

ハイスループットスクリーニングおよび
フラグメントヒット化合物から展開したホスホジエステ
ラーゼ 10A 阻害剤の合成と構造活性相関に関する研究

茅野 綾香

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

- 1 . Chino, A.; Masuda, N.; Amano, Y.; Honbou, K.; Mihara, T.; Yamazaki, M.; Tomishima, M. Novel benzimidazole derivatives as phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibitors with improved metabolic stability. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3515–3526.
- 2 . Chino, A.; Seo, R.; Amano, Y.; Namatame, I.; Hamaguchi, W.; Honbou, K.; Mihara, T.; Yamazaki, M.; Tomishima, M.; Masuda, N. Fragment-Based Discovery of Pyrimido[1,2-*b*]indazole PDE10A Inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **2018**, *66*, 286–294.
- 3 . Chino, A.; Honda, S.; Morita, M.; Yonezawa, K.; Hamaguchi, W.; Amano, Y.; Moriguchi, H.; Yamazaki, M.; Aota, M.; Tomishima, M.; Masuda, N. Synthesis, SAR study, and biological evaluation of novel 2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole derivatives as phosphodiesterase 10A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 3692–3706.

目次

略語表

序論

第一節	本研究の背景	1
第二節	中枢神経系薬の創製で求められる物理化学的性質について	8
第三節	Fragment-Based Drug Design (FBDD)について	11
第四節	本研究の概要	16

本論

第一章 HTS ヒット化合物から展開した新規ベンゾイミダゾール誘導体の合成および構造活性相関

第一節	分子設計	19
第二節	化合物の合成	19
第三節	PDE10A 阻害活性および代謝安定性の評価結果ならびに考察	23
第四節	PDE10A 阻害活性および CYP3A4 阻害活性の評価結果	28
第五節	小括	29

第二章 フラグメントヒット化合物から展開した新規ピリミド[1,2-*b*]インダゾール誘導体の合成および構造活性相関

第一節	分子設計	30
第二節	化合物の合成	32
第三節	フラグメントヒットからの合成展開結果ならびに考察	33
第四節	小括	39

第三章 中枢移行性の向上した新規ベンゾイミダゾール誘導体の合成および構造活性相関

第一節	分子設計	41
第二節	化合物の合成	42
第三節	PDE10A 阻害活性および P-gp 基質性の評価結果ならびに考察	45
第四節	マウス行動薬理モデルにおける <i>in vivo</i> 薬効評価および PK 評価	52
第五節	小括	56

結論

実験の部

参考文献・注釈

謝辞

略語表

本論文中における以下の用語、試薬は下記のように略記した。

Ac	acetyl
ADMET	absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity
aq.	aqueous
Ar	aryl
ATP	adenosine triphosphate
BBB	blood-brain barrier
BINAP	2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
cLogD	calculated logarithm of the distribution coefficient at pH7.4
cLogP	calculated logarithm of the partition coefficient
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
CL _{int}	intrinsic clearance
CNS	central nervous system
Compds	compounds
CYP	cytochrome P450
d.	day(s)
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCE	1,2-dichloroethane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DME	1,2-dimethoxyethane
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Et	ethyl
FBDD	Fragment-Based Drug Design
GABA	γ -aminobutyric acid
GTP	guanosine triphosphate
h.	hour(s)

HATU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBD	hydrogen bond donor
HLM	human liver microsomes
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectra
HTRF	homogeneous time-resolved fluorescence
HTS	high throughput screening
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
JOSIPHOS	(dicyclohexylphosphino)ferrocenyl]ethyl-di- <i>tert</i> -butylphosphine
LC–MS	liquid chromatography–mass spectrometry
Me	methyl
min.	minute(s)
MLM	mouse liver microsomes
MSN	medium spiny neuron
MW	molecular weight
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
ND	not detected
NER	net efflux ratio
<i>n</i> -hexane	normal hexane
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
No Dep.	No depletion in this condition
NT	not tested
PCP	phencyclidine
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
Pd–C	palladium on carbon
PdCl ₂ (dppf)·CH ₂ Cl ₂	[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) dichloromethane complex
Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)

PDE	phosphodiesterase
PEI	percent efficiency index
Ph	phenyl
PK	pharmacokinetics
PKA	protein kinase A
PKG	protein kinase G
p.o.	oral administration
quant.	quantitative yield
SAR	structure activity relationship
SOR	social odor recognition
s.c.	subcutaneous injection
T3P	propylphosphonic anhydride
<i>t</i> -BuONa	sodium <i>tert</i> -butoxide
THF	tetrahydrofuran
TPSA	topological polar surface area
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
UPLC	ultra performance liquid chromatography
WSC·HCl	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride
WT	wild type
Xantphos	4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene
Xphos	2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl

序論

第一節 本研究の背景

統合失調症 (schizophrenia) は、罹患率が約 1% の難治性精神疾患であり、思春期や青春기에その多くが発症し、再発や再燃を繰り返す¹。統合失調症の症状は多彩であるが、主症状として、幻覚や妄想などの陽性症状、感情の平板化や社会性の低下、自閉などの陰性症状、および論理的思考の低下や注意力障害などの認知機能障害の 3 つに大別される²。病態の原因は特定されていないが、遺伝や環境要因などが複雑に関与していると想定されている。

統合失調症の発症原因として、様々な仮説が提唱されているが、中でもドパミン神経系の伝達機構の異常が古くから提唱されており、大脳辺縁系のドパミン神経伝達が亢進することにより、陽性症状が発現すると考えられている。統合失調症患者の脳内線条体におけるドパミン量の濃度上昇に関するデータも報告されている³。実際、既存の統合失調症治療薬としては主にドパミン D₂ 受容体拮抗作用を機序とするハロペリドールなどの定型抗精神病薬や D₂ 受容体拮抗作用にセロトニン 5-HT_{2A} 受容体などの D₂ 以外の受容体への作用を併せ持つオランザピンなどの非定型抗精神病薬が用いられているおり、陽性症状に有効性を示す。また、統合失調症患者での抗精神病薬の陽性症状に対する改善作用は線条体での D₂ 受容体占有率と相関することが報告されている⁴。一方で、線条体以外の脳部位、例えば前頭前野などでのドパミンの機能低下や濃度低下が報告されている⁵。既存抗精神病薬は辺縁系のみならず脳の他の部位の D₂ 受容体も遮断してしまうため、ドパミン拮抗作用による陰性症状や認知機能障害の誘発や悪化などの副作用が見られる⁶。そのため既存薬は陽性症状には有効であるが、陰性症状や認知機能障害に対する改善作用は不十分であり、大きなアンメットメディカルニーズが存在している。そこで各症状を改善するためにはこれまでと異なるアプローチが必要と考えた。

先ほども述べたが、原因は明らかではないが統合失調症患者の脳内では、線条体におけるドパミン量の増加および抑制性ドパミン D₂ 受容体の機能亢進⁷、またグルタミン酸の入力低下⁸が起きていることが報告されている。D₂ 受容体は G_i 受容体が共役した GPCR であり、ドパミンの結合により G_i が活性化され、アデニル酸シクラーターゼによる細胞内のアデノシン三リン酸(adenosine triphosphate; ATP)か

らセカンドメッセンジャーである 3',5'-環状アデノシンーリン酸(cyclic adenosine monophosphate; cAMP)の産生および cAMP/protein kinase A (PKA)シグナルを抑制する。また、グルタミン酸の入力により *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体などのイオンチャネルが開口して Ca イオンが流入し、一酸化窒素(NO)の合成酵素、アデニル酸シクラーゼによるグアノシン-5'-三リン酸(guanosine triphosphate; GTP)からの 3',5'-環状グアノシンーリン酸 (cyclic guanosine monophosphate; cGMP)産生および cGMP/protein kinase G (PKG)シグナルを活性化する。統合失調症患者の線条体ではドパミン量の増加とドパミン D₂受容体の発現量亢進による cAMP/PKA シグナルの低下、ならびにグルタミン酸の入力低下による cGMP/PKG シグナルの低下が起きる。それにより、線条体からの淡蒼球への抑制性 γ -aminobutyric acid (GABA)シグナルの出力が低下していると考えられている。その結果、線条体を含む大脳基底核によって調整される視床への抑制性 GABA シグナルの入力が低下していることが示唆される⁸。視床は外部からの情報を適切に選別して大脳皮質に転送するというフィルターとしての機能を果たしている^{8b}が、統合失調症患者では、視床への抑制性シグナルの入力低下によりフィルター機能の異常を生じ、情報が選別されずにグルタミン酸シグナルを介して過剰な情報が大脳皮質へ流入することで、種々の症状を引き起こしていると考えられている^{8c} (Figure 1)。この仮説に基づくと、線条体からの出力シグナルを増強することにより、視床への抑制性シグナルの入力が改善し、視床から大脳皮質への情報の選別が行えるようになり、さらには大脳皮質から先の神経シグナル伝達も正常化することで、フィルター機能の異常により引き起こされた統合失調症の各種症状を改善できるようになる可能性がある。

そこで、線条体の cAMP 濃度および cGMP 濃度を上昇させることが出来れば、続く神経回路の活性化により統合失調症の症状を改善できると考え、cAMP や cGMP の加水分解酵素であるホスホジエステラーゼ(PDE)に着目した。

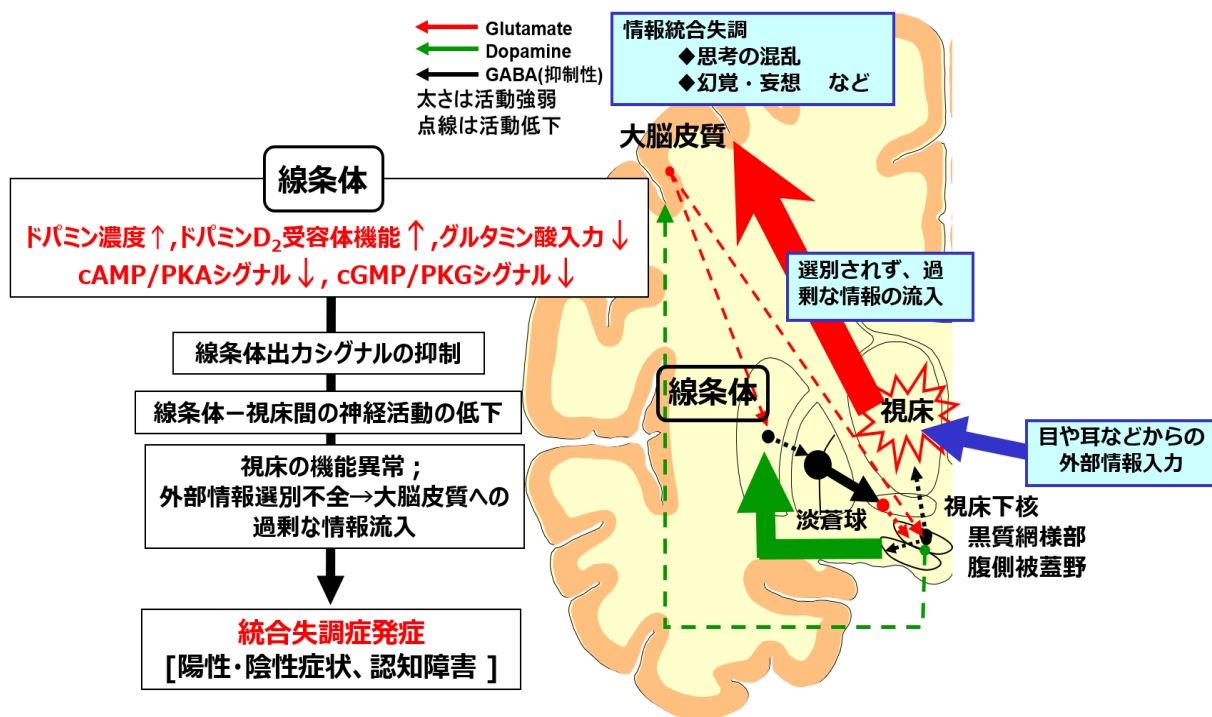


Figure 1. 統合失調症の病態仮説

PDE は cAMP や cGMP といった細胞内の環状ヌクレオチドを分解する酵素であり、アミノ酸配列や酵素化学的性質から 11 種類のファミリー、21 遺伝子に分類されている。PDE サブタイプはそれぞれ基質特異性や発現部位が異なるが、その中で PDE10A は脳の線条体に多く発現しており、cAMP と cGMP の両方を基質とする⁹。線条体において PDE10A は GABA 作動性の中型有棘細胞 (medium spiny neuron; MSN) に局在していることが報告されており、PDE10A が細胞内 cAMP/cGMP の代謝を介して GABA 神経系の機能を調節していることが推察されている。したがって、PDE10A を阻害する薬物は線条体内の cAMP および cGMP 濃度を上昇させ、線条体から視床への GABA シグナルの出力を賦活化させることで、視床のフィルター機能を正常化し、各症状に対する統合失調症治療薬としての作用を発現することが期待できる (Figure 2)¹⁰。PDE10A は cAMP に対する親和性が cGMP よりも 10 倍高いことが知られている¹¹。既存抗精神病薬は D₂ 受容体下流の cAMP/PKA シグナルの調整のみで cGMP には作用しないため、cAMP 濃度の上昇のみでも病態改善は期待できるが、弱いながらも cGMP に対しても作用することにより副次的な効果が得られるものと考えられる。PDE10A は線条体特異的に発現しているため、

PDE10A 阻害薬を投与しても線条体以外の脳部位への作用に由来する統合失調症の悪化を回避でき、かつ大脳皮質から先のシグナルを改善することにより、脳全体の神経機能が正常化し、認知機能障害を含む統合失調症の各症状が改善できると考えた。実験的には、PDE10A 阻害作用を有する鎮痙薬や平滑筋弛緩薬として知られるパパベリンをマウスに投与すると線条体の cAMP や cGMP が増加すること^{10a}や、ラットでの陽性症状モデル(phencyclidine(PCP)誘発過活動モデル)や認知機能障害モデル(PCP 誘発 attentional set-shifting task 試験)で改善作用を示す^{10a, 12} ことが報告されている。また、PDE10A KO マウスを用いた検討で、陰性症状モデル(social interaction 試験)において有効性が示されている¹³。

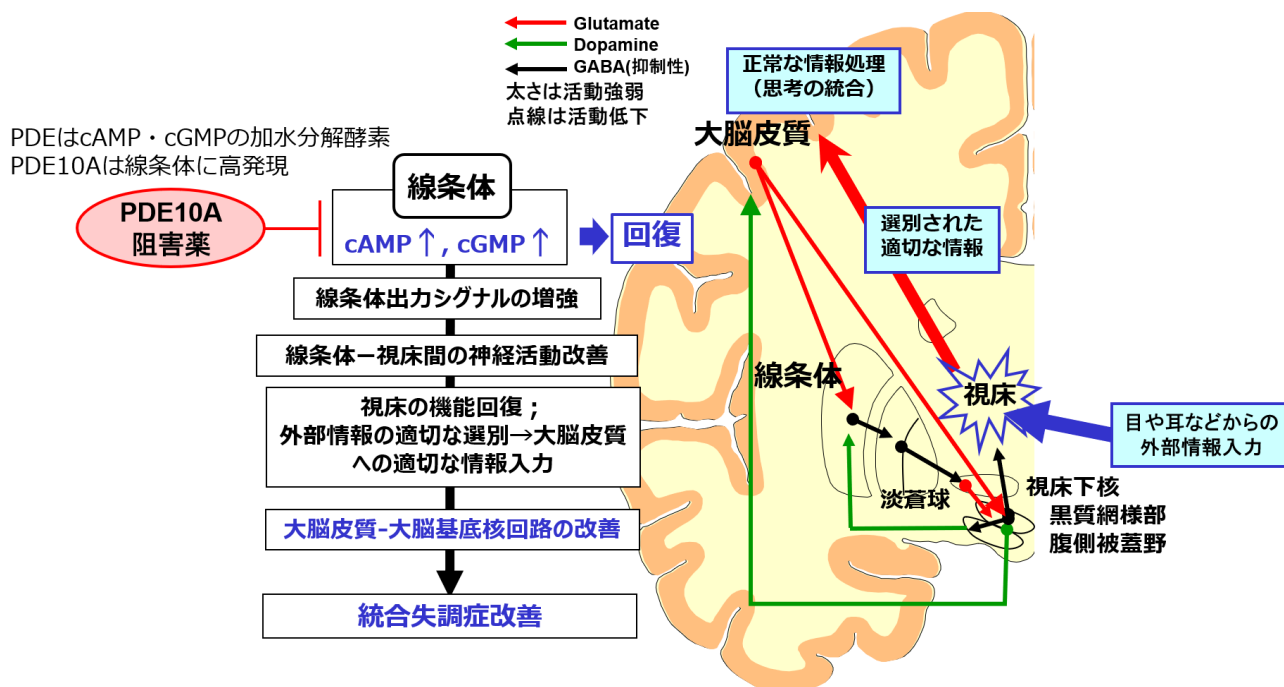


Figure 2. PDE10A 阻害剤の推定効果

また、既存抗精神病薬には様々な副作用が知られている。定型抗精神病薬では線条体 D₂ 受容体の過剰な拮抗作用による錐体外路症状の誘発¹⁴や、下垂体前葉細胞上の D₂ 受容体の遮断による高プロラクチン血症¹⁵などの副作用を引き起こすことが知られている。非定型抗精神病薬は、D₂ 受容体以外の受容体への作用も併せ持ち、それらの作用が協働して有効性をもたらすため、定型抗精神病薬よりも上述の副作用を発現させにくい。他の受容体への作用による肥満や糖尿病および脂質代謝異常などの

代謝関連の副作用が新たに認められている¹⁶。これに対し、線条体には PDE10A 以外にも多くの PDE ファミリーが発現しており、cAMP の分解は PDE10A が主に担っているが、他に PDE1 や PDE4, PDE7 などに関わっている¹¹。そのため選択的 PDE10A 阻害剤は線条体の機能を過度に抑制することが無く、錐体外路症状の緩和が期待できる。また、PDE10A は線条体特異的に発現しているため、線条体以外の脳部位への作用に由来する高プラクチン血症などの既存抗精神病薬でみられる副作用を回避できると考えられる。

以上のことから、選択的 PDE10A 阻害剤は、陽性症状のみならず陰性症状や認知障害にも効果的な作用を示し、副作用を回避あるいは軽減する新規の統合失調症治療薬として期待される。

現在までに Pfizer(MP-10)や武田薬品工業(TAK-063)、Omeros(OMS-824)、Amgen(AMG-579)、Roche(RO 5545965, structure unknown)、Lundbeck(Lu AF11167, structure unknown)など多くの製薬会社が PDE10A 阻害薬の臨床開発を行っており(Figure 3)、また PDE10A 阻害剤の開発研究については多くの学術論文が報告されている¹⁷。

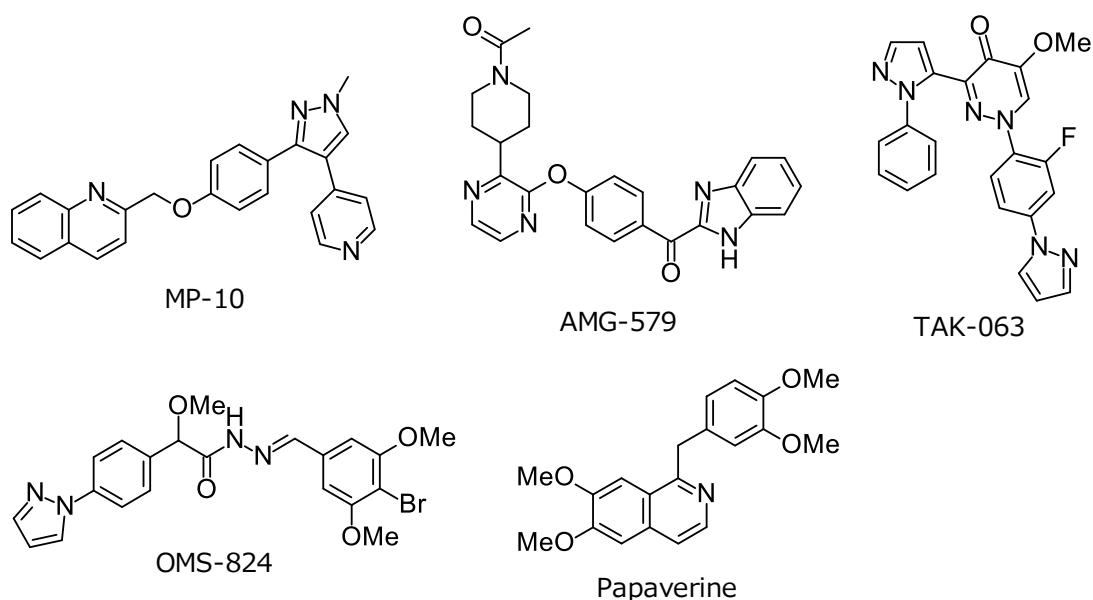


Figure 3. Representative PDE10A inhibitors.

PDE10A サブタイプの結晶構造は解明されており、これまでに様々な PDE10A 阻害剤と PDE10A タンパクとの X 線結晶構造解析が行われている。すべての PDE ファミリーには 'catalytic pocket' があり、共通するグルタミン酸残基が cAMP や cGMP と水素結合を形成する役目を担っている¹⁸。一方で、PDE10A に特異的に存在するポケットとして 'selectivity pocket' が知られている。21 の PDE ファミリーのうち、PDE10A のみが Gln726 の隣に Gly725 を有している。他のサブタイプではグリシンよりも嵩高いアミノ酸残基のために、catalytic pocket に隣接する脂溶性ポケットに阻害剤が進入しにくくなる。この PDE10A の脂溶性ポケットは他の多くの PDE サブタイプのポケットよりも深く、その内部には阻害剤との水素結合形成が可能な Tyr693 を有している。水素結合を形成できるアミノ酸残基が脂溶性ポケット内に存在するのは PDE サブタイプ内では珍しいため、この脂溶性ポケット(selectivity pocket)を占有し、Tyr693 と水素結合を形成することが PDE10A 選択的阻害剤の獲得に重要であると考えられている。実際にこれまでに報告されている PDE10A 阻害剤の MP-10 や ASP9436 などでは、それぞれキノリン環やベンゾイミダゾール環が PDE10A の selectivity pocket を占め、それらの環上窒素原子が Tyr693 と相互作用しており、いずれも他の PDE サブタイプとの高い選択性発現が報告されている^{18,19} (Figure 4, 5)。そのため、PDE10A との共結晶の X 線結晶構造解析において selectivity pocket を占有し Tyr693 と相互作用している化合物については他の PDE サブタイプとの選択性が高いことが期待される。

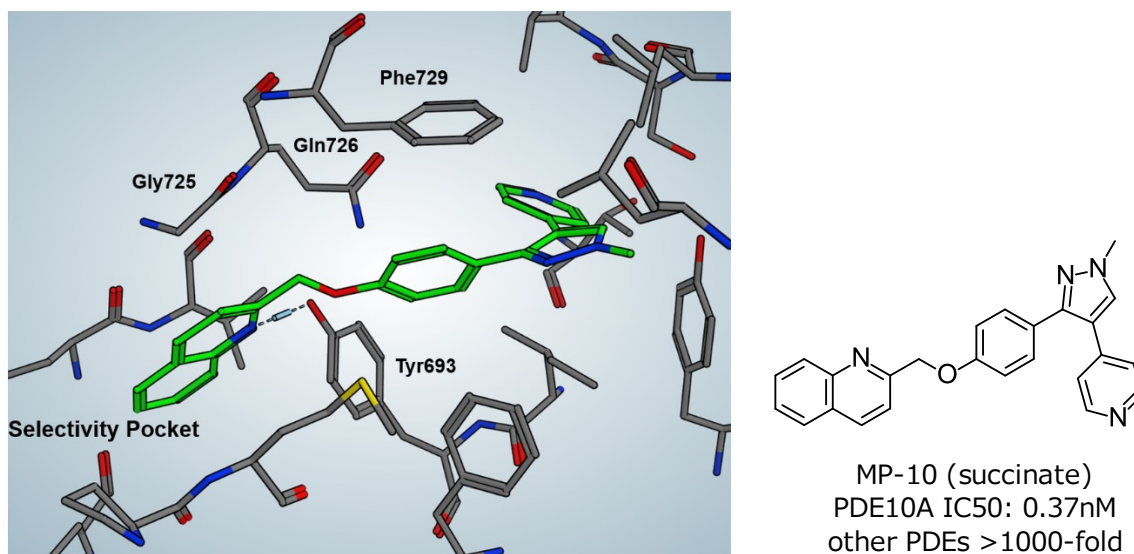
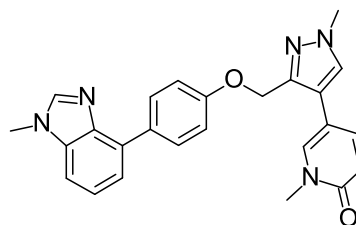
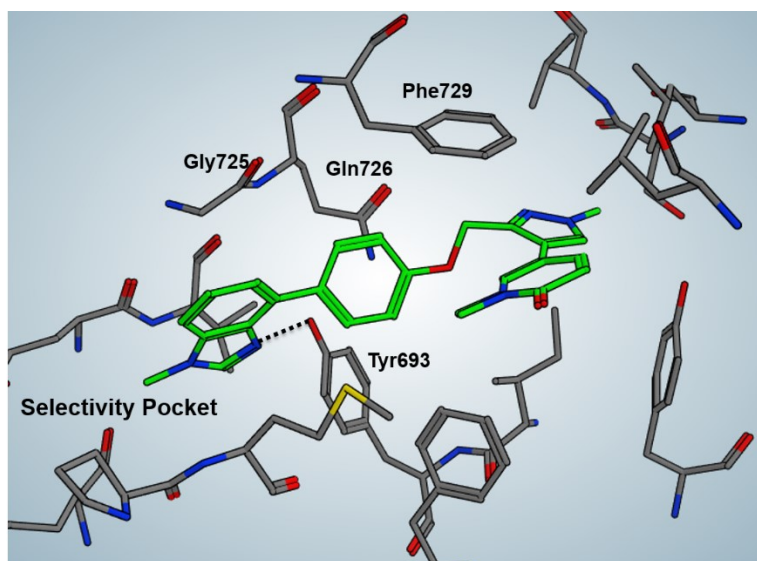


Figure 4. MP-10 (lime green) bound to PDE10A (PDB 3HR1)¹⁸.



ASP9436 (succinate)
PDE10A IC₅₀: 8.0 nM
other PDEs: >420-fold

Figure 5. ASP9436 (lime green) bound to PDE10A (PDB code: 4XY2)¹⁹.

第二節 中枢神経系薬の創製で求められる物理化学的性質について

経口投与された医薬品は、消化管液への溶解および拡散した後、消化管から吸収され、小腸膜を通過して血液中へ移行し、さらに各組織の細胞内へ移行することで効果を発揮する。経口吸収性が高い化合物をデザインする場合、Lipinski らが報告している Rule of five が物理化学的指標としてよく用いられる²⁰。

Rule of five: (a) molecular weight (MW) > 500 Da; (b) calculated logarithm of the partition coefficient (cLogP) or logP > 5; (c) number of hydrogen bond donors (HBDs), OH plus NH count > 5; (d) number of hydrogen bond acceptors (HBAs), O plus N atoms > 10

この指標は経験則だが、いずれか1つでも当てはまる化合物は水溶性および小腸での透過性が低下し、2つに当てはまると経口吸収性が悪く、最終的に医薬品になりづらいとされる。しかしながら、中枢神経系(central nervous system; CNS)をターゲットとした薬剤の創製の場合、この指標を参考にしただけでは中枢移行性の高い化合物が得られないことが多く、詳細は後述するが、脂溶性などの物理化学的パラメータを調整する必要がある。これは、脳が生体にとって有害な物質から自らを効率的に防御し、自らの恒常性を維持する、脳特有のバリア機構を有することに起因する。中枢神経系薬の創製において、化合物が脳内で期待される効果を発揮するためには、バリア機能を有する血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)の透過性が成功の重要な鍵となる。

BBB は脳の毛細血管内に存在し、主体となる脳毛細血管内皮細胞と、その一部に接着するペリサイト(周辺細胞)およびそれらを囲むアストロサイト(星状膠細胞)から構成されている。多くの末梢臓器の毛細血管内皮細胞同士は細胞間隙を有しているのに対し、脳の毛細血管内皮細胞は強固なタイトジャンクション(密着結合)によって細胞同士が結合しており、無窓性のチューブ構造を形成している。このような形状のため、血液中の物質は細胞間隙を無差別には通過できず、脳毛細血管内皮細胞の細胞膜を透過して脳内に到達する必要がある²¹。物質の脳内への移行は主に受動拡散によって行われるが、それに加え、脳毛細血管内皮細胞の血液側と脳側に非対称に発現する様々なトランスポーターの基質認識特性に基づいて脳内への取り込みや脳内からの排出を行う。脳内への取り込みに関しては、グル

コースやアミノ酸など CNS での活動を維持するための必須物質を輸送するトランスポーターが発現しているが、基質が限定的であることから、創薬研究においては受動拡散による BBB の透過性の向上を図る検討が主に行われる。一方、排出トランスポーターは幅広い基質認識を示し、多様な化合物が基質となるため、排出トランスポーターに認識されないような化合物をデザインし、能動的な汲み出しを回避することで、薬物の脳内への送達を目指す手法も併せて用いられる。

1) 中枢移行に適した物理化学的性質

受動拡散による化合物の中枢移行性は、その物理化学的性質が大きな影響を及ぼすことが知られており、数多くの研究者が市販の CNS 薬や CNS 候補薬を用いて、中枢移行に適した物理化学的パラメータの同定を試みている。中枢移行に最適な分子の物性値についての論文報告からの抜粋を Table 1 に示す²²。

Table 1. Physicochemical properties for optimal brain exposure in selected literature.

data set	conclusions and recommendations
119 marketed CNS drugs and 108 pfizer CNS clinical candidates ²³	Median values for marketed CNS drugs: MW 305.3; cLogP 2.8; cLogD 1.7; TPSA 44.8 Å ² ; pK _a 8.4; HBD 1
119 marketed CNS drugs and 108 pfizer CNS clinical candidates ²⁴	The most desirable values: MW ≤ 360; cLogP ≤ 3; clogD ≤ 2; TPSA 40–90 Å ² ; HBD = 0; pK _a ≤ 8
Medicinal chemistry literature review ²⁵	Suggested physicochemical property ranges for increasing the potential for BBB penetration; MW < 500; cLogP 2–5; clogD 2–5; TPSA < 90 Å ² ; HBD < 3
Marketed CNS drugs ²⁶	Attributes of a successful CNS drug candidate: MW < 450; cLogP < 5; PSA < 60–70 Å ² ; HBD < 3; HBA < 7; pK _a 7.5–10.5; rotatable bonds < 8

論文報告では、cLogP, calculated logarithm of the distribution coefficient at pH7.4 (cLogD), MW, topological polar surface area (TPSA), number of HBDS, ionization state (pK_a) の 6 つの物理化学的パラメータが中枢移行性に関連する指標として多く報告されている²⁷。創薬研究においては、これら複数の物理学的パラメータのバランスをとりながら structure activity relationship (SAR) 探索を行う必要がある。CNS 薬は非 CNS 薬に比べて、分子量や極性表面積が小さく、脂溶性が高く、水素結合供与基が少ない傾向がある²⁸。しかし、化合物の脂溶性の増加は活性が向上する可能性がある一方で代謝を受けやすく毒性を示しやすくなるという課題がある²⁹。また、PSA < 75Å²; cLogP > 3 のプロファイルの化合物で

は毒性リスクが高まるという報告もある³⁰。安全性面のリスクを示しやすい化合物の物理学的特性と CNS 薬として好ましい物理学的特性の範囲が重なっているため、CNS 薬創製においては ADMET プロファイルに配慮しながら SAR 探索研究を行う必要がある。

また、BBB 透過性に有利もしくは不利に働く分子の部分構造も報告されている。CNS 薬の多くに芳香環や塩基性アミノ基が含まれる一方³¹、スルホンアミド、スルホン、テトラゾール、アミン-*N*-オキシド、カルボン酸などの官能基は中枢移行性に悪影響を与える²⁵。化合物デザインの際にはこれらの情報と物理学的特性とを組み合わせることで、中枢移行性の高い化合物が得られやすくなると考えられている。

2) 排出トランスポーターの影響

脳毛細血管内皮細胞の血液側膜上には、P-glycoprotein (P-gp) に代表される排出トランスポーターが発現している。このトランスポーターは ATP の加水分解エネルギーを利用して細胞内から細胞外(血液側)へ排泄することで異物の侵入を阻止する生体防御機構の役割を果たしている。そのため、受動拡散で膜透過が良好になるように最適化された CNS 候補薬であっても、P-gp によって細胞外に汲み出される可能性があり、物性値から予測される中枢移行性よりも実際には大きく低下する恐れがある。P-gp は広範な基質認識性を有しているが、脂溶性が高く、分子量や疎水性表面積が大きく、電気陰性基や水素結合基を有する中性・有機カチオン化合物が基質になりやすい³²。中枢神経系をターゲットとする薬物の場合、P-gp によるバリア機構を回避する必要があり、P-gp の基質とならない化合物のデザインおよび選択が求められる。

いずれも経験則であり、上述の指標の範囲外の化合物でも良好な中枢移行性を示す場合もあるが、これらの指標を参考にしながら創薬研究を行うことで、より中枢移行性の高い化合物を効率的に取得できると考えられる。

第三節 Fragment-Based Drug Design (FBDD)について

低分子医薬品の創製において、質の高いヒット化合物を効率よく見出す手法は非常に重要となる。従来のヒット探索の主流は High Throughput Screening (HTS) である。HTS ヒット化合物は 250–600 程度の幅広い分子量で数百 nM–数 μ M の活性を示し、比較的分子量の大きい drug-like な分子が得られるという特徴を持つ。しかし、この分子量の大きさと構造の複雑さゆえに、タンパクのポケットに対して分子の大きさの割に非効率な結合様式や非特異的な相互作用をとる場合がある。実際、HTS では分子量が大きく脂溶性の高い化合物がヒットとして見出されるケースが多いと報告されている³³。ヒット化合物からリード化合物への構造最適化の過程において、分子量や脂溶性が増すことが知られており^{33,34}、HTS ヒット化合物からの合成展開では、標的タンパクとの相互作用に必要な最小部分構造を定義することが難しいため、脂溶性が高くなりやすい。高い脂溶性は生体内分子への非特異的な結合による体内動態の変化や予期せぬ副作用をもたらすため、drug-like な創薬リード化合物が得られない場合がある³⁵ (Figure 6a)。一方、HTS と異なるヒット化合物探索の手法として新しく Fragment-Based Drug Design (FBDD) が用いられるようになった。

FBDD ではフラグメントと呼ばれる分子量 300 未満の小さな分子のスクリーニングを行う。そのヒット化合物は 10 μ M–mM 程度の弱い薬理活性を示すが、標的タンパクと効率よく相互作用を取る特徴をもつ。効率の良い相互作用を示す指標としてリガンド効率(Ligand Efficiency; 分子の大きさ当たりの活性強度を示す値)³⁶ が知られており、それをを用いることで構造修飾の効率を定量化できると言われている。フラグメントヒット化合物は高い Ligand Efficiency を示し、そのようなヒット化合物を起点として構造修飾を行うことで、分子量が増大しても drug-like なリード化合物が創出できる可能性が高まると考えられる(Figure 6b)。フラグメントは分子量が小さく、タンパクと小さい相互作用しか得られないため非常に活性が弱く、HTS で用いられるような通常の薬理学的手法では評価できないため、X線結晶構造解析や核磁気共鳴(NMR)、表面プラズモン共鳴(SPR)などの生物物理学的手法を用いてスクリーニングを行う³⁷。

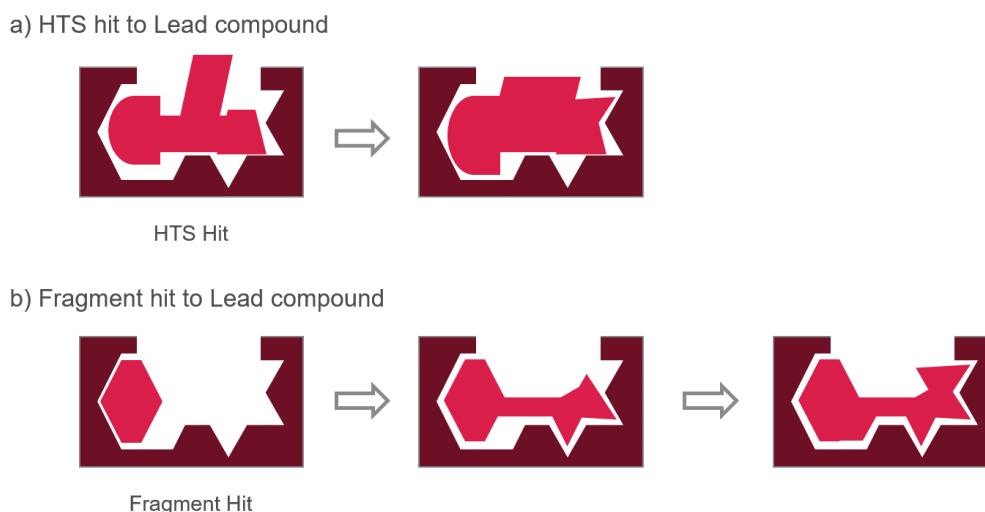


Figure 6. Schematic representation of optimization of HTS hits and Fragment hits for drug discovery.

