

腫瘍壊死因子産生阻害剤の合成と構造活性相関
および薬理作用に関する研究

2009年3月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

藤原 範雄

目次

第1章 緒言

1-1. サイトカイン	1
1-2. TNF- α	2
1-3. TNF- α 阻害剤と疾患の治療	4
1-4. 研究の概要	6
1-5. 引用文献	8

第2章 パビン誘導体の合成とTNF- α 産生阻害活性

2-1. 序論	11
2-2. パビン誘導体の合成	12
2-3. パビン誘導体の構造活性相関	15
2-4. パビン誘導体からの異なる展開	17
2-5. マウスエンドトキシンショックモデルにおける化合物の評価	19
2-6. 小括	21
2-7. 実験の部	22
2-8. 引用文献	38

第3章 ピペリジニルピリミジン誘導体の合成とTNF- α 産生阻害活性

3-1. 序論	39
3-2. キナゾリン誘導体の合成と構造活性相関	41
3-3. ピペリジニルピリミジン誘導体の合成	43
3-4. ピペリジニルピリミジン誘導体の構造活性相関	46
3-5. ピペリジニルピリミジン誘導体の製法検討	50
3-6. マウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおける評価	55
3-7. リード化合物 19e と選択化合物 28q の物性および一般薬理評価	62
3-8. 小括	64
3-9. 実験の部	65
3-10. 引用文献	85

第4章 TNF- α 産生阻害剤の抗HIV活性

4-1. 序論	87
4-2. TNF- α 産生阻害剤の抗HIV活性の評価	91
4-3. ピペリジニルピリミジン誘導体の合成	94

4-4. ピペリジニルピリミジン誘導体の構造活性相関.....	98
4-5. Tat刺激による抗HIV-1LTR活性とTNF- α 産生阻害活性の評価.....	101
4-6. 小括.....	103
4-7. 実験の部.....	105
4-8. 引用文献.....	119
第5章 結語.....	122
謝辞.....	124
研究業績リスト.....	125

略語表

Ac: acetyl、アセチル

Ac₂O: acetic anhydride、無水酢酸

AcOH : acetic acid、酢酸

AIDS: acquired immune deficiency syndrome、後天性免疫不全症候群

BA: Bioavailability、生物学的利用率

Bn: benzyl、ベンジル

Boc: *tert*-butoxycarbonyl、*tert*-ブトキシカルボニル

Bz: benzoyl、ベンゾイル

CAT: chloramphenicol acetyltransferase、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ

CDI: 1, 1'-carbonyldiimidazole、1, 1'-カルボニルジイミダゾール

CIA: collagen-induced arthritis、コラーゲン誘発関節炎

CSF: colony stimulating factor、コロニー刺激因子

DMAP: 4-(dimethylamino)pyridine、4-ジメチルアミノピリジン

DMF : *N,N*-dimethylformamide、*N,N*-ジメチルホルムアミド

DMSO: dimethylsulfoxide、ジメチルスルホキシド

EDC: 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミドプロピル)カルボジイミド塩酸塩

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay、酵素結合免疫吸着法

ESI: electrospray ionization、エレクトロスプレー法

Et: ethyl、エチル

Et₂O: diethyl ether、ジエチルエーテル

EtOAc: ethyl acetate、酢酸エチル

EtOH : ethanol、エタノール

Et₃N: triethylamine、トリエチルアミン

GF: growth factor、増殖因子

HIV: human immunodeficiency virus、ヒト免疫不全ウイルス

HMPA: hexamethylphosphoric triamide、ヘキサメチルリン酸トリアミド

HOBt: 1-hydroxybenzotriazole、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

HPLC: high-performance liquid chromatography、高速液体クロマトグラフィー

HRP: horseradish peroxidase、西洋ワサビペルオキシターゼ

IBD: inflammatory bowel disease、炎症性腸疾患

IL: interleukin、インターロイキン

IFN: interferon、インターフェロン

*i*PrOH: isopropylalcohol、イソプロピルアルコール

LDA: lithium diisopropylamide、リチウムジイソプロピルアミド

LGL: large granular lymphocyte、大型顆粒リンパ球

LPS: lipopolysaccharide、リポポリサッカライド
LTR: long terminal repeat、反復配列
MC: methylcellulose、メチルセルロース
Me: methyl、メチル
MeOH : methanol、メタノール
MsCl: methanesulfonyl chloride、メタンスルホニルクロリド
NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells、核内因子 κ B
*n*Bu: normal butyl、ノルマルブチル
*n*Pr: normal propyl、ノルマルプロピル
PBMC: peripheral blood mononuclear cell、末梢血単核球
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
PTX: pentoxifylline、ペントキシフィリン
Ph: phenyl、フェニル
Phthal: phthaloyl、フタロイル
po: *per os*, 経口
RA: rheumatoid arthritis、関節リウマチ
*t*Bu: tertiary butyl、*ter*-ブチル
Tat: transactivator of transcription
TFA: trifluoroacetic acid、トリフルオロ酢酸
THF : tetrahydrofuran、テトラヒドロフラン
TLC: thin-layer chromatography、薄層クロマトグラフィー
TsOH: *p*-toluenesulfonic acid、*p*-トルエンスルホン酸
TNF: tumor necrosis factor、腫瘍壊死因子

第1章 緒言

1-1. サイトカイン

一般に細胞の増殖、分化、死や細胞機能の発現、停止は周りの細胞により厳密に制御され、その結果、生体の恒常性が維持されている。こうした細胞同士のコミュニケーションは、細胞表面分子を介する直接的な細胞同士の接触や可溶性分子を介して行われている。この細胞間情報伝達分子がサイトカインである。たとえば生体が異物の侵入などを受けると、その情報は最終的に局所でのサイトカインの産生につながり、生体防御に関与する多種類の細胞に働き、あるいは他のサイトカインの産生誘導や活性を制御しながら、異常な情報を除去、修正し正常に戻す働きをする。サイトカインは、その他内分泌系や神経系にも直接的あるいは間接的に関与しており、生体機能の調節や様々な疾患の発症抑制に重要な役割を果たしている (Fig. 1-1)。これまでに、数十種類のサイトカインが見つかっており、代表的なものにインターロイキン (IL)、インターフェロン (IFN)、腫瘍壊死因子 (TNF)、コロニー刺激因子 (CSF)、増殖因子 (GF) などがある。いずれも、免疫系の調節、炎症反応の惹起、細胞の増殖や分化の調節、抗腫瘍作用など、感染防御、造血機構に関わっている。

しかし、本来は生体防御反応であるサイトカインが、その制御を逸脱した状態による過剰反応は同時に病態形成にもつながりうることから、生体にとっては諸刃の剣とも言える。近年数多くの病気とサイトカインとの関連が報告されており、サイトカインの理解とともにその制御と正常なサイトカインネットワークの回復による病態治療が重要な課題である。

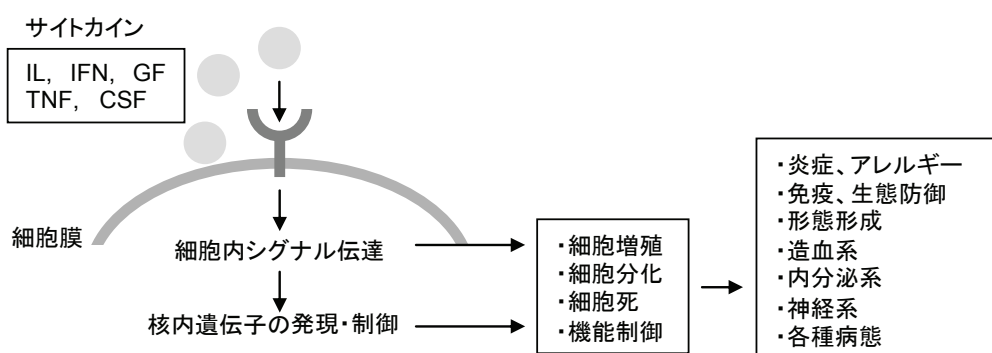


Fig. 1-1 サイトカインの働き

1-2. TNF- α

腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α)はアミノ酸157個からなる分子量約17,000のペプチドであり、マクロファージをはじめとする各種細胞から産生される。IL-1 や IL-6 と並ぶ強力な前炎症性サイトカインの一つであり、炎症や免疫反応において重要な役割を果たしている。TNF- α はその名の由来の通り、腫瘍傷害作用を示すサイトカインとして見出され¹、その生物作用から発見された当初は抗がん剤として期待された。しかし、後に構造解析により末期がん患者などに認められる悪液質の誘発因子とされるカケクチン(Cachectin)と同一物であることが明らかとなった²。さらにその後の研究から、TNF- α の作用は腫瘍細胞だけでなく多くの正常細胞にもおよんでいることが分かり、免疫系、中枢神経系、骨、肝細胞、内皮細胞、繊維芽細胞などに作用し、きわめて多彩な活性を示すことが明らかとなっている(Fig. 1-2)。例えば、①発熱活性、②繊維芽細胞の増殖促進、③繊維芽細胞や滑膜細胞からのコラーゲナーゼやプロスタグランジン(PG)の産生誘導、④血管内皮細胞での血管透過性の亢進、接着分子、コロニー刺激因子(CSF)、IL-1、IL-6やIFNなどの産生誘導、⑤好中球機能の増強とスーパーオキシドの発生、⑥マクロファージからのIL-1、IL-6やIFNなどの産生誘導、⑦ナチュラルキラー(NK)活性の増強、⑧骨再吸収の促進、⑨ウイルスの増殖抑制、⑩脂肪球のリポタンパク質リパーゼ活性の阻害など数多くの生物作用が挙げられ、最近では炎症免疫反応を通して広く生体防御に関わるサイトカインとして理解されている³。

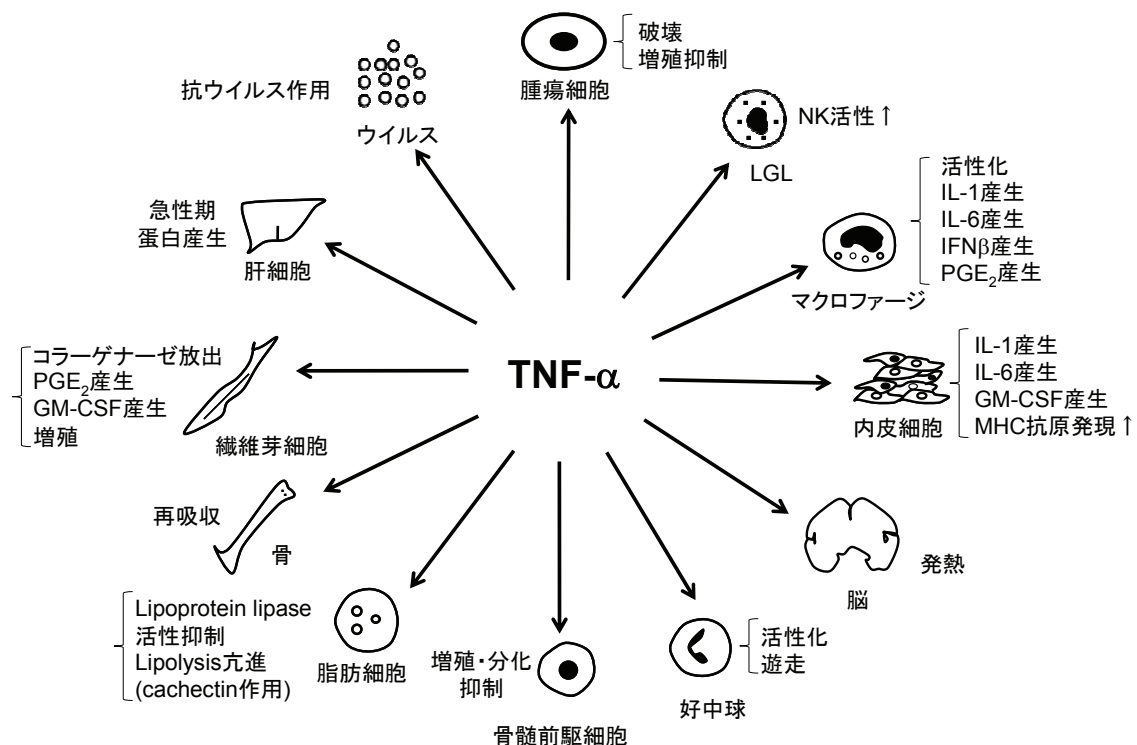


Fig. 1-2 TNF- α の多彩な生物活性

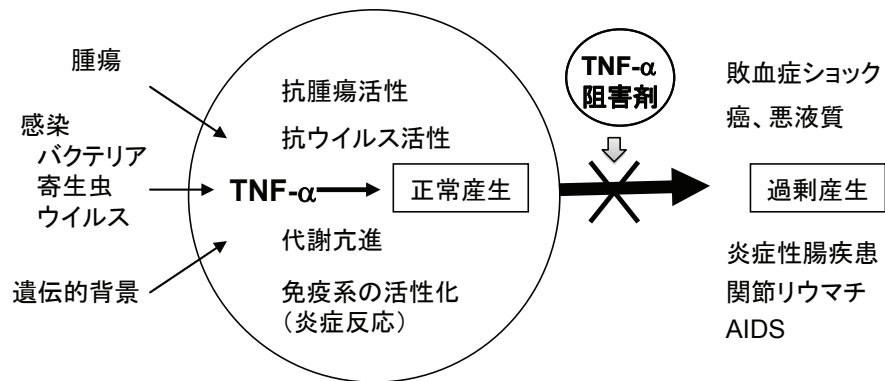


Fig. 1-3 TNF- α の多面性と阻害剤の可能性

一方、TNF- α の持続的または過剰産生は逆に、正常細胞に激しい作用をきたし、種々の病態を引き起こすことも明らかとなってきた。例えば、TNF- α は先にも述べた癌や感染症における悪液質(全身の代謝を異化亢進し、極度の消耗をもたらす)の誘発因子であるカケクチンと同一物質であることが報告されており、また、敗血症に対してもその関与は大きく、抗TNF- α 抗体を用いた実験で抑制効果が認められている⁴。その他、関節リウマチ(RA)、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患(IBD)、変形性関節症、川崎病、多発性硬化症、ベーチェット病、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、骨髄移植時の拒絶反応(GvHD)、多臓器不全、マラリア、後天性免疫不全症候群(AIDS)、髄膜炎、肝炎やII型糖尿病など枚挙にいとまがない⁵。こうしたTNF- α の役割に注目し、それを標的とした阻害剤が創薬のターゲットとなり得ると考えられる(Fig. 1-3)。

1-3. TNF- α 阻害剤と疾患の治療

近年、IBDやRAなどの疾患に対し、抗体療法による臨床試験が行われ、それらが著効を示すことが明らかとなり、抗TNF- α 抗体(infliximab, adalimumab)や可溶性TNF受容体(etanercept)などが欧米のみならず日本においても医薬品としての承認を受けている。その効果の発現の速さ、切れの良さはリウマチをはじめとする自己免疫疾患の治療に革命的变化をもたらすとともに、慢性炎症性疾患の病態形成においてTNF- α の果たす役割の重要性を確実なものとしたと言える。またTNF- α のみならずIL-1やIL-6などの炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤についてもこうした疾患の治療薬として注目を集めており、病態治療は勿論のこと、病態形成へのサイトカインの詳細な関与あるいは新たな作用についても今後明らかになっていくものと思われる⁶。

一方、低分子化合物に目を向けると、TNF- α の活性を阻害するもの、あるいはその産生阻害作用を示す低分子化合物や因子として、古くはグルココルチコイド、プロスタグランジンE₂またはI₂(PGE₂, PGI₂)、フォスホリパーゼA₂(PLA₂)阻害剤、リポキシゲナーゼ(LOX)阻害剤、血小板凝集因子(PAF)拮抗剤、プロテアーゼ阻害剤、ラジカルスカベンジャー、ペントキシフィリン(pentoxifylline, PTX)などが知られている⁷(Fig. 1-4)。しかし、これらの化合物のいくつかは、多岐にわたる薬理作用による副作用を伴うため、その使用には制限がある。また最近では、p38キナーゼ阻害剤あるいはホスホジエステラーゼ(PDE)阻害剤など非常に強力な阻害活性を示す低分子化合物が報告され⁸、実際にRAや呼吸器疾患において臨床試験も行われているが、現在のところ承認までには至ったものはなく、選択性なども含めた副作用の問題が課題の一つと考えられ、低分子創薬の難しさをうかがわせるものである。

しかし、生物学的製剤についてはその有用性が認められている一方で、例えばRAの場合、十分な効果を示さない抵抗性の患者が~40-60%、クローン病で~25-40%存在していると言われている⁹。また免疫を長期に渡り完全に抑えてしまう結果、結核、侵襲性真菌感染症、その他の日和見感染症などの易感染性や発癌リスクの増大も指摘されている。また、生物製剤による治療は投与方法と費用が使用に当たり問題となる。例えばinfliximabの場合、点滴静注で2時間を要し、1バイアル当たりの薬価が12万円弱で、1回につき2~3バイアル使用することになるので、約23~34万円かかる。通常2ヶ月に1回の投与とはいえ、他の薬剤や検査費用も加えると患者の負担は相当なものになる。こうしたコンプライアンスや医療経済学的な課題も考慮すると改善すべき課題も多く、より良い薬剤の開発が必要とされている^{6b}。そのため、短い半減期や多剤との併用などにより免疫反応をコントロールでき、経口投与可能で製造コストも安価な低分子化合物の意義は大きい。

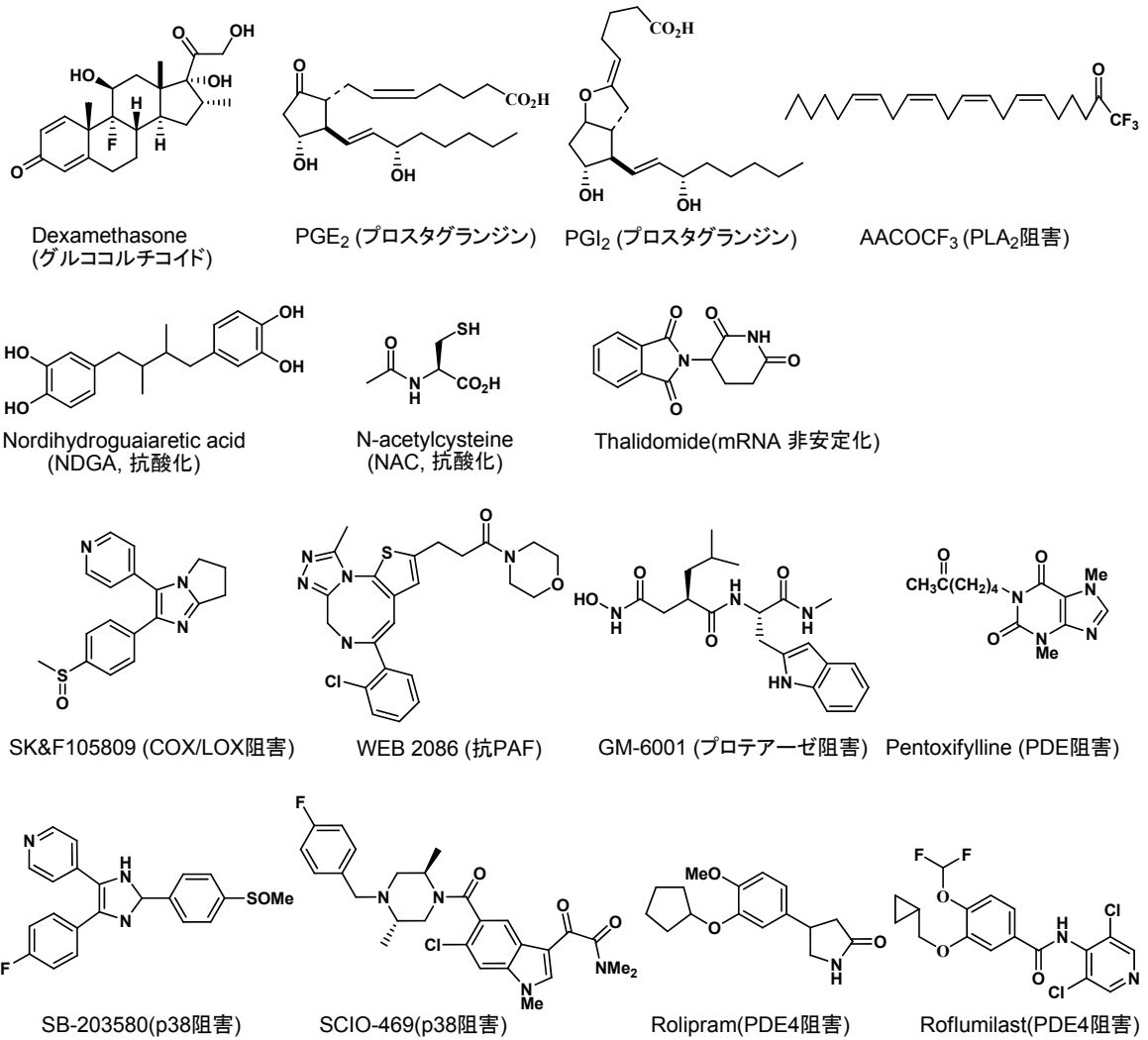


Fig. 1-4 TNF- α 阻害剤の例

1-4. 研究の概要

こうした背景のもとに、関節リウマチ等TNF- α の関与する疾患の治療薬として、低分子TNF- α 阻害剤の創薬研究を開始した。旧住友製薬(株)の社内ライブラリーを用いてランダムスクリーニングを実施した結果、産生阻害活性を示す2系統の構造の化合物を見出すことができ、これらをリードとして合成展開を図ることにした。

まず、パビン (Pavine) 誘導体では、その構造的な制約から、カテコール部と窒素上の変換を中心に合成展開を図るとともに、環の切断による展開等も試みた (Fig. 1-5A)。その中でジメチレンジオキシ構造を有する誘導体群7を見出し、*in vivo*のエンドトキシンショックモデルを用いて、経口での有効性を確認した。特に化合物7sについて、薬理作用と血中のTNF- α レベルの関連について詳細に検討した。以上の内容については第2章で述べる。

次に、フェニルキナゾリン (Phenyl quinazoline) をリードとした合成展開では、既知のフェニルキナゾリン構造から予想される中枢、循環器系への多彩な薬理活性 (副作用) の回避、吸収性の改善と構造的な新規性も考慮し、異なる独自骨格への変換を指向した合成を行った (Fig. 1-5B)。その結果、ピペリジニルピリミジン誘導体28に強いTNF- α 産生阻害作用を見出した。代表化合物28qを用いた関節リウマチモデルでの薬効評価において、同化合物の予防的あるいは治療的効果を確認し、ピペリジニルピリミジン誘導体が炎症性疾患等の治療薬として期待できる結果が示された。以上の内容については第3章で述べる。

また、TNF- α の関与する別の疾患として後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) が挙げられる。AIDSはヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) 感染によって引き起こされ、重篤な全身性免疫不全

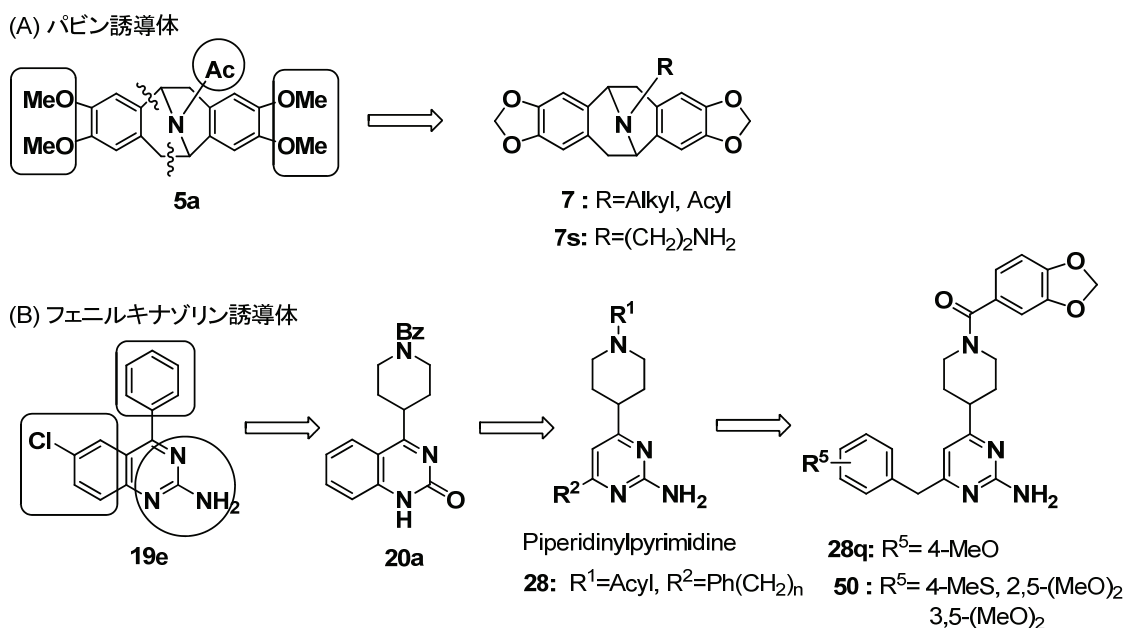


Fig. 1-5 リード化合物と合成展開

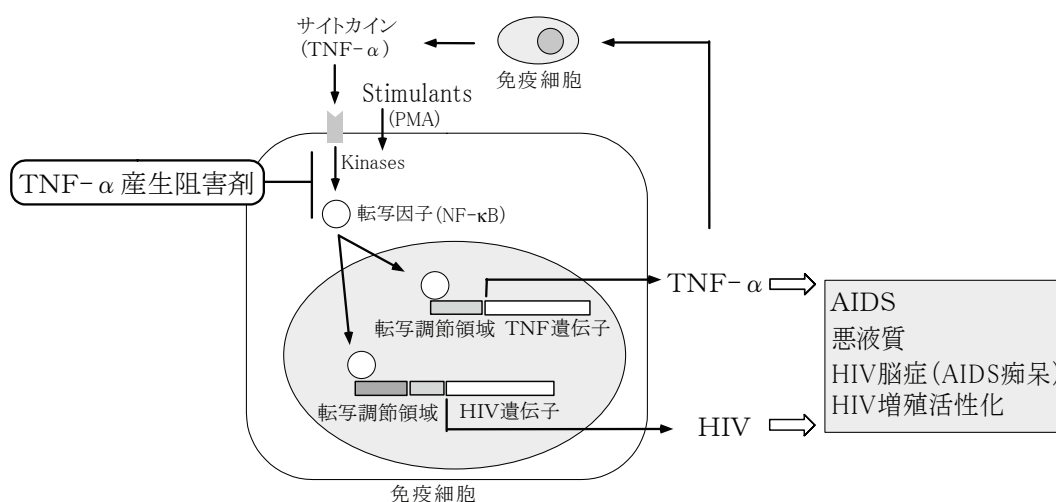


Fig. 1-6 TNF- α 産生阻害剤のTNF- α とHIV遺伝子活性化における期待される効果

によって特徴づけられる疾患である。HIVはヘルパーT細胞やマクロファージなど細胞性免疫に中心的な役割を果たしている細胞に感染し、これを破壊するため、免疫の著しい機能低下による免疫不全状態となり、様々な日和見感染症や日和見腫瘍、中枢神経障害など多彩で重篤な全身症状が起こる。TNF- α とAIDSの関わりをみると、TNF- α の過剰産生はHIVウイルスの増殖活性化と病態の進展に関与しているばかりでなく¹⁰、AIDS患者の悪液質(感染後期にみられる体重と筋肉量の減少などの極度の消耗状態)やAIDS脳症(痴呆)の原因の一つといわれており、TNF- α 産生阻害剤の治療薬としての効果が期待できる¹¹。一方、HIVの複製は宿主染色体に挿入されたHIVプロウイルスの転写調節領域であるLTR(long terminal repeat)部位により制御されており¹²、HIV複製を増強させる宿主由来の細胞性因子(NF- κ Bなど)を活性化すると、HIVの複製が増強する。興味深いことにHIVとTNF遺伝子の転写調節領域は多くの共通した部分が存在することがわかっていることから、TNF- α 産生阻害剤が自身の産生を抑制するだけでなく、遺伝子活性化の共通性から直接のHIV増殖抑制作用も有する可能性が推察される(Fig 1-6)。本研究の化合物群の詳細な作用メカニズムについては不明であるが、これら誘導体で抗HIV作用が確認できれば、HIV遺伝子活性化の直接的な作用に加え、TNF- α 産生阻害に基づく間接的な作用も併せ持つことになり、AIDS治療の新しいアプローチとして期待できると考えた。以上のことから、先のTNF- α 産生阻害剤の抗HIV作用について調べた。その結果、化合物**28q**に強いHIV-1 LTR転写抑制活性とHIV増殖抑制活性が見出された。詳細な構造活性相関から、ピペリジノ基上の置換基としてピペロニロイル構造の重要性が明らかとなり、更なる合成展開により化合物**28q**よりも強いHIV-1 LTR転写抑制活性を示す化合物群**50**を見出した(Fig 1-5B)。TNF- α 産生阻害活性との相関は明確ではなかったが、両者の構造活性相関の類似性から予想されるように、これらの化合物ではTNF- α 産生阻害活性も維持されており、新たな抗HIV剤としての可能性が示された。以上の内容については第4章で述べる。以下それぞれの内容の詳細について次章から述べていくことにする。

1-5. 引用文献

1. (a) Carswell, E.A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1975**, *72*, 3666-3670. (b) Haranaka, K.; Carswell, E. A.; Williamson, B. D.; Prendergast, J. S.; Satomi, N.; Old, L. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1986**, *83*, 3949-3953.
2. (a) Beutler, B.; Greenwald, D.; Hulmes, J. D. *Nature* **1985**, *316*, 552. (b) 川上正舒. *生化学* **1987**, *59*, 1244.
3. Vassalli, P. *Ann. Rev. Immunol.*, **1992**, *10*, 411.
4. (a) Starnes, H. F. Jr.; Pearce, M. K.; Tewari, A.; Yim, J. H.; Zou, J.-C.; Abrams, J. S. *J. Immunol.* **1990**, *145*, 4185. (b) Beutler, B.; Milsark, I. W.; Cerami, A. C. *Science*, **1985**, *229*, 869. (c) Hinshaw, L. B.; Tekamp-Olson, P.; Chang, A. C.; Lee, P. A.; Taylor, F. B. Jr.; Murray, C. K.; Peer, G. T.; Emerson, T. E. Jr.; Passey, R. B.; Kuo, G. C. *Circ. Shock*, **1990**, *30*, 279-292. (d) Feldmann, M.; Elliott, M. J.; Woody, J. N.; Maini, R. N. *Adv. Immunol.* **1997**, *64*, 283.
5. 総説:(a) Bradley, J. R. *J. Pathology* **2008**, *214*, 149. (b)江口勝美. *炎症と免疫* **2006**, *14*, 487. (c) Wang, H.; Czura, C. J.; Tracey, K. J. *The Cytokine Handbook*, 4th Edition, Michael T. Lotze and Angus W. Thomson Ed. 2003, pp837-860. RA:(d) Tetta, C.; Camussi, G.; Modena, V.; Vittorio, C. D.; Baglioni, C. *Ann. Rheum. Dis.* **1990**, *49*, 665. 炎症性腸疾患:(e) Murch, S.; Walker-Smith, J. A. *Arch. Dis. Child* 1991, *66*, 561. (f)前田征洋. *消化器と免疫* **1989**, *22*, 111. 変形性関節症:(g) Venn, G.; Nietfeld, J. J.; Duits, A. J.; Brennan, F. M.; Arner, E.; Covington, M.; Billingham, M. E. J.; Hardingham, T. E. *Arthritis Rheum.* **1993**, *36(6)*, 819. 川崎病:(h) Matsubara, T.; Furukawa, S.; Yubuta, K. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1990**, *56*, 29. 多発性硬化症:(i) Sharief, M. K.; Hentges, R. N. *Engl. J. Med.*, **1991**, *325(7)*, 467. ベーチェツト病:(j) Akoglu, T.; Direskeneli, H.; Yazici, H.; Lawrence, R. *J. Rheumatol.* **1990**, *17*, 1107. SLE:(k) Maury, C. P. J.; Teppo, A-M. *Arthritis Rheum.* **1989**, *32*, 146. GvHD:(l) Nestel, F. P.; Price, K. S.; Seemeyer, T. A.; Lapp, W. S. *J. Exp. Med.*, **1992**, *175*,405. 多臓器不全:(m) 藤原俊文; 川上正舒. *臨床医* **1991**, *17(10)*, 2006. マラーリ:(n) Grau, G. E.; Fajardo, L. F.; Piguet, P. F.; Allet, B; Lambert, P. H.; Vassalli, P. *Science* **1987**, *237*, 1210. AIDS:(o)川上正舒; 早田邦康. *Medical Immunology* **1990**, *20*, 615. (p) Dezube, B. J.; Pardee, A. B. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1992**, *5*, 1099. 髄膜炎:(l) Waage, A.; Halstensen, A.; Espevik, T. *Lancet* **1987**, *1*, 355. 肝炎:(q) 菅野幸三. *肝臓* **1992**, *33*, 213. II型糖尿病: (r) Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B. M. *Science* **1993**, *259*, 87.
6. (a) Andreakos, E.; Foxwell, B.; Brennan, F.; Maini, R.; Feldmann, M. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, *13*, 299-313. (b) Ackermann, C.; Kavanaugh, A. *Expert Opin. Ther. Targets.* **2007** *11(11)*, 1369-84. (c) Wong, M.; Ziring, D.; Korin, Y.; Desai, S.; Kim, S.; Lin, J.; Gjertson, D.; Braun, J.; Reed, E.; Singh, R. R. *Clin Immunol.*

- 2008, 126(2),121-36. (d) 宮坂信之. 治療学 2002, 36(12), 5-61. (e) 竹内勤. 最新医学 2002, 2, 829-913.
7. グルココルチコイド:(a) Han, J.; Thompson, P.; Beutler, B. *J. Exp. Med.* **1990**, 172(1), 391-394. (b) Neale, M. L., Fiera, R. A., Matthews, N. *Immunology* **1988**, 64(1), 81-85. PLA₂:(c) Thommesen, L., Sjursen, W., Gåsvik, K., Hanssen, W., Brekke, O. L., Skattebøl, L., Holmeide A. K., Espevik, T., Johansen, B., Laegreid, A. *J. Immunol.* **1998**, 161(7), 3421-30. PG:(d) Spengler, R. N.; Spengler, M. L.; Strieter, R. M.; Remick, D. G.; Larrick, J. W.; Kunkel, S.L. *Immunology* **1988**, 64(4), 719-24. LO阻害剤:(e) Olivera, D. L.; Esser, K. M.; Lee, J. C.; Greig, R. G.; Badger, A. M. *Circ Shock.* **1992**, 37(4), 301-306. PAF拮抗剤:(f) Hunyadi, J.; Kenderessy, A. S.; Duda, E.; Braquet, P.; Dobozy, A. *Mol Immunol.* **1993**, 30(6), 517-519. MMP阻害剤:(g) Solorzano, C. C.; Ksontini, R.; Pruitt, J. H.; Auffenberg, T., Tannahill, C.; Galardy, R. E.; Schultz, G. P.; MacKay, S. L.; Copeland, E. M. 3rd; Moldawer, L. L. *Shock*, **1997**, 7(6), 427-431. NAC:(h) Peristeris, P.; Clark, B. D.; Gatti, S.; Faggioni, R.; Mantovani, A.; Mengozzi, M.; Orencole, S. F.; Sironi, M.; Ghezzi, P. *Cell Immunol.* **1992**, 140(2), 390-399. NDGA:(i) Hepburn, A.; Boeynaems, J. M.; Fiers, W.; Dumont, J. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 149(2), 815. PTX:(j) Strieter, R. M.; Remick, D. G.; Ward, P. A.; Spengler, R. N.; Lynch, III, J. P.; Larrick, J.;Kunkel, S. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 155, 1230. (k) Schade, U. F. *Circ. Shock* **1990**, 31, 171. (l) Waage, A.; Sørensen, M.; Størdal, B. *Lancet* **1990**, 335, 543. (m) Zabel, P.; Schade, U. F.; Schlaak, M. *Immunobiol.***1993**, 187, 447. Thalidomide: (n)Moreira, A.; Sampaio, E. P.; Zmuidzinias, A.; Frindt, P.; Smith, K. A.; Kaplan, G. *J Exp. Med.* **1993**, 177, 1675.
8. Palladino, M. A.; Bahjat, F. R.; Theodorakis, E. A.; Moldawer, L. L. *Nature Rev.* **2003**, 2, 736. (b) Sugita, T. *Folia Pharmacol. Jpn.* **2007**, 129, 177. (c) Kotera, J.; Sasaki, T.; Omori, K. *Folia Pharmacol. Jpn.* **2005**, 126, 121. (d) Spina, D. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 155(3), 308.
9. Kooloos, W. M.; de Jong, D. J.; Huizinga, T. W. J.; Guchelaar, H.-J. *Drug Discovery Today*, **2007**, 12, 125.
10. (a) Denis, M.; Ghadirian, E. *Clin. Exp. Immunol.***1994**, 97, 76. (b) Maury, C. P. J.; Lähdevirta, J. *J. Intern. Med.* **1990**, 227, 253. (c) Poli, G.; Kinter, A.; Justement, J. S.; Kehrl, J. H.; Bressler, P.; Stanley, S.; Fauci, A. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 782. (d) Fauci, A. S. *Science* **1993**, 262, 1011. (e) Fauci, A. S. *Nature* **1996**, 384, 529. (f) Pallarés-Trujillo, J.; López-Soriano, F. J.; Argiléas, J. M. *Med. Res. Rev.* **1995**, 15, 533. (g) Theodore, S.; Cass, W. A.; Nath, A.; Steiner, J.; Young, K.; Maragos, W. F. *Neurobiol. Dis.* **2006**, 23, 663. (h) Ting, P. T.; Koo, J. Y. *Int. J. Dermatol.* **2006**, 45, 689.
11. (a) Bélec, L.; Meillet, D.; Hervann, A.; Grésenguet, G.; Gherardi, R. *Clin. Diag.*

- Lab. Immunol.* **1994**, *1*, 117. (b) Zangerle, R.; Reibnegger, G.; Wachter, H. Fuchs, D. *AIDS.* **1993**, *7*, 175. (c) Saha, R. N.; Pahan, K. *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 1057. (d) Brabers, N. A. C. H.; Nottet, H. S. L. M. *Eur. J. Clin. Invest.* **2006**, *36*, 447.
12. (a) Haseltine, W. A. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2349. (b) Cullen, B. R. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2361. (c) Jones, K. A.; Peterlin, B. M. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 717. (d) Pereira, L. A.; Bentley, K.; Peeters, A.; Churchill, M. J.; Deacon, N. J. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 663.

第2章 パビン誘導体の合成とTNF- α 産生阻害活性

2-1. 序論

パビン (Pavine) アルカロイド¹は中国南部や台湾などのクスノキ科植物に含まれるイソキノリンアルカロイドの一つである。窒素原子で架橋された4環構造で、同種のイソパビンアルカロイド (Amuresinineなど)とともに非常に特徴的な構造を有している。Papaverine (平滑筋弛緩作用)、Tubocurarine (抗痙攣作用)、Coclaurine (痙攣作用)、Berberine (殺菌作用)、Noscapine (鎮咳作用)、Trimethoquinol (気管支拡張作用、化学合成品)など、同種のベンジルイソキノリンアルカロイド類は古くから種々の薬理活性が知られていたが²、パビン類については、最近のThalimonineの抗ウイルス作用やO-methyl-neocaryachineの抗不整脈作用の報告までほとんど知られていなかった³。今回、化合物 **5a** に認められたTNF- α 産生阻害活性は、パビンアルカロイドの新しい薬理作用としても興味深い知見であり、まずこれをリードとした合成展開を行った。

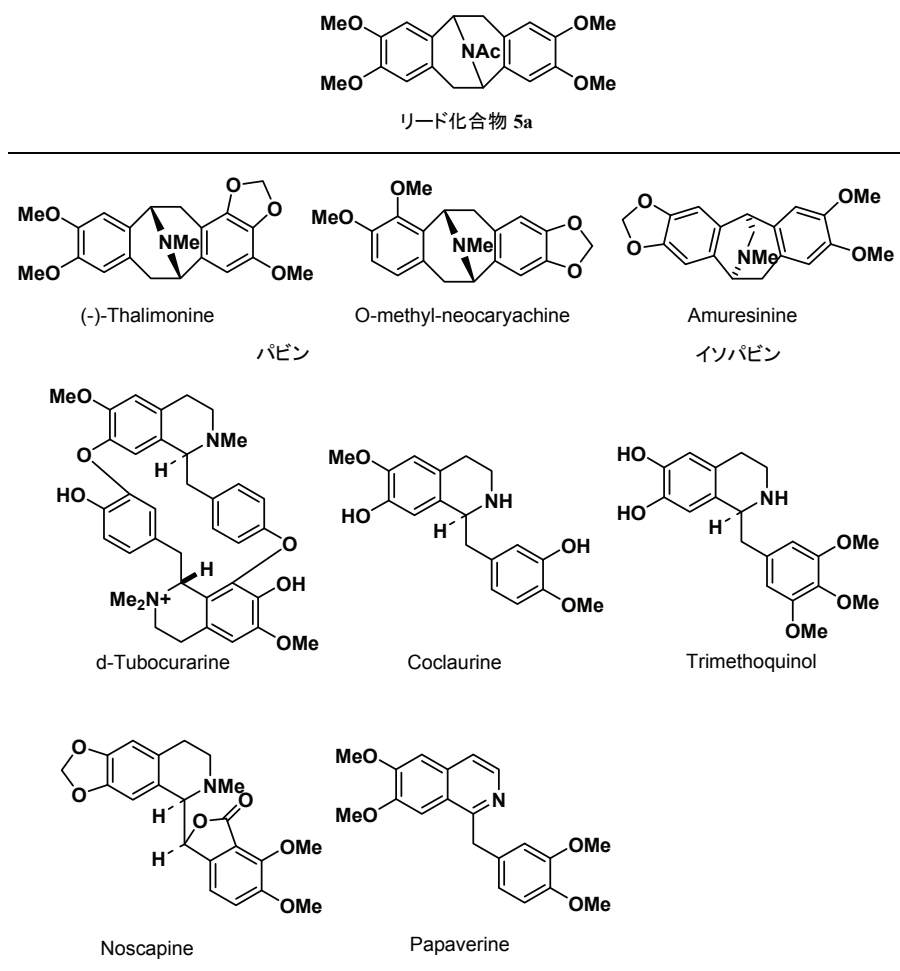
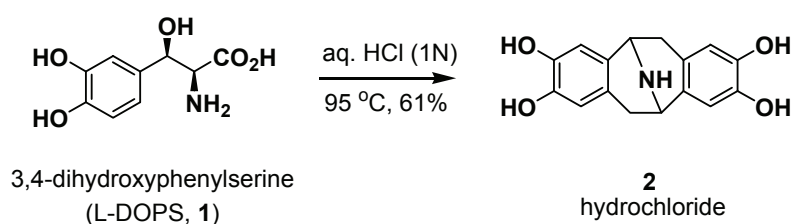


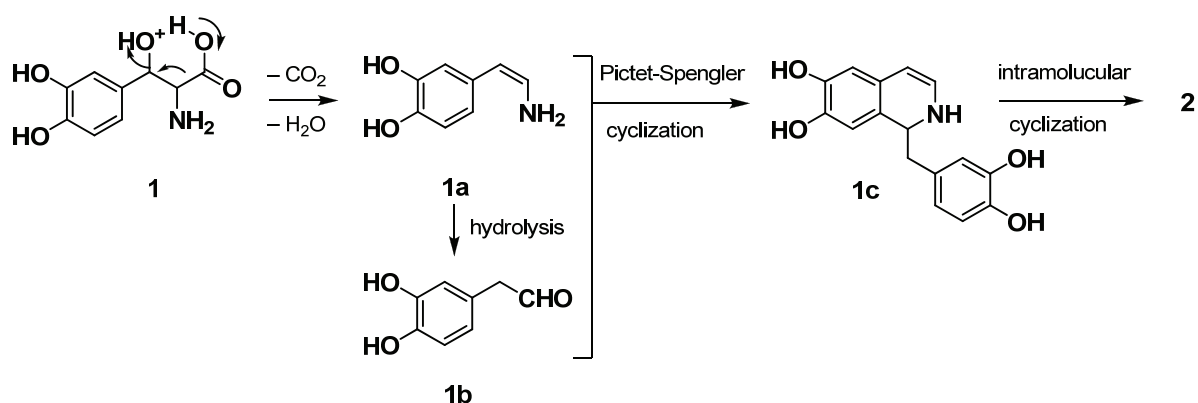
Fig. 2-1 リード化合物 **5a** とパビン、その他のベンジルイソキノリンアルカロイド

2-2. パビン誘導体の合成

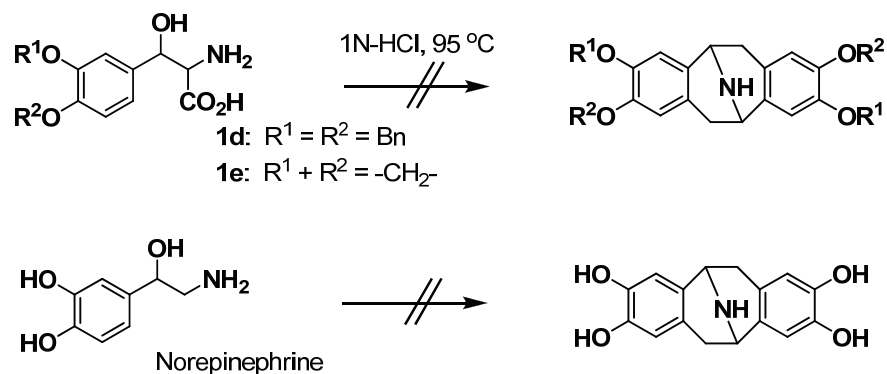
Scheme 2-1に示すように、3,4-ジヒドロキシフェニルセリン(L-DOPS, **1**)を塩酸中で加熱処理することにより、重要中間体であるテトラヒドロキソパビナン **2**⁴がラセミ体として生成する。生成物の構造から、2量化反応が進行した結果であり非常に興味深い反応であるが、この反応のメカニズムは、以下のように考えている。即ち、Scheme 2-2の様に脱炭酸、ひき続いての脱水反応により生じたエナミン **1a**が一部加水分解したアルデヒド体 **1b**と閉環し(Pictet-Spengler cyclization)⁵、ジヒドロイソキノリン環構造を形成した後(**1c**)、さらに分子内閉環反応⁶により化合物 **2**へ誘導される機構を推定している。さらに、この反応の一般性を検証するために、カテコール部をエーテル保護した基質 **1d**, **1e**を用いて同様の反応を行ったが、目的の2量化反応は進行しなかった。また、カルボキシル基のないノルエピネフリンでもこの反応は進行しないことから(Scheme 2-3)、パラ位フェノールの強力な電子供与性と脱炭酸を開始反応とするカルボキシル基の重要性が示唆され、また続いた分子内閉環反応においてもメタ位フェノールの電子供与性が影響しており、ジヒドロキシフェニルセリンに特異的な反応であると考えられた。また、推定したメカニズムの一部は、イソキノリンアルカロイド類で報告されている生合成経路にも一部共通するステップもあり興味深い⁷。



Scheme 2-1 Synthesis of tetrahydroxypavine **2**



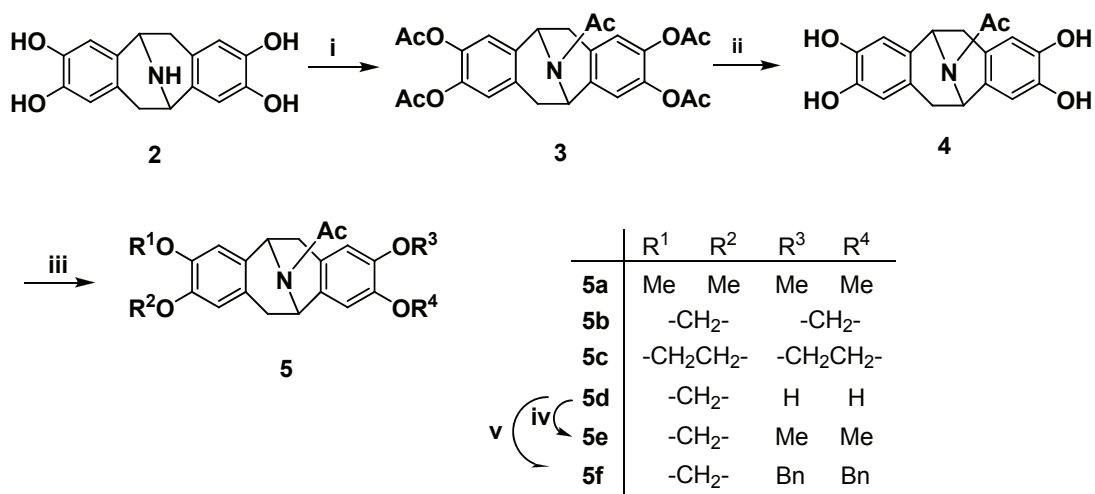
Scheme 2-2 Speculation of synthetic mechanism



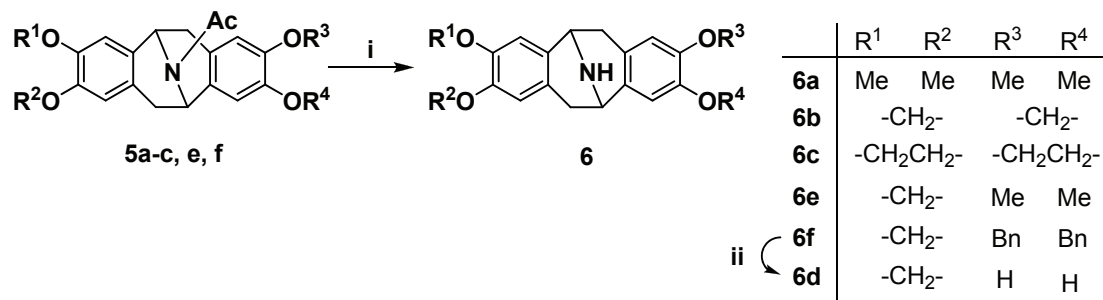
Scheme 2-3 Reaction of catechol analogs

中間体化合物 **2** を用いて、以降の誘導体合成を実施した。反応性官能基をすべてアセチル化した後 (**3**)、カテコール部のみを脱保護して、ジカテコール体 **4** を得た。これに対し各種アルキル化を行いテトラメトキシ (**5a**)、ジメチレンジオキシ (**5b**) とジエチレンジオキシ (**5c**) 化合物を合成した。また、メチレンジオキシ化反応で用いる試薬の当量を制御することでモノカテコール体 **5d** とした後、別のアルキル化剤で反応させ、非対称化合物 **5e, f** を得た (Scheme 2-4)。

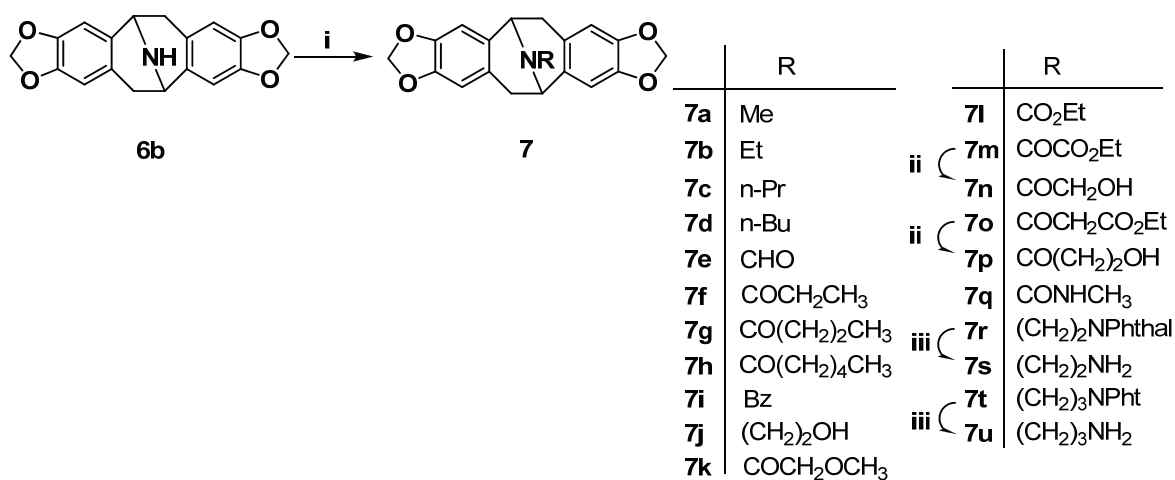
合成したアセチル体 **5** をアルカリ加水分解し、対応する 2 級アミン化合物 **6a-e** を得た (Scheme 2-5)。カテコール構造はアルカリ条件に非常に弱く、酸化分解が容易に起こるため、モノカテコール化合物 **6d** の合成については、ベンジル保護体 **5f** から同様に加水分解した後 (**6f**)、接触還元により脱保護することで目的物を得た。



Scheme 2-4 Synthesis of pavines **3-5**. CONDITIONS: (i) Ac_2O , Et_3N , DMF, 0°C , 95%; (ii) K_2CO_3 , MeOH, 40°C , 99%; (iii) MeI (8 eq.), Et_3N , DMF, 40°C , 86% (for **5a**); CH_2ClBr (2.3 eq.), Cs_2CO_3 , DMF, 100°C , 68% (for **5b**); $\text{Br}(\text{CH}_2)_2\text{Br}$ (6 eq.), K_2CO_3 , DMF, 110°C , 85% (for **5c**); or CH_2ClBr (1.1 eq.), Cs_2CO_3 , DMF, 100°C , 22% (for **5d**); (iv) MeI, K_2CO_3 , DMF, 50°C , 32%; (v) BnBr, K_2CO_3 , DMF, 70°C , 52%.



