

ビスクロアミン骨格を有する新規 GPR119 アゴニストの創製研究

2014 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

坂入 将夫

目次

略語表	・・・3
第一章 緒言	
1-1 糖尿病	・・・6
1-2 GLP-1	・・・8
1-3 GLP-1 分泌に関わる GPCR	・・・11
1-4 GPR119 アゴニスト	・・・13
1-5 本研究の目的	・・・15
1-6 参考文献	・・・17
第二章 新規 GPR119 アゴニストの探索	
2-1 序論	・・・22
2-2 HTS ヒット化合物の獲得	・・・23
2-3 リンカーの最適化	・・・25
2-4 A 環の最適化	・・・27
2-5 B 環 Boc 等価体の検討	・・・30
2-6 活性化合物の <i>in vivo</i> 評価	・・・32
2-7 26a のドラッグライクネス評価	・・・36
2-8 小括	・・・38
2-9 実験の部	・・・39
2-10 参考文献	・・・58
第三章 hERG チャネル阻害活性の回避	
3-1 序論	・・・61
3-2 リード化合物の hERG チャネル阻害作用	・・・64
3-3 hERG チャネル阻害作用の解決策	・・・65
3-4 ヘテロビシクロアミンの合成	・・・67
3-5 ヘテロビシクロアミン誘導体の SAR	・・・70
3-6 活性化合物の <i>in vivo</i> 評価	・・・78
3-7 小括	・・・83
3-8 実験の部	・・・84
3-9 参考文献	・・・101

第四章 代謝安定性の改善	
4-1 序論	・・・103
4-2 代謝安定性の改善策	・・・105
4-3 リード周辺化合物の SAR	・・・105
4-4 活性化合物の <i>in vivo</i> 評価	・・・109
4-5 他の糖尿病治療薬との比較試験	・・・114
4-6 hERG チャンネル阻害安全域及びその他安全性評価	・・・117
4-7 小括	・・・119
4-8 実験の部	・・・120
4-9 参考文献	・・・131
第五章 結論	・・・133
謝辞	・・・136
研究業績リスト	・・・137

略語表

Chemistry

AcOH	acetic acid
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Cbz	benzyloxycarbonyl
cLogP	calculated logarithm of partition coefficient P, hydrophobicity partition coefficient
DCM	dichloromethane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
Et ₂ O	diethyl ether
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
LAH	lithium aluminium hydride
LBDD	ligand based drug design
LDA	lithium diisopropyl amide
<i>m</i> -CPBA	<i>m</i> -chloroperbenzoic acid
MeOH	methanol
NaBH(OAc) ₃	sodium triacetoxyborohydride
OEA	oleoylethanolamide
2-OG	2-oleoylglycerol
PTLC	preparative thin-layer chromatography
SBDD	structure based drug design
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborate
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin-layer chromatography
WSC	water soluble carbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride

Biology

ADME	absorption, distribution, metabolism and excretion
ADP	adenosine-5'-diphosphate
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine-5'-triphosphate
AUC	area under the curve
BA	bioavailability
cAMP	cyclic adenosine-5'-monophosphate
CC ₅₀	half maximal (50%) cytotoxicity concentration
CHO	Chinese hamster ovary
C _{max}	max value of concentration
CYP	cytochrome P450
DPP4	dipeptidyl peptidase IV
EC ₅₀	half maximal (50%) effective concentration
E _{max}	max value of efficacy
FBS	fetal bovine serum
FRB	free rotatable bond
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GIP	glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP-1	glucagon-liked peptide-I
GPR119	G-protein coupled receptor 119
HA	hydrogen bond acceptor
HD	hydrogen bond donor
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hERG	human ether-a-go-go related gene
HIT-T15	hamster β -cell line
HLM	human liver microsomes
HP β CD	2-hydroxypropyl β -cyclodextrin
HTRF	homogeneous time-resolved fluorescence
HTS	high throughput screening
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
KO	knock out
LDL	low-density lipoprotein
mGLUTag	mouse L-cell line
MIN6	mouse insulinoma cell line

MW	molecular weight
NEAA	non-essential amino acids
NCI-H716	human L-cell line
NIT-1	mouse pancreatic β -cell line
NR	number of rings
oGTT	oral glucose tolerance test
PD	pharmacodynamics
PK	pharmacokinetics
RIN5	rat insulinoma cell line
PKA	protein kinase A
SAR	structure-activity relationship
scGTT	subcutaneous glucose tolerance test
SEM	standard error mean
siRNA	small interfering RNA
Tox	toxicology

Analysis

ESI	electrospray ionization
HRMS	high-resolution mass spectra
IR	infrared spectroscopy
LC	liquid chromatography
LTQ	linear trap quadropole
MS	mass spectrum
NMR	nuclear magnetic resonance
PDA	photo diode array
ZMD	ZSpray™ Mass Detector

第一章 緒言

1-1) 糖尿病¹

糖尿病とはインスリン作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする糖代謝異常による疾患である。糖尿病患者数は、生活環境や食生活の変化に伴い、年々増加しており、世界中で3億人以上の有病者がいることが知られている。厚生労働省が行った平成19年の国民健康・栄養調査によると、日本でも、「糖尿病が強く疑われる人」の890万人と「糖尿病の可能性を否定できない人」の1,320万人を合わせると、全国に2,210万人いると推定されている。²

糖尿病は大きくI型糖尿病とII型糖尿病に分けられる。I型糖尿病は、インスリンを合成・分泌する膵ランゲルハンス島β細胞の破壊・消失がインスリン不足の主要な原因として起こる。糖尿病全体の5%前後で、小児から思春期に発症することが多く、強化インスリン療法が必須となっている。II型糖尿病は、インスリン分泌の低下やインスリン抵抗性をきたす素因を含む複数の遺伝因子に、様々な環境因子および加齢が加わり発症する。糖尿病全体の95%近くを占めており、40歳以上での発症が多いが、近年若年発症も増加してきている。インスリンの効力が落ちたインスリン抵抗性やインスリンを分泌する膵β細胞の機能減弱などにより高血糖状態になっている。空腹時血糖値が126 mg/dL以上または、75 gのブドウ糖負荷試験(oGTT)において2時間値が200 mg/dL以上を示す場合に、糖尿病と診断される。³ また、慢性的な高血糖を表す指標として、糖化ヘモグロビンの血中ヘモグロビンに対する割合を示すHbA1cがより積極的に糖尿病診断に取り入れられており、HbA1cが6.1%以上である場合にも糖尿病と診断される。³ この高血糖状態を是正し、血糖値を正常時の状態(空腹時血糖:110 mg/dL未満、且つoGTT後2時間値:140 mg/dL)に保つことが糖尿病の治療目的である。

糖尿病患者の多くは、糖代謝異常だけでなく、他の代謝性疾患も併発しており、慢性的に続く高血糖や代謝異常は、慢性合併症を発症するリスクが高くなる。慢性合併症とは、長期間持続する高血糖・脂質異常を含む代謝障害と高血圧などの血管障害因子によって起こる全身の血管を中心とした組織の変性・機能喪失である。全身のあらゆる臓器に起こるが、特に細小血管症に分類される網膜症、腎症、神経障害と、大血管症に分類される脳卒中、心筋梗塞・狭心症、糖尿病足病変がある。多くの疫学的解析から、血糖コントロールが良好なほど、細小血管症あるいは大血管症の発症・進展のリスクを減少できる。どの程度まで血糖コントロールを行えば合併症の発症が抑制できるかの明確な基準はないが、本邦ではHbA1c 6.5%未満であれば細小血管症の発症・進展を抑制できることが報告されている。⁴ しかし、大血管症については、食後の血糖コントロール

だけが低い耐糖能以上の段階から発症・進展のリスクが高くなる。⁵ いずれも、患者の機能予後、生命予後の決定因子となることから、これらへの対策も糖尿病治療の重要な課題であり、その予防策は糖尿病の早期発見と適切かつ継続的な危険因子の管理である。従って、血糖コントロールの理想的な目標は、1日を通じて高血糖、低血糖なく空腹時及び食後高血糖を是正し、HbA1c が正常化することである。

II型糖尿病発症の環境因子として考えられているものは過食やストレスなどのほかに、肥満が挙げられる。肥満とは、体脂肪が過剰に蓄積した身体状況で、本邦では欧米に比べ軽度肥満でも糖尿病や高血圧症などの健康障害を合併しやすいため、BMI25以上を肥満と判定している。⁶ 耐糖能異常や空腹時高血糖を伴う肥満者は糖尿病に移行しやすく、米国で行われた **Diabetes Prevention Program** では、耐糖能異常例に食事指導と活動性を高める生活改善指導を強化し、体重を5%程度減少させたところ、約3年後には従来通りの指導群に対し、強化群では糖尿病への移行を58%減少させることができ、⁷ 体重1kgの減量により糖尿病への移行リスクが平均16%減少したことが明らかとなった。⁸ そのため、初期の糖尿病患者は食事療法が施され、適切な栄養バランスとエネルギー摂取量にコントロールされる。BMI22までコントロールできると最も健康障害が少ないとされるが、BMI22まで減量できなくても現体重を5%程度減らすことで耐糖能や脂質、血圧の異常が改善すると知られている。⁶ また、このほかに運動療法も推奨されている。適切な食事療法の下に、医学的に管理された運動療法を行う場合、体重減少が期待できるばかりでなく、インスリン感受性が改善し、脂質代謝の改善や血圧低下も見られ、血糖コントロールはさらに良好となる。^{9,10} これらの食事療法と運動療法で目標の血糖コントロールを達成できない場合には、薬物治療が開始される。

糖尿病治療薬には、インスリンやインスリン分泌促進剤、インスリン抵抗性改善剤、糖の吸収を遅らせる α -グルコシダーゼ阻害剤などがある。これらの薬剤は優れた血糖コントロール能を有しているが、インスリン、インスリン分泌促進剤やインスリン抵抗性改善剤のチアゾリジンジオン類では体重増加の作用も報告されている。インスリン関連薬では、インスリンが肝臓や骨格筋に作用して、優れた血糖コントロール能を発揮するが、脂肪細胞にとってインスリンが過剰となり、脂肪細胞の肥大化を招いて体重が増加する。また、チアゾリジンジオン類では、アディポネクチンの上昇、TNF- α やMCP-1などの炎症性サイトカインの低下に示されるアディポカインのプロファイル変化によりインスリン抵抗性が改善する一方で、前駆脂肪細胞の分化が誘導され、小型脂肪細胞が多数形成し、この小型脂肪細胞が過剰のエネルギー負荷により肥大化することで体重が増加する。¹¹ そのため、これらの薬剤を投与する場合には、食事療法を

確実に実行することが求められている。そんな中、近年上市されたグルカゴン様ペプチド-I (GLP-1) 作動薬やジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP4) 阻害剤は糖濃度依存的なインスリン分泌により血糖をコントロールすることができるため、体内に過剰なインスリンが少なく、低血糖の発症リスクも低い。また、GLP-1 作動薬では体重減少作用も報告され、DPP4 阻害剤では体重増加がなく、これらの薬剤は GLP-1 関連薬剤として注目されている。

1-2) GLP-1

経口投与と経静脈内投与のグルコース負荷試験を比較すると、同程度に血糖値を上昇させるグルコース負荷に対してのインスリン分泌量が経口投与の方が多いたことが 1960 年代に示されていた。¹² この膵β細胞からのインスリン分泌を増強させる因子が、栄養素の経口摂取に伴い消化管から分泌されて膵β細胞に作用する消化管ホルモン、インクレチンである。インクレチンホルモンには GLP-1 と Glucose-dependent insulinotropic polypeptide(GIP)がある。¹² 食後のインスリン分泌量の 20~60%は、GIP と GLP-1 のインクレチン作用によるといわれている。¹³ 耐糖能異常またはⅡ型糖尿病患者では食後の GLP-1 分泌は低下しており、Ⅱ型糖尿病患者に外因性に GLP-1 を投与するとインスリン分泌能が改善することが知られており、¹⁴ Ⅱ型糖尿病では GLP-1 の補充により血糖コントロール改善が期待される。

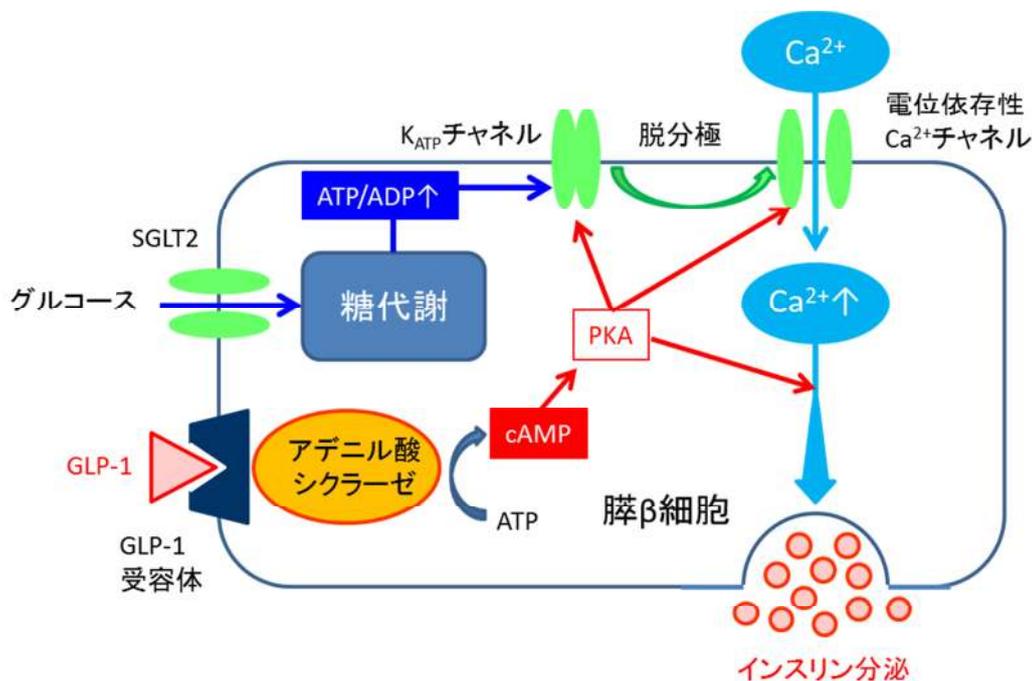


図 1-1 : GLP-1 のインスリン分泌増強メカニズム

GLP-1によるインスリン分泌増強メカニズムは図1-1のようになっている。まず、グルコーストランスポーター2を介しグルコースを膵β細胞に取り込むと、Adenosine-5'-triphosphate (ATP)濃度が解糖系により上昇する。これによりAdenosine-5'-diphosphate (ADP)との比が上昇し、細胞膜上のATP依存性Kチャンネル(K_{ATP} チャンネル)を閉鎖し、脱分極が生じる。その結果、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化し、 Ca^{2+} イオンの流入が起こる。 Ca^{2+} イオン濃度の上昇は、インスリン顆粒の分泌反応を促進し、インスリンが分泌される。これに加え、GLP-1は膵β細胞上に存在するGLP-1受容体に結合しアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内のcyclic Adenosine-5'-monophosphate (cAMP)濃度を上昇させる。その結果活性化されるProtein kinase A(PKA)を介して、 K_{ATP} チャンネルの閉鎖や電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの活性化、さらにはインスリン顆粒の分泌システムを直接促進することなどが報告されている。¹² その他に、GLP-1は膵作用として血糖依存性グルカゴン分泌抑制作用や膵β細胞の複製、新生及び分化を促進し、アポトーシスを抑制することも報告されている。¹²

さらに、GLP-1受容体は、膵β細胞だけではなく、中枢神経系、肺、心臓、腎臓、消化管などにも存在しており、その膵外作用が数多く報告されている。糖尿病治療において有用なものも多く、まず、中枢神経系における食欲抑制作

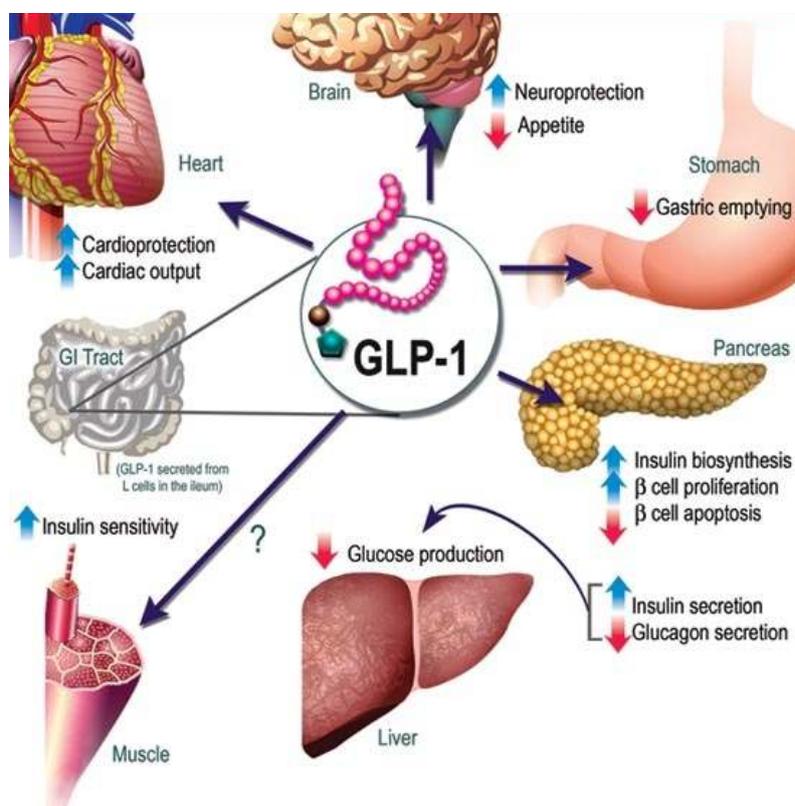


図 1-2 : GLP-1 の膵外作用(Medscape J Med, 2008, 10(7), 171.より転載)

用が挙げられる。GLP-1 は脳室内に投与されることにより、食欲抑制作用を示すことが報告され、GLP-1 受容体拮抗薬でその効果が消失し、逆に食欲が亢進することから、食欲抑制作用は GLP-1 を介していることが示されている。腸管より分泌された GLP-1 が食欲中枢のある視床下部で作用するかは、直接血液脳関門を通ること、GLP-1 受容体は粘膜固有層や門脈内の神経終末にも存在し、そこに GLP-1 が結合すると迷走神経求心路を介して視床下部に刺激が伝達されることや、末梢の自律神経に GLP-1 が作用しその刺激が視床下部に作用することなどが考えられている。¹⁵ 同じく中枢を介するものとして、胃排出抑制作用も知られている。食後高血糖の抑制には、GLP-1 によるインスリン分泌促進作用も挙げられるが、この胃排出抑制作用により、糖質の腸管への移動が遅延し、糖吸収が緩やかになることも挙げられる。また、この他にも肝臓におけるブドウ糖取り込み促進作用などが報告されている。(図 1-2)¹⁵ そのため、GLP-1 の効果を糖尿病治療に応用するため多くの研究がなされてきた。小腸 L 細胞より分泌された GLP-1 は血中に存在する DPP4 により数分単位で速やかに分解されるため、GLP-1 の作用を増強する薬剤として、GLP-1 受容体アゴニストや DPP4 阻害剤が開発されてきた。

GLP-1 受容体アゴニストは 2010 年に本邦で初めて承認され、現在 3 種の薬剤が上市されている。アゴニストとは、受容体に結合して、その受容体に対して生理活性物質と同様の生体反応を示す薬剤を示す。同じく、受容体に結合するアンタゴニストは、生理活性物質の結合を遮断し、その生体反応を阻害する薬剤であるが、GLP-1 受容体アゴニストは、GLP-1 のアミノ酸配列を一部変換することで DPP4 による分解を抑制することに成功した GLP-1 アナログであり、GLP-1 受容体に結合し、GLP-1 と同等の反応を示し、インスリン分泌や膵外作用などが報告されている。^{12, 15} いずれもペプチド製剤であり、経口投与ではなく皮下注射により投与される。臨床試験では、プラセボ群またはインスリン分泌促進剤であるスルホニル尿素剤と比較して、HbA1c 改善及び体重増加抑制が認められたが、^{16, 17} 副作用として、嘔気などの消化器症状も報告されている。¹⁸

また、DPP4 阻害剤は 2009 年に本邦で初めて承認され、現在 7 成分が上市されており、いずれも低分子薬で経口投与されている。血中の DPP4 の働きを阻害することで GLP-1 濃度を維持することができるため、食後のインスリン分泌が促進され、食後高血糖を是正することができる。¹ 臨床試験ではプラセボ群と比較して体重の変化や重篤な低血糖の発生に差はなく、体重を増加させにくい薬剤である。¹⁹ 以上のことから、血中 GLP-1 濃度をコントロールすることは抗糖尿病作用の発現に重要であることが臨床的に証明されている。

1-3) GLP-1 分泌に関わる GPCR

1 - 3 - 1) GPR119

GLP-1 の分泌に関わるレセプターとして、近年 G タンパク質共役型受容体 119(GPR119)の研究が盛んに行われている。この GPR119 は 2003 年に同定されたオーファン受容体であり、ヒト、マウス及びラットにおいて消化管と膵臓に多く発現している。^{20, 21} 膵臓では特に β 細胞においてインスリンと、消化管 L 細胞では GLP-1 との局在が組織染色により確認されている。^{22, 23} また、膵 β 細胞株の NIT-1、MIN6、RIN5 や HIT-T15、腸内分泌 L 細胞株モデルである mGLUTag や NCI-H716 において発現が確認され、これらでの発現は組織で認められた分布と一致している。²³ GPR119KO マウスの oGTT では正常マウスと同等の血糖推移を示しているものの、摂餌刺激による GLP-1 分泌が減少している。これは GPR119 を介さないインスリン分泌が代替的に働いたためであると考えられるが、GLP-1 分泌には特に重要な役割を果たしていると考えられる。²⁴ GPR119 の内在性リガンドである *N*-オレオイルエタノールアミド(OEA)は、NCI-H716 や mGLUTag に対する刺激により、濃度依存的な cAMP 濃度の上昇作用を惹起し、GLP-1 分泌が促進することが報告されている。²⁵ また、同じく GPR119 内在性リ

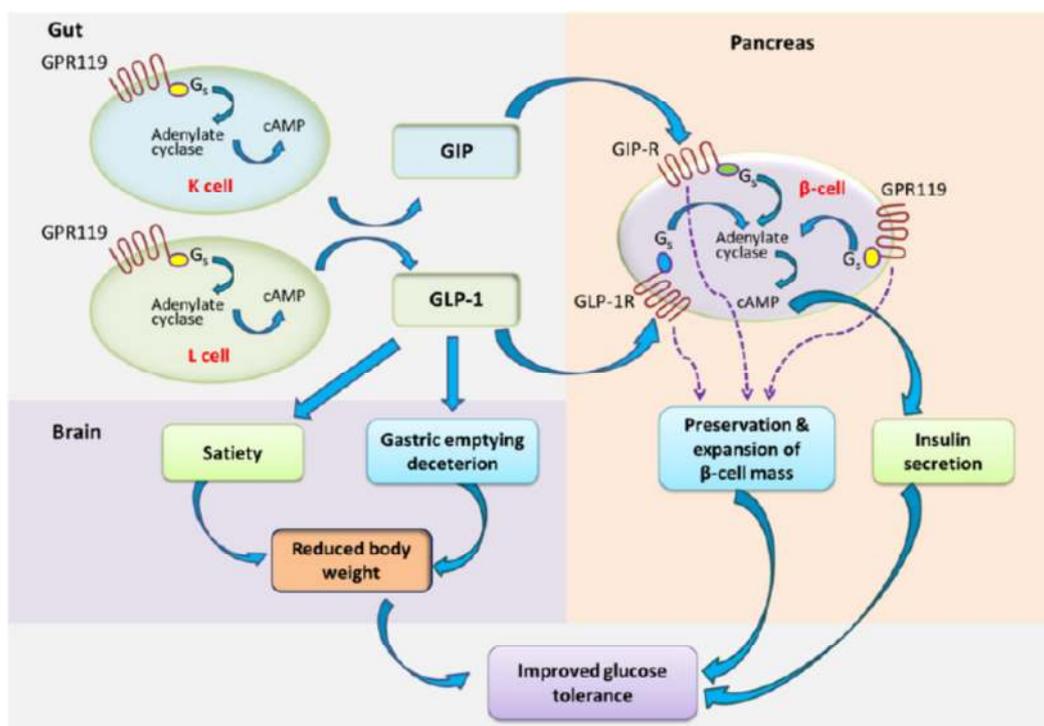


図 1-3: GPR119 の作用 (Diabetes Mellitus-Insights and Perspectives, 2013. より転載)

ガンドであるリゾホスファチジルコリンはラット単離膵島において濃度依存的なインスリン分泌作用を示し、GPR119 の siRNA を同時に作用させることによりインスリン分泌能が低下することを報告している。²¹ つまり、GPR119 の作用は図 1-3 のようになると考えられる。²⁶ 腸管内の L 細胞の GPR119 が活性化されると、アデニル酸シクラーゼを介し cAMP 濃度が上昇し、GLP-1 が分泌される。この GLP-1 が膵臓に作用し、図 1-1 で示した機序と同様に cAMP が上昇する。また、膵 β 細胞上の GPR119 が活性化されても cAMP の濃度が上昇する。これにより GLP-1 の効果とあいまって、糖濃度依存的なインスリンの分泌能が上がると考えられる。また、1-2) で示した GLP-1 の中枢への効果により、胃排出抑制効果による食欲の低下や糖吸収の遅延なども起こり、糖尿病の進行を遅らせることができると考えられる。さらには、胃排出抑制効果とともに摂食抑制効果もあり、体重増加抑制効果も期待できる。

1-3-2) GPR120, GPR40

GLP-1 分泌を促進する受容体として、GPR119 以外に、GPR120 や GPR40 の存在も知られ、精力的に研究がおこなわれている。GPR120 や GPR40 はいずれも中鎖-長鎖脂肪酸(C8-C22)をリガンドとする遊離脂肪酸受容体である。²⁷ ヒト結腸由来の内分泌細胞における GPR120 の活性化は GLP-1 の分泌を促進させることが報告されており、これはマウス内分泌細胞である STC-1 細胞でも確認されている。この STC-1 細胞の遊離脂肪酸刺激による GLP-1 分泌は GPR120 特異的 siRNA により抑制されている。そのため、GPR120 は GLP-1 分泌を促進し、間接的に糖濃度依存的なインスリン分泌を促し、血糖コントロールできる可能性が示されている。²⁸ また、GPR120 は単球様 RAW264.7 細胞及び M1 様マクロファージに内因性に発現しており、ω3 脂肪酸刺激が GPR120 を活性化させ、これらの細胞において広範な抗炎症作用を発現することが知られている。マクロファージによる組織の炎症は動脈硬化等の循環器疾患の原因としても知られており、メタボリックシンドロームを伴う循環器疾患においても魅力的なターゲットである。²⁷

GPR40 は小腸 L 細胞に発現しており、その活性化により GLP-1 分泌が促進されることが知られている。しかし、同じ遊離脂肪酸受容体の GPR120 の GLP-1 分泌促進能に対し、GPR40 の効果が低いことが、それぞれレセプターの siRNA を用いた試験から示唆されている。²⁹ 一方で、GPR40 は膵 β 細胞にも高発現していることが知られている。長鎖脂肪酸が GPR40 の活性化により、膵 β 細胞からの糖濃度依存的なインスリン分泌を促進し、GPR40siRNA によりこの効果は消失している。GPR40KO マウスでは、肥満による高インスリン血症や脂肪肝、

耐糖能異常が起きず、過剰発現させるとβ機能不全、高インスリン血症を伴う糖尿病をきたす。しかし、GPR40KO マウスに 8 週間高脂肪食を負荷した場合、空腹時高血糖や肥満、インスリン抵抗性をきたすという逆の報告もある。GPR40 のアゴニストとアンタゴニスト、どちらがⅡ型糖尿病の治療ターゲットになるのかは議論が分かれている。²⁸ そんな中、武田薬品工業社が開発した選択的 GPR40 アゴニスト Fasiglifam (TAK-875)は、³⁰ ラット及びヒトの単離膵島において糖濃度依存的なインスリン分泌促進作用を示し、また、糖尿病病態モデルラットでの空腹時高血糖と耐糖能を改善し、糖刺激によるインスリン分泌を向上させた。臨床試験にも進み、良好な薬物動態を示し、低血糖のリスクも低いことが示された。さらに、TAK-875 はインスリンレベルを高め、血糖値と HbA1c を低下させたため、新たな機序の糖尿病治療薬として非常に期待されていたが、Phase 3 試験において肝臓における安全性の懸念から開発を中止した。³¹

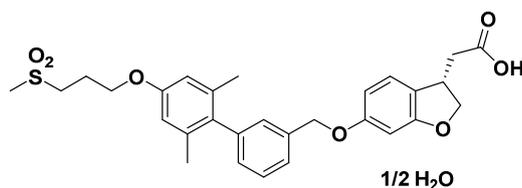


図 1-4 : Fasiglifam (TAK-875)

この原因が GPR40 アゴニストのクラスエフェクトであるかどうかはわからないが、この安全性の懸念から、同じく小腸 L 細胞からの GLP-1 分泌と膵β細胞でのインスリン分泌を促進する GPR119 アゴニストに注目が集まっている。

1-4) GPR119 アゴニスト

近年、GPR119 アゴニストの報告例が増えてきている。Arena 社の開発した GPR119 アゴニストである AR231453 は、GPR119 発現細胞株 mGLUTag 細胞および膵β細胞株 HIT-T15 において、化合物濃度依存的に細胞内 cAMP 濃度を上昇させた。³² (図 1-5) HIT-T15 細胞の cAMP 上昇は GPR119 の siRNA によって著しく抑制されたことから、AR231453 は GPR119 に選択的なアゴニストであ

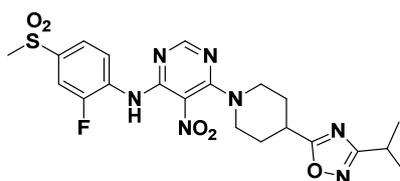


図 1-5 : AR231453

ると考えられている。mGLUTag 細胞では GLP-1 分泌促進作用が確認され、HIT-T15 では 5 mM グルコース条件下では無作用であったが、15 mM グルコース条件下でインスリン分泌促進作用を示したことから、糖濃度依存的なインスリン分泌促進作用が確認され、低血糖リスクが低いことが示唆されている。²²

AR231453 の報告と同時期に Prosidion 社が開発した選択的 GPR119 アゴニストである PSN-632408 は、GPR119 発現細胞において化合物濃度依存的な cAMP 濃度上昇を示すことが確認され、さらに 100 mg/kg と高用量ではあるものの、ラットで摂餌抑制作用が確認された。²⁵ (図 1-6) この試験でのラットの運動量はコントロール群と変化はなく、鎮静作用などによる摂餌抑制でないことも確認されている。この摂餌抑制に基づく体重減少作用も確認されており、GPR119 により分泌促進される GLP-1 の効果によるものと考えられている。

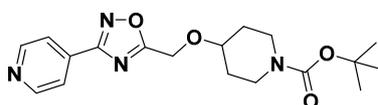


図 1-6 : PSN-632408

AR231453 や PSN-632408 の報告後、多くの GPR119 アゴニストの報告がなされ、いくつかは臨床試験まで進んでいる。AR231453 の後継化合物として開発された APD668 は非常に高い薬理作用と薬物動態を示していたが、非臨床試験において反復投与時に代謝物が高い濃度で蓄積していくことがわかり開発を中止している。^{33, 34} (図 1-7) APD597 は APD668 に比べ、活性が減弱しているが、経口吸収性も良く、安全性も優れており、開発がすすめられ、Phase 1 まで進み、良好な結果であったと報告されている。³⁵

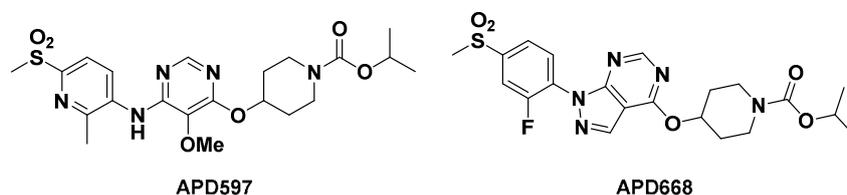


図 1-7 : APD597 及び APD668

グラクソスミスクライン社の GSK-1293263A³⁶ は Phase 2 試験において糖尿病患者で LDL コレステロールやトリグリセリドの低下作用が報告されたが、血糖降下作用について十分な薬効が見られず開発を中止している。(図 1-8) その他に Prosidion 社の PSN821 や第一三共社の DS-8500 なども開発が進められている。³⁷

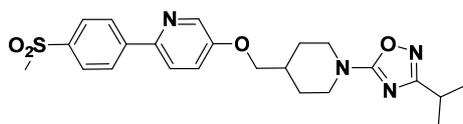


図 1-8 : GSK-1293263A

CymaBay 社(旧 Metabolex 社)の MBX-2982 はヒトにおける食事負荷試験で食後血糖を低下させ、インスリンと GLP-1 の分泌促進作用が確認された。³⁸ (図 1-9) また、グルコースクランプ試験においてインスリン分泌促進作用も確認されている。ヒトでの有害事象も報告されておらず、GPR119 アゴニスト作用の延長上における毒性懸念も少ないと考えられ、GPR119 アゴニストは有望な抗糖尿病ターゲットであると考えられる。

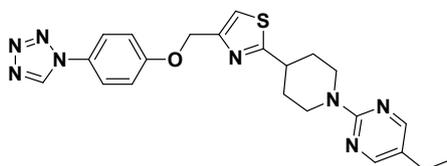


図 1-9 : MBX-2982

1-5) 本研究の目的

GPR119 アゴニストは小腸 L 細胞と膵 β 細胞の両方に作用し、GLP-1 分泌とインスリン分泌を促進するデュアルな作用が期待でき、糖濃度依存的なインスリン分泌による抗糖尿病効果と GLP-1 による胃排出抑制や摂食抑制効果から体重増加抑制も期待できる。他の GLP-1 関連薬剤である GLP-1 受容体アゴニストはいずれも非常に高い薬効を示すことが知られているが、注射剤であることから、服薬コンプライアンスが悪い。DPP4 阻害剤でも糖濃度依存的なインスリン分泌がなされるが、GLP-1 濃度が下がる空腹時での効果の減弱や肥満患者やインスリン抵抗性患者での効果が弱い場合があることが考えられる。一方、GPR119 アゴニストは GLP-1 分泌促進作用に加え、直接的なインスリン分泌を促すため、強力な GPR119 アゴニストであれば、体重増加作用の懸念がなく、DPP4 阻害剤よりも高い血糖降下作用を示す可能性があると考えられる。最も開発が進んでいる GPR119 アゴニストである MBX-2982 は体重増加抑制については言及されておらず、その効果を示すことができれば差別化点になると考えている。そこで、私は DPP4 阻害剤と同等以上の血糖降下作用を有し、且つ体重増加抑制作用を示す経口投与可能な GPR119 アゴニストの創製をめざし、研究をスタートした。

本論文の構成として、第一章では糖尿病と糖尿病治療薬の現状と新たな糖尿病治療薬としての GPR119 アゴニストの可能性について紹介する。第二章では化合物ライブラリのハイスループットスクリーニング(HTS)から見出された HTS ヒット化合物 **1** からビスクロアミン骨格を有するリード化合物 **26a** を見出すまでの SAR 研究について述べる。第三章では、リード化合物 **26a** やその周辺化合物に確認された hERG チャンネル阻害作用の軽減のため、ビスクロアミンをヘテロビスクロアミンとすることで塩基性の調節を図った。その結果得られた GPR119 アゴニスト活性と hERG チャンネル阻害作用の SAR について、また、高活性化合物 **55f** を中心に薬理試験の結果について述べている。第四章では、**55f** などのヘテロビスクロアミン誘導体では *in vivo* 試験での薬理作用が確認できなかったことから、リード化合物 **26a** に立ち戻り、再度リード最適化研究を行うことで見出された **73b** の薬理試験結果を交え、その SAR 研究を述べる。第五章では、結論として、HTS ヒット化合物 **1** からリード化合物 **26a**、そして開発候補化合物 **73b** を得るまでの結果と考察をまとめ述べる。

1-6) 参考文献

1. 日本糖尿病学会編, 糖尿病治療ガイド, **2010**, 文光堂.
2. 平成 19 年国民健康・栄養調査報告 結果の概要 第 1 部糖尿病等の状況, **2010**, 厚生労働省.
3. 糖尿病・糖代謝異常に関する診断基準検討委員会報告--空腹時血糖値の正常域に関する新区分.
門脇 孝, 羽田 勝計, 富永 眞琴
糖尿病, **2010**, 51, 281-283.
4. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized.
Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M.
Diabetes Research and Clinical Practice, **1995**, 28, 103-117.
5. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study.
Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A.
Diabetes Care. **1999**, 22(6), 920-924.
6. 肥満診断基準 2011
斎藤 康, 白井 厚治, 中村 正
肥満研究, **2011**, 17, 1-78.
7. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin.
Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group.
N Engl J Med. **2002**, 346(6), 393-403.
8. Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes.
Hamman RF, Wing RR, Edelstein SL, Lachin JM, Bray GA, Delahanty L, Hoskin M, Kriska AM, Mayer-Davis EJ, Pi-Sunyer X, Regensteiner J, Venditti B, Wylie-Rosett J.
Diabetes Care. **2006**, 29(9), 2102-2107.
9. Effect of an intensive exercise intervention strategy on modifiable cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial: the Italian Diabetes and Exercise Study (IDES).

Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, De Feo P, Cavallo S, Cardelli P, Fallucca S, Alessi E, Fallucca F, Pugliese G; Italian Diabetes Exercise Study (IDES) Investigators.

Arch Intern Med. **2010**, 170(20), 1794-1803.

10. The relative benefits of endurance and strength training on the metabolic factors and muscle function of people with type 2 diabetes mellitus.
Cauza E, Hanusch-Enserer U, Strasser B, Ludvik B, Metz-Schimmerl S, Pacini G, Wagner O, Georg P, Prager R, Kostner K, Dunky A, Haber P.
Arch Phys Med Rehabil. **2005**, 86(8), 1527-1533.
11. 糖尿病治療薬の副作用.
山崎 夕, 薄井 勲, 戸邊 一之
月刊糖尿病, **2010**, 2(5), 122
12. インクレチンの膵島への作用
豊田 健太郎, 稲垣 暢也
糖尿病, **2009**, 52(6), 419-421.
13. Additive insulintropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulintropic hormone and glucose concentrations.
Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W.
J Clin Endocrinol Metab. **1993**, 76(4), 912-917.
14. Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus.
Vilsbøll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Vølund A, Juul AG, Holst JJ.
J Clin Endocrinol Metab. **2003** Jun;88(6):2706-2713.
15. インクレチン治療の夜明け 期待される多彩な作用—体重減少など.
成田 琢磨.
糖尿病の最新治療, **2010**, 1(3), 130-137.
16. Exenatide exhibits dose-dependent effects on glycemic control over 12 weeks in Japanese patients with suboptimally controlled type 2 diabetes.
Kadowaki T, Namba M, Yamamura A, Sowa H, Wolka AM, Brodows RG.
Endocr J. **2009**, 56(3), 415-424.
17. Efficacy and safety of the once-daily human GLP-1 analogue, liraglutide, vs glibenclamide monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes.
Seino Y, Rasmussen MF, Nishida T, Kaku K.
Curr Med Res Opin. **2010**, 26(5), 1013-1022.

18. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes.
Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD; Exenatide-113 Clinical Study Group.
Diabetes Care. **2004**, 27(11), 2628-2635.
19. Dose-ranging efficacy of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus.
Iwamoto Y, Taniguchi T, Nonaka K, Okamoto T, Okuyama K, Arjona Ferreira JC, Amatruda J.
Endocr J. **2010**, 57(5), 383-394.
20. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives.
Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DE, Lagerström MC, Schiöth HB.
FEBS Lett, **2002**, 554(1-3), 381-383.
21. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor.
Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, Matsumoto S, Kamohara M, Hiyama H, Yoshida S, Momose K, Ueda Y, Matsushime H, Kobori M, Furuichi K.
Biochem Biophys Res Commun, **2005**, 326(4), 744-751.
22. A role for beta-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release.
Chu ZL, Jones RM, He H, Carroll C, Gutierrez V, Lucman A, Moloney M, Gao H, Mondala H, Bagnol D, Unett D, Liang Y, Demarest K, Semple G, Behan DP, Leonard J.
Endocrinology, **2007**, 148(6), 2601-2609.
23. A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release.
Chu ZL, Carroll C, Alfonso J, Gutierrez V, He H, Lucman A, Pedraza M, Mondala H, Gao H, Bagnol D, Chen R, Jones RM, Behan DP, Leonard J.
Endocrinology, **2008**, 149(5), 2038-2047.
24. GPR119 is required for physiological regulation of glucagon-like peptide-1 secretion but not for metabolic homeostasis.
Lan H, Vassileva G, Corona A, Liu L, Baker H, Golovko A, Abbondanzo SJ, Hu W, Yang S, Ning Y, Del Vecchio RA, Poulet F, Laverty M, Gustafson EL, Hedrick

- JA, Kowalski TJ.
J Endocrinol. **2009**, 201(2), 219-230
25. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents.
Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C.
Cell Metab, **2006**, 3(3), 167-175. (25)
26. GPR119 Agonists: A Novel Strategy for Type 2 Diabetes Treatment.
Xiaoyun Z, Wenglong H, Hai Q.
Diabetes Mellitus-Insights and Perspectives, **2013**, 4, 59-82.
27. 創薬標的としての遊離脂肪酸受容体：循環器疾患とメタボリックシンドローム
市村 敦彦, 原 貴史, 木村 郁夫, 平澤 明, 辻本 豪三
血管, **2011**, 34(2), 145-152.
28. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases.
Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O.
Trends Pharmacol Sci. **2011**, 32(9), 543-550.
29. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120.
Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G.
Nat Med. **2005**, 11(1), 90-94.
30. GPR40: a therapeutic target for mediating insulin secretion (review).
Feng XT, Leng J, Xie Z, Li SL, Zhao W, Tang QL.
Int J Mol Med. **2012**, 30(6), 1261-1266.
31. 武田薬品工業株式会社プレスリリース.
http://www.takeda.co.jp/news/2013/20131227_6116.html
32. Discovery of the first potent and orally efficacious agonist of the orphan G-protein coupled receptor 119.
Semple G, Fioravanti B, Pereira G, Calderon I, Uy J, Choi K, Xiong Y, Ren A, Morgan M, Dave V, Thomsen W, Unett DJ, Xing C, Bossie S, Carroll C, Chu ZL, Grottick AJ, Hauser EK, Leonard J, Jones RM.
J Med Chem. **2008**, 51(17), 5172-5.
33. Discovery of fused bicyclic agonists of the orphan G-protein coupled receptor

GPR119 with in vivo activity in rodent models of glucose control.

Semple G, Ren A, Fioravanti B, Pereira G, Calderon I, Choi K, Xiong Y, Shin YJ, Gharbaoui T, Sage CR, Morgan M, Xing C, Chu ZL, Leonard JN, Grottick AJ, Al-Shamma H, Liang Y, Demarest KT, Jones RM.

Bioorg Med Chem Lett, **2011**, 21(10), 3134-3141.

34. Discovery of a second generation agonist of the orphan G-protein coupled receptor GPR119 with an improved profile.

Semple G, Lehmann J, Wong A, Ren A, Bruce M, Shin YJ, Sage CR, Morgan M, Chen WC, Sebring K, Chu ZL, Leonard JN, Al-Shamma H, Grottick AJ, Du F, Liang Y, Demarest K, Jones RM.

Bioorg Med Chem Lett, **2012**, 22(4), 1750-1755.

