂肪食下 TG 蓄積阻害試験)	70
第五節 小括	72
総括	73
実験の部	75
参考文献	127
論文目録	131
学会・外部発表	131
謝辞	132

略語表

本論文中における以下の用語、試薬は下記のように略記した。

AcOEt	ethyl acetate
AcOH	acetic acid
AGE	advanced glycation end product
aq.	aqueous
AUC	area under the blood concentration-time curve
<i>i</i> -Bu	<i>iso</i> -butyl
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
BA	bioavailability
BG	biguanide
BMI	body mass index
BP	blood pressure
Cl	clearance
CV	cardiovascular
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMT-MM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride <i>n</i> -hydrate
DPP-IV	dipeptidyl peptidase-IV
EC ₅₀	50% effective concentration
Et ₃ N	triethylamine
EtOH	ethanol
FDA	food and drug administration
FFA	free fatty acid
GPCR	G protein-coupled receptor
HATU	(dimethylamino)- <i>N,N</i> -dimethyl(3 <i>H</i> -[1,2,3]triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-yloxy)methan- iminium hexafluorophosphate

HFD	high fat diet
HP β CD	hydroxypropyl- β -cyclodextrin
HR	heart rate
HTS	high throughput screening
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
<i>iv</i>	intra venus
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -chloroperoxybenzoic acid
MS	metabolic stability
MeOH	methanol
PB	protein binding
Pd-C	palladium on carbon
PG	propylene glycol
PK	pharmacokinetics
<i>po</i>	per os
PPTS	pyridinium <i>para</i> -toluenesulfonate
<i>c</i> -Pr	<i>cyclo</i> -propyl
PSA	polar surface area
Py	pyridyl
quant.	quantitative yield
SAR	structure–activity relationship
SGLT2	sodium-dependent glucose transporter 2
SU	sulfonyl urea
TG	triglyceride
THF	tetrahydrofuran
TZD	thiazolidine
Vd	volume of distribution
WSCl	<i>N</i> -[3-(dimethylamino)propyl]- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide

第一部

抗肥満薬 bombesin receptor subtype-3 (BRS-3)

アゴニストの創製研究

第一章 序論

第一節 世界人口の増加に伴う肥満症患者数の急増

有史以来、人類は様々な病気や環境変化による飢餓と闘ってきた。先人達の英知を結集した科学技術を巧みに利用し、我々は今、その恩恵を謳歌するかの如く、平均寿命を延ばし続けている¹⁾。事実、2014年時点で世界には既に70億人を超える人類が存在しており、とりわけ20世紀に入ってからの人類の急激な人口増加の主因は、医療技術の発達と農業技術・物流システム向上に伴う飢餓からの解放といっても過言ではない (Fig. 1)²⁾。

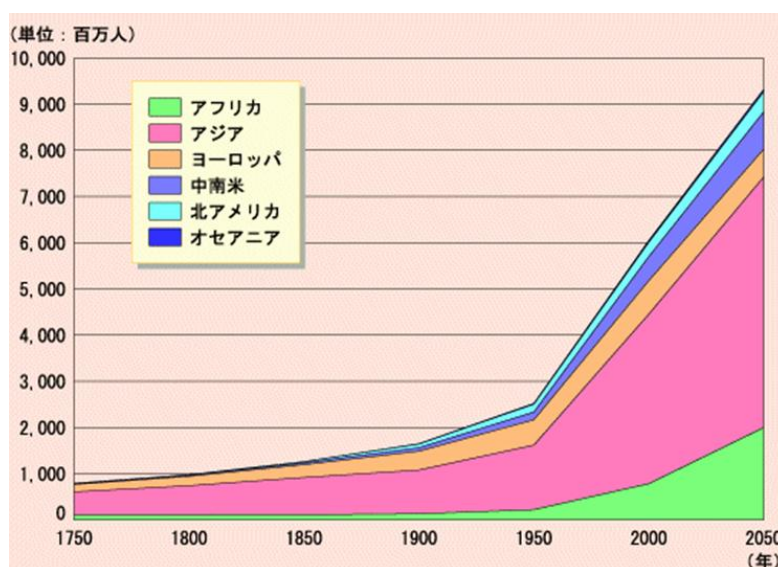


Figure 1. 世界人口の推移 (文献 2 より引用) .

しかし皮肉にも、この飢餓からの解放、すなわち容易なカロリー摂取が生活習慣病と呼ばれる肥満症や糖尿病などの新たな慢性疾患を増大させ、我々の生命を脅かす状況になっている。人種や年齢によって一日あたり必要な摂取カロリーは異なるが、一般的に成人でおよそ 2000~2700 kcal/day と言われている。Fig. 2 に示すように、明らかなカロリー摂取過多 (図中の橙、赤色) に相当する地域は現在 178 カ国中 63 カ国 (総人口の約 40%) にも上っており、カロリー摂取過多に伴う肥満は、もはや全世界的な現象である³⁾。

このようなグローバルかつ急速に進行する肥満症患者の増加の原因に対し、J. V. Neel らは生物学的観点から倹約遺伝子型仮説 (thrifty genotype hypothesis) を提唱した⁴⁾。つまり人類は誕生から数百万年の間、自らの子孫を次世代に残すため、頻繁に起こる飢餓による摂取カロリーの急減に対

し、長期にわたるエネルギー代謝関連遺伝子群の進化的変異によって適応し、効率よくエネルギーを蓄える体質を獲得してきた。そのため、我々は人体で最も効率のよい貯蔵エネルギーシステムである脂肪組織（体脂肪）を蓄えやすい生体機構を遺伝子レベルの進化と共に形成してきた、とする説である。科学技術の発達および食文化の西欧化による飽食の時代は、産業革命の起こった西欧諸国で 19 世紀初頭、わが国でもせいぜい戦後高度経済成長期の 1960 年代に始まったばかりである。環境適応への遺伝子変異が少なくとも数万年以上かかることを考慮すると、前述の儉約遺伝体質がここ数十年の生活習慣の急激な変化（飽食環境やモータリゼーションに伴う運動不足）に適応できないのも至極当然である。事実、2 型糖尿病や虚血性疾患を惹起する肥満症は 2008 年時点で 5 億人を越え、今後も増加の一途が見込まれている⁵⁾。それゆえ、近年の世界的な肥満症患者増加はもはや個人の意志のみで解決を期待できる問題ではなく、医療的介入によって取り組むべき喫緊の課題と言えよう。

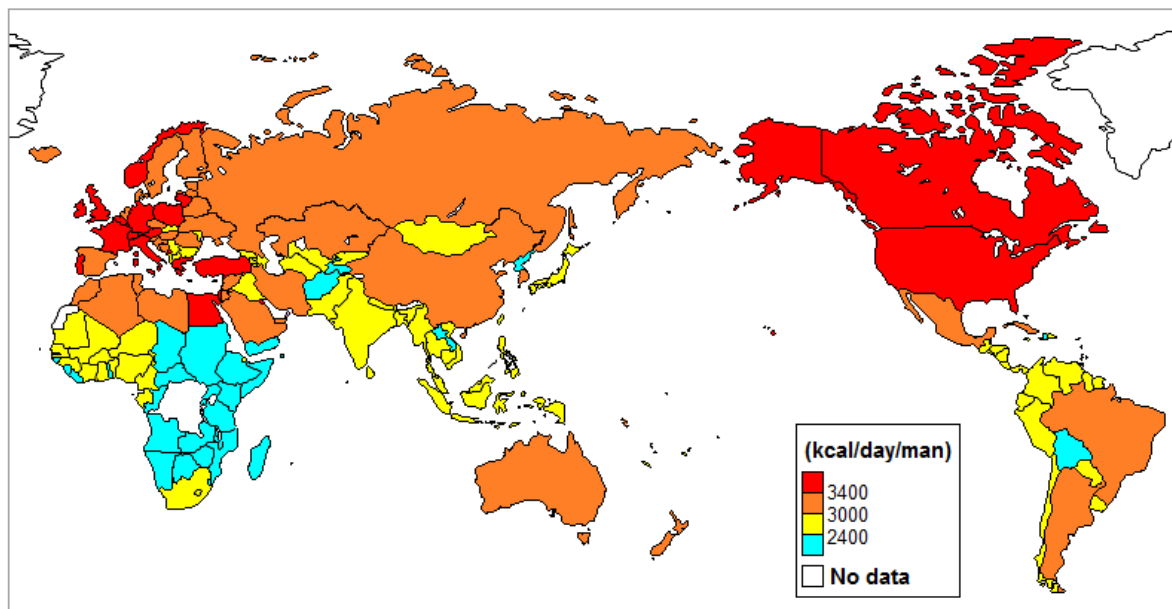


Figure 2. 世界各国の供給カロリー (2009~2011 年平均、FAO statistical Yearbook. 2012)³⁾.

第二節 肥満症患者に対する治療薬の現状

前節では、急増する世界人口とそれに伴う肥満症患者の増加について述べた。肥満症という疾患それ自体が直接死因に結びつく訳ではないため、適切な早期治療および肥満症患者数の増加抑制を困難にしている⁶⁾。Table 1 に示すように、2012 年における世界の死因と死亡者数では肥満に関連の深い虚血性疾患や糖尿病、高血圧症などが並んでいる⁷⁾。とりわけ、1,2 位を占める心血管系疾患のみを併せても約 1400 万人、20%強を占める計算になる。虚血性心疾患の危険因子として、肥満、糖尿病、高血圧、高脂血症、喫煙、飲酒、運動不足が知られており、特に前者 4 つが重大なリスクである。よって、糖尿病、高血圧、高脂血症を誘発する元凶である肥満症の治療薬の開発は、数少ない新薬創出国である我が国が世界の健康文化へ貢献するため、精力的研究を最も必要とする領域の一つである。一方、日本国内に目を転ずると、肥満症患者の割合が世界平均より少ないため、2013 年の死因第一位は悪性新生物（癌）となっている（Table 2）⁸⁾。しかしながら、2, 4 位における虚血性疾患を含む脳・心血管を主因とした死亡者総数は全体の 1/4 を占めており、肥満症がこれらの主なリスクファクターとなりうることを考慮すると、我が国においても依然として軽視できない疾患であることが分かる。

Table 1. 世界における死因 Top 10 (2012)^a.

順位	死因	死亡数(万人)
1	虚血性心疾患(IHD)	740
2	心臓発作	670
3	慢性閉塞性肺疾患(COPD)	310
4	呼吸器感染症	310
5	肺疾患(肺炎/肺がんなど)	160
6	後天性免疫不全症候群(HIV/AIDS)	150
6	下痢症状	150
6	糖尿病	150
9	交通事故	130
10	高血圧性心疾患	110

Table 2. 日本における死因 Top 5 (2013)^a.

順位	死因	死亡数(万人)
1	悪性新生物	36.5
2	心疾患	19.7
3	肺炎	12.4
4	脳血管疾患	11.9
5	不慮の事故	6.0

^a 世界の 2012 年における死因と死亡者数（死亡総数 5600 万人／年）と日本国内の 2013 年における死因と死亡者数（死亡総数 127 万人／年）。

このように肥満を要因とした国内外の死因・死亡者数の占める割合の大きさから、肥満症治療薬への社会的関心・要望は年々高まりを見せてきたが、これまで幅広い患者に安心して使用できる薬剤は必ずしも上市されてきたわけではない。BMIが25以上の過体重の成人が2/3を占める肥満大国となった米国では、これまでいくつかの抗肥満薬が米国食品医薬品局（FDA）によって承認されてきた（Table 3）⁹⁾。およそ半世紀前のフェンテルミンに始まり、近年のシブトラミンおよびオルリスタットに至るまで、中枢系作用による摂食抑制または腸管からの吸収抑制など、種々作用メカニズムを駆使して体重減少ならびに抗肥満作用を目指してきたが、十分な薬効と安全性を両立した薬剤は未だ不足している。実際、10年以上臨床で使用されてきたシブトラミンは血圧や心拍数上昇などの心血管リスク（心筋梗塞、脳卒中）が問題視され、2010年に市場撤退を余儀なくされている。中枢系抗肥満薬の安全性への懸念が払拭されなかったため、オルリスタット以降10年以上新規抗肥満薬は承認されなかったが、2012年にセロトニン2c受容体アゴニスト、ロルカセリンおよびフェンテルミン/抗てんかん薬トピラマートの合剤が相次いでFDAより承認された。しかし両薬剤は副作用の懸念から、一度FDAによって非承認を受けた後に追加の臨床試験および社会的要請によって承認された経緯があり、また患者の既往歴によって多くの使用制限があるという解決すべき課題（未充足医療ニーズ）が存在している。

Table 3. 米国で承認された抗肥満薬.

一般名	商品名	承認年	作用機序	主な副作用
フェンテルミン	Adipex-P®	1959	摂食抑制 モノアミン賦活薬	心血管リスク (肺高血圧・心臓弁膜症など)
シブトラミン	Meridia®/Reductil®	1997 (副作用により販売停止(2010))	摂食抑制 セロトニン/ノルアドレナリン取込み阻害薬	心血管リスク (血圧、心拍数上昇など)
オルリスタット	Xenical®/Alli®	1999	吸収抑制 膵リパーゼ阻害薬	下痢、脂肪便
ロルカセリン	BELVIQ®	2012	摂食抑制 セロトニン2c受容体作動薬	心血管リスク (心臓弁膜症など)
フェンテルミン /トピラマート	Qsymia®	2012	摂食抑制 モノアミン賦活薬 グルタミン拮抗作用等	心血管リスク (心臓弁膜症など)

日本国内では肥満症患者がこれまで少なかったこともあり、積極的な抗肥満薬の開発は行われなかった（Table 4）¹⁰⁾。マジンドール（中枢性作動薬）は副作用の懸念から使用期間などの制限が厳しく、その処方は限定的であった。米国で用いられてきたフェンテルミンを含む薬剤は日本国内で

は法規制化合物（第3種向精神薬）に分類され、その製造と輸出入が禁止されているため、長らく有効な抗肥満薬は入手できなかったが、2013年になってセチリスタット（膵リパーゼ阻害薬）がようやく国内承認された。本薬剤はオルリスタット同様の作用メカニズムであるため副作用の懸念が少ない反面、体重減少作用が緩やかであり、今後国内でも急増が予想される肥満症患者にとって十分な薬効を有しているとはいいがたいのが現状である。

これらの事実が示すように、安全かつ有効な抗肥満薬の迅速な開発は、肥満症を取り巻く昨今の環境の変動に鑑みると、我々創薬研究者に課せられた重大な使命であると言えよう。

Table 4. 日本で承認された抗肥満薬.

一般名	商品名	承認年	作用機序	主な副作用
マジンドール	サノレックス®	1992	摂食抑制 モノアミン再吸収抑制薬	口渇感、吐気、便秘、 不眠、頭痛、動悸など
セチリスタット	オブリーン®	2013	吸収抑制 膵リパーゼ阻害薬	下痢、脂肪便

第三節 本研究の概要

本研究において私は、従来の中枢系ではなく末梢器官である消化管（小腸）に発現している bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) を抗肥満薬の標的として着目し、消化管 BRS-3 選択的に作用する化合物を取得することで中枢副作用を回避した、より安全性の高い新規抗肥満薬の合成研究を行った。

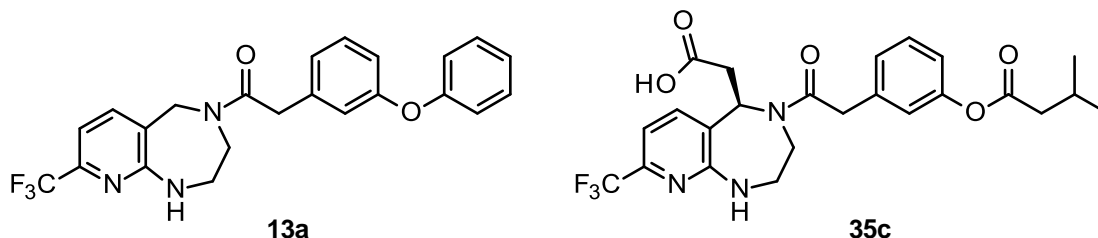
本章では、急速な世界人口増加に潜む肥満症患者急増の背景、および国内外の医療現場で用いられている抗肥満薬の現状と課題について述べた。

第二章では、自社ヒット化合物と Merck 社ジアゼピン化合物の構造類似性から新規二環性ジアゼピン化合物 **13a** のデザイン・合成について述べる。右側末端側鎖の脂溶性低減によって強力な BRS-3 活性を示す化合物を獲得したが、依然として低代謝安定性や高い中枢移行性が見られた。

第三章では、化合物 **13a** の分子中各部位へ極性基導入を精力的に行った結果、ジアゼピン環上に酢酸ユニットを導入した化合物において活性改善、および劇的な高極性化による低中枢移行性化を達成した。また、キラルカラム分割によって(*R*)体のみ高活性であることを明らかにし、不斉合成法の開発によって効率的な(*R*)-酢酸ユニット導入を達成した。

第四章では、BRS-3 高活性化合物のごく僅かな中枢系曝露を回避するため、生体内代謝を受けやすい官能基（エステル基）を分子内に導入した「アンテドラッグ」という手法について述べる。エステル基に対して種々アルキル側鎖を変換後、BRS-3 活性評価およびマウス薬物動態（PK）試験によって、望ましい PK プロファイルを持つ化合物 (**35c**) を選抜した。消化管作用型 BRS-3 アゴニストとして **35c** を用いたマウスの摂食抑制試験を実施し、摂餌量の抑制度を評価した。また、心血管系リスク評価試験として、麻酔処置下ビーグル犬への **35c** の静脈持続投与を行い、心拍数・血圧を経時的にモニタリングすることで中枢系副作用の有無を調べた。

以下、各章にて本研究の内容を詳細に記述する。

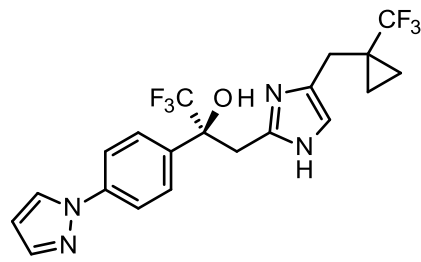


第二章 新規 BRS-3 アゴニストの化合物探索

第一節 抗肥満薬ターゲットとしての BRS-3

Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) とは、オーファン G タンパク質共役受容体 (orphan GPCR) の一種であり、その発現部位は中枢系である脳だけでなく、消化管、肺、精巣および膵臓に分布していることが知られている¹¹⁾。本受容体に対し長らく自然界に存在するリガンドは見出されてこなかったが、1997 年、遺伝子工学により作成した BRS-3 欠損型マウスが肥満および糖代謝能に異常を来すことが報告された¹²⁾。これにより、BRS-3 におけるシグナル伝達を調節するリガンドが新たな抗肥満・抗糖尿病薬の創製につながる可能性が示唆され、2000 年以降、世界中で活発な研究が進められてきた。

近年、Merck 社の Guan らは高活性かつ高中枢移行型 BRS-3 アゴニスト (**1**, MK-5046) がラット・イヌなどの実験動物だけでなく、ヒトを用いた臨床試験においても、抗肥満の指標である体重減少作用を統計学的に有意に示すことを報告した (Fig. 3)¹³⁾。しかし同時に、副作用としてラット・イヌにおいて一過性の体温、心拍数、血圧の上昇が見られ、ヒトにおいても少なくとも血圧の軽微な上昇が観測されている¹⁴⁾。前章で述べたように、肥満症患者はすでに複数の疾患を合併していることが多く、±10%程度の軽微な血圧上昇でさえ生命に関わる重大な危険因子となることから、同社は 2010 年に MK-5046 の開発を中止した。私は、これらの副作用が中枢系 BRS-3 作用による副交感神経系への刺激に由来するものであると推測し、創薬化学に基づく知見を活かした分子デザインにより、中枢系への化合物曝露を低下させた高活性 BRS-3 アゴニストを取得できれば、これら有害な副作用を回避する新規化合物を創製できると考えた (Fig. 4)¹⁵⁾。すなわち、消化管 BRS-3 選択的な作用により、迷走神経を介した中枢系への摂食抑制シグナル入力によって薬効を発揮しつつ中枢系副作用を回避することを目指した。これにより、「より安全性の高い抗肥満薬の開発」を基幹コンセプトに定め、本研究を開始した。



1 (MK-5046)
 human BRS-3 EC₅₀ = 14 nM
 mouse BRS-3 EC₅₀ = 21 nM

Figure 3. Merck 社臨床開発化合物 1 (MK-5046) .

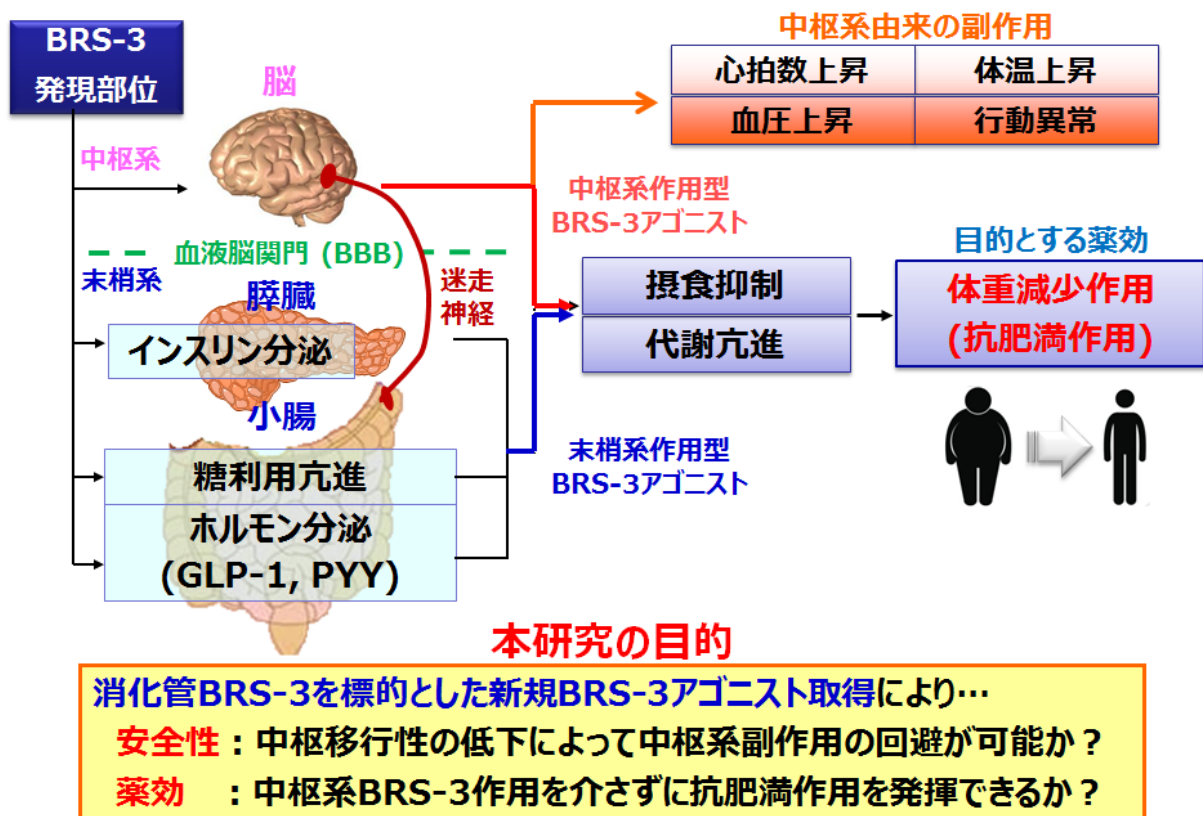


Figure 4. BRS-3 の発現部位と本研究における基幹コンセプト.
 (BBB, blood-brain barrier; GLP-1, glucagon-like peptide-1; PYY, peptide YY)

第二節 自社 HTS ヒット化合物からの化合物デザイン

新規骨格を有する BRS-3 アゴニストを取得するため、自社化合物ライブラリーを用いた high throughput screening (HTS) によって BRS-3 活性を有する化合物を選抜し、Fig. 5 に示すような二環性ベンゾジアゼピン構造を有する、活性化合物 **2a**, **2b** を獲得した。一方で、以前 Merck 社の研究グループは三環性ピロジアゼピン構造を有する高活性化合物 **3a**, **3b** を報告していたため¹⁶⁾、これら二系統の化合物群における薬効発現のコアユニットの探索に着手することとした。すなわち、下記化合物の構造類似性から、分子変換を通じて活性発現に必要最小限の化学構造を見極め、次いで分子剛直性・分子量の低減によって脂溶性、溶解性を含む物性改善を行い、よりドラッグライクネスを高めた新規骨格の獲得を試みた。具体的には、図中 A, B 環部分が化合物 **2a**, **2b** における活性発現のコアユニットであると仮定し、化合物 **3a**, **3b** の C 環部分の除去、およびスルホンリンカーからアシルリンカーへの変換が可能ではないかと考え、化合物 **4** の構造をベースにした合成探索を行った。

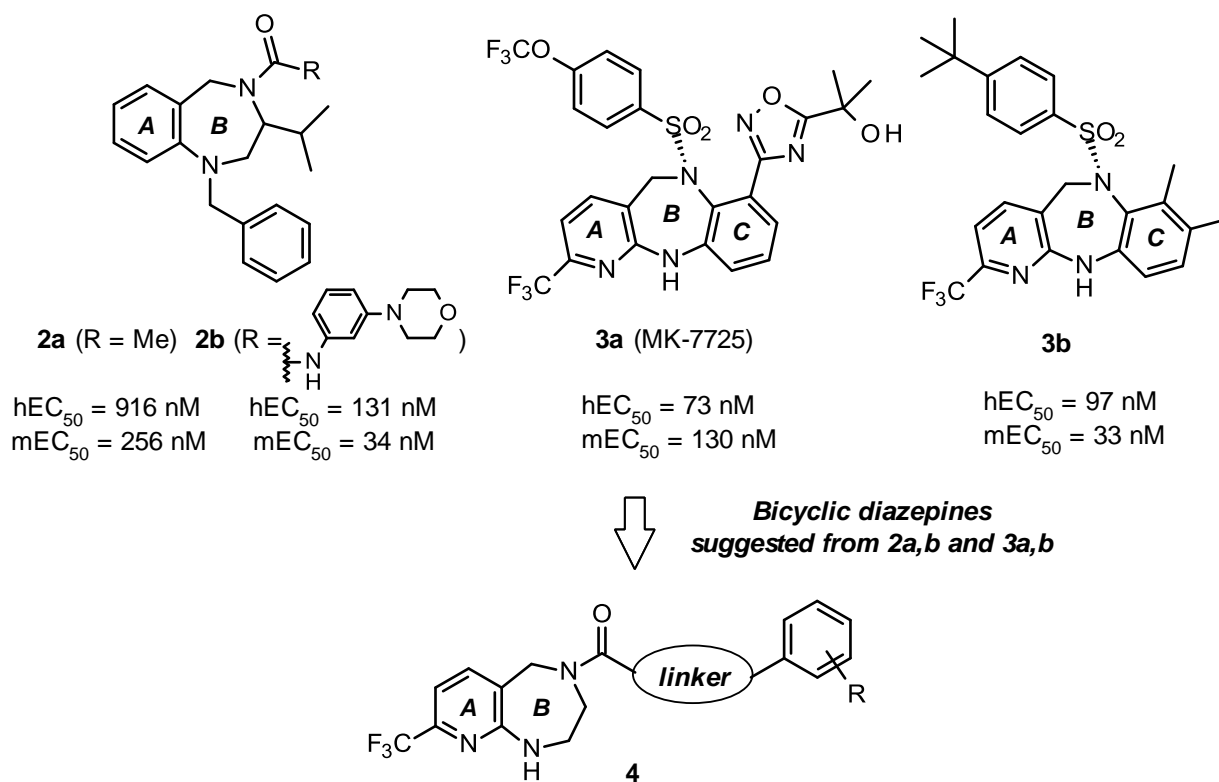
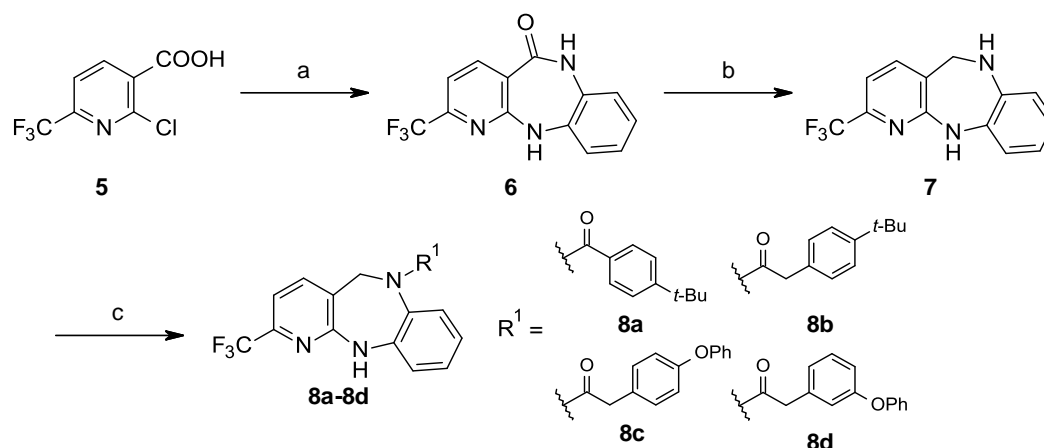


Figure 5. 自社ヒット化合物 **2a**, **2b**, Merck 社化合物 **3a** (MK-7725), **3b** とそれらから類推される薬効発現コアユニット **4**.

まず私は、効率的な誘導体展開を目指し、以前 Liu らによって報告された基本構造を有する化合物 **3b** の 4-*tert*-ブチルフェニル基を分子上部に採用し^{9b)}、構造活性相関 (structure-activity relationship, SAR) を取得することにした。

第三節 新規二、三環性ジアゼピン化合物の合成

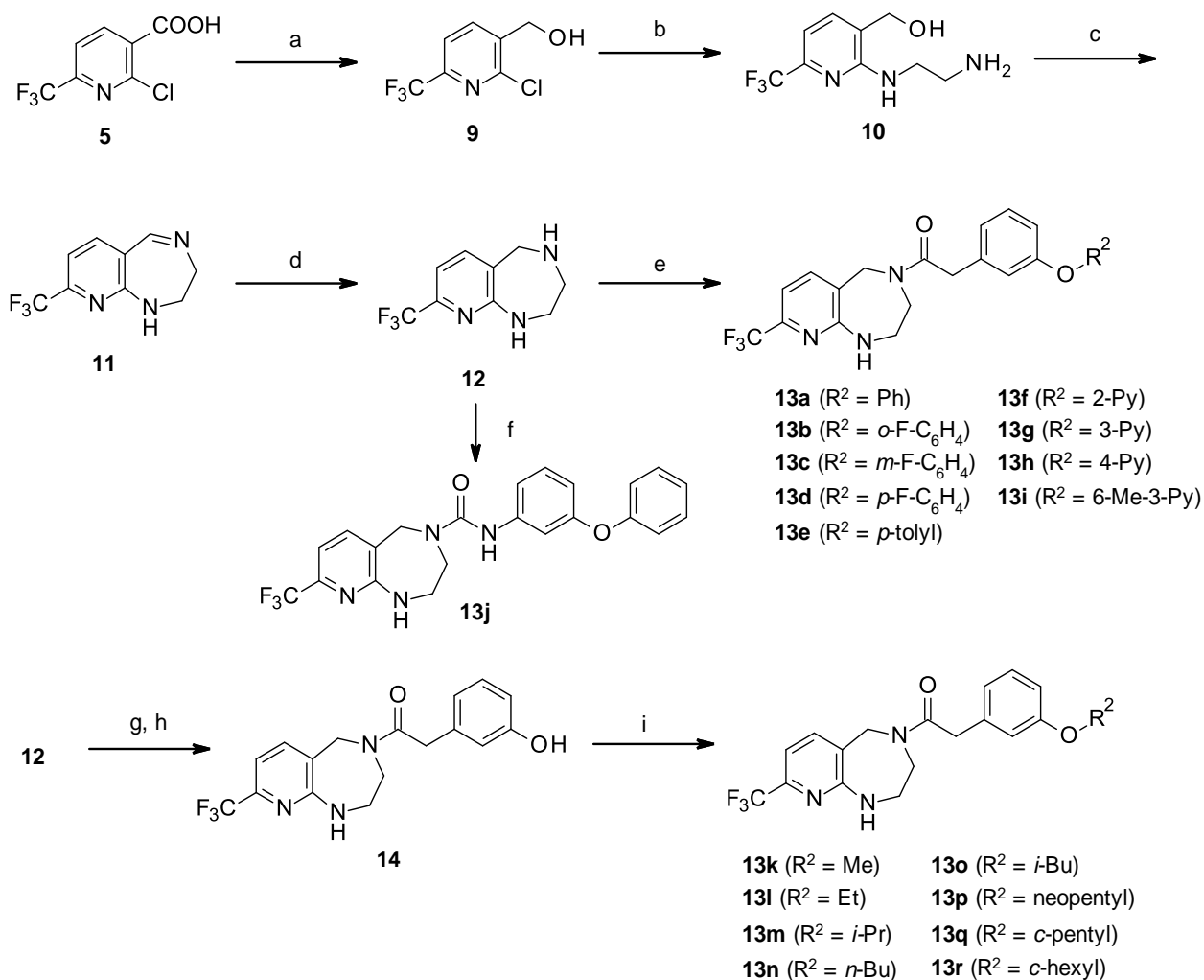
アシルリンカーを持つ三環性ジアゼピン化合物 **8a-8d** の合成法を以下に示す (Scheme 1)。市販のニコチン酸誘導体 **5** と剛直な骨格である 1,2-ジアミノベンゼンを高沸点極性溶媒中、160 °C で反応させると、一挙に三環性ピロジアゼピン **6** を与えた。これをボラン還元によって **7** へと導き、各種アシルユニットとアミド縮合させることで所望の化合物 **8a-8d** を得た。



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) 1,2-diaminobenzene, ethylene glycol monobutyl ether, 160 °C, 64%; (b) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ complex, THF, 0 °C~rt, 66%; (c) 4-*tert*-butylbenzoyl chloride, Et_3N , CH_2Cl_2 , 72%, or arylacetic acid, HATU, (*i*-Pr)₂EtN, CH_2Cl_2 , 89–92%.

次に、新規二環性ピロジアゼピン誘導体の合成法を Scheme 2 に示す。当初、ラクタム **6** の右側ベンゼン環を除去した化合物を別途調製し、カルボニル基の還元反応により目的の鍵中間体 **12** の合成を試みたが、反応は全く進行しなかった。これはカルボニル基に隣接する N 原子の芳香族性と脂肪族性との電子状態の違いに起因すると推測される (三環性ラクタム **6** のカルボニル炭素の方が電子求引性が高い)。化合物 **5** のカルボキシル基をボラン-THF 錯体溶液を用いてアルコール体 **9** に還元後、過剰のエチレンジアミンと混合し、無溶媒加熱条件に付すことにより、イプソ置換したジアミン **10** を得た。二酸化マンガンを用いたベンジル位の酸化により、アルデヒドを生成させたところ、系中で速やかに分子内環化が進行し、望みの環状イミン **11** が得られた。続く Pd-C 触媒による水素添加反応では、エタノールを用いるとイミンへの付加反応が見られたため、酢酸

エチルを用いて鍵中間体 **12** を取得した。末端にアリール部位を有する化合物 **13a–13i** は、対応するカルボン酸誘導体とのアミド縮合によって効率的に得られた。また、ウレア体 **13j** は **12** に対し、対応するアリールイソシアナートを作用させることで合成した。なお、末端にアルキル部位を有する化合物 **13k–13r** に関しては、(3-benzyloxyphenyl)acetic acid と縮合後、脱ベンジル化して **14** を得た後、各種アルキルハライドとの S_N2 反応によって導いた。

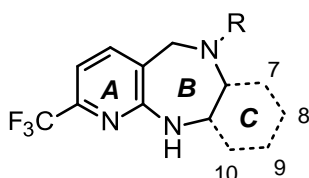


Scheme 2. Reagents and conditions: (a) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ complex, THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$ –rt, quant.; (b) ethylene diamine (neat), $120\text{ }^\circ\text{C}$, 62%; (c) MnO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 76%; (d) H_2 , Pd–C, AcOEt, 82%; (e) arylacetic acid, HATU, (*i*-Pr) $_2$ EtN, CH_2Cl_2 , 31–97%; (f) 1-isocyanato-3-phenoxybenzene, toluene, $90\text{ }^\circ\text{C}$, 91%; (g) (3-benzyloxyphenyl)acetic acid, (*i*-Pr) $_2$ EtN, HATU, CH_2Cl_2 , 99%; (h) H_2 , Pd–C, EtOH, 98%; (i) alkyl halide, K_2CO_3 , DMF, $60\text{ }^\circ\text{C}$, 31–83%.

第四節 新規二、三環性ジアゼピン化合物の生物学的評価

本章の第三節において合成した新規二、三環性ジアゼピン化合物について、ヒト/マウス BRS-3 におけるアゴニスト活性 (EC_{50} 値) の *in vitro* 評価を行った (Table 5)。Merck 社化合物 **3b** のスルホニルリンカーをアシル基に置換した **8a** では活性が消失したが、メチレンリンカーを介した **8b** ではヒト/マウスにて良好な活性を示した。次に高脂溶性の末端 *tert*-ブチル基をフェノキシ基に変換した **8c** において大幅な活性減弱が見られたものの、自社ヒット化合物 **2b** の部分構造を参考にしてメタ位置換型フェノキシ基を導入した **8d** では劇的な活性向上を示した。次に、新規骨格取得の鍵戦略となる C 環部分の除去を行ったところ、(3-phenoxyphenyl)acetyl 基を有する **13a** においてさらなる活性向上が見られた。一方、ヒット化合物 **2b** では有効であったウレアリンカーへ変換した **13j** では、著しい活性減弱が見られた。

Table 5. EC_{50} values of BRS-3 agonists **8a–8d**, **13a** and **13j**.



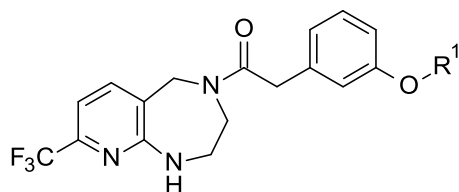
Compound	R	Ring C	Human BRS-3 EC_{50} (nM) ^a	Mouse BRS-3 EC_{50} (nM) ^a
3b ((<i>S</i>)-atropisomer)		7,8-Me ₂ C ₆ H ₂	97 ^b	33 ^b
8a		phenyl	>10000	>10000
8b		phenyl	48	227
8c		phenyl	368	>10000
8d		phenyl	25	46
13a		none	8.5	12.2
13j		none	4378	1378

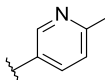
^a Data are averages of at least 3 times repeated measurement.

^b Data are cited from ref 16a.

新規二環性ジアゼピン化合物 **13a** が良好な活性を示したため、分子脂溶性の低減および中枢移行性の低下を目指し、右側末端部位 R^1 の置換基変換を行った (Table 6)。なお、分子脂溶性の指標として、pH 7.4 のリン酸緩衝溶液 (日本薬局方 2 液) と 1-オクタノールの分配係数 $\text{Log } D_{7.4}$ を測定した。

末端ベンゼン環上にフルオロ基を導入した **13b–13d** において、高脂溶性ではあるが高い活性を示した。とりわけ *para*-フルオロ体 **13d** が最も高活性であり、この傾向は *para*-トルイル体 **13e** においても同様であった ($\text{Log } D_{7.4} > 4.8$)。フェニル環への窒素原子の導入では位置に依らず活性が減少したが (**13f–13h**)、3-ピリジル体 **13g** において最良の活性値を与えた。一方、**13e** および **13g** を組み合わせた 6-メチル-3-ピリジル体 **13i** では、狙い通り高活性かつ脂溶性低減が明らかとなった。次に右側末端部位 R^1 のアルキル基への変換を行った。比較的小さなアルキル誘導體 **13k–13m** では活性が減弱し、炭素数が 4 以上で構成される **13n–13r** では良好な活性であったことから、この部位のファーマコフォアとして、ある程度のサイズの脂溶性が必要とされることが示唆された。活性としてはシクロヘキシル体 **13r** が最高であるものの、脂溶性と活性の観点から、イソブチル体 **13o** がこれらアルキル化合物 **13k–13r** の中で最もバランスの取れた化合物であった。

Table 6. EC₅₀ values of BRS-3 agonists **13a–13r**.

Compound	R ¹	Human BRS-3 EC ₅₀ (nM) ^a	Mouse BRS-3 EC ₅₀ (nM) ^a	Log D _{7.4} ^b
13a	phenyl	8.5	12.2	4.5
13b	<i>o</i> -F-C ₆ H ₄	6.9	3.5	4.5
13c	<i>m</i> -F-C ₆ H ₄	6.8	8.7	4.8
13d	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	3.6	2.7	4.6
13e	<i>p</i> -tolyl	1.3	1.0	>4.8
13f	2-pyridyl	254	244	3.2
13g	3-pyridyl	156	106	3.2
13h	4-pyridyl	977	621	3.3
13i		9.5	2.8	3.6
13k	Me	2041	1781	ND ^c
13l	Et	2046	1208	ND ^c
13m	<i>i</i> -Pr	381	569	ND ^c
13n	<i>n</i> -Bu	59	52	ND ^c
13o	<i>i</i> -Bu	70	62	4.3
13p	neopentyl	199	121	ND ^c
13q	<i>c</i> -pentyl	41	100	ND ^c
13r	<i>c</i> -hexyl	8.1	8.7	4.4

^a Data are averages of at least 3 times repeated measurements.

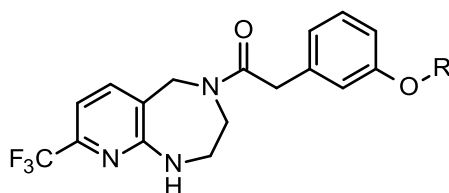
^b The distribution coefficients (Log D_{7.4}) were measured between 1-octanol and phosphate buffered saline (pH 7.4).

^c Not determined.

第五節 小括

本章では、自社ヒット化合物 **2a**, **2b** と Merck 社ジアゼピン化合物 **3a**, **3b** の構造類似性から着想を得て、C 環の除去およびスルホニルリンカーをアシルメチレンリンカーに変換した新規二環性ジアゼピン化合物 **13a** を合成した (Fig. 6)。中枢移行性を抑制するため、分子右側末端部分の変換を通じて脂溶性の低減を試みた結果、アリール基として 6-メチル-3-ピリジルを有する **13i** (Log $D_{7.4}$ = 3.6)、およびイソブチル基を有する **13o** (Log $D_{7.4}$ = 4.3) を有望化合物として獲得した。両化合物は高活性ではあるものの依然として脂溶性が高いため、さらなる低減がその後の合成展開として求められた。

Figure 6. EC₅₀ and Log $D_{7.4}$ values of novel BRS-3 agonists **13a**, **13i** and **13o**.

