

博士論文

新規非ステロイド型ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬
としての1,4-ベンゾオキサジン-3-オン誘導体の創製

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府
博士論文である。

2015年9月

蓮井 智章

Discovery of 1,4-Benzoxazin-3-one Derivatives
as Novel Nonsteroidal Mineralocorticoid
Receptor Antagonists

September 2015

Tomoaki Hasui

目次

序論	1
第一章 ヒット化合物からのリード創出および最適化: 高活性かつ優れた薬物動態を示す 3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体の創出およびその生物活性	
第一節 研究方針および MR 結合阻害活性増強を指向したドラッグデザイン	8
第二節 トリアゾロチアジジン誘導体の合成	9
第三節 MR 結合阻害活性および構造活性相関 (1)	10
第四節 薬物動態の改善を指向したドラッグデザイン	12
第五節 イミダゾチアジジン, ベンゾチアジジンおよびアゾール誘導体の合成	13
第六節 MR 結合阻害活性および構造活性相関 (2)	
第一項 新規骨格の探索	16
第二項 3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体の最適化	19
第七節 化合物 14n の薬物動態および生物活性評価	22
第八節 結語	24
第二章 非芳香族ヘテロ 5 員環誘導体の探索: 優れたステロイド受容体選択性を示す 2,5-ジヒドロピロール-2-オン誘導体の創出	
第一節 研究方針	25
第二節 ステロイド受容体選択性の向上を指向したドラッグデザイン	25
第三節 ジヒドロフラン-2-オンおよびジヒドロピロール-2-オン誘導体の合成	28
第四節 MR 結合阻害活性, ステロイド受容体選択性および構造活性相関	30
第五節 結語	35

第三章 新規アゾール誘導体の探索：高活性，高選択性かつパーシャルアゴニスト活性 の低減した 1-アルキル-3-メチルピラゾール誘導体の創出およびその生物活性	
第一節 研究方針	36
第二節 化合物デザインおよび合成計画	36
第三節 各種アゾール誘導体の合成	38
第四節 <i>in vitro</i> 活性および構造活性相関	
第一項 リード骨格の探索	43
第二項 ピラゾール環上 1 位側鎖の最適化	44
第五節 化合物 80a の生物活性評価	49
第六節 化合物 80a の X 線共結晶構造および考察	50
第七節 結語	52
総括	53
謝辞	56
実験の部	58
第一章に関する実験	58
第二章に関する実験	75
第三章に関する実験	86
薬理作用および薬物動態の評価方法	108
MR/リガンド複合体の構造解析方法	111
引用文献	114
論文目録	119

略号表

Ac	acetyl
ACE	angiotensin-converting enzyme
AcOH	acetic acid
ADDP	1,1'-(azodicarbonyl)dipiperidine
ADME-tox	absorption distribution metabolism excretion toxicity
AR	androgen receptor
ARB	angiotensin II receptor blocker
AUC	area under the concentration-time curve
BA	bioavailability
Bu	butyl
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
DAST	diethylaminosulfur trifluoride
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMFDMA	<i>N,N</i> -dimethylformamide dimethylacetal
DMSO	dimethyl sulfoxide
dppf	1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EMPHASIS-HF	Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure
EPHESUS	Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study
Et	ethyl
GR	glucocorticoid receptor

HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high-performance liquid chromatography
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
Ms	methanesulfonyl
Me	methyl
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
PD	pharmacodynamics
Ph	phenyl
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
<i>p.o.</i>	per os
Pr	propyl
PR	progesterone receptor
PTSA	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
Py	pyridyl
q.d.	quaque die
RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
SAR	structure-activity relationship
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
TFAA	trifluoroacetic anhydride
Tf ₂ O	triflic anhydride
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyranyl
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl

序論

高血圧とその治療

高血圧は動脈の血圧が高値になる疾患であり、各国の高血圧治療ガイドラインでは収縮期血圧および拡張期血圧がそれぞれ 140 mmHg 以上, 90 mmHg 以上の状態を高血圧と定めている。¹⁾ 多数の疫学調査により、²⁾ 血圧と脳卒中や心疾患などの心血管病リスクの間には正の相関があることが示されており、高血圧はそれらの心血管病を引き起こす強力かつ最大の危険因子と考えられている。その有病者数は極めて多く、全世界で 10 億人、³⁾ 本邦だけでもおよそ 4300 万人と推定されており、¹⁾ 人口の高齢化に伴い今後さらに増加することが見込まれている。高血圧の患者は、血圧値と血圧以外の危険因子 (糖尿病や脂質異常症、喫煙など) の有無によって、低リスク、中リスク、高リスクの 3 群に層別化され、それぞれのリスクレベルに応じて治療方針が決定される。高血圧の治療には、食事療法や運動療法などの非薬物療法と血圧低下作用を有する薬剤を用いる薬物療法がある。非薬物療法は有効かつ重要な治療法であるものの、通常それのみで目標血圧を達成することは難しく、多くの場合において薬物療法が必要である。高血圧治療薬としてこれまでに、カルシウム拮抗薬、レニン・アンジオテンシン系阻害薬 (ACE 阻害薬, ARB), 交感神経抑制薬 (β 遮断薬), 利尿薬 (サイアザイド系利尿薬, ループ利尿薬, カリウム保持性利尿薬) など、様々な作用機序をもつ薬剤が開発されており、優れた血圧低下作用と心血管病の抑制効果が実証されている。^{1, 4)} 一方で、降圧目標達成率は 50%未満⁵⁾ と未だ十分ではなく、より優れた薬剤の開発が求められている。

ミネラルコルチコイド受容体およびアルドステロン

ミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor, MR) は、核内受容体スーパーファミリー内のステロイドホルモン受容体サブファミリーに分類されるリガンド依存性転写調節因子のひとつである。MR 蛋白質は、N 末端ドメイン、DNA 結合ドメイン、ヒンジ領域、およびリガンド結合ドメイン (ligand binding domain, LBD) から構成されており、LBD におけ

るアミノ酸配列は同じサブファミリー内のアンドロゲン受容体 (AR), プログステロン受容体 (PR), グルココルチコイド受容体 (GR) と高い相同性を有している。^{6,7)}

MR の主要な内因性リガンドであるアルドステロンは, 主に副腎皮質球状層において合成, 分泌されるステロイドホルモンである (Figure 1). アルドステロンは, 腎臓の遠位尿細管に存在する MR と結合し, *sgk-1* や ENaC などの標的遺伝子の転写を活性化することでナトリウムの再吸収およびカリウムの排泄を促進させる作用を有しており, MR と共に, 電解質および体液量調節を介した血圧制御に重要な役割を果たしている。⁸⁾ しかしながら, 近年, 血管壁や心臓, 腎臓などの組織でのアルドステロンの産生や MR の発現が報告され,^{9,10)} アルドステロン量の増加に伴う過剰な MR の活性化が, 血管炎症の惹起や組織の繊維化, 酸化ストレスの亢進などを引き起こし, 高血圧のみならず, 心不全や腎不全などの循環器系疾患の進展にも深く関与することが明らかとなっている。^{11,12)} 従って, 過剰な MR シグナルの抑制は, これらの疾患の治療に対する極めて有望なアプローチであり, 重要な創薬標的となっている。

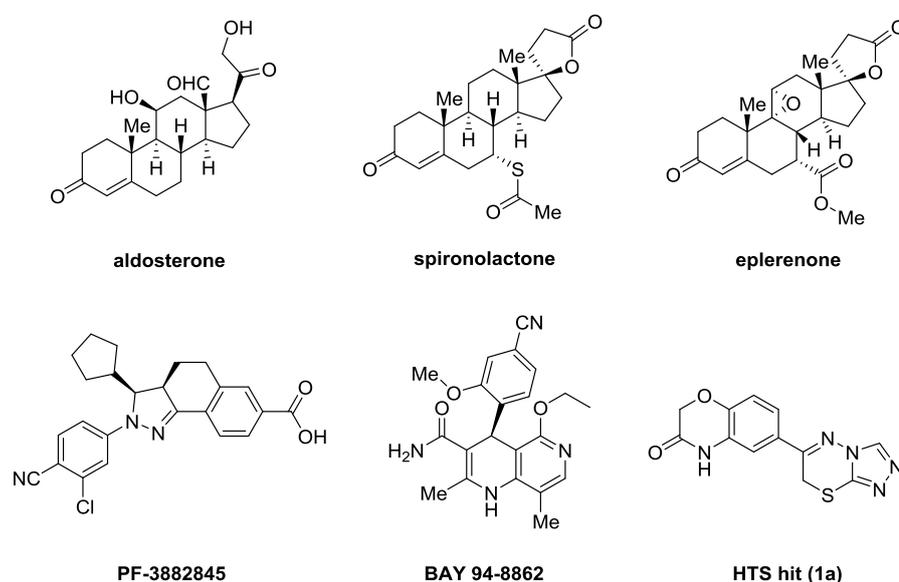


Figure 1. Chemical structures of steroidal MR ligands, aldosterone, spironolactone and eplerenone, and selected non-steroidal MR antagonists.

ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬

MR 拮抗薬は、アルドステロンの MR への結合を競合的に阻害することにより MR シグナルを抑制する薬剤であり、現在、スピロノラクトンとエプレレノンの2つの薬剤がカリウム保持性利尿薬として臨床で使用されている (Figure 1)。MR 拮抗薬は、古くから利尿作用に基づく降圧作用を有することが知られていたが、標準治療でもコントロール不良の治療抵抗性高血圧患者に対して MR 拮抗薬の追加投与が有効であることが示され、現在、有力な治療手段として注目されている。¹³⁾ また、近年、複数の大規模臨床試験により MR 拮抗薬が強力な抗心不全作用を有することが明らかとなった。重症心不全患者を対象に行われた RALES¹⁴⁾ では、ACE 阻害薬などの標準治療群に対してスピロノラクトンの併用群が死亡率を約 30% 改善すること、急性心筋梗塞患者を対象に行われた EPHEBUS¹⁵⁾ では、エプレレノンの併用群が死亡率を約 15% 減少させること、軽度の心不全患者を対象に行われた EMPHASIS-HF¹⁶⁾ では、エプレレノンの併用群が死亡率を約 24% 減少させることが報告された。さらに、慢性腎不全患者を対象に行われた試験において、標準治療に対するエプレレノンの追加投与が尿中アルブミン量の顕著な低下作用を示すことが報告されており、MR 拮抗薬は腎保護薬としても期待されている。¹⁷⁾ このように、MR 拮抗薬は心臓や腎臓に対して強力な臓器保護作用を併せ持つ降圧薬として、その有効性が注目を集めている。

新規 MR 拮抗薬開発の意義

上述のように、MR 拮抗薬は様々な疾患への有用性が多数報告されているものの、スピロノラクトンおよびエプレレノンの臨床での使用は限定的なものに留まっている。その一因として、それぞれ以下に示す課題が挙げられる。すなわち、スピロノラクトンは、強力な MR 拮抗作用に基づく顕著な薬効を示す一方で、ステロイド受容体選択性が低く AR や PR にも比較的高い結合親和性を有しており、これらの両受容体に対する作用に基づく性ホルモン関連の副作用 (女性化乳房、月経不順など) が臨床で報告されている。¹⁸⁾ 一方、より新しい薬剤であるエプレレノンは、ステロイド受容体選択性を改善し上述の副作用を軽減したものの、MR 拮抗作用が弱く、降圧作用もスピロノラクトンより劣ることが明らかとなっている。¹⁹⁾

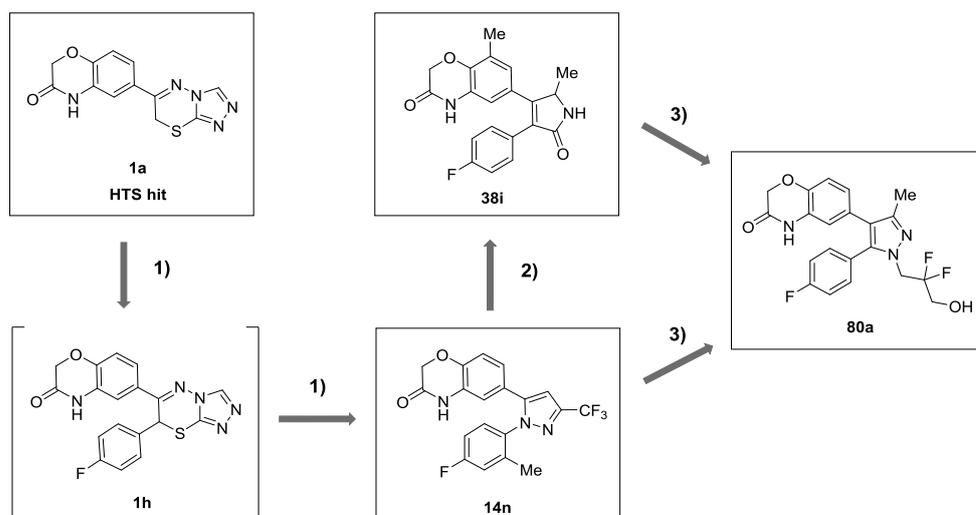
加えて、エプレレノン[®]は、米国では1日2回の服薬で承認されており、服薬アドヒアランスの点においても課題を有している。以上のことから、スピロノラク톤の性ホルモン関連の副作用、およびエプレレノンの弱い薬効を改善した新たな薬剤が求められている。このような背景の下、筆者は、強力な薬理作用と高い受容体選択性を併せ持つ次世代のMR拮抗薬の創製を目指し、研究を開始した。

研究計画と概要

MR拮抗薬は、古くからステロイド型化合物の合成研究が精力的に行われてきた。実際に、スピロノラク톤やエプレレノンも、その母核にステロイド骨格を有している。しかしながら、ステロイド型化合物は、概してその他のステロイド受容体との選択性の確保が困難であることや、誘導体の合成展開の多様性に乏しいことが知られている。そこで、本研究においては非ステロイド型化合物を探索することとした。現在までにMR拮抗薬として複数の非ステロイド型化合物が報告されているが (Figure 1),²⁰⁾ 独自の構造を有する新規誘導体を創出すべく、武田薬品工業の保有する化合物ライブラリーに対しハイスループットスクリーニング (high throughput screening, HTS) 試験を実施した。こうして見出されたMR結合阻害活性を示す複数の化合物の中から、1,4-ベンゾオキサジン誘導体 **1a** に着目した (Scheme 1)。本化合物は、活性が中程度であるものの (IC₅₀ = 2000 nM)、他の誘導体と比べて脂溶性が低く、かつ分子量が小さいなどの利点を有していた。そこで、化合物 **1a** をヒット化合物として選出し、これを基に最適化研究を行った。

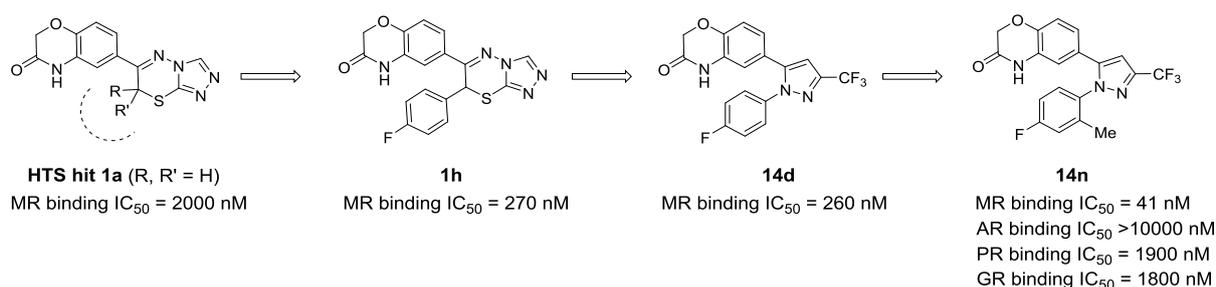
本研究は、以下に示す3つの内容から構成される (Scheme 1)。すなわち、1) 高活性かつ優れた薬物動態を示す化合物の創出、2) 優れたステロイド受容体選択性を有する化合物の創出、3) 高活性、高選択性かつパーシャルアゴニスト活性の低減した化合物の創出、である。これらの化合物の効率的な合成法を開発しつつ、それぞれの誘導体における構造活性相関を明らかにし、さらに詳細な生物活性評価を行うことにより、次の成果を得た。

Scheme 1



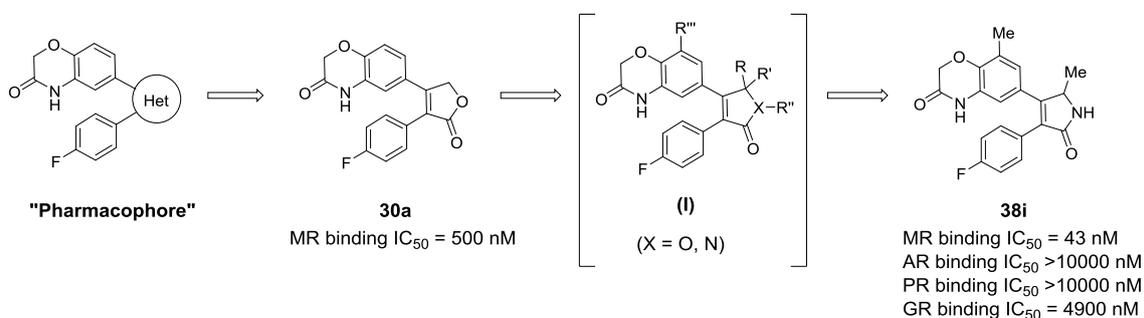
1) MR 結合阻害活性の増強を指向して、ヒット化合物 **1a** からのリード創出および最適化を行った (Scheme 2). 化合物 **1a** とスピロノラクトンとの重ね合わせを基に、中央環へ種々の脂溶性置換基を導入した結果、ベンゼン環の導入により活性が大きく増強することを見出し、1,2-ジアリール型構造が活性発現に重要な部分構造であることを明らかにした. 続いて、中央骨格の変換を検討し、[6-5]系縮合環からヘテロ5員環へと構造の大きく異なる骨格への誘導化に成功し、良好な活性および薬物動態プロファイルを示す3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体 **14d** へと導いた. その際、種々の置換ピラゾール誘導体の効率的な合成法を確立した. さらなる最適化によって見出した化合物 **14n** は、強力な MR 結合阻害活性 ($IC_{50} = 41$ nM) および優れた経口吸収性 (BA = 51%) を示し、高血圧モデルラットへの経口投与 (100 mg/kg) においてスピロノラクトンと同等の有意な降圧作用を示した. これらの詳細について、第一章で述べる.

Scheme 2



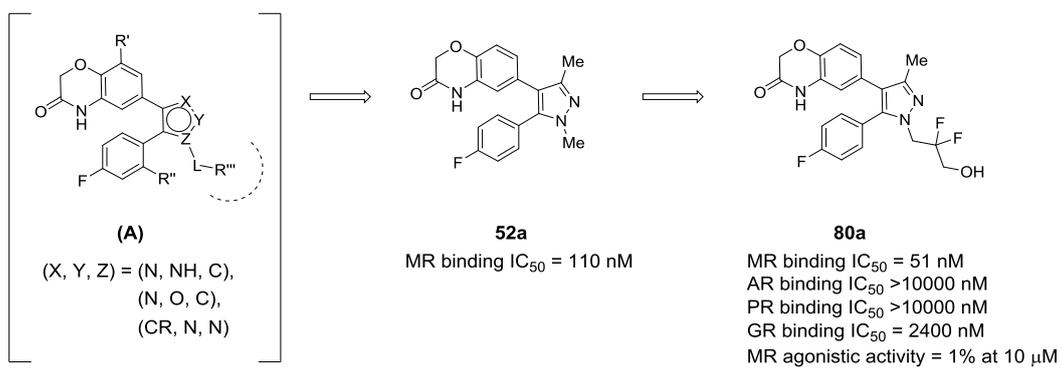
2) 受容体選択性の改善を指向し、中央骨格の異なる誘導体の探索を行った (Scheme 3). 新たなリード化合物として化合物 **30a** を選出し、MR との X 線共結晶構造を基に、化合物(**I**)をデザインした. 種々の置換ジヒドロフラン-2-オン誘導体および置換ジヒドロピロール-2-オン誘導体の効率的な合成法を確立し、構造活性相関を取得する中で、5 位メチル基が活性を増強させること、および *N*-無置換ジヒドロピロール-2-オン骨格が高い受容体選択性を示すことを見出した. さらなる最適化の結果、強力な MR 結合阻害活性 ($IC_{50} = 43 \text{ nM}$) および極めて高い受容体選択性 (AR, PR: >250 倍, GR: 100 倍) を有する化合物 **38i** を見出した. これらの詳細について、第二章で述べる.

Scheme 3



3) 強力な活性と高い受容体選択性を有し、かつパーシャルアゴニスト活性の低減した化合物の創出を目指して最適化を行った (Scheme 4). パーシャルアゴニスト活性に対する構造活性相関や結合様式の情報に基づき、母核にアゾール環を有する誘導体(**A**)をデザインした. はじめに母核の探索を行い、良好な活性および選択性を示しかつパーシャルアゴニスト活性を示さない 1,3-ジメチルピラゾール誘導体 **52a** を見出した. 続いて、光延反応などを用いる効率的な合成法を確立しつつピラゾール環 1 位側鎖の最適化を行った結果、目的に適う優れた *in vitro* プロファイルを示しかつ良好な経口吸収性を示す化合物 **80a** を見出した. 化合物 **80a** は、高血圧モデルラットへの経口投与 (100 mg/kg) において、精嚢重量比の低下作用を示すことなくスピロラクトンと同等の有意な降圧作用を示した. これらの結果は、化合物 **80a** が強力な MR 拮抗作用を有しかつ性ホルモン関連副作用の軽減した新規 MR 拮抗薬であることを示唆するものである. これらの詳細について、第三章で述べる.

Scheme 4



本論

第一章 ヒット化合物からのリード創出および最適化: 高活性かつ優れた薬物動態を示す 3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体の創出およびその生物活性

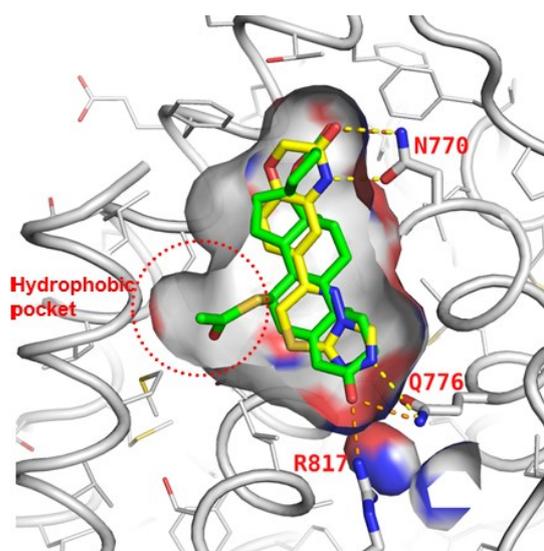
第一節 研究方針および MR 結合阻害活性増強を指向したドラッグデザイン

序論で述べたように、独自の構造を有する MR 拮抗薬を見出す目的で社内の化合物ライブラリーに対して HTS 試験^{注1)}を実施し、1,4-ベンゾオキサジン-3-オン環を有する化合物 **1a** を見出した。本化合物は、活性は中程度であるものの ($IC_{50} = 2000 \text{ nM}$), MR 拮抗薬としてこれまでに報告例のない構造を有しており、さらに脂溶性が低くかつ分子量が小さいなどの利点を有していたことからヒット化合物として選出した。

まず初めに、MR 結合阻害活性の増強を計画した。化合物をデザインするに当たり、強力な MR 拮抗作用を示すスピロラクトンの結合様式を参考にすることとした。そこで、社内で解析された MR/スピロラクトン複合体の X 線共結晶構造 (PDB ID: **3VHU**) を鋳型に用いて、ヒット化合物 **1a** の MR に対するドッキングモデルを作成した。MR/スピロラクトン (X 線結晶構造) と MR/化合物 **1a** (ドッキングモデル) の重ね合わせを Figure 2A に示す。本モデルにより、ヒット化合物 **1a** はスピロラクトンと同様に MR の LBD 内のステロイド結合サイトに結合し、Asn770 や Gln776 などのアミノ酸残基と水素結合していることが示唆された。一方で、化合物 **1a** はスピロラクトンのチオエステル基が占有している疎水性の空間を埋めていないことも示唆された。著者はこの違いに着目し、本空間を脂溶性側鎖で充填することで疎水性相互作用による活性増強が期待できると考え、トリアゾロチアジアジン環 2 位への脂溶性置換基の導入を検討した (Figure 2B)。

注 1) HTS 試験では、 $[H^3]$ -アルドステロンの MR への結合を競合阻害する活性 (以下、MR 結合阻害活性と表記する) を評価した。

(A)



(B)

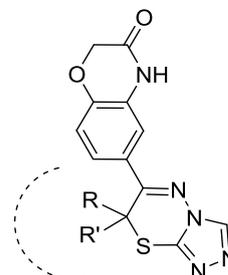
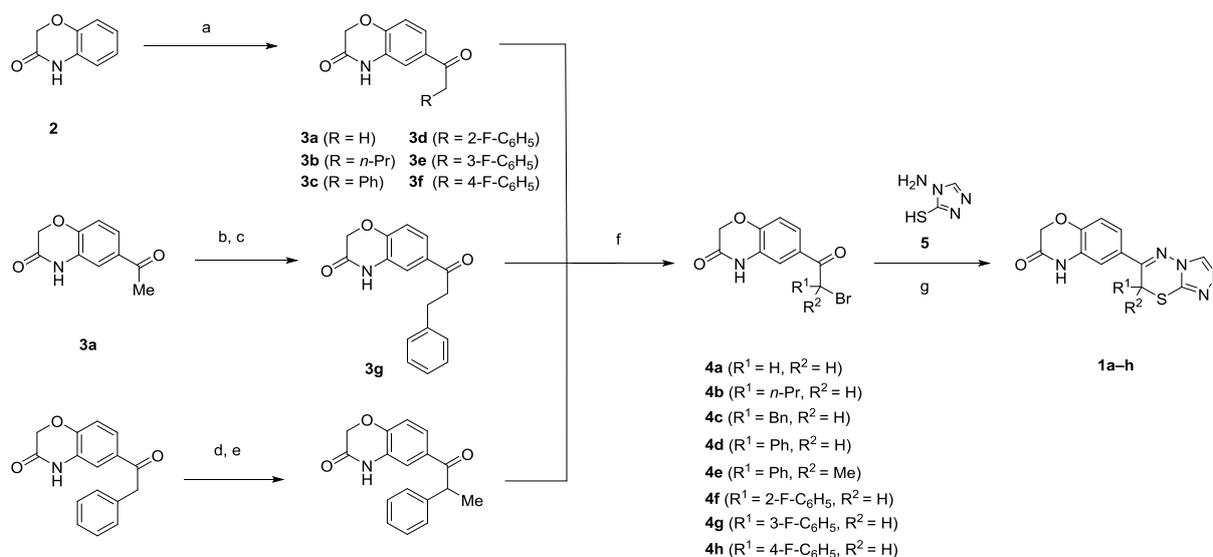


Figure 2. (A) Overlay of a compound **1a** (yellow) and spironolactone (green) in MR. The compound **1a** was docked to MR in the X-ray crystal structure of MR/spironolactone obtained in-house. The hydrogen bonds are shown as orange or yellow dotted lines. (B) Compound design aiming to increase binding activity.

第二節 トリアゾロチアジアジン誘導体の合成

トリアゾロチアジアジン誘導体 **1a-h** の合成法を Scheme 5 に示す。まず、種々のケトン体 **3b-h** を以下のように合成した (アセチル体 **3a** のみ市販品を用いた)。ケトン体 **3b-f** は、1,4-ベンゾオキサジン **2** と種々の酸クロリドとの Friedel-Crafts アシル化反応により合成し、フェネチルケトン **3g** は、**3a** とベンズアルデヒドとのアルドール縮合反応を塩基性条件下行い縮合体を得た後、水素雰囲気下パラジウム炭素を用いて二重結合を還元することにより合成した。ケトン **3h** は、ベンジルケトン **3c** と *N,N,N',N'*-テトラメチルジアミノメタンとを縮合させた後、水素雰囲気下パラジウム炭素を用いて二重結合を還元することにより合成した。続いて、ケトン体 **3a-h** を酢酸溶媒中でピリジニウムヒドロブロミドペルブロミドと反応させてモノブロモ化体 **4a-h** を得たのち、4-アミノ-3-メルカプト-1,2,4-トリアゾール (**5**) と縮合させることにより目的とするトリアゾロチアジアジン誘導体 **1a-h** を合成した。

Scheme 5^a



^aReagents and conditions: (a) RCH₂COCl, AlCl₃, ClCH₂CH₂Cl, 25–88%; (b) PhCHO, NaOMe, MeOH, 50 °C, 87%; (c) H₂, Pd/C, EtOH, THF, 25%; (d) Me₂NCH₂NMe₂, Ac₂O, CH₂Cl₂, 56%; (e) H₂, Pd/C, THF, 66%; (f) HBr₃·Py, HBr, AcOH, 85–99%; (g) 4-amino-3-mercapto-4*H*-1,2,4-triazole (**5**), EtOH/toluene, reflux, 24–97%.

第三節 MR 結合阻害活性および構造活性相関 (1)

トリアゾロチアジアジン環 2 位へ脂溶性置換基を導入した結果を Table 1 に示す。 *n*-プロピル基 (**1b**) やベンジル基 (**1c**) の導入は活性に大きな影響を与えなかったものの、フェニル基の導入において 4 倍程度活性が増強した (**1d**: IC₅₀ = 510 nM)。 また、 **1d** はヒット化合物の課題のひとつであった PR との選択性も大きく改善した。 トリアゾロチアジアジン環 2 位へのさらなるメチル基の導入は、大幅に活性を減弱させた (**1e**)。 これらの結果から、フェニル体 **1d** に見られる 1,2-ジアリール型構造が MR 結合阻害活性に重要な部分構造であることが分かった。

Table 1. Effects of introduction of substituents at the 2-position of triazolothiadiazine ring^a

Compound No.	R ¹	R ²	MR binding IC ₅₀ (nM)	Selectivity		
				AR binding IC ₅₀ (nM)	PR binding IC ₅₀ (nM)	GR binding IC ₅₀ (nM)
1a	H	H	2000	>10000	1600	>10000
1b	<i>n</i> -Pr	H	4100	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b
1c	Bn	H	1300	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b
1d	Ph	H	510	3600	>10000	5600
1e	Ph	Me	>10000	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b
1f	2-F-C ₆ H ₅	H	600	5900	>10000	5500
1g	3-F-C ₆ H ₅	H	310	4700	>10000	>10000
1h	4-F-C ₆ H ₅	H	270	>10000	>10000	>10000

^aIC₅₀ values are shown as the means of duplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism. ^bNot tested.

化合物 **1d** と MR との X 線共結晶構造を Figure 3 に示す。これは、非ステロイド型化合物が MR に結合した X 線共結晶構造として初めての例である。本結晶構造から、化合物 **1d** がドッキングモデルと同様にベンゾオキサジン環部位で Asn770 と、トリアゾール環部位で Arg817 や Gln776 と水素結合していること、および導入したフェニル基がデザイン通り狙った疎水性空間を占有していることが確認された。さらに、導入したフェニル基の周囲には、小さいながらも占有されていない空間が存在することも明らかとなった。そこで、空間充填によるさらなる活性の増強を期待して、ベンゼン環上のオルト位、メタ位、パラ位へそれぞれフッ素原子を導入したところ、3-フルオロ体 (**1g**) および 4-フルオロ体 (**1h**) において活性が増強した (Table 1)。興味深いことに、これらのフッ素化体は対応する無置換体 **1d** と比べて受容体選択性が改善しており、特に 4-フルオロ体 **1h** は、AR, PR, GR それぞれに対しいずれも 35 倍以上と良好な受容体選択性を示した。本結果から、AR, PR, GR における本疎水性

空間はMRのそれよりも小さいと推測された。

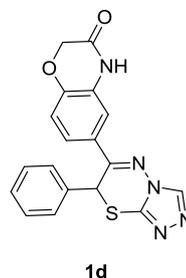
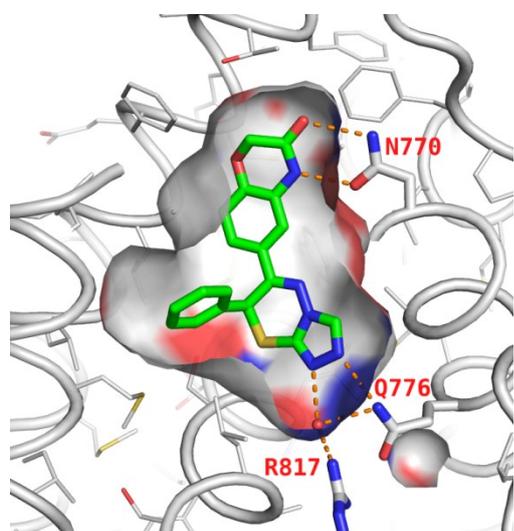


Figure 3. X-ray crystal structure of MR/compound **1d** complex. The hydrogen bonds are shown as orange dotted lines.

第四節 薬物動態の改善を指向したドラッグデザイン

化合物 **1h** は良好な活性と受容体選択性を示したものの、**1h** およびその周辺誘導体はいずれもラットにおける薬物動態 (pharmacokinetics, PK) プロファイルが不良であった。これらの化合物はラットの肝ミクロソーム中での安定性 (代謝安定性) に乏しく、中央環部位の一般的に代謝を受けやすいとされるチオエーテルやイミンなどの部分構造にその原因があるのではないかと推察した。そこで、こうした部分構造を持たない新たな中央環を有する誘導体を探索することとした (Figure 4)。まず、中央環部位における構造修飾の許容性を調べる目的で、トリアゾロチアジアジン環に近い構造であるイミダゾチアジアジン環 (**7**) やベンゾチアジアジン環 (**8**) への変換を行った。これらの化合物がいずれも良好な活性を示したことから (第六節第一項)、構造が大きく異なるものの、代謝されやすい部分構造を持たず、よりドラッグライクな環である5員環へテロ芳香環への変換を検討した。

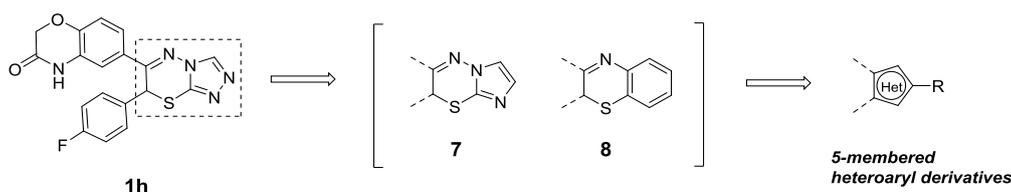
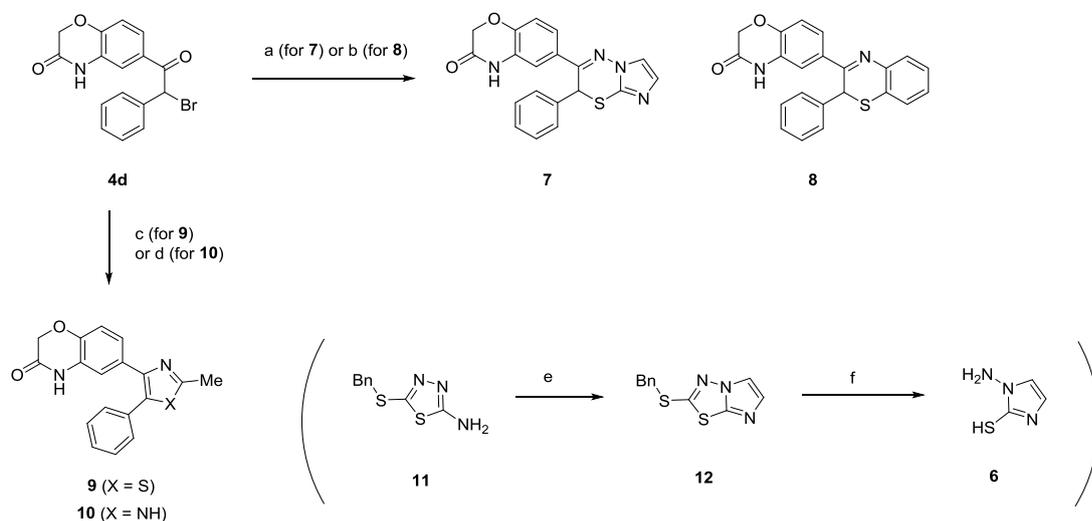


Figure 4. Design of new compounds possessing alternative scaffolds.

