

複素環構造を有する化合物の合成と構造活性相関に関する研究

東北大学大学院農学研究科

生物産業創成科学専攻

生物有機化学分野

高井 健太郎

指導教官 桑原 重文 教授

Studies on the Synthesis and Structure-Activity Relationship of
Heterocycle-Containing Compounds

by

Kentaro Takai

*Laboratory of Applied Bioorganic Chemistry
Graduate School of Agricultural Science
Tohoku University*

目次

諸言

第1章 抗生物質 polynactin 類新規フッ素化アナログの合成研究

1-1 研究の背景	6
1-2 合成方針	13
1-3 ω -trifluorononactic acid (2e)の合成	13
1-4 Macrotetrolide β (1k)の合成	17
1-5 第1章まとめ	20

第2章 可溶性エポキシド加水分解酵素阻害剤の創薬研究

2-1 研究の背景	22
2-2 合成方針	25
2-3 SAR 情報	25
2-4 96 の <i>ex vivo</i> 、 <i>in vivo</i> 試験	28
2-5 三置換シクロプロパン活用の戦略	30
2-6 化合物の合成	34
2-7 第2章まとめ	37

第3章 M_1/M_4 選択的ムスカリン性アセチルコリン受容体作動薬の創薬研究

3-1 研究の背景	39
3-2 研究の方針とリード化合物の取得	41
3-3 最適化検討	42
3-4 化合物の合成	45
3-5 第3章まとめ	49

第4章 総括

略語表 51

語句説明 53

実験の部 55

参考文献 95

謝辞 101

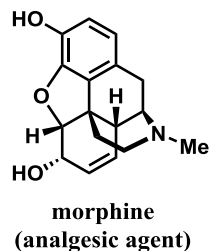
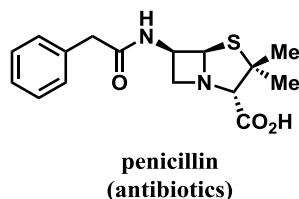
諸言

医薬品や農薬をはじめとする低分子生理活性物質創出の手段は、シーズの由来から主に 1) 天然物そのものの利用、2) 天然物の改変、3) 非天然物の三種類に分類でき、それぞれ異なる志向のもと研究が実施されている。

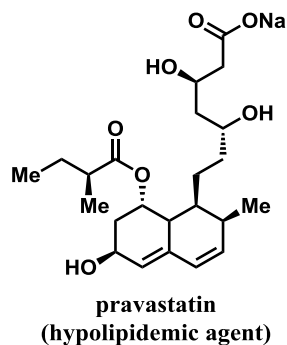
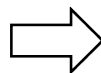
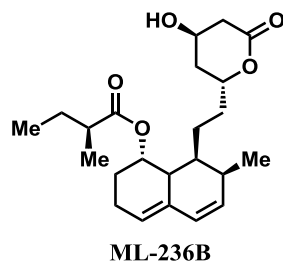
1)においては、植物、細菌、海洋生物の抽出物等から生理活性物質が見出され、続いてその物質の詳細な作用メカニズムの解明がなされる。それらバイオロジック的研究と同時並行で化合物の構造決定、全合成研究が行われ、最終的に天然を直接、または化学合成により化合物を供給することで一般に使われるようになる。この場合、化合物自体が研究対象であり、どんな興味深い化合物であるかを明らかにする、化合物志向 (compound-oriented) の立場である。代表例としてはアオカビから発見された抗生物質 penicillin や、アヘンから抽出された鎮痛薬 morphine などが挙げられる¹。

2)については、研究開発への供給容易化、主活性の向上、薬物動態の改善などを目的として天然物そのものに手を加え構造改変を行っているが、化合物の出自自体は 1)と同様天然物であり、こちらも大筋としては compound-oriented と言って良い。代表例として、コウジカビから単離された ML-236B の構造変換により水溶性を改善させた高脂血症治療薬 pravastatin などが挙げられる²。一方、3)の研究において compound-oriented と言えるのは、ある特定の化合物ライブラリーを用いて抗菌活性や抗カビ活性、G-protein coupled receptors (GPCRs)等の受容体との親和性を網羅的に評価する場合は挙げられるが、人工の化合物は元々何らかの生物活性を持たせることを目的としてデザインされた化合物であるため、それ以外の用途を網羅的に探索するというのは効率的な手法とは言えない。3)が最も効率的に機能するのは、既に標的、作用メカニズムがある程度想定されている時に、化合物ライブラリーを用いてスクリーニングをかけ、さらに見出された化合物を最適な形へと構造変換する場合である。こちらは 1)、2)とは対称的に、標的、作用メカニズムがメインの研究対象、すなわち標的志向 (target-oriented) の立場である。代表例として、核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ を活性化するためにデザインされた、インスリン抵抗性改善薬、pioglitazone などが挙げられる³。PPAR γ の生体内リガンドとしては遊離脂肪酸や leukotriene B4 などが挙げられるが、pioglitazone との構造的共通性は酸性プロトンの存在以外ほとんど無く、pioglitazone が標的への親和性向上のために人工的にデザインされているのが分かる。

1) Natural product



2) Development from natural product



3) Non-natural product

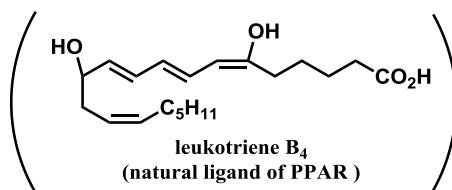
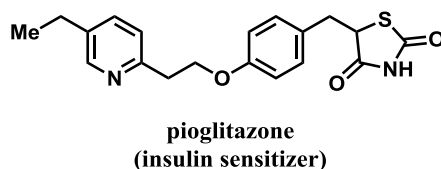


Figure 1. Representatives of the method of bioactive compound discovery.

1990年代以降、バイオロジーの発展による様々な有望疾患ターゲットの発見、及びその効率的評価方法の確立と共に、鈴木カップリングや野依不斉合成、ring-closing-metathesis (RCM)反応といった従来の常識を覆すような効率的合成技術、そして高効率的な化合物評価を実現した high-throughput-screening (HTS)が開発された。これらの手法により、多くの化合物を短時間で合成、評価できるようになり、target-oriented の手法は大いに進展した。しかしながら近年は疾患ターゲットの高難易度化とケミカルバイオロジーの再発展により、特異な構造を有する天然有機化合物に再び注目が集まっており、化合物自体の面白さに着目した compound-oriented の研究が多くの成果を上げている。

よって有用な生理活性や興味深い性質を有する、所謂「面白い」有機化合物の創出に向けては、特定的手段に偏ることなく、発達した技術と蓄積されてきた知識の全てを総動員して取り掛かることが求められている。

その様な中、複素環構造は、標的との相互作用、化合物の物理化学的、生物学的安定性、薬物動態等に重大な役割を果たしている場合が多く、*target-oriented*、*compound-oriented*、いずれの研究志向においても研究の進展に多大な寄与をもたらすと考えられる。例えば、有毒渦鞭毛藻が産生するシガテラ食中毒の原因物質の一つである *ciguatoxin* は、ナトリウムチャンネルへの結合により脱分極を引き起こすことで麻痺や心収縮といった毒性をもたらすことが知られているが、*ciguatoxin* の部分構造と抗 *ciguatoxin* 抗体との相互作用が、梯子状ポリエーテル環部分の多数の水素結合により成立していることが近年の研究により明らかとなった⁴。

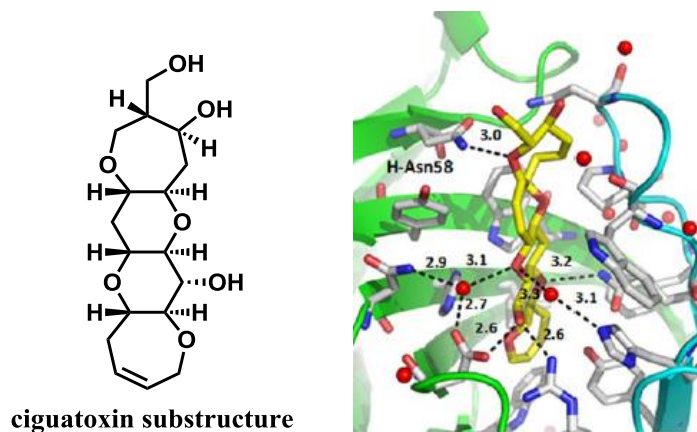


Figure 2. Interaction between *ciguatoxin* substructure and its antibody.

また、有機合成に用いられるクラウンエーテルや、中心に鉄を配置することでヘム鉄を形成し生体内で重要な役割を果たしているポルフィリン環は、各種イオンをキレートすることが可能であるが、これも酸素原子や窒素原子を適切に配置でき、さらにイオンを捕捉する際の熱学的エネルギーを最小限に抑えることができる複素環構造が大きく貢献している。

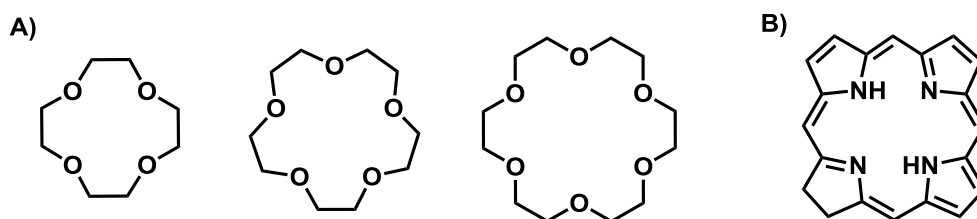






Figure 3. Examples of chelatable compounds. A) crown ethers and B) porphyrin ring.

標的との相互作用の他にも、複素環構造の導入により、水への溶解度の改善や、生体内における代謝酵素に対する安定性向上といった、薬らしさ(*druggability*)を向上させることも可能となる。簡単な例として、*benzene* と *pyridine*、*cyclohexane* と *tetrahydropyran* はそれぞれ一つの炭素原子が窒素原子、及び酸素原子へと置き換わった関係にあるが、ヘテロ原子への変換で水への溶解度、及び脂溶性が劇的に変化する(**Table 1**)。

Table 1. Comparisons of water solubility and Log P between heterocycles and non-heterocycles.

Compound	 benzene	 pyridine	 cyclohexane	 tetrahydropyran
Water solubility (SciFinder)	1.8 g/L (15°C)	Miscible	Insoluble	80 g/L (25°C)
Log P (ChemBioDraw®)	2.03	0.7	2.5	0.82

従って、有用な新規低分子生理活性物質の創出やケミカルバイオロジー研究の進展において、複素環構造を生かした戦略を取ることは、有益な結果をもたらすと期待できる合理的な進め方と言える。

本博士論文では、新規有用生理活性物質の創出に向け、天然物構造の利用、また HTS を利用した手法を実施する中で、複素環構造を有する化合物の合成、及び構造活性相関に関する研究を記述する。

第一章では、天然有機化合物であるマクロライド型抗生物質 polynactin 類への新たな生理活性付与を目指した新規フッ素化アナログ合成を実施した。第二章では、可溶性エポキシド加水分解酵素 (soluble epoxide hydrolase: sEH) 阻害剤の天然物の構造に着目した創薬展開を実施、その手法の有用性を論じる。また X 線結晶構造解析の利用による効率的な構造変換も併せて論じる。第三章では、M₁/M₄ 選択的ムスカリン性アセチルコリン受容体作動薬の創薬研究において、HTS による複素環化合物リード探索からの効率的な合成展開について論じる。

第1章 抗生物質 polynactin 類新規フッ素化アナログの合成研究

1-1 研究の背景

1-1-1 Polynactin 概説

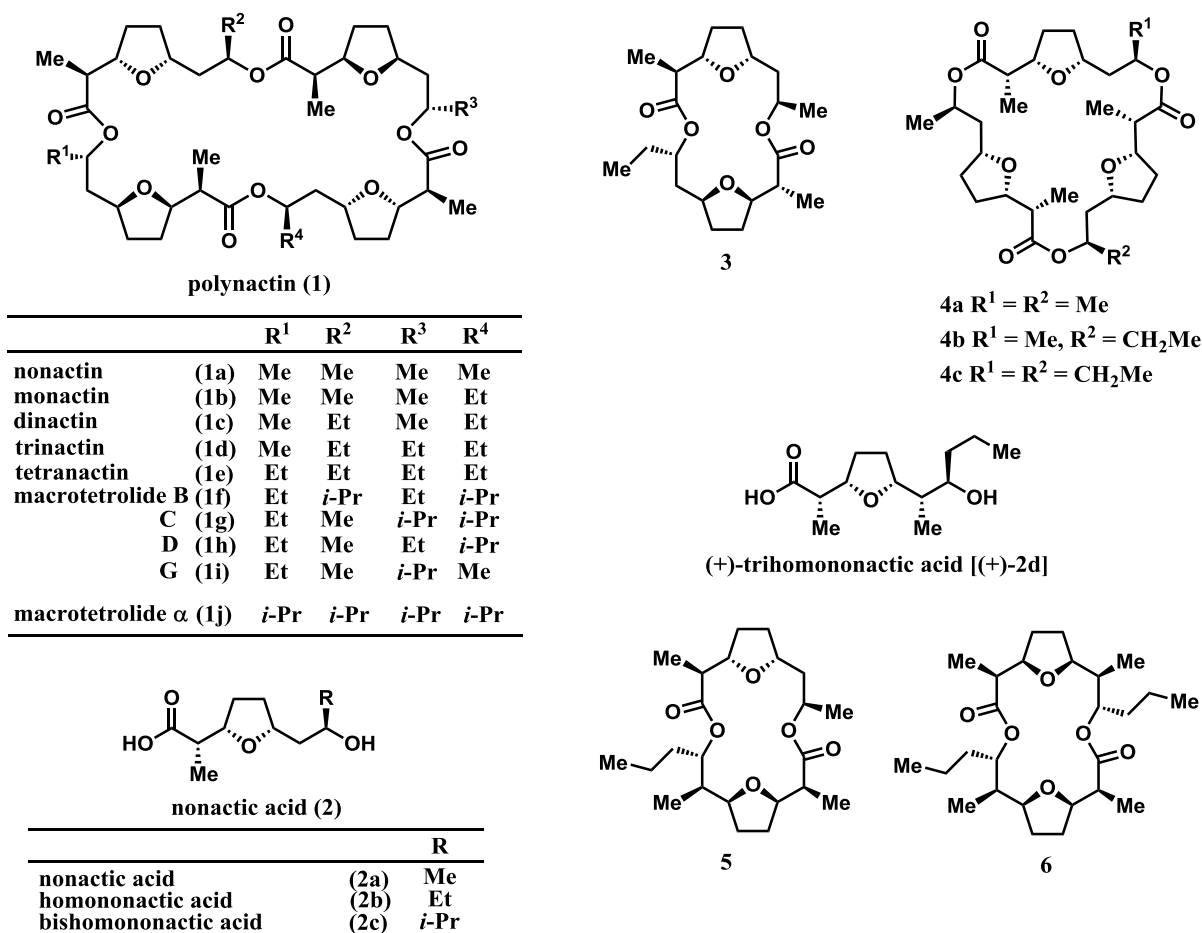


Figure 4. polynactin family.

Polynactin(1)は *Streptomyces* 属放線菌の培養液から単離されたマクロライド型抗生物質の総称である。nonactic acid (側鎖が Me 基) (2a)、homonactinic acid (側鎖が Et 基) (2b)、bishomonactinic acid (側鎖が *i*-Pr 基) (2c)をモノマーとして、異なる組合せにより 9 種類が現在までに単離されている。

Nonactin (1a)は、1995年 Corbaz らにより *Streptomyces griseus* ETH A7796 の培養液より単離され⁵、1963年に Gerlach、Prelog らにより構造決定された⁶。当初抗菌活性はないとされたが(nonactin = non-action)、Nishimura らによってイモチ病原菌に対する生育阻害活性があることが見出された⁷。Monactin (1b)、dinactin (1c)、trinactin (1d)は 1a と同一の培養液から 1962年に Dominguez ら^{8a}と Beck ら^{8b}により別々に単離、構造決定された。Tetranactin (1e)は 1971年に Ando らにより *Streptomyces aureus* S-3466 の培養液から単離、構造決定された⁹。さらに、Keller-Schierlein らにより

bishomononactin acid (**2c**)を構成単位の一部とする polynactin、macrotetrolide B (**1f**)、C (**1g**)、D (**1h**)、G (**1i**)も発見されているが¹⁰、その生物活性等は知られていない。また近年 nonactin acid (**2a**)、homononactin acid (**2b**)を構成成分とする環状二量体 **3**、環状三量体 **4a-4c** が Rezanka、Spizek らによって *Streptomyces globisporus* より単離された¹¹。さらに彼らは trihomononactin acid (**2d**)を構成成分とする環状二量体 **7**、**8** 及び環状単量体 **9** を同一の放線菌より単離している。

Nonactin (**1a**)、monactin (**1b**)、dinactin (**1c**)、trinactin (**1d**)の生物活性については、酸化リン酸の脱共役剤であることや、ATPase 活性の増大¹²、アルカリあるいはアルカリ土類金属イオンをキレート状に補足することで(selectivity : $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ \approx \text{Pb}^+ > \text{Ca}^+ > \text{Na}^+$)ミトコンドリアの内部呼吸を阻害すると報告されている¹³。また数種類のグラム陽性菌に対する抗菌活性も報告されているが、その活性の強さは構成成分の homononactin acid の割合が増える程、すなわち側鎖 R の Et 基の数が増える程増大する¹⁴。この理由としては、側鎖 R の嵩高さが増大するにつれ polynactin (**1**)の構造がより剛直になり、イオンをキレートする際のエントロピーのハンデが小さくなるためであると考えられており、我々の予想とは別に、Priestly は計算化学により macrotetrolide α (**1j**)が強い K イオン捕捉能を有することを予想している¹⁵。

また、nonactin (**1a**)の新たな生物活性として、P170 糖タンパク質を介した多剤耐性細胞に対して阻害効果が報告された。P170 糖タンパク質は多剤耐性細胞に発現する MDR1(multidrug resistance)遺伝子にコードされている。このタンパク質は細胞膜上に存在しており、構造に類似性のない種々の薬剤と直接結合し ATP 加水分解のエネルギーを用いて細胞外へ能動輸送していると考えられている。Nonactin (**1a**)を用いた場合、耐性細胞におけるアドリアマイシンの取込みが多剤耐性克服剤として知られているシクロスポリン A と同等の効果があり、その作用機構の解明に興味をもたれている¹⁶。

Tetranactin (**1e**) は、低濃度(≤ 100 ng/ml)で他の細胞の存在によるヒトの T リンパ球の増殖を阻害し、さらにリンパ球の混合培地における細胞毒性の T リンパ球や活性化キラー細胞の増殖を抑制する。このリンパ組織増殖誘導の抑制効果、すなわち免疫抑制効果は、シクロスポリン A と同等である¹⁷。

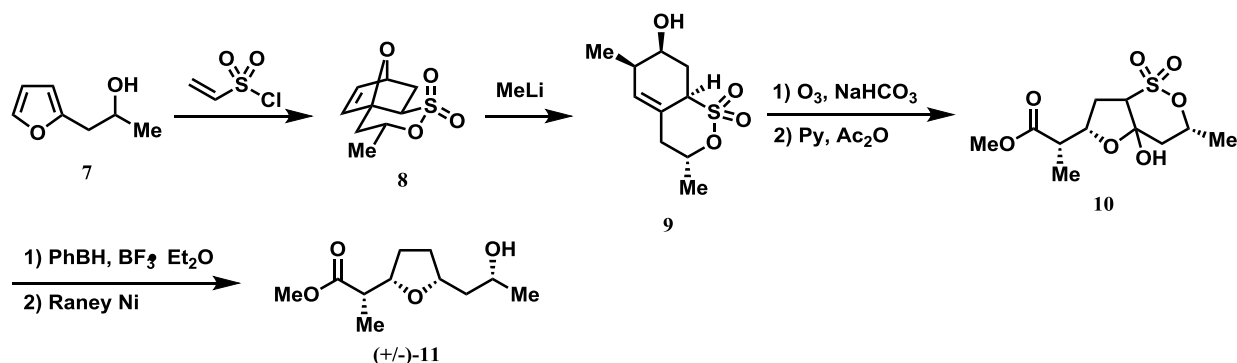
また、2011 年 3 月に発生した東日本大震災時の福島原発からの放射性元素漏出問題の影響か、近年 nonactin によるセシウム、ストロンチウム等に対するキレート能を評価している報告もなされている¹⁸。

以上のような薬剤としての有用性（多剤耐性細胞に対する抑制作用や免疫抑制活性）、キレート剤としての再評価（放射性元素の捕捉）という観点から、今後 polynactin 類の科学に対する幅広い貢献が期待される。

1-1-2 Polynactin 関連化合物の合成研究

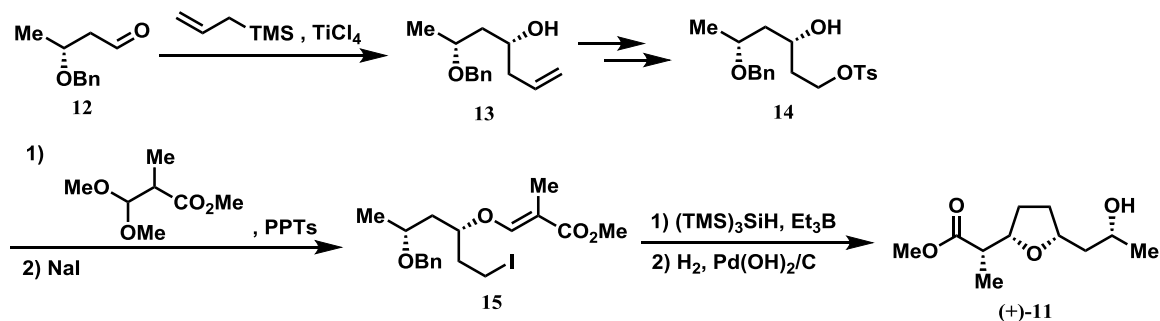
Nonactic acid (**2a**)の合成研究においては過去多くの報告がなされており、Ferraz からはフランス語の総説が出されている¹⁹。ここではそれ以降の合成法についていくつか紹介する。

Mets らは **7** に対する エステル化とそれに附随する分子内 Diels-Alder 反応により、スルトン **8** をジアステレオ選択的に構築した。続いて Me 基の導入、フラン環の形成、還元的なスルホンの脱離により **2a** のラセミ体を非常に短工程で合成することに成功している (Scheme 1)^{20a, 20b}。



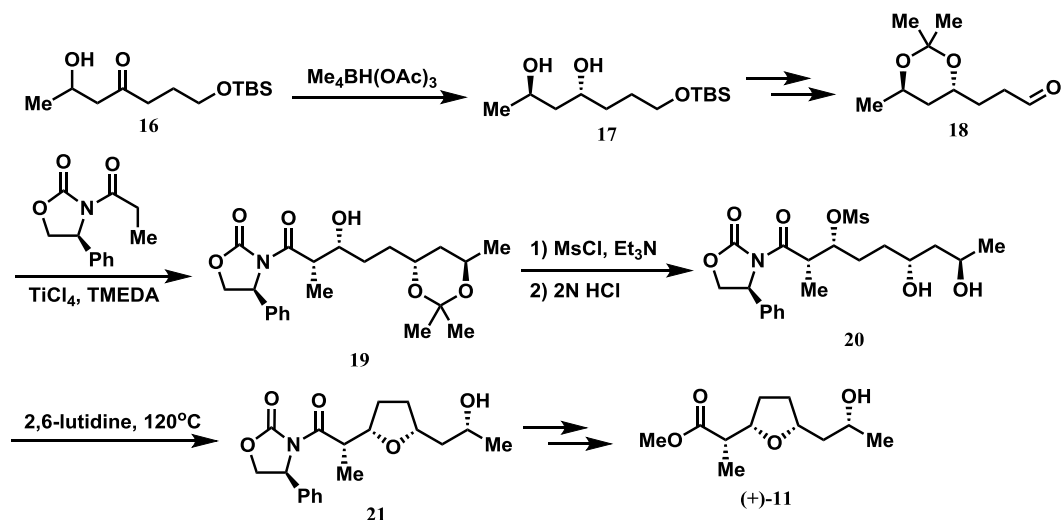
Scheme 1. Mets's method.

Lee らはエン反応等による増炭の後、ラジカル環化により高選択的 (>25 : 1)に望む *cis* 配置のフラン環化合物を得ることに成功している (Scheme 2)²¹。



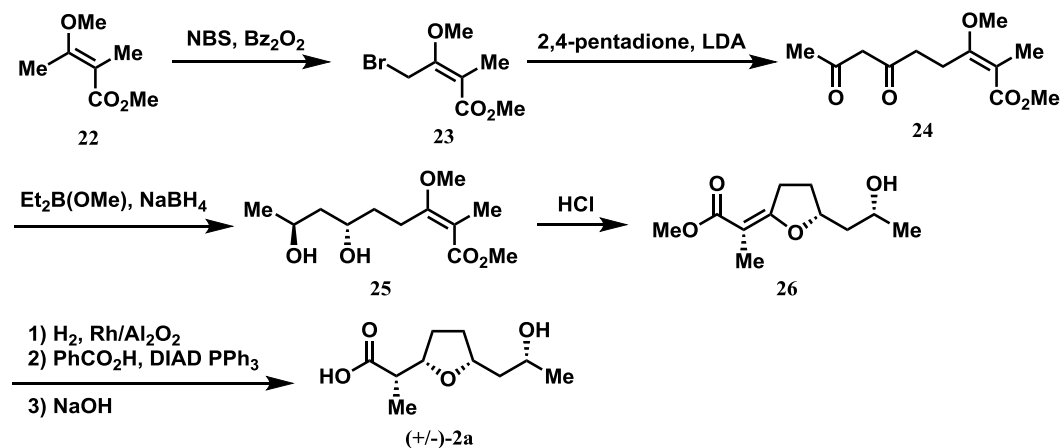
Scheme 2. Lee's method

また Wu らの方法は基本的な反応の組み合わせであること、*cis* 配置のフラン環構築等の選択性がほぼ完璧に制御されていることなどから、実用的な方法であると言える (Scheme 3)²²。



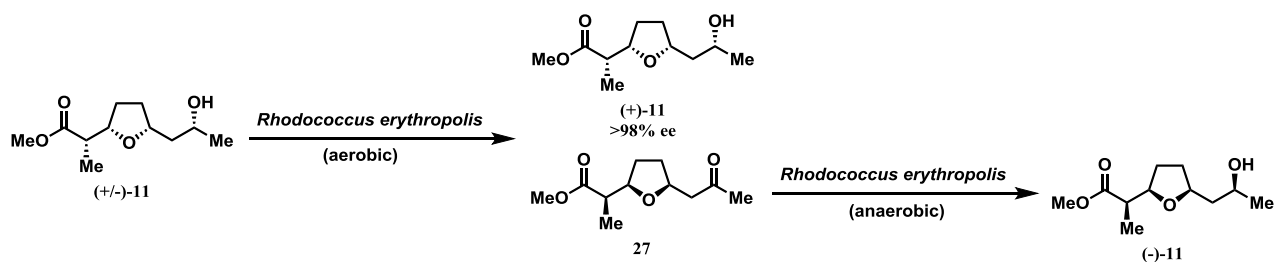
Scheme 3. Wu's method.

Zhou らは 1,3-ジケトン を $\text{Et}_2\text{B}(\text{OMe})$ 存在下、 NaBH_4 で還元することで形成した *trans*-1,3-ジオール を立体構築の起点とし、*cis* 選択的なフラン環の構築を達成している (Scheme 4)²³。



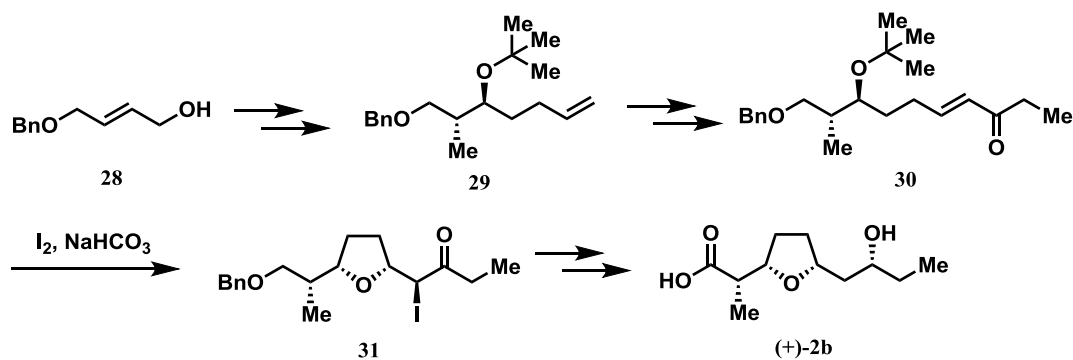
Scheme 4. Zhou's method.

Nonactic acid (**2a**)の光学分割について、*Rhodococcus erythropolis* を用いた酵素反応が Nikodinovic らから最近報告された²⁴。彼らはまず好気性条件にて(-)-**11** の(8*S*)-OH 基のみを酸化でケトン **27** とし、続いて分離した **27** を嫌気性条件にて立体選択的に還元することで、両鏡像異性体の取得に成功した。一種の酵素を異なる雰囲気下で用いるという興味深い手法である (Scheme 5)。

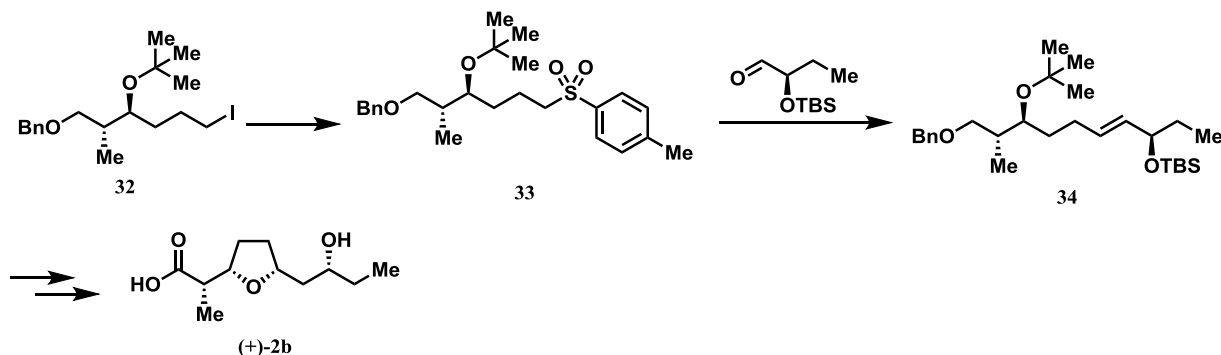


Scheme 5. Nikodinovic's optical resolution.

本研究室では阿部²⁵、尾野²⁶らによって homononactic acid (**2b**)の合成が達成されている。*cis*配置のフラン環は Bartlett らの *cis* 選択的ヨードエーテル化反応²⁷を用いて構築しており、良好な収率、選択性を実現している (**Scheme 6, 7**)。

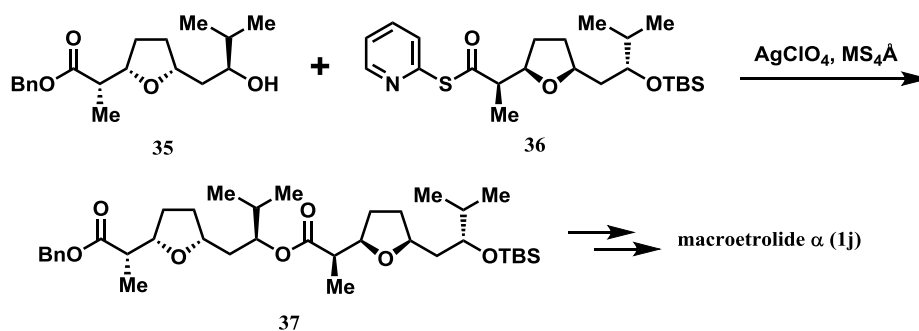


Scheme 6. Abe's method.



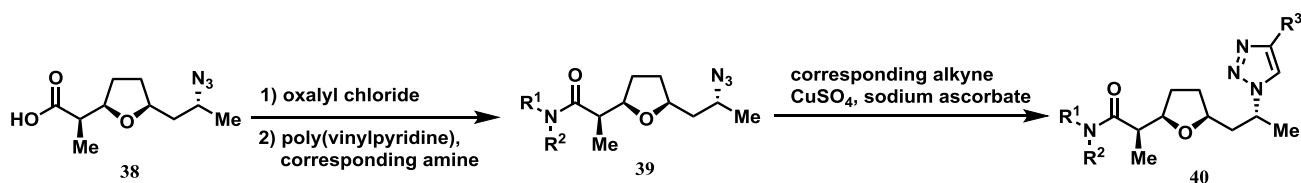
Scheme 7. Ono's method.

ダイマー化、テトラマー化、そしてマクロラクトン化による環状四量体の合成方法としては、山口法や向山-Corey 法などが用いられてきた。ここでは花館らの方法を紹介する。花館らは天然型側鎖としては最も嵩高い *i*-Pr 基を側鎖に有するアナログ体、macrotetrolide α (**1j**)の全合成を達成しているが、縮合、及びマクロラクトン化の条件は、Gerlach による過塩素酸銀を用いた向山-Corey 法の変法²⁸により、高収率で目的物を得ることに成功している (**Scheme 8**)²⁹。



Scheme 8. Hanadate's method.

また近年 nonactic acid (**2a**)をテンプレートとした化合物ライブラリ構築の試みもなされており、Luesse らによってクリック反応を用いた側鎖への効率的な置換基導入が実践された (**Scheme 9**)³⁰。



Scheme 9. Construction of nonactic acid derivatives library.

1-1-3 フッ素化アナログ

著者はその後側鎖を嵩高くするだけでなく、非天然型の側鎖を導入することで polynactin (**1**)に新たな性質を与えることができないかと考え、フッ素原子に注目した。フッ素原子は全原子中、水素に次いで小さい原子半径、そして最も強い電気陰性度を有している。

Table 2. Comparison of atom properties.

	最外殻電子配置	電気陰性度	ファンデルワールス半径(Å)	電子親和力(eV)
H	1s ¹	2.1	1.20	0.75
F	2s ² 2p ⁵	4.0	1.35	3.40
Cl	3s ² 3p ⁵	3.1	1.81	3.62
Br	4s ² 4p ⁵	3.0	1.95	3.36

そうした性質から、化合物へのフッ素原子の導入により 1)立体因子、2)静電的因子、3)炭素-フッ素結合の安定性、及び 4)疎水性といった観点での形質変化をもたらすことができ、これを利用した特異な効果が種々報告されている。代表的な例としては、フッ素原子が水素原子の疑似体として認識されるミミック効果が挙げられる。酢酸の α 位の一つの水素原子がフッ素原子へと置き換わったモノフルオロ酢酸は生体内で酢酸と誤認識され、TCA サイクルへと取り込まれ、フルオロクエン酸へと変換されるが、その後アコニターゼによる代謝を受けなくなる。さらにアコニターゼそのものを阻害する作用を発揮するため、嘔吐、痙攣、呼吸抑制、心不全といった重篤な毒性を示す。生体

内代謝安静性の向上は毒性だけではなく、薬物動態の改善にもつながるので、医薬品や農薬といった生理活性物質へフッ素原子を導入することは非常にポピュラーな構造変換の方策となっている^{31, 32}。

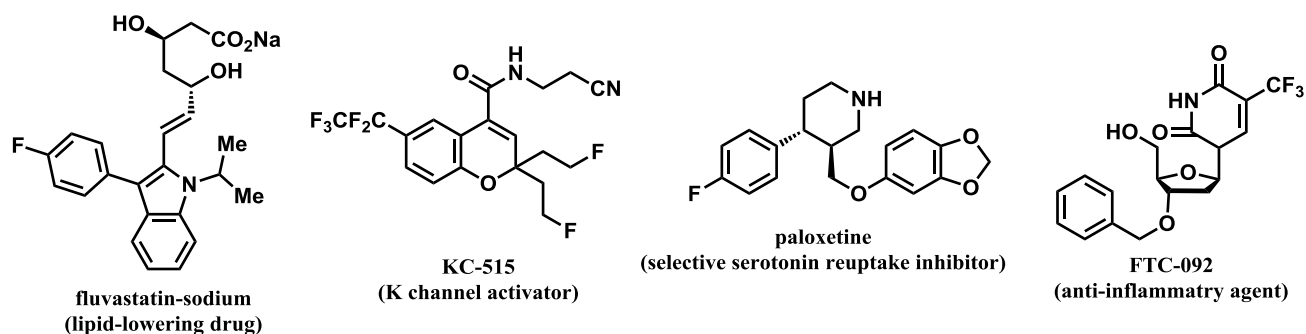


Figure 5. Examples of fluorine containing bioactive compound.

