

博士論文

3-(1-ピペリジニル)ピリジン構造を有する新規コレステロール
24 ヒドロキシラーゼ (CH24H) 阻害剤の創製

2024 年

梶田 雄一

目次

序論	1
第一章 3-置換-4-フェニルピリジン構造を有する新規 CH24H 阻害剤の設計と合成、およびその生物活性.....	8
第一節 X 線共結晶構造解析をもとにした新規 CH24H 阻害剤の設計	8
第二節 3-置換-4-フェニルピリジン誘導体の合成	12
第三節 3-置換-4-フェニルピリジン誘導体の CH24H 阻害活性	14
第四節 化合物 4 と CH24H の共結晶構造解析	15
第五節 小括	16
第二章 3-(1-ピペリジニル)ピリジンまたは 5-(1-ピペリジニル)ピリミジン構造を有する高選択的 CH24H 阻害剤の設計と合成、およびその生物活性.....	18
第一節 CYP3A4 との選択性改善を指向した分子設計.....	18
第二節 3-(1-ピペリジニル)ピリジンまたは 5-(1-ピペリジニル)ピリミジン誘導体の合成.....	20
第一項 2,4'-ビピリジンおよび 4-フェニルピリミジン誘導体の合成.....	20
第二項 4-ピラゾリルピリジン誘導体の合成	22
第三項 4-チアゾリルピリジン誘導体の合成	23
第三節 3-(1-ピペリジニル)ピリジンまたは 5-(1-ピペリジニル)ピリミジン誘導体の CH24H および CYP3A4 阻害活性.....	24
第一項 2,4'-ビピリジンおよび 4-フェニルピリミジン誘導体の生物活性.....	24
第二項 Ligand-lipophilicity efficiency (LLE) を指標としたビアリアル構造の最適化とその誘導体の生物活性.....	26
第四節 小括	31
第三章 4-(4-メチル-1-ピラゾリル)ピリジン誘導体 23 の生物学的特性評価	32
第一節 化合物 23 の CH24H との共結晶構造解析.....	32
第二節 化合物 23 の CYP 選択性評価.....	33
第三節 化合物 23 のマウスにおける薬物動態および脳内 24HC 低下作用の評価..	34
第四節 小括	35

総括	36
実験の部	38
第一章に関する化合物合成法	39
第二章に関する化合物合成法	43
X線共結晶構造解析に関する実験	59
薬理作用および薬物動態に関する実験	61
引用文献	64
論文目録	71
謝辞	72

略記号

ABC	ATP-binding cassette
Ac	acetyl
Ala	alanine
Ar	aryl
Arg	arginine
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
Bu	butyl
C _{brain}	brain drug concentration
CH24H	cholesterol 24-hydroxylase
C _{plasma}	plasma drug concentration
cPr	cyclopropyl
CPR	NADPH-cytochrome P450 reductase
CYP	cytochrome P450
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
dba	dibenzylideneacetone
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DME	1,2-dimethoxyethane
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMF-DMA	<i>N,N</i> -dimethylformamide dimethyl acetal
DMSO	dimethyl sulfoxide
dppf	1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
EAAT2	excitatory amino acid transporter 2
Et	ethyl
Gly	glycine
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
hERG	human ether-a-go-go related gene
HIV	human immunodeficiency virus
IC ₅₀	50% inhibition concentration

LDL	low density lipoprotein
LLE	ligand-lipophilicity efficiency
LLOQ	lower limit of quantification
LXR	liver X receptor
Me	methyl
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen
NK ₃ R	neurokinin 3 receptor
NMDAR	<i>N</i> -methyl-D-aspartate receptor
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone
PDB	protein data bank
PET	positron emission tomography
Ph	phenyl
Phe	phenylalanine
p.o.	per os
rt	room temperature
SBDD	structure-based drug design
SD	standard deviation
SEM	standard error of mean
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
Trp	tryptophan
TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
XantPhos	4,5-bis-(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene
24HC	24 <i>S</i> -hydroxycholesterol

序論

脳内コレステロールの恒常性とコレステロール 24 ヒドロキシラーゼ (CH24H)

脳は全身のわずか 2% の重量を占めるに過ぎないが、体内で最も豊富にコレステロールを含む臓器であり、体内コレステロール総量の約 4 分の 1 が脳内に存在する^{1,2}。脳内では、神経伝達速度を高めるミエリン鞘が神経細胞の軸索周囲に形成される。ミエリン鞘は脂質二重膜が何層にも重なった構造であり、コレステロールはその主要な構成要素である。また、コレステロールは細胞膜の構築や流動性の調節、膜タンパクが安定に存在するための脂質ラフトの形成と維持にも重要な役割を果たしている。

末梢組織の多くが、体外からの吸収や肝臓で合成されたコレステロールを利用できるのに対し、血液脳関門によってコレステロールの輸送が隔てられた脳は、末梢組織とは異なるコレステロール恒常性維持の仕組みを有する³。コレステロールは血液脳関門を通じて脳に移行せず、必要なコレステロールは脳内で生合成される¹。主にアストロサイトで合成されたコレステロールは、ATP 結合カセット (ATP-binding cassette: ABC) トランスポーターを通じてリポタンパクとして細胞外に放出され、神経細胞やグリア細胞に輸送された後、低比重リポタンパク (low density lipoprotein: LDL) 受容体ファミリーを介して神経細胞に取り込まれる。取り込まれたコレステロールは、最終的には代謝酵素によって血液脳関門を通過しやすい形に変換され、抹消へ排出される。これらのプロセスが調節されることで脳内コレステロールの恒常性が維持される。

脳内コレステロールの恒常性維持に関連する重要な分子の一つが、コレステロール 24 ヒドロキシラーゼ (cholesterol 24-hydroxylase: CH24H) である。CH24H は脳内コレステロールの代謝を担うシトクロム P450 (CYP) 酵素群の一つ (CYP46A1) であり、コレステロールの 24 位を水酸化し、24S-ヒドロキシコレステロール (24S-hydroxycholesterol: 24HC) へと変換する (Figure 1)⁴。CH24H は脳特異的に発現しており、CH24H によるコレステロールの酸化代謝は、脳内コレステロール代謝の主経路の一つとして考えられている⁵。CH24H によって生成した 24HC は血液脳関門を通じて脳から排出される。排出された 24HC は肝臓に運ばれ CYP39A1 などによってさ

らなる代謝を受けた後、胆汁酸として体外へと排泄される。また、24HC は脳内コレステロールの代謝バランスの調節機能を有する。24HC は核内受容体である肝臓 X 受容体 (liver X receptor: LXR) のリガンドとして機能し、LXR を活性化させる。アストロサイト内で活性化した LXR は ABC トランスポーターの発現を増加させ、細胞外へのコレステロールの排出を促進する。このように、CH24H は 24HC を介したコレステロール恒常性に対するフィードバック機能を有しており、脳内コレステロールの代謝バランスを維持する重要な役割を担っている。

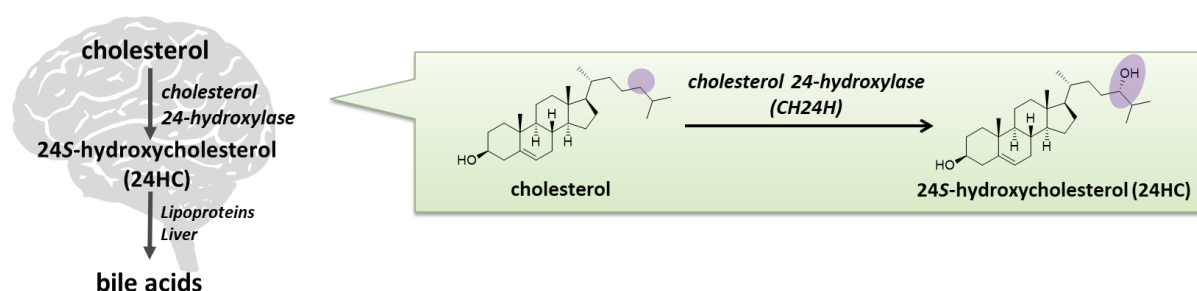


Figure 1. Brain cholesterol and CH24H.

CH24H と疾患の関連

CH24H は様々な疾患との関連が指摘されている⁶。CH24H をコードする *CYP46A1* はアルツハイマー病発症の危険因子として複数同定されているコレステロール代謝関連遺伝子の一つである。ウイルスベクターを用いた CH24H の局所的過剰発現が、アルツハイマー病のモデルマウスにおいて病態を改善させることが報告されており⁷、CH24H の活性化がアルツハイマー病の治療戦略として期待されている。近年、抗 HIV 薬である非核酸系逆転写酵素阻害薬エファビレンツが CH24H を活性化することが明らかとなり、アルツハイマー病を適応疾患とした臨床試験が実施されている⁸。

CH24H の薬理的阻害は、神経過興奮を伴う疾患と関連する。CH24H によって産生される 24HC は、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体 (N-methyl-D-aspartate receptor : NMDAR) のポジティブアロステリックモジュレーターであり、グルタミン酸によって引き起こされる神経細胞の興奮性伝達を増強させる⁹。また、活性化アストロサイトでは CH24H の発現量が亢進し、膜内コレステロール量が減少することで、グルタミン酸の再取り込みを担う興奮性グルタミン酸トランスポーター (excitatory amino acid transporter 2: EAAT2) が細胞膜から剥離し、機能不全を引き起

こす¹⁰。その結果、細胞外でのグルタミン酸濃度が上昇し、グルタミン酸作動性シグナル伝達が増強する。てんかん発作はグルタミン酸により誘発されることが知られており¹¹、CH24H 阻害剤は、グルタミン酸作動性シグナル伝達を減少させ、てんかん患者の発作コントロールを改善させる可能性がある。実際に、選択的 CH24H 阻害剤であるソチクレスタット（または **TAK-935**）は、マウスにおいてカリウム誘発の細胞外グルタミン酸濃度の上昇を抑え¹²、複数のてんかんモデルマウスにおいてけいれん発作頻度を減少させる¹³。さらに、第Ⅱ相臨床試験ではドラベ症候群およびレノックスガストー症候群の患者のけいれん発作頻度を有意に減少させた¹⁴。これらのことから、CH24H が神経過興奮をおさえる有望な標的分子であることが示唆される。

CYP と CH24H

CH24H は CYP46A1 と呼ばれ、CYP 酵素群の一つである。CYP は約 500 アミノ酸残基からなり、活性部位にヘムを含む膜結合ヘムタンパクとして体外異物の解毒、細胞代謝、恒常性維持に重要な役割を果たしている。酵母や細菌、植物、哺乳類に至るまでのほとんどの生物において存在し、ヒトでは 57 種類の CYP がコードされ、18 のファミリーと 43 のサブファミリーに分類される (Table 1)¹⁵。同ファミリー内では 40%以上の相同性を有するが、CH24H が属する CYP46 にはこれまでに見つかった他のサブファミリーはなく、CYP46A1 の一つのみである。

CYP1 から CYP3 ファミリーに属するアイソフォームは薬物代謝型 CYP と呼ばれる。基質特異性が低く、肝臓で生体外異物を代謝するのが主な役割である。一方で、これらの CYP 種が内因性物質を基質にすることも報告されており、CYP3A4 によるテストステロンの代謝や、CYP2D6 による脳内でのドーパミンやセロトニン合成など、近年になって中枢神経系でのこれらの CYP 種の機能について研究が進んでいる¹⁶。CYP11 や CYP17 をはじめとした CYP 種はステロイドホルモン合成に関与する。また、CH24H を含む複数の CYP 種がコレステロールの代謝を通じて胆汁酸を生合成する経路を担う。

CH24H は脳組織では主に神経細胞に発現しており、細胞内の小胞体膜表面に結合している膜結合型タンパクである¹⁷。CH24H の N 末端には疎水性のアミノ残基が配列しており、これがアンカーとなって膜に接着すると考えられている。CH24H は X

線によって結晶構造が解かれている¹⁸。水溶性を高めるために、膜結合領域と考えられる N 末端を除く改変がなされているが、CH24H は他の CYP と同様、比較的 β シートが多い領域と α ヘリックスの多い領域で構成されており、活性中心のヘムは分子全体のほぼ中央に位置する (Figure 2a)。膜結合モデルとして、ヘリックス A、 β 1 シートおよび F-G ループ領域が小胞体膜への接地点かつ、基質のアクセスチャネルを形成しているモデルが提唱されており¹⁷、このモデルにおいて CH24H の基質であるコレステロールは、小胞体膜から直接 CH24H に結合することができる。これは他の CYP 種を含めた最近の研究内容と矛盾しない¹⁹。基質となるコレステロールの硫酸抱合体との共結晶構造解析では、コレステロールの 24 位が活性中心のヘム鉄近傍に位置しており、CH24H がコレステロールの 24 位を酸化し、24HC を選択的に生成する機構を支持する (Figure 2b)。

Table 1. CYP family in human

Family	Function (representative)	Family	Function (representative)
1	drug metabolism	19	steroid aromatase
2	drug metabolism	20	function not determined
3	drug metabolism	21	steroid 21-hydroxylase
4	fatty acid metabolism	24	vitamin D ₃ -24-hydroxylase
5	thromboxane synthase	26	retinoic acid hydroxylase
7	steroid 7 α -hydroxylase	27	sterol 27-hydroxylase
8	prostacyclin synthase	39	oxysterol 7 α -hydroxylase
11	steroid 11 β -hydroxylase	46	cholesterol 24-hydroxylase
17	steroid 17 α -hydroxylase	51	lanosterol 14 α -demethylase

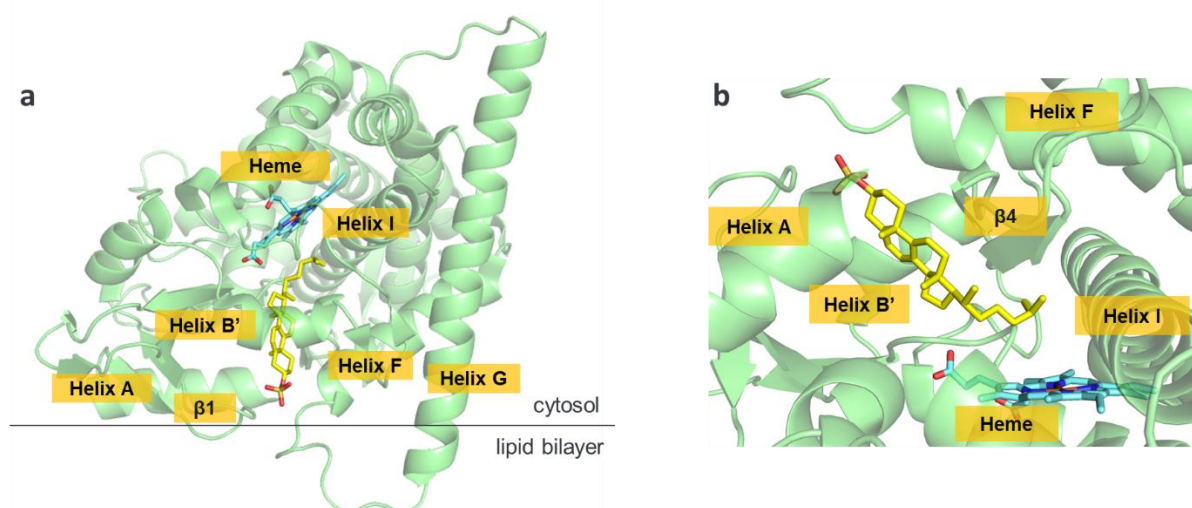


Figure 2. An X-ray crystal structure of CH24H in complex with cholesterol sulfate (PDB: 2Q9F). (a) A proposed model of CH24H binding to the membrane¹⁷. (b) A binding mode of cholesterol sulfate around the catalytic site of CH24H.