Scheme 2-5 Synthesis of pavines **6a-d**. CONDITIONS: (i) 6N-NaOH, MeOCH₂CH₂OH, reflux, 45-99%; (ii) H₂, 10%-Pd/C, MeOH, rt., 89%.



Scheme 2-6 Synthesis of pavines **7a-u**. CONDITIONS: (i) RX, Et₃N, 0-80 °C, CHCl₃ or DMF, 21-89% (for **7a-d**, **7j**, **7r**, **7t**); R'COCl, Et₃N, CH₂Cl₂ or CHCl₃, 0 °C, 74-98% (for **7f-i**, **7k**, **7m**, **7o**); HCO₂H, EDC, DMAP, DMF, rt., 85% (for **7e**); EtOCOCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 82% (for **7l**); or CH₃NCO, CHCl₃, rt., 86% (for **7q**); (ii) LiBH₄, THF, 0 °C, 37-53%; (iii) H₂NNH₂, EtOH, rt., 59-71%.

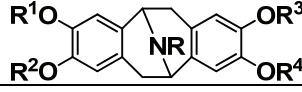
架橋窒素上の置換基変換は、ジメチレンジオキシ化合物 **6b** を基質に用いて行った。Scheme 2-6 に示す様に一般的なアルキル化、アシル化と場合によっては、さらなる官能基変換により、化合物 **7a-u** を合成した。

2-3. パピン誘導体の構造活性相関

得られた誘導体について、マウス腹腔マクロファージを用いたTNF- α 産生阻害活性を調べた。細胞をリポポリサッカライド(LPS)で刺激すると、1時間以内に急速なTNF- α mRNAの発現が上昇し、1.5~2時間程でタンパクが合成される。培養上清中に産生されたTNF- α レベルをTNF- α 特異的抗体を用いたELISA法により測定することで、その産生阻害活性を評価した。またLPS非存在下では培養上清中にTNF- α の産生は認められなかった。

結果をTable 2-1 に示した。いくつかの誘導体では、陽性対照であるペントキシフィリン(PTX)⁸よりも強い活性を示すことが分かった。カテコール部の変換が活性に大きく影響し、閉環構造をとるジメチレンジオキシあるいはジエチレンジオキシ構造の**5b**, **5c**, **6b**, **6c**で強い阻害活性を示した。化合物**5a**のように一部例外も認められたが、開環構造のジカテコール(**2**, **4**)、テトラアセトキシ(**3**)とテトラメトキシ(**6a**)体等では活性が消失した。また片方のみメチレンジオキシ構造とした場合、水酸基(**5d**, **6d**)あるいはベンジルオキシ基(**5f**, **6f**)で活性が減弱することから、この部分は水素結合受容部として機能していること、また立体的な制約も認めら

Table 2-1 *in vitro* TNF- α 産生阻害活性 —カテコール部の変換—

													
Compd ^a	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ ^b (μ M)	Compd ^a	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ ^b (μ M)
4	Ac	H	H	H	H	>100	2	H	H	H	H	H	>100
3	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	>100							
5a	Ac	Me	Me	Me	Me	38	6a	H	Me	Me	Me	Me	>100
5b	Ac	-CH ₂ -	-CH ₂ -			13	6b	H	-CH ₂ -	-CH ₂ -			15
5c	Ac	-CH ₂ CH ₂ -	-CH ₂ CH ₂ -			34	6c	H	-CH ₂ CH ₂ -	-CH ₂ CH ₂ -			22
5e	Ac	-CH ₂ -	Me	Me		22	6e	H	-CH ₂ -	Me	Me		100
5d	Ac	-CH ₂ -	H	H		46	6d	H	-CH ₂ -	H	H		44
5f	Ac	-CH ₂ -	Bn	Bn		>50	6f	H	-CH ₂ -	Bn	Bn		>50
PTX^c						68							

^aAll the compounds tested were racemic

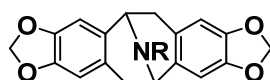
^bInhibition in mouse macrophages. Results are average of two independent experiments.

^cPentoxifylline

れ、極めて狭いファーマコフォア領域であると推察される。またメチレンジオキシ基の特徴として、その電子供与性は他のメトキシ基やエチレンジオキシ基と比較した場合に弱いことから⁹、電子的な効果も影響していることも考えられた。

カテコール部変換により、化合物 **5b**, **6b** が良好な阻害活性を示したことから、この部分をジメチレンジオキシ構造に固定し、架橋窒素上の変換を行った (Table 2-2)。アルキル誘導体 **6b**, **7a-7d** では鎖長の増大に伴い活性が減弱する傾向にあった。同様な傾向がアシル誘導体 **5b**, **7e-7i** でも認められ、置換基の嵩高さによる立体的な制約のあるファーマコフォアが判明した。しかし、官能基の種類についてはかなり許容範囲が広くエーテル (**7k**)、エステル (**7m**)、アルコール (**7n**)、ウレア (**7q**) やアミン (**7s**) などの置換基に対して良好な TNF- α 産生阻害活性を示した。

Table 2-2 *in vitro* TNF- α 産生阻害活性 —架橋窒素上の変換—



Compd ^a	R	IC ₅₀ (μ M) ^b	Compd ^a	R	IC ₅₀ (μ M) ^b
6b	H	15	7j	(CH ₂) ₂ OH	36
7a	Me	19	7k	COCH ₂ OCH ₃	17
7b	Et	27	7l	CO ₂ Et	31
7c	n-Pr	56	7m	COCO ₂ Et	15
7d	n-Bu	58	7o	COCH ₂ CO ₂ Et	26
7e	CHO	22	7n	COCH ₂ OH	20
5b	Ac	13	7p	CO(CH ₂) ₂ OH	27
7f	COCH ₂ CH ₃	11	7q	CONHMe	15
7g	CO(CH ₂) ₂ CH ₃	11	7s	(CH ₂) ₂ NH ₂	14
7h	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	>100	7u	(CH ₂) ₃ NH ₂	52
7i	Bz	38			

^aAll the compounds tested were racemic

^bInhibition in mouse macrophages. Results are averages of two independent experiments.

2-4. パビン誘導体からの異なる展開

異なるアプローチによる活性の向上が可能か検討した。すなわち、Fig. 2-2の様にこれまでの固定化されたコンホメーションを開裂させて構造にフレキシビリティを持たせた場合の活性について調べることにした。こうしたタイプの化合物に活性が見出せれば、これまでの限定された合成から新たな展開の方向が期待できると考えた。以下、一般的なイソキノリン合成に用いられる手法により2種類のタイプの化合物を合成した。

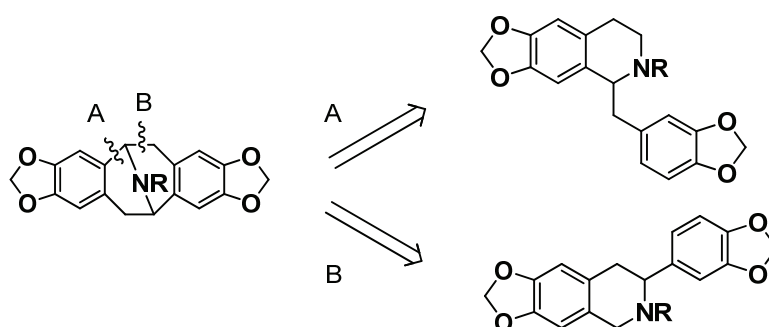
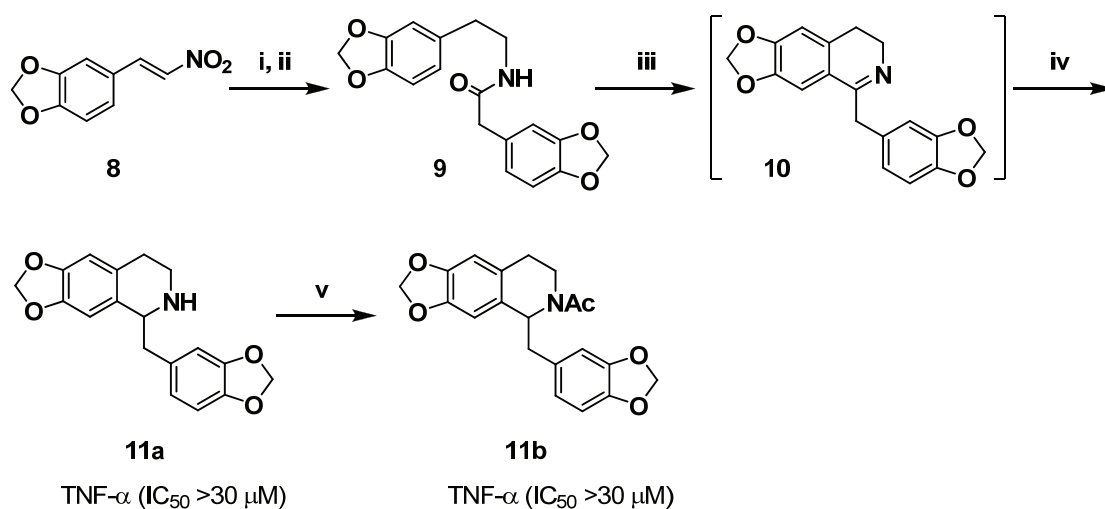


Fig. 2-2 環構造の開裂

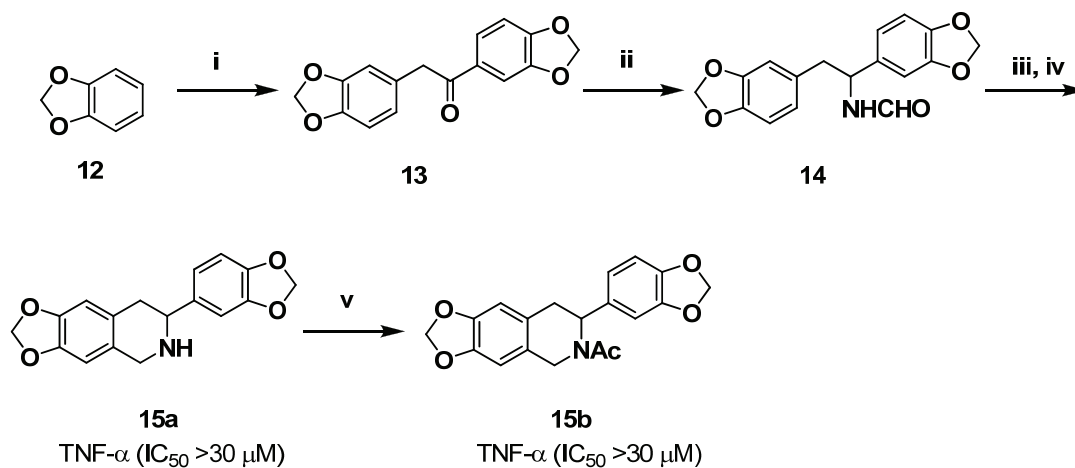
原料となる β -ニトロスチレン **8** を還元し¹⁰、対応する酸クロライドと縮合して得たアミド体 **9** を Bischler-Napieralski 反応¹¹により閉環して、ジヒドロイソキノリン **10** へと誘導した。化合物 **10** は容易に酸化を受けることから単離することなく還元を行い、テトラヒドロベンジルイソキノリン体 **11a** を、また続いてのアセチル化により化合物 **11b** を合成した (Scheme 2-7)。

テトラヒドロフェニルイソキノリン体は Scheme 2-8 に示す方法で合成した。1,3-ベンゾジオキソール **12** から Friedel-Crafts 反応によりケトン体 **13** とし、これを Leuckart 反応 (**14**)、加水分解と Pictet-Spengler 反応を順次行い、化合物 **15a** を得た。また同様にアミの基をアセチル化して化合物 **15b** とした¹²。

TNF- α 産生阻害活性については、同スキーム上にも記載したが、残念ながら、いずれの誘導体においても期待した阻害活性は認められなかった ($IC_{50} > 30 \mu M$)。この結果は、パビン構造のきわめて特殊な固定化されたコンホメーションの重要性を逆に再確認することになり、さらなる展開の難しさから、これ以上の検討を中断した。



Scheme 2-7 Synthesis of tetrahydrobenzylisoquinolines **11**. CONDITIONS: (i) LiAlH_4 , THF, 0 °C, 67%; (ii) homopiperonyl chloride, Et_3N , THF, 0 °C, 63%; (iii) POCl_3 , CH_3CN ; (iv) NaBH_4 , MeOH, 41% (2 steps); (v) Ac_2O , Et_3N , CHCl_3 , 63%.



Scheme 2-8 Synthesis of tetrahydrophenylisoquinolines **15**. CONDITIONS: (i) homopiperonyl chloride, SnCl_4 , CH_2Cl_2 , 48%; (ii) HCO_2NH_4 , HCONH_2 , HCO_2H , 180 °C; (iii) 6N-NaOH, EtOH, reflux, 99%; (iv) formalin, 1N-HCl, EtOH, 60 °C, 80%; (v) Ac_2O , Et_3N , CHCl_3 , 58%.

2-5. マウスエンドトキシンショックモデルにおける化合物の評価

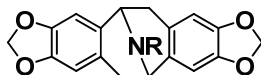
続いて、パビン誘導体の *in vivo* における効果を調べるため、ガラクトサミン付加-エンドトキシンショックモデルマウスを用いて検討した。マウスにLPSを投与すると典型的なショック症状を呈し、マウスは急速に死亡することが知られている。このため、このモデルはヒトにおけるエンドトキシンショックの病態モデルとして考えられている。またこのモデルでは、LPS投与直後、マウス血中TNF- α レベルの一過性の上昇が認められること、さらに抗TNF抗体投与により、ショック致死が抑制されることより、TNF- α が病態発現の主要なメディエーターとして働いていることが示唆されている¹³。

一方、ガラクトサミン投与は、上記LPSによるショック発症の感受性を著しく高めることが報告されており、しばしば上記エンドトキシンショックモデルにおいてLPSと併用し投与される¹⁴。従って上記評価系を用いてTNF- α 産生阻害剤の経口投与における有用性を明らかにするため、評価を実施した。

Table 2-3 に示すように合成した阻害剤は、100 mg/kg, 50 mg/kg の経口投与において用量依存的な致死抑制活性を示した。中でも特に化合物 **5b**, **6b**, **7b**, **7e**, **7f**, **7j**, **7s** は70%以上 (50 mg/kg) の強い抑制活性を示した。評価化合物の中には、例えば **6c**, **7g** や **7m** の様に *in vitro* での活性が *in vivo* の効果に反映されないものもあったが、これらの結果については物性等の理由から吸収性が十分得られていないこと、あるいは吸収された後の肝臓などにおける代謝安定性が悪いなどの理由が考えられる。逆に、**7j** の様に弱い *in vitro* 活性であるにもかかわらず、強い *in vivo* 作用を示す化合物では、吸収性に優れており阻害作用を示す化合物濃度が血中レベルで十分確保されていることで説明できるものと考えている。

また、この中から代表化合物 **7s** を用いて、血中の TNF- α レベルと薬効の関連についてより詳細な検討を行った (Fig. 2-3)。エンドトキシンショックモデルにおいて、LPS 投与 1.5 時間後には血中 TNF- α レベルの上昇が引き起こされることが確認された (A)。それに対して薬剤投与群では用量依存的に TNF- α レベルを減少させると共に、生残率が改善され (B)、*in vivo* においても TNF- α 産生阻害作用に基づく薬剤の薬効を確認することができた。また、この評価モデルは、*in vivo* での薬剤の効果を確認すると共に、経口投与での薬物動態を含めたプロフィールの良い化合物を選択するために適した評価であると考えられた。

Table 2-3 LPS 誘発ガラクトサミン負荷エンドトキシンショック致死抑制作用



Compd	生残数, day 7			Compd	生残数, day 7		
	0	50	100 (mg/kg)		0	50	100 (mg/kg)
5b	0/10	7/10	9/10	7j	0/10	7/10	9/10
5c	0/10	4/10	7/10	7l	0/10	3/10	3/10
6b	0/10	7/10	10/10	7m	0/10	3/10	2/10
6c	0/10	1/10	4/10	7n	0/10	6/10	9/10
7b	0/10	9/10	10/10	7o	0/10	2/10	3/10
7e	0/10	7/10	7/10	7p	0/10	5/10	6/10
7f	0/10	8/10	8/10	7q	0/10	6/10	6/10
7g	0/10	4/10	5/10	7s	0/10	8/10	8/10
PTX	0/10	N.T.	4/10				

Method: Female BALB/c mice (5 weeks old) were injected i.v. with a mixture of D-galactosamine (1 g/kg) and LPS (1 µg/kg). Compounds were dissolved in 10% NIKKOL[®] solution (Nippon Surfactant Kougyou, Japan) containing 5% DMSO and administered orally to mice immediately after D-galactosamine/LPS injection. The survival rates of the 10 mice in each treatment were monitored during the last 7 days of the experiment; PTX: Pentoxifylline; N.T.: Not tested.

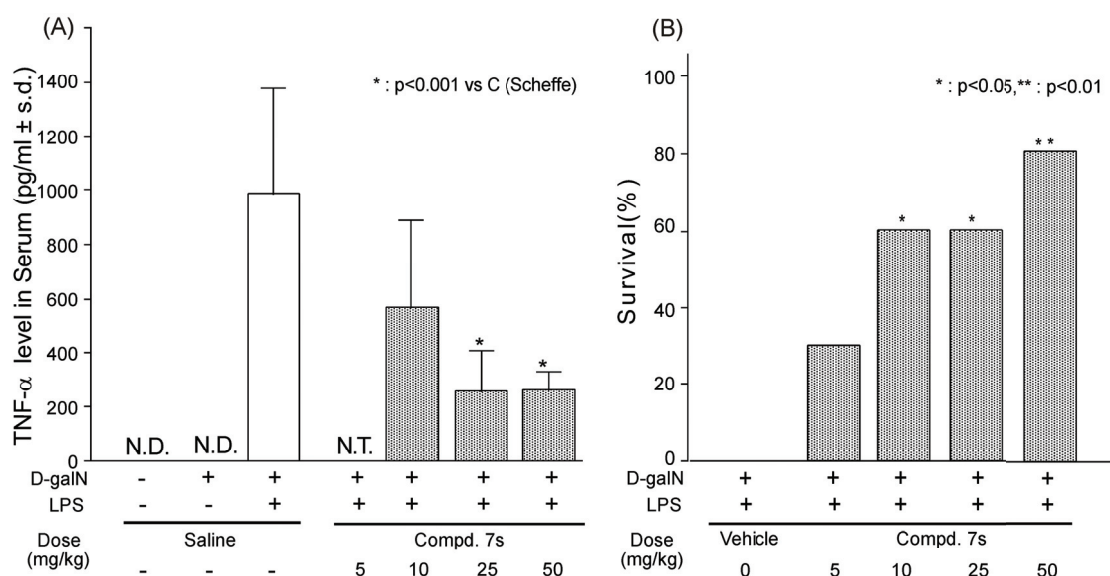


Fig. 2-3 化合物 7s のエンドトキシンショックモデルにおける血中 TNF-α レベル (A) と生残率 (B) (A): Serum samples were obtained 1.5h after LPS/D-galN injection and analyzed for TNF-α level by ELISA. The results were expressed as mean±s.d.; *: P<0.05 vs C (ANOVA, Scheff's F); N.D.: not detected. (B) *: P<0.05, **: p<0.01 vs vehicle (Fisher's exact p-value); N.D.: not tested.

2-6. 小括

パビン誘導体の構造活性相関について以下にまとめた (Fig. 2-4)。

- ・ 架橋窒素部およびカテコール部ともに、立体的な制約が認められた。
- ・ 窒素上の置換基はその種類に関わらず活性を維持できた。
- ・ カテコール部においてはメチレンジオキシ構造など閉じた環構造が最適であり、立体的効果とともに電子的効果もあることが推察され、極めて狭いファーマコフォアモデルが示唆された。
- ・ パビン構造由来のコンホメーションも活性に大きな影響し、同じテトラヒドロイソキノリンではあるが、架橋部を切断し構造的にフレキシビリティを持たせることで活性が消失した。

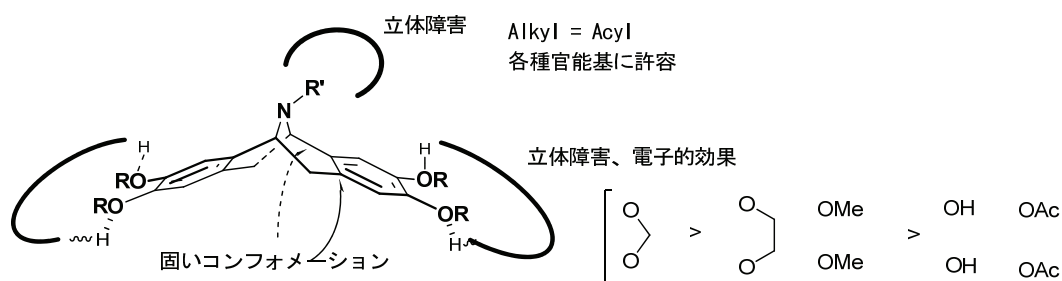


Fig. 2-4 構造活性相関まとめ

これら誘導体の *in vitro* ならびに *in vivo* における TNF- α 産生阻害作用について確認し、またショック致死モデルを用いた薬効試験からその有効性を評価できた。しかし、残念ながらこれらの化合物は後述するより高次の評価と位置付けていた関節リウマチモデルであるコラーゲン誘発関節炎 (CIA) 試験において有効性を示さなかった。パビン誘導体の TNF- α 産生阻害活性が強いものでも十数 μM という活性の弱さも原因の一つとして考えられた。エンドトキシンショックのような一過性の TNF- α 産生によって引き起こされる急性モデルと比較して、その産生が持続的で、また他のサイトカイン等の因子がより複雑に絡み合っていると思われる慢性炎症モデルでは、その劇的な効果を認め辛いともいえる。そこで更なる活性の向上を目指す必要があると考えたが、上述の非常に狭い構造活性相関および合成反応機構の解析からの基質特異性も考慮すると、本化合物は創薬展開を行う上では良いリードとはならないと判断し、新たなリード化合物を用いた合成展開を図ることとした。

2-7. 実験の部

2-7-1. Chemistry

合成における各種物性データの測定機器、測定方法および物性データの表記法を以下に示した。

融点はThomas Hooverキャピラリ融点測定器を用いて測定し、未補正である。

¹H核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、JEOL JNM AL-400 FT NMR (400 MHz) spectrometerまたは、JEOL GSX270 FT NMR (270 MHz) spectrometerを用いて室温で測定した。化学シフトはテトラメチルシラン (TMS) を内部標準としてδ値 (ppm) で表示した。いずれもシグナルの分裂様式は、s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broadなどの略号を用いて表した。

質量分析スペクトル (MS) は、Bruker Esquire 3000 Plus mass spectrometer (ES ionization modes, positive or negative) を用いて測定した。

高分解能質量分析スペクトル (HRMS) は、LTQ Orbitrap Discovery (ES ionization modes, positive) を用いて測定した。

元素分析は、CE Instruments EA1110 elemental analyzer [C, H, N]とYokogawa IC7000S Ion Chromatoanalyzer[F, Cl, Br]を用いて測定した。全ての元素分析の結果は、理論値の±0.4%以内を適とした。

薄層クロマトグラフィー (TLC) にはMerk Kieselgel 60 F254 precoated platesを用いた。カラムクロマトグラフィーにはMerk Kieselgel 60またはCica-Reagent Silica Gel 60を用いた。

5, 6, 11, 12-Tetrahydrodibenzo[a,e]cycloocten-5, 11-imine-2, 3, 8, 9-tetrol hydrochloride (2)

L-threo-(3,4-dihydroxyphenyl)serine (**1**, 600 g) と 1N-塩酸 (3.6 L) の混合物を窒素雰囲気下、90 °C で 5 時間加熱攪拌した。反応混合物を冷却し、一晚放置して生じた結晶をろ別した。粗生成物にアセトン (600 ml) と CH₃CN (2 L) を加え、50 °C で 30 分攪拌洗浄後、結晶をろ別して化合物 **2** (275 g, 61%) を得た。

Mp 225-229 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.60 (2H, s, D₂Oexchangeable), 9.06 (2H, s, D₂O exchangeable), 8.98 (2H, s, D₂O exchangeable), 6.64 (2H, s), 6.42 (2H, s), 4.71 (2H, d, J = 5.1 Hz), 3.35 (2H, dd, J = 16.6, 5.1 Hz), 2.65 (2H, d, J = 16.6 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 145.49, 144.42, 123.67, 120.56, 115.16, 113.44, 47.86, 34.22; MS (ESI, positive) m/z 286 (M+1); Anal. calcd for C₁₆H₁₆ClNO₄·0.25H₂O: C, 58.90; H, 5.10; N, 4.29; Cl, 10.87. Found: C, 58.85; H, 5.12; N, 4.36; Cl, 10.69.

2, 3, 8, 9-Tetraacetoxy-13-acetyl-5, 6, 11, 12-tetrahydrodibenzo [a,e]cycloocten -5, 11- imine (3)

化合物 **2** (50 g, 0.155 mol)、Et₃N (94.11 ml, 0.93 mol) と DMF (500 ml) の混合物に、窒素雰囲気下、氷浴中において Ac₂O (79.12 g, 0.775 ml) を 30 分かけて滴下した。室温において 5 時間攪拌した後、生じた塩をろ別し、ろ液を減圧濃縮した。残渣に水を加えて CH₂Cl₂ で抽出し、有機層を MgSO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を EtOH から結晶化させ、化合物 **3** (73.15 g, 95%) を得た。

Mp 236-237 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.05 (1H, s), 7.04 (1H, s), 6.86 (2H, s), 6.04 (1H, d, J = 5.6 Hz), 5.20 (1H, d, J = 5.6 Hz), 3.43 (2H, m), 2.93 (1H, d, J = 15.5 Hz), 2.81 (1H, d, J = 16.2 Hz), 2.27 (3H, s), 2.26 (3H, s), 2.25 (3H, s), 2.23 (3H, s), 2.18 (3H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₆H₂₆NO₉: 496.1602. Found: 496.1588 (M+H).

13-Acetyl-5,6,11,12-tetrahydrodibenzo[a,e]cycloocten-5,11-imine-2,3,8,9-tetrol (4)

化合物 **3** (73.0 g, 0.147 mol)、K₂CO₃ (10 g, 0.072 mol) と MeOH (1 L) の混合物を窒素雰囲気下 40 °C において 30 分攪拌した。反応混合物に酢酸を加え酸性とし減圧濃縮した後、残渣に水を加えてトリチュレートし、化合物 **4** (48 g, 99%) を得た。

Mp 294-296 °C (dec.); ¹H NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.69 (4H, m), 6.59 (1H, s), 6.56 (1H, s), 6.32 (2H, s), 5.58 (1H, d, J = 5.0 Hz), 5.09 (1H, d, J = 5.0 Hz), 3.18 (1H, dd, J = 16.2, 5.0 Hz), 2.98 (1H, dd, J = 15.8, 5.0 Hz), 2.53 (2H, m), 2.06 (3H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₈H₁₈NO₅: 328.1179. Found: 328.1174 (M+H).

13-Acetyl-2,3,8,9-tetramethoxy-5,6,11,12-tetrahydrodibenzo[a,e]cycloocten-5,11-imine (5a)

化合物 **4** (400 mg, 1.22 mmol)、K₂CO₃ (1.35 g, 9.76 mmol) と DMF (11 ml) の混合物に、ヨウ化メチル (0.61 ml, 9.76 mmol) を滴下し、窒素雰囲気下 40 °C で 3 時間攪拌した。反応混合物に水を加えて EtOAc で抽出し、有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を MeOH から結晶化させ化合物 **5a** (403 mg, 86%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (1H, s), 6.65 (1H, s), 6.49 (1H, s), 6.45 (1H, s), 5.97 (1H, d, J = 5.4 Hz), 5.14 (1H, d, J = 5.4 Hz), 3.87 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.43-3.34 (2H, m), 2.87 (1H, d, J = 15.4 Hz), 2.76 (1H, d, J = 15.1 Hz), 2.20 (3H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₂H₂₆NO₅: 384.1805. Found: 384.1798 (M+H).

15-Acetyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (5b)

化合物 **4** (40 g, 0.122 mol)、炭酸セシウム (119 g, 0.366 mol)、CH₂ClBr (47.4 g, 0.266 mol) と DMF (600 ml) の混合物を窒素雰囲気下 100 °C で 3 時間加熱攪拌した。不溶の塩をろ別後、ろ液を減圧濃縮し、残渣に水を加えて EtOAc で抽出した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:EtOAc, 9:1, v/v) で精製した。濃縮残渣に少量の MeOH を加えて溶かした後、水を加えてトリチュレートし化合物 **5b** (28 g, 68 %) を得た。

Mp 144-145 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.64 (1H, s), 6.61 (1H, s), 6.45 (1H, s), 6.42 (1H, s), 5.91-5.87 (3H, m), 5.85-5.84 (2H, m), 5.07 (1H, d, $J = 5.4$ Hz), 3.36-3.29 (2H, m), 2.80 (1H, d, $J = 14.9$ Hz), 2.69 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 2.18 (3H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_5$: 352.1179. Found: 352.1175 (M+H).

17-Acetyl-6,7,14,15-tetrahydrocycloocta [1,2-g:5,6-g']bis[1,34]benzodioxane-6,14-imine (5c).

化合物 **4** (10 g, 0.031 mol)、 K_2CO_3 (42.8 g, 0.31 mol)、 $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ (34.9 g, 0.186 mol) と DMF (186 ml) を用いて **5b** と同様に反応させ化合物 **5c** (9.81 g, 85%) を得た。Mp 170-175 °C; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 6.67 (1H, s), 6.65 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.46 (1H, s), 5.90 (1H, d, $J = 5.6$ Hz), 5.07 (1H, d, $J = 5.3$ Hz), 4.18 (8H, s), 3.29 (2H, m), 2.79 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 2.69 (1H, d, $J = 15.5$ Hz), 2.16 (3H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_5$: 380.1492. Found: 380.1488 (M+H).

14-Acetyl-5,6,11,12-tetrahydrobenzo [5,6] cycloocta [1,2-f]-1,3-benzodioxol-5,11-imine-8,9-diol (5d)

化合物 **4** (36 g, 0.11 mol)、炭酸セシウム (39.40 g, 0.12 mol)、 CH_2ClBr (21.0 g, 0.12 mol) と DMF (540 ml) の混合物を窒素雰囲気下 100 °C で 5.5 時間加熱攪拌した。不溶の塩をろ別後、ろ液を減圧濃縮し、残渣に 1N 塩酸を加えて酸性とした。不溶の固体をろ別乾燥後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 :MeOH, 30:1, v/v) で精製し、MeOH から結晶化させ化合物 **5d** (8.03 g, 22%) を得た。

Mp 161-165 °C (dec.); ^1H NMR (400 MHz $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.73 (2H, br s, OH), 6.88, 6.86, 6.61, 6.58, 6.56, 6.55, 6.33, 6.32 (4H, s, Ar \underline{H} , rotamer), 5.92 (1H, s, OCH_2O , rotamer), 5.87, 5.86 (1H, s, OCH_2O , rotamer), 5.61, 5.70 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_4\text{N}$, rotamer), 5.15, 5.22 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, CH_2CH_4 , rotamer), 3.22 (1H, m, $\text{CH}_4\text{H}_B\text{CHN}$), 3.02 (1H, m, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{CHN}$), 2.67 (2H, m, $\text{CH}_4\text{H}_B\text{CH}$, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{CHN}$), 2.08 (3H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NO}_5$: 340.1179. Found: 340.1172 (M+H); Anal. calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 63.86; H, 5.36; N, 3.92. Found: C, 64.00; H, 5.40; N, 4.01.

14-Acetyl-8,9-dimethoxy-5,6,11,12-tetrahydrobenzo [5,6] cycloocta [1,2-f]-1,3-benzodioxol-5,11-imine (5e)

化合物 **5d** (339 mg, 1 mmol)、 K_2CO_3 (553 mg, 4 mmol) と DMF (10 ml) の混合物にヨウ化メチル (0.25 ml, 4 mmol) を滴下し、窒素雰囲気下 50 °C において 4 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮後、残渣に水を加えて CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 :EtOAc, 40:1, v/v) で精製し、 Et_2O から結晶化させ化合物 **5e** (117 mg, 32%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.66, 6.63 (2H, s, rotamer), 6.48, 6.46, 6.44, 6.43 (2H, s,

rotamer), 5.93 (1H, d, J = 5.6 Hz), 5.89, 5.84 (1H, d, J = 1.5 Hz, rotamer), 5.88, 5.85 (1H, d, J = 1.2 Hz, rotamer), 5.11-5.09 (1H, m), 3.87, 3.85 (3H, s, rotamer), 3.79, 3.78 (3H, s, rotamer), 3.40-3.31 (2H, m), 2.86-2.81 (1H, m), 2.75-2.70 (1H, m), 2.19, 2.19 (3H, s, rotamer); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₁H₂₂NO₅: 368.1492. Found: 368.1487 (M+H); Anal. calcd for C₂₁H₂₁NO₅: C, 68.65; H, 5.76; N, 3.81. Found: C, 68.25; H, 5.74; N, 4.01.

14-Acetyl-8,9-dibenzyloxy-5,6,11,12-tetrahydrobenzo[5,6]cycloocta[1,2-f]-1,3-benzodioxol-5,11-imine (5f)

化合物 **5d** (339 mg, 1 mmol)、K₂CO₃ (691 mg, 5 mmol) と DMF (10 ml) の混合物に BnBr (855 mg, 5 mmol) を滴下し、窒素雰囲気下 70 °C において 9 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮後、残渣に水を加えて CHCl₃ で抽出した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:EtOAc, 25:1, v/v) で精製し、Et₂O から結晶化させ化合物 **5f** (268 mg, 52%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.28 (10H, m), 6.72, 6.69 (1H, s, rotamer), 6.63, 6.60 (1H, s, rotamer), 6.58, 6.53 (1H, s, rotamer), 6.41 6.39 (1H, s, rotamer), 5.91-5.84 (3H, m), 5.11-5.03 (5H, m), 3.35-3.25 (2H, m), 2.81-2.57 (2H, m), 2.16, 2.15 (3H, s, rotamer); HRMS (ESI, positive) calcd for C₃₃H₃₀NO₅: 520.2118. Found: 520.2103 (M+H).

5,6,12,13-Tetrahydrocycloocta [1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine hydrochloride (6b)

化合物 **5b** (28 g, 80 mmol)、12N-NaOH 水溶液 (250 ml) と MeO(CH₂)₂OH (250 ml) の混合物を 12 時間還流した。反応混合物に水を加えて CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去し、MeOH から結晶化させ、5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (14.2 g, 58%, mp 201-202 °C) を得た。得られたアミン体化合物 (1.1 g, 3.6 mmol) の Et₂O 溶液に 1N-HCl/Et₂O (5 ml) を加え、析出した塩をろ別し、EtOH より再結晶を行い化合物 **6b** (1.04 g, 85%) を得た。

Mp >300 °C; ¹H NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.95 (2H, brs, NH₂⁺Cl⁻), 6.94 (2H, s, ArH), 6.65 (2H, s, ArH), 5.98 (2H, d, J = 1.0 Hz, OCH₂O), 5.92 (2H, d, J = 1.0 Hz, OCH₂O), 4.84 (2H, d, J = 4.6 Hz, CH₂CHN), 3.46 (2H, d, J = 4.6, 17.4 Hz, CH_AH_BCHN), 3.46 (2H, d, J = 17.4 Hz, CH_AH_BCHN); Anal. calcd for C₁₈H₁₆NO₄Cl · 0.5H₂O: C, 60.94; H, 4.83; N, 3.95. Found: C, 60.69; H, 4.81; N, 3.74; HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₈H₁₆NO₄: 310.1074. Found: 340.1069 (M+H).

化合物 **6b** の合成と同様に反応を行い、以下の化合物を合成した。

2,3,8,9-Tetramethoxy-5,6,11,12-tetrahydrodibenzo[a,e]cycloocten-5,11-imine hydrochloride (6a)

314 mg (71% from MeOH); mp 252 °C (dec.); ¹H NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.87 (2H, brs, NH2⁺Cl⁻), 6.96 (2H, s, ArH), 6.64 (2H, s, ArH), 4.86 (2H, d, J = 5.0 Hz, CH₂CHN), 3.74 (6H, s, OCH₃), 3.67 (6H, s, OCH₃), 3.50 (2H, dd, J = 5.9, 16.8 Hz, CH_AH_BCHN), 3.46 (2H, d, J = 16.8 Hz, CH_AH_BCHN); Anal. calcd for C₂₀H₂₄NO₄Cl·1/3H₂O: C, 62.58; H, 6.48; N, 3.65. Found: C, 62.69; H, 6.36; N, 3.49; HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₀H₂₃NO₄: 342.1700. Found: 342.1695 (M+H).

6,7,14,15-Tetrahydrocycloocta [1,2-g:5,6-g']bis[1,34]benzodioxane-6,14-imine hydrochloride (6c)

1.0 g (90% from EtOH); mp 266-270 °C(dec.); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃, free amine) δ 6.61 (2H, s, ArH), 6.45 (2H, s, ArH), 4.33 (2H, d, J = 5.9 Hz, CH₂CHN), 4.17 (8H, s, O(CH₂)₂O), 3.24 (2H, dd, J = 5.9, 16.2 Hz, CH_AH_BCHN), 2.66 (2H, d, J = 16.2 Hz, CH_AH_BCHN); HRMS(ESI, positive) calcd for C₂₀H₂₀NO₄: 3381387. Found: 3338.1382 (M+H).

8,9-Dimethoxy-5,6,11,12-tetrahydrobenzo[5,6]cycloocta[1,2-f]-1,3-benzodioxol-5,11-imine hydrochloride (6e)

120 mg (45% from EtOH); mp 293-298 °C (dec.); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.80 (2H, br s), 6.96 (1H, s), 6.94 (1H, s), 6.65 (2H, s), 5.98 (1H, d, J = 0.7 Hz), 5.92 (1H, d, J = 0.7 Hz), 4.85 (2H, t, J = 4.0 Hz), 3.73 (3H, s), 3.67 (3H, s), 3.51-3.41 (2H, m), 2.86 (2H, dd, J = 17.0, 11.3 Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₉H₂₀NO₄: 326.1387. Found: 326.1387 (M+H); Anal. calcd for C₁₉H₁₉NO₄·0.5H₂O(free base): C, 68.25; H, 6.03; N, 4.19. Found: C, 68.10; H, 5.90; N, 4.30.

8,9-Dibenzyloxy-5,6,11,12-tetrahydrobenzo[5,6]cycloocta[1,2-f]-1,3-benzodioxol-5,11-imine (6f)

200 mg (99% from Et₂O); mp 195-197 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42-7.27 (10H, m), 6.67 (1H, s), 6.58 (1H, s), 6.55 (1H, s), 6.40 (1H, s), 5.86 (2H, d, J = 1.5 Hz), 5.81 (2H, d, J = 1.2 Hz), 5.10 (2H, s), 5.03 (2H, s), 4.33 (1H, d, J = 5.4 Hz), 4.29 (1H, d, J = 5.4 Hz), 3.24 (2H, dd, J = 16.1, 5.9 Hz), 2.65 (1H, d, J = 16.1 Hz), 2.60 (1H, d, J = 15.9 Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for C₃₁H₂₈NO₄: 478.2013. Found: 478.1995 (M+H); Anal. calcd for C₃₁H₂₇NO₄: C, 77.97; H, 5.70; N, 2.93. Found: C, 77.60; H, 5.70; N, 3.10.

5, 6, 11, 12-Tetrahydrobenzo[5, 6]cycloocta [1, 2-f]-1, 3-benzodioxol-5, 11-imine-8, 9-diol hydrochloride (6d)

化合物 **6f**(190 mg, 0.4 mmol)、10%-Pd/C(40 mg)、1N Hal(0.42 ml)、MeOH(10 ml)の混合物を、室温において 1 時間水素添加した(1atm)。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮した後、残渣を EtOH から結晶化させ化合物 **6d**(105 mg, 89%)を得た。

Mp 256-259 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.02-9.89 (2H, m), 6.92 (1H, s), 6.66 (1H, s), 6.65 (1H, s), 6.42 (1H, s), 5.97 (1H, s), 5.90 (1H, s), 4.76 (2H, d, J = 9.3 Hz), 4.12 (3H, br s), 3.49-3.34 (2H, m), 2.72 (2H, dd, J = 16.8, 9.3 Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₇H₁₆NO₄: 298.1074. Found: 298.1069 (M+H); Anal. calcd for C₁₇H₁₆NO₄Cl·H₂O: C, 58.04; H, 5.16; N, 3.98. Found: C, 58.20; H, 5.00; N, 4.20.

15-Methyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine hydrochloride (**7a**)

窒素雰囲気下、氷浴中において化合物 **6b**(309 mg, 1 mmol)、Et₃N(116 mg, 1.15 mmol)の DMF(10 ml)溶液にヨウ化メチル(78 μl, 1.15 mmol)を滴下し、そのまま昇温させ室温において一晩攪拌した。反応混合物に水を加え、CHCl₃で抽出し、有機層を Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH, 30:1, v/v)で精製し、MeOH から結晶化させフリーアミン化合物(120 mg, 37%, mp 220-222 °C)を得た。得られたアミン体(120 mg)の Et₂O 溶液に 1N HCl/Et₂O(1 ml)を加え、析出した塩をろ別し、EtOH より再結晶化させ化合物 **7a**(76 mg, 57%)を得た。

Mp 256-260 °C(dec.); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, free amine) δ 6.73 (2H, s), 6.50 (2H, s), 5.90 (2H, d, J = 0.7 Hz), 5.85 (2H, d, J = 1.0 Hz), 3.88 (2H, d, J = 5.1 Hz), 3.20 (2H, dd, J = 16.5, 5.7 Hz), 2.43 (2H, d, J = 16.3 Hz), 2.34 (3H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₉H₁₈NO₄: 324.1230. Found: 324.1230 (M+H).

化合物 **7a** の合成と同様にアルキルハライドと反応を行い、以下の化合物を合成した。

15-Ethyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine hydrochloride (**7b**)

328 mg (88% from *i*PrOH): mp 284-288 °C (dec.); ¹H NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.90 (1H, s), 7.01 (1H, s), 6.92 (1H, s), 6.70 (1H, s), 6.68 (1H, s), 6.00 (2H, d, J = 4.0 Hz), 5.94 (2H, s), 4.89 (2H, m), 3.61 (1H, m), 3.33 (1H, m), 3.16 (2H, br m), 2.91 (1H, d, J = 18.9 Hz), 2.84 (1H, d, J = 19.1 Hz), 1.35 (3H, t, J = 6.9 Hz).

15-Propyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine hydrochloride (**7c**)

153 mg (40% from Et₂O): mp 155-156 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, free amine) δ

6.58 (2H, s), 6.42 (2H, s), 5.86 (2H, d, J = 1.5 Hz), 5.82 (2H, d, J = 1.5 Hz), 4.05 (2H, d, J = 5.6 Hz), 3.32 (2H, dd, J = 16.2, 5.7 Hz), 2.59-2.48 (4H, m), 1.66-1.58 (2H, m), 0.91 (3H, t, J = 7.4 Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₁H₂₂NO₄: 352.1543. Found: 352.1541 (M+H).

15-Butyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine hydrochloride (7d)

146 mg (36%): mp 270-275 °C (dec.); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃, free base) δ 6.57 (2H, s), 6.41 (2H, s), 5.85 (2H, d, J = 1.5 Hz), 5.81 (2H, d, J = 1.5 Hz), 4.05 (2H, d, J = 5.6 Hz), 3.32 (2H, dd, J = 16.2, 5.6 Hz), 2.63-2.50 (4H, m), 1.67-1.54 (2H, m), 1.38-1.30 (2H, m), 0.91 (3H, t, J = 7.3 Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₂H₂₄NO₄: 366.1700. Found: 366.1697 (M+H).

15-(2-Hydroxyethyl)-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine hydrochloride (7j)

632 mg (67% from EtOH): mp 269-272 °C(dec.); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃, free amine) δ 6.58 (2H, s), 6.43 (2H, s), 5.87 (2H, d, J = 1.3 Hz), 5.83 (2H, d, J = 1.3 Hz), 4.03 (2H, d, J = 5.9 Hz), 3.66 (2H, m), 3.33 (2H, dd, J = 16.5, 5.9 Hz), 2.77 (2H, m), 2.58 (2H, d, J = 16.5 Hz); HRMS(ESI, positive) calcd for C₂₀H₂₀NO₅: 354.1336. Found: 354.1333 (M+H).

15-Propionyl-5, 6, 12, 13-tetrahydrocycloocta [1, 2-f : 5, 6-f'] bis [1, 3]benzodioxol-5, 12-imine (7f)

窒素雰囲気下、氷浴中において化合物 **6b** (309 mg, 1 mmol)、Et₃N (121 mg, 1.2 mmol) の CHCl₃ (5 ml) 溶液に propionyl chloride (0.1 ml, 1.2 mmol) を滴下し、同温度において 2 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、CHCl₃ で抽出し、有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:EtOAc, 25:1, v/v) で精製した。濃縮残渣に少量の MeOH を加えて溶かした後、水を加えてトリチュレートし化合物 **7f** (330 mg, 90%) を得た。

Mp 202-203 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.65 (1H, s, ArH), 6.61 (1H, s, ArH), 6.44 (1H, s, ArH), 6.41 (1H, s, ArH), 5.87 (5H, m, OCH₂O, CH₂CH₄N), 5.11 (1H, d, J = 5.0 Hz, CH₂CH₄N), 3.32 (2H, m, CH₄H_BCHN, CH₄H_BCHN), 2.80 (1H, d, J = 15.8 Hz, CH_AH_BCHN), 2.68 (1H, d, J = 15.5 Hz, CH_AH_BCHN), 2.43 (2H, q, J = 7.6 Hz, CH₂CH₃), 1.16 (3H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₃); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₁H₂₀NO₅: 366.1336. Found: 366.1333 (M+H).

