

学位論文

抗乾癬作用を有する
新規 MALT1 阻害薬の創製研究

東レ株式会社

浅場 絢ヌネツ

目次

1. 序論	1
2. 本論	
(1) 起点化合物の同定	5
(2) スルホニルグアニジン構造を有する MALT1 阻害化合物の創出	19
(3) 経口投与で抗乾癬作用を有する MALT1 阻害化合物 68 の創出	29
(4) Docking study による推定結合様式の同定	34
3. 総括	40
4. 実験の部	41
引用文献	100
文献目録	104
謝辞	105

略語表

本文中の略語は以下に示す一覧に従う。

Ac: acetyl

Ac-LRSR-AMC: Ac-Leu-Arg-Ser-Arg-AMC

AMC: 7-amino-4-methylcoumarin

API: apoptosis inhibitor

ATR: attenuated total reflection

AUC: area under curve

BA: bioavailability

BBB: blood brain barrier

Bcl10: B-cell lymphoma/leukemia 10

Bn: benzyl

Boc: *tert*-butoxycarbonyl

C_{5min}: concentration at 5-minute time point

CARD: caspase recruitment domain-containing protein

CBM: Bcl10-CARD11-MALT1

Cbz: benzyloxycarbonyl

CHAPS: 3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate

CL_{int}: intrinsic clearance rate

CL_{tot}: total clearance rate

C_{max}: maximum observed concentration

CYLD: cylindromatosis

DME: 1,2-dimethoxyethane

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine

DTT: dithiothreitol

EDCI: 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide

ELISA: enzyme-linked immuno-sorbent assay

Et: ethyl

ESI: electrospray ionization

fmk: fluoromethylketone

GBVI/WSA: generalized-born volume integral/weighted surface area

GEO: gene expression omnibus
HATU: 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
HOBt: 1-hydroxybenzotriazole
HPLC: high performance liquid chromatography
HRMS: high resolution mass spectrometer
IC₅₀: 50% inhibition concentration
IκB: i kappa B
IKK: i kappa B kinase
IL: interleukin
K_m: Michaelis constant
LC: liquid chromatography
LogP: Log₁₀(partition coefficient)
MALT1: mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1
MC: methylcellulose
Me: methyl
MES: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid
MS: mass spectrometer
MTBE: methyl *tert*-butyl ether
MW: microwave
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NEMO: NF-κB essential modulator
NF-κB: nuclear factor-kappa B
NMR: nuclear magnetic resonance
Ns: 2-nitrobenzenesulfonyl
PDB: protein data bank
Ph: phenyl
PK: pharmacokinetics
PKC: protein kinase C
PMA: 4β-phorbol 12-myristate 13-acetate
RFU: relative fluorescence units
Ro5: rule of five
SAR: structure-activity relationship
SEM: standard error of the mean
t_{1/2}: half-life
TEA: triethylamine

Tf: triflyl

TFA: trifluoroacetic acid

THF: tetrahydrofuran

TLC: thin-layer chromatography

T_{max}: time to maximum plasma concentration

TMS: trimethylsilyl/ tetramethylsilane

TNF: tumor necrosis factor

TRAF6: TNF receptor-associated factor 6

UV: ultraviolet

V_{max}: maximum velocity

Z: Cbz

Z-VAD-fmk: Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fmk

Z-VRPR-fmk: Z-Val-Arg-Pro-DL-Arg-fmk

1. 序論

乾癬は、真皮血管の拡張と免疫細胞の浸潤による鱗屑と紅斑を伴う表皮の肥厚を特徴とする慢性の自己炎症性皮膚疾患であり、世界人口の 2~3%が罹患していると推定されている^{1,2}。多くの場合、関節症性乾癬などの合併症を伴うため、社会的、心理的負担が非常に大きい²⁻⁴。主な薬物治療法は、シクロスポリンやメトトレキサートなどの免疫抑制剤や IL-17a、IL-23、TNF などの重要なサイトカインを標的とする生物学的製剤である。現行の治療薬は、望ましくない副作用を伴う可能性や高い製造コストなどの課題を抱えており、代替となる治療薬のニーズが高まっている⁵。近年、乾癬に関連する CARD14 の遺伝子変異を報告する研究が増えており、患者で見つかった CARD14 変異のいくつかは、核内因子- κ B (NF- κ B) の活性化を促進したと報告している⁶⁻⁸。また、MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1) プロテアーゼ活性を阻害することで、ヒト初代ケラチノサイトにおいて高活性 CARD14 変異体の過剰発現によって誘導されるサイトカインおよびケモカインの発現を減少させることが報告されている^{9,10}。NCBI が提供・管理するヒトの遺伝子発現情報データベース GEO (Gene Expression Omnibus) における健常人・乾癬患者皮膚における MALT1 遺伝子の発現解析から、乾癬患者皮膚の病変部位で特異的に MALT1 遺伝子が高発現していることを我々は明らかにした (図 1)。そのため、MALT1 を介した NF- κ B 機能の調節は、乾癬の治療標的として有望である。

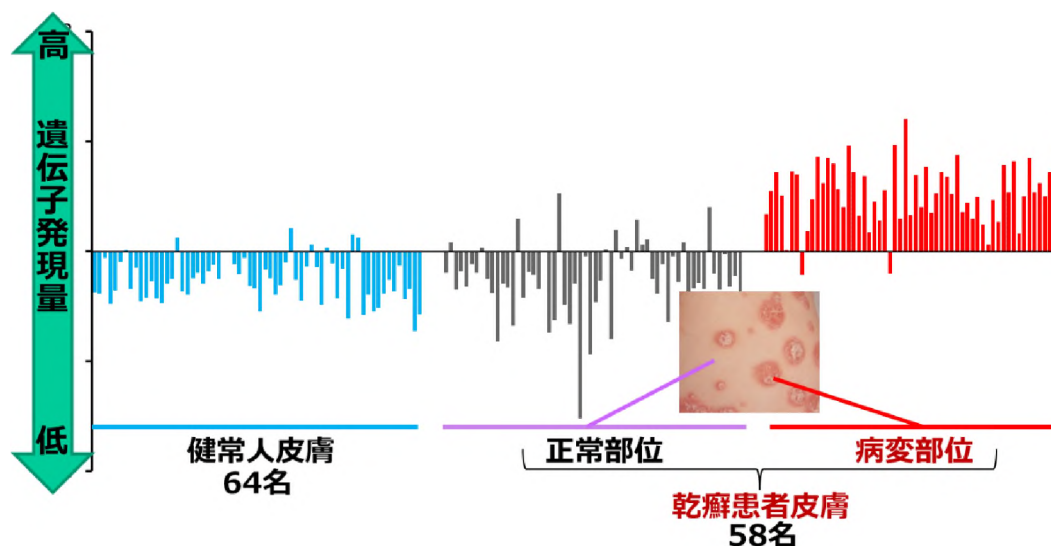


図 1 健常人および乾癬患者皮膚における MALT1 遺伝子の発現

転写因子の NF- κ B ファミリーは、免疫細胞の発生、恒常性、生存、機能など、免疫システムにおいて中心的な役割を果たすと考えられており¹¹⁻¹⁴、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、I 型糖尿病、多発性硬化症、炎症性腸疾患など、いくつかの自己

免疫疾患の発症に関与していることが報告されている¹⁵⁻²¹。NF- κ B は正常な免疫反応では一過性に活性化している。しかし、自己免疫疾患に罹患した組織では NF- κ B が慢性的に活性化し、過剰な炎症性サイトカインやケモカインを誘導することで、自己免疫疾患につながる。

MALT1 遺伝子は、MALT リンパ腫において、API2 遺伝子に転座するがん遺伝子として発見された²²。MALT1 遺伝子にコードされるタンパク質（以下、MALT1 と記載する）は、NF- κ B シグナル伝達の活性化と、このシグナル伝達に必要な負のフィードバックループに関与することで、T 細胞を含むリンパ球の活性化に重要な役割を果たしている（図2）²³⁻²⁷。抗原が T 細胞レセプターを刺激すると、プロテインキナーゼ C (PKC) が活性化し、足場タンパク質 CARD11 のリン酸化が引き起こされる。リン酸化によりコンフォメーションが変化して活性化した CARD11 により MALT1 と複合体を形成した Bcl10 がリクルートされ、Bcl10-CARD11-MALT1 (CBM) 複合体を形成する。CARD14 は CARD11 と同様に足場タンパク質として機能する（リンパ球では CARD11、ケラチノサイトでは CARD14 により CBM 複合体が形成される）。CBM 複合体はさらに TRAF6 をリクルートする。Bcl10 と MALT1 は、TRAF6 と結合し、TRAF6 を活性化する。活性化した TRAF6 は、MALT1 をポリユビキチン化し、NEMO のドッキングサイトを形成する。その後、TRAF6 によって NEMO 自身がポリユビキチン化され、IKK 複合体のリクルートと活性化を促進する。最後に、IKK 複合体によって NF- κ B 阻害因子である I κ B α （細胞質側で NF- κ B をトラップしている）がリン酸

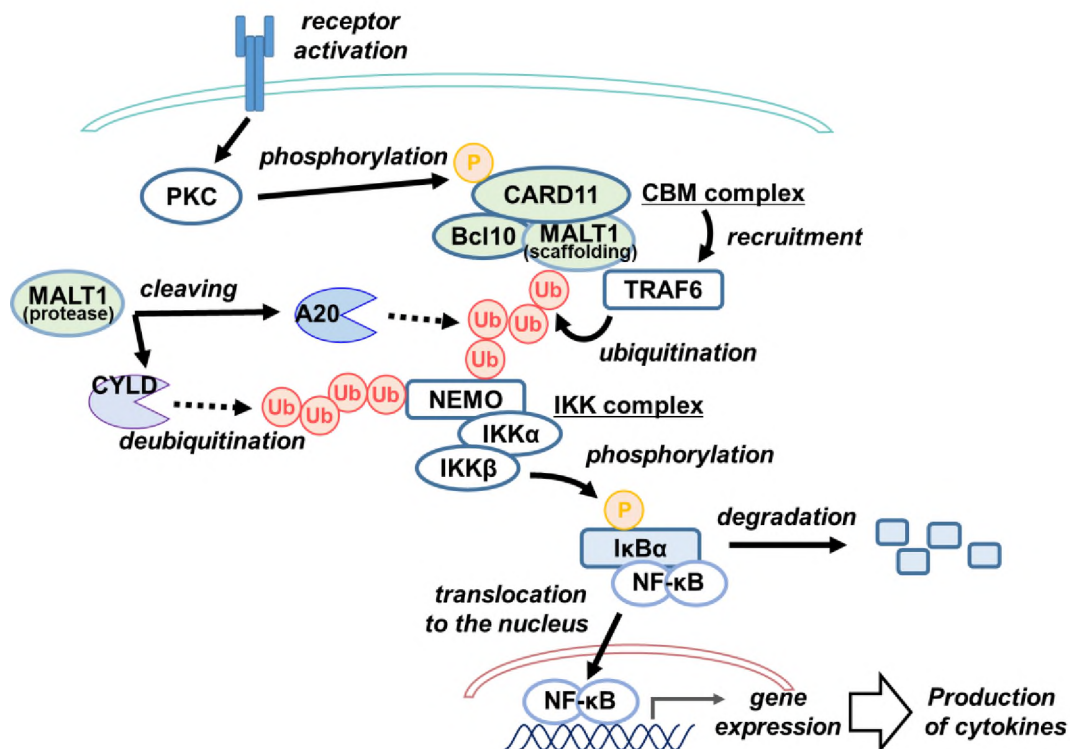


図2 NF- κ B シグナル伝達経路と MALT1 タンパク質

化される。リン酸化された I κ B α は、ポリユビキチン化とそれに続くプロテアソーム分解を受ける。そして、遊離した NF- κ B は核に移行し、炎症標的遺伝子の発現を促進する。一方、持続的な NF- κ B 活性化を防ぐために、脱ユビキチナーゼ A20 や CYLD が NF- κ B シグナル伝達タンパク質のポリユビキチン鎖を除去し不活性化する。MALT1 は、前述の足場タンパク質としての機能に加えて、システインプロテアーゼとしても機能し、CYLD や A20 などのタンパク質を分解する。これらのタンパク質は NF- κ B シグナルの負の制御因子として働くため、MALT1 依存的なこれらの基質の分解は T 細胞の活性化を増幅させる。

MALT1 の結晶構造は、複数の研究グループによって解析されている。初期に報告されたアポ体 (ligand-free) ²⁸ や阻害剤 Z-VRPR-fmk との共結晶構造 ²⁹ の解析から、リガンドが存在しない場合、MALT1 は不活性型で存在しており、リガンドの結合とパラカスパーゼドメインの二量体化によって活性化されることが明らかになった。その後、複数のアロステリック阻害剤との共結晶構造が報告され、パラカスパーゼドメインと Ig ドメインの界面にアロステリック部位があることが示された (図 3 右) ^{30a,31}。

これまでに様々なタイプの MALT1 阻害剤が報告されている (図 3 左) ³²。Z-VRPR-fmk³³ および MI-2³⁴ は、オルソステリックサイトの触媒残基 Cys464 に共有結合する阻害剤である。一方、メパジンやチオリダジンなどのフェノチアジン誘導体 ³⁰、MLT-985³¹ および JNJ-67856633³⁵ は、アロステリック部位に結合する阻害剤である。一般的に、同種酵素間で類似した結合ポケット形状を持つ活性中心に対する阻害剤に比べて、アロステリック部位に対する阻害剤の方が、同種酵素に対する選択性を高めやすく、副作用や毒性を回避しやすいと考えられている。また、研究開始当時、経口投与で抗乾癬作用を示す MALT1 阻害化合物の報告は存在しなかった (2023/8 現在でも Nuffel らによる 1 例のみである²)。

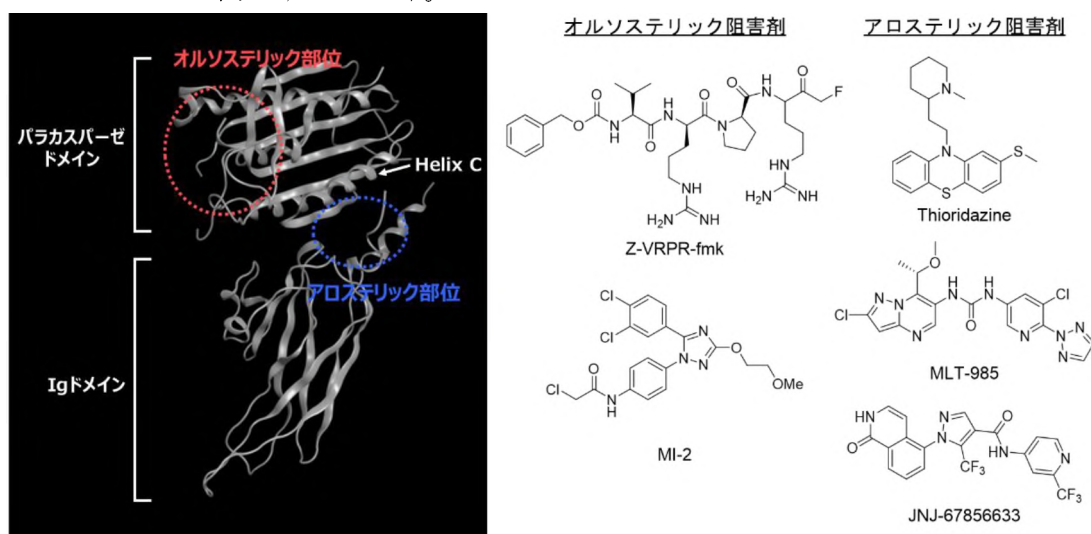


図 3 MALT1 タンパク質 (アポ体) の結晶構造 (左) と既知の MALT1 阻害剤 (右)

以上のことから、乾癬の治療標的として MALT1 タンパク質の阻害が有効と考えられる。本論では、経口投与が可能であり、*in vivo* における乾癬症状への有効性を示す、MALT1 タンパク質に対する新規アロステリック低分子阻害剤の創出を目的とし、その合成、設計および薬理作用について述べる。

2. 本論

(1) 起点化合物の同定

我々は、MALT1 タンパク質に対する低分子阻害剤を同定するために、MALT1 タンパク質との分子ドッキングシミュレーションを実施した (図 4)。自社ライブラリや市販化合物ライブラリの中から、①分子量や疎水性、官能基の種類などの構造多様性と、②既存 MALT1 阻害化合物の部分構造の 2 つの観点からドッキングに適用する *in silico* スクリーニングライブラリを構築した。自社ライブラリからの選出においては、例えば、分子量 600 以下、ClogP (ChemDraw) 6 以下、既存 MALT1 阻害化合物部分構造 (グアニジン構造、ジフェニルトリアゾール構造とその類縁構造、フェノチアジン構造とその類縁構造など) を有することなどの特徴から化合物を選出した。ヒット化合物同定の段階では、より多様な骨格を選出するために、Ro5 (rule of five) を逸脱した分子特性を含めた。これは、Ro5 を外れていたとしても、ヒット化合物に対する不要部分構造の削除 (必須構造要件の抽出) によって Ro5 を満たす化合物へと変換できる可能性があると考えたためである。また、MALT1 タンパク質とアロステリック阻害剤であるチオリダジンとの複合体の結晶構造 (PDB ID: 4I1R) からドッキングモデルを構築し、ライブラリ化合物の MALT1 タンパク質への結合親和性をシミュレーションした。上位にランクされた化合物を選抜し、酵素生化学的アッセイを実施したところ、非常に弱いながらも MALT1 プロテアーゼ活性に対して阻害作用を示すヒット化合物 1 が同定された。

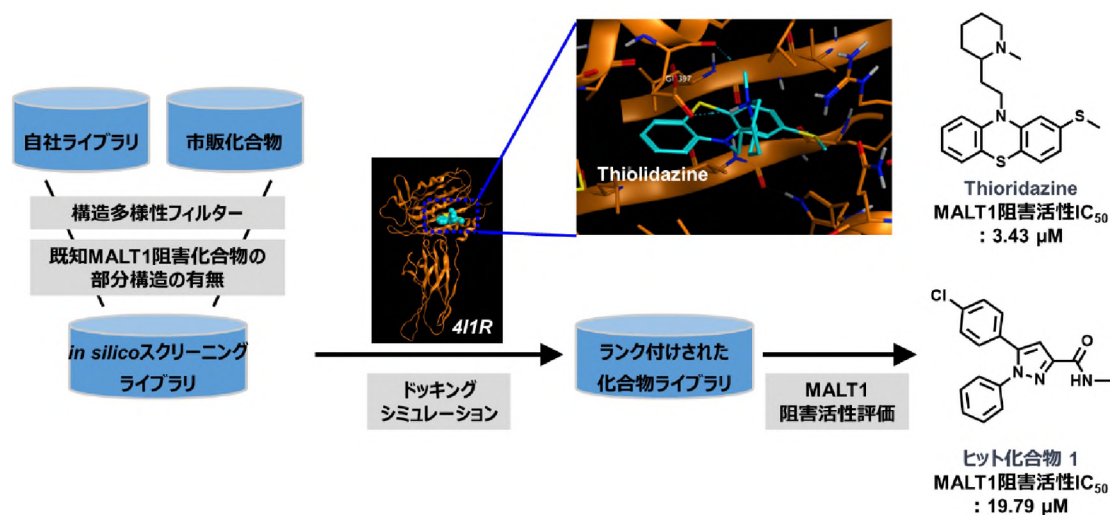


図 4 スクリーニングライブラリに対するドッキングシミュレーションに基づくヒット化合物の探索

ソフトウェア MOE (CCG 社) を使用して、MALT1 タンパク質へのヒット化合物 **1** のドッキングポーズを以下の条件でシミュレーションした (図 5)。1,5-ジフェニルピラゾールの 2 つのフェニル基は、チオリダジンのフェノチアジン部分と同様の位置にあることが示された。また、この結合様式では、**1** の *N*-メチルアミド窒素と 397 番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸 (以下、Glu397 と称する) の間に水素結合が形成されていることを示していた。これもチオリダジンと類似した特徴である^{30a}。

【ドッキングシミュレーション条件 (使用ソフトウェア : MOE)】

受容体原子 : 4I1R (PDB ID)

リガンド結合部位 : Ligand Atoms

配置探索手法 : Triangle Matcher (Method), London dG (Score)

構造最適化手法 : Rigid Receptor (Method), GBVI/WSA dG (Score)

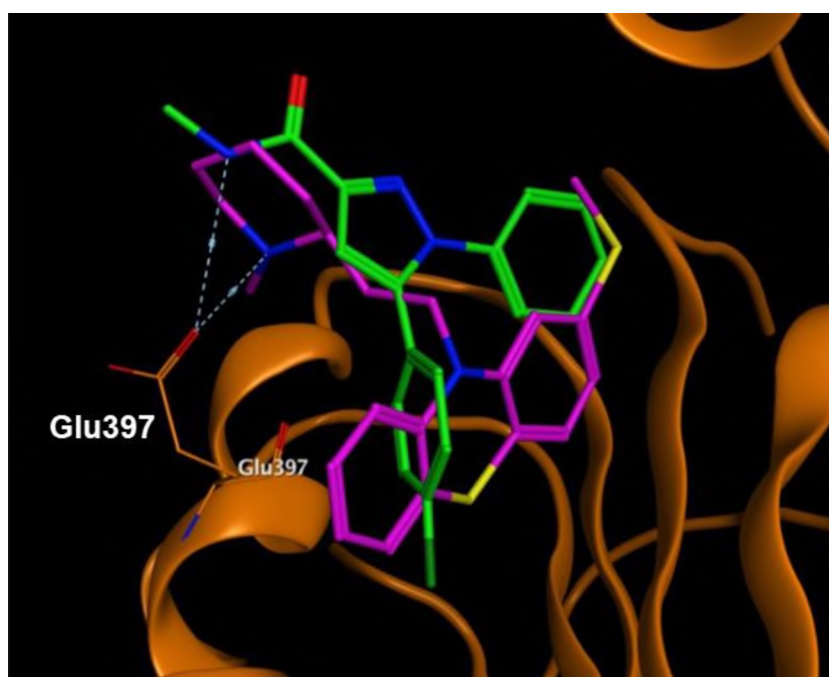


図 5 チオリダジン (紫) と結合した MALT1 の結晶構造 (PDB ID: 4I1R) におけるヒット化合物 **1** (緑) の推定結合様式

MOE の Surfaces and Maps 機能を使い、チオリダジンの結合ポケット形状を可視化した (図 6)。タンパク質表面において、疎水性部位は緑、極性部位は紫、溶媒露出部位は赤で示されている。結合ポケット内部の大部分が疎水性環境であり (図 6 左)、平らに広がった空間であった (図 6 中央)。その部位へ平面性・疎水性の高いフェノチアジン部位が占めることで強い疎水性相互作用を獲得していると考えられる。チオリダジンと同様に、ヒット化合物 **1** の 2 つのフェニル基はこの疎水性ポケットに位置することで、MALT1 阻害活性に重要な役割を果たしていると考えられた。一方で、溶媒露

出部位に近い Glu397 付近には、チオリダジンのピペリジン部位が配置されている。MOE によるドッキングシミュレーションの評価スコア S (kcal/mol) を比較すると、チオリダジン (-7.67 kcal/mol) の方がヒット化合物 **1** (-6.48 kcal/mol) より良好なスコアを示していた。これは、おそらく、ピペリジンと Glu397 との強い水素結合相互作用に起因すると考えられる (図7)。そこで、チオリダジンと同様に、強い水素結合相互作用を獲得することで MALT1 阻害活性の向上が期待できると考えた。

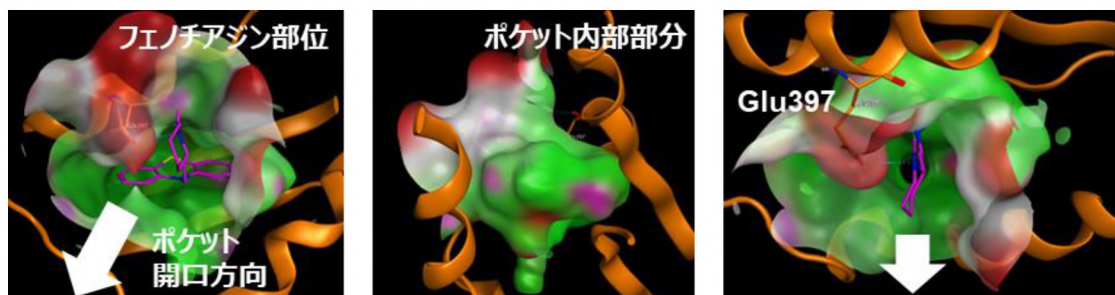


図6 チオリダジンとの共結晶構造 (PDB ID: 4I1R) における結合ポケット形状 (緑：疎水性部位、紫：極性部位、赤：溶媒露出部位)

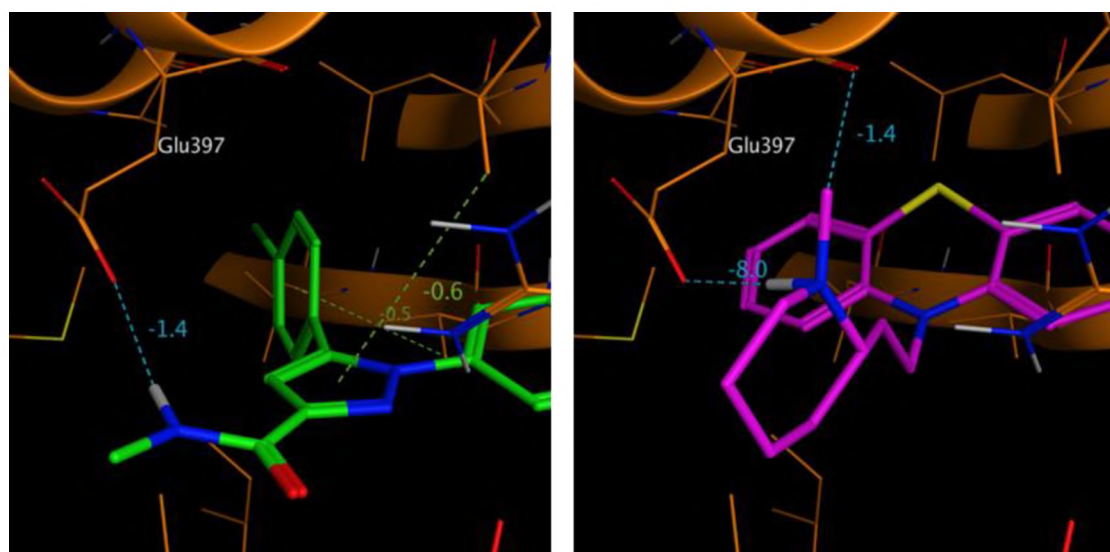


図7 Glu397 との水素結合相互作用 (左：ヒット化合物 **1**、右：チオリダジン、数値は相互作用エネルギー (kcal/mol))

我々は、ヒット化合物 **1** を探索の起点に選択し、構造活性情報の取得ならびに MALT1 阻害活性向上を目的として、上記のドッキングシミュレーション結果に対する考察に基づき、MALT1 阻害活性に強く影響を与えると考えられる 3 つの部位 (①1 位フェニル部位、②5 位フェニル部位、③アミド部位) を探索することとした (図 8)。

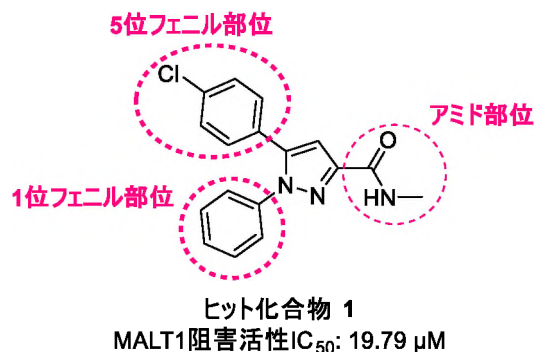
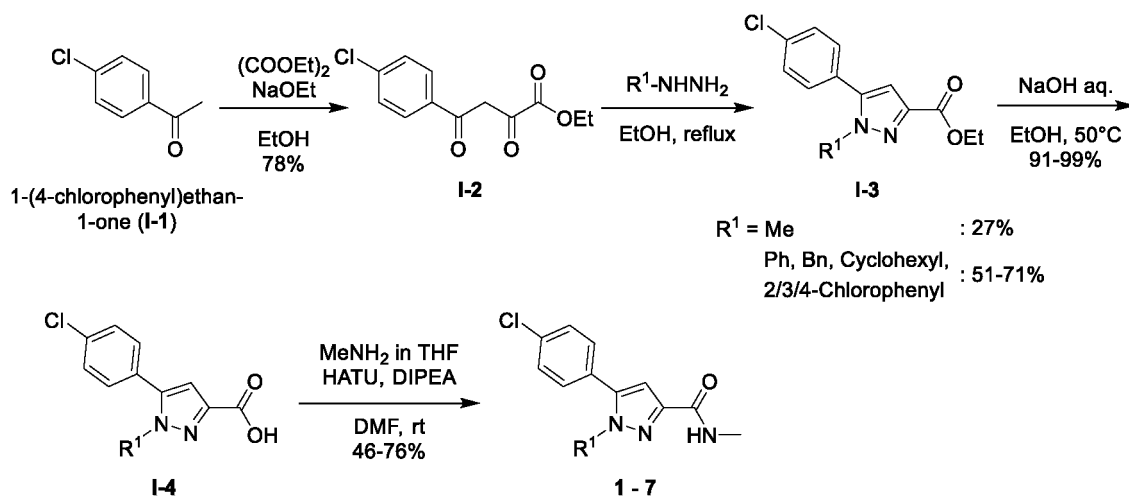


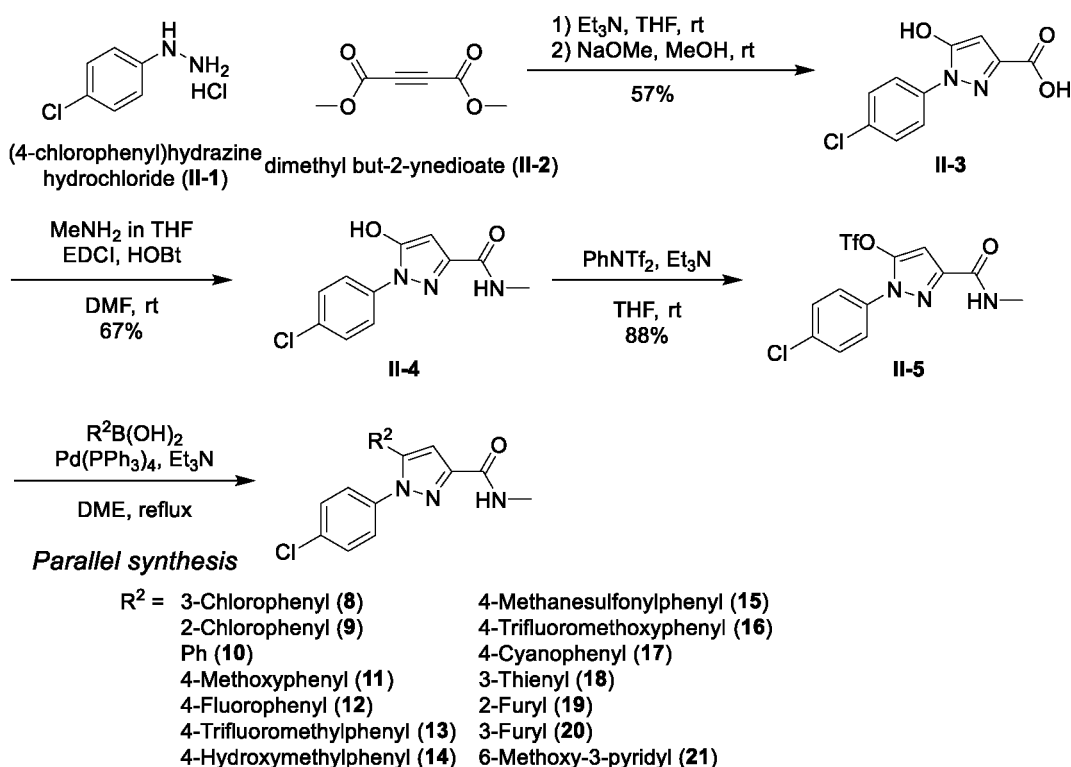
図 8 3つの探索部位

ヒット化合物の周辺誘導体のうち、1*H*-ピラゾール 1 位フェニル部位を変換した誘導体の合成ルートをスキーム 1 に示す。エタノール中ナトリウムエトキシドを用いて、1-(4-クロロフェニル)エタン-1-オン (**I-1**) をシュウ酸ジエチルと縮合した。得られた 2,4-ジオキソブタン酸エチル **I-2** にエタノール中ヒドラジン誘導体を作用させて、1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル **I-3** を得た。多くの場合、中程度の収率で目的物を得たが、R¹ 置換基がメチル基の場合、低収率であった。メチルヒドラジンを用いた場合には、望まない位置異性体が主生成物として得られたこと (収率 43%) が主な収率低下の要因である。続いて、エタノール中、水酸化ナトリウム水溶液を用いて、化合物 **I-3** を加水分解し、1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 **I-4** を得た。縮合剤 HATU を用いて、メチルアミンと化合物 **I-4** を縮合することにより、目的化合物 **1-7** を得た。