CH24H の結合リガンドとその結晶構造

CH24H はコレステロールの硫酸抱合体に加えて、アポ体 (Figure 3a)や他の低分子化合物との複合体の結晶構造も解かれている^{18,20,21}。ポリコナゾールは、アゾール系抗真菌薬と呼ばれる承認薬であり、CYP51 を阻害することで真菌類の細胞膜を構成するエルゴステロールの合成を阻害する一方、CYP3A4 を始め様々な CYP を阻害する非選択的 CYP 阻害剤である²²。ポリコナゾールはそのトリアゾール窒素原子で CH24H のヘム鉄に直接配位する (Figure 3c)²⁰。ソチクレスタットは選択的 CH24H 阻害剤として設計、開発された化合物であり、分子末端のピリジン窒素原子で CH24H のヘム鉄に配位する (Figure 3d)²¹。CH24H の活性中心はヘリックス B'や F、I といった複数のヘリックスおよび $\beta 4$ シートに囲まれた構造をしており、この活性中心の形状は、アポ体と、非選択的 CYP 阻害薬ポリコナゾールや選択的 CH24H 阻害薬ソチクレスタット (Figure 3d) が結合した複合体間で大きな違いは認められない。

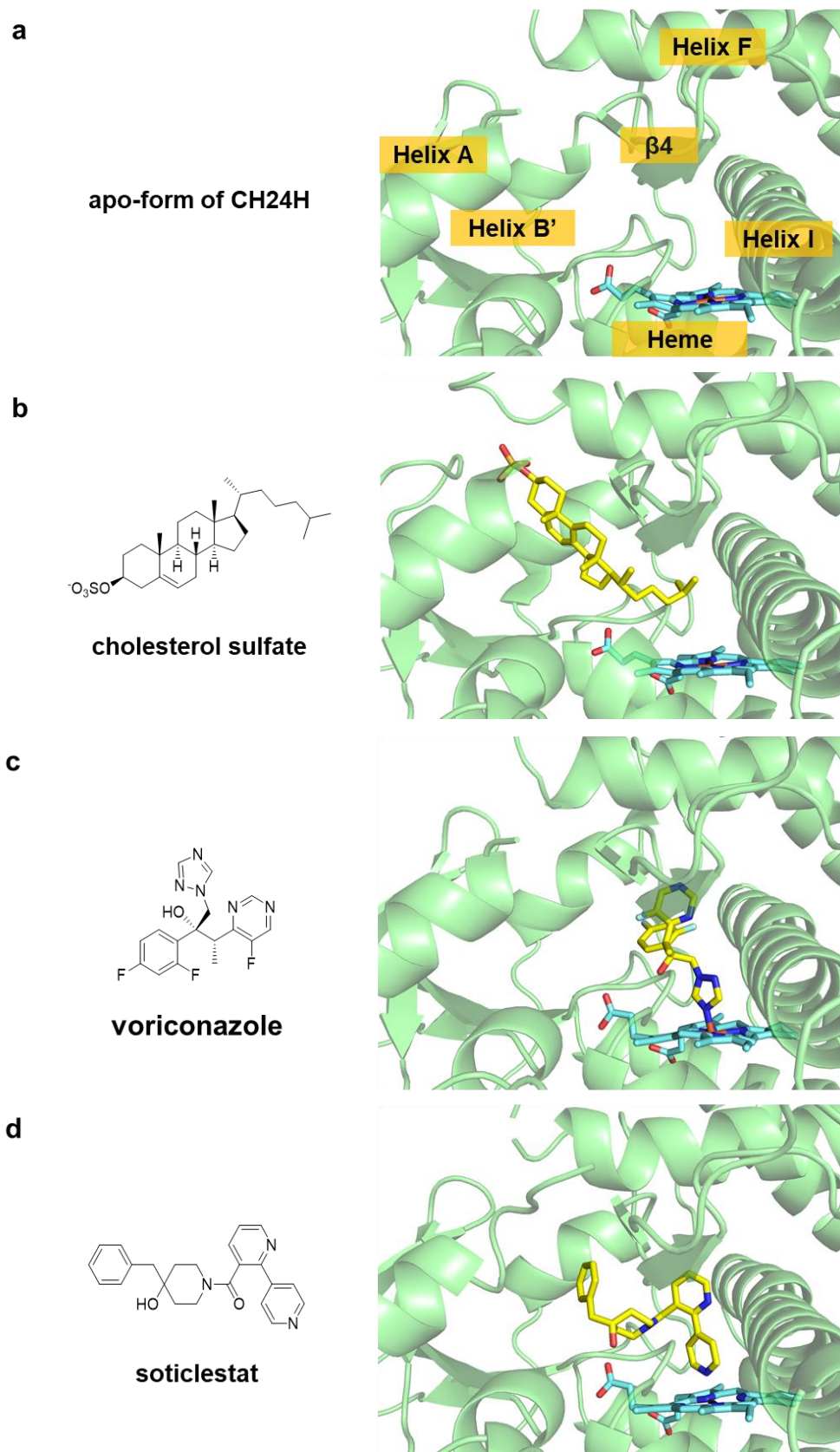


Figure 3. X-ray crystal structures of CH24H in complex with (a) apo-form (PDB: 2Q9G), (b) cholesterol sulfate (PDB: 2Q9F), (c) voriconazole (PDB: 3MDT) and (d) soticlestat (PDB: 7LRL).

本研究の目的

CH24H は脳内コレステロールの恒常性調節や、興奮性／抑制性バランスが関与する疾患への関連など、重要な機能を有していると考えられ、化合物を使用したさらなる検証が求められる。しかしながら、既知の CH24H 阻害剤の多くが、非選択的 CYP 阻害剤や、副次的薬理作用としてその活性が見出されてきた化合物である^{20,22,23}。強力かつ選択的な CH24H 阻害剤として検証に資する化合物としてソチクレスタットが報告されているが、さらなる詳細な薬理作用の検証のためには、以下の観点から新規ツール化合物の創出が望まれる。すなわち、1) 低分子化合物は未知のオフターゲット作用を有する潜在的风险があるため、標的分子の検討には、構造の異なる複数の化合物を用いて交差検証することが望ましいこと²⁴、2) 構造が異なる化合物は、異なる結合様式や結合カインेटクス、薬理作用を示す可能性があり、CH24H に関する新たな現象を提示する可能性があること²⁵、3) ソチクレスタットと非特異的結合プロファイルが異なる化合物は、ソチクレスタットと併用することでそれぞれの非特異的結合によるノイズを切り分けることができ、質の高いケミカルプローブ開発に貢献できる可能性があること、である。

以上のことから、ソチクレスタットと構造が異なり、強力かつ選択的な新規 CH24H 阻害剤の創出を重要課題ととらえ、本研究を開始した。

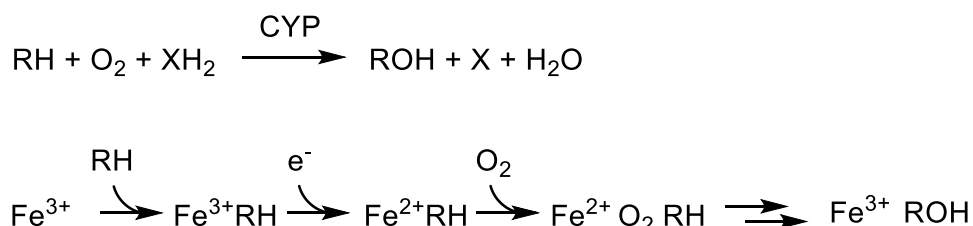
本論

第一章 3-置換-4-フェニルピリジン構造を有する新規 CH24H 阻害剤の設計と合成、およびその生物活性

第一節 X線共結晶構造解析をもとにした新規 CH24H 阻害剤の設計

CYP の活性中心は、鉄原子とポルフィリンからなるヘムを有する。CH24H をはじめとするモノオキシゲナーゼは、NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (NADPH-cytochrome P450 reductase: CPR) 等の電子供与体と協同し、酸素分子 (O_2) から 1 原子の酸素 (O) を基質に導入する反応を触媒する (Scheme 1)²⁶。この酸化反応において、不活性状態の Fe^{3+} から Fe^{2+} への還元が不可欠である。

Scheme 1. Role of monooxygenase



これまでに様々な CYP 阻害剤が見出されているが、その多くがイミダゾールやピリジンなど芳香族ヘテロ環を有する誘導体である (Figure 4)。これらの化合物はヘム鉄に直接配位し可逆的に阻害することが知られている。芳香族ヘテロ環窒素原子は鉄原子に強く配位するとともに、鉄原子の酸化還元電位を負の方向にシフトさせることで鍵となる Fe^{3+} から Fe^{2+} への還元を抑制する。

ヘム鉄に直接配位するヘムバインダーを有する阻害剤は強い阻害活性が期待できるとともに、X線共結晶構造を利用し、ヘムバインダーを起点とした Structure-Based Drug Design (SBDD) アプローチによる分子設計が可能となることから、ヘム直接配位型阻害剤を設計することとした。

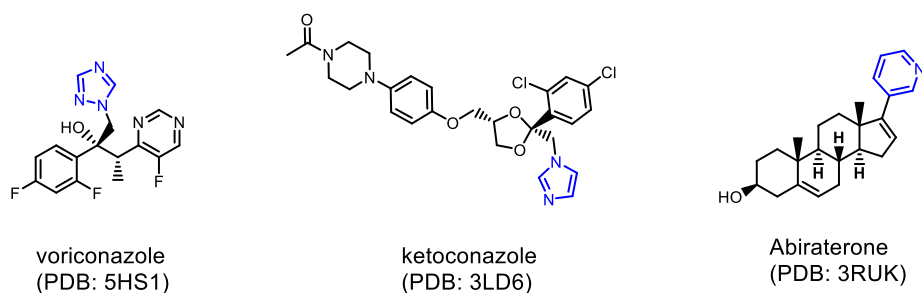


Figure 4. Examples of marketed CYP inhibitors. Heme binders are highlighted in blue.

ソチクレスタットと構造の異なる新規 CH24H 阻害剤を設計するにあたり、チオペラミドに着目した。チオペラミドはヒスタミン H3 受容体遮断薬として知られる研究用試薬であるが、その副次的薬理作用として CH24H 阻害作用を有する¹⁸。ヒト型 CH24H を発現した細胞ライセートを用い、 $[^{14}\text{C}]$ コレステロールから $[^{14}\text{C}]$ 24HC への変換量を測定することでその阻害活性を評価したところ、チオペラミドの 50%阻害濃度 (IC_{50}) は 430 nM であった。阻害活性は強くないものの、チオペラミドはソチクレスタットと異なる特徴的な結合様式をとることが X 線共結晶構造解析から示されており (Figure 5a)²⁰、ソチクレスタットと構造および結合様式の異なる分子を設計する上で適切な出発物質であると考えた。

ソチクレスタットは、分子末端のピリジン環窒素原子でヘム鉄に直接配位する (Figure 5b)²¹。もう一方のピリジン環が CH24H に特徴的なヘリックス F 下方の脂溶性空間を占有するとともに、ピペリジン環上に導入されたヒドロキシ基が Gly369 の主鎖カルボニル部位と水素結合を形成し、ピペリジン環 4 位のベンジル基は「steroidal cavity」と呼ばれるコレステロール分子が結合する脂溶性ポケットを占有する。これらの相互作用の結果、強力な CH24H 阻害活性 ($\text{IC}_{50}=4.5$ nM)¹²を示すと考えられた。一方、チオペラミドは、そのイミダゾール環窒素原子でヘム鉄に直接配位し、イミダゾール環 NH 部位が Thr306 側鎖のヒドロキシ基と、チオウレア構造 NH 部位が水を介して Trp368 の主鎖 NH 部位や Gly369 の主鎖カルボニル部位、ヘムプロピオナートと水素結合ネットワークを形成する。ソチクレスタットと異なる特徴的な結合様式として、Arg226 と Phe80 の側鎖が steroidal cavity に引き込まれ、チオペラミドのチオウレア硫黄原子と水素結合を形成するとともに、引き込まれた Phe80 によって生成したヘムプロピオナート上方の脂溶性空間をチオペラミドのシクロヘキサン環が占有する。また、チオペラミドはヘリックス F 下方の脂溶性空間を使用

していない。

本構造解析にもとづいた SBDD によって新たな分子を設計した (Figure 6)。はじめに、ヘリックス F 下方の空間を脂溶性置換基で占有することを検討した。上述のように、ソチクレスタットはヘリックス F 下方の脂溶性空間をピリジン環で占有している一方で、チオペラミドはその部位を占有しておらず、脂溶性置換基でヘリックス F 下方の脂溶性空間を占有できれば強い阻害活性を示す可能性があると考えた。チオペラミドの5員環イミダゾールはヘム鉄への配位能が高く、ヘムバインダーとして優れた配位能を有する構造であるが、イミダゾール上への置換基導入では角度が悪く、ヘリックス F 下方の脂溶性空間を適切に占有することは困難と考えられた。そこで、5員環イミダゾールに替えて6員環ピリジンを適用することとし、4-フェニルピリジン構造を設計した。4-フェニルピリジン構造を導入することによって、そのピリジン環窒素原子によるヘム鉄への直接配位と、フェニル基によるヘリックス下方の脂溶性空間の占有を期待した。4-フェニルピリジン構造はその誘導体のフラグメントが $IC_{50} = 1,900 \text{ nM}$ の活性を示し、さらなる最適化によって強い活性を示すことが報告されており²¹、ヘムバインダーとして CH24H への親和性が高いと考えられる構造である。次に、チオウレア構造はウレアまたはアミド構造へ変換した。共結晶構造からチオウレア硫黄原子は Arg226 と水素結合を形成していることが示唆される。硫黄原子は電気陰性度が低いことから、より電気陰性度の高い酸素原子に置き換えることでより強い水素結合の形成と、それに伴う活性向上を期待した。また、チオペラミドのチオウレア部分はシクロヘキサン環のアキシアル位にあり、環構造とチオウレア構造が折れ曲がった配置となっている。しかし、このような構造はエネルギー的に不利である。結合親和性が減弱するエネルギーロスを生じながら結合していることから、シクロヘキサン環がエクアトリアル配置で結合した場合には Phe80 と立体反発が起こり Phe80 および Arg226 を引き込めず、エネルギーロスを生じてでも折れ曲がった形で Phe80 と Arg226 と相互作用を形成する方が、複合体として安定な構造となっている可能性が考えられた。大きな置換基では、配置のわずかなずれにより Phe80 および Arg226 を引き込めず、分子設計の妥当性が検討できなくなるおそれがあること、安定コンフォメーションで結合できる小さな置換基であれば活性が向上する可能性があったことから、新規化合物探索では環サイズを縮小し、環構造とウレアまたはアミド構造とが折れ曲がった配置しかとれないシクロプロパ

ン環を採用した。詳細な構造活性相関は、分子設計全体の妥当性を確認した後に取得することとした。

以上の設計にもとづき、適切な位置にウレア構造を配置できるリンカーを探索し、3-置換-4-フェニルピリジン誘導体 **1-4** を合成した。

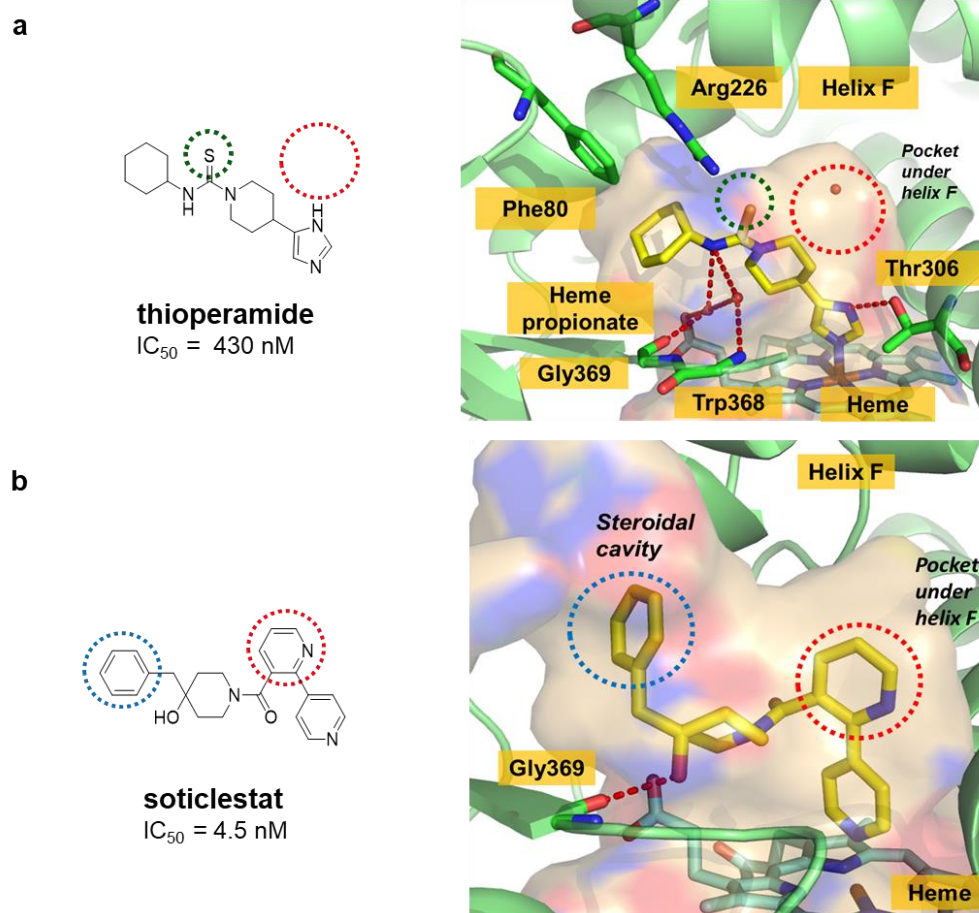


Figure 5. X-ray crystal structures of CH24H in complex with (a) thioperamide (PDB: 3MDM) and (b) soticlestat (PDB: 7LRL).

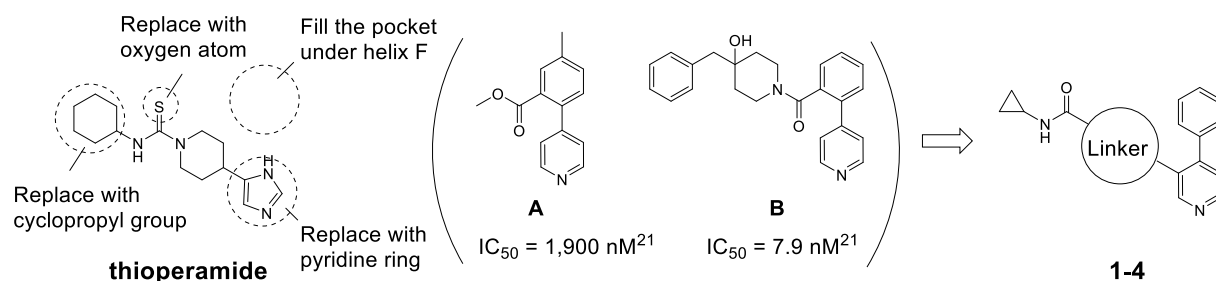


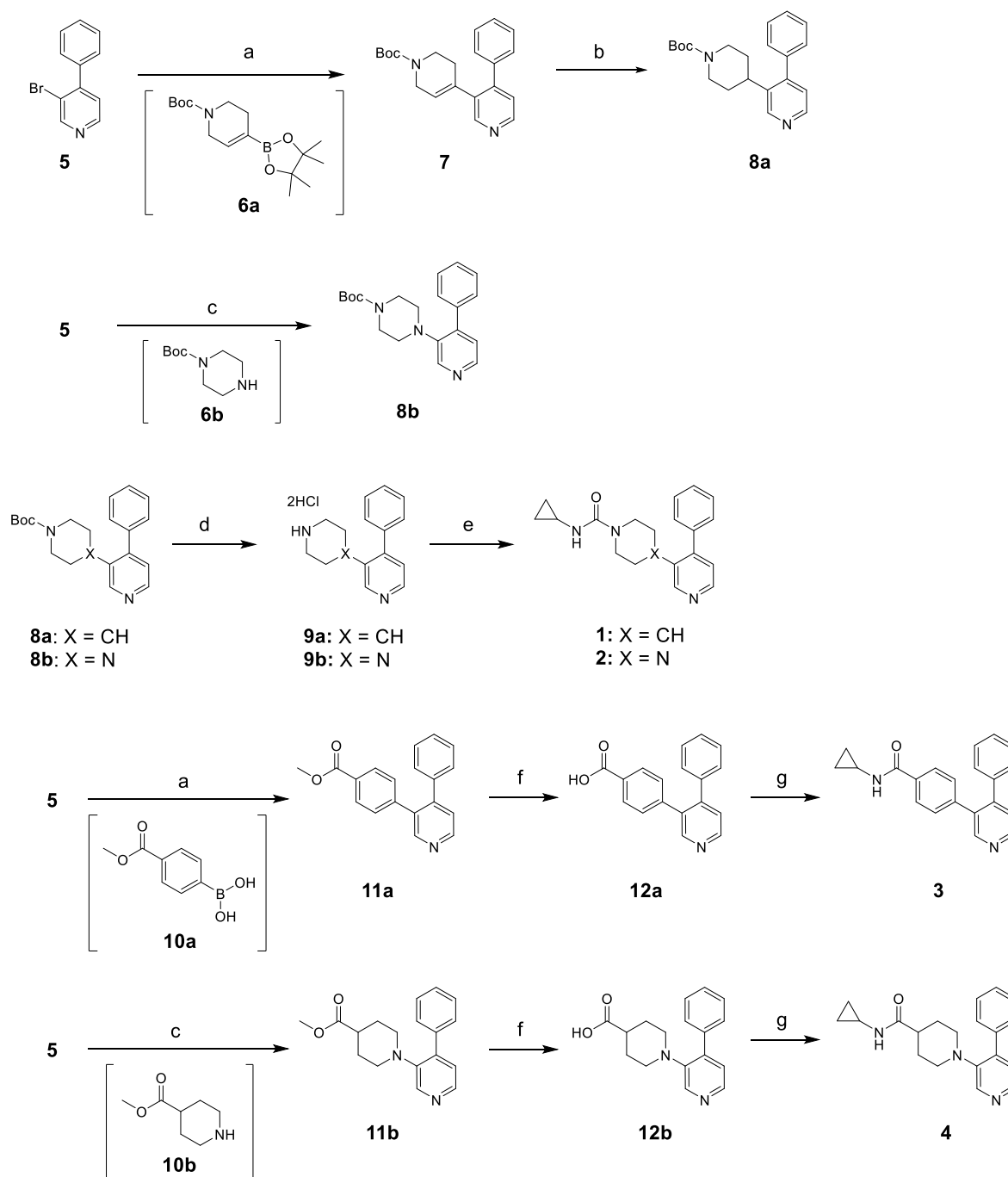
Figure 6. Design of compounds **1-4** based on thioperamide by structure-based drug design approach.