その中でもトリフルオロメチル (CF_3)基の導入は強力な電子求引効果によるフッ素原子上の分極率の低下に伴った分子間相互作用の低下、すなわち疎水性の向上をもたらす。これによって生体内への化合物の取り込み率に変化が生じ、生理活性に新たな知見をもたらすことがある。さらに CF_3 基は Es 値と呼ばれる嵩高さの指標において *i*-Pr 基と *t*-Bu 基の中間の嵩高さを有していることが知られて

Table 3. Es values of several substituents.

	Es value
H	0.00
F	-0.46
OH	-0.55
Me	-1.24
Et	-1.31
<i>i</i> -Pr	-1.71
CF_3	-2.40
<i>t</i> -Bu	-2.78

おり、polynactin (**1**)の側鎖に CF_3 基を導入することは、嵩高さが増すほど抗菌活性が増強されるという構造活性相関、そして疎水性の向上による機能変換といった観点から興味深い結果をもたらすと予想される。

以上の観点から、新たなアナログ体、側鎖 CF_3 基のモノマーである ω -trifluorononactic acid (**2e**)、そして macrotetrolide β (**1k**)の合成を目的に研究を行った。

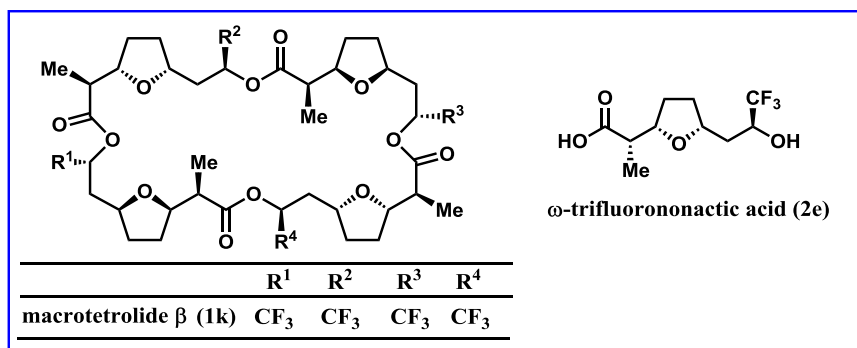
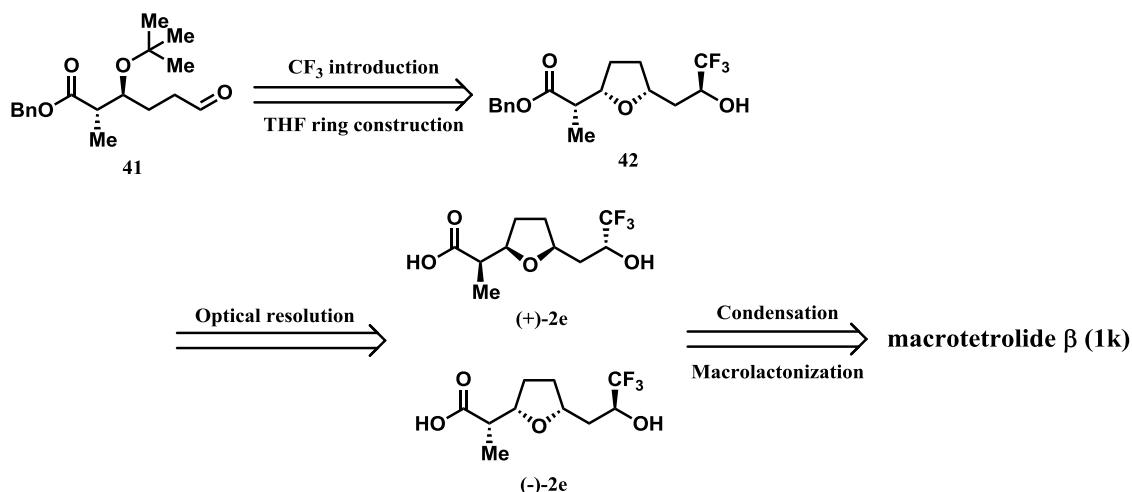


Figure 6. Polynactin analogs and properties of fluorine atom and CF_3 group.

1-2 合成方針

1-2-1 逆合成解析

目的物の逆合成解析を **Scheme 10** に示す。花館らのアナログ合成で報告されているアルデヒド **41**²⁹ に対し、CF₃ 基導入、及びヨードエーテル化反応による *cis* 選択的 THF 環構築を鍵段階とし、**42** を合成する。その後 **42** に対し光学分割を行うことでモノマーである ω-trifluorononactic acid (**2e**) が合成できると考えた。さらに得られたモノマーを順次縮合させ、最終的にマクロラクトン化をすることにより macrotetrolide β (**1k**) が合成できると考えた。



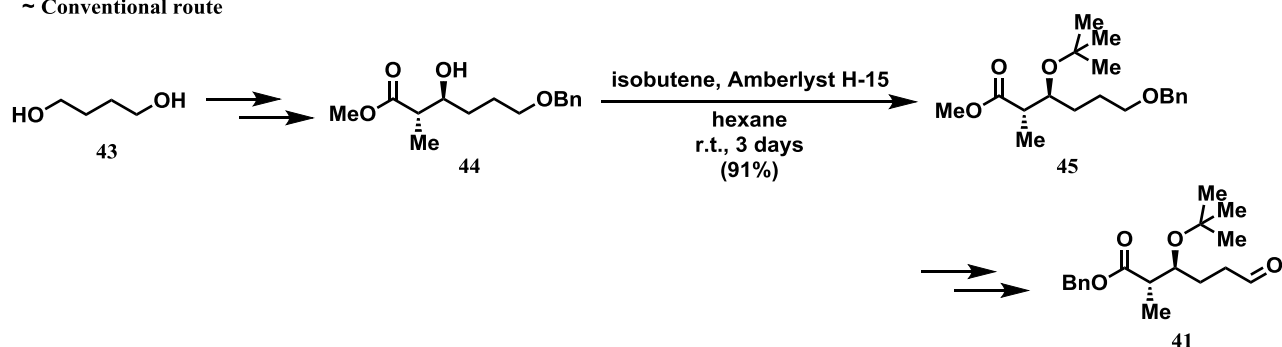
Scheme 10. Retrosynthetic analysis of new polynactin analogs.

1-3 ω-trifluorononactic acid (**2e**)の合成

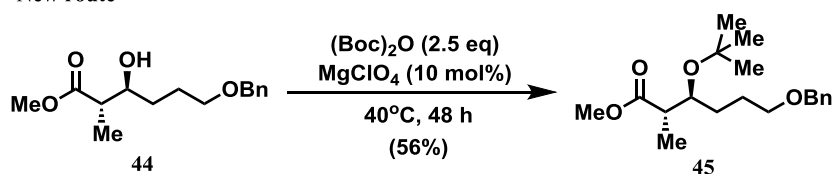
1-3-1 重要中間体アルデヒド **41** の合成

アルデヒド **41** の合成は花館らのアナログ合成で用いられたルートを採用した。本合成ルートは *t*-Bu エーテル構築の際に *isobutene* を高圧下封入し、酸触媒存在下 3 日程度攪拌するという条件を用いているが、高圧反応は安全性の点で問題があり、またスケールアップに不適であるため代替法を試みた。Bartoli らの方法に従い、**44** と (Boc)₂O を触媒量の MgClO₄ 存在下無溶媒で 48 時間反応させたところ、中程度の収率で *t*-Bu エーテル化に成功した³³。収率に改善の余地はあるものの、*isobutene* を用いる方法と比較し、本手法は (Boc)₂O の分解に伴って CO₂ ガスが発生するという点さえ留意すればスケールアップも容易であり、安全性の観点から言ってもより実用的な方法と言える。さらに CO₂ ガスの生成量によって反応の進行をある程度見積もることも可能というメリットもある。

~ Conventional route



~ New route

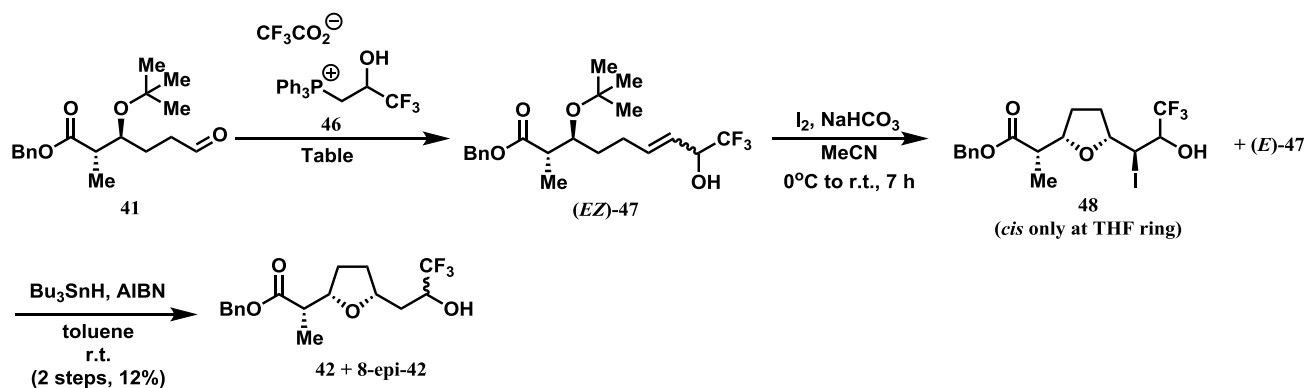


Scheme 11. Alternative method of *t*-Bu group introduction.

1-3-2 Wittig 反応による CF₃ 基導入

Kubota らより報告のあった Wittig 試薬 **46** を調製し³⁴、**41** に対して Wittig 反応を試みたところ収率、及び立体選択性に問題があったものの、望む **47** を得ることができた (Table 4, entry 1)。続く NaHCO₃ 存在下ヨードエーテル化反応により、望む *cis* 配置の THF 環を有する **48** を得たものの、ここでは **47** の *Z* 体のみが反応していることが分かった。これは (*E*)-**47** では CF₃ 基の立体障害のためにヨードエーテル化反応の進行を妨げたと考えた。得られた **48** に対し、スズヒドリド Bu₃SnH 試薬によりラジカル的に I 基を還元し、望むモノマー **42** を得ることに成功した。

最初の Wittig 反応の収率、及び立体選択性の向上により、**42** の収量向上が見込めると考え、Wittig 反応の条件を検討した。OH 基を有する Wittig 試薬を用いた場合、その中間で生成するアルコキシアニオンのアシストにより反応が可逆的になる。そのため生成物は熱力学的に安定な *trans* 体が優先する場合が多い。そこで Wittig 反応の不可逆性の増加を狙い、カウンターカチオンを Na⁺へと変えた塩基として NaHMDS (Table 4, entry 2) を用いたり、HMPA (Table 4, entry 3) を添加したりしたが、結果に改善は見られなかった。しかも OH 基をフリーにするため、その OH 基が関与した副反応が生じたためか非常に低収率となってしまった。そこでまず収率の改善を目指し、OH 基をブロックする目的で TMSCl を反応系内に添加したが、反応は全く進行しなかった。これは生じる TMSO 基が脱離してしまっただめだと考えられる (Table 4, entry 4)。以上のように収率、立体選択性ともに改善が困難であったため、本反応による **42** の供給は断念し、別法による CF₃ 基導入を試みることにした。



Scheme 12. Wittig reaction.

Table 4. The conditions of Wittig reaction.

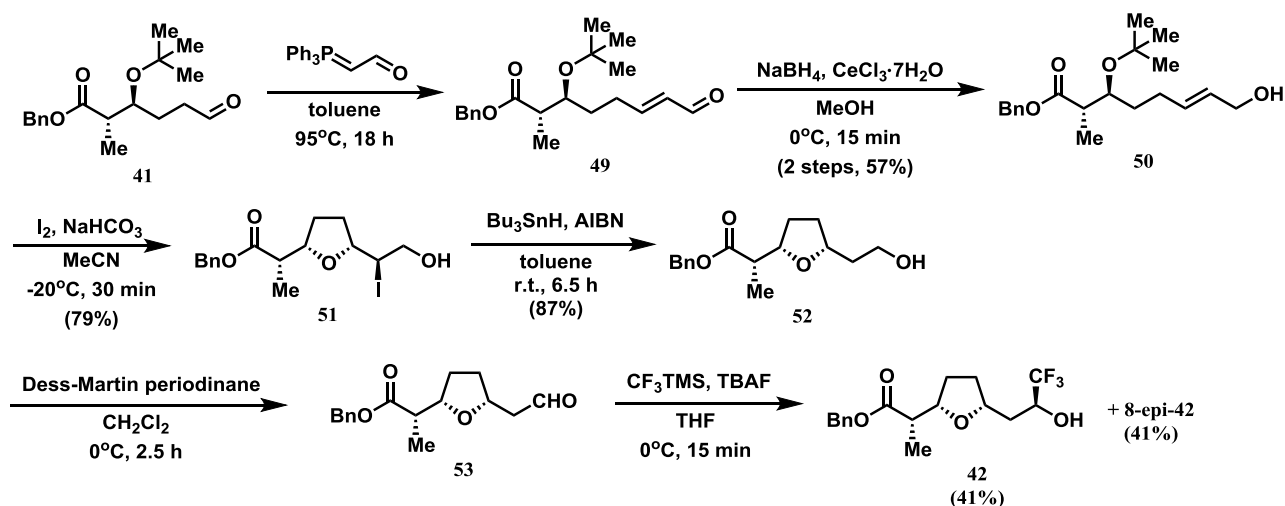
entry	bases	additives	results (cis / trans)
1	<i>n</i> -BuLi (2 eq)	–	40% (1:1 – 3:2)
2	NaHMDS (2 eq)	–	22% (3:1)
3	<i>n</i> BuLi (2 eq)	HMPA	trace (2:1)
4	<i>n</i> BuLi (2 eq)	TMSCl	No Reaction

1-3-3 CF₃TMS を用いた CF₃ 基導入

アルデヒド **41** に対し、Wittig 反応により不飽和アルデヒド **49** へと導き、続いてヨードエーテル化反応を試みたが反応は全く進行しなかった。これはアルデヒドの存在によりオレフィンの電子密度が低下しているためであると考え、Luche 還元³⁵によりアリルアルコール **50** としてからヨードエーテル化反応を試みた。当初氷浴で反応を行ったところアリル位の OH 基によるエポキシドの形成がかなり見られたが、-20°C に下げることで、ある程度抑制することが可能であった。続いて Bu₃SnH により I 基を除去し、最後に Dess-Martin periodinane³⁶により酸化反応を行うことで望むアルデヒド **53** へと導くことができた。

アルデヒド **53** に対して Ruppert's reagent として知られる CF₃TMS と TBAF から発生する CF₃アニオンを求核攻撃させることで、望む **42** を 8-*epi* 体と 1 : 1 の生成比で得ることに成功した³⁷。本合成ルートは工程数はかかるものの、一つ一つ反応を着実に進めることができ、モノマー構築までの収率は決して悪いものではない。今後検討の余地はあるものの **42** の供給には本ルートを採用することにした。

8 位相対立体配置の決定はこの時点で困難であったため、後述する X 線結晶構造解析により行った。

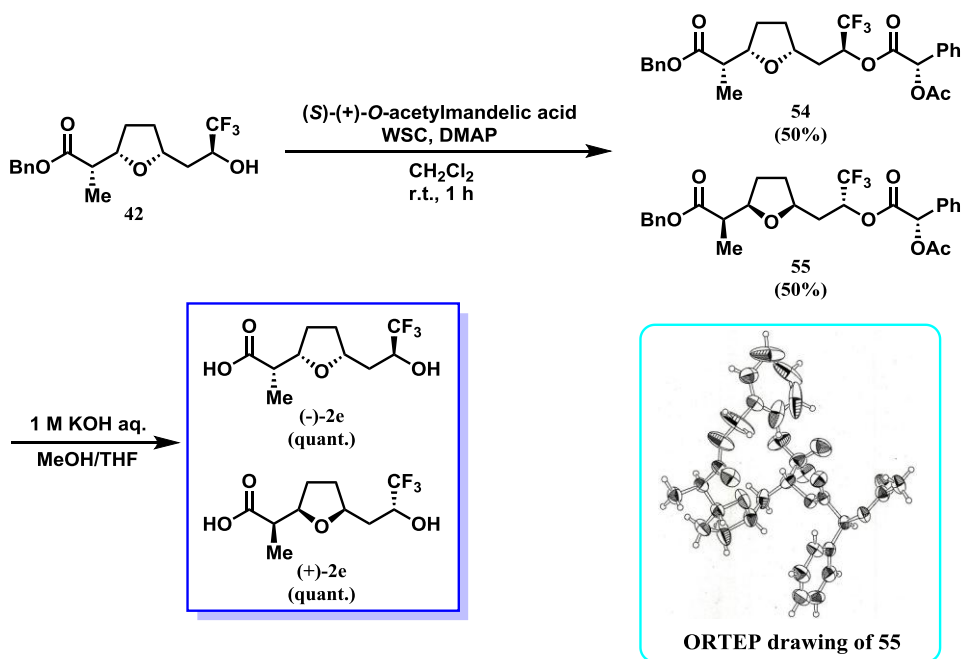


Scheme 13. CF₃ group introduction with CF₃TMS.

1-3-4 ω-trifluorononactic acid (**2e**)の合成

42を光学分割するため、光学活性の(*S*)-(+)-*O*-acetylmandelic acidを縮合させ**54**及び**55**を得た。**54**、**55**はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離可能であり、**55**が結晶化した。そこで**55**の単結晶を作成し、X線結晶構造解析により立体化学を決定しようと試みた。再結晶条件を検討したところ、溶媒に過剰量のヘキサンを用い、70°Cで結晶を溶解、その後セプタムで密栓をして3日間放置するという条件である程度クリスタル様の透明感を有する結晶を得ることができた。その結晶を用いてX線結晶構造解析を試みたところ、実際には結晶内部にヘキサンを含んでいることが分かったが、幸運にも測定は可能であった。X線結晶構造解析により得られたORTEP図から、**55**は2、3、6、8位の立体化学がそれぞれ*R*、*R*、*S*、*R*であり、望む天然型の相対立体配置であった。この時点で関連化合物の相対立体配置も決定した。

最後に**54**、**55**をそれぞれ塩基性条件下加水分解することで、ω-trifluorononactic acid (**2e**)の両鏡像体を得ることに成功した³⁸。

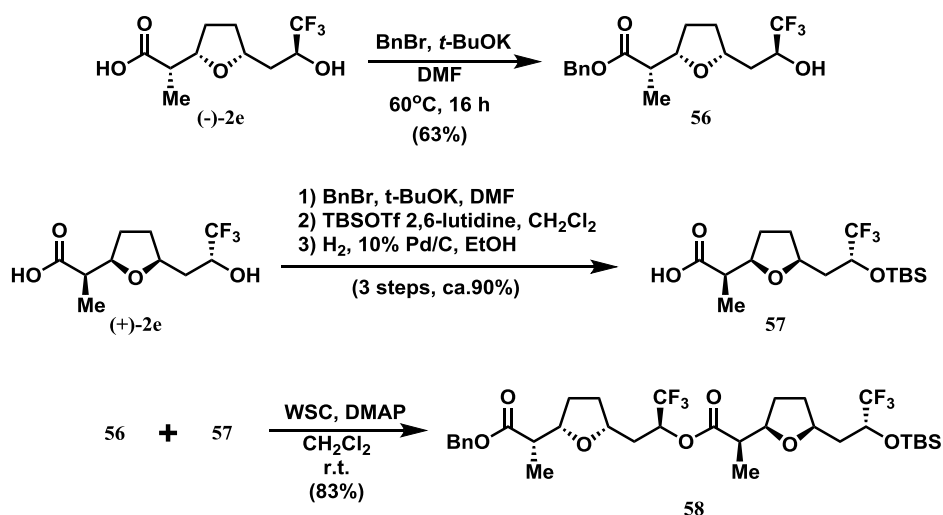


Scheme 14. Optical resolution and synthesis of (+) and (-)-2e.

1-4 Macrotetrolide β (**1k**)の合成

1-4-1 ダイマー化

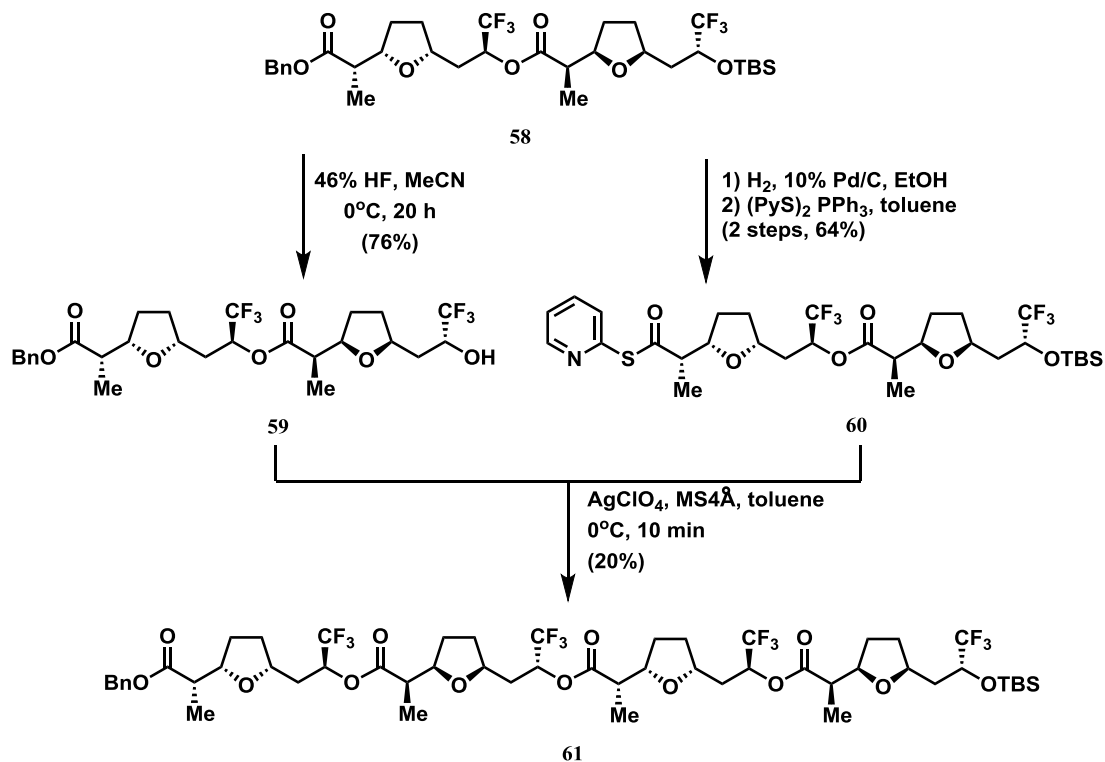
得られたモノマーの両鏡像異性体を用いて、ダイマー化を試みた。(–)-2e はベンジルエステル化により **56** へと導き、(+)-2e はカルボン酸部分を Bn 基で保護、続いて OH 基を TBS 基で保護、最後に Bn 基を加水素分解し、カルボン酸 **57** へと導いた。その後、当初は CF₃ 基の高さを考慮し、macrotetrolide α (**1j**)の合成の際に花館が採用した Gerlach による銀塩を用いた向山-Corey 法の変法でダイマー**58** を得ていたが、縮合の収率が中程度(56%)に留まっていたため、一般的な縮合剤である WSC、DMAP を用いた縮合条件を試みたところ、収率を 83%に向上させることができた。



Scheme 15. Dimerization.

1-4-2 テトラマー化

得られたダイマー**58**を、脱 TBS 化により **59**、また Bn エステルの加水素分解、ピリジルチオールによるエステル化で **60** へと導いた。続いて AgClO_4 を用いて縮合を試みたところ、20%という低収率ではあるが、望むテトラマー**61**を得ることに成功した。低収率の主な原因がピリジルチオールエステル**60**の速い分解にあったため、ダイマー化の時と同様にカルボン酸体を縮合に用いることを検討した。



Scheme 16. Tetramerization.

まず初めにダイマー化の際良好な収率を示した WSC、DMAP による縮合条件を検討したが、反応が複雑化し、基質が分解する結果となった。これは、CF₃ 基の存在により、モノマー間のエステル結合が不安定になっており、DMAP で塩基性になる反応系内では混入した少量の水により加水分解が起きやすくなっていることが原因でないかと考えた。そこで DMAP を除き WSC のみを用いて縮合を試みた。すると興味深いことにカルボン酸 **61** が自己縮合を起こした酸無水物 **63** がほぼ定量的に得られた。これは **59** の OH 基の求核性が隣接する CF₃ 基の電子求引効果により著しく損なわれているためだと考えられる。また縮合剤として HBTU を用いた結果、テトラマーが痕跡量得られるのみであった (Table 5)。

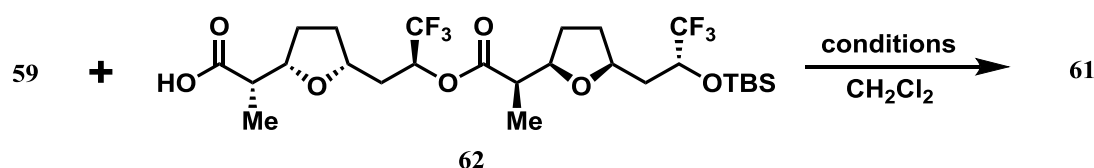
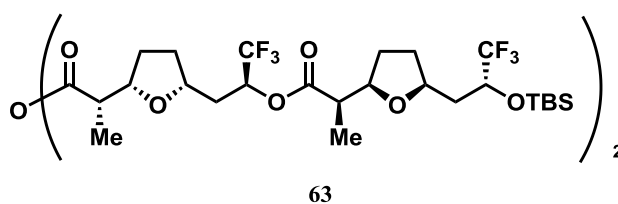


Table 5. The conditions of tetramerization

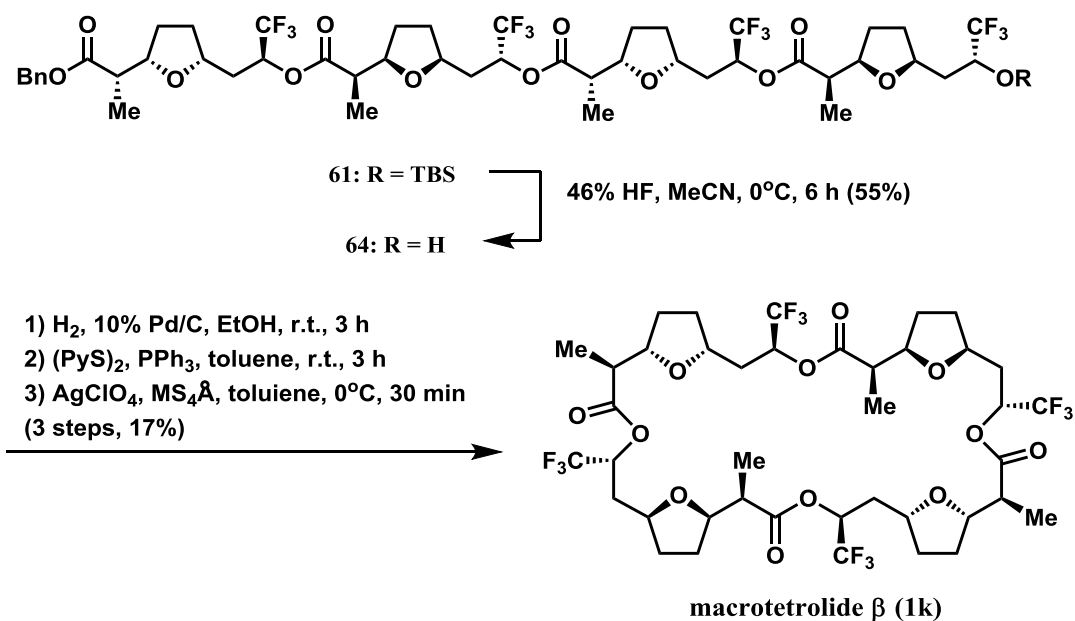
entry	conditions	results
1	WSC, DMAP	decomp
2	WSC	63 (quant.)
3	HBTU	61 (trace)



Scheme 17. Exploring of condensation conditions using carboxylic acid.

1-4-3 マクロラクトン化

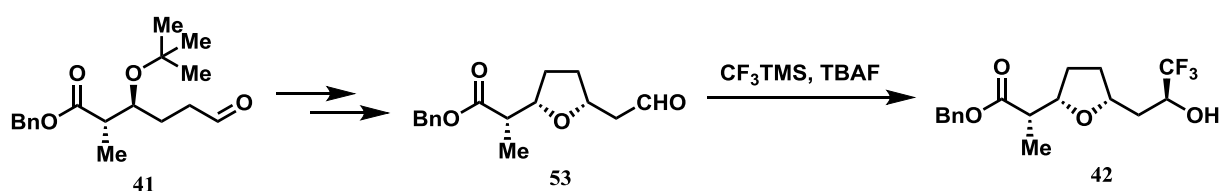
得られたテトラマー**61** に対し TBSO 基の脱保護を行い **64**、続いて Bn エステルの加水素分解、ピリジルチオールエステル化を経て、最後に Gerlach の方法を用いてマクロラクトン化を行い、目的物である macrotetrolide β (**1k**) の生成を HRMS にて確認した³⁹。本法を用いた大量合成により、各種生理活性試験を通じた構造活性相関の解明、医農薬リードの開発が可能である。



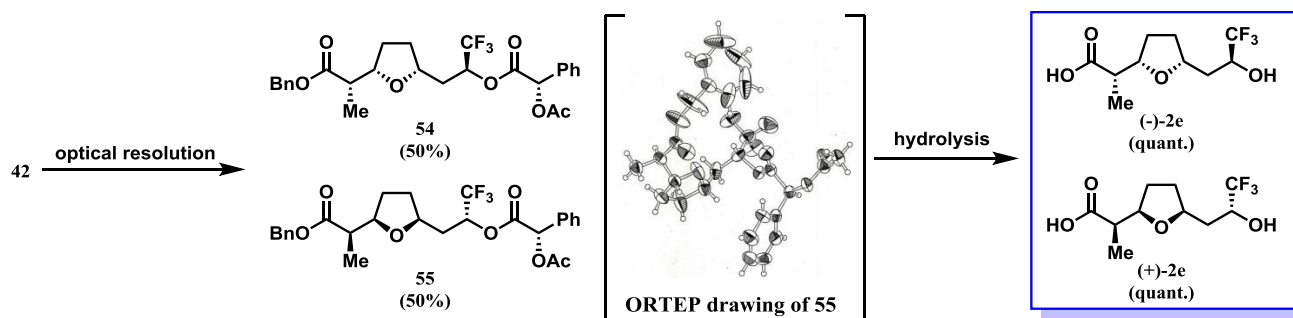
Scheme 18. Macrolactonization.

1-4 第1章まとめ

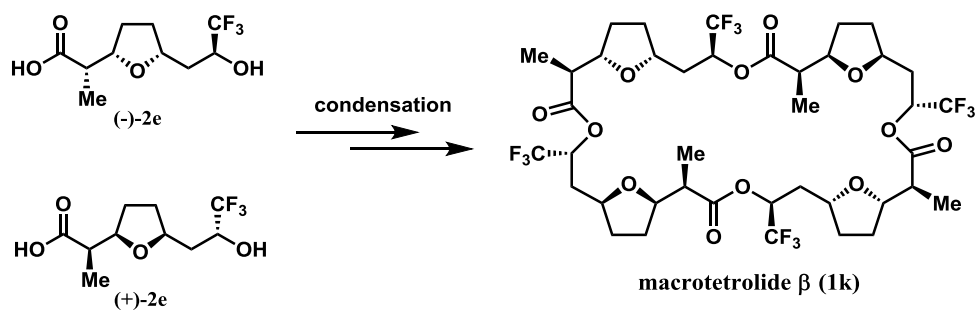
花館らの報告している合成中間体、アルデヒド **41** を出発原料とし、Wittig 反応による増炭、続いてヨードエーテル化反応により *cis* 配置の THF 環を構築した後、TMSCF₃ と TBAF を用いて発生させた CF₃ アニオンにより CF₃ 基導入に成功した。



光学活性の(*S*)-(+)-*O*-acetylmandelic acid により光学分割を行い、結晶化した **55** の X 線結晶構造解析により、絶対立体配置、及び一連の化合物の相対立体配置を決定することができた。最後に塩基性条件下加水分解によってベンジルエステルとアセチルマンデル酸エステル部位を除去することで、*o*-trifluorononactic acid (**2e**)の両鏡像体を得ることに成功した。



さらにこれら鏡像体を用いて花館が開発した手法による縮合、及びマクロラクトン化を行うことで、macrotetrolide β (**1k**)の生成を確認した。



第2章 可溶性エポキシド加水分解酵素阻害剤の創薬研究

2-1 研究の背景

2-1-1 Epoxyeicosatrienoic acids 概説

Epoxyeicosatrienoic acids (EETs)はアラキドン酸が代謝酵素の一種であるチトクローム P450 (CYP) 酵素のサブタイプ 2C 及び 2J による酸化を受けて生産される代謝中間体であり、エポキシドの形成される位置の違いで4種の構造異性体が存在する(5,6-, 8,9-, 11,12-, and 14,15-)⁴⁰。これまでEETsには多彩な生理活性があることが報告されており、特に循環器系に対する保護作用が数多く知られている^{41,42}。さらにBKチャネルやPPAR α 及び γ の活性化⁴³⁻⁴⁵やNF- κ Bの抑制⁴⁶といった作用も報告されており、高血圧や糖尿病といった生活習慣病全般に対する有効性が期待されている。また近年脳血流量の増加による痛みの調節や⁴⁷、神経疾患の抑制の可能性が言及されており⁴⁸、中枢神経系の保護作用を発揮することも期待されている。よってEETsは今後の高齢化社会のさらなる進行に伴い増加する種々の疾患(生活習慣病全般、アルツハイマー型認知障害、パーキンソン病)に対する福音となる可能性を秘めていると言える。

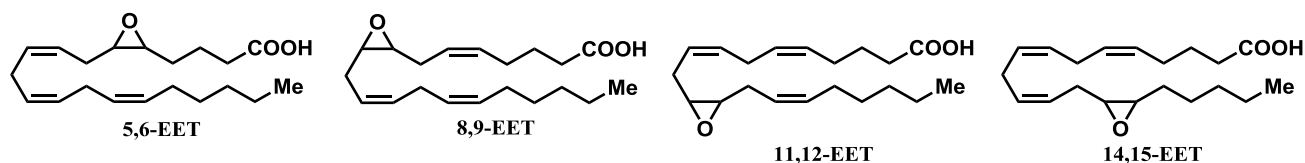


Figure 7. Regioisomers of EET.

Table 6. Biological activities of EETs.

EETs	生理活性
5,6-EET	<ul style="list-style-type: none"> ・ コラーゲンによる血小板凝集抑制⁴⁹ ・ 内皮細胞の遊走、及び血管形成促進⁵⁰
8,9-EET	<ul style="list-style-type: none"> ・ 内皮細胞の遊走、及び血管形成促進⁵⁰
11,12-EET	<ul style="list-style-type: none"> ・ 単球のマウス頸動脈への接着抑制⁵¹ ・ PPAR α の活性化⁵²
14,15-EET	<ul style="list-style-type: none"> ・ PPAR γ の活性化⁵³

EETsは種々の脂肪酸における代謝反応の例に漏れず、 β 酸化や ω 酸化等を受ける。しかしながら、EETsの代謝においては、これら酸化反応よりも大きく寄与している経路が存在する。すなわち、エポキシド構造を有するEETsのエポキシド環が加水分解を受け、dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs)へと変換されるという経路である⁵⁴。さらにDHETsはその極めて高い水溶性のために素早く生体内から

消失してしまうため、EETs の生体内濃度は有益な薬理作用を発揮するには不十分と考えられている⁵⁵。その加水分解を担う主な酵素として知られているのが、可溶性エポキシド加水分解酵素(soluble epoxide hydrolase: sEH)である。

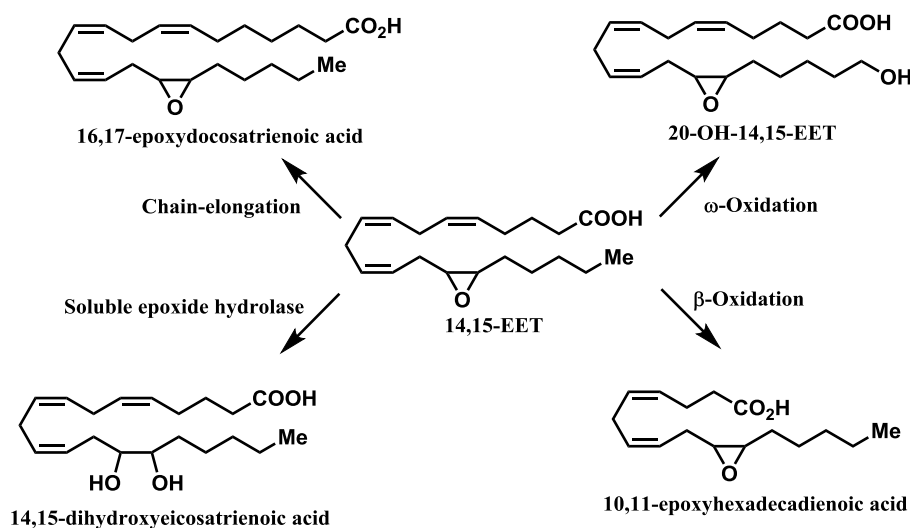


Figure 8. Metabolic pathway of EETs.