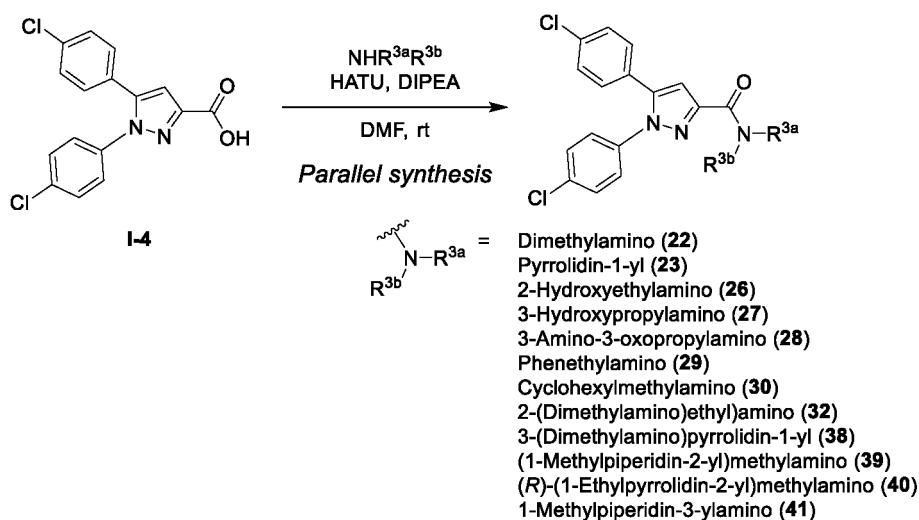
スキーム 1 1*H*-ピラゾール 1 位を変換した誘導体 **1-7** の合成

次に、1*H*-ピラゾール 5 位を変換した誘導体を合成した (スキーム 2)。5 位置換基を効率的に探索するために、液相パラレル合成を活用して、最終工程で 5 位置換基を導入することとした。(4-クロロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (II-1) とアセチレンジカルボン酸ジメチル (II-2) を出発原料として、ピラゾール環化と続く加水分解を経て、1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 II-3 を得た。縮合剤 EDCI を用いてメチルアミンを縮合した後、*N*-フェニルビス(トリフルオロメタンスルホンイミド)を用いてトリフラート化した。得られた II-5 に対して、液相パラレル合成法により種々のボロン酸誘導体と鈴木クロスカップリング反応させることで目的化合物 8 - 21 を得た。得られたサンプルは、いずれも良好な純度 (HPLC 純度 90%以上) であることを確認した。



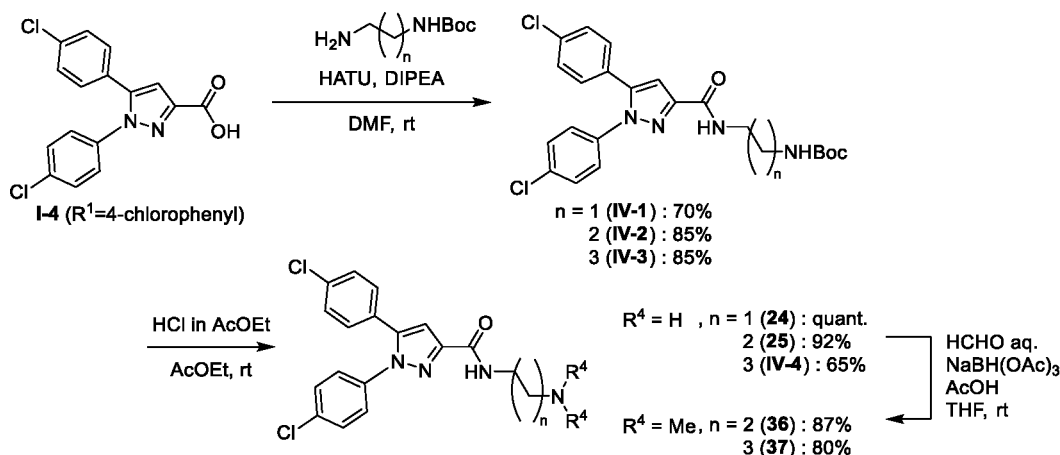
スキーム 2 1*H*-ピラゾール 5 位を変換した誘導体 8 - 21 の合成

最後に、3 位アミド部位を変換した誘導体を合成した (スキーム 3 ~ 6)。スキーム 1 で得られたカルボン酸 I-4 に対して、液相パラレル合成を用いて、アミン誘導体を縮合することで目的物を得た (スキーム 3)。得られたサンプルは、いずれも良好な純度 (HPLC 純度 90%以上) であることを確認した。

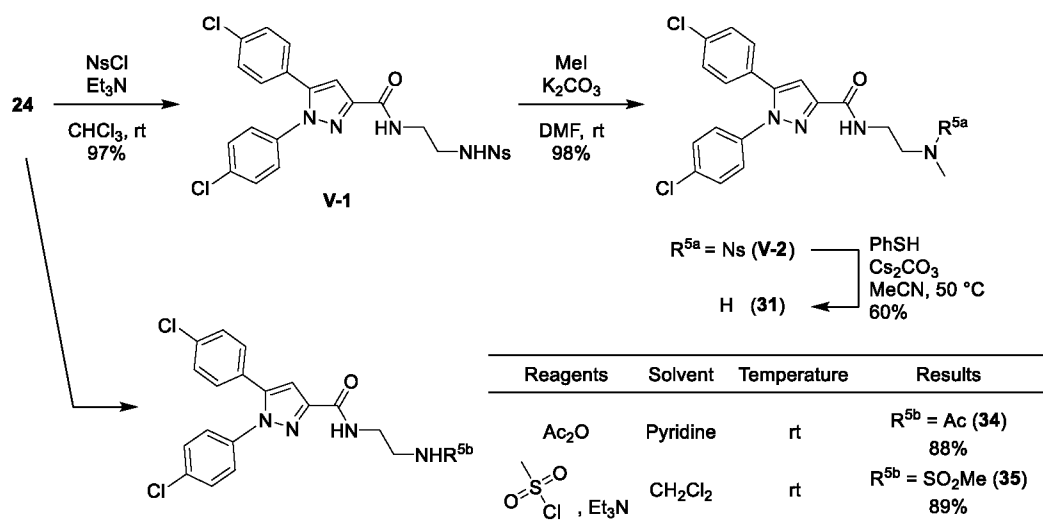


スキーム3 パラレル合成を用いて3位アミド部位を変換した誘導体の合成

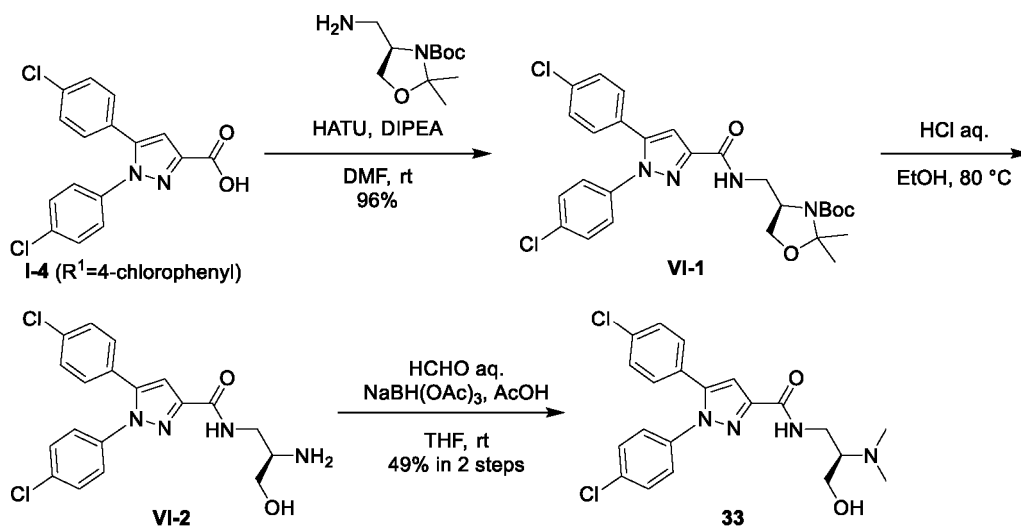
パラレル合成では合成が困難なアミン誘導体（例えば、保護基をもつアミン誘導体や、縮合反応に対して複数の反応点を持つアミン誘導体）やパラレル合成後に設計した化合物に対応するアミン誘導体は、マニュアル合成で個別にアミド化した（スキーム4～6）。カルボン酸 **I-4** に Boc 保護ジアミンを縮合させた後、Boc 基を除去することで、アミン体 **24**、**25** や **IV-4** を得た。続いて、ホルマリンを用いた還元的アルキル化により、ジメチルアミン体 **36** や **37** を得た。モノメチルアミン体 **31** は、アミン体 **24** に対する福山アミン合成法により取得した。また、アミン体 **24** を常法に従い、アセチル化あるいはスルホン化することで、アセチル体 **34** やスルホンアミド体 **35** を得た。ジメチルアミノアルコール体 **33** は、カルボン酸 **I-4** と (*R*)-4-(アミノメチル)-2,2-ジメチルオキサザリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチルを縮合し、酸性条件下で保護基を除去することで得たアミノアルコール体 **VI-2** に対する、ホルマリンを用いた還元的アルキル化により取得した。



スキーム4 3位アミド部位を変換した誘導体 **24**, **25**, **36**, **37** の合成



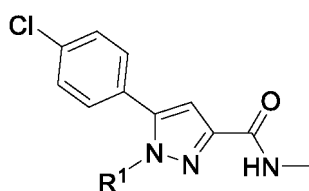
スキーム5 3位アミド部位を変換した誘導体 **31**, **34**, **35** の合成



スキーム6 3位アミド部位を変換した誘導体 **33** の合成

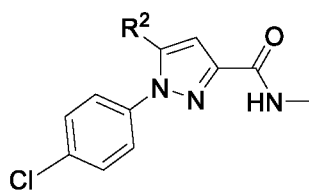
まず、1*H*-ピラゾール 1 位フェニル基を変換した誘導体について、MALT1 基質である Ac-LRSR-AMC に対する、精製した MALT1 タンパク質を用いたプロテアーゼ阻害活性を評価した (表 1)。ベンジル体 **2** とシクロヘキシル体 **3** はフェニル体 **1** と同等の MALT1 阻害活性を示したが、メチル体 **4** では MALT1 阻害活性が大幅に減弱した。アロステリック部位の疎水性ポケットを埋めるためには、フェニル基のような大きな疎水性置換基が必要であることを示唆している。塩素原子で置換したフェニル基 (**5** - **7**) において、4-クロロフェニル体 **5** のとき最も MALT1 阻害活性が強かった。次に、4-クロロフェニルを 1*H*-ピラゾール 1 位の置換基として固定し、1*H*-ピラゾール 5 位置換基を探索した (表 2)。塩素原子を取り除いた場合、または塩素原子の置換位置を変えた場合、いずれの場合でも **5** と比較して MALT1 阻害作用が減弱した (**8** - **10**)。他の *p*-

表1 1*H*-ピラゾール 1位を変換した誘導体の MALT1 阻害活性



compound	R ¹	MALT1 inhibition at 25 μM	MALT1 inhibition IC ₅₀ (μM)
1 (ヒット化合物)	Ph	59%inh	19.79
2	Bn	57%inh	16.33
3	Cyclohexyl	63%inh	not evaluated
4	Me	7.7%inh	>25
5	4-Chlorophenyl	72%inh	7.01
6	3-Chlorophenyl	57%inh	not evaluated
7	2-Chlorophenyl	46%inh	>25

表2 1*H*-ピラゾール 5位を変換した誘導体の MALT1 阻害活性

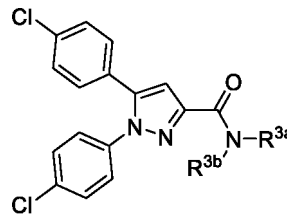


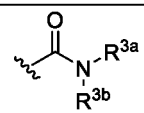
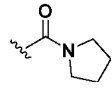
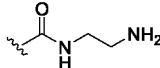
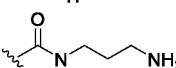
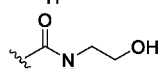
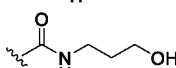
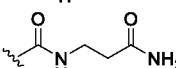
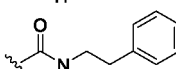
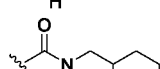
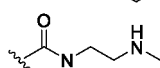
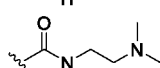
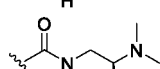
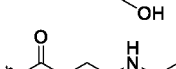
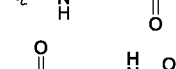
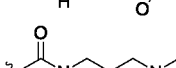
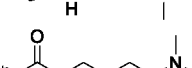
compound	R ²	MALT1 inhibition at 25 μM	MALT1 inhibition IC ₅₀ (μM)
5	4-Chlorophenyl	72%inh	7.01
8	3-Chlorophenyl	43%inh	>25
9	2-Chlorophenyl	23%inh	>25
10	Ph	61%inh	16.79
11	4-Methoxyphenyl	80%inh	6.55
12	4-Fluorophenyl	47%inh	>25
13	4-Trifluoromethylphenyl	47%inh	>25
14	4-Hydroxymethylphenyl	19%inh	>25
15	4-Methanesulfonylphenyl	5.7%inh	>25
16	4-Trifluoromethoxyphenyl	38%inh	>25
17	4-Cyanophenyl	31%inh	>25
18	3-Thienyl	26%inh	>25
19	2-Furyl	20%inh	>25
20	3-Furyl	16%inh	>25
21	6-Methoxy-3-pyridyl	21%inh	>25

置換フェニル基についても検討した。4-メトキシフェニル体 **11** の MALT1 阻害活性は **1** と同等であったが、4-フルオロフェニル基のような他の *p*-置換フェニル基や 3-チエニル基のようなヘテロ芳香族で置換すると MALT1 阻害活性が減弱した (**12**, **18**)。特に、極性官能基を置換した化合物 **14**, **15**, **19**, **20**, **21** は、**5** に比べて MALT1 阻害活性が大幅に減弱した。この結果は、1*H*-ピラゾール 5 位のフェニル基が結合ポケットの疎水性部位に位置していることを示すドッキング結果 (図 5) を支持した。

次に、3 位の置換基を探索した (表 3)。メチルアミド体 **5** と比較して、ジメチルアミド体 **22** やピロリジン-1-カルボニル体 **23** の MALT1 阻害活性は大きく減弱した。第三級アミドより第二級アミドの MALT1 阻害活性の方が強かったことから、アミド水素は MALT1 阻害活性の増加に重要であると考えられた。この結果は、図 5 に示した化合物 **1** の結合様式と一致しており、化合物 **5** のアミド水素が Glu397 と相互作用していることを示唆している。N-(2-アミノエチル)アミド体 **24**、N-(3-アミノプロピル)アミド体 **25** および N-(2-ヒドロキシエチル)アミド体 **26** の MALT1 阻害活性は **5** と同等かそれ以上であったが、N-(3-ヒドロキシプロピル)アミド体 **27** および N-(2-カルバモイルエチル)アミド体 **28** の MALT1 阻害活性は減弱した。N-(2-フェニルエチル)アミド体 **29** と N-(シクロヘキシルメチル)アミド体 **30** は MALT1 阻害活性が大幅に減弱した。これらの結果は、アミノ基やヒドロキシ基のような親水性の置換基が好ましい置換基であることを示している。そこで、次にアミノ基に注目した。**24** にメチル基を導入すると、より強力な MALT1 阻害活性を有する化合物が得られた (化合物 **31**, **32**)。特に、N-(2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチル)アミド体 **32** は化合物 **5** の 14 倍強力な MALT1 阻害活性を示した。ヒドロキシメチル基を **32** に付与した誘導體 **33** の MALT1 阻害活性は、**32** より 1.4 倍減弱した。N-(2-アセトアミドエチル)アミド体 **34** と N-(2-(メチルスルホンアミド)エチル)アミド体 **35** は、**32** に比べて MALT1 阻害活性が弱く、アミンの塩基性が MALT1 阻害活性の向上に重要な要素であることを示している。化合物 **32** の炭素鎖を長くすると、**32** と比較して MALT1 阻害活性が減弱した (化合物 **36**, **37**)。この結果は、MALT1 阻害活性の向上に炭素鎖の長さが重要である可能性を示唆している。例えば、1,5-ジフェニルピラゾール系統では、エチレンリンカーが有利である (**32** vs **36** vs **37**, **24** vs **25**, **26** vs **27**)。

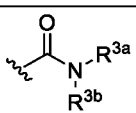
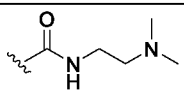
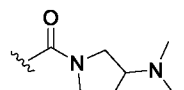
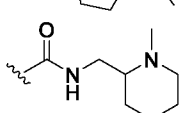
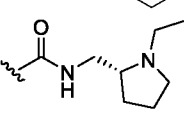
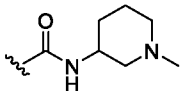
表3 1*H*-ピラゾール3位アミド部位を変換した誘導体の MALT1 阻害活性



compound		MALT1 inhibition IC ₅₀ (μM)
5	-CONHMe	7.01
22	-CONMe ₂	21.18
23		>25
24		1.98
25		7.39
26		6.55
27		12.41
28		13.39
29		>25
30		>25
31		0.800
32		0.490
33		0.690
34		3.30
35		4.37
36		2.63
37		2.22

化合物 **32** の *N*-(2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチル)アミド構造を保持したまま、種々の環構造を導入した (表 4)。 *N,N*-ジメチルアミノピロリジン-1-カルボニル体 **38** の MALT1 阻害活性は、**32** と比較して減弱したが、 *N,N*-ジメチルアミノ基を欠くピロリジン-1-カルボニル体 **23** よりも強力であった。 *N*-((1-メチルピペリジン-2-イル)メチル)アミド体 **39** の MALT1 阻害活性は **32** と同等であったが、他の環化置換基では MALT1 阻害活性が低下した (化合物 **40**, **41**)。適切な位置にアミノ基を導入することにより MALT1 阻害活性が増強されたことから、アミノ基が MALT1 タンパク質のアミノ酸と相互作用していることが示唆された。また、化合物 **32** と比較して、環化固定化することにより MALT1 阻害活性が同等~10 倍以上減弱した化合物を与えた。アミド部位の立体配座を制限しても MALT1 阻害活性は向上しなかった。ヒット化合物 **1** のドッキングシミュレーション結果からアミド部位は溶媒露出部位方向に位置したことを考慮すると、アミノ基の三次元的な配置や環化による疎水性向上による周囲水分子との親和性低下が活性に影響を与えていると考えられた。

表 4 1*H*-ピラゾール 3 位アミド部位に環構造を持つ置換基を導入した化合物の MALT1 阻害活性

compound		MALT1 inhibition IC ₅₀ (μM)
32		0.490
38		10.62
39		0.521
40		2.10
41		1.70

3種の代表化合物（チオリダジン、化合物 **5** および **32**）の細胞評価系での免疫反応に与える影響を評価した（表5）。ここでは、MALT1 阻害作用が免疫反応の活性化に与える影響のうち、NF- κ B 活性化阻害作用とサイトカインのひとつである IL-2 の産生抑制作用を確認した。化合物 **32** の NF- κ B 活性および IL-2 産生の阻害作用（82%inh、94%inh）は、化合物 **5**（25%inh、54%inh）よりも強く、チオリダジン（85%inh、95%inh）と同等であった。さらに、MALT1 基質切断の直接的阻害を確認するため、Jurkat 細胞における CYLD の分解をウェスタンブロッティングで測定した（図9）。化合物 **32** は、PMA/イオノマイシン刺激により誘導された CYLD 分解産物（Frag-CYLD）を濃度依存的に減少させた。化合物 **32** 10 μ M における relative Frag-CYLD/Full-CYLD 値は、MALT1 活性化刺激のない細胞と同じであった。これらの結果から、本系統の化合物が MALT1 阻害作用に基づく基質切断阻害を介して、サイトカイン産生を抑制していることが示された。

表5 チオリダジンと化合物 **5**、**32** の細胞活性（NF- κ B 活性阻害および IL-2 産生阻害）

Compounds	NF- κ B inhibition IC ₅₀	Inhibition of IL2 production IC ₅₀
Thioridazine	not evaluated (85%inh)	not evaluated (95%inh)
Compound 5	9.34 μ M (25%inh)	4.26 μ M (54%inh)
Compound 32	5.41 μ M (82%inh)	1.79 μ M (94%inh)

Numbers in parentheses represent the percent inhibition at 5 μ M concentration.

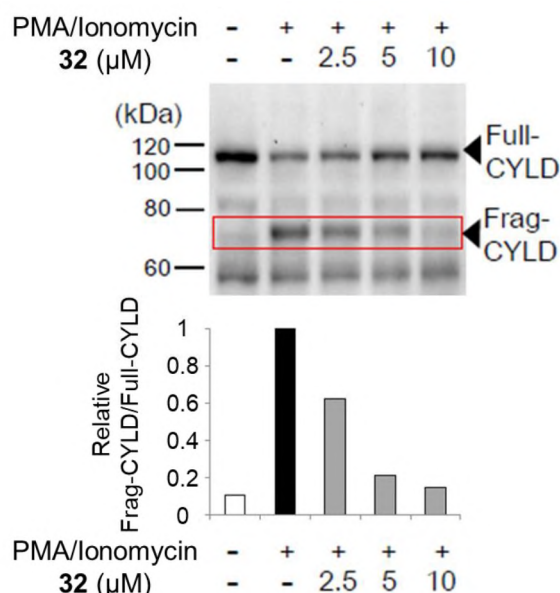


図9 ウェスタンブロッティングによる化合物 **32** による MALT1 タンパク質を介した CYLD 切断阻害作用。Relative Frag-CYLD/Full-CYLD は、陽性対照（PMA/Ionomycin(+)、**32**(-)）に対する相対値のこと。

MALT1 パラカスパーゼドメインと caspase-9 などの代表的なカスパーゼとの間の配列同一性は 17%と比較的低いにもかかわらず、MALT1 タンパク質のフォールディングはすべての既知カスパーゼのフォールディングと実質的に同一であることが報告されている²⁹。そこで、我々が見いだした MALT1 阻害化合物 **32** のパラカスパーゼと構造的に関連する caspase-3、-8、-9 に対する選択性を、カスパーゼ薬物スクリーニングキット (Promokine 社製) を用いて評価した (図 1 0)。パラカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-fmk を各実験の陽性対照として用いた。化合物 **32** は、基質濃度 100 μM においても caspase-3、-8、-9 に対してほとんど活性を示さず、選択的な MALT1 パラカスパーゼ阻害剤であることが示された。

32 の作用機序を調べるため、酵素反応速度を評価した (図 1 1)。化合物 **32** の MALT1 阻害活性 IC_{50} 付近の濃度 (0.5 μM) では、 V_{max} を 35,612 から 19,979 RFU/s へと強く減少させたが、 K_m は本質的に変化しなかった (246.9 から 234.2 μM) こと

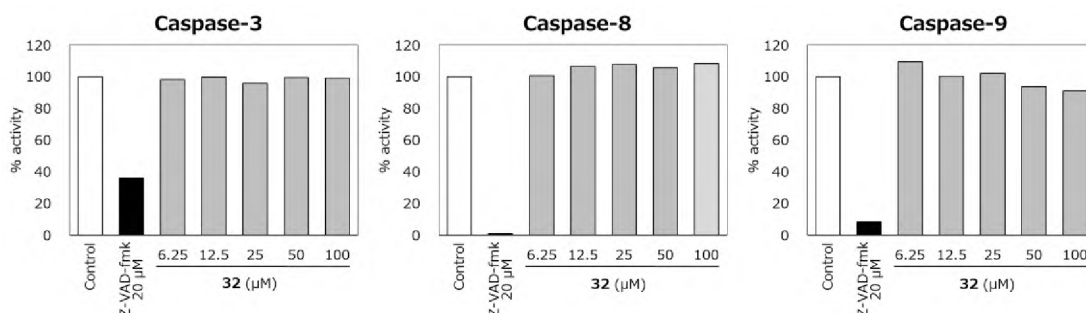


図 1 0 化合物 **32** の caspase-3、-8、-9 に対する阻害作用

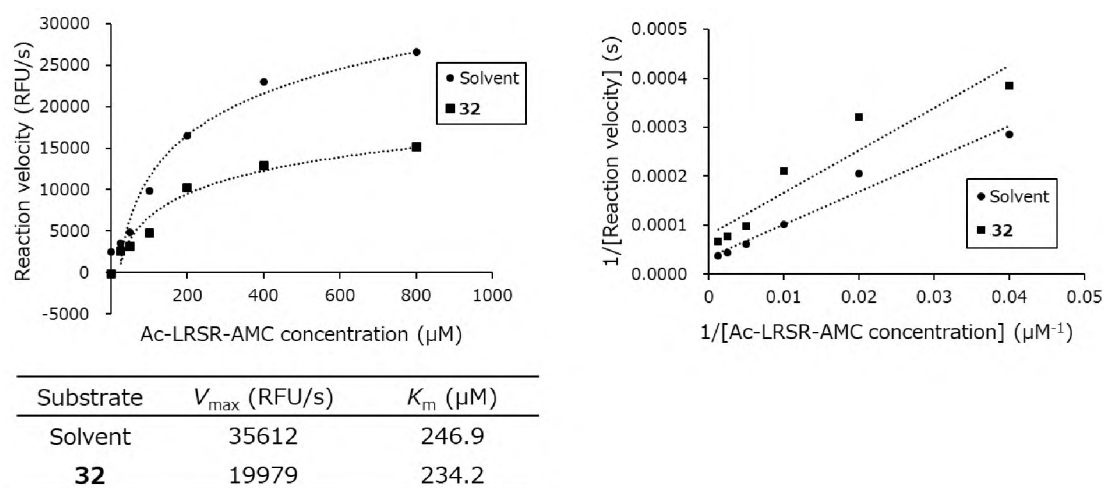


図 1 1 Michaelis-Menten 式に基づく酵素反応速度評価結果 (左) と Lineweaver-Burk プロット (右) (0.5 μM の化合物 **32** の存在下または非存在下において Ac-LRSR-AMC の基質濃度を増加させることにより測定した。 V_{max} 、 K_m の算出には、GraphPad Prism (ver. 6, MDF) の Enzyme kinetics-Michaelis-Menten を用いた。)

から、化合物 **32** は非競合的阻害剤であることが示された。このことは、**32** がパラカスパーゼ活性部位に結合するのではなく、アロステリックポケットに結合することを示唆している。

以上を小括する。我々は、構造活性相関情報の取得ならびに MALT1 阻害活性向上を目的として、スクリーニングにより同定されたヒット化合物 **1** の網羅的な SAR 探索を実施した。本システムでは、2 つのフェニル部位は、今回の探索の中では 4-クロロフェニル基が最も適しており、アミド部位の 2-アミノエチル構造は MALT1 阻害活性を向上させるために重要な部分構造であることが示された。このアミド部位に *N,N*-ジメチルアミノエチル基をもつ化合物 **32** は、ヒット化合物 **1** よりも MALT1 阻害活性が 40 倍向上し、チオリダジンと同等の細胞活性を示した。また、**32** は、MALT1 基質である CYLD の分解を抑制し、MALT1 選択的なパラカスパーゼ阻害作用を有しており、反応速度論的研究から MALT1 タンパク質に対する非競合的阻害機構が示された。以上の結果より、化合物 **32** の MALT1 プロテアーゼ阻害を介した免疫反応の抑制とアロステリック部位への結合の可能性が示されたことから、本システムの化合物は目的の作用機序を有する誘導体であると考え、さらなる探索を実施することとした。

(2) スルホニルグアニジン構造を有する MALT1 阻害化合物の創出

化合物 **32** は、高用量 (100 mg/kg/day) の腹腔内投与によりイミキモド誘発乾癬モデルマウスの背部皮膚厚を改善した。しかし、**32** の PK プロファイルが不良であるため、経口投与では症状を改善させることはできなかった (データは示さず)。そこで、より強力な阻害活性を示し、経口投与で *in vivo* 薬効を示す化合物の取得を目指し、新たなファーマコフォアの探索と経口活性の改善に着手した。

初めに、より強力な阻害活性をもつ化合物の取得に焦点を当てて、新たなファーマコフォアの探索に着手した。これまでの SAR 研究の中で変換許容性を示したピラゾール-3-カルボキサミド誘導体のピラゾール 3 位置換基を変換することとした。図 5 のドッキングシミュレーション結果では、ピラゾール-3-カルボキサミド誘導体 **1** の 1' 位カルボニル基は MALT1 タンパク質と相互作用していなかった。そこで、ピラゾール-3-カルボキサミド誘導体と同じ置換基を有し、カルボニル基を 3' 位にシフトした *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体を設計し、この部位を変換することによる構造活性相関の違いや変換許容性を確認することで、ジフェニルピラゾール骨格を持つ誘導体の合成展開の可能性を確認することとした (図 1 2)。

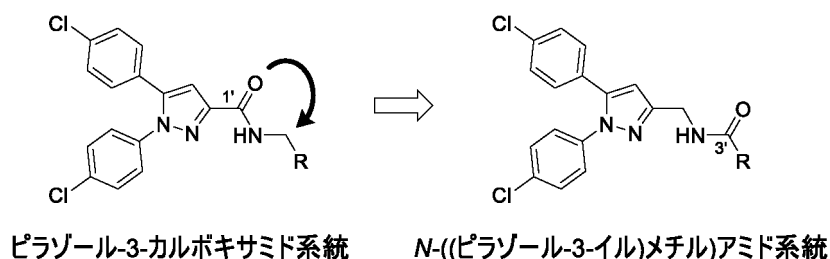
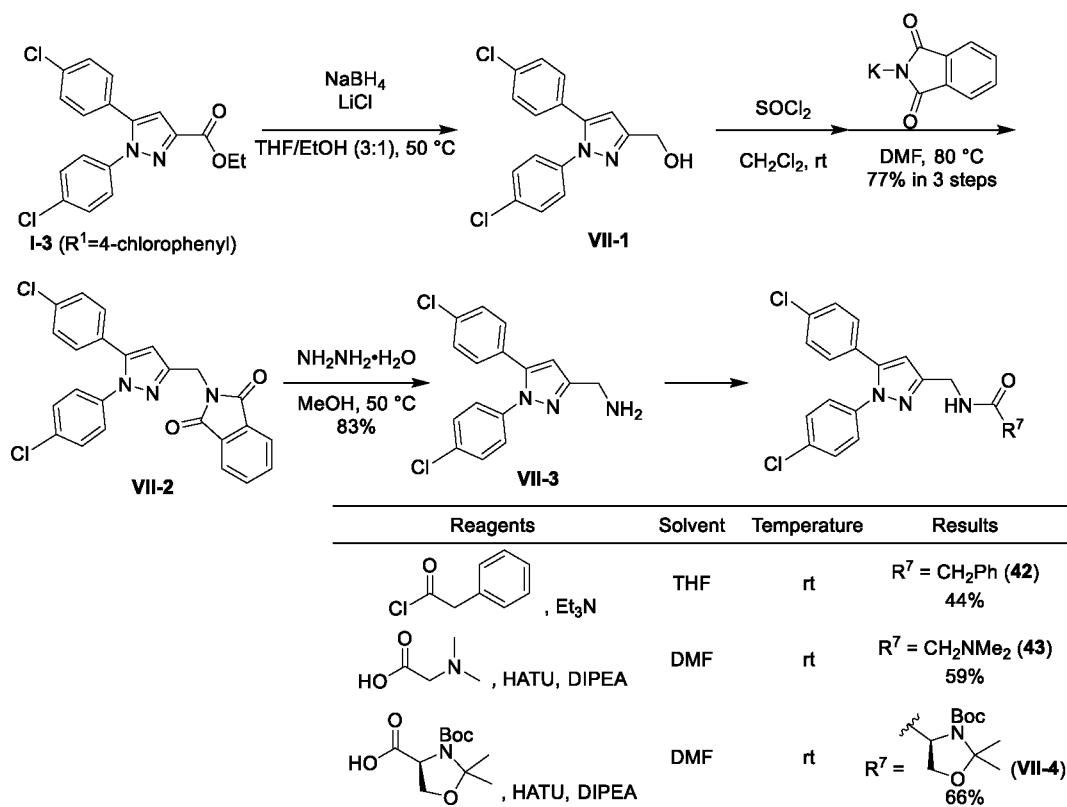
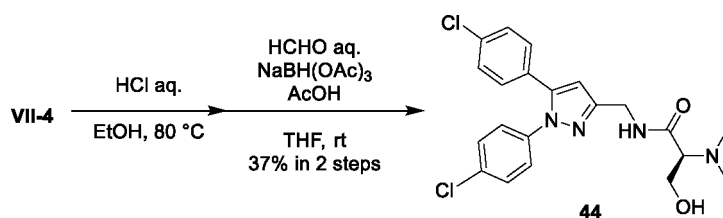