第二節 3-置換-4-フェニルピリジン誘導体の合成

3-置換-4-フェニルピリジン誘導体**1-4**は市販のブロミド**5**を出発原料として合成した (Scheme 2)。市販のボロン酸エステル**6a**との鈴木-宮浦カップリング反応により得られた化合物**7**を水酸化パラジウム存在下接触還元反応に付し、ピリジン環3位に4-ピペリジニル基を導入した化合物**8a**を合成した。また、Boc-ピペラジンとブロミド**5**のBuchwald-Hartwigクロスカップリング反応により、3-ピペラジニル-4-フェニルピリジン誘導体**8b**を得た。酸性条件下でこれらの化合物のBoc基を脱保護したのち、得られた**9a**および**9b**とシクロプロピルアミンを、クロロギ酸4-ニトロフェニルを用いたウレア化反応に付すことで、目的とするウレア誘導体**1**ならびに**2**を合成した。

4-フェニルピリジン構造の3位にフェニル基を導入したアミド誘導体**3**、および1-ピペリジニル基を導入した化合物**4**は以下の方法で合成した。ブロミド**5**を出発原料として、分子内にエステル部位を有する市販のボロン酸**10a**またはアミン**10b**とのクロスカップリング反応によって、対応するエステル**11a**と**11b**を得た。得られたエステルは水酸化ナトリウム水溶液で加水分解してカルボン酸**12a**および**12b**とし、続くHATUを縮合剤として用いたシクロプロピルアミンとの縮合により、アミド誘導体**3**ならびに**4**を合成した。

Scheme 2. Synthesis of 3-substituted-4-phenylpyridine derivatives^a



^aReagents and conditions: (a) **6a** or **10a**, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DME/H₂O, microwave 130 °C, 90% (**7**) or 94% (**11a**); (b) H₂, Pd(OH)₂, THF, rt, 90%; (c) **6b** or **10b**, Pd₂(dba)₃, XantPhos, NaOt-Bu, toluene, 100–110 °C, 63% (**8b**) or 12% (**11b**); (d) 4 M HCl/EtOAc, MeOH, rt, 100% (**9a**) or 98% (**9b**); (e) cyclopropylamine, *p*-nitrophenyl chloroformate, DIPEA, THF, rt, 22% (**1**) or 50% (**2**); (f) 1 M NaOH aq., THF/MeOH, 50 °C, 84%; (g) cyclopropylamine, HATU, DIPEA, DMF, rt, 89% (**3**) or 82% (**4**).

第三節 3-置換-4-フェニルピリジン誘導体の CH24H 阻害活性

4-フェニルピリジンの3位にチオペラミドの部分構造である4-ピペリジニル基をリンカーとして導入した化合物**1** ($IC_{50} = 950 \text{ nM}$) は中程度のCH24H阻害活性を示した (Table 2)。この結果により、3-置換-4-フェニルピリジン誘導体が新規のCH24H阻害剤となることが確認できた。阻害活性が中程度であった原因として、ヘムバインダーを5員環イミダゾールから6員環ピリジンに変換した化合物**1**では、ヘム鉄への配位能が低くなっている影響が考えられた。しかし、置換4-フェニルピリジンのフラグメント自体が化合物**1**と同程度の活性を示している報告例 (化合物A, Figure 6)²¹を考慮すると、4-フェニルピリジン構造のCH24Hに対する親和性は高く、化合物**1**が中程度の阻害活性を示したのは、Arg226と相互作用を形成できる位置にウレア構造を適切に配置できていない可能性が高いと考えられた。4-ピペリジニル基をピペラジニル基 (化合物**2**, $IC_{50} = 52 \text{ nM}$) およびフェニル基 (化合物**3**, $IC_{50} = 74 \text{ nM}$) に変換したところ活性の向上が認められ、ピリジン環3位に結合する原子としては sp^2 性をもつ原子が好ましいことが示唆された。ピリジン環に sp^2 窒素や sp^2 炭素で結合する化合物**2**および**3**は、 sp^3 炭素で結合している化合物**1**と比べてピリジン環とリンカーが平面に近い立体配座をとりやすく、この立体配座が活性発現に有利であったためと推察された。次に、ピリジン環3位に結合する原子を窒素に固定し、リンカーに結合したカルボニル部位が自由回転可能な1-ピペリジニル基を導入した化合物**4** ($IC_{50} = 8.1 \text{ nM}$) を合成したところ、非常に強いCH24H阻害活性を示した。カルボニル部位が自由回転可能となったことで、Arg226と相互作用をとれるより適切な位置にシクロプロピルアミド部位を配置できるようになったと考察した。

Table 2. CH24H inhibitory activities of 3-substituted-4-phenylpyridine derivatives

ID	Linker	CH24H
		IC ₅₀ (nM)
thioperamide		430
1		950
2		52
3		74
4		8.1

第四節 化合物 **4** と CH24H の共結晶構造解析

強い CH24H 阻害活性を示した化合物 **4** と CH24H との X 線共結晶構造を解析したところ、化合物 **4** は期待通り CH24H の活性中心に結合しており、4-フェニルピリジン構造のピリジン環窒素原子がヘム鉄へ直接的配位し、ピリジン環4位フェニル基がヘリックス F 下方脂溶性空間を占有することが確認された (Figure 7a)。リンカー部位はピリジン環に対してねじれた構造で結合していた。これは、カルボニル部位がリンカーに対して自由回転可能となったことで、化合物 **2** および **3** で考察されたようなピリジン環と平面に近い立体配座をとる必要性がなくなったため、安定なねじれ構造をとったと推察された。また、チオペラミドと同様に Arg226 と Phe80 が活性中心に引き込まれ、化合物 **4** のアミドカルボニル基が Arg226 と水素結合を形成していた。Arg226 および Phe80 の引き込みによってヘムプロピオナート上方に生成した小さな空間は、シクロプロパン環が占有していることが示された。アミド NH 部位はヘ

ムプロピオナートのカルボキシ基ならびに Gly369 主鎖カルボニル基と水を介した水素結合ネットワークを構築していることが観測された。

チオペラミドと化合物 **4** の結晶構造を重ね合わせたところ、化合物 **4** のフェニル基を除き、良い重なりを示した (Figure 7b)。複数の部分構造が異なるため、それぞれの構造の活性への寄与は比較できないものの、分子設計時に期待した以下3つのアプローチ、すなわち 1) ヘリックス F 下方の空間を脂溶性置換基で占有、2) チオカルボニル基からカルボニル基への変換、3) シクロヘキサン環からシクロプロパン環への変換、が効果的に働き、大きな活性向上につながった可能性が考えられた。

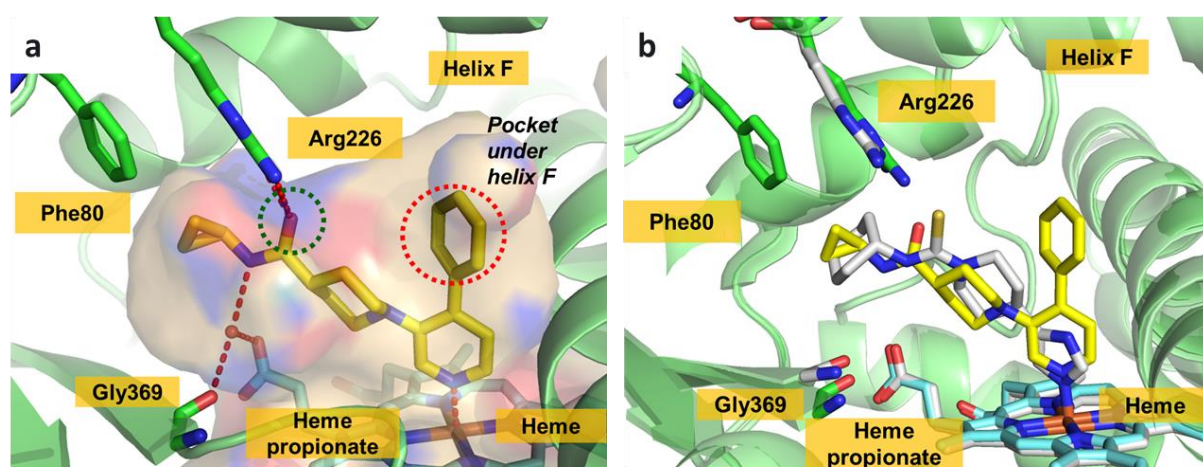


Figure 7. (a) X-ray crystal structure of CH24H in complex with compound **4** (PDB: 7N3L). (b) Overlaid cocrystal structures of compound **4** (yellow) and thioperamide (white) in the CH24H catalytic domain.

第五節 小括

ソチクレスタットと構造の異なる新規 CH24H 阻害剤の創出を目的に、ソチクレスタットおよびチオペラミドと CH24H との X 線共結晶構造を起点とした SBDD アプローチを展開した。ヘム直接配位型の阻害剤を指向して、4-フェニルピリジン構造を鋳型としたピリジン環 3 位のリンカーを探索した結果、強力な CH24H 阻害活性を有する 4-フェニル-3-(1-ピペリジニル)ピリジン誘導体 **4** ($IC_{50} = 8.1 \text{ nM}$) が見出された。化合物 **4** はヘリックス F 下方の脂溶性ポケットを占有するとともに Arg226 および Phe80 を活性中心に引き込み、ソチクレスタットと異なる特徴的な結合様式を示した。

以上の結果から、分子設計の妥当性が示されたとともに、強力な阻害活性を有する新規 CH₂4H 阻害剤を見出すに至った。

第二章 3-(1-ピペリジニル)ピリジンまたは 5-(1-ピペリジニル)ピリミジン構造を有する高選択的 CH24H 阻害剤の設計と合成、およびその生物活性

第一節 CYP3A4との選択性改善を指向した分子設計

第一章で見出された化合物 **4** は強力な CH24H 阻害活性を示したが、同じ CYP ファミリー酵素の一つである CYP3A4 に対しても強い阻害活性を示した (83% at 10 μ M)。化合物 **4** は非選択的な CYP 阻害活性を有する可能性が示唆されたことから、選択的 CH24H 阻害剤を見出すことを目的に化合物を最適化した。

CYP3A4 は代表的な生体異物の代謝酵素であり、多くの化合物が CYP3A4 に結合する^{15,27}。CYP3A4 の活性中心は CH24H に比べてヘリックス F が短く、ヘム鉄上部に大きな空間がある。その空間はフェニルアラニンを多く含む柔軟性の高いループで囲まれており、「Phe-cluster」と呼ばれる脂溶性に富んだ領域を形成している (Figure 8a)²⁸⁻³⁰。非選択的 CYP 阻害剤であるケトコナゾールは、複数分子が CYP3A4 の活性中心に結合していることから、その活性中心は大きく、非特異的に様々な分子を認識している可能性がある。一方で、CH24H は序論で述べたように、その活性中心の形状が大きく変わらない剛直な構造をとることが示唆される (Figure 8b)。そのため、活性中心を構成しているアミノ酸残基の空間的配置があまり変化しないと期待される。

以上のことから、分子の適切な位置に極性部位を導入し、分子全体の脂溶性を下げることで CYP3A4 への非特異的結合を含めた結合活性を減弱させるとともに、分子の適切な位置に、空間的配置が固定化されている CH24H のアミノ酸残基と相互作用を形成できる適切な置換基を導入すれば、CH24H と特異的な相互作用を獲得することができ、CYP3A4 との選択性が改善できるのではないかと考えた。そこで、4-フェニルピリジン環の一部の炭素原子を電気陰性度のより大きな窒素原子へ置換するとともに、アミド側鎖の置換基効果を検討するために、化合物 **13-29** を設計した (Figure 9)。化合物の設計にあたっては CH24H が脳内に発現していることを考慮した。化合物は中枢移行性を有している必要がある。一般的に脂溶性が高いほど血液脳関門は通過しやすいとされることから、分子全体の脂溶性を下げるアプローチは

中枢移行性を下げる懸念がある。そのため、窒素原子の導入にあたっては中枢移行性に対する影響が少ないと考えられる立体的に入り組んだ位置を選択したとともに、過度に脂溶性を下げないように設計した。

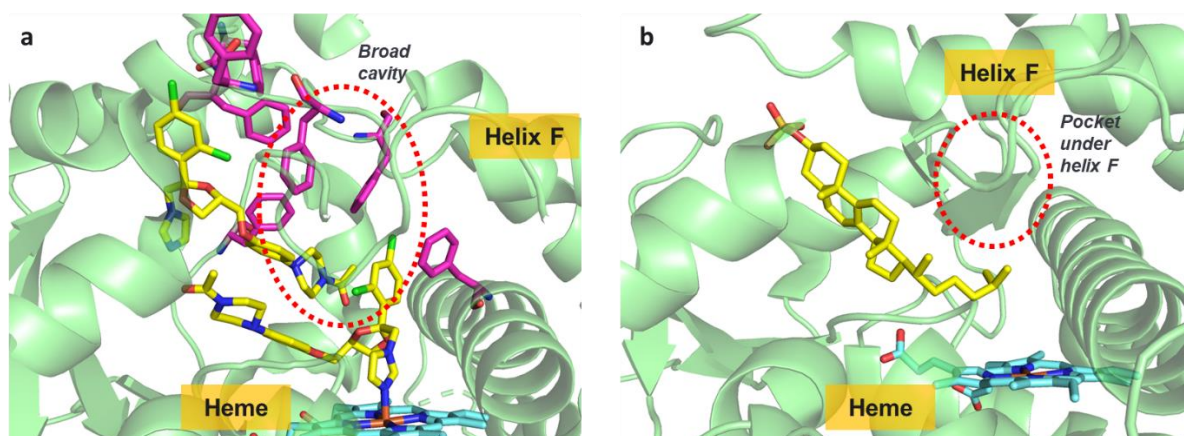


Figure 8. X-ray cocrystal structures. (a) CYP3A4 in complex with ketoconazole (PDB: 2V0M). The Phe-cluster was shown in magenta. (b) CH24H in complex with cholesterol sulfate (PDB: 2Q9F).