第五節 イミダゾチアジアジン、ベンゾチアジアジンおよびアゾール誘導体の合成

イミダゾチアジアジン **7**、ベンゾチアジアジン **8**、チアゾール **9**、イミダゾール **10** の合成法を Scheme 6 に示す。Scheme 5 で合成したブロムケトン **4d** を、1-アミノ-2-メルカプトイミダゾール (**6**)、2-アミノチオフェノール、チオアセトアミド、アセトアミジンと縮合させ、それぞれ化合物 **7-10** を得た。**6** は、市販のチアジアゾール **11** とクロルアセトアルデヒドとを縮合させイミダゾール環を構築後、ヒドラジンをを用いてチアジアゾール環を開環することにより合成した。

Scheme 6^a

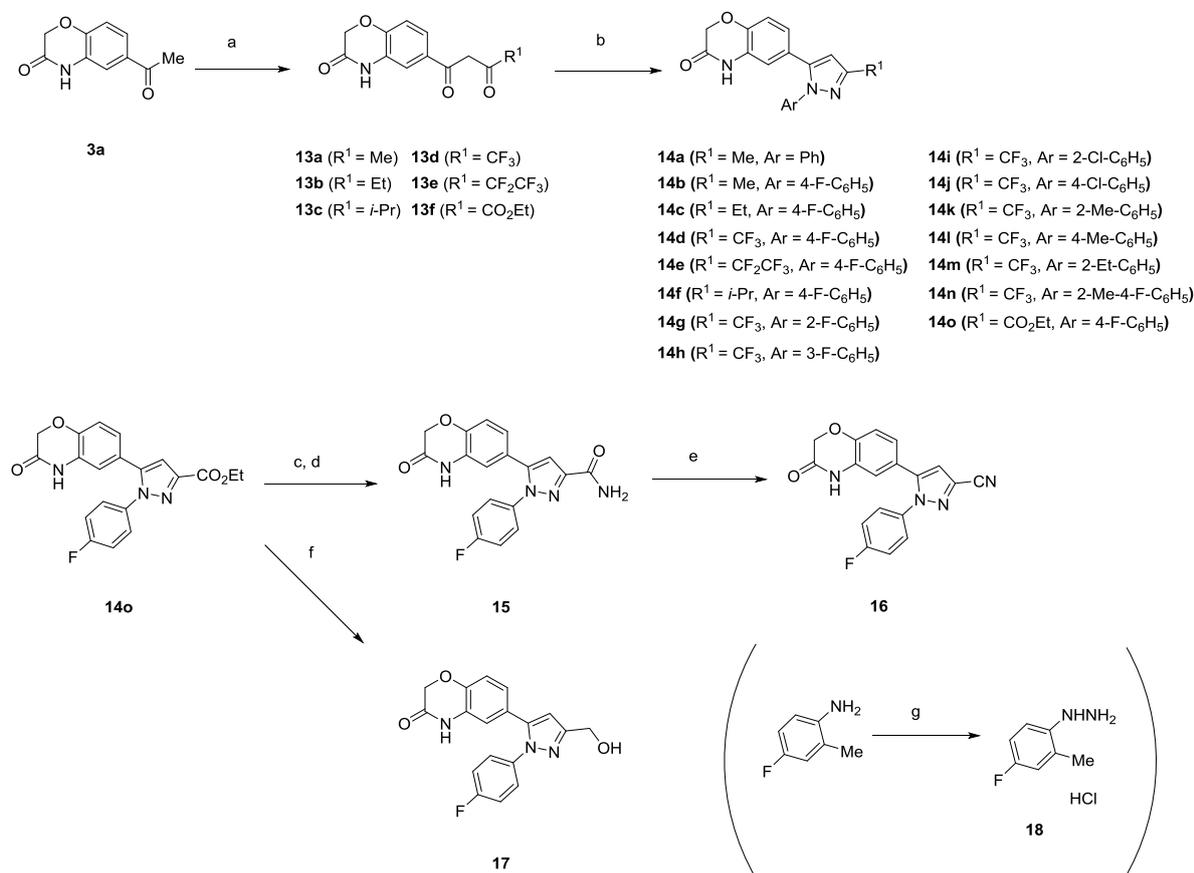


^aReagents and reaction conditions: (a) 1-amino-2-mercaptimidazole (**6**), EtOH, reflux, 17%; (b) 2-aminothiophenol, EtOH, reflux, 19%; (c) thioacetamide, NaOEt, EtOH, reflux, 23%; (d) acetamidine, K₂CO₃, 2-propanol, reflux, 14%; (e) 45% chloroacetaldehyde, EtOH/toluene, reflux, 23%; (f) hydrazine monohydrate, EtOH, reflux, 32%.

3位置換ピラゾール誘導体 **14a-o**、**16** および **17** は、以下のようにして合成した (Scheme 7)。アセトフェノン誘導体 **3a** を塩基存在下種々のエステルと縮合させ、ジケトン **13a-f** を得た。続いて、酸性条件下 **13a-f** を各種アリールヒドラジンと縮合させてピラゾール環を構築し、3位置換ピラゾール誘導体 **14a-o** を得た。シアノ体 **16** は、エステル **14o** を加水分解後、アンモニアと縮合させてアミド体 **15** へと変換した後に、TFAA を用いてカルボキサミド基を脱水させることにより合成した。ヒドロキシメチル体 **17** は、化合物 **14o** のエステル基を LiAlH₄

を用いて還元して合成した。ヒドラジン **18** は、市販の 2-メチル-4-フルオロアニリンのアミノ基をジアゾ化し、塩化スズ(II) を用いて還元することにより合成した。

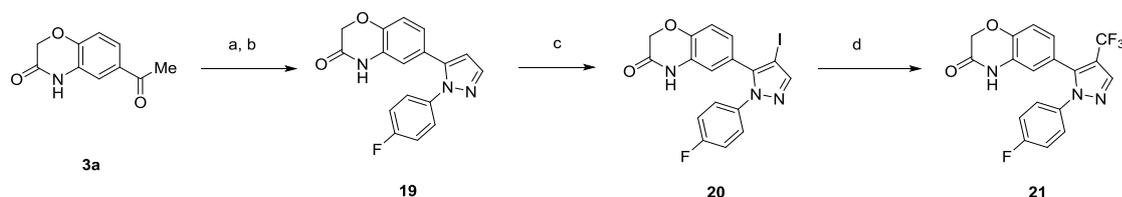
Scheme 7^a



^aReagents and conditions: (a) 60% NaH, [2,4]-dibenzo-18-crown-6, $R^1\text{CO}_2\text{Et}$, THF, EtOH, reflux, 43–95%; (b) ArNHNH_2 , 2-propanol, TFA, 60 °C or 80 °C, 12–86%; (c) 1 N NaOH, THF, 75%; (d) 2 M NH_3 in MeOH, EDCI, HOBt, DMF, 76%; (e) TFAA, pyridine, dioxane, 38%; (f) LiAlH_4 , THF, 34%; (g) 1) NaNO_2 , HCl, 2) SnCl_2 , 48% in 2 steps.

4-トリフルオロメチルピラゾール誘導体 **21** の合成法を Scheme 8 に示す。アセトフェノン誘導体 **3a** を DMFDMA と反応させた後、ヒドラジンをを用いてピラゾール環を構築し、化合物 **19** を得た。続いて NIS を用いてピラゾール環 4 位をヨウ素化し、銅触媒によるトリフルオロメチル化反応²¹⁾ に付すことにより、**21** を合成した。

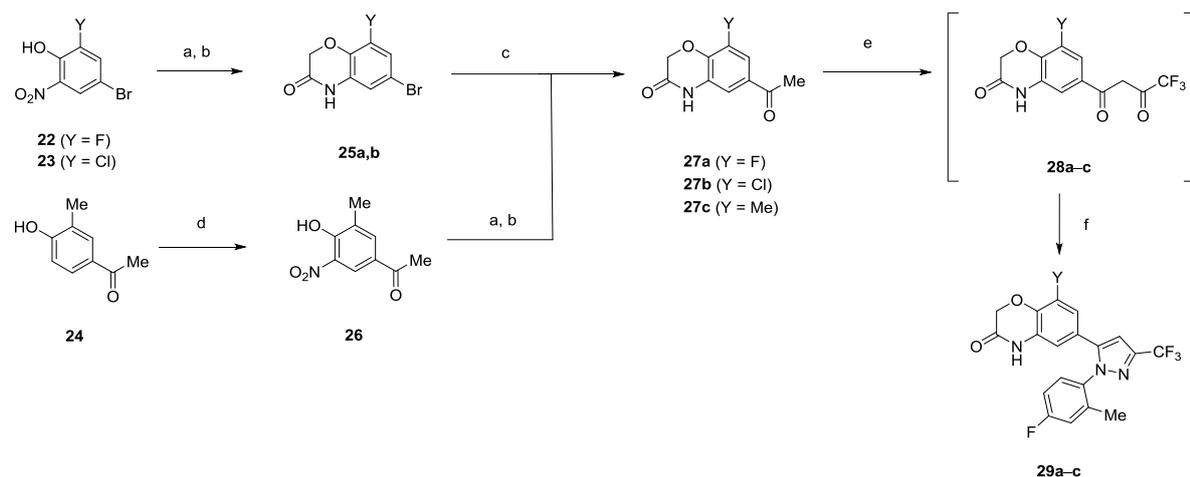
Scheme 8^a



^aReagents and conditions: (a) DMFDMA, 80 °C, 73%; (b) 4-fluorophenylhydrazine, MeOH, 40 °C, 44%; (c) NIS, DMF, 55 °C, 50%; (d) FSO₂CF₂CO₂Me, CuI, DMF, 100 °C, 5%.

8 位置換ベンゾオキサジン-3-オン誘導体 **29a-c** の合成法を Scheme 9 に示す。化合物 **22, 23** の水酸基をブromo酢酸メチルでアルキル化後、酢酸溶媒中 Zn を用いてニトロ基を還元し分子内で環化させることで1,4-ベンゾオキサジン-3-オン環を構築し、**25a,b** を得た。**25a,b** をビニルエーテルとの Heck 反応に付した後、酸処理することでケトン体 **27a,b** を得た。ケトン体 **27c** は、アセトフェノン誘導体 **24** を硝酸によりニトロ化し **26** へと変換後、アルキル化、還元的環化を行うことで合成した。得られたケトン体 **27a-c** を塩基存在下トリフルオロ酢酸エチルと縮合させジケトン **28a-c** とし、続いてヒドラジン **18** と縮合させることで目的物 **29a-c** を得た。

Scheme 9^a



^aReagents and conditions: (a) BrCH₂CO₂Me, K₂CO₃, DMF, 65 °C; (b) Zn, AcOH, 100 °C, 41–89% in 2 steps; (c) 1) 4-(vinylloxy)butan-1-ol, PdCl₂[P(o-tolyl)]₃, DMF/H₂O, 80 °C, 2) 2 N HCl, reflux, 34–72% in 2 steps; (d) HNO₃, AcOH, room temperature, 59%; (e) NaH, [2,4]-dibenzo-18-crown-6, CF₃CO₂Et, THF, 60 °C; (f) 1-(4-fluoro-2-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (**18**), TFA, 2-propanol, 80 °C, 16–30% in 2 steps.

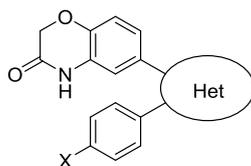
第六節 MR 結合阻害活性および構造活性相関 (2)

第一項 新規骨格の探索

新たな中央環の探索結果を Table 2 に示す。まず、中央環部位における初期 SAR 取得を目的に、イミダゾチアジアジン環およびベンゾチアジアジン環への変換を検討した (7, 8)。これらの誘導体は、活性発現に重要な相互作用として考えられた Arg817 や Gln776 との水素結合性相互作用が減少あるいは消失しているにも関わらず、強力な MR 結合阻害活性を示した。これらの結果から、本ベンゾオキサジン-3-オン誘導体においては、Arg817 や Gln776 との水素結合は必須ではなく、ベンゾオキサジン-3-オン環部位での Asn770 との水素結合や 2 位フェニル基部位での疎水性相互作用の方が MR 結合阻害活性により重要であることが示唆された。そこで、より大きな構造変化を伴う環への変換についても許容される可能性があると考え、代謝されやすい部分構造を持たず、よりドラッグライクな骨格である 5 員環ヘテロ芳香環への変換を検討した。はじめに、チアゾール環 (9) やイミダゾール環 (10)、ピラゾール環 (14a) を有する誘導体を合成し、評価したところ、ピラゾール 14a において弱いながらも MR 結合阻害活性が認められた。さらに、14a のベンゼン環上 4 位へフッ素原子を導入したところ、中程度まで MR 結合阻害活性が増強することが分かった (14b: IC₅₀ = 1100 nM)。化合物 14b の代謝安定性は不良であったものの (ラット代謝安定性: 164 μL/min/mg)、被代謝部位と推定される 3 位メチル基の変換により改善可能であると考えられた。そこで次に、さらなる活性の増強および代謝安定性の改善を目的に、ピラゾール環上置換基の最適化を行うこととした。

Figure 5 に、化合物 14b (ドッキングモデル) と化合物 1d (X 線結晶構造) の重ね合わせを示す。この図から、化合物 14b の 3-メチルピラゾール環はトリアゾロチアジアジン環が占有していた空間を十分には埋めていないことが示唆された。そこで、空間充填による活性増強を期待し、3 位メチル基をより嵩高い置換基へと変換した。また、Arg817, Gln776 との水素結合獲得を期待し極性置換基への変換も検討した。

Table 2. SAR summary for central ring moiety^a



Compound No.	Het	X	MR binding IC ₅₀ (nM)	Selectivity		
				AR binding IC ₅₀ (nM)	PR binding IC ₅₀ (nM)	GR binding IC ₅₀ (nM)
7		H	36	95	350	3500
8		H	69	1200	1400	950
9		H	>10000	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b
10		H	>10000	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b
14a		H	5300	>10000	>10000	>10000
14b		F	1100	>10000	>10000	6900

^aIC₅₀ values are shown as the means of duplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism. ^bNot tested.

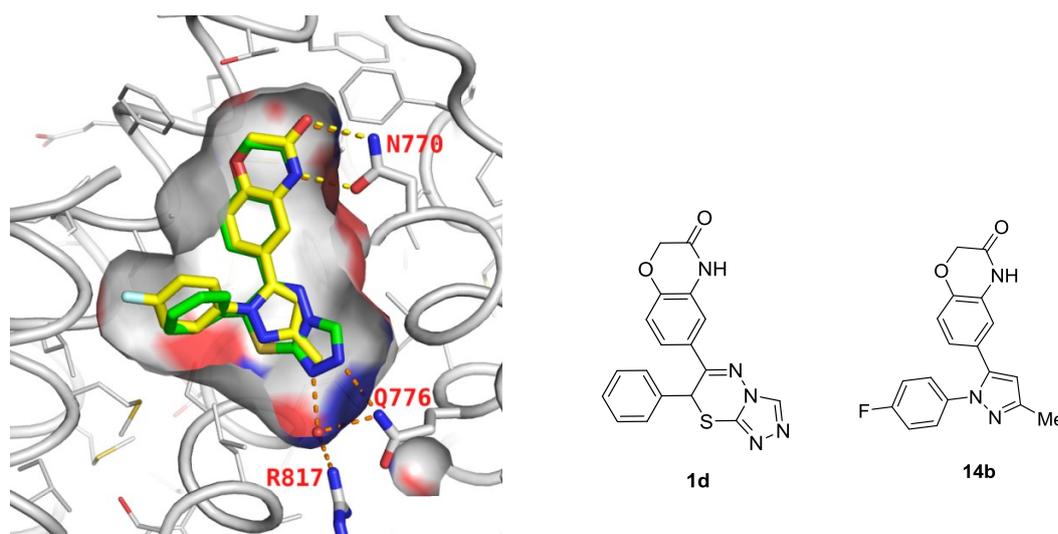
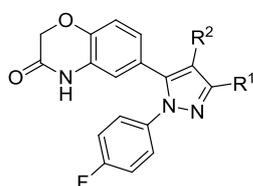


Figure 5. Overlay of the compound **14b** (yellow) and compound **1d** (green) in MR. The compound **14b** was docked to the X-ray crystal structure of MR/compound **1d** complex. The hydrogen bonds are shown as orange or yellow dotted lines.

ピラゾール環上置換基の検討結果を Table 3 に示す。期待通り、メチル基をより嵩高いエチル基、トリフルオロメチル基、テトラフルオロエチル基へと変換することにより MR 結合阻害活性が増強した (**14c-e**)。特に、トリフルオロメチル体 **14d** においては活性がおよそ 4 倍増強した ($IC_{50} = 260$ nM)。さらに、**14d** は良好な代謝安定性および薬物動態プロファイルを示した (BA = 28%, ラット代謝安定性: 24 μ L/min/mg)。一方で、イソプロピル基への変換は大幅に活性を減弱させた (**14f**)。この結果から、ピラゾール環 3 位周辺には分岐型アルキル側鎖を許容する空間がないものと考えられる。Arg817, Gln776 との水素結合獲得を狙ったシアノ基やヒドロキシメチル基の導入では、活性の大幅な増強は得られなかった (**16, 17**)。また、トリフルオロメチル基の置換位置を 3 位から 4 位へと移したところ、大きく活性が減弱した。以上の検討の結果から、これらの中で 3-トリフルオロメチル体 **14d** が最も良好なプロファイルを示すことが分かった。

Table 3. SAR summary for substituent on pyrazole ring^a



Compound No.	R ¹	R ²	MR binding IC ₅₀ (nM)
14c	Et	H	960
14d	CF ₃	H	260
14e	CF ₂ CF ₃	H	570
14f	<i>i</i> -Pr	H	>10000
16	CN	H	920
17	CH ₂ OH	H	6800
21	H	CF ₃	2700

^aIC₅₀ values are shown as the means of duplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism. ^bNot tested.

以上、トリアゾロチアジアジン環に替わる新たな母核として3-トリフルオロメチルピラゾール環を見出した。本環への変換は、良好な活性を保持しつつ、薬物動態プロファイルを大きく改善させた。これらの結果を基に、3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体 **14d** を新たなリード化合物とし、さらなる最適化を行うこととした。

第二項 3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体の最適化

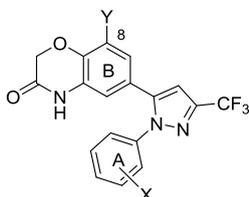
化合物 **14d** のさらなる活性の増強を目的に、ピラゾール環 1 位ベンゼン環およびベンゾオキサジン-3-オン環部位のベンゼン環 (以下、それぞれ A 環および B 環と呼ぶ) 上の置換基の最適化を実施した。これらの結果を Table 4 に示す。

まず、A 環上置換基の最適化を行った。置換基およびその置換位置が活性に与える影響を探るべく、A 環上 2 位, 3 位, 4 位の各位置へフッ素原子, 塩素原子, メチル基を導入した。フッ素原子置換体の活性を比較した結果, 4-フルオロ体 **14d** の活性が最も良好であった ($IC_{50} = 260$ nM)。塩素原子置換体においても同様の傾向であり, 4-クロロ体 **14j** が最も良好な活性を示した ($IC_{50} = 320$ nM)。一方, メチル基置換体では 2-メチル体 **14k** が最も良好な活性を示し, 対応する 2-フルオロ体 **14g** や 2-クロロ体 **14i** よりも 5 倍程度強力な MR 結合阻害活性を示した (**14k**: $IC_{50} = 80$ nM)。この 2 位メチル基に特有の活性増強効果は, 2 位メチル基がピラゾール環と A 環との間がねじれ型になる推定活性コンホメーションを安定化したことによるものと考えられる。2 位メチル基のエチル基への変換は活性が大きく減弱した (**14m**)。2 位および 4 位における最適な置換基同士を組み合わせさせた 2-メチル-4-フルオロ体 **14n** は, 相乗効果によりさらに活性が増強し, 期待通り強力な MR 結合阻害活性を示した (**14n**: $IC_{50} = 41$ nM)。

次に、B 環上置換基の最適化を行った。Figure 5 に示したドッキングモデルより、ベンゾオキサジン-3-オン環上の 8 位周辺には小さいながらも置換基導入を許容する空間が存在する可能性が示唆された。そこで、疎水性相互作用によるさらなる活性増強を期待して、小さい置換基 (フッ素原子, 塩素原子, メチル基) を B 環上 8 位へと導入した。フッ素原子の導入は活性が減弱したものの (**29a**)、塩素原子およびメチル基の導入では期待通り活性が増強し

た (**29b**: IC₅₀ = 12 nM, **29c**: IC₅₀ = 21 nM).

Table 4. SAR summary for benzene ring (A-ring) at 1-position of pyrazole ring and benzene ring (B-ring) in the benzoxazin-3-one moiety^a



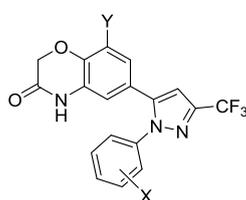
Compound No.	X	Y	MR binding IC ₅₀ (nM)
14g	2-F	H	440
14h	3-F	H	1100
14d	4-F	H	260
14i	2-Cl	H	430
14j	4-Cl	H	320
14k	2-Me	H	80
14l	4-Me	H	590
14m	2-Et	H	700
14n	2-Me, 4-F	H	41
29a	2-Me, 4-F	F	76
29b	2-Me, 4-F	Cl	12
29c	2-Me, 4-F	Me	21

^aIC₅₀ values are shown as the means of duplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism.

強力な MR 結合阻害活性を示した化合物 **14k**, **14n**, **29a-c**, およびスピロノラクトン, エブレレノンの MR 結合阻害活性, 受容体選択性および MR アンタゴニスト活性を Table 5 に示す. MR アンタゴニスト活性は, COS-1 細胞を用いたレポータージーンアッセイによって評価した. 2-メチル体 **14k** は MR 結合阻害活性, MR アンタゴニスト活性共にスピロノラクトンと比べて 2-3 倍程度弱かった. 一方, 2-メチル-4-フルオロ体 **14n** は, スピロノラクトンと

同等の強力な MR 結合阻害活性および MR アンタゴニスト活性を示した。さらに, **14n** は AR, PR, GR の各受容体に対してそれぞれ 40 倍以上の良好な受容体選択性を示した。特に, スピロノラクトンと比べて性ホルモン受容体の AR, PR に対する選択性が大きく改善していることが重要な点である (**14n**: AR: > 250 倍, PR: 45 倍, スピロノラクトン: AR: 3 倍, PR: 15 倍)。化合物 **29a-c** も良好な MR アンタゴニスト活性を示したものの, GR に対する選択性が化合物 **14n** やスピロノラクトンよりも劣っていた。以上の結果から, これらの中で化合物 **14n** が活性および選択性のバランスが最も優れた化合物であることが分かった。

Table 5. Steroid hormone receptor selectivities and MR antagonistic activities of selected compounds^a



Cmpd No.	X	Y	MR binding IC ₅₀ (nM)	Selectivity			MR antagonistic IC ₅₀ (nM) ^b
				AR binding IC ₅₀ (nM)	PR binding IC ₅₀ (nM)	GR binding IC ₅₀ (nM)	
14k	2-Me	H	80	>10000	4900	2500	150
14n	2-Me, 4-F	H	41	>10000	1900	1800	43
29a	2-Me, 4-F	F	76	>10000	1800	1700	85
29b	2-Me, 4-F	Cl	12	4500	930	200	70
29c	2-Me, 4-F	Me	21	>10000	2400	470	15
Spi ^c	-	-	49	120	650	1400	60
Epl ^d	-	-	2600	>10000	>10000	>10000	1300

^aIC₅₀ values are shown as the means of duplicate or triplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism. ^bInhibitory activity of transcription of aldosterone (Reporter gene assay). ^cSpironolactone. ^dEplerenone.

第七節 化合物 **14n** の薬物動態および生物活性評価

化合物 **14n** のラットにおける薬物動態を調べたところ、**14n** は約 51% の BA を示し、良好な経口吸収性を有することが確認された (Table 6).

Table 6. Pharmacokinetic profiles of compound **14n** in SD rats^a

CL (mL/h/kg)	Vdss (mL/kg)	AUC _{0-24h,p.o.} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	MRT _{p.o.} (h)	BA (%)
1328 \pm 88	4626 \pm 315	3.829 \pm 1.172	4.39 \pm 0.12	50.7 \pm 15.9

^aCompound **14n** was administered to SD rats intravenously at 3 mg/kg and orally at 10 mg/kg (n = 3).

次に、*in vivo* における MR 拮抗作用の指標である尿中 Na^+/K^+ 比の増加作用^{注2)} を評価した (Figure 6A). 化合物 **14n** (10, 30, 100 mg/kg) およびスピロノラクトン (30 mg/kg) を Wistar ラットに経口投与後、アルドステロンを皮下投与し、5 時間尿を採取した。尿中のナトリウムおよびカリウムの量を測定し、得られたナトリウムの濃度をカリウムの濃度で除することで尿中 Na^+/K^+ 比を算出した。化合物 **14n** は用量依存的に尿中 Na^+/K^+ 比を増加させ、その作用は 30 mg/kg 経口投与群から有意であった。陽性対照化合物であるスピロノラクトンも、同様に尿中 Na^+/K^+ 比を増加させた。両化合物の 30 mg/kg での作用は同等のものであった。

続いて、高血圧モデルとして確立されている DOCA/食塩高血圧ラットを用いて化合物 **14n** の降圧作用を評価した。化合物 **14n** (100 mg/kg, q.d.) およびスピロノラクトン (100 mg/kg, q.d.) を DOCA/食塩高血圧ラットに 13 日間反復経口投与し、収縮期血圧 (systolic blood pressure, SBP) および心拍数 (heart rate, HR) を測定した (Figure 6B)。その結果、両化合物共

注2) MR アゴニストであるアルドステロンが MR に結合すると、カリウムの排泄およびナトリウムの貯留が亢進するため、尿中での Na^+/K^+ 比が減少する。ここへ MR 拮抗薬を投与すると、アルドステロンによる作用が阻害され、尿中 Na^+/K^+ 比は増加する。このため、尿中 Na^+/K^+ 比は MR 拮抗作用を示す薬力学マーカー (PD マーカー) として用いられている。

に有意な血圧低下作用を示し、その作用は同等のものであった。また、これらの化合物は心拍数に影響を与えなかった。以上の結果から、化合物 **14n** が *in vivo* においてスピロノラクトンと同等の強力な降圧作用を有し、かつその作用はMR拮抗作用に基づくことが示唆された。

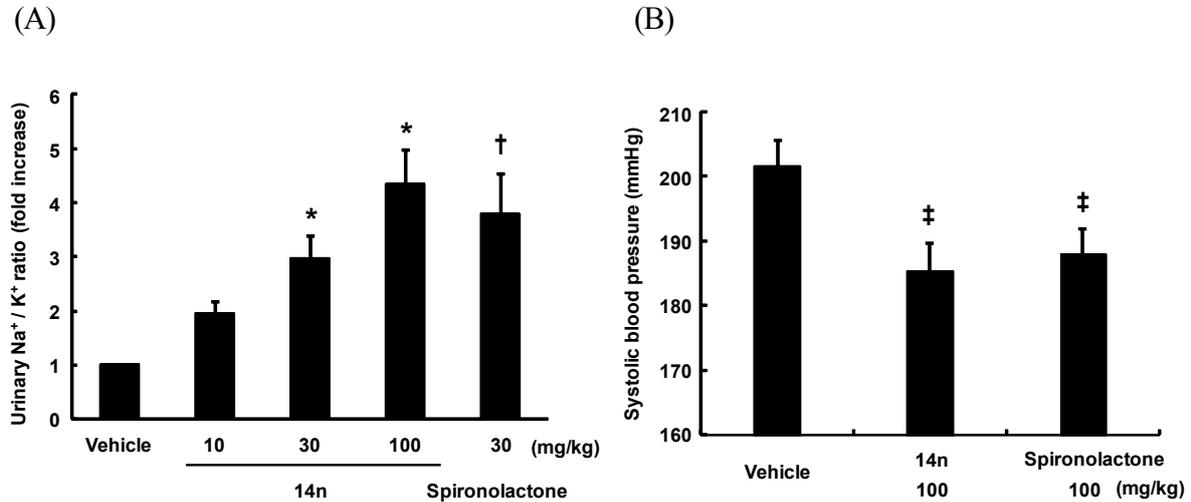


Figure 6. Potassium-sparing and natriuretic (A) and anti-hypertensive (B) effects of compound **14n** in rats. (A) Wistar rats were treated with vehicle, compound **14n** at 10, 30, or 100 mg/kg or spironolactone at 30 mg/kg 30 min before aldosterone injection (3 μ g/kg, *s.c.*) and oral saline load (25 mL/kg). Urine (5 h after the saline load) was collected and urinary Na⁺ and K⁺ were measured. Mean \pm SEM (n = 5), **p* < 0.025 vs. Vehicle by one-tailed Williams' test, †*p* < 0.05 vs. Vehicle by Aspin-Welch test. (B) DOCA-salt hypertensive rats were treated with vehicle, compound **14n**, or spironolactone at a dose of 100 mg/kg for 13 days. SBP and HR were measured by tail-cuff method approximately 24 h after the last administration. Pre-treatment values of SBP in each group were 193–194 mmHg. Mean \pm SEM (n = 7–8), ‡*p* < 0.05 vs. Vehicle by Student's t-test.

第八節 結語

以上述べてきたように、HTS ヒット化合物 **1a** からのリード創出および最適化により、強力な MR 結合阻害活性を有する新規非ステロイド型 MR 拮抗薬の創出に成功した。ヒット化合物 **1a** からのリード創出の過程において、1,2-ジアリール型構造が MR への高い結合親和性に重要であることを明らかにした。さらに、縮合環であるトリアゾロチアジアジン環から単環である 3-トリフルオロメチルピラゾール環への大幅な骨格変換に成功し、活性および薬物動態の良好なリード化合物 **14d** へと導いた。さらなる最適化により見出した化合物 **14n** は、強力な MR 結合阻害活性 ($IC_{50} = 41 \text{ nM}$) および良好な受容体選択性 (AR: >250 倍, PR, GR: 40 倍) を示した。化合物 **14n** は薬物動態試験により経口吸収性に優れることが示され、Wistar ラットにおいて尿中 Na^+/K^+ 比の有意な増加作用を示し、かつ DOCA/食塩高血圧ラットにおいてスピロラクトンと同等の強力な降圧作用を示した。これらは、**14n** が MR 拮抗作用に基づく降圧作用を有することを示す結果である。

第二章 非芳香族ヘテロ5員環誘導体の探索：優れたステロイド受容体選択性を示す2,5-ジヒドロピロール-2-オン誘導体の創出

第一節 研究方針

第一章では、3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体 **14n** が強力な MR 結合阻害活性および良好な薬物動態を示し、ラットを用いた生物活性評価において MR 拮抗作用に基づく降圧作用を有することを明らかにした。化合物 **14n** は、スピロノラクトンよりも優れたステロイド受容体選択性を有しており、AR に対する結合阻害活性をほとんど示さなかった (AR binding $IC_{50} > 10000$ nM)。一方で、PR に対しては未だ中程度の結合阻害活性を有していた (PR binding $IC_{50} = 1900$ nM)。性ホルモン関連副作用の観点から、AR だけでなく PR に対しても結合阻害活性を持たない化合物が望ましい。そこで本章では、強力な MR 結合阻害活性を有し、かつ AR および PR に対して結合阻害活性を示さない高選択的な化合物を探索することとした。

第二節 ステロイド受容体選択性の向上を指向したドラッグデザイン

第一章で得られた SAR から、1,4-ベンゾオキサジン-3-オン誘導体の活性発現に重要なファーマコフォアは、以下の3つの部位で構成されることが示唆された。すなわち、(1) 1,4-ベンゾオキサジン-3-オン環、(2) 4-フルオロベンゼン環、(3) これらの二つの芳香環を隣接する位置で繋ぐ中央環の3つである。これらの中で、中央環部位が多様な構造変換を最も許容しやすく、また、その修飾は活性のみならず受容体選択性にも大きく影響することが明らかとなった。そこで、3-トリフルオロメチルピラゾール環以外の新たなリード骨格を探索することとした。これまで未検討であった非芳香族ヘテロ5員環、6員環を中心に種々の母核を有する誘導体を合成、評価した結果、中程度の MR 結合阻害活性 ($IC_{50} = 500$ nM) を示し、かつ AR, PR, GR への結合阻害活性をほとんど示さない ($IC_{50} > 10000$ nM)、2,5-ジヒドロフラン-2-オン誘導体 **30a** を見出した (Figure 7)。化合物 **30a** は、分子量が小さく、脂溶性が低いなどのリード化合物に相応しいプロファイルを有していたことから、本化合物を新たなリード

化合物として選出した。

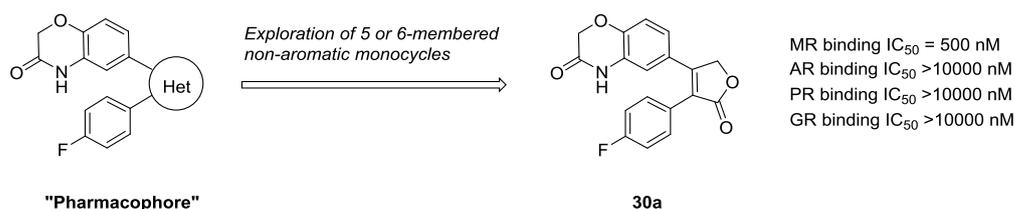


Figure 7. Identification of new lead compound **30a**.

続いて、初期 SAR を調べる目的で、化合物 **30a** の 4-フルオロベンゼン環部位の修飾を実施した (Table 7). 第一章第六節第二項で示したように、3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体においてベンゼン環上 2 位へのメチル基導入が MR 結合阻害活性を大きく増強させたことから、同様にベンゼン環 2 位へフッ素原子およびメチル基を導入した (**30b**, **c**). しかしながら、いずれの化合物も活性および選択性の両面において明確な利点を示さなかった. 第一章で述べたように、3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体においては、2 位のメチル基がピラゾール環と 4-フルオロベンゼン環の間のねじれ型コンホメーションを安定化したことにより活性が増強したと考えられる. 一方 2,5-ジヒドロフラン-2-オン誘導体では、母核のカルボニル基により元からねじれ型コンホメーションが優位になっていると考えられ、2 位への置換基導入による活性増強効果が見られなかったものと考えている. その他の置換基に

Table 7. Effect of installation of substituents into 4-fluorobenzene ring^a

Compound No.	R	MR binding IC_{50} (nM)	Selectivity		
			AR binding IC_{50} (nM)	PR binding IC_{50} (nM)	GR binding IC_{50} (nM)
30a	H	500	>10000	>10000	>10000
30b	F	660	>10000	4600	>10000
30c	Me	750	>10000	1800	>10000

^a IC_{50} values were shown as the means of duplicate experiments. IC_{50} values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism.

についても種々検討したものの、4-フルオロベンゼン環が最も良好な結果を示したことから、本部位を4-フルオロベンゼン環に固定し、以後の検討を行った。

化合物 **30b** と MR との X 線共結晶構造, およびそれを用いた化合物デザインを以下に示す (Figure 8). X 線共結晶構造の解析により, 化合物 **30b** がこれまでと同様に MR の LBD 内のステロイド結合サイトに結合することが分かった. また, 母核のカルボニル基が二つの水分子を介して Arg817 や Gln776 と水素結合すること, および 1,4-ベンゾオキサジン-3-オン部位が Asn770 に加えて新たに Thr945 と水素結合することが明らかとなった (Figure 8A). これらの新たな水素結合は, 化合物 **30b** に特有のものであり, 2,5-ジヒドロフラン-2-オン誘導体の MR との結合に重要な相互作用であると考えられる. さらに, 化合物 **30b** は MR のリガンド結合サイトを十分に占有しておらず, その近傍には最適化に利用できる空間 A, B, C が存在することも分かった. 筆者はこれらの空間に着目し, 空間 A, B, C を充填するように脂溶性置換基を導入する, あるいは Arg817, Gln776 と水素結合するように空間 B へ極性置換基を導入することにより, 結合阻害活性を増強できると考え, 化合物(I)として示した置換 2,5-ジヒドロフラン-2-オン誘導体および 2,5-ジヒドロピロール-2-オン誘導体をデザインした (Figure 8B).