35. Arena Pharmaceuticals プレスリリース, Nov 4, 2010.

36. <http://www.cardiovalens.com/>

37. Thomson Reuters Cortellis®, Drug report.

38. CymaBay Therapeutics ホームページ.

http://www.cymabay.com/pipeline_mbx2982.html

第二章 新規 GPR119 アゴニストの探索

2-1) 序論

医薬品開発において創薬研究では、まず、ターゲット分子(タンパクやレセプター)に対して作用する低分子量のヒット化合物を見出し、このヒット化合物の化学修飾などにより周辺化合物を合成し、目標とするプロファイル(活性、物性、動態、安全性、新規性など)を持つ化合物に変換し、動物での薬理活性を示すリード化合物の獲得を目指す。その後、構造最適化を行い、臨床候補化合物へと導いていくことが一般的に行われている。

近年の創薬研究では薬理活性を示す新規なヒット化合物を得る方法として、大きく分けて 3 つの方法が知られている。一つは、目的のターゲット分子に対する既存薬や既存の活性化合物の改良により得る方法である。この方法は薬理活性を示す化合物を獲得できる可能性が高いが、競争の激しいターゲットである場合は特許の報告数も多くなり、新規性や進歩性を獲得することが困難な場合もある。二つ目として、ターゲット蛋白の結晶構造や既存のリガンドから新規な化合物デザインする Structure Based Drug Design (SBDD) や Ligand Based Drug Design (LBDD) などが知られている。^{1,2} SBDD ではターゲット蛋白が特定された場合、ヴァーチャルなドッキングによって新規化合物の探索を行うことや見出した化合物の共結晶 X 線構造解析から活性を向上させることが可能である。ターゲット蛋白の結晶構造からヒット化合物を探索するため、ヒット率が高いことが知られている。しかし、ターゲット蛋白の結晶構造が既知でない場合は活用することができない。今回のターゲットである GPR119 の X 線結晶構造は明らかになっていない。また、GPR119 は膜タンパクであり、その結晶化も困難であると考えられ、GPR119 アゴニストの創製において、この手法を活用することは難しい。LBDD では既存の活性化合物の立体的、電子的特徴から作成したファーマコフォアモデルを用いヴァーチャルスクリーニングを行うことにより、評価する化合物を絞ることができ、ランダムスクリーニングよりも高いヒット率を実現できる。その反面、既存の活性化合物からモデルを作成するため、しばしば活性化合物に良く似た化合物がヒットすることがある。最後の三つ目は、各研究機関で所有する化合物ライブラリを用いた HTS である。この方法ではターゲットに対する活性化合物がほとんど知られていない場合でも、評価方法さえあれば活性化合物を得ることができる。また、既知の活性化合物がある場合でも、そこからでは見出すことのできない新規な構造のヒット化合物を得られる可能性を秘めている。³ しかし、所有しているライブラリに依存することから、数多くの多様性のあるライブラリを用意しておく必要がある。また、

ヒット率もこれら 3 つの方法の中で最も低いことや多くの化合物を評価するためコストがかかる。

2-2) HTS ヒット化合物の獲得

研究開始時には既に GPR119 アゴニストを開発している先行他社が多く、⁴ より新規な GPR119 アゴニストを得るために、私は化合物ライブラリを用いた HTS を行うこととした。その結果、図 2-1 に示すビスクロアミド骨格を有する HTS ヒット化合物 **1** を得ることができた。

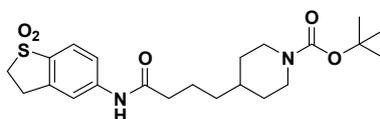


図 2-1 : HTS ヒット化合物 **1**

この化合物は、EC₅₀が 2.6 μM、E_{max} が 56%の活性を有しており、鎖状のリンカー構造でビスクロ環と Boc ピペリジンを繋いだ構造をしている。化合物 **1** の新規性について精査したところ、数は少ないものの他社が出願した特許中に鎖状リンカー構造の化合物もクレームされていることが分かった。^{5,6} しかし、さらにビスクロ環を有する化合物は報告されておらず、ビスクロ環と鎖状リンカーの両方を持つことで新規性を見出すことが出来ている。次に、この化合物 **1** を A 環、リンカーおよび B 環の 3 つのフラグメントに分け、各フラグメントについて、これまで報告されている GPR119 アゴニストの構造との比較を行った。

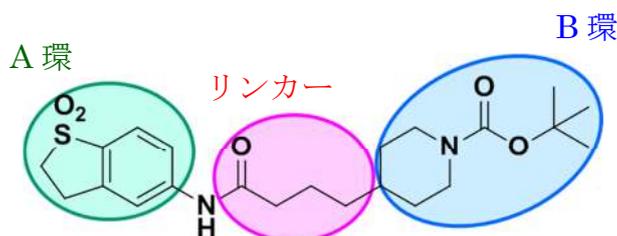


図 2-2 : 化合物 **1** のフラグメント化

多くの GPR119 アゴニストは、化合物 **1** に用いられているピペリジン環を有している。そこで、ピペリジン環を合わせた状態でのトポロジー解析を行った。その結果、A 環に相当する部分に、メタンスルホニル基などで置換されたベンゼン環やピリジン環が重なっている。各社の開発化合物やこれまで報告されてきた GPR119 アゴニスト⁷ ではピペリジン環からこれらの芳香環までを環を含

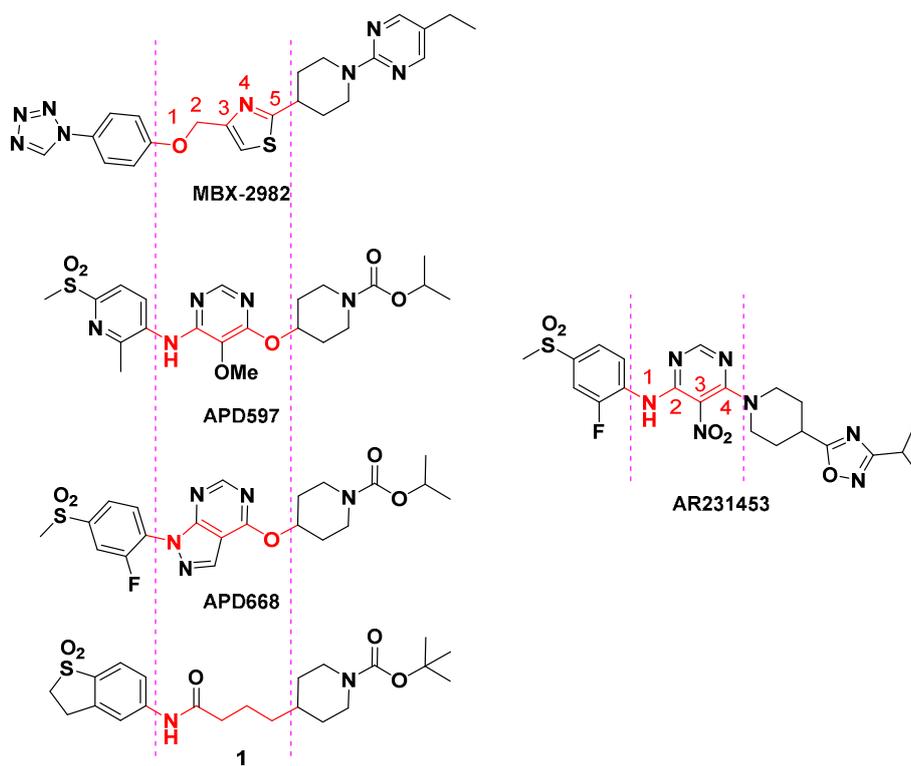


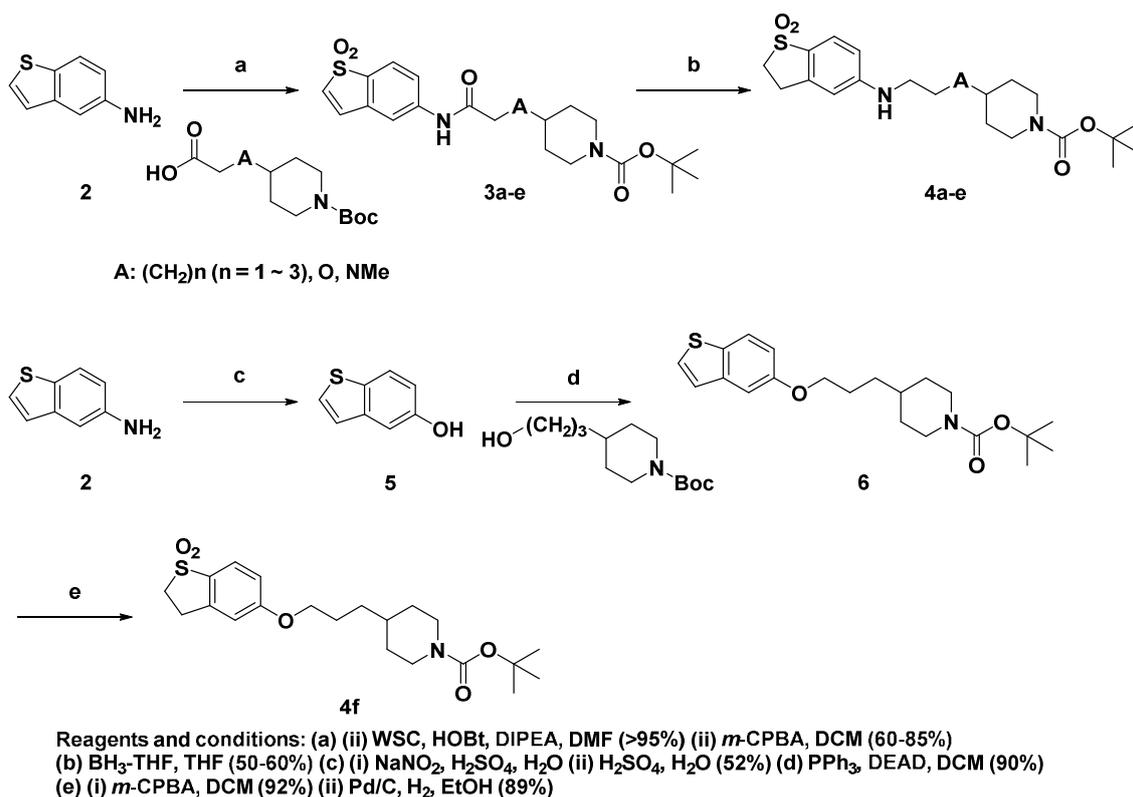
図 2-3：化合物 1 と各社化合物のトポロジー解析

む構造で繋いでいる場合が多い。その長さは 5 原子長になっているものが最も多く報告されており、化合物 1 も 5 原子長の直鎖リンカー構造を有しているため、このようなフレキシブルな構造でも活性を示したと考えられる。一方、高活性を示す AR231453 ではピペリジン環からベンゼン環までの距離は 4 原子長となっており、この距離は 4 または 5 原子長が適していることが示唆され、化合物 1 のリンカー構造も 1 原子分短くしても活性を維持する可能性がある。また、各社の化合物の A 環とリンカーに相当する環構造の結合部位にはエーテル結合やアミノ結合などが用いられており、アミド構造よりも適したモチーフがある可能性がある。脂溶性や酸性条件での安定性が危惧される Boc 基の等価体として、ピリミジン環やオキサジアゾール環が用いられた化合物が各社から特許出願されている。⁶ しかし、その構造と活性についての知見はほとんど報告されていないため、Boc 等価体の変換についても検討を行う必要がある。

そこで、まずは、報告例の少ない鎖状リンカーについてリンカーの長さや結合様式の変換を行い、続いて A 環であるビシクロ環の変換、最後に脂溶性、酸への安定性が危惧される B 環の Boc 基の等価体への変換を行った。以下、実際の化合物の合成と SAR 結果について説明する。

2-3) リンカーの最適化

リンカーの最適化では、A 環と B 環を化合物 **1** と同じものに固定し、検討を行った。まず、リンカーの長さの変換を行い、その後、リンカーにヘテロ原子を導入し、脂溶性の差による活性への寄与を検討した。アミン体 **4a-e** は 5-アミノベンゾチオフェン **2** と対応するカルボン酸との脱水縮合後にチオフェン環の硫黄原子の酸化によりアミド体 **3a-e** を得た。その後、ボラン-THF 錯体によりベンゾチオフェン環とアミド基の還元を行うことで、**4a-e** を高収率で得ることができた。エーテル体 **4f** についても、5-アミノベンゾチオフェン **2** から合成した。すなわち、アミン **2** の Sandmeyer 反応⁸ により得られた 5-ヒドロキシベンゾチオフェン **5** と対応するアルコールとの光延反応によりエーテル体 **6** とした。得られた **6** の硫黄原子の酸化に続く、二重結合の還元により **4f** を合成した。

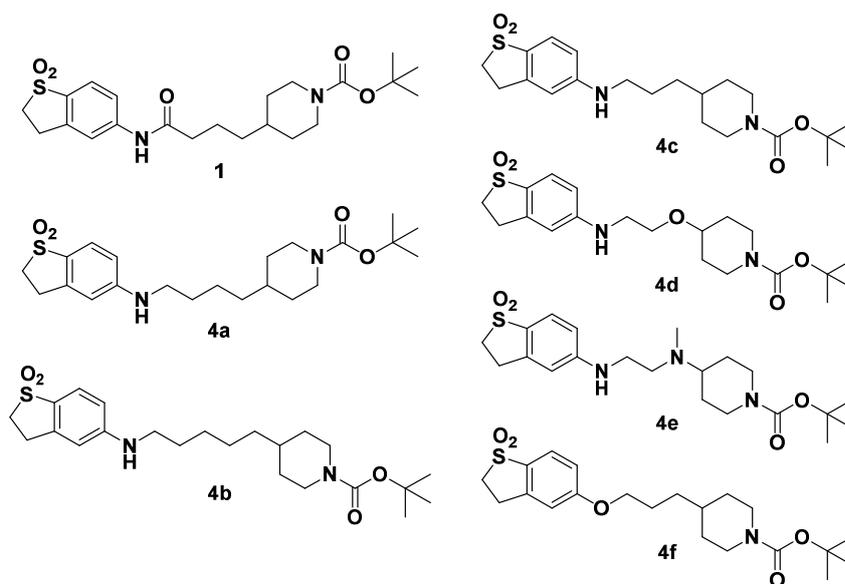


Scheme 2-1 : スルホンアナログ **4a-f** の合成

得られた化合物の評価はヒト GPR119 発現細胞を用い、均一系時間分解蛍光 (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF))法により測定した。HTRF 法とは、2 種類の蛍光標識分子、具体的にはドナーである長寿命のユーロピウム (Eu³⁺) クリプテートと、cAMP-d2 との間のエネルギー転移に基づいている。⁹ この技術

は、時間分解蛍光と蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を組み合わせたものである。生化学実験で通常使用される蛍光標識化合物は蛍光寿命が短いため、サンプルや媒体などに由来するバックグラウンドの蛍光の影響を受けやすい。それに対し、ランタノイドイオンはストークスシフトの大きい長寿命の蛍光を生じるため、時間分解蛍光測定を行うことにより、バックグラウンドの影響を低減することができる。この技術を利用したアッセイは、高感度であることに加え、洗浄操作不要のホモジニアスな系であるため、簡便で精度が高く、迅速であるという利点がある。即ち、GPR119 発現細胞に GPR119 アゴニストを作用させることにより濃度上昇する cAMP が cAMP-d2 と競合し変化するエネルギー転移を測定することにより、GPR119 アゴニスト活性を測定することができる。活性化率は Arena 社の開発した GPR119 アゴニストである AR231453 が最大活性を示す

Table 2-1 : スルホンアナログのヒト GPR119 アゴニスト活性



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hEmax(%) ^c
1	2610	56
4a	210	62
4b	145	65
4c	270	80
4d	(33%) ^a	33
4e	(10%) ^b	10
4f	736	84

^a %アゴニスト活性@1 μM, ^b %アゴニスト活性@10 μM, ^c %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較) .

100 nM での活性化率を 100%として算出した。

リンカー構造を変換したスルホンアナログの *in vitro* GPR119 アゴニスト活性の評価結果を Table 2-1 に示した。リンカーのアミド基をアミノメチレン基に変換した化合物 **4a** は、化合物 **1** と比較して、約 10 倍の活性向上が見られた。エーテル体 **4f** は対応するアミン体 **4c** に比べ 3 倍の活性減弱が見られた。これらの結果から、このシリーズの GPR119 アゴニストにおいて、リンカーの塩基性窒素が活性発現に重要な役割をしていることが示唆された。

続いて、リンカーと B 環の結合様式の検討を行った。メチレンをエーテル(**4d**)やメチルアミン(**4e**)に置換した場合には、**4c** に対し活性が大きく減弱する結果となった。さらにリンカーの長さの検討を行った結果、メチレン鎖が 3 原子の場合(**4c**)に最も良好な結果が得られた。したがって、直鎖のアルキル鎖がリンカーに最適であり、リンカーの脂溶性が GPR119 アゴニスト活性の発現に寄与していると考えられた。また、リンカー長が短くなったことにより、自由度が下がったことが活性発現に繋がったものと考えている。リンカーの最適化により良好な結果が得られた **4c** を基に、A 環の最適化を行った。

2-4) A 環の最適化

A 環がビシクロ環であり、且つ鎖状リンカー構造であることが、他社特許に対してこのシリーズの GPR119 アゴニストが新規性を有する条件である。そのため、A 環はビシクロ環に固定し、様々な環への変換を行うこととした。**4c** に用いられているスルホニル基は他社化合物にもよく使われているモチーフであり、活性発現に重要であり、この骨格での最適なモチーフを探索するため、スルホニル基の等価体変換を中心に検討した。A 環の変換時には、様々な A 環の構造に対応するため、Scheme 2-1 のようなアミド化後の還元ではなく、アミン **10b-1** へのアルキル化を検討した(**10a** を除く)。その結果、アミンの求核性が非常に低く図 2-4 に示すハロゲン体との反応は殆ど進行せず室温から通常の還流条件下では収率が 10%程度であり、高温での反応では原料アミンの分解が確認された。また、マイクロウェーブ反応装置を用いた場合に 180°C 以上の高温化で 50~60% 程度の収率で目的物を得ることができた。次に、還元的アミノ化を検討し、NaCN(BH₃)ではアルデヒド体の還元が先に進行してしまうが、NaBH(OAc)₃ を用いた場合には、アルデヒドの還元を抑制し、系内で生成したイミンの還元が優先して起こり、中程度から良好な収率で目的のアミン体を得ることができた。そこで、より簡便な還元的アミノ化の手法を選択し合成を行った。(Scheme

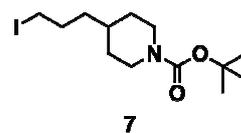
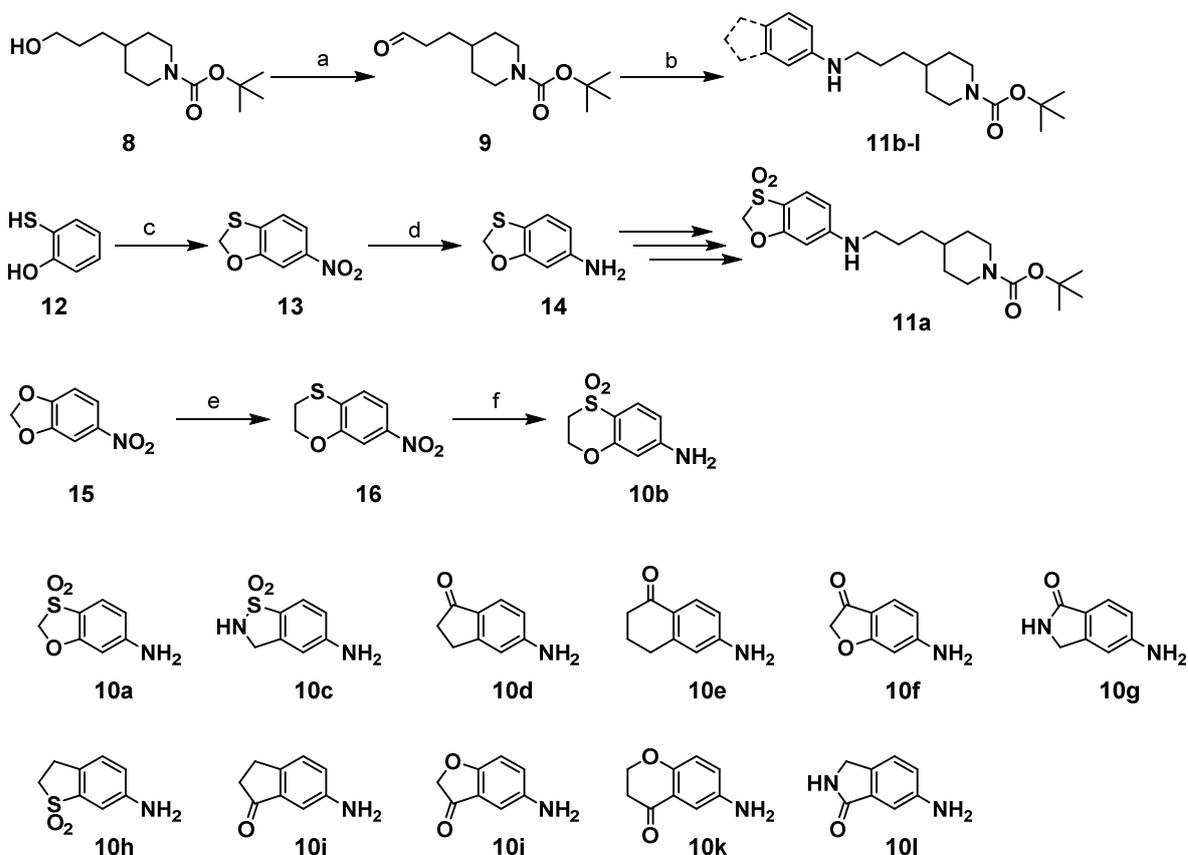


図 2-4: ハロゲン体 7



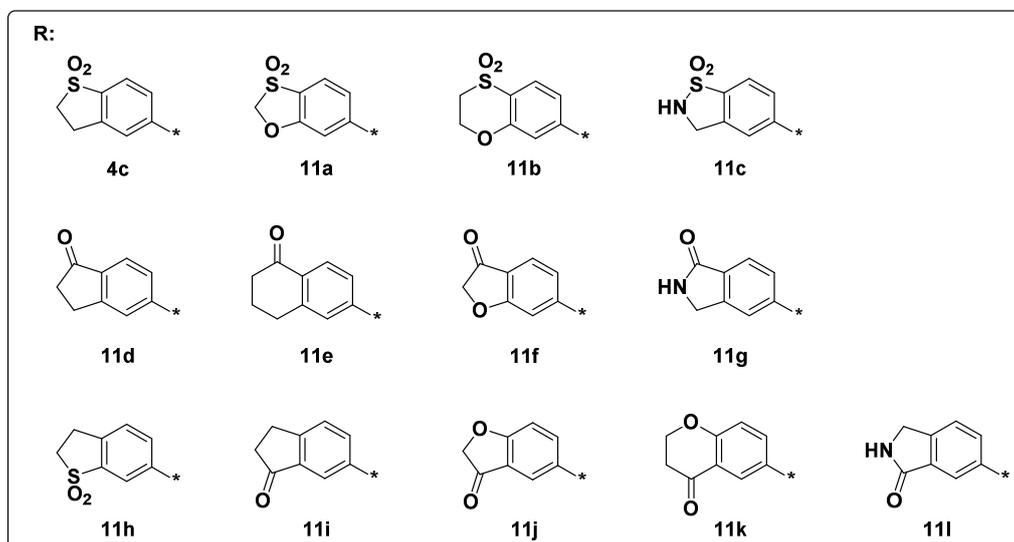
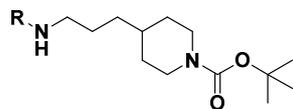
Reagents and conditions: (a) Dess-Martin periodinane, DCM (92%) (b) **10b-l**, NaBH(OAc)₃, DCM (20-85%) (c) (i) BrCH₂Cl, Cs₂CO₃, DMF (44%) (ii) 40% HNO₃, AcOH (11%) (d) Fe, NH₄Cl, EtOH, H₂O (56%) (e) (i) HO(CH₂)₂SH, DIPEA, NMP (26%) (ii) PPh₃, DEAD, Toluene (75%) (f) (i) m-CPBA, DCM (99%) (ii) Fe, AcOH, H₂O (99%)

Scheme 2-2 : アミンアナログ **11a-l** の合成

2-2) アミン **14** は以下の方法により合成した。ニトロ体 **13** は 2-ヒドロキシチオフエノール **12** とブロモクロロメタンとの環化後、40%硝酸を用いたニトロ化により合成し、ニトロ基を鉄と塩化アンモニウムにより還元することにより **14** を合成した。**11a** は Scheme 2-1 に示す方法に従って合成した。アミン **10b** は 4-メチレンジオキシニトロベンゼン **15** から合成した。即ち、メルカプトエタノールとの求核置換に続く光延反応により **16** とし、硫黄原子の酸化とニトロ基の還元により **10b** を合成した。その他のアミンは、市販の原料の購入または既報の方法に基づき合成し、後の反応に使用した。¹⁰

A 環を変換したビスクロアミン体の *in vitro* GPR119 アゴニスト活性の評価結果を Table 2-2 に示した。活性はヒトとマウスの 2 種の発現細胞を用い評価を行った。その結果、6-6 ビシクロ環に環拡大した **11b**, **11e** や **11k** では、対応する 5-6 ビシクロ環を有する **11a**, **11d** や **11j** に比べ活性の低下が見られた。そのため、5-6 ビシクロ環について、更なる変換を行った。スルホニル基の等価体であるケト

Table 2-2 : ビシクロアミン誘導体の GPR119 アゴニスト活性



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hEmax ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mEmax ^a (%)
4c	270	80	224	83
11a	254	93	266	105
11b	511	81	NT ^b	NT ^b
11c	268	99	331	95
11d	86	85	87	105
11e	770	8	NT ^b	NT ^b
11f	52	94	66	108
11g	550	91	515	102
11h	1029	25	NT ^b	NT ^b
11i	46	98	123	110
11j	88	95	262	116
11k	272	100	351	108
11l	734	89	892	97

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較) ^b 未測定

ン **11d** では 3 倍の活性増強が見られた。しかし、スルホラクタム **11c** やラクタム体 **11g** では活性が減弱する結果となった。さらに、**11d** のメチレンを酸素原子に置換した **11f** はヒトとマウスの両方で非常に高い活性を示した。次に、ケトンやスルホニル基などの電子求引性基をリンカー結合位置のメタ位に導入した。そ

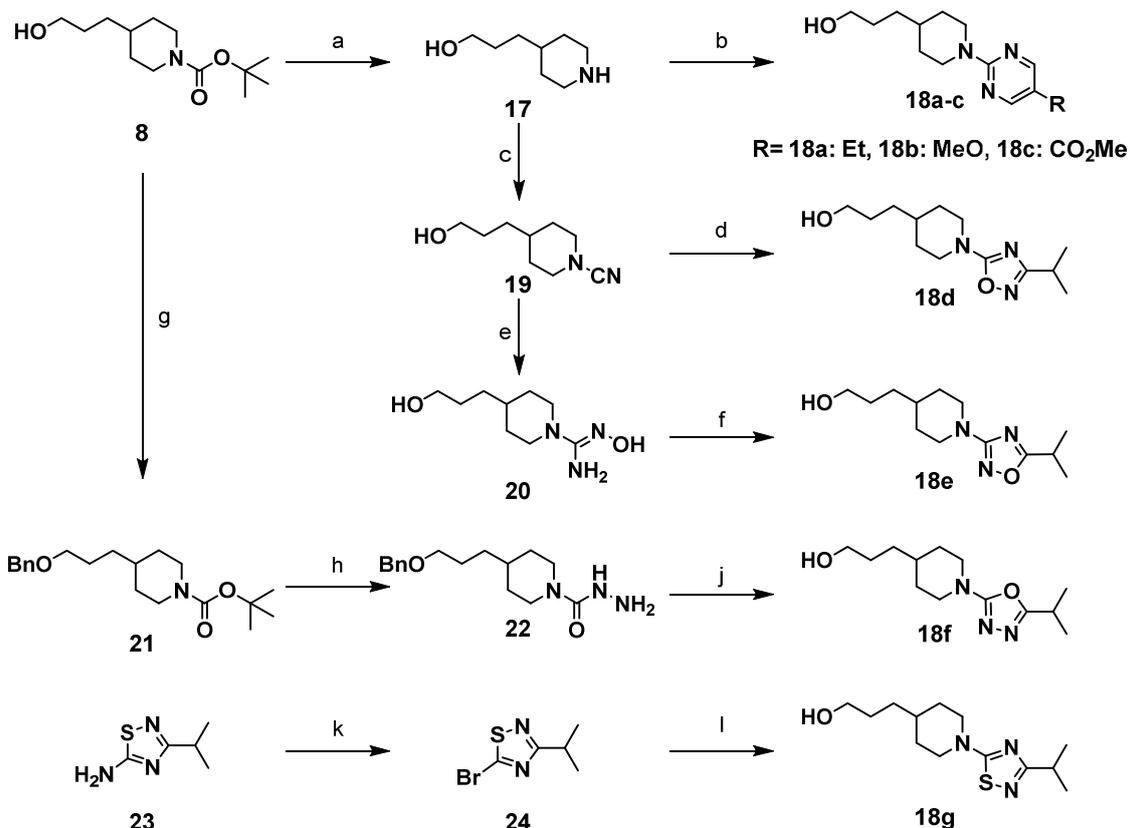
の結果、**11i** と **11j** は対応するパラ位体 **11d** 及び **11f** 同様、高い活性を示した。特に、インダノン **11i** では約 2 倍の活性向上と Emax の向上が見られ、これらの化合物の中で最も高い活性を示した。**11d**, **11f**, **11i** や **11j** のように、リンカーの結合位置が変わっても活性を維持している化合物では、ケトンの位置と活性の相関がないことから、スルホニル基やケトンは水素結合受容体としての役割よりも、電子求引性基としての役割が大きいと推察している。

2-5) B 環 Boc 等価体の検討

これまで、このシリーズの GPR119 アゴニストには、活性の高かった **11f** と **11i** も含めて B 環に Boc 基が使用されている。Boc 基はアミン類の保護基に良く用いられており、脂溶性が非常に高く、酸性条件下で分解することが知られている。さらに、体内でのエステラーゼによる分解なども予測され、経口での薬物の投与を考える上で構造上適していないと考えられる。Szewczyk らの報告した GPR119 アゴニスト研究では、Boc 基の等価体に、6 員環のピリジン、ピリダジン、ピリミジンを用いており、ピリミジンが最も適していたと報告している。¹¹ しかし、5 員環等価体の報告例は殆どないため、5 員環等価体としてオキサジアゾールやチアジアゾールなどへ、6 員環等価体としてピリミジンへの変換を行った。

Boc 基を等価体変換した化合物は Scheme 2-2 の方法に則り合成を行うこととし、合成に必要な対応するアルコール体はアルコール **8** から合成した。(Scheme 2-3) ピリミジン誘導体 **18a-c** はアルコール **8** の脱保護体であるアミノアルコール **17** と 2-クロロピリミジン誘導体とのカップリングにより合成した。1,2,4-オキサジアゾール **18d** はアミノアルコール **17** をニトリル化し、ヒドロキシアミジンとの環化により合成した。ニトリル **19** から調製したヒドロキシグアニジン **20** とイソブチル酸との WSC および HOBt を用いた縮合により 1,2,4-オキサジアゾール **18e** を得た。1,3,4-オキサジアゾール **18f** はアルコール **8** のベンジル保護体 **21** より合成した。即ち、エーテル **21** の脱 Boc 化に続く、*p*-ニトロフェニルカーバメートを紹介してヒドラジド **22** とし、イソブチル酸によるアシル化に続く、四塩化炭素とトリフェニルホスフィンにより環化し、脱ベンジル化することで、**18f** へと導いた。チアジアゾール **18g** はアミノチアジアゾール **23** の Sandmeyer 反応¹² により調製したプロモチアジアゾール **24** とアミノアルコール **17** の反応により得られた。

11f 及び **11i** の Boc 基を等価体変換した化合物の in vitro GPR119 アゴニスト活性の評価結果を Table 2-4 に示した。化合物 **11f** の Boc 基をピリミジン誘導体 (**25a-c**) に変換した場合、いずれの場合も hEC₅₀ の若干の低下が見られたが、**25a**

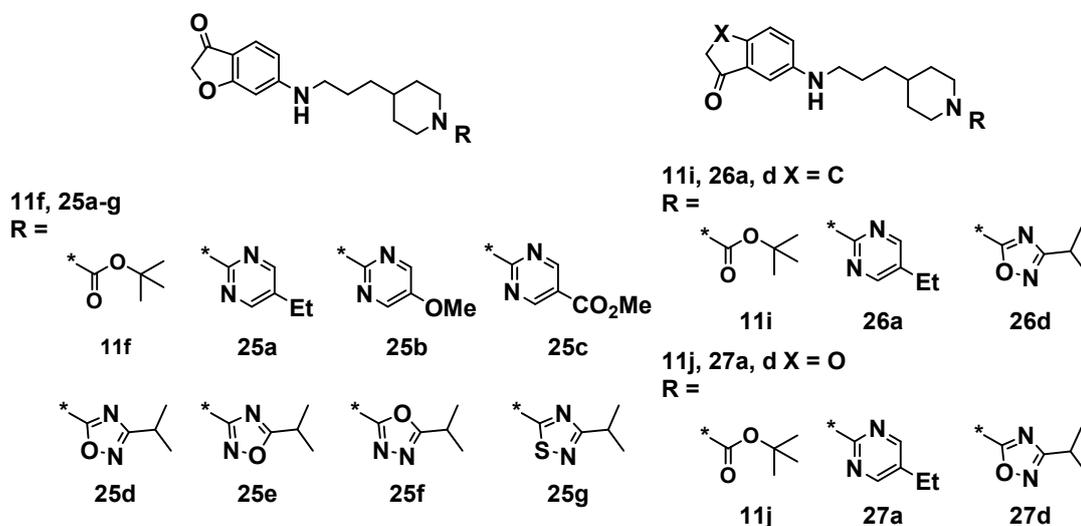


Reagents and conditions: (a) HCl, 1,4-Dioxane, DCM (95%) (b) corresponding pyrimidines, DIPEA, i-PrOH (30-95%) (c) BrCN, NaHCO₃, DCM, H₂O (95%) (d) (i) *N*-Hydroxyisobutyrimidamide, ZnCl₂, EtOAc, THF (ii) EtOH, *conc.*HCl (78%) (e) NH₂OH HCl, K₂CO₃, EtOH, H₂O (76%) (f) Isobutyric acid, WSC, HOBT, DIPEA, DMF (50%) (g) BnBr, NaH, DMF (95%) (h) (i) HCl, 1,4-Dioxane, DCM (ii) *p*-Nitrophenyl chloroformate, DIPEA, DCM (96%) (iii) NH₂NH₂, EtOH (45%) (j) (i) Isobutyric acid, TBTU, HOBT, DIPEA, DMF (66%) (ii) CCl₄, Et₃N, PPh₃, DCM (63%) (iii) Pd/C, H₂, EtOH (99%) (k) *tert*-Butylnitrate, CuBr, Acetone (67%) (l) **17**, Et₃N, DCM (98%)

Scheme 2-3 : アルコールアナログ **18a-g** の合成

ではヒト GPR119 において高い E_{max} を示し、ピリミジン 5 位の置換基には脂溶性の高いものが適していることが分かった。1,2,4-オキサジアゾール誘導体 **25d** では **11f** と同等の活性を示したが、他の異性体(**25e**, **25f**)では活性が低下した。**25d** のチアアナログであるチアジアゾール **25g** では活性が見られなかった。**11i** や **11j** の Boc 基の変換においては、**26a, d** や **27a, d** がそれぞれ **11i** と **11j** と同等の EC₅₀ を示し、さらに、ヒトとマウスの両方で高い E_{max} を示した。これらの結果から、このシリーズの GPR119 アゴニストにおいて、5-エチルピリミジンと 3-イソプロピル-1,2,4-オキサジアゾールが Boc 基の良好な等価体として働くことが分かった。

Table 2-3 : ビシクロアミン誘導体の GPR119 アゴニスト活性



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hEmax ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mEmax ^a (%)
11f	52	94	55	108
25a	117	115	159	98
25b	115	101	60	106
25c	149	85	139	67
25d	73	94	NT ^b	NT ^b
25e	161	91	NT ^b	NT ^b
25f	704	85	1015	88
25g	121	10	812	93
11i	46	98	123	110
26a	51	113	167	110
26d	58	110	158	113
11j	88	95	262	116
27a	58	110	160	109
27d	61	95	266	111

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較) ^b 未測定

2-6) 活性化化合物の in vivo 評価

本研究において、第一章で述べたように、このシリーズの GPR119 アゴニストは経口投与可能な糖尿病治療薬としての開発を目標としている。そのためには、化合物がげっ歯類、イヌやサルなどの動物ににおいて経口投与での効果を確認する必要がある。そこで、初めに in vitro 評価で高活性を示した化合物につ

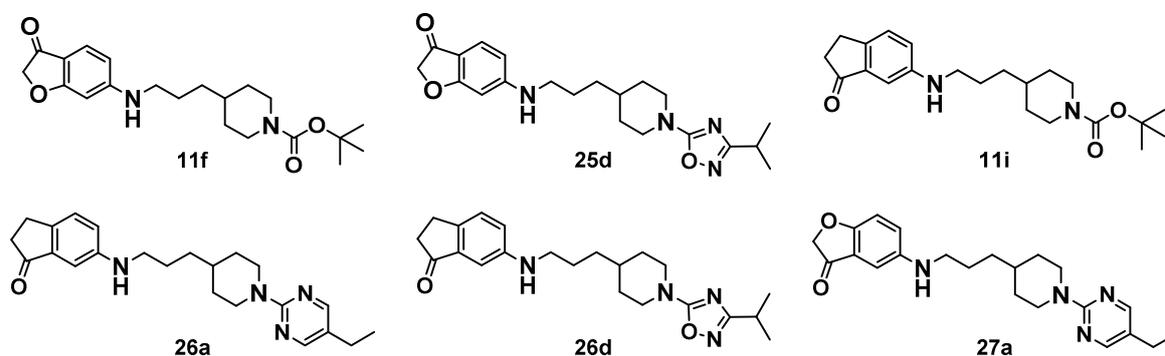
いて、oGTTによる血糖上昇抑制効果を見ることとした。このoGTTは絶食下のマウスに対して、事前に10 mg/kgのGPR119アゴニストを経口投与した30分後に経口での2 g/kgのブドウ糖を負荷し、0分から120分まで経時的に血中糖濃度を測定し、非薬剤投与群(コントロール)に対する血糖上昇抑制率を評価した。化合物の使用量を抑えることができ、安価に動物を入手できることから、マウスを使用し実験を行った。この試験で効果のある薬剤は、ヒトでの食後高血糖に対する効果を占うことができ、さらに、経口投与による血糖上昇抑制作用があると判断することができる。血糖上昇抑制率は以下の式により算出している。また、血糖上昇抑制率は統計学的に有意差がある場合に効果が見られたと判定している。

血糖上昇抑制率(%) =

$$\text{薬物投与群血糖上昇曲線 AUC} / \text{コントロール群血糖上昇曲線 AUC} * 100$$

高活性であった化合物についてoGTT評価を行った結果をTable 2-4に示す。

Table 2-4 : 活性化合物のoGTT結果



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hE _{max} ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mE _{max} ^a (%)	oGTT 120min ΔAUC(%)
11f	52	94	55	108	67*
25d	73	94	NT ^b	NT ^b	82
11i	46	98	123	110	82
26a	51	113	167	110	62**
26d	58	110	158	113	85
27a	58	110	160	109	83

^a %最大活性 (AR231453の最大活性との比較) ^b 未測定

その結果、多くの化合物で 20%前後の血糖上昇抑制傾向を示し、**11f** と **26a** においてコントロール群に対し血糖上昇抑制効果を有意な差を持って確認することができた。次に、最も高い効果を示した **26a** の oGTT における用量反応性を評価した。その結果、用量依存的な血糖上昇抑制効果を示し、3 及び 10 mg/kg の両方において、それぞれ 29%及び 38%の有意な血糖上昇抑制率を示し、化合物 **26a** は食後過血糖をコントロールできる可能性を示した。(図 2-5)

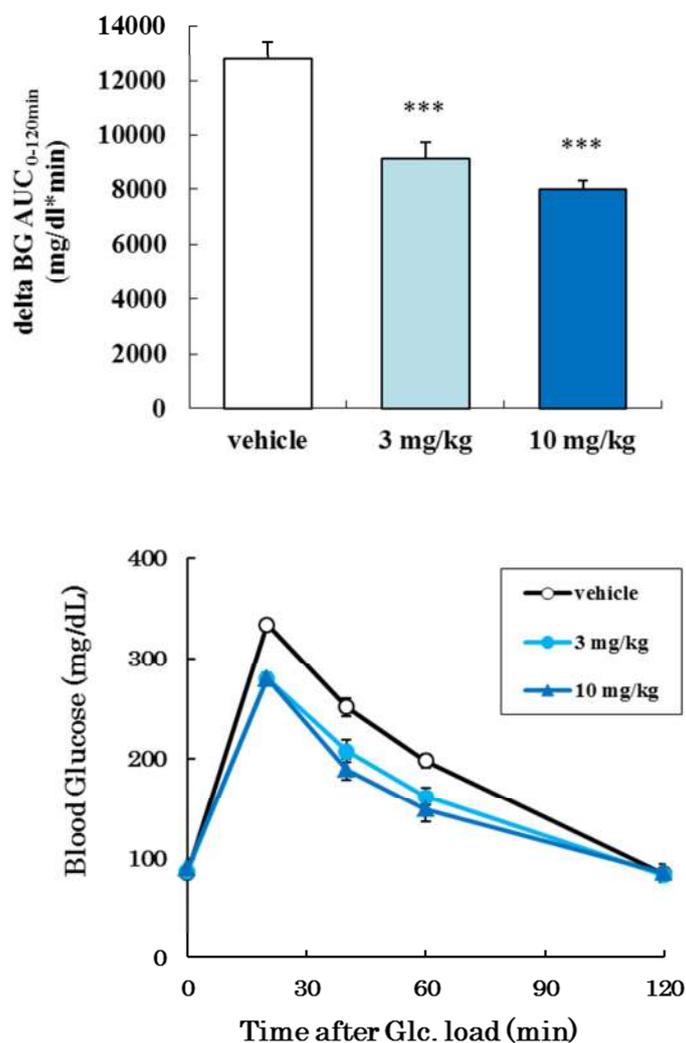


図 2-5 : **26a** の oGTT 用量反応性試験

化合物 **26a** が高い血糖上昇抑制効果を有していることから、続いて皮下糖負荷試験(scGTT)による血糖上昇抑制効果を見ることとした。この scGTT は絶食下のマウスに対して、事前に 10 mg/kg の GPR119 アゴニストを経口投与した 30 分

後に皮下に 2 g/kg のブドウ糖を負荷し、0 分から 120 分まで経時的に血中糖濃度を測定し、コントロール群に対する血糖上昇抑制率を評価した。scGTT では経口で糖負荷を行わないため、糖刺激による消化管からの GLP-1 分泌がなく、GPR119 アゴニストそのものの GLP-1 およびインスリン分泌による血糖上昇抑制能を見ることができる。さらには、消化管からの GLP-1 分泌がなく、高血糖を実現することができるため、疑似的な空腹時高血糖の状態を簡易的に作り出すことができ、それに対する効果を評価できる。(図 2-6) 一般的に糖刺激による GLP-1 分泌を抑えるためには、静脈内糖負荷試験が行われるが、¹³ より簡便に試験を行うため、皮下投与による糖負荷を行っている。その結果、10 mg/kg において 32%の血糖上昇抑制率を示し、化合物 **26a** が食後過血糖だけでなく、空腹時高血糖もコントロールできる可能性を示した。

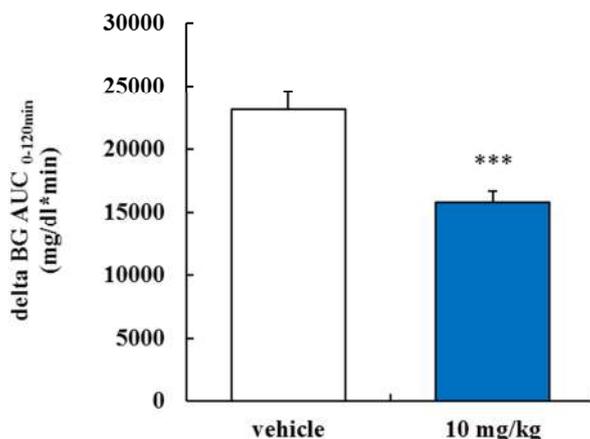


図 2-6 : **26a** の scGTT 結果

さらに、化合物 **26a** の GLP-1 分泌能の評価を行った。摂餌による GLP-1 分泌刺激を抑えるため絶食下のマウスを用い、化合物 **26a** を投与後、30 分の GLP-1 濃度をコントロール群と比較した。第一章で述べたように、GLP-1 は DPP4 により速やかに分解されてしまうため、活性型 GLP-1 を測定することは困難であった。そこで、活性型および不活性型を合わせた total GLP-1 濃度を測定し、コントロール群との比較を行った。その結果、化合物 **26a** を投与した群では、コントロール群に対し、2 倍以上の有意な GLP-1 濃度の上昇が認められた。(図 2-7) Metabolex 社の開発化合物である MBX-2982 の絶食下での GLP-1 分泌が最近報告され、化合物 **26a** の GLP-1 濃度上昇と同等であった。¹⁴ さらに、GLP-1 レセプターノックアウト(GLP-1RKO)マウスを用いた oGTT の報告例では、AR231453 は正常マウスでは有意な血糖上昇抑制率を示したのに対し、GLP-1RKO マウス

ではその効果は傾向程度に留まっている。¹⁵ つまり、AR231453 のような強力な GPR119 アゴニストでも GLP-1 を介さないインスリン分泌だけでは、強い薬効を示すことができず、GPR119 アゴニストの糖負荷試験では、GLP-1 分泌能がその薬効への寄与が大きいと考えられる。そのため、化合物 **26a** は oGTT で強い薬効を示したため、この 2 倍という GLP-1 分泌能は十分高く、血糖上昇抑制に寄与していると考えている。

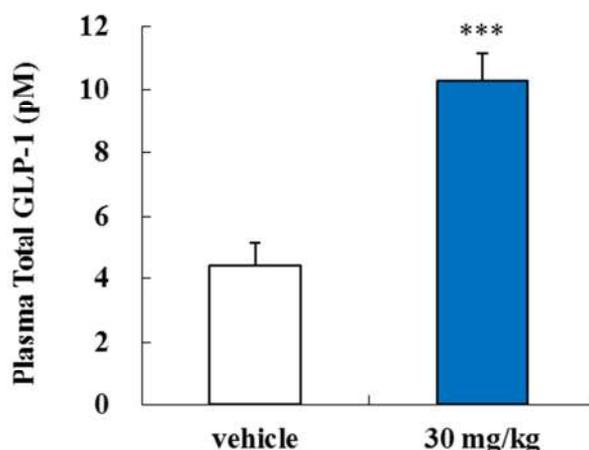


図 2-7 : **26a** の GLP-1 分泌促進試験

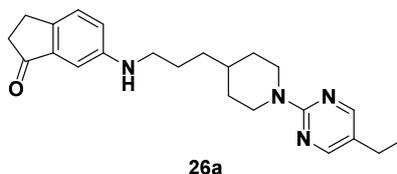
2-7) **26a** のドラッグライクネス評価

化合物 **26a** は oGTT 及び scGTT において血糖上昇抑制作用を示した。今後、開発候補化合物を見出すために、この化合物を基にして構造展開を行っていくが、このシリーズの GPR119 アゴニストが薬になりうるか、ドラッグライクネスの評価を行った。経口投与が可能な薬剤として Phase 2 以上に進んだ化合物構造の解析からドラッグライクネスを示すパラメータとして以下のものが知られている。分子量(MW)、水素結合供与体の数(HD)、水素結合受容体の数(HA)、水/オクタノール分配係数(cLogP)、自由回転結合の数(FRB) や環の数(NR)があり、Lipinski や Oprea らがドラッグライクな化合物における適度なパラメータ数値を提唱している。^{16, 17} 化合物 **26a** のこれらのパラメータ算出した結果が以下のとおりである。

Table 2-5 : ドラッグライクネスパラメータ

Lipinski Rule of 5	Oprea Rule
MW \leq 500	HD \leq 2
HD \leq 5	HA = 2~9
HA \leq 10	FRB = 2~8
cLogP < 5	NR = 1~4

Table 2-6 : **26a** の物性パラメータ



Compound	MW	cLogP	HA	HD	NR	FRB
26a	378.51	4.42	5	1	4	7

26a はいずれのパラメータも Lipinski や Oprea の提唱するの指標にあてはまっており、ドラッグライクであると考えられる。以上のことから、**26a** は抗糖尿病作用として oGTT と scGTT で有意な薬効を示し、ドラッグライクな構造をしており、その構造も新規であることから、私はこの **26a** をリード化合物と認定した。

2-8) 小括

1. 弊社化合物ライブラリの HTS により得られた HTS ヒット化合物の活性を向上させ、抗糖尿病作用を持つ化合物を獲得するため、化合物を A 環、リンカー及び B 環の 3 つのフラグメントに分け、それぞれについて最適化を行った。
2. リンカーの検討
4 原子長のリンカーが最も良好な結果を与えることが分かり、脂溶性の高い炭素鎖によるリンカーが適していた。A 環との結合部では、アミドからアミノメチレン基に変換した場合に 10 倍の活性向上(**1 vs 4a**)が見られ、エーテル体 **4f** では活性減弱が見られたことから、活性発現に塩基性窒素が重要な働きをしていることが示唆された。
3. A 環の検討
スルホニル基の等価体変換を行った結果、カルボニル基に変換した場合にのみ活性の向上が見られ、インダノンとジヒドロベンゾフラノンが良好な結果を与えた。また、ケトンとリンカー結合位置関係と活性に相関がなく、ケトンやスルホニル基の水素結合受容体としての役割よりも、電子求引性基としての作用の方が活性に寄与していることが示唆された。
4. B 環の検討
Boc 基を各種ヘテロ環に変換し、5-エチルピリミジンと 3-イソプロピル-1,2,4-オキサジアゾールが良好な等価体として機能することが分かった。
5. *in vitro* 評価において、良好な結果を示した化合物について *o*GTT スクリーニングを行った結果、2 化合物(**11f** と **26a**) が有意な血糖上昇抑制作用を示した。
6. 最も高い効果を示した化合物 **26a** では用量依存的な血糖コントロールも確認でき、*sc*GTT でも高い効果が見られ、食後過血糖と空腹時高血糖の両方をコントロールすることができると思われる。

2-9) 実験の部

2-9-1) Chemistry

General directions

All commercially available reagents and solvents were used without further purification. Reactions were carried out using oven-dried flasks or glassware, mixtures were stirred with magnetic stirring bars and concentrated using a standard rotary evaporator, unless otherwise noted. ¹H NMR spectra were recorded by a JEOL JNM-ECP400 spectrometer operating at 400 MHz at 25 °C with tetramethylsilane as internal standard. Data are reported as follows: chemical shift in ppm (δ), integration, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quin = quintet, sep = septet, br = broad, m = multiplet), and coupling constant (Hz). LC/MS spectra were determined on a Waters ZMD2000 equipped with a Waters 2690 injector and a PDA detector operating at 210–400 nm and interfaced with a Micromass ZMD mass spectrometer. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Thermo. LTQ Orbitrap. Column chromatography was carried out on silica gel (Merck silica gel 60 (0.063-0.200 mm) or Fuji Silysia NH-DM1020). Preparative thin-layer chromatography and thin-layer chromatography was performed on silica gel (Merck TLC or Fuji Silysia NH-TLC).