図 1 2 カルボニル基の位置をシフトした *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド系統

N-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体 **42** - **44** の合成をスキーム 7 および 8 に示す。スキーム 1 の合成中間体 **I-3** ($R^1 = 4\text{-chlorophenyl}$) を出発原料として、*in situ* で発生させた水素化ホウ素リチウムによりエステルをアルコールへと還元し、生じたヒドロキシ基を塩化チオニルによって塩素化した。続けて、フタルイミドカリウムによる求核置換反応により化合物 **VII-2** を得た。ヒドラジン-水和物を作用させてフタロイル基を除去した後に、酸クロリド誘導体、あるいは縮合剤とともにカルボン酸誘導体を作用させることで、**42**、**43** および **VII-4** を得た。**VII-4** は、その後、酸性条件下加熱することで、Boc 基ならびにアセトニド基を除去した後、続けて、ホルムアルデヒド存在下、還元的アミノ化させることにより、**44** を得た。



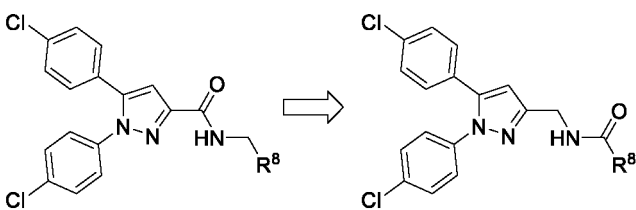
スキーム7 *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体 **42**, **43** の合成

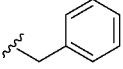

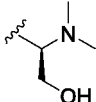


スキーム8 *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体 **44** の合成

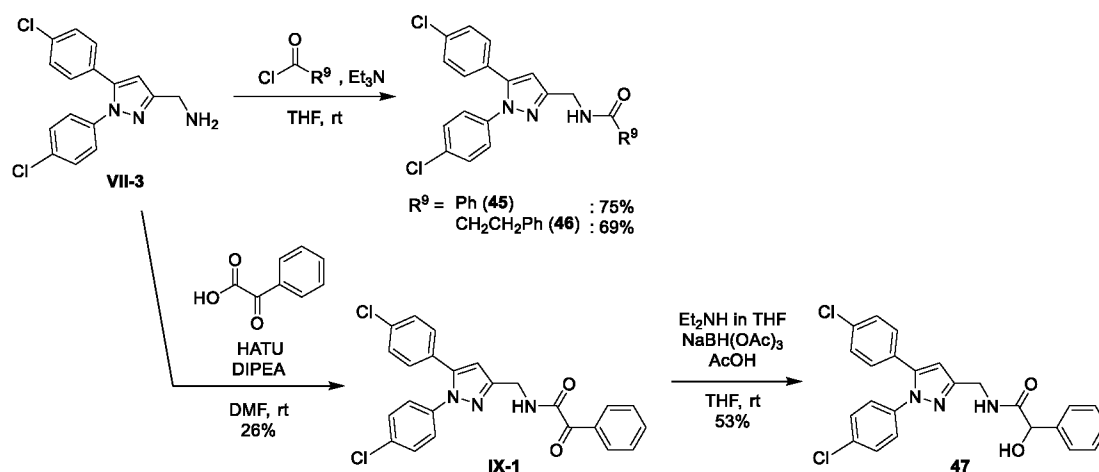
N-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体 **42** - **44** は、対応するピラゾール-3-カルボキサミド誘導体 **29**, **32**, **33** と同様に官能基許容性が確認されたが、構造活性相関が全く異なっていた (表6)。ピラゾール-3-カルボキサミド系統では、疎水性のベンジル基を導入すると活性が低下し (化合物 **29**)、親水性の置換基を導入すると MALT1 阻害活性が上昇する傾向があった (化合物 **32**, **33**)。一方、*N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド系統では、疎水性置換基を導入したフェニルアセトアミド体 **42** の MALT1 阻害活性は、これまでの探索で最も強力な MALT1 阻害活性を示した化合物 **32** と比較して 2.6 倍増強した。この結果から、ピラゾール 3 位置換基の変換許容性と、フェニル基導入による活性向上が期待できた。そこで、*N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド系統のアミド部位について、さらなる探索を実施することとした。

表6 カルボニル基の位置の違いによる SAR の変化



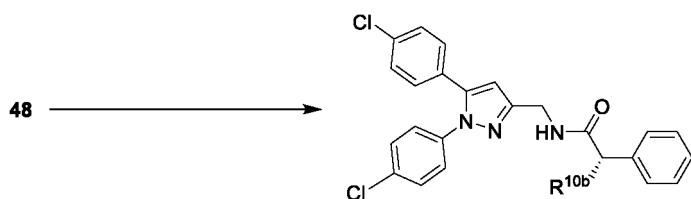
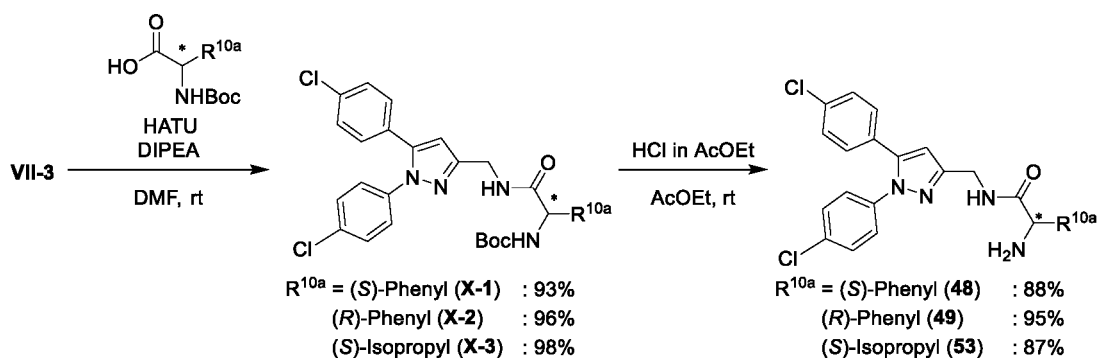
R ⁸ =	MALT1 IC ₅₀	MALT1 IC ₅₀
	29 >25 μM	42 0.188 μM
	32 0.490 μM	43 3.878 μM
	33 0.690 μM	44 4.021 μM

N-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体 **45** - **54** の合成をスキーム 9 ~ 11 に示す。スキーム 7 で合成した **VII-3** に対して、酸クロリド誘導体や、縮合剤 HATU 存在下でカルボン酸誘導体を作用させてアミド化した。いくつかの化合物は、さらに変換を実施した。例えば、**IX-1** に対して還元的アミノ化を実施したところ、アミノ化生成物は得られず、代わりにヒドロキシアセトアミド **47** が得られた。



スキーム 9 *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体 **45** - **47** の合成

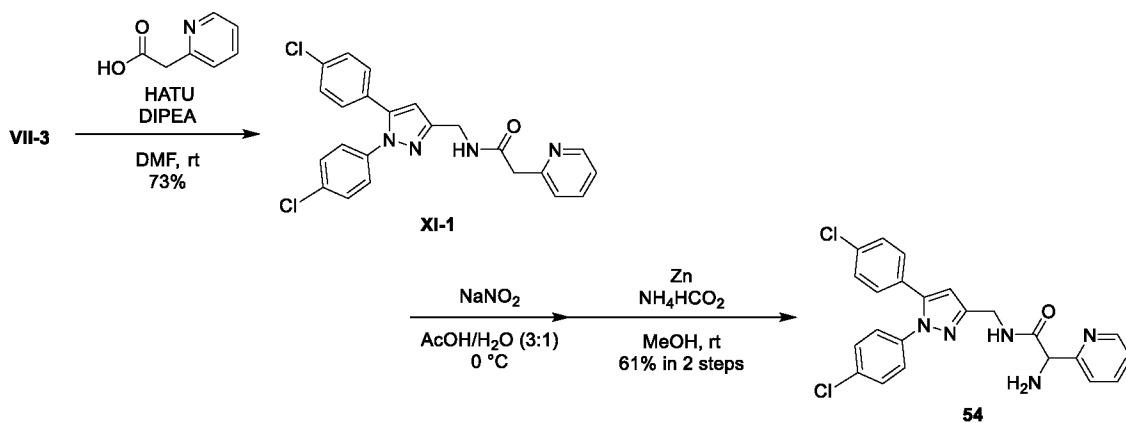
アミド化反応により得た **X-1** ~ **X-3** の Boc 基を酸性条件下で除去して、**48** や **49**、**53** を得た (スキーム 10)。**48** に対しては、さらに、還元的アルキル化によりジメチルアミノ体 **50** へ、スルホン化によりスルホンアミド体 **51** へ、無水酢酸によるアミド化によりアミド体 **52** へ変換した。



Reagents	Solvent	Temperature	Results
NaBH(OAc)_3 HCHO aq., AcOH	THF	rt	$R^{10b} = \text{NMe}_2$ (50) 81%
	THF	rt	$R^{10b} = \text{NHSo}_2\text{Me}$ (51) quant.
Ac_2O	Pyridine	rt	$R^{10b} = \text{NHAc}$ (52) 94%

スキーム 10 *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体 **48 - 53** の合成

アミド化反応により得た **XI-1** に亜硝酸ナトリウムを作用させて、ベンジル位をケトオキシムへと変換した。生じたケトオキシムを亜鉛、ギ酸アンモニウム存在下で還元し、アミン体 **54** へ変換した (スキーム 11)。

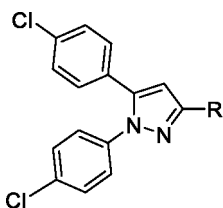


スキーム 11 *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体 **54** の合成

N-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体の MALT1 阻害活性および肝ミクロソーム代謝特異的クリアランス (CL_{int}) を表 7 に示す。肝ミクロソーム代謝クリアランスは、経口吸収性の *in vitro* 評価指標として用いた。化合物 **42** のフェニル基とアミド基の間のメチレン鎖を除去したベンズアミド体 **45** は MALT1 阻害活性が大幅に減弱した。メチレン鎖をエチレン鎖に伸長したフェニルプロピオンアミド体 **46** は、**42** と同等の MALT1 阻害活性を示した。**42** のメチレン炭素に極性官能基を導入した場合、1-ヒドロキシ-1-フェニルアセトアミド体 **47** の MALT1 阻害活性は **42** と同程度であったが、**42** にアミノ基を導入した(S)-フェニルグリシンアミド体 **48** の MALT1 阻害活性は 3.5 倍増強した。対照的に、**48** のエナンチオマーである **49** の MALT1 阻害活性は、**42** に比べて 7 倍減弱した。化合物 **32** などのピラゾール-3-カルボキサミド誘導体の探索で得られた知見と同様に、本系統でもアミノ基の導入は MALT1 阻害活性を向上させることが示された。**48** のアミノ基をジメチルアミノ基やメタンスルホンアミド基、アセトアミド基に変換しても、高い MALT1 阻害活性を維持した (**50** - **52**)。また、化合物 **48** のフェニル基をイソプロピル基に変換した(S)-バリンアミド体 **53** の MALT1 阻害活性は大幅に減弱し、2-ピリジル基に変換した 2-アミノ-2-(ピリジン-2-イル)アセトアミド体 **54** の MALT1 阻害活性は 4 倍減弱した。この結果から、アミノ基とともに、フェニル基は MALT1 阻害活性を向上させるために重要なファーマコフォアであると考えられた。

代謝安定性に乏しかったジメチルアミン体 **50** を除いて、高い MALT1 阻害活性を有していた化合物 **48**、**51**、**52** について、細胞評価系である IL-2 産生抑制活性を評価した。その結果、メタンスルホンアミド体 **51** やアセトアミド体 **52** の IL-2 産生抑制活性は、化合物 **32** (IL-2 産生抑制活性 IC₅₀: 1.79 μM) と比較して、大幅に減弱した (IL-2 産生抑制活性 IC₅₀ がそれぞれ >10 μM、5.02 μM)。(S)-フェニルグリシンアミド体 **48** は、良好な IL-2 産生抑制活性を示したが (IL-2 産生抑制活性 IC₅₀: 1.79 μM)、残念ながら、経口吸収性は乏しかった (データは示さず)。活性と経口吸収性を両立した化合物を見いだすことはできなかったが、ピラゾール 3 位の変換許容性を確認し、さらに、MALT1 阻害活性向上に重要なファーマコフォアであるフェニル基を見いだした。そこで、ピラゾール 3 位置換基のさらなる最適化のために、ピラゾール 3 位にあるアミド基を生物学的等価体または類似の置換基に変換することとした³⁶⁻⁴¹。

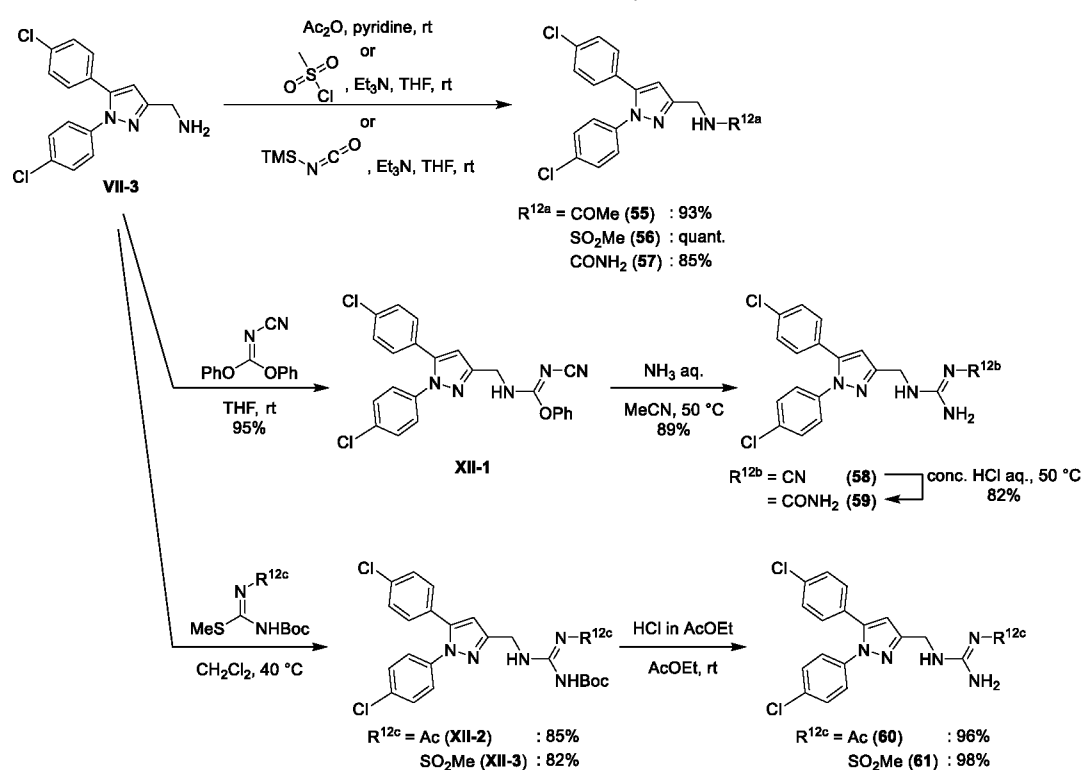
表7 *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体の *in vitro* 評価結果



compound	R	MALT1 inhibition IC ₅₀ (μM)	CL _{int} (mouse/human) (mL/min/mg)
42		0.188	N.D.
45		>25	N.D.
46		0.262	N.D.
47		0.159	N.D.
48		0.053	0.029 /<0.0005
49		0.368	N.D.
50		0.053	0.203 /0.189
51		0.060	N.D.
52		0.042	0.019 /<0.0005
53		1.846	N.D.
54		0.227	N.D.

N.D.: no data

ピラゾール 3 位置換基を変換した誘導体の合成をスキーム 1 2 に示す。アミド体 **55**、スルホンアミド体 **56**、ウレア体 **57** は、それぞれ、アミン体 **VII-3** に無水酢酸、メタンスルホニルクロリド、イソシアン酸トリメチルシリルを作用させることで得た。グアニジノ基を有する誘導体は、グアニジノ基に結合する置換基によって、2 通りの合成法を適用した。アミン体 **VII-3** に室温で *N*-シアノカルボンイミド酸ジフェニルを作用させた後、50 °C でアンモニア水を作用させることで、シアノグアニジン体 **58** を得た。**58** のシアノ基を酸性条件下、加水分解することでカルバモイルグアニジン体 **59** を得た。アセチルグアニジン体 **60** やメタンスルホニルグアニジン体 **61** は、対応する *N*-Boc-*S*-メチルイソチオ尿素誘導体をアミン体 **VII-3** に作用させてグアニジニル化した後、酸性条件下で Boc 基を除去することで得た。

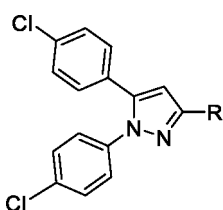


スキーム 1 2 ピラゾール 3 位置換基を変換した誘導体の合成

ピラゾール 3 位にあるアミド基を生物学的等価体または類似の置換基に変換した誘導体の MALT1 阻害活性および肝ミクロソーム代謝クリアランスを表 8 に示す。なお、*N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド誘導体のアセトアミド体 **55** を比較対象とした。メタンスルホンアミド体 **56**、ウレア体 **57**、シアノグアニジン体 **58**、カルバモイルグアニジン体 **59**、アセチルグアニジン体 **60** の MALT1 阻害活性は、アセトアミド体 **55** と同程度であった。メタンスルホニルグアニジン体 **61** のみ、アセトアミド体 **55** よりも MALT1 阻害活性が 4 倍向上し、腹腔内投与で *in vivo* 薬効を示した化合物 **32** (MALT1 阻害活性 IC₅₀: 0.490 μM) と同等の MALT1 阻害活性を示した。さらに、**61**

の代謝安定性は非常に良好であり、優れた起点化合物であると考えた。そこで、新たに見いだしたファーマコフォアであるフェニル基を **61** に導入して、さらなる活性向上を目指した。

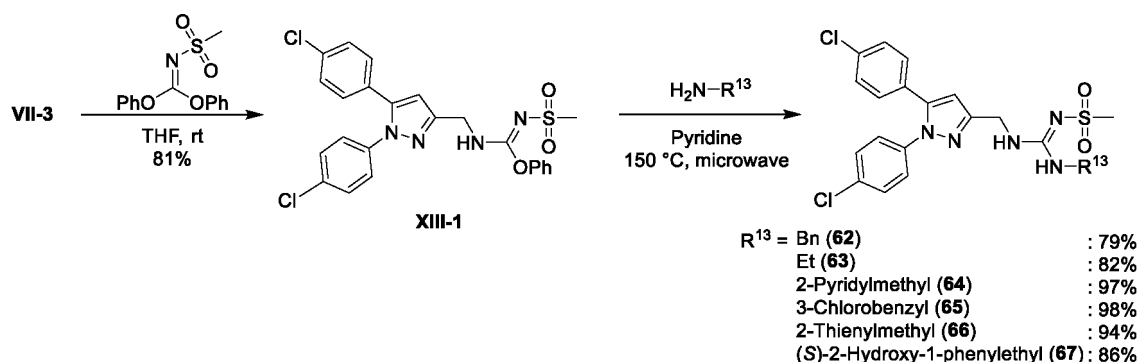
表 8 ピラゾール 3 位置換基を変換した誘導体の *in vitro* 評価結果



compound	R	MALT1 inhibition IC ₅₀ (μM)	CL _{int} (mouse/human) (mL/min/mg)
55		1.773	N.D.
56		2.189	N.D.
57		1.432	N.D.
58		1.586	<0.0005 /<0.0005
59		1.114	N.D.
60		1.540	0.263 /<0.0005
61		0.401	<0.0005 /0.021

N.D.: no data

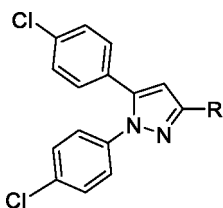
N-置換スルホニルグアニジン誘導体の合成をスキーム 13 に示す。VII-3 に、*N*-メタンスルホニルカルボンイミドジフェニルを作用させて XIII-1 を得た後、マイクロウェーブ照射下 150 °C で各種アミン誘導体を作用させることで、*N*-置換スルホニルグアニジン誘導体 62 - 67 を得た。



スキーム 13 *N*-置換スルホニルグアニジン誘導体 62 - 67 の合成

メタンスルホニルグアニジン体 **61** のグアニジン窒素に置換基を導入した誘導体 (*N*-置換スルホニルグアニジン誘導体) の MALT1 阻害活性および肝ミクロソーム代謝クリアランスを表 9 に示す。*N*-ベンジル体 **62** の MALT1 阻害活性は約 13 倍増強した。対照的に、**62** のベンジル基をエチル基に変換すると MALT1 阻害活性が、**61** と比べて 2 倍減弱した。**62** のベンジル基を 2-ピリジルメチル基、3-クロロベンジル基、2-チエニルメチル基、2-ヒドロキシ-1-フェニルエチル基に変換しても高い MALT1 阻害活性を維持した (化合物 **64** - **67**)。この系統でも、フェニル基の導入は MALT1 阻害活性向上に寄与することが明らかになった。しかし、*N*-置換スルホニルグアニジン誘導体の代謝安定性は非常に乏しかった (**62**, **64** - **67**)。グアニジン窒素原子に置換基を導入していない化合物 **61** の代謝安定性は良好であったこと、化合物 **62** のベンジル基のメチレン炭素をヒドロキシメチル基でブロックした化合物 **67** の代謝安定性が不十分ながらも改善したことから、新たに導入された置換基に共通する部分構造であるベンジル位メチレン基が代謝部位となっていると考えた。MALT1 阻害活性の大幅な向上を達成することができた一方で、代謝安定性の改善が必要であった。

表9 *N*-置換スルホニルグアニジン誘導体の *in vitro* 評価結果



compound	R	MALT1 inhibition IC ₅₀ (μM)	Inhibition of IL-2 production IC ₅₀ (μM)	CL _{int} (mouse/human) (mL/min/mg)
61		0.401	N.D.	<0.0005 /0.021
62		0.031	1.095	>0.600 />0.600
63		0.848	N.D.	N.D.
64		0.034	N.D.	>0.600 />0.600
65		0.020	N.D.	>0.600 />0.600
66		0.026	N.D.	>0.600 />0.600
67		0.045	N.D.	0.170 /0.071

N.D.: no data

(3) 経口投与で抗乾癬作用を有する MALT1 阻害化合物 68 の創出

活性と代謝安定性を両立した MALT1 阻害化合物の取得のために、代謝部位と考えられるメチレン炭素を持つ *N*-ベンジルメタンスルホニルグアニジン体 62 のベンジル基を除去しながらも、フェニル基導入による強い MALT1 阻害活性を維持する分子設計が求められる。そこで、良好な代謝安定性を示したメタンスルホニルグアニジン体 61 に対して、62 とは異なる位置へのフェニル基の導入を考えた (図 1 3)。これまでの検討から、フェニル基の導入位置には最適な距離があることが示されている。MALT1 阻害活性が向上した化合物 42 と 62 のフェニル基と空間的に同じ位置に配置するようにフェニル基を導入することができれば、強い MALT1 阻害活性を期待できると考えた。そこで、フェニル基の導入位置の選定にあたり、化合物 42 や 62 と新規設計したフェニル基導入分子の 3 次元構造の重ね合わせを実施した。その結果、メタンスルホニルグアニジン体 61 の導入位置候補 3 にフェニル基を導入したフェニルスルホニルグアニジン誘導体のときに、そのフェニル基が 42 や 62 のフェニル基と非常に良い重なりを示した (図 1 4)。以上の結果から、フェニルスルホニルグアニジン誘導体とすること

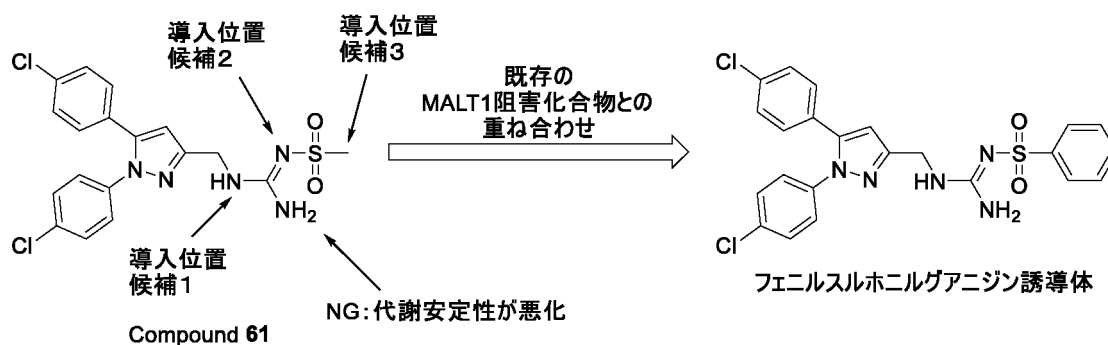


図 1 3 代謝安定性改善を目的としたフェニル基導入

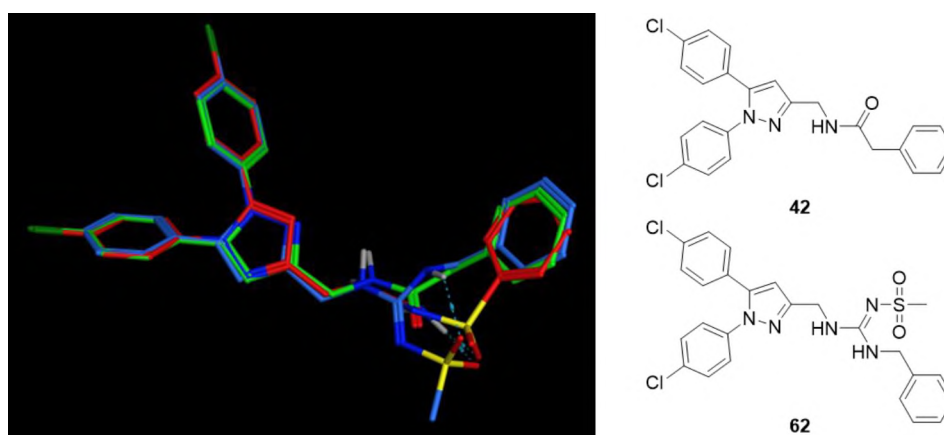
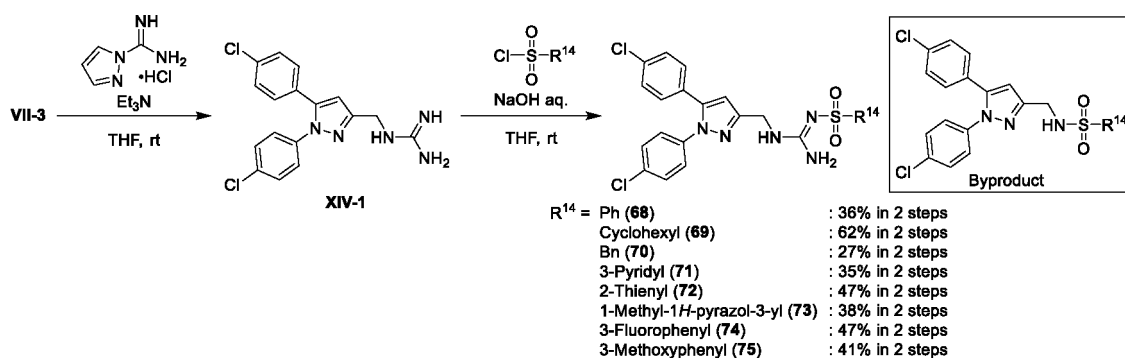


図 1 4 MOE 「Flexible Alignment」機能による分子構造の重ね合わせ (緑: 化合物 42、青: 化合物 62、赤: 新規設計フェニルスルホニルグアニジン誘導体)

で、①代謝部位と考えられるベンジル位の除去による代謝安定性の改善と②重要なファーマコフォアであるフェニル基の適切な位置への導入により MALT1 阻害活性向上が期待できると考えた。

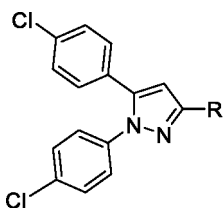
ベンゼンスルホニルグアニジン体 **68** およびその類縁体 **69 - 75** の合成をスキーム 14 に示す。VII-3 に 1-アミジノピラゾール塩酸塩を作用させてグアニジニル化した後に、各種スルホニルクロリド誘導体でスルホニル化することで、ベンゼンスルホニルグアニジン体および類縁体 **68 - 75** を得た。この反応が低収率である要因は、副生成物として対応するスルホンアミド体が得られたためである。



スキーム 14 ベンゼンスルホニルグアニジン体 **68** およびその類縁体 **69 - 75** の合成

ベンゼンスルホニルグアニジン体 **68** は、期待通り、フェニル基導入前のメタンスルホニルグアニジン体 **61** と比べて、MALT1 阻害活性が約 4 倍増強した (表 10)。一方で、**68** のフェニル基をシクロヘキシル基やベンジル基に変換すると、**61** と比べて MALT1 阻害活性が約 2 倍減弱した (化合物 **69, 70**)。また、**68** のフェニル基を 3-ピリジル基や 2-チエニル基、1-メチル-3-ピラゾリル基に変換すると、MALT1 阻害活性が 2.7~5.5 倍減弱した (化合物 **71 - 73**)。一方で、3-フルオロフェニル基や 3-メトキシフェニル基は、フェニル基を導入した場合と同等の MALT1 阻害活性を示した (化合物 **74, 75 vs 68**)。代謝安定性を評価した全てのスルホニルグアニジン誘導体で良好な代謝安定性を示した (化合物 **68, 71, 72, 74, 75**)。特に、化合物 **68, 72** および **74** の IL-2 産生抑制活性は化合物 **32** (IC₅₀: 1.742 μM) と比較して向上した。MALT1 阻害活性や IL-2 産生抑制作用、代謝安定性がいずれも良好であった化合物 **68** および **74** のうち、より低分子量かつ低疎水性である化合物 **68** について、代表化合物として以降の評価を実施した (化合物 **68**: 分子量 500, ClogP 5.29 vs 化合物 **74**: 分子量 518, ClogP 5.43)。

表 10 ベンゼンスルホニルグアニジン体およびその類縁体の *in vitro* 評価結果



compound	R	MALT1 inhibition IC ₅₀ (μM)	Inhibition of IL-2 production IC ₅₀ (μM)	CL _{int} (mouse/human) (mL/min/mg)
61		0.401	N.D.	<0.0005 /0.021
68		0.093	1.401	0.004 /0.011
69		0.762	N.D.	N.D.
70		0.774	N.D.	N.D.
71		0.307	N.D.	<0.0005 /0.073
72		0.249	1.287	0.012 /0.024
73		0.510	N.D.	N.D.
74		0.056	1.348	<0.0005 /<0.0005
75		0.060	2.061	<0.0005 /0.012

N.D.: no data

MALT1 基質切断の直接的阻害を確認するため、Jurkat 細胞における CYLD の分解をウェスタンブロッティングで測定した (図 1 5)。化合物 68 は、PMA/イオノマイシン刺激により誘導される CYLD 分解産物 (Frag-CYLD) を用量依存的に減少させた。これらの結果は、化合物 68 の MALT1 プロテアーゼ阻害作用を介した IL-2 産生抑制効果を支持するものである。

68 は、*in vitro* 評価での良好な代謝安定性に加えて、Caco-2 細胞単層で良好な透過性 (P_{app} : 3.0×10^{-6} cm/s) を有しており、高い腸管吸収性も期待できた。PK 評価の結果、静脈内投与および経口投与、いずれの場合であっても良好な PK プロファイルを示した。化合物 68 のバイオアベイラビリティは約 40% であり、経口投与で十分に 68 が血中に曝露されていることが示された (表 1 1)。

次に、良好な MALT1 阻害作用と経口吸収性を示した 68 に対して、イミキモド誘発乾癬マウスモデルを用いて *in vivo* 薬効を評価した。その結果、化合物 68 は、15~60 mg/kg を 1 日 2 回経口投与した場合、溶媒投与群と比較して用量依存的に耳の厚さを改善した (図 1 6)。