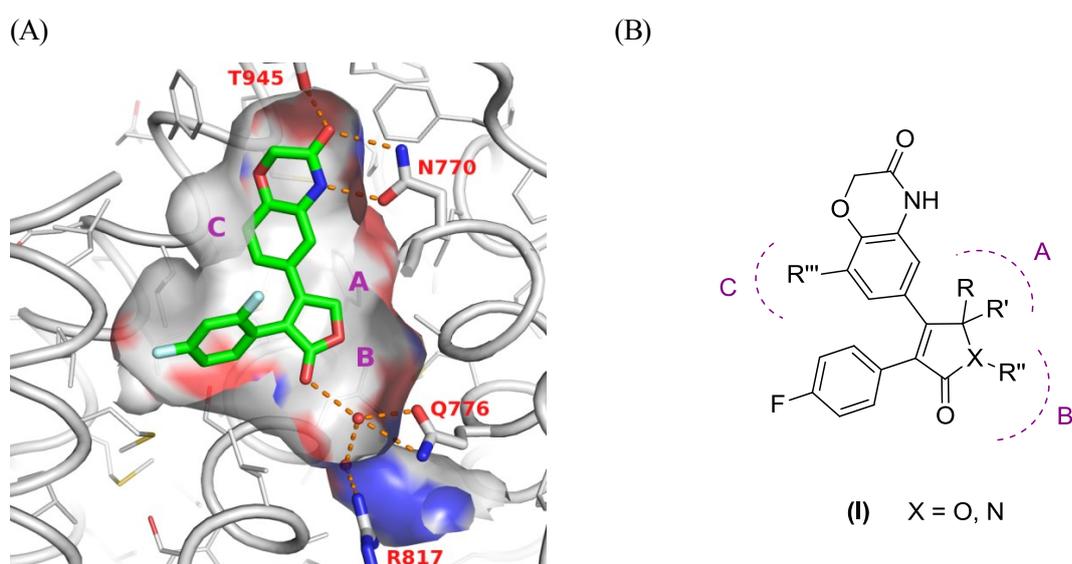
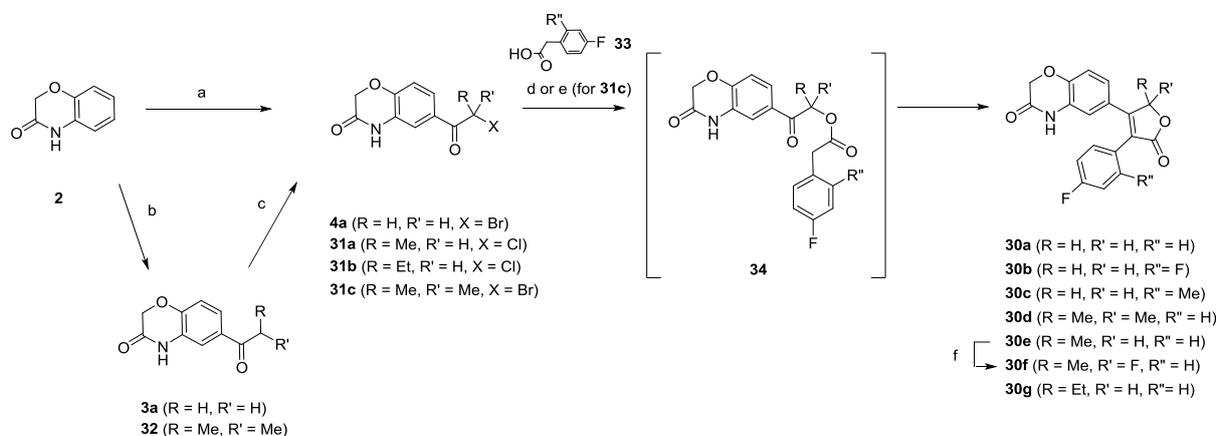


Figure 8. (A) X-ray cocrystal structure of MR/compound **30b** complex. Orange dot means hydrogen bond. “A”, “B” and “C” mean the unfilled space available for lead optimization. (B) Compound design for potent MR binding affinity.

第三節 ジヒドロフラン-2-オンおよびジヒドロピロール-2-オン誘導体の合成

2,5-ジヒドロフラン-2-オン誘導体 **30a–g** の合成法を Scheme 10 に示す。市販の化合物 **2** と 酸塩化物との Friedel–Crafts アシル化反応により化合物 **31a, b, 32** を得た。ケトン体 **3a, 32** を 酢酸溶媒中、ピリジニウムヒドロブロミドペルブロミドと反応させてモノブロモ化し化合物 **4a, 31c** を得た。得られた α -ハロケトン体 **4a, 31a, b** をトリエチルアミン存在下でフェニル酢酸誘導体 **33** と縮合させ **34** とした後、窒素雰囲気下 DBU を用いて分子内環化–脱水反応させることで、目的とするジヒドロフラン-2-オン誘導体 **30a–c, e, g** を得た。ジメチル体 **30d** は、ブロモケトン **31c** と 4-フルオロフェニル酢酸を炭酸カリウム存在下で過熱し、縮合および分子内環化–脱水反応させることにより合成した。5-フルオロ体 **30f** は、DBU 存在下、*N*-フルオロベンゼンスルホンイミドを用いて化合物 **30e** の 5 位を求電子的にフッ素化することにより合成した。

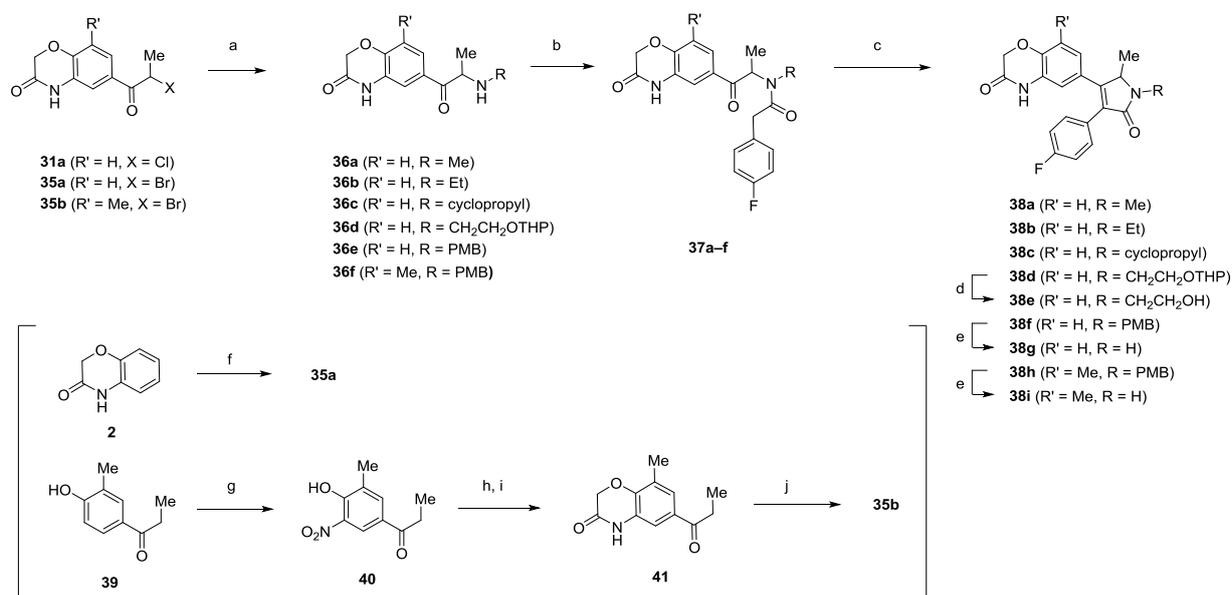
Scheme 10^a



^aReagents and conditions: (a) AlCl₃, ClCOCRR'Cl, ClCH₂CH₂Cl, 37–99%; (b) AlCl₃, ClCOCRR'H, ClCH₂CH₂Cl, 16%; (c) HBr₃·Py, HBr, AcOH, 69–92%; (d) 1) **33**, TEA, DMF, 2) DBU, under nitrogen atmosphere, 15–65% in 2 steps; (e) 4-fluorophenylacetic acid, K₂CO₃, BnNEt₃Cl, DMA, 11%; (f) *N*-fluorobenzenesulfonimide, DBU, THF, 24%.

2,5-ジヒドロピロール-2-オン誘導体 **38a-i** の合成法を Scheme 11 に示す. α -ハロケトン体 **31b**, **35a, b** を各種 1 級アミンと縮合させた後, 炭酸カリウム存在下 4-フルオロフェニル酢酸クロリドを用いてアシル化し, アミド体 **37a-f** を得た. 得られた **37a-f** を, アルゴン雰囲気下 *tert*-ブトキシカリウムを用いて分子内環化-脱水反応させることで目的とする化合物 **38a-d, f, h** を合成した. 酸性条件下, 化合物 **38d, f, h** のテトラヒドロピラニル基および *p*-メトキシベンジル基を脱保護し, それぞれヒドロキシルエチル体 **38e** および 2,5-ジヒドロ-1*H*-ピロール-2-オン誘導体 **38g, i** を得た. 化合物 **35a** は, 化合物 **2** と酸塩化物との Friedel-Crafts アシル化反応により合成した. 化合物 **35b** は, フェノール体 **39** をニトロ化後, 水酸基のアルキル化, ニトロ基の還元により 1,4-ベンゾオキサジン-3-オン環を構築して **41** を得, その後モノブロモ化することにより合成した.

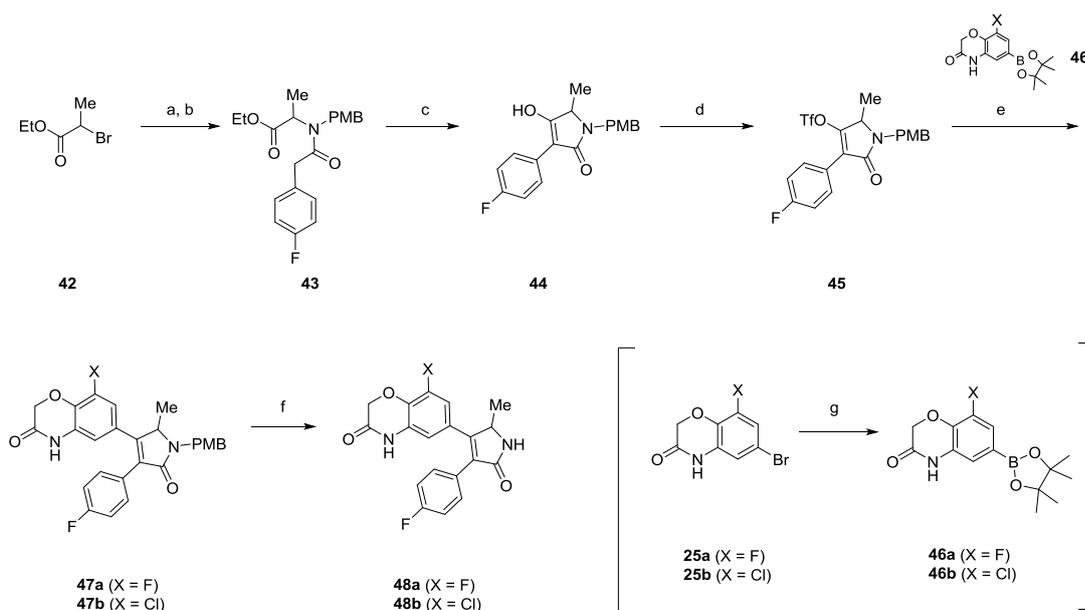
Scheme 11^a



^aReagents and conditions: (a) RNH_2 , THF/ H_2O , 20–90%; (b) 4-fluorophenylacetyl chloride, K_2CO_3 , THF/ H_2O , 25–86%; (c) $KO-t-Bu$, *t*-BuOH, under argon atmosphere, 28–86%; (d) PTSA, MeOH, 61%, (e) TFA, anisole, 64–68%; (f) $AlCl_3$, $ClCOCH(CH_3)Br$, CH_2Cl_2 , 89%; (g) $NaNO_2$, H_2SO_4 , 51%; (h) Zn, AcOH; (i) 1) $ClCOCH_2Cl$, K_2CO_3 , 2) reflux, 62% in 2 steps; (j) $HBr_3 \cdot Py$, HBr, AcOH, 84%.

また、1,4-ベンゾオキサジン-3-オン環部位の効率的な探索に有用な合成経路として、最終工程で鈴木-宮浦カップリングを用いる方法を確立し、本法により 8-フルオロ体 **48a**、および 8-クロロ体 **48b** を合成した (Scheme 12). α -ブロモケトン **42** を *p*-メトキシベンジルアミンと縮合させた後、炭酸カリウム存在下 4-フルオロフェニル酢酸クロリドを用いてアシル化し、アミド体 **43** を得た. 得られた **43** を、窒素雰囲気下水素化ナトリウムを用いて分子内環化-脱水反応させることで化合物 **44** を得た. 続いて、化合物 **44** をトリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応させて、カップリング前駆体であるトリフラート **45** を得た. 得られた化合物 **45** を鈴木-宮浦カップリングに付し、*p*-メトキシベンジル基の脱保護を行うことで目的とする化合物 **48a, b** を合成した. ボロン酸エステル **46a, b** は、対応するブロモ体 **23** (第一章に合成法記載) からビスピナコラートジボロンとのカップリング反応により調製した.

Scheme 12^a

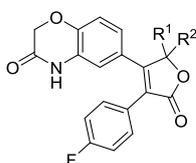


^aReagents and conditions: (a) PMBNH₂, THF/H₂O, 90%; (b) 4-F-BnCOCl, K₂CO₃, THF/H₂O, 91%; (c) NaH, DMF, under nitrogen atmosphere, 93%; (d) Tf₂O, TEA, CH₂Cl₂, 71%; (e) boronic acid ester **46**, 20 mol% PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, THF/H₂O, 42–64%; (f) TFA, anisole, 57–78%; (g) bis(pinacolato)diboron, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, KOAc, dioxane, 99%.

第四節 MR 結合阻害活性, ステロイド受容体選択性および構造活性相関

空間 A の充填による活性増強を期待し, 2,5-ジヒドロフラン-2-オン環の 5 位に種々のアルキル基を導入した (Table 8). 5,5'-ジメチル化合物 **30d** はリード化合物である 5 位無置換体 **30a** よりも活性が減弱したものの, 5-モノメチル体 **30e** (ラセミ体) は期待通り 4 倍程度活性が増強した ($IC_{50} = 120$ nM). 化合物 **30e** の 5 位へのフッ素原子の導入 (**30f**) や, メチル基からエチル基への変換 (**30g**) は活性が減弱した.

Table 8. SAR summary for the space “A”^a



Compound No.	R ¹	R ²	MR binding IC ₅₀ (nM)	Selectivity		
				AR binding IC ₅₀ (nM)	PR binding IC ₅₀ (nM)	GR binding IC ₅₀ (nM)
30d	Me	Me	1200	>10000	1000	4700
30e	Me	H	120	>10000	740	3800
30f	Me	F	550	>10000	5000	>10000
30g	Et	H	1200	>10000	2200	2000

^aIC₅₀ values were shown as the means of duplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism.

5-メチル体 **30e** と MR との X 線共結晶構造を Figure 9 に示す. 共結晶化にはラセミ体の化合物を用いたが, (5*S*)-エナンチオマーの共結晶のみが得られた. 得られた結晶構造は, Table 8 の SAR と概ね合致するものであった. 本結晶構造から, (5*S*)-メチル基はコンホメーション変化をほとんど起こすことなく空間 A を占有することが明らかとなった. 一方, (5*R*)-メチル基については, ベンゾオキサジン-3-オン環との立体反発により大きなコンホメーション変化を引き起こすことが推察された. これらのことは, (5*S*)-エナンチオマーの方が(5*R*)-エナンチオマーよりも結合阻害活性が強いことを強く示唆しており, ラセミ体を光学分割することで結合阻害活性がさらに増強するものと考えられる. また, ジメチル体 **30d** がモノメチル体 **30e**

よりも活性が弱いという結果もこの考察を支持している。化合物 **30d-g** の受容体選択性を評価したところ、5 位へのメチル基導入は MR だけでなく PR や GR (特に PR) についても活性を増強させることが分かった。MR 結合阻害活性の大幅な増強という利点を考慮し、5 位メチル基置換体をさらなる最適化のためのテンプレートとして選択した。

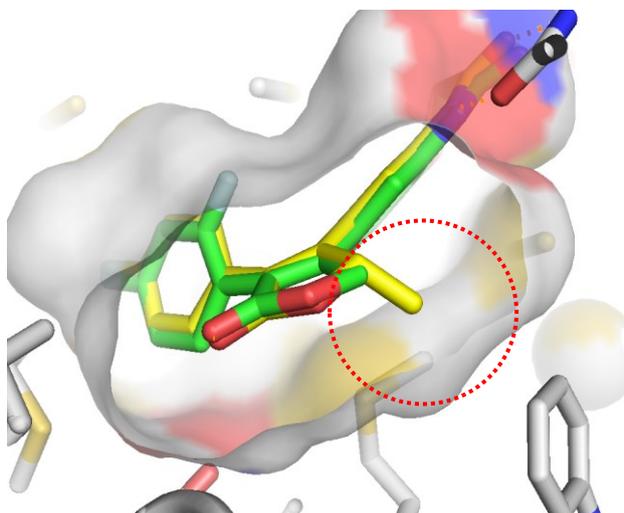
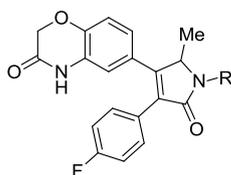


Figure 9. Overlay of a compound **30b** (green) and compound **30e** (yellow) in MR. Cocrystallization of MR and racemic compound **30e** provided only the crystal of MR/(*S*)-enantiomer complex.

続いて、空間 B について調査した (Table 9)。空間 B へと置換基を伸長させるために、中央環を 2,5-ジヒドロフラン-2-オン環から 2,5-ジヒドロピロール-2-オン環に変換した。まず、空間 B の充填による活性増強を期待し、窒素原子上にメチル基、エチル基、シクロプロピル基を導入した (**38a-c**)。メチル体 **38a** は化合物 **30e** と比べて若干 MR 結合阻害活性が減弱したものの、より高いエチル体やシクロプロピル体では期待通り活性が増強した (**38b**: $IC_{50} = 33$ nM, **38c**: $IC_{50} = 68$ nM)。次に、Arg817, Gln776 との水素結合を狙い、窒素原子上にヒドロキシエチル基を導入した (**38e**)。しかしながら、ヒドロキシエチル体 **38e** は MR 結合阻害活性が大幅に減弱した。化合物 **38e** においては、望みの水素結合が形成しなかったと考えられる。中央環を 2,5-ジヒドロピロール-2-オン環に変換した影響を調べる目的で、窒素原子上無置換体 (NH 体) **38g** についても合成、評価したところ、対応するジヒドロフラン-2-オン誘導体 **30e** よりも強い結合阻害活性を示すことが分かった ($IC_{50} = 94$ nM)。母核を 2,5-ジヒドロピロール-2-オン環へと変換することで環内のカルボニル基の電子密度が上昇し、水を介した Arg817,

Gln776 との水素結合が増強したために、MR 結合阻害活性が増強したものと推測している。これらの化合物 **38a–g** について受容体選択性を評価したところ、PR 結合阻害活性について重要な SAR 情報が得られた。すなわち、窒素原子上にアルキル基が置換した化合物 **38a–c** がいずれも、中程度あるいは強力な PR 結合阻害活性を示したのに対し ($IC_{50} = 61$ to 770 nM), NH 体 **38g** の PR 活性は弱いものであった ($IC_{50} = 5600$ nM)。これらの結果から、PR における空間 B は脂溶性置換基を好み極性置換基は許容しないという傾向が示された。また、興味深いことに、*N*-メチル体 **38a** と NH 体 **38g** との間で最も強く結合するステロイド受容体が入れ替わる現象が確認された (**38a**: MR binding $IC_{50} = 170$ nM, PR binding $IC_{50} = 61$ nM vs **38g**: MR binding $IC_{50} = 94$ nM, PR binding $IC_{50} = 5600$ nM)。*N*-メチル体 **38a** は PR に対して最も強い結合阻害活性を示したことから、本化合物は選択的 PR 調節薬の研究²²⁾ における新たなリード化合物となりうると考えられる。以上のように、化合物 **38a–g** の中では、NH 体 **38g** が最も良好な活性と選択性のバランスを示した。そこで、**38g** についてさらなる最適化を実施することにした。

Table 9. SAR summary for the space “B”^a

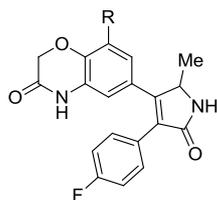


Compound No.	R	MR binding IC_{50} (nM)	Selectivity		
			AR binding IC_{50} (nM)	PR binding IC_{50} (nM)	GR binding IC_{50} (nM)
38a	Me	170	>10000	61	2100
38b	Et	33	>10000	770	1600
38c	cyclopropyl	68	>10000	400	2200
38e	CH ₂ CH ₂ OH	1600	>10000	>10000	>10000
38g	H	94	>10000	5600	9100

^a IC_{50} values were shown as the means of duplicate experiments. IC_{50} values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism.

最後に、空間 C の充填による MR 結合阻害活性のさらなる増強を期待し、化合物 **38g** のベンゾオキサジン-3-オン環5位へフッ素原子, 塩素原子, およびメチル基を導入した (Table 10). フッ素原子の導入は活性にあまり影響を与えなかったものの (**48a**), 塩素原子およびメチル基の導入により期待通り活性が2-3 倍増強した (**48b**, **38i**). 両化合物の MR 結合阻害活性は、スピロラクトンと同等以上の強力なものであった. 受容体選択性について評価したところ、塩素原子の導入は PR 結合阻害活性も同時に増強させたが (**48b**: PR binding IC_{50} = 1600 nM), メチル基の導入は PR 結合阻害活性を減弱させることが分かった (**38i**: PR binding IC_{50} >10000 nM). このように、メチル体 **38i** は強力な MR 結合阻害活性を示し (MR binding IC_{50} = 43 nM), かつ目的に適う優れた選択性プロファイル (AR, PR: >200 倍, GR: 100 倍) を有することが分かった.

Table 10. SAR summary for the space “C”^a



Compound No.	R	MR binding IC_{50} (nM)	Selectivity		
			AR binding IC_{50} (nM)	PR binding IC_{50} (nM)	GR binding IC_{50} (nM)
38g	H	94	>10000	5600	9100
48a	F	92	>10000	3200	5000
48b	Cl	23	>10000	1600	1100
38i	Me	43	>10000	>10000	4900
14n	-	41	>10000	1900	1800
spironolactone	-	49	120	650	1400
eplerenone	-	2300	>10000	>10000	>10000

^a IC_{50} values were shown as the means of duplicate experiments. IC_{50} values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism.

第五節 結語

以上述べてきたように、X線共結晶構造を基に、SBDDの手法を用いてリード化合物**30a**の最適化を行うことにより、強力なMR結合阻害活性とARおよびPRに対して結合阻害性を示さない優れたステロイド受容体選択性を併せ持つMR拮抗薬の創出に成功した。はじめに中央環部位の探索を行い、リード化合物である2,5-ジヒドロフラン-2-オン誘導体**30a**を見出した。X線共結晶構造の解析により結合様式を明らかにし、この構造情報に基づき種々の化合物をデザインした。脂溶性置換基による空間A, B, Cの充填や、中央骨格の2,5-ジヒドロピロール-2-オン環への変換によって結合阻害活性が増強した。また、N-無置換2,5-ジヒドロピロール-2-オン環が高いステロイド受容体選択性を獲得するための鍵骨格であることも見出した。これらの知見は、新たな選択的MR拮抗薬をデザインする際に有益な情報を与えるものと考えられる。最適化により見出した化合物**38i**は、強力なMR結合阻害活性 ($IC_{50} = 43 \text{ nM}$) および非常に高いステロイド受容体選択性 (AR, PR: > 250 倍, GR: 100 倍) を示した。

第三章 新規アゾール誘導体の探索：高活性、高選択性かつパーシャルアゴニスト活性の低減した1-アルキル-3-メチルピラゾール誘導体の創出およびその生物活性

第一節 研究方針

第二章において、強力な MR 結合阻害活性および優れた受容体選択性を有する 2,5-ジヒドロピロール-2-オン誘導体 **38i** を見出した (Figure 10). しかしながら、レポータージーンアッセイを用いて化合物 **38i** のアンタゴニスト/アゴニスト活性を評価したところ、本化合物は強力な MR アンタゴニスト活性 ($IC_{50} = 83 \text{ nM}$) を示したものの、中程度のパーシャルアゴニスト活性を有することが明らかとなった (30% activation at $10 \mu\text{M}$)^{注3)}. 強いパーシャルアゴニスト活性は動物モデルにおける薬効 (*in vivo* MR 拮抗作用) を減弱させることが報告されており,²³⁾ また、臨床での薬効および安全性への影響も未だ不明瞭であることから、本章では、高活性、高選択性、かつパーシャルアゴニスト活性の減弱した誘導体を探索することとした。

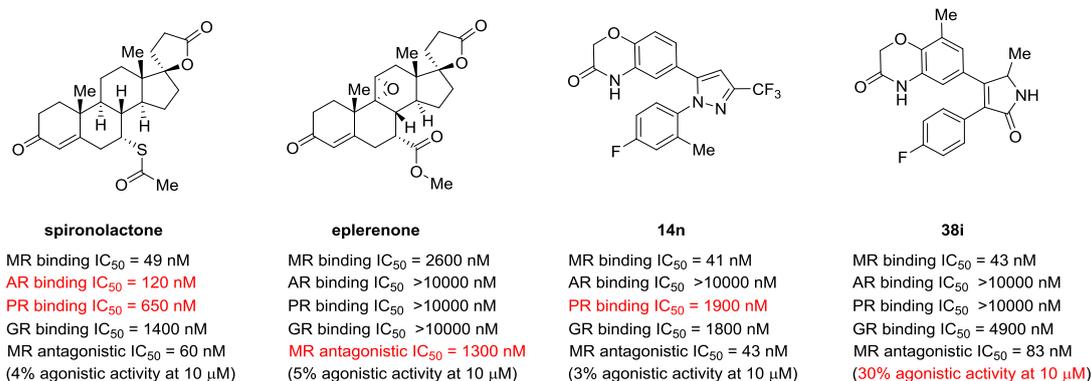


Figure 10. Structures and *in vitro* profiles of steroidal and nonsteroidal MR antagonists.

第二節 化合物デザインおよび合成計画

まず、パーシャルアゴニスト活性に対する初期 SAR を取得すべく、化合物 **14n** および **38i** の周辺誘導体についてアゴニスト活性の評価を行った。その結果、化合物 **38i** に代表される

注3) パーシャルアゴニスト活性は、 1 nM のアルドステロンの転写活性を 100%とした際の比転写活性 (% activation) を測定、評価した。

2,5-ジヒドロピロール-2-オン誘導体の多くが中程度のパーシャルアゴニスト活性を示したのに対し (20–30% activation at 10 μ M), 化合物 **14n** 周辺誘導体 (ピラゾール誘導体) はアゴニスト活性をほとんど示さず, 中央環の構造によってパーシャルアゴニスト活性の発現傾向に差があることが分かった. この結果から, 適切な中央環を選出し最適化することによって, 高活性, 高選択性を示しかつパーシャルアゴニスト活性の減弱した化合物を見出すことができると考えた.

続いて, パーシャルアゴニスト活性の発現傾向の違いを探るべく, 両誘導体の MR との結合様式を比較した. 化合物 **38i** の類縁体である 2,5-ジヒドロフラン-2-オン誘導体 **30e** と MR との X 線共結晶構造 (Figure 13B 参照) から, 2,5-ジヒドロピロール-2-オン誘導体は母核のカルボニル基と Arg817, Gln776 との間に水分子を介した水素結合ネットワークを形成していることが示唆された. 一方, 化合物 **14n** やその類縁体は母核にカルボニル基を持たないため, そのような相互作用をもたないと考えられる. 筆者はこの違いに着目し, カルボニル基を含む水素結合ネットワークがパーシャルアゴニスト活性発現に重要な役割を果たしているのではないかと考えた. 実際に, 母核にカルボニル基を有するいくつかの 2,5-ジヒドロフラン-2-オン誘導体もパーシャルアゴニスト活性を示した. 以上のことから, カルボニル基を持たない中央環を選択することで, パーシャルアゴニスト活性の懸念を回避できると考えた.

化合物デザインを Figure 11 に示す. 上述の仮説に基づき, パーシャルアゴニスト活性を回避するため, 中央環としてアゾール環を選択した. 第二章で *N*-無置換ジヒドロピロール-2-

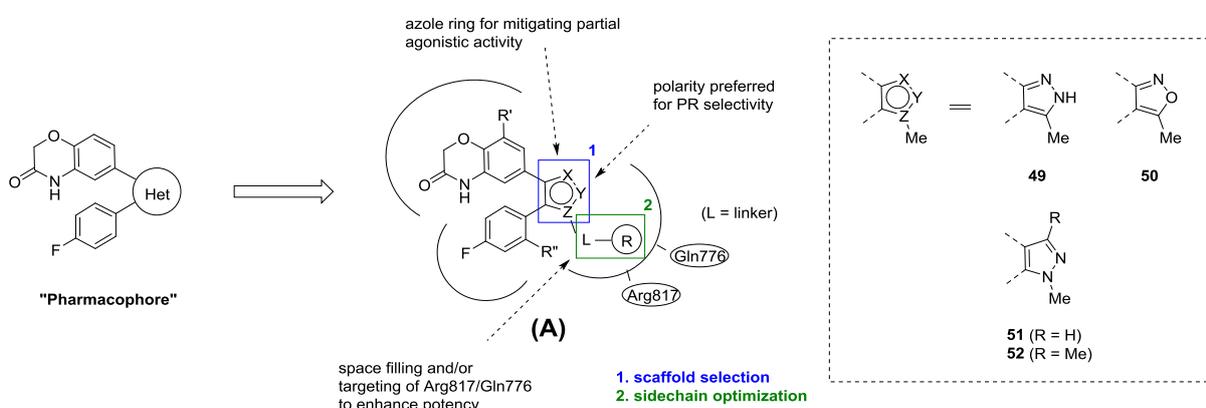


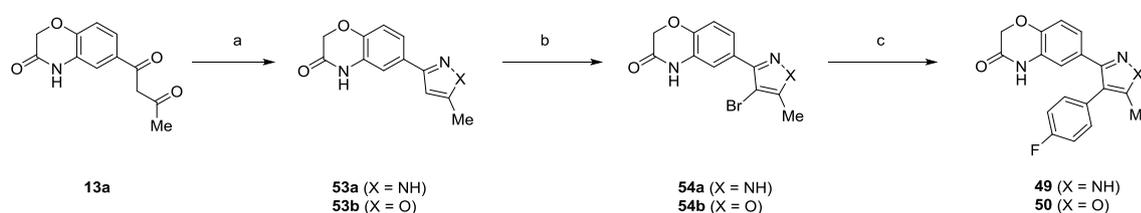
Figure 11. Compound design of novel azole-based MR antagonists.

オン骨格が優れた受容体選択性を示したことを参考に、アゾール環上の位置 Y には極性部位が好ましいと考え、無置換ヘテロ原子 (O, N, NH) を選択した。また、空間の充填あるいは Arg817, Gln776 との水素結合による活性の増強を期待し、位置 Z に脂溶性側鎖および極性側鎖を導入することとした。こうして、新たなアゾール誘導体(A)をデザインした (Figure 11)。本章では、母核 (リード骨格) を選択後、側鎖の最適化を行うという 2 段階の最適化を計画し、実施した。

第三節 各種アゾール誘導体の合成

ピラゾール誘導体 **49** およびイソオキサゾール誘導体 **50** の合成法を Scheme 13 に示す。ジケトン **13a** (第一章に合成法記載) をヒドラジンあるいはヒドロキシルアミンと縮合させることでピラゾール環およびイソオキサゾール環を構築し、それぞれ **53a, b** を得た。NBS を用いてアゾール環 3 位をブロモ化した後、得られた化合物 **54a, b** を鈴木-宮浦カップリング反応に付すことにより化合物 **49** および **50** を合成した。

Scheme 13^a

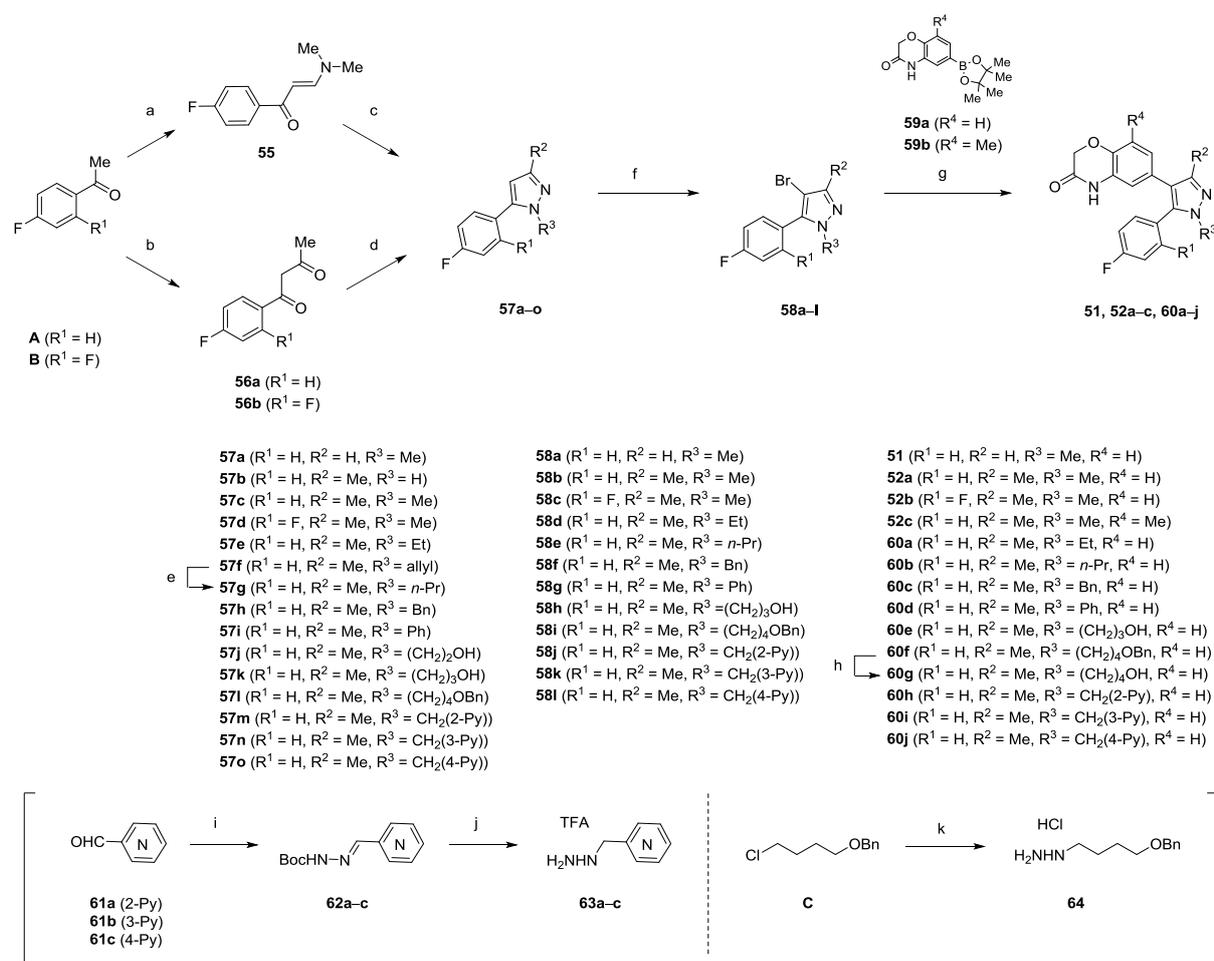


^aReagents and conditions: (a) hydrazine or hydroxylamine, 2-propanol, 77% (**53a**) and 95% (**53b**); (b) NBS, DMF, 94% (**54a**) and 98% (**54b**); (c) 4-fluorophenylboronic acid, Pd(*t*-Bu₃P)₂, K₃PO₄, dioxane, 54% (**49**) and 74% (**50**).