2-1-2 Soluble epoxyde hydrolase 概説

sEH は 62.5 kDa のサブユニットによるホモダイマーからなる加水分解酵素で、加水分解ドメインを C 末側に有している。全身に発現しているが、特に肝臓、腎臓に多く発現が認められている。ヒトとげっ歯類間で種差があることが知られているため(ヒト: 100%、ラット: 74%、マウス: 77%)、*in vitro*、及び *in vivo* 試験を実施する際は結果の解釈に注意が必要である⁵⁶。

また、sEH はその阻害剤との共結晶の X 線結晶構造解析により、受容体に認識され生物活性の原因となる構造的特徴、ファルマコフォア (pharmacophore) が明らかとなっている⁵⁷。すなわち、1) Tyr 383 及び Tyr466 の水酸基と相互作用する水素結合アクセプター、2) Asp 335 のカルボン酸基と相互作用する水素結合ドナー、との 2 種類の重要な水素結合が必須であり、その構造を満たすものとして、アミド、ウレア構造が良く用いられている。さらにその水素結合を中心に左右に空間が広がっており、Trp336 等との相互作用が期待できる比較的広い A パート、疎水性の高い B パート、そして構造水を介して Ser412、Phe497 との相互作用が期待できる C パートが存在する。こういった種々の構造情報による効率的な Structure-based drug discovery (SBDD) 可能であること、及び EETs の有用な生理活性から、sEH を阻害することで生体内 EETs 濃度を増加させるという創薬戦略に多くの注目が集まり、精力的な創薬研究が行われてきた。

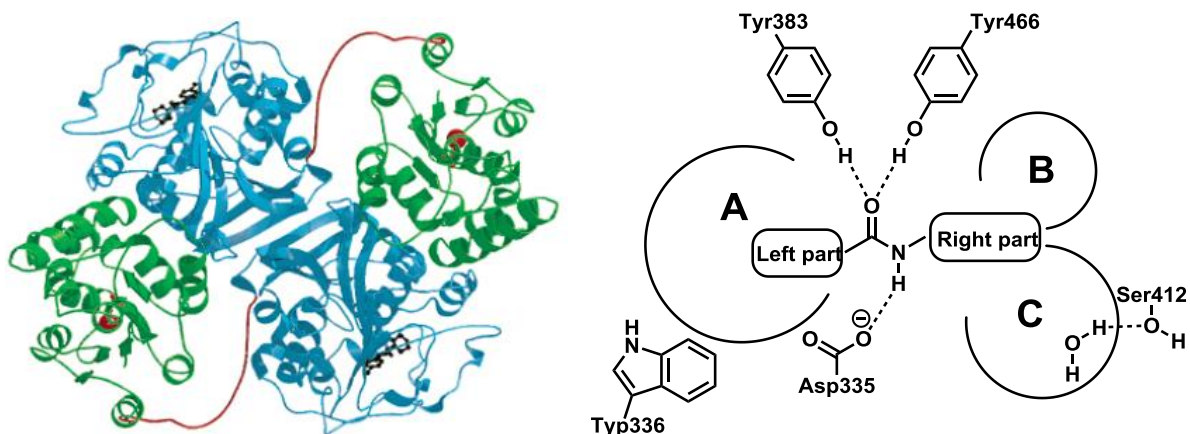


Figure 9. Structure of the human sEH dimer and pharmacophore of catalytic domain.

2-1-3 過去の sEH 阻害剤

DCU⁵⁸ や ADU⁵⁹、AUDA⁶⁰ は初期の研究で見出された sEH 阻害剤である。これらはラットにおいて降圧作用、及び血管保護作用を示し、sEH を阻害するという薬理コンセプトの有用性の一端を示した⁶¹。t-AUCB は Hammock らにより合成された経口吸収性の高い sEH 阻害剤であり、LPS 誘発のマウス致死性高血圧モデルに対する強力な降圧作用を示した⁶²。AR9281 は Arete 社の研究グループによって創出された、本コンセプトで初めて臨床試験へと進んだ sEH 阻害剤であり、高血圧モデル動物における降圧作用、及び高脂肪食誘発肥満(DIO)マウスにおける抗糖尿病作用を示した⁶³。その他 Boehriner Ingelheim 社、Merck 社、大日本住友製薬社等の研究グループから種々の sEH 阻害剤の報告がなされており、近年 Hammock らが総説にまとめている⁶⁴。

一方で Merck 社の研究グループは優れた sEH 阻害活性、循環器系作用を有する標的に対する高い選択性、及び十分な薬物動態プロファイルを有する **65** を報告したが、高血圧モデルマウスである高血圧自然発症ラット(SHR)の血圧を十分に下げることができなかった⁶⁵。そのため、現在では抗高血圧治療薬以外に、sEH 阻害剤が最もポテンシャルを発揮できる適応疾患の探索が求められている。

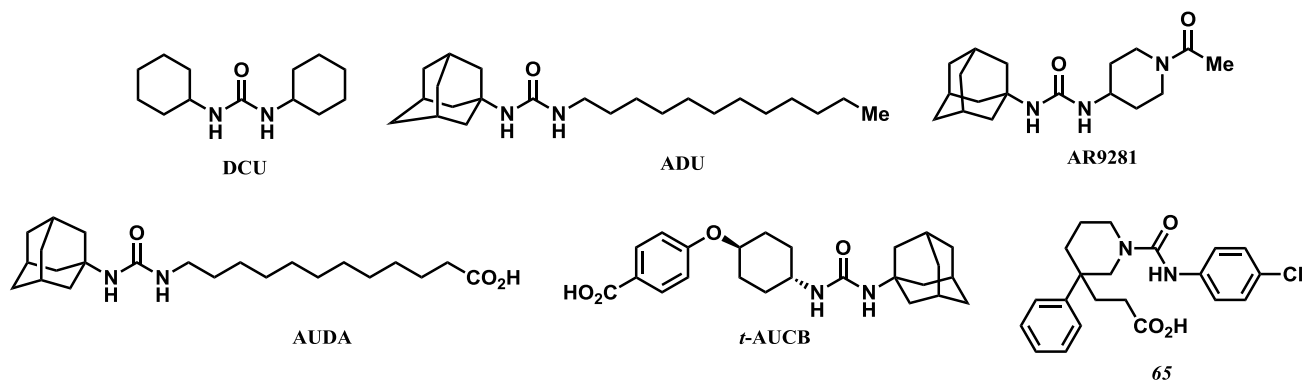


Figure 10. Previously reported representative sEH inhibitors.

2-2 合成方針

大日本住友製薬の田中らは Fragment-based drug discovery (FBDD)の手法によりベンズアミド構造を有する化合物 **66**、ピペリジルウレア構造とオキサジアゾール環を有する化合物 **67** を見出した⁶⁶。ピペリジルウレアはベンズアミドより柔軟な構造をしており、比較的空間が広いとされる sEH のリガンド結合部位を埋めるのに効率的と言える。しかしながら **67** は水への溶解度が十分ではなく (0.041 mg/ml at pH 7.4)、また CYP2C8 および 2C19 に対する mechanism-based inhibition (MBI)を有していた。CYP2C に対する MBI があると、アラキドン酸から EETs への変換の阻害や、薬物相互作用の懸念がある。そこで sEH 阻害において効果的と考えられるピペリジルウレア構造を生かしながら、更なる最適化を目指した。すなわちオキサジアゾール環の単純化、そして物性改善に向け、天然リガンドである EETs の構造を模倣し、CO₂H 基を導入することとした。オキサジアゾール環を単純化する理由は、最適化の余地が、置換位置の変換と、3 位もしくは 5 位への置換基導入に限られてしまうからである。

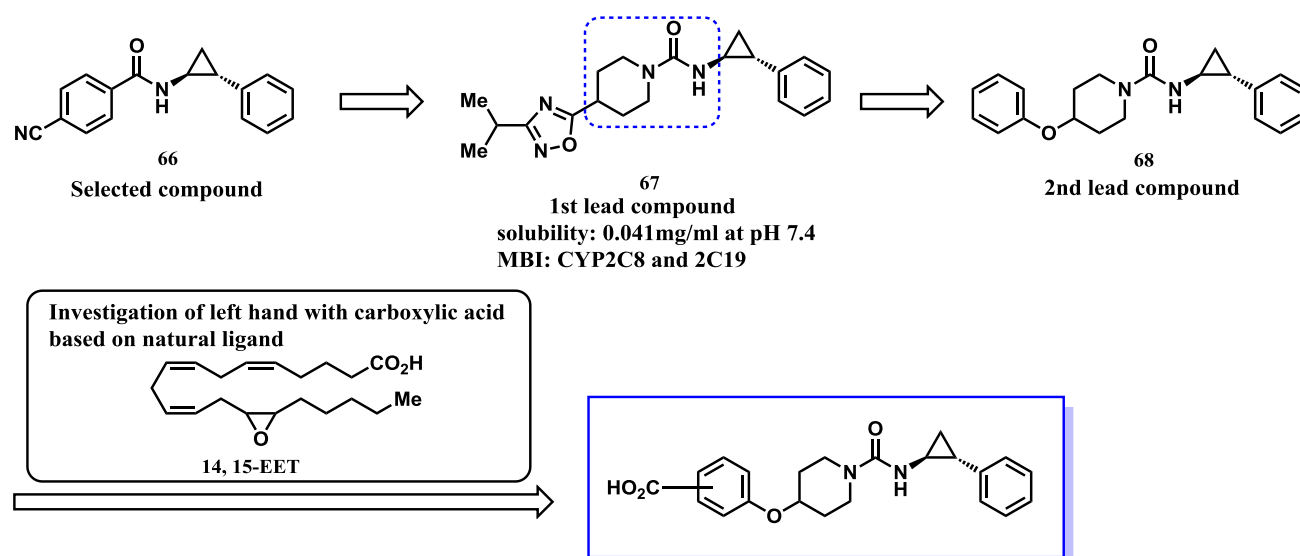


Figure 11. Strategy to optimize compound **58**.

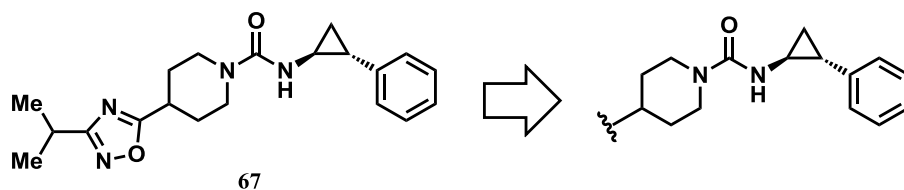
2-3 SAR 情報

2-3-1 ピペリジン環 4 位の SAR 情報

最初にオキサジアゾール環の構造単純化を試みた。

PhO 基に変換した **68** は **67** と比較し 3 倍程度 sEH 阻害活性は減弱することが分かった。一方 pyridine、pyrimidine、pyrazine 等の含窒素芳香族複素環ではより大きく活性が減弱する結果となった (**60-64**)。以上の結果から、sEH 阻害活性は **67** と比較して減弱しているものの、より化合物空間 (chemical space)の確保が期待できる化合物 **68** から展開し、その後の詳細な最適化によって活性向上、及び物性改善を目指すこととした。

Table 7. *In vitro* human sEH inhibition of simplified benzene ring compounds derived from lead compound **67**.

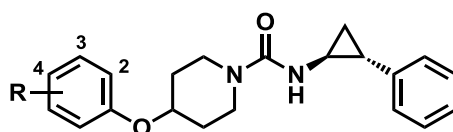


Compound ^a	Structure	h-sEH IC ₅₀ (nM) ^b	r-sEH IC ₅₀ (nM) ^b
67	3-(5-isopropyl)oxadiazole-1-yl	6.1	8.5
68	phenyloxy	18.0	18.3
69	2-pyridyloxy	27.4	35.4
70	3-pyridyloxy	25.2	20.2
71	4-pyridyloxy	24.4	12.3
72	2,6-pyrimidyloxy	94.2	> 100
73	2,5-pyrazyloxy	26.7	25.6
74	diphenylmethyloxy	27.1	5.2

^a All compounds are racemates. ^b Values are an average of two experiments.

2-3-2 PhO 基上の SAR 情報

続いて PhO 基上の置換基を検討した。Cl 基、Me 基、CF₃ 基で置換された PhO 基の場合、4 位置換で最も強いヒト、ラット sEH 阻害活性を示し、活性の強さは 2 > 3 > 4 位置換という順であった (**75-83**)。一方、OMe 基及び Ph 基で置換された場合は、3 位置換が最も強い sEH 阻害活性を示し、活性の強さは 3 > 4 > 2 位置換という順であった (**84-89**)。電子求引性基、電子供与性基、また置換基の嵩高さといったパラメータに相関が無く、この結果を考察することは困難であるが、一つの推察としては、OMe 基の場合は水素結合アクセプターの存在により、Ph 基の場合はその嵩高さで π 相互作用により、sEH との結合様式が変化したのではないかと考えられる。前述したとおり sEH のリガンド結合部位はウレア構造を中心としてそれぞれ両側に比較的広く、特徴的なアミノ酸残基が存在する空間が存在しており、置換基によってそれぞれ適する結合様式が変化している可能性がある。

Table 8. SAR of various substituents at the phenoxy group.

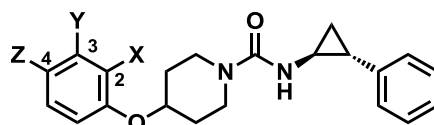
Compound ^a	R	h-sEH IC ₅₀ (nM) ^b	r-sEH IC ₅₀ (nM) ^b
75	2-Cl	2.0	3.5
76	3-Cl	12.0	8.0
77	4-Cl	22.4	9.3
78	2-Me	3.1	4.2
79	3-Me	8.9	6.5
80	4-Me	14.2	6.8
81	2-CF ₃	2.1	3.2
82	3-CF ₃	15.8	10.5
83	4-CF ₃	29.8	8.9
84	2-OMe	11.3	12.8
85	3-OMe	7.4	5.1
86	4-OMe	10.2	5.0
87	2-Ph	14.7	20.7
88	3-Ph	10.7	5.9
89	4-Ph	12.0	6.7

^a All compounds are racemates. ^b Values are an average of two experiments.

続いて溶解度改善のためのカルボン酸導入に向け、その置換位置の探索を実施した。2位、3位では sEH 阻害活性が大きく減弱する結果となったが、4位への導入はある程度活性が残ることが分かった (**92, 93**)。また CO₂H 基の等価体と考えられているテトラゾールへと変換したところ、活性は向上したものの、CYP の 2C8 に対する阻害活性が強くなってしまいう結果となった (**94**) (IC₅₀: 0.8 μM)。続いて **92, 93** と **Table 8** において最も強力なヒト sEH 阻害活性を示した 2-Cl 基と組み合わせたところ、**95, 96** とともにリード化合物 **58** よりも強力な sEH 阻害活性を示し、また溶解度の改善、さらに CYP2C8 及び 2C19 の阻害作用が大きく減弱していた。

95, 96 を用いてラット薬物動態試験を実施したところ、いずれも良い経口吸収性と体内動態を示した。この結果より、以降は **95** よりも若干活性が落ちるものの、優れた薬物動態を有していた **96** を用いて、検討を実施することとした。

Table 9. (A) Test-compounds *in vitro* human and rat sEH inhibitory activity and initial pharmacokinetics evaluation. (B) Compounds **95** and **96** pharmacokinetics study in rats.



A

Compound ^a	X	Y	Z	h-sEH IC ₅₀ (nM) ^b	r-sEH IC ₅₀ (nM) ^b	Solubility (mg/mL) ^c	CYP inhibition
67	–	–	–	6.1	8.5	0.041	MBI ^d : 2C8, 2C19
90	CO ₂ H	H	H	> 100	> 100	N.T. ^e	N.T. ^e
91	H	CO ₂ H	H	> 100	> 100	> 0.15	N.T. ^e
92	H	H	CO ₂ H	30.3	32.2	> 0.15	N.T. ^e
93	H	H	CH ₂ CO ₂ H	43.2	56.6	> 0.15	N.T. ^e
94	H	H	tetrazole	3.3	6.6	> 0.15	2C8(IC ₅₀): 0.8 μM
95	Cl	H	CO ₂ H	2.6	4.1	> 0.15	2C8, 2C19(IC ₅₀): > 50 μM
96	Cl	H	CH ₂ CO ₂ H	4.3	6.6	> 0.15	2C8, 2C19(IC ₅₀): > 50 μM

B

Compound ^a	Bioavailability ^f (%)	Clearance ^f (mL/min/Kg)
95	31	32.7
96	63	3.5

^a All compounds are racemates. ^b Values are an average of two experiments. ^c Solubility was evaluated at pH 7.4. ^d MBI: Mechanism based inhibition. ^e N.T. = not tested. ^f Test compounds were dosed intravenously at 1 mg/kg and orally at 10 mg/kg.

2-4 **96** の *ex vivo*、*in vivo* 試験

2-4-1 *Ex vivo* 試験

化合物が生体内で sEH 阻害活性を発揮しているかを確認するため、*ex vivo* 試験を実施した。これは化合物を投与した動物の全血液を 14,15-EET とともに培養し、14,15-DHET の生産量を測定することで、生体内の sEH 活性阻害程度を見積もるものである。

96 をラットに 10 mg/kg、及び 100 mg/kg 経口投与後、0 時間、1 時間、6 時間、24 時間で採血し、*ex vivo* 試験を実施した。得られた結果は極めてばらつきが大きく、評価系のさらなる最適化は必要であるものの、100 mg/kg 投与下においては 6 時間後も十分な sEH 阻害活性を有していることが示唆された。

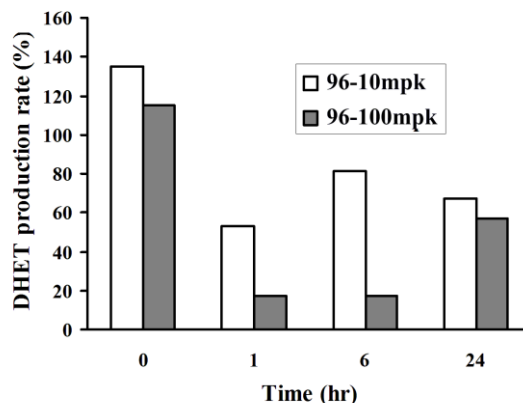


Figure 12. *Ex vivo* study of sEH Inhibitory Activity of **96** by DHET Production in SD Rats Whole Blood.

2-4-1 DOCA-salt ラットモデルを用いた *in vivo* 試験

続いて **96** の循環器系に対する作用を評価するため、本態性高血圧のモデルであり、salt-sensitive な評価系である DOCA-salt ラットを用いた^{61b}。このモデルは片方の腎臓を除去した動物に deoxycorticosterone acetate (DOCA)、及び食塩水を連続投与することで、Na 貯留を引き起こし、徐々に血圧が上がっていく。本モデル作成後、13 日目から 28 日目まで **96** を 1 日 1 回 100 mg/kg 連続経口投与した。

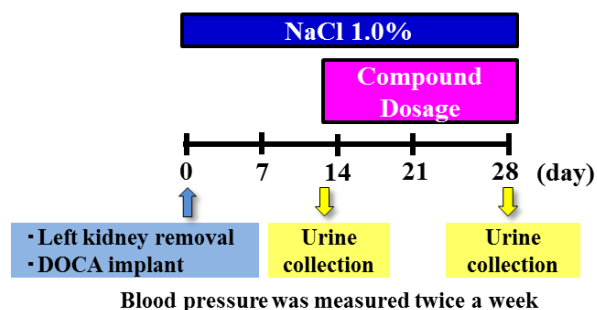


Figure 13. The protocol of DOCA-salt model.

結果として、**96** 投与により明確な降圧作用は確認できなかった。一方で、腎障害の指標の一つである尿中 MCP-1 及び albumin の排泄量が減弱していた。腎保護作用を示す sEH 阻害剤は他にも知られているが、それらは同時に降圧作用も発揮している。こういった性質は一般的な降圧剤による臓器保護作用でも同様である。今後より詳細な検討は必要であるが、今回の結果は **96** が降圧作用によらない腎保護作用を有する、非常にユニークな化合物であることを示唆している⁶⁷。

また近年、Khan らは、EET アナログが Dahl salt-sensitive 高血圧ラットにおいて **96** と同様に降圧効果によらない腎保護作用を示したことを報告している⁶⁸。前述した Merck 社の報告と Kahn らの報告、そして今回の検討結果から、腎臓を初めとする臓器保護作用に焦点を当てるのが効率的な sEH 阻害剤の適応疾患探索に繋がるのではないかと考えられる。

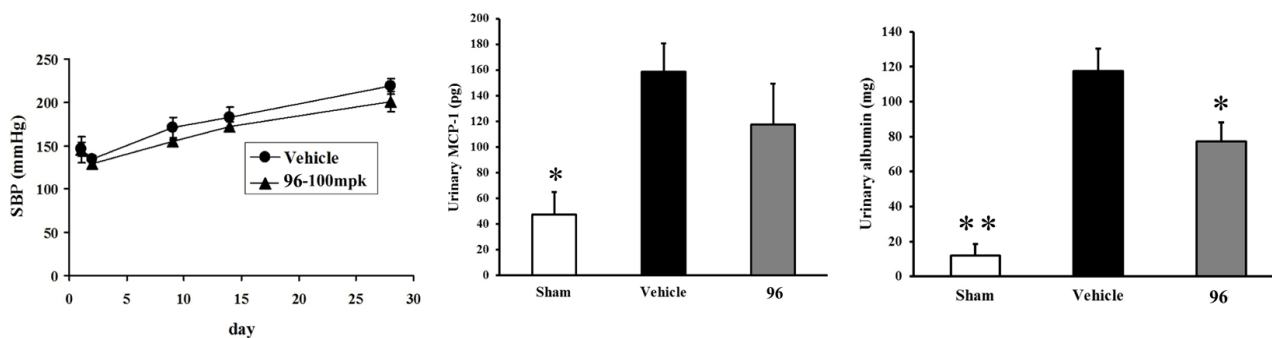


Figure 14. Administration of compound **96** to DOCA-salt rats. (A) Measurement of SBP for 28 days. (B) Urinary MCP-1 on the last day of dosing. (C) Urinary albumin on the last day of dosing. Significantly different from vehicle unpaired two-tailed *t*-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2-5 三置換シクロプロパン活用の戦略

2-5-1 三置換シクロプロパンデザインの背景

合成したフェニルプロパン酸部分を有する化合物 **97** において、ヒト sEH との共結晶を得ることができた。そこでより効率的な SBDD を実施するため、X線結晶構造解析を実施したところ、**Figure 15** で示される結合様式を取っていることが明らかとなった。すなわち、sEH における A、B パートで示した空間はそれぞれフェノキシピペリジン部位、及び Ph 基で埋められているが、C パートには空間が広がっていた。一方、Boehriner Ingelheim 社の研究グループは、優れた sEH 阻害活性を有する化合物 **98**⁶⁹ 及び **99**⁷⁰ を報告しているが、これらの化合物はいずれも A、B 及び C パートを全て活用していることが示唆されている。すなわち、化合物 **98** においては、ジフェニル部分、化合物 **99** においては 2-, 4-位に配置された Cl 基が、B 及び C パートを埋めていると考えられる。化合物 **97** と sEH との結合様式より、シクロプロパン部分の geminal-hydrogen 部分に置換基を導入してやることで、C パートを埋めることができ、sEH 阻害活性を向上させることができるのではないかと考えた。さらにウレア部分の N 原子と *trans*、シクロプロパンの Ph 基と *cis* になるように配置することでより効果的な空間の利用が可能であると予想した。

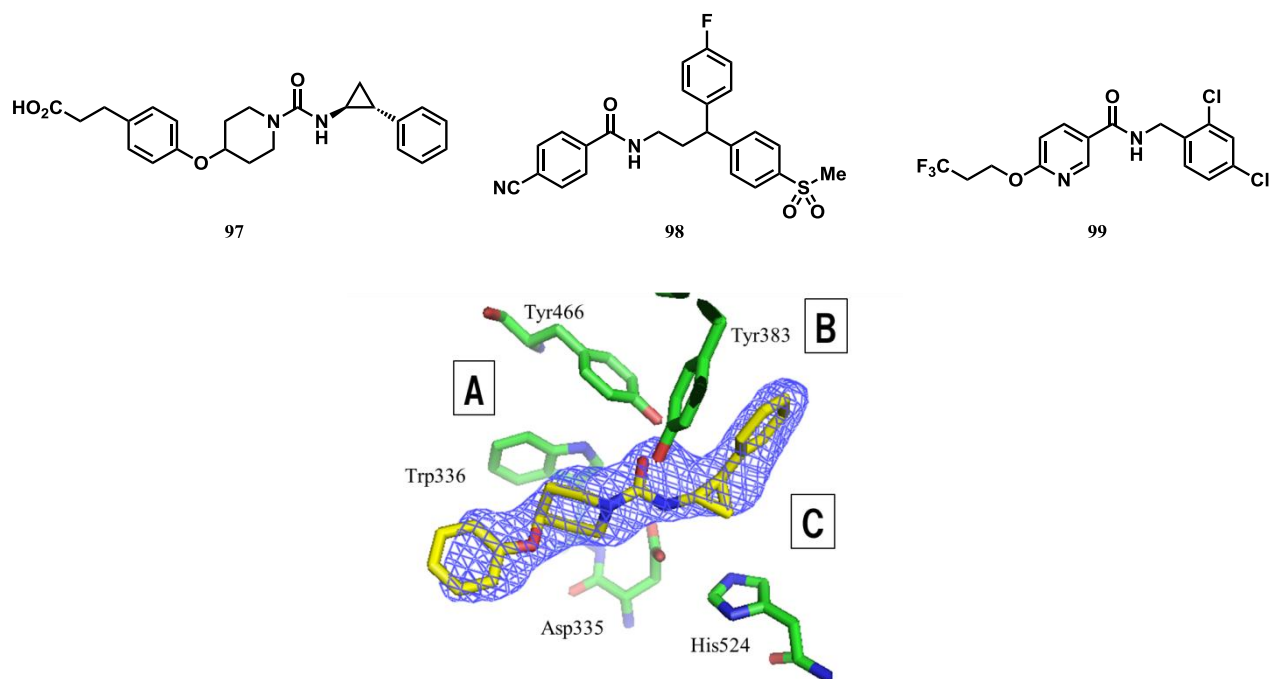
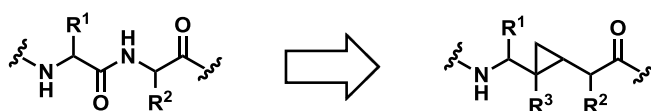


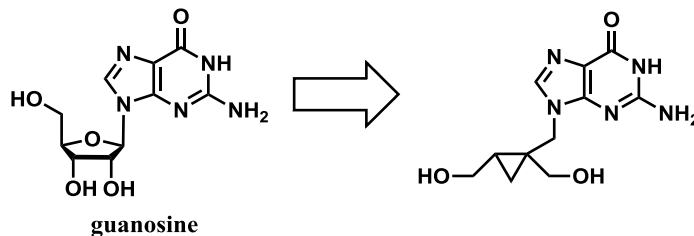
Figure 15. X-ray co-crystal structure of compound **97** with human sEH hydrolase domain. The electron density of propionic acid moiety could not be identified (PDB code 4X6Y).

これまでシクロプロパンの立体配置を利用した創薬への活用としては多くの報告がなされている。例えばペプチド結合の配座、リボース、アミノ酸の配座などのミメティクスとしてのシクロプロパンの導入が挙げられる⁷¹⁻⁷⁴。またその他にも、その強い配座固定を利用して生物活性を向上させるという報告はあるものの⁷⁵、三置換のシクロプロパンを三次元的な配座制御に利用した例は著者の知る限り存在しない。よって今回の戦略はシクロプロパンによる配座制御を利用した新たな戦略としても興味深いものであると考える。

Peptide mimetics



Nucleoside mimetics



Amino acid mimetics

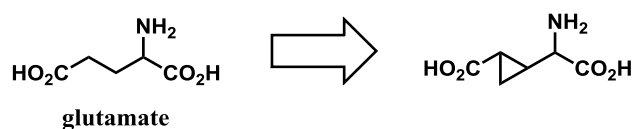
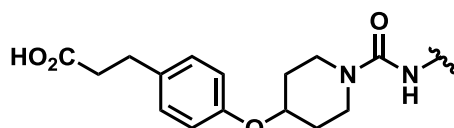


Figure 16. Utilization of cyclopropane to drug discovery.

2-5-2 三置換シクロプロパンの SAR 情報と sEH との共結晶の X 線結晶構造解析

シクロプロピル部分の SAR 情報を **Table 10** に示す。geminal Me 基を有する **100** は活性が消失する結果となったが、ウレア部位の窒素原子と *trans*、Ph 基と *cis* の立体配置になるように Me 基を導入した **101** は活性が向上した (h-sEH IC₅₀ 12.0 nM, r-sEH IC₅₀ 11.7 nM)。一方で、ウレア部位の N 原子と *cis*、Ph 基と *trans* の立体配置になるように Me 基を導入した場合は、活性が大きく減弱する結果となった (**102**) (h-sEH IC₅₀ 75.7 nM, r-sEH IC₅₀ > 100 nM)。従って、予想通り、シクロプロパンへの置換基導入は、適切な立体配置にて行う必要があることが明らかとなった。さらに適切な立体に Ph 基、4-F-Ph 基を導入したところ、活性が大きく向上する結果となった (**103**, h-sEH IC₅₀ 2.3 nM, r-sEH IC₅₀ 3.9 nM) (**104**, h-sEH IC₅₀ 2.1 nM, r-sEH IC₅₀ 3.2 nM)。

Table 10. SAR study of substituent effects on cyclopropyl ring.



Compound ^a	Structure	h-sEH IC ₅₀ (nM) ^b	r-sEH IC ₅₀ (nM) ^b
97		19.1	55.6
100		> 100	> 100
101		12.0	11.7
102		75.7	> 100
103		2.3	3.9
104		2.1	3.2

^a All compounds are racemates. ^b Values are an average of two experiments.

103 と sEH の加水分解ドメインとの共結晶の X 線結晶構造解析を実施したところ、新たに適切な立体配置となる様に導入した Ph 基が、我々の狙い通り C パートに配置されていることが明らかとなった。また、A 及び B パートにおいては、Ph 基が導入されていない場合と同様の結合様式を取っていることが示されており、本ストラテジーが sEH との効果的な相互作用を邪魔することなく阻害活性を強めることができる、有用な手法であることを示唆している。さらに、**97** の sEH 阻害活性はヒトとラットで約 3 倍の種差があったが、化合物 **101**、**103** 及び **104** においてはほぼ同等の阻害活性を示した。ヒトとラットでは、sEH の加水分解ドメインの構造において、アミノ酸残基 406 番目(ヒト: Leu、ラット: Phe)にわずかながら違いがあることが知られており、それらは B、及び C パートに位置している。よって、B パートだけでなく、C パートも占有することにより、種差を超えた強固な結合が可能となったのでは、と考えられる。

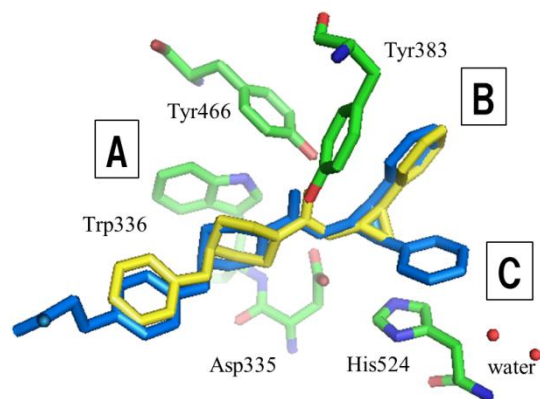


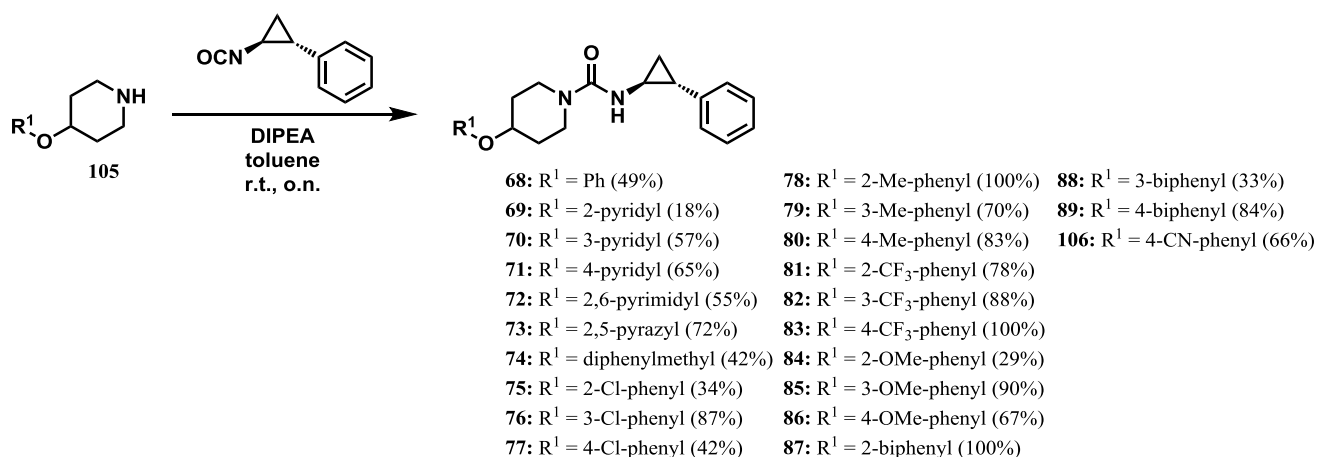
Figure 17. Binding of compounds **97** (yellow) and **103** (blue) to human sEH hydrolase catalytic domain. (PDB code 4X6X).

2-6 化合物の合成

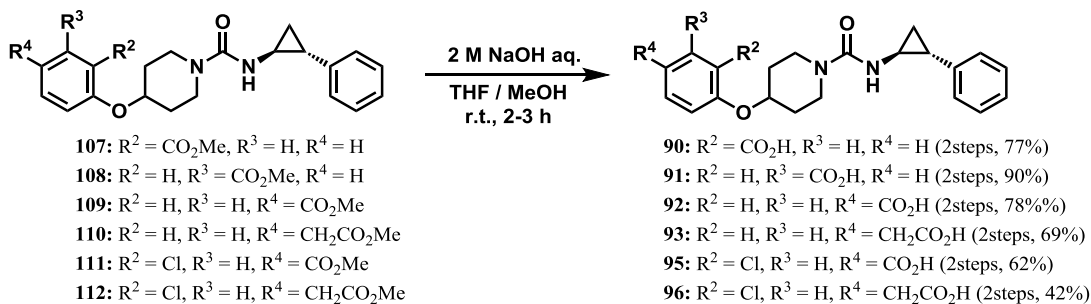
2-6-1 二置換シクロプロパンの合成

化合物 **68-96** の合成を **Scheme 19-21** に示す。

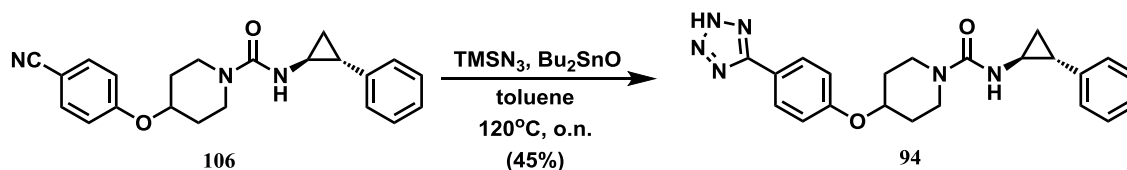
まずウレア形成はシクロプロパン部分が *trans* の立体配置を有するイソシアナトを原料に用いることで実施した。収率にばらつきがあるのは、化合物によっては結晶性が極めて高く、精製段階で損失したためであった。カルボン酸体を得る際のエステルの加水分解は通常の塩基性条件下で問題なく進行した。カルボン酸の生物学的等価体であるテトラゾールへの変換は、ベンゾニトリル部位に対しルイス酸としてスズ触媒存在下、 TMSN_3 を反応させることで実施し、目的物を得ることができた。



Scheme 19. Construction of urea moiety.



Scheme 20. Basic hydrolysis of esters.

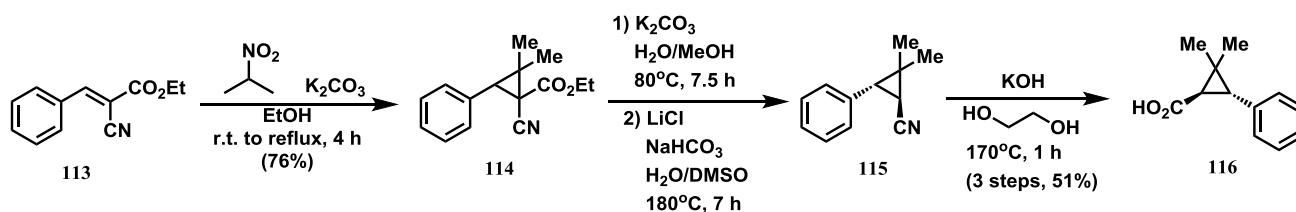


Scheme 21. Tetrazolization of benzonitrile.

