

ピペリジン骨格を有する新規レニン阻害剤の創製研究

2015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

森 裕

目次

略語表	・・・3
第一章 緒言	
1-1 高血圧	・・・6
1-2 レニン-アンジオテンシン系	・・・6
1-3 レニン阻害剤	・・・9
1-4 本研究の目的	・・・14
1-5 参考文献	・・・16
第二章 ピペリジン骨格を有する新規レニン阻害剤の探索	
2-1 序論	・・・19
2-2 新規 3,5-二置換ピペリジン誘導体の探索	・・・21
2-3 P ₁ '部位を有する高活性化合物の獲得	・・・24
2-4 P ₂ '部位の構造変換	・・・27
2-5 ラット <i>in vivo</i> 評価	・・・29
2-6 3,5-二置換ピペリジン誘導体の合成	・・・30
2-7 小括	・・・35
2-8 実験の部	・・・36
2-9 参考文献	・・・56
第三章 カニクイサルで薬効を示す 3,5-二置換ピペリジン誘導体の探索	
3-1 序論	・・・58
3-2 血中薬物濃度改善の検討	・・・58
3-3 CYP3A4 および hERG 電流阻害低減の検討	・・・62
3-4 P ₃ 部位の構造最適化	・・・64
3-5 有望化合物の各種 <i>in vitro</i> 評価	・・・65
3-6 ラット、カニクイサル <i>in vivo</i> 評価	・・・67
3-7 P ₁ ', P ₂ ', P ₃ 変換体の合成	・・・69
3-8 小括	・・・72
3-9 実験の部	・・・73
3-10 参考文献	・・・88
第四章 P ₁ 部位の構造変換	
4-1 序論	・・・90
4-2 P ₁ 部位変換のデザイン	・・・90

4-3 炭素置換体の合成検討	・ ・ ・ 91
4-4 炭素置換体の <i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> 評価	・ ・ ・ 95
4-5 小括	・ ・ ・ 97
4-6 実験の部	・ ・ ・ 98
4-7 参考文献	・ ・ ・ 105
第五章 総括	・ ・ ・ 106
謝辞	・ ・ ・ 109
研究業績リスト	・ ・ ・ 110

略語表

Chemistry

Ac	acetyl
Aq	aqueous
Arg	arginine
Asp	aspartic acid
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BOP	benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium
Bu	butyl
Cbz	benzyloxycarbonyl
DABCYL	4-[4-(Dimethylamino)phenylazo]benzoic Acid
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
(DHQ) ₂ AQN	hydroquinine anthraquinone-1,4-diyl diether
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
dr	diastereomer ratio
E-DANS	5-(2-aminoethylamino)naphthalene-1-sulfonic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ee	enantiomeric excess
Et	ethyl
Glu	glutamic acid
h	hour
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
His	histidine
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
<i>i</i> -	<i>iso</i> -
Ile	isoleucine
KHMDS	potassium hexamethyldisilazide
Leu	leucine
Lys	lysine
MC	methylcellulose

Me	methyl
min	minute
NCS	<i>N</i> -chlorosuccinimide
Ns	2-nitrobenzenesulfonyl
Ph	phenyl
Phe	phenylalanine
Pro	proline
Py	pyridine, pyridyl
quant	quantitative
rt	room temperature
sec	second
<i>t</i> -	<i>tert</i> -
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
Teoc	trimethylsilylethoxycarbonyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
Trp	tryptophan
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tyr	tyrosine
Val	valine

Biology

ACE	angiotensin converting enzyme
Ang	angiotensin
ARB	angiotensin II receptor blocker
AUC	area under the curve
AT	angiotensin II receptor type
dTG	double transgenic
CL	clearance
C _{max}	max value of concentration
CYP	cytochrome P450
hERG	human ether-a-go-go related gene
HTS	high throughput screening
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration

iv	intravenous
MAP	mean arterial pressure
NT	not tested
P_{app}	apparent permeability coefficient
PK	pharmacokinetic
po	per os
PRA	plasma renin activity
RA	renin-angiotensin
RIA	radioimmunoassay
SD	Sprague Dawley
sp	sub pocket
V_{ss}	volume of distribution at steady state

Analysis

ATR	attenuated total reflection
ESI	electrospray ionization
FT	fourier transform
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
IR	infrared spectroscopy
LC	liquid chromatography
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
Tof	time of flight
UPLC	ultra performance liquid chromatography

第一章 緒言

1-1) 高血圧

高血圧とは、収縮期血圧または拡張期血圧が高い状態を示す。慢性心不全、腎不全を含む心血管系疾患や心筋梗塞を引き起こす主要因であり、先進国における主な死亡原因の1つである¹。アメリカでは、2002年に年間およそ27.7万人の高血圧による死亡が報告されており²、日本でも高血圧による過剰死亡数が2007年に10.4万人と報告されている³。患者数は現在も増加しており、2025年までに世界中で15億人以上に達すると見られている¹。

高血圧の治療は、各団体が示すガイドラインに従って行われる。ガイドラインは各国の実情や各団体の治療方針、新規薬剤の開発状況によって異なっており、降圧目標値や第一選択薬、治療手順に違いが見られる。ガイドラインは大規模臨床試験の結果や社会情勢に伴い一定期間毎に変更される。2014年に日本でもガイドラインが改定され、日本高血圧学会よりJSH2014が示された⁴。JSH2014は、脳卒中が心筋梗塞より多いという日本の実情に即したガイドラインとなっている。

ガイドライン毎に細かな違いはあるが、高血圧の治療は生活習慣の改善を基本としており、血圧が目標値に届かない場合降圧剤が使用される。日本ではJSH2014⁴に沿って治療が行われるが、まず生活習慣の改善として、食塩の制限、野菜や果物の摂取と脂肪分の制限、適正体重の維持、運動、アルコールの制限、および禁煙の6項目が指導される。それでもなお、降圧目標値である血圧<140 mmHg / 90 mmHgに届かない場合、第一選択薬としてCa拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)、または利尿薬が単剤もしくは併用で用いられる。第一選択薬の併用で降圧作用が十分に確認できない場合、さらにβ遮断薬、α遮断薬、アルドステロン拮抗薬が併用される。このように、高血圧の治療には詳細な手順が定められており、使用可能な薬剤の種類も豊富である。しかしながら、降圧目標値に到達している患者は全体の30%以下と言われており、依然として効果的で優れた降圧剤が強く望まれている^{1,5}。

1-2) レニン-アンジオテンシン系

レニン-アンジオテンシン(RA)系は、体液量や電解質のホメオスタシスの維持に重要な生体内機構であり、血圧調整に中心的な役割を果たしている⁶。その機構をFigure 1-1に示す⁷。RA系のファーストステップは、アスパラギンプロテアーゼであるレニンによるアンジオテンシノーゲンの分解である。生じたアンジオテンシンIはACEにより分解を受けアンジオテンシンIIへと変換される。アンジオテンシンIIが

AT₁ や AT₂ 受容体に結合すると、種々の生体内シグナルが発生する。特に、AT₁ 受容体結合によるシグナルは、アルドステロンの分泌、血管収縮、水やナトリウムイオンの再吸収を促し、血圧上昇だけでなく心臓、腎臓に対して臓器障害を引き起こす⁸。そのため、アンジオテンシン II の生成と作用の阻害は、高血圧や心血管の病気に対する優れた治療手段と考えられている。

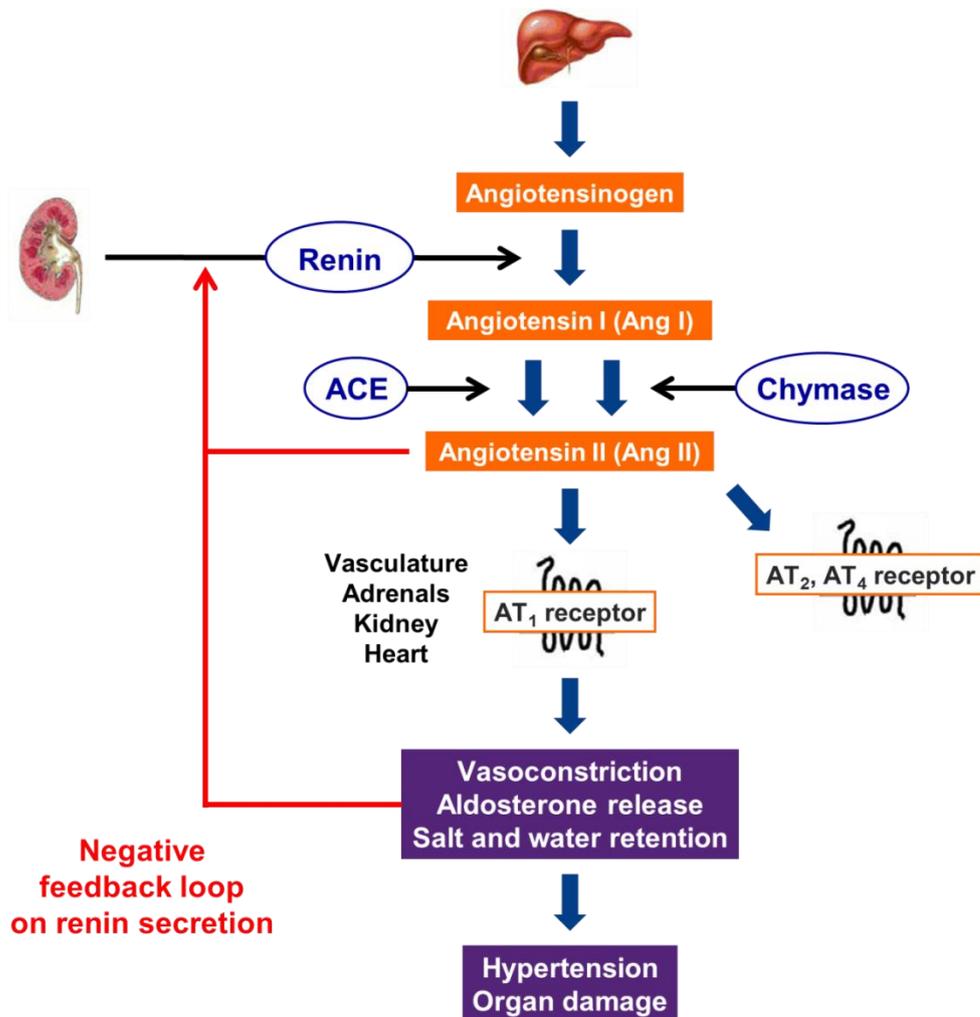


Figure 1-1. RA system (modified from *Bioorg. Med. Chem. Lett.*⁷⁾

RA系を調整する代表的な薬剤としては、ACE阻害剤およびAT₁受容体への結合を阻害するARBが知られており、多くの市販薬が存在する。特に、ACE阻害剤は優れた降圧作用と臓器保護作用、予後改善に関して数多くのエビデンスを持つ。最近では、降圧作用と独立して冠動脈イベントリスクを下げる可能性も示唆されている⁹。ARBは、大規模臨床試験のデータや臓器保護のエビデンスがACE阻害剤に比べ少ないものの、同様に優れた降圧作用と臓器保護作用を示す。そのため、ACE阻害剤およびARBは降圧剤の第一選択薬として広く使用が推奨されている。

ACE阻害剤は優れた降圧剤であるが、ブラジキニンの不活化を抑制する作用を併せ持つため、副作用として空咳を引き起こす事が報告されている¹⁰。またACE阻害剤

を長期投与した場合、ACE とは別にアンジオテンシン I をアンジオテンシン II へと変換するキマーゼが活性化され、降圧作用が低下することが知られている¹¹。これに対し ARB は、RA 系の最終段階である AT₁ 受容体への結合のみを選択的に阻害する薬剤であるため、ブラジキニンの不活化抑制やキマーゼの活性化を引き起こさない。しかしながら、ARB は AT₁ 受容体不活性化に伴うネガティブフィードバックにより、アンジオテンシン II の濃度上昇を引き起こす。アンジオテンシン II の濃度上昇は、AT₁ 以外の AT₂ や AT₄ 受容体を活性化することで各種サイトカイン、メディエーターの生成を促進し、心血管系に悪影響を与える事が示唆される¹²。

最近、第三の RA 系薬剤としてレニン阻害剤が注目を集めている。他の RA 系薬剤とレニン阻害剤の比較を Table 1-1¹³ に示す。レニン阻害剤は、ACE 阻害剤や ARB と同様に、最終的に AT₁ 受容体の活性化を阻害するため優れた降圧作用を示す。一方、レニン阻害剤はレニンの作用のみを阻害するため、ACE 阻害剤で見られるブラジキニンの不活化抑制やキマーゼ活性化といった副反応を引き起こさない。また、ネガティブフィードバックによりレニンの濃度が上昇しても、レニン阻害剤の作用により血漿中のレニン活性は低下したままであるため、ARB で懸念されるようなアンジオテンシン II の濃度上昇を引き起こさない。さらにレニン阻害剤は、RA 系の上流かつ律速酵素であるレニンを阻害することから効率的に RA 系を抑制すると考えられ、ACE 阻害剤や ARB よりも優れた臓器保護効果を示すことが期待される。実際、モルモットに代表的な ACE 阻害剤 (captopril) 、ARB (losartan) 、レニン阻害剤 (remikiren) の 3 剤を投与し比較したところ、レニン阻害剤は他の 2 剤に比べて明らかに腎臓の血流、糸球体ろ過量、ナトリウム利尿を増加させ、より優れた腎保護効果を示すことが確認されている¹⁴。

以上のことから、レニン阻害剤は RA 系薬剤の中で最も魅力的な高血圧治療のアプローチとして期待されており、精力的に研究が行われている¹³。

Table 1-1. The characters of RA system inhibitors (modified from *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*¹³)

	ACE inhibitor	ARB	Renin inhibitor
Ang I level	Increase	Increase	Decrease
Ang II level	Decrease	Increase	Decrease
Active renin concentration	Increase	Increase	Increase
Plasma renin activity	Increase	Increase	Decrease
Bradykinin	Increase	No change	No change
Non-ACE production of Ang II	Not blocked	Blocked	Not blocked
AT ₁ receptor	Not activated	Not activated	Not activated
AT ₂ , AT ₄ receptor	Not activated	Activated	Not activated

1-3) レニン阻害剤

レニン阻害剤の歴史は古く、その研究は 30 年以上前に遡る。初期のレニン阻害剤は、レニンによるアンジオテンシノーゲン切断の機構を基にデザインされた。その機構を Figure 1-2 に示す。なお、切断部位を中心にアンジオテンシノーゲンの N 末側のアミノ酸側鎖を順に P_1, P_2, P_3, \dots と表記し、C 末側のアミノ酸側鎖を順に P_1', P_2', P_3', \dots と表記する。また、各アミノ酸側鎖を認識するレニンのポケットをそれぞれ $S_1, S_2, S_3, \dots, S_1', S_2', S_3', \dots$ と表記することとする。まず、糖ペプチドであるアンジオテンシノーゲンのアミノ酸側鎖をレニンが認識する (Figure 1-2, ①)。次に、触媒残基である 2 つのアスパラギン酸 (Asp32 と Asp215) による水の付加がおこる (Figure 1-2, ②)¹⁵。最後にアミド結合が切断されることでアンジオテンシン I が生成する (Figure 1-2, ③)。

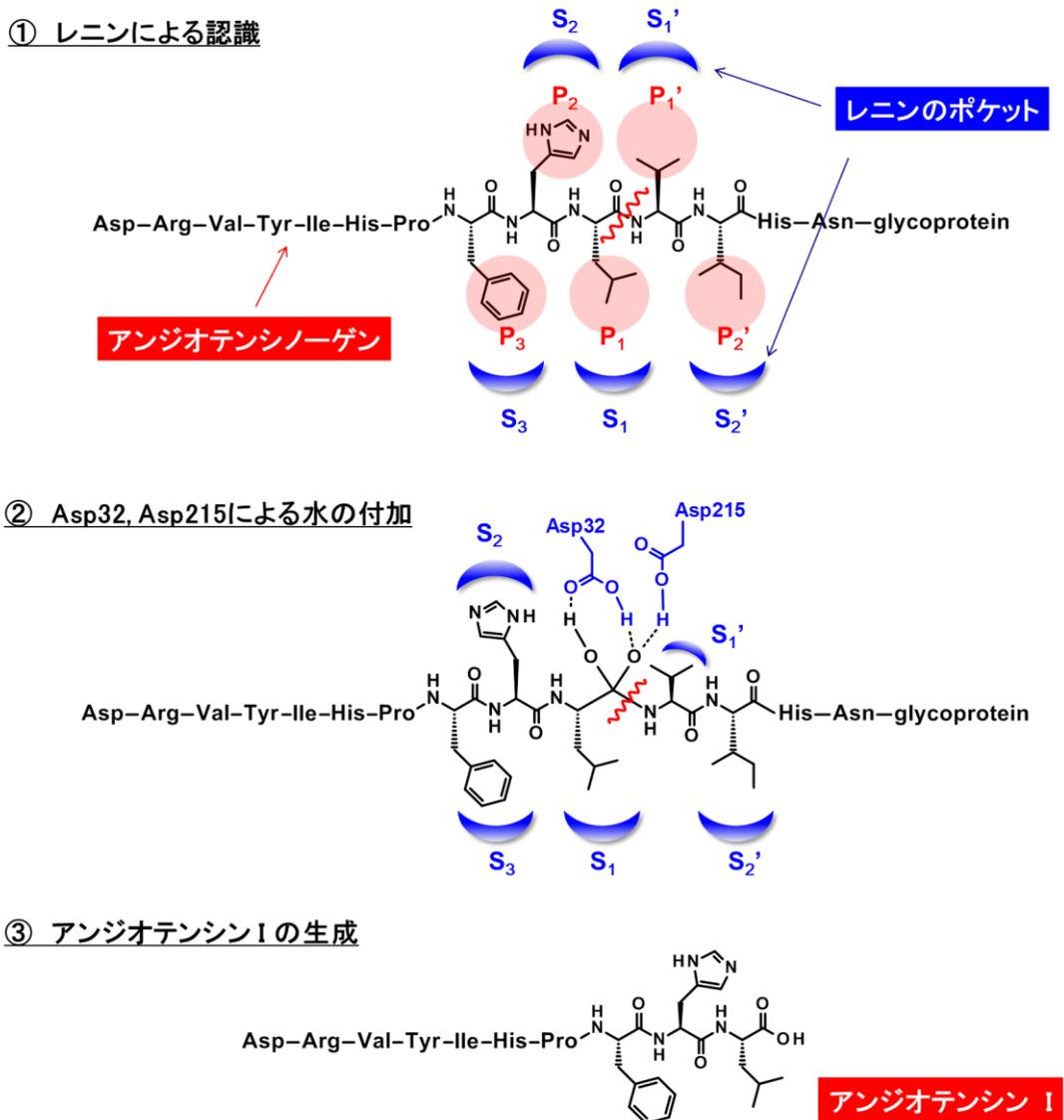


Figure 1-2. Hydrolysis of angiotensinogen by renin

アンジオテンシノーゲンの切断に關与するレニンのポケットと触媒残基の正確な位置關係を示した図を Figure 1-3 に示す¹⁶。この図は、初期のレニン阻害剤である CGP 38560 とレニンとの複合体 X 線結晶構造解析像であり、全体像を (a) に、相互作用部位を拡大した図を (b) に示している。図に示す通り、中央に触媒残基である D32 (Asp32) と D215 (Asp215) が位置し、左右にレニンのポケットが配置されていることが確認できる。なお、以後、各レニンのポケット S₁, S₂, S₃, . . . , S₁' , S₂' , S₃' , . . . と相互作用する阻害剤の置換基を、アンジオテンシノーゲンのアミノ酸側鎖と同様に P₁, P₂, P₃, . . . , P₁' , P₂' , P₃' , . . . と表記することとする。

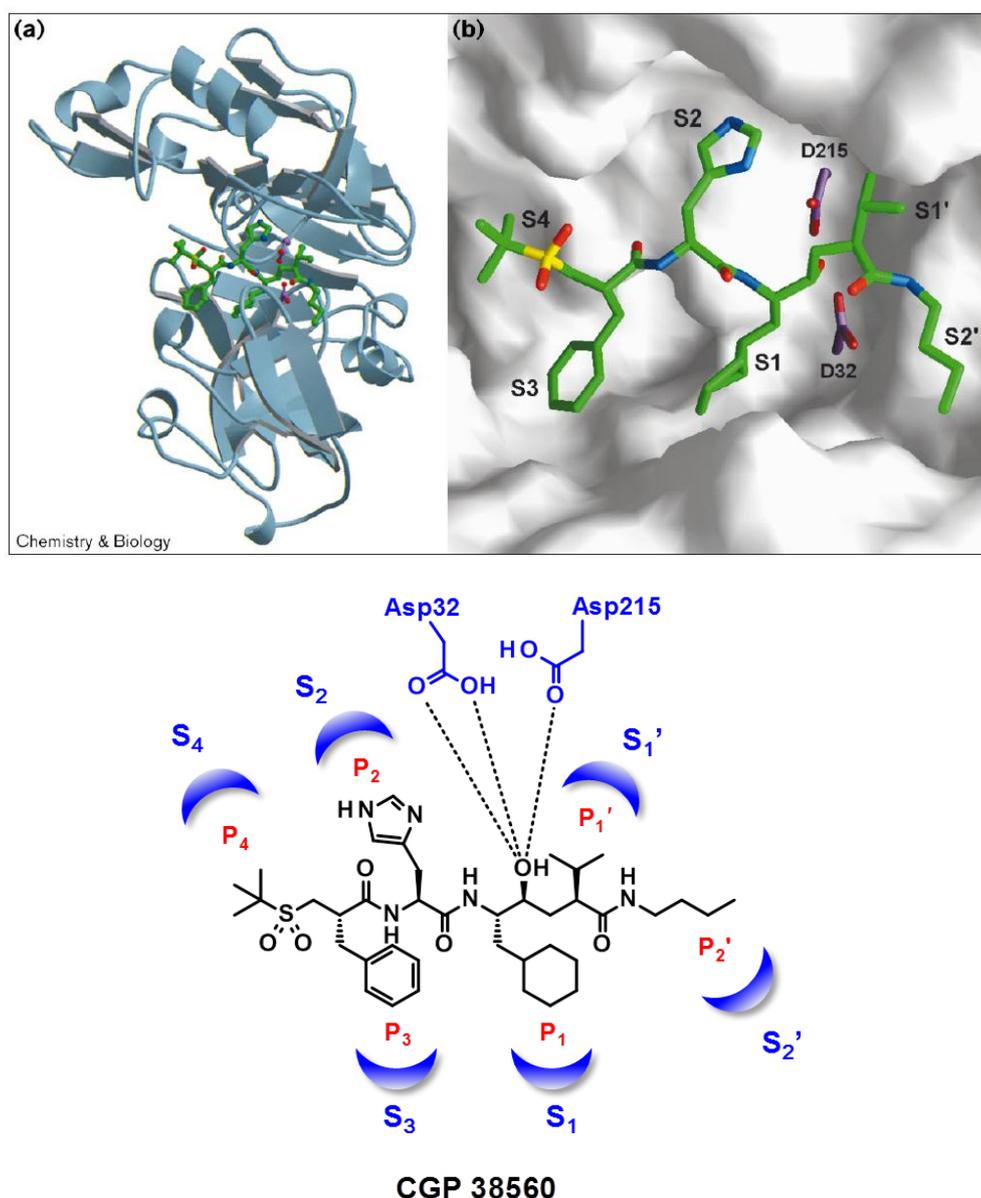


Figure 1-3. X-ray crystal structure of CGP 38560 in complex with human renin
 (a) general view (b) enlarged view (reprinted from *Chem. Biol.*¹⁶)

1980年代初頭、Figure 1-2 ①に示したアンジオテンシノーゲンの一部を模倣したペプチドアナログが報告されたが、その阻害活性は弱かった¹⁷。その後、Figure 1-2 ②に示した遷移状態（Asp32 と Asp215 による水の付加）を模倣した構造を導入することで、飛躍的に阻害活性が向上した（Figure 1-4, CGP 29287 など）¹⁸。しかしながら、低い膜透過性や初回通過効果による高い肝代謝のために経口吸収性が低く、薬効は非常に低かった¹⁹。

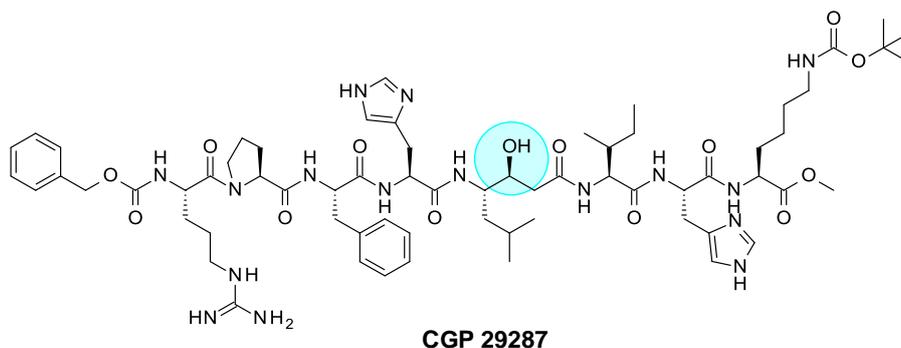


Figure 1-4. The structure of transition state analog CGP 29287

その後、経口吸収性向上を目的に分子量の低減と化合物の安定化が検討された。その結果 1980 年代後半から 1990 年代前半にかけて、ペプチド鎖の短いレニン阻害剤として、Abbott 社の Enalkiren や Zankiren、Roche 社の Remikiren が創製され臨床試験が行われた（Figure 1-5）²⁰。しかし、それでもなお高いペプチド性のために経口吸収性が低く、すべての開発は中止された。

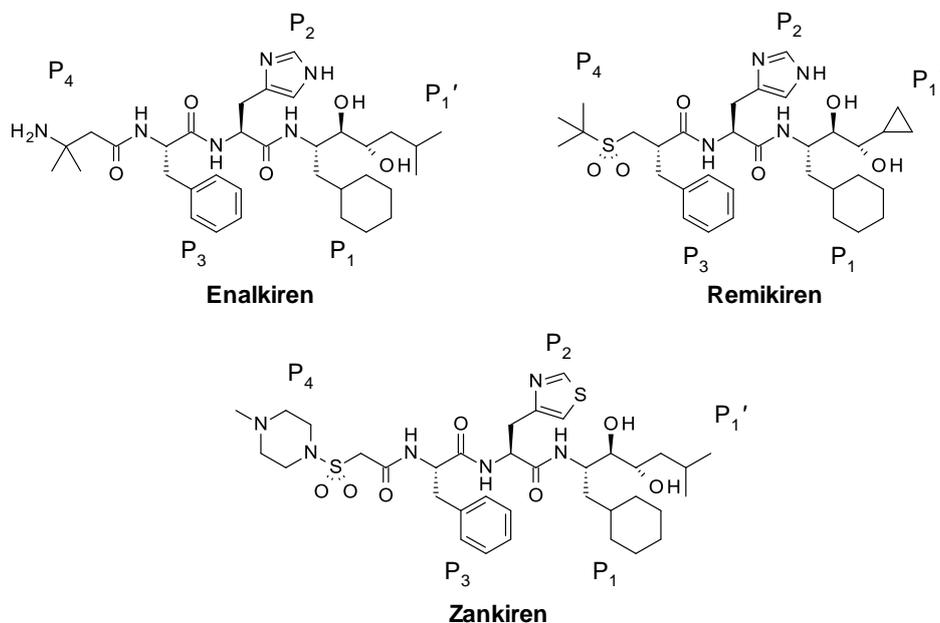


Figure 1-5. The structures of peptidic renin inhibitors

その後、Novartis 社と Roche 社によって、経口吸収性獲得を目指し非ペプチド性レニン阻害剤の探索が進められた。Novartis 社は、ペプチド性化合物（CGP 38560）の

構造からペプチド結合を排除することで経口吸収性の改善を試みた (Figure 1-6)。まず、 P_4 、 P_2 部位の除去によりペプチド性を低減した。その後、X 線結晶構造解析の結果から S_3 と S_1 ポケットが一繋ぎの大きな疎水性ポケットを形成していることを見出し、 P_3 – P_1 部位を連結させた高活性化合物 **1** を獲得した²¹。さらに Novartis 社は、新たに見出された S_3 サブポケット (S_3^{sp}) をメトキシプロポキシ基によって占有することでさらなる活性向上に成功し、強い降圧作用を示す Aliskiren の獲得に成功した²² (Figure 1-6)。この S_3 サブポケット (S_3^{sp}) はアンジオテンシノーゲンの認識には関与しないポケットであり、 S_3 ポケットから紙面奥側にひろがっている (Figure 1-7)。なお、この S_3^{sp} を活用する置換基を、以後 P_3^{sp} と表記する。2007 年、Aliskiren は新規降圧剤として FDA に承認された²³。

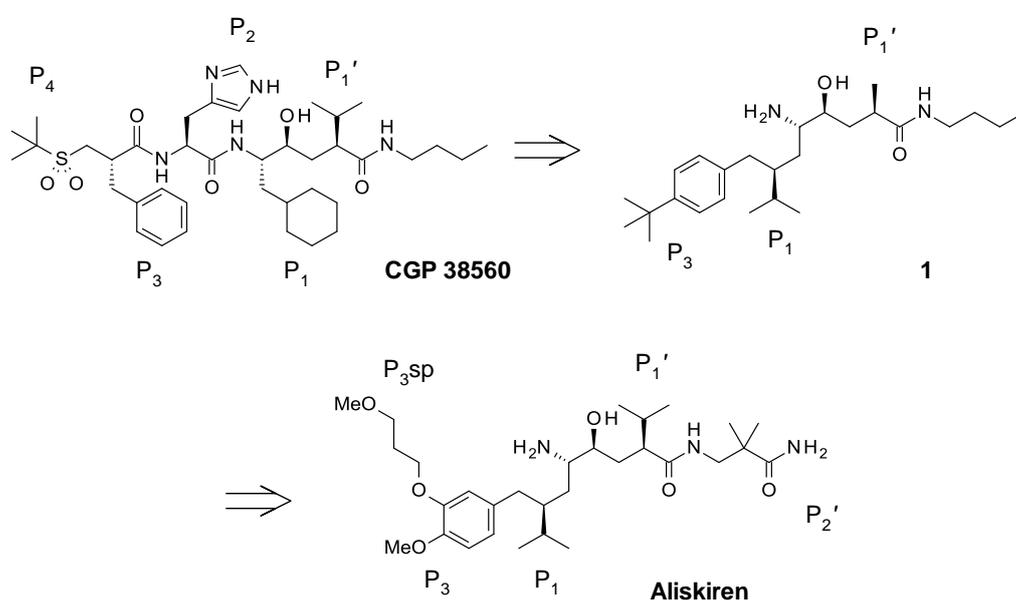


Figure 1-6. Design of Aliskiren

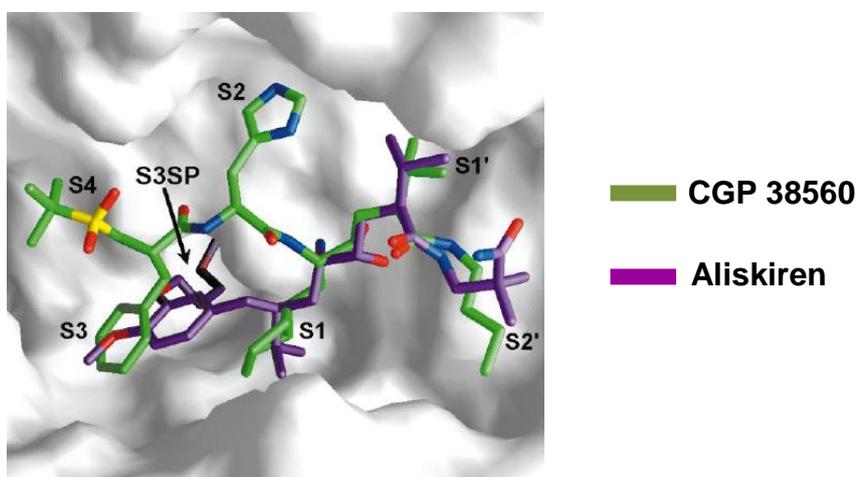


Figure 1-7. Superposition of the crystal structures of CGP 38560 and Aliskiren (reprinted from *Chem. Biol.*¹⁶)

一方 Roche 社は、ハイスループットスクリーニング (HTS) によって非ペプチド性レニン阻害剤の探索を行った。その結果、弱いながらもレニン阻害活性を有するピペリジン誘導体が発見された (Figure 1-8 化合物 **2** など)。複合体 X 線結晶構造解析の結果、Figure 1-9 (a) に示す通り、ヒトレニンとの相互作用様式はこれまでのレニン阻害剤とは全く異なっており、触媒残基である 2 つのアスパラギン酸 (D32 と D215) がピペリジン環の窒素原子と強く相互作用していることが判明した²⁴。その後、X 線結晶構造解析を利用した誘導体展開により、フラップ部位と呼ばれる空間を活用した高活性化合物の獲得に成功している (Figure 1-8 化合物 **3** など)²⁴。このフラップ部位は、Figure 1-9 (b) に示す通り、ピペリジン環 4 位の置換基がヒトレニンのタンパク面を押し上げレニンの W39 (Trp39) がフリップすることで生じるピペリジン誘導体に特有の空隙である。さらにピペリジン 4 位の置換基を含めた構造最適化により、経口活性を有する Ro-X1 が見出された (Figure 1-8)²⁵。

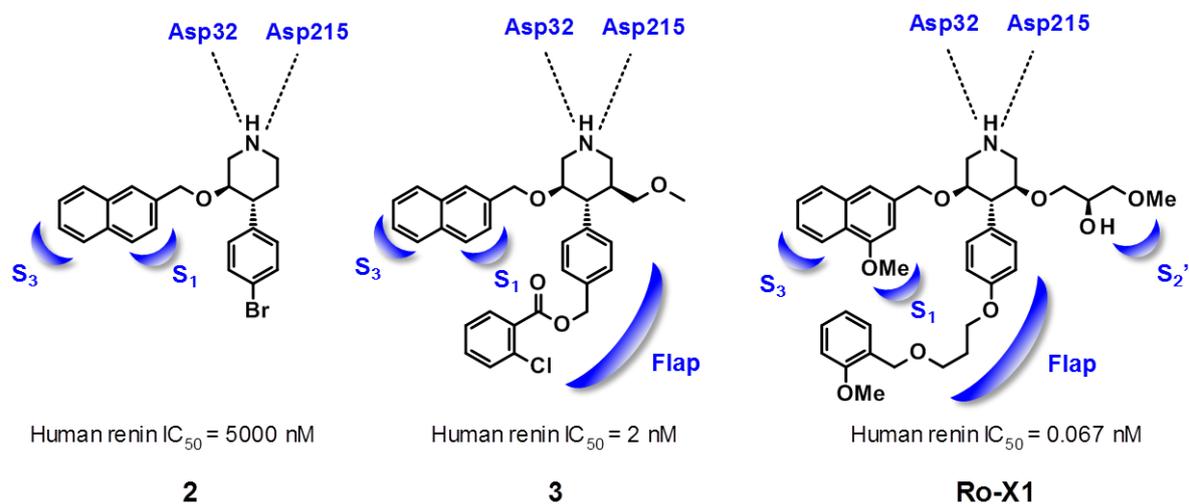


Figure 1-8. The structures of **2**, **3**, and Ro-X1

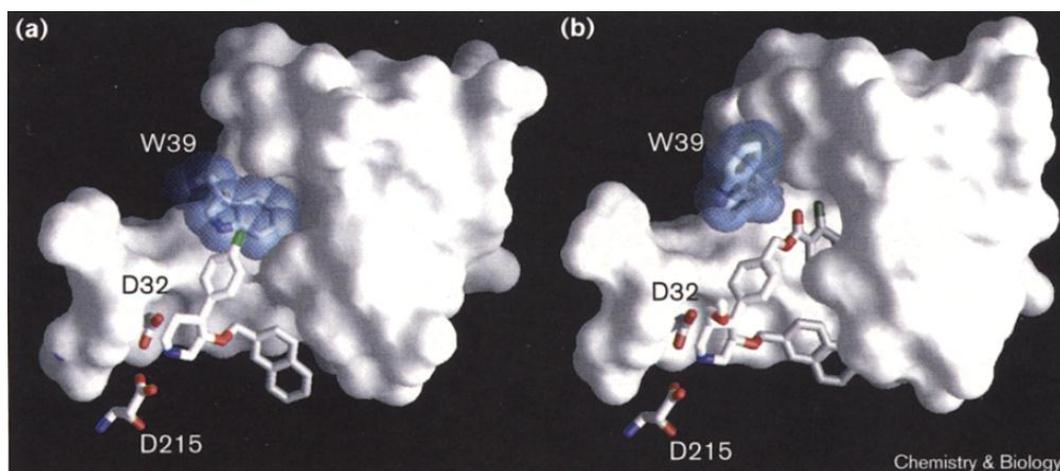


Figure 1-9. X-ray crystal structure of piperidine derivatives in complex with human renin (a) compound **2** (b) compound **3** (reprinted from *Chem. Biol.*²⁴)

Aliskiren の成功および新たな相互作用様式を持つペリジン誘導体の発見により、2000 年代に再びレニン阻害剤の研究が活発化した。その結果、2000 年代後半から 2010 年代にかけて、優れた降圧作用を示すレニン阻害剤が多数報告されるようになった。Aliskiren と同じアミノエタノール構造を持つ化合物として、筆者の所属する研究チームから開発候補品 DS-8108b が²⁶、ペリジン骨格を持つ化合物として Actelion-Merck 社から開発品 ACT-077825 (MK-8141)²⁷ および ACT-178882 (MK-1597)²⁸ が創製された。既存の骨格以外にも、新たに計算化学を用いた骨格デザインも試行され、Vitae 社から開発品 VTP-27999 が見出された (Figure 1-10)²⁹。

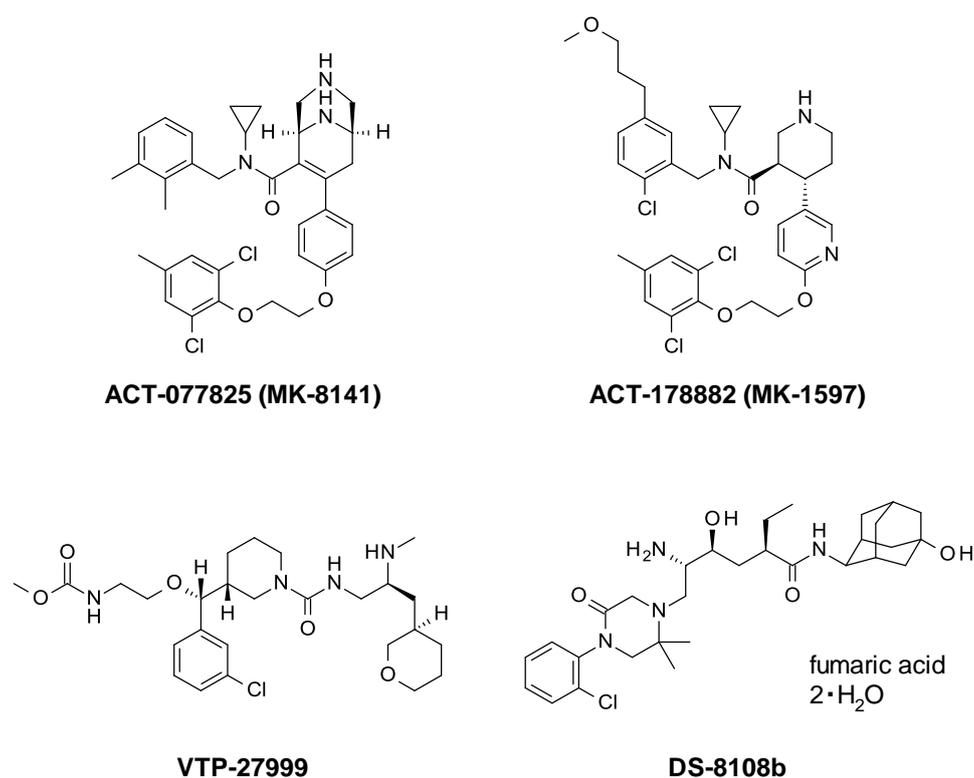


Figure 1-10. The structures of ACT-077825, ACT-178882, VTP-27999, and DS-8108b

以上のように、Aliskiren の発見以後、経口活性を有する新規な非ペプチド性レニン阻害剤が数多く報告された。現在、これらの化合物は非臨床や臨床試験において検証が行われている段階であり、上市されているレニン阻害剤は Aliskiren のみとなっている。

1-4) 本研究の目的

筆者の所属研究チームでは、これまでに Aliskiren と同じアミノエタノール構造を持つレニン阻害剤 DS-8108b を見出している。DS-8108b は Aliskiren より強い薬効を示す

が、Aliskirenと同様に生物学的利用率が低い ($F = 5\%$ in cynomolgus monkey)²⁶。そのため、投与量の増大や血中濃度に個体差を生じさせる可能性がある。そこで筆者は、強い降圧作用だけでなくより高い生物学的利用率を持つレニン阻害剤の開発が必要であると考えた。これまでに、臨床試験に進み、良好な生物学的利用率を示したレニン阻害剤としては、ピペリジン環を有する ACT-077825 (MK-8141) および ACT-178882 (MK-1597)、アミン誘導体である VTP-27999 が知られている²⁷⁻²⁹。特に、ピペリジン環を持つレニン阻害剤は、多くの誘導体で良好な生物学的利用率を示している³⁰。以上より、ピペリジン環を主骨格として定め、優れた降圧作用と良好な生物学的利用率を示す新規レニン阻害剤の獲得を目的に、本研究を開始した。

1-5) 参考文献

1. Kearney, P. M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P. K.; He, J. *Lancet* **2005**, *365*, 217.
2. Rosamond, W.; Flegal, K.; Friday, G.; Furie, K.; Go, A.; Greenlund, K.; Haase, N.; Ho, M.; Howard, V.; Kissela, B.; Kittner, S.; Lloyd-Jones, D.; McDermott, M.; Meigs, J.; Moy, C.; Nichol, G.; O'Donnell, Ch. J.; Roger, V.; Rumsfeld, J.; Sorlie, P.; Steinberger, J.; Thom, T.; Wasserthiel-Smoller, S.; Hong, Y. *Circulation* **2007**, *115*, e69.
3. Ikeda, N.; Inoue, M.; Iso, H.; Ikeda, S.; Satoh, T.; Noda, M.; Mizoue, T.; Imano, H.; Saito, E.; Katanoda, K.; Sobue, T.; Tsugane, S.; Naghavi, M.; Ezzati, M.; Shibuya, K. *PLoS Med.* **2012**, *9*, e1001160.
4. 日本高血圧学会, 高血圧治療ガイドライン作成委員会 : 高血圧治療ガイドライン 2014: JSH2014, 日本高血圧学会, 2014.
5. Chobanian, A. V.; Bakris, G. L.; Black, H. R.; Cushman, W. C.; Green, L. A.; Izzo, J. L., Jr.; Jones, D. W.; Materson, B. J.; Oparil, S.; Wright, J. T., Jr.; Roccella, E. J. *J. Am. Med. Assoc.* **2003**, *289*, 2560.
6. MacGregor, G. A.; Markandu, N. D.; Roulston, J. E.; Jones, J. C.; Morton, J. J. *Nature* **1981**, *291*, 329.
7. Chen, A.; Bayly, C.; Bezençon, O.; Richard-Bildstein, S.; Dubé, D.; Dubé, L.; Gagné, S.; Gallant, M.; Gaudreault, M.; Grimm, E.; Houle, R.; Lacombe, P.; Laliberté, S.; Lévesque, J. F.; Liu, S.; MacDonald, D.; Mackay, B.; Martin, D.; McKay, D.; Powell, D.; Remen' , L.; Soisson, S.; Toulmond, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2204.
8. Zaman, M. A.; Oparil, S.; Calhoun, D. A. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2002**, *1*, 621.
9. Turnbull, F.; Neal, B.; Pfeffer, M.; Kostis, J.; Algert, C.; Woodward, M.; Chalmers, J.; Zanchetti, A.; MacMahon, S. *J. Hypertens.* **2007**, *25*, 951.
10. Ceconi, C.; Francolini, G.; Olivares, A.; Comini, L.; Bachetti, T.; Ferrari, R. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *577*, 1.
11. Hollenberg, N. K.; Fisher, N. D.; Price, D. A. *Hypertension* **1998**, *32*, 387.
12. Azizi, M.; Webb, R.; Nussberger, J.; Hollenberg, N. K. *J. Hypertens.* **2006**, *24*, 243.
13. Hershey, J. C.; Steiner, B.; Fischli, W.; Feuerstein, G. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* **2005**, *2*, 181.
14. El Amrani, A.; Menard, J.; Gonzales, M. F.; Michel, J. B. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1993**, *22*, 231.
15. Bursavich, M. G.; Rich, D. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 541.
16. Rahuel, J.; Rasetti, V.; Maibaum, J.; Rüeger, H.; Göschke, R.; Cohen, N. C.; Stutz, S.; Cumin, F.; Fuhrer, W.; Wood, J. M.; Grütter, M. G. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 493.
17. (a) Cumin, F.; Evin, G.; Fehrentz, J. A.; Seyer, R.; Castro, B.; Menard, J.; Corvol, P. J.