フラグメントヒット化合物の選定では、リガンド効率に着目する。最初に高いリガンド効率の値を示すフラグメントヒットを選定することにより、構造最適化の過程でリガンド効率が低下した場合でも、比較的分子量で高い薬理活性を示すリード化合物を得られる確率が向上する。代表的なリガンド効率の指数を Table 2 に示す³⁸。

Table 2. 各種リガンド効率

リガンド効率指数 (Ligand Efficiency Index; LEI)	$LEI = \frac{-\text{自由エネルギー} (\Delta G)}{\text{重原子数}} \approx \frac{-RTpIC_{50}}{\text{重原子数}}$
結合効率指数 (Binding Efficiency Index; BEI)	$BEI = \frac{\text{活性} (pKi, pKd, pIC_{50})}{\text{分子量} (kDa)}$
パーセント阻害効率指数 (Percent Efficiency Index; PEI)	$PEI = \frac{\text{阻害活性} (\%inhibition)}{\text{分子量} (kDa)}$
表面結合効率指数 (Surface-binding Efficiency Index; SEI)	$SEI = \frac{\text{活性} (pKi, pKd, pIC_{50})}{\text{極性表面積} (\text{\AA}^2)}$

フラグメントヒットを同定した後は、合成化学的な展開によりリード化合物へ導いていく。この際の手法は以下の3つに大別される(Figure 7)。いずれにおいても、フラグメントと標的タンパクの結合

に関する構造情報は合理的な展開のために極めて重要となるため、FBDD においては X 線構造解析がよく用いられる。

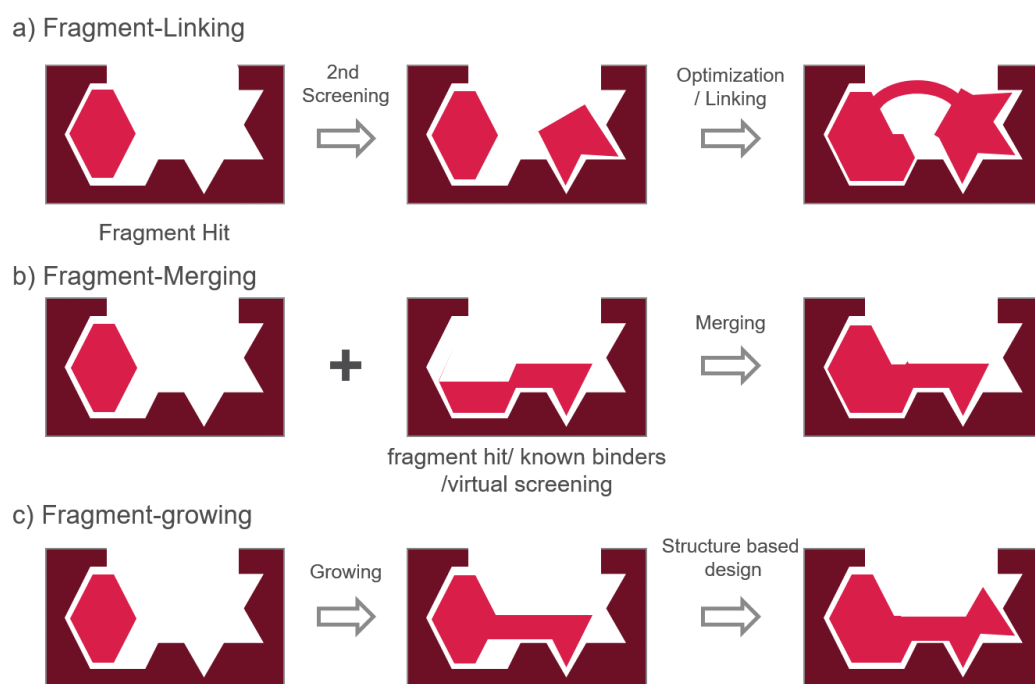


Figure 7. Strategies for fragment optimization

a) Fragment-Linking

標的タンパクの1つのポケットに結合するフラグメントヒットを同定し、そのフラグメント存在下で隣接するポケットに結合する1つ目よりも小さな2つ目のフラグメントを探索し、その2つのフラグメント同士を適切なリンカーを介して結合させ、リード化合物を得るという手法である。実際に Fesik らは本手法を用いて様々なリード化合物を見出している (Figure 8)³⁹。本手法は標的タンパクの結合サイトに個々のフラグメントを収容し、結合が可能な適切な相対配置のポケットがある場合に適用可能であるが、2つのフラグメントの結合様式と位置に影響を与えず、リンカーの歪みやタンパクとの静電的・立体的反発が生じることもなくフラグメントを結合させる必要がある点は難易度が高い。

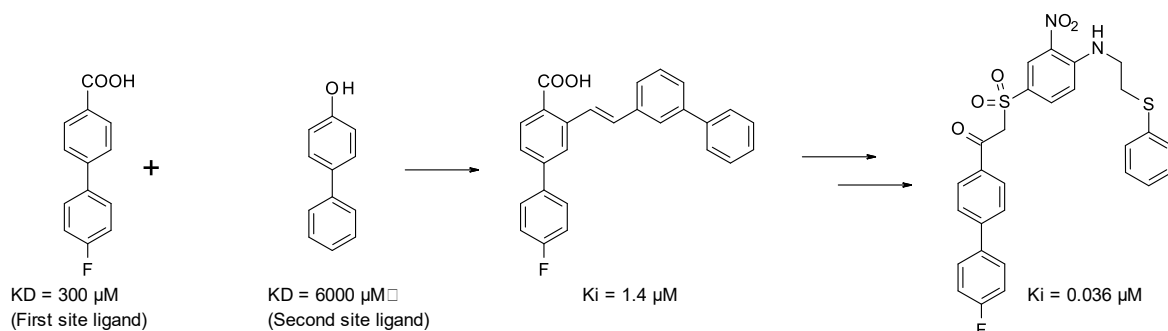


Figure 8. Example of fragment linking.

b) Fragment-Merging

同一のポケットを共有するフラグメントヒットが複数得られた場合に、それらを部分的に重ね合わせる手法である。様々なケモタイプのヒット化合物との結晶構造が必要であり、それらを融合させた化合物デザインを行うことでリード化合物に導く。またヒットフラグメントと既知のリガンド（論文や HTS ヒット、天然物など）とのハイブリット化は、Fragment-merging の手法を用いて短時間に高活性な新規リード化合物を取得するのに有効な手段である。実際に GlaxoSmithKline 社の Bertrand らの報告では、フラグメントヒットと HTS ヒットを組み合わせることにより強力な Branched-Chain Aminotransferase (BCATm) 阻害剤を見出している (Figure 9)⁴⁰。

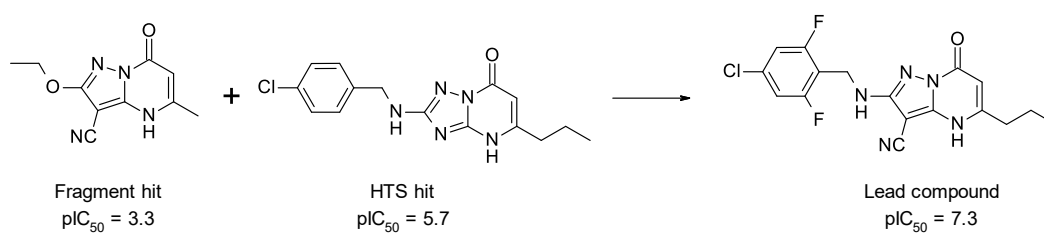


Figure 9. Example of fragment merging.

c) Fragment-Growing

Fragment-growing は FBDD において最も広く使用される手法であり、フラグメントヒットとタンパクの構造を基にして通常のメディシナルケミストリーを展開するものである。フラグメントヒットは効率よく標的タンパクと相互作用していることからリード化合物のコア構造として好ましく、良好な活性および物性プロファイルを有するリード化合物を迅速に見出すことが可能となると考えら

れる。例えば、Astex Therapeutics 社の Howard らはフラグメントから X 線結晶構造解析を基に合成展開を行い、Aurora A 阻害剤を合成している (Figure 10)⁴¹。

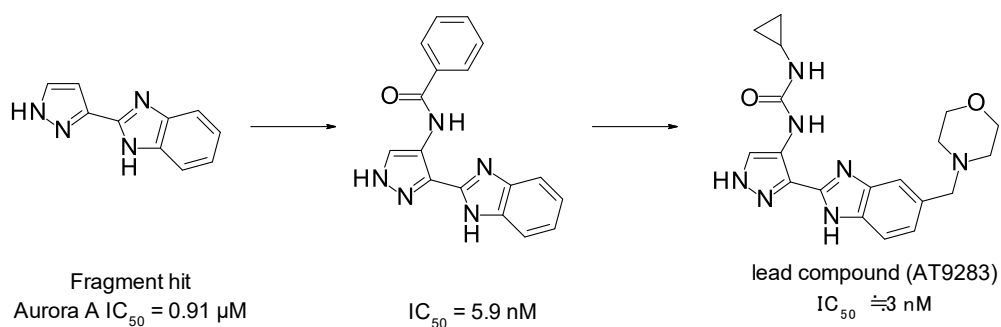


Figure 10. Example of fragment growing.

第四節 本研究の概要

本研究では、統合失調症治療薬、特に認知機能障害改善薬として有用性の高い新規 PDE10A 阻害剤の創製を目的に研究を行うこととする。

目標とする化合物のプロファイルとして以下の項目を設定する。

- (1) PDE10A に対する高い阻害活性を示すこと
- (2) ADME プロファイルが良好であること
- (3) 中枢移行性が良好であること
- (4) げっ歯類の認知機能障害モデルにおいて低用量で有効性を示すこと

研究方針として、HTS ライブラリーやフラグメントライブラリーから得られたヒット化合物に対し、PDE10A との X 線結晶構造解析を用いながら新規化合物の設計と合成展開を行い、上記目標プロファイルを満たす化合物を創出することとする。

第一章では、HTS ヒット化合物から高い PDE10A 阻害活性を有する化合物 **5b** を創出した経緯について述べている。HTS ヒットのイミダゾ[1,5-*a*]ピリジン誘導体 **1** から合成展開を行い、イミダゾ[4,5-*b*]ピリジノンへの変換及びベンゾイミダゾールへの置換基導入により阻害活性が大きく向上した化合物 **3a** を見出した。さらに薬物動態の改善を図り、化合物 **3a** のベンゾイミダゾール環上 7 位への窒素原子導入および 5 位 Me 基から 4 位 MeO 基への変換により、代謝安定性が改善した化合物 **4b** を見出した。続くイミダゾ[4,5-*b*]ピリジノン環 7 位への Me 基導入により、*in vitro* 活性が向上し、cytochrome P450(CYP)3A4 阻害活性が低減した化合物 **5b** を創出した (Figure 11)。

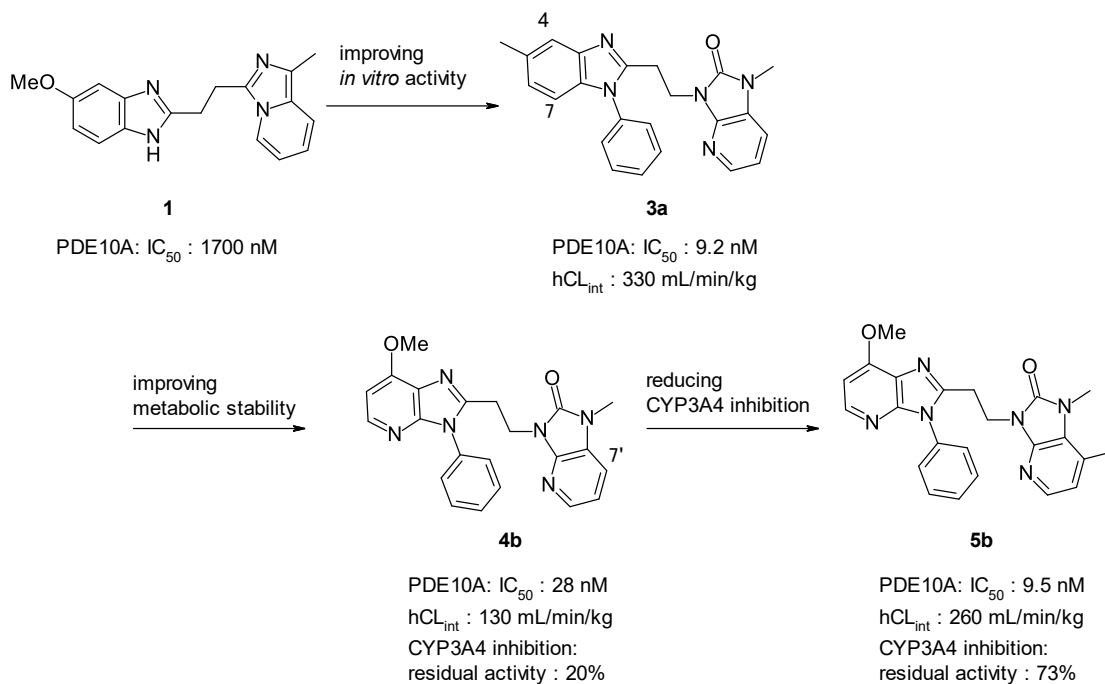


Figure 11. HTS ヒット化合物 **1** から化合物 **5b** 創出に至る経緯

第二章では、第一章で述べた化合物 **5b** の代謝安定性と CYP3A4 阻害活性の値が不十分であったため、より ADME プロファイルの良好な新規母核の獲得を目指し、FBDD を実施し、**36a** を見出した経緯について述べている。PDE10A タンパクとの X 線結晶構造解析から得られたフラグメントヒット **33** に対して、*in vitro* 活性の向上を目的に、PDE10A タンパクの構造情報を参考にして置換基の導入および変換などの構造最適化を実施した。その結果、強力な *in vitro* PDE10A 阻害活性を有するピリミド [1,2-*b*]インダゾール誘導体 **36a** を見出した。化合物 **36a** は CYP3A4 阻害作用を示さず、良好な代謝安定性を示した (Figure 12)。

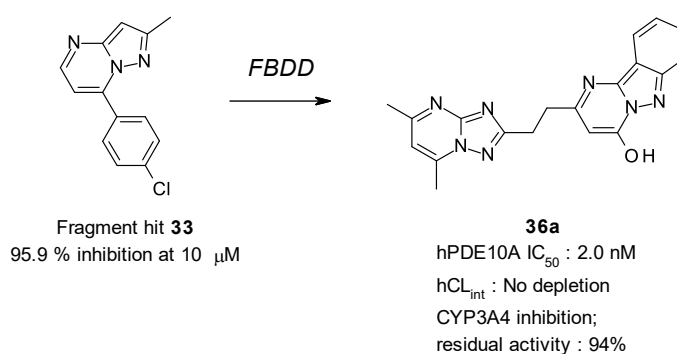


Figure 12. フラグメントヒット **33** から化合物 **36a** 創出の概要

第三章では、化合物**36a** からさらに構造最適化を行い、マウス中枢移行性の向上を達成し、マウスの認知機能障害モデルである Y 字型迷路(Y-maze)試験において有効性を示す化合物**45d** を見出した経緯について述べている。化合物**36a** の膜透過性の低さが中枢移行性の低さの主要因であると考え、水素結合供与基を持たない PDE10A 阻害剤を分子設計した。化合物**36a** のピリミド[1,2-*b*]インダゾール構造を2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾールへ変換することにより、PDE10A 阻害活性は中程度にとどまるものの、良好な膜透過性を示すことを見出した。化合物**44a** の PDE10A 阻害活性の向上と P-gp 基質性の低減を目指して置換基の導入および変換などの構造最適化を実施した結果、P-gp 基質性を回避しつつ、強力な PDE10A 阻害活性を示し、さらには良好な中枢移行性を有する化合物**45d** を創出した。このリード化合物**45d** はマウスの PCP 誘発過活動モデルや Y 字型迷路試験にて有意な改善作用を示し、カタレプシーを引き起こさないことが確認できた。これらの結果より、化合物**45d** は統合失調症治療薬として有望な化合物であると考え (Figure 13)。

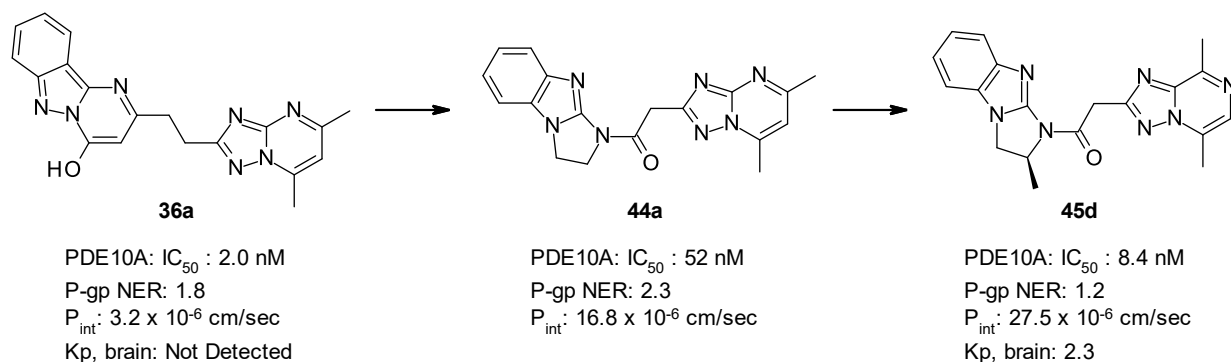


Figure 13. 中枢移行性向上を指向した **36a** の構造最適化による **45d** 創出の経緯

結論では、本研究の総括を行う。

本論

第一章 ハイスループットスクリーニングヒット化合物から展開した新規ベンゾイミダゾール誘導体の合成および構造活性相関

第一節 分子設計

PDE10A 阻害剤を取得するために High-throughput screening (HTS) を実施した結果、化合物**1**をヒット化合物として同定した (Figure 14)。化合物の *in vitro* PDE10A 阻害活性は、ヒトリコンビナント PDE10A による cAMP 加水分解反応を50%阻害する化合物濃度を IC₅₀値として算出することにより評価した。化合物**1**の近傍の SAR 探索を行ったところ、ベンゾイミダゾール環上 N-1位にフェニル基を導入することで活性が向上することが分かった。中でも化合物**2a** は**1**に比べ PDE10A 阻害活性が約3倍向上することが明らかとなったため、さらなる阻害活性の向上を目指し、化合物**2a**の構造変換を行うこととした。

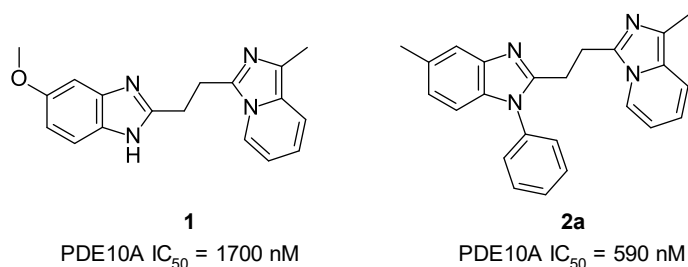
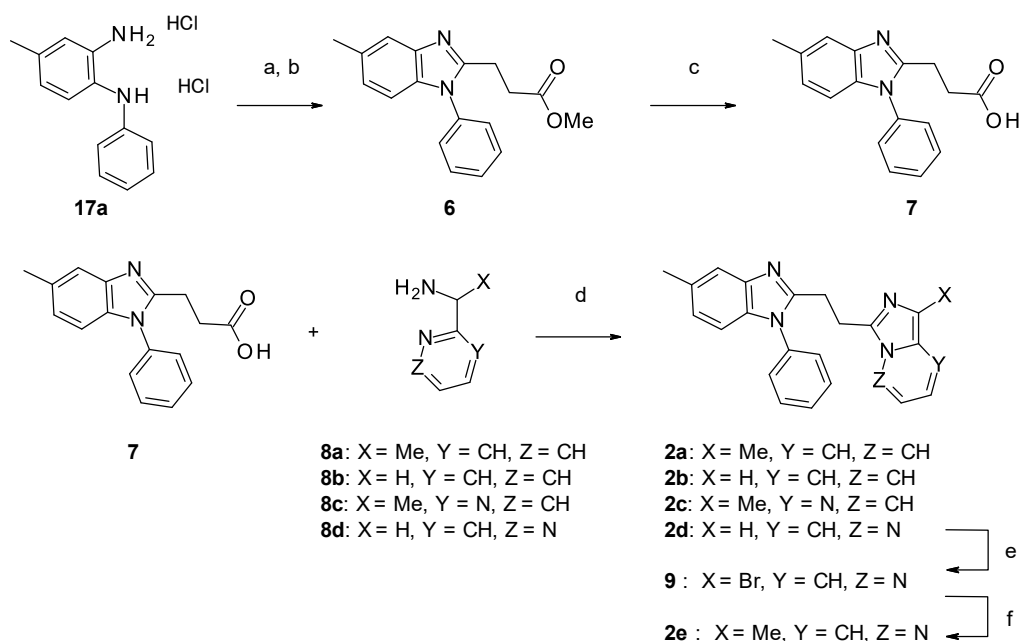


Figure 14. Structures of compounds **1** and **2a**.

第二節 化合物の合成

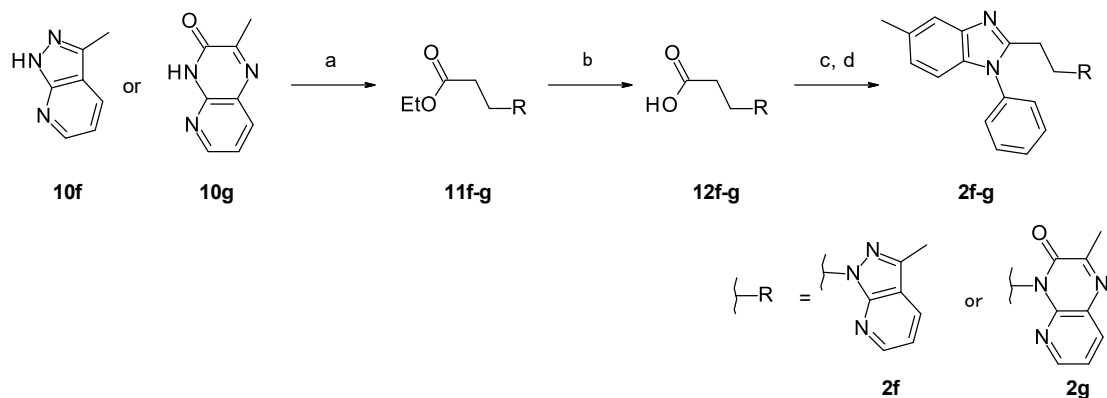
一連の化合物は以下に示す方法を用いて合成した。イミダゾピリダジン誘導体**2a-e**の合成法を Scheme 1 に示す。フェニレンジアミン誘導体**17a** (合成法は後述)とこはく酸モノメチルとの縮合、続く酢酸中での環化反応によりベンゾイミダゾール体**6**を得た。化合物**6**のメチルエステル部の加水分解によりカルボン酸**7**を合成した。酢酸エチル中プロピルホスホン酸無水物 (T3P)⁴²を用いて化合物**7**とヘテロアリアルール**8a-d**の縮合反応⁴³を行い、環化体**2a-d**を得た。さらに *N*-ブロモスクシンイミド (NBS) を用

いた化合物**2d** のプロモ化によりプロモ体**9**を得たのち、トリメチルボロキシンのとの鈴木-宮浦カップリングを行うことで、メチル体**2e** を合成した。



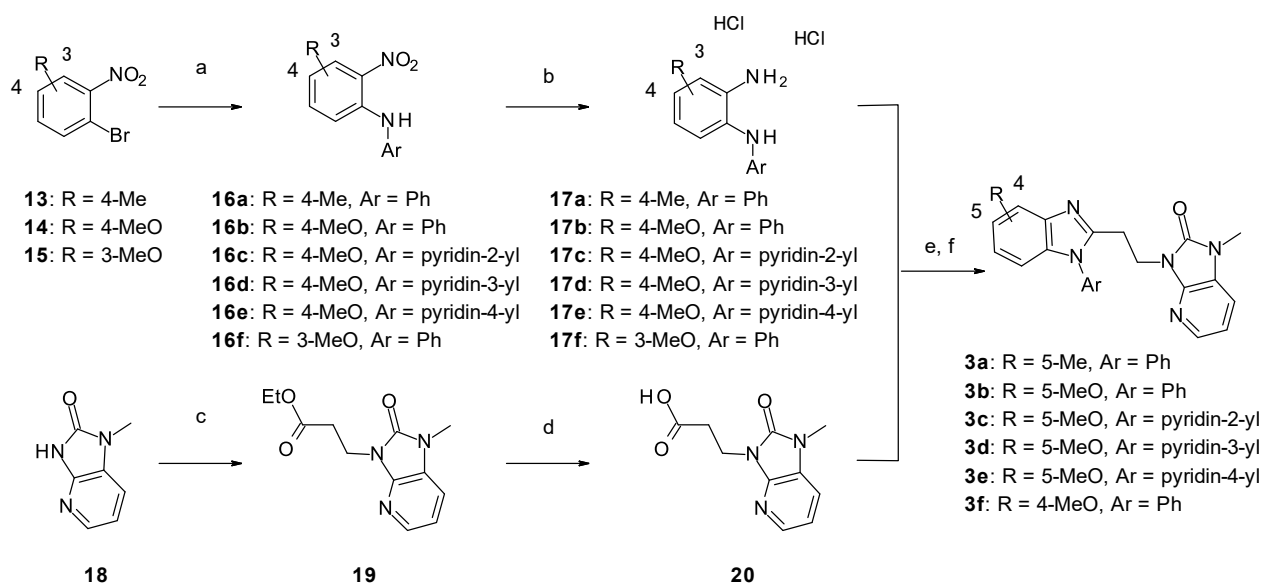
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) mono-methyl succinate, HATU, DIPEA, CH₂Cl₂; (b) AcOH, 96% (2 steps); (c) *aq.* NaOH, MeOH, 81%; (d) T3P, EtOAc, 33–82%; (e) *N*-bromosuccinimide, CH₃CN, CH₂Cl₂, 81%; (f) trimethylboroxine, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, K₂CO₃, 1,4-dioxane, 35%.

次に、化合物**2f**, **2g** の合成法を Scheme 2 に示す。まず、**10f**⁴⁴, **10g**⁴⁵ のアクリル酸エチルへのマイケル付加反応によりエステル体**11f**, **11g** とし、続く加水分解反応によりカルボン酸体**12f**, **12g** とした。次いで**12f**, **12g** とフェニレンジアミン類縁体**17a** とのアミド化反応、続く酢酸中での環化反応⁴⁶により、目的物**2f**, **2g** を得た。



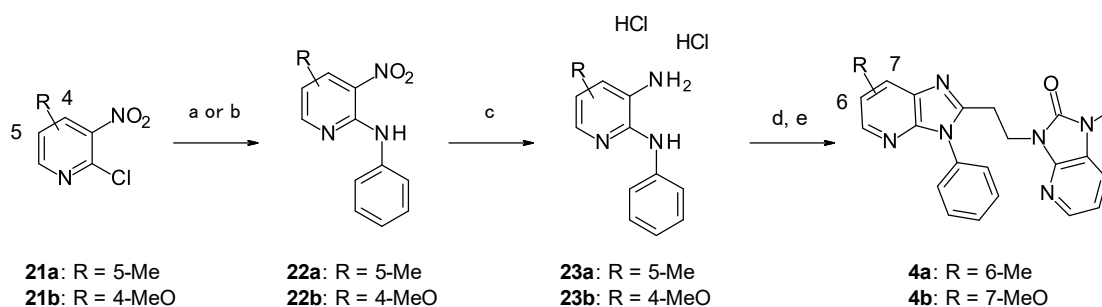
Scheme 2. Reagents and conditions: (a) ethyl acrylate, DBU, THF, 28–71%; (b) *aq.* NaOH, EtOH, 79–89%; (c) **17a**, HATU, DIPEA, CH₂Cl₂; (d) AcOH, 77–91% (2 steps).

一連のイミダゾ[4,5-*b*]ピリジン-2-オン誘導体は以下に示す方法を用いて合成した。化合物**3a-f**の合成法を Scheme 3 に示す。まず、市販のプロモニトロベンゼン体**13-15**と芳香族アミンとの Buchwald-Hartwig アミノ化反応⁴⁷により、ニトロアニリン誘導体**16a-f**を得た。化合物**16a-f**の触媒的水素添加反応によりフェニレンジアミン誘導体**17a-f**を合成した。一方、**18**⁴⁸のアクリル酸エチルへのマイケル付加反応により**19**とした後、加水分解反応により化合物**20**とした。得られたフェニレンジアミン体**17a-f**とカルボン酸**20**とのアミド化反応の後に、酢酸中での環化反応を行うことで目的物**3a-f**を合成した。



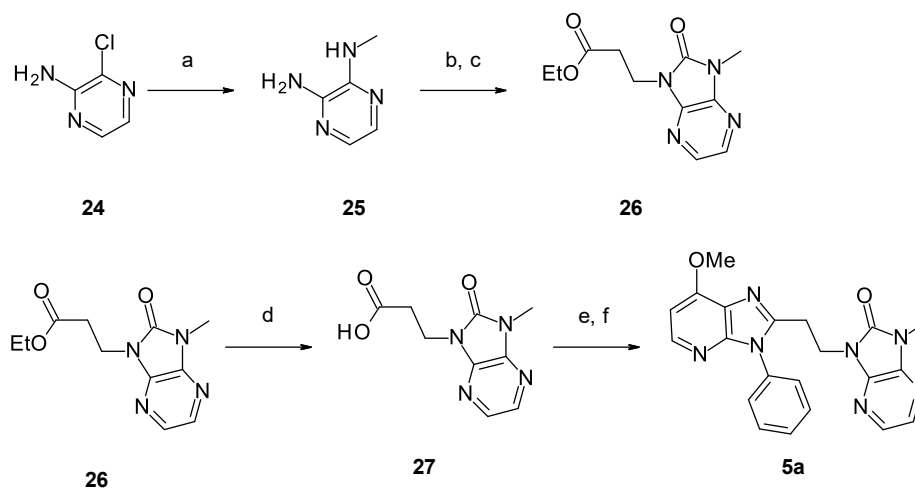
Scheme 3. Reagents and conditions: (a) Ar-NH₂, Pd₂(dba)₃, BINAP, Cs₂CO₃, toluene, 33–97%; (b) H₂, Pd(OH)₂-C, EtOH, 14–79%; (c) ethyl acrylate, DBU, THF, 65%; (d) aq. NaOH, EtOH, 99%; (e) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂; (f) AcOH, 21–99% (2 steps).

次にアザベンゾイミダゾール誘導体**4a, 4b**の合成法を Scheme 4 に示す。2-クロロピリジン体**21a**と過剰量のアニリンとをマイクロウェーブ照射下で反応させることにより、2-アミノピリジン体**22a**を合成した⁴⁹。一方、2-クロロピリジン体**21b**とアニリンのカップリング反応により2-アミノピリジン体**22b**を得た。2-アミノ-3-ニトロピリジン誘導体**22a, 22b**を触媒的水素添加反応により**23a, 23b**とした後、カルボン酸**20**との縮合および環化反応により、目的物**4a, 4b**を合成した。



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) aniline, 47%; (b) aniline, Pd₂(dba)₃, BINAP, Cs₂CO₃, toluene, 74%; (c) H₂, Pd-C, EtOH, 23–98%; (d) **20**, HATU, DIPEA, CH₂Cl₂; (e) AcOH, 63–72% (2 steps).

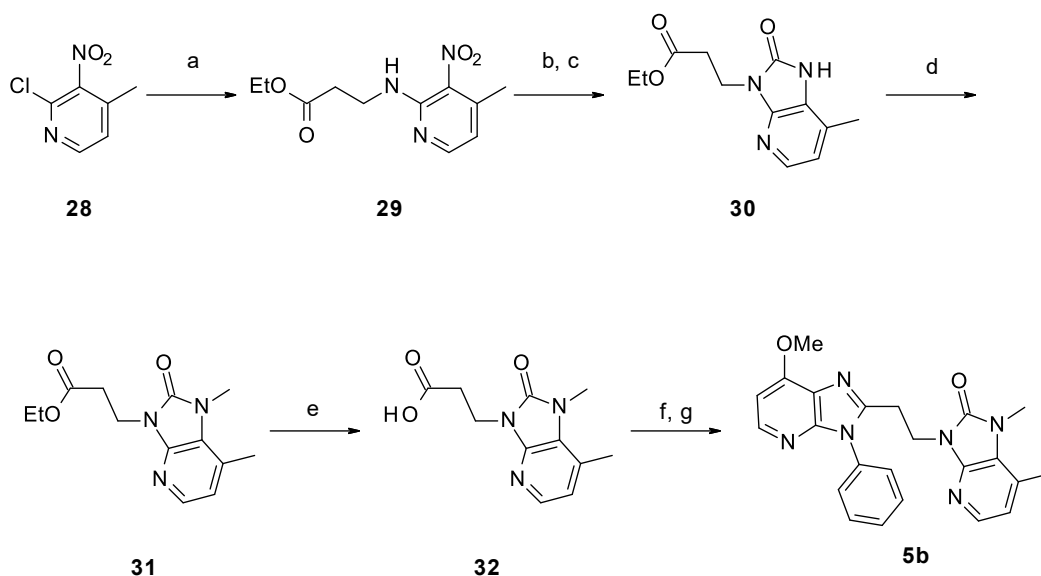
イミダゾ[4,5-*b*]ピラジン-2-オン誘導体**5a**の合成法を Scheme 5 に示す。まず、3-クロロピラジン-2-アミン (**24**) とメチルアミンを反応させ、*N*-メチルピラジン-2,3-ジアミン (**25**) を得た⁵⁰。次いで、**25**を1,1'-カルボニルジイミダゾール (CDI) と反応させた⁵¹後、アクリル酸エチルへのマイケル付加反応によりエステル体**26**を得た。化合物**26**の加水分解の後、ジアミノピリジン体**23b**とのアミド化反応、続く環化反応により目的物**5a**を合成した。



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) methylamine, CuSO₄, 80%; (b) CDI, THF; (c) ethyl acrylate, DBU, MeCN, 76% (2 steps); (d) *aq.* NaOH, EtOH, 89%; (e) **23b**, HATU, DIPEA, CH₂Cl₂; (f) AcOH, 76% (2 steps).

イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン-2-オン誘導体**5b**の合成法を Scheme 6 に示す。市販の2-クロロ-4-メチル-3-ニトロピラジン (**28**) へのβ-アラニンエチルエステルの置換反応により3-ニトロピラジン-2-アミン体**29**を得た。ニトロ体**29**の触媒的水素添加反応と、続く CDI との反応によりイミダゾピリジン体**30**へと変換し、さらにメチル化反応により**31**を得た。化合物**31**の加水分解反応によりカルボン酸**32**を得、ジアミノピリ

ジン**23b** とのアミド化反応と環化反応を行うことにより、目的物**5b** を合成した。



Scheme 6. Reagents and conditions: (a) β -alanine ethyl ester hydrochloride, Et_3N , EtOH , 82%; (b) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$, EtOH ; (c) CDI, THF , 44% (2 steps); (d) MeI , Cs_2CO_3 , DMF , 99%; (e) *aq.* NaOH , EtOH , 85%; (f) **23b**, HATU, DIPEA, CH_2Cl_2 ; (g) AcOH , 68% (2 steps).