2-6-2 三置換シクロプロパンの合成

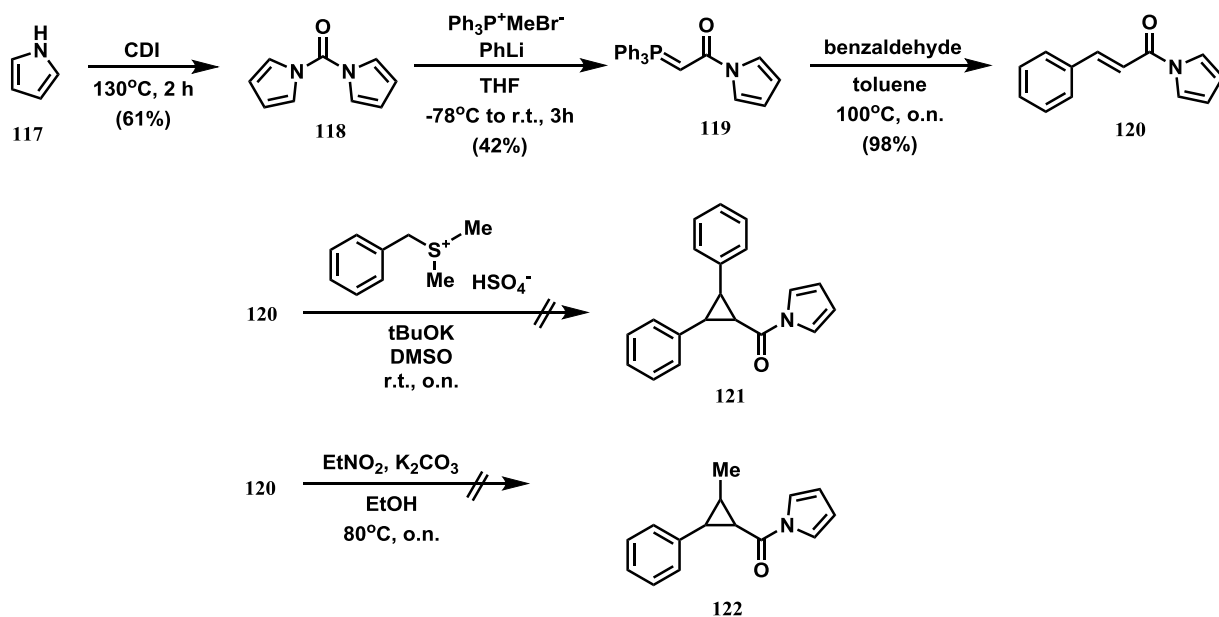
三置換シクロプロピルウレアの構築は、置換シクロプロパンカルボン酸を Curtius 転移⁷⁶ によってイソシアナトに変換し、**Scheme 19**と同様の反応で合成できると考えた。そこでまずは置換シクロプロパンカルボン酸の合成に着手した。

ジメチル体のカルボン酸は既知の方法によって調製した(**Scheme 22**)⁷⁷。すなわち ethyl (*E*)- α -cyano- β -phenylacrylate (**113**)に対し、2-nitropropane を用いてシクロプロパン化することで **114** へと導いた後、脱炭酸することで **115** を得た。最後に CN 基を強塩基存在下 ethyleneglycol 溶媒中加熱することで CO₂H 基へと変換し、**116** を得た。



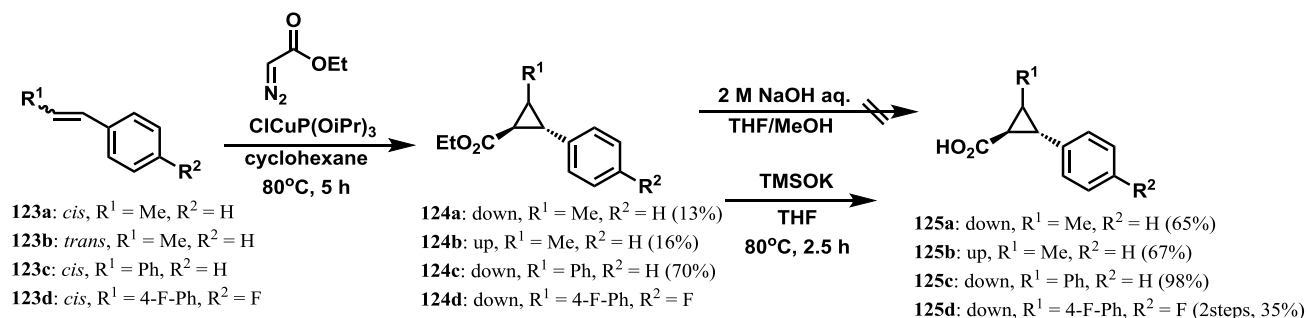
Scheme 22. Synthesis of **116**.

続いて三置換シクロプロパンは、活性化されたエノンに対するシクロプロパン化反応により構築できると考え、松永らによって報告されているアシルピロール **120**⁷⁸ を調製し、シクロプロパン化反応を試みた。しかしながら 3 級硫黄を用いる方法、ニトロ化合物を用いる方法いずれにおいてもシクロプロパン化反応は進行しなかった(**Scheme 23**)。



Scheme 23. Cyclopropanation of activating acylpyrrole **120**.

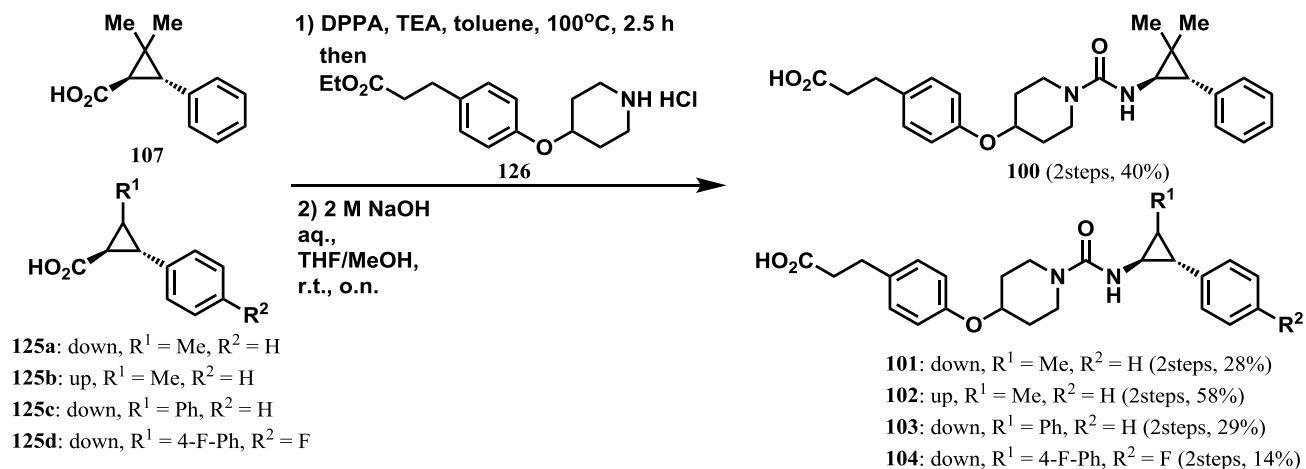
そこで Merlic らが報告しているジアゾ化合物と亜リン酸エステル-ハロゲン化銅複合体を用いたシクロプロパン化反応を試みた⁷⁹。Cis、または *trans*- β -methylstyrene、及び *cis*-stilbene (**123a-123d**) に対し、 $P(OiPr)_3$ と $CuCl$ からなる複合体の存在下、ethyl diazoacetate を cyclohexane 溶媒中加熱攪拌することで、望む置換基が導入された三置換シクロプロパン化合物 **124a-124d** を低収率ながら得ることに成功した。**124a-124d** は全て単一の立体配置を有しており、その他の生成物としては原料のスチレン、及びスチルベン誘導体の二重結合部位が還元されたものが得られた。続いてエチルエステルのカルボン酸への変換を試みたが、一般的な塩基性条件下の加水分解では反応が進行しなかった。これは三置換シクロプロパンの立体障害のためと考えられる。そこで TMSOK による求核的な反応を試みたところ⁸⁰、望むカルボン酸体を得ることができた (**125a-125d**)。



Scheme 24. Synthesis of three-substituted cyclopropane carboxylic acid.

得られた置換シクロプロパンカルボン酸に対し、DPPA、TEA 存在下加熱攪拌することで Crutius 転移反応に付しイソシアナトを構築した。ここにワンポッドでピペリジン **126** を加えることでシク

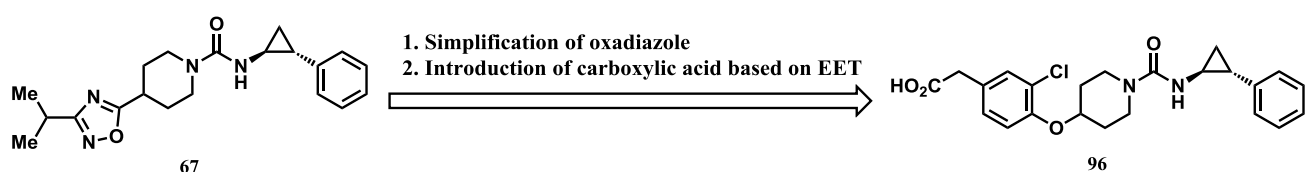
ロプロピルウレアを構築した。続いてエステル部分を塩基性条件下加水分解することで、望む化合物 **100-104** を得ることができた。



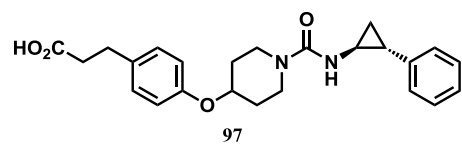
Scheme 25. Synthesis of **100-104**.

2-7 第2章まとめ

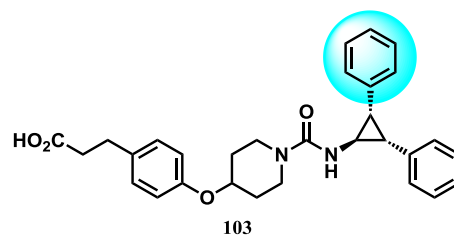
田中らより報告されていたピペリジルウレア構造を生かしながらオキサジアゾール化合物の問題点を解決すべく、オキサジアゾール構造の単純化、さらに天然リガンドである EETs の部分構造である CO₂H 基を導入することにより、強い sEH 阻害活性と優れた物性を有する **96** を得ることに成功した。本化合物を本態性高血圧のモデルである DOCA-salt ラットに投与したところ、降圧作用によらない腎保護作用という極めてユニークな性質を示した。



sEH との共結晶の X 線結晶構造解析の結果から、シクロプロパン上に置換基を導入するという戦略を立て、化合物をデザイン、合成した。シクロプロパン環上の Ph 基と *cis*、ウレア構造の N 原子と *trans* になるように置換基を導入し、sEH 阻害活性が大きく向上した **103** を見出した。X 線結晶構造解析の結果、本化合物は狙い通り効率的に sEH のスペースを利用した結合様式をとることが示唆された。



h-sEH IC ₅₀	r-sEH IC ₅₀
19.1 nM	55.6 nM



h-sEH IC ₅₀	r-sEH IC ₅₀
2.3 nM	3.9 nM

第3章 M₁/M₄選択的ムスカリン性アセチルコリン受容体作動薬の創薬研究

3-1 研究の背景

3-1-1 Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs)概説

Acetylcholine は副交感神経を活性化する神経伝達物質であり、その薬理作用は G 蛋白結合型受容体 (G-protein coupled receptor; GPCR)であるムスカリン性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptors; mAChRs)とイオンチャネルであるニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptors; nAChRs)とを介して発揮される。天然の mAChRs 選択的リガンドとして知られる muscarine は毒キノコの一つ

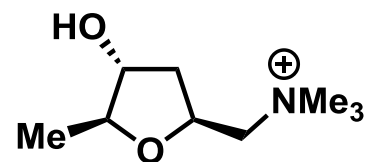


Figure 18. Muscarine.

である *Amanita muscaria* (和名：ベニテングダケ)に含まれる生理活性物質であり、経口摂取することで涙や唾液、発汗等の腺分泌、腹痛、吐き気、下痢といった症状を引き起こす。一般に死亡することはほとんど無いが、ベニテングダケが旨味成分である(同時に毒性成分でもある)イボテン酸を豊富に含んでいることから、おいしさのあまり大量に摂取してしまう危険性があり、注意が必要とされている⁸¹。

mAChRs には M₁ から M₅ までのサブタイプの存在が知られており、対応する G タンパクや発現部位が異なる⁸²。また、近年の遺伝子導入技術の発展に伴い、各サブタイプの KO マウスが作成され、その行動薬理学研究によって、各々の機能解明が進んだ。

Table 11. Overview of mAChRs.

サブタイプ	G タンパクタイプ	主な発現部位	KO マウスのフェノタイプ
M ₁	G _q	脳	認知障害の惹起 ⁸³ 、痙攣の欠落 ⁸⁴
M ₂	G _i	心臓、平滑筋	振戦の欠落 ⁸⁴
M ₃	G _q	平滑筋	唾液の減少 ⁸⁴
M ₄	G _i	脳	精神症状の惹起 ⁸⁵ 、カタレプシーの減少 ⁸⁶
M ₅	G _q	脳	精神症状の改善 ⁸⁷

中でも、M₁ 及び M₄ 受容体は主に脳に発現しており、これらの活性化は KO マウスの情報から認知機能障害の改善や精神疾患に対する改善が期待された。アルツハイマー病治療薬として見出された M₁/M₄ 受容体に比較的選択性が高い作動性を有している xanomeline は、アルツハイマー病の認知症状を改善するとともに統合失調症様の周辺症状をも改善した。本結果に基づいて統合失調症の病態モデルで評価した結果、抗精神病作用を有することが報告された。ヒトでの抗精神病作用を確認すべく医師主導の臨床試験が実施された結果、xanomeline は統合失調症の三大症状である陽性症状、陰性症状、及び

認知機能障のすべてを改善し、かつ錐体外路症状を示さなかった⁸⁸。さらに xanomeline を M₁ および M₄ 受容体の KO マウスに投与した行動薬理学試験の結果、陽性症状改善は M₄ 受容体、認知障害は M₁ 受容体を介することが明らかとなった^{85,89}。

現在、統合失調症の標準治療薬はドパミン D₂ 受容体であるが、錐体外路症状などの副作用、治療抵抗性患者の存在、不十分な長期寛解維持効果といった問題があり、新たな作用機序に基づく治療薬の創製が望まれている⁹⁰。そこで Xanomeline の強力な統合失調症治療効果を基盤とし、新規 M₁/M₄ 受容体作動薬の創出を目指し、研究に着手した。

3-1-2 M₁、M₄ 受容体リガンド

しかしながら前述したとおり、mAChRs の活性化は副交感神経の活性化により種々の副作用を示す懸念がある。実際、xanomeline は消化管系の副作用により臨床試験は中止されているが、これは M₃ 受容体に対する作動性によるものと考えられる。従って M₁/M₄ 受容体を選択的に活性化する薬剤が求められるが、mAChRs はそのホモロジーの高さからサブタイプ選択的な作動薬の創製は極めて困難であった⁹¹。

これらの課題を克服すべく創薬研究が行われた結果、様々なアプローチにより選択的な化合物が取得された。AC-42⁹² は Jacobson らによって見出された M₁ allosteric agonist である。内因性リガンドである acetylcholine が結合するオルソステリック部位ではなく、アロステリック部位に結合することで、他のサブタイプとの選択性を出すことに成功している。VU0456940⁹³ は Lindsley らによって見出された M₁ 受容体の positive allosteric modulator (PAM) である。化合物自身には M₁ 受容体の活性化作用は無いが、内因性リガンドである acetylcholine の作用を強めることができる。これもアロステリック部位に結合しているので、高い選択性を有している。M₄ 受容体に関しては PAM 作用を有する化合物として、Christopoulos らより LY-2033298⁹⁴ が、Lindsley らより VU0152100⁹⁵ が報告されている。しかしながら M₄ 受容体の選択的作動薬の報告はほとんど無く⁹⁶、またアロステリック部位に結合することで受容体選択性を発揮するというアプローチでは異なる受容体を同時に活性化することは大変困難であり、選択的 M₁/M₄ 受容体作動薬の報告もほとんどない⁹⁷。

著者らは M₁ 及び M₄ の両受容体を同時にかつ選択的に刺激する作動薬を見出すべく、候補化合物の探索研究に着手した。

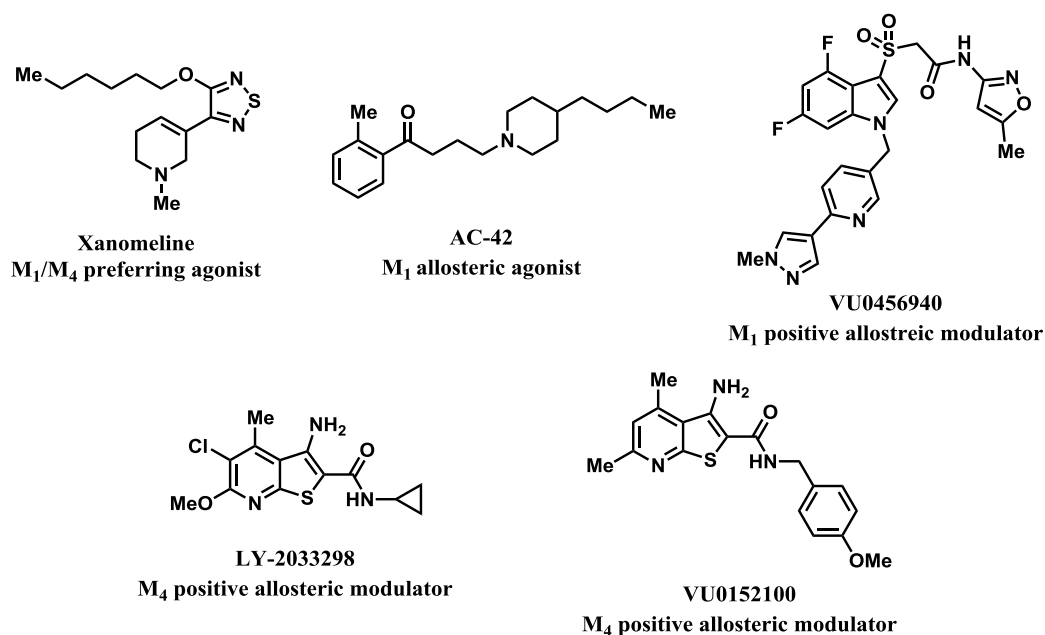


Figure 19. M_1 and/or M_4 mAChR ligands.

3-2 研究の方針とリード化合物の取得

著者らの研究グループは HTS によってベンズオキサジノン誘導体 **127** を見出したが、本化合物は M_4 作動性が弱いという問題点があった。そこで、既知情報から M_4 作動性のファルマコフォアを抽出し、**127** と組み合わせることで M_1/M_4 作動性を有するリード化合物を取得しようと試みた。

特許出願では M_4 作動性を有する化合物が報告されており⁹⁸、それらの情報から「芳香環 - アミンリンカー - *N*-カーバメートピペリジン」という構造が M_4 作動性に寄与していると考えた。**127** の構造を見るに、シンプルなイソアミル構造よりもベンズオキサジノン部分が mAChRs 活性化に寄与していると推定し、イソアミル構造を前述の M_4 作動性ファルマコフォアである *N*-カーバメートピペリジンへと置き換えた **128** を合成した。得られた **128** は狙い通り M_1/M_4 受容体作動性が強くなり、サブタイプ選択性に関しても、 M_3 作動性はあるものの M_2 作動性は十分に弱く、リード化合物として十分な性質を有していた。

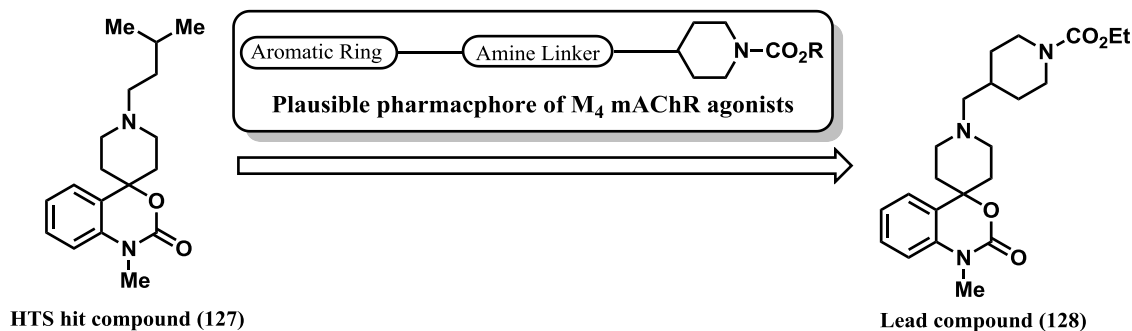


Figure 20. Hybridization of HTS hit compound and M_4 mAChR pharmacophore.

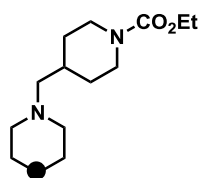
3-3 最適化検討

3-3-1 8-アザジヒドロキノロン骨格

続いて M₁/M₄ 選択性の向上に向けて、ヘテロ環部分の構造展開を実施した。

まずベンゼン環の 8 位を N 原子へ変換することで M₃ 作動性の低減に成功した(128 vs 129)。さらに環内の酸素原子を炭素原子へと変換、8-アザジヒドロキノロン骨格とすることで不整脈等の心毒性につながるとされる human ether-a-go-go related gene (hERG)の阻害を低減することができた(130 vs 131)。最後に 1 位窒素原子上の置換基としては Et 基が最も良いことが分かり、133 が優れたバランスを有する化合物であった。さらにこの化合物は統合失調症の陽性症状のモデルとされるメタンフェタミン誘発のラット運動量亢進モデルにおいて ED₅₀ 値が 0.21mg/kg という極めて低用量の投与により有効性を示した。

Table12. Conversion of hetero ring.



Entry	Structure	M ₁ (% effect) ^a	M ₂ (% effect) ^a	M ₃ (% effect) ^a	M ₄ (% effect) ^a	M ₅ (% effect) ^b	hERG inhibition (IC ₅₀ : μM)	Effect on MEPH-induced hyperlocomotion in rats (ED ₅₀ : mg/kg) ^c
128		- / 91	27 / 28	- / 75	72 / 90	-	-	-
129		80 / 99	12 / 18	7 / 11	74 / 81 ^d	5	1.48	0.87
130		99 / 106	46 / 51	8 / 25	88 / 91 ^d	12	0.92	0.69
131		89 / 112	66 / 75	21 / 36	138 / 112	13	2.80	0.10
132		85 / 94	26 / 29	4 / 21	82 / 89 ^d	8	2.54	0.51
133		91 / 93	20 / 27	2 / 3	134 / 125	3	2.89	0.21
134		74 / 80	49 / 54	6 / 3	118 / 105	12	0.67	-

^a Maximum efficacy of each receptor subtype was defined as 100%. Concentration of the test compound was 1 μM / 10 μM. ^b Concentration of the test compound was 10 μM. ^c Doses for oral administration. ^d Measurement was performed by FDSS.

8-アザジヒドロキノロン骨格の SAR 情報を Figure 21 に示す。予想通りカルバメートを有するピペリジン環の導入で M₄ 作動性を付与することができた。1 位窒素原子上の置換基は M₂ 作動性に参与していることが分かった。3 位酸素原子を炭素に置き換えることで hERG 阻害を減弱させることができた。そしてベンゼン環のピリジン環への変換により、M₃ 作動性を低減させることが可能となった。ドラスティックな置換基変換だけでなく、複素環構造の mAChRs に対する親和性を利用することで、最小限の変換で効率的に望む化合物を得ることができた⁹⁹。

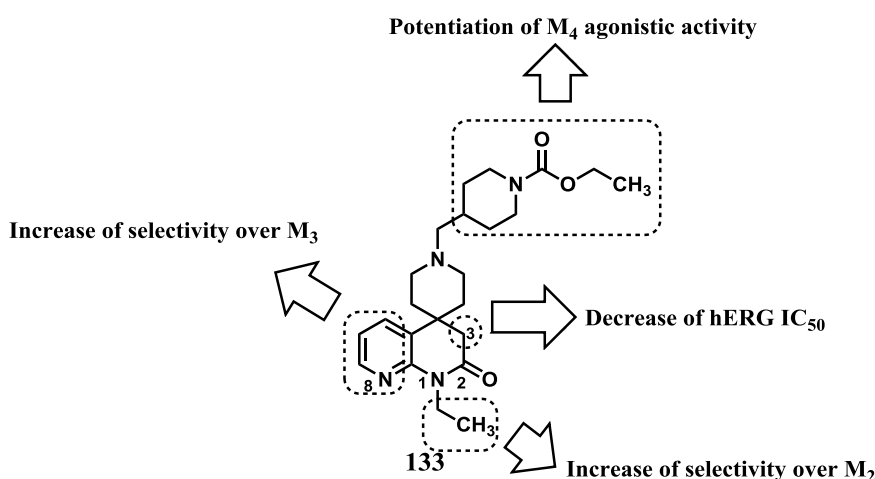


Figure 21. SAR information of 8-azadihydroquinolone scaffold.

3-3-2 7-アザインドリン

しかしながら、得られた化合物 **133** はラットにおける生物学的利用率(BA)が 2.6%と極めて低く、またクリアランスも 49.3 mL/min/kg であり、体内からの消失が早いことが明らかとなった。これは 1 位の Et 基が素早く脱離してしまうためであると考え、新たな縮環構造の探索に向けて HTS ヒット化合物を精査したところ、ウレア構造を有するインドリン骨格の **135** を見出した。**135** の構造を利用することで **133** のアミド構造、すなわち-CONRR 構造を維持できると考え、2 化合物をハイブリットした 7-アザインドリン骨格をデザインし、**136** を合成したところ、優れた選択的 M₁/M₄ 作動性を示した。一方で hERG 阻害作用が増強されてしまったため、窒素原子上置換基を種々検討することとした。

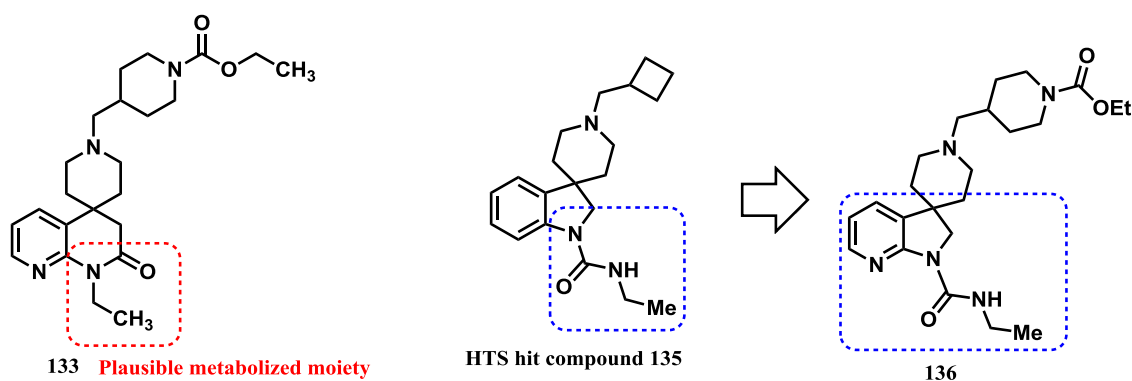
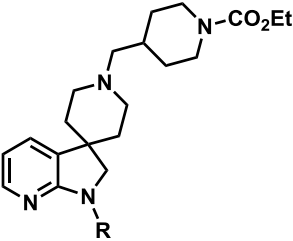




Figure 22. Further hybridization to obtain a new scaffold.

ジエチルウレア **137** は M_1/M_4 選択性を維持しながら、hERG 阻害を改善することができた (IC_{50} : 2.54 μM)。一方、ウレア上の置換基を除去した **138** では hERG 阻害が増強されていた (IC_{50} : 0.19 μM)。そこで 2 置換ウレアに注目して誘導体合成を実施したところ、ジメチルウレア **139** において hERG 阻害が劇的に改善された (IC_{50} : > 10 μM)。環状アミンに変換した場合は残念ながら活性が大幅に減弱する結果となった (**140**, M_4 agonistic activity 29% at 1 μM) (**141**, M_4 agonistic activity 10% at 1 μM)。

Table 13. SAR information of substituents on nitrogen atom of 7-azaindoline derivative.



Compound	R	mAChR agonistic activity ^a					hERG inhibition (IC_{50} : μM)
		M_1 at 1 μM	M_2 at 1 μM	M_3 at 1 μM	M_4 at 1 μM	M_5 at 10 μM	
133	–	91%	20%	2%	134%	3%	2.89
136	-CONHEt	55%	13%	5%	77%	11%	0.23
137	-CONEt ₂	52%	23%	4%	132%	9%	2.54
138	-CONH ₂	99% ^b	17% ^b	11% ^b	103% ^b	8%	0.19
139	-CONMe ₂	76% ^b	10% ^b	2% ^b	118% ^b	11%	> 10
140		NT	NT	NT	29% ^b	NT	NT
141		NT	NT	NT	10% ^b	NT	NT

^a Maximum activity for each receptor subtype was defined as 100% in the calcium mobilization assay. ^b

Concentration of the test compound was 0.3 μM . NT: Not tested.

139 を用いてラットにおける薬物動態試験を実施したところ、期待通り BA が 51.1%、クリアランスが 28.4 と、**133** と比較して大幅に改善していることが明らかとなった。また **139** は末梢と脳内の血中薬物濃度の比(Kp)が、脳内 / 末梢 = 0.7 と良好な脳内移行性を示した。さらに **139** はイヌ及びサルにおいても高い経口吸収性を示した。

Table 14. PK profiles of compound **133** and **139** in rat.^a

	BA (%)	CL (mL/min/kg)	Brain penetration Kp
133	2.6	49.3	–
139	51.1	28.4	0.7

^a Test compound was dosed intravenously at 0.25 mg/kg and orally at 2.5 mg/kg.

Table 15. PK profiles of compound **139** in Dog and monkey.^a

	BA (%)	CL (mL/min/kg)
Dog	49.3	–
Monkey	39.8	16.5

^a Test compound was dosed intravenously at 1 mg/kg and orally at 1 mg/kg.

続いて臨床試験で統合失調症、及びアルツハイマー病に対して治療効果のあった xanomeline と mAChRs に対する選択性の比較を行った。**139** は mAChRs の M₂、M₃、M₅ に対して十分な選択性を有しており、特に xanomeline の臨床試験で問題となった消化管系障害の原因と考えられる M₃ 作動性が大きく減弱されていた。また、統合失調症の陽性症状のモデルにおいて xanomeline よりも低用量で有効性を示したことから、**139** は臨床試験に進んでも、xanomeline よりも高い安全性と優れた有効性を示す可能性がある¹⁰⁰。

Table 16. Pharmacological data of xanomeline and compound **139**.

	mAChR agonistic activities ^a , EC ₅₀ /intrinsic activity					Antipsychotic-like activity ^b ED ₅₀
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	
xanomeline	16 nM / 100%	379 nM / 36%	44 nM / 86%	126 nM / 85%	46% at 30 μM	8.1 mg/kg (sc)
139	133 nM / 76%	5% at 10 μM	2% at 10 μM	47 nM / 108%	11% at 10 μM	1.44 mg/kg (po)

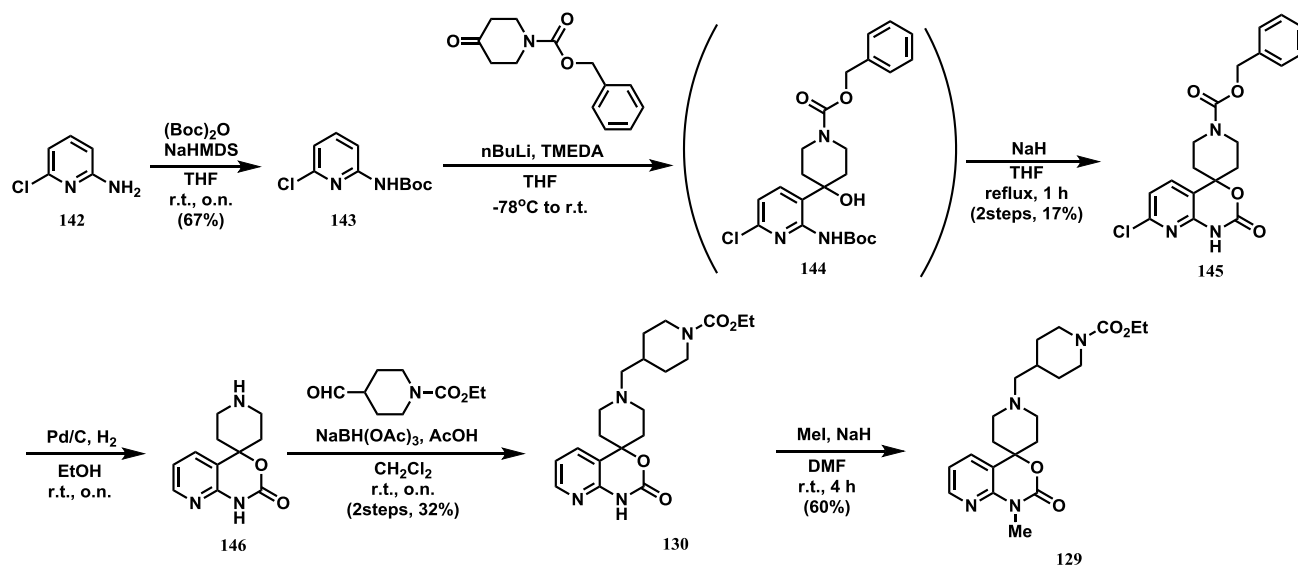
^a mAChR agonistic activity was measured in the calcium mobilization assay. ^b Antipsychotic-like effect was evaluated in the methamphetamine-induced locomotor hyperactivity test in rats.

3-4 化合物の合成

3-4-1 8-アザベンズオキサジノン骨格の合成¹⁰¹

クロロアミノピリジン **142** の NH₂ 基を Boc で保護した後、TMEDA 存在下、*n*-BuLi を用いてリチオ化を行い、ピペリジノンと反応させた。この段階で同時に環化が起こることを期待したものの、

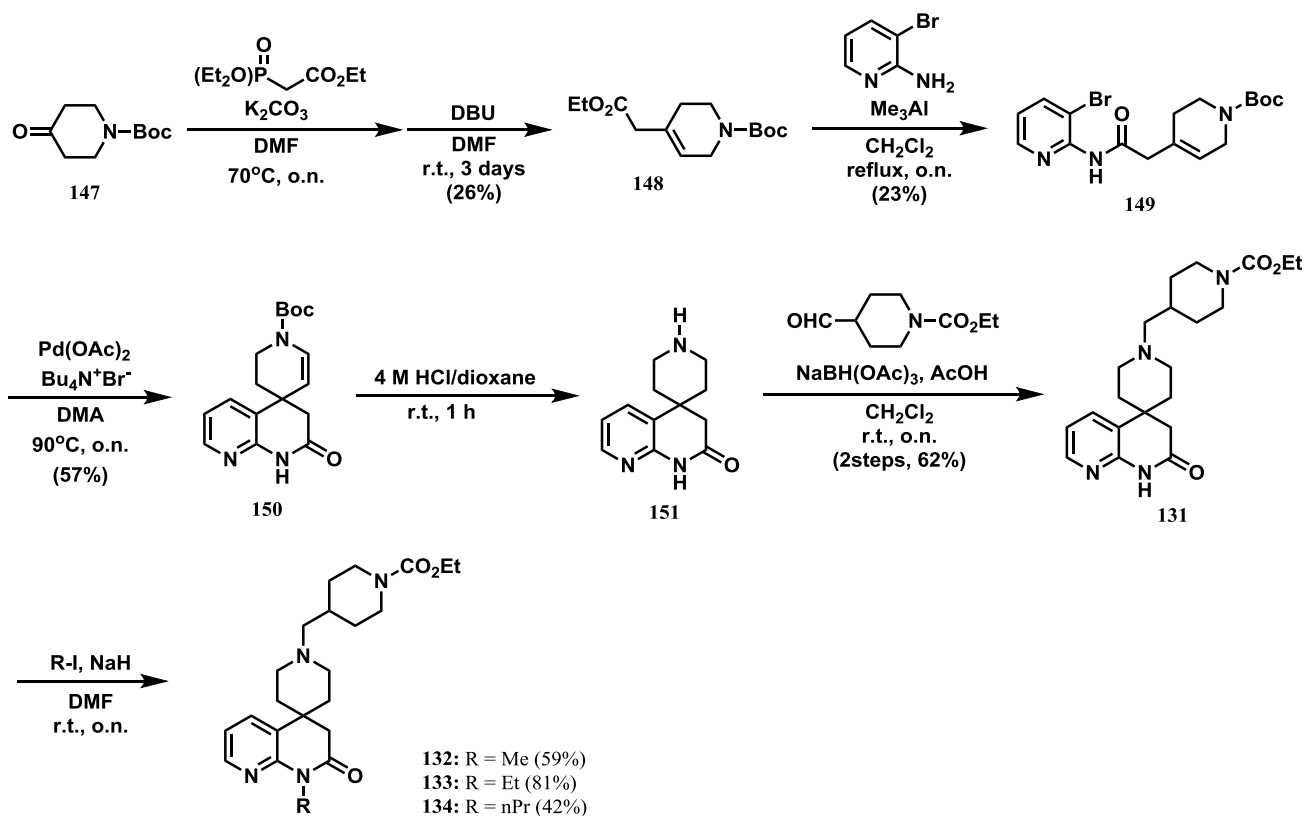
実際にはアルコール体 **144** で反応が止まってしまった。そこで **144** を用いて NaH と共に加熱することで、望む 8-アザベンズオキサジノン骨格を有する環化体 **145** を得ることができた。続いて Cbz 基と Cl 基を水素添加で同時に落とし、還元的アミノ化反応でエチルカルバメート部分を導入することで得た **130** に対して、MeI を用いてアルキル化反応に付すことで **129** へと導いた。



Scheme 26. Synthesis of 8-azabenzoxadinone derivatives.