- Biol. Chem.* **1985**, 260, 9154; (b) Haber, E. *Fed. Proc.* **1983**, 42, 3155.
18. Wood, J. M.; Gulati, N.; Forgiarini, P.; Fuhrer, W.; Hofbauer, K. G. *Hypertension* **1985**, 7, 797.
19. Yokokawa, F.; Maibaum, J. *Expert Opin. Ther. Patents* **2008**, 18, 581.
20. Maibaum, J.; Feldman, D. L. *Expert Opin. Ther. Patents* **2003**, 13, 589.
21. (a) Plummer, M.; Hamby, J. M.; Hingorani, G.; Batley, B. L.; Rapundalo, S. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 2119; (b) Rasetti, V.; Cohen, N. C.; Rüeger, H.; Göschke, R.; Maibaum, J.; Cumin, F.; Fuhrer, W.; Wood, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1589; (c) Göschke, R.; Cohen, N. C.; Wood, J. M.; Maibaum, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2735.
22. (a) Wood, J. M.; Maibaum, J.; Rahuel, J.; Grütter, M. G.; Cohen, N. -C.; Rasetti, V.; Rüggar, H.; Göschke, R.; Stutz, S.; Fuhrer, W.; Schilling, W.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Cumin, F.; Baum, H. -P.; Schnell, C. R.; Herold, P.; Mah, R.; Jensen, C.; O'Brien, E.; Stanton, A.; Bedigian, M. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 308, 698; (b) Göschke, R.; Stutz, S.; Rasetti, V.; Cohen, N. -C.; Rahuel, J.; Rigollier, P.; Baum, H. -P.; Forgiarini, P.; Schnell, C. R.; Wagner, T.; Gruetter, M. G.; Fuhrer, W.; Schilling, W.; Cumin, F.; Wood, J. M.; Maibaum, J. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4818; (c) Maibaum, J.; Stutz, S.; Göschke, R.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Cumin, F.; Rahuel, J.; Baum, H. -P.; Cohen, N. -C.; Schnell, C. R.; Fuhrer, W.; Gruetter, M. G.; Schilling, W.; Wood, J. M. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4832.
23. Jensen, C.; Herold, P.; Brunner, H. R. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2008**, 7, 399.
24. Oefner, C.; Binggeli, A.; Breu, V.; Bur, D.; Clozel, J. P.; D'Arcy, A.; Dorn, A.; Fischli, W.; Grüninger, F.; Güller, R.; Hirth, G.; Märki, H. P.; Mathews, S.; Müller, M.; Ridley, R. G.; Stadler, H.; Vieira, E. Wilhelm, M.; Winkler, F. K.; Wostl, W. *Chem. Biol.* **1999**, 6, 127.
25. (a) Vieira, E.; Binggeli, A.; Breu, V.; Bur, D.; Fischli, W.; Güller, R.; Hirth, G.; Märki, H. P.; Müller, M.; Oefner, C.; Scalone, M.; Stadler, H.; Wilhelm, M.; Wostl, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1397; (b) Güller, R.; Binggeli, A.; Breu, V.; Bur, D.; Fischli, W.; Hirth, G.; Jenny, C.; Kansy, M.; Montavon, F.; Müller, M.; Oefner, C.; Stadler, H.; Vieira, E.; Wilhelm, M.; Wostl, W.; Märki, H.P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1403; (c) Märki, H. P.; Binggeli, A.; Bittner, B.; Böhner-Lang, V.; Breu, V.; Bur, D.; Coassolo, Ph.; Clozel, J. P.; D'Arcy, A.; Doebeli, H.; Fischli, W.; Funk, Ch.; Foricher, J.; Giller, T.; Grüninger, F.; Guenzi, A.; Güller, R.; Hartung, T.; Hirth, G.; Jenny, Ch.; Kansy, M.; Klinkhammer, U.; Lave, T.; Lohri, B.; Luft, F. C.; Mervaala, E. M.; Müller, D. N.; Müller, M.; Montavon, F.; Oefner, Ch.; Qiu, C.; Reichel, A.; Sanwald-Ducray, P.; Scalone, M.; Schleimer, M.; Schmid, R.; Stadler, H.; Treiber, A.; Valdenaire, O.; Vieira, E.; Waldmeier,

- P.; Wiegand-Chou, R.; Wilhelm, M.; Wostl, W.; Zell, M.; Zell, R. *Il Farmaco* **2001**, *56*, 21.
26. Nakamura, Y.; Fujimoto, T.; Ogawa, Y.; Sugita, C.; Miyazaki, S.; Tamaki, K.; Takahashi, M.; Matsui, Y.; Nagayama, T.; Manabe, K.; Mizuno, M.; Masubuchi, N.; Chiba, K.; Nishi, T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 754.
27. Bezençon, O.; Bur, D.; Weller, T.; Richard-Bildstein, S.; Remeň, L.; Sifferlen, T.; Corminboeuf, O.; Grisostomi, C.; Boss, C.; Prade, L.; Delahaye, S.; Treiber, A.; Strickner, P.; Binkert, C.; Hess, P.; Steiner, B.; Fischli, W. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3689.
28. Corminboeuf, O.; Bezençon, O.; Remeň, L.; Grisostomi, C.; Richard-Bildstein, S.; Bur, D.; Prade, L.; Strickner, P.; Hess, P.; Fischli, W.; Steiner, B.; Treiber, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6291.
29. Jia, L.; Simpson, R. D.; Yuan, J.; Xu, Z.; Zhao, W.; Cacatian, S.; Tice, C. M.; Guo, J.; Ishchenko, A.; Singh, S. B.; Wu, Z.; McKeever, B. M.; Bukhtiyarov, Y.; Johnson, J. A.; Doe, C. P.; Harrison, R. K.; McGeehan, G. M.; Dillard, L. W.; Baldwin, J. J.; Claremon, D. A. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 747.
30. Yokokawa, F. *Expert Opin. Drug. Discov.* **2013**, *8*, 673.

第二章 ピペリジン骨格を有する新規レニン阻害剤の探索

2-1) 序論

ピペリジン骨格を有するレニン阻害剤は、経口で降圧作用を示す Ro-X1 の報告を契機に盛んに研究されるようになった。第一章において、初期のピペリジン誘導体とヒトレニンの複合体 X 線結晶構造解析の結果を示したが、Ro-X1 に関しても同様な相互作用を示すことが報告されている¹。その相互作用部位を Figure 2-1 に示す。ヒトレニンの触媒残基である 2 つのアスパラギン酸 (Asp32 と Asp215) は、Ro-X1 のピペリジン環上の窒素原子と相互作用している。また、ピペリジン環 3 位の置換基は S₂' ポケットと、5 位のナフタレン環は S₃-S₁ ポケットと相互作用している。一方、ピペリジン環 4 位の嵩高い脂溶性置換基は、ヒトレニンのフラップ部位と呼ばれる空間を占有している。このフラップ部位は、ピペリジン環 4 位の置換基がヒトレニンのタンパク面を押し上げ Tyr75 と Trp39 の間の水素結合を解裂させることで生じる空隙であり、4 位に嵩高い置換基を持つピペリジン誘導体に特有の空間である²。以上のように、Ro-X1 はピペリジン環上の 3,4,5 位の各置換基が S₂' ポケット、フラップ部位、S₃-S₁ ポケットをそれぞれ占有することで高活性を示している。

Ro-X1 から展開された化合物は、フラップ部位を活用するためにピペリジン環 4 位に嵩高い脂溶性置換基を持つものが多い。その代表化合物の 1 つである Actelion-Merck 社の 4,5-二置換ピペリジン誘導体 ACT-178882 (MK-1597) を Figure 2-1 に示す。ピペリジン環 3 位に置換基を持たない代わりに、S₃^{sp} と相互作用するメトキシプロピル基を持つことで高活性を示している³。しかしながら、ACT-178882 (MK-1597) は CYP 阻害や hERG 阻害といった代謝・物性面に問題があることが報告されている⁴。CYP は薬剤を代謝する代表的な代謝酵素であり、CYP 阻害作用を持つ薬剤を同じ CYP で代謝を受ける薬剤と併用した場合、薬剤の濃度を一時的に高め重い副作用を引き起こす可能性がある。一方、hERG チャンネルの阻害は、心室細胞の再分極を遅らせ QT 間隔を延長させる作用を持ち、重篤な不整脈である torsades de pointes を引き起こす可能性がある⁵。そのため、ACT-178882 (MK-1597) で見られるような CYP と hERG 阻害を回避することは、降圧剤の開発において必要不可欠であると考えられる。ACT-178882 (MK-1597) が CYP 阻害や hERG 阻害を示す原因構造としては、嵩高い 4 位の脂溶性置換基が考えられる。実際 Actelion-Merck 社は、近年この脂溶性置換基の縮小を精力的に行っている (5)^{4a,6}。その他に、Ro-X1 から展開された化合物として Pfizer 社のピペラジン化合物 4 が知られている⁷。骨格がケトピペラジン環に変更されているが、4,5-二置換ピペリジン誘導体 ACT-178882 (MK-1597) と同じくフラップ部位を活用することで高活性を示している。また、化合物 4 も強い CYP 阻害作用を示すが、ACT-178882 (MK-1597) 同様、嵩高い脂溶性置換基がその原因構造であると予想される。一方、最近になり、Novartis 社が 4 位に置換基を持たない 3,5-二置換

ピペリジン誘導体 **6** を報告した (Figure 2-2) ⁸。化合物 **6** はこれまでのピペリジン誘導体と異なりフラップ部位を活用していないが、代わりに 3 位の置換基が S₁'ポケットを占有することで高活性を示している。しかしながら、P₃-P₁ 部位に嵩高い脂溶性置換基である Xanthen 骨格を持っており改善の余地がある。

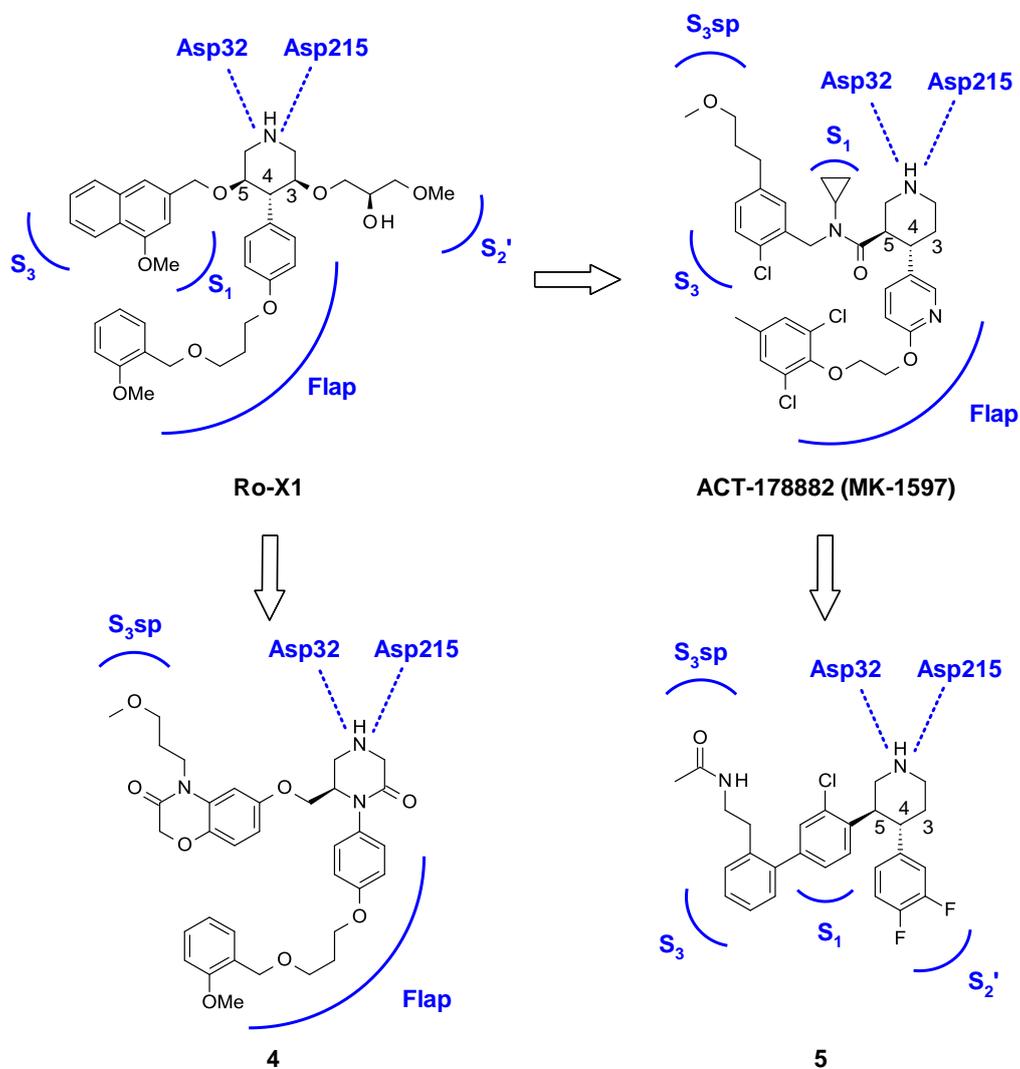


Figure 2-1. Actelion-Merck's and Pfizer's renin inhibitors

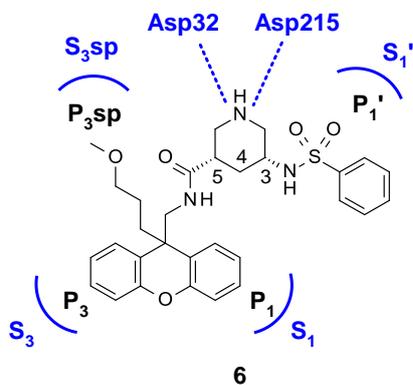


Figure 2-2. Novartis' piperidine-based renin inhibitor

このように、ピペリジン誘導体の多くは、高活性を示すために4位に嵩高い脂溶性置換基を持つ。しかしながら、嵩高い脂溶性置換基を持つ化合物は代謝・物性面で問題となる可能性が高い。そこで筆者は、Ro-X1の構造を基に4位に置換基を持たないピペリジン誘導体の探索を行うこととした。また、阻害活性向上のため3位と5位への置換基導入とDS-8108bの高活性発現部位であるフェニルケトピペラジンおよび2級アミドの活用を検討することとした。ところで、Novartis社のピペリジン誘導体は、化合物6のように立体がRo-X1と異なる場合高活性を示し、立体がRo-X1と同じ場合低い活性を示すことが報告されている⁸。この結果から、ピペリジン誘導体が高活性を示すために必要な立体配置は、ピペリジン環上の置換基によって異なると考えられる。今回、Ro-X1を基にデザインを行うことから、ピペリジン環の立体はRo-X1と同一にすることとした(Figure 2-3)。以上述べた通り、本章では、代謝・物性面に優れかつ高活性を示す新規レニン阻害剤獲得のために、立体が制御された3,5-二置換ピペリジン誘導体7を基に探索研究を行うこととした。

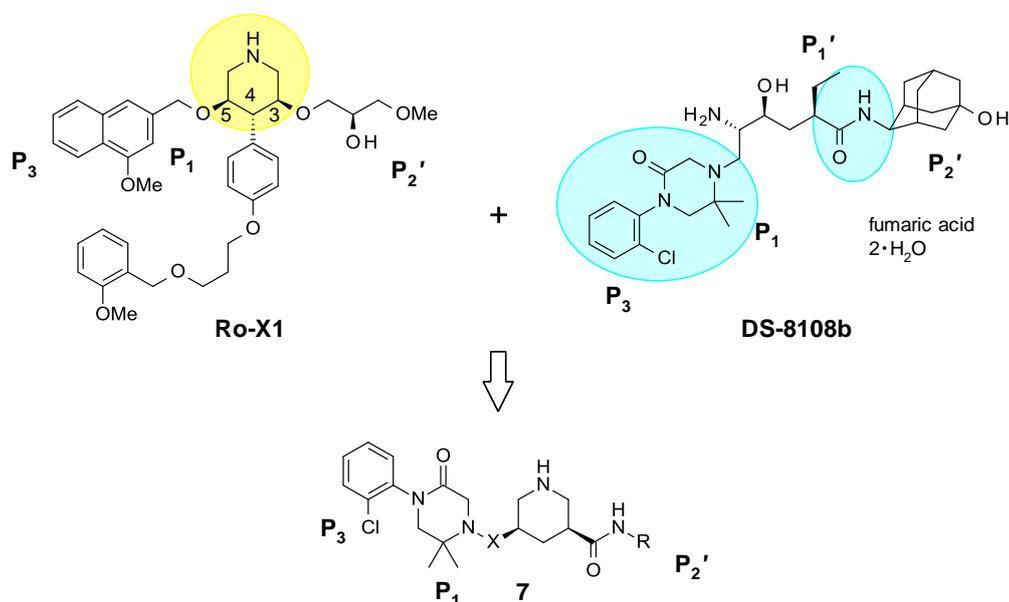


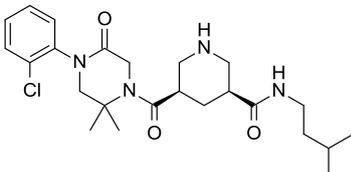
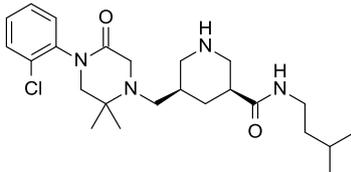
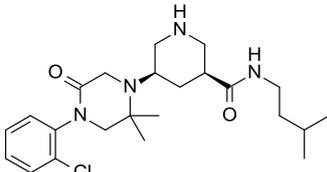
Figure 2-3. Design of 3,5-disubstituted piperidine derivatives.

2-2) 新規 3,5-二置換ピペリジン誘導体の探索

初期デザインを行うにあたり、ピペリジン誘導体で唯一げっ歯類および非げっ歯類での降圧作用が報告されているRo-X1に注目した¹。Figure 2-4に示す通り、まずRo-X1のピペリジン環4位の脂溶性置換基を除去し8とした。4位置換基の除去による阻害活性の大幅な減弱は、DS-8108bの高活性発現部位を活用することで補うこととした。すなわち、化合物8のP₃-P₁部位であるナフタレン環を、DS-8108bのP₃-P₁部位である2,2-ジメチル-4-フェニルピペラジン-5-オン構造に置き換えることとした。この際、ピペリジン環とナフタレン環の距離を考慮し、ピペリジン環からケトピペラジン環までの距離は1炭素以下とした。具体的には、2つの環をカルボニル(9)またはメチレ

12 は全く阻害活性を示さなかったのに対し、メチレンをリンカーとして持つ化合物 **13** は、わずかにヒトレニン阻害活性を示した ($IC_{50} = 406 \text{ nM}$)。一方、ケトピペラジン環とピペリジン環が直接結合した化合物 **14** は、高いヒトレニン阻害活性を示し ($IC_{50} = 7.7 \text{ nM}$)、サル血漿中でもレニン阻害活性を示した ($IC_{50} = 54 \text{ nM}$)。

Table 2-1. *In vitro* renin inhibitory activities (IC_{50}) of initial compounds ^{a,b}

Compound	Structure	Purified human	Monkey plasma
		renin	renin
		IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
12		>1000	>1000
13		406	>1000
14		7.7	54

^a Compounds were obtained as fumarate salts.

^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates.

ケトピペラジン環とピペリジン環の結合様式の違いで阻害活性が大きく変化する理由を確かめるため、化合物 **13** とヒトレニンとの共結晶、および、化合物 **14** とヒトレニンとの共結晶について、複合体 X 線結晶構造解析を行った。まず、これまで報告されているピペリジン誘導体と同様に、化合物 **13**、**14** のピペリジン環上の窒素原子がヒトレニンの触媒残基 (Asp32 と Asp215) と相互作用していることが確認された。また、期待した通り、新規に導入したフェニルケトピペラジン環がヒトレニンの S_3 - S_1 ポケットと相互作用することが確かめられた。化合物 **13**、**14** とヒトレニンとの複合体 X 線結晶構造解析像で、 S_3 - S_1 ポケット部分を拡大した図を Figure 2-5、2-6 に示す。化合物 **13** は、ヒトレニンと相互作用する際、ケトピペラジン環上の置換基が不安定なシュードアキシアル型配座をとることが確認された (Figure 2-5)。これに対して、化合物 **14** は安定なシュードエクアトリアル型配座をとることが確認された (Figure

2-6)。相互作用時の配座が安定であるほど、薬物とヒトレニンの結合状態も安定で強固になると予想されることから、この配座安定性の差がレニン阻害活性の差に寄与したと考えられる。一方、カルボニル基をリンカーに持つ化合物 **12** はピペリジン環とケトピペラジン環の距離が化合物 **13** と同じであるため、Figure 2-5 と同様なシュードアキシアル型配座をとると考えられる。しかしながら、カルボニル基はメチレンに比べ自由度が低く嵩高い。そのため、シュードアキシアル型配座がさらに不安定となり阻害活性が消失したと推察される。

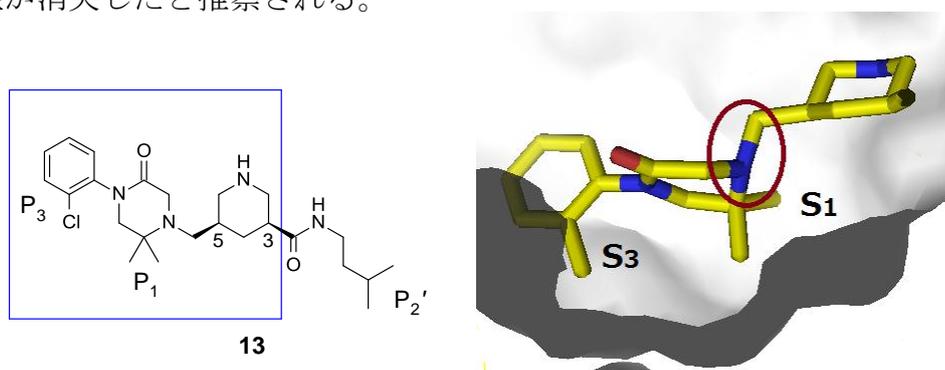


Figure 2-5. X-ray crystal structure of **13** in complex with human renin.¹² Pseudo-axial bond between the piperidine ring and ketopiperazine ring is indicated.

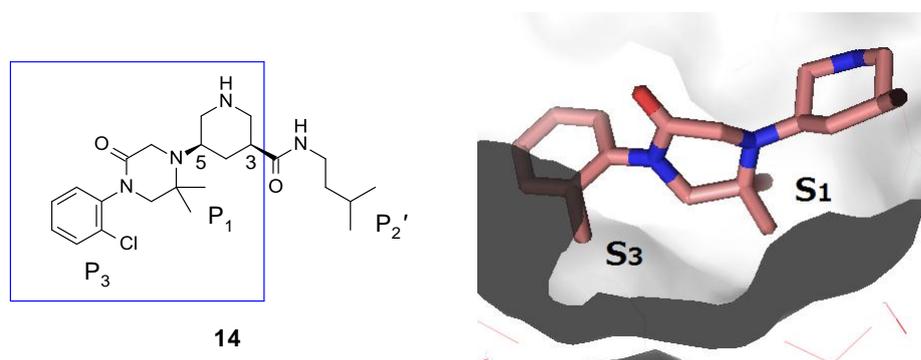


Figure 2-6. X-ray crystal structure of **14** in complex with human renin¹²

2-3) P₁'部位を有する高活性化合物の獲得

ピペリジン環とフェニルケトピペラジン環を直結することで高活性化合物 **14** (IC₅₀ = 7.7 nM) を獲得したが、その阻害活性は DS-8108b (IC₅₀ = 0.9 nM)¹⁰ に比べまだ低い。さらなる阻害活性向上の手掛かりを得るため DS-8108b と化合物 **14** の構造を比較した。その結果、**14** には S₁'ポケットと相互作用する P₁'部位が存在しないことが分かった。S₁'ポケットは疎水性アミノ酸で構成されているため、P₁'部位として脂溶性置換基を導入することで阻害活性が向上すると予想される。そこで次に、化合物 **14** への P₁'部位導入を検討することとした。

まず、化合物 **14** と S₁'-S₂'ポケットの位置関係を確認するため、再度 **14** とレニンの

複合体 X 線結晶構造解析を行い S_1' - S_2' ポケットを調べた。 S_1' - S_2' ポケット周辺を拡大した図を Figure 2-7 に示す。その結果、 S_2' ポケットはイソブチル基で占有されているのに対し、 S_1' ポケットは空であることが確認された。

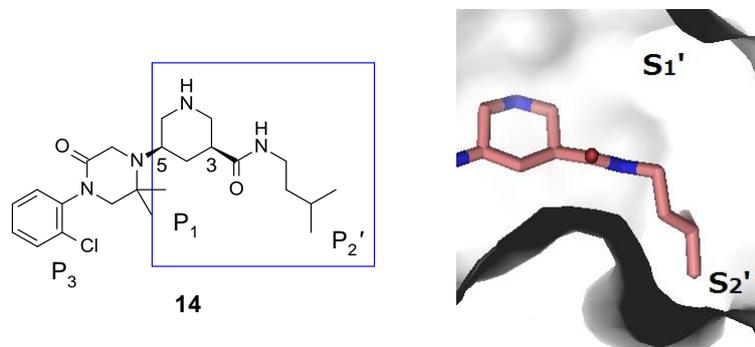


Figure 2-7. X-ray crystal structure of **14** in complex with human renin¹²

次に、 P_1' 部位を導入する位置を決定するため、DS-8108b¹⁰ と化合物 **14** の複合体 X 線結晶構造解析像の重ね合わせを行った。なお、DS-8108b と化合物 **14** では、相互作用するレニンの構造に大きな変化が無いことが確認されている。Figure 2-8 に示す通り、DS-8108b のエチル基が S_1' ポケットに向かって張り出していることが分かる。このエチル基の先端は、**14** の 2 級アミドに隣接する炭素原子 a から、2~3 炭素先に位置している。また、炭素原子 a の周辺は、紙面奥側により広い空間が存在することが確認された。

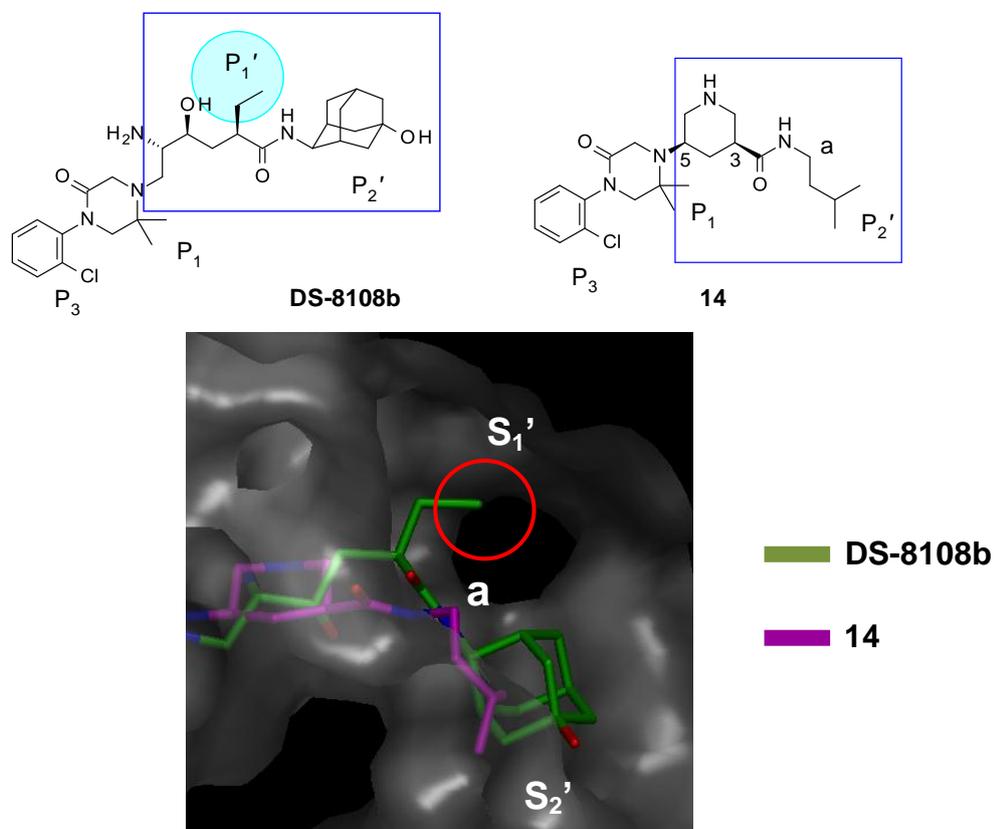
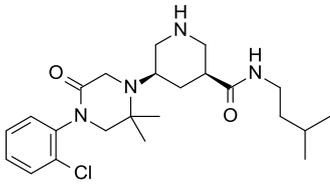
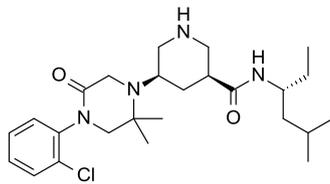
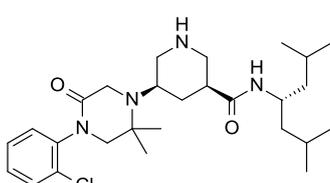


Figure 2-8. Superposition of the crystal structures of DS-8108b and **14**¹²

以上の結果を基に、化合物 **14** の炭素原子 a から紙面奥側に向かってエチル基 (**15a**) およびイソブチル基 (**15b**) を伸ばした化合物を合成し評価した。Table 2-2 に示す通り、いずれの化合物も阻害活性が向上した。特に化合物 **15b** は、DS-8108b と同等のヒトレニン阻害活性を示した ($IC_{50} = 1.6 \text{ nM}$)。

Table 2-2. *In vitro* renin inhibitory activities (IC_{50}) of **14** and **15a-b**^{a,b}

Cmpd	Structure	Purified human renin	Monkey plasma renin
		IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
14		7.7	54
15a		2.8	16
15b		1.6	10

^a Compounds were obtained as fumarate salts.

^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates.

導入したアルキル鎖が S_1' ポケットを占有していることを確かめるため、化合物 **15b** とヒトレニンとの複合体 X 線結晶構造解析を行った (Figure 2-9)。その結果、炭素原子 a から紙面奥側に伸ばしたイソブチル基が S_1' ポケットを、もう片方のイソブチル基が S_2' ポケットを占有していることが確認された。

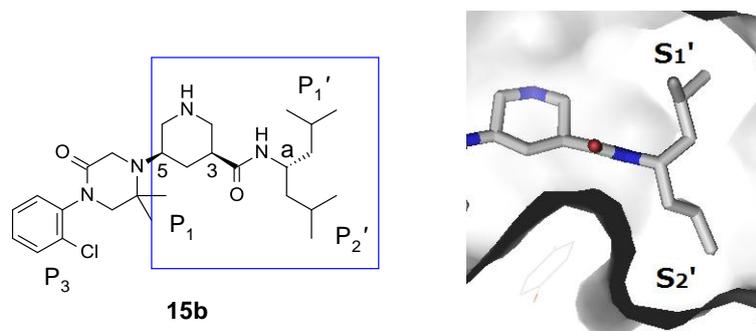


Figure 2-9. X-ray crystal structure of **15b** in complex with human renin¹²

さらに詳細な情報を得るために、DS-8108b¹⁰とヒトレニンの複合体 X 線結晶構造解析像との重ね合わせを行った。Figure 2-10 に示したように、化合物 **15b** のイソブチル基が DS-8108b の P₁'部位に到達し、広範に S₁'ポケットを占有していることが確認された。一方この図から、イソブチル基をエチル基まで短くした化合物 **15a** では、DS-8108b の P₁'部位に届かず S₁'ポケットの占有が不十分であると予想された。そのためレニンとの疎水性相互作用が低下し、イソブチル基 (**15b**) に比べ阻害活性が減弱したと考えられる。

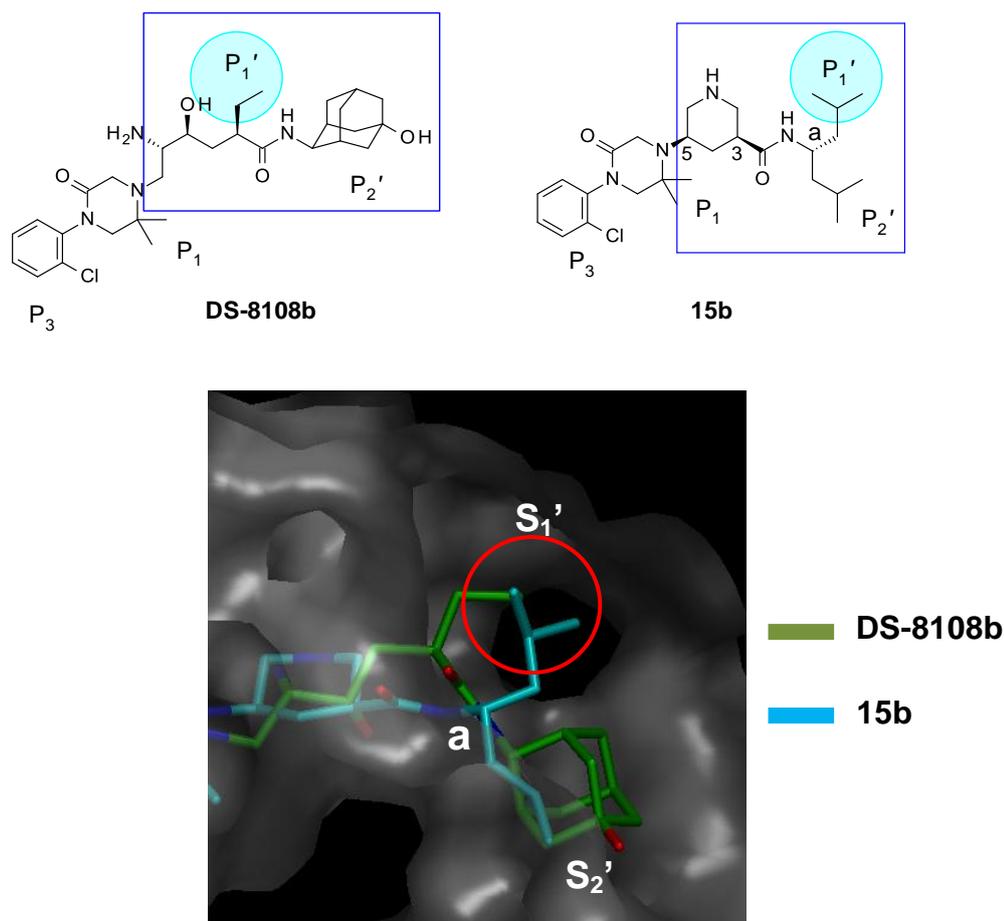


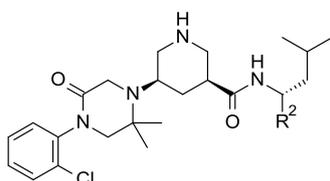
Figure 2-10. Superposition of the crystal structures of DS-8108b and **15b**¹²

2-4) P₂'部位の構造変換

高活性を示す化合物 **15b** を獲得したので、次にサル肝臓ミクロソーム中の代謝酵素に対する安定性を評価した。代謝酵素を共存させ 30 分後の残存率を測定した結果、21%と非常に低い値を示した。代謝安定性は脂溶性低減により一般的に改善されることから¹³、化合物 **15b** に極性基を導入することとした。ヒトレニンの S₁'ポケットは疎水性アミノ酸で構成されているのに対して、S₂'ポケットには親水性アミノ酸残基が

存在する。そのため、P₂'部位に水溶性置換基を導入しても高活性を維持することが知られている。実際、Aliskiren の P₂'のカルボキサミドは水を介して Arg74 と相互作用しており¹²、DS-8108b の P₂'のアルコールは水を介して Arg74 および Thr72 と相互作用し阻害活性を維持している¹⁰。そこで次に、P₂'部位に水酸基 (**15c-d**)、エーテル基 (**15e**)、カルボキサミド基 (**15f**) を導入した化合物を合成し評価した (Table 2-3)。その結果、いずれの化合物も高い阻害活性を示した。脂溶性の計算値である clogP を算出したところ、化合物 **15f** のみ極端に低い値を示したことから、脂溶性の大幅な低下が若干の活性低下を引き起こしたと考えられる。阻害活性を維持しつつ極性基を導入できたので、化合物 **15e** を用いて **15b** と同様に代謝安定性を評価した。期待した通り、**15b** に比べ改善されていることが確かめられた (61% in monkey)。

Table 2-3. *In vitro* renin inhibitory activities (IC₅₀) of compounds **15b-f**^{a,b}



Compound	R ²	Purified human renin	Monkey plasma renin
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
15b		1.6	10
15c ^c	more polar	2.3	4.8
15d ^{c,d}	less polar	2.5	7.5
15e		1.3	1.4
15f		8.4	23

^a Compounds were obtained as fumarate salts.