Representative procedure of compound **4** (except for **4f**)

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-((1,1-dioxidobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)-4-oxobutyl) piperidine-1-carboxylate **3a**

To a solution of *N*-Boc-4-(piperidin-4-yl)butyric acid (407 mg, 1.5 mmol),WSC (575 mg, 3.0 mmol), HOBt (405 mg, 3.0 mmol) and DIPEA (870 μL, 5.0 mmol) in DMF (5.0 mL) was added 5-aminobenzothiophene **2** (149 mg, 1.0 mmol). The resulting solution was stirred with ambient temperature overnight. The reaction mixture was poured into crushed ice and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 2 : 3) to give a benzothiophene amide (400 mg, yield 99%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.19 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.32-7.20 (m, 3H), 4.10 (brs, 2H), 2.68 (brs, 2H), 2.39 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.81-1.75 (m, 2H), 1.69-1.55 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.41-1.35 (m, 2H), 1.15-1.09 (m, 2H): ESI-MS (*m/e*): 403 [M+H]⁺.

To a solution of the amide obtained above (391 mg, 0.97 mmol) in DCM (10 mL) was added *m*-CPBA (419 mg, 2.43 mmol) at 0 °C. The resulting mixture was allowed to

warm to room temperature and stirred for 2 h. Water (10 mL) and 5 N NaOH (1 mL, 5.0 mmol) were added to the reaction mixture, and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by PTLC (EtOAc : hexane = 3 : 2) to give **3a** (327 mg, yield 88%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.97 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.10 (brs, 2H), 2.67 (brs, 2H), 2.39 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.79-1.73 (m, 2H), 1.68-1.63 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.33-1.29 (m, 2H), 1.10 (dq, *J* = 12.4, 4.4 Hz, 2H): ESI-MS (*m/e*): 435 [M+H]⁺.

tert-butyl 4-(5-((1,1-dioxidobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)-5-oxopentyl)piperidine-1-carboxylate **3b**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.97 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.09 (brs, 2H), 2.66 (brs, 2H), 2.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.73-1.69 (m, 2H), 1.65-1.59 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.44-1.35 (m, 2H), 1.32-1.26 (m, 2H), 1.08 (dq, *J* = 12.8, 4.1 Hz, 2H): ESI-MS (*m/e*): 449 [M+H]⁺.

tert-butyl 4-(3-((1,1-dioxidobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)-3-oxopropyl)piperidine-1-carboxylate **3c**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.96 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.32 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.11 (brs, 2H), 2.69 (brs, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.76-1.72 (m, 2H), 1.60-1.55 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.18-1.10 (m, 2H): ESI-MS (*m/e*): 421 [M+H]⁺.

tert-butyl 4-(2-((1,1-dioxidobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)-2-oxoethoxy)piperidine-1-carboxylate **3d**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.51 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.85 (brs, 2H), 3.63 (sep, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.09 (ddd, *J* = 13.6, 9.9, 2.7 Hz, 2H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.63-1.56 (m, 2H), 1.47 (s, 9H): ESI-MS (*m/e*): 423 [M+H]⁺.

tert-butyl 4-((2-((1,1-dioxidobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)-2-oxoethyl)methyl)amino)piperidine-1-carboxylate **3e**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 9.57 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.22 (brs, 2H), 3.21 (s, 2H),

2.72-2.63 (m, 3H), 2.60 (t, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.82-1.73 (m, 2H), 1.47-1.39 (m, 11H): ESI-MS (m/e): 436 $[M+H]^+$.

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)butyl)piperidine-1-carboxylate **4a**

To a solution of **3a** (21.7 mg, 50 μ mol) in THF (1 mL) was added 0.9 M BH_3 -THF solution (200 μ L, 180 μ mol), the resulting solution was refluxed for 3 h and then allowed to cool to room temperature. To the reaction mixture was added MeOH (1 mL) and K_2CO_3 (34.6 mg, 250 μ mol) and stirred for 1 h. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by PTLC (EtOAc : hexane = 3 : 2) to give **4a** (11 mg, yield 51%) as a white solid.: 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 7.47 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.57 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 1H), 6.37 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.11 (brs, 2H), 3.44 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.14 (dd, $J = 12.4, 7.8$ Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.67-1.59 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.30-1.25 (m, 2H), 1.12-1.05 (m, 2H): HRMS ESI calcd for $C_{21}H_{34}N_2O_4S$ 423.2312, found 423.2310.

tert-butyl 4-(5-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)pentyl)piperidine-1-carboxylate **4b**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.11 (brs, 2H), 3.44 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.13 (dd, $J = 12.4, 7.0$ Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.68-1.61 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.41-1.36 (m, 2H), 1.29-1.24 (m, 2H), 1.13-1.05 (m, 2H): HRMS ESI calcd for $C_{22}H_{36}N_2O_4S$ 437.2468, found 437.2466.

tert-butyl 4-(3-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **4c**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.11 (brs, 2H), 3.63 (brs, 1H), 3.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.15 (dd, $J = 11.7, 5.9$, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.69-1.62 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.39-1.32 (m, 2H), 1.15-1.07 (m, 2H) : ESI-MS (m/e): HRMS ESI calcd for $C_{21}H_{32}N_2O_4S$ 409.2155, found 409.2151.

tert-butyl 4-(2-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)ethoxy)piperidine-1-carboxylate **4d**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.63 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 6.43 (s,

1H), 3.75 (brs, 2H), 3.76 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.61-3.43 (m, 3H), 3.33 (dd, $J = 10.7, 5.2$ Hz, 2H), 3.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.07 (ddd, $J = 12.8, 9.2, 3.7$ Hz, 2H), 1.90-1.81 (m, 2H), 1.62-1.55 (m, 2H), 1.46 (s, 9H): HRMS ESI calcd for C₂₀H₃₀N₂O₅S 411.1948, found 411.1946.

tert-butyl 4-((2-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophen-5-yl)amino)ethyl)(methyl) amino)piperidine-1-carboxylate **4e**

¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.89 (s, 1H), 4.19 (brs, 2H), 3.46 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.28 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.18 (brs, 2H), 2.79-2.63 (m, 4H), 2.58 (brs, 1H), 2.23 (s, 3H), 1.81-1.72 (m, 2H), 1.49-1.39 (m, 11H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₃₃N₃O₄S 423.2191, found 423.2191.

Synthesis of *tert*-butyl 4-(3-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophen-5-yl)oxy)propyl)piperidine-1-carboxylate **4f**

benzo[*b*]thiophen-5-ol **5**

To a suspension of 5-aminobenzothiophene **2** (149 mg, 1.0 mmol) in 10% H₂SO₄ (16 mL) was added dropwise a solution of NaNO₂ (72.5 mg, 1.05 mmol) in water (1.5 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 1 h at same temperature, slowly warmed to 10 °C for 30 min and then urea (60 mg, 1.0 mmol) was added to the mixture. After stirring for 5 min, the resulting mixture was added dropwise to 10% H₂SO₄ (10 mL) at 90 °C and stirred at 90 °C further 30 min. The reaction mixture was hot filtrated through a celite pad and the filtrate was cooled to 0 °C. The formed precipitate was filtered, rinsed with water and dried under reduced pressure to give benzo[*b*]thiophen-5-ol **5** (78 mg, yield 52%) as a yellow solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 6.92 (dd, $J = 2.5, 8.4$ Hz, 1H), 4.83 (s, 1H): ESI-MS (m/e): 151 [M+H]⁺.

tert-butyl 4-(3-(benzo[*b*]thiophen-5-yloxy)propyl)piperidine-1-carboxylate **6**

To a solution of benzo[*b*]thiophen-5-ol **5** (78 mg, 0.52 mmol), *N*-Boc-3-(piperidin-4-yl)propan-1-ol (138 mg, 0.57 mmol) and triphenylphosphine (150 mg, 0.57 mmol) in toluene (5.0 mL) was added dropwise a solution of 2.2 M diethylazodicarboxylate (260 μ L, 0.57 mmol) in toluene at 0 °C and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 3 h, the solution was concentrated and the residue was purified by PTLC (CHCl₃ : hexane = 5 : 1) to give the title compound **6** (175 mg, yield 90%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.72 (d, J

= 8.8 Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.26 (m, 2H), 6.98 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 1H), 4.10 (brs, 2H), 4.01 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.69 (brs, 2H), 1.89-1.81 (m, 2H), 1.73-1.67 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.35-1.27 (m, 2H), 1.15-1.07 (m, 2H) : ESI-MS (m/e): 376 [M+H]⁺.

tert-butyl 4-(3-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophen-5-yl)oxy)propyl)piperidine-1-carboxylate **4f**

To a solution of **6** (175 mg, 0.47 mmol) in DCM (5.0 mL) was added *m*-CPBA (201 mg, 1.16 mmol) at 0 °C. The resulting mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. Water (5.0 mL) and 5 N NaOH (0.5 mL, 2.5 mmol) were then added, and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by PTLC (EtOAc : hexane = 1 : 3) to give a dioxobenzothiophene ether (175 mg, yield 92%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.09 (brs, 2H), 4.01 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.69 (brs, 2H), 1.89-1.80 (m, 2H), 1.73-1.65 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.44-1.38 (m, 2H), 1.15-1.09 (m, 2H) : ESI-MS (m/e): 408 [M+H]⁺.

To a solution of the ether obtained above (71 mg, 173 μmol) in EtOH (3.0 mL) was added 10 % Pd/C (14 mg). The mixture was stirred under hydrogen atmosphere at room temperature for 1 h. The catalyst was filtered off, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the title compound **4f** (64 mg, yield 90%) as a yellow solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 4.11 (brs, 2H), 3.99 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.49 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.33 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.69 (brs, 2H), 1.87-1.79 (m, 2H), 1.71-1.66 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.44-1.38 (m, 2H), 1.18-1.10 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₃₁NO₅S 410.1995, found 410.1994.

Synthesis of 5-nitrobenzo[*d*][1,3]oxathiole **13**

To a solution of 2-hydroxythiophenol **12** (2.52 g, 20 mmol) and Cs₂CO₃ (9.77 g, 30 mmol) in DMF (100 mL) was added dropwise bromochloromethane (2.0 mL, 30 mmol) and the mixture was stirred at 110 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was poured into ice-water and extracted with Et₂O. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 10) to give benzo[*d*][1,3]oxathiole (2.39 g, yield 86%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.17 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 7.00 (td, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 6.89 (td, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.71 (s, 2H): ESI-MS (m/e): 139 [M+H]⁺.

A solution of benzo[*d*][1,3]oxathiole obtained above (239 mg, 17.3 mmol) in AcOH

(0.5 mL) was added dropwise to a mixture 40% HNO₃ (11.4 mL) and AcOH (9.0 mL) at -15 °C and the mixture was stirred for 1 h at -10 °C. The mixture was poured into ice-water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 3) to give a title compound **13** (342 mg, yield 11%) as a yellow solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.81 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.86 (s, 2H): ESI-MS (*m/e*): 184 [M+H]⁺.

Synthesis of benzo[*d*][1,3]oxathiol-5-amine **14**

Iron (418 mg, 7.5 mmol) was added to a solution of **13** (342 mg, 1.87 mmol) and NH₄Cl (100 mg, 1.87 mmol) in EtOH (7.5 mL) and water (3.0 mL) and the mixture was stirred for 2 h. The mixture was filtrated through a celite pad and washed with EtOAc and water. After a phase separation of the filtrate, the aqueous layer was extracted with EtOAc, the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by PTLC (EtOAc : hexane = 1 : 3) to give a title compound **14** (160 mg, yield 55%).: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.27-6.24 (m, 2H), 5.63 (s, 2H), 3.60 (brs, 2H): ESI-MS (*m/e*): 154 [M+H]⁺.

Synthesis of 6-nitro-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]oxathiine **16**

Potassium hydroxide (2.0 g, 36 mmol) was added to a solution of 3,4-methylenedioxynitrobenzene **15** (3.34 g, 20 mmol) and 2-mercaptoethanol (3.14 mL, 44 mmol) in *N*-methylpyrrolidone and the reaction mixture was stirred at 50 °C overnight. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 1) to give a diol (1.12 g, yield 26%) as a yellow solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.81 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.78 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.01 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H): ESI-MS (*m/e*): 216 [M+H]⁺.

To a solution of the diol obtained above (430 mg, 2.0 mmol) and triphenylphosphine (577 mg, 2.2 mmol) in toluene (10 mL) was added dropwise a solution of 2.2 M diethylazodicarboxylate (1.0 mL, 2.2 mmol) in toluene at 0 °C and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 1 h, the solution was concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 4) to give a title compound **16** (295 mg, yield 75%) as a yellow solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.75-7.69 (m, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.45 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H) : ESI-MS (*m/e*): 198 [M+H]⁺.

Synthesis of 7-amino-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]oxathiine 4,4-dioxide **10b**

To a solution of **16** (282 mg, 1.45 mmol) in DCM (10 mL) was added *m*-CPBA (398 mg, 3.6 mmol) at 0 °C. The resulting mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h. Water (10 mL) and 5 N NaOH (1.2 mL, 6 mmol) were added to the reaction mixture and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by PTLC (EtOAc : hexane = 3 : 2) to give a sulfone derivative (330 mg, yield 99%) as a pale white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.85 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.51 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H): ESI-MS (*m/e*): 230 [M+H]⁺.

Iron (279 mg, 5.0 mmol) and water (300 μL) was added to a solution of the sulfone derivative obtained above (229 mg, 1.0 mmol) in AcOH (3.0 mL) and the reaction mixture was stirred at 65 °C for 2 h. The mixture was filtrated through a celite pad and washed with water and EtOAc. After a phase separation of the filtrate, the aqueous layer was extracted with EtOAc, the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated to give a title compound **10b** (199 mg, yield 99%) as a pale white solid, which was used for next step without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.38 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.77 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.06 (brs, 2H), 3.43 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H): ESI-MS (*m/e*): 200 [M+H]⁺.

Synthesis of 3-(piperidin-4-yl)propan-1-ol **17**

To a 4 M hydrogen chloride/1,4-dioxane solution (10 mL) was added *tert*-butyl 4-(3-hydroxypropyl)piperidine-1-carboxylate **7** (3.0 g, 12.4 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred for 3.5 h at 30 °C. The solvent was removed in vacuo and the residue was partitioned between DCM and satd. NaHCO₃, and the organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to give **17** (1.77 g, yield 99%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.64 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.05 (dt, *J* = 11.6, 2.8 Hz, 2H), 2.57 (dt, *J* = 11.6, 2.5 Hz, 2H), 1.68 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 1.55-1.61 (m, 2H), 1.21-1.43 (m, 3H), 1.09 (ddd, *J* = 24.1, 12.1, 4.0 Hz, 2H). ESI-MS (*m/e*): 144 [M+H]⁺.

General procedure with Synthesis of pyrimidine derivatives **18a-c** (Method I)

A mixture of **17** (3.18 mmol), the corresponding 2-chloropyrimidine (6.36 mmol) and DIPEA (2.77 mL, 15.9 mmol) in 2-propanol (15 mL) was heated under reflux for 23 h. The mixture was concentrated and the residue was partitioned between EtOAc and satd. NaHCO₃, and the organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and then

concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography to give the desired product.

3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol 18a

^1H NMR (CDCl_3) δ : 8.16 (s, 2H), 4.68 (dt, $J = 13.2, 2.2$ Hz, 2H), 3.65 (dd, $J = 11.7, 6.6$ Hz, 2H), 2.84 (dt, $J = 11.7, 2.7$ Hz, 2H), 2.45 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.77 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 1.48-1.66 (m, 3H), 1.12-1.36 (m, 7H). ESI-MS (m/e): 250 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(1-(5-methoxypyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol 18b

^1H NMR (CDCl_3) δ : 8.46 (s, 2H), 4.54-4.67 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.65 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 2.84 (dt, $J = 11.7, 2.8$ Hz, 2H), 1.50-1.86 (m, 5H), 1.12-1.44 (m, 4H). ESI-MS (m/e): 252 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(1-(5-methoxycarbonylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol 18c

^1H NMR (CDCl_3) δ : 8.81 (s, 2H), 4.88 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.66 (td, $J = 6.6, 5.4$ Hz, 2H), 2.93 (td, $J = 13.2, 2.8$ Hz, 2H), 1.82 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.66-1.54 (m, 3H), 1.37-1.32 (m, 2H), 1.23 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 1.20-1.13 (m, 2H). ESI-MS (m/e): 280 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparation of 3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol 18d (Method II)

4-(3-hydroxypropyl)piperidine-1-carbonitrile 19

A solution of **17** (10.0 g, 70 mmol) in DCM (170 mL) was mixed with a suspension of NaHCO_3 (17.7 g, 210 mmol) in water (40 mL). To this stirred mixture was added dropwise a solution of cyanogen bromide (8.9 g, 84 mmol) in DCM (30 mL) at 0 °C and the resulting mixture was stirred at same temperature for 30 min. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The mixture was poured into satd. NaHCO_3 and the whole was extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated to give crude product **19** (10.8 g, yield 91%) as a colorless oil, which was used in the next step without further purification.: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 3.65 (dd, $J = 11.4, 6.6$ Hz, 2H), 3.42 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 2.99 (t, $J = 11.4$ Hz, 2H), 1.71-1.75 (m, 2H), 1.55-1.60 (m, 2H), 1.24-1.37 (m, 5H). ESI-MS (m/e): 169 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol 18d

Zinc chloride (1.0 M in Et_2O , 77 mL, 77 mmol) was added dropwise to a stirred

solution of **19** (10.8 g, 64 mmol) and *N*-hydroxyisobutyramidine (7.85 g, 77 mmol) in EtOAc (130 mL)/THF (130 mL) over 30 min. After stirring for 1 day, the formed precipitates were filtered and washed with Et₂O (30 mL). This precipitate was dissolved in a mixture of EtOH (250 mL) and conc. HCl (37 mL) and the solution was stirred at 70 °C for 17 h. The solvent was removed in vacuo, the residue was dissolved with satd. NaHCO₃ and EtOAc. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc) to give the title compound **18d** (13.6 g, yield 77%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.10-4.14 (m, 2H), 3.66 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.02 (td, *J* = 12.8, 2.8 Hz, 2H), 2.87 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.78 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 1.45-1.64 (m, 3H), 1.38-1.20 (m, 10H). ESI-MS (*m/e*): 254 [M+H]⁺.

Preparation of 3-(1-(5-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol **18e**

N'-hydroxy-4-(3-hydroxypropyl)piperidine-1-carboximidamide **20**

To a solution of **19** (236 mg, 1.4 mmol) in EtOH (1.57 mL) was added K₂CO₃ (193 mg, 1.4 mmol), hydroxylamine hydrochloride (195 mg, 2.8 mmol) and water (2.36 mL) and the mixture was refluxed for 1 day. After cooling to ambient temperature, the reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated to give crude product **20** (213 mg, yield 76%) as a colorless oil, which was used in the next step without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.31 (s, 1H), 3.65 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.42 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 2.62 (dt, *J* = 2.6, 12.8 Hz, 2H), 1.75-1.68 (m, 2H), 1.65-1.55 (m, 3H), 1.42-1.09 (m, 4H). ESI-MS (*m/e*): 202 [M+H]⁺.

3-(1-(5-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol **18e**

To a solution of **20** (213 mg, 1.06 mmol), WSC (243 mg, 1.27 mmol), HOBt (180 mg, 1.17 mmol) and DIPEA (487 μL, 3.5 mmol) in DMF (4.0 mL) was added isobutylic acid (93.4 mg, 1.06 mmol). After stirring for 3 days, the resulting solution was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was dissolved in toluene (4.0 mL), the mixture was refluxed for 1 h and concentrated. The residue was purified by PTLC (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1) to give the title compound **18e** (135 mg, yield 49%) as a yellow oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.01 (s, 1H), 3.98 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.06 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.86 (dt, *J* = 2.6, 12.5 Hz, 2H), 1.74 (d, *J* = 13.2 Hz,

2H), 1.65-1.58 (m, 2H), 1.49-1.40 (m, 1H), 1.35 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H), 1.31-1.23 (m, 2H). ESI-MS (m/e): 254 $[M+H]^+$.

Preparation of 3-(1-(5-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol **18f
tert-butyl 4-(3-(benzyloxy)propyl)piperidine-1-carboxylate **21****

To a suspension of NaH (328 mg in oil, 8.2 mmol) in DMF (10 mL) on the ice bath was added **7** (1.0 g, 4.1 mmol) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Benzyl bromide (843 mg, 4.9 mmol) was added to the mixture at 0 °C, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. The mixture was diluted with satd. NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with satd. NaHCO₃ and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane : EtOAc = 3 : 1) to give **21** (1.4 g, yield 99%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.37-7.26 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 4.11 (brs, 2H), 3.46 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.65 (t, $J = 12.1$ Hz, 2H), 1.67-1.57 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.39-1.30 (m, 3H), 1.09 (qd, $J = 4.0, 11.4$, 2H). ESI-MS (m/e): 334 $[M+H]^+$.

4-(3-(benzyloxy)propyl)piperidine-1-carbohydrazide **22**

A 4 M hydrogen chloride/1,4-dioxane solution (7.15 mL, 31 mmol) was added dropwise to a solution of **21** (1.4 g, 4.1 mmol) in DCM (14.3 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. The solvent was removed in vacuo and the residue was washed with Et₂O to give a hydrochloride salt (1.06 mg, yield 95%) as a colorless solid, which was used in the next step without further purification.: ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 8.46 (brs, 2H), 7.38-7.19 (m, 5H), 4.44 (s, 2H), 3.41 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.22 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.78 (d, $J = 13.1$ Hz, 2H), 1.59-1.42 (m, 3H), 1.31-1.19 (m, 4H). ESI-MS (m/e): 234 $[M+H]^+$.

To a solution of the hydrochloride salt obtained above and DIPEA (2.22 mL, 12.8 mmol) in DCM (17.2 mL) was added 4-nitrophenylchloroformate (641 mg, 3.19 mmol) at 0 °C, stirred for 30 min at same temperature and allowed to warm to room temperature. The mixture was concentrated and the residue purified with silica gel column chromatography (Hexane : EtOAc = 2 : 1) to give a 4-nitrophenylcarbamate (1.13 g, yield 89%) as a colorless solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.37-7.26 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 3.89 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 3.80 (brs, 2H), 3.46 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.75 (td, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 2H), 1.75-1.57 (m, 4H), 1.51-1.30 (m, 3H), 1.23-1.14 (m, 2H). ESI-MS (m/e): 399 $[M+H]^+$.

Hydrazine monohydrate (2.83 mL, 58 mmol) was added to a solution of

4-nitrophenylcarbamate obtained above (283 mg, 0.71 mmol) in EtOH (17 mL) and the mixture was refluxed for 1 h. After concentration of the mixture, the residue was dissolved in EtOAc and the solution was washed satd. NaHCO₃ four times, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by PTLC (CHCl₃ : MeOH = 5 : 1) to give the title compound **22** (92 mg, yield 45%) as a yellow oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.40-7.26 (m, 5H), 4.48 (s, 2H), 3.94 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H), 3.78 (brs, 2H), 3.47 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.75 (td, *J* = 12.1, 2.2 Hz, 2H), 1.75-1.62 (m, 4H), 1.50-1.35 (m, 3H), 1.20-1.09 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 292 [M+H]⁺.

3-(1-(5-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol **18f**

To a 30 min stirring solution of isobutylic acid (30 mL, 0.32 mmol), *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (102 mg, 0.32 mmol), HOBt (8.9 mg, 63 μmol) and DIPEA (277 μL, 1.59 mmol) in DMF (1.1 mL) was added **22** (92 mg, 0.32 mmol) and the mixture was stirred further 1 day. The reaction mixture was diluted with satd. NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc) to give an acylhydrazide (75 mg, yield 65%) as a colorless solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.40-7.26 (m, 5H), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.50 (s, 2H), 3.96 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 12.6 Hz, 2H), 2.46 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.75 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.66-1.58 (m, 2H), 1.49-1.39 (m, 1H), 1.38-1.33 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.25-1.12 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 362 [M+H]⁺.

A solution of the acylhydrazide obtained above (75 mg, 0.21 mmol), triphenylphosphine (174 mg, 0.662 mmol) and Et₃N (185 μL, 1.2 mmol) in tetrachloromethane (5 mL) was refluxed overnight and then evaporated. The residue was purified by NH-PTLC (Hexane : EtOAc = 1 : 1) to give a 1,3,4-oxadiazole (45 mg, yield 63%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.40-7.26 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 3.94 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H), 3.47 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.01 (sep, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.93 (td, *J* = 1.8, 11.8 Hz, 2H), 1.80-1.62 (m, 4H), 1.50-1.35 (m, 3H), 1.32 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.29-1.22 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 344 [M+H]⁺.

To a solution of 1,3,4-oxadiazole obtained above (45 mg, 130 μmol) in EtOH (1.0 mL) was added 10 % Pd/C (5 mg). The mixture was stirred under hydrogen atmosphere at 40 °C overnight. The catalyst was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the title compound **19f** (33 mg, yield 99%) as a colorless solid, which was used in the next step without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.02 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 3.66 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.05-2.92 (m, 3H), 1.77 (t, *J* = 13.0 Hz,

2H), 1.69-1.62 (m, 2H), 1.60-1.54 (m, 1H), 1.47-1.26 (m, 10H): ESI-MS (*m/e*): 254 [M+H]⁺.

Preparation of 3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol **18g**

5-bromo-3-isopropyl-1,2,4-thiadiazole **24**

Copper(II) bromide (328 mg, 1.47 mmol) was added to *tert*-butyl nitrite (460 μ L, 3.84 mmol) in acetone (6 mL) at 0 °C, the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1.5 h. To the mixture was added a solution of 5-amino-3-isopropyl-1,2,4-thiadiazole **23** (200 mg, 1.74 mmol) in acetone (1.4 mL) and stirred for 1 h. After cooling to 0 °C, 48% HBr solution was added to the mixture and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane : EtOAc = 9 : 1) to give **24** (241 mg, yield 67%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ : 3.31 (sep, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H). ESI-MS (*m/e*): 208 [M+H]⁺.

3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propan-1-ol **18g**

To a solution of **24** (241 mg, 1.16 mmol) and Et₃N (487 μ L, 3.48 mmol) in DCM (5 mL) was added **8** (332 mg, 2.32 mmol) at room temperature and the reaction mixture was stirred for 1 day. The mixture was diluted with water and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by PTLC (Hexane : EtOAc = 1 : 2) to give **18g** as a colorless oil (306 mg, yield 98%).: ¹H NMR (CDCl₃) δ : 3.88 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H), 3.66 (dd, *J* = 6.3, 11.1 Hz, 2H), 3.49 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.10 (td, *J* = 3.0, 12.7 Hz, 2H), 3.00 (sep, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.79 (d, *J* = 13.4 Hz, 2H), 1.67-1.46 (m, 3H), 1.42-1.28 (m, 10H). ESI-MS (*m/e*): 270 [M+H]⁺.

Preparation of **11a-l**, **25a-g**, **26a,d** and **27a, d**

General procedure for preparation of aldehydes (Method III)

To a solution of the corresponding alcohol (1 mmol) in DCM (10 mL) was added Dess-Martin periodinane (1.1 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. To the mixture was added water and 5 N NaOH (6 mmol), and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over

anhydrous Na₂SO₄, concentrated and the crude product was subjected to the next reaction without further purification.

General procedure with reductive amination (Method IV)

To a solution of amine (0.1 mmol) and a corresponding aldehyde (0.1 mmol) in DCM (2 mL) was added NaBH(OAc)₃ (0.2 mmol), and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into satd. NaHCO₃ and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by PTLC.

tert-butyl 4-(3-((3,3-dioxido-2H-benzo[*d*][1,3]oxathiol-6-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.32 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.29 (brs, 1H), 4.08 (brs, 2H), 3.12 (dd, *J* = 12.1, 5.5 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.69-1.62 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.41-1.33 (m, 2H), 1.13-1.06 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₀H₃₀N₂O₅S 411.1948, found 411.1953.

tert-butyl 4-(3-((4,4-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]oxathiin-7-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11b**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.53 (dd, *J* = 8.8, 0.9 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.79-4.74 (m, 2H), 4.09 (brs, 2H), 3.64 (s, 1H), 3.44-3.40 (m, 2H), 3.09 (dd, *J* = 12.4, 7.0 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.65-1.57 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.34-1.28 (m, 2H), 1.16-1.07 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₃₂N₂O₅S 425.2104, found 425.21024.

tert-butyl 4-(3-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*d*]isothiazol-5-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11c**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.61 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.51 (s, 1H), 4.41 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.18 (s, 1H), 4.09 (brs, 2H), 3.13 (dd, *J* = 12.4, 7.0 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.69-1.63 (m, 5H), 1.46 (s, 9H), 1.39-1.33 (m, 2H), 1.16-1.07 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₀H₃₁N₃O₄S 409.2035, found 409.2035.

tert-butyl 4-(3-((1-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11d**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.52-6.48 (m, 2H), 4.12 (brs, 2H), 3.65 (brs, 1H), 3.19 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 2.62 (t, *J* = 5.5, 2H), 1.69-1.62 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.42-1.36 (m, 2H), 1.15-1.07 (m, 2H): HRMS

ESI calcd for C₂₂H₃₂N₂O₃ 373.2486, found 373.2491.

tert-butyl 4-(3-((5-oxo-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11e**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.13 (brs, 2H), 3.16 (dd, *J* = 12.4, 7.0 Hz, 2H), 2.84 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 2.56 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.07 (quin, *J* = 5.5, 2H), 1.69-1.62 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.39-1.32 (m, 2H), 1.10 (qd, *J* = 4.4, 10.5 Hz, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₃H₃₄N₂O₃ 387.2642, found 387.2648.

tert-butyl 4-(3-((3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11f**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.48 (s, 1H), 4.11 (brs, 2H), 3.18 (dd, *J* = 12.4, 6.6 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.69-1.62 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.38-1.32 (m, 2H), 1.17-1.12 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₃₀N₂O₄ 375.2278, found 375.2278.

tert-butyl 4-(3-((1-oxoisoindolin-5-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11g**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 4.34 (s, 2H), 4.08 (brs, 2H), 3.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.69-1.62 (m, 5H), 1.46 (s, 9H), 1.41-1.34 (m, 2H), 1.14-1.07 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₃₁N₃O₃ 373.2365, found 373.2364.

tert-butyl 4-(3-((1,1-dioxido-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophen-6-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11h**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.76 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 4.08 (brs, 2H), 3.91 (s, 1H), 3.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.11 (q, *J* = 4.4 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.69-1.60 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.39-1.30 (m, 2H), 1.15-1.05 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₃₂N₂O₄S 408.2083, found 408.2079.

tert-butyl 4-(3-((3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11i**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.26 (m, 1H), 6.89 (m, 2H), 4.08 (brs, 2H), 3.11 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.01 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.72-2.62 (m, 4H), 1.69-1.62 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.37-1.30 (m, 2H), 1.13-1.05 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₂H₃₂N₂O₃ 372.2413, found

372.2412.

tert-butyl 4-(3-((3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11j**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.48 (brs, 1H), 4.09 (brs, 2H), 3.18 (dd, *J* = 12.4, 7.3 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.69-1.62 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.37-1.30 (m, 2H), 1.15-1.07 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₃₀N₂O₄ 374.2205, found 374.2216.

tert-butyl 4-(3-((4-oxochroman-6-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11k**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.03 (dd, *J* = 6.5, 2.5 Hz, 1H), 6.83-6.81 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.07 (brs, 2H), 3.45 (s, 1H), 3.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.72-1.64 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.36-1.28 (m, 2H), 1.15-1.06 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₂H₃₂N₂O₄ 388.2362, found 388.2362.

tert-butyl 4-(3-((3-oxoisindolin-5-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **11l**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 8.1, 2.2 Hz, 1H), 6.08 (s, 1H), 4.33 (s, 2H), 4.08 (brs, 2H), 3.15 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.67 (brs, 2H), 1.70-1.62 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.39-1.31 (m, 2H), 1.15-1.07 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₃₁N₃O₃ 373.2365, found 373.2365.

6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2*H*)-one **25a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.16 (s, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.51 (s, 1H), 3.19 (dd, *J* = 12.6, 7.1 Hz, 2H), 2.84 (td, *J* = 12.8, 2.4 Hz, 2H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.80-1.65 (m, 4H), 1.65-1.55 (m, 1H), 1.40-1.34 (m, 2H), 1.25-1.13 (m, 5H). HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₈N₄O₂ 381.2285, found 381.2291.

6-((3-(1-(5-methoxypyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2*H*)-one **25b**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.09 (s, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 6.10 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.49 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.19 (dd, *J* = 12.2, 6.6 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 11.4 Hz, 2H), 1.79-1.65 (m, 5H), 1.33-1.27 (m, 2H), 1.20 (ddd, *J* = 25.4, 13.2, 4.8 Hz, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₂₆N₄O₃ 383.2077, found 383.2079.

6-((3-(1-(5-methoxycarbonylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2H)-one **25c**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.81 (s, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.34 (dd, *J* = 1.9, 8.4 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.90 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.48 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.20 (dd, *J* = 6.9, 12.6 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 10.6 Hz, 2H), 1.83 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 1.70-1.62 (m, 2H), 1.57-1.49 (m, 1H), 1.37-1.33 (m, 2H), 1.21-1.15 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₆N₄O₄ 411.2027, found 411.2017.

6-((3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2H)-one **25d**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.52 (s, 1H), 4.13 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.19 (dd, *J* = 6.6, 12.6 Hz, 2H), 3.02 (td, *J* = 12.8, 2.6 Hz, 2H), 2.88 (sep, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.78 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 1.70-1.62 (m, 2H), 1.52-1.47 (m, 1H), 1.42-1.36 (m, 2H), 1.34-1.25 (m, 8H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₂₈N₄O₃ 385.2234, found 385.2240.

6-((3-(1-(5-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2H)-one **25e**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 8.8, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.49 (s, 1H), 3.99 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.19 (dd, *J* = 12.8, 7.2 Hz, 2H), 3.06 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.86 (td, *J* = 12.8, 2.2 Hz, 2H), 1.77-1.65 (m, 4H), 1.59-1.50 (m, 1H), 1.42-1.23 (m, 10H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₂₈N₄O₃ 385.2234, found 385.2241.

6-((3-(1-(5-isopropyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2H)-one **25f**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J* = 1.9, 8.4 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.49 (s, 1H), 3.98 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.20 (dd, *J* = 7.2, 12.8 Hz, 2H), 3.02 (sep, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.92 (t, *J* = 10.1 Hz, 2H), 1.76 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 1.70-1.65 (m, 2H), 1.52-1.46 (m, 1H), 1.45-1.40 (m, 2H), 1.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 1.37-1.33 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₁H₂₈N₄O₃ 385.2234, found 385.2235.

6-((3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2H)-one **25g**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.49 (s, 1H), 3.91 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H), 3.20 (dd, *J* = 12.8, 7.0

Hz, 2H), 3.10 (td, $J = 12.8, 2.9$ Hz, 2H), 3.02 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H), 1.80 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 1.73-1.67 (m, 2H), 1.55-1.48 (m, 1H), 1.43-1.38 (m, 2H), 1.37-1.28 (m, 8H): HRMS ESI calcd for $C_{21}H_{28}N_4O_2S$ 401.2006, found 401.1983.

6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **26a**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 8.16 (s, 2H), 7.24 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.89-6.87 (m, 2H), 4.68 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.80 (brs, 1H), 3.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.01 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.83 (td, $J = 13.2, 2.4$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.45 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.77 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 1.69-1.65 (m, 2H), 1.59-1.49 (m, 1H), 1.36 (dd, $J = 15.7, 7.0$ Hz, 2H), 1.23-1.12 (m, 5H): HRMS ESI calcd for $C_{23}H_{30}N_4O$ 379.2492, found 379.2482.

6-((3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **26d**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 7.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.89-6.87 (m, 2H), 4.12 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.76 (brs, 1H), 3.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.29-2.91 (m, 4H), 2.88 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.67 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 1.78 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 1.71-1.66 (m, 2H), 1.53-1.46 (m, 1H), 1.38 (dd, $J = 15.6, 6.8$ Hz, 2H), 1.23-1.18 (m, 8H): HRMS ESI calcd for $C_{22}H_{30}N_4O_2$ 383.2441, found 383.2446.

5-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2*H*)-one **27a**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 8.16 (s, 2H), 7.0-6.94 (m, 2H), 6.75 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 4.59 (s, 3H), 3.62 (brs, 1H), 3.09 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.84 (td, $J = 12.8, 2.4$ Hz, 2H), 2.45 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.77 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 1.71-1.66 (m, 2H), 1.58-1.50 (m, 1H), 1.37 (dd, $J = 15.9, 6.8$ Hz, 2H), 1.22-1.11 (m, 5H): HRMS ESI calcd for $C_{22}H_{28}N_4O_2$ 381.2285, found 381.2282.

5-((3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)benzofuran-3(2*H*)-one **27d**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 7.0-6.94 (m, 2H), 6.75 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.12 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.61 (brs, 1H), 3.09 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.02 (td, $J = 12.8, 2.2$ Hz, 2H), 2.88 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H), 1.78 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 1.70-1.62 (m, 2H), 1.54-1.48 (m, 1H), 1.38 (dd, $J = 15.9, 6.8$ Hz, 2H), 1.26-1.20 (m, 8H): HRMS ESI calcd for $C_{21}H_{28}N_4O_3$ 385.2234, found 385.2230.

Calculate of physical property

All physical property except cLogP was calculated with ACD/PhysChem History. ACD/Labs, ver. 10.00, Advanced Chemistry Development, Inc.: Toronto, Canada, 2006. cLogP was calculated with sybyl-X, ver 2.0. Tipos, L.P.: St. Louis MO, USA, 1979.

2-9-2) Biology

Cell-based cAMP functional assay

Cellular cAMP was measured using HTRF cAMP HiRange reagent (CISBIO, Cedex, France). CHO-K1 cells expressing hGPR119 receptors were obtained from Applied Cell Sciences and were grown in flasks containing F-12 medium supplemented with 10% FBS, 1% non-essential amino acids (NEAA), 20 mM HEPES, 50 units/ml penicillin, 50 µl/ml streptomycin, and 400 µg/ml geneticin. CHO-K1 cells expressing mGPR119 receptors were prepared in house and were grown in flasks containing F-12 medium supplemented with 10% FBS, 1% NEAA, 20 mM HEPES, 50 units/ml penicillin, 50 µl/ml streptomycin, and 400 µg/ml geneticin. For the hGPR119 or mGPR119 functional assay, cells expressing hGPR119 or mGPR119 were harvested, resuspended in incubation buffer (F-12 medium, 20 mM HEPES, 1 mM IBMX), and dispensed into 384-well plates at a density of 1.5_10⁴ cells/well in the presence or absence of test compounds. Cells were incubated at 37 °C for 30 min, and the cAMP-d2-conjugated antibody and the anti-cAMP-criptase-conjugated antibody were added to the plate. After incubation for 60 min at room temperature, measurements were made using a HTRF_ (TR-FRET) Microplate Reader ARTEMIS (Furuno Electric Co., Ltd, Tokyo, Japan). Data analysis was performed based on the ratio of fluorescence intensity of each well at 620 and 665 nm. The sigmoidal dose-response equation was used to determine EC₅₀ and Emax values. These values represent the relative efficacy that was defined as the ratio of the response of test compound to the maximum response of AR231453 (7.4 nM for hEC₅₀ and 20 nM for mEC₅₀).