化合物 **7f** の合成と同様に酸クロライドと反応を行い、以下の化合物を合成した。

15-Butylryl-5, 6, 12, 13-tetrahydrocycloocta[1, 2-f: 5, 6-f']bis[1, 3]benzodioxol-5, 12-imine (7g)

335 mg (88% from MeOH); mp 193-195 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (1H, s, ArH), 6.62 (1H, s, ArH), 6.44 (1H, s, ArH), 6.42 (1H, s, ArH), 5.85 (5H, m, OCH₂O, CH₂CH₄N), 5.11 (1H, d, J= 5.0 Hz, CH₂CH₄N), 3.32 (2H, m, CH₄H_BCHN, CH₄H_BCHN), 2.80 (1H, d, J = 15.8 Hz, CH_AH_BCHN), 2.67 (1H, d, J = 16.5 Hz, CH_AH_BCHN), 2.39 (2H, t, J = 7.3 Hz, CH₂CH₂CH₃), 1.66 (2H, m, CH₂CH₂CH₃), 0.95 (3H, t, J = 7.3 Hz, CH₂CH₂CH₃); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₂H₂₂NO₅: 380.1492. Found: 380.1488 (M+H).

15-Hexanoyl-5, 6, 12, 13-tetrahydrocycloocta[1, 2-f: 5, 6-f']bis [1, 3]benzodioxol-5, 12-imine (7h)

335 mg (74% from MeOH): mp 175-176 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (1H, s, ArH), 6.62 (1H, s, ArH), 6.44 (1H, s, ArH), 6.42 (1H, s, ArH), 5.87 (5H, m, OCH₂O, CH₂CH₄N), 5.12 (1H, d, J= 5.0 Hz, CH₂CH₄N), 3.32 (2H, m, CH₄H_BCHN, CH₄H_BCHN), 2.80 (1H, d, J= 15.2 Hz, CH_AH_BCHN), 2.68 (1H, d, J= 15.5 Hz, CH_AH_BCHN), 2.40 (2H, t, J= 6.3 Hz, COCH₂CH₂), 1.63 (2H, m, COCH₂CH₂), 1.32 (4H, m, CH₂CH₂CH₃), 0.87 (3H, t, J= 6.9 Hz, CH₃); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₄H₂₆NO₅: 408.1805. Found: 408.1798 (M+H).

15-Benzoyl-5, 6, 12, 13-tetrahydrocycloocta[1, 2-f: 5, 6-f'] bis [1, 3]benzodioxol-5, 12-imine (7i)

406 mg (98% from MeOH-H₂O): mp 271-273 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (5H, m, C₆H₅), 6.71 (1H, s, ArH), 6.48 (1H, s, ArH), 6.43 (1H, s, ArH), 6.40 (1H, s, ArH), 5.96 (1H, d, J= 5.0 Hz, CH₂CH₄N), 5.86 (4H, m, OCH₂O), 4.98 (1H, d, J= 5.0 Hz, CH₂CH₄N), 3.53 (1H, dd, J= 5.0, 15.8 Hz, CH₄H_BCHN), 3.33 (1H, dd, J= 16.2, 5.0 Hz, CH₄H_BCHN), 2.78 (1H, d, J= 16.8 Hz, CH_AH_BCHN), 2.70 (1H, d, J= 16.2 Hz, CH_AH_BCHN); HRMS(ESI, positive) calcd for C₂₅H₂₀NO₅: 414.1336. Found: 414.1331 (M+H).

15-(2-Methoxyacetyl)-5, 6, 12, 13-tetrahydrocycloocta[1, 2-f: 5, 6-f']bis[1, 3]benzodioxol -5, 12-imine (7k)

310 mg (77% from MeOH): mp 184-186 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (1H, s, ArH), 6.61 (1H, s, ArH), 6.44 (1H, s, ArH), 6.43 (1H, s, ArH), 5.85 (5H, m, CH₂CH₄N, OCH₂O), 5.24 (1H, d, J= 5.3 Hz, CH₂CH₄N), 4.26 (1H, d, J= 13.5 Hz, CH₄H_BOCH₃), 4.10 (1H, d, J= 13.5 Hz, CH_AH_BOCH₃), 3.41 (3H, s, OCH₃), 3.33 (2H, m, CH₄H_BCHN, CH₄H_BCHN), 2.79 (1H, d, J= 16.2 Hz, CH_AH_BCHN), 2.70 (1H, d, J= 16.2 Hz, CH_AH_BCHN); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₁H₂₀NO₆: 382.1285. Found: 382.1283

(M+H).

15-(Ethoxycarbonyl)-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (7l)

313 mg (82% from MeOH): mp 201-202 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.63 (1H, s, ArH), 6.62 (1H, s, ArH), 6.44 (1H, s, ArH), 6.42 (1H, s, ArH), 5.87 (2H, s, OCH₂O), 5.84 (2H, s, OCH₂O), 5.46 (1H, d, J= 5.3 Hz, CH₂CH₄N), 5.35 (1H, d, J= 5.6 Hz, CH₂CH₄N), 4.17 (2H, m, CH₂CH₃), 3.34 (2H, m, CH₄H_BCHN, CH₄H_BCHN), 2.69 (2H, d, J= 15.5 Hz, CH₂CHN), 1.27 (3H, t, J= 6.9 Hz, CH₂CH₃); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₁H₂₀NO₆: 382.1285. Found: 382.1278 (M+H).

Ethyl 15-oxalyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (7m)

771 mg (94% from MeOH-H₂O): mp 194-195 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (1H, s, ArH), 6.57 (1H, s, ArH), 6.45 (1H, s, ArH), 6.43 (1H, s, ArH), 5.89 (2H, s, OCH₂O), 5.85 (2H, s, OCH₂O), 5.78 (1H, d, J= 5.6 Hz, CH₂CH₄N), 5.05 (1H, d, J= 5.6 Hz, CH₂CH₄N), 4.37 (2H, q, J= 6.9 Hz, CH₂CH₃), 3.50 (1H, dd, J= 5.5, 15.5 Hz, CH₄H_BCHN), 3.39 (1H, dd, J= 5.6, 15.5 Hz, CH₄H_BCHN), 2.79 (1H, d, J= 15.5 Hz, CH_AH_BCHN), 2.76 (1H, d, J= 15.5 Hz, CH_AH_BCHN), 1.38 (3H, t, J= 6.9 Hz, CH₂CH₃); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₂H₂₀NO₇: 410.1234. Found: 410.1231 (M+H).

Ethyl 15-malonyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (7o)

5.89 g (86% from MeOH); mp 197-199 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.63 (1H, s, ArH), 6.59 (1H, s, ArH), 6.44 (1H, s, ArH), 6.42 (1H, s, ArH), 5.86 (5H, m, OCH₂O, CH₂CH₄N), 5.04 (1H, d, J= 5.3 Hz, CH₂CH₄N), 4.10 (2H, m, CH₂CH₃), 3.53 (2H, s, COCH₂), 3.36 (2H, m, CH₄H_BCHN, CH₄H_BCHN), 2.80 (1H, d, J= 15.8 Hz, CH_AH_BCHN), 2.69 (1H, d, J= 15.8 Hz, CH_AH_BCHN), 1.14 (3H, t, J= 7.3 Hz, CH₂CH₃); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₃H₂₂NO₇: 424.1391. Found: 424.1385 (M+H).

15-Formyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (7e)

窒素雰囲気下、化合物 **6b** (309 mg, 1 mmol)、蟻酸 (55 mg, 1.2 mmol)、*N,N*-dimethyl aminopyridine (297 mg, 1.5 mmol) の DMF (20 ml) 溶液に *N*-ethyl-*N'*-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDC, 466 mg, 1.5 mmol) を添加し室温において一晩攪拌した。反応混合物を減圧濃縮後、1N HCl 水を加え CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を水で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:EtOAc, 19:1, v/v) で精製した。濃縮残

渣に少量の MeOH を加えて溶かした後、水を加えてトリチュレートし化合物 **7e** (285 mg, 85%) を得た。

Mp 141-146 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (1H, s, CH₂O), 6.64 (1H, s, ArH), 6.62 (1H, s, ArH), 6.44 (1H, s, ArH), 6.24 (1H, s, ArH), 5.87 (4H, m, OCH₂O), 5.67 (1H, d, J= 5.3 Hz, CH₂CH₄N), 4.89 (1H, d, J= 5.6 Hz, CH₂CH₄N), 3.34 (2H, m, CH₄H_BCHN, CH₄H_BCHN), 2.84 (1H, d, J= 15.2 Hz, CH_AH_BCHN), 2.71 (1H, d, J= 16.5 Hz, CH_AH_BCHN); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₉H₁₆NO₅: 338.1023. Found: 340.1017 (M+H).

15-(N-Methylcarbamoyl)-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (**7q**)

窒素雰囲気下水浴中において、化合物 **6b** (309 mg, 1 mmol) の CHCl₃ (5 ml) 溶液に methylisocyanate (60 μl, 1 mmol) を加え 2 時間攪拌した。析出した固体をろ別した後、MeOH から再結晶をおこない化合物 **7q** (316 mg, 86%) を得た。

Mp 254-256 °C; ¹H NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.77 (2H, s, ArH), 6.65 (1H, m, NH), 6.52 (2H, s, ArH), 5.91 (2H, s, OCH₂O), 5.86 (2H, s, OCH₂O), 5.30 (2H, d, J= 5.0 Hz, CH₂CHN), 3.14 (2H, dd, J= 5.0, 16.5 Hz, CH₄H_BCH₂N), 2.62 (5H, m, CH_AH_BCHN, CH₂); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₀H₁₉N₂O₅: 367.1288. Found: 367.1287 (M+H).

15-Glycoloyl-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (**7n**)

窒素雰囲気下室温において、LiBH₄ (22 mg, 1 mmol) の THF (5 ml) 溶液に、化合物 **7m** (409 mg, 1 mmol) の THF (5 ml) 溶液を 30 分かけて滴下した。4 時間反応混合物に 1N 塩酸水を加え CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥の後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:EtOAc, 30:1, v/v) で精製し、MeOH から結晶化させ **7n** (194 mg, 53%) を白色固体として得た。

Mp 184-187 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.65 (1H, s, ArH), 6.60 (1H, s, ArH), 6.45 (1H, s, ArH), 6.42 (1H, s, ArH), 5.89 (5H, m, OCH₂O, CH₂CHN), 4.77 (1H, d, J= 5.3 Hz, CH₂CHN), 4.26 (2H, d, J= 4.3 Hz, CH₂OH), 3.59 (1H, t, J= 4.3 Hz, CH₂OH), 3.34 (2H, m, CH₄H_BCH₂N, CH₄H_BCH₂N), 2.81 (1H, d, J= 16.2 Hz, CH_AH_BCHN), 2.73 (1H, d, J= 16.2 Hz, CH_AH_BCHN); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₀H₁₈NO₆: 368.1129. Found: 368.1121 (M+H).

15-(3-Hydroxypropanoyl)-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (**7p**)

化合物 **7n** の合成と同様に反応を行い、化合物 **7o** (4 g, 9.45 mmol) から **7p** (1.32 g, 37%) を泡状物質として得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 6.64 (1H, s, ArH), 6.60 (1H, s, ArH), 6.45 (1H, s, ArH), 6.42 (1H, s, ArH), 5.88 (5H, m, OCH_2O , CH_2CHN), 5.08 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, CH_2CHN), 3.89 (2H, m, CH_2OH), 3.34 (3H, m, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{CH}_2\text{N}$, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{CH}_2\text{N}$, CH_2OH), 2.81 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{CHN}$), 2.71 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{CHN}$), 2.63 (2H, t, $J = 5.3$ Hz, COCH_2); HRMS(ESI, positive) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{NO}_6$: 382.1285. Found: 382.1280 (M+H).

15-(2-Aminoethyl)-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine hydrochloride (7s)

化合物 **7a** の合成と同様に、化合物 **6b** (25 g, 81 mmol)、N-(2-bromoethyl)phthalimide (24.7 g, 97.2 mmol)、 Et_3N (9.8 g, 97.2 mmol) と DMF (500 ml) を用いて反応を行い、6,12,13-tetrahydro-15-(2-phthaloyliminoethyl)cycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (**7r**, 34.58 g, 89%) を泡状物質として得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (2H, dd, $J = 5.6, 3.3$ Hz), 7.47 (2H, dd, $J = 5.6, 3.3$ Hz), 6.57 (2H, s), 6.39 (2H, s), 5.83 (2H, d, $J = 1.7$ Hz), 5.80 (2H, d, $J = 1.7$ Hz), 4.11 (2H, d, $J = 5.6$ Hz), 4.00 (1H, m), 3.74 (1H, m), 3.27 (2H, dd, $J = 16.5, 5.6$ Hz), 3.01 (1H, m), 2.76 (1H, m), 2.52 (1H, d, $J = 16.5$ Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$: 483.1551. Found: 483.1539 (M+H).

化合物 **7r** (34 g, 70 mmol)、ヒドラジン一水和物 (7.0 g, 140 mmol) と EtOH (460 ml) の混合物を室温において一晩攪拌した。不溶の固体をろ別して除き、ろ液を減圧濃縮し、残渣に塩酸水 (3N) を加え CH_2Cl_2 で洗浄した。水層を濃アンモニア水で塩基性とした後、 CH_2Cl_2 で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥の後、溶媒を減圧留去した。残渣 (4.0 g) を EtOH (10 ml) に溶解し、1N HCl/ Et_2O (25 ml) を加えて酸性とし生成した塩をろ別した。EtOH から再結晶化させ化合物 **7s** (14.5 g, 49%) を白色固体として得た。

Mp 184-187 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , free amine) δ 6.57 (2H, s), 6.42 (2H, s), 5.86 (2H, d, $J = 1.5$ Hz), 5.82 (2H, d, $J = 1.5$ Hz), 4.01 (2H, d, $J = 5.6$ Hz), 3.32 (2H, dd, $J = 16.1, 5.9$ Hz), 2.92-2.78 (2H, m), 2.71-2.63 (2H, m), 2.54 (2H, d, $J = 16.1$ Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4$: 353.1496. Found: 353.1495 (M+H).

15-(3-Aminopropyl)-5,6,12,13-tetrahydrocycloocta[1,2-f:5,6-f']bis[1,3]benzodioxol-5,12-imine (7u)

化合物 **7s** の合成と同様に、反応を行い化合物 **6b** (450 mg, 1.45 mmol) から化合物 **7u** (210 mg, 39%) を泡状物質として得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , free amine) δ 6.57 (2H, s), 6.42 (2H, s), 5.86 (2H, d, $J = 1.3$ Hz), 5.82 (2H, d, $J = 1.3$ Hz), 4.05 (2H, d, $J = 5.9$ Hz), 3.32 (2H, dd, $J = 16.2, 5.9$ Hz), 2.71 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 2.60 (2H, m), 2.53 (2H, d, $J = 16.2$ Hz), 1.55 (4H, m).

2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-N-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)ethyl]acetamide (9)

窒素雰囲気下、LiAlH₄ (18.75 g, 0.49 mol) の THF (500 ml) に 3,4-methylenedioxy-β-nitrostyrene (25 g, 0.13 mol) の THF (900 ml) 溶液を 3 時間かけて滴下し、その後 50 °C で 5 時間加熱した。反応混合物を氷浴中において水 (15 ml) を注意しながら滴下し、15% NaOH 水溶液 (15 ml)、水 (50 ml)、Et₂O (1.5 L) を順次加えた。混合物をセライトろ過、有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥の後、溶媒を減圧留去した。残渣を減圧蒸留 (0.5 mmHg, 85 °C) し、homopiperonylamine (14.34 g, 67%) を無色オイルして得た¹⁰。Homopiperonylamine (1.83 g, 11.1 mmol) と Et₃N (1.12 g, 11.1 mmol) の CH₂Cl₂ (35 ml) 溶液に氷冷下、3,4-methylenedioxyphenylacetyl chloride (2.20 g, 11.1 mmol) の CH₂Cl₂ (30 ml) 溶液を滴下した。同温度にて 2 時間攪拌の後、反応混合物を CH₂Cl₂ で希釈し、飽和 NaHCO₃ 水溶液、水で順次洗浄し有機層を Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を EtOH から結晶化させ化合物 **9** (2.28 g, 62.7%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.77-6.46 (6H, m, ArH), 5.97 (2H, s, OCH₂O), 5.93 (2H, s, OCH₂O), 5.35 (1H, brs, NH), 3.44 (2H, s, CH₂CO), 3.40 (2H, t, J= 3.59 Hz, CH₂CH₂N), 2.65 (2H, t, J= 6.59 Hz, CH₂CH₂N).

5-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-5,6,7,8-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinoline (11a)

窒素雰囲気下、化合物 **9** (1.5 g, 4.58 mmol) の CH₃CN (25 ml) の溶液にオキシ塩化リン (1.2 ml) を加え室温において 15 分攪拌後、さらに 80 °C で 3.5 時間加熱した。反応混合物を氷水に注ぎ、CHCl₃ で抽出した。有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液で 2 回洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥の後、溶媒を減圧留去した。残渣に MeOH (60 ml) を加え水素化ホウ素ナトリウム (1.2 g, 32.1 mmol) を数回に分けて添加し、一晚室温において攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣に CHCl₃ を加えて飽和 NaHCO₃ 水溶液、水で順次洗浄の後、有機層を Na₂SO₄ で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH, 30:1, v/v) で精製し **11a** (590 mg, 41.4%) を油状物として得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.75 (3H, m, ArH), 6.70 (1H, s, ArH), 6.57 (1H, s, ArH), 5.95 (2H, s, OCH₂O), 5.91 (2H, s, OCH₂O), 4.04 (1H, m, CH₂CH), 3.13 (2H, m, CH₂CH₂N), 2.70 (4H, m, CH₂CH, CH₂CH₂N), 1.65 (1H, brs, NH overlapped with H₂O); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₈H₁₈NO₄: 312.1230. Found: 312.1228 (M+H).

N-Acetyl-5-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-5,6,7,8-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinoline (11b)

化合物 **11a** (350 mg, 1.12 mmol)、Et₃N (125 mg, 1.23 mmol) の CH₂Cl₂ (7 ml) 溶液に、窒素雰囲気下、氷浴中において Ac₂O (0.12 ml, 1.23 mmol) を滴下した。反応混合物を同温において 3 時間攪拌の後、飽和 NaHCO₃ 水溶液を加え CH₂Cl₂ で抽出し

た。有機層を水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc}$, 9:1, v/v) で精製し **11b** (244 mg, 61.4%) をアモルファスとして得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 6.78-6.37 (5H, m, ArH), 5.94 (4H, m, OCH_2O), 5.54 (0.5H, t, $J = 6.6$ Hz, CH_2CH , rotamer), 4.73 (1H, m, CH_2CH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, rotamer), 3.63-2.55 (5.5H, m, CH_2CH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, rotamer), 2.12, 1.61 (3H, s, CH_3 , rotamer); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_5$: 354.1336. Found: 354.1328 (M+H).

1, 2-bis(1,3-benzodioxol-5-yl)ethanone (13)

1,3-benzodioxole (13.43 g, 0.11 mol)、 SnCl_4 (15.2 ml, 0.132 mol) と CH_2Cl_2 (100 ml) の混合物に、 -10 °C において 3,4-methylenedioxyphenylacetylchloride (21.85 g, 0.11 mol) の CH_2Cl_2 (100 ml) 溶液を 1 時間かけて滴下した。反応混合物を室温に戻して 1 時間攪拌した後、6N 塩酸水溶液 (150 ml) に注ぎ CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を飽和食塩水で 2 回洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥の後、溶媒を減圧留去した。残渣を EtOAc から結晶化させ **13** (15.0 g, 47.5%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (1H, dd, $J = 1.7, 8.3$ Hz, ArH), 7.46 (1H, d, $J = 1.7$, ArH), 6.85 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, ArH), 6.75 (3H, m, ArH), 6.04 (2H, s, OCH_2O), 5.93 (2H, s, OCH_2O), 4.12 (2H, s, CH_2).

N-[1,2-bis(1,3-benzodioxol-5-yl)ethyl]formamide (14)

化合物 **13** (13.0 g, 45.7 mmol)、蟻酸アンモニウム (28.82 g, 0.457 mol)、蟻酸 (13 ml) と formamide (13 ml) の混合物を 180 °C において 18 時間加熱攪拌した。反応混合物を氷水中に注ぎ、EtOAc で抽出した。有機層を水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥の後、溶媒を減圧留去した。残渣を EtOAc から結晶化させ化合物 **14** (9.05 g, 63 %) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (1H, s, CHO), 6.34 (4H, m, ArH), 6.55 (2H, m, ArH), 5.96 (2H, s, OCH_2O), 5.92 (2H, s, OCH_2O), 5.75 (1H, m, NH), 5.17 (1H, q, $J = 6.9$ Hz, CHN), 3.00 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, CH_2).

7-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5,6,7,8-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinoline (15a)

ホルミル化合物 **14** (7.7 g, 27.1 mmol)、6N NaOH 水溶液 (45 ml) と EtOH (45 ml) の混合物を窒素雰囲気下 2.5 時間加熱還流した。反応混合物を減圧濃縮しエタノールを除き、水を加えて CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を飽和食塩水で 2 回洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を *i*PrOH から結晶化させ 1,2-bis(1,3-benzodioxol-5-yl)ethanamine (6.98 g, 99.5%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 6.89-6.60 (6H, m, ArH), 5.95 (2H, s, OCH_2O), 5.93 (2H, s, OCH_2O), 4.06 (1H, dd, $J = 5.0, 8.6$ Hz, CHN), 2.87 (1H, dd, $J = 13.5, 5.0$ Hz, CH_AH_B), 2.69 (1H, dd, $J = 8.6, 13.5$ Hz, CH_AH_B).

1,2-bis(1,3-benzodioxol-5-yl)ethanamine (3.5 g, 12.3 mmol)、formalin (6 ml, 35% 水溶

液)、EtOH(40 ml)と 1N HCl水溶液(180 ml)の混合物を窒素雰囲気下、60 °Cにおいて 8 時間加熱攪拌した。反応混合物を減圧濃縮しEtOHを除き、3N NaOH水溶液で塩基性としCH₂Cl₂で抽出した。有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をEtOHから結晶化させ **15a** (3.29 g, 80.3%)を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.95-6.77 (3H, m, ArH), 6.54 (1H, s, ArH), 6.56 (1H, s, ArH), 5.95 (2H, s, OCH₂O), 5.90 (2H, s, OCH₂O), 4.16 (1H, d, J= 15.2 Hz, CH_AH_BN), 4.04 (1H, d, J= 15.2 Hz, CH_AH_BN), 3.88 (1H, t, J= 7.3 Hz, CH₂CH), 2.83 (2H, d, J= 7.3 Hz, CH₂CH), 1.68 (3H, brs, NH overlapped with H₂O); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₇H₁₆NO₄: 298.1074. Found: 298.1069 (M+H).

N-Acetyl-7-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5,6,7,8-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinoline (15b)

化合物 **15a** (300 mg, 1.01 mmol)、Et₃N(112 mg, 1.11mmol)の CHCl₃(7ml)溶液に窒素雰囲気下、氷浴中において Ac₂O(0.11 ml, 1.11 mmol)を滴下した。反応混合物を同温において 4 時間攪拌の後、飽和 NaHCO₃水溶液を加え CHCl₃で抽出した。有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂:EtOAc, 10:1, v/v)で精製し **15b**(200 mg, 58.4%, foam)を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 6.66 (3H, m, ArH), 6.52 (2H, m, ArH), 5.91 (4H, m, OCH₂O), 6.02, 5.08 (1H, m, CH₂CH, rotamer), 4.82, 4.51 (1H, d, J= 16.2 Hz, CH_AH_BN, rotamer), 4.45, 4.19 (1H, d, J= 15.8 Hz, CH_AH_BN, rotamer), 3.24 (1H, m, CH_ACH_BCH), 2.99 (1H, m, CH_ACH_BCH), 2.21, 2.06 (3H, s, CH₃, rotamer); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₉H₁₈NO₅: 340.1179. Found: 340.1179 (M+H).

2-7-2. Biology

TNF-α産生阻害活性の評価

細胞の調整

容量 1 ml の 2.4%チオグリコレート培地を 5~7 週齢の雌 BALB/c マウス (Charles River Japan, Tokyo, Japan) の腹腔内に投与した。4 日間飼育後、マウスを安楽死させ、腹腔内を 5 U/ml のヘパリンと 1%牛胎児血清 (FBS ; Filtron, Victoria, Australia) を添加した最小栄養培地 (MEM ; 阪大微研) 4 ml にて洗浄し、洗浄液に含まれる腹腔内浸潤細胞 (PEC) を回収した。細胞は、10%牛胎児血清を添加した MEM (cMEM) で 3 回洗浄した後、2x10⁵ 個/well で 96 穴培養プレート (Costar, Cambridge, MA USA) に播種した。次に細胞を CO₂ インキュベーター内で、37 °C、1 時間培養した後、各ウェルを 2 回洗浄し、非接着細胞を除去しマウスマクロファージとして使用した。

TNF- α の産生誘導と産生阻害活性の測定

TNF- α の誘導は、細胞を含むウェルに 10 $\mu\text{g/ml}$ になるように LPS (E.coli o111B4, Difco Laboratories, Detroit, MI USA) を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、20 時間培養することで行った。評価化合物は DMSO に溶解し、LPS と同時に培養細胞を含むウェルに添加した。その際、最終 DMSO 濃度は、0.1% 以下になるように設定した。産生された TNF- α は ELISA 法により測定した。すなわち、ウェル表面に抗マウス TNF- α モノクローナル抗体 (Pharmingen, San Diego, CA USA) を吸着させ、10% FBS で非特異的結合部位をブロックした 96 穴プレートに、上記培養液および組換え型マウス TNF- α 標準品 (rm-TNF- α : Genzyme, Cambridge, MA USA) を添加し 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置した。続いてビオチン化抗 TNF- α ポリクローナル抗体 (Pharmingen) を添加し、室温で 45 分間インキュベートした後、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン (KPL, Gaithersburg, ML USA) を添加し、さらに 30 分間インキュベートした。なお、各インキュベーション終了後、0.2% Tween 20 を含む PBS (-) で各ウェルを 4~8 回洗浄した後、次の試薬を添加した。ペルオキシダーゼ基質として TMB (KPL) を使用し、マイクロプレートリーダーを使用して波長 450 nm の吸光度を測定した。培養液中の TNF- α レベルは、組換え型マウス TNF- α を標準として定量した。

ガラクトサミン負荷マウスエンドトキシシンショックモデル致死抑制試験

D-ガラクトサミン塩酸塩 (D-galN: ナカライテスク社製) 及び LPS を最終濃度がそれぞれ 100 mg/ml、0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるように生理食塩水に溶解した。また、評価化合物を 5% DMSO-10% ニッコール (日本サーフェクタント工業社製) 水溶液に最終濃度 10 mg/ml と 5 mg/ml になるように溶解した。次に、10 匹/群の BALB/c マウス (5 週齢、雌、チャールズリバー社) に上記 D-galN と LPS を含有する水溶液を体重 20 g 当たり 200 μl 静脈内投与し、その直後、上記各濃度に調製した化合物を体重 20 g 当たり 200 μl 腹腔内投与した。対照群として、化合物のかわりに上記 5% DMSO と 10% ニッコールの混合溶液のみを投与した群を設けた。化合物のガラクトサミン負荷マウスエンドトキシシンショック致死抑制活性は、マウスの 7 日後の生残率によって示した。有意差検定 (カイ二乗検定) は、対照群と化合物投与群との間で実施した。

化合物 7s のマウスエンドトキシシンショックモデル致死抑制試験と血中 TNF- α レベルの測定

上記エンドトキシシンモデルを用いて 7s の用量依存的な効果を調べた。化合物 7s の 0.5 mg, 1 mg, 2.5 mg, 5 mg/ml 生理食塩水溶液を調整し、LPS/D-galN 投与直後に調整溶液を 20 g 当たり 200 μl 経口投与し、7 日後の致死抑制活性を評価した。また、別

の群を用いて7sの1 g, 2.5 mg、5 mg/mlの生理食塩水溶液を調整し、LPS/D-galN投与直後に調整溶液を20 g当たり200 μ l経口投与した。1時間後、エーテル麻酔下で心臓採血により血液を採取し、セパラピッドチューブを用いて血清を分離した。細胞系で用いたELISA法の検出限界は250 pg/mlであるため、マウス血清中での測定は、抗マウスTNF- α ELISAキット (Factor-Test-X, Genzyme社製) マウスTNF抗体とHRP-共役抗マウスTNF- α 抗体 (Mouse TNF- α Duo Set, Genzyme社製)を用いたELISA法によりTNF- α 量を定量した。これにより検出限界は30 pg/mlに上げることが可能であった。

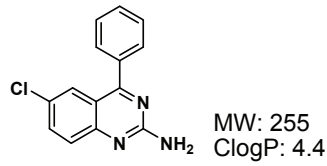
2-8. 引用文献

1. (a) Shamma, M. *The Isoquinoline Alkaloids, Chemistry and Pharmacology*; Blomquist, A.T. and Wasserman, H., Ed.; Academic Press: New York, 1972; Vol 25, pp. 96-114. (b) Gozler, B.; Lantz, M. S.; Shamma, M. *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*(3), 293.
2. 津田喜典; 二宮一弥; 金子洋. 薬品化学; 南江堂, 1977, pp87-121.
3. (a) Varadinova, T. L.; Shishkov, S. A.; Ivanovska, N. D.; Velcheva, M. P.; Danghaaghin, S.; Samadangiin, Z.; Yansanghiin, Z. *Phytother. Res.* **1996**, *10*, 414-418. (b) Chang, G. J. ; Su, M. J. ; Hung, L. M.; Lee, S. S.; *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *136*, 459-71.
4. (a) Brossi, A.; Rice, K. C.; Mak, C.-P.; Reden, J.; Jacobson, A. E. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 648. (b) Meisenberg, G.; Simmons, W. H.; Collins, M. A. *Pharmacol. Biochem. behav.* **1984**, *20*, 355.
5. Whaley, W. M.; Govindachari, T. R. *Organic Reactions*; Adams, R., Ed.; Wiley: New York, 1951; Vol 6, pp. 151-190.
6. (a) Barker, A. C.; Battersby, A. R. *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 1317. (b) Sainsbury, M.; Brown, D. W.; Dyke, S. F.; Kinsman, R. G.; Moon, B. J. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 6695.
7. (a) Dyke, S. F. *Hetrocycles* **1977**, *6*, 1441. (b) Sato, F.; Hashimoto, T.; Hachiya, A.; Tamura, K.; Choi, K.-B.; Morishige, T.; Fujimoto, H.; Yamada, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 367-372.
8. (a) Strieter, R. M.; Remick, D. G.; Ward, P. A.; Spengler, R. N.; Lynch, III, J. P.; Larric, J.; Kunkel, S. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *155*, 1230. (b) Schade, U. F. *Circ. Shock* **1990**, *31*, 171. (c) Waage, A.; Sørensen, M.; Størdal, B. *Lancet* **1990**, *335*, 543. (d) Zabel, P.; Schade, U. F.; Schlaak, M. *Immunobiol.* **1993**, *187*, 447.
9. Sha, C.-K.; Young, J.-J.; Yeh, C.-P.; Chang, S.-C. Wang, S.-L. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2694.
10. Marsden, R.; MacLean, D. B. *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 1392.
11. (a) Srenlake, J. B.; Waigh, R. D.; Dewar, G. H.; Hughes, R.; Chapple, D. J.; Coker, G. *Eur. J. Med. Chem.* **1981**, *16*, 515. (b) *Ind. J. Chem.* **1980**, *19B*, 561.
12. Dyke, S. F.; Brown, D. W.; Sainsbury, M.; Hardy, G. *Tetrahedron* **1971**, *27*, 3495.
13. (a) Zanetti, G.; Heumann, D.; Gerain, J.; Kohler, J.; Abbet, P.; Barras, C.; Lucas, R.; Glauser, M. P.; Baumgartner, J. D. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 1890. (b) Engelberts, I.; von Asmuth, E. J. U.; van der Linden, C. J.; Buurman, W. A. *Lymphokine Cytokine Res.* **1991**, *10*, 127. (c) Beutler, B.; Milsark, I. W.; Cerami, A. C. *Science* **1985**, *229*, 869.
14. (a) Galanos, C.; Freudenberg, M. A.; Reutter, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5939. (b) Freudenberg, M.A.; Galanos, C. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 2110..

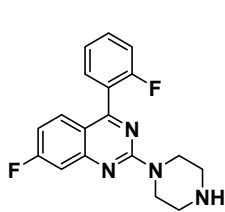
第3章 ピペリジニルピリミジン誘導体の合成とTNF- α 産生阻害活性

3-1. 序論

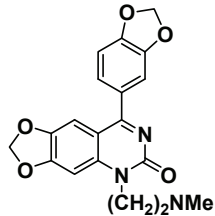
パビン誘導体に代わる新たなリード化合物として、フェニルキナゾリン(Phenylquinazoline)が見出されてきた¹。これら化合物のTNF- α 産生阻害活性は先述のパビン誘導体と比較して強く、活性だけに注目すると非常に魅力的な化合物であると考えられた。一方、特許情報などからフェニルキナゾリン構造を検索すると、実に多彩な薬理活性を示す類似の化合物が数多く報告されていることも分かった。Fig. 3-1にその一部を示したが、中枢、内分泌、循環器や免疫系などあらゆる領域での薬剤としての可能性が報告されている。また、フェニル基の有無に関わらずキナゾリン構造を有する薬剤はその他にも数多く知られており、いわゆるDrug-like(ドラッグライク、薬になりやすい)な分子といえる²。また、ドラッグライクネスの評価には、先の構造的な特徴によるもの以外にもいくつかの手法が報告されている。特にLipinskiらによるルール・オブ・ファイブが有名で、①分子量500未満、②水素結合供与体(OHまたはNH)の数が5以下、③水素結合受容体の数が10未満、④LogPの計算値(CLogP)が5未満、の項目の中で2つ以上当てはまらない化合物は吸収されない確率が高く、分子の生体内における吸収性に着目した有用な指標の一つである³。しかし、リード化合物 **19e** はACDデータベース(Advanced Chemistry Development Inc.)の解析に基づけば、このルールを十分満たした分子である(分子量255 水素結合供与体数2, 水素結合受容体数3, CLogP 4.4)にも関わらず、実際の生物学的利用率(BA)は14%程度に留まり、十分な経口吸収性を示していないことが分かった(Table 3-13)。吸収性を支配するファクターとして溶解性も極めて重要であり⁴、実際、化合物 **19e** の溶解度は中性もしくは弱酸性域で非常に悪いことから、溶解度の改善が必要であると考えられた(Table 3-13)。また、毒性面においても、その多彩な作用ゆえのDirtyな側面も容易に推察され、実際にリード化合物は中枢、内分泌、循環器系などにおいていくつかの作用も見いだされており(Table 3-14)、副作用が懸念されることも事実である。創薬的な合成展開を行う上で活性増強とともに、新規性の確保、吸収性や副作用につながり得る不必要な作用の分離も考慮する必要がある。そこで、フェニルキナゾリンの平面性と電子共役系の構造が溶解性あるいは多彩な作用の一因と考えられたため、できる限り望みの薬理活性を保持しながら、平面性を崩すために脱キナゾリン化を視野に入れた合成を行うこととした。



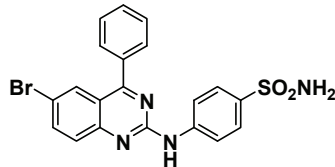
リード化合物 (19e) TNF- α : IC₅₀ 4 μ M



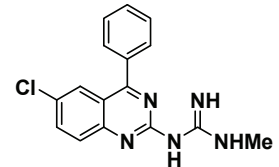
WO 2005042501
Norepinephrine
Reuptake Inhibitors
ADHD



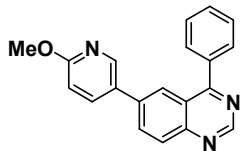
WO 1999044612
NMDA Antagonists
Epilepsy (てんかん)



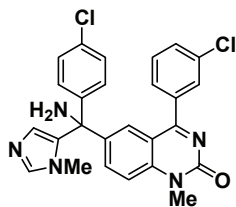
WO 2004099159
PTP-1B Inhibitors
Diabetes (糖尿病)



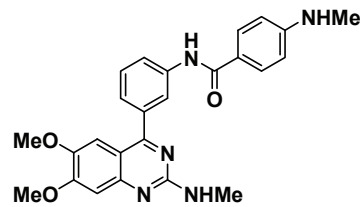
WO 2002020496
Na/H Exchanger Inhibitors
Hypertension (高血圧)



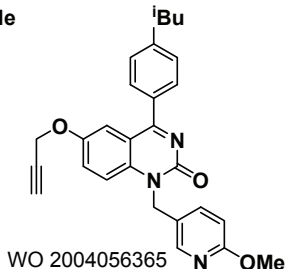
WO 2008012326
PI3K Inhibitors
Cancer
Inflammation (炎症)



WO 1998049157
Farnesyl Transferase
Inhibitors
Cancer (癌)



WO 1999037622
PDE IV Inhibitors
Asthma (喘息)
Atopic Dermatitis (アトピー)



WO 2004056365
CaSR Antagonists
Osteoporosis (骨粗鬆症)

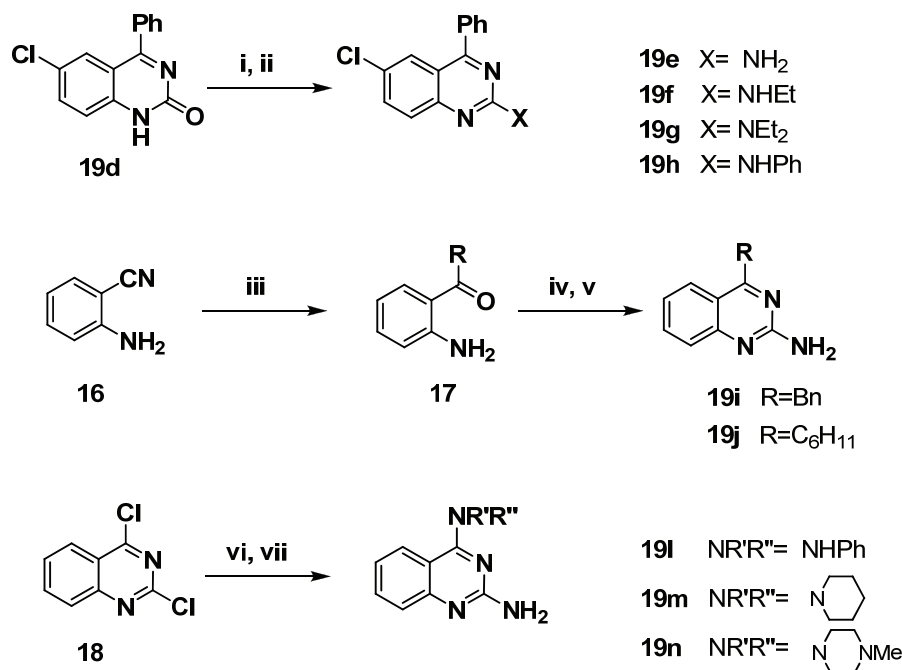
Fig. 3-1 リード化合物とフェニルキナゾリン類の多様な薬理活性

3-2. キナゾリン誘導体の合成と構造活性相関

キナゾリン化合物は古くから合成法も確立されており、それらの報告に準じて容易に合成可能であった²。そこで、まず主要各部位においておおまかな変換を実施し、構造活性相関を確認した後、さらに新たな展開の可能性を提案することとした。

複素環部分の窒素原子に着目した化合物やキナゾリン-2-オン化合物 **19a-d** は文献記載の方法で合成し^{5b-e}、また化合物 **19k** は入手可能であった (Table 3-1)。その他の誘導体はScheme 3-1 に示す方法により合成した。すなわち、キナゾリン2位へのアミノ置換基導入は、ケト体 **19d** をオキシ塩化リンでクロロ化の後、各種アミンと反応させ化合物 **19e-h**⁶を得た。4位アルキル変換体 **19i, 19j** は2-アミノベンズニトリル **16** と対応するGrignard試薬との反応により得られたアミノケトン体 **17** をシアמידで閉環させることで合成した⁷。また、4位への置換アミノ基の導入 (**19l, m, n**) については、2,4-ジクロロキナゾリン **18**⁸を置換アミンとアンモニアで段階的に反応させることで選択的に得ることができた。

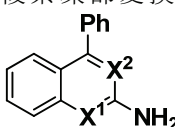
これら合成化合物のTNF- α 産生阻害活性をTable 3-1に示した。複素環構造中の窒素原子は活性発現に重要であり、炭素原子と置き換えたキノリン **19b** やイソキノリン **19c** では活性が減弱することが示された。2位アミノ基の変換では、置換基導入により立体的に嵩高くすることで活性が消失した (**19f-h**)。



Scheme 3-1 Synthesis of quinazolines **19e-n**. CONDITIONS: (i) POCl₃, 94%; (ii) NH₃/ EtOH, EtOH, 140 °C, 88-97%; (iii) RMgCl, THF, 66%-85%; (iv) 1N-HCl/Et₂O, Et₂O; (v) Cyanamide, 50 °C, 76%-77%; (vi) R'R''NH, THF, 0 °C, 75-81%; (vii) NH₃/ EtOH, EtOH, 140 °C, 38-70%.

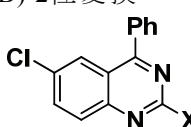
Table 3-1 キナゾリン誘導体の*in vitro* TNF- α 産生阻害活性

(A) 窒素複素環部変換



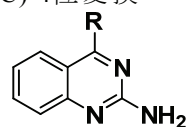
Compd	X ¹	X ²	IC ₅₀ (μ M) ^a
19a	N	N	3.4
19b	N	C	12
19c	C	N	>30

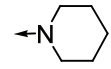
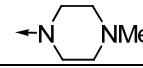
(B) 2位変換



Compd	X	IC ₅₀ (μ M) ^a
19d	OH	3.6
19e	NH ₂	2.8
19f	NHEt	>30
19g	NEt ₂	>30
19h	NHPh	>30

(C) 4位変換



Compd	R	IC ₅₀ (μ M) ^a
19a	Ph	3.4
19i	Bn	>30
19j	C ₆ H ₁₁	6.7
19k	NH ₂	>30
19l	NHPh	>30
19m		>30
19n		>30

^a inhibition in mouse macrophages

また4位の変換では、シクロヘキシル基 (**19j**) に活性が見出され、ビフェニル構造にならない非共役型置換基の導入が可能であることが分かった。しかし、フレキシビリティを持たせたベンジル基 (**19i**) では活性が消失し、またシクロヘキシル基と同様に環状構造を有する化合物 **19m**, **19n** では活性は認められず、興味深い結果となった。その他のアミン置換体 **19k**, **19l** での活性消失の結果も合わせて考えると、4位部分の置換基は環状構造による嵩高さ、固さとともに中性(非塩基性)の官能基構造が好ましいことが示唆された。

以上の結果を踏まえて、新たなリードとなり得る構造としてピペリジニルキナゾリン/ピリミジン化合物を提案した (Fig. 3-2)。特にキナゾリン4位のベンゼン環をピペリジニル構造とすることで、(1) 構造的なオリジナリティを持たせること、(2) フェニル構造を飽和型に変換して平面性と共役性を回避することによる溶解性や不要な薬理作用の改善、(3) 窒素原子導入により合成展開の幅が広がることなどが期待できる。化合物 **20a** は公知化合物であったため⁹、文献記載の方法に準じて合成し活性を評価したところ、果たしてTNF- α 産生阻害活性が確認できた。その活性はIC₅₀値が20 μ Mと弱いものであったが、各種変換により活性の向上が可能であると考え更なる合成展開を行った。

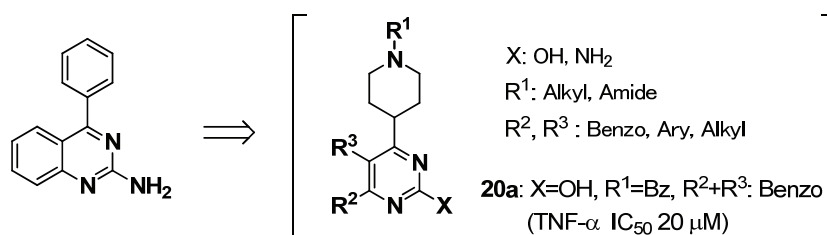
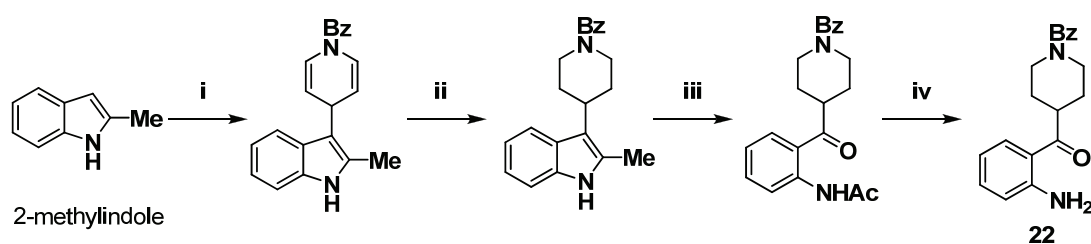


Fig. 3-2 ピペリジニルピリミジンとプロトタイプ (**20a**) のTNF- α 産生阻害活性

3-3. ピペリジニルピリミジン誘導体の合成

より詳細な構造活性相関取得のため、誘導体合成を以下に示す様に行った。キナゾリン化合物の合成には、中間体であるアミノケトン体 **22** の取得が重要であるが、これは化合物 **20a** の合成のために用いた既存のルートによる合成は可能であった (Scheme 3-2)。しかし、この方法は 1,4-付加での反応時間の長さ、オゾン分解やステップ数の多さなど大量合成には向かない面も多く、より効率的なルートでの実施を試みた。Scheme 3-3 に示すように、シアノピペリジン **21**¹⁰ をベンゾイル化した後、アニリンへのオルト位選択的 Friedel-Crafts 反応¹¹ を行うことで極めて効率的かつ高収率で化合物 **22** を得ることができた。

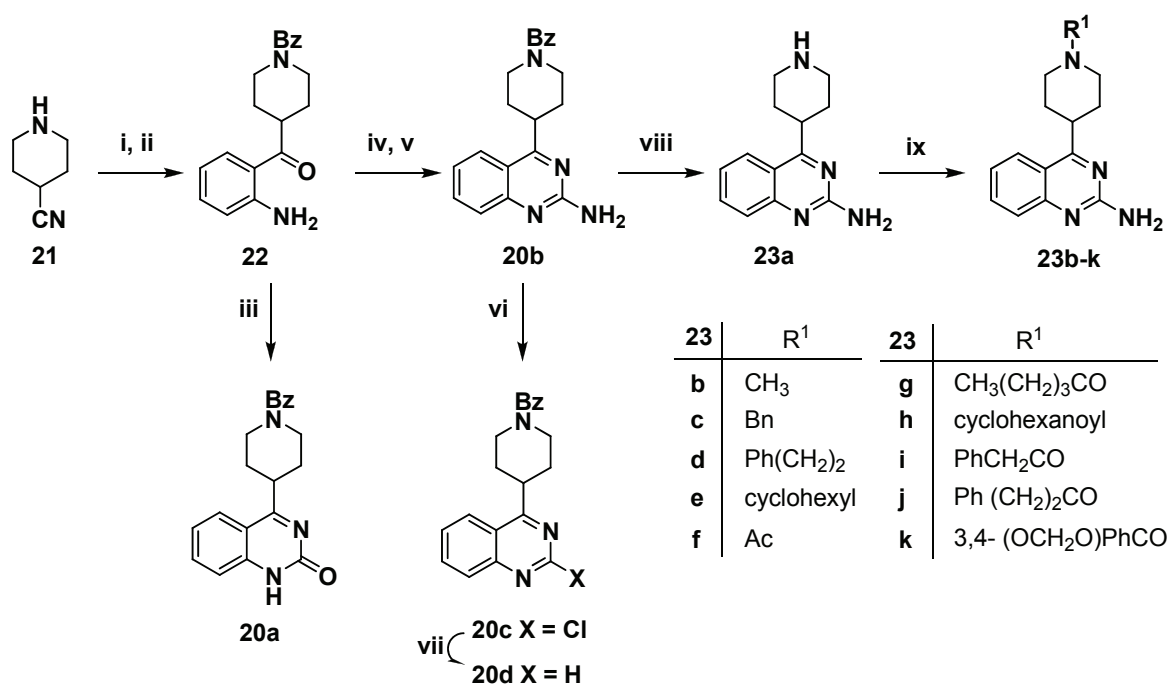


Scheme 3-2 Synthesis of **22**. CONDITIONS: (i) BzCl, pyridine, rt, 7 days, 38%; (ii) H₂, PtO₂, EtOH-THF, 84%; (iii) O₃, AcOH, 60 °C, 86%; (iv) 6N-HCl, MeOH, reflux, quant.