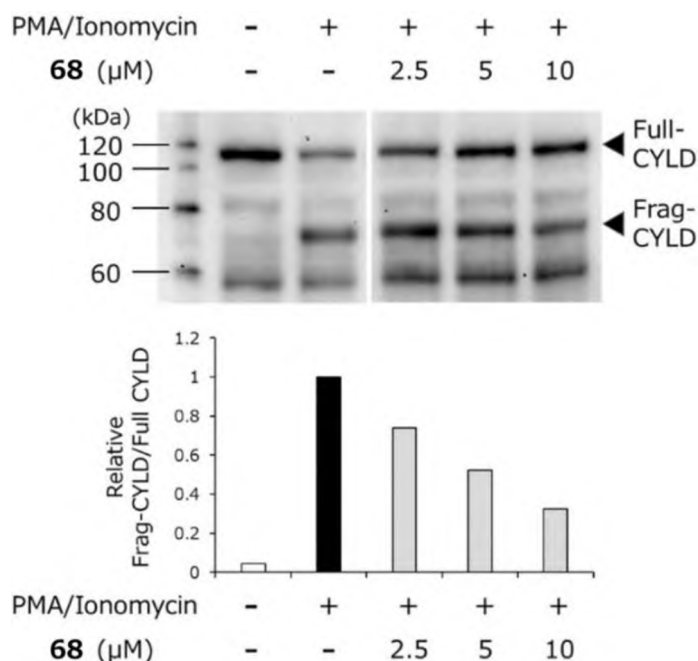


図 1 5 ウェスタンブロッティングによる化合物 68 による MALT1 タンパク質を介した CYLD 切断阻害作用。Relative Frag-CYLD/Full-CYLD は、陽性対照 (PMA/Ionomycin (+)、68 (-)) に対する相対値のこと。左右のウェスタンブロッティング画像は同一実験回のもの。

表 1 1 化合物 68 のマウス PK プロファイル

(a) 単回静脈内投与 (1 mg/kg)		(b) 単回経口投与 (2 mg/kg)	
C_{5min}	1920 ng/mL	C_{max}	560 ng/mL
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	5569 h·ng/mL	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	4449 h·ng/mL
$t_{1/2}$	3.37 h	$t_{1/2}$	4.82 h
CL_{tot}	180 mL/h/kg	T_{max}	2.00 h
		BA	39.9%

絶食雄性 BALB/cAnNCrCrij マウス (8 週齢) に化合物 68 を (a) 単回静脈内投与 (1 mg/kg) 後および (b) 単回経口投与 (2 mg/kg) 後に投与したときの薬物動態パラメータ。これらのパラメータは、Phoenix WinNonlin を用いて算出した。BA = $(AUC_{0 \rightarrow \infty, po} / dose_{po}) / (AUC_{0 \rightarrow \infty, iv} / dose_{iv}) \times 100$ 。

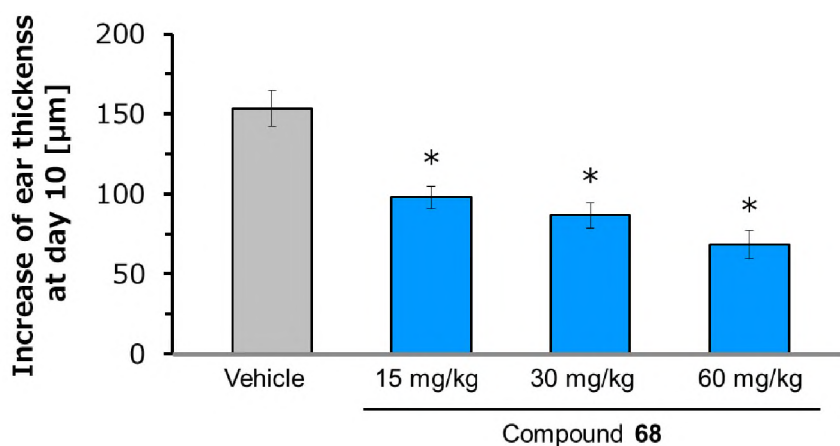


図 1 6 イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける化合物 68 の薬効評価効果。

BALB/c マウス (8 週齢) の両耳にイミキモドクリーム (5%、5 mg) を 0 日目から 5 日目、7 日目、9 日目に塗布した。これらのマウスは、化合物 68 (15、30 または 60 mg/kg、1 日 2 回 (b.i.d.)、7~9 日目に経口) または溶媒対照 (0.5 % MC - 0.025 % Tween20、1 日 2 回 (b.i.d.)、7~9 日目に経口) による治療処置を受けた。耳の厚さは 0 日目 (イミキモド塗布前) と 10 日目に測定した。結果は、10 日目と 0 日目の耳の厚さの差で表した (平均±SEM、化合物 68 の 15 mg/kg 群では n=5、化合物 68 の 30 および 60 mg/kg 群と溶媒対照群では n=6)。統計解析は、Steel の方法に続いて Shirley-Williams 多重比較検定を用いて実施した。*: P < 0.05 vs 溶媒対照群。

(4) Docking study による推定結合様式の同定

MALT1 タンパク質への結合様式を推定するために、チオリダジンが結合した MALT1 タンパク質の結晶構造 (PBD ID: 4I1R) に対して、ドッキングシミュレーションを実施した (ドッキングシミュレーション条件は、P.10 と同様) (図 17)。化合物 **32** の推定結合様式では、予想したとおり、新たに導入したジメチルアミノ基が Glu397 残基と水素結合相互作用を形成していた。しかし、化合物 **32** の S スコアは -6.76 kcal/mol であり、MALT1 阻害活性 IC₅₀ 値から想定されるほど向上しなかった (チオリダジン: -7.67 kcal/mol、ヒット化合物 **1**: -6.48 kcal/mol、これらの化合物のドッキングシミュレーションは同一条件で実施した)。化合物 **32** について、S スコアと MALT1 阻害活性の整合性が取れなかった要因として、MALT1 阻害活性向上に寄与するジメチルアミノ基が MALT1 タンパク質の外部へ露出していたため、水素結合相互作用を獲得しても化合物 **32** 非結合時の水分子との相互作用以上に大きな安定化エネルギーを獲得できなかったことが挙げられる。また、同一条件でドッキングシミュレーションした化合物 **62** と **68** の S スコアは、それぞれ -7.72、-7.49 kcal/mol であった。これらの化合物は、MALT1 阻害活性が大幅に向上したにもかかわらず、チオリダジン (-7.67 kcal/mol) と同程度の S スコアであった。フェニル基の導入により MALT1 阻害活性が向上したことから、フェニル基は MALT1 タンパク質と何らかの相互作用を獲得していると考えられる。しかし、本シミュレーション結果では、フェニル基はタンパク質の外側 (溶媒露出部位) に位置し、MALT1 タンパク質と相互作用していなかった。以上より、化合物 **32** や **62**、**68** では、実際の評価結果と一致したシミュレーション結果を得ることができなかった。ピラゾール-3-カルボキサミド系統から N-((ピラゾール-

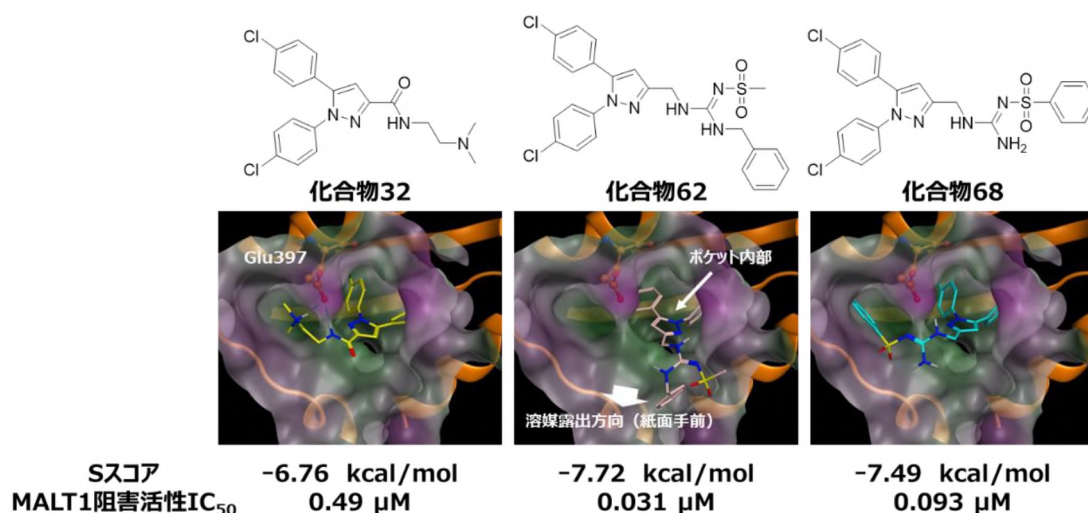


図 17 MALT1 阻害化合物 (化合物 **32**, **62**, **68**) の推定結合様式。チオリダジンが結合した MALT1 タンパク質の結晶構造 (PBD ID: 4I1R) に対して、MOE によるドッキングシミュレーションを実施した。

3-イル)メチル)アミド系統に変換した際に構造活性相関が大きく変化したことから (表 6)、化合物展開をしている間にヒット化合物とは結合様式が変化した可能性があると考えられた。構造活性相関が大きく変化した *N*-((ピラゾール-3-イル)メチル)アミド系統以降の探索では、フェニル基導入による MALT1 阻害活性の大幅な向上が共通の特徴として確認されている (表 7、表 9、表 10)。我々が見いだした新規誘導体の結合様式を推定するためには、このフェニル基の影響を考慮できる条件で再度シミュレーションする必要があると考えた。

我々は、Quancard ら³¹が報告した MALT1 タンパク質の X 線共結晶構造 (PBD ID: 6F7I) に着目した (図 18)。Quancard らが見いだした MALT1 阻害化合物 MLT-747 はチオリダジンと同じアロステリック部位に結合する。MLT-747 のピラゾロピリジン構造がアポ MALT1 タンパク質における Trp580 インドールが占めていた部位、クロロピリジン構造は Met717 部位、メトキシを含む置換基は Leu715 部位に結合する。この結合様式により、MLT-747 は野生型タンパク質のアロステリックポケットを効率よく占め、酵素の活性化に必要なヘリックス C の動きを制限し、不活性コンフォメーション (アポ体のコンフォメーション) を安定化していることが報告されている。また、MLT-747 の強力な MALT1 阻害活性の主要因は、Glu397 との相互作用だけでなく、前述の疎水性相互作用であることを示している。

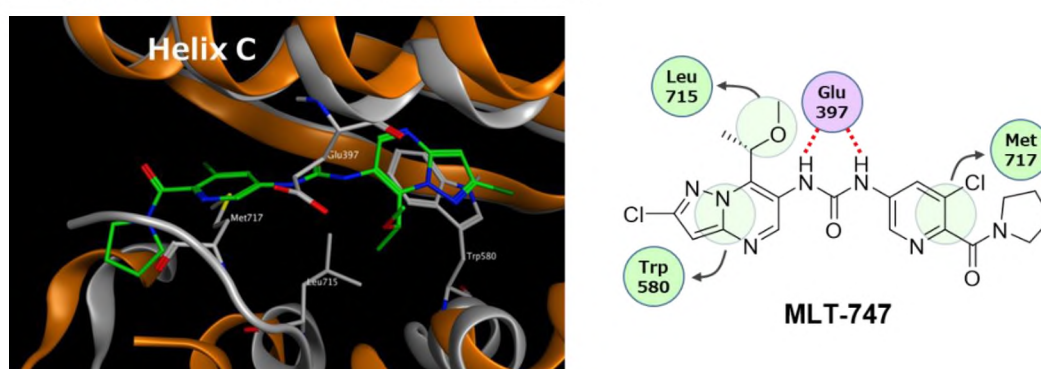
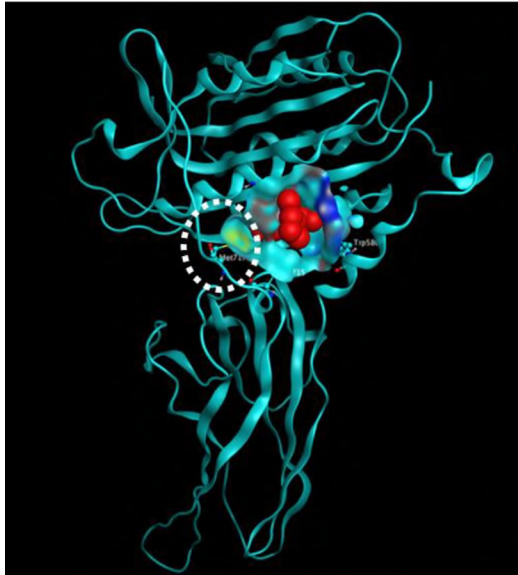


図 18 (左) MLT-747 と MALT1 タンパク質の X 線共結晶構造 (橙色、PBD ID: 6F7I) とアポ MALT1 タンパク質の X 線結晶構造の重ね合わせ (灰色、PBD ID: 3V55)、(右) MLT-747 と MALT1 タンパク質との相互作用図

チオリダジンが結合した MALT1 タンパク質 (PBD ID: 4I1R) と MLT-747 が結合した MALT1 タンパク質 (PBD ID: 6F7I) における結合ポケット形状を比較した (図 19)。チオリダジンとの共結晶構造では、Met717 はアポ体と同じ位置に存在している。そのため、この Met717 の存在により、MLT-747 との共結晶構造においてクロロピリジン構造が位置している部位 (アポ MALT1 タンパク質における Met717 部位) にはポケットが存在していない。探索の中で見いだした新たなファーマコフォアであるフェニル基は、MLT-747 と同様に、このアポ体 Met717 部位に相当するポケットに位置す

Thioridazineとの
共結晶構造



MLT-747との
共結晶構造

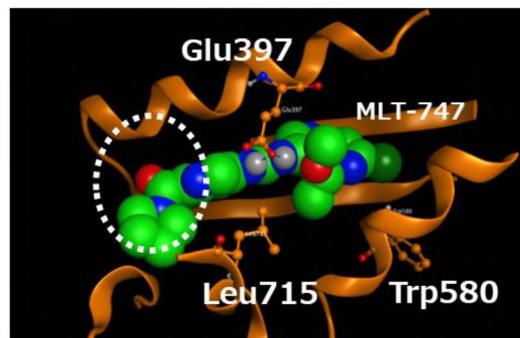
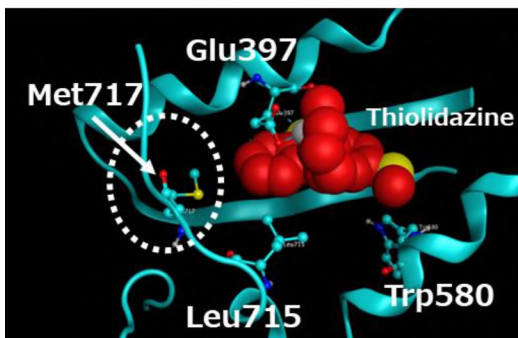
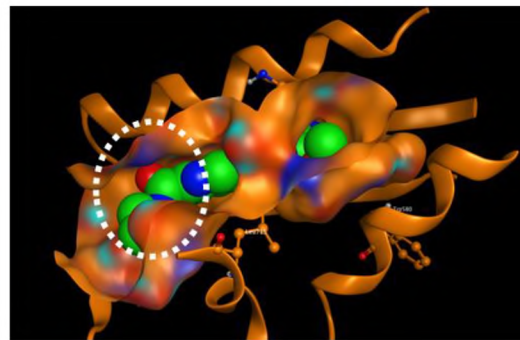
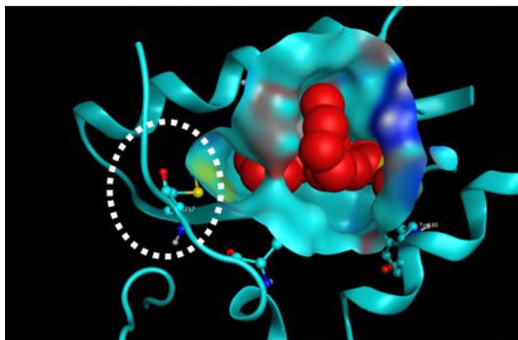
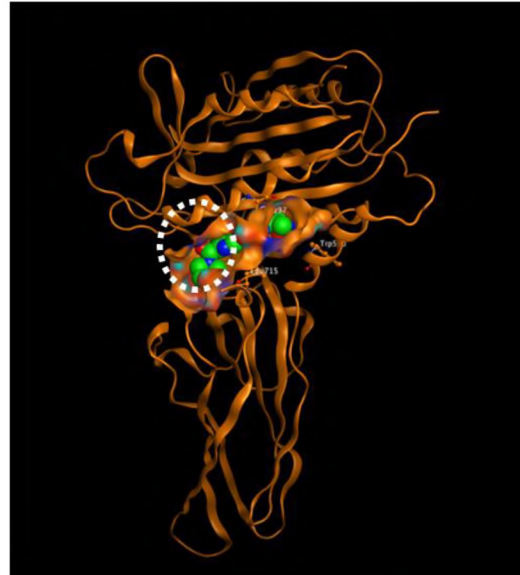


図19 チオリダジン（赤、空間充填モデル）が結合した MALT1 タンパク質（水色、PBD ID: 4I1R）（左）と MLT-747（緑、空間充填モデル）が結合した MALT1 タンパク質（橙色、PBD ID: 6F7I）（右）の結合ポケット形状の比較。リガンド近傍のタンパク質表面を可視化した（上段および中段）。MALT1 タンパク質全体図（上段）とアロステリック部位の拡大図（中段、下段）。

ることで、MALT1 阻害活性の向上に寄与していると考えられた。

MLT-747 との共結晶構造 (PDB ID: 6F7I) を用いて、化合物 **42**, **62**, **68** のドッキングシミュレーションを実施した。その際、個々の化合物の構造に合わせてタンパク質の側鎖構造を最適化するために、タンパク質構造最適化手法条件を「Induced Fit」に変更した (ドッキングシミュレーション条件は以下の通り)。

【ドッキングシミュレーション条件 (使用ソフトウェア: MOE)】

受容体原子: 6F7I (PDB ID)

リガンド結合部位: Ligand Atoms

配置探索手法: Triangle Matcher (Method), London dG (Score)

構造最適化手法: Induced Fit (Method), GBVI/WSA dG (Score)

化合物 **68** の推定結合様式では、予想した通り、1つのクロロフェニル基が MLT-747 ピラゾロピリミジン部分に、スルホニル基に結合したフェニル基が MLT-747 クロロピリジン近傍に位置していた (図 20)。一方で、Glu397 との相互作用は確認されなかった。化合物 **42** や化合物 **62** も同様の結合様式であることがシミュレーションによって示された。また、ドッキングシミュレーションを実施した 7 つの化合物の S スコアと MALT1 阻害活性 pIC_{50} 値には良好な相関 (相関係数 $R^2 = 0.58$) が認められ、シミュレーション結果の妥当性を支持する結果が得られた (表 12、図 21)。

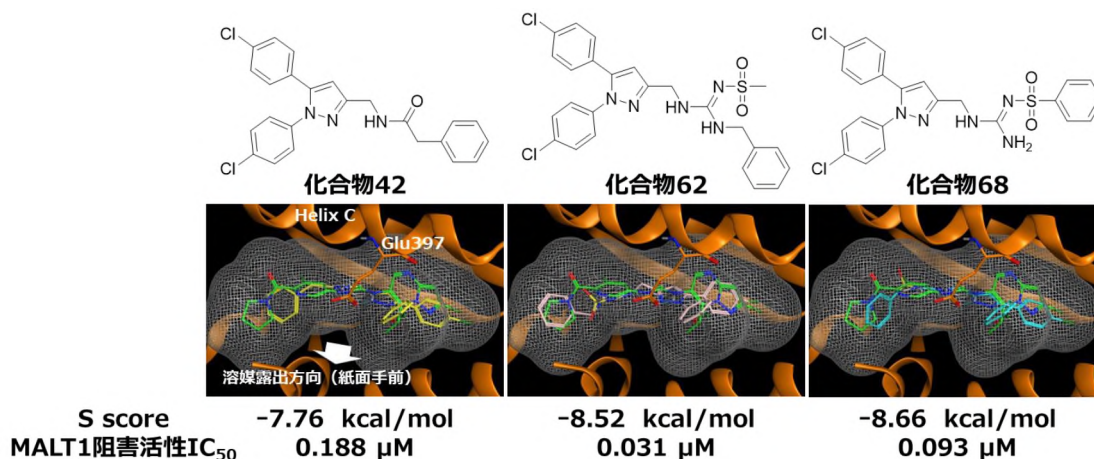


図 20 MALT1 阻害化合物 (**42**, **62**, **68**) の推定結合様式。MLT-747 が結合した MALT1 タンパク質の結晶構造 (PDB ID: 6F7I) に対して MOE によるドッキングシミュレーションを実施した。化合物 **42** (黄)、化合物 **62** (ピンク)、化合物 **68** (水色)、MLT-747 (緑) を示した。

表 1 2 ドッキングシミュレーション条件と S スコア、MALT1 阻害活性の pIC₅₀ 値 (-LOG₁₀(IC₅₀ 値[μM]*10⁻⁶) により算出)

化合物	S スコア	pIC ₅₀	受容体原子	構造最適化手法
Thioridazine	-7.67	5.46	411R	Rigid Receptor
化合物 1	-6.48	3.70	411R	Rigid Receptor
化合物 32	-6.76	6.31	411R	Rigid Receptor
化合物 42	-7.76	6.73	6F7I	Induce Fit
化合物 62	-8.52	7.51	6F7I	Induce Fit
化合物 68	-8.66	7.03	6F7I	Induce Fit
MLT-747	-11.09	7.85 ³¹	6F7I	Induce Fit

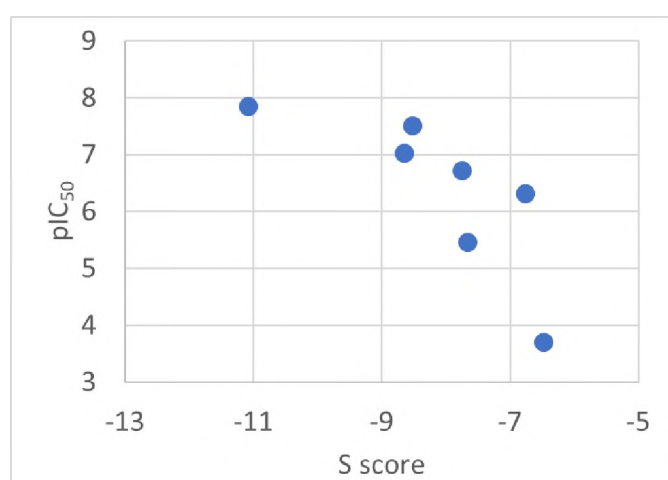


図 2 1 S スコアと MALT1 阻害活性 pIC₅₀ 値の相関 (線形近似における決定係数 R² = 0.58、Microsoft® Excel®により算出)

以上の結果から、予想したとおり、化合物 42 以降の化合物群で結合様式が変化した可能性が示された。結合様式の変化の影響をドッキングシミュレーションに反映させるために、各化合物群の構造活性相関に適したテンプレート結晶構造を選択することが重要であった。化合物 68 の推定結合様式では、アポ構造において Trp580 と Met717 が占める領域に 2 つのアリール基が位置していた。一方で、チオリダジンや MLT-747 で確認されている Glu397 との相互作用を獲得していない。このドッキングシミュレーション結果から、1*H*-ピラゾール 1 位および 5 位フェニル部位の低い変換許容性の要因として、ヘリックス C の動きを制限するために十分に強い疎水性相互作用を獲得する必要があったことが考えられる。その結果、化合物 68 は MALT1 タンパク質の不活性コンフォメーションを安定化し、強力な MALT1 阻害活性を実現していると考えられた (図 2 2)。

これまでの結果は、MALT1 阻害活性との整合性があることによって妥当性が支持された結合様式の推定である。結合様式の同定には、MALT1 タンパク質との共結晶構造の取得が必要である。今後のリード最適化段階での共結晶構造の取得が望まれる。

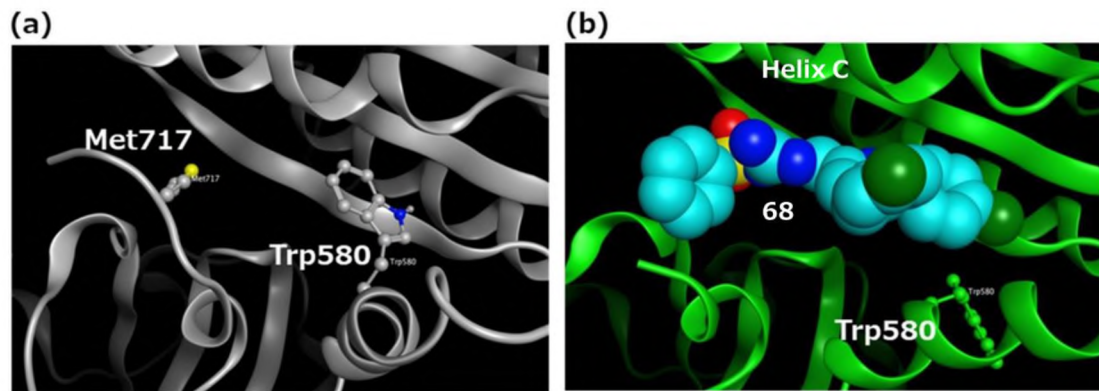


図 2.2 アロステリックポケット領域の拡大図。(a) アポヒト MALT1 タンパク質 (PDB ID: 3V55)。(b) ヒト MALT1 タンパク質の結晶構造 (PDB ID: 6F7I) における化合物 **68** (水色) の推定結合様式。

3. 総括

我々は、ヒット化合物 **1** を起点にした探索により、MALT1 阻害活性向上と経口吸収性を両立し、*in vivo* において抗乾癬活性を有する新規 MALT1 阻害化合物 **68** を見いだした (図 2 2)。初めに、ヒット化合物 **1** に対する網羅的な探索から、2 つのフェニル部位には 4-クロロフェニル基が適していること、アミド部位には変換許容性があることを見いだした。次に、アミド部位を構造変換することにより、アミド構造の代替としてメタンスルホニルグアニジン構造を、さらに、MALT1 阻害活性のさらなる向上に寄与する新たなファーマコフォアとしてフェニル基を見いだした。それらの情報を組み合わせ、強力な MALT1 阻害活性を有する *N*-ベンジルスルホニルグアニジン **62** を創出したが、代謝安定性が乏しかった。その課題を解決するために、フェニル基導入位置を変更することで、高い MALT1 阻害活性を維持しつつ、課題であった経口吸収性の改善を実現したベンゼンスルホニルグアニジン誘導体を取得した。その代表化合物である **68** は、*in vivo* において良好な経口吸収性を示し、経口投与でイミキモド誘発乾癬マウスモデルにおいて抗乾癬活性を示した。本化合物は、乾癬治療薬創出に向けた有望なリード化合物である。

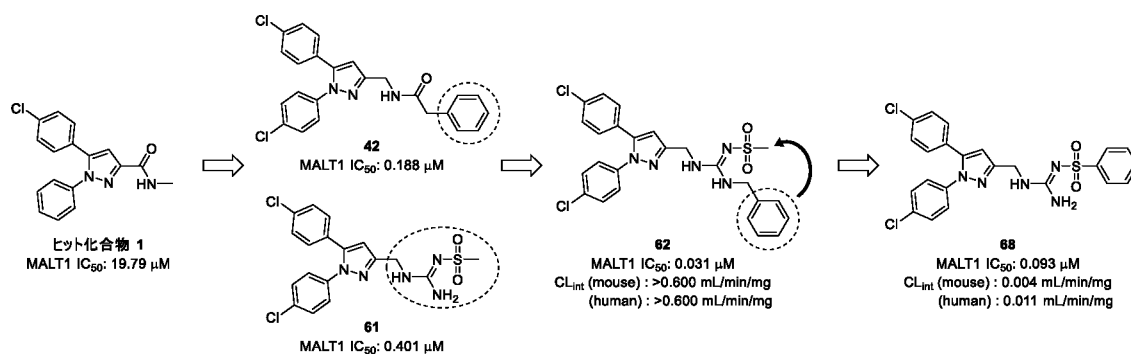


図 2 2 経口投与可能な抗乾癬作用を有する MALT1 阻害化合物の創出の経緯

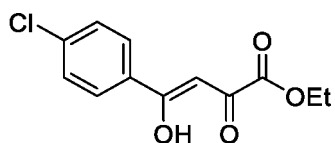
本研究により見出した誘導体はヒトでの効果が期待されるものであり、さらなる改良による医薬の創出や MALT1 タンパク質を標的とした医薬研究のツールとして有用である。今後、ベンゼンスルホニルグアニジン系統の化合物や、それらを改良した誘導体が治療薬として患者に届くことを期待したい。

4. 実験の部

化合物合成

特に断りのない限り、反応はアルゴン雰囲気下、各種操作は室温で行い、試薬・溶媒・無水溶媒は市販のものをそのまま用いた。反応の進行は TLC を用いて、UV 吸収および/または適当な発色試薬により明瞭なスポットとして確認できるまでホットプレート上で焼き、そのスポットを確認した。TLC は Merck 社製 Art.5715 シリカ TLC を用いた。減圧濃縮は、ロータリーエバポレーターを使用した。マイクロ波合成装置は Anton Paar 社製 Monowave 300 を使用した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータは、日本電子社製 JEOL ECS-400 核磁気共鳴分光計 (400 MHz)、ECZ-400 核磁気共鳴分光計 (400 MHz) を用い測定した。 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルデータは、日本電子社製 JEOL ECS-400 核磁気共鳴分光計 (100 MHz)、ECZ-400 核磁気共鳴分光計 (100 MHz) を用い測定した。LC-MS は Agilent 社製 1200 シリーズ質量分析計を用いて測定した。高分解能質量スペクトル (HRMS) は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用いて、島津製作所的高速液体クロマトグラフ/イオントラップ飛行時間型質量分析計で得られた。赤外分光スペクトルは、JASCO FT/IR-4100 を用いて ATR 法により測定した。並列型の有機合成装置は東京理科器械社製パーソナル有機合成装置 PPS-1500S を使用した。カラムクロマトグラフィーは山善社の FR-260 パラレル精製システムを用い、山善シリカゲルプレパックドカラム (シリカゲルハイフラッシュカラム、アミノハイフラッシュカラム、逆相ハイフラッシュカラム) により行なった。ケミカルシフトは、テトラメチルシラン (TMS) を基準にして δ (単位: ppm) にて示し、カップリング様式については、一重線:s、二重線:d、三重線:t、多重線:m、ブロード:br、あるいはその組み合わせにより表記した。

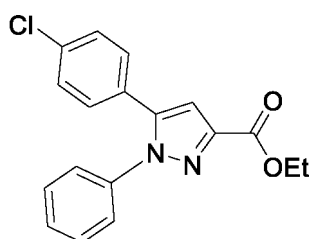
(Z)-4-(4-クロロフェニル)-4-ヒドロキシ-2-オキソブタ-3-エン酸エチル (I-2) の合成



1-(4-クロロフェニル)エタノン (I-1) (3.00 g, 19.4 mmol)、シュウ酸ジエチル (2.84 g, 19.4 mmol) およびエタノール (50 mL) の混合物に、ナトリウムエトキシド (132 mg, 1.94 mmol) を加え、攪拌しながら、一晩加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、1 M 塩酸を加え、得られた溶液を減圧下濃縮した。生じた固体をろ別し、水で洗浄することにより表題化合物 (3.84 g, 15.1 mmol, 収率 78%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.42 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 4.41 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 7.04 (1H, s), 7.47-7.51 (2H, m), 7.93-7.96 (2H, m). LCMS (ESI) m/z : 255 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

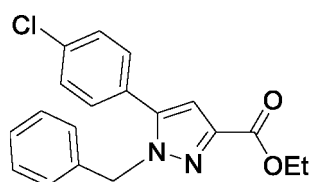
5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3a**) の合成



(*Z*)-4-(4-クロロフェニル)-4-ヒドロキシ-2-オキソブタ-3-エン酸エチル (**I-2**) (500 mg, 1.96 mmol) とフェニルヒドラジン (212 mg, 1.96 mmol) をエタノール (5 mL) に溶解した後、攪拌しながら一晩加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下で濃縮した。粗生成物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (407 mg, 1.25 mmol, 収率 63%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.42 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.46 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 7.04 (1H, s), 7.13-7.16 (2H, m), 7.27-7.39 (7H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 327 (M+H)⁺.

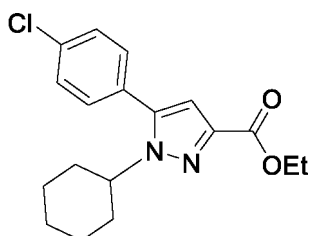
1-ベンジル-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3b**) の合成



(*Z*)-4-(4-クロロフェニル)-4-ヒドロキシ-2-オキソブタ-3-エン酸エチル (**I-2**) (500 mg, 1.96 mmol) に対して、ベンジルヒドラジン二塩酸塩 (383 mg, 1.96 mmol) を用いて、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (453 mg, 1.33 mmol, 収率 68%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.42 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.44 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 5.41 (2H, s), 6.88 (1H, s), 6.99-7.02 (2H, m), 7.17-7.30 (5H, m), 7.34-7.37 (2H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 341 (M+H)⁺.