Animal Experiments

All animal experiments in this study were performed in accordance with the "Rules for Feeding and Storage of Experimental Animals and Animal Experiments" and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the testing facility from the point of view of animal welfare.

oGTT and scGTT

Male 8-week-old C57BL/6J mice (Charles River Japan) were fasted overnight and then received orally administered vehicle (20% HP β CD) or test compound 3 or 10 mg/kg (n = 8). After 30 min, glucose was given orally or subcutaneously at 2 g/kg, and blood samples were collected from tail veins at 0, 20, 40, 60 and 120 min. Blood glucose level was measured using Glutest Pro R (Sanwa Kagaku Kenkyusyo).

GLP-1 secretion

Male 10-week-old C57BL/6J mice were fasted for 5 h and received orally administered vehicle (5% DMSO, 0.1% Tween 80 and 0.5% methylcellulose) or compound at 30 mg/kg (n = 10). Plasma total GLP-1 (both intact GLP-1 (7–36) amide and its primary metabolite) levels at 30 min after the administration were measured by ELISA using anti-GLP-1 monoclonal antibodies.

Statistical analysis

All values are expressed as a mean and standard error mean (SEM). Statistical significance was tested using a one-way ANOVA and the Dunnett's multiple comparison test.

2-10) 参考文献

1. 蛋白質構造を利用した創薬 (SBDD) の最先端. 融合発展する構造生物学とケミカルバイロジの最前線.
本間 光貴, 長野 哲雄, 若槻 壮市, 高木 淳一, 古谷 利夫編.
蛋白質核酸酵素, **2009**, 54(12), 1582-1590.
2. Software and resources for computational medicinal chemistry.
Liao C, Sitzmann M, Pugliese A, Nicklaus MC.
Future Med Chem. **2011**, 3(8), 1057-1085.
3. ハイスループットスクリーニング技術とは?
新井 好史.
化学と生物, **2000**, 38(4), 264-269.
4. Thomson Reuters Cortellis®, Drug report.
5. GPR119 agonists as potential new oral agents for the treatment of type 2 diabetes and obesity.
Fyfe MC, McCormack JG, Overton HA, Procter MJ, Reynet C.
Expert Opin Drug Discov. **2008**, 3(4), 403-413
6. GPR119 agonists for the potential treatment of type 2 diabetes and related metabolic disorders.
Shah U, Kowalski TJ.
Vitam Horm. **2010**, 84, 415-448.
7. Targeting GPR119 for the Potential Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus.
Mo XL, Yang Z, Tao YX.
Prog Mol Biol Transl Sci., **2014**, 121, 95-131.
8. The Synthesis of 5-Hydroxy-2,3-dihydrobenzo(B)thiophene (1) via an Efficient One Step Preparation of 5-Nitro-Benzo(B)thiophene-2-carboxylate(3A).
Robert AZ, Milton LH.
Synth Commun, **1991**, 21, 959-964.
9. HTRF を用いたハイスループットスクリーニング.
武本 浩.
化学と生物, **2000**, 38(7), 481-487.
10. (a) Novel compounds.
Atkinson FL, Barker MD, Campos SA, Parr NJ, Patel VK.
PCT Int Appl. WO/2006129100, **2006**.
(b) Novel Cyclopenta[b]benzofuran derivatives and the utilization thereof.
Diedrichs N, Fahrig T, Gerlach I, Ragot J, Schuhmacher J, Thede K, Horvath

- E.
PCT Int Appl, WO/2005113529, **2005**.
- (c) 4-Phenoxy-6-aryl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine and *N*-aryl -6-aryl-1*H*-pyrrolo[3,4-*d*]pyrimidine-4-amine compounds, their use as mTOR kinase and PI3 kinase inhibitors, and their synthesis.
Bursavich MG, Nowak PW, Malwitz D, Lombardi S, Gilbert AM, Zhang N, Ayral-Kaloustian S, Anderson JT, Brooijmans N.
PCT Int Appl, WO/2010011620, **2010**.
- (d) 4-Substituted-7-azaindoles bearing a ureidobenzofuranone moiety as potent and selective, ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin (mTOR).
Tsou HR, MacEwan G, Birnberg G, Zhang N, Brooijmans N, Toral-Barza L, Hollander I, Ayral-Kaloustian S, Yu K.
Bioorg Med Chem Lett. **2010**, 20(7), 259-263.
- (e) Piperidinylchromen-6-ylsulfonamide compounds as 5- hydroxyltryptamine-6 ligands.
Greenblatt LP.
PCT Int Appl, WO/2005037830, **2005**.
- (f) Bicyclic lactam factor VIIA inhibitors useful as anticoagulants.
Wurtz NR, Priestley ES, Cheney DL, Zhang X, Parkhurst B, Ladziata V.
PCT Int Appl, WO/2008079759, **2008**.
11. Design of potent and selective GPR119 agonists for type II diabetes.
Szewczyk JW, Acton J, Adams AD, Chicchi G, Freeman S, Howard AD, Huang Y, Li C, Meinke PT, Mosely R, Murphy E, Samuel R, Santini C, Yang M, Zhang Y, Zhao K, Wood HB.
Bioorg Med Chem Lett. **2011**, 21(9), 2665-2669.
12. Bicyclic compounds and use as antidiabetics.
Fang J, Tang J, Carpenter AJ, Peckham G, Conlee CR, Du KS, Katamreddy SR.
PCT Int Appl, WO/2008070692, **2008**.
13. 糖尿病の新しい診断方法 血糖動態のシミュレーションにもとづく IVGTT の再評価について
七里 元亮, 井上 通敏, 繁田 幸男
第 73 回日本内科学会講演会 シンポジウム 糖尿病の診断, **1976**.
14. Agonists at GPR119 mediate secretion of GLP-1 from mouse enteroendocrine cells through glucose-independent pathways.
Lan H, Lin HV, Wang CF, Wright MJ, Xu S, Kang L, Juhl K, Hedrick JA,

Kowalski TJ.

Br J Pharmacol. **2012**, 165(8), 2799-2807.

15. GPR119 regulates murine glucose homeostasis through incretin receptor-dependent and independent mechanisms.

Flock G, Holland D, Seino Y, Drucker DJ.

Endocrinology, **2011**, 152(2), 374–383.

16. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ.

Adv Drug Deliv Rev, **2001**, 46(1-3), 3-26.

17. Property distribution of drug-related chemical databases.

Oprea TI.

J Comput-Aided Mol Des, **2000**, 14, 251-264.

第三章 hERG チャンネル阻害活性の回避

3-1) 序論

第二章において、リード化合物 **26a** を見出すことができた。創薬研究では、リード化合物を獲得したのち、リード最適化研究が行われ、その中から見出されたものが臨床開発候補化合物になる。国内自社開発の医薬品開発において、非臨床及び臨床試験での安全性を理由に開発を中止する例が半分以上を占めている。¹ そのため、リード最適化研究では、まず、リード化合物からの構造修飾を開始する前に、リード化合物のプロファイリングを行い、ターゲット以外に関わる選択性や ADME-Tox パラメータでの弱点を見出し、その後、リード化合物の周辺化合物の構造展開を行い、その弱点の克服を目指して、活性評価及び ADME-Tox 評価データを基に更なる構造展開を行うことを繰り返し、目的の活性や薬物動態を持つ化合物へと導いていく。

そのプロファイリング項目の中に、hERG チャンネル阻害がある。hERG チャンネル阻害は 1990 年代後半から注目を浴びている毒性評価項目の一つであり、hERG チャンネル阻害作用(hERG 阻害作用)を有する薬物と心室頻脈につながる QT 延長作用の関係性が明らかとされている。² QT 延長とは、心室筋の脱分極開始時相 (Q 波) から再分極終了時相 (T 波の終わり) までの時間である QT 間隔が通常時に比べて長くなることをいう。³

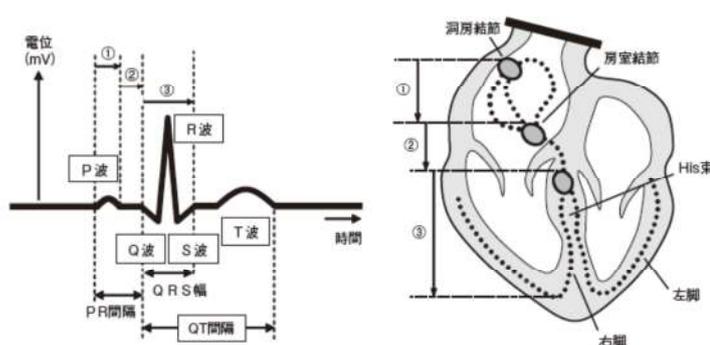


図1 心臓の刺激伝導系と心電図の関係

P、心房の脱分極；QRS、心室の脱分極；Q、1相（中隔の活動）；R、2相（自由壁の活動）；S、3相（心臓の中隔基部と心室基部の活動）；ST、心室の脱分極極期；T、心室の再分極；PR、房室伝導時間；QT、心室の電氣的収縮時間

図 3-1：心臓の刺激伝導系と心電図の関係(日薬理誌, 2008, 132, 221 より転載)

心電図の P 波は心房筋の活動電位に対応し、QRS 波 ST-T 波は心室筋の活動電位に対応するものと考えられている。⁴ このうち、QRS 波は心室筋の活動電位脱分極相に相当し、T 波が活動電位再分極層に相当している。QT 間隔は心室筋の

活動電位持続時間の平均的長さを表している。静止状態では細胞膜 K イオンに対して高い透過性を有し、カリウム平衡電位に近い静止電位が形成されている。活動電位発生時には、Na イオンチャネルが開口することにより急激な脱分極が起こり、次いで Ca イオンチャネルがゆっくりと閉じるとともに、K イオンチャネルが活性化されるという 2 つの機構が相まって再分極相が形成され、再び静止電位に戻る。

QT 延長の原因は、脱分極後の再分極の遅れにあると考えられている。⁵ 遺伝的 QT 延長患者において、最近、細胞膜にある再分極に必要な K イオンチャネルの異常が発見されている。この異常チャネルをもつ細胞では、再分極に必要な K イオンの流入が遅れる。再分極が妨げられるので QT 間隔が延長する。細胞は再分極が完了しないと次の興奮を起こすことはできなくなり、その延長の程度は各部位ごとにバラツキがある。このような状態では、新たに刺激を与えなくても興奮が止まったり、消えたりすることなく自動的に回ってしまうリエントリー回路ができやすい。この不安定なリエントリー回路の結果が多形性心室性頻脈であり、その典型が **Torsades de pointes (TdP)** である。TdP は、直ちに適切な治療を行わないと極めて容易に心室細動に移行するため、極めて危険な悪性不整脈である。(図 3-2)

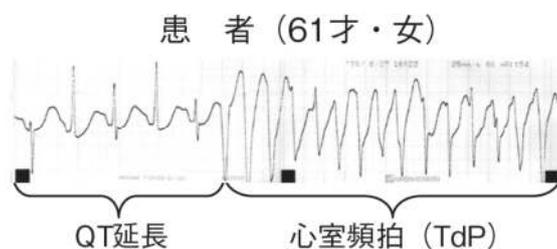


図 3-2 : QT 延長患者の心電図(日薬理誌, 2009, 133, 4-7 より転載)

QT 延長を誘発する薬物の多くが、心筋細胞の遅延整流 K^+ チャネル (IK) の速い成分 (IKr) を抑制し、心筋細胞の活動電位延長および心電図における QT 間隔の延長を起こすことが知られている。IKr は、心筋細胞の活動電位の第 2 相 (プラトー相) 中に活性化され、活動電位を終了し再分極させる重要な役割を担っている。機能の発現実験や電気生理学的検討から、この IKr を形成する K^+ チャネルサブユニット分子が hERG チャネルであると推定されている。つまり、hERG チャネルが阻害されると IKr を抑制してしまい、QT 延長を引き起こすといわれている。⁵(図 3-3)

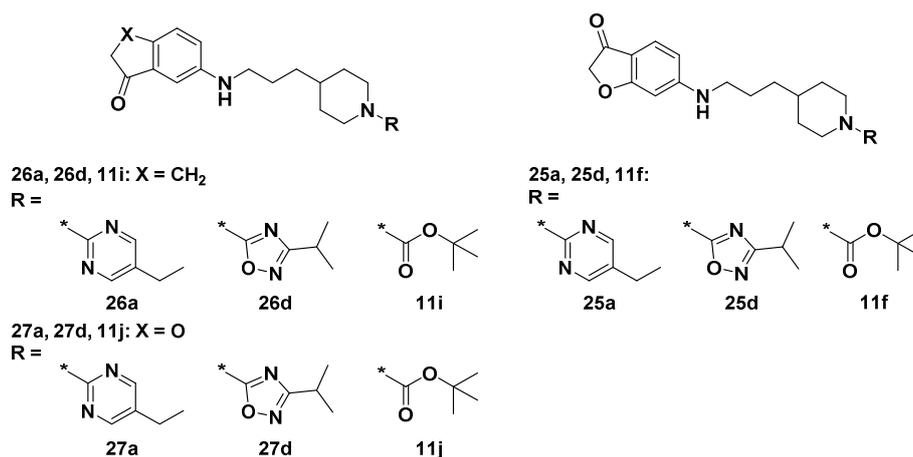
実際に hERG 阻害作用を有するシサプリド、テルフェナジンやアステミゾー

とにより、化合物の QT 延長作用の有無を予測することができる。hERG 阻害作用が疑われる場合には、非臨床試験においてイヌやサルを用いたテレメトリー試験が行われ、QT 延長作用の有無が評価され、一般的に QT 延長作用が確認された場合にはその化合物の開発は中止される。

3-2) リード化合物の hERG チャンネル阻害作用

図 3-4 に示した 3 つの薬剤は塩基性窒素を中心にもち、その両側に芳香環を有するという共通のファーマコフォアが認められ、これら以外にも塩基性窒素を有する化合物ではしばしば hERG 阻害活性が見られている。化合物 **26a** も塩基性窒素を有しており、hERG 阻害作用を持つ可能性が示唆された。化合物 **26a** だけでなく、周辺化合物の hERG 阻害作用も測定した結果、その化合物 **26a** に若

Table 3-1 : リード化合物と周辺化合物の hERG 阻害活性



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hEmax ^a (%)	hERG inhibition (%)@10 μM	cLogP	pKa (MB)
26a	51	113	14	4.41	7.92
26d	41	96	27	4.38	7.92
11i	46	98	33	4.98	7.92
27a	58	110	22	3.91	7.94
27d	61	95	38	3.88	7.94
11j	88	95	45	4.48	7.94
25a	117	115	0	3.91	6.64
25d	73	94	8	3.88	6.64
11f	52	94	11	4.48	6.64

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較)

干ながら hERG 阻害作用があることが判明した。(Table 3-1) さらに、化合物 **26a** の周辺化合物において、いくつかの化合物が強い阻害作用を持つことが分かった。そのため、このシリーズの GPR119 アゴニストは hERG 阻害作用が出やすい骨格であることが示唆され、GPR119 アゴニスト活性と hERG 阻害活性の安全域を確保することが必要である。そのためには、hERG 阻害作用を十分に下げることと、hERG 阻害作用を低い状態で維持しながら活性の向上を目指すことが方法として考えられ、まず、GPR119 アゴニスト活性を維持または向上させながら、hERG 阻害作用を十分に下げることが目標にリード最適化研究をスタートした。

3-3) hERG チャネル阻害作用の解決策

これまで hERG 阻害作用回避を目指した構造毒性相関の報告が多くなされ、hERG 阻害回避に有効な方法として、①分子量の低減、②脂溶性の調整、③塩基性の調整、④小さな構造変換、⑤Zwitter イオンの導入の 5 つが知られている。⁸ ①では分子量が 250 以下の場合にはほとんどの化合物が hERG 阻害作用を有していないにもかかわらず、分子量が 400 超の化合物では hERG 阻害を有する化合物の割合の方が多くなることが分かっており、分子量を制限することは hERG 阻害を抑えることに有用である。②では脂溶性を表す指標である cLogP が 4 を超えると阻害活性を示す確率が高まることが知られており、cLogP と hERG 阻害活性の間に相関も見られている。③では、hERG 阻害作用を有する化合物は塩基性部位を持つ場合が多いことが知られており、プロトン化された塩基性窒素カチオンが hERG チャネルの Tyr652 と相互作用することが推定されており、この塩基性窒素の pKa を調節することにより、hERG 阻害を回避できる。④では、メチル基などの小さな置換基の導入のような構造修飾や脂溶性や塩基性の変化を起こさないようなメチル基やカルボニルといった置換基の分子内の移動でも、hERG 阻害活性が大きく変化することがある。しかし、確立された方法論などはなく、化合物の合成及び評価を繰り返すことにより回避をしていかなければならない。⑤では、hERG 阻害作用を示す化合物が持つ塩基性部位とともに、同一分子内に酸性基を導入することであり、極性基が導入されることによる cLogP の低減の作用もあるが、それだけでは説明のできない hERG 阻害作用の大きな低減が見られる。しかし、Zwitter イオンを形成することにより、経口吸収性が悪くなる欠点も持ち合わせている。

リード化合物 **26a** は、分子量が 378 であり、①のような 250 以下の分子量まで、分子量の低減は難しい。cLogP は 4.41 であることから、②の脂溶性の調整により hERG 阻害作用を調節できる可能性がある。**26a** と **27a** を比較すると、cLogP が **27a** の方が低いにもかかわらず、**27a** の方が強い hERG 阻害作用を有

している。一方、B環の違いによる脂溶性の差から考察すると、すべての場合において最も脂溶性の高い Boc 基の化合物で最も強い hERG 阻害作用が見られている。(Table 3-1) そのため、B環周辺の脂溶性の調整は hERG 阻害に有効であると考えられる。しかし、GPR119 の天然のリガンドとして脂肪酸由来の OEA や 2-OG などが知られていることから(図 3-5)、⁹ その GPR119 アゴニストの結合ポケットの位置や構造は明らかとなっていないが、天然のリガンドのような脂溶性物質を好む傾向があると考えられ、脂溶性を下げることにより活性の低下の恐れもある。

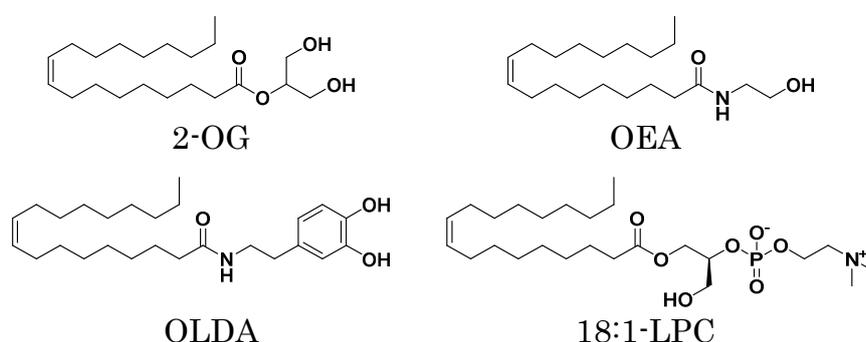
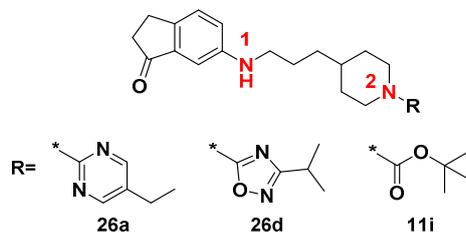


図 3-5 : GPR119 の天然リガンド

このシリーズの GPR119 アゴニストは A 環アミノ基を有しており、酸性基を導入することにより、⑤の Zwitter イオンを形成することができるが、経口吸収性が低下しやすく、GPR119 リガンドが脂溶性のものが多くことから、酸性基の導入が向かない可能性が高い。このアミノ基の塩基性に着目すると、25a に比べ、26a 及び 27a の pKa が高値を示しており、hERG 阻害作用とも相関している。そのため、③のアミノ基の塩基性を調整することにより、hERG 阻害活性を低減できる可能性は高い。また、26a、26d や 27a、27d の間では、脂溶性及び塩基性に差はほとんどないが、hERG 阻害作用には差が出てきており、④の小さな構造変換でも hERG 阻害作用を軽減できると考えられる。そこで、③の塩基性の調整を目指した構造展開を中心に行い、④の小さな構造変換も交えながら、hERG 阻害作用の低減を狙うこととした。

化合物 26a, d 及び 11i はビシクロアミンの他にピペリジン環にも窒素原子を有している。図 3-4 にある化合物のように hERG 阻害が確認される場合には、しばしば塩基性ピペリジン環を有している。26a などもピペリジン環を有しており、ビシクロアミンとどちらが hERG 阻害に重要な役割をしているか、pKa 値を算出し、確認した(Table 3-2)。その結果、ピペリジン窒素の塩基性は、いずれの化合物でもビシクロアミンよりも低かった。hERG 阻害作用に影響するような塩基性

Table 3-2 : 塩基性と hERG 阻害作用の関係

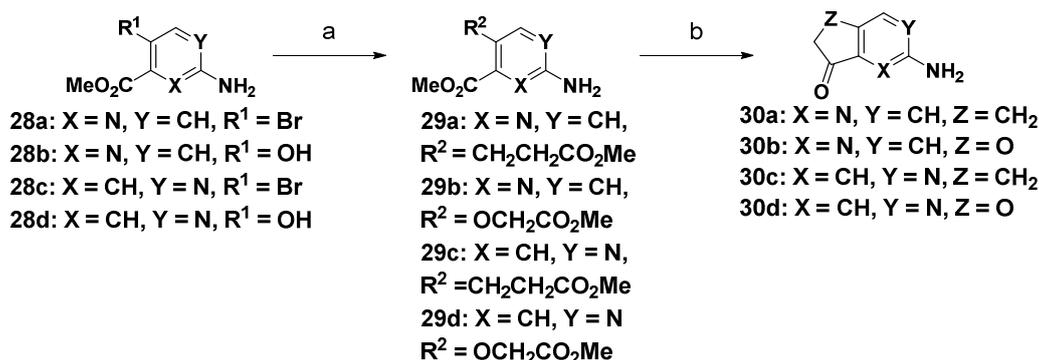


Compound	hERG inhibition (%)@10 μ M	N 1 pKa	N 2 pKa
26a	14	7.92	5.39
26d	27	7.92	4.75
11i	33	7.92	-1.39

を持つ窒素は N1 だけであり、この塩基性の調整を行うことが重要であると考えられ、ビスクロアミンの塩基性の調整を行うこととした。

3-4) ヘテロビスクロアミンの合成

化合物 **26a** のアミノ基の塩基性を調整するには、塩基性アミノ基を持たないエーテル体やアミド基などに置換する方法、アミノ基の近隣に置換基を導入し嵩高くする方法とアミノ基の非共有電子対の電子密度を下げする方法とがある。アミノ基の塩基性がないものとして、第二章で示した化合物 **1** と **4f** (Table2-1)があるが、活性が減弱してしまっている。アミノ基を嵩高いものに変換する場合は分子量の増大や脂溶性の増加が考えられ、塩基性以外の面で hERG 阻害作用に影響する可能性がある。アミノ基の非共有電子対の電子密度を下げるためには、A 環やリンカーに電子求引性基を導入することや A 環のベンゼン環をヘテロ環への変換することが考えられる。分子量を維持しながら、脂溶性も下げ、塩基性も調整できることから、A 環へのヘテロ環の導入を行うこととした。A 環をヘテロ環に変換した化合物を合成するため、原料となる各種アミン体の合成を行った。ヘテロビスクロアミン体は、既存の方法¹⁰を基に Dieckmann 縮合に続く脱炭酸をキー反応として合成した。(Scheme 3-1~4) 即ち、市販されている **28a** 及び **28c** とアクリル酸メチルとの Heck 反応は、アミノ基を保護することなく、速やかに反応が進行した。水素添加後、Dieckmann 縮合に続く脱炭酸により、**30a** と **30c** を高収率で得た。オキサアナログ **30b** と **30d** は、対応するアルコール体のプロモ酢酸メチルを用いたアルキル化により **29b** と **29d** を調整した後、**30a** と **30c** と同様のルートで合成した。

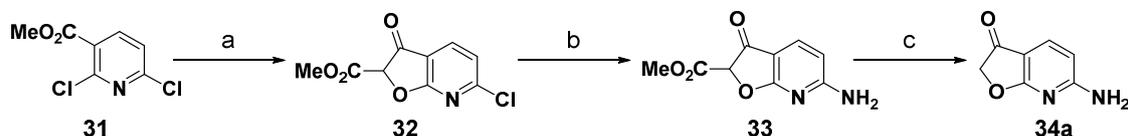


Reagents and conditions: from **28a** and **28c** to **30a** and **30c** respectively. (a) (i) Methyl acrylate, PdCl₂(P *o*-Tol₃)₂, Et₃N, DMF (ii) H₂, Pd/C, EtOH (65-72%) (b) (i) *tert*-BuOK, DMF (ii) NaCl (56-71%)

Reagents and conditions: from **28b** and **28d** to **30b** and **30d** respectively. (a) BrCH₂CO₂Me, Cs₂CO₃, DMF (58-82%) (b) (i) *tert*-BuOK, DMF (ii) NaOH (35-51%)

Scheme 3-1 : ヘテロビシクロアミン **30a-d** の合成

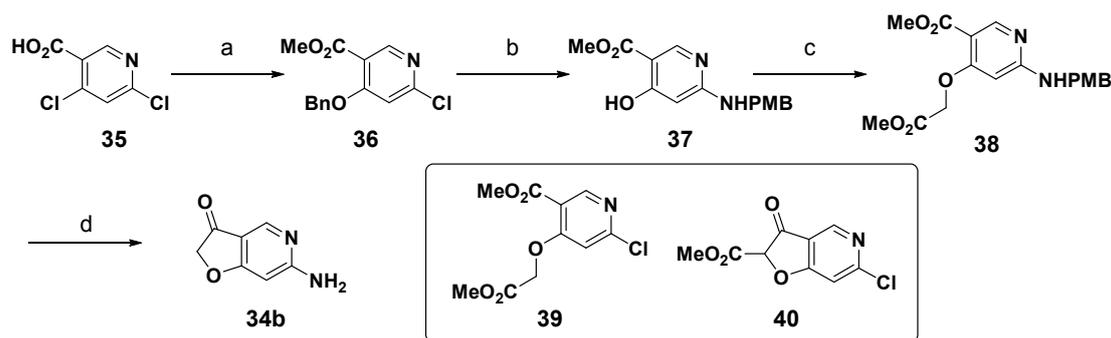
類縁体である、化合物 **34a-c** はそれぞれ市販の原料である **31**, **35**, **41** から合成した。即ち、**31** とグリコール酸メチルとのカップリングから速やかに Dieckmann 縮合が起こり **32** を与えた。*p*-メトキシベンジルアミンとの縮合後、脱保護によりアミノ基を導入し、脱炭酸することにより、**34a** を得ることができた。



Reagents and conditions: (a) HOCH₂CO₂Me, NaH, DMF (67%) (b) (ii) *p*-MPMNH₂, Et₃N, NMP (27%) (ii) TFA (66%) (d) conc. HCl, MeOH (86%)

Scheme 3-2 : ヘテロビシクロアミン **34a** の合成

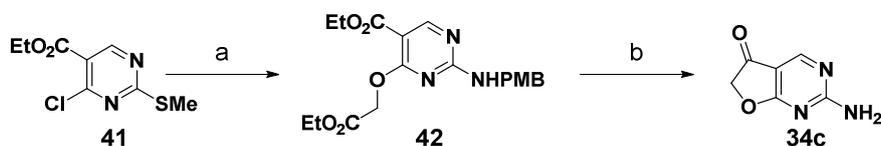
34b も **34a** と同様のルートでの合成を検討したが、**39** や **40** と *p*-メトキシベンジルアミンとの縮合が進行せず、ベンジル保護体を經由した長いルートでの合成となった。即ち、ジクロロニコチン酸 **35** をベンジルアルコールにより 4 位選択的にベンジルエーテルとしたのち、エステル化により **36** とした。*p*-メトキシベンジルアミンとの縮合によりアミノ窒素を導入し、水素化分解により脱ベンジルしたのち、ブromo酢酸メチルによるアルキル化でジエステル体 **38** とした。LDA により Dieckmann 縮合したのち、脱炭酸に続く、*p*-メトキシベンジル基を TFA により脱離させることにより **34b** を合成した。



Reagents and conditions: (a) (i) BnOH, NaH, THF (ii) MeI, K₂CO₃, DMF (90%) (b) (i) *p*-MPMNH₂, Et₃N, NMP (40%) (ii) H₂, Pd/C, MeOH (92%) (c) BrCH₂CO₂Me, K₂CO₃, DMF (56%) (d) (i) LDA, THF (70%) (ii) conc. HCl, MeOH (99%) (iii) TFA (80%)

Scheme 3-3 : ヘテロビシクロアミン **34b** の合成

34c はメタンスルホニル基を脱離基として用いたルートにより合成を行った。ピリミジン **41** とグリコール酸エチルとの縮合後に、硫黄原子の酸化に続く、*p*-メトキシベンジルアミンとの置換反応により、ジエステル体 **42** とした。*p*-メトキシベンジル基を脱保護したのち、Dieckmann 縮合に続く脱炭酸により、**34c** を合成した。



Reagents and conditions: (a) (i) HOCH₂CO₂Et, NaH, THF (40%) (ii) *m*-CPBA, DCM (iii) *p*-MPMNH₂, Et₃N, NMP (63%) (b) (i) TFA (91%) (ii) *tert*-BuOK, DMF (21%) (iii) conc. HCl, MeOH (49%)

Scheme 3-4 : ヘテロビシクロアミン **34c** の合成

これらのヘテロビシクロアミン体のキー反応としてジエステルからの *t*-BuOK を塩基として用いた Dieckmann 縮合を行っているが、ヘテロ環の違いにより非常に加水分解が起こりやすいものがあり、**42** の反応では非常に収率が悪くなっている。(scheme 3-4) さらに、**38** からの反応では *t*-BuOK ではほとんど目的の環化体を得ることはできず、LDA を用いることで収率よく得ることができており、厳密な脱水条件で反応させる必要がある。また、もう一つのキー反応である脱炭酸では、エステルの加水分解後に脱炭酸が起きる。最も一般的な加水分解の条件は塩基性条件下で行われるが、**30b** と **30d** の合成以外の場合、脱炭酸後に図 3-6 に示すような二量体が生成していることが確認された。これは、

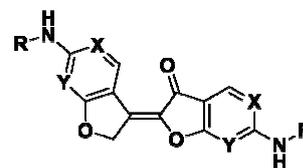
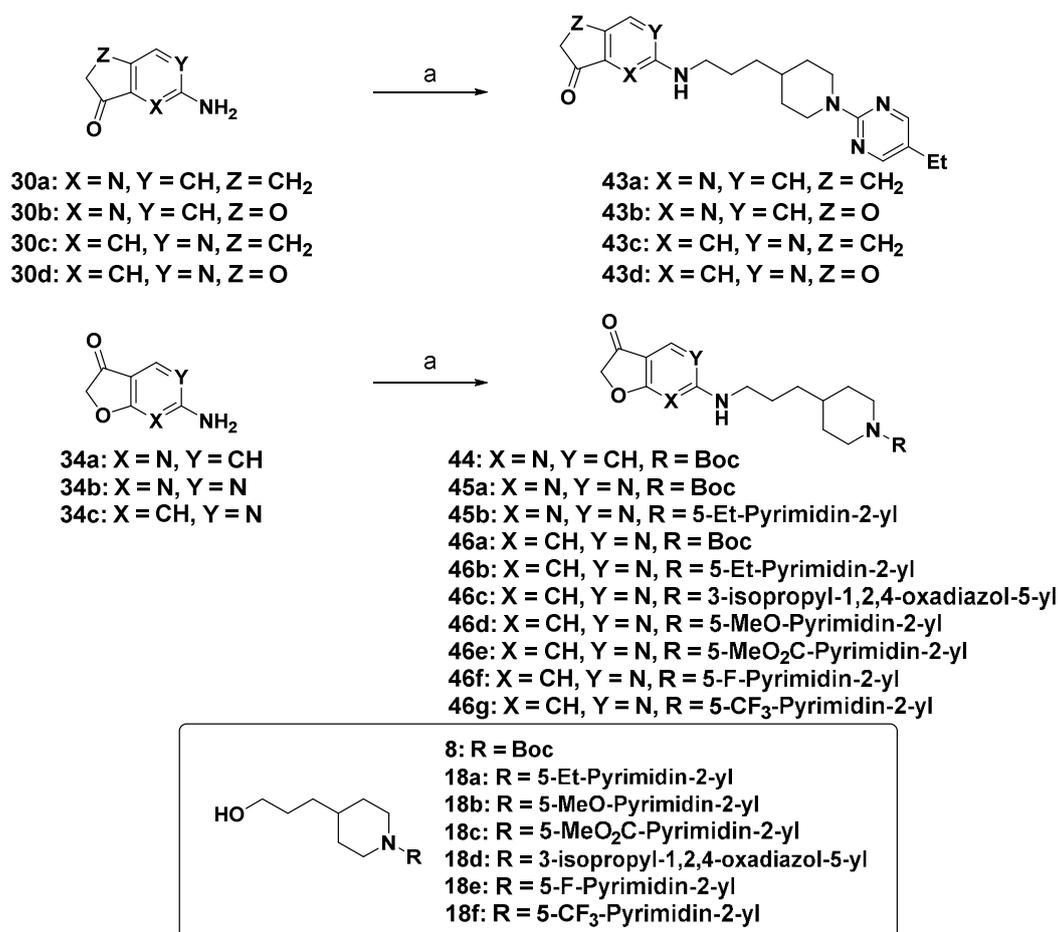


図 3-6 : 二量体副生成物

加水分解後に生成するケトン体が塩基性条件下ではケトン α 位が活性化されてしまうことにより、二量体化が進んだと考えている。そこで、2量体化を防ぐため、酸性条件下および中性条件下での反応に切り替えることにより良好な収率で目的のアミン体を得ることができた。

3-5) ヘテロビシクロアミン誘導体の SAR

30a-d および **34a-c** と対応するアルデヒドとの還元的アミノ化により、アルキル鎖の伸長を行い、化合物が不安定であった **44d** は得ることができなかつたが、その他においては目的の化合物を得ることができた。(Scheme 3-5) しかし、A環がヘテロビシクロ環になったことにより、アミンの求核性が低下しており、反応の進行が遅い場合があり、アミン **34b** や **34c** Scheme 2-2 の方法では低収率と

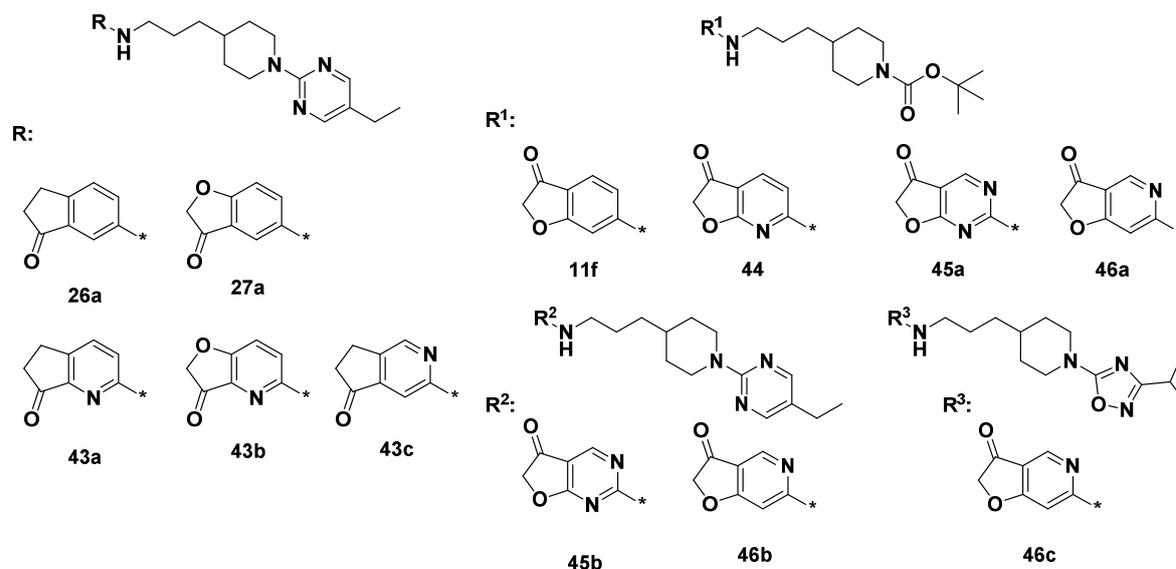


Reagents and conditions: (a) (i) Corresponding alcohol (**8**, **18a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**), Dess-Martin periodinane, DCM (>90%) (ii) NaBH(OAc)₃, DCM (Method A, 25-62%) or AcOH (Method B, 45-71%)

Scheme 3-5 : ヘテロビシクロアミン **43-46** の合成

なった。その原因として、アミン **34b** や **34c** の求核性が低いこと、また、これらのアミンが溶媒として用いている塩化メチレンに溶けにくいことが挙げられた。そこで、触媒として酢酸の添加を行い、その比率を変えていったところ、酢酸量依存的に収率が向上し、酢酸のみで反応を行うことで、最も良好な収率で目的のアミン体を得ることができた。A 環を変換したヘテロビシクロアミン

Table 3-3 : A 環へテロビシクロ体の SAR



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hE _{max} ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mE _{max} ^a (%)	hERG inhibition (%)@10 μM	pKa (MB)
26a	51	113	167	110	14	7.92
27a	58	110	160	109	22	7.94
43a	114	117	147	113	NT ^b	5.39
43b	1098	110	1319	97	NT ^b	5.39
43c	78	115	54	110	NT ^b	5.39
11f	52	94	55	108	11	6.64
44	(23%) ^c	87	448	107	5	2.50
45a	(26%) ^c	110	513	120	5	5.39
45b	46	112	75	105	0	5.39
46a	(57%) ^c	108	255	113	8	5.84
46b	31	111	45	103	0	5.84
46c	51	108	79	108	0	5.84

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較) ^b 未測定

^c %アゴニスト活性@100 nM

体の *in vitro* GPR119 アゴニスト活性の評価結果と hERG 阻害活性を Table 3-3 に示した。

その結果、化合物 **26a** のアザアナログである **43a** や **43c** では活性の若干の低下が見られた。**27a** のアザアナログである **43b** では大きく活性が減弱する結果となった。ヒトとマウスの両方で高活性を示していた化合物 **11f** のアザアナログである **44**, **45a** および **46a** も活性の減弱が認められたが、hERG 阻害作用の軽減傾向が見られた。さらに、**45a** と **46a** の Boc 基をエチルピリミジンに置換した **45b** と **46b** では、hERG 阻害作用が全くなく、活性の向上が見られた。特に、**46b** ではヒトとマウスともに活性の向上が見られ、これまでで最も高い活性を示した。また、イソプロピルオキサジアゾール体 **46c** でも高活性を維持しながら、hERG 阻害活性を完全に抑えることができた。脂溶性の高い Boc 基から環状等価体に変換することで完全に hERG 阻害作用を抑えることができおり、ビスクロアミンの pKa を 6 以下に抑え、且つ脂溶性を下げるということが重要であることが分かった。また、ヘテロビスクロ環の窒素原子の位置により、アミン窒素の pKa に変化しており、6-アミノフロ[3,2-*c*]ピリジン-3(2*H*)-オンの場合(**46a-c**)で、ヘテロビスクロ環誘導体として最も高い pKa を示し、且つ最も高い活性を示していた。これは、第二章で得られた知見である塩基性窒素の活性発現に対する重要性と同様の傾向がある。**46b** の pKa が 5.84 であり、過度な塩基性の低下は活性の低下を招くことが示唆された。

これまで、A 環ビスクロ環とリンカーとの結合位置を変換しても活性に大きな変化がない場合が多く、ビスクロ環上のケトンの活性に対する役割が不明であった。そこで、これまで合成したビスクロ環の静電ポテンシャルマップを算出し、考察を行った。Schrödinger 社の量子計算プログラム Jaguar 8.2 を用い、Hartree-Fock 法(HF/6-31G** level)を使用し静電ポテンシャルを算出し、マップ化した。(図 3-7)

化合物 **25a** と **46b** を比較するとケトンの電子密度に変化はないが、**46b** の方が芳香環の電子密度は低下している。しかし、**26a** や **27a** とそのピリジン体(**43a-c**)の間では、ピリジン体の芳香環電子密度が低下しているが、活性はむしろ低下してしまっている。そこで、ピリジン体 **43a-c** をそれぞれ比較すると、**43a** や **43b** は比較的活性の高かった **43c** に比べ、ケトンの電子密度が低下している。また、**43b** は **43a** と比べ、芳香環の電子密度が高くなっており、ケトンの電子密度の低下及び芳香環の電子密度の増加が、他のピリジン体との活性差に繋がっていると考えられる。ケトンの電子密度が低下するとそのアクセプターとしての機能は低下すると考えられるため、ケトンは電子求引性による芳香環の電子密度の低下させることとアクセプターとしての機能の両方が活性発現に寄与していると考えている。

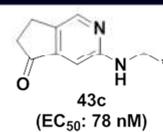
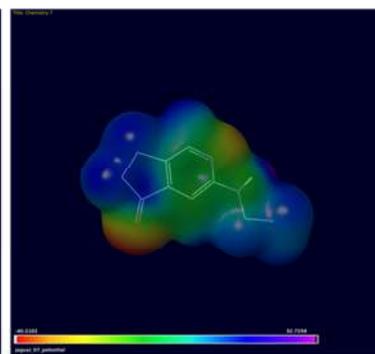
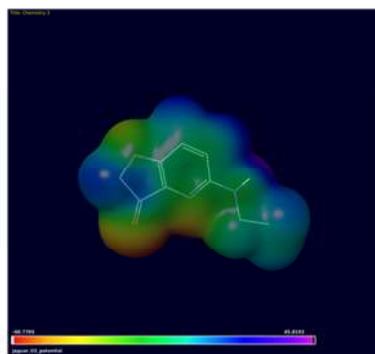
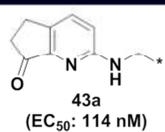
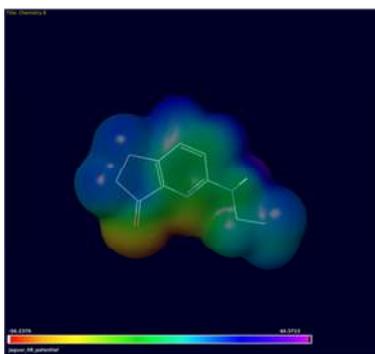
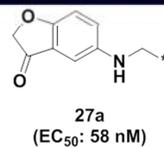
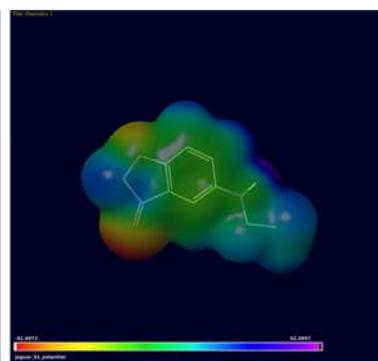
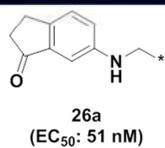
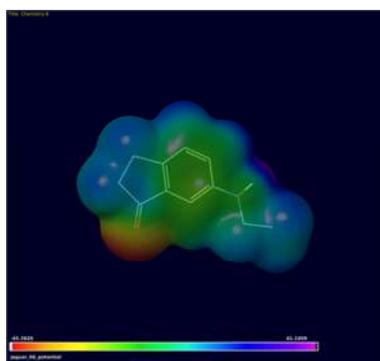
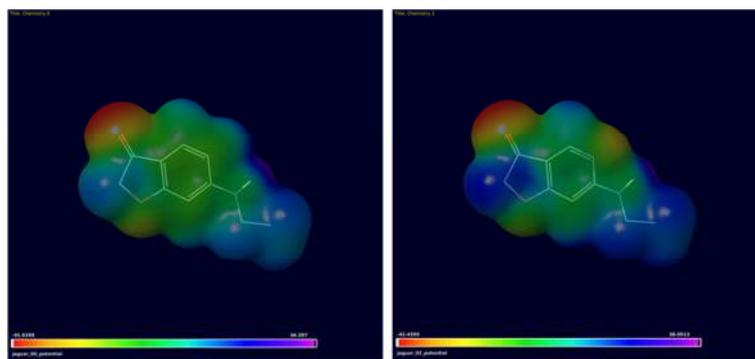
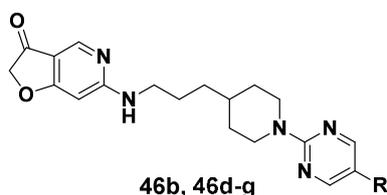