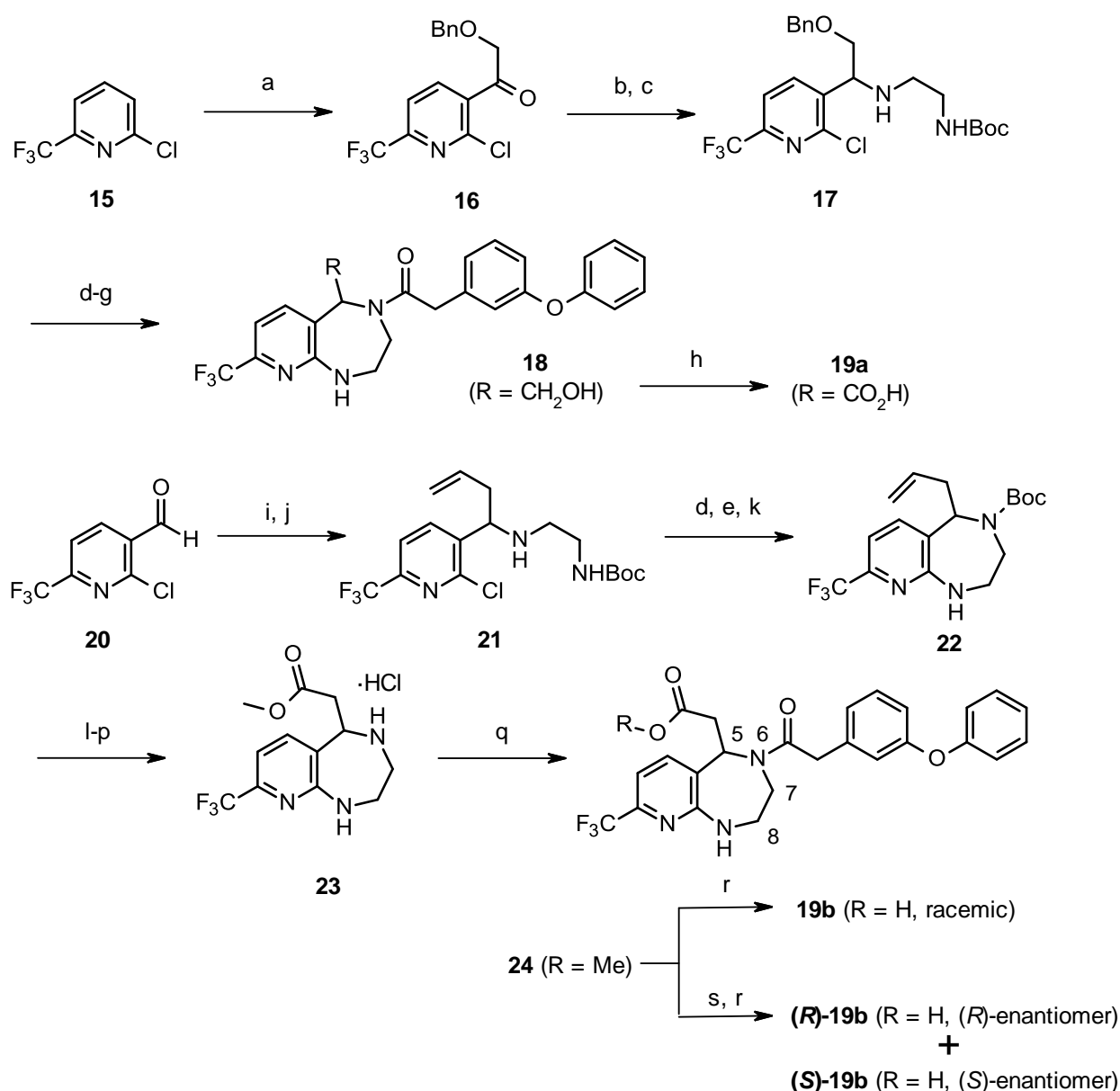


Compound	13a	13i	13o
R	Ph	6-Me-3-Py	<i>i</i> -Bu
BRS-3 EC ₅₀ (nM, h/m)	8.5 / 12.2	9.5 / 2.8	70 / 62
Log $D_{7.4}$	4.5	3.6	4.3

第三章 低中枢移行性BRS-3 アゴニストの開発

第一節 極性基を導入したジアゼピン化合物の合成

前章の結果から、物性改善および中枢移行性低下へ向けてさらなる脂溶性低減が必要となったため、二環性ジアゼピン **13a** 中に極性基を導入する分子デザインを行った。具体的には、ジアゼピン環上 5 位に対し、高極性を付与できるカルボン酸を導入することによって、*in vitro* 活性値を保持したまま Log D_{7.4} 低下が可能かを合成探索によって検証した。



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) 2-benzyloxy-*N*-methoxy-*N*-methyl-acetamide, (*i*-Pr)₂NH, *n*-BuLi/hexane, THF, -78~-20 °C, 43%; (b) *N*-Boc-ethylenediamine, Ti(*O*-*i*Pr)₄, THF, rt; (c) NaBH₄, THF/MeOH, 0 °C, 78% (2 steps); (d) 4 N HCl/AcOEt; (e) (*i*-Pr)₂EtN, *N*-methylpyrrolidone,

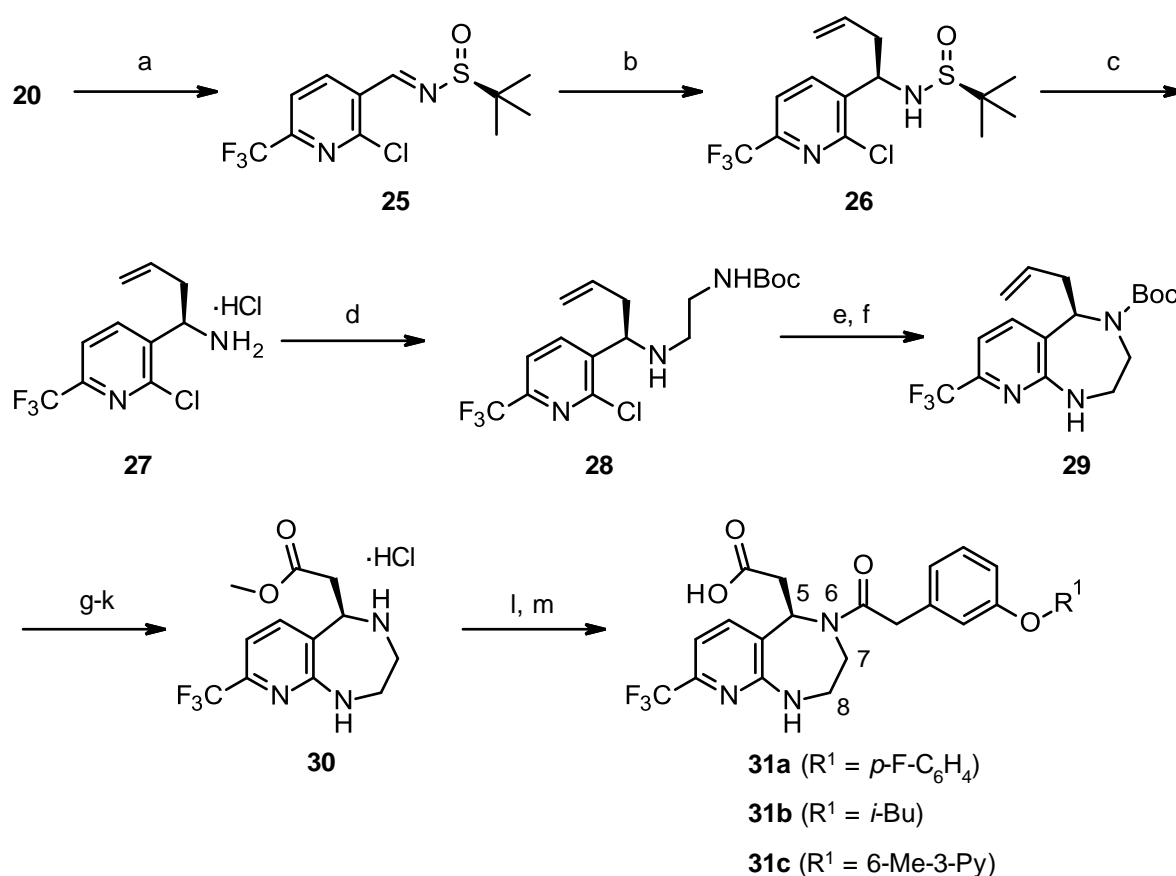
160 °C; (f) (3-phenoxyphenyl)acetic acid, (*i*-Pr)₂EtN, HATU, CH₂Cl₂, 45% (3 steps); (g) H₂, 10% Pd-C, EtOH, 86%; (h) Jones reagent, acetone, 0 °C, 17%; (i) *N*-Boc-ethylenediamine, Na₂SO₄, CH₂Cl₂, rt, 69%; (j) allylmagnesium bromide/Et₂O, THF, 0 °C, 73%; (k) Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 59% (3 steps); (l) 2.5% OsO₄/*i*-PrOH, *N*-methylmorpholine oxide, acetone, 0 °C~rt; (m) NaIO₄, THF/H₂O; (n) NaClO₂, NaH₂PO₄, 2-methyl-2-butene, *t*-BuOH/H₂O; (o) iodomethane, K₂CO₃, DMF, 50 °C, 77% (4 steps); (p) 4 N HCl/AcOEt, 92%; (q) (3-phenoxyphenyl)acetic acid, (*i*-Pr)₂EtN, HATU, CH₂Cl₂, 91%; (r) 2 N aq. NaOH, THF/MeOH, 88–97%; (s) Chiral separation (CHIRALPAK IC, hexane/EtOH = 70/30).

ジアゼピン環上 5 位にカルボキシル基が直結した **19a** の合成は、市販化合物 **15** を出発物質とした。リチウムジイソプロピルアミド (LDA) を用いた 3 位選択的リチオ化の後、対応する Weinreb アミドを求電子的に付加させることでケトン **16** を得た。次に Ti(O-*i*-Pr)₄ を Lewis 酸として *N*-Boc-エチレンジアミンを縮合させ、NaBH₄ によってイミン部位の還元を行いジアミン **17** が得られた。脱 Boc 化後、Hünig 塩基存在下、160 °C で加熱することで分子内環化させ、水素添加反応によって脱ベンジル化することで所望のアルコール体 **18** を得た。**18** の酸化反応の条件検討を行ったところ、Jones 試薬を用いることで低収率ながら目的のカルボン酸 **19a** を得た¹⁷⁾。

続いて 5 位に酢酸ユニットを導入した **19b** の合成を示す。アルデヒド **20** および *N*-Boc-エチレンジアミンの縮合によりイミンを形成後、アリルグリニャールを作用させることにより 5 位にアリル基を有するジアミン **21** を得た。本反応は種々グリニャール試薬を用いることで、5 位に様々な官能基を有するジアゼピン体を合成することが可能と考えられる。酸性条件下で **21** の Boc 基を除去し、前述と同様に塩基存在下、高温加熱攪拌することで分子内環化反応を行い、そのまま反応液に Boc₂O を加え one-pot にて Boc 基保護した **22** を得た。次にアリル部位に対し、Os 触媒によるジオール酸化、NaIO₄ を用いる酸化的開裂によりアルデヒドへの変換、Kraus 反応によるカルボン酸への酸化¹⁸⁾、および塩基性条件下、アルキルハライドを用いたエステル化を行い、再び脱 Boc 化することでメチルエステル **23** を塩酸塩として単離した。**23** を 3-フェノキシフェニル酢酸とアミド縮合させることで **24** を得た後、最後にこれを加水分解することで目的のカルボン酸 **19b** を得た。5 位に置換基を導入した **19b** はこの位置に不斉炭素を有するため、溶出溶媒 (ヘキサン/エタノール) に溶解性の高い **24** を用いてキラルカラム (CHIRALPACK IC) を用いた光学異性体分離を行い、その後加水分解することで (*R*)-**19b** および (*S*)-**19b** を単離した。

次に 5 位に (*R*)-酢酸ユニットを導入した **31a–31c** の合成法について述べる (Scheme 4)。初めに、アルデヒド **20** に対し、5 位に立体選択的にアリル基を導入するため Ellman らが開発したキラルス

ルフィンアミド ((*S*)-*t*-BuS(O)NH₂) を縮合しイミン **25** を得た¹⁹⁾。近年 Sun らが報告した方法を用い、インジウムおよびアリルブロミドを NaBr 水溶液中、室温にて攪拌することで、高効率・高立体選択的に化合物 **26** を得た²⁰⁾。なお、アリル基の絶対立体配置は Ellman らが報告した反応メカニズムから推定した。目的の(*R,S*)-ジアステレオマーはシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に単離可能であり、30 g 程度のスケールの反応でも再現性は良い。**26** のスルフィニル部位を酸性条件下除去し、得られたアミン塩酸塩 **27** を *N*-Boc-エチレンジアミンおよび水素化トリアセトキシホウ素ナトリウムと還元的アミノ化反応によって縮合させジアミン **28** が得られた。



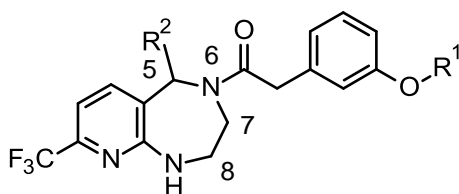
Scheme 4. Reagents and conditions: (a) (*S*)-*t*-BuS(O)NH₂, Ti(OEt)₄, THF, reflux, 99%; (b) allyl bromide, In, aq. NaBr, 94%; (c) 4 N HCl/1,4-dioxane, 82%; (d) *tert*-butyl *N*-(2-oxoethyl)carbamate, NaBH(OAc)₃, CH₂Cl₂, quant.; (e) 4 N HCl/AcOEt, rt; (f) (*i*-Pr)₂EtN, *N*-methylpyrrolidone, 160 °C, then (Boc)₂O, 59% (2 steps); (g) 2.5% OsO₄/*i*-PrOH, *N*-methylmorpholine oxide, acetone/H₂O, 0 °C ~rt; (h) NaIO₄, THF/H₂O; (i) NaClO₂, NaH₂PO₄, 2-methyl-2-butene, *t*-BuOH/H₂O; (j) 2 M TMSCH₂N₂ in hexane, THF/MeOH, 0 °C; (k) 4 N HCl/1,4-dioxane, 64% (5 steps); (l) 1-arylacetic acid, (*i*-Pr)₂EtN, HATU, CH₂Cl₂, 74%–quant.; (m) 2 N aq. NaOH, THF/MeOH, 90–97%.

酸性条件で **28** の Boc 基を除去し、得られたジアミン体を 160 °C の加熱条件下、Hünig 塩基を用いて分子内環化させ、引き続き 6 位の二級アミンを Boc 基保護することによってキラルアリルジ

アゼピン **29** を取得した。次に Scheme 3 の化合物 **22** から **23** への変換と同様の酸化反応条件を用いて **29** のアリル部位をメチルエステルに変換後、酸性条件下 Boc を脱保護した **30** を得た。対応するアリール酢酸ユニットとアミド縮合させ、最後に加水分解を行うことで 5 位に (*R*)-酢酸ユニットを有する目的化合物 **31a–31c** を効率的に合成した。

第二節 極性基を導入したジアゼピン化合物の生物学的評価

本章の第一節において合成した、5 位に極性基を導入したジアゼピン化合物について、ヒト/マウス BRS-3 アゴニスト活性 (EC_{50} 値) および脂溶性 ($\text{Log } D_{7.4}$) の評価を行った (Table 7)。これまでの合成検討により、置換基 R^2 の位置に比較的小さい脂溶性基の導入が許容であることが分かっていたため (データ非掲載)、極性基であるカルボキシル基を導入した **19a** を合成したが、大幅な活性減弱となった。しかし興味深いことに、炭素鎖を 1 炭素伸長した酢酸ユニットを有する **19b** では活性が **13a** と同程度まで劇的に回復し、かつ $\text{Log } D_{7.4}$ も 1.2 まで低減することができた。**19a** が低活性である原因の考察については、次節の計算化学を用いた分子コンフォメーションの項で述べる。ジアゼピン環 5 位への置換基 R^2 導入によって不斉炭素が生じたため、生物活性の高い光学異性体 (eutomer) の存在を期待し、前節 Scheme 3 で示した条件を用いてキラルカラムを用いて各エナンチオマー (**R**)-**19b**, (**S**)-**19b** を分離・評価を行った。その結果、予想通り低極性エナンチオマーである (**R**)-**19b** のみ活性を有し、ラセミ体 **13a** より活性が 5 倍程度向上することが判明した。なお、各エナンチオマーの絶対立体配置はキラルカラム分離由来の (**R**)-**19b** と、Scheme 4 で示した不斉アリル化反応 (化合物 **25**→**26**) から得られた目的物 (**R**)-**19b** とのキラルカラム分析における保持時間の一致により決定している。

Table 7. EC₅₀ and Log D_{7.4} values of BRS-3 agonists **13a**, **19a**, (*R*)-**19b**, (*S*)-**19b** and **31a–31c**.

Compound	R ¹	R ²	Human BRS-3 EC ₅₀ (nM) ^a	Mouse BRS-3 EC ₅₀ (nM) ^a	Log D ^b
13a	Ph	H	8.5	12.2	4.5
19a	Ph	CO ₂ H	1562	2260	ND ^c
19b	Ph	CH ₂ CO ₂ H	13	15	1.2
(R)-19b (less polar)	Ph	(<i>R</i>)-CH ₂ CO ₂ H	1.6	3.4	1.2
(S)-19b (more polar)	Ph	(<i>S</i>)-CH ₂ CO ₂ H	2071	3124	1.2
31a	<i>p</i> -F-Ph	(<i>R</i>)-CH ₂ CO ₂ H	1.7	2.7	1.2
31b	<i>i</i> -Bu	(<i>R</i>)-CH ₂ CO ₂ H	17	62	0.9
31c		(<i>R</i>)-CH ₂ CO ₂ H	1.7	3.5	0.3

^a Data are averages of at least 3 times repeated measurement.

^b The distribution coefficients (Log D_{7.4}) were measured between 1-octanol and phosphate buffered saline (pH 7.4).

^c Not determined.

このように酢酸ユニット導入において(*R*)-体のみ高活性を保持したことから、不斉合成による(*R*)-酢酸ユニットの導入が効率的に誘導体合成を進める上で必要となった。実際、Scheme 4 に示すルートでキラルジアゼピン鍵中間体 **30** を取得し、これと第二章第四節 (Table 6) で高活性・中程度の脂溶性を持つ有望な右側末端部位 (化合物 **13d**, **13i**, **13o**) を組み合わせることで、さらなる脂溶性低下または活性向上した化合物 **31a–31c** を獲得した。特に 6-メチル-3-ピリジル基を有する **31c** ではこれまでで最も高活性かつ脂溶性も著しく低く (Log D_{7.4} = 0.3)、研究当初に目指していた低中枢移行型 BRS-3 アゴニストに合致した有望化合物と言える。

本章で得られた有望化合物 **13a**, **31b**, **31c** について、各種物性評価およびマウスを用いた PK 試験を行い、化合物の物性および中枢移行性を評価した (Table 8)。高脂溶性化合物 **13a** では、低い溶解性および代謝安定性によりマウス血中曝露が不十分であり、さらに分子極性表面積 (polar surface area, PSA) が低値であり血液脳関門を容易に通過できるため、中枢移行性も比較的高値となっている (K_p_brain = 0.72)。一方、キラル酢酸ユニットを持つ **31b**, **31c** では血中タンパク結合

フリー体率 (PB free) も上昇し、溶解性向上と相まってマウス血中曝露および血中半減期も改善した。さらに **31b**, **31c** の PSA は高値であるため中枢移行性は極めて低く、最も低脂溶性の **31c** でその傾向が最大化している ($K_p\text{_{brain}} = 0.002$)。

このように、分子中の適切な位置への極性官能基付与による脂溶性低減によって、各種物性・PKパラメータの改善および低中枢移行性化を同時に達成することができた。

Table 8. Physical properties and mouse PK parameters of **13a**, **31b** and **31c**.

Compd	mouse BRS-3 EC ₅₀ (nM)	Log D ^a	Solubility JP1/JP2 ($\mu\text{g/mL}$)	PB free (%) ^b	C _{max} ($\mu\text{g/mL}$) ^c	AUC (hr* $\mu\text{g mL}$) ^c	T _{1/2} (h) ^c	MS (%) ^d	PSA ^e	Mouse K _p brain ^f
13a	12	4.5	11/5.1	0.67	0.060	0.041	0.82	0.70	53	0.72 ^g
31b	62	0.9	40/810	3.3	0.36	0.39	3.7	70	88	0.043 ^g
31c	3.5	0.3	960/950	4.6	0.090	0.20	2.6	94	98	0.002 ^{g,h}

^a The distribution coefficients (Log D_{7.4}) were measured between 1-octanol and phosphate buffered saline (pH 7.4).

^b Unbound fractions (%) in mouse plasma. PB: Protein Binding.

^c Average of 2 mice dosed at 10 mg/kg *po*. Each dose was administered by DMA/PG/(20% HP β CD/saline): 10/10/80 as a solvent.

^d Remaining (%) of the tested compound after 0.5 h incubation with mouse liver microsome.

^e Polar surface area (\AA^2).

^f K_p brain: brain to plasma concentration ratio.

^g K_p value was determined after a single administration of compound at 30 mg/kg *po*. to mice. The measurement of each concentration was conducted at 2.5 h after administration.

^h Measured by racemic compound of **31c**.

第三節 計算化学を用いたキラル酢酸ユニットの役割に関する考察

前節 Table 7 で示したように、酢酸ユニットを持つ化合物 **19b** はそのエナンチオマー間 ((**R**)-**19b**, (**S**)-**19b**) でヒト/マウス両方において約 1000 倍程度の著しい活性差が存在する。一方、膜タンパクの一種である BRS-3 はその結晶構造が未知であるため、*in silico* におけるドッキングスタディを用いた構造解析は不可能であった。そこで、この興味深い現象について、計算化学的手法を用いた最安定立体配座の算出により分子コンホメーションの観点から推測される要因を考察した (Fig. 7)。

化合物 **19b** や **31b** など、分子右末端側鎖がピリジン環と CH- π や π - π 相互作用を有する場合が散見されたため、これら側鎖による影響を除外する目的で簡素化したモデル化合物を用い、最安定立体配座を算出した (OPLS-2005 使用, 実験項参照)。

(*R*)-19b のモデル化合物 **A** では、最安定構造として Fig 7 に示すような配座 I (酢酸ユニットがジアゼピン環平面より上に位置するコンホメーション) を取ることが分かった。Merck 社化合物 **3b** も、溶液から単離された単結晶の X 線結晶構造解析から活性型アトロプアイソマーとして配座 I を有することが示されており^{6c)}、この七員環の配座様式が BRS-3 に対して高い親和性を有していることが推察される。加えて 5 位の (*R*)-酢酸ユニットの立体障害の影響から、モデル化合物 **A** の酢酸ユニットがジアゼピン環平面より下に位置する配座 II (Fig. 8 参照) への環反転はより起こりにくい、すなわち望ましい方向へ一定の環固定効果が生じていると考えられる ($\Delta E_A(\text{I} \rightarrow \text{II}) = E_A(\text{I}) - E_A(\text{II}) = +2.2 \text{ kcal/mol}$)。このように、7 員環上 5 位にキラル酢酸ユニット (*R* 体) を導入することで、分子脂溶性の劇的な低減効果の他に、立体反発効果による配座 I への環固定効果が生じ、活性改善効果が見られた。Merck 社ジアゼピン化合物 **3b** は、配座 I への固定化のために近傍に別のヘテロ環を配置し、軸不斉によって高活性アトロプアイソマーとして単離された。しかし、大量供給が困難なキラルカラムによる異性体分離に依存していると同時に、溶液中で徐々にラセミ化が進行する問題点も報告されている^{16a)}。一方、目的とする立体中心に隣接する炭素上にキラル官能基を導入し、7 員環配座の固定化を実現した本論文の手法は、光学活性中心の導入による高活性化を図る他の研究テーマの場合にも応用可能であろう。

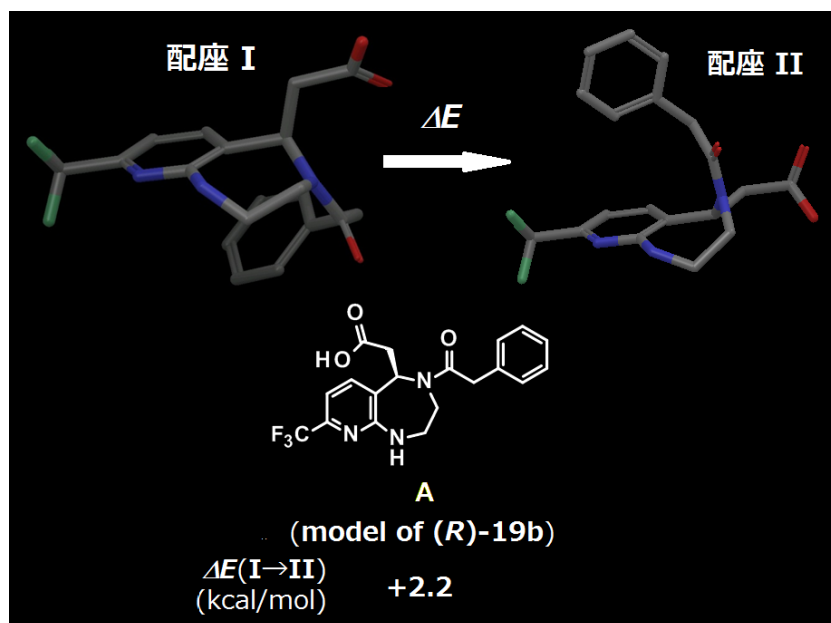


Figure 7. Calculated molecular model structure of compound **A** with configuration I for the most stable conformer (hydrogen atoms are omitted for clarity).

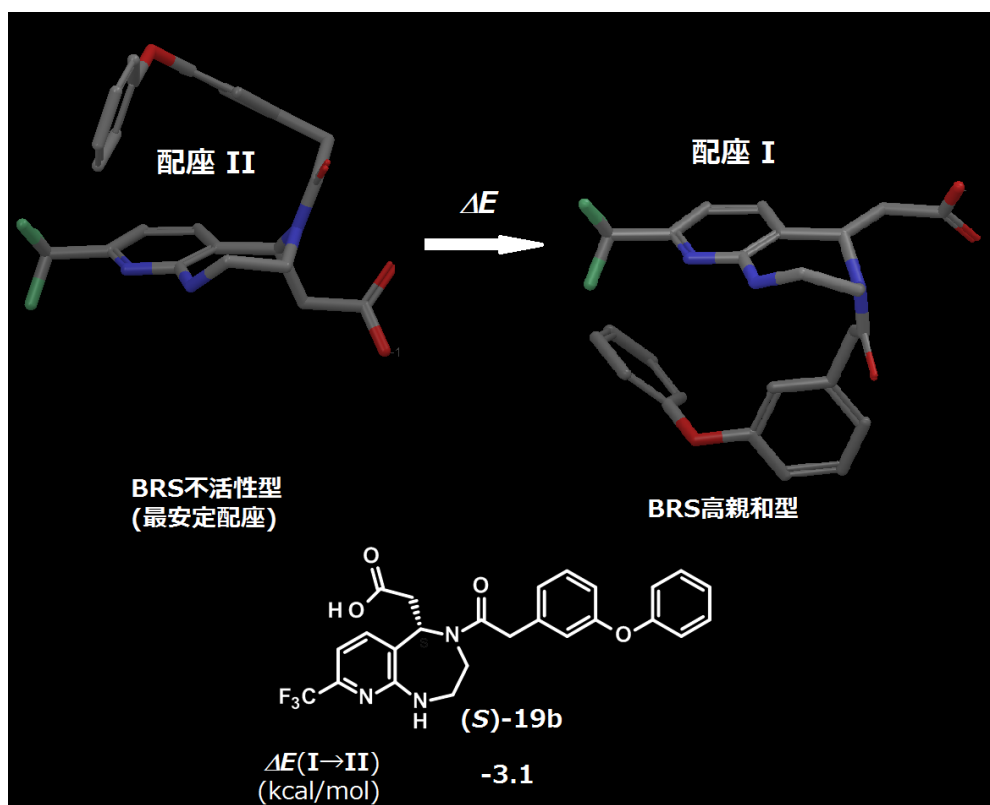


Figure 8. Calculated molecular model structure of **(S)-19b** with configuration I or II (hydrogen atoms are omitted for clarity).

次に実際の**(S)-19b**を用いて、*in vitro*におけるBRS-3活性実測値および計算化学による最安定配座間のポテンシャルエネルギー差に関する定量的考察を行い、本モデルに基づく仮説の妥当性を検証した (Fig. 8)。最安定構造として配座 II を有し、BRS-3 に対し低活性である**(S)-19b** に対し、高活性型配座 (active conformer) である配座 I を取るのに必要なポテンシャルエネルギー差 ΔE を算出すると、 $\Delta E_{(S)-19b}(\text{I} \rightarrow \text{II}) = E_{(S)-19b}(\text{I}) - E_{(S)-19b}(\text{II}) = -3.1$ kcal/mol であった。つまり、**(S)-19b** は BRS-3 と相互作用するために有利なコンフォメーション (配座 I) へ変化する際、3.1 kcal/mol 分の安定化エネルギー (標的への親和力) を損失していることになる。

一方、創薬標的タンパク質と低分子基質の溶液中での解離定数 K_d は、下記のギブス自由エネルギーの定義式で記述される (eq. 1)。そこで Table 7 で示した**(R)-19b**、**(S)-19b** のマウス BRS-3 *in vitro* 活性値 (mEC₅₀, nM) を結合定数 $K_{(R)-19b}$ 、 $K_{(S)-19b}$ とみなし、室温を 25 °C (298 K) として下式へ適用した。

$$\Delta G = -RT \ln K_d \quad (\text{eq. 1})$$

$$\Delta \Delta G ((R)-19b \rightarrow (S)-19b) = -RT \ln (K_{(S)-19b} / K_{(R)-19b})$$

$$= -1.987 \times 298 \times \ln(3124/3.4) = -4.0 \text{ (kcal/mol)}$$

この結果、実際の活性値に基づいた **19b** の立体異性体間のギブス自由エネルギー差 $\Delta\Delta G$ (**(R)-19b**→**(S)-19b**)は-4.0 kcal/mol となった。**(S)-19b** の両配座異性体間のポテンシャルエネルギー差に関して計算化学的に算出した ΔE と、実測値から見積もった $\Delta\Delta G$ がある程度的一致を示したことから、キラル酢酸ユニットの役割に関する本仮説の妥当性を裏付けるデータと言える。

次に、ジアゼピン環上 5 位にカルボキシル基が直結した **19a** において BRS-3 活性が消失した原因について、生理活性エナンチオマー (eutomer) であると予想される**(S)-19a** のモデル化合物 **B** を用いて最安定配座を算出したところ、**(R)-19b** と同様に配座 I をとることが判明した (Fig. 9)。この結果、かさ高いカルボキシル基は母核に近接するため、環に対してほぼ垂直真上方向を向いており、また本計算条件であるエネルギー差 (5.0 kcal/mol) の範囲内で 7 員環が反転した配座 II は存在しなかった ($\Delta E_B(\text{I} \rightarrow \text{II}) = E_B(\text{I}) - E_B(\text{II}) > +5.0$ kcal/mol)。この事実は、モデル化合物 **B** において最安定な配座 I から配座 II へ変化するには少なくとも 5.0 kcal/mol 以上のエネルギー障壁が存在しており、この環反転のしにくさはカルボキシル基と近接するアミド部位カルボニル基との立体反発、静電反発によるものであることを示唆している。すなわち、**(S)-19a** が標的 BRS-3 と相互作用するため Fig 9 で示した **B** の配座から、最適な (標的タンパクとの相互作用に好都合な) 末端側鎖を含むアミド部位のコンフォメーションに変化する際、これら斥力による影響で低活性を示した可能性がある。

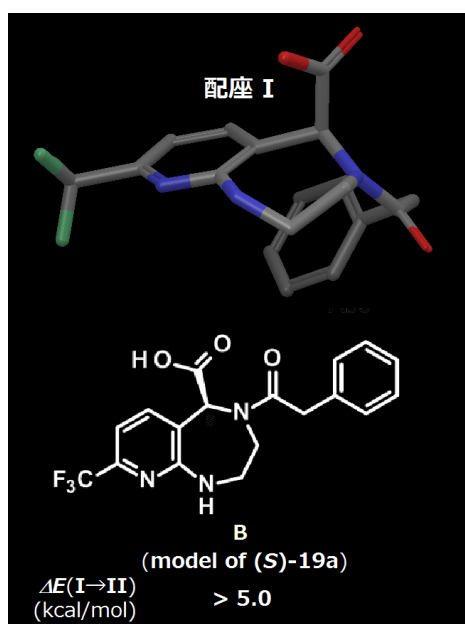
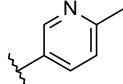


Figure 9. Calculated molecular model structures of **B** with configuration I as a model of **(S)-19a** (hydrogen atoms are omitted for clarity).

このように、計算化学的手法と実際の BRS-3 活性値を参照することで、5 位キラル酢酸ユニットの持つ環固定効果だけでなく、熱力学方程式を用いた定量的議論、および高活性発現に対し 5 位置換基が直結型カルボキシル基でなく酢酸ユニットである必要性についても考察できた。

第四節 小括

本章では、第二章で得た新規二環性化合物に対し、ジアゼピン環上 5 位に酢酸ユニットを立体選択的に導入することによって、さらなる活性向上かつ脂溶性低減を両立した化合物 **31b**, **31c** を獲得した (Fig. 10)。**31b**, **31c** は初期物性およびマウス PK 試験において、低脂溶性に由来した良好な物性プロファイルおよび血中曝露を有しており、極めて低い中枢移行性 (Kp_{brain}) を示した。これら低中枢移行性 BRS-3 アゴニストは、末梢系 BRS-3 選択的に作用することで中枢系由来の副作用を回避することが期待された。酢酸ユニット導入によるエナンチオマー間の活性差を計算化学的手法によって考察したところ、高活性(*R*)-エナンチオマー**19b** は窒素原子上で(*S*)-配座を最安定立体配座として有しており、酢酸ユニットによる隣接基関与 (立体反発) 由来の BRS-3 活性発現へ有利な配座への固定効果が示唆された。

Compound	31b	31c
R	<i>i</i> -Bu	
BRS-3 EC_{50} (h/m, nM)	17 / 62	1.7 / 3.5
Log $D_{7.4}$	0.9	0.3
Kp_{brain}	0.043	0.002 ^a

^a Measured by racemic compound of **31c**.

Figure 10. EC_{50} , Log $D_{7.4}$ (pH = 7.4), and Kp_{brain} values of novel BRS-3 agonists **31b** and **31c**.

第四章 アンテドラッグ型 BRS-3 アゴニスト

第一節 さらなる中枢移行性低減を志向したアンテドラッグ手法の採用

第三章では高活性かつ低中枢移行性化合物 **31b**, **31c** を獲得したが、中枢由来の副作用を完全に回避するためには、ごく僅かな中枢系への化合物曝露も検出限界以下のレベルまで低減する必要性が考えられた。そこで、一般的に外用薬であるステロイド系薬剤に汎用されている「アンテドラッグ化」という手法²¹⁾を用いることとした (Fig. 11)。すなわち、分子内への分解しやすい官能基 (エステル基) 導入によって、薬物が消化管から吸収後、活性体から非活性体へと速やかに代謝変換され、血中ならびに中枢系への活性体曝露を低減させることで中枢系 BRS-3 作用を回避する手法である。これまで私が獲得した二環性ジアゼピン化合物群は、いずれも活性発現に右末端部分にある程度の大きさの脂溶性基が必須であり、かつ比較的官能基許容性が広いことが判明していたため、*O*-リンカー部位をエステル基に変換し、アンテドラッグ化を行うこととした。本手法を分子右側のアルキル置換体 **31b** およびアリアル置換体 **31c** に適用したところ、アリアルエステルを有する化合物 (Fig. 11, R = Ph) の場合では活性が消失した (データ非掲載)。そこで置換基 R には各種アルキル基を導入することとし、合成誘導体に対して生物活性評価およびマウス PK 試験によって、アンテドラッグとしての優れたプロファイルを有する化合物の選抜を行った。

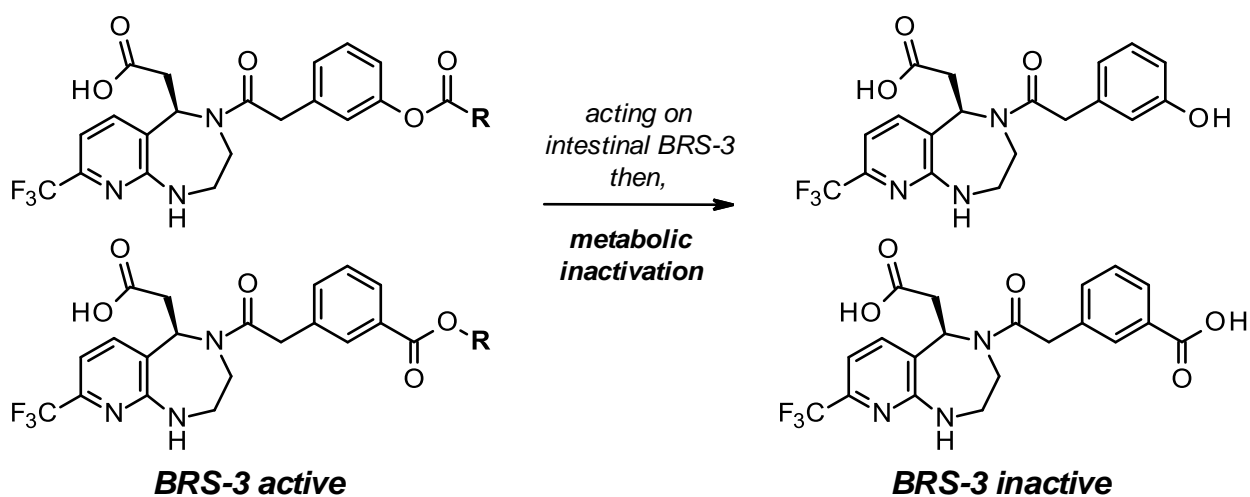
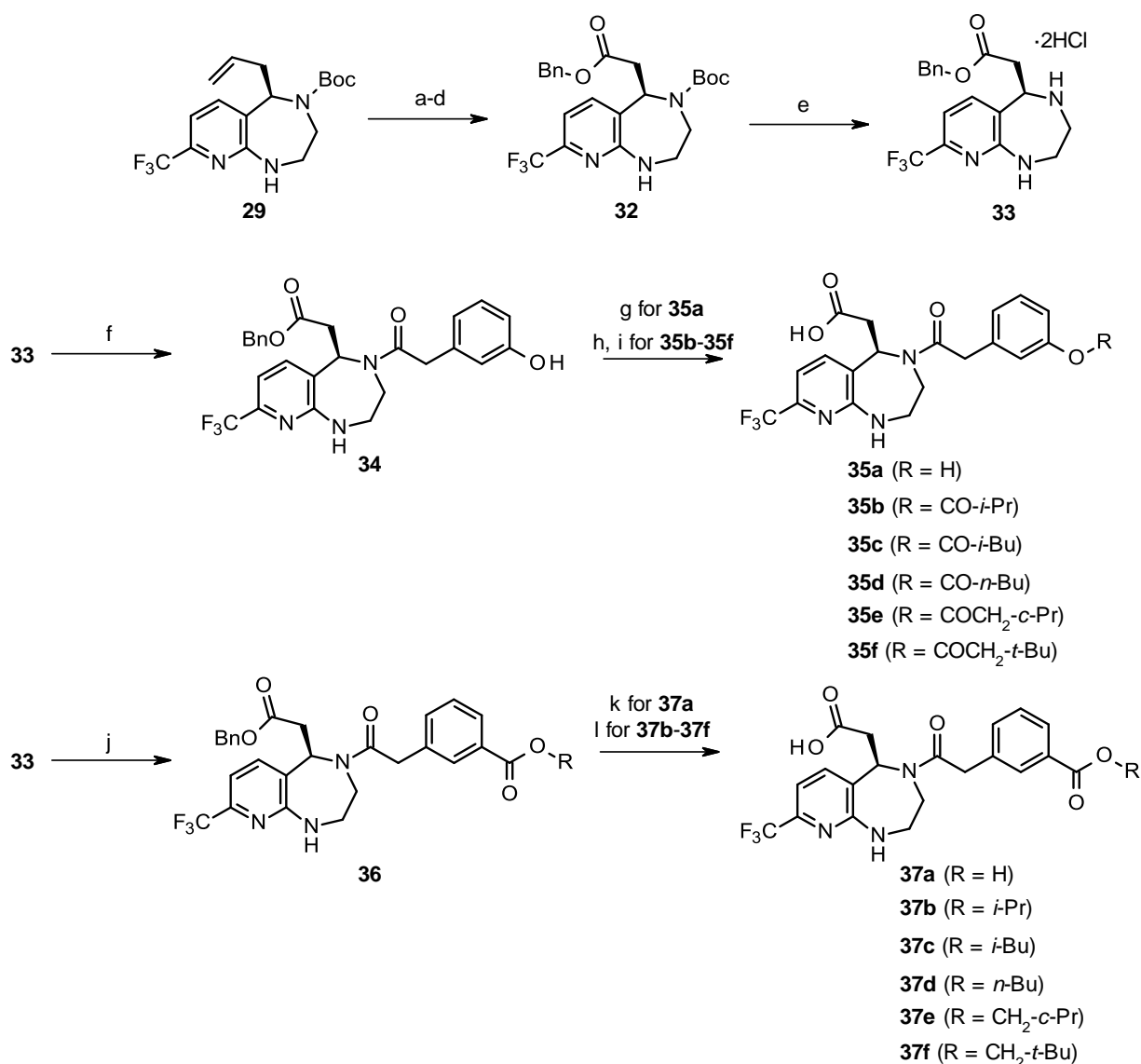


Figure 11. Illustration of ante-drug applied to **31b** and **31c**.

第二節 アンテドラッグ型ジアゼピン化合物の合成

アンテドラッグ型ジアゼピン化合物 **35a–35f** および **37a–37f** は、第三章 Scheme 4 で得たキラル鍵中間体 **29** を出発物質として合成した (Scheme 5)。出発物質 **29** を前述と同様の合成変換法を用いてベンジルエステル体 **32** へと変換後、酸性条件下で Boc 基を脱保護して **33** を塩酸塩として単離した。アルコール存在下でも選択的にアミンと縮合可能な縮合剤 DMT-MM²²⁾を用いてフェノール **34** を得た。これと各種アルキル脂肪酸クロリドとの縮合後、水素添加によってベンジル基を選択的に脱保護し **35b–35f** を合成した。一方、安息香酸エステル **37a–37f** については、塩酸塩 **33** に対し対応するジカルボン酸モノエステルをアミド縮合させ、次いで水素添加による脱ベンジル化によって得られた。

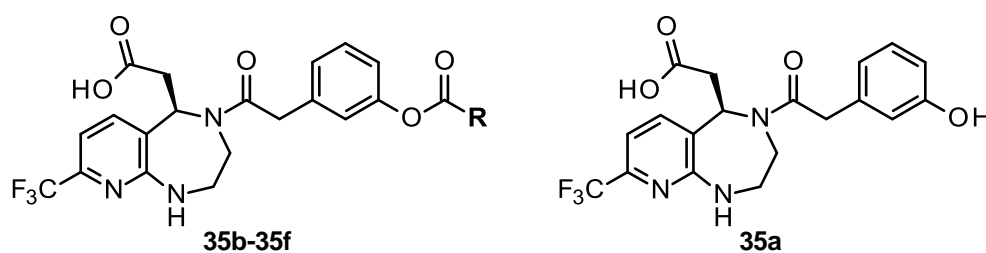


Scheme 5. Reagents and conditions: (a) 2.5% OsO₄/*i*-PrOH, *N*-methylmorpholine oxide, acetone/H₂O, 0 °C~rt; (b) NaIO₄, THF/H₂O; (c) NaClO₂, NaH₂PO₄·2H₂O, 2-methyl-2-butene, *t*-BuOH/H₂O; (d) BnBr, K₂CO₃, acetone, 60 °C; (e) 4 N HCl/1,4-dioxane, 80% (5 steps); (f) (3-hydroxyphenyl)acetic acid, DMT-MM, MeOH, 77%; (g) H₂, Pd-C, EtOH, 87%; (h) alkylacyl chloride, Et₃N, CH₂Cl₂; (i) H₂, Pd-C, EtOH, 46–96% (2 steps); (j) arylacetic acid, (*i*-Pr)₂EtN, HATU, CH₂Cl₂; (k) 2 N aq. NaOH, THF/MeOH, quant.; (l) H₂, Pd-C, EtOH, 74–80% (2 steps).

第三節 アンテドラッグ型ジアゼピン化合物の生物学的評価

本章第二節で合成したアンテドラッグ型化合物について、ヒト/マウス BRS-3 におけるアゴニスト活性 (EC₅₀ 値) の *in vitro* 評価を行った (Table 9)。前節で述べたように、右側末端部分の脂溶性が活性発現に必須という知見を支持するように、フェノール体 **35a** は活性を完全に消失した。一方、イソプロピルエステル **35b** からアルキル基をかき高くしていくと活性は上昇し、ネオペンチルエステル **35f** でヒトにおいて 10 nM 以下の高活性を示した。前節で示した低中枢移行性化合物 **31b** と比較しても、エステル基を挿入したイソブチルエステル **35c** は期待通り同程度の活性を保持していることが明らかとなった。

Table 9. EC₅₀ values of BRS-3 agonists **31b** and **35a–35f**.



Compound	R	Human BRS-3 EC ₅₀ (nM) ^a	Mouse BRS-3 EC ₅₀ (nM) ^a
31b	-	17	62
35a	-	>10000	>10000
35b	<i>i</i> -Pr	68	282
35c	<i>i</i> -Bu	12	43
35d	<i>n</i> -Bu	19	35
35e	CH ₂ - <i>c</i> -Pr	42	81
35f	CH ₂ - <i>t</i> -Bu	8.7	20

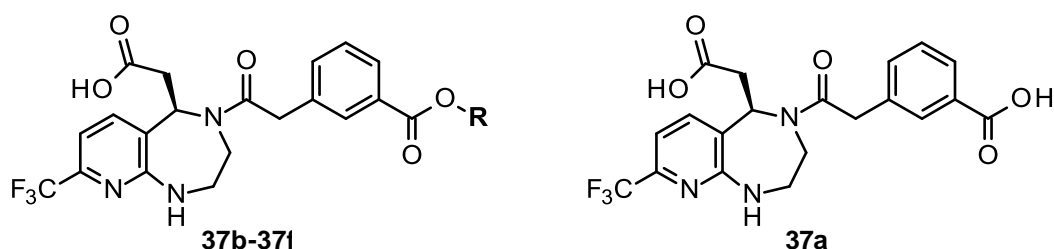
^a Data are averages of repeated measurements at least 3 times.

安息香酸誘導体 **37a–37f** の構造活性相関を以下に示す (Table 10)。フェノール誘導体 **35a–35f** の場合と同じく、右末端に脂溶性基を持たないジカルボン酸体 **37a** は非活性であり、アルキルエス

テル化した **37b–37f** では良好な活性を示した。特に、イソブチル基以上のかさ高さを有する **37c–37f** においてはヒト/マウスのいずれも EC₅₀ 値が 10 nM 以下の高活性であり、フェノールエステル型の一連の化合物群 (**35b–35f**) と比較し、全体的に活性が上昇する傾向が見られた。

このように、本章ではアンテドラッグ化を目指して官能基許容性の高い分子右側末端部位に着目し、*O*-リンカーを代謝的に不安定なエステル基へと変換したところ、活性が維持・改善することを見出した。

Table 10. EC₅₀ values of BRS-3 agonists **37a–37f**.



Compound	R	Human BRS-3 EC ₅₀ (nM) ^a	Mouse BRS-3 EC ₅₀ (nM) ^a
37a	H	>10000	>10000
37b	<i>i</i> -Pr	40	45
37c	<i>i</i> -Bu	4.2	5.4
37d	<i>n</i> -Bu	4.0	5.6
37e	CH ₂ - <i>c</i> -Pr	3.4	3.7
37f	CH ₂ - <i>t</i> -Bu	5.6	8.1

^a Data are averages of repeated measurements at least 3 times.