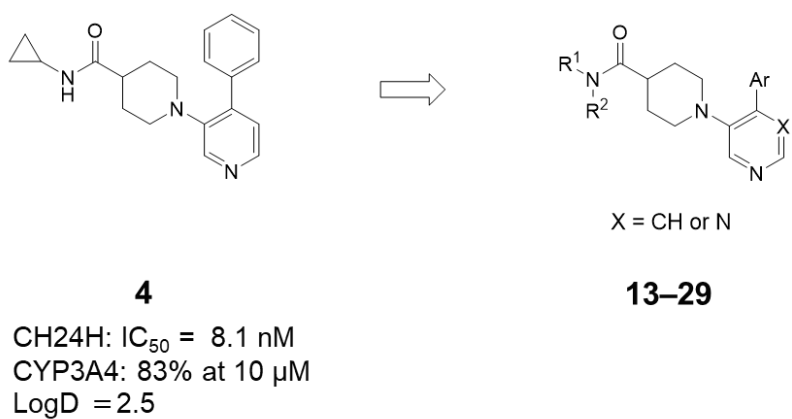


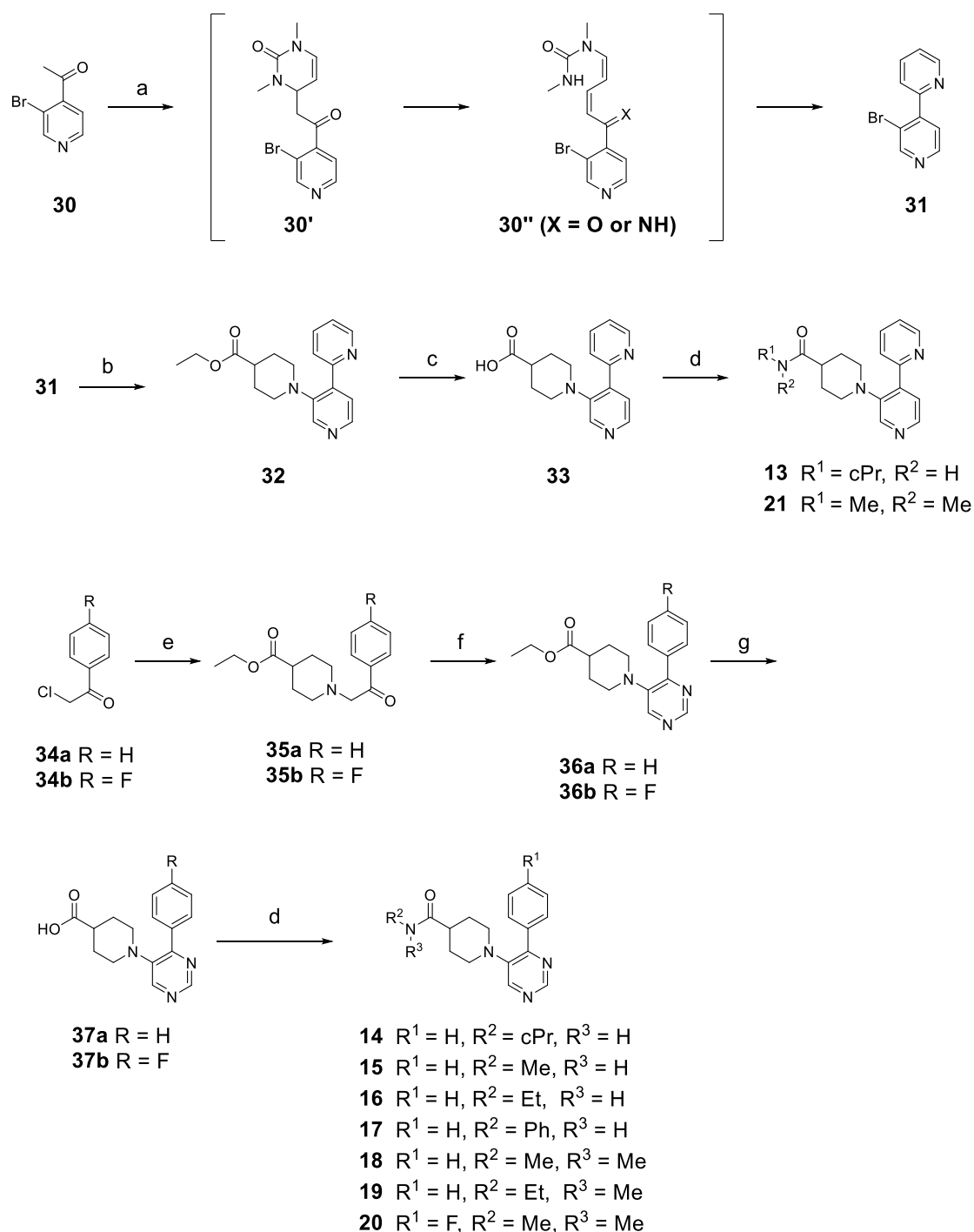
Figure 9. Design of CH24H selective inhibitors.

第二節 3-(1-ピペリジニル)ピリジンまたは5-(1-ピペリジニル)ピリミジン誘導体の合成

第一項 2,4'-ビピリジンおよび4-フェニルピリミジン誘導体の合成

2,4'-ビピリジン誘導体**13**と**21**、および4-フェニルピリミジン誘導体**14-20**はScheme 3に示す方法で合成した。市販の4-アセチルピリジン誘導体**30**に対し、既知のbis(1,3-dimethyl-2,3-dihydro-2-oxopyrimidinium) sulfateおよびトリエチルアミンを作用させた後、酢酸溶媒下で酢酸アンモニウムと反応させることでピリジン環を構築した³¹。本反応ではbis(1,3-dimethyl-2,3-dihydro-2-oxopyrimidinium) sulfateおよびトリエチルアミンとの反応によりまず中間体**30'**が生成する。続く酢酸中での酢酸アンモニウムとの反応でE2脱離によって生成する**30''**を経由し、1,3-ジメチルウレアの脱離を伴う芳香族化が駆動力となりピリジン環が構築されたと考えられる。合成したブロミド**31**はDABCO存在下イソニペコチン酸エチルによる芳香族求核置換反応によって化合物**32**へ変換した。続く加水分解と、HATUを縮合剤として用いたアミド化反応によって目的とする化合物**13**および**21**を得た。4-フェニルピリミジン誘導体**14-20**は、市販の2-クロロアセトフェノン**34a**および**34b**を出発原料として合成した。イソニペコチン酸エチルの*N*-アルキル化によりアミノケトン**35a**および**35b**とした後、*N,N*-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール (DMF-DMA) を用いた増炭反応と続くホルムアミンによる環化反応によりピリミジン環を構築し、化合物**36a**と**36b**を得た。得られた生成物のエステル部位を加水分解し、HATUを用いて対応するアミンと縮合させて目的とするピリミジン誘導体**14-20**とした。

Scheme 3. Synthesis of 2,4'-bipyridine and 4-phenylpyrimidine derivatives^a

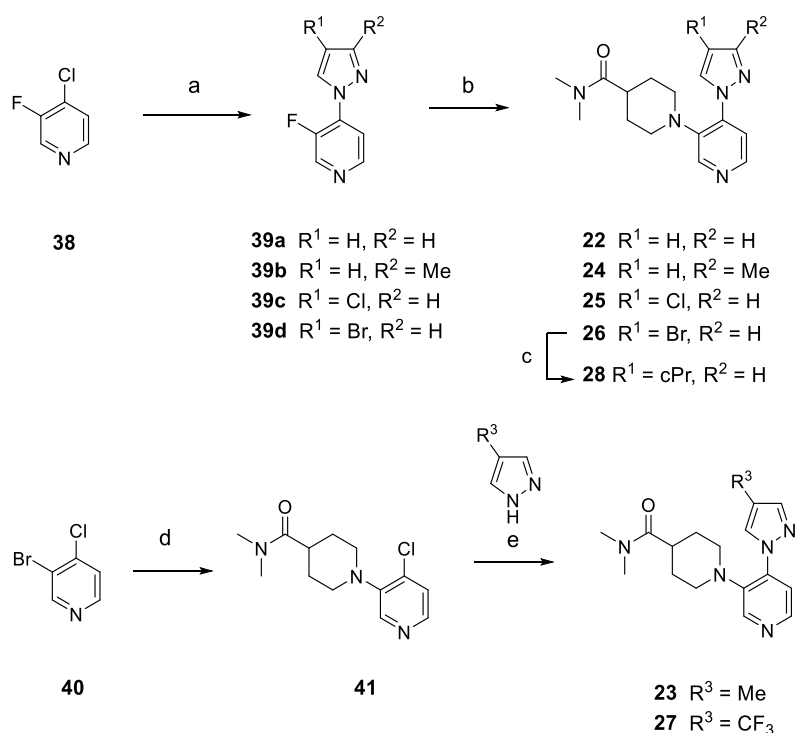


^aReagents and conditions: (a) (1) bis(1,3-dimethyl-2,3-dihydro-2-oxopyrimidinium) sulfate, Et₃N, MeCN, 0–45 °C, (2) NH₄OAc, AcOH, 120 °C, 47% over 2 steps; (b) ethyl isonipecotate, DIPEA, DABCO, 200 °C, microwave, 40%; (c) 2 M NaOH aq., THF/EtOH, 60 °C, 100%; (d) amines, HATU, DIPEA, DMF, rt, 70–100%; (e) ethyl isonipecotate, K₂CO₃, MeCN, rt, 89% (**35a**) or 97% (**35b**); (f) (1) DMF-DMA, 100 °C or reflux, (2) formamidinium acetate, DIPEA, *n*-BuOH, 100 °C or reflux, 50% (**36a**) or 67% (**36b**) over 2 steps; (g) 2 M NaOH aq., THF/MeOH, rt, 97% (**37a**) or 91% (**37b**).

第二項 4-ピラゾリルピリジン誘導体の合成

4-ピラゾリルピリジン誘導体**22–28**は2つの方法で得た (Scheme 4)。4-クロロ-3-フルオロピリジン (**38**) に対する芳香族求核置換反応の配向性を利用し、はじめに酸性条件下でピリジン環4位クロロ基をピラゾリル基で置換し、4-(1-ピラゾリル)ピリジン**39a–d**を合成した後、高温下*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミドを、化合物**39a–d**のピリジン環3位のフルオロ基と置換させることで化合物**22, 24–26**を合成した。シクロプロピルピラゾリル基を有する化合物**28**はブロミド**26**とシクロプロピルボロン酸との鈴木–宮浦カップリング反応により得た。別法では、3-ブロモ-4-クロロピリジン (**40**) の、金属触媒を用いたカップリング反応に対する反応性の違いを利用した。すわなち、パラジウム触媒下、化合物**40**と*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミドとのBuchwald–Hartwigクロスカップリングによって選択的にピリジン環3位に1-ピペリジニル基を導入 (化合物**41**) した後、続く塩基性条件下でピラゾールを化合物**41**のピリジン環4位クロロ基と置換することで、目的物**23**および**27**を得た。

Scheme 4. Synthesis of 4-(1-pyrazolyl)pyridine compounds **22-28**^a

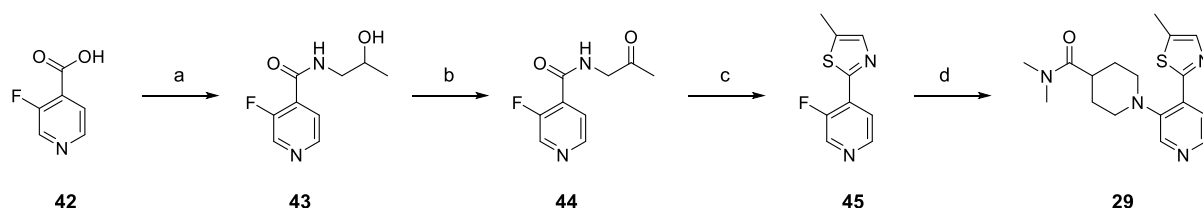


^aReagents and conditions: (a) pyrazoles, TsOH·H₂O, 2-propanol, 80 °C to reflux or 130 °C microwave, 47–90%; (b) *N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide or *N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide hydrochloride, K₂CO₃, DMA or NMP, 180 °C or 200 °C, microwave, 22–55%; (c) cyclopropylboronic acid, Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, DME/water, 100 °C, microwave, 21%; (d) *N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide, Pd₂(dba)₃, XantPhos, NaOt-Bu, toluene, 110 °C, 41%; (e) pyrazoles, Cs₂CO₃, DMA, 200 °C, microwave, 35% (**23**) or 14% (**27**).

第三項 4-チアゾリルピリジン誘導体の合成

4-(5-メチル-2-チアゾリル)ピリジン**29**は以下の方法により合成した (Scheme 5)。3-フルオロイソニコチン酸 (**42**) と塩化チオニルを反応させて酸クロリドを調製した後、1-アミノ-2-プロパノールとの反応によりアミド**43**とした。続く三酸化硫黄-ピリジン複合体によるアルコールの酸化反応によってケトン**44**とし、ローソン試薬を用いた硫黄原子の導入と続く環化反応により、4-チアゾリルピリジン誘導体**45**を得た。*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミドによる芳香族求核置換反応により、4-(5-メチル-2-チアゾリル)ピリジン**29**を合成した。

Scheme 5. Synthesis of 4-(5-methyl-2-thiazolyl)pyridine **29**^a



^aReagents and conditions: (a) (1) SOCl₂, reflux; (2) 1-aminopropan-2-ol, DIPEA, THF, 0 °C to rt, 77% over 2 steps; (b) sulfur trioxide pyridine complex, Et₃N, DMSO, rt, 45%; (c) Lawesson's Reagent, toluene, reflux, 83%; (d) *N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide, K₂CO₃, NMP, 150 °C, 63%.

第三節 3-(1-ピペリジニル)ピリジンまたは 5-(1-ピペリジニル)ピリミジン誘導体の CH24H および CYP3A4 阻害活性

第一項 2,4'-ビピリジンおよび4-フェニルピリミジン誘導体の生物活性

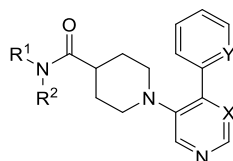
合成した3-(1-ピペリジニル)ピリジン誘導体**13-19**のCH24HおよびCYP3A4の阻害活性を測定した (Table 3)。化合物**4**の4-フェニルピリジン構造の脂溶性を下げるためにフェニル基をピリジル基に変換した**13** (CH24H: IC₅₀ = 160 nM, CYP3A4: 29%阻害 at 10 μM、以下CYP3A4について「at 10 μM」を省略) およびピリジン環をピリミジン環に変換した**14** (CH24H: IC₅₀ = 44 nM, CYP3A4: 50%阻害) を合成したところ、いずれの化合物も脂溶性の指標となるLogD値³² (pH=7.4での実測値) は化合物**4**と比べて低くなり、2.5からそれぞれ1.3と1.8へ低下した。期待通りCYP3A4の阻害活性が減弱したものの、CH24Hに対する主活性も減弱した。

次に4-フェニルピリミジン構造を鋳型としてアミド側鎖を探索した。第一章では、リンカー探索のためにシクロプロパン環に固定したが、ここではCYP3A4との選択性も含めた構造活性相関を取得するために、最も小さな置換基であるメチル基から検討した。第二級アミド誘導体においては、メチル基 (化合物**15**, CH24H: IC₅₀ = 72 nM, CYP3A4: 31%阻害) でも活性を維持し、シクロプロピル基のような環状構造が必須ではないことが確認された。CYP3A4阻害については改善傾向を示した。次に、エチル基 (化合物**16**, CH24H: IC₅₀ = 58 nM, CYP3A4: 42%阻害)、フェニル基 (化合物**17**, CH24H: IC₅₀ = 28 nM, CYP3A4: 84%阻害) と変換したところ、CH24H阻害活性は維持しながら、CYP3A4の阻害活性は脂溶性依存的に強まった。このことから、選択性改

善にはアミド側鎖としては、脂溶性の低い小さな置換基が好ましいことが示唆された。興味深いことに、NHの水素原子をメチル基で置換したジメチルアミド誘導体**18**が良好な選択性を示した (CH24H: $IC_{50} = 16$ nM, CYP3A4: 28%阻害)。化合物**4**のX線共結晶構造解析では、NH部位はCH24HのGly369やヘムプロピオナートと水を介した水素結合ネットワークを形成していた (Figure 7a)。メチル基の導入により活性が向上したことから、この形成されていた水素結合ネットワークは強固なものではなく、脂溶性置換基で水分子を追い出し、空間を脂溶性置換基で充填するほうがエネルギー的に有利に働いたと考えられる。CYP3A4に対しては、対応するNH誘導体からメチル基の導入により脂溶性が増加しているにもかかわらずCYP3A4の阻害が増強していないことから (化合物**15** vs 化合物**18**、化合物**16** vs 化合物**19**)、NH部位がCYP3A4となんらかの相互作用を獲得しており、メチル基の導入がCYP3A4との結合に不利に働いた可能性がある。

以上の検討から、CYP3A4の阻害活性は脂溶性依存的に増減するとともに、本ケミカルシリーズにおいてはアミドのNH基がCYP3A4の阻害活性に関与している可能性が明らかとなった。分子全体の脂溶性を低減させながらCH24Hとの相互作用を獲得することで選択性が改善した化合物**18**および**19**を見出すに至った。

Table 3. CH24H and CYP3A4 inhibitory activities, LogD and LLE values for 3-(1-piperidinyl)pyridine and 5-(1-piperidinyl)pyrimidine derivatives



ID	X	Y	R ¹	R ²	CH24H	CYP3A4	LogD (measured)	LLE ^a
					IC ₅₀ (nM)	% inhibition (at 10 μM)		
4	CH	CH	cPr	H	8.1	83	2.5	5.6
13	CH	N	cPr	H	160	29	1.3	5.5
14	N	CH	cPr	H	44	50	1.8	5.6
15	N	CH	Me	H	72	31	1.4	5.7
16	N	CH	Et	H	58	42	1.8	5.4
17	N	CH	Ph	H	28	84	2.7	4.9
18	N	CH	Me	Me	16	28	1.7	6.1
19	N	CH	Et	Me	14	35	2.1	5.8

^aLLE = pIC₅₀ – LogD.