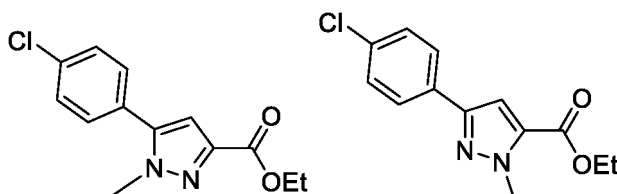
5-(4-クロロフェニル)-1-シクロヘキシル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3c**) の合成



(*Z*)-4-(4-クロロフェニル)-4-ヒドロキシ-2-オキソブタ-3-エン酸エチル (**I-2**) (500 mg, 1.96 mmol) に対して、シクロヘキシルヒドラジン塩酸塩 (296 mg, 1.96 mmol) を用いて、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (406 mg, 1.22 mmol, 収率 62%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.19-1.35 (3H, m), 1.39 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.64-1.91 (5H, m), 2.08-2.18 (2H, m), 4.07 (1H, dddd, *J* = 11.8, 11.8, 3.9, 3.9 Hz), 4.41 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 6.76 (1H, s), 7.27-7.31 (2H, m), 7.44-7.48 (2H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 333 (M+H)⁺.

5-(4-クロロフェニル)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3d**) および 3-(4-クロロフェニル)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボン酸エチル (**I-3d'**) の合成



(*Z*)-4-(4-クロロフェニル)-4-ヒドロキシ-2-オキソブタ-3-エン酸エチル (**I-2**) (3.00 g, 11.8 mmol) に対して、メチルヒドラジン (0.815 mL, 15.3 mmol) を用いて、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3a**) の合成と同様の方法で、5-(4-クロロフェニル)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3d**) (850 mg, 3.21 mmol, 収率 27%) を白色固体として、また 3-(4-クロロフェニル)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボン酸エチル (**I-3d'**) (1.35 g, 5.10 mmol, 収率 43%) を白色固体として得た。

I-3d

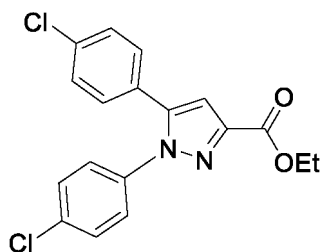
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.41 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.94 (3H, s), 4.43 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 6.85 (1H, s), 7.34-7.37 (2H, m), 7.45-7.48 (2H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 265 (M+H)⁺.

I-3d'

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.40 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.22 (3H, s), 4.37 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 7.09

(1H, s), 7.35-7.39 (2H, m), 7.71-7.74 (2H, m). LCMS (ESI) m/z : 265 (M+H)⁺.

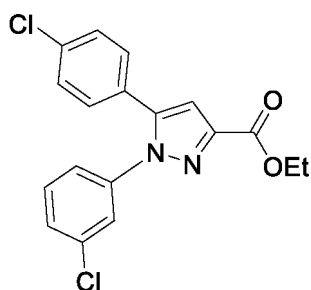
1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3e**) の合成



(*Z*)-4-(4-クロロフェニル)-4-ヒドロキシ-2-オキソブタ-3-エン酸エチル (**I-2**) (2.00 g, 7.85 mmol) に対して、(4-クロロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (1.41 g, 7.85 mmol) を用いて、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (1.55 g, 4.29 mmol, 収率 55%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.30 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 4.29 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 7.30 (1H, s), 7.38-7.47 (6H, m), 7.78-7.81 (2H, m). LCMS (ESI) m/z : 361 (M+H)⁺.

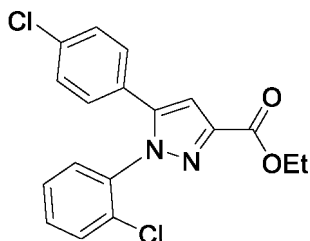
1-(3-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3f**) の合成



(*Z*)-4-(4-クロロフェニル)-4-ヒドロキシ-2-オキソブタ-3-エン酸エチル (**I-2**) (500 mg, 1.96 mmol) に対して、(3-クロロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (352 mg, 1.96 mmol) を用いて、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (361 mg, 1.00 mmol, 収率 51%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.43 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.46 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 7.03 (1H, s), 7.07-7.10 (1H, m), 7.14-7.18 (2H, m), 7.26 (1H, dd, $J = 8.2, 8.2$ Hz), 7.31-7.37 (3H, m), 7.49 (1H, dd, $J = 2.0, 2.0$ Hz). LCMS (ESI) m/z : 361 (M+H)⁺.

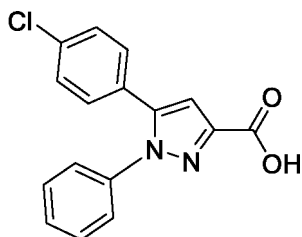
1-(2-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3g**)
の合成



(*Z*)-4-(4-クロロフェニル)-4-ヒドロキシ-2-オキソブタ-3-エン酸エチル (**I-2**) (500 mg, 1.96 mmol) に対して、(2-クロロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (352 mg, 1.96 mmol) を用いて、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (501 mg, 1.39 mmol, 収率 71%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.43 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.46 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 7.08 (1H, s), 7.11-7.15 (2H, m), 7.23-7.26 (2H, m), 7.35-7.45 (3H, m), 7.49-7.51 (1H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 361 (M+H)⁺.

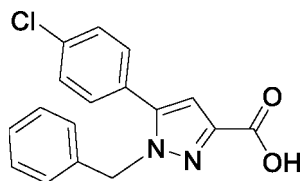
5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4a**) の合成



5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3a**) (300 mg, 0.918 mmol) をエタノール (3 mL) に加えた後、8 M 水酸化ナトリウム水溶液 (0.574 mL, 4.59 mmol) を加えて、攪拌しながら 50 °C で 4 時間加熱した。反応混合物を室温まで冷却した後、1 M 塩酸を加えて pH 2 として、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮することにより表題化合物 (250 mg, 0.837 mmol, 収率 91%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.11 (1H, s), 7.25-7.35 (4H, m), 7.42-7.50 (5H, m), 12.99 (1H, s). LCMS (ESI) *m/z*: 299 (M+H)⁺.

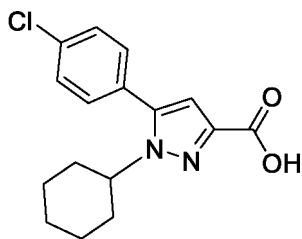
1-ベンジル-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4b**) の合成



1-ベンジル-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3b**) (300 mg, 0.880 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (270 mg, 0.863 mmol, 収率 98%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 5.41 (2H, s), 6.94 (1H, s), 7.02-7.04 (2H, m), 7.20-7.31 (5H, m), 7.36-7.40 (2H, m). 1H (COOH) は観察されなかった. LCMS (ESI) *m/z*: 313 (M+H)⁺.

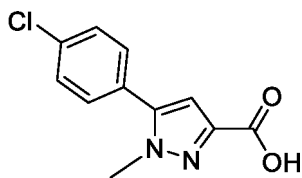
5-(4-クロロフェニル)-1-シクロヘキシル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4c**) の合成



5-(4-クロロフェニル)-1-シクロヘキシル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3c**) (300 mg, 0.901 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (249 mg, 0.817 mmol, 収率 91%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.21-1.35 (3H, m), 1.64-2.14 (7H, m), 4.09 (1H, dddd, *J* = 11.8, 11.8, 3.6, 3.6 Hz), 6.83 (1H, s), 7.29-7.32 (2H, m), 7.46-7.50 (2H, m). 1H (COOH) は観察されなかった. LCMS (ESI) *m/z*: 305 (M+H)⁺.

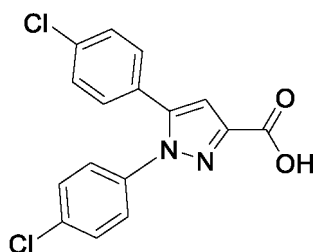
5-(4-クロロフェニル)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4d**) の合成



5-(4-クロロフェニル)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3d**) (100 mg, 0.378 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (87 mg, 0.37 mmol, 収率 97%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.97 (3H, s), 6.91 (1H, s), 7.36-7.39 (2H, m), 7.46-7.50 (2H, m). 1H (COOH) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 237 (M+H) $^+$.

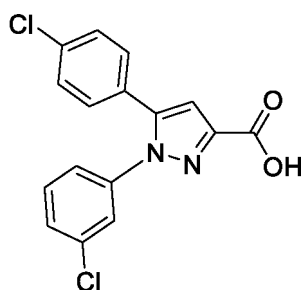
1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4e**) の合成



1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3e**) (3.50 g, 9.69 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (3.20 g, 9.60 mmol, 収率 99%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.11 (1H, s), 7.28-7.31 (2H, m), 7.34-7.38 (2H, m), 7.45-7.48 (2H, m), 7.52-7.56 (2H, m). 1H (COOH) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 333 (M+H) $^+$.

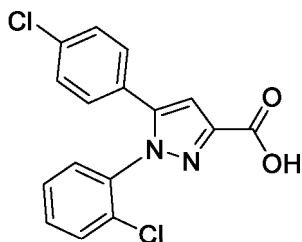
1-(3-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4f**) の合成



1-(3-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3f**) (300 mg, 0.831 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (268 mg, 0.804 mmol, 収率 97%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.09-7.12 (2H, m), 7.17-7.19 (2H, m), 7.29-7.39 (4H, m), 7.49-7.50 (1H, m). 1H (COOH) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 333 (M+H) $^+$.

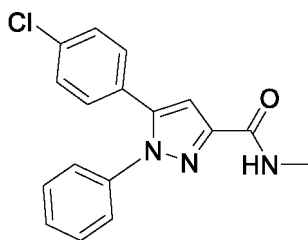
1-(2-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4g**) の合成



1-(2-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (**I-3g**) (300 mg, 0.831 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4a**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (253 mg, 0.759 mmol, 収率 91%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.12-7.16 (3H, m), 7.25-7.28 (2H, m), 7.37-7.51 (4H, m). 1H (COOH) は観察されなかった. LCMS (ESI) *m/z*: 333 (M+H)⁺.

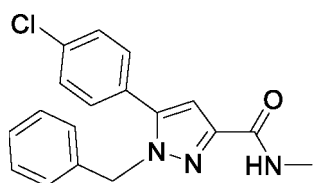
5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**1**) の合成



5-(4-クロロフェニル)-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4a**) (50 mg, 0.17 mmol) を DMF (1 mL) に溶解した後、2 M メチルアミン THF 溶液 (0.100 mL, 0.201 mmol) と DIPEA (0.088 mL, 0.502 mmol) を加え、さらに、氷冷下、HATU (70 mg, 0.18 mmol) を加えた。室温で 14 時間攪拌した後、反応混合物に水を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (32 mg, 0.10 mmol, 収率 61%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃): δ 3.01 (3H, d, *J* = 4.9 Hz), 6.93-6.97 (1H, m), 7.04 (1H, s), 7.13-7.16 (2H, m), 7.26-7.30 (4H, m), 7.37-7.41 (3H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 312 (M+H)⁺.

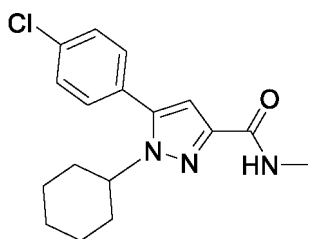
1-ベンジル-5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**2**) の合成



1-ベンジル-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4b**) (50 mg, 0.16 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**1**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (24 mg, 0.074 mmol, 収率 46%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.99 (3H, d, *J* = 5.0 Hz), 5.31 (2H, s), 6.88-6.91 (2H, m), 7.00-7.02 (2H, m), 7.21-7.39 (7H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 326 (M+H)⁺.

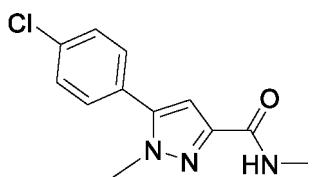
5-(4-クロロフェニル)-1-シクロヘキシル-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**3**) の合成



5-(4-クロロフェニル)-1-シクロヘキシル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4c**) (50 mg, 0.16 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**1**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (32 mg, 0.10 mmol, 収率 61%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.23-1.32 (3H, m), 1.67-1.71 (1H, m), 1.84-2.02 (6H, m), 3.00 (3H, d, *J* = 5.0 Hz), 4.00-4.07 (1H, m), 6.75 (1H, s), 6.89-6.95 (1H, m), 7.26-7.30 (2H, m), 7.44-7.47 (2H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 318 (M+H)⁺.

5-(4-クロロフェニル)-*N*,1-ジメチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**4**) の合成

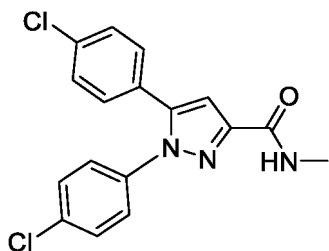


5-(4-クロロフェニル)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4d**) (10 mg, 0.13 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カル

ボキサミド (1) の合成と同様の方法で、表題化合物 (8.0 mg, 0.032 mmol, 収率 76%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.99 (3H, d, $J = 4.9$ Hz), 3.87 (3H, s), 6.81-6.86 (2H, m), 7.33-7.37 (2H, m), 7.44-7.47 (2H, m). LCMS (ESI) m/z : 237 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

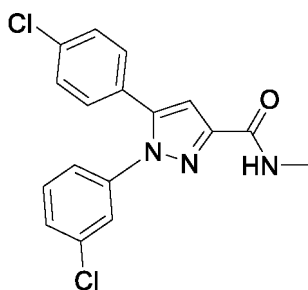
1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (5) の合成



1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (I-4e) (1.00 g, 3.00 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (1) の合成と同様の方法で、表題化合物 (673 mg, 1.94 mmol, 収率 65%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.01 (3H, d, $J = 5.1$ Hz), 6.91-6.96 (1H, m), 7.03 (1H, s), 7.13-7.16 (2H, m), 7.21-7.24 (2H, m), 7.30-7.38 (4H, m). LCMS (ESI) m/z : 346 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

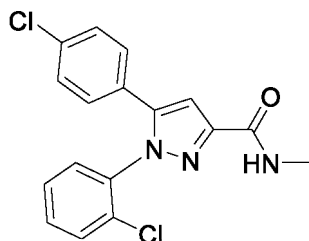
1-(3-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (6) の合成



1-(3-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (I-4f) (50 mg, 0.15 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (1) の合成と同様の方法で、表題化合物 (30 mg, 0.087 mmol, 収率 58%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.02 (3H, d, $J = 5.0$ Hz), 6.93-6.97 (1H, m), 7.03-7.06 (2H, m), 7.14-7.18 (2H, m), 7.26-7.37 (4H, m), 7.45 (1H, dd, $J = 2.0, 2.0$ Hz). LCMS (ESI) m/z : 346 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

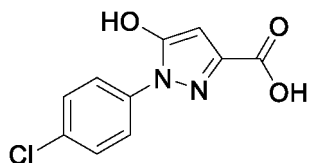
1-(2-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**7**) の合成



1-(2-クロロフェニル)-5-(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4g**) (50 mg, 0.15 mmol) に対して、5-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**1**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (32 mg, 0.092 mmol, 収率 62%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.00 (3H, d, *J* = 5.0 Hz), 6.89-6.94 (1H, m), 7.08 (1H, s), 7.10-7.13 (2H, m), 7.22-7.26 (2H, m), 7.36-7.50 (4H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 346 (M+H)⁺.

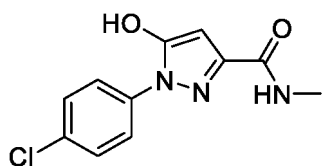
1-(4-クロロフェニル)-5-ヒドロキシ-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**II-3**) の合成



(4-クロロフェニル)ヒドラジン塩酸塩 (**II-1**) (12.6 g, 70.4 mmol) とブタ-2-イン二酸ジメチル (**II-2**) (10.0 g, 70.4 mmol) を THF (100 mL) に懸濁した後、トリエチルアミン (19.6 mL, 141 mmol) を 30 分かけて滴下した。一晩攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた残渣をメタノール (100 mL) に溶解し、1 M ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 (281 mL, 281 mmol) を 30 分かけて滴下した。反応混合物を、さらに一晩攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた残渣を水で希釈し、MTBE およびジクロロメタンで洗浄した。水層に 1 M 塩酸を加えて、pH 2 に酸性化した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル-メタノール) で精製することにより表題化合物 (9.50 g, 39.8 mmol, 収率 57%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 5.92 (1H, s), 7.55-7.59 (2H, m), 7.77-7.81 (2H, m), 12.23 (1H, br s), 12.79 (1H, br s). LCMS (ESI) *m/z*: 239 (M+H)⁺.

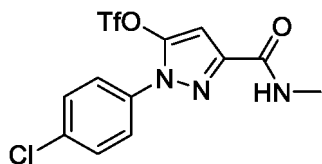
1-(4-クロロフェニル)-5-ヒドロキシ-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (II-4) の合成



2 M メチルアミン/THF 溶液 (12.6 mL, 25.1 mmol) と HOBt (3.85 g, 25.1 mmol) を DMF (30 mL) に溶解した後、1-(4-クロロフェニル)-5-ヒドロキシ-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (II-3) (5.00 g, 21.0 mmol) と EDCI (4.42 g, 23.0 mmol) を加えた。室温で一晩攪拌した後、反応混合物に 1 M 塩酸を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を 1 M 塩酸、水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム-メタノール) で精製することにより表題化合物 (3.55 g, 14.1 mmol, 収率 67%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.74 (3H, d, $J = 4.5$ Hz), 5.86 (1H, s), 7.56 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.84 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 8.13 (1H, q, $J = 4.5$ Hz), 12.19 (1H, s). LCMS (ESI) m/z : 252 (M+H) $^+$.

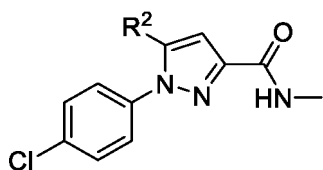
トリフルオロメタンスルホン酸 1-(4-クロロフェニル)-3-(メチルカルバモイル)-1*H*-ピラゾール-5-イル (II-5) の合成



1-(4-クロロフェニル)-5-ヒドロキシ-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (II-4) (3.50 g, 13.9 mmol) とトリエチルアミン (4.65 mL, 33.4 mmol) を THF (30 mL) に溶解した後、*N*-フェニルビス(トリフルオロメタン)スルホンイミド (5.96 g, 16.7 mmol) を室温で少しずつ加えた。室温で一晩攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (4.68 g, 12.2 mmol, 収率 88%) を白色アモルファスとして得た。

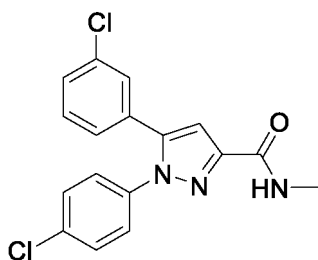
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.01 (3H, d, $J = 5.1$ Hz), 6.87 (1H, s), 6.90 (1H, m), 7.49-7.54 (4H, m). LCMS (ESI) m/z : 384 (M+H) $^+$.

1-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド誘導体の液相パラレル合成



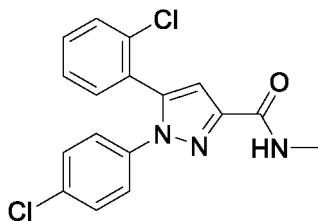
トリフルオロメタンスルホン酸 1-(4-クロロフェニル)-3-(メチルカルバモイル)-1*H*-ピラゾール-5-イル (II-5) (30 mg, 0.078 mmol)、ボロン酸誘導体 (0.094 mmol)、テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (9.0 mg, 0.0078 mmol) およびトリエチルアミン (0.026 mL, 0.19 mmol) を DME (0.5 mL) に溶解し、一晩加熱還流した。35 °C に加熱しながら窒素ガスを吹き込んで溶媒を除去した。残渣をアセトニトリル/DMF の混合溶媒に溶解し、その溶液を分取 HPLC (水-アセトニトリル) で精製し、カップリング生成物 (8-21) を得た。

5-(3-クロロフェニル)-1-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (8)



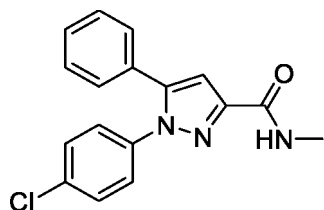
LCMS (ESI) m/z : 346 (M+H)⁺.

5-(2-クロロフェニル)-1-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (9)



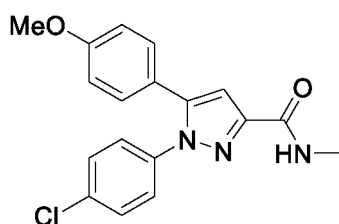
LCMS (ESI) m/z : 346 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-5-フェニル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (10)



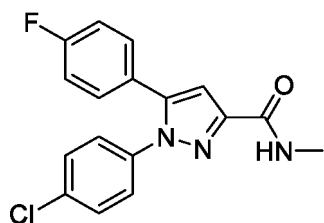
LCMS (ESI) m/z : 312 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-5-(4-メトキシフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (11)



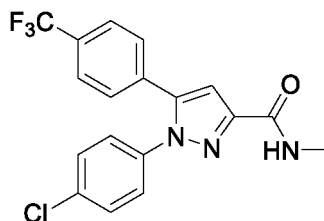
LCMS (ESI) m/z : 342 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-5-(4-フルオロフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (12)



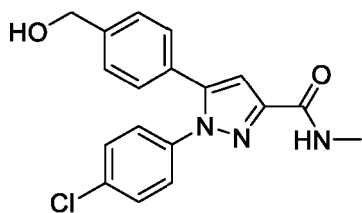
LCMS (ESI) m/z : 330 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-5-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (13)



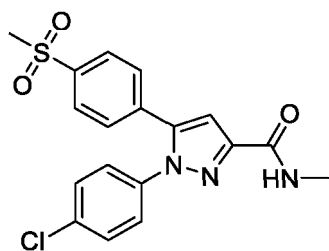
LCMS (ESI) m/z : 380 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-5-(4-(ヒドロキシメチル)フェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (14)



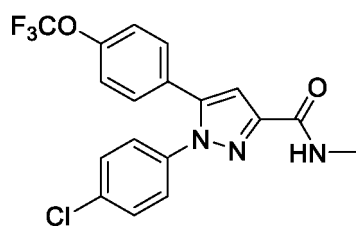
LCMS (ESI) m/z : 342 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-5-(4-(メチルスルホニル)フェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (15)



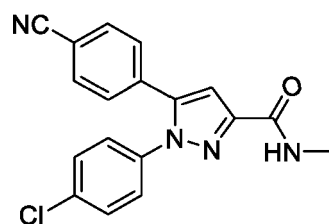
LCMS (ESI) m/z : 390 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-5-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (16)



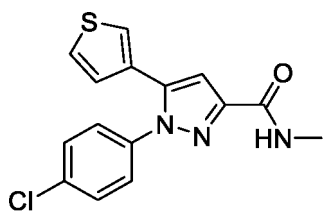
LCMS (ESI) m/z : 396 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-5-(4-シアノフェニル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (17)



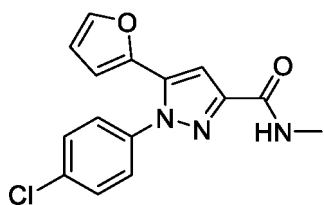
LCMS (ESI) m/z : 337 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-*N*-メチル-5-(チオフェン-3-イル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (18)



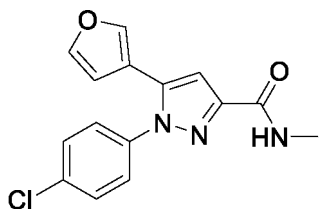
LCMS (ESI) m/z : 318 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-5-(フラン-2-イル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (19)



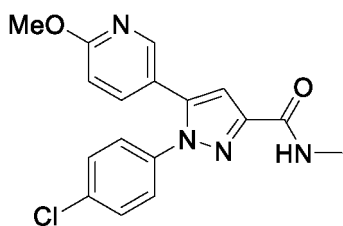
LCMS (ESI) m/z : 302 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-5-(フラン-3-イル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (20)



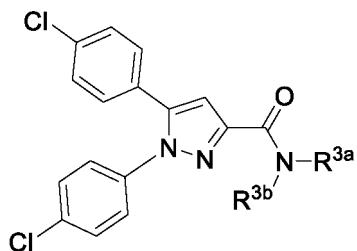
LCMS (ESI) m/z : 302 (M+H)⁺.

1-(4-クロロフェニル)-5-(6-メトキシピリジン-3-イル)-*N*-メチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (21)



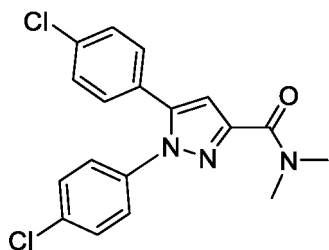
LCMS (ESI) m/z : 343 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド誘導体の液相パラレル合成



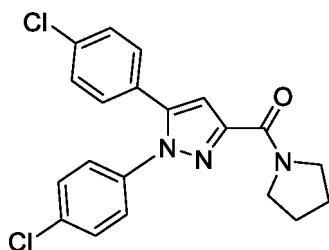
1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4**) (10 mg, 0.030 mmol)、アミン (0.060 mmol)、DIPEA (0.026 mL, 0.150 mmol) および HATU (17 mg, 0.045 mmol) を DMF (0.3 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌した。35 °C に加熱しながら窒素ガスを吹き込んで溶媒を除去した。残渣をアセトニトリル/DMF 混合溶媒に溶解し、その溶液を分取 HPLC (水/アセトニトリル混合溶媒) で精製し、アミド誘導体 (**22**, **23**, **26 - 30**, **32**, **38 - 41**) を得た。

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N,N*-ジメチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**22**)



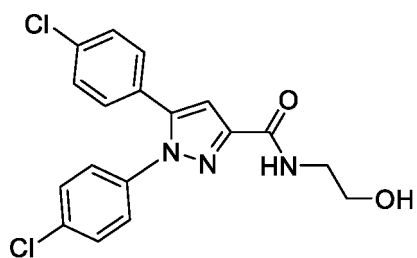
LCMS (ESI) m/z : 360 (M+H)⁺.

(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)(ピロリジン-1-イル)メタノン (**23**)



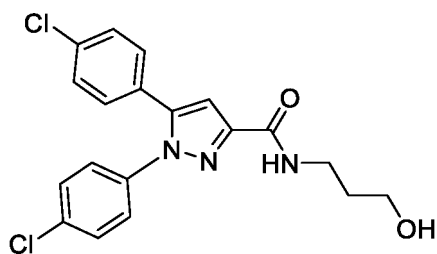
LCMS (ESI) m/z : 386 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-ヒドロキシエチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド
(26)



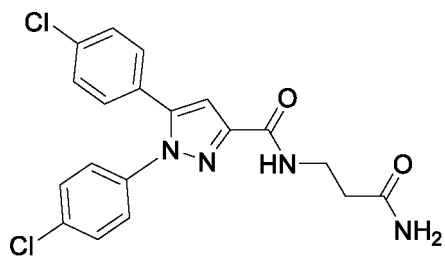
LCMS (ESI) m/z : 376 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(3-ヒドロキシプロピル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (27)



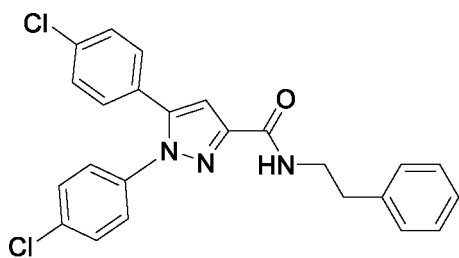
LCMS (ESI) m/z : 390 (M+H)⁺.

N-(3-アミノ-3-オキソプロピル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (28)



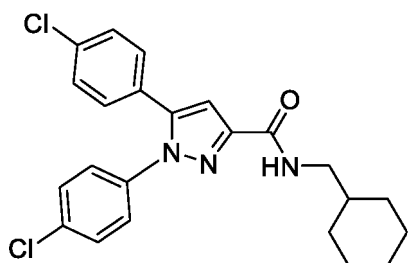
LCMS (ESI) m/z : 403 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-フェネチル-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (29)



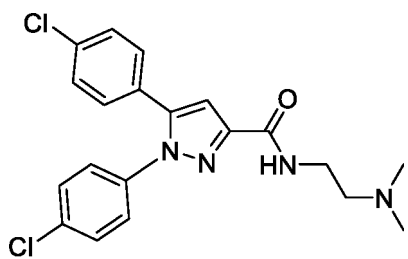
LCMS (ESI) m/z : 436 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(シクロヘキシルメチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (30)



LCMS (ESI) m/z : 428 (M+H)⁺.

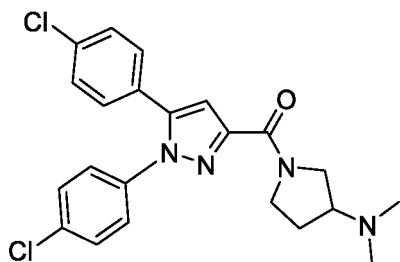
1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-(ジメチルアミノ)エチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (32)



¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.27 (6H, s), 2.52 (2H, t, $J = 6.0$ Hz), 3.55 (2H, dt, $J = 6.0, 6.0$ Hz), 7.02 (1H, s), 7.12-7.16 (2H, m), 7.23-7.38 (7H, m).

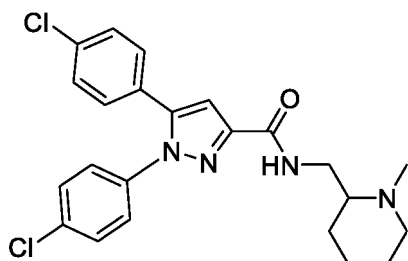
LCMS (ESI) m/z : 403 (M+H)⁺.

(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)(3-(ジメチルアミノ)ピロリジン-1-イル)メタノン (38)



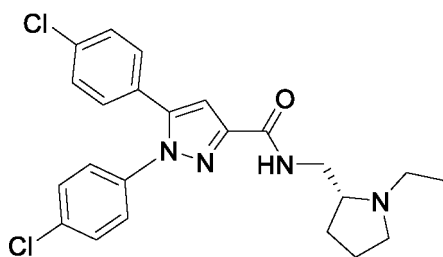
LCMS (ESI) m/z : 429 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-((1-メチルピペリジン-2-イル)メチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド(39)



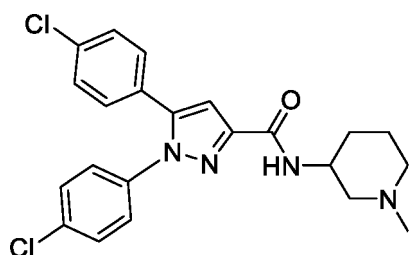
LCMS (ESI) m/z : 443 (M+H)⁺.

(*R*)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-((1-エチルピロリジン-2-イル)メチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (40)



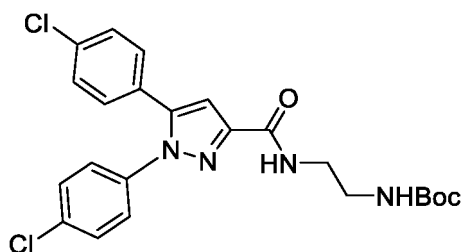
LCMS (ESI) m/z : 443 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(1-メチルピペリジン-3-イル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**41**)



LCMS (ESI) m/z : 429 (M+H)⁺.

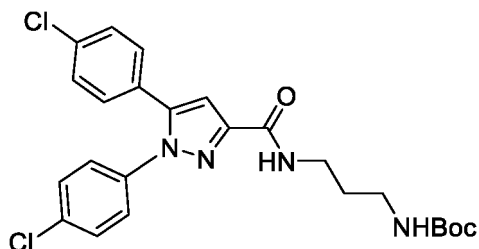
(2-(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)エチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**IV-1**) の合成



1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (**I-4**) (1.00 g, 3.00 mmol) と *N*-Boc エチレンジアミン (529 mg, 3.30 mmol)、DIPEA (1.15 mL, 6.60 mmol) を DMF (10 mL) に溶解した後、HATU (1.26 g, 3.30 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 12 時間攪拌した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をヘキサンで洗浄することにより表題化合物 (1.00 g, 2.10 mmol, 収率 70%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.36 (9H, s), 3.08-3.10 (2H, m), 3.31-3.33 (2H, m), 6.91 (1H, m), 7.05 (1H, s), 7.28-7.30 (2H, m), 7.37-7.39 (2H, m), 7.46-7.48 (2H, m), 7.54-7.56 (2H, m), 8.34-8.38 (1H, m). LCMS (ESI) m/z : 475 (M+H)⁺.