^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates.

^c Stereochemistry is not determined. **15c** and **15d** are single isomer.

^d Compound **15d** is the epimer of compound **15c**.

2-5) ラット *in vivo* 評価

高活性を示し代謝安定性が改善された 3,5-二置換ピペリジン誘導体 **15e** を獲得したので、次に *in vivo* での作用を確認することとした。まず、化合物 **15e** を SD ラットに 10 mg/kg 経口投与し、その薬物動態を評価した (Table 2-4)。その結果、化合物 **15e** は良好な生物学的利用率を示すことが分かった ($F = 45\%$)。Ro-X1 に比べ高い値を示すことから (Ro-X1, $F = 6\%$ in dog¹⁴)、ピペリジン環 4 位の置換基除去が効果的に働いたと考えられる。

Table 2-4. PK profile of compound **15e** in SD rat

SD rat, male (10 mg/kg, p.o., 0.5% MC) (1 mg/kg, i.v., saline)	F (%)	45
	C_{max} (ng/mL)	540
	$AUC_{po,0-24h}$ (ng*h/mL)	1940
	CL (mL/min/kg)	31
	V_{ss} (L/kg)	5.8
	$t_{1/2}$ (h)	3.2

次に、化合物 **15e** の降圧作用を評価した。レニン阻害剤の薬効評価モデル動物として多くの実績があることから、ヒトアンジオテンシノーゲンおよびヒトレニンの遺伝子を持つ dTG ラット¹⁵ を用いて降圧試験を行った (Figure 2-11)。化合物 **15e** を 10 mg/kg 経口投与した結果、24 時間以上にわたって持続的で強力な血圧降下作用を示すことが分かった。

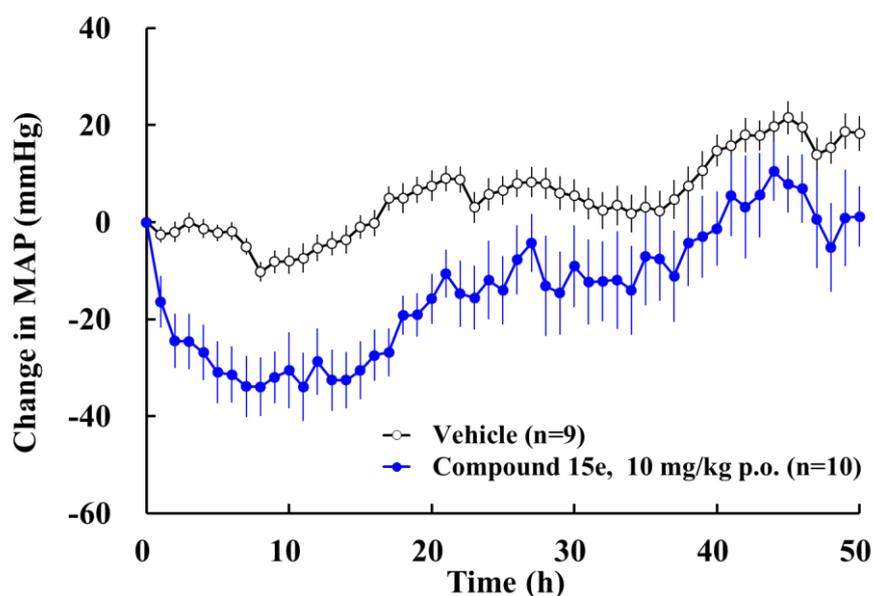
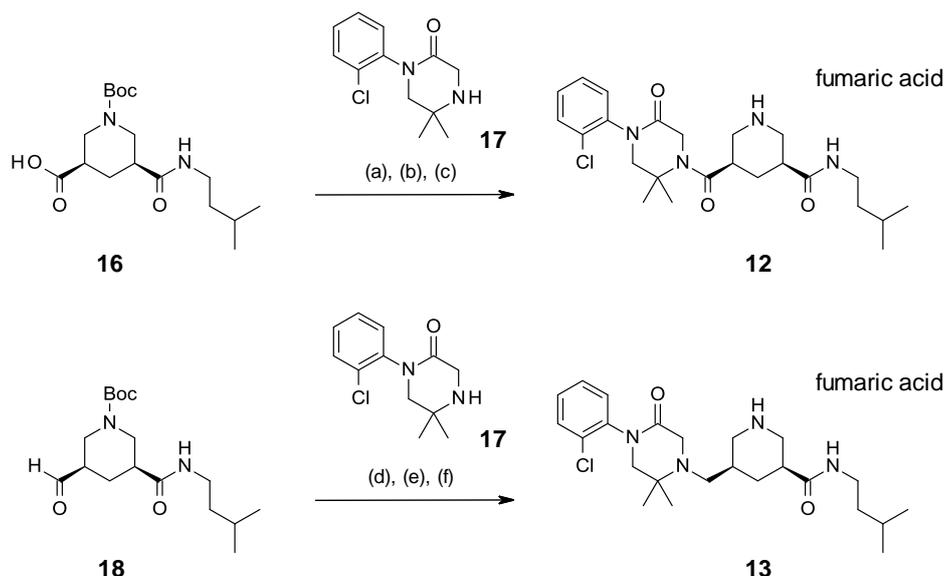


Figure 2-11. Effect of compound **15e** on mean arterial pressure (MAP) in dTG rat

2-6) 3,5-二置換ピペリジン誘導体の合成

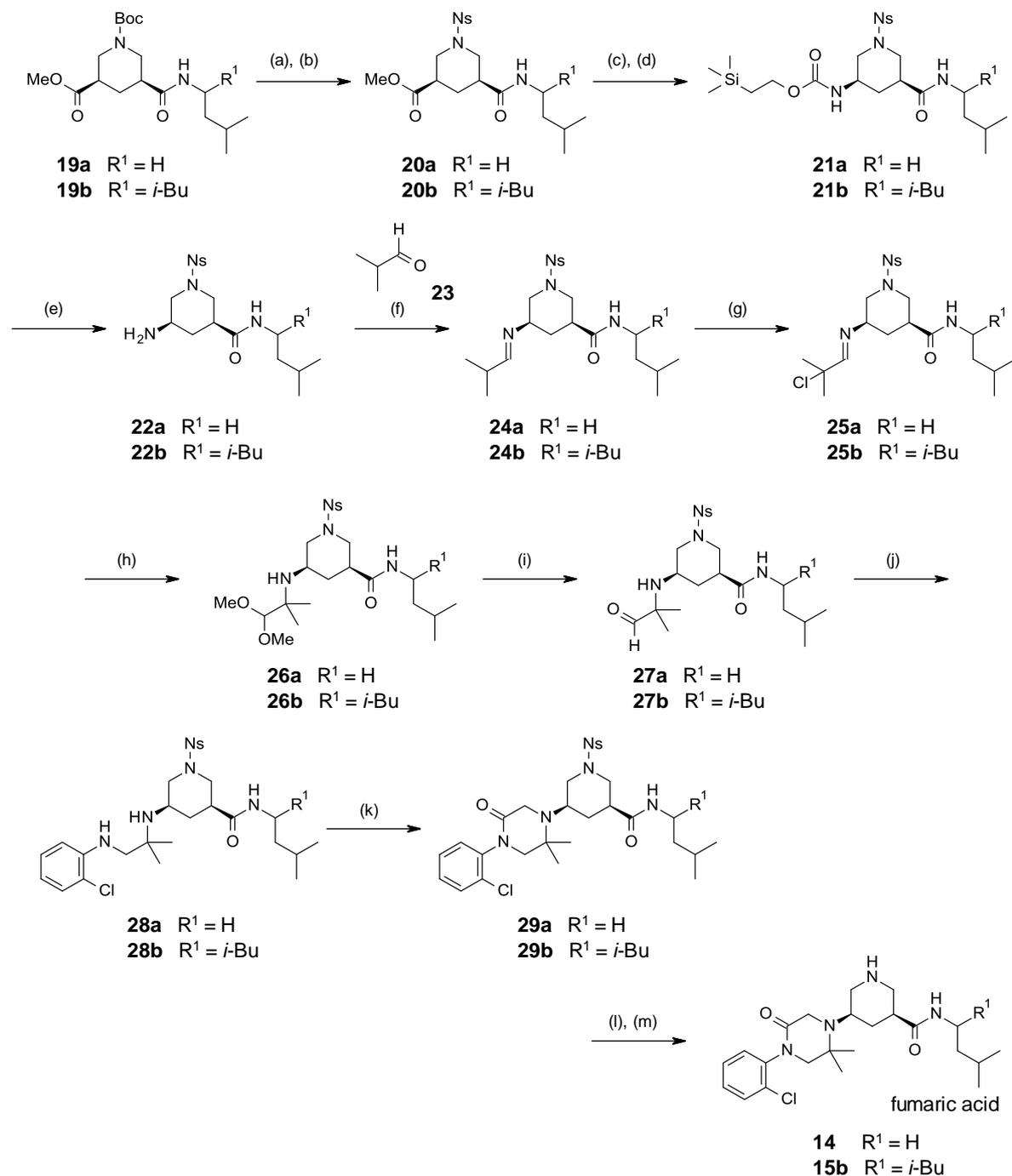
本章で使用した 3,5-二置換ピペリジン誘導体の合成法を Scheme 2-1, 2-2, 2-3, 2-5 に示した。まず、化合物 **12** および **13** の合成法を Scheme 2-1 に示す。目的物 **12** は、文献既知の光学活性なカルボン酸 **16**¹⁶ およびアミン **17**¹⁷ を縮合し、Boc 基を TFA で除去した後にフマル酸を添加することで合成した。一方、目的物 **13** は、文献既知である光学活性なアルデヒド **18**¹⁶ とアミン **17** を NaBH(OAc)₃ を用いた還元的アミノ化により結合した後、Boc 基の除去とフマル酸の添加により得た。



Scheme 2-1. Reagents and conditions: (a) **17**, BOP reagent, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 24 h. quant.; (b) TFA, CH₂Cl₂, rt, 1.5 h; (c) fumaric acid, MeOH, rt, 5 min., 88% (2 steps); (d) **17**, NaBH(OAc)₃, AcOH, 1,2-dichloroethane, 0 °C, 4 h, 66%; (e) TFA, CH₂Cl₂, rt, 2 h; (f) fumaric acid, MeOH, rt, 5 min., 62% (2 steps).

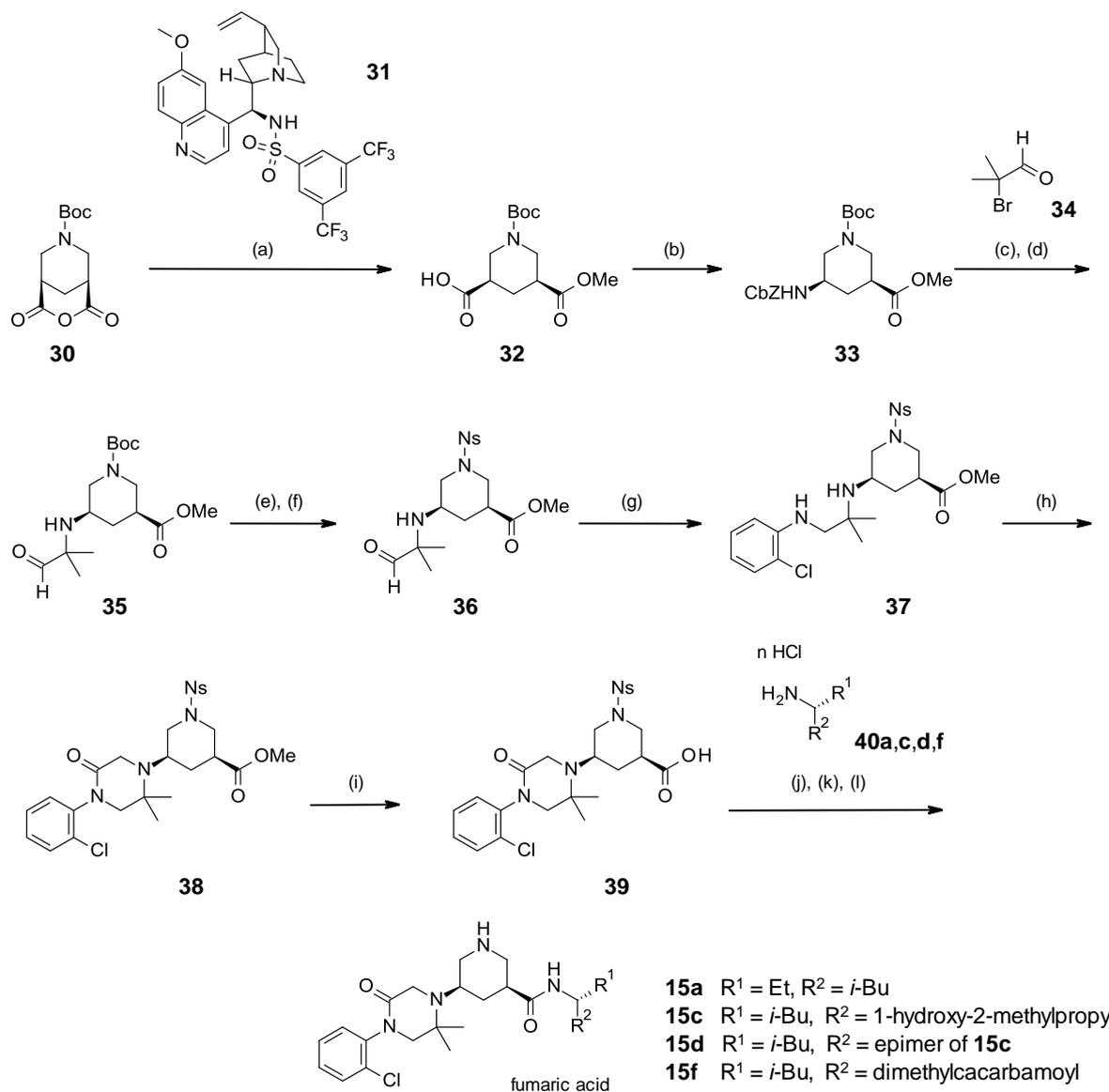
次に、化合物 **14**, **15b** の合成法を Scheme 2-2 に示す。まず、光学活性体 **19a-b**¹⁶ の Boc 基を除き Ns 基で保護し直し **20a-b** とした。エステル基を 1N 水酸化ナトリウム水溶液で加水分解後、ジフェニルホスホリルアジドを用いた Curtius 転位により Teoc 基で保護された **21a-b** を得た。Teoc 基を 1 M TBAF で除去することでアミン **22a-b** へと誘導した。アミン **22a-b** と 2-メチルプロパナール (**23**) によりイミン **24a-b** を形成後、NCS を用いたクロロ化によって α -クロロアルドイミン **25a-b** を得た。 α -クロロアルドイミン **25a-b** をメタノール中加熱することで、イミンへのメタノール付加とアジリジン環形成を行い、さらにメタノールをアジリジン環に付加させることで、アセタール **26a-b** を得た¹⁸。ジメチルアセタールを濃塩酸で処理しアルデヒド **27a-b** とした後、2-クロロアニリンとの還元的アミノ化により **28a-b** へと誘導した。引き続きプロモアセチルブロミドを作用させることで、ケトピペラジン環を構築した (**29a-b**)。この際、ピペリジン環に隣接する窒素原子周辺が非常に嵩高いために、アニリン部分

が先にブロモアセチルブロミドと反応し、**29a-b** に示す位置選択性が発現したと考えられる。最後に、Ns 基を除去しフマル酸を添加することで、目的物 **14**, **15b** を合成した。



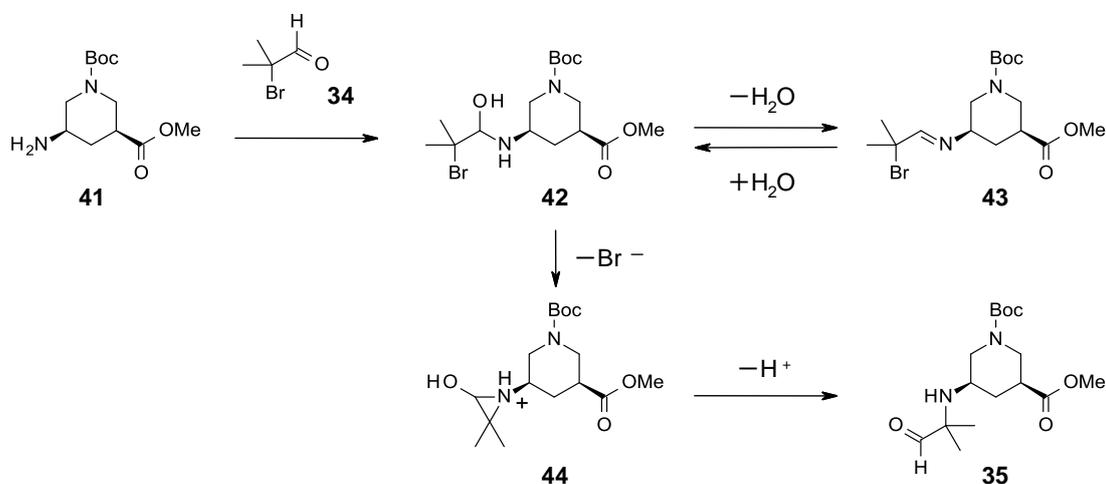
Scheme 2-2. Reagents and conditions: (a) TFA, CH₂Cl₂, rt; (b) NsCl, NaHCO₃, CH₂Cl₂, rt; (c) 1N NaOH aq., MeOH, 60 °C; (d) diphenylphosphoryl azide, Et₃N, toluene, 2-trimethylsilylethanol, 90 °C; (e) 1 M TBAF in THF, THF, 50 °C; (f) 2-methylpropanal (**23**), CH₂Cl₂, rt; (g) NCS, CH₂Cl₂, rt; (h) MeOH, 65 °C; (i) conc. HCl aq., CH₂Cl₂, 40 °C; (j) 2-chloroaniline, AcOH, toluene, 130 °C, then NaBH(OAc)₃, rt; (k) bromoacetyl bromide, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, then 40 °C; (l) PhSH, Cs₂CO₃, CH₃CN, rt; (m) fumaric acid, MeOH, rt.

Scheme 2-2 に示した合成ルートにより、種々の 3,5-二置換ピペリジン誘導体の合成が可能になった。しかしながら、2級アミドの変換を行う場合には、**19a-b** の段階で2級アミドを導入しておく必要があり非効率的なルートであった。そこで、2級アミドを終盤に構築する Scheme 2-3 の合成ルートを開発した。化合物 **15a,c,d,f** は本ルートにより合成している。



Scheme 2-3. Reagents and conditions: (a) **31**, MeOH, THF, $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 1 day, 69%, 94% ee; (b) diphenylphosphoryl azide, Et_3N , toluene, benzyl alcohol, $90\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h, 96%; (c) H_2 , Pd on carbon, MeOH, rt, 1.5 h; (d) 2-bromo-2-methylpropanal **34**, DMF, water, rt, 1 day, 73% (2 steps); (e) 4N-HCl in 1,4-dioxane, rt, 0.5 h; (f) NsCl, NaHCO_3 , 1,4-dioxane, water, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h, 86% (2 steps); (g) 2-chloroaniline, AcOH, toluene, $130\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h, then $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, rt, 16 h, 74%; (h) bromoacetyl bromide, Et_3N , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2.5 h, then $40\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, 78%; (i) 1N NaOH aq., MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$, quant.; (j) amine **40a,c,d,f**, HBTU, *N,N*-diisopropylethylamine, DMF, $0\text{ }^\circ\text{C}$; (k) PhSH, Cs_2CO_3 , DMF, rt; (l) fumaric acid, MeOH, rt.

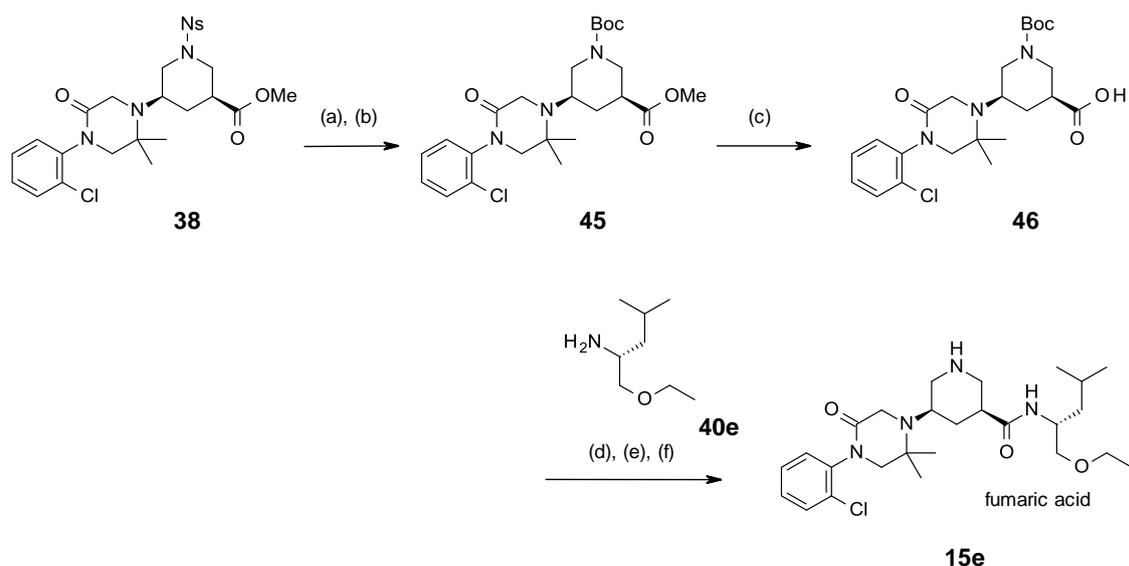
まず、文献に従い酸無水物 **30**¹⁶ に対してメタノールによる不斉加溶媒分解を行った。しかしながら、文献記載の不斉触媒(DHQ)₂AQN を用いた場合エナンチオ選択性が低かったため (72% ee)¹⁶、反応条件の検討を行った。その結果、不斉触媒としてスルホンアミド **31**¹⁹ を用い-20 °C で 1 日反応を行うことにより、高いエナンチオ選択性 (94% ee) で開環体 **32** が得られることが分かった。引き続き、Curtius 転位を行い CbZ で保護されたアミン **33** へと誘導した。**33** の CbZ 基を除去した後、ジメチルアセトアルデヒドが導入された **35** の合成を行った。これまで、ジメチルアセトアルデヒドの導入には、2-メチルプロパナール (**23**) によるイミン形成、NCS によるクロロ化、アジリジンを経由した転位反応、アセタールの加水分解の計 4 工程が必要であった (Scheme 2-2, **22a-b** ⇒ **27a-b**)。今回、短工程化を期待し、先にクロロ化された 2-クロロ-2-メチルプロパナールを用いてイミン形成を試みた。しかし反応が遅かったため、より反応性の高い 2-ブロモ-2-メチルプロパナール (**34**) を用いて反応を行った。その結果、わずか 1 工程で **35** が得られることが分かった。本反応は、水の添加で促進され、添加しない場合イミン **43** が単離される。また、脱離能の低いクロロ基では同様の反応が起こらないことから、Scheme 2-4 に示した機構で進行していると推察した。すなわち、まずアミン **41** と 2-ブロモ-2-メチルプロパナール (**34**) が反応することで、アミナール **42** を経由してイミン **43** が生成する。しかし、過剰な水存在下ではアミナール **42** とイミン **43** が平衡状態となる。ここで脱離能の高いブロモ基が存在する場合、アミナール **42** が分子内で環化し **44** へと変換される。最後に、アルデヒド形成と同時に開環が起こり **35** が生成したと考えた。化合物 **35** が得られたので、次に Boc 基を除き Ns 基で保護し直し、2-クロロアニリンとの還元的アミノ化を行うことでアニリン誘導体 **37** へと誘導した。引き続き、ブロモアセチルブロミドを作用させケトピペラジン環を構築後、エステル基を加水分解することでカルボン酸 **39** を得た。最後に、種々の光学活性なアミン誘導体 **40a,c,d,f** と縮合し Ns 基を除去した後、フマル酸を添加することで目的物 **15a,c,d,f** を合成した。



Scheme 2-4. Plausible mechanism

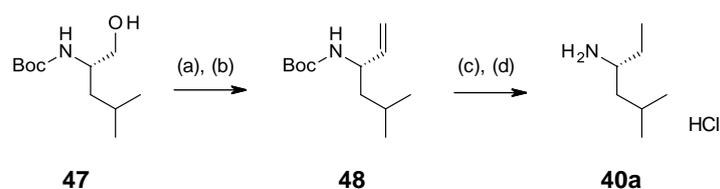
Scheme 2-3 に示した合成ルートによって、2級アミドの効率的な変換が可能となった。しかしながら、このルートで大量合成を行った場合、最終工程直前に用いるチオフェノール由来の不純物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで除去することが困難であった。そこで、早い段階でNs基を除去するScheme 2-5のルートに変更することとした。化合物**15e**は本ルートにより合成している。

まず、Scheme 2-3 で得られた化合物**38**のNs基を除きBoc基で保護し直し、エステル基を加水分解することで**46**を得た。光学活性なアミン誘導体**40e**と縮合した後、Boc基の除去とフマル酸の添加により、目的物**15e**を合成した。

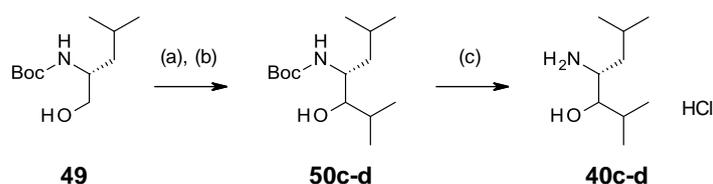


Scheme 2-5. Reagents and conditions: (a) PhSH, Cs₂CO₃, CH₃CN, rt, 2.5 h, quant.; (b) (Boc)₂O, NaHCO₃, AcOEt, water, rt, 0.5 h, 68%; (c) LiOH-H₂O, THF, water, 0 °C, 2 h, quant.; (d) amine **40e**, HBTU, *N,N*-diisopropylethylamine, DMF, 0 °C; (e) TFA, CH₂Cl₂, rt; (f) fumaric acid, MeOH, rt, 51% (3 steps).

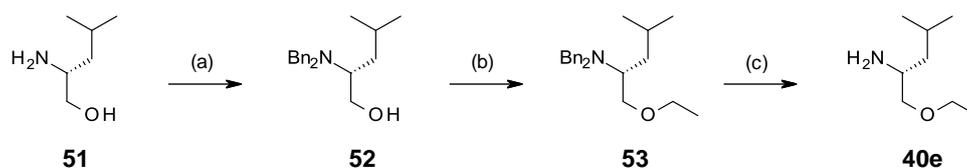
次に、Scheme 2-3, 2-5 で使用した光学活性なアミン**40a,c,d** および**40e**の合成法をScheme 2-6, 2-7, 2-8に示す。なお、Scheme 2-3 使用したジメチルカルバモイル基を持つ光学活性アミン**40f**は、文献記載の方法で合成した²⁰。まず、アミン**40a**の合成法をScheme 2-6に示す。はじめにL-Leucinol **47**を酸化した後、Wittig反応によりメチレン化された**48**を得た。引き続き水素添加によって二重結合を還元しBoc基を除去することでアミン**40a**を合成した。アミン**40c-d**は、Scheme 2-7に示す方法で合成した。まず、Boc-D-Leucinol **49**を酸化しアルデヒドとした後、イソプロピルリチウムと反応させた。得られたジアステレオマー混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離することで**50c-d**を得た(dr = 8:7)。最後に塩酸で処理することでアミン**40c-d**を合成した。アミン**40e**は、Scheme 2-8に示す方法で合成した。まず、D-Leucinol **51**のアミノ基をジベンジル化し**52**を得た。アルコール**52**をエチル化した後、水素添加によりベンジル基を除去することで目的のエーテル体**40e**を合成した。



Scheme 2-6. Reagents and conditions: (a) $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$, Et_3N , DMSO, rt, 10 min.; (b) Methylene triphenyl phosphorane, toluene, rt, 16 h, 58% (2 steps); (c) H_2 , 10% Pd on carbon wet (50%), MeOH, rt, 1.5 h; (d) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 10 min., then 4N HCl/1,4-dioxane, 5 min., 56% (2 steps).



Scheme 2-7. Reagents and conditions: (a) $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$, Et_3N , DMSO, rt, 10 min., dr = 8:7; (b) 0.7 M isopropyl lithium, toluene, -78°C , then separation; (c) 4N HCl/1,4-dioxane, rt.



Scheme 2-8. Reagents and conditions: (a) BnBr, K_2CO_3 , EtOH, rt, 4 days, 85%; (b) EtI, NaH, THF, rt, 18 h, 81%; (c) H_2 , 20% Pd(OH)₂ on carbon, MeOH, rt, 6 h, 98%.

2-7) 小括

本章では、活性中心としてピペリジン環を有する新規レニン阻害剤の探索を行った。まず、Roche社のRo-X1およびDS-8108bの構造を基に、4位の嵩高い脂溶性置換基を除去した新規3,5-二置換ピペリジン誘導体をデザインした。ヒトレニンとの複合体X線結晶構造解析を行うことで、ピペリジン環とケトピペラジン環の最適な結合様式を特定し、高いレニン阻害活性を示す化合物**14**を獲得した。さらに、2級アミド近傍にアルキル鎖を導入しS₁'ポケットを活用することで、より高い阻害活性を示す化合物**15b**を獲得した。最後に、P₂'部位に極性基を導入することで代謝安定性の改善を行い、ラットで経口投与において良好な生物学的利用率と優れた降圧作用を示す3,5-二置換ピペリジン誘導体**15e**を獲得した。

2-8) 実験の部

2-8-1) Synthesis

General

Starting reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification unless otherwise specified. Flash column chromatography was performed on silica gel 60 N (spherical, neutral), 40–50 mesh, purchased from Kanto Chemical Co., Inc., or NH silica gel, 100–200 mesh, purchased from Fuji Silysia Chemical Ltd. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were obtained on a Varian Unity 400 or 500 spectrometer, or a Bruker Avance III 500 spectrometer. Spectra were taken in the indicated solvent at ambient temperature, and chemical shifts are reported in parts per million (ppm (d)) relative to the lock of the solvent used. Resonance patterns are recorded with the following notations: br (broad), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), and m (multiplet). Mass spectra were obtained on a JEOL JMS-LCmate or an LC-MS system composed of Waters Xevo Q-ToF MS and Acquity UPLC systems. Optical rotations were measured on an Autopol V Plus. Elemental analyses for CHN and ClF were determined on a Microcorder JM10 and a Dionex ICS-1500, respectively. Infrared spectrum was recorded in a KBr disc or ATR mode with a Jasco FT/IR-6100.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazine-1-carbonyl]-*N*-isopentylpiperidine-3-carboxamide fumarate (12)

BOP reagent (134 mg, 0.528 mmol) was added to a solution of (3*R*,5*S*)-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-(isopentylcarbamoyl)piperidine-3-carboxylic acid **16** (120 mg, 0.351 mmol) and 1-(2-chlorophenyl)-5,5-dimethylpiperazin-2-one **17** (100 mg, 0.418 mmol) and triethylamine (68.0 mg, 0.527 mmol) in CH_2Cl_2 (5.00 mL) under ice-cooling, and then the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH_2Cl_2 . Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/1 to 0/1) to obtain *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-3-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazine-1-carbonyl]-5-(isopentylcarbamoyl)piperidine-1-carboxylate (200 mg, quant.) as a colorless solid. Trifluoroacetic acid (1.20 mL) was added to a solution of *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-3-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazine-1-carbonyl]-5-(isopentylcarbamoyl)piperidine-1-carboxylate (200 mg, 0.355 mmol) in CH_2Cl_2 (2.00 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 2.5 h. Saturated NaHCO_3 aqueous solution was added to the reaction mixture under ice-cooling, followed by extraction with CH_2Cl_2 . Then, the organic layer was washed with brine, and dried over

anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, CH₂Cl₂/MeOH = 1/0 to 3/1) to obtain the free base of **12** (145 mg, 0.313 mmol). Fumaric acid (36.3 mg, 0.313 mmol) was added to a solution of the free base of **12** (145 mg, 0.313 mmol) in MeOH (1.00 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 5 min. The solvent was evaporated under reduced pressure, and then Et₂O was added to the residue. The resulting solid was collected by filtration to obtain **12** (181 mg, 88%, 2 steps) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.58-7.52 (m, 1H), 7.45-7.36 (m, 3H), 6.70 (s, 2H), 4.40-4.33 (m, 2H), 3.93-3.86 (m, 1H), 3.74-3.66 (m, 1H), 3.44-3.38 (m, 1H), 3.22-3.03 (m, 6H), 2.86-2.78 (m, 1H), 2.22-2.15 (br m, 1H), 1.80-1.73 (m, 1H), 1.64-1.56 (m, 5H), 1.43-1.36 (m, 2H), 1.11 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₄H₃₅ClN₄O₃+H: 463.2476; found: 463.2462.

(3*S*,5*R*)-5-[[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]methyl]-*N*-isopentylpiperidine-3-carboxamide fumarate (13**)**

NaBH(OAc)₃ (249 mg, 1.17 mmol) was added to a solution of *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-3-formyl-5-(isopentylcarbamoyl)piperidine-1-carboxylate **18** (133 mg, 0.588 mmol) and 1-(2-chlorophenyl)-5,5-dimethylpiperazin-2-one **17** (281 mg, 1.17 mmol) and acetic acid (43.0 mg, 0.717 mmol) in 1,2-dichloroethane (5.00 mL) under ice-cooling, and then the reaction mixture was stirred at same temperature for 3.5 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/1 to 0/1) to obtain *tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-[[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]methyl]-5-(isopentylcarbamoyl)piperidine-1-carboxylate (212 mg, 66%) as a colorless solid. Trifluoroacetic acid (1.20 mL) was added to a solution of *tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-[[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]methyl]-5-(isopentylcarbamoyl)piperidine-1-carboxylate (212 mg, 0.386 mmol) in CH₂Cl₂ (2.00 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. Saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture under ice-cooling, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, CH₂Cl₂/MeOH = 1/0 to 3/1) to obtain the free base of **13** (107 mg, 0.238 mmol). Fumaric acid (27.7 mg, 0.238 mmol) was added to a solution of the free base of **13** (107 mg, 0.238 mmol) in MeOH (1.00 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 5 min. The solvent was evaporated under reduced pressure, and then Et₂O was added to the residue. The resulting

solid was collected by filtration to obtain **13** (134 mg, 62%, 2 steps) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.54 (dd, *J* = 7.2, 2.2 Hz, 1H), 7.41-7.30 (m, 3H), 6.69 (s, 2H), 3.53-3.33 (m, 5H), 3.24-3.17 (m, 2H), 3.04-2.97 (m, 1H), 2.74-2.39 (m, 4H), 2.15-2.03 (m, 2H), 1.65-1.58 (m, 1H), 1.42-1.33 (m, 2H), 1.26-1.21 (m, 4H), 1.12 (d, *J* = 5.9 Hz, 4H), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₄H₃₇ClN₄O₂+H: 449.2683; found: 449.2683.

Methyl (3*R*,5*S*)-5-[(1-isobutyl-3-methylbutyl)carbamoyl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylate (20b)

Trifluoroacetic acid (15.0 mL) was added to a solution of **19b** (950 mg, 2.30 mmol) in CH₂Cl₂ (23.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 1.5 h. Saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain crude methyl (3*R*,5*S*)-5-[(1-isobutyl-3-methylbutyl)carbamoyl]piperidine-3-carboxylate. Et₃N (511 mg, 5.06 mmol) and 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (559 mg, 2.53 mmol) were added to a solution of the crude methyl (3*R*,5*S*)-5-[(1-isobutyl-3-methylbutyl)carbamoyl]piperidine-3-carboxylate in CH₂Cl₂ (25.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 18 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 1/1) to obtain **20b** (1.00 g, 87%, 2 steps) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.01-7.98 (m, 1H), 7.76-7.68 (m, 2H), 7.65-7.63 (m, 1H), 5.17 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.11-3.93 (m, 3H), 3.71 (s, 3H), 2.90-2.80 (m, 2H), 2.69-2.61 (m, 1H), 2.45-2.37 (m, 1H), 2.30-2.23 (m, 1H), 1.86-1.74 (m, 1H), 1.61-1.53 (m, 2H), 1.31-1.24 (m, 4H), 0.95-0.88 (m, 12H).

Methyl (3*R*,5*S*)-5-isopentylcarbamoyl-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylate (20a)

The title compound was prepared from **19a** in a manner similar to that described for **20b** as a colorless solid (81%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.01-7.99 (m, 1H), 7.75-7.69 (m, 2H), 7.66-7.63 (m, 1H), 5.65-5.57 (m, 1H), 4.15-4.10 (m, 1H), 4.00-3.96 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.32-3.22 (m, 2H), 2.91-2.83 (m, 2H), 2.68-2.61 (m, 1H), 2.45-2.39 (m, 1H), 2.31-2.26 (m, 1H), 1.81 (q, *J* = 11.8 Hz, 1H), 1.65-1.57 (m, 1H), 1.39 (q, *J* = 8.3 Hz, 2H), 0.93 (d, *J* = 9.5 Hz, 6H).

2-Trimethylsilylethyl *N*-[(3*R*,5*S*)-5-[(1-isobutyl-3-methylbutyl)carbamoyl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonyl-3-piperidyl]carbamate (21b)

1*N* NaOH aqueous solution (10.0 mL, 10.0 mmol) were added to a solution of **20b** (2.00 g, 2.01 mmol) in MeOH (20.0 mL) at room temperature, and then the mixture was stirred at 60 °C for 1 h. 1 *N* HCl aqueous solution was added to the reaction mixture to acidify it (pH = 2-3). The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂, washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain crude (3*R*,5*S*)-5-[(1-isobutyl-3-methylbutyl)carbamoyl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylic acid. Et₃N (254 mg, 2.51 mmol) and diphenylphosphoryl azide (614 mg, 2.23 mmol) were added to a solution of the crude (3*R*,5*S*)-5-[(1-isobutyl-3-methylbutyl)carbamoyl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylic acid in toluene (10.0 mL) at rt, and the mixture was stirred at 90 °C for 2 h. After cooling, 2-trimethylsilylethanol was added to the reaction mixture, and then stirred at 90 °C for 24 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and poured into water, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 1/1) to obtain **21b** (25.5 g, 96%, 2 steps) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.07-8.03 (m, 1H), 7.74-7.70 (m, 2H), 7.64-7.60 (m, 1H), 5.39-5.30 (m, 1H), 4.71-4.66 (m, 1H), 4.17-4.11 (m, 1H), 4.07-4.00 (m, 2H), 3.94-3.88 (m, 1H), 3.68-3.62 (m, 1H), 3.49 (s, 2H), 2.97-2.84 (m, 1H), 2.67-2.61 (m, 1H), 2.52-2.45 (m, 1H), 2.12-2.07 (m, 1H), 1.63-1.54 (m, 2H), 1.28-1.23 (m, 4H), 0.92-0.87 (m, 14H), 0.04 (s, 9H).