第三節 PDE10A 阻害活性および代謝安定性の評価結果ならびに考察

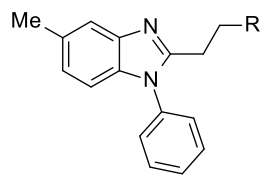
序論で述べたように、過去の文献情報⁵²から、化合物**2a** のベンゾイミダゾール環の3位窒素原子が PDE10A タンパクの Tyr693と、イミダゾピリジン環の1位窒素原子が Gln726と相互作用すると推察された。ベンゾイミダゾール環は selectivity pocket を占有しており、他の PDE サブタイプとの選択性発現に重要な構造であると推測したため、まずは *in vitro* PDE10A 阻害活性の向上を目的とし、化合物**2a** のイミダゾピリジン部の変換を行うこととした。

まずイミダゾピリジン部の置換基の変換及び窒素原子の位置や数の変換を行った結果を Table 3に示す。1位 Me 基を除去した**2b** は PDE10A 阻害活性が大幅に減弱したことから、イミダゾピリジン環上置換基が阻害活性発現に重要であることが分かった。イミダゾピリジン環上の電子状態の変化が Gln726との相互作用の強さに影響を与える可能性を考え、窒素原子を環内に追加した**2c** および**2e** を合成した。いずれも PDE10A 阻害活性は向上したが、**2c** は**2a** に比べ約3倍の活性向上に留まった一方、**2e** の PDE10A

阻害活性は60倍程度増強した。この活性の違いを明らかにすべく、**2c** および**2e** の類縁体である**2d** と PDE10A タンパクとの X 線共結晶構造解析を行った (Figure 15, 16)。その結果、予想通りベンゾイミダゾール環の3位窒素原子が Tyr693と水素結合していることが判明した。さらに、**2c** および**2d** の右側環構造と PDE10A の Phe729との間に π - π 相互作用が、Ile692との間に CH- π 相互作用が認められ、**2c** と**2d** の PDE10A 阻害作用に貢献している可能性が示された。興味深いことに、**2c** と**2d** の Gln726に対する結合様式が異なっており、**2c** ではイミダゾピリミジン環上の7位窒素原子が Gln726と水素結合する一方、**2d** ではイミダゾピリダジン環上1位窒素原子が相互作用することが明らかとなった。この結合様式の違いについて明確な理由は不明であるが、**2d** の結合様式が、PDE10A の Gln726との強力な水素結合形成に好ましい、あるいは catalytic pocket 内の空間を良好に占有するという可能性が考えられる。

化合物**2e** は強力な PDE10A 阻害活性を示したが、ヒト肝ミクロソーム (HLM) 中での固有クリアランス (hCL_{ini}) は大きな値を示した。代謝安定性と脂溶性に相関があることが知られている⁵³。PDE10A に対して化合物**2e** と同様の結合様式を取ることで高い阻害活性を示すという推察を元に、イミダゾピリダジン環上1位窒素原子を固定したまま脂溶性が低減した別の母核構造への変換を行い、代謝安定性の改善を目指すこととした。化合物**2g** は**2e** に比べ PDE10A 阻害活性が1/3程度減弱したものの、**2f** および**3a** は保持した。中でもイミダゾピリジノン誘導体**3a** は HLM 中での代謝安定性の改善が見られた。

Table 3. PDE10A inhibitory activity and metabolic stability of heterocycles (right)



Compds	R	PDE10A IC ₅₀ (nM)	hCL _{int} (mL/min/kg)	logD _{7.4}
2a		590	>1000	NT ^a
2b		6800	NT ^a	NT ^a
2c		210	>1000	NT ^a
2d		92	>1000	4.5
2e		9.1	>1000	5.0
2f		8.3	910	4.9
3a		9.2	330	3.6
2g		28	>1000	4.4

^a Not tested

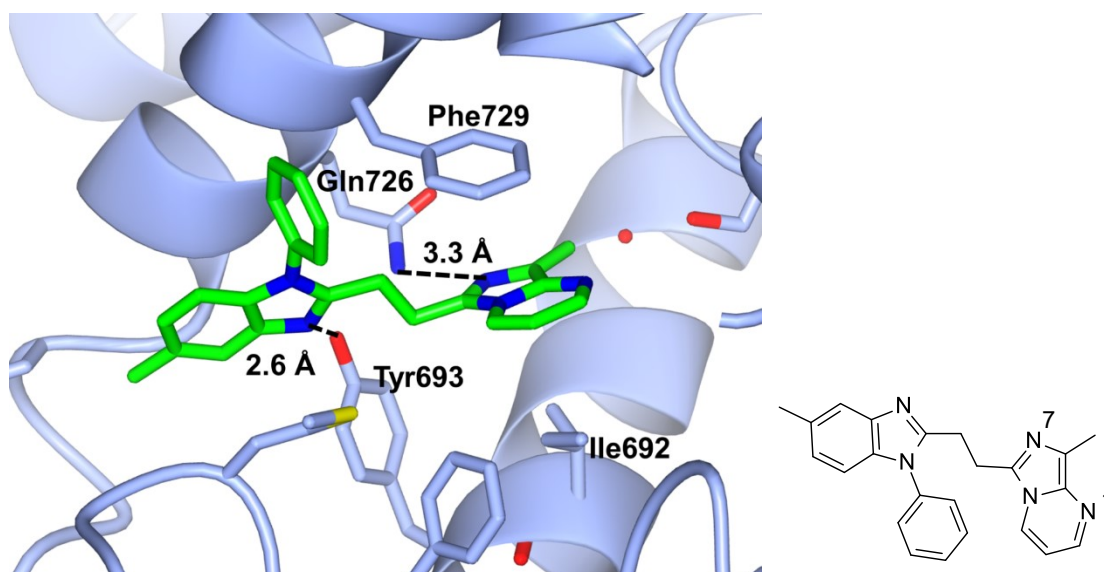


Figure 15. Crystal structure of **2c** (green) bound to PDE10A (PDB code: 3WS8)

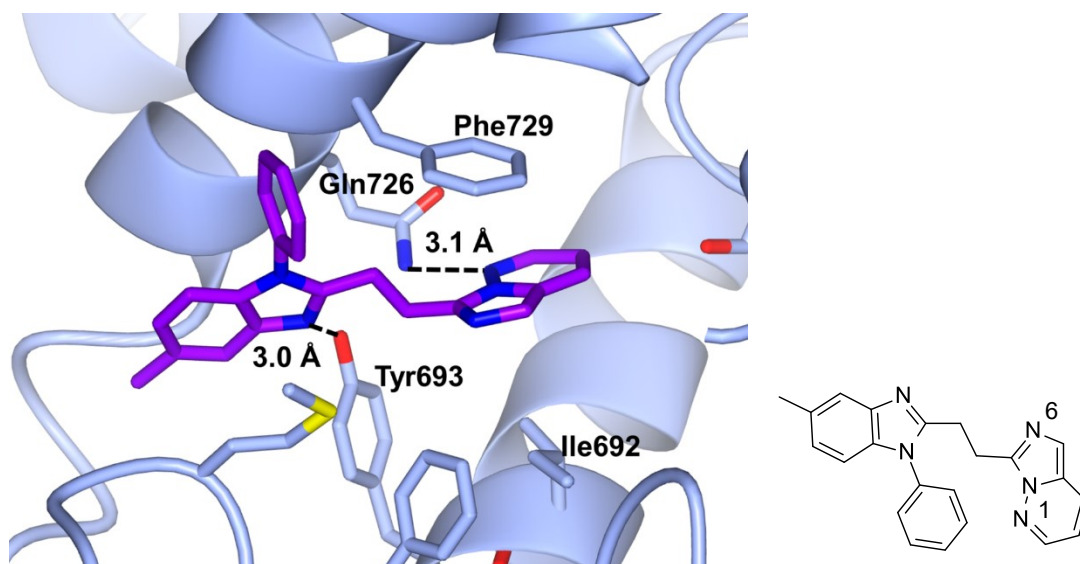
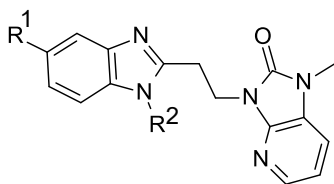


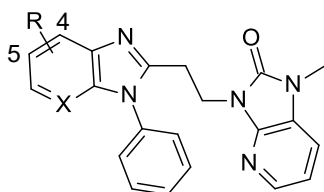
Figure 16. Crystal structure of **2d** (purple) bound to PDE10A (PDB code: 3WS9)

化合物**3a**の代謝安定性をさらに向上するため、ベンゾイミダゾール環上の置換基変換を行った (Table 4)。ベンゾイミダゾール環上5位置換基をメトキシ基に変換した**3b**では代謝安定性は**3a**と同等であったが、PDE10A 阻害活性がわずかに向上した。化合物**3b**の1位フェニル環をピリジン環へ変換した**3c**および**3d**は脂溶性が低減したにもかかわらず、代謝安定性改善への効果を示さなかった。**3e**は代謝安定性が改善したものの PDE10A 阻害活性が減弱したことから、1位の変換は許容されないと考えた。

Table 4. PDE10A inhibitory activity and metabolic stability for *N*-1 ring

Compds	R ¹	R ²	PDE10A IC ₅₀ (nM)	hCL _{int} (mL/min/kg)	logD _{7.4}
3a	Me	Ph	9.2	330	3.6
3b	MeO	Ph	6.3	320	3.6
3c	MeO	pyridin-2-yl	220	310	1.8
3d	MeO	pyridin-3-yl	37	310	1.4
3e	MeO	Pyridin-4-yl	97	180	1.5

続いてベンゾイミダゾール環上への窒素原子導入を行った (Table 5)。5位にメチル基とベンゾイミダゾール環上7位に窒素原子を有する**4a**では阻害活性が大幅に減弱し、代謝安定性も改善しなかった。一方、**3b**のメトキシ基の置換位置を5位から4位に変換した**3f**では**3b**と同程度の阻害活性を示した。さらにベンゾイミダゾール環上7位に窒素原子を導入した**4b**では IC₅₀ = 28nM を示し、**3b**と比較して代謝安定性が改善する結果となった。これは**4b**の脂溶性の低さが代謝安定性の改善に寄与したと考える。

Table 5. PDE10A inhibitory activity and metabolic stability for benzimidazole

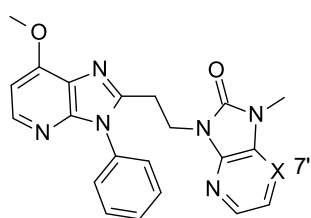
Compds	R	X	PDE10A IC ₅₀ (nM)	hCL _{int} (mL/min/kg)	logD _{7.4}
3b	5-MeO	CH	6.3	320	3.6
4a	5-Me	N	200	480	2.0
3f	4-MeO	CH	7.3	460	2.8
4b	4-MeO	N	28	130	1.6

第四節 PDE10A 阻害活性および CYP3A4 阻害活性の評価結果

これまでに述べた化合物の中で、**4b** は HLM 中で最も安定で且つ良好な PDE10A 阻害活性を示した。しかしながら **4b** は強い CYP3A4 阻害作用を有することが判明した (Table 6)。CYP3A4 は上市されている薬の半数以上の代謝に関わっているとされているため、CYP3A4 の阻害は臨床現場で薬物-薬物相互作用を引き起こす懸念がある⁵⁴。

化合物の CYP3A4阻害活性は、化合物 (5 μ M) と HLM を30分間プレインキュベーションした後、CYP3A4の基質であるミダゾラムを用いて CYP3A4の残存活性を測定することにより評価した。化合物 **4b** に含まれるピリジン環のような塩基性ヘテロ芳香環は CYP のへムに配位することができ、CYP 阻害を引き起こすことが知られている⁵⁵。よって、化合物**4b** のピリジン環上に立体障害となる置換基導入や、ピリジン環から他のヘテロ環への変換により、化合物が CYP のへムに配位するのを妨げ CYP3A4阻害作用の減弱が達成できると考えた。イミダゾピリジノン環上7'位に窒素原子を導入したところ、化合物 **5a** は CYP3A4阻害作用が大きく低減することが分かったが、PDE10A 阻害活性も減弱する結果となった。これは7'位窒素原子導入により、4'位ピリジン環上窒素原子の塩基性が低下し、配位能が減弱した可能性が考えられる。この結果から、イミダゾピリジノン環の窒素原子が CYP3A4阻害の主要因であると同時に PDE10A 阻害活性にも寄与していることが示された。一方、7'位にメチル基を導入した化合物**5b** では CYP3A4阻害作用が低減し、PDE10A 阻害活性を約3倍向上させる結果となった。

Table 6. PDE10A inhibitory activity, metabolic stability and CYP3A4 inhibition for imidazopyridinone



Compds	X	PDE10A IC ₅₀ (nM)	hCL _{int} (mL/min/kg)	CYP3A4 inhibition ^a (% residual activity)	logD _{7.4}
4b	CH	28	130	20	1.6
5a	N	111	100	91	1.3
5b	CMe	9.5	260	73	1.9

^a Expressed as percent midazolam activity remaining following 30 min of pre-incubation with compound (5 μ M).

第五節 小括

第一章では、HTS ライブラリーから見出した PDE10A 阻害活性を有するイミダゾ[1,5-*a*]ピリジン誘導体 **1** の *in vitro* 活性の向上を目的に、構造変換を行った(Figure 17)。その結果、イミダゾ[1,5-*a*]ピリジンからイミダゾ[4,5-*b*]ピリジノンへの変換及びベンゾイミダゾールへの置換基導入により阻害活性が大きく向上した化合物 **3a** を見出した。化合物 **3a** の代謝安定性を改善すべく合成展開を実施した結果、ベンゾイミダゾール環上 7 位への窒素原子導入および 5 位メチル基から 4 位メトキシ基への変換により、代謝安定性が改善した化合物 **4b** を見出した。さらに、化合物 **4b** の CYP3A4 阻害活性の課題を回避すべく構造活性相関研究を実施した。その結果、イミダゾ[4,5-*b*]ピリジノン環 7' 位へのメチル基導入により、*in vitro* 活性が向上し、CYP3A4 阻害活性が低減した化合物 **5b** を創出した。

しかしながら、化合物 **5b** の代謝安定性と CYP3A4 阻害活性の値は創薬リード化合物としては十分でなく、さらに有望な化合物の探索が必要なため、続いて FBDD を活用した手法を検討することにした。

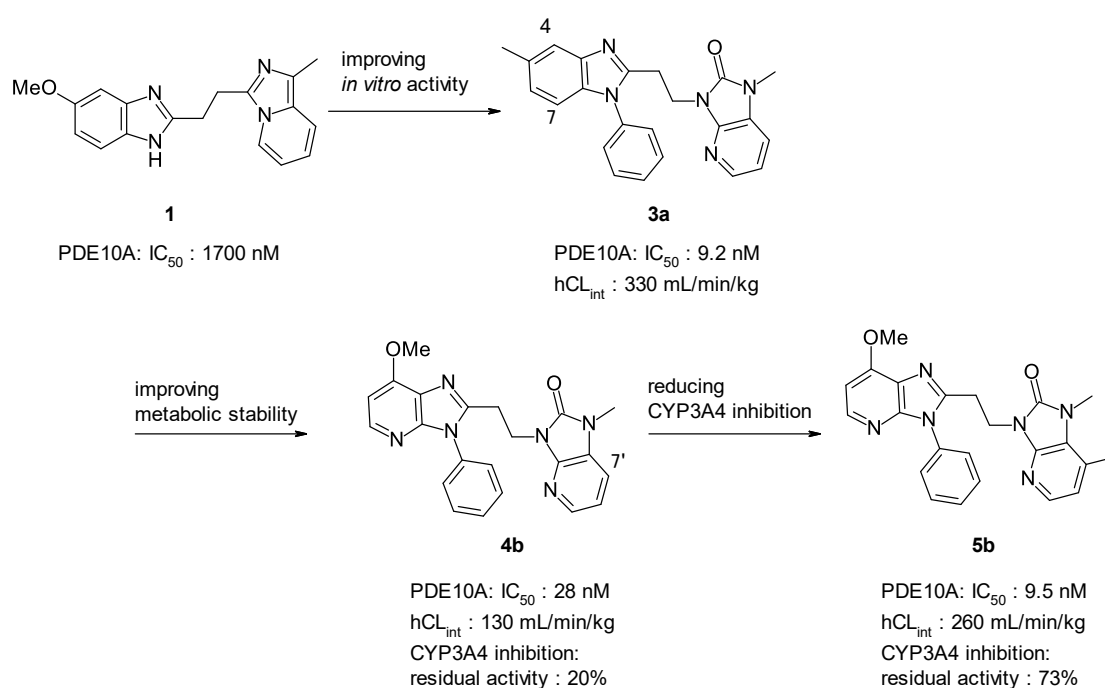


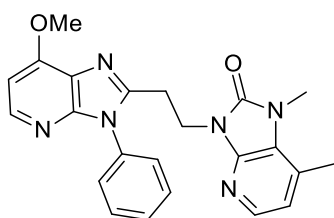
Figure 17. HTS ヒット化合物**1**から化合物**5b**創出の概要

第二章 フラグメントヒット化合物から展開した新規ピリミド[1,2-*b*]インダゾール誘導体の合成および構造活性相関

第一節 分子設計

第一章第五節で述べた通り、HTS ヒット化合物からの合成展開により見出した新規 PDE10A 阻害剤**5b**の代謝安定性と CYP3A4阻害活性の値は創薬リード化合物として不十分であった(Figure 18)。更に種々の構造変換を試みたが、それらの改善は困難であった。

HTS ヒットからの展開は困難であったが、PDE10A タンパクは結晶構造が明らかとなっていることから、化合物**5b**とは異なる母核構造の取得を目指して FBDD を試みることにした。序論第三節で述べた通り、フラグメントヒットは HTS ヒットに比べ低分子量であり、高いリガンド効率を有する。PDE10A タンパクと効率的な相互作用をとるように合成展開を進めることで、HTS ヒットからの展開に比べてより脂溶性が低く、物理学的性質の整ったリード化合物の創出が可能になると考えた。そこで、高い PDE10A 阻害活性と良好な ADME プロファイルを両立できる構造を見出すべく、フラグメントヒットから X 線結晶構造解析を用いた合成展開を開始した。



PDE10A IC₅₀: 9.5 nM

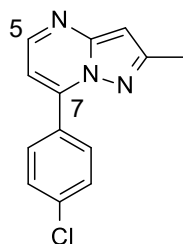
CYP3A4 inhibition; residual activity: 73%

hCLint: 260 mL/min/kg

Figure 18. Structure of compound **5b**.

フラグメントライブラリーと PDE10A の X 線結晶構造解析により、catalytic pocket を占有するピラゾロ[1,5-*a*]ピリミジン誘導体 **33**を見出した(Figure 19, 20)。本化合物は良好なりガンド効率を示していたため (PEI³⁸=0.39)、フラグメントヒットとして化合物 **33** から合成展開を進めることにした。PDE10A

と化合物 **33** との X 線結晶構造解析から、ピラゾロピリミジン環の 4 位窒素原子が Gln726 と水素結合をしていること、またその一方で、化合物 **33** は selectivity pocket を占有しておらず、選択性の向上に必要な Tyr693 と相互作用していないことが明らかとなった。



PDE10A 95.9% inhibition at 10 μ M

MW = 243.69

PEI = 0.39

Figure 19. Structure of compound **33**.

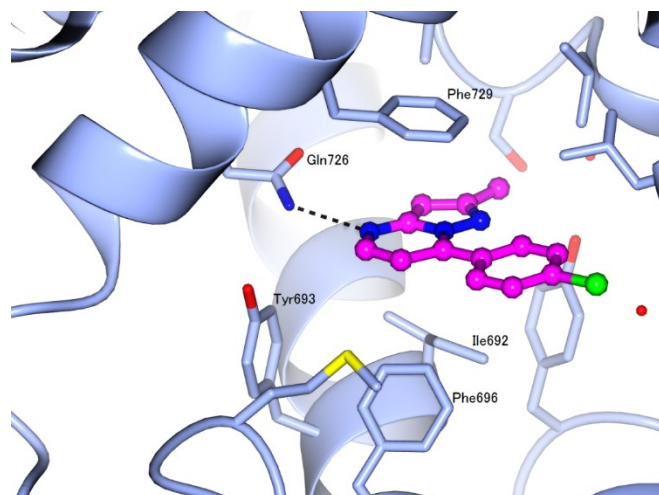


Figure 20. Crystal structure of **33** (pink) bound to PDE10A (PDB code: 5XUJ).

X 線構造解析の結果から、Selectivity pocket 内の Tyr693 と水素結合を形成することにより PDE10A 阻害活性の向上が図れる^{18,56}と考へ、fragment-growing の手法を用いて、隣接する selectivity pocket に向かってピラゾロピリミジン環の 5 位からヘテロ芳香環を伸張することにした (Figure 21)。Tyr693 と水素結合をし、阻害活性が向上した化合物を見出す過程において、化合物の分子量増加とそれに伴う脂溶性の向上が見込まれた。過度な脂溶性の向上は ADME プロファイルに対して悪影響をもたらすことがある。X 線結晶構造解析から、化合物 **33** の 4-クロロフェニル基は溶媒側に面しており、薬効に寄与するような相互作用をとっていないことから、7 位の置換基には 4-クロロフェニル基の代わりに、脂溶性が低く分子量が低減した水酸基を導入することにした。また、水酸基に変更することで、合成容易な共通中間体から一挙に誘導体合成が可能になり、化合物の迅速な最適化が行えるようになることを考えた。

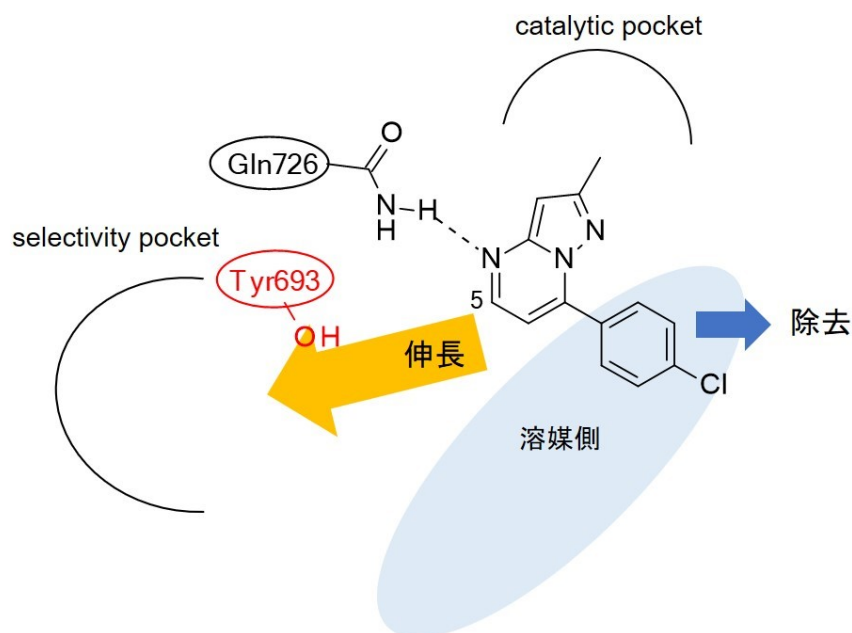
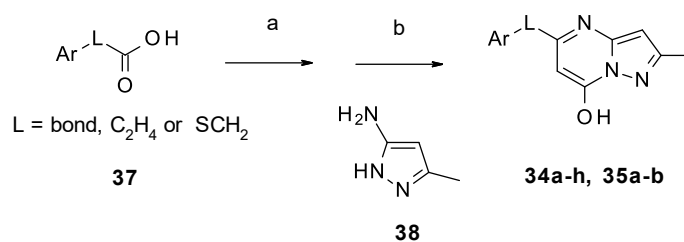


Figure 21. Schematic binding mode of compound **33** and optimization strategies.

第二節 化合物の合成

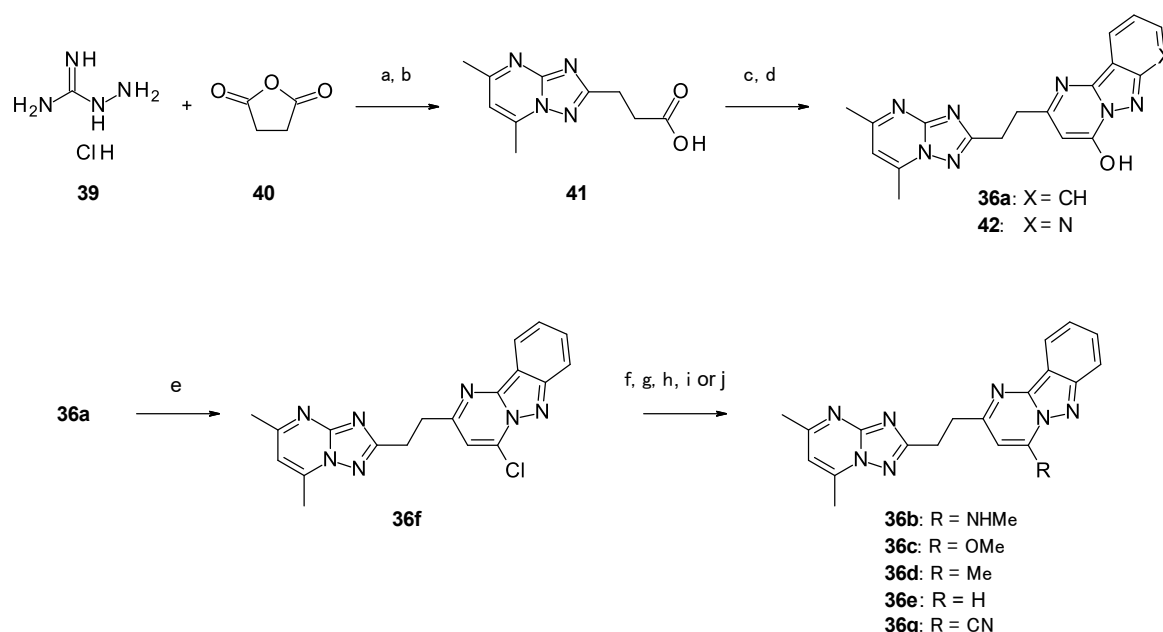
第二章に記した種々のアリール誘導体は以下に示す方法で合成した。ピラゾロ[1,5-*a*]ピリミジン-7-オール誘導体**34a-h**, **35a-b**は Scheme 7に示す方法により合成した。マロン酸モノエチルカリウムと CDI、塩化マグネシウム存在下、市販のカルボン酸**37**を β -ケトエステル化した⁵⁷後、ピラゾールアミン誘導体**38**と酢酸中で反応させることにより、目的物**34a-h**, **35a-b**を得た⁵⁸。



Scheme 7. Reagents and conditions: (a) monoethyl potassium malonate, CDI, MgCl₂, NEt₃, THF; (b) AcOH, 1,4-dioxane, 11–76% (2 steps).

Scheme 8に化合物**36a-g**の合成法を示す。アミノグアニジン塩酸塩**39**と無水コハク酸(**40**)を縮合環化させ⁵⁸、続くアセチルアセトンとの縮合反応⁶⁰により、カルボン酸誘導体**41**を得た。さらに Scheme 7と同

様の方法を用いて化合物**41**と1*H*-インダゾール-3-アミンもしくは1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-3-アミンと反応させることにより、目的物**36a**と**42**を得た。化合物**36a**とオキシ塩化リンを反応させることにより目的物**36f**を合成し、続くメチルアミンやナトリウムメトキシド、シアン化カリウムとの芳香族求核置換反応を行うことで目的物**36b**, **36c**, **36g**をそれぞれ得た。また、**36f**とトリメチルボロキシンとの鈴木-宮浦カップリングにより化合物**36d**を、加水素分解反応により脱クロロ体**36e**をそれぞれ得た。



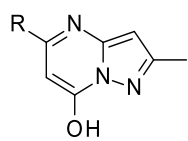
Scheme 8. Reagents and conditions: (a) *aq.* NaOH; (b) acetylacetone, AcOH, EtOH, 68% (2 steps); (c) monoethyl potassium malonate, CDI, MgCl₂, NEt₃, THF; (d) 1*H*-indazol-3-amine or 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-3-amine, AcOH, 1,4-dioxane, 11% (2 steps); (e) POCl₃, 38%; (f) methylamine, THF, 97%; (g) sodium methoxide, MeOH, 82%; (h) trimethylboroxine, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, K₂CO₃, 1,4-dioxane, 34%; (i) H₂, Pd-C, EtOH, 3% ; (j) KCN, DABCO, 1,4-dioxane, H₂O, 37%.

第三節 フラグメントヒットからの合成展開結果ならびに考察

合成した化合物の *in vitro* PDE10A 阻害活性は、化合物濃度4 μM でのヒトリコンビナント PDE10A による cAMP 加水分解反応の阻害率もしくは cAMP 加水分解反応を50%阻害する化合物濃度を IC₅₀値として算出することにより評価した。

Table 7に示すように、化合物 **33** のピラゾロピリミジン環の 5 位に対し、selectivity pocket 内の Tyr693 と相互作用し得るような窒素原子を有する様々なヘテロ芳香環の導入を行った。阻害活性の高い母核構造を効率的に見出すべく、まずはコンビナトリアル合成を用いて合成展開を行うことにした。ピラゾロピリミジン環とキノリン環がエチレンリンカーを介して結合した化合物 **34a** が強い阻害活性を示すことが分かった。一方、キノリン環が直接結合した **34b** やメチルチオエーテルリンカーを介した **34c** では阻害活性が低減することから、エチレンリンカーにおいてキノリンの窒素原子が Tyr693 と相互作用するのに適切な位置に配置されていると考えられた。ピリジルエチル誘導体 **34d** ではキノリン誘導体 **34a** よりも低い阻害活性を示しており¹⁹、キノリンのフェニル部分は阻害活性の発現に必要であることが示された。他のヘテロ芳香環では、ベンゾイミダゾール誘導体 **34h** は活性が減弱したものの、トリアゾロピリミジン誘導体 **34e** やイミダゾピリジン誘導体 **34f**、イミダゾピリミジン誘導体 **34g** がいずれも中程度から高い PDE10A 阻害活性を示した。特に、トリアゾロピリミジン誘導体 **34e** はキノリン誘導体 **34a** と同程度の阻害活性を示す一方で **34a** よりも脂溶性が低い(log*D*_{7.4} 値; **34e** = 0.3, **34a** = 2.5)ことから、**34e** から活性の向上を目指し、さらなる合成展開を行うこととした。

トリアゾロピリミジン誘導体 **34e** と PDE10A タンパクとの X線結晶構造解析から、トリアゾロピリミジン環が selectivity pocket を想定通り占有しており、トリアゾロピリミジン環の 4 位窒素原子が Tyr693 と水素結合を形成していることが確認できた(Figure 22)。

Table 7. PDE10A inhibitory activity of heterocycles

Comps	R	PDE10A %inhibition at 4 μ M
34a		97.5
34b		12.3
34c		57.9
34d		11.2
34e		97.3
34f		89.6
34g		88.6
34h		47.3

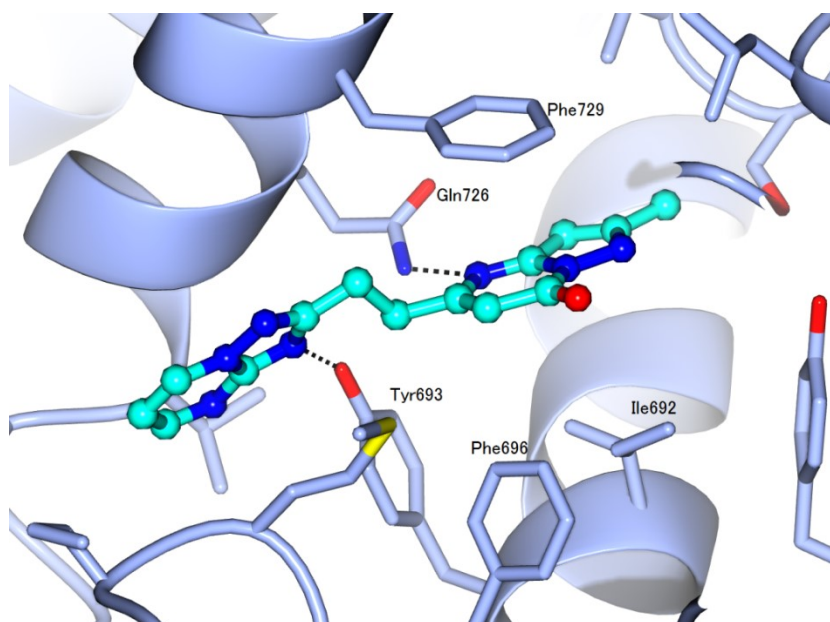
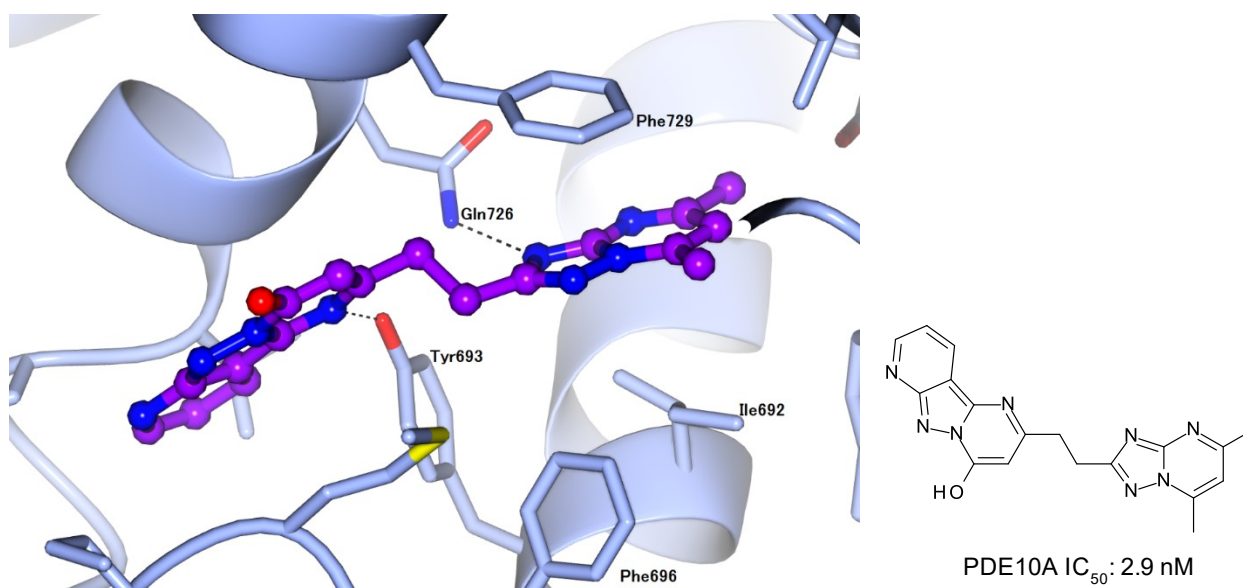


Figure 22. Crystal structure of **34e** (cyan) bound to PDE10A (PDB code: 5XUI)

次に、トリアゾロピリミジン環とピラゾロピリミジン環それぞれへの置換基導入を行い、その効果を検証することにした(Table 8)。5,7-ジメチルトリアゾロピリミジン誘導体 **35a** は $IC_{50} = 44$ nM の阻害活性を示したことから、トリアゾロピリミジン環上の5位および7位への置換基導入は立体的に許容されることが分かった。一方、6-メチルトリアゾロピリミジン誘導体 **35b** は **35a** に比べて阻害活性が大幅に低減したため、6位への置換基導入は立体的に許容されないことが示された。驚くべきことに、ピリミド[1,2-*b*]インダゾール誘導体 **36a** は **35a** よりも22倍も強力な阻害活性を示した。化合物 **36a** が高活性を示したことから、化合物 **36a** の類縁体であるピリミドアザインダゾール誘導体 **42** と PDE10A タンパクとの X 線結晶構造解析を行った。その結果、予想に反してピリミドアザインダゾール環上1位窒素原子が Tyr693 と水素結合をとり、トリアゾロピリミジン環上4位窒素原子が Gln726 と水素結合を取ることが分かった (Figure 23)。PDE10A タンパクの占有の形式が予想と左右反転した理由は明らかではないが、化合物 **36a** が PDE10A タンパクのポケットの奥深くまで占有したために阻害活性が向上したと推測している¹⁸。そこで、化合物 **36a** からさらなる最適化を行うこととした。

Table 8. PDE10A inhibitory activity

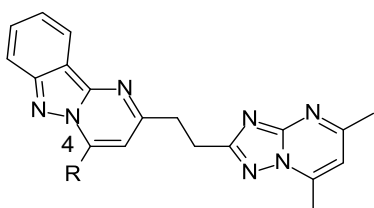
Compds	PDE10A IC ₅₀ (nM)
35a	44
35b	1095
36a	2.0

**Figure 23.** Crystal structure of compound **42** (purple) bound to PDE10A (PDB code: 6KDZ).

序論第二節で述べた通り、中枢移行には水素結合供与基がない化合物が好まれる。そこで、化合物 **36a** のピリミド[1,2-*b*]インダゾール環上の4位水酸基を他の官能基へと変換を試みた(Table 9)。メチルアミノ基 **36b** は水酸基 **36a** と同様に強い阻害活性を示したが、メトキシ基 **36c** やメチル基 **36d**、無置換

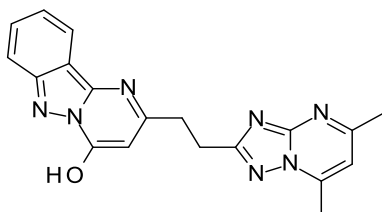
体 **36e** では活性が低下した。さらにクロロ基 **36f** やシアノ基 **36g** ではさらに大幅に阻害活性が減弱する結果となった。4 位水酸基が最も高い阻害活性を示す理由は明らかとなっていないが、4 位置換基が電子供与性基であることが、高い阻害活性を示すために重要なことが推測される。結果として、**36a** を最も強力な PDE10A 阻害剤として見出した。

Table 9. PDE10A inhibitory activity for pyrimidoindazole.



Compds	R	PDE10A IC ₅₀ (nM)
36a	OH	2.0
36b	NHMe	7.8
36c	OMe	30
36d	Me	64
36e	H	78
36f	Cl	221
36g	CN	606

化合物 **36a** の ADME プロファイルを Figure 24 に示す。化合物 **36a** は HLM 中およびマウス肝ミクロソーム(MLM)中で良好な代謝安定性を示し、各種 CYP 阻害作用も弱く、P 糖タンパク質(P-gp)基質性も低いことが明らかとなった。



PDE10A IC₅₀: 2.0 nM

logD_{7.4}: 0.3

CYP inhibition (1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4); residual activity ^a: 109%, 99%, 86%, 95%, 99%, 94%

CL_{int} (mL/min/kg) (human, mouse): No Dep.^b, No Dep.^b

P-gp NER: 1.8

Figure 24. Profiles of compound **36a**.

^a Residual activities of HLM for metabolism of each substrate in the presence of test compounds were determined following pre-incubation for 30 min.