第二項 Ligand-lipophilicity efficiency (LLE) を指標としたビアリール構造の最適化とその誘導体の生物活性

第一項の検討において、脂溶性とCYP3A4阻害活性に正の相関が認められた。CYP3A4との選択性を改善するためには、脂溶性をあげる疎水性相互作用に依存せずにCH24H阻害活性を向上させる重要性が確認された。このことから、CH24H阻害活性だけでなく、脂溶性の影響を加味した新たな活性指標の導入が必要と考えた。そこで、さらなる化合物最適化にはligand-lipophilicity efficiency (LLE) に着目した。LLE値は $LLE = pIC_{50} \text{ (or } pK_i) - \text{LogD (or CLogP)}$ で記述されるドラッグライクネス（薬らしさ）を評価する指標の一つであり、阻害活性や親和性から脂溶性の影響を除いた値である³³。一般的に、分子の脂溶性が高くなるほど薬理活性は示しやすいものの、非特異的な相互作用が増強し、オフターゲット活性を有するリスクが高くなる。実

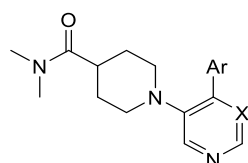
際に2,000以上の化合物の脂溶性とオフターゲットヒット数との相関が調べられており、非常によい相関を示すことが示されている³³。このことから、高活性、低脂溶性の化合物ほど高値となるLLE値は、分子のオフターゲット作用を有するリスクを見積もる指標ととらえることができる。LLE値がオフターゲットリスクを見積もる指標となっている例として、ニューロキニン3受容体 (neurokinin 3 receptor: NK₃R) 拮抗薬の最適化研究があげられる^{34,35}。NK₃R拮抗作用とLLE値の向上を目的に化合物が最適化されており、off-target safety panelとして設定されたCYP阻害活性や、ヒト心臓の心筋に発現しているhuman ether-a-go-go related gene (hERG) カリウムイオンチャネルの阻害活性は、LLE値が高値な化合物ほど弱いことが確認されている。

同じターゲットクラスであるCYPファミリー内でLLE値を指標に選択性を改善した先行研究はないため、Table 3で得られた化合物についてLLE値を計算した。化合物によってLLE値に違いが認められ (化合物17: LLE = 4.9, 化合物18: LLE = 6.1)、LLE値が高値の化合物ほどCYP3A4との選択性が高かった。このことから、同じCYPファミリー内においてもLLE値が高いほどオフターゲットCYP阻害リスクが低い可能性がある。LLE値を指標とすることで、他のCYPファミリーに対して高い選択性を確保できる可能性が示唆されたことから、CH24H阻害活性から脂溶性の影響を排除した指標としてLLE値を採用し、LLE値の高い化合物を探索することとした。

第一項にて化合物18が最も高いLLE値を示したことから、アミド側鎖をジメチルアミノ基に固定し、さらなるビアリアル構造を検討した (Table 4)。化合物18のフェニル基上にフルオロ基を導入した化合物20 (CH24H: IC₅₀ = 7.3 nM, CYP3A4: 37%阻害, LLE = 6.2) では、LLEはほぼ変化せず、脂溶性の増加に伴いCH24HおよびCYP3A4ともに阻害活性が増強した。強いCH24H阻害活性を維持しつつ、さらに高い選択性を達成するために、化合物20の脂溶性を超えない分子を設計することとし、脂溶性の予測値であるCLogP値³⁶において化合物20の1.4を下回る化合物を設計した。疎水性相互作用を減弱させるためにヘムバインダー4位にヘテロアリアル環を導入するにあたり、ヘムバインダーにピリミジン環を選択すると分子全体の脂溶性は化合物20から大きく低下する。しかし、このような化合物については脂溶性が低下しすぎることに伴い中枢移行性が低下してしまうことが懸念されたため、ヘムバインダーにはピリジン環を選択した。

2-ピリジルピリジン誘導体**21** (CH24H: IC₅₀ = 68 nM, LLE = 6.0) および1-ピラゾリルピリジン誘導体**22** (CH24H: IC₅₀ = 48 nM, LLE = 6.1) はCH24H阻害活性が化合物**18**より減弱したものの、同等のLLEを示す程度であり、脂溶性に依存しない阻害活性は化合物**18**と比べて同程度であった。また**22**は10 μMにおいて明確なCYP3A4阻害活性も認められなかったことから、置換ピラゾール誘導体を合成したところ、4-メチル-1-ピラゾリル基を導入した **23** (CH24H: IC₅₀ = 8.5 nM, CYP3A4: 21% 阻害, LLE = 6.5) が強いCH24H阻害活性と高いLLE値を示した。本化合物は脂溶性が低く、CYP3A4との選択性も良好であった。対照的に、3-メチル-1-ピラゾリル基の導入 (化合物**24**, CH24H: IC₅₀ = 1,100 nM, LLE = 4.5) は大幅にCH24H阻害活性を減弱させた。化合物**24**のピラゾール環3位メチル基とCH24Hとの立体反発が活性減弱の原因として考えられた。

Table 4. CH24H and CYP3A4 inhibitory activities, CLogP, LogD and LLE values for 4-aryl 3-(1-piperidinyl)pyridine/pyrimidine derivatives



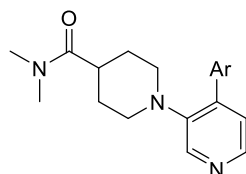
ID	X	Ar	CH24H	CYP3A4	CLogP	LogD (measured)	LLE ^a
			IC ₅₀ (nM)	% inhibition (at 10 μM)			
18	N		16	28	1.2	1.7	6.1
20	N		7.3	37	1.4	1.9	6.2
21	CH		68	11	0.7	1.2	6.0
22	CH		48	1	0.4	1.1	6.1
23	CH		8.5	21	0.6	1.6	6.5
24	CH		1,100	5	0.6	1.5	4.5

^aLLE = pIC₅₀ – LogD.

4-(4-メチル-1-ピラゾリル)ピリジン誘導体**23**が最も高いLLE値を与えたことから、ピラゾール環 4 位の置換基を探索した (Table 5)。メチル基をクロロ基 (化合物 **25**, CH24H: IC₅₀ = 24 nM, LLE = 5.6)、ブロモ基 (化合物 **26**, CH24H: IC₅₀ = 9.5 nM, LLE = 5.9)、トリフルオロメチル基 (化合物 **27**, CH24H: IC₅₀ = 65 nM, LLE = 5.1)、シクロプロピル基 (化合物 **28**, CH24H: IC₅₀ = 12 nM, LLE = 5.8) へ変換したところ、ブロモ基を有する化合物 **26** が化合物 **23** と同等の CH24H 阻害活性を示したものの、いずれの変換においても LLE 値が低下した。また、化合物 **23** のピラゾール環 4 位メチル基の

空間的配置を調節することを目的にピラゾール環を、ピリジン環とメチル基のなす角度がより広いチアゾール環に変換した **29** (CH24H: IC₅₀ = 12 nM, LLE = 5.9) を合成したが、LLE 値は化合物 **23** に比べて低値を示した。これらの結果から、4-メチル-1-ピラゾリル基は CH24H に強く認識されていることが示唆された。

Table 5. CH24H and CYP3A4 inhibitory activities, CLogP, LogD and LLE values for 4-aryl 3-(1-piperidinyl)pyridine derivatives



ID	Ar	CH24H	CYP3A4	CLogP	LogD (measured)	LLE ^a
		IC ₅₀ (nM)	% inhibition (at 10 μM)			
23		8.5	21	0.6	1.6	6.5
25		24	19	1.1	2.0	5.6
26		9.5	31	1.3	2.1	5.9
27		65	47	1.3	2.1	5.1
28		12	56	1.1	2.1	5.8
29		12	32	1.0	2.0	5.9

^aLLE = pIC₅₀ – logD.

第四節 小括

第一章で見出された化合物**4**から同じCYPファミリー酵素のCYP3A4に対する選択性を改善するために、分子全体の脂溶性を下げながらCH24H特異的な相互作用を獲得することを指向してビアリール部位およびアミド部位を最適化した。CYP3A4の阻害活性は脂溶性依存的に増減するとともに本ケミカルシリーズにおいてはアミドのNH基がCYP3A4の阻害活性に関与している可能性が明らかとなった。CYP3A4阻害活性が脂溶性と正の相関を示したことから、LLE値を指標として構造を変換した結果、強いCH24H阻害活性と高いCYP3A4に対する選択性を有する4-(4-メチル-1-ピラゾリル)ピリジン誘導体**23** (CH24H: IC₅₀ = 8.5 nM, CYP3A4: 21% 阻害 at 10 μM, LLE = 6.5)が見出された (Figure 10)。LLE値を指標とする化合物最適化戦略が選択的CH24H阻害剤を見出すアプローチとして有効である可能性が示された。

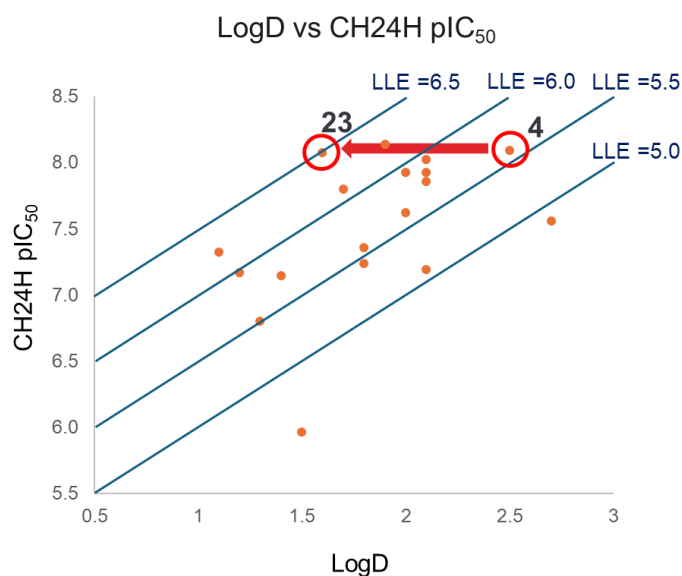


Figure 10. LLE-guided optimization to identify compound **23**.

第三章 4-(4-メチル-1-ピラゾリル)ピリジン誘導体**23**の生物学的特性評価

第二章で見出された4-(4-メチル-1-ピラゾリル)ピリジン誘導体**23**がソチクレスタットと構造の異なる新規ツール化合物として資するプロファイルを有しているかを確認するために、*in vitro*および*in vivo*の両面から評価した。

第一節 化合物**23**のCH24Hとの共結晶構造解析

ツール化合物に求められる重要なプロファイルとして、**target engagement**が明確になっていることが挙げられる²⁴。標的分子への結合様式を明らかにすることで、観測される薬理現象の理解を助けるとともに、その現象が標的分子を介する作用であることの信頼性を高めることができる。CH24Hにおいては、X線共結晶構造解析により結合部位と阻害形式を確認できる。化合物**23**の結合様式を明らかにするために、CH24HとのX線共結晶構造解析を実施したところ、化合物**23**は化合物**4**と同様にCH24Hの活性中心に結合し、ピリジン環窒素原子でヘム鉄に直接配位することが確認された (Figure 11a)。また期待通り、ピリジン環4位4-メチルピラゾリル基によるヘリックスF下方脂溶性空間の占有や、アミドカルボニル部位とArg226の水素結合の形成、アミドN,N-ジメチル部位によるヘムプロピオナート上方の脂溶性空間の占有が観測された。化合物**23**に特徴的な相互作用として、化合物**23**のカルボニル基とArg226が形成している水素結合に対して、Ala474が水を介して水素結合ネットワークを形成していることが確認された。これはチオペラミドや化合物**4**では認められない相互作用であった。この水素結合ネットワークが化合物**23**とCH24Hとの間に強固な相互作用を形成し、低い脂溶性でも強いCH24H阻害活性を維持し、高いCYP3A4選択性やLLE値につながった可能性が考えられた。

化合物**23**とソチクレスタット (Figure 11b) の結合様式を比較すると、両化合物はともにCH24Hの活性中心のヘム鉄に直接配位する結合様式を示した。また、ヘリックスF下方の脂溶性空間を、化合物**23**は4-メチル-1-ピラゾリル基で、ソチクレスタットは2-ピリジル基で占有する。コレステロール骨格が結合するsteroidal cavityには、ソチクレスタットは脂溶性置換基であるベンジル基が配置されているのに対し、化

化合物**23**ではアミド構造が配置されており、steroidal cavityにArg226およびPhe80が引き込まれる点が大きく異なっている。

以上より、化合物**23**はCH24Hの基質であるコレステロールと競合する活性中心のヘム鉄に直接配位する阻害様式を有することが明らかになったとともに、選択的CH24H阻害剤として知られるソチクレスタットと異なる結合様式を示すことが確認され、*in vitro*でのtarget engagementを確認することができた。

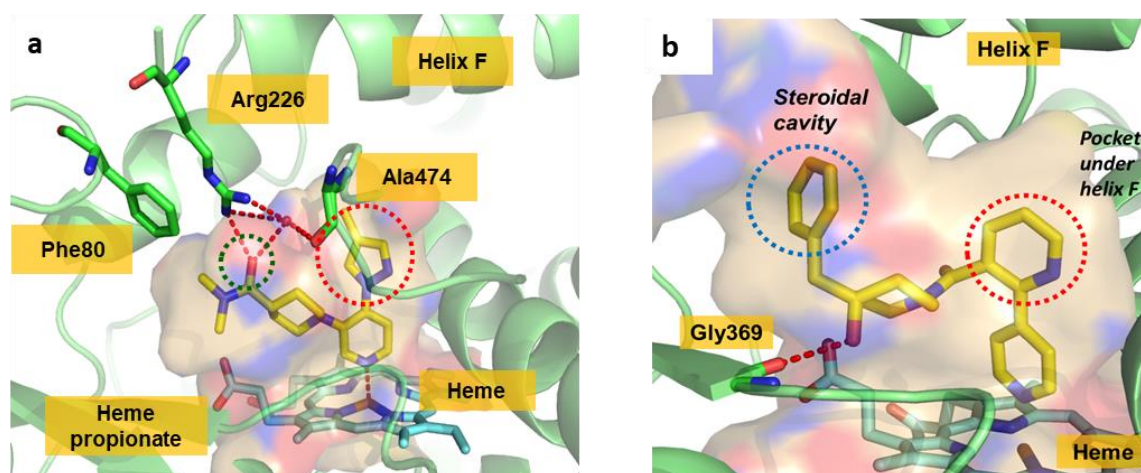


Figure 11. X-ray crystal structures of CH24H in complex with (a) compound **23** (PDB: 7N3M) and (b) soticlestat (PDB: 7LRL).

第二節 化合物**23**のCYP選択性評価

観測された薬理現象が標的分子由来の作用であることの確からしさを高めるために、良好な選択性を有することはツール化合物に求められる重要な要素の一つである²⁴。前述のように低分子化合物は潜在的なオフターゲットリスクを有するが、化合物**23**のようにLLE値が高値の化合物はそのリスクが低いことが期待される。実際に、化合物**23**はCYP3A4に対して良好な選択性を示しており、次に他のCYPファミリー酵素に対しても高い選択性があるかを確認した。基質特異性が低い薬物代謝型CYP酵素の一つであるCYP2ファミリーに対しての阻害活性を確認したところ、化合物**23**はCYP2C8やCYP2C9、CYP2D6に対しても明確な阻害作用を示さなかった (Table 6)。この結果から、化合物**23**は他のオフターゲットCYPに対しても選択性を有する選択的CH24H阻害剤である可能性が示唆された。選択的CH24H阻害薬として知られるソチクレスタットも薬物代謝型CYP種に対して良好な選択性を有している²¹。ソチク

レスタットのLLE値は7.0と計算され (CH24H IC₅₀ = 4.5 nM²¹, LogD = 1.3³⁷)、本化合物 **23** の6.5とともに高いLLE値を示していることから、LLE値6-7は選択的CH24H阻害剤の創出において一つの指標となりえる。

Table 6. CYP selectivity of compound **23**

ID	CH24H	CYPs % inhibition (at 10 µM)			
	IC ₅₀ (nM)	3A4	2C8	2C9	2D6
23	8.5	21	2	19	3

第三節 化合物**23**のマウスにおける薬物動態および脳内24HC低下作用の評価

化合物 **23** が CH24H の活性中心に結合し target engagement が確認されたこと、他の CYP 種についても選択性を有し、オフターゲットへの良好な選択性が示唆されたことから、次に *in vivo* 試験としてマウスにおける薬物動態を確認した。野生型マウスに対して化合物 **23** を 30 mg/kg で経口投与したところ、投与後 1 時間において良好な中枢移行性を示した (C_{plasma} = 0.179 µM C_{brain} = 0.102 µM)。また、投与後 8 時間においても *in vitro* における 50%阻害濃度以上の脳内濃度が確認され (Table 7)、マウスを用いた *in vivo* 薬理試験に利用可能な薬物動態プロファイルを示した。

Table 7. Pharmacokinetics of compound **23** at 30 mg/kg, p.o. in mice brain (n = 3). Values less than the quantitation limit were presumed to be 0 (LLOQ: Brain 0.0015 µg/g).

	Compound 23	
	Brain (µg/g, (µM))	
Time (h)	Mean	SD
1	0.032 (0.102)	0.003
4	0.013 (0.041)	0.001
8	0.011 (0.035)	0.005
24	0	0

30 mg/kg において化合物 **23** が良好な脳内の薬物動態プロファイルを示したことから、野生型マウスを用いて同用量にて脳内 24HC の低下作用を確認した。脳内 24HC の半減期はヒトにおいて約 12 時間と見積もられており³⁸、マウスにおいても脳内

24HC の低下作用を確認するには持続的な CH24H 阻害が必要である可能性が示唆されていたことから¹²、薬効試験は 3 日間連投試験として実施したところ、化合物 **23** は有意に脳内 24HC を低下させた (26%低下, Figure 12)。化合物 **23** は *in vivo* のツール化合物としても有望なプロファイルを示した。

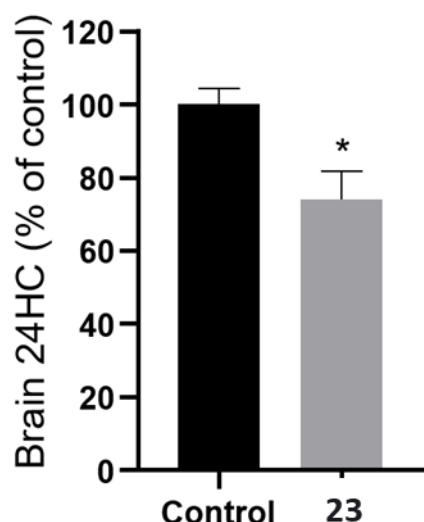


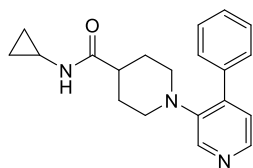
Figure 12. 24HC lowering effects of compound **23** in the brain following 3-day repetitive treatments in mice (30 mg/kg, once daily orally). Data are mean + SEM. * $p < 0.05$ vs Control (Student's t-test).