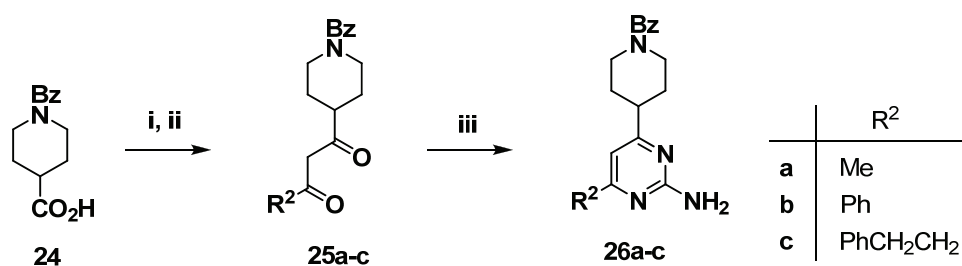
化合物 **22** をシアン酸カリウム、シアナミドと作用させることで2-オキソ体 **20a** と2-アミノ体 **20b** をそれぞれ合成した。また化合物 **20b** のアミノ基部分を ^tBuONO-SbCl₃ による非水系でのジアゾ化置換反応¹²により2-クロロ体 **20c**、引き続いての接触還元で無置換体 **20d** へと誘導した。

一方、化合物 **20b** のベンゾイル保護基を加水分解した後 (**23a**)、ピペリジノ基上に種々の置換基を導入し、化合物 **23b-k** を得た。

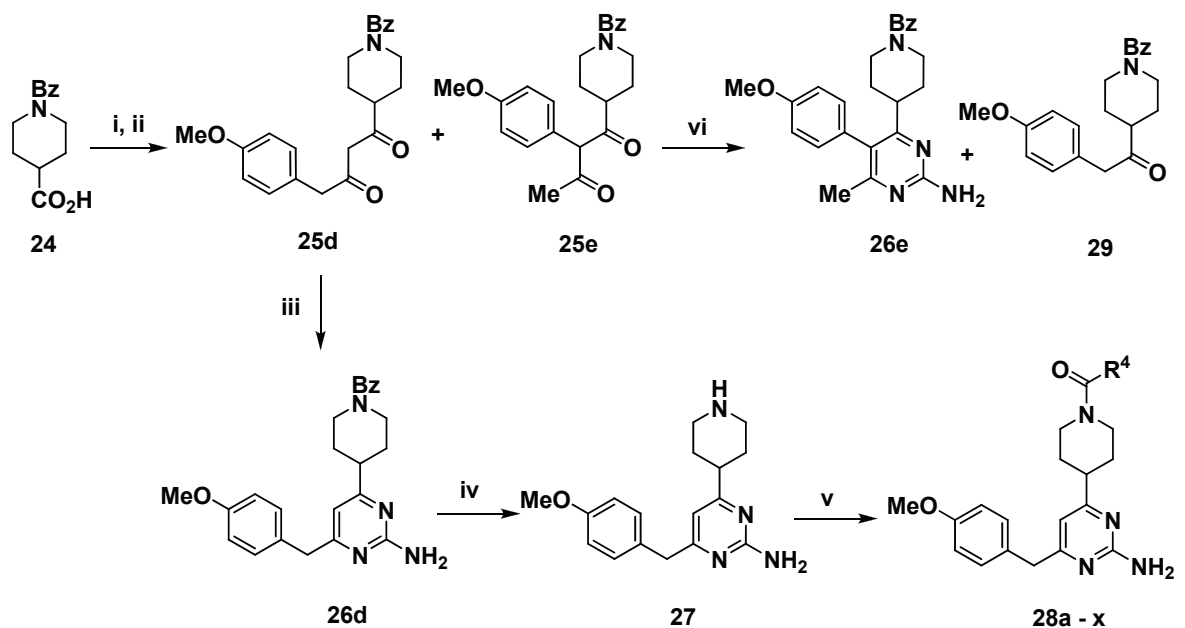
非縮環型のピリミジン化合物 **26a-c** は、ベンゾイルイソニペコチン酸 **24**¹³ から誘導した酸クロライドと対応するケトン体を Claisen 縮合により反応させ 1,3-ジケトン体 **25** とした後、グアニジンで閉環させることで合成した (Scheme 3-4)。しかし、この反応をベンジルメチルケトンに適用した場合 (Scheme 3-5)、生成物は 1,3-ジケトン体 **25d** と **25e** の 1:1 異性体混合物であった。これはベンジル位のメチレンの酸性度が高いことが原因であり、今後検討を要するルートであると思われたが、ひとまず誘導体合成を優先して進めることにした。両異性体は、カラムクロマトグラフィーによる分離が可能であり、得られた 1,3-ジケトン体を同様にグアニジンで縮合させた。化合物 **25e** の反応では脱アセチル化が優先し、主生成物として化合物 **29** を与えたため、**26e** の収率は 7% と極めて低いものであった。もう一方の異性体 **25d** では問題なく縮環反応は進行し、引き続いての加水分解で得られたアミン体 **27** を基質としてピペリジノ基上の変換を行った (**28a-x**)。



Scheme 3-3 Synthesis of piperidinylquinazolines **20** and **23**. CONDITIONS: (i) BzCl, Et₃N, THF, 0 °C, 95%; (ii) aniline, BCl₃, AlCl₃, (CHCl₂)₂, 90 °C, 75%; (iii) KOCN, AcOH, 60 °C, 71%; (iv) HCl/Et₂O; (v) H₂NCN, 50 °C, 97%; (vi) *t*BuONO, SbCl₃, (CHCl₂)₂, 60 °C, 32%; (vii) H₂, Pd/C, AcONa, MeOH, rt, 45%; (viii) 6N-NaOH, EtOH, reflux, 82%; (ix) R¹X, Et₃N, 0-80 °C, DMF, 20-41% (for **23b-d**); cyclohexanone, NaB(CN)H₃, HCl-MeOH, rt, 45% (for **23e**); Ac₂O, Et₃N, CHCl₃, 0 °C, 76% (for **23f**); R¹COCl, Et₃N, 0 °C, CHCl₃, 45-69% (for **23g-k**).



Scheme 3-4 Synthesis of piperidinylpyrimidines **26a-c**. CONDITIONS: (i) SOCl₂, CHCl₃, reflux; (ii) R²COCH₃/LDA, THF, -70 °C, 38-54%; (iii) guanidine hydrochloride, K₂CO₃, pyridine, 110 °C, 74-77%.



28	R ⁴	28	R ⁴	28	R ⁴
a	CH ₃	i	4-MeOPh	q	3,4- (OCH ₂ O)Ph
b	CH ₃ CH ₂	j	2-NO ₂ Ph	r	3,4-Cl ₂ Ph
c	CH ₃ (CH ₂) ₂	k	3-NO ₂ Ph	s	PhCH ₂
d	CH ₃ (CH ₂) ₄	l	4-NO ₂ Ph	t	4-MeOPhCH ₂
e	CH ₃ (CH ₂) ₆	m	4-ClPh	u	4-ClPhCH ₂
f	^t Bu	n	2,3-(MeO) ₂ Ph	v	3,4-(MeO) ₂ PhCH ₂
g	2-MeOPh	o	3,4-(MeO) ₂ Ph	w	3,4- (OCH ₂ O)PhCH ₂
h	3-MeOPh	p	3,5-(MeO) ₂ Ph	x	3,4- Cl ₂ PhCH ₂

Scheme 3-5 Synthesis of piperidinyipyrimidines **28a-x**. CONDITIONS: (i) SOCl₂, CHCl₃, reflux; (ii) 4-methoxyphenylacetone/LDA, THF, -70 °C, 35% (for **25d**), 35% (for **25e**); (iii) guanidine hydrochloride, K₂CO₃, pyridine, 110 °C, 45%; (iv) 6N-NaOH, EtOH, reflux, 79%; (v) R⁴COCl, Et₃N, CH₂Cl₂ or CHCl₃, 0 °C, 68-100% (for **28a-g**, **28i-m**, **28s**); R⁴CO₂H, HOBT, EDC, CHCl₃, rt, 86-100% (for **28h**, **28n-r**, **28t-x**), (vi) guanidine hydrochloride, K₂CO₃, dioxane, 110 °C, 7%.

3-4. ピペリジニルピリミジン誘導体の構造活性相関

得られた誘導体について、LPS刺激によるマウス腹腔マクロファージを用いたTNF- α 産生阻害活性を調べた。細胞をリポポリサッカライド(LPS)で刺激し、培養上清中に産生されたTNF- α レベルをTNF- α 特異的抗体を用いたELISA法により測定することで、その産生阻害活性を評価した。またLPS非存在下では培養上清中にTNF- α の産生は認められなかった。

まずキナゾリン2位の変換では、置換基をアミノ(20b)、クロロ(20c)あるいは無置換(20d)とすることで、初期に見出したヒドロキシ体 20a に比べて活性が大幅に増強され、当初の懸念であった活性の弱さについては改善できることが示された(Table 3-2)。ヒドロキシ体 20a はその互変異性であるケト型構造を優先的にとることが知られており¹⁴、これにより他の置換基との活性の違いについても説明できる。キナゾリンあるいはピリミジン構造の窒素原子は、ファーマコフォアモデルを想定した場合、水素結合アクセプターとして機能していると考えられ、先のTable 3-1(A)の結果とも合わせて共役型のピリミジン構造の重要性を確認できた。

また、Table 3-3にはピペリジノ基上の置換変換についての結果を示した。アルキル置換体 23a-e のTNF- α 産生阻活性は減弱または消失したが、アミド置換体 23f-k ではおおむね良好な活性が維持された。先のTable 3-1(B)のフェニルキナゾリン体での知見と合わせると、キナゾリン4位の置換基はアミノ基の位置的な違いに関わらず非塩基的性質が好ましい空間であると考えられた。

さらに、基本構造をアミノピリミジンとし、縮環部分の変換による効果を調べた(Table 3-4)。興味深いことにベンゼン縮環構造(キナゾリン)以外のものでも同等のTNF- α 産生阻害活性が認められ、2-アミノピリミジン誘導体の4位置換体を比べると、阻害活性の強度としては Me(26a) < Ph(26b) < Phenethyl(26c), MeOBn(26d)の順であった。メチル置換体 26a で活性が減弱したことから、この部分はある程度の嵩高さと脂溶性が必要であると推察された。同様に化合物 26e もピリミジン 5 位(R²)に脂溶性基を有することから強い活性を期待したが、実際には減弱した。隣接するピペリジニル基との立体反発によるコンホメーションのねじれが原因ではないかと考えている。特にフェネチル(26c)あるいはメトキシベンジル(26d)誘導体がキナゾリンと同程度の活性を示したことから、当初一つの目標としていた脱キナゾリン構造への展開がほぼ達成された。

そこで、さらに活性の増強を目指して、最適化を行った。基質としてメトキシベンジル構造のものを選択し、ピペリジノ基上の置換基をアミドタイプに限定した変換を実施した。基質の選択についてはフェネチル構造の化合物 26c も強い活性を示したことより、いくつかピペリジノ基上の変換体に誘導したが、活性が安定せず置換基によって大きく変動してしまい構造活性相関が上手く取れないため候補から除外した。

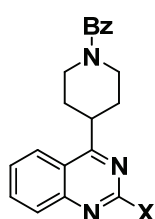
アルカノイル誘導体 28a-f では活性はある程度維持されたが、強いものは見出す

ことはできなかった。側鎖の長さや大きさによる活性の変化を調べたが、明確な傾向はつかめずピバロイル基のような嵩高い置換基でも許容されることから、立体的な制約はほとんどないことが推察された。

一方、ベンゾイル置換体 **28g-r** で強い活性を示すものが数多く見出されてきた。電子供与性 (**28g-i**) と電子性吸引性 (**28j-l**) による効果の差はほとんど認められなかったが、位置的な効果は活性に影響し、オルト (**28g, 28j**) < メタ (**28h, 28k**) < パラ (**28i, 28l**) の順に活性が上昇した。フェニルアセチル置換体 **28s-x** は対応するベンゾイル誘導体と比較した場合、活性が減弱した。これら評価化合物のうち、化合物 **28i, 28k-o, 28q, 28r** は IC₅₀ 値で 1 μM を下回る非常に強い阻害活性を示した。

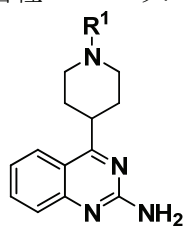
前章でも述べたように、マウスに LPS を投与することで一過性の TNF-α の上昇が認められる。そこで評価化合物の経口投与における血中 TNF-α 産生に対する阻害活性を調べた結果を Table 3-5 に示した。この評価は *in vivo* における TNF-α 産生阻害活性の確認と共に、化合物の吸収性を含めた薬物動態プロファイルの良い化合物を効率的に選択する目的で実施した。細胞系での活性が非常に強い化合物群の中でも、*in vivo* における阻害活性は十分でないものも見出され (**28i, 28k** など)、また逆に *in vitro* の阻害活性が弱くても *in vivo* における阻害活性が強い化合物 (**28a**) もあり、化合物の吸収性や代謝安定性などの薬物動態的なプロファイルの違いによる効果が反映された結果であると考えられる。これら化合物の中で、*in vitro* および *in vivo* の活性のバランスが良い化合物として特に **28q** を選択し、高次評価のための製法も含めたより詳細な検討を行った。

Table 3-2 *in vitro* TNF-α 産生阻害活性 -2 位変換-

	Table 3-2 <i>in vitro</i> TNF-α 産生阻害活性 -2 位変換-		
	Compd	X	IC ₅₀ (μM) ^a
20a	OH	20	
20b	NH ₂	1.4	
20c	Cl	1.4	
20d	H	1.4	

^aInhibition in mouse macrophages. Results are averages of two independent experiments

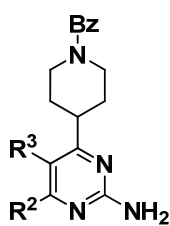
Table 3-3 *in vitro* TNF- α 産生阻害活性 —ピペリジノ基上の置換基変換—



Compd	R ¹	IC ₅₀ (μ M) ^a	Compd	R ¹	IC ₅₀ (μ M) ^a
23a	H	51	23g	CH ₃ (CH ₂) ₃ CO	3.0
23b	Me	>100	23h	cyclohexanoyl	2.5
23c	Bn	16	20b	PhCO	1.4
23d	Ph(CH ₂) ₂	>100	23i	PhCH ₂ CO	2.0
23e	cyclohexyl	53	23j	Ph (CH ₂) ₂ CO	6.3
23f	Ac	3.6	23k	3,4- (OCH ₂ O)PhCO	4.5

^aInhibition in mouse macrophages. Results are averages of two independent experiments.

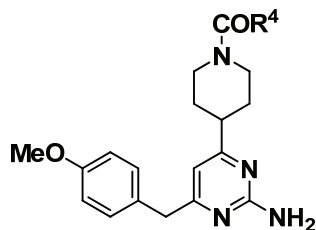
Table 3-4 *in vitro* TNF- α 産生阻害活性 —縮環部変換—



Compd	R ²	R ³	IC ₅₀ (μ M) ^a
20b	-C=C-C=C-		1.4
26a	Me	H	9.0
26b	Ph	H	5.1
26c	PhCH ₂ CH ₂	H	1.0
26d	4-MeOPhCH ₂	H	1.4
26e	Me	4-MeOPh	9.7

^aInhibition in mouse macrophages. Results are averages of two independent experiments

Table 3-5. *in vitro* および *in vitro* TNF- α 産生阻害活性 –ベンジルピリミジン最適化–



Compd	R ⁴	IC ₅₀ (μ M) ^a	<i>in vivo</i> ^b	Compd	R ⁴	IC ₅₀ (μ M) ^a	<i>in vivo</i> ^b
20b	PhCO	1.4	52	28m	4-ClPh	0.6	56
28a	CH ₃	6.1	60	28n	2,3-(MeO) ₂ Ph	0.9	nt
28b	CH ₃ CH ₂	4.9	49	28o	3,4-(MeO) ₂ Ph	0.9	52
28c	CH ₃ (CH ₂) ₂	7.2	nt	28p	3,5-(MeO) ₂ Ph	1.0	nt
28d	CH ₃ (CH ₂) ₄	1.5	47	28q	3,4-(OCH₂O)Ph	0.6	74
28e	CH ₃ (CH ₂) ₆	1.9	nt	28r	3,4-Cl ₂ Ph	0.7	53
28f	t-Bu	5.6	nt	28s	PhCH ₂	2.1	nt
28g	2-MeOPh	3.6	44	28t	4-MeOPhCH ₂	1.7	57
28h	3-MeOPh	1.2	37	28u	4-ClPhCH ₂	2.4	nt
28i	4-MeOPh	0.5	24	28v	3,4-(MeO) ₂ PhCH ₂	1.2	49
28j	2-NO ₂ Ph	1.7	27	28w	3,4-(OCH ₂ O)PhCH ₂	1.8	nt
28k	3-NO ₂ Ph	0.8	44	28x	3,4-Cl ₂ PhCH ₂	2.1	51
28l	4-NO ₂ Ph	0.7	56				

^aInhibition in mouse macrophages. Results are averages of two independent experiments.

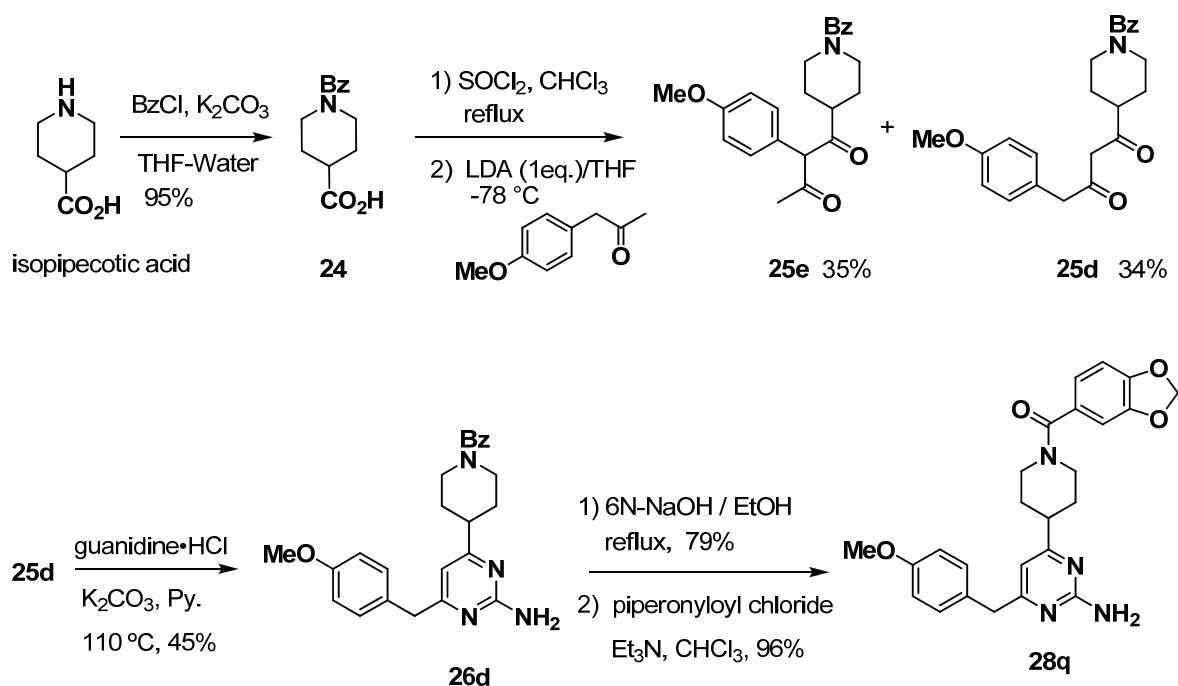
^b% inhibition of serum TNF- α production in LPS-induced D-galactosamine-sensitized mice. Test compounds were orally administered 100 mg/kg. Results are averages of two independent experiments. nt: not tested.

3-5 ピペリジニルピリミジン誘導体の製法検討

高次評価を実施するに当たり、まずは十分量の化合物を供給する必要があることから、既存の合成ルートの見直しを行った。スクリーニング合成で用いた化合物 **28q** の合成ルートを Scheme 3-6 に示した。原料であるイソニペコチン酸から出発して、わずか 6 段階で目的物に至るルートであり、さらにベンゾイル基からピペロニロイル基への置換基の付け替えを省略することでステップ数の短縮が期待できる。但しこのルートの課題は、ベンジルメチルケトンを用いた Claisen 縮合における異性体混合物の生成と、そのカラム精製であり、これらを解決することが重要となる。

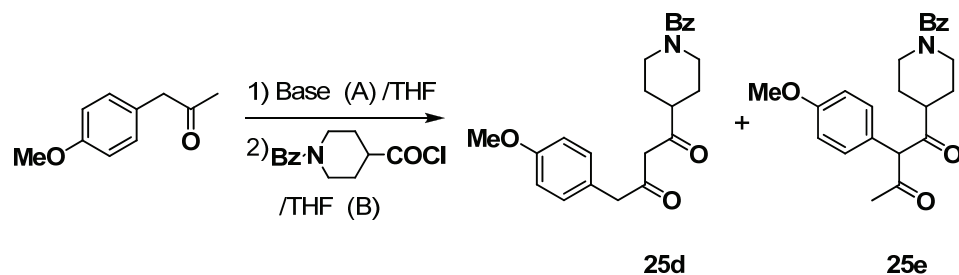
スクリーニング合成の初期段階では、より酸性度の高いベンジル位での反応を回避し、*exo* 側での反応を優先させるため、*dianion*¹⁵ を経由する方法も検討した (Table 3-6)。しかし、用いる塩基の組み合わせや反応温度等の条件を変えたが、いずれの場合も速度論的な条件下での反応 (entry 7) に比べ良い結果を得ることはできなかった。また、*exo* 部の酸性度をより高めたケトエステル体 (**29**)¹⁶ を用いての縮合も検討したが、反応が全く進行せずジケトエステル (**30**) を得ることができなかった (Scheme 3-7)。

そこで、新たなルートとして 1,3-ジケトン化合物の逆合成経路をこれまでとは異なる結合位置での切断による組み合わせとして提案した (Scheme 3-8)。すなわち活性メチレン (β -ケトエステル) 側をピペリジン基質に、また活性エステル側をフェニル酢酸とする反応を検討した。



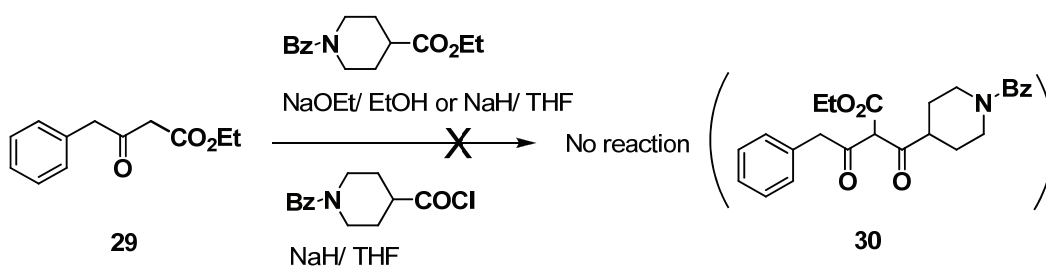
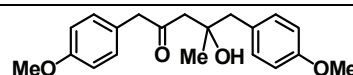
Scheme 3-6 Original route for the synthesis of compound **28q**

Table 3-6 Conditions for Claisen condensation



Entry	A	B	25d	25e
1	LDA (-78 °C) → nBuLi (0 °C)	0 °C	5%	15%
2	LDA (-78 °C) → nBuLi (rt)	0 °C	-	9%
3	LDA (-78 °C) → nBuLi (0 °C), HMPA	0 °C	-	trace
4 ^a	LDA (-78 °C) → nBuLi (0 °C), HMPA	-78 °C	trace	trace
5	NaH (rt) → nBuLi (0 °C)	0 °C	-	trace
6	NaNH ₂ (rt) → nBuLi (0 °C)	0 °C	-	trace
7	LDA (-78 °C, 1 eq.)	-78 °C	41%	45%

^aaldol adduct was obtained as a main product (20%).



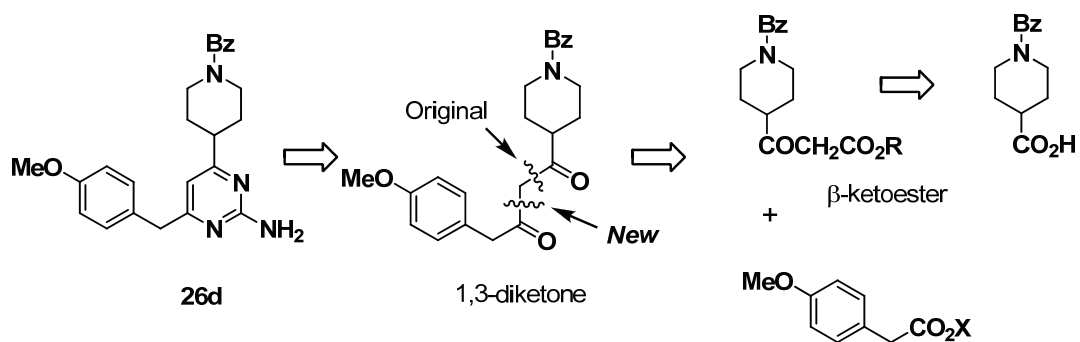
Scheme 3-7 Reaction of β -ketoester **29**

β -ケトエステル **32** は、公知化合物であり、実際に文献記載の方法に従い合成を行った (Scheme 3-9, Table 3-7, entry 1)¹⁷。イソニペコチン酸の活性エステルにエチル *t*-ブチルマロネートを作用させた後、酸性条件下での脱炭酸により目的物を得る反応である。しかし収率的には満足できるものでないことから若干の改良検討を行った。マロン酸のハーフエステルを用いることで縮合と脱炭酸が同一系内で行えるが、塩基にブチルリチウムを用いた反応は低収率であった (entry 2)¹⁶。マグネシウム塩との反応では、まず入手可能な *p*-メトキシベンジル (PNB) エステルで検討したところ、*N,N'*-カルボニルジイミダゾール (CDI) で活性化した基質に対して非常に高収率で β -ケトエステル体を与えた (entry 4, 5)¹⁸。そこで実際のマロン酸モノエチルマグネシウムを用いて縮合を行い、 β -ケトエステル **32** を 98% の高収率で得ることができた。

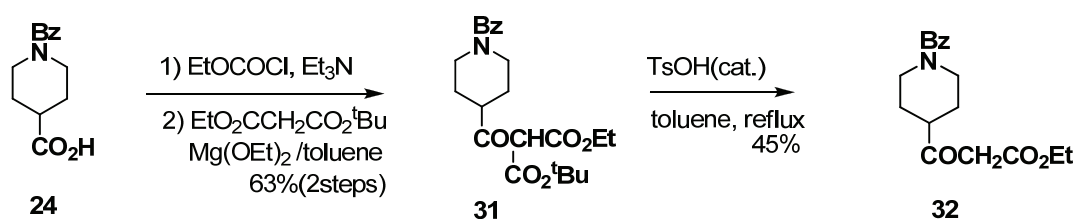
続いての Claisen 縮合では活性化エステルと塩基は、それぞれ酸クロライドと水素化ナトリウムの組み合わせの場合のみで反応が進行した (Table 3-8A)。また、脱エトキシカルボニル化反応は強い酸性条件下において基質の分解が認められたため、酢酸による緩和な条件下での反応により、1,3-ジケトン化合物 **25d** を得ることができた (Table 3-8B)。

以上の結果、課題であった 1, 3-ジケトン合成に目処が立ったことより、実際のターゲット化合物 **28q** の合成に適用した。将来的な大量合成を意識し、反応全体を通して若干の見直しを行いながら、ルートの検証を行った (Scheme 3-10)。まずピペリジノ基上の保護・脱保護による置換基の付け替えの無駄を省くため、ピペロニロイル基をあらかじめ導入し (**34**)、CDI で酸イミダゾールに活性化した後、マロン酸モノエチルマグネシウムと反応させ β -ケトエステル **35** を高収率で得た。4-メトキシフェニルアセチルクロライドと化合物 **35** の Claisen 縮合では、ベンゾイル基質の **32** を用いた場合と比較して水素化ナトリウムが 2 当量必要であった。本来、反応により生成するジケトステルの高い酸性度から 2 倍量の塩基が必要であり、むしろ後者の結果が一般的であると言える。 β -ケトエステル **32** のエノラートでは、実際の反応が不均一であったことが観察されたことから、生成してくるジケトステルとのプロトン交換が起こりにくいため、少ない塩基量での進行が実現されたものと思われる。続いての脱エトキシカルボニル化反応を酢酸中で行うと、ピペロニロイル基から酢酸残基へのアミド交換が進行してしまうことが分かった。しかし、この問題は DMSO-H₂O のより緩和な条件に変更することで回避できることを見出した。最後のグアニジンとの縮合では、価格的にも安価な炭酸塩に変更することで、従来用いていた炭酸カリウムによるフリー化を必要としない反応が可能となった¹⁹。

実際にこのルートに従い大量での反応も検証したが、カラム精製すること無しに化合物 **28q** の 200 g スケールでの合成も達成できることが示され、初期の合成ルートに比べ、より緩和な条件下での反応による効率的な合成法を確立することができた。



Scheme 3-8 New retrosynthetic scheme of **26d**



Scheme 3-9 Synthesis of β-ketoester **32**

Table 3-7 Conditions for the preparation of β-ketoester

entry	X	Reagent	Conditions	R	Yield
1	OCO ₂ Et	EtO ₂ CCH ₂ CO ₂ tBu	Mg(OEt) ₂ /toluene, then TsOH	Et	28%
2	Cl	EtO ₂ CCH ₂ CO ₂ H	nBuLi (2eq.)/THF	Et	31%
3	OCO ₂ Et	(PNBO ₂ CCH ₂ CO ₂) ₂ Mg	DMF, 60 °C	PNB ^a	0%
4	im. ^b	(PNBO ₂ CCH ₂ CO ₂) ₂ Mg	DMF, rt.	PNB	83%
5	im.	(PNBO ₂ CCH ₂ CO ₂) ₂ Mg	THF, 60 °C	PNB	77%
6	im.	(EtO ₂ CCH ₂ CO ₂) ₂ Mg	THF, 60 °C	Et	98%

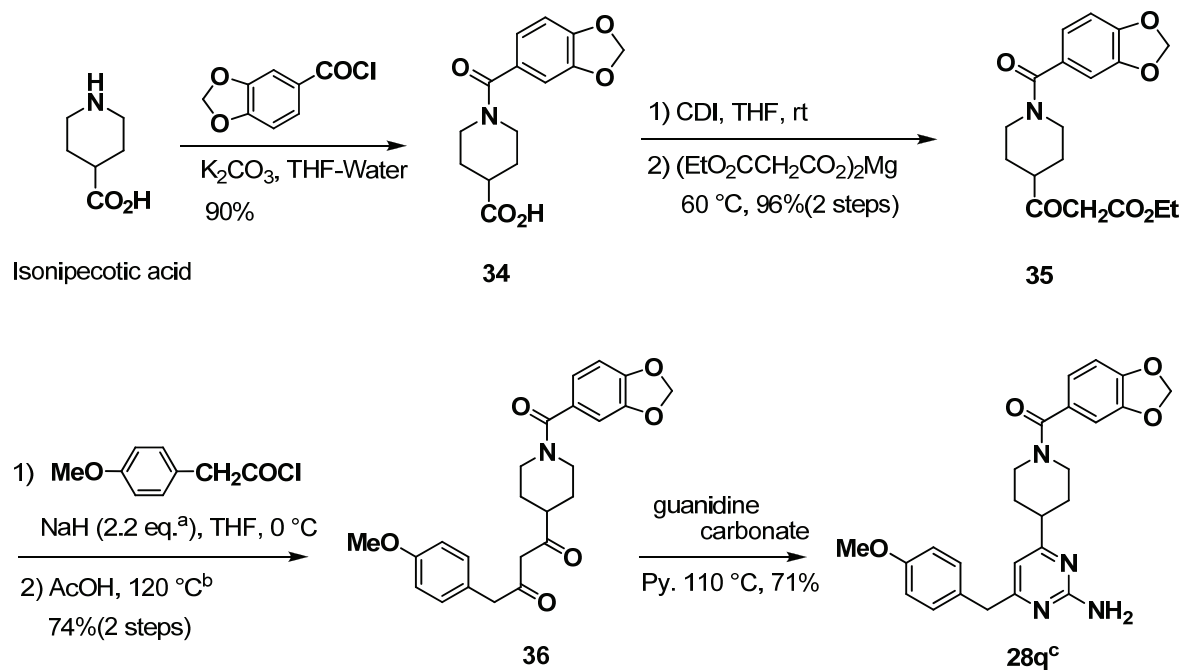
^a*p*-NO₂Bn, ^bimidazolyl

Table 3-8

Reaction scheme showing the synthesis of compound 25d from compound 32. Compound 32 (1-(benzylamino)propan-2-one ethyl ester) reacts with a substituted benzyl ester (MeO-C₆H₄-CH₂CO₂X) in the presence of a base (A) to form intermediate 33. Intermediate 33 is then treated with conditions (B) to yield compound 25d (1-(benzylamino)propan-2-one ethyl ester derivative).

(A) Conditions for Claisen condensation					(B) Conditions for deethoxycarbonylation		
entry	X	Base	Condition	Yield	entry	Condition	Yield
1	OEt	NaOEt	EtOH, reflux	N.R. ^b	1	3N-H ₂ SO ₄ /THF, reflux	dec. ^c
2	OEt	NaH ^a	THF, 0 °C	N.R.	2	48% HBr, 100 °C	dec.
3	OCO ₂ Et	NaH ^a	THF, 0 °C	N.R.	3	TsOH/toluene, reflux	dec.
4	Cl	NaH ^a	THF, 0 °C	64%	4	AcOH, 120 °C	84%

^a1.2eq.; N.R.; No reaction ^cdec.: decomposition



Scheme 3-10 Improved route for the synthesis of compound 28q

^a1.2 eq. of NaH was insufficient to consume β-ketoester; ^bAcetamide compd. was obtained as byproduct (12%); ^cTotal yield: 45%, through the newly developed route (vs. 11%, through the original route).

3-6. マウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおける化合物の評価

既に、*in vitro* および *in vivo* の阻害活性から化合物 **28q** を選択し、またその製法についても確立した。引き続き、高次薬効評価モデルであるコラーゲン誘発関節炎 (CIA) モデルを用いて、化合物の経口投与による予防的試験および治療的試験の評価を行った。このモデルでは DBA/1J 系マウスの背部皮内に完全アジュバントと共に乳化したウシ II 型コラーゲンを注射 (1 次免疫) し、3 週後に同様にして調製した II 型コラーゲンを尾根部皮内に注射 (2 次免疫) すると四肢に多発性関節炎を誘導することができる。ヒトにおけるリウマチ関節炎や慢性炎症の病態を反映したモデルの一つである²⁰。

発症した関節炎の重症度 (Clinical score) は、Björk と Kleinau の基準²¹に基づいて肉眼により各肢をそれぞれ採点することによってスコア化した。

0=変化なし; **1**=1関節の腫脹; **2**=2関節の腫脹/前後肢の軽度の発赤、浮腫; **3**=3関節以上の腫脹/前後肢の中度の発赤、浮腫; **4**=上記3と同様であるが前後肢発赤、浮腫が強度/関節強直が認められる (1 匹当たりの最大スコアは16となる)。

また、骨破壊の重症度 (Radiographical score) は、試験最終日における軟X線写真の撮影画像を Gilman 等の基準²²に基づいて各肢をそれぞれ評価することによってスコア化した。

0=変化なし; **1**=微小な骨糜爛; **2**=骨糜爛が明瞭に同定できる; **3**=明白かつ広範な骨糜爛が多関節に存在する (1 匹当たりの最大スコアは12となる)。

評価結果を以下に示した。対照薬としてシクロスポリン (CsA, 免疫抑制剤)、インドメタシン (IM, シクロオキシゲナーゼ阻害剤) とデキサメタゾン (Dex, ステロイド剤) を用いたがいずれもこのモデルにおいて強い抑制作用が確認されているものである。

まず、関節炎が発症する以前より薬剤投与を開始した予防的投与試験を実施した。Fig. 3-3に示すように、2次免疫開始からの臨床所見を経時的に観察すると、その効果は強力な免疫抑制剤であるCsAに比べると弱いものの、化合物 **28q** の用量依存的な (25-100 mg/kg) 関節炎の進行に対する抑制効果が示された。また、試験最終日における炎症パラメータの薬剤無投与群 (Vehicle) との比較においても、100 mg/kgの投与量で臨床所見、関節炎の発症 (Number of affected paw) を有意に抑制した。関節破壊のスコア (Radiographical score) においても、有意な差ではなかったが抑制傾向にあった。血清中の IL-6濃度については、いずれの濃度においても有意な抑制が観察された (Table 3-9)。

引き続き、化合物 **28q** の治療効果についても評価した (Fig. 3-4, Table 3-10)。先の予防的投与試験とは異なり、関節炎が軽度に発症した (Clinical score 2 を設定) 段階から薬剤投与を開始した。化合物 **28q** は、50-100 mg/kg投与で関節炎の発症と進行を有意に抑制し、関節破壊についても100 mg/kg投与において有意な抑制作用が

認められた。さらに関節炎が進行した重度 (Clinical score 6) な症状を呈する段階からの治療投与試験においても化合物 **28q** は、関節炎と関節破壊の進行を抑制した (Figure 3-5, Table 3-11)。

以上のように代表化合物を用いた評価結果より、見出したピペリジニルピリミジン誘導体は、RAなどの炎症性疾患の治療薬として期待できることが示された。

CIAモデルにおける抗TNF- α モノクローナル抗体の強い抑制効果はすでに報告され、また我々の実験においても同様に確認されていることなどから(データは示さず)、この病態モデルにおけるTNF- α の関与は明らかである。前章でも述べたように、パビン誘導体 **7s** はCIA評価試験において抑制効果を示さなかった (Fig. 3-6)。一方、構造的には異なるがピペリジニルピリミジン化合物の同モデルにおける効果が確認できたことは、当初の予想通り、*in vitro*でのTNF- α 産生阻害活性が改善された結果に基づくものであると考えられる。

また、化合物 **28q** の *in vitro* におけるサイトカインの阻害活性についてTable 3-12 にまとめた。TNF- α とIL-1については、同程度の阻害活性が確認できたが、IL-6の産生阻害作用は弱く、ヒト末梢血単核球 (PBMC) においてはその作用を確認できなかった。しかし、今回のCIA評価試験において、血中のTNF- α やIL-1濃度は検出限界以下であったが、IL-6レベルの抑制が認められたことは非常に興味深い。

TNF- α がIL-1やIL-6の上流に位置し、関節部等の局所的なTNF- α やIL-1産生の阻害と共に、そのオートクラインあるいはパラクライン作用による結果として血中のIL-6レベルの低下に結びついたものと推察される。IL-6やIL-1は、TNF- α と同様にRAなどの自己免疫疾患に関与が深い前炎症性サイトカインである²³。実際にはこれら複数のサイトカインがネットワークを形成し、相互に作用を及ぼすことでRAの病態形成に関わっているものと思われ、本評価化合物 **28q** もそのネットワークを遮断することで効果を発揮したと考えられる。

化合物 **28q** の作用は、報告されている抗TNF- α モノクローナル抗体の抑制効果に比べると弱く²⁴、その原因の一つに膜型TNFに対する影響も考えられる。膜型TNFは可溶性TNF(TNF- α)の前駆体で、活性化された細胞がTNF- α を遊離する際に細胞表面に表出され、TNF- α 変換酵素 (TNF-alpha converting enzyme, TACE) によって切断される。膜型TNFの機能はまだ不明な点も多いが、自身が他の細胞と会合すること (cell to cell contact) による細胞障害活性、IL-6の誘導や関節炎などの炎症反応に関与する報告もあり²⁵、抗TNF- α 抗体が膜型TNFにも結合することで、こうした炎症反応の抑制や産生細胞の除去による強力な抑制作用につながっていることが示唆されている²⁶。逆に、この強力な免疫抑制作用による易感染性や発ガンリスクが抗TNF- α 抗体で問題となっていることも事実であり、低分子TNF- α 阻害剤は生物製剤による治療後の寛解維持的な使用においても有用ではないかと考えられる。

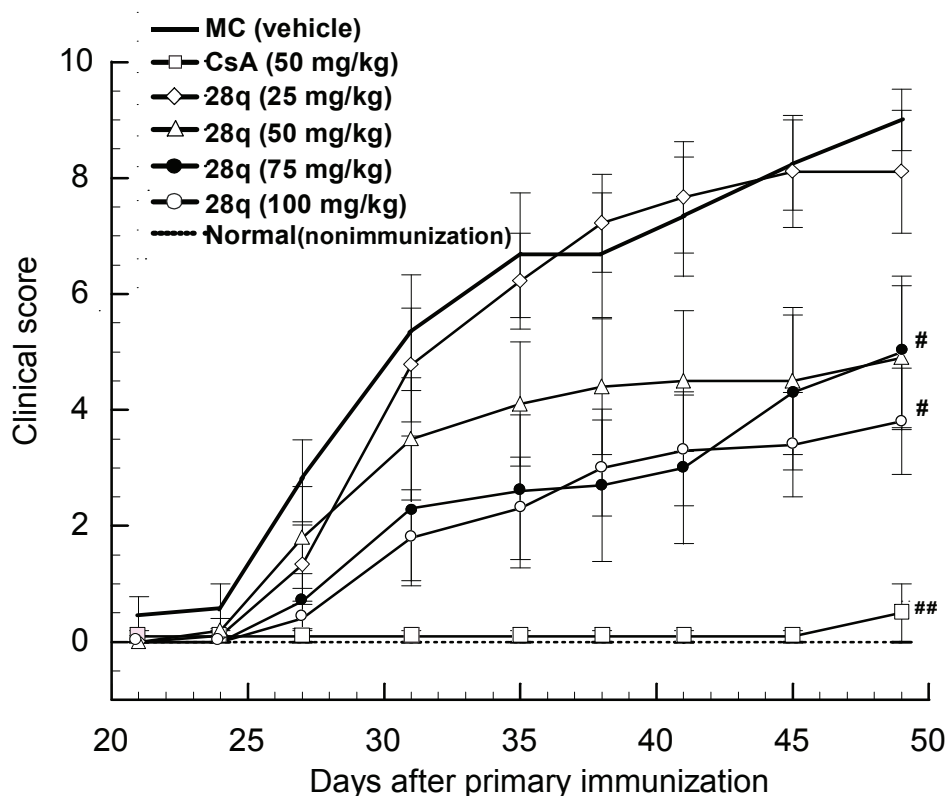


Fig. 3-3 CIAモデルでの化合物 28q の効果 —予防的投与試験—

DBA/1J mice were immunized intradermally at the base of the tail with bovine type II collagen emulsified with Freund's complete adjuvant. 3 weeks after the primary immunization, a booster injection of emulsion of collagen solution and incomplete Freund's adjuvant was done with the same manner. Test compounds were suspended in methyl cellulose(MC) and mice were perorally administered 6 times per week from day 1 to the end of experiment(day 49). The results were expressed as mean±SE(n=10). Significant difference was observed for area under the curve (AUC) at # p<0.05 and ## p<0.01 (parametric Dunnet's test). Normal: nonimmunization; CsA: cyclosporinA

Table 3-9 最終日パラメータ —予防的投与試験—

Treatment	Final clinical score (%inhibition)	Number of affected paw	Radiographical score	serum IL-6 (pg/ml)
MC (vehicle)	9.0 ± 0.5 (0.0%)	3.0 ± 0.0	5.9 ± 0.7	54.2 ± 14.3
CsA (50 mg)	0.5 ± 0.5** (94%)	0.2 ± 0.2**	0.2 ± 0.2**	3.1 ± 2.3**
28q (25 mg)	8.1 ± 1.1 (10%)	2.4 ± 0.3	6.7 ± 0.8	11.3 ± 5.0**
28q (50 mg)	4.9 ± 1.2 (46%)	2.0 ± 0.4	4.0 ± 1.1	20.7 ± 3.7*
28q (75 mg)	5.0 ± 1.3 (44%)	1.9 ± 0.4	3.4 ± 1.0	23.6 ± 11.6*
28q (100 mg)	3.8 ± 0.9** (58%)	1.7 ± 0.4*	3.3 ± 0.8	8.9 ± 3.9**
Normal	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	n.d.

Normal: nonimmunization; CsA: cyclosporineA. Values are expressed means±SE (n=10). *, ** Significantly different from MC-treated animals (p<0.05 and 0.01, respectively). The radiographic assessment of each skeletal alteration was performed using a Sofron X-ray unit (Sofron, Tokyo, Japan) at the end of experiments. IL-6 level in sera was measured by ELISA kit using streptavidine-peroxidase complex technique, according to manufacture's instruction (Collagen Research Center).

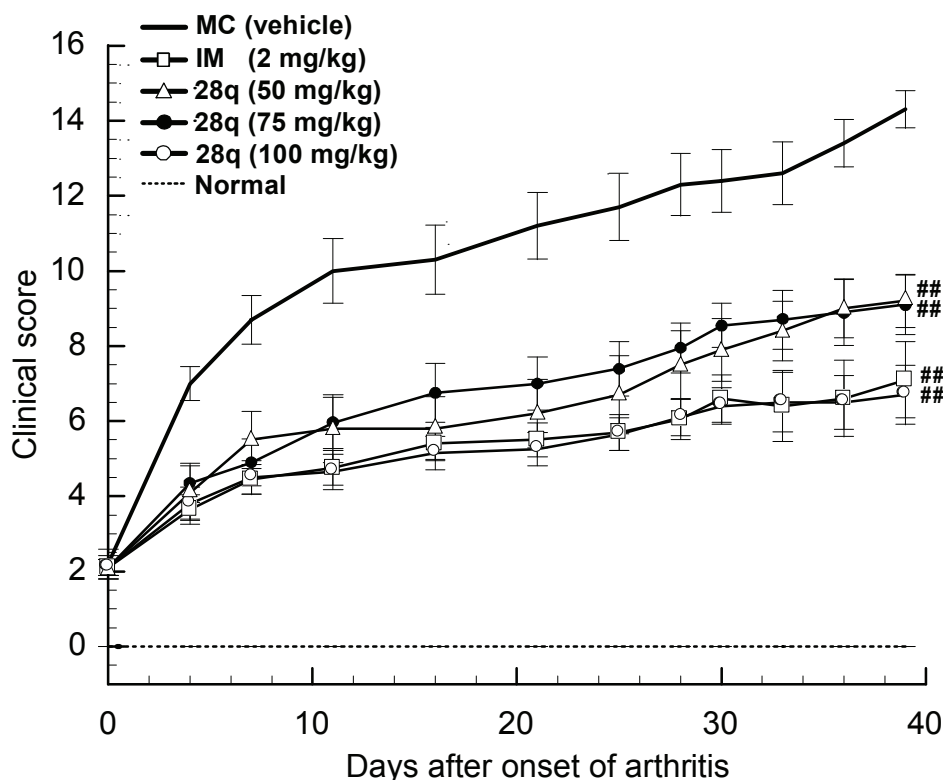


Fig. 3-4 CIAモデルでの化合物 **28q** の効果 —治療的投与試験、軽度—

DBA/1J mice were immunized in the same manner. After boost immunization, mice were inspected daily and each mouse that exhibited erythema and/or swelling in one or more limbs was randomly divided into treatment groups of ten animals on the bases of clinical score and body weight (providing this day as day 0 in this therapeutic protocol). Drug treatment was performed for 39 days 6 times a week after above randomizing. Severity of arthritis was scored through a 39-day drug treatment period. The results were expressed as mean \pm SE (n = 10). Significant difference was observed for AUC at ## p<0.01(parametric Dunnet's test). Significant difference was observed for AUC at # p < 0.05 and ## p<0.01(parametric Dunnet's test). Normal: nonimmunization; IM: indomethacine.

Table 3-10 最終日パラメータ —治療的投与試験、軽度—

Treatment	Clinical score		Number of affected paw		Radiograph ical score ^e	Serum IL-6 (pg/ml)
	Initial	Final (%inhibition)	Initial	Final		
MC (vehicle)	2.2 \pm 0.4	14.3 \pm 0.5 (0%)	1.2 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1	9.9 \pm 0.6	31.8 \pm 8.4
IM (2 mg)	2.1 \pm 0.2	7.1 \pm 1.0** (58%)	1.3 \pm 0.2	3.4 \pm 0.3	4.6 \pm 0.5**	0.8 \pm 0.6*
28q (50 mg)	2.1 \pm 0.3	9.2 \pm 0.7** (41%)	1.3 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2	7.2 \pm 0.8	27.1 \pm 8.5
28q (75 mg)	2.1 \pm 0.2	9.1 \pm 0.8** (42%)	1.3 \pm 0.2	3.3 \pm 0.2	7.8 \pm 0.8	19.4 \pm 4.3
28q (100 mg)	2.1 \pm 0.2	6.7 \pm 0.8** (62%)	1.3 \pm 0.2	2.6 \pm 0.3**	5.6 \pm 0.6**	1.3 \pm 0.9*
Normal	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	n.d.

Normal: nonimmunization; IM: indomethacine. Values are expressed mean or means \pm SE (n = 10). *, ** Significantly different from MC-treated animals (p < 0.05 and 0.01, respectively).

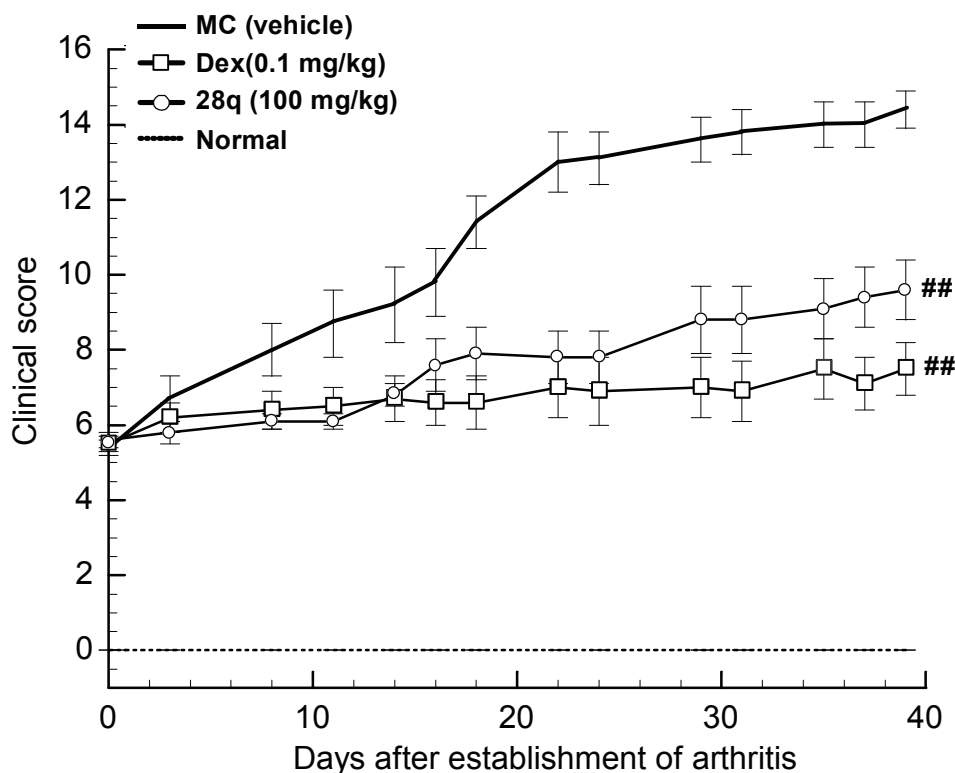


Fig. 3-5 CIAモデルでの化合物 **28q** の治療的効果 —投与試験, 重度—

DBA/1J mice were immunized in the same manner. After boost immunization, mice exhibited severe polyarticular arthritis (clinical score 5 to 6) were randomly assigned into three groups of nine animals on the bases of clinical score and body weight (providing this day as day 0 in this therapeutic protocol) and then perorally administered daily MC suspension of test compounds for 39 days. Severity of arthritis was scored through a 39-day drug treatment period. The results were expressed as mean \pm SE (n=10). Significant difference was observed for AUC at ## $p < 0.01$ (parametric Dunnet's test). Normal: nonimmunization; Dex: dexamethasone.