図 3-7 : 静電ポテンシャルマップ

続いて、良好な結果を示した **46b** のエチルピリミジンのエチル基の変換を行った。(Scheme 3-5) その結果を Table 3-4 に示した。

Table 3-4 : B 環側鎖の SAR



Compound	R	hEC ₅₀ (nM)	hEmax ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mEmax ^a (%)	hERG inhibition (%)@10 μM
46b	Et	31	111	45	103	0
46d	OMe	64	106	126	104	0
46e	CO ₂ Me	153	100	124	80	0
46f	F	51	111	70	98	0
46g	CF ₃	51	94	39	72	NT ^b

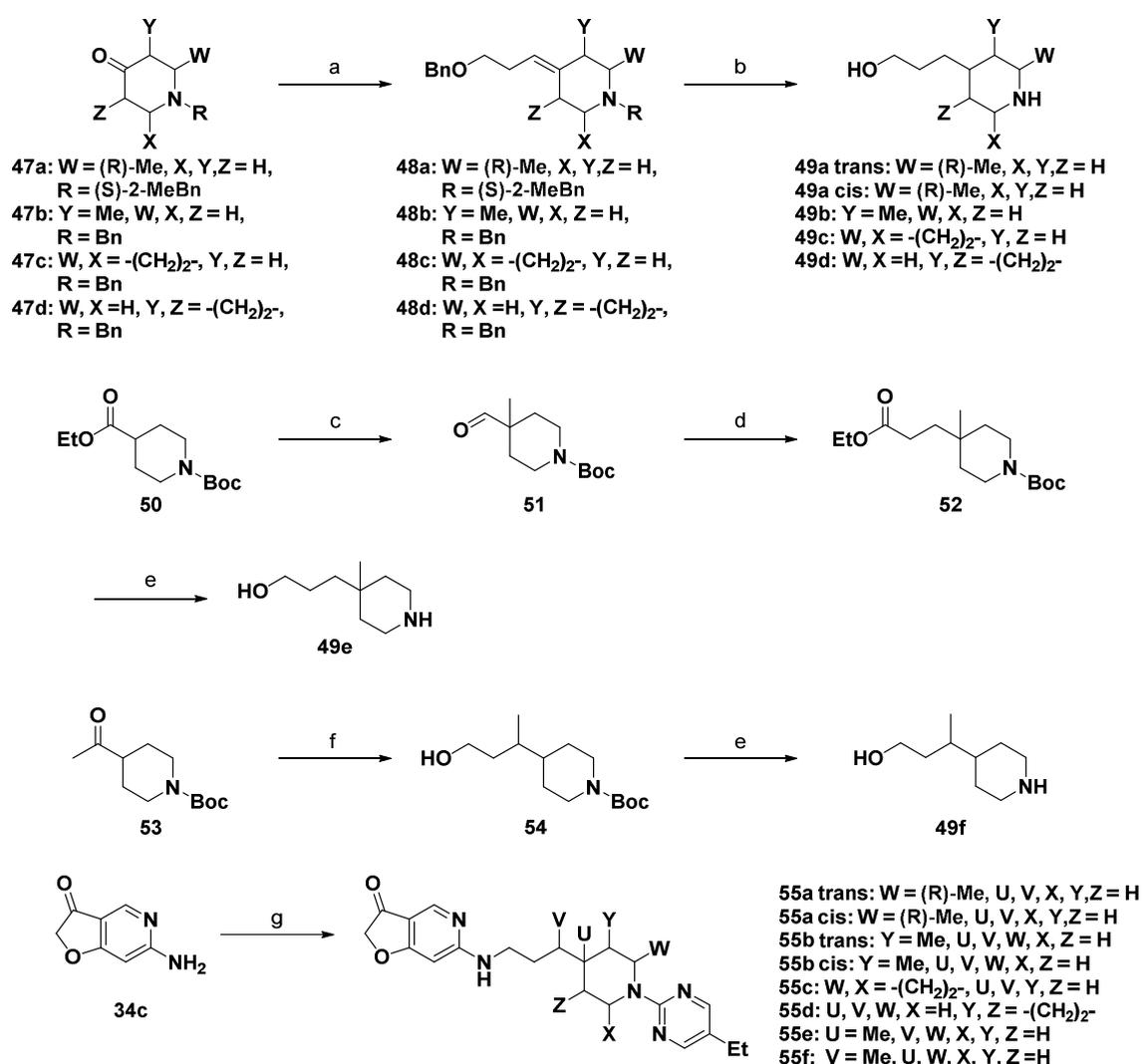
^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較, ^b 未測定

メトキシ基 **46d** やエステル **46e** のような極性基では活性の低下が見られたが、フルオロ基 **46f** やトリフルオロメチル基 **46g** を用いた場合には高活性を示し、エチル体 **46b** が最も高活性を示した。トリフルオロメチル基は脂溶性が高く、電子求引性基でもある。しかし、エチル体で最も高い活性を示していることから、ピリミジン環の電子密度よりも末端の脂溶性が GPR119 アゴニスト活性の発現に重要であると考えられる。また、いずれも hERG 阻害作用は全く検出されず、A 環であるフロ[3,2-*c*]ピリジン-3-(2*H*)-オン骨格が活性発現及び hERG 阻害作用の回避に有用なスキップフォールドであることが分かった。

ヘテロビシクロタイプの化合物では hERG 阻害活性を示す懸念がほとんどなく、**46b** の活性向上を目指し脂溶性置換基などを導入したとしても、hERG 阻害が増悪する可能性は低い。近年、Kelly や Dominique らはピペリジン環へのメチル基の導入により、活性を向上させている。¹¹ これは化合物の脂溶性の向上とともにピペリジン環の自由度が下がり、コンフォメーションが固定されるためだと考えられている。また、Mascitti らは、リンカーの置換基修飾により活性を向上させている。¹² MBX-2982 や GSK-263A とリード化合物の構造をトポロジー的に比較すると、リンカー部分にチアゾール環やピリジン環が重なると考えられ、小さな置換基の導入できるスペースはあると考えられ、むしろ置換基が自由度を下げ、さらに環構造にあたる部分を占有することで活性が向上する可能性が

ある。そこで、**46b** の更なる活性向上を目指し、リンカーやピペリジン環の構造修飾を行うこととした。

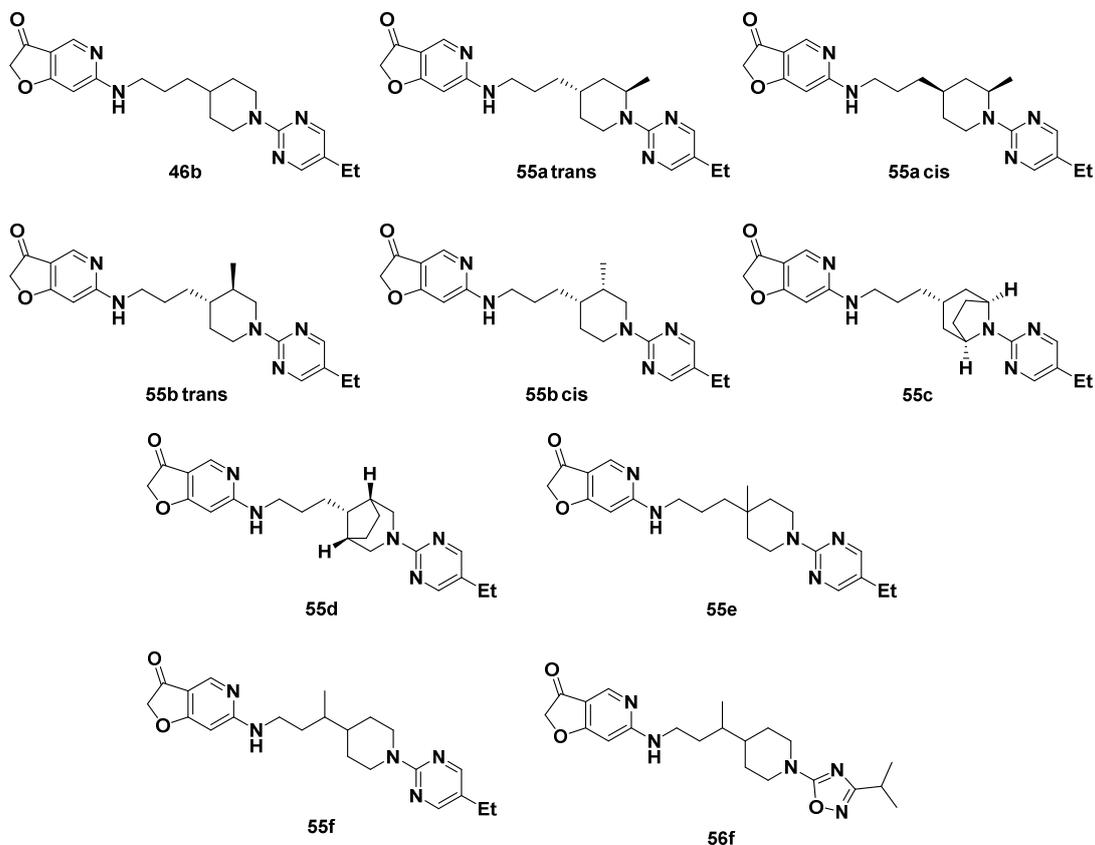
まず、原料となるアミノアルコール体は、各種ピペリジノン誘導体に対し、Wittig 反応によりリンカー部分を伸長し、水素添加することにより合成した(**49e** と **49f** を除く)。(Scheme 3-6) 即ち、市販のピペリジノン誘導体と(3-ベンジルオキシプロピル)トリフェニルホスフォニウム塩との Wittig 反応により、ベンジルエーテル体としたのち、Pearlman 触媒¹³ を用いた中圧水素雰囲気下の反応により、水素添加と脱保護を行い、**49a-d** を合成した。4-メチル体 **49e** は *N*-Boc-イソニコチン酸エチル **50** を出発原料として、エステル α 位を LDA とヨウ化メチ



Reagents and conditions: (a) BnO(CH₂)₃PPh₃Br, t-BuOK, THF (42-85%) (b) H₂, Pd(OH)₂, EtOH and then conc. HCl (81%-99%) (c) (i) LDA, MeI, THF (99%) (ii) LAH, THF (99%) (iii) Dess-Martin Periodinane, DCM (85%) (d) (i) EtO₂CCH=PPH₃, Toluene (74%) (ii) H₂, Pd/C, EtOH (99%) (iii) LAH, THF (92%) (e) HCl, 1,4-Dioxane (49%) (f) (i) EtO₂CCH₂FO(OEt)₂, NaH, THF (ii) H₂, Pd/C, MeOH (93%) (iii) LAH, THF (99%) (g) (i) 49a-f, 2-Cl-5-Et-Pyrimidine, DIPEA, i-PrOH (32-88%) (ii) Dess-Martin Periodinane, DCM (>95%) (iii) NaBH(AcO)₃, AcOH (25-56%)

Scheme 3-6 : ヘテロビシクロアミン **55a-f** の合成

Table 3-5 : リンカー及びピペリジン環への置換基導入による SAR



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hEmax ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mEmax ^a (%)	hERG inhibition (%)@10 μM	pKa (MB)
46b	31	111	45	103	0	5.39
55a trans	(52%) ^c	92	NT ^b	NT ^b	0	5.84
55a cis	(24%) ^c	91	NT ^b	NT ^b	NT ^b	5.84
55b trans	600	80	306	28	NT ^b	5.84
55b cis	111	111	279	96	0	5.84
55c	(58%) ^c	99	NT ^b	NT ^b	10	5.84
55d	(28%) ^c	106	NT ^b	NT ^b	NT ^b	5.84
55e	(1%) ^c	65	NT ^b	NT ^b	NT ^b	5.85
55f	14	112	68	104	0	5.82
56f	18	111	61	108	3	5.82

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較, ^b 未測定 ^c %アゴニスト活性@100 nM.

ルによりメチル化し、エステルをアルデヒドに還元したのち、Wittig 反応によりエステル側鎖を増炭した。水素添加後、エステルをアルコールに還元し、酸性条件下 Boc 基を除去することにより、アミノアルコール **49e** を得た。リンカー3位メチル体 **49f** は、*N*-Boc-4-アセチルピペリジン **53** を原料として、Horner-Wadsworth-Emmons 試薬を用い α, β -不飽和エステルに変換したのち、**49e** と同様のルートにて合成した。得られたアミノアルコール **49a-f** に Scheme2-2 の方法に従いピペリジンアミノ基にエチルピリミジン環を導入、アルコールを酸化しアルデヒドとした。得られたアルデヒドと 6-アミノ-フロ[3,2-*c*]ピリジン-3-オン **34c** との還元的アミノ化により、目的の化合物 **55a-f** を合成した。リンカーやピペリジン環を修飾したヘテロビシクロアミン体の *in vitro* GPR119 アゴニスト活性の評価結果を Table 3-5 に示した。

その結果、ピペリジン環のメチル化体 **55a**, **55b** 及び **55e** はいずれも活性が低下する結果となった。**55a** や **55b** においてメチル基のシス-トランス配置の差により、活性に差があることが分かった。いずれの化合物においても活性の高い配置はリンカー部分をエカトリアル方向に延びていると仮定すると、メチル基はアキシアル方向に向いている(図 3-8)。この配置は Kelly らの報告にある活性向上した化合物の X 線結晶構造と一致している。¹¹

55b trans では、マウス Emax が大きく低下しており、メチル基がエカトリアル方向を向く場合には活性の低下を招くと考えられる。そこで、ピペリジン環の置換基をアキシアル方向に固定することができれば、活性が向上する可能性が考えられる。そこで、ダイアキシアル構造になると考えられる架橋体の合成を行った。しかし、予想に反し、ピペリジン環の 2,6-架橋化体 **55d** 及び 3,5-架橋化体 **55e** についても、活性が低下しており、このシリーズの GPR119 アゴニス

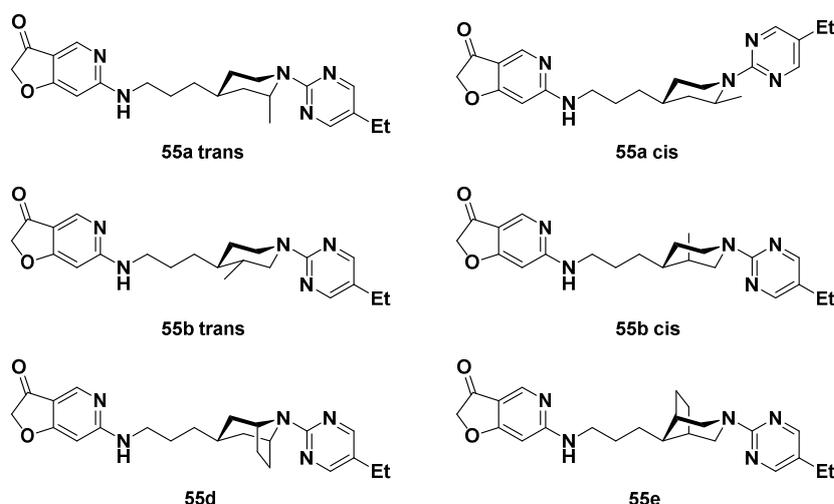


図 3-8 : **55a**, **55b**, **55d** 及び **55e** の構造

トではピペリジン環の自由度を調節することでは、活性向上に繋がらなかった。これは、架橋化で活性の向上した例では、ピリミジノオキシ-4-ピペリジン構造をしており、このシリーズの GPR119 アゴニストの鎖状リンカーに比べ、ピペリジン環 4 位の立体障害が大きくなっており、ピペリジンに置換基が導入されることにより、よりコンフォメーションが固定され活性発現に有利に働いたと考えられる。

次に、リンカーにメチル基を導入した **55f** では活性が 2 倍向上し、14 nM と非常に高い活性を示した。これは、オキサジアゾール体 **56f** でも同様の効果が見られ、18 nM と高い活性を示し、リンカーへのメチル基の導入が活性向上に寄与していることが分かった。また、**55f** には hERG 阻害作用が検出されず、さらにこのシリーズの GPR119 アゴニストの中で最も高いアゴニスト活性を有していた。

3-6) 活性化化合物の in vivo 評価

A 環にヘテロビシクロ環を使用することにより、hERG 阻害活性と GPR119 アゴニスト活性の乖離を実現することができた。その中で、最も高い活性を示した **55f** を用いて、体重抑制作用につながると考えられる胃排出抑制作用と GLP-1 分泌促進試験及び抗糖尿病作用を検証するため oGTT を行った。第一章で述べたように、GLP-1 には様々な薬理作用があることが知られており、その中の一つに胃排出抑制作用がある。この効果は中枢作用と考えられており、糖吸収の遅延が起きるとともに胃の内容物が留まることにより、食欲を抑えることができる。同じく中枢作用として摂食抑制作用があり、胃排出抑制作用がある場合には摂食抑制作用も発現する可能性が高く、この 2 つの効果で体重を抑制できると考えられている。胃排出抑制作用はアセトアミノフェンテストにより評価される。アセトアミノフェンは、胃では吸収されず小腸で速やかに吸収される。そのため、血中のアセトアミノフェン濃度を測定することにより、胃から小腸への排出能を評価することができる。アセトアミノフェンの吸収量を評価するため、消失相が多くなる Cmax 以降は評価対象とせず、Cmax までの血中濃度と AUC により評価を行う。絶食下のマウスに対して化合物 **55f** を投与し、30 分後アセトアミノフェンを経口投与し、継時的に血中アセトアミノフェン濃度を測定した。(図 3-9) その結果、10、20 分値及びアセトアミノフェン投与後 20 分までの AUC において、アセトアミノフェン濃度がコントロールに対し有意に低下しており、**55f** の胃排出抑制作用を確認できた。

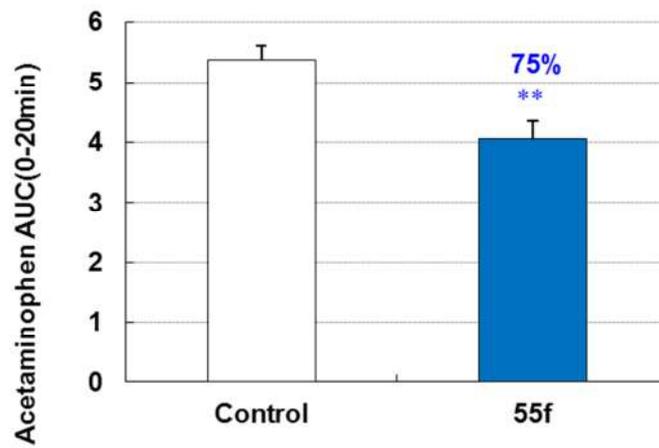
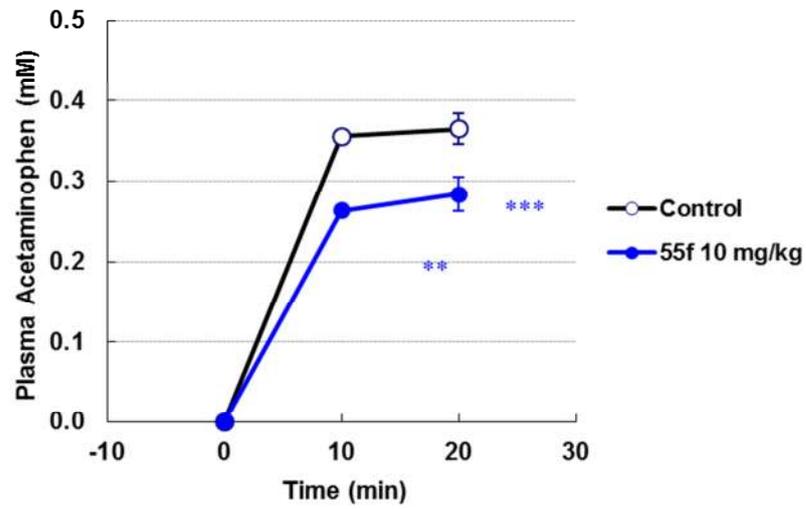


図 3-9 : 55f のアセトアミノフェン法評価結果

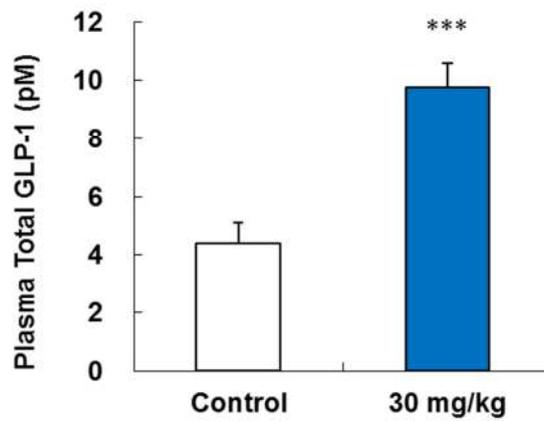


図 3-10 : 55f の GLP-1 分泌促進作用

この結果を裏付けるため、**55f** の GLP-1 分泌促進能を測定した。絶食下のマウスに対し、化合物を投与し、30 分後の total GLP-1 濃度を測定した。(図 3-10) その結果、有意な GLP-1 濃度の上昇があり、胃排出抑制作用を支持するものと考えられる。

続いて、抗糖尿病作用として、食後過血糖への作用を見るため、**55f** を用いた oGTT を行った。絶食下のマウスに **55f** を経口投与し、30 分後にグルコース負荷を行い、継時的に血中糖濃度を測定した。その結果を図 3-11 に示した。

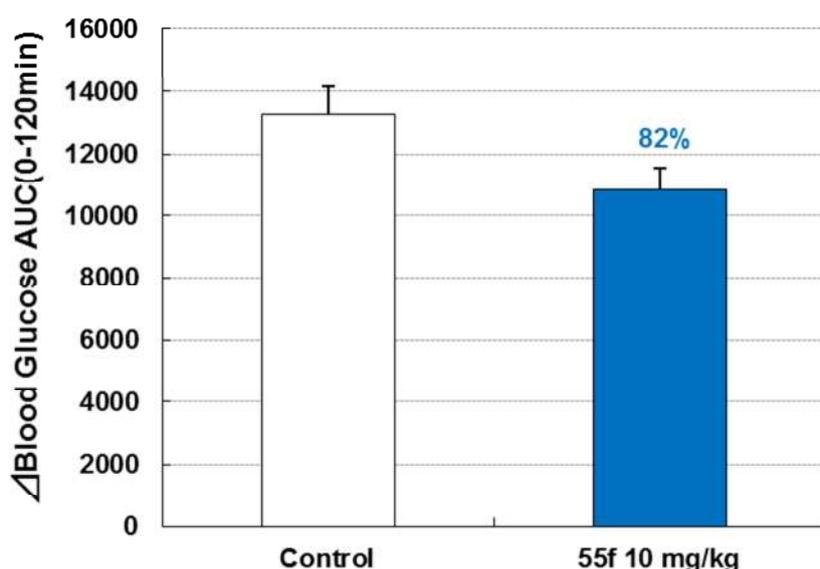
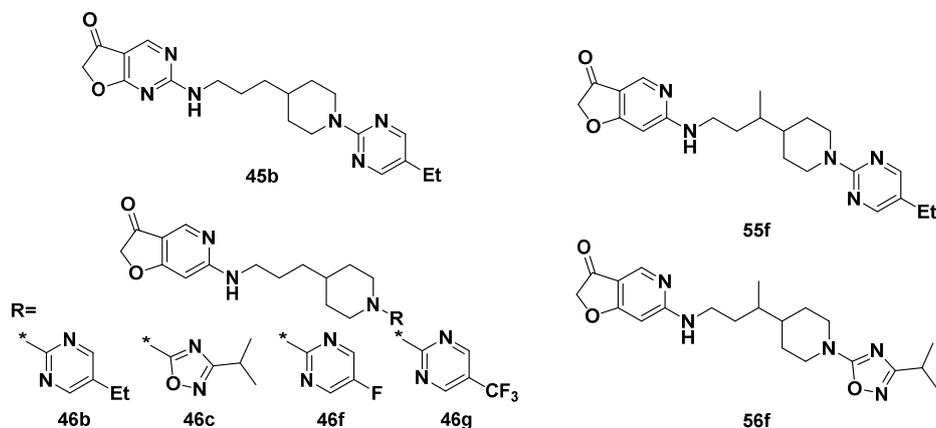


図 3-11 : **55f** の oGTT 評価結果

その結果、18%の血糖上昇抑制作用を示したが、コントロール群に対し有意差はなく、傾向を示した程度であると判断した。そこで、**55f** と同様に高活性を示した化合物 **45b**, **46b**, **46c**, **46f**, **46g** 及び **56f** を用いて、oGTT を行った。その結果を **55f** の結果とともに Table 3-6 に示した。その結果、10 mg/kg で 20%程度の血糖上昇抑制作用を示すものもあったが、いずれの化合物も有意な薬効は示さなかった。**46b** や **55f** は高い in vitro 活性を有しており、薬物動態に問題がないか確認するため、**46b** 及び **55f** の Pharmacokinetic(PK)試験を行った。薬物が生体に投与された後、消化管での吸収、肝臓・消化管での代謝(初回通過効果)の影響を受け、循環血に到達する。その割合を示す生物学的利用率(BA)がそれぞれ 55%、11%であることが分かった。**55f** は BA が低く、経口吸収性が悪いことが薬効を示さなかった原因であると考えられたが、**46b** は高い BA を示しながら、有意な薬効を示さなかった。また、ヘテロビシクロ環を有する化合物が、oGTT で効果

Table 3-6 : ヘテロビシクロ体の oGTT 結果



Compound	hEC ₅₀ (nM)	mEC ₅₀ (nM)	hERG inhibition (%>@10 μM)	oGTT 120min ΔAUC(%)	BA(%)
45b	46	75	0	94	NT ^a
46b	31	45	0	76	55
46c	51	79	0	85	35
46f	51	70	0	99	NT ^a
46g	51	39	NT ^a	90	NT ^a
55f	14	68	0	82	11
56f	18	61	3	88	NT ^a

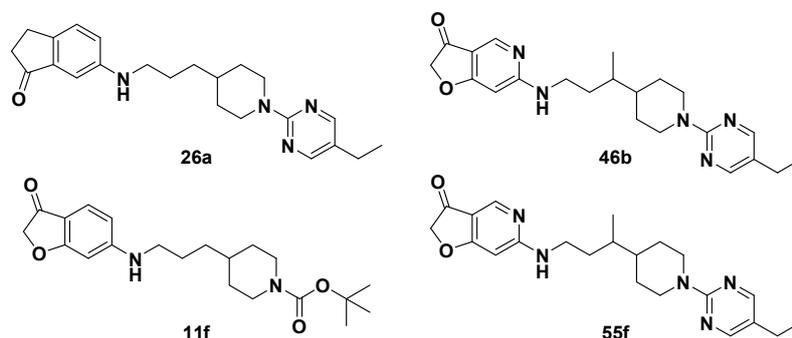
^a 未測定

の見られた化合物 **26a** や **11f** と同等以上の *in vitro* 活性を有しているにも関わらず、いずれも血糖上昇抑制作用を示していない。そこで、その原因を探るため **26a**、**11f**、**46b** や **55f** の薬物濃度の比較を行った。4 化合物の GPR119 アゴニスト活性、oGTT 結果、oGTT 時の薬物最高濃度(C_{max})及び薬物濃度 AUC と BA を Table 3-7 に示した。

その結果、**46b** や **55f** の血中の化合物濃度は、**26a** や **11f** に対し、同等以上の値を示しており、薬効を示すのに十分な薬物濃度であるにもかかわらず、薬効を示していないことが明らかとなった。

Drucker らは GLP-1 レセプター-KO マウス、GIP レセプター-KO マウス及び両方のレセプターを KO した DIRKO マウスでの AR231453 の oGTT の違いを報告している。¹⁴ DIRKO マウスでは AR231453 により分泌された GLP-1 及び GIP によるインスリン分泌促進作用がないと考えられ、AR231453 の GPR119 を介した直接的なインスリン分泌作用による血糖上昇抑制作用を見ているが、その効果は小さい。

Table 3-7 : oGTT 結果と血中濃度



Compound	hEC ₅₀ (nM)	mEC ₅₀ (nM)	oGTT 120min ΔAUC(%)	Compound concentration		BA(%)
				C _{max} (μM)	AUC (μM/h)	
26a	51	167	62	4.8	8.44	45
11f	52	66	67	6.3	9.09	18
46b	31	45	76	6.9	8.22	55
55f	14	68	82	9.0	6.63	11

また、GLP-1KO マウスでも血糖上昇抑制作用は減弱しており、GLP-1、GIP 及びインスリンの総合的な作用により効果が発現していると考えられる。**55f** の GLP-1 分泌作用は 2 倍程度であり、**26a** や MBX-2982 と同等程度の GLP-1 分泌促進作用を有しているが、有意な血糖上昇抑制作用を示していない。¹⁵ **55f** は BA が悪いとはいえ、**26a** 以上の血中濃度を示しており、GLP-1 での効果が十分であると考えれば、インスリン分泌能が低い可能性が示唆される。BA に問題のない **46b** も薬効を示していないことから、**26a** のようなインダノンタイプに比べ、ヘテロビシクロタイプの骨格は *in vitro* と *in vivo* での乖離があると考えられ、ヘテロビシクロタイプの化合物での抗糖尿病薬としての開発は難しいと考えられる。しかし、**55f** は GLP-1 分泌促進作用とそれに基づく胃排出抑制作用を有しており、体重増加抑制作用などの GLP-1 分泌に関する薬理作用の検証が望まれる。

3-7) 小括

1. リード化合物 **26a** のプロファイリングの結果、若干の hERG 阻害が認められ、ビスクロアミンの塩基性窒素が hERG 阻害活性に影響していると予測されたため、化合物 **26a** の A 環をヘテロ環に変換し、アミン部位の塩基性を調節し、hERG 阻害作用と GPR119 アゴニスト活性との乖離を図ることとした。
2. A 環のヘテロビスクロ環への変換を行った結果、予測通り hERG 阻害作用を軽減することができ、6-アミノフロ[3,2-*c*]ピリジン-3(2*H*)-オンでのみ活性の向上が見られ、B 環を変換してもその活性は維持された。
3. ビスクロ環の電子密度を求めた結果、芳香環の電子密度の低下とケトンのアクセプター能の両方が活性発現に寄与していると考えられた。
4. A 環を固定し、B 環とリンカーの構造修飾を行った。B 環ピペリジン環のコンフォメーションの固定による活性向上を目指し、架橋構造やメチル基の導入を行ったが、活性の向上は見られなかった。
5. リンカー3 位へのメチル基の導入により、約 2 倍の活性向上が見られた。これは、リンカーの自由度が下がっていると考えられ、メチル基の導入による脂溶性の向上と相まって、活性向上につながったと考えており、これまでで最も高い GPR119 アゴニスト活性を有する化合物である **55f** を見出した。
6. **55f** は GLP-1 分泌促進作用に基づく、胃排出抑制作用が確認された。この GLP-1 分泌促進作用は MBX-2982 と同等の GLP-1 分泌能であり、十分な分泌量であることが考えられる。
7. **55f** をはじめとする高い活性を示した化合物の oGTT を行ったが、これらのヘテロビスクロ環を有する化合物ではいずれも有意な薬効を示さなかった。
8. 血中濃度の比較から oGTT で薬効を示した **26a** に比べヘテロビスクロ環を A 環として有する化合物群では、*in vitro* と *in vivo* 活性の乖離があることが明らかであり、十分な *in vivo* 活性を示すためにはさらなる活性向上が必要となると考えられる。これまで報告されている GPR119 アゴニストは、最も高い活性を有するものでも数 nM 程度であり、**55f** から 2 倍程度の活性差しかなく、これ以上の開発は困難と判断した。

3-8) 実験の部

3 - 8 - 1) Chemistry

Representative procedure for compound **30a-d**

Methyl 6-amino-3-(3-methoxy-3-oxopropyl)picolinate **29a**

To a degassed solution of **28a** (5.57 g, 24.1 mmol), methyl acrylate (6.5 mL, 72.3 mmol), Et₃N (10.1 mL, 72.3 mmol) in DMF (30 mL) was added dichlorobis(tri-*o*-tolyl-phosphine) palladium (II) (0.95 g, 1.2 mmol). The resulting solution was stirred at 80 °C for 17 h under argon atmosphere. The reaction mixture was evaporated, and then the residue was diluted with Et₂O/hexane = 1/1. The resultant precipitate was filtered and washed with hexane to give an unsaturated ester (4.42 g) as a yellow solid, which was used in the next reaction without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H), 4.87 (brs, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.80 (s, 3H): ESI-MS (*m/e*): 236 [M+H]⁺.

To a solution of the unsaturated ester obtained above (4.42 g, 18.7 mmol) in EtOH (40 mL) was added 10% Pd/C (0.44 g). The mixture was stirred under hydrogen atmosphere at 50 °C for 8 h. The catalyst was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the title compound **29a** (4.16 g, yield 72%, 2 steps) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.10 (brs, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 2.69-2.65 (m, 2H), 2.35-2.30 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 238 [M+H]⁺.

Methyl 2-amino-5-(3-methoxy-3-oxopropyl)isonicotinate **29c**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.04 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.49 (brs, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.10 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.60 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H). ESI-MS (*m/e*): 239 [M+H]⁺.

6-Amino-3-methoxycarbonylmethoxy-pyridine-2-carboxylic acid methyl ester **29b**

A suspension of **28b** (1.81 g, 10.8 mmol), methyl bromoacetate (1.04 mL, 11.3 mmol) and Cs₂CO₃ (7.57 g, 23.2 mmol) in acetonitrile (75 mL) was stirred at room temperature for 15 h. Methyl bromoacetate (500 μL, 5.43 mmol) was further added, and the mixture was stirred at room temperature for an additional 7 h. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography (MeOH: CHCl₃ = 1: 10) to give **29b** (2.12 g, yield 82%).: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.35-7.30 (m, 1H),

6.66-6.61 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.79 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 241[M+H]⁺.

Methyl 2-amino-5-(2-methoxy-2-oxoethoxy)isonicotinate 29d

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.14 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.35 (brs, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.83 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 241 [M+H]⁺.

2-Amino-5*H*-cyclopenta-*b*]pyridin-7(6*H*)-one 30a

To a solution of **29a** (2.0 g, 8.39 mmol) in anhydrous DMF (40 mL) under argon atmosphere was added potassium *tert*-butoxide (2.22 g, 16.8 mmol) at 0 °C. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1.5 h. The mixture was cooled to 0 °C and neutralized with 2 N HCl (10 mL). NaCl (984 mg, 16.8 mmol) was then added to the mixture and the resulting suspension was stirred at 140 °C for 30 min. The reaction mixture was evaporated and the residue was diluted with 90 % methanolic CHCl₃. Insoluble materials were filtered off, and the filtrate was concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (MeOH : CHCl₃ = 1: 50) to give **30a** (0.697 g, yield 56%) as a brown solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.75 (brs, 2H), 3.03-2.94 (m, 2H), 2.75-2.65 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 149 [M+H]⁺.

5-Amino-furo[3,2-*b*]pyridin-3-one 30b

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.52-7.48 (m, 1H), 6.75 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.19 (s, 2H). ESI-MS (*m/e*): 151 [M+H]⁺.

3-Amino-6,7-dihydro-5*H*-cyclopenta[*c*]pyridin-5-one 30c

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.35 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.67 (brs, 2H), 3.12-3.02 (m, 2H), 2.76-2.66 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 149 [M+H]⁺.

5-Aminofuro[2,3-*c*]pyridin-3(2*H*)-one 30d

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.24 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.39 (brs, 2H). ESI-MS (*m/e*): 151 [M+H]⁺.

Preparation of 6-aminofuro[2,3-*b*]pyridin-3(2*H*)-one 34a

Methyl 6-chloro-3-oxo-2,3-dihydrofuro[2,3-*b*]pyridine-2-carboxylate 32

To a suspension of NaH (4.16 g in oil, 104 mmol) in DMF (50 mL) was added dropwise methyl glycolate (3.94 mL, 52 mmol) in ice-water bath. After removed from ice-water bath, the mixture was allowed to warm to room temperature, stirred for further 30 min and then cooled to 0 °C again. To the resulting mixture was added methyl 2,6-dichloronicotinate (4.03 g, 19.8 mmol) one portion and stirred for 30 min at same temperature. To the reaction mixture was added water (100 mL) and 6 N HCl (12 mL), the formed precipitate was collected, washed with water and hexane and dried under reduced pressure to give **32** (3.07 g, yield 67%) as a pale yellow solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.20 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 228 [M+H]⁺.

Methyl 6-amino-3-oxo-2,3-dihydrofuro[2,3-*b*]pyridine-2-carboxylate **33**

To a solution of **32** (920 mg, 4 mmol) in *N*-methylpyrrolidone (9 mL) was added *p*-methoxybenzyl amine (1.05 mL, 8 mmol) and Et₃N (2.23 mL, 16 mmol) and the mixture was heated to 80 °C. After stirring for 5 h, the reaction mixture was cooled to room temperature, poured into satd. NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc: Hex = 1: 3) to give *p*-methoxybenzyl amine derivative (350 mg, yield 27%) as a yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.65 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 8H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.17 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.19 (s, 1H), 4.65 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.81 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 329 [M+H]⁺.

A solution of *p*-methoxybenzyl amine derivative obtained above (328 mg, 1.07 mmol) in TFA (5 mL) was refluxed for 3 h and then concentrated. To the residue was added MeOH, insoluble materials were filtered off, and the filtrate was concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : Hex = 1 : 1) to give **33** (147 mg, yield 66%) as a brown solid.: ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.82 (d, *J* = 33.9 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.49 (s, 1H), 3.73 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 209 [M+H]⁺.

6-aminofuro[2,3-*b*]pyridin-3(2*H*)-one **34a**

A solution of **33** (127 mg, 0.61 mmol) in MeOH (2.4 mL) and conc. HCl (2.4 mL) was refluxed for 30 min and then concentrated. To the residue was added satd. NaHCO₃, the formed precipitate was collected, washed with water and dried under reduced pressure to give **34a** (79 mg, yield 86%) as a brown solid.: ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 3H), 6.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H). ESI-MS (*m/e*): 151 [M+H]⁺.

Preparation of 6-aminofuro[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **34b**

Methyl 4-(benzyloxy)-6-chloronicotinate **36**

To a solution of benzyl alcohol (269 mL, 2.6 mol) in THF (2 L) was added NaH (104 g in oil, 2.6 mol) at 0 °C. After stirring at room temperature for 30 min, a solution of **35** (192 g, 1 mol) in THF (100 mL) was added dropwise to the mixture at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature overnight and then diluted with water. The low-boiling solvent was evaporated and the residue was washed with Et₂O. The aqueous layer was acidified with 6 N HCl to pH 1 and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was dissolved in DMF (1 L), and K₂CO₃ (138 g, 1 mol) was added portionwise to the solution. After stirring at room temperature for 30 min, iodomethane (258 g, 1.82 mol) was added dropwise to the mixture, and the resulting mixture was stirred at room temperature for an additional 2 h, and then partitioned between water and EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to give **36** (230 g, 90%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.74 (s, 1H), 7.33-7.49 (m, 5H), 5.24 (s, 2H), 3.92 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 278 [M+H]⁺.

Methyl 4-hydroxy-6-((4-methoxybenzyl)amino) nicotinate **37**

The mixture of **36** (52 g, 187 mmol), *p*-methoxybenzyl amine (51 g, 374 mmol) and Et₃N (75 g, 748 mmol) in *N*-methylpyrrolidone (500 mL) was stirred at 80 °C overnight. The reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc: hexane = 1:1) to give an ester (28 g, yield 40%) as a white solid, which was used in the next step without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.63 (s, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.81 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.41 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.81 (s, 3H): ESI-MS (*m/e*): 379 [M+H]⁺

A mixture of the ester obtained above (28 g, 75 mmol) and 10% Pd/C (2.8 g) in MeOH (1 L) was stirred under hydrogen atmosphere for 2 h at room temperature, and CHCl₃ (2 L) was added. The catalyst was filtered off and rinsed with 90% methanolic CHCl₃, and the filtrate was concentrated to give **37** (20 g, yield 92%), which was used in the next step without further purification.: ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 8.40 (s, 1H), 8.10 (brs, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.04 (s, 1H), 4.43 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 289 [M+H]⁺.

Methyl 4-(2-methoxy-2-oxoethoxy)-6-((4-methoxybenzyl)amino)nicotinate 38

A suspension of **37** (22 g, 75 mmol) and K₂CO₃ (16 g, 113 mmol) in DMF (50 mL) was stirred at room temperature for 30 min, and methyl bromoacetate (17.2 g, 113 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature overnight, diluted with water, and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, concentrated, and the residue was triturated with MeOH to give **38** (15 g, yield 56%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.65 (s, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.60 (s, 1H), 5.23 (brs, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.43 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 361 [M+H]⁺.

6-Aminofuro[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one 34b

To a solution of **38** (18 g, 50 mmol) in THF (150 mL) was added dropwise LDA (2 M, 50 ml, 200 mmol) at -40 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. The mixture was then quenched with satd. NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was concentrated and the residue was recrystallized from MeOH to give the β-keto ester (11.5 g, yield 70%) as a white solid, which was used in the next reaction without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.49 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 8H), 6.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.01 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 5.75 (brs, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.47 (brs, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.81 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 329 [M+H]⁺.

To a solution of the β-keto ester obtained above (11.5 g, 35 mmol) in MeOH (100 mL) was added conc. HCl (100 mL), and the reaction mixture was refluxed for 2 h. The resulting mixture was concentrated to give the corresponding decarboxylated product (9.5 g, yield 99%) as a yellow solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 7H), 6.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.93 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.45 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H): ESI-MS (*m/e*): 271 [M+H]⁺.

A solution of the decarboxylated product prepared above (28.5 g, 105 mmol) in TFA (15 mL) was heated at 60 °C for 4 h. The mixture was evaporated, and the residue was partitioned between EtOAc and 6 N HCl. The pH of the aqueous layer was adjusted to pH 9 with NaHCO₃ in an ice-bath, and the formed precipitates were collected to give 4.6 g of **34b** as a yellow solid. The filtrate was extracted with EtOAc, and the organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated to give an additional 8.2 g of **34b** (combined yield 80%).: ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 8.31 (s, 1H), 7.13 (brs, 2H), 5.98 (s, 1H), 4.69 (s, 2H). ESI-MS (*m/e*): 151 [M+H]⁺.

Preparation of 2-aminofuro[2,3-*d*]pyrimidin-5(6*H*)-one **34c**

Ethyl 4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-2-((4-methoxybenzyl)amino)pyrimidine-5-carboxylate **42**

NaH (1.76 g in oil, 44 mmol) was added to a solution of ethyl glycolate (2.1 mL, 22 mmol) in THF (50 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred for 30 min. To the mixture was added **41** (4.6 g, 20 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was quenched with crushed ice and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc: hexane = 1: 3) to give an ester (2.4 g, yield 40%) as a white solid, which was used in the next step without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.86 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ESI-MS (*m/e*): 301 [M+H]⁺.

To a solution of the ester obtained above (4.1 g, 13.7 mmol) in DCM (110 mL) was added *m*-CPBA (6.82 g, 27.3 mmol) at 0 °C. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. Water and 5 N NaOH were added to the mixture and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was dissolved in *N*-methylpyrrolidone (45 mL), and *p*-methoxybenzyl amine (2.14 mL, 16.4 mmol) and Et₃N (4.57 mL, 32.8 mmol) were added to the solution. The resulting mixture was stirred overnight, poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1: 3) to give **42** (3.35 g, yield 63%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.82 (brs, 0.75H), 8.70 (brs, 0.75H), 7.21 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 5.88 (brs, 0.75H), 5.45 (brs, 0.25H), 4.89 (s, 2H), 4.61 (brs, 0.5H), 4.49 (brs, 1.5H), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.15 (brs, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.21 (brs, 3H). ESI-MS (*m/e*): 390 [M+H]⁺.