^b No depletion in this condition

第四節 小括

第一章で述べたように、HTS から見出した化合物 **5b** の代謝安定性と CYP3A4 阻害活性の値は十分ではなく、さらなる改善が必要であった。同様の母核からの展開では本課題の改善は困難であると考え、化合物 **5b** とは異なる母核構造の取得を目指し、FBDD に基づいて展開を行った。PDE10A タンパクとの X 線結晶構造解析から得られたフラグメントヒット化合物 **33** に対して、*in vitro* 阻害活性の向上を目的に、その構造変換を行った。PDE10A タンパクの構造情報を参考にして置換基の導入および変換などの構造最適化を実施した結果、強力な *in vitro* PDE10A 阻害活性を有するピリミド[1,2-*b*]インダゾール誘導体 **36a** を見出した。化合物 **36a** は CYP3A4 阻害作用を示さず、良好な代謝安定性を示した (Figure 25)。

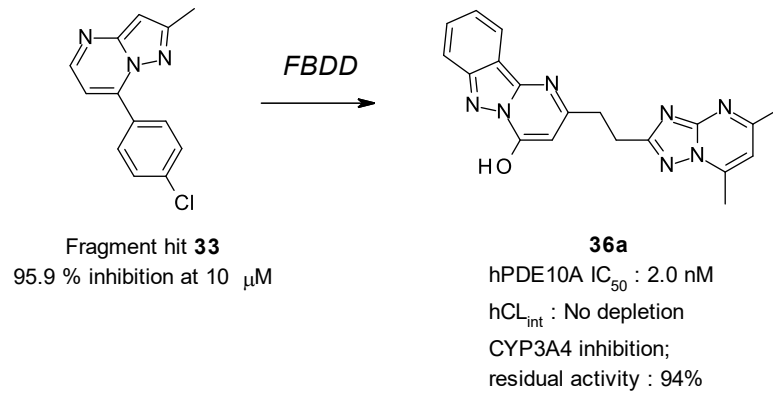


Figure 25. FBDD を活用した**36a** の創製の概要

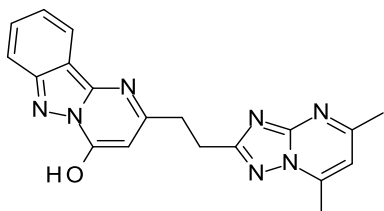
しかしながら、化合物**36a** はマウスの中枢移行性が非常に低く、*in vivo* 試験のツール化合物として適さないことが明らかとなった。そこで第三章ではさらなる構造最適化研究の結果について述べる。

第三章 中枢移行性の向上した新規ベンゾイミダゾール誘導体の合成および構造活性相関

第一節 分子設計

第二章で見出した化合物**36a** (Figure 26) は *in vitro* 評価において強力な PDE10A 阻害活性を示し、代謝安定性や CYP 阻害活性が改善された。しかし、**36a** はマウスの中枢移行性が非常に低く (Table 10)、*in vivo* 試験のツール化合物として適さないことが明らかとなった。化合物**36a** は P-gp 基質性は低いものの (Net Efflux Ratio (NER) = 1.8)、血中-脳間での膜透過性が低いことがわかった ($P_{int} = 3.2 \times 10^{-6}$ cm/sec)。そこで化合物**36a** の膜透過性の低さが低い中枢移行性の原因であると仮説を立て、膜透過性の向上を図ることとした。

膜透過性は脂溶性の高さや水素結合供与基 (Hydrogen bond donors (HBDs)) の数に関連していることが知られている^{35b, 61}。化合物**36a** の水酸基は水素結合供与基であり、水酸基の導入により低脂溶性を示しており、これが化合物**36a** の膜透過性の低さ、ひいては中枢移行性の低さをもたらしたと考えた。しかしながら、第二章で述べた通り化合物**36a** の水酸基は高い PDE10A 阻害活性を示すために重要な官能基であることが分かっている。例えば、水酸基を除去した化合物**36e** では阻害活性が大幅に減弱した (第二章 Table 9)。化合物**36a** の最適化は困難なため、ピリミドインダゾール環以外の新規母核の探索を行い、水酸基を保持せずに高い阻害活性を有し、中枢移行性が改善した PDE10A 阻害剤の創出を目指すこととした。そこでまず、ピリミドインダゾール母核を Tyr693 との水素結合を保つと想定される他のヘテロ環への変換を行い、母核構造の探索を行うことにした。



PDE10A IC₅₀: 2.0 nM

logD_{7.4}: 0.3

P-gp NER: 1.8

P_{int}: 3.2 × 10⁻⁶ cm/sec

Figure 26. Structure of compound **36a**.

Table 10. Plasma and brain concentration of **36a** at 1 h after oral administration to mice

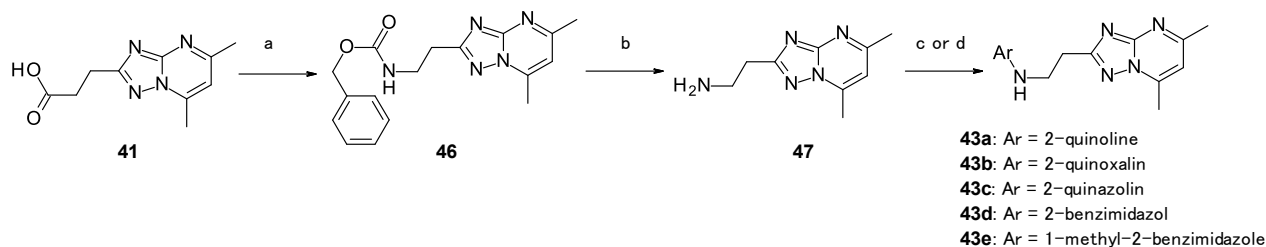
Dose (mg/kg)	Plasma (ng/mL)	Brain (ng/g)	$K_{p, \text{brain}}^a$
0.1	0.59	ND ^b	ND ^b

^a Average value of individual K_p (brain/plasma) (n=3).

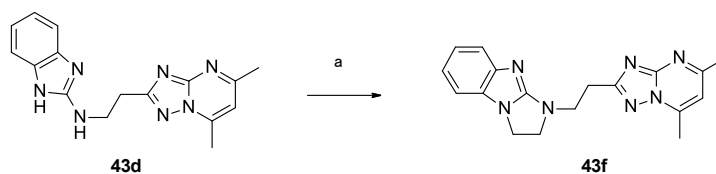
^b Not Detected

第二節 化合物の合成

種々のアリール誘導体は以下に示す方法で合成した。まず[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリミジン誘導体 **43a–e** の合成法を Scheme 9 に示す。3-(5,7-ジメチル[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリミジン-2-イル)プロピオン酸(**41**)の Curtius 転位反応と続くベンジルアルコールの付加反応により、カルバメート **46** を合成した。中間体 **46** の加水素分解反応によりアミン **47** に変換後、種々のアリールクロライドとの Buchwald-Hartwig クロスカップリング反応もしくはイプソ置換反応により目的物 **43a–e** を得た。化合物 **43d** を 1,2-ジブロモエタンでアルキル化することにより目的物 **43f** に誘導した(Scheme 10)。

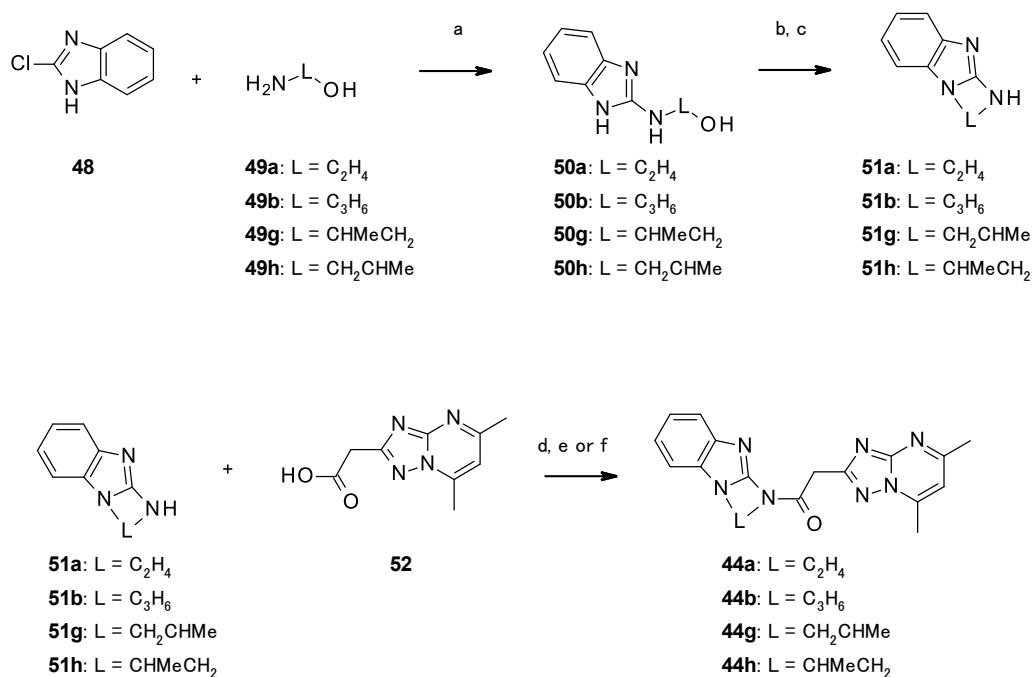


Scheme 9. Reagents and conditions: (a) BnOH, diphenylphosphoryl azide, triethylamine, toluene, 69%; (b) H₂, Pd-C, MeOH, quant.; (c) Ar-Cl, Pd(OAc)₂, (*S*)-1-[(*R*)-2-(dicyclohexylphosphino)ferrocenyl]ethyl-di-*tert*-butylphosphine ((*S*)-(*R*)-JOSIPHOS), *t*-BuONa, DME, 13%; (d) Ar-Cl, NMP, 14–96%.



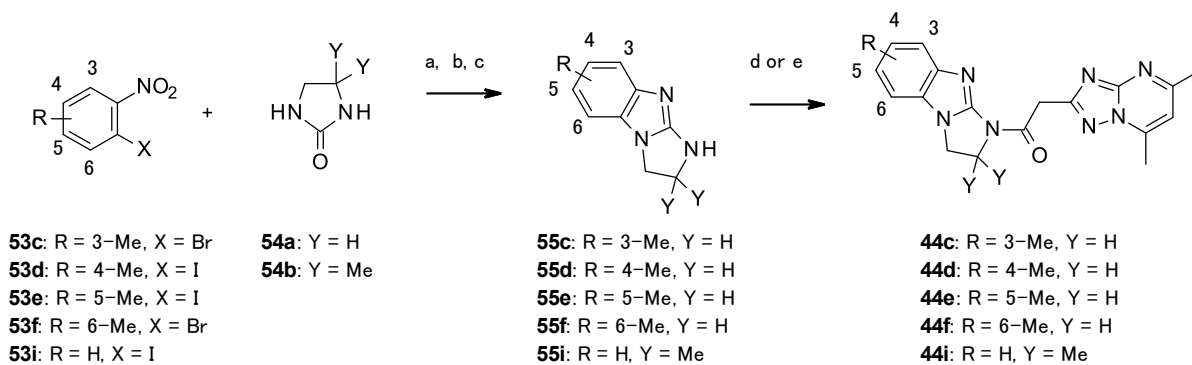
Scheme 10. Reagents and conditions: (a) 1,2-dibromoethane, tetrabutylammonium bromide, aq. NaOH, DCE, 31%.

次に、化合物**44a, b, g, h**の合成法を Scheme 11 に示す。2-クロロ-1*H*-ベンゾイミダゾール(**48**)とアミノアルコール**49a, b, g, h**のイプソ置換反応によりアルコール体**50a, b, g, h**を合成した。塩化チオニルによる中間体**50a, b, g, h**のクロロ化の後、分子内アルキル化反応⁶²により**51a, b, g, h**とし、続く(5,7-ジメチル[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリミジン-2-イル)酢酸 (**52**)との縮合により目的物**44a, b, g, h**を得た。



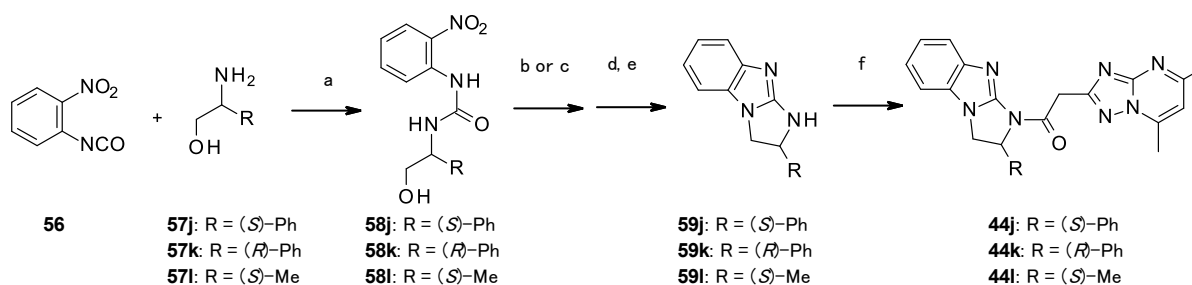
Scheme 11. Reagents and conditions: (a) neat, 24–97%; (b) SOCl₂, DCE; (c) xylene, 14–97% (2 steps); (d) WSC•HCl, HOBT, triethylamine, DMF, 54–58%; (e) WSC•HCl, HOBT, DMF, 44%; (f) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, 59%.

イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾリル誘導体**44c–f, 44i**は Scheme 12 に示す方法で合成した。イミダゾリジノン**54a–b**と2-ハロニトロベンゼン**53c–f, 54i**との Buchwald-Hartwig クロスカップリング反応の後、鉄触媒とヒドラジンをを用いたニトロ基の還元、続くクロロ化により環化体したイミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール誘導体**55c–f, 55i**を得た⁶³。得られたアミン体**55c–f, 55i**とカルボン酸**52**との縮合により、目的物**44c–f, 44i**を合成した。



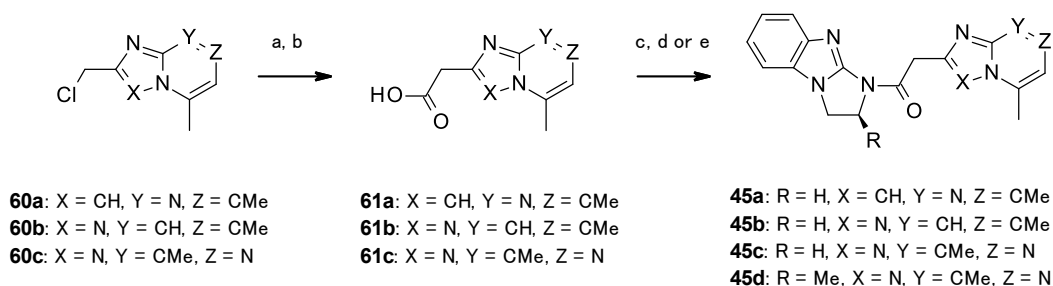
Scheme 12. Reagents and conditions: (a) Pd₂(dba)₃, 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene (Xantphos), Cs₂CO₃, 1,4-dioxane; (b) FeCl₃·6H₂O, N₂H₄·H₂O, activated carbon, EtOH, H₂O; (c) POCl₃, 2.0–63% (3 steps); (d) **52**, WSC·HCl, HOBt, DMF, 41–84%; (e) **52**, HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, 44%.

イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾリル誘導体**44j-1**の合成法を示す(Scheme 13)。アルキルアミン**57j-1**の2ニトロフェニルイソシアネート(**56**)への求核付加反応⁶⁴により、ウレア体**58j-1**へと誘導した。続いて、化合物**58j-1**のニトロ基の還元、続くクロロ化およびキシレン中での加熱還流により、環化体**59j-1**を得た。得られたアミン体**59j-1**とカルボン酸**52**との縮合により、目的物**44j-1**を合成した。



Scheme 13. Reagents and conditions: (a) THF, quant.; (b) FeCl₃·6H₂O, N₂H₄·H₂O, activated carbon, EtOH, H₂O; (c) H₂, Pd-C, EtOH, THF; (d) POCl₃; (e) xylene, 13–24% (3 steps); (f) **52**, WSC·HCl, HOBt, DMF, 46–73%.

イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾリル誘導体**45a-d**は以下に示す方法で合成した(Scheme 14)。メチルクロライド体**60a-c**のシアノ化の後、水酸化ナトリウム水溶液を用いた加水分解反応によりカルボン酸誘導体**61a-c**を得た。中間体**61a-c**とアミン体**51a**もしくは**59l**とのアミド化反応により、目的物**45a-d**へと誘導した。



Scheme 14. Reagents and conditions: (a) NaCN, DMF, H₂O; (b) *aq.* NaOH, 1,4-dioxane, 40–81% (2 steps); (c) **51a**, WSC•HCl, HOBT, DIPEA, DMF 53%; (d) **51a**, HATU, DIPEA, DMF, 71%; (e) **51a** or **59I**, WSC•HCl, HOBT, DMF, 55–68%.

第三節 PDE10A 阻害活性および P-gp 基質性の評価結果ならびに考察

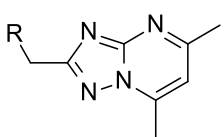
第二節で合成した化合物の PDE10A 阻害活性は、第一章で述べた方法により評価した。化合物の P-gp 基質性はヒト P-gp 遺伝子である MDR1 を導入した LLC-PK1 細胞を用いて化合物の細胞輸送能を評価した。P-gp への輸送能をコントロールの細胞(WT)と比較した値である NER が 2.0 以上を示す化合物を P-gp 基質性があるものとして定義した。また、 P_{int} はコントロールの細胞(WT)での評価化合物の apical 側から basal 側への輸送と basal 側から apical 側への透過性の平均値を示す値である。pH7.4 での評価であるため、血中-脳間での膜透過性の指標として用いることとした。

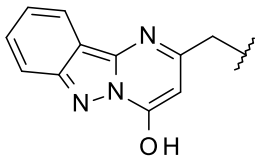
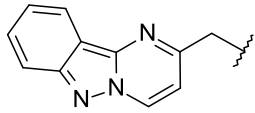
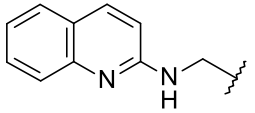
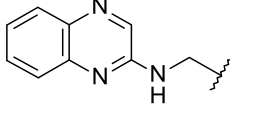
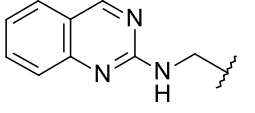
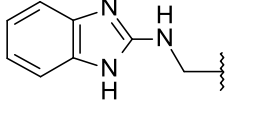
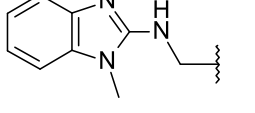
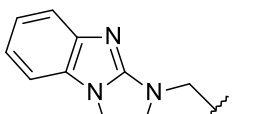
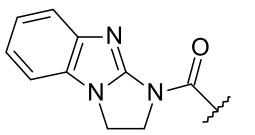
最初にピリミドインダゾール母核を Tyr693 との水素結合を保つと想定される他のヘテロ環への変換を行い、その活性評価を行った(Table 11)。2-アミノキノリン誘導体 **43a** は $IC_{50} = 294$ nM の PDE10A 阻害活性を示した。この化合物 **43a** は X 線結晶構造解析により、PDE10A タンパクとの結合様式が化合物 **42** と同様であることが確認できた(Figure 27)。キノキサリン誘導体 **43b** とキナゾリン誘導体 **43c** は著しく活性が低下した一方、ベンゾイミダゾール誘導体 **43d** と **43e** は **43a** に比べて高い PDE10A 阻害活性を示した。

脳内移行性の観点からは HBD の数は少ない方が良いため、ベンゾイミダゾール上 NH 基を置換することとした。2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール誘導体 **43f** は化合物 **43d** と同程度の PDE10A 阻害活性を示した。化合物 **43f** ($P_{int} = 19.2 \times 10^{-6}$ cm/sec) は化合物 **36a** ($P_{int} = 3.2 \times 10^{-6}$ cm/sec) よりも良好な膜透過性を示したが、高い P-gp 基質性を有していることがわかった (NER = 3.6)。一方、構造

の固定化による阻害活性の向上を図り、リンカー上にカルボニル基を導入した **44a** ($P_{int} = 16.8 \times 10^{-6}$ cm/sec)では、**43f** と同程度の膜透過性を持ちつつも、2倍以上高い阻害活性を示した。さらに、まだ改善の必要はあるが、化合物 **44a** (NER = 2.3)は化合物 **43f** (NER = 3.6)に比べて低い P-gp 基質性を示した。これはアミノ基からアミド基への変換により rotatable bond 数が減少した、もしくは 2,3-ジヒドロイミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール環上の塩基性が低減したため (pK_a values calculated by ACD/Percepta; **43f** = 6.6, **44a** = 4.3)と推測する²²。続いて、阻害活性の向上と P-gp 基質性の低減を目指し、化合物 **44a** から最適化研究を行うこととした。

Table 11. PDE10A inhibitory activity and P-gp net efflux ratio of heterocycles



Comps	R	PDE10A IC ₅₀ (nM)	P-gp NER	P _{int} (x 10 ⁻⁶ cm/sec)
36a		2.0	1.8	3.2
36e		78	NT	NT
43a		294	NT	NT
43b		1219	NT	NT
43c		2083	NT	NT
43d		105	NT	NT
43e		88	NT	NT
43f		138	3.6	19.2
44a		52	2.3	16.8

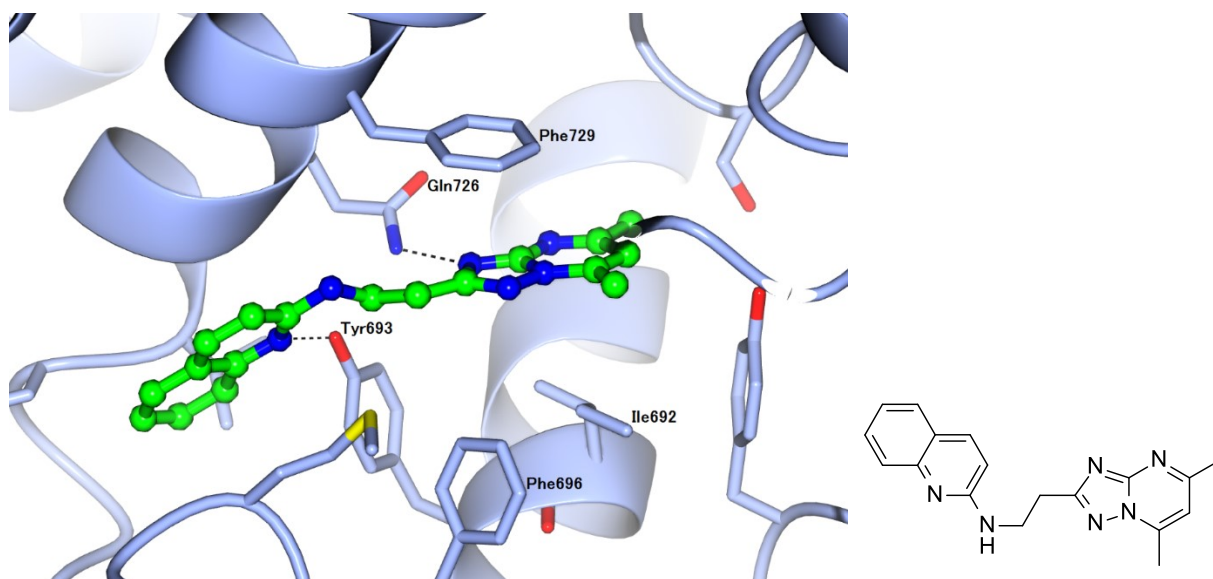


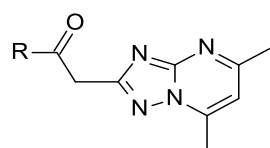
Figure 27. Crystal structure of compound **43a** (green) bound to PDE10A (PDB code: 6KDX).

阻害活性向上を目指し、イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール環上の置換基変換を行った(Table 12)。まず、化合物 **44a** の 2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾールを 1,2,3,4-テトラヒドロピリミド[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール **44b** へ変換したところ、PDE10A 阻害活性が 28 倍程度減弱した。そのため、2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール環からさらに最適化することとした。

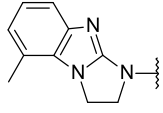
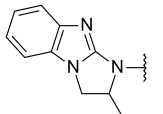
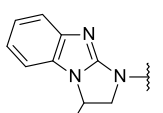
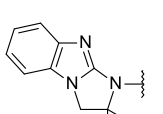
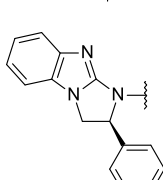
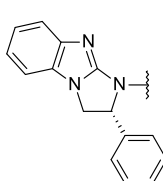
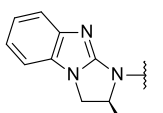
活性向上を目指して 2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール骨格のフェニレン環上にメチル基の導入を行ったが、残念ながらいずれも阻害活性が低減した(**44c**, **44d**, **44e** and **44f**)。この結果から、フェニレン環上への置換基導入が許容されないことが示唆された。第 1 章 Table 4 では 8 位や 7 位に相当する位置でのベンゾイミダゾール環上への置換基導入が可能であったが、本母核では置換基導入が許容されなかった。これはリンカー部が 1 原子分伸長したために、2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール環が無置換の状態では脂溶性ポケットを深く占有しており、置換基導入が許容される空間が無かったためと推測する。次に、イミダゾリン部へのメチル基導入を試みた。ラセミ体である 2 位メチル化誘導体 **44g** は化合物 **44a** と同等の阻害活性を示したが、3 位メチル化誘導体 **44h** は 1/6 程度に活性が減弱した。2 位への置換基導入が許容されることを確認したため、さらに 2 位に置換基を導入することにした。2 位ジメチル体 **44i** はモノメチル体 **44g** と同程度の阻害活性を示したため、モノ置換体からジ置換体にするることによる阻害活性への効果は少ないことがわかった。続いて光学活性な 2

位フェニル置換体 **44j** と **44k** を評価したところ、(*S*)-フェニル体 **44j** は(*R*)-フェニル体 **44k** よりも顕著に高い阻害活性を示すことが明らかになった。しかしながら、(*S*)-フェニル体 **44j** はメチル体 **44g** と同程度の活性にとどまった。これは(*S*)-置換体は阻害活性に重要な役割を有するものの、2位置換基はタンパク構造の溶媒側に存在しているため、2位置換基を嵩高くすることによる阻害活性への寄与は小さかったためと考察する。これらの結果をもとに、(*S*)-メチル体 **44i** を評価したところ、ラセミ体 **44g** よりも2倍程度阻害活性が向上した。化合物 **44i** と PDE10A タンパクとの X 線結晶構造解析の結果から、イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール部の9位窒素原子が Tyr693 と水素結合を形成していることが分かった(Figure 28)。また、(*S*)-メチル基は Gly725 と van der Waals 相互作用を形成しており、このことが阻害活性向上をもたらしたと考えられる。PDE10A 阻害活性の向上は達成したものの、化合物 **44i** は依然として高い P-gp 基質性を示していた(NER = 2.4)。本課題を解決すべく、続いてトリアゾロピリミジン環の最適化を行うこととした。

Table 12. PDE10A inhibitory activity and P-gp net efflux ratio of heterocycles



Comps	R	PDE10A IC ₅₀ (nM)	P-gp NER
44a		52	2.3
44b		1476	NT
44c		>10000	NT
44d		441	NT
44e		416	NT

44f		279	NT
44g		69	2.4
44h		292	NT
44i		74	2.1
44j		75	3.8
44k		1920	NT
44l		28	2.4

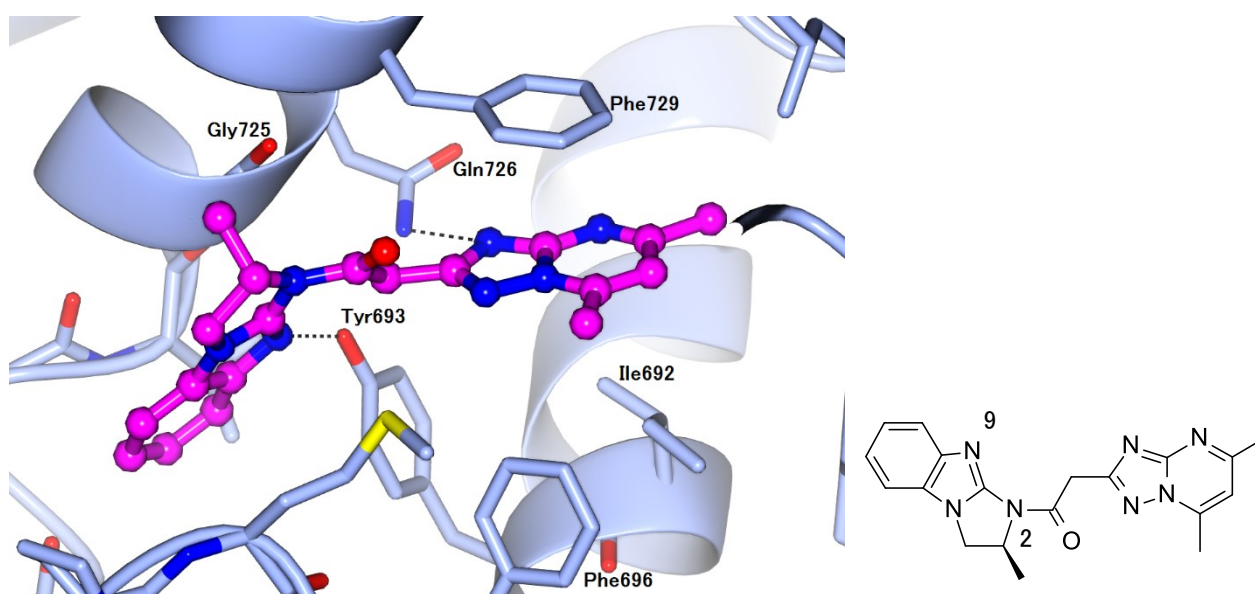


Figure 28. Crystal structure of compound 44l (magenta) bound to PDE10A (PDB code: 6KE0).

P-gp 基質性にはヘテロ原子の数や位置が関連するとの報告がある⁶⁵。そこで、P-gp 基質性低減のためにトリアゾロピリミジン環上窒素原子の数や位置の変換を行うこととした(Table 13)。イミダゾピリミジン環 **45a** やトリアゾロピリジン環 **45b** への変換は、P-gp 基質性が改善したものの PDE10A 阻害活性の低下をもたらした。このことからトリアゾロピリミジン環上の 1 位および 4 位窒素原子は阻害活性だけでなく P-gp 基質性の発現にも重要であることがわかった。4 位窒素原子を除去した **45b** の方が **45a** よりも阻害活性の減弱度合いが少なかったことに着目し、窒素原子を 4 位から 5 位に、メチル基を 5 位から 4 位に移動させたトリアゾロピラジン環 **45c** を合成したところ、**44a** の PDE10A 阻害活性を保持しながら P-gp 基質性を回避できることが明らかとなった。2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール環上 2 位へのメチル基の導入により PDE10A 阻害活性が向上した知見(Table 13, **44a** vs **44l**) を参考に、化合物 **45c** へのメチル基の導入を行った結果、P-gp 基質性を示さず、強力な PDE10A 阻害活性を有する化合物 **45d** が得られた。

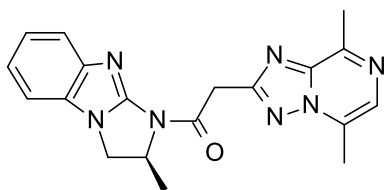
Table 13. PDE10A inhibitory activity and P-gp NER of heterocycles

Comps	R ¹	R ²	PDE10A IC ₅₀ (nM)	P-gp NER
44l	Me		28	2.4
44a	H		52	2.3
45a	H		275	1.0
45b	H		135	1.2
45c	H		44	1.3
45d	Me		8.4	1.2

第四節 マウス行動薬理モデルにおける *in vivo* 薬効評価および PK 評価

化合物 **45d** のさらなるプロファイルを Figure 29 に示す。**45d** は CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 に対する阻害作用が低く、マウスおよびヒトにおいて代謝的に安定で良好な溶解性と膜透過性を示し

た。次に、**45d** をマウスに 0.1mg/kg の用量で経口投与後の脳内濃度を調べた結果、Table 14 に示すように良好な脳内移行性を示した($K_{p,brain} = 2.3$)。



PDE10A IC₅₀: 8.4 nM

logD_{7.4}: 2.0

Solubility ^a: ≥ 100 μM

CYP inhibition (1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4); residual activity: 98%, 99%, 96%, 90%, 102%, 90%

CL_{int} (mL/min/kg) (human, mouse): No Dep., 175.3

P-gp NER: 1.2

P_{int}: 27.5 x 10⁻⁶ cm/sec

Figure 29. Profiles of compound **45d**.

^a Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid for disintegration test (JP2; pH = 6.8).

Table 14. Plasma and brain concentration of **45d** at 1 h after oral administration to mice

Dose (mg/kg)	Plasma (ng/mL)	Brain (ng/g)	$K_{p,brain}$ ^a
0.1	0.91	2.2	2.3

^a Average value of individual K_p (brain/plasma) (n=3).

そこで、統合失調症の陽性症状のモデルであるフェンサイクリジン (PCP) 誘発マウス過活動の系を用いて、**45d** の *in vivo* 薬効を検証した (Figure 30)。その結果、**45d** を経口投与することにより投与量依存的にマウスの過活動が抑制されることがわかった。また Y 字型迷路試験では、NMDA 受容体の非競合的拮抗薬である MK-801 投与によるマウスの空間作業記憶低下に対する **45d** の *in vivo* 効果を調査した (Figure 31)。この空間作業記憶の低下は認知症や統合失調症のような認知機能障害での一般的な症状であるため、本系は認知機能障害に対する薬剤のスクリーニングに使用される⁶⁶。Y 字型迷路試験において、直前に進入したアームとは異なったアームに入ろうとするげっ歯類の習性を利用した試験方法で、マウスが異なる 3 本のアームを連続して選択するには、少なくとも 2 回前まで選択した

アームを記憶している必要がある。この記憶は、3回目以降の選択をする際には次々と入れ替わっていく必要があることから作業記憶能力を必要とする。3回連続して異なるアームへ侵入した回数（交替行動回数）を数え、以下の式により自発的交替行動率を計算した。

$$\text{自発的交替行動率} = 100 \times \{ \text{交替行動回数} / (\text{全アーム侵入回数} - 2) \}$$

この試験では、正常群の交替率は約70%であったが、MK-801投与群では約50%にまで顕著に低下した。45dを0.1 mg/kgおよび0.3 mg/kg経口投与することにより、MK-801による交替率低下を有意に改善させることがわかった(p < 0.01 および p < 0.05)。1 mg/kgの投与量を除き、対照群と比較して45d投与による全アーム侵入回数への影響はなかった。化合物45dはMK-801による交替行動の低下を改善したことから、45dは認知機能障害の治療に有効であることが示唆された。

既存の統合失調症治療薬は、臨床における副作用として錐体外路症状(EPS)⁶⁷を誘発し、そのげっ歯類での指標であるカタレプシーも誘発することが知られている⁶⁸。Figure 32に示すように、45dについてマウスでのカタレプシー誘発に関する評価を行ったが、100mg/kgの経口投与量までカタレプシーを引き起こさなかった。化合物45dは、既存の統合失調症薬で問題となっている副作用を誘発しない統合失調症の認知機能障害の治療薬としての試験に向けて、さらなる検討を行うに値する化合物であると言える。

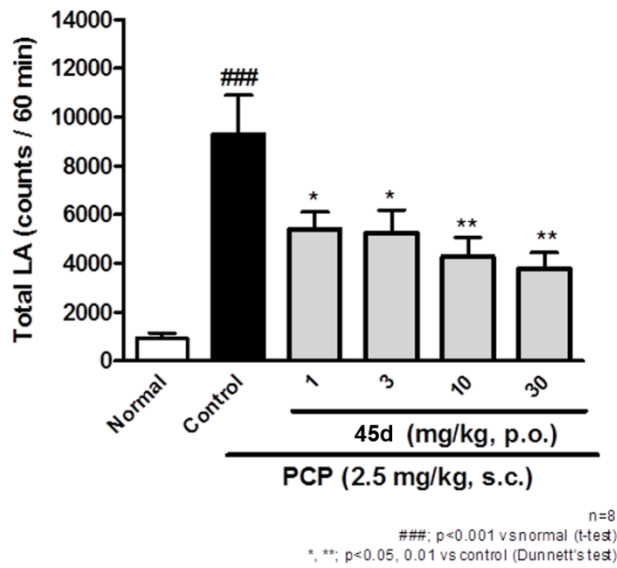


Figure 30. Effect of oral administration of **45d** on PCP-induced hyperlocomotion in mice. PCP was administered subcutaneously (s.c.). The data represent the mean \pm SEM: ### p < 0.001 versus normal group (Student's t test); **p < 0.01 vs control, *p < 0.05 vs control (Dunnett's test).

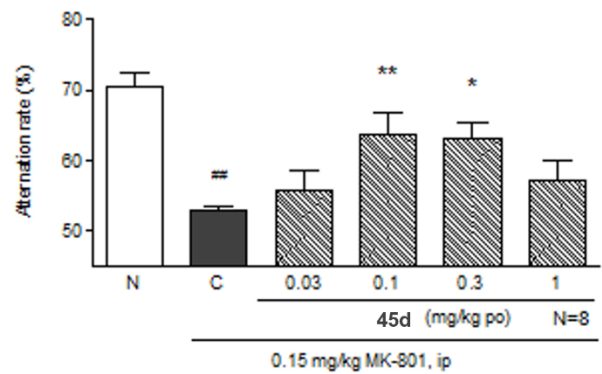


Figure 31. Effect of **45d** on MK-801-induced disruption of spontaneous alternation behavior in mice. Data represent the mean \pm S.E.M. alternation rate in mice. ##p < 0.01 vs normal group (Student's t-test); **p < 0.01 vs control, *p < 0.05 vs control (Dunnett's test). N: normal (vehicle/saline-treated group), C: control (vehicle/MK801-treated group).

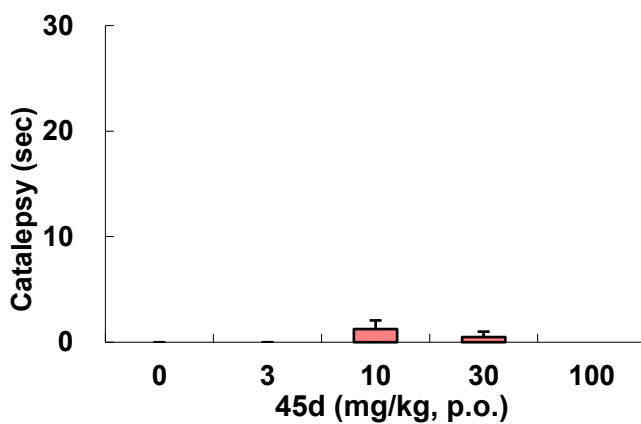


Figure 32. The influence of **45d** on catalepsy in mice. Catalepsy was measured for a period of 120 sec. Data represent the mean \pm S.E.M. (n = 6–8 for each group).