Table 3-11 最終日パラメータ —治療的投与試験, 重度—

Treatment	Clinical score		Number of affected paw		Radiographi- cal score ^c
	Initial	Final (%inhibition)	Initial	Final	
MC (vehicle)	5.4 \pm 0.2	14.4 \pm 0.5 (0.0%)	2.1 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1	10.6 \pm 0.5
28q (100 mg)	5.6 \pm 0.2	9.6 \pm 0.8** (55.6%)	2.1 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2**	6.9 \pm 0.8**
Dex (0.1 mg)	5.5 \pm 0.2	7.5 \pm 0.7** (77.8%)	2.2 \pm 0.1	2.8 \pm 0.2**	5.6 \pm 0.6**
Normal	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Normal: nonimmunization. Dex: dexamethasone. Values are expressed mean or means \pm SE (n = 10). *, ** Significantly different from MC-treated animals ($p < 0.05$ and 0.01 , respectively).

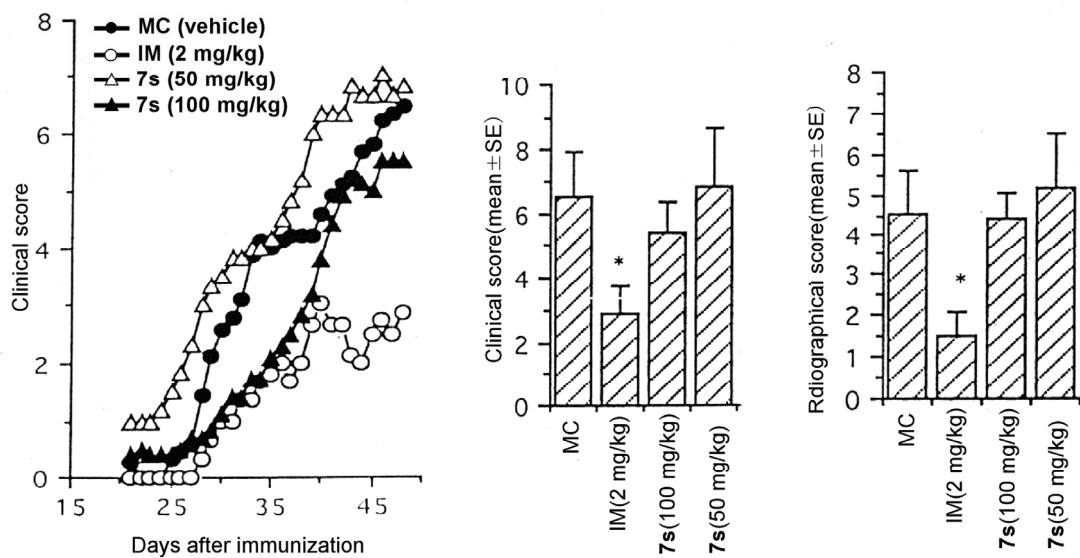


Fig. 3-6 パビン誘導体 7s の効果 —予防的投与試験—

Table 3-12 化合物 28q のサイトカイン阻害活性まとめ

	TNF- α (IC ₅₀)	IL-1 (IC ₅₀)	IL-6 (IC ₅₀)
Mouse macrophage	1 μ M	8 μ M	24 μ M
Human PBMC	2 μ M	3 μ M	>50 μ M

また、本化合物の作用点については今後の検討課題である。初期のフェニルキナゾリンで認められていた3型ホスホジエステラーゼ (PDE3) 阻害作用は、化合物 **28q** では消失し、その他の既存の産生阻害剤で報告されているプロテインキナーゼ Cやp38キナーゼに対しての直接的な阻害作用も認められなかった。また、前述の TACEをターゲットとした遊離抑制の可能性も考えられる。しかし、TACEなどメタロプロテアーゼ阻害剤の構造的長として金属イオンと配位するためのヒドロキサム酸あるいはそれに類似した官能基が必要であり (Fig. 3-7)²⁷、ピペリジニルピリミジンには同種の官能基が認められないことから、その可能性も低いと思われた。細胞系あるいは動物モデルなどにおいて血中のTNF- α 、IL-1やIL-6が抑制されることから、本化合物は遊離抑制ではないTNF- α 産生に至る経路を阻害しているものと考えている。今後は、PDE4などのサブタイプ選択制、キナーゼのリン酸化経路、あるいはメッセンジャーレベルでの発現抑制など既存の経路も含めた詳細な検討により作用点を明らかにしていく必要がある。

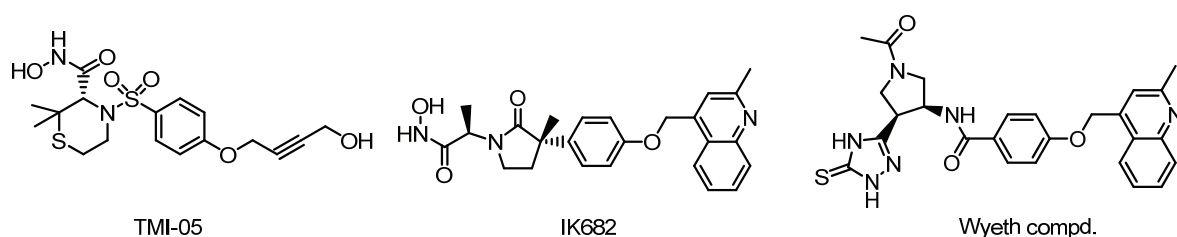


Fig. 3-7 TACE阻害剤の例

3-7. リード化合物 **19e** と選択化合物 **28q** の物性および一般薬理評価

誘導体合成において、活性の向上とともに課題として掲げていた項目について初期のリード化合物であるフェニルキナゾリン **19e** と最適化により得たピペリジニルピリミジン **28q** について比較した。

まず、吸収性向上の要因として考えていた化合物の溶解性については、分子の平面性を崩すことで期待通り溶解度が改善された。また、ルール・オブ・ファイブについてもその範囲内に適合する分子であった。その結果、経口吸収性も大きく向上させることができた (Table 3-13)。

次に、副作用となり得る多彩な薬理活性の回避が実際になされたかどうか確認した。外部評価機関である Panlab 社 (現 MDS 社) で行った、一般薬理試験の結果を Table 3-14 に示した。評価試験において陽性と認められた項目を列記した。化合物 **19e** では中枢、循環、代謝、炎症などで様々な薬理作用が認められたが、化合物 **28q** においてはそのほとんどが消失した。認められた薬理作用の実際の疾患における重篤度や薬効用量との安全域等も考慮して本来は副作用を議論すべきものであるが、この結果は初期に掲げていたキナゾリン構造の「Dirty」さから懸念される副作用の乖離について一応の軽減を果たすことができたと判断できるものと考えている。

しかし、いくつかの項目において残った作用あるいは新たに生じた作用もあり、これらについては作用メカニズムも含め注意が必要である。また、メチレンジオキシ基は化学的には比較的安定であるが、代謝によりカテコール構造に変換され代謝酵素である P450 に影響を与える懸念も報告されていることから²⁸、こうした副作用評価については今後より詳細な検討が必要であると考えている。

Table 3-13 フェニルキナゾリンとピペリジニルピリミジンの物性と吸収性の評価

	Quinazoline(19e)	Pyrimidine(28q)
分子量	255	446
CLogP ^a	4.4	2.4
水素結合給与体数 ^a	2	2
水素結合受容体数 ^a	3	8
LogP*(実測値)	2.8	2.4
溶解度	186 µg/ml (pH2.5) 1 µg/ml (pH5.5) 1 µg/ml (pH7.6)	830 µg/ml (pH2.5) 130 µg/ml (pH5.5) 20 µg/ml (pH7.6)
マウス経口吸収性 (BA)	14%	40%

*ACDデータベースによる計算値

Table 3-14 フェニルキナゾリンとピペリジニルピリミジンの一般薬理評価

薬理作用	作用の有無	
	Quinazoline(19e)	Pyrimidine(28q)
<u>中枢系の作用</u>		
Autonomic signs (300 mg/kg, po, mouse)	+	-
PQ writhing (100 mg/kg, po, mouse)	+	+
<u>循環器系の作用</u>		
Ca antagonism ileum (3 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	-
α ₁ antagonism (3 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	-
Angiotensin I inhibition (3 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	-
Chronotropic (10 µg/ml, <i>in vitro</i>)	-	+
Platelet Aggregation AA (10 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	-
<u>代謝系の作用</u>		
Hypocholesteretol (300 mg/kg, po, mouse)	+	-
HP β-lipoprotein (300 mg/kg, po, mouse)	+	-
Saluresis (30 mg/kg, po, mouse)	+	-
<u>免疫系の作用</u>		
Tracheal relax (30 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	+
LTD ₄ antagonism (3 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	-
Bradykinin antagonism (3 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	-
Substance P antagonism (3 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	-
Cholecystokinin antagonism (3 µg/ml, <i>in vitro</i>)	+	-

Panlab社による一般薬理評価試験結果 (Parmascreen) から認められた作用; (+):作用有; (-):作用無

3-8. 小括

フェニルキナゾリンをリードとした合成展開をおこない、構造活性相関を明らかにした。その結果、新規なピペリジニル誘導体(代表化合物 **28q**)を見出すことに成功した。

構造活性相関について以下にまとめた (Fig. 3-7)。

- ・ 中心部分のピリミジン環構造の重要性が明らかとなった。
- ・ キナゾリン4位のベンゼン環部分は、他の飽和型環状置換基に変換可能であった。この部位は非塩基性の置換基が好ましく、ピペリジノ基上の置換基変換においてアミン誘導体では活性の消失がみられたが、中性アミド構造の置換基を導入することでその種類に関わらず強い活性を維持できた (R^1)。
- ・ キナゾリンの縮環部分も他のアリール基やアラルキル基などの脂溶性置換基に変換可能であった (R^2)。
- ・ ピリミジン5位への置換基導入は活性を低下させ、立体的な制約が認められた (R^3)。

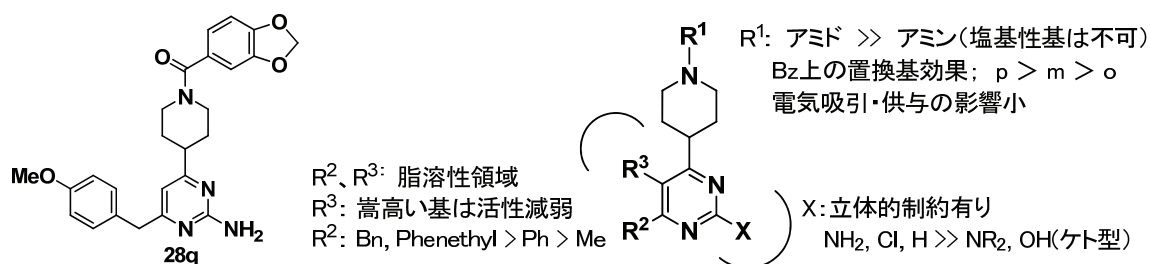


Fig. 3-7 化合物 **28q** とピペリジニルピリミジンの構造活性相関

また、見出した化合物 **28q** の製法検討を実施し、これまで合成上問題のあった縮合反応での異性体生成を回避した効率的な合成方法を確立した。この方法は、LDAなどの強い塩基を必要とせず、簡便かつ比較的温和な条件で目的化合物を得ることができる。また次章で述べるが、これまで副生成物の生成のため、あるいは基質によっては得ることが困難であったベンジル置換体の合成にも適用可能で非常に優れた方法である。

化合物 **28q** のRAの病態モデルであるマウスCIA試験において予防的、治療的効果を確認した。一般薬理評価においても初期のキナゾリン化合物と比較してその多岐にわたる薬理作用が減少したことから、ピペリジニルピリミジン誘導体は、RAなどの炎症性疾患の安全な治療薬として期待できるものと考えられる。

3-9. 実験の部

3-9-1. Chemistry

2-Amino-6-chloro-4-phenyquinazoline (19e)^{6a}

6-Chloro-4-phenyl-2(1H)-quinazolinone^{2c} (**19d**, 25 g, 97 mmol) と POCl₃ (140 ml) の混合物を 3.5 時間還流した。反応混合物を氷水に注ぎ、析出した固体をろ別、EtOH で洗浄後、乾燥させ、2,6-Dichloro-4-phenylquinazoline (25.29 g, 94%) を得た。次に 2,6-Dichloro-4-phenylquinazoline (9 g, 33 mmol) と 15% NH₃/EtOH 溶液 (200 ml) の混合物を 100 °C においてオートクレーブ中 15 時間加熱した。反応混合物を減圧濃縮し、残渣に水を加え、CH₂Cl₂ で抽出後、有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄ 乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:EtOAc, 9:1, v/v) で精製し、CH₂Cl₂ から結晶化させ **19e** (8.11 g, 97%) を得た。

化合物 **19e** の合成と同様に反応を行い、以下の化合物を合成した。

6-Chloro-2-ethylamino-4-phenyquinazoline (19f)^{6b}

904 mg (88%, from EtOAc): ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.75-7.54 (8H, m), 5.30 (1H, m), 3.61 (2H, q, J = 7.3 Hz), 1.31 (3H, t, J = 7.3 Hz).

6-Chloro-2-diethylamino-4-phenyquinazoline (19g)^{6c}

1.04 g (92%, from MeOH): ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (3H, m), 7.54 (5H, m), 3.78 (4H, q, J = 6.9 Hz), 1.31 (3H, t, J = 6.9 Hz).

6-Chloro-2-phenylamino-4-phenyquinazoline (19h)^{6d}

1.07 g (89%, from EtOAc): ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.86-7.58 (10H, m), 7.42-7.36 (3H, m), 7.08 (1H, t, J = 7.6 Hz).

2-Amino-4-benzylquinazoline (19i)

BnMgCl の Et₂O 溶液 (1.6 M, 105 ml) に窒素雰囲気下、2-アミノベンズニトリル (**16**, 5 g, 42 mmol) の THF (50 ml) 溶液を 20 分かけて滴下した。室温において 1.5 時間攪拌の後、反応混合物に氷浴中において 4N 塩酸水溶液を注意しながら滴下して酸性とした。飽和 NaHCO₃ 水溶液を加え塩基性とした後、Et₂O で抽出、有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 19:1, v/v) で精製し、EtOH から再結晶させ **17i** (5.89 g, 66%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (1H, dd, J = 8.2, 1.3 Hz), 7.29 (6H, m), 6.64 (2H, m), 6.29 (2H, br s), 4.26 (2H, s).

化合物 **17i** (982 mg, 5.65 mmol) の Et₂O (5 ml) 溶液に HCl/Et₂O (1 N, 6 ml) を加えた後、

混合物を減圧濃縮し塩酸塩を得た。この塩酸塩にシアナミド (350 mg, 8.35 mmol) を添加し 50 °C において 30 分攪拌した。反応混合物 1N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去し、EtOH から結晶を得た。さらに MeOH から再結晶化させ **19i** (1.01 g, 76%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (1H, d, J= 8.3 Hz), 7.61 (2H, m), 7.24 (6H, m), 5.17 (2H, br s), 4.46 (2H, s).

2-Amino-4-cyclohexylquinazoline (**19j**)

化合物 **19i** と同様に反応を行い、2-アミノベンズニトリル (**16**, 10 g, 85 mmol) から **17j** (14.85 g, 85%) を得た。その後、塩酸塩 (1 g, 4.17 mmol) とシアナミド (350 mg, 4.34 mmol) を用いて同様に反応させ、MeOH から再結晶させ **19j** (732 mg, 77%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (1H, d, J= 7.6 Hz), 7.62 (2H, m), 7.25 (1H, dd, J= 8.3, 6.9 Hz), 5.08 (2H, br s), 3.41 (1H, m), 1.94-1.27 (10H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₄H₁₈N₃: 228.1495. Found: 228.1491 (M+H).

2-amino-4-piperidinoquinazoline (**19m**)

2,4-dichloroquinazoline⁸ (**18**, 1.1 g, 5.53 mmol) の THF (15 ml) 溶液に、窒素雰囲気下室温においてピペリジン (1.07 g, 13.83 mmol) を 20 分かけて滴下した。7 時間後、反応混合物に水を加えて CH₂Cl₂ で抽出、有機層を水で洗浄、Na₂SO₄ 乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 8:2, v/v) で精製し、EtOAc から結晶化させ 2-Chloro-4-piperidinoquinazoline (1.29 g, 95%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.68-7.67 (3H, m), 7.40 (1H, dd, J= 8.2, 6.9 Hz), 3.80 (4H, m), 1.93-1.73 (6H, m).

2-Chloro-4-piperidinoquinazoline (900 mg, 3.63 mmol) と 15%NH₃/EtOH 溶液 (30 ml) の混合物を 140 °C においてオートクレーブ中 20 時間加熱した。反応混合物を減圧濃縮し、残渣に飽和 NaHCO₃ 水溶液を加え、CH₂Cl₂ で抽出後、有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄ 乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 1:1, v/v) で精製し、Et₂O から結晶化させ **19m** (292 mg, 38%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (3H, m), 7.00 (1H, m), 5.34 (2H, br s), 3.85 (4H, m), 1.73-1.54 (6H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₁₃H₁₇N₄: 229.1448. Found: 229.1442 (M+H).

2-amino-4-phenylaminoquinazoline (**19l**)

化合物 **19m** と同様に反応を行い、MeOH から結晶化させ **19l** (351 mg, 32% for 2

steps from **18**)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ 7.75-7.60 (4H, m), 7.51 (1H, dd, $J = 7.6, 0.7$ Hz), 7.41 (3H, m), 7.26-7.14 (2H, m), 4.93 (2H, br s); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_4$: 237.1135. Found: 237.1129 (M+H).

2-amino-4-(1-methylpiperidin-4-yl)quinazoline (**19n**)

化合物 **19m** と同様に反応を行い、 Et_2O から結晶化させ **19n** (351 mg, 38% for 2 steps from **18**)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.97 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.52-7.48 (1H, m), 7.39 (2H, br s), 7.25 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.06-7.02 (1H, m), 3.76 (4H, m), 2.39 (4H, m), 2.24 (3H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_5$: 244.1557. Found: 244.1555 (M+H).

(2-Aminophenyl)[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]methanone (**22**).

窒素雰囲気下、氷浴中において 4-cyano-piperidine⁷ (**21**, 40 g, 0.363 mol)、 Et_3N (37.47 g, 0.37 mol) の THF (250 ml) 溶液に塩化ベンゾイル (52.05 g, 0.37 mol) を 2 時間かけて滴下した。同温度において 2 時間攪拌の後、反応混合物を減圧濃縮、残渣に水を加え CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を MgSO_4 で乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣を *i*PrOH から結晶化させ 1-(Benzoyl)piperidine-4-carbonitrile (73.53 g, 95%) を白色個体として得た。

Mp 94-96 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45-7.37 (5H, m), 3.95-3.40 (4H, m), 2.97-2.91 (1H, m), 2.03-1.76 (4H, br m); MS (ESI, positive) m/z 215 (M+1).

窒素雰囲気下、氷浴中において三塩化ホウ素 (26.3 ml, 0.303 mol) を 1,2-ジクロロエタン (300 ml) に溶解した溶液に、アニリン (28.21 g, 0.303 mol) を 15 分かけて滴下した。この溶液に、1-(Benzoyl) piperidine-4-carbonitrile (50 g, 0.233 mol) を数回に分けて添加し、次いで塩化アルミニウム (40.39 g, 0.303 mol) を数回に分けて添加した。室温において 15 分攪拌した後、さらに 14 時間加熱還流した。反応混合物に氷浴下、1N 塩酸水溶液を加え 1 時間加熱還流した後、3N NaOH 水溶液を加え塩基性とし、生じたスラリーをセライトろ過した。ろ液に水を加えて CH_2Cl_2 で抽出し、有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をエタノールから結晶化させ **22** (51.4 g, 71%) を得た。

Mp 138-138.5 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (1H, dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz), 7.45-7.37 (5H, m), 7.30-7.26 (1H, m), 6.69-6.64 (2H, m), 6.31 (2H, br s), 4.82-4.72 (1H, br m), 3.92-3.82 (1H, br m), 3.60-3.52 (1H, m), 3.17-2.94 (2H, br m), 2.02-1.76 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 309 (M+1).

1-Benzoylpiperidin-4-yl-2-(1H)-quinazolinone (**20a**)

窒素雰囲気下、化合物 **22** (450 mg, 1.46 mmol)、シアン酸カリウム (142 mg, 1.75 mmol) と酢酸 (2 ml) の混合物を 60 °C において 1.5 時間加熱した。反応混合物に水

を加え固体をろ別し、EtOH から再結晶化させ **20a** (345 mg, 71%) を白色個体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, DMSO- d_6) δ 13.03 (1H, s), 7.96 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.75-7.27 (8H, m), 4.92 (1H, br m), 4.01 (1H, br m), 3.68 (1H, m), 3.10 (2H, m), 2.25-2.05 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$: 334.1550. Found: 334.1541 (M+H).

4-[1-(Phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]quinazolin-2-amine (**20b**)

化合物 **22** の塩酸塩 (17 g, 0.049 mol) とシアナミド (4.12 g, 0.098 mol) の混合物を 50 °C において攪拌した。やがて激しい発熱が起こる。反応終了後、反応混合物を冷却し水を加え、炭酸水素ナトリウムで塩基性とし、 CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 1:1) で精製し、EtOH から結晶化させ **20b** (15.9 g, 96%) を白色固体として得た。

Mp 182-183 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.71-7.66 (1H, m), 7.60 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.48-7.41 (5H, m), 7.30-7.28 (1H, m), 5.16 (2H, s), 4.96-4.83 (1H, br m), 4.01-3.91 (1H, br m), 3.74-3.66 (1H, m), 3.26-2.98 (2H, br m), 2.10-1.82 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 333 (M+1); Anal. calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$: C, 72.27; H, 6.06; N, 16.86. Found: C, 72.01; H, 6.01; N, 16.80.

2-Chloro-4-[1-(Phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]quinazoline (**20c**)

化合物 **20b** (997 mg, 3 mmol)、 SbCl_3 (958 mg, 4.2 mmol) と 1,2-ジクロロエタン (54 ml) の混合物に $t\text{BuONO}$ (1.86 mmol, 15.6 mmol) を加え 50 °C において 1 時間攪拌した。反応混合物をろ別して不溶物を除き、ろ液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 1:1, v/v) で精製して **20c** (336 mg, 32%) を黄緑色の泡状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 8.02 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.95-7.91 (1H, m), 7.71-7.65 (1H, m), 7.50-7.42 (5H, m), 5.00-4.83 (1H, br m), 4.09-3.93 (1H, br m), 3.86-3.78 (1H, m), 3.28-3.00 (2H, br m), 2.22-1.88 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{OCl}$: 352.1211. Found: 352.1203 (M+H).

4-[1-(Phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]quinazoline (**20d**)

化合物 **20c** (100 mg, 0.28 mmol)、酢酸ナトリウム (40 mg)、10% Pd/C (50 mg) と MeOH (2 ml) の混合物を室温において 5 時間水素添加した (1 atm)。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮した後、残渣をPTLC (Hexane:EtOAc, 1:1, v/v) 精製し化合物 **20d** (41 mg, 45%) を得た。

$^1\text{HNMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.27 (1H, s), 8.19 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 8.09 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.94-7.89 (1H, m), 7.70-7.65 (1H, m), 7.50-7.42 (5H, m), 4.99-4.86 (1H, br m), 4.08-3.95 (1H, br m), 3.89-3.82 (1H, m), 3.31-3.02 (2H, m), 2.23-1.85 (4H, m); MS (ESI,

positive) m/z 318 (M+1).

4-(Piperidin-4-yl)quinazolin-2-amine (23a)

化合物 **20b** (24 g, 0.072 mol)、EtOH (250 ml)、6N NaOH 水溶液 (250 ml) の混合物を窒素雰囲気下、加熱還流した。7 時間後、反応溶液を減圧濃縮し EtOH を除き、残渣を CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、 MgSO_4 で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を *i*PrOH から結晶化させ化合物 **23a** (13.0 g, 82%) を得た。

Mp 184-186 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.69-7.64 (1H, m), 7.58 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.28-7.24 (1H, m), 5.11 (2H, s), 3.60-3.52 (1H, m), 3.26 (2H, dt, $J = 12.2, 3.0$ Hz), 2.86 (2H, dt, $J = 12.2, 3.0$ Hz), 1.99-1.84 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 229 (M+1); Anal. calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4$: C, 68.39; H, 7.06; N, 24.54. Found: C, 68.21; H, 7.04; N, 24.61.

4-(1-methylpiperidin-4-yl)quinazolin-2-amine (23b)

窒素雰囲気下、氷浴中において化合物 **23a** (600 mg, 2.63 mmol)、 Et_3N (266 mg, 2.63 mmol) と DMF (12 ml) の混合物にヨウ化メチル (0.16 ml, 2.63 mmol) を滴下し、一晚攪拌した。反応混合物を減圧濃縮後、残渣に飽和 NaHCO_3 水溶液を加えて CHCl_3 で抽出した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣を PTLC (CH_2Cl_2 :MeOH, 19:1, v/v) で精製し、*i*PrOH から結晶化させ化合物 **23b** (124 mg, 20%) を白色個体として得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.68-7.64 (1H, m), 7.58 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.28-7.24 (2H, m), 5.08 (2H, s), 3.41-3.34 (1H, m), 3.06-3.02 (2H, m), 2.36 (3H, s), 2.19-2.07 (4H, m), 1.91-1.86 (2H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_4$: 243.1604. Found: 243.1601 (M+H).

4-(1-benzylpiperidin-4-yl)quinazolin-2-amine (23c)

化合物 **23a** (600 mg, 2.63 mmol)、 Et_3N (279 mg, 2.76 mmol)、BnBr (0.38 ml, 2.76 mmol) と DMF (12 ml) を用いて **23b** と同様に反応し、*i*PrOH から結晶化させて化合物 **23c** (225 mg, 32%) を白色固体として得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.67-7.63 (1H, m), 7.57 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.38-7.32 (4H, m), 7.29-7.23 (2H, m), 5.08 (2H, s), 3.60 (2H, s), 3.44-3.38 (1H, m), 3.09-3.04 (2H, m), 2.24-2.06 (4H, m), 1.88-1.82 (2H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_4$: 319.1917. Found: 319.1912 (M+H).

4-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]quinazolin-2-amine (23d)

化合物 **23a** (500 mg, 2.19 mmol)、 Et_3N (222 mg, 2.19 mmol)、BnBr (375 mg, 2.19 mmol) と THF (25 ml) を用いて **23b** と同様に反応し、EtOH から結晶化させ化合物 **23d** (380 mg, 41%) を白色固体として得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.67-7.63 (1H, m), 7.57 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.38-7.32 (4H, m), 7.29-7.23 (2H, m), 5.08 (2H, s), 3.60 (2H, s), 3.44-3.38 (1H, m), 3.09-3.04 (2H, m), 2.24-2.06 (4H, m), 1.88-1.82 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 333 (M+1).

4-(1-cyclohexylpiperidin-4-yl)quinazolin-2-amine (23e)

化合物 **23a** (500 mg, 2.19 mmol)、cyclohexanone (430 mg, 4.38 mmol)、MeOH (10 ml) と 4N HCl (0.55 ml) の溶液に $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ (55 mg, 0.88 mmol) を添加し、室温において 40 時間攪拌した。反応混合物に飽和 NaHCO_3 水溶液を加え CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を水で洗浄し Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 :MeOH, 9:1, v/v) で精製し、MeOH から結晶化させ **23e** (305 mg, 45%) を白色固体として得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.62 (2H, m), 7.25 (1H, m), 5.10 (2H, s), 3.39 (1H, m), 3.10 (2H, m), 2.46 (3H, m), 2.11-1.25 (14H, m); MS (ESI, positive) m/z 311 (M+1).

1-[4-(2-aminoquinazolin-4-yl)piperidin-1-yl]ethanone (23f)

窒素雰囲気下、氷浴中において、化合物 **23a** (500 mg, 2.19 mmol)、 Et_3N (233 mg, 2.3 mmol) の DMF (10 ml) 溶液に窒素雰囲気下、無水酢酸 (0.22 ml, 2.30 mmol) を滴下した。3 時間後、反応溶液を減圧濃縮し、残渣に飽和 NaHCO_3 水溶液を加え CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を水で洗浄し Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を EtOH から結晶化させ **23f** (452 mg, 76%) を白色固体として得た。

Mp 239-240 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.71-7.67 (1H, m), 7.60 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.30-7.26 (1H, m), 5.13 (2H, s), 4.81-4.75 (1H, m), 4.03-3.97 (1H, m), 3.70-3.62 (1H, m), 3.33-3.25 (1H, m), 2.84-2.76 (1H, m), 2.11-1.88 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}$: 271.1553. Found: 271.1550 (M+H).

化合物 **23f** の合成と同様に対応する酸クロライドを用いて反応を行い、以下の化合物を合成した。

1-[4-(2-aminoquinazolin-4-yl)piperidin-1-yl]pentan-1-one (23g)

534 mg (65%, a white solid from *i*PrOH): mp 216-217 °C; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.69 (1H, dt, $J = 8.6, 1.3$ Hz), 7.59 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.28 (1H, m), 5.10 (2H, s), 4.81 (1H, m), 4.05 (1H, m), 3.65 (1H, m), 3.25 (1H, m), 2.75 (1H, m), 2.39 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.99 (4H, m), 1.66 (2H, m), 1.40 (2H, m), 0.95 (3H, t, $J = 7.3$ Hz); MS (ESI, positive) m/z 313 (M+1).

[4-(2-aminoquinazolin-4-yl)piperidin-1-yl](cyclohexyl)methanone (23h)

582 mg (65%, a white solid from MeOH-Et₂O): mp 203-204 °C; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.58-7.71 (2H, m), 7.28 (1H, m), 5.11 (2H, s), 4.81 (1H, m), 4.11 (1H, m), 3.65 (1H, m), 3.24 (1H, m), 2.77 (1H, m), 2.54 (1H, m), 1.97-1.18 (10H, m); MS (ESI, positive) m/z 339 (M+1).

1-[4-(2-aminoquinazolin-4-yl)piperidin-1-yl]-2-phenylethanone (23i)

478 mg (53%, a white solid from MeOH): mp 225-226 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.70-7.65 (1H, m), 7.58 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.36-7.24 (6H, m), 5.09 (2H, s), 4.83-4.78 (1H, m), 4.08-4.03 (1H, m), 3.80 (2H, s), 3.64-3.57 (1H, m), 3.23-3.16 (1H, m), 2.88-2.80 (1H, m), 1.97-1.79 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₁H₂₃N₄O: 347.1866. Found: 347.1858 (M+H).

1-[4-(2-aminoquinazolin-4-yl)piperidin-1-yl]-3-phenylpropan-1-one (23j)

478 mg (53%, a foam): ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.64 (2H, m), 7.27 (6H, m), 5.10 (2H, s), 4.82 (1H, m), 3.99 (1H, m), 3.63 (1H, m), 3.18 (1H, m), 3.04 (2H, t, J = 7.9 Hz), 2.80 (1H, m), 2.69 (2H, t, J = 7.9 Hz), 1.92 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 361 (M+1).

[4-(2-aminoquinazolin-4-yl)piperidin-1-yl](1,3-benzodioxol-5-yl)methanone (23k)

418 mg (45%, a white solid from MeOH): mp 197-198 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.71-7.67 (1H, m), 7.60 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.29 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.01-6.97 (2H, m), 6.84 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.01 (2H, s), 5.14 (2H, s), 4.88-4.70 (1H, br m), 4.20-4.03 (1H, br m), 3.73-3.66 (1H, m), 3.23-3.01 (2H, m), 2.10-1.89 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 377 (M+1); Anal. calcd for C₂₁H₂₀N₄O₃: C, 67.01; H, 5.36; N, 14.88. Found: C, 66.78; H, 5.33; N, 14.87.

2-(4-Methoxyphenyl)-1-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]butane-1,3-dione (25e), 4-(4-Methoxyphenyl)-1-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]butane-1,3-dione (25d)

1-Benzoylisonipecotic acid¹⁰ (**24**, 60 g, 0.257 mol)、SOCl₂ (38 ml) と CHCl₃ (360 ml) の混合物を 1 時間加熱還流した。反応混合物を減圧濃縮後、さらに残渣にトルエンを加えて減圧濃縮し、過剰の塩化チオニルを除き、1-benzoyl-4-piperidinecarbonyl chloride を未精製のオイルとして得た。一方、*i*Pr₂NH (72 ml, 0.514 mol) の THF (510 ml) 溶液に、窒素雰囲気下、氷浴中において *n*BuLi (310 ml, 1.66 mmol/ml) を 1.5 時間かけて滴下した。反応混合物を同温度において 30 分攪拌の後、-78 °C に冷却し、4-methoxy phenylacetone (84.4 g, 1.03 mol) を 1.5 時間かけて滴下した。さらに 30 分攪拌の後、同温度において先に合成した 1-benzoyl-4-piperidinecarbonyl chloride の THF (510 ml) 溶液を 2 時間かけて滴下した。30 分攪拌の後、反応混合物に濃塩酸を

加えて酸性とし、水を加えて EtOAc で抽出した。有機層を水で洗い、MgSO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 6:4, v/v) で精製した。低極性のフラクションを EtOAc から結晶化させ **25e** (less polar, 35.3 g, 35%) を白色固体として得た。

Mp 134-137 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 16.85 (1H, s, enol), 7.40-7.34 (5H, m), 7.10-7.04 (2H, br m), 6.93 (2H, d, J = 7.3 Hz), 4.73-4.61 (1H, br m), 3.85 (3H, s), 3.78-3.67 (1H, br m), 2.81-2.51 (2H, br m), 2.46-2.38 (1H, m), 1.88 (3H, s), 1.81-1.59 (4H, br m); MS (ESI, positive) m/z 380 (M+1).

また、高極性のフラクションを濃縮し、**25d** (polar, 35.5 g, 35%) を油状物として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 15.44 (1H, s, enol), 7.42-7.37 (5H, m), 7.15 (2H, d, J = 8.9 Hz), 6.88 (2H, d, J = 8.9 Hz), 5.44 (1H, s), 4.77-4.67 (1H, br m), 3.84-3.75 (4H, m), 3.56 (2H, s), 3.05-2.78 (2H, br m), 2.46-2.38 (1H, m), 1.94-1.66 (4H, br m); MS (ESI, positive) m/z 380 (M+1).

4-(4-Methoxybenzyl)-6-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]pyrimidin-2-amine (26d).

化合物 **50** (33 g, 0.084 mmol)、グアニジン塩酸塩 (16 g, 0.168 mol) と炭酸カリウム (23.18 g, 0.168 mol) とピリジン (210 ml) の混合物を 110 °C において 8 時間加熱攪拌した。反応混合物を減圧濃縮後、残渣に飽和水を加えて CHCl₃ で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) で精製し、EtOH から結晶化させ化合物 **26d** (15.34 g, 45%) を白色個体として得た。

Mp 170-171 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42-7.38 (5H, m), 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.26 (1H, s), 4.98 (2H, s), 4.87-4.77 (1H, br m), 3.90-3.84 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.10-3.01, (1H, br m), 2.89-2.79 (1H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.95-1.72 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 403 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₆N₄O₂: C, 71.62; H, 6.51; N, 13.92. Found: C, 71.67; H, 6.47; N, 13.98.

4-methyl-6-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]pyrimidin-2-amine (26a)

化合物 **25d** の合成と同様にし、1-benzoylisonipecotic acid (**24**, 30 g, 0.128 mol) と acetone (14.5 g, 0.25 mol) から 1-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]pentane-1,3-dione (**25a**, 17.0 g, 50%) を得た。化合物 **25a** (16 g, 0.059 mol)、グアニジン塩酸塩 (11.27 g, 0.118 mol) と炭酸カリウム (16.31 g, 0.118 mol) とピリジン (200 ml) から化合物 **26d** の合成と同様に反応を行い、EtOH から結晶化させ化合物 **26a** (14.4 g, 83%) を白色個体として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.44-7.39 (5H, m), 7.26 (0H, s), 6.39 (1H, s), 4.91 (2H, s), 4.87-4.79 (1H, br m), 3.92-3.83 (1H, br m), 3.14-3.05 (1H, br m), 2.93-2.82 (1H, br m), 2.73-2.65 (1H, m), 2.35-2.32 (3H, m), 1.99-1.79 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 297

(M+1); Anal. calcd for C₁₇H₂₀N₄O₁: C, 68.89; H, 6.80; N, 18.90. Found: C, 68.82; H, 6.78; N, 18.97.

4-Phenyl-6-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]pyrimidin-2-amine (26b)

化合物 **25d** の合成と同様にし、acetophenone (113.42 g, 0.944 mol)、1-benzoyl isonipecotic acid (**24**, 110 g, 0.472 mol) から 3-phenyl-1-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]butane-1,3-dione (**25b**, 85.91 g, 54%) を Et₂O から結晶化させ得た。

Mp 104-105 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 16.20 (1H, s), 7.89 (2H, d, J = 7.0 Hz), 7.56-7.52 (1H, m), 7.48-7.41 (7H, m), 6.21 (1H, s), 4.84-4.70 (1H, br m), 3.96-3.81 (1H, br m), 3.13-2.85 (2H, br m), 2.66-2.58 (1H, m), 2.08-1.70 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 336 (M+1).

化合物 **25b** (11 g, 0.033 mol)、グアニジン塩酸塩 (6.3 g, 0.066 mol)、炭酸カリウム (9.12 g, 0.066 mol) とピリジン (50 ml) の混合物を 110 °C において加熱攪拌した。6 時間後、さらに炭酸カリウム (4.56 g, 0.033 mol) とグアニジン塩酸塩 (3.15 g, 0.033 mol) を添加し加熱を続けた。10 時間後、反応混合物に水を加え、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 1:1, v/v) で精製し、iPrOH から結晶化させ化合物 **26b** (8.60 g, 73%) を白色個体として得た。

Mp 147-148 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99-7.96 (2H, m), 7.48-7.41 (8H, m), 6.92 (1H, s), 5.05 (2H, s), 4.93-4.82 (1H, br m), 3.97-3.85 (1H, br m), 3.18-3.05 (1H, br m), 3.00-2.87 (1H, br m), 2.85-2.78 (1H, m), 2.07-1.75 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₂H₂₃N₄O: 359.1866. Found: 359.1859 (M+H).

4-(2-Phenylethyl)-6-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]pyrimidin-2-amine (26c)

化合物 **25d** の合成と同様にし、1-benzoylisonipecotic acid (**24**, 50 g, 0.214 mol) と benzyl acetone (38.06 g, 0.257 mol) から 5-phenyl-1-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]pentane-1,3-dione (**25c**, 29.9 g, 38%) を油状物として得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 1.63 (3H, m), 2.43 (1H, m), 2.63 (2H, t, J = 7.3 Hz), 2.91 (5H, m), 3.83 (1H, m), 4.71 (1H, m), 5.46 (1H, s), 7.30 (10H, m), 15.48 (1H, brs); MS (ESI, positive) m/z 364 (M+1).

化合物 **25c** (29 g, 0.080 mol)、グアニジン塩酸塩 (15.28 g, 0.16 mol) と炭酸カリウム (9.12 g, 0.16 mol) とピリジン (200 ml) から化合物 **26d** の合成と同様に反応を行い、EtOH から結晶化させ化合物 **26c** (23.8 g, 77%) を白色個体として得た。

Mp 154-155 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.39 (5H, m), 7.30-7.25 (2H, m), 7.22-7.17 (3H, m), 6.27 (1H, s), 4.96 (2H, s), 4.89-4.76 (1H, m), 4.73-4.69 (1H, br m), 3.92-3.81 (1H, br m), 3.17-3.03 (1H, br m), 3.01-2.96 (2H, m), 2.90-2.83 (3H, m), 2.71-2.63 (1H, m), 1.98-1.73 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₄H₂₇N₄O: 387.2179. Found: 387.2168 (M+H).

5-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-6-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]pyrimidin-2-amine (26e)

化合物 **25e** (30 g, 0.076 mol)、グアニジン塩酸塩 (72.6 g, 0.76 mol)、炭酸カリウム (105 g, 0.76 mol) とジオキサン (300 ml) の混合物を 100 °C において 10 時間加熱攪拌した。反応混合物をろ過し不溶の塩を除いた後、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂: MeOH, 19:1, v/v) で精製し、EtOH から結晶化させ化合物 **26e** (2.14 g, 7%) を白色個体として得た。

Mp 226-227 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42-7.36 (5H, m), 7.07-6.93 (4H, m), 4.92 (2H, s), 4.76-4.69 (1H, br m), 3.87 (3H, s), 3.78-3.70 (1H, br m), 2.87-2.76 (1H, br m), 2.68-2.53 (2H, m), 2.08 (3H, s), 1.95-1.81 (2H, br m), 1.73-1.47 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 403 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₆N₄O₂: C, 71.62; H, 6.51; N, 13.92. Found: C, 71.52; H, 6.48; N, 14.03.

生成物である **26e** の収率がきわめて低いが、これは反応の主生成物として脱アセチル化体である 2-(4-methoxyphenyl)-1-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]ethanone (**29**, 16.15 g, 57 %) が油状物として得られてくるためである。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41-7.36 (5H, m), 7.11 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.87 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.71-4.55 (1H, br m), 3.80 (3H, s), 3.79-3.71 (1H, br m), 3.70 (2H, s), 3.04-2.68 (2H, br m), 2.76-2.68 (1H, m), 1.97-1.57 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₁H₂₄N₃O: 338.1751. Found: 338.1744 (M+H).

4-(4-Methoxybenzyl)-6-piperidin-4-ylpyrimidin-2-amine (27)

化合物 **26d** (15 g, 37.3 mmol)、EtOH (130 ml)、6N NaOH 水溶液 (130 ml) の混合物を窒素雰囲気下、加熱還流した。6 時間後、反応溶液を減圧濃縮し EtOH を除き、残渣を CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄ で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を *i*PrOH-Et₂O から結晶化し、化合物 **27** (8.81 g, 79%) 白色個体として得た。

Mp 112-113 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.85 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.28 (1H, s), 4.97 (2H, s), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.16-3.12 (2H, m), 2.71-2.64 (2H, m), 2.55-2.42 (1H, m), 1.81-1.77 (2H, m), 1.62-1.51 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 299 (M+1); Anal. calcd for C₁₇H₂₂N₄O: C, 68.43; H, 7.43; N, 18.78. Found: C, 68.35; H, 7.46; N, 18.90.

4-(4-Methoxybenzyl)-6-{1-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}pyrimidin-2-amine (28i)

窒素雰囲気中、化合物 **27** (200 mg, 0.67 mmol) と Et₃N (0.1 ml, 0.70 mmol) の CHCl₃ (100 ml) 溶液に氷冷下、4-methoxybenzoyl chloride (120 mg, 0.70 mmol) を滴下した。1 時間後、反応混合物を水、飽和食塩水で順次洗浄し有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH,

50:1, v/v) で精製し、EtOH から結晶化させ化合物 **28i** (286 mg, 99%) を白色個体として得た。

Mp 169-170.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.91 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.27 (1H, s), 4.95 (2H, s), 4.83-4.62 (1H, br m), 4.11-3.90 (1H, br m), 3.83 (5H, s), 3.80 (3H, s), 3.08-2.78 (2H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.87-1.69 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 433 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₈N₄O₃·0.25H₂O: C, 68.71; H, 6.57; N, 12.82. Found: C, 68.93; H, 6.48; N, 12.93.

化合物 **28i** の合成と同様にして、ピペリジン体 **27** と対応する酸クロライドから化合物 **28a-f**、**28j-m**、**28o** と **28q-s** を合成した。

4-(1-Acetylpiperidin-4-yl)-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28a)

227 mg (99%, a white solid from EtOH): mp 203-205 °C, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.24 (1H, s), 4.96 (2H, s), 4.73-4.68 (1H, m), 3.91-3.86 (1H, m), 3.82 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.10 (1H, td, J = 13.0, 2.7 Hz), 2.64-2.55 (2H, m), 2.10 (3H, s), 1.89-1.81 (2H, m), 1.69-1.54 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 341 (M+1); Anal. calcd for C₁₉H₂₄N₄O₂·0.25H₂O: C, 66.16; H, 7.16; N, 16.24. Found: C, 65.92; H, 7.06; N, 16.07.

4-(4-Methoxybenzyl)-6-(1-propanoylpiperidin-4-yl)pyrimidin-2-amine (28b)

111 mg (93%, a white solid from Et₂O): mp 133-135 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.24 (1H, s), 4.94 (2H, s), 4.76-4.69 (1H, m), 3.95-3.90 (1H, m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.10-3.02 (1H, m), 2.64-2.54 (2H, m), 2.36 (2H, q, J = 7.5 Hz), 1.89-1.81 (2H, m), 1.64-1.52 (4H, m), 1.15 (3H, t, J = 7.5 Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₀H₂₇N₄O₂: 355.2129. Found: 355.2121 (M+H).

4-(1-Butanoylpiperidin-4-yl)-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28c)

217 mg (88%, a white solid from EtOH): mp 140-141 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.15 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.85 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.24 (1H, s), 4.96 (2H, s), 4.75-4.70 (1H, m), 3.96-3.90 (1H, m), 3.82 (2H, s), 3.80 (3H, d, J = 0.7 Hz), 3.10-3.02 (1H, m), 2.64-2.54 (2H, m), 2.31 (2H, t, J = 7.6 Hz), 1.90-1.79 (2H, m), 1.70-1.53 (4H, m), 0.97 (3H, t, J = 7.3 Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₁H₂₉N₄O₂: 369.2285. Found: 369.2278 (M+H).

4-(1-Hexanoylpiperidin-4-yl)-6-(4-Methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28d)

217 mg (82%, a white solid from hexane-EtOH): mp 120-121 °C; ¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.24 (1H, s), 4.94 (2H, s), 4.75-4.70 (1H, m), 3.96-3.91 (1H, m), 3.82 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.10-3.03 (1H, m), 2.65-2.54 (2H, m), 2.32 (2H, t, J = 7.8 Hz), 1.90-1.81 (2H, m), 1.65-1.53 (4H, m), 1.37-1.30 (4H, m), 0.90 (3H, t, J = 7.1 Hz); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₃H₃₃N₄O₂: 397.2598. Found: 397.2587 (M+H).

4-(4-Methoxybenzyl)-6-(1-octanoylpiperidin-4-yl)pyrimidin-2-amine (28e)

230 mg (90%, a white solid from hexane-EtOH): mp 101-103 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.24 (1H, s), 4.93 (2H, s), 4.75-4.70 (1H, m), 3.96-3.90 (1H, m), 3.82 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.10-3.02 (1H, m), 2.64-2.54 (2H, m), 2.32 (2H, t, J = 7.7 Hz), 1.90-1.81 (2H, m), 1.65-1.55 (4H, m), 1.32-1.28 (8H, m), 0.88 (3H, t, J = 7.0 Hz); MS (ESI, positive) m/z 425 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₃₆N₄O₂: C, 70.72; H, 8.55; N, 13.20. Found: C, 70.61; H, 8.56; N, 13.16.

4-(4-methoxybenzyl)-6-(1-pivaloylpiperidin-4-yl)pyrimidin-2-amine (28f)

220 mg (86%, a white solid from hexane-EtOH): mp 151-152 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.26 (1H, s), 4.94 (2H, s), 4.54-4.47 (2H, m), 3.82 (2H, s), 3.80 (3H, s), 2.83 (2H, t, J = 12.7 Hz), 2.67-2.58 (1H, m), 1.85 (2H, d, J = 11.0 Hz), 1.65-1.56 (4H, m), 1.29 (9H, s); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₂H₃₁N₄O₂: 383.2442. Found: 383.2428 (M+H).

4-(4-Methoxybenzyl)-6-{1-[(2-methoxyphenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}pyrimidin-2-amine (28g)

124 mg (99%, a white solid from Et₂O): mp 161-162 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.31 (1H, m), 7.28-7.25 (1H, m), 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.00-6.96 (1H, m), 6.90 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.25, 6.24 (1H, s, rotamer), 4.95 (2H, s), 4.91, 4.85 (1H, s, rotamer), 3.83 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.78 (1H, s, rotamer), 3.59-3.53 (1H, m), 3.11-3.02 (0.5H, m, rotamer), 3.01-2.93 (0.5H, m, rotamer), 2.87-2.75 (1H, m), 2.67-2.57 (1H, m), 1.96-1.90 (1H, m), 1.78-1.68 (3H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₅H₂₉N₄O₃: 433.2234. Found: 433.2221 (M+H).