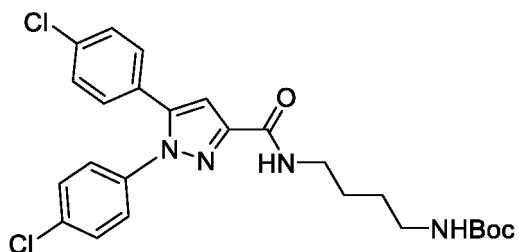
(3-(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)プロピル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (IV-2) の合成



1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (I-4) (500 mg, 1.50 mmol) に対して、*N*-Boc-1,3-プロパンジアミン (288 mg, 1.65 mmol) を用いて、(2-(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)エチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (IV-1) の合成と同様の方法で、表題化合物 (628 mg, 1.28 mmol, 収率 85%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.44 (9H, s), 1.74-1.77 (2H, m), 3.21-3.22 (2H, m), 3.50-3.55 (2H, m), 5.11 (1H, m), 7.01 (1H, s), 7.13-7.15 (2H, m), 7.23-7.26 (2H, m), 7.31-7.33 (2H, m), 7.35-7.37 (2H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 489 (M+H)⁺.

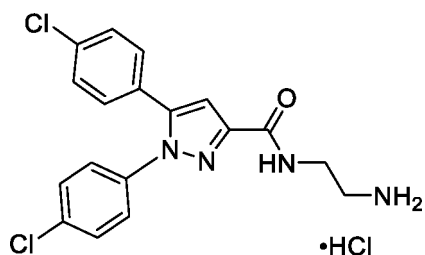
(4-(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)ブチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (IV-3) の合成



1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (I-4) (500 mg, 1.50 mmol) に対して、*N*-Boc-1,4-ブタンジアミン (311 mg, 1.65 mmol) を用いて、(2-(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)エチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (IV-1) の合成と同様の方法で、表題化合物 (640 mg, 1.27 mmol, 収率 85%) を白色固体として得た。

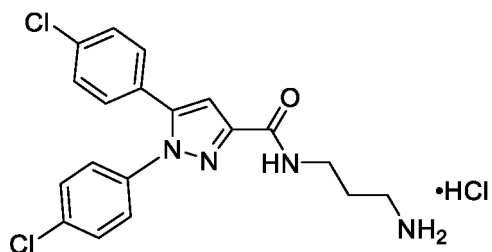
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.43 (9H, s), 1.57-1.68 (4H, m), 3.16-3.17 (2H, m), 3.45-3.50 (2H, m), 4.55-4.59 (1H, m), 7.02 (1H, s), 7.13-7.15 (2H, m), 7.24-7.26 (2H, m), 7.30-7.32 (2H, m), 7.35-7.37 (2H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 503 (M+H)⁺.

N-(2-アミノエチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**24**)
の塩酸塩の合成



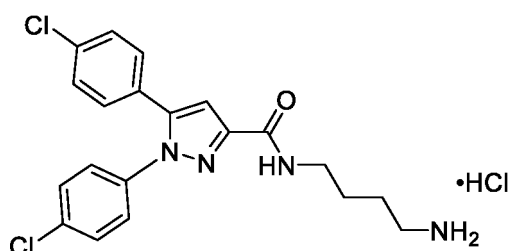
(2-(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)エチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**IV-1**) (400 mg, 0.841 mmol) を酢酸エチル (2 mL) に溶解した後、4 M 塩化水素/酢酸エチル溶液 (2.10 mL, 8.42 mmol) を滴下した。室温で 12 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物を酢酸エチルで洗浄することにより表題化合物 (346 mg, 0.841 mmol, 収率 quant.) を白色固体として得た。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2.96-2.99 (2H, m), 3.51-3.56 (2H, m), 7.11 (1H, s), 7.29-7.31 (2H, m), 7.37-7.40 (2H, m), 7.47-7.49 (2H, m), 7.56-7.58 (2H, m), 8.02-8.03 (2H, m), 8.64 (1H, m). 1H (HCl) は観察されなかった。LCMS (ESI) *m/z*: 375 (M+H)⁺.

N-(3-アミノプロピル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**25**) の塩酸塩の合成



(3-(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)プロピル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**IV-2**) (620 mg, 1.27 mmol) に対して、*N*-(2-アミノエチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**24**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (496 mg, 1.17 mmol, 収率 92%) を白色固体として得た。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.78-1.85 (2H, m), 2.79-2.86 (2H, m), 3.25-3.27 (2H, m), 7.06 (1H, s), 7.28-7.30 (2H, m), 7.38-7.40 (2H, m), 7.46-7.49 (2H, m), 7.55-7.57 (2H, m), 7.78-7.81 (2H, m), 8.57-8.60 (1H, m). 1H (HCl) は観察されなかった。LCMS (ESI) *m/z*: 389 (M+H)⁺.

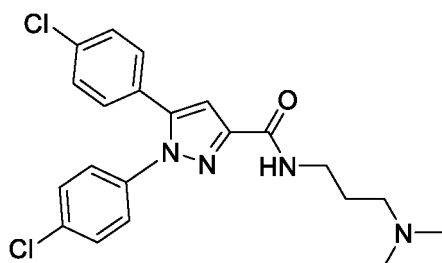
N-(4-アミノブチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**IV-4**) の塩酸塩の合成



(4-(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)ブチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**IV-3**) (630 mg, 1.25 mmol) に対して、*N*-(2-アミノエチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**24**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (326 mg, 0.808 mmol, 収率 65%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.52-1.60 (4H, m), 2.77-2.82 (2H, m), 3.27-3.32 (2H, m), 7.04 (1H, s), 7.28-7.30 (2H, m), 7.37-7.39 (2H, m), 7.46-7.49 (2H, m), 7.55-7.57 (2H, m), 7.77-7.80 (2H, m), 8.42-8.45 (1H, m). 1H (HCl) は観察されなかった. LCMS (ESI) *m/z*: 403 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**36**) の合成

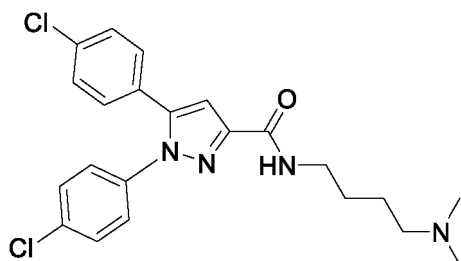


N-(3-アミノプロピル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**25**) の塩酸塩 (20 mg, 0.047 mmol) とホルムアルデヒド水溶液 (0.013 mL, 0.47 mmol)、酢酸 (0.054 mL, 0.94 mmol) を THF (5 mL) に懸濁した後、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (49.8 mg, 0.235 mmol) を加えた。室温で 12 時間攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム-メタノール) で精製することにより表題化合物 (17 mg, 0.041 mmol, 収率 87%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.76-1.80 (2H, m), 2.25 (6H, s), 2.40-2.44 (2H, m), 3.51-3.55 (2H, m), 7.02 (1H, s), 7.14-7.16 (2H, m), 7.22-7.24 (2H, m), 7.31-7.33 (2H, m), 7.35-7.37

(2H, m), 7.81-7.84 (1H, m). LCMS (ESI) m/z : 417 (M+H)⁺.

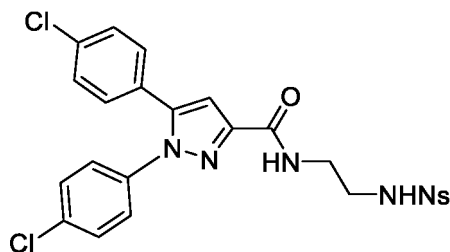
1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**37**) の合成



N-(4-アミノブチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**IV-4**) の塩酸塩 (40 mg, 0.091 mmol) に対して、1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**36**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (31 mg, 0.073 mmol, 収率 80%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.57-1.69 (4H, m), 2.23 (6H, s), 2.31-2.34 (2H, m), 3.45-3.05 (2H, m), 7.02 (1H, s), 7.13-7.15 (2H, m), 7.22-7.24 (2H, m), 7.30-7.32 (2H, m), 7.35-7.37 (2H, m). 1H (CONH) は観察されなかった。LCMS (ESI) m/z : 431 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-((4-ニトロフェニル)スルホンアミド)エチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**V-1**) の合成

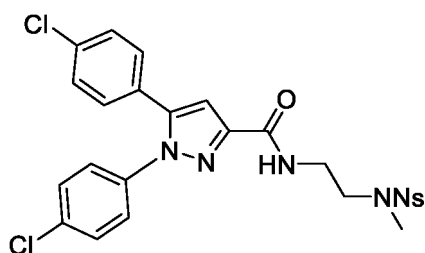


N-(2-アミノエチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**24**) の塩酸塩 (89 mg, 0.22 mmol) とトリエチルアミン (0.060 mL, 0.43 mmol) をクロロホルム (2 mL) に溶解した後、2-ニトロベンゼンスルホンクロリド (72 mg, 0.32 mmol) を加えた。室温で 12 時間攪拌した後、反応混合物に水を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (118 mg, 0.211 mmol, 収率 97%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.36-3.41 (2H, m), 3.60-3.64 (2H, m), 5.82-5.85 (1H, m), 6.98 (1H, s), 7.13-7.15 (2H, m), 7.22-7.24 (2H, m), 7.31-7.33 (2H, m), 7.36-7.38 (2H, m), 7.68-

7.74 (2H, m), 7.80-7.82 (1H, m), 8.14-8.16 (1H, m). 1H (NH) は観察されなかった.
LCMS (ESI) m/z : 560 (M+H)⁺.

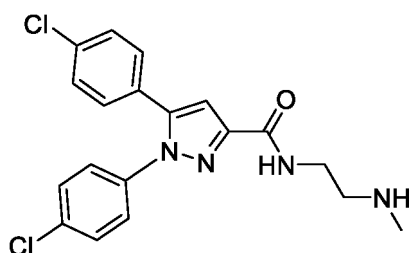
1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-((*N*-メチル-4-ニトロフェニル)スルホンアミド)エチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**V-2**) の合成



1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-((4-ニトロフェニル)スルホンアミド)エチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**V-1**) (118 mg, 0.211 mmol) と炭酸カリウム (145 mg, 1.05 mmol) を DMF (2 mL) に懸濁した後、ヨウ化メチル (0.066 mL, 1.05 mmol) を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、反応混合物に水を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (119 mg, 0.207 mmol, 収率 98%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.03 (3H, s), 3.50-3.53 (2H, m), 3.66-3.71 (2H, m), 6.97 (1H, s), 7.13-7.16 (2H, m), 7.22-7.24 (2H, m), 7.31-7.32 (2H, m), 7.35-7.37 (2H, m), 7.51-7.53 (1H, m), 7.58-7.66 (2H, m), 7.99-8.01 (1H, m). LCMS (ESI) m/z : 574 (M+H)⁺.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-(メチルアミノ)エチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**31**) の合成

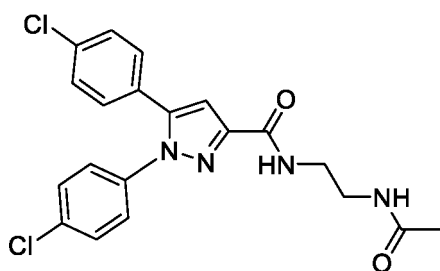


1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-((*N*-メチル-4-ニトロフェニル)スルホンアミド)エチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**V-2**) (65 mg, 0.11 mmol) と炭酸セシウム (184 mg, 0.566 mmol) をアセトニトリル (2 mL) に溶解した後、チオフェノール (0.035 mL, 0.34 mmol) を加えた。50 °C で 1 時間攪拌した後、反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し

た後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム-メタノール）で精製することにより表題化合物（27 mg, 0.068 mmol, 収率 60%）を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.57 (3H, s), 3.01-3.03 (2H, m), 3.67-3.71 (2H, m), 7.02 (1H, s), 7.10-7.12 (2H, m), 7.22-7.24 (2H, m), 7.29-7.31 (2H, m), 7.33-7.35 (2H, m), 7.69 (1H, m). LCMS (ESI) m/z : 389 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

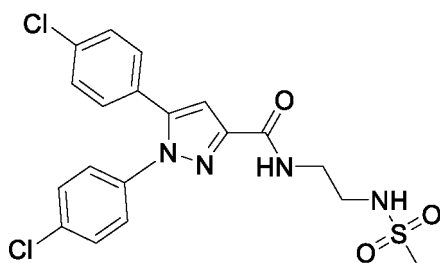
N-(2-アセトアミドエチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**34**) の合成



N-(2-アミノエチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**24**) の塩酸塩 (50.0 mg, 0.121 mmol) をピリジン (2 mL) に溶解した後、無水酢酸 (1.0 mL, 87 mmol) を加えた。室温で 12 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサノール-酢酸エチル）で精製することにより表題化合物 (45 mg, 0.11 mmol, 収率 88%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.99 (3H, s), 3.47-3.51 (2H, m), 3.59-3.64 (2H, m), 6.28-6.32 (1H, m), 7.02 (1H, s), 7.14-7.16 (2H, m), 7.22-7.25 (2H, m), 7.34-7.36 (2H, m), 7.36-7.38 (2H, m). 1H (NH) は観察されなかった。LCMS (ESI) m/z : 417 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-(メチルスルホンアミド)エチル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**35**) の合成

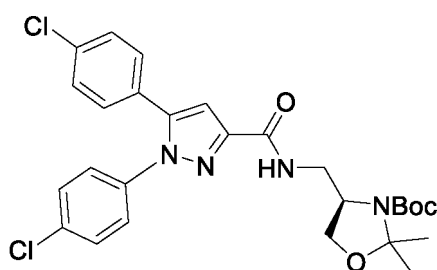


N-(2-アミノエチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**24**) の塩酸塩 (50 mg, 0.12 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に懸濁した後、トリエチルアミン (0.085 mL, 0.61 mmol) とメタンсульホニルクロリド (0.014 mL, 0.18 mmol)

を加えた。室温で 12 時間攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル）で精製することにより表題化合物（49 mg, 0.11 mmol, 収率 89%）を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.97 (3H, s), 3.36-3.40 (2H, m), 3.62-3.66 (2H, m), 5.51 (1H, m), 7.00 (1H, s), 7.10-7.12 (2H, m), 7.20-7.22 (2H, m), 7.29-7.31 (2H, m), 7.33-7.36 (2H, m), 7.43-7.47 (1H, m). LCMS (ESI) m/z : 453 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

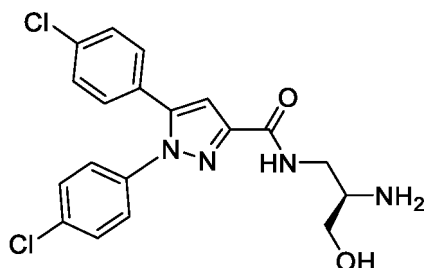
(*R*)-4-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)メチル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (VI-1) の合成



1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸 (I-4) (1.0 g, 3.0 mmol) と (*R*)-4-(アミノメチル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (1.04 g, 4.50 mmol) を DMF (10 mL) に溶解した後、DIPEA (1.26 mL, 7.20 mmol) を加えた。さらに、4 °C で HATU (1.37 g, 3.60 mmol) を 4 回に分けて加えた。室温で一晩攪拌した後、反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル）で精製することにより表題化合物 (1.57 g, 2.88 mmol, 収率 96%) を白色アモルファスとして得た。

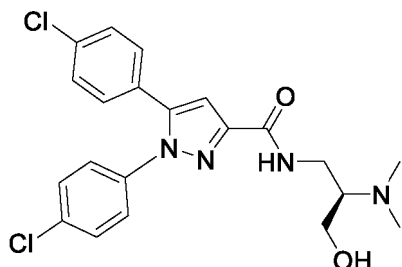
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.47-1.68 (15H, m), 3.60-3.76 (2H, m), 3.92-4.01 (2H, m), 4.09-4.21 (1H, m), 7.02 (1H, s), 7.14 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.20-7.25 (2H, m), 7.31-7.36 (4H, m), 7.74 (1H, br s). LCMS (ESI) m/z : 545 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(*R*)-*N*-(2-アミノ-3-ヒドロキシプロピル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**VI-2**) の合成



(*R*)-4-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド)メチル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (**VI-1**) (100 mg, 0.183 mmol) をエタノール (1 mL) に溶解した後、12 M 塩酸 (0.306 mL, 3.67 mmol) を加えた。80 °C で 5 時間撹拌した後、反応混合物を室温まで冷却して、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて中和して、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮することにより、粗生成物として表題化合物を得た。この粗生成物はこれ以上精製することなく次の反応に使用した。

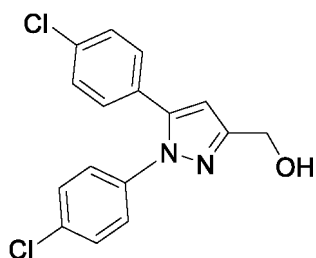
(*R*)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-(ジメチルアミノ)-3-ヒドロキシプロピル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**33**) の合成



(*R*)-*N*-(2-アミノ-3-ヒドロキシプロピル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (**VI-2**) を含む粗生成物 (40 mg) とホルムアルデヒド水溶液 (0.227 mL, 2.96 mmol)、酢酸 (0.028 mL, 0.49 mmol) を THF (1 mL) に溶解した後、4 °C でトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (105 mg, 0.493 mmol) を加えた。室温で一晩撹拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (21 mg, 0.048 mmol, 2 段階収率 49%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.42 (6H, s), 2.70-2.76 (1H, m), 3.50-3.69 (4H, m), 7.02 (1H, s), 7.12-7.18 (3H, m), 7.21-7.25 (2H, m), 7.30-7.38 (4H, m). 1H (CONH あるいは OH) は観察されなかった。LCMS (ESI) *m/z*: 433 (M+H)⁺.

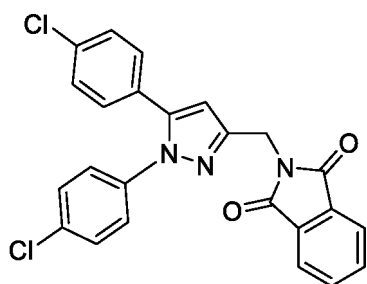
(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタノール (VII-1) の合成



塩化リチウム (282 mg, 6.64 mmol) と水素化ホウ素ナトリウム (628 mg, 16.6 mmol) を THF/エタノール (3/1) (40 mL) に懸濁した後、1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボン酸エチル (I-3) (2.00 g, 5.54 mmol) を加えた。50 °C で 6 時間攪拌した後、水素化ホウ素ナトリウム (628 mg, 16.61 mmol) をさらに加えた。50 °C で一晩攪拌した後、反応混合物に水 (100 mL) を加え、酢酸エチル (100 mL×2 回) で抽出した。有機層を飽和食塩水 (100 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮することにより、粗生成物として表題化合物 (1.77 g) を得た。この粗生成物はこれ以上精製することなく次の反応に使用した。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.11 (1H, t, *J* = 5.9 Hz), 4.78 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 6.52 (1H, s), 7.13-7.23 (4H, m), 7.29-7.34 (4H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 319 (M+H)⁺.

2-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオン (VII-2) の合成

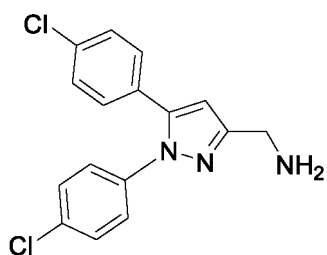


(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタノール (VII-1) を含む粗生成物 (1.77 g) をジクロロメタン (20 mL) に溶解した後、室温で塩化チオニル (1.21 mL, 16.6 mmol) を滴下した。2 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮することにより、粗生成物として 3-(クロロメチル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール (1.87 g) を得た。この粗生成物はこれ以上精製することなく次の反応に使用した。粗生成物 (1.87 g) とフタルイミドカリウム (1.08 g, 5.82 mmol) を DMF (20 mL) に溶解した後、80 °C で 4 時間攪拌した。反応混合物を室温に冷却した後、水を加えて、酢酸エチル (50 mL×2 回) で抽出した。有機層を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (100 mL)、水 (100 mL) および飽和食塩水 (50 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し

た後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物を再結晶（ヘキサン-酢酸エチル）で精製することにより表題化合物（1.91 g, 4.26 mmol, 3段階収率 77%）を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.99 (2H, s), 6.47 (1H, s), 7.08-7.11 (2H, m), 7.17-7.20 (2H, m), 7.25-7.30 (4H, m), 7.72-7.74 (2H, m), 7.88-7.90 (2H, m). LCMS (ESI) m/z : 448 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

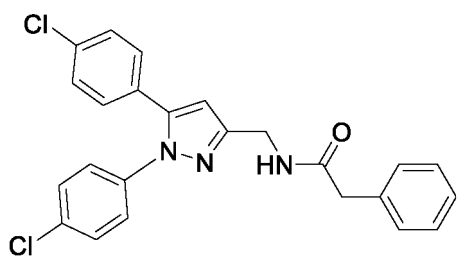
(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) の合成



2-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオン (**VII-2**) (7.00 g, 15.6 mmol) をメタノール (100 mL) に溶解した後、ヒドラジン-水和物 (2.28 ml, 46.8 mmol) を加えた。50 °Cで5時間攪拌した後、反応混合物に酢酸エチル (100 mL) を加えて、ろ過 (酢酸エチル) した。ろ液を水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をヘキサン/MTBE (3/1) に懸濁して、固体成分をろ別することにより表題化合物 (4.13 g, 13.0 mmol, 収率 83 %) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.80 (2H, br s), 3.74 (2H, s), 6.65 (1H, s), 7.23-7.27 (4H, m), 7.44-7.49 (4H, m). LCMS (ESI) m/z : 318 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**42**) の合成

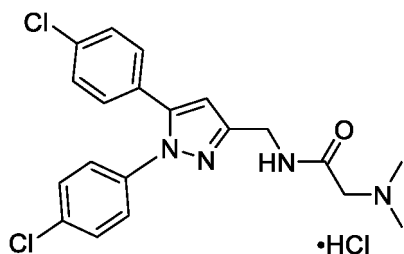


(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (50 mg, 0.16 mmol) とトリエチルアミン (0.066 mL, 0.47 mmol) を THF (1 mL) に溶解した後、室温でフェニルアセチルクロリド (0.021 mL, 0.16 mmol) を加えた。一晩攪拌した後、反応混合物に水を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー

(ヘキサン-酢酸エチル) および再結晶 (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (30 mg, 0.069 mmol, 収率 44%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.65 (2H, s), 4.49 (2H, d, $J = 5.9$ Hz), 6.03 (1H, m), 6.37 (1H, s), 7.09-7.15 (4H, m), 7.28-7.38 (9H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 37.5, 43.8, 107.0, 126.1, 127.4, 128.4, 128.9, 129.0, 129.2, 129.5, 129.9, 133.3, 134.7, 134.8, 138.1, 143.0, 150.4, 171.0. LCMS (ESI) m/z : 436 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. IR (ATR) ν_{max} 3274, 3065, 1640, 1539, 1491, 1093, 830, 803 cm^{-1} .

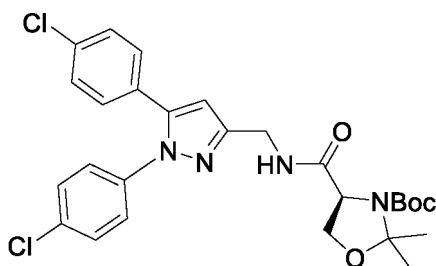
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(ジメチルアミノ)アセトアミド (**43**) の塩酸塩の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (300 mg, 0.943 mmol) と *N,N*-ジメチルグリシン (117 mg, 1.13 mmol)、DIPEA (0.494 mL, 2.83 mmol) を DMF (3 mL) に溶解した後、室温で HATU (394 mg, 1.04 mmol) を少量ずつ加えた。一晩攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をアミノシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製した。得られた *N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(ジメチルアミノ)アセトアミドを酢酸エチルに溶解し、4 M 塩化水素/酢酸エチル溶液を加えた。1 時間攪拌した後、析出物をろ別することにより表題化合物 (243 mg, 0.553 mmol, 収率 59%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 2.95 (6H, s), 4.01 (2H, s), 4.54 (2H, s), 6.60 (1H, s), 7.19-7.27 (4H, m), 7.35-7.38 (2H, m), 7.41-7.44 (2H, m). LCMS (ESI) m/z : 403 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

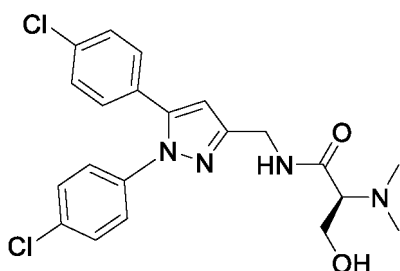
(S)-4-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)カルバモイル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (VII-4) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (VII-3) (500 mg, 1.57 mmol) と (S)-3-(*tert*-ブトキシカルボニル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-4-カルボン酸 (424 mg, 1.73 mmol)、DIPEA (0.604 mL, 3.46 mmol) を DMF (5 mL) に溶解した後、室温で HATU (657 mg, 1.73 mmol) を少量ずつ加えた。一晩攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (566 mg, 1.04 mmol, 収率 66%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.24-1.78 (15H, m), 4.04-4.68 (5H, m), 6.45 (1H, s), 7.11-7.14 (2H, m), 7.16-7.19 (2H, m), 7.28-7.34 (4H, m). 1H (NH) は観察されなかった. LCMS (ESI) *m/z*: 545 (M+H)⁺.

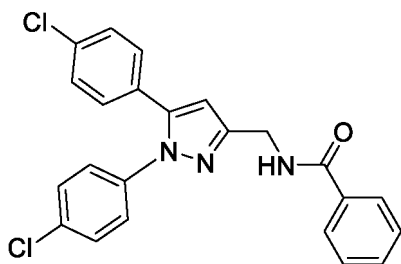
(S)-*N*-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(ジメチルアミノ)-3-ヒドロキシプロパンアミド (44) の合成



(S)-4-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)カルバモイル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (VII-4) (100 mg, 0.183 mmol) に対して、(R)-*N*-(2-アミノ-3-ヒドロキシプロピル)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (VI-2) の合成、ならびに (R)-1,5-ビス(4-クロロフェニル)-*N*-(2-(ジメチルアミノ)-3-ヒドロキシプロピル)-1*H*-ピラゾール-3-カルボキサミド (33) の合成と同様の方法で、表題化合物 (16 mg, 0.037 mmol, 2段階収率 37%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.38 (6H, s), 2.98 (1H, dd, $J = 5.7, 3.1$ Hz), 3.86 (1H, dd, $J = 11.8, 3.1$ Hz), 3.95 (1H, dd, $J = 11.8, 5.7$ Hz), 4.43 (1H, dd, $J = 15.9, 5.7$ Hz), 4.78 (1H, dd, $J = 15.9, 7.2$ Hz), 6.41 (1H, s), 7.10-7.18 (4H, m), 7.26-7.33 (4H, m), 7.84 (1H, dd, $J = 7.2, 5.7$ Hz). LCMS (ESI) m/z : 433 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

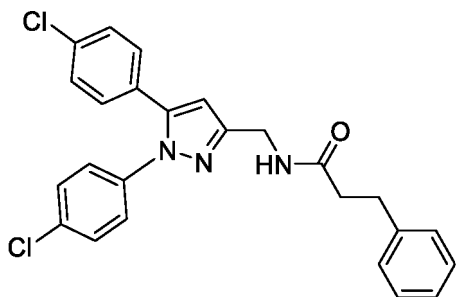
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)ベンズアミド (**45**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (50 mg, 0.16 mmol) に対して、フェニルアセチルクロリド (0.019 mL, 0.17 mmol) を用いて、*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**42**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (50 mg, 0.12 mmol, 収率 75%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.75 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 6.53 (1H, s), 6.73-6.78 (1H, m), 7.12-7.16 (2H, m), 7.20-7.23 (2H, m), 7.28-7.35 (4H, m), 7.42-7.47 (2H, m), 7.49-7.53 (1H, m), 7.81-7.85 (2H, m). LCMS (ESI) m/z : 422 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

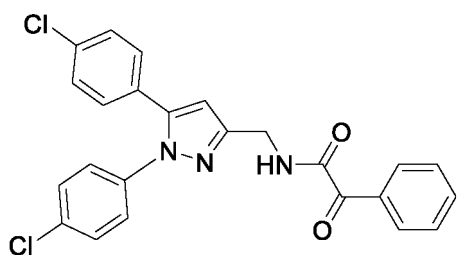
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-3-フェニルプロパンアミド (**46**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (50 mg, 0.16 mmol) に対して、3-フェニルプロピオニルクロリド (0.025 mL, 0.17 mmol) を用いて、*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**42**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (49 mg, 0.11 mmol, 収率 69%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.55 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), 3.01 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), 4.51 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 5.93-5.97 (1H, m), 6.34 (1H, s), 7.10-7.34 (13H, m). LCMS (ESI) m/z : 450 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

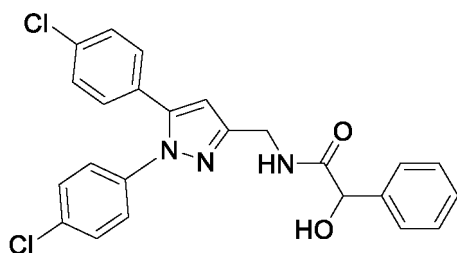
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-オキシ-2-フェニルアセトアミド (**IX-1**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (100 mg, 0.314 mmol) に対して、2-オキシ-2-フェニル酢酸 (50 mg, 0.33 mmol) を用いて、(S)-4-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)カルバモイル)-2,2-ジメチルオキサザリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (**VII-4**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (37 mg, 0.082 mmol, 収率 26%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.68 (2H, d, $J = 5.9$ Hz), 6.50 (1H, s), 7.12-7.16 (2H, m), 7.20-7.23 (2H, m), 7.29-7.35 (4H, m), 7.47-7.51 (2H, m), 7.61-7.66 (2H, m), 8.36-8.38 (2H, m). LCMS (ESI) m/z : 450 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

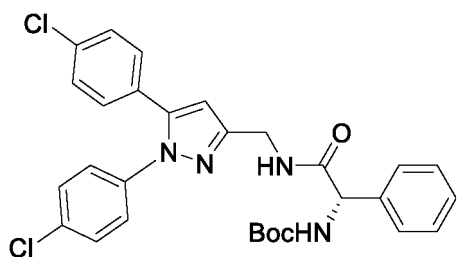
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-ヒドロキシ-2-フェニルアセトアミド (**47**) の合成



N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-オキシ-2-フェニルアセトアミド (**IX-1**) (15 mg, 0.033 mmol) を THF (1 mL) に溶解した後、2 M ジメチルアミン/THF 溶液 (0.085 mL, 0.017 mmol) を加え、続けて、4 °C でトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (21 mg, 0.10 mmol) を加えた。室温で一晩攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサノン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (8.0 mg, 0.018 mmol, 収率 53%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.75 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 6.53 (1H, s), 6.74-6.78 (1H, m), 7.12-7.16 (2H, m), 7.20-7.23 (2H, m), 7.28-7.35 (4H, m), 7.42-7.47 (2H, m), 7.49-7.53 (1H, m), 7.81-7.85 (2H, m). 2H は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 452 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

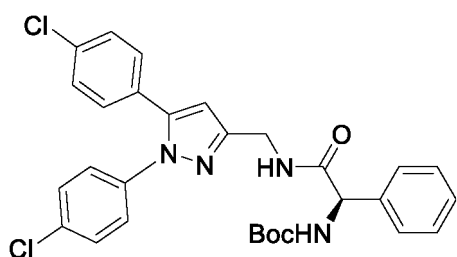
(S)-2-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)-2-オキソ-1-フェニルエチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**X-1**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (100 mg, 0.314 mmol) に対して、Boc-L-フェニルグリシン (83 mg, 0.33 mmol) を用いて、(S)-4-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)カルバモイル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (**VII-4**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (161 mg, 0.292 mmol, 収率 93%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.40 (9H, s), 4.44-4.59 (2H, m), 5.19 (1H, br s), 5.81 (1H, br s), 6.30 (1H, s), 6.32-6.36 (1H, m), 7.07-7.16 (4H, m), 7.26-7.41 (9H, m). LCMS (ESI) m/z : 551 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(R)-2-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)-2-オキソ-1-フェニルエチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**X-2**) の合成

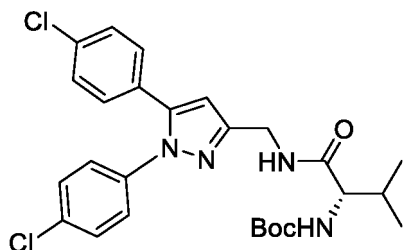


(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (100 mg, 0.314 mmol) に対して、Boc-D-フェニルグリシン (83 mg, 0.33 mmol) を用いて、(S)-4-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)カルバモイル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (**VII-4**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (166 mg, 0.301 mmol, 収率 96%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.40 (9H, s), 4.45-4.59 (2H, m), 5.19 (1H, br s), 5.81 (1H, br s), 6.30 (1H, s), 6.32-6.36 (1H, m), 7.07-7.15 (4H, m), 7.26-7.40 (9H, m). LCMS (ESI) m/z :

551 (M+H)⁺.