第五節 小括

本章では、第二章で述べた化合物**36a**の課題であるマウス中枢移行性の改善を目的に、さらなる構造最適化を行った。化合物**36a**の膜透過性の低さが中枢移行性の低さの原因であるとの仮説を立て、HBDを持たないPDE10A阻害剤をデザインすることにした。化合物**36a**の水酸基の変換では活性が減弱することが分かっていたため、ピリミド[1,2-*b*]インダゾール構造の母核を変換した。その結果、HBDを有さない2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール誘導体**44a**が中程度の*in vitro*活性を有し、良好な膜透過性を示すことを見出した。*In vitro*活性の向上とP-gp基質性の回避を目指し、置換基の導入および変換などの構造最適化を実施した結果、P-gp基質性を回避しつつ、強力なPDE10A阻害活性を示す化合物**45d**を創出した。さらに、**45d**は良好な中枢移行性を有することも確認できた。化合物**45d**はマウスにおけるPCP誘発過活動において良好な阻害作用を示し、MK-801による作業記憶障害に対しても有意な改善作用を示した。また抗精神病薬にみられる錐体外路症状を化合物**45d**は示さないことも確認できた。これらの結果より、化合物**45d**は統合失調症治療薬として有望な化合物であると考えられる (Figure 33)。

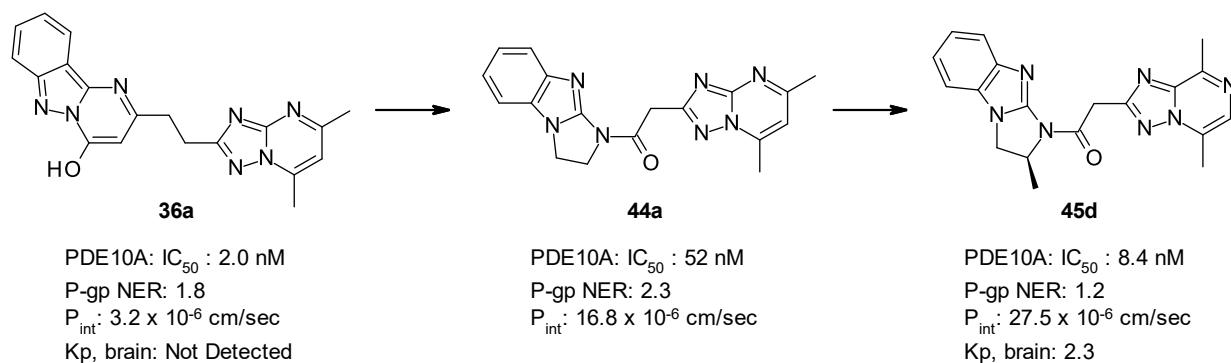


Figure 33. 化合物**36a**の構造最適化による中枢移行性が向上した**45d**創出の概略

結論

著者は、統合失調症治療薬、特に統合失調症の認知機能障害改善薬として有用性の高い新規 PDE10A 阻害剤の創製を目指し、HTS ヒット化合物およびフラグメントヒット化合物より合成展開を行った結果、以下の知見を得た。

序論では、統合失調症治療薬の現状と、PDE10A 阻害剤創製に至る背景を述べた。また、中枢神経系薬の創製に求められる化合物の物理化学的性質や FBDD を用いた化合物探索からリード化合物創製に至る手法を紹介した。その上で、本研究の目標や概要を述べた。

第一章では、HTS ヒット化合物であるイミダゾ[1,5-*a*]ピリジン誘導体**1**の構造活性相関研究を実施した結果について述べた (Figure 34)。まず PDE10A 阻害活性の向上を目指して合成展開を行った結果、イミダゾ[4,5-*b*]ピリジノン**3a**を得た。続いて**3a**の HLM 中での代謝安定性の向上を目指してベンゾイミダゾール部の構造変換を行った結果、化合物**4b**を見出した。化合物**4b**は CYP3A4阻害活性に課題があったため、その回避のために構造変換を行い、結果としてイミダゾ[4,5-*b*]ピリジノン環7'位へのメチル基導入により、*in vitro* 活性が向上し、CYP3A4阻害活性が低減した化合物**5b**を創出した。

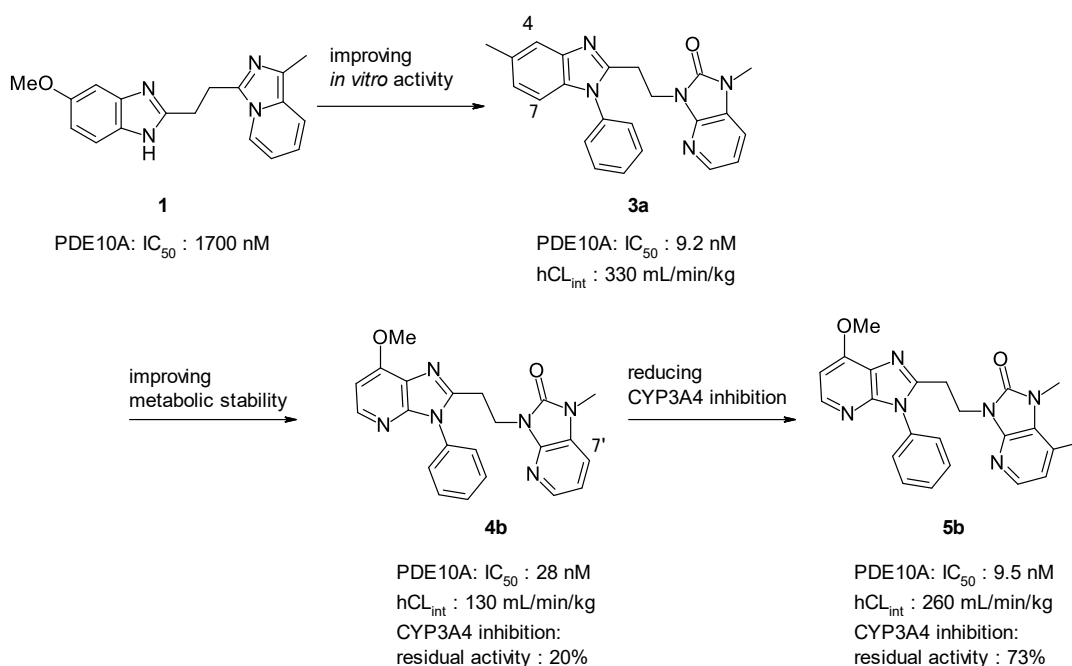


Figure 34. HTS ヒット化合物 **1** から化合物 **5b** 創出に至る経緯

第二章では、新たな母核構造の取得を目指して FBDD を試みた。PDE10A タンパクの X 線結晶構造解析から得られたフラグメントヒット化合物**33**に対して、*in vitro* 活性の向上を目的に、その SAR 探索を行った(Figure 35)。PDE10A タンパクの構造情報を参考にしながら catalytic pocket への伸張を試み、トリアゾロピリミジンの導入を行った。さらに、各環上への置換基の導入や変換などの構造最適化を実施した結果、強力な *in vitro* PDE10A 阻害活性を有するピリミド[1,2-*b*]インダゾール誘導体**36a**を見出した。化合物**36a**は CYP3A4阻害作用を示さず、良好な代謝安定性を示した。

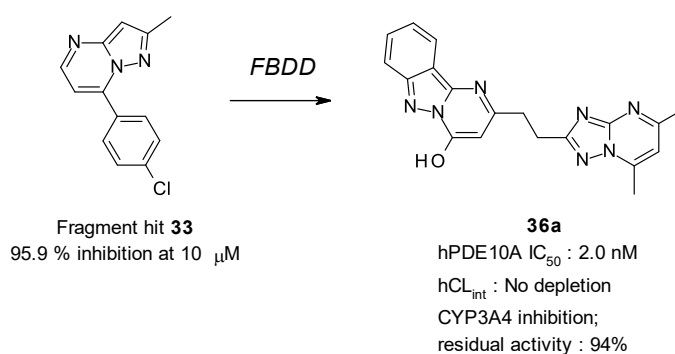


Figure 35. フラグメントヒット **33** から化合物 **36a** 創出の概要

第三章では、化合物**36a**の低いマウス中枢移行性を改善するために SAR 探索を行った。膜透過性の改善に着目し、HBD を持たない PDE10A 阻害剤を創出すべく、**36a**のピリミド[1,2-*b*]インダゾール構造の母核を変換した(Figure 36)。その結果、HBD を保有しない2,3-ジヒドロ-1*H*-イミダゾ[1,2-*a*]ベンゾイミダゾール誘導体**44a**が中程度の *in vitro* 活性を有し、**36a**よりも良好な膜透過性を示すことを見出した。さらに、阻害活性の向上と P-gp 基質性の回避を目指し、置換基の導入・変換などを行った。特に P-gp 基質性の回避のために、**44a**のトリアゾロピリミジン環上のヘテロ原子の数や位置の変換を行い、トリアゾロピラジン環**45c**への変換により、阻害活性を保持しながら P-gp 基質性が回避できることを見出した。結果として、P-gp 基質性を回避しつつ、強力な PDE10A 阻害活性を示す化合物**45d**を創出した。また、化合物**45d**はマウスにおける良好な中枢移行性を示すことが確認できた。この化合物**45d**は NMDA 拮抗剤 PCP を用いた陽性症状のモデルや MK-801を用いた認知機能障害のモデルである Y 字型迷路試験において有意な活性を有することが確認できた。これらの結果より、**45d**は統合失調症治療薬として有望な化合物であると考えられる。

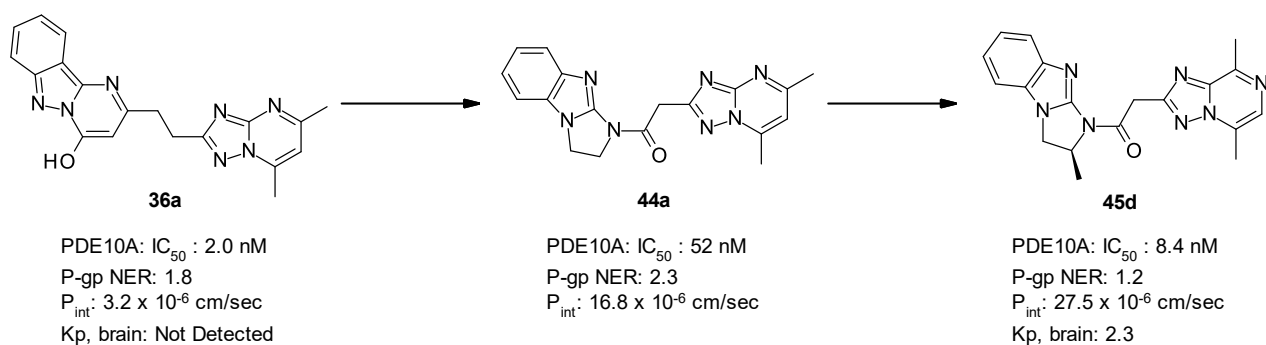


Figure 36. 中枢移行性向上を指向した **36a** の構造最適化による **45d** 創出の経緯

以上、本研究により、著者は強力な PDE10A 阻害活性を有する化合物 **45d** を見出した。**45d** は優れた中枢移行性を示し、且つ統合失調症の認知機能障害のモデルと考えられる MK-801 を投与したマウスの Y 字型迷路試験において、0.1 mg/kg (p.o.) という低用量で空間作業記憶障害を改善したことは意義深いものであると考えられる。また、CYP3A4 阻害作用の低減や代謝安定性の向上、P-gp 基質性の回避を目指した中で得られた知見は、PDE10A 阻害剤の研究のみならず、創薬研究全般に応用できると考えている。最後に、化合物 **45d** のような優れたプロファイルを示す PDE10A 阻害剤が統合失調症の認知機能障害の新たな治療薬となることを期待する。

実験の部

合成の部

¹H NMR spectra were recorded on a Varian VNS-400, JEOL JNM-LA400, JEOL JNM-AL400, Varian 400-MR, or BRUKER AV-III HD500, and the chemical shifts were expressed in δ (ppm) values with tetramethylsilane as an internal reference (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, dd = double doublet, dt = double triplet, tt = triple triplet, ddd = double double doublet, and br = broad peak). Mass spectra (MS) were recorded on a Waters UPLC/SQD and Waters Acquity UPLC/ZQ. Elemental analyses were performed using a Yanaco JM10 or Yanaco MT-6 (C, H, N), Elementar Vario EL III (C, H, X), and Dionex ICS-3000 (S, halogene) and were within $\pm 0.4\%$ of theoretical values. Electrospray ionization positive high-resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Thermo EXACTIVE-Plus Waters LCT Premier. Specific rotation was obtained using Horiba SEPA-500 and OHM Electric OCE-TCR12075WL. Melting points were determined on a BÜCHI M-565 melting point apparatus and are uncorrected. Unless otherwise noted, all reagents and solvents obtained from commercial suppliers were used without further purification.

第一章に関する実験

3-Methoxy-2-nitro-*N*-phenylaniline (**16f**)

To a mixture of 3-bromo-2-nitroanisole (**15**) (3.00 g, 12.9 mmol) in toluene (30 mL) were added aniline (3.55 mL, 38.9 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$; 1.18 g, 1.29 mmol), 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP; 1.20 g, 1.93 mmol) and Cs_2CO_3 (8.42 g, 25.8 mmol). The mixture was stirred at 110 °C for 24 h under an argon atmosphere. After cooling at room temperature, the mixture was filtered through a pad of Celite, and the filtrate was then concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–50% EtOAc in *n*-hexane) to give **16f** (1.90 g, 60%) as an orange oil. ¹H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.85 (s, 3H), 6.77 (dd, 1H, $J = 8.4, 0.9$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J = 8.4, 0.9$ Hz), 6.92–7.07 (m, 3H), 7.23–7.48 (m, 3H), 7.96 (s, 1H); MS (ESI) m/z 245 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-Methyl-2-nitro-*N*-phenylaniline (**16a**)

Compound **16a** was prepared from 4-bromo-3-nitrotoluene (**13**) in a manner similar to that described for compound **16f**, with a yield of 97% as a red oil. ¹H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2.27 (s, 3H), 7.13–7.17 (m, 2H), 7.27–7.47 (m, 5H), 7.92 (dd, 1H, $J = 1.8, 0.8$ Hz), 9.21 (s, 1H); MS (ESI) m/z 229 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-Methoxy-2-nitro-*N*-phenylaniline (**16b**)

Compound **16b** was prepared from 4-bromo-3-nitroanisole (**14**) in a manner similar to that described for compound

16f, with a yield of 80% as an orange solid. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 3.83 (s, 3H), 6.98–7.64 (m, 8H), 9.33 (s, 1H); MS (ESI) m/z 245 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)pyridin-2-amine (16c)**

Compound **16c** was prepared from **14** and pyridin-2-amine in a manner similar to that described for compound **16f**, with a yield of 33% as a red oil. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 3.85 (s, 3H), 6.88–6.92 (m, 2H), 7.22 (dd, 1H, $J = 9.4, 3.1$ Hz), 7.60 (ddd, 1H, $J = 8.7, 7.4, 2.0$ Hz), 7.67 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 8.29–8.31 (m, 1H), 8.69 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz), 9.92 (s, 1H); MS (ESI) m/z 246 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)pyridin-3-amine (16d)**

Compound **16d** was prepared from **14** and pyridin-3-amine in a manner similar to that described for compound **16f**, with a yield of 64% as a red solid. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.81 (s, 3H), 7.25 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.34 (ddd, 1H, $J = 7.6, 4.7, 0.7$ Hz), 7.56–7.59 (m, 2H), 8.25 (dd, 1H, $J = 4.7, 1.5$ Hz), 8.46 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.97 (s, 1H); MS (ESI) m/z 246 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)pyridin-4-amine (16e)**

Compound **16e** was prepared from **14** and pyridin-4-amine in a manner similar to that described for compound **16f**, with a yield of 44% as a red oil. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.85 (s, 3H), 6.81 (dd, 2H, $J = 4.8, 1.6$ Hz), 7.32 (dd, 1H, $J = 9.0, 3.0$ Hz), 7.51 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.58 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz), 8.20 (dd, 2H, $J = 4.8, 1.6$ Hz), 8.77 (s, 1H); MS (ESI) m/z 246 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-Methoxy-*N*¹-phenylbenzene-1,2-diamine dihydrochloride (17f)

To a solution of **16f** (3.19 g, 13.1 mmol) in EtOH (20 mL) was added 10% Pd(OH)₂-C (183 mg, 0.26 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 24 h under a hydrogen atmosphere. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite, and the filtrate was concentrated *in vacuo* and diluted with 4 M HCl in EtOAc (10 mL, 40.0 mmol) to give **17f** (2.97 g, 79%) as a purple solid. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.88 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 8.08–8.25 (m, 8H), 9.57 (s, 1H); MS (ESI) m/z 215 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-Methyl-*N*¹-phenylbenzene-1,2-diamine dihydrochloride (17a)

Compound **17a** was prepared from **16a** in a manner similar to that described for compound **17f**, with a yield of 49% as a purple solid. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2.26 (s, 3H), 3.46 (br-s, 3H), 6.78 (tt, 1H, $J = 7.2, 1.0$ Hz), 6.84 (dd, 2H, $J = 8.6, 1.0$ Hz), 6.98 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.05 (s, 1H), 7.16–7.21 (m, 3H); MS (ESI) m/z 199 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-Methoxy-*N*¹-phenylbenzene-1,2-diamine dihydrochloride (17b)

Compound **17b** was prepared from **16b** in a manner similar to that described for compound **17f**, with a yield of 63% as a purple solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.73 (s, 3H), 6.69–6.72 (m, 4H), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz), 7.12–7.18 (m, 3H); MS (ESI) *m/z* 215 [M+H]⁺.

4-Methoxy-*N*¹-(pyridin-2-yl)benzene-1,2-diamine dihydrochloride (17c)

Compound **17c** was prepared from **16c** in a manner similar to that described for compound **17f**, with a yield of 14% as a brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.73 (s, 3H), 6.38 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.8 Hz), 6.56 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 6.92–7.09 (m, 2H), 7.89 (d, 1H, *J* = 6.1 Hz), 7.96 (ddd, 1H, *J* = 8.7, 7.0, 1.7 Hz), 10.15 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 216 [M+H]⁺.

4-Methoxy-*N*¹-(pyridin-3-yl)benzene-1,2-diamine dihydrochloride (17d)

Compound **17d** was prepared from **16d** in a manner similar to that described for compound **17f**, with a yield of 64% as a brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.71 (s, 3H), 3.82–4.15 (br-s, 2H), 6.27 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.8 Hz), 6.45 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 7.50 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 2.8, 1.1 Hz), 7.72 (dd, 1H, *J* = 8.6, 5.3 Hz), 7.81 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 8.07 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz), 8.54 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 216 [M+H]⁺.

4-Methoxy-*N*¹-(pyridin-4-yl)benzene-1,2-diamine dihydrochloride (17e)

Compound **17e** was prepared from **16e** in a manner similar to that described for compound **17f**, with a yield of 37% as a brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.34–3.57 (br-s, 2H), 3.70 (s, 3H), 6.21 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.8 Hz), 6.40 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 6.91 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.07 (s, 1H), 8.08–8.25 (m, 2H), 9.78 (s, 1H), 13.38 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 216 [M+H]⁺.

Ethyl 3-(1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-3-yl)propanoate (19)

To a stirred mixture of **18** (5.25 g, 35.2 mmol) in acetonitrile (100 mL) were added ethyl acrylate (7.65 mL, 70.4 mmol) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU; 2.63 mL, 17.6 mmol). The mixture was stirred at 50 °C for 12 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃) to give **19** (5.72 g, 65%) as a pale yellow oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.10 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 2.77 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.34 (s, 3H), 4.00 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 4.11 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.08 (dd, 1H, *J* = 7.7, 5.2 Hz), 7.49 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.4 Hz), 7.98 (dd, 1H, *J* = 5.2, 1.4 Hz); MS (ESI) *m/z* 250 [M+H]⁺.

3-(1-Methyl-2-oxo-1,2-dihydro-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-3-yl)propanoic acid (20)

To a solution of **19** (4.18 g, 16.7 mmol) in EtOH (50 mL) was added 1 M NaOH aqueous solution (30 mL, 30.0 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*.

The residue was neutralized with 1 M HCl aqueous solution (30mL). The resulting precipitate was collected by filtration and washed with water. The solid was dried *in vacuo* to give **20** (3.67 g, 99%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.68 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 3.05–3.52 (br-s, 1H), 3.33 (s, 3H), 4.06 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.07 (dd, 1H, *J* = 7.7, 5.2 Hz), 7.47 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.3 Hz), 7.98 (dd, 1H, *J* = 5.2, 1.3 Hz); MS (ESI) *m/z* 222 [M+H]⁺.

3-[2-(4-Methoxy-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)ethyl]-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one dihydrochloride (3f)

To a suspension of **17f** (250 mg, 0.871 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) were added 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU; 500 mg, 1.32 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 600 μL, 3.51 mmol), and **20** (200 mg, 0.904 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 12 h. The mixture was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. To the residue was added AcOH (5 mL), and the mixture was stirred at 100 °C for 24 h. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–10% MeOH in CHCl₃) to give the free form of the title compound, which was dissolved in EtOAc (2.5 mL), and 4 M HCl in EtOAc (0.218 mL, 0.870 mmol) was added to the solution. The mixture was concentrated *in vacuo* to give **3f** (87.0 mg, 21%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.25 (s, 3H), 3.40 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 4.04 (s, 3H), 4.21 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 6.81 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.00 (dd, 1H, *J* = 7.7, 5.2 Hz), 7.13 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.38–7.46 (m, 4H), 7.58–7.60 (m, 3H), 7.67 (dd, 1H, *J* = 5.2, 1.3 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 25.60, 27.22, 37.69, 56.91, 104.76, 107.63, 114.82, 117.67, 124.70, 127.13, 127.13, 127.76, 130.75, 130.75, 131.06, 132.45, 135.04, 140.03, 140.03, 142.67, 147.82, 151.67, 153.05; MS (ESI) *m/z* 400 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₂N₅O₂ [M+H]⁺ 400.1773; found, 400.1779; Anal. Calcd for C₂₃H₂₁N₅O₂·2.3HCl·3.1H₂O: C, 51.24; H, 5.52; N, 12.99; Cl, 15.12. Found: C, 51.07; H, 5.69; N, 12.85; Cl, 14.92.

1-Methyl-3-[2-(5-methyl-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)ethyl]-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one dihydrochloride (3a)

Compound **3a** was prepared from **17a** in a manner similar to that described for compound **3f**, with a yield of 99% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.50 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.50 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 4.23 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 6.98 (dd, 1H, *J* = 7.7, 5.3 Hz), 7.19 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.35 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.0 Hz), 7.40–7.45 (m, 3H), 7.57–7.60 (m, 3H), 7.62 (dd, 1H, *J* = 5.3, 1.3 Hz), 7.67–7.68 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 20.39, 24.49, 26.15, 36.61, 111.39, 113.09, 113.77, 116.60, 123.65, 126.00, 126.00, 127.12, 129.67, 129.67, 129.78, 129.98, 130.45, 131.14, 136.02, 138.88, 141.52, 150.63, 151.92; MS (ESI) *m/z* 384 [M+H]⁺ Anal. Calcd for C₂₃H₂₁N₅O·2.6HCl·0.8H₂O: C, 56.07; H, 5.16; N, 14.22; Cl, 18.71. Found: C, 56.01; H, 5.00; N, 14.12; Cl, 18.48;

mp 205 °C.

3-[2-(5-Methoxy-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)ethyl]-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one (3b)

To a mixture of **17b** (390 mg, 1.36 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) were added HATU (770 mg, 1.49 mmol), DIPEA (930 μL, 5.43 mmol), and **20** (300 mg, 1.36 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To the residue was added AcOH (6 mL), and the mixture was stirred at 100 °C for 8 h. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–10% MeOH in CHCl₃). The residue was washed with EtOAc to give **3b** (213 mg, 39%) as a purple solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.21 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.27 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 4.24 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 6.81 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.02 (dd, 1H, *J* = 7.7, 5.3 Hz), 7.19 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 7.39–7.56 (m, 6H), 7.86 (dd, 1H, *J* = 5.3, 1.4 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 26.52, 27.13, 38.18, 56.04, 102.09, 110.72, 112.38, 114.40, 117.36, 124.69, 127.23, 127.23, 129.08, 130.31, 130.31, 130.99, 135.56, 140.18, 143.08, 143.37, 152.33, 153.25, 156.22; MS (ESI) *m/z* 400 [M+H]⁺ Anal. Calcd for C₂₃H₂₁N₅O₂·0.2H₂O: C, 68.54; H, 5.35; N, 17.38. Found: C, 68.41; H, 5.19; N, 17.33; mp 160 °C.

3-{2-[5-Methoxy-1-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]ethyl}-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one (3c)

To a suspension of **17c** (390 mg, 1.36 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) were added HATU (770 mg, 1.49 mmol), DIPEA (930 μL, 5.43 mmol), and **20** (300 mg, 1.36 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To the residue was added AcOH (6 mL), and the mixture was stirred at 130 °C for 48 h. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (NH silica gel, 0–10% MeOH in CHCl₃) to give **3c** (120 mg, 22%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.26 (s, 3H), 3.42 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.81 (s, 3H), 4.26 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 6.85 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.02 (dd, 1H, *J* = 7.7, 2.4 Hz), 7.21 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 7.25 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.39–7.44 (m, 2H), 7.49 (dt, 1H, *J* = 8.1, 0.7 Hz), 7.86 (dd, 1H, *J* = 5.2, 1.3 Hz), 8.00 (td, 1H, *J* = 7.7, 2.0 Hz), 8.52 (ddd, 1H, *J* = 5.2, 2.0, 1.1 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 26.04, 26.15, 37.35, 54.93, 101.27, 110.29, 111.46, 113.27, 116.27, 119.14, 122.60, 123.58, 128.35, 138.81, 139.11, 141.99, 142.59, 147.95, 148.87, 151.35, 152.13, 155.30; MS (ESI) *m/z* 401 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₁N₆O₂ [M+H]⁺ 401.1726; found, 401.1725; Anal. Calcd for C₂₂H₂₀N₆O₂·0.8H₂O: C, 63.69; H, 5.25; N, 20.26. Found: C, 63.47; H, 4.90; N, 20.14; mp 124°C.

3-{2-[5-Methoxy-1-(pyridin-3-yl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]ethyl}-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one (3d)

Compound **3d** was prepared from **17d** in a manner similar to that described for compound **3c**, with a yield of 25% as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.23 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.26 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 4.22 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 6.83 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.3 Hz), 6.99–7.04 (m, 2H), 7.21 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 7.42 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.2 Hz), 7.57 (dd, 1H, *J* = 7.9, 4.8 Hz), 7.85 (dd, 1H, *J* = 5.2, 1.2 Hz), 7.91–7.95 (m, 1H), 8.65–8.67 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 26.46, 27.14, 38.18, 56.06, 102.32, 110.56, 112.55, 114.46, 117.39, 124.63, 125.03, 131.02, 132.51, 135.14, 140.20, 143.02, 143.68, 148.08, 150.03, 152.54, 153.22, 156.37; MS (ESI) *m/z* 401 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₁N₆O₂ [M+H]⁺ 401.1726; found, 401.1733; Anal. Calcd for C₂₂H₂₀N₆O₂·0.4H₂O: C, 64.82; H, 5.14; N, 20.62. Found: C, 64.58; H, 5.11; N, 20.52; mp 137°C.

3-{2-[5-Methoxy-1-(pyridin-4-yl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]ethyl}-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one (3e)

Compound **3e** was prepared from **17e** in a manner similar to that described for compound **3b**, with a yield of 23% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.26 (s, 3H), 3.32 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.80 (s, 3H), 4.23 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 6.85 (dd, 1H, *J* = 7.8, 2.5 Hz), 7.02 (dd, 1H, *J* = 7.8, 2.5 Hz), 7.14 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 7.22 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 7.42 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.4 Hz), 7.49 (dd, 2H, *J* = 4.4, 1.6 Hz), 7.85 (dd, 1H, *J* = 5.2, 1.4 Hz), 8.70 (dd, 2H, *J* = 4.4, 1.6 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 26.69, 27.11, 38.23, 56.05, 102.41, 110.86, 112.69, 114.45, 117.43, 121.41, 121.41, 124.61, 129.81, 140.19, 143.00, 143.03, 143.85, 151.91, 151.91, 152.03, 153.19, 156.51; MS (ESI) *m/z* 401 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₁N₆O₂ [M+H]⁺ 401.1726; found, 401.1716; Anal. Calcd for C₂₂H₂₀N₆O₂·0.3H₂O: C, 65.11; H, 5.12; N, 20.71. Found: C, 65.12; H, 5.11; N, 20.52.

Methyl 3-(5-methyl-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)propanoate (6)

To a mixture of **17a** (2.18 g, 8.05 mmol) in CH₂Cl₂ (33 mL) were added HATU (4.59 g, 12.1 mmol), DIPEA (5.50 mL, 32.2 mmol) and 4-methoxy-4-oxobutanoic acid (1.12 g, 8.45 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 12 h. The resulting mixture was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To the residue was added AcOH (44 mL). The mixture was stirred at 90 °C for 24 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃) to give **6** (2.23 g, 96%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.41 (s, 3H), 2.86–2.90 (m, 2H), 2.93–2.97 (m, 2H), 3.56 (s, 3H), 6.98 (dd, 1H, *J* = 8.2, 0.7 Hz), 7.01 (dd, 1H, *J* = 8.2, 1.2 Hz), 7.43–7.45 (m, 1H), 7.51–7.67 (m, 5H); MS (ESI) *m/z* 295

[M+H]⁺.

3-(5-Methyl-1-phenyl-1H-benzimidazol-2-yl)propanoic acid (**7**)

To a mixture of **6** (2.17 g, 7.37 mmol) in EtOH (22 mL) was added 1 M NaOH aqueous solution (15 mL, 15.0 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 20 h. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was neutralized with 1 M HCl aqueous solution (13 mL). The resulting precipitate was collected by filtration and washed with water. The solid was dried *in vacuo* to give **7** (1.67 g, 81%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.41 (s, 3H), 2.79 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.91 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 6.97–7.02 (m, 2H), 7.03–7.67 (m, 6H), 12.17 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 281 [M+H]⁺.

5-Methyl-2-[2-(1-methylimidazo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)ethyl]-1-phenyl-1H-benzimidazole (**2a**)

To a mixture of **7** (336 mg, 1.20 mmol) in EtOAc (10 mL) were added propylphosphonic anhydride (T3P; 1.7 M solution in EtOAc; 1.96 mL, 3.35 mmol) and **8a** (161 mg, 1.32 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred at 80 °C for 12 h. The mixture was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃). The product was recrystallized from EtOAc/*n*-hexane to give **2a** (160 mg, 36%) as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.30 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.22 (dd, 2H, *J* = 8.3, 6.8 Hz), 3.40 (dd, 2H, *J* = 8.3, 6.8 Hz), 6.48 (ddd, 1H, *J* = 6.2, 4.2, 1.1 Hz), 6.56 (dd, 1H, *J* = 9.2, 5.9 Hz), 6.96–7.02 (m, 2H), 7.38–7.63 (m, 7H), 7.92 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.70, 21.61, 24.05, 25.20, 109.85, 112.00, 116.63, 118.08, 118.93, 121.65, 124.23, 125.97, 126.52, 127.56, 127.56, 129.17, 130.43, 130.43, 131.46, 134.76, 135.95, 136.01, 143.04, 154.27; MS (ESI) *m/z* 367 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₃N₄ [M+H]⁺ 367.1923; found, 367.1928; Anal. Calcd for C₂₄H₂₂N₄·H₂O: C, 74.97; H, 6.29; N, 14.57. Found: C, 74.74; H, 6.29; N, 14.54.

2-[2-(Imidazo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)ethyl]-5-methyl-1-phenyl-1H-benzimidazole (**2b**)

Compound **2b** was prepared from **7** and **8b** in a manner similar to that described for compound **2a**, with a yield of 33% as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.41 (s, 3H), 3.26 (dd, 2H, *J* = 9.0, 4.8 Hz), 3.46 (dd, 2H, *J* = 9.0, 4.8 Hz), 6.59 (ddd, 1H, *J* = 7.2, 6.3, 1.2 Hz), 6.70 (ddd, 1H, *J* = 9.2, 6.3, 0.7 Hz), 6.96–7.02 (m, 2H), 7.20 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz), 7.44–7.63 (m, 7H), 8.07 (dd, 1H, *J* = 7.2, 1.0 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 21.61, 24.04, 25.09, 109.84, 112.35, 118.30, 118.44, 118.52, 118.93, 122.03, 124.21, 127.52, 127.52, 129.19, 130.41, 130.44, 130.44, 131.45, 134.75, 135.95, 137.69, 143.04, 154.21; MS (ESI) *m/z* 353 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₁N₄ [M+H]⁺ 353.1766; found, 353.1761; Anal. Calcd for C₂₃H₂₀N₄·H₂O: C, 74.57; H, 5.99; N, 15.12. Found: C, 74.40; H, 6.00; N, 15.16.

8-Methyl-6-[2-(5-methyl-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)ethyl]imidazo[1,5-*a*]pyrimidine dihydrochloride (2c)

To a mixture of **7** (336 mg, 1.20 mmol) in EtOAc (10 mL) were added propylphosphonic anhydride (1.7 M solution in EtOAc; 4.00 mL, 6.85 mmol) and **8c** (163 mg, 1.10 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred at 80 °C for 24 h. The mixture was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃) to give the free form of the title compound, which was dissolved in EtOAc (10 mL), and 4 M HCl in EtOAc (1.20 mL, 4.80 mmol) was added to the solution. The mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was triturated with 2-propanol and diisopropyl ether. The resulting precipitate was collected by filtration and dried *in vacuo* to give **2c** (528 mg, 53%) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.63 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 2.73 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.09 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 6.25 (dd, 1H, *J* = 3.8, 7.9 Hz), 6.34 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.48 (dd, 1H, *J* = 8.5, 0.9 Hz), 6.76–6.90 (m, 6H), 7.56 (dd, 1H, *J* = 3.8, 1.4 Hz), 8.26 (dd, 1H, *J* = 7.4, 1.4 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.58, 21.96, 23.84, 25.96, 111.49, 112.14, 114.97, 116.10, 120.40, 127.54, 127.54, 130.61, 130.81, 130.81, 130.84, 131.62, 132.18, 133.02, 133.78, 136.11, 148.74, 152.45, 172.45; MS (ESI) *m/z* 368 [M+H]⁺; Anal. Calcd for C₂₃H₂₁N₅·2HCl·1.5H₂O·0.1*i*-Pr₂O: C, 59.35; H, 5.78; N, 14.85; Cl, 18.80. Found: C, 59.43; H, 5.59; N, 14.56; Cl, 18.97.

7-[2-(5-Methyl-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)ethyl]imidazo[1,5-*b*]pyridazine (2d)

Compound **2d** was prepared from **7** and **8d** in a manner similar to that described for compound **2a**, with a yield of 82% as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.41 (s, 3H), 3.27 (dd, 2H, *J* = 8.3, 6.5 Hz), 3.52 (dd, 2H, *J* = 8.3, 6.5 Hz), 6.65 (dd, 1H, *J* = 9.3, 4.3 Hz), 6.95–7.02 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.43–7.61 (m, 6H), 8.03 (dd, 1H, *J* = 9.3, 1.5 Hz), 8.20 (dd, 1H, *J* = 3.0, 1.5 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 21.60, 24.11, 24.72, 109.83, 111.81, 118.98, 119.08, 124.19, 124.81, 127.46, 127.46, 127.92, 129.12, 130.41, 130.41, 131.43, 134.73, 135.92, 140.74, 143.08, 145.22, 154.10; MS (ESI) *m/z* 354 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₀N₅ [M+H]⁺ 354.1718; found, 354.1719; Anal. Calcd for C₂₂H₁₉N₅: C, 74.77; H, 5.42; N, 19.82. Found: C, 74.56; H, 5.49; N, 19.58; mp 144 °C.

5-Bromo-7-[2-(5-methyl-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)ethyl]imidazo[1,5-*b*]pyridazine (9)

To a mixture of **2d** (300 mg, 0.849 mmol) in MeCN (3.0 mL) was added *N*-bromosuccinimide (NBS; 181 mg, 1.02 mmol) in CH₂Cl₂ (0.60 mL) at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 1 h under argon atmosphere. The mixture was diluted with H₂O and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃) to give **9** (297 mg, 81%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.41 (s, 3H), 3.26 (dd, 2H, *J* = 8.3, 6.3 Hz), 3.51 (dd, 2H, *J* =

8.3, 6.3 Hz), 6.76 (dd, 1H, $J = 9.3, 4.3$ Hz), 6.96–7.02 (m, 2H), 7.43–7.61 (m, 6H), 7.88 (dd, 1H, $J = 9.3, 1.6$ Hz), 8.26 (dd, 1H, $J = 4.3, 1.6$ Hz); MS (ESI) m/z 432, 434 $[M+H]^+$.