第四節 小括

第二章で見出された 4-(4-メチル-1-ピラゾリル)ピリジン誘導体 **23** が新規 CH24H 阻害剤のツール化合物として資するかを確認するため、*in vitro* および *in vivo* において生物学的特性を評価した。X 線構造解析において、化合物 **23** がソチクレスタットと同様に CH24H の活性中心に結合することを明らかにしたとともに、その結合様式がソチクレスタットと異なるものであることを示した。また、CYP3A4 と同じ薬物代謝型 CYP ファミリー酵素である CYP2C8 や CYP2C9、CYP2D6 に対しても良好な選択性を示し、選択的 CH24H 阻害剤である可能性を示した。さらに、野生型マウスを用いた *in vivo* 評価において、化合物 **23** は 30 mg/kg の経口投与にて良好な脳内濃度と暴露の持続性を示し、同用量において有意に脳内 24HC を低下させた。以上の結果より、化合物 **23** はソチクレスタットと構造が異なる選択的 CH24H 阻害剤のツール化合物として資する可能性を示した。

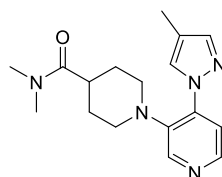
総括

脳内コレステロール恒常性システムやCH24Hの機能解明に貢献することを目的として、ソチクレスタットと異なる構造を有する新規な選択的CH24H阻害剤の創出について研究を行い、以下の結論を得た。すなわち、チオペラミドのX線共結晶構造解析をもとにしたSBDDアプローチによって、化合物**4**を代表化合物とする強力なCH24H阻害活性を有する3-(1-ピペリジニル)ピリジン誘導体を見出した。CYP選択性改善に、分子全体の脂溶性を低下させるとともにCH24Hとの特異的相互作用を獲得するアプローチや、LLE値を指標とする化合物最適化方針が選択的CH24H阻害剤創出のアプローチとなりうることを示し、強力かつ選択的なCH24H阻害剤**4**-(4-メチル-1-ピラゾリル)ピリジン誘導体**23**を見出すに至った。X線共結晶構造解析から化合物**23**は、ソチクレスタットと同様にCH24Hの活性中心のヘム鉄に直接配位する結合様式をとるものの、Arg226およびPhe80を活性中心にリクルートする、ソチクレスタットと異なる結合様式を示した。また、複数の薬物代謝型CYPファミリー酵素（CYP3A4やCYP2C8、CYP2C9、CYP2D6）に対して高い選択性を示し、選択的CH24H阻害剤である可能性を示した。さらに、化合物**23**は野生型マウスにおいても30 mg/kgの経口投与にて十分な脳内濃度とその推移を示し、同30 mg/kgの経口投与において脳内24HCの有意な低下が認められ、新規*in vivo*ツール化合物として有望なプロファイルを示した。



4

CH24H: IC₅₀ = 8.1 nM



23

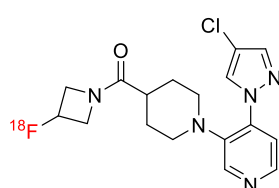
CH24H: IC₅₀ = 8.5 nM

LLE = 6.5

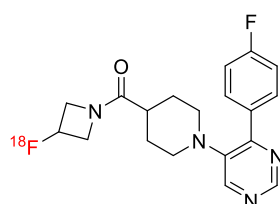
CYPs % inhibition at 10 uM (CYP3A4 / 2C8 / 2C9 / 2D6): 21 / 2 / 19 / 3

Brain 24HC reduction (mice): 26% (30 mg/kg, p.o.)

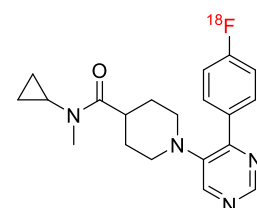
今後、化合物**23**をはじめとする本ケミカルシリーズが、ソチクレスタットとともに脳内コレステロールの恒常性維持システムやCH24Hのさらなる薬理作用の検証に貢献することが期待される。具体的には、本ケミカルシリーズは高活性かつ脂溶性が低く選択性も高いと考えられ、非特異的結合の低さが期待されることから、良好なケミカルプローブになりえる。実際に、本ケミカルシリーズからはPETトレーサーとして臨床現場で使用されている化合物が複数見出されている。池田らは $[^{18}\text{F}]$ **3g** および $[^{18}\text{F}]$ **T-008**をPETトレーサーとして同定し^{39,41}、サルにおけるPETイメージングによってCH24Hの発現パターンを非侵襲的に可視化した。また、 $[^{18}\text{F}]$ **T-008**はヒトにおけるソチクレスタットのCH24H受容体占有率の測定を可能とした。また、Haiderらは ^{18}F -**CHL2205** (^{18}F -Cholestify)と名付けられたPETトレーサーを合成し、アルツハイマー病モデルマウスでの脂質代謝バランスについての研究や、ヒトにおけるコレステロールの恒常性評価に用いており、CH24Hを介したコレステロールの代謝速度に性差があることなどを明らかにしている⁴²。本分野の今後のさらなる発展に期待したい。



$[^{18}\text{F}]$ **3g**³⁹



$[^{18}\text{F}]$ **T-008**³⁹



^{18}F -**CHL2205**⁴²
(^{18}F -Cholestify)

実験の部

市販の試薬や溶媒は精製せずに使用した。マイクロウェーブ反応は Biotage Initiator 2.0 あるいは 2.5 を用いた。反応追跡は薄層クロマトグラフィー (TLC) または LC/MS によって行った。TLC は Merck 社の 60 F₂₅₄ プレートまたは富士シリシア社の NH シリカゲルプレートを用いた。クロマトグラフィーによる精製はシリカゲルカラム (Merck Kieselgel 60, 70–230 mesh または 230–400 mesh, Merck 社), 塩基性シリカゲル (Chromatorex NH, 100–200 mesh, 富士シリシア社) または Purif-Pack (SI または NH, 昭光サイエンス社)を用いた。LC-MS 分析は Shimadzu UFLC/MS (Prominence UFLC high pressure gradient system/LCMS-2020) または Agilent LC/MS system (Agilent 1200SL/Agilent 6130MS)を用い, ESI (+ or –) または APCI (+ or –)のイオンモードを使用した。移動相にはアセトニトリル-水 (0.05% TFA または 5 mM 酢酸アンモニウム含有) を用いた。分取 HPLC は ODS カラム を用いた UV または MS トリガーによる自動分取精製 HPLC システムにて行い、0.1%の TFA を含む 10–100% 水/アセトニトリルを移動相として用いた。核磁気共鳴スペクトル (¹H NMR および ¹³C NMR) は Bruker AVANCE III (300 MHz)または Bruker AVANCE III plus (400 MHz)を用いて測定し、ACD/Labs 2017.1.2 で解析した。化学シフトはテトラメチルシランを内部標準として用い、 δ 値 (ppm) で示した。結合定数 (*J* 値) はヘルツ (Hz) で表記した。多重線は以下のように表現した: s = シングレット、d = ダブルレット、t = トリプレット、q = カルテット、quint = クインテット、m = マルチプレット、dd = ダブルダブルレット、td = トリプルダブルレット、br = ブロード。元素分析は武田分析研究所で行われた。実験値は理論値の $\pm 0.4\%$ 以内であった。各種アッセイに供した化合物の純度は分析 HPLC で確認した。分析 HPLC は Corona Charged Aerosol Detector (CAD)、Nano quantity analyte detector (NQAD)、または photo diode array detector を用いた。カラムにはカプセルカップ C18AQ (50 mm \times 3.0 mm I.D., 資生堂製) または L-column 2 ODS (30 mm \times 2.0 mm I.D., 化学物質評価研究機構製) を使用し、移動相には 50 mM 酢酸アンモニウム/水/アセトニトリル(1:8:1, v/v/v) および 50 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル(1:9, v/v)を用いた。

第一章に関する化合物合成法

***tert*-Butyl 4-phenyl-3',6'-dihydro-3,4'-bipyridine-1'(2'*H*)-carboxylate (7)**

3-ブロモ-4-フェニルピリジン(**5**) (1.00 g, 4.27 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (0.247 g, 0.21 mmol)、*tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**6a**) (1.45 g, 4.70 mmol)、K₂CO₃ (0.708 g, 5.13 mmol)、DME (9 mL) および水 (3 mL) の脱気した混合物を、130 °C で 2 時間マイクロ波照射下加熱した。室温まで冷却した後、酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した。残留物は塩基性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 = 100/0 to 80/20) および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 = 100/0 to 20/80) により精製し、**7** (1.30 g, 90%) を無色の油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (9H, s), 1.77-1.93 (2H, m), 3.30 (2H, t, *J* = 5.5 Hz), 4.03 (2H, brs), 5.81 (1H, br s), 7.23 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.37-7.44 (5H, m), 8.47 (1H, s), 8.56 (1H, d, *J* = 5.1 Hz). MS *m/z* 337.1 [M+H]⁺.

***tert*-Butyl 4-(4-phenylpyridin-3-yl)piperidine-1-carboxylate (8a)**

7 (200 mg, 0.59 mmol) と 20% Pd(OH)₂ (50 mg, 0.36 mmol) の THF (4 mL) 混合物を、水素雰囲気下、室温で 16 時間撹拌した。触媒を濾去した後、ろ液を減圧下濃縮して、**8a** (181 mg, 90%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (9H, s), 1.65-1.77 (4H, m), 2.48-2.66 (2H, m), 2.74-2.89 (1H, m), 4.05-4.28 (2H, m), 7.12 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.23-7.29 (2H, m), 7.41-7.50 (3H, m), 8.47 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 8.57 (1H, s). MS *m/z* 339.2 [M+H]⁺.

4-Phenyl-3-(piperidin-4-yl)pyridine dihydrochloride (9a)

8a (689 mg, 2.04 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4 M HCl/酢酸エチル (25 mL, 100 mmol) を加え、室温で 2 時間撹拌した。混合物を減圧下で濃縮し、**9a** (634 mg, 100%) を白色の粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.80-1.95 (2H, m), 2.01-2.23 (2H, m), 2.70-2.91 (2H, m), 3.02-3.36 (3H, m), 7.44-7.53 (2H, m), 7.55-7.64 (3H, m), 7.84 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 8.80 (1H, s), 8.83 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 9.18 (2H, br s), Hidden 1H. MS *m/z* 239.1 [M+H]⁺.

***N*-Cyclopropyl-4-(4-phenylpyridin-3-yl)piperidine-1-carboxamide (1)**

シクロプロピルアミン (0.027 mL, 0.39 mmol) と DIPEA (0.224 mL, 1.29 mmol)、THF (2 mL) の混合物に、室温でクロロギ酸 4-ニトロフェニル (78 mg, 0.39 mmol) を加えた。室温で 30 分間攪拌した後、反応混合物に **9a** (100 mg, 0.32 mmol) を加えた。混合物を室温で終夜攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 50/50 to 0/100) により精製し、酢酸エチル/ヘキサンから再結晶化して、**1** (22.5 mg, 22%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.40-0.52 (2H, m), 0.64-0.79 (2H, m), 1.66-1.80 (4H, m), 2.53-2.71 (3H, m), 2.74-2.92 (1H, m), 3.91-4.02 (2H, m), 4.66 (1H, s), 7.13 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.21-7.31 (2H, m), 7.41-7.52 (3H, m), 8.47 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 8.56 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 6.8, 23.6, 32.9, 36.7, 44.5, 124.5, 128.1, 128.5, 128.5, 137.9, 138.8, 147.3, 148.7, 148.9, 158.4. MS (ESI) *m/z* 322.2 [M+H]⁺. Purity: 99.6%.

***tert*-Butyl 4-(4-phenylpyridin-3-yl)piperazine-1-carboxylate (8b)**

3-ブロモ-4-フェニルピリジン(**5**) (2 g, 8.54 mmol)、*tert*-butyl piperazine-1-carboxylate (**6b**) (1.91 g, 10.3 mmol)、Pd₂(dba)₃ (0.391 g, 0.43 mmol)、XantPhos (0.494 g, 0.85 mmol)、NaOt-Bu (0.985 g, 10.3 mmol) およびトルエン (30 mL) の混合物を、窒素雰囲気下 110 °C で 6 時間攪拌した。不溶性物質をセライトでろ去し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣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 = 50/50 to 20/80) で精製し、得られた固体をヘキサンで洗浄して、**8b** (1.84 g, 63%) を黄褐色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.38 (9H, s), 2.73-2.85 (4H, m), 3.18-3.29 (4H, m), 7.23 (1H, d, *J* = 4.7 Hz), 7.37-7.55 (3H, m), 7.71 (2H, dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz), 8.27-8.35 (2H, m). MS (ESI) *m/z* 340.2 [M+H]⁺.

1-(4-Phenylpyridin-3-yl)piperazine dihydrochloride (9b)

8b (500 mg, 1.47 mmol) とメタノール (5 mL) の混合物に、室温で 4 M HCl/酢酸エチル (10 mL, 40.0 mmol) を加えた。混合物を室温で終夜攪拌した後、減圧下で濃縮して **9b** (453 mg, 98%) を淡黄色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.93-3.21

(8H, m), 7.47-7.70 (3H, m), 7.73-7.89 (3H, m), 8.49-8.68 (2H, m), 9.48 (2H, br s), Hidden 1H. MS (ESI) m/z 240.2 $[M+H]^+$.

***N*-Cyclopropyl-4-(4-phenylpyridin-3-yl)piperazine-1-carboxamide (2)**

シクロプロピルアミン (0.037 mL, 0.53 mmol)、DIPEA (0.092 mL, 0.53 mmol) および THF (5 mL) の混合物に、0 °C でクロロギ酸 4-ニトロフェニル (107 mg, 0.53 mmol) を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、反応混合物に **9b** (150 mg, 0.48 mmol) と DIPEA (0.252 mL, 1.44 mmol) を加えた。混合物を室温で 3 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 30/70 to 70/30) で精製し、酢酸エチル/ヘキサンから再結晶化して、**2** (77 mg, 50%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.27-0.37 (2H, m), 0.45-0.56 (2H, m), 2.40-2.48 (1H, m), 2.72-2.79 (4H, m), 3.12-3.22 (4H, m), 6.54 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.22 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.37-7.43 (1H, m), 7.45-7.53 (2H, m), 7.65-7.75 (2H, m), 8.25-8.34 (2H, m). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 6.8, 23.5, 43.7, 50.4, 125.2, 128.2, 128.3, 128.7, 138.3, 140.8, 141.7, 144.9, 145.1, 158.6. MS (ESI) m/z 323.2 $[M+H]^+$. Purity: 100%.

Methyl 4-(4-phenylpyridin-3-yl)benzoate (11a)

5 (500 mg, 2.14 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (247 mg, 0.21 mmol)、(4-(メトキシカルボニル)フェニル)ボロン酸 (**10a**) (577 mg, 3.20 mmol)、K₂CO₃ (443 mg, 3.20 mmol)、DME (9 mL) および水 (3 mL) の混合物を、マイクロ波照射下 130 °C で 2 時間加熱した。室温まで冷却した後、酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、NH シリカゲルパッドを通してろ過後、減圧下で濃縮した。残渣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 = 100/0 to 65/35) で精製し、**11a** (578 mg, 94%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.91 (3H, s), 7.10-7.17 (2H, m), 7.20-7.31 (5H, m), 7.37 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 7.91-7.98 (2H, m), 8.64-8.68 (2H, m). MS (ESI) m/z 290.2 $[M+H]^+$.

4-(4-Phenylpyridin-3-yl)benzoic acid (**12a**)

11a (577 mg, 1.99 mmol) を THF (6 mL) とメタノール (1 mL) 中に溶解し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (3 mL, 3.00 mmol) を加え、50 °C で 2 時間攪拌した。室温まで冷却した後、1 M 塩酸水溶液 (3 mL) で中和し、生じた沈殿物をろ過し、水で洗浄後、減圧乾燥させて、**12a** (460 mg, 84%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.14-7.22 (2H, m), 7.26-7.36 (5H, m), 7.49 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.82-7.88 (2H, m), 8.63 (1H, s), 8.68 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 13.01 (1H, s). MS (ESI) *m/z* 276.1 [M+H]⁺.

N-Cyclopropyl-4-(4-phenylpyridin-3-yl)benzamide (**3**)

12a (100 mg, 0.36 mmol)、シクロプロピルアミン (0.060 mL, 0.87 mmol)、HATU (166 mg, 0.44 mmol)、DIPEA (0.076 mL, 0.44 mmol) および DMF (2 mL) の混合物を、室温で 2 時間攪拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 30/70) で精製し、**3** (102 mg, 89%) を白色の粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.56-0.66 (2H, m), 0.83-0.92 (2H, m), 2.84-2.95 (1H, m), 6.29 (1H, br s), 7.09-7.16 (2H, m), 7.18-7.31 (5H, m), 7.36 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.61-7.69 (2H, m), 8.61 (1H, s), 8.65 (1H, d, *J* = 4.9 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 6.8, 23.1, 124.7, 126.9, 128.1, 128.5, 129.3, 130.0, 133.2, 134.8, 138.2, 141.1, 147.8, 149.3, 150.8, 168.4. MS (ESI) *m/z* 315.1 [M+H]⁺. Purity: 100%.

Methyl 1-(4-phenylpyridin-3-yl)piperidine-4-carboxylate (**11b**)

5 (500 mg, 2.14 mmol)、4-ピペリジンカルボン酸メチルエステル **10b** (0.289 mL, 2.14 mmol)、Pd₂(dba)₃ (58.7 mg, 0.06 mmol)、XantPhos (74.2 mg, 0.13 mmol)、NaOt-Bu (308 mg, 3.20 mmol) およびトルエン (10 mL) の混合物を、アルゴン雰囲気下 110 °C で 6.5 時間攪拌した。室温まで冷却した後、酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、NH シリカゲルパッドを通してろ過し、減圧下濃縮した。残渣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 = 100/0 to 65/35) で精製し、**11b** (76 mg, 12%) を淡黄色の油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.55-1.71 (2H, m), 1.77-1.88 (2H, m), 2.27-2.39 (1H, m), 2.58-2.70 (2H, m),

3.11-3.22 (2H, m), 3.67 (3H, s), 7.13 (1H, d, $J = 4.9$ Hz), 7.33-7.48 (3H, m), 7.61-7.68 (2H, m), 8.28-8.33 (2H, m). MS (ESI) m/z 297.1 $[M+H]^+$.

1-(4-Phenylpyridin-3-yl)piperidine-4-carboxylic acid (**12b**)

11b (74 mg, 0.25 mmol) を THF (2 mL) とメタノール (0.4 mL) に溶解し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (0.5 mL, 0.50 mmol) を加え、50 °C で 2 時間撹拌した。室温まで冷却した後、1 M 塩酸 (0.5 mL) で中和し、生じた沈殿物をろ過し、水で洗浄後、減圧乾燥させて、**12b** (59 mg, 84%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.37-1.54 (2H, m), 1.64-1.78 (2H, m), 2.18-2.31 (1H, m), 2.56-2.69 (2H, m), 2.99-3.12 (2H, m), 7.20 (1H, d, $J = 4.9$ Hz), 7.36-7.44 (1H, m), 7.45-7.53 (2H, m), 7.65-7.71 (2H, m), 8.26 (1H, d, $J = 4.5$ Hz), 8.31 (1H, s), 12.19 (1H, s). MS (ESI) m/z 283.1 $[M+H]^+$.