Ethyl 2-amino-5-oxo-5,6-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxylate **43**

A solution of **42** (2.73 g, 7 mmol) in TFA (40 mL) was refluxed for 2 days, evaporated, and then azeotroped with toluene. The residue was partitioned with CHCl₃ and satd. NaHCO₃, the aqueous layer was extracted with CHCl₃, and the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was triturated with Et₂O, filtered, rinsed with cold Et₂O and dried under reduced pressure to give a diester (1.72 g, yield 91%) as a yellow powder, which was used in the

next step without further purification.: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.75 (s, 1H), 5.23 (brs, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.34 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.23 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.36 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); ESI-MS (m/e): 270 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

To a solution of the ester obtained above (470 mg, 1.74 mmol) in DMF (15 mL) was added potassium *tert*-butoxide (490 mg, 4.4 mmol) at -15 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 30 min, the solution was cooled to 0 °C, neutralized with 6 N HCl and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (MeOH: $\text{CHCl}_3 = 1: 50$) to give the title compound **43** (80 mg, yield 21%) as a brown solid.: $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.65 (1H, s), 8.32 (1H, brs), 8.23 (1H, brs), 5.57 (1H, s), 4.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ESI-MS (m/e): 224 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

2-Aminofuro[2,3-*d*]pyrimidin-5(6*H*)-one **34c**

To a suspension of **43** (61 mg, 0.27 mmol) in MeOH (2 mL) was added conc. HCl (455 μL , 5.4 mmol), and the mixture was refluxed for 1 h. The mixture was cooled to 0 °C and neutralized with satd. NaHCO_3 . The precipitate was filtrated and washed with water, and the filtrate was extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by PTLC (MeOH: $\text{CHCl}_3 = 1: 9$) to give **34c** (20 mg, yield 49%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.58 (s, 1H), 8.04 (brs, 1H), 7.96 (brs, 1H), 4.72 (s, 2H). ESI-MS (m/e): 152 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

General procedure for substituted 3-(piperidin-4-yl)propan-1-ol **49a-d**

Step 1: To a suspension of (3-benzyloxypropyl)triphenylphosphonium bromide (1.07 g, 5.0 mmol) in THF (10 mL) was added NaH (400 mg in oil, 10 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred for 10 min at room temperature. A solution of **47** (5.0 mmol) in THF (10 mL) was added dropwise to the mixture over a period of 5 min. The resulting mixture was refluxed for 13 h. The mixture was quenched with satd. NH_4Cl at 0 °C and poured into water (20 mL) and then extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography to give **48**.

(*E,Z*)-4-(3-(benzyloxy)propylidene)-2-methyl-1-((*S*)-1-phenylethyl)piperidine **48a**

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.41-7.22 (m, 10H), 5.12 (td, $J = 15.3, 7.0$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.95-3.85 (m, 1H), 3.45 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.07-2.93 (m, 1H), 2.41-2.19 (m, 5H), 2.16-1.94 (m, 3H), 1.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H), 1.04 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H): ESI-MS (m/e): 350 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

1-benzyl-4-(3-(benzyloxy)propylidene)-3-methylpiperidine 48b

less-polar isomer; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.37 – 7.20 (m, 10H), 5.09 (td, $J = 7.2, 1.9$ Hz, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.52 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.45 (td, $J = 7.2, 1.9$ Hz, 2H), 3.38 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 2.92-2.85 (m, 1H), 2.76-2.64 (m, 2H), 2.64-2.52 (m, 1H), 2.33 (tdd, $J = 14.4, 7.3, 1.7$ Hz, 2H), 2.01-1.87 (m, 3H), 1.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H): ESI-MS (m/e): 336 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

polar isomer; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.36-7.22 (m, 10H), 5.12 (td, $J = 7.0, 0.9$ Hz, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.53-3.41 (m, 4H), 2.72-2.64 (m, 2H), 2.53-2.42 (m, 1H), 2.35 (dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 3H), 2.14-2.05 (m, 2H), 1.85 (dd, $J = 10.6, 9.1$ Hz, 1H), 1.01 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H) : ESI-MS (m/e): 336 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8-benzyl-3-(3-(benzyloxy)propylidene)-8-azabicyclo[3.2.1]octane 48c

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.41-7.22 (m, 10H), 5.30-5.20 (m, 1H), 4.52 (s, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.48-3.43 (m, 2H), 3.23-3.19 (m, 2H), 2.57-2.54 (m, 1H), 2.37-2.24 (m, 2H), 2.23 (s, 2H), 1.91-1.85 (m, 2H), 1.64-1.38 (m, 3H). ESI-MS (m/e): 348 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-benzyl-8-(3-(benzyloxy)propylidene)-3-azabicyclo[3.2.1]octane 48d

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.35-7.20 (m, 10H), 5.10 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.52 (s, 2H), 3.47 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 2.75 (td, $J = 8.5, 3.9$ Hz, 2H), 2.68 (s, 1H), 2.39-2.30 (m, 3H), 2.13 (dd, $J = 18.3, 8.8$ Hz, 2H), 1.88-1.75 (m, 2H), 1.58-1.55 (m, 2H). ESI-MS (m/e): 348 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Step 2: To a solution of **48** (5 mmol) in EtOH (18 mL) was added 20% Pd/C (0.35 g). Medium pressure hydrogenation (4.5 atm) was conducted at 60 °C for 70 h and then at room temperature for 7 h in the presence of conc. HCl (0.83 mL, 10 mmol). The catalyst was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give **49**.

3-((2R)-2-methylpiperidin-4-yl)propan-1-ol 49a

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.09 (ddd, $J = 10.2, 4.6, 1.8$ Hz, 2H), 2.68-2.55 (m, 2H), 1.65-1.26 (m, 7H), 1.09-0.98 (m, 5H): ESI-MS (m/e): 158 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(3-methylpiperidin-4-yl)propan-1-ol 49b

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.77 (brs, 2H), 3.71 (td, $J = 7.3, 5.6$ Hz, 2H), 3.29 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H), 2.93-2.88 (m, 2H), 2.37 (td, $J = 7.3, 2.6$ Hz, 2H), 1.92 (s, 1H), 1.81 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 1.65-1.26 (m, 3H), 0.99 (dd, $J = 7.2, 3.5$ Hz, 3H): ESI-MS (m/e): 158 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-ylidene)propan-1-ol 49c

¹H NMR (CDCl₃) δ: 9.62-9.18 (m, 2H), 4.02 (brs, 2H), 3.68 (s, 2H), 2.57-2.46 (m, 2H), 2.32-2.25 (m, 2H), 1.96-1.91 (m, 3H), 1.59-1.51 (m, 6H). ESI-MS (*m/e*): 170 [M+H]⁺.

3-(3-azabicyclo[3.2.1]octan-8-ylidene)propan-1-ol 49d

¹H NMR (CDCl₃) δ: 9.82 (brs, 1H), 8.89 (brs, 1H), 3.67 (td, *J* = 15.5, 7.0 Hz, 2H), 3.24 (dd, *J* = 12.4, 2.6 Hz, 2H), 3.01 (t, *J* = 9.5 Hz, 2H), 2.20-1.91 (m, 5H), 1.76-1.42 (m, 6H). ESI-MS (*m/e*): 170 [M+H]⁺.

Preparation of 3-(4-methylpiperidin-4-yl)propan-1-ol 49e

***tert*-butyl 4-formyl-4-methylpiperidine-1-carboxylate 51**

To a solution of *tert*-butyl 4-ethoxycarbonylpiperidine-1-carboxylate **50** (2.32 g, 9 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was added dropwise 1.8 M LDA in THF/heptane/ethylbenzene solution (10 mL, 18 mmol) at -78 °C. After 10 min stirring at -78 °C, iodomethane was added to the mixture and the reaction mixture was warmed to 0 °C for over 3 h. The reaction mixture was quenched with satd. NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with 0.5 N HCl, satd. NaHCO₃ and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated to give a quaternary ester (2.45 g, yield 99%) as a colorless oil, which was used in the next reaction without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.16 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.75 (brs, 2H), 2.98 (t, *J* = 11.3 Hz, 2H), 2.05 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.35 (t, *J* = 13.2 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.20 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 272 [M+H]⁺.

To a suspension of LAH (684 mg, 18 mmol) in anhydrous THF (45 mL) was added dropwise a solution of the quaternary ester obtained above (2.45 g, 9 mmol) in THF (7 mL) at 0 °C, the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. After cooling to 0 °C, to the reaction mixture was carefully added water (1.1 mL) and stirred for 30 min. Insoluble materials were filtered off, the residue was washed with EtOAc and the filtrate was concentrated to give an alcohol (2.06 g, yield 99%) as a colorless solid, which was used in the next reaction without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.70 (brs, 2H), 3.38 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.14 (ddd, *J* = 13.4, 10.2, 3.3 Hz, 2H), 1.49-1.44 (m, 11H), 1.34-1.27 (m, 2H), 0.99 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 230 [M+H]⁺.

To a solution of the alcohol obtained above (2.06 g, 9 mmol) in DCM (90 mL) was added Dess-Martin periodinane (4.2 g, 10 mmol) at 0 °C, the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. To the mixture was added water and 5 N

NaOH (10 mL) and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 3) to give the title compound **51** (1.75 g, yield 85%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 9.47 (s, 1H), 3.64 (brs, 2H), 3.15-3.09 (m, 2H), 1.91 (td, *J* = 13.9, 4.0, 2H), 1.49-1.39 (m, 13H), 1.08 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 232 [M+H]⁺.

tert-butyl 4-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-4-methylpiperidine-1-carboxylate **52**

A solution of **51** (1.75 g, 7.65 mmol) and (carbethoxymethylene)triphenylphosphorane (1.9 g, 7.65 mmol) in toluene (30 mL) was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 3) to give an α,β-unsaturated ester (1.69 g, yield 74%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 6.92 (d, *J* = 16.0, 1H), 5.79 (d, *J* = 16.0, 1H), 4.20 (q, *J* = 7.0, 2H), 3.46 (brs, 2H), 3.32 (ddd, *J* = 12.0, 8.4, 4.0, 2H), 1.65-1.61 (m, 2H), 1.49-1.41 (m, 11H), 1.30 (t, *J* = 7.0, 3H), 1.10 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 298 [M+H]⁺.

To a solution of the unsaturated ester obtained above (1.69 g, 5.69 mmol) in EtOH (30 mL) was added 10% Pd/C (169 mg). The mixture was stirred under hydrogen atmosphere at room temperature for 9 h. The catalyst was filtered off, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give **52** (1.69 g, yield 99%) as a colorless oil, which was used in the next reaction without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.13 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.57 (brs, 2H), 3.20 (ddd, *J* = 12.0, 8.4, 4.0, 2H), 2.26 (m, 2H), 1.69-1.60 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.40-1.25 (m, 5H), 0.93 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 240 [M+H]⁺.

3-(4-methylpiperidin-4-yl)propan-1-ol **49e**

To a suspension of LAH (322 mg, 8.5 mmol) in anhydrous THF (30 mL) was added dropwise **52** (1.69 g, 5.65 mmol) in THF (5 mL) at 0 °C, the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h. After cooling to 0 °C, to the reaction mixture was carefully added water (600 μL) and stirred for 30 min. Insoluble materials were filtered off, the residue was washed with EtOAc and the filtrate was concentrated to give an alcohol (1.43 g, yield 92%) as a colorless solid, which was used in the next reaction without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.63 (dd, *J* = 11.7, 6.2 Hz, 2H), 3.54 (brs, 2H), 3.21 (ddd, *J* = 13.2, 10.2, 3.3 Hz, 2H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.39-1.28 (m, 6H), 0.94 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 258 [M+H]⁺.

A 4 M HCl 1,4-dioxane solution (13 mL) was added to a solution of the alcohol

obtained above (1.43 g, 5.21 mmol) in 1,4-dioxane at 0 °C, and the mixture was stirred for 2 h at 50 °C. The solvent was evaporated and dissolved in DCM, this solution was washed with satd. NaHCO₃, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to give **49e** (403 g, yield 49%) as a white solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.64 (m, 2H), 2.85-2.78 (m, 4H), 1.61-1.50 (m, 2H), 1.39-1.26 (m, 6H), 0.93 (s, 3H). ESI-MS (*m/e*): 158 [M+H]⁺.

Preparation of 3-(piperidin-4-yl)butan-1-ol **49f**

Ethyl 2-(diethoxyphosphoryl)acetate (4.23 mL, 21.1 mmol) was added to a suspension of NaH (845 mg in oil, 21.1 mmol) in THF (40 mL) at 0 °C and the resulting mixture was stirred at the same temperature for 15 min. A solution of *tert*-butyl 4-acetylpiperidine-1-carboxylate **53** (4.0 g, 17.6 mmol) in THF (10 mL) was added to the mixture at 0 °C and allowed to warm to room temperature. After stirring for 12 h, the reaction mixture was quenched by ice-water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 4) to give a (E) and (Z)-mixture of α,β-unsaturated ester (4.92 g) as a colorless oil.

To a mixture of α,β-unsaturated ester obtained above (4.90 g, 16.5 mmol) in MeOH (20 mL) was added 10% Pd/C (500 mg), and the mixture was stirred at 30 °C for 15 h under hydrogen atmosphere. After filtering through celite pad, the solvent was distilled off under reduced pressure to give a saturated ester (4.93 g, yield 93%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.11-4.16 (m, 4H), 2.60-2.66 (m, 2H), 2.34-2.39 (m, 1H), 2.07-2.13 (m, 1H), 1.88-1.95 (m, 1H), 1.57-1.61 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.31-1.35 (m, 1H), 1.26 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 1.14-1.22 (m, 2H), 0.92 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H). ESI-MS (*m/e*): 300 [M+H]⁺.

To a solution of the saturated ester obtained above (4.93 g, 16.5 mmol) in THF (40 mL) was added portionwise LAH (625 mg, 16.5 mmol) at 0 °C under argon atmosphere, the mixture was stirred at the same temperature for 1 h and allowed to warm to room temperature. After stirring for 3 h, the reaction mixture was quenched with crashed ice, diluted with EtOAc, washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was distilled off under reduced pressure to provide **54** (4.2 g, yield 99%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.13 (m, 2H), 3.61-3.76 (m, 2H), 2.63 (m, 2H), 1.17-1.71 (m, 21H), 0.87 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H). ESI-MS (*m/e*): 258 [M+H]⁺.

To a 4 M HCl 1,4-dioxane solution (10 mL) was added **54** (3.2 g, 12.4 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred for 3.5 h at 30 °C. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in DCM. This solution was washed with satd. NaHCO₃, dried

over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to give **49f** (1.94 g, yield 99%) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.60-3.74 (m, 2H), 3.10-3.13 (m, 2H), 2.54-2.62 (m, 2H), 2.15 (s, 2H), 1.18-1.73 (m, 8H), 0.88 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H). ESI-MS (*m/e*): 158 [M+H]⁺.

Preparation of compounds **43a-c**, **44**, **45a-b**, **46a-c** and **55a-f**

General procedure for preparation of aldehydes

Corresponding alcohols (pyrimidine derivatives and oxadiazole derivatives) were prepared from substituted 3-(piperidin-4-yl)propanol **49a-f** according to Method I or II in chapter 2, and were converted to corresponding aldehydes using the synthetic method III in chapter 2. **43a-c**, **44**, **45a-b**, **46a-c** and **55a-f** were prepared by reductive amination mentioned below (Method A and B) from heterobicyclic amines and corresponding aldehydes.

General procedure with reductive amination

Method A

To a solution of amine (0.1 mmol) and aldehyde (0.1 mmol) in DCM (2 mL) was added NaBH(OAc)₃ (0.2 mmol), and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into satd. NaHCO₃ and the whole was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by PTLC.

Method B

To a solution of amine (0.1 mmol) and aldehyde (0.1 mmol) in AcOH (500 μL) was added NaBH(OAc)₃ (0.2 mmol), and the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The mixture was then neutralized with satd. NaHCO₃ and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by PTLC.

2-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)-5,6-dihydro-7H-cyclopenta[*b*]pyridin-7-one **43a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.15 (s, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.72-4.63 (m, 2H), 3.38-3.32 (m, 2H), 3.08-2.90 (m, 2H), 2.86-2.76 (m, 2H), 2.73-2.55 (m, 2H), 2.50-2.45 (m, 2H), 1.78-1.71 (m, 2H), 1.68-1.62 (m, 2H), 1.61-1.45 (m, 1H), 1.40-1.30 (m, 2H), 1.24-1.10 (m, 4H). HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₉N₅O 380.2445, found 380.2448.

5-((3-(1-(5-Ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*b*]pyridin-3(2*H*)-one **43b**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.16 (s, 2H), 7.33 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.67-4.65 (m, 3H), 4.58 (s, 1H), 3.37 (dd, *J* = 12.5, 7.0 Hz, 2H), 2.83 (td, *J* = 13.1, 2.6 Hz, 2H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.79-1.73 (m, 2H), 1.68-1.64 (m, 2H), 1.59-1.51 (m, 1H), 1.40-1.24 (m, 4H), 1.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). HRMS ESI calcd for C₂₁H₂₇N₅O₂ 382.2237, found 382.2239.

3-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)-6,7-dihydro-5*H*-cyclopenta[*c*]pyridin-5-one **43c**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.35 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.70-4.48 (m, 3H), 3.30-3.20 (m, 2H), 3.09-3.02 (m, 2H), 2.95-2.80 (m, 2H), 2.73-2.67 (m, 2H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.80-1.60 (m, 4H), 1.61-1.47 (m, 2H), 1.42-1.32 (m, 2H), 1.23-1.13 (m, 5H). HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₉N₅O 380.2444, found 380.2448.

tert-butyl 4-(3-((3-oxo-2,3-dihydrofuro[2,3-*b*]pyridin-6-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **44**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.38 (brs, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.08 (brs, 2H), 3.47 (brs, 2H), 2.67 (t, *J* = 12.3 Hz, 2H), 1.710-1.63 (m, 4H), 1.50-1.45 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.33 (td, *J* = 13.9, 6.3 Hz, 2H), 1.09 (ddd, *J* = 24.3, 12.5, 4.3 Hz, 2H). HRMS ESI calcd for C₂₀H₂₉N₃O₄ 376.2231, found 376.2234.

tert-butyl 4-(3-((5-oxo-5,6-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **45a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.67 (s, 0.4H), 8.56 (s, 0.6H), 6.21 (brs, 0.6H), 5.94 (brs, 0.4H), 4.66 (s, 1.3H), 4.63 (s, 0.7H), 4.10 (brs, 2H), 3.48-3.57 (m, 2H), 2.67 (t, *J* = 11.7 Hz, 2H), 1.63-1.71 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.33-1.39 (m, 2H), 1.12-1.23 (m, 2H). HRMS ESI calcd for C₁₉H₂₈N₄O₄ 377.2183, found 377.2193.

2-((3-(1-(5-Ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)furo[2,3-*d*]pyrimidin-5(6*H*)-one **45b**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.67 (s, 0.4H), 8.56 (s, 0.6H), 8.16 (s, 2H), 6.05 (brs, 0.6H), 5.83 (brs, 0.4H), 4.67-4.71 (m, 2H), 4.66 (s, 1.3H), 4.63 (s, 0.7H), 3.49-3.58 (m, 2H), 2.80-2.86 (m, 2H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.66-1.78 (m, 4H), 1.54-1.56 (m, 1H), 1.32-1.38 (m, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.12-1.23 (m, 2H). HRMS ESI calcd for C₂₀H₂₆N₆O₂ 383.2189, found 383.2197.

tert-butyl 4-(3-((3-oxo-2,3-dihydrofuro[3,2-*c*]pyridin-6-yl)amino)propyl)piperidine-1-carboxylate **46a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.34 (brs, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.09 (brs, 2H), 3.27 (d, *J* = 6.6, 2H), 2.67 (t, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.71-1.64 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.38-1.32 (m, 2H), 1.25-1.10 (m, 2H). HRMS ESI calcd for C₂₀H₂₉N₃O₄ 376.2230, found 376.2240.

6-((3-(1-(5-Ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **46b**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 5.88 (s, 1H), 5.32 (brs, 1H), 4.70 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.28 (dd, *J* = 12.5, 6.3, 2H), 2.84 (td, *J* = 13.1, 2.6 Hz, 2H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.83-1.63 (m, 5H), 1.43-1.32 (m, 2H), 1.26-1.11 (m, 5H). HRMS ESI calcd for C₂₁H₂₇N₅O₂ 382.2237, found 382.2244.

6-((3-(1-(3-Isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **46c**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.47 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.13 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 3.29 (dd, *J* = 12.3, 6.2 Hz, 2H), 3.02 (td, *J* = 13.0, 2.8 Hz, 2H), 2.88 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.78 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H), 1.74-1.64 (m, 2H), 1.55-1.44 (m, 1H), 1.43-1.34 (m, 2H), 1.34-1.19 (m, 8H). HRMS ESI calcd for C₂₀H₂₇N₅O₃ 386.2186, found 386.2195.

6-((3-(1-(5-Methoxypyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **46d**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H), 8.08 (s, 2H), 5.88 (s, 1H), 5.45 (brs, 1H), 4.67-4.54 (m, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.28 (d, *J* = 6.2, 2H), 2.82 (td, *J* = 13.1, 2.6 Hz, 2H), 1.86-1.61 (m, 4H), 1.59-1.53 (m, 1H), 1.44-1.32 (m, 2H), 1.27-1.12 (m, 2H). HRMS ESI calcd for C₂₀H₂₅N₅O₃ 384.2029, found 384.2041.

6-((3-(1-(5-Methoxycarbonylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **46e**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.81 (s, 2H), 8.47 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 4.90 (d, *J* = 13.3, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.30 (brs, 2H), 2.92 (t, *J* = 13.2, 2H), 1.822 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 1.75-1.66 (m, 2H), 1.59-1.53 (m, 1H), 1.46-1.37 (m, 2H), 1.25-1.11 (m, 2H). HRMS ESI calcd for C₂₁H₂₅N₅O₄ 412.1979, found 412.1975.

6-((3-(1-(5-Fluoropyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **46f**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H), 8.17 (s, 2H), 5.88 (s, 1H), 5.31 (brs, 1H), 4.59-4.69 (m, 4H), 3.22-3.34 (m, 2H), 2.79-2.90 (m, 2H), 1.11-1.82 (m, 9H). HRMS ESI calcd for C₁₉H₂₂FN₅O₂ 372.1830, found 372.1835.

6-((3-(1-(5-(Trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **46g**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.50-8.41 (m, 3H), 5.88 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 5.46 (brs, 1H), 4.87-4.78 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.29 (dd, *J* = 12.5, 6.4 Hz, 2H), 2.91 (td, *J* = 13.1, 2.6 Hz, 2H), 1.85-1.76 (m, 2H), 1.75-1.67 (m, 2H), 1.65-1.57 (m, 1H), 1.43-1.33 (m, 2H), 1.23-1.11 (m, 2H). HRMS ESI calcd for C₂₀H₂₂F₃N₅O₂ 422.1798, found 422.1803.

trans-6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)-2-methylpiperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **55a trans**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 5.88 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 5.08-4.99 (m, 1H), 4.64-4.53 (m, 3H), 3.28 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.95 (td, *J* = 13.3, 2.7 Hz, 1H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.86-1.54 (m, 4H), 1.42-1.31 (m, 3H), 1.20-1.08 (m, 8H). HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₉N₅O₂ 396.2394, found 396.2398.

cis-6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)-2-methylpiperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **55a cis**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.42 (s, 1H), 8.15 (s, 2H), 5.90 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.49-4.35 (m, 2H), 3.31-3.10 (m, 3H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.07-1.94 (m, 1H), 1.92-1.81 (m, 1H), 1.68 (td, *J* = 14.9, 7.5 Hz, 2H), 1.62-1.50 (m, 1H), 1.50-1.40 (m, 2H), 1.36-1.23 (m, 2H), 1.23-1.15 (m, 6H). HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₉N₅O₂ 396.2394, found 396.2400.

trans-6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)-3-methylpiperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **55b trans**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.40 (s, 1H), 8.14 (s, 2H), 5.96 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 4.71 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.65-4.55 (m, 3H), 3.25 (s, 2H), 2.81 (dd, *J* = 17.4, 7.6 Hz, 1H), 2.56-2.3.9 (m, 3H), 1.87-1.67 (m, 3H), 1.66-1.52 (m, 1H), 1.34 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 1.29-1.14 (m, 6H), 0.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H): HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₉N₅O₂ 396.2394, found 396.2384.

cis-6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)-3-methylpiperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **55b cis**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.44 (s, 1H), 8.14 (s, 2H), 5.89 (s, 1H), 5.79 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.56-4.48 (m, 1H), 4.40 (ddd, *J* = 13.1, 3.7, 1.8 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 12.3, 6.4 Hz, 2H), 3.10 (dd, *J* = 13.1, 3.2 Hz, 1H), 2.98 (ddd, *J* = 13.1, 10.0, 5.0 Hz, 1H), 2.44 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.97-1.87 (m, 1H), 1.76-1.62 (m, 3H), 1.52 (dd, *J* = 9.4, 4.2 Hz, 2H), 1.37 (dd, *J* = 15.0, 7.6 Hz, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.86 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H): HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₉N₅O₂ 396.2394, found 396.2384.

6-((3-((1*R*,3*S*,5*S*)-8-(5-Ethylpyrimidin-2-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **55c**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.45 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 5.85 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.68-4.63 (m, 2H), 4.62-4.59 (m, 2H), 3.25-3.19 (m, 2H), 2.49-2.42 (m, 2H), 2.32-2.29 (m, 2H), 2.08-2.04 (m, 2H), 1.78-1.75 (m, 2H), 1.68-1.64 (m, 2H), 1.64-1.60 (m, 2H), 1.58-1.55 (m, 1H), 1.32-1.28 (m, 2H), 1.31-1.19 (m, 3H). HRMS ESI calcd for C₂₃H₂₉N₅O₂ 408.2394, found 408.2393.

6-((3-(3-(5-ethylpyrimidin-2-yl)-3-azabicyclo[3.2.1]octan-8-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **55d**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.47 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 5.89 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.34 (dd, *J* = 12.7, 3.3 Hz, 2H), 3.31 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.93 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H), 2.46 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.11 (s, 2H), 1.74-1.68 (m, 3H), 1.58-1.51 (m, 4H), 1.38-1.27 (m, 2H), 1.18 (*J* = 7.6 Hz, 3H). HRMS ESI calcd for C₂₃H₂₉N₅O₂ 408.2394, found 408.2392.

6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)-4-methylpiperidin-4-yl)propyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **55e**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.46(s, 1H), 8.16 (s, 2H), 5.87 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.05 (td, *J* = 13.5, 4.9 Hz, 2H), 3.46 (ddd, *J* = 13.5, 8.8, 4.2 Hz, 2H), 3.27 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.65 (td, *J* = 11.2, 7.5 Hz, 2H), 1.50-1.36 (m, 6H), 1.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₉N₅O₂ 396.2394, found 396.2384.

6-((3-(1-(5-Ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)butyl)amino)furo[3,2-*c*]pyridin-3(2*H*)-one **55f**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.46 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 5.88 (s, 1H), 5.35 (brs, 1H), 4.75-4.79 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.20-3.41 (m, 2H), 2.75-2.83 (m, 2H), 2.45 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.74-1.81 (m, 1H), 1.66-1.70 (m, 2H), 1.45-1.52 (m, 3H), 1.23-1.36 (m, 2H), 1.18 (t, *J*

= 8.0 Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H). HRMS ESI calcd for $C_{22}H_{29}N_5O_2$ 396.2393, found 396.2387.

3 - 8 - 2) Biology

hERG binding assay

hERG channel inhibition was assessed using Predictor TM hERG Fluorescence Polarization Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The positive control, E-4031, and test compounds were dissolved in DMSO. The assay was performed according to the manufacture's protocol.

Gastric emptying

Liquid-phase gastric emptying was assessed using the acetaminophen absorption test according to a literature method.⁸ Male 11-week-old C57BL/6J mice were fasted overnight, and orally given 10 mg/kg of compound or vehicle (5 % DMSO, 0.1 % Tween 80 and 0.5 % methylcellulose) 30 min before oral administration of an aqueous solution of 20 % glucose and 1 % acetaminophen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a dose of 2 g/kg glucose–100 mg/kg acetaminophen. Blood samples (40 μ L) were collected 10 and 20 min after acetaminophen administration and plasma acetaminophen levels were measured using an acetaminophen assay kit (Cambridge Life Sciences, Cambridge, U.K.).

Pharmacokinetic study

Male Wister/ST rats (9 weeks old) and male CD-1 (ICR) mice (7 weeks old) were acclimated to experimental conditions 7-14 d before use, and had free access to food and water throughout the acclimatization period. The animals were fasted overnight, and compound was administered intravenously *via* the tail vein or orally (by gavage) at the indicated doses ($n=3$ in rats, $n=2$ in mice) as a solution in 10% DMSO and 5% HP β CD in H₂O. Blood samples were taken periodically and the plasma was analyzed by LC-MS-MS with quantitation against a standard curve.

3-9) 参考文献

1. 政策研ニュース, 2010, No. 30, 医薬産業政策研究所.
2. Towards a drug concentration effect relationship for QT prolongation and torsades de pointes.
Webster R, Leishman D, Walker D.
Curr Opin Drug Discov Devel. **2002**, 5(1), 116-126.
3. 心循環毒性.
高岡 雅哉
日薬理誌, **2008**, 132, 221-225.
4. 医薬品の安全性, 長尾 拓編, **2004**, 南山堂
5. 代表的な QT 延長薬の非臨床試験における成績.
杉山 篤.
日薬理誌, 2009, 133, 4-7.
6. ヒト用医薬品の心室再分極遅延 (QT 間隔延長) の潜在的可能性に関する非臨床的評価 非臨床に関するガイドライン(S7B), 日米 EU 医薬品規制調和国際会議.
7. 非抗不整脈薬における QT/QTc 間隔の延長と催不整脈作用の潜在的可能性に関する臨床的評価, 臨床に関するガイドライン(E14), 日米 EU 医薬品規制調和国際会議.
8. Medicinal chemistry of hERG optimizations: Highlights and hang-ups.
Jamieson C, Moir EM, Rankovic Z, Wishart G.
J Med Chem, **2006**, 49(17), 5029-5046.
9. Targeting GPR119 for the Potential Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus.
Mo XL, Yang Z, Tao YX.
Prog Mol Biol Transl Sci., 2014, 121, 95-131.
10. Spirocyclic GPR40 modulators.
Brown SP, Dransfield P, Du X, Fu Z, Houze J, Jiao XY, Lai SJ, Li AR, Liu J, Ma Z, Medina JC, Pattaropong V, Shen W, Vimolratana M, Wang Y, Wang Z, Yu M, Zhu L.
PCT Int Appl. WO/2010045258, **2010**.
11. (a) Discovery of GPR119 agonists for the treatment of Type 2 Diabetes: Part 1. Pyrrolopyrimidines.
Kelly G, Qiang Z, Sherrie P, Shawn E. Kevin G, Kyunglin K, Romyr D.
ACS 239th annual meetings, San Francisco, CA, March, **2010**, MEDI 178.
(b) Discovery of GPR119 agonists for the treatment of Type 2 Diabetes: Part 2.

Dihydropyrrolopyrimidines

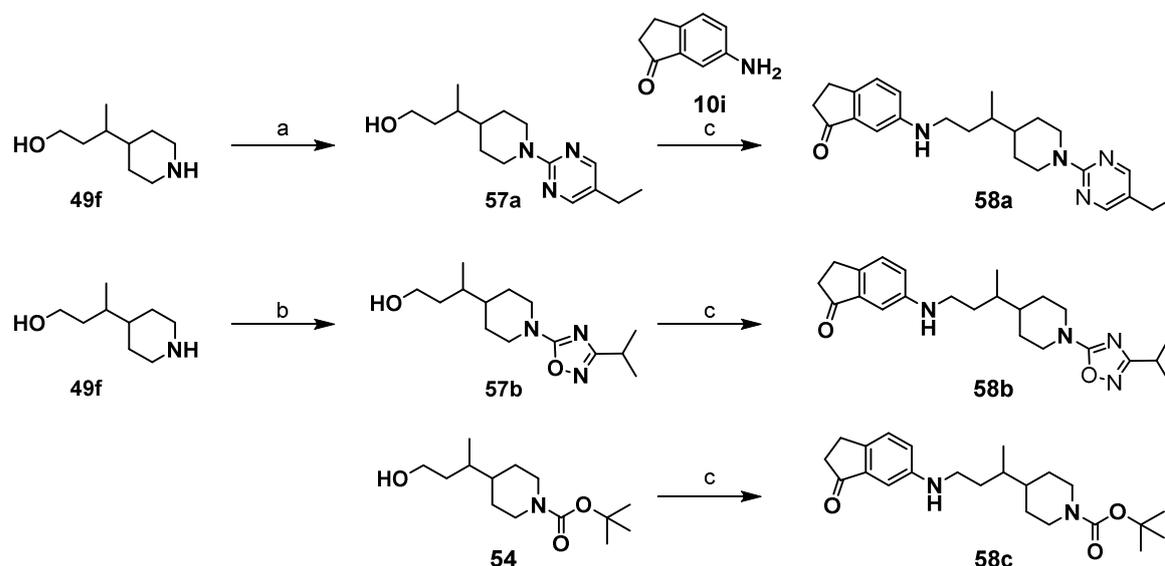
Romyr D, Sherrie P, Kevin G, Shawn E, Kyugin K, Kelly G, Qi Q, Qiang Z.
ACS 239th annual meetings, San Francisco, CA, March, **2010**, MEDI 175.

12. Design and evaluation of a 2-(2,3,6-trifluorophenyl)acetamide derivative as an agonist of the GPR119 receptor.
Mascitti V, Stevens BD, Choi C, McClure KF, Guimarães CR, Farley KA, Munchhof MJ, Robinson RP, Futatsugi K, Lavergne SY, Lefker BA, Cornelius P, Bonin PD, Kalgutkar AS, Sharma R, Chen Y.
Bioorg Med Chem Lett. **2011**, 21(5), 1306-1309.
13. Noble metal hydroxides on carbon nonpyrophoric dry catalysts.
William MP.
Tetrahedron Lett, **1967**, 8(17), 1663–1664.
14. GPR119 regulates murine glucose homeostasis through incretin receptor-dependent and independent mechanisms.
Flock G, Holland D, Seino Y, Drucker DJ.
Endocrinology. **2011**, 152(2), 374-383.
15. Agonists at GPR119 mediate secretion of GLP-1 from mouse enteroendocrine cells through glucose-independent pathways.
Lan H, Lin HV, Wang CF, Wright MJ, Xu S, Kang L, Juhl K, Hedrick JA, Kowalski TJ.
Br J Pharmacol. **2012**, 165(8), 2799-2807.

第四章 代謝安定性の改善

4-1) 序論

第三章において、フロ[3,2-*c*]ピリジン-3(2*H*)-オンを A 環として持つ化合物群が、リード化合物 **26a** で確認された hERG チャンネル阻害作用がほとんど検出されず、さらに活性の向上も実現することができた。しかし、このフロ[3,2-*c*]ピリジン-3(2*H*)-オン骨格を有する化合物の中で最も高活性な **55f** は GLP-1 分泌に基づく胃排出抑制作用を示したが、oGTT における薬効が弱いことが明らかとなった。**55f** や周辺化合物の解析により、ヘテロビシクロ骨格を有する化合物群は *in vitro* 活性と *in vivo* 活性に乖離があった。そこで、oGTT で薬効が確認されている **26a** の持つインダノン骨格を A 環として用い再度リード最適化を行うこととした。しかし、リード化合物 **26a** は hERG 阻害作用を有しており、GPR119 アゴニスト作用との安全域を確保する必要がある。安全域を確保するためには、hERG 阻害作用を十分に下げるか、hERG 阻害作用を低い状態で維持しながら活性を向上させる方法が考えられる。第三章で述べたように、hERG 阻害作用を回避する戦略として 5 つの方法が知られている。¹ 第三章で行った塩基性の調節以外に、この化合物群に適した方法論として小さな構造変換が考えられ、この方法により同時に活性の向上もできれば安全域の確保が可能である。

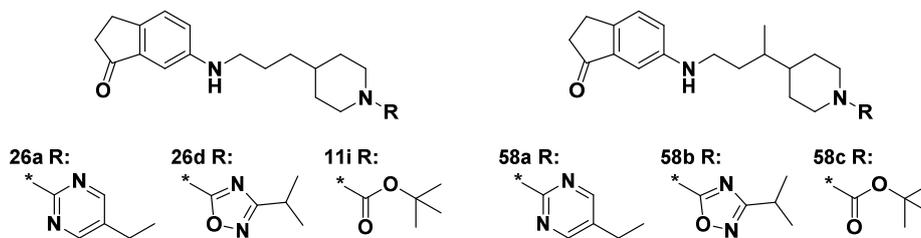


Reagents and conditions: (a) 2-Cl-5-Et-Pyrimidine, DIPEA, *i*-PrOH (99%) (b) (i) BrCN, NaHCO₃, DCM, H₂O (ii) *N*-Hydroxyisobutyrimidamide, ZnCl₂, EtOAc, THF (iii) EtOH, *conc.*HCl (65%) (c) (i) Dess-Martin periodinane, DCM (90-98%) (ii) **10i**, NaBH(OAc)₃, DCM (56-78%)

Scheme 4-1 : **58a-c** の合成

フロ[3,2-*c*]ピリジン-3(2*H*)-オンを A 環として持つ化合物群の最適化から、リンカー及びB環上の GPR119 アゴニスト活性に対する置換基効果などの SAR が得られている。そこで、この知見がインダノン骨格においても、同様に機能するかを確認するとともに、その小さな構造変換の hERG 阻害作用への影響を確認することとした。フロ[3,2-*c*]ピリジン-3(2*H*)-オン骨格において、活性向上に寄与していたリンカー3位へのメチル基の導入を行った。化合物は、市販の 6-アミノインダノン **10i** とアルコール体 **49f** を基に調整したアルデヒドを用い合成した。(Scheme 4-1) ヘテロビシクロ環で収率が向上していた酢酸溶媒での反応を行ったところ、インダノン骨格では、反応が汚くなることが分かった。そこで Scheme 2-2 の方法に基づき合成し、良好な収率で **58a-c** を得ることができた。その *in vitro* GPR119 アゴニスト活性の評価結果を Table 4-1 に示した。

Table 4-1 : リンカー3位メチル基の置換基効果



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hE _{max} ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mE _{max} ^a (%)	hERG inhibition (%)@10 μM	Metabolic Stability ^b
26a	51	113	167	110	14	4.7
58a	110	111	298	105	6	7.4
26d	58	110	158	113	27	3.6
58b	105	95	203	104	7	7.5
11i	46	98	123	110	33	4.0
58c	61	93	144	107	1	6.6

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較)

^b ヒト肝ミクロソームに化合物(5 μM)を添加し、30 分後の化合物の残存量から算出。

その結果、B環の違う3化合物のリンカー3位にメチル基を導入したが、いずれの場合も、活性向上はないものの概ね活性を維持し、脂溶性が向上しているにもかかわらず hERG 阻害活性が低値を示すことが分かった。しかし、脂溶性の増大が原因として考えられる代謝安定性の悪化が確認された。リンカーの置換基修飾が大きな活性減弱がなく、hERG 阻害作用の改善に寄与しており、代謝安定性を改善できる構造修飾を行うこととした。

4-2) 代謝安定性の改善策

代謝安定性を改善するためには、大きく分けて2つの方法論が知られている。一つは脂溶性を調節することであり、もう一つは代謝されうる部位が代謝されないように置換基を導入すること、またはその部位の立体障害を大きくすることである。^{2,3} 体内に吸収された薬物は肝臓で代謝を受け、腎臓において尿中へ排泄される。そのため、肝臓では、体内に侵入した薬物などの異物の水溶性を上げるため代謝を行っている。つまり、脂溶性の高い化合物ほど肝臓での代謝を受けやすくなると考えられており、脂溶性を調節することにより代謝安定性を改善することができる。代謝には第一相反応と第二相反応がある。⁴ 第一相反応とは、シトクロム P450 (CYP) などにより起こる水酸化などの酸化的代謝やエステラーゼのような加水分解酵素によるエステルやアミドなどの加水分解などがある。第二相反応とは、親化合物や代謝産物の水酸基やアミノ基などへの抱合のことであり、グルクロン酸抱合、硫酸抱合やグルタチオン抱合などが知られている。リード化合物の代謝安定性を評価した *in vitro* での代謝安定性試験はヒトマイクロソームを用いた系であり、主に CYP が関与する第一相反応である。その第一相反応で代謝を受けやすい部位として有機化学的に反応性の高い部位が代謝されることが知られており、ベンジル位、電子密度の高い部位や立体障害の少ない部位などがあげられ、これらの部分の代謝を妨げる置換基変換や脂溶性の調節を行うことでリード化合物の代謝安定性を改善できると考えられる。リード化合物のリンカー及び B 環における代謝部位を予測すると、丸で示したように、脂肪鎖であり脂溶性が高く立体障害の少ないリンカー部分、B 環ピペリジン 2 位や B 環ピリミジン 5 位のエチル基などが挙げられる。(図 4-1)

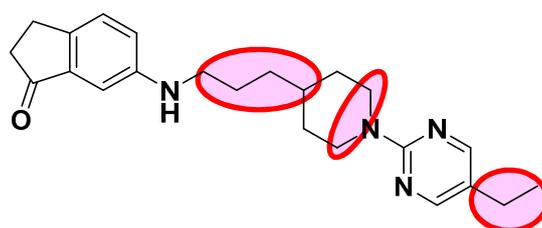


図 4-1 : リード化合物 26a の代謝予想部位

4-3) リード周辺化合物の SAR

代謝部位を抑えるために用いられる置換基として、メチル基やフルオロ基が挙げられる。^{5,6} これらの置換基は小さく、活性に対する影響が少ない場合もある。特に、フルオロ基は代謝を受けにくく、その使用頻度は多くなってきてい

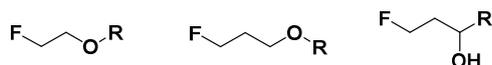
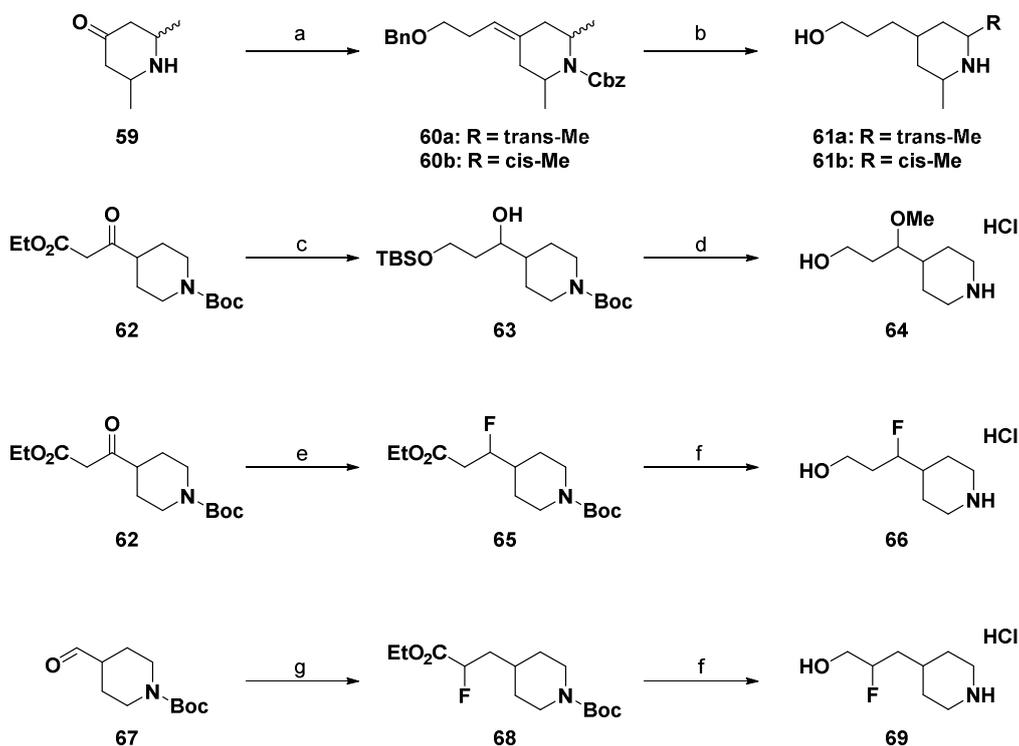


図 4-2 : 脂溶性を下げうるフッ素置換位置
(Chembiochem. 2004, 5(5), 637-643 より転載)

る。^{3,7} フルオロ基を導入すると一般的には脂溶性は増大すると考えられ、代謝安定性に悪影響が出る可能性も考えられたが、分子内に酸素原子とフッ素原子が存在し、O-F 間距離が 3.1 Å 以下の安定コンフォメーションを持つ場合に脂溶性が低減することが報告されている。⁷ (図 4-2) **26a** のリンカーへのフルオロ基の導入では、その報告にある酸素原子を窒素原子に置換した類似構造であり、実際に cLogP も低下しており、代謝安定性を改善できる可能性が高い。