5-Methyl-7-[2-(5-methyl-1-phenyl-1H-benzimidazol-2-yl)ethyl]imidazo[1,5-b]pyridazine (2e)

To a mixture of **9** (120 mg, 0.277 mmol) in 1,4-dioxane (2.4 mL) were added trimethylboroxine (0.116 mL, 0.833 mmol), [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) dichloromethane complex ($PdCl_2(dppf) \cdot CH_2Cl_2$; 68.0 mg, 83.2 μ mol) and K_2CO_3 (230 mg, 1.66 mmol). The mixture was stirred at 90 °C for 26 h under an argon atmosphere. After cooling at room temperature, the mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–50% MeOH in $CHCl_3$ then NH silica gel, 0–30% EtOAc in $CHCl_3$) to give **2e** (36.0 mg, 35%) as a colorless solid. 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 2.33 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.25 (dd, 2H, $J = 8.5, 5.8$ Hz), 3.46 (dd, 2H, $J = 8.5, 5.8$ Hz), 6.50 (dd, 1H, $J = 9.2, 4.2$ Hz), 6.95–7.02 (m, 2H), 7.44–7.61 (m, 6H), 8.00 (dd, 1H, $J = 9.2, 1.6$ Hz), 8.09 (dd, 1H, $J = 4.2, 1.6$ Hz); MS (ESI) m/z 368 $[M+H]^+$; HRMS (ESI+) calcd for $C_{23}H_{22}N_5$ $[M+H]^+$ 368.1875; found, 368.1879.

Ethyl 3-(3-methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-1-yl)propanoate (11f)

To a mixture of **10f** (3.65 g, 27.4 mmol) in MeCN (25 mL) were added ethyl acrylate (5.97 mL, 54.9 mmol) and DBU (2.05 mL, 13.7 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 12 h under an argon atmosphere. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–20% AcOEt in *n*-hexane) to give **11f** (4.56 g, 71%) as a colorless oil. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 1.85 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 2.56 (s, 3H), 2.96 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 4.12 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 4.76 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 7.07 (dd, 1H, $J = 8.0, 4.6$ Hz), 7.97 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.6$ Hz), 8.51 (dd, 1H, $J = 4.6, 1.6$ Hz); MS (ESI) m/z 234 $[M+H]^+$.

Ethyl 3-(2-methyl-3-oxopyrido[2,3-b]pyrazin-4(3H)-yl)propanoate (11g)

Compound **11g** was prepared from **10g** in a manner similar to that described for compound **11f**, with a yield of 28% as a yellow solid. 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 1.12 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 2.46 (s, 3H), 2.69 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.02 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.59 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.43 (dd, 1H, $J = 7.9, 4.7$ Hz), 8.18 (dd, 1H, $J = 7.9, 1.7$ Hz), 8.59 (dd, 1H, $J = 4.7, 1.7$ Hz); MS (ESI) m/z 262 $[M+H]^+$.

3-(3-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-1-yl)propanoic acid (12f)

Compound **12f** was prepared from **11f** in a manner similar to that described for compound **7**, with a yield of 89% as a colorless solid. 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 2.50 (s, 3H), 2.85 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 4.58 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.17 (dd, 1H, $J = 8.0, 4.5$ Hz), 8.20 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.6$ Hz), 8.51 (dd, 1H, $J = 4.5, 1.6$ Hz), 12.30 (s, 1H); MS (ESI) m/z 206 $[M+H]^+$.

3-(2-Methyl-3-oxopyrido[2,3-*b*]pyrazin-4(3*H*)-yl)propanoic acid (**12g**)

Compound **12g** was prepared from **11g** in a manner similar to that described for compound **7**, with a yield of 79% as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.46 (s, 3H), 2.60–2.64 (m, 2H), 4.53–4.57 (m, 2H), 7.42 (dd, 1H, *J* = 7.9, 4.7 Hz), 8.17 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.7 Hz), 8.59 (dd, 1H, *J* = 4.7, 1.7 Hz), 12.41 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 234 [M+H]⁺.

3-Methyl-1-[2-(5-methyl-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)ethyl]-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine dihydrochloride (**2f**)

Compound **2f** was prepared from **17a** and **12f** in a manner similar to that described for compound **3f**, with a yield of 91% as an off-white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.36 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 3.58 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 4.84 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 7.12 (dd, 1H, *J* = 8.0, 4.6 Hz), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.30–7.36 (m, 3H), 7.56–7.65 (m, 3H), 7.70 (t, 1H, *J* = 0.7 Hz), 8.17 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.5 Hz), 8.26 (dd, 1H, *J* = 4.5, 1.5 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 11.38, 20.40, 25.75, 43.07, 111.36, 113.08, 114.19, 115.78, 126.10, 126.10, 127.09, 129.54, 129.61, 129.61, 129.81, 130.01, 130.31, 131.13, 136.05, 140.40, 147.96, 149.51, 150.78; MS (ESI) *m/z* 368 [M+H]⁺ Anal. Calcd for C₂₃H₂₁N₅·2.65HCl·H₂O: C, 57.30; H, 5.36; N, 14.53; Cl, 19.49. Found: C, 57.56; H, 5.29; N, 14.59; Cl, 19.45.

2-Methyl-4-[2-(5-methyl-1-phenyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)ethyl]pyrido[2,3-*b*]pyrazin-3(4*H*)-one (**2g**)

To a mixture of **17a** (325 mg, 1.20 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) were added HATU (684 mg, 1.50 mmol), DIPEA (0.820 mL, 4.79 mmol) and **12g** (308 mg, 1.32 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 12 h. The mixture was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To the residue was added AcOH (8 mL), and the mixture was stirred at 90 °C for 12 h. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃). The residue was washed with EtOAc/*n*-hexane to give **2g** (367 mg, 77%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.38 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.15 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 4.73 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 6.96–7.03 (m, 2H), 7.35 (dd, 1H, *J* = 7.9, 4.7 Hz), 7.43–7.59 (m, 6H), 8.12 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.7 Hz), 8.43 (dd, 1H, *J* = 4.7, 1.7 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 20.48, 20.53, 24.44, 37.88, 108.84, 117.91, 119.01, 123.32, 126.28, 126.28, 126.80, 128.04, 129.34, 129.34, 130.44, 133.51, 134.67, 135.85, 142.00, 142.54, 147.91, 150.94, 154.58, 158.67; MS (ESI) *m/z* 396 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₂N₅O [M+H]⁺ 396.1824; found, 396.1833; Anal. Calcd for C₂₄H₂₁N₅O: C, 72.89; H, 5.35; N, 17.71. Found: C, 72.90; H, 5.34; N, 17.66; mp 150 °C.

5-Methyl-3-nitro-*N*-phenylpyridin-2-amine (**22a**)

To a mixture **21a** (3.00 g, 17.4 mmol) in aniline (4.05 mL, 43.5 mmol) was stirred at 120 °C for 3 h under microwave

irradiation. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and diluted with EtOAc. Insoluble fraction was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was washed with *n*-hexane to give **22a** (2.96 g, 74%) as a dark red solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.29 (s, 3H), 7.11 (tt, 1H, *J* = 7.3, 1.1 Hz), 7.31–7.37 (m, 2H), 7.63–7.66 (m, 2H), 8.38–8.40 (m, 2H), 9.85 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 230 [M+H]⁺.

4-Methoxy-3-nitro-*N*-phenylpyridin-2-amine (22b)

Compound **22b** was prepared from **21b** in a manner similar to that described for compound **16f**, with a yield of 47% as an orange oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.94 (s, 3H), 6.52–6.55 (m, 1H), 6.80 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz), 7.25–7.29 (m, 2H), 7.50 (dd, 2H, *J* = 8.6, 1.1 Hz), 8.18 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz), 8.87 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 246 [M+H]⁺.

5-Methyl-*N*²-phenylpyridine-2,3-diamine dihydrochloride (23a)

Compound **23a** was prepared from **22a** in a manner similar to that described for compound **17f**, with a yield of 98% as a gray solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.18 (s, 3H), 7.11 (s, 1H), 7.14 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 7.25 (tt, 1H, *J* = 7.4, 1.1 Hz), 7.31–7.34 (m, 2H), 7.44–7.49 (m, 2H), 9.95 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 200 [M+H]⁺.

4-Methoxy-*N*²-phenylpyridine-2,3-diamine dihydrochloride (23b)

Compound **23b** was prepared from **22b** in a manner similar to that described for compound **17f**, with a yield of 29% as a green solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.03 (s, 3H), 7.05 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 7.15–7.22 (m, 3H), 7.36–7.54 (m, 3H), 9.44 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 216 [M+H]⁺.

1-Methyl-3-[2-(6-methyl-3-phenyl-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)ethyl]-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one dihydrochloride (4a)

Compound **4a** was prepared from **23a** and **20** in a manner similar to that described for compound **3f**, with a yield of 72% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.47 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.41 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 4.24 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 7.00 (dd, 1H, *J* = 7.7, 5.2 Hz), 7.41–7.45 (m, 3H), 7.52–7.58 (m, 3H), 7.70 (dd, 1H, *J* = 7.3, 1.3 Hz), 8.07 (s, 1H), 8.28 (d, 1H, *J* = 1.3 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 18.43, 26.29, 27.23, 37.74, 114.88, 117.66, 124.17, 124.81, 125.94, 127.75, 127.75, 130.16, 130.16, 130.51, 132.02, 132.04, 139.78, 142.64, 144.31, 147.85, 153.04, 153.59; MS (ESI) *m/z* 385 [M+H]⁺ Anal. Calcd for C₂₂H₂₀N₆O·2HCl·0.5H₂O: C, 56.66; H, 4.97; N, 18.02; Cl, 15.20. Found: C, 56.57; H, 5.02; N, 17.86; Cl, 15.18; mp 194 °C.

3-[2-(7-Methoxy-3-phenyl-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)ethyl]-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one dihydrochloride (4b)

Compound **4b** was prepared from **23b** and **20** in a manner similar to that described for compound **3f**, with a yield

of 63% as a colorless solid. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 3.24 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.26 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 4.22 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 6.93 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.01 (dd, 1H, $J = 7.7, 5.2$ Hz), 7.40–7.55 (m, 6H), 7.81 (dd, 1H, $J = 5.2, 1.3$ Hz), 8.12 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 26.28, 27.21, 37.85, 57.60, 104.61, 114.83, 117.59, 124.80, 127.85, 127.85, 130.09, 130.09, 130.26, 132.67, 139.74, 139.74, 142.72, 147.48, 147.96, 152.17, 153.10, 156.14; MS (ESI) m/z 401 $[\text{M}+\text{H}]^+$ Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2 \cdot 1.8\text{HCl} \cdot 2.87\text{H}_2\text{O}$: C, 51.03; H, 5.36; N, 16.23; Cl, 12.33. Found: C, 51.31; H, 5.37; N, 15.93; Cl, 12.34.

***N*-Methylpyrazine-2,3-diamine (25)**

A mixture of 2-amino-3-chloropyrazine (**24**) (5.20 g, 40.1 mmol) and CuSO_4 (640 mg, 4.01 mmol) in 12 M aqueous solution of methanamine (40.0 mL, 480 mmol) was stirred at 120 °C for 3 h under microwave irradiation. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl_3) to give **25** (3.99 g, 80%) as a yellow solid. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.81 (d, 3H, $J = 4.7$ Hz), 5.84 (s, 2H), 6.13 (q, 1H, $J = 4.7$ Hz), 7.09 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 7.23 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz); MS (ESI) m/z 125 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ethyl 3-(3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyrazin-1-yl)propanoate (26)

To a mixture of **25** (3.99 g, 32.1 mmol) in THF (200 mL) was added carbonyldiimidazole (CDI; 10.4 g, 64.1 mmol), and the mixture was stirred at 70 °C for 5 h. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl_3). The residue was washed with EtOAc/*n*-hexane. To the residue in MeCN (100 mL) were added ethyl acrylate (7.00 mL, 64.4 mmol) and DBU (2.40 mL, 16.4 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 12 h under an argon atmosphere. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl_3) to give **26** (6.11 g, 76%) as a colorless solid. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.10 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 2.81 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.34 (s, 3H), 4.00 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.11 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 7.95 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz), 7.96 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz); MS (ESI) m/z 251 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(3-Methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyrazin-1-yl)propanoic acid (27)

Compound **27** was prepared from **26** in a manner similar to that described for compound **7**, with a yield of 89% as a pale yellow solid. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.75 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.34 (s, 3H), 4.08 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.94–7.97 (m, 2H), 12.39 (s, 1H); MS (ESI) m/z 223 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-[2-(7-Methoxy-3-phenyl-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)ethyl]-3-methyl-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyrazin-2-one hydrochloride (5a)

Compound **5a** was prepared from **23b** and **27** in a manner similar to that described for compound **3f**, with a yield of 76% as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.25–3.34 (m, 5H), 4.08 (s, 3H), 4.22 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 6.95 (d, 1H, *J* = 5.7 Hz), 7.41–7.54 (m, 5H), 7.78 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz), 7.89 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz), 8.14 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 25.82, 26.31, 37.83, 57.30, 103.83, 127.92, 127.92, 129.67, 129.97, 129.97, 133.69, 134.77, 134.77, 135.12, 139.00, 139.59, 146.55, 149.43, 151.43, 153.10, 156.67; MS (ESI) *m/z* 402 [M+H]⁺ Anal. Calcd for C₂₁H₁₉N₇O₂·HCl·1.6H₂O: C, 54.04; H, 5.01; N, 21.01; Cl, 7.60. Found: C, 54.13; H, 5.13; N, 20.94; Cl, 7.57; mp 179 °C.

Ethyl *N*-(4-methyl-3-nitropyridin-2-yl)-beta-alaninate (**29**)

To a mixture of **28** (5.00 g, 29.0 mmol) in EtOH (50 mL) were added β-alanine ethyl ester hydrochloride (11.1 g, 72.4 mmol) and triethylamine (20.2 mL, 145 mmol), and the mixture was stirred at 80 °C for 3 d. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with 50% EtOAc/*n*-hexane, and the resulting precipitate was removed by filtration. The filtrate was concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography (silica gel, 0–30% EtOAc in *n*-hexane) to give **29** (6.03 g, 82%) as a yellow oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.16 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 2.36–2.38 (m, 4H), 2.59 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.67 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz), 4.05 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 6.64 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 8.16 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz); MS (ESI) *m/z* 254 [M+H]⁺.

Ethyl 3-(7-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-3-yl)propanoate (**30**)

To a mixture of **29** (765 mg, 3.02 mmol) in EtOH (20 mL) was added 10% Pd(OH)₂-C (38.4 mg, 0.055 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 6 h under a hydrogen atmosphere. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give a yellow oil. To a mixture of the residue in THF (12 mL) was added CDI (343 mg, 2.11 mmol), and the mixture was stirred at 80 °C for 24 h. The mixture was diluted with H₂O and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃) to give **30** (216 mg, 44%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.11 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 2.29 (s, 3H), 2.75 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 4.00 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 4.05 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 6.84 (dd, 1H, *J* = 5.3, 0.6 Hz), 7.82 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz), 11.20 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 250 [M+H]⁺.

Ethyl 3-(1,7-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydro-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-3-yl)propanoate (**31**)

To a mixture of **30** (3.21 g, 12.9 mmol) in DMF (50 mL) were added MeI (1.20 mL, 19.2 mmol) and Cs₂CO₃ (5.00 g, 15.3 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 14 h. The mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in

CHCl₃) to give **31** (3.39 g, 99%) as a yellow oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.11 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 2.55 (s, 3H), 2.74 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.54 (s, 3H), 4.00 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 4.09 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 6.85 (dd, 1H, *J* = 5.3, 0.6 Hz), 7.84 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz); MS (ESI) *m/z* 264 [M+H]⁺.

3-(1,7-Dimethyl-2-oxo-1,2-dihydro-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-3-yl)propanoic acid (**32**)

Compound **32** was prepared from **31** in a manner similar to that described for compound **7**, with a yield of 85% as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.55 (s, 3H), 2.69 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 3.54 (s, 3H), 4.06 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 6.86 (dd, 1H, *J* = 5.2, 0.7 Hz), 7.84 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 12.33 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 236 [M+H]⁺.

3-[2-(7-Methoxy-3-phenyl-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)ethyl]-1,7-dimethyl-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one (**5b**)

Compound **5b** was prepared from **23b** and **32** in a manner similar to that described for compound **2g**, with a yield of 68% as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.52 (s, 3H), 3.21 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.46 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 4.21 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 6.78 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.38–7.53 (m, 5H), 7.69 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 8.07 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 17.06, 26.83, 29.19, 38.14, 56.93, 102.99, 120.58, 122.69, 124.38, 127.16, 127.98, 127.98, 128.99, 129.67, 129.67, 134.65, 140.05, 142.76, 145.70, 150.88, 151.16, 153.39, 156.96; MS (ESI) *m/z* 415 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₃N₆O₂ [M+H]⁺ 415.1882; found, 415.1873; Anal. Calcd for C₂₃H₂₂N₆O₂·0.3H₂O·0.1EtOAc: C, 65.56; H, 5.50; N, 19.60. Found: C, 65.72; H, 5.44; N, 19.50; mp 203 °C.

第二章に関する実験

2-Methyl-5-[2-(quinolin-2-yl)ethyl]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (**34a**)

A mixture of ethyl potassium malonate (1019 mg, 6.00 mmol), magnesium chloride (571 mg, 6.00 mmol) and triethylamine (1070 μL, 7.68 mmol) in THF (24 mL) was stirred at room temperature for 2.5 h. 1 mL of the reaction mixture was added to another reaction mixture of 3-(quinoline-2-yl)propanoic acid (17.3 mg, 0.100 mmol) and CDI (24.3 mg, 0.150 mmol) in THF (0.2 mL) which had been stirred at 50 °C for 2 h. The combined reaction mixture was stirred at 50 °C for 15 h. After cooling at room temperature, to the reaction mixture were added 1 M HCl aqueous solution (0.5 mL), CHCl₃ and saturated NaHCO₃ aqueous solution (0.5 mL). The mixture was through the phase separator. The organic layer was concentrated *in vacuo*. To the residue was added 5-methyl-1*H*-pyrazole-3-amine (**38**) (9.70 mg, 0.100 mmol) in 1,4-dioxane (0.100 mL) and AcOH (5.0 μL, 87 μmol), and the mixture was stirred at 90 °C for overnight. After cooling at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue

was purified by preparative HPLC (Waters SunFire™ Column, C18, 5 μm, 19×100 mm, 10–95% MeOH in 0.1%(v/v) formic acid aqueous solution) to give **34a** (5.4 mg, 17%) as a pale brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.27 (s, 3H), 3.09 (dd, 2H, *J* = 9.0, 6.8 Hz), 3.32–3.36 (m, 2H), 5.57 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 5.95 (s, 1H), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.56 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 6.9, 1.2 Hz), 7.74 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 6.9, 1.5 Hz), 7.93–7.96 (m, 2H), 8.30 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 12.23 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 305 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₈H₁₇ON₄ [M+H]⁺ 305.1397; found, 305.1398.

2-Methyl-5-(quinolin-2-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (**34b**)

Compound **34b** was prepared from quinaldic acid in a manner similar to that described for compound **34a**, with a yield of 12%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.34 (s, 3H), 6.22 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 7.75 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 7.0, 0.99 Hz), 7.92 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz), 8.12 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 8.24 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.37 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 8.62 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 12.53 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 277 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₆H₁₃ON₄ [M+H]⁺ 277.1084; found, 277.1084.

2-Methyl-5-[(quinolin-2-ylsulfanyl)methyl]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (**34c**)

Compound **34c** was prepared from (quinolin-2-ylsulfanyl)acetic acid in a manner similar to that described for compound **34a**, with a yield of 27%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.26 (s, 3H), 4.52 (s, 2H), 5.84 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.54 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 7.0, 1.1 Hz), 7.76 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.0, 1.4 Hz), 7.90–7.98 (m, 2H), 8.23 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 12.43 (br-s, 1H); MS (ESI) *m/z* 323 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₇H₁₅ON₄S [M+H]⁺ 323.0961; found, 323.0961.

2-Methyl-5-[2-(pyridin-2-yl)ethyl]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (**34d**)

A mixture of ethyl potassium malonate (2145 mg, 12.6 mmol), magnesium chloride (1428 mg, 15.0 mmol) and triethylamine (2676 μL, 19.2 mmol) in THF (60 mL) was stirred at room temperature for 2.5 h. 0.5 mL of the reaction mixture was added to another reaction mixture of 3-(pyridin-2-yl)propanoic acid (7.56 mg, 50.0 μmol) and CDI (12.2 mg, 75 μmol) in THF (0.2 mL) which had been stirred at 50 °C for 2 h. The combined reaction mixture was stirred at 50 °C for overnight. After cooling at room temperature, to the reaction mixture were added 1 M HCl aqueous solution (0.5 mL), CHCl₃ (2.5 mL) and saturated NaHCO₃ aqueous solution (0.5 mL). The mixture was through the phase separator. The organic layer was concentrated *in vacuo*. To the residue was added 5-methyl-1*H*-pyrazole-3-amine (**38**) (4.90 mg, 50 μmol) in 1,4-dioxane (0.100 mL) and AcOH (5.0 μL, 87 μmol), and the mixture was stirred at 90 °C for overnight. After cooling at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative HPLC (Waters SunFire™ Column, C18, 5 μm, 19×100 mm, 10–95% MeOH in 0.1%(v/v) formic acid aqueous solution) to give **34d** (5.3 mg, 42%). MS (ESI) *m/z* 255 [M+H]⁺.

2-Methyl-5-[2-([1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (34e)

Compound **34e** was prepared from 3-([1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidine-2-yl)propanoic acid in a manner similar to that described for compound **34a**, with a yield of 40% as a pale brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.27 (s, 3H), 3.05–3.13 (m, 2H), 3.23–3.30 (m, 2H), 5.57 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 7.31 (dd, 1H, *J* = 6.8, 4.3 Hz), 8.83 (dd, 2H, *J* = 4.3, 1.9 Hz), 9.33 (dd, 1H, *J* = 6.8, 1.9 Hz), 12.20 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 296 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₄H₁₄ON₇ [M+H]⁺ 296.1254; found, 296.1257.

5-[2-(Imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)ethyl]-2-methylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (34f)

Compound **34f** was prepared from 3-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)propanoic acid in a manner similar to that described for compound **34d**, with a yield of 30%. MS (ESI) *m/z* 294 [M+H]⁺.

5-[2-(Imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]-2-methylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (34g)

Compound **34g** was prepared from 3-(imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-2-yl)propanoic acid in a manner similar to that described for compound **34d**, with a yield of 10%. MS (ESI) *m/z* 295 [M+H]⁺.

5-[2-(1*H*-Benzimidazol-2-yl)ethyl]-2-methylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (34h)

Compound **34h** was prepared from 3-(1*H*-benzimidazole-2-yl)propanoic acid in a manner similar to that described for compound **34a**, with a yield of 27%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.27 (s, 3H), 3.09 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 3.23 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 5.54 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 7.08–7.16 (m, 2H), 7.43–7.53 (m, 2H), 12.30 (br-s, 2H); MS (ESI) *m/z* 294 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₆H₁₆ON₅ [M+H]⁺ 294.1349; found, 294.1347.

3-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)propanoic acid (41)

A mixture of aminoguanidine hydrochloride (**39**) (25.0 g, 226 mmol) and succinic anhydride (**40**) (25.0 g, 250 mmol) was stirred at 190 °C for 1 h. After cooling at room temperature, to the reaction mixture were added sodium hydroxide (27.0 g, 675 mmol) and H₂O (67 mL). The mixture was stirred at 120 °C for 1.5 h. After cooling, to the reaction mixture were added conc. HCl aqueous solution (37 mL) and H₂O (25 mL) at room temperature, and the mixture was stood overnight. The resulting precipitate under ice-bath cooling was collected by filtration. To the residue were added EtOH (400 mL), acetylacetone (20.0 mL, 194 mmol) and AcOH (2.00 mL, 35.0 mmol), and the mixture was stirred under reflux for 7 h. After cooling at room temperature, to the mixture were added H₂O (30 mL) and sodium hydroxide (10.0 g, 250 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo* lightly. To the solution was added conc. HCl aqueous solution (20 mL) and the mixture was cooled under ice-bath. The resulting precipitate was collected by filtration to give **41** (33.7 g, 68%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.55 (s, 3H), 2.69 (d, 3H, *J* = 0.9 Hz), 2.76 (t, 2H, *J* = 7.3

Hz), 3.05 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.10 (d, 1H, $J = 0.9$ Hz), 12.20 (br-s, 1H); MS (ESI) m/z 221 $[M+H]^+$.

5-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]-2-methylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (**35a**)

To a mixture of **41** (661 mg, 3.00 mmol) in THF (10 mL) was added CDI (584 mg, 3.60 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 1 h. To the reaction mixture were added ethyl potassium malonate (1.02 g, 6.00 mmol), magnesium chloride (571 mg, 6.00 mmol), triethylamine (1.04 mL, 7.50 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 12 h. After cooling at room temperature, to the reaction mixture was added 1 M HCl aqueous solution, and the mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To the residue were added 1,4-dioxane (10 mL), 5-methyl-1*H*-pyrazol-3-amine (**38**) (200 mg, 2.06 mmol) and AcOH (1.18 mL, 20.6 mmol), and the mixture was stirred at 90 °C for 12 h. After cooling at room temperature, the mixture was diluted with Et₂O, and the resulting precipitate was collected by filtration to give **35a** (614 mg, 92%) as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.27 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.68 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz), 3.01–3.11 (m, 2H), 3.20–3.28 (m, 2H), 5.57 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 7.12 (d, 1H, $J = 0.8$ Hz), 12.20 (br-s, 1H); MS (ESI) m/z 324 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for C₁₆H₁₈N₇O $[M+H]^+$ 324.1567; found, 324.1569; Anal. Calcd for C₁₆H₁₇N₇O·1.3H₂O: C, 55.42; H, 5.70; N, 28.27. Found: C, 55.67; H, 5.63; N, 27.93.

2-Methyl-5-[2-(6-methyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ol (**35b**)

To a mixture of 3-(6-methyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)propanoic acid (619 mg, 3.00 mmol) in THF (10 mL) was added CDI (584 mg, 3.60 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 1 h. To the reaction mixture were added ethyl potassium malonate (1.02 g, 6.00 mmol), magnesium chloride (571 mg, 6.00 mmol), triethylamine (1.04 mL, 7.50 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 12 h. After cooling at room temperature, to the reaction mixture was added 1 M HCl aqueous solution, and the mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To the residue were added 1,4-dioxane (10 mL), 5-methyl-1*H*-pyrazol-3-amine (**38**) (200 mg, 2.06 mmol) and AcOH (1.18 mL, 20.6 mmol). The mixture was stirred at 90 °C for 12 h. After cooling at room temperature, the mixture was diluted with Et₂O, and the resulting precipitate was collected by filtration to give **35b** (487 mg, 76%) as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.26 (s, 3H), 2.36 (d, 3H, $J = 0.8$ Hz), 3.01–3.11 (m, 2H), 3.20–3.29 (m, 2H), 5.55 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 8.73 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 9.17 (dd, 1H, $J = 2.3, 1.1$ Hz), 12.20 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 14.54, 14.89, 27.45, 30.81, 88.62, 94.83, 120.71, 135.16, 142.57, 152.24, 152.40, 154.41, 156.50, 157.47, 166.99; MS (ESI) m/z 310 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for C₁₅H₁₆N₇O $[M+H]^+$ 310.1411; found, 310.1414; Anal. Calcd for C₁₅H₁₅N₇O·0.4H₂O: C, 56.92; H, 5.03; N, 30.98. Found: C, 57.05; H, 5.00; N, 30.81; mp 273 °C.

2-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]pyrimido[1,2-*b*]indazol-4-ol (36a)

To a mixture of **41** (2.20 g, 10.0 mmol) in THF (33 mL) was added CDI (1.95 g, 12.0 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 1 h. To the reaction mixture were added ethyl potassium malonate (3.40 g, 20.0 mmol), magnesium chloride (1.90 g, 20.0 mmol), triethylamine (3.48 mL, 25.0 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 12 h. After cooling at room temperature, to the reaction mixture was added 1 M HCl aqueous solution (50 mL), and the mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To a half of the residue were added 1,4-dioxane (15 mL), 1*H*-indazol-3-amine (610 mg, 4.58 mmol) and AcOH (4 mL). The mixture was stirred at 95 °C for 18 h. After cooling at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with EtOAc and saturated NaHCO₃ aqueous solution, and the resulting precipitate was collected by filtration to give **36a** (194 mg, 11%) as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, *J* = 0.7 Hz), 3.03–3.13 (m, 2H), 3.21–3.27 (m, 2H), 5.76 (s, 1H), 6.82 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 6.8, 0.8 Hz), 7.09 (d, 1H, *J* = 0.9 Hz), 7.24–7.33 (m, 1H), 7.44 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.90 (dt, 1H, *J* = 8.2, 1.0 Hz); MS (ESI) *m/z* 360 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₁₈N₇O [M+H]⁺ 360.1567; found, 360.1568.

4-Chloro-2-[2-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]pyrimido[1,2-*b*]indazole (36f)

A mixture of **36a** (280 mg, 0.779 mmol) and phosphorous oxychloride (3.35 g, 21.8 mmol) was stirred at 100 °C for 1 d. After cooling at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with saturated NaHCO₃ aqueous solution and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃) to give **36f** (112 mg, 38%) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.55 (s, 3H), 2.68 (d, 3H, *J* = 0.9 Hz), 3.36–3.58 (m, 4H), 7.10 (d, 1H, *J* = 0.9 Hz), 7.32 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.7, 0.7 Hz), 7.67 (ddd, 1H, *J* = 8.7, 6.7, 1.1 Hz), 7.87 (dt, 1H, *J* = 8.6, 0.9 Hz), 7.98 (s, 1H), 8.23 (dt, 1H, *J* = 8.3, 1.0 Hz); MS (ESI) *m/z* 378 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₁₇N₇Cl [M+H]⁺ 378.1228; found, 378.1230.

2-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]-*N*-methylpyrimido[1,2-*b*]indazol-4-amine (36b)

To a solution of **36f** (96.0 mg, 0.254 mmol) in THF (0.96 mL) was added methylamine solution (381 μL, 0.762 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 17 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–20% MeOH in CHCl₃). The residue was washed with EtOAc to give **36b** (92.0 mg, 97%) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, *J* = 0.7 Hz), 3.04 (d, 3H, *J* = 4.9 Hz), 3.33–3.43 (m, 4H), 6.58 (s, 1H), 7.05–7.14 (m, 2H), 7.43–7.58 (m, 1H), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.05–8.13 (m, 1H), 8.14–8.23 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.99, 24.89, 28.68, 28.87, 36.41, 89.30, 110.79, 112.73, 115.70, 119.04, 121.65, 129.65, 143.69, 147.00, 147.29, 150.33, 155.53, 159.60, 164.37, 167.61;

MS (ESI) m/z 373 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for $C_{20}H_{21}N_8$ $[M+H]^+$ 373.1884; found, 373.1886; Anal. Calcd for $C_{20}H_{20}N_8 \cdot 0.4EtOAc$: C, 63.64; H, 5.74; N, 27.49. Found: C, 63.33; H, 5.53; N, 27.78; mp 245 °C.

2-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]-4-methoxypyrimido[1,2-*b*]indazole (36c)

To a solution of **36f** (100 mg, 0.265 mmol) in MeOH (1.00 mL) was added sodium methoxide (28.6 mg, 0.529 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was diluted with H₂O, and the resulting precipitate was collected by filtration. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–10% MeOH in CHCl₃). The residue was washed with EtOAc to give **36c** (81.0 mg, 82%) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, J = 0.9 Hz), 3.39–3.55 (m, 4H), 4.28 (s, 3H), 7.11 (d, 1H, J = 0.9 Hz), 7.14–7.29 (m, 2H), 7.56 (ddd, 1H, J = 8.8, 6.7, 1.1 Hz), 7.72 (dt, 1H, J = 8.7, 0.9 Hz), 8.15 (dt, 1H, J = 8.3, 1.0 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.99, 24.89, 28.26, 36.28, 58.20, 92.48, 110.84, 112.46, 116.52, 120.22, 121.25, 129.97, 144.81, 147.03, 150.97, 155.19, 155.54, 160.86, 164.43, 167.37; MS (ESI) m/z 374 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for $C_{20}H_{20}N_7O$ $[M+H]^+$ 374.1724; found, 374.1726; Anal. Calcd for $C_{20}H_{19}N_7O \cdot 0.2H_2O \cdot 0.2EtOAc$: C, 63.30; H, 5.36; N, 24.85. Found: C, 63.42; H, 5.23; N, 25.01; mp 144°C.

2-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]-4-methylpyrimido[1,2-*b*]indazole (36d)

To a stirred mixture of **36f** (50.0 mg, 0.132 mmol), trimethylboroxine (49.8 mg, 0.397 mmol) and PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (32.4 mg, 39.7 μ mol) in 1,4-dioxane (1.00 mL) was added K₂CO₃ (110 mg, 0.794 mmol) under an argon atmosphere, and the mixture was stirred at 90 °C for 1 d. After cooling at room temperature, the mixture was diluted with water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃) to give **36d** (16.0 mg, 34%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.55 (s, 3H), 2.69 (d, 3H, J = 0.7 Hz), 2.88 (d, 3H, J = 0.7 Hz), 3.36–3.54 (m, 4H), 7.10 (d, 1H, J = 0.9 Hz), 7.24 (ddd, 1H, J = 8.2, 6.7, 0.8 Hz), 7.43–7.65 (m, 2H), 7.70–7.90 (m, 1H), 8.20 (dt, 1H, J = 8.3, 0.9 Hz); MS (ESI) m/z 358 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for $C_{20}H_{20}N_7$ $[M+H]^+$ 358.1775; found, 358.1776.

2-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]pyrimido[1,2-*b*]indazole (36e)

To a suspension of **36f** (104 mg, 0.275 mmol) in EtOH (1.0 mL) was added 5% Pd-C (29.3 mg). The mixture was stirred at room temperature for 24 h under a hydrogen atmosphere. The mixture was filtered through a pad of Celite, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–10% MeOH in CHCl₃) to give **36e** (3.3 mg, 3%) as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.55 (s, 3H), 2.68 (s, 3H), 3.39–3.53 (m, 4H), 7.10 (s, 1H), 7.22–7.28 (m, 1H), 7.51 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 7.60 (ddd, 1H, J = 8.4, 6.9, 0.99 Hz), 7.76 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 8.21 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 9.32 (d, 1H, J = 7.1 Hz); MS (ESI) m/z 344 $[M+H]^+$.

2-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]pyrimido[1,2-*b*]indazole-4-carbonitrile (36g)

A mixture of **36f** (50.0 mg, 0.132 mmol), potassium cyanide (18.0 mg, 0.276 mmol) and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO; 18.0 mg, 0.160 mmol) in 1,4-dioxane (2.0 mL) and H₂O (0.20 mL) was stirred at room temperature for 5 h. The residue was diluted with H₂O. The resulting precipitate was collected by filtration and purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃) to give **36g** (18.0 mg, 37%) as a bright red solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.55 (s, 3H), 2.68 (s, 3H), 3.40–3.60 (m, 4H), 7.10 (s, 1H), 7.36–7.50 (m, 1H), 7.73 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.0, 1.0 Hz), 7.94 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.26–8.36 (m, 1H), 8.40 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 369 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₀H₁₇N₈ [M+H]⁺ 369.1571; found, 369.1571.

2-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]pyrido[2',3',3,4]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-4-ol (42)

To a mixture of 3-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)propanoic acid (2.20 g, 10.0 mmol) in THF (33 mL) was added 1,1'-carbonyldiimidazole (1.95 g, 12.0 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 1 h. To the reaction mixture were added ethyl potassium malonate (3.40 g, 20.0 mmol), magnesium chloride (1.90 g, 20.0 mmol), triethylamine (3.48 mL, 25.0 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 12 h. After cooling to room temperature, to the reaction mixture was added 1 M HCl aqueous solution (50 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To a half of the residue were added 1,4-dioxane (15 mL), 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-3-amine (615 mg, 4.58 mmol) and AcOH (4 mL). The mixture was stirred at 90 °C for 36 h. After cooling to room temperature, the precipitate was collected by filtration. The solid was washed with EtOAc and saturated NaHCO₃ aqueous solution to give **42** (201 mg, 11%) as a pale brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 2.99–3.17 (m, 2H), 3.21–3.28 (m, 2H), 5.86 (s, 1H), 6.84 (dd, 1H, *J* = 7.9, 4.4 Hz), 7.10 (d, 1H, *J* = 0.66 Hz), 8.31 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.8 Hz), 8.54 (dd, 1H, *J* = 4.2, 1.8 Hz); MS (ESI) *m/z* 361 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₈H₁₇N₈O [M+H]⁺ 361.1520; found, 361.1519.

第三章に関する実験

Benzyl [2-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]carbamate (46)

To a suspension of 3-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)propanoic acid (**41**) (3.00 g, 13.6 mmol) in toluene (50 mL) were added benzyl alcohol (7.00 mL, 67.6 mmol), triethylamine (3.00 mL, 21.5 mmol) and diphenylphosphoryl azide (4.46 g, 16.2 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 120 °C for 2 h. After cooling to room temperature, H₂O was added to the residue followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified

by flash column chromatography (silica gel, 0–4% MeOH in CHCl₃) to give **46** (3.05 g, 69%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 2.96 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.40–3.50 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.26–7.39 (m, 6H); MS (ESI) *m/z* 326 [M+H]⁺.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethanamine (47)

To a solution of **46** (521 mg, 1.60 mmol) in MeOH (20 mL) was added 5% Pd-C (200 mg). The mixture was stirred at room temperature for 9 h under a hydrogen atmosphere. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give **47** (310 mg, quant.) as a pale brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, *J* = 0.78 Hz), 2.89–2.96 (m, 2H), 2.99–3.06 (m, 2H), 7.11 (d, 1H, *J* = 0.98 Hz); MS (ESI) *m/z* 192 [M+H]⁺.