3-4-2 8-アザジヒドロキノロン骨格の合成¹⁰¹

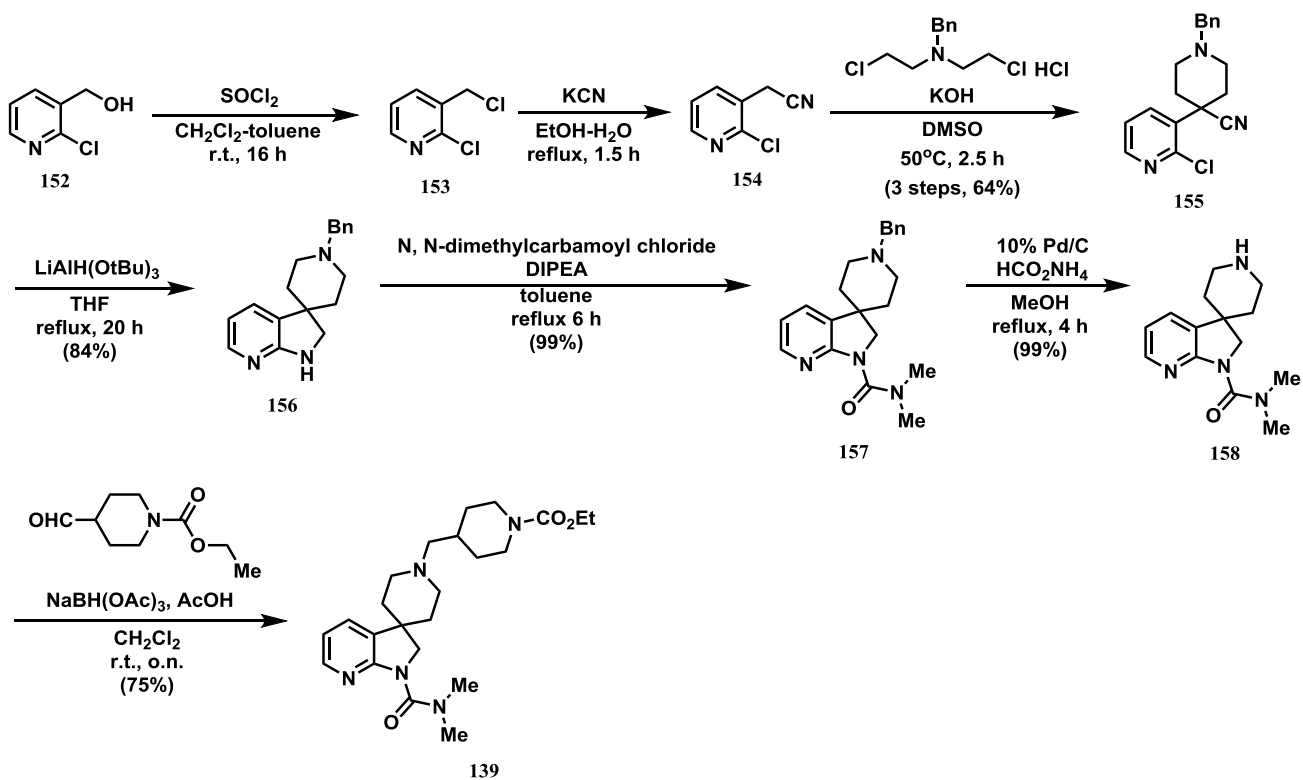
ピペリジノン **147** に対し Horner-Wadsworth-Emmons 反応に付すことで α,β -不飽和エステルを形成後、DBU 存在下 3 日間攪拌することで二重結合部位をピペリジン環内へ異性化し、**148** へと導いた。異性化は約 25%程度原料の α,β 不飽和エステル体が残存したが、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分離することができた。**148** を用いてアミノピリジンの *N*-アシル化を行い **149**、続いて Pd 触媒を用いた環化を行い 8-アザジヒドロキノロン骨格を構築した。Boc 基の脱保護の後エチルカルバメート部分を導入し **131**、最後にアルキルヨードを用いて *N*-アルキル化を行うことで **132-134** へと導いた。



Scheme 27. Synthesis of 8-azadihydroquinolone derivatives.

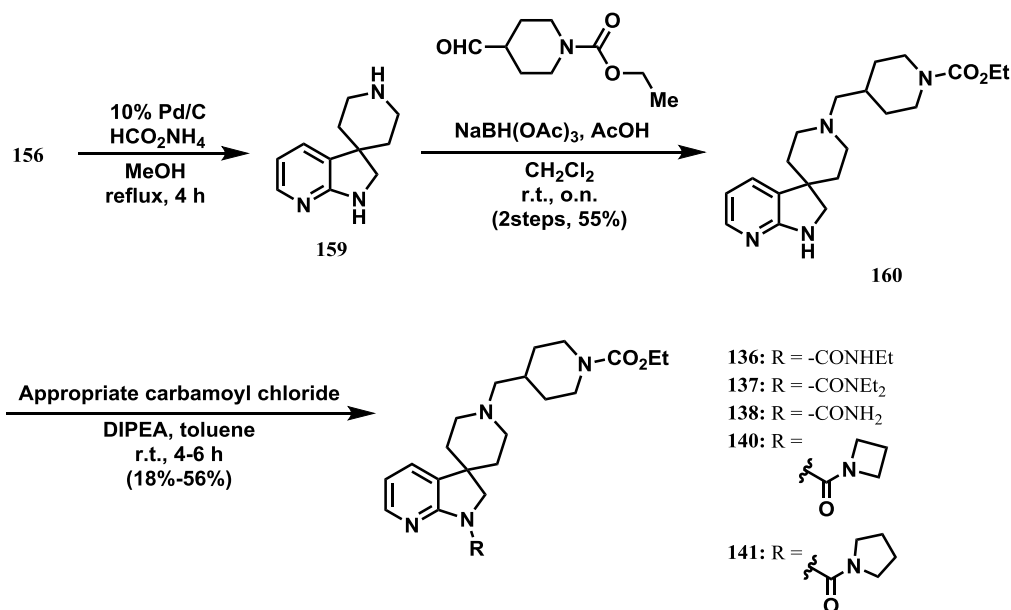
3-4-3 7-アザインドリン骨格の合成

ピリジンメタノール **152** に対し、クロロ化、シアノ化、続いてピペリジン環の構築で **155** へと導いた。LiAlH(O*t*Bu)₃ を還元剤として用いて CN 基の還元と同時に環を巻き 7-アザインドリン **156** を合成した。続いてジメチルウレア部位を導入後、Bn を落とし、最後に還元的アミノ化でエチルカルバメート部分を導入し、**139** を合成した¹⁰²。



Scheme 28. Synthesis of 7-azaindoline derivative **139**.

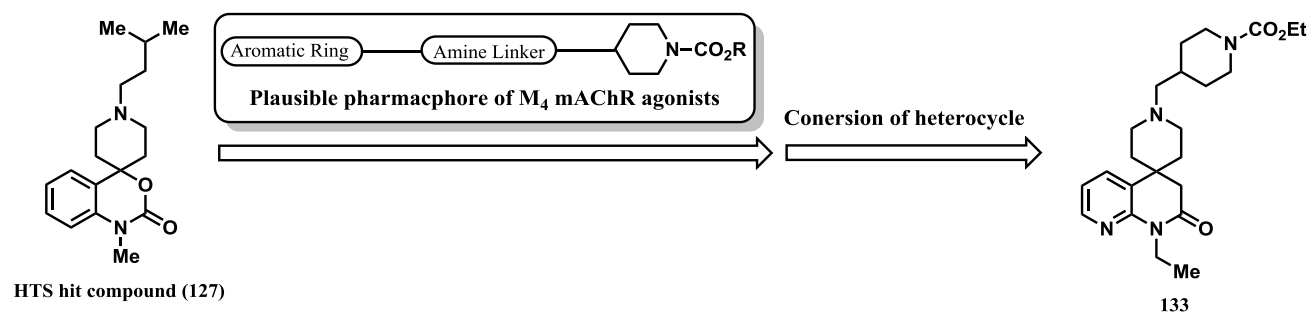
ジメチルウレア以外の N 原子上置換基を有する化合物は、**156** に対し還元的アミノ化反応により先にエチルカルバメート部分を導入して **160** へと導いた後、置換基に対応する適当なカルバモイルクロリドを用いてウレア化を行うことで得ることができた。



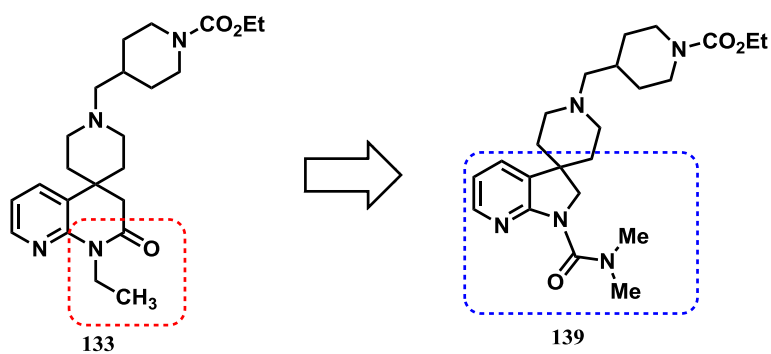
Scheme 29. Synthesis of 7-azaindoline derivatives.

3-5 第3章まとめ

HTS により見出された複素環構造を有する化合物 **127** に対し、既知情報から得られたファルマコフォアを組み合わせて、効率的に M_1/M_4 選択性を高めることができた。さらに複素環部分の最適化により、8-アザジヒドロキノロン誘導体 **133** を創出した。



133 の薬物動態における問題点を改善するため、さらなる複素環の変換を実施したところ、7-アザインドリン骨格を見出し、窒素原子上の置換基をジメチルウレアへと変換することで選択的 M_1/M_4 作動性を維持しながら hERG 阻害が劇的に改善された **139** を創出した。**139** は臨床試験へ進んだ xanomeline よりも高い有効性と安全性を示すことが示唆された。



第4章 総括

著者は新規生理活性物質の創出に向け、天然物構造の利用、また HTS を利用した手法を実施する中で、複素環構造を有する化合物の合成、及び構造活性相関における研究を実施した。

第一章では天然有機化合物であるマクロライド型抗生物質ポリナクチン類への新たな生理活性付与を目指した新規フッ素化アナログ合成を実施した。Cis 配置の THF 環構築と CF₃ 基導入を鍵反応とし、目的とする macrotetrolide β のモノマーである (+) 及び (-)-ω-trifluorononactic acid の合成を達成した。さらにこれら鏡像体を用いて花館が開発した手法による縮合、及びマクロラクトン化を行うことで、macrotetrolide β (**1k**) の生成を確認した。

第二章では sEH 阻害剤の創薬研究を実施した。天然有機化合物である EETs のカルボン酸構造を利用し、溶解度が向上、さらに CYP 阻害が減弱されたシクロプロピルウレア誘導体 **96** を見出した。さらに、化合物と sEH との共結晶の X 線結晶構造解析の結果から、シクロプロパン上に適切な立体配置で置換基を配置することにより、より強力な阻害剤 **103** の創出に成功した。本戦略はシクロプロパンを三次元的な立体制御に利用しており、その有効性を示すことができた。

第三章では M₁/M₄ 選択的ムスカリン性アセチルコリン受容体作動薬の創薬研究を実施した。HTS により複素環を含むヒット化合物を見出し、既知情報と組み合わせることで、リードとして十分な性質を有する化合物 **133** を見出した。さらにその後の合成展開により、標的へ高選択的、かつ薬物動態、安全性の面で優れた化合物 **139** の創出に成功した。

略語表

Ac	: acetyl
AIBN	: azobisisobutyronitrile
ATPase	: adenosine triphosphatase
ATR	: attenuated total reflection
BK	: big potassium
Bn	: benzyl
Boc	: <i>tert</i> -butoxycarbonyl
CDI	: carbodiimidazole
CN	: cyano
Cbz	: benzyloxycarbonyl
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIAD	: diisopropyl azodicarboxylate
DIO	: diet-induced obesity
DIPEA	: <i>N, N'</i> -diisopropylethylamine
DMA	: dimethylacetamide
DMAP	: dimethylaminopyridine
DMF	: dimethylformamide
DMSO	: dimethylsulfoxide
DOCA	: deoxycorticosterone acetate
DPPA	: diphenylphosphoryl azide
ED ₅₀	: effective dose 50
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
Et	: ethyl
EtOH	: ethanol
FDSS	: functional drug screening system
HMPA	: hexamethylphosphorous amide
IC ₅₀	: half maximal (50%) inhibitory concentration
<i>i</i> -Pr	: isopropyl
IR	: infrared spectroscopy
LDA	: lithium diisopropylamide
MBI	: mechanism-based inhibition
MCP-1	: monocyte chemoattractant protein-1
Me	: methyl
MeOH	: methanol
MEPH	: methamphetamine

Mp	: melting point
NaHMDS	: sodium hexamethyldisilazide
NBS	: <i>N</i> -bromosuccinimide
<i>n</i> BuLi	: butyllithium
NF- κ B	: nuclear factor-kappa B
NMR	: nuclear magnetic resonance
ORTEP	: oak ridge thermal ellipsoid plot program
PDB	: protein data bank
PhO	: phenyloxy
PK	: pharmacokinetics
Rf	: rate of flow
SAR	: structure-activity relationship
SBP	: systolic blood pressure
SD	: Sprague Dawley
SHR	: spontaneously hypertensive rat
TBAF	: tetrabutylammonium fluoride
TBS	: <i>tert</i> -butyldimethylsilyl
<i>t</i> -Bu	: <i>tert</i> -butyl
TCA	: tricarboxylic acid cycle
TEA	: triethylamine
THF	: tetrahydrofuran
TLC	: thin layer chromatography
TMS	: trimethylsilyl
WSC	: water soluble carbodiimide

語句説明

HTS: High-throughput screening

自動化されたロボットなどを用いて、化合物ライブラリーからターゲットに対する活性を評価する技術。本技術により大量の化合物を短期間に評価することが可能となった。

ORTEP: Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program

X線結晶構造解析より得られた各原子の位置や原子間の結合、及び熱振動により原子がどの方向にどの程度揺れているかを楕円体として表現する描画。

チトクローム P450(CYP)酵素

生体内の代謝において酸化還元反応を担う酵素ファミリーの一種。活性中心にヘム鉄を有する。CYP 酵素の阻害、または誘導を引き起こす化合物は種々の副作用や、薬物間相互作用の原因となることがあるため、注意が必要である。

MBI: Mechanism-based inhibition

非可逆的な阻害作用。例えば CYP に対する MBI では、化合物がヘム鉄と共有結合するなどして CYP 分子が活性を消失するため、通常の代謝反応がストップしてしまう恐れがある。

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

転写因子として働くタンパク質の一種。ストレスやサイトカインなどで活性化され、免疫反応を引き起こす。過度な活性化は間接リウマチ等種々の自己免疫病に関わるとされている。

BK チャネル

カリウムチャネルの一種で、細胞内カルシウムを増加させるような刺激後、それを抑制する働きを有する。

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

核内受容体の一種で、 α 、 β/σ 、 γ の三種のサブタイプが知られており、脂質の細胞内代謝や細胞の分化に関与している。

FBDD: Fragment-based drug discovery

ドラッグデザインの手法の一つ。小さいフラグメント分子から出発することで、標的との相互作用をより効率的に高めることができる。

Metabolic stability

ヒト、及びラットの肝ミクロソームに対する安定性を評価することで、生体内の代謝安定性を見積もることができる。

BA: Bioavailability

生物学的利用能。生体内に投与された薬物が全身循環血に移行した割合を表す。

CL: Clearance

薬物が単位時間あたり生体内からどれくらい排泄されたかを表す。

Ex vivo sEH inhibitory activity

化合物を投与した動物の血液を 14,15-EET とともにインキュベートし、14,15-DHET の産生量を測定する。これにより生体内における sEH 活性が化合物によってどれくらい阻害されたかを見積もることができる。

DOCA-salt model

片方の腎臓を除去した動物に DOCA (デオキシコルチコステロン酢酸塩)、及び食塩水を連投することで、Na 貯留を引き起こし、徐々に血圧が上がっていくモデル。

デオキシコルチコステロン酢酸塩：ミネラル代謝に関与するホルモンの一種。

PAM: Positive allosteric modulator

標的のアロステリックサイトに結合し、内因性リガンドによる反応を強めることができる化合物。そのもの自身には活性化作用がなく、またリガンドが結合するオルソステリックサイトではない部分に結合するため、副作用などの懸念が少ないとされている。

hERG: human ether-a-go-go related gene

心筋活動電位の再分極を担う、カリウムイオンチャネルをコードする遺伝子。

このカリウムチャネルが阻害されると再分極が乱れ、QT 延長、さらに不整脈を誘発する恐れがある。多くの既存の向精神薬が有する作用のため、新規向精神薬の開発では hERG 阻害の懸念があるかどうかは非常に重要な要素となる。

MEPH-induced hyperlocomotion model

中枢神経興奮作用を有するメタンフェタミンを動物に投与することで、運動量を亢進させるモデル。統合失調症の陽性症状を反映する評価系として用いられている。

実験の部

機器分析は次の機種で行った。

IR	第 1 章	JASCO FT/IR-4100
	第 2-3 章	JOEL JIR-SPX60
NMR	第 1 章	Varian GEMINI 2000 (300 MHz) Varian UNITY INOVA 500 (500 MHz)
	第 2-3 章	VARIAN Mercury-400
比旋光度	第 1 章	SEPA-300 polarimeter
	第 2-3 章	JASCO Polarimeter P-1020
薄層クロマトグラフィー	第 1-3 章	MERCK DC-Platten 20×20 cm Kieselgel 60 F ₂₅₄
融点	第 1-3 章	Yanaco MP-J3

反応溶媒は必要に応じて以下の精製操作の後、使用した。

THF

KOH で予備乾燥後、Na-ベンゾフェノケチルで 2-3 時間還流した。

MeCN

水素化カルシウムで予備乾燥後、2~3 時間還流した。

CH₂Cl₂

水素化カルシウムで予備乾燥後、2~3 時間還流した。

DMF

水素化カルシウムで予備乾燥後、減圧で蒸留した。

DMSO

水素化カルシウムで予備乾燥後、減圧で蒸留した。

Methyl (2SR,3SR)-6-benzyloxy-3-tert-butoxy-2-methylhexanoate (45)

Methyl (2SR,3SR)-6-benzyloxy-3-hydroxy-2-methylhexanoate (**44**) (3.62 g, 13.59 mmol), Mg(ClO₄)₂ (450 mg, 2.02 mmol) and (Boc)₂O (8.0 g, 36.66 mmol) were stirred for 48 h at 40°C. The reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane-EtOAc) to give the title compound (**45**) (1.96 g, 56%) as a pale yellow oil and recover the starting material (**44**) (1.62 g, 43%).

Benzyl (2SR,3SR,6EZ)-3-tert-butyloxy-9,9,9-trifluoro-8-hydroxy-2-methyl-6-nonenoate [(EZ)-47]

A 50 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with **46** (806 mg, 1.65 mmol) in dry THF (12 ml) and cooled to -78°C. To this solution *n*-BuLi (1.6 M solution in hexane, 2.1 ml, 3.41 mmol) was added and stirred for 1h. Reddish-yellow ylid was generated and to this was added a solution of **41** (335 mg, 1.10 mmol) in THF (5 ml). The solution was warmed to room temperature and stirred for 10 h. The reaction mixture was evaporated and chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (5:1) gave (EZ)-**47** (161 mg, 0.40 mmol, 40%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO₂): R_f = 0.41 (hexane/EtOAc = 3:1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.26–7.43 (5H, m, Bn), 5.72–5.93 (1H, m), 5.39–5.53 (1H, m), 5.06–5.20 (2H, m, Bn), 4.64–4.78 (0.5H, m, 8-H), 4.30–4.40 (0.5H, m, 8-H), 3.86–3.94 (1H, m), 2.76–2.88 (1H, m, 2-H), 1.11–1.16 (3H, m, 2-Me), 2.17–2.30 (2H, m), 1.25–1.60 (2H, m), 1.17–1.19 (9H, s, *t*-Bu); IR ν max cm⁻¹: 3447 (w, -OH), 2973 (s), 2930 (m), 1733 (s, C=O), 1457 (m), 1364 (m), 1266 (m), 1167 (s), 1126 (s), 1046 (m), 697 (s); HRMS *m/z* (M⁺+H) : calcd. for C₂₁H₃₀O₄F₃, 403.2096 ; found, 403.2102.

Benzyl (2SR,3SR,6RS,7RS)-3,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-8-hydroxy-7-iodo-2-methynonanoate (48)

A 20-mL two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter, and a septum was placed under a N₂ atmosphere. The flask was charged with I₂ (267 mg, 1.05 mmol) and NaHCO₃ (176 mg, 2.10 mmol) in anhyd MeCN (2 ml) and cooled to 0°C. After the addition of (EZ)-**47** (84 mg, 0.21 mmol), the solution was warmed to r.t. and stirred for 7.5 h. Then, the mixture was diluted with sat. Na₂S₂O₃ soln and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure to give a mixture was **48** and (E)-**47** (total 76 mg). The

mixture was used in the deiodination step without further purification. Part of the mixture was purified to give **48**.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.26–7.40 (m, 5H), 5.20 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 5.13 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 5.09–5.20 (m, 1H), 4.41 (dd, $J = 3.3, 1.9$ Hz, 1H), 4.06–4.23 (m, 1H), 3.73–3.83 (m, 1H), 3.32 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 2.73 (dq, $J = 8.2, 6.9$ Hz, 1H), 1.77–2.12 (m, 4H), 1.18 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). IR ν max cm^{-1} : 3480 (w, OH), 1734 (s, C=O), 1264 (m), 1170 (s), 774 (m).

Benzyl (2SR,3SR,6E)-3-tert-butoxy-2-methyl-8-oxo-6-octenoate (49)

A 100 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a reflux condenser with a N_2 inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with **36** (615 mg, 2.01 mmol) and formylmethylene triphenylphosphorane (1.04 g, 3.42 mmol) in toluene (25 ml). The mixture was stirred for 18 h at 95°C . The reaction mixture was evaporated and chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (4:1) gave mixture of **49** and **41** (ca. 5.1:1.7, 539 mg). Part of the mixture was purified to give **49** as a colorless oil.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 9.44 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.24–7.41 (m, 5H), 6.74 (dt, $J = 15.6, 6.6$ Hz, 1H), 6.06 (dd, $J = 15.6, 7.7$ Hz, 1H), 5.17–5.23 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 5.07–5.11 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 3.90–3.97 (m, 1H), 2.83 (dq, $J = 6.9, 5.5$ Hz, 1H), 2.20–2.45 (m, 2H), 1.54–1.66 (m, 1H), 1.35–1.47 (m, 1H), 1.19 (s, 9H), 1.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H); HRMS-FAB: m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NaO}$ (M+Na): 355.1885, found: 355.1894.

Benzyl (2SR,3SR,6E)-3-tert-butoxy-8-hydroxy-2-methyl-6-octenoate (50)

A 200 ml three-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N_2 inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with the mixture of **49** and **41** (539 mg) in MeOH (50 ml). To this solution $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (905 mg, 2.43 mmol) was added at 0°C and stirred for 5 min. To this mixture NaBH_4 (92 mg, 2.43 mmol) was added and stirred for 15 min. The reaction mixture was quenched with a sat. aq. NH_4Cl soln., evaporated and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (5:1) gave **50** (400 mg, 1.20 mmol, 60%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO_2): $R_f = 0.20$ (hexane/EtOAc = 3:1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.27–7.40 (m, 5H), 5.58–5.63 (m, 2H), 5.06–5.19 (q, 2H), 4.01–4.08 (m, 2H), 3.87–3.94 (m, 1H), 2.74–2.85 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.92–2.16 (m, 2H), 1.67–1.82 (s, 1H), 1.43–1.58 (m, 1H), 1.27–1.42 (m, 1H), 1.18 (s, 9H), 1.11–1.14 (d, $J = 7.14$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 174.8, 136.4, 133.1, 129.1, 128.6, 128.2, 73.9, 71.6, 66.0, 63.7, 44.8,

31.2, 29.6, 28.7, 27.8, 26.6, 10.23; IR ν max cm^{-1} : 3448 (w, -OH), 2974 (s), 2930 (s), 2850 (m), 1734 (s, C=O), 1457 (m), 1364 (m), 1254 (m), 1190 (m), 1050 (m), 748 (w), 698 (w); HRMS-FAB: m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NaO}_4$ (M+Na): 357.2050, found: 357.2042.

Benzyl (2SR,3SR,6RS,7RS)-2,6-epoxy-8-hydroxy-7-iodo-2-methyloctanoate (51)

A 200 ml three-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N_2 inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with I_2 (3.52 g, 13.85 mmol) and NaHCO_3 (2.33 g, 27.70 mmol) in dry CH_3CN (30 ml). After the suspension had been stirred for 15 min at 0°C under N_2 , a solution of **50** (925 mg, 2.77 mmol) in dry CH_3CN (8 ml) was added dropwise at -20°C . After stirred for 30 min, the reaction mixture was quenched with a sat. aq. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ soln. and brine, and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (3:1) gave **51** (890 mg, 2.20 mmol, 80%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO_2): R_f = 0.34 (toluene/EtOAc = 5:1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.27–7.43 (m, 5H), 5.10–5.17 (m, 2H), 4.12–4.21 (dt, J = 6.60 Hz, 2H), 3.92–4.01 (m, 1H), 3.81–3.88 (m, 2H), 2.84–2.94 (m, 1H), 2.53–2.65 (m, 1H), 2.17–2.30 (m, 1H), 1.81–2.05 (m, 2H), 1.60–1.73 (m, 1H), 1.11–1.17 (d, J = 6.87 Hz, 3H).

Benzyl (2SR,3SR,6RS)-2,6-epoxy-8-hydroxy-2-methyloctanoate (52)

A 100 ml three-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N_2 inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with **58** (792 mg, 1.96 mmol) in dry CH_2Cl_2 (20 ml). To this solution Bu_3SnH (790 μl , 2.94 mmol) and AIBN (33 mg, 0.2 mmol) was added and stirred for 6.5 h. To this mixture KF was added and stirred for 3h. The reaction mixture was filtrated, evaporated and chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (3:1) gave **52** (477 mg, 1.71 mmol, 87%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO_2): R_f = 0.21 (hexane/EtOAc = 1:1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.26–7.44 (m, 5H), 5.07–5.22 (m, 2H), 3.98–4.12 (m, 2H), 3.68–3.80 (m, 2H), 2.54–2.70 (m, 2H), 1.92–2.08 (m, 2H), 1.50–1.85 (m, 4H), 1.12–1.18 (d, J = 7.14 Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 174.7, 136.1, 128.2, 128.2, 81.1, 79.5, 66.2, 61.3, 45.3, 37.6, 31.0, 28.7, 28.4, 13.3; IR ν max cm^{-1} : 3483 (w, -OH), 2955 (m), 2944 (m), 2877 (m), 1734 (s, C=O), 1498 (w), 1457 (m), 1385 (w), 1254 (w), 1185 (m), 1058 (m), 739 (w), 698 (w); HRMS-FAB: m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_4$ (M+H): 279.1598, found: 279.1597.

Benzyl (2SR,3SR,6RS,8SR)-2,6-epoxy-9, 9, 9-trifluoro-8-hydroxy-2-methylnonanoate

[Benzyl (2SR,3SR,6RS,8SR)- α , α , α -trifluorononactate] (42)

and

Benzyl (2SR,3SR,6RS,8RS)-2,6-epoxy-9, 9, 9-trifluoro-8-hydroxy-2-methylnonanoate

[Benzyl (2SR,3SR,6RS,8RS)- α , α , α -trifluorononactate] (8-epi-42)

A 200 ml three-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with Dess-Martin periodinane (2.80 g, 6.54 mmol) in dry CH₂Cl₂. To this solution **52** (909 mg, 3.27 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 ml) was added at 0°C and stirred for 2.5 h. The reaction mixture was quenched with a sat. aq. Na₂S₂O₃ soln., a sat. aq. NaHCO₃ soln. and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated *in vacuo* to give aldehyde **53** (933 mg, *ca.* 3.38 mmol) as a pale yellow oil. This aldehyde was used in the next step without further purification.

A 200 ml three-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with **53** (933 mg, *ca.* 3.38 mmol) in dry THF (65 ml). To this solution TMSCF₃ (750 μ l, 5.07 mmol) and TBAF (1.0 M solution in THF, 0.4 ml, 0.40 mmol) was added at 0°C and stirred for 10 min. To this mixture 1 N HCl was added at 0°C and stirred for 15 min. The reaction mixture was quenched with a sat. aq. NH₄Cl soln. and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (20:1) gave **42** (468 mg, 1.35 mmol, 41%) as a pale yellow oil and **8-epi-42** (496 mg, 1.43 mmol, 44%) as a pale yellow oil.

42: TLC (SiO₂): R_f = 0.38 (hexane/EtOAc = 1:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.27–7.44 (m, 5H), 5.20–5.38 (m, 2H), 3.52–3.58 (s, 1H), 4.01–4.24 (m, 3H), 2.51–2.66 (q, *J* = 7.14, 1H), 1.96–2.10 (m, 2H), 1.84–1.95 (m, 1H), 1.52–1.82 (m, 3H), 1.13–1.18 (d, *J* = 7.14, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 174.6, 136.1, 128.6, 128.3, 128.3, 127.2, 81.2, 75.4, 68.1, 67.7, 66.3, 45.4, 34.7, 30.6, 28.5, 13.4; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃, δ ppm): –80.60 (d, *J* = 7.52 Hz); IR ν max cm⁻¹: 3434 (w, -OH), 2955 (w), 2939 (w), 2870 (w), 1734 (s, C=O), 1498 (w), 1457 (w), 1385 (w), 1276 (s), 1163 (s), 1127 (s), 1072 (s), 860 (w), 739 (w), 698 (w), 575 (w); HRMS-FAB: *m/z* calcd for C₁₇H₂₂F₃O₄ (M+H): 347.1470, found: 347.1470.

8-epi-42: TLC (SiO₂): R_f = 0.41 (hexane/EtOAc = 1:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.26–7.40 (m, 5H), 5.08–5.20 (m, 2H), 4.05–4.17 (m, 3H), 2.54–2.65 (q, *J* = 7.14 Hz, 1H), 1.90–2.15 (m, 3H), 1.54–1.79 (m, 3H), 1.13–1.17 (d, *J* = 6.87 Hz, 3H).

Benzyl (2*S*,3*S*,6*R*,8*S*)-2,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-8-[(*S*)-acetyl]-phenylacetoxy-2-methylnonanoate (54)

and

Benzyl (2*R*,3*R*,6*S*,8*R*)-2,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-8-[(*S*)-acetyl]-phenylacetoxy-2-methylnonanoate (55)

A 50 ml three-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with **42** (300 mg, 0.87 mmol) in CH₂Cl₂ (18 ml). To this solution (*S*)-acetylmandelic acid (254 mg, 1.31 mmol), WSC (250 mg, 1.31 mmol) and DMAP (12 mg, 0.1 mmol) was added and stirred for 1 h. The reaction mixture was quenched with a sat. aq. NH₄Cl soln. and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (20:1) gave **54** (226 mg, 0.43 mmol, 50%) as a pale yellow oil and **55** (223 mg, 0.43 mmol, 50%) as a colorless crystal.

54: TLC (SiO₂): R_f = 0.37 (hexane/EtOAc = 3:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.25–7.46 (m, 10H), 5.94 (s, 1H), 5.55 (sextet, *J* = 6.5 Hz, 1H), 5.15–5.19 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 5.10–5.14 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.03 (pseudo q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.85 (pseudo quintet, *J* = 6.5 Hz, 1H), 2.57 (quintet, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.91–2.06 (m, 2H), 1.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.40–1.70 (m, 2H), 1.12 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 172.1, 170.4, 167.4, 129.5, 128.9, 128.6, 128.2, 128.1, 127.6, 124.0 (q, *J* = 285 Hz), 80.5, 75.9, 74.2, 74.1, 68.6 (q, *J* = 29 Hz), 66.2, 45.2, 34.2, 31.0, 28.3, 20.5, 12.9; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃, δ ppm): –79.06 (d, *J* = 6.11 Hz); IR ν max cm⁻¹: 2979 (w), 2948 (w), 1776 (m, C=O), 1739 (s, C=O), 1497 (w), 1455 (w), 1375 (w), 1281 (w), 1231 (m), 1182 (m), 1062 (m), 739 (w), 698 (w); HRMS-FAB: *m/z* calcd for C₂₇H₃₀F₃O₇ (M+H): 523.1944, found: 523.1952; [α]_D²⁴ = +15.7° (*c* = 0.27, CHCl₃).

55: TLC (SiO₂): R_f = 0.42 (hexane/EtOAc = 3:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.27–7.48 (m, 10H), 5.98 (s, 1H), 5.49 (sextet, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.16–5.20 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 5.11–5.15 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.74 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.01 (quintet, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.48 (quintet, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.67–1.76 (m, 2H), 1.42–1.64 (m, 2H), 1.14–1.28 (m, 2H), 1.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 174.5, 170.2, 167.1, 136.2, 133.5, 129.5, 128.6, 128.3, 128.2, 80.3, 74.1, 73.3, 68.1, 66.3, 45.1, 33.7, 30.6, 28.2, 20.5, 13.0; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃, δ ppm): –78.81 (d, *J* = 6.11 Hz); IR ν max cm⁻¹: 2951 (s), 2825 (s), 1781 (m, C=O), 1743 (s, C=O), 1382 (w), 1256 (m), 1188 (m), 1059 (s), 1033 (s), 800 (m); HRMS-FAB: *m/z* calcd for C₂₇H₃₀F₃O₇ (M+H): 523.1944, found: 523.1941; [α]_D²⁴ = +46.9° (*c* = 0.51, CHCl₃).

(-)-(2S,3S,6R,8S)-3,6-Epoxy-9,9,9-trifluoro-8-hydroxy-2-methylnonactic acid [ω -trifluorononactic acid, (-)-2e]

A 100 ml one-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar was charged with 54 (167 mg, 0.32 mmol) in MeOH (3 ml) and THF (4 ml). To this solution was added 1 M KOH aq (6 ml) at 0°C and the mixture was stirred for 24 h. Then, the solvent was evaporated and the residue was washed with CHCl₃. The aqueous layer was acidified with 1M HCl aq and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure to give crude (-)-2e (135 mg) as a pale yellow oil. An analytical sample was further purified.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 5.90–7.20 (br, 1H), 4.14–4.40 (m, 2H), 4.00–4.13 (m, 1H), 2.46 (quintet, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.00–2.20 (m, 2H), 1.88 (ddd, $J = 13.5, 10.1, 3.0$ Hz, 1H), 1.60–1.80 (m, 3H), 1.16 (d, $J = 6.8$ Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 179.5, 125.3 (q, $J = 282$ Hz), 81.6, 75.2, 67.2 (q, $J = 31.4$ Hz), 46.3, 35.2, 30.7, 29.0, 13.8; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃, δ ppm): -80.90 (d, $J = 10.8$ Hz); IR ν max cm⁻¹: 3415 (s), 2962 (s), 1713 (s), 1277 (s), 1165 (s), 1128 (s), 1070 (s); HRMS-FAB: m/z calcd for C₁₀H₁₆F₃O₄ (M+H): 257.1000, found: 257.1004; $[\alpha]_D^{24} = -3.5^\circ$ ($c = 0.71$, CHCl₃).