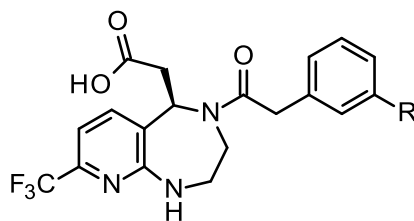
第四節 アンテドラッグ型ジアゼピン化合物の薬物動態的評価

前節で取得したフェノールエステル体 **35a–35f** および安息香酸体 **37a–37f** に対し、アンテドラッグとして最適な PK プロファイルを有する化合物を選抜するため、マウス経口投与 2 時間後までの活性体および非活性体の血中濃度測定を行った (Table 11)。すなわち、高活性エステル体 **35b–35f**, **37b–37f** が消化管に発現する BRS-3 に作用した後に消化器官から吸収され、全身循環血に入るまでに生体内代謝を受け、非活性体 **35a** または **37a** へ変換される割合を評価した。

安息香酸エステル **37b–37f** はフェノールエステル **35b–35f** を全体的に上回る高活性を有するものの、血中において活性体 (未変化体) を若干検出した。実際、活性体に対する非活性対比 (**A/I**) は、最も少ない **37c** (R = CO₂-*i*-Bu) でも 0.0145 を示し、微量ながら活性体の中枢系への曝露が懸

念された。一方、**35b–35f** は生体内代謝による加水分解反応をより受けやすく、**35b**, **35c**, **35e** の活性体では血中で全く検出されなかった (**A/I** = 0)。Fig. 12 に示すように、とりわけ最も非活性体の最高血中濃度の高かった **35c** は投与後 0–2 時間において終始非活性体 **35a** のみを検出した (C_{\max} of **I** = 1.26 μM , **A/I** = 0)。なお、化合物 **35a** のみを同条件でマウスに経口投与を行うと、ほとんど血中に曝露されない (C_{\max} = 0.04 μM , 30 mg/kg)。この結果から、**35c** は消化管通過時までには確かに一定量が活性体として存在し、全身循環血中に到達するまでに生体内代謝によって全て **35a** に変換されていることが示唆される。そこでこのイソブチル基を有するフェノールエステル **35c** を有望なアンテドラッグ型化合物として選抜し、次節の薬効評価試験を実施することとした。

Table 11. Mouse PK parameters of **35b–35f** and **37b–37f**.



Active compound (A)	Inactive metabolite (I)	Mouse PK (<i>po</i> , 30 mg/kg) ^a		
		C_{\max} (μM) of A	C_{\max} (μM) of I	Ratio of A/I
35b (R = O ₂ C- <i>i</i> -Pr)	35a (R = OH)	0 ^b	0.68	0 ^b
35c (R = O ₂ C- <i>i</i> -Bu)	35a (R = OH)	0 ^b	1.26	0 ^b
35d (R = O ₂ C- <i>n</i> -Bu)	35a (R = OH)	0.0285	1.63	0.0175
35e (R = O ₂ CCH ₂ - <i>c</i> -Pr)	35a (R = OH)	0 ^b	0.607	0 ^b
35f (R = O ₂ CCH ₂ - <i>t</i> -Bu)	35a (R = OH)	0.0058	0.0325	0.179
37b (R = CO ₂ - <i>i</i> -Pr)	37a (R = CO ₂ H)	1.24	0.918	1.35
37c (R = CO ₂ - <i>i</i> -Bu)	37a (R = CO ₂ H)	0.0308	2.12	0.0145
37d (R = CO ₂ - <i>n</i> -Bu)	37a (R = CO ₂ H)	0.0285	1.63	0.0175
37e (R = CO ₂ CH ₂ - <i>c</i> -Pr)	37a (R = CO ₂ H)	0.0393	0.300	0.131
37f (R = CO ₂ CH ₂ - <i>t</i> -Bu)	37a (R = CO ₂ H)	0.0127	0.197	0.0643

^a Average of 2 or 3 mice dosed at 30 mg/kg *po*. Each dose was administered with 0.5% MC (methyl cellulose) as a solvent.

^b Under limit of qualification.

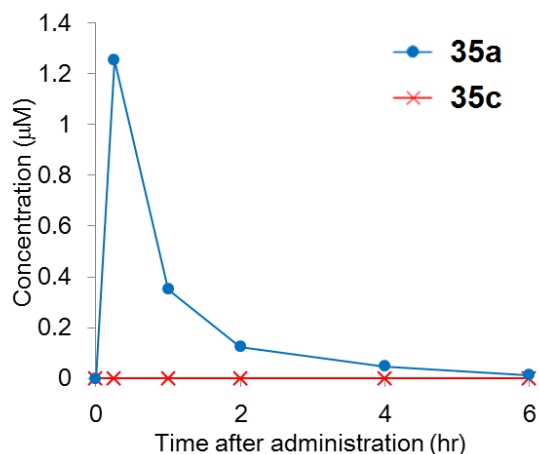
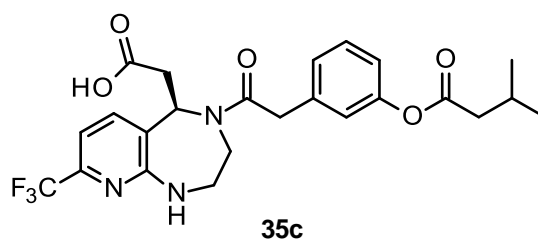


Figure 12. PK profile of **35c** (mice, 30 mg/kg, *po*, *n* = 2).

有望化合物 **35c** の活性、初期物性および PK プロファイルを示す (Table 12)。前述のように末端アシル基の有無によって BRS-3 アゴニスト活性はオン/オフ制御が可能であるうえ、非活性代謝物 **35a** の水溶性も高く、体外に排出されやすい性質を有している。また、一般的に分子極性表面積 (PSA) が 75 \AA^2 以上になると化合物が血液脳関門を通過しにくくなり、中枢移行性が低下することが知られている²³⁾。ゆえに、**35c**, **35a** の PSA が 100 \AA^2 以上の高値を示すことは、中枢系 BRS-3 由来の副作用を軽減する上で適している。**35c** の PK プロファイルは、Fig. 12 に示すように血中で活性体が全く検出されない一方、非活性体 **35a** は短い半減期かつ高 C_{\max} 値を示すため、アンテドラッグとして最適な物性である。

Table 12. Physical properties and mouse PK parameters of **35c** and its metabolite **35a**.



Compd	<i>In vitro</i> EC ₅₀ (human/mouse, nM)	Log D _{7.4} ^a	Solubility JP1/JP2 (μM/mL)	PB free ^b (%)	PSA ^c	T _{max} ^d (h)	C _{max} ^d (μg/mL)	AUC ^d (hr · μg/mL)	T _{1/2} ^d (h)
35c (active compound)	12/43	0.7	62/900	10.8	101.5	ND ^e	0 ^f	0 ^f	0 ^f
35a (inactive metabolite)	>10000/>10000	-0.8	750/780	>30.0	101.0	0.25 ^g	1.26 ^g	1.23 ^g	0.25 ^g

^a The distribution coefficients (Log D_{7.4}) were measured between 1-octanol and phosphate buffered saline (pH 7.4).

^b Unbound fractions (%) in mouse plasma. PB: Protein Binding.

^c Polar surface area (Å²).

^d Average of 2 mice dosed at 30 mg/kg *po*. Each dose was administered with 0.5% MC (methyl cellulose) as a solvent.

^e Not determined.

^f Under limit of qualification.

^g Each PK parameter of **35a** was observed in the administration of **35c** at 30 mg/kg *po*.

第五節 アンテドラッグ型化合物 **35c** の薬効評価

前節にて得られた、アンテドラッグとして望ましい PK プロファイルを有する **35c** に対して、消化管作用型 BRS-3 アゴニストとしての抗肥満作用を評価すべく、健常マウス (C57BL/6N マウス) を用いた摂食抑制試験を行った (Fig. 13)。C57BL/6N マウスに対し、化合物 **35c** を 1, 3, 10, 30 mg/kg の 4 用量にて経口単回投与したところ、用量依存的な摂食量の抑制が見られた。特に最高用量の 30 mg/kg 投与において、vehicle 投与群に対し統計的に有意な摂食抑制作用が観測された ($P < 0.05$)。本用量において約 30% の摂食量の抑制が見られたことから、反復投与試験を行うことにより、持続的なエネルギー摂取の低下、それに伴う抗肥満作用 (体重減少作用) が期待される。実際、病態モデルの *db/db* マウスへの 12 日間反復経口投与試験 10 mg/kg において、ロルカセリン (セロトニン 2c アゴニスト) と同等 (30% 程度) の体重増加抑制の傾向が見られた (データ非掲載)。この摂食抑制作用が BRS-3 欠損型マウスを用いた同条件の試験で見られなかったこと、および活性体

35c の血中曝露が全く検出されなかったことから、本化合物は消化管に発現する BRS-3 に作用することで薬効を発揮したものと考えられる。

以上より、私はアンテドラッグ **35c** によって末梢系 BRS-3 受容体の刺激による薬効発現（摂食抑制作用）を初めて達成した。同時に、中枢移行型化合物である Merck 社化合物 **3a**, **3b** の経口投与試験で観測された摂食抑制作用は、中枢系由来のみでなくその一部が消化管由来の BRS-3 への刺激を介していることが明らかになった。

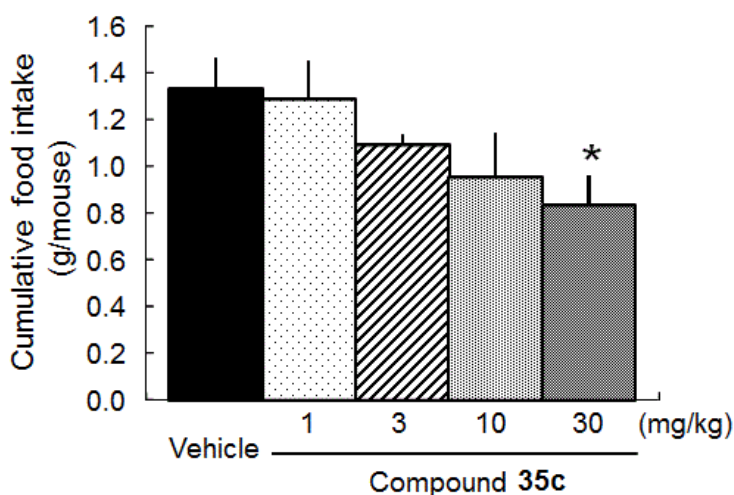


Figure 13. Effect of **35c** on food intake in C57BL/6N mice. Mice were fasted for 16 hours and fed normal chow 1 hr after the compound administration. Cumulative food intake of each mouse over 6 hours was measured. Data are mean \pm S.E.M. $n = 4-5$. *, $P < 0.05$, Dunnett's test.

第六節 アンテドラッグ型化合物 **35c** の心血管系リスク評価

次に、**35c** を麻酔処置下ビーグル犬に静脈持続投与 (*iv* infusion) することによって、心血管系 (cardiovascular, CV) リスク評価試験を行うこととした。CV リスク評価試験は、対象動物の心拍数 (heart rate, HR) や血圧 (blood pressure, BP) 変動を経時的にモニターすることで中枢系由来の副作用を評価する方法であり、Merck 社化合物 **1** (MK-5046) の臨床試験にも用いられた方法である。本試験において、アンテドラッグ **35c** および末端官能基の類似した低中枢移行性化合物 **31b** の CV リスク評価を実施することにより、生体内代謝を受けやすいエステル基の導入、すなわちアンテドラッグ化という手法が中枢毒性の回避に効果的に機能しているかを検証した (Fig. 14)。**31b**, **35c** はそれぞれハロタン麻酔処置したビーグル犬 ($n = 2$) に対し、30 分間かけて 3 mg/kg/3 mL の薬剤溶液を静脈持続注入した。**31b** の場合、曝露投与終了時点 (30 分後) まで心拍数が一貫して増加して

いる。血圧に関しても、一例のイヌ (animal #2) において投与終了付近から顕著に上昇を示しており、個体としての麻酔維持が困難になったため、投与開始 48 分後の時点で実験を中断した。一方で、**35c** に関しては、心拍数は両例共に 10% 程度の減少傾向、および血圧は 10 mmHg 以内の軽微な増加に留まるという良好な結果を得た。なお、本試験系において 10 mmHg 程度の血圧上昇は vehicle 投与群にも見られる所見である。

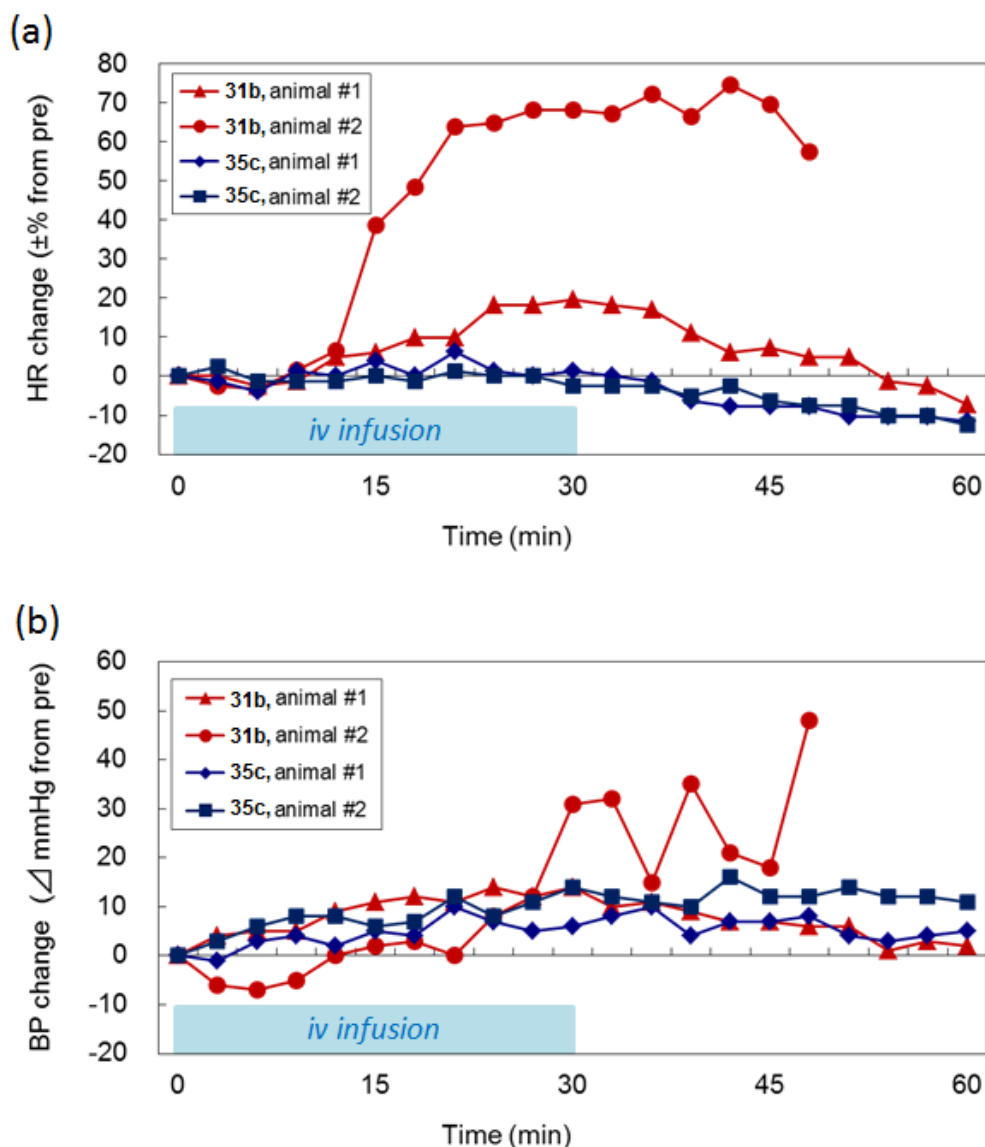


Figure 14. Effect of **31b** (animal #1, #2, red) and **35c** (animal #1, #2, blue) on (a) heart rate (HR) and (b) blood pressure (BP) in dogs ($n = 2/\text{group}$). The compound **31b** and ante-drug **35c** were administered to halothane anaesthetized dogs at 3 mg/kg/3 mL for 30 min by *iv* infusion (the duration of the *iv* infusion is shown as a light blue zone). Cardiovascular (CV) change was normalized by the pre-administration values (at 0 min) for the heart rate and blood pressure. The observation of the animal #2 was forcibly stopped at 48 min (18 min after completing dosage) due to the difficulty of anesthetic maintenance.

Table 13. Dog PK parameters of **31b** and **35c**.^a

Compound	Blood conc. (μM) at 30 min		Blood conc. (μM) at 60 min	
	animal #1	animal #2	animal #1	animal #2
31b	16.85	18.67	1.01	1.28
35c	1.73	1.39	0	0

^a Test compounds were dispersed in 20% v/w HP β CD solution, at the concentration of 1 mg/mL. Dogs were anesthetized with halothane (0.5–1.5% end-tidal concentration) proceeded by intravenous injection of thiopental (30 mg/kg of body weight).

血中濃度と中枢毒性の相関を調べるため、投与開始から 30, 60 分後の各化合物の血中濃度を測定した (Table 13)。30 分後において、**31b** は比較的高い血中濃度を示しており ($C_{30\text{min}} = 16\text{--}19 \mu\text{M}$)、生体内代謝によって減少するものの、60 分後でも $1 \mu\text{M}$ 程度の血中曝露を確認した。対照的に、**35c** では投与終了直後の 30 分後の時点で既に低い血中濃度 ($C_{30\text{min}} = 1.3\text{--}1.7 \mu\text{M}$) であり、60 分後には二例いずれも体内から完全に消失していた。このように、**35c** はイヌにおいても、薬物動態的にアンテドラッグとしての特性を効果的に発揮していることが明らかとなった。すなわち、分子右末端に導入したエステル基が、投与時間内および投与後に速やかに生体内酵素によって加水分解代謝を受け、中枢系を含む全身循環血への活性体曝露を極限まで低下させた、ということである。一方、**31b** が非常に低い中枢移行性 ($K_p_{\text{brain}} = 0.043$) であることを考慮すると、 K_p 値の極小化のみで心血管パラメーター (HR, BP) の変動を完全に回避することはかなり困難であることを示唆している。

以上の結果より、**35c** に適用したアンテドラッグ化という手法によって、中枢系副作用である心血管系リスク (HR, BP の変動) が回避可能であることが明らかとなった。

第七節 小括

本章では、第三章で得た低中枢移行性化合物 **31b** における、ごく僅かな中枢系への血中曝露を回避するため、より安全性の高いアンテドラッグ化手法を用いることとした (Fig. 15)。すなわち、官能基許容性の高い右側側鎖部分へ代謝的に不安定なエステル基を各種導入することで、中枢系への活性体曝露を低減するため、種々アルキル基を有するアンテドラッグの合成・生物学的評価を実施した。

マウス PK 試験によって、様々なかさ高さを持つアルキル側鎖を導入した化合物群 **35b–35f**、**37b–37f** のうち、イソブチル基を持つ **35c** が狙い通り血中で全く検出されず、かつ不活性代謝物 **35a** の血中曝露が最大となることを見出した。

In vivo 薬効試験として **35c** を健常マウスに単回経口投与したところ、1–30 mg/kg において用量依存的に摂食抑制作用を示した。

中枢系への安全性評価試験として、麻酔処置したイヌへの静脈持続投与による心血管系 (CV) リスク評価を実施した。低中枢移行性化合物 **31b** では一匹の症例で急激な心拍数変化および若干の血圧上昇が観測されたのに対し、アンテドラッグ **35c** では両パラメータにおける顕著な変化は見られず、中枢系由来の副作用の回避を示唆する望ましい結果を得た。投与 30, 60 分後の化合物血中濃度を測定したところ、ある程度の曝露を認めた **31b** に対し、**35c** では血中消失速度が早く、全身循環血中への化合物の蓄積および中枢系への曝露が効果的に回避された。

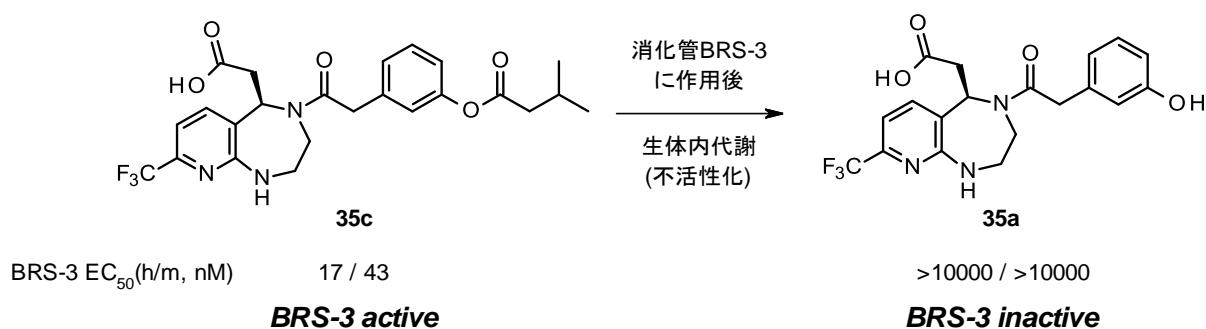


Figure 15. BRS-3 agonist **35c** with ante-drug profile.

総括

私は、消化管など末梢系 BRS-3 を標的とした低中枢移行型化合物の摂食抑制作用による、より安全性の高い新規抗肥満薬の開発を目指し、最終的に薬効と中枢系副作用回避を両立したアンテドラッグ **35c** を獲得した (Fig. 16)。

まず、HTS より得られたヒット化合物 **2a**, **2b** および Merck 社臨床化合物 **3a** (MK-7725) の構造類似性に着目し、構造簡略化と物性改善を目指したピリドジアゼピン **3b** における C パートの芳香環除去、および B パートのスルホンリンカー変換を行った。これにより分子剛直性を低減した高活性化合物 **13a** を獲得した。しかし **13a** は高脂溶性 ($\text{Log } D_{7.4} = 4.5$) による低代謝安定性や高中枢移行性により、脂溶性低減が必要となった。そこで **13a** への極性基の導入を検討したところ、ジアゼピン環上 5 位に酢酸ユニットを持つ **19b** で活性および物性改善が見られた ($\text{Log } D_{7.4} = 1.2$)。次にキラルカラムを用いた **19b** の七員環上不斉炭素の光学分割により、*R* 体である (*R*)-**19b** のみ BRS-3 活性を有することを見出した。不斉合成法の合成検討により、Ellman のキラルスルフィニルイミンを用いた立体選択的アシル基導入によって種々の高活性キラル化合物 **31a–31c** の効率的合成を達成した。

代表化合物 **13a**, **31b**, **31c** の物性、マウス PK パラメーターを測定したところ、低脂溶性化合物 **31b**, **31c** は経口投与での血中曝露増加、高代謝安定性など良好な物性プロファイルを与えた。さらに中枢移行性の指標である血中/脳中濃度比 (K_p _brain) 値の測定によって、**31b**, **31c** が極めて低い K_p _brain 値を示すことが判明した。

上記化合物 **31b**, **31c** におけるごくわずかな中枢系曝露を回避するため、より安全性の高いアンテドラッグ型手法を用いることとした。すなわち、官能基許容性の高い右側末端部分へ、生体内代謝を容易に受けやすいエステル基を導入した化合物 **35b–35f**, **37b–37f** をデザインした。これにより、化合物が消化管通過時、末梢系 BRS-3 受容体を刺激した後、血中で速やかに代謝を受けて不活性体 **35a**, **37a** へと変化することが期待された。

マウスを用いた化合物 **35b–35f**, **37b–37f** の PK 試験によって、アンテドラッグとしての機能評価を行った結果、様々な長さのアルキル側鎖を持つ誘導體群のうち、イソブチル基を持つ **35c** が血中で完全に消失し、かつ不活性代謝物 **35a** の血中曝露が最大であることが判明した。

次に *in vivo* 薬効試験として、**35c** を 1–30 mg/kg の用量で健常マウスに経口投与したところ、用量依存的な摂食抑制効果を示し、30 mg/kg において統計的有意差のある薬効を認めた。本結果から、これまで Merck 社などが報告した中枢性 BRS-3 由来の摂食抑制作用の一部が消化管 BRS-3 にも由来していたことが示唆されたと同時に中枢系を介さない末梢系 BRS-3 受容体の刺激による、摂食抑制作用の薬効発現を初めて達成した。

安全性評価試験として、麻酔処置したビーグル犬への静脈注入投与によるイヌ心血管系 (CV) リスク評価を実施した。化学的に安定な低中枢移行性化合物 **31b** では一匹の症例で急激な心拍数変化および若干の血圧上昇が観測されたのに対し、アンテドラッグ **35c** ではこのような顕著な変化は見られず、中枢系由来の副作用の回避を示唆する望ましい結果を得た。投与 30, 60 分後の化合物血中濃度を測定したところ、ある程度の曝露を認めた化合物 **31b** に対し、アンテドラッグ **35c** では血中消失が早く、循環血中への化合物の蓄積および中枢系への曝露が当初想定どおり効果的に回避されていることが判明した。

このように、新規抗肥満薬として消化管作用型 BRS-3 アゴニストの開発を目指し、極少量の中枢系曝露も回避可能なアンテドラッグ法を低中枢移行性の切り札として採用することで、摂食抑制作用と中枢系副作用回避を両立した化合物 **35c** の獲得を達成した。本研究の成果が、末梢系 BRS-3 刺激による薬理学的作用機序解明への一助となること、ならびに近年世界的に要望の強い「有効かつ安全性の高い抗肥満薬」として患者さまの治療に貢献できれば、望外の喜びである。

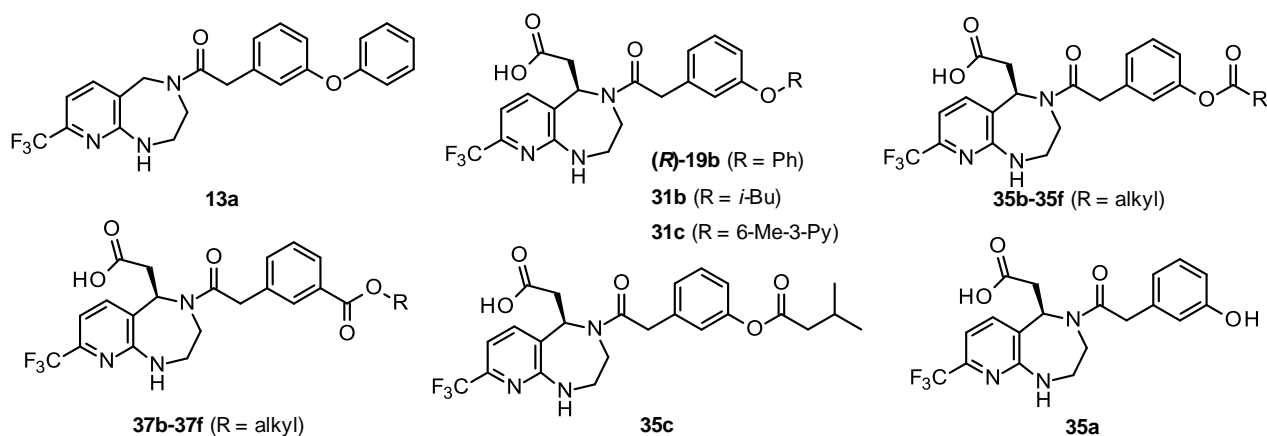


Figure 16. Representative BRS-3 agonists of this study.

第二部

抗糖尿病薬 **FATP1** 阻害剤の創製研究

第一章 序論

第一節 糖尿病とは

糖尿病 (diabetes mellitus) とは、膵 β 細胞から分泌されるインスリン量の低下、および肝臓や骨格筋などの末梢組織でのインスリン作用感度の低下 (インスリン抵抗性) によって血糖値が慢性的に異常な高値を示す病態を指す。この病態が一定期間続くと、やがてヘモグロビンやアルブミンなどの生体内タンパクが糖化 (グリケーション) を受け、その後老化組織特有の性質をもつ糖化最終産物 (advanced glycation end product, AGE) を形成する²⁴⁾。AGE は加齢、動脈硬化症、慢性腎不全、アルツハイマー病のほか、糖尿病合併症によっても生体内へ蓄積する。また AGE はその生産過程によって生じる活性酸素 (スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル) による細胞傷害のみならず、マクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞上の AGE 受容体に作用し、細胞シグナル応答として血液凝固能の亢進、および血管傷害性のサイトカイン/増殖因子の分泌を促進する²⁵⁾。その結果、糖尿病の三大合併症である糖尿病性網膜症、腎症、神経障害のほか、虚血性脳疾患や心疾患を惹起し、患者の QOL (quality of life) を著しく低下させることになる。

20 世紀半ば以降の生活様式の西欧化と日常生活における運動量減少が相まって、2 型糖尿病は今や世界規模で顕著に患者層を拡大し続ける慢性疾患である。さらに第一部・抗肥満薬の項でも述べたように、摂取カロリー過多に起因する肥満人口の増大がこれを相乗的に加速させている。2013 年時点、世界で年間 510 万人、すなわち 6 秒に 1 人が糖尿病で命を落としていると推計され、その治療に関わる医療費 (5480 億ドル/年) は、近年の各国経済の重荷にもなっている²⁶⁾。

2013 年に糖尿病と診断された成人患者数は世界で 3.7 億人 (20~79 歳人口比 8.3%)、日本国内においても 720 万人 (同 7.6%) に上るが、約半数が未診断とされ、実数はさらに多いと考えられている (Fig. 17)。近年の発展途上国における糖尿病患者の増加も相乗し、2030 年には総数は約 1.5 倍に増加すると予測されているため、速やかな新規糖尿病治療法の確立は、QOL 向上および健康寿命増加の面から、今後も世界的に強く望まれる領域である。

糖尿病は 1 型糖尿病と 2 型糖尿病に分類され、その成因の約 95% が 2 型糖尿病である。1 型糖尿病は自己免疫疾患により膵 β 細胞が破壊されるため、インスリン投与による治療が必要となり、その多くが若年期に発症する。一方、遺伝的要因に加え、ライフスタイルの急変など環境因子によっ

て引き起こされる 2 型糖尿病は、インスリン抵抗性の増大とインスリン分泌量の減少が成因であり、自覚症状が乏しいため発症時期の確定が難しい。しかし、高血糖の持続時間が比較的短い早期糖尿病の時期に適切な血糖値コントロールを行えば、インスリン抵抗性が改善された状態を長期に継続しうることが臨床学的に知られている。

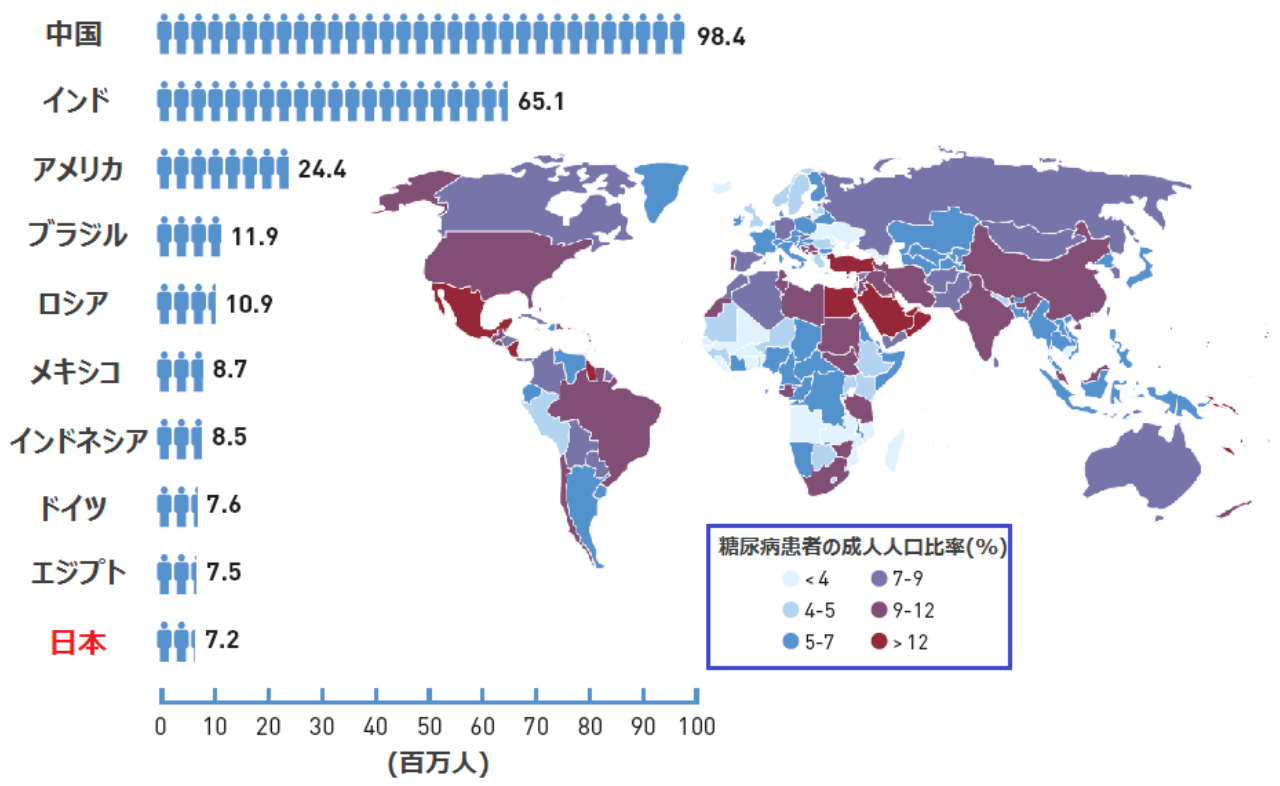


Figure 17. 2013 年の世界の成人 (20~79 歳) の糖尿病患者数上位 10 カ国 (文献 26 を参考に作成) .

現在臨床で用いられている抗糖尿病低分子薬を以下に示す (Table 14) 。最も初期に登場したインスリン分泌薬のスルホニル尿素 (SU) 薬は下記薬剤群で最も強い血糖低下作用を有し、低インスリン分泌能かつ非肥満型 2 型糖尿病患者の多い日本人の標準治療薬として現在も中心的役割を果たしているが、低血糖リスクや膵疲弊による二次無効が問題視されている。インスリン分泌ホルモンであるインクレチンを分解する酵素を阻害する DPP-IV 阻害剤は国内でも 2010 年に上市され、高血糖時にのみ血糖低下する作用機序のため低血糖リスクが低い。α-グルコシダーゼ阻害薬は、食後のデンプンなど多糖類の消化吸収の遅延により食後の血糖ピークを減少させるが、空腹時の高血糖治療には不適とされている。インスリン感受性を高めるビグアナイド (BG) 薬やチアゾリジン (TZD) 薬は膵臓のインスリン分泌能を保護する作用を持ち、临床上 SU 薬との一定の相加効果も見られ、最も使用されている薬剤の一つである。主な副作用として BG 薬では乳酸アシドーシス、TZD

薬では浮腫、体重増加などが報告されているが、数少ないインスリン抵抗性改善薬として世界中で服用されている。事実、TZD系薬剤は抗糖尿病薬の世界主要薬剤市場の年間売上において、2007年時点でヒトインスリンアナログに次ぐ二番目のシェア（24%、55億ドル）を占めるまでに成長した²⁷⁾。2014年に日本においても上市されたナトリウム/グルコース共輸送体（SGLT2）阻害剤は、ナトリウムと共に輸送されるグルコースの尿細管細胞内への再吸収を阻害する新規血糖低下薬として最近注目されている。

以上のように、経口糖尿病薬としてSU薬しか選択肢のなかった1960年代と比較すると、多剤併用によって血糖コントロールの手法は飛躍的に進歩を遂げた。しかし、副作用の軽減や膵インスリン分泌作用保存期間のさらなる延長など、未だ解決すべき課題は残されている。

Table 14. 糖尿病経口薬の主な種類.

系統名	薬剤の分類（作用機序）	薬剤名
インスリン分泌促進薬	スルホニル尿素（SU）薬 (膵臓のインスリン分泌を促進)	トリブタミドなど（第一世代） グリベンクラミドなど（第二世代） グリメピリド（第三世代）
	速効型インスリン分泌促進薬 (速やかにインスリン分泌促進)	ナテグリニド、ミチグリニドなど
	DPP-IV阻害薬 (高血糖時のインスリン分泌促進とグルカゴン分泌抑制)	シタグリプチン、テネグリプチンなど
糖吸収遅延薬	α -グルコシダーゼ阻害薬 (小腸のグルコース吸収を遅延)	アガルボース、ボグリボースなど
インスリン抵抗性改善薬	ビグアナイド（BG）薬 (肝での糖新生を抑制)	メドフォルミン、プロホルミンなど
	チアゾリジン（TZD）薬 (骨格筋や肝臓のインスリン感受性を改善)	ピオグリタゾンなど
糖排泄促進薬	Na/グルコース共輸送体（SGLT2）阻害薬 (尿細管からの糖再吸収を阻害)	ダパグリフロジン、カナグリフロジンなど

第二節 糖尿病におけるインスリン抵抗性と標的臓器としての骨格筋

インスリン抵抗性改善薬は、急激なインスリン分泌による低血糖および膵疲弊のリスクを回避しうる作用機序であるため、比較的長期の血糖コントロールが可能な有望な薬剤である。たしかに、近年注目されているiPS細胞（induced pluripotent stem cell）を用いた再生医療の発達によって膵 β

細胞を自己複製させ、これまで不可逆的に進行していた糖尿病を寛解させる可能性はある。しかしその臨床的応用までには未だ長期間要するため、現段階の実際的治療法としてインスリン分泌促進薬やインスリン抵抗性改善薬などの抗糖尿病薬を選択する必要がある。とりわけ、インスリン抵抗性改善薬は先に述べた作用機序により、長期に渡る血糖コントロール、および低血糖リスクを低減しうる有望な薬剤である。

インスリン抵抗性改善薬である TZD 薬が実用に耐えうる薬効を発揮し、臨床で汎用されている主な理由は、骨格筋を標的臓器とするところが大きい。Fig. 18 に示すように、ヒトにおいて最大重量 (40%) を占める骨格筋は生体内で 7 割以上のグルコース消費を担っている²⁸⁾。2 型糖尿病患者においてその代謝速度は顕著に低下しているため、骨格筋に作用する新規インスリン抵抗性改善薬の開発は十分な薬効発現が期待できる。同時に、これがインスリンによる糖取込み機構や肥満によるインスリン抵抗性発症の分子機構の解明の一助となれば、糖尿病、メタボリックシンドロームとその合併症の予防法、治療法開発につながることも見込まれる。そこで私は、骨格筋をターゲットとした新規インスリン抵抗性改善薬の研究に着手することとした。

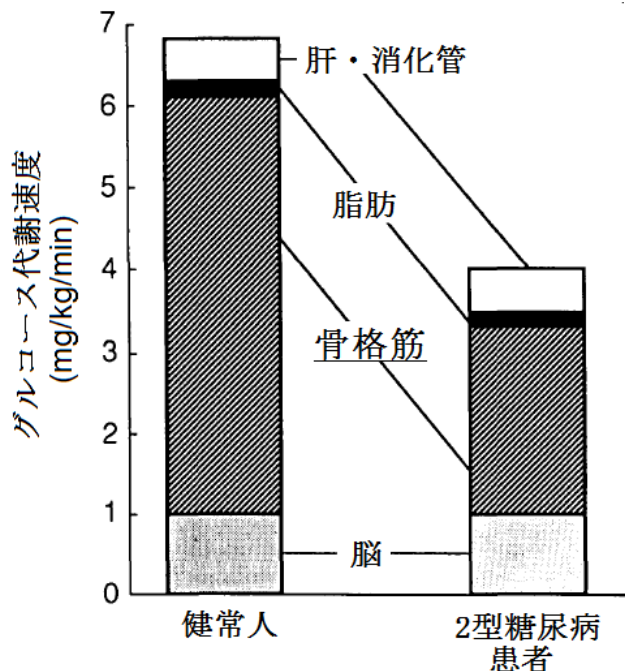


Figure 18. 骨格筋におけるインスリン抵抗性 (文献 28 を参照に作成).

第三節 Fatty acid transport protein 1 (FATP1) 阻害剤について

Fatty acid transport protein 1 (FATP1) は、骨格筋、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞や心臓に多く発現し、細胞内脂肪酸の初期代謝段階であるアシル-CoA 合成活性 (acyl-CoA synthase) を有する膜タンパクとして知られている (Fig. 19)^{29), 30)}。哺乳類において FATP は局在部位・基質の異なる 6 つの関連するタンパクファミリー (FATP1-6) を形成し、FATP4 の相同性が最も高く 64% である³¹⁾。一方、マウスとヒト間の FATP1 におけるゲノム相同性は比較的高く、89% である³²⁾。脂肪細胞分化の際、FATP1, FATP4 双方の発現が亢進する一方、FATP1 のみがインスリンシグナルに応答して細胞膜へ転座 (translocation) するため、FATP1 はホルモン制御による脂肪酸取り込みに関わっている可能性が考えられた。

FATP1 の主な役割は、インスリンシグナルに応答して血中の遊離長鎖脂肪酸 (free fatty acid, FFA)、具体的基質としてパルミチン酸、ステアリン酸、リグノセリン酸を細胞に取込むことである。これらは細胞内で対応するアシル-CoA 代謝物、さらに中性脂肪 (triglyceride, TG) へと変換されるため、FATP1 を介した脂肪酸取込みと TG 蓄積における機能的関連性が指摘されていた。加えて他の研究グループにより、高脂肪食下の FATP1 欠損型マウスが、筋肉中の糖取込み能の低下、および TG 蓄積への耐性を示すことが報告された³³⁾。これらの事実より、FATP1 阻害を介した骨格筋への脂肪酸取込みの抑制によって、TG 蓄積阻害ならびにインスリン抵抗性の改善作用が期待された。

以上の状況に鑑み、私は FATP 1 阻害剤の開発によって、新しい作用機序を有するインスリン抵抗性改善薬の創製を目指した。骨格筋はヒトにおける最大臓器であり、インスリン非依存的な糖取込みが可能な標的器官である一方、これまで骨格筋に直接作用しインスリン抵抗性を改善する薬剤は上市されていない。また、研究開始時点で FATP を標的とした合成研究は FATP4 阻害剤の *in vitro* 活性向上に関する報告一例のみであり³⁴⁾、本研究によってインスリン抵抗性改善発症メカニズムに関する新しい科学的知見も得られると考えられた。

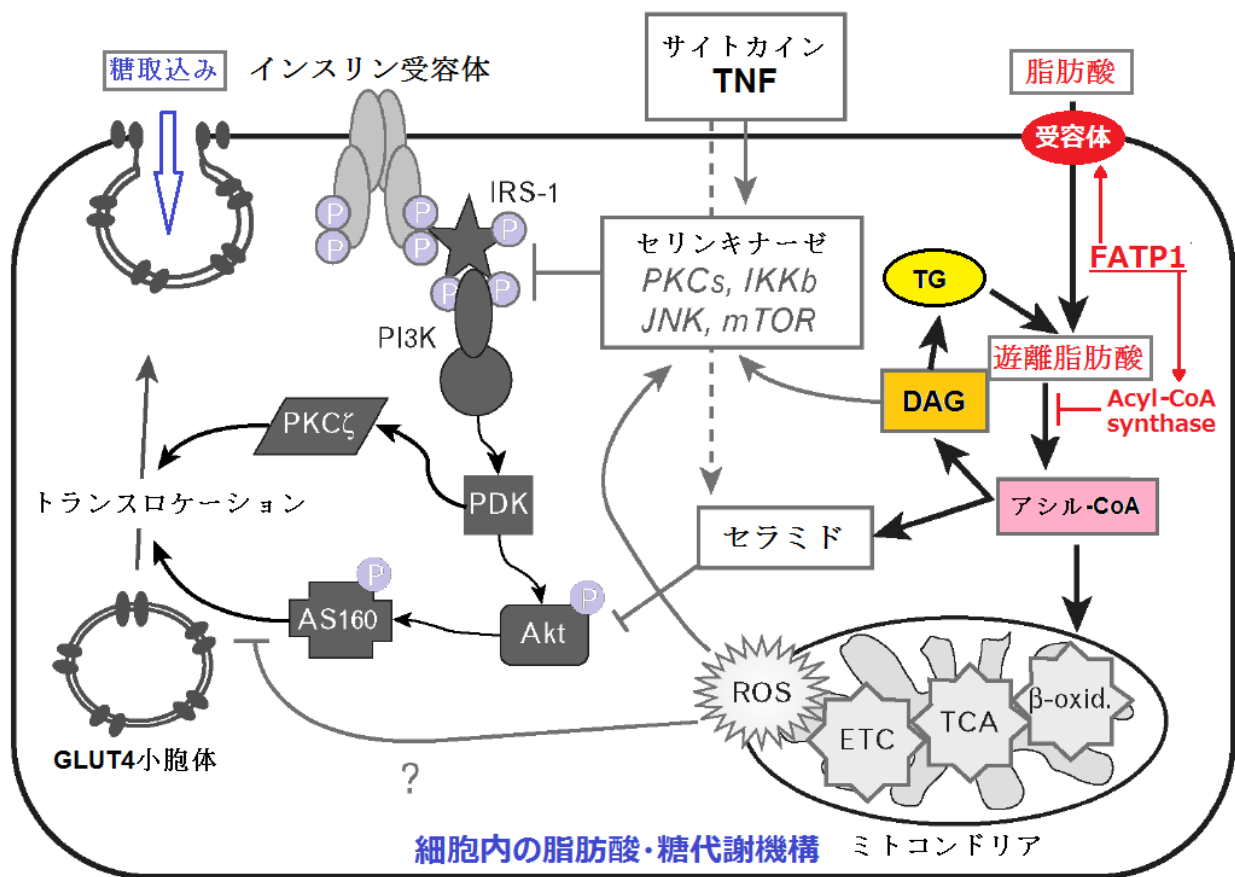


Figure 19. 骨格筋の細胞内における脂肪酸取込みとインスリン抵抗性の作用機序.
 (文献 30 を参考に作成, TG: triglyceride, DAG: diacylglycerol, CD36: cluster of differentiation 36)

第四節 本研究の概要

著者らの研究グループでは、自社 high throughput screening (HTS) の実施により得られたトリアゾール化合物 **38**, **39** およびアрилピペラジン化合物 **58**, **59** の二系統のヒット化合物の誘導体展開により、インスリン抵抗性改善作用を有する新規 FATP1 阻害剤の開発を行った (Fig. 20)。

本章では、糖尿病の現状とインスリン抵抗性、およびインスリン改善薬としての FATP1 阻害剤の創薬標的に関する有用性について述べた。

第二章では、脂溶性や代謝不安定性の改善を主眼とした誘導体展開により、エステル基回避の方策について述べる。またマウス *iv* 投与による代謝物解析によって判明したアミド部位の加水分解を回避したオキサゾール体 **54o**, **54p** を得ることで、ラット血中安定性を大幅に改善した。

第三章では、**54o**, **54p** の PK パラメーター (血中曝露) を改善した化合物を取得すべく、フェニルピペラジン構造を有するヒット化合物 **58**, **59** の合成展開について述べる。マウス PK 試験より、高活性化合物 **71a** は血中タンパク結合フリー体率 (PB free) が高く、血中に対する筋組織中濃度比率 (K_p _soleus) も良好であることから、マウス FATP1 IC_{50} 値以上のターゲット組織への十分な曝露が期待された。そこで代表化合物 **58**, **71a** を用い、マウス *in vivo* 試験 (TG 蓄積阻害評価) を FATP1 発現組織 (ヒラメ筋、腓腹筋、肝臓) にて実施した。これにより、FATP1 阻害による細胞内 TG 生成量に関わる生体内脂肪酸の輸送や代謝に対する影響を調べ、インスリン抵抗性改善薬の標的タンパクとしての FATP1 の有効性を検証した。

以下、各章にて本研究の内容を詳細に記述する。

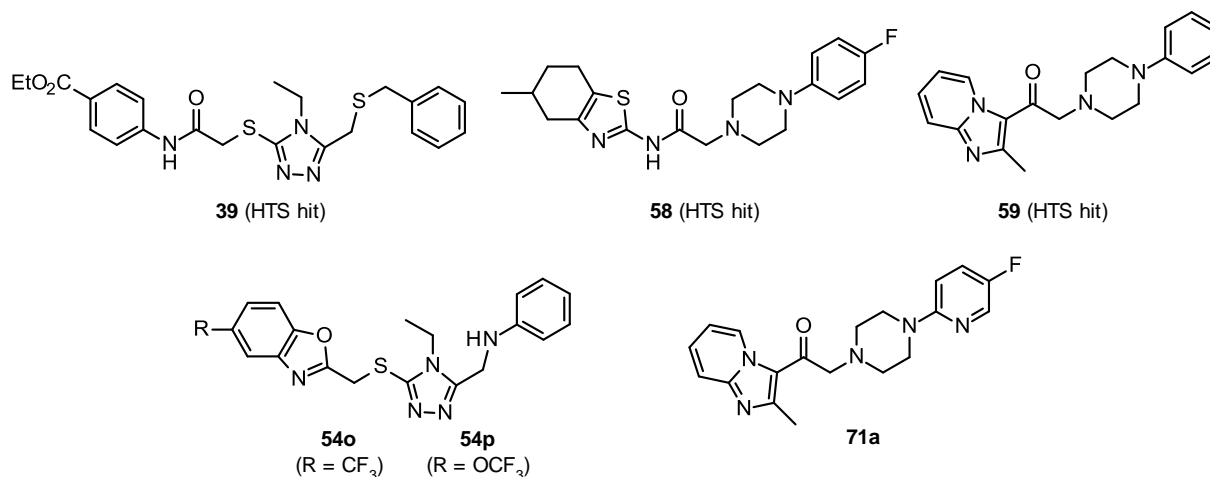


Figure 20. 自社 HTS ヒット化合物 **39**, **58**, **59** と本研究における主要化合物.