1 位置換ピラゾール誘導体 **51**, **52a-c**, **60a-j** の合成法を Scheme 14 に示す。まず、市販のメチルフェニルケトン **A**, **B** から調製したエナミノン **55** あるいはジケトン **56** を酸性条件下、各種ヒドラジンと縮合させることによりピラゾール誘導体 **57** を得た。このとき、酸として TFA を用いることでピラゾールの位置異性体に対する選択性が向上することを見出した。続いて、**57** のピラゾール環上 4 位を NBS によりブロモ化し化合物 **58** とした後に、ボロン酸エステル

59a, b との鈴木-宮浦カップリングに付すことにより, 目的とする 1 位置換ピラゾール誘導体 **51, 52a-c, 60a-f, h-j** を合成した. 1-ヒドロキシブチル体 **60g** は, 化合物 **60f** のベンジル基を水素添加によって脱保護することで合成した. ピリジルメチルヒドラジン **63a-c** は, ピリジルアルデヒド **61a-c** をヒドラゾン **62a-c** とした後に, イミン部位を還元することにより調製した. ヒドラジン **64** は, ブチルクロリド **C** とヒドラジン 1 水和物との反応により合成した.

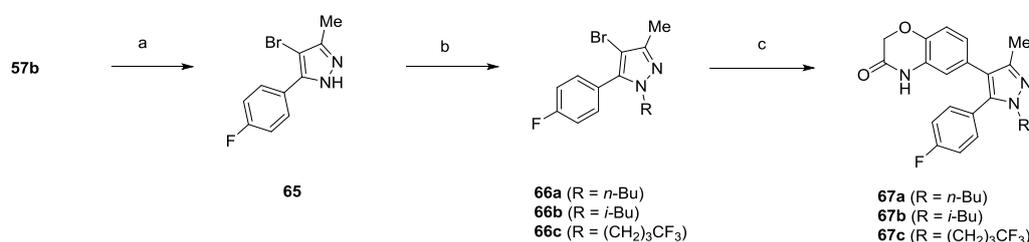
Scheme 14^a



^aReagents and conditions: (a) DMFDMA, 32%; (b) NaH, EtOAc, THF, 74%; (c) methylhydrazine, EtOH, 81%; (d) R-NHNH₂, TFA, TEA, 2-propanol, 19–97%; (e) H₂, Pd/C, MeOH; (f) NBS, CH₃CN or DMF, 30–99%; (g) boronic acid ester **59a** or **59b**, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, THF/H₂O, 5–52%; (h) H₂, Pd/C, EtOH, 88%; (i) *tert*-butyl carbazate, EtOH, 55–90%; (j) 1) NaBH₃CN, AcOH, 2) TFA; (k) 1) hydrazine hydrate, NaOH, 2) HCl, 83%.

ピラゾール環上1位側鎖の効率的な探索を目的として光延反応を鍵反応とする合成法を確立し、化合物 **67a-c** を合成した (Scheme 15). 本法は、*N*-無置換ピラゾールと各種アルコールとの光延反応によって1位側鎖を導入することを特徴とする。*N*-無置換ピラゾール **57b** をブロモ化後、得られた化合物 **65** を各種アルコールとの光延反応に付し、1位置換ピラゾール **66a-c** を得た。このとき、側鎖の置換位置の異なる位置異性体も副生したが、両者はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離可能であった。得られた **66a-c** をボロン酸エステル **59a** との鈴木-宮浦カップリング反応に付し、化合物 **67a-c** を合成した。

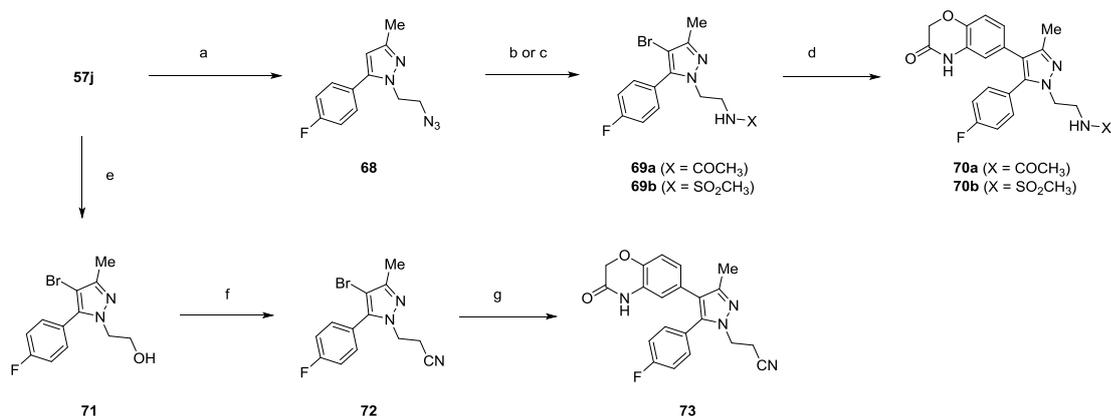
Scheme 15^a



^aReagents and conditions: (a) NBS, DMF, 98%; (b) R-OH, PPh₃, diisopropyl azodicarboxylate, THF, 11–30%; (c) **59a**, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, THF/H₂O, 5–43%.

アミド体 **70a**, スルホンアミド体 **70b**, シアノエチル体 **73** の合成法を Scheme 16 に示す。ヒドロキシエチル体 **57j** の水酸基をトシル化後、ナトリウムアジドと反応させることでアジド体 **68** を得た。化合物 **69a, b** は、**68** から3工程 (ピラゾール環のブロモ化, アジド基の還元, アミノ基のアシル化あるいはスルホニル化) を経て合成した。得られた **69a, b** を鈴木-宮浦カップリング反応に付すことで、アミド体 **70a** およびスルホンアミド体 **70b** を合成した。シアノエチル体 **73** は、**57j** のピラゾール環をブロモ化後、側鎖の水酸基をアセトンシアノヒドリンとの光延反応によりシアノ基へと変換し、最後にボロン酸エステル **59a** との鈴木-宮浦カップリング反応に付すことにより合成した。

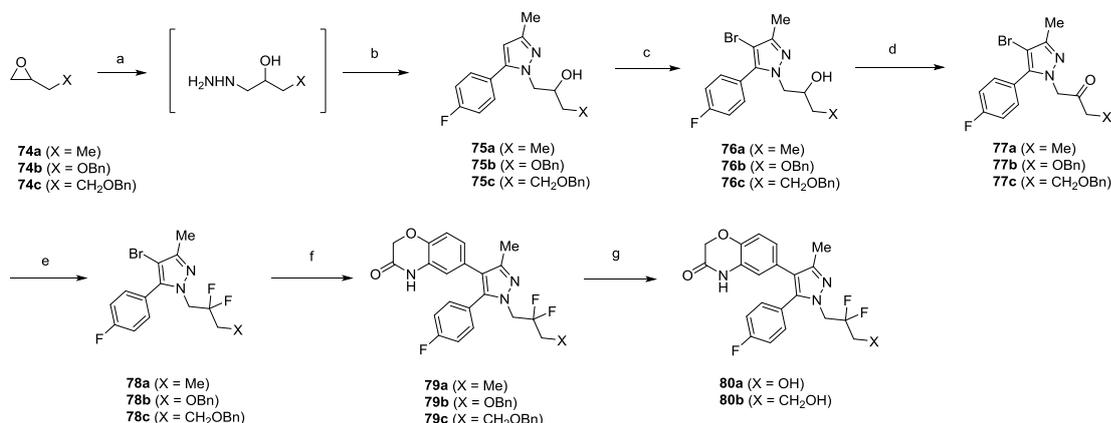
Scheme 16^a



^aReagents and conditions: (a) 1) TsCl, pyridine, 2) NaN₃, DMF, 83% in 2 steps; (b) 1) PPh₃, THF, H₂O, 2) Ac₂O, pyridine, 3) NBS, DMF, 94% in 3 steps; (c) 1) NBS, DMF, 2) PPh₃, THF, H₂O, 3) MsCl, pyridine, 80% in 3 steps; (d) **59a**, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, THF/H₂O, 44% (**70a**) and 33% (**70b**); (e) NBS, DMF, 69%; (f) acetone cyanohydrin, ADDP, PBu₃, toluene, 76%; (g) **59a**, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, THF/H₂O, 43%.

化合物 **79a**, **80a**, **b** の合成を Scheme 17 に示す. 市販のエポキシ化合物 **74a-c** をヒドラジンと反応させた後に, ジケトン **56a** と酸性条件下縮合させることでピラゾール **75a-c** を得た. ピラゾール環 4 位をブロモ化後, 2 級アルコール部位を酸化してケトン体 **77a-c** とし, DAST を用いてケトン部位をジフッ素化することで化合物 **78a-c** を得た. 得られた **78a-c** をボロン

Scheme 17^a

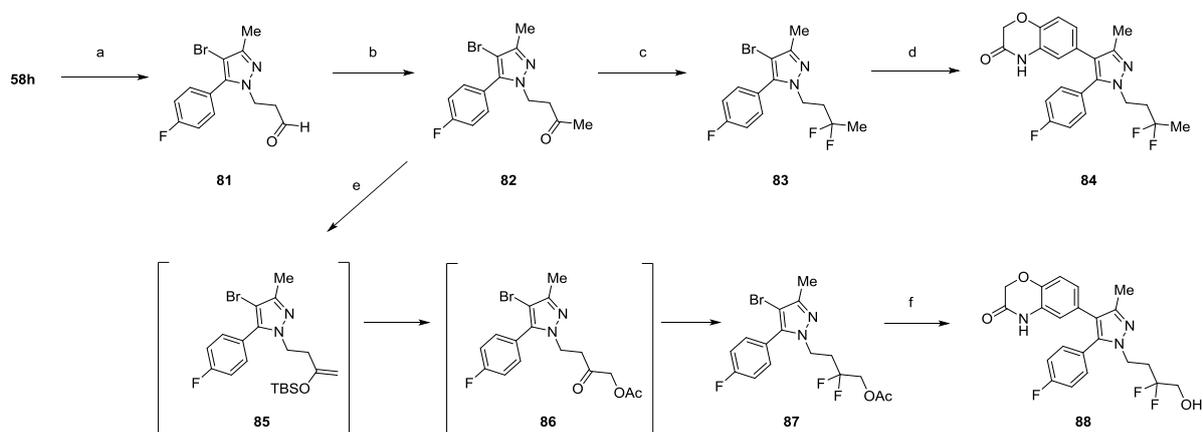


^aReagents and conditions: (a) hydrazine hydrate; (b) **56a**, HCl, MeOH, 47–66% in 2 steps; (c) NBS, DMF, 4% in 3 steps (**76a**), 98% (**76b**) and 96% (**76c**); (d) Dess–Martin periodinane, toluene, 93–99%; (e) DAST, toluene, 39–71%; (f) **59a**, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, THF/H₂O, 40–61%; (g) H₂, Pd/C, 88% (**80a**) and 70% (**80b**).

酸エステル **59a** との鈴木-宮浦カップリング反応に付し、化合物 **79a-c** を合成した。化合物 **80a, b** は、**79b, c** のベンジル基を加水素分解反応によって脱保護することにより合成した。

化合物 **84, 88** の合成法を Scheme 18 に示す。ヒドロキシプロピル体 **58h** の側鎖上の水酸基を酸化してアルデヒドに変換した後に、メチルマグネシウムブロミドを付加させ、再び水酸基を酸化することでメチルケトン体 **82** を得た。**82** のケトン部位を DAST を用いてジフッ素化し、ボロン酸エステル **59a** との鈴木-宮浦カップリング反応に付すことで、化合物 **84** を合成した。また、化合物 **87** は、メチルケトン体 **82** から以下に示す 3 工程を経て合成した。まず、**82** をトリエチルアミン存在下でシリルトリフラートと反応させてシリルエノールエーテル体 **85** へと変換し、続いて、炭酸カリウム存在下で酢酸鉛 (IV) と反応させた後にテトラブチルアンモニウムフルオリドで処理することで、1-アセトキシメチルケトン体 **86** を得た。²⁴⁾ 最後に、**86** のケトン部位を DAST を用いてジフッ素化し化合物 **87** を得た。得られた化合物 **87** を鈴木-宮浦カップリング反応に付すことにより、目的とする化合物 **88** を合成した。

Scheme 18^a

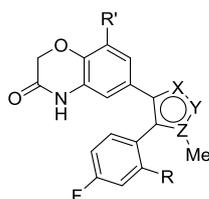


^aReagents and conditions: (a) $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$, DMSO, TEA, 70%; (b) 1) MeMgBr , THF, 2) Dess-Martin periodinane, toluene, 77% in 2 steps; (c) DAST, toluene, 28%; (d) **59a**, $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, Cs_2CO_3 , THF/ H_2O , 30%; (e) 1) TBSOTf, TEA, toluene, 2) $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, K_2CO_3 , toluene, 3) TBAF, THF, 4) DAST, toluene, 10% in 4 steps; (f) **59a**, $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, Cs_2CO_3 , THF/ H_2O , 34%.

第四節 *in vitro* 活性および構造活性相関

第一節 リード骨格の探索

まずリード骨格を見出すべく、位置 Z の側鎖をメチル基に固定して種々のアゾール誘導体を合成、評価探索した (Table 11). はじめに検討した 3 つのアゾール誘導体 **49**, **50**, **51** の中で 1-メチルピラゾール誘導体 **51** が、最も良好な活性を示した ($IC_{50} = 290$ nM). 位置 X は脂溶性アミノ酸残基に囲まれていることから、本部位が脂溶性構造をより好んだものと考えられる. 続いて、位置 X での疎水性相互作用を期待し化合物 **51** の 3 位にメチル基を導入したところ、期待通り MR 結合阻害活性が増強した (**52a**: $IC_{50} = 110$ nM). 重要なことに、**52a** は良好な活性を示しただけでなく、受容体選択性 (特に AR, PR) も良好であり、さらにレポータージーンアッセイにおいてパーシャルアゴニスト活性をほとんど示さなかった (3% activation at 10 μ M). これらの結果に基づき、1,3-ジメチルピラゾール環を本章におけるリード骨格として選出した. また、第一章、第二章での結果を参考に、化合物 **52a** の 4-フルオロベンゼン環上 2 位やベンゾオキサジン-3-オン環上 8 位にフッ素原子およびメチル基をそれぞれ導入したものの、これらの修飾は MR 結合阻害活性を増強させなかった (**52b**, **52c**). この理由としてそれぞれ、ピラゾール環上 1 位メチル基によって 4-フルオロベンゼン環とピラゾール環との間のねじれ型コンホメーション (活性コンホメーション) が元々優位となっていた可能性や、化合物 **52a** のベンゾオキサジン-3-オン環 8 位近傍の空間が化合物 **14n** や **38i** よりも小さかった可能性などが考えられた. 以上の結果から、最も良好なプロファイルを示した 1,3-ジメチルピラゾール誘導体 **52a** をリード化合物として選出し、さらなる最適化を行った.

Table 11. Exploration of a central ring as a new template^a

Cmpd No.	Azole core	R	R'	MR binding IC ₅₀ (nM)	Selectivity			MR
					AR binding IC ₅₀ (nM)	PRbinding IC ₅₀ (nM)	GR binding IC ₅₀ (nM)	antagonistic IC ₅₀ (nM)
49		H	H	3700	>10000	1600	>10000	n.t. ^b
50		H	H	710	>10000	>10000	>10000	1400 (3%) ^c
51		H	H	290	>10000	>10000	>10000	170 (1%) ^c
52a		H	H	110	>10000	9800	3200	160 (3%) ^c
52b		F	H	190	>10000	9300	2300	600 (2%) ^c
52c		H	Me	150	>10000	>10000	2500	350 (8%) ^c

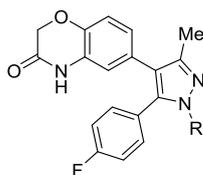
^aIC₅₀ values were shown as the means of duplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism. ^bNot tested. ^cAgonistic activity at a concentration of 10 μM.

第二節 ピラゾール環上1位側鎖の最適化

空間充填による活性増強を期待して、1位メチル基を嵩高い脂溶性側鎖へと変換した (Table 12). エチル基への変換は活性が減弱したものの (60a), 炭素鎖がさらに伸長した *n*-プロピル基や *n*-ブチル基への変換では期待通り活性が増強した (60b, 67a). 特に, *n*-ブチル体 67a はメチル体 52a と比べて5倍程度強力なMR結合阻害活性を示した ($IC_{50} = 22$ nM). また, 分岐型側鎖を有するイソブチル体 67b も強力なMR結合阻害活性を示した ($IC_{50} = 60$ nM). これらの結果から, ピラゾール環上1位近傍には置換基導入を許容するある程度の大きさの空間が存在することが示唆された. そこで, この空間をより密に占有するべく, 側鎖上へのベンゼン環 (60c, d) およびフッ素原子 (67c, 84, 79a) の導入を検討した. *N*-フェニル体 60d では活性が大幅に減弱したものの, *N*-ベンジル基への変換では活性が保持した (60c: $IC_{50} = 100$ nM). これらの結果から, 側鎖上に嵩高い置換基を導入する際にはリンカーとして少なくとも一つ以上のメチレン鎖が必要であることが明らかとなった. 続いて, この時点で最も強力な活性を示した化合物 67a の *n*-ブチル基上にフッ素原子を導入した. 結果, これらのフッ素化体 67c, 84, 79a はいずれも期待通り活性が増強した. 中でも, 化合物 67c および 79a は IC_{50} 値が 10^{-9} M オーダーの極めて強力な結合阻害活性を示した (67c: $IC_{50} = 8.4$ nM, 79a: $IC_{50} = 5.8$ nM).

このように, 1位のメチル基を嵩高い脂溶性側鎖へと変換することにより, 期待通りMR結合阻害活性が増強することが分かった. また, これらの化合物のパーシャルアゴニスト活性はいずれも低いままであった. 一方で, これらの修飾は化合物の脂溶性を増大させ^{注4)}, ADME-tox プロファイル, 特にラットにおける代謝安定性を悪化させることが明らかとなった (rat microsomal clearance > 100 μ L/mg/min). 一般に, 脂溶性の高い化合物は代謝安定性に乏しい傾向にあることが広く知られている.²⁵⁾ そこで, ADME-tox プロファイル (特に代謝安定性) の改善を指向し, 脂溶性がより低減した誘導体の探索に注力することとした.

注4) 脂溶性の指標として用いた logD 値は, いずれも pH 7.4 における実測値である.²⁶⁾

Table 12. Exploration of lipophilic side chains^a

Cmpd No.	R	MR binding IC ₅₀ (nM)	Selectivity			MR antagonistic IC ₅₀ (nM)	logD (pH 7.4)
			AR binding IC ₅₀ (nM)	PR binding IC ₅₀ (nM)	GR binding IC ₅₀ (nM)		
52a	Me	110	>10000	9800	3200	160 (3%) ^c	2.51
60a	Et	510	>10000	>10000	5600	950 (-1%) ^c	2.79
60b	<i>n</i> -Pr	81	>10000	5700	1600	180 (1%) ^c	3.20
67a	<i>n</i> -Bu	22	3600	4000	1400	45 (0%) ^c	3.64
67b	<i>i</i> -Bu	60	3700	4300	390	49 (-7%) ^c	3.52
60c	Bn	100	5600	2000	630	64 (-9%) ^c	3.55
60d	Ph	>10000	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b
67c	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CF ₃	8.4	>10000	6800	1100	33 (6%) ^c	3.40
84	CH ₂ CH ₂ CF ₂ CH ₃	10	9200	4000	370	18 (4%) ^c	3.11
79a	CH ₂ CF ₂ CH ₂ CH ₃	5.8	>10000	4000	540	27 (11%) ^c	3.21

^aIC₅₀ values were shown as the means of duplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism. ^bNot tested. ^cAgonistic activity at a concentration of 10 μM.

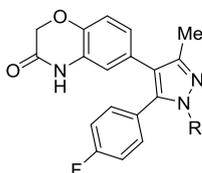
強力な MR 結合阻害活性と脂溶性の低減の両立を期待して、ピラゾール環 1 位側鎖上に極性基を有する誘導体を探索した (Table 13). 極性基としては, Arg817, Gln776 との水素結合が期待できるアミド基やスルホンアミド基, シアノ基, 水酸基, ピリジン環を検討した. これらの化合物は, Table 12 に示した化合物と比べて脂溶性が大きく低減し, 多くの化合物で代謝安定性を含む ADME-tox プロファイルが大きく改善する傾向を示した. アセトアミド体 **70a**, メタンスルホンアミド体 **70b**, シアノエチル体 **73**, 3-ヒドロキシプロピル体 **60e** はメチ

ル体 **52a** と比べて活性が減弱したものの、4-ヒドロキシブチル体 **60g** では活性が増強し、強力な MR 結合阻害活性を示した ($IC_{50} = 75 \text{ nM}$). また、3つのピリジルメチル誘導体 (**60h-j**) について評価したところ、3-ピリジルメチル誘導体 **60i** のみが強力な MR 結合阻害活性を示し ($IC_{50} = 36 \text{ nM}$), 窒素原子の位置が活性に大きく影響することが分かった. 3-ピリジルメチル体 **60i** は対応するベンジル体 **60c** よりも3倍程度活性が強かったことから、このピリジン環上窒素原子は MR と強く水素結合していることが示唆された. このように、ピラゾール環1位メチル基の極性側鎖への変換でも、極性基の位置や種類によって MR 結合阻害活性を増強できることが分かった. 続いて、Table 12 で得られた結果を参考に、活性の増強を期待して極性側鎖上へのフッ素原子の導入を検討した (**80a, b, 88**). 極性側鎖として、直鎖状の3-ヒドロキシプロピル基および4-ヒドロキシブチル基を選出し、リンカーのメチレン鎖上へフッ素原子を導入した. 化合物 **88** ではフッ素原子の導入効果がみられなかったものの、化合物 **80a, b** では期待通りに活性が増強し、両化合物共に強力な MR 結合阻害活性を示した (**80a**: $IC_{50} = 51 \text{ nM}$, **80b**: $IC_{50} = 38 \text{ nM}$). 特に、化合物 **80a** ではフッ素原子導入の効果が顕著であり、対応するフッ素無置換体 **60e** と比べて8倍程度強力な活性を示した.

以上の検討の結果、4つの化合物 (**60g, 60i, 80a, b**) が、脂溶性が低くかつ強力な MR 結合阻害活性を示すことが分かった. これらの化合物は AR および PR に対する親和性を持たず、優れた受容体選択性を示した. また、いずれもパーシャルアゴニスト活性をほとんど示さなかった. 化合物 **60g, 80b** の MR アンタゴニスト活性は中程度であったが、化合物 **60i** および **80a** はスピロラクトンに匹敵する強力な MR アンタゴニスト活性を示した (**60i**: $IC_{50} = 36 \text{ nM}$, **80a**: $IC_{50} = 71 \text{ nM}$). しかしながら、3-ピリジルメチル体 **60i** は脂溶性が低減したものの、ラット肝ミクロソームにおける酸化代謝に対して不安定であることが明らかとなった ($\rightarrow 200 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$). 他のピリジルメチル誘導体 **60h, j** も同様の結果であったことから、これらの誘導体が共通して有するジアリールメタン構造が原因である可能性が考えられた. 一方、化合物 **80a** は良好なラット代謝安定性を示した ($42 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$). さらに、ラットにおける薬物動態試験において、**80a** は約 21%の BA を示し、良好な経口吸収性を有することが分かった (Table 14). このように、化合物 **80a** が活性、選択性、薬物動態の面において最もバランスの

良い優れたプロファイルを示した。そこで、**80a** を精査対象化合物として選出し *in vivo* 試験を実施した。

Table 13. Exploration of polar side chains targeting for Arg817 and/or Gln776^a



Cmpd No.	R	MR binding IC ₅₀ (nM)	Selectivity			MR antagonistic IC ₅₀ (nM)	logD (pH 7.4)
			AR binding IC ₅₀ (nM)	PR binding IC ₅₀ (nM)	GR binding IC ₅₀ (nM)		
52a	Me	110	>10000	9800	3200	160 (3%) ^c	2.51
70a	CH ₂ CH ₂ NHCOMe	>10000	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b
70b	CH ₂ CH ₂ NHSO ₂ Me	250	>10000	>10000	>10000	2000 (5%) ^c	1.7
73	CH ₂ CH ₂ CN	530	>10000	>10000	4600	490 (-1%) ^c	1.89
60e	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	440	>10000	>10000	>10000	680 (2%) ^c	1.99
60g	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	75	>10000	>10000	5400	130 (8%) ^c	2.16
60h	CH ₂ -(2-Py)	2800	>10000	>10000	>10000	990 (-14%) ^c	2.45
60i	CH ₂ -(3-Py)	36	>10000	>10000	1700	36 (-4%) ^c	2.22
60j	CH ₂ -(4-Py)	520	>10000	>10000	>10000	430 (-8%) ^c	2.2
80a	CH ₂ CF ₂ CH ₂ OH	51	>10000	>10000	2400	71 (1%) ^c	2.05
80b	CH ₂ CF ₂ CH ₂ CH ₂ OH	38	>10000	>10000	1300	540 (1%) ^c	2.11
88	CH ₂ CH ₂ CF ₂ CH ₂ OH	95	>10000	>10000	2500	180 (3%) ^c	2.34
Spi^d	-	49	120	650	1400	60 (4%) ^c	n.t. ^b
Epl^e	-	2600	>10000	>10000	>10000	1300 (5%) ^c	n.t. ^b

^aIC₅₀ values were shown as the means of duplicate experiments. IC₅₀ values are calculated from the concentration-response curves generated by GraphPad Prism. ^bNot tested. ^cAgonistic activity at a concentration of 10 μM. ^dSpironolactone. ^eEplerenone.

Table 14. Pharmacokinetic profiles of compound **80a** in SD rats^a

CL (mL/h/kg)	Vdss (mL/kg)	AUC _{0-24h,p.o.} (ng·h/mL)	MRT _{p.o.} (h)	BA (%)
990 ± 165	1356 ± 59	662 ± 372	3.77 ± 0.66	21.4 ± 12.6

^aCompound **80a** was administered to SD rats intravenously at 1 mg/kg and orally at 3 mg/kg (n = 3).

第五節 化合物 **80a** の生物活性評価

DOCA/食塩高血圧ラットを用いて、化合物 **80a** の薬効 (降圧作用) および副作用 (精嚢重量比減少作用) について評価した (Figure 12). 化合物 **80a** (100 mg/kg, q.d.) およびスピロノラクトン (100 mg/kg, q.d.) を18日間経口投与し、7日および14日経過後の収縮期血圧 (SBP) および心拍数 (HR) を測定した. また、最終投与から 24 時間後に体重を測定し、その後剖検により精嚢重量を測定した. その結果、両化合物共に、心拍数にほとんど影響を与えることなく vehicle 投与群に対し有意な血圧低下作用を示すことが明らかとなった (Figure 12A). また、両化合物の作用は同等のものであった. 一方、化合物 **80a** がアンドロゲン受容体拮抗作用の指標である精嚢重量比の減少を示さなかったのに対し、スピロノラクトン投与群では精嚢重量比の有意な減少が確認された (Figure 12B). これは、化合物 **80a** の持つ優れたステロイド受容体選択性による結果であると考えられる.

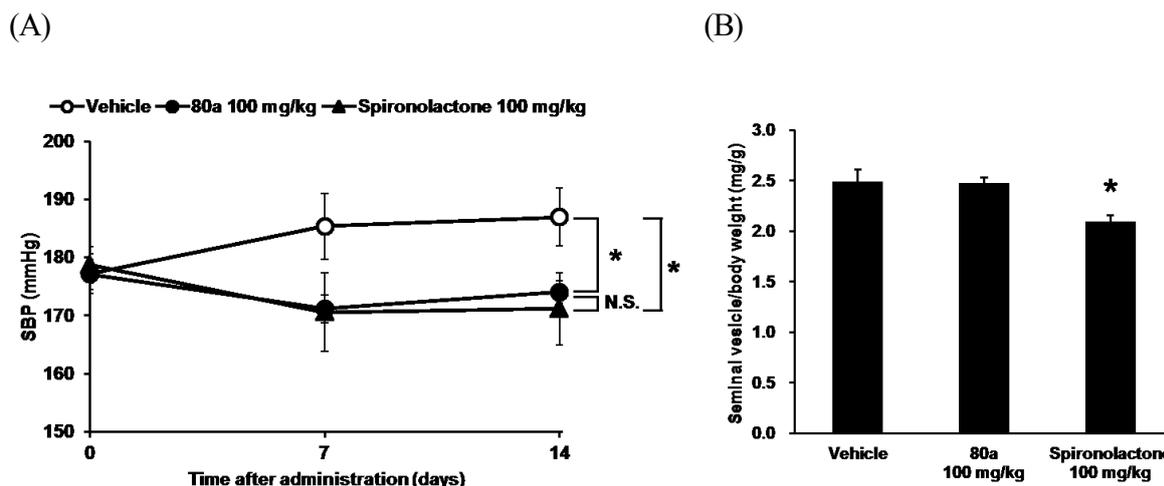


Figure 12. Anti-hypertensive (A), and anti-androgenic (B) effects of compound **80a** in DOCA–salt rats. (A) DOCA–salt hypertensive rats were treated with vehicle, compound **80a**, or spironolactone at a dose of 100 mg/kg for 18 days. SBP and HR were measured by tail-cuff method approximately 24 h after the 7th and 14th administration. Data were shown as mean \pm SEM ($n = 8$); $*p \leq 0.05$ vs. vehicle by repeated-measures ANOVA, which indicated significant group \times time interaction but not the main effects of group and time. N.S. means not significant. (B) Seminal vesicle weight was measured by autopsy after the measurement of body weight approximately 24 h after the last administration. Data were shown as mean \pm SEM ($n = 7-8$); $*p \leq 0.05$ vs. vehicle by Aspin-Welch test.

このように、化合物 **80a** は *in vivo* 試験においてアンドロゲン受容体拮抗作用を示すことなく強力な降圧作用を示した。これらは、化合物 **80a** が性ホルモン関連副作用の懸念の小さい、高活性かつ高選択的な新たな MR 拮抗薬であることを示唆する結果である。

第六節 化合物 **80a** の X 線共結晶構造および考察

化合物 **80a** と MR との X 線共結晶構造を Figure 13A に示す。本結晶構造により、化合物 **80a** がこれまでの化合物と同様に MR の LBD 内のステロイド結合サイトに結合することが示された。また、ベンゾオキサジン-3-オン環部位が Asn770 および Thr945 と水素結合し、4-フルオロベンゼン環部位が疎水性空間を占有するなど、結合様式も類似していることが分かった。さらに、ピラゾール環 1 位側鎖は Arg817 や Gln776 の方向に伸長しており、水酸基が Gln776 と直接水素結合していることが明らかとなった。また、側鎖上のフッ素原子は周囲のアミノ酸残基と明確な水素結合を形成することなく空間を充填していたことから、これらの

フッ素原子の導入による活性増強効果は主に疎水性相互作用によるものと考えられた。また、側鎖上の水酸基の酸性度の上昇による Gln776 との水素結合の強化も、フッ素原子導入による活性増強の一因として考えられた。

MR/化合物 **80a** と MR/ジヒドロフラン-2-オン誘導体 **30e** との重ね合わせを Figure 13B に示す。化合物 **80a** が Gln776 と直接相互作用する一方で、ジヒドロフラン-2-オン誘導体 **30e** は水分子を介した水素結合ネットワークを形成して Arg817 および Gln776 と相互作用しており、両誘導体間で本部位の水素結合の様式が大きく異なることが分かった。これまでに得られた構造活性相関から、この違いがパーシャルアゴニスト活性の発現傾向に深く関与していると考えられる。これらの結果は、MR 拮抗薬の探索において Arg817, Gln776 が関与する水素結合の様式を調整することが、パーシャルアゴニスト活性を低減するための有用なアプローチであることを示唆するものである。

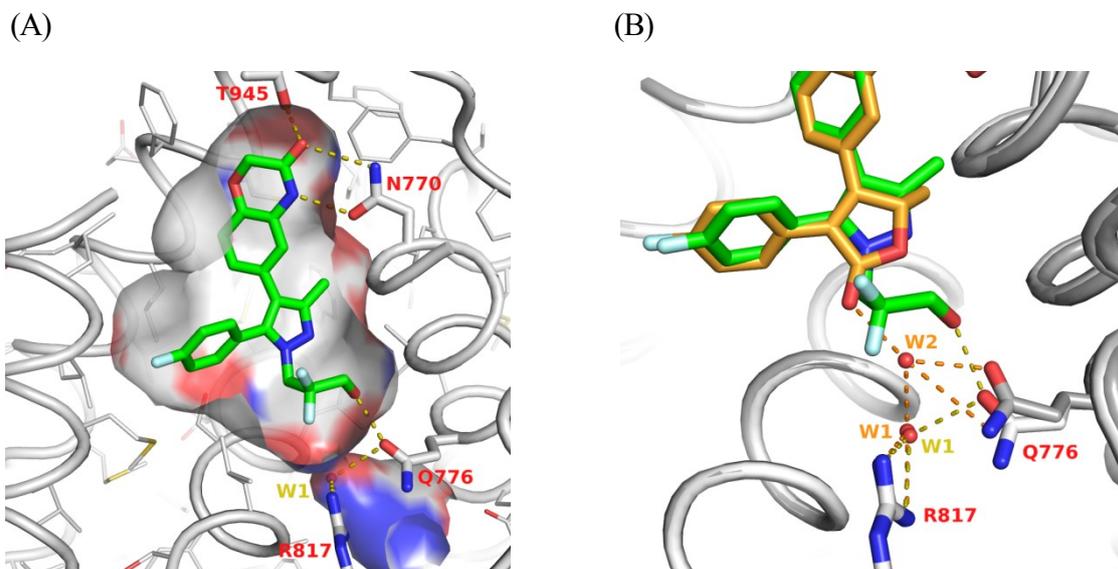


Figure 13. (A) X-ray crystal structure of compound **80a** bound to MR. (B) Overlay of compound **80a** (green) and a dihydrofuran-2-one derivative **30e** (orange) in MR. Yellow or orange dotted lines mean hydrogen bonds.