(+)-2e

The title compound was synthesized as a pale yellow oil according to the procedure described for (-)-2e. HRMS-FAB: m/z calcd for C₁₀H₁₆F₃O₄ (M+H): 257.1000, found: 257.0999; $[\alpha]_D^{24} = +3.3^\circ$ ($c = 0.50$, CHCl₃).

Benzyl (2S, 3S, 6R, 8S)-2, 6-epoxy-9, 9, 9-trifluoro-8-hydroxy-2-methylnonanoate (56)

A 50 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with *t*BuOk (119 mg, 1.06 mmol) in dry DMF (10 ml). To this solution (-)-2e (135 mg, *ca.* 0.53 mmol) in dry DMF (2 ml) was added, warmed to 60°C and stirred for 5 min. To this mixture BnBr (126 μ l, 10.6 mmol) was added and stirred for 16 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with water and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (10:1) gave 56 (77 mg, 0.22 mmol, 70%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO₂): R_f = 0.62 (hexane/EtOAc = 1:1). $[\alpha]_D^{24} = -0.81^\circ$ ($c = 0.55$, CHCl₃).

Benzyl (2R, 3R, 6S, 8R)-2, 6-epoxy-9, 9, 9-trifluoro-8-hydroxy-2-methylnonanoate

A 30 ml one-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar. The flask was charged with 61 (90 mg, 0.17 mmol) in MeOH (1 ml) and THF (3 ml). To this solution 1N KOH (4 ml) was added at 0°C

and stirred for 24 h. The reaction mixture was evaporated and washed with CHCl_3 . The water layer was acidified with 1N HCl and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo to give carboxylic acid (71 mg, ca. 0.28 mmol) as a pale yellow oil. This carboxylic acid was used in the next step without further purification.

A 50 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N_2 inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with *t*BuOk (63 mg, 0.56 mmol) in dry DMF (6 ml). To this solution carboxylic acid (71 mg, ca. 0.28 mmol) in dry DMF (2 ml) was added, warmed to 60°C and stirred for 5 min. To this mixture BnBr (70 μl , 0.59 mmol) was added and stirred for 20 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with water and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (10:1) gave title compound (55 mg, 0.16 mmol, 92%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO_2): Rf = 0.62 (hexane/EtOAc = 1:1). $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +5.56^\circ$ (c = 0.90, CHCl_3).

Benzyl (2R, 3R, 6S, 8R)-2, 6-epoxy-9, 9, 9-trifluoro-8-tert-butyldimethylsilyloxy-2-methylnonanoate

A 50 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N_2 inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with benzyl ester (77 mg, 0.22 mmol) in dry CH_2Cl_2 (7 ml). To this solution 2, 6-lutidine (77 μl , 0.66 mmol) was added at 0°C and stirred for 5 min. To this mixture TBSOTf (70 μl , 0.33 mmol) was added, warmed to room temperature and stirred for 9 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc, washed with a sat. aq. CuSO_4 soln. and brine, dried over MgSO_4 and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (7:1) gave title compound (100 mg, 0.22 mmol, 98%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO_2): Rf = 0.66 (hexane/EtOAc = 3:1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.20–7.40 (m, 5H, Bn), 5.07–5.19 (q, 2H, Bn), 4.07–4.22 (m, 1H), 3.90–4.04 (m, 1H), 2.51–2.64 (m, 1H, 2-H), 1.92–2.10 (m, 2H), 1.44–1.80 (m, 4H), 1.11–1.14 (d, $J = 7.14$ Hz, 3H, 2-Me), 0.85 (s, 9H, TBS), 0.04 (s, 3H, TBS); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 132.37, 128.59, 128.19, 128.00, 89.38, 80.60, 73.69, 68.71, 66.05, 53.58, 45.55, 42.23, 37.65, 36.87, 35.29, 31.01, 28.58, 25.57, 13.43; ^{18}F NMR (470 MHz, CDCl_3 , δ ppm) –80.208, –80.221; IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 2958 (s), 2926 (s), 2887 (m), 2860 (m), 1739 (s, C=O), 1464 (w), 1387 (w), 1282 (m), 1255 (m), 1170 (s), 1136 (s), 1079 (s), 840 (m), 782 (w), 751 (w), 697 (w); HRMS m/z ($\text{M}^+ + \text{H}$): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{O}_4\text{Si}$, 461.2335; found, 461.2340. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +16.43^\circ$ (c = 0.35, CHCl_3).

(2*R*,3*R*,6*S*,8*R*)-2,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-8-tert-butyl dimethylsilyloxy-2-methylnonanoic acid (57)

A 30 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with benzyl ester (100 mg, 0.22 mmol) in EtOH (6 ml). To this solution 10% Pd/C (80 mg) was added and the mixture was stirred for 10 h at 1 atm H₂. The reaction mixture was filtrated and concentrated in vacuo to give the title compound (75 mg, ca. 0.20 mmol) as a pale yellow oil. The carboxylic acid was used in the next step without further purification.

Benzyl

(2'*R*,3'*R*,6'*S*,8'*R*)-2',6'-epoxy-9',9',9'-trifluoro-8'-tert-butyl dimethylsilyloxy-2'-methyl-8-nonanoyl-(2*S*,3*S*,6*R*,8*S*)-2,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-2-methylnonanoate (58)

A 30 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with **56** (53 mg, 0.15 mmol) and **57** (19 mg, 0.05 mmol) in dry CH₂Cl₂ (2 ml). To this solution WSC (38 mg, 0.20 mmol) and DMAP (12 mg, 0.10 mmol) were added and stirred for 4 h. The reaction mixture was quenched with a sat. aq. NH₄Cl soln. and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (20/1) gave **58** (30 mg, 0.04 mmol, 84%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO₂): R_f = 0.58 (hexane/EtOAc =3:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.26–7.40 (m, 5H, Bn), 5.47–5.60 (m, 1H, 8-H), 5.12 (s, 2H, Bn), 3.82–4.24 (m, 5H), 2.52–2.63 (quant, 2H), 1.83–2.08 (m, 6H), 1.44–1.78 (m, 6H), 1.06–1.16 (t, 6H), 0.89 (s, 9H, TBS), 0.09 (s, 3H, TBS); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 174.54, 172.64, 136.23, 128.54, 128.24, 128.13, 80.67, 79.79, 74.32, 74.00, 66.20, 45.26, 36.92, 34.44, 31.06, 31.01, 28.27, 28.18, 25.54, 17.95, 13.22, 12.96, –5.42; ¹⁸F NMR (470 MHz, CDCl₃, δ ppm): –78.774, –78.791, –80.286, –80.299; IR ν max cm⁻¹: 2958 (m), 2924 (m), 2886 (w), 2859 (w), 1748 (m, C=O), 1740 (m, C=O), 1463 (w), 1379 (w), 1281 (m), 1136 (s), 1076 (m), 841 (w), 809 (w), 782 (w), 751 (w), 697 (w); HRMS *m/z* (M⁺+H): calcd. for C₃₃H₄₉F₆O₇Si, 699.3152; found, 699.3154; [α]_D²⁴ = +14.17° (*c* = 0.30, CHCl₃).

Benzyl

(2'*R*,3'*R*,6'*S*,8'*R*)-2',6'-epoxy-9',9',9'-trifluoro-8'-hydroxy-2'-methyl-8-nonanoyl-(2*S*,3*S*,6*R*,8*S*)-2,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-2-methylnonanoate (59)

A 10 ml one-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar. The flask was charged with **58** (12 mg, 0.017 mmol) in CH₃CN (1.0 ml). To this solution 46% HF/CH₃CN (1:4) (0.50 ml) was added at 0°C and stirred for 20 h. The reaction mixture was quenched with NaHCO₃ and a sat. aq. NaHCO₃ soln. and

extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (5:1) gave **59** (10 mg, 0.017 mmol, quant.) as a pale yellow oil.

TLC (SiO₂): R_f = 0.21 (hexane/EtOAc =3:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.27–7.44 (m, 5H, Bn), 5.49–5.63 (m, 1H, 8-H), 5.11–5.22 (q, 2H, Bn), 4.12–4.27 (m, 3H), 3.86–4.06 (m, 3H), 2.45–2.62 (m, 2H), 1.76–2.14 (m, 6H), 1.49–1.73 (m, 6H), 1.09–1.18 (dd, 6H); ¹⁸F NMR (470 MHz, CDCl₃, δ ppm): –78.804, –78.820, –80.601, –80.617; IR ν max cm⁻¹: 3485 (m, -OH), 2979 (m), 2948 (m), 1760 (s, C=O), 1736 (s, C=O), 1458 (m), 1281 (s), 1176 (s), 1145 (s), 1073 (s), 699 (w); HRMS *m/z* (M⁺+H) : calcd. for C₂₇H₃₅F₆O₇, 585.2287 ; found, 585.2292; [α]_D²⁴ = +2.22° (*c* = 0.09, CHCl₃).

2'-Thiopyridyl (2'*R*,3'*R*,6'*S*,8'*R*)-2',6'-epoxy-9',9',9'-trifluoro-8'-tert-butyl dimethylsilyloxy-2'-methyl-8-nonanoyl-(2*S*,3*S*,6*R*,8*S*)-2,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-2-methylnonanoate (**60**)

A 30 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with **58** (31.0 mg, 0.044 mmol) in EtOH (2 ml). To this solution 10% Pd/C was added and the mixture was stirred for 30 min at 1 atm H₂. The reaction mixture was filtrated and concentrated *in vacuo* to give carboxylic acid (24.0 mg, *ca.* 0.039 mmol) as a pale yellow oil. The carboxylic acid was used in the next step without further purification.

A 10 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with carboxylic acid (24.0 mg, *ca.* 0.039 mmol) in dry toluene (2.0 ml). To this solution 2, 2'-dipyridyl disulfide (17.0 mg, 0.078 mmol) and PPh₃ (20.0 mg, 0.078 mmol) were added and stirred for 22 h at room temperature. The reaction mixture was evaporated and chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (5:1) gave **60** (20.0 mg, 0.028 mmol, 64%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO₂): R_f = 0.29 (hexane/EtOAc =3:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8.59–8.65 (m, 1H, Py), 7.68–7.78 (m, 2H, Py), 7.26–7.32 (m, 1H, Py), 5.60–5.68 (m, 1H, 8-H), 3.87–4.19 (m, 5H), 2.79–2.91 (quat, 1H), 2.54–2.66 (quant, 1H), 1.83–2.20 (m, 6H), 1.48–1.81 (m, 6H), 1.14–1.23 (dd, 6H), 0.89 (s, 9H, TBS), 0.08 (s, 3H, TBS); ¹⁸F NMR (470 MHz, CDCl₃, δ ppm) –78.722, –78.706, –80.264, –80.248; IR ν max cm⁻¹: 2959 (s), 2934 (s), 2875 (m), 2855 (m), 1761 (s, C=O), 1715 (m, C=O), 1574 (w), 1456 (m), 1420 (m), 1283 (s), 1177 (s), 1139 (s), 1078 (s), 841 (w); HRMS *m/z* (M⁺+H) : calcd. for C₃₁H₄₆F₆NO₆SSi, 702.2719 ; found, 702.2722; [α]_D²⁴ = +26.25° (*c* = 0.09, CHCl₃).

Benzyl

(2''R,3''R,6''S,8''R)-2'',6''-epoxy-9'',9'',9''-trifluoro-8''-tert-butyldimethylsilyloxy-2''-methyl-8''-nonanoyl-(2''S,3''S,6''R,8''S)-2'',6''-epoxy-9'',9'',9''-trifluoro-2''-methyl-8''-nonanoyl-(2'R,3'R,6'S,8'R)-2',6'-epoxy-9',9',9'-trifluoro-2'-methyl-8-nonanoyl-(2S,3S,6R,8S)-2,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-2-methylnonanoate (**61**)

A 10 ml two-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The flask was charged with **59** (21.0 mg, 0.036 mmol) and **60** (20.0 mg, 0.028 mmol) in dry toluene (3.0 ml). To this solution MA4A (5.0 mg) and dry AgClO₄ (7.50 mg, 0.036 mmol) were added at 0°C and stirred for 10 min. The reaction mixture was quenched with a sat. aq. NaHCO₃ soln. and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (5:1) gave **61** (5.0mg, 0.004 mmol, 15%) as a pale yellow oil.

TLC (SiO₂): R_f = 0.53 (hexane/EtOAc =3:1).

Benzyl (2''R, 3''R, 6''S, 8''R)-2'', 6''-epoxy-9'', 9'', 9''-trifluoro 8''-hydroxy-2''-methyl-8''-nonanoyl-(2''S, 3''S, 6''R, 8''S)-2'', 6''-epoxy-9'', 9'', 9''-trifluoro-2''-methyl-8''-nonanoyl-(2'R, 3'R, 6'S, 8'R)-2', 6'-epoxy-9', 9', 9', 9'-trifluoro-2'-methyl-8-nonanoyl-(2S, 3S, 6R, 8S)-2, 6-epoxy-9, 9, 9-trifluoro-2-methylnonanoate (**64**)

A 10 ml one-necked round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer bar was charged with **61** (5.0 mg, 0.0042 mmol) in dry CH₃CN (0.30 ml). To this solution 46% HF/CH₃CN (1:4) (0.10 ml) was added at 0°C and stirred for 6 h. The reaction mixture was quenched with NaHCO₃ and a sat. aq. NaHCO₃ soln. and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (3:1) gave **64** (1.0 mg, 0.0009 mmol, 22%) as a pale yellow oil.

2'-Thiopyridyl

(2''R,3''R,6''S,8''R)-2'',6''-epoxy-9'',9'',9''-trifluoro-8''-hydroxy-2''-methyl-8''-nonanoyl-(2''S,3''S,6''R,8''S)-2'',6''-epoxy-9'',9'',9''-trifluoro-2''-methyl-8''-nonanoyl-(2'R,3'R,6'S,8'R)-2',6'-epoxy-9',9',9'-trifluoro-2'-methyl-8-nonanoyl-(2S,3S,6R,8S)-2,6-epoxy-9,9,9-trifluoro-2-methylnonanoate

A sample tube equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The tube was charged with **64** (1.0 mg, 0.0009 mmol) in EtOH (0.1 ml). To this solution 10% Pd/C was added and the mixture was stirred for 3 h at 1 atm H₂. The reaction mixture was filtrated and

concentrated *in vacuo* to give carboxylic acid (1.20 mg, *ca.* 0.0012 mmol) as a pale yellow oil. The carboxylic acid was used in the next step without further purification.

A sample tube equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The tube was charged with the carboxylic acid (1.20 mg, *ca.* 0.0012 mmol) in dry toluene. To this solution 2,2'-dipyridyl disulfide (1.0 mg, 0.0045 mmol) and PPh₃ (1.0 mg, 0.0038 mmol) were added and stirred for 3 h at room temperature. The reaction mixture was evaporated to give the title compound. The thiol ester was used in the next step without further purification.

Macrotetrolide β (**1k**)

A sample tube equipped with a magnetic stirrer bar, a N₂ inlet adapter and a septum was placed under a nitrogen atmosphere. The tube was charged with the thiol ester in dry toluene. To this solution AgClO₄ (2mg, 0.0096 mmol) was added and stirred for 30 min at 0°C. The reaction mixture was quenched with a sat. aq. NaHCO₃ soln. and extracted with EtOAc. The combined extract was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel. Elution with hexane/EtOAc (3:1) to give **1k** (200 μ g, 0.0002 mmol, 17%).

HRMS m/z (M⁺+Na) : calcd. for C₄₀H₅₂F₁₂ Na O₁₂, 975.3165 ; found, 975.3169.

第 2 章

Biological assay

Recombinant human or rat sEH was prepared in *E.Coli* expression system in our Genomic Science Laboratories. Test compounds were pre-incubated with human or rat sEH (0.3 µg/mL) in a buffer (25 mM Bis-Tris buffer, pH 7.0, 0.1 mg/mL BSA) for 10 minutes at room temperature in a 96-well black plate. The reaction was started by addition of Epoxy Fluor 7 (25 µM, Cayman Chemical) and the increase in fluorescence intensity was then determined on a fluorescence plate reader set at an excitation of 330 nm and emission of 465 nm. The IC₅₀ values were calculated as the concentrations of test compounds that inhibited the increase in fluorescence intensity by 50% as compared with DMSO-treated samples.

Pharmacokinetics (PK) study

Test compounds were given intravenously (1 mg/kg, dissolved in 5% glucose/0.1 N HCl = 9:1) or orally (10 mg/kg, suspended in 0.5% methyl cellulose solution) to fasted male rats (n = 3). After dosing, blood samples (250 µl) were collected from the jugular vein using a heparinized syringe at selected time points (intravenous administration: pre-dosing, 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6 and 24 h; oral administration : 15, 30 min, 1, 2, 4, 6 and 24 h, respectively). The collected samples were iced-chilled and then centrifuged at 12,000 rpm for 2 min at room temperature to obtain plasma samples, which were preserved at -70°C in a freezer. The AUC was obtained by measuring the time course of test compounds plasma concentration.

Clearance (CL) was calculated according to the following equation.

$$CL(\text{mL}/\text{min}/\text{kg}) = D_{\text{iv}}/AUC_{\text{iv}}$$

Bioavailability (BA) was calculated according to the following equation.

$$BA(\%) = (AUC_{\text{po}}/D_{\text{po}})/(AUC_{\text{iv}}/D_{\text{iv}}) \times 100$$

***Ex vivo* study**

Compound **96** (10 mg/kg or 100 mg/kg) was orally administered to SD rats (7–8 week old) (Japan SLC, Inc.) and blood samples were collected at 0, 1, 6 and 24 h after drug administration. Using these whole blood samples, 14, 15-DHET production rate as an index of *ex vivo* sEH activity was evaluated by 14, 15-DHET ELISA kit (DETROIT R&D INC.).

DOCA-salt rat study

Male SD rats weighing 180–220 g (5 week old) were obtained from Japan SLC, Inc. All rats were uninephrectomized under anesthesia with pentobarbital given intraperitoneally at 50 mg/kg. The kidneys were then exposed through a left lateral abdominal incision. The left kidney was removed after ligation of the adjoining renal vasculature and ureter with sutures, and DOCA pellets (25 mg/pellet, 60-day release, Innovative Research of America, Sarasota, FL) were implanted subcutaneously. After the operation, drinking water was replaced with 1% NaCl. Ten days later, the animals were randomly divided and compound **87** (100 mg/kg) was orally administered for 28 days. SBP was measured in the morning by the tail-cuff method (BP-98A, Softron Co., Ltd, Japan), and urine samples were collected for 18 h during the last day of dosage using metabolic cages.

4-Phenoxy-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (**68**)

To a solution of 4-Phenoxypiperidine (333 mg, 1.88 mmol), *N,N'*-diisopropylethylamine (320 μ l, 1.88 mmol) in toluene (3 ml) was added *trans*-2-phenylcyclopropyl isocyanate (racemic) (300 mg, 1.88 mmol), and the mixture was stirred for 12 h at room temperature. The reaction mixture was then poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/hexane) to give the title compound (**68**) (309 mg, 49%) as a white solid.

Mp: 135°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.21–7.29 (m, 5H), 7.13–7.17 (m, 2H), 6.87–6.96 (m, 3H), 4.91 (br s, 1H), 4.48–4.51 (m, 1H), 3.57–3.65 (m, 2H), 3.27–3.35 (m, 2H), 2.80–2.86 (m, 2H), 1.98–2.05 (m, 1H), 1.89–1.98 (m, 2H), 1.75–1.84 (m, 2H), 1.16–1.22 (m, 1H), 1.09–1.15 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 158.1, 157.1, 140.9, 129.6, 128.3, 126.6, 125.9, 121.1, 116.1, 71.6, 40.8, 33.2, 30.3, 25.0, 16.5; IR (ATR) ν : 3321, 3022, 1614, 1525, 1493, 1234, 1047, 815, 750, 694 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 337 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₂₅N₂O₂ (M+H): 337.1916, found: 337.1910.

N-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]-4-(pyridin-2-yloxy)piperidine-1-carboxamide (**69**)

The title compound was synthesized as a colorless oil (18% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8.12 (dq, *J* = 6.6, 1.0 Hz, 1H), 7.52–7.60 (m, 1H), 7.13–7.29 (m, 5H), 6.82–6.87 (m, 1H), 6.71 (dt, *J* = 10.3, 1.0 Hz), 5.20–5.29 (m, 1H), 4.92 (br s, 1H), 3.64–3.73 (m, 2H), 3.23–3.33 (m, 2H), 2.82–2.88 (m, 1H), 1.96–2.06 (m, 3H), 1.71–1.82 (m, 2H) 1.10–1.27 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 162.9, 158.1, 146.7, 140.9, 138.7, 128.2, 126.6, 125.9, 116.7, 111.6, 69.6, 41.3, 33.2,

30.6, 25.0, 16.5; IR (ATR) ν : 3298, 3024, 2931, 2852, 1736, 1614, 1593, 1522, 1468, 1429, 1309, 1265, 1250, 1043, 1030, 773, 750, 694 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 338 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ (M+H): 338.1869, found: 338.1862.

***N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]-4-(pyridin-3-yloxy)piperidine-1-carboxamide (70)**

The title compound was synthesized as a yellow oil (57% yield) according to the procedure described for compound **68**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 8.31 (dd, $J = 2.7, 1.0$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 4.2, 2.0$ Hz, 1H), 7.12–7.28 (m, 7H), 4.97 (br s, 1H), 4.49–4.58 (m, 1H), 3.60–3.68 (m, 2H), 3.30–3.38 (m, 2H), 2.81–2.88 (m, 1H), 1.92–2.08 (m, 3H), 1.77–1.84 (m, 2H), 1.18–1.27 (m, 1H), 1.11–1.17 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 158.1, 153.3, 142.5, 140.8, 139.3, 128.2, 126.6, 125.9, 123.9, 122.7, 72.4, 40.7, 33.2, 30.1, 25.0, 16.4; IR (ATR) ν : 3264, 3024, 2949, 2845, 1614, 1558, 1541, 1471, 1423, 1269, 1225, 1049, 1034, 744, 694 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 338 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ (M+H): 338.1869, found: 338.1860.

***N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]-4-(pyridin-4-yloxy)piperidine-1-carboxamide (71)**

The title compound was synthesized as a yellow oil (65% yield) according to the procedure described for compound **68**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 8.43 (dd, $J = 4.9, 1.5$ Hz, 2H), 7.14–7.19 (m, 3H), 7.24–7.28 (m, 2H), 6.80 (dd, $J = 4.9, 1.5$ Hz, 2H), 5.00 (br s, 1H), 4.57–4.64 (m, 1H), 3.57–3.66 (m, 2H), 3.32–3.39 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 1.90–2.07 (m, 3H), 1.77–1.88 (m, 2H), 1.18–1.23 (m, 1H), 1.11–1.17 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 163.3, 158.1, 151.2, 140.8, 128.3, 126.5, 125.9, 111.0, 71.5, 40.6, 33.2, 30.0, 25.0, 16.4; IR (ATR) ν : 3298, 3028, 2953, 2852, 2362, 1616, 1587, 1522, 1487, 1267, 1213, 1030, 835, 816, 760, 696 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 338 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ (M+H): 338.1869, found: 338.1863.

***N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]-4-(pyrimidin-2-yloxy)piperidine-1-carboxamide (72)**

The title compound was synthesized as a yellow oil (55% yield) according to the procedure described for compound **68**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 8.19–8.21 (m, 1H), 8.12 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 8.04–8.06 (m, 1H), 7.14–7.29 (m, 5H), 5.18–5.25 (m, 1H), 5.02 (br s, 1H), 3.65–3.73 (m, 2H), 3.25–3.33 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 1.97–2.06 (m, 3H), 1.74–1.83 (m, 2H), 1.11–1.25 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 164.4, 159.3, 158.1, 140.9, 128.2, 126.6, 125.9, 115.0, 71.8, 41.1, 33.2, 30.3, 25.0, 16.4; IR (ATR) ν : 3309, 2953, 2860, 2360, 1624, 1578,

1562, 1419, 1317, 1267, 1248, 1028, 806. 746, 696 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 339 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_2$ (M+H): 339.1821, found: 339.1817.

***N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]-4-(pyrazin-2-yloxy)piperidine-1-carboxamide (73)**

The title compound was synthesized as a yellow oil (72% yield) according to the procedure described for compound **68**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 8.51 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 7.13–7.28 (m, 5H), 6.94 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H), 5.19–5.25 (m, 1H), 4.93 (br s, 1H), 3.67–3.76 (m, 2H), 3.28–3.36 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.00–2.07 (m, 3H), 1.82–1.91 (m, 2H), 1.18–1.25 (m, 1H), 1.11–1.17 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 159.2, 158.1, 140.9, 140.4, 136.5, 136.3, 128.3, 126.6, 125.9, 70.7, 41.2, 33.2, 30.3, 25.0, 16.4; IR (ATR) ν : 3307, 2951, 2360, 1622, 1525, 1408, 1308, 1269, 1250, 1024, 1005, 837, 748, 696 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 339 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_2$ (M+H): 339.1821, found: 339.1816.

4-(Diphenylmethoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (74)

The title compound was synthesized as a colorless oil (42% yield) according to the procedure described for compound **68**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.11–7.38 (m, 15H), 5.52 (s, 1H), 4.81 (br s, 1H), 3.58–3.69 (m, 3H), 3.08–3.17 (m, 2H), 2.88–2.93 (m, 1H), 1.96–2.05 (m, 1H), 1.78–1.87 (m, 2H), 1.63–1.74 (m, 2H), 1.09–1.22 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 158.1, 142.5, 140.9, 128.4, 128.3, 127.4, 127.0, 126.6, 125.9, 80.3, 71.6, 41.3, 33.2, 30.9, 25.0, 16.5; IR (ATR) ν : 3305, 3026, 2943, 2858, 1620, 1521, 1492, 1267, 1246, 1059, 1028, 741, 694 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 448 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2$ (M+H): 427.2386, found: 427.2380.

4-(2-Chlorophenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (75)

The title compound was synthesized as a colorless oil (34% yield) according to the procedure described for compound **68**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.38 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.15–7.28 (m, 6H), 6.90–6.97 (m, 2H), 4.87 (br s, 1H), 4.55–4.60 (m, 1H), 3.57–3.64 (m, 2H), 3.38–3.45 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.01–2.06 (m, 1H), 1.86–1.92 (m, 4H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.17 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 158.1, 152.7, 140.9, 130.6, 128.3, 127.6, 126.6, 125.9, 124.6, 122.2, 116.4, 73.2, 40.8, 33.2, 30.1, 25.0, 16.5; IR (ATR) ν : 3309, 3005, 2951, 2360, 1624, 1522, 1479, 1267, 1238, 1059, 1026, 744, 696 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 371 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (M+H): 371.1526, found: 371.1521.

4-(3-Chlorophenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (76)

The title compound was synthesized as a white solid (87% yield) according to the procedure described for compound **68**.

Mp: 125°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.16–7.29 (m, 6H), 6.89–6.95 (m, 2H), 6.77–6.81 (m, 1H), 4.95 (br s, 1H), 4.44–4.50 (m, 1H), 3.56–3.64 (m, 2H), 3.28–3.35 (m, 2H), 2.82–2.86 (m, 1H), 2.00–2.06 (m, 1H), 1.89–1.97 (m, 2H), 1.72–1.82 (m, 2H), 1.17–1.23 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 157.9, 140.9, 134.9, 130.3, 128.3, 126.6, 125.9, 121.2, 116.3, 114.4, 72.1, 40.7, 33.2, 30.2, 25.0, 16.4; IR (ATR) v: 3363, 2845, 2360, 1618, 1522, 1475, 1242, 1041, 881, 839, 785, 746, 692, 685 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 371 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₂₄ClN₂O₂ (M+H): 371.1526, found: 371.1521.

4-(4-Chlorophenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (77)

The title compound was synthesized as a yellow oil (42% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.14–7.28 (m, 7H), 6.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.90 (br s, 1H), 4.41–4.47 (m, 1H), 3.56–3.64 (m, 2H), 3.28–3.35 (m, 2H), 2.81–2.86 (m, 1H), 2.01–2.06 (m, 1H), 1.89–1.97 (m, 2H), 1.73–1.82 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 155.7, 140.9, 129.5, 128.3, 126.6, 125.9, 117.4, 72.2, 40.7, 33.2, 30.2, 25.0, 16.4; IR (ATR) v: 3259, 3024, 2953, 2862, 2360, 1614, 1541, 1487, 1419, 1279, 1236, 1028, 818, 746, 696 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 371 (M+1). HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₂₄ClN₂O₂ (M+H): 371.1526, found: 371.1521.

4-(2-Methylphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (78)

The title compound was synthesized as a yellow oil (100% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.10–7.28 (m, 7H), 6.81–6.89 (m, 2H), 4.92 (br s, 1H), 4.50–4.56 (m, 1H), 3.53–3.3.60 (m, 2H), 3.35–3.42 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.00–2.06 (m, 1H), 1.80–1.96 (m, 4H), 1.11–1.26 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 155.1, 140.9, 131.0, 128.3, 127.8, 126.7, 126.6, 125.9, 120.7, 112.8, 71.2, 40.7, 33.2, 30.3, 25.0, 16.5, 16.3; IR (ATR) v: 3263, 3024, 2953, 2931, 1610, 1535, 1489, 1421, 1275, 1240, 1028, 742, 696 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 351 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₇N₂O₂ (M+1): 351.2073, found: 351.2068.

4-(3-Methylphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (79)

The title compound was synthesized as a white solid (70% yield) according to the procedure described for compound **68**.

Mp: 115°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 7.13–7.28 (m, 6H), 6.68–6.79 (m, 3H), 4.87 (br s, 1H), 4.45–4.51 (m, 1H), 3.58–3.65 (m, 2H), 3.29–3.37 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.01–2.06 (m, 1H), 1.89–1.98 (m, 2H), 1.75–1.84 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 157.1, 140.9, 140.0, 129.3, 128.3, 126.6, 125.9, 121.9, 117.0, 112.9, 71.5, 40.8, 33.2, 30.3, 25.0, 21.5, 16.5; IR (ATR) ν: 3261, 3028, 2954, 2848, 2360, 1614, 1527, 1489, 1421, 1267, 1250, 1169, 1049, 740, 692 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 351 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₇N₂O₂ (M+H): 351.2073, found: 351.2066.

4-(4-Methylphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (80)

The title compound was synthesized as a white solid (83% yield) according to the procedure described for compound **68**.

Mp: 1114°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.23–7.28 (m, 2H), 7.14–7.19 (m, 3H), 7.09 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz), 4.87 (br s, 1H), 4.41–4.46 (m, 1H), 3.58–3.65 (m, 2H), 3.27–3.34 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.00–2.06 (m, 1H), 1.88–1.95 (m, 2H), 1.73–1.82 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 154.9, 140.9, 130.5, 130.0, 128.2, 126.6, 125.9, 116.2, 71.9, 40.8, 33.2, 30.3, 25.0, 20.5, 16.4; IR (ATR) ν: 3348, 2937, 2360, 1618, 1541, 1506, 1221, 1038, 752, 698 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 351 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₇N₂O₂ (M+H): 351.2073, found: 351.2067.

4-(2-Trifluoromethylphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (81)

The title compound was synthesized as a colorless oil (78% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.58 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.23–7.28 (m, 2H), 7.14–7.18 (m, 3H), 6.96–7.02 (m, 2H), 4.92 (br s, 1H), 4.67–4.72 (m, 1H), 3.47–3.52 (m, 4H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.00–2.06 (m, 1H), 1.88–1.93 (m, 4H), 1.17–1.23 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 155.0, 140.9, 133.1, 128.3, 127.5 (q, *J* = 4.9 Hz), 127.4, 126.6, 125.9, 125.0, 122.3, 120.1, 113.5, 71.5, 40.1, 33.2, 29.8, 25.0, 16.5; IR (ATR) ν: 3244, 2954, 2864, 2360, 2343, 1618, 1462, 1321, 1271, 1255, 1242, 1124, 1111, 1034, 746, 694 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 405 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₄F₃N₂O₂ (M+H): 405.1790, found: 405.1784.

4-(3-Trifluoromethylphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (82)

The title compound was synthesized as a colorless oil (88% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.39 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.12–7.28 (m, 7H), 7.06–7.09 (m, 1H), 4.90 (br s, 1H), 4.52–4.57 (m, 1H), 3.58–3.65 (m, 2H), 3.32–3.38 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.01–2.06 (m, 1H), 1.92–2.00 (m, 2H), 1.76–1.85 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.17 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 157.3, 140.9, 131.5–132.5 (q, *J* = 32.1 Hz), 130.1, 128.3, 126.6, 125.9, 125.2, 119.2, 117.7, 112.7, 72.1, 40.7, 33.2, 30.1, 25.0, 16.4; IR (ATR) *v*: 3267, 3032, 2954, 1612, 1448, 1336, 1252, 1234, 1169, 1119, 1039, 863, 795, 744, 694 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 405 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₄F₃N₂O₂ (M+1): 405.1790, found: 405.1784.

4-(4-Trifluoromethylphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (83)

The title compound was synthesized as a colorless oil (100% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.54 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.23–7.27 (m, 2H), 7.15–7.19 (m, 3H), 6.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.93 (br s, 1H), 4.54–4.59 (m, 1H), 3.57–3.64 (m, 2H), 3.31–3.38 (m, 2H), 2.82–2.86 (m, 1H), 2.01–2.05 (m, 1H), 1.92–2.00 (m, 2H), 1.76–1.85 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 159.6, 158.1, 140.8, 128.3, 127.0, 126.6, 126.0, 125.7, 123.2, 122.9, 71.9, 40.7, 33.2, 30.1, 25.0, 16.4; IR (ATR) *v*: 3265, 3026, 2937, 2875, 2360, 2343, 1612, 1541, 1327, 1242, 1151, 1103, 1066, 1026, 831, 746, 696 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 405 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₄F₃N₂O₂ (M+H): 405.1790, found: 405.1784.

4-(2-Methoxyphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (84)

The title compound was synthesized as a colorless oil (29% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.24–7.28 (m, 2H), 7.14–7.19 (m, 3H), 6.86–7.00 (m, 4H), 4.89 (br s, 1H), 4.39–4.45 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.67–3.74 (m, 2H), 3.21–3.28 (m, 2H), 2.82–2.86 (m, 1H), 2.01–2.06 (m, 1H), 1.91–1.98 (m, 2H), 1.78–1.87 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 151.1, 146.4, 140.9, 128.2, 126.6, 125.9, 122.5, 120.8, 118.0, 122.5, 74.1, 55.9, 41.0, 33.2, 30.6, 25.0, 16.4; IR (ATR) *v*: 3311, 2947, 1624, 1525, 1496, 1250, 1221, 1028, 746, 698 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 367 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₇N₂O₃ (M+H): 367.2022, found: 367.2016.

4-(3-Methoxyphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (85)

The title compound was synthesized as a white solid (90% yield) according to the procedure described for compound **68**.

Mp: 100°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.15–7.29 (m, 6H), 6.46–6.54 (m, 3H), 4.90 (br s, 1H), 4.44–4.51 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.58–3.65 (m, 2H), 3.28–3.35 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.00–2.06 (m, 1H), 1.90–1.98 (m, 2H), 1.75–1.83 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.17 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 160.9, 158.3, 158.1, 140.9, 130.0, 128.3, 126.6, 125.9, 108.1, 106.5, 102.6, 71.7, 55.3, 40.8, 33.2, 30.3, 25.0, 16.5; IR (ATR) ν: 3290, 3024, 2929, 2360, 2345, 1614, 1587, 1541, 1489, 1267, 1201, 1173, 1148, 1053, 1030, 906, 841, 754, 744, 696, 680 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 367 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₇N₂O₃ (M+H): 367.2022, found: 367.2016.

4-(4-Methoxyphenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (86)

The title compound was synthesized as a white solid (67% yield) according to the procedure described for compound **68**.

Mp: 120°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.24–7.28 (m, 2H), 7.14–7.19 (m, 3H), 6.80–6.88 (m, 4H), 4.87 (br s, 1H), 4.32–4.38 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.59–3.66 (m, 2H), 3.24–3.32 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.00–2.05 (m, 1H), 1.87–1.95 (m, 2H), 1.73–1.82 (m, 2H), 1.18–1.23 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 154.2, 151.0, 140.9, 128.2, 126.6, 125.9, 117.8, 114.7, 73.0, 55.7, 40.8, 33.2, 30.4, 25.0, 16.4; IR (ATR) ν: 3350, 2953, 2856, 2360, 2343, 1618, 1541, 1504, 1213, 1037, 822, 750, 698 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 367 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₇N₂O₃ (M+H): 367.2022, found: 367.2016.