N-Cyclopropyl-1-(4-phenylpyridin-3-yl)piperidine-4-carboxamide (**4**)

12b (58 mg, 0.21 mmol)、シクロプロピルアミン (0.020 mL, 0.29 mmol)、HATU (109 mg, 0.29 mmol)、DIPEA (0.0501 mL, 0.29 mmol) および DMF (2 mL) の混合物を、室温で 2 時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 20/80) で精製し、**4** (54 mg, 82%) を白色の粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.41-0.50 (2H, m), 0.71-0.84 (2H, m), 1.61-1.76 (4H, m), 1.96-2.10 (1H, m), 2.54-2.76 (3H, m), 3.14-3.26 (2H, m), 5.54 (1H, br s), 7.13 (1H, d, $J = 4.9$ Hz), 7.32-7.40 (1H, m), 7.41-7.49 (2H, m), 7.61-7.70 (2H, m), 8.28-8.32 (2H, m). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 6.7, 22.6, 28.8, 42.7, 50.8, 125.2, 128.0, 128.2, 128.7, 138.5, 140.9, 141.6, 144.3, 145.9, 175.9. MS (ESI) m/z 322.2 $[M+H]^+$. Purity: 100%.

第二章に関する化合物合成法

3'-Bromo-2,4'-bipyridine (**31**)

1-(3-ブロモピリジン-4-イル)エタノン (**30**) (1.00 g, 5.00 mmol) とビス(1,3-ジメチル-2,3-ジヒドロ-2-オキソピリミジニウム)硫酸塩 (0.909 g, 5.25 mmol) をアセトニトリル (4 mL) 中に懸濁させ、0 °C でトリエチルアミン (1.05 mL, 7.55 mmol) を加えた。混合物を 45 °C まで昇温後、同温度で 1.5 時間撹拌した。混合物を減圧下濃縮した。残渣

に酢酸 (4 mL) と酢酸アンモニウム (2.11 g, 27.35 mmol) を加え、120 °C で 4 時間撹拌した。室温まで冷却後、混合物を 0 °C の 8 M 水酸化ナトリウム水溶液 (35 mL) に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 80/20) で精製し、**31** (548 mg, 47%) を淡黄色の油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.38 (1H, ddd, *J* = 7.6, 4.9, 1.1 Hz), 7.52 (1H, dd, *J* = 4.9, 0.8 Hz), 7.66-7.73 (1H, m), 7.78-7.87 (1H, m), 8.61 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 8.73-8.79 (1H, m), 8.85 (1H, s). MS (ESI) *m/z* 235.1 [M+H]⁺.

Ethyl 1-(2,4'-bipyridin-3'-yl)piperidine-4-carboxylate (32)

31 (400 mg, 1.70 mmol)、DABCO (191 mg, 1.70 mmol)、イソニペコチン酸エチル (2 mL, 13.0 mmol) および DIPEA (2 mL) の混合物を、200 °C で 14 時間マイクロ波照射下で加熱した。室温まで冷却した後、混合物を酢酸エチルと飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 70/30) により精製し、**32** (213 mg, 40%) を淡黄色の油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.59-1.77 (2H, m), 1.82-1.93 (2H, m), 2.28-2.40 (1H, m), 2.67-2.79 (2H, m), 3.12-3.22 (2H, m), 4.14 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 7.25-7.31 (1H, m), 7.50 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.72-7.80 (1H, m), 8.05-8.10 (1H, m), 8.35-8.41 (2H, m), 8.71-8.77 (1H, m). MS (ESI) *m/z* 312.2 [M+H]⁺.

1-(2,4'-Bipyridin-3'-yl)piperidine-4-carboxylic acid (33)

32 (435 mg, 1.40 mmol) を THF (4 mL) とエタノール (1 mL) に溶解し、2 M 水酸化ナトリウム水溶液 (1.75 mL, 3.49 mmol) を加え、60 °C で 1.5 時間撹拌した。混合物は 0 °C で 2 M 塩酸 (1.75 mL) で中和し、生じた沈殿物をろ過し、水で洗浄後、減圧下で乾燥させて、**33** (395 mg, 100%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.43-1.60 (2H, m), 1.71-1.82 (2H, m), 2.21-2.35 (1H, m), 2.64-2.76 (2H, m), 2.99-3.10 (2H, m), 7.38-7.44 (1H, m), 7.47 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.87-7.95 (1H, m), 8.08-8.14 (1H, m), 8.31 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 8.38 (1H, s), 8.70-8.74 (1H, m), 12.21 (1H, s). MS (ESI) *m/z* 284.2 [M+H]⁺.

1-(2,4'-Bipyridin-3'-yl)-N-cyclopropylpiperidine-4-carboxamide (**13**)

33 (50 mg, 0.18 mmol)、シクロプロピルアミン (0.024 mL, 0.35 mmol)、HATU (87 mg, 0.23 mmol)、DIPEA (0.040 mL, 0.23 mmol) および DMF (2 mL) の混合物を、室温で 20 時間撹拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、酢酸エチル/メタノール = 100/0 to 97/3) により精製し、**13** (46 mg, 81%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.43-0.51 (2H, m), 0.73-0.82 (2H, m), 1.67-1.78 (4H, m), 1.97-2.11 (1H, m), 2.61-2.77 (3H, m), 3.15-3.25 (2H, m), 5.56 (1H, br s), 7.25-7.30 (1H, m), 7.50 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.73-7.82 (1H, m), 8.06-8.12 (1H, m), 8.35-8.41 (2H, m), 8.70-8.75 (1H, m). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 6.7, 22.6, 28.8, 42.6, 51.5, 123.0, 123.7, 125.0, 136.2, 140.1, 141.1, 144.7, 145.8, 150.2, 156.2, 175.9. MS (ESI) *m/z* 323.2 [M+H]⁺. Purity: 100%.

Ethyl 1-(2-oxo-2-phenylethyl)piperidine-4-carboxylate (**35a**)

イソニペコチン酸エチル (2.24 g, 14.2 mmol)、炭酸カリウム (2.68 g, 19.4 mmol) およびアセトニトリル (30 mL) の混合物に、2-クロロ-1-フェニルエタノン (**34a**) (2.0 g, 12.9 mmol) のアセトニトリル (20 mL) 溶液を室温下で滴下した。混合物を室温で終夜撹拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 90/10 to 50/50) で精製し、**35a** (3.17 g, 89%) を淡褐色の油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.20-1.30 (3H, m), 1.77-1.99 (4H, m), 2.17-2.39 (3H, m), 2.96 (2H, ddd, *J* = 11.6, 3.5, 3.5 Hz), 3.79 (2H, s), 4.07-4.18 (2H, m), 7.40-7.51 (2H, m), 7.53-7.61 (1H, m), 7.96-8.06 (2H, m). MS (ESI) *m/z* 276.2 [M+H]⁺.

Ethyl 1-(4-phenylpyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylate (**36a**)

35a (1.0 g, 3.63 mmol) と DMF-DMA (10 mL, 71.3 mmol) の混合物を、100 °C で終夜撹拌した。混合物を減圧下濃縮し、*n*-BuOH (5 mL) と DIPEA (5 mL) に溶解させた。ホルムアミジン酢酸塩 (1.32 g, 12.7 mmol) を加え、5 時間加熱還流した。混合物を減圧下濃縮し、得られた残渣を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下で濃縮

した。残渣は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 = 95/5 to 50/50）で精製し、褐色固体を得た。この固体を酢酸エチル/ヘキサン（1/10）で洗浄して、**36a** (0.568 g, 50%) を淡黄色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.26 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.67-1.82 (2H, m), 1.85-1.97 (2H, m), 2.37 (1H, tt, *J* = 11.2, 4.0 Hz), 2.68 (2H, ddd, *J* = 11.5, 11.5, 2.9 Hz), 3.23 (2H, ddd, *J* = 12.3, 2.9, 2.9 Hz), 4.15 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 7.38-7.53 (3H, m), 8.01-8.11 (2H, m), 8.40 (1H, s), 8.91 (1H, s). MS (ESI) *m/z* 312.2 [M+H]⁺.

1-(4-Phenylpyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid (**37a**)

36a (1.5 g, 4.82 mmol)、THF (10 mL) およびメタノール (3 mL) の混合物に、2 M 水酸化ナトリウム水溶液 (4.82 mL, 9.63 mmol) を室温下で加えた。室温で1時間攪拌した後、混合物を減圧下濃縮し、水で希釈し、1 M 塩酸で pH 4~5 まで酸性にした。生成した固体をろ取り、**37a** (1.33 g, 97%) を淡黄色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.46-1.65 (2H, m), 1.78 (2H, m), 2.19-2.38 (1H, m), 2.59-2.75 (2H, m), 3.12 (2H, m), 7.38-7.58 (3H, m), 7.98-8.09 (2H, m), 8.52 (1H, s), 8.85 (1H, s), 12.30 (1H, br s). MS (ESI) *m/z* 284.2 [M+H]⁺.

N-Cyclopropyl-1-(4-phenylpyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxamide (**14**)

37a (70 mg, 0.25 mmol)、シクロプロピルアミン (0.034 mL, 0.49 mmol)、HATU (122 mg, 0.32 mmol)、DIPEA (0.056 mL, 0.32 mmol) および DMF (2 mL) の混合物を、室温下 2.5 時間攪拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー（NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 0/100）により精製し、**14** (78 mg, 98%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.43-0.51 (2H, m), 0.74-0.83 (2H, m), 1.73-1.83 (4H, m), 2.01-2.13 (1H, m), 2.56-2.77 (3H, m), 3.23-3.33 (2H, m), 5.55 (1H, br s), 7.40-7.53 (3H, m), 8.02-8.09 (2H, m), 8.39 (1H, s), 8.91 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 6.7, 22.6, 28.6, 42.3, 50.3, 128.0, 128.6, 129.8, 137.9, 144.0, 147.0, 152.6, 157.6, 175.6. MS (ESI) *m/z* 323.2 [M+H]⁺. Purity: 100%.

***N*-Methyl-1-(4-phenylpyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxamide (15)**

37a (50 mg, 0.18 mmol)、2 M メチルアミン/THF (0.441 mL, 0.88 mmol)、HATU (87 mg, 0.23 mmol)、DIPEA (0.040 mL, 0.23 mmol) および DMF (2 mL) の混合物を、室温下 2.5 時間撹拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 0/100) で精製し、**15** (43 mg, 82%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.74-1.85 (4H, m), 2.07-2.19 (1H, m), 2.58-2.70 (2H, m), 2.83 (3H, m), 3.24-3.34 (2H, m), 5.45 (1H, br s), 7.39-7.52 (3H, m), 8.03-8.09 (2H, m), 8.40 (1H, s), 8.91 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 26.3, 28.6, 42.6, 50.4, 128.0, 128.6, 129.8, 137.9, 144.0, 147.0, 152.6, 157.6, 174.8. MS (ESI) *m/z* 297.2 [M+H]⁺. Purity: 100%.

***N*-Ethyl-1-(4-phenylpyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxamide (16)**

37a (55 mg, 0.19 mmol)、2 M エチルアミン/THF (0.485 mL, 0.97 mmol)、HATU (96 mg, 0.25 mmol)、DIPEA (0.044 mL, 0.25 mmol) および DMF (1 mL) の混合物を、室温下 18 時間撹拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 0/100) で精製し、**16** (55 mg, 91%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.14 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.75-1.85 (4H, m), 2.05-2.17 (1H, m), 2.58-2.69 (2H, m), 3.24-3.36 (4H, m), 5.41 (1H, br s), 7.40-7.52 (3H, m), 8.03-8.09 (2H, m), 8.40 (1H, s), 8.91 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 14.9, 28.6, 34.4, 42.6, 50.4, 128.0, 128.6, 129.8, 137.9, 144.0, 147.0, 152.6, 157.6, 174.1. MS (ESI) *m/z* 311.3 [M+H]⁺. Purity: 100%.

***N*-Phenyl-1-(4-phenylpyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxamide (17)**

37a (100 mg, 0.35 mmol)、DIPEA (0.185 mL, 1.06 mmol) および DMF (2 mL) の混合物に、HATU (161 mg, 0.42 mmol) とアニリン (0.039 mL, 0.42 mmol) を室温下に加えた。混合物は室温で終夜撹拌した。反応混合物は水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物は飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣は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 = 70/30 to 30/70) で精製し、酢酸エチル/ヘキサンから再結晶化して、**17** (88 mg, 70%) を灰白

色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.86-1.97 (4H, m), 2.22-2.38 (1H, m), 2.63-2.77 (2H, m), 3.34 (2H, d, *J* = 12.4 Hz), 7.07-7.17 (2H, m), 7.28-7.38 (2H, m), 7.41-7.55 (5H, m), 8.03-8.13 (2H, m), 8.43 (1H, s), 8.93 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 28.6, 43.6, 50.3, 119.8, 124.5, 128.0, 128.6, 129.1, 129.9, 137.7, 137.9, 143.9, 147.0, 152.7, 157.7, 172.5. MS (ESI) *m/z* 359.2 [M+H]⁺. Purity: 100%.

***N,N*-Dimethyl-1-(4-phenylpyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxamide (18)**

37a (50 mg, 0.18 mmol)、ジメチルアミン塩酸塩 (28.8 mg, 0.35 mmol)、HATU (87 mg, 0.23 mmol)、DIPEA (0.080 mL, 0.46 mmol) および DMF (2 mL) の混合物を、室温下 2.5 時間撹拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 0/100) で精製し、**18** (55 mg, 100%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.64-1.75 (2H, m), 1.80-1.96 (2H, m), 2.51-2.72 (3H, m), 2.95 (3H, s), 3.04 (3H, s), 3.25-3.36 (2H, m), 7.38-7.52 (3H, m), 8.05-8.11 (2H, m), 8.41 (1H, s), 8.91 (1H, s). MS (ESI) *m/z* 311.2 [M+H]⁺. Purity: 100%.

***N*-Ethyl-*N*-methyl-1-(4-phenylpyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxamide (19)**

37a (100 mg, 0.35 mmol)、HATU (148 mg, 0.39 mmol) および DMF (5 mL) の混合物に、室温で DIPEA (0.123 mL, 0.71 mmol) と *N*-メチルエチルアミン (0.045 mL, 0.53 mmol) を加えた。混合物を室温で終夜撹拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 80/20 to 30/70) で精製し、**19** (113 mg, 99%) を淡黄色の油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), mixture of inseparable rotamers; δ 1.09 (1.5H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.19 (1.5H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.63-1.76 (2H, m), 1.78-2.02 (2H, m), 2.53 (1H, tt, *J* = 11.5, 3.6 Hz), 2.66 (2H, ddd, *J* = 11.8, 11.8, 1.7 Hz), 2.92 (1.5H, s), 3.00 (1.5H, s), 3.23-3.48 (4H, m), 7.36-7.54 (3H, m), 8.08 (2H, br d, *J* = 8.0 Hz), 8.41 (1H, s), 8.91 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 12.3, 14.2, 28.1, 28.7, 33.0, 34.4, 38.0, 38.3, 42.6, 44.2, 50.4, 128.0, 128.6, 129.8, 137.9, 144.1, 146.9, 152.5, 157.6, 173.8, 174.2. MS (ESI) *m/z* 325.2 [M+H]⁺. Purity: 100%.

Ethyl 1-(2-(4-fluorophenyl)-2-oxoethyl)piperidine-4-carboxylate (**35b**)

イソニペコチン酸エチル (8.02 g, 51.0 mmol)、炭酸カリウム (9.61 g, 69.5 mmol) およびアセトニトリル (90 mL) の混合物に、2-クロロ-1-(4-フルオロフェニル)エタノン (**34b**) (8.00 g, 46.4 mmol) のアセトニトリル (60 mL) 溶液を室温下で滴下した。混合物を室温で終夜撹拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、ろ過し、減圧下濃縮して **35b** (13.2 g, 97%) を淡黄色の固体として得た。得られた粗生成物は、さらなる精製を行わずに次の反応に用いた。MS (ESI) m/z 294.1 $[M+H]^+$.

Ethyl 1-(4-(4-fluorophenyl)pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylate (**36b**).

35b (13.2 g, 45.0 mmol) と DMF-DMA (82 mL, 585 mmol) の混合物を終夜加熱還流させた。混合物を減圧下濃縮し、*n*-BuOH (40 mL) と DIPEA (40 mL) に溶解させた後、ホルムアミジン酢酸塩 (16.4 g, 157.50 mmol) を加え、100 °C で終夜撹拌した。混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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 = 95/5 to 50/50）で精製し、**36b** (9.93 g, 67%) を褐色の固体として得た。得られた粗生成物は、さらなる精製を行わずに次の反応に用いた。MS (ESI) m/z 330.1 $[M+H]^+$.

1-(4-(4-Fluorophenyl)pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid (**37b**)

36b (9.93 g, 30.2 mmol)、THF (80 mL) およびメタノール (20 mL) の混合物に、2 M 水酸化ナトリウム水溶液 (30.1 mL, 60.3 mmol) を室温下で加えた。室温で 1.5 時間撹拌した後、混合物を減圧下濃縮し、水で希釈し、2 M 塩酸で中和した。得られた固体をろ取し、減圧下乾燥させて、**37b** (8.28 g, 91%) を淡黄色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.49-1.68 (2H, m), 1.75-1.88 (2H, m), 2.24-2.39 (1H, m), 2.61-2.75 (2H, m), 3.05-3.19 (2H, m), 7.30-7.41 (2H, m), 8.08-8.20 (2H, m), 8.54 (1H, s), 8.85 (1H, s), 12.26 (1H, s). MS (ESI) m/z 302.1 $[M+H]^+$.