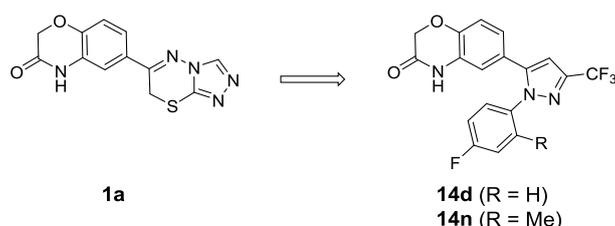
第七節 結語

以上述べてきたように、構造活性相関や結合様式の情報に基づき新規アゾール誘導体をデザインし、効率的な合成法を開発しつつ母核および側鎖の最適化を行うことにより、高活性、高選択性かつパーシャルアゴニスト活性の低減したMR拮抗薬の創出に成功した。また、本研究により、MR拮抗薬の探索においてArg817, Gln776近傍の水素結合の様式を調節することがパーシャルアゴニスト活性の減弱に有用なアプローチとなりうることを初めて示した。最適化により見出した誘導体**80a**は、パーシャルアゴニスト活性をほとんど示さず、強力なMR結合阻害活性(MR binding $IC_{50} = 51$ nM)および優れたステロイド受容体選択性(AR, PR: > 195倍, GR: 45倍)を示した。さらに、**80a**はDOCA/食塩高血圧ラットにおいて、アンドロゲン受容体拮抗作用を示すことなく強力な降圧作用を示した。これらの結果は、化合物**80a**が、強力なMR拮抗作用を有しかつ性ホルモン関連副作用の軽減した新規MR拮抗薬であることを示唆するものである。

総括

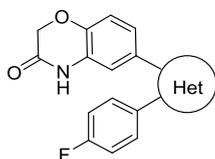
本研究で著者は、強力な MR 拮抗作用を有しかつ性ホルモン関連副作用を示さない新規 MR 拮抗薬の創出を目的に研究を行った。MR/リガンド複合体の構造情報を活用して種々の新規ベンゾオキサジン-3-オン誘導体をデザインし、それらの効率的合成法を開発しながら構造活性相関研究および生物活性評価を行った結果、目的とするプロファイルを有する種々の MR 拮抗薬を創出することに成功した。本研究で得られた知見を以下にまとめる。

1. 強力な MR 結合阻害活性を有する新規 MR 拮抗薬の創出を目的に、ベンゾオキサジン-3-オン環を有する HTS ヒット化合物 **1a** からのリード創出および最適化を行った。スピロノラクトンの結合様式を参考に、**1a** のトリアゾロチアジアジン環 2 位に種々の脂溶性置換基を導入し、ベンゼン環の導入により活性が増強することを見出した。続いて、縮合環から単環へと大幅な中央骨格の変換を検討し、活性および薬物動態の良好な 3-トリフルオロメチルピラゾール誘導体 **14d** を見出した。さらなる最適化により見出した化合物 **14n** は、強力な MR 結合阻害活性 ($IC_{50} = 41 \text{ nM}$) および良好なステロイド受容体選択性 (AR: >250 倍, PR, GR: 40 倍) を示した。(第一章第一節～第六節)

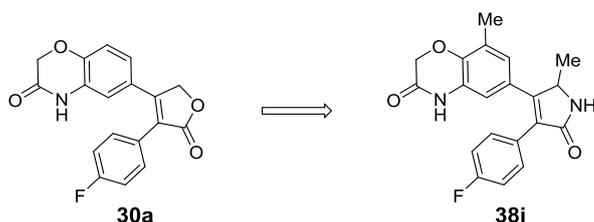


2. 化合物 **14n** の経口投与 (100 mg/kg) は Wistar ラットにおいて尿中 Na^+/K^+ 比の有意な増加作用を示し、かつ DOCA/食塩高血圧ラットにおいてスピロノラクトンと同等の強力な降圧作用を示した。これらの結果から、化合物 **14n** が強力な降圧作用を有し、かつその作用は MR 拮抗作用に基づくことが確認された。(第一章第七節)

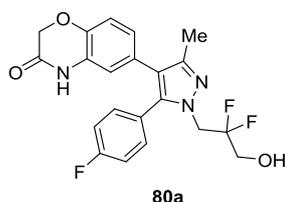
3. ベンゾオキサジン-3-オン誘導体において、以下に示す 1,2-ジアリール型構造が MR 結合阻害活性発現に重要な部分構造であることを明らかにした。(第一章第四節～第五節)



4. 強力な MR 結合阻害活性を有し、かつ AR および PR に対して結合阻害活性を示さない高選択的な MR 拮抗薬の創出を目的に、リード化合物 **30a** の最適化を行った。X 線共結晶構造に基づき化合物をデザインし最適化を進める中で、脂溶性置換基による空間 A, B, C の充填や中央骨格の 2,5-ジヒドロピロール-2-オン環への変換によって結合阻害活性が増強すること、*N*-無置換 2,5-ジヒドロピロール-2-オン環を母核に選出することにより高いステロイド受容体選択性が得られることを見出した。これらの最適化の結果、強力な MR 結合阻害活性 ($IC_{50} = 43 \text{ nM}$) および目的に合う非常に高い受容体選択性 (AR, PR: > 250 倍, GR: 100 倍) を示す化合物 **38i** を見出した。(第二章第二節～第五節)



5. 高活性、高選択性かつパーシャルアゴニスト活性の低減した MR 拮抗薬の創製を目的に、新規アゾール誘導体を探索した。はじめに種々のアゾール環を調査し母核として 1-アルキル-3-メチルピラゾール環を選出後、効率的な合成法を確立しつつ 1 位側鎖の最適化を行うことにより、パーシャルアゴニスト活性をほとんど示さず、強力な活性 (MR binding $IC_{50} = 51 \text{ nM}$) および優れたステロイド受容体選択性 (AR, PR: > 195 倍, GR: 45 倍) を示す化合物 **80a** を見出した。(第三章第一節～第四節)



6. ピラゾール誘導体 **80a** の経口投与 (100 mg/kg) は, DOCA/食塩高血圧ラットを用いた *in vivo* 試験において, アンドロゲン受容体拮抗作用の指標である精嚢重量の低下を示すことなくスピロラクトンと同等の強力な降圧作用を示した. このように, 化合物 **80a** が強力な MR 拮抗作用を有しかつ性ホルモン関連副作用の軽減した新規 MR 拮抗薬であることを示唆する結果が得られた. (第三章第五節)
7. MR 拮抗薬の探索において, Arg817 および Gln776 が関与する水素結合の様式を調節することがパーシャルアゴニスト活性減弱のための有用なアプローチとなりうることを初めて示した. (第三章第六節)
8. 本研究において, MR/リガンド複合体の X 線共結晶構造情報を活用して最適化を実施し, MR 拮抗薬の探索における SBDD アプローチの有用性を初めて示した. 活性増強目的での活用が特に有用性が高く, 空間充填による疎水性相互作用の獲得が MR 結合阻害活性の増強に効果的であることを明らかにした. (第一章~第三章)

これらの研究成果は, 今後の選択的 MR 拮抗薬の研究ならびに核内受容体リガンドの探索研究に有用な知見を与えるものである.

謝辞

本論文の発表および作成にあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました静岡県立大学薬学部教授 菅敏幸先生に深く感謝いたします。

本論文の審査にあたり、御指導ならびに御助言を賜りました静岡県立大学薬学部教授 眞鍋敬先生、静岡県立大学薬学部教授 濱島義隆先生、静岡県立大学薬学部教授 橋本博先生、ならびに静岡県立大学薬学部准教授 江木正浩先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいました、元武田薬品工業医薬研究本部本部長 大川滋紀博士、元医薬研究本部主席部員 石原雄二博士に深謝申し上げます。

本研究は元炎症疾患創薬ユニット主席研究員 福本正司博士のご指導の下行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

化合物合成にご協力頂きました化学研究所主任研究員 邑楽泰一博士、中枢疾患創薬ユニット主任研究員 大藪紀雄博士、富士晃嗣博士、杉本貴裕博士、化学研究所主任研究員 麻野耕平氏、癌創薬ユニット主任研究員 藤本潤氏、Array Biopharma社 Christopher S. Siedem博士、Tony P. Tang博士、Cassandra Gauthier氏、Lisa A. De Meese氏、Steven A. Boyd博士に深謝致します。本研究の薬理試験をご担当頂いた循環代謝疾患創薬ユニット主席研究員 西垣信裕博士、循環代謝疾患創薬ユニット主任研究員 大澤壮登氏、プロジェクトマネジメントグループ 塩谷紗知子氏、元循環代謝疾患創薬ユニット主任研究員 井形由美子氏、循環代謝疾患創薬ユニット主席部員 楠本啓司博士、実験推進グループ主席部員 井村良視博士、中枢疾患創薬ユニット主席研究員 松井英起博士、生物分子研究所主任研究員 元屋地孝士氏、本部長室課長代理 水上温司氏に深謝致します。本研究の受容体ドッキングモデルおよびX線結晶構造解析をご担当頂きました化学研究所リサーチマネジャー 田中稔祐博士、化学研究所主席研究員 遠藤聡史博士、生物分子研究所主任研究員 曾我部智博士、元中枢疾

患創薬ユニット主席研究員 羽深典之博士に深謝致します。本研究の薬物動態試験をご担当
頂いたGIA監査室課長代理 小野みどり氏に深謝致します。

本論文の作成にあたり、適切なお助言とご配慮を頂きました中枢疾患創薬ユニットリサー
チマネジャー 黒板孝信博士，循環代謝疾患創薬ユニットリサーチマネジャー 前川毅博士，
化学研究所所長 内川治博士，循環代謝疾患創薬ユニット主席研究員 松永伸之博士に深謝
致します。

最後に，本研究にご協力頂きましたすべての方々に感謝致します。

実験の部

核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H NMR}$) は Varian INOVA-400 (400 MHz) または Bruker DPX (300 MHz) を用いて測定した. 化学シフトはテトラメチルシランを内部標準として用い, δ (ppm) で示した. 多重線は以下のように表現した: s, シングレット; d, ダブルレット; t, トリプレット; q, カルテット; dd, ダブルダブルレット; dt, ダブルトリプレット; td, トリプルダブルレット; tt, トリプルトリプレット; sep, セプテット; quin, クインテット; brs, ブロードシングレット; m, マルチプレット. 結合定数 (J 値) はヘルツ (Hz) で表記した. 分取 HPLC には Waters UV 精製システム [Develosil ODS-UG-10 カラム (5 μM , 4.6 mm \times 150 mm)] を用い, 0.1% の TFA を含む 5–90% 水/アセトニトリルを移動相として用いた. 反応追跡は薄層クロマトグラフィーを用い, Merck 社の 60 F₂₅₄ プレートまたは富士シリシア社の NH シリカゲルプレートを用いた. クロマトグラフィーによる精製はシリカゲルカラム 60 (0.063–0.200 または 0.040–0.063 mm, Merck 社), 塩基性シリカゲル (ChromatorexNH, 100–200 mesh, 富士シリシア社) または Purif-Pack (SI 60 μM or NH 60 μM , 富士シリシア社) を用いて行った. 市販の試薬, 溶媒は精製を行わずに用いた. 元素分析 (Anal. と略す) および高分解能質量分析スペクトル (HRMS) は武田分析研究所で行われた. 生物活性を評価した化合物の純度 (> 95%) は元素分析あるいは分析 HPLC により確認した. 分析 HPLC には Shimadzu UFLC システム [L-カラム 2 ODS (3.0 mm \times 50 mm, 2 μM)] を用い, 0.1% の TFA を含む 5–90% 水/アセトニトリルを移動相として用いた.

第一章に関する実験

6-Pentanoyl-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (3b).

2 (10.0 g, 67.0 mmol) の 1,2-ジクロロエタン (120 mL) 溶液に, 塩化アルミニウム (20.0 g, 150 mmol) およびバレリルクロリド (9.60 mL, 80.9 mmol) を 0 °C で加えた. 反応液を 80 °C で 3 時間攪拌後, 氷水に注ぎ, ジクロロメタンで抽出した. 抽出液を飽和重曹水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥させ, 減圧濃縮した. 得られた残渣をメタノールを用いて再結晶

し, **3b** (12.0 g, 77%) を白色固体として得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.89 (3H, t, $J=7.4$ Hz), 1.24–1.40 (2H, m), 1.50–1.64 (2H, m), 2.91 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 4.68 (2H, s), 7.03 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.48 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 7.61 (1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz), 10.85 (1H, brs).

6-(Phenylacetyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (3c).

3b の合成と同様の方法により **3c** (46%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (2H, s), 4.69 (2H, s), 7.00 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.22–7.36 (5H, m), 7.48–7.49 (1H, d, $J=2.1$ Hz), 7.68 (1H, dd, $J=2.1, 8.4$ Hz), 8.10 (1H, brs).

6-[(2-Fluorophenyl)acetyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (3d).

3b の合成と同様の方法により **3d** (88%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4.26 (2H, s), 4.70 (2H, s), 7.02–7.29 (5H, m), 7.51 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 7.70 (1H, dd, $J=1.8, 8.4$ Hz), 8.15–8.30 (1H, brs).

6-[(3-Fluorophenyl)acetyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (3e).

3b の合成と同様の方法により **3e** (25%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.35 (2H, s), 4.69 (2H, s), 7.01–7.15 (4H, m), 7.30–7.40 (1H, m), 7.52 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 7.73 (1H, dd, $J=2.0, 8.5$ Hz), 10.89 (1H, brs).

6-[(4-Fluorophenyl)acetyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (3f).

3b の合成と同様の方法により **3f** (36%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.31 (2H, s), 4.69 (2H, s), 7.02–7.20 (3H, m), 7.23–7.33 (2H, m), 7.52 (1H, d, $J=1.9$ Hz), 7.73 (1H, dd, $J=1.9, 8.3$ Hz), 10.88 (1H, brs).

6-(3-Phenylpropanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (3g).

3a (4.00 g, 20.9 mmol) とベンズアルデヒド (2.70 g, 25.5 mmol) のメタノール (40 mL) 溶液に, 28%ナトリウムメトキシドのメタノール溶液 (4.40 g, 22.8 mmol) を室温で加えた. 反応液を 50 °C で 24 時間攪拌後, 減圧濃縮し, 得られた残渣に水および 10%塩酸を加えた. 析出物をろ取し, メタノールで洗浄することで 6-(3-phenylprop-2-enoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (5.10 g, 87%) を白色固体として得た. 得られた固体 (4.00 g, 14.3 mmol) に, エタノール (80 mL), THF (20 mL), 10%パラジウム炭素 (2.00 g) を加え, 水素雰囲気下, 室温で 2 時間

攪拌した。反応液をろ過後，ろ液を減圧下濃縮した。得られた残渣をメタノールから再結晶し，**3g** (1.00 g, 25%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.91 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 3.27 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 4.68 (2H, s), 7.03 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.12–7.33 (5H, m), 7.49 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.63 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.3 Hz), 10.84 (1H, brs).

6-(2-Phenylpropanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (3h).

3c (7.00 g, 36.6 mmol) と *N,N,N',N'*-テトラメチルジアミノメタン (10.5 mL, 77.0 mmol) のジクロロメタン (14 mL) 溶液に無水酢酸 (10.5 mL, 111 mmol) を 0 °C で加え，室温で 72 時間攪拌した後，反応液を減圧濃縮した。得られた残渣に水を加え，酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し，無水硫酸ナトリウムで乾燥後，減圧濃縮した。得られた残渣にメタノール (70 mL) を加えて攪拌し，析出した固体をろ取し 6-(2-phenylacryloyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (5.75 g, 56%) を得た。得られた個体 (3.00 g, 10.7 mmol) に，THF (60 mL) および 10%パラジウム炭素 (1.00 g) を加え，水素雰囲気下，室温で 1 時間攪拌した。反応液をろ過後，ろ液を減圧下濃縮した。得られた残渣を塩基性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し，**3h** (1.98 g, 66%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.38 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 4.63 (2H, s), 4.81 (1H, q, *J* = 6.8 Hz), 6.96 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.13–7.34 (5H, m), 7.50 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.64 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz), 10.84 (1H, brs).

6-(2-Bromopentanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (4b).

3b (10.0 g, 42.9 mmol), 酢酸 (80 mL), 25%臭化水素酢酸溶液 (20 mL) の混合溶液に，ピリジニウムヒドロブロミドペルブロミド (14.4 g, 45.0 mmol) を室温で徐々に加えた。反応液を室温で 2 時間攪拌後，水 (300 mL) に注ぎ，析出物をろ取して **4b** (13.1 g, 98%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.99 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.32–1.70 (2H, m), 2.01–2.26 (2H, m), 4.73 (2H, s), 5.07 (1H, dd, *J* = 6.7, 7.6 Hz), 7.04 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.67 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz), 8.56 (1H, s).

6-(Bromoacetyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (4a).

4b の合成と同様の方法により **4a** (92%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.71 (2H, s), 4.81 (2H, s), 7.07 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.49 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.66 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.3 Hz), 10.91 (1H, brs).

6-(2-Bromo-3-phenylpropanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (4c).

4b の合成と同様の方法により **4c** (95%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.23 (1H, dd, *J* = 7.3, 14.3 Hz), 3.52 (1H, dd, *J* = 7.3, 14.3 Hz), 4.70 (2H, s), 5.82 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.05 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.16–7.39 (5H, m), 7.52 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.74 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz), 10.87 (1H, brs).

6-(2-Bromo-2-phenylpropanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (4e).

4b の合成と同様の方法により **4e** (97%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.14 (3H, s), 4.63 (2H, s), 6.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.15 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz), 7.29–7.50 (6H, m), 10.88 (1H, brs).

6-[Bromo(2-fluorophenyl)acetyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (4f).

4b の合成と同様の方法により **4f** (85%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.71 (2H, s), 6.66 (1H, s), 6.99–7.36 (4H, m), 7.55–7.65 (3H, m), 8.79 (1H, brs).

6-[Bromo(3-fluorophenyl)acetyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (4g).

4b の合成と同様の方法により **4g** (99%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.69 (2H, s), 6.97–7.11 (2H, m), 7.13–7.26 (1H, m), 7.29–7.57 (4H, m), 7.78 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.5 Hz), 10.91 (1H, brs).

6-[Bromo(4-fluorophenyl)acetyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (4h).

4b の合成と同様の方法により **4g** (96%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.69 (2H, s), 7.01–7.12 (2H, m), 7.23 (2H, t, *J* = 8.9 Hz), 7.54 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.56–7.65 (2H, m), 7.78 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz), 10.93 (1H, s).

6-[Bromo(phenyl)acetyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (4d).

3c (25.0 g, 93.5 mmol), 酢酸 (280 mL), 25%臭化水素酢酸溶液 (70 mL) の混合溶液に、ピリジニウムヒドロブロミドペルブロミド (30.4 g, 95.1 mmol) を室温で徐々に加えた。反応液を室温で 30 分攪拌後、チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、上澄み液を分離除去した。残渣

に 10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和重曹水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、シリカゲルを通した後に、減圧濃縮した。得られた残渣にジイソプロピルエーテルおよび酢酸エチルを加えて攪拌後、析出物をろ取り **4d** (28.2 g, 87%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.70 (2H, s), 6.30 (1H, s), 6.98 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.29–7.53 (6H, m), 7.62 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.7 Hz), 8.64 (1H, brs).

6-(7*H*-[1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-6-yl)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (1a).

4a (0.20 g, 0.74 mmol) および **5** (0.10 g, 0.89 mmol) のエタノール/トルエン (4 mL/ 2 mL) 溶液を 24 時間加熱還流させた後、減圧濃縮した。得られた残渣にメタノール (30 mL) および 10%炭酸カリウム水溶液 (10 mL) を加え、室温で 3 時間攪拌した。得られた析出物をろ取後、水およびメタノールで洗浄し **1a** (180 mg, 85%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.38 (2H, s), 4.70 (2H, s), 7.12 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.51–7.59 (2H, m), 9.14 (1H, s), 10.95 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₂H₉N₅O₂S: C, 50.17; H, 3.16; N, 24.38. Found: C, 49.80; H, 3.19; N, 24.24.

6-(7-Propyl-7*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-6-yl)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (1b).

3b (0.50 g, 1.60 mmol) および **5** (0.19 g, 1.63 mmol) のエタノール/トルエン (10 mL/ 5 mL) 溶液を 12 時間加熱還流させた後、減圧濃縮した。得られた残渣に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣をメタノールから再結晶し **1b** (0.34 g, 65%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.85 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.20–1.66 (4H, m), 4.70 (2H, s), 4.87 (1H, dd, *J* = 5.0, 9.1 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.54–7.62 (2H, m), 9.17 (1H, s), 10.96 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₅H₁₅N₅O₂S: C, 54.70; H, 4.59; N, 21.26. Found: C, 54.67; H, 4.48; N, 21.19.

6-(7-Benzyl-7*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-6-yl)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (1c).

1b の合成と同様の方法により **1c** (97%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.77 (1H, dd, *J* = 9.2, 14.1 Hz), 3.01 (1H, dd, *J* = 5.7, 14.1 Hz), 4.69 (2H, s), 5.14 (1H, dd, *J* = 5.7, 9.2 Hz), 7.06 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.11–7.31 (5H, m), 7.51 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 9.12 (1H, s),

10.95 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅N₅O₂S·0.3EtOAc·0.1hexane: C, 60.57; H, 4.59; N, 16.98. Found: C, 60.43; H, 4.66; N, 16.55.

6-[7-Phenyl-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-6-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (1d).

1b の合成と同様の方法により **1d** (24%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.67 (2H, s), 6.32 (1H, s), 7.03–7.22 (3H, m), 7.26–7.41 (3H, m), 7.47 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.7 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 9.25 (1H, s), 10.93 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₈H₁₃N₅O₂S·0.3EtOAc: C, 59.16; H, 3.98; N, 17.97. Found: C, 58.83; H, 4.18; N, 17.61.

6-[7-(2-Fluorophenyl)-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-6-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (1f).

1b の合成と同様の方法により **1f** (37%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.66 (2H, s), 6.44 (1H, s), 6.76–6.81 (1H, m), 7.04–7.10 (2H, m), 7.30–7.43 (2H, m), 7.47–7.50 (1H, m), 7.53–7.54 (1H, m), 9.28 (1H, s), 10.92 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for C₁₈H₁₃FN₅O₂S *m/z* 382.0769 (M+H), Found 382.0754 (M+H).

6-[7-(3-Fluorophenyl)-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-6-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (1g).

1b の合成と同様の方法により **1g** (73%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.68 (2H, s), 6.35 (1H, s), 6.87–6.94 (1H, m), 7.04–7.12 (2H, m), 7.12–7.22 (1H, m), 7.32–7.42 (1H, m), 7.47 (1H, dd, *J* = 2.5, 8.5 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 9.28 (1H, s), 10.96 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for C₁₈H₁₃FN₅O₂S *m/z* 382.0769 (M+H), Found 382.0741 (M+H).

6-[7-(4-Fluorophenyl)-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-6-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (1h).

1b の合成と同様の方法により **1h** (69%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.68 (2H, s), 6.35 (1H, s), 7.09 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.12–7.26 (4H, m), 7.46 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.5 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 9.27 (1H, s), 10.95 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₁₂FN₅O₂S·0.1EtOAc: C, 56.64; H, 3.31; N, 17.95. Found: C, 56.25; H, 3.27; N, 17.79.

6-(7-Methyl-7-phenyl-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-6-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (1e).

4e (0.30 g, 0.83 mmol), **5** (0.29 g, 2.50 mmol) および トリエチルアミン (3 mL) のエタノール (3 mL) 溶液を 80 °C で 6 時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/メタノール) により精製し、**1e** (4.80 g, 84%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.02 (3H, s), 4.62 (2H, s), 6.86–6.94 (2H, m), 7.05 (1H, s), 7.28–7.49 (5H, m), 9.26 (1H, s), 10.75 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for C₁₉H₁₆N₅O₂S *m/z* 378.1019 (M+H), Found 378.0989 (M+H).

2-(Benzylthio)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole (12).

11 (5.00 g, 20.2 mmol) と 45%クロロアセトアルデヒド (3.90 g, 22.3 mmol) のエタノール/トルエン (20 mL/ 10 mL) 溶液を 12 時間加熱還流させた後、減圧濃縮した。得られた残渣に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し、**12** (1.27 g, 23%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.44 (2H, s), 7.30–7.40 (6H, m), 7.62–7.71 (1H, m).

1-Amino-1H-imidazole-2-thiol (6).

12 (1.20 g, 5.10 mmol) とヒドラジン 1 水和物 (2.40 g, 47.9 mmol) のエタノール (20 mL) 溶液を 50 時間加熱還流させた後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) により精製し、**6** (0.19 g, 32%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.62 (2H, s), 6.80 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.04 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 12.06 (1H, brs).

6-(2-Phenyl-2H-imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazin-3-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (7).

1e の合成と同様の方法により **7** (17%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.65 (2H, s), 6.14 (1H, s), 6.99–7.00 (1H, m), 7.04–7.07 (1H, m), 7.13–7.16 (2H, m), 7.27–7.34 (3H, m), 7.41–7.45

(1H, m), 7.57–7.58 (1H, m), 7.77–7.79 (1H, m), 10.92 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for C₁₉H₁₅N₄O₂S *m/z* 363.0910 (M+H), Found 363.0877 (M+H).

6-(2-Phenyl-2*H*-1,4-benzothiazin-3-yl)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (8).

4c (0.50 g, 1.44 mmol)と 2-アミノチオフェノール (0.18 g, 1.44 mmol) のエタノール (10 mL) 溶液を 6 時間加熱還流させた後、減圧濃縮した。得られた残渣をクロロホルムに溶解させ、溶液を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し、酢酸エチルとジイソプロピルエーテルの混合溶媒から再結晶し **8** (0.10 g, 19%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.67 (2H, s), 5.17 (1H, s), 6.98 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.03–7.32 (8H, m), 7.44–7.57 (2H, m), 7.63 (1H, s), 7.98 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₂H₁₆N₂O₂S·0.1EtOAc: C, 70.57; H, 4.44; N, 7.35. Found: C, 70.14; H, 4.55; N, 7.24.

6-(2-Methyl-5-phenyl-1,3-thiazol-4-yl)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (9).

8 の合成と同様の方法により **9** (23%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.74 (3H, s), 4.61 (2H, s), 6.83 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.00–7.07 (2H, m), 7.33 (5H, s), 7.63 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for C₁₈H₁₅N₂O₂S *m/z* 323.0849 (M+H), Found 323.0833 (M+H).

6-(2-Methyl-5-phenyl-1*H*-imidazol-4-yl)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (10).

4c (200 mg, 0.58 mmol), アセトアミジン塩酸塩 (273 mg, 2.89 mmol) および炭酸カリウム (399 mg, 2.89 mmol) の 2-プロパノール (5 mL) 溶液を 12 時間加熱還流させた後、減圧濃縮した。得られた残渣に水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、減圧濃縮した。得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/メタノール) により精製し、酢酸エチルとヘキサンの混合溶媒から再結晶し **8** (24.0 mg, 14%) を白色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.32 (3H, s), 4.57 (2H, brs), 6.76–7.54 (8H, m), 10.58–10.77 (1H, m), 11.99 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for C₁₈H₁₆N₃O₂ *m/z* 306.1237 (M+H), Found 306.1212 (M+H).

4,4,4-Trifluoro-1-(3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-yl)butane-1,3-dione (13d).

60%水素化ナトリウム (2.51 g, 105 mmol) の THF (100 mL) 溶液に, トリフルオロ酢酸エチル (12.5 mL, 105 mmol), **3a** (5.00 g, 26.2 mmol), エタノール (2.5 mL) および [2,4]-ジベンゾ-18-クラウン-6 (150 mg, 0.418 mmol) の THF (50 mL) 溶液を加えた. 反応溶液を 16 時間加熱還流させた後, 10%硫酸を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を水および飽和重曹水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣をジエチルエーテルから再結晶し **13d** (6.67 g, 80%) を黄色固体として得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4.74 (2H, s), 6.50 (1H, s), 7.08 (1H, d, $J=8.7$ Hz), 7.44 (1H, d, $J=1.9$ Hz), 7.60 (1H, dd, $J=1.9, 8.7$ Hz), 8.08 (1H, brs).

1-(3-Oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)butane-1,3-dione (13a).

13d の合成と同様の方法により **13a** (51%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.19 (3H, s), 4.70 (2H, s), 6.10 (1H, s), 7.01 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.51 (1H, dd, $J=2.0, 8.2$ Hz), 7.40 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 8.26 (1H, brs).

1-(3-Oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)pentane-1,3-dione (13b).

13d の合成と同様の方法により **13b** (80%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz), 2.46 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 4.70 (2H, s), 6.10 (1H, s), 7.02 (1H, d, $J=8.7$ Hz), 7.40 (1H, d, $J=1.9$ Hz), 7.52 (1H, dd, $J=1.9, 8.7$ Hz), 8.23 (1H, brs).

4-Methyl-1-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)pentane-1,3-dione (13c).

13d の合成と同様の方法により **13c** (43%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.22 (6H, d, $J=7.2$ Hz), 2.61 (1H, sep, $J=7.2$ Hz), 4.70 (2H, s), 6.10 (1H, s), 7.02 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.42 (1H, d, $J=1.9$ Hz), 7.53 (1H, dd, $J=1.9, 8.5$ Hz), 8.64 (1H, brs).

4,4,5,5,5-Pentafluoro-1-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)pentane-1,3-dione (13e).

13d の合成と同様の方法により **13e** (87%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4.59 (2H, s), 5.80 (1H, s), 6.91 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.34 (1H, dd, $J=2.0, 8.2$ Hz), 7.38 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 10.71 (1H, s).

Ethyl 2,4-dioxo-4-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)butanoate (13f).

13d の合成と同様の方法により **13f** (95%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.18–1.25 (3H, m), 4.02–4.13 (2H, m), 4.58 (2H, s), 5.18 (1H, s), 6.80–6.82 (1H, m), 7.20–7.40 (2H, m), 10.68 (1H, brs).

6-(3-Methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14a).

14d の合成と同様の方法により **14a** (61%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.38 (3H, s), 4.70 (2H, s), 6.24 (1H, s), 6.63 (1H, s), 6.80–6.92 (2H, m), 7.25–7.40 (5H, m), 7.83 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₁₅N₃O₂: C, 70.81; H, 4.95; N, 13.76. Found: C, 70.72; H, 5.09; N, 13.60.

6-[1-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14b).

1-(4-フルオロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (105 mg, 0.64 mmol) とトリエチルアミン (90 μL, 0.64 mmol) の2-プロパノール (5 mL) 溶液に、TFA (99 μL, 1.29 mmol) および **13a** (150 mg, 0.64 mmol) を室温で加えた。反応液を 80 °C で 12 時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し、ヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒から再結晶して **14b** (70.0 mg, 34%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.35 (3H, s), 4.63 (2H, s), 6.25 (1H, s), 6.64 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.78 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.2 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.00–7.08 (2H, m), 7.20–7.28 (2H, m), 8.35 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₁₄FN₃O₂: C, 66.87; H, 4.36; N, 13.00. Found: C, 66.75; H, 4.35; N, 12.90.

6-[3-Ethyl-1-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14c).

1-(4-フルオロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (99.0 mg, 0.61 mmol) とトリエチルアミン (85 μL, 0.61 mmol) の2-プロパノール (5 mL) 溶液に、TFA (93 μL, 1.21 mmol) および **13b** (150 mg, 0.64 mmol) を室温で加えた。反応液を 80 °C で 12 時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を分取 HPLC により精製し、酢酸エチルとヘキサンの混合溶媒から再結晶して **14c** (51.0 mg, 25%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.32 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.74 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 4.63 (2H, s), 6.29 (1H, s), 6.67 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.79

(1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz), 6.98 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.00–7.08 (2H, m), 7.22–7.30 (2H, m), 8.72 (1H, brs). Anal. Calcd for $C_{19}H_{16}FN_3O_2$: C, 67.65; H, 4.78; N, 12.46. Found: C, 67.74; H, 4.84; N, 12.44.

6-[1-(4-Fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14d).

1-(4-フルオロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (133 mg, 0.82 mmol) とトリエチルアミン (113 μ L, 0.82 mmol) の2-プロパノール (4.6 mL) 溶液に, TFA (129 μ L, 1.68 mmol) および **13d** (225 mg, 0.74 mmol) を室温で加えた. 反応液を 60 °C で 12 時間攪拌した後, 減圧濃縮した. 得られた残渣に 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えた後に, 析出物をろ取り, 得られた固体をジエチルエーテルで洗浄して **14d** (198 mg, 67%) を淡黄色固体として得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.65 (2H, s), 6.65 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.71 (1H, s), 6.80 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.05–7.16 (2H, m), 7.25–7.38 (2H, m), 8.28 (1H, brs). Anal. Calcd for $C_{18}H_{11}F_4N_3O_2$: C, 57.30; H, 2.94; N, 11.14. Found: C, 57.31; H, 2.90; N, 11.10.

6-[1-(4-Fluorophenyl)-3-(perfluoroethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14e).

14d の合成と同様の方法により **14e** (65%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.66 (2H, s), 6.66 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.72 (1H, s), 6.81 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.09–7.15 (2H, m), 7.31–7.38 (2H, m), 8.26 (1H, brs). Anal. Calcd for $C_{19}H_{11}F_6N_3O_2$: C, 53.41; H, 2.59; N, 9.83. Found: C, 53.48; H, 2.74; N, 9.52.

6-[1-(4-Fluorophenyl)-3-(1-methylethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14f).

14c の合成と同様の方法により **14f** (12%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.16 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 2.90–3.05 (1H, sep, $J = 6.8$ Hz), 4.59 (2H, s), 6.66 (1H, s), 6.97 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.28–7.46 (4H, m), 7.51–7.64 (2H, m), 10.69 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for $C_{20}H_{19}FN_3O_2$ m/z 352.1456 (M+H), Found 352.1434 (M+H).

6-[1-(2-Fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14g).

14d の合成と同様の方法により **14g** (85%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.63 (2H, s), 6.65 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.73 (1H, s), 6.80 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.08–7.18 (1H, m), 7.23–7.30 (1H, m), 7.45–7.58 (2H, m), 7.62 (1H, brs). Anal. Calcd for $C_{18}H_{11}F_4N_3O_2$: C, 57.30; H, 2.94; N, 11.14. Found: C, 57.24; H, 2.99; N, 11.08.

6-[1-(3-Fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14h).

14d の合成と同様の方法により **14h** (86%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.67 (2H, s), 6.66 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.71 (1H, s), 6.84 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.4 Hz), 6.96 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.08–7.18 (3H, m), 7.35–7.40 (1H, m), 7.81 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₁₁F₄N₃O₂: C, 57.30; H, 2.94; N, 11.14. Found: C, 57.33; H, 3.02; N, 11.12.

6-[1-(2-Chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14i).

14d の合成と同様の方法により **14i** (76%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.62 (2H, s), 6.63 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.79 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz), 6.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.40–7.47 (4H, m), 7.66 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for C₁₈H₁₀ClF₃N₃O₂ *m/z* 392.0419 (M–H), Found 392.0415 (M–H).

6-[1-(4-Chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14j).

14d の合成と同様の方法により **14j** (66%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.66 (2H, s), 6.65 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.70 (1H, s), 6.82 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz), 6.95 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.27–7.30 (2H, m), 7.37–7.40 (2H, m), 7.86 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₁₁ClF₃N₃O₂: C, 54.91; H, 2.82; N, 10.67. Found: C, 54.70; H, 2.87; N, 10.56.

6-[1-(2-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14k).

14d の合成と同様の方法により **14k** (73%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.97 (3H, s), 4.61 (2H, s), 6.53 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.75–6.93 (3H, m), 7.26–7.34 (3H, m), 7.34–7.40 (1H, m), 7.69 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄F₃N₃O₂: C, 61.13; H, 3.78; N, 11.26. Found: C, 61.00; H, 3.82; N, 11.18.

6-[1-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14l).

14d の合成と同様の方法により **14l** (83%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.39 (3H, s), 4.64 (2H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.69 (1H, s), 6.84 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.18–7.20 (1H, m), 7.23–7.27 (3H, m), 7.73 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄F₃N₃O₂: C, 61.13; H, 3.78; N, 11.26. Found: C, 61.22; H, 3.84; N, 11.23.

6-[1-(2-Ethylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (14m).

14d の合成と同様の方法により **14m** (47%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.94 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.22 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 4.57 (2H, s), 6.66–6.81 (2H, m), 6.79–6.94 (1H, m), 7.11 (1H, s), 7.26–7.38 (2H, m), 7.34–7.59 (2H, m), 10.77 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆F₃N₃O₂: C, 62.01; H, 4.16; N, 10.85. Found: C, 62.28; H, 4.31; N, 10.65.

6-[1-(4-Fluoro-2-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazol-5-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (14n).

18 (29.0 g, 164 mmol) とトリエチルアミン (22.9 mL, 164 mmol) の2-プロパノール (350 mL) 溶液に、TFA (12.6 mL, 164 mmol) および **13d** (47.1 g, 164 mmol) を室温で加えた。反応液を 80 °C で3時間攪拌した後、水に注いだ。析出物をろ取した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製して、**14n** (31.4 g, 54%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.90 (3H, s), 4.58 (2H, s), 6.70 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.82 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz), 6.92 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.13 (1H, s), 7.11–7.23 (1H, m), 7.28–7.32 (1H, m), 7.41–7.45 (1H, m), 10.78 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₃F₄N₃O₂: C, 58.32; H, 3.35; N, 10.74. Found: C, 58.25; H, 3.23; N, 10.80.

Ethyl 1-(4-fluorophenyl)-5-(3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylate (14o).

14d の合成と同様の方法により **14o** (80%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.32 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.33 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.60 (2H, s), 6.76 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.80 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.02 (1H, s), 7.30–7.37 (2H, m), 7.37–7.41 (2H, m), 10.76 (1H, s).

1-(4-Fluorophenyl)-5-(3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (15).

14o (1.26 g, 3.30 mmol) の THF (25 mL) 溶液に、1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (8.26 mL) を室温で加えた。反応液を12時間加熱還流させ、1 N 塩酸を加えて酸性にした。析出物をろ取り、エタノールから再結晶して 1-(4-fluorophenyl)-5-(3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (877 mg, 75%) を得た。得られたカルボン酸 (170 mg, 0.48 mmol) と HOBt 一水和物 (74.4 mg, 0.48 mmol) および EDCI 塩酸塩 (100 mg, 0.52 mmol) の DMF (5

mL) 溶液に, 2 M アンモニアのメタノール溶液 (253 μ L, 0.51 mmol) を室温で加えた. 反応液を室温で 12 時間攪拌し, 水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣に酢酸エチルを加えて攪拌後, 析出物をろ取して **15** (130 mg, 76%) を白色固体として得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.60 (2H, s), 6.77–6.80 (2H, m), 6.89 (1H, s), 6.93 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 7.31–7.42 (5H, m), 7.69 (1H, s), 10.76 (1H, brs).

1-(4-Fluorophenyl)-5-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile (16).

15 (25.0 mg, 0.07 mmol) の 1,4-ジオキサン/ピリジン (1 mL/ 0.1 mL) 溶液に, TFAA (25 μ L, 0.18 mmol) を 0 $^{\circ}\text{C}$ で加えた. 反応液を 30 分攪拌後, 1 N 塩酸を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥後, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製して, **16** (9.00 mg, 38%) を白色固体として得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.60 (2H, s), 6.75 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.80 (1H, dd, $J=2.0, 8.6$ Hz), 6.95 (1H, d, $J=8.6$ Hz), 7.08–7.15 (3H, m), 7.23–7.44 (2H, m), 7.60 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{FN}_4\text{O}_2$ m/z 333.0793 (M-H), Found 333.0791 (M-H).