第二章 トリアゾール系化合物の合成探索

第一節 自社ヒット化合物 **38**, **39** をリードとしたトリアゾール誘導体の合成法

著者らの所属する社内化合物ライブラリーを用いた HTS を実施した結果、ヒト FATP1 の IC_{50} 値が μM オーダーを有する、比較的高活性のヒット化合物を複数取得した (Fig. 21)。FATP1 を介した細胞内遊離脂肪酸の移送はアシル-CoA 合成を経由するため、HTS において蛍光標識を用いたアッセイ系によってアシル-CoA 合成活性の阻害能を測定し、これらのヒット化合物を選抜した。

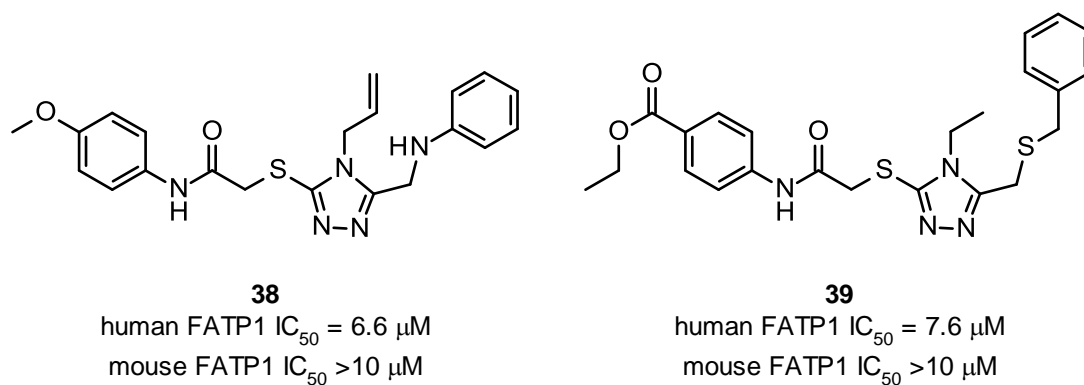
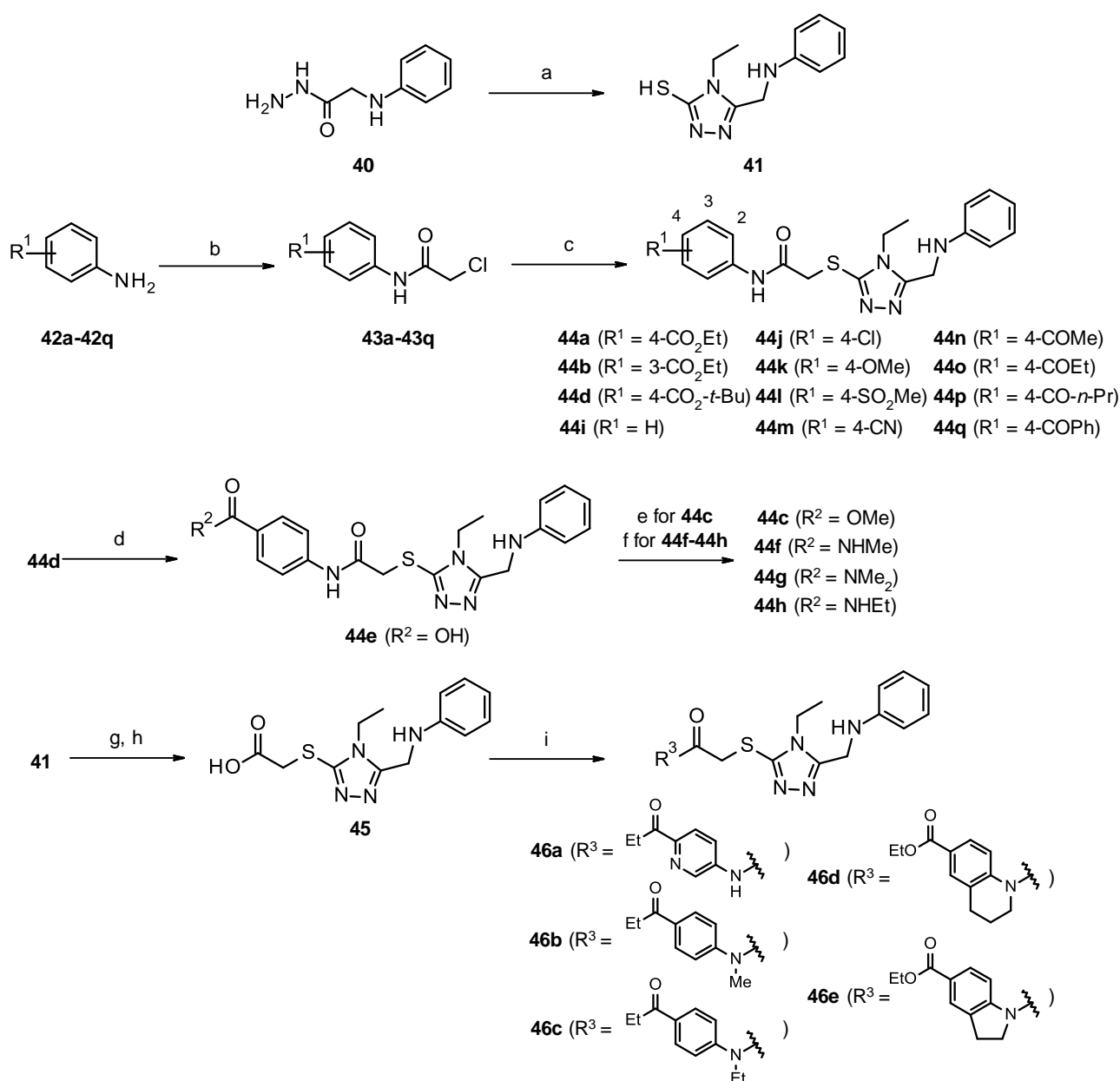


Figure 21. HTS により見出されたトリアゾール系化合物 **38**, **39**.

両化合物は特徴として分子中央部分にトリアゾール環を有しており、ヒト FATP1 阻害作用は中程度の活性を示したが、マウスにおいては $10 \mu\text{M}$ 以上の低活性であった。さらに、**38** のアリル基、**39** のチオベンジル基やエステル基、および分子中央部にアミド部位が存在することから、代謝不安定性が予想されたため、これらの官能基変換に着手した。各種化合物の合成法を以下に示す (Scheme 6)。

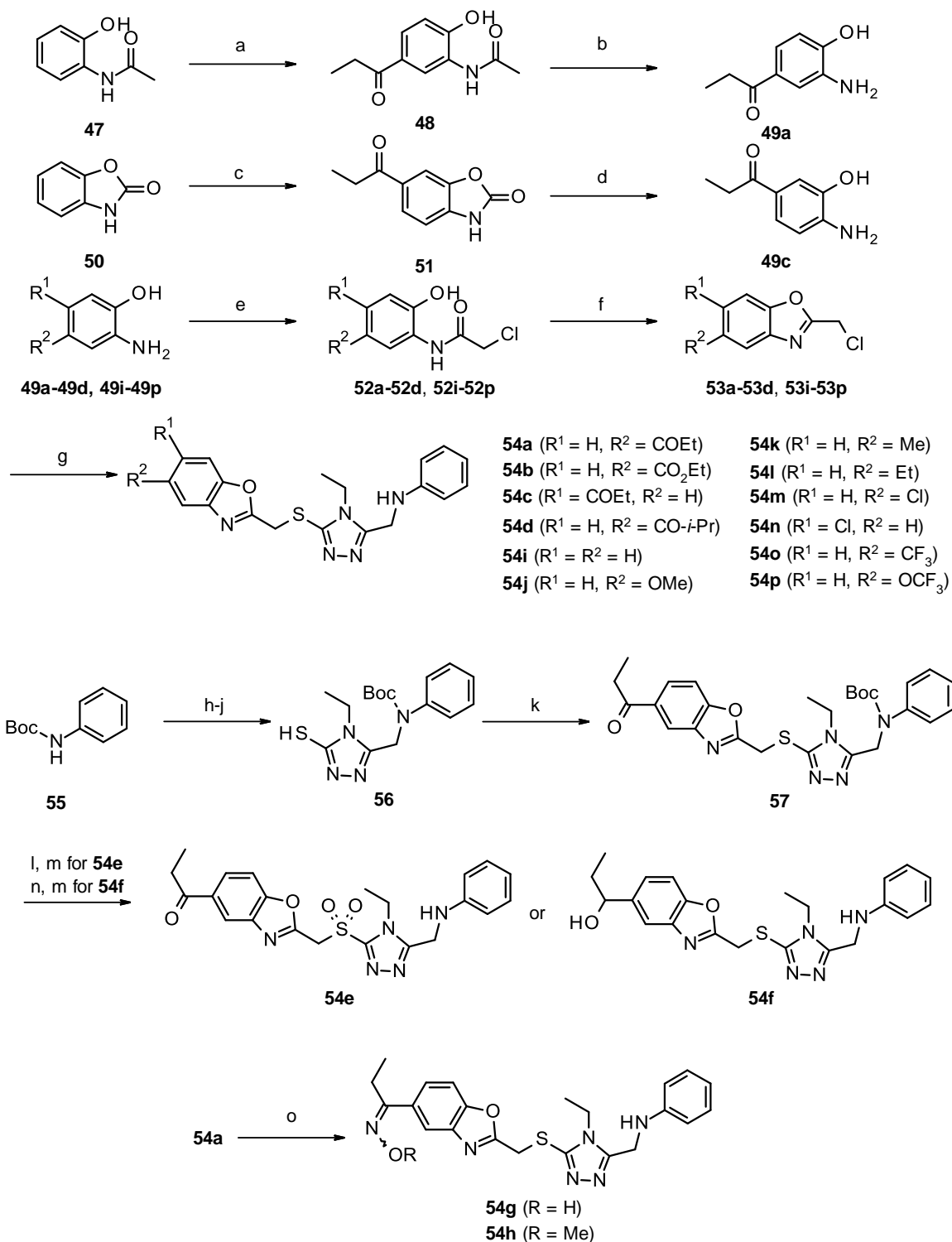


Scheme 6. Reagents and conditions: (a) EtNCS, NaOH, THF, H₂O, reflux, 84%; (b) chloroacetyl chloride, Et₃N, THF, rt; (c) **41**, AcONa, EtOH, reflux, 33–83%; (d) TFA, CH₂Cl₂, 68%; (e) MeI, K₂CO₃, DMF, rt, 23%; (f) corresponding amine, WSCI·HCl, HOBT·H₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 31–66%; (g) *tert*-butyl bromoacetate, AcONa, EtOH, reflux, 68%; (h) TFA, CH₂Cl₂, 53%; (i) corresponding amine, HATU, (*i*-Pr)₂NEt, CH₂Cl₂, 13–77%.

合成既知のヒドラジン **40** とエチルチオイソシアネートを塩基性条件下で還流させることにより、トリアゾール環を構築し中間体 **41** を得た³⁵⁾。一方、各種アニリン体 **42** を α -クロロ酢酸クロリドによって **43** へ導き、中間体 **41** との S_N2 反応によって効率的に **44a**, **44b**, **44d**, **44i–44q** を合成した。分子左末端部位のカルボニル基の変換に関しては、*tert*-ブチルエステル体 **44d** を酸性条件下で加水分解しカルボン酸 **44e** へ導き、エステル化によって **44c** を、また縮合剤 HATU と用いた各種アミ

ンとの縮合によりアミド体 **44f–44h** をそれぞれ得た。また左側部位へピリジン環を導入した **46a**、アミド部位を *N*-アルキル化した **46b, 46c**、および二環性のテトラヒドロキノリン **46d** やジヒドロインドール **46e** の合成については、予め酢酸ユニットを導入した中間体 **45** と市販の各種アミンとの縮合によって目的物を得た。

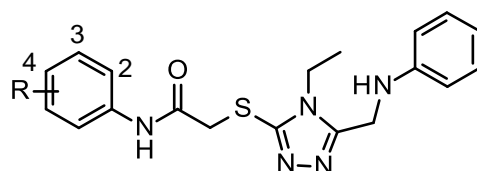
続いて、ベンズオキサゾール環を有するトリアゾール誘導体 **54a–54p** の合成方法を以下に示す (Scheme 7)。図中置換基 R^2 の位置 (5 位) にアシル基を有する **49a** については、市販の 2-acetylamino-phenol (**47**) を Lewis 酸 ($AlCl_3$) 存在下 Friedel–Crafts アシル化を行い、脱アセチル化反応によって得た。置換基 R^1 の位置 (4 位) にアシル基を有する **49c** は、3*H*-1,3-benzoxazol-2-one (**50**) に対しポリリン酸を用いた Friedel–Crafts アシル化、続く N 原子上の脱アシル化反応によって得た。各種ヒドロキシフェノール体 **49a–49d, 49i–49p** を α -クロロ酢酸クロリドでアシル化して **52a–52d, 52i–52p** を得た後、*p*-トルエンスルホン酸ピリジニウムを酸触媒として加熱還流させることで環化させ、ベンズオキサゾール **53a–53d, 53i–53p** を合成した。これをチオール中間体 **41** と S_N2 反応によって連結し、所望の目的物 **54a–54d, 54i–54p** を得た。スルホン体 **54e** およびアルコール体 **54f** に関しては、**54a** からの酸化または還元反応条件下で右側アニリン部位の分解が見られたため、Boc 基保護されたアニリン **55** を出発物質とした。**55** を S_N2 反応による酢酸エステル部位の導入、ヒドラジド化、続くトリアゾール環化によって **56** へと導いた。従来と同様に *S*-アルキル化によって 5 位にエチルケトン部位を有するベンズオキサゾール **57** を合成し、それぞれメタクロロ過安息香酸を用いたスルフィド酸化または $NaBH_4$ を用いたカルボニル還元反応後、最後に Boc 基を脱保護することで **54e, 54f** を得た。オキシム体 **54g, 54h** については、**54a** のカルボニル基とヒドロキシルアミン、または *O*-メチルヒドロキシルアミンと脱水縮合することで得られた。



Scheme 7. Reagents and conditions: (a) propionyl chloride, $AlCl_3$, DMF, 80 °C, 37%; (b) 10 N HCl, 100 °C, 79%; (c) propionic acid, polyphosphoric acid, 90 °C, 15%; (d) 10 N aq. NaOH, reflux, 50%; (e) chloroacetyl chloride, Et_3N , THF, 22–71%; (f) PPTS, xylene, 150 °C, 52–80%; (g) **41**, AcONa, EtOH, reflux, 43–93%; (h) methyl bromoacetate, NaO-*t*-Bu, THF, 46%; (i) hydrazine monohydrate, EtOH, reflux, 91%; (j) EtNCS, NaOH, THF, H_2O , 60 °C, 52%; (k) **53a**, AcONa, EtOH, reflux, 76%; (l) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , 73%; (m) 4 N HCl/AcOEt, 61–84%; (n) $NaBH_4$, MeOH, 0 °C, 98%; (o) hydroxylamine HCl salt or *O*-methyl hydroxylamine, AcONa, EtOH, 80 °C, 80–87%.

第二節 自社ヒット化合物 38, 39 をリードとしたトリアゾール誘導体の生物学的評価

本章の第一節において合成した化合物について、ヒト/マウス FATP1 阻害活性の *in vitro* アッセイを行った (Table 15)。まず、ヒット化合物 39 の分子右側部分のベンジルチオ基を、ヒット化合物 38 の持つアニリノ体 44a へ変換したところ、ヒトおよびマウスで FATP1 阻害活性が 10 倍以上向上した。代謝不安定が予想される左側エステル基を除去するため、フェニル環上置換基の官能基変換を行った。メタ位エステル置換体 44b で活性が減弱した。一方、パラ位エチルエステルをメチルエステル、*tert*-ブチルエステル、カルボン酸へ変換したが、いずれの活性も低下した (44c-44e)。次にアルキルアミド基への展開も行ったが、44f-44h すべて活性を消失した。続いてエステル基を H, Cl 原子、メトキシ基またはメシル基へ置換したが、活性は消失した (44i-44l)。一方、シアノ基置換体 44m において若干のマウス活性を示した。次にエステルに構造が類似した、種々の長さを有するアルキルケトン 44n-44q を合成したところ、44o, 44p で良好な活性を示し、ヒト/マウス共に 10 倍程度の活性向上を確認した。ただし、フェニルケトン体 44q の場合、活性は消失した。

Table 15. IC₅₀ values of FATP1 inhibitors **38**, **39**, and **44a–44q**.

Compound	R	Human FATP1 IC ₅₀ ^a (μM)	Mouse FATP1 IC ₅₀ ^a (μM)
38 (HTS hit)		6.6	>10
39 (HTS hit)		7.6	>10
44a	4-CO ₂ Et	0.33	1.1
44b	3-CO ₂ Et	>1	2.9
44c	4-CO ₂ Me	0.54	ND ^b
44d	4-CO ₂ - <i>t</i> -Bu	>1	>10
44e	4-CO ₂ H	>1	>10
44f	4-CONHMe	>1	>10
44g	4-CONMe ₂	>1	>10
44h	4-CONHEt	>1	>10
44i	H	>1	>10
44j	4-Cl	>1	>10
44k	4-OMe	>1	>10
44l	4-SO ₂ Me	>1	>10
44m	4-CN	>1	5.1
44n	4-COMe	>1	ND ^b
44o	4-COEt	0.40	1.0
44p	4-CO- <i>n</i> -Pr	0.23	1.1
44q	4-COPh	>1	>10

^a Inhibition of recombinant human or mouse acyl-CoA synthetase activity of FATP1. The IC₅₀ values represent the average of at least *n* = 2.

^b Not determined.

以上より得られた高活性化合物 **44o** のクリアランスをマウス *iv* 投与によって測定したところ非常に高値を示し、血中における低代謝安定性を示唆した。さらに LC-MS/MS を用いたマウス代謝物解析により、化合物 **44o** は *iv* 投与 5 分後には代謝によって血中から完全に消失し、アミド部位が切断された主代謝物 **M1**、およびケトン部位が還元された副代謝物 **M2** に変換されていることが判明した (Fig. 22)。そこで私は、この代謝不安定なアミド部位およびケトン部位回避を志向した

誘導体展開を行うと同時に、ラット血液を用いて2時間インキュベーション後の化合物残存率 (rat blood stability (%)) を指標とし、血液安定性の改善を試みた。

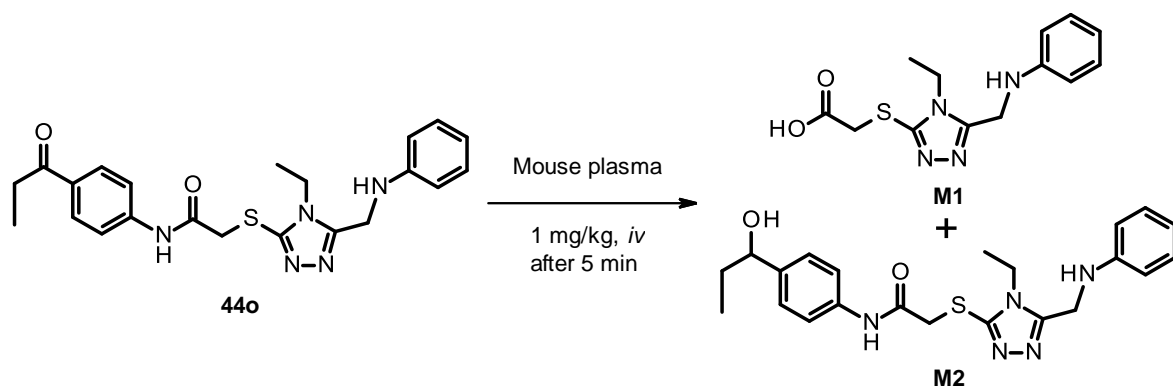


Figure 22. マウス *iv* 投与を用いた化合物 **44o** の代謝物解析と代謝部位の同定.

Table 16. IC₅₀ values of FATP1 inhibitors **44o**, **46a–46e**, and **54a–54b**.

Compound	R	Human FATP1 IC ₅₀ (μM)	Mouse FATP1 IC ₅₀ (μM)	Blood stability ^a (%)
44o		0.40	1.0	28
46a		0.40	1.5	ND ^b
46b		0.58	2.0	1.9
46c		>1	>10	ND ^b
46d		>1	2.9	ND ^b
46e		>1	>10	ND ^b
54a		0.19	0.36	8.9
54b		0.68	0.84	0

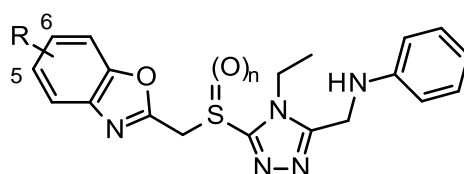
^a Remaining (%) of the test compound after 2 hour incubation with rat blood.

^b Not determined.

血中代謝安定性向上を志向した誘導体展開の結果を Table 16 に示す。化合物 **44o** はラット血中安定性が 28%と低値を示した。脂溶性低下を目指しピリジン環を導入した **46a** ではマウス活性がやや低下し、*N*-メチル体 **46b** で若干低下、*N*-エチル体 **46c** は活性消失であった。**46b** では立体障害によるアミド部位の加水分解回避を期待したが、血液安定性はむしろ劇的に低下した。*N*-メチル体で活性を維持したため、分子内縮環による活性・安定性向上を志向し、二環性のテトラヒドロキノリン **46d** やジヒドロインドール **46e** を合成したが、活性は消失した。なお、**46d**, **46e** がエステル基を有しているのは試薬入手性のためである。異なる縮環パターンとして、アミド部位のカルボニル酸素とベンゼン環を連結したベンズオキサゾール **54a** を合成したところ、血中安定性は改善しなかったものの (8.9%)、マウス・ヒト共に 3 倍程度の活性向上が見られた。エステル体 **54b** ではさらに安定性が悪化したことから、**54a** のケトン部位が低血中安定性の原因構造と推定し、この官能基の更なる構造最適化に着手した。

ベンズオキサゾール環上カルボニル部位を置換した誘導体展開の *in vitro* 活性評価結果を Table 17 に示す。エチルケトン部位の位置異性体である **54c**、およびイソプロピルケトン **54d** では代謝安定性は向上したものの、活性は低下した。このようにベンズオキサゾール環上の置換基の位置・嵩高さによって血液安定性が大きく変動することから、この部位の最適化によって活性・安定性を両立した化合物取得への期待が高まった。酸化的代謝を受けると考えられた S 原子をスルホニル基に変換した **54e** は活性・安定性ともに改善しなかった。一方、**54a** のマウス代謝物解析を再度行い、依然としてカルボニル部位の還元が見られたことから、予めその部位を還元したアルコール **54f** を合成すると安定性は改善したが、活性は 10 倍以上低下した。次なるケトン部位の変換としてオキシム **54g** を合成したところ、幸運にも活性を維持しながら血中安定性が 100%まで向上した。オキシム部位をメチル化した **54h** で活性消失することから、この近傍に極性的相互作用を持つファーマコフォアの存在が示唆された。ベンゼン環を無置換にした **54i** では完全に活性が消失する一方、5 位置換基の脂溶性を増大させるに従って、マウス活性も改善傾向にあることが判明した (**54i**–**54l**, **54o**)。 **54m** と **54n** の比較から 6 位より 5 位置換体が高活性であり、また **54j** と **54k** の比較から酸素原子の挿入が活性向上に寄与していたことから、トリフルオロメトキシ基を導入した **54p** を合成した。**54p** はヒト/マウス両方において、最も良好な IC₅₀ 値を示すことが明らかとなった。

Table 17. IC₅₀ values of FATP1 inhibitors **54a–54p**.



Compd	R	n	Human FATP1 IC ₅₀ (μM)	Mouse FATP1 IC ₅₀ (μM)	Blood stability ^a (%)
54a	5-COEt	0	0.19	0.36	8.9
54b	5-CO ₂ Et	0	0.68	0.84	0
54c	6-COEt	0	0.90	1.2	35
54d	5-CO- <i>i</i> -Pr	0	0.60	0.52	42
54e	5-COEt	2	1.67	>10	44
54f	5-CH(OH)Et	0	>1	3.7	80
54g	5-C(=NHOH)Et	0	0.26	0.20	100
54h	5-C(=NHOMe)Et	0	>1	>10	ND ^b
54i	H	0	>1	>10	ND ^b
54j	5-OMe	0	>1	2.7	ND ^b
54k	5-Me	0	>1	>10	ND ^b
54l	5-Et	0	>1	1.8	ND ^b
54m	5-Cl	0	>1	2.3	92
54n	6-Cl	0	>1	5.4	ND ^b
54o	5-CF ₃	0	0.36	0.36	ND ^b
54p	5-OCF ₃	0	0.10	0.091	100

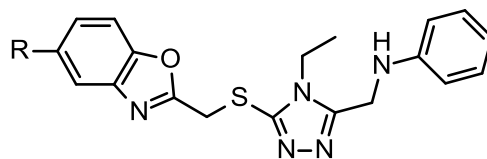
^a Remaining (%) of the test compound after 2 hour incubation with rat blood.

^b Not determined.

化合物が十分な血中曝露を有しているかを評価するため、これまでの代表化合物としてベンズオキサゾール体 **54a**, **54o** および **54p** を選抜し、ラット PK 試験を行った (Table 18)。ケトン部位を有する **54a** では極めて大きなクリアランスを示したが (Cl_{mouse} = 378 mL/min/kg)、これを回避した **54o**, **54p** では大幅な改善傾向が見られた。同様に、**54a** では経口投与後、ラットの血中で検出限界以下の血中曝露 (C_{max}, AUC) であったのに対し、**54o**, **54p** では顕著な改善傾向が見られた。一方、**54o**, **54p** 共に生物学的利用率 (BA (%)) は比較的低値を示しており、これは分子のもつ高い脂溶性 (Log D_{7.4}) に起因しているものと考えられる。実際、**54p** のマウス肝ミクロソーム存在下の代謝安定性 (MS_{mouse}) を測定したところ、インキュベーション 30 分後残存率が 0.2% と極めて低値であり、タンパク結合フリー体率 (PB free_{rat}) も 2.9% であった。したがって、本研究の目標である ‘FATP1 IC₅₀ 値以上の血中 (筋中) への化合物曝露による *in vivo* 薬効の確認’ の観点か

ら、トリアゾール系統化合物 **54o**, **54p** は FATP1 活性の種差改善は達成したものの、PK プロファイルは未だ不十分であり、物性改善に向けた大幅な脂溶性低下が必須であると考えられた。

Table 18. Rat PK parameters of **54a**, **54o**, and **54p**.



Compd	Log D _{7.4}	T _{max} ^a (hr)	C _{max} ^a (μg/mL)	AUC ^a (hr*μg/mL)	T _{1/2} ^a (hr)	Cl ^b (mL/min/kg)	Vd ^b (L/kg)	BA (%)
54a (R = COEt)	3.1	LOQ ^c	LOQ ^c	LOQ ^c	LOQ ^c	378	2.69	ND
54o (R = CF ₃)	ND	0.33	0.22	0.28	1.23	56.0	1.86	9.2
54p (R = OCF ₃)	4.3	0.33	0.19	0.20	1.02	52.0	1.73	5.4

^a Average of two rats dosed at 10 mg/kg *po* in DMA/PG/(20% HPβCD/saline): 10/10/80.

^b Average of two rats dosed at 1 mg/kg *iv* in DMA/PG/(20% HPβCD/saline): 10/10/80.

^c Under limit of quantification.

第三節 小括

本章では、自社化合物ライブラリーの HTS を通じて得たトリアゾール環を有するヒット化合物 **38**, **39** をリード化合物とし、ヒト/マウス双方で高い FATP1 阻害活性を示す化合物 **54o**, **54p** を獲得した (Fig. 23)。**39** の代謝的不安定な構造を除去するため、左側ベンゼン環上のエステル基をエチルケトンに変換した **44o** にて 10 倍以上の活性改善が見られたが、iv 投与におけるマウス代謝物解析でアミド/ケトン部位の分解が判明した。そこでアミド部位回避のため、種々分子内縮環を検討しベンズオキサゾール **54a** が高い活性を持つことを見出した。**54a** のラット血中安定性が不十分であったため、ケトン部位の構造最適化により、ベンズオキサゾール環上 5 位にトリフルオロメチルまたはトリフルオロメトキシ基を有する高活性化合物 **54o**, **54p** を得た。両化合物はラット PK 試験によって、血中曝露やクリアランスなどの各種動態パラメーターの改善が見られたものの、依然として高脂溶性に起因する低い肝ミクロソーム代謝安定性や低タンパク結合フリー体率を示した。これらの知見から、標的 FATP1 が発現しているとされる血中および筋組織中に対し、十分な化合物曝露を与えるためには、脂溶性低減などによる更なる物性/動態プロファイル改善の必要性が明らかとなった。

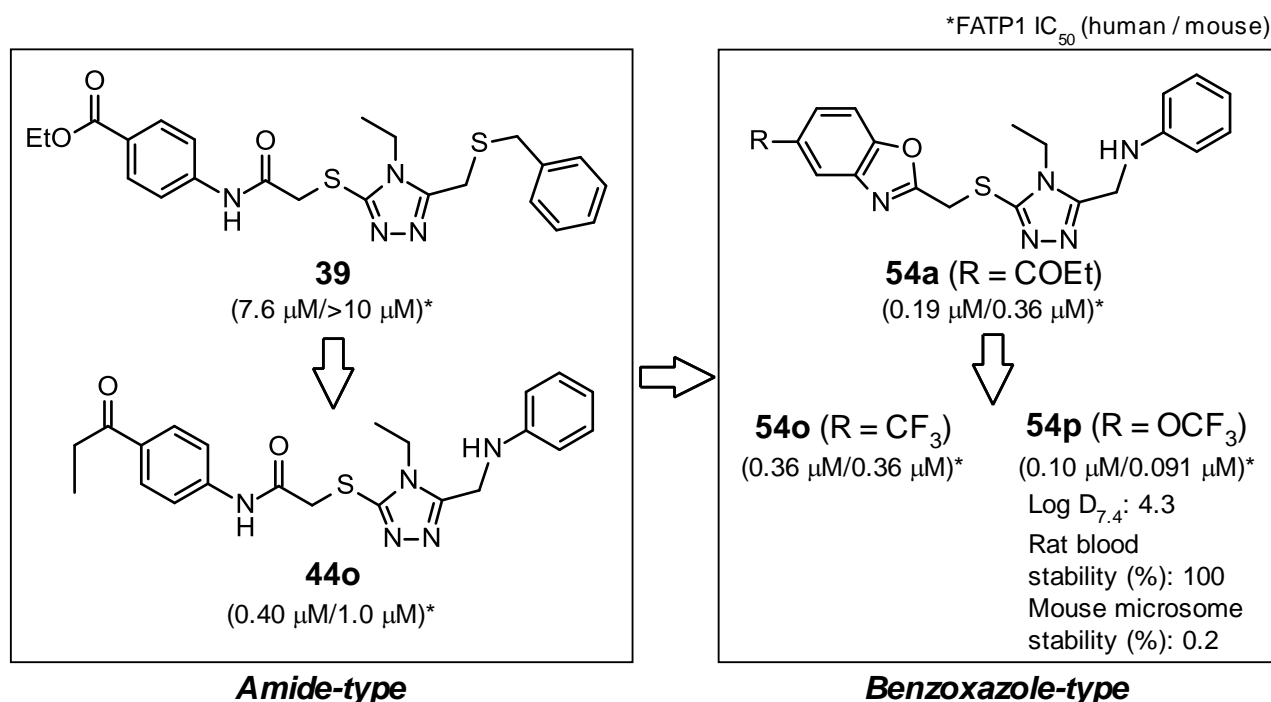


Figure 23. トリアゾール環を有する FATP1 阻害剤の誘導体展開.

第三章 フェニルピペラジン系化合物の合成探索

第一節 HTS ヒット化合物 58, 59 をリードとしたフェニルピペラジン誘導体の合成法

第二章の合成展開によって見出したトリアゾール化合物 **54o**, **54p** は高活性であるものの、依然として肝ミクロソーム中の代謝安定性が著しく低く、大幅な物性/PK パラメーター改善が必要であった。そこで私は、HTS で見出されたフェニルピペラジン骨格を有するヒット化合物である **58**, **59** に着目し、誘導体展開を行うことにした (Fig. 24)。

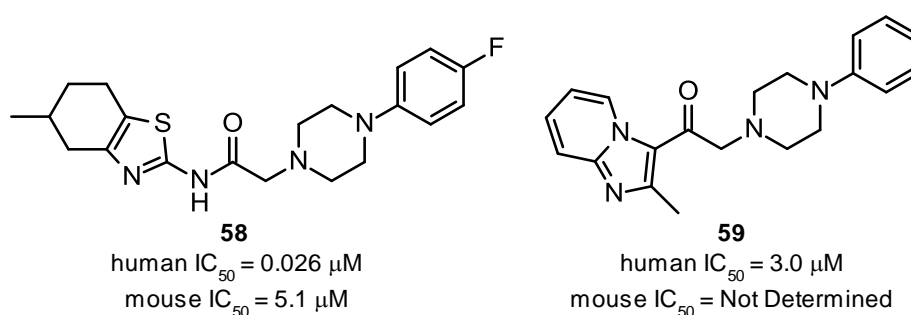
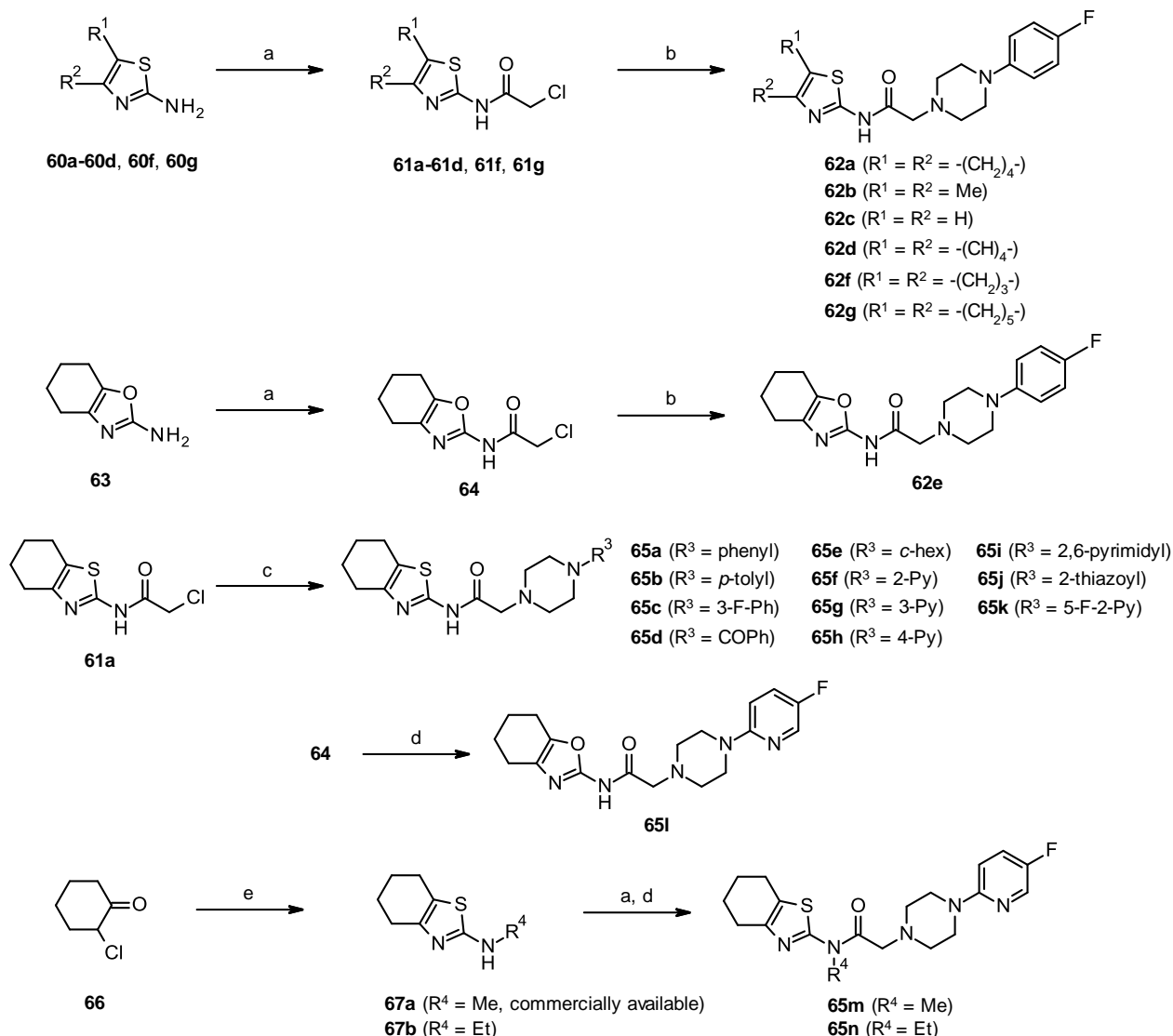


Figure 24. HTS により見出されたフェニルピペラジン系化合物 **58**, **59**.

まず初めに、ヒト FATP1 阻害活性が非常に高いヒット化合物 **58** (hFATP1 IC₅₀ = 26 nM) の誘導体展開に着手した (Scheme 8)。具体的には、**58** の持つ高脂溶性のシクロヘキサン部位が低代謝安定性につながると考え、まずは脂溶性低減を志向した誘導体合成を行った。

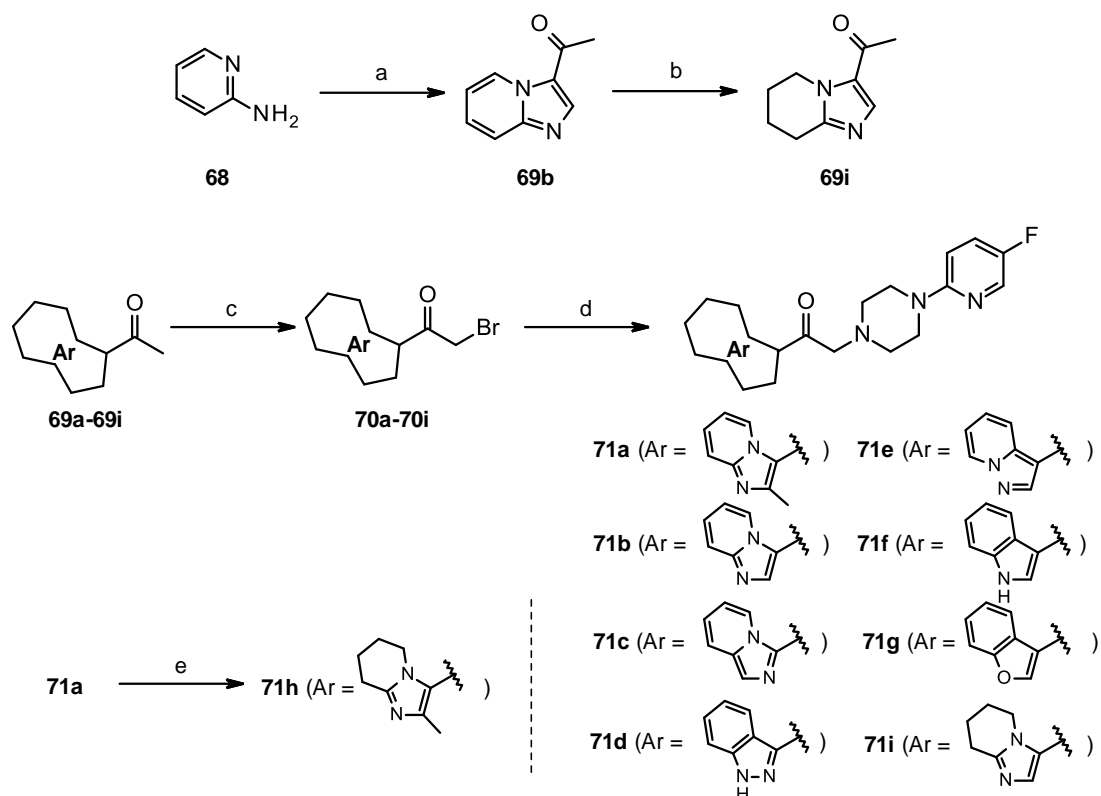
化合物 **62a–62g** は効率的な 2 段階合成で調製した。チアゾール **60a–60d**, **60f**, **60g** またはオキサゾールアミン **63** を既知の方法で合成後³⁶⁾、 α -クロロ酢酸クロリドによるアシル化によって **61a–61d**, **61f**, **61g**, **64** を合成し、(4-fluorophenyl)piperazine による S_N2 反応によって目的物 **62a–62g** を与えた。分子右側に種々置換基を有する **65a–65l** は、まず各種ピペラジンを市販または既知の合成法で別途準備し、 α -クロロ体 **61a** または **64** と S_N2 反応を行うことで得られた。*N*-アルキル化した誘導体 **65m**, **65n** は、クロロシクロヘキサノン (**66**) を *N*-エチルチオウレアとエタノール中還流させて縮合環化させ、*N*-エチルチアゾールアミン **67b** とした。なお、**67a** は市販化合物を用いた。その後、1-(5-fluoropyridin-2-yl)piperazine との S_N2 反応によって目的物を取得した。



Scheme 8. Reagents and conditions: (a) chloroacetyl chloride, Et_3N , THF; (b) 4-fluorophenyl piperazine, KI, DMF or THF, 80 °C, 7–78% (2 steps); (c) aryl- or alkyl-piperazine, KI, DMF, 80 °C, 16–75%; (d) 1-(5-fluoropyridin-2-yl)piperazine, Et_3N , DMF, 80 or 90 °C, 13–45%; (e) *N*-ethyl thiourea, EtOH, reflux, 61%.

次に、イミダゾピリジン環を左側に有するヒット化合物 **59** の各種誘導体 **71a–71i** の合成法を以下に示す (Scheme 9)。化合物 **71a**, **71c–71g** は、対応する合成既知もしくは市販のアリールアシル体 **69a**, **69c–69g** を出発物質として用いた³⁷⁾。これらを 25% 臭化水素酸/酢酸を溶媒に用いてブロモ化し、続く 1-(5-fluoropyridin-2-yl)piperazine dihydrochloride を S_N2 反応で付加させることで合成した。**71b** に関しては、市販の 2-アミノピリジン (**68**) を *N,N*-ジメチルホルムアミド/ジメチルアセタール、ブロモアセトンと混合し、トルエン中還流させることでイミダゾピリジン **69b** へと環化し、上記と同様にブロモ化後、ピペラジン体との S_N2 反応によって得た。部分的飽和化した芳香環を持つ **71h** については、**71a** に対し 10% Pd-C 触媒を用い、酸性条件下水素添加することで少量ながら

目的物を得た。71i については収量を改善するため、69b を塩酸/エタノール溶媒、中圧条件下での水素添加反応によって予め部分的飽和化した 69i へと変換後、同様にブロモ化、ピペラジン体との S_N2 反応によって良好な収率で最終体へと導いた。

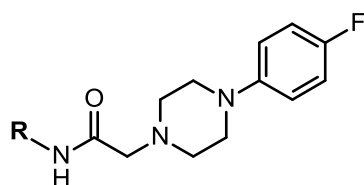


Scheme 9. Reagents and conditions: (a) *N,N*-dimethylformamide dimethylacetal, toluene, 80 °C, then bromoacetone, EtOH, reflux, 18%; (b) H₂ (50 psi), 10% Pd-C, 1 N HCl/EtOH, 59%; (c) bromine, 25% HBr/AcOH, 96–100%; (d) 1-(5-fluoropyridin-2-yl)piperazine dihydrochloride, Et₃N, DMF or THF, 8–51%; (e) H₂, 10% Pd-C, 4 N HCl/AcOEt, 1.4%.