2-Trimethylsilylethyl *N*-[(3*R*,5*S*)-5-isopentylcarbamoyl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonyl-3-piperidyl]carbamate (21a)

The title compound was prepared from **20a** in a manner similar to that described for **21b** as a colorless solid (87%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.07-8.04 (m, 1H), 7.73-7.69 (m, 2H), 7.65-7.60 (m, 1H), 5.86-5.80 (m, 1H), 4.85-4.76 (m, 1H), 4.15-3.90 (m, 4H), 3.66-3.59 (m, 1H), 3.29-3.22 (m, 2H), 3.02-2.96 (m, 1H), 2.70-2.63 (m, 1H), 2.52-2.46 (m, 1H), 2.12-2.03 (m, 1H), 1.68-1.57 (m, 2H), 1.39 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.00-0.93 (m, 2H), 0.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H), 0.04 (s, 9H).

(3*S*,5*R*)-5-Amino-*N*-(1-isobutyl-3-methylbutyl)-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (22b)

1 M Tetrabutylammonium fluoride in THF (4 mL) was added to a solution of **21b** (660 mg, 1.10 mmol) in THF (10.0 mL) at room temperature, and then the reaction mixture was stirred at 50 °C for 3 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂.

Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (eluent, AcOEt /MeOH = 1/0 to 85/15) to obtain **22b** (380 mg, 76%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.98 (dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H), 7.74-7.67 (m, 2H), 7.62 (dd, *J* = 6.8, 2.0 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.08-4.03 (m, 1H), 3.89 (dd, *J* = 12.5, 3.2 Hz, 2H), 2.94-2.89 (m, 1H), 2.85 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H), 2.47-2.38 (m, 2H), 2.13-2.07 (m, 1H), 1.62-1.41 (m, 5H), 1.30-1.22 (m, 4H), 0.94-0.88 (m, 12H).

(3*S*,5*R*)-5-Amino-*N*-isopentyl-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (22a)

The title compound was prepared from **21a** in a manner similar to that described for **22b** as a colorless solid (53%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.98 (dd, *J* = 7.2, 2.2 Hz, 1H), 7.74-7.67 (m, 2H), 7.64-7.62 (m, 1H), 6.09 (br s, 1H), 5.86-5.66 (m, 2H), 3.94-3.87 (m, 2H), 3.34-3.28 (m, 1H), 2.95-2.82 (m, 2H), 2.50-2.40 (m, 2H), 2.13-2.06 (m, 1H), 1.68-1.38 (m, 5H), 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H).

(3*S*,5*R*)-5-[(2,2-Dimethoxy-1,1-dimethylethyl)amino]-*N*-(1-isobutyl-3-methylbutyl)-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (26b)

2-Methylpropanal **23** (61.0 mg, 0.847 mmol) was added to a solution of **22b** (380 mg, 0.836 mmol) in CH₂Cl₂ (5.00 mL) at room temperature, and then the reaction mixture was stirred at the same temperature for 2 h. After filtration, *N*-chlorosuccinimide (110 mg, 0.827 mmol) was added to the reaction mixture at room temperature, and then stirred at the same temperature for 2 h. The solvent was evaporated under reduced pressure, and MeOH (5.00 mL) was added to the residue at room temperature, then, the reaction mixture was stirred at 65 °C for 2 days. 1*N* NaOH aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 7/3 to 0/1, and then CH₂Cl₂/MeOH = 1/0 to 85/15) to obtain **26b** (220 mg, 46%, 3 steps) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.96 (dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz, 1H), 7.73-7.65 (m, 2H), 7.63-7.60 (m, 1H), 5.21 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.08-4.02 (m, 1H), 3.92-3.85 (m, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 2.87-2.76 (m, 2H), 2.50-2.42 (m, 1H), 2.36-2.30 (m, 1H), 1.99-1.94 (m, 1H), 1.61-1.42 (m, 4H), 1.28-1.23 (m, 4H), 1.06 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.93-0.88 (m, 12H).

(3*S*,5*R*)-5-[(2,2-Dimethoxy-1,1-dimethylethyl)amino]-*N*-isopentyl-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (26a)

The title compound was prepared from **22a** in a manner similar to that described for **26b** as a colorless solid (58%, 3 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.98-7.96 (m, 1H), 7.73-7.66

(m, 2H), 7.64-7.61 (m, 1H), 6.13-6.05 (br m, 1H), 5.63-5.56 (br m, 1H), 3.89-3.84 (m, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.25 (td, $J = 7.4, 5.9$ Hz, 2H), 2.87-2.78 (m, 2H), 2.50-2.44 (m, 1H), 2.36 (dd, $J = 12.5, 10.9$ Hz, 1H), 2.01-1.95 (m, 1H), 1.60-1.38 (m, 4H), 1.05 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H).

(3*S*,5*R*)-5-[(1,1-Dimethyl-2-oxoethyl)amino]-*N*-(1-isobutyl-3-methylbutyl)-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (27b)

12*N* HCl aqueous solution (5.00 mL) was added to a solution of **26b** (251 mg, 0.440 mmol) in CH₂Cl₂ (5.00 mL) at room temperature, and then the reaction mixture was stirred at 40 °C for 21 h. 5*N* NaOH aqueous solution was added to the reaction mixture at 0 °C, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/1 to 0/1) to obtain **27b** (135 mg, 58%) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.42 (s, 1H), 7.96-7.94 (m, 1H), 7.74-7.68 (m, 2H), 7.63-7.61 (m, 1H), 5.31 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.08-4.00 (m, 1H), 3.88-3.80 (m, 2H), 2.82 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H), 2.64-2.58 (m, 1H), 2.46-2.36 (m, 2H), 2.06-2.01 (m, 1H), 1.61-1.49 (m, 4H), 1.28-1.24 (m, 4H), 1.23 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 0.93-0.88 (m, 12H).

(3*S*,5*R*)-5-[(1,1-Dimethyl-2-oxoethyl)amino]-*N*-isopentyl-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (27a)

The title compound was prepared from **26a** in a manner similar to that described for **27b** as a colorless solid (61%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.42 (s, 1H), 7.95 (dd, $J = 6.1, 1.7$ Hz, 1H), 7.74-7.68 (m, 2H), 7.64-7.62 (m, 1H), 6.12-5.98 (br m, 1H), 5.90-5.82 (br m, 1H), 3.88-3.79 (m, 2H), 3.24 (dd, $J = 14.6, 6.3$ Hz, 2H), 2.84 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H), 2.63-2.57 (m, 1H), 2.48-2.39 (m, 2H), 2.08-2.03 (m, 1H), 1.64-1.57 (m, 1H), 1.55-1.46 (m, 1H), 1.39 (dd, $J = 15.1, 7.3$ Hz, 2H), 1.23 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 0.91 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H).

(3*S*,5*R*)-5-[[2-(2-Chloroanilino)-1,1-dimethylethyl]amino]-*N*-(1-isobutyl-3-methylbutyl)-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (28b)

To a single-neck flask upon which there was placed a Dean-Stark, **27b** (199 mg, 0.380 mmol), 2-chloroaniline (72.0 mg, 0.567 mmol), toluene (5.00 mL), and acetic acid (80.0 mg, 1.33 mmol) were added. The mixture was stirred at 130 °C for 1.5 h. After cooling in an ice bath, NaBH(OAc)₃ (161 mg, 0.759 mmol) was added to the reaction mixture. The mixture was further stirred at room temperature for 16 h. Saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was

evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 4/1 to 7/3) to obtain **28b** (125 mg, 52%) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.75-7.73 (m, 1H), 7.66-7.62 (m, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.53-7.50 (m, 1H), 7.27-7.24 (m, 1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 6.65-6.62 (m, 2H), 5.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.92-4.86 (m, 1H), 4.08-4.02 (m, 1H), 3.92-3.88 (m, 1H), 3.82-3.77 (m, 1H), 2.99-2.93 (m, 2H), 2.83 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H), 2.75-2.69 (m, 1H), 2.44-2.33 (m, 2H), 1.98-1.93 (m, 1H), 1.61-1.45 (m, 4H), 1.27-1.23 (m, 4H), 1.21 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 0.93-0.87 (m, 12H).

(3*S*,5*R*)-5-[[2-(2-Chloroanilino)-1,1-dimethylethyl]amino]-*N*-isopentyl-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (28a)

The title compound was prepared from **27a** in a manner similar to that described for **28b** as a colorless solid (91%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.70 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.65-7.62 (m, 1H), 7.60-7.57 (m, 1H), 7.52-7.48 (m, 1H), 7.26-7.24 (m, 1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 6.65-6.62 (m, 2H), 5.87-5.72 (m, 1H), 5.67-5.61 (m, 1H), 4.93-4.87 (br m, 1H), 3.93-3.89 (m, 1H), 3.77-3.74 (m, 1H), 3.27-3.19 (m, 2H), 2.96-2.93 (br m, 2H), 2.84 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H), 2.76-2.69 (m, 1H), 2.47-2.36 (m, 2H), 2.01-1.95 (m, 1H), 1.62-1.48 (m, 2H), 1.37 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.21 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H).

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-(1-isobutyl-3-methylbutyl)-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (29b)

A solution of bromoacetyl bromide (158 mg, 0.786 mmol) was added dropwise to a solution of **28b** (125 mg, 0.197 mmol) and Et₃N (159 mg, 1.57 mmol) in CH₂Cl₂ (5.00 mL) under ice-cooling. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 20 min, and then stirred at 40 °C for 6.5 h. After cooling, water was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 4/1 to 1/4) to obtain **29b** (120 mg, 90%) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.77-7.72 (m, 2H), 7.65 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.33-7.23 (m, 2H), 6.35-6.16 (m, 1H), 4.88-4.80 (m, 1H), 4.09-3.99 (m, 1H), 3.95-3.81 (m, 1H), 3.72-3.42 (m, 1H), 3.41-3.17 (m, 2H), 2.83-2.70 (m, 2H), 2.62-2.55 (m, 1H), 2.35-2.20 (m, 4H), 2.00-1.85 (m, 1H), 1.64-1.57 (m, 2H), 1.41-1.23 (m, 10H), 0.96-0.86 (m, 12H).

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-isopentyl-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (29a)

The title compound was prepared from **28a** in a manner similar to that described for **29b** as a colorless solid (66%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.97-7.93 (m, 1H), 7.76-7.67 (m, 2H), 7.66-7.60 (m, 1H), 7.48-7.43 (m, 1H), 7.33-7.28 (m, 2H), 7.23-7.19 (m, 1H), 5.86-5.73 (br m, 1H), 3.94-3.76 (m, 2H), 3.74-3.61 (m, 1H), 3.60-3.44 (m, 1H), 3.42-3.32 (m, 1H), 3.32-3.16 (m, 4H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.54-2.46 (m, 1H), 1.99-1.83 (m, 2H), 1.65-1.56 (m, 1H), 1.40-1.30 (m, 8H), 0.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H).

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-(1-isobutyl-3-methylbutyl)piperidine-3-carboxamide fumarate (15b**)**

Cesium carbonate (30.0 mg, 0.215 mmol) was added to a solution of **29b** (120 mg, 0.178 mmol) and thiophenol (30.0 mg, 0.273 mL) in CH₃CN (3.00 mL) under ice-cooling, and the mixture was stirred at room temperature for 1 day. Water and CH₂Cl₂ was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, CH₂Cl₂/MeOH = 1/0 to 7/3) to obtain the free base of **15b** (50.0 mg, 0.102 mmol). Fumaric acid (11.8 mg, 0.102 mmol) was added to a solution of the free base of **15b** (50.0 mg, 0.102 mmol) in MeOH (1.00 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 5 min. The solvent was evaporated under reduced pressure, and then **15b** (38.0 mg, 35%, 2 steps) was obtained as a colorless solid by washing with CH₂Cl₂ and diisopropyl ether. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.53 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.33-7.30 (m, 1H), 6.71 (s, 2H), 4.06-4.02 (m, 1H), 3.73-3.44 (m, 5H), 3.38-3.26 (m, 2H), 3.10-3.05 (m, 1H), 2.97 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H), 2.84-2.77 (m, 1H), 2.14-2.04 (m, 1H), 1.99-1.91 (m, 1H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.38-1.32 (m, 2H), 1.29-1.24 (m, 2H), 1.12 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.95-0.89 (m, 12H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₇H₄₃ClN₄O₂+H: 491.3153; found: 491.3175.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-isopentylpiperidine-3-carboxamide fumarate (14**)**

The title compound was prepared from **29a** in a manner similar to that described for **15b** as a colorless solid (69%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.53 (dd, *J* = 7.4, 2.0 Hz, 1H), 7.43-7.35 (m, 2H), 7.34-7.29 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 3.70-3.45 (m, 4H), 3.38-3.33 (m, 1H), 3.25-3.19 (m, 3H), 3.10-3.03 (m, 1H), 2.97 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H), 2.85-2.77 (m, 1H), 2.15-2.07 (m, 1H), 1.98-1.88 (m, 1H), 1.67-1.57 (m, 1H), 1.44-1.34 (m, 7H), 1.14-1.11 (m, 2H), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₃H₃₅ClN₄O₂+H: 435.2527; found: 435.2513.

(3*R*,5*S*)-1-*tert*-Butoxycarbonyl-5-methoxycarbonylpiperidine-3-carboxylic acid (32**)**

Methanol (43.0 mL, 105 mmol) was added to a solution of *tert*-butyl 2,4-dioxo-3-oxa-7-azabicyclo[3.3.1]nonane-7-carboxylate **30** (27.0 g, 105 mmol) and *N*-[(*S*)-(6-methoxy-4-quinolyl)-(5-vinylquinuclidin-2-yl)methyl]-3,5-bis(trifluoromethyl)benzenesulfonamide **31** (8.30 g, 13.8 mmol) in THF (1.00 L) at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 day. 1*N* HCl aq. was added to the reaction mixture, followed by extraction with Et₂O-AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO₄. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/5 to 0/1) to obtain **32** (20.7 g, 69%, 94% ee) as a colorless solid. The ee value of **32** was determined by chiral HPLC analysis: column, Chiral Pack AD-H (4.6 x 250 mm); eluent, *n*-hexane/ethanol = 95/5; flow rate = 0.5 mL/min; *t_R* of (3*R*,5*S*)-isomer = 29.6 min; *t_R* of (3*S*,5*R*)-isomer = 33.3 min. $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} +5.77$ (*c* 1.01, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.37 (br s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.72 (br s, 2H), 2.55-2.45 (m, 3H), 1.72 (q, *J* = 12.7 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 177.8, 172.9, 154.5, 80.7, 52.0, 45.0, 40.7, 40.6, 30.0, 28.4. IR: 3197, 2982, 1739, 1670, 1435, 1252, 1147, 819, 627 cm⁻¹. HRMS (ESI⁻): *m/z* calcd for C₁₃H₂₁NO₆-H: 286.1291; found: 286.1298.

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-(benzyloxycarbonylamino)piperidine-1,3-dicarboxylate (33)

Et₃N (11.3 mL, 80.8 mmol) and diphenylphosphoryl azide (20.4 g, 74.1 mmol) were added to a solution of **32** (19.4 g, 67.4 mmol) in toluene (335 mL) at rt, and the mixture was stirred at 90 °C for 1.5 h. After cooling, benzyl alcohol was added to the reaction mixture, and mixture was stirred at 90 °C for 3.5 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and poured into water, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 4/1) to obtain **33** (25.5 g, 96%) as a colorless liquid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} -4.16$ (*c* 1.01, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.26 (m, 5H), 5.11 (br s, 3H), 4.06-4.03 (m, 2H), 3.70-3.63 (m, 5H), 3.09-3.05 (m, 1H), 2.60 (br s, 1H), 2.31-2.27 (m, 1H), 1.61-1.56 (m, 1H), 1.45 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 173.4, 155.5, 154.5, 128.4, 128.2, 127.6, 127.0, 80.3, 66.8, 65.3, 52.0, 46.4, 45.0, 40.0, 32.8, 28.3. IR: 3342, 2976, 1720, 1671, 1522, 1435, 1239, 1157, 1047, 737 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₀H₂₈N₂O₆+H: 393.2026; found: 393.2023.

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-[(1,1-dimethyl-2-oxoethyl)amino]piperidine-1,3-dicarboxylate (35)

To a suspension of **33** (50.0 g, 127 mmol) in MeOH (300 mL), 10% Pd on carbon (50% wet, 5.00 g) were added. The suspension was stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 1.5 h. H₂ in the reaction vessel was replaced by N₂, and then Pd on carbon was separated by filtration. The solvent was evaporated under reduced pressure to obtain crude 1-*tert*-butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-aminopiperidine-1,3-dicarboxylate as a colorless liquid. 2-Bromo-2-methylpropanal **34** (112 g, 792 mmol) was added to a solution of the crude 1-*tert*-butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-aminopiperidine-1,3-dicarboxylate in a mixed solvent of DMF (211 mL) and water (52.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 day. Saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with water, 10% NaCl aqueous solution, and brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/1) to obtain **35** (31.8 g, 73%, 2 steps) as a light yellow liquid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} -9.47$ (*c* 1.05, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.43 (s, 1H), 4.32-4.21 (m, 1H), 4.11-4.01 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.71-2.61 (m, 1H), 2.54-2.41 (m, 2H), 2.30 (dd, *J* = 12.7, 10.7 Hz, 1H), 2.20 (br d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.40-1.33 (m, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.17 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 203.8, 172.9, 154.6, 80.1, 61.3, 51.9, 50.8, 48.9, 44.9, 41.2, 36.5, 28.4, 22.7, 21.9. IR: 3334, 2974, 1726, 1679, 1425, 1326, 1252, 1172, 937, 899, 772, 661 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₂₈N₂O₅+H: 329.2076; found: 329.2071.

Methyl (3*S*,5*R*)-5-[(1,1-dimethyl-2-oxoethyl)amino]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylate (36**)**

4*N*-HCl in 1,4-dioxane (362 mL, 1.45 mmol) was added to **35** (31.8 g, 96.6 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 0.5 h. The solvent was evaporated under reduced pressure to obtain crude methyl (3*S*,5*R*)-5-[(1,1-dimethyl-2-oxoethyl)amino]piperidine-3-carboxylate. NaHCO₃ (40.6 g, 483 mmol) and 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (21.2 g, 95.6 mmol) were added to a solution of the crude methyl (3*S*,5*R*)-5-[(1,1-dimethyl-2-oxoethyl)amino]piperidine-3-carboxylate in a mixed solvent of 1,4-dioxane (250 mL) and water (250 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 1.5 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/1 to 0/1) to obtain **36** (34.4 g, 86%, 2 steps) as a colorless solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} +22.0$ (*c* 1.04, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.44 (s, 1H), 8.01-7.99 (m, 1H), 7.74-7.69 (m, 2H), 7.66-7.63 (m, 1H), 4.01-3.98 (m, 1H), 3.83-3.80 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.79-2.64 (m, 3H), 2.38 (dd, *J* =

12.7, 10.7 Hz, 1H), 2.28 (br d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.32 (q, $J = 12.2$ Hz, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.18 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 203.7, 172.2, 148.0, 133.8, 132.1, 131.8, 130.9, 124.3, 61.4, 52.6, 52.1, 49.0, 46.6, 41.1, 35.9, 23.0, 21.9. IR: 3331, 2694, 1729, 1707, 1553, 1378, 1357, 1172, 1017, 782, 584 cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}+\text{H}$: 414.1335; found: 414.1330.

Methyl (3*S*,5*R*)-5-[[2-(2-chloroanilino)-1,1-dimethylethyl]amino]-1-(2-nitrophenyl) sulfonylpiperidine-3-carboxylate (37)

To a single-neck flask upon which there was placed a Dean-Stark, **36** (17.1 g, 41.4 mmol), 2-chloroaniline (7.87 g, 61.7 mmol), toluene (400 mL), and acetic acid (8.67 g, 144 mmol) were added. The mixture was stirred at 130 °C for 4 h. After cooling in an ice bath, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (17.5 g, 82.6 mmol) was added to the reaction mixture. The mixture was further stirred at room temperature for 16 h. Saturated NaHCO_3 aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 4/1 to 7/3) to obtain **37** (16.0 g, 74%) as a light colorless liquid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.64-7.58 (m, 2H), 7.52-7.48 (m, 1H), 7.25-7.23 (m, 1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 6.65-6.62 (m, 2H), 4.85 (br s, 1H), 4.07 (br d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.75-3.71 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.97 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 2.94 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 2.81-2.69 (m, 3H), 2.34 (dd, $J = 12.5, 10.5$ Hz, 1H), 2.21 (br d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 1.32 (q, $J = 12.2$ Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.21 (s, 3H).

Methyl (3*S*,5*R*)-5-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylate (38)

A solution of bromoacetyl bromide (24.4 g, 121 mmol) in CH_2Cl_2 (80.0 mL) was added dropwise to a solution of **37** (16.0 g, 30.5 mmol) and Et_3N (24.8 g, 245 mmol) in CH_2Cl_2 (320 mL) under ice-cooling over a period of 2.5 h. The reaction mixture was stirred at room temperature for 45 min, and then stirred at 40 °C for 3 h. After cooling, water was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH_2Cl_2 . Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 7/3 to 0/1) to obtain **38** (13.5 g, 78%) as a colorless liquid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.03-8.01 (m, 1H), 7.76-7.70 (m, 2H), 7.67-7.65 (m, 1H), 7.48-7.46 (m, 1H), 7.33-7.23 (m, 3H), 4.03 (br d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.87-3.81 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.71-3.22 (m, 5H), 2.76-2.68 (m, 3H), 2.24-2.17 (m, 1H), 1.73-1.66 (m, 1H), 1.41-1.35 (m, 6H).

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylic acid (39**)**

A solution of **38** (195 mg, 0.350 mmol) in MeOH (150 mL) was cooled in an ice bath, and then 1*N* NaOH aq. (2.00 mL, 2.00 mmol) was added. The mixture was stirred at the same temperature for 20 min. 1 *N* HCl aqueous solution was added to the reaction mixture to acidify it (pH = 2-3). The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂, washed with water and brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain **39** (190 mg, quant.) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.02-8.01 (m, 1H), 7.75-7.70 (m, 2H), 7.67-7.65 (m, 1H), 7.48 (dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H), 7.36-7.22 (m, 3H), 4.01-3.94 (m, 1H), 3.87-3.80 (m, 1H), 3.72 (br d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 3.63 (br d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 3.48-3.41 (m, 1H), 3.29-3.23 (m, 2H), 2.77-2.70 (m, 3H), 2.26-2.20 (m, 1H), 1.71-1.58 (m, 1H), 1.41-1.35 (m, 6H).

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-2-hydroxy-1-isobutyl-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (15c**)**

HBTU (207 mg, 0.544 mmol) was added to a solution of **39** (200 mg, 0.363 mmol) and (4*R*)-4-amino-2,6-dimethylheptan-3-ol hydrochloride **40c** (142 mg, 0.726 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (0.260 mL, 1.45 mmol) in DMF (3.00 mL) under ice-cooling, and then the reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, CH₂Cl₂/MeOH = 20/1) and NH silica gel column chromatography (eluent, AcOEt) to obtain (3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl] -*N*-[(1*R*)-2-hydroxy-1-isobutyl-3-methylbutyl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (182 mg) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.98-7.96 (m, 1H), 7.77-7.70 (m, 2H), 7.65-7.63 (m, 1H), 7.47 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.33-7.21 (m, 3H), 5.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.21-4.14 (m, 1H), 3.94-3.83 (m, 2H), 3.72-3.47 (m, 2H), 3.39-3.17 (m, 4H), 2.81-2.69 (m, 2H), 2.58-2.50 (m, 1H), 2.02-1.85 (m, 2H), 1.76 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 1.69-1.62 (m, 1H), 1.57-1.53 (m, 1H), 1.47-1.30 (m, 7H), 1.26-1.19 (m, 1H), 1.02 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.97-0.92 (m, 9H). Cesium carbonate (102 mg, 0.318 mmol) was added to a solution of (3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-2-hydroxy-1-isobutyl-3-methylbutyl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxamide (180 mg, 0.260 mmol) and thiophenol (56.0 μL, 0.547 mmol) in DMF (1.30 mL) under ice-cooling, and the mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. Water and CH₂Cl₂ was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine

and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, CH₂Cl₂/MeOH = 1/0 to 7/3) to obtain the free base of **15c** (44.0 mg, 0.0867 mmol). Fumaric acid (10.0 mg, 0.0867 mmol) was added to a solution of the free base of **15c** (44.0 mg, 0.0867 mmol) in MeOH (1.00 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 5 min. The solvent was evaporated under reduced pressure, and then **15c** (41.0 mg, 19%, 3 steps) was obtained as a colorless solid by washing with CH₂Cl₂ and diisopropyl ether. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.90 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.42-7.31 (m, 2H), 6.72 (s, 2H), 4.10-4.03 (m, 1H), 3.71-3.34 (m, 6H), 3.17-2.82 (m, 4H), 2.22-2.12 (m, 1H), 1.97-1.88 (m, 1H), 1.72-1.33 (m, 11H), 0.99-0.89 (m, 12H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₇H₄₃ClN₄O₃+H: 507.3102; found: 507.3094.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-ethyl-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (15a)

The title compound was prepared from **39** and (3*R*)-5-methylhexan-3-amine hydrochloride **40a** in a manner similar to that described for **15c** as a colorless solid (42%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.85 (br d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.33-7.31 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 3.87-3.83 (m, 1H), 3.67-3.44 (m, 4H), 3.38-3.23 (m, 3H), 3.11-3.05 (m, 1H), 2.99 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H), 2.85-2.79 (m, 1H), 2.13-2.06 (m, 1H), 2.00-1.91 (m, 1H), 1.65-1.50 (m, 2H), 1.41-1.25 (m, 9H), 0.94-0.88 (m, 9H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₅H₃₉ClN₄O₂+H: 463.2840; found: 463.2874.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-2-hydroxy-1-isobutyl-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide 0.25 fumarate (15d)

The title compound was prepared from **39** and (4*R*)-4-amino-2,6-dimethylheptan-3-ol hydrochloride **40d** in a manner similar to that described for **15c** as a colorless solid (27%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.53 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.43-7.31 (m, 3H), 6.73 (s, 0.25H), 4.20-4.14 (m, 1H), 3.70-3.34 (m, 6H), 3.11-3.07 (m, 2H), 3.02-2.96 (m, 1H), 2.92-2.83 (m, 1H), 2.20-2.15 (m, 1H), 1.97-1.90 (m, 1H), 1.63-1.49 (m, 4H), 1.43-1.30 (m, 7H), 0.99-0.92 (m, 12H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₇H₄₃ClN₄O₃+H: 507.3102; found: 507.3098.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(dimethylcarbamoyl)-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (15f)

The title compound was prepared from **39** and (2*R*)-2-amino-*N,N*,4-trimethylpentanamide hydrochloride **40f** in a manner similar to that described for **15c** as a colorless solid (16%, 3 steps). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.57-7.52 (m, 1H), 7.44-7.33 (m, 3H), 6.74 (s, 2H),

3.72-3.47 (m, 4H), 3.38-3.32 (m, 1H), 3.28-3.21 (m, 2H), 3.15 (s, 3H), 3.13-2.98 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.91-2.81 (m, 2H), 2.28-2.20 (m, 1H), 1.92-1.81 (m, 1H), 1.72-1.57 (m, 2H), 1.47-1.33 (m, 7H), 0.99-0.92 (m, 6H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₆H₄₀ClN₅O₃+H: 506.2898; found: 506.2875.

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-1,3-dicarboxylate (45)

Cesium carbonate (9.31 g, 28.6 mmol) was added to a solution of **38** (13.5 g, 23.9 mmol) and thiophenol (3.64 mL, 35.7 mmol) in CH₃CN (400 mL) under ice-cooling, and the mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. After concentration under reduced pressure, water was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, CH₂Cl₂/MeOH = 1/0 to 7/3) to afford methyl (3*S*,5*R*)-5-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-3-carboxylate (9.10 g, quant.). Di-*t*-butyl dicarbonate (6.00 g, 27.5 mmol) was added to a solution of methyl (3*S*,5*R*)-5-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-3-carboxylate (9.10 g, 23.9 mmol) obtained above and NaHCO₃ (6.20 g, 73.8 mmol) in a mixed solvent of AcOEt (200 mL) and water (200 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 0.5 h. The reaction mixture was extracted with AcOEt, washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 7/3 to 1/9) and NH silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/0 to 1/1) to afford **45** (7.80 g, 68%) as colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.47 (dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H), 7.34-7.22 (m, 3H), 4.29 (br s, 1H), 4.12 (br s, 1H), 3.74-3.52 (m, 5H), 3.36-3.29 (m, 2H), 3.02-2.98 (m, 1H), 2.68-2.56 (m, 3H), 2.14 (br s, 1H), 1.84-1.73 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.44-1.31 (m, 6H).

(3*S*,5*R*)-1-*tert*-Butoxycarbonyl-5-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-3-carboxylic acid (46)

A solution of **45** (7.80 g, 16.3 mmol) in a mixed solvent of THF (150 mL) and water (75.0 mL) was cooled in an ice bath, and then lithium hydroxide monohydrate (1.37 g, 32.6 mmol) were added. The mixture was stirred at the same temperature for 2 h. 1*N* HCl aqueous solution was added to the reaction mixture to acidify it (pH = 2-3). The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂, washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain **46** (7.70 g, quant.) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.47 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.34-7.25 (m, 3H), 4.30 (br s, 1H), 4.12 (br s, 1H), 3.76 (br d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 3.66 (br d, *J* = 17.6 Hz, 1H),

3.38-3.29 (m, 2H), 3.03-2.99 (m, 1H), 2.69-2.56 (m, 3H), 2.22-2.15 (m, 1H), 1.81-1.69 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.43-1.32 (m, 6H). ESI-MS (m/z): 466 [M+H]⁺

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-ethoxymethyl-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (15e**)**

HBTU (180 mg, 0.475 mmol) was added to a solution of **46** (148 mg, 0.318 mmol) and (2*R*)-1-ethoxy-4-methylpentan-2-amine **40e** (92.0 mg, 0.633 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (0.166 mL, 0.953 mmol) in DMF (3.00 mL) under ice-cooling, and then the reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 3/1 to 0/1) to obtain *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-3-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-5-[[*(1R)*-1-ethoxymethyl-3-methylbutyl]carbamoyl]piperidine-1-carboxylate (137 mg, 73%) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.48-7.46 (m, 1H), 7.33-7.22 (m, 3H), 5.64 (br d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.22-4.10 (m, 2H), 3.77-3.70 (m, 1H), 3.62-3.31 (m, 8H), 2.98 (br s, 1H), 2.74-2.68 (m, 2H), 2.34 (br s, 1H), 1.99-1.91 (m, 2H), 1.58 (br s, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.46-1.31 (m, 8H), 1.20 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.93-0.91 (m, 6H). Trifluoroacetic acid (0.350 mL, 4.71 mmol) was added to a solution of *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-3-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-5-[[*(1R)*-1-ethoxymethyl-3-methylbutyl]carbamoyl]piperidine-1-carboxylate (135 mg, 0.228 mmol) in CH₂Cl₂ (0.700 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 15 min. Saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture under ice-cooling, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (eluent, CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 to 7/3) to obtain the free base of **15e** (94.0 mg, 0.190 mmol). Fumaric acid (22.0 mg, 0.190 mmol) was added to a solution of the free base of **15e** (94.0 mg, 0.190 mmol) in MeOH (1.00 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 5 min. The solvent was evaporated under reduced pressure, and then **15e** (97.0 mg, 51%, 3 steps) was obtained as a colorless solid by crystallization from CH₂Cl₂ and Et₂O. [α]_D^{25.0} +18.3 (*c* 1.05, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.54-7.52 (m, 1H), 7.43-7.32 (m, 3H), 6.69 (s, 2H), 4.12-4.08 (m, 1H), 3.69-2.94 (m, 13H), 2.84-2.78 (m, 1H), 2.16-2.10 (m, 1H), 1.98-1.89 (m, 1H), 1.67-1.58 (m, 1H), 1.54-1.32 (m, 8H), 1.17 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.95-0.90 (m, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 173.0, 171.4, 169.4, 140.1, 136.3, 133.3, 131.5, 130.9, 130.5, 129.5, 73.8, 67.5, 63.5, 54.8, 50.3, 47.7, 47.0, 45.6, 41.5, 32.6, 26.0, 25.1, 24.3, 23.7, 23.1, 22.3, 21.7, 15.6. IR: 2967, 2870, 1648, 1556, 1386, 1272, 1174, 984, 755 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺):

m/z calcd for $C_{26}H_{41}ClN_4O_3+H$: 493.2945; found: 493.2963. Anal. $C_{26}H_{41}ClN_4O_3 \cdot C_4H_4O_4 \cdot H_2O$; calcd: C 57.45, H 7.55, N 8.93, Cl 5.65; found: C 57.43, H 7.50, N 8.82, Cl 5.54.

***tert*-Butyl *N*-[(1*S*)-3-methyl-1-vinylbutyl]carbamate (48)**

A solution of $SO_3 \cdot Py$ (3.30 g, 20.7 mmol) in DMSO (15.0 mL) was added to a solution of *tert*-butyl *N*-[(1*S*)-1-hydroxymethyl-3-methylbutyl]carbamate **47** (1.50 g, 6.90 mmol) and Et_3N (2.88 mL, 20.7 mmol) in DMSO (15.0 mL) under ice-cooling, and the mixture was stirred at the same temperature for 10 min. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with Et_2O . Then, the organic layer was washed with 10% citric acid aq., water, and brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain crude *tert*-butyl *N*-[(1*S*)-1-formyl-3-methylbutyl]carbamate. Methylene triphenyl phosphane (5.70 g, 20.7 mmol) was added to a solution of crude *tert*-butyl *N*-[(1*S*)-1-formyl-3-methylbutyl]carbamate in toluene (13.0 mmol) under ice-cooling, and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 4/1) to obtain **48** (860 mg, 58%, 2 steps) as a colorless liquid. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.77-5.70 (m, 1H), 5.15 (br d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 5.06 (br d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 4.38 (br s, 1H), 4.14, (br s, 1H), 1.72-1.64 (m, 1H), 1.44 (br s, 9H), 1.36-1.30 (m, 2H), 0.93-0.91 (m, 6H).

(3*R*)-5-Methylhexan-3-amine hydrochloride (40a)

To a solution of **48** (860 mg, 4.00 mmol) in MeOH (30.0 mL), 10% Pd on carbon (50% wet, 430 mg) was added with stirring under H_2 atmosphere at room temperature for 1.5 h. H_2 in the reaction vessel was replaced by N_2 , and then Pd on carbon was separated by filtration. The solvent was evaporated under reduced pressure to obtain crude *tert*-butyl *N*-[(1*R*)-1-ethyl-3-methylbutyl]carbamate. Trifluoroacetic acid (5.00 mL) was added to a solution of crude *tert*-butyl *N*-[(1*R*)-1-ethyl-3-methylbutyl]carbamate in CH_2Cl_2 (10.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 10 min. Saturated $NaHCO_3$ aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH_2Cl_2 . Then, the organic layer was washed with 1*N* NaOH aq. and brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure. 4*N*-HCl in 1,4-dioxane (2.00 mL) was added to the residue. The solvent was evaporated under reduced pressure, and then **40a** (340 mg, 56%, 2 steps) was obtained as a colorless solid by crystallization from

AcOEt. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.34 (br s, 3H), 3.22-3.16 (m, 1H), 1.92-1.84 (m, 1H), 1.80-1.64 (m, 3H), 1.50-1.44 (m, 1H), 1.08 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H), 0.95-0.93 (m, 6H).

***tert*-Butyl *N*-[(1*R*)-2-hydroxy-1-isobutyl-3-methylbutyl]carbamate (**50c**, **50d**)**

A solution of $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ (2.20 g, 13.8 mmol) in DMSO (10.0 mL) was added to a solution of *tert*-butyl *N*-[(1*R*)-1-hydroxymethyl-3-methylbutyl]carbamate **49** (1.00 g, 4.60 mmol) and Et_3N (1.92 mL, 13.8 mmol) in DMSO (10.0 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 10 min. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with Et_2O . Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain crude *tert*-butyl *N*-[(1*R*)-1-formyl-3-methylbutyl]carbamate. 0.7 M isopropyl lithium in toluene (21.0 mL, 14.7 mmol) was added to a solution of crude *tert*-butyl *N*-[(1*R*)-1-formyl-3-methylbutyl]carbamate in toluene (20.0 mL) at -78°C , and mixture was stirred at room temperature for 0.5 h. Saturated NH_4Cl aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 2/1) to obtain **50c** (292 mg, 24%, 2 steps, more polar) as a colorless solid and **50d** (256 mg, 21%, 2 steps, less polar) as a colorless liquid. More polar; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.72-4.65 (br m, 1H), 3.83-3.75 (m, 1H), 3.30-3.24 (m, 1H), 1.70-1.62 (m, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.24-1.19 (m, 1H), 0.97-0.89 (m, 12H). Less polar; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.66-4.61 (m, 1H), 3.81-3.74 (m, 1H), 3.15-3.09 (m, 1H), 1.74-1.62 (m, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.31-1.25 (m, 1H), 0.97-0.90 (m, 12H).

(4*R*)-4-Amino-2,6-dimethylheptan-3-ol hydrochloride (More polar) (40c**)**

4*N*-HCl in 1,4-dioxane (7.90 mL, 31.7 mmol) was added to **50c** (584 mg, 2.25 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 45 min. The solvent was evaporated under reduced pressure to obtain **40c** (440 mg, quant.) as a colorless solid. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 3.38-3.27 (m, 2H), 1.72-1.63 (m, 3H), 1.38-1.31 (m, 1H), 1.05 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.01 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).

(4*R*)-4-Amino-2,6-dimethylheptan-3-ol hydrochloride (Less polar) (40d**)**

The title compound was prepared from **50d** in a manner similar to that described for **40c** as a colorless solid (quant.). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 3.26-3.20 (m, 2H), 1.80-1.71 (m, 2H), 1.60-1.52 (m, 1H), 1.47-1.40 (m, 1H), 0.99-0.94 (m, 12H).

(2R)-2-(Dibenzylamino)-4-methylpentan-1-ol (52)

K₂CO₃ (14.7 g, 107 mmol) was added to a solution of (*R*)-leucinol **51** (5.00 g, 42.7 mmol) and benzyl bromide (11.2 mL, 93.9 mmol) in ethanol (200 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 4 days. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and diluted with water, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 10/1 to 1/1) to obtain **52** (10.8 g, 85%) as a colorless liquid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.33-7.21 (m, 10H), 3.81 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H), 3.48 (dd, *J* = 10.6, 5.1 Hz, 1H), 3.42 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 3.37 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H), 3.19 (br s, 1H), 2.84 (ddt, *J* = 9.8, 5.1, 2.4 Hz, 1H), 1.55-1.46 (m, 2H), 1.20-1.11 (m, 1H), 0.92 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.86 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H).

(2R)-N,N-Dibenzyl-1-ethoxy-4-methylpentan-2-amine (53)

NaH (60%, dispersion in paraffin liquid) (349 mg, 8.74 mmol) was added to a solution of **52** (2.00 g, 6.72 mmol) and EtI (0.700 mL, 8.74 mmol) in THF (30.0 mL) at room temperature over a period of 10 min. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/0 to 5/1) to obtain **53** (1.78 g, 81%) as a colorless liquid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.37 (br d, *J* = 7.4 Hz, 4H), 7.30-7.26 (m, 4H), 7.22-7.17 (m, 2H), 3.75 (d, *J* = 13.7 Hz, 2H), 3.66-3.61 (m, 3H), 3.45 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.38 (dd, *J* = 9.8, 5.1 Hz, 1H), 2.89-2.83 (m, 1H), 1.84-1.74 (m, 1H), 1.46 (ddd, *J* = 13.7, 8.2, 5.4 Hz, 1H), 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.10 (ddd, *J* = 13.7, 8.2, 5.4 Hz, 1H), 0.82 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.59 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H).