6-[1-(4-Fluorophenyl)-3-(hydroxymethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (17).

14o (100 mg, 0.26 mmol) の THF (1 mL) 溶液に, LiAlH_4 の THF 溶液 (1 M, 0.26 mL, 0.26 mmol) を 0 $^{\circ}\text{C}$ で加えた. 反応液を室温で 1 時間攪拌後, LiAlH_4 の THF 溶液 (1 M, 0.10 mL, 0.10 mmol) を室温で加えた. 反応液を室温で 12 時間攪拌後, THF および硫酸ナトリウム 10 水和物を加え, 12 時間攪拌した. 反応液をろ過し, ろ液に 1 N 水酸化ナトリウムを加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール) により精製して, **17** (30 mg, 34%) を白色固体として得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.49 (2H, d, $J=6.0$ Hz), 4.59 (2H, s), 5.17 (1H, t, $J=6.0$ Hz), 6.49 (1H, s), 6.65–6.81 (2H, m), 6.92 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 7.16–7.33 (4H, m), 10.73 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{FN}_3\text{O}_3$ m/z 340.1092 (M+H), Found 340.1066 (M+H).

1-(4-Fluoro-2-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (18).

4-フルオロ-2-メチルアニリン (125 g, 1.00 mol) の濃塩酸 (1 L) 溶液に、亜硝酸ナトリウム (137 g, 2.00 mol) を 0 °C で加えた。反応液を 0 °C で 2 時間攪拌後、塩化スズ (474 g, 2.50 mol) を 0 °C で加えた。反応液を室温で 12 時間攪拌後、ジエチルエーテルを加えた。水層を分離し、水酸化ナトリウムで塩基性にした後、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をジエチルエーテルに溶解させた後に、4 N 塩酸のジオキサン溶液を加え、析出物をろ取して **18** (85.0 g, 48%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.20 (3H, s), 6.89–7.12 (3H, m), 7.75 (1H, brs), 10.16 (3H, brs).

6-[1-(4-Fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (19).

3a (4.00 g, 20.9 mmol) と DMFDMA (4.46 mL, 33.5 mmol) のエタノール (50 mL) 溶液を 80 °C で 16 時間攪拌後、室温に戻した。析出物をろ取し、エタノールで洗浄して 6-[3-(dimethylamino)acryloyl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (3.80 g, 73%) を黄色固体として得た。1-(4-フルオロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (0.58 g, 3.54 mmol) のメタノール (14 mL) 溶液に、6 N 塩酸 (3.16 mL, 19.0 mmol) および 6-[3-(dimethylamino)acryloyl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (0.78 g, 3.16 mmol) を加えた。反応液を 40 °C で 16 時間攪拌後、減圧濃縮した。得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄後、エタノールから再結晶し **19** (0.43 g, 44%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.64 (2H, s), 6.46 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.67 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.80 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.6 Hz), 6.91 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.05–7.18 (2H, m), 7.28–7.38 (2H, m), 7.69 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.54 (1H, brs).

6-[1-(4-Fluorophenyl)-4-iodo-1*H*-pyrazol-5-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (20).

19 (1.00 g, 3.2 mmol) の DMF (10 mL) 溶液に、NIS (0.73 g, 3.2 mmol) を 0 °C で加えた。反応液を 55 °C で 60 時間攪拌後、水を加え、0 °C に冷却した。析出物をろ取し、ジクロロメタンで洗浄して **20** (0.70 g, 50%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.67 (2H, s), 6.69 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.83 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.98–7.10 (2H, m), 7.19–7.22 (2H, m), 7.76 (1H, s), 7.80 (1H, brs).

6-[1-(4-Fluorophenyl)-4-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazol-5-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (21).

窒素雰囲気下, **20** (200 mg, 0.46 mmol), フルオロスルホニルジフルオロ酢酸メチル (0.39 mL, 3.03 mmol) およびヨウ化銅 (96.3 mg, 0.51 mmol) の DMF (3 mL) 溶液を 100 °C で 16 時間攪拌した. 反応液に水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を水および飽和食塩水で洗浄し, 硫酸マグネシウムで乾燥後, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (ジクロロメタン/酢酸エチル) により精製して, **21** (8.2 mg, 5%) を白色固体として得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.67 (2H, s), 6.66 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.80–6.83 (1H, m), 6.93–7.10 (3H, m), 7.18–7.30 (2H, m), 7.83 (1H, brs), 7.95 (1H, s). ESI-HRMS. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_2$ m/z 376.0715 (M–H), Found 376.0715 (M–H).

6-Bromo-8-fluoro-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (25a).

22 (216 g, 917 mmol), 2-ブロモ酢酸メチル (104 mL, 1.10 mol) および炭酸カリウム (633 g, 4.58 mol) の DMF (500 mL) 溶液を 65 °C で 12 時間攪拌後, 水に注いだ. 析出物をろ取りし, methyl (4-bromo-2-nitrophenoxy)acetate (282 g) を黄色固体として得た. 得られた methyl (4-bromo-2-nitrophenoxy)acetate (282 g) の酢酸 (1.5 L) 溶液に亜鉛粉末 (209 g, 320 mmol) を加え, 100 °C で 12 時間攪拌後, 反応液をろ過した. 固体を DMF に懸濁させ, ろ過した. 両ろ液を混合した後, 水に注いだ. 析出物をろ取りして **25a** (130 g, 57%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.68 (2H, s), 6.87 (1H, t, $J=2.0$ Hz), 7.21 (1H, dd, $J=2.0, 10.0$ Hz), 10.99 (1H, brs).

6-Bromo-8-chloro-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (25b).

25a の合成と同様の方法により **25b** (41% in 2 steps) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.72 (2H, s), 6.99 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 7.30 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 10.98 (1H, brs).

4-Hydroxy-3-methyl-5-nitroacetophenone (26).

24 (100 g, 666 mmol) の酢酸 (444 mL) 溶液に, 70%硝酸 (31 mL, 732 mmol) を室温で加えた. 反応液を室温で 24 時間攪拌後, 水に注いだ. 析出物をろ取りして **25** (77.0 g, 59%) を黄色固体として得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{acetone-}d_6$) δ 2.38 (3H, s), 2.62 (3H, s), 8.18 (1H, s), 8.57 (1H, s), 11.05 (1H, brs).

6-Acetyl-8-fluoro-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (27a).

窒素雰囲気下, **25a** (93.7 g, 381 mmol), 4-ビニロキシブタン-1-オール (156 mL, 1.26 mol), ジクロロビス(トリ-*o*-トリルホスフィン)パラジウム(II) (8.98 g, 11.4 mmol), および炭酸カリウム (105 g, 762 mmol) の DMF/水 (635 mL/ 38.1 mL) 溶液を 80 °C で 12 時間攪拌した. 反応液に 2N 塩酸を加え, 1 時間攪拌後, ジクロロメタンで抽出した. 抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製して, **27a** (58.0 g, 72%) を得た. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.53 (3H, s), 4.78 (2H, s), 7.33 (1H, s), 7.64 (1H, d, *J* = 10.8 Hz), 11.02 (1H, brs).

6-Acetyl-8-chloro-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (27b).

27a の合成と同様の方法により **27b** (34%) を得た. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.52 (3H, s), 4.80 (2H, s), 7.40 (1H, s), 7.71 (1H, s), 11.02 (1H, brs).

6-Acetyl-8-methyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (27c).

25a の合成と同様の方法により **26** から **27c** (89%) を得た. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.23 (3H, s), 2.52 (3H, s), 4.68 (2H, s), 7.34 (1H, s), 7.52 (1H, s), 10.78 (1H, brs).

8-Fluoro-6-[1-(4-fluoro-2-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (29a).

60% NaH (44.4 g, 1.10 mol) の THF (4.0 L) 溶液に, トリフルオロ酢酸エチル (146 mL, 1.10 mol), **27a** (58.0 g, 0.28 mol), エタノール (1.5 mL) および 2,4-ジベンゾ-18-クラウン-6 (1.60 g, 4.43 mmol) を加えた. 反応液を 60 °C で 12 時間攪拌後, 1 N 塩酸を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を水で洗浄し, 硫酸マグネシウムで乾燥後, 減圧濃縮した. 得られた残渣にジエチルエーテルを加えて攪拌し, 析出物をろ取り **28a** (33.0 g, 39%) を得た. **18** (19.1 g, 108 mmol) とトリエチルアミン (15.1 mL, 108 mmol) の 2-プロパノール (500 mL) 溶液に, TFA (8.33 mL, 108 mmol) および **28a** (33.0 g, 108 mmol) を加え, 80 °C で 3 時間攪拌後, 水に注いだ. 析出物をろ取り, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製して, **29a** (35.2 g, 79%) を得た. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.91 (3H, s), 4.67 (2H, s), 6.47 (1H, s), 6.91 (1H, dd, *J* = 2.0, 11.3 Hz), 7.15–7.28 (2H, m), 7.30–7.34 (1H, m), 7.46–7.50 (1H, m),

10.98 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₂F₅N₃O₂: C, 55.75; H, 2.96; N, 10.27. Found: C, 55.85; H, 3.03; N, 10.21.

8-Chloro-6-[1-(4-fluoro-2-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (29b).

29a の合成と同様の方法により **29b** (28% in 2 steps) を得た. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.91 (3H, s), 4.71 (2H, s), 6.58 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.07 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.13–7.36 (3H, m), 7.44–7.49 (1H, m), 10.95 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₂ClF₄N₃O₂: C, 53.60; H, 2.84; N, 9.87. Found: C, 53.58; H, 2.89; N, 9.76.

6-[1-(4-Fluoro-2-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl]-8-methyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (29c).

29a の合成と同様の方法により **29c** (16% in 2 steps) を得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.96 (3H, s), 2.15 (3H, s), 4.64 (2H, s), 6.39 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.70 (1H, s), 6.74 (1H, s), 6.97–7.00 (2H, m), 7.25–7.30 (1H, m), 9.00 (1H, brs). ESI-HRMS. Calcd for C₂₀H₁₆F₄N₃O₂ *m/z* 406.1173 (M+H), Found 406.1146 (M+H).

第二章に関する実験

6-Isobutyryl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (32).

3b の合成と同様の方法により **32** (16%) を得た. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (6H, d, *J* = 7.2 Hz), 3.49 (1H, sep, *J* = 7.2 Hz), 4.70 (2H, s), 7.03 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.50 (1H, s), 7.61 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.16 (1H, brs).

6-(2-Chloropropanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (31a).

2 (5.00 g, 33.5 mmol) の 1,2-ジクロロエタン (50 mL) 溶液に, 粉末状の塩化アルミニウム (9.80 g, 73.7 mmol) および 2-クロロプロピオニルクロリド (3.9 mL, 40.2 mmol) を 0 °C で加えた. 反応液を室温で 12 時間攪拌後, 氷水に注いだ. 析出物をろ取り, 1 N 塩酸, 水, ジイソプロピルエーテルで洗浄して **31a** (8.00 g, 99%) を得た. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.60

(3H, d, $J = 6.6$ Hz), 4.71 (2H, s), 5.65 (1H, q, $J = 6.6$ Hz), 7.08 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.54 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.70 (1H, dd, $J = 2.3, 8.7$ Hz), 10.91 (1H, s).

6-(2-Chlorobutanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (31b).

31a の合成と同様の方法により **31b** (37%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.98 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.78–2.13 (2H, m), 4.71 (2H, s), 5.50 (1H, dd, $J = 5.5, 7.8$ Hz), 7.08 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.53 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.71 (1H, dd, $J = 2.3, 8.3$ Hz), 10.91 (1H, s).

6-(2-Bromo-2-methylpropanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (31c).

4b の合成と同様の方法により **31c** (69%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃) δ 2.03 (6H, d, $J = 7.2$ Hz), 4.70 (2H, s), 7.00 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.64 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.96 (1H, dd, $J = 1.8, 8.7$ Hz), 8.10 (1H, brs).

6-[4-(2,4-Difluorophenyl)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (30b).

4a (300 mg, 1.11 mmol) および TEA (281 μL , 2.02 mmol) の DMF (5 mL) 溶液に, 2,4-ジフルオロフェニル酢酸 (173 mg, 1.01 mmol) を室温で加えた. 反応液を室温で3時間攪拌後, 窒素置換し DBU (304 μL , 2.02 mmol) を加えた. 窒素雰囲気下, 反応液を室温で12時間攪拌した後, 水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し, ヘキサン/酢酸エチルの混合液から再結晶し **30b** (74.0 mg, 19%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.62 (2H, s), 5.43 (2H, s), 6.83 (1H, s), 7.01 (2H, s), 7.12–7.29 (1H, m), 7.30–7.60 (2H, m), 10.82 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₈H₁₁F₂NO₄: C, 62.98; H, 3.23; N, 4.08. Found: C, 62.81; H, 3.29; N, 3.98.

6-[4-(4-Fluorophenyl)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (30a).

30b の合成と同様の方法により **30a** (56%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.62 (2H, s), 5.43 (2H, s), 6.83 (1H, s), 6.98–7.02 (2H, m), 7.12–7.29 (2H, m), 7.30–7.60 (2H, m), 10.82 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₈H₁₂FNO₄: C, 66.46; H, 3.72; N, 4.31. Found: C, 66.40; H, 3.75; N, 4.35.

6-[4-(4-Fluoro-2-methylphenyl)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (30c).

30b の合成と同様の方法により **30c** (15%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.13 (3H, s), 4.54 (2H, s), 5.29 (2H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.77–6.86 (3H, m), 6.95–7.18 (3H, m), 10.75 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄FNO₄: C, 67.25; H, 4.16; N, 4.13. Found: C, 66.97; H, 4.22; N, 4.08.

6-[4-(4-Fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (30e).

30b の合成と同様の方法により **30e** (42%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.34 (3H, t, *J* = 6.8 Hz), 4.63 (2H, s), 5.76 (1H, q, *J* = 6.8 Hz), 6.80 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.90–7.07 (2H, m), 7.18–7.20 (2H, m), 7.33–7.42 (2H, m), 10.75 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄FNO₄: C, 67.25; H, 4.16; N, 4.13. Found: C, 67.10; H, 4.29; N, 4.06.

6-[2-Ethyl-4-(4-fluorophenyl)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (30g).

30b の合成と同様の方法により **30g** (65%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.80 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.41–1.56 (1H, m), 1.80–1.96 (1H, m), 4.63 (2H, s), 5.72 (1H, dd, *J* = 3.6, 7.3 Hz), 6.79–6.80 (1H, m), 6.89–7.11 (2H, m), 7.17–7.31 (2H, m), 7.31–7.55 (2H, m), 10.74 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆FNO₄·0.2H₂O: C, 67.30; H, 4.63; N, 3.92. Found: C, 67.15; H, 4.75; N, 3.60.

6-[4-(4-Fluorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (30d).

31c (300 mg, 1.01 mmol), 4-フルオロフェニル酢酸 (155 mg, 1.01 mmol), 炭酸カリウム (277 mg, 2.01 mmol) およびベンジルトリエチルアンモニウムクロリド (11.4 mg, 0.05 mmol) の DMA (5 mL) 溶液を 50 °C で 48 時間, 100 °C で 72 時間攪拌後, 1 N 塩酸を加え, 酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **30d** (38.0 mg, 11%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.54 (6H, s), 4.63 (2H, s), 6.76–6.89 (2H, m), 7.00 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.11–7.22 (2H, m), 7.29–7.48 (2H, m), 10.72 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆FNO₄: C, 67.98; H, 4.56; N, 3.96. Found: C, 67.64; H, 4.64; N, 4.04.

6-[2-Fluoro-4-(4-fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (30f).

アルゴン雰囲気下, **30e** (500 mg, 1.47 mmol) の THF (10 mL) 溶液に, DBU (666 μL, 4.33 mmol) および *N*-フルオロベンゼンスルホンイミド (700 mg, 2.21 mmol) の THF (4 mL) 溶液を -78 °C で加えた。反応液を -78 °C で 1 時間攪拌後, DBU (666 μL, 4.33 mmol) および *N*-フ

ルオロベンゼンスルホンイミド (700 mg, 2.21 mmol) の THF (4 mL) 溶液を加えた。反応液を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分攪拌後、飽和塩化アンモニウム水溶液および 1 N 塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製後、さらに分取 HPLC で精製して **30f** (129 mg, 24%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.82 (3H, d, $J = 18.9$ Hz), 4.65 (2H, s), 6.84–7.06 (3H, m), 7.21–7.36 (2H, m), 7.37–7.47 (2H, m), 10.80 (1H, brs). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{NO}_4$: C, 63.87; H, 3.67; N, 3.92. Found: C, 63.70; H, 3.62; N, 4.08.

6-(2-Bromopropanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (35a).

31b の合成と同様の方法により **35a** (89%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.76 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 4.71 (2H, s), 5.69 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.54 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.70 (1H, dd, $J = 2.3, 8.3$ Hz), 10.90 (1H, s).

1-(4-Hydroxy-3-methyl-5-nitrophenyl)propan-1-one (40).

39 (18.3 g, 111.4 mmol), 濃硫酸 (10 mL), 水 (20 mL) の混合液に、亜硝酸ナトリウム (23.1 g, 334.4 mmol) の水溶液 (40 mL) を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で加えた。反応液を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 3 時間攪拌し、水に注いだ。析出物をろ取り、水で洗浄して **40** (11.8 g, 51%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.07 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 2.31 (3H, s), 3.03 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 8.11 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 8.35 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 11.05 (1H, s).

8-Methyl-6-propionyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (41).

40 (11.5 g, 54.9 mmol) の酢酸 (20 mL) 溶液に、亜鉛粉末 (35.9 g, 549.7 mmol) を加えた。反応液を 10 分間攪拌し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣に 4-methyl-2-pentanone (100 mL), 炭酸ナトリウム (17.4 g, 164.9 mmol) の水溶液 (100 mL), クロロアセチルクロリド (6.2 g, 54.9 mmol) を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で加えた。反応液を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した後、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 12 時間攪拌し、水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルから再結晶し **41** (7.50 g, 62% in 2 steps) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.06 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 2.21 (3H, s), 2.93 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.68 (2H, s), 7.33 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 7.50 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 10.79 (1H, s).

6-(2-Bromopropanoyl)-8-methyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (35b).

31a の合成と同様の方法により **35b** (84%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.75 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 2.22 (3H, s), 4.72 (2H, s), 5.68 (1H, q, *J* = 6.4 Hz), 7.40 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 10.85 (1H, s).

6-[2-(Methylamino)propanoyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (36a).

40%メチルアミン (15 mL) の THF (15 mL) 溶液に, **31a** (1.00 g, 4.17 mmol) を加え, 40 °C で 12 時間攪拌した。反応液に水を加え, 酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した。得られた残渣を塩基性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) により精製し **36a** (200 mg, 20%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.14 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 2.20 (3H, s), 4.12 (1H, q, *J* = 6.8 Hz), 4.68 (2H, s), 7.04 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.53 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.67 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.3 Hz), 10.85 (1H, brs).

6-[2-(Ethylamino)propanoyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (36b).

36a の合成と同様の方法により **36b** (51%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.98 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.14 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 2.35–2.49 (2H, m), 4.22 (2H, q, *J* = 6.8 Hz), 4.69 (2H, s), 7.05 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.53 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.68 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.5 Hz), 10.85 (1H, brs).

6-[2-(Cyclopropylamino)propanoyl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (36c).

36a の合成と同様の方法により **36c** を得た。得られた **36c** は粗生成物のまま次の反応に用いた。

2-(4-Fluorophenyl)-N-[1-oxo-1-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)propan-2-yl]-N-[2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl]acetamide (36d).

36a の合成と同様の方法により **36d** を得た。得られた **36d** は粗生成物のまま次の反応に用いた。

6-{2-[(4-Methoxybenzyl)amino]propanoyl}-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (36e).

35a (2.00 g, 7.04 mmol), 4-メトキシベンジルアミン (2.90 g, 21.1 mmol) およびトリエチルアミン (1.9 mL, 14.1 mmol) の THF/水 (20 mL/5 mL) 溶液を 50 °C で 2 時間攪拌し, 水を加え, 酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した。得られた

残渣にジイソプロピルエーテルを加えて攪拌し、析出物をろ取して **36e** (2.15 g, 90%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.18 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 3.43–3.68 (2H, m), 3.72 (3H, s), 4.22 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 4.69 (2H, s), 6.80–6.91 (2H, m), 7.03 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.18–7.21 (2H, m), 7.51 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.57–7.66 (1H, m), 10.34 (1H, brs).

6-{2-[(4-Methoxybenzyl)amino]propanoyl}-8-methyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (36f).

36e の合成と同様の方法により **36f** (72%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.18 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 2.13–2.46 (4H, m), 3.47–3.67 (2H, m), 3.72 (3H, s), 4.21 (1H, q, *J* = 6.8 Hz), 4.70 (2H, s), 6.84–6.85 (2H, m), 7.19–7.23 (2H, m), 7.36 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.47–7.48 (1H, m), 10.56 (1H, brs).

2-(4-Fluorophenyl)-N-methyl-N-[1-oxo-1-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)propan-2-yl]acetamide (37a).

36a (200 mg, 0.85 mmol) の THF (2 mL) 溶液に、炭酸カリウム (354 mg, 2.56 mmol) の水溶液 (2 mL) および 4-フルオロフェニル酢酸クロリド (162 mg, 0.94 mmol) を 0 °C で加えた。反応液を室温で 30 分攪拌後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣にジイソプロピルエーテルを加えて攪拌し、析出物をろ取して **37a** (240 mg, 76%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.24 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 2.86 (3H, s), 3.61–3.67 (2H, m), 4.67 (2H, s), 5.51 (1H, q, *J* = 6.8 Hz), 6.93–7.15 (5H, m), 7.32–7.44 (2H, m), 10.88 (1H, s).

N-Ethyl-2-(4-fluorophenyl)-N-[1-oxo-1-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)propan-2-yl]acetamide (37b).

37a の合成と同様の方法により **37b** (53%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.13 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.41 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.17–3.49 (2H, m), 3.69 (2H, s), 4.67 (2H, s), 5.97 (1H, q, *J* = 6.8 Hz), 6.84–6.99 (3H, m), 7.04–7.20 (2H, m), 7.49 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.54–7.67 (1H, m), 9.39 (1H, s).

N-Cyclopropyl-2-(4-fluorophenyl)-N-[1-oxo-1-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)propan-2-yl]acetamide (37c).

37a の合成と同様の方法により **37c** (25% in 2 steps) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.80–1.00 (4H, m), 1.32 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 2.67–2.77 (1H, m), 3.57–3.93 (2H, m), 4.65 (2H, s), 4.99 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 6.87–7.03 (5H, m), 7.16–7.32 (2H, m), 10.84 (1H, s).

6-(2-{[2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl]amino}propanoyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (37d).

37a の合成と同様の方法により **37d** (71% in 2 steps) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.40–1.80 (9H, m), 3.36–3.83 (8H, m), 4.26–4.54 (1H, m), 4.63 (2H, s), 5.49–5.80 (1H, m), 6.85–7.12 (5H, m), 7.26–7.60 (2H, m), 9.80 (1H, brs).

2-(4-Fluorophenyl)-N-(4-methoxybenzyl)-N-[1-oxo-1-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)propan-2-yl]acetamide (37e).

37a の合成と同様の方法により **37e** (70%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.08–1.30 (3H, m), 3.52–3.78 (5H, m), 4.63 (2H, s), 4.67 (2H, s), 5.29 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 6.84–7.04 (6H, m), 7.09–7.39 (5H, m), 10.84 (1H, s).

2-(4-Fluorophenyl)-N-(4-methoxybenzyl)-N-[1-(8-methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)-1-oxopropan-2-yl]acetamide (37f).

37a の合成と同様の方法により **37f** (86%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.05–1.32 (3H, m), 2.09–2.17 (3H, m), 3.48–3.70 (2H, m), 3.70–3.83 (3H, m), 4.54–4.76 (4H, m), 5.26 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 6.69–6.95 (2H, m), 6.98–7.03 (4H, m), 7.09–7.34 (4H, m), 10.78 (1H, brs).

6-[4-(4-Fluorophenyl)-1,2-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38a).

アルゴン雰囲気下, **37a** (240 mg, 0.65 mmol) の THF (5 mL) 溶液に, カリウム *tert*-ブトキシド (181 mg, 1.62 mmol) の *tert*-ブタノール (4 mL) を 0 °C で加えた. 反応液を室温で 30 分攪拌後, 水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し, ヘキサン/酢酸エチルの混合液から再結晶し **38a** (123 mg, 54%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.13 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 2.99 (3H, s), 4.58–4.68 (3H, m), 6.73 (1H, d, $J = 1.9$

Hz), 6.78–6.88 (1H, m), 6.92–7.00 (1H, m), 7.13–7.24 (2H, m), 7.26–7.38 (2H, m), 10.70 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₇FN₂O₃: C, 68.17; H, 4.86; N, 7.95. Found: C, 68.07; H, 4.85; N, 8.07.

6-[1-Ethyl-4-(4-fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38b).

38a の合成と同様の方法により **38b** (28%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.05–1.21 (6H, m), 3.16–3.29 (1H, m), 3.63–3.81 (1H, m), 4.60 (2H, s), 4.68–4.77 (1H, m), 6.73 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.83–6.91 (1H, m), 6.93–6.99 (1H, m), 7.09–7.22 (2H, m), 7.26–7.37 (2H, m), 10.68 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₁H₁₉FN₂O₃: C, 68.84; H, 5.23; N, 7.65. Found: C, 68.79; H, 5.25; N, 7.63.

6-[1-Cyclopropyl-4-(4-fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38c).

38a の合成と同様の方法により **38c** (78%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.67–0.80 (2H, m), 0.81–0.93 (2H, m), 1.20 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 2.55–2.65 (1H, m), 4.53–4.68 (3H, m), 6.72 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.81–6.89 (1H, m), 6.92–7.02 (1H, m), 7.08–7.24 (2H, m), 7.24–7.36 (2H, m), 10.67 (1H, brs).

6-{4-(4-Fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-1-[2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl]-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl}-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38d).

38a の合成と同様の方法により **38d** (62%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.24 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.40–1.90 (6H, m), 3.35–3.58 (2H, m), 3.62–3.72 (1H, m), 3.75–4.02 (2H, m), 4.04–4.22 (1H, m), 4.57–4.78 (2H, m), 4.63 (2H, s), 6.57 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 6.80 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.1 Hz), 6.91–7.03 (3H, m), 7.32–7.41 (2H, m), 8.13 (1H, s).

6-[4-(4-Fluorophenyl)-1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38e).

38d (0.51 g, 1.1 mmol) と PTSA (22.5 mg, 0.13 mmol) のメタノール (50 mL) 溶液を室温で2時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し、酢酸エチルから再結晶し **38e** (256 mg, 61%) を得た。¹H

NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.13 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 3.19–3.35 (1H, m), 3.53–3.65 (2H, m), 3.75–3.86 (1H, m), 4.59 (2H, s), 4.78–4.95 (2H, m), 6.62–6.85 (2H, m), 6.88–6.97 (1H, m), 7.09–7.22 (2H, m), 7.28–7.37 (2H, m), 10.66 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₁H₁₉FN₂O₄: C, 65.96; H, 5.01; N, 7.33. Found: C, 65.72; H, 5.07; N, 7.31.

6-[4-(4-Fluorophenyl)-1-(4-methoxybenzyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38f).

38a の合成と同様の方法により **38f** (86%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.10 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 3.74 (3H, s), 4.35 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 4.47 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 4.59 (2H, s), 4.89 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 6.67–6.73 (1H, m), 6.76–6.83 (1H, m), 6.87–6.97 (3H, m), 7.14–7.29 (4H, m), 7.31–7.42 (2H, m), 10.60 (1H, s).

6-[4-(4-Fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38g).

38e (2.00 g, 4.36 mmol) とアニソール (470 mg, 4.36 mmol) の TFA (15 mL) 溶液を 65 °C で 12 時間攪拌し、減圧濃縮した。得られた残渣に水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を分離後、室温で攪拌した。析出物をろ取り、エタノールから再結晶して **38f** (950 mg, 64%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.09 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 4.60 (2H, s), 4.67 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 6.73 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.81–6.90 (1H, m), 6.91–6.99 (1H, m), 7.10–7.29 (2H, m), 7.27–7.37 (2H, m), 8.61 (1H, s), 10.67 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅FN₂O₃: C, 67.45; H, 4.47; N, 8.28. Found: C, 67.11; H, 4.63; N, 8.26.

6-[4-(4-Fluorophenyl)-1-(4-methoxybenzyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-8-methyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38h).

38a の合成と同様の方法により **38h** (40%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.10 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 2.08 (3H, s), 3.74 (3H, s), 4.33 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 4.46 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 4.60 (2H, s), 4.90 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 6.53 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.73 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.86–6.97 (2H, m), 7.12–7.30 (4H, m), 7.30–7.45 (2H, m), 10.53 (1H, s).

6-[4-(4-Fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-8-methyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (38i).

38g の合成と同様の方法により **38i** (68%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.09 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 2.12 (3H, s), 4.49–4.72 (3H, m), 6.55 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.09–7.23 (2H, m), 7.21–7.45 (2H, m), 8.59 (1H, s), 10.59 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₇FN₂O₃·0.1 (H₂O): C, 67.83; H, 4.90; N, 7.91. Found: C, 67.46; H, 5.18; N, 7.53.

Ethyl *N*-[(4-fluorophenyl)acetyl]-*N*-(4-methoxybenzyl)alaninate (43).

36e および **37a** の合成と同様の方法により **43** (81% in 2 steps) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.06–1.16 (3H, m), 1.17–1.26 (3H, m), 3.65–3.81 (5H, m), 3.93–4.06 (2H, m), 4.10–4.20 (1H, m), 4.49–4.99 (2H, m), 6.79–6.96 (2H, m), 7.06–7.35 (6H, m).

3-(4-Fluorophenyl)-4-hydroxy-1-(4-methoxybenzyl)-5-methyl-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one (44).

60%水素化ナトリウム (2.16 g, 53.91 mmol) の DMF (90 mL) 溶液に, **43** (18.3 g, 49.0 mmol) の DMF (90 mL) 溶液を 0 °C で加えた。窒素雰囲気下, 反応液を室温で 12 時間攪拌し, 1N 塩酸を加え, 酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した。得られた残渣をメタノールから再結晶し **44** (15.0 g, 93%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.30 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.68–3.83 (4H, m), 4.14 (1H, d, *J* = 15.3 Hz), 4.82 (1H, d, *J* = 15.3 Hz), 6.80–6.96 (2H, m), 7.08–7.25 (4H, m), 7.98–8.15 (2H, m), 11.46 (1H, s).

4-(4-Fluorophenyl)-1-(4-methoxybenzyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl trifluoromethanesulfonate (45).

窒素雰囲気下, **44** (15.0 g, 45.82 mmol) とトリエチルアミン (6.70 mL, 50.4 mmol) のジクロロメタン (150 mL) 溶液に, トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (14.2 g, 50.4 mmol) を 0 °C で滴下した。反応液を 3 時間攪拌し, 水を加えた。有機層を飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し, エタノールと水の混合液から再結晶し **45** (15.0 g, 71%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.41 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.74 (3H, s), 4.33–4.51 (2H,

m), 4.79 (1H, d, $J = 15.5$ Hz), 6.87–7.00 (2H, m), 7.27 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.31–7.45 (2H, m), 7.70–7.82 (2H, m).

8-Fluoro-6-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (46a).

アルゴン雰囲気下, **25a** (8.00 g, 32.5 mmol), ビスピナコラートジボロン (9.08 g, 35.8 mmol), [1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]パラジウム(II)ジクロリド ジクロロメタン付加物 (1.33 g, 1.63 mmol) および酢酸カリウム (11.2 g, 114 mmol) の1,4-ジオキサン (320 mL) 溶液を 90 °C で 13 時間攪拌し, 水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し, 酢酸エチルとヘキサンの混合液から再結晶し **46a** (9.48 g, 99%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.28 (12H, s), 4.70 (2H, s), 6.99–7.08 (2H, m), 10.90 (1H, s).

8-Chloro-6-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (46b).

46a の合成と同様の方法により **46b** (99%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.28 (12H, s), 4.74 (2H, s), 7.14 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 7.23 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 10.89 (1H, s).

8-Fluoro-6-[4-(4-fluorophenyl)-1-(4-methoxybenzyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (47a).

アルゴン雰囲気下, **46a** (500 mg, 1.71 mmol), **45** (84.0 mg, 1.71 mmol), [1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]パラジウム(II)ジクロリド ジクロロメタン付加物 (278 mg, 0.34 mmol) および炭酸セシウム (1.67 g, 5.21 mmol) の THF/水 (20 mL/5 mL) 溶液を 100 °C で 12 時間攪拌し, 1 N 塩酸を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し, ヘキサンと酢酸エチルの混合液から再結晶し **47a** (522 mg, 64%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.11 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 3.74 (3H, s), 4.35 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 4.52 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 4.68 (2H, s), 4.88 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 6.51 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.82–6.98 (3H, m), 7.16–7.45 (6H, m), 10.80 (1H, s).

8-Chloro-6-[4-(4-fluorophenyl)-1-(4-methoxybenzyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (47b).

47a の合成と同様の方法により 47b (42%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.10 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.32 (3H, s), 4.35 (1H, d, *J* = 15.1 Hz), 4.55 (1H, q, *J* = 6.8 Hz), 4.72 (2H, s), 4.88 (1H, d, *J* = 15.1 Hz), 6.63 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.92–7.03 (3H, m), 7.15–7.44 (6H, m), 10.78 (1H, s).

8-Fluoro-6-[4-(4-fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (48a).

38g の合成と同様の方法により 48a (78%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.10 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 4.62–4.77 (3H, m), 6.52 (1H, s), 6.89–6.94 (1H, m), 7.07–7.24 (2H, m), 7.27–7.41 (2H, m), 8.67 (1H, s), 10.85 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄F₂N₂O₃: C, 64.04; H, 3.96; N, 7.86. Found: C, 63.66; H, 4.05; N, 7.79.

8-Chloro-6-[4-(4-fluorophenyl)-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (48b).

38g の合成と同様の方法により 48b (57%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.09 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 4.62–4.79 (3H, m), 6.64 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.05 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.14–7.23 (2H, m), 7.27–7.39 (2H, m), 8.67 (1H, s), 10.84 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄ClFN₂O₃: C, 61.22; H, 3.79; N, 7.51. Found: C, 60.98; H, 4.03; N, 7.23.

第三章に関する実験

6-(5-Methyl-1,2-oxazol-3-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (53b)

ヒドロキシルアミン塩酸塩 (188 mg, 2.70 mmol) と TEA (369 μL, 2.65 mmol) の 2-プロパノール (15 mL) 溶液を室温で 15 分攪拌後、TFA (423 μL, 5.53 mmol) を加えた。反応液を室温で 15 分攪拌した後、13a (600 mg, 2.57 mmol) を加えた。反応液を 60 °C で 12 時間攪拌し、減圧濃縮した。得られた残渣に水を加え、1 N 水酸化ナトリウム水溶液で中和した。析出物をろ取り、ジエチルエーテルで洗浄して 53b (560 mg, 95%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.25 (3H, s), 4.64 (2H, s), 6.72 (1H, s), 7.05–7.10 (1H, m), 7.30–7.45 (2H, m), 10.90 (1H, brs).

6-(5-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (53a).

53b の合成と同様の方法により **53a** (77%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.40 (3H, s), 4.72 (2H, s), 6.38 (1H, s), 7.00–7.05 (1H, m), 7.30–7.35 (1H, m), 7.67 (1H, s), 10.82 (1H, brs).

6-(4-Bromo-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (54a).

53a (390 mg, 1.66 mmol) の DMF (10 mL) 溶液に, NBS (295 mg, 1.66 mmol) を室温で加えた. 反応液を氷冷した後, 析出物をろ取り, ジエチルエーテルで洗浄して **54a** (480 mg, 94%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.39 (3H, s), 4.72 (2H, s), 7.05–7.11 (1H, m), 7.42 (1H, s), 7.77–7.81 (1H, m), 10.20 (1H, brs).

6-(4-Bromo-5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (54b).

54a の合成と同様の方法により **54b** (98%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.30 (3H, s), 4.70 (2H, s), 7.15–7.20 (1H, m), 7.55–7.60 (2H, m), 10.95 (1H, brs).