4-(4-Methoxybenzyl)-6-{1-[(2-nitrophenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}pyrimidin-2-amine (28j)

277 mg (92%, a white solid from hexane-EtOH): mp 161-162 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.71 (1H, t, J = 7.3 Hz), 7.59-7.54 (1H, m), 7.46-7.35 (1H, m), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.27 (1H, s), 4.97 (2H, s), 4.93-4.75 (1H, m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.52-3.37 (1H, br m), 3.16-3.03 (1H, br m), 2.96-2.85 (1H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 2.02-1.75 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 448 (M+1).

4-(4-Methoxybenzyl)-6-{1-[(3-nitrophenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}pyrimidin-2-amine (28k)

149 mg (99%, a brown solid from Et₂O-MeOH): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.30-8.27 (2H, m), 7.76 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.62 (1H, dd, J = 8.8, 7.6 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.27 (1H, s), 4.96 (2H, s), 4.85-4.75 (1H, br m), 3.84 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.78-3.69 (3H, br m), 3.20-3.10 (1H, br m), 2.95-2.83 (1H, br m), 2.72-2.64 (1H, m), 2.01-1.70 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₄H₂₆N₅O₄: 448.1979. Found: 448.1967 (M+H).

4-(4-Methoxybenzyl)-6-{1-[(4-nitrophenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}pyrimidin-2-amine (28l)

200 mg (67%, a pale yellow solid from MeOH): mp 178-179 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.58 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.26 (1H, s), 4.95 (2H, s), 4.83-4.78 (1H, m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.70-3.66 (1H, m), 3.15-3.08 (1H, m), 2.91-2.84 (1H, m), 2.71-2.64 (1H, m), 1.98-1.67 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 448 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₅N₅O₄: C, 64.42; H, 5.63; N, 15.65. Found: C, 64.37; H, 5.64; N, 15.78.

4-{1-[(4-Chlorophenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28m)

246 mg (84%, a white solid from MeOH): mp 188-189 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.36 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.26 (1H, s), 4.94 (2H, s), 4.82-4.74 (1H, br m), 3.88-3.83 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.11-3.01 (1H, br m), 2.89-2.78 (1H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.93-1.69 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 437 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₅ClN₄O₂: C, 65.97; H, 5.77; N, 12.82; Cl, 8.11. Found: C, 65.85; H, 5.71; N, 12.88; Cl, 8.08.

4-{1-[(3,4-Dimethoxyphenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28o)

230 mg (74%, a white solid from MeOH): mp 159-160 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.00-6.98 (2H, m), 6.87-6.84 (3H, m), 6.27 (1H, s), 4.95 (2H, s), 4.80-4.64 (1H, br m), 4.16-3.98 (1H, br m), 3.91 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.04-2.84 (2H, br m), 2.69-2.62 (1H, m), 1.87-1.66 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 463 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₃₀N₄O₄: C, 67.51; H, 6.54; N, 12.11. Found: C, 67.49; H, 6.49; N, 12.12.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28q)

858 mg (96%, a white solid from EtOH): mp 170-171 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.95-6.91 (2H, m), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.82 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.26 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.94 (2H, s), 4.82-4.54 (1H, br m), 4.18-3.86 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.08-2.78 (2H, br m), 2.68-2.61 (1H, m), 1.90-1.66 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 447 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₆N₄O₄: C, 67.25; H, 5.87; N, 12.55. Found: C, 67.06; H, 5.88; N, 12.78.

4-{1-[(3,4-Dichlorophenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28r)

272 mg (86%, a white solid from MeOH): mp 195-196 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.52-7.48 (2H, m), 7.26-7.24 (1H, m), 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.26 (1H, s), 4.95 (2H, s), 4.80-4.71 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.82-3.73 (1H, br m), 3.13-3.03 (1H, br m), 2.87-2.78 (1H, br m), 2.70-2.62 (1H, m), 1.94-1.69 (4H, br m); MS (ESI, positive) m/z 471 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₄Cl₂N₄O₂: C, 61.15; H, 5.13; Cl, 15.04; N, 11.89. Found: C, 61.06; H, 5.10; Cl, 14.96; N, 11.94.

4-(4-methoxybenzyl)-6-[1-(phenylacetyl)piperidin-4-yl]pyrimidin-2-amine (28s)

554 mg (66%, a white solid from Et₂O): mp 140-140.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.22 (5H, m), 7.14 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.17 (1H, s), 4.91 (2H, s), 4.76-4.70 (1H, m), 3.97-3.90 (1H, m), 3.81 (2H, s), 3.81 (3H, s), 3.74 (2H, s), 3.04-2.97 (1H, m), 2.65-2.52 (2H, m), 1.86-1.71 (2H, m), 1.61-1.51 (1H, m), 1.42-1.31 (1H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₅H₂₉N₄O₂: 417.2285. Found: 417.2274 (M+H).

4-{1-[(3,4-Dimethoxyphenyl)acetyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28v)

窒素雰囲気下、化合物 **27** (200 mg, 0.67 mmol)、3,4-dimethoxyphenylacetic acid (138 mg, 0.70 mmol) と 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, 95 mg, 0.70 mmol) の CHCl₃ (100 ml) 溶液に N-ethyl-N'-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDC, 135 mg, 0.70 mmol) を添加して室温において 2 時間攪拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 50:1, v/v) で精製し、*i*PrOH から結晶化させ化合物 **28v** (308 mg, 96%) を白色個体として得た。

Mp 140-140.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.15 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.85 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.82-6.79 (2H, m), 6.75 (1H, dd, J = 8.3, 2.0 Hz), 6.19 (1H, s), 4.94 (2H, s), 4.75-4.71 (1H, m), 3.97-3.93 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.81 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.69 (2H, s), 3.05-2.98 (1H, m), 2.65-2.52 (2H, m), 1.84-1.70 (2H, m), 1.62-1.52 (1H,

m), 1.44-1.33 (1H, m); MS (ESI, positive) m/z 477 (M+1); Anal. calcd for C₂₇H₃₂N₄O₄: C, 68.05; H, 6.77; N, 11.76. Found: C, 67.96; H, 6.78; N, 11.78.

化合物 **28v** の合成と同様にして、ピペリジン体 **27** と対応するカルボン酸から化合物 **28h**, **28n**, **28p**, **28t**, **28u**, **28w** と **28x** を合成した。

4-{1-[(3-Methoxyphenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28h)

144 mg (99% , a white solid from Et₂O): mp 149-151 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (1H, dd, J = 8.9, 7.4 Hz), 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.98-6.92 (3H, m), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.26 (1H, s), 4.96 (2H, s), 4.85-4.76 (1H, br m), 3.93-3.83 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.82 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.09-2.97 (1H, br m), 2.88-2.77 (1H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.96-1.71 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₅H₂₉N₄O₃: 433.2234. Found: 433.2218 (M+H).

4-{1-[(3,4-Dimethoxyphenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28n)

134 mg (86%, a white solid from Et₂O): mp 147-148 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 6.8 Hz), 7.08 (1H, t, J = 7.9 Hz), 6.93 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.87-6.79 (2H, m), 6.26, 6.25 (1H, s, rotamer), 4.93 (2H, s), 4.90-4.82 (1H, m), 3.89, 3.88 (3H, s, rotamer), 3.86, 3.84 (3H, s, rotamer), 3.83, 3.82 (2H, s, rotamer), 3.80 (3H, s), 3.61-3.54 (1H, m), 3.12-3.04 (0.5H, m, rotamer), 3.00-2.92 (0.5H, m, rotamer), 2.88-2.75 (1H, m), 2.67-2.57 (1H, m), 1.99-1.90 (1H, m), 1.83-1.64 (3H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₆H₃₁N₄O₄: 463.2340. Found: 463.2321 (M+H).

4-{1-[(3,5-Dimethoxyphenyl)carbonyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28p)

155 mg (100%, a white solid from Et₂O): mp 198-200 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.53-6.52 (2H, m), 6.49-6.47 (1H, m), 6.26 (1H, s), 4.84-4.73 (1H, br m), 3.92-3.86 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (9H, s), 3.09-2.97 (1H, br m), 2.87-2.76 (1H, br m), 2.68-2.60 (1H, m), 1.97-1.69 (4H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₆H₃₁N₄O₄: 463.2340. Found: 463.2322 (M+H).

4-(4-methoxybenzyl)-6-{1-[(4-methoxyphenyl)acetyl]piperidin-4-yl}pyrimidin-2-amine (28t)

264 mg (88%, a white solid from Et₂O): mp 129-130 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.17-7.13 (4H, m), 6.85 (4H, d, J = 8.8 Hz), 6.20 (1H, s), 4.96 (2H, s), 4.75-4.69 (1H, m), 3.98-3.92 (1H, m), 3.81 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.67 (2H, s), 3.04-2.97 (1H,

m), 2.65-2.52 (2H, m), 1.85-1.76 (2H, m), 1.62-1.52 (1H, m), 1.47-1.36 (1H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₆H₃₁N₄O₃: 447.2391. Found: 447.2375 (M+H).

4-{1-[(4-Chlorophenyl)acetyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28u)

139 mg (92%, a white solid from Et₂O): mp 190-193 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.29 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.18 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.15 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.19 (1H, s), 4.93 (2H, s), 4.74-4.68 (1H, m), 3.94-3.88 (1H, m), 3.82 (2H, s), 3.81 (3H, s), 3.70 (2H, s), 3.07-3.00 (1H, m), 2.66-2.53 (2H, m), 1.87-1.75 (2H, m), 1.62-1.38 (2H, m); HRMS (ESI, positive) calcd for C₂₅H₂₈N₄O₂Cl: 451.1895. Found: 451.1882 (M+H).

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylacetyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28w)

198 mg (86%, a white solid from *i*PrOH): mp 155-156 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.15 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.77-6.74 (2H, m), 6.67 (1H, dd, J = 7.9, 1.6 Hz), 6.21 (1H, s), 5.94 (2H, s), 4.93 (2H, s), 4.74-4.69 (1H, m), 3.97-3.91 (1H, m), 3.82 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.64 (2H, s), 3.06-2.99 (1H, m), 2.66-2.53 (2H, m), 1.86-1.76 (2H, m), 1.61-1.40 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 461 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₈N₄O₄: C, 67.81; H, 6.13; N, 12.17. Found: C, 67.62; H, 6.12; N, 12.18.

4-{1-[(3,4-Dichlorophenyl)acetyl]piperidin-4-yl}-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28x)

307 mg (94%, a white solid from MeOH): mp 150-151 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.36 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.09 (1H, dd, J = 8.3, 2.2 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.21 (1H, s), 4.94 (2H, s), 4.73-4.68 (1H, m), 3.92-3.88 (1H, m), 3.82 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.68 (2H, s), 3.11-3.03 (1H, m), 2.68-2.55 (2H, m), 1.87-1.80 (2H, m), 1.62-1.44 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 485 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₆ Cl₂N₄O₂: C, 61.86; H, 5.40; N, 11.54; Cl, 14.61. Found: C, 61.75; H, 5.36; N, 11.54; Cl, 14.63.

化合物 **28q** の改良合成

1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidine-4-carboxylic acid (34)

イソニペコチン酸 (119.77 g, 0.927 mol) と K₂CO₃ (256.32 g, 1.855 mol) を水 (900 ml) に溶解し、氷冷下、激しく攪拌しながら、ピペロニロイルクロリド (155.6 g, 0.843 mol) を THF (900 ml) に溶解した溶液を 2 時間かけて滴下した。このとき、反応温度が 10 °C を越えないようにし、滴下終了後、さらに 30 分攪拌を行った。反応混

合物を濃塩酸で酸性とし、 CHCl_3 で抽出した。有機層を水で洗浄した後、 MgSO_4 で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣にメタノールを加えて結晶化し、**34** (210.81 g, 90%) を白色個体として得た。

Mp 156-158 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.30 (1H, s), 6.96-6.94 (2H, m), 6.88 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz), 6.07 (2H, s), 4.29-3.54 (2H, br m), 3.09-2.88 (2H, br m), 2.55-2.49 (1H, m), 1.88-1.79 (2H, br m), 1.54-1.45 (2H, m).

Ethyl 3-[1-(1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-3-oxopropanoate (35)

窒素雰囲気下、化合物 **34** (110 g, 0.397 mol) を THF (2 L) に溶解し室温において CDI (70.8 g, 0.437 mol) を数回に分けて添加した。3.5 時間攪拌の後、マロン酸モノエチルマグネシウム¹⁵ (125.12 g, 0.437 mol) を添加し、3 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去し、残渣に sat. NaHCO_3 水溶液 (1.5 L) を加え EtOAc (3 L) で抽出した。有機層を飽和食塩水で 2 回洗浄、 MgSO_4 で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:EtOAc=1:1, v/v) で精製し、化合物 **35** (132.40 g, 96.1 %) を無色オイルとして得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.92-6.88 (2H, m), 6.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.00 (2H, s), 4.64-4.37 (1H, br m), 4.20 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.15-3.86 (1H, br m), 3.51 (2H, s), 3.04-2.94 (2H, m), 2.82-2.74 (1H, m), 1.97-1.84 (2H, m), 1.69-1.61 (2H, m), 1.28 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); MS (ESI, positive) m/z 348 (M+1).

マロン酸モノエチルマグネシウムは以下のようにして合成した。すなわち、マロン酸モノエチル (183.18 g, 1.39 mol) を THF (1 L) に溶解し、 $\text{Mg}(\text{OEt})_2$ (79.54 g, 0.70 mol) を攪拌溶液中、下数回に分けて添加した。4 時間後、溶媒を減圧留去し、さらに残渣にトルエンを加え共沸して除き、マグネシウム塩 (190.82 g) を得た。

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (28q)

化合物 **35** (80 g, 0.23 mol) の THF (400 ml) 溶液に窒素雰囲気下、氷浴中において水素化ナトリウム (60% oil dispersion, 19.32 g, 0.483 mol) を反応温度が 5 °C を越えないように数回に分けて添加した。さらに 30 分攪拌の後、この混合物に、4-methoxyphenylacetyl chloride (46.7 g, 0.253 mol) の THF (240 ml) 溶液を 5 °C において 2 時間かけて滴下した。さらに 30 分攪拌の後、反応混合物を 1N 塩酸水溶液で酸性とし、水 (1 L) を加えて EtOAc (1 L) で抽出した。有機層を水 (1 L) で洗浄した後、 MgSO_4 で乾燥、溶媒を減圧留去し、ジケトエステル (126.98 g) を未精製のオイルとして得た。このジケトエステルは精製することなく次の反応に用いた。ジケトエステル体 (126.98 g) と AcOH (1 L) の混合物を 14 時間加熱還流した。反応混合物を水 (1 L) に注ぎ、EtOAc (1.5 L+1 L) で抽出し、層を水で洗浄した後、 MgSO_4 乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane :

EtOAc, 1:1, v/v)で精製し、化合物 **36** (72 g, 74%)を油状物として得た。

化合物 **36** (72 g, 0.17 mol)、グアニジン炭酸塩 (30.63 g, 0.17 mol) とピリジン (360 ml) の混合物を 110 °C において 9 時間、加熱攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残渣に飽和食塩水 (500 ml) を加え CHCl₃ で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、MgSO₄ で乾燥、溶媒を減圧留去した後、残渣に EtOH を加え結晶をろ別した。MeOH から再結晶化させ化合物 **28q** (55.30 g, 73%) を得た。

Ethyl 3-(1-benzoylpiperidin-4-yl)-3-oxopropanoate (32)¹⁷

化合物 **36** の合成と同様の反応により、化合物 **24** (130 g, 0.557 mol)、CDI (99.35 g, 0.613 mol)、マロン酸モノエチルマグネシウム (175.55 g, 0.613 mol) と THF (2.8 L) から **32** (163 g, 96%) をヘキサンから結晶化させ白色固体として得た。

4-(4-Methoxyphenyl)-1-[1-(phenylcarbonyl)piperidin-4-yl]butane-1,3-dione (25d)

化合物 **36** の合成と同様の反応により化合物 **32** (150 g, 0.494 mol)、4-methoxy phenylacetyl chloride (100.3 g, 0.543 mol)、THF (100 ml)、水素化ナトリウム (60% oil dispersion, 21.74 g, 0.543 mol) と THF (1.4 L) から **33** (142.89 g, 64%) を得た後、同様に脱エトキシカルボニル化させ **25d** (100.87 g, 84%) を得た。

3-9-2. Biology

ガラクトサミン負荷マウスエンドトキシシンショックモデルでのTNF- α 産生阻害活性の評価

D-ガラクトサミン塩酸塩 (D-galN, ナカライテスク社製) 及びLPSを最終濃度がそれぞれ100 mg/ml、30 μ g/mlとなるように生理食塩水に溶解させ、1群7匹のBALB/cマウスに100 μ l/10 gの量で尾静脈内投与した (LPS: 300 μ g/kg、D-galN: 1 g/kg)。LPS/D-galN投与の4時間前に評価化合物の0.5%メチルセルロース懸濁液を100 mg/kgで経口投与した。対照群として、化合物の代わりに、0.5%メチルセルロース溶液のみを同量投与した群を設けた。LPS/D-galN投与1時間後、エーテル麻酔下で心臓採血により血液を採取し、セパラピッドチューブを用いて血清を分離した。分離した血清は、ハムスター抗マウスTNF- α 抗体とHRP-共役抗マウスTNF- α 抗体 (Mouse TNF- α Duo Set, Genzyme社製) を用いたELISA法によりTNF- α 量を測定し、産生阻害活性を調べた。

コラーゲン誘発関節炎マウスに対する化合物の評価

関節炎の惹起と評価

日本チャールスリバーより5週齢の雌性DBA1/Jマウスを購入し、1週間の馴化後、以下の実験に供した。ウシタイプIIコラーゲン(コラーゲン研修会)を0.01 M酢酸に2 µg/mlの濃度になるように溶解した。等量のコラーゲン溶液とフロイント完全アジュバント(Difco)とを連結シリンジ内で混合し、エマルジョン化した。マウス尾根部に該エマルジョンを1匹当たり0.1 ml皮内投与した(初回免疫)。3週間後、同様の方法でコラーゲン溶液とフロイント不完全アジュバント(Difco)とのエマルジョンを1匹当たり0.1 ml皮内投与した(追加免疫)。

関節炎の重症度(Clinical score)は、Björk と Kleinauの基準に基づいて肉眼により各肢をそれぞれ採点することによって関節炎スコアとした²¹。1匹当たりの最大スコアは16である。

0=変化なし

1=1関節の腫脹

2=2関節の腫脹/前後肢の軽度の発赤、浮腫

3=3関節以上の腫脹/前後肢の中度の発赤、浮腫

4=上記3と同様であるが前後肢発赤、浮腫が強度/関節強直

骨破壊(Radiographical score)の評価としての軟X線写真は、軟X線発生装置SOFRONを用いて試験最終日に撮影した。骨破壊の程度は、以下の基準に基づいて各肢をそれぞれ評価することによってスコア化した²²。1匹当たりの最大スコアは12である。

0=変化なし

1=微小な骨糜爛

2=骨糜爛が明瞭に同定できる

3=明白かつ広範な骨糜爛が多関節に存在する

試験最終日に採取した血清中に含まれるIL-6は、市販のELISAキット(コラーゲン研修会)によって測定した。

予防的投与試験

0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した被検化合物 **28q**(25, 50, 75, 100 mg/kg)、cyclosporinA(50 mg/kg, Sandimmun®, Sandoz, Swiss)、**7s**(50, 100 mg/kg)とindomethacin(2mg/kg, Wako, Osaka, Japan)を初回免疫(予防試験ではこの日をday 0とする)の翌日から7週間、1日1回の頻度で週に6回、それぞれ経口投与した。関節炎の重症度の採点(関節炎スコア)は、追加免疫日から試験終了日まで行った。

治療的投与試験

追加免疫数日後に、関節炎症状を呈しているマウスを抽出し、関節炎スコアと体重とが群間で等しくなるように群分けした(治療試験ではこの日をday 0とする)。0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した被検化合物 **28q** (50, 75, 100 mg/kg) と indomethacin (2 mg/kg, Wako, Osaka, Japan) を群分け日から39日間、1日1回の頻度で週に6回、それぞれ経口投与した。関節炎スコアは、群分け日から試験終了日まで採点した。

重篤化した関節炎に対する治療的投与

関節炎が重篤化したマウス、即ち、関節炎スコアが5ないし6のマウスを、関節炎スコアと体重とが群間で等しくなるように群分けし、0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した被検化合物 **28q** (100 mg/kg) と dexamethasone (0.1 mg/kg, Wako, Osaka, Japan) を群分け日から39日間、1日1回の頻度で連日、経口投与した。関節炎スコアは、群分け日から試験終了日まで採点した。

ヒト末梢血単核球(PBMC)に対するTNF- α 、IL-1 β とIL-6の産生阻害活性の評価

細胞の調整

ヒト末梢血は社内ボランティアより得た。血液凝固剤としてヘパリンを用い、Ficoll-Paque 12.5 mlに血液25 mlを静かに重層し、室温において2000 rpmで30分間遠心分離した。単核球層を回収し、Ficoll を除くため細胞培養培地RPMI 1640に再懸濁し遠心操作(室温、1500rpm、10 minを1回と4 °C、1350 rpm、5 minを2回)により洗浄した。最終濃度2 mM グルタミンと10%FBS添加のRPMI 1640に 1×10^6 cell/mlで懸濁した細胞液を、24穴もしくは96穴プレートに1wellあたり 1×10^6 cellと 1×10^5 cell播種した。

サイトカインの産生誘導と産生阻害活性測定

サイトカインの誘導は、細胞を含むウェルに10 μ g/mlになるようにLPS(E.coli o111B4, Difco Laboratories, Detroit, MI USA)を添加し、37 °C、20時間培養することで行った。評価化合物はDMSOに溶解し、LPSと同時に培養細胞を含むウェルに添加した。その際、最終DMSO濃度は、0.1%以下になるように設定した。ヒトTNF- α 、IL-1 β とIL-6は市販のELISAキット(TNF- α 、IL-1 β はGenzyme社、IL-6はコラーゲン研修会から購入した)を用いて、添付のプロトコールに従い測定した。

3-10. 引用文献

1. Irie, K.; Ueda, Y.; Fujiwara, N. Patent (WO) 9407498, 1994.
2. Wermuth, C. G. Ed. 最新創薬化学; テクノミックス, 2006, pp239-255.
3. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3.
4. Lipinski, C. A. *J. Pharmacol. Toxicol. Method* **2000**, *44*, 235.
5. (a) Armarego, W. L. F. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds: Fused Pyrimidines, Part I: Quinazolines*; Brown, D. J., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1967, Vol 24, pp 322-331. (b) Hoefle, M. L.; Holmes, A. Patent (US) 3305553 (1967). (c) 権順度, 田中忍, 去来川覚三. *有機合成科学協会誌* **1973**, *34*, 328. (d) Bartmann, W.; Konz, E.; Rüger, W. *Heterocycles*, **1989**, *24*, 707. (e) Kamal, A.; Rao, K. R.; Sattur, P. B. *Synthetic Communications*, **1980**, *10*, 799-804.
6. (a) Kamal, A.; Rao, M. V.; Sattur, P. B. *Heterocycles*, **1986**, *24*, 3075. (b) Nakasawa, A.; Arata, Y.; Uneme, H. Patent (WO) 20080529 (2008). (c) Walker, G. N. Patent (US) 3309141 (1970). (d) Haraoka, Y.; Kamiya, T.; Kariyone, K.; Yazawa, H. Patent (JP) 40020866 (1963)
7. Theiling, L. F.; McKee, R. L. *J. Amer. Chem. Soci.* **1952**, *74*, 1834.
8. Butler, K.; Partridge, M. W. *J. Chem. Soc.* **1959**, 1512-1521.
9. Takai, H.; Obase, H.; Teranishi, M.; Karasawa, A.; Kubo, K.; Shuto, K.; Kasuya, Y.; Shigenobu, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 1907-1916.
10. Carabateas, P. M.; Surrey, A. R.; Harris, L. S. *J. Med. Chem.* **1964**, *7*, 293-297.
11. Sugasawa, T.; Toyoda, T.; Adachi, M.; Sasakura, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4842-4852.
12. Robins, M. J.; Uznaski, B. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 2608-2611.
13. DeGraw, J. I.; Kennedy, J. G.; Skinner, W. A. *J. Het. Chem.* **1966**, *3*, 67-69.
14. (a) Elguero, J.; Marzin, C.; Katritzky, A. R.; and Linda, P. In *Adv. Heterocycl. Chem.*; Katritzky, A. R., Boulton, A. J., Eds.; Academic Press: New York, 1976; Suppl. 1, pp 71-210. (b) Armarego, W. L. F. In *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*; Brown, D. J., Eds.; Wiley: New York, 1967; vol. 24, pp 69-206.
15. (a) Mao, C.-H.; Hauser, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5303-5304. (b) Weiler, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6702-6704.
16. Katagiri, N.; Kato, T.; Nakano, J. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 2440.
17. Razdan, R. K.; Thompson, W. R. Patent (US) 3855229 (1974).
18. Brooks, D. W.; Lu, L. D-L; Masamune, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 72.
19. Krapcho, A. P. *Synthesis* **1982**, 1982, 805.
20. Hegen, M.; Keith Jr., J.C.; Collins, M. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67*, 1505.
21. Björk, J.; Kleinau, S. *Agents Actions* **1989**, *27*, 319.
22. Gilman, S. C.; Carlson, R. P.; Daniels, J. F.; Datko, L.; Berner, P. R.; Chang, J. *Int J*

- Immunopharmacol.* **1987**, 9, 9.
23. (a) Andreakos, E.; Foxwell, B.; Brennan, F.; Maini, R.; Feldmann, M. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, 13, 299-313. (b) 宮坂信之. *治療学* **2002**, 36(12), 5-61. (c) 竹内勤. *最新医学* **2002**, 2, 829-913.
24. Williams, R. O.; Feldmann, M.; Maini, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9784.
25. (a) Alexopoulou, L.; Pasparakis, M.; Kollias, G. *Eur. J. Immunol.* **1997**, 27 2588. (b) Haas, E.; Grell, M.; Wajant, H.; Scheurich, P. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274(25), 18107. (c) 堀内孝彦; 三苦弘喜; 塚本浩; 原田実根. *最新医学* **2004**, 59(10), 2340.
26. (a) Scallon, B. J.; Moore, M. A.; Trinh, H.; Knight, D. M.; Ghrayeb, J. *Cytokine* **1995**, 7(3), 251. (b) Wong, M.; Ziring, D.; Korin, Y.; Desai, S.; Kim, S.; Lin, J.; Gjertson, D.; Braun, J.; Reed, E.; Singh, R. R. *Clin Immunol.* **2008**, 126(2), 121. (c) 関口 直哉; 竹内勤. *最新医学* **2006**, 61(5), 925.
27. (a) Duan, J. J.-W.; Chen, L.; Wasserman, Z. R.; Lu, Z.; Liu, R.-Q.; Covington, M. B.; Qian, M.; Hardman, K. D.; Magolda, R. L.; Newton, R. C.; Christ, D. D.; Wexler, R. R.; Decicco, C. P. *J. Med. Chem.* **2002**, 45(23), 4954. (b) Levin, J. I.; Chen, J. M.; Laakso, L. M.; Du, M.; Schmid, J.; Xu, W.; Cummons, T.; Xu, J.; Jin, G.; Barone, D.; Skotnicki, J. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1605. (c) Gilmore, J. L.; King, B. W.; Asakawa, N.; Harrison, K.; Tebben, A.; Sheppeck II, J. E.; Liu, R.-Q.; Covington, M.; Duan, J. J.-W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 4678. (d) DasGupta, S.; Murumkar, P. R.; Giridhar, R.; Yadav, M. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 444.
28. Kumagai, Y.; Fukuto, J. M.; Cho, A. K. *Eur. Curr. Med. Chem.* **1994**, 4 254.

第4章 TNF- α 産生阻害剤の抗HIV活性

4-1. 序論

後天性免疫不全症候群(AIDS)はHIV感染によって引き起こされ、重篤な全身性免疫不全によって特徴づけられる疾患である。HIVはCD4とよばれる細胞膜蛋白質を受容体としてヘルパーT細胞やマクロファージに感染し破壊する。これらの細胞は、細胞性免疫に中心的な役割を果たしているため、免疫の著しい機能低下による全身性の免疫不全状態となり、様々な日和見感染症や日和見腫瘍、中枢神経障害など多彩で重篤な全身症状が起こる。1980年代には、その高い発症率・死亡率と予防・治療の難しさから、人類が直面する最も深刻な医療問題の一つとなっていた。

このHIVの産生・増殖にはFig 4-1に示すように、①HIVウイルスの細胞への吸着と侵入、②脱殻、③ウイルスRNAからDNAへの逆転写、④HIV DNA(逆転写されたDNA)の感染細胞DNAへの組み込み、⑤感染細胞DNAからRNAへの転写、⑥RNAから蛋白質合成のための翻訳と各種ウイルス蛋白質の合成、⑦ウイルス構成物質(蛋白質やRNA)の集合によるウイルス粒子の形成、⑧ウイルスの出芽、ウイルス粒子の成熟(プロテアーゼの働き)、といった多段階の機構が存在し、これらの仕組みを利用した阻害剤の研究が精力的に行われた¹。その研究の進歩は目覚ましく、段階③を阻害する核酸系逆転写酵素阻害剤(Nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI)と非核酸系逆転写酵素阻害剤(Non nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI)や段階⑧に作用するプロテアーゼ阻害剤(Protease inhibitor, PI)等が数多く開発された。またそれらを組み合わせたHAART治療(Highly active antiretroviral therapy)が行われるようになった結果、現在ではAIDSの発症をかなりコントロールできるようになり、先進諸国では死亡率が顕著に低下し、患者予後も大きく改善されている²。ただ、この治療法では感染細胞を完全に駆逐することはできず、治療を中断すると再びウイルスが増殖し始めることが知られている。そのため長期服用に伴う薬剤耐性、NRTIによるミトコンドリア障害、PIの脂質代謝異常や糖代謝異常などの副作用の問題³と医療費の問題も含め、より根本的な治療法が望まれている。また、これまでのRTI、PI以外にも、2003年には融合阻害剤(Enfuvirtide)、2007年にはインテグラーゼ阻害剤(Raltegravir)やCCR5阻害剤(Maraviroc)などの新しい作用機序による治療薬が米国等で相次いで承認されており(Fig 4-2)、新規薬剤の開発は今後も重要な課題と言える⁴。

ここで、TNF- α とHIVの関わりを見てみると、その過剰産生はHIVウイルスの増殖活性化と病態の進展に深く関与しているばかりでなく⁵、AIDS患者の悪液質(感染後期にみられる体重と筋肉量の減少などの極度の消耗状態)やAIDS脳症(痴呆)の原因の一つといわれており、TNF- α 産生阻害剤の治療薬としての効果が期待される⁶。

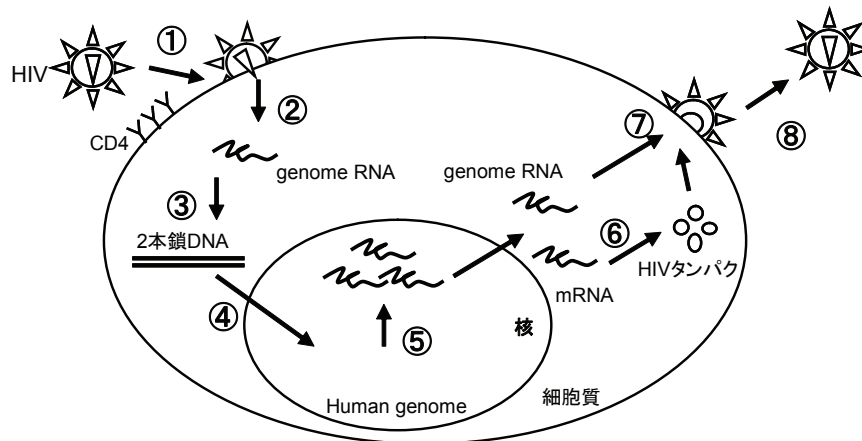


Fig 4-1. HIV増殖と抗HIV薬の作用点

①侵入(接着/融合阻害剤); ②脱殻; ③逆転写(逆転写酵素阻害剤); ④核内取り込み(インテグラーゼ阻害剤); ⑤転写(転写活性化阻害剤); ⑥翻訳; ⑦融合・粒子形成; ⑧放出と成熟(プロテアーゼ阻害剤)

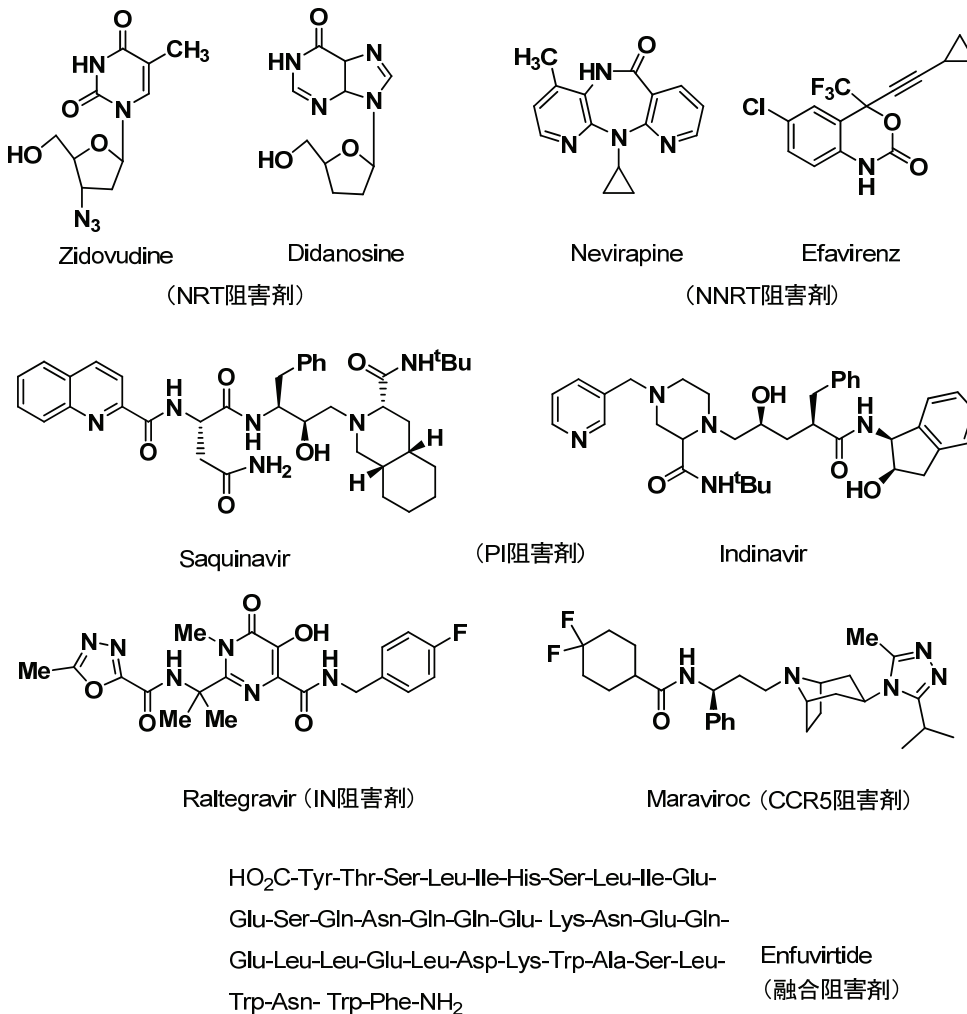


Fig 4-2. 抗HIV剤の例

ところで、HIVの複製は宿主染色体に挿入されたHIVプロウイルスの転写調節領域であるLTR (long terminal repeat) 部位により制御されており⁷、HIV-LTR領域に作用する宿主因子を標的とした抗HIV剤の開発の可能性が考えられる (Fig 4-1における段階⑤)⁸。HIV複製を増強させる細胞性因子として転写因子NF- κ Bの活性化などがよく知られており⁹、HIV感染細胞にTNF- α を始めとする様々な刺激が作用すると、そうした宿主由来の因子が活性化され、その結果としてHIVの複製が増強する。興味深いことにTNF遺伝子の転写調節にもNF- κ Bをはじめとした転写因子が関与しており、TNF- α 産生阻害剤が自身の産生を抑制するだけでなく、その遺伝子の活性化機構の共通性から直接的なHIV増殖抑制作用も有する可能性が考えられる (Fig 4-3)¹⁰。

実際に、Pentoxifylline (ホスホジエステラーゼ阻害)、SB203580 (p38キナーゼ阻害)、Rolipram (ホスホジエステラーゼ4阻害)、Fluoroquinolone誘導体 (K-37, 機序不明)、Thalidomide (mRNAの非安定化)、LPM-420 (転写阻害) やCanventol (機序不明) などいくつかのTNF- α 産生阻害剤においてその阻害のメカニズムは異なるものの、HIV遺伝子転写抑制活性やHIVウイルス増殖抑制活性が報告されている¹¹。本研究の化合物群の詳細な作用メカニズムについて現段階では不明であるが、同様の作用が確認できれば、HIV遺伝子活性化への直接的な作用に加え、TNF- α 産生阻害に基づく間接的な作用も併せ持つことになり、抗HIV療法の新しいアプローチとして期待できるものと思われる。

また、すでに述べたように、ウイルス感染は細菌感染と同様、耐性株の出現による薬剤に対する効果の減弱が問題となる。HIVにおいてもRTIやPIなど既に薬剤耐性株が出現しており、特にNNRTIはHIVがその1個のアミノ酸配列を変えることできわめて強い耐性を短期間で獲得してしまうことが報告されている¹²。そのため継続的な薬剤開発が必要となる。一方、HIVの転写過程はウイルスが宿主側の活性化機構を利用したものであり、宿主由来のタンパク因子などを標的にしている。そのためウイルス由来の酵素の阻害剤と異なり、耐性ウイルスが出現しにくいと考えられる。

以上のことから、先のTNF- α 産生阻害剤の抗HIV作用について調べることにした。

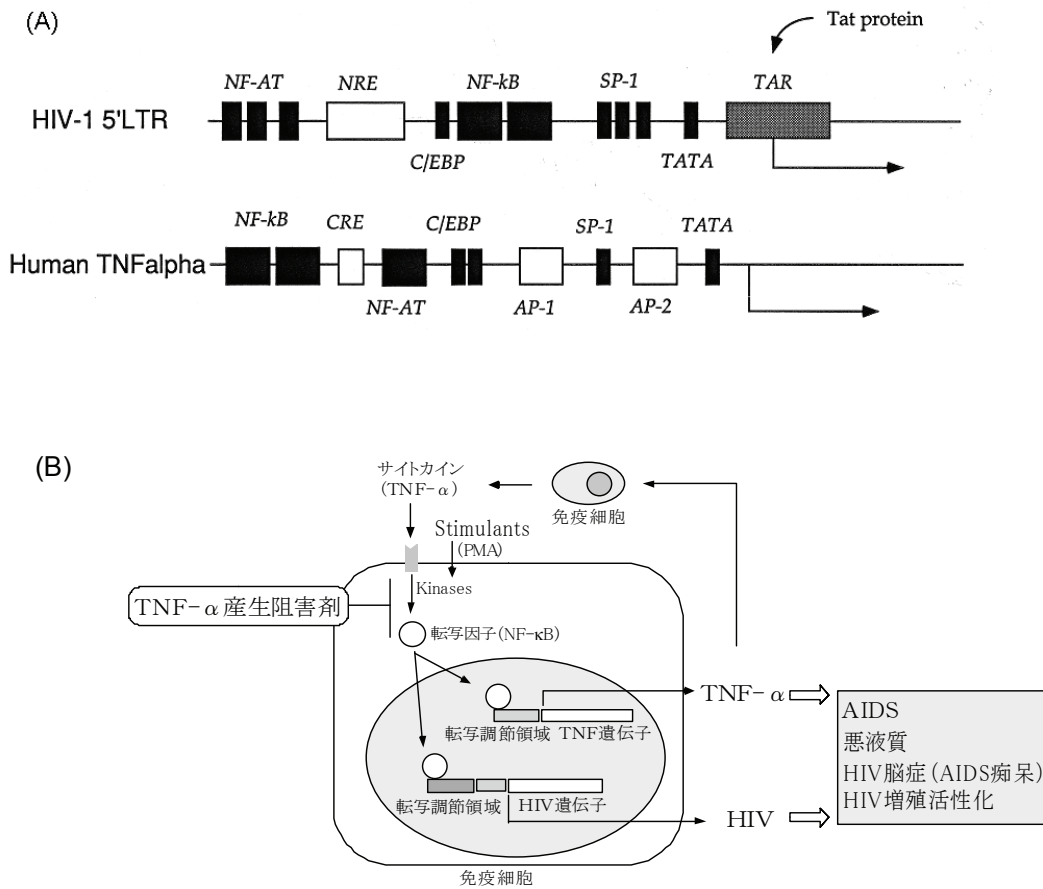


Fig. 4-3 TNF- α とHIVの遺伝子調節領域 (A)とTNF- α 産生阻害剤の期待される効果 (B)

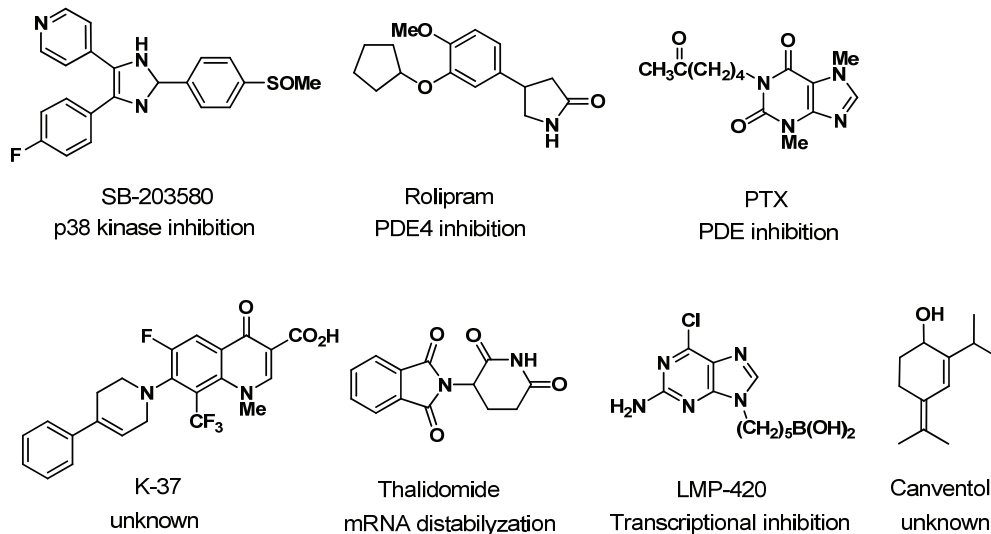


Fig 4-4 抗HIV活性の報告されているTNF- α 産生阻害剤

4-2. TNF- α 産生阻害剤の抗HIV活性の評価

まず、先の作業仮説に対し、我々のTNF- α 産生阻害剤に期待した抗HIV活性が認められるかどうか評価した。抗HIV活性の指標として、レポーター遺伝子アッセイ法を用いた (Fig. 4-5)。ヒトT細胞由来のJurkat細胞を用い、HIV-1ウイルス転写調節領域であるLTR下にChloramphenicol acetyltransferaseレポーター遺伝子を持つプラスミドDNA (HIV-1 LTR-CAT) を導入した。細胞をPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) で処理することで、プロモーター領域が活性化され、転写が誘導される。導入したCAT酵素が複製され、その酵素活性を指標にして遺伝子転写活性を評価した。

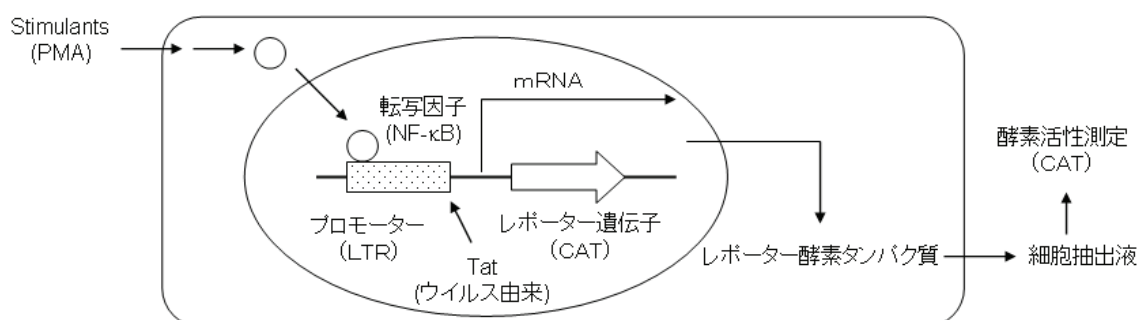
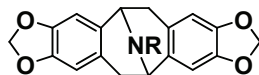


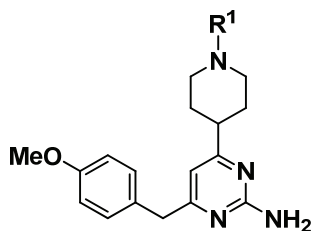
Fig 4-5 レポーター遺伝子アッセイ

まず、パビン誘導体について評価した結果を以下のTable 4-1に示した。残念ながら、50 μ Mという高濃度においてもHIV-1 LTR転写活性化阻害作用を確認できなかった。またピペリジニルピリミジン誘導体についても同様に評価したが、ほとんどの化合物でHIV-1 LTR転写活性化阻害作用は認められないか、あっても弱いものであった (Table 4-2)。興味深いことに、化合物 **28q** にのみ極めて強い抗HIV1-LTR活性が認められた (86%, 5 μ M)。さらに化合物 **28q** は、HIV-1感染細胞を用いた評価試験においてもウイルス増殖抑制活性を示し、ウイルス増殖による特異的なp24タンパクの生成を用量依存的に抑制した (Fig. 4-6)。その作用は、既存のAZT (NRTI) に比べて弱いものの、同様な作用が報告されているPTX (TNF- α 産生阻害活性:IC₅₀~100 μ M) よりも強力であった。表に示すようにTNF- α 産生阻害活性と抗HIV1-LTR活性の間に明確な相関は認められなかったが、化合物 **28q** の両作用は、期待したとおりの効果であり、作用発現のメカニズムはそれぞれ異なるものと考えられるが、非常に興味深い知見である。特に **28q** とその他の誘導体を比較した場合、構造的な特徴として3,4-メチレンジオキシフェニル (ピペロニロイル) 構造が挙げられ、それが抗HIV活性に及ぼす効果についても非常に興味をもたれる。そこで、この化合物を新たなリードとして、ピペリジニルピリミジン誘導体の抗HIV-1活性について構造活性相関を明らかにし、活性の増強が可能かどうか詳細に検討する意義は十分にあるものと考え、以下合成と評価を行った。

Table 4-1 パピン誘導体の抗 HIV-1 LTR 活性と TNF- α 産生阻害活性

Compd	R ¹	inhibition of HIV-1 LTR ^a	inhibition of TNF- α IC ₅₀ (μ M) ^b
5b	Ac	4%	13
7b	Et	15%	27
7h	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO	24%	>100
7j	HO(CH ₂) ₂	19%	36
7s	H ₂ N(CH ₂) ₂	19%	14

^a % inhibition at 50 μ M; ^b inhibition in mouse macrophages

Table 4-2 ピペリジニルピリミジン誘導体の抗 HIV-1 LTR 活性と TNF- α 産生阻害活性

Compd	R ¹	inhibition of HIV-1 LTR ^a	inhibition of TNF- α IC ₅₀ (μ M) ^b
28a	Ac	0%	6.1
20b	PhCO	19%	1.4
28e	Me(CH ₂) ₆ CO	19%	1.9
28i	4-MeOPhCO	-5%	0.5
28l	4-O ₂ NPhCO	23%	0.7
28m	4-ClPhCO	21%	0.6
28o	3,4-(MeO) ₂ PhCO	14%	0.9
28q	3,4-(OCH ₂ O)PhCO	86%	0.6
28r	3,4-Cl ₂ PhCO	17%	0.7
28v	3,4-(MeO) ₂ PhCH ₂ CO	7%	1.2
28w	3,4-(OCH ₂ O)PhCH ₂ CO	16%	1.8