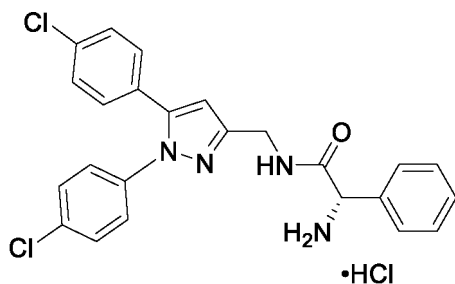
(S)-1-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)-3-メチル-1-オキサブタン-2-イル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**X-3**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (300 mg, 0.943 mmol) に対して、Boc-L-バリン (215 mg, 0.990 mmol) を用いて、(S)-4-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)カルバモイル)-2,2-ジメチルオキサゾリジン-3-カルボン酸 *tert*-ブチル (**VII-4**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (479 mg, 0.924 mmol, 収率 98%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.93 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 0.98 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.41 (9H, s), 2.16-2.25 (1H, m), 3.96 (1H, dd, *J* = 8.2, 6.3 Hz), 4.50-4.60 (2H, m), 5.07 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 6.44 (1H, s), 6.53 (1H, br s), 7.12 (2H, m), 7.19 (2H, m), 7.28-7.34 (4H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 517 (M+H)⁺.

(S)-2-アミノ-*N*-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**48**) の塩酸塩の合成

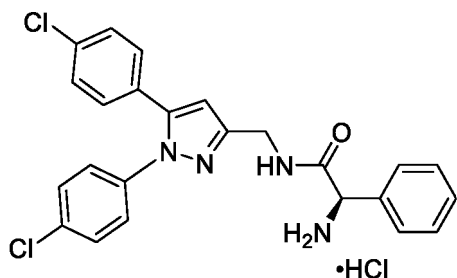


(S)-2-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)-2-オキシ-1-フェニルエチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**X-1**) (160 mg, 0.290 mmol) を酢酸エチル (1 mL) に溶解した後、室温で 4 M 塩化水素/酢酸エチル溶液 (1.0 mL, 4.0 mmol) を加えた。3 時間攪拌した後、反応混合物にヘキサン (6 mL) を加えて、析出物をろ別することにより表題化合物 (124 mg, 0.254 mmol, 収率 88%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4.31-4.42 (2H, m), 5.00-5.04 (1H, m), 6.39 (1H, s), 7.15-7.24

(4H, m), 7.44-7.51 (7H, m), 7.57-7.60 (2H, m), 8.77-8.79 (3H, m), 9.17 (1H, t, $J = 5.9$ Hz). LCMS (ESI) m/z : 451 (M+H)⁺.

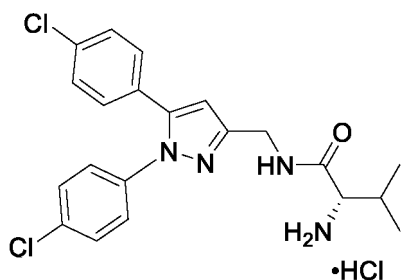
(*R*)-2-アミノ-*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**49**) の塩酸塩の合成



(*R*)-(2-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)-2-オキシ-1-フェニルエチル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**X-2**) (160 mg, 0.290 mmol) に対して、(*S*)-2-アミノ-*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**48**) の塩酸塩の合成と同様の方法で、表題化合物 (135 mg, 0.277 mmol, 収率 95%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 4.30-4.42 (2H, m), 5.02-5.04 (1H, m), 6.41 (1H, s), 7.16-7.23 (4H, m), 7.44-7.50 (7H, m), 7.58-7.61 (2H, m), 8.80-8.84 (3H, m), 9.22 (1H, t, $J = 5.9$ Hz). LCMS (ESI) m/z : 451 (M+H)⁺.

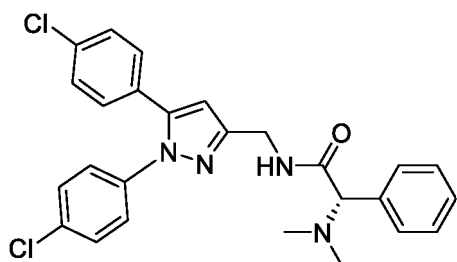
(*S*)-2-アミノ-*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-3-メチルブタンアミド (**53**) の塩酸塩の合成



(*S*)-(1-(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)-3-メチル-1-オキシブタン-2-イル)カルバミン酸 *tert*-ブチル (**X-3**) (475 mg, 0.918 mmol) に対して、(*S*)-2-アミノ-*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**48**) の塩酸塩の合成と同様の方法で、表題化合物 (333 mg, 0.799 mmol, 収率 87%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 1.06 (3H, d, $J = 5.4$ Hz), 1.08 (3H, d, $J = 5.4$ Hz), 2.16-2.26 (1H, m), 3.67 (1H, d, $J = 5.9$ Hz), 4.53 (2H, s), 6.59 (1H, s), 7.23 (4H, m), 7.36 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.42 (2H, d, $J = 9.1$ Hz). LCMS (ESI) m/z : 417 (M+H)⁺.

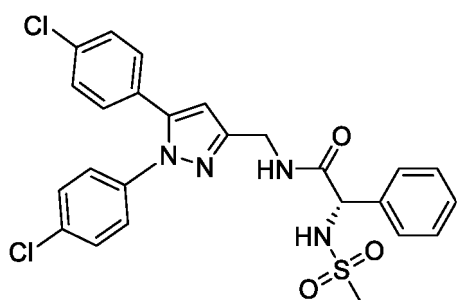
(S)-N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(ジメチルアミノ)-2-フェニルアセトアミド (**50**) の合成



(S)-2-アミノ-N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**48**) の塩酸塩 (20 mg, 0.041 mmol)、37%ホルムアルデヒド水溶液 (0.011 mL, 0.41 mmol) および酢酸 (7.0 μ L, 0.12 mmol) を THF (1 mL) に懸濁した後、室温でトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (43 mg, 0.021 mmol) を加えた。3 時間攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル-メタノール) で精製することにより表題化合物 (16 mg, 0.033 mmol, 収率 81%) を白色アモルファスとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.22 (6H, s), 3.78 (1H, s), 4.52-4.62 (2H, m), 6.30 (1H, s), 7.08-7.11 (2H, m), 7.18-7.22 (2H, m), 7.28-7.38 (9H, m), 7.58 (1H, dd, $J = 5.7, 5.7$ Hz). LCMS (ESI) m/z : 479 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(S)-N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(メチルスルホンアミド)-2-フェニルアセトアミド (**51**) の合成

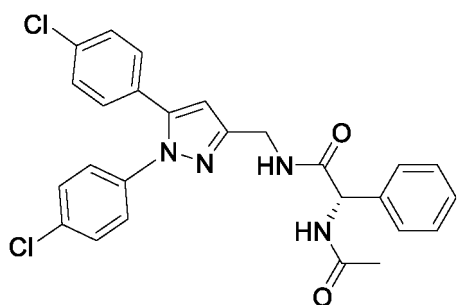


(S)-2-アミノ-N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**48**) の塩酸塩 (20 mg, 0.041 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に懸濁した後、トリエチルアミン (0.023 mL, 0.16 mmol) とメタンスルホニルクロリド (3.8 μ L, 0.049 mmol) を加え、1 時間攪拌した。TLC で原料の残存が確認されたため、メタンスルホニルクロリド (3.8 μ L, 0.049 mmol) を加え、さらに 1 時間攪拌した。反応混合物に水を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した

後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル）で精製することにより表題化合物（22 mg, 0.041 mmol, 収率 quant.）を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.66 (3H, s), 4.42 (1H, dd, $J = 15.4, 5.4$ Hz), 4.59 (1H, dd, $J = 15.4, 5.9$ Hz), 5.10 (1H, d, $J = 5.0$ Hz), 5.97 (1H, dd, $J = 5.9, 5.4$ Hz), 6.29-6.31 (2H, m), 7.07-7.14 (4H, m), 7.28-7.32 (4H, m), 7.37-7.44 (5H, m). LCMS (ESI) m/z : 529 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

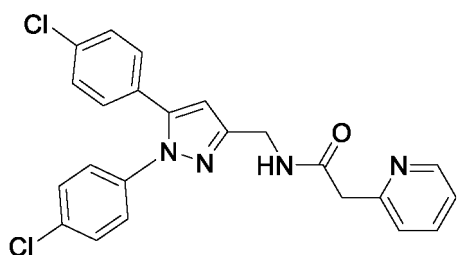
(*S*)-2-アセトアミド-*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**52**) の合成



(*S*)-2-アミノ-*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-フェニルアセトアミド (**48**) の塩酸塩 (20 mg, 0.041 mmol) をピリジン (1 mL) に溶解した後、無水酢酸 (0.019 mL, 0.21 mmol) を加えた。室温で 3 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル）で精製することにより表題化合物 (19 mg, 0.039 mmol, 収率 94%) を白色アモルファスとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.02 (3H, s), 4.45 (1H, dd, $J = 15.4, 5.7$ Hz), 4.58 (1H, dd, $J = 15.4, 5.7$ Hz), 5.51-5.53 (1H, m), 6.29 (1H, s), 6.38 (1H, br s), 6.86-6.88 (1H, m), 7.06-7.15 (4H, m), 7.27-7.37 (7H, m), 7.39-7.43 (2H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 23.2, 37.6, 57.1, 106.8, 126.2, 127.4, 128.2, 128.4, 128.9, 129.0, 129.2, 129.8, 133.5, 134.8, 137.98, 137.99, 143.1, 149.8, 169.5, 170.0. LCMS (ESI) m/z : 493 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. IR (ATR) ν_{max} 3284, 3066, 1635, 1539, 1500, 1491, 1093, 834, 728 cm^{-1} .

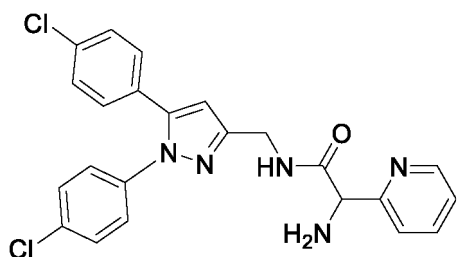
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(ピリジン-2-イル)アセトアミド (**XI-1**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (300 mg, 0.943 mmol) と 2-(ピリジン-2-イル)酢酸 塩酸塩 (246 mg, 1.41 mmol) を DMF (5 mL) に溶解した後、DIPEA (0.494 mL, 2.83 mmol) と HATU (394 mg, 1.04 mmol) を加えた。室温で 16.5 時間攪拌した後、反応混合物に水を加えて、酢酸エチル/ヘキサン (1/1) で抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (301 mg, 0.688 mmol, 収率 73%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.81 (2H, s), 4.54 (2H, d, *J* = 5.4 Hz), 6.41 (1H, s), 7.11 (2H, m), 7.16-7.23 (3H, m), 7.27-7.33 (5H, m), 7.67 (1H, ddd, *J* = 7.7, 7.7, 1.8 Hz), 7.86 (1H, t, *J* = 5.4 Hz), 8.54 (1H, dd, *J* = 5.0, 0.9 Hz). LCMS (ESI) *m/z*: 437 (M+H)⁺.

2-アミノ-*N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(ピリジン-2-イル)アセトアミド (**54**) の合成

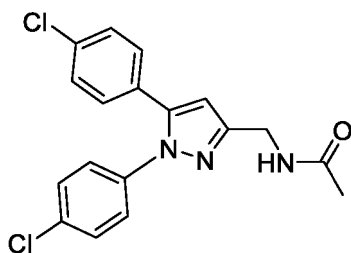


N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(ピリジン-2-イル)アセトアミド (**XI-1**) (100 mg, 0.229 mmol) を酢酸/水 (3/1) に溶解した後、氷冷下、亜硝酸ナトリウム (17 mg, 0.24 mmol) の酢酸/水 (3:1) 溶液 (0.25 mL) を加え、同じ温度で 3 時間攪拌した。TLC で原料の残存が確認されたため、氷冷下亜硝酸ナトリウム (8.0 mg, 0.12 mmol) の酢酸/水 (3:1) 溶液 (0.05 mL) を加え、同じ温度で 2 時間攪拌した。反応混合物に水を加えて、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮することにより、粗生成物として *N*-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-

1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(ヒドロキシイミノ)-2-(ピリジン-2-イル)アセトアミド (110 mg) を得た。この粗生成物はこれ以上精製することなく次の反応に使用した。得られた粗生成物 (110 mg) とギ酸アンモニウム (58 mg, 0.918 mmol) をメタノール (1 mL) に溶解した後、氷冷下で亜鉛 (60 mg, 0.92 mmol) を加えた。室温で1時間攪拌した後、反応混合物をセライトろ過した。得られたろ液をジクロロメタンで希釈し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物を再結晶 (クロロホルム-メタノール) で精製することにより表題化合物 (63 mg, 0.14 mmol, 2段階収率 61%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4.40 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.51 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 5.38 (1H, s), 6.37 (1H, s), 7.01 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.06-7.14 (3H, m), 7.20 (5H, m), 7.58 (1H, t, *J* = 6.8 Hz), 7.77 (1H, d, *J* = 6.3 Hz), 8.44 (1H, s), 9.07 (1H, s). LCMS (ESI) *m/z*: 452 (M+H)⁺.

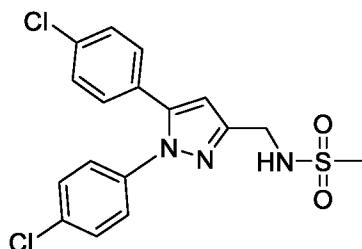
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アセトアミド (**55**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (20 mg, 0.063 mmol) をピリジン (1 mL) に溶解した後、無水酢酸 (0.030 mL, 0.31 mmol) を加えた。室温で一晩攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (21 mg, 0.058 mmol, 収率 93%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.05 (3H, s), 4.53 (2H, d, *J* = 5.4 Hz), 6.13 (1H, m), 6.46 (1H, s), 7.11-7.15 (2H, m), 7.18-7.22 (2H, m), 7.28-7.35 (4H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 360 (M+H)⁺.

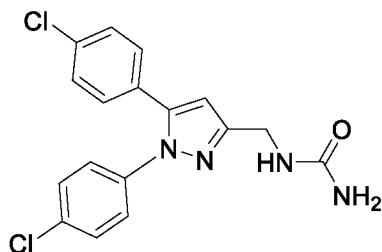
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)メタンスルホンアミド (56) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (VII-3) (50 mg, 0.16 mmol) を THF (3 mL) に溶解した後、トリエチルアミン (0.066 mL, 0.47 mmol) とメタンスルホニルクロリド (0.018 mL, 0.24 mmol) を加えた。室温で一晩攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (62 mg, 0.16 mmol, 収率 quant) を白色アモルファスとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.02 (3H, s), 4.43 (2H, d, $J = 5.9$ Hz), 4.99 (1H, t, $J = 5.9$ Hz), 6.50 (1H, s), 7.12-7.20 (4H, m), 7.29-7.35 (4H, m). LCMS (ESI) m/z : 396 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

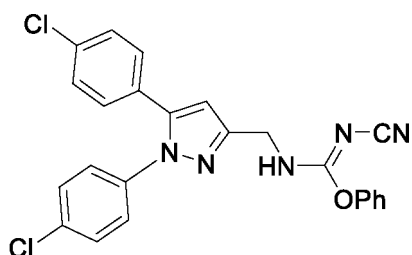
1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)尿素 (57) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (VII-3) (50 mg, 0.16 mmol) を THF (3 mL) に溶解した後、トリエチルアミン (0.053 mL, 0.38 mmol) とイソシアヌ酸トリメチルシリル (0.025 mL, 0.19 mmol) を加えた。室温で一晩攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (48 mg, 0.13 mmol, 収率 85%) を白色固体として得た。

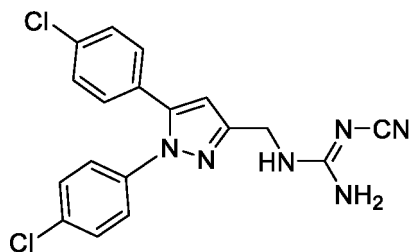
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.42 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 4.77 (2H, s), 5.61 (1H, t, $J = 5.4$ Hz), 6.44 (1H, s), 7.09-7.19 (4H, m), 7.27-7.32 (4H, m). LCMS (ESI) m/z : 361 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-シアノカルバムイミド酸フェニル (**XII-1**) の合成



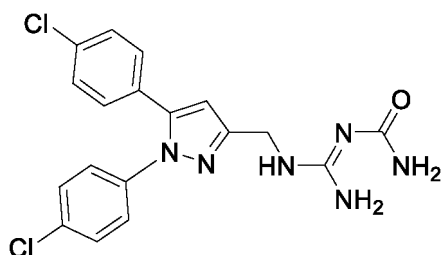
(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (1.50 g, 4.71 mmol) とシアノカルボンイミド酸ジフェニル (1.18 g, 4.95 mmol) をジクロロメタン (15 mL) に溶解した。室温で 2 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をヘキサン/酢酸エチル (3/1) に懸濁して、固体成分をろ別することにより表題化合物 (2.08 g, 4.50 mmol, 収率 95%) を白色固体として得た。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4.58-4.76 (2H, m), 6.50 (1H, s), 7.11-7.45 (13H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 462 (M+H)⁺.

1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-シアノグアニジン (**58**) の合成



N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-シアノカルバムイミド酸フェニル (**XII-1**) (50 mg, 0.11 mmol) をアセトニトリル (1 mL) に溶解した後、25%アンモニア水 (0.162 mL, 2.16 mmol) を加えた。50 °Cで一晩攪拌した後、反応混合物に室温に冷却し、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (37 mg, 0.096 mmol, 収率 89%) を白色固体として得た。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4.40 (2H, d, *J* = 4.5 Hz), 5.98 (2H, s), 6.46 (1H, s), 7.10-7.19 (4H, m), 7.28-7.33 (4H, m). 1H (NH) は観察されなかった。LCMS (ESI) *m/z*: 385 (M+H)⁺.

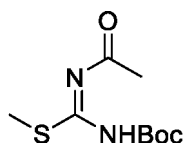
1-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)尿素 (59) の合成



1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-シアノグアニジン (58) (30 mg, 0.063 mmol) を濃塩酸 (1 mL) に溶解した後、50 °Cで一晩攪拌した。反応混合物を室温に冷却した後、エタノールを加えて、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をエタノールで懸濁した後、固体成分をろ別することにより表題化合物 (26 mg, 0.052 mmol, 収率 82%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4.40 (2H, s), 4.93 (1H, br s), 6.45 (1H, s), 7.11-7.18 (4H, m), 7.29-7.37 (4H, m). 4H (NH₂ および CONH₂) は観察されなかった。LCMS (ESI) *m/z*: 403 (M+H)⁺.

N-アセチル-*N'*-(*tert*-ブトキシカルボニル)-*S*-メチルイソチオ尿素の合成



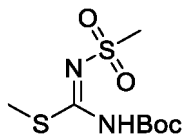
チオ尿素 (10.0 g, 131 mmol) をメタノール (100 mL) に溶解した後、ヨウ化メチル (8.21 mL, 131 mmol) を加えた。1時間加熱還流した後、反応混合物を減圧下で濃縮することにより *S*-メチルイソチオ尿素 ヨウ化水素酸塩 (27.6 g) を粗生成物として得た。

得られた粗生成物 (27.6 g) とトリエチルアミン (17.9 mL, 128 mmol) をジクロロメタン (250 mL) に溶解した後、二炭酸ジ-*tert*-ブチル (29.8 mL, 128 mmol) を加えた。室温で一晩攪拌した後、反応混合物に水を加えて、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物を酢酸エチルで洗浄することにより *N*-(*tert*-ブトキシカルボニル)-*S*-メチルイソチオ尿素 (24.0 g) を粗生成物として得た。

得られた粗生成物 (1.00 g) 及び DIPEA (0.918 mL, 5.26 mmol) をジクロロメタン (3 mL) に溶解した後、無水酢酸 (0.496 mL, 5.26 mmol) を加えた。室温で3時間攪拌した後、反応混合物に水を加えて、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物を再

結晶 (酢酸エチル) することにより表題化合物 (608 mg, 3段階収率 48%) を得た。
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.53 (9H, s), 2.21 (3H, s), 2.39 (3H, s).

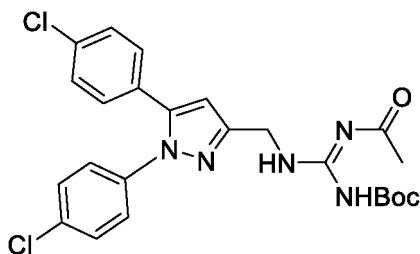
N-(*tert*-ブトキシカルボニル)-*N'*-メタンスルホニル-*S*-メチルイソチオ尿素の合成



N-アセチル-*N'*-(*tert*-ブトキシカルボニル)-*S*-メチルイソチオ尿素の合成と同様の方法で取得した、*N*-(*tert*-ブトキシカルボニル)-*S*-メチルイソチオ尿素の粗生成物 (1.00 g) をジクロロメタン (3 mL) に溶解した後、DIPEA (0.918 mL, 5.26 mmol) を加えた。氷冷下、メタンスルホニルクロリド (0.410 mL, 5.26 mmol) を加えた。室温で1時間攪拌した後、反応混合物に水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (1.1 g, 3段階収率 75%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 2.34 (3H, s), 3.09 (3H, s).

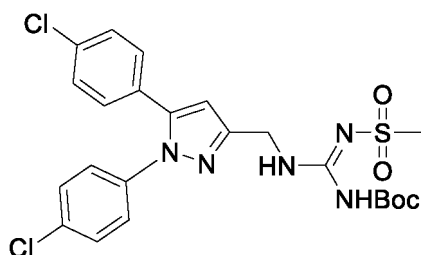
1-アセチル-2-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-3-(*tert*-ブトキシカルボニル)guanidinin (**XII-2**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (603 mg, 1.89 mmol) と *N*-アセチル-*N'*-(*tert*-ブトキシカルボニル)-*S*-メチルイソチオ尿素 (440 mg, 1.89 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、室温で1時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (805 mg, 1.60 mmol, 収率 85%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.54 (9H, s), 2.23 (3H, s), 4.71-4.78 (2H, m), 6.46 (1H, s), 7.14-7.34 (8H, m), 9.46 (1H, m), 12.46 (1H, s). LCMS (ESI) m/z : 502 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

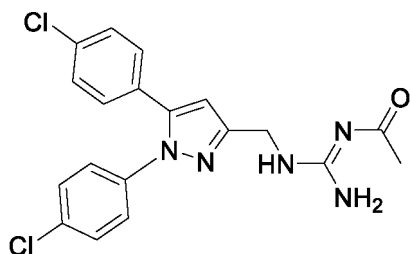
1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(*tert*-ブトキシカルボニル)-3-メタンスルホニルグアニジン (**XII-3**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (1.02 g, 3.21 mmol) と *N*-(*tert*-ブトキシカルボニル)-*N'*-メタンスルホニル-*S*-メチルイソチオ尿素 (862 mg, 3.21 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解した。室温で 1 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物を再結晶 (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (1.42 g, 2.64 mmol, 収率 82%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.49 (9H, s), 3.04 (3H, s), 4.56-4.64 (2H, m), 6.49 (1H, s), 7.13-7.15 (2H, m), 7.20-7.22 (2H, m), 7.30-7.34 (4H, m), 8.93 (1H, m), 9.79 (1H, s). LCMS (ESI) *m/z*: 538 (M+H)⁺.

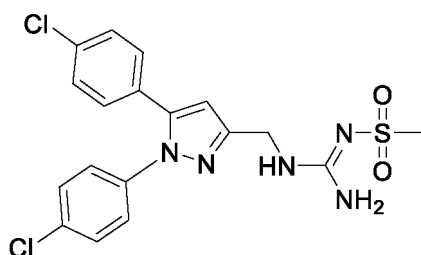
N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)アセトアミド (**60**) の合成



1-アセチル-2-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-3-(*tert*-ブトキシカルボニル)グアニジン (**XII-2**) (995 mg, 1.98 mmol) を酢酸エチル (3 mL) に溶解した後、4 M 塩酸/酢酸エチル溶液 (0.495 mL, 1.98 mmol) を滴下した。室温で 12 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物を酢酸エチルで懸濁した後、固体成分をろ別することにより表題化合物 (761 mg, 1.89 mmol, 収率 96%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 2.22 (3H, s), 4.65 (2H, s), 6.66 (1H, s), 7.23-7.29 (4H, m), 7.37-7.44 (4H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 402 (M+H)⁺.

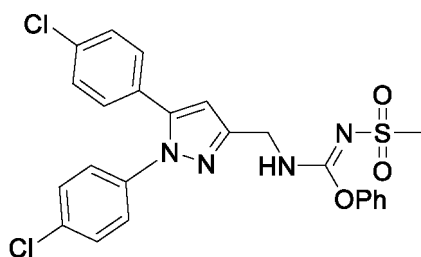
N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**61**) の合成



1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-2-(*tert*-ブトキシカルボニル)-3-メタンスルホンイルグアニジン (**XII-3**) (1.60 g, 2.98 mmol) を酢酸エチル (3 mL) に溶解した後、4 M 塩酸/酢酸エチル溶液 (0.743 mL, 2.98 mmol) を滴下した。室温で 12 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物を酢酸エチルで懸濁した後、固体成分をろ別することにより表題化合物 (1.28 g, 2.92 mmol, 収率 98%) を白色固体として得た。

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 3.31 (3H, s), 4.58-4.66 (2H, m), 6.64(1H, s), 7.22-7.28 (4H, m), 7.36-7.44 (4H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 438 (M+H)⁺.

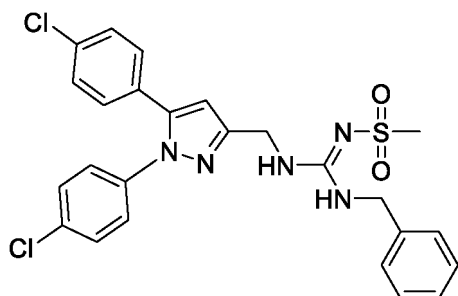
N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-(メチルスルホンイル)カルバムイミド酸フェニル (**XIII-1**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**VII-3**) (650 mg, 2.04 mmol) と *N*-(ジフェノキシメチレン)メタンスルホンアミド (625 mg, 2.15 mmol) を THF (5 mL) に溶解した。室温で一晩攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (850 mg, 1.65 mmol, 収率 81%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.90 (3H, s), 4.72 (2H, d, *J* = 5.4 Hz), 6.51 (1H, s), 7.10-7.24 (6H, m), 7.31-7.43 (7H, m), 7.86 (1H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 515 (M+H)⁺.

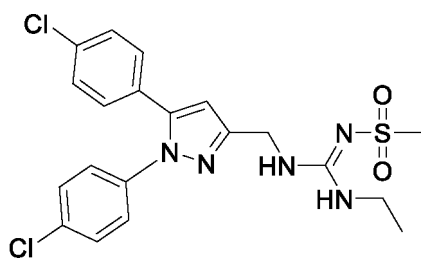
N-((ベンジルアミノ)(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**62**) の合成



N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-(メチルスルホニル)カルバムイミド酸フェニル (**XIII-1**) (300 mg, 0.582 mmol) をピリジン (2 mL) に溶解した後ベンジルアミン (0.076 mL, 0.698 mmol) を加えた。反応混合物をマイクロ波照射下、150 °C で 15 分間加熱した。反応混合物を室温に冷却した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することにより表題化合物 (243 mg, 0.460 mmol, 収率 79%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2.77 (3H, s), 4.41-4.48 (4H, m), 6.49 (1H, m), 7.20-7.28 (9H, m), 7.46-7.52 (4H, m), 7.62-7.67 (2H, m). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 41.6, 44.02, 44.04, 107.0, 126.6, 127.0, 127.1, 128.3, 128.4, 128.8, 128.9, 129.1, 129.2, 130.2, 132.1, 133.4, 138.2, 155.3. LCMS (ESI) *m/z*: 528 (M+H)⁺. IR (ATR) *v*_{max} 3317, 1564, 1498, 1093, 970, 836, 794 cm⁻¹.