6-[4-(4-Fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (49).

アルゴン雰囲気下, **54a** (158 mg, 0.513 mmol), 4-フルオロフェニルボロン酸 (215 mg, 1.54 mmol), ビス(トリ-*tert*-ブチルホスフィン)パラジウム(0) (13.1 mg, 0.025 mmol) およびリン酸三カリウム (1.05 g, 4.87 mmol) の 1,4-ジオキサン (5 mL) 溶液を 90 °C で 12 時間攪拌後, 水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥後, 減圧濃縮した. 得られた残渣にヘキサンとアセトニトリルを加え攪拌し, 析出物をろ取りして **49** (89.0 mg, 54%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.30 (3H, s), 4.69 (2H, s), 6.72 (1H, dd, $J = 2.0, 8.6$ Hz), 6.78 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.02–7.10 (2H, m), 7.16–7.22 (2H, m), 7.26 (1H, s), 7.52 (1H, s), 10.56 (1H, brs). Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}_2$: C, 66.87; H, 4.36; N, 13.00. Found: C, 66.57; H, 4.52; N, 13.04.

6-[4-(4-Fluorophenyl)-5-methyl-1,2-oxazol-3-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (50).

49 の合成と同様の方法により **50** (74%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.15 (3H, s), 4.62 (2H, s), 6.95–6.99 (2H, m), 7.07 (1H, s), 7.30–7.35 (2H, m), 7.37–7.42 (2H, m), 10.84 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_3$: C, 66.66; H, 4.04; N, 8.64. Found: C, 66.40; H, 4.16; N, 8.55.

3-(Dimethylamino)-1-(4-fluorophenyl)prop-2-en-1-one (55).

4-フルオロフェニルメチルケトン (2.00 g, 14.5 mmol) と DMFDMA (4 mL) の混合液を 2 時間加熱還流した後、減圧濃縮した。得られた残渣にヘキサンを加え、析出物をろ取り **55** (0.89 g, 32%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.92 (3H, s), 3.14 (3H, s), 5.82 (1H, d, *J* = 12.2 Hz), 7.21–7.27 (2H, m), 7.71 (1H, d, *J* = 12.2 Hz), 7.96 (2H, dd, *J* = 5.7, 8.9 Hz).

1-(4-Fluorophenyl)butane-1,3-dione (**56a**).

60%水素化ナトリウム (43.4 g, 1.81 mol) の THF (1.5 L) 溶液に、4-フルオロフェニルメチルケトン (50.0 g, 0.361 mol) を室温に加え、反応液を室温で 30 分攪拌後、酢酸エチル (127.6 g, 1.45 mmol) を加えた。反応液を 40 °C で 3 時間攪拌し、1 N 塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を 1 N 塩酸および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をヘキサンから再結晶し **56a** (48.3 g, 74%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.19 (3H, s), 6.13 (1H, s), 7.01–7.18 (2H, m), 7.82–7.96 (2H, m), 16.15 (1H, brs).

5-(4-Fluorophenyl)-1-methyl-1*H*-pyrazole (**57a**).

55 (800 mg, 4.14 mmol) およびメチルヒドラジン (257 μL, 4.88 mmol) のエタノール (8 mL) 溶液を 4 時間加熱還流させ、減圧濃縮した。得られた残渣を塩基性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **57a** (592 mg, 81%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.83 (3H, s), 6.39 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.31–7.40 (2H, m), 7.46 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.58 (2H, dd, *J* = 5.5, 8.9 Hz).

5-(4-Fluorophenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole (**57c**).

56a (12.6 g, 69.9 mmol), メチルヒドラジン (6.4 g, 139 mmol), TFA (10.7 mL, 144 mmol), TEA (19.4 mL, 139 mmol) の 2-プロパノール (350 mL) 溶液を 80 °C で 1 時間攪拌後、減圧濃縮した。得られた残渣に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **57c** (10.0 g, 75%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.16 (3H, s), 3.74 (3H, s), 6.16 (1H, s), 7.27–7.40 (2H, m), 7.54 (2H, dd, *J* = 5.5, 8.7 Hz).

5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazole (**57b**).

57c の合成と同様の方法により **57b** (72%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.32 (3H, s),

6.30–6.31 (1H, m), 7.03–7.10 (2H, m), 7.66–7.71 (2H, m), 10.5 (1H, brs).

1-Ethyl-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (57e).

57c の合成と同様の方法により 57e (90%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.26 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.17 (3H, s), 3.99 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 6.11 (1H, s), 7.27–7.37 (2H, m), 7.43–7.54 (2H, m).

1-Allyl-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (57f).

57c の合成と同様の方法により 57f (95%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.18 (3H, s), 4.57–4.69 (2H, m), 4.86 (1H, dd, *J* = 1.5, 17.0 Hz), 5.11 (1H, dd, *J* = 1.5, 10.5 Hz), 5.85–6.01 (1H, m), 6.19 (1H, s), 7.31 (2H, t, *J* = 9.0 Hz), 7.43–7.53 (2H, m).

1-Benzyl-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (57h).

57c の合成と同様の方法により 57h (88%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.31 (3H, s), 5.22 (2H, s), 6.09 (1H, s), 6.94–7.07 (4H, m), 7.16–7.33 (5H, m).

5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazole (57i).

57c の合成と同様の方法により 57i (39%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.37 (3H, s), 6.27 (1H, s), 6.91–7.00 (2H, m), 7.13–7.21 (2H, m), 7.21–7.34 (5H, m).

2-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]ethanol (57j).

57c の合成と同様の方法により 57j (97%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.18 (3H, s), 3.75 (2H, q, *J* = 5.5 Hz), 3.98 (2H, t, *J* = 5.5 Hz), 4.92 (1H, t, *J* = 5.0 Hz), 6.12 (1H, s), 7.25–7.40 (2H, m), 7.51–7.67 (2H, m).

3-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]propan-1-ol (57k).

57c の合成と同様の方法により 57k (77%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.85 (2H, quin, *J* = 6.7 Hz), 2.17 (3H, s), 3.25–3.39 (2H, m), 4.03 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.46–4.50 (1H, m), 6.11 (1H, s), 7.31 (2H, t, *J* = 8.7 Hz), 7.49 (2H, t, *J* = 2.8 Hz).

1-[4-(Benzyloxy)butyl]-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (57l).

57c の合成と同様の方法により 57l (49%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.40–1.65 (2H, m), 1.81–1.93 (2H, m), 2.29 (3H, s), 3.37 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 4.02 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.41 (2H, s),

6.00 (1H, s), 7.03–7.12 (2H, m), 7.23–7.35 (7H, m).

2-{{[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]methyl}pyridine (57m).

57c の合成と同様の方法により **57m** (30%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.34 (3H, s), 5.49 (2H, s), 6.19 (1H, s), 6.99–7.10 (3H, m), 7.27–7.37 (3H, m), 7.73–7.82 (1H, m), 8.61 (1H, d, *J* = 4.9 Hz).

3-{{[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]methyl}pyridine (57n).

57c の合成と同様の方法により **57n** (19%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.32 (3H, s), 5.34 (2H, s), 6.16 (1H, s), 7.07–7.17 (2H, m), 7.22–7.30 (2H, m), 7.48–7.56 (1H, m), 7.72 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 8.28–8.40 (1H, m), 8.63 (1H, d, *J* = 4.0 Hz).

4-{{[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]methyl}pyridine (57o).

57c の合成と同様の方法により **57o** (33%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.21 (3H, s), 5.31 (2H, s), 6.26 (1H, s), 6.92–6.94 (2H, m), 7.24–7.43 (4H, m), 8.46–8.48 (2H, m).

5-(2,4-Difluorophenyl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazole (57d).

2,4-ジフルオロフェニルメチルケトン (2.00 g, 12.8 mmol) の THF (100 mL) 溶液に、ヘキサメチルジシラザンリチウム の THF (1.1 M, 12.8 mL, 14.1 mmol) 溶液を−25°C で滴下した。反応液を−25°C で1時間攪拌後、−78°C に冷却し、アセチルクロリド (1.19 mL, 16.8 mmol) を加えた。反応液を3時間攪拌し、1 N 塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、**56b** を得た。得られた **56b** の粗精製物に、2-プロパノール (100 mL), TFA (1.99 mL, 26.8 mmol), メチルヒドラジン (1.35 mL, 25.6 mmol) および TEA (3.61 mL, 25.6 mmol) を加えた。反応液を80°C で30分攪拌後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **57d** (0.63 g, 25% in 2 steps) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.18 (3H, s), 3.62 (3H, s), 6.17 (1H, s), 7.23 (1H, td, *J* = 2.5, 8.4 Hz), 7.43–7.60 (2H, m).

5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1-propyl-1H-pyrazole (57g).

水素雰囲気下、**57f** (2.00 g, 9.24 mmol) と10%パラジウム炭素 (300 mg) のメタノール (50

mL) 溶液を室温で 12 時間攪拌した。反応液をろ過し、ろ液を減圧濃縮し **57g** を得た。得られた **57g** は粗精製物のまま次の反応に用いた。

4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazole (58b).

57c (5.00 g, 26.3 mmol) と NBS (4.68 g, 26.3 mmol) のアセトニトリル (40 mL) 溶液を室温で 10 分攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を塩基性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **58b** (2.11 g, 30%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.17 (3H, s), 3.69 (3H, s), 7.35–7.40 (2H, m), 7.54 (2H, dd, *J* = 5.7, 8.7 Hz).

4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-1-methyl-1H-pyrazole (58a).

58b の合成と同様の方法により **58a** (39%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.76 (3H, s), 7.40 (2H, t, *J* = 8.9 Hz), 7.56 (2H, dd, *J* = 5.5, 8.9 Hz), 7.66 (1H, s).

4-Bromo-5-(2,4-difluorophenyl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazole (58c).

58b の合成と同様の方法により **58c** (82%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.18 (3H, s), 3.63 (3H, s), 7.30 (1H, td, *J* = 1.9, 8.5 Hz), 7.43–7.62 (2H, m).

4-Bromo-1-ethyl-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (58d).

58b の合成と同様の方法により **58d** (99%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.21 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.18 (3H, s), 3.96 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 7.34–7.45 (2H, m), 7.45–7.54 (2H, m).

4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1-propyl-1H-pyrazole (58e).

58b の合成と同様の方法により **58e** (99% in 2 steps) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.69 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.54–1.70 (2H, m), 2.18 (3 H, s), 3.90 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 7.39 (2H, t, *J* = 9.0 Hz), 7.48 (2H, dd, *J* = 5.5, 9.0 Hz).

1-Benzyl-4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (58f).

58b の合成と同様の方法により **58f** (80%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.30 (3H, s), 5.17 (2H, s), 6.97 (2H, dd, *J* = 1.9, 5.4 Hz), 7.02–7.12 (2H, m), 7.18–7.27 (5H, m).

4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazole (58g).

58b の合成と同様の方法により **58g** (88%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.38 (3H, s), 6.97–7.07 (2H, m), 7.15–7.33 (7H, m).

3-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]propan-1-ol (**58h**).

58b の合成と同様の方法により **58h** (95%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.80 (2H, quin, *J* = 6.5 Hz), 2.18 (3H, s), 3.22–3.34 (2H, m), 3.99 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 4.43–4.48 (1H, m), 7.34–7.44 (2H, m), 7.50 (2H, dd, *J* = 5.5, 8.7 Hz).

1-[4-(Benzyloxy)butyl]-4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazole (**58i**).

58b の合成と同様の方法により **58i** (87%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.42–1.55 (2H, m), 1.75–1.87 (2H, m), 2.28 (3H, s), 3.36 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 3.90 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.41 (2H, s), 7.09–7.18 (2H, m), 7.23–7.36 (7H, m).

2-[[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]methyl]pyridine (**58j**).

58b の合成と同様の方法により **58j** (69%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.32 (3H, s), 5.31 (2H, s), 6.93 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.05–7.21 (3H, m), 7.31–7.40 (2H, m), 7.58–7.68 (1H, m), 8.52 (1H, d, *J* = 4.2 Hz).

3-[[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]methyl]pyridine (**58k**).

58b の合成と同様の方法により **58k** (55%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.31 (3H, s), 5.26 (2H, s), 7.12–7.22 (2H, m), 7.22–7.31 (2H, m), 7.41–7.50 (1H, m), 7.64 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 8.36 (1H, s), 8.63 (1H, s).

4-[[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]methyl]pyridine (**58l**).

58b の合成と同様の方法により **58l** (43%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.33 (3H, s), 5.31 (2H, s), 7.08–7.32 (6H, m), 8.66 (2H, s).

6-[5-(4-Fluorophenyl)-1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (**51**).

アルゴン雰囲気下, **58a** (500 mg, 1.96 mmol), **59a** (647 mg, 2.35 mmol), [1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]パラジウム(II)ジクロリド ジクロロメタン付加物 (160 mg, 0.196 mmol) および炭酸セシウム (1.92 g, 5.89 mmol) のTHF/水 (8 mL/ 2 mL) 溶液を18時間加熱還流した後, 飽和食塩水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を飽和食塩水で洗浄後, 無水

硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を塩基性シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）により精製し、ヘキサンと酢酸エチルの混合液から再結晶し**51** (196 mg, 31%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.68 (3H, s), 4.51 (2H, s), 6.59–6.73 (2H, m), 6.82 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.24–7.49 (4H, m), 7.66 (1H, s), 10.62 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₈H₁₄FN₃O₂: C, 66.87; H, 4.36; N, 13.00. Found: C, 66.77; H, 4.34; N, 12.93.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (52a).

51 の合成と同様の方法により **52a** (22%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.17 (3H, s), 3.64 (3H, s), 4.53 (2H, s), 6.57 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.83 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.18–7.42 (4H, m), 10.58 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₆FN₃O₂: C, 67.65; H, 4.78; N, 12.46. Found: C, 67.62; H, 4.74; N, 12.46.

6-[5-(2,4-Difluorophenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (52b).

51 の合成と同様の方法により **52a** (48%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.20 (3H, s), 3.59 (3H, s), 4.53 (2H, s), 6.58 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz), 6.64 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.83 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.18 (1H, td, *J* = 2.1, 8.6 Hz), 7.31–7.47 (2H, m), 10.59 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅F₂N₃O₂: C, 64.22; H, 4.25; N, 11.83. Found: C, 64.09; H, 4.21; N, 11.75.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-8-methyl-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (52c).

51 の合成と同様の方法により **52c** (12%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.06 (3H, s), 2.16 (3H, s), 3.64 (3H, s), 4.54 (2H, s), 6.45 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.51 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.18–7.41 (4H, m), 10.51 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₈FN₃O₂: C, 68.36; H, 5.16; N, 11.96. Found: C, 68.23; H, 5.16; N, 11.86.

6-[1-Ethyl-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60a).

51 の合成と同様の方法により **60a** (28%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.24 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.19 (3H, s), 3.91 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 4.53 (2H, s), 6.57 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.19–7.36 (4H, m), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₈FN₃O₂: C, 68.36; H, 5.16; N, 11.96. Found: C, 68.58; H, 5.39; N, 11.72.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60b).

51 の合成と同様の方法により **60b** (36%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.73 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.57–1.73 (2H, m), 2.19 (3H, s), 3.84 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 4.53 (2H, s), 6.56 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.22–7.35 (4H, m), 10.60 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₁H₂₀FN₃O₂: C, 69.03; H, 5.52; N, 11.50. Found: C, 69.04; H, 5.51; N, 11.50.

6-[1-Benzyl-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60c).

51 の合成と同様の方法により **60c** (38%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.21 (3H, s), 4.53 (2H, s), 5.15 (2H, s), 6.59 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.3 Hz), 6.68 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.82 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.97 (2H, dd, *J* = 1.5, 7.9 Hz), 7.19–7.32 (7H, m), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₅H₂₀FN₃O₂: C, 72.63; H, 4.88; N, 10.16. Found: C, 72.61; H, 4.94; N, 10.07.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60d).

51 の合成と同様の方法により **60d** (16%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.26 (3H, s), 4.56 (2H, s), 6.59–6.75 (2H, m), 6.68 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.10–7.23 (6H, m), 7.27–7.39 (3H, m), 10.65 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₄H₁₈FN₃O₂: C, 72.17; H, 4.54; N, 10.52. Found: C, 72.18; H, 4.58; N, 10.48.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-1-(3-hydroxypropyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60e).

51 の合成と同様の方法により **60e** (17%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.73–1.90 (2H, m), 2.18 (3H, s), 3.27–3.40 (2H, m), 3.94 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.47 (1H, t, *J* = 4.9 Hz), 4.53 (2H, s), 6.56 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz), 6.64 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.17–7.41 (4H, m), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₁H₂₀FN₃O₃: C, 66.13; H, 5.29; N, 11.02. Found: C, 65.89; H, 5.16; N, 10.80.

6-{1-[4-(Benzyloxy)butyl]-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl}-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60f).

51 の合成と同様の方法により **60f** (44%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.47–1.59 (2H, m), 1.81–1.92 (2H, m), 2.30 (3H, s), 3.38 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 3.99 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 4.22 (2H, s), 4.57 (2H, s), 6.43 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.65 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz), 6.84 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.98–7.08 (2H,

m), 7.11–7.18 (2H, m), 7.22–7.36 (5H, m), 7.97 (1H, s).

6-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1-(pyridin-2-ylmethyl)-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60h).

51 の合成と同様の方法により **60h** (52%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.20 (3H, s), 4.54 (2H, s), 5.22 (2H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.69 (1H, s), 6.83 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.16–7.37 (5H, m), 7.68–7.82 (1H, m), 8.49 (1H, d, *J* = 4.5 Hz), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₄H₁₉FN₄O₂: C, 69.55; H, 4.62; N, 13.52. Found: C, 69.28; H, 4.66; N, 13.13.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1-(pyridin-3-ylmethyl)-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60i).

51 の合成と同様の方法により **60i** (21%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.21 (3H, s), 4.53 (2H, s), 5.20 (2H, s), 6.60 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.3 Hz), 6.68 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.82 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.21–7.35 (5H, m), 7.37–7.44 (1H, m), 8.19 (1H, s), 8.45 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₄H₁₉FN₄O₂·0.1(EtOAc): C, 69.24; H, 4.72; N, 13.24. Found: C, 68.92; H, 4.69; N, 13.16.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1-(pyridin-4-ylmethyl)-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60j).

51 の合成と同様の方法により **60j** (5%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.22 (3H, s), 4.54 (2H, s), 5.20 (2H, s), 6.62 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.3 Hz), 6.69 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.96 (2H, d, *J* = 6.1 Hz), 7.20–7.25 (4H, m), 8.47 (2H, d, *J* = 6.1 Hz), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₄H₁₉FN₄O₂: C, 69.55; H, 4.62; N, 13.52. Found: C, 69.38; H, 4.75; N, 13.25.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-1-(4-hydroxybutyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (60g).

水素雰囲気下, **60f** (0.49 g, 1.01 mmol) と 10%パラジウム炭素 (0.1 g) のエタノール (30 mL) 溶液を室温で5時間攪拌し, 50 °C で18時間攪拌した。反応液をろ過し, ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣を, 酢酸エチルとヘキサンの混合液から再結晶し **60g** (0.35 g, 88%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.10–1.37 (2H, m), 1.60–1.73 (2H, m), 2.18 (3H, s), 3.23–3.34 (2H, m), 3.88 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.34 (1H, t, *J* = 5.1 Hz), 4.52 (2H, s), 6.55 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz), 6.64

(1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.21–7.32 (4H, m), 10.58 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{22}H_{22}FN_3O_3$: C, 66.82; H, 5.61; N, 10.63. Found: C, 66.92; H, 5.71; N, 10.50.

8-Methyl-6-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (59b)

4-ブロモ-2-メチル-6-ニトロフェノール (9.40 g, 40.5 mmol), ブロモ酢酸メチル (6.50 g, 42.5 mmol) および炭酸カリウム (8.40 g, 60.8 mmol) の DMSO (50 mL) 溶液を室温で 48 時間攪拌した後、水および 10% 塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をヘキサンで洗浄し、4-ブロモ-2-メチル-6-ニトロフェノキシ酢酸メチル (9.86 g, 80%) を得た。4-ブロモ-2-メチル-6-ニトロフェノキシ酢酸メチル (10.9 g, 35.8 mmol) と亜鉛粉末 (35.0 g, 535 mmol) の酢酸/THF (100 mL/ 200 mL) 溶液を 45 °C で 30 分攪拌後、1 時間加熱還流した。反応液をろ過後、ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣に、ヘキサンおよびメタノールを加え、析出物をろ取り 6-ブロモ-8-メチル-2H-1,4-ベンゾオキサジン-3(4H)-オン (5.80 g, 70%) を得た。アルゴン雰囲気下、6-ブロモ-8-メチル-2H-1,4-ベンゾオキサジン-3(4H)-オン (2.00 g, 8.3 mmol), ビスピナコラートジボロン (2.30 g, 9.1 mmol), [1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]パラジウム(II)ジクロリド ジクロロメタン付加物 (0.34 g, 0.42 mmol) および酢酸カリウム (2.90 g, 29.5 mmol) の 1,4-ジオキサン (50 mL) 溶液を 90 °C で 12 時間攪拌し、水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣にジイソプロピルエーテルを加えて攪拌し、析出物をろ取りして **59b** (2.36 g, 98%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.27 (12H, s), 2.15 (3H, s), 4.61 (2H, s), 7.06 (1H, s), 7.13 (1H, s), 10.61 (1H, s).

6-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (59a)

59b の合成と同様の方法により **59a** (7% in 3 steps) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.33 (12H, s), 4.64 (2H, s), 6.96 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.21 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 7.44 (1H, dd, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.90 (1H, brs).

***tert*-Butyl-2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinecarboxylate (62a).**

61a (5.00 g, 46.7 mmol) と *tert*-ブチルカルバゼート (7.40 g, 56.0 mmol) のエタノール (50 mL) 溶液を室温で3時間攪拌し、減圧濃縮した。得られた残渣にジイソプロピルエーテルを加え攪拌し、ろ取して **62a** (5.60 g, 55%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.55 (9H, s), 7.21–7.28 (1H, m), 7.65–7.73 (1H, m), 7.94 (1H, s), 8.07 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 8.36 (1H, s), 8.53–8.59 (1H, m).

***tert*-Butyl-2-(pyridin-3-ylmethylene)hydrazinecarboxylate (62b).**

62a の合成と同様の方法により **62b** (90%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (9H, s), 7.27–7.34 (1H, m), 7.95 (1H, s), 8.09–8.16 (1H, m), 8.57 (1H, dd, *J* = 1.7, 4.9 Hz), 8.74 (1H, d, *J* = 1.9 Hz).

***tert*-Butyl-2-(pyridin-4-ylmethylene)hydrazinecarboxylate (62c).**

62a の合成と同様の方法により **62c** (62%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (9H, s), 7.51–7.57 (2H, m), 7.87 (1H, s), 8.59–8.64 (2H, m), 8.74 (1H, s).

2-(Hydrazinomethyl)pyridine trifluoroacetate (63a).

62a (3.00 g, 13.6 mmol) のシアノ水素化ホウ素ナトリウム (0.85 g, 13.6 mmol) の酢酸/水 (15 mL/ 15 mL) 溶液を室温で2時間攪拌した。反応液に1 N水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をジクロロメタンに溶解し、TFAを加えた。反応液を室温で2時間攪拌し、減圧濃縮して **63a** を得た。得られた **63a** は粗精製物のまま次の反応に用いた。

3-(Hydrazinomethyl)pyridine trifluoroacetate (63b).

63a の合成と同様の方法により **63b** を得、粗精製物のまま次の反応に用いた。

4-(Hydrazinomethyl)pyridine trifluoroacetate (63c).

63a の合成と同様の方法により **63c** を得、粗精製物のまま次の反応に用いた。

[4-(Benzyloxy)butyl]hydrazine hydrochloride (64).

ヒドラジン一水和物 (11.6 g, 231 mmol) と水酸化ナトリウム (2.01 g, 50 mmol) の混合液に、**63** (10 g, 50 mmol) を 95 °C で加えた。反応液を室温で2時間攪拌し、減圧濃縮した。得られ

た残渣に濃塩酸 (5 mL) と水 (120 mL) を加え、ジエチルエーテルで抽出した。抽出物を減圧濃縮して **64** (9.60 g, 83%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.50–1.77 (4H, m), 2.86–3.05 (2H, m), 3.43 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 4.45 (2H, s), 6.60 (3H, brs), 7.23–7.37 (5H, m).

4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (65).

58b の合成と同様の方法により **65** (98%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.25 (3H, s), 7.01–7.17 (2H, m), 7.65–7.81 (2H, m), 8.97 (1H, brs).

4-Bromo-1-butyl-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (66a).

65 (600 mg, 3.41 mmol), 1-ブタノール (523 mg, 7.06 mmol) およびトリフェニルホスフィン (1.8 g, 6.86 mmol) の THF (6 mL) 溶液に、ジイソプロピルアゾジカルボキシラートのトルエン (1.9 M, 3.7 mL, 7.03 mmol) 溶液を 60 °C で加えた。反応液を 30 分攪拌後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣にジイソプロピルエーテルを加え攪拌し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **66a** (211 mg, 20%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.73 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.03–1.17 (2H, m), 1.52–1.63 (2H, m), 2.18 (3H, s), 3.94 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 7.33–7.43 (2H, m), 7.45–7.54 (2H, m).

4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-1-isobutyl-3-methyl-1H-pyrazole (66b).

66a の合成と同様の方法により **66b** (11%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.67 (6H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.87–2.02 (1H, m), 2.19 (3H, s), 3.77 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.31–7.43 (2H, m), 7.43–7.53 (2H, m).

4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1-(4,4,4-trifluorobutyl)-1H-pyrazole (66c).

66a の合成と同様の方法により **66c** (30%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.86 (2H, quin, *J* = 7.5 Hz), 2.07–2.18 (2H, m), 2.19 (3H, s), 4.02 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 7.28–7.45 (2H, m), 7.46–7.56 (2H, m).

6-[1-Butyl-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-4-yl]-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (67a).

51 の合成と同様の方法により **67a** (43%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.75 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.04–1.25 (2H, m), 1.52–1.69 (2H, m), 2.19 (3H, s), 3.88 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.53 (2H, s),

6.56 (1H, dd, $J = 2.1, 8.3$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.21–7.34 (4H, m), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{22}H_{22}FN_3O_2$: C, 69.64; H, 5.84; N, 11.07. Found: C, 69.63; H, 5.72; N, 11.10.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-1-isobutyl-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (67b).

51の合成と同様の方法により 67b (43%) を得た。 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.70 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.88–2.16 (1H, m), 2.19 (3H, s), 3.71 (2H, d, $J = 7.2$ Hz), 4.53 (2H, s), 6.56 (1H, dd, $J = 1.9, 8.3$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.24–7.32 (4H, m), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{22}H_{22}FN_3O_2$: C, 69.64; H, 5.84; N, 11.07. Found: C, 69.45; H, 5.84; N, 11.05.

6-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1-(4,4,4-trifluorobutyl)-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (67c).

51の合成と同様の方法により 67c (5%) を得た。 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.89 (2H, m), 2.10–2.33 (5H, m), 3.96 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 4.53 (2H, s), 6.58 (1H, dd, $J = 1.9, 8.3$ Hz), 6.66 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.82 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.22–7.40 (4H, m), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{22}H_{19}F_4N_3O_2$: C, 60.97; H, 4.42; N, 9.70. Found: C, 60.59; H, 4.16; N, 9.65.

1-(2-Azidoethyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazole (68).

57j (5.35 g, 24.3 mmol) と TsCl (6.00 g, 31.5 mmol) のピリジン (30 mL) 溶液を室温で12時間攪拌後、1 N HCl を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を1 N 塩酸および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣に DMF (30 mL) および NaN_3 (2.05 g, 31.5 mmol) を室温に加え、反応液を 50 °C で6時間攪拌後、室温で48時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し 68 (4.94 g, 83%) を得た。 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.20 (3H, s), 3.66 (2H, t, $J = 5.5$ Hz), 4.14 (2H, t, $J = 5.5$ Hz), 6.18 (1H, s), 7.34 (2H, t, $J = 9.0$ Hz), 7.51 (2H, dd, $J = 5.5, 9.0$ Hz).

***N*-{2-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]ethyl}acetamide (69a).**

68 (1.00 g, 4.08 mmol) の THF (25 mL) 溶液に、トリフェニルホスフィン (1.28 g, 4.88 mmol)

を室温で加えた。反応液を室温で 30 分攪拌し、水 (360 μ L, 20.0 mmol) を加えた。反応液を 50 $^{\circ}$ C で 12 時間攪拌し、1 N 塩酸と酢酸エチルを加えた。8 N 水酸化ナトリウムを用いて水層を塩基性にした後に酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をピリジン (15 mL) に溶解させ、無水酢酸 (15 mL) を加えた。反応液を室温で 3 時間攪拌し、減圧濃縮した。得られた残渣を DMF (30 mL) に溶解させ、NBS (871 mg, 4.89 mmol) を 0 $^{\circ}$ C で加えた。反応液を室温で 30 分攪拌後、チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **69a** (1.30 g, 94% in 3 steps) を得た。 1 H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.65 (3H, s), 2.20 (3H, s), 3.27 (2H, q, J = 6.0 Hz), 3.97 (2H, t, J = 6.0 Hz), 7.37 (2H, t, J = 9.0 Hz), 7.45 (2H, dd, J = 5.5, 9.0 Hz), 7.87 (1H, t, J = 6.0 Hz).

***N*-{2-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]ethyl}methanesulfonamide (69b).**

68 (3.84 g, 15.7 mmol) と NBS (3.35 g, 18.8 mmol) の DMF (50 mL) 溶液を室温で 30 分攪拌した後、チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し 1-(2-azidoethyl)-4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazole (4.94 g, 97%) を得た。1-(2-Azidoethyl)-4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazole (800 mg, 2.46 mmol) の THF (20 mL) 溶液に、トリフェニルホスフィン (774 mg, 2.95 mmol) を室温で加えた。反応液を室温で 30 分攪拌し、水 (220 μ L, 12.2 mmol) を加えた。反応液を 50 $^{\circ}$ C で 12 時間攪拌し、1 N 塩酸と酢酸エチルを加えた。8 N 水酸化ナトリウムを用いて水層を塩基性にした後に酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をピリジン (5 mL) に溶解させ、MsCl (285 μ L, 3.68 mmol) を加えた。反応液を室温で 12 時間攪拌し、1 N 塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **69b** (760 mg, 82%) を得た。 1 H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.20 (3H, s),

2.79 (3H, s), 3.27 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 4.02 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 7.14 (1H, brs), 7.38 (2H, t, $J = 9.0$ Hz), 7.51 (2H, dd, $J = 5.5, 9.0$ Hz).

***N*-{2-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-4-(3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl]ethyl}acetamide (70a).**

51の合成と同様の方法により **70a** (44%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.69 (3H, s), 2.20 (3H, s), 3.32 (2H, q, $J = 6.0$ Hz), 3.90 (2H, t, $J = 6.0$ Hz), 4.53 (2H, s), 6.56 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz), 6.66 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.20–7.34 (4H, m), 7.94 (1H, t, $J = 6.0$ Hz), 10.61 (1H, brs). Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{FN}_4\text{O}_3$: C, 64.70; H, 5.18; N, 13.72. Found: C, 65.05; H, 5.53; N, 13.38.

***N*-{2-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-4-(3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl]ethyl}methanesulfonamide (70b).**

51の合成と同様の方法により **70b** (33%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.20 (3H, s), 2.81 (3H, s), 3.25–3.33 (2H, m), 3.97 (2H, t, $J = 6.5$ Hz), 4.53 (2H, s), 6.57 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz), 6.61–6.68 (1H, m), 6.82 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.18 (1H, t, $J = 6.0$ Hz), 7.22–7.41 (4H, m), 10.60 (1H, brs). Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{FN}_4\text{O}_4\text{S}$: C, 56.75; H, 4.76; N, 12.61. Found: C, 56.46; H, 4.70; N, 12.29.

3-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]propanenitrile (71).

58bの合成と同様の方法により **71** (69%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.19 (3H, s), 3.68 (2H, q, $J = 5.5$ Hz), 4.00 (2H, t, $J = 5.5$ Hz), 4.89 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 7.32–7.43 (2H, m), 7.50–7.61 (2H, m).

3-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]propanenitrile (72).

71 (600 mg, 3.41 mmol), トリブチルホスフィン (1.25 mL, 5.01 mmol), 90%アセトンシアノヒドリン (0.44 mL, 4.34 mmol) のトルエン (25 mL) 溶液に, ADDP のトルエン (1.9 M, 1.3 g, 5.01 mmol) 溶液を 0°C で加えた。反応液室温で 12 時間攪拌後, 水を加え, 酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **72** (781 mg, 76%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.21 (3H, s), 2.98 (2H, t, $J = 6.5$ Hz), 4.18

(2H, t, $J = 6.5$ Hz), 7.37–7.46 (2H, m), 7.47–7.56 (2H, m).

3-[5-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-4-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)-1H-pyrazol-1-yl]propanenitrile (73).

51 の合成と同様の方法により **73** (43%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.21 (3H, s), 3.01 (2H, t, $J = 6.5$ Hz), 4.12 (2H, t, $J = 6.5$ Hz), 4.54 (2H, s), 6.59 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz), 6.66 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.83 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.23–7.40 (4H, m), 10.60 (1H, brs). Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}_2$: C, 67.01; H, 4.55; N, 14.89. Found: C, 66.67; H, 4.68; N, 14.49.

1-(Benzyloxy)-3-[5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]propan-2-ol (75b).

ベンジルグリシジルエーテル (25.0 g, 152 mmol) にヒドラジン (100 g) を 60°C で加え、反応液を 60°C で3時間攪拌し、減圧濃縮し 1-(benzyloxy)-3-hydrazinopropan-2-ol (29.6 g) を粗精製物として得た。 **56a** (5.00 g, 27.8 mmol), メタノール (50 mL) および濃塩酸 (2.80 mL) の混合溶液に、1-(benzyloxy)-3-hydrazinopropan-2-ol (6.60 g, 33.6 mmol) を 0°C で加え室温で12時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣に水と酢酸エチルを加えた。炭酸カリウムを用いて水層を塩基性にした後、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **75b** (6.21 g, 66%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.29 (3H, s), 3.29–3.38 (1H, m), 3.48–3.56 (1H, m), 4.06–4.25 (3H, m), 4.45 (2H, s), 4.53 (1H, s), 6.07 (1H, s), 7.00–7.10 (2H, m), 7.15–7.22 (2H, m), 7.25–7.41 (5H, m).

1-(Benzyloxy)-3-[5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]propan-2-ol (75a).

75b の合成と同様の方法により **75a** を得た。得られた **75a** は粗精製物のまま次の反応に用いた。

4-(Benzyloxy)-1-[5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]butan-2-ol (75c).

75b の合成と同様の方法により **75c** (47%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.62–1.73 (2H, m), 2.29 (3H, s), 3.53–3.69 (2H, m), 3.91–4.01 (1H, m), 4.10 (1H, dd, $J = 3.0, 14.0$ Hz), 4.15–4.26 (1H, m), 4.45 (2H, s), 4.48 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 6.06 (1H, s), 7.03–7.14 (2H, m), 7.22–7.41 (7H, m).

1-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]butan-2-ol (76a).

58bの合成と同様の方法により**76a** (4% in 3 steps) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.79 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.11–1.41 (2H, m), 2.19 (3H, s), 3.69–3.88 (3H, m), 4.87 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.37 (2H, t, *J* = 8.9 Hz), 7.56 (2H, dd, *J* = 5.6, 8.9 Hz).

1-(Benzyloxy)-3-[4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]propan-2-ol (76b).

58bの合成と同様の方法により**76b** (98%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.28 (3H, s), 3.33–3.42 (1H, m), 3.45–3.53 (1H, m), 3.90–4.22 (4H, m), 4.46 (2H, s), 7.04–7.44 (9H, m).

4-(Benzyloxy)-1-[4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]butan-2-ol (76c).

58bの合成と同様の方法により**76c** (96%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.62–1.72 (2H, m), 2.28 (3H, s), 3.53–3.68 (2H, m), 3.88–3.98 (1H, m), 4.03 (1H, dd, *J* = 3.2, 13.8 Hz), 4.14–4.26 (1H, m), 4.44 (2H, s), 7.09–7.19 (2H, m), 7.21–7.44 (7H, m).

1-(Benzyloxy)-3-[4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]acetone (77b).