第二節 HTS ヒット化合物 58, 59 をリードとしたフェニルピペラジン誘導体の生物学的評価

本章の第一節において合成した化合物について、ヒト/マウス FATP1 阻害活性の *in vitro* アッセイを行った (Table 19)。シクロヘキサン環上のメチル基を除去した **62a** では活性を維持しつつ、脂溶性低下と代謝安定性向上が見られた。ジメチル体 **62b** ではヒト FATP1 活性が 5 倍減弱し、チアゾール体 **62c** では完全に活性消失した。一方、ベンズチアゾール **62d** はヒトで若干の活性保持 (hFATP1 IC₅₀ = 0.49 μM) に留まったことから、分子左側部分として二環性芳香環かつシクロアルキル基が活性発現に重要であることが判明した。**62a** の S 原子を O 原子で置換したテトラヒドロベンズオキサゾール **62e** ではマウス活性が 2 倍程度低下したが、脂溶性低下および若干の代謝安定性向上が見られた。**62a** と比較して、5 員環誘導体 **62f** では大幅活性減弱し、7 員環誘導体 **62g** では脂溶性増大に伴いマウス活性は 2 倍向上、ヒト活性は減弱した。以上の結果より、この部位の置換基としてテトラヒドロベンズチアゾール **62a** が最適であることが明らかとなった。

Table 19. IC₅₀ values of FATP1 inhibitors **58** and **62a–62g**.



Compd	R	Human FATP1 IC ₅₀ (μM) ^a	Mouse FATP1 IC ₅₀ (μM) ^a	Log D _{7.4} ^b	MS (%) ^c
58 (HTS hit)		0.026	5.1	5.1	30
62a		0.077	4.0	4.5	42
62b		0.43	1.7	3.7	56
62c		>1.0	>10	2.8	ND ^d
62d		0.49	>10	4.4	ND ^d
62e		0.18	5.4	3.0	53
62f		0.49	>10	4.0	ND ^d
62g		0.12	2.0	5.0	ND ^d

^a Inhibition of recombinant human or mouse acyl-CoA synthetase activity of FATP1. The IC₅₀ values represent the average of at least $n = 2$.

^b The distribution coefficients (Log D_{7.4}) were measured between 1-octanol and phosphate buffered saline (pH = 7.4).

^c Remaining (%) of the test compound after 0.5-h incubation with mouse liver microsome.

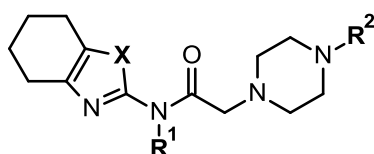
^d Not determined.

次に **62a** の右側側鎖の誘導体展開を行った (Table 20)。**62a** の 4-フルオロ基を除去した **65a** およびメチル基に置換した **65b**、および 3-フルオロ基を持つ **65c** でいずれもヒト/マウス FATP1 活性が減少したため、4-フルオロフェニル基が活性発現に適している。アシルリンカーを介した **65d**、シクロヘキシル体 **65e** では活性が消失した。さらなる FATP1 阻害活性と代謝安定性向上を目指し、ベンゼン環のヘテロアリアル環への置換を実施した。N 原子の位置の異なるピリジン環を有する **65f–65h** においては、2-ピリジン体 **65f** が最も良好な活性を示した一方、ピリミジン **65i**、チアゾール **65j** で大幅に活性減弱した。以上の知見を組合せた 4-フルオロ-2-ピリジル基を導入した **65k** では、ヒト/マウスにおいてこれまでで最高活性を示すと共に、代謝安定性も改善した (**65k**: h/m FATP1 IC₅₀ = 46 nM / 600 nM, MS_{mouse} = 63%)。一方でテトラヒドロベンズオキサゾール **65l** では脂溶性低下 (Log D_{7.4} = 2.7) に伴う代謝安定性改善は見られなかった。続いて **65k** のアミド部位

を *N*-アルキル化することで立体障害を増大させた **65m**, **65n** を合成した。*N*-メチル体 **65m** では活性維持したが代謝安定性は改善せず、**65n** では活性を消失した。

もう一つのフェニルピペラジン系ヒット化合物であり、左側側鎖にイミダゾピリジン環を有する **59** の構造活性相関を示す (Table 21)。**59** および **65k** の構造類似性から、右側側鎖へ 4-フルオロ-2-ピリジル基を **59** へ導入したところ、予想通り **71a** は劇的なヒト/マウス FATP1 阻害活性の改善を示し、**65k** と比較しても良好な脂溶性を与えた (**71a**: h/m FATP1 IC₅₀ = 430 nM / 390 nM, Log D_{7.4} = 2.8)。メチル基を除去した **71b** ではさらなる活性向上と Log D_{7.4} 低下が見られ、マウス代謝安定性は 98% という顕著な改善傾向を示した。イミダゾピリジン環上の N 原子配置を変換した誘導体 **71c-71e** を合成したが、ピラゾロピリジン **71e** で若干の活性維持に留まった。インドール **71f** は活性を消失し、ベンゾフラン **71g** ではヒト FATP1 阻害活性は維持したものの、マウスで減弱かつ高脂溶性を示した。続いて、チアゾール系化合物 **65k** の左側側鎖の構造活性相関を参考にし、芳香環を部分的飽和化したテトラヒドロイミダゾピリジン **71h** を合成したところ、**71a** に対しヒト阻害活性の向上と脂溶性低減が見られた。メチル基を除去した **71i** では脂溶性を増すこと無く、本系統で最高の FATP1 阻害活性を示した (**71i**: h/m FATP1 IC₅₀ = 0.10 μM / 0.16 μM, Log D_{7.4} = 2.1)。

Table 20. IC₅₀ values of FATP1 inhibitors **62a**, and **65a–65n**.



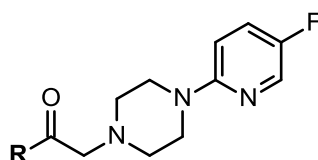
Compd	X	R ¹	R ²	Human FATP1 IC ₅₀ (μM) ^a	Mouse FATP1 IC ₅₀ (μM) ^a	Log D _{7.4} ^b	MS (%) ^c
62a	S	H		0.077	4.0	4.5	42
65a	S	H		0.28	9.0	4.3	ND ^d
65b	S	H		0.25	>10	4.8	ND ^d
65c	S	H		>1.0	>10	ND ^d	ND ^d
65d	S	H		>1.0	>10	2.1	ND ^d
65e	S	H		>1.0	>10	3.0	ND ^d
65f	S	H		0.20	4.9	3.9	ND ^d
65g	S	H		>1.0	>10	3.3	ND ^d
65h	S	H		>1.0	>10	2.0	ND ^d
65i	S	H		>1.0	>10	3.7	ND ^d
65j	S	H		0.52	7.9	3.8	ND ^d
65k	S	H		0.046	0.60	4.1	63
65l	O	H		0.10	1.7	2.7	63
65m	S	Me		0.041	0.62	3.9	65
65n	S	Et		0.78	>10	ND ^d	ND ^d

^a Inhibition of recombinant human or mouse acyl-CoA synthetase activity of FATP1. The IC₅₀ values represent the average of at least $n = 2$.

^b The distribution coefficients (Log D_{7.4}) were measured between 1-octanol and phosphate buffered saline (pH = 7.4).

^c Remaining (%) of the test compound after 0.5 h incubation with mouse liver microsomes.

^d Not determined.

Table 21. IC₅₀ values of FATP1 inhibitors **59**, **65k**, and **71a–71i**.

Compd.	R	Human FATP1 IC ₅₀ (μ M) ^a	Mouse FATP1 IC ₅₀ (μ M) ^a	Log D _{7.4} ^b	MS (%) ^c
59 (HTS hit)		3.0	ND ^d	ND ^d	ND ^d
65k		0.046	0.60	4.1	63
71a		0.43	0.39	2.8	52
71b		0.13	0.29	2.5	98
71c		>1	>10	ND ^d	ND ^d
71d		>1	>10	2.8	ND ^d
71e		0.33	1.1	2.5	84
71f		>1	>10	ND ^d	ND ^d
71g		0.47	1.9	3.9	76
71h		0.19	0.40	2.5	55
71i		0.10	0.16	2.1	86

^a Inhibition of recombinant human or mouse acyl-CoA synthetase activity of FATP1. The IC₅₀ values represent the average of at least $n = 2$.

^b The distribution coefficients (Log D_{7.4}) were measured between 1-octanol and phosphate buffered saline (pH = 7.4).

^c Remaining (%) of the test compound after 0.5-h incubation with mouse liver microsome.

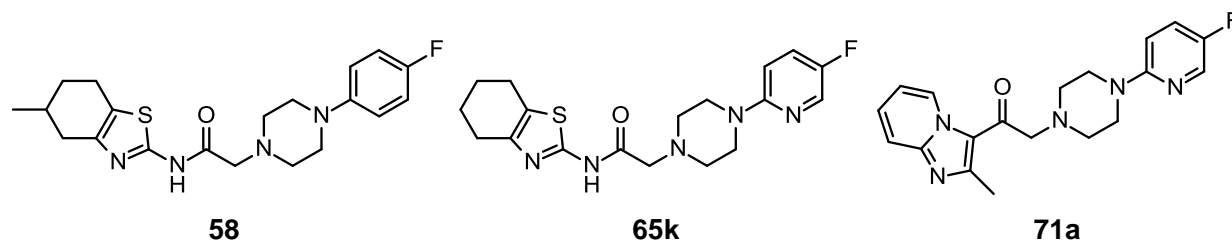
^d Not determined.

第三節 有望化合物 65k, 71a の物性・薬物動態プロファイル

第一節、第二節における誘導体展開で見出したチアゾール系有望化合物 **65k**、およびイミダゾピリジン系化合物で **71i** よりも先行して評価の進んでいた有望化合物 **71a** について、*in vivo* 薬効評価試験に供する資質、すなわち十分な血中もしくは筋組織中への化合物曝露を有しているかを見極めるため、マウス PK 試験と物性評価を実施した (Table 22)。

物性プロファイルについては、イミダゾピリジン **71a** がヒット化合物 **58** と比較して低脂溶性のため溶解性・タンパク結合フリー体率の点で優れていた (**71a**: PB free = 27.5%)。さらにマウス経口投与 (10 mg/kg) によって得た最高血中濃度 (C_{max}) からフリー体換算した free C_{max} を算出すると、**58** および **65k** は低いタンパク結合フリー体率 (PB free) のため、free C_{max} 値がマウス *in vitro* IC_{50} 値を超えることはなかったが、**71a** においては十分に IC_{50} 値 (0.14 $\mu\text{g/mL}$) を超えることが判明した (free C_{max} = 0.61 $\mu\text{g/mL}$)。次に、FATP1 の主な発現臓器である骨格筋での化合物曝露が十分に得られるかを検証した。すなわち、化合物のヒラメ筋に対する組織移行性 (化合物の筋中/血中濃度比; Kp_{soleus}) を評価したところ、本項目においても **71a** が最も良好な値を示した (Kp_{soleus} = 1.1)。これらの結果より、**71a** を *in vivo* 薬効を示す可能性が最も高い候補化合物として選抜し、次段階評価へと進めた。

Table 22. Physical properties and mouse PK parameters of **58**, **65k**, and **71a**.



Compd	<i>In vitro</i> mIC ₅₀ (μg/mL)	Solubility JP1/JP2 (μg/mL)	PB free (%) ^a	T _{max} ^b (h)	C _{max} ^b (μg/mL)	Free C _{max} ^c (μg/mL)	AUC ^b (hr*μg/mL)	Vd ^d (L/kg)	Cl ^d (mL/min/kg)	BA (%)	K _p soleus ^e
58	2.0	540/0.7	0.43	0.25	1.8	0.0077	2.3	1.5 ^f	46 ^f	62	0.33
65k	0.22	700/2.4	0.15	0.33	5.5	0.0083	36	0.57	5.0	100	0.030
71a	0.14	>700/350	27.5	0.33	2.2	0.61	5.5	0.20	6.4	21	1.1

^a Unbound fractions (%) in mouse plasma.

^b Average of three mice dosed at 10 mg/kg *po* in DMA/PG/(20% HPβCD/saline): 10/10/80.

^c Free C_{max} = PB free (%) × *in vitro* IC₅₀.

^d Average of two mice dosed at 1 mg/kg *iv* in DMA/PG/(20% HPβCD/saline): 10/10/80.

^e Soleus to plasma concentration ratio. K_p value was determined after 1-week repeated administration of compounds at 10 mg/kg *po* to mice. The measurement of each concentration was conducted at 3 h after administration.

^f Dosed at 5 mg/kg *iv*.

第四節 化合物 **71a** のマウス *in vivo* 薬効評価 (高脂肪食下 TG 蓄積阻害試験)

前節で得た化合物 **71a** は良好な PK プロファイルを有し、タンパク結合フリー体率や骨格筋への組織移行性を加味してもマウス FATP1 IC₅₀ 値以上の十分な化合物曝露が期待できた。そこで、**71a** の *in vivo* 薬効評価として、細胞内遊離脂肪酸 (FFA) の代謝産物であり、貯蔵形態として知られているトリグリセリド (TG) の蓄積阻害作用試験を行い FATP1 阻害作用との関連性を調べた (Fig. 25)。具体的評価方法として、高脂肪食を健常マウスに 4 週間給餌し、通常食コントロール群に対し TG を蓄積しやすい状況にしておき、FATP1 発現が考えられる肝臓・骨格筋 (ヒラメ筋、腓腹筋) 内の TG 含有量を比較し、化合物経口投与による TG 蓄積阻害作用を評価した。試験方法として、体重別に群分けした健常マウスに対し、高脂肪食を給餌しながらヒット化合物 **58** およびイミダジピリジン化合物 **71a** を各用量で 1 日 1 回経口投与し、これを 4 週間継続後、各組織を摘出した。

高脂肪食条件下、細胞内 TG 含有量はコントロール群に対し、肝臓では 3 倍ほど増大が見られた

が、腓腹筋では若干の有意差、およびヒラメ筋においてはその差は見られなかった。また期待に反し、**71a** を 3, 10, 30 mg/kg で投与したが TG 蓄積阻害作用は全ての用量で確認できず、同様の結果が **58** でも得られた。確認のため、チアゾール系化合物 **65k** についても別途 1, 10, 100 mg/kg の用量で 3 週間経口連続投与試験を行ったが、TG 含有量の低下は示さなかった (データ非掲載)。

以上のように、**58, 65k** のみならず、組織中 FATP1 に IC₅₀ 値以上の十分な化合物曝露がタンパク結合フリー体換算でかかっていると考えられる **71a** においても TG 蓄積阻害作用が見られなかったことから、FATP1 を介した脂肪酸取込み阻害と細胞内 TG 蓄積の間には直接的な機能関連性が低いことが明らかとなった。原因として、FATP1 阻害によって他の脂肪酸代謝経路の亢進や代償が生じ、TG 産生に関わる生体恒常性 (ホメオスタシス) が働いた可能性が考えられる。

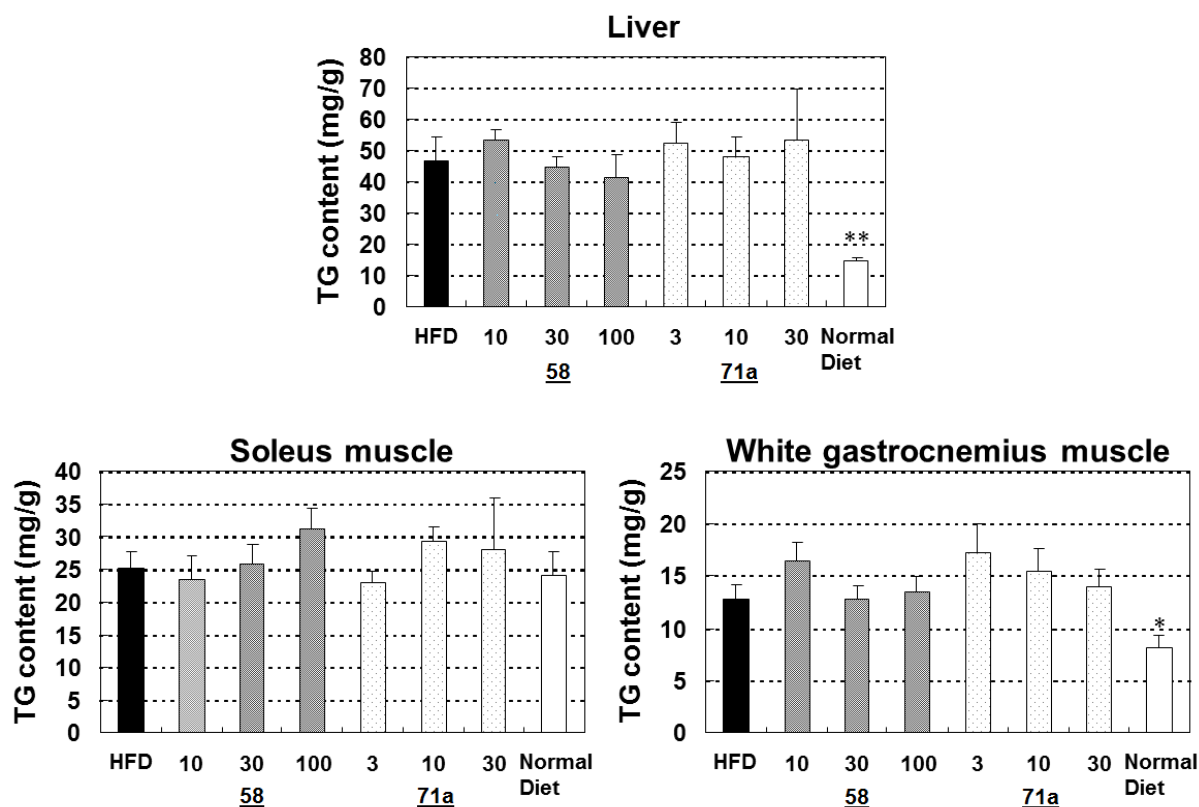


Figure 25. 高脂肪食下マウスにおけるトリグリセリド (TG) 蓄積阻害作用評価 (4 週間連続経口投与).

第五節 小括

本章では、アリールピペラジン構造を有する新規 FATP1 阻害剤の誘導体展開、および *in vivo* 薬効評価として有望化合物 **71a** のマウス TG 蓄積阻害作用試験を行い、FATP1 阻害作用単独では細胞内 TG 生成量に関わる生体内脂肪酸の輸送や代謝に対し、影響が弱いことが明らかとなった。

第一章で見出した高活性トリアゾール系化合物 **54o**, **54p** の低代謝安定性を改善すべく、アリールピペラジン構造を持つヒット化合物 **58**, **59** の誘導体展開を行い、**58** については右側芳香環に 4-フルオロ-2-ピリジル基を持つ **65k** を見出した (Fig. 26)。次に **65k** の蛋白結合フリー体率を向上させるため、**59** の誘導体展開を行った。**65k** との構造類似性から、**59** の右側部分に 4-フルオロ-2-ピリジル基を導入することで劇的に活性向上した **71a** を効率的に見出した。さらに左側イミダゾピリジン環変換により、芳香環の部分的飽和化およびメチル基除去によって脂溶性低下と代謝安定性を向上させた **71i** を見出すに至った。

有望化合物 **71a** はタンパク結合フリー体率や骨格筋への組織移行性を考慮しても、標的タンパクへの十分な化合物曝露が期待されたため、高脂肪食マウスにおける経口 4 週間連続投与試験を行ったが、3, 10, 30 mg/kg の全用量において FATP1 の発現組織 (ヒラメ筋、腓腹筋、肝臓) での TG 蓄積阻害作用は見られなかった。

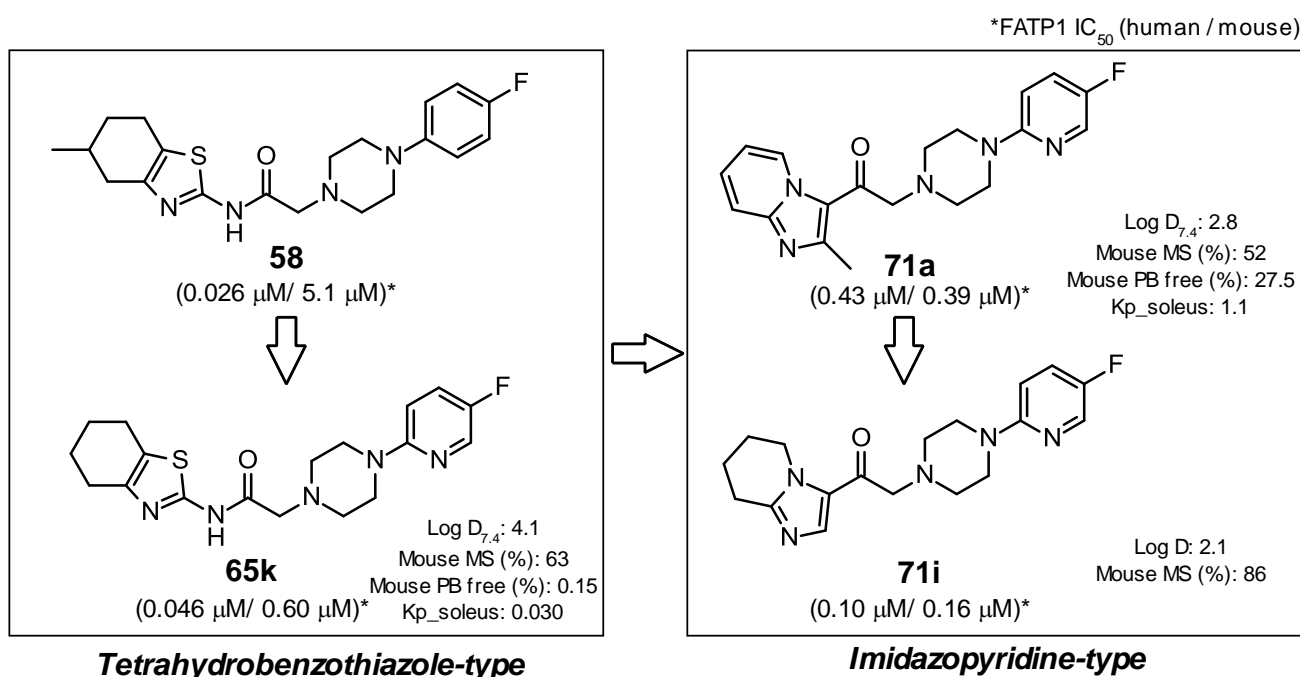


Figure 26. アリールピペラジン部位を有する FATP1 阻害剤の誘導体展開。

総括

本研究では、新規 FATP1 阻害剤として自社 HTS より見出した二系統のヒット化合物 **39**, **58**, **59** をベースとした誘導体展開による有望化合物 **71a** の獲得、および **71a** の *in vivo* 薬効評価 (マウス TG 蓄積阻害作用試験) の実施により、FATP1 阻害作用は細胞内 TG 蓄積阻害に対して有意な影響を及ぼさないことを見出した (Fig. 27)。

第一章では、自社 HTS の実施により得られたトリアゾール系ヒット化合物 **39** に対し下記3つの目標を設定し、誘導体展開を実施した。すなわち、① マウスの *in vitro* 活性向上による種差の改善 (mouse IC₅₀ < 0.1 μM)、② 脂溶性低減による薬物動態の良好な化合物の取得、③ FATP1 IC₅₀ 値以上の血中および筋組織中曝露による、*in vivo* 薬効 (脂肪酸蓄積阻害およびインスリン抵抗性) の確認、である。まず、脂溶性や代謝不安定性の原因と考えられるヒット化合物 **39** のエステル基をエチルケトンへ、チオベンジル基をアニリノ基へと置換することで、活性は 10 倍以上向上し **44a** を得た。しかし **44a** は血中安定性 (ラット) が低かったため、マウス *iv* 投与による代謝物解析を行ったところ、投与 5 分後にはアミド部位の加水分解、若干のケトン部位の還元代謝が検出された。これら代謝不安定な部位の回避を目指した合成展開により、アミド部位をオキサゾールに環化させ、ケトンをトリフルオロメチルやトリフルオロメトキシに置換した **54o**, **54p** を獲得した。両化合物はヒト、マウス両方で高活性を示し、ラット血中安定性も大幅に改善した。しかしマウス経口投与試験ではある程度の血中曝露を与えるが、マウス肝ミクロソーム中の低代謝安定性、低タンパク結合フリー体率のため、FATP1 が発現する筋組織への化合物曝露の点で不十分であることが判明した。

第二章では、分子右側部分にフェニルピペラジン骨格を有するヒット化合物 **58**, **59** に着目し、前章で達成し得なかった PK プロファイルの改善を目指し誘導体展開を実施した。テトラヒドロベンズチアゾール部位を持つ化合物 **58** に対し、高脂溶性部位の変換に着手した結果、シクロヘキサン環上のメチル基除去、オキサゾール環への変換によって活性維持しつつ脂溶性を若干低下することができた。次に右側部分のパラ位フルオロ基およびベンゼン環オルト位への N 原子導入が最適であることを見出し、脂溶性低下と共にマウス活性が大幅に向上した化合物 **65k** を得た。一方、**65k** は中程度の代謝安定性 (MS_{mouse} = 63%) であったため、アミド基 N 原子上アルキル化によって加水分解回避を試みたが、安定性改善および活性向上は見られなかった。

イミダゾピリジン環を持つヒット化合物 **59** の誘導体展開については、**65k** との構造類似性から右側部位へ 4-フルオロ-2-ピリジル基を導入することでヒト、マウス共に良好な活性を持つ **71a** を得た。**71a** は良好な脂溶性を有していたが ($\text{Log } D_{7.4} = 2.8$)、さらなる脂溶性低減のためメチル基の除去、およびイミダゾピリジン環の部分的飽和化を行い活性・代謝安定性をさらに改善した **71i** を取得した ($\text{Log } D_{7.4} = 2.1$, $\text{MS}_{\text{mouse}} = 86\%$)。各系統の化合物の物性、PK パラメーターを測定したところ、イミダゾピリジン **71a** が最もバランスの取れたプロファイルを示した。特に血中タンパク結合フリー体率が高く ($\text{PB free} = 27.5\%$)、血中に対する筋組織中濃度比率 ($\text{Kp}_{\text{soleus}} = 1.1$) も良好であり、化合物 **71a** は標的組織である骨格筋への IC_{50} 値以上の十分な曝露が期待された。

In vivo 薬効評価として、脂肪酸代謝物である TG 蓄積阻害作用試験を高脂肪食マウスを用いて経口 4 週間連続投与を行った。しかしヒット化合物 **58** および有望化合物 **71a** 共に、各投与用量において FATP1 発現組織 (ヒラメ筋、腓腹筋、肝臓) での TG 蓄積阻害作用は見られなかった。マウス筋組織中 FATP1 過剰発現系においても TG 蓄積阻害が見られないという他グループによる最近の報告³⁸⁾と本研究の結果を勘案すると、FATP1 阻害単独では細胞内 TG 生成量に関わる生体内脂肪酸の輸送や代謝に対し影響が弱いと言える。したがって、FATP1 欠損型マウスのフェノタイプとして見られたような、脂肪酸取込み阻害に起因する TG 蓄積阻害作用、および糖取込み能低下の抑制に関して、本研究で見出した FATP1 阻害剤で実現するのは困難であることが明らかとなった。将来 FATP1 の更なる機能解明が進み、本研究で見出した複数骨格の高活性化化合物が他の研究テーマに活用され、関連する疾患治療の開発に貢献することを願って止まない。

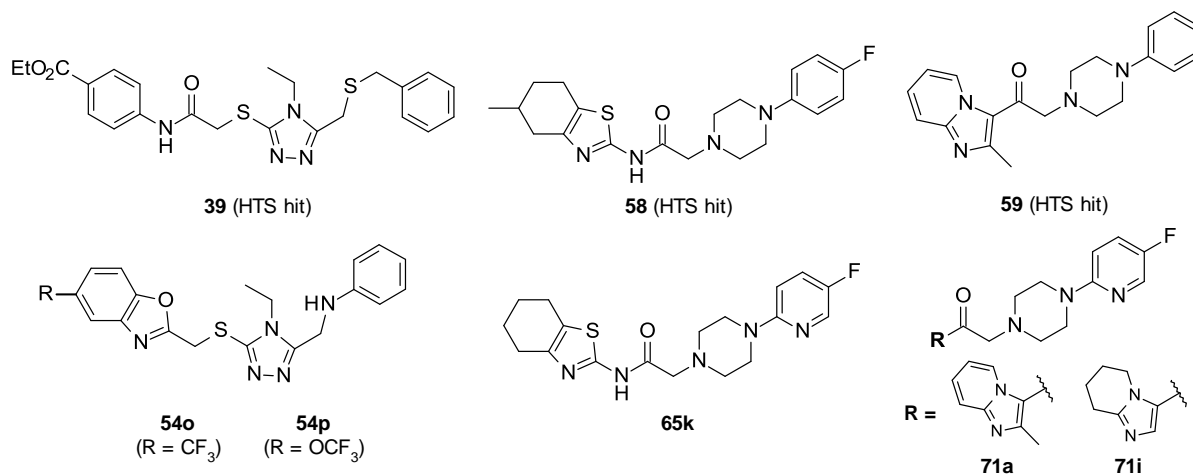


Figure 27. Representative FATP1 inhibitors of this study.

実験の部

第一部 抗肥満薬 bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) アゴニストの創製研究

1. Chemistry for BRS-3 agonists

Unless otherwise noted, materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 400 or 500 spectrometer with tetramethylsilane as an internal reference. Mass spectra were recorded on an Agilent Technologies Agilent 1100 or 1200 series LC/MS. Optical rotations were measured on an Autopol V Plus. TLC analysis was performed on 60F254 plates. Flash column chromatography was performed on Shoko scientific cartridge series (SI-60).

2-(Trifluoromethyl)-6,11-dihydropyrido[3,2-*c*][1,5]benzodiazepin-5-one (6).

A mixture of 2-chloro-6-(trifluoromethyl)pyridine-3-carboxylic acid **5** (400 mg, 1.77 mmol) and 1,2-diaminobenzene (196 mg, 1.81 mmol) in ethylene glycol monobutylether (5 mL) was stirred at 160 °C for 6 h. The cooled reaction mixture was diluted with water, and the resulting suspension was filtered off. The obtained solid was washed with water and dissolved in AcOEt (30 mL). The organic solution was washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **6** (317 mg, 64%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.42 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.54 (1H, br s), 7.24 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.10-7.03 (2H, m), 6.91-6.89 (1H, m), 6.87-6.85 (1H, m), 6.68 (1H, br s).

2-(Trifluoromethyl)-6,11-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*c*][1,5]benzodiazepine (7).

A solution of borane-THF complex in THF (1.0 M, 3.3 mL, 3.3 mmol) was added to a solution of **6** (307 mg, 1.10 mmol) in THF (5 mL) under N₂ atmosphere at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. The reaction mixture was raised to room temperature and further stirred for 16 h. After addition of methanol (1 mL), the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **7** (192 mg, 66%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.37 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.22 (1H, br s), 7.00 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.91-6.87 (1H, m), 6.85-6.81 (2H, m), 6.76 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 4.23-4.19 (3H, m).

(4-*tert*-Butylphenyl)-[2-(trifluoromethyl)-5,11-dihydropyrido[3,2-*c*][1,5]benzodiazepin-6-yl]methanone (8a).

4-*tert*-Butylbenzoyl chloride (103 μ L, 0.57 mmol) was added to a solution of **7** (100 mg, 0.38 mmol) and Et₃N (158 μ L, 1.13 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 3 h. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (30 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 3:1). The obtained solid was triturated in hexane/CH₂Cl₂, and filtered to provide **8a** (116 mg, 72%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.67 (1H, br s), 7.45 (1H, s), 7.19-7.09 (6H, m), 6.98 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.70-6.68 (2H, m), 5.89-5.85 (1H, m), 4.10-4.06 (1H, m), 1.22 (9H, s). MS (ESI⁺) *m/z*: 426 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₂F₃N₃O: C, 67.79; H, 5.21; N, 9.88. Found: C, 67.57; H, 5.23; N, 9.79.

2-(4-*tert*-Butylphenyl)-1-[2-(trifluoromethyl)-5,11-dihydropyrido[3,2-*c*][1,5]benzodiazepin-6-yl]ethanone (8b).

4-*tert*-Butylphenylacetic acid (75 mg, 0.39 mmol) was added to a solution of the diazepine **7** (80 mg, 0.30 mmol), HATU (126 mg, 0.33 mmol), and (*i*-Pr)₂EtN (165 μ L, 0.90 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred overnight. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 3:1). The obtained solid was triturated in hexane/CH₂Cl₂, and filtered to provide **8b** (120 mg, 91%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.59 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.22-7.16 (2H, m), 7.13-7.09 (2H, m), 7.05 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.99-6.95 (2H, m), 6.81 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz), 6.73-6.70 (2H, m), 5.40 (1H, d, *J* = 15.2 Hz), 3.86 (1H, d, *J* = 14.9 Hz), 3.52 (2H, s), 1.24 (9H, s). MS (ESI⁺) *m/z*: 440 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₂₄F₃N₃O·0.25H₂O: C, 67.63; H, 5.56; N, 9.46. Found: C, 67.62; H, 5.39; N, 9.71.

2-(4-Phenoxyphenyl)-1-[2-(trifluoromethyl)-5,11-dihydropyrido[3,2-*c*][1,5]benzodiazepin-6-yl]ethanone (8c).

8c was prepared in a similar manner described for **8b**. Yield: 92%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.64 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.34-7.29 (2H, m), 7.25-7.21 (3H, m), 7.10-7.07 (2H, m), 7.03-7.01 (1H, m), 6.98-6.96 (2H, m),

6.91 (1H, dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz), 6.82-6.77 (4H, m), 5.45 (1H, d, $J = 14.9$ Hz), 3.94 (1H, d, $J = 14.5$ Hz), 3.57 (2H, s). MS (ESI⁺) m/z : 476 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₇H₂₀F₃N₃O₂: C, 68.24; H, 4.24; N, 8.84. Found: C, 68.02; H, 4.25; N, 8.71.

2-(3-Phenoxyphenyl)-1-[2-(trifluoromethyl)-5,11-dihydropyrido[3,2-*c*][1,5]benzodiazepin-6-yl]ethanone (8d).

8d was prepared in a similar manner described for **8b**. Yield: 89%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.63 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.32-7.28 (2H, m), 7.24-7.17 (2H, m), 7.12-7.07 (4H, m), 6.99-6.95 (1H, m), 6.92 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.85 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.80 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.48 (1H, s), 5.45 (1H, d, $J = 14.9$ Hz), 3.93 (1H, d, $J = 14.9$ Hz), 3.57 (2H, s). MS (ESI⁺) m/z : 476 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₇H₂₀F₃N₃O₂: C, 68.24; H, 4.24; N, 8.84. Found: C, 68.45; H, 4.34; N, 8.98.

[2-Chloro-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]methanol (9).

A solution of borane-THF complex in THF (0.9 M, 70 mL, 63 mmol) was added to a solution of 2-chloro-6-(trifluoromethyl)pyridine-3-carboxylic acid **5** (5.10 g, 22.1 mmol) in THF (100 mL) under N₂ atmosphere at 0 °C, then the mixture was gradually raised to room temperature and stirred for 20 h. After addition of methanol (10 mL), the reaction mixture was diluted with AcOEt (100 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to obtain the alcohol **9** (4.66 g, quant.) as a colorless oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.12 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.69 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.87 (2H, d, $J = 5.5$ Hz), 2.06 (1H, t, $J = 5.5$ Hz).

[2-(2-Aminoethylamino)-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]methanol (10).

The alcohol **9** (42.4 g, 201 mmol) was dissolved in ethylenediamine (161 mL, 1.20 mol), and the reaction mixture was stirred at 120 °C for 12 h. The cooled mixture was diluted with brine, extracted with AcOEt (300 mL x 3). The organic layer was dried over Na₂SO₄, concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 3:1) to provide **10** (29.4 g, 62%) as a colorless oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ :

7.33 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 6.85 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 6.03 (1H, br s), 4.59 (2H, s), 3.72 (2H, q, $J = 5.9$ Hz), 3.48 (2H, t, $J = 6.3$ Hz).

8-(Trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[2,3-*e*][1,4]diazepine (11).

MnO₂ (98.8 g, 1.00 mol) was added to a solution of **10** (29.4 g, 125 mmol) in CH₂Cl₂/MeOH (700 mL/100 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was filtered through a Celite pad, concentrated to provide **11** (20.4 g, 76%). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.27 (1H, t, $J = 1.6$ Hz), 7.75 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.99 (1H, br s), 4.14-4.11 (2H, m), 3.49-3.46 (2H, m).

8-(Trifluoromethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-*e*][1,4]diazepine (12).

10% Pd-C (8.00 g) was added to a solution of **11** (20.4 g, 94.8 mmol) in AcOEt (250 mL), and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 4 h. The mixture was filtered through a Celite pad, concentrated, and purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 8:1) to provide the diazepine **12** (16.9 g, 82%) as a yellow oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.46 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 5.11 (1H, s), 3.91 (2H, br s), 3.49 (1H, s), 3.28-3.25 (2H, m), 3.11-3.09 (2H, m).

2-(3-Phenoxyphenyl)-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13a).

(3-Phenoxyphenyl)acetic acid (41 mg, 0.18 mmol) was added to a solution of the diazepine **12** (30 mg, 0.14 mmol), HATU (63 mg, 0.17 mmol), and (*i*-Pr)₂EtN (75 μL, 0.48 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 15 h. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 2:3). The obtained solid was triturated in hexane/CH₂Cl₂, and filtered to provide **13a** (49 mg, 85%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.66-7.30 (3H, m), 7.25-7.10 (3H, m), 6.98-6.83 (5H, m), 5.21 (0.4H, br s), 5.03 (0.6H, br s), 4.61 (1.2H, s), 4.48 (0.8H, s), 3.91-3.88 (0.8H, m), 3.76-3.74 (1.2H, m), 3.73 (0.8H, s), 3.70 (1.2H, s), 3.44-3.40 (0.8H, m), 3.31-3.27 (1.2H, m). MS (ESI⁺) m/z : 428 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₂₀F₃N₃O₂: C, 64.67; H, 4.72; N, 9.84. Found: C, 64.49; H, 4.73; N, 9.72.

2-[3-(2-Fluorophenoxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13b).

The synthesis of **13b** was prepared in a similar manner described for **13a**. Yield: 71%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.65 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.23-6.90 (7H, m), 6.84-6.80 (2.4H, m), 5.20 (0.4H, br s), 5.01 (0.6H, br s), 4.60 (1.2H, s), 4.47 (0.8H, s), 3.91-3.89 (0.8H, m), 3.75-3.70 (3.2H, m), 3.45-3.41 (0.8H, m), 3.28-3.24 (1.2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 446 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₁₉F₄N₃O₂: C, 62.05; H, 4.30; N, 9.44. Found: C, 61.92; H, 4.33; N, 9.29.

2-[3-(3-Fluorophenoxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13c).

The synthesis of **13c** was prepared in a similar manner described for **13a**. Yield: 92%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.64 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.30-7.22 (3H, m, overlapped with CHCl₃), 7.10-6.97 (2H, m), 6.92-6.87 (2H, m), 6.81-6.64 (2.4H, m), 5.24 (0.4H, s), 5.07 (0.6H, s), 4.62 (1.2H, s), 4.49 (0.8H, s), 3.92-3.89 (0.8H, m), 3.78-3.75 (1.2H, m), 3.74 (0.8H, s), 3.71 (1.2H, s), 3.46-3.41 (0.8H, m), 3.34-3.30 (1.2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 446 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₁₉F₄N₃O₂: C, 62.05; H, 4.30; N, 9.44. Found: C, 62.08; H, 4.37; N, 9.54.

2-[3-(4-Fluorophenoxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13d).

The synthesis of **13d** was prepared in a similar manner described for **13a**. Yield: 89%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.65 (0.6H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.25-7.09 (2H, m), 7.05-6.88 (5.4H, m), 6.83-6.78 (2H, m), 5.21 (0.4H, br s), 5.03 (0.6H, br s), 4.61 (1.2H, s), 4.48 (0.8H, s), 3.92-3.89 (0.8H, m), 3.76-3.74 (1.2H, m), 3.74 (0.8H, s), 3.71 (1.2H, s), 3.44-3.41 (0.8H, m), 3.32-3.29 (1.2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 446 (M+H)⁺. Anal. C₂₃H₁₉F₄N₃O₂: C, 62.05; H, 4.30; N, 9.44. Found: C, 61.92; H, 4.33; N, 9.29.

2-[3-(4-Methylphenoxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13e).

The synthesis of **13e** was prepared in a similar manner described for **13a**. Yield: 96%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.65 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.24-7.09 (4H, m), 7.00-6.81 (5.4H, m), 5.21 (0.4H, br s), 5.02 (0.6H, br s), 4.60 (1.2H, s), 4.47 (0.8H, s), 3.90-3.88 (0.8H, m), 3.74-3.72 (1.2H, m), 3.72 (0.8H, s), 3.72-3.70 (2H, m), 3.44-3.26 (1.2H, m), 2.34-2.33 (3H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 442 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₂F₃N₃O₂·0.5H₂O: C, 63.99; H, 5.15; N, 9.33. Found: C, 64.14; H, 5.26; N, 9.37.

2-[3-(2-Pyridyloxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13f).

The synthesis of **13f** was prepared in a similar manner described for **13a**. Yield: 31%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 8.18-8.13 (2H, m), 7.71-7.63 (1.4H, m), 7.34-7.28 (1H, m), 7.08 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.03-6.96 (4H, m), 6.89 (1H, dd, *J* = 8.2, 4.7 Hz), 5.21 (0.4H, br s), 5.04 (0.6H, br s), 4.61 (1.2H, s), 4.49 (0.8H, s), 3.92-3.90 (0.8H, m), 3.77-3.74 (3.2H, m), 3.47-3.43 (0.8H, m), 3.32-3.28 (1.2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 429 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₂H₁₉F₃N₄O₂·0.25H₂O: C, 61.04; H, 4.54; N, 12.94. Found: C, 61.24; H, 4.79; N, 12.78.

2-[3-(3-Pyridyloxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13g).

The synthesis of **13g** was prepared in a similar manner described for **13a**. Yield: 97%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 8.37-8.36 (2H, m), 7.64 (0.8H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.31-7.22 (3.2H, m, overlapped with CHCl₃), 7.11-6.97 (2H, m), 6.91-6.87 (2H, m), 5.23 (0.4H, br s), 5.05 (0.6H, br s), 4.62 (1.2H, s), 4.50 (0.8H, s), 3.92-3.90 (0.8H, m), 3.79-3.76 (1.2H, m), 3.73 (0.8H, s), 3.71 (1.2H, s), 3.46-3.43 (0.8H, m), 3.31-3.28 (1.2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 429 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₂H₁₉F₃N₄O₂: C, 61.71; H, 4.47; N, 13.09. Found: C, 61.65; H, 4.59; N, 12.96.

2-[3-(4-Pyridyloxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13h).

The synthesis of **13h** was prepared in a similar manner described for **13a**. Yield: 63%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 8.43-8.41 (2H, m), 7.61 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.34-7.25 (1H, m), 7.07-7.02 (2H,

m), 6.97-6.90 (2.4H, m), 6.78-6.72 (2H, m), 5.19 (0.4H, br s), 5.02 (0.6H, br s), 4.60 (1H, s), 4.49 (1.2H, s), 3.90-3.87 (0.8H, m), 3.78-3.75 (1H, m), 3.73 (0.8H, s), 3.70 (1.2H, s), 3.43-3.40 (0.8H, m), 3.35-3.32 (1.2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 429 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₂H₁₉F₃N₄O₂·0.25H₂O: C, 61.04; H, 4.54; N, 12.94. Found: C, 61.29; H, 4.62; N, 12.79.

2-{3-[(6-Methyl-3-pyridyl)oxy]phenyl}-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13i).

The synthesis of **13i** was prepared in a similar manner described for **13a**. Yield: 34%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 8.28-8.26 (1H, m), 7.64 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.24-7.09 (3.4H, m), 7.00-6.82 (4H, m), 5.22 (0.4H, br s), 5.04 (0.6H, br s), 4.62 (1.2H, s), 4.48 (0.8H, s), 3.92-3.89 (0.8H, m), 3.76-3.74 (1.2H, m), 3.72 (0.8H, s), 3.70 (1.2H, s), 3.46-3.43 (0.8H, m), 3.35-3.32 (1.2H, m), 2.54 (3H, s). MS (ESI⁺) *m/z*: 443 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₂₁F₃N₄O₂·0.8H₂O: C, 60.47; H, 4.99; N, 12.26. Found: C, 60.33; H, 5.10; N, 12.17.

***N*-(3-Phenoxyphenyl)-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepine-4-carboxamide (13j).**

1-Isocyanato-3-phenoxybenzene (116 mg, 0.55 mmol) was added to a solution of the diazepine **12** (100 mg, 0.46 mmol) in toluene (1 mL) and stirred at 90 °C for 1 h. The mixture was diluted with AcOEt (20 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 4:1). The obtained solid was triturated in hexane/CH₂Cl₂, and filtered to provide **13j** (180 mg, 91%) as a yellow solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.56 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.34-7.29 (2H, m), 7.20 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.11-6.96 (6H, m), 6.68-6.66 (1H, m), 6.40 (1H, br s), 5.25 (1H, t, *J* = 4.3 Hz), 4.60 (2H, s), 3.79-3.76 (2H, m), 3.54-3.51 (2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 429 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₂H₁₉F₃N₄O₂·0.2H₂O: C, 61.16; H, 4.53; N, 12.97. Found: C, 61.05; H, 4.51; N, 12.94.