4-(Biphenyl-2-yloxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (87)

The title compound was synthesized as a pale yellow oil (100% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.50–7.53 (m, 2H), 7.21–7.41 (m, 7H), 7.13–7.18 (m, 3H), 7.03–7.08 (m, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.78 (br s, 1H), 4.42–4.47 (m, 1H), 3.22–3.33 (m, 4H), 2.77–2.83 (m, 1H), 1.96–2.02 (m, 1H), 1.69–1.81 (m, 4H), 1.15–1.21 (m, 1H), 1.07–1.13 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.0, 154.0, 140.9, 138.5, 132.6, 131.2, 129.5, 128.5, 128.3, 127.9, 126.9, 126.6, 125.9, 121.7, 115.3, 72.5, 40.4, 33.1, 30.1, 25.0, 16.4; IR (ATR) ν: 3269, 3059, 3022, 2941, 2360, 2343, 1624, 1541, 1518, 1477, 1423, 1259, 1225, 1205, 1028, 748, 737, 696 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 413 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₇H₂₉N₂O₂ (M+H): 413.2229, found: 413.2224.

4-(Biphenyl-3-yloxy)-N-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (88)

The title compound was synthesized as a colorless oil (33% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.58 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.50 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.12–7.29 (m, 7H), 6.88–6.91 (m, 1H), 4.88 (br s, 1H), 4.54–4.60 (m, 1H), 3.60–3.67 (m, 2H), 3.31–3.38 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 1.93–2.06 (m, 3H), 1.80–1.88 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 1H), 1.11–1.17 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 157.5, 143.0, 140.9, 129.9, 128.7, 128.3, 127.5, 127.1, 126.6, 125.9, 120.1, 115.2, 114.7, 71.8, 40.8, 33.2, 30.3, 25.1, 16.5; IR (ATR) ν: 3302, 3028, 2947, 1622, 1522, 1475, 1267, 1242, 1198, 1026, 754, 694 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 413 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₇H₂₉N₂O₂ (M+H): 413.2229, found: 413.2224.

4-(Biphenyl-4-yloxy)-N-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (89)

The title compound was synthesized as a colorless oil (84% yield) according to the procedure described for compound **68**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.50–7.56 (m, 4H), 7.42 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.15–7.33 (m, 6H), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.88 (br s, 1H), 4.52–4.58 (m, 1H), 3.61–3.68 (m, 2H), 3.32–3.38 (m, 2H), 2.83–2.88 (m, 1H), 1.94–2.07 (m, 3H), 1.81–1.89 (m, 2H), 1.19–1.25 (m, 1H), 1.12–1.17 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 158.1, 156.6, 140.9, 140.6, 134.2, 128.7, 128.3, 128.2, 126.8, 126.7, 126.6, 125.9, 116.3, 71.8, 40.8, 33.2, 30.3, 25.0, 16.5; IR (ATR) ν: 3340, 3032, 2939, 2862, 2362, 1618, 1541, 1483, 1227, 1038, 760, 750, 694 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 413 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₇H₂₉N₂O₂ (M+H): 413.2229, found: 413.2224.

Methyl 2-[(1-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]benzoate

To a solution of methyl 2-[(piperidin-4-yl)oxy]benzoate hydrochloride (342 mg, 1.26 mmol), diisopropylethylamine (430 μl, 2.52 mmol) in toluene (3 ml) was added *trans*-2-phenylcyclopropyl isocyanate (racemic) (200 mg, 1.26 mmol), and the mixture was stirred for 12 h at room temperature. The reaction mixture was then poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and used in the next step without further purification.

2-[(1-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]benzoic acid (90)

To a solution of methyl 2-[(1-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]benzoate (prepared as described above), THF (4 ml) and MeOH (4 ml) was added 2 M NaOH aq. (4 ml), and the

mixture was stirred for 2.5 h. The reaction mixture was then quenched by 5% KHSO₄ aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (MeOH/CHCl₃) to give the title compound (**90**) (224 mg, 2 steps 77%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 8.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.51–7.57 (m, 1H), 7.22–7.28 (m, 2H), 7.11–7.18 (m, 4H), 7.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.00 (br s, 1H), 4.74–4.81 (m, 1H), 3.68–3.75 (m, 2H), 3.27–3.76 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.01–2.14 (m, 3H), 1.84–1.93 (m, 2H), 1.12–1.25 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 166.4, 158.1, 156.0, 140.9, 134.6, 133.7, 128.2, 126.5, 125.9, 122.2, 119.3, 114.2, 75.1, 40.8, 33.2, 30.3, 24.9, 16.4; IR (ATR) *v*: 2931, 2362, 1701, 1599, 1522, 1485, 1456, 1271, 1234, 1024, 750, 696 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 381 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₅N₂O₄ (M+H): 381.1814, found: 381.1809.

3-[(1-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]benzoic acid (91)

The title compound was synthesized as a colorless oil (90% yield) according to the procedure described for compound **90**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.68 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.60 (br s, 1H), 7.32–7.40 (m, 1H), 7.22–7.28 (m, 2H), 7.12–7.18 (m, 4H), 4.94 (br s, 1H), 4.52–4.60 (m, 1H), 3.56–3.65 (m, 2H), 3.31–3.38 (m, 2H), 2.83–2.88 (m, 1H), 2.01–2.06 (m, 1H), 1.91–2.00 (m, 2H), 1.76–1.84 (m, 2H), 1.11–1.25 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 170.6, 158.4, 157.1, 140.8, 129.6, 128.3, 126.5, 125.9, 122.9, 121.8, 116.5, 80.5, 71.9, 40.7, 33.2, 30.1, 25.0, 16.6; IR (ATR) *v*: 2929, 2362, 2343, 1697, 1581, 1522, 1236, 1028, 752, 696, 682 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 381 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₅N₂O₄ (M+H): 381.1814, found: 381.1809.

4-[(1-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]benzoic acid (92)

The title compound was synthesized as a white solid (78% yield) according to the procedure described for compound **90**.

Mp: 173°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, δ): 7.94–7.97 (m, 2H), 7.20–7.25 (m, 2H), 7.09–7.14 (m, 3H), 6.99–7.02 (m, 2H), 4.85–4.88 (m, 1H), 4.67–4.82 (m, 1H), 3.66–3.73 (m, 2H), 3.28–3.36 (m, 2H), 2.72–2.76 (m, 1H), 1.95–2.03 (m, 3H), 1.65–1.74 (m, 2H), 1.12–1.17 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 166.9, 160.7, 157.7, 141.9, 131.4, 128.0, 125.8, 125.3, 122.9, 115.2, 72.4, 40.7, 34.0, 30.3, 24.2, 15.5; IR (ATR) *v*: 3311, 2945, 2480, 2362, 1678, 1601, 1537, 1236, 1176, 1030, 849, 777, 741, 694 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 381 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₅N₂O₄ (M+H): 381.1814, found: 381.1809.

{4-[(1-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]phenyl}acetic acid (93)

The title compound was synthesized as a colorless oil (69% yield) according to the procedure described for compound **90**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.14–7.28 (m, 7H), 6.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.91 (br s, 1H), 4.43–4.48 (m, 1H), 3.55–3.63 (m, 4H), 3.28–3.35 (m, 2H), 2.82–2.86 (m, 1H), 2.00–2.05 (m, 1H), 1.87–1.95 (m, 2H), 1.74–1.82 (m, 2H), 1.17–1.23 (m, 1H), 1.10–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 176.2, 158.5, 156.2, 140.1, 130.5, 128.2, 126.5, 126.4, 125.9, 116.1, 71.6, 40.7, 40.2, 33.2, 30.2, 25.0, 16.6; IR (ATR) ν: 2929, 2362, 2343, 1707, 1603, 1508, 1268, 1230, 1173, 1028, 748, 696 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 395 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₇N₂O₄ (M+H): 395.1971, found: 395.1966.

4-(4-Cyanophenoxy)-*N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]piperidine-1-carboxamide (106)

The title compound was synthesized as a white solid (66% yield) according to the procedure described for compound **68**.

Mp: 182°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.16–7.28 (m, 5H), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.89 (br s, 1H), 4.54–4.61 (m, 1H), 3.57–3.64 (m, 2H), 3.32–3.39 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 1.93–2.06 (m, 3H), 1.77–1.85 (m, 2H), 1.19–1.25 (m, 1H), 1.11–1.16 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 160.6, 157.7, 141.9, 134.2, 128.0, 125.8, 125.3, 119.0, 116.4, 102.6, 72.8, 40.7, 34.0, 30.2, 24.2, 15.5; IR (ATR) ν: 3267, 3026, 2951, 2862, 2360, 2345, 2216, 1616, 1603, 1541, 1504, 1419, 1257, 1240, 1169, 1025, 843, 750, 700 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 362 (M+1); HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₄N₃O₂ (M+H): 362.1869, found: 362.1863.

***N*-[(1*SR*,2*RS*)-2-Phenylcyclopropyl]-4-[4-(2*H*-tetrazol-5-yl)phenoxy]piperidine-1-carboxamide (94)**

A mixture of **106** (110 mg, 0.30 mmol), TMSN₃ (105 mg, 0.91 mmol), and dibutyltin oxide (22 mg, 0.09 mmol) in toluene was stirred overnight at 120°C. MeOH was then added, and the reaction mixture was filtrated. Water was next added to the filtrate, and the whole was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (MeOH/CHCl₃) to give the title compound (**94**) (55 mg, 45%) as an orange oil.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, δ): 7.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.20–7.24 (m, 2H), 7.11–7.115 (m, 5H), 4.67–4.74 (m, 1H), 3.67–3.75 (m, 2H), 3.29–3.36 (m, 2H), 2.72–2.77 (m, 1H), 1.96–2.03 (m, 4H), 1.67–1.76 (m, 2H), 1.12–1.17 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 159.0, 157.7, 155.1, 141.9, 128.5, 128.1, 125.8, 125.3, 117.0, 116.3, 72.5, 40.8, 34.0, 30.3, 24.2, 15.5; IR (ATR) ν: 3419, 2922, 2835, 2752, 2719, 2360, 1605, 1524,

1497, 1242, 1178, 1070, 1022, 928, 839, 752, 700 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 405 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_2$ (M+H): 405.2039, found: 405.2033.

3-Chloro-4-[(1-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]benzoic acid (95)

The title compound was synthesized as a white solid (62% yield) according to the procedure described for compound **90**.

Mp: 172°C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , δ): 7.99 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 1H), 7.18–7.25 (m, 3H), 7.10–7.15 (m, 3H), 4.79–4.84 (m, 1H), 3.59–3.66 (m, 2H), 3.40–3.47 (m, 2H), 3.28–3.31 (m, 1H), 2.72–2.76 (m, 1H), 1.92–2.02 (m, 3H), 1.74–1.83 (m, 2H), 1.13–1.17 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ): 165.9, 157.7, 155.9, 141.9, 131.0, 129.8, 128.0, 125.8, 125.3, 124.0, 122.2, 114.8, 73.6, 40.4, 34.0, 30.0, 24.2, 15.5; IR (ATR) ν : 3329, 2943, 2467, 2360, 1684, 1593, 1533, 1421, 1263, 1238, 1053, 1026, 741, 706, 694 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 415 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_4$ (M+H): 415.1425, found: 415.1419. HPLC; 96.4% (rt; 3.62 min).

{3-Chloro-4-[(1-[(1*SR*,2*RS*)-2-phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]phenyl}acetic acid (96)

The title compound was synthesized as a colorless oil (42% yield) according to the procedure described for compound **90**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.22–7.31 (m, 3H), 7.13–7.18 (m, 3H), 7.07–7.11 (m, 1H), 6.87 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.97 (br s, 1H), 4.48–4.55 (m, 1H), 3.51–3.60 (m, 4H), 3.34–3.43 (m, 2H), 2.82–2.87 (m, 1H), 2.00–2.05 (m, 1H), 1.82–1.91 (m, 4H), 1.11–1.23 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 175.4, 158.5, 151.8, 140.8, 131.4, 128.6, 128.3, 128.0, 126.5, 125.9, 124.4, 116.2, 73.1, 40.5, 40.0, 33.2, 30.0, 25.0, 16.6; IR (ATR) ν : 3340, 2931, 2536, 2362, 1716, 1603, 1522, 1495, 1242, 1059, 1026, 748, 696 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 429 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{ClN}_2\text{O}_4$ (M+H): 429.1581, found: 429.1576. HPLC; 95.2% (rt; 3.76 min).

Ethyl 1-cyano-2,2-dimethyl-3-phenylcyclopropane-1-carboxylate (114)

Ethyl (*E*)-2-cyano-3-phenylacrylate (**113**) (8.0 g, 39.76 mmol), 2-nitropropane (3.54 g, 39.76 mmol) and K_2CO_3 (5.50 g, 39.76 mmol) in EtOH were stirred for 4 h at reflux. The reaction mixture was quenched with sat. NaHCO_3 aq. and extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc = 9:1) to afford the title compound (**114**) (7.34 g, 76%) as a pale yellow oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.28–7.41 (m, 5H), 4.35 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.32 (s, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.35 (s, 3H); MS (ESI) m/z : 244 (M+1).1

(1*SR*,2*RS*)-2,2-Dimethyl-3-phenylcyclopropane-1-carbonitrile (115)

114 (7.34 g, 30.17 mmol), K₂CO₃ (4.60 g, 33.28 mmol) in MeOH / H₂O (55 ml / 15 ml) was stirred for 7.5 h at 80°C. The reaction mixture was evaporated, quenched by 2 M HCl aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was triturated with hexane-EtOAc to give the carboxylic acid (3.45 g) as a white solid.

To the solution of carboxylic acid (3.45 g) in DMSO (30 ml), LiCl (2.72 g, 64.11 mmol) and NaHCO₃ (2.02 g, 24.05 mmol) in H₂O (1.15 g, 64.11 mmol) were added and stirred for 7 h at 180°C. The reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue (2.16 g) was used to the next reaction without further purification.

MS (ESI) *m/z*: 172 (M+1).

(1*SR*,3*RS*)-2,2-Dimethyl-3-phenylcyclopropane-1-carboxylic acid (116)

To the solution of crude **115** (2.16 g) in ethylene glycol (40 ml), KOH (2.83 g, 50.46 mmol) was added and stirred for 13 h. The reaction mixture was quenched with 2 M HCl aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was triturated with hexane-EtOAc to afford the title compound (**116**) (1.56 g, 51 % from **114**) as a pale red solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.29–7.33 (m, 2H), 7.17–7.26 (m, 3H), 2.77 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 1.99 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 0.97 (s, 3H); MS (ESI) *m/z*: 191 (M+1).

Di(1*H*-pyrrol-1-yl)methanone (118)

The mixture of Pyrrole (**117**) (7.45 g, 111 mmol) and CDI (6.0 g, 37 mmol) was stirred for 2 h at 130°C. To the reaction mixture, EtOAc and activated carbon and stirred for 10 min at reflux. The mixture was filtrated, washed with 2 M HCl aq. and brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc = 9:1) to afford the title compound (**118**) (3.63 g, 61%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.31–7.33 (m, 4H), 6.37–6.39 (m, 4H).

1-(1*H*-Pyrrol-1-yl)-2-(triphenyl-*I*5-phosphanylidene)ethan-1-one (119)

To the solution of methyltriphenylphosphonium bromide (6.69 g, 18.73 mmol) in THF (5 ml), PhLi (1.1 M, 17 ml, 18.73 mmol) was added at 0°C. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 h. The

reaction mixture was cooled to -78°C and **118** (1.0 g, 6.24 mmol) in THF (8 ml) was added. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 3 h. Then, the mixture was diluted with water and extracted with EtOAc- CH_2Cl_2 (5:1). The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc = 4:1 to 1:3) to afford the title compound (**119**) (960 mg, 42%) as a pale yellow solid.

MS (ESI) m/z : 370 (M+1).

(E)-3-Phenyl-1-(1H-pyrrol-1-yl)prop-2-en-1-one (120)

The solution of benzaldehyde (200 mg, 1.88 mmol) and **119** (905 mg, 2.45 mmol) in toluene (5 ml) was stirred for overnight at 100°C . The reaction mixture was evaporated and purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc = 9:1) to give the title compound (**120**) (365 mg, 98%) as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 8.00 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 7.61–7.68 (m, 2H), 7.42–7.48 (m, 5H), 7.15 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 6.35–6.37 (m, 2H); MS (ESI) m/z : 198 (M+1).

Ethyl (1*rs*, 2*RS*, 3*SR*)-2,3-diphenylcyclopropanecarboxylate (124c)

To a solution of *cis*-stilbene (1.0 g, 5.55 mmol) and $\text{CuCl}(\text{O}i\text{Pr})_3$ (172 mg, 0.56 mmol) in cyclohexane (2 ml), ethyl diazoacetate (2.53 g, 22.20 mmol) was added at 80°C . The mixture was stirred for 5 h at reflux and additional ethyl diazoacetate (253 g, 22.20 mmol) was added. Subsequently, the reaction mixture was stirred for 6 h and filtrated through alumina powder. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc) to give the title compound (**124c**) (1.04 g, 70%) as a pale yellow oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.08–7.16 (m, 6H), 6.92–6.97 (m, 4H), 4.24 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.06 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.54 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z : 267 (M+1).

(1*rs*, 2*RS*, 3*SR*)-2, 4-Diphenylcyclopropanecarboxylic acid (125c)

To a solution of **124c** (1.34 g, 5.03 mmol) in THF (14 ml), TMSOK (1.29 g, 10.06 mmol) was added and stirred for 2.5 h at 80°C . The reaction mixture was quenched by 1 M HCl aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc) to give the title compound (**125c**) (1.17 g, 98%) as a white solid.

Mp: 150°C ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 12.5 (s, 1H), 6.95–7.17 (m, 10H), 2.93 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.68 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 173.9, 135.4, 128.7, 127.8, 126.3, 25.6, 25.4; IR (ATR)

ν : 2924, 1676, 1443, 1280, 1205, 947, 760, 696 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 239 (M+1). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NaO}_2$ (M+Na): 261.0891, found: 261.0888.

(1SR,2RS,3SR)-2-Methyl-3-phenylcyclopropane-1-carboxylic acid (125a)

The title compound was synthesized as a white solid (8% yield from **123a**) according to the procedure described for compound **125c**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.19–7.34 (m, 5 H), 2.84 (dd, $J = 9.4, 5.1$ Hz, 1H), 1.82–1.90 (m, 2H), 0.94 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z : 177 (M+1).

(1SR,2SR,3SR)-2-methyl-3-phenylcyclopropane-1-carboxylic acid (125b)

The title compound was synthesized as a white solid (11% yield from **123b**) according to the procedure described for compound **125c**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.23–7.28 (m, 2H), 7.16–7.20 (m, 1H), 7.07 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 2.43 (dd, $J = 6.6, 4.9$ Hz, 1H), 2.00 (dd, $J = 9.2, 4.9$ Hz, 1H), 1.71–1.77 (m, 1H), 1.37 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H); MS (ESI) m/z : 177 (M+1).

(1rs,2RS,3SR)-2,3-Bis(4-fluorophenyl)cyclopropane-1-carboxylic acid (125d)

The title compound was synthesized as a white solid (35% yield from **123d**) according to the procedure described for compound **125c**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 6.81–6.91 (m, 8H), 3.08 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.47 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H); MS (ESI) m/z : 275 (M+1).

3-{4-[(1-[(1sr, 2RS, 3SR)-2, 3-Diphenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]phenyl}propanoic acid (103)

To a solution of **125c** (64 mg, 0.27 mmol) and triethylamine (75 μl , 0.54 mmol) in toluene (2 ml), DPPA (64 μl , 0.30 mmol) was added and stirred for 2.5 h at 100°C. The reaction mixture was cooled to ambient temperature, ethyl 3-[4-(piperidin-4-lyloxy)phenyl]propanoate hydrochloride (**126**) (80 mg, 0.27 mmol) was added and stirred for 3 h. The reaction mixture was quenched by water and extracted with EtAOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc) to give ethyl 3-{4-[(1-[(1sr, 2RS, 3SR)-2, 3-diphenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]phenyl}propanoate (75 mg, 54%). The ester (60 mg, 0.12 mmol) was dissolved with THF (2 ml) and MeOH (2 ml). 2 M NaOH aq.

(2 ml) was added to the solution and stirred for overnight at ambient temperature. The reaction mixture was quenched by 5% KHSO₄ aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by recrystallization with hexane - EtOAc to give the title compound (**103**) (38 mg, 67%) as a white solid.

Mp: 175°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 12.07 (s, 1H), 6.98–7.13 (m, 12H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.49 (s, 1H), 3.67–3.75 (m, 2H), 3.45 (s, 1H), 3.08–3.16 (m, 2H), 2.71–2.76 (m, 2H), 2.54 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 2.52 (s, 2H), 2.45–2.51 (m, 2H), 1.84–1.92 (m, 2H), 1.43–1.53 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 173.8, 157.8, 155.2, 137.1, 133.0, 129.2, 128.8, 127.7, 125.7, 115.8, 72.2, 40.8, 36.4, 35.5, 32.1, 30.5, 29.5; IR (ATR) ν: 3325, 2927, 1699, 1618, 1508, 1234, 1024, 754, 694 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 485 (M+1). HRMS (ESI) calcd for C₃₀H₃₃N₂O₄ (M+H): 485.2440, found: 485.2434.

3-{4-[(1-[(1*RS*,3*SR*)-2,2-Dimethyl-3-phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]phenyl}propanoic acid (100**)**

The title compound was synthesized as a white solid (40% yield from **116**) according to the procedure described for compound **103**.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 7.09–7.28 (m, 7H), 6.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.72 (s, 1H), 4.44–4.51 (m, 1H), 3.65–3.76 (m, 2H), 3.33 (br s, 1H), 3.04–3.15 (m, 2H), 2.71–2.80 (m, 3H), 1.82–1.92 (m, 3H), 1.40–1.50 (m, 2H), 1.12 (s, 3H), 0.77 (s, 3H); MS (ESI) *m/z*: 437 (M+1).

3-{4-[(1-[(1*sr*, 2*RS*, 3*SR*)-2-Methyl-3-phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]phenyl}propanoic acid (101**)**

The title compound was synthesized as a white solid (28% yield from **125a**) according to the procedure described for compound **103**.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 7.28–7.31 (m, 4H), 7.17–7.24 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.88 (s, 1H), 4.44–4.49 (m, 1H), 3.59–3.67 (m, 2H), 3.30–3.36 (m, 2H), 2.91 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 2.65 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.18 (dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 1H), 1.89–1.97 (m, 2H), 1.75–1.83 (m, 2H), 1.31 (ddt, *J* = 10.0, 6.3, 4.0 Hz, 1H), 0.9 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); MS (ESI) *m/z*: 423 (M+1).

3-{4-[(1-[(1*sr*, 2*SR*, 3*RS*)-2-Methyl-3-phenylcyclopropyl]carbamoyl]piperidin-4-yl)oxy]phenyl}propanoic acid (102**)**

The title compound was synthesized as a white solid (58% yield from **125b**) according to the procedure described for compound **103**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.13–7.20 (m, 3H), 6.98–7.08 (m, 5H), 6.74–6.76 (m, 2H), 4.75 (s, 1H), 4.35–4.39 (m, 1H), 3.48–3.60 (m, 2H), 3.21–3.29 (m, 2H), 2.90 (ddd, *J* = 7.6, 4.0, 1.8 Hz, 1H), 2.82 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.55 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.83 (s, 2H), 1.71 (s, 2H), 1.53 (dd, *J* = 5.5, 4.0 Hz, 1H), 1.32 (ddt, *J* = 7.6, 6.0, 5.5 Hz, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H); MS (ESI) *m/z*: 423 (M+1).

3-{4-[(1-{{(1*S*, 2*R*, 3*S*)-2,3-Bis(4-fluorophenyl)cyclopropyl]carbamoyl}piperidin-4-yl)oxy]phenyl}propanoic acid (104)

The title compound was synthesized as a white solid (14% yield from **125d**) according to the procedure described for compound **103**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 7.04 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.86–6.97 (m, 4H), 6.72–6.77 (m, 6H), 5.01 (s, 1H), 4.40 (s, 1H), 3.54–3.60 (m, 2H), 3.34–3.27 (m, 3H), 2.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.45 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 1.84–1.89 (m, 2H), 1.69–1.79 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 521 (M+1).

第3章

Biological assay

Calcium mobilization assays were performed with CHO cells stably expressing human muscarinic M₁, M₂, M₃, M₄ or M₅ receptors using a FLIPR^{TETRA} (Fluorometric Imaging Plate Reader: Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA) or FDSS FDSS7000EX System (Functional Drug Screening System: Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka, Japan). Unless otherwise noted, FLIPR^{TETRA} was used. In the case of Gi-coupled receptors (M₂ and M₄), G_{α16} proteins were also co-expressed to increase the sensitivity of calcium signaling. Concentration-response curve of M₁₋₅ receptors activation was analyzed for each compound. The results were imported into Stat Preclinica (Takumi Information Technology Inc., Tokyo, Japan) and analyzed by non-linear curve fitting to give EC₅₀ values.

hERG inhibition

The experiments were performed using an automated planar patch-clamp system QPatch HT (Sophion Bioscience A/S). Pressure was applied to form gigaseals, and whole-cell patch clamp configuration was obtained using the QPatch assay software. Patch-clamp experiments were performed in the voltage-clamp mode, and whole-cell currents were recorded from individual cells. The following stimulation protocol was used to investigate the effects of each test-compound on hERG channel: The membrane potential was held at -80 mV and repetitively (every 15 s) depolarized to +20 mV for 5 s after the pulse and to -50 mV for 20 ms to define baseline followed by repolarization to -50 mV for 5 s to evaluate tail current amplitude. Experiments were conducted at room temperature (22 ± 2°C). To evaluate the effects of test-compounds, the fraction of tail current amplitude was calculated by averaging 3 data points of initial control current and 3 data points of current remaining 5 min after application of each compound. The effects of test-compounds were calculated as percentages of blocked current (inhibition [%]). Data points were fitted with Hill equation to calculate half-maximal inhibition concentrations (IC₅₀ [μM]) using the QPatch Assay software.

Plasma-Brain Exposure Profile PK Study

Test compound was suspended with sterilized 0.5% (w/v) methyl cellulose solution and orally administered to male Sprague–Dawley rats (Charles River Japan, Inc., Kanagawa, Japan) at a dose of 2.5 mg/kg (base form). After 1 hour administration, rats were anesthetized with isoflurane and whole blood was collected via inferior vena cava in sodium heparin. The blood was centrifuged for 15 min at 2500 g at 4 °C and the resulting

plasma was frozen until analyzed. Following the blood collection, the brains were removed and stored at freezer until analysis.

Plasma was deproteinized with 4-fold methanol containing internal standard (100 nmol/L of propranolol), kept in the freezer (ca. -26°C) for more than 30 min and centrifuged at ca 3000g for 5 min at 4°C . The supernatant was filtrated (pore size: $0.45\ \mu\text{m}$) and diluted 2 fold by water. The brains were homogenized in a volume of methanol containing internal standard (in mL) equal to 4-fold weight (in g) of the tissue. The same procedure used as for the plasma.

The supernatants of plasma and brain homogenate extracts were analyzed by means of LC/MS/MS, using an API 2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) mass spectrometer with electrospray ionization interface in positive ion mode. Shimadzu LC-10AD VP pumps (Shimadzu, Kyoto, Japan) were used. The chromatographic separation was achieved on Imtakt Unison UK-C18 column ($2.0 \times 20\ \text{mm}$, $3\ \mu\text{m}$, Imtakt Corporation, Kyoto) at a flow rate of $0.4\ \text{mL/min}$. The gradient program was used with the mobile phase, combining solvent A (Ammonium acetate buffer ($10\ \text{mM}$, $\text{pH}\ 4.0$)) and solvent B (acetonitrile) as follows: 10–90% B for 0–2 min, 90% B for 2–3.5 min, and 10% B for 3.51–5 min. The column temperature was set at 40°C . The software Analyst version 1.4.2 was used to control the instrument and collect data.

Methamphetamine-induced hyperactivity in rats

Male Sprague-Dawley (SD) rats (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) were injected with methamphetamine ($1\ \text{mg/kg}$ i.p.), and individually moved to clear plastic cages. Locomotor activity was measured for 80 min from 10 min after the methamphetamine injection (Supermex ; Muromachi Kikai Co., LTD., Tokyo, Japan). Compound ($1, 3, \text{ or } 10\ \text{mg/kg}$ p.o.) or vehicle was injected 30 min before the methamphetamine injection.

***tert*-Butyl (6-chloropyridin-2-yl)carbamate (**143**)**

6-Chloropyridin-2-amine (**142**) ($2.0\ \text{g}$, $15.6\ \text{mmol}$), NaHMDS ($1.0\ \text{M}$ in THF, $32.7\ \text{ml}$, $32.7\ \text{mmol}$) were dissolved in THF ($16\ \text{ml}$). To the mixture, $(\text{Boc})_2\text{O}$ ($3.73\ \text{g}$, $17.1\ \text{mmol}$) in THF ($16\ \text{ml}$) was added and stirred for overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with EtOAc and $1\ \text{M}$ HCl and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc) to afford the title compound (**143**) ($2.83\ \text{g}$, 67%) as a white solid.

^1H NMR ($400\ \text{MHz}$, CDCl_3 , δ): 7.74 (d, $J = 8.3\ \text{Hz}$, 1H), 7.49 (t, $J = 8.0\ \text{Hz}$, 1H), 7.14 (br s, 1H), 6.86 (d, $J = 8.3\ \text{Hz}$), 1.40 (s, 9H); MS (ESI) m/z : 229 ($\text{M}+1$).

Benzyl 7'-chloro-2'-oxo-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,4'-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine)-1-carboxylate (145)

To the solution of TMEDA (4.40 ml, 28.8 mmol) in THF (10 ml), nBuLi (2.0 M in hexane, 14.4 ml, 28.8 mmol) was added at -20°C and stirred for 30 min. The mixture was cooled to -78°C , then **143** (3.0 g, 13 mmol) in THF (8 ml) was added. After 1h stirring at -50°C , benzyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate (4.59 g, 19.7 mmol) in THF (10 ml) was added to the reaction mixture and stirred for overnight at room temperature. The reaction mixture was quenched with sat. NaHCO_3 aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure to give benzyl 4-{2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-chloropyridin-3-yl}-4-hydroxypiperidine-1-carboxylate (**144**) as a pale yellow oil. To the solution of **144** in THF (30 ml), NaH (325 mg, 13 mmol) was added and stirred for 1h at reflux. The reaction mixture was quenched with sat. NaHCO_3 aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc = 1:7) to afford the title compound (**145**) (890 mg, 17%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.29–7.38 (m, 6H), 7.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.05–4.28 (m, 2H), 3.37 (br s, 2H), 2.02–2.13 (m, 2H), 1.80–1.92 (m, 2H); MS (ESI) m/z : 387 (M+1).

Spiro[piperidine-4,4'-pyrido[2,3-d][1,3]oxazin]-2'(1'H)-one (146)

To the solution of **145** (300 mg, 0.77 mmol) in EtOAc – MeOH (25 ml – 25 ml), 10% Pd/C (100 mg) was added and stirred for 3 days under H_2 atmosphere. The reaction mixture was filtrated and concentrated under reduced pressure to give the title compound (**146**) (100 mg). **146** was used in the next tep without further purification.

MS (ESI) m/z : 220 (M+1).

Ethyl 4-{{2'-oxo-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,4'-pyrido[2,3-d][1,3]oxazin)-1-yl}methyl} piperidine-1-carboxylate (130)

To the solution of **146** (100 mg, 0.46 mmol) in CH_2Cl_2 (5 ml), ethyl 4-formylpiperidine-1-carboxylate (90 mg, 0.49 mmol) and $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (120 mg, 0.57 mmol) were added and stirred for 1h at room temperature. The reaction mixture was quenched with sat. NaHCO_3 aq. and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (CHCl_3 / MeOH = 50:1) to afford the title compound (**130**) (97 mg, 54%) as a pale yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 8.25 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 7.6, 5.1 Hz, 1H), 4.10–4.21 (m, 4H), 2.75 (s, 4H), 2.53–2.64 (m, 2H), 2.28 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.98–2.16 (m, 4H), 1.72–1.81 (m, 1H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.01–1.12 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 389 (M+1).

Ethyl

4-[[1'-methyl-2'-oxo-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,4'-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**129**)

To the solution of **130** (70 mg, 0.18 mmol) in DMF (1 ml), NaH (11 mg, 0.25 mmol) was added and stirred for 20 min at room temperature. MeI (17 μl, 0.28 mmol) was added to the reaction mixture and stirred for overnight at reflux. The reaction was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃ / MeOH = 50 : 1) to afford the title compound (**129**) (43 mg, 60%) as a pale yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 8.29 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 7.5, 5.1 Hz), 4.08–4.13 (m, 4H), 3.48 (s, 3H), 2.74 (s, 4H), 2.51–2.64 (m, 2H), 1.96–2.30 (m, 6H), 1.70–1.80 (m, 1H), 1.12–1.25 (m, 5H); MS (ESI) *m/z*: 403 (M+1).

tert-Butyl 4-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**148**)

To the solution of *tert*-butyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate (**147**) (15.0 g, 75 mmol) in DMF (150 ml), triethyl phosphonoacetate (19.59 ml, 98 mmol) and K₂CO₃ (31.2 g, 226 mmol) were added and stirred for 2 days at 70°C. The reaction mixture was diluted with water and stirred for 10 min to give yellow solid. The solid was filtrated, washed with water and dried under reduced pressure to afford the α,β-unsaturated ester (17.77 g). To the solution of the ester (17.77 g) in DMF (150 ml), DBU (11.46 g, 75 mmol) was added and stirred for 3 days at room temperature. The reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc) to afford the title compound (**148**) (7.16 g, 35%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 5.50 (s, 1H), 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.48 (s, 2H), 2.99 (s, 2H), 2.11 (s, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); MS (ESI) *m/z*: 270 (M+1).

***tert*-Butyl 4-(2-((3-bromopyridin-2-yl)amino)-2-oxoethyl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (149)**

To the solution of **148** (6.0 g, 22.28 mmol) in CH₂Cl₂ (110 ml), 2-amino-3-bromopyridine (3.85 g, 22.28 mmol) and Me₃Al (16.71 ml, 33.4 mmol) were added at 0°C. The mixture was warmed to reflux and stirred for overnight. The reaction mixture was quenched with sat. NaHCO₃ aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc) to afford the title compound (**149**) (2.42 g, 27%) as pale yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 8.34 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.80 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 6.88–6.93 (m, 1H), 5.67 (s, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.49 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 2.16 (s, 2H), 1.40 (s, 9H); MS (ESI) *m/z*: 397 (M+1).

***tert*-Butyl 2'-oxo-2,2',3,3'-tetrahydro-1*H*,1'*H*-spiro(pyridine-4,4'-[1,8]naphthyridine)-1-carboxylate (150)**

To the solution of **140** (1.0 g, 2.52 mmol) in DMA (20 ml), tetrabutylammonium bromide (812 mg, 2.52 mmol) and Pd(OAc)₂ (85 mg, 15 mol%) were added and stirred for overnight at 90°C. The reaction was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with sat. NaHCO₃ aq. and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / EtOAc = 1:1 to 1:5) to afford the title compound (**150**) (450 mg, 57%) as a pale yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 8.91–9.01 (m, 1H), 8.20–8.23 (m, 1H), 7.50–7.55 (m, 1H), 6.95–7.00 (m, 1H), 4.53–4.70 (m, 1H), 3.62–3.80 (m, 1H), 3.06–3.16 (m, 1H), 2.71 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 2.54 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 1.77–1.88 (m, 2H), 1.50 (s, 9H); MS (ESI) *m/z*: 316 (M+1).

1'*H*-Spiro(piperidine-4,4'-[1,8]naphthyridin)-2'(3'*H*)-one (151)

To the solution of **150** (535 mg, 1.70 mmol) in CHCl₃ (3 ml), 4 M HCl in dioxane (3 ml) was added and stirred for 1 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with sat. NaHCO₃ aq. and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford the title compound (**151**) (335 mg). **151** was used in the next step without further purification.

MS (ESI) *m/z*: 218 (M+1).

Ethyl

4-[[2'-oxo-2',3'-dihydro-1'*H*-spiro(piperidine-4,4'-[1,8]naphthyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**131**)

To the solution of **151** (335 mg) in CH₂Cl₂ (4 ml), ethyl 4-formylpiperidine-1-carboxylate (332 mg, 1.79 mmol) and NaBH(OAc)₃ (824 mg, 3.89 mmol) were added and stirred for 1 h at room temperature. The reaction mixture was diluted with sat. NaHCO₃ aq. and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with amino silica gel column chromatography (CHCl₃ / MeOH = 50:1) to give the title compound (**131**) (410 mg, 62% from **150**) as a pale yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 9.11 (s, 1H), 8.23 (dd, *J* = 5.0, 1.8 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 7.6, 5.0 Hz, 1H), 4.02–4.20 (m, 4H), 2.64–2.75 (m, 6H), 2.20–2.32 (m, 4H), 1.95–2.06 (m, 2H), 1.64–1.74 (m, 5H), 1.20–1.27 (m, 3H), 1.01–1.16 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 387 (M+1).