また、メトキシ基はそのローンペアの影響で水溶性を向上させることができ、分子の脂溶性を低下させることができる。そこで、リンカーや B 環のこれらの位置へメチル基、メトキシ基やフルオロ基の導入を行い、GPR119 アゴニスト活性や代謝安定性への影響を見ることとした。



Reagents and conditions:

(a) (i) CbzCl, K₂CO₃, DCM, H₂O (91%) (ii) BnO(CH₂)₃PPh₃Br, t-BuOK, THF (37%) (b) H₂, Pd(OH)₂, EtOH and then conc. HCl (99%) (c) (i) LiBH₄, THF (63%) (ii) TBSCl, imidazole, DMF (48%) (d) (i) Me₃OBF₄, Proton sponge, DCM (91%) (ii) TBAF, THF (85%) (iii) HCl, 1,4-dioxane, DCM (99%) (e) (i) NaBH₄, EtOH (99%) (ii) Deoxo-Fluor, DCM (25%) (f) (i) LAH, THF (93-99%) (ii) HCl, 1,4-dioxane (96-99%) (g) (i) EtO₂CCHFPO(OEt)₂, BuLi, THF (82%) (ii) H₂, Pd/C, EtOH (99%)

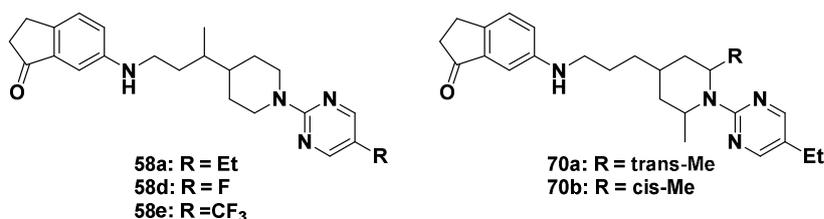
Scheme 4-2 : アミノアルコール **61**, **64**, **66** 及び **69** の合成

ピペリジン 2,6 位ジメチル体は Scheme 3-6 の方法に従い合成した。リンカー3 位がメトキシ基及びフルオロ基で置換されたアミノアルコールは、*N*-Boc-4-(2-エトキシカルボニルアセチル)ピペリジン **62** から合成した。メトキシ体は水素化ホウ素リチウムにより、エステル、ケトンの両方を還元しジオールとしたのち、1 級アルコールの *tert*-ブチルジメチルシリル化を行うことで **63** とした。この 2 級アルコールを Meervein 試薬と Proton sponge®によりメチル化を行い、脱保護することによりアミノアルコール **64** を得た。フルオロ体 **66** は **62** のケトンの還元により得られたアルコールを Deoxo-Flour®にてフルオロ基に変換した後、エステルの還元が続く、脱保護により合成した。また、リンカー2 位がフルオロ基で置換されたアミノアルコール **69** は、*N*-Boc-4-ホルミルピペリジン **66** から合成した。即ち、アルデヒドと Horner-Wadsworth-Emmons 試薬を作用させることによりリンカーの伸長を行い、Pd/C での水素添加後、LAH 還元によりアルコールとし、脱保護することにより目的の **69** へ導いた。

得られたアミノアルコールから Scheme 2-3 の方法を基に各種 B 環を導入し、アルデヒドに酸化した後、6-アミノインドノンとの還元的アミノ化により、目的物を合成した。

B 環を変換した化合物の *in vitro* GPR119 アゴニスト活性の評価結果を Table 4-2 に示した。その結果、ピリミジン 5 位の置換基をトリフルオロメチル基に変換した **58e** では活性の向上は見られなかった。しかし、フルオロ基(**58d**)及びト

Table 4-2 : B 環の置換基効果



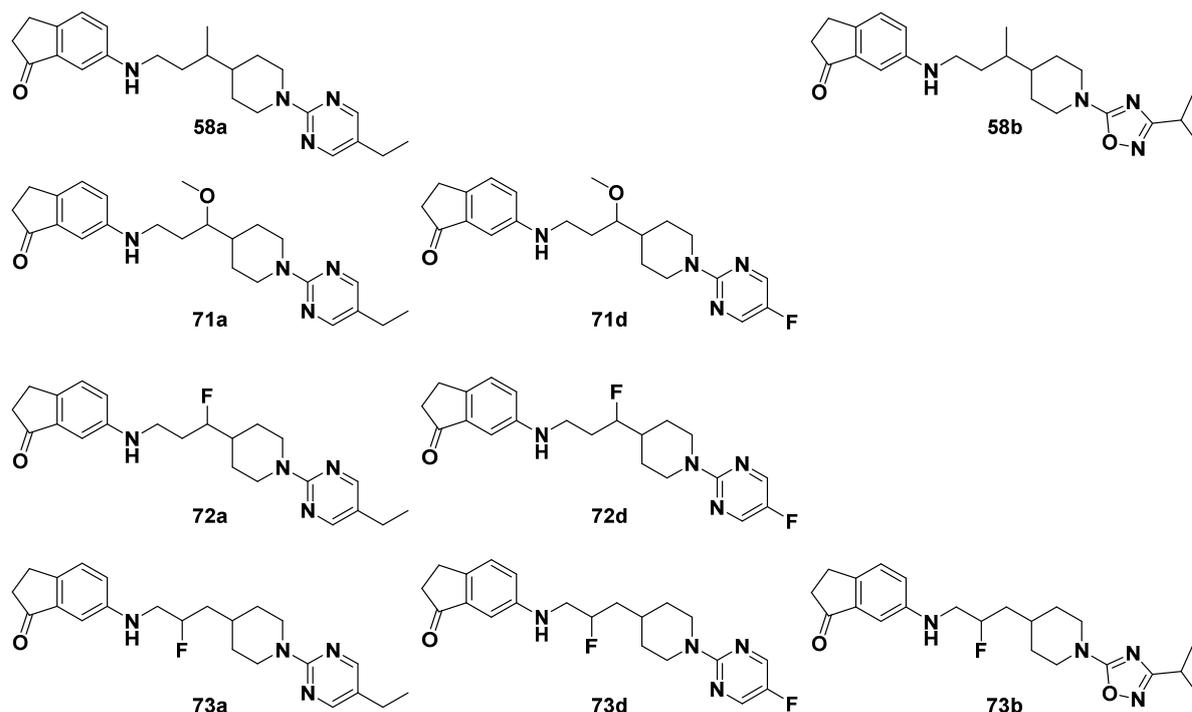
Compound	hEC ₅₀ (nM)	hE _{max} ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mE _{max} ^a (%)	hERG inhibition (%)@10 uM	Metabolic Stability ^c
26a	51	113	167	110	14	4.7
58a	110	111	298	105	6	7.4
58d	107	104	215	100	NT ^b	6.0
58e	192	105	472	98	NT ^b	4.0
70a	398	88	237	59	NT ^b	4.9
70b	1273	92	2727	40	NT ^b	NT ^b

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較, ^b 未測定

^c ヒト肝ミクロソームに化合物(5 μM)を添加し、30 分後の化合物の残存量から算出。

リフルオロメチル基(58e)のいずれの場合もエチル基に対して、代謝安定性の改善が見られており、58a ではエチル基が代謝を受けていたと考えている。フルオロ基(58d)は活性面ではエチル基(58a)と同等の値を示しており、良好な B 環置換基であるといえる。ピペリジン 2,6 位ジメチル体 70a, b では、代謝安定性の改善

Table 4-3 : リンカーの置換基効果



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hE _{max} ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mE _{max} ^a (%)	hERG inhibition (%)@10 μM	Metabolic Stability ^c
26a	51	113	167	110	14	4.7
58a	110	111	298	105	6	7.4
58b	105	95	203	104	7	7.5
71a	138	118	235	107	NT ^b	9.4
71d	197	108	432	99	NT ^b	4.1
72a	58	118	71	111	NT ^b	10.6
72d	48	101	114	97	19	4.4
73a	48	114	70	110	NT ^b	6.6
73b	33	100	47	116	16	4.6
73d	68	107	83	98	NT ^b	1.0

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較, ^b 未測定

^c ヒト肝ミクロソームに化合物(5 μM)を添加し、30 分後の化合物の残存量から算出。

が見られたが、トランス体 **70a**、シス体 **70b** の両方で活性の減弱が認められた。特にシス体 **70b** での活性減弱が目立っており、シス体ではメチル基同士がアキシヤルになることは考えにくく、おそらくエクatorial方向を向いていると考えられる。第三章で置換基がエクatorial方向に向くと考えられる場合には、同様に活性の低下が確認されており、ピペリジン環上の置換基はその向きが活性の強弱に影響することが改めて確認された。

続いて、リンカーの代謝を防ぐため、リンカーに水溶性置換基としてメトキシ基を導入した化合物 **71a, b**、代謝を受けにくく分子全体の脂溶性も下げることができるフルオロ基により置換した化合物 **72a, d** 及び **73a, b, d** の *in vitro* GPR119 アゴニスト活性の評価結果を Table 4-3 に示した。

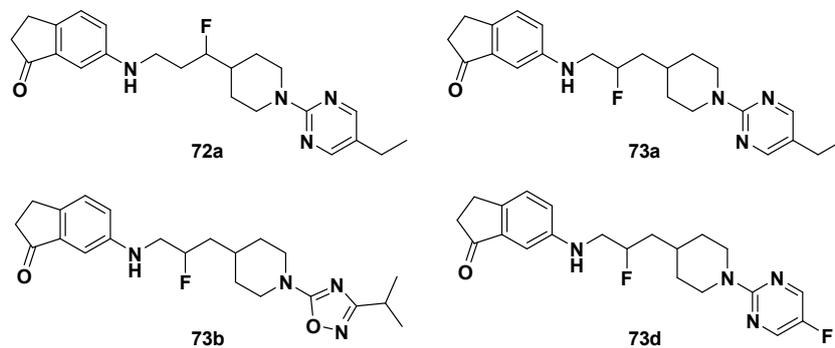
その結果、B 環がエチルピリミジンである **71a** 及び **72a** を除いて、メチル体 **58a** や **58b** に対して代謝安定性の改善が認められた。メチル体 **58a** やメトキシ体 **71a** では活性の減弱が見られたが、フルオロ基を導入した化合物では代謝安定性の改善傾向が見え、いずれの場合もヒト及びマウスの両方で高い GPR119 アゴニスト活性を示すことが分かった。特に、**73d** は、リード化合物と同等レベルの活性を示しながら、非常に高い代謝安定性を示した。これにはフルオロ基そのものが代謝を受けにくいことと、この化合物群ではフルオロ基での置換により *cLogP* が低下していることも影響していると考えられた。また、フッ素は、水素に次いで原子半径が小さいため、活性発現に必要なコンフォメーションに大きな影響を与えなかったと考えられる。また、**73b** はヒト及びマウスでリード化合物より高い活性を示し、インダノン骨格の化合物群として最も高い活性を示した。

4-4) 活性化合物の *in vivo* 評価

リンカーにフルオロ基を導入した化合物ではヒト及びマウスの両方でリード化合物に比べ高活性を示し、且つ代謝安定性も維持向上していた。そこで、高活性を示した化合物 **72a, 73a, b, 及び d** について、抗糖尿病作用を検証するため、*oGTT* を行った。絶食下のマウスに対し、各化合物を 10 mg/kg の用量で投与し、その 30 分後にグルコース負荷を行い、その後継時的に血中糖濃度の測定を行った。その結果を Table 4-4 に示す。

その結果、代謝安定性が非常に向上していた **73d** は有意な薬効が期待されたが、予想に反し 4 化合物中最も低い AUC を示した。**73d** を除くすべての場合に 20%以上の血糖上昇抑制率が認められ、さらに **73b** は最も強い作用があり、有意な血糖上昇抑制効果が確認された。続いて、この **73b** の *oGTT* における用量反応性試験を行った。(図 4-3)

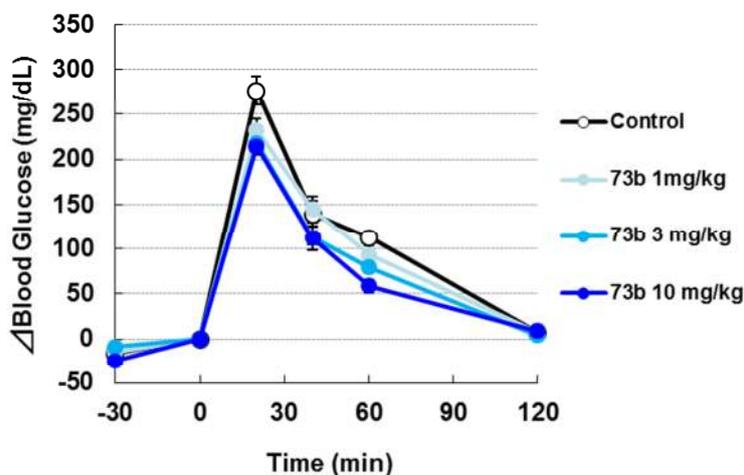
Table 4-4 : 高活性化合物のマウス oGTT 結果



Compound	hEC ₅₀ (nM)	hE _{max} ^a (%)	mEC ₅₀ (nM)	mE _{max} ^a (%)	oGTT 120min ΔAUC(%)
72a	58	118	71	111	78
73a	48	114	70	110	73
73b	33	100	47	116	70*
73d	68	107	83	98	91

^a %最大活性 (AR231453 の最大活性との比較)

その結果、1~10 mg/kg の間で用量依存的な血糖上昇抑制作用が確認され、**73b** が食後過血糖を抑制する効果を有していることが明らかとなった。次に **73b** が体重抑制作用を有するかどうか簡易的に確認するため、アセトアミノフェン法による胃排出抑制作用を検証した。(図 4-4) 試験は絶食下のマウスに対し 10 mg/kg の **73b** を投与し、その 30 分後に 100 mg/kg のアセトアミノフェンを負荷し、20 分までの血中アセトアミノフェン濃度を測定することにより評価した。



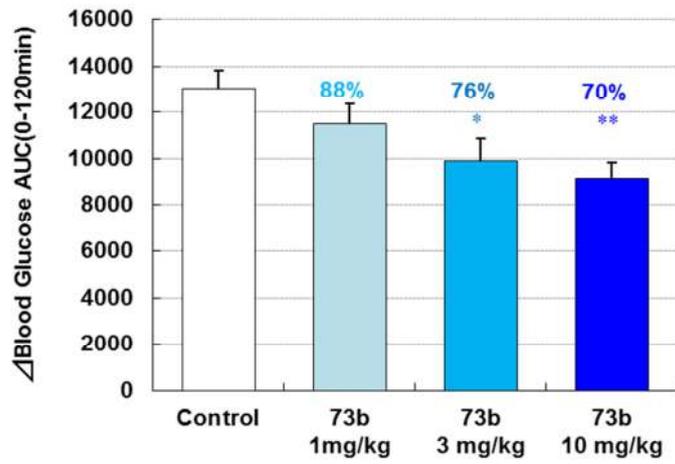


図 4-3 : 73b のマウス oGTT 用量反応性試験

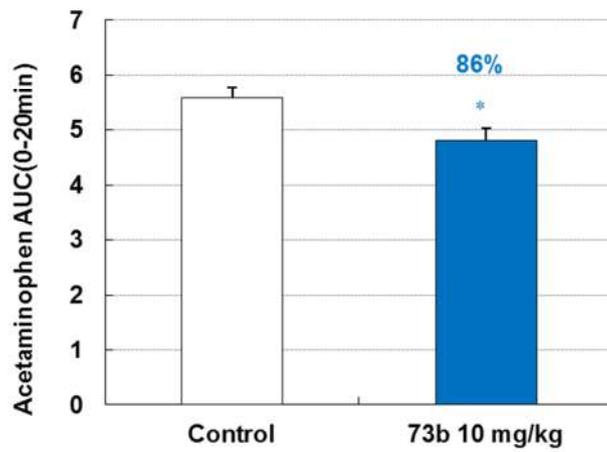
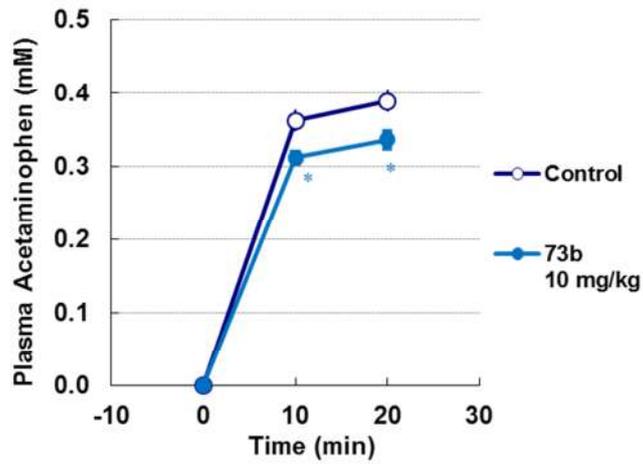


図 4-4 : 73b の胃排出抑制試験

その結果、10分及び20分の血中アセトアミノフェン濃度はいずれもコントロール群に対し有意な低値を示し、AUCも有意に低下させており、胃排出抑制作用を有していることが確認できた。

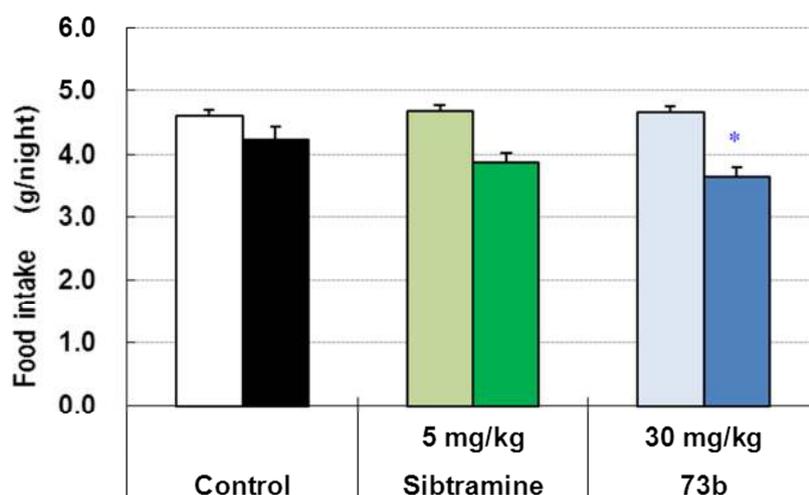


図 4-5 : 73b の摂餌量測定^a

^a各系列の左側のカラムは薬物投与前日の1日摂餌量、右側が vehicle または化合物の投与後の1日摂餌量を示している。

さらに、73b の体重増加抑制作用を予測するため、薬物投与後1晩の摂餌量の測定を行った。(図 4-5) 73b 投与群では薬物未投与時に比べ摂餌量の減少が認められ、コントロール群に対しても、有意な摂餌量の低下を示した。この効果は抗肥満薬として米国で上市されているセロトニン・ノルアドレナリン再取込阻害剤であるシブトラミン (図 4-6)⁸ と同等以上の摂餌抑制作用であり、胃排出抑制試験の結果と合わせ、73b の連続投与が体重増加抑制作用を示す可能性を示せたと考えている。リード化合物 26a は、MBX-2982 と同等の GLP-1 分泌促進作用を有しながらも胃排出抑制作用を示していないことから、73b は 26a に比べ高い薬効を持つと考えられる。次にラットを用いた抗糖尿病作用の検証を行った。複数回の採血を必要とする糖負荷試験において、マウスでは採血時の負荷が大きくなるが、ラットはマウスよりも大きいことからその負荷も小さくなり、再現性も向上する。また、種の違いにより薬効が減弱する例も多く、ヒトでの効果を予測するためにも複数の種での薬効評価は重要であり、ラットを用いた評価も行った。ラットでの糖負荷試験を行う前に、ラット GPR119 発現細胞を用いた cAMP アッセイを行い、EC₅₀ が 125 nM、E_{max} が 102%であることが

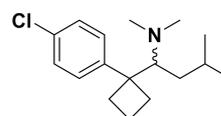


図 4-6 : シブトラミン

分かった。次に **73b** の PK 試験を行い、マウス同様ラットでも薬効を示すかどうか予測した。その結果を Table 4-5 に示した。

Table 4-5 : **73b** の PK プロファイル

Species	Dose iv/oral (mg/kg)	iv t _{1/2} (h)	CL _p (L/h/kg)	V _{dss} (L/kg)	oral t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	BA (%)
Rat	0.5/3.0	2.24	0.89	2.31	3.67	315	2.11	58
Mouse	1.0/5.0	1.16	1.71	1.87	1.07	1090	0.17	68

73b はマウス、ラットにおいて、いずれも高い BA を示しており、特にラットでは薬物の消失速度を示すクリアランスが低く、4 時間程度の半減期を示すこと

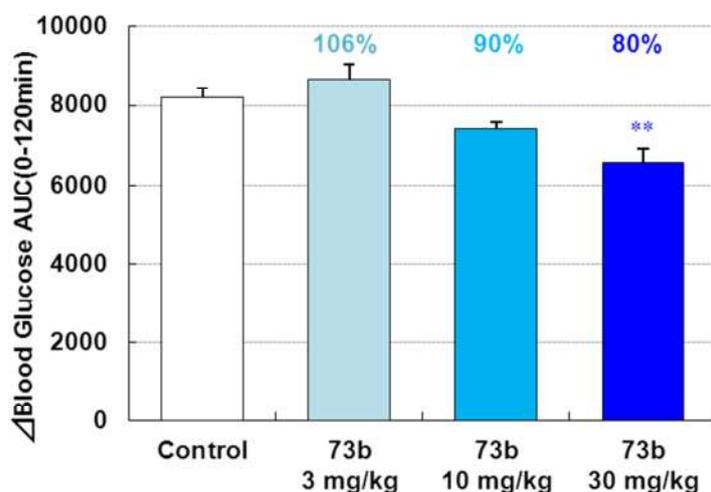
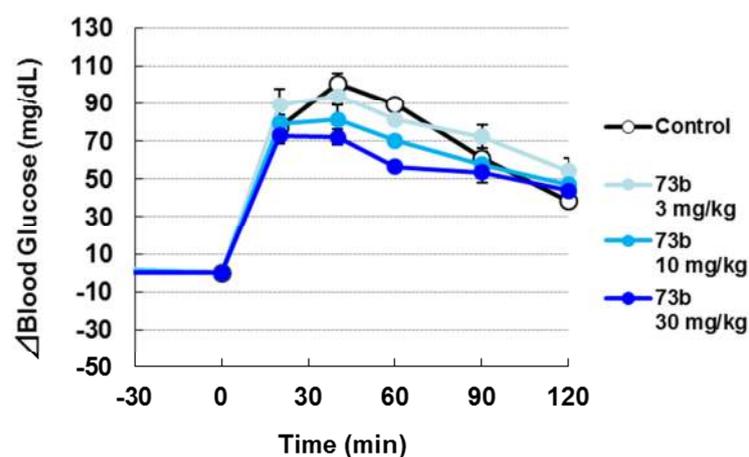


図 4-7 : **73b** のラット oGTT 用量反応性試験

が分かった。マウスとラットで同程度の BA を示し、マウスとラットで 3 倍程度の種差があることから、マウス oGTT に比べ用量が上がるのが予測されたため、3~30 mg/kg の用量でのラット oGTT を行った。(図 4-7) その結果、ラットでも用量依存的な血糖上昇抑制作用が確認でき、30 mg/kg で有意な薬効を示した。そこで、次に、この薬効用量において空腹時高血糖での効果を予測できる scGTT を行った。(図 4-8)

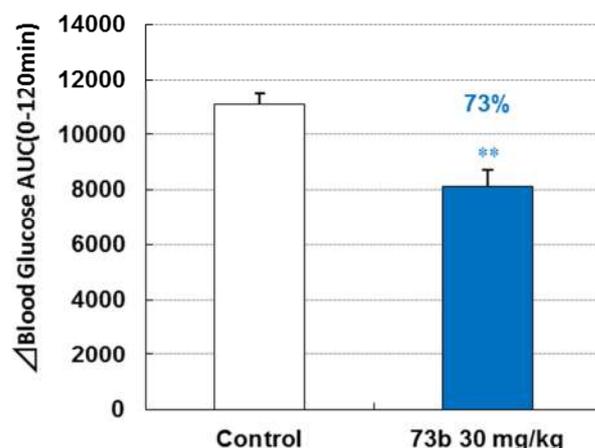


図 4-8 : 73b のラット scGTT

その結果、73b は oGTT で有意な薬効を示した同じ 30 mg/kg で有意な血糖上昇抑制作用を示し、マウスだけでなくラットにおいても有意な薬効を示すことができた。ヒト GPR119 アゴニスト活性はマウス及びラットに比べ高く、ヒトではより低い用量での投与が可能になると考えられる。

4-5) 他の糖尿病治療薬との比較試験

高い抗糖尿病作用と体重抑制作用に繋がると考えられる胃排出抑制作用と摂餌抑制作用を併せ持つ 73b を見出すことができた。GPR119 アゴニストは消化管での GLP-1 分泌による抗糖尿病作用のほかに、膵 β 細胞に直接作用し、糖濃度依存的なインスリン分泌が可能である。強力な GPR119 アゴニストであれば、類薬としてすでに上市されている DPP4 阻害剤よりも高い抗糖尿病作用を示すと考えられ、高い効果を示した 73b を用いて、DPP4 阻害剤との薬効比較試験を行うこととした。抗糖尿病作用の比較を行うため、Merck 社の開発したシタグリプチン (図 4-9)⁹ と

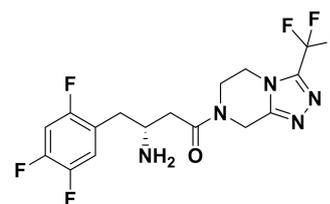


図 4-9 : シタグリプチン

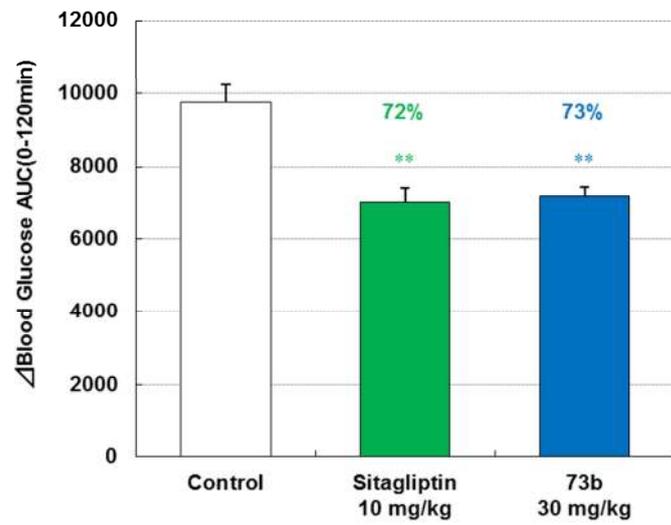
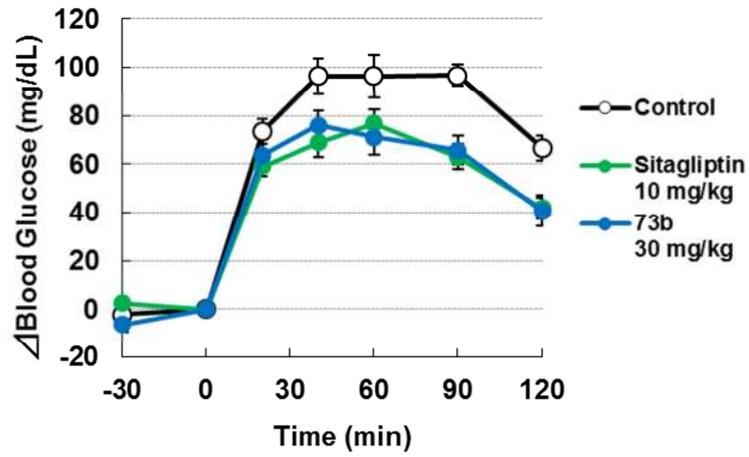
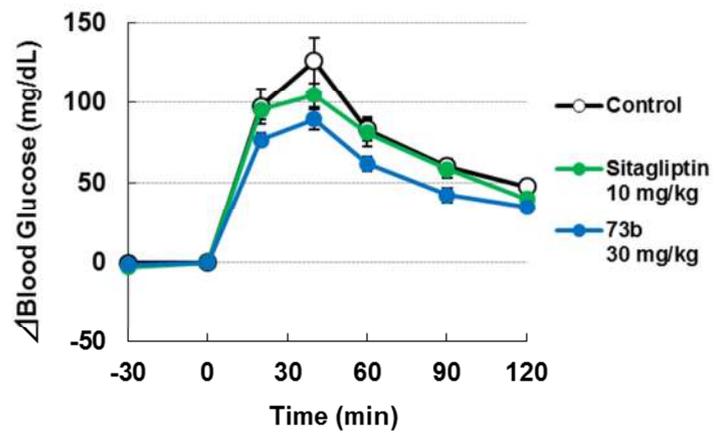


図 4-10 : DPP4 阻害剤との比較試験①; oGTT



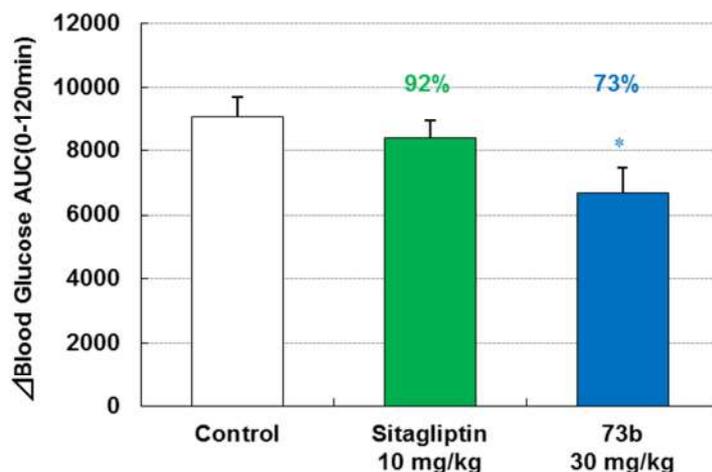


図 4-11 : DPP4 阻害剤との比較試験②; scGTT

73b を用い、ラットでの oGTT 及び scGTT を行った。(図 4-10 及び 11) oGTT では、シタグリプチン、**73b** とともに類似の血糖推移を示し、それぞれ 28%、27%の有意な血糖上昇抑制率が認められ、同等な抗食後過血糖抑制作用が確認された。また、scGTT では **73b** は 27%と有意な血糖上昇抑制率を示したのに対し、シタグリプチンの抑制率は 8%と低値であった。空腹時高血糖を模倣した scGTT は皮下投与によるグルコース負荷であるため、グルコース刺激による GLP-1 分泌が少なくなる。DPP4 阻害剤は分泌された GLP-1 の分解を阻害するメカニズムである。DPP4 阻害剤投与後に行われた oGTT における GLP-1 濃度の半減期は 2 時間程度であり、4 時間後には基準値に戻ることがわかっている。⁹ 次の糖刺激までは GLP-1 濃度の上昇はなく、薬効発現に必要な GLP-1 濃度に達していないと考えられ、空腹時高血糖状態では抗糖尿病作用は低いと考えられる。一方、GPR119 アゴニストは小腸 L 細胞に作用して、GLP-1 の分泌を促進するため、長時間 GLP-1 濃度を維持することができる。さらに、膵 β 細胞では GLP-1 の効果とともに、直接的なインスリン分泌促進作用があるため、scGTT において DPP4 阻害剤よりも高い薬効を示したと考えられる。以上のことから、**73b** は 2 つの糖負荷試験において良好な結果を示したため、食後過血糖及び空腹時高血糖にも効果があることが示唆され、DPP4 阻害剤と同等以上の抗糖尿病作用を示すことができた。

次に GPR119 アゴニストの低血糖リスクについて評価した。糖尿病治療薬の副作用の一つとして低血糖がある。インスリンやインスリン分泌促進剤であるスルフォニルウレア剤(SU 剤)やグリニド剤では、その作用の延長上に低血糖があり、処方には注意が必要とされている。これら 2 剤のように低血糖の有無を確認するため、低血糖リスク評価を行った。試験は絶食下のラットに対し、SU 剤

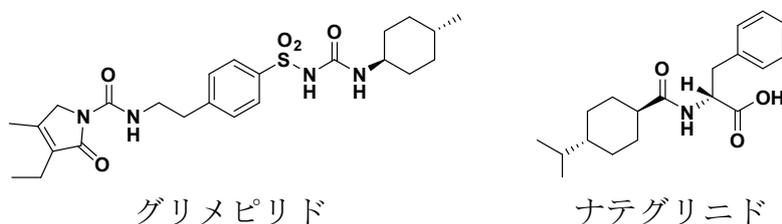
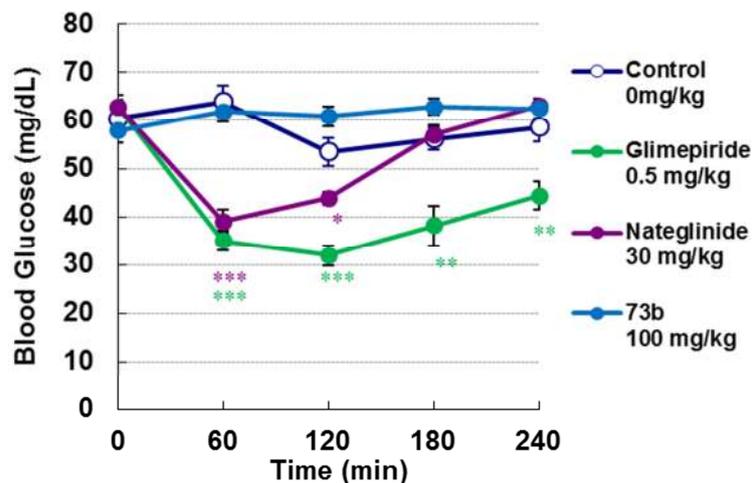


図 4-12 : 73b の低血糖リスク評価

としてグリメピリド¹⁰を、グリニド剤としてナテグリニド¹¹を用い、73b は有効用量以上の 100 mg/kg を投与し評価した。(図 4-12)

インスリン分泌促進剤であるグリメピリドやナテグリニドは空腹時の血糖値から速やかに血中グルコース濃度の低下が起こり、50 mg/dL を下まわり低血糖が確認された。73b では投与後 4 時間まで血糖値に変化はなかった。GPR119 アゴニストは第一章で示した通り、それ自身と GLP-1 による糖濃度依存的なインスリン分泌促進作用により、血糖をコントロールするため低血糖が起きなかったと考えられ、低血糖のリスクの少ない安全な糖尿病治療薬であることが確認された。

4-6) hERG チャネル阻害安全域及びその他安全性評価

リード化合物 26a には hERG チャネル阻害作用があり、安全域の確保が求められた。26a の最適化により DPP4 阻害剤と同等以上の抗糖尿病作用を有する 73b を見出すことができたため、hERG 阻害作用との安全域を確認することとした。パッチクランプ試験を薬物安全性試験センター¹²に委託し hERG チャネル阻害作用を確認したところ、IC₅₀ 値が 27.4 μM (8.6%@1 μM)であった。73b がラット oGTT で薬効を示した際のフリー体の C_{max} が 92.4 nM (C_{max}: 6.6 μM, タンパク

結合率 98.6%) であり、300 倍近い安全域があることが確認された。QT 延長作用が現れる安全域は 30 倍前後からと報告されており、¹³ 十分な安全域がとれていると考えられ、QT 延長作用による心室頻脈は出にくいと判断できる。

続いて、**73b** が GPR119 選択的アゴニストであることを示すため、他の GPCR との選択性を確認した。Multispan 社の化合物プロファイリングサービス¹⁴ においてインスリン分泌や肥満に関わる GPCR として 18 種 (アデノシン A1, A3 レセプター、アドレナリン受容体 $\alpha 2, \alpha 2, \beta 2$ 、カンナビノイド CB1 受容体、コレシストキニン 2、GPR40, 41, 43, 120、グレリン受容体、GIP レセプター、GLP-1 レセプター、メラトニン受容体 MT1、ムスカリン受容体 M3、ニューロペプチド Y1、P2Y1 受容体) を選択し、アゴニスト、アンタゴニスト活性を測定した。その結果、10 μM で 50%以上の活性を示すものはなく、**73b** の抗糖尿病作用は GPR119 選択的なものであることが確認された。また、Ricerca 社の LeadProfilingScreen®にてパネルアッセイ¹⁵ を行い、セロトニン受容体 2B(97% at 10 μM)を除く、68 種の受容体やチャンネルのバインディングアッセイにおいて 10 μM で 50%以下の結合率であり、十分な選択性があると確認された。

次に、その他の毒性評価項目についても評価を行い、**73b** の安全性を検証した。薬物代謝に関与する CYP 分子種の阻害や誘導は、薬物相互作用に関わる毒性項目である。最も代謝に重要な CYP3A4 や遺伝子多型の割合の多い CYP2C9 や CYP2D6 の阻害作用は弱く、いずれも IC₅₀ 値が 10 μM 以上であった。CYP3A4 の酵素誘導の他に、誘導のメカニズムがガン化につながると考えられている CYP1A2 の酵素誘導作用も 50 μM まで確認されず、薬物相互作用に問題ないことが示された。

化合物の遺伝毒性を検出するために多くの手法が考案されており、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA 傷害性などを試験することができる。その中の一つとして最近を用いた遺伝子突然変異試験 (Ames 試験) があり、その簡便さ、ならびに感度と信頼性の高さから、医薬品や化学物質などの安全性試験に適用される国内外のガイドラインにも取り入れられている。三菱化学メディエンス社¹⁶ で 5 菌株を用いた Ames 試験で **73b** は陰性を示し、遺伝毒性の危険性も低いと考えられた。また、急性毒性試験を予測することができる CHO K1 細胞を用いた細胞毒性試験でも、低毒性(CC₅₀: 31 μM)であることが示された。

4-7) 小括

1. 化合物 **26a** のリード最適化において、**hERG** 阻害作用が軽減できる方法論として、小さな構造変換も有効であると考え、第三章での **SAR** 結果を基に検証を行った。
2. 第三章で活性向上に寄与したリンカー3位へのメチル基による置換は活性を維持させながら、**hERG** 阻害作用を軽減させることが分かった。しかし、新たな問題として、脂溶性の向上によると考えられる代謝安定性の増悪が認められた。
3. 化合物 **26a** の代謝を受けると考えられる部位をメチル基、メトキシ基やフルオロ基で置換することにより、代謝安定性の向上を図り、リンカーにフルオロ基を導入した場合には、代謝安定性の改善と活性の向上が確認された。
4. **73b** は最も高活性を示し、6-アミノインダノン骨格を有する化合物群で最も高い活性を示した。
5. **73b** はマウス、ラットともに抗糖尿病作用(**oGTT** 及び **scGTT**)を確認することができ、且つ、胃排出抑制作用や摂餌抑制作用も確認され、体重抑制作用を示す可能性が示唆された。
6. **DPP4** 阻害剤との比較試験を行い、**oGTT** では同等、**scGTT** では強い薬効が示され、**DPP4** 阻害剤よりも空腹時高血糖に対し、強い薬効を示すことができた。
7. 有効薬効濃度と **hERG** 阻害作用との安全域も 300 倍程度あり、セロトニン受容体 **2B** への影響は精査が必要なものの、低血糖リスクを含む、他の安全性項目も問題ないことが確認された。

4-8) 実験の部

4-8-1) Chemistry

Preparation of 3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)butan-1-ol **57a**

To a solution of **49f** (500 mg, 3.18 mmol) and DIPEA (2.77 mL, 15.9 mmol) in 2-propanol (15 mL) was added 2-chloro-5-ethylpyrimidine (906 mg, 6.36 mmol), and the resulting mixture was refluxed for 1 day. The mixture was diluted with EtOAc and satd. NaHCO₃, and the layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 2 : 1) to give **57a** (830 mg, yield 99%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.16 (s, 2H), 4.73-4.78 (m, 2H), 3.62-3.77 (m, 2H), 2.74-2.82 (m, 2H), 2.45 (q, *J* = 16 Hz, 8 Hz, 2H), 1.24-1.53 (m, 8H), 1.18 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H). ESI-MS (*m/e*): 264 [M+H]⁺.

Preparation of 3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)butan-1-ol **57b**

To a solution of **49f** (500 mg, 3.18 mmol) in DCM (10 mL) were added successively a suspension of NaHCO₃ (801 mg, 9.54 mmol) in water (3.0 mL) and a solution of cyanogen bromide (505 mg, 4.77 mmol) in DCM (3.0 mL) 0 °C, and the resulting mixture was stirred at the same temperature for 30 min and then to room temperature overnight. The mixture was poured into satd. NaHCO₃ and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give crude product of a nitrile derivative (600 mg) as a colorless oil, which was used in the next step without further purification.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.27 (s, 2H), 3.61-3.76 (m, 2H), 3.43-3.47 (m, 2H), 2.94-3.02 (m, 2H), 1.26-1.70 (m, 8H), 0.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H). ESI-MS (*m/e*): 183 [M+H]⁺.

Zinc chloride (1.0 M in Et₂O, 3.95 mL, 3.95 mmol) was added over 5 min to a stirred solution of the nitrile derivative obtained above (600 mg) and *N*-hydroxyisobutyramidine (404 mg, 3.95 mmol) in EtOAc (8.0 mL)/THF (7.0 mL). After a 1 day of stirring, the precipitate was filtered and washed with Et₂O (2.0 mL). This precipitate was dissolved in a mixture of EtOH (15 mL) and conc. HCl (2.0 mL), and the solution was stirred at 70 °C for 17 h. The solvent was evaporated and the

residue was dissolved with satd. NaHCO₃ and EtOAc. After phase separation, the aqueous layer was extracted with EtOAc, the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc) to give **57b** (550 mg, yield 65%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.16-4.19 (m, 2H), 3.63-3.77 (m, 2H), 2.95-3.03 (m, 2H), 2.85-2.92 (m, 14H), 1.31-1.73 (m, 8H), 1.29 (d, *J* = 4.0 Hz, 6H), 0.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H). ESI-MS(*m/e*): 268 [M+H]⁺.

Preparation of 3-(2,6-dimethylpiperidin-4-yl)propanol **61a** and **61b**

Benzyl 4-(3-(benzyloxy)propylidene)-2,6-dimethylpiperidine-1-carboxylate **60a** and **b**

To a suspension of 2,6-dimethylpiperidin-4-one **59** (cis trans mixture, 5.1 g, 31.2 mmol) and K₂CO₃ (12.9 g, 93.6 mmol) in DCM (51 mL) and water (51 mL) was added benzylchloroformate (6.95 mL, 46.8 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 1 day. After phase separation, the aqueous layer was extracted with DCM, the combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 4) to give a Cbz-piperidone derivative (7.4 g, yield 91%) as a pale yellow oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.42-7.30 (m, 5H), 5.25-5.10 (m, 2H), 4.91-4.80 (m, 0.7H, trans) 4.53-4.39 (m, 1.3 H, cis trans mixture) 2.86 (dd, *J* = 17.0, 5.6 Hz, 0.7H), 2.73 (dd, *J* = 16.2, 6.0 Hz, 0.3H), 2.39 (dd, *J* = 17.0, 2.2 Hz, 0.7H), 2.30 (dd, *J* = 16.2, 1.8 Hz, 0.3H), 1.38-1.26 (m, 6H). ESI-MS (*m/e*): 262 [M+H]⁺.

To a suspension of (3-benzyloxypropyl)triphenylphosphonium bromide (27.8 g, 56.6 mmol) in THF (140 mL) was added NaH (2.26 g in oil, 56.6 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 10 min. To the mixture was added dropwise a solution of Cbz-piperidone derivative obtained above (7.4 g, 28.3 mmol) in THF (20 mL) and the resulting mixture was refluxed for 12 h. The mixture was quenched with satd. NH₄Cl at 0 °C and poured into water (20 mL) and then extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 4) to give **60a** (trans isomer, (E) and (R) mixture, 4.1 g, yield 37%) as a colorless oil and **60b** (cis isomer, (E) and (R) mixture, 3.3 g, yield 30%) as a colorless oil. **60a** ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.49-7.30 (m, 10H), 5.51-5.43 (m, 1H), 5.25-5.17 (m, 2H), 5.25-5.10 (m, 2H), 4.55-4.48 (m, 3H), 4.25-4.15 (m, 1H), 3.54-3.48 (m, 2H), 2.83 (d, *J* = 14.2 Hz, 0.4H), 2.54 (d, *J* = 13.2 Hz, 0.4H), 2.48-2.28 (m, 3.5H), 2.22-2.17 (m, 1H), 1.95 (d, *J* = 12.0

Hz, 0.7H), 1.39-1.20 (m, 6H). ESI-MS (*m/e*): 394 [M+H]⁺. **60b** ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.48-7.25 (m, 10H), 5.36 (s, 1H), 5.20-5.09 (m, 2H), 4.52-4.48 (m, 2H), 4.26-4.11 (m, 2H), 3.56-3.47 (m, 2H), 2.83 (d, *J* = 13.2 Hz, 0.6H), 2.54 (d, *J* = 13.2 Hz, 0.6H), 2.44-2.28 (m, 4H), 2.12 (d, *J* = 12.0 Hz, 0.8H), 1.19-1.07 (m, 6H). ESI-MS (*m/e*): 394 [M+H]⁺.