***N*-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]quinolin-2-amine (43a)**

To a mixture of **47** (310 mg, 1.62 mmol) in 1,2-dimethoxyethane (10 mL) were added 2-chloroquinoline (300 mg, 1.83 mmol), *t*-BuONa (220 mg, 2.29 mmol), Pd(OAc)₂ (40.0 mg, 0.178 mmol) and (*S*)-1-[(*R*)-2-(dicyclohexylphosphino)ferrocenyl]ethyl-di-*tert*-butylphosphine ((*S*)-(*R*)-JOSIPHOS; 90.0 mg, 0.162 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C for 3 h under an argon atmosphere. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, MeOH in CHCl₃ then NH silica gel, EtOAc in *n*-hexane), and concentrated *in vacuo*. The residue was precipitated from EtOAc with Et₂O, and the resulting precipitate was collected by filtration to give **43a** (65.6 mg, 13%) as a brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.69 (d, 3H, *J* = 0.78 Hz), 3.17 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.81–3.93 (m, 2H), 6.76 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.10 (d, 1H, *J* = 0.78 Hz), 7.16 (br-t, 1H, *J* = 6.9 Hz), 7.41–7.57 (m, 2H), 7.62 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.85 (br-d, 1H, *J* = 8.8 Hz); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 15.43, 23.25, 28.85, 39.39, 110.56, 110.56, 112.64, 121.94, 123.02, 123.80, 127.29, 129.36, 137.45, 147.40, 155.19, 156.89, 165.36, 166.10; MS (ESI) *m/z* 319 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₈H₁₉N₆ [M+H]⁺ 319.1666; found, 319.1666; mp 216 °C.

***N*-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]quinoxalin-2-amine (43b)**

To a solution of 2-chloroquinoxaline (100 mg, 0.608 mmol) in *N*-methylpyrrolidone (NMP; 1.00 mL) was added **47** (250 mg, 1.31 mmol) under an argon atmosphere. The mixture was stirred at 160 °C for 3 h under microwave irradiation. After cooling to room temperature, H₂O was added to the residue followed by extraction with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–100% EtOAc in *n*-hexane), and concentrated *in vacuo*. The residue was washed with *n*-hexane/EtOAc to give **43b** (58.0 mg, 30%) as a brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.68 (s, 3H), 3.18 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 3.83–3.92 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 7.32 (ddd, 1H, *J*

= 8.2, 5.8, 2.3 Hz), 7.50–7.59 (m, 2H), 7.68–7.78 (m, 2H), 8.27 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.98, 24.89, 28.90, 39.28, 110.77, 123.85, 126.18, 128.89, 130.07, 136.75, 140.42, 142.18, 146.97, 152.77, 155.55, 164.37, 166.33; MS (ESI) *m/z* 320 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₇H₁₈N₇ [M+H]⁺ 320.1618; found, 320.1619.

***N*-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]quinazolin-2-amine (43c)**

Compound **43c** was prepared from 2-chloroquinazoline in a manner similar to that described for compound **43b**, with a yield of 14% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.68 (d, 3H, *J* = 0.66 Hz), 3.15 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.77–3.88 (m, 2H), 7.10 (d, 1H, *J* = 0.88 Hz), 7.23 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 6.8, 1.1 Hz), 7.39–7.50 (m, 2H), 7.69 (ddd, 1H, *J* = 8.5, 7.0, 1.5 Hz), 7.79 (dd, 1H, *J* = 8.1, 0.99 Hz), 9.11 (br-s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.99, 24.89, 29.25, 40.25, 110.74, 120.14, 122.46, 125.30, 128.36, 134.54, 146.97, 151.98, 155.52, 159.94, 162.56, 164.33, 166.44; MS (ESI) *m/z* 320 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₇H₁₈N₇ [M+H]⁺ 320.1618; found, 320.1620.

***N*-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]-1*H*-benzimidazol-2-amine (43d)**

Compound **43d** was prepared from 2-chlorobenzimidazole in a manner similar to that described for compound **43b**, with a yield of 96% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.57 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, *J* = 0.66 Hz), 3.15 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.75 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz), 6.59 (br-t, 1H, *J* = 6.1 Hz), 6.77–6.94 (m, 2H), 7.05–7.19 (m, 3H), 10.75 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 17.00, 24.90, 29.71, 41.38, 109.04, 110.80, 115.21, 118.71, 120.34, 134.19, 144.20, 147.01, 155.53, 155.74, 164.41, 166.43; MS (ESI) *m/z* 308 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₆H₁₈N₇ [M+H]⁺ 308.1618; found, 308.1619; Anal. Calcd for C₁₆H₁₇N₇·1.5H₂O: C, 57.47; H, 6.03; N, 29.32. Found: C, 57.51; H, 6.09; N, 29.19; mp 275 °C.

***N*-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]-1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-amine (43e)**

Compound **43e** was prepared from 2-chloro-1-methylbenzimidazole in a manner similar to that described for compound **43b**, with a yield of 89% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.57 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 3.19 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.47 (s, 3H), 3.73–3.84 (m, 2H), 6.80 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz), 6.88–6.99 (m, 2H), 7.09–7.16 (m, 2H), 7.19–7.25 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 15.94, 23.82, 27.55, 28.53, 40.70, 106.60, 109.69, 114.38, 117.68, 119.58, 134.61, 141.98, 145.92, 154.31, 154.47, 163.28, 165.29; MS (ESI) *m/z* 322 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₇H₂₀N₇ [M+H]⁺ 322.1775; found, 322.1776.

1-[2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethyl]-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (43f)

To a mixture of **43d** (95.0 mg, 0.309 mmol) in 1,2-dichloroethane (DCE; 1.0 mL) were added 1,2-dibromoethane (0.100 mL, 1.16 mmol), 1M NaOH aqueous solution (1.00 mL, 1.00 mmol) and tetrabutylammonium bromide (18.0

mg, 55.8 μ mol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. Subsequently, 1,2-dibromoethane (0.100 mL, 1.16 mmol) and 1 M NaOH aqueous solution (1.00 mL, 1.00 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 20 h. After cooling to room temperature, H₂O was added to the residue followed by extraction with CHCl₃/MeOH co-solvent. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo*. The solid was washed with EtOAc, and the resulting precipitate was collected by filtration to give **43f** (32.0 mg, 31%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.68 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 3.23 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.77 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.94–4.03 (m, 2H), 4.06–4.14 (m, 2H), 6.87–6.97 (m, 2H), 7.08–7.13 (m, 2H), 7.16–7.20 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.97, 24.89, 27.78, 41.02, 45.59, 53.06, 108.10, 110.86, 116.41, 119.48, 120.60, 132.92, 147.02, 148.83, 155.53, 162.10, 164.48, 166.02; MS (ESI) *m/z* 334 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₈H₂₀N₇ [M+H]⁺ 334.1775; found, 334.1775; Anal. Calcd for C₁₈H₁₉N₇·0.5H₂O: C, 63.14; H, 5.89; N, 28.64. Found: C, 63.09; H, 5.85; N, 28.49.

2-[(1*H*-Benzimidazol-2-yl)amino]ethan-1-ol (**50a**)

A mixture of 2-chlorobenzimidazole (**48**) (10.0 g, 65.5 mmol) and 2-aminoethanol (**49a**) (12.0 mL, 199 mmol) was stirred at 140 °C for 14 h. After cooling to room temperature, saturated NaHCO₃ aqueous solution and H₂O were added to the reaction mixture with stirring. The resulting precipitate was collected by filtration, washed with H₂O and dried to give **50a** (11.2 g, 97%) as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.35 (t, 3H, *J* = 5.9 Hz), 3.54–3.59 (m, 2H), 4.96 (br-s, 1H), 6.48 (br-s, 1H), 6.81–6.88 (m, 2H), 7.08–7.15 (m, 2H); MS (ESI) *m/z* 178 [M+H]⁺.

2,3-Dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole hydrogen chloride (**51a**)

To a mixture of **50a** (1.77 g, 9.99 mmol) in DCE (20 mL) was added thionyl chloride (0.850 mL, 11.7 mmol). The mixture was stirred under reflux for 50 min. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the residue followed by extraction with CHCl₃/MeOH co-solvent. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue in xylene (20 mL) was stirred under reflux for 21 h. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was collected by filtration, washed with *n*-hexane and dried to give **51a** (1.78 g, 91% in 2 steps) as a brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.20–4.38 (m, 4H), 7.17–7.30 (m, 2H), 7.35–7.43 (m, 2H), 9.46 (br-s, 1H), 13.44 (br-s, 1H); MS (ESI) *m/z* 160 [M+H]⁺.

1-(2,3-Dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)-2-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethan-1-one (**44a**)

To a mixture of **51a** (149 mg, 0.762 mmol) and (5,7-dimethyl-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)acetic acid (**52**)

(169 mg, 0.820 mmol) in DMF (3.0 mL) were added WSC·HCl (161 mg, 0.840 mmol), HOBt (55.0 mg, 0.407 mmol) and triethylamine (160 μ L, 1.15 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 18 h. Saturated NaHCO₃ aqueous solution and H₂O were added to the reaction mixture. The resulting precipitate was collected by filtration. The filtered solid was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo*. The residue was washed with EtOAc, and the resulting precipitate was collected by filtration to give **44a** (143 mg, 54%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.57 (s, 3H), 2.72 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 4.28–4.36 (m, 2H), 4.47–4.57 (m, 2H), 4.80 (s, 2H), 7.10–7.19 (m, 3H), 7.39–7.45 (m, 1H), 7.46–7.53 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 15.94, 23.85, 34.96, 39.52, 48.72, 108.87, 110.02, 117.55, 120.77, 120.97, 130.99, 145.86, 146.05, 152.34, 154.41, 161.44, 163.64, 165.21; MS (ESI) *m/z* 348 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₈H₁₈ON₇ [M+H]⁺ 348.1567; found, 348.1569; Anal. Calcd for C₁₈H₁₇N₇O: C, 62.24; H, 4.93; N, 28.23. Found: C, 61.88; H, 4.95; N, 27.92.

3-[(1*H*-Benzimidazol-2-yl)amino]propan-1-ol (**50b**)

A mixture of 2-chlorobenzimidazole (**48**) (2.00 g, 13.1 mmol) and 3-aminopropanol (**49b**) (5.00 mL, 65.8 mmol) was stirred at 140 °C for 15.5 h. After cooling to room temperature, saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the reaction mixture followed by extraction with CHCl₃. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to give **50b** (198 mg, 8%) as a colorless solid. A small amount of the solid was added to the aqueous layer with stirring. The resulting precipitate was collected by filtration to give **50b** (624 mg, 25%) as a gray solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.70 (quint., 2H, *J* = 6.4 Hz), 3.29–3.38 (m, 2H), 3.42–3.53 (m, 2H), 4.77 (br-s, 1H), 6.49 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz), 6.74–6.94 (m, 2H), 7.02–7.17 (m, 2H), 10.69 (br-s, 1H); MS (ESI) *m/z* 192 [M+H]⁺.

1,2,3,4-Tetrahydropyrimido[1,2-*a*]benzimidazole (**51b**)

To a mixture of **50b** (300 mg, 1.57 mmol) in DCE (5.0 mL) was added thionyl chloride (0.150 mL, 2.06 mmol). The mixture was stirred under reflux for 2 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the residue followed by extraction with CHCl₃/MeOH. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and xylene (5.0 mL) was stirred under reflux for 14 h. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was collected by filtration and washed with *n*-hexane. The filtered solid was dissolved with MeOH. Saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the solution followed by extraction with CHCl₃. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃) to give **51b** (148 mg, 54% in 2 steps) as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.19–2.28 (m, 2H), 3.49–3.55 (m, 2H), 4.02 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 5.26 (br-s, 1H), 6.99–

7.14 (m, 3H), 7.38 (dt, 1H, $J = 7.8, 0.88$ Hz); MS (ESI) m/z 174 $[M+H]^+$.

1-(3,4-Dihydropyrimido[1,2-*a*]benzimidazol-1(2*H*)-yl)-2-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethan-1-one (44b)

To a mixture of **51b** (73.0 mg, 0.421 mmol) and **52** (95.0 mg, 0.461 mmol) in DMF (1.0 mL) were added WSC·HCl (99.0 mg, 0.516 mmol) and HOBt (34.0 mg, 0.252 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 18 h. H₂O was added to the reaction mixture. The resulting precipitate was collected by filtration. The filtered solid was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was washed with EtOAc and collected by filtration to give **44b** (67.0 mg, 44%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.18–2.28 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.69 (d, 3H, $J = 0.88$ Hz), 3.99–4.07 (m, 2H), 4.18 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz), 4.96 (s, 2H), 7.12 (d, 1H, $J = 0.88$ Hz), 7.15–7.21 (m, 2H), 7.40–7.47 (m, 1H), 7.48–7.54 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.96, 21.45, 24.90, 38.45, 41.25, 41.41, 109.70, 110.94, 117.99, 121.61, 122.40, 133.70, 140.66, 147.00, 147.14, 155.40, 163.12, 164.55, 168.79; MS (ESI) m/z 362 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₀N₇O $[M+H]^+$ 362.1724; found, 362.1725; Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₇O: C, 63.14; H, 5.30; N, 27.13. Found: C, 63.04; H, 5.28; N, 26.97; mp 198 °C.

8-Methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (55c)

To a mixture of 3-bromo-2-nitrotoluene (**53c**) (2.13 g, 9.86 mmol) and 1,4-dioxane (50 mL) were added 2-imidazolidone (**54a**) (4.01 g, 46.6 mmol), Cs₂CO₃ (4.71 g, 14.5 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (Pd₂(dba)₃; 400 mg, 0.437 mmol), and 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene (XantPhos; 503 mg, 0.869 mmol) under an argon atmosphere. The mixture was stirred at 100 °C for 19.5 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo*. To a mixture of the residue in EtOH (12 mL) and H₂O (3.0 mL) were added FeCl₃·6H₂O (99.0 mg, 0.366 mmol), N₂H₄·H₂O (1.10 mL, 22.7 mmol), and activated carbon (102 mg). The mixture was stirred under reflux for 14 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was diluted with EtOAc, and washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and POCl₃ (2.00 mL, 21.8 mmol) was stirred at 100 °C for 5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. 1 M NaOH aqueous solution was added to the residue followed by extraction with CHCl₃/MeOH co-solvent. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃) to give **55c** (345 mg, 20% in 3 steps) as a brown solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.52 (s, 3H), 4.07–4.20 (m, 4H), 4.97–5.66 (m, 1H), 6.89–7.05 (m, 3H); MS (ESI) m/z 174 $[M+H]^+$.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-(8-methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)ethan-1-one (44c)

To a mixture of **55c** (98.0 mg, 0.566 mmol) and **52** (128 mg, 0.621 mmol) in DMF (2.0 mL) were added WSC·HCl (133 mg, 0.694 mmol) and HOBt (37.0 mg, 0.274 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3.5 h. H₂O was added to the reaction mixture. The resulting precipitate was collected by filtration. The filtered solid was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo*. The residue was washed with EtOAc (2 mL)/MeOH (1 mL) co-solvent, and the resulting precipitate was collected by filtration to give **44c** (83.0 mg, 41%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.45 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.72 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 4.26–4.32 (m, 2H), 4.47–4.55 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 6.94–7.00 (m, 1H), 7.05 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.15 (d, 1H, *J* = 0.88 Hz), 7.23 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.80, 17.01, 24.94, 36.08, 40.60, 49.71, 107.43, 111.08, 121.68, 122.61, 127.93, 131.60, 145.99, 147.12, 152.73, 155.51, 162.58, 164.72, 166.30; MS (ESI) *m/z* 362 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₀N₇O [M+H]⁺ 362.1724; found, 362.1725; Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₇O: C, 63.14; H, 5.30; N, 27.13. Found: C, 62.78; H, 5.21; N, 26.98; mp 269 °C.

7-Methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (55d)

Compound **55d** was prepared from 4-iodo-3-nitrotoluene **53d** in a manner similar to that described for compound **55c**, with a yield of 15% in 3 steps as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.41 (s, 3H), 4.07–4.18 (m, 4H), 4.51 (br-s, 1H), 6.83–6.88 (m, 1H), 6.95 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.23 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 174 [M+H]⁺.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-(7-methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)ethan-1-one (44d)

To a mixture of **55d** (44.0 mg, 0.254 mmol) and **52** (59.0 mg, 0.286 mmol) in DMF (1.0 mL) were added WSC·HCl (56.0 mg, 0.292 mmol) and HOBt (17.0 mg, 0.126 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3.5 h. H₂O was added to the reaction mixture. The resulting precipitate was collected by filtration to give **44d** (47.0 mg, 51%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.38 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.72 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 4.24–4.32 (m, 2H), 4.46–4.54 (m, 2H), 4.79 (s, 2H), 6.95–7.00 (m, 1H), 7.15 (d, 1H, *J* = 0.88 Hz), 7.27–7.32 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 17.02, 21.72, 24.93, 36.01, 40.60, 49.75, 109.47, 111.09, 118.75, 122.90, 130.09, 131.05, 147.12, 147.26, 153.40, 155.48, 162.55, 164.72, 166.22; MS (ESI) *m/z* 362 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₀N₇O [M+H]⁺ 362.1724; found, 362.1725; mp 239 °C.

6-Methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (55e)

Compound **55e** was prepared from 3-iodo-4-nitrotoluene (**53e**) in a manner similar to that described for compound **55c**, with a yield of 2% in 3 steps as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.42 (s, 3H), 4.08–4.18 (m, 4H), 4.58 (br-

s, 1H), 6.89–6.94 (m, 2H), 7.30 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); MS (ESI) m/z 174 [M+H]⁺.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-(6-methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)ethan-1-one (44e)

Compound **44e** was prepared from **55e** in a manner similar to that described for compound **44c**, with a yield of 84% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.40 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.71 (d, 3H, $J = 0.88$ Hz), 4.24–4.32 (m, 2H), 4.46–4.54 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 6.94–7.00 (m, 1H), 7.15 (d, 1H, $J = 0.88$ Hz), 7.21–7.25 (m, 1H), 7.37 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 17.02, 21.71, 24.93, 35.98, 40.60, 49.72, 109.99, 111.09, 118.23, 123.22, 131.12, 132.21, 144.90, 147.12, 153.00, 155.48, 162.55, 164.71, 166.21; MS (ESI) m/z 362 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₀N₇O [M+H]⁺ 362.1724; found, 362.1725; Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₇O: C, 63.14; H, 5.30; N, 27.13. Found: C, 62.75; H, 5.32; N, 27.05; mp 247 °C.

5-Methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (55f)

Compound **55f** was prepared from 2-bromo-3-nitrotoluene **53f** in a manner similar to that described for compound **55c**, with a yield of 10% in 3 steps as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.51 (s, 3H), 4.09–4.16 (m, 2H), 4.36–4.43 (m, 2H), 6.81 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 6.99 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.23–7.25 (m, 1H); MS (ESI) m/z 174 [M+H]⁺.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-(5-methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)ethan-1-one (44f)

Compound **44f** was prepared from **55f** in a manner similar to that described for compound **44d**, with a yield of 60% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.55 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.72 (d, 3H, $J = 0.66$ Hz), 4.46–4.60 (m, 4H), 4.79 (s, 2H), 6.91 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.02 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J = 0.88$ Hz), 7.30 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz); MS (ESI) m/z 362 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₀N₇O [M+H]⁺ 362.1724; found, 362.1725; ; Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₇O·0.5H₂O: C, 61.61; H, 5.44; N, 26.47. Found: C, 61.80; H, 5.18; N, 26.47; mp 282 °C.

2-[(1*H*-Benzimidazol-2-yl)amino]propan-1-ol (50g)

Compound **50g** was prepared from 2-chlorobenzimidazole (**48**) and 2-amino-1-propanol (**49g**) in a manner similar to that described for compound **50a**, with a yield of 91% as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.17 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz), 3.40 (dd, 1H, $J = 10.4, 5.7$ Hz), 3.50 (dd, 1H, $J = 10.5, 5.2$ Hz), 3.75–3.88 (m, 1H), 4.93 (br-s, 1H), 6.26 (br-d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.85 (br-s, 2H), 7.08–7.14 (m, 2H), 10.53 (br-s, 1H); MS (ESI) m/z 192 [M+H]⁺.

2-Methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (51g)

Compound **51g** was prepared from **50g** in a manner similar to that described for compound **51b**, with a yield of

14% in 2 steps as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.49 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 3.70 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.7 Hz), 4.27 (dd, 1H, *J* = 9.1, 8.3 Hz), 4.52–4.61 (m, 1H), 5.19 (br-s, 1H), 7.00–7.12 (m, 3H), 7.38–7.44 (m, 1H); MS (ESI) *m/z* 174 [M+H]⁺.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-(2-methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)ethan-1-one (44g)

To a mixture of **51g** (103 mg, 0.595 mmol) and **52** (146 mg, 0.708 mmol) in dichloromethane (2.0 mL) were added *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU; 248 mg, 0.652 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA; 300 μL, 1.75 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 20 h. 1 M NaOH aqueous solution and H₂O were added to the reaction mixture followed by extraction with CHCl₃. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo*. The residue was washed with EtOAc (1 mL)/MeOH (1 mL), and the resulting precipitate was collected by filtration to give **44g** (127 mg, 59%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.51 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 2.57 (s, 3H), 2.71 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 3.99 (dd, 1H, *J* = 9.9, 3.1 Hz), 4.42 (dd, 1H, *J* = 9.8, 8.5 Hz), 4.74 (d, 1H, *J* = 16.5 Hz), 4.83 (d, 1H, *J* = 16.5 Hz), 5.10–5.19 (m, 1H), 7.12–7.19 (m, 3H), 7.38–7.44 (m, 1H), 7.47–7.53 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.99, 20.21, 24.92, 36.44, 47.19, 58.68, 110.04, 111.08, 118.60, 121.83, 122.05, 132.02, 146.90, 147.11, 153.03, 155.47, 162.54, 164.71, 166.16; MS (ESI) *m/z* 362 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₀N₇O [M+H]⁺ 362.1724; found, 362.1725; Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₇O: C, 63.14; H, 5.30; N, 27.13. Found: C, 63.18; H, 5.26; N, 27.09; mp 244 °C.

1-[(1*H*-Benzimidazol-2-yl)amino]propan-2-ol (50h)

Compound **50h** was prepared from **48** and 1-amino-2-propanol (**49h**) in a manner similar to that described for compound **50a**, with a yield of 88% as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.09 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz), 3.12–3.30 (m, 2H), 3.76–3.87 (m, 1H), 4.99 (br-d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 6.43 (br-t, 1H, *J* = 5.9 Hz), 6.76–6.93 (m, 2H), 7.11 (br-d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 10.60 (br-s, 1H); MS (ESI) *m/z* 192 [M+H]⁺.

3-Methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole hydrogen chloride (51h)

Compound **51h** was prepared from **50h** in a manner similar to that described for compound **51a**, with a yield of 97% in 2 steps as a brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.57 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 3.82 (dd, 1H, *J* = 10.0, 6.5 Hz), 4.39 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz), 4.83–4.98 (m, 1H), 7.18–7.31 (m, 2H), 7.35–7.44 (m, 1H), 7.48–7.54 (m, 1H), 9.58 (br-s, 1H), 13.52 (br-s, 1H); MS (ESI) *m/z* 174 [M+H]⁺.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-(3-methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-

***a*]benzimidazol-1-yl)ethan-1-one (44h)**

To a mixture of **51h** (127 mg, 0.606 mmol) and **52** (137 mg, 0.664 mmol) in DMF (3.0 mL) were added WSC·HCl (139 mg, 0.725 mmol), HOBt (47.0 mg, 0.348 mmol) and triethylamine (150 μ L, 1.08 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 22 h. H₂O was added to the reaction mixture. The resulting precipitate was collected by filtration. The residue was washed with EtOAc, and the resulting precipitate was collected by filtration to give **44h** (126 mg, 58%) as a beige solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.60 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 2.57 (s, 3H), 2.71 (d, 3H, *J* = 0.66 Hz), 4.07 (dd, 1H, *J* = 11.3, 5.5 Hz), 4.67 (dd, 1H, *J* = 11.1, 8.7 Hz), 4.74–4.90 (m, 3H), 7.11–7.20 (m, 3H), 7.47–7.54 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 17.01, 19.47, 24.93, 36.15, 48.77, 56.80, 109.99, 111.10, 118.76, 121.83, 122.05, 131.35, 147.04, 147.12, 152.81, 155.48, 162.50, 164.73, 166.34; MS (ESI) *m/z* 362 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₀N₇O [M+H]⁺ 362.1724; found, 362.1725; Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₇O: C, 63.14; H, 5.30; N, 27.13. Found: C, 63.00; H, 5.31; N, 27.08; mp 236 °C.

2,2-Dimethyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (55i)

Compound **55i** was prepared from 1-iodo-2-nitrobenzene (**53i**) and 4,4-dimethylimidazolidin-2-one (**54b**) in a manner similar to that described for compound **55c**, with a yield of 63% in 3 steps as a brown solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.54 (s, 6H), 3.88 (s, 2H), 6.99–7.12 (m, 3H), 7.41 (dt, 1H, *J* = 7.7, 0.93 Hz); MS (ESI) *m/z* 188 [M+H]⁺.

1-(2,2-Dimethyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)-2-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)ethan-1-one (44i)

To a mixture of **55i** (155 mg, 0.828 mmol) and **52** (194 mg, 0.941 mmol) in dichloromethane (3.0 mL) were added HATU (357 mg, 0.939 mmol) and DIPEA (300 μ L, 1.75 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 6 d. The reaction mixture was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo*. The solid was washed with EtOAc (3 mL), and the resulting precipitate was collected by filtration to give **44i** (137 mg, 44%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.76 (s, 6H), 2.57 (s, 3H), 2.71 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 4.16 (s, 2H), 4.83 (s, 2H), 7.11–7.18 (m, 3H), 7.36–7.42 (m, 1H), 7.46–7.52 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.98, 24.91, 26.11, 26.11, 37.83, 54.21, 70.31, 109.99, 111.00, 118.49, 121.74, 122.09, 131.72, 146.59, 147.06, 153.60, 155.45, 162.69, 164.63, 166.79; MS (ESI) *m/z* 376 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₀H₂₂ON₇ [M+H]⁺ 376.1880; found, 376.1881; Anal. Calcd for C₂₀H₂₁N₇O: C, 63.98; H, 5.64; N, 26.12. Found: C, 63.81; H, 5.63; N, 26.00; mp 219 °C.

***N*-[(*S*)-2-Hydroxy-1-phenylethyl]-*N'*-(2-nitrophenyl)urea (58j)**

To a mixture of 2-nitrophenyl isocyanate (**56**) (1.00 g, 6.09 mmol) in THF (15 mL) was added (*S*)-2-amino-2-phenylethan-1-ol (**57j**) (850 mg, 6.20 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The reaction

mixture was concentrated *in vacuo* to give **58j** (1.86 g, quant.) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.53–3.67 (m, 2H), 4.73–4.81 (m, 1H), 4.96 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.11 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.2, 1.3 Hz), 7.20–7.28 (m, 1H), 7.30–7.37 (m, 4H), 7.61 (ddd, 1H, *J* = 8.6, 7.2, 1.5 Hz), 8.04 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.4 Hz), 8.08 (br-d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.31 (dd, 1H, *J* = 8.6, 0.98 Hz), 9.49 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 302 [M+H]⁺.

(S)-2-Phenyl-2,3-dihydro-1H-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (59j)

To a mixture of **58j** (1.85 g, 6.14 mmol) in EtOH (20 mL) and H₂O (5.0 mL) were added FeCl₃·6H₂O (189 mg, 0.699 mmol), N₂H₄·H₂O (1.20 mL, 24.7 mmol), and activated carbon (172 mg). The mixture was stirred under reflux for 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was diluted with EtOAc, and washed with H₂O and brine. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and POCl₃ (5.00 mL, 54.6 mmol) was stirred at 100 °C for 1.5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. 1 M NaOH aqueous solution was added to the residue followed by extraction with CHCl₃/MeOH co-solvent. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and xylene (10 mL) was stirred under reflux for 17 h. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was collected by filtration, washed with *n*-hexane. The filtered solid was solved with MeOH (5 mL). H₂O and saturated NaHCO₃ aqueous solution were added to the solution followed by extraction with CHCl₃/MeOH co-solvent. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃) to give **59j** (191 mg, 13% in 3 steps) as a pale yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.97 (dd, 1H, *J* = 9.4, 7.4 Hz), 4.55 (dd, 1H, *J* = 9.4, 8.8 Hz), 5.09–5.30 (m, 1H), 5.48 (dd, 1H, *J* = 8.7, 7.5 Hz), 7.01–7.08 (m, 2H), 7.08–7.15 (m, 1H), 7.33–7.47 (m, 6H); MS (ESI) *m/z* 236 [M-H]⁻.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-[(S)-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl]ethan-1-one (44j)

Compound **44j** was prepared from **59j** in a manner similar to that described for compound **44b**, with a yield of 53% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 4.18 (dd, 1H, *J* = 10.1, 3.1 Hz), 4.69–4.79 (m, 2H), 4.98 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz), 6.16 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.9 Hz), 7.12–7.20 (m, 3H), 7.29–7.45 (m, 6H), 7.51–7.57 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.98, 24.92, 36.50, 49.29, 64.55, 110.25, 111.08, 118.77, 121.99, 122.22, 126.14, 126.14, 128.37, 129.24, 129.24, 132.04, 141.00, 147.08, 147.10, 153.66, 155.45, 162.46, 164.73, 165.99; MS (ESI) *m/z* 424 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₂N₇O [M+H]⁺ 424.1880; found, 424.1882; Anal. Calcd for C₂₄H₂₁N₇O: C, 68.07; H, 5.00; N, 23.15. Found: C, 68.05; H, 5.17; N, 23.16; mp 189 °C; [α]_D²³ +48.0 (c 0.375, MeOH).

***N*-[(*R*)-2-Hydroxy-1-phenylethyl]-*N'*-(2-nitrophenyl)urea (58k)**

To a mixture of **56** (1.00 g, 6.09 mmol) in THF (15 mL) was added (*R*)-2-amino-2-phenylethan-1-ol (**57k**) (854 mg, 6.23 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. After concentrated *in vacuo*, the reaction mixture was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl₃), and concentrated *in vacuo* to give **58k** (1.89 g, quant.) as a yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.26 (br-s, 1H), 3.88–4.03 (m, 2H), 4.95–5.06 (m, 1H), 5.91 (br-s, 1H), 7.00–7.07 (m, 1H), 7.28–7.35 (m, 1H), 7.35–7.42 (m, 4H), 7.50–7.59 (m, 1H), 8.15 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5 Hz), 8.59 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 9.85 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 302 [M+H]⁺.

(*R*)-2-Phenyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (59k)

Compound **59k** was prepared from **58k** in a manner similar to that described for compound **59j**, with a yield of 24% in 3 steps as a beige solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.97 (dd, 1H, *J* = 9.4, 7.4 Hz), 4.51–4.58 (m, 1H), 5.31 (br-s, 1H), 5.46–5.51 (m, 1H), 7.04–7.06 (m, 2H), 7.08–7.14 (m, 1H), 7.32–7.48 (m, 6H); MS (ESI) *m/z* 236 [M-H]⁻.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-[(*R*)-2-phenyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl]ethan-1-one (44k)

Compound **44k** was prepared from **59k** in a manner similar to that described for compound **44b**, with a yield of 46% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.56 (s, 3H), 2.70 (d, 3H, *J* = 0.88 Hz), 4.18 (dd, 1H, *J* = 10.3, 3.0 Hz), 4.69–4.79 (m, 2H), 4.98 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz), 6.16 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.9 Hz), 7.12–7.20 (m, 3H), 7.29–7.45 (m, 6H), 7.50–7.58 (m, 1H); MS (ESI) *m/z* 424 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₂N₇O [M+H]⁺ 424.1880; found, 424.1883; Anal. Calcd for C₂₄H₂₁N₇O: C, 68.07; H, 5.00; N, 23.15. Found: C, 68.17; H, 5.06; N, 23.07; mp 190 °C; [α]_D²³ –55.8 (*c* 0.375, MeOH).

***N*-[(*S*)-1-Hydroxypropan-2-yl]-*N'*-(2-nitrophenyl)urea (58l)**

Compound **58l** was prepared from **56** and (*S*)-2-aminopropan-1-ol (**57l**) in a manner similar to that described for compound **58j**, with a quantitative yield as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.08 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz), 3.36–3.43 (m, 1H), 3.62–3.76 (m, 1H), 4.75 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.11 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.1, 1.3 Hz), 7.43 (br-d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.63 (ddd, 1H, *J* = 8.5, 7.1, 1.6 Hz), 8.04 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.6 Hz), 8.32 (dd, 1H, *J* = 8.6, 1.2 Hz), 9.31 (s, 1H); MS (ESI) *m/z* 240 [M+H]⁺.

(*S*)-2-Methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (59l)

To a solution of **58l** (1.45 g, 6.06 mmol) in EtOH (15 mL) and THF (15 mL) was added 5% Pd-C (160 mg). The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h under a hydrogen atmosphere. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and POCl₃ (4.00 mL,

43.7 mmol) was stirred at 100 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. 1M NaOH aqueous solution and CHCl₃/MeOH co-solvent were added to the reaction mixture. The resulting precipitate was collected by filtration. A mixture of the residue and xylene (10 mL) was stirred under reflux for 37 h. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was collected by filtration, and washed with *n*-hexane. The filtered solid was dissolved with MeOH (2 mL). H₂O and saturated NaHCO₃ aqueous solution were added to the solution followed by extraction with CHCl₃/MeOH co-solvent. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–3% MeOH in CHCl₃) to give **59I** (229 mg, 22% in 3 steps) as a yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.49 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz), 3.70 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.9 Hz), 4.28 (dd, 1H, *J* = 9.2, 8.2 Hz), 4.51–4.64 (m, 1H), 4.89 (br-s, 1H), 7.01–7.12 (m, 3H), 7.42 (dt, 1H, *J* = 7.8, 0.90 Hz); MS (ESI) *m/z* 174 [M+H]⁺.

2-(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)-1-[(*S*)-2-methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl]ethan-1-one (44I)

Compound **44I** was prepared from **59I** in a manner similar to that described for compound **44b**, with a yield of 73% as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.51 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 2.57 (s, 3H), 2.71 (d, 3H, *J* = 0.66 Hz), 3.99 (dd, 1H, *J* = 9.9, 3.1 Hz), 4.42 (dd, 1H, *J* = 9.9, 8.6 Hz), 4.74 (d, 1H, *J* = 16.5 Hz), 4.83 (d, 1H, *J* = 16.5 Hz), 5.10–5.19 (m, 1H), 7.12–7.19 (m, 3H), 7.38–7.44 (m, 1H) 7.47–7.53 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.99, 20.21, 24.92, 36.45, 47.19, 58.68, 110.03, 111.06, 118.60, 121.82, 122.05, 132.01, 146.90, 147.10, 153.02, 155.47, 162.54, 164.69, 166.16; MS (ESI) *m/z* 362 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₀N₇O [M+H]⁺ 362.1724; found, 362.1723; Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₇O: C, 63.14; H, 5.30; N, 27.13. Found: C, 63.22; H, 5.46; N, 27.25; mp 233 °C; [α]_D²³ +45.5 (*c* 0.375, MeOH).

(5,7-Dimethylimidazo[1,2-*a*]pyrimidin-2-yl)acetic acid (61a)

To a solution of 2-(chloromethyl)-5,7-dimethylimidazo[1,2-*a*]pyrimidine (**60a**) (1.00 g, 5.11 mmol) in DMF (10 mL) were added sodium cyanide (500 mg, 10.2 mmol) and H₂O (2.0 mL). The mixture was stirred at 80 °C for 6 h. After cooling to room temperature, saturated NaHCO₃ aqueous solution was added to the solution followed by extraction with EtOAc. The aqueous layer was concentrated with toluene. H₂O was added to the residue followed by extraction with CHCl₃. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography and concentrated *in vacuo*. To a mixture of the residue in 1,4-dioxane (4.4 mL) was added NaOH (374 mg, 9.36 mmol) in H₂O (4.4 mL). The mixture was stirred under reflux for 3 h. The reaction mixture was cooled at room temperature. To the mixture was added 1M HCl aqueous solution (9.4 mL) under ice-bath cooling. The resulting precipitate was collected by filtration. The filtered solid was washed with CHCl₃/MeOH (4:1) co-solvent and diisopropyl ether successively to give **61a** (418 mg, 40% in 2 steps)

as a brown solid. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 2.66 (s, 3H), 2.76 (s, 3H), 4.00 (s, 2H), 7.45–7.49 (m, 1H), 8.12 (s, 1H); MS (ESI) m/z 206 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-(2,3-Dihydro-1H-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)-2-(5,7-dimethylimidazo[1,2-*a*]pyrimidin-2-yl)ethan-1-one (45a)

To a mixture of **51a** (100 mg, 0.628 mmol) and **61a** (215 mg, 0.943 mmol) in DMF (3.0 mL) were added WSC·HCl (145 mg, 0.756 mmol), HOBt (51.0 mg, 0.377 mmol) and DIPEA (323 μL , 1.89 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 d. H_2O was added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The aqueous layer was concentrated *in vacuo* with toluene. H_2O was added to the residue followed by extraction with CHCl_3 . The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, MeOH in CHCl_3), and concentrated *in vacuo* to give **45a** (115 mg, 53%) as a pale brown solid. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.55 (s, 6H), 4.19–4.32 (m, 2H), 4.63 (br-t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.82 (br-s, 2H), 6.54 (s, 1H), 7.14–7.24 (m, 3H), 7.46 (s, 1H), 7.57–7.67 (m, 1H); MS (ESI) m/z 347 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 347.1615; found, 347.1614; Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}\cdot 2.2\text{H}_2\text{O}$: C, 59.12; H, 5.85; N, 21.77. Found: C, 58.99; H, 5.83; N, 21.72; mp 206 $^\circ\text{C}$.