^a% inhibition at 5 μ M; ^bInhibition in mouse macrophages

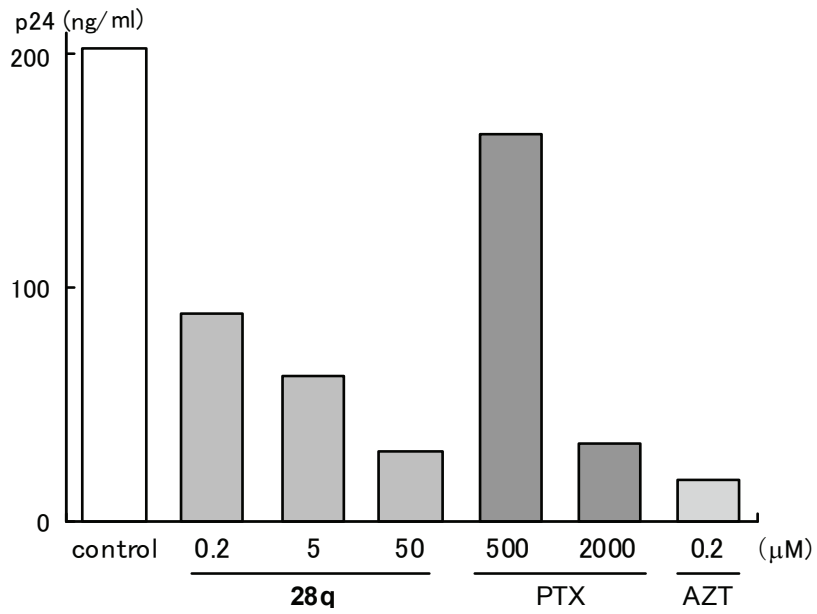


Fig. 4-6 C81166 リンパ細胞を用いた HIV-1 増殖抑制活性の評価
 PTX: pentoxifylline; AZT: Zidovudine

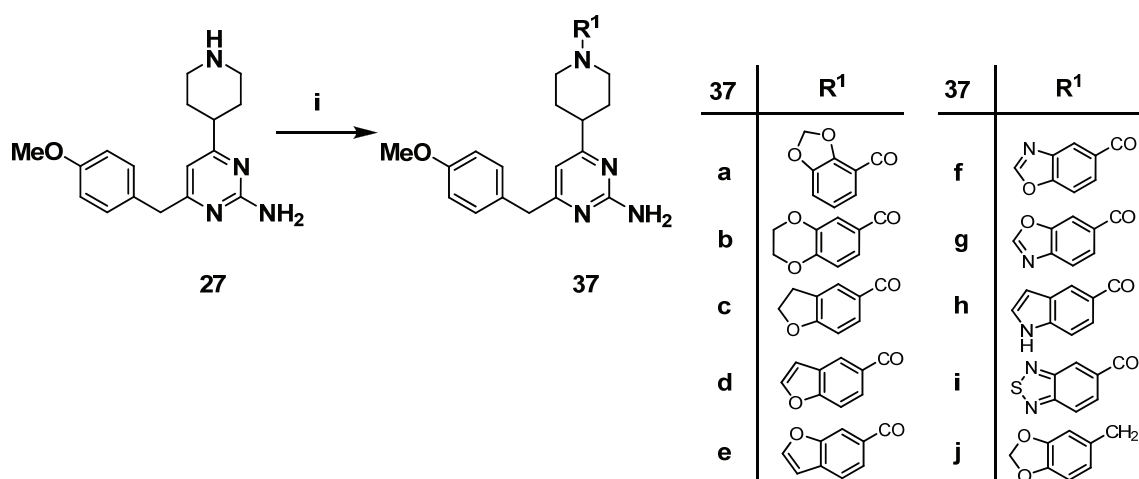
4-3. ピペリジニルピリミジン誘導体の合成

ピペリジノ基上の置換基に着目して、ピペロニロイル構造の構造的特異性を確認するため、同様な構造を有する複素環縮環型構造の置換基を導入した。既に 3 章で合成したピペリジン化合物 **27** を用いて、対応するカルボン酸と縮合させ、アミド体 **37a-i** を得た。また、塩基性基の効果を調べるため、ピペロナルから還元的アミノ化反応により、ベンジルアミン化合物 **37j** を合成した (Scheme 4-1)。

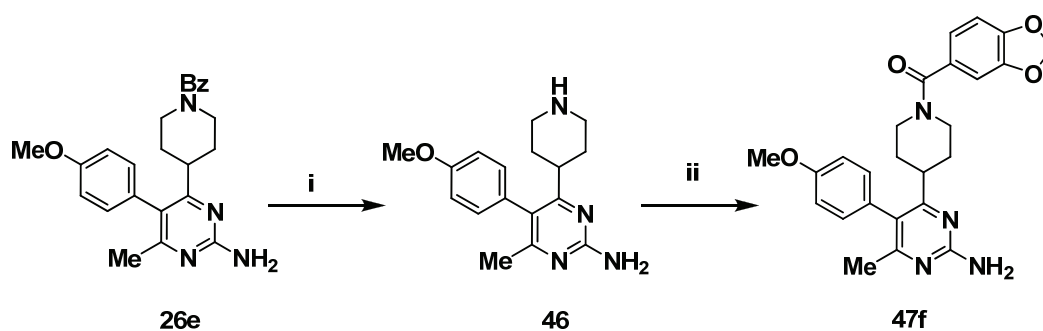
次に、ピリミジン部 5 位変換体 **47f** の合成は、既に合成していたベンゾイル体 **26e** から、加水分解と続いてのピペロニロイルクロライドとの縮合により得た (Scheme 4-2)。

ピリミジン環部の変換を行った (Scheme 4-3)。化合物 **28q** を $t\text{BuONO-SbCl}_3$ による非水条件でのジアゾ化-ハロゲン置換反応により¹³、化合物 **38** を得た後、接触還元により無置換体 **39** を合成した。さらに、1,3-ジケトン体 **36** を基質とし、ウレア、ヒドラジンとヒドロキシルアミンと反応させ、ピリミジン-2-オン **40**、ピラゾール **41** とイソオキサゾール **44**, **45** をそれぞれ合成した (Scheme 4-4)。ヒドロキシルアミンとの反応では、中間体のイソオキサゾリジンが分離可能な異性体混合物 **42**, **43** として得られ、それぞれを単離した後、脱水反応により単一の異性体を得ることができた。これら異性体の構造は中間体の $^1\text{H NMR}$ の化学シフト値の解析から決定することが可能であった。すなわち、イソオキサゾリジン構造に隣接するベンジル位またはピペリジニル上の 4 位プロトンのどちらがイミノ基の π 電子による非遮蔽効果を受けているかで判断した。その結果、化合物 **42** ではベンジル位、また化合物 **43** ではピペリジニル基のプロトンがより低磁場側に観測されたことから Scheme 4-4 記載の構造とした。また、より立体障害の少ないベンジル側でのイミン形成 (**42**) が優先して得られており、反応の選択性からもこの結果を支持できるものであった。最終的には化合物 **44** の単結晶 X 線構造解析により、その構造を確認した。

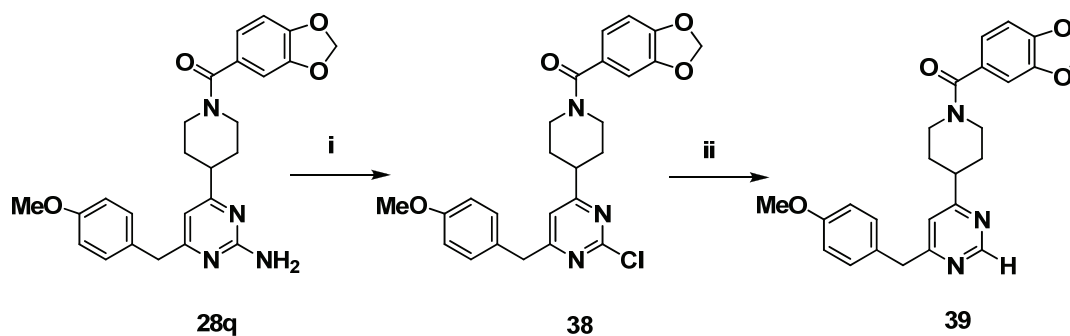
ピリミジン部 6 位変換体は、新たに見出した β -ケトエステル **35** を経由する方法で合成した。即ち、化合物 **35** を水素化ナトリウム存在下、対応する酸クロライドと Claisen 縮合させ、生じたジケトエステル体を脱エトキシカルボニル化し、1,3-ジケトン体 **48** を得た。最後にグアニジンで閉環させ、各種変換体 **47a-e** を合成した (Scheme 4-5)。また、置換ベンジル誘導体についても同様にフェニル酢酸クロライドから置換基を種々変換した誘導体 **50a-j** も合成した (Scheme 4-6)。さらにベンジル基上の官能基変換においては、ベンジルエーテル体 **50e** の接触還元によるフェノール体 **50k**、また、メチルチオ基 (**50f**) の過酸化水素酸化によるスルフィニル体 **50l** とスルホニル体 **50m** への誘導と官能基変換をおこなった (Scheme 4-7)。



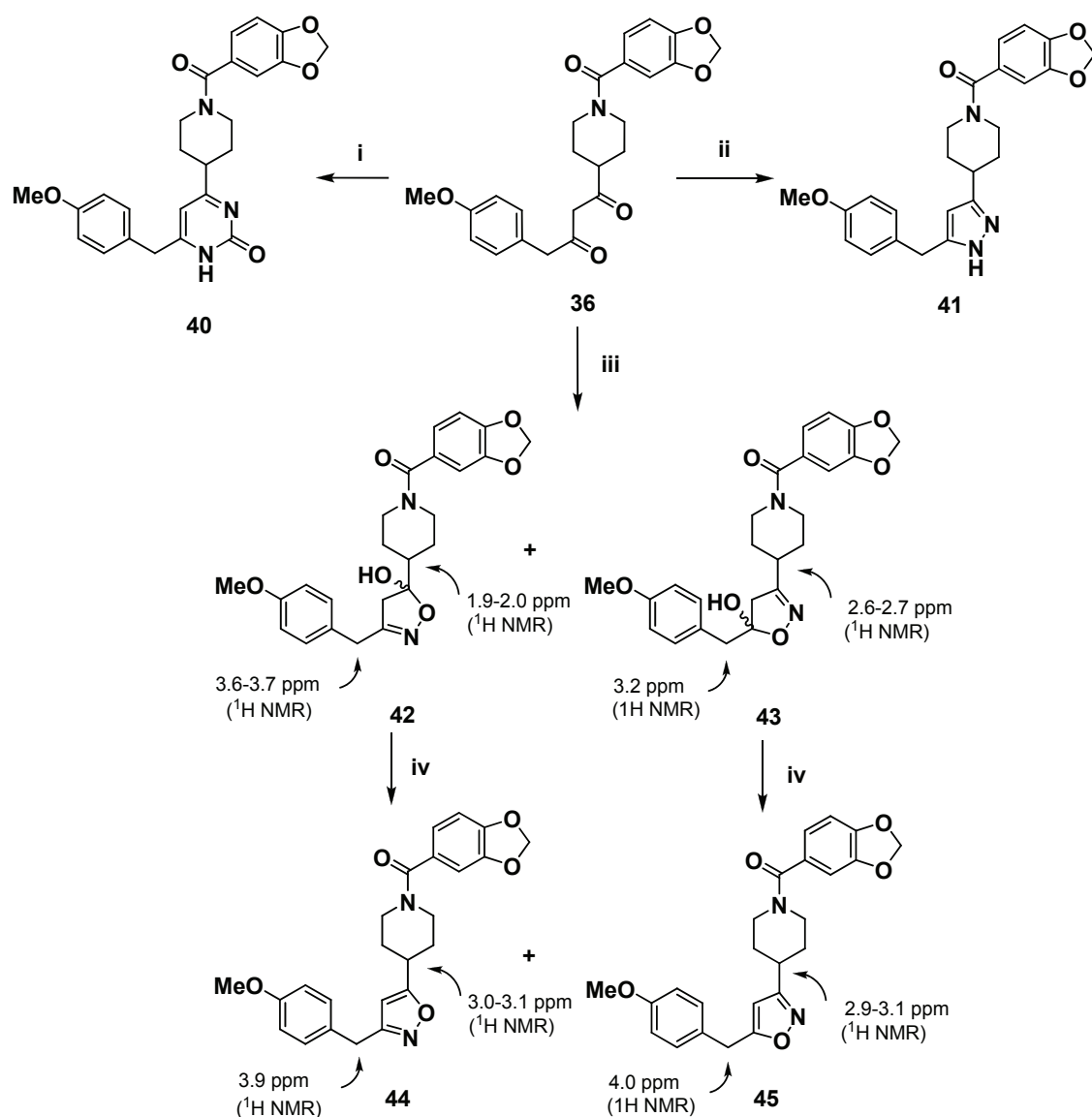
Scheme 4-1 Synthesis of piperidinyipyrimidines **37a-j**. CONDITIONS: (i) Heteroarylcarboxylic acid, HOBt, EDC, CHCl₃, 77-93% (for **37a-i**); or piperonal, NaBH₃CN, HCl-MeOH, 39% (for **37j**).



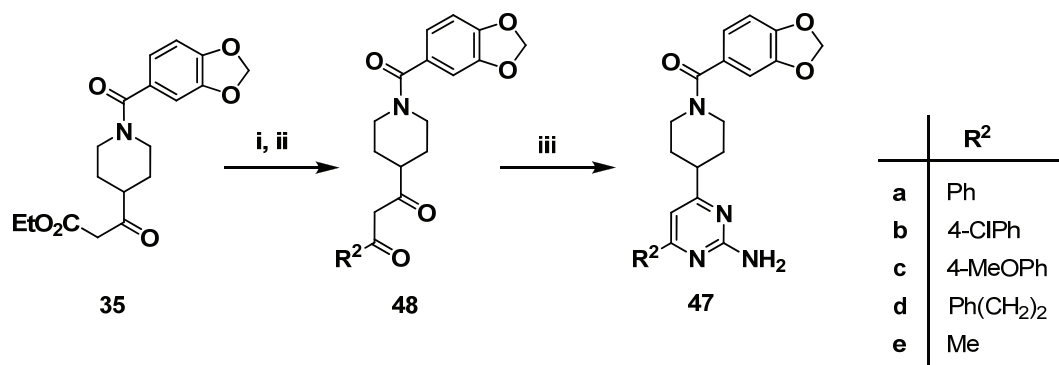
Scheme 4-2 Synthesis of piperidinyipyrimidine **47f**. CONDITIONS: (i) 6N-NaOH, EtOH, reflux, 88%; (ii) piperonyl chloride, Et₃N, CHCl₃, 97%.



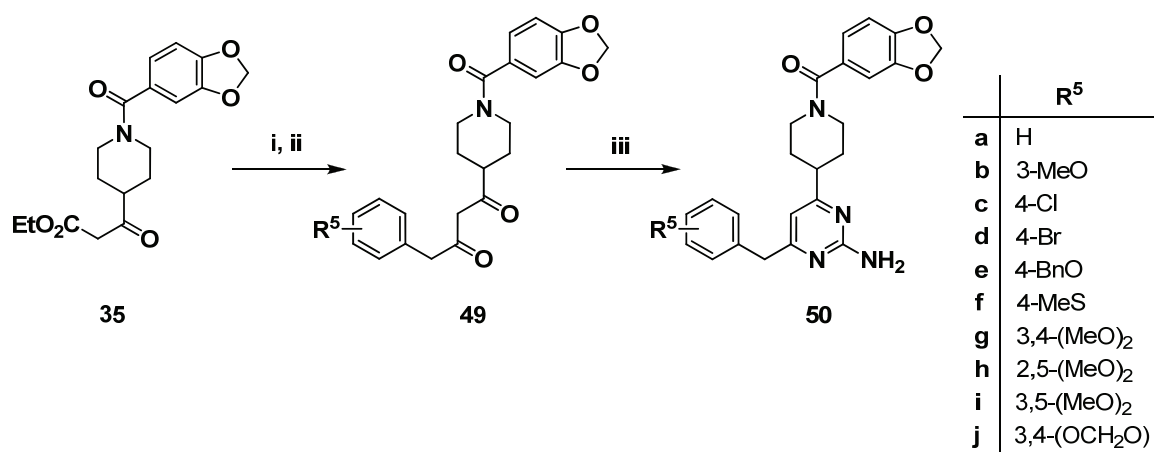
Scheme 4-3 Synthesis of piperidinyipyrimidines **38** and **39**. CONDITIONS: (i) *t*BuONO, SbCl₃, (CHCl₂)₂, 60 °C, 25%; (ii) H₂, Pd/C, AcONa, MeOH, 74%.



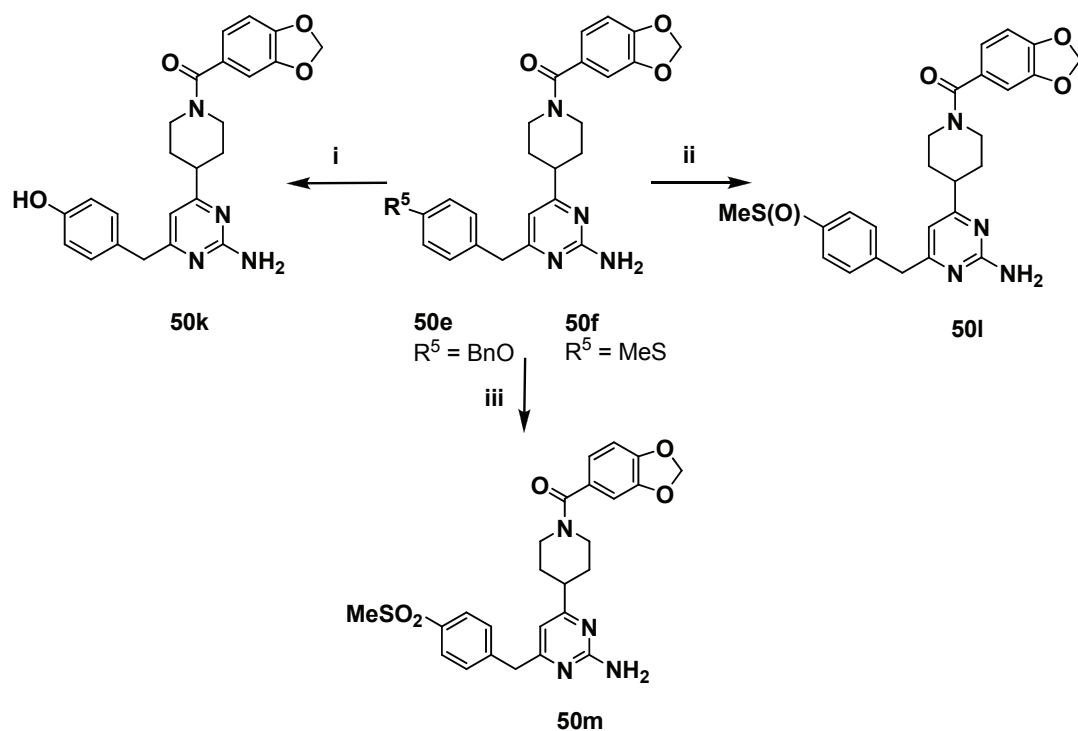
Scheme 4-4 Synthesis of other piperidinyl analogs 40-45. CONDITIONS: (i) urea, 150 °C, 25%; (ii) hydrazine, EtOH, rt., 77%; (iii) hydroxylamine hydrochloride, MeOH, 40% (for 42), 21% (for 43); (iv) MsCl, Et₃N, THF, 0 °C, 88% (for 44), 97% (for 45).



Scheme 4-5 Synthesis of piperidinylpyrimidines 47a-e. CONDITIONS: (i) R²COCl, NaH, THF, 0 °C; (ii) AcOH, 110 °C, or DMSO, water, 110 °C; (iii) guanidine carbonate, pyridine, 110 °C, 29-49% (3 steps).



Scheme 4-6 Synthesis of piperidinylpyrimidines **50a-j**. CONDITIONS: (i) R⁵-PhCH₂COCl, NaH, THF, 0 °C; (ii) AcOH, 110 °C, or DMSO, water, 110 °C; (iii) guanidine carbonate, pyridine, 110 °C, 18-55% (3 steps).



Scheme 4-7 Synthesis of piperidinylpyrimidines **50k-m**. CONDITIONS: (i) H₂, Pd/C, MeOH, 84%; (ii) H₂O₂, AcOH, 60 °C, 92%; (iii) H₂O₂, Na₂WO₄, AcOH, 50 °C, 82%.

4-4. ピペリジニルピリミジン誘導体の構造活性相関

まずピペリジノ基上の置換基変換により、ピペロニロイル構造が活性に与える効果を調べた。Table 4-3に示すように種々の2環性の複素環フェニル置換体について阻害活性を評価したところ、ホモピペロニロイル体 **28w**やメチレンジオキシ構造の位置の異なる化合物**37a**をはじめ、エチレンジオキシ(**37b**)、ベンゾフラン(**37c-e**)、ベンズオキサゾール(**37f, g**)、インドール(**37h**)、ベンゾチアジアゾール(**37i**)のいずれの化合物も5 μM で抗HIV-1 LTR活性を示さなかった。特に、ベンゾチアジアゾール構造(**37i**)は、電子的、立体的にメチレンジオキシフェニル構造の生物学的等価体とも言われており、実際、エンドセリンレセプター拮抗作用において同等の活性を示すことが報告されていたが¹⁴、本評価においては活性が認められず、興味深い結果であった。また、ベンジルアミン置換体**37j**でも活性が消失し、TNF- α の構造活性相関での議論と同様、非塩基性の領域であることも分った。以上の結果より、抗HIV-1 LTR活性発現に、ピペロニロイル構造はきわめて重要なものであることが確認できた。

そこで、ピペリジノ基上の置換基をピペロニロイル基に固定し、ピリミジン構造の重要性を調べた(Table 4-4)。ピリミジン2位の置換基変換では、クロライド **38**や無置換体 **39**でも活性は維持されたが、ヒドロキシル体 **40**では活性が消失した。ヒドロキシ基は、その互変異性体としてケト構造を優先することより、相手タンパクとの相互作用を考慮した場合、水素結合様式は上記ピリミジン体とは異なることが推定され、活性が消失したものと推察している。その他の5員環複素環である、ピラゾール(**41**)やイソオキサゾール(**42, 43**)も活性が減弱したことより、ピリミジン構造も活性発現には重要であることが分った。

ピリミジン5位あるいは6位の変換(Table 4-5)においては、ベンゾ縮環(**23k**)、アリール(**45a-c**)やフェネチル(**45d**)置換基でも活性が適度に維持された。単純な6位メチル体 **45e**や5位アリール体 **45f**では活性が減弱することより、それぞれ脂溶性と立体的制約を有する領域であることが示唆された。また、アリール置換体**45a-c**での置換基を比較すると、メトキシ置換体 **45a**の活性が強く、置換基の影響を受けやすいことが推察された。

そのため、最も活性の強いベンジル誘導体において、種々の置換基の影響を調べた(Table 4-6)。その結果、置換基の種類、位置や数は活性に影響を及ぼすことが分かり、評価化合物の中には3-メトキシ(**50b**)、4-メチルチオ(**50f**)、2,5-ジメトキシ(**50h**)や3,5-ジメトキシ(**50i**)では、無置換体**50a**と比較して約3~4倍の強い抑制活性を示すものが見出された。また、水酸基(**50k**)、スルフィニル(**50l**)やスルホニル(**50m**)などの極性基の導入により活性が減弱し、先の縮環部分の変換において考察したように、この領域が脂溶性嗜好部位であることを支持する結果が得られた。

Table 4-3. 抗HIV-1 LTR活性 —ピペリジノ基上の変換—

Compd	R ¹	inhibition of HIV-1 LTR (%) ^a	Compd	R ¹	inhibition of HIV-1 LTR (%) ^a
28q		86	37e		2
28w		16	37f		-7
37a		13	37g		-8
37b		7	37h		1
37c		-8	37i		4
37d		4	37j		-2

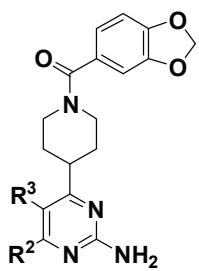
^a % inhibition at 5 μ M

Table 4-4. 抗HIV-1 LTR活性 —複素環部の変換—

Compd	HetAr	inhibition of HIV-1 LTR (%) ^a	Compd	HetAr	inhibition of HIV-1 LTR (%) ^a
28q		86 (IC ₅₀ :0.6 μ M)	41		35
38		85 (IC ₅₀ :0.7 μ M)	42		35
39		87 (IC ₅₀ :0.5 μ M)	43		36
40		-14			

^a % inhibition at 5 μ M

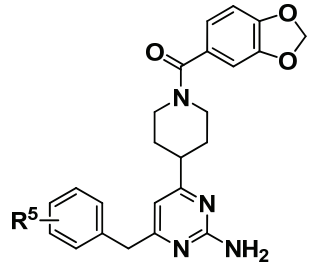
Table 4-5 抗HIV-1 LTR活性 —縮環部の変換—



Compd	R ²	R ³	inhibition of HIV-1 LTR IC ₅₀ (μM)
28q	4-MeOPhCH ₂	H	0.6
23k	-C=C-C=C-		2.6
45a	Ph	H	>5(47%) ^a
45b	4-ClPh	H	>5(42%) ^a
45c	4-MeOPh	H	1.9
45d	Ph(CH ₂) ₂	H	2.1
45e	Me	H	>5(10%) ^a
45f	Me	4-MeOPh	>5(31%) ^a

^a % inhibition at 5 μM

Table 4-6 抗 HIV-1 LTR 活性 —ベンジル上の置換基変換—



Compd	R ⁵	inhibition of HIV-1 LTR IC ₅₀ (μM)	Compd	R ⁵	inhibition of HIV-1 LTR IC ₅₀ (μM)
28q	4-MeO	0.6	50g	3,4-(MeO) ₂	0.6
50a	H	0.8	50h	2,5-(MeO) ₂	0.2
50b	3-MeO	0.3	50i	3,5-(MeO) ₂	0.3
50c	4-Cl	1.3	50j	3,4-(OCH ₂ O)	0.7
50d	4-Br	0.7	50k	4-HO	>5 (36%) ^a
50e	4-BnO	1.2	50l	4-MeS(O)	>5 (27%) ^a
50f	4-MeS	0.2	50m	4-MeSO ₂	>5 (37%) ^a

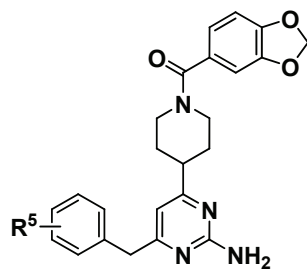
^a % inhibition at 5 μM

4-5. Tat刺激による抗HIV-1LTR活性とTNF- α 産生阻害活性の評価

TNF- α や PMA などの刺激で宿主由来の転写因子(NF- κ B 等)が活性化され HIV RNA への転写が開始されることから、これまで活性化の刺激として PMA を用いて評価してきた。さらに異なる刺激に対する作用についても興味を持たれたため、新たに Tat(transactivator of transcription)による転写活性化作用について誘導体のポテンシャルを評価した。Tat タンパクはウイルス RNA の 5'領域に形成される TAR(trans-acting responsive element)と呼ばれる高次構造に結合し、RNA の転写を活性化するウイルス由来の制御タンパクである(Fig. 4-3A)。興味深いことに Tat の作用が加わることでウイルス RNA への転写が飛躍的(~数千倍)に増幅されることが知られており、Tat に対する阻害も抗 HIV 剤のターゲットとして注目されている^{8e-g,15}。その結果、Table 4-7 に示すように評価した誘導体は、Tat による遺伝子転写活性化も阻害することが見出され、その作用は PMA 刺激による阻害活性の強さとほぼ相関する傾向が認められた。NF- κ B を介する阻害活性をもつ PTX(転写抑制活性:IC₅₀ 0.5-1 mM)が Tat 阻害剤との併用により、HIV 増殖活性が相乗的に抑制されたこと^{15e}、また、フェニルクマリン誘導体 K37 (Fig. 4-4, 転写抑制活性: IC₅₀ ~25 μ M)の HIV 増殖抑制活性が NF- κ B に対する効果に加え Tat の阻害活性の強さに相関しているという報告もある^{8e}。今回新たに評価した化合物の中には 50f、50h、50i のように IC₅₀ 値で 1 μ M を切る化合物も見出されており、初期の化合物 28q よりも強い阻害活性を示したことから、これら誘導体にはより強力な HIV 増殖抑制活性が期待できると考えられる。

また、ピペリジニルピリミジン誘導体の抗HIV-1 LTR活性の構造活性相関についてFig. 4-7にまとめた。種々の変換情報より、(1)ピペリジノ基上の置換基(R¹)として非塩基性とともに、ピペロニロイル(3,4-メチレンジオキシベンゾイル)構造に限定された特異的領域であること、(2)中心部分のピリミジン環構造の重要性、(3)脂溶性置換基の効果(R²)と立体的制約(R³)、などが明らかとなった。特にピペロニロイル構造の特異的な効果を除けば、これらの知見のほとんどは前章のTNF- α 産生阻害活性の構造活性相関と共通しており、非常に興味深い。既に述べたようにTNF- α 産生阻害活性と抗HIV1-LTR活性の間に明確な相関は認められなかったが、両者の構造活性相関情報から抗HIV1-LTR活性を示す化合物は、TNF- α 産生阻害活性も有することは容易に推察できる。実際、Table 4-7に示したように、ヒト抹消血単核球(PBMC)を用いた試験において、果たしてこれら誘導体にLPS刺激によるTNF- α 産生阻害活性を確認することができた。TNF- α はHIVウイルスの増殖活性化とAIDSにおける病態の進展、悪液質や痴呆にも関係するともいわれていることから、ピペリジニルピリミジン誘導体は直接的なHIV増殖抑制作用とともにTNF- α 産生阻害作用を介する間接的な効果が期待できるユニークな化合物であると考えられる。

Table 4-7 Tat 刺激による抗 HIV-1 LTR 活性と TNF- α 産生阻害活性



Compd	R ⁵	HIV-1 LTR(PMA) IC ₅₀ (μ M)	HIV-1 LTR(Tat) IC ₅₀ (μ M)	TNF- α IC ₅₀ (μ M) ^b
28q	4-MeO	0.6	4.0	1.9
50a	H	0.8	n.t.	3.2
50b	3-MeO	0.3	n.t.	2.7
50c	4-Cl	1.3	7.1	13
50e	4-BnO	1.2	2.1	n.t.
50f	4-MeS	0.2	<1 (57%) ^a	n.t.
50g	3,4-(MeO) ₂	0.6	n.t.	3.2
50h	2,5-(MeO) ₂	0.2	<1 (58%) ^a	7.7
50i	3,5-(MeO) ₂	0.3	<1 (56%) ^a	3.3
50j	3,4-(OCH ₂ O)	0.7	n.t.	3.3

^a values within parenthesis indicate % inhibition at 1 μ M

^b inhibition in human PBMC

n.t.: not tested.

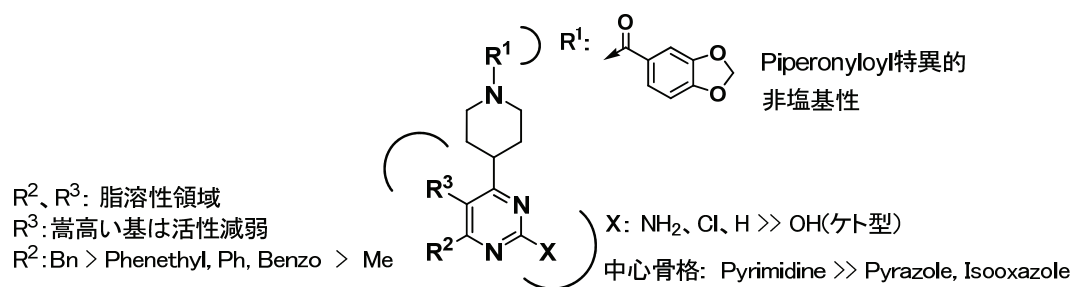


Fig. 4-7. ピペリジニルピリミジンの抗 HIV-1 LTR に対する構造活性相関

4-6. 小括

TNF- α とHIV-1遺伝子の転写調節領域の共通性から、TNF- α 産生阻害剤の抗HIV活性を期待して、これまでに見出したパビン、ピペリジニルピリミジン誘導体を評価した。両者の活性に相関は認められなかったが、ピペリジニルピリミジン誘導体で一部の化合物 **28q** に強いHIV-1 LTR転写活性化抑制作用とウイルス増殖抑制作用を確認した。詳細な構造活性相関から、ピペロニロイル構造の重要性が明らかとなり、また、それ以外はTNF- α 産生阻害活性の構造活性相関と極めて共通していた。そのため抗HIV-1 LTR活性を示す誘導体はTNF- α 産生阻害活性も併せて有することが分かった。さらにこれら誘導体は宿主由来の活性化因子による転写活性化だけでなく、ウイルス由来の制御因子であるTatタンパクによる作用も阻害することから、より強力な抗HIV活性を示すと考えられた。すなわち、ピペリジニルピリミジン誘導体はHIV遺伝子活性化への直接的な作用に加え、TNF- α 産生によってもたらされる、ウイルスの増殖、悪液質や痴呆になどの間接的な抑制作用も併せ持つ抗HIV療法の新しいアプローチとして期待できるものと考えられる。

一方、ピペロニロイル基の抗HIV活性については、現段階でその特異性を説明できる明確な理由を見出せていない。既に述べたようにメチレンジオキシフェニル構造の生物学的等価体として報告されたベンゾチアジアゾール¹³を始め、その他の構造的に等価と思われる誘導体においても抑制効果が認められなかった。文献上では、エンドセリン拮抗薬のようにメチレンジオキシ構造を特徴とする活性化化合物の報告も多いが、実際には他の類似の置換基への置き換えが可能であり、またその効果について詳しく述べられていないことが多い¹⁶。また、ピペロニロイル部分の置換基はアミド構造ではあるが回転の自由度は残されていると考えられるため、今後は新たな置換基の導入や環状構造での固定化により、活性コンホメーションを探りながらその特異的な効果を探っていきたいと考えている。

一方で、その作用メカニズムについても今後明らかにしていく必要がある。研究開始当初は、転写調節領域の相同性と、既に報告されていたTNF- α 産生阻害のPentoxifylline (PTX)に関する知見より、TNF- α とHIVに共通の細胞内伝達経路(プロテインキナーゼ等)を介したNF- κ Bなどの転写制御因子の抑制ではないかと考えていた^{11c}。しかし、この機序ではピペリジニルピリミジンのTNF- α とHIV抑制作用に対する非相関性を説明することができず、改めて機序について考察する必要がある。興味深いことに、本阻害剤がウイルス由来の制御因子Tatによる転写活性化も同じように阻害したことから、その作用は核内以降でのイベントに影響を及ぼしている可能性が示唆された。mRNAへの転写が開始されるためには、RNAポリメラーゼ(RNA pol II)に基本転写因子や転写制御因子に加え転写調節因子(コアクティベータ)も含めた複合体形成が必要である。そのため現在のところ、ピペリジニルピリミジン化合物がNF- κ BとTatに共通の未知なるコアクティベータを介した複合体形成を阻害することで、宿主・ウイルス由来の異なる制御因子の作用を抑制しているのではないかと推察している(Fig. 4-9)^{7c, 17}。また、TNF- α 産生阻害作用に関してもHIVとは異なるが、相同性の高いコアクティベータを介した作用発現の可能

性も考えられ、それにより、きわめて類似性の高い構造活性相関を示したことも説明できるのではないかと考えられる。作用メカニズムの詳細な検討については、遺伝チップを用いた遺伝子発現変動解析も一つの手法であると思われる。また、有機合成の立場からはアフィニティー樹脂を用いた手法¹⁸などを通してターゲット分子の探索を行い明らかにしていきたい。

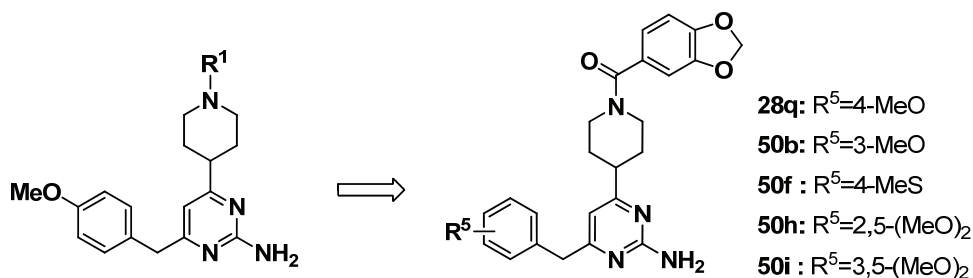


Fig. 4-8. ピペリジニルピリミジンの抗HIV-1 LTRの最適化

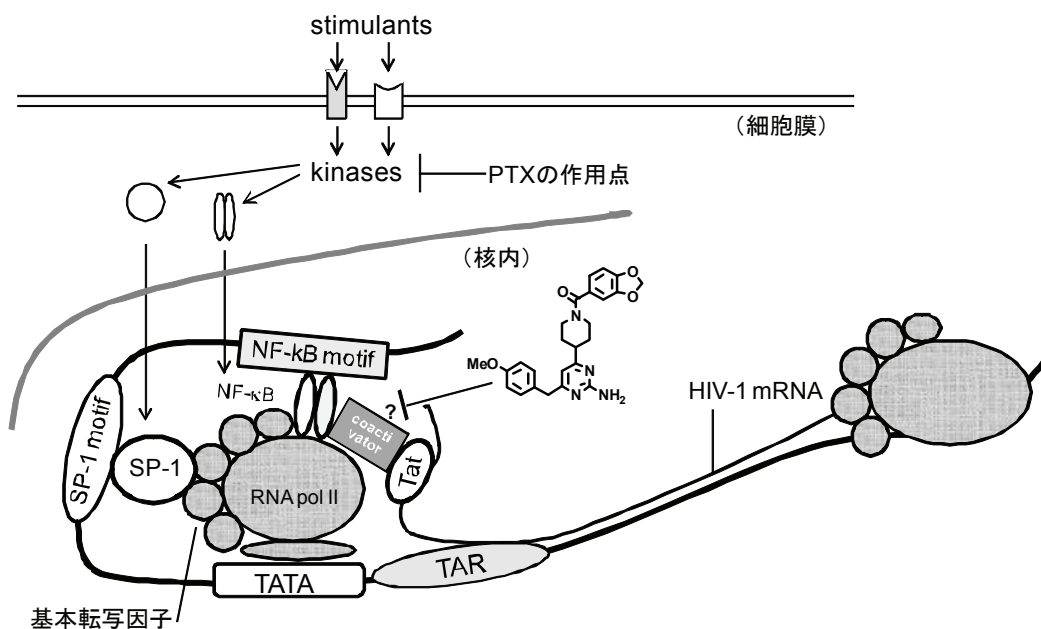


Fig. 4-9. 作用メカニズムの推定

4-7. 実験の部

4-7-1. Chemistry

4-[1-(1,3-Benzodioxol-4-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37a)

窒素雰囲気中、化合物 **27** (400 mg, 1.34 mmol)、2,3-methylenedioxybenzoic acid (245 mg, 1.47 mmol) と HOBt (199 mg, 1.47 mmol) の CHCl₃ (50 ml) 溶液に、EDC (283 mg, 1.47 mmol) を添加して室温において 3 時間攪拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 50:1, v/v) で精製し、*i*PrOH から結晶化させ化合物 **37a** (488 mg, 82%) を白色個体として得た。

Mp 167-167.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, t, J = 5.9 Hz), 6.91-6.85 (5H, m), 6.26 (1H, s), 5.99 (2H, s), 4.95 (2H, s), 4.83-4.81 (1H, m), 3.83 (2H, s), 3.81-3.76 (1H, m), 3.12 (1H, t, J = 12.4 Hz), 2.82 (1H, t, J = 12.1 Hz), 2.68-2.61 (1H, m), 1.95-1.68 (4H, m).; MS (ESI, positive) m/z 447 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₆N₄O₄: C, 67.25; H, 5.87; N, 12.55. Found: C, 67.10; H, 5.88; N, 12.58.

化合物 **37a** の合成と同様にして、ピペリジン体 **27** と対応するカルボン酸から化合物 **37b-37i** を合成した。

4-[1-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37b)

568 mg (92%, a white solid from *i*PrOH): mp 187-188 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.96 (1H, d, J = 2.0 Hz), 6.92 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz), 6.87-6.85 (3H, m), 6.26 (1H, s), 4.93 (2H, s), 4.80-4.67 (1H, br m), 4.27 (4H, s), 4.08-3.91 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.03-2.85 (2H, br m), 2.68-2.60 (1H, m), 1.86-1.67 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 461 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₈N₄O₄: C, 67.81; H, 6.13; N, 12.17. Found: C, 67.59; H, 6.14; N, 12.04.

4-[1-(2,3-Dihydro-1-benzofuran-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37c)

581 mg (98%, a white solid from *i*PrOH): mp 162-264 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (1H, s), 7.20-7.15 (3H, m), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.77 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.27 (1H, s), 4.94 (2H, s), 4.83-4.67 (1H, br m), 4.61 (2H, t, J = 8.7 Hz), 4.29-3.93 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.23 (2H, t, J = 8.7 Hz), 3.02-2.86 (2H, br m), 2.68-2.61 (1H, m), 1.87-1.67 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 445 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₈N₄O₃: C,

70.25; H, 6.35; N, 12.60. Found: C, 70.47; H, 6.38; N, 12.63.

4-[1-(1-Benzofuran-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37d)

459 mg (77%, a white solid from EtOH): mp 188-188.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69-7.67 (2H, m), 7.52 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.37 (1H, dd, J = 8.3, 1.5 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.80 (1H, dd, J = 2.2, 1.0 Hz), 6.27 (1H, s), 4.96 (2H, s), 4.84-4.78 (1H, br m), 3.96-3.88 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.05-2.88 (2H, br m), 2.70-2.62 (1H, m), 1.88-1.72 (4H, br m); MS (ESI, positive) m/z 443 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₆N₄O₃: C, 70.57; H, 5.92; N, 12.66. Found: C, 70.50; H, 5.95; N, 12.69.

4-[1-(1-Benzofuran-6-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37e)

520 mg (88 %, a white solid from MeOH): mp 186-187 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.70 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.63-7.59 (2H, m), 7.31 (1H, dd, J = 7.9, 1.1 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.80 (1H, dd, J = 2.2, 1.1 Hz), 6.28 (1H, s), 4.94 (2H, s), 4.85-4.76 (1H, br m), 4.00-3.91 (1H, br m), 3.84 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.05-2.92 (2H, br m), 2.69-2.63 (1H, m), 1.88-1.73 (4H, br m); MS (ESI, positive) m/z 443 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₆N₄O₃: C, 70.57; H, 5.92; N, 12.66. Found: C, 70.36; H, 5.95; N, 12.69.

4-[1-(1,3-Benzoxazol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37f)

524 mg (88%, a white solid from MeOH): mp 178-179 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (1H, s), 7.86 (1H, d, J = 1.5 Hz), 7.63 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.50 (1H, dd, J = 8.5, 1.5 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.27 (1H, s), 4.96 (2H, s), 4.90-4.77 (1H, br m), 3.92-3.86 (1H, br m), 3.84 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.11-2.88 (2H, br m), 2.71-2.63 (1H, m), 1.94-1.72 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 444 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₅N₅O₃: C, 67.70; H, 5.68; N, 15.79. Found: C, 67.42; H, 5.70; N, 15.85.

4-[1-(1,3-Benzoxazol-6-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37g)

492 mg (83%, a white solid from MeOH): mp 185-186 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (1H, s), 7.82 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.69 (1H, d, J = 1.2 Hz), 7.44 (1H, dd, J = 8.0, 1.2 Hz), 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.27 (1H, s), 4.99 (2H, s), 4.86-4.76 (1H, br m), 3.92-3.86 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.09-2.89 (2H, m), 2.70-2.63 (1H, m), 1.95-1.79 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 444 (M+1); Anal. calcd for

C₂₅H₂₅N₅O₃·0.25H₂O: C, 67.02; H, 5.74; N, 15.63. Found: C, 67.22; H, 5.72; N, 15.52.

4-[1-(1H-Indol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37h)

550 mg (93%, a white solid from MeOH-H₂O): mp 146-147 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (1H, br s), 7.74 (1H, s), 7.40 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.29-7.26 (2H, m), 7.17 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.60-6.58 (1H, m), 6.28 (1H, s), 4.95 (2H, s), 4.85-4.69 (1H, br m), 4.19-3.99 (1H, br m), 3.84 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.06-2.88 (2H, br m), 2.70-2.62 (1H, m), 1.85-1.71 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 442 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₇N₅O₂: C, 70.73; H, 6.16; N, 15.86. Found: C, 70.49; H, 6.21; N, 15.79.

4-[1-(2,1,3-Benzothiadiazol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37i)

518 mg (84%, a white solid from MeOH): mp 164-165 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.08-8.05 (2H, m), 7.65 (1H, dd, J = 8.8, 1.7 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.27 (1H, s), 4.95 (2H, s), 4.89-4.81 (1H, br m), 3.92-3.86 (1H, br m), 3.84 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.21-3.09 (1H, br m), 2.97-2.85 (1H, br m), 2.72-2.65 (1H, m), 1.98-1.74 (4H, br m); MS (ESI, positive) m/z 461 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₄N₆O₂S: C, 62.59; H, 5.25; N, 18.25; S, 6.96. Found: C, 62.48; H, 5.20; N, 18.32, S, 6.91.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (37j)

化合物 **27** (700 mg, 2.35 mmol)、piperonal (706 mg, 4.70 mmol) と 4N 塩酸 (0.6 ml) の MeOH (70 ml) 溶液に、NaBH₃CN (74 mg, 1.18 mmol) を添加して室温において一晩攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え CHCl₃ で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 30:1, v/v) で精製し、*i*PrOH から結晶化させ化合物 **37j** (400 mg, 39%) を白色個体として得た。

Mp 126-127 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.15 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.86-6.83 (3H, m), 6.74 (2H, s), 6.28 (1H, s), 5.94 (2H, s), 4.91 (2H, s), 3.82 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.40 (2H, s), 2.96-2.93 (2H, m), 2.41-2.33 (1H, m), 2.02-1.95 (2H, m), 1.81-1.67 (4H, m).; MS (ESI, positive) m/z 433 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₈N₄O₃: C, 69.42; H, 6.53; N, 12.95. Found: C, 69.31; H, 6.57; N, 13.20.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-2-chloro-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidine (38)

窒素雰囲気下、化合物 **28q** (4.46 g, 10 mmol)、SbCl₃ (3.19 g, 14 mmol) と 1,2-ジクロロエタン (250 ml) の混合物に *t*BuONO (6.2 ml, 52 mmol) を加え 60 °C において 2 時間攪拌した。反応混合物に sat.NaHCO₃ 水溶液を加えて攪拌した後、不溶物をろ別して除き、CHCl₃ で抽出した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:EtOAc, 9:1, v/v) で精製して **38** (1.17 g, 25%) を泡状物質として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.17 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.95-6.87 (4H, m), 6.83-6.81 (2H, m), 6.00 (2H, s), 4.82-4.47 (1H, br m), 4.33-4.04 (1H, br m), 4.02 (2H, s), 3.81 (3H, s), 3.07-2.90 (2H, br m), 2.89-2.80 (1H, m), 1.93-1.85 (2H, m), 1.77-1.68 (2H, m).; MS (ESI, positive) m/z 466 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₄ClN₃O₄·0.2H₂O·0.2CHCl₃: C, 61.34; H, 5.03; Cl, 11.50; N, 8.52. Found: C, 61.47; H, 5.02; Cl, 11.13; N, 8.52.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidine (39)

化合物 **38** (200 mg, 0.43 mmol)、酢酸ナトリウム (53 mg, 0.65 mmol)、10% Pd/C (67 mg) と MeOH (1.5 ml) の混合物を室温において 8 時間水素添加した (1 atm)。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮した後、残渣をカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 19:1, v/v) で精製し、Hexane-Et₂O から結晶化させ **38** (137 mg, 74%) を白色固体として得た。

Mp 101-102 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.05 (1H, s), 7.18 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.96-6.92 (3H, m), 6.88 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.00 (2H, s), 4.87-4.57 (1H, m), 4.44-4.13 (1H, m), 4.04 (2H, s), 3.81 (3H, s), 3.10-2.92 (2H, br m), 2.89-2.81 (1H, m), 1.96-1.88 (2H, m), 1.81-1.71 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 432 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₅N₃O₄: C, 69.59; H, 5.84; N, 9.74. Found: C, 69.33; H, 5.79; N, 9.75.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxybenzyl)pyrimidin-2(1H)-one (40).

化合物 **36** (3 g, 7.08 mmol)、urea (8.58 g, 0.142 mol) の混合物を 150 °C において 8 時間激しく攪拌した。反応混合物に水を加えて CHCl₃ で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH, 50:1, v/v) で精製し、MeOH から結晶化させ **40** (795 mg, 25%) を白色固体として得た。

Mp 197-198 °C (dec.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.48 (1H, br s), 7.22 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.94-6.92 (2H, m), 6.88 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.81 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.02 (1H, s), 5.99 (2H, s), 4.85-4.53 (1H, br m), 4.19-3.94 (1H, br m), 3.91 (2H, s), 3.81 (3H, s), 3.07-2.85 (2H, br m), 2.80-2.70 (1H, m), 1.90-1.69 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 448

(M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₅N₃O₅: C, 67.10; H, 5.63; N, 9.39. Found: C, 66.90; H, 5.65; N, 9.47.

1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)-4-[5-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-3-yl] piperidine (41).

化合物 **36** (1.0 g, 2.26 mmol)、ヒドラジン-水和水物 (473 mg, 9.44 mmol) と MeOH (35 ml) の混合物を室温において 2 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、水を加えて EtOAc で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 50:1, v/v) で精製し、化合物 **41** (763 mg, 77%) を泡状物質として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.14 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.94-6.90 (2H, m), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.81 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.00 (2H, s), 5.87 (1H, s), 4.77-4.50 (1H, br m), 4.20-3.93 (1H, br m), 3.92 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.12-2.96 (2H, br m), 2.93-2.86 (1H, m), 2.05-1.92 (2H, m), 1.74-1.60 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 420 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₅N₃O₄·0.9H₂O: C, 66.16; H, 6.20; N, 9.64. Found: C, 66.08; H, 5.81; N, 9.62.

5-[1-(1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-3-(4-methoxybenzyl)-4,5-dihydro isoxazol-5-ol(42) and 3-[1-(1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-5-(4-methoxybenzyl)-4,5-dihydroisoxazol-5-ol (43)

化合物 **36** (1.0 g, 2.26 mmol)、塩酸ヒドロキシルアミン (329 mg, 4.72 mmol)、Et-*i*Pr₂N (610 mg, 4.72 mmol) と DMF (16 ml) の混合物を室温において 5 時間攪拌した。反応混合物に水を加えて EtOAc で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 1:2, v/v) で精製し、**42** (less polar, 414 mg, 40%) を泡状物質として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.13 (2H, d, J = 8.5 Hz, ArH), 6.90-6.86 (4H, m, ArH), 6.81 (1H, d, J = 7.8 Hz, ArH), 5.99 (2H, s, OCH₂O), 4.81-4.53 (1H, br m, NCH_AH_BCH₂CH), 4.23-3.87 (1H, br m, NCH_{A'}H_{B'}CH₂CH), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.67 (1H, d, J = 15.1 Hz, CH_AH_BPhOCH₃), 3.62 (1H, d, J = 15.1 Hz, CH_{A'}H_{B'}PhOCH₃), 3.07-2.72 (4H, m, 1H is D₂O exchangeable, OH, NCH_AH_BCH₂CH, NCH_{A'}H_{B'}CH₂CH, N=CCH_AH_B), 2.63 (1H, d, J = 17.8 Hz, N=CCH_AH_B), 2.00-1.72 (3H, m, NCH₂CH₂CH, NCH₂CH_AH_BCH), 1.37-1.25 (2H, m, NCH₂CH_AH_BCH); MS (ESI, negative) m/z 437 (M-1).