Ethyl

4-[[1'-methyl-2'-oxo-2',3'-dihydro-1'*H*-spiro(piperidine-4,4'-[1,8]naphthyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**132**)

The title compound was synthesized from **131** as a white solid (59% yield) according to the procedure described for compound **129**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.98–8.01 (m, 1H), 7.44 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H), 6.50–6.55 (m, 1H), 4.13–4.19 (m, 4H), 3.31 (s, 2H), 3.13 (s, 3H), 2.70–2.81 (m, 4H), 2.19–2.31 (m, 4H), 2.00–2.11 (m, 2H), 2.00 (s, 2H), 1.97 (s, 2H), 1.59–1.78 (m, 7H), 1.23–1.30 (m, 3H), 1.01–1.17 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 387 (M+1).

4-[[1'-Ethyl-2'-oxo-2',3'-dihydro-1'*H*-spiro(piperidine-4,4'-[1,8]naphthyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**133**)

The title compound was synthesized from **131** as a white solid (81% yield) according to the procedure described for compound **129**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8.26 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 7.6, 4.9 Hz, 1H), 4.07–4.25 (m, 6H), 2.68–2.79 (m, 6H), 2.27–2.35 (m, 2H), 2.23 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.90–2.01 (m, 2H), 1.57–1.79 (m, 5H), 1.20–1.27 (m, 6H), 1.02–1.17 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 168.9, 155.6, 151.0, 146.1, 132.0, 129.2, 118.6, 64.7, 61.1, 49.4, 43.9, 38.8, 35.7, 33.8, 33.7, 33.6, 30.7, 14.7, 13.2; MS (ESI) *m/z*: 415 (M+H); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₃H₃₅N₄O₃ (M+H): 415.2709, found: 415.2704; Anal. calcd for C₂₃H₃₄N₄O₃: C, 66.64; H, 8.27; N, 13.52. Found: C, 66.60; H, 8.26; N, 13.51.

4-[[1'-Propyl-2'-oxo-2',3'-dihydro-1'H-spiro(piperidine-4,4'-[1,8]naphthyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (134)

The title compound was synthesized from **131** as a white solid (42% yield) according to the procedure described for compound **129**.

MS (ESI) m/z : 431 (M+1).

2-Chloro-3-(chloromethyl)pyridine (153)

To the solution (2-chloropyridin-3-yl)methanol (**152**) (25.0 g, 174.0 mmol) in CH₂Cl₂ (100 ml) and toluene (80 ml), thionyl chloride (22.8 g, 191 mmol) was added at 0°C. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 16 h. The reaction mixture was quenched by sat. NaHCO₃ aq. and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with sat. NaHCO₃ aq., dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford the title compound (**153**) (27.4 g) as a pale yellow oil. **153** was used in the next step without further purification.

2-(2-Chloropyridin-3-yl)acetonitrile (154)

To the solution of NaCN (5.3 g, 81 mmol) in EtOH (11 ml) and water (22 ml), **144** (13.0 g) in EtOH (22 ml) was added and stirred at reflux. After 1.5 h, the reaction mixture was cooled to 0°C. To the reaction mixture, ice water was added and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with sat. NaHCO₃ aq., dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford the title compound (**154**) (12.2 g) as a pale yellow oil. **154** was used in the next step without further purification.

MS (ESI) m/z : 153 (M+1).

1-Benzyl-4-(2-chloropyridin-3-yl)piperidine-4-carbonitrile (144)

To the solution of **154** (10.0 g) in DMSO (200 ml), KOH (11.1 g, 197 mmol) and *N*-benzyl-2-chloro-*N*-(2-chloroethyl)ethan-1-amine (15.3 g, 65.8 mmol) were added and stirred for 2.5 h at 50°C. The reaction mixture was dilute with sat. NaHCO₃ aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was triturated with hexae-IPA, filtrated and dried over reduced pressure to afford the title compound (**155**, 64% from **152**) as a pale yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 8.40 (dd, $J = 4.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 1H), 7.43-7.27 (m, 6H), 3.62 (s, 2H), 3.00–3.09 (m, 2H), 2.56–2.65 (m, 2H), 2.47–2.54 (m, 2H), 2.04–2.15 (m, 2H); MS (ESI) m/z : 312 (M+1).

1-Benzyl-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridine) (156)

155 (4.8 g, 15.0 mmol) and $\text{LiAlH}(\text{O}t\text{Bu})_3$ in THF (1.0 M) (76 ml 76.0 mmol) were stirred at reflux. After 20 h, the reaction mixture was cooled to 0°C. To the reaction mixture, sat potassium sodium tartrate tetrahydrate aq. was added and stirred for 30 min at room temperature. The mixture was filtrated through celite pat and extracted with CHCl_3 . The organic layer was washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by recrystallization from hexane-EtOAc to afford the title compound (**156**) (3.3 g, 84%) as a white solid.

Mp 124–126 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7.84 (dd, $J = 5.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.21–7.34 (m, 6H), 6.53 (dd, $J = 7.1, 5.1$ Hz, 1H), 4.42 (br s, 1H), 3.55 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 2.82–2.85 (m, 2H), 2.10–2.15 (m, 2H), 1.85–1.94 (m, 2H), 1.72–1.75 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 163.5, 146.4, 138.2, 129.9, 129.7, 129.2, 128.2, 127.1, 113.4, 163.5, 54.0, 50.2, 42.7, 36.4; IR (ATR) ν : 1612, 771, 744, 694 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 280 ($\text{M}+1$); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3$ ($\text{M}+\text{H}$): 280.1808, found: 280.1813.

1-Benzyl-*N,N*-dimethylspiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridine)-1'(2'*H*)-carboxamide (157)

To a solution of *N,N*-Diisopropylethylamine (105 mL, 752 mmol) and **156** (105 g, 376 mmol) in toluene (250 mL) was added *N,N*-Dimethylcarbamoyl chloride (52 mL, 564 mmol) at room temperature and stirred under reflux for 3 h. After addition of *N,N*-diisopropylethylamine (32 mL, 226 mmol) and *N,N*-dimethylcarbamoyl chloride (10 mL, 113 mmol), the reaction mixture was stirred for 3 h at reflux. The reaction mixture was cooled to room temperature, quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with sat NaHCO_3 aq. and brine, dried over Na_2SO_4 and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure to give the pale yellow solid. The solid was triturated with hexane to afford **157** (119 g, 99%) as pale yellow solid.

Mp 128–129 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 8.05 (dd, $J = 5.4, 1.7$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 7.3, 1.7$ Hz, 1H), 7.26–7.35 (m, 5H), 6.75 (dd, $J = 7.3, 5.4$ Hz, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 3.03 (s, 6H), 2.84–2.87 (m, 2H), 2.15–2.21 (m, 2H), 1.89–1.96 (m, 2H), 1.70–1.73 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 157.6, 157.3, 146.4, 137.8, 132.1, 130.3, 129.2, 128.2, 127.1, 116.2, 63.3, 57.5, 50.1, 39.7, 38.1, 35.5; IR (ATR) ν : 1655, 1416, 1366, 771, 744, 702 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 351 ($\text{M}+1$); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$): 351.2179, found: 351.2183.

***N,N*-Dimethylspiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridine)-1'(2'*H*)-carboxamide (158)**

To a solution of **157** (27.5 g, 78.5 mmol) in MeOH (80 mL) were added HCOONH_4 (24.7g, 392 mmol) and 10% palladium on carbon (5.5 g). The mixture was stirred for 7 h at reflux, cooled to room temperature and

filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with CHCl_3 and washed with water, sat. NaHCO_3 aq. and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to afford the title compound (**158**) (20.4 g) as a pale yellow amorphous. **149** was used in the next step without further purification.

Ethyl

4-[[1'-(dimethylcarbamoyl)-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**139**)

To a solution of **158** (20.4 g), acetic acid (6.7 mL, 117 mmol) and ethyl 4-formylpiperidine-1-carboxylate (14.5 g, 78.2 mmol) in dichloromethane (390 mL) was added $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (24.8 g, 117 mmol) at room temperature and the mixture was stirred for 2 h. The reaction mixture was cooled to 0°C and quenched with sat. NaHCO_3 aq.. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane / AcOEt) to afford the title compound (**139**) (25.3 g, 75% from **158**) as a white solid.

Mp $120\text{--}122^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 8.06 (dd, $J = 5.4, 1.5$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 7.3, 1.5$ Hz, 1H), 6.76 (dd, $J = 7.3, 5.4$ Hz, 1H), 4.13–4.17 (m, 1H), 4.13 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 3.78 (s, 2H), 2.71–2.83 (m, 4H), 2.21 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.11 (t, $J = 10.7$ Hz, 2H), 1.84–1.95 (m, 2H), 1.65–1.82 (m, 8H), 1.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.04–1.18 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 157.7, 157.3, 155.6, 146.5, 132.2, 130.4, 116.2, 64.9, 61.1, 57.5, 50.8, 43.9, 39.9, 38.2, 35.7, 33.7, 30.7, 14.7; IR (ATR) ν : 1420, 1361, 1111, 1080, 768 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 430 (M+1); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_3$ (M+H): 430.2813, found: 430.2824.

1',2'-Dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridine) (**159**)

To the solution of **156** (3.0 g, 10.7 mmol) in MeOH (90 ml), HCOONH_4 (3.4 g, 53.7 mmol) and 10% palladium on carbon (0.6 g) were added. The mixture was stirred for 3 h at reflux, cooled to room temperature and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with CHCl_3 and washed with water, sat NaHCO_3 aq. and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to afford the title compound (**159**) (2.0 g) as a pale yellow amorphous. **159** was used in the next step without further purification.

Ethyl

4-[[1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**160**)

To a solution of **159** (2.0 g), acetic acid (0.9 mL, 16 mmol) and ethyl 4-formylpiperidine-1-carboxylate (1.9 g, 10.2 mmol) in dichloromethane (40 mL) was added NaBH(OAc)₃ (3.4 g, 16 mmol) at room temperature and the mixture was stirred for 15 h. The reaction mixture was quenched with sat NaHCO₃ aq. and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane / AcOEt) to afford the title compound (**160**) (2.0 g, 55% from **156**) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.84–7.88 (m, 1H), 7.23–7.25 (m, 1H), 6.55–6.57 (m, 1H), 4.44 (s, 1H), 4.10–4.16 (m, 4H), 3.44 (s, 2H), 2.72–2.81 (m, 4H), 2.20 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.03–2.06 (m, 2H), 1.88–1.92 (m, 2H), 1.72–1.78 (m, 5H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.10–1.12 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 359 (M+1).

Ethyl

4-[[1'-(ethylcarbamoyl)-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**136**)

The title compound was synthesized as a white solid (56% from **160**) according to the procedure described for compound **157**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 9.05 (s, 1H), 7.99–8.02 (m, 1H), 7.39–7.42 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.80–6.83 (m, 1H), 4.08–4.21 (m, 4H), 3.92 (s, 2H), 3.45 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.75–2.83 (m, 4H), 2.22 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.07–2.14 (m, 3H), 1.67–1.74 (m, 6H), 1.14–1.28 (m, 9H); MS (ESI) *m/z*: 430 (M+1).

Ethyl

4-[[1'-(diethylcarbamoyl)-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**137**)

The title compound was synthesized from **160** as a white solid according to the procedure described for compound **157**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8.01–8.03 (m, 1H), 7.32–7.36 (m, 1H), 6.71–6.75 (m, 1H), 4.09–4.22 (m, 4H), 3.77 (s, 2H), 3.46 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 2.69–2.84 (m, 4H), 2.20 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.07–2.15 (m, 2H), 1.84–1.94 (m, 2H), 1.67–1.81 (m, 4H), 1.20–1.29 (m, 10H), 1.05–1.16 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 458 (M+1).

Ethyl

4-[[1'-(carbamoyl)-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**138**)

The title compound was synthesized from **160** as a white solid according to the procedure described for compound **157**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8.00–8.02 (m, 1H), 7.44–7.47 (m, 1H), 6.85–6.88 (m, 1H), 4.10–4.16 (m, 4H), 3.93 (s, 2H), 2.75–2.84 (m, 4H), 2.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.07–2.10 (m, 2H), 1.88–1.92 (m, 2H), 1.55–1.78 (m, 5H), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.09–1.12 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 402 (M+1).

Ethyl

4-[[1'-(azetidine-1-carbamoyl)-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**140**)

The title compound was synthesized from **160** as a white solid according to the procedure described for compound **157**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8.12 (dd, *J* = 5.1, 1.7 Hz, 1H), 7.35–7.39 (m, 1H), 6.79 (dd, *J* = 7.3, 5.1 Hz, 1H), 4.07–4.25 (m, 7H), 3.84 (s, 2H), 2.68–2.87 (m, 4H), 2.25–2.36 (m, 2H), 2.16–2.22 (m, 2H), 2.05–2.15 (m, 2H), 1.81–1.93 (m, 2H), 1.63–1.80 (m, 4H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.02–1.19 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 442 (M+1).

Ethyl

4-[[1'-(pyrrolidine-1-carbamoyl)-1',2'-dihydrospiro(piperidine-4,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridin)-1-yl]methyl]piperidine-1-carboxylate (**141**)

The title compound was synthesized from **160** as a white solid according to the procedure described for compound **157**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8.05 (dd, *J* = 5.0, 1.8 Hz, 1H), 7.36–7.39 (m, 1H), 6.78 (dd, *J* = 7.2, 5.0 Hz, 1H), 4.08–4.23 (m, 4H), 3.82 (s, 2H), 3.53–3.68 (m, 4H), 2.68–2.85 (m, 3H), 1.61–1.91 (m, 14H), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.04–1.20 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 456 (M+1).

参考文献

1. Wermuth, C. G. 「最新創薬化学上巻」, テクノミック **2004**.
2. 佐藤健太郎 「創薬科学入門-薬はどのようにつくられる?」, オーム社 **2011**.
3. 池田衝, 杉山泰雄 *日本薬理学雑誌* **2001**, 117, 335–342.
4. Ui, M.; Tanaka, Y.; Tsumuraya, T.; Fujii, I.; Inoue, M.; Hirama, M.; Tsumoto, K. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 19440–19447.
5. Corbaz, R.; Gaumann, E. E.; Keller-Schierlein, W.; Kradolfer, F.; Neipp, L.; Prelog, V.; Zahner, H. *Helv. Chim. Acta* **1955**, 38, 1445–1448.
6. Gerlach, H.; Prelog, V. *Liebigs Ann. Chem.* **1963**, 669, 121–135.
7. Nishimura, H. 13pp, FR 1389057, 19650212 *Chem. Abstr.* **1965**, 45, 129.
8. (a) Dominguez, J.; Gerlach, D. H.; Prelog, V. *Helv. Chim. Acta* **1962**, 45, 129–138.; (b) Beck, J.; Gerlach, H.; Prelog, V.; Voser, W. *Helv. Chim. Acta* **1962**, 45, 620–630.
9. (a) Ando, K.; Oishi, H.; Hirano, S.; Okutumi, T.; Suzuki, K.; Okazaki, H.; Sawada, M.; Sagawa, T. *J. Antibiot.* **1971**, 24, 347–352.; (b) Ando, K.; Murakami, Y.; Nawata, Y. *J. Antibiot.* **1971**, 24, 418–423.
10. (a) Keller-Schierlein, W.; Gerlach, H.; Seibl, J. *Antimicrob. Agents & Chemother.-1996* **1967**, 644–650.; (b) Keller-Schierlein W.; Gerlach, H. *Fortschritte Chem. Org. Naturstoff* **1967**, 26, 161–189.; (c) Gerlach, H.; Hutter, R.; Keller-Schierlein, W.; Seibl, J. *Helv. Chim. Acta* **1967**, 50, 1782–1793.
11. (a) Rezanka, T.; Spizek, J.; Prikrylova, V.; Prell, A.; Dembitsky, V. M. *Tetrahedron* **2004**, 60, 4781–4787.; (b) Rezanka, T.; Spizek, J.; Prikrylova, V.; Dembitsky, V. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4239–4244.
12. Graven, N.; Lardy, H. A.; Johnson, D.; Rutter, A. *Biochemistry* **1966**, 5, 1729–1735.
13. (a) Graven, N.; Lardy, H. A.; Rutter, A. *Biochemistry* **1966**, 5, 1735–1742; (b) Graven, N.; Lardy, H. A.; Estrada-O., S. *Biochemistry* **1967**, 6, 365–371.
14. Meyers, E.; Pansy, F. E.; Perlmann, D.; Smith, D. A.; Weisenborn, F. L. *J. Antibiot.* **1965**, 18, 128–129.
15. Lee, J. W.; Priestley, N. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1725–1728.
16. (a) Marie, N. B.; Elene, P.; Marina, F.; Aelette, G.-S. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223, 125–133.; (b) 鶴尾隆, 「薬剤耐性の分子機構」, 羊土社 **1994**.
17. Calleaert, D. M.; Padcliff, G.; Tanouchi, Y.; Shichi, H. *Immunopharmacology* **1988**, 16, 25–32.
18. (a) Makrlík, E.; Toman, P.; Vaňura, P. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, 295, 615–619.; (b) Makrlík, E.; Toman, P.; Vaňura, P. *J. Mol. Struct.* **2013**, 1032, 155–158.
19. Ferraz, M. C. H.; Payret-Arrua, M. E. *Quim. Nova* **1998**, 21, 597–607.
20. (a) Metz, P.; Meiners, U.; Cramer, E.; Frohlich R.; Wibbeling, B. *Chem. Commun.* **1996**, 431–432.; (b)

- Meiners, U.; Cramer, E.; Frohlich, R.; Wibbeling, B.; Metz, P. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2073–2078.
21. Lee, E.; Choi, S. J. *Org. Lett.* **1999**, 1, 1127–1128.
22. Wu, Y.; Sun, Y. *Org. Lett.* **2006**, 8, 2831–2834.
23. Zhou, Y.; Xu, Q.; Zhai, H. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5271–5272.
24. Nikodinovic, J.; Dinges, J. M.; Bergmeier, S. C.; McMills, M. C.; Wright, D. L.; Priestley, N. D. *Org. Lett.* **2006**, 8, 443–445.
25. 阿部正樹, 平成7年度修士論文, 東北大学大学院農学研究科 **1995**.
26. 尾野由紀江, 平成9年度卒業論文, 東北大学農学部 **1997**.
27. Rychnovsky, S. D.; Bartlett, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3963–3964.
28. Gerlach, H.; Thalmann, A. *Helv. Chim. Acta* **1974**, 57, 2661–2663.
29. Takai, K.; Hanadate, T.; Abe, M.; Ono, Y.; Yamada, T.; Kuwahara, S.; Kiyota, H. *Tetrahedron* **2011**, 67, 7066–7072.
30. Luesse, S. B.; Wells, G.; Nayek, A.; Smith, A. E.; Kusche, B. R.; Bergmeier, S. C.; McMills, M. C.; Priestley, N. D.; Wright, D. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 3946–3949.
31. 北爪智哉, 石原孝, 田口武夫 「フッ素の化学」, 講談社サイエンティフィク **1993**.
32. 田口武夫 「フッ素系生理活性物質の合成と応用」, シーエムシー出版 **2000**.
33. Bartoli, G.; Bosco M.; Locatelli M.; Marcantoni, E.; Melchiorre, P.; Sambri, L. *Org. Lett.* **2005**, 7, 427–430.
34. Kubota, T.; Yamamoto, M. *Tetrahedron, Lett.* **1992**, 33, 2603–2606.
35. Luche, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 2226–2227.
36. Martin, D. B.; Martin, J. J. *Org. Chem.* **1983**, 48, 4155–4156.
37. Prakash, G. K. S.; Krishnamurti, R.; Olah, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 393–395.
38. Takai, K.; Hanadate, T.; Oi, S.; Yamada, T.; Kuwahara, S.; Kiyota, H. *Synthesis*, **2011**, 22, 3741–3748.
39. 高井健太郎, 第47回天然有機化合物討論会要旨集, **2006**.
40. (a) Spector, A. A.; Norris, A. W. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, 292, C966–C1012.; (b) Iliff, J. J.; Nelson, J.; Goyagi, T.; Klaus, J.; Alkayed, N. J. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2010**, 91, 68–84.
41. Spiecker, M.; Liao, J, K. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 433, 413–420.
42. Larsen, B. T.; Gutterman, D. D.; Hatoum, O. A. *Eur. J. Clin. Invest.* **2006**, 36, 293–300.
43. Larsen, B. T.; Miura, H.; Hatoum, O. A.; Campbell, W. B.; Hammock, B. D.; Zeldin, D. C.; Falck, J. R.; Gutterman, D. D. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* **2006**, 290, H491–H499.
44. Cowart, L. A.; Wei, S.; Hsu, M. -H.; Johnson, E. F.; Krishna, M. U.; Falck, J. R.; Capdevila, J. H. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35105–35112.

45. Liu, Y.; Zhang, Y.; Schmelzer, K.; Lee, T. -S.; Fang, X.; Zhu, Y.; Spector, A. A.; Gill, S.; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Shyy, J. Y. -J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 16747–16752.
46. Node, K.; Huo, Y.; Ruan, X.; Yang, B.; Spiecker, M.; Ley, K.; Zeldin, D. C.; Liao, J. K. *Science* **1999**, *285*, 1276–1279.
47. Inceoglu, B.; Wagner, K.; Schebb, N. H.; Morisseau, C.; Jinks, S. L.; Ulu, A.; Hegedus, C.; Rose, T.; Brosnan, R.; Hammock, B. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 5093–5097.
48. Phillis, J. W.; Horrocks, L. A.; Farooqui, A. A. *Brain Res. Rev.* **2006**, *52*, 201–243.
49. Jiang, H.; McGiff, J. C.; Quilley, J.; Sacerdoti, D.; Reddy, L. M.; Falck, J. R.; Zhang, F.; Lerea, K. M.; Wong, P. Y. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36412–36418.
50. Pozzi, A.; Macias-Perez, I.; Abair, T.; Wei, S.; Su, Y.; Zent, R.; Falck, J. R.; Capdevila, J. H. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27138–27146.
51. Node, K.; Huo, Y.; Ruan, X.; Yang, B.; Spiecker, M.; Ley, K.; Zeldin, D. C.; Liao, J. K. *Science* **1999**, *285*, 1276–1279.
52. Ng, V. Y.; Huang, Y.; Reddy, L. M.; Falck, J. R.; Lin, E. T.; Kroetz, D. L. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 1126–1134.
53. Zhang, Z.; Hu, D.; Zhou, M.; Liu, H.; Wu, J.; Huang, S.; Wang, D.; Cai, L. *Daru.* **2011**, *19*, 462–468.
54. Spector, A. A.; Norris, A. W. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, *292*, C996–1012.
55. Revermann, M. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *10*, 1–6.
56. (a) Spector, A. A.; Fang, X.; Snyder, G. D.; Weintraub, N. L. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 55–90.; (b) Newman, J. W.; Morisseau, C.; Hammock, B. D. *Prog. Lipid Res.* **2005**, *44*, 1–51.; (c) Chiamvimonvat, N.; Ho, C.; Tsai, H.; Hammock, B. D. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2007**, *50*, 225–237.
57. (a) Gomez, G. A.; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W. *Biochemistry* **2004**, *43*, 4716–4723. (b) Gomez, G. A.; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W. *Protein Science* **2006**, *15*, 58–64.
58. Morisseau, C.; Goodrow, M. H.; Dowdy, D.; Zheng, J.; Greene, J. F.; Sanborn, J. R.; Hammock, B. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8849–8854.
59. Kin, I. -H.; Heirtzler, F. R.; Morisseau, C.; Nishi, K.; Tsai, H. -J.; Hammock, B. D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3621–3629.
60. Morisseau, C.; Goodrow, M. H.; Newman, J. W.; Wheelock, C. E.; Dowdy, D. L.; Hammock, B. D. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 1599–1608.
61. (a) Zhao, X.; Yamamoto, T.; Newman, J. W.; Kim, I. -H.; Watanabe, T.; Hammock, B. D.; Stewart, J.; Pollock, J. S.; Pollock, D. M.; Imig, J. D.; *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 1244–1253. (b) Loch, D.; Hoey,

- A.; Morisseau, C.; Hammock, B. O.; Brown, L. *Cell Biochem. Biophys.* **2007**, *47*, 87–97.
62. Hwang, S. H.; Tsai, H. -J.; Liu, J. -Y.; Morisseau, C.; Hammock, B. D. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3825–3840.
63. (a) Zhang, L. -N.; Vincelette, J.; Chen, D.; Gless, R. D.; Anandan, S. -K.; Rubanyi, G. M.; Webb, H. K.; MacIntyre, E.; Wang, Y. -X. (J.) *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *654*, 68–74. (b) Anandan, S. -K.; Webb, H. K.; Chen, D.; Wang, Y. -X. (J.) Aavula, B. R.; Cases, S.; Cheng, Y.; Do, Z. N.; Mehra, U.; Tran, V.; Vincelette, J.; Waszczuk, J.; White, K.; Wong, K. R.; Zhang, L. -N.; Jones, P. D.; Hammock, B. D. Patel, D. V.; Whitcomb, R.; MacIntyre, E.; Sabry, J.; Gless, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 983–988.
64. Shen, H. C.; Hammock, B. D. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1789–1808.
65. Shen, H. C.; Ding, F. -X.; Deng, Q.; Xu, S.; Chen, H. -S.; Tong, X.; Tong, V.; Zhang, X.; Chen, Y.; Zhou, G.; Pai, L. -Y.; Alonso-Galicia, M.; Zhang, B.; Roy, S.; Tata, J. R.; Berger, J. P.; Colletti, S. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5314–5320.
66. Tanaka, D.; Tsuda, Y.; Shiyama, T.; Nishimura, T.; Chiyo, N.; Tominaga, Y.; Sawada, N.; Mimoto, T.; Kusunose, N. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 851–857.
67. Takai, K.; Nakajima, T.; Takanashi, Y.; Sone, T.; Nariai, T.; Chiyo, N.; Nakatani, S.; Ishikawa, C.; Yamaguchi, N.; Fujita, K.; Yamada, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1548–1557.
68. Khan, Md. A. H.; Neckář, J.; Manthati, V.; Errabelli, R.; Pavlov, T. S.; Staruschenko, A.; Falck, J. R.; Imig, J. D. *Hypertension*, **2013**, *62*, 905–913.
69. Eldrup, A. B.; Soleymanzadeh, F.; Taylor, S. J.; Muegge, I.; Farrow, N. A.; Joseph, D.; McKellop, K.; Man, C. C.; Kukulka, A.; De Lombaert, S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5880–5895.
70. Taylor, S. J.; Soleymanzadeh, F.; Eldrup, A. B.; Farrow, N. A.; Muegge, I.; Kukulka, A.; Kabcenell, A. K.; De Lombaert, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5864–5868.
71. Review of cyclopropane based molecule: De Meijere, A.; Kozhushkov, S. I.; Schill, H. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4926–4996.
72. (a) Shimamoto, K.; Ohfuné, Y. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 407–423.; (b) Collado, I.; Pedregal, C.; Bueno, A. B.; Marcos, A.; González, R.; Blanco-Urgoiti, J.; Pérez-Castells, J.; Schoepp, D. D.; Wright, R. A.; Johnson, B. G.; Kingston, A. E.; Moher, E. D.; Hoard, D. W.; Griffey, K. I.; Tizzano, J. P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 456–466.
73. (a) Wipf, P.; Xiao, J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 103–106.; (b) Reichelt, A.; Martin, S. F. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 433–442.; (c) Mizuno, A.; Miura, S.; Watanabe, M.; Ito, Y.; Yamada, S.; Odagami, T.; Kogami, Y.; Arisawa, M.; Shuto, S. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1686–1689.
74. Onishi, T.; Mukai, C.; Nakagawa, R.; Sekiyama, T.; Aoki, M.; Suzuki, K.; Nakazawa, H.; Ono, N.;

- Ohmura, Y.; Iwayama, S.; Okunishi, M.; Tsuji, T. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 278–282.
75. (a) Kazuta, Y.; Hirano, K.; Natsume, K.; Yamada, S.; Kimura, R.; Matsumoto, S.; Furuichi, K.; Matsuda, A.; Shuto, S. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1980–1988.; (b) Watanabe, M.; Hirokawa, T.; Kobayashi, T.; Yoshida, A.; Ito, Y.; Yamada, S.; Orimoto, N.; Yamasaki, Y.; Arisawa, M.; Shuto, S. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3585–3593.
76. Zhang, Q.; Shi, C.; Zhang, H. R.; Wang, K. K. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7977–7983.
77. Babler, J. H.; Spina, K. P. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1923–1926.
78. Matsunaga, S.; Qin, H.; Sugita, M.; Okada, S.; Kinoshita, T.; Yamagiwa, N.; Shibasaki, M. *Tetrahedron* **2006**, 62, 6630–6639.
79. Merlic, C. A.; Walsh, J. C.; Tantillo, D. J.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3596–3606.
80. Laganis, E. D.; Chenard, B. L. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5831–5834.
81. 長沢栄史, 「日本の毒きのこ」, 学習研究社 **2009**.
82. Bubser, M.; Byun, N.; Wood, M. R.; Jones, C. K. Muscarinic Receptor Pharmacology and Circuitry for the Modulation of Cognition *Muscarinic Receptors*; Fryer, A. D.; Christopoulos, A.; Nathanson, N. M., Eds.; Springer: Berlin Heidelberg, **2012**, pp 121–166., and references are therein.
83. Anagnostaras, S. G.; Murphy, G. G.; Hamilton, S. E.; Mitchell, S. L.; Rhanama, N. P.; Nathanson, N. M.; Silva, A. J. *Nat. Neurosci.* **2002**, 6, 51–58.
84. Bymaster, F. P.; Carter, P. A.; Yamada, M.; Gomeza, J.; Wess, J.; Hamilton, S. E.; Nathanson, N. M.; McKinzie, D. L.; Felder, C. C. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, 17, 1403–1410.
85. Dencker, D.; Wörtwein, G.; Weikop, P.; Jeon, J.; Thomsen, M.; Sager, T. N.; Mørk, A.; Woldbye, D. P.; Wess, J.; Fink-Jensen, A. *J. Neurosci.* **2011**, 31, 5905–5908.
86. Fink-Jensen, A.; Schmidt, L. S.; Dencker, D.; Schüle, C.; Wess, J.; Wörtwein, G.; Woldbye, D. P. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, 656, 39–44.
87. Yamada, M.; Basile, A. S.; Fedorova, I.; Zhang, W.; Duttaroy, A.; Cui, Y.; Lamping, K. G.; Faraci, F. M.; Deng, C. X.; Wess, J. *Life Sci.* **2003**, 74, 345–353.
88. (a) Bodick, N.C.; Offen, W. W.; Levey, A. I.; Cutler, N.R.; Gauthier, S.G.; Satlin, A.; Shannon, H. E.; Tollefson, G. D.; Rasmussen, K.; Bymaster, F. P.; Hurley, D. J.; Potter, W. Z.; Paul, S. M. *Arch. Neurol.* **1997**, 54, 465–473.; (b) Shekhar, A.; Potter, W. Z.; Lightfoot, J.; Lienemann, J.; Dube, S. Mallinckrodt, C.; Bymaster, F. P.; McKinzie, D. L.; Felder, C. C. *Am. J. Psychiatry* **2008**, 165, 1033–1039.
89. Woolley, M. L.; Carter, H. J.; Gartlon, J. E.; Watson, J. M.; Dawson, L. A. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, 603, 147–149.
90. Lieberman, J. A.; Stroup, T. S.; McEvoy, J. P.; Swartz, M. S.; Rosenheck, R. A.; Perkins, D. O.; Keefe, R.

- S.; Davis, S. M.; Davis, C. E.; Lebowitz, B. D.; Severe, J.; Hsiao, J. K.; Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. *N. Engl. J. Med.* **2005**, 353, 1209–1223.
91. Wess, J. *Crit. Rev. Neurobiol.* **1996**, 10, 69–99.
92. Jacobson, M. A.; Kreamsoulas, C.; Pascarella, D. M.; O'Brien, J. A.; Sur, C. *Mol. Pharmacol.* **2010**, 78, 648–657.
93. Tarr, J. C.; Turlington, M. L.; Reid, P. R.; Utley, T. J.; Sheffler, D. J.; Cho, H. P.; Klar, R.; Pancani, T.; Klein, M. T.; Bridges, T. M.; Morrison, R. D.; Blobaum, A. L.; Xiang, Z.; Daniels, J. S.; Niswender, C. M.; Conn, P. J.; Wood, R. M.; Lindsley, C. W. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, 3, 884–895.
94. Valant, C.; Felder, C. C.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. *Mol. Pharmacol.*, **2012**, 81, 41–52.
95. (a) Brady, A. E.; Jones, C. K.; Bridges, T. M.; Kennedy, J. P.; Thompson, A. D.; Heiman, J. U.; Breininger, M. L.; Gentry, P. R.; Yin, H.; Jadhav, S. B.; Shirey, J. K.; Conn, P. J.; Lindsley, C. W. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 327, 941–953.; (b) Dencker, D.; Weikop, P.; Sørensen, G.; Woldbye, D. P. D.; Wörtwein, G.; Wess, J.; Fink-Jensen, A. *Psychopharmacology* **2012**, 224, 277–287.
96. Suwa, A.; Konishi, Y.; Uruno, Y.; Takai, K.; Nakako, T.; Sakai, M.; Enomoto, T.; Ochi, Y.; Matsuda, H.; Kitamura, A.; Uematsu, Y.; Kiyoshi, A.; Sumiyoshi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 2909–2912.
97. Sumiyoshi, T.; Enomoto, T.; Takai, K.; Takahashi, Y.; Konishi, Y.; Uruno, Y.; Tojo, K.; Suwa, A.; Matsuda, H.; Nakako, T.; Sakai, M.; Kitamura, A.; Uematsu, Y.; Kiyoshi, A. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 244–248.
98. (a) WO 2006/023852.; (b) WO 2007/076070.; (c) WO 2007/100670
99. Takai, K.; Inoue, Y.; Konishi, Y.; Suwa, A.; Uruno, Y.; Matsuda, H.; Nakako, T.; Sakai, M.; Nishikawa, H.; Hashimoto, G.; Enomoto, T.; Kitamura, A.; Uematsu, Y.; Kiyoshi, A.; Sumiyoshi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 4644–4647.
100. Takai, K.; Inoue, Y.; Konishi, Y.; Suwa, A.; Uruno, Y.; Matsuda, H.; Nakako, T.; Sakai, M.; Nishikawa, H.; Hashimoto, G.; Enomoto, T.; Kitamura, A.; Uematsu, Y.; Kiyoshi, A.; Sumiyoshi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 3189–3193.
101. Burgey, C. S.; Potteiger, C. M.; Deng, J. Z.; Mosser, S. D.; Salvatore, C. A.; Yu, S.; Roller, S.; Kane, S. A.; Vacca, J. P.; Williams, T. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6368–6372.
102. Uruno, Y.; Tanaka, A.; Hashimoto, K.; Usui, S.; Inoue, Y.; Konishi, Y.; Suwa, A.; Takai, K.; Katoda, W.; Fujiwara, N.; Sumiyoshi, T. *Tetrahedron* **2013**, 69, 9675–9681.

謝辞

本博士論文研究は、東北大学大学院農学研究科、及び大日本住友製薬（株）旧化学研究所で行い、大変多くの方々より御指導、御協力を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり特段の御配慮、そして終始変わらぬ有益な御指導、御助言を賜りました東北大学大学院農学研究科 桑原重文先生に謹んで感謝申し上げます。

直接御指導、御鞭撻を頂き、本博士論文作成の際には全編にわたり御助言を賜りました岡山大学大学院環境生命科学研究科 清田洋正先生に心から感謝申し上げます。

本博士論文を査読して頂きました東北大学農学部農学研究科 宮澤陽夫先生、此木敬一先生に深く感謝致します。

各種スペクトル測定を始め、研究を円滑に進行できるよう図って頂きました山田てい子技官に深く感謝致します。

X線結晶構造解析を測定していただいた東北大学大学院工学研究科 大井秀一先生に深く感謝致します。

本研究を開始するにあたり、前任者である花館忠篤博士の築いた基礎を大いに参考とさせて頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

本博士論文研究を進めるにあたり、寛大な御理解と御支援を賜りました大日本住友製薬（株）先端創薬研究所 石山健夫所長、磯部義明シニアスペシャリストに深く感謝申し上げます。

終始格別の御配慮と激励を賜りました藤原範雄博士に深く感謝致します。

共同研究者として有益な御指導、御助言を賜り、論文作成の機会を与えて頂きました曾根俊彦博士、住吉孝明博士、多くの御助力を頂きました中嶋友子氏、井上泰尚博士、諏訪篤志博士、東條健剛氏、小西康子氏、宇留野義治博士を初めとする旧化学研究所の皆様、薬理実験を担当して頂きました成相哲朗博士、石川千尋氏、榎本健史博士、酒井睦子氏、松田晴美氏、仲子友和氏を初めとする旧薬理研究所の皆様、X線結晶構造解析を担当して頂きました千代直樹氏を初めとするゲノム科学研究所の皆様、安全性試験を実施して頂きました旧安全性研究所の皆様、薬物動態評価を実施して頂きました旧薬物動態研究所の皆様心から感謝申し上げます。

最後に、本研究に際し、終始変わらぬ暖かな御支援を賜りました両親、そして妻と息子に深く感謝致します。