2-(3-Hydroxyphenyl)-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (14).

The diazepine **12** (230 mg, 1.06 mmol) was added to a solution of (3-benzyloxyphenyl)acetic acid (256 mg, 1.06 mmol), HATU (443 mg, 1.16 mmol), and (*i*-Pr)₂EtN (578 μL, 3.18 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) at

room temperature, and the reaction mixture was stirred for 15 h. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (50 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 7:3) to provide the benzyl compound (465 mg, 99%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.67 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.40-7.32 (5.4H, m), 7.23-7.09 (2H, m), 6.93-6.77 (3H, m), 5.19 (0.4H, s), 5.03-4.99 (2.6H, m), 4.60 (1.2H, s), 4.43 (0.8H, s), 3.91-3.89 (0.8H, m), 3.72-3.70 (3.2H, m), 3.46-3.43 (0.8H, m), 3.25-3.22 (1.2H, m).

10% Pd-C (140 mg) was added to a solution of the benzyl compound (465 mg, 1.05 mmol) in EtOH (15 mL), and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 4 h. The mixture was filtered through a Celite pad and concentrated to provide **14** (361 mg, 98%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.66 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.21-7.14 (1.4H, m), 7.08-6.97 (1H, m), 6.74-6.70 (3H, m), 5.26 (0.4H, br s), 5.04 (0.6H, br s), 4.60 (1.2H, s), 4.49 (0.8H, s), 3.91-3.88 (0.8H, m), 3.77-3.74 (1.2H, m), 3.70-3.68 (2H, m), 3.46-3.43 (0.8H, m), 3.31-3.27 (1.2H, m).

2-(3-Methoxyphenyl)-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13k).

The phenol compound **14** (60 mg, 0.17 mmol) was dissolved in a mixture of iodomethane (32 μL, 0.51 mmol) and K₂CO₃ (35 mg, 0.26 mmol) in DMF (2 mL), and the reaction mixture was stirred at 60 °C for 5 h. The mixture was diluted with Et₂O (30 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1). The obtained solid was triturated in hexane/Et₂O, and filtered to provide **13k** (41 mg, 66%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.67 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.22-7.18 (1.4H, m), 7.10 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.95 (0.4H, d, *J* = 7.3 Hz), 6.79-6.71 (3H, m), 5.20 (0.4H, br s), 5.00 (0.6H, br s), 4.62 (1.2H, s), 4.48 (0.8H, s), 3.94-3.91 (0.8H, m), 3.75-3.71 (6.2H, m), 3.49-3.45 (0.8H, m), 3.27-3.25 (1.2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 366 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₁₈H₁₈F₃N₃O₂: C, 59.20; H, 4.97; N, 11.51. Found: C, 58.95; H, 4.95; N, 11.43.

2-(3-Ethoxyphenyl)-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13l).

The synthesis of **13l** was prepared in a similar manner described for **13k**. Yield: 83%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.67 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.22-7.17 (1.4H, m), 7.10 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.95 (0.4H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.77-6.69 (3H, m), 5.20 (1H, br s), 4.99 (1H, br s), 4.61 (0.4H, s), 4.47 (0.6H, s), 3.98-3.90 (2.8H, m), 3.75-3.73 (1.2H, m), 3.72 (0.8H, s), 3.70 (1.2H, s), 3.49-3.45 (0.8H, m), 3.24-3.22 (1.2H, m), 1.39-1.33 (3H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 380 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₂₀F₃N₃O₂: C, 60.18; H, 5.32; N, 11.08. Found: C, 59.95; H, 5.32; N, 11.00.

2-(3-Isopropoxyphenyl)-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13m).

The synthesis of **13m** was prepared in a similar manner described for **13k**. Yield: 42%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.68 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.17-7.13 (1.4H, m), 7.10 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.95 (0.4H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.73 (3H, m), 5.20 (0.4H, br s), 4.99 (0.6H, br s), 4.61 (1.2H, s), 4.48-4.45 (1.8H, m), 3.93-3.90 (0.8H, m), 3.75-3.72 (1.2H, m), 3.72 (0.8H, s), 3.70 (1.2H, s), 3.47-3.44 (0.8H, m), 3.21-3.18 (1.2H, m), 1.29 (2.4H, d, *J* = 5.9 Hz), 1.25 (3.6H, d, *J* = 5.9 Hz). MS (ESI⁺) *m/z*: 394 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₀H₂₂F₃N₃O₂: C, 61.09; H, 5.64; N, 10.69. Found: C, 61.39; H, 5.63; N, 10.50.

2-(3-Butoxyphenyl)-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13n).

The synthesis of **13n** was prepared in a similar manner described for **13k**. Yield: 83%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.67 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.19 (1.4H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.10 (0.6H, d, *J* = 7.3 Hz), 6.95 (0.4H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.77-6.71 (3H, m), 5.20 (0.4H, br s), 5.00 (0.6H, br s), 4.61 (1.2H, s), 4.47 (0.8H, s), 3.95-3.81 (2.8H, m), 3.76-3.73 (1.2H, m), 3.72 (0.8H, s), 3.70 (1.2H, s), 3.46-3.44 (0.8H, m), 3.24-3.21 (1.2H, m), 1.76-1.68 (2H, m), 1.50-1.41 (2H, m), 0.98-0.94 (3H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 408 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₂₄F₃N₃O₂: C, 61.94; H, 5.94; N, 10.32. Found: C, 61.70; H, 5.95; N, 10.21.

2-(3-Isobutoxyphenyl)-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13o).

13o was prepared in a similar manner described for **13k**. Yield: 31%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.67 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.22-7.17 (1.4H, m), 7.10 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.97 (0.4H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.78-6.72 (3H, m), 5.20 (0.4H, br s), 5.01 (0.6H, br s), 4.61 (1.2H, s), 4.48 (0.8H, s), 3.92-3.90 (0.8H, m), 3.75-3.73 (1.2H, m), 3.72 (0.8H, s), 3.70 (1.2H, s), 3.52-3.50 (2H, m), 3.48-3.44 (0.8H, m), 3.26-3.22 (1.2H, m), 2.02 (1H, m), 1.00 (6H, d, *J* = 8.2 Hz). MS (ESI⁺) *m/z*: 408 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₂₄F₃N₃O₂: C, 61.94; H, 5.94; N, 10.32. Found: C, 61.83; H, 6.06; N, 10.30.

2-[3-(2,2-Dimethylpropoxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13p).

13p was prepared in a similar manner described for **13k**. Yield: 39%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.67 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.22-7.17 (1.4H, m), 7.10 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.97 (0.4H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.78-6.72 (3H, m), 5.20 (0.4H, br s), 5.01 (0.6H, br s), 4.61 (1.2H, s), 4.48 (0.8H, s), 3.93-3.91 (0.8H, m), 3.76-3.74 (1.2H, m), 3.72 (0.8H, s), 3.70 (1.2H, s), 3.52-3.50 (2H, m), 3.48-3.44 (0.8H, m), 3.26-3.22 (1.2H, m), 1.01 (3.6H, s), 0.99 (5.4H, s). MS (ESI⁺) *m/z*: 422 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₂H₂₆F₃N₃O₂: C, 62.69; H, 6.22; N, 9.97. Found: C, 62.86; H, 6.33; N, 9.99.

2-[3-(Cyclopentoxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13q).

13q was prepared in a similar manner described for **13k**. Yield: 60%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.68 (0.6H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.20-7.09 (2H, m), 6.94 (0.4H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.76-6.67 (3H, m), 5.19 (0.4H, br s), 4.98 (0.6H, br s), 4.68-4.64 (1H, m), 4.60 (1.2H, s), 4.46 (0.8H, s), 3.93-3.91 (0.8H, m), 3.74-3.69 (3.2H, m), 3.47-3.44 (0.8H, m), 3.18-3.15 (1.2H, m), 1.24-1.07 (8H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 420 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₂H₂₄F₃N₃O₂: C, 63.03; H, 5.77; N, 10.02. Found: C, 62.88; H, 5.77; N, 9.91.

2-[3-(Cyclohexoxy)phenyl]-1-[8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]ethanone (13r).

13r was prepared in a similar manner described for **13k**. Yield: 76%. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.67 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.20-7.10 (2H, m), 6.95 (0.4H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.77-6.71 (3H, m),

5.20 (0.4H, br s), 5.00 (0.6H, br s), 4.60 (1.2H, s), 4.46 (0.8H, s), 4.19-4.14 (1H, m), 3.93-3.90 (0.8H, m), 3.75-3.69 (3.2H, m), 3.47-3.43 (0.8H, m), 3.23-3.19 (1.2H, m), 1.94-1.72 (4H, m), 1.49-1.25 (6H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 434 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₂₆F₃N₃O₂·0.05H₂O: C, 63.60; H, 6.06; N, 9.67. Found: C, 63.31; H, 5.86; N, 9.97.

2-Benzyloxy-1-[2-chloro-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]ethanone (16).

n-BuLi in hexane (2.64 M, 1.88 mL, 4.97 mmol) was dissolved in a mixture of (*i*-Pr)₂NH (0.697 mL, 4.97 mmol) in THF (10 mL) at -40 °C and the mixture was stirred for 30 min. 2-Chloro-6-(trifluoromethyl)-pyridine **15** (0.902 g, 4.97 mmol) in THF (6 mL) was added to the mixture at -78 °C and the mixture was stirred for 20 min. 2-Benzyloxy-*N*-methoxy-*N*-methyl-acetamide (0.800 g, 3.82 mmol) in THF (4 mL) was added to the mixture, then warmed to -20 °C and stirred for 1 h. The mixture was diluted with Et₂O (30 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 7:3). The obtained solid was triturated in hexane/Et₂O, and filtered to provide **16** (0.69 g, 43%) as an orange oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.95 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.69 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.40-7.25 (5H, m), 4.64 (2H, s), 4.61 (2H, s).

***tert*-Butyl *N*-[2-((2-benzyloxy-1-[2-chloro-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]ethyl)amino)ethyl]carbamate (17).**

16 (0.190 g, 5.76 mmol) was added to a solution of *N*-Boc-ethylenediamine (0.185 g, 11.5 mmol) and Ti(*Oi*-Pr)₄ (0.34 mL, 11.5 mmol) in THF (4 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred overnight. After the reaction mixture was cooled to 0 °C, MeOH (3 mL) was added to the reaction mixture. Then, NaBH₄ (0.218 g, 57.5 mmol) was added to the mixture, and stirred at the same temperature for 4.5 h. Then, the reaction mixture was diluted with saturated aq. NaHCO₃ and filtered through a Celite pad. The filtered solution was extracted with AcOEt (400 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **17** (0.212 g, 78%) as a yellow oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.15 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.39-7.26 (5H, m), 4.79 (1H, br s), 4.58-4.51 (2H, m), 4.39 (1H, dd, *J* = 7.8, 3.1 Hz), 3.96 (1H, br s), 3.70 (1H, dd, *J* = 9.8, 3.5 Hz), 3.38-3.34 (1H, m), 3.23-3.17 (2H, m), 2.65-2.59 (1H, m), 2.48-2.42 (1H, m), 1.43 (9H, s).

1-[5-(Hydroxymethyl)-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]-2-(3-phenoxyphenyl)ethanone (18).

17 (0.212 g, 4.47 mmol) was dissolved in 4 N HCl/AcOEt (2 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 1.5 h. The mixture was concentrated and triturated in (*i*-Pr)₂O (100 mL). Then, after the suspension was filtered off, the obtained solid was washed with (*i*-Pr)₂O and dried *in vacuo* to provide the diamine HCl salt (0.190 g). The obtained diamine HCl salt (0.190 g) was added to a solution of (*i*-Pr)₂EtN (0.389 mL, 2.24 mmol) in NMP (4 mL) at 160 °C, and the reaction mixture was stirred for 5 h. After the reaction mixture was diluted with Et₂O (30 mL), washed with brine (50 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated to provide the diazepine including NMP (0.250 g) as a brown oil. (3-Phenoxyphenyl)acetic acid (41 mg, 0.18 mmol) was added to a solution of the crude diazepine (0.250 g), HATU (255 mg, 0.67 mmol), and (*i*-Pr)₂EtN (117 μL, 0.67 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 15 h. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide the benzyl ether (110 mg, 45%, 3 steps) as a colorless solid. 10% Pd-C (110 mg) was added to a solution of the benzyl alcohol (110 mg, 0.20 mmol) in EtOH (5 mL), and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 1.5 h. The mixture was filtered through a Celite pad, concentrated to provide the alcohol **18** (79 mg, 86%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.70 (0.6H, s), 7.34-7.28 (2.4H, m), 7.12-6.96 (5H, m), 6.90-6.79 (3H, m), 5.85 (0.6H, s), 5.24 (0.6H, br s), 4.93 (0.4H, br s), 4.72 (0.4H, br s), 4.11-4.04 (1.2H, m), 3.89-3.78 (4.8H, m), 3.39-3.35 (0.8H, m), 3.15-3.04 (1.2H, m).

4-[2-(3-Phenoxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepine-5-carboxylic acid (19a).

Jones reagent (2.5 M, 180 μL, 0.45 mmol) was added to a solution of **18** (101 mg, 0.23 mmol) in acetone (6 mL) at 0 °C, and the reaction mixture was stirred for 1.5 h. The reaction mixture was diluted with H₂O (20 mL), extracted with CH₂Cl₂ (40 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 85:15) and gel-phase chromatography

(GPC) to provide **19a** (18 mg, 17%) as a white solid. ¹H-NMR (CD₃OD) a mixture of conformers δ: 7.65 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.32-7.23 (3H, m), 7.11-6.95 (4H, m), 6.94-6.87 (4H, m), 6.60 (1H, s), 3.92-3.86 (0.8H, m), 3.80-3.75 (3.2H, m), 3.53-3.46 (1.2H, m), 3.22-3.16 (0.8H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 422 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₀F₃N₃O₄·0.25H₂O: C, 60.57; H, 4.34; N, 8.83. Found: C, 60.73; H, 4.64; N, 8.61.

***tert*-Butyl *N*-(2-{1-[2-chloro-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]but-3-enylamino}ethyl)carbamate (**21**).**

2-Chloro-6-(trifluoromethyl)pyridine-3-carbaldehyde **20** (11.96 g, 57.1 mmol) was added to a solution of *N*-Boc-ethylenediamine (5.83 mL, 58.2 mmol) and Na₂SO₄ (50 g) in CH₂Cl₂ (400 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 17 h. After the reaction mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 3:2) to provide the imine (13.87 g, 69%) as a yellow oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.67 (1H, s), 8.53 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.68 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.79 (1H, br s), 3.83 (2H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.50 (2H, q, *J* = 5.7 Hz), 1.44 (9H, s).

A solution of allylmagnesium bromide in Et₂O (0.7 M, 60 mL, 42 mmol) was added to a solution of the imine (13.44 g, 38.2 mmol) in THF (150 mL) under N₂ atmosphere at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 45 min. Then, the reaction mixture was diluted with H₂O (200 mL), extracted with AcOEt (400 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 7:3) to provide **21** (10.91 g, 73%) as a yellow oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.12 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.82-5.71 (1H, m), 5.17-5.11 (2H, m), 4.72 (1H, br s), 4.21-4.10 (2H, m), 3.21-3.14 (2H, m), 2.65-2.59 (1H, m), 2.57-2.52 (1H, m), 2.47-2.41 (1H, m), 2.24-2.16 (1H, m), 1.44 (9H, s).

***tert*-Butyl 5-allyl-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepine-4-carboxylate (**22**).**

21 (12.22 g, 31.0 mmol) was dissolved in 4 N HCl/AcOEt (50 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 5 h. The mixture was concentrated and triturated in (*i*-Pr)₂O (100 mL). Then, after the suspension was filtered off, the obtained solid was washed with (*i*-Pr)₂O and dried *in vacuo* to provide the diamine HCl salt (10.3 g). The obtained diamine HCl salt (10.3 g) was added to a solution of (*i*-Pr)₂EtN (15.0 mL, 82.2 mmol) in NMP (100 mL) at 160 °C, and the reaction mixture was stirred for 8 h. After the reaction mixture was diluted with AcOEt/Et₂O (150 mL/150 mL), washed with brine (300 mL), dried

(Na₂SO₄), and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 3:7) to provide the diazepine including NMP (11.8 g) as a brown oil. Di-*tert*-butyl dicarbonate (7.98 g, 36.5 mmol) was added to a solution of the diazepine including NMP (11.8 g) and Et₃N (12.7 mL, 91.4 mmol) in CH₂Cl₂ (80 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 15 h. Then, the reaction mixture was diluted with H₂O (200 mL), extracted with Et₂O (200 mL x 2), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 4:1) to provide **22** (6.53 g, 59%, 3 steps) as a yellow oil. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.56 (0.5H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.44 (0.5H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.10 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 5.68-5.59 (1H, m), 5.33 (0.5H, br s), 5.08-4.99 (3.5H, m), 4.14-4.00 (1H, m), 3.38-3.31 (2H, m), 3.19-3.08 (1H, m), 2.86-2.72 (1H, m), 2.53-2.46 (1H, m), 1.45 (9H, s).

Methyl 2-[8-(trifluoromethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl]acetate hydrochloride (23).

A mixture of **22** (550 mg, 1.54 mmol), 2.5% OsO₄ in *i*-PrOH (20 μL, 20 μmol), and *N*-methylmorpholine oxide (360 mg, 3.08 mmol) in acetone (15 mL) was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was diluted with AcOEt (30 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated to provide the diol as a brown oil (600 mg). A mixture of the diol (600 mg) and sodium periodate (491 mg, 2.30 mmol) in THF/H₂O (9 mL/3 mL) was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was diluted with AcOEt (30 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated *in vacuo* to provide the aldehyde as a colorless oil (495 mg). A mixture of the obtained aldehyde, NaH₂PO₄·2H₂O (2.15 g, 13.8 mmol), NaClO₂ (312 mg, 3.45 mmol), and 2-methyl-2-butene (7.33 mL, 69.0 mmol) in *t*-BuOH/H₂O (5 mL/5 mL) was stirred at room temperature for 2 h. After concentration, the residue was diluted with AcOEt (50 mL x 2), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated *in vacuo* to provide the carboxylic acid as a brown oil (560 mg). A mixture of the obtained carboxylic acid, iodomethane (1.82 mL, 2.93 mmol), and K₂CO₃ (303 mg, 2.20 mmol) in DMF (8 mL) was stirred at 50 °C for 4 h. Then, the reaction mixture was diluted with H₂O (30 mL), extracted with Et₂O (30 mL x 2), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 2:1) to provide the methyl ester (460 mg, 77%, 4 steps)

as a brown oil. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.72-7.59 (1H, m), 7.13 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 5.76 (0.4H, s), 5.57 (0.6H, s), 5.02-4.98 (1H, m), 4.12-3.99 (2H, m), 3.63 (3H, s), 3.50-3.33 (2H, m), 3.18-2.99 (2H, m), 1.44 (9H, s).

The methyl ester (460 mg, 1.18 mmol) was dissolved in 4 N HCl/AcOEt (5 mL) and stirred at room temperature for 2 h. (*i*-Pr)₂O (30 mL) was added to the resulting suspension. The deposited HCl salt was separated by filtration and dried *in vacuo* to provide **23** as a colorless solid (395 mg, 92%). ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 7.85 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.26 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.10 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.72 (3H, s), 3.57-3.40 (4H, m), 3.24-3.13 (2H, m).

Methyl 2-{4-[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl}acetate (24).

A mixture of **23** (300 mg, 0.83 mmol), (3-phenoxyphenyl)acetic acid (236 mg, 1.04 mmol), (*i*-Pr)₂EtN (0.60 mL, 3.31 mmol), and HATU (378 mg, 0.99 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was stirred at room temperature for 17 h. The mixture was diluted in CH₂Cl₂ (20 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **24** as a colorless oil (375 mg, 91%). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.77 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.33-7.29 (2H, m), 7.25-7.23 (1.2H, m), 7.16-7.07 (1.2H, m), 7.00-6.77 (6H, m), 6.17 (0.6H, t, *J* = 7.8 Hz), 5.44 (0.4H, t, *J* = 7.6 Hz), 5.08 (0.4H, s), 4.92 (0.6H, s), 4.70 (0.6H, d, *J* = 14.5 Hz), 4.04-3.90 (1H, m), 3.85-3.67 (2.4H, m), 3.64-3.60 (3H, m), 3.40-3.28 (1H, m), 3.21-2.70 (3H, m).

2-{4-[2-(3-Phenoxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl}acetic acid (19b).

A mixture of **24** (200 mg, 0.40 mmol) and 2 N aq. NaOH (4 mL) in THF/MeOH (2 mL/2 mL) was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was acidified with 2 N HCl and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 12:1). The obtained solid was triturated in hexane/Et₂O, filtered and dried *in vacuo* to provide **19b** as a colorless solid (183 mg, 94%). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.77 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.33-7.28 (2H, m), 7.25-7.21 (1.2H, m), 7.15-7.06 (1.2H, m),

6.97-6.76 (6H, m), 6.16 (0.6H, t, $J = 7.4$ Hz), 5.41 (0.4H, t, $J = 7.6$ Hz), 5.15 (0.4H, s), 5.02 (0.6H, s), 4.71 (0.6H, d, $J = 14.5$ Hz), 3.97-3.94 (1H, m), 3.84-3.63 (2.4H, m), 3.40-3.27 (1H, m), 3.21-2.70 (3H, m). MS (ESI⁺) m/z : 486 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₂₂F₃N₃O₄·0.2H₂O: C, 61.40; H, 4.62; N, 8.59. Found: C, 61.42; H, 4.75; N, 8.57.

2-((5R)-4-[2-(3-Phenoxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid ((R)-19b) and **2-((5S)-4-[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid ((S)-19b).**

Each enantiomer of **24** (120 mg, 0.240 mmol) was separated by using chiral HPLC: column, t_R of (*R*)-enantiomer = 6.56 min, (*S*)-enantiomer = 7.47 min; temperature, 27 °C, CHIRALPACK IC (4.6 x 250 mm); eluent, hexane/EtOH = 70/30; flow rate = 1.0 mL/min. Then, the obtained (*R*)-enantiomer (55 mg, 0.11 mmol) and (*S*)-enantiomer (56 mg, 0.11 mmol) was respectively dissolved in a mixture of 2 N aq. NaOH (2 mL), THF (1 mL), and MeOH (1 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was acidified with 2 N HCl and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo*. The obtained residue was triturated in hexane/Et₂O, filtered and dried *in vacuo* to provide (*R*)-**19b** as a colorless solid (47 mg, 88%), [α]_D^{21.0} -43.5 (*c* 0.49, CHCl₃), and (*S*)-**19b** as a colorless solid (54 mg, 97%), [α]_D^{21.0} +42.7 (*c* 0.48, CHCl₃). The absolute configurations were determined by the correspondence of the optical rotation of (*R*)-**19b** obtained from the stereospecific route in Scheme 3.

(NE)-N-[[2-Chloro-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]methylene]-2-methyl-propane-2-sulfinamide (25).

A mixture of 2-chloro-6-(trifluoromethyl)pyridine-3-carbaldehyde **20** (19.0 g, 90.8 mmol), Ti(OEt)₄ (41.4 g, 182 mmol), and (*S*)-(-)-*tert*-butylsulfinamide (11.2 g, 92.6 mmol) in THF (200 mL) was stirred at reflux for 5 h. The cooled reaction mixture was concentrated, and dissolved in AcOEt (500 mL). The resulting suspension was filtered through a Celite pad, and the filtrate was concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 4:1) to provide **25** (28.9 g, 99%) as a light yellow solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 9.00 (1H, s), 8.53 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.73 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 1.29 (9H, s).

N-((1R)-1-[2-Chloro-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]but-3-enyl)-2-methylpropane-2-sulfinamide (26).

A mixture of **25** (28.9 g, 90.0 mmol), allyl bromide (55.9 g, 0.46 mol), and indium (42.5 g, 0.37 mol) was vigorously stirred in saturated aq. NaBr at room temperature for 21 h. After addition of saturated aq. NaHCO₃ (500 mL), the reaction mixture was extracted with AcOEt (250 mL x 3). The organic layers were filtered through a Celite pad, and dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:4 with 5% of Et₃N) to provide **26** as a colorless solid (30.7 g, 94%). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.95 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.79-5.68 (1H, m), 5.24 (2H, t, *J* = 14.1 Hz), 5.03-4.99 (1H, m), 3.78 (1H, s), 2.79-2.73 (1H, m), 2.51-2.43 (1H, m), 1.24 (9H, s).

(1R)-1-[2-Chloro-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]but-3-en-1-amine hydrochloride (27).

The sulfinamide **26** (22.8 g, 64.3 mmol) was dissolved in 4 N HCl/1,4-dioxane (100 mL) and stirred at room temperature for 2 h. After the reaction mixture was concentrated, the residue was added to Et₂O (300 mL). The resulting suspension was filtered, and dried *in vacuo* to provide **27** (15.1 g, 82%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 8.24 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.97 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 5.83-5.72 (1H, m), 5.25 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 5.22 (1H, s), 4.93 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.81 (2H, t, *J* = 7.2 Hz).

tert-Butyl N-[2-((1R)-1-[2-chloro-6-(trifluoromethyl)-3-pyridyl]but-3-enyl)amino)ethyl]carbamate (28).

A mixture of **27** (15.1 g, 52.8 mmol), *tert*-butyl *N*-(2-oxoethyl)carbamate (12.6 g, 79.3 mmol), and NaBH(OAc)₃ (25.2 g, 95.1 mmol) in CH₂Cl₂ (250 mL) was stirred at room temperature for 4 h. After addition of saturated aq. NaHCO₃ (300 mL), the reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ (250 mL x 2). The organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 2:3) to provide **28** as a colorless solid (20.8 g, quant.). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.12 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 5.81-5.71 (1H, m), 5.13 (2H, t, *J* = 12.3 Hz), 4.72 (1H, br s), 4.21-4.17 (1H, m), 3.19 (2H, br s), 2.65-2.59 (1H, m), 2.57-2.51 (1H, m), 2.47-2.41 (1H, m), 2.24-2.16 (1H, m), 2.05 (1H, s), 1.44 (9H, s).

tert-Butyl (5R)-5-allyl-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepine-4-carboxylate (29).

28 (20.8 g, 52.8 mmol) was dissolved in 4 N HCl/AcOEt (100 mL) and stirred at room temperature for 1 h.

After the reaction mixture was concentrated, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (300 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 12:1) to provide the diamine as a colorless solid (12.7 g). A mixture of the diamine (12.7 g, 43.3 mmol) and (*i*-Pr)₂EtN (23.7 mL, 130 mmol) in *N*-methylpyrrolidone (250 mL) was stirred at 160 °C for 8 h. Subsequently, di-*tert*-butyl dicarbonate (14.2 g, 65.0 mmol) was added to the cooled mixture. After stirring at room temperature for 1 h, The mixture was diluted with Et₂O, washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 4:1) to provide **29** as a brown oil (11.1 g, 59%, 2 steps). ¹H NMR (CDCl₃): a mixture of conformers δ 7.56 (0.5H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.44 (0.5H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.10 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 5.68-5.59 (1H, m), 5.33 (0.5H, br s), 5.08-4.99 (3.5H, m), 4.14-4.00 (1H, m), 3.38-3.31 (2H, m), 3.19-3.08 (1H, m), 2.86-2.72 (1H, m), 2.53-2.46 (1H, m), 1.45 (9H, s).

Methyl 2-[(5*R*)-8-(trifluoromethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl]acetate hydrochloride (30).

A mixture of **29** (11.1 g, 31.1 mmol), 2.5% OsO₄ in *i*-PrOH (8.00 mL, 0.79 mmol), and *N*-methylmorpholine oxide (4.74 g, 40.5 mmol) was dissolved in acetone/H₂O (90 mL/30 mL) at 0 °C, then stirred at room temperature for 18 h. The mixture was diluted with AcOEt (300 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 8:1) to provide the diol as a brown oil (12.9 g). A mixture of the diol (12.9 g) and sodium periodate (13.3 g, 62.3 mmol) in THF/H₂O (150 mL/50 mL) was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was diluted with AcOEt (300 mL), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated *in vacuo* to provide the aldehyde as a colorless oil (11.9 g). A mixture of the aldehyde (11.9 g), NaH₂PO₄·2H₂O (36.4 g, 234 mmol), NaClO₂ (7.04 g, 78 mmol), and 2-methyl-2-butene (33.1 mL, 311 mmol) in *t*-BuOH/H₂O (150 mL/150 mL) was stirred at room temperature for 17 h. After concentration, the residue was diluted with AcOEt (300 mL x 2), washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated *in vacuo* to provide the carboxylic acid as a brown oil (16.1 g). A mixture of the carboxylic acid (15.2 g) and 2.0 M (trimethylsilyl)diazomethane/hexane (18.0 mL, 36.0 mmol) in THF/MeOH (50 mL/50 mL) was stirred at 0 °C for 1 h. The mixture was concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 3:1) to provide the methyl ester as a colorless oil (8.38 g). The

methyl ester (8.82 g, 22.7 mmol) was dissolved in 4 N HCl/1,4-dioxane (50 mL) and stirred at room temperature for 1 h. (*i*-Pr)₂O (300 mL) was added to the resulting suspension. The deposited HCl salt was separated by filtration and dried *in vacuo* to provide **30** as a colorless solid (7.07 g, 64%, 5 steps). ¹H NMR (CDCl₃): a mixture of conformers δ: 7.85 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.26 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.10 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.72 (3H, s), 3.66 (1H, s), 3.58-3.40 (4H, m), 3.25-3.22 (2H, m).

2-((5*R*)-4-{2-[3-(4-Fluorophenoxy)phenyl]acetyl}-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (31a).

A mixture of **30** (120 mg, 0.32 mmol), 2-[3-(4-fluorophenoxy)phenyl]acetic acid (94 mg, 0.38 mmol), (*i*-Pr)₂EtN (0.116 mL, 0.64 mmol), and HATU (146 mg, 0.38 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was stirred at room temperature overnight. The mixture was diluted in CH₂Cl₂ (20 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide the acylated diazepine as a colorless oil (165 mg, quant.). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.77 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.24-7.15 (1.4H, m), 7.03-6.88 (5H, m), 6.83-6.71 (3H, m), 6.16 (0.4H, t, *J* = 8.0 Hz), 5.43 (0.6H, t, *J* = 7.4 Hz), 5.08 (0.4H, d, *J* = 5.5 Hz), 4.92 (0.6H, d, *J* = 4.3 Hz), 4.72-4.67 (0.6H, m), 4.03-3.90 (1H, m), 3.86-3.69 (2.4H, m), 3.65-3.61 (3H, m), 3.42-3.29 (1H, m), 3.20-2.70 (3H, m).

A mixture of the acylated diazepine (170 mg, 0.33 mmol) and 2 N aq. NaOH (4 mL) in THF/MeOH (2 mL/2 mL) was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was acidified with 2 N HCl and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo*. The obtained residue was triturated in hexane/Et₂O, filtered and dried *in vacuo* to provide **31a** as a colorless solid (160 mg, 97%). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.77 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.23 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.16 (0.4H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.03-6.89 (5H, m), 6.83-6.71 (3H, m), 6.16 (0.6H, t, *J* = 8.0 Hz), 5.43 (0.4H, t, *J* = 7.4 Hz), 5.08 (0.6H, d, *J* = 5.5 Hz), 4.92 (0.4H, d, *J* = 5.5 Hz), 4.72-4.67 (0.6H, m), 4.03-3.91 (1H, m), 3.85-3.61 (2.4H, m), 3.42-3.28 (1H, m), 3.21-2.70 (3H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 504 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₂₁F₄N₃O₄ · 0.2H₂O: C, 59.22; H, 4.25; N, 8.29. Found: C, 59.26; H, 4.34; N, 8.22.

2-((5*R*)-4-[2-(3-Isobutoxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl}acetic acid (31b).

31b was prepared in a similar manner described for **31a**. Yield: 72% (2 steps from **30**). ¹H NMR (CDCl₃): a

mixture of conformers δ : 7.79 (0.6H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.19-7.11 (1.2H, m), 6.91 (0.6H, d, $J = 7.4$ Hz), 6.84 (0.6H, d, $J = 7.4$ Hz), 6.77-6.68 (3H, m), 6.19 (0.6H, t, $J = 7.6$ Hz), 5.44 (0.4H, t, $J = 7.6$ Hz), 5.14 (0.4H, br s), 4.98 (0.6H, br s), 4.78-4.63 (0.6H, m), 4.03-3.91 (1H, m), 3.87-3.82 (0.4H, m), 3.77-3.41 (4H, m), 3.25-2.73 (4H, m), 2.05-1.95 (1H, m), 0.99-0.95 (6H, m). MS (ESI⁺) m/z : 466 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁻) m/z : 464.1793 (M-H)⁻ (calcd for C₂₃H₂₆F₃N₃O₄: 464.1797). [α]_D^{21.0} -40.2 (c 1.00, CHCl₃). Anal. Calcd for C₂₃H₂₆F₃N₃O₄·0.2H₂O: C, 58.89; H, 5.67; N, 8.96. Found: C, 58.89; H, 5.67; N, 8.96.

2-[(5*R*)-4-(2-{3-[(6-Methyl-3-pyridyl)oxy]phenyl}acetyl)-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl]acetic acid (31c).

31c was prepared in a similar manner described for **31a**. Yield: 69% (2 steps from **30**). ¹H-NMR (CD₃OD) a mixture of conformers δ : 8.13-8.09 (1H, m), 7.75 (0.5H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.34-7.24 (3H, m), 7.13 (0.5H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.06-7.02 (1.5H, m), 6.90 (1.5H, d, $J = 7.2$ Hz), 6.81 (0.5H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.70 (0.5H, s), 6.12 (0.5H, t, $J = 7.6$ Hz), 5.53 (0.5H, t, $J = 7.3$ Hz), 4.60-4.56 (0.5H, m), 4.16-4.13 (0.5H, m), 3.99-3.96 (0.5H, m), 3.91-3.78 (1.5H, m), 3.72-3.67 (0.5H, m), 3.50-3.36 (1.5H, m), 3.23-2.78 (4H, m), 2.52-2.48 (3H, m). MS (ESI⁺) m/z : 501 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁻) m/z : 499.1597 (M-H)⁻ (calcd for C₂₅H₂₃F₃N₄O₄: 499.1593). [α]_D^{21.0} +32.9 (c 1.00, CHCl₃). Anal. Calcd for C₂₅H₂₃F₃N₄O₄·5/7H₂O: C, 58.49; H, 4.80; N, 10.91. Found: C, 58.71; H, 4.81; N, 10.61.

***tert*-Butyl (5*R*)-5-(2-benzyloxy-2-oxo-ethyl)-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepine-4-carboxylate (32).**

A mixture of the carboxylic acid obtained in the procedure of **30** (16.5 g, 36.0 mmol), benzyl bromide (5.56 mL, 46.8 mmol), and K₂CO₃ (7.47 g, 54.0 mmol) in acetone (250 mL) was stirred at 60 °C for 7 h. Then, the reaction mixture was filtered through a Celite pad, concentrated, and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **32** (16.9 g) as a crude brown oil.

Benzyl 2-[(5*R*)-8-(trifluoromethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl]acetate dihydrochloride (33).

The benzyl ester **32** (16.9 g) was dissolved in 4 N HCl/1,4-dioxane (80 mL) and stirred at room temperature for 0.5 h. Et₂O (300 mL) was added to the resulting suspension. The deposited hydrochloride

salt was separated by filtration and dried *in vacuo* to provide **33** as a colorless solid (12.8 g, 80%, 5 steps).

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 7.77 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.34-7.29 (5H, m), 7.16 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.16 (2H, s), 5.11 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.56-3.40 (4H, m), 3.26-3.23 (2H, m).

Benzyl 2-((5*R*)-4-[2-(3-hydroxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetate (34).

A mixture of **33** (500 mg, 1.14 mmol), (3-hydroxyphenyl)acetic acid (208 mg, 1.37 mmol), and DMT-MM (573 mg, 1.71 mmol) in MeOH (10 mL) was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was diluted in AcOEt (50 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **34** as a colorless solid (441 mg, 77%). ¹H NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.72 (0.6H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.38-7.33 (3H, m), 7.29-7.27 (1.4H, m), 7.17-7.07 (2H, m), 6.90 (0.6H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.81 (0.4H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.73-6.60 (3H, m), 6.18 (0.6H, t, *J* = 8.1 Hz), 5.89 (0.4H, s), 5.45-5.41 (1H, m), 5.18 (0.4H, d, *J* = 4.9 Hz), 5.11-4.88 (3H, m), 4.60-4.57 (0.6H, m), 3.88-3.58 (3H, m), 3.27-2.77 (4H, m).

2-((5*R*)-4-[2-(3-Hydroxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (35a).

10% Pd-C (60 mg) was added to a solution of **34** (300 mg, 0.60 mmol) in EtOH (5 mL), and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 5 h. The mixture was filtered through a Celite pad, concentrated, and purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1) to provide the diazepine **35a** (213 mg, 87%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CD₃OD) a mixture of conformers δ: 7.77 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.13-6.82 (2.4H, m), 6.67-6.53 (3H, m), 6.16 (0.6H, t, *J* = 7.8 Hz), 5.52 (0.4H, t, *J* = 7.4 Hz), 4.64-4.58 (0.4H, m), 4.10-4.06 (0.6H, m), 3.97-3.92 (0.4H, m), 3.85-3.81 (0.6H, m), 3.75 (1H, s), 3.70-3.63 (0.4H, m), 3.45 (0.6H, dd, *J* = 13.9, 4.5 Hz), 3.25-3.02 (2H, m), 2.95-2.76 (2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 410 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₁₈F₃N₃O₄·7/8H₂O: C, 53.68; H, 4.68; N, 9.88. Found: C, 53.76; H, 4.90; N, 9.59.

2-((5*R*)-4-{2-[3-(2-Methylpropanoyloxy)phenyl]acetyl}-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (35b).

A mixture of **34** (100 mg, 0.20 mmol), 2-methylpropanoyl chloride (256 mg, 0.24 mmol), and Et₃N (56 μ L, 0.40 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was diluted with AcOEt (30 mL), washed with water and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide the benzyl ester (114 mg, quant.). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ : 7.69 (0.6H, d, J = 7.8 Hz), 7.37-7.28 (5.4H, m), 6.80-6.79 (5H, m), 6.18 (0.6H, t, J = 7.8 Hz), 5.40 (0.4H, t, J = 7.4 Hz), 5.09-4.88 (3H, m), 4.72-4.69 (0.4H, m), 3.96-3.88 (0.6H, m), 3.79-3.59 (2H, m), 3.42-3.30 (2H, m), 3.28-3.07 (2H, m), 2.99-2.71 (2H, m), 1.31-1.25 (6H, m).

10% Pd-C (50 mg) was added to a solution of the benzyl ester (114 mg, 0.200 mmol) in EtOH (5 mL), and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 5 h. The mixture was filtered through a Celite pad, concentrated, and purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1). The obtained was triturated in hexane/Et₂O, filtered and dried *in vacuo* to provide **35b** (75 mg, 78%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ : 7.76 (0.6H, d, J = 7.6 Hz), 7.31-7.24 (1.4H, m), 7.15-6.88 (4H, m), 6.27-6.24 (0.6H, m), 5.35-5.33 (0.4H, m), 5.18 (0.4H, br s), 5.09 (0.6H, br s), 4.76-4.74 (0.4H, m), 4.01-3.99 (0.6H, m), 3.88 (0.4H, d, J = 15.6 Hz), 3.74 (1H, s), 3.68-3.62 (0.6H, m), 3.43-3.28 (2H, m), 3.21-3.14 (1.6H, m), 3.03-3.01 (0.4H, m), 2.83-2.78 (1H, m), 2.69-2.54 (1H, m), 1.32-1.28 (3.6H, m), 0.90-0.86 (2.4H, m). MS (ESI⁺) m/z : 480 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₂₄F₃N₃O₅·0.5H₂O: C, 56.55; H, 5.16; N, 8.60. Found: C, 56.52; H, 5.19; N, 8.38.

2-((5R)-4-{2-[3-(3-Methylbutanoyloxy)phenyl]acetyl}-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (35c).

35c was prepared in a similar manner described for **35b**. Yield: 71% (2 steps from **34**). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ : 7.76 (0.6H, d, J = 7.8 Hz), 7.34-7.29 (1.4H, m), 7.16-6.90 (4H, m), 6.28-6.24 (0.6H, m), 5.32-5.28 (0.4H, m), 5.12 (0.6H, br s), 5.02 (0.4H, br s), 4.78-4.73 (0.4H, m), 3.99-3.60 (3.6H, m), 3.40-2.60 (4H, m), 2.47-2.45 (2H, m), 2.28-2.18 (1H, m), 1.07-1.03 (6H, m). MS (ESI⁺) m/z : 494 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁺) m/z : 494.1908 (M+H)⁺ (calcd for C₂₄H₂₇F₃N₃O₅: 494.1903). [α]_D^{21.0} -21.6 (c 1.00, CHCl₃). Anal. Calcd for C₂₄H₂₆F₃N₃O₅·0.2H₂O: C, 57.99; H, 5.35; N, 8.45. Found: C, 58.05; H, 5.44; N, 8.42.

2-((5R)-4-[2-(3-Pentanoyloxyphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (35d).

35d was prepared in a similar manner described for **35b**. Yield: 96% (2 steps from **34**). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.76 (0.6H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.31-7.25 (1.4H, m), 7.15-6.88 (4H, m), 6.25-6.23 (0.6H, m), 5.34-5.32 (0.4H, m), 5.19 (0.4H, br s), 5.11 (0.6H, br s), 4.75-4.73 (0.4H, m), 4.02-3.63 (3.6H, m), 3.43-3.27 (1.4H, m), 3.21-3.14 (1.4H, m), 3.05-2.97 (0.6H, m), 2.75-2.68 (0.6H, m), 2.58-2.54 (2H, m), 1.74-1.72 (2H, m), 1.43 (2H, td, *J* = 15.1, 7.3 Hz), 0.99-0.95 (3H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 494 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₆F₃N₃O₅ · 1/3H₂O: C, 57.71; H, 5.38; N, 8.41. Found: C, 57.76; H, 5.49; N, 8.35.

2-((5R)-4-[2-[3-(2-Cyclopropylacetyl)oxyphenyl]acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (35e).

35e was prepared in a similar manner described for **35b**. Yield: 57% (2 steps from **34**). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.77 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.32-7.20 (1.4H, m), 7.14-6.91 (4H, m), 6.24-6.22 (0.6H, m), 5.35-5.33 (0.4H, m), 5.20 (0.4H, br s), 5.11 (0.6H, br s), 4.77-4.75 (0.4H, m), 4.01-3.99 (0.6H, m), 3.89-3.88 (0.4H, m), 3.85-3.77 (2H, m), 3.68-3.62 (0.6H, m), 3.45-3.27 (1H, m), 3.23-3.00 (2H, m), 2.72 (0.4H, dd, *J* = 15.3, 7.6 Hz), 2.56 (0.6H, dd, *J* = 15.7, 5.5 Hz), 2.48-2.46 (2H, m), 1.20-1.10 (1H, m), 0.66-0.58 (2H, m), 0.29-0.24 (2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 492 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₄F₃N₃O₅ · 0.5H₂O: C, 57.60; H, 5.03; N, 8.40. Found: C, 57.48; H, 4.97; N, 8.70.

2-((5R)-4-[2-[3-(3,3-Dimethylbutanoyloxy)phenyl]acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (35f).

35f was prepared in a similar manner described for **35b**. Yield: 46% (2 steps from **34**). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.76 (0.6H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.34-7.28 (1.4H, m), 7.15-6.89 (4H, m), 6.27-6.24 (0.6H, m), 5.32-5.30 (0.4H, m), 5.13 (0.4H, br s), 5.04 (0.6H, br s), 4.75-4.73 (0.4H, m), 4.01-3.97 (0.6H, m), 3.89-3.76 (2H, m), 3.64 (1H, t, *J* = 11.3 Hz), 3.41-3.04 (3H, m), 2.66 (0.6H, dd, *J* = 15.1, 6.1 Hz), 2.51 (0.4H, dd, *J* = 15.1, 4.9 Hz), 2.44 (2H, s), 1.13 (9H, d, *J* = 3.5 Hz). MS (ESI⁺) *m/z*: 508 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₂₈F₃N₃O₅ · 0.25H₂O: C, 58.64; H, 5.61; N, 8.21. Found: C, 58.68; H, 5.87; N, 7.94.

Isopropyl 3-{2-[(5R)-5-(2-benzyloxy-2-oxo-ethyl)-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]-2-oxo-ethyl}benzoate (36, R = *i*-Pr).

33 (229 mg, 0.52 mmol) was added to a solution of 2-(3-isopropoxycarbonylphenyl)acetic acid (110 mg, 0.48 mmol), HATU (217 mg, 0.58 mmol), and (*i*-Pr)₂EtN (325 μ L, 1.90 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 5 h. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 5:2) to provide **36** (212 mg, 78%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ : 7.93-7.85 (1H, m), 7.80 (1H, s), 7.70 (0.6H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.38-7.28 (7H, m), 7.07 (0.4H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.01-6.83 (1H, m), 6.18 (0.6H, t, *J* = 6.3 Hz), 5.44 (0.4H, t, *J* = 7.0 Hz), 5.25-5.18 (1H, m), 5.09-4.99 (2H, m), 4.91-4.69 (1H, m), 3.95 (1H, s), 3.83-3.64 (2H, m), 3.42-2.79 (4H, m), 1.35-1.32 (6H, m).

3-{2-[(5R)-5-(Carboxymethyl)-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-4-yl]-2-oxo-ethyl}benzoic acid (37a).