1-(4-(4-Fluorophenyl)pyrimidin-5-yl)-*N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide (**20**)

37b (70 mg, 0.23 mmol)、ジメチルアミン塩酸塩 (37.9 mg, 0.46 mmol)、HATU (115 mg, 0.30 mmol)、DIPEA (0.105 mL, 0.60 mmol) および DMF (2 mL) の混合物を、室温で 18 時間撹拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層

を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 40/60) で精製し、ジエチルエーテルでトリチュレーションして、**20** (70 mg, 92%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.69-1.77 (2H, m), 1.82-1.95 (2H, m), 2.55-2.72 (3H, m), 2.96 (3H, s), 3.05 (3H, s), 3.25-3.33 (2H, m), 7.13-7.20 (2H, m), 8.11-8.18 (2H, m), 8.42 (1H, s), 8.90 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 28.3, 35.7, 37.0, 38.0, 50.5, 115.6 (d, ²J_{C-F} = 22 Hz), 130.3 (d, ³J_{C-F} = 8.8 Hz), 133.9 (d, ⁴J_{C-F} = 3.7 Hz), 144.0, 147.2, 152.7, 156.6, 163.6 (d, ¹J_{C-F} = 251 Hz), 174.3. MS (ESI) *m/z* 329.2 [M+H]⁺. Purity: 99.8%.

1-(2,4'-Bipyridin-3'-yl)-*N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide (**21**)

33 (50 mg, 0.18 mmol)、ジメチルアミン塩酸塩 (28.8 mg, 0.35 mmol)、HATU (87 mg, 0.23 mmol)、DIPEA (0.123 mL, 0.71 mmol) および DMF (2 mL) の混合物を、室温で 20 時間攪拌した。混合物を酢酸エチルと水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、酢酸エチル/メタノール = 100/0 to 97/3) で精製し、ジエチルエーテルでトリチュレーションして、**21** (47 mg, 86%) を灰白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.63-1.89 (4H, m), 2.49-2.62 (1H, m), 2.67-2.79 (2H, m), 2.94 (3H, s), 3.04 (3H, s), 3.17-3.28 (2H, m), 7.24-7.29 (1H, m), 7.52 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 7.74-7.81 (1H, m), 8.11-8.16 (1H, m), 8.36-8.41 (2H, m), 8.70-8.75 (1H, m). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 28.5, 35.6, 37.0, 38.3, 51.7, 122.9, 123.7, 125.0, 136.3, 140.0, 141.0, 144.6, 145.9, 150.1, 156.1, 174.6. MS (ESI) *m/z* 311.2 [M+H]⁺. Purity: 99.8%.

3-Fluoro-4-(1*H*-pyrazol-1-yl)pyridine (**39a**)

4-クロロ-3-フルオロピリジン (**38**) (1 g, 7.60 mmol)、1*H*-ピラゾール (0.569 g, 8.36 mmol)、4-メチルベンゼンスルホン酸一水和物 (0.289 g, 1.52 mmol) および 2-プロパノール (5 mL) の混合物を、80 °C で終夜攪拌し、その後 5 時間加熱還流した。混合物を減圧下濃縮した。残渣は水に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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 = 95/5 to 50/50) で精製し、**39a** (0.819 g, 66%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.56 (1H, dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 8.03 (1H, dd, *J* = 7.0, 5.4 Hz), 8.21 (1H, dd, *J* = 2.6, 2.5 Hz), 8.48 (1H, d, *J* = 5.4 Hz), 8.60 (1H, d, *J* = 3.8 Hz). MS (ESI) *m/z* 164.2 [M+H]⁺.

***N,N*-Dimethyl-1-(4-(1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin-3-yl)piperidine-4-carboxamide (22)**

39a (200 mg, 1.23 mmol)、*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミド (575 mg, 3.68 mmol)、炭酸カリウム (186 mg, 1.35 mmol) および NMP (0.5 mL) の混合物を、180 °C で 1 時間マイクロ波照射下で加熱した。混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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 = 100/0 to 90/10) で精製し、**22** (202 mg, 55%) を無色の油状物質として得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.69-1.83 (2H, m), 1.87-2.02 (2H, m), 2.55-2.80 (3H, m), 2.97 (3H, s), 3.04-3.17 (2H, m), 3.07 (3H, s), 6.49 (1H, dd, *J* = 2.7, 1.9 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 7.73 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 8.37 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.43 (1H, s), 8.61 (1H, d, *J* = 2.7 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 28.6, 35.7, 37.1, 38.2, 50.9, 108.0, 118.6, 130.5, 139.6, 139.7, 141.3, 142.6, 145.6, 174.4. MS (ESI) *m/z* 300.2 [M+H]⁺. Purity: 99.4%.

3-Fluoro-4-(3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridine (39b)

38 (500 mg, 3.80 mmol)、3-メチル-1*H*-ピラゾール (0.337 mL, 4.18 mmol)、4-メチルベンゼンスルホン酸一水和物 (145 mg, 0.76 mmol) および 2-プロパノール (3.5 mL) の混合物を、130 °C で 2 時間マイクロ波照射下で加熱した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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 = 95/5 to 80/20) で精製し、**39b** (317 mg, 47%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.31 (3H, s), 6.49 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.92 (1H, dd, *J* = 7.2, 5.3 Hz), 8.27 (1H, dd, *J* = 2.6, 2.5 Hz), 8.48 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.73 (1H, d, *J* = 4.2 Hz). MS (ESI) *m/z* 178.1 [M+H]⁺.

***N,N*-Dimethyl-1-(4-(3-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin-3-yl)piperidine-4-carboxamide**
(24)

39b (34 mg, 0.19 mmol)、*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミド塩酸塩 (370 mg, 1.92 mmol)、炭酸カリウム (398 mg, 2.88 mmol)、および DMA (0.3 mL) の混合物を、200 °C で 10 時間マイクロ波照射下で加熱した。混合物を水で反応停止させ、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 95/5 to 40/60) で精製し、**24** (20.0 mg, 33%) を淡黄色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.77 (2H, d, *J* = 12.1 Hz), 1.87-2.04 (2H, m), 2.37 (3H, s), 2.56-2.67 (1H, m), 2.68-2.80 (2H, m), 2.97 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.15 (2H, m), 6.27 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.34 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 8.39 (1H, s), 8.55 (1H, d, *J* = 2.7 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 13.7, 28.7, 35.7, 37.1, 38.3, 51.0, 108.2, 118.1, 131.2, 139.3, 139.6, 142.6, 145.6, 150.8, 174.4. MS (ESI) *m/z* 314.3 [M+H]⁺. Purity: 94.9%.

4-(4-Chloro-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-fluoropyridine (39c)

38 (332 mg, 2.52 mmol)、4-クロロ-1*H*-ピラゾール (285 mg, 2.78 mmol)、4-メチルベンゼンスルホン酸一水和物 (96 mg, 0.50 mmol) および 2-プロパノール (2 mL) の混合物を、130 °C で 2 時間マイクロ波照射下で加熱した。混合物を室温の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応停止させた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣は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 = 95/5 to 80/20) で精製し、**39c** (450 mg, 90%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.93 (1H, dd, *J* = 6.8, 5.3 Hz), 8.10 (1H, s), 8.55 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.66 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.81 (1H, d, *J* = 3.8 Hz). MS (ESI) *m/z* 198.1 [M+H]⁺.

1-(4-(4-Chloro-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin-3-yl)-*N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide
(25)

39c (75 mg, 0.38 mmol)、*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミド (148 mg, 0.95 mmol)、炭酸カリウム (105 mg, 0.76 mmol) および DMA (0.5 mL) の混合物を、200 °C で 10 時間マイクロ波照射下で加熱した。混合物を室温下水で反応停止させ、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥

させ、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー（NH、ヘキサン/酢酸エチル = 95/5 to 50/50）で精製し、酢酸エチル/ヘキサンから結晶化して、**25** (27.5 mg, 22%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.60-1.70 (4H, m), 2.65-2.79 (3H, m), 2.82 (3H, s), 2.91 (2H, dt, *J* = 12.0, 3.5 Hz), 3.02 (3H, s), 7.52 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 7.96 (1H, s), 8.36 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.48 (1H, s), 8.76 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 28.5, 35.7, 37.1, 38.2, 51.0, 112.7, 118.1, 128.1, 139.0, 139.5, 140.0, 142.9, 145.7, 174.2. MS (ESI) *m/z* 334.2 [M+H]⁺. Purity: 98.7%.

4-(4-Bromo-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-fluoropyridine (**39d**)

38 (1.04 g, 7.88 mmol)、4-ブromo-1*H*-ピラゾール (1.28 g, 8.67 mmol)、4-メチルベンゼンスルホン酸一水和物 (0.300 g, 1.58 mmol) および 2-プロパノール (5 mL) の混合物を、130 °C で 2 時間マイクロ波照射下で加熱した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で塩基性にした後、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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 = 100/0 to 85/15）で精製し、**39d** (1.50 g, 79%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.93 (1H, dd, *J* = 6.8, 5.3 Hz), 8.09 (1H, s), 8.55 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.65 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.81 (1H, d, *J* = 3.8 Hz). MS (ESI) *m/z* 242.0 [M+H]⁺.

1-(4-(4-Bromo-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin-3-yl)-*N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide (**26**)

39d (0.7 g, 2.89 mmol)、*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミド (0.678 g, 4.34 mmol)、炭酸カリウム (0.799 g, 5.78 mmol) および NMP (2.5 mL) の混合物を、180 °C で 5 時間加熱した。室温まで冷却後、混合物を水で反応停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー（NH、ヘキサン/酢酸エチル = 95/5 to 40/60）で精製し、酢酸エチル/ヘキサン/ジイソプロピルエーテルから結晶化して、**26** (0.411 g, 38%) を淡黄色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.49-1.78 (4H, m), 2.64-2.84 (3H, m), 2.82 (3H, s), 2.86-2.96 (2H, m), 3.02 (3H, s), 7.52 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.96 (1H, s), 8.36 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 8.48 (1H, s), 8.77 (1H, d, *J* = 0.8 Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 28.5, 35.7, 37.1, 38.2, 51.0, 96.0, 118.1, 130.3, 138.9, 139.6, 142.0, 142.9, 145.7, 174.1. MS (ESI) m/z 378.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Purity: 100%.

1-(4-(4-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin-3-yl)-*N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide (28)

26 (80 mg, 0.21 mmol)、シクロプロピルボロン酸 (36.3 mg, 0.42 mmol)、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (17.3 mg, 0.02 mmol)、炭酸セシウム (207 mg, 0.63 mmol)、DME (1.5 mL) および水 (0.3 mL) の混合物を、100 °C で 30 分間マイクロ波照射下で加熱した。混合物に $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (17.3 mg, 0.02 mmol) とシクロプロピルボロン酸 (36.3 mg, 0.42 mmol) を追加し、100 °C で 1 時間マイクロ波照射下で加熱した。混合物を室温下水で反応停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 50/50) で精製し、さらに分取 HPLC で精製した。目的とする分取画分を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下濃縮した。残渣は酢酸エチル/ヘキサンから結晶化して、**28** (15.2 mg, 21%) を白色の固体として得た。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.56-0.63 (2H, m), 0.88-0.96 (2H, m), 1.73-1.83 (3H, m), 1.86-2.02 (2H, m), 2.56-2.67 (1H, m), 2.73 (2H, ddd, J = 11.9, 11.9, 2.3 Hz), 2.98 (3H, s), 3.08 (3H, s), 3.09-3.17 (2H, m), 7.49 (1H, s), 7.60 (1H, d, J = 5.3 Hz), 8.34 (1H, d, J = 5.3 Hz), 8.36 (1H, s), 8.40 (1H, s). MS (ESI) m/z 340.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Purity: 98.7%.

1-(4-Chloropyridin-3-yl)-*N,N*-dimethylpiperidine-4-carboxamide (41)

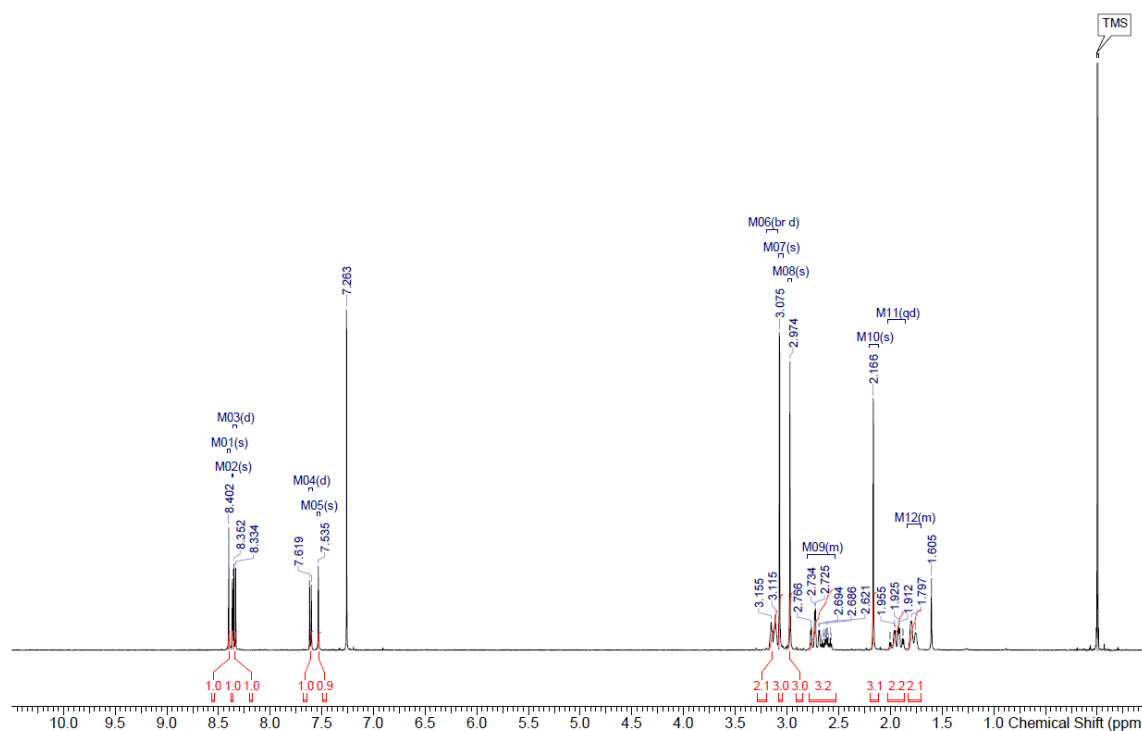
3-ブロモ-4-クロロピリジン (**40**) (222 mg, 1.15 mmol)、*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミド (120 mg, 0.77 mmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (14.1 mg, 0.02 mmol)、XantPhos (26.7 mg, 0.05 mmol)、 NaOt-Bu (111 mg, 1.15 mmol) およびトルエン (1 mL) の混合物を、窒素雰囲気下 110 °C で 2 時間攪拌した。混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 70/30 to 30/70) で精製し、**41** (85 mg, 41%) を淡黄色の固体として得た。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.83 (2H, d, J = 11.4 Hz), 1.96-2.16 (2H, m), 2.60-2.74 (1H, m), 2.83 (2H, ddd, J = 11.8, 11.8, 2.5 Hz), 2.98 (3H, s), 3.10 (3H, s), 3.50 (2H, ddd, J = 11.9, 2.6, 2.6 Hz), 7.28 (1H, d, J = 5.3 Hz), 8.16 (1H, d, J = 5.3 Hz), 8.29 (1H, s). MS (ESI) m/z 268.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N,N*-Dimethyl-1-(4-(4-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin-3-yl)piperidine-4-carboxamide
(23)**

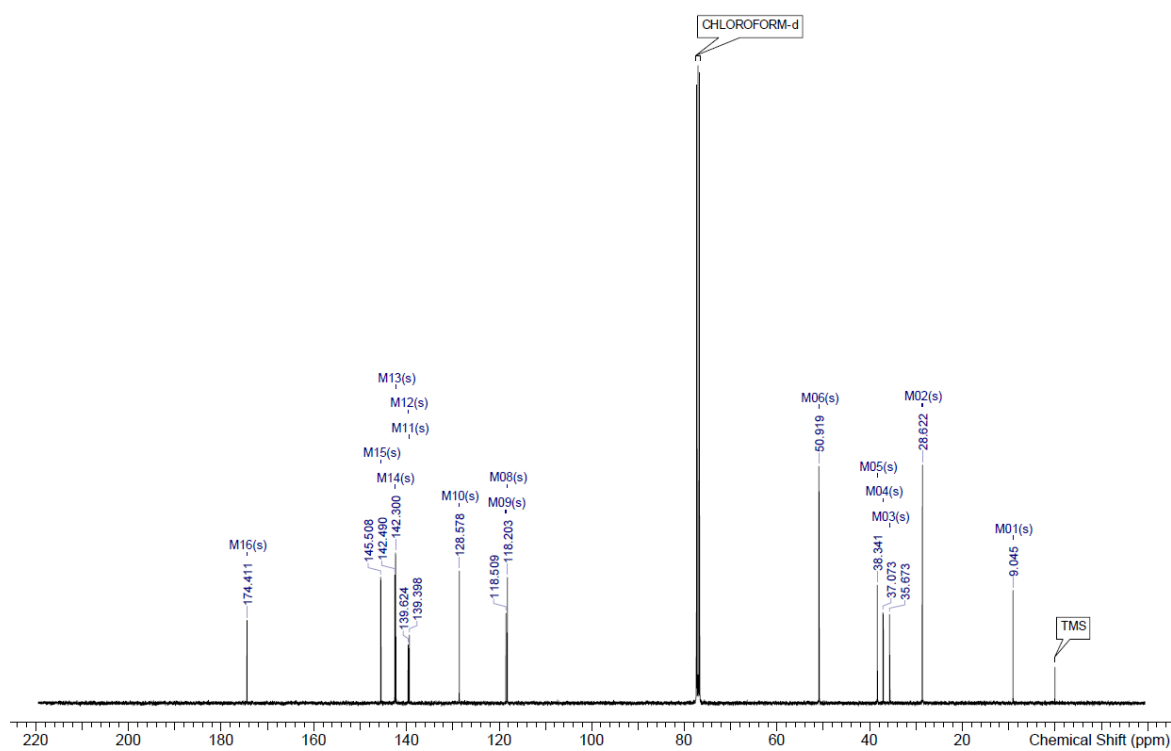
41 (200 mg, 0.75 mmol)、4-メチル-1*H*-ピラゾール (0.309 mL, 3.73 mmol)、炭酸セシウム (487 mg, 