(2R)-1-Ethoxy-4-methylpentan-2-amine (40e)

To a suspension of **53** (1.78 g, 5.47 mmol) in MeOH (25.0 mL), 20% Pd(OH)₂ on carbon (50% wet, 360 mg) was added. The suspension was stirred under 1 MPa H₂ at room temperature for 6 h. H₂ in the reaction vessel was replaced by N₂, and then Pd(OH)₂ on carbon was separated by filtration. The solvent was evaporated under reduced pressure to obtain **40e** (799 mg, 98%) as a colorless liquid. [α]_D^{25.0} -11.8 (*c* 1.03, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.55-3.45 (m, 2H), 3.39 (dd, *J* = 9.0, 3.7 Hz, 1H), 3.12 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.05-3.00 (m, 1H), 1.77-1.69 (m, 1H), 1.22-1.13 (m, 5H), 0.93 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₈H₁₉NO+H: 146.1545; found: 146.1552.

2-8-2) Biology assays

IC₅₀ in buffer

The activity of renin inhibitors against purified enzyme was measured using the following protocol: All reactions were carried out in a flat bottom black opaque microtiter plate. Test compounds in DMSO (2 μ L) were mixed with 100 μ L of the assay buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 100 mM NaCl) containing 5 μ L of trypsin-activated recombinant human renin (final enzyme concentration of 50 μ M), and the solution was pre-incubated at room temperature for 10 min. Next, 2 μ M of the substrate (Arg-Glu(EDANS)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Thr-Lys(DABCYL)-Arg) in 100 μ L of the assay buffer was added, and the resulting mixture was incubated at 37 °C for 90 min. After completion of incubation, the concentration of generated angiotensin I was measured by fluorescence at 492 nm (excitation at 340 nm) using a multilabel reader (PerkinElmer Inc.). The slope of the linear portion of the plot of fluorescence increase as a function of time was then determined, and the rate was used to calculate % inhibition in relation to uninhibited control. The % inhibition values were plotted as a function of inhibitor concentration, and the IC₅₀ value was determined by probit analysis. The IC₅₀ value is defined as the concentration of a particular inhibitor that reduces the formation of product by 50% relative to a control sample containing no inhibitor.

IC₅₀ in plasma

The activity of renin inhibitors *in vitro* in cynomolgus monkey plasma was measured by the decrease in plasma renin activity (PRA) levels observed in the presence of the compounds. Compounds were dissolved in DMSO and the final concentration of DMSO was 1%. Incubation mixtures were contained in the final volume of 20 μ L of test compound solution, 200 μ L of pooled mixed-gender human or cynomolgus monkey plasma stabilized with EDTA, 20 μ L of pH adjusting solution, and 10 μ L of Inhibitor A solution. Reaction mixture was incubated at 37 °C for 60 min. After incubation, angiotensin I in the reaction mixture was measured by competitive radioimmunoassay using a commercial available RIA kit, RENIN RIABEAD (Yamasa Co.). An uninhibited tube containing 1% DMSO and control tube incubated at 4 °C were used to derive the % inhibition for each concentration of inhibitors. The % inhibition values were plotted as the function of inhibitor concentration, and the IC₅₀ value was determined from a fit of this data to a four parameter equation. The IC₅₀ value is defined as above.

Metabolic stability

After 1 μ M of compounds were incubated with human liver microsome in the presence of a NADPH generating system at 37 °C for 30 min, remaining concentration of compounds was

semi-quantitatively analyzed by LC-MS/MS. The microsomal protein concentration in the assay was 0.5 mg/mL and % remaining was calculated by the following formula.

$$[\% \text{ remaining}] = [\text{compound concentration}] \text{ after incubation} / [\text{compound concentration}] \text{ before incubation} \times 100$$

2-8-3) Animal studies

Blood pressure study in dTG rats

Double transgenic rats (dTGRs) were bred at PhoenixBio Co., Ltd. from parents who were homozygous for hREN or hAOGEN.²¹ Male and female hypertensive dTGRs (150-200 g) >8 weeks of age were instrumented with telemetric devices (TA11PA-C40, Data Sciences International Inc.) using a sterile technique. Baseline values were recorded for 24 h prior to administration. Following measurement of baseline values, rats were dosed by oral gavage with vehicle (0.5% methylcellulose, n = 9) or compound **15e** at 10 mg/kg (n = 10) after which animals were monitored for 48 h post-dose. Blood pressure signals were digitized and analyzed using Dataquest Art Software (Data Sciences International Inc.) for the derivation of MAP. These MAP values are reported as 1 h average values and also as changes from the corresponding time-matched baseline values.

Pharmacokinetics

The pharmacokinetics of compounds **15e** were determined in fasting SD rats. Compounds **15e** were administered intravenously as a saline solution or by oral gavage in 0.5% methylcellulose. Following dosing, blood samples were taken over 24 h with a minimum of 7 time points, and plasma concentrations were measured by HPLC/MS/MS. PK parameters were calculated from non-compartmental analysis of the plasma concentration-time curves.

2-9) 参考文献

1. Märki, H. P.; Binggeli, A.; Bittner, B.; Bohner-Lang, V.; Breu, V.; Bur, D.; Coassolo, Ph.; Clozel, J. P.; D'Arcy, A.; Doebeli, H.; Fischli, W.; Funk, Ch.; Foricher, J.; Giller, T.; Grüninger, F.; Guenzi, A.; Güller, R.; Hartung, T.; Hirth, G.; Jenny, Ch.; Kansy, M.; Klinkhammer, U.; Lave, T.; Lohri, B.; Luft, F. C.; Mervaala, E. M.; Müller, D. N.; Müller, M.; Montavon, F.; Oefner, Ch.; Qiu, C.; Reichel, A.; Sanwald-Ducray, P.; Scalone, M.; Schleimer, M.; Schmid, R.; Stadler, H.; Treiber, A.; Valdenaire, O.; Vieira, E.; Waldmeier, P.; Wiegand-Chou, R.; Wilhelm, M.; Wostl, W.; Zell, M.; Zell, R. *Il Farmaco* **2001**, *56*, 21.
2. Oefner, C.; Binggeli, A.; Breu, V.; Bur, D.; Clozel, J. P.; D'Arcy, A.; Dorn, A.; Fischli, W.; Grüninger, F.; Güller, R.; Hirth, G.; Märki, H. P.; Mathews, S.; Müller, M.; Ridley, R. G.; Stadler, H.; Vieira, E. Wilhelm, M.; Winkler, F. K.; Wostl, W. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 127.
3. Corminboeuf, O.; Bezençon, O.; Remeň, L.; Grisostomi, C.; Richard-Bildstein, S.; Bur, D.; Prade, L.; Strickner, P.; Hess, P.; Fischli, W.; Steiner, B.; Treiber, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6291.
4. (a) Yokokawa, F. *Expert Opin. Drug. Discov.* **2013**, *8*, 673; (b) Aspiotis, R.; Chen, A.; Cauchon, E.; Dubé, D.; Falguyre, J. P.; Gagné, S.; Gallant, M.; Grimm, E. L.; Houle, R.; Juteau, H.; Lacombe, P.; Laliberté, S.; Lévesque, J. F.; MacDonald, D.; McKay, D.; Percival, M. D.; Roy, P.; Soisson, S. M.; Wu, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2430.
5. Ben-David, J.; Zipes, D. P. *Lancet* **1993**, *341*, 1578.
6. Fournier, P. A.; Arbour, M.; Cauchon, E.; Chen, A.; Chefson, A.; Ducharme, Y.; Falguyret, J. P.; Gagné, S.; Grimm, E.; Han, Y.; Houle, R.; Lacombe, P.; Lévesque, J. F.; MacDonald, D.; Mackay, B.; McKay, D.; Percival, M. D.; Ramtohl, Y.; St-Jacques, R.; Toulmond, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2670.
7. Holsworth, D. D.; Cai, C.; Cheng, X. M.; Cody, W. L.; Downing, D. M.; Erasga, N.; Lee, C.; Powell, N. A.; Edmunds, J. J.; Stier, M.; Jalaie, M.; Zhang, E.; McConnell, P.; Ryan, M. J.; Bryant, J.; Li, T.; Kasani, A.; Hall, E.; Subedi, R.; Rahim, M.; Maiti, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2500.
8. Ostermann, N.; Ruedisser, S.; Ehrhardt, C.; Breitenstein, W.; Marzinik, A.; Jacoby, E.; Vangrevelinghe, E.; Ottl, J.; Klumpp, M.; Hartweg, J. C. D.; Cumin, C.; Hassiepen, U.; Trappe, J.; Sedrani, R.; Geisse, S.; Bernd Gerhartz, B.; Richert, R.; Francotte, E.; Wagner, T.; Krömer, M.; Kosaka, T.; Randy, L.; Webb, R. L.; Rigel, D. F.; Maibaum, J.; Baeschlin, D. K. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2196.
9. Wood, J. M.; Maibaum, J.; Rahuel, J.; Grütter, M. G.; Cohen, N. -C.; Rasetti, V.; Rugar, H.; Göschke, R.; Stutz, S.; Fuhrer, W.; Schilling, W.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Cumin,

- F.; Baum, H. -P.; Schnell, C. R.; Herold, P.; Mah, R.; Jensen, C.; O'Brien, E.; Stanton, A.; Bedigian, M. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *308*, 698.
10. Nakamura, Y.; Fujimoto, T.; Ogawa, Y.; Sugita, C.; Miyazaki, S.; Tamaki, K.; Takahashi, M.; Matsui, Y.; Nagayama, T.; Manabe, K.; Mizuno, M.; Masubuchi, N.; Chiba, K.; Nishi, T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 754.
11. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; Bennett, C. D.; DiPardo, R. M.; Boger, J.; Poe, M.; Ulm, E. H.; LaMont, B. I.; Blaine, E. H.; Fanelli, G. M.; Stabilito, I. I.; Veber, D. F. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1755.
12. The X-ray crystallographic studies were accomplished according to the procedure described in following reference. Rahuel, J.; Rasetti, V.; Maibaum, J.; Rüeger, H.; Göschke, R.; Cohen, N. C.; Stutz, S.; Cumin, F.; Fuhrer, W.; Wood, J. M.; Grütter, M. G. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 493.
13. Johnson, T. W.; Dress, K. R.; Edwards, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5560.
14. Bittner, B.; Chou, R.; Schleimer, M.; Morgenroth, B.; Zell, M.; Lavé, T. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **2002**, *52*, 593.
15. Ganten, D.; Wagner, J.; Zeh, K.; Bader, M.; Michel, J. B.; Paul, M.; Zimmermann, F.; Ruf, P.; Hilgenfeldt, U.; Ganten, U.; Kaling, M.; Bachmann, S.; Fukamizu, A.; Mullins, J. J.; Murakami, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 7806.
16. Ehara, T.; Grosche, P.; Irie, O.; Iwaki, Y.; Kanazawa, T.; Kawakami, S.; Konishi, K.; Mogi, M.; Suzuki, M.; Yokokawa, F. *PCT Int. Appl.* WO2007/077005.
17. Miyazaki, S.; Fujimoto, T.; Nagayama, T.; Kato, M.; Nakamura, Y.; Ogawa, Y. *PCT Int. Appl.* WO2011/065519.
18. (a) De Kimpe, N.; Verhé, R.; De Buyck, L.; Hasma, H.; Schamp, N. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2457; (b) De Kimpe, N.; Boeykens, M.; Boelens, M.; De Buck, K.; Cornelis, J. *Org. Prep. Proced. Int.* **1992**, *24*, 679.
19. Oh, S. H.; Rho, H. S.; Lee, J. W.; Lee, J. E.; Youk, S. H.; Chin, J.; Song, C. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7872.
20. Tasir, S. H.; Jennifer, C. L.; Samuel, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6975.
21. Pilz, B.; Shagdarsuren, E.; Wellner, M.; Fiebeler, A.; Dechend, R.; Gratze, P.; Meiners, S.; Feldman, D. L.; Webb, R. L.; Garrelds, I. M.; Danser, A. H. J.; Luft, F. C.; Müller, D. N. *Hypertension* **2005**, *46*, 569.

第三章 カニクイサルで薬効を示す 3,5-二置換ピペリジン誘導体の探索

3-1) 序論

第二章において、ヒトレニンとの複合体 X 線結晶構造解析を利用することによって高活性な新規 3,5-二置換ピペリジン誘導体 **15b** を獲得した。さらに P_2' 部位に極性基を導入することで代謝安定性を改善し、ラットで優れた降圧作用を示す 3,5-二置換ピペリジン誘導体 **15e** を得た (Figure 3-1)。この結果を受け、次にカニクイサルを用いて薬効試験を行った。しかしながら、化合物 **15e** はフロセミドで処置したカニクイサルに対して経口で薬効を示さなかった。これまでに数多くのレニン阻害剤が開発されているが、げっ歯類と非げっ歯類、両方の薬効を報告している化合物は少なく、唯一の上市品である *Aliskiren* およびピペリジン型化合物 *Ro-X1* のみである^{1,2}。以上のことから、優れたレニン阻害剤獲得のためには、よりヒトに近いカニクイサルにおいても薬効を示すことが必要であると考えた。そこで本章では、化合物 **15e** がカニクイサルで薬効を示さない原因の解明と、カニクイサルにおいても薬効を示す 3,5-二置換ピペリジン誘導体の獲得を目指し研究を行った。

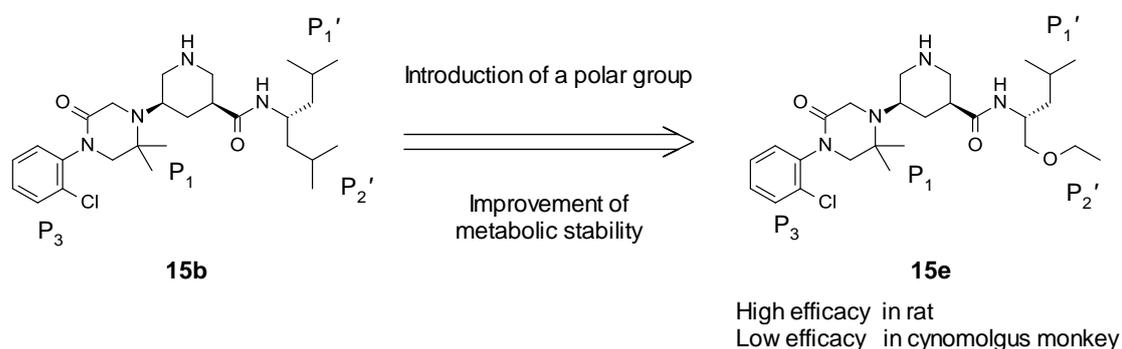


Figure 3-1. The results in chapter 2

3-2) 血中薬物濃度改善の検討

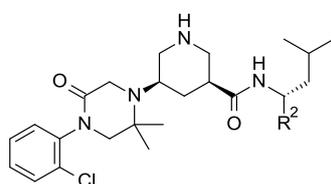
化合物 **15e** がカニクイサルで経口活性を示さない原因を確かめるため、薬物動態を評価した。その結果、化合物 **15e** を 3mg/kg 経口投与した際の血中薬物濃度 ($AUC_{po,0-24h}$) がわずかに 60 ng*hr/ml であり、カニクイサルで薬効を示す DS-8108b ($AUC_{po,0-24h} = 685$ ng*hr/ml) の 10 分の 1 であることが分かった³。この低い血中濃度が薬効を示さない原因と考え、血中暴露量の改善を目指すこととした。

暴露改善の手掛かりを得るため、まず、第二章で高活性を示した 3,5-二置換ピペリジン誘導体 **15b, c, e** の *in vitro* 活性、代謝安定性、経口投与時の血中濃度を比較した。なお、血中濃度測定は、スループットを向上させるため、複数の薬剤を同時に投与す

るカセット投与 (po, 0-4h) により評価した⁴。また、より正確に阻害活性を比較するため、内部標準として Aliskiren を用いその比活性も同時に算出した。

Table 3-1 に示した通り、化合物 **15b**, **c**, **e** はいずれも低い血中濃度を示した。特に、P₂'部位にヒドロキシ基 (**15c**) やエーテル基 (**15e**) を持つ化合物は、**15b** から代謝安定性が改善したにもかかわらずより低い血中濃度を示した。この結果から、極性基の導入による脂溶性の大幅な低下が、腸管膜からの吸収低下を引き起こしていると考えられた⁵。そこで次に、極性基を導入することなく **15b** の代謝安定性を向上させることで、血中暴露の改善を目指すこととした。

Table 3-1. *In vitro* renin inhibitory activities (IC₅₀ and Ratio), metabolic stabilities, and oral exposures of **15b**, **c**, **e**, **54a**^{a,b}



Cmpd	R ²	Purified human renin	Monkey plasma renin		Metabolic stability (%) ^d	Cynomolgus monkey PK (1mg/kg, po) ^e	
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ratio ^c		AUC _{po,0-4h} (ng*h/mL)	n ^f
15b		1.6	10	2.8	21	25	4
15c^g		2.3	4.8	0.8	90	10	3
15e		1.3	1.4	0.5	61	14	4
54a		2.1	9.0	1.0	75	51	3

^a Compounds were obtained as fumarate salts. ^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates. ^c Ratio = IC₅₀ (nM) of compound / IC₅₀ (nM) of Aliskiren. ^d % remaining after 30 min in monkey liver microsomes. ^e The data were obtained by cassette dosing. ^f Number of compounds dosed in cassette. ^g Stereochemistry is not determined.

代謝安定性を向上させるためには、一般に以下4つの方法が用いられる。即ち①脂溶性の低減、②代謝部位への置換基導入、③代謝部位の除去、④代謝部位を等価構造

で置換、の4つである⁶。化合物 **15b** の代謝部位は、電子豊富で反応性の高いピペリジン環およびケトピペラジン環と予想されるが、この2つの環への②置換基導入、③除去、④等価構造への置換は合成上難易度が高く、また阻害活性が低下する可能性が高い。そこで、①～④以外の手法としてコンフォメーションの固定化を行うこととした⁷。化合物 **15b** の部分構造の中で、構造変換が容易であり活性維持が期待できる P₂' のイソブチル基を固定化部位として選択した。ここで、化合物 **15b** の炭素原子 a, b, c, d はほぼ同一平面上に存在していることから、P₂' 部位の自由度を最も低下させたフェニル基 (**54a**) をデザインした (Figure 3-2, Figure 2-9 参照)。化合物 **54a** を合成しレニン阻害活性を評価した結果、高活性を維持することが分かった (Table 3-1)。また、極性基を導入することなしに代謝安定性が向上し、サルカセット投与による血中濃度も改善された。

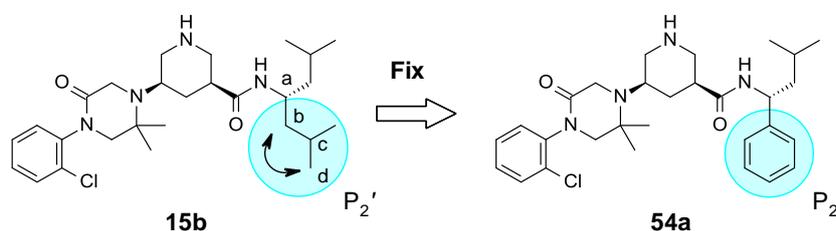
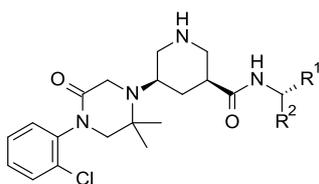


Figure 3-2. Design of compound **54a**

化合物 **54a** が高活性と良好な血中暴露を示したので、次に **54a** の P₁' 部位および P₂' のフェニル基上の置換基効果を検討した (Table 3-2)。まず、P₁' のイソブチル基 (**54a**) をエチル基 (**54b**) に変換したが、第二章で得られた結果と同様サル血漿中でのレニン阻害活性が減弱した。次に、P₂' のフェニル基上への置換基導入を行った。この際、原料が入手容易であることから、P₁' 部位はエチル基に固定した。フェニル基上には、最も小さい脂溶性置換基であるフルオロ基 (**54c-e**) と、次に小さいクロロ基 (**54f-g**) を導入した⁸。In vitro 活性を評価したところ、クロロ基では阻害活性が大きく低下することが分かった。この結果から、P₂' のフェニル基周辺は、置換基を導入できる空間が狭いことが示唆された。一方、代謝安定性および血中濃度はいずれの化合物も良好な値を示した。以上の結果から、P₁' 部位はイソブチル基が適しており、フェニル基上は無置換もしくはフルオロ基で置換された化合物が、良好な阻害活性と血中濃度を示すことが分かった。

Table 3-2. *In vitro* renin inhibitory activities, metabolic stabilities, oral exposures of **54a-g**^{a,b}

Cmpd	R ¹	R ²	Purified	Monkey		Metabolic	Cynomolgus	
			human	plasma	renin		stability	monkey PK
			renin	renin	Ratio ^c	(%) ^d	(1 mg/kg, po) ^e	
			IC ₅₀	IC ₅₀			AUC _{po,0-4h}	n ^f
			(nM)	(nM)			(ng*h/mL)	
54a	<i>i</i> -Bu	Ph	2.1	9.0	1.0	75	51	3
54b	Et	Ph	2.1	6.6	1.8	76	60	3
54c	Et	2-F-Ph	3.3	11	2.3	83	90	3
54d	Et	3-F-Ph	1.8	14	2.8	82	57	3
54e	Et	4-F-Ph	2.4	19	3.7	78	52	3
54f	Et	3-Cl-Ph	2.3	25	5.0	81	83	3
54g	Et	4-Cl-Ph	5.2	55	11	79	130	3

^a Compounds were obtained as fumarate salts. ^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates. ^c Ratio = IC₅₀ (nM) of compound / IC₅₀ (nM) of Aliskiren. ^d % remaining after 30 min in monkey liver microsomes. ^e The data were obtained by cassette dosing. ^f Number of compounds dosed in cassette.

P₂'部位にフェニル基を持つ化合物がサルカセット投与において高暴露を示すことが分かったので、次に、サルカセット投与を利用した選抜方法の妥当性について検証を行った (Table 3-3)。カセット投与による血中濃度が改善されている化合物 **54b** を単独で投与したところ、化合物 **15e** の約 10 倍、DS-8108b と同等の血中暴露を示すことが確かめられた。以上の結果から、高暴露を示す 3,5-二置換ピペリジン誘導体を獲得する手法として、サルカセット投与による選抜が有効であることが示された。

Table 3-3. Oral exposures of compounds **15e**, **54b**, and DS-8108b in cynomolgus monkeys^a

Compound	Cynomolgus monkey PK (3 mg/kg, po), AUC _{0-24h} (ng*hr/ml)
15e	60
54b	730
DS-8108b	685

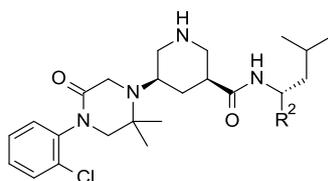
^a The data were obtained by individual dosing.

3-3) CYP3A4 および hERG 電流阻害低減の検討

高活性かつ良好な血中濃度を示す化合物 **54a** を用いて、次に初期 *in vitro* 安全性評価を行った。残念ながら、化合物 **54a** は 10 μM において CYP3A4 の直接阻害 (49%) を、30 μM において hERG 電流阻害 (36%) を示した。なお、CYP3A4 の直接阻害は、代謝物ではなく化合物自身による CYP3A4 の阻害を示している。第二章で述べた通り、CYP の阻害は、同じ CYP で代謝を受ける薬剤と併用した場合に薬剤の濃度を一時的に高め、重い副作用を引き起こす可能性がある。CYP 代謝の約 40% が CYP3A4 によるものであり⁹、高血圧患者は他の薬剤を併用する機会が多いことから、CYP3A4 直接阻害の回避は必須である。また hERG チャンネルの阻害は、重篤な不整脈である *torsades de pointes* を引き起こす可能性があることから¹⁰、CYP3A4 と同様に阻害の回避が必要不可欠である。そこで次に、CYP3A4 直接阻害および hERG 阻害活性の低減を目指すこととした。

一般に、化合物の脂溶性が低下すると CYP3A4 や hERG チャンネルへの結合能が落ちその阻害活性は低下する⁵。レニン阻害剤の研究においても、脂溶性の低減による CYP3A4 および hERG 電流阻害の回避が報告されている¹¹。そこで、P₂' のフェニル基を複素環に変換することで、脂溶性低減を試みることにした。複素環としては 2-ピリジル基 (**54h**)、3-ピリジル基 (**54j**)、5-イソキサゾリル基 (**54l**)、および 2-オキサゾリル基 (**54m**) を使用した。また、フェニル基上の置換基としてフルオロ基のみ許容されたことから、5-フルオロ 2-ピリジル基 (**54i**)、および、5-フルオロ 3-ピリジル基 (**54k**) も併せて合成した。レニン阻害活性、代謝安定性、カセット投与による血中濃度の結果を Table 3-4 に示す。いずれの化合物も高いレニン阻害活性と良好な代謝安定性を示した。しかしながら、化合物 **54j-m** は大幅に血中濃度が低下した。これは Table 3-1 と同様の結果であり、3,5-二置換ピペリジン誘導体への極性基導入は、腸管膜からの吸収低下を容易に引き起こすことが推察された。一方、2-ピリジル基 (**54h**) および 5-フルオロ-2-ピリジル基 (**54i**) のみ血中濃度が維持された。推測ではあるが、化合物が腸管膜を通過する際、一時的に 2 級アミドの NH とピリジン環上の窒素原子の間で 5 員環性の分子内水素結合を形成したため、血中濃度が維持されたと考えている (Figure 3-3)。なお、分子内水素結合を形成することで経口吸収性が向上することはよく知られており、その一例を Figure 3-3 に示す。LHRH アンタゴニストである TAK-013 (**56**) は、分子内水素結合を形成するため化合物 **55** より高い血中濃度を示すと推察されている¹²。また 2-ピリジル誘導体 **58** は、分子内水素結合を持つため 4-ピリジル誘導体 **57** より高い膜透過性を示すと考察されている¹³。

Table 3-4. *In vitro* renin inhibitory activities (IC₅₀ and Ratio), metabolic stabilities, and oral exposures of **54a,h-m**^{a,b}



Cmpd	R ²	Purified human renin	Monkey plasma renin		Metabolic stability (%) ^d	Cynomolgus monkey PK (1mg/kg, po) ^e	
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ratio ^c		AUC _{po,0-4h} (ng*h/mL)	n ^f
54a		2.1	9.0	1.0	75	51	3
54h		1.4	17	3.6	87	52	3
54i		1.0	9.7	2.1	70	53	3
54j		2.1	4.2	0.9	76	1.6	3
54k		1.7	6.9	0.8	80	5.4	3
54l		1.1	3.3	0.6	89	11	3
54m		1.9	8.3	1.4	86	15	3

^a Compounds were obtained as fumarate salts. ^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates. ^c Ratio = IC₅₀ (nM) of compound / IC₅₀ (nM) of Aliskiren. ^d % remaining after 30 min in monkey liver microsomes. ^e The data were obtained by cassette dosing. ^f Number of compounds dosed in cassette.

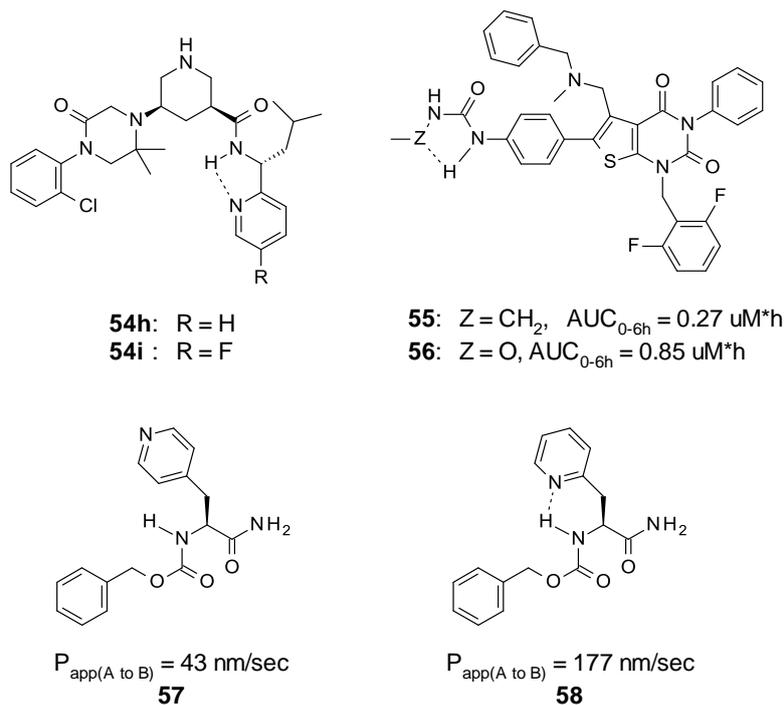


Figure 3-3. Effect of intramolecular hydrogen bond

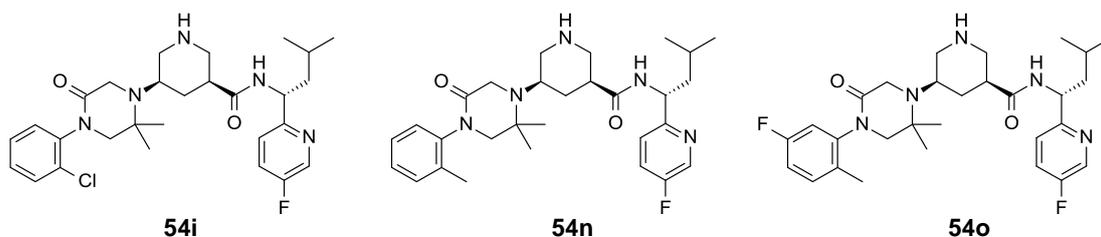
より高いレニン阻害活性と良好な血中暴露を示した化合物 **54i** を用いて、CYP3A4 および hERG 電流の阻害活性を評価した。期待した通り、10 μM における CYP3A4 の直接阻害活性(22%)、および、30 μM における hERG 電流阻害活性 (27%) が、化合物 **54a** に比べ改善されていることが分かった。

3-4) P₃ 部位の構造最適化

P₁ および P₂ 部位の構造変換により、高いレニン阻害活性と良好な血中濃度を示し、CYP3A4 阻害と hERG 電流阻害リスクが低減された化合物 **54i** を得た。しかしながら、hERG 電流阻害活性 (27%) の低減は十分ではなく、さらなる改善が望まれる。そこで次に、P₃ 部位の脂溶性を低下させることで hERG 電流阻害活性のさらなる低減を目指すこととした。なお、大幅な脂溶性の低下は容易に血中濃度を低下させることから、脂溶性を数値化した clogP を指標に化合物デザインを行った。DS-8108b 周辺の構造活性相関^{4,14} を参考に、clogP がわずかに減少した *o*-トルイジル基 (**54n**) と 5-フルオロ-2-メチルフェニル基 (**54o**) を P₃ 変換体として選択した。レニン阻害活性、clogP、代謝安定性、血中濃度の結果を Table 3-5 に示す。なお、より厳密に血中濃度を比較するため、薬物を単独で経口投与し評価を行った。いずれの化合物も高活性を示し、特に化合物 **54n** がサル血漿中において最も強いレニン阻害活性を示した。これは、脂溶性の低下により血漿タンパクとの結合率が減少し、血漿中における化合物 **54n** のフリ

一体濃度が向上したためと考えられた。実際、化合物 **54n** の血漿タンパク結合率 (55% in monkey) は、**54i** (71% in monkey) より低い値を示した。また化合物 **54n** は、脂溶性低減に伴い代謝安定性および血中濃度が向上することが分かった。

Table 3-5. *In vitro* renin inhibitory activities (IC₅₀ and Ratio), clogP, metabolic stabilities, and oral exposures of **54i,n,o**^{a,b}



Cmpd	Purified	Monkey plasma		clogP ^d	Metabolic stability (%) ^e	Cynomolgus monkey PK (10 mg/kg), AUC _{po,0-24h} (ng*h/mL) ^f
	human renin	renin	Ratio ^c			
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)				
54i	1.0	9.7	2.1	4.7	70	2579
54n	1.6	7.0	0.9	4.5	84	3190
54o	1.3	16	2.1	4.6	80	NT ^g

^a Compounds were obtained as fumarate salts. ^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates. ^c Ratio = IC₅₀ (nM) of compound / IC₅₀ (nM) of Aliskiren. ^d cLogP values were calculated using cLogP daylight version 4.83 which was supplied by Daylight Chemical Information Systems, Inc. ^e % remaining after 30 min in monkey liver microsomes. ^f The data were obtained by individual dosing. ^g NT = not tested.

高いレニン阻害活性と血中濃度を示した **54n** を用いて、初期安全性評価を行った。その結果、化合物 **54n** は 10 μM において **54i** と同様に弱い CYP3A4 の直接阻害活性 (30%) を示した。また、30 μM における hERG 電流阻害活性 (5.2%) が大幅に改善された。

3-5) 有望化合物の各種 *in vitro* 評価

P₁'、P₂'および P₃ 部位の構造変換により、優れたレニン阻害活性、良好な経口暴露、低い CYP3A4 直接阻害と hERG 電流阻害リスクを示す有望化合物 **54n** を獲得した。次に、薬剤としての資質を確かめるため、より詳細な *in vitro* データを取得することと

した。各種 *in vitro* 評価の結果を Table 3-6 に示す。活性面においては、サル血漿中 ($IC_{50} = 7.0 \text{ nM}$) だけでなくヒト血漿中 ($IC_{50} = 3.6 \text{ nM}$) においても強いレニン阻害活性を示した。物性面においては、計算値 ($clogP = 4.5$) と同様に実測においても良好な脂溶性 ($LogD_{7.4} = 2.0$) を示した。また、代謝安定性はサル (84%) のみならず、ヒト (100%) およびラット (89%) においても優れた値を示すことが分かった。血漿タンパク結合率はいずれの種でも良好な値を示しており、化合物 **54n** がバッファー中だけでなく血漿中においても高いレニン阻害活性を示すことを支持する結果といえる。CYP の直接阻害としては、CYP3A4 だけでなく、遺伝的多型が存在する CYP2D6 や CYP2C9、その次に基質となる化合物の多い CYP1A2⁹ についても評価した。いずれの種においても CYP の直接阻害活性は低く、幅広くリスクが低いことを示した。心臓への作用としては、前述の通り低い hERG 阻害作用を示すが、ケトピペラジン環を有するレニン阻害剤は hERG 阻害作用とは別に催不整脈作用を示す可能性が指摘されている⁴。具体的には、化合物の脂溶性が高い場合に、モルモットの単離心筋を用いた活動電位に対する作用評価で、90%再分極時の活動電位持続時間 (APD_{90}) の短縮と、最大脱分極速度 (dV/dt_{max}) が観測されている。そこで、化合物 **54n** が同様の作用を示すか評価を行った。その結果、変化は軽微であり低リスクであることが示された。また、遺伝毒性試験として Ames 試験を行った結果、陰性であることが確かめられた。その他の *in vitro* 評価として、他のアスパラギン酸プロテアーゼとの選択性評価が考えられる。評価は未実施であるが、主骨格が同じ Novartis 社の 3,5-二置換ピペリジン誘導体 (**6**)¹⁵ や同じフェニルケトピペラジン構造を持つ DS-8108b³ が高い選択性を示すことから、同様に高い選択性を持つと予想される。

Table 3-6. *In vitro* profile of compound **54n**^{a,b}

Purified human renin	IC ₅₀ (nM)	1.6
Human plasma renin	IC ₅₀ (nM)	3.6
	Ratio ^c	1.2
Monkey plasma renin	IC ₅₀ (nM)	7.0
	Ratio ^c	0.9
Lipophilicity (LogD _{7.4} , clogP)		2.0, 4.5
Metabolic stability (human, monkey, rat) ^d		100%, 84%, 89%
Plasma protein binding ratio (human, monkey, rat) ^e		38%, 55%, 63%
CYP direct inhibition (10 μM)	3A4	30%
	2D6	1%
	2C9	0%
	1A2	7%
hERG current inhibition (30 μM) ^f		5.2%
	APD ₉₀	-1.0%
Guinea pig right ventricular papillary muscle-cardiac action potential (30 μM) ^{g,h}		(Shortening)
	dV/dt max	-11.6%
		(Decrease)
Ames test (<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100)		Negative

^a Compound **54n** was obtained as fumarate salt. ^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates. ^c Ratio = IC₅₀ (nM) of compound / IC₅₀ (nM) of Aliskiren. ^d Percent remaining after 30 min in human, monkey, and rat liver microsomes. ^e The plasma protein binding ratio was determined by a micro-scale ultracentrifugation method (436,000g, 2 h 20 min, at 4 °C). ^f hERG were measured using the patch clamp technique on IonWorks[®] Quattro[™] system. ^g Action potentials were measured using the glass microelectrode method. ^h % change from baseline.