A mixture of **36** (R = *i*-Pr, 110 mg, 0.223 mmol) and 2 N aq. NaOH (0.4 mL) in MeOH (2 mL) was stirred at room temperature for 6 h. The mixture was acidified with 2 N HCl, and concentrated *in vacuo*. The aqueous phase was extracted with *i*-PrOH in CHCl₃ (25%). The combined organic extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was triturated upon Et₂O in hexane, collected by filtration to afford **37a** as a colorless solid (97 mg, quant.). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ : 8.13-8.03 (1H, m), 8.00-7.95 (1.6H, m), 7.64-7.42 (2.4H, m), 7.22-7.15 (1H, m), 6.56-6.51 (0.6H, m), 5.65 (0.4H, t, *J* = 6.7 Hz), 5.20 (0.4H, br s), 5.07 (0.6H, br s), 4.71-4.68 (0.4H, m), 4.13-4.09 (0.6H, m), 3.90-3.77 (2H, m), 3.60-3.37 (2H, m), 3.27-2.99 (2H, m), 2.86-2.60 (1H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 438 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₀H₁₈F₃N₃O₅·0.5H₂O: C, 53.81; H, 4.29; N, 9.41. Found: C, 54.06; H, 4.54; N, 9.22.

2-{(5R)-4-[2-(3-Isopropoxycarbonylphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl}acetic acid (37b).

10% Pd-C (60 mg) was added to a solution of the benzyl ester **36** (R = *i*-Pr, 212 mg, 0.372 mmol) in EtOH (5 mL), and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 2 h. The mixture was filtered through a Celite pad, concentrated, and purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1). The obtained was triturated in hexane/Et₂O, filtered and dried *in vacuo* to provide **37b** (174 mg, 98%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.91-7.87 (0.6H, m), 7.85-7.79 (2H, m), 7.38-7.29 (2H, m), 7.15-6.88 (1.4H, m), 6.28 (0.6H, t, *J* = 7.8 Hz), 5.46 (0.4H, t, *J* = 7.8 Hz), 5.28-5.17 (1.2H, m), 4.77-4.72 (0.4H, m), 4.08-3.99 (0.4H, m), 3.82 (2H, s), 3.76-3.64 (1H, m), 3.45-3.03 (3H, m), 2.84-2.72 (1H, m), 1.37-1.28 (4H, m), 0.90-0.87 (3H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 480 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₃H₂₄F₃N₃O₅·0.2H₂O: C, 57.19; H, 5.09; N, 8.70. Found: C, 57.16; H, 5.22; N, 8.65.

2-{(5*R*)-4-[2-(3-Isobutoxycarbonylphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl}acetic acid (37c).

37c was prepared in a similar manner described for **37b**. Yield: 75% (2 steps from **33**). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.93-7.89 (0.6H, m), 7.86-7.80 (2H, m), 7.41-7.29 (2H, m), 7.19-6.89 (1.4H, m), 6.35-6.31 (0.6H, m), 5.46 (0.4H, t, *J* = 7.4 Hz), 5.15 (0.4H, br s), 5.06 (0.6H, br s), 4.78-4.73 (0.4H, m), 4.13 (1.6H, d, *J* = 6.3 Hz), 4.08-4.02 (1H, m), 3.83 (2H, s), 3.68-3.66 (1H, m), 3.40-3.34 (1H, m), 3.25-3.04 (2H, m), 2.76-2.74 (1H, m), 2.12-2.02 (1H, m), 1.02-0.99 (6H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 494 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₆F₃N₃O₅: C, 58.41; H, 5.31; N, 8.51. Found: C, 58.18; H, 5.45; N, 8.45.

2-{(5*R*)-4-[2-(3-Butoxycarbonylphenyl)acetyl]-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl}acetic acid (37d).

37d was prepared in a similar manner described for **37b**. Yield: 80% (2 steps from **33**). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.91-7.89 (0.6H, m), 7.87-7.81 (2H, m), 7.41-7.29 (2H, m), 7.17-6.91 (1.4H, m), 6.36-6.32 (0.6H, m), 5.46 (0.4H, t, *J* = 7.4 Hz), 5.12 (0.4H, br s), 5.06 (0.6H, br s), 4.78-4.74 (0.4H, m), 4.08-3.98 (0.4H, m), 3.83 (2H, s), 3.68-3.65 (1H, m), 3.39-3.35 (1H, m), 3.25-3.04 (2H, m), 2.78-2.72 (1H, m), 1.78-1.63 (2H, m), 1.35-1.33 (2H, m), 1.32-1.16 (2H, m), 0.99-0.88 (3H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 494 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₆F₃N₃O₅·0.2H₂O: C, 57.99; H, 5.35; N, 8.45. Found: C, 58.02; H, 5.56; N, 8.38.

2-((5R)-4-{2-[3-(Cyclopropylmethoxycarbonyl)phenyl]acetyl}-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (37e).

37e was prepared in a similar manner described for **37b**. Yield: 74% (2 steps from **33**). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.96-7.93 (0.6H, m), 7.89-7.80 (2H, m), 7.41-7.31 (2H, m), 7.16-6.90 (1.4H, m), 6.30 (0.6H, t, *J* = 7.4 Hz), 5.46 (0.4H, t, *J* = 7.4 Hz), 5.20 (0.4H, br s), 5.10 (0.6H, br s), 4.78-4.72 (0.4H, m), 4.17-4.12 (2H, m), 4.08-3.98 (1.6H, m), 3.83-3.05 (5H, m), 2.81-2.73 (1H, m), 1.32-1.21 (1H, m), 0.88 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 0.38-0.33 (2H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 492 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₄F₃N₃O₅·1/3H₂O: C, 57.94; H, 5.10; N, 8.45. Found: C, 57.94; H, 5.10; N, 8.50.

2-((5R)-4-{2-[3-(2,2-Dimethylpropoxycarbonyl)phenyl]acetyl}-8-(trifluoromethyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrido[2,3-*e*][1,4]diazepin-5-yl)acetic acid (37f).

37f was prepared in a similar manner described for **37b**. Yield: 75% (2 steps from **33**). ¹H-NMR (CDCl₃) a mixture of conformers δ: 7.93-7.90 (0.6H, m), 7.86-7.80 (2H, m), 7.42-7.30 (2H, m), 7.19-6.91 (1.4H, m), 6.37-6.33 (0.6H, m), 5.48-5.44 (0.4H, m), 5.12 (0.4H, br s), 5.01 (0.6H, br s), 4.78-4.73 (0.4H, m), 4.08-3.96 (1.6H, m), 3.84 (2H, s), 3.67-3.64 (2H, m), 3.41-3.35 (1H, m), 3.26-3.17 (1H, m), 3.12-3.06 (1H, m), 2.75-2.69 (1H, m), 1.04-1.02 (9H, m). MS (ESI⁺) *m/z*: 508 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₂₈F₃N₃O₅·0.2H₂O: C, 58.75; H, 5.60; N, 8.22. Found: C, 58.64; H, 5.77; N, 8.30.

2. Biological assays for BRS-3

2.1. *In vitro* BRS-3 agonist activity

The 384-well IP-One HTRF[®] Assay (Cisbio, Bedford, MA) was performed as described by the manufacturer's protocol. CHO-K1 stably expressing human and mouse BRS-3 was plated at 200,000 cells per well in 50 μL HAM and incubated in the CO₂ incubator at 37 °C for 24 h. On the next day, the media were removed and 25 μL of compounds diluted in HAM containing 0.1% BSA and 20 mM LiCl were added to each well and serial diluted IP1 standards (Cisbio) were also added to corresponding wells for this step. After the cells were incubated for 1 h in the CO₂ incubator at 37 °C, all the media were removed again and d2-labeled IP1 and cryptate-labeled anti-IP1 monoclonal antibody diluted in lysis buffer were added

sequentially. The assay plates were kept in the dark at 4 °C, overnight. Ratiometric measurements of fluorescence emission at 665 nm and 620 nm were obtained using a RUBY star fluorometer (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). IP1 levels in each well were calculated according to the standard curves on each plate. EC₅₀ values were obtained by fitting data to a nonlinear curve-fitting program (GraphPad Software, Inc., La Jolla CA).

2.2. Food intake evaluation in mice

Male C57BL/6N mice 7 weeks of age were purchased from Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan). All animals were held under standard laboratory conditions (12 h light per day, light on at 7:00 AM, 23 ± 2 °C, 55 ± 10% humidity) with food and water available ad libitum. On the day of testing, mice had been fasted for 16 hours were weighed and placed individually in cages. After 1 hour habituation to the new environment, mice were orally administered vehicle (0.5% methylcellulose) or compounds. One hour after compound administration, pre-weighed normal chow diet (FR2, purchased from Funabashi farm) was fed to the mice. Cumulative food intake of each mouse over 6 hours was measured. All experimental procedures were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Daiichi Sankyo. Statistical analysis using Dunnett's test was performed to compare the vehicle-treated and compound-administered groups. P values < 0.05 were considered significant.

3. Pharmacokinetic evaluation in mice

Male C57BL/6N mice were purchased at 5 weeks old from Charles River Laboratories Japan, Inc (Kanagawa, Japan). For acclimation, they were housed in stainless steel cages for 7-11 days in the controlled animal area. The mice were allowed free access to FR2 laboratory food (Funabashi Farm Co., Ltd.) and tap water. Compound **35b-35f** and **37b-37f** were suspended in a 0.5(w/v) % methyl cellulose 400 solution (Wako pure chemical industries, Osaka, Japan) for oral administration. For the administration, 2 mL/kg of the solution at a concentration of 5 mg/mL was used. The solutions of compounds were administered to male C57BL/6N mice, after overnight fasting. A blood sample of approximately 0.2 mL was collected from the jugular vein with a heparinized syringe. The blood was centrifuged at 14,000 rpm for 3 min at 4 °C (himac CR15D, Hitachi Koki Co., Ltd. rotor: RT15A2) to obtain the plasma. The plasma

was stored frozen at -20 °C until use for measurement of plasma concentration. The determination of the plasma concentration was performed by LC-MS/MS method using API 4000QTRAP (Applied Biosystems/MDS SCIEX). PK parameters were calculated by a non-compartmental model.

4. Safety evaluation in dogs

Female beagle dogs were obtained from Nosan Corporation (Kanagawa, Japan). Animals were housed in a temperature (22–25 °C) and humidity controlled (35–75%) environment with a 12-h light/dark cycle. All experimental procedures were performed in accordance with the in-house guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan. Test compounds were dispersed in 20% v/w hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution, at the concentration of 1 mg/mL. Dogs were anesthetized with halothane (0.5–1.5% end-tidal concentration) proceeded by intravenous injection of thiopental (30 mg/kg of body weight). Two catheters were placed in the femoral artery and vein, for blood pressure recording and test substance administration, respectively. Heart rate and mean blood pressure were analyzed by the hemodynamic analysis software (SBP2000, Softron Co., Ltd., Tokyo). After the recording of pre-administration value, test substance was administered via the catheter in the femoral vein with syringe driver, at 3 mg/kg/3 mL for 30 min (adjusted by infusion speed). Blood pressure was recorded for 60 min from the administration start, except for the one animal (#2, **31b** administered).

5. Computational calculation for the conformational analysis

3D coordinates of compounds illustrated in Figure 7-9 were generated using the program Ligprep and used for Conformational Search with the program Macromodel (Schrodinger, LLC, New York, NY, 2010). Relative energy $\Delta E = E_{(R)} - E_{(S)}$ was calculated in each compound as the energy barrier for the N-atom inversion. $E_{(R)}/E_{(S)}$ is defined as the potential energy in OPLS-2005 forcefield of the lowest energy conformation with (R)/(S) ring configuration.

第二部 抗糖尿病薬 FATP1 阻害剤の創製研究

6. Chemistry for FATP1 inhibitors

Unless otherwise noted, materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 400 or 500 spectrometer with tetramethylsilane as an internal reference. Mass spectra were recorded on an Agilent Technologies Agilent 1100 series LC/MS. TLC analysis was performed on 60F254 plates. Flash column chromatography was performed on Shoko scientific cartridge series (SI-60).

5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazole-3-thiol (**41**)

A mixture of phenylaminoacetic acid hydrazide **40** (3.56 g, 21.6 mmol), ethyl isothiocyanate (1.88 mL, 21.6 mmol), and 2 M aq. NaOH (5.0 mL, 10.0 mmol) in THF (10 mL) was refluxed for 2 h. 1 M HCl was added to the cooled reaction mixture until the mixture became pH 6. The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (100 mL). The organic layers were dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **4** (4.23 g, 84%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.28 (1H, br s), 7.23 (2H, t, *J* = 8.3 Hz), 6.84 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.72 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 4.39 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 4.15 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 4.08 (1H, br s), 1.39 (3H, t, *J* = 6.8 Hz).

tert-Butyl 4-[(2-chloroacetyl)amino]benzoate (**43d**, R¹ = 4-CO₂-*t*-Bu)

A mixture of *tert*-butyl 4-aminobenzoate **42d** (2.00 g, 10.4 mmol), 2-chloroacetyl chloride (0.91 mL, 11.5 mmol), and Et₃N (4.33 mL, 31.1 mmol) in THF (40 mL) was stirred at room temperature for 4 h. Water (50 mL) was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt (50 mL). The organic layers were dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 3:1) to provide **43d** (2.32 g, 83%) as a white solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.37 (1H, br s), 7.99 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.67 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 4.22 (2H, s), 1.23 (9H, s).

tert-Butyl 4-[(2-[[5-(anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)amino]benzoate (**44d**)

A mixture of **41** (0.665 g, 2.84 mmol), **43d** (1.15 g, 4.26 mmol), and sodium acetate (0.494 g, 8.51 mmol) in EtOH (15 mL) was refluxed for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **44d** (0.608 g, 46%)

as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.77 (1H, s), 7.90 (2H, dt, *J* = 9.0, 2.1 Hz), 7.63 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.22 (2H, t, *J* = 8.2 Hz), 6.81 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.44 (2H, s), 4.00 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.93 (2H, s), 1.56 (9H, t, *J* = 5.3 Hz), 1.35 (3H, t, *J* = 7.2 Hz). Anal. Calcd for C₂₄H₂₉N₅O₃S: C, 61.65; H, 6.25; N, 14.98. Found C, 61.56; H, 6.24; N, 15.00.

Ethyl 4-[(2-[[5-(anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)amino]benzoate (44a)

44a was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 57%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.83 (1H, br s), 7.99 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.67 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.23 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.83 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.51 (2H, d, *J* = 5.5 Hz), 4.35 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 4.14 (1H, t, *J* = 6.7 Hz), 4.02 (2H, q, *J* = 7.4 Hz), 3.95 (2H, s), 1.36-1.40 (6H, m). Anal. Calcd for C₂₃H₂₅N₅O₃S: C, 60.12; H, 5.73; N, 15.93. Found C, 60.03; H, 5.66; N, 15.92.

Ethyl 3-[(2-[[5-(anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)amino]benzoate (44b)

44b was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 77%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.53 (1H, s), 8.23 (1H, t, *J* = 1.8 Hz), 7.78 (2H, dt, *J* = 7.8, 1.8 Hz), 7.37 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.24 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 6.83 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 4.50 (2H, s), 4.37 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 4.01 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.97 (2H, s), 1.41-1.35 (6H, m). Anal. Calcd for C₂₂H₂₅N₅O₃S: C, 60.11; H, 5.73; N, 15.93. Found C, 60.14; H, 5.86; N, 15.80.

Methyl 4-[(2-[[5-(anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)amino]benzoate (44c)

A mixture of **44e** (150 mg, 0.31 mmol), iodomethane (30 μL, 0.47 mmol) and K₂CO₃ (214 mg, 1.55 mmol) in DMF (5 mL) was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **7c** (32 mg, 23%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.85 (1H, s), 7.95 (2H, dt, *J* = 9.3, 2.2 Hz), 7.65 (2H, dt, *J* = 9.3, 2.2 Hz), 7.19 (2H, dt, *J* = 9.1, 2.0 Hz), 6.80 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.74 (2H, dd, *J* = 8.8, 1.0 Hz), 4.47 (2H, s), 3.99 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.92 (2H, s), 3.86 (3H, s), 1.34 (3H, t, *J* = 7.2 Hz). Anal. Calcd for C₂₁H₂₃N₅O₃S·0.1H₂O: C, 59.03; H, 5.47; N, 16.39. Found C, 59.06; H, 5.45; N, 16.13.

4-[(2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)amino]benzoic acid (44e)

TFA (1 mL) was added to **44d** (115mg, 0.25 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. After the reaction mixture was evaporated, the residue was diluted with

AcOEt, washed with saturated aq. NaHCO₃, brine and dried *in vacuo* to provide **44e** (69 mg, 68%) as a light yellow solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 11.42 (1H, s), 8.69 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.46 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.86 (2H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.49 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.36 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 5.20 (2H, s), 4.97 (2H, s), 4.83 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 2.03 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). Anal. Calcd for C₂₀H₂₁N₅O₃S·0.4H₂O: C, 57.37; H, 5.25; N, 16.73. Found C, 57.39; H, 5.15; N, 16.64.

4-[(2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)amino]-*N*-methyl-benzamide (44f)

44e (65 mg, 0.16 mmol) was added to a solution of methylamine (19 μL, 0.19 mmol, 1.0 M in THF), WSCI HCl (45 mg, 0.24 mmol), HOBt·H₂O (27 mg, 0.17 mmol), and Et₃N (26 μL, 0.19 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 16 h. The mixture was diluted with AcOEt (30 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **44f** (21 mg, 31%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.68 (1H, s), 7.64 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.39 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.24 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 6.83 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 4.50 (2H, s), 4.02 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.95 (2H, d, *J* = 2.0 Hz), 3.08-2.99 (5H, m), 1.37 (3H, t, *J* = 7.4 Hz). Anal. Calcd for C₂₁H₂₄N₆O₂S·1.2H₂O: C, 54.72; H, 5.79; N, 18.15. Found C, 54.65; H, 5.50; N, 18.12.

4-[(2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)amino]-*N,N*-dimethyl-benzamide (44g)

44g was prepared in a similar manner described for **44f**. Yield: 66%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.79 (1H, s), 7.71 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.67 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.25-7.22 (2H, m), 6.83 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.06 (1H, br s), 4.51 (2H, s), 4.02 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.95 (2H, s), 3.01-3.00 (6H, m), 1.37 (3H, t, *J* = 7.2 Hz). Anal. Calcd for C₂₂H₂₆N₆O₂S·1.4H₂O·0.08hexane: C, 57.37; H, 6.41; N, 17.86. Found C, 57.23; H, 6.12; N, 17.56.

4-[(2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)amino]-*N*-ethyl-benzamide (44h)

44h was prepared in a similar manner described for **44f**. Yield: 56%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.77 (1H, s), 7.71 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.67 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.24 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 6.83 (1H, t, *J* = 7.1 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 6.01 (1H, br s), 4.51 (2H, d, *J* = 5.4 Hz), 4.15 (1H, s), 4.02 (2H, q, *J* = 7.5 Hz), 3.95 (2H, s), 3.52-3.46 (2H, m), 1.37 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.25 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). Anal. Calcd for

$C_{22}H_{26}N_6O_2S \cdot 1.0H_2O$: C, 57.88; H, 6.18; N, 18.41. Found C, 57.85; H, 6.00; N, 18.21.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-phenyl-acetamide (44i)

44i was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 83%. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 10.38 (1H, s), 7.56 (2H, d, $J = 7.0$ Hz), 7.30 (2H, t, $J = 9.0$ Hz), 7.24 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.08 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 6.83 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 6.76 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 4.49 (2H, s), 4.01 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.95 (2H, s), 1.37 (3H, t, $J = 7.2$ Hz). Anal. Calcd for $C_{19}H_{21}N_5OS$: C, 62.10; H, 5.76; N, 19.06. Found C, 62.07; H, 5.73; N, 18.96.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-(4-chlorophenyl)acetamide (44j)

44j was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 33%. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 10.61 (1H, s), 7.54 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.27-7.22 (4H, m), 6.83 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 6.77 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.50 (2H, s), 4.02 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.93 (2H, s), 1.37 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). Anal. Calcd for $C_{19}H_{20}N_5OSCl \cdot 0.1H_2O$: C, 56.53; H, 5.04; N, 17.35. Found C, 56.56; H, 5.07; N, 17.11.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-(4-methoxyphenyl)acetamide (44k)

44k was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 53%. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 10.19 (1H, s), 7.50 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.26-7.22 (2H, m), 6.83 (3H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.76 (2H, dd, $J = 8.6, 0.8$ Hz), 4.49 (2H, s), 4.01 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.93 (2H, s), 3.76 (3H, s), 1.37 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). Anal. Calcd for $C_{20}H_{23}N_5O_2S$: C, 60.43; H, 5.83; N, 17.62. Found C, 60.53; H, 5.80; N, 17.60.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-(4-methylsulfonylphenyl)acetamide (44l)

44l was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 43%. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 11.16 (1H, s), 7.87 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.81 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.26-7.22 (2H, m), 6.84 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 6.77 (2H, dd, $J = 8.6, 0.8$ Hz), 4.52 (2H, d, $J = 5.9$ Hz), 4.17 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.95 (2H, s), 3.03 (3H, s), 1.37 (3H, q, $J = 6.8$ Hz). Anal. Calcd for $C_{20}H_{23}N_5O_3S_2 \cdot 1.1H_2O$: C, 51.62; H, 5.46; N, 15.05. Found C, 52.02; H, 5.29; N, 14.61.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-(4-cyanophenyl)acetamide (44m)

44m was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 47%. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 11.16 (1H, s), 7.73 (2H, dt, $J = 8.9, 2.2$ Hz), 7.58 (2H, dt, $J = 8.9, 2.2$ Hz), 7.26-7.22 (2H, m), 6.84 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 6.77 (2H, d, $J = 8.2$ Hz), 4.51 (2H, s), 4.03 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.94 (2H, s), 1.38 (3H, t, $J = 7.2$ Hz). Anal. Calcd for $C_{20}H_{20}N_6OS$: C, 61.20; H, 5.14; N, 21.41. Found C, 61.27; H, 5.16; N, 21.27.

***N*-(4-Acetylphenyl)-2-[[5-(anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]acetamide (44n)**

44n was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 56%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.91 (1H, s), 7.92 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.24 (2H, td, *J* = 6.8, 1.6 Hz), 6.83 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.77 (2H, dd, *J* = 8.8, 1.0 Hz), 4.51 (2H, s), 4.02 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.96 (2H, s), 2.57 (3H, s), 1.38 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). Anal. Calcd for C₂₁H₂₃N₅O₂S·0.3H₂O: C, 60.79; H, 5.73; N, 16.88. Found C, 60.77; H, 5.66; N, 16.88.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-(4-propanoylphenyl)acetamide (44o)

44j was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 68%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.90 (1H, s), 7.93 (2H, dt, *J* = 9.3, 2.2 Hz), 7.69 (2H, dt, *J* = 9.3, 2.2 Hz), 7.25-7.21 (2H, m), 6.84 (1H, t, *J* = 6.6 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 4.51 (2H, s), 4.02 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.96 (2H, s), 2.96 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.38 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.21 (3H, t, *J* = 7.2 Hz). Anal. Calcd for C₂₂H₂₅N₅O₂S: C, 62.39; H, 5.95; N, 16.54. Found C, 62.15; H, 5.95; N, 16.44.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-(4-butanoylphenyl)acetamide (44p)

44p was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 69%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.85 (1H, s), 7.92 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.23 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.84 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.76 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.51 (2H, s), 4.03 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 3.97 (2H, s), 2.90 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.72-1.78 (2H, m), 1.38 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.00 (3H, t, *J* = 7.4 Hz). Anal. Calcd for C₂₃H₂₇N₅O₂S: C, 63.13; H, 6.22; N, 16.01. Found C, 62.90; H, 6.18; N, 15.94.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-(4-benzoylphenyl)acetamide (44q)

44q was prepared in a similar manner described for **44d**. Yield: 57%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.93 (1H, s), 7.79 (3H, t, *J* = 9.4 Hz), 7.76-7.71 (3H, m), 7.58 (1H, tt, *J* = 7.4, 1.4 Hz), 7.47 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.26-7.22 (2H, m), 6.83 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 6.78 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.51 (2H, d, *J* = 5.5 Hz), 4.03 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.97 (2H, s), 1.38 (3H, t, *J* = 7.4 Hz). Anal. Calcd for C₂₆H₂₅N₅O₂S: C, 66.21; H, 5.34; N, 14.85. Found C, 66.19; H, 5.54; N, 14.77.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]acetic acid (45)

A mixture of **41** (10.0 g, 42.7 mmol), *tert*-butyl 2-bromoacetate (6.88 mL, 46.9 mmol), and sodium acetate (7.44 g, 128 mmol) in EtOH (200 mL) was refluxed for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction

mixture was concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 2:1) to provide *tert*-butyl ester (10.2 g, 68%) as a light yellow solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.22 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 6.80 (1H, t, *J* = 6.8 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 4.45 (2H, s), 4.05 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 4.01 (2H, s), 1.45 (9H, s), 1.36 (3H, t, *J* = 7.3 Hz).

TFA (30 mL) was added to the obtained solid (6.28 g, 18.0 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. After the reaction mixture was evaporated, the residue was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **45** (2.77 g, 53%). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.24 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.84 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.50 (2H, s), 4.05 (2H, q, *J* = 7.4 Hz), 3.88 (2H, s), 1.38 (3H, t, *J* = 7.4 Hz).

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-(6-propanoyl-3-pyridyl)acetamide (46a)

45 (0.19 g, 0.65 mmol) was added to a solution of 1-(5-amino-2-pyridyl)propan-1-one (0.11 g, 0.71 mmol), HATU (0.30 g, 0.78 mmol), and (*i*-Pr)₂EtN (0.35 mL, 1.95 mL) in CH₂Cl₂ (5 mL) at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 3 h. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 12:1) to provide **46a** (65 mg, 24%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.85 (1H, s), 8.17 (1H, d, *J* = 10.3 Hz), 8.02 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.26-7.23 (2H, m), 6.84 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.78 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.51 (2H, s), 4.03 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.97 (2H, s), 3.20 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.38 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.20 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). Anal. Calcd for C₂₁H₂₄N₆O₂S·0.75H₂O: C, 57.58; H, 5.87; N, 19.19. Found C, 57.58; H, 5.76; N, 18.99.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-methyl-*N*-(4-propanoylphenyl)acetamide (46b)

46b was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 77%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.04 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.39 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.80 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.74 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.42 (2H, s), 4.05-3.98 (4H, m), 3.99 (2H, s), 3.33 (3H, s), 3.02 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 1.34 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.25 (3H, t, *J* = 7.0 Hz). Anal. Calcd for C₂₃H₂₇N₅O₂S·0.75H₂O: C, 61.24; H, 6.37; N, 15.53. Found C, 61.61; H, 6.29; N, 15.23.

2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]-*N*-ethyl-*N*-(4-propanoylphenyl)acetamide

(46c)

46c was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 55%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.04 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.36 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.21 (2H, t, *J* = 8.1 Hz), 6.79 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.73 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 4.41 (2H, s), 4.02 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 3.92 (2H, br s), 3.79 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 3.02 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.34 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.25 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.13 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). Anal. Calcd for C₂₄H₂₉N₅O₂S·0.4H₂O: C, 62.83; H, 6.55; N, 15.26. Found C, 62.84; H, 6.51; N, 15.04.

Ethyl 1-(2-[[5-(anilinoethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)-3,4-dihydro-2H-quinoline-6-carboxylate (46d)

46d was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 75%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.89-7.87 (2H, m), 7.28-7.26 (1H, m), 7.21 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 6.80 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.74 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 4.43 (4H, s), 4.37 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.02 (2H, q, *J* = 6.8 Hz), 3.85 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 2.84 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 2.04-1.99 (2H, m), 1.39 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.35 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). Anal. Calcd for C₂₅H₂₉N₅O₃S·0.25H₂O: C, 62.03; H, 6.14; N, 14.47. Found C, 62.46; H, 6.24; N, 14.08.

Ethyl 1-(2-[[5-(anilinoethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonyl]acetyl)indoline-5-carboxylate (46e)

46e was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 13%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.20 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.92 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.88 (1H, s), 7.24-7.20 (2H, m), 6.81 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.74 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.46 (2H, s), 4.41-4.30 (6H, m), 4.06 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.28 (2H, t, *J* = 8.4 Hz), 1.41-1.37 (6H, m). Anal. Calcd for C₂₄H₂₇N₅O₃S·0.25H₂O: C, 61.32; H, 5.90; N, 14.90. Found C, 61.36; H, 5.80; N, 14.71.

N-(2-Hydroxy-5-propanoyl-phenyl)acetamide (48)

2-Acetylaminophenol **47** (4.00 g, 26.5 mmol) was added to a suspension of AlCl₃ (28.2 g, 212 mmol) and propionyl chloride (3.22 mL, 37.9 mmol) in DMF (4.5 mL), and the mixture was stirred at 80 °C for 8 h. The reaction mixture was poured into an ice-cooled 10 N HCl (100 mL). Water (100 mL) was added to the mixture, then the resulting suspension was filtered off. The obtained solid was washed with AcOEt (100 mL), and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **48** (2.05 g, 37%) as a yellow solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 10.73 (1H, s), 9.34 (1H, s), 8.42 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 2.90 (2H, q, *J* = 6.8 Hz), 2.10 (3H, s), 7.82 (3H, t, *J* = 6.8 Hz).

1-(3-Amino-4-hydroxy-phenyl)propan-1-one (49a)

A mixture of **48** (1.00 g, 4.83 mmol) and 10 N HCl (36 mL) was stirred at 100 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was neutralized with 2 N aq. NaOH (180 mL) at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 1 h. The resulting suspension was filtered, washed with water, and dried *in vacuo* to **49a** (0.628 g, 79%) as a brown solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.72 (1H, br s), 7.63 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.57-7.53 (1H, m), 7.36 (1H, s), 4.24 (2H, s), 2.94 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.22-1.17 (3H, m).

6-Propanoyl-3H-1,3-benzoxazol-2-one (51)

A mixture of 3H-1,3-benzoxazol-2-one **50** (5.00 g, 37.0 mmol) and propionic acid (5.54 mL, 74.0 mmol) in polyphosphoric acid (50.0 g) was stirred at 90 °C for 12 h. Iced water (100 mL) was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **51** (1.04 g, 15%) as a light brown solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.13 (1H, s), 7.87 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz), 7.84 (1H, d, *J* = 0.8 Hz), 7.12 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 3.00 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.24 (3H, t, *J* = 7.2 Hz).

1-(4-Amino-3-hydroxy-phenyl)propan-1-one (49c)

51 (520 mg, 2.72 mmol) was dissolved in 10 N aq. NaOH (9 mL), and the reaction mixture was stirred at 100 °C for 6 h. The reaction mixture was neutralized with 2 N HCl (pH = 7), diluted with AcOEt (30 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, and dried (Na₂SO₄), concentrated to provide **49c** (225 mg, 50%) as a brown solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.31 (1H, s), 7.26 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz), 7.21 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.54 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 5.39 (2H, br s), 2.77 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 0.99 (3H, t, *J* = 7.4 Hz).

2-Chloro-N-(2-hydroxy-5-propanoyl-phenyl)acetamide (52a)

A mixture of **49a** (528 mg, 3.80 mmol), 2-chloroacetyl chloride (0.33 mL, 4.18 mmol) and Et₃N (0.583 mL, 4.18 mmol) in THF (15 mL) was stirred at room temperature for 12 h. Water (30 mL) was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt (30 mL). The organic layers were dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **52a** (0.650 g, 71%) as a light yellow solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.36 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 8.10 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.6 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.78 (2H, s), 3.08 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.27 (3H, t, *J* = 7.0 Hz).

1-[2-(Chloromethyl)-1,3-benzoxazol-5-yl]propan-1-one (53a)

A mixture of **52a** (350 mg, 1.45 mmol) and PPTS (73 mg, 0.29 mmol) in xylene (15 mL) was stirred at

150 °C for 2 h. The cooled reaction mixture was concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **53a** (168 mg, 52%) as a yellow oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.36 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.10 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.6, 0.8 Hz), 4.78 (2H, s), 3.08 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 1.27 (3H, t, *J* = 7.0 Hz).

1-(2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanylmethyl]-1,3-benzoxazol-5-yl)propan-1-one (54a)

A mixture of **41** (0.130 g, 0.48 mmol), **52a** (0.090 g, 0.40 mmol), and sodium acetate (0.070 g, 1.21 mmol) in EtOH (4 mL) was stirred at reflux for 1 h. The cooled reaction mixture was concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 12:1) to provide **54a** (0.126 g, 74%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.28 (1H, s), 8.03 (1H, dd, *J* = 8.8, 1.5 Hz), 7.49 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.22 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.81 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.74 (2H, s), 4.47 (2H, s), 4.01 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.05 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.32 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.25 (3H, t, *J* = 6.4 Hz). Anal. Calcd for C₂₂H₂₃N₅O₂S: C, 62.69; H, 5.50; N, 16.61. Found C, 62.52; H, 5.51; N, 16.52.

Ethyl 2-[[5-(anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanylmethyl]-1,3-benzoxazole-5-carboxylate (54b)

54b was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 60%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.40 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 8.12 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz), 7.49 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.25 (2H, dd, *J* = 8.3, 7.3 Hz), 6.85 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.78 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.77 (2H, s), 4.52 (2H, s), 4.44 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.04 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.44 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.35 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). Anal. Calcd for C₂₂H₂₃N₅O₃S: C, 60.39; H, 5.30; N, 15.93. Found C, 60.34; H, 5.26; N, 15.93.

2-Chloro-N-(2-hydroxy-4-propanoyl-phenyl)acetamide (52c, R¹ = COEt, R² = H)

A mixture of 1-(4-amino-3-hydroxy-phenyl)propan-1-one **49c** (0.43 g, 2.60 mmol), 2-chloroacetyl chloride (0.23 mL, 2.86 mmol), and Et₃N (1.09 mL, 7.81 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) was stirred at room temperature for 3 h. Water (50 mL) was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt (50 mL). The organic layers were dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **52c** (0.14 g, 22%) as a light brown solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.75 (1H, br s), 7.67 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.61 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.56 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz), 7.39 (1H, br s), 4.27

(2H, s), 2.98 (2H, q, $J = 7.0$ Hz), 1.22 (3H, t, $J = 7.4$ Hz).

1-[2-(Chloromethyl)-1,3-benzoxazol-6-yl]propan-1-one (53c, $R^1 = \text{COEt}$, $R^2 = \text{H}$)

53c was prepared in a similar manner described for **53a**. Yield: 80%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.19 (1H, s), 8.04 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 7.80 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 4.78 (2H, s), 3.08 (2H, q, $J = 7.4$ Hz), 1.27 (3H, t, $J = 6.3$ Hz).

1-(2-([5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanylmethyl)-1,3-benzoxazol-6-yl)propan-1-one (54c)

54c was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 80%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.10 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 7.99 (1H, dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz), 7.72 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.22 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 6.81 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 6.75 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.75 (2H, s), 4.47 (2H, s), 4.00 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.04 (2H, q, $J = 6.8$ Hz), 1.32 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.26 (3H, t, $J = 7.3$ Hz). Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: C, 62.69; H, 5.50; N, 16.61. Found C, 62.58; H, 5.42; N, 16.50.

1-(2-([5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanylmethyl)-1,3-benzoxazol-5-yl)-2-methyl-propan-1-one (54d)

54d was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 93%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.28 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 8.02 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz), 7.50 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.22 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 6.81 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 6.75 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 4.74 (2H, s), 4.47 (2H, s), 4.01 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.58 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 1.32 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.24 (6H, d, $J = 6.8$ Hz). Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: C, 63.43; H, 5.79; N, 16.08. Found C, 63.34; H, 5.77; N, 15.88.

***tert*-Butyl-*N*-[(4-ethyl-5-sulfanyl-1,2,4-triazol-3-yl)methyl]-*N*-phenyl-carbamate (56)**

A mixture of *tert*-butyl *N*-phenylcarbamate **55** (1.00 g, 5.17 mmol), methyl bromoacetate (1.19 g, 7.76 mmol), and sodium *tert*-butoxide (0.75 g, 7.76 mmol) in THF (15 mL) was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was quenched with water (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide the ester (0.630 g, 46%). The obtained ester (4.24 g, 16.0 mmol) was added to a suspension of hydrazine monohydrate (4.00 g, 79.9 mmol) in EtOH (50 mL), and the mixture was refluxed for 6 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), and

concentrated to provide the hydrazide (3.84 g, 91%) as a colorless solid. Then, a mixture of the obtained hydrazide (3.84 g, 14.5 mmol) and ethyl isothiocyanate (1.51 mL, 17.4 mmol) in 2 N aq. NaOH (30 mL) and THF (60 mL) was stirred at 60 °C for 3 h. The cooled reaction mixture was neutralized with 2 N HCl and extracted with AcOEt (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 3:1) to provide **56** (2.52 g, 52%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.39 (1H, br s), 7.34 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.27-7.26 (1H, m), 7.25-7.20 (2H, m), 4.26 (2H, s), 4.12 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.44 (9H, s), 1.26 (3H, t, *J* = 5.5 Hz).

***tert*-Butyl *N*-({4-ethyl-5-[(5-propanoyl-1,3-benzoxazol-2-yl)methylsulfanyl]-1,2,4-triazol-3-yl)methyl}-*N*-phenyl-carbamate (**57**)**

A mixture of **56** (0.233 g, 0.697 mmol), **53a** (0.238 g, 0.630 mmol), and sodium acetate (0.111 g, 1.90 mmol) in EtOH (10 mL) was stirred at reflux for 1.5 h. The cooled reaction mixture was diluted with AcOEt (30 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **57** (0.250 g, 76%) as a yellow foam. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.29 (1H, s), 8.04 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz), 7.54 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.30-7.26 (2H, m), 7.21-7.18 (1H, m), 7.13 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 5.01 (2H, s), 4.74 (2H, s), 4.11 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 3.05 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.39 (9H, s), 1.34 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.25 (3H, t, *J* = 7.3 Hz).

1-(2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonylmethyl]-1,3-benzoxazol-5-yl)propan-1-one (54e**)**

57 (60 mg, 0.12 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and cooled in ice bath. *m*-Chloroperoxybenzoic acid (65% purity, 92 mg, 0.35 mmol) was added to the solution. After stirring at 0 °C for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aq. NaHCO₃ (20 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide the sulfone (46 mg, 73%) as a colorless waxy solid. The obtained sulfone (46 mg, 0.083 mmol) was dissolved in 4 N HCl/AcOEt (2 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt (30 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, and dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **54e** (32 mg, 84%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.28 (1H, s), 8.06 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz), 7.49 (1H, d,

$J = 8.8$ Hz), 7.26-7.22 (1H, m), 6.86 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 6.78 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 5.32 (3H, s), 4.58 (2H, s), 4.30 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.04 (3H, q, $J = 7.2$ Hz), 1.38 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.25 (3H, t, $J = 7.1$ Hz). Anal. Calcd for $C_{22}H_{23}N_5O_4S \cdot 0.4H_2O \cdot 0.12\text{hexane}$: C, 57.71; H, 5.47; N, 14.81. Found C, 58.04; H, 5.18; N, 14.45.

1-(2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonylmethyl]-1,3-benzoxazol-5-yl)propan-1-ol (54f)

57 (127 mg, 0.243 mmol) was dissolved in MeOH (5 mL) and cooled in ice bath. $NaBH_4$ (13.8 mg, 0.365 mmol) was added to the solution. After stirring at 0 °C for 0.5 h, the reaction mixture was quenched with water (20 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), concentrated to provide the alcohol (125 mg, 98%) as a colorless waxy solid. The obtained alcohol (125 mg, 0.24 mmol) was dissolved in 4 N HCl/AcOEt (2 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt (30 mL), washed with saturated aq. $NaHCO_3$ and brine, and dried (Na_2SO_4), concentrated and purified by column chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH = 10:1$) to provide **54f** (62 mg, 61%) as a colorless solid. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7.64 (1H, s), 7.40 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.33 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.22 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.81 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 6.75 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.72-4.69 (3H, m), 4.47 (2H, s), 3.99 (2H, q, $J = 6.8$ Hz), 1.88-1.72 (2H, m), 1.31 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 0.91 (3H, t, $J = 7.3$ Hz). Anal. Calcd for $C_{22}H_{25}N_5O_2S$: C, 62.39; H, 5.95; N, 16.54. Found C, 62.27; H, 5.97; N, 16.29.

1-(2-[[5-(Anilinomethyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl]sulfonylmethyl]-1,3-benzoxazol-5-yl)propan-1-one oxime (54g)

A mixture of **54a** (0.052 g, 0.12 mmol), hydroxyl amine hydrochloride salt (0.010 g, 0.15 mmol), and sodium acetate (0.011 g, 0.19 mmol) in EtOH (5 mL) was stirred at 80 °C for 3 h. Water (10 mL) was added to the reaction mixture and extracted with AcOEt (20 mL). The organic layers were dried (Na_2SO_4), concentrated and the obtained solid was washed with AcOEt/ Et_2O to provide **54g** (0.047 g, 87%) as a colorless solid. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 11.18 (1H, s), 7.86 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 7.68 (1H, dd, $J = 8.6, 1.6$ Hz), 7.57 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.07 (2H, dd, $J = 8.4, 7.2$ Hz), 6.68 (2H, d, $J = 7.4$ Hz), 6.57 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 6.23 (1H, s), 4.70 (2H, d, $J = 3.5$ Hz), 4.41 (2H, d, $J = 5.1$ Hz), 3.99 (2H, q, $J = 7.8$ Hz), 2.77 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.19-1.14 (3H, m), 1.02 (3H, dt, $J = 17.9, 7.3$ Hz). Anal. Calcd for $C_{22}H_{24}N_6O_2S \cdot 0.5H_2O$ C, 59.31;

H, 5.66; N, 18.86. Found C, 59.25; H, 5.60; N, 18.70.

***N*-{[4-Ethyl-5-({5-[(*Z*)-*C*-ethyl-*N*-methoxy-carbonimidoyl]-1,3-benzoxazol-2-yl)methylsulfanyl]-1,2,4-triazol-3-yl)methyl}aniline (54h)**

54h was prepared in a similar manner described for **54g**. Yield: 80%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.85 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.67 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.21-7.17 (2H, m), 6.78 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 6.72 (2H, t, *J* = 4.3 Hz), 4.68 (2H, s), 4.43 (2H, s), 3.97-3.92 (5H, m), 2.74 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 1.27 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.10 (3H, t, *J* = 7.6 Hz). Anal. Calcd for C₂₃H₂₆N₆O₂S: C, 61.31; H, 5.82; N, 18.65. Found C, 61.29; H, 5.83; N, 18.53.

***N*-{[5-(1,3-Benzoxazol-2-ylmethylsulfanyl)-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl)methyl}aniline (54i)**

54i was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 56%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.70-7.67 (1H, m), 7.47-7.43 (1H, m), 7.35-7.30 (2H, m), 7.25-7.20 (2H, m), 6.81 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.76-6.73 (2H, m), 4.72 (2H, s), 4.46 (2H, s), 3.98 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.29 (3H, q, *J* = 7.6 Hz). Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₅OS: C, 62.44; H, 5.24; N, 19.16. Found C, 61.86; H, 5.15; N, 18.78.

***N*-{[4-Ethyl-5-[(5-methoxy-1,3-benzoxazol-2-yl)methylsulfanyl]-1,2,4-triazol-3-yl)methyl}aniline (54j)**

54j was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 43%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.31 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.25-7.21 (2H, m), 7.15 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.92 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 6.81 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 4.68 (2H, s), 4.47 (2H, s), 3.97 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.84 (3H, s), 1.30 (3H, t, *J* = 7.4 Hz). Anal. Calcd for C₂₀H₂₁N₅O₂S: C, 60.74; H, 5.35; N, 17.71. Found C, 60.47; H, 5.36; N, 17.46.

***N*-{[4-Ethyl-5-[(5-methyl-1,3-benzoxazol-2-yl)methylsulfanyl]-1,2,4-triazol-3-yl)methyl}aniline (54k)**

54k was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 56%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.44 (1H, s), 7.30 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.22 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.13 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz), 6.81 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.74 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.68 (2H, s), 4.46 (2H, s), 3.97 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 2.45 (3H, s), 1.29 (3H, t, *J* = 7.0 Hz). Anal. Calcd for C₂₀H₂₁N₅OS: C, 63.30; H, 5.58; N, 18.46. Found C, 63.14; H, 5.64; N, 18.22.

***N*-{[4-Ethyl-5-[(5-ethyl-1,3-benzoxazol-2-yl)methylsulfanyl]-1,2,4-triazol-3-yl)methyl}aniline (54l)**

54l was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 59%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.47 (1H, d, *J* = 5.4 Hz), 7.33 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.22 (2H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.16 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.81 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 4.69 (2H, s), 4.47 (2H, s), 3.98 (2H, q, *J* = 6.8 Hz), 2.74 (2H, q, *J* = 7.5 Hz),

1.31-1.26 (6H, m). Anal. Calcd for C₂₁H₂₃N₅OS: C, 64.10; H, 5.89; N, 17.80. Found C, 63.96; H, 5.91; N, 17.57.

***N*-({5-[(5-Chloro-1,3-benzoxazol-2-yl)methylsulfanyl]-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl)methyl}aniline (54m)**

54m was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 62%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.64 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.30 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 7.25-7.21 (2H, m), 6.82 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.75 (2H, dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz), 4.71 (2H, s), 4.48 (2H, s), 4.00 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.31 (3H, t, *J* = 7.2 Hz). Anal. Calcd for C₁₉H₁₈ClN₅OS: C, 57.07; H, 4.54; N, 17.51. Found C, 57.12; H, 4.51; N, 17.49.

***N*-({5-[(6-Chloro-1,3-benzoxazol-2-yl)methylsulfanyl]-4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl)methyl}aniline (54n)**

54n was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 67%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.57 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.45 (1H, s), 7.30 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.22 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 6.81 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.70 (2H, s), 4.47 (2H, s), 3.99 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.30 (3H, t, *J* = 7.2 Hz). Anal. Calcd for C₁₉H₁₈ClN₅OS·0.1H₂O: C, 56.81; H, 4.57; N, 17.43. Found C, 56.90; H, 4.58; N, 17.14.