また異性体 **43** (polar, 217 mg, 21%) を泡状物質として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (2H, d, J = 8.5 Hz, ArH), 6.91-6.80 (5H, m, ArH), 5.99 (2H, s, OCH₂O), 4.62-4.23 (1H, br m, NCH_AH_BCH₂CH), 4.17-3.85 (1H, br m, NCH_AH_BCH₂CH), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.15 (2H, s, CH₂PhOCH₃), 3.04-2.93 (3H, m, 1H is D₂O exchangeable, OH, NCH_AH_BCH₂CH, NCH_{A'}H_{B'}CH₂CH), 2.89 (1H, d, J = 17.6 Hz,

N=CCH_AH_B), 2.81 (1H, d, J = 17.6 Hz, N=CCH_AH_B), 2.67-2.60 (1H, m, NCH₂CH₂CH), 1.89-1.83 (2H, m, NCH₂CH_AH_BCH), 1.65-1.52 (2H, m, NCH₂CH_AH_BCH); MS (ESI, negative) m/z 437 (M-1).

1-(1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl)-4-[3-(4-methoxybenzyl)isoxazol-5-yl]piperidine (44)

化合物 **42** (less polar, 200 mg, 0.46 mmol) と Et₃N (0.19 ml, 1.38 mmol) の CH₂Cl₂ (5 ml) 溶液に氷冷下、MsCl (39 μl, 0.64 mmol) を滴下し 2 時間攪拌した。反応混合物に水を加えて EtOAc で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 1:1, v/v) で精製し、Et₂O から結晶化させ化合物 **44** (168 mg, 88%) を白色固体として得た。Mp 121-122 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz, ArH), 6.92-6.81 (5H, m, ArH), 6.00 (2H, s, OCH₂O), 5.74 (1H, s, C=CH), 4.68-4.33 (1H, br m, NCH_AH_BCH₂CH), 4.19-3.95 (1H, br m, NCH_AH_BCH₂CH), 3.91 (2H, s, CH₂PhOCH₃), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.07-2.96 (3H, m, NCH₂CH₂CH, NCH_AH_BCH₂CH, NCH_AH_BCH₂CH), 2.07-2.01 (2H, m, NCH₂CH_AH_BCH), 1.71-1.62 (2H, m, NCH₂CH_AH_BCH); MS (ESI, positive) m/z 421 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₄N₂O₅: C, 68.56; H, 5.75; N, 6.66. Found: C, 68.52; H, 5.74; N, 6.75.

1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)-4-[5-(4-methoxybenzyl)isoxazol-3-yl]piperidine (45)

化合物 **43** (polar, 150 mg, 0.34 mmol) を用いて化合物 **44** の合成と同様にして反応し、Et₂O から結晶化させて化合物 **45** (140 mg, 97%) を白色固体として得た。Mp 96-96.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.17 (2H, d, J = 8.8 Hz, ArH), 6.93-6.86 (4H, m, ArH), 6.81 (1H, d, J = 7.8 Hz, ArH), 6.00 (2H, s, OCH₂O), 5.74 (1H, s, C=CH), 4.70-4.40 (1H, br m, NCH_AH_BCH₂CH), 4.31-4.01 (1H, br m, NCH_AH_BCH₂CH), 3.98 (2H, s, CH₂PhOCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.09-2.93, (3H, m, NCH₂CH₂CH, NCH_AH_BCH₂CH, NCH_AH_BCH₂CH), 1.99-1.92 (2H, m, NCH₂CH_AH_BCH), 1.73-1.63 (2H, m, NCH₂CH_AH_BCH); MS (ESI, positive) m/z 421 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₄N₂O₅: C, 68.56; H, 5.75; N, 6.66. Found: C, 68.47; H, 5.73; N, 6.71.

5-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-6-piperidin-4-ylpyrimidin-2-amine (46)

化合物 **26e** (1.9 g, 4.7 mmol)、EtOH (17 ml)、6N NaOH 水溶液 (17 ml) の混合物を窒素雰囲気下、加熱還流した。9 時間後、反応溶液を減圧濃縮し EtOH を除き、残渣を CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄ で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を EtOH から結晶化し、化合物 **46** (1.24 g, 88%) を白色個体として得た。

Mp 191-192 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.03 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.96 (2H, d, J =

8.8 Hz), 4.89 (2H, s), 3.87 (3H, s), 3.04 (2H, dt, J = 12.6, 2.7 Hz), 2.56-2.49 (1H, m), 2.43 (2H, dt, J = 12.6, 2.7 Hz), 2.07 (3H, s), 1.80-1.69 (2H, m), 1.53-1.48 (2H, m).; MS (ESI, positive) m/z 299 (M+1); Anal. calcd for C₁₇H₂₂N₄O · 0.1EtOH: C, 68.18; H, 7.52; N, 18.49. Found: C, 67.92; H, 7.38; N, 18.79.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-5-(4-methoxyphenyl)-6-methylpyrimidin-2-amine (47f)

窒素雰囲気中、化合物 **46** (200 mg, 0.67 mmol) と Et₃N (0.1 ml, 0.70 mmol) の CHCl₃ (100 ml) 溶液に氷冷下、piperonyloyl chloride (129 mg, 0.70 mmol) を滴下した。1 時間後、反応混合物を水、飽和食塩水で順次洗浄し有機層を Na₂SO₄ で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 50:1, v/v) で精製し、EtOH から結晶化させ化合物 **47f** (289 mg, 97%) を白色個体として得た。

Mp 220-222 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.03 (2H, d, J = 7.8 Hz), 6.96 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.93-6.90 (2H, m), 6.80 (1H, d, J = 7.8 Hz), 5.99 (2H, s), 4.91 (2H, s), 4.78-4.49 (1H, br m), 3.98-3.73 (4H, m), 2.82-2.51 (3H, m), 2.08 (3H, s), 1.91-1.82 (2H, m), 1.62-1.50 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 447 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₆N₄O₄ · 0.25H₂O: C, 66.58; H, 5.92; N, 12.42. Found: C, 66.68; H, 5.87; N, 12.72.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-bromobenzyl)pyrimidin-2-amine (50d).

化合物 **35** (7g, 20 mmol) の THF (35 ml) 溶液に窒素雰囲気下、氷浴中において水素化ナトリウム (60% oil dispersion, 1.68 g, 42 mmol) を反応温度が 5 °C を越えないように数回に分けて添加した。さらに 30 分攪拌の後、この混合物に、4-bromophenylacetyl chloride (5.18 g, 22 mmol) の THF (15 ml) 溶液を 5 °C において 1 時間かけて滴下した。さらに 30 分攪拌の後、反応混合物を 4N-HCl 水溶液で酸性とし、水を加えて EtOAc で抽出した。有機層を水で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥、溶媒を減圧留去し、ジケトエステル体を未精製のオイルとして得た。このジケトエステルは精製することなく次の反応に用いた。ジケトエステル、水 (1.6 ml) と DMSO (18 ml) の混合物を 110 °C において 7.5 時間加熱した。反応混合物を水に注ぎ、EtOAc で抽出、有機層を水で洗浄した後、MgSO₄ 乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 1:1, v/v) で精製し、化合物 **49d** (5.54 g, 58.2%) を油状物として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 15.38 (1H, s, enol), 7.46 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.12 (2H, d, J = 8.2 Hz), 6.92-6.87 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.00 (2H, s), 5.44 (1H, s), 4.73-4.42 (1H, br m), 4.17-3.91 (1H, br m), 3.57 (2H, s), 3.01-2.83 (2H, br m), 2.46-2.38 (1H, m), 1.89-1.77 (2H, m), 1.71-1.61 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 472 (M+1).

化合物 **49d** (5.3 g, 11 mmol)、グアニジン炭酸塩 (2.02 g, 11 mmol) とピリジン (25

ml)の混合物を 110 °C において 8 時間加熱攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え CHCl₃ で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥、溶媒を減圧留去した。残渣に EtOH を加え結晶して化合物 **50d** (3.88 g, 69.8%) を白色個体として得た。

Mp 162-162.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.44 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.13 (2H, d, J = 8.3 Hz), 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.26 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.95 (2H, s), 4.80-4.58 (1H, br m), 4.10-3.89 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.07-2.81 (2H, br m), 2.70-2.62 (1H, m), 1.87-1.67 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 495 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₃BrN₄O₃: C, 58.19; H, 4.68; Br, 16.13; N, 11.31. Found: C, 58.19; H, 4.71; Br, 16.07; N, 11.23.

化合物 **50d** の合成と同様にして、β-ケトエステル体 **35** と対応するカルボン酸クロライドから化合物 **47a-e**、**50a-c**、**50e**、**50f** と **50i** を合成した。

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-phenylpyrimidin-2-amine (47a)

272 mg (29% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH-Et₂O): mp 201-202 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00-7.96 (2H, m), 7.49-7.46 (3H, m), 6.98-6.92 (3H, m), 6.84 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.01 (2H, s), 5.08 (2H, s), 4.88-4.67 (1H, br m), 4.20-3.93 (1H, br m), 3.09-2.92 (2H, br m), 2.85-2.77 (1H, m), 2.00-1.80 (4H, m).; MS (ESI, positive) m/z 403 (M+1); Anal. calcd for C₂₃H₂₂N₄O₃·0.25H₂O: C, 67.88; H, 5.57; N, 13.77. Found: C, 67.89; H, 5.63; N, 13.78.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-chlorophenyl)pyrimidin-2-amine (47b)

490 mg (49% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH-Et₂O): mp 103-106 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.44 (2H, d, J = 8.3 Hz), 6.99-6.93 (2H, m), 6.89 (1H, s), 6.84 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.01 (2H, s), 5.04 (2H, s), 4.86-4.67 (1H, br m), 4.18-3.94 (1H, br m), 3.09-2.91 (2H, br m), 2.85-2.77 (1H, m), 2.01-1.75 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 437 (M+1); Anal. calcd for C₂₃H₂₁ClN₄O₃: C, 63.23; H, 4.84; Cl, 8.11; N, 12.82. Found: C, 63.18; H, 4.91; Cl, 8.05; N, 12.84.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-2-amine (47c)

450 mg (45% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH-Et₂O): mp 103-106 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.99-6.94 (4H, m), 6.87 (1H, s), 6.83 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.00 (2H, s), 5.01 (2H, s), 4.85-4.68 (1H, br m), 4.15-3.98 (1H, br m), 3.87 (3H, s), 3.08-2.95 (2H, br m), 2.82-2.75 (1H, m), 1.99-1.78 (4H, m).; MS (ESI, positive) m/z 433 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₄N₄O₄: C, 66.65; H, 5.59; N, 12.96.

Found: C, 66.67; H, 5.70; N, 12.93.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(2-phenylethyl)pyrimidin-2-amine (47d)

298 mg (30% for 3 steps from **35**, a white solid from EtOH): mp 158-158.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.27 (2H, m), 7.22-7.17 (3H, m), 6.96-6.92 (2H, m), 6.83 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.27 (1H, s), 6.01 (2H, s), 4.95 (2H, s), 4.80-4.64 (1H, br m), 4.09-3.92 (1H, br m), 3.02-2.93 (4H, m), 2.85 (2H, t, J = 8.2 Hz), 2.71-2.63 (1H, m), 1.89-1.69 (4H, br m); MS (ESI, positive) m/z 431 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₆N₄O₃: C, 69.75; H, 6.09; N, 13.01. Found: C, 69.57; H, 6.12; N, 13.05.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-methylpyrimidin-2-amine (47e)

347 mg (41% for 3 steps from **35**, a white solid from EtOH): mp 171-173 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.96-6.92 (2H, m), 6.83 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.38 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.90 (2H, s), 4.80-4.64 (1H, br m), 4.23-3.88 (1H, br m), 3.07-2.88 (2H, br m), 2.73-2.65 (1H, m), 2.33 (3H, s), 1.93-1.69 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 341 (M+1); Anal. calcd for C₁₈H₂₀N₄O₃: C, 63.52; H, 5.92; N, 16.46. Found: C, 63.59; H, 5.97; N, 16.62.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-benzylpyrimidin-2-amine (50a)

302 mg (39% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH): mp 199-200 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34-7.30 (2H, m), 7.26-7.23 (3H, m), 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.28 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.95 (2H, s), 4.80-4.58 (1H, br m), 4.19-3.95 (1H, br m), 3.89 (2H, s), 3.06-2.82 (2H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.87-1.67 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 417 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₄N₄O₃: C, 69.21; H, 5.81; N, 13.45. Found: C, 69.10; H, 5.77; N, 13.56.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(3-methoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (50b)

239 mg (23% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH-Et₂O): mp 167-168 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.94-6.91 (2H, m), 6.85-6.79 (4H, m), 6.29 (1H, s), 5.99 (2H, s), 4.96 (2H, s), 4.83-4.59 (1H, br m), 4.14-3.91 (1H, br m), 3.86 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.05-2.84 (2H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.90-1.79 (2H, m), 1.75-1.69 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 447 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₆N₄O₄: C, 67.25; H, 5.87; N, 12.55. Found: C, 67.14; H, 5.84; N, 12.61.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(4-chlorobenzyl)pyrimidin-2-amine (50c)

343 mg (33% for 3 steps from **55**, a white solid from MeOH-Et₂O): mp 162-163 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.18 (2H, d, J = 8.3 Hz), 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.26 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.96 (2H, s), 4.80-4.56 (1H, br m), 4.24-3.95 (1H, br m), 3.85 (2H, s), 3.04-2.81 (2H, br m), 2.69-2.62 (1H, m), 1.88-1.82 (2H, m), 1.74-1.68 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 451 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₃ClN₄O₃: C, 63.93; H, 5.14; Cl, 7.86; N, 12.43. Found: C, 63.69; H, 5.11; Cl, 7.73; N, 12.43.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-[4-(benzyloxy)benzyl]pyrimidin-2-amine (50e)

425 mg (21% for 3 steps from **35**, a white solid from EtOH): mp 178-179 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.44-7.31 (5H, m), 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.94-6.91 (4H, m), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.27 (1H, s), 6.00 (2H, s), 5.06 (2H, s), 4.94 (2H, s), 4.81-4.68 (1H, br m), 4.09-3.92 (1H, br m), 3.83 (2H, s), 3.01-2.83 (2H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.86-1.68 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 523 (M+1); Anal. calcd for C₃₁H₃₀N₄O₄: C, 71.25; H, 5.79; N, 10.72. Found: C, 71.12; H, 5.80; N, 10.77.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-[4-(methylthio)benzyl]pyrimidin-2-amine (50f)

1.56 g (36% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH): mp 185.5-186.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.3 Hz), 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.27 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.96 (2H, s), 4.80-4.61 (1H, br m), 4.12-3.91 (1H, br m), 3.84 (2H, s), 3.03-2.84 (2H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 2.48 (3H, s), 1.86-1.70 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 463 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₆N₄O₃S: C, 64.91; H, 5.67; N, 12.11 S, 6.93. Found: C, 64.94; H, 5.72; N, 12.17; S, 6.87.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(3,5-dimethoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (50i)

344 mg (52% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH): mp 176-178 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.40-6.35 (3H, m), 6.30 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.97 (2H, s), 4.80-4.63 (1H, br m), 4.10-3.89 (1H, br m), 3.82 (2H, s), 3.78 (6H, s), 3.04-2.81 (2H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.88-1.71 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 477 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₈N₄O₅: C, 65.53; H, 5.92; N, 11.76. Found: C, 65.46; H, 5.95; N, 11.83.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(3,4-dimethoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (50g)

化合物 **35** (800 mg, 2.3 mmol) の THF (6 ml) 溶液に窒素雰囲気下、氷浴中において水素化ナトリウム (60% oil dispersion, 193 mg, 4.8 mmol) を数回に分けて添加した。さらに 30 分攪拌の後、この混合物に、3,4-dimethoxyphenylacetyl chloride (543 mg, 2.5 mmol) の THF (3 ml) 溶液を 5 °C において 30 分かけて滴下した。さらに 30 分攪拌の後、反応混合物を 4N HCl 水溶液で酸性とし、水を加えて EtOAc で抽出した。有機層を水で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥、溶媒を減圧留去し、ジケトエステル体を未精製のオイルとして得た。このジケトエステルは精製することなく次の反応に用いた。ジケトエステルと酢酸 (3 ml) の混合物を 110 °C において 6 時間加熱した。反応混合物を水に注ぎ、EtOAc で抽出、有機層を水で洗浄した後、MgSO₄ 乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc, 1:1, v/v) で精製し、化合物 **49g** (648 mg, 62%) を油状物として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 15.44 (1H, s), 6.93-6.75 (6H, m), 6.00 (2H, s), 5.45 (1H, s), 4.74-4.41 (1H, br m), 4.26-3.94 (1H, br m), 3.88 (7H, s), 3.56 (2H, s), 3.01-2.78 (2H, br m), 2.45-2.37 (1H, m), 1.88-1.75 (2H, m), 1.68-1.60 (2H, m).

化合物 **49g** (648 mg, 1.43 mmol)、グアニジン炭酸塩 (258 mg, 1.43 mmol) とピリジン (3 ml) の混合物を 110 °C において 4 時間加熱攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥、溶媒を減圧留去した。残渣をリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 50:1, v/v) で精製し、MeOH-Et₂O から結晶させ化合物 **50g** (300 mg, 44 %) を白色個体として得た。

Mp 150-151 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95-6.91 (2H, m), 6.84-6.77 (4H, m), 6.27 (1H, s), 5.99 (2H, s), 4.97 (2H, s), 4.83-4.55 (1H, br m), 4.29-3.96 (1H, br m), 3.87 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.83 (2H, s), 3.04-2.82 (2H, br m), 2.68-2.61 (1H, m), 1.90-1.80 (2H, m), 1.75-1.68 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 477 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₈N₄O₅: C, 65.53; H, 5.92; N, 11.76. Found: C, 65.45; H, 5.91; N, 11.80.

化合物 **50g** の合成と同様にして、β-ケトエステル体 **35** と対応するカルボン酸クロライドから化合物 **50h** と **50j** を合成した。

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(2,5-dimethoxybenzyl)pyrimidin-2-amine (**50h**)

397 mg (60% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH-Et₂O): mp 150-152 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.94-6.91 (2H, m), 6.84-6.75 (4H, m), 6.25 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.93 (2H, s), 4.80-4.58 (1H, br m), 4.16-3.91 (1H, br m), 3.88 (2H, s), 3.76 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.03-2.81 (2H, br m), 2.67-2.60 (1H, m), 1.87-1.80 (2H, m), 1.74-1.67 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 477 (M+1); Anal. calcd for C₂₆H₂₈N₄O₅: C, 65.53; H, 5.92; N, 11.76. Found: C, 65.31; H, 5.91; N, 11.76.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)pyrimidin-2-amine (50j)

187 mg (18% for 3 steps from **35**, a white solid from MeOH-Et₂O): mp 197-198 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.77-6.69 (3H, m), 6.28 (1H, s), 6.00 (2H, s), 5.95 (2H, s), 4.96 (2H, s), 4.81-4.59 (1H, br m), 4.17-3.91 (1H, br m), 3.79 (2H, s), 3.07-2.78 (2H, br m), 2.69-2.61 (1H, m), 1.91-1.81 (2H, m), 1.76-1.69 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 461 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₄N₄O₅: C, 65.21; H, 5.25; N, 12.17. Found: C, 64.92; H, 5.23; N, 12.16.

4-({2-Amino-6-[1-(1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]pyrimidin-4-yl}methyl)phenol (50k)

化合物 **50e** (230 mg, 0.44 mmol)、10%-Pd/C (20 mg) と MeOH (3 ml) の混合物を、室温において 7 時間水素添加した (1 atm)。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 50:1, v/v) で精製し MeOH-H₂O から結晶化させ化合物 **50k** (160 mg, 84%) を白色固体として得た。

Mp 136.5-137 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.05 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.73 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.60 (1H, br s), 6.30 (1H, s), 6.00 (2H, s), 5.01 (2H, s), 4.83-4.60 (1H, br m), 4.15-3.92 (1H, br m), 3.81 (2H, s), 3.05-2.84 (2H, br m), 2.71-2.63 (1H, m), 1.92-1.84 (2H, m), 1.75-1.66 (2H, m); MS (ESI, positive) m/z 433 (M+1); Anal. calcd for C₂₄H₂₄N₄O₄·0.75H₂O: C, 64.63; H, 5.76; N, 12.56. Found: C, 64.87; H, 5.74; N, 12.65.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-[4-(methylsulfinyl)benzyl]pyrimidin-2-amine (50l)

化合物 **50f** (200 mg, 0.43 mmol)、MeOH (12 ml) と 34%過酸化水素水 (0.2 ml) の混合物を 60 °C において 2.5 時間加熱した。反応混合物に過酸化水素水 (0.2 ml) を追加して、さらに 3 時間加熱した。反応混合物に水を加え EtOAc で抽出、有機層を飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH, 30:1, v/v) で精製し、MeOH から結晶化させ化合物 **50l** (190 mg, 92%) を白色個体として得た。

Mp 183.5-184 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.42 (2H, d, J = 8.3 Hz), 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.30 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.97 (2H, s), 4.82-4.59 (1H, br m), 4.18-3.99 (1H, br m), 3.94 (2H, s), 3.06-2.83 (2H, br m), 2.73 (3H, s), 2.70-2.63 (1H, m), 1.89-1.68 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 479 (M+1); Anal. calcd for C₂₅H₂₆N₄O₄S: C, 62.74; H, 5.48; N, 11.71; S, 6.70. Found: C, 62.59; H, 5.52; N, 11.80; S, 6.57.

4-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbonyl)piperidin-4-yl]-6-[4-(methylsulfonyl)benzyl]pyrimidin-2-amine (50m)

化合物 **50f** (200 mg, 0.43 mmol)、 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mg, 0.03 mmol)、34%過酸化水素水 (0.4 ml) と MeOH (12 ml) の混合物を 50 °C において 1 時間加熱した。反応混合物に水を加え EtOAc で抽出、有機層を飽和食塩水で洗浄し Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 :MeOH, 30:1, v/v) で精製し、MeOH から結晶化させ化合物 **50m** (175 mg, 82%) を白色個体として得た。

Mp 201-202.5 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.46 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.95-6.91 (2H, m), 6.82 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.31 (1H, s), 6.00 (2H, s), 4.97 (2H, s), 4.81-4.63 (1H, br m), 4.20-4.04 (1H, br m), 3.96 (2H, s), 3.05 (3H, s), 3.01-2.87 (2H, br m), 2.72-2.64 (1H, m), 1.87-1.69 (4H, m); MS (ESI, positive) m/z 495 (M+1); Anal. calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$: C, 60.71; H, 5.30; N, 11.33; S, 6.48. Found: C, 60.52; H, 5.30; N, 11.32; S, 6.41.

4-7-2. Biology

HIV-1LTRに制御されたCAT遺伝子発現に対する化合物の評価

材料と方法

HIV-1LTR の制御下にある CAT 遺伝子を含むプラスミド p469 および Tat 発現ベクター pSV-Tat は、Dr. Gary J. Nabel^{9b} より供与された。非動化した牛胎児血清 (シグマ社より購入) を添加した RPMI1640 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を培地として用い、Jurkat 細胞 (ヒト T リンパ球白血病細胞株) は、上記培地を用いて培養した。プラスミド DNA の細胞内への導入は、Chang 等の方法に準じて行った¹⁹。すなわち細胞を上記培地に 2×10^7 個/ml の濃度で懸濁し、1 μg の p469 と 0.5 μg の DEAE-dextran (Sigma) を添加した。Tat の作用を評価する実験では、pSV-Tat を 0.5 μg を同時に添加した。次に DNA を添加した細胞を時々攪拌しながら室温で 10 分間インキュベートした後、140 V で電気穿孔を行った。細胞は、新鮮培地に再懸濁し、37 °C で 20 時間培養した。

HIV-1LTR制御CAT遺伝子発現抑制試験

化合物は DMSO に溶解し、100 mM のストック溶液とし、-20 °C に保存した。p469 を遺伝子導入した Jurkat 細胞を化合物共存下で、10 ng/ml の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA ; Sigma, St. Louis, MO, USA) で刺激し、HIV-1 LTR の活性化を介した CAT 遺伝子の転写を誘導した。p469 と pSV-Tat を遺伝子導入した実験では、

化合物の DMSO 溶液を細胞に添加し、細胞をさらに 37 °C で 24 時間培養した後、りん酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し、15%グリセロールを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液に懸濁後、凍結融解を繰り返すことで細胞を溶解した。調製した細胞溶解液は、遠心にて不溶物を除去した後、Bradford 法によりタンパク濃度を測定した (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)。細胞溶解液中の CAT 活性の測定は、Fridovich-Keil 等の方法に準じて行った^{19b}。すなわちタンパク量 30 µg の細胞溶解液に 35 µg のアセチルコエンザイム A (GIBCO/BRL, Grand Island, MO, USA) および 0.1 µCi の ¹⁴C-クロラムフェニコール (Dupont, NEN Boston, MA, USA) を添加後、全量を 42 µl とし、37 °C で 2 時間インキュベートした。この反応液に 9 倍容量の EtOAc を加え、酵素反応物であるアセチル ¹⁴C-クロラムフェニコールを抽出した後、薄相クロマトグラフィー (MeOH:CHCl₃, 1:19, v/v) にて分離した。CAT 活性は、オートラジオグラフィーにて検出し、イメージングデンシオメーター (model GS-700; Bio-Rad) により定量した。

HIV-1 増殖抑制活性の評価

化合物 **28q** の HIV-1 増殖抑制活性は、Advanced Biotechnologies, Inc. (ABi 社) において評価した。HIV-1 p24 Antigen Capture on Rapid Screen Assay in C8166-45 Cells: Cat No. 12-302-000

4-8. 引用文献

1. (a) 小柳義夫, ウイルス. **2005**, 55, 251. (b) Clercq, E. D. *J. Clin. Virol.* **2004**, 30, 115.
2. (a) Bushman, F.; Landau N. R.; Emini, E. A. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* **1998**, 95, 11041. (b) Cohen, O. J., Fauci, A. S. *Adv. Intern. Med.* **2002**, 48, 150. (c) Powderly, W. G. *J. Neurovirol.* **2000**, 6 Suppl 1, S8. (d) 岡真一, 医学のあゆみ. **2005**, 213, 859.
3. (a) Graham, N. M. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2000**, 25, Suppl 1, S4. (b) Moyle, G. *Clin Ther.* **2000**, 22, 911. (c) Montessori, V.; Press, N.; Harris, M.; Akagi, L.; Montaner, J. S. G. *CMAJ* **2004**, 170, 229. (d) 立川夏夫. 医学のあゆみ **2006**, 218, 911.
4. (a) Clercq, E. D. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, 36, 1800. (b) Clercq, E. D. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1297.
5. (a) Denis, M.; Ghadirian, E. *Clin. Exp. Immunol.* **1994**, 97, 76. (b) Maury, C. P. J.; Lähdevirta, J. *J. Intern. Med.* **1990**, 227, 253. (c) Poli, G.; Kinter, A.; Justement, J. S.; Kehrl, J. H.; Bressler, P.; Stanley, S.; Fauci, A. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 782. (d) Fauci, A. S. *Science* **1993**, 262, 1011. (e) Fauci, A. S. *Nature* **1996**, 384, 529. (f) Pallarés-Trujillo, J.; López-Soriano, F. J.; Argiléas, J. M. *Med. Res. Rev.* **1995**, 15, 533. (g) Theodore, S.; Cass, W. A.; Nath, A.; Steiner, J.; Young, K.; Maragos, W. F. *Neurobiol. Dis.* **2006**, 23, 663. (h) Ting, P. T.; Koo, J. Y. *Int. J. Dermatol.* **2006**, 45, 689.
6. (a) Bélec, L.; Meillet, D.; Hervann, A.; Grésenguet, G.; Gherardi, R. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **1994**, 1, 117. (b) Zangerle, R.; Reibnegger, G.; Wachter, H. Fuchs, D. *AIDS*. **1993**, 7, 175. (c) Saha, R. N.; Pahan, K. *J. Neurochem.* **2003**, 86, 1057. (d) Brabers, N. A. C. H.; Nottet, H. S. L. M. *Eur. J. Clin. Invest.* **2006**, 36, 447.
7. (a) Haseltine, W. A. *FASEB J.* **1991**, 5, 2349. (b) Cullen, B. R. *FASEB J.* **1991**, 5, 2361. (c) Jones, K. A.; Peterlin, B. M. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 717. (d) Pereira, L. A.; Bentley, K.; Peeters, A.; Churchill, M. J.; Deacon, N. J. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 663.
8. (a) Li, C. J.; Dezube, B. J.; Biswas, D. K.; Ahlers, C. M.; Pardee, A. B. *Trends in Microbiology.* **1994**, 2, 164. (b) Daelemans, D; Vandamme, A-M.; De Clerq, E. *Antiviral Chem. Chemother.* **1999**, 10, 1. (c) Calzad, M. A.; Macho, A.; Lucena, C.; Muñoz, E. *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, 120, 317. (d) Mitsuhashi, S.; Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Okamoto, T.; Ubukata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 2645. (e) Bedoya, L. M.; Beltrán, M.; Sancho, R.; Olmedo, D. A.; Sánchez-Palomino, S.; del Olmo, E.; López-Pérez, J. L.; Muñoz, E.; Feliciano, A. S.; Alcamí, J. *Bioorg. Med.*

- Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4447. (f) Wang, M.; Xu, Z.; Tu, P.; Yu, X.; Xiao, S.; Yang, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2585. (g) He, M.; Yuan, D.; Lin, W.; Pang, R.; Yu, X.; Yang, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3978.
9. (a) Sen, R.; Baltimore, D. *Cell*, **1986**, *47*, 921. (b) Nabel, G.; Baltimore, D. *Nature* **1987**, *326*, 711. (c) Lowenthal, J. W.; Ballard, D. W.; Böhnlein, E.; Greene, W. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2331.
10. (a) Trede, N. S.; Tsytsy.kova, A. V.; Chatila, T.; Goldfeld, A. E.; Geha, R. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 902. (b) O'Donnell, P. M.; Taffet, S. M. *J. Interferon Cytokine Res.* **2002**, *22*, 539. (c) Krämer, B.; Wiegmann, K.; Krönke, M. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6577.
11. PTX: (a) Biswas, D. K.; Dezube, B. J.; Ahlers, C. M.; Pardee, A. B. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **1993**, *6*, 778. (b) Smith, J. A.; Nunnari, G.; Preuss, M.; Pomerantz, R. J.; Daniel, R. *Intervirology* **2007**, *50*, 377. (c) D. K. Biswas, C. M. Ahlers, B. J. Dezube, A. B. Pardee, *Molecular Medicine*, **1994**, *1*, 31. SB203580: (d) Kumar, S.; Orsini, M. J.; Lee, J. C.; McDonnell, P. C.; Debouck, C.; Young, P. R. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30864. Rolipram: (e) Navarro, J.; Punzón, C.; Jiménez, J. L.; Fernández-Cruz, E.; Pizarro, A.; Fresno, M.; Muñoz-Fernández, M.A. *J. Virol.*, **1998**, *72(6)*, 4712. Fluoroquinoline: (f) Baba, M.; Okamoto, M.; Kawamura, M.; Makino, M.; Higashida, T.; Takashi, T.; Kimura, Y.; Ikeuchi, T.; Tetsuka, T.; Okamoto, T. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 1097. Thalidomide: (g) Makonkawkeyoon, S.; Limson-Pobre, R. N. R.; Moreira, A. L.; Schauf, V.; Kaplan, G. *Pro. Nat. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5974. LMP420: (h) Haraguchi, S.; Day, N. K.; Kamchaisatian, W.; Beigier-Pompadre, M.; Stenger, S.; Tangsinmankong, N.; Sleasman, J. W.; Pizzo, S. V.; Cianciolo, G. J. *AIDS Res. Ther.* **2006**, *3*, 8. Canventol: (i) Biswas, D. K.; Tius, M. A.; Zhuo, J.; Pardee, A. B. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **1996**, *12*, 120.
12. (a) Richman, D.; Shih, C. K.; Lowy, I.; Rose, J.; Prodanovich, P.; S. Goff; Griffin, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 11241. (b)遊佐敬介, 満屋裕明. *実験医学* **1997**, *15(2)*, 142.
13. (a)Robins, M. J.; Uznaski, B. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 2608.
14. (a) Anzali, S.; Mederski, W. W. K. R.; Osswald, M.; Dorsch, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***1998**, *8*, 11. (b)Mederski, W. W. K. R.; Osswald, M.; Dorsch, D.; Anzali, S.; Christadler, M.; Schmitges, C.-J.; Wilm, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***1998**, *8*, 17.
15. (a) Richter, S. N.; Palù, G. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1305. (b) Rusnati, M.; Presta, M., *Drugs Future* **2002**, *27*, 481. (c) Hsu, M. C.; Schutt, A.D.; Holly, M.; Slice, L. W.; Sherman, M.I.; Richman, D. D.; Potash, M. J.; Volsky, D. J. *Science* **1991**, *254*, 1799. (d) Furia, B.; Deng, L.; Wu, K.; Baylor, S.; Kehn, K.; Li, H.; Donnelly, R.; Coleman, T.; Kashanchi, F. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4973. (e) Biswas, D. K.; Ahlers, C. M.; Dezube, B. J.; Pardee, A. B. *Pro. Nat. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 11044.

16. (a) Aoyama, T.; Satoh, T.; Yonemoto, M.; Shibata, J.; Nonoshita, K.; Arai, S.; Kawakami, K.; Iwasawa, Y.; Sano, H.; Tanaka, K.; Monden, Y.; Kodaera, T.; Arakawa, H.; Suzuki-Takahashi, I.; Kamei, T.; Tomimoto, K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*(2), 144. (b) Meyer, M. D.; Hancock, A. A.; Tietje, K.; Sippy, K. B.; Prasad, R.; Stout, D. M.; Arendsen, D. L.; Donner, B. G.; Carroll, W. A. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*(7), 1049.
17. (a) Liang, C.; Wainberg, M. A., *AIDS*, **2002**, *4*, 41. (b)岡本完, 岡本尚. *実験医学* **1997**, *15*(2), 131.
18. Terstappen, G. C.; Schlüpen, C.; Raggiacchi, R.; Gaviraghi, G. *Nature Rev.*, **2007**, *6*, 891.
19. (a) Li, C. J.; Wang, C.; Friedman, D. J.; Pardee A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 5461. (b) Fridovich-Keil, J. L.; Gudas, J. M.; Dou, Q.-P.; Bouvard, I. Pardee, A. B. *Cell Growth and Differentiation* **1991**, *2*, 67.

第5章 結語

炎症や免疫反応において重要な役割を果たしているTNF- α に着目した場合、その阻害剤は、制御を逸脱したTNF- α の過剰産生により引き起こされる、敗血症ショック、関節リウマチ(RA)、炎症性腸疾患(IBD)やAIDSなどの疾患の治療薬として期待できる。実際にTNF- α 抗体などの生物製剤がRAやIBDなどに優れた有効性を示すものの、副作用、投与経路や高価な薬剤費等問題点も多く、より良い低分子薬剤の開発が必要とされている。こうした背景のもとに、TNF- α 産生阻害の開発を目指し、構造的に異なる2系統の化合物をリードとして創薬研究を行った。

パビン誘導体 **5a** からの展開では、カテコール部の変換においてジメチレンジオキシのような閉環構造で適度の阻害活性が見出された。架橋窒素上の置換基は鎖長の伸長に伴い活性が減弱し立体的制約が認められたが、アミン、エステルやアルコールなど種々の官能基に許容であった。化合物 **5b** や **7s** など一連の誘導体は、エンドトキシンショックモデルにおいて経口での致死抑制作用を示したが、より高次の CIA モデルでは効果を確認できなかった。より強力な TNF- α 産生阻害活性が必要であると考えられたため、環の切断によるテトラヒドロイソキノリン化合物 **11b**, **15b** 等への誘導化も試みたが、活性が消失した。固いコンホメーションの重要性、狭い構造活性相関に加えて合成反応の特殊性から、本化合物を用いてのこれ以上の活性向上は困難であると判断し、新たなリード化合物を用いた合成展開に移行した。

フェニルキナゾリン **19e** では、活性の増強に加え、その構造由来の多彩な薬理活性から懸念される副作用、吸収性と新規性も考慮し、構造的に異なる独自骨格への展開を目指した。その結果、ペペリジニルキナゾリン **20a**、さらに最適化により、ペペリジニルピリミジン誘導体 **28** を見出すことに成功した。化合物 **28q** は、CIAモデルにおいて予防的あるいは治療的效果を示し、本誘導体が炎症性疾患等の治療薬として期待できることが示された。溶解度改善による吸収性も大きく向上させることができ、また一般薬理試験の比較においても初期のフェニルキナゾリン **19e** に認められた中枢、循環器等への作用がペペリジニルピリミジン **28q** ではほぼ消失したことから、副作用につながり得る安全性の課題も一応の解決を得たものと判断できる。見出した化合物 **28q** の製法検討も実施し、これまで合成上問題のあった縮合反応での異性体生成を回避した効率的な合成方法を確立した。この方法は、簡便かつ比較的温和な条件で目的化合物を得ることができ、これまで困難であった種々のベンジル置換体の合成にも適用可能で非常に優れた方法であった。

また、TNF- α とHIV-1遺伝子のプロモーター領域の共通性により、TNF- α 産生阻害剤の抗HIV活性が期待できることから、見出したパビン、ペペリジニルピリミジン誘導体を評価した。両者の活性に明確な相関は認められなかったが、ペペリジ

ニルピリミジン誘導体 **28q** に強いHIV-1 LTR転写活性化抑制作用とウイルス増殖抑制作用を確認した。詳細な構造活性相関から、窒素上の置換基としてピペロニロイル構造の重要性が明らかとなり、さらに一連の誘導体 **50h**, **50i** はウイルス由来の制御因子であるTatによる活性化も強く阻害することが見出された。合成した誘導体はピペロニロイル基の構造特異性を除けば、TNF- α 阻害活性の構造活性相関と極めて類似性が高く、作用メカニズムは異なると思われるが、TNF- α 産生阻害活性も有することが分かった。TNF- α はHIVウイルスの増殖活性化と病態の進展に関与しているばかりでなく、AIDS患者の悪液質や痴呆の原因の一つといわれていることから、ピペリジニルピリミジン誘導体はHIV遺伝子活性化の直接的な作用に加え、TNF- α 産生によって引き起される、ウイルスの増殖、悪液質や痴呆などの改善作用も併せ持つ抗HIV療法の新しいアプローチとして期待できるものと考えられる。

以上、リード化合物からの合成展開により、新規なTNF- α 産生阻害剤を見出すことに成功した。これらの化合物は、関節リウマチ等の慢性炎症疾患だけでなく、直接的な抗HIV活性も有していることから、AIDS治療薬としての候補化合物あるいは、作用発現における研究用ツールとしての活用が期待される。

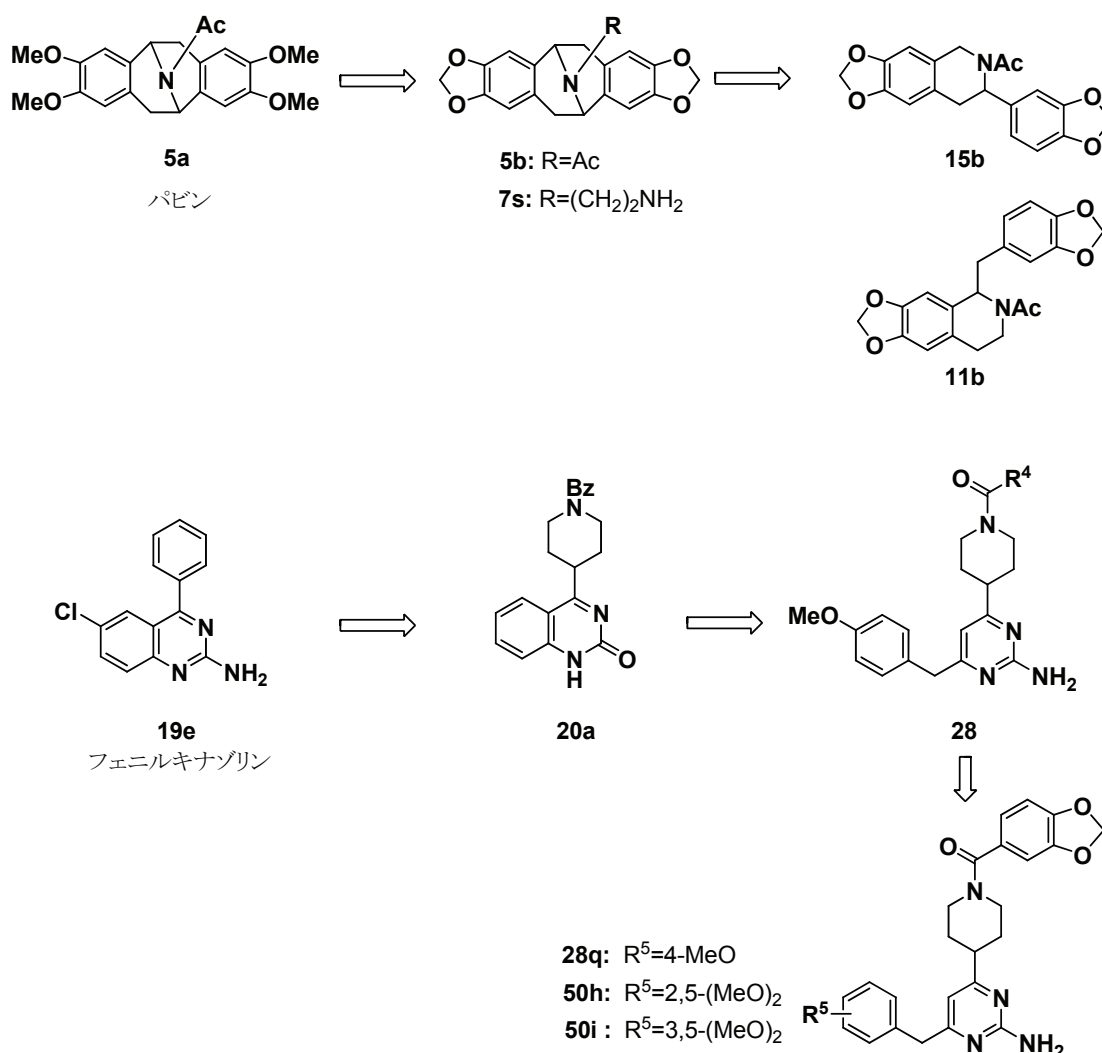


Fig. 5-1 リード化合物からの合成展開による最適化

謝辞

本論文をまとめるにあたり終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学講座 垣内喜代三教授に深く感謝し、心からお礼を申し上げます。

また、本論文を作成するにあたり、有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 伴正和教授、谷原正夫教授、森本積准教授に心から感謝申し上げます。

本研究は、住友製薬（現大日本住友製薬株式会社）において行われました。本研究の機会を与えてくださり、終始ご激励を賜りました、大橋尚仁博士、川上肇博士に心から感謝申し上げます。

本研究に関する論文投稿および本論文の作成の機会を与えてくださり、終始ご激励を賜りました、大野一教博士、佐藤文憲博士に心から感謝申し上げます。

本研究の推進、論文投稿にあたり、終始懇切なご指導とご助言を賜りました、藤田一司博士、上田豊博士に心から感謝申し上げます。

本研究の推進にあたり、化合物合成や製法について検討していただきました、岩井清高氏、栗本歩博士、村田士乃武氏、荻野哲広氏に感謝申し上げます。薬理的評価を行っていただきました、中島孝氏、川村哲也氏をはじめとする薬理研究グループの方々に感謝申し上げます。

最後に、本論文を作成するにあたり、暖かく見守ってくれた、家族に心から感謝します。

研究業績リスト

学位論文の主たる部分を公表した論文

1. Synthesis of new TNF-alpha inhibitors and their biological properties
Norio Fujiwara*; Yutaka Ueda; Naohito Ohashi.
1996, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(7), pp743-748.
2. Synthesis and bioactivities of novel piperidylpyrimidine derivatives: inhibitors of tumor necrosis factor-alpha production
Norio Fujiwara*; Hitoshi Fujita; Kiyotaka Iwai; Ayumu Kurimoto; Shinobu Murata; Hajime Kawakami.
2000, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10(12), pp1317-1320.
3. Novel piperidinyppyrimidine derivatives as inhibitors of HIV-1 LTR activation
Norio Fujiwara*; Takashi Nakajima; Yutaka Ueda; Hitoshi Fujita; Hajime Kawakami.
2008, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(22), pp9804-9816.

参考論文

1. Synthesis and alkali-hydrolysis reactions of some 2,3'-(substituted-imino)pyrimidine nucleosides lacking a 2'-hydroxyl group
Katsumaro Minamoto; Kishiko Azuma; Norio Fujiwara; Shoji Eguchi; Toyohiko Hirota; Shizuo Kadoya. 1988, *Nucleic Acids Symposium Series*, 20, pp71-72.
2. Synthesis of 1-(5'-O-benzoyl-3'-deoxy-.beta.-D-glycero-pentofuran-2'-ulosyl)uracil and its alpha-anomer by [1,2]-hydride shift
Katsumaro Minamoto; Norio Fujiwara; Yuji Hamano; Shoji Eguchi. 1989, *Nucleic Acids Symposium Series*, 21, pp121-122.
3. Conversion of some 2,3'-substituted-imino uracil furanosides into piperidine sugar analogs
Katsumaro Minamoto; Norio Fujiwara; Kishiko Azuma; Shoji Eguchi. 1989, *Journal of Organic Chemistry*, 54(19), pp4543-4549.
4. Synthesis of some piperidine sugar uracil nucleosides with a 2,3'-substituted-imino bridge
Katsumaro Minamoto; Norio Fujiwara; Yoshihisa Hoshino; Yuji Hamano; Shoji Eguchi; Toshihiko Hirota; Reimei Mori, 1990, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* 11, pp3027-3033.

学会発表

1. 2, 3'-置換イミノ含窒素ピラノシルピリミジン類の一般合成
源勝麻呂、藤原範雄、江口昇次、1988、日本化学会第 56 春季年会
2. 2'-ケトウリジンの合成の再検討
源勝麻呂、藤原範雄、浜野裕二、江口昇次、1989 日本化学会第 58 春季年会
3. Synthesis of New TNF- α inhibitors and Their Biological Properties.
Norio Fujiwara; Yutaka Ueda; Naohito Ohashi, 1996, 11th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 24-28.
4. TNF- α 産生阻害活性を有する、新規ピペリジルピリミジン誘導体の合成と構造活性相関.
藤原範雄、藤田一司、川村哲也、上田豊、川上肇、2001 第 21 回メディシナルケミストリーシンポジウム
5. Novel disease modifying anti-rheumatic agents (DMARDs): Syntheses and SAR of 5-guanidinoisoxazoles. Masashi Nakatsuka; Shin-ichiro Okada; Yoshihide Ueno; Takahiko Hashizuka; Norio Fujiwara; Kiyotaka Iwai; Hiroyuki Nakahira; Shogo Nakatani; Kazunori Shimano; Yoshihiro Horiuchi; Fumio Samizo; Nobuhisa Fukuda, 2001, 222nd ACS National Meeting, Chicago, IL, United States, August 26-30, MEDI-269.

特許

1. Promoters for nerve growth factor formation and secretion
Norio Fujiwara; Eiji Nakajo; Mitsutaka Nakamura; Naohito Ohashi, 1992, JP04330010.
2. Pharmaceutical composition for inhibiting tumor necrosis factor production
Kenji Irie; Yutaka Ueda; Norio Fujiwara, 1994, WO9407498.
3. Preparation of heterocyclic tumor necrosis factor production inhibitors
Naohito Ohashi; Norio Fujiwara; Yutaka Ueda, 1995, EP 663210.
4. Piperidinympyrimidine derivatives useful as inhibitors of tumor necrosis factor.
Norio Fujiwara; Yutaka Ueda; Shinobu Murata; Fumiyo Hirota; Hajime Kawakami; Hitoshi Fujita, 1997, WO9738992.
5. Preparation of tetrahydroisoquinolinylphthalazines and pharmaceutical compositions containing them
Hitoshi Fujita; Norio Fujiwara; Hajime Kawakami, 1999, JP 11222486.
6. Preparation of piperidinympyrimidines tumor necrosis factor alpha inhibitors.
Norio Fujiwara; Yutaka Ueda; Shinobu Murata; Fumiyo Hirota; Hajime Kawakami; Hitoshi Fujita, 1999, US 5948786.

7. Pyridopyrimidine derivatives, immunomodulators containing them, and their uses as prophylactic and therapeutic drugs
Hitoshi Fujita; Fujio Antoku; Norio Fujiwara; Kiyotaka Iwai; Hiroshi Tanaka; Hajime Kawakami, 2000, JP 2000063381.
8. Preparation of 1-piperidinophthalazine derivatives as production or secretion inhibitors of tumor necrosis factor
Hitoshi Fujita; Shinobu Murata; Norio Fujiwara; Hajime Kawakami, 2000, JP 2000191659.
9. Preparation of pyrimidine derivatives
Fujita, Hitoshi; Fujio Antoku; Norio Fujiwara; Kiyotaka Iwai; Hiroshi Tanaka; Hajime Kawakami, 2000, WO 2000012487.
10. Preparation of thiazoles and oxazoles as antiinflammatories
Norio Fujiwara; Hitoshi Fujita; Fujio Antoku; Toshinari Sugawara; Hajime Kawakami, 2002, WO 2002002542.
11. Preparation of 5-member cyclic compounds as antiinflammatory agents
Norio Fujiwara; Hitoshi Fujita,; Fujio Antoku,; Toshishinari Kanzawa; Hajime Kawakami, 2003, JP 2003192591.
12. Preparation of thiazole derivatives for treatment of inflammation
Norio Fujiwara; Fujio Antoku, 2003, WO 2003057693.