3-6) ラット、カニクイサル *in vivo* 評価

最後に、化合物 **54n** のラットおよびカニクイサルにおける薬物動態と薬効を評価した。化合物 **54n** の SD ラットおよびカニクイサルにおける PK プロファイルを Table 3-7 に示す。いずれの種においても十分な経口暴露と良好な生物学的利用率を示した。また、DS-8108b ($F = 5\%$ in cynomolgus monkey)³ よりも高い生物学的利用率 ($F = 25\%$ in cynomolgus monkey) を示すことが確かめられた。

Table 3-7. PK profile of compound **54n** in SD rat and cynomolgus monkey

SD rat, female (30 mg/kg, p.o., 0.5% MC) (1 mg/kg, i.v., Saline)	<i>F</i> (%)	20
	<i>C</i> _{max} (ng/mL)	204
	AUC _{po,0-24h} (ng*h/mL)	1100
	CL (mL/min/kg)	4.8
	<i>V</i> _{ss} (L/kg)	11
	<i>t</i> _{1/2} (h)	5.4
Cynomolgus monkey, male (10 mg/kg, p.o., 0.5% MC) (1 mg/kg, i.v., Saline)	<i>F</i> (%)	25
	<i>C</i> _{max} (ng/mL)	604
	AUC _{po,0-24h} (ng*h/mL)	3191
	CL (mL/min/kg)	0.57
	<i>V</i> _{ss} (L/kg)	5.4
	<i>t</i> _{1/2} (h)	7.9

次に、化合物 **54n** を用いて dTG ラットおよびフロセミドで処置したカニクイサルに対する降圧作用を評価した。Figure 3-4 に示した通り、dTG ラットに 30 mg/kg 投与した結果、24 時間以上にわたって優れた降圧作用を示した。

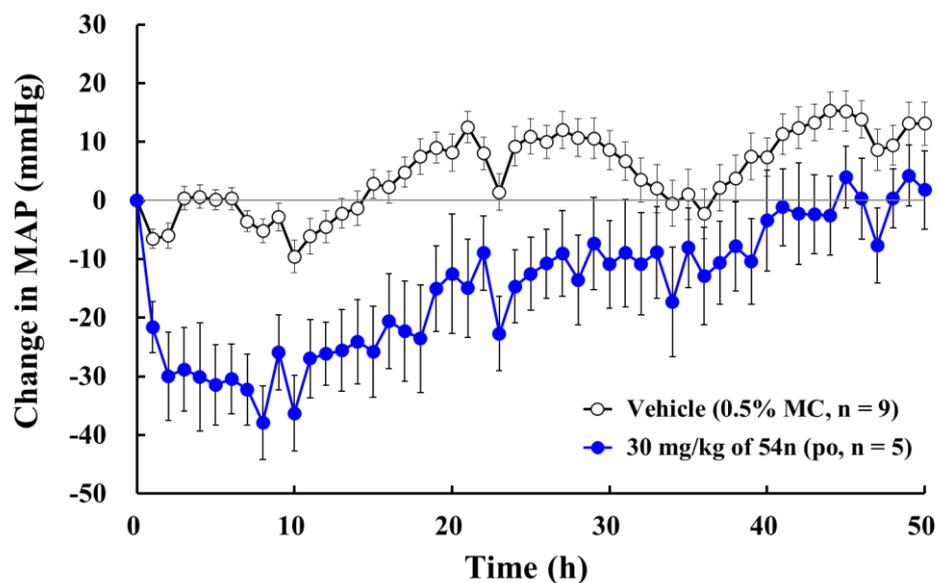


Figure 3-4. Effect of **54n** on MAP in dTG rat

また、Figure 3-5 に示した通り、フロセミドで処置したカニクイサルに 3 mg/kg および 10 mg/kg 投与した結果、用量依存的に 24 時間以上にわたって優れた降圧作用を示した。なお、9 時間経過時に一過性の血圧上昇が観測されるが、給餌・消灯のタイミングと重なることから、薬物による作用ではないと推察される。この結果より、血中

濃度を改善することで、カニクイサルにおいても降圧作用を示すことが確かめられた。

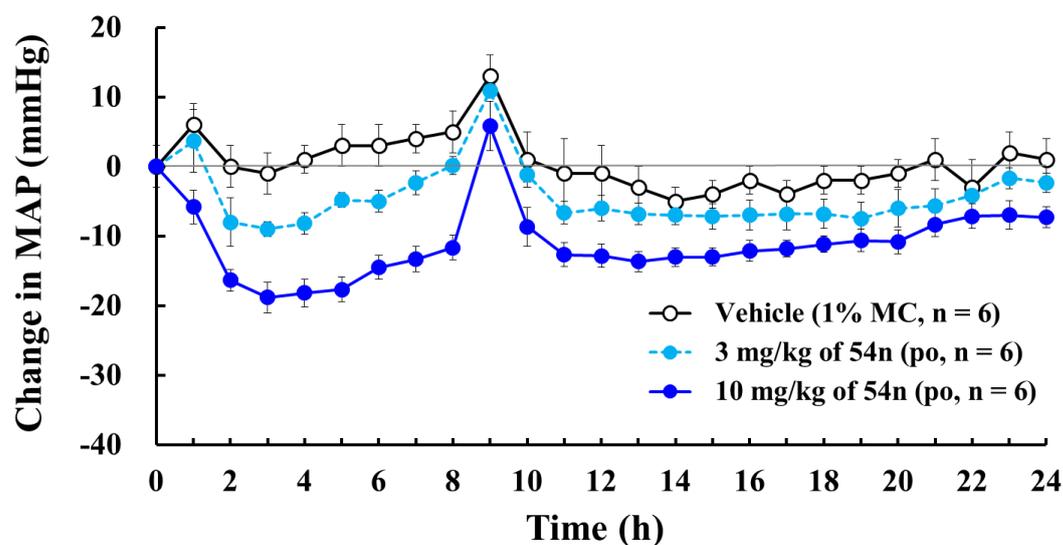
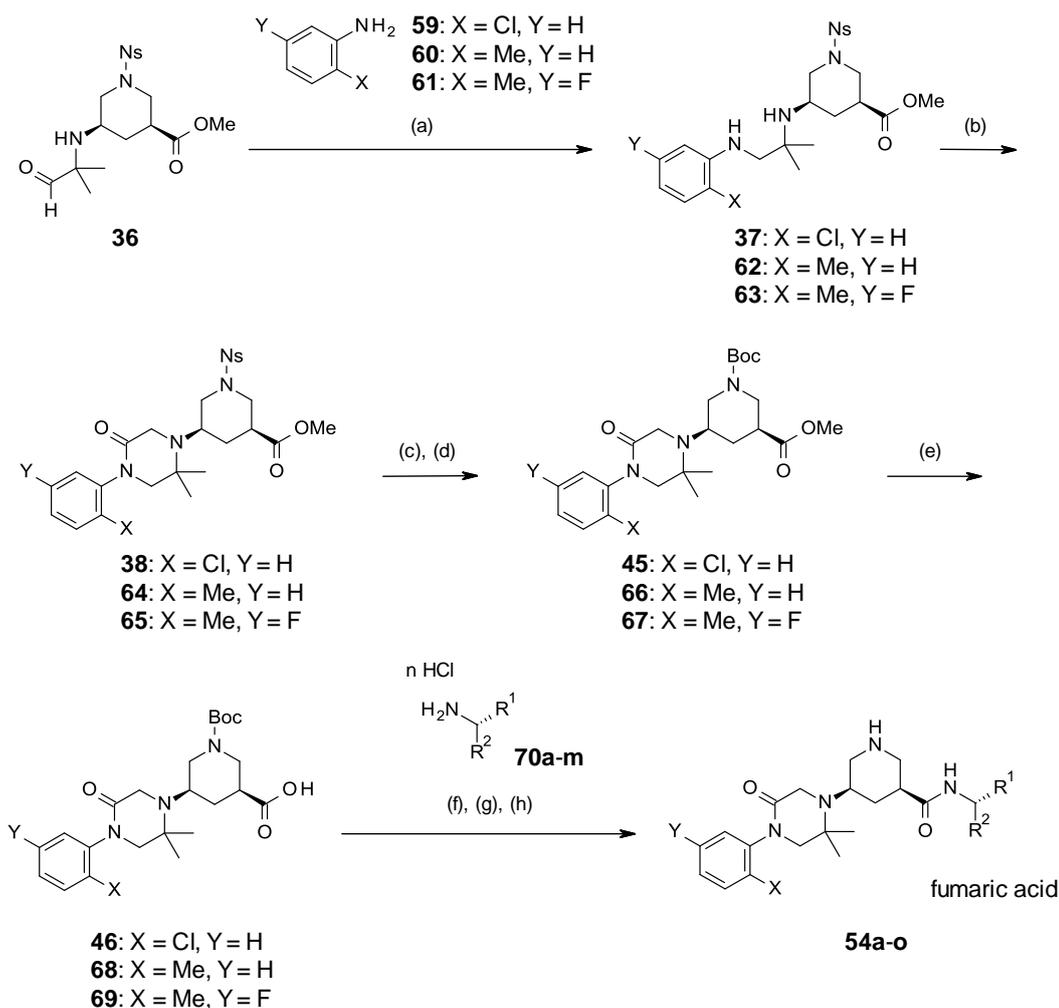


Figure 3-5. Effect of 54n on MAP in cynomolgus monkeys pretreated with furosemide

以上、各種 *in vitro* 試験と *in vivo* 試験の良好な結果を持って、化合物 54n をさらなる高次評価のための有望化合物として選抜した。

3-7) P₁', P₂', P₃ 変換体の合成

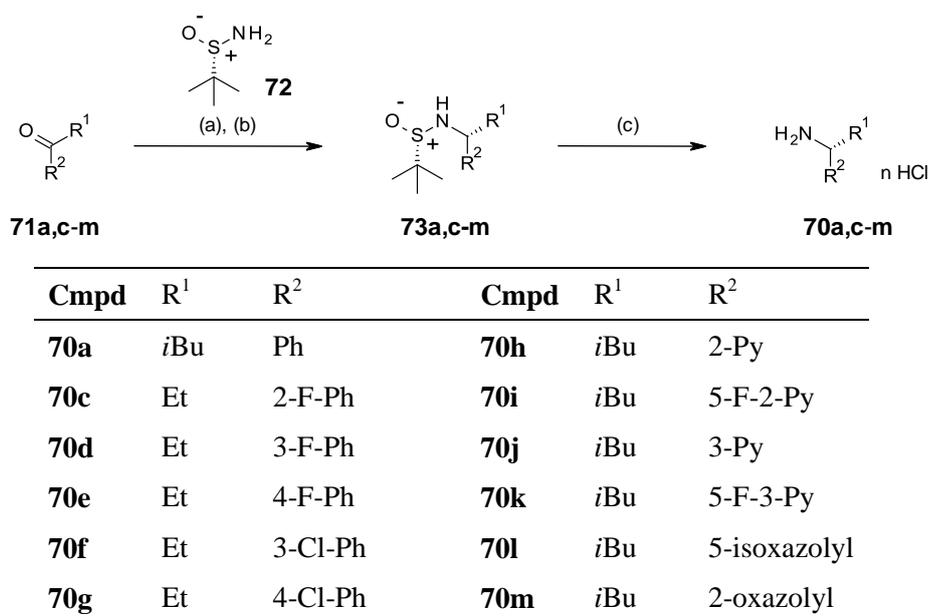
本章で使用した 3,5-二置換ピペリジン誘導体の合成法を Scheme 3-1 に示す。まず、第二章で合成したアルデヒド 36 とアニリン 59-61 の還元的アミノ化反応により、化合物 37, 62, 63 を得た。引き続きブロモアセチルブロミドを作用させることで、ケトピペラジン環を持つ化合物 38, 64, 65 へと変換した。次に Ns 基を除き Boc 基で保護し直し、エステル基を加水分解することでカルボン酸 46, 68, 69 へと誘導した。最後に、別途用意した光学活性なアミン塩酸塩 70a-m と縮合した後、Boc 基を除去しフマル酸塩とすることで、目的の 3,5-二置換ピペリジン誘導体 54a-o を合成した。



Cmpd	X	Y	R ¹	R ²	Cmpd	X	Y	R ¹	R ²
54a	Cl	H	<i>i</i> Bu	Ph	54i	Cl	H	<i>i</i> Bu	5-F-2-Py
54b	Cl	H	Et	Ph	54j	Cl	H	<i>i</i> Bu	3-Py
54c	Cl	H	Et	2-F-Ph	54k	Cl	H	<i>i</i> Bu	5-F-3-Py
54d	Cl	H	Et	3-F-Ph	54l	Cl	H	<i>i</i> Bu	5-isoxazolyl
54e	Cl	H	Et	4-F-Ph	54m	Cl	H	<i>i</i> Bu	2-oxazolyl
54f	Cl	H	Et	3-Cl-Ph	54n	Me	H	<i>i</i> Bu	5-F-2-Py
54g	Cl	H	Et	4-Cl-Ph	54o	Me	F	<i>i</i> Bu	5-F-2-Py
54h	Cl	H	<i>i</i> Bu	2-Py					

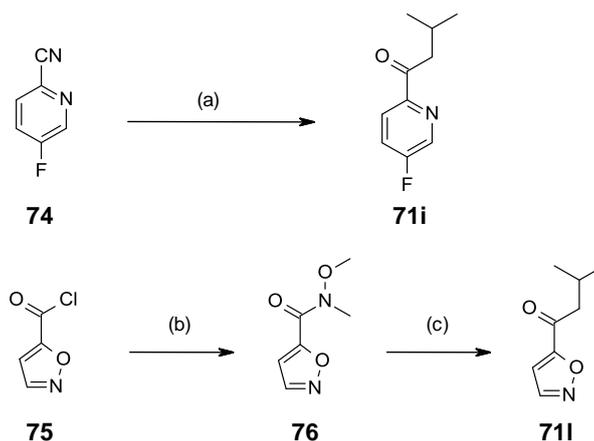
Scheme 3-1. Reagents and conditions: (a) **59-61**, AcOH, toluene, 130 °C, then NaBH(OAc)₃, rt; (b) bromoacetyl bromide, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 2.5 h, then 40 °C, 3 h, 78%; (c) PhSH, Cs₂CO₃, CH₃CN, rt, 2.5 h; (d) (Boc)₂O, NaHCO₃, AcOEt, water, rt, 0.5 h, 68% (2 steps); (e) LiOH-H₂O, THF, water, 0 °C, 2 h, quant.; (f) amine **70a-m**, HBTU, *N,N*-diisopropylethylamine, DMF, 0 °C; (g) TFA, CH₂Cl₂, rt; (h) fumaric acid, MeOH, rt.

次に、Scheme 3-1 で使用した光学活性なアミン塩酸塩 **70a,c-m** の合成法を Scheme 3-2 に示す¹⁶。なお、光学活性なアミン **70b** は市販品を使用した。まず、原料であるケトン **71a,c-m** とキラルなスルフィニルアミン **72** を $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ 存在下反応させスルフィニルイミンとした。その後、*L*-selectride を用いたジアステレオ選択的な還元によりスルフィニルアミド **73a,c-m** を得た。最後に 4*N* 塩酸/1,4-ジオキササンで処理することで、目的の光学活性なアミン塩酸塩 **70a,c-m** を合成した。



Scheme 3-2. Reagents and conditions: (a) (*S*)-*t*-BuSONH₂ **72**, $\text{Ti}(\text{OEt})_4$, THF, 70 °C; (b) *L*-selectride, THF, 0 °C; (c) 4*N*-HCl in 1,4-dioxane, MeOH, rt.

Scheme 3-2 で使用したケトン **71i,l** は Scheme 3-3 に示す方法で合成した。すなわち、ケトン **71i** は 5-フルオロピリジン-2-カルボニトリル (**74**) をイソブチルマグネシウムブロミドと反応させることによって合成した。ケトン **71l** は、まずイソキサゾール-5-カルボニルクロリド (**75**) に *N,O*-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩を作用させ Weinreb アミド (**76**) に変換した後、イソブチルマグネシウムブロミドと反応させることで合成した。



Scheme 3-3. Reagents and conditions: (a) 1 M Isobutylmagnesium bromide in THF, THF, -78 °C, 0.5 h, then rt, 1.5 h, 55%; (b) *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 2 h, 94%; (c) 1 M Isobutylmagnesium bromide in THF, THF, -78 °C, 0.5 h, then rt, 2 h, 97%.

3-8) 小括

本章では、カニクイサルに対しても経口活性を有する 3,5-二置換ピペリジン誘導体の探索を行った。まず、第二章で得られた高活性化合物 **15e** がカニクイサルで薬効を示さなかったことから、その原因の解明を行った。薬物動態の評価結果から、低い血中濃度が薬効を示さない原因であると仮定し、良好な血中濃度を示す化合物の探索を行った。その結果、P₂'部位にベンゼン環を有する化合物 **54a** が高いレニン阻害活性と良好な経口暴露を有することが分かった。しかしながら、初期安全性試験の結果、強い CYP3A4 直接阻害と hERG 電流阻害を示すことが判明した。そこで次に、CYP3A4 直接阻害と hERG 電流阻害が低減された化合物の獲得を目指すこととした。脂溶性低減による改善を検討した結果、P₂'部位に 5-フルオロ-2-ピリジル基を有する化合物 **54i** が良好なプロファイルを示すことが分かった。最後に P₃ 部位の構造変換により、より血中暴露および初期安全性に優れた有望化合物 **54n** を獲得した。化合物 **54n** は、各種 *in vitro* 評価において良好なプロファイルを示した。また、*in vivo* 評価を行った結果、SD ラットおよびカニクイサルにおいて良好な血中濃度と生物学的利用率を示すことが分かった。さらに、高血圧モデルである dTG ラットおよびフロセミドで処置したカニクイサルにおいて、経口投与で 24 時間にわたり優れた降圧作用を示した。以上の結果を持って、化合物 **54n** をさらなる高次評価のための有望化合物として選抜した。

3-9) 実験の部

3-9-1) Synthesis

Methyl (3*S*,5*R*)-5-[[1,1-dimethyl-2-(2-methylanilino)ethyl]amino]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylate (62)

The title compound was prepared from **36** and 2-methylaniline **60** in a manner similar to that described for **37** as a colorless solid (98%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H), 7.64-7.58 (m, 2H), 7.48-7.45 (m, 1H), 7.16-7.13 (m, 1H), 7.05 (br d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.68-6.65 (m, 1H), 6.58 (br d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.08-4.05 (m, 1H), 3.73-3.69 (m, 4H), 2.96 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 2.91 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 2.81-2.70 (m, 3H), 2.32 (dd, *J* = 12.2, 10.7 Hz, 1H), 2.21-2.17 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.31 (q, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.21 (s, 3H).

Methyl (3*S*,5*R*)-5-[[2-(5-fluoro-2-methylanilino)-1,1-dimethylethyl]amino]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylate (63)

The title compound was prepared from **36** and 5-fluoro-2-methylaniline **61** in a manner similar to that described for **37** as a colorless solid (98%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.66-7.59 (m, 2H), 7.51 (dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 6.95 (br t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.32 (dt, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 6.23 (dd, *J* = 11.2, 2.4 Hz, 1H), 4.26 (br s, 1H), 4.07-4.05 (m, 1H), 3.69-3.64 (m, 4H), 2.89-2.84 (m, 2H), 2.80-2.70 (m, 3H), 2.36-2.32 (m, 1H), 2.21-2.17 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.31 (q, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.20 (s, 3H).

Methyl (3*S*,5*R*)-5-[2,2-dimethyl-4-(*o*-tolyl)-5-oxopiperazin-1-yl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylate (64)

The title compound was prepared from **62** in a manner similar to that described for **38** as a colorless solid (84%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.03-8.01 (m, 1H), 7.76-7.71 (m, 2H), 7.67-7.65 (m, 1H), 7.27-7.21 (m, 3H), 7.13-7.06 (m, 1H), 4.05-4.00 (m, 1H), 3.87-3.81 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.68-3.15 (m, 5H), 2.79-2.66 (m, 3H), 2.24-2.18 (m, 4H), 1.75-1.66 (m, 1H), 1.37-1.34 (m, 6H).

Methyl (3*S*,5*R*)-5-[4-(5-fluoro-2-methylphenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-1-(2-nitrophenyl)sulfonylpiperidine-3-carboxylate (65)

The title compound was prepared from **63** in a manner similar to that described for **38** as a colorless solid (84%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.03-8.02 (m, 1H), 7.76-7.71 (m, 2H), 7.67-7.65 (m, 1H), 7.27-7.20 (m, 1H), 6.95 (dq, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 6.87-6.81 (m, 1H),

4.05-3.99 (m, 1H), 3.87-3.80 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.68-3.14 (m, 5H), 2.80-2.66 (m, 3H), 2.32-2.17 (m, 4H), 1.74-1.66 (m, 1H), 1.37-1.34 (m, 6H).

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-[2,2-dimethyl-4-(*o*-tolyl)-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-1,3-dicarboxylate (66)

The title compound was prepared from **64** in a manner similar to that described for **45** as a colorless solid (79%, 2steps). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.27-7.21 (m, 3H), 7.12-7.08 (m, 1H), 4.30 (br s, 1H), 4.08 (br s, 1H), 3.72-3.52 (m, 5H), 3.39-3.35 (m, 1H), 3.21 (br d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.01-2.97 (m, 1H), 2.70-2.54 (m, 3H), 2.24-2.23 (m, 3H), 2.12 (br d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 1.83-1.74 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.36-1.32 (m, 6H).

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-[4-(5-fluoro-2-methylphenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-1,3-dicarboxylate (67)

The title compound was prepared from **65** in a manner similar to that described for **45** as a colorless liquid (72%, 2steps). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.21 (dd, *J* = 8.3, 6.8 Hz, 1H), 6.97-6.93 (m, 1H), 6.86-6.83 (m, 1H), 4.29 (br s, 1H), 4.09 (br s, 1H), 3.71-3.51 (m, 5H), 3.37-3.33 (m, 1H), 3.19 (br d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.01-2.97 (m, 1H), 2.69-2.53 (m, 3H), 2.18-2.10 (m, 4H), 1.81-1.74 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.36-1.32 (m, 6H).

(3*S*,5*R*)-1-*tert*-Butoxycarbonyl-5-[2,2-dimethyl-4-(*o*-tolyl)-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-3-carboxylic acid (68)

The title compound was prepared from **66** in a manner similar to that described for **46** as a colorless solid (quant.). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.28-7.23 (m, 3H), 7.12-7.08 (m, 1H), 4.30 (br s, 1H), 4.05 (br s, 1H), 3.79-3.63 (m, 2H), 3.44-3.18 (m, 2H), 3.00 (br s, 1H), 2.73-2.54 (m, 3H), 2.24-2.17 (m, 4H), 1.79-1.70 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.36-1.33 (m, 6H).

(3*S*,5*R*)-1-*tert*-Butoxycarbonyl-5-[4-(5-fluoro-2-methylphenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-3-carboxylic acid (69)

The title compound was prepared from **67** in a manner similar to that described for **46** as a colorless solid (quant.). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.22 (dd, *J* = 8.3, 6.3 Hz, 1H), 6.98-6.94 (m, 1H), 6.87-6.83 (m, 1H), 4.29 (br s, 1H), 4.09 (br s, 1H), 3.78-3.61 (m, 2H), 3.42-3.18 (m, 2H), 3.01 (br s, 1H), 2.74-2.54 (m, 3H), 2.32-2.16 (m, 4H), 1.78-1.71 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.36-1.34 (m, 6H).

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-3-methyl-1-phenylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54a)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-3-methyl-1-phenylbutan-1-amine hydrochloride **70a** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (40%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.52-7.22 (m, 9H), 6.70 (s, 2H), 4.94 (br dd, *J* = 9.3, 5.4 Hz, 1H), 3.63-3.22 (m, 7H), 3.05-2.88 (m, 3H), 2.06-2.00 (m, 1H), 1.87-1.69 (m, 2H), 1.61-1.54 (m, 2H), 1.38-1.35 (m, 6H), 0.97-0.91 (m, 6H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₉H₃₉ClN₄O₂+H: 511.2840; found: 511.2850.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-phenylpropyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54b**)**

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-phenylpropan-1-amine **70b** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (37%, 3 steps). [α]_D^{25.0} +19.5 (*c* 1.02, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.53-7.51 (m, 1H), 7.41-7.21 (m, 8H), 6.70 (s, 2H), 4.73 (br t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.63-3.42 (m, 4H), 3.39-3.20 (m, 3H), 3.06-3.01 (m, 1H), 2.96 (br t, *J* = 12.2 Hz, 1H), 2.90-2.85 (m, 1H), 2.08-2.02 (m, 1H), 1.89-1.77 (m, 3H), 1.39-1.35 (m, 6H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 170.6, 168.0, 166.0, 143.5, 139.2, 135.0, 131.4, 129.9, 129.4, 129.2, 128.2, 128.1, 126.5, 126.2, 61.5, 54.0, 52.9, 49.1, 45.9, 43.9, 31.4, 29.2, 23.9, 23.1, 22.6, 21.1, 10.9. IR: 3318, 2968, 1648, 1551, 1493, 1334, 986, 757, 702 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₇H₃₅ClN₄O₂+H: 483.2527; found: 483.2541. Anal. C₂₇H₃₅ClN₄O₂·C₄H₄O₄·H₂O; calcd: C 60.33, H 6.70, N 9.08, Cl 5.74; found: C 60.61, H 6.57, N 9.13, Cl 5.75.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(2-fluorophenyl)propyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54c**)**

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-(2-fluorophenyl)propan-1-amine hydrochloride **70c** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (48%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.52 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.41-7.26 (m, 5H), 7.16 (dt, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H), 7.08 (ddd, *J* = 10.7, 8.3, 1.0 Hz, 1H), 6.71 (s, 2H), 5.01 (br t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.63-3.43 (m, 4H), 3.39-3.22 (m, 3H), 3.07-3.02 (m, 1H), 2.99-2.89 (m, 2H), 2.11-2.04 (m, 1H), 1.89-1.79 (m, 3H), 1.40-1.36 (m, 6H), 0.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₇H₃₄ClFN₄O₂+H: 501.2433; found: 501.2440.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(3-fluorophenyl)propyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54d**)**

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-(3-fluorophenyl)propan-1-amine hydrochloride **70d** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (45%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.52-7.51 (m, 1H), 7.40-7.27 (m, 4H), 7.12 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.06-7.04 (m, 1H), 7.00-6.96 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 4.74 (br t, *J* = 7.3 Hz, 1H),

3.64-3.42 (m, 4H), 3.39-3.22 (m, 3H), 3.07-2.89 (m, 3H), 2.10-2.02 (m, 1H), 1.89-1.78 (m, 3H), 1.39-1.36 (m, 6H), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₇H₃₄ClFN₄O₂+H: 501.2433; found: 501.2444.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(4-fluorophenyl)propyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54e)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-(4-fluorophenyl)propan-1-amine hydrochloride **70e** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (44%, 3 steps). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.53-7.51 (m, 1H), 7.38-7.28 (m, 5H), 7.09-7.04 (m, 2H), 6.70 (s, 2H), 4.73 (br t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.64-3.22 (m, 7H), 3.07-2.86 (m, 3H), 2.08-2.00 (m, 1H), 1.89-1.77 (m, 3H), 1.38-1.36 (m, 6H), 0.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₇H₃₄ClFN₄O₂+H: 501.2433; found: 501.2435.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(3-chlorophenyl)propyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54f)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-(3-chlorophenyl)propan-1-amine hydrochloride **70f** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (35%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.53-7.50 (m, 1H), 7.39-7.23 (m, 7H), 6.70 (s, 2H), 4.71 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.73-3.49 (m, 4H), 3.47-3.42 (m, 1H), 3.40-3.22 (m, 2H), 3.06-2.88 (m, 3H), 2.12-2.02 (m, 1H), 1.88-1.77 (m, 3H), 1.42-1.35 (m, 6H), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₇H₃₄Cl₂N₄O₂+H: 517.2137; found: 517.2132.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(4-chlorophenyl)propyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54g)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-(4-chlorophenyl)propan-1-amine hydrochloride **70g** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (35%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.54-7.50 (m, 1H), 7.40-7.26 (m, 7H), 6.70 (s, 2H), 4.71 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.64-3.22 (m, 7H), 3.07-2.86 (m, 3H), 2.09-2.01 (m, 1H), 1.89-1.77 (m, 3H), 1.41-1.34 (m, 6H), 0.92 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₇H₃₄Cl₂N₄O₂+H: 517.2137; found: 517.2144.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-3-methyl-1-(2-pyridyl)butyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54h)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-3-methyl-1-(2-pyridyl)butan-1-amine dihydrochloride **70h** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (48%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.51 (br d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.79 (br t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.52-7.51 (m, 1H), 7.41-7.35 (m, 3H), 7.31-7.28 (m, 2H), 6.70 (s, 2H), 5.03 (dd, $J = 9.3, 5.9$

Hz, 1H), 3.64-3.44 (m, 4H), 3.39-3.22 (m, 3H), 3.06-3.01 (m, 1H), 2.98-2.89 (m, 2H), 2.17-2.11 (m, 1H), 1.87-1.78 (m, 1H), 1.76-1.58 (m, 3H), 1.41-1.36 (m, 6H), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₈H₃₈ClN₅O₂+H: 512.2792; found: 512.2813.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54i)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutan-1-amine dihydrochloride **70i** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (47%, 3 steps). $[\alpha]_D^{25.0} +16.6$ (c 1.16, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.41 (br d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.58-7.50 (m, 2H), 7.42-7.35 (m, 3H), 7.33-7.30 (m, 1H), 6.71 (s, 2H), 5.05 (dd, $J = 9.3, 6.4$ Hz, 1H), 3.64-3.44 (m, 4H), 3.39-3.21 (m, 3H), 3.04 (br t, $J = 11.7$ Hz, 1H), 2.99-2.89 (m, 2H), 2.15-2.09 (m, 1H), 1.86-1.78 (m, 1H), 1.76-1.64 (m, 2H), 1.61-1.55 (m, 1H), 1.40-1.36 (m, 6H), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 172.8, 171.5, 169.4, 161.2, 159.1, 140.1, 138.3, 136.3, 133.3, 131.5, 130.8, 130.4, 129.5, 125.0, 123.8, 63.4, 54.8, 53.7, 50.3, 47.7, 47.0, 45.5, 41.2, 32.6, 26.1, 25.1, 24.2, 23.3, 22.3, 21.8. IR: 3279, 2961, 1649, 1552, 1485, 1387, 1228, 983, 752, 633 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₈H₃₇ClFN₅O₂+H: 530.2698; found: 530.2700. Anal. C₂₈H₃₇ClFN₅O₂·C₄H₄O₄·0.5H₂O; calcd: C 58.66, H 6.46, N 10.69, Cl 5.41, F 2.90; found: C 58.70, H 6.58, N 10.73, Cl 5.43, F 2.86.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-3-methyl-1-(3-pyridyl)butyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54j)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-3-methyl-1-(3-pyridyl)butan-1-amine dihydrochloride **70j** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (36%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.51 (br s, 1H), 8.45 (br d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.82-7.79 (m, 1H), 7.53-7.51 (m, 1H), 7.45-7.26 (m, 4H), 6.72 (s, 2H), 4.99 (dd, $J = 9.4, 5.5$ Hz, 1H), 3.63-3.22 (m, 7H), 3.09-2.85 (m, 3H), 2.10-2.01 (m, 1H), 1.87-1.75 (m, 2H), 1.64-1.57 (m, 2H), 1.39-1.36 (m, 6H), 0.99 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₈H₃₈ClN₅O₂+H: 512.2792; found: 512.2813.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(5-fluoro-3-pyridyl)-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54k)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-(5-fluoro-3-pyridyl)-3-methylbutan-1-amine dihydrochloride **70k** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (33%, 3 steps). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.39-8.37 (m, 2H), 7.62-7.59 (m, 1H), 7.51 (br d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.41-7.35 (m, 2H), 7.31-7.27 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.02

(dd, $J = 9.5, 5.6$ Hz, 1H), 3.64-3.42 (m, 4H), 3.39-3.21 (m, 3H), 3.06-3.00 (m, 1H), 2.98-2.86 (m, 2H), 2.09-2.01 (m, 1H), 1.88-1.76 (m, 2H), 1.67-1.58 (m, 2H), 1.39-1.36 (m, 6H), 0.99 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₈H₃₇ClFN₅O₂+H: 530.2698; found: 530.2725.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-isoxazol-5-yl-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54l)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-1-isoxazol-5-yl-3-methylbutan-1-amine hydrochloride **70l** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (53%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.33-8.31 (m, 1H), 7.53-7.51 (m, 1H), 7.42-7.28 (m, 3H), 6.70 (s, 2H), 6.31-6.29 (m, 1H), 5.26 (dd, $J = 9.3, 6.3$ Hz, 1H), 3.68-3.23 (m, 7H), 3.08-2.86 (m, 3H), 2.14-2.08 (m, 1H), 1.95-1.87 (m, 1H), 1.82-1.74 (m, 2H), 1.68-1.61 (m, 1H), 1.41-1.33 (m, 6H), 0.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₆H₃₇ClN₅O₃+H: 502.2585; found: 502.2588.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(2-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-3-methyl-1-oxazol-2-yl-butyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54m)

The title compound was prepared from **46** and (1*R*)-3-methyl-1-oxazol-2-yl-butan-1-amine hydrochloride **70m** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (13%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.88-7.86 (m, 1H), 7.53 (dd, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.41-7.35 (m, 2H), 7.33-7.30 (m, 1H), 7.14-7.12 (m, 1H), 6.70 (d, $J = 2.9$ Hz, 2H), 5.17 (dd, $J = 8.5, 7.1$ Hz, 1H), 3.69-3.22 (m, 7H), 3.08-2.95 (m, 2H), 2.92-2.84 (m, 1H), 2.23-2.15 (m, 1H), 1.94-1.85 (m, 1H), 1.82-1.77 (m, 2H), 1.65-1.60 (m, 1H), 1.43-1.36 (m, 6H), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₂₆H₃₇ClN₅O₃+H: 502.2585; found: 502.2603.

(3*S*,5*R*)-5-[2,2-Dimethyl-4-(*o*-tolyl)-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54n)

The title compound was prepared from **68** and (1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutan-1-amine dihydrochloride **70i** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (50%, 3 steps). $[\alpha]_D^{25.0} +15.3$ (c 1.19, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.41 (br s, 1H), 7.59-7.54 (m, 1H), 7.41-7.38 (m, 1H), 7.30-7.24 (m, 3H), 7.12-7.09 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.06-5.03 (m, 1H), 3.64-3.46 (m, 4H), 3.41-3.19 (m, 3H), 3.04 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H), 2.98-2.87 (m, 2H), 2.19 (s, 1.5H), 2.17 (s, 1.5H), 2.13-2.09 (m, 1H), 1.86-1.57 (m, 4H), 1.38-1.36 (m, 6H), 0.98-0.93 (m, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170.8, 168.1, 165.9, 158.9, 158.7, 156.9, 141.0, 136.6, 136.4, 135.1, 130.5, 127.4, 126.8, 123.6, 121.8, 61.9, 52.9, 51.7, 48.9, 45.9, 45.6, 43.9, 43.7, 31.3, 24.4, 24.0, 23.0, 22.7, 21.6, 21.0, 17.3. IR: 3296, 2960,

1643, 1485, 1387, 1228, 983, 749, 647 cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{FN}_5\text{O}_2+\text{H}$: 510.3244; found: 510.3235. Anal. $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{FN}_5\text{O}_2\cdot\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$; calcd: C 62.44, H 7.15, N 11.03, F 2.99; found: C 62.47, H 7.41, N 10.97, F 2.88.

(3*S*,5*R*)-5-[4-(5-Fluoro-2-methylphenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (54o)

The title compound was prepared from **69** and (1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutan-1-amine dihydrochloride **70i** in a manner similar to that described for **15e** as a colorless solid (44%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.41 (br s, 1H), 7.59-7.52 (m, 1H), 7.43-7.38 (m, 1H), 7.31-7.28 (m, 1H), 7.04-7.00 (m, 1H), 6.96-6.93 (m, 1H), 6.69 (s, 2H), 5.04 (br dd, $J = 8.4, 6.5$ Hz, 1H), 3.64-3.18 (m, 7H), 3.02 (br t, $J = 12.1$ Hz, 1H), 2.98-2.90 (m, 2H), 2.16-2.07 (m, 4H), 1.89-1.56 (m, 4H), 1.37-1.35 (m, 6H), 0.97 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_2+\text{H}$: 528.3150; found: 528.3162.

(*S*_S)-2-Methyl-*N*-[(1*R*)-3-methyl-1-phenylbutyl]propane-2-sulfinamide (73a)

Ti(OEt)₄ (6.82 g, 29.9 mol) was added to a solution of 3-methyl-1-phenylbutan-1-one **71a** (27.0 g, 105 mmol) and (*S*)-(-)-2-methylpropane-2-sulfinamide **72** (2.00 g, 16.5 mmol) in THF (36.0 mL) at rt, and the mixture was stirred at 70 °C for 5.5 h. After cooling, brine was added to the reaction mixture. The mixture was filtered, and then the solvent was extracted with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/0 to 7/3) to obtain (*S*_S)-2-methyl-*N*-[(1*E*)-3-methyl-1-phenylbutylidene]propane-2-sulfinamide (2.31 g, 47%) as a colorless liquid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.82-7.80 (m, 2H), 7.48-7.40 (m, 3H), 3.35-3.31 (m, 1H), 3.08-3.05 (m, 1H), 2.10-2.02 (m, 1H), 1.32 (s, 9H), 0.98-0.96 (m, 6H). 1M L-selectride in THF (26.0 mL, 26.0 mmol) was added to a solution of (*S*_S)-2-methyl-*N*-[(1*E*)-3-methyl-1-phenylbutylidene]propane-2-sulfinamide (2.31 g, 8.70 mmol) in THF (20 mL) under ice-cooling over a period of 5 min, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/0 to 1/1) to obtain **73a** (1.93 g, 83%) as a colorless liquid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.34-7.25 (m, 5H), 4.47-4.43 (m, 1H), 3.33 (br s, 1H), 1.72-1.63 (m, 2H), 1.48-1.40 (m, 1H), 1.16 (s, 9H), 0.94 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H).

(*S*_S)-*N*-[(1*R*)-1-(2-Fluorophenyl)propyl]-2-methylpropane-2-sulfinamide (73c)

The title compound was prepared from 1-(2-fluorophenyl)propan-1-one **71c** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (49%, 2 steps). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.31-7.23 (m, 2H), 7.14-7.10 (m, 1H), 7.05-7.01 (m, 1H), 4.62-4.58 (m, 1H), 3.44 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 1.99-1.84 (m, 2H), 1.17 (s, 9H), 0.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

(S_S)-N-[(1R)-1-(3-Fluorophenyl)propyl]-2-methylpropane-2-sulfinamide (73d)

The title compound was prepared from 1-(3-fluorophenyl)propan-1-one **71d** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (60%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.32-7.28 (m, 1H), 7.09-7.05 (m, 1H), 7.02-6.94 (m, 2H), 4.32-4.28 (m, 1H), 3.38 (br s, 1H), 1.88-1.74 (m, 2H), 1.19 (s, 9H), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

(S_S)-N-[(1R)-1-(4-Fluorophenyl)propyl]-2-methylpropane-2-sulfinamide (73e)

The title compound was prepared from 1-(4-fluorophenyl)propan-1-one **71e** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (70%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.28-7.23 (m, 2H), 7.05-7.00 (m, 2H), 4.31-4.25 (m, 1H), 3.38 (br s, 1H), 1.87-1.72 (m, 2H), 1.18 (s, 9H), 0.83 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

(S_S)-N-[(1R)-1-(3-Chlorophenyl)propyl]-2-methylpropane-2-sulfinamide (73f)

The title compound was prepared from 1-(3-chlorophenyl)propan-1-one **71f** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (57%, 2 steps). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.29-7.24 (m, 3H), 7.19-7.16 (m, 1H), 4.29-4.26 (m, 1H), 3.38 (br s, 1H), 1.87-1.74 (m, 2H), 1.20 (s, 9H), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

(S_S)-N-[(1R)-1-(4-Chlorophenyl)propyl]-2-methylpropane-2-sulfinamide (73g)

The title compound was prepared from 1-(4-chlorophenyl)propan-1-one **71g** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (60%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.32-7.29 (m, 2H), 7.24-7.21 (m, 2H), 4.30-4.26 (m, 1H), 3.37 (br s, 1H), 1.86-1.72 (m, 2H), 1.18 (s, 9H), 0.84 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

(S_S)-2-Methyl-N-[(1R)-3-methyl-1-(2-pyridyl)butyl]propane-2-sulfinamide (73h)

The title compound was prepared from 3-methyl-1-(2-pyridyl)butan-1-one **71h** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (63%, 2 steps). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.58-8.57 (m, 1H), 7.65 (dt, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H), 7.27-7.24 (m, 1H), 7.18 (ddd, *J* = 7.6, 4.9, 1.2 Hz, 1H), 4.54-4.50 (m, 1H), 3.85 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 1.85-1.76 (m, 2H), 1.56-1.51 (m, 1H), 1.15 (s, 9H), 0.95 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H).

(S_S)-N-[(1R)-1-(5-Fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutyl]-2-methylpropane-2-sulfinamide (73i)

The title compound was prepared from 1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutan-1-one **71i** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (53%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.43 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.36 (dt, *J* = 8.6, 2.7 Hz, 1H), 7.29-7.26 (m, 1H), 4.55 (dt, *J* = 7.4, 5.5 Hz, 1H), 3.73 (br d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 1.84-1.72 (m, 2H), 1.54-1.44 (m, 1H), 1.15 (s, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H).

(S_S)-2-Methyl-N-[(1R)-3-methyl-1-(3-pyridyl)butyl]propane-2-sulfinamide (73j)

The title compound was prepared from 3-methyl-1-(3-pyridyl)butan-1-one **71j** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (45%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.57-8.54 (m, 2H), 7.64-7.61 (m, 1H), 7.30-7.27 (m, 1H), 4.50 (dt, *J* = 7.4, 2.3 Hz, 1H), 3.40 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 1.70 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.48-1.43 (m, 1H), 1.17 (s, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

(S_S)-N-[(1R)-1-(5-Fluoro-3-pyridyl)-3-methylbutyl]-2-methylpropane-2-sulfinamide (73k)

The title compound was prepared from 1-(5-fluoro-3-pyridyl)-3-methylbutan-1-one **71k** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (41%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.41-8.40 (m, 2H), 7.40-7.37 (m, 1H), 4.54 (dt, *J* = 7.2, 1.7 Hz, 1H), 3.56 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 1.76-1.63 (m, 2H), 1.53-1.42 (m, 1H), 1.19 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

(S_S)-N-[(1R)-1-Isoxazol-5-yl-3-methylbutyl]-2-methylpropane-2-sulfinamide (73l)

The title compound was prepared from 1-isoxazol-5-yl-3-methylbutan-1-one **71l** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (69%, 2 steps). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.18 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.70 (dt, *J* = 7.6, 5.0 Hz, 1H), 3.38 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 1.90-1.77 (m, 2H), 1.64-1.59 (m, 1H), 1.19 (s, 9H), 0.98-0.94 (m, 6H).

(S_S)-2-Methyl-N-[(1R)-3-methyl-1-oxazol-2-yl-butyl]propane-2-sulfinamide (73m)

The title compound was prepared from 3-methyl-1-oxazol-2-yl-butan-1-one **71m** in a manner similar to that described for **73a** as a colorless liquid (58%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.61 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 4.68-4.62 (m, 1H), 3.53 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 1.97-1.82 (m, 2H), 1.63-1.57 (m, 1H), 1.17 (s, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

(1R)-3-Methyl-1-phenylbutan-1-amine hydrochloride (70a)

4*N*-HCl in 1,4-dioxane (3.60 mL, 14.4 mmol) was added to a solution of **73a** (1.93 g, 7.22 mmol) in methanol (3.60 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 40 min. Et₂O was added to the reaction mixture, and then the precipitate was collected by filtration to obtain **70a** (1.30 g, 90%) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.49-7.41 (m, 5H), 4.31 (dd, *J* = 10.0, 5.6 Hz, 1H), 1.93 (ddd, *J* = 15.6, 10.3, 5.4 Hz, 1H), 1.81-1.75 (m, 1H), 1.44-1.36 (m, 1H), 0.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₁₁H₁₇N+H: 164.1439; found: 164.1441.