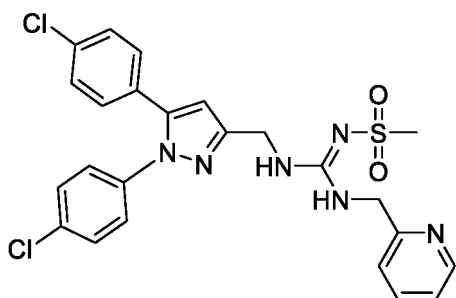
N-((((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)(エチルアミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**63**) の合成



N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-(メチルスルホニル)カルバムイミド酸フェニル (**XIII-1**) (81 mg, 0.16 mmol) に対して、2 M エチルアミン/THF 溶液 (0.236 mL, 0.471 mmol) を用いて、*N*-((ベンジルアミノ)(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**62**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (60 mg, 0.13 mmol, 収率 82%) を白色アモルファスとして得た。

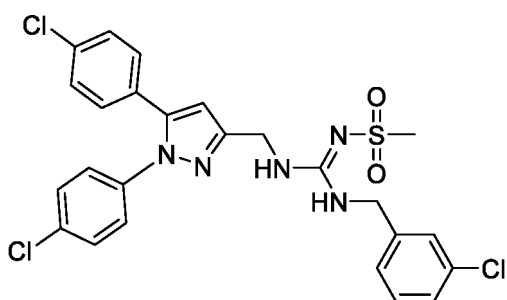
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.12-1.23 (3H, m), 2.97 (3H, s), 3.20-3.29 (2H, m), 4.43 (2H, br s), 6.46 (1H, s), 7.12-7.20 (4H, m), 7.30-7.36 (4H, m). LCMS (ESI) m/z : 466 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

N-((((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)((ピリジン-2-イルメチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**64**) の合成



N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-(メチルスルホニル)カルバムイミド酸フェニル (**XIII-1**) (30 mg, 0.058 mmol) に対して、2-ピコリルアミン (7.6 mg, 0.070 mmol) を用いて、*N*-((ベンジルアミノ)((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**62**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (30 mg, 0.057 mmol, 収率 97%) を白色固体として得た。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.97 (3H, s), 4.44-4.60 (4H, m), 6.49 (1H, s), 7.11-7.15 (2H, m), 7.16-7.21 (3H, m), 7.26-7.33 (5H, m), 7.61-7.69 (1H, m), 7.84-7.94 (1H, m), 8.39-8.42 (1H, m). 1H (NH) は観察されなかった。LCMS (ESI) m/z : 529 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

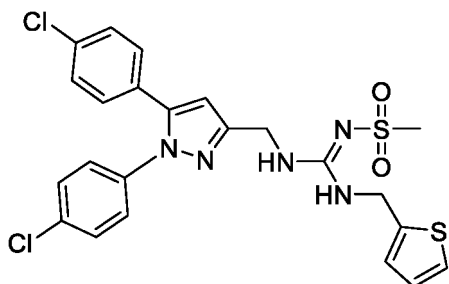
N-((((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)((3-クロロベンジル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**65**) の合成



N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-(メチルスルホニル)カルバムイミド酸フェニル (**XIII-1**) (30 mg, 0.058 mmol) に対して、3-クロロベンジルアミン (9.9 mg, 0.070 mmol) を用いて、*N*-((ベンジルアミノ)((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**62**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (32 mg, 0.057 mmol, 収率 98%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.94 (3H, s), 4.36-4.46 (4H, m), 6.43 (1H, br s), 6.91-7.02 (2H, m), 7.09-7.34 (10H, m). 2H (2つの NH) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 562 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

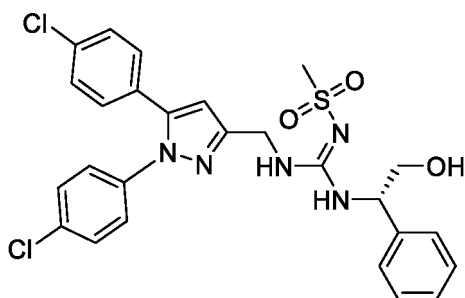
N-((((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)((チオフェン-2-イルメチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**66**) の合成



N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-(メチルスルホニル)カルバムイミド酸フェニル (**XIII-1**) (30 mg, 0.058 mmol) に対して、2-(アミノメチル)チオフェン (6.6 mg, 0.058 mmol) を用いて、*N*-((ベンジルアミノ)((((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**62**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (29 mg, 0.054 mmol, 収率 94%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.99 (3H, s), 4.34-4.42 (2H, m), 4.58-4.64 (2H, m), 6.43 (1H, s), 6.86-7.36 (11H, m). 2H (2つの NH) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 534 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

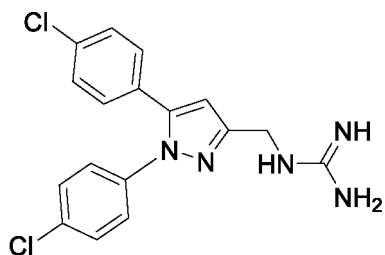
(*S*)-*N*-((((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)((2-ヒドロキシ-1-フェニルエチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**67**) の合成



N-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)-*N'*-(メチルスルホニル)カルバムイミド酸フェニル (**XIII-1**) (30 mg, 0.058 mmol) に対して、(*S*)-2-アミノ-2-フェニルエタノール (9.6 mg, 0.070 mmol) を用いて、*N*-((ベンジルアミノ)((((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)メタンスルホンアミド (**62**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (28 mg, 0.050 mmol, 収率 86%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.83 (3H, s), 3.71-3.78 (1H, m), 3.80-3.87 (1H, m), 4.42-4.48 (2H, m), 4.76-5.08 (1H, m), 6.41 (1H, br s), 7.09-7.14 (4H, m), 7.21-7.34 (9H, m). 2H は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 558 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

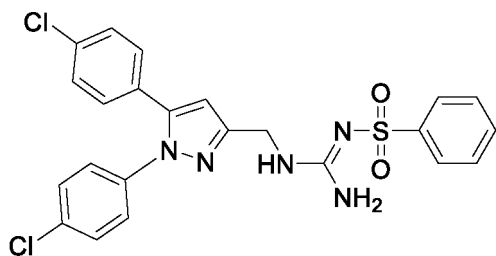
1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**) の合成



(1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メタンアミン (**XIII-1**) (2.00 g, 6.29 mmol)、1-アミノピラゾール塩酸塩 (1.01 g, 6.91 mmol) およびトリエチルアミン (2.19 mL, 15.7 mmol) を THF (15 mL) に溶解し、室温で 12 時間攪拌した。反応混合物に 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮することにより、粗生成物として表題化合物を得た。この粗生成物はこれ以上精製することなく次の反応に使用した。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 4.48 (2H, s), 6.62 (1H, s), 7.22-7.28 (4H, m), 7.37-7.44 (4H, m).
LCMS (ESI) m/z : 360 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)ベンゼンスルホンアミド (**68**) の合成

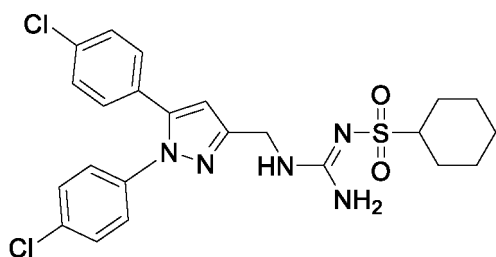


1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**) (30 mg, 0.083 mmol) を THF (0.5 mL) に溶解した後、8 M 水酸化ナトリウム水溶液 (0.021 mL, 0.17 mmol) とベンゼンスルホニルクロリド (8.5 μL , 0.17 mmol) を加えた。室温で 1 時間攪拌した後、反応混合物に水を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。得られた粗生成物をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製することに

より表題化合物 (15 mg, 0.030 mmol, 2 段階収率 36%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.46 (2H, s), 6.45 (1H, s), 7.10 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.16 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.36-7.31 (4H, m), 7.50 (2H, dd, $J = 7.7, 7.2$ Hz), 7.60 (1H, dd, $J = 7.2, 7.2$ Hz), 7.97 (2H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.69 (1H, br s). 2H (NH_2) は観察されなかった. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 38.8, 107.5, 126.0, 126.2, 127.9, 128.6, 129.0, 129.3, 129.9, 131.5, 133.7, 135.0, 137.8, 143.4, 143.7. LCMS (ESI) m/z : 500 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 500.0709, found: 500.0698 (error 2.2 ppm). IR (ATR) ν_{max} 3311, 3027, 1671, 1636, 1501, 1093, 1012, 833, 589 cm^{-1} .

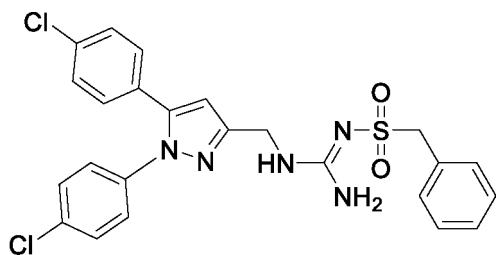
N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)シクロヘキサンスルホンアミド (**69**) の合成



1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**) (50 mg, 0.14 mmol) に対して、シクロヘキサンスルホニルクロリド (0.034 mL, 0.21 mmol) を用いて、*N*-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)ベンゼンスルホンアミド (**68**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (44 mg, 0.086 mmol, 2 段階収率 62%) を白色アモルファスとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.03-1.34 (3H, m), 1.41-1.51 (2H, m), 1.63-1.66 (1H, m), 1.77-1.82 (2H, m), 2.17 (2H, m), 2.81 (1H, dddd, $J = 12.1, 12.1, 3.3, 3.3$ Hz), 4.40 (2H, d, $J = 3.9$ Hz), 6.47 (1H, s), 6.57 (1H, m), 7.10-7.18 (4H, m), 7.28-7.32 (4H, m). 2H (NH_2) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 506 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)-1-フェニルメタンスルホンアミド (**70**) の合成

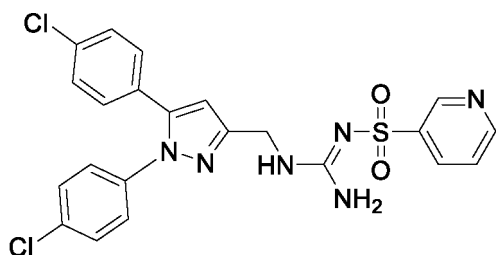


1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**)

(36 mg, 0.10 mmol) に対して、ベンジルスルホニルクロリド (57 mg, 0.30 mmol) を用いて、*N*-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)ベンゼンスルホンアミド (**68**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (14 mg, 0.027 mmol, 2段階収率 27%) を無色透明油状物として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.77 (2H, br s), 4.09-4.16 (2H, m), 4.21-4.24 (2H, m), 6.28 (1H, br s), 6.42 (1H, s), 7.11-7.16 (4H, m), 7.19-7.25 (3H, m), 7.30-7.37 (6H, m). LCMS (ESI) *m/z*: 514 (M+H)⁺.

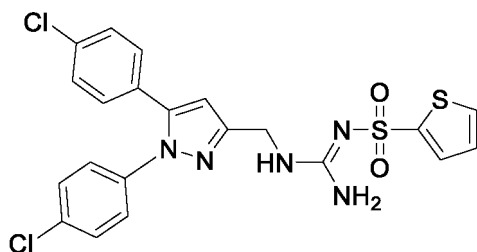
N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)ピリジン-3-スルホンアミド (**71**) の合成



1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**) (30 mg, 0.083 mmol) に対して、3-ピリジンスルホニルクロリド (0.011 mL, 0.092 mmol) を用いて、*N*-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)ベンゼンスルホンアミド (**68**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (15 mg, 0.029 mmol, 2段階収率 35%) を白色アモルファスとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4.40 (2H, s), 6.37 (1H, s), 6.87 (1H, br s), 7.06-7.16 (5H, m), 7.26-7.35 (4H, m), 8.14 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 8.67 (1H, d, *J* = 3.6 Hz), 9.06 (1H, s). 2H (NH₂) は観察されなかった. LCMS (ESI) *m/z*: 506 (M+H)⁺.

N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)チオフェン-2-スルホンアミド (**72**) の合成

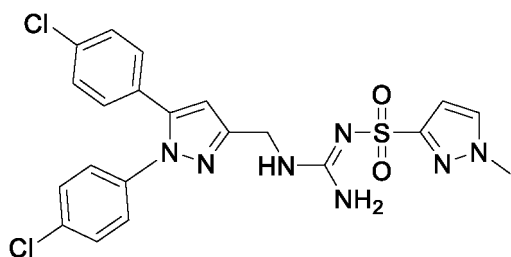


1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**) (56 mg, 0.16 mmol) に対して、2-チオフェンスルホニルクロリド (31 mg, 0.17 mmol) を用いて、*N*-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)チオフェン-2-スルホンアミド (**72**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (15 mg, 0.029 mmol, 2段階収率 35%) を白色アモルファスとして得た。

ル)アミノ)メチレン)ベンゼンスルホンアミド (**68**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (37 mg, 0.073 mmol, 2段階収率 47%) を白色アモルファスとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.42 (2H, br s), 6.43 (1H, m), 6.60 (1H, br s), 6.98 (1H, dd, $J = 5.0, 3.8$ Hz), 7.11-7.15 (4H, m), 7.30-7.33 (4H, m), 7.42 (1H, dd, $J = 5.0, 1.2$ Hz), 7.55 (1H, dd, $J = 3.8, 1.2$ Hz). 2H (NH_2) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 506 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

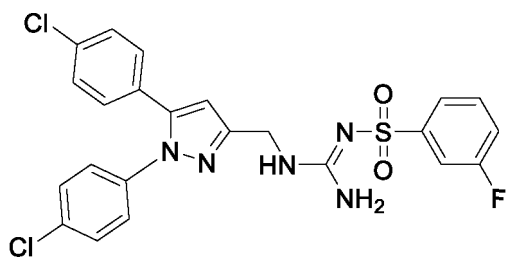
N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-3-スルホンアミド (**73**) の合成



1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**) (50 mg, 0.14 mmol) に対して、1-メチル-1*H*-ピラゾール-3-スルホンイルクロリド (0.017 mL, 0.15 mmol) を用いて、*N*-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)ベンゼンスルホンアミド (**68**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (26 mg, 0.052 mmol, 2段階収率 38%) を白色アモルファスとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.85 (3H, s), 4.43 (2H, d, $J = 4.1$ Hz), 6.49 (1H, m), 6.61 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.77 (1H, s), 7.09-7.17 (4H, m), 7.27-7.32 (5H, m). 2H (NH_2) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 504 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)-3-フルオロベンゼンスルホンアミド (**74**) の合成

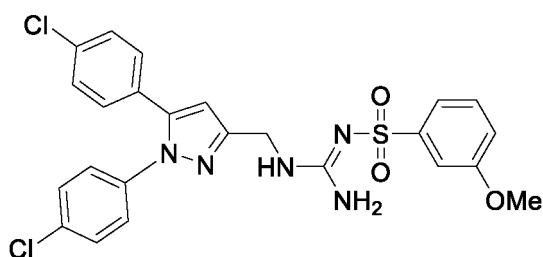


1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**) (100 mg, 0.278 mmol) に対して、3-フルオロベンゼンスルホンイルクロリド (0.055 mL, 0.42 mmol) を用いて、*N*-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)ベンゼンスルホンアミド (**68**) の合成と同様の方法で、

表題化合物 (68 mg, 0.13 mmol, 2 段階収率 47%) を白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.40 (2H, s), 6.37 (1H, s), 6.76 (1H, s), 7.06-7.16 (5H, m), 7.28-7.39 (5H, m), 7.53-7.58 (1H, m), 7.64-7.67 (1H, m). 2H (NH_2) は観察されなかった. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 107.0, 112.6, 112.8, 121.8, 121.9, 126.7, 128.4, 128.8, 129.2, 130.1, 130.97, 131.04, 132.1, 133.4, 138.1, 142.3, 161.5 (d, $J = 245.3$ Hz). 2C (Het- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-N}$ およびグアニジン炭素) は観察されなかった. LCMS (ESI) m/z : 518 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. IR (ATR) ν_{max} 3394, 3229, 3119, 1605, 1499, 1411, 1080, 926 cm^{-1} .

N-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)-3-メトキシベンゼンスルホンアミド (**75**) の合成



1-((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)グアニジン (**XIV-1**) (50 mg, 0.14 mmol) に対して、3-メトキシベンゼンスルホンクロリド (0.039 mL, 0.28 mmol) を用いて、*N*-(アミノ(((1,5-ビス(4-クロロフェニル)-1*H*-ピラゾール-3-イル)メチル)アミノ)メチレン)ベンゼンスルホンアミド (**68**) の合成と同様の方法で、表題化合物 (30 mg, 0.057 mmol, 2 段階収率 41%) を白色アモルファスとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.74 (3H, s), 4.40 (2H, br s), 6.37 (1H, m), 6.66 (2H, br s), 6.98 (1H, dd, $J = 8.2, 2.7$ Hz), 7.05-7.08 (2H, m), 7.11-7.15 (2H, m), 7.25-7.32 (5H, m), 7.39-7.46 (2H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 38.9, 55.4, 107.5, 110.9, 117.8, 118.2, 126.2, 127.9, 129.0, 129.3, 129.7, 129.9, 133.8, 135.0, 137.7, 143.5, 144.8, 159.5. LCMS (ESI) m/z : 530 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. IR (ATR) ν_{max} 3416, 3322, 1540, 1499, 1241, 1121, 1090, 594 cm^{-1} .

MALT1 プロテアーゼ活性評価

プロテアーゼ活性は、100 μL のアッセイバッファー (50 mM MES (pH 6.8)、150 mM NaCl、10%スクロース、0.1%CHAPS、10 mM DTT、1 M クエン酸トリアンモニウム) 中で、427 ng の N 末端 GST タグ付きヒト MALT1 タンパク質 (full length) と 20 μM の Ac-LRSR-AMC を用いて、96 ウェルプレートで調べた。プロテアーゼ活性は、Envision マイクロプレートリーダー (Ex: 380 nm, Em: 460 nm, PerkinElmer) を用いて、AMC 蛍光の増加により測定した。

NF-κB レポーター遺伝子アッセイ

NF-κB ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL4.32, Promega) を安定に発現させた Jurkat 細胞を用いて、NF-κB の転写活性に対する化合物の効果を測定した。Jurkat 細胞を 200 ng/mL の PMA と 1 μM のイオノマイシンで 5% CO₂ インキュベーター (37 °C) で 5 時間刺激した。その後、Steady-Glo 試薬 (Promega) を添加し、得られた発光を Fusion α (Perkin Elmer) で測定した。

IL-2 産生評価

Jurkat 細胞を 75 ng/mL の PMA と 150 nM のイオノマイシンで、5% CO₂ インキュベーター (37 °C) で 18 時間刺激した。細胞懸濁液を遠心分離し、上清を回収した。IL-2 濃度は、市販の ELISA 法 (OptEIA Human IL-2 ELISA set, BD Biosciences) を用いて、メーカーのプロトコルに従って測定した。

CYLD 切断評価

Jurkat 細胞を各濃度の試験化合物で 30 分間前処理し、200 ng/mL の PMA と 1 μM のイオノマイシンで 2 時間、5% CO₂ インキュベーター (37 °C) で刺激した。その後、これらの細胞を Passive Lysis Buffer (Promega 社製) で溶解し、15 分間遠心分離 (15,000g, 4 °C) し、上清をウェスタンブロッティングに用いた。ウェスタンブロッティングは、マウス抗 CYLD 抗体 (E-10, Santa Cruz Biotechnology) とヒツジ抗マウス IgG 抗体、HRP 結合全抗体 (GE Healthcare) を用いて、一般的なプロトコルで実施した。

In vitro 代謝安定性評価

ヒトまたはマウス肝ミクロソーム画分を用い、96 ウェルプレートで *in vitro* 代謝安定性を調べた。各化合物 2 μmol/L を 100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で反応混合物 (最終濃度: 10 mmol/L G6P, 8 mmol/L MgCl₂, 1 U/mL G6PDH, 0.5 mg protein/mL microsomal fraction, 1 mmol/L NADPH) と 30 分間インキュベートした。インキュベーションを停止し、同量のアセトニトリルを加えて化合物を抽出し、遠心した上清を LC-MS で分析した。肝固有クリアランス (CL_{int}) は、コントロール (0 時点) とインキュベーション時間からの化合物残存率から以下の式で算出した:

$$\text{化合物残存率 (\%)} = 100 \times \exp(-k \times t)$$

$$\text{CL}_{\text{int}} (\text{mL/min/mg protein}) = k/\text{Ms}$$

k: 消失速度定数 (min⁻¹), t: インキュベーション時間 (min), Ms: ミクロソーム濃度 (mg protein/mL)

In vitro 代謝安定性評価における LC-MS 分析

前処理したインキュベーション混合物は、タンデム液体クロマトグラフィー (Waters UPLC) および質量分析 (Waters SQD) システムで分析した。LC 分離は、Ascentis Express C18 カラム (20 mm×2.1 mm、2.7 μm) を用いて 40 °C で実施した。移動相は 0.1%ギ酸 (A) とアセトニトリル (B)。流速は 0.6 mL/min で、グラジエントプログラムは以下の通りであった： 3%-90%B (0-2 分)。MS イオン化と分析は、ESI のポジティブモード、シングルイオンモニタリングで実施した。

Caco-2 細胞膜透過性評価

Caco-2 細胞単層は、Multiscreen® 96 ウェルプレートシステム (Merck) 上で modified fast 法^{S1)}により 7 日間培養した。ルシファーイエローの透過性を調べることにより、単層膜の完全性を確認した。各被験化合物の apical 側から basal 側への見かけの透過性 (P_{app}) は、以下の式を用いて計算した：

$$P_{app} = dQ / dt \times 1 / AC_0.$$

単分子膜を通過する被験化合物の流動は dQ/dt (μmol/s) である。Apical 側の初期被験化合物濃度は C_0 (μmol/L) である。単分子膜の表面積は A (cm²) である。

Apical 側の被験化合物濃度は 1 μmol/L であった。37 °C で 1 時間インキュベートした後の basal 側被験化合物濃度を LC-MS で測定した。

S1) Masashi Uchida, *et. al.*, A modified fast (4 day) 96-well plate Caco-2 permeability assay, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2009, 59, 39-43.

マウスにおける薬物動態評価

絶食させた雄の BALB/cAnNCrIj マウス (8 週齢) に、1 mg/kg を静脈内 (尾静脈経由) または 2 mg/kg を経口投与した。マウスをイソフルランで麻酔した後、ヘパリン処理した注射針付きシリンジで頸静脈から採血した。採血した血液は 1,500 g で 10 分間遠心分離した。得られた血漿は LC-MS/MS 分析実施までは、-30 °C で保存した。血漿試料中の化合物は 3 倍量のメタノールを加えて抽出し、遠心分離した上清を LC-MS/MS で分析した。

薬物動態評価における LC-MS/MS 分析

前処理した血漿サンプルをタンデム液体クロマトグラフィー (Agilent 1200 シリーズ) および質量分析 (SCIEX API-5500) システムで分析した。LC 分離は、Ascentis Express C18 カラム (20 mm×2.1 mm、2.7 μm) を用い、40 °C で実施した。移動相は 0.1%ギ酸 (A) とアセトニトリル (B)。流速は 0.7 mL/min で、グラジエントプログラムは以下の通りであった： 30%B (0-0.1 分)、30%-100%B (0.1-1.8 分)。MS イオン

化および分析は、ESI を用い、イオン源温度 5500°V、350°C のポジティブモードで、化合物 68 の m/z 501.9→303.1 (コリジョンエネルギー：35eV) を選択反応モニタリングした。

薬物動態評価における薬物動態パラメータ解析

化合物 68 の血漿中濃度および時間プロファイルから薬物動態パラメータを Phoenix WinNonlin (ver.4, Jun 2007) (Pharsight, NC, USA) を用いた非コンパートメント解析により算出した。経口バイオアベイラビリティ (BA) は以下の式で算出した：

$$BA (\%) = (AUC_{oral} / Dose_{oral}) / (AUC_{intravenous} / Dose_{intravenous}) \times 100$$

AUC：濃度-時間曲線下面積、Dose：投与量。

イミキモド誘発乾癬モデルマウスを用いた薬効評価

BALB/c マウス (8 週齢) の両耳に、0 日目から 5 日目、7 日目、9 日目にイミキモドクリーム (5%、5 mg) を塗布した。これらのマウスは、化合物 68 の治療処置 (15、30 または 60 mg/kg のいずれかを、1 日 2 回、7 日目から 9 日目に経口投与)、またはコントロール処置 (0.5% MC-0.025% Tween20 を、1 日 2 回、7 日目から 9 日目に経口投与) を受けた。耳の厚さは 0 日目 (イミキモド塗布前) と 10 日目に測定した。

引用文献

- 1) Van Nuffel, E., Schmitt, A., Afonina, I. S., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., & Hailfinger, S. CARD14-Mediated Activation of Paracaspase MALT1 in Keratinocytes: Implications for Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **2017**, *37*, 569–575.
- 2) Van Nuffel, E., Staal, J., Baudelet, G., Haegman, M., Driege, Y., Hochepped, T., Afonina, I. S., & Beyaert, R. MALT1 targeting suppresses CARD14-induced psoriatic dermatitis in mice. *EMBO Rep.* **2020**, *21*, e49237.
- 3) Rapp, S. R., Feldman, S. R., Exum, M. L., Fleischer, A. B., Jr, & Reboussin, D. M. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1999**, *41*, 401–407.
- 4) Takeshita, J., Grewal, S., Langan, S. M., Mehta, N. N., Ogdie, A., Van Voorhees, A. S., & Gelfand, J. M. Psoriasis and comorbid diseases: Implications for management. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2017**, *76*, 393–403.
- 5) Hawkes, J. E., Chan, T. C., & Krueger, J. G. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140*, 645-653.
- 6) Howes, A., O'Sullivan, P. A., Breyer, F., Ghose, A., Cao, L., Krappmann, D., Bowcock, A. M., & Ley, S. C. Psoriasis mutations disrupt CARD14 autoinhibition promoting BCL10-MALT1-dependent NF- κ B activation. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 1759–1768.
- 7) Israel, L., & Mellett, M. Clinical and Genetic Heterogeneity of CARD14 Mutations in Psoriatic Skin Disease. *Front. Immunol.* **2018**, *16*, 2239.
- 8) Jordan, C. T., Cao, L., Roberson, E. D., Duan, S., Helms, C. A., Nair, R. P., Duffin, K. C., Stuart, P. E., Goldgar, D., Hayashi, G., Olfson, E. H., Feng, B. J., Pullinger, C. R., Kane, J. P., Wise, C. A., Goldbach-Mansky, R., Lowes, M. A., Peddle, L., Chandran, V., Liao, W., ... Bowcock, A. M. Rare and common variants in CARD14, encoding an epidermal regulator of NF-kappaB, in psoriasis. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *90*, 796–808.
- 9) Juilland, M., & Thome, M. Holding All the CARDS: How MALT1 Controls CARMA/CARDDependent Signaling. *Front. Immunol.* **2018**, *30*, 1927.
- 10) Afonina, I. S., Van Nuffel, E., Baudelet, G., Driege, Y., Kreike, M., Staal, J., & Beyaert, R. The paracaspase MALT1 mediates CARD14-induced signaling in keratinocytes. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 914–927.
- 11) DiDonato, J. A., Mercurio, F., & Karin, M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol. Rev.* **2012**, *246*, 379–400.
- 12) Hayden, M. S., & Ghosh, S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* **2011**, *21*, 223–244.
- 13) Hayden, M. S., West, A. P., & Ghosh, S. NF-kappaB and the immune response.

Oncogene **2006**, *25*, 6758–6780.

14) Liang, Y., Zhou, Y., & Shen, P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol. Immunol.* **2004**, *1*, 343–350.

15) Sun, S. C., Chang, J. H., & Jin, J. Regulation of nuclear factor-kB in autoimmunity. *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 282–289.

16) Herrington, F. D., Carmody, R. J., & Goodyear, C. S. Modulation of NF-kB Signaling as a Therapeutic Target in Autoimmunity. *J. Biomol. Screen.* **2016**, *21*, 223–242.

17) Pai, S., & Thomas, R. Immune deficiency or hyperactivity-Nf-kappab illuminates autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2008**, *31*, 245–251.

18) Greve, B., Weissert, R., Hamdi, N., Bettelli, E., Sobel, R. A., Coyle, A., Kuchroo, V. K., Rajewsky, K., & Schmidt-Supprian, M. I kappa B kinase 2/beta deficiency controls expansion of autoreactive T cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 179–185.

19) Han, Z., Boyle, D. L., Manning, A. M., & Firestein, G. S. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis, *Autoimmunity* **1998**, *28*, 197–208.

20) Cleyne, I., Jüni, P., Bekkering, G. E., Nüesch, E., Mendes, C. T., Schmied, S., Wyder, S., Kellen, E., Villiger, P. M., Rutgeerts, P., Vermeire, S., & Lottaz, D. Genetic evidence supporting the association of protease and protease inhibitor genes with inflammatory bowel disease: a systematic review. *PLoS One* **2011**, *6*, e24106.

21) Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. NF-kB signaling in inflammation. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 1–9.

22) Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V., & Dixit, V. M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 961-967.

23) Klein, T., Fung, S. Y., Renner, F., Blank, M. A., Dufour, A., Kang, S., Bolger-Munro, M., Scurll, J. M., Priatel, J. J., Schweigler, P., Melkko, S., Gold, M. R., Viner, R. I., Régnier, C. H., Turvey, S. E., & Overall, C. M. The paracaspase MALT1 cleaves HOIL1 reducing linear ubiquitination by LUBAC to dampen lymphocyte NF-kB signalling. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8777.

24) Rosebeck, S., Rehman, A. O., Lucas, P. C., & McAllister-Lucas, L. M. From MALT lymphoma to the CBM signalosome: three decades of discovery. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2485–2496.

25) Afonina, I. S., Elton, L., Carpentier, I., & Beyaert, R. MALT1 – a universal soldier: multiple strategies to ensure NF-kB activation and target gene expression. *FEBS J.*

2015, 282, 3286–3297.

26) Coornaert, B., Baens, M., Heyninck, K., Bekaert, T., Haegman, M., Staal, J., Sun, L., Chen, Z. J., Marynen, P., & Beyaert, R. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat. Immunol.* **2008**, 9, 263–271.

27) Hailfinger, S., Nogai, H., Pelzer, C., Jaworski, M., Cabalzar, K., Charton, J. E., Guzzardi, M., Décaillet, C., Grau, M., Dörken, B., Lenz, P., Lenz, G., & Thome, M. Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF-kappaB activation in lymphocytes and lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2011**, 108, 14596–14601.

28) Wiesmann, C., Leder, L., Blank, J., Bernardi, A., Melkko, S., Decock, A., D'Arcy, A., Villard, F., Erbel, P., Hughes, N., Freuler, F., Nikolay, R., Alves, J., Bornancin, F. and Rénatus, M. Structural determinants of MALT1 protease activity. *J. Mol. Biol.* **2012**, 419, 4–21.

29) Yu, J. W., Jeffrey, P. D., Ha, J. Y., Yang, X., & Shi, Y. Crystal structure of the mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1 (MALT1) paracaspase region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, 108, 21004-21009.

30) (a) Schlauderer, F., Lammens, K., Nagel, D., Vincendeau, M., Eitelhuber, A. C., Verhelst, S. H., Kling, D., Chrusciel, A., Ruland, J., Krappmann, D., & Hopfner, K. P. Structural analysis of phenothiazine derivatives as allosteric inhibitors of the MALT1 paracaspase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10384–10387. (b) Nagel, D., Spranger, S., Vincendeau, M., Grau, M., Raffegerst, S., Kloo, B., Hlahla, D., Neuenschwander, M., Peter von Kries, J., Hadian, K., Dörken, B., Lenz, P., Lenz, G., Schendel, D. J., & Krappmann, D. Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL. *Cancer Cell* **2012**, 22, 825–837.

31) Quancard, J., Klein, T., Fung, S. Y., Rénatus, M., Hughes, N., Israël, L., Priatel, J. J., Kang, S., Blank, M. A., Viner, R. I., Blank, J., Schlapbach, A., Erbel, P., Kizhakkedathu, J., Villard, F., Hersperger, R., Turvey, S. E., Eder, J., Bornancin, F., & Overall, C. M. An allosteric MALT1 inhibitor is a molecular corrector rescuing function in an immunodeficient patient. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, 15, 304–313.

32) Hamp, I., O'Neill, T. J., Plettenburg, O., & Krappmann, D. A patent review of MALT1 inhibitors (2013-present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2021**, 31, 1079–1096.

33) Rebeaud, F., Hailfinger, S., Posevitz-Fejfar, A., Tapernoux, M., Moser, R., Rueda, D., Gaide, O., Guzzardi, M., Iancu, E. M., Rufer, N., Fasel, N., & Thome, M. The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat. Immunol.*

2008, 9, 272–281.

34) Fontan, L., Yang, C., Kabaleeswaran, V., Volpon, L., Osborne, M. J., Beltran, E., Garcia, M., Cerchietti, L., Shaknovich, R., Yang, S. N., Fang, F., Gascoyne, R. D., Martinez-Climent, J. A., Glickman, J. F., Borden, K., Wu, H., & Melnick, A. MALT1 small molecule inhibitors specifically suppress ABC-DLBCL in vitro and in vivo. *Cancer Cell* **2012**, 22, 812–824.

35) Philippar, U., T. Lu, N. Vloemans, M. Bekkers, L. Van Nuffel, M. Gaudiano, K. Wnuk-Lipinska, B.-j. Van Der Leede, K. Amssoms, K. Kimpe, B. Medaer, T. Greway, Y. Abraham, M. Cummings, E. Trella, G. Vanhoof, W. Sun, J.W. Thuring, P. Connolly, J. Linders, H. Rui, S. Balasubramanian, A. Johnson, J. Gerecitano, J. Goldberg, J.P. Edwards, Y. Elsayed, J. Smit, J. Bussolari, J. Bussolari, & R. Attar. Discovery of JNJ-67856633: A novel, first-in-class MALT1 protease inhibitor for the treatment of B cell lymphomas. *Cancer Res.* **2020**, 80, 5690-5690.

36) Patani, G. A., & LaVoie, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147–3176.

37) Meanwell N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 2529–2591.

38) Poindexter, G. S., Bruce, M. A., Breitenbucher, J. G., Higgins, M. A., Sit, S. Y., Romine, J. L., Martin, S. W., Ward, S. A., McGovern, R. T., Clarke, W., Russell, J., & Antal-Zimanyi, I. Dihydropyridine neuropeptide Y Y1 receptor antagonists 2. bioisosteric urea replacements. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 507-521.

39) Durant, G. J., Emmett, J. C., Ganellin, C. R., Miles, P. D., Parsons, M. E., Prain, H. D., & White, G. R. Cyanoguanidine-thiourea equivalence in the development of the histamine H₂-receptor antagonist, cimetidine. *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 901–906.

40) Wouters, J., Michaux, C., Durant, F., Dogné, J. M., Delarge, J., & Masereel, B. Isosterism among analogues of torasemide: conformational, electronic and lipophilic properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 923–929.

41) Wenzel, M., Light, M. E., Davis, A. P., & Gale, P. A. Thiourea isosteres as anion receptors and transmembrane transporters. *Chem. Commun. (Camb).* **2011**, 47, 7641–7643.

論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Structure–activity relationship studies of 3-substituted pyrazoles as novel allosteric inhibitors of MALT1 protease

Ken Nunetsu Asaba, Yohei Adachi, Kazuyuki Tokumaru, Akira Watanabe, Yasufumi Goto, Takumi Aoki, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (IF = 2.7), **2021**, *41*, 127996.

Discovery of orally bioavailable inhibitors of MALT1 with in vivo activity for psoriasis

Ken Nunetsu Asaba, Keiichi Okimura, Yohei Adachi, Kazuyuki Tokumaru, Yasufumi Goto, Shigeo Fujii, Akira Watanabe, Chizuka Sakai, Eri Sakurada, Kazutoshi Amikura, Takumi Aoki, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (IF = 2.7), **2023**, *82*, 129155.

謝辞

本論文作成にあたり、多大なご指導を頂き、また学位取得に関して親身になって相談に乗って頂きました北里大学薬学部生命薬化学教室 藤井秀明教授に深甚なる謝意を申し上げます。

本研究は、東レ株式会社 医薬研究所内で行われたものであり、多大なご支援とご指導を賜りました創薬化学研究室室長 河合 孝治 博士をはじめ、MALT1阻害薬の研究にご協力頂きました、青木 拓実 博士、徳丸 和之 博士、後藤 康文 博士、沖村 慶一 修士、安達 庸平 博士、渡辺 昌 博士、藤井 茂雄 修士、網蔵 和敏 修士、桜田 恵里 修士、坂井 知津香 修士に心より御礼申し上げます。

最後に、学生時代から多大なご支援を頂きました両親、研究生活を多方面から支えてくれた妻をはじめ家族に心より感謝致します。