(5,7-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-2-yl)acetic acid (61b)

To a solution of 2-(chloromethyl)-5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridine (**60b**) (564 mg, 2.88 mmol) in DMF (6.0 mL) was added sodium cyanide (298 mg, 6.08 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 5 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. H_2O was added to the residue followed by extraction with CHCl_3 . The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH in CHCl_3) and concentrated *in vacuo*. To a mixture of the residue in 1,4-dioxane (6.0 mL) was added NaOH (480 mg, 12.0 mmol) in H_2O (6.0 mL). The mixture was stirred under reflux for 3 h. The reaction mixture was cooled at room temperature. To the mixture was added 1M HCl aqueous solution (12 mL) under ice-bath cooling. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) co-solvent and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was washed with diisopropyl ether to give **61b** (480 mg, 81% in 2 steps) as a brown solid. MS (ESI) m/z 206 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-(2,3-Dihydro-1H-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)-2-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-2-yl)ethan-1-one (45b)

To a mixture of **51a** (100 mg, 0.628 mmol) and **61b** (167 mg, 0.814 mmol) in DMF (3.0 mL) were added HATU (310 mg, 0.815 mmol) and DIPEA (323 μL , 1.89 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 d. After concentrated *in vacuo*, the reaction mixture was purified by flash column chromatography (silica gel, 0–5% MeOH

in CHCl₃) and concentrated *in vacuo* to give **45b** (155 mg, 71%) as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.42 (d, 3H, *J* = 0.66 Hz), 2.73 (s, 3H), 4.24–4.31 (m, 2H), 4.61–4.70 (m, 2H), 4.95 (s, 2H), 6.63 (br-s, 1H), 7.16–7.25 (m, 3H), 7.30–7.34 (m, 1H), 7.60–7.64 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 16.34, 20.28, 34.48, 39.52, 48.70, 108.84, 110.92, 114.55, 117.54, 120.75, 120.96, 130.99, 136.65, 140.16, 145.87, 150.36, 152.36, 159.66, 165.55; MS (ESI) *m/z* 347 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₁₉N₆O [M+H]⁺ 347.1615; found, 347.1614; Anal. Calcd for C₁₉H₁₈N₆O·0.2H₂O: C, 65.20; H, 5.30; N, 24.01. Found: C, 65.18; H, 5.28; N, 23.82; mp 242 °C.

(5,8-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrazin-2-yl)acetic acid (61c)

To a solution of 2-(chloromethyl)-5,8-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrazine (**60c**) (1.00 g, 5.09 mmol) in DMF (10 mL) was added sodium cyanide (499 mg, 10.2 mmol). The mixture was stirred at 80 °C for 3 h. H₂O (2.0 mL) was added to the mixture. The mixture was stirred at 80 °C for 30 min. After cooling to room temperature, H₂O was added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. To a half of the residue in 1,4-dioxane (10 mL) was added NaOH (793 mg, 19.8 mmol) in H₂O (10 mL). The mixture was stirred under reflux for 1.5 h. After cooling to room temperature, H₂O was added to the reaction mixture followed by extraction with EtOAc. To the aqueous layer was added 1M HCl aqueous solution (20 mL) under ice-bath cooling. The mixture was concentrated *in vacuo*. To the residue was added CHCl₃/MeOH (20 mL/5 mL). The mixture was filtered, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give **61c** (555 mg, 86% in 2 steps) as an orange solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.66 (s, 3H), 2.75 (s, 3H), 3.93 (s, 2H), 7.97–8.00 (m, 1H).

1-(2,3-Dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl)-2-(5,8-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrazin-2-yl)ethan-1-one (45c)

Compound **45c** was prepared from **51a** and **61c** in a manner similar to that described for compound **44d**, with a yield of 55% as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.67 (s, 3H), 2.75 (s, 3H), 4.27–4.36 (m, 2H), 4.48–4.56 (m, 2H), 4.92 (s, 2H), 7.13–7.19 (m, 2H), 7.40–7.46 (m, 1H), 7.48–7.54 (m, 1H), 8.01 (d, 1H, *J* = 0.88 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 14.42, 20.61, 35.55, 39.73, 49.83, 109.96, 118.65, 121.88, 122.08, 129.82, 130.53, 132.08, 146.24, 146.93, 148.53, 153.40, 161.13, 166.26; MS (ESI) *m/z* 348 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₁₈H₁₈N₇O [M+H]⁺ 348.1567; found, 348.1568; Anal. Calcd for C₁₈H₁₇N₇O: C, 62.24; H, 4.93; N, 28.23. Found: C, 62.44; H, 4.96; N, 28.44; mp 247 °C.

2-(5,8-Dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrazin-2-yl)-1-[(2*S*)-2-methyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]benzimidazol-1-yl]ethan-1-one (45d)

Compound **45d** was prepared from **59l** and **61c** in a manner similar to that described for compound **44b**, with a

yield of 68% as a colorless solid. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.51 (d, 3H, J = 6.6 Hz), 2.66 (s, 3H), 2.75 (d, 3H, J = 0.66 Hz), 3.99 (dd, 1H, J = 9.9, 3.1 Hz), 4.42 (dd, 1H, J = 9.9, 8.4 Hz), 4.87 (d, 1H, J = 16.8 Hz), 4.94 (d, 1H, J = 16.8 Hz), 5.10–5.20 (m, 1H), 7.12–7.20 (m, 2H), 7.38–7.45 (m, 1H), 7.48–7.55 (m, 1H), 8.00 (d, 1H, J = 1.1 Hz); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 14.39, 20.19, 20.59, 36.01, 47.22, 58.72, 110.05, 118.62, 121.85, 122.07, 129.80, 130.51, 132.02, 146.21, 146.89, 148.50, 153.02, 161.10, 166.15; MS (ESI) m/z 362 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 362.1724; found, 362.1724; Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}$: C, 63.14; H, 5.30; N, 27.13. Found: C, 63.03; H, 5.40; N, 27.11; mp 142 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ +55.3 (c 0.750, MeOH).

In vitro 評価

PDE10A enzyme assay protocol

Cloning and vector construction of PDE10A2. The full-length human PDE10A2 was amplified by PCR using the 1st strand cDNA synthesized from the total RNA isolated from human neuroblastoma TGW cell line. The PCR products were cloned into a pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, Inc.) to confirm sequences. The confirmed plasmid was digested with restricted enzymes, BamHI/HindIII, and this digested product was inserted into a pFastBac1 vector (Invitrogen, Inc.).

Preparation of human PDE10A2 enzyme. Human PDE10A2 enzyme protein was expressed in a *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cell using the Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen, Inc.). The infected Sf9 cells were collected by the centrifuge and removed medium. The collected cells were lysed by sonication in the lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 3 mM DTT, 0.1% NP-40, 20% glycerol with protease inhibitors), The lysate was centrifuged and supernatant was collected to obtain the PDE10A2 enzyme solution. We confirmed the PDE10A2 expression by Western blot analysis.

PDE10A2 inhibition assay. Inhibition of human PDE10A enzyme activity was assessed by measuring the quantity of cAMP via the Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF) detection method. The assay was performed in 12 μL samples containing an optimal amount of the PDE10A enzyme, a buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.5; 5 mM MgCl_2), 0.1 μM cAMP and various concentrations of compounds (0.1 nM to 10 μM). After compounds were preincubated for 30 min with the enzyme, the reaction was initiated by adding the substrate cAMP and the mixture was incubated for 60 min at room temperature with agitation. The reaction was terminated on addition of the fluorescence acceptor (cAMP labeled with the dye d2) and the fluorescence donor (anti-cAMP antibody labeled with Cryptate, Cisbio). After 60 min, the fluorescence transfer corresponding to the amount of residual cAMP was measured at λ_{ex} . 320 nm, λ_{em} . 620 nm and λ_{em} . 665 nm using an Envision plate reader (PerkinElmer) and signal

ratio (665/620) was calculated. The ratio determined in the absence of enzyme was subtracted from all data. The obtained results were converted to activity relative to an uninhibited control (100%) and IC₅₀ values were calculated using Prism software (GraphPad Software, Inc.).

Expression and Purification of PDE10A Protein (for inhibition assay of compounds 33 and 34a–h).

Human PDE10A phosphodiesterase domain (amino acids 449–789) was cloned between the *Nde*I and *Xho*I sites of pET28a vector to express target protein as a 6×histidine (His)-tagged protein. This plasmid was transformed in *E. coli* BL21(DE3) and overexpressed. The cells were disrupted by sonication and the supernatant was collected by centrifugation at 4 °C. The target protein was precipitated from the supernatant by adding ammonium sulfate to 60% and was collected by centrifugation. The precipitate was dissolved with nickel–nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) wash buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole) and was applied onto an Ni-NTA column. After washing with Ni-NTA wash buffer, the bound protein was eluted with 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazole. Eluate was collected and the buffer exchanged with 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl. The amino-terminal His tag of PDE10A (449–789) was removed by incubation with thrombin protease for 12 h at 4 °C. After digestion, protein solution was passed through Benzamidine Sepharose 6B column (GE Healthcare) and again applied onto an Ni-NTA column to remove thrombin and uncleaved His-tag protein. Further purification was performed by passing through Q Sepharose column (GE Healthcare) equilibrated with 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl followed by Superdex 75pg 16/60 (GE Healthcare) in 25 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N*'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-Na pH 7.5, 100 mM NaCl.

PDE10A inhibition assay (for inhibition assay of compounds 33 and 34a–h).

Inhibition of human PDE10A enzyme activity was assessed by measuring the quantity of cAMP via the Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF) detection method. The assay was performed in 20µL samples containing an optimal amount of the PDE10A enzyme domain, a buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 2 mM MgCl₂, 0.1% BSA), 0.1 µM cAMP and various concentrations of compounds (0.03 nM to 40 µM). After compounds were mixed with the enzyme, the reaction was initiated by adding the substrate cAMP and the mixture was incubated for 30 min at room temperature with agitation. The reaction was terminated on addition of the fluorescence acceptor (cAMP labeled with the dye d2) and the fluorescence donor (anti-cAMP antibody labeled with Cryptate, Cisbio). After 60 min, the fluorescence transfer corresponding to the amount of residual cAMP was measured at lex. 320 nm, lem. 620 nm and lem. 665 nm using an Envision plate reader (PerkinElmer) and signal ratio (665/620) was calculated. The ratio determined in the absence of enzyme was subtracted from all data. The obtained results were converted to inhibition percentage relative to an uninhibited control.

Mouse and human liver microsomal assays

Pooled mouse or human liver microsomes (Xenotech LLC.) were diluted in 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH7.4) containing 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The incubation mixtures (270 μL total volume), which contained 0.2 mg/mL of microsomal proteins, and 0.2 μM of substrates were pre-incubated for approximately 15min at 37 °C. Reactions were initiated by the addition of 1 mM NADPH (30 μL). After the appropriate incubation time (0, 15, 30, and 45 min), 40 μL of incubation mixture was transferred into 80% acetonitrile containing internal standard (200nM methyltestosterone, 250 μL), stood at 4 °C for 20 min, and centrifuged for 20 min at 2800 rpm. The supernatant (200 μL) was prepared and analyzed via LC–MS/MS with UPLC system (Waters) and Xevo TQ (Waters). The *in vitro* intrinsic clearance ($\text{CL}_{\text{int, vitro}}$) was calculated using Equation 1, which is based on the time course of the residual ratio of the compounds.⁶⁹

$$\text{CL}_{\text{int, vitro}} (\text{mL}/\text{min}/\text{kg}) = \frac{Ke(1/\text{min}) \times \text{MScontent}(\text{mg}/\text{kg})}{\text{MS Protein Conc.}(\text{mg}/\text{mL})} \quad (1)$$

where the Ke is the disappearance rate constant.

CYPs inhibitory assays

Time-dependent inhibition assay for CYP activity was performed in two steps, a pre-incubation step where the test compound was incubated with human liver microsomes and the secondary incubation period where specific substrates were added to the preincubate to measure residual CYP activity. Specific metabolites were used to monitor the CYP activities.

Each test compound (5 μM) was pre-incubated with human liver microsomes (0.1 mg/mL) and NADPH (1.0 mM) at 37 °C. The pre-incubation times used were 0 and 30 min. Following the pre-incubation step, each compound was co-incubated with substrates at 37 °C for 20 min. At the end of the incubation, the reaction was terminated by the addition of aqueous solution containing 80% acetonitrile. The concentration of metabolites was determined by LC–MS analysis. The inhibition of CYP activities was assessed by comparing the amount of metabolites formed in the presence of single concentration of inhibitor to the amount of metabolites formed in the solvent control. In each study, a CYP potent and specific inhibitors were used as positive control.

$$\% \text{ residual activity} = 100 \times \frac{\text{Activity NME,30min}}{\text{Activity vehicle,30min}} \quad (2)$$

where Activity new molecular entity (NME), 30 min is the activity in the presence of test compound and with pre-incubation, and Activity vehicle, 30 min is the activity in the absence of test compound and with pre-incubation.

The substrates of CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4 were phenacetin (20 μM), amodiaquine (0.1 μM), diclofenac (10 μM), S-mephenytoin (30 μM), dextromethorphan (7.0 μM) and midazolam (1.5 μM) respectively.

Transcellular transport study in LLC-PK1-MDR1 cells

Wild type or MDR1-expressing LLC-PK1 cells (LLC-PK1-WT or LLC-PK1-MDR1, respectively) cultured for 5 d on a Millicell-96 Cell Culture Insert Plate (Millipore) were pre-incubated with transport buffer (HBSS, pH 7.4, for the apical and basolateral sides) for 1 h. After aspiration of the transport buffer, the donor solution (transport buffer (0.5% DMSO) containing the test compound (1 μ M) and Texas Red (1 μ M)) was added to the apical or basolateral side for the influx or efflux transport study, respectively, and the receiver solution (transport buffer (0.5% DMSO)) was added to the opposite side. After incubation for 3 h, the test compound in both sides was analyzed by LC-MS/MS and the apparent permeability was determined. Efflux ratio (ER) was calculated by dividing the apparent permeability in the direction from the basolateral to the apical side by that in the opposite direction. Net efflux ratio (NER) was the ratio of ER of LLC-PK1-MDR1 to LLC-PK1-WT. Texas Red was used for the estimation of the apparent permeability via para cellular transport. P_{int} was expressed as a mean value of apparent permeability from apical to basal and from basal to apical in a wild-type cells.

***In vivo* 評価**

All animal experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Astellas Pharma Inc. Further, Astellas Pharma Inc. Tsukuba Research Center was awarded Accreditation Status by the AAALAC International. All efforts were made to minimize the number of animals used and to avoid suffering and distress.

***In vivo* behavioral assay in mice**

Phencyclidine-induced hyperlocomotion: ICR mice aged 5 weeks were used to evaluate the effect of PDE10A inhibitor on hyper-locomotion induced by the NMDA antagonist phencyclidine (PCP). Immediately after oral administration of either vehicle or agent as pre-treatment, mice were placed into individual plastic test cages (30 × 35 × 17.5 cm) of a SUPERMEX system (PAT.P; Muromachi Kikai Co., Ltd), and measurement of locomotor activity was started. After 1 h, the mice were injected with a post-treatment of saline or PCP (2.5 mg/10 mL/kg, s.c.), and locomotor activity was measured for a further 60 min. Total locomotor activity for 60 min post-treatment was calculated.

MK-801-induced working memory deficit in mice during Y-maze test: Spatial working memory performance was assessed by recording spontaneous alternation behavior of male ddY mice (aged 5-6 weeks, Japan SLC, Inc.) in a Y-maze as described previously^{68, 70}. The maze was constructed from gray polyvinyl chloride, with arms (length, 40 cm; height, 13 cm; width at bottom, 3 cm; and width at top, 10 cm) converging at equal angles. 40 minutes after p.o.

administration of **45d** or vehicle, 0.15 mg/kg of MK-801 was administered intraperitoneally (i.p.) to each animal. Control animals were administered vehicle instead of **45d** and saline instead of MK-801 (i.p.). Twenty minutes after administration of MK-801 or saline, each mouse was placed at the end of one arm and allowed to freely explore the apparatus for 8 min. The total number of arm entries was recorded for each animal throughout the period. Alternation was defined as entries into all three arms on consecutive occasions. The alternation rate was calculated using the following formula:

$$\text{Alternationrate(\%)} = 100 \times \text{Numberofalternations} / (\text{Numberoftotalarmentries} - 2)$$

Catalepsy in mice: Eight-week-old male ICR mice were administered **45d** or vehicle (p.o.) as previously described⁶⁸. After 60 min, each mouse was assessed for catalepsy for 120 s. Catalepsy was measured via the bar method, which consists of placing an animal following drug administration, with its front legs resting on a bar suspended above the floor of the test apparatus. Intensity of catalepsy was measured as the length of time the test subject maintains this abnormal posture. Catalepsy time (duration of catalepsy) was calculated. 100 mg/kg of **45d** became jelly like it was impossible to administer, so we excluded this group.

Mouse pharmacokinetic study

The mice were treated orally with compound **36a** or **45d** suspended in 0.5% methylcellulose aqueous solution. Blood samples were collected using syringes containing heparin sodium at 1 h after oral administration. Blood samples were kept on ice and centrifuged, which was then frozen stored prior to analysis. Whole brain samples were collected at 1 h after administration, and frozen stored and homogenized in 4-fold volume of phosphate buffered saline (pH 7.4) before extraction processing. Extraction and analysis of compound concentrations were performed via LC-MS MS with an ACQUITY UPLC(Waters) and QTRAP5500_Nexera.

参考文献

- 1) (a) Kay, S. R.; Fiszbein, A.; Opler, L. A. *Schizophr. Bull.* **1987**, *13*, 261; (b) Gustavsson, A.; Svensson, M.; Jacobi, F.; Allegrander, C.; Alonso, J. E.; Beghi, E.; Dodel, R.; Ekman, M.; Faravell, C.; Fratiglioni, L. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2011**, *21*, 718.
- 2) (a) Grube, B. S.; Bilder, R. M.; Goldman, R. S. *Schizophr. Res.* **1998**, *31*, 113; (b) Schultz, S. H.; North, S. W.; Shields, C. G. *Am. Fam. Physician* **2007**, *75*, 1821; (c) Carbon, M.; Correll, C. U. *CNS Spectr.* **2014**, *19 (Suppl 1)*, 38.
- 3) (a) Abi-Dargham, A.; Gil, R.; Krystal, J.; Baldwin, R. M.; Seibyl, J. P.; Bowers, M.; van Dyck, C. H.; Charney, D. S.; Innis, R. B.; Laruelle, M. *Am. J. Psychiatry* **1998**, *155*, 761; (b) Pogarell, O.; Koch, W.; Karch, S.; Dehning, S.; Müller, N.; Tatsch, K.; Poepperi, G.; Möller, H. J. *Pharmacopsychiatry* **2012**, *45 (Suppl 1)*: S36; (c) Meyer-Lindenberg, A.; Miletich, R. S.; Kohn, P. D.; Esposito, G.; Carson, R. E.; Quartantelli, M.; Weinberger, D. R.; Berman, K. F. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 267.
- 4) (a) Kapur, S.; Zipursky, R.; Jones, C.; Remington, G.; Houle, S. *Am. J. Psychiatry* **2000**, *157*, 514; (b) Kapur, S.; Zipursky, R. B.; Wilson, A. A.; Vitcu, I.; Ginovart, N.; Mamo, D.; Agid, O. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 1209.
- 5) (a) Risch, S. C. *Pharmacotherapy*, **1996**, *16 (1 Pt2)*, 11S; (b) Slifstrin, M.; van de Giessen, E.; Van Snellenberg, J.; Thompson, J. L.; Narendran, R.; Gil, R.; Hackett, E.; Girgis, R.; Ojeil, N.; Moore, H.; D'Souza, D.; Malison, R. T.; Huang, Y.; Lim, K.; Nabulsi, N.; Carson, R. E.; Lieberman, J. A.; Abi-Dargham, A. *JAMA Psychiatry*. **2015**, *72*, 316.
- 6) (a) Wezenberg, E.; Sabbe, B. G. C.; Hulstijn, W.; Ruigt, G. S. F.; Verkes, R. J. *J. Psychopharmacol.* **2007**, *21*, 579; (b) Harrison, P. J. *Brain* **1999**, *122 (Pt4)*, 593.
- 7) (a) Abi-Dragham, A.; Rodenhiser, J.; Printz, D.; Zea-Pomce, Y.; Gil, R.; Kegeles, L. S.; Weiss, R.; Cooper, T. B.; Mann, J. J.; Van Heertum, R. L.; Gorman, J. M.; Laruelle, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8104; (b) Abi-Dragham, A.; van de Giessen, E.; Slifstein, M.; Kegeles, L. S.; Laruelle, M. *Biol. Psychiatry* **2009**, *65*, 1091.; (c) Kegeles L. S.; Abi-Dargham, A.; Frankle, W. G.; Gil, R.; Cooper, T. B.; Slifstein, M.; Hwang, D. R.; Huang, Y.; Haber, S. N.; Laruellw, M. *Arch. Gen. Psychiatry* **2010**, *67*, 231.
- 8) (a) Laruelle, M.; Kegeles, L. S.; Abi-Dargham, A. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2003**, *1003*, 138; (b) Carlsson, A.; Waters, N.; Carlsson, M. L. *Biol. Psychiatry* **1999**, *46*, 1388; (c) Takahashi, H.; Higuchi, M.; Suhara, T. *Biol. Psychiatry* **2006**, *59*, 919.
- 9) (a) Soderling, S. H.; Bayuga, S. J.; Beavo, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 7071; (b) Loughney, K.; Snyder, P. B.; Uher, L.; Rosman, G. J.; Ferguson, K.; Florio, V. A. *Gene* **1999**, *234*, 109; (c) Fujishige, K.; Kotera, J.; Michibata, H.; Yuasa, K.; Takebayashi, S.; Okumura, K.; Omori, K. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18438;

- (d) Seeger, T. F.; Bartlett, B.; Coskran, T. M.; Culp, J. S.; James, L. C.; Krull, D. L.; Lanfear, J.; Ryan, A. M.; Schmidt, C. J.; Strick, C. A.; Varghese, A. H.; Williams, R. D.; Wylie, P. G.; Menniti, F. S. *Brain Res.* **2003**, *985*, 113.
- 10) (a) Siuciak, J. A.; Chapin, D. S.; Harms, J. F.; Lebel, L. A.; James, L. C.; McCarthy, S. A.; Chambers, L. K.; Shrikehande, A.; Wong, S. K.; Menniti, F. S.; Schmidt, C. *J. Neuropharmacology* **2006**, *51*, 386; (b) Simpson, E. H.; Kellendonk, C.; Kandel, E. *Neuron* **2010**, *65*, 585.
- 11) 西昭徳, 黒岩真帆美, 首藤隆秀 *日薬理誌* **2010**, *135*, 8.
- 12) Rodefer, J. S., Murphy, E. R.; Baxter, M. G. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21*, 1070-1076.
- 13) Sano, H.; Nagai, Y.; Miyakawa, T.; Shigemoto, R.; Yokoi, M. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 546.
- 14) Wadenberg, M. L.; Kapur, S.; Soliman, A.; Jones, C.; Vaccarino, F. *Psychopharmacology* **2000**, *150*, 422.
- 15) 石郷岡純 *脳の科学* **2003**, *25*, 425.
- 16) Roerig, J. L.; Steffen, K. J.; Mitchell, J. E. *CNS Drugs.* **2011**, *25*, 1035.
- 17) For recent literatures on preclinical PDE10A inhibitors, see: (a) Raheem, I. T.; Schreier, J. D.; Fuerst, J.; Gantert, L.; Hostetler, E. D.; Huszar, S.; Joshi, A.; Kandebo, M.; Kim, S. H.; Li, J.; Ma, B.; McGaughey, G.; Sharma, S.; Shipe, W. D.; Uslaner, J.; Vandever, G. H.; Yan, Y.; Renger, J. J.; Smith, S. M.; Coleman, P. J.; Cox, C. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 126; (b) Yoshikawa, M.; Hitaka, T.; Hasui, M.; Fushimi, M.; Kunitomo, J.; Kokubo, H.; Oki, H.; Nakashima, K.; Taniguchi, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3447; (c) Meegalla, S. K.; Huang, H.; Illig, C. R.; Parks, D. J.; Chen, J.; Lee, Y. K.; Wilson, K. J.; Patel, S. K.; Cheung, W. S.; Lu, T.; Kirchner, T.; Askari, H. B.; Geisler, J.; Patch, R. J.; Gibbs, A. C.; Rady, B.; Connelly, M.; Player, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4216; (d) Chen, L.; Chen, D.; Tang, L.; Ren, J.; Chen, J.; Zhen, X.; Liu, Y. C.; Zhang, C.; Luo, H.; Shen, J.; Xiong, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3315; (e) Kadoh, Y.; Miyoshi, H.; Matsumura, T.; Tanaka, Y.; Hongu, M.; Kimura, M.; Takedomi, K.; Omori, K.; Kotera, J.; Sasaki, T.; Kobayashi, T.; Taniguchi, H.; Watanabe, Y.; Kojima, K.; Sakamoto, T.; Himiyama, T.; Kawanishi, E. *Chem. Pharm. Bull.* **2018**, *66*, 243; (f) Moszczyński-Pętkowski, R.; Majer, J.; Borkowska, M.; Bojarski, Ł.; Janowska, S.; Matłoka, M.; Stefaniak, F.; Smuga, D.; Bazydło, K.; Dubiel, K.; Wieczorek, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 96; (g) Li, J.; Chen, J. Y.; Deng, Y. L.; Zhou, Q.; Wu, Y.; Wu, D.; Luo, H. B. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 167.
- 18) Verhoest, P. R.; Chapin, D. S.; Corman, M.; Fonseca, K.; Harms, J. F.; Hou, X.; Marr, E. S.; Menniti, F. S.; Nelson, F.; O'Connor, R.; Pandit, J.; Proulx-LaFrance, C.; Schmidt, A. W.; Schmidt, C. J.; Suiciak, J. A.; Liras, S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5188.
- 19) Hamaguchi, W.; Masuda, N.; Miyamoto, S.; Kikuchi, S.; Narazaki, F.; Shiina, Y.; Seo, R.; Amano, Y.; Mihara, T.; Moriguchi, H.; Hattori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 3351.
- 20) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3.
- 21) (a) 鈴木豊史 *ファルマシア* **2012**, *48*, 761; (b) 大見和宏 *Organ Biology* **2013**, *20*, 36; (c) 大槻純男, 堀

- 里子, 寺崎 哲也 *日薬理誌(Folia Pharmacol. Jpn.)* **2003**, *122*, 55; (d) 楠原洋之, *Drug Delivery System* **2012**, *27*, 370.
- 22) Rankovic Z. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2584.
- 23) Wager, T. T.; Chandrasekaran, R. Y.; Hou, X.; Troutman, M. D.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A.; Will, Y. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 420.
- 24) Wager, T. T., Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 435.
- 25) Hitchcock, S. A.; Pennington, L. D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7559.
- 26) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. *NeuroRx* **2005**, *2*, 541.
- 27) Wager, T. T.; Villalobos, A.; Verhoest, P. R.; Hou, X.; Shaffer, C. L. *Expert Opin. Drug. Discov.* **2011**, *6*, 371.
- 28) Ghose, A. K.; Herbertz, T.; Hudkins, R. L.; Dorsey, B. D.; Mallamo, J. P. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 50.
- 29) Leeson, P. D.; Springthorpe, B. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 881.
- 30) Hughes, J. D.; Blagg, J.; Price, D. A.; Bailey, S.; Decrescenzo, G. A.; Devraj, R. V.; Ellsworth, E.; Fobian, Y. M.; Gibbs, M. E.; Gilles, R. W.; Greene, N.; Huang, E.; Krieger-Burke, T.; Loesel, J.; Wager, T.; Whiteley, L.; Zhang, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4872.
- 31) Bran, D.; Caulfield, W.; Cowley, P.; Dickins, R.; Bakker, I. W.; McGuire, R.; Morphy, R. J.; Rankovic, Z.; Thorn, M. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 534.
- 32) Raub, T. J. *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 3.
- 33) Teague, S. J.; Davis, A. M.; Lesson, P. D.; Oprea, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3743.
- 34) (a) Hann, M. M.; Leach, A. R.; Harper, G. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 856; (b) Opera, T. I.; Davis, A. M.; Teague, S. J.; Lesson, P. D. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1308.
- 35) (a) Leeson, O. D.; Springthorpe, B. *Nature Rev. Drug. Discov.* **2007**, *6*, 881; (b) Gleeson, M. P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 817.
- 36) Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 430.
- 37) (a) Carr, R. A.; Congreve, M.; Murray, C. W.; Rees, D. C. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 987; (b) Lamoree, B.; Hubbrd, R. E. *Essays Biochem.* **2017**, *61*, 453.
- 38) Abad-Zapatero, C.; Metz, J. T. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 464.
- 39) (a) Petros, A. M.; Dinges, J.; Augeri, D. J.; Baumeister, S. A.; Betebenner, D. A.; Bures, M. G.; Elmore, S. W.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Landis, S. K.; Nettesheim, D. G.; Rosenberg, S. H.; Shen, W.; Thomas, S.; Wang, X.; Zanze, I.; Zhang, H.; Fesik, S. W. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 656; (b) Hajduk, P. J. *Mol. Interv.* **2006**, *6*, 266.
- 40) Bertrand, S. M.; Ancellin, N.; Beaufiles, B.; Bingham, R. P.; Borthwick, J. A.; Boullay, A. B.; Boursier, E.; Carter, P. S.; Chung, C. W.; Churcher, I.; Dodic, N.; Fouchet, M. H.; Fournier, C.; Francis, P. L.; Gummer, L. A.; Herry, K.; Hobbs, A.; Hobbs, C. I.; Homes, P.; Jamieson, C.; Nicodeme, E.; Pickett, S. D.; Reid, I. H.; Simpson, G. L.; Sloan, L. A.; Smith, S. E.; Somers, D. O.; Spitzfaden, C.; Suckling, C. J.; Valko, K.; Washio, Y.; Young, R. J. J

Med Chem. **2015**, *58*, 7140.

- 41) Howard, S.; Berdini, V.; Boulstridge, J. A.; Carr, M. G.; Cross, D. M.; Curry, J.; Devine, L. A.; Early, T. R.; Fazal, L.; Gill, A. L.; Heathcote, M.; Maman, S.; Matthews, J. E.; McMenamin, R. L.; Navarro, E. F.; O'Brien, M. A.; O'Reilly, M.; Rees, D. C.; Reule, M.; Tisi, D.; Williams, G.; Vinkovic, M.; Wyatt, P. G. *J Med Chem.* **2009**, *52*, 379.
- 42) Augustine, J. K.; Atta, R. N.; Ramappa, B. K.; Boodappa, C. *Synlett* **2009**, *20*, 3378.
- 43) Crawforth, J.; Paoletti, M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4916.
- 44) Lukasik, P. M.; Elabar, S.; Lam, F.; Shao, H.; Liu, X.; Abbas, A. Y.; Wang, S. *Euro. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 311.
- 45) Abasolo, M. I.; Bianchi, D.; Atlasovich, F.; Gaozza, C.; Fernandez, B. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1990**, *27*, 157.
- 46) Sessions, E. H.; Smolinski, M.; Wang, B.; Frackowiak, B.; Chowdhury, S.; Yin, Y.; Chen, Y. T.; Ruiz, C.; Lin, L.; Pocas, J.; Schröter, T.; Cameron, M. D.; LoGrasso, P.; Feng, Y.; Bannister, T. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1939.
- 47) Tietze, M.; Iglesias, A.; Merisor, E.; Conrad, J.; Klaiber, I.; Beifuss, U. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1549.
- 48) Zecchini, G. P.; Torrini, I.; Paradisi, P. *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, *22*, 1061.
- 49) Marta, C. R.; Jordi, G. F.; Victor, G. M.; Lluís Miquel, P. S.; Emma, T. B. WO2012146667 A1.
- 50) Chrisman, W.; Tanga, M. J.; Knize, M. G. *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, *45*, 1641.
- 51) Zhang, P.; Terefenko, E. A.; Bray, J.; Deecher, D.; Fensome, A.; Harrison, J.; Kim, C.; Koury, E.; Mark, L.; McComas, C. C.; Mugford, C. A.; Trybulski, E. J.; Vu, A. T.; Whiteside, G. T.; Mahaney, P. E. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5703.
- 52) Kehler, J.; Ritzen, A.; Langgard, M.; Leth-Petersen, S.; Farah, M. M.; Bundgaard, C.; Chirstoffersen, C. T.; Nielsen, J.; Kilburn, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3738.
- 53) Arnott, J. A.; Planey, S. L. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 863.
- 54) Jeon, S.; Kim, K-H.; Yun, C-H.; Hong, B-W.; Chang, Y-S.; Han, H-S.; Yoon, Y-S.; Choi, W-B.; Kim, S.; Lee, A-Y. *Exp. Mol. Med.* **2008**, *40*, 254.
- 55) (a) Lizarzaburu, M.; Turcotte, S.; Du, X.; Duquette, J.; Fu, A.; Houze, J.; Li, L.; Liu, J.; Murakoshi, M.; Oda, K.; Okuyama, R.; Nara, F.; Reagan, J.; Yu, M.; Medina, J. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5942; (b) Riley, R. J.; Parker, A. J.; Trigg, S.; Manners, C. N. *Pharmaceutical Research* **2001**, *18*, 652.
- 56) Chappie, T.; Humphrey, J.; Menniti, F.; Schmidt, C. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2009**, *12*, 458.
- 57) Ponpandian, T.; Muthusubramanian, S. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 527.
- 58) Luo, Z.; Slee, D.; Tellew, J. E.; Williams, J.; Zhang, X. WO2005063755 A1.
- 59) Chernyshev, V. M.; Chernysheva, A. V.; Starikova, Z. A. *Heterocycles*, **2010**, *81*, 2291.
- 60) Camp, D.; Matthews, C. F.; Neville, S. T.; Rouns, M.; Scott, R. W.; Truong, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 814.
- 61) (a) Waring, M. J. *J. Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *3*, 235; (b) Oja, M.; Maran, U. *SAR QSAR Environ Res.*

2016, 813.

- 62) Anisimova, V. A.; Levchenko, M. V.; Koshchienko, Yu. V.; Pozharskii, A. F. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1983**, *19*, 344.
- 63) Bailey, N.; Pickering, P. L.; Wilson, D. M. WO2006097691 A1
- 64) Raja, Erum K.; Nilsson Lill, Sten O.; Klumpp, Douglas A. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8141.
- 65) (a) Raub, T. *J. Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 3; (b) Seeling, A. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 252.
- 66) (a) Benvenga, M. J.; Spaulding, T. C. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1988**, *30*, 205; (b) Butelman, E. R. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1989**, *34*, 13; (c) Maurice, T.; Privat, A. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *328*, 9.
- 67) (a) Hoffman, D. C.; Donovan, H. *Psychopharmacology* **1995**, *120*, 128; (b) Schmidt, C. J.; Chapin, D. S.; Cianfrogna, J.; Corman, M. L.; Hajos, M.; Harms, J. F.; Hoffman, W. E.; Lebel, L. A.; McCarthy, S. A.; Nelson, F. R.; Proulx-LaFrance, C.; Majchrzak, M. J.; Ramirez, A. D.; Schmidt, K.; Seymour, P. A.; Siuciak, J. A.; Tingley, F. D.; Williams, R. D.; Verhoest, P. R.; Menniti, F. S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 681.
- 68) Yamazaki, M.; Harada, K.; Yamamoto, N.; Yarimizu, J.; Okabe, M.; Shimada, T.; Ni, K.; Matsuoka, N. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2014**, *24*, 1698.
- 69) Naritomi, Y.; Terashita, S.; Kimura, S.; Suzuki, A.; Kagayama, A.; Sugiyama, Y. *Drug. Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 1316.
- 70) Maurice, T.; Privat, A. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *328*, 9.

謝辞

本論文を提出するにあたり、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました、東北大学大学院薬学研究科教授 土井隆行博士に深く感謝の意を表します。

本論文に関して審査および貴重な御教示と御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 徳山英利博士、同研究科教授 岩淵好治博士に心より御礼申し上げます。また、御指導と御助言を賜りました同研究科准教授 安立昌篤博士、ならびに同研究科助教 大澤宏祐博士に深く感謝いたします。

本研究はアステラス製薬株式会社研究本部モダリティ研究所で行われたものであり、キャンディデートディスカバリー研究所京都大学アライアンスステーション担当部長（元モダリティ研究所所長） 増田典之博士、元モダリティ研究所機能分子研究室室長 松嶋雄司博士の御指導に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻をいただきました富島昌紀博士に深く感謝いたします。また、直接懇切なるご指導を頂きました増田直之博士に心より感謝いたします。本論文の作成にあたり、有益なるご助言とご協力を賜りました四月朔日晋博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の実施及び遂行において、終始ご協力いただきました濱口渉博士、瀬尾竜志氏、本多集悟氏、森田真正博士、米沢公一氏に心より感謝いたします。

X線共結晶を取得していただきました天野靖士博士、本坊和也博士に深く感謝いたします。

各種薬理試験を行っていただきました三原拓真博士、山崎真也子博士、青田正樹氏、生田目一寿博士及び薬物動態試験を行っていただきました森口博行氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、私の研究生生活を激励し、常に支えてくれた家族に深く感謝いたします。