(1R)-1-(2-Fluorophenyl)propan-1-amine hydrochloride (70c)

The title compound was prepared from **73c** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (89%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.51-7.45 (m, 2H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.25-7.21 (m, 1H), 4.47 (dd, *J* = 9.3, 5.9 Hz, 1H), 2.12-1.94 (m, 2H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

(1R)-1-(3-Fluorophenyl)propan-1-amine hydrochloride (70d)

The title compound was prepared from **73d** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (80%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.52-7.47 (m, 1H), 7.27-7.16 (m, 3H), 4.21 (dd, *J* = 9.3, 5.9 Hz, 1H), 2.08-1.90 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

(1R)-1-(4-Fluorophenyl)propan-1-amine hydrochloride (70e)

The title compound was prepared from **73e** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (quant.). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.50-7.44 (m, 2H), 7.23-7.18 (m, 2H), 4.19 (dd, *J* = 9.2, 5.7 Hz, 1H), 2.09-1.88 (m, 2H), 0.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

(1R)-1-(3-Chlorophenyl)propan-1-amine hydrochloride (70f)

The title compound was prepared from **73f** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (90%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.50-7.44 (m, 3H), 7.38-7.36 (m, 1H), 4.19 (dd, *J* = 9.0, 6.1 Hz, 1H), 2.06-1.91 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

(1R)-1-(4-Chlorophenyl)propan-1-amine hydrochloride (70g)

The title compound was prepared from **73g** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (59%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.49-7.47 (m, 2H), 7.45-7.42 (m, 2H), 4.19 (dd, *J* = 9.3, 5.9 Hz, 1H), 2.09-1.89 (m, 2H), 0.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

(1R)-3-Methyl-1-(2-pyridyl)butan-1-amine dihydrochloride (70h)

The title compound was prepared from **73h** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (89%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.81-8.79 (m, 1H), 8.28 (dt, *J* = 7.8,

1.5 Hz, 1H), 7.86 (br d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.75 (ddd, $J = 7.8, 5.4, 1.0$ Hz, 1H), 4.66 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.99-1.87 (m, 2H), 1.57-1.49 (m, 1H), 1.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

(1R)-1-(5-Fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutan-1-amine dihydrochloride (70i)

The title compound was prepared from **73i** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (quant.). $[\alpha]_D^{25.0} -4.39$ (c 1.00, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 8.56 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.67 (dt, $J = 8.6, 2.9$ Hz, 1H), 7.53 (dd, $J = 8.8, 4.4$ Hz, 1H), 4.51-4.48 (m, 1H), 1.86 (ddd, $J = 13.7, 8.3, 6.4$ Hz, 1H), 1.76 (ddd, $J = 13.7, 7.8, 6.4$ Hz, 1H), 1.51-1.43 (m, 1H), 1.00 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{FN}_2+\text{H}$: 183.1298; found: 183.1294.

(1R)-3-Methyl-1-(3-pyridyl)butan-1-amine dihydrochloride (70j)

The title compound was prepared from **73j** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (84%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 9.16-9.15 (m, 1H), 8.99-8.98 (m, 1H), 8.87-8.84 (m, 1H), 8.24 (dd, $J = 8.3, 5.9$ Hz, 1H), 4.76 (dd, $J = 8.8, 6.8$ Hz, 1H), 2.07-1.96 (m, 2H), 1.54-1.46 (m, 1H), 1.01 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

(1R)-1-(5-Fluoro-3-pyridyl)-3-methylbutan-1-amine dihydrochloride (70k)

The title compound was prepared from **73k** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (88%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 8.71 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.67 (br s, 1H), 8.03 (dt, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J = 9.3, 6.4$ Hz, 1H), 2.00-1.94 (m, 1H), 1.91-1.86 (m, 1H), 1.49-1.41 (m, 1H), 0.99 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

(1R)-1-Isoxazol-5-yl-3-methylbutan-1-amine hydrochloride (70l)

The title compound was prepared from **73l** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (87%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 8.48 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.75 (dd, $J = 9.8, 5.9$ Hz, 1H), 2.04-1.97 (m, 1H), 1.86-1.80 (m, 1H), 1.56-1.49 (m, 1H), 0.99 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

(1R)-3-Methyl-1-oxazol-2-yl-butan-1-amine hydrochloride (70m)

The title compound was prepared from **73m** in a manner similar to that described for **70a** as a colorless solid (quant.). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 8.01 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 4.62 (dd, $J = 9.3, 5.9$ Hz, 1H), 2.05-1.98 (m, 1H), 1.83-1.77 (m, 1H), 1.63-1.55 (m, 1H), 0.99 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

1-(5-Fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutan-1-one (71i)

Isobutylmagnesium bromide (17% in THF, ca. 1 mol/L) (32.0 mL, 32.0 mmol) was added to a solution of **74** (3.07 g, 25.1 mmol) in THF (50.0 mL) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ over a period of 20 min, and the mixture was stirred at the same temperature for 10 min. Then, the mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. 2*N* HCl aqueous solution was added to the reaction mixture under ice-cooling, and then NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/0 to 2/1) to obtain **71i** (2.50 g, 55%) as a colorless liquid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.49 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 8.8, 4.4 Hz, 1H), 7.50 (dt, *J* = 8.3, 2.9 Hz, 1H), 3.06 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.34-2.26 (m, 1H), 0.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

***N*-Methoxy-*N*-methylisoxazole-5-carboxamide (76)**

75 (10.0 g, 76.0 mmol) was added to a solution of *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (8.90 g, 91.2 mmol) and pyridine (13.5 mL, 167 mmol) in CH₂Cl₂ (150 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/1) to obtain **76** (11.1 g, 94%) as a colorless liquid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.39 (s, 3H).

1-Isioxazol-5-yl-3-methylbutan-1-one (71I)

Isobutylmagnesium bromide (17% in THF, ca. 1 mol/L) (101 mL, 101 mmol) was added to a solution of **76** (11.1 g, 71.2 mmol) in THF (400 mL) at 0 °C over a period of 30 min, and then, the mixture was stirred at room temperature for 2 h. Saturated NH₄Cl aqueous solution was added to the reaction mixture under ice-cooling, and then NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 9/1) to obtain **71I** (10.6 g, 97%) as a colorless liquid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.86 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.35-2.28 (m, 1H), 1.01 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H).

3-9-2) Biology assays

IC₅₀ in buffer

The assay was conducted in a manner similar to that described in chapter 1.

IC₅₀ in plasma

The assay was conducted in a manner similar to that described in chapter 1.

Metabolic stability

The evaluation was conducted in a manner similar to that described in chapter 1.

Lipophilicity (LogD_{7.4})

100 μM of compounds was added into a mixture of 1-octanol and phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). After the mixture was vortexed and centrifuged, compound concentrations in the 1-octanol layer and PBS layer were semi-quantitatively analyzed by LC-MS/MS and LogD value was calculated by the following formula.

$$[\text{LogD}] = \text{Log}_{10} [\text{compound concentration in 1-octanol} / \text{compound concentration in PBS}]$$

Plasma protein binding ratio

After human plasma spiked with 5 μM of compounds was dialyzed against PBS at 37 °C for 5 h using dialysis membrane., compound concentration in the PBS and human plasma were semi-quantitatively analyzed by LC-MS/MS and % binding was calculated by the following formula.

$$[\% \text{ binding}] = 100 - [\text{compound concentration in PBS}] / [\text{compound concentration in human plasma}] \times 100$$

CYP direct inhibition

The reversible inhibition by compounds on the specific activities of CYP were examined in the reaction mixture containing human liver microsome and a NADPH generating system. The microsomal protein concentration in the assay was 0.1 mg/mL. After CYP substrate was incubated at 37 °C for 10 min in the absence or presence of compounds (10 μmol/L), concentration of metabolites from CYP substrate was semi-quantitatively analyzed by LC-MS/MS and % inhibition was calculated by the following formula.

$$[\% \text{ inhibition}] = 100 - [\text{metabolite concentration}] \text{ with compound} / [\text{metabolite concentration}] \text{ without compound} \times 100$$

hERG current inhibition

Potassium currents in CHO-K1 cells stably expressing the hERG potassium channel were measured using the patch clamp technique on an IonWorks Quattro system (Molecular Devices, USA). hERG channels were activated from a holding potential of -80 mV by a step to +50 mV for 2 s, followed by a step to -40 mV for 2 s, and then tail peak currents were measured. Test compounds were incubated with the cells for 5 min.

Guinea pig right ventricular papillary muscle-cardiac action potential

Action potentials were measured using the glass microelectrode method. Male Hartley guinea pigs were sacrificed by cervical dislocation and exsanguination. The heart was immediately excised. A strand of free-running papillary muscle from the right ventricle was dissected and immediately mounted into a perfusion chamber. The perfusing Tyrode solution was oxygenated with a gas mixture of 5% CO₂ and 95% O₂, and kept at 36.5 °C with a temperature-controlled circulator. Transmembrane action potentials were recorded using a 3 M KCl glass microelectrode with a tip resistance of 5–30 megohms, which was coupled to an Ag-AgCl bath electrode and connected to a microelectrode amplifier (MEZ-8300 or MEZ-8301, Nihon Kohden, Japan). The tissue preparation was electrically driven at 1 Hz through bipolar electrodes using a stimulator (SEN-3201 or SEN-3301, Nihon Kohden). The stimulation pulse was square in shape, 1 ms duration, with an intensity of about 1.3 times the diastolic threshold. The action potentials were displayed on an oscilloscope (CS-4025 or DSC-7040, Kenwood, Japan), and recorded and analyzed using a computer system (WinCAPA1.6.6. Aui, Physio-Tech, Japan). Resting membrane potential, action potential amplitude, maximal upstroke velocity, and action potential duration at 30%, 60% and 90% repolarization levels were quantified. After confirming that these parameters were stabilized, test compounds were incubated with the tissue preparation for 30 min.

Ames test (*Salmonella typhimurium* TA98 and TA100)

To detect the mutagenic potential of test compound in bacteria, various dose levels of test compound were evaluated for each bacterial strain in either the presence or absence of a metabolic activation system (S9 mix). The revertant colonies after 48 h incubation (37°C) were counted using an automated colony counter (CA-11, System Science, Inc.) with automatic area correction. When the mean revertant colony count increased 2 times or more than that of the vehicle control (DMSO), and the increase showed dose-dependency or reproducibility, the test compound was judged to be positive.

3-9-3) Animal studies

Blood pressure study in dTG rats

The evaluation was conducted in a manner similar to that described in chapter 1.

Blood pressure study in cynomolgus monkeys pre-treated with furosemide

Arterial pressure was measured by a telemetry system in conscious, freely moving cynomolgus monkeys (n = 6). Pressure transmitters (TL11M2-D70-PCT, Data Sciences International Inc., USA) were implanted into the peritoneal cavity under aseptic conditions and anesthesia, and the sensor catheter was placed in the left femoral artery. Cynomolgus monkeys were allowed to recover for at least 1 week before any experiment. The animals were fasted from the morning on the dosing day. Feeding on the dosing day was conducted 8 hours after dosing or later. The animals were allowed free access to water the whole time. Furosemide at 5 mg/kg/day was intramuscularly administered for 3 days before drug administration. Cynomolgus monkeys orally received **54n** at doses of 3 and 10 mg/kg, or vehicle (1% methylcellulose). Arterial pressure was continuously measured telemetrically from 3 h before administration to 24 h after administration with the data collection and real-time analysis system (Dataquest™ OpenART™, Data Sciences International, USA). The mean value for 1 h of MAP was calculated.

Pharmacokinetics

The evaluation was conducted in a manner similar to that described in chapter 1.

Cassette dosing method (po, 0-4h) in cynomolgus monkeys

Three or four compounds suspended in 1% methylcellulose were administered simultaneously to cynomolgus monkeys by oral gavage at a dose of 1 mg/kg for each compound. Following dosing, blood samples were collected over 4 h with a minimum of 4 time points, and plasma concentrations of each compound were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to obtain PK parameters via non-compartmental analysis.

3-10) 参考文献

1. (a) Wood, J. M.; Maibaum, J.; Rahuel, J.; Grütter, M. G.; Cohen, N.-C.; Rasetti, V.; Rüger, H.; Göschke, R.; Stutz, S.; Fuhrer, W.; Schilling, W.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Cumin, F.; Baum, H.-P.; Schnell, C. R.; Herold, P.; Mah, R.; Jensen, C.; O'Brien, E.; Stanton, A.; Bedigian, M. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *308*, 698; (b) Wood, J. M.; Schnell, C. R.; Cumin, F.; Menard, J.; Webb, R. L. *J. Hypertens.* **2005**, *23*, 417; (c) Pilz, B.; Shagdarsuren, E.; Wellner, M.; Fiebeler, A.; Dechend, R.; Gratze, P.; Meiners, S.; Feldman, D. L.; Webb, R. L.; Garrelds, I. M.; Danser, A. H. J.; Luft, F. C.; Müller, D. N. *Hypertension* **2005**, *46*, 569; (d) Maibaum, J.; Stutz, S.; Göschke, R.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Cumin, F.; Rahuel, J.; Baum, H.-P.; Cohen, N.-C.; Schnell, C. R.; Fuhrer, W.; Gruetter, M. G.; Schilling, W.; Wood, J. M. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4832.
2. Märki, H. P.; Binggeli, A.; Bittner, B.; Bohner-Lang, V.; Breu, V.; Bur, D.; Coassolo, Ph.; Clozel, J. P.; D'Arcy, A.; Doebeli, H.; Fischli, W.; Funk, Ch.; Foricher, J.; Giller, T.; Grüniger, F.; Guenzi, A.; Güller, R.; Hartung, T.; Hirth, G.; Jenny, Ch.; Kansy, M.; Klinkhammer, U.; Lave, T.; Lohri, B.; Luft, F. C.; Mervaala, E. M.; Müller, D. N.; Müller, M.; Montavon, F.; Oefner, Ch.; Qiu, C.; Reichel, A.; Sanwald-Ducray, P.; Scalone, M.; Schleimer, M.; Schmid, R.; Stadler, H.; Treiber, A.; Valdenaire, O.; Vieira, E.; Waldmeier, P.; Wiegand-Chou, R.; Wilhelm, M.; Wostl, W.; Zell, M.; Zell, R. *Il Farmaco* **2001**, *56*, 21.
3. Nakamura, Y.; Fujimoto, T.; Ogawa, Y.; Sugita, C.; Miyazaki, S.; Tamaki, K.; Takahashi, M.; Matsui, Y.; Nagayama, T.; Manabe, K.; Mizuno, M.; Masubuchi, N.; Chiba, K.; Nishi, T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 754.
4. Nakamura, Y.; Fujimoto, T.; Ogawa, Y.; Namiki, H.; Suzuki, S.; Asano, M.; Sugita, C.; Mochizuki, A.; Miyazaki, S.; Tamaki, K.; Nagai, Y.; Inoue, S.; Nagayama, T.; Kato, M.; Chiba, K.; Takasuna, K.; Nishi, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3175.
5. Waring, M. J. *Expert Opin Drug Discov.* **2010**, *5*, 235.
6. 有機医薬分子論, 周東 智, 京都廣川書店.
7. The practice of medicinal chemistry, Third edition, Wermuth, C. G.
8. Nakatani, H. *J.Theor. Biol.* **1996**, *178*, 423.
9. Burger's medicinal chemistry and drug discovery, Six edition, Volume 2, Abraham, D. J.
10. Ben-David, J.; Zipes, D. P. *Lancet* **1993**, *341*, 1578.
11. (a) Aspiotis, R.; Chen, A.; Cauchon, E.; Dubé, D.; Falgueyret, J.-P.; Gagné, S.; Gallant, M.; Grimm, E. L.; Houle, R.; Juteau, H.; Lacombe, P.; Laliberté, S.; Lévesque, J.-F.; MacDonald, D.; McKay, D.; Percival, M. D.; Roy, P.; Soisson, S. M.; Wu, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2430; (b) Yuan, J.; Simpson, R. D.; Zhao, W.; Tice, C. M.; Xu, Z.; Cacatian, S.; Jia, L.; Flaherty, P. T.; Guo, J.; Ishchenko, A.; Wu, Z.; McKeever, B. M.;

- Scott, B. B.; Bukhtiyarov, Y.; Berbaum, J.; Panemangalore, R.; Bentley, R.; Doe, C. P.; Harrison, R. K.; McGeehan, G. M.; Singh, S. B.; Dillard, L. W.; Baldwin, J. J.; Claremon, D. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4836.
12. Sasaki, S.; Cho, N.; Nara, Y.; Harada, M.; Endo, S.; Suzuki, N.; Furuya, S.; Fujino, M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 113.
13. Rafi, S. B.; Hearn, B. R.; Vedantham, P.; Jacobson, M. P.; Renslo, A. R. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3163.
14. Nakamura, Y.; Sugita, C.; Meguro, M.; Miyazaki, S.; Tamaki, K.; Takahashi, M.; Nagai, Y.; Nagayama, T.; Kato, M.; Suemune, H.; Nishi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4561.
15. Ostermann, N.; Ruedisser, S.; Ehrhardt, C.; Breitenstein, W.; Marzinzik, A.; Jacoby, E.; Vangrevelinghe, E.; Ottl, J.; Klumpp, M.; Hartweg, J. C. D.; Cumin, C.; Hassiepen, U.; Trappe, J.; Sedrani, R.; Geisse, S.; Bernd Gerhartz, B.; Richert, R.; Francotte, E.; Wagner, T.; Krömer, M.; Kosaka, T.; Randy, L.; Webb, R. L.; Rigel, D. F.; Maibaum, J.; Baeschlin, D. K. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2196.
16. Colyer, J. T.; Andersen, N. G.; Tedrow, J. S.; Soukup, T. S.; Faul, M. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6859.

第四章 P₁ 部位の構造変換

4-1) 序論

第三章までにおいて、ピペリジン環を有するレニン阻害剤の探索を行い、P₁ 部位にケトピペラジン環を持つ3,5-二置換ピペリジン誘導体 **15e** 等を獲得した。さらに、P₁'、P₂'、P₃ 部位の構造最適化を行うことで、フロセミドで処置したカニクイサルにおいて優れた降圧作用を示す有望化合物 **54n** を獲得した (Figure 4-1)。しかしながら、化合物 **54n** をカニクイサルに経口投与すると、ピペリジン環とケトピペラジンの結合が切れフェニルケトピペラジンが遊離することが判明した。そこで本章では、不要な代謝物の生成を抑えるために、これまで未着手であった P₁ 部位の変換により安定なピペリジン誘導体の獲得を目指すこととした。

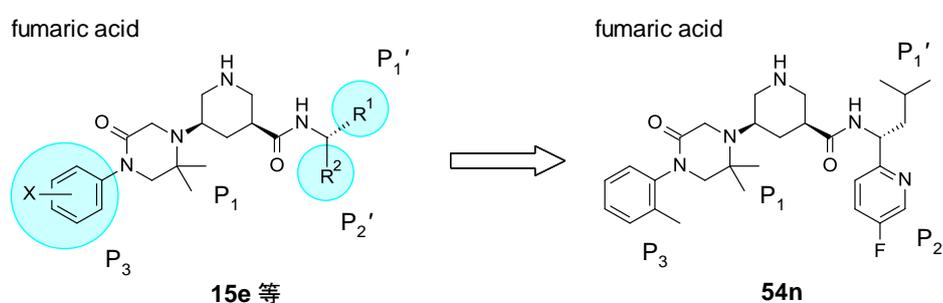


Figure 4-1. Modification of P₁' , P₂' , and P₃ region

4-2) P₁ 部位変換のデザイン

P₁ 部位にケトピペラジン環を有するレニン阻害剤の検討において、ケトピペラジン環とヒトレニンとの相互作用については詳細な解析が行われている^{1,2}。その結果、ケトピペラジン環上のジメチル基はヒトレニンの S₁ ポケットと、カルボキサミドの酸素原子はヒトレニンの Tyr77 と相互作用し、ケトピペラジン環上の塩基性窒素原子は相互作用に関与していないことが確認されている。有望化合物 **54n** に関しても同様の相互作用を示すことが予想されることから、P₁ 部位とピペリジン環との結合を安定化するために、P₁ 部位の窒素原子を炭素原子に変換した炭素置換体 **77** をデザインした (Figure 4-2)。なお、不斉炭素原子数の増加を防ぎ、炭素置換位置の平面性を維持するために、ラクタム内には二重結合を導入した。

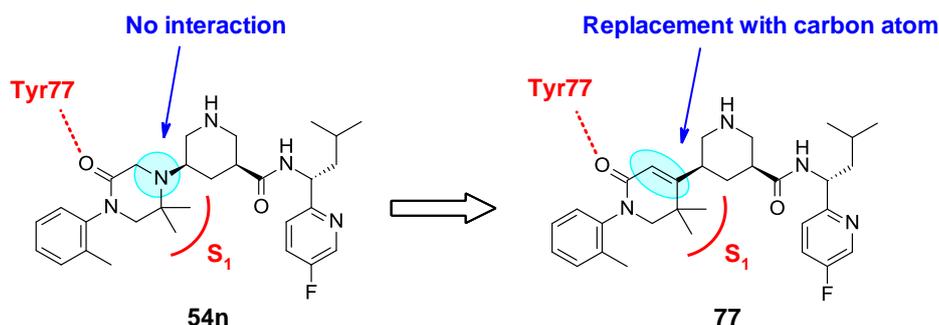
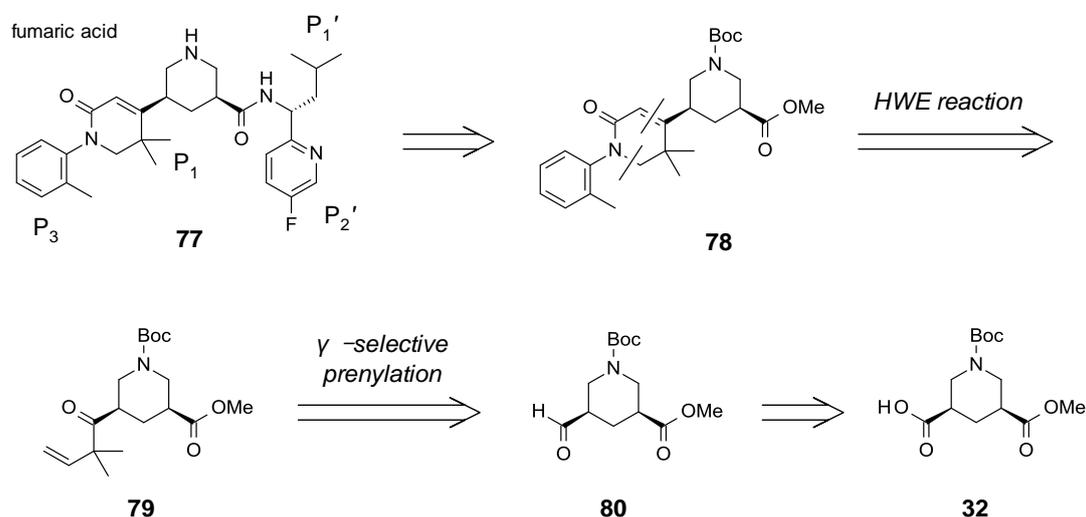


Figure 4-2. Modification of P₁ region

4-3) 炭素置換体の合成検討

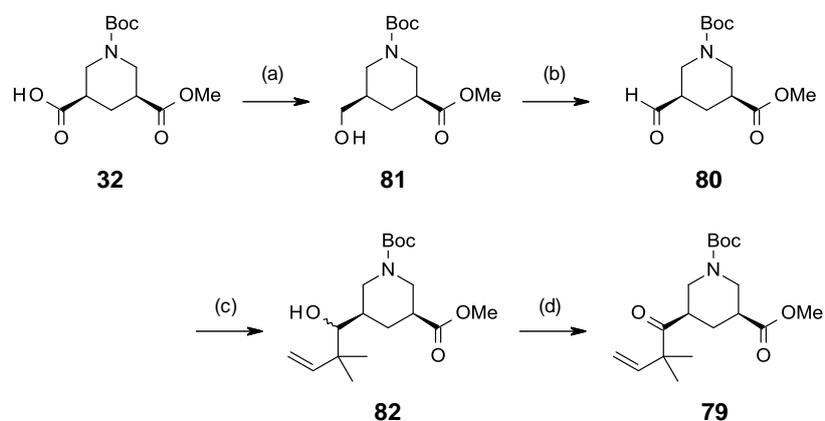
まず、炭素置換体 **77** の合成検討を行い、ルート確立後にアミド部位の置換基変換を行うこととした。炭素置換体 **77** の逆合成解析を Scheme 4-1 に示す。目的化合物 **77** は、エステル体 **78** から合成できるものと考えた。エステル体 **78** のジヒドロピリドン環は、ケトン体 **79** から Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) 反応により合成できると考えた。ケトン体 **79** の4級炭素原子は、アルデヒド体 **80** への γ 位選択的なプレニル化によって構築することとした。アルデヒド体 **80** は、大量合成可能な非対称二置換ピペリジン **32** から誘導することとした。



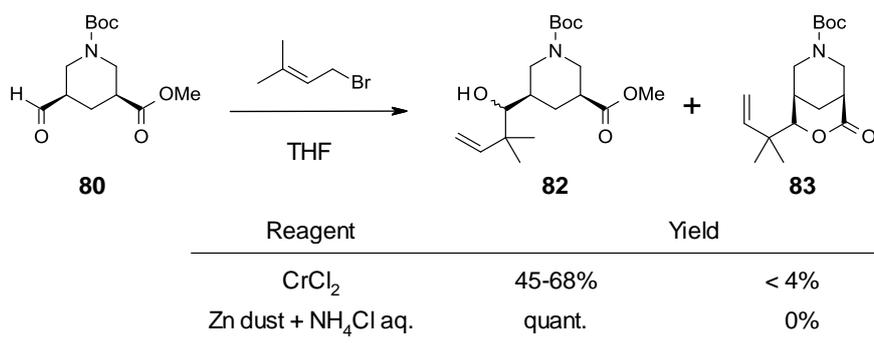
Scheme 4-1. Retrosynthetic analysis of **77**

4級炭素が導入されたケトン体 **79** までの合成ルートを Scheme 4-2 に示す。はじめに、第二章で合成した光学活性なカルボン酸 **32** をボラン THF 錯体により還元しアルコール **81** を91%の収率で得た。続いて Swern 酸化によりアルデヒド **80** へと誘導した後、プレニルブロミドを用いた γ 位選択的なプレニル化の検討を行った (Scheme 4-3)。まず、CrCl₂を用いた野崎-檜山反応を行ったところ、収率および反応の再現性が低か

った。また、アルデヒドへの付加により生じたアルコキシドが、メチルエステルと反応し生成したと考えられる環状エステル **83** が副生した。再現性の低さは CrCl_2 の不安定性によるものと予想し、Cr 以外の金属を用いた Barbier 反応の検討を行った。その結果、塩化アンモニウム水溶液と THF の混合溶媒中で亜鉛粉末を使用することにより³、定量的に γ 位選択的なプレニル化が進行することが分かった。この結果は、Zn の安定性に加え、アルデヒドへの付加後に生じるアルコキシドが酸性水溶液中ですぐに失活し、環状エステル **83** の生成が抑えられたためと考えられる。最後に、得られたアルコール体 **82** に対して再び Swern 酸化を行うことにより、目的のケトン体 **79** を合成した (87%, 3 steps)。



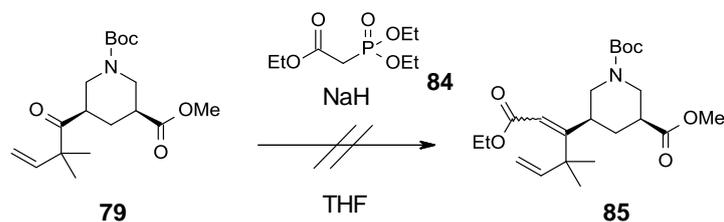
Scheme 4-2. Synthetic pathway leading to **79**. Reagents and conditions: (a) BH_3 -THF, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ to rt, 1 h, 91%; (b) $(\text{COCl})_2$, DMSO, CH_2Cl_2 , then Et_3N , $-78\text{ }^\circ\text{C}$ to $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; (c) prenyl bromide, zinc dust, NH_4Cl aq., THF, rt, 1.5 h; (d) $(\text{COCl})_2$, DMSO, CH_2Cl_2 , then Et_3N , $-78\text{ }^\circ\text{C}$ to $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, 87% (3 steps).



Scheme 4-3. γ -selective prenylation of **80**

ケトン体 **79** が得られたので、次にリン酸エステル **84** との分子間 HWE 反応を試みた (Scheme 4-4)。しかし、望みのエノン体 **85** はまったく得られず、原料が回収された (89% recovery)。この結果から、ケトン周辺が非常に嵩高いために分子間反応が進行しなかったと推察した。そこで次に、嵩高いケトンに対しても進行することが期

待される、分子内 HWE 反応^{4,5}を利用した別ルートの検討を行った。

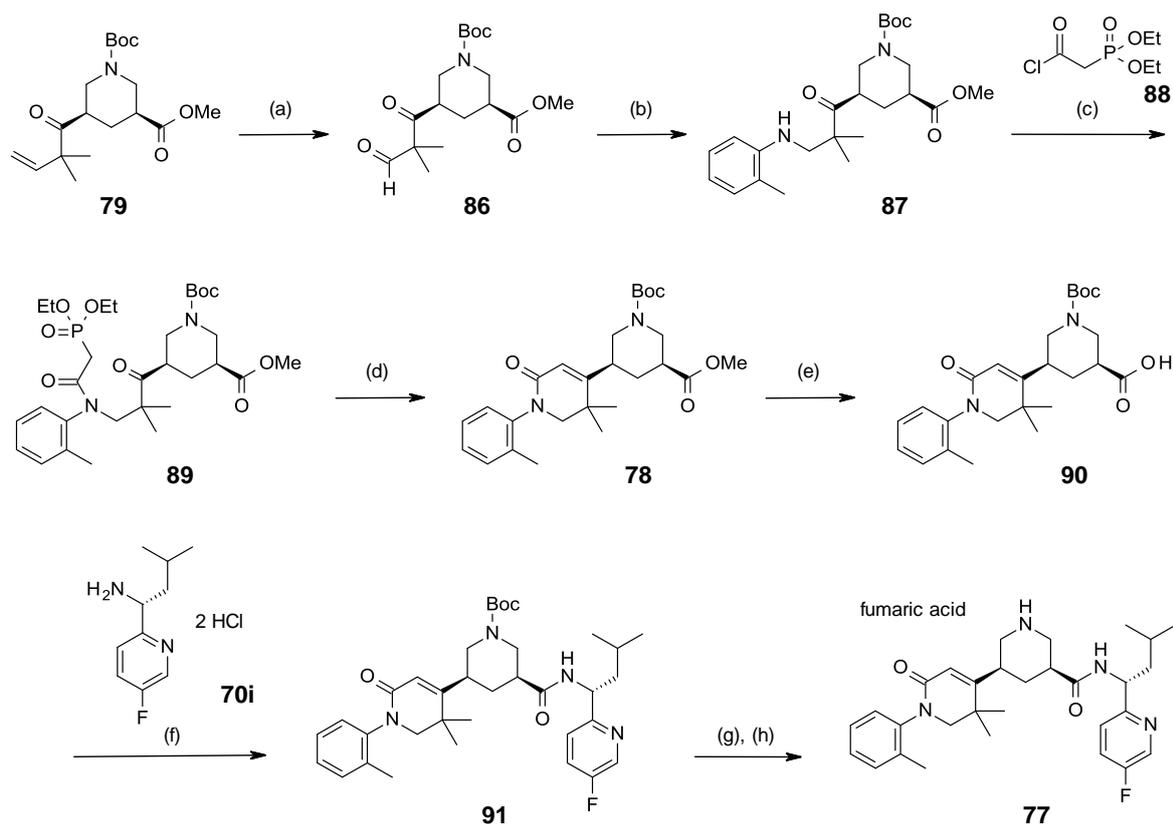


Scheme 4-4. Intermolecular HWE reaction of **79** with **84**

分子内 HWE 反応を利用した合成ルートを Scheme 4-5 に示す。まず、ケトン体 **79** のビニル基をオゾン酸化することによりアルデヒド **86** へと変換した (81%)。得られた **86** と *o*-トルイジンの還元的アミノ化によって、アニリン **87** を 91% の収率で得た。次にホスホノアセトアニリド誘導体 **89** を合成するため、2-ジエトキシホスホリル酢酸とアニリン **87** の縮合反応を検討した。HBTU、HATU、BOP reagent、向山試薬^{6,7}を試したが、アニリン **87** の反応性が低いためか、目的物 **89** はまったく得られなかった。そこで、縮合反応ではなく 2-ジエトキシホスホリルアセチルクロリド (**88**) を用いたアシル化反応を行うこととした。文献に従い、2-ジエトキシホスホリル酢酸とオキザリルクロリドから 2-ジエトキシホスホリルアセチルクロリド (**88**) のジクロロメタン溶液を調製した⁸。直ちにアニリン **87** と反応させることで、ホスホノアセトアニリド誘導体 **89** を 88% の収率で得ることに成功した。

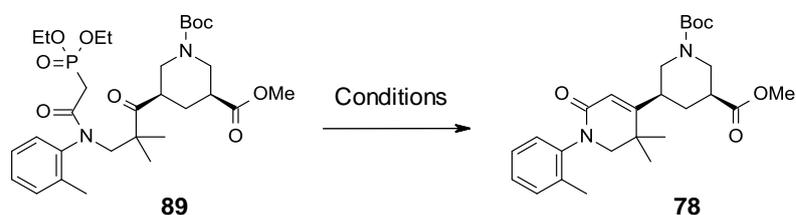
続いて、化合物 **89** の分子内 HWE 反応の検討を行った (Table 4-1)。塩基として DBU (Entry 1) や NaOMe (Entry 2) を用いた場合目的の環化体 **78** は全く得られなかったが、より強塩基である NaH (Entry 3) を用いたところ 36% の収率で目的物 **78** が得られた。低収率の原因はケトン周辺の嵩高さによると予想し、リン酸エステル部位に発生するアニオンの求核性を上げることを考えた。 β -ケトリン酸エステル部位の求核性向上には 18-crown-6 の添加が有用との報告があることから⁹、 K_2CO_3 または KHMDS を 18-crown-6 と組み合わせて反応を行った。その結果、 K_2CO_3 を用いた場合環化体 **78** は全く得られなかったが (Entry 4)、強塩基である KHMDS を用いたところ 72% の収率で得られることが分かった (Entry 5)。

良好な収率で環化体 **78** が得られたので、引き続き LiOH·H₂O によるエステル基の加水分解を行った (92%)。得られたカルボン酸 **90** を、光学活性なアミン **70i** と縮合することで **91** へと誘導した (quant.)。最後に、Boc 基を TFA により除去しフマル酸を添加することで、目的物 **77** を 2 工程 81% の収率で合成した。



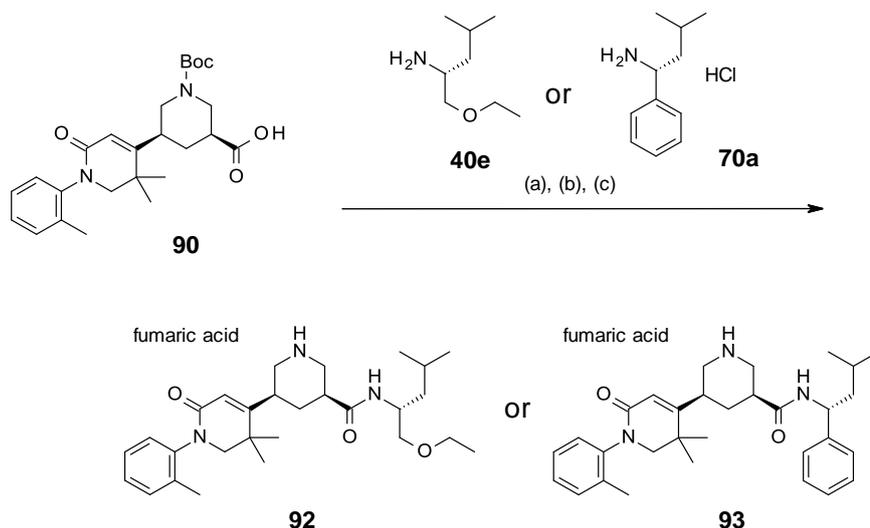
Scheme 4-5. Synthetic pathway leading to **77**. Reagents and conditions: (a) O_3 , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, then PPh_3 , $4\text{ }^\circ\text{C}$, 18 h, 81%; (b) *o*-toluidine, AcOH, toluene, $80\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, then $NaBH(OAc)_3$, rt, 1.5 h, 91%; (c) **88** in CH_2Cl_2 , DMA, rt, 1 h, 88%; (d) 0.5 M KHMDS in toluene, 18-crown-6, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ to $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, 72%; (e) $LiOH\cdot H_2O$, THF, water, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, 92%; (f) amine **70i**, HBTU, *N,N*-diisopropylethylamine, DMF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, quant.; (g) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 40 min; (h) fumaric acid, MeOH, rt, 5 min, 81% (2 steps).

Table 4-1. Intramolecular HWE reaction



Entry	base	additive	solvent	temperature	Yield (%)
1	DBU	-	THF	rt	0
2	NaOMe	-	MeOH	rt	0
3	NaH	-	THF	rt	36
4	K_2CO_3	18-crown-6	Toluene	rt	0
5	KHMDS	18-crown-6	THF	$-78\text{ }^\circ\text{C}$ to $-20\text{ }^\circ\text{C}$	72

炭素置換体の合成法を確立したので、次にこれまでの検討で得られた代表的なアミド部位であるエトキシメチル基 (**92**) またはフェニル基 (**93**) を持つ炭素置換体の合成を行った (Scheme 4-6)。Scheme 4-5 で得られたカルボン酸 **90** を光学活性なアミン **40e** または **70a** と縮合し、Boc 基を除去した後にフマル酸を添加することで、目的の炭素置換体 **92** および **93** を合成した。



Scheme 4-6. Synthetic pathway leading to **92** and **93**. Reagents and conditions: (a) amine **40e** or **70a**, HBTU, *N,N*-diisopropylethylamine, DMF, 0 °C, 1 h; (b) TFA, CH₂Cl₂, rt, 40 min; (c) fumaric acid, MeOH, rt, 5 min.

4-4) 炭素置換体の *in vitro*、*in vivo* 評価

炭素置換体 **77**, **92**, **93** の合成を達成したので、レニン阻害活性、カニクイサルにおける血中濃度、CYP3A4 の直接阻害活性、および hERG 電流阻害活性を評価した (Table 4-2)。その結果、いずれの化合物も強いレニン阻害活性を示した。特に、ヒトレニン阻害活性はケトピペラジン誘導体 **54n** (IC₅₀ = 1.6 nM) の 2 倍以上強い値を示した。これは、P₁ 部位の塩基性アミンを除去したことで、脂溶性の S₁ ポケットとの疎水性相互作用が高まったためと考えられる。なお、P₁ 部位の塩基性窒素原子の有無による阻害活性への影響については Aliskiren においても検証されており、今回、同様の傾向を示したことが確かめられた¹⁰。次にカニクイサルにおける血中濃度を比較した。その結果、化合物 **92** のみ低い値を示すことが分かった。一方、CYP3A4 および hERG 電流に関しては、化合物 **93** のみ強い阻害活性を示した。以上の結果から、炭素置換体 **77** がケトピペラジン体 **54n** と同等以上の初期プロファイルを示すことが分かった。また、ケトピペラジン誘導体と同様に、エーテル基を持つ化合物 (**92**) が低い血中濃度を示しフェニル基 (**93**) を持つ化合物が強い CYP3A4 および hERG 電流阻害を示し

たことから、これまでの検討で得られた知見が、さらなる構造変換にも有効であることが示唆された。

Table 4-2. *In vitro* renin inhibitory activities (IC₅₀ and Ratio), oral exposure, CYP 3A4 direct inhibition, and hERG current inhibition of **54n**, **77**, **92**, **93**^{a,b}

Cm pd	Purified		Cynomolgus		CYP 3A4	hERG	
	human	Monkey plasma	monkey PK	direct	current		
	renin	renin	(1mg/kg, po) ^d	inhibition	inhibition		
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ratio ^c	AUC _{po,0-4h} (ng*h/mL)	n ^e	(% at 10 μM)	(% at 30 μM) ^f
54n	1.6	7.0	0.9	19	3	30	5.2
77	0.7	2.7	0.8	12	3	28	6.3
92	0.8	2.3	0.7	4	3	10	-0.2
93	0.6	3.0	0.9	33	3	46	47

^a Compounds were obtained as fumarate salts.