***N*-{[(4-Ethyl-5-[[5-(trifluoromethyl)-1,3-benzoxazol-2-yl]methylsulfanyl]-1,2,4-triazol-3-yl)methyl]aniline (54o)**

54o was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 70%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.57 (1H, s), 7.46 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.25 (3H, t, *J* = 7.8 Hz), 6.85 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.78 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 4.76 (2H, s), 4.51 (2H, s), 4.04 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.35 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). Anal. Calcd for C₂₀H₁₈N₅OS: C, 55.42; H, 4.19; N, 16.16. Found C, 55.20; H, 4.29; N, 15.92.

***N*-[(4-Ethyl-5-[[5-(trifluoromethoxy)-1,3-benzoxazol-2-yl]methylsulfanyl]-1,2,4-triazol-3-yl)methyl]aniline (54p)**

54p was prepared in a similar manner described for **54a**. Yield: 74%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.92 (1H, s), 7.58 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.50 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.19 (2H, dd, *J* = 8.6, 7.4 Hz), 6.78 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 6.71 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 4.71 (2H, s), 4.44 (2H, s), 3.97 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.28 (3H, t, *J* = 7.4 Hz). Anal. Calcd for C₂₀H₁₈F₃N₅O₂S: C, 53.45; H, 4.04; N, 15.58. Found C, 53.37; H, 4.05; N, 15.56.

2-Chloro-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (61a, R = -(CH₂)₄-)

A mixture of 4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-amine **60a** (1.99 g, 13.9 mmol), 2-chloroacetyl chloride (1.54 mL, 19.4 mmol), and Et₃N (3.87 mL, 27.8 mmol) in THF (40 mL) was stirred at 60 °C for 2 h.

After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with AcOEt (50 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **61a** (2.43 g, 82%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4.25 (2H, s), 2.72-2.65 (4H, m), 1.90-1.83 (4H, m).

2-[4-(4-Fluorophenyl)piperazin-1-yl]-N-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (62a)

A mixture of **61a** (75 mg, 0.33 mmol), 4-fluorophenylpiperadine (86 mg, 0.48 mmol), and potassium iodide (11 mg, 0.066 mmol) in DMF (2 mL) was stirred at 80 °C for 14 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with AcOEt (20 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **62a** (84 mg, 70%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.00-6.96 (2H, m), 6.90-6.87 (2H, m), 3.29 (2H, s), 3.19-3.17 (4H, m), 2.78-2.76 (4H, m), 2.72-2.71 (2H, m), 2.67-2.65 (2H, m), 1.88-1.83 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₉H₂₃FN₄OS: C, 60.94; H, 6.19; N, 14.96. Found C, 60.93; H, 6.14; N, 14.72.

N-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2-[4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl]acetamide (62b)

62b was prepared in a similar manner described for **62a**. Yield: 27% (2 steps from **60b**). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 6.98 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 6.88 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 3.28 (2H, s), 3.19-3.18 (4H, m), 2.78-2.76 (4H, m), 2.30 (3H, s), 2.24 (3H, s). Anal. Calcd for C₁₇H₂₁FN₄OS·0.2H₂O: C, 58.00; H, 6.13; N, 15.91. Found C, 58.17; H, 6.25; N, 15.87.

2-[4-(4-Fluorophenyl)piperazin-1-yl]-N-thiazol-2-yl-acetamide (62c)

62c was prepared in a similar manner described for **62a**. Yield: 42% (2 steps from **60c**). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.46 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 3.9 Hz), 7.00-6.97 (2H, m), 6.91-6.88 (2H, m), 3.33 (2H, s), 3.20 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 2.80 (4H, t, *J* = 4.9 Hz). Anal. Calcd for C₁₅H₁₇FN₄OS·0.25H₂O: C, 55.45; H, 5.43; N, 17.24. Found C, 55.73; H, 5.38; N, 17.45.

N-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-2-[4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl]acetamide (62d)

62d was prepared in a similar manner described for **62a**. Yield: 39% (2 steps from **60d**). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.84 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.47-7.44 (1H, m), 7.35-7.32 (1H, m), 6.99 (2H, t, *J* =

8.3 Hz), 6.93-6.90 (2H, m), 3.38 (2H, s), 3.24-3.22 (4H, m), 2.85-2.83 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₉H₁₉FN₄OS: C, 61.60; H, 5.17; N, 15.12. Found C, 61.74; H, 5.20; N, 14.94.

2-[4-(4-Fluorophenyl)piperazin-1-yl]-N-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzoxazol-2-yl)acetamide (62e)

62e was prepared in a similar manner described for **62a**. Yield: 7.3% (2 steps from **60e**). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 9.67 (1H, s), 6.97-6.91 (2H, m), 6.86-6.83 (2H, m), 3.21 (2H, s), 3.13 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 2.75 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 2.57 (2H, dq, *J* = 8.1, 2.0 Hz), 2.46 (2H, dq, *J* = 7.9, 2.0 Hz), 1.83-1.73 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₉H₂₃FN₄O₂: C, 63.67; H, 6.47; N, 15.63. Found C, 63.49; H, 6.60; N, 15.50.

N-(5,6-Dihydro-4H-cyclopenta[d]thiazol-2-yl)-2-[4-(4-fluorophenyl)piperazin-1-yl]acetamide (62f)

62f was prepared as a light yellow solid in a similar manner described for **62a**. Yield: 32% (2 steps from **60f**). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.17 (1H, s), 6.98 (2H, tt, *J* = 7.6, 2.7 Hz), 6.88 (2H, tt, *J* = 7.0, 2.8 Hz), 3.29 (2H, s), 3.15 (4H, dd, *J* = 16.2, 11.1 Hz), 2.90 (2H, dq, *J* = 11.5, 2.5 Hz), 2.80-2.75 (6H, m), 2.51-2.44 (2H, m). Anal. Calcd for C₁₈H₂₁FN₄OS: C, 59.98; H, 5.87; N, 15.54. Found C, 59.76; H, 5.96; N, 15.38.

2-[4-(4-Fluorophenyl)piperazin-1-yl]-N-(5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[d]thiazol-2-yl)acetamide (62g)

62g was prepared as a light yellow solid in a similar manner described for **62a**. Yield: 78% (2 steps from **60g**). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.00-6.96 (2H, m), 6.90-6.86 (2H, m), 3.28 (2H, s), 3.18 (4H, t, *J* = 5.1 Hz), 2.83-2.72 (8H, m), 1.86-1.81 (2H, m), 1.76-1.67 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₉H₂₄FN₅OS: C, 58.59; H, 6.21; N, 17.98. Found C, 58.54; H, 6.21; N, 17.93.

2-(4-Phenylpiperazin-1-yl)-N-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65a)

A mixture of **61a** (80 mg, 0.49 mmol), phenylpiperazine (121 mg, 0.74 mmol), and potassium iodide (16 mg, 0.10 mmol) in DMF (1.5 mL) was stirred at 80 °C for 4 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with AcOEt (20 mL), washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **65a** (120 mg, 68%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.31 (2H, dd, *J* = 8.5, 7.6 Hz), 6.97-6.91 (3H, m), 3.32 (2H, s), 3.29 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 2.80 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 2.74 (2H, t, *J* = 4.9 Hz), 2.69 (2H, t, *J* = 5.1 Hz), 1.91-1.86 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₉H₂₄N₄OS: C, 64.01; H, 6.79; N, 15.72. Found C, 63.83; H, 6.60; N, 15.78.

2-[4-(*p*-Tolyl)piperazin-1-yl]-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65b)

65b was prepared as a light yellow amorphous in a similar manner described for **65a**. Yield: 72%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.07 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.82 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 3.18 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.26 (2H, s), 2.74 (2H, t, *J* = 4.9 Hz), 2.71-2.62 (6H, m), 2.26 (3H, s), 1.86-1.81 (4H, m). Anal. Calcd for C₂₀H₂₆N₄OS·0.7H₂O·0.1CH₂Cl₂: C, 60.34; H, 6.95; N, 14.00. Found C, 60.12; H, 6.70; N, 14.05.

2-[4-(3-Fluorophenyl)piperazin-1-yl]-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65c)

65c was prepared as a colorless solid by conversion to HCl salt after a similar manner described for **65a**. Yield: 28%. ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 7.29-7.25 (1H, m), 6.82 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.77 (1H, d, *J* = 12.2 Hz), 6.62 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 4.15 (2H, br s), 3.58-3.41 (8H, m), 2.68 (2H, br s), 2.61 (2H, br s), 1.88-1.85 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₉H₂₃FN₄OS·0.25H₂O·1.0HCl: C, 54.93; H, 5.94; N, 13.49. Found C, 54.80; H, 5.91; N, 13.49.

2-(4-Benzoylpiperazin-1-yl)-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65d)

65d was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **65a**. Yield: 51%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.43-7.40 (5H, m), 3.87 (2H, br s), 3.52 (2H, br s), 3.26 (2H, s), 2.70 (4H, t, *J* = 5.1 Hz), 2.66 (4H, t, *J* = 5.1 Hz), 1.88-1.84 (4H, m). Anal. Calcd for C₂₀H₂₄N₄O₂S·0.5H₂O: C, 61.05; H, 6.40; N, 14.24. Found C, 61.17; H, 6.21; N, 14.18.

2-(4-Cyclohexylpiperazin-1-yl)-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65e)

65e was prepared as a light yellow solid in a similar manner described for **65a**. Yield: 62%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.20 (2H, s), 2.72-2.63 (12H, m), 2.27 (1H, br s), 1.86-1.80 (8H, m), 1.27-1.09 (6H, m). Anal. Calcd for C₁₉H₃₀N₄OS·0.2H₂O: C, 62.33; H, 8.37; N, 15.30. Found C, 62.45; H, 8.28; N, 15.20.

2-[4-(2-Pyridyl)piperazin-1-yl]-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65f)

65f was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **65a**. Yield: 49%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.11 (1H, br s), 8.17-8.16 (1H, m), 7.49-7.44 (1H, m), 6.62 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.59 (4H, t, *J* = 5.1 Hz), 3.24 (2H, s), 2.68 (6H, t, *J* = 4.9 Hz), 2.64-2.61 (2H, m), 1.84-1.80 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₈H₂₃N₅OS: C, 60.48; H, 6.49; N, 19.59. Found C, 60.71; H, 6.59; N, 19.63.

2-[4-(3-Pyridyl)piperazin-1-yl]-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65g)

65g was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **65a**. Yield: 46%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.10 (1H, s), 8.32 (1H, s), 8.14 (1H, t, *J* = 3.1 Hz), 7.20-7.18 (2H, m), 3.30-3.28 (6H, m), 2.79 (4H, t, *J* = 5.1 Hz), 2.72-2.70 (2H, m), 2.67-2.64 (2H, m), 1.88-1.84 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₈H₂₃N₅OS: C, 60.48; H, 6.49; N, 19.59. Found C, 60.43; H, 6.61; N, 19.56.

2-[4-(4-Pyridyl)piperazin-1-yl]-N-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65h)

65h was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **65a**. Yield: 16%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.08 (1H, s), 8.31 (2H, dd, *J* = 5.1, 1.6 Hz), 6.67 (2H, dd, *J* = 5.1, 1.6 Hz), 3.41 (4H, t, *J* = 5.1 Hz), 3.29 (2H, s), 2.75-2.70 (6H, m), 2.67-2.64 (2H, m), 1.87-1.84 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₈H₂₃N₅OS·0.75H₂O·0.05hexane: C, 58.57; H, 6.77; N, 18.66. Found C, 58.75; H, 6.47; N, 18.42.

2-(4-Pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)-N-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65i)

65i was prepared as a light brown solid in a similar manner described for **65a**. Yield: 75%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.16 (1H, s), 8.32 (2H, d, *J* = 5.1 Hz), 6.52 (1H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.91 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.26 (2H, s), 2.73-2.70 (2H, m), 2.66 (6H, t, *J* = 5.1 Hz), 1.88-1.85 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₇H₂₂N₆OS·0.12H₂O: C, 56.62; H, 6.22; N, 23.30. Found C, 56.88; H, 6.18; N, 23.02.

N-(4,5,6,7-Tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-(4-thiazol-2-yl)piperazin-1-yl)acetamide (65j)

65j was prepared as a light yellow solid in a similar manner described for **65a**. Yield: 64%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.04 (1H, s), 7.19 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 6.59 (1H, d, *J* = 3.9 Hz), 3.58-3.54 (4H, m), 3.26 (2H, s), 2.72-2.61 (8H, m), 1.87-1.80 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₆H₂₁N₅OS₂·0.2H₂O: C, 52.35; H, 5.88; N, 19.08. Found C, 52.57; H, 5.80; N, 18.79.

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-N-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65k)

65k was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **65a**. Yield: 27%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 10.15 (1H, br s), 8.06 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 7.29-7.28 (1H, m), 6.61 (1H, dd, *J* = 9.3, 3.4 Hz), 3.55 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.27 (2H, s), 2.72 (6H, t, *J* = 5.1 Hz), 2.66 (2H, t, *J* = 4.9 Hz), 1.87-1.85 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₈H₂₂FN₅OS: C, 57.58; H, 5.91; N, 18.65. Found C, 57.61; H, 5.93; N, 18.32.

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-N-methyl-N-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65l)

A mixture of **64** (102 mg, 0.56 mmol), 1-(5-fluoropyridin-2-yl)piperazine dihydrochloride (0.10 g, 0.51 mmol), and potassium iodide (17 mg, 0.10 mmol) in DMF (1.5 mL) was stirred at 80 °C for 2 h. The cooled reaction mixture was concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **65l** (28 mg, 14%) as a waxy solid. **65l** was converted to HCl salt with 4 N HCl/AcOEt as a colorless solid for ¹H NMR spectrum and element analysis. ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 8.18 (1H, s), 7.89 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.34 (1H, dd, *J* = 9.5, 3.2 Hz), 4.50 (2H, s), 4.05 (4H, br s), 3.71 (4H, br s), 2.66 (4H, d, *J* = 7.3 Hz), 2.01-1.90 (5H, m). Anal. Calcd for C₁₈H₂₂N₅O₂F·3H₂O·0.4AcOEt·3HCl: C, 42.18; H, 6.18; N, 12.55. Found C, 42.09; H, 6.23; N, 12.25.

***N*-Ethyl-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-amine (67b)**

A mixture of 2-chlorocyclohexanone **66** (1.00 g, 7.54 mmol) and *N*-ethyl thiourea (825 mg, 7.92 mmol) in EtOH (10 mL) was stirred at reflux for 4 h. The cooled reaction mixture was diluted with AcOEt (50 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 10:1) to provide **67b** (0.84 g, 61%) as a light yellow solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 9.60 (1H, br s), 3.33-3.28 (2H, m), 2.58-2.52 (4H, m), 1.87-1.82 (4H, m), 1.38 (3H, t, *J* = 7.2 Hz).

***N*-Methyl-2-[4-(5-fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65m)**

65m was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **62a**. Yield: 45% (2 steps from **67a**). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.08 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 7.30-7.26 (1H, m), 6.64 (1H, dd, *J* = 9.3, 3.4 Hz), 3.77 (3H, br s), 3.55-3.52 (6H, m), 2.74-2.70 (8H, m), 1.92-1.83 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₉H₂₄FN₅OS: C, 58.59; H, 6.21; N, 17.98. Found C, 58.41; H, 6.09; N, 17.76.

***N*-Ethyl-2-[4-(5-fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-*N*-(4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazol-2-yl)acetamide (65n)**

65n was prepared as a colorless solid by conversion to HCl salt after a similar manner described for **62a**. Yield: 13% (2 steps from **67b**). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.08 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 7.28-7.25 (1H, m), 6.63 (1H, dd, *J* = 9.3, 3.4 Hz), 4.31 (2H, br s), 3.56-3.46 (6H, m), 2.76-2.67 (8H, m), 1.91-1.84 (4H, m), 1.39-1.30

(3H, m). Anal. Calcd for $C_{20}H_{26}FN_5OS \cdot 1.5HCl$: C, 52.43; H, 6.05; N, 15.28. Found C, 52.66; H, 6.24; N, 14.88.

1-Imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-ylethanone (69b)

A mixture of 2-aminopyridine **68** (2.00 g, 21.3 mmol) and *N,N*-dimethylformamide dimethylacetal (3.11 mL, 23.4 mmol) in toluene (20 mL) was stirred at 80 °C for 1.5 h. The cooled reaction mixture was concentrated to give a crude imine. A mixture of the imine and bromoacetone (2.20 mL, 23.4 mmol) in EtOH (20 mL) was refluxed for 2.5 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt (50 mL) and water. The organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), concentrated and purified by column chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH = 20:1$) to provide **69b** (0.575 g, 18%) as a colorless solid. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 9.65 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 8.35 (1H, s), 7.77 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.52-7.49 (1H, m), 7.09 (1H, t, $J = 6.8$ Hz), 2.80 (3H, s).

2-Bromo-1-(2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)ethanone (70a)

A mixture of 1-(2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)ethanone **69a** (1.47 g, 8.44 mmol) and bromine (0.48 mL, 9.28 mmol) in 25% HBr/AcOH (20 mL) was stirred at room temperature for 1 h. Et_2O (100 mL) was added to the reaction mixture, and the resulting precipitation was filtrated. The obtained solid was washed with Et_2O and dried *in vacuo* to provide **70a** (2.73 g, quant.) as a colorless solid. 1H -NMR ($DMSO-d_6$) δ : 9.65 (1H, dt, $J = 7.0, 1.2$ Hz), 7.86-7.77 (2H, m), 7.39 (1H, td, $J = 6.8, 1.4$ Hz), 4.83 (2H, s), 2.81 (3H, s).

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-1-(2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)ethanone (71a)

A mixture of **70a** (2.53 g, 10.0 mmol), 1-(5-fluoropyridin-2-yl)piperazine dihydrochloride (2.54 g, 10.0 mmol), and Et_3N (4.18 mL, 30.0 mmol) in THF (10 mL) was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was concentrated, and the resulting residue was purified by column chromatography (hexane/AcOEt = 1:1) to provide **71a** (1.75 g, 51%) as a colorless solid. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 9.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.07 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.67 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.49 (1H, dt, $J = 8.6, 1.6$ Hz), 7.29-7.24 (1H, m), 7.05 (1H, dt, $J = 5.5, 1.6$ Hz), 6.63 (1H, dd, $J = 9.0, 3.1$ Hz), 3.74 (2H, s), 3.58-3.56 (4H, m), 2.84 (3H, s), 2.81-2.78 (4H, m). Anal. Calcd for $C_{19}H_{20}FN_5O$: C, 64.57; H, 5.70; N, 19.82. Found C, 64.58; H, 5.67; N, 19.76.

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-1-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl-ethanone (71b)

71b was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **71a**. Yield: 13%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 9.69 (1H, d, *J* = 6.7 Hz), 8.69 (1H, s), 8.06 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.79 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.52-7.55 (1H, m), 7.29-7.24 (1H, m), 7.12 (1H, td, *J* = 7.0, 1.2 Hz), 6.62 (1H, dd, *J* = 9.4, 3.5 Hz), 3.77 (2H, s), 3.56 (4H, t, *J* = 5.1 Hz), 2.76 (4H, t, *J* = 5.1 Hz). Anal. Calcd for C₁₈H₁₈FN₅O: C, 63.70; H, 5.35; N, 20.64. Found C, 63.78; H, 5.41; N, 20.63.

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-1-imidazo[1,5-*a*]pyridin-3-yl-ethanone (71c)

71c was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **71a**. Yield: 12%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 9.65 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 7.70 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.64 (1H, s), 7.26-7.23 (1H, m, overlapped with CHCl₃), 7.19 (1H, dd, *J* = 8.8, 6.8 Hz), 7.01 (1H, t, *J* = 6.8 Hz), 6.62 (1H, dd, *J* = 9.0, 3.2 Hz), 4.22 (2H, s), 3.59 (4H, t, *J* = 5.1 Hz), 2.83 (4H, t, *J* = 4.9 Hz). Anal. Calcd for C₁₈H₁₈FN₅O: C, 63.70; H, 5.35; N, 20.64. Found C, 63.66; H, 5.38; N, 20.69.

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-1-(1*H*-indazol-3-yl)ethanone (71d)

71d was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **71a**. Yield: 39%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.39 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.47 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.36 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.28-7.26 (1H, m), 6.63 (1H, dd, *J* = 9.3, 3.4 Hz), 4.16 (2H, s), 3.61 (4H, t, *J* = 4.6 Hz), 2.85-2.83 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₈H₁₈FN₅O·0.2H₂O: C, 63.04; H, 5.41; N, 20.42. Found C, 63.07; H, 5.31; N, 20.39.

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-1-imidazo[1,5-*a*]pyridin-1-yl-ethanone (71e)

71e was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **71a**. Yield: 24%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.71 (1H, s), 8.56 (1H, td, *J* = 5.9, 1.2 Hz), 8.44 (1H, td, *J* = 8.6, 1.2 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 3.1 Hz), 7.53-7.48 (1H, m), 7.28-7.24 (1H, m), 7.04 (1H, td, *J* = 6.7, 1.6 Hz), 6.62 (1H, dd, *J* = 8.6, 3.1, Hz), 3.72 (2H, s), 3.56 (4H, t, *J* = 4.3 Hz), 2.75 (4H, br s). Anal. Calcd for C₁₈H₁₈FN₅OS: C, 63.70; H, 5.35; N, 20.64. Found C, 63.63; H, 5.37; N, 20.52.

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-yl)ethanone (71f)

71f was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **71a**. Yield: 8.1%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.63 (1H, br s), 8.43-8.40 (1H, m), 8.31 (1H, d, *J* = 3.1 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.44-7.42 (1H, m), 7.32-7.30 (2H, m), 7.28-7.26 (1H, m), 6.62 (1H, dd, *J* = 9.0, 3.1 Hz), 3.73 (2H, s), 3.55 (4H, t, *J* =

5.1 Hz), 2.76 (4H, t, $J = 5.1$ Hz). Anal. Calcd for $C_{19}H_{19}N_4O \cdot 0.24H_2O$: C, 66.59; H, 5.73; N, 16.35. Found C, 66.96; H, 5.81; N, 15.96.

1-(Benzofuran-3-yl)-2-[4-(5-fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]ethanone (71g)

71g was prepared as a colorless solid in a similar manner described for **71a**. Yield: 39%. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 8.80 (1H, s), 8.28-8.26 (1H, m), 8.07 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 7.55-7.53 (1H, m), 7.40-7.37 (2H, m), 7.24-7.29 (1H, m), 6.63 (1H, dd, $J = 3.5, 9.4$ Hz), 3.68 (2H, s), 3.55 (4H, t, $J = 5.1$ Hz), 2.73 (4H, t, $J = 5.1$ Hz). Anal. Calcd for $C_{19}H_{18}FN_3O_2$: C, 67.24; H, 5.35; N, 12.38. Found C, 67.34; H, 5.38; N, 12.21.

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-1-(2-methyl-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)ethanone (71h)

10% Pd-C (0.15 g) was added to a solution of **71a** (0.500 g, 1.41 mmol) in 4 N HCl/AcOEt (25 mL), and the reaction mixture was stirred under H_2 atmosphere at room temperature for 5 h. The mixture was filtered through a Celite pad, concentrated, and purified by column chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH = 10:1$) to provide **71h** (7 mg, 1.4%) as a colorless solid. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 8.06 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 7.28-7.25 (1H, m), 6.61 (1H, dd, $J = 9.4, 3.5$ Hz), 4.30 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 3.57 (2H, s), 3.54 (4H, t, $J = 5.1$ Hz), 2.87 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 2.71 (4H, t, $J = 5.1$ Hz), 2.55 (3H, s), 1.97-1.86 (4H, m). Anal. Calcd for $C_{19}H_{24}FN_5O$: C, 63.85; H, 6.77; N, 19.59. Found C, 63.74; H, 6.86; N, 19.41.

1-(5,6,7,8-Tetrahydroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)ethanone (69i)

10% Pd-C (0.10 g) was added to a solution of **69b** (0.25 g, 1.56 mmol) in 1 N HCl/EtOH (25 mL), and the reaction mixture was stirred under medium H_2 pressure (50 psi) at room temperature for 4 h. The mixture was filtered through a Celite pad, concentrated, and purified by column chromatography ($CH_2Cl_2/MeOH = 10:1$) to provide **69i** (0.15 g, 59%) as a yellow oil. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7.72 (1H, s), 4.32 (2H, t, $J = 5.9$ Hz), 2.93 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 2.43 (3H, s), 2.01-1.88 (4H, m).

2-Bromo-1-(5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)ethanone (70i)

A mixture of **69i** (0.15 g, 0.91 mmol) and bromine (0.047 mL, 0.91 mmol) in 25% HBr/AcOH (1 mL) was stirred at room temperature for 2 h. Et_2O (10 mL) was added to the reaction mixture, and the resulting precipitation was filtrated. The obtained solid was washed with Et_2O and dried *in vacuo* to provide the

bromo compound **70i** (0.29 g, 98%) as a yellow solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 8.63 (1H, s), 4.72 (2H, s), 4.30 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 3.02 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 1.99-1.85 (4H, m).

2-[4-(5-Fluoro-2-pyridyl)piperazin-1-yl]-1-(5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)ethanone (71i)

A mixture of **70i** (238 mg, 0.73 mmol), 1-(5-fluoropyridin-2-yl)piperazine (233 mg, 0.88 mmol), and Et₃N (0.51 mL, 3.67 mmol) in DMF (2 mL) was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt (20 mL) and water (20 mL). The organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 12:1) to provide **71i** (118 mg, 47%) as a colorless solid. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.06 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 7.94 (1H, s), 7.29-7.23 (1H, m), 6.61 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz), 4.34 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 3.63 (2H, s), 3.54 (4H, t, *J* = 5.4 Hz), 2.94 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 2.70 (4H, t, *J* = 5.4 Hz), 2.02-1.91 (4H, m). Anal. Calcd for C₁₈H₂₂FN₅O: C, 62.96; H, 6.46; N, 20.39. Found C, 62.67; H, 6.38; N, 20.33.

7. Biological assays

7.1. *In vitro* FATP1 inhibition activity (cell-free human/mouse acyl-CoA synthase (ACS) assay)

FLAG-tag fused human or mouse FATP1 protein was incubated with 10 μM [1-¹⁴C] oleic acid and test compound in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 30 mM NaCl, 0.5 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM coenzyme A, 0.05% Triton-X 100, 2 mM dithiothreitol at 37 °C for 20 min. After the reaction, [1-¹⁴C] oleoyl-CoA was extracted by successive additions of fivefold volume of 2-propanol/heptane/H₂SO₄ (40:10:1, v/v/v), threefold volume of heptane, and twofold volume of water. Phases were then separated by centrifugation, and the organic phase was removed. To remove [1-¹⁴C] oleic acid completely, the aqueous phase was washed by heptane again. The aqueous phase was added Pico-Fluor 40 scintillation cocktail (PerkinElmer) and the radioactivity was measured by LSC-6100 scintillation counter (Aloka). The radioactivity of FLAG-tagged luciferase protein instead of FATP1 protein was deducted as background. The IC₅₀ values represent the average of at least *n* = 2.

7.2. *In vivo* FATP1 inhibition assay (tissue accumulation of TG in the high fat diet (HFD) -fed mice)

7-week old male C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan) and

acclimatized for more than 1 week. All animals were held under standard laboratory conditions (12 h light per day, light on at 7:00 AM, 23 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ humidity) with food and water available ad libitum. Mice were divided to 8 groups according to body weight (BW, $n = 5$ for each group). One group was fed regular chow (FR2, Funabashi Farm) and others were fed high fat diet (HFD32, Japan Crea). Mice were orally administered vehicle (0.5% methylcellulose) or compound suspensions at a volume of 10 mL/kg once a day for 4 weeks. HFD-feeding and compound administration were started on the same day. BW was monitored every day. After 4-week repeated dosing, mice were killed by deep anesthesia. The liver, soleus muscle and gastrocnemius muscle were quickly removed and frozen for later analysis. Lipids were extracted from tissue samples by the 2-propanol/hexane method. TG concentrations in the extracted lipids were measured by colorimetric assay (TG-E Test Wako, Wako pure chemicals), and the TG content each tissue was calculated. All experimental procedures were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Daiichi Sankyo.

参考文献

第一部 抗肥満薬 bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) アゴニストの創製研究

1. World Health Statistics **2014**.
http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/. Accessed on January, **2015**.
2. 厚生労働省、図で見る環境白書 (平成 13 年度).
<https://www.env.go.jp/policy/hakusyo/zu/h13/eav010000000600.html>. Accessed on January, **2015**.
3. FAO statistical Yearbook **2012**, P.93.
<http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e02a.pdf>. Accessed on January, **2015**.
4. (a) Neel, J. V. *Am. J. Human Gene* **1962**, *14*, 353; (b) Kadowaki, H.; Yasuda, K.; Iwamoto, K.; Otabe, S.; Shimokawa, K.; Silver, K.; Walston, J.; Yoshinaga, H.; Kosaka, K.; Yamada, N.; Saito, Y.; Hagura, R.; Akanuma, Y.; Shuldiner, A.; Yazaki, Y.; Kadowaki, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 555.
5. World Health Organization. Obesity and overweight: Fact sheet No. 311, updated on March, **2013**. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>. Accessed on January, **2015**.
6. (a) Flegel, K. M.; Carroll, M. D. *J. Am. Med. Assoc.* **2012**, *308*, 491; (b) Flegel, K. M.; Carroll, M. D. *J. Am. Med. Assoc.* **2013**, *309*, 71.
7. World Health Organization: Fact sheet No. 310, updated on March, **2013**. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en>. Accessed on January, **2015**.
8. 厚生労働省、平成 24 年人口動態統計月報年計 (概数).
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai12/dl/gaikyou24.pdf>. Accessed on January, **2015**.
9. (a) Fong, T. M.; Heymsfield, S. B. *Int. J. Obes.* **2009**, *33*, 947; (b) Faulconbridge, L.; Wadden, T. A.; Berkowitz, R. I.; Sarwer, D. B.; Womble, L. G.; Hesson, L. A.; Stunkard, A. J.; Fabriatore, A. N. *Obesity* **2009**, *17*, 1009; (c) Warren, K. R.; Buchanan, R. W.; Feldman, S.; Conley, R. R.; Linthicum, J.; Ball, M. P.; Liu, F.; McMahon, R. P.; Gorelick, D. A.; Huestis, M. A.; Kelly, D. L. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2013**, *33*, 118; (d) James, W. P. T.; Caterson, I. D.; Coutinho, W.; Finer, N.; Gaal, L. F. V.; Maggioni, A. P.; Torp-P, C.; Sharma, A. M.; Shepherd, G. M.; Rode, R. A.; Renz, C. L. *N. Eng. J. Med.* **2010**, *363*, 905; (e) Davenport, R. J.; Wright, S. *Drug Discovery Today* **2014**, *19*, 845.
10. (a) 宮崎 滋, 最新肥満学, **2014**, 72-4, 463; (b) 細田 公則, 最新肥満学, **2014**, 72-4, 469; (c) Yasuda, T.; Mori, I. *The Lipid* **2013**, *24*, 404.
11. (a) Ohki-Hamazaki, H.; Wada, E.; Matsui, K.; Wada, K. *Brain Res.* **1997**, *762*, 165; (b) Liu, J.; Lao, Z. J.; Zhang, J.; Schaeffer, M. T.; Jiang, M. M.; Guan, X. M.; Van der Ploeg, L. H.; Fong, T. M. *Biochemistry* **2002**, *41*, 8954; (c) Porcher, C.; Juhem, A.; Peinnequin, A.; Bonaz, B. *Cell Tissue Res.* **2005**, *320*, 21; (d) Feng, Y.; Guan, X.-M.; Li, J.; Metzger, J. M.; Zhu, Y.; Juhl, K.; Zhang, B. B.;

Thornberry, N. A.; Reitman, M. L.; Zhou, Y.-P. *Endocrinology* **2011**, *152*, 4106.

12. Ohki, H.; Watase, K.; Yamamoto, K.; Ogura, H.; Yamano, M.; Yamada, K.; Maeno, H.; Imaki, J.; Kikuyama, S.; Wada, E.; Wada, K. *Nature* **1997**, *390*, 165.
13. (a) Sebhat, I. K.; Franklin, C.; Lo, M. M.-C.; Chen, D.; Jewell, J. P.; Miller, R.; Pang, J.; Palyha, O.; Kan, Y.; Kelly, T. M.; Guan, X.-M.; Marsh, D. J.; Kosinski, J. A.; Metzger, J. M.; Lyons, K.; Dragovic, J.; Guzzo, P. R.; Henderson, A. J.; Reitman, M. L.; Nargund, R. P.; Wyvratt, M. J.; Lin, L. S. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 43; (b) Guan, X.-M.; Metzger, J. M.; Yang, L.; Raustad, K. A.; Wang, S.-P.; Spann, S. K.; Kosinski, J. A.; Yu, H.; Shearman, L. P.; Faidley, T. D.; Palyha, O.; Kan, Y.; Kelly, T. M.; Sebhat, I.; Lin, L. S.; Dragovic, J.; Lyons, K. A.; Craw, S.; Nargund, R. P.; Marsh, D. J.; Strack, A. M.; Reitman, M. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 356; (c) Lateef, D. M.; Abreu-Vieira, G.; Xiao, C.; Reitman, M. L. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2014**, *306*, E681.
14. Reitman, M. L.; Dishy, V.; Moreau, A.; Denney, W. S.; Liu, C.; Kraft, W. K.; Mejia, A. V.; Matson, M.; Stoch, S. A.; Wagner, J. A.; Lai, E. *J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *52*, 1306.
15. (a) Krolczyk, D. G.; Zurowski, J.; Sobocki, J.; Slowiaczek, M. P.; Laskiewicz, J.; Matyja, A.; Zaraska, K.; Thor, P. J. *J. Physiol. Pharmacol.* **2001**, *52*, 705; (b) Pardo, J. V.; Sheikh, S. A.; Kuskowski, M. A.; Surerus, J. C.; Hagen, M. C.; Lee, J. T.; Rittberg, B. R.; Adson, D. E. *Int. J. Obes.* **2007**, *31*, 1756.
16. (a) Liu, P.; Lanza, T. J. Jr.; Chioda, M.; Jones, C.; Chobanian, H. R.; Guo, Y.; Chang, L.; Kelly, T. M.; Kan, Y.; Palyha, O.; Guan, X.-M.; Marsh, D. J.; Metzger, J. M.; Ramsay, K.; Wang, S.-P.; Strack, A. M.; Miller, R.; Pang, J.; Lyons, K.; Dragovic, J.; Ning, J. G.; Schafer, W. A.; Welch, C. J.; Gong, X.; Gao, Y.-D.; Hornak, V.; Ball, R. G.; Tsou, N.; Reitman, M. L.; Wyvratt, M. J.; Nargund, R. P.; Lin, L. S. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 933; (b) Chobanian, H. R.; Guo, Y.; Liu, P.; Chioda, M.; Lanza, T. J. Jr.; Chang, L.; Kelly, T. M.; Kan, Y.; Palyha, O.; Guan, X.-M.; Marsh, D. J.; Metzger, J. M.; Gorski, J. N.; Raustad, K.; Wang, S.-P.; Strack, A. M.; Miller, R.; Pang, J.; Madeira, M.; Lyons, K.; Dragovic, J.; Reitman, M. L.; Nargund, R. P.; Lin, L. S. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 252; (c) Chobanian, H. R.; Guo, Y.; Liu, P.; Lanza, T. J. Jr.; Chioda, M.; Chang, L.; Kelly, T. M.; Kan, Y.; Palyha, O.; Guan, X.-M.; Marsh, D. J.; Metzger, J. M.; Raustad, K.; Wang, S.-P.; Strack, A. M.; Gorski, J. N.; Miller, R.; Pang, J.; Lyons, K.; Dragovic, J.; Ning, J. G.; Schafer, W. A.; Welch, C. J.; Gong, X.; Gao, Y.-D.; Hornak, V.; Reitman, M. L.; Nargund, R. P.; Lin, L. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2845.
17. Bowden, K.; Heilbron, I. M.; Jones, E. R. H. *J. Chem. Soc.* **1946**, 39.
18. Kraus, G. A.; Roth, B. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4825.
19. (a) Liu, G.; Cogan, D. A.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9913; (b) Ellman, J. A.; Owens, T. D.; Tang, T. P. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 984.
20. Sun, X.-W.; Liu, M.; Xu, M.-H.; Lin, G.-Q. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1259.
21. (a) Shimizu, K.; Kawase, A.; Haneishi, T.; Kato, Y.; Kinoshita, K.; Ohmori, M.; Furuta, Y.; Emura, T.; Kato, N.; Mitsui, T.; Yamaguchi, K.; Morita, K.; Sekiguchi, N.; Yamamoto, T.; Matsushita, T.; Shimaoka, S.; Sugita, A.; Morikawa, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3323; (b) Kurimoto, A.;

Hashimoto, K.; Nakamura, T.; Norimura, K.; Ogita, H.; Takaku, H.; Bonnert, R.; McNally, T.; Wada, H.; Isobe, Y. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2964; (c) Procopiou, P. A.; Barrett, V. J.; Ford, A. J.; Looker, B. E.; Lunniss, G. E.; Needham, D.; Smith, C. E.; Somers, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6026; (d) Hasumi, K.; Sato, S.; Saito, T.; Kato, J.; Shirota, K.; Sato, J.; Suzuki, H.; Ohta, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4162.

22. Kunishima, K.; Kawachi, K.; Hioki, K.; Terao, K.; Tani, S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1551.

23. (a) Doan, K. M. M.; Humphereys, J. E.; Webster, L. O.; Wring, S. A.; Shampine, L. J.; Serabjit-S, C. J.; Adkinson, K. K.; Polli, J. W. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 1029; (b) Clark, D. E. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 927; (c) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. *NeuroRX* **2005**, *2*, 541.

第二部 抗糖尿病薬 FATP1 阻害剤の創製研究

24. Kinslinger, T. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31740.

25. Schmidt, A. M. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 1395.

26. International Diabetes Federation (IDF), *Diabetes Atlas, 6th edition (2013)*.
<http://www.idf.org/diabetesatlas>. Accessed on January, **2015**.

27. Higgins, L. S.; Mantzoros, C. S. *PPAR Research*, **2008**, Article ID 936906. doi:10.1155/2008/936906.

28. DeFronzo, R. A. *Diabetes* **1988**, *37*, 667.

29. (a) Schaffer, J. E.; Lodish, H. F. *Cell* **1994**, *79*, 427; (b) Abumrad, N.; Coburn, C.; Ibrahimi, A. *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, *1441*, 4; (c) Bonen, A.; Miskovic, D.; Kiens, B. *Can. J. Appl. Physiol.* **1999**, *24*, 515; (d) Kazantzis, M.; Stahl, A. *Biochem. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 852.

30. Kraegen, E. W.; Cooney, G. J. *Curr. Opin. Lipidol.* **2008**, *19*, 235.

31. Hirsch, D.; Stahl, A.; Lodish, H. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8625.

32. The homology between human and mouse FATP1 is calculated to be 89% from NCBI reference sequence: NP_940982.1 (human FATP1), NP_036107.1 (mouse FATP1).

33. (a) Kim, J. K.; Gimeno, R. E.; Higashimori, T.; Kim, H.-J.; Choi, H.; Punreddy, S.; Mozell, R. L.; Tan, G.; Stricker-Krongrad, A.; Hirsch, D. J.; Fillmore, J. J.; Liu, Z.-X.; Dong, J.; Cline, G.; Stahl, A.; Lodish, H. F.; Shulman, G. I. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 756; (b) Wu, Q.; Ortegon, A. M.; Tsang, B.; Doege, H.; Feingold, K. R.; Stahl, A. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 3455; (c) Wu, Q.; Kazantzis, M.; Doege, H.; Ortegon, A. M.; Tsang, B.; Falcon, A.; Stahl, A. *Diabetes* **2006**, *55*, 3229.

34. Blackburn, C.; Guan, B.; Brown, J.; Cullis, C.; Condon, S. M.; Jenkins, T. J.; Peluso, S.; Ye, Y.; Gimeno, R. E.; Punreddy, S.; Sun, Y.; Wu, H.; Hubbard, B.; Kaushik, V.; Tummino, P.; Sanchetti, P.; Sun, D. Y.; Daniels, T.; Tozzo, E.; Balanic, S. K.; Ramana, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3504.

35. (a) Shivarama, H. B.; Venkatramana, U. K. *Farmaco* **1992**, *47*, 305; (b) Abdel-Aal, M. T.; El-Sayed, W. A.; Abdel Aleem, A. H.; El Ashry, E. S. H. *Pharmazie* **2003**, *58*, 788.
36. (a) Chordia, M.; Murphree, L. J.; Macdonald, T. L.; Linden, J.; Olsson, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1563; (b) Lang, M.; Seifert, M. H.-J.; Wolf, K. K.; Aschenbrenner, A.; Baumgartner, R.; Wieber, T.; Trentinaglia, V.; Blisse, M.; Vitt, D.; Tajima, N.; Yamashita, T.; Noda, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5417.
37. (a) Almirante, L.; Mugaini, A.; Toma, D. N.; Gamba, A.; Murmann, W. *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 1048; (b) Hlasta, J. D. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5833; (c) Desreumaux, P.; Chavatte, P. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *63*, 419; (d) Bonnet, M.; Flanagan, J. U.; Hay, M. P.; Chan, D. A.; Lai, E. W.; Nguyen, P.; Giaccia, A. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3347; (e) Ottoni, O.; Neder, A.; Dias, V.; Cruz, R.; Aquino, L. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1005; (f) Zaidlewicz, M.; Chechlowska, A.; Prewysz-Kwinto, A.; Wojtczak, A. *Heterocycles* **2001**, *55*, 569.
38. Holloway, G. P.; Chou, C. J.; Lally, J.; Stellingwerff, T.; Maher, A. C.; Gavrilova, O.; Haluzik, M.; Alkhateeb, H.; Reitman, M. L.; Bonen, A. *Diabetologia* **2011**, *54*, 1457.

論文目録

1. Tetsuyoshi Matsufuji, Mika Ikeda, Asuka Naito, Masakazu Hirouchi, Hideo Takakusa, Shoichi Kanda, Masanori Izumi, Jun Harada, Tsuyoshi Shinozuka. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 5067–5070.
2. Tetsuyoshi Matsufuji, Mika Ikeda, Asuka Naito, Masakazu Hirouchi, Hideo Takakusa, Shoichi Kanda, Masanori Izumi, Jun Harada, Tsuyoshi Shinozuka. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 2560–2565.
3. Tetsuyoshi Matsufuji, Kousei Shimada, Shozo Kobayashi, Asuka Kawamura, Teppei Fujimoto, Tsuyoshi Arita, Takashi Hara, Masahiro Konishi, Rie Abe-Ohya, Masanori Izumi, Yoshitaka Sogawa, Youko Nagai, Kazuhiro Yoshida, Hisashi Takahashi. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 750–755.
4. Tetsuyoshi Matsufuji, Kousei Shimada, Shozo Kobayashi, Asuka Kawamura, Teppei Fujimoto, Tsuyoshi Arita, Takashi Hara, Masahiro Konishi, Rie Abe-Ohya, Masanori Izumi, Yoshitaka Sogawa, Youko Nagai, Kazuhiro Yoshida, Yasuyuki Abe, Takako Kimura, Hisashi Takahashi. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 89–104.

学会・外部発表

- 1 第30回メディシナルケミストリーシンポジウム (poster, 2012/11/28~11/30, 東京)
「Fatty acid transport protein 1 (FATP1) 阻害剤の合成研究」
- 2 247th American Chemical Society National Meeting and Exposition (poster, 2014/3/16~3/20, Dallas, Texas, US)
「Discovery and optimization of novel fatty acid transport protein 1 (FATP1) inhibitors」
- 3 第32回メディシナルケミストリーシンポジウム (poster, 2014/11/26~11/28, 神戸)
「Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) アゴニストの合成研究」
(平成26年度日本薬学会メディシナルケミストリーシンポジウム優秀賞受賞)
- 4 *MEDCHEM NEWS* **2015**, 25 (2), 95–102.
「Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) アゴニストの合成研究」
- 5 *Drug Delivery System* **2015**, 30 (5), *in press*.
「アンテドラッグ化を志向した末梢作用型抗肥満薬の創薬研究」

謝辞

本論文を提出するにあたり懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました、静岡県立大学薬食生命科学総合学府薬学研究院医薬品製造化学教室教授 菅敏幸先生に深く感謝の意を表します。

また、本論文に関して審査およびご指導とご助言を賜りました同研究院薬化学研究室教授 眞鍋敬先生、同研究院医薬品創製化学教室教授 濱島義隆先生、同研究院生命物理化学教室教授 橋本博先生、ならびに同研究院医薬品製造化学教室准教授 江木正浩先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う機会を与えていただき貴重な御指導を賜りました、Daiichi Sankyo India Pharma Pvt. Ltd. 西剛秀博士、アスピオファーマ株式会社創薬化学ファンクション 長谷川雅司博士、第一三共株式会社創薬化学研究所 高橋寿博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行、および論文発表にあたり、貴重な御指導、御助言をいただきました、島田神生博士、篠塚剛博士、小林祥三氏に深謝いたします。

本研究の合成研究に御協力いただいた、市川正則博士、河村明日香博士、藤本哲平博士、有田健氏はじめとする多くの共同研究者の方々に感謝いたします。

また、貴重な御助言と御協力を頂くとともに生物評価の労を取っていただきました泉正憲博士、神田昇一博士、原田淳博士、原崇博士、小西正博博士、曾川能任博士、大屋理恵氏、内藤明日香博士、池田未佳博士、薬物動態評価の労を取って頂きました高草英生博士、廣内幹和博士、吉田和弘氏、永井陽子氏、計算科学的手法について御尽力いただきました木村貴子氏、安全性評価の労を取っていただきました阿部泰之博士をはじめとする多くの共同研究者の方々に感謝いたします。

元素分析・旋光度測定・HR-MS 測定を実施してくださいました、第一三共 RD ノバーレ株式会社 分析グループ諸氏に感謝いたします。

最後に、本論文の作成に際し、蔭ながら心温かく支援し、深い理解を示してくれた最愛の家族に感謝いたします。