76b (1.50 g, 3.58 mmol) のトルエン (30 mL) 溶液に, Dess–Martin 試薬 (2.00 g, 4.72 mmol) を 0 °C で加え, 室温で 12 時間攪拌した。反応液に, 酢酸エチル, チオ硫酸ナトリウム水溶液, および飽和重曹水を加え, 室温で 30 分攪拌した。抽出液を水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **77b** (1.39 g, 93%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.29 (3H, s), 4.05 (2H, s), 4.51 (2H, s), 4.98 (2H, s), 7.08–7.17 (2H, m), 7.22–7.43 (7H, m).

1-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]butan-2-one (77a).

77bの合成と同様の方法により**77a** (94%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.85 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.18 (3H, s), 2.37 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.99 (2H, s), 7.31–7.47 (4H, m).

4-(Benzyloxy)-1-[4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]butan-2-one (77c).

77bの合成と同様の方法により**77c** (99%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.30 (3H, s), 2.61 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.69 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.43 (2H, s), 4.82 (2H, s), 6.99–7.10 (2H, m), 7.19–7.38 (7H, m).

1-[3-(Benzyloxy)-2,2-difluoropropyl]-4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazole (78b).

77b (890 mg, 2.13 mmol) のトルエン (20 mL) 溶液に, DAST (700 mg, 4.34 mmol) を 0 °C で徐々に加えた. 40 °C で 6 時間攪拌後, 反応液に DAST (350 mg, 2.17 mmol) を加えた. 反応液を 40 °C で 24 時間攪拌後, 飽和重曹水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **78b** (622 mg, 66%) を得た. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.30 (3H, s), 3.68 (2H, t, *J* = 12.5 Hz), 4.44 (2H, t, *J* = 12.7 Hz), 4.58 (2H, s), 7.09–7.19 (2H, m), 7.23–7.40 (7H, m).

4-Bromo-1-(2,2-difluorobutyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazole (78a).

78bの合成と同様の方法により **78a** (71%) を得た. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.84 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.79 (2H, tt, *J* = 7.5, 17.7 Hz), 2.21 (3H, s), 4.45 (2H, t, *J* = 13.4 Hz), 7.34–7.43 (2H, m), 7.44–7.51 (2H, m).

1-[4-(Benzyloxy)-2,2-difluorobutyl]-4-bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazole (78c).

78b の合成と同様の方法により **78c** (39%) を得た. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.20 (2H, tt, *J* = 6.3, 16.3 Hz), 2.30 (3H, s), 3.60 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 4.31–4.47 (4H, m), 7.09–7.20 (2H, m), 7.22–7.39 (7H, m).

6-{1-[3-(Benzyloxy)-2,2-difluoropropyl]-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl}-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (79b).

アルゴン雰囲気下, **78b** (600 mg, 1.37 mmol), **59a** (490 mg, 1.78 mmol), [1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]パラジウム(II)ジクロリド ジクロロメタン付加物 (220 mg, 0.27 mmol) および炭酸セシウム (1.20 g, 3.69 mmol) の THF/水 (25 mL/5 mL) 溶液を 24 時間加熱還流した. 反応液に酢酸エチルを加えた後, ろ過した. 有機層を飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し, ジイソプロピルエーテルとヘキサンの混合液から再結晶し **79b** (420 mg, 61%) を得た. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.20 (3H, s), 3.74 (2H, t, *J* = 13.3 Hz), 4.41–4.57 (6H, m), 6.58 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz), 6.66 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.82 (1H, d,

$J = 8.2$ Hz), 7.18–7.40 (9H, m), 10.61 (1H, s).

6-[1-(2,2-Difluorobutyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (79a).

79b の合成と同様の方法により **79a** (40%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.86 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.71–1.96 (2H, m), 2.20 (3H, s), 4.38 (2H, t, $J = 13.3$ Hz), 4.53 (2H, s), 6.58 (1H, dd, $J = 2.1, 8.1$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.82 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.21–7.35 (4H, m), 10.61 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀F₃N₃O₂: C, 63.61; H, 4.85; N, 10.12. Found: C, 63.44; H, 4.83; N, 10.03.

6-{1-[4-(Benzyloxy)-2,2-difluorobutyl]-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl}-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (79c).

79b の合成と同様の方法により **79c** (55%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.11–2.31 (5H, m), 3.51 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 4.36–4.56 (6H, m), 6.58 (1H, dd, $J = 1.9, 8.3$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.82 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.18–7.39 (9H, m), 10.61 (1H, s).

6-[1-(2,2-Difluoro-3-hydroxypropyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (80a).

水素雰囲気下, **79b** (380 mg, 0.75 mmol) と 10%パラジウム炭素 (0.4 g) のメタノール/THF (8 mL/8 mL) 溶液を 50 °C で 12 時間攪拌した。反応液をろ過し, ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣にジイソプロピルエーテルを加えて攪拌し, 析出物をろ取して **80a** (275 mg, 88%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.20 (3H, s), 3.60 (2H, dt, $J = 6.3, 13.9$ Hz), 4.42 (2H, t, $J = 14.0$ Hz), 4.53 (2H, s), 5.53 (1H, t, $J = 6.3$ Hz), 6.58 (1H, dd, $J = 2.1, 8.3$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.82 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.21–7.35 (4H, m), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₁H₁₈F₃N₃O₃: C, 60.43; H, 4.35; N, 10.07. Found: C, 60.51; H, 4.32; N, 10.02.

6-[1-(2,2-Difluoro-4-hydroxybutyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (80b).

80a の合成と同様の方法により **80b** (70%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.93–2.14 (2H, m), 2.21 (3H, s), 3.45–3.55 (2H, m), 4.43 (2H, t, $J = 14.2$ Hz), 4.53 (2H, s), 4.69 (1H, t, $J = 5.1$ Hz), 6.58 (1H, dd, $J = 2.2, 8.2$ Hz), 6.66 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.21–7.33 (4H, m),

10.61 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀F₃N₃O₃: C, 61.25; H, 4.67; N, 9.74. Found: C, 61.34; H, 4.64; N, 9.62.

3-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]propanal (**81**).

58h (4.20 g, 13.4 mmol) と TEA (30 mL) の DMSO (42 mL) 溶液に、三酸化硫黄ピリジン錯体 (17.1 g, 107 mmol) を室温で加えた。反応液を室温で1時間攪拌し、氷水に注いだ。炭酸カリウムを加えて反応液を塩基性にし、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **81** (2.95 g, 70%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.26 (3H, s), 2.99 (2H, td, *J* = 0.9, 6.7 Hz), 4.27 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 7.15–7.25 (2H, m), 7.35–7.44 (2H, m), 9.74 (1H, t, *J* = 0.9 Hz).

4-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazol-1-yl]butan-2-one (**82**).

81 (1.00 g, 3.21 mmol) の THF (10 mL) 溶液に、メチルマグネシウムブロミドのジエチルエーテル (3 M, 1.60 mL, 4.8 mmol) 溶液を室温で滴下した。反応液を室温で30分攪拌し、氷水に注いだ。濃塩酸を加えた後、28%アンモニア溶液で水層を塩基性にし、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をトルエン (20 mL) に溶解させ、Dess–Martin 試薬 (1.80 g, 4.24 mmol) を 0 °C で加えた。反応液を室温で12時間攪拌後、チオ硫酸ナトリウム水溶液および飽和重曹水を加え室温で30分攪拌し、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **82** (0.80 g, 77%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.13 (3H, s), 2.27 (3H, s), 3.00 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 4.19 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 7.14–7.24 (2H, m), 7.36–7.44 (2H, m).

4-Bromo-1-(3,3-difluorobutyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole (**83**).

78a の合成と同様の方法により **83** (28%) を得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.51 (3H, t, *J* = 19.2 Hz), 2.19 (3H, s), 2.26–2.46 (2H, m), 4.10 (2H, dd, *J* = 6.7, 8.4 Hz), 7.40 (2H, t, *J* = 8.9 Hz), 7.46–7.56 (2H, m).

6-[1-(3,3-Difluorobutyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (84).

79bの合成と同様の方法により**84** (30%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.53 (3H, t, $J=19.2$ Hz), 2.19 (3H, s), 2.38 (2H, m), 4.00–4.11 (2H, m), 4.53 (2H, s), 6.57 (1H, dd, $J=2.1, 8.3$ Hz), 6.65 (1H, d, $J=2.1$ Hz), 6.82 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 7.24–7.39 (4H, m), 10.59 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$: C, 63.61; H, 4.85; N, 10.12. Found: C, 63.49; H, 4.77; N, 9.96.

4-[4-Bromo-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl]-2,2-difluorobutyl acetate (87).

82 (470 mg, 1.45 mmol) と TEA (4 mL) のトルエン (4 mL) 溶液に *tert*-ブチルジメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (535 mg, 2.02 mmol) を 0 °C で加えた. 反応液を 0 °C で 30 分攪拌し, 飽和重曹水を加えて, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣にトルエン (4 mL) を加えた後, 酢酸鉛(IV) (962 mg, 2.96 mmol) および炭酸カリウム (579 mg, 5.78 mmol) を加えた. 反応液を室温で 3 時間攪拌し, 飽和重曹水を加えて, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣を THF (4 mL) に溶解させ, TBAF の THF (1 M, 2.9 mL, 2.90 mmol) 溶液を加えた. 反応液を室温で 1 時間攪拌し, 飽和重曹水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 残渣にトルエン (3 mL) を加えた後, DAST (436 mg, 2.70 mmol) を室温で加えた. 反応液を 40 °C で 24 時間攪拌後, 氷水に注ぎ, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製し **87** (60 mg, 10% in 4 steps) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.05 (3H, s), 2.19 (3H, s), 2.33–2.49 (2H, m), 4.13 (2H, t, $J=7.3$ Hz), 4.23 (2H, t, $J=13.8$ Hz), 7.35–7.46 (2H, m), 7.47–7.56 (2H, m).

6-[1-(3,3-Difluoro-4-hydroxybutyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (88).

79bの合成と同様の方法により**88** (34%) を得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.19 (3H, s), 2.25–2.48 (2H, m), 3.51 (2H, dt, $J=6.3, 13.7$ Hz), 4.00–4.14 (2H, m), 4.53 (2H, s), 5.51 (1H, t, $J=6.2$ Hz), 6.57 (1H, dd, $J=2.1, 8.3$ Hz), 6.65 (1H, d, $J=2.1$ Hz), 6.82 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 7.22–7.42 (4H,

m), 10.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀F₃N₃O₃: C, 61.25; H, 4.67; N, 9.74. Found: C, 61.40; H, 4.65; N, 9.55.

薬理作用および薬物動態の評価方法

受容体への結合活性評価 (放射性リガンドの結合阻害試験)

Freestyle293細胞 (Invitrogen) を用いて調製したMRセルライゼート (45 µg) をTEGM bufferで希釈し、予め-20 °Cに冷却した結合試験用プレート (96-wellのhalf-wellポリプロピレンプレート (coming, #9876)) に45 µL/wellで分注した。そこに各濃度に希釈した化合物のDMSO溶液を0.5 µL添加した後、³H]-アルドステロン (終濃度 10 nM) を5 µL添加し、4 °Cで一晩静置した。各wellに活性炭懸濁液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.2], 1 mM EDTA, 5% charcoal, 0.5% dextran T-70, 0.1% gelatin) を35 µL添加し、4 °Cで10分間静置した。活性炭を遠心操作 (2000 rpm, 10 min, 4 °C) により沈殿させ、上清30 µLを測定用プレート (Optiplate™-96, Perkin Elmer Life Sciences) に分取した後、マイクロシンチ20を150 µL添加し、放射活性を測定した。0%コントロールのwellには非標識のアルドステロンを終濃度100 µMで添加し、100%コントロールのwellにはDMSOのみを添加した。また、すべてのwellのDMSO終濃度を1%に設定した。50%の結合阻害活性を示す化合物濃度 (IC₅₀値) は、Prism 3.0 (GraphPad Software Inc.) を用いて計算した。その他のステロイド受容体 (AR, PR, GR) に対する結合阻害試験は、上述のMRにおける結合阻害試験と同様の手法により実施した。各受容体に対する放射性リガンドは、それぞれ ³H]-テストステロン、³H]-プロゲステロン、³H]-デキサメタゾンを用いた。なお、PR結合阻害試験では、5 nMの³H]-プロゲステロンを用いた。

COS-1 細胞を用いた MR アゴニスト/アンタゴニスト活性評価

COS-1細胞を10% FBSおよび50 µg/mL gentamicinを含むD-MEM (lowglucose) を培地として、5x10⁶ cells/F150フラスコになるように50 mL播種し、一晩培養した後、培地を20 mLのOpti-MEMに置換した。次に、1液 (2.5 mL Opti-MEM, 100 µL Plus Reagent (invitrogen), 9 µg pMCMVneo-hMR, 5 µg pMAM-Luc, 1 µg pRL-TK) を室温で15分間静置した後、2液 (2.5 mL

Opti-MEM, 125 μ L Lipofectamin Reagent (invitrogen)) と混合し、さらに室温で15分間静置した後、上記の細胞に添加した。3時間後、反応培地 (0.1% BSA (fatty acid free) および50 μ g/mL gentamicinを含むD-MEM (low glucose)) を25 mL添加し、5% CO₂, 37 °Cの条件で一晩培養した。反応培地で3.3x10⁵ cells/mLになるように懸濁した細胞を、96-wellのhalf-wellホワイトプレート (coming#3688) に下記条件で播種した。アゴニスト活性を調べる際には、細胞を45 μ L/wellで播種し、反応培地で希釈した化合物を5 μ L/well添加した。また、アンタゴニスト活性を調べる際には、細胞を40 μ L/wellで播種し、反応培地で希釈した化合物およびアルドステロン (終濃度 1 nM) をそれぞれ5 μ L/well添加した。これらの細胞を5% CO₂, 37°Cの条件で一晩培養した後、培地を抜き取り、HBSSで2倍希釈したピッカジーンLT7.5 (東洋インキ) を20 μ L/well添加して、発光強度を測定した。尚、アゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を調べる際の100%コントロールのwellには終濃度1 nMのアルドステロンを添加し、0%コントロールのwellにはDMSOのみを添加した。また、すべてのwellのDMSO終濃度を0.1%に設定した。

***In vivo* MR 拮抗作用 (ラット尿中 Na⁺/K⁺比増加作用)**

Kagawaらの方法²⁷⁾を一部改変して試験を行った。6週齢の雄性Wistarラット (日本クレア株式会社) を使用し、実験前日から約16時間絶食絶水させた。実験当日、体重が均等になるようにラットを14n (10, 30, 100 mg/kg), スピロノラクトン (30 mg/kg, Sigma Aldrich) およびベヒクル投与の5群に分けた。各薬物は0.5%メチルセルロース (MC) 溶液に懸濁し、2 mL/kgの容量で強制経口投与した。被検薬物投与の0.5時間後にアルドステロン (3 μ g/kg, ACROS ORGANICS) を皮下投与した後、生理食塩水 (25 mgL/kg) を経口投与して代謝ケージに入れ、5時間尿を採取した。尿中のNa⁺およびK⁺濃度はEX-2000 (常光株式会社) を用いて測定した。尿中Na⁺濃度をK⁺濃度で割ることによりNa⁺/K⁺比を算出し、各群のNa⁺/K⁺比は実験毎にベヒクル (0.5% MC溶液) 投与群の値を1として標準化した。データはすべて平均値 \pm 標準誤差で示した。

DOCA/食塩高血圧ラットにおける降圧作用および抗アンドロゲン作用

6週齢の雄性Wistarラット (日本クレア株式会社) をペントバルビタール (50 mg/kg, *i.p.*) で麻酔し, deoxycorticosterone acetate (DOCA, SIGMA) の25 mg ペレットを背部皮下に埋め込んだ。手術後, 通常食を与え, 1%食塩水および水道水を給水し, 飼育した。3週間後, テールカフ法 (BP-98A, ソフトロン) で収縮期血圧 (SBP) および心拍数 (HR) を測定し, 高血圧症の進展を確認した。その後, 体重, SBP, HRが均等になるようにラットを4群に分け, ベヒクル (0.5% MC溶液) 投与群, 化合物**14n**あるいは**80a** (各100 mg/kg) 投与群, スピロノラクトン (100 mg/kg) 投与群とした (各群n = 8)。薬物は0.5%MC溶液に懸濁し, 1日1回強制経口投与し, 反復投与後にSBP, HRおよび精嚢重量を測定した。

(1) 化合物**14n** : 13日間投与し, 最終投与の約24時間後に, SBPおよびHRをテールカフ法で測定した。ベヒクル投与群の一例は, SBP値の異常な変動が見られたため解析から除外した。

データはすべて平均値±標準誤差で示した。

(2) 化合物**80a** : 7日間および14日間投与の約24時間後に, SBPおよびHRをテールカフ法で測定した。18日間投与の約24時間後に体重測定および剖検を行い, 精嚢の重量を測定した。データはすべて平均値±標準誤差で示した。

ラット肝ミクロソームにおける酸化的代謝に対する安定性試験

ラット肝ミクロソームは Xenotech, LLC 社から購入した。50 mmol/L リン酸緩衝溶液 (pH 7.4), 0.2 mg/mL 肝ミクロソーム, および 1 μ mol/L の試験化合物から 0.1 mL の試験化合物混合液を調製した。試験化合物混合液に NADPH 産生系 (50 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L glucose-6-phosphate, 5 mmol/L beta-NADP⁺, および 15 unit/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase) を加え反応を開始した。37 °C インキュベーション開始前または 20 分後に反応液と同量のアセトニトリルを添加し, インキュベーション前後のサンプルを得た。これらのサンプルを HPLC により分析した。反応開始前後の未変化体ピーク面積の差から消失率を求め, 消失速度 ((μ L/min)/mg) を算出した。

薬物動態試験

試験化合物を 8 週齢の非絶食ラットに投与した。経口および静脈内投与した後、採血し、血液サンプルを遠心分離し、血漿画分を得た。血漿画分を内部標準を含むアセトニトリルで除蛋白し、遠心分離を行った後、上清液を、10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で希釈し、再度遠心分離を行った。上清液の化合物濃度を LC/MS/MS で測定した。

MR/リガンド複合体の構造解析方法

MR-LBD への化合物のドッキング方法

武田薬品内で解析された蛋白質構造 (PDB ID: 3VHU, 3VHV) の原子座標をドッキングに用いた。両蛋白質構造に水素原子を付加し、水素原子のみをプログラム MOE (ver. 2005.06, Chemical Computing Group Inc) を用いて、重原子を固定してエネルギー極小化することにより、水素原子の位置を最適化した。MR-LBD モデルへの化合物のドッキングは、プログラム GOLD (ver. 3.0, the Cambridge Crystallographic Data Centre) を用いて実施した。高スコア (Gold score) を示したドッキングモードについて、MOE における MMFF94s 力場を用いてエネルギー最小化を行った。エネルギー極小化過程において、化合物から 5.0 Å 以内のアミノ酸残基を可変とし、誘電率は $2 * r$ に設定した (r は相互作用する二原子間距離を示す)。

MR/リガンド複合体の共結晶化および X 線による構造解析の方法

ヒト MR-LBD 変異体は、すでに報告されている方法を基に調製した。²⁸⁻³⁰ 712-984 残基もしくは 727-984 残基の MR-LBD を pRT1 ベクターを用いて C 末端に 6xHis タグがつくようにクローニングした。作成した発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) 細胞に形質変換し、2×YT 培養液中で IPTG を用いて発現誘導させ、30 °C で 3 時間培養した。超音波処理で細胞を破碎した後、超遠心分離機で可溶性画分を分取し、Ni アフィニティカラムで精製した。続いて、TEV プロテアーゼを用いて 6xHis タグを切断して除去した後、分子ふるいカラムにより精製した。発現および精製段階では、すべての溶液にリガンドを最終濃度 100 μM で添加した。精製された蛋白質を限外ろ過器を用いて蛋白質濃度 7-10 mg/mL に濃縮した。蛋白質溶液の

組成は、25 mM HEPES pH 7.2, 0.2 M sodium chloride, 10 mM DTT, 10% glycerol, 0.05% β -octyl glucoside, 100 μ M ligand である。

結晶化は、蒸気拡散法で 20 °C で行った。それぞれの結晶化条件 (リザーバ溶液) を Table 15 に示す。得られた結晶は 25% ethylene glycol を含むリザーバ溶液に浸した後、液体窒素を用いて凍結させた。回折データは、100 K で Advance Light Source のビームライン 5.0.3 もしくは SPring-8 のビームライン BL41XU において収集した。データ処理は、HKL2000³¹⁾ もしくは d*trek³²⁾ を用いて行った。構造解析は、MR-LBD (S810L)/spironolactone 複合体 (PDB code: 2AB2) を初期モデルとして、CCP4 パッケージ³³⁾ のプログラム MOLREP³⁴⁾ を用いて行った。構造の精密化とモデル構築は、それぞれプログラム REFMAC³⁵⁾ と COOT³⁶⁾ を用いて行った。リガンドの構造パラメータファイルは、プログラム AFITT (OpenEye Scientific Software) を用いて作成した。構造の最終モデルは、プログラム Molprobity³⁷⁾ を用いて検証した。結晶学的パラメータと精密化の統計値を Table 16 に示す。立体構造の描画は、プログラム PyMOL (Schrödinger, LLC) を用いて作成した。

Table 15. Crystallization condition

protein	MR-LBD C808S/S801L	MR-LBD C808S/S810L/A976V	MR-LBD C808S/S810L/A976V	MR-LBD C808S/S810L/A976V	MR-LBD C808S/S810L/A976V
ligand	spironolactone	1d	30b	30e	80a
reserver	0.1 M MES pH 7.0, 1.26	0.1 M HEPES pH 7.4,	0.04 M K dihydrogen	0.1 M Tris pH 7.8, 23%	0.1 M Tris pH 8.0,
solution	M Li sulfate, 6% PEG 2000 monomethyl ether	0.88 M K/Na tartrate, 5% ethylene glycol	phosphate, 16% PEG 8000, 20% glycerol	ethanol	23% ethanol

Table 16. Data collection and refinement statistics

Crystal	MR-LBD/spironolactone	MR-LBD/1d	MR-LBD/30b	MR-LBD/30e	MR-LBD/80a
Data collection					
Spacegroup	<i>C</i> 22 ₁	<i>P</i> 3 ₂	<i>P</i> 3 ₁ 21	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions:					
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	91.5, 171.5, 42.4	62.6, 62.6, 75.5	51.9, 51.9, 206.0	58.4, 66.8, 75.3	58.1, 66.4, 74.9
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution range (Å)	40–2.12 (2.16–2.12)	40–1.35 (1.38–1.35)	50–2.05 (2.10–2.05)	50–1.40 (1.43–1.40)	50–1.1 (1.14–1.10)
Observed reflections	116007	264961	156531	269767	514047
Unique reflections	19366	71863	21157	56402	111992
Redundancy	6.0 (3.9)	3.7 (2.5)	7.4 (6.6)	4.8 (3.4)	4.6 (2.1)
Completeness (%)	98.6 (90.3)	98.6 (88.4)	99.9 (99.4)	96.4 (74.7)	95.1 (73.6)
<i>I</i> / σ	26.2 (2.4)	22.2 (2.2)	23.1 (3.4)	22.9 (2.6)	12.3 (2.1)
<i>R</i> _{sym} ^a	0.059 (0.515)	0.045 (0.410)	0.079 (0.484)	0.058 (0.369)	0.052 (0.377)
Molecules in ASU	1	1	1	1	1
Refinement					
Resolution (Å)	40–2.12 (2.16–2.12)	40–1.35	40–2.05 (2.10–2.05)	40–1.40 (1.44–1.40)	40–1.10 (1.13–1.10)
Reflections	18299	68224	20007	53493	106388
<i>R</i> _{work} ^b	0.196 (0.295)	0.162 (0.311)	0.186 (0.232)	0.164 (0.262)	0.154 (0.326)
<i>R</i> _{free} ^b	0.240 (0.358)	0.184 (0.319)	0.216 (0.248)	0.179 (0.265)	0.177 (0.326)
Number of atoms					
Protein	2034	2134	2128	2089	2118
Ligand/ion	29	61	30	77	62
Water	45	355	94	200	224
Average B value (Å ²) ^c	34.7	15.2	38.8	15.0	18.2
Rms deviation from ideal geometry					
bond lengths (Å)	0.010	0.008	0.009	0.010	0.009
bond angles (°)	1.22	1.30	1.404	1.452	1.379
Ramachandran plot (%) ^d					
Preferred regions	98.4	98.0	96.8	97.5	97.4
Allowed regions	1.6	2.0	2.4	2.5	2.6
Outliers	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
PDB code	3VHU	3VHV	3WFF	3WFG	4PF3

^a $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$, where $\langle I(h) \rangle$ is the mean intensity of symmetry-related reflections. ^b $R_{\text{work}} = \sum |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$. R_{free} was calculated for randomly chosen 5% of reflections excluded from refinement. ^cB-factor includes contributions from TLS parameters. ^dCalculated with Coot. Values in parentheses are for the highest resolution shell.

引用文献

1. 高血圧治療ガイドライン (JSH2014), http://www.jpnsh.jp/data/jsh2014/jsh2014v1_1.pdf
2. Fujiyoshi, A.; Ohkubo, T.; Miura, K.; Murakami, Y.; Nagasawa, S. Y.; Okamura, T.; Ueshima, H. Observational Cohorts in Japan (EPOCH-JAPAN) Research Group. Blood pressure categories and long-term risk of cardiovascular disease according to age group in Japanese men and women. *Hypertens. Res.* **2012**, *35*, 947–953.
3. World Health Organization. A global brief on hypertension; Silent killer, global public health crisis. **2013**. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf?ua=1
4. Law, M. R.; Morris, J. K.; Wald, N. J. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ.* **2009**, *338*, b1665.
5. Miura, K.; Nagai, M.; Ohkubo, T. Epidemiology of hypertension in Japan. *Circ J.* **2013**, *77*, 2226–2231.
6. Fagart, J.; Wurtz, J. M.; Souque, A.; Hellal-Levy, C.; Moras, D.; Rafestin-Oblin, M. E. Antagonism in the human mineralocorticoid receptor. *EMBO J.* **1998**, *15*, 3317–3325.
7. Fuller, P. J.; Yao, Y.; Yang, J.; Young, M. J. Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. *J. Endocrinol.* **2012**, *213*, 15–24.
8. Pearce, D. The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends Endocrinol. Metab.* **2001**, *12*, 341–347.
9. Silvestre, J. S.; Robert, V.; Heymes, C.; Aupetit-Faisant, B.; Mouas, C.; Moalic, J. M.; Swynghedauw, B.; Delcayre, C. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4883–4891.
10. Lombès, M.; Oblin, M. E.; Gasc, J. M.; Baulieu, E. E.; Farman, N.; Bonvalet, J. P. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res.* **1992**, *71*, 503–510.

11. Catena, C.; Colussi, G.; Nait, F.; Martinis, F.; Pezzutto, F.; Sechi, L. A. Aldosterone and the heart: still an unresolved issue? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2014**, *5*, 168.
12. Kiyomoto, H.; Rafiq, K.; Mostofa, M.; Nishiyama, A. Possible underlying mechanisms responsible for aldosterone and mineralocorticoid receptor-dependent renal injury. *J. Pharmacol. Sci.* **2008**, *108*, 399–405.
13. Chapman, N.; Dobson, J.; Wilson, S.; Dahlof, B.; Sever, P. S.; Wedel, H.; Poulter, N. R. Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension. *Hypertension* **2007**, *49*, 839–845.
14. Pitt, B.; Zannad, F.; Remme, W. J.; Cody, R.; Castaigne, A.; Perez, A.; Palensky, J.; Wittes, J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 709–717.
15. Pitt, B.; Remme, W.; Zannad, F.; Neaton, J.; Martinez, F.; Roniker, B.; Bittman, R.; Hurley, S.; Kleiman, J.; Gatlin, M. Eplerenone, a Selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1309–1321.
16. Zannad, F.; McMurray, J. J.; Krum, H.; van Velhuisen, D. J.; Swedberg, K.; Shi, H.; Vincent, J.; Pocock, S. J.; Pitt, B.; EMPHASIS-HF study group. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 11–21.
17. Navaneethan, S. D.; Nigwekar, S. U.; Sehgal, A. R.; Strippoli, G. F. Aldosterone antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 542–551.
18. de Gasparo, M.; Whitebread, S. E.; Preiswer, G.; Jeunemaitre, X.; Corvol, P.; Menard, J. Antialdosterones: incidence and prevention of sexual side effects. *J. Steroid Biochem.* **1989**, *32*, 223–227.
19. Parthasarathy, H. K.; Menard, J.; White, W. B.; Young, W. F. Jr.; Williams, G. H.; Williams, B.; Ruilope, L. M.; McInnes, G. T.; Connell, J. M.; MacDonald, T. M. A double-blind, randomized

- study comparing the antihypertensive effect of eplerenone and spironolactone in patients with hypertension and evidence of primary aldosteronism. *J. Hypertens.* **2011**, *29*, 980–990.
20. (a) Meyers, M. J.; Hu, X. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonists. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2007**, *17*, 17–23 and references therein. (b) Meyers, M. J.; Arhancet, G. B.; Hockerman, S. L.; Chen, X.; Long, S. A.; Mahoney, M. W.; Rico, J. R.; Garland, D. J.; Blinn, J. R.; Collins, J. T.; Yang, S.; Huang, H. C.; McGee, K. F.; Wendling, J. M.; Dietz, J. D.; Payne, M. A.; Homer, B. L.; Heron, M. I.; Reitz, D. B.; Hu, X. Discovery of (3*S*,3*aR*)-2-(3-Chloro-4-cyanophenyl)-3-cyclopentyl-3,3*a*,4,5-tetrahydro-2*H*-benzo[*g*]indazole-7-carboxylic acid (PF-3882845), an orally efficacious mineralocorticoid receptor (MR) antagonist for hypertension and nephropathy. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5979–6002. (c) Bärfacker, L.; Kuhl, A.; Hillisch, A.; Grosser, R.; Figueroa-Pérez, S.; Heckroth, H.; Nitsche, A.; Ergüden, J.; Gielen-Haertwig, H.; Schlemmer, K.; Mittendorf, J.; Paulsen, H.; Platzek, J.; Kolkhof, P. Discovery of BAY 94-8862: a nonsteroidal antagonist of the mineralocorticoid receptor for the treatment of cardiorenal diseases. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1385–1403. (d) Yang, C.; Balsells, J.; Chu, H. D.; Cox, J. M.; Crespo, A.; Ma, X.; Contino, L.; Brown, P.; Gao, S.; Zamlynny, B.; Wiltsie, J.; Clemas, J.; Lisnock, J.; Gibson, J.; Zhou, G.; Garcia-Calvo, M.; Bateman, T. J.; Xu, L.; Tong, V.; Xu, L.; Crook, M.; Sinclair, P.; Shen, H. C. Discovery of benzimidazole oxazolidinediones as novel and selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 461–465.
21. Chen, Q.; Yang, G.; Wu, S. Copper electron-transfer induced trifluoromethylation with methyl fluorosulphonyldifluoroacetate. *J. Fluorine Chem.* **1991**, *55*, 291–298.
22. Winneker, R. C.; Fensome, A.; Zhang, P.; Yudt, M. R.; McComas, C. C.; Unwalla, R. J. A new generation of progesterone receptor modulators. *Steroids* **2008**, *73*, 689–701.
23. Nariai, T.; Fujita, K.; Mori, M.; Katayama, S.; Hori, S.; Matsui, K. SM368229, a novel promising mineralocorticoid receptor antagonist, shows antihypertensive efficacy with minimal effect on serum potassium level in Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2012**, *59*, 458–464.

24. Rubottom, G. M.; Gruber, J. M.; Kincaid, K. Lead tetraacetate oxidation of trimethylsilyl enol ethers: synthesis of aryl substituted phenacyl acetates. *Synth. Commun.* **1976**, *6*, 59–62.
25. Waring, M. J. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5*, 235–248.
26. Nakashima, S.; Yamamoto, K.; Arai, Y.; Ikeda, Y. Impact of physicochemical profiling for rational approach on drug discovery. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 1228–1238.
27. Kagawa, C. M. Blocking the Renal Electrolyte Effects of Mineralocorticoids with an Orally Active Steroidal Spirolactone. *Endocrinology* **1960**, *67*, 125–132.
28. Bledsoe, R. K.; Madauss, K. P.; Holt, J. A.; Apolito, C. J.; Lambert, M. H.; Pearce, K. H.; Stanley, T. B.; Stewart, E. L.; Trump, R. P.; Willson, T. M.; Williams, S. P. A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31283–31293.
29. Fagart, J.; Huyet, J.; Pinon, G. M.; Rochel, M.; Mayer, C.; Rafestin-Oblin, M. E. Crystal structure of a mutant mineralocorticoid receptor responsible for hypertension. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 554–555.
30. Huyet, J.; Pinon, G. M.; Fay, M. R.; Fagart, J.; Rafestin-Oblin, M. E. Structural basis of spiro lactone recognition by the mineralocorticoid receptor. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 563–571.
31. Otwinowski, Z.; Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
32. Pflugrath, J. W. The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr.* **1999**, *D55*, 1718–1725.
33. Bailey, S. The CCP4 suite – programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, *50*, 760–763.
34. Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022–1025.
35. Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240–255.

36. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
37. Chen, V. B.; Arendall, W. B. 3rd.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21.

論文目録

主論文

1. Hasui, T.; Matsunaga, N.; Ohra, T.; Ohyabu, N.; Nishigaki, N.; Imura, Y.; Igata, Y.; Matsui, H.; Motoyaji, T.; Tanaka, T.; Habuka, N.; Sogabe, S.; Ono, M.; Siedem, C. S.; Tang, T. P.; Gauthier, C.; De Meese, L. A.; Boyd, S. A.; Fukumoto, S. Identification of benzoxazin-3-one derivatives as novel, potent, and selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8616–8631.
2. Hasui, T.; Ohra, T.; Ohyabu, N.; Asano, K.; Matsui, H.; Mizukami, A.; Habuka, N.; Sogabe, S.; Endo, S.; Siedem, C. S.; Tang, T. P.; Gauthier, C.; De Meese, L. A.; Boyd, S. A.; Fukumoto, S. Design, synthesis, and structure - activity relationships of dihydrofuran-2-one and dihydropyrrol-2-one derivatives as novel benzoxazin-3-one-based mineralocorticoid receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5983–5994.
3. Hasui, T.; Ohyabu, N.; Ohra, T.; Fujii, K.; Sugimoto, T.; Fujimoto, J.; Asano, K.; Oosawa, M.; Shiotani, S.; Nishigaki, N.; Kusumoto, K.; Matsui, H.; Mizukami, A.; Habuka, N.; Sogabe, S.; Endo, S.; Ono, M.; Siedem, C. S.; Tang, T. P.; Gauthier, C.; De Meese, L. A.; Boyd, S. A.; Fukumoto, S. Discovery of 6-[5-(4-fluorophenyl)-3-methyl-pyrazol-4-yl]-benzoxazin-3-one derivatives as novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5428–5445.

副論文

1. Suginome, M.; Noguchi, H.; Hasui, T.; Murakami, M. Synthesis and reactions of cyclic silylboranes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 323–326.
2. Suginome, M.; Tanaka, Y.; Hasui, T. Reductive amination of aldehydes using aminoboranes as iminium ion generators. *Synlett* **2006**, 1047–1050.
3. Tanaka, Y.; Hasui, T.; Suginome, M. Acid-Free, aminoborane-mediated Ugi-type reaction leading to general utilization of secondary amines. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4407–4410.
4. Tanaka, Y.; Hasui, T.; Suginome, M. Diarylborinic acid derivatives as a catalytic iminium ion generator in the Mannich-type reaction using secondary amines, aldehydes, and ketene silyl acetals. *Synlett* **2008**, 1239–1242.
5. Tanaka, Y.; Hidaka, K.; Hasui, T.; Suginome, M. B(OMe)₃ as a nonacidic iminium ion generator in Mannich- and Ugi-type reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1148–1151.
6. Harada, A.; Suzuki, K.; Miura, S.; Hasui, T.; Kamiguchi, N.; Ishii, T.; Taniguchi, T.; Kuroita, T.; Takano, A.; Stepanov, V.; Halldin, C.; Kimura, H. Characterization of the binding properties of T-773 as a PET radioligand for phosphodiesterase 10A. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *21*, 146–154.
7. Stepanov, V.; Miura, S.; Takano, A.; Amini, N.; Nakao, R.; Hasui, T.; Nakashima, K.; Taniguchi, T.; Kimura, H.; Kuroita, T.; Halldin, C. Development of a series of novel carbon-11 labeled PDE10A inhibitors. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2015**, *58*, 202–208.