^b Assay results of renin inhibitory activity are the average of at least two replicates.

^c Ratio = IC₅₀ (nM) of compound / IC₅₀ (nM) of Aliskiren.

^d The data were obtained by cassette dosing.

^e Number of compounds dosed in cassette.

^f hERG currents were measured using the patch clamp technique on IonWorks® Quattro™ system

最後に、炭素置換体 **77** を用いてカニクイサルにおける生物学的利用率および降圧作用を評価した。カニクイサルに対して **77** を 10 mg/kg 経口投与したところ、ケトピペラジン誘導体 **54n** ($F = 25\%$) より若干低い生物学的利用率を示した ($F = 18\%$)。しかしながら、フロセミドで処置したカニクイサルに 10 mg/kg 経口投与したところ、ケトピペラジン誘導体 **54n** と同様に 24 時間にわたって優れた降圧作用を示した (Figure 4-3)。

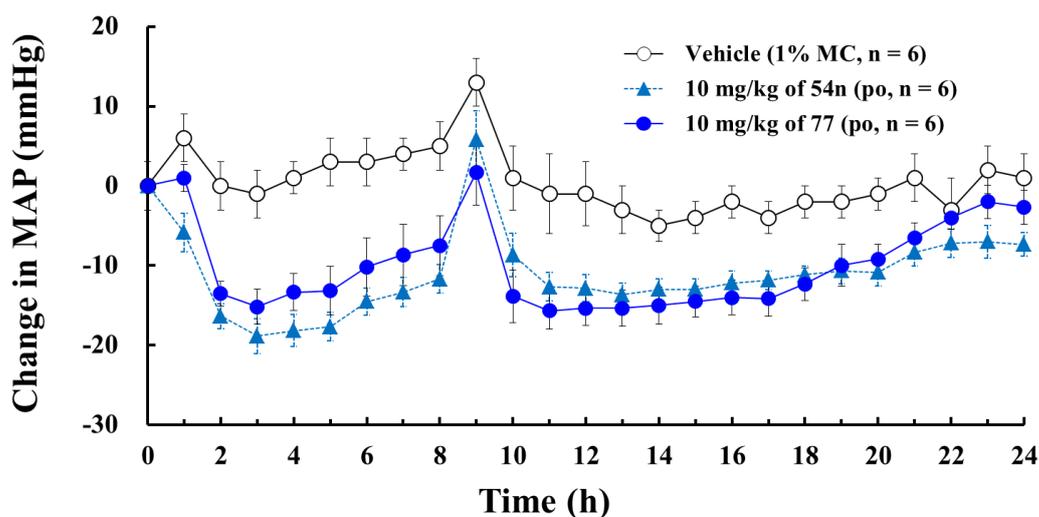


Figure 4-3. Effect of compound **54n** and **77** on MAP in cynomolgus monkeys pretreated with furosemide

4-5) 小括

本章では、より安定なピペリジン誘導体を獲得するために、これまで未着手であった P₁ 部位変換のデザインと合成法の確立、薬効評価を行った。まず、P₁ 部位のケトピペラジンとヒトレニンの相互作用に関する知見を基に塩基性窒素原子を炭素原子に変換することで、P₁ 部位とピペリジン環との結合が安定な炭素置換体 **77** をデザインした。炭素置換体 **77** は、生物学的利用率がケトピペラジン誘導体 **54n** より若干劣るものの、フロセミドで処置したカニクイサルにおいて **54n** と同等の降圧作用を示し、**54n** よりも強いヒトレニン阻害活性を示した。以上の結果から、より安定な骨格を持つ炭素置換体 **77** を化合物 **54n** のバックアップ化合物として選抜した。

4-6) 実験の部

4-6-1) Synthesis

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-hydroxymethylpiperidine-1,3-dicarboxylate (81)

BH₃-THF (133 mL, 1.09 M THF solution, 145 mmol) was added dropwise to a solution of **32** (27.7 g, 96.4 mmol) in THF (500 mL) at -78 °C over a period of 25 min. After warming the reaction mixture to room temperature, the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. After cooling to 0 °C, saturated NaHCO₃ aq. was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 3/1 to 1/3) to obtain **81** (24.1 g, 91%) as a colorless liquid. $[\alpha]_D^{25.0} +23.4$ (*c* 1.06, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.38-4.26 (br m, 1H), 4.23-4.16 (br m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.57-3.50 (m, 2H), 2.77-2.72 (m, 1H), 2.53-2.46 (m, 1H), 2.42 (dd, *J* = 15.9, 8.5 Hz, 1H), 2.15 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 1.76-1.70 (m, 1H), 1.53-1.48 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.37-1.30 (m, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 173.3, 154.7, 80.1, 65.1, 51.8, 46.3, 45.8, 41.3, 38.1, 30.4, 28.4. IR: 3440, 2932, 2870, 1733, 1689, 1667, 1422, 1253, 1145, 881, 767 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₁₃H₂₃NO₅+H: 274.1654; found: 274.1655.

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-(2,2-dimethylbut-3-enoyl)piperidine-1,3-dicarboxylate (79)

A solution of DMSO (14.4 mL, 203 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) was added dropwise to a solution of oxalyl chloride (8.70 mL, 101 mmol) in CH₂Cl₂ (300 mL) at -78 °C over a period of 20 min, and then the mixture was stirred at the same temperature for 20 min. To the reaction mixture, a solution of **81** (24.1 g, 88.2 mmol) in CH₂Cl₂ (150 mL) was added dropwise at -78 °C over a period of 25 min, and then the mixture was stirred at the same temperature for 20 min. To the reaction mixture, Et₃N (68.0 mL, 488 mmol) was added dropwise at -78 °C over a period of 15 min. After warming the reaction mixture to 0 °C, the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. H₂O was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with 1*N* HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the filtrate was diluted with AcOEt. The solution was filtered through the silica gel pad. The filtrate was evaporated under reduced pressure to obtain crude **80** (23.3 g) as a colorless liquid. Saturated NH₄Cl aq. (60.0 mL) was added to a suspension of the crude **80** (23.3 g), prenyl bromide (14.4 mL, 125 mmol), and zinc dust (11.0 g, 168 mmol) in THF (500 mL) at 0 °C, and then the mixture was stirred at rt for 1.5 h. The reaction mixture was filtered through the

celite pad. The filtrate was evaporated under reduced pressure until the volume of the solution was about 250 mL. The residue was extracted with AcOEt. Then, the organic layer was washed with 1N HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solution was filtered through the silica gel pad. The filtrate was evaporated under reduced pressure to obtain crude **82** (28.1 g) as a colorless solid. A solution of DMSO (14.0 mL, 197 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) was added dropwise to a solution of oxalyl chloride (8.50 mL, 99.1 mmol) in CH₂Cl₂ (300 mL) at -78 °C over a period of 20 min, and then the mixture was stirred at the same temperature for 20 min. To the reaction mixture, a solution of crude **82** (28.1 g) in CH₂Cl₂ (150 mL) was added dropwise at -78 °C over a period of 20 min, and then the mixture was stirred at the same temperature for 30 min. To the reaction mixture, Et₃N (63.0 mL, 452 mmol) was added dropwise at -78 °C over a period of 20 min. After warming the reaction mixture to 0 °C, the mixture was stirred at the same temperature for 2 h. H₂O was added to the reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with 1N HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 2/1) to obtain **79** (25.9 g, 87%, 3 steps) as a colorless solid. $[\alpha]_D^{25.0}$ -31.0 (*c* 1.00, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.91 (dd, *J* = 17.6, 10.7 Hz, 1H), 5.24 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 5.22 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 4.38-4.29 (m, 1H), 4.13-4.01 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.98-2.93 (m, 1H), 2.81-2.70 (m, 1H), 2.69-2.60 (m, 1H), 2.49-2.42 (m, 1H), 2.06-2.01 (m, 1H), 1.80-1.72 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.26 (s, 3H), 1.24 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 212.2, 173.0, 154.3, 141.1, 115.8, 80.2, 51.9, 51.6, 47.0, 45.3, 43.2, 40.4, 31.1, 28.4, 23.0, 22.9. IR: 2978, 1731, 1689, 1421, 1163, 1149, 963, 770 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₁₈H₂₉NO₅+H: 340.2124; found: 340.2153.

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-(2,2-dimethyl-3-oxopropanoyl)piperidine-1,3-dicarboxylate (86**)**

Ozonized oxygen was bubbled through a solution of **79** (25.9 g, 76.3 mmol) in CH₂Cl₂ (380 mL) at -78 °C for 3 h. The end of ozonolysis was indicated by the blue color appearance in the reaction mixture. The ozone stream was then stopped and the solution was flushed with N₂ for 1.5 h to remove excess ozone. Triphenylphosphine (26.0 g, 99.1 mmol) was then added at -78 °C and the reaction mixture was allowed to reach 4 °C and was stirred for additional 18 h. Silica gel (260 g) and Et₂O (380 mL) was added to the reaction mixture. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 19/1 to 3/2) to obtain **86** (21.1 g, 81%) as a colorless solid. $[\alpha]_D^{25.0}$ -49.8 (*c* 1.04, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.60 (s, 1H), 4.39-4.27 (m, 1H), 4.17-4.06 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.87-2.61 (m, 3H), 2.50-2.42 (m, 1H),

2.16-2.09 (m, 1H), 1.80-1.71 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.39 (s, 3H), 1.36 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 209.2, 200.5, 172.7, 154.2, 80.5, 61.0, 52.0, 46.6, 45.6, 44.8, 40.3, 30.4, 28.4, 18.9, 18.8. IR: 3411, 2979, 1730, 1693, 1425, 1254, 1147, 960, 892 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₁₇H₂₇NO₆+H: 342.1917; found: 342.1918.

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-[2,2-dimethyl-3-(2-methylanilino)propanoyl]piperidine-1,3-dicarboxylate (87)

To a solution of **86** (10.0 g, 29.3 mmol) in toluene (75.0 mL), *o*-toluidine (4.71 mL, 44.4 mmol) and AcOH (2.51 mL, 43.9 mmol) were added at rt, and the mixture was stirred at the same temperature for 15 min. Then, the mixture was stirred at 80 °C for 1 h. After cooling in an ice bath, NaBH(OAc)₃ (19.6 g, 92.5 mmol) and AcOH (5.28 mL, 92.2 mmol) were added to the reaction mixture. The mixture was stirred at rt for 1.5 h. After cooling in an ice bath, saturated NaHCO₃ aq. was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. The organic layer was washed with 1*N* HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 19/1 to 4/1) to obtain **87** (11.5 g, 91%) as a light yellow liquid. [α]_D^{25.0} -37.1 (*c* 1.01, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.14-7.10 (m, 1H), 7.04 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.69-6.64 (m, 2H), 4.40-4.30 (m, 1H), 4.16-4.04 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.30-3.22 (m, 2H), 3.07-2.99 (m, 1H), 2.80-2.64 (m, 2H), 2.49-2.42 (m, 1H), 2.10 (s, 3H), 2.08-2.05 (m, 1H), 2.04-2.02 (m, 1H), 1.80 (q, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.45-1.36 (m, 9H), 1.31 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 215.1, 172.9, 154.3, 146.1, 130.2, 127.1, 122.4, 117.3, 109.9, 80.3, 51.9, 51.7, 49.5, 47.0, 45.4, 42.8, 40.5, 30.9, 28.3, 22.5, 22.4, 17.4. IR: 2972, 1735, 1689, 1419, 1251, 1144, 858, 745 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₄H₃₆N₂O₅+H: 433.2702; found: 433.2683.

1-*tert*-Butyl 3-methyl (3*S*,5*R*)-5-{3-[*N*-(2-diethoxyphosphorylacetyl)-2-methylanilino]-2,2-dimethylpropanoyl}piperidine-1,3-dicarboxylate (89)

Oxalyl chloride (3.35 mL, 38.5 mmol) was added to a solution of (diethoxyphosphinoyl)acetic acid (9.20 g, 46.9 mmol) in CH₂Cl₂ (120 mL) at 0 °C, and then the mixture was stirred at rt for 5 d. The solvent was evaporated under reduced pressure. After azeotropic drying with CH₂Cl₂, CH₂Cl₂ (38.0 mL) was added to the residue to obtain a crude **88** (*ca.* 1.00 M CH₂Cl₂ solution). The crude **88** (32.7 mL, *ca.* 1.00 M CH₂Cl₂ solution) was added to a solution of **87** (9.29 g, 21.5 mmol) in DMA (70.0 mL) at 0 °C for 3 h, and then the mixture was stirred at rt for 1 h. After cooling, saturated NaHCO₃ aq. was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography

(eluent, AcOEt) to obtain **89** (11.6 g, 88%) as a colorless liquid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} -17.9$ (c 1.00, MeOH). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.28-7.18 (m, 4H), 4.46 (dd, $J = 33.8, 13.9$ Hz, 1H), 4.32-4.19 (m, 1H), 4.17-4.02 (m, 5H), 3.96-3.92 (m, 1H), 3.68-3.65 (m, 3H), 3.47-3.25 (m, 1H), 2.96-2.82 (m, 1H), 2.76-2.56 (m, 3H), 2.50-2.29 (m, 2H), 2.24-2.22 (m, 3H), 1.86-1.81 (m, 1H), 1.46-1.44 (m, 9H), 1.36-1.24 (m, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 213.1, 213.0, 173.0, 172.9, 166.5, 166.4, 154.2, 141.5, 141.4, 135.5, 132.0, 131.8, 130.1, 129.8, 128.8, 128.7, 127.3, 127.0, 80.3, 62.5, 62.4, 62.3, 54.2, 54.0, 51.8, 49.8, 49.7, 45.4, 42.9, 40.5, 33.5, 32.4, 32.3, 30.5, 30.3, 28.6, 28.4, 23.8, 22.3, 22.1, 21.0, 17.8, 16.4, 16.3. IR: 2978, 1734, 1691, 1659, 1248, 1146, 1022, 957, 773 cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}+\text{H}$: 611.3097; found: 611.3141.

1-tert-Butyl 3-methyl (3S,5S)-5-[3,3-dimethyl-1-(*o*-tolyl)-6-oxo-2H-pyridin-4-yl]piperidine-1,3-dicarboxylate (78)

After azeotropic drying of **89** (11.4 g, 18.7 mmol) with toluene, 18-crown-6 (4.93 g, 18.7 mmol) and THF (350 mL) were added to the residue at rt, and then the mixture was stirred at -78 °C for 30 min. KHMDS (37.3 mL, *ca.* 0.5 M in toluene) was added to the reaction mixture at -78 °C, and then the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. After warming the reaction mixture to -20 °C, the mixture was stirred at the same temperature for 3 h. Saturated NH_4Cl aq. and AcOEt were added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with saturated NH_4Cl aq. and brine, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 2/1) to obtain **78** (5.92 g, 72%) as a colorless solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} -24.3$ (c 1.00, MeOH). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.28-7.19 (m, 3H), 7.14-7.10 (m, 1H), 5.85 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.46-4.35 (br m, 1H), 4.28-4.15 (br m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.51 (dd, $J = 12.1, 8.2$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J = 12.1, 5.1$ Hz, 1H), 2.83-2.75 (m, 1H), 2.59-2.49 (m, 2H), 2.34-2.18 (m, 5H), 1.75-1.64 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.30-1.24 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 172.9, 163.7, 162.1, 154.3, 141.3, 135.7, 131.1, 127.6, 127.1, 126.3, 120.3, 80.3, 61.9, 52.0, 49.6, 45.5, 41.5, 36.8, 36.5, 34.5, 28.4, 24.4, 24.3, 18.2. IR: 2973, 1736, 1694, 1667, 1474, 1421, 1255, 1150, 874, 748 cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5+\text{H}$: 457.2702; found: 457.2702.

(3S,5S)-1-tert-Butoxycarbonyl-5-[3,3-dimethyl-1-(*o*-tolyl)-6-oxo-2H-pyridin-4-yl]piperidine-3-carboxylic acid (90)

$\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1.09 g, 26.0 mmol) was added to a solution of **78** (5.92 g, 13.0 mmol) in THF (80.0 mL) and H_2O (40.0 mL) at 0 °C, and then the mixture was stirred at the same temperature for 1 h. 1 N HCl aq. (26.0 mL, 26.0 mmol) and CH_2Cl_2 were added to the

reaction mixture, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with H₂O, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and then Et₂O was added to the residue. The resulting solid was collected by filtration to obtain **90** (5.27 g, 92%) as a colorless solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} -31.1$ (*c* 1.01, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.32-7.23 (m, 3H), 7.22-7.16 (m, 1H), 5.84 (s, 1H), 4.40-4.34 (m, 1H), 4.23-4.14 (m, 1H), 3.63-3.45 (m, 2H), 2.90-2.80 (m, 1H), 2.72-2.62 (m, 1H), 2.61-2.52 (m, 1H), 2.49-2.42 (m, 1H), 2.26-2.20 (m, 4H), 1.77-1.68 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.33-1.29 (m, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): 175.9, 166.2, 166.0, 156.1, 142.4, 136.9, 132.0, 128.9, 128.3, 127.5, 119.9, 81.6, 62.7, 51.4, 46.3, 42.4, 38.3, 37.7, 35.5, 28.7, 24.6, 24.5, 18.3. IR: 3418, 2979, 2928, 1717, 1686, 1649, 1425, 1268, 1150, 751 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₅H₃₄N₂O₅+H: 443.2546; found: 443.2545.

***tert*-Butyl (3*S*,5*S*)-3-[3,3-dimethyl-1-(*o*-tolyl)-6-oxo-2*H*-pyridin-4-yl]-5-[(1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutyl]carbamoyl]piperidine-1-carboxylate (**91**)**

A solution of HBTU (0.62 g, 1.64 mmol) in DMF (4.00 mL) was added to a solution of **90** (0.600 g, 1.36 mmol), (1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutan-1-amine dihydrochloride **70i** (0.420 g, 1.65 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (0.946 mL, 5.42 mmol) in DMF (12.0 mL) under ice-cooling, and then the reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h. Water was added to the reaction mixture, followed by extraction with AcOEt. Then, the organic layer was washed with 1 *N* HCl aq., saturated NaHCO₃ aq., and brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent, *n*-hexane/AcOEt = 1/1) to obtain **91** (0.823 g, quant.) as a colorless solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} +17.9$ (*c* 1.00, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.40 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.39-7.34 (m, 1H), 7.26-7.19 (m, 4H), 7.12-7.08 (m, 1H), 6.55-6.49 (m, 1H), 5.84 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 5.13 (q, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.38-4.29 (m, 1H), 4.19-4.11 (m, 1H), 3.51-3.46 (m, 1H), 3.41-3.36 (m, 1H), 2.89-2.83 (m, 1H), 2.64-2.51 (m, 1H), 2.42-2.34 (m, 1H), 2.30-2.22 (m, 4H), 1.99-1.94 (m, 1H), 1.86-1.75 (m, 1H), 1.71-1.58 (m, 2H), 1.50-1.44 (m, 10H), 1.29-1.26 (m, 3H), 1.21 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H), 0.96-0.92 (m, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 171.2, 163.7, 159.6, 157.6, 156.6, 154.4, 141.3, 137.6, 135.7, 131.1, 127.6, 127.1, 126.3, 123.5, 123.2, 120.3, 80.3, 61.8, 51.5, 50.6, 46.4, 45.7, 43.5, 36.9, 36.5, 34.5, 28.4, 24.9, 24.4, 22.7, 22.6, 18.2. IR: 3307, 2960, 1659, 1481, 1255, 1153, 849, 753, 558 cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₅H₄₇FN₄O₄+H: 607.3660; found: 607.3696.

(3*S*,5*S*)-5-[3,3-Dimethyl-1-(*o*-tolyl)-6-oxo-2*H*-pyridin-4-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(5-fluoro-2-pyridyl)-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (77**)**

Trifluoroacetic acid (5.00 mL) was added to a solution of **91** (0.823 g, 1.36 mmol) in CH₂Cl₂ (10.0 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred at rt for 40 min. Saturated NaHCO₃ aq. was added to the reaction mixture under ice-cooling, followed by extraction with CH₂Cl₂. Then, the organic layer was washed with brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (eluent, CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 to 7/3) to obtain the free base of **77** (0.610 g, 1.20 mmol). Fumaric acid (0.139 g, 1.20 mmol) was added to a solution of the free base of **77** (0.610 g, 1.20 mmol) in MeOH (1.00 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 5 min. The solvent was evaporated under reduced pressure, and then Et₂O was added to the residue. The resulting solid was collected by filtration to obtain **77** (0.690 g, 81%, 2 steps) as a colorless solid. $[\alpha]_D^{25.0} +35.9$ (*c* 1.01, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.41 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.56 (td, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 8.8, 4.5 Hz, 1H), 7.30-7.23 (m, 3H), 7.18-7.14 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.05 (dd, *J* = 9.0, 6.3 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J* = 12.5, 11.3 Hz, 1H), 3.52-3.44 (m, 2H), 3.41-3.35 (m, 1H), 3.13-3.06 (m, 1H), 3.00-2.88 (m, 2H), 2.83-2.76 (m, 1H), 2.23-2.14 (m, 4H), 1.76-1.55 (m, 4H), 1.32-1.28 (m, 6H), 0.97 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): 172.8, 171.5, 165.6, 164.5, 161.2, 159.2, 142.2, 138.2, 136.9, 136.3, 132.1, 129.0, 128.3, 127.5, 125.0, 123.8, 121.3, 62.6, 53.8, 45.8, 45.4, 41.5, 37.6, 35.2, 34.8, 26.2, 24.6, 24.5, 23.3, 22.3, 18.3. IR: 3293, 2960, 1658, 1482, 1388, 1252, 983, 751, 646. HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₀H₃₉N₄O₂+H: 507.3135; found: 507.3148.

(3*S*,5*S*)-5-[3,3-Dimethyl-1-(*o*-tolyl)-6-oxo-2*H*-pyridin-4-yl]-*N*-[(1*R*)-1-(ethoxymethyl)-3-methylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (92**)**

The title compound was prepared from **90** and **40e** in a manner similar to that described for **77** as a colorless solid (71%, 3 steps). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.30-7.23 (m, 3H), 7.18-7.15 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.90 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.13-4.08 (m, 1H), 3.61-3.59 (m, 1H), 3.51-3.35 (m, 7H), 3.12 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H), 3.02-2.96 (m, 1H), 2.86-2.79 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.20-2.17 (m, 1H), 1.83-1.75 (m, 1H), 1.67-1.61 (m, 1H), 1.44-1.35 (m, 2H), 1.33-1.28 (m, 6H), 1.18-1.14 (m, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₈H₄₃N₃O₃+H: 470.3383; found: 470.3384.

(3*S*,5*S*)-5-[3,3-Dimethyl-1-(*o*-tolyl)-6-oxo-2*H*-pyridin-4-yl]-*N*-[(1*R*)-3-methyl-1-phenylbutyl]piperidine-3-carboxamide fumarate (93**)**

The title compound was prepared from **90** and **70a** in a manner similar to that described for **77** as a colorless solid (77%, 3 steps). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.34-7.21 (m, 8H), 7.17-7.13 (m, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 8.8, 5.7 Hz, 1H),

3.58-3.34 (m, 4H), 3.13-3.06 (m, 1H), 2.96-2.73 (m, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.13-2.07 (m, 1H), 1.75-1.67 (m, 2H), 1.62-1.55 (m, 2H), 1.31-1.27 (m, 6H), 0.97 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H). HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₃₁H₄₁N₃O₂+H: 488.3277; found: 488.3276.

4-6-2) Biology assays

IC₅₀ in buffer

The assay was conducted in a manner similar to that described in chapter 1.

IC₅₀ in plasma

The assay was conducted in a manner similar to that described in chapter 1.

CYP direct inhibition

The evaluation was conducted in a manner similar to that described in chapter 2.

hERG current inhibition

The evaluation was conducted in a manner similar to that described in chapter 2.

4-6-3) Animal studies

Blood pressure study in cynomolgus monkeys pre-treated with furosemide

The evaluation was conducted in a manner similar to that described in chapter 2.

Pharmacokinetics

The evaluation was conducted in a manner similar to that described in chapter 1.

PK evaluation by cassette dosing method

The evaluation was conducted in a manner similar to that described in chapter 2.

4-7) 参考文献

1. Nakamura, Y.; Fujimoto, T.; Ogawa, Y.; Sugita, C.; Miyazaki, S.; Tamaki, K.; Takahashi, M.; Matsui, Y.; Nagayama, T.; Manabe, K.; Mizuno, M.; Masubuchi, N.; Chiba, K.; Nishi, T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 754.
2. Nakamura, Y.; Sugita, C.; Meguro, M.; Miyazaki, S.; Tamaki, K.; Takahashi, M.; Nagai, Y.; Nagayama, T.; Kato, M.; Suemune, H.; Nishi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4561.
3. Pétrier, C.; Luche, J.-L. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 910.
4. Carcache, D. A.; Cho, Y. S.; Hua, Z.; Tian, Y.; Li, Y.-M.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1016.
5. Mehta, G.; Shinde, H. M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8056.
6. Bald, E.; Saigo, K.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1975**, 1163.
7. Minami, T.; Isonaka, T.; Okada, Y.; Ichikawa, J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7009.
8. Cooke, M. P. Jr.; Biciunas, K. P. *Synthesis* **1981**, 283.
9. Aristoff, P. A. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1954.
10. Yamaguchi, Y.; Menear, K.; Cohen, N. C.; Mah, R.; Cumin, F.; Schnell, C.; Wood, J. M.; Maibaum, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4863.

第五章 総括

高血圧は、慢性心不全・腎不全を含む新血管系疾患や心筋梗塞を引き起こす重要な因子であることから、これまでに数多くの降圧剤が開発されてきた。しかしながら、未だ降圧目標値に到達していない患者は多く、依然として優れた降圧剤が強く望まれている。降圧剤の中で、RA系薬剤は強い降圧作用と臓器保護作用を示すことから優れた治療手段の一つと考えられている。特に、RA系の起点に位置するレニンを直接阻害するレニン阻害剤は、より強い作用が期待されている。しかしながら、現在までに上市されているレニン阻害剤は、Novartisが創製したアミノエタノール構造を持つAliskirenのみである。筆者の所属研究チームでも、同じアミノエタノール構造を持つレニン阻害剤DS-8108bを見出している。DS-8108bは強い降圧作用を示すが、Aliskirenと同様に生物学的利用率が低い。そのため、投与量の増大や血中濃度に個体差を生じさせる可能性がある。そこで筆者は、優れた降圧作用と良好な生物学的利用率を示す新規レニン阻害剤の獲得を目的に本研究を開始した。

第二章では、活性中心としてピペリジン環を有する新規レニン阻害剤の探索を行った。まず、Roche社のRo-X1を基に、代謝・物性面で不利に働くピペリジン環4位の高脂溶性置換基を除去するデザインを行った。阻害活性の減弱が予想されたので、DS-8108bで使用している高活性発現部位を活用することとした。すなわち、Ro-X1のピペリジン環5位にフェニルケトピペラジン構造を、3位に2級アミドを導入した。ヒトレニンとの複合体X線結晶構造解析と阻害活性の結果から、ピペリジン環とケトピペラジン環を直結させた**14**が、安定な配座を保持した状態でヒトレニンと相互作用し、高い阻害活性を示すことが分かった。さらに、複合体X線結晶構造解析の結果を利用することで、S₁'ポケットの占有と阻害活性の向上を達成した化合物**15b**を獲得した。S₂'ポケットが水溶性のアミノ酸で構成されていることから、次にP₂'部位を極性基に変換した化合物を合成した。その結果、阻害活性と代謝安定性が向上した化合物**15e**を獲得した。化合物**15e**は、ラットで優れた降圧作用と良好な生物学的利用率を示した。

第二章で得られた化合物**15e**は、よりヒトに近いと考えられるカニクイサルにおいて薬効を示さなかったことから、第三章では、その原因の解明とカニクイサルで薬効を示す3,5-二置換ピペリジン誘導体の探索を行った。まず、化合物**15e**の薬物動態の評価結果から、低い血中濃度が薬効を示さない原因として予想された。血中濃度の改善には良好な代謝安定性が必要であるが、極性基導入による代謝安定性の改善は腸管膜からの吸収低下を引き起こすことが示唆された。そこで次に、化合物の固定化による代謝安定性向上を試みた。その結果、P₂'のイソブチル基を固定化しベンゼン環に変換することで、代謝安定性と血中濃度の改善に成功した。しかしながら、ベンゼン環を持つ化合物**54a**は初期安全性試験で強いCYP3A4直接阻害とhERG電流阻害を示した。そこで次に、CYP3A4とhERG電流阻害が低減された化合物の獲得を目指すこ

ととした。CYP3A4 と hERG 電流阻害の低減には脂溶性の低減が有効であることから、フェニル基を複素環に変換する検討を行った。その結果、P₂' 部位に 5-フルオロ-2-ピリジル基 (**54i**) を導入することで、高活性と良好な血中濃度を維持したまま CYP3A4 直接阻害と hERG 電流阻害を改善できることが分かった。さらに P₃ のクロロ基をメチル基に変換し脂溶性を低減することで、血中濃度と初期安全性のさらなる改善に成功した。得られた化合物 **54n** は、カニクイサルにおいて優れた降圧作用と良好な生物学的利用率を示した。以上の結果から、化合物 **54n** を高次評価用有望化合物として選抜した。

第三章までにおいて、P₁'、P₂'、P₃ 部位の構造最適化により有望化合物 **54n** を獲得した。しかしながら、**54n** はカニクイサルに対する経口投与により、ピペリジン環とケトピペラジン環の結合が切れることが判明した。そこで第四章では、これまで未着手であった P₁ 部位変換のデザインと合成を行うことで、より安定なピペリジン誘導体の獲得を目指すこととした。まず、これまで得られた複合体 X 線結晶構造解析の結果を基に化合物 **54n** の塩基性窒素原子を炭素原子に置換することで、安定な炭素置換体 **77** をデザインした。炭素置換体 **77** は、化合物 **54n** に比べカニクイサルにおける生物学的利用率が若干劣るものの、フロセミドで処置したカニクイサルにおいて **54n** と同等の降圧作用を示し、**54n** よりも優れたヒトレニン阻害活性を示した。以上の結果から、安定な骨格を持つ炭素置換体 **77** を化合物 **54n** のバックアップ化合物として選抜した。

以上、3,5-二置換ピペリジン誘導体の探索研究により、優れた降圧作用と良好な生物学的利用率を示す新規レニン阻害剤を見出した。今後、**54n** および **77** を用いた各種高次評価によって、3,5-二置換ピペリジン誘導体のレニン阻害剤としての資質が検証される予定である。本研究で得られた知見が、レニン阻害剤を含めた降圧剤の創薬研究に活かされることを期待したい。

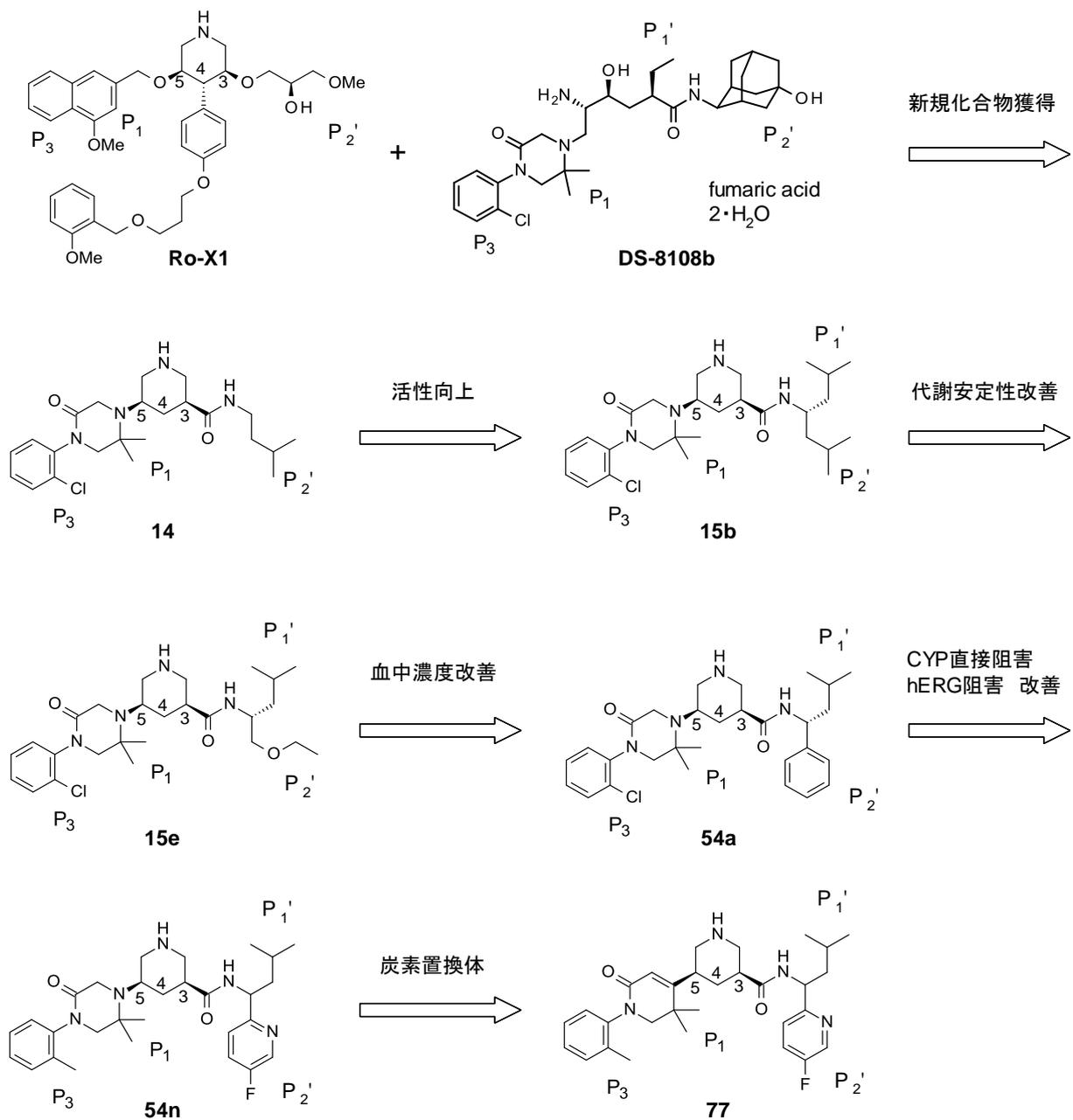


Figure 5-1. Summary

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始温かい御指導と御鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学研究室 垣内 喜代三 教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究の審査を引き受けてくださり、有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 生体適合性物質科学研究室 谷原 正夫 教授、機能高分子科学研究室 本田 崇宏 教授、反応制御科学研究室 森本 積 准教授に厚く御礼申し上げます。

本論文作成の機会を与えてくださいました、Daiichi Sankyo India Pharma Pvt. Ltd. 西剛秀 博士、第一三共株式会社 バイオ基盤研究所 本田 雄 博士に心より感謝の意を表します。

本研究の共同研究者であります、第一三共株式会社 ベンチャーサイエンスラボラトリー 小川 泰之 博士、創薬化学研究所 望月 明慶 博士、中村 勇二 博士、藤本 哲平 博士、杉田 千絵 氏、宮崎 正二郎 博士、玉木 和彦 博士、吉田 昌生 博士、浅野 正義 氏、バイオ基盤研究所 岩本 充広 博士、森 一樹 博士、開発薬事部 鈴木 さやか氏に深く感謝いたします。

生物学的評価を担当していただきました第一三共株式会社 循環代謝研究所 永山 貴弘 博士、上野 真澄 氏、西 美奈 氏、薬物動態研究所 永井 陽子 氏、井上 晋一 博士、安全性研究所 千葉 克芳 博士、高砂 浄 博士、生物医学研究所 水野 誠 博士、開発推進部 倉田 晃文 博士、トランスレーショナルメディスン部 前田 尚之 博士に深く感謝いたします。

X 線結晶構造解析を実施していただきました第一三共 RD ノバーレ株式会社 生物評価研究部 松井 由美 氏、高橋 瑞稀 博士に深く感謝いたします。

元素分析・各種スペクトルを測定していただきました第一三共 RD ノバーレ株式会社 分析グループの皆様に深く感謝いたします。

最後に、研究生活を終始理解し支えてくれた家族に感謝いたします。

研究業績リスト

学位論文の主たる部分を公表した論文

- (1) “Design and discovery of new (3*S*,5*R*)-5-[4-(2-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-5-oxopiperazin-1-yl]piperidine-3-carboxamides as potent renin inhibitors”
Yutaka Mori, Yasuyuki Ogawa, Akiyoshi Mochizuki, Yuji Nakamura, Chie Sugita, Shojiro Miyazaki, Kazuhiko Tamaki, Yumi Matsui, Mizuki Takahashi, Takahiro Nagayama, Yoko Nagai, Shin-ichi Inoue, Takahide Nishi,
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 22 (24), 7677-7682 (2012).
- (2) “Synthesis and optimization of novel (3*S*,5*R*)-5-(2,2-dimethyl-5-oxo-4-phenylpiperazin-1-yl)piperidine-3-carboxamides as orally active renin inhibitors”
Yutaka Mori, Yasuyuki Ogawa, Akiyoshi Mochizuki, Yuji Nakamura, Teppei Fujimoto, Chie Sugita, Shojiro Miyazaki, Kazuhiko Tamaki, Takahiro Nagayama, Yoko Nagai, Shin-ichi Inoue, Katsuyoshi Chiba, Takahide Nishi,
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21 (18), 5907-5922, (2013).
- (3) “An efficient synthesis of (3*S*,5*S*)-5-[3,3-dimethyl-1-(*o*-tolyl)-6-oxo-2*H*-pyridin-4-yl]piperidine-3-carboxamide as potent renin inhibitor”
Yutaka Mori, Mitsuhiro Iwamoto, Kazuki Mori, Masao Yoshida, Takeshi Honda, Takahiro Nagayama, and Takahide Nishi,
Heterocycles, 89 (6), 1413-1426, (2014).

参考論文

- (1) “Synthesis of Spiro[indoline-3,2'-pyrrolidine] derivatives from β -3-indolyl ketone oximes”
Kenichi Tanaka, **Yutaka Mori**, Koichi Narasaka,
Chemistry Letters, 33 (1), 26-27 (2004).
- (2) Photochemical radical cyclization of γ,δ -unsaturated ketone oximes to 3,4-dihydro-2*H*-pyrroles”
Mitsuru Kitamura, **Yutaka Mori**, Koichi Narasaka,
Tetrahedron Letters, 46 (14), 2373-2376 (2005).

学会発表

- (1) 「 β - (3-インドリル) ケトンオキシムからのスピロ [インドリン-3,2' -ピロリジン] 誘導体合成」
森 裕、田中健一、奈良坂紘一、
日本化学会第 84 春季年会(2004)、1F1-27、2004 年 3 月 26 日。
- (2) 「 γ, δ - 不飽和ケトンオキシムの光ラジカル環化反応」
北村 充、森 裕、奈良坂紘一、
日本化学会第 85 春季年会(2005)、2D4-183、2005 年 3 月 27 日。
- (3) 「ピペリジン骨格を有する新規レニン阻害剤の創製」
森 裕、
創薬懇話会 2013、2013 年 7 月 4 日。

特許

- (1) “Novel pyrazole amide derivative”
Yutaka Mori, Yoshikazu Uto, Takayuki Kitazawa,
PCT Int. Appl. WO2012/063896 (2012), PCT/JP/2011/075931 (2011).
- (2) “Substituted amide compound”
Masao Yoshida, Kazuki Mori, Mitsuhiro Iwamoto, Yutaka Mori, Yasuyuki Ogawa,
Takahiro Nagayama,
PCT Int. Appl. WO2012/161173 (2012), PCT/JP2012/062996 (2012).
- (3) “Cycloalkyloxybiaryl compound”
Yoshikazu Uto, Yutaka Mori,
PCT Int. Appl. WO2012/165398 (2012), PCT/JP2012/063693 (2012).
- (4) “Fused Heterocyclic derivative”
Yoshikazu Uto, Yuko Ueno, Keiko Suzuki, Yutaka Mori,
PCT Int. Appl. WO2013/039140 (2013), PCT/JP2012/073442 (2012).