Preparation of 3-(2,6-dimethylpiperidin-4-yl)propan-1-ol **61a** and **61b**

Title compound was synthesized from **60a** and **60b** respectively according to step 2 in the general procedure of **49a-d** in chapter 3.

trans-3-(2,6-dimethylpiperidin-4-yl)propan-1-ol **61a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 9.46 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.33 (s, 1H), 3.12 (s, 1H), 1.82-1.72 (m, 2H), 1.62-1.45 (m, 8H), 1.41-1.35 (m, 1H), 1.14 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H). ESI-MS (*m/e*): 172 [M+H]⁺.

3-((*r*-2, *c*-4, *c*-6)-2,6-dimethylpiperidin-4-yl)propan-1-ol **61b**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 9.69 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.10 (s, 2H), 1.84 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 1.64-1.39 (m, 12H). ESI-MS (*m/e*): 172 [M+H]⁺.

Preparation of 3-methoxy-3-(piperidin-4-yl)propanol hydrochloride **64**

tert-butyl 4-(3-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-hydroxypropyl)piperidine-1-carboxylate **63**

To a suspension of LiBH₄ (343 mg, 15.8 mmol) in THF (12 mL) was added a solution of 1-Boc-4-(2-ethoxycarbonyl-acetyl)piperidine **62** (1.18 g, 3.94 mmol) in THF at 0 °C, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The mixture was diluted with water, carefully quenched with 1 N HCl and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (MeOH : CHCl₃ = 1 : 30) to give a diol (638 mg, yield 63%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.14 (s, 2H), 3.92 (s, 1H), 3.88-2.81 (m, 1H), 3.66 (s, 1H), 2.65 (d, *J* = 14.6 Hz, 3H), 2.25 (s, 1H), 1.82-1.78 (m, 1H), 1.75-1.66 (m, 1H), 1.72-1.68 (m, 1H), 1.53-1.44 (m, 11H), 1.28-1.21 (m, 2H): ESI-MS (*m/e*): 260[M+H]⁺.

To a solution of the diol obtained above (3.4 g, 13.1 mmol) and imidazole (1.78 g, 26.2 mmol) was added *tert*-butyldimethylsilyl chloride (2.37 g, 15.7 mmol) at room temperature. After stirring for 1.5 h, the mixture was diluted with water and extracted

with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 3) to give **63** (2.33 g, yield 48%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.12 (s, 2H), 3.94 (td, *J* = 10.1, 4.4 Hz, 1H), 3.87-3.78 (m 1H), 3.65-3.52 (m, 2H), 2.66 (t, *J* = 12.2 Hz, 2H), 1.85 (t, *J* = 13.9 Hz, 1H), 1.64 (td, *J* = 12.7, 7.2 Hz, 2H), 1.52-1.44 (s, 11H), 1.28-1.19 (m, 2H), 0.91 (s, 9H), 0.10 (s, 6H) : ESI-MS (*m/e*): 374 [M+H]⁺.

3-methoxy-3-(piperidin-4-yl)propanol hydrochloride **64**

To a solution of **63** (2.33 g, 6.24 mmol) in DCM (100 mL) was added proton sponge® (8.02 g, 37.4 mmol) and trimethyloxonium tetrafluoroborate (2.77 g, 18.7 mmol) at room temperature. After stirring for 1.5 h, the reaction mixture was quenched with satd. NH₄Cl and the whole was extracted with DCM. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 4) to give a methyl ether (2.21 g, yield 91%) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.12 (s, 2H), 3.70 (dd, *J* = 7.2, 5.4 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.09 (m, 1H) 2.64 (t, *J* = 12.1 Hz, 2H), 1.76-1.55 (m , 5H), 1.45 (s, 9H), 1.32-1.18 (m, 2H), 0.91 (s, 9H), 0.05 (s, 6H) : ESI-MS (*m/e*): 388 [M+H]⁺.

To a solution of the methyl ether obtained above (2.21 g, 5.70 mmol) in THF (58 mL) was added 1 M tetrabutylammonium fluoride in THF solution (28.5 mL, 28.5 mmol) at 0 °C, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc) to give an alcohol (1.33 g, yield 85%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.16 (s, 2H), 3.83-3.74 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.21 (ddd, *J* = 9.0, 5.7, 3.5 Hz, 1H), 2.65 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 1.80-1.57 (m , 5H), 1.46 (s, 9H), 1.33-1.14 (m, 2H): ESI-MS (*m/e*): 274 [M+H]⁺.

A 4 M HCl 1,4-dioxane solution (10 mL) was added to a solution of the alcohol obtained above (1.33 g, 4.87 mmol) in DCM (6.0 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was concentrated in vacuo to give **64** (840 mg, yield 99%) as a colorless solid, which was used in the next step without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.92 (s, 2H), 4.46 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.13 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.52-3.43 (m ,2H), 3.26 (s, 3H), 3.17 (td, *J* = 7.2, 2.2 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 12.2 Hz, 2H), 1.85-1.60 (m ,2H), 1.58-1.36 (m, 3H): ESI-MS (*m/e*): 174 [M+H]⁺.

Preparation of 3-fluoro-3-(piperidin-4-yl)propanol **66**

tert-butyl 4-(3-ethoxy-1-fluoro-3-oxopropyl)piperidine-1-carboxylate **65**

To a solution of 1-Boc-4-(2-Ethoxycarbonyl-acetyl)piperidine **62** (2.99 g, 10 mmol) in EtOH (30 mL) was added portionwise NaBH₄ (416 mg, 11 mmol) at room temperature and then the reaction mixture was stirred for 1 h. The mixture was poured into cold satd. NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated to give a secondary alcohol (3.0 g, yield 99%) as a colorless oil, which was used in the next reaction without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.22-4.05 (m, 4H), 3.80 (s, 1H), 3.04 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 2.66 (t, *J* = 11.8 Hz, 2H), 2.52 (dd, *J* = 16.0, 2.7 Hz, 1H), 2.41 (dd, *J* = 16.0, 9.5 Hz, 1H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.75-1.68 (m, 1H), 1.59-1.47 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.29 (t, *J* = 4.4 Hz, 3H). ESI-MS (*m/e*): 302 [M+H]⁺.

To a solution of the secondary alcohol obtained above (3.0 g, 10 mmol) in DCM (60 mL) was added dropwise Deoxo-Fluor® (3.69 mL, 20 mmol) at -78 °C and the mixture was stirred at same temperature for 3 h. The reaction mixture was carefully poured into satd. NaHCO₃ and the whole was extracted with DCM. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 4) to give **65** (760 mg, yield 25%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.76 (ddd, *J* = 48.0, 8.8, 3.6 Hz, 1H), 4.21-4.10 (m, 4H), 2.72-2.48 (m, 4H), 1.82-1.69 (m, 2H), 1.62-1.53 (m, 1H), 1.35-1.24 (m, 5H). ESI-MS (*m/e*): 304 [M+H]⁺.

3-fluoro-3-(piperidin-4-yl)propanol hydrochloride **66**

To a suspension of LAH (143 mg, 3.75 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added dropwise a solution of **65** (760 mg, 2.5 mmol) in THF (2 mL) at 0 °C, the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h. After cooling to 0 °C, to the reaction mixture was carefully added water (250 μL) and stirred for 30 min. Insoluble materials were filtered off, the residue was washed with EtOAc and the filtrate was concentrated to give an alcohol (650 mg, yield 99%) as a colorless oil, which was used in the next reaction without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.48 (dddd, *J* = 48.6, 8.8, 6.2, 3.8 Hz, 1H), 4.41-4.35 (m, 2H), 3.70 (brs, 2H), 2.72-2.62 (m, 2H), 1.95-1.81 (m, 3H), 1.75-1.62 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.21-1.12 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 262 [M+H]⁺.

A 4 M HCl 1,4-dioxane solution (6.0 mL) was added to a solution of the alcohol obtained above (650 mg, 2.5 mmol) in 1,4-dioxane (6.0 mL) at 0 °C, and the mixture

was stirred for 2 h at 50 °C. The solvent was concentrated in vacuo to give **66** (491 mg, yield 99%) as a colorless solid.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.46 (d, *J* = 48.6 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.64-3.52 (m, 2H), 2.79 (s, 2H), 1.96-1.83 (m, 3H), 1.61-1.51 (m, 2H), 1.39-1.26 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 162 [M+H]⁺.

Preparation of 2-fluoro-3-(piperidin-4-yl)propanol **69**

tert-butyl 4-(3-ethoxy-2-fluoro-3-oxopropyl)piperidine-1-carboxylate **68**

To a solution of triethyl 2-fluoro-2-phosphonoacetate (24.2 g, 100 mmol) was added dropwise 1.6 M *n*-butyl lithium in hexane solution (65.6 mL, 105 mmol) for 20 min at 0 °C and the mixture was stirred at same temperature for 1 h. To the reaction mixture was added dropwise 1-Boc-4-piperidinecarboxyaldehyde **67** (21.3 g, 100 mmol) in THF (100 mL) for 10 min and allowed to warm to room temperature. After stirring for 12 h, the reaction mixture was cooled to 0 °C, quenched with satd. NH₄Cl, diluted with water and extracted with Et₂O. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc : hexane = 1 : 5) to give an α,β-unsaturated ester (24.6 g, yield 82%) as a pale yellow oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 5.72 (dd, *J* = 21.2, 10.1 Hz, 1H), 4.30 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.12 (brs, 2H), 3.32-3.10 (m, 2H), 2.76 (t, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.77-1.65 (m, 2H), 1.53-1.42 (m, 10H), 1.40-1.22 (m, 5H). ESI-MS (*m/e*): 302 [M+H]⁺.

A mixture of the α,β-unsaturated ester obtained above (24.3 g, 80.6 mmol) and 10% Pd/C (2.4 g) in EtOH (240 mL) was stirred under hydrogen atmosphere for 2 days at room temperature. The catalyst was filtered off and rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated to give **68** (24.3 g, yield 99%), which was used in the next reaction without further purification. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.96 (ddd, *J* = 49.4, 9.2, 3.2 Hz, 1H), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.10 (brs, 2H), 2.70 (t, *J* = 12.2 Hz, 2H), 1.96-1.55 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.26-1.05 (m, 2H). ESI-MS (*m/e*): 304 [M+H]⁺.

2-fluoro-3-(piperidin-4-yl)propanol hydrochloride **69**

To a suspension of LAH (4.5 g, 119 mmol) in anhydrous THF (240 mL) was added dropwise a solution of **68** (24.1 mg, 79.4 mmol) in THF (120 mL) at 0 °C, the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 4 h. After cooling to 0 °C, to the reaction mixture was carefully added water (8.5 mL) and stirred for 30 min. Insoluble materials were filtered off, the residue was washed with EtOAc and the filtrate was concentrated to give an alcohol (19.2 g, yield 93%) as a colorless oil.: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.69 (dddd, *J* = 50.2, 12.7, 6.2, 3.2 Hz, 1H), 4.10 (brs, 2H), 3.78-3.58

(m, 2H), 2.72 (t, $J = 12.2$ Hz, 2H), 1.83-1.57 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.37-1.32 (m, 1H), 1.22-1.03 (m, 2H). ESI-MS (m/e): 262 [M+H]⁺.

A solution of the alcohol obtained above (19.2 g, 73.4 mmol) in 4 M HCl 1,4-dioxane solution (220 mL) was stirred at room temperature for 1 h and concentrated in vacuo to give the title compound **69** (14.0 g, yield 96%) as a colorless solid, which was used in the next reaction without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 8.83 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.67-4.46 (m, 1H), 3.53-3.42 (m, 2H), 3.21 (s, 2H), 2.84 (tdd, $J = 15.9, 12.6, 2.9$ Hz, 2H), 1.98-1.66 (m, 3H), 1.64-1.42 (m, 2H), 1.40-1.25 (m, 2H). ESI-MS (m/e): 162 [M+H]⁺.

Preparation of compounds **58a-e**, **70a, b**, **71a, d**, **72a, d** and **73 a, b** and **d**

Corresponding alcohols was prepared from substituted 3-(piperidin-4-yl)propanol **61**, **64**, **66** and **69** according to Method I or II in chapter 2, and was converted to corresponding aldehydes using the synthetic method III in chapter 2. **58a-e**, **70a, b**, **71a, d**, **72a, d** and **73 a, b** and **d** were prepared by reductive amination from 6-aminoindan-1-one and corresponding aldehydes mentioned in chapter 2 (Method IV).

6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)butyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **58a**

¹H NMR (CDCl₃) δ : 8.16 (s, 2H), 7.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.91-6.86 (m, 2H), 4.76 (dd, $J = 11.1, 2.2$ Hz, 2H), 3.69 (s, 1H), 3.26-3.05 (m, 2H), 3.01 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 2.79 (ddd, $J = 11.1, 5.3, 2.2$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J = 5.3$, 2H), 2.45 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.81-1.63 (m, 3H), 1.57-1.40 (m, 3H), 1.37-1.21 (m, 2H), 1.18 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 0.93 (d $J = 6.4$, 3H). HRMS ESI calcd for C₂₄H₃₂N₄O 393.2649, found 393.2681.

6-((3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)butyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **58b**

¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.25 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.91-6.86 (m, 2H), 4.18 (dd, $J = 13.4, 2.0$ Hz, 2H), 3.70 (s, 1H), 3.27-3.05 (m, 2H), 3.05-2.68 (m, 4H), 2.88 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.68 (dd, $J = 6.4, 4.9$ Hz, 2H), 1.79-1.65 (m, 3H), 1.65-1.31 (m, 5H), 1.28 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H), 0.94 (d $J = 6.7$, 3H). HRMS ESI calcd for C₂₃H₃₂N₄O₂ 397.2598, found 397.2597.

tert-butyl 4-(4-((3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl)amino)butan-2-yl)piperidine-1-carboxylate **58c**

¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.25 (d, $J = 8.8$, 1H), 6.89-6.86 (m, 2H), 4.14 (brs, 2H), 3.18 (ddd, $J = 11.7, 7.0, 4.8$, 1H), 3.12-3.07 (m, H), 3.01 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J = 5.1$ Hz,

2H), 2.64 (brs, 2H), 1.74-1.68 (m, 1H), 1.62-1.55 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.41-1.17 (m, 4H), 0.91 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H). HRMS ESI calcd for $C_{23}H_{34}N_2O_3$ 387.2642, found 287.2122 (deBoc fragment).

6-((3-(1-(5-fluoropyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)butyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **58d**

1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.17 (d, $J = 0.5$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.91-6.86 (m, 2H), 4.75-4.59 (m, 2H), 3.73 (brs, 1H), 3.21 (ddd, $J = 11.6, 9.1, 5.1$ Hz, 1H), 3.10 (ddd, $J = 11.6, 8.6, 6.5$ Hz, 1H), 3.04-2.98 (m, 2H), 2.80 (tdd, $J = 12.8, 4.4, 2.7$ Hz, 2H), 2.70-2.64 (m, 2H), 1.80-1.61 (m, 3H), 1.56-1.40 (m, 3H), 1.36-1.18 (m, 2H), 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H). HRMS ESI calcd for $C_{22}H_{27}FN_4O$ 383.2241, found 383.2244.

6-((3-(1-(5-trifluoromethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)butyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **58e**

1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.45 (d, $J = 0.7$ Hz, 2H), 7.28-7.21 (m, 1H), 6.91-6.86 (m, 2H), 4.94-4.85 (m, 2H), 3.71 (brs, 1H), 3.21 (ddd, $J = 11.8, 9.1, 5.2$ Hz, 1H), 3.11 (ddd, $J = 11.8, 8.6, 6.5$ Hz, 1H), 3.04-2.98 (m, 2H), 2.92-2.79 (m, 2H), 2.70-2.64 (m, 2H), 1.79-1.67 (m, 3H), 1.64-1.39 (m, 3H), 1.38-1.17 (m, 2H), 0.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H). HRMS ESI calcd for $C_{23}H_{27}F_3N_4O$ 433.2209, found 433.2211.

trans-6-((3-((1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)-2,6-dimethylpiperidin-4-yl)propyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **70a**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 8.20 (s, 2H), 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.93-6.88 (m, 2H), 4.59-4.52 (m, 1H), 4.31-4.25 (m, 1H), 3.89 (brs, 1H), 3.16 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.03-2.99 (m, 2H), 2.67 (dd, $J = 6.6, 4.9$ Hz, 2H), 2.45 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.12-2.06 (m, 1H), 1.96-1.91 (m, 1H), 1.88-1.79 (m, 2H), 1.72-1.66 (m, 2H), 1.53-1.47 (m, 2H), 1.42 (td, $J = 11.2, 3.6$ Hz, 1H), 1.31 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.26-1.18 (m, 6H). HRMS ESI calcd for $C_{25}H_{34}N_4O$ 407.2805, found 407.2800.

6-((3-((*r*-2,*c*-4,*c*-6)-1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)-2,6-dimethylpiperidin-4-yl)propyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **70b**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 8.19 (s, 2H), 7.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.91-6.87 (m, 2H), 4.89 (quin, $J = 6.2$ Hz, 1H), 3.91 (brs, 1H), 3.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.03-2.99 (m, 2H), 2.70-2.68 (m, 2H), 2.45 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.98-1.93 (m, 1H), 1.74-1.69 (m, 3H), 1.39-1.28 (m, 4H), 1.21-1.13 (m, 9H). HRMS ESI calcd for $C_{25}H_{34}N_4O$ 407.2805, found 407.2797.

6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-3-methoxypropyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **71a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.16 (s, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.91-6.86 (m, 2H), 4.82-4.73 (m, 2H), 4.13 (brs, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.30-3.21 (m, 2H), 3.12 (ddd, *J* = 8.6, 5.8, 3.2 Hz, 1H), 3.06-2.97 (m, 2H), 2.87-2.74 (m, 2H), 2.70-2.64 (m, 2H), 2.45 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.92-1.76 (m, 3H), 1.74-1.67 (m, 2H), 1.37-1.27 (m, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H): HRMS ESI calcd for C₂₄H₃₂N₄O₂ 409.2598, found 409.2603.

6-((3-(1-(5-fluoropyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-3-methoxypropyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **71d**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.17 (s, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.91-6.86 (m, 2H), 4.78-4.69 (m, 2H), 4.13 (brs, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.30-3.21 (m, 2H), 3.16-3.09 (m, 1H), 3.05-2.98 (m, 2H), 2.87-2.75 (m, 2H), 2.71-2.64 (m, 2H), 1.92-1.78 (m, 3H), 1.76-1.66 (m, 2H), 1.37-1.22 (m, 2H): HRMS ESI calcd for C₂₂H₂₇N₄O₂ 399.2191, found 399.2188.

6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-3-fluoropropyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **72a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.16 (s, 2H), 7.26-7.5 (m, 1H), 6.93-6.89 (m, 2H), 4.82-4.71 (m, 2H), 4.56-4.30 (m, 1H), 4.07 (brs, 1H), 3.36 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.09-2.97 (m, 2H), 2.83 (tdd, *J* = 12.9, 5.8, 2.8 Hz, 2H), 2.74-2.59 (m, 2H), 2.04-1.87 (m, 3H), 1.87-1.75 (m, 1H), 1.67 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 1.36 (dddd, *J* = 16.8, 12.6, 8.5, 4.4 Hz, 2H). HRMS ESI calcd for C₂₃H₂₉FN₄O 397.2398, found 397.2401.

6-((3-(1-(5-fluoropyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-3-fluoropropyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **72d**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.18 (s, 2H), 7.27-7.25 (m, 1H), 6.98-6.87 (m, 2H), 4.97-4.74 (m, 1H), 4.66 (dd, *J* = 12.6, 2.8 Hz, 2H), 4.13 (brs, 1H), 3.42-3.28 (m, 2H), 3.08-2.97 (m, 2H), 2.94-2.80 (m, 2H), 2.75-2.61 (m, 2H), 1.91-1.71 (m, 4H), 1.47 (dddd, *J* = 21.9, 14.5, 8.4, 2.9 Hz, 2H), 1.35-1.09 (m, 2H). HRMS ESI calcd for C₂₁H₂₄F₂N₄O 387.1991, found 387.1996.

6-((3-(1-(5-ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-2-fluoropropyl)amino)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **73a**

¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.16 (s, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.93 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.00-4.76 (m, 1H), 4.76-4.65 (m, 2H), 4.12 (brs, 1H), 3.43-3.28 (m, 2H), 3.08-2.96 (m, 2H), 2.94-2.81 (m, 2H), 2.76-2.64 (m, 2H), 2.45 (q, *J*

= 7.6 Hz, 2H), 1.91-1.72 (m, 4H), 1.58-1.37 (m, 1H), 1.28 (ddd, $J = 22.4, 15.1, 8.0$ Hz, 2H), 1.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). HRMS ESI calcd for $C_{23}H_{29}FN_4O$ 397.2398, found 397.2405.

6-((2-fluoro-3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one **73b**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 7.27 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 8.1, 2.4$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.84 (dddd, $J = 50.4, 10.5, 6.9, 2.9$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J = 12.6, 2.0$ Hz, 3H), 3.46-3.21 (m, 2H), 3.07 (ddd, $J = 12.6, 3.9, 2.9$ Hz, 2H), 3.02 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.88 (sep, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.68 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 1.94-1.68 (m, 4H), 1.61-1.20 (m, 9H). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 207.4, 175.7, 170.8, 147.2, 145.5, 138.1, 127.16, 122.5, 104.2, 90.4 (d, $J = 169.9$ Hz), 48.4 (d, $J = 21.2$ Hz), 46.1, 46.0, 3.92 (d, $J = 20.1$ Hz), 36.9, 31.94, 31.92, 30.94, 27.0, 24.9, 20.4. HRMS Calcd for $C_{20}H_{29}FN_4O_2$ 401.2347; Found, 401.2352. mp 88–90°C. IR (KBr) 3402, 2926, 1699, 1598, 1505, 1406, 1263, 837 cm^{-1} .

6-((3-(1-(5-fluoropyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-2-fluoropropyl)amino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one **73d**

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 8.17 (s, 2H), 7.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.98-6.87 (m, 2H), 4.97-4.74 (m, 1H), 4.66 (dd, $J = 12.6, 2.8$ Hz, 2H), 4.13 (brs, 1H), 3.42-3.28 (m, 2H), 3.08-2.97 (m, 2H), 2.94-2.80 (m, 2H), 2.75-2.61 (m, 2H), 1.91-1.71 (m, 4H), 1.47 (dddd, $J = 21.9, 14.5, 8.4, 2.9$ Hz, 2H), 1.35-1.09 (m, 2H). HRMS ESI calcd for $C_{21}H_{24}F_2N_4O$ 387.1991, found 387.1997.

4-8-2) Biology

Assessment of hepatic microsomal metabolism

Metabolic stability was calculated from substrate disappearance rate in human liver microsomes as L/h/kg body weight. The assay was carried out by incubation of 5 μM test compound with human liver microsomes (Xenotech, Lenexa, KS, U.S.A.), NADPH and buffer at 37°C for 30 min and measurement of percent compound remaining by precipitation method followed by LC-MS-MS analysis.

Assessment of hypoglycemia risk

Male 8-week-old Wistar/ST rats (Japan SLC) were used. Compounds were administered orally at time 0 min to overnight-fasted animals ($n=8$ /group). The plasma glucose levels

were measured using a portable glucometer (GLUTEST Pro R; Sanwa Kagaku Kenkyusho, Japan).

Food Intake

Male 8-week-old C57BL/6J mice (Charles River Japan) were used. Mice were housed in a SPF facility with controlled light cycle (7:00-19:00 on) and were given standard chow (CRF-1; Charles River Japan) and water ad libitum. The vehicle (3%DMSO/15%PEG/15%HP β CD) or test compounds were administered orally, and the diet was exchanged for 45% kcal high fat diet (D14251; Research Diet Inc., NJ) between 19:00 and 8:30. The diet weight before and after a feed was measured. All the mice were administered the vehicle two days before the experiment, and the food intake was measured in the similar way.

4-9) 参考文献

1. Medicinal chemistry of hERG optimizations: Highlights and hang-ups.
Jamieson C, Moir EM, Rankovic Z, Wishart G.
J Med Chem. **2006**, 49(17), 5029-5046.
2. Structural pairwise comparisons of HLM stability of phenyl derivatives: Introduction of the Pfizer metabolism index (PMI) and metabolism-lipophilicity efficiency (MLE).
Lewis ML, Cucurull-Sanchez L.
J Comput Aided Mol Des. **2009**, 23(2), 97-103.
3. Discovery of 2-chloro-N-((4,4-difluoro-1-hydroxycyclohexyl)methyl)-5-(5-fluoro pyrimidin-2-yl)benzamide as a potent and CNS penetrable P2X7 receptor antagonist.
Chen X, Pierce B, Naing W, Grapperhaus ML, Phillion DP.
Bioorg Med Chem Lett. **2010**, 20(10), 3107-3111.
4. 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として 第2版, 加藤 隆一, 鎌滝 哲也編, **2000**, 東京化学同人.
5. Identification and hit-to-lead exploration of a novel series of histamine H4 receptor inverse agonists.
Cramp S, Dyke HJ, Higgs C, Clark DE, Gill M, Savy P, Jennings N, Price S, Lockey PM, Norman D, Porres S, Wilson F, Jones A, Ramsden N, Mangano R, Leggate D, Andersson M, Hale R.
Bioorg Med Chem Lett. **2010**, 20(8), 2516-2519.
6. Discovery of cyclic guanidines as potent, orally active, human glucagon receptor antagonists.
Sinz C, Chang J, Lins AR, Brady E, Candelore M, Dallas-Yang Q, Ding V, Jiang G, Lin Z, Mock S, Qureshi S, Salituro G, Saperstein R, Shang J, Szalkowski D, Tota L, Vincent S, Wright M, Xu S, Yang X, Zhang B, Tata J, Kim R, Parmee E.
Bioorg Med Chem Lett. **2011**, 21(23), 7131-7136.
7. Fluorine in medicinal chemistry.
Böhm HJ, Banner D, Bendels S, Kansy M, Kuhn B, Müller K, Obst-Sander U, Stahl M.
Chembiochem. **2004**, 5(5), 637-643.
8. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis.
Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC.
BMJ. **2007**, 335(7631), 1194-1199.

9. ジャヌビア®錠インタビューフォーム.
10. アマリール®錠インタビューフォーム.
11. スターシス®錠インタビューフォーム.
12. 株式会社薬物安全性試験センター, <http://www.dstc.jp/index.html>
13. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development.
Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG.
Cardiovasc Res. **2003**, 58(1), 32-45.
14. Multispan, Inc., <http://www.multispaninc.com/>
15. Ricerca Biosciences, <http://www.ricerca.com/default.asp>
16. 三菱化学メディエンス株式会社, <http://www.medience.co.jp/index.html>

第五章 結論

肥満は糖尿病の発症原因の一つであり、インスリン抵抗性や膵 β 細胞の機能減弱を引き起こすことが知られている。糖尿病治療薬は数多く開発されているが、その一部は体重増加作用があるとされ、厳密な体重管理が必要な例もあった。近年、GLP-1 に関連する経口薬として、DPP4 阻害剤が上市された。糖濃度依存的なインスリン分泌により血糖をコントロールできる薬剤として、多くの初期患者に処方されている一方、肥満患者やインスリン抵抗性患者では無効例も報告されている。GPR119 アゴニストは、DPP4 阻害剤と同様に GLP-1 に関連するターゲットであり、GLP-1 とインスリンの両方の分泌を促進することから、インスリンによる直接的な血糖コントロールと体重抑制作用も期待でき、DPP4 阻害剤と同等以上の血糖降下作用を示すと考え、本研究に着手した。

近年、GPR119 アゴニストの報告数は増えており、多くの製薬企業で開発が行われている。そこで、私は新規な GPR119 アゴニストを見出すため、自社化合物ライブラリを用いた HTS を行い、化合物 **1** を見出すことができた。この化合物 **1** はビシクロ環(A 環)、鎖状リンカー及び Boc-ピペリジン(B 環)により構成されている報告例のない新規な化合物であり、化合物 **1** をヒット化合物として、A 環、リンカー及び B 環の構造活性相関研究を開始した。

リンカーの結合様式をアミド結合からアミノメチレンに変換した場合に 10 倍の活性向上が見られ(**1** vs **4a**)、アミノ基をエーテル構造に変換した場合に活性が低下したことから(**4c** vs **4f**)、アミノ基が活性発現に重要な役割をしていることが示唆された。ビシクロ環のスルホニル基は他社化合物にも良く用いられているモチーフであり、その電子求引性及び水素結合受容体の効果が重要であると考えられ、このスルホニル基の等価体変換を行った。スルホニル基をケトンに置換した場合にのみ活性の向上が認められ、特に 6-アミノベンゾフラン-3-オン体 **11f** や 6-アミノインダン-1-オン体 **11i** が高活性を示した。この 2 つの化合物のように、ビシクロ環とリンカーの結合位置を変換しても、活性が維持または向上していた。水素結合受容体の向きに活性が依存しておらず、水素結合による効果は不明だが、電子求引性基として機能は活性に影響していると考えられた。これら 2 つの化合物を基に、Boc 基をより安定なカーバメート等価体に変換した結果、5-エチルピリミジン(**25a**, **26a**, **27a**)や 3-イソプロピル-1,2,4-オキサジアゾール(**25d**, **26d**, **27d**)が良好に機能することが分かった。ここまでの検討で高活性を示した化合物の oGTT を評価したところ、**26a** が高い効果を示した。この **26a** は用量依存的な血糖上昇抑制作用を示し、scGTT での効果も確認でき、空腹時高血糖の是正効果を持っていることが分かった。そのため、この **26a** をリード化合物とし、更なる検討を行った。

26a のプロファイリングを行った結果、弱いながらも hERG 阻害作用があり、さらにリード周辺化合物ではその作用が強いものもあり、この骨格は hERG 阻害作用を呈しやすいことが示唆された。そこで、主活性と hERG 阻害作用との安全域を確保する必要があり、そのためには、hERG 阻害作用を十分に下げるか、hERG 阻害作用を低い状態で維持しながら GPR119 アゴニスト活性を向上させる必要があった。hERG 阻害回避のストラテジーの中から、塩基性の調整がこのシリーズの化合物に最も適していると予測し、分子量や構造に影響なく塩基性を調整できる方法として、ビシクロ環内のベンゼン環のヘテロ環への置換を試みた。その結果、6-アミノフロ[3,2-*c*]ピリジン-3(2*H*)-オンで hERG 阻害作用を完全に抑え、活性の向上も認められた。様々なビシクロ環の静電ポテンシャルの分布から、ケトンのアクセプターとしての機能と芳香環の電子密度の低下が活性の向上につながったと推測している。さらにリンカーのメチル基による修飾により最も活性の高い **55f** を見出した。しかし、この **55f** を初めとする A 環がヘテロビシクロ環である化合物群では、*in vitro* 活性が非常に高いにもかかわらず、oGTT での有意な効果が確認できず、*in vitro* 活性と *in vivo* 活性の間に乖離が認められた。

そこで、*in vivo* 活性の確認できている **26a** の有する 6-アミノインダン-1-オンを A 環として用い、これまでの知見を基に再度リード最適化を行った。A 環が 6-アミノフロ[3,2-*c*]ピリジン-3(2*H*)-オンの場合に活性向上したリンカーのメチル基による置換は活性を維持したものの、代謝安定性の悪化が認められた。そこで、代謝予想部位に置換基の導入することにより、代謝安定性の改善を試みた。その結果、リンカーへのフルオロ基の導入が活性を維持向上させることが分かり、代謝安定性もメチル体に対し改善していた。フルオロ基はそれ自身が代謝を受けにくい置換基であり、さらにリンカーへのフルオロ基の導入は構造上の特性として、cLogP を低下させており、このことで分子全体の脂溶性も下がっており、代謝安定性が改善したと考えられる。特に、リンカー 2 位をフルオロ基で置換した **73b** が 6-アミノインダン-1-オンを有する化合物群で最も高活性を示した。

高活性を示した化合物の *in vivo* 試験を行い、**73b** が最も高い効果を示し、oGTT や scGTT でも高活性を示した。また、胃排出抑制作用や摂餌抑制作用も認められ、この化合物が体重増加抑制作用を有する可能性を示すことができた。さらに、DPP4 阻害剤との比較試験においても、oGTT で同等の血糖上昇抑制作用を示し、scGTT では DPP4 阻害剤以上の薬効を示しており、**73b** は空腹時高血糖には DPP4 阻害剤よりも高い薬効示すことが分かった。懸念されていた hERG チャネル阻害作用と GPR119 アゴニスト活性の安全域は、**73b** の hERG 阻害活性は低い状態で維持しながら、GPR119 アゴニスト活性はリード化合物 **26a** よりも活性

が向上することができており、**26a** に比べ広がっていると考えられた。パッチクランプ試験での IC₅₀ 値と有効血中フリー体濃度の間に約 300 倍の差があり、十分な安全域が確認できた。また、セロトニン 2B を除くその他のレセプターやイオンチャネルなどへの作用もないことが確認でき、高い薬効を有し、安全な GPR119 アゴニストを創製することができた。

以上、HTS ヒット化合物 **1** からの合成展開により、食後過血糖及び空腹時高血糖を是正でき、且つ、体重抑制作用を示す可能性を持つ **73b** を見出すことができた。この化合物やこの研究で得られた高活性化合物が、糖尿病治療薬や他の GPR119 アゴニストの研究用ツールとして活用されることを期待している。

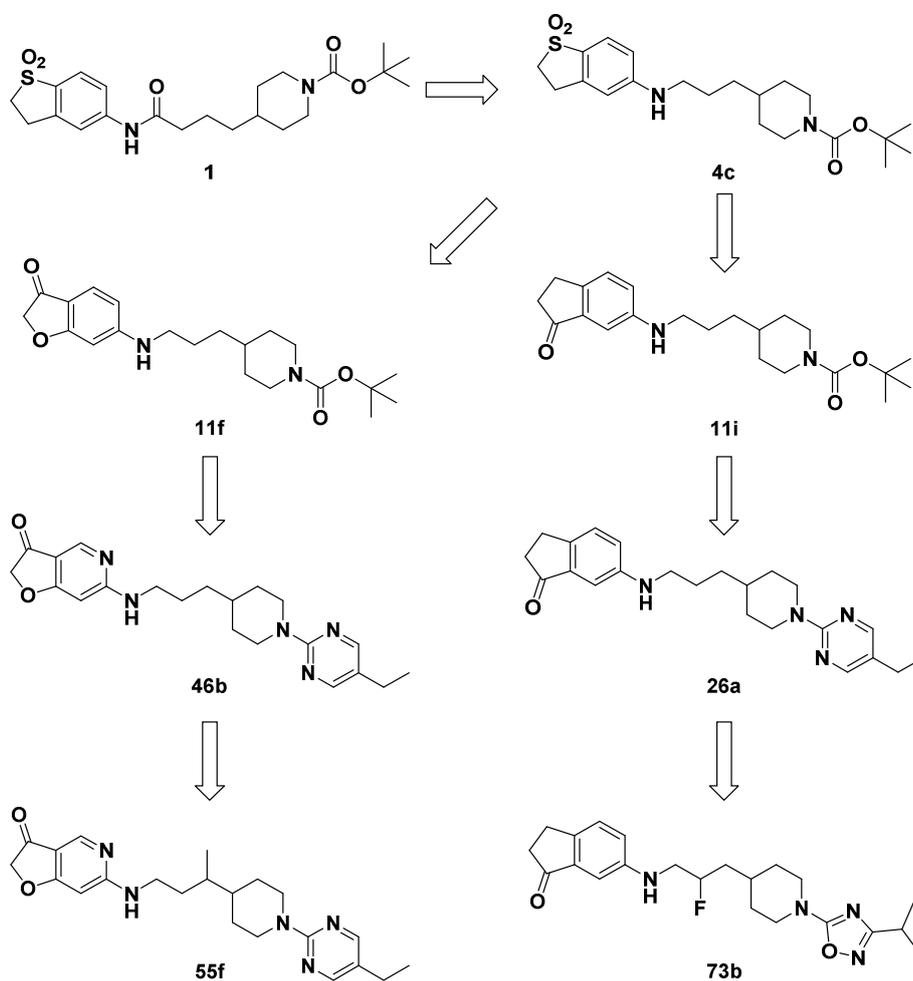


図 5-1 : 活性化化合物獲得のまとめ

謝辞

本研究を学位論文にまとめるに当たり、多くのご支援とご指導を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成学科 垣内 喜代三 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の審査をお引き受けいただき、多くの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 物質創成学科 本田 崇宏 客員教授、廣田 俊 教授、谷本 裕樹 助教に深く感謝いたします。

本研究の開始にあたりご尽力いただきました株式会社三和化学研究所 常務執行役員企画部門担当兼経営戦略企画部長 野田 倫 様、同執行役員医薬開発センター長 城森 孝仁 様、同研究開発企画部長 武田 基宏 様に深く感謝いたします。

本論文作成の機会を与えていただきました株式会社三和化学研究所 取締役常務執行役員 熊谷 良洋 様、同探索研究所長 渡邊 信英 様、同探索研究所合成グループ長 加藤 憲泰 様に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者である株式会社三和化学研究所 鳥居 雅史 氏、小上将和 氏、片岡 浩代 氏、久野 祐花 氏、大澤 靖 氏、藤枝 広樹 氏、元株式会社三和化学研究所 山田 由里枝 氏に深く感謝いたします。

本研究の *in vitro* 評価並びに *in vivo* 評価を実施していただきました株式会社三和化学研究所 牧野 充弘 氏、片岡 大輔 氏、宮澤 俊行 氏、井上 めぐみ 氏、高橋 直希 氏、原田 聡子 氏、元株式会社三和化学研究所 岡本 隆司 氏、岡部 守男 氏に深く感謝いたします。

本研究におけるサンプルの純度、HRMS 測定をしていただきました株式会社三和化学研究所 村瀬 貴代 氏、物性パラメータ計算のご指導及び静電ポテンシャルの計算をしたいただきました株式会社三和化学研究所 村上 聖 氏に深く感謝いたします。

本論文の作成に当たり、終始温かく見守ってくれた家族に感謝します。

研究業績リスト

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題目、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

- 1) Synthesis and SAR studies of bicyclic amine series GPR119 agonists.
Sakairi M, Kogami M, Torii M, Kataoka H, Fujieda H, Makino M, Kataoka D, Okamoto R, Miyazawa T, Okabe M, Inoue M, Takahashi N, Harada S, Watanabe N.
Bioorg. Med. Chem. Lett. **2012**; 22(15): 5123-8.
- 2) Synthesis and pharmacological profile of a new selective G protein-coupled receptor 119 agonist; 6-((2-fluoro-3-(1-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-4-yl)propyl)amino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one.
Sakairi M, Kogami M, Torii M, Makino M, Kataoka D, Okamoto R, Miyazawa T, Inoue M, Takahashi N, Harada S, Watanabe N.
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **2012**; 60(9): 1093-5.
- 3) Synthesis and Biological Evaluation of a 6-Aminofuro[3,2-c]pyridin-3(2H)-one Series of GPR 119 Agonists.
Sakairi M, Kogami M, Torii M, Kuno Y, Ohsawa Y, Makino M, Kataoka D, Okamoto R, Miyazawa T, Inoue M, Takahashi N, Harada S, Watanabe N.
Arzneimittelforschung **2012**, 62(11): 537-44.

参考論文

(題目、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

- 1) Preparation of a novel, camphor-derived sulfide and its evaluation as a chiral auxiliary mediator in asymmetric epoxidation via the Corey–Chaykovsky reaction.
Saito T, Akiba D, **Sakairi M**, Kanazawa S.
Tetrahedron Lett. **2001**; 42 (1): 57-9.
- 2) Enantioselective synthesis of aziridines from imines and alkyl halides using a camphor-derived chiral sulfide mediator via the imino Corey–Chaykovsky reaction.
Saito T, **Sakairi M**, Akiba D.
Tetrahedron Lett. **2001**; 42 (32): 5451-4.
- 3) Chiral sulfide-mediated enantioselective epoxidation of aldehydes.
Saito T, Akiba D, **Sakairi M**, Ishikawa K, Otani T.

ARKIVOC **2004** (ii): 152-171.

- 4) Synthesis and pharmacological characterization of potent, selective, and orally bioavailable isoindoline class dipeptidyl peptidase IV inhibitors.

Kato N, Oka M, Murase T, Yoshida M, **Sakairi M**, Yakufu M, Yamashita S, Yasuda Y, Yoshikawa A, Hayashi Y, Shirai M, Mizuno Y, Takeuchi M, Makino M, Takeda M, Kakigami T.

Org. Med. Chem. Lett. **2011**; *1*(1): 7.

- 5) Discovery and pharmacological characterization of N-[2-({2-[(2S)-2-cyanopyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-2-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide hydrochloride (anagliptin hydrochloride salt) as a potent and selective DPP-IV inhibitor.

Kato N, Oka M, Murase T, Yoshida M, **Sakairi M**, Yamashita S, Yasuda Y, Yoshikawa A, Hayashi Y, Makino M, Takeda M, Mirenscha Y, Kakigami T.

Bioorg. Med. Chem. **2011**; *19*(23): 7221-7.

学会発表

- 1) 「キラルスルフィドを用いた不斉エポキシ化反応、アジリジネーション及びシクロプロパネーション」、**坂入将夫**、金澤信太郎、佐久間智子、齊藤隆夫、日本化学会第 79 春季年会、2001 年 3 月。
- 2) 「キラルスルフィドを用いた不斉エポキシ化反応及びアジリジネーション」、**坂入将夫**、石川健、大谷卓、齊藤隆夫、日本化学会第 81 春季年会、2002 年 3 月。
- 3) “Novel Glucokinase Activator (SKL-19014); in vitro and in vivo Properties,” Yamashita T, Takahashi N, Miyoshi M, Iwai H, Kinoshita H, Makino M, Kataoka D, Kogami M, **Sakairi M**, Watanabe N, 70th scientific sessions American Diabetes Association, (631-P), 2010 年 6 月。

特許

- 1) 「ジペプチジルペプチダーゼIVを阻害する化合物」、出願人：株式会社三和化学研究所、発明者：垣上卓司、岡みつる、加藤憲泰、吉田雅宏、白井真宏、村瀬徹、**坂入将夫**、山本貴代、竹内光明、林祐二、武田基宏、牧野充弘、出願番号：特願 2005-504761、出願日：2004 年 1 月 30 日、特許第 4184378 号、登録日 2008 年 9 月 12 日。
- 2) 「新規化合物及びその医薬用途」、出願人：株式会社三和化学研究所、発明者：

吉田雅宏、**坂入将夫**、鏝本義治、中村敬志、水野幸恵、垣上卓司、出願番号：特願 2008-144258、出願日：2008 年 6 月 2 日、特開 2011-184298、公開日：2011 年 9 月 22 日。

- 3) 「新規チオフェンカルボキサミド誘導体及びその医薬用途」、出願人：株式会社三和化学研究所、発明者：山下篤行、近松香里、高橋直希、岩井久和、小上将和、**坂入将夫**、渡邊信英、藤枝広樹、片岡大輔、牧野充弘、加藤憲泰、宮澤俊行、長井和包、春日井宣慶、片岡浩代、平松尚樹、鶴田亘昭、近藤由里枝、三好美佳、村上聖、後藤いずみ、井土徹、鈴木君枝、原田聡子、ランク マルティン、ザイフェルト ハンスーユルゲン マルクス、ボルフ カーリナ クリスティーナ、出願番号：特願 2009-152741、出願日：2009 年 6 月 26 日、特開 2011-6366、公開日：2011 年 1 月 13 日。
- 4) 「新規チオフェンカルボキサミド誘導体及びその医薬用途」、出願人：株式会社三和化学研究所、発明者：春日井宣慶、井土徹、岩井久和、片岡大輔、片岡浩代、加藤憲泰、久野祐花、小上将和、後藤いずみ、近藤由里枝、**坂入将夫**、鈴木君枝、高橋直希、近松香里、鶴田亘昭、長井和包、原田聡子、平松尚樹、藤枝広樹、牧野充弘、宮澤俊行、三好美佳、村上聖、山下篤行、渡邊信英、ランク マルティン、ザイフェルト ハンスーユルゲン マルクス、ボルフ カーリナ クリスティーナ、出願番号：特願 2010-141162、出願日：2010 年 6 月 22 日、特開 2013-212994、公開日：2013 年 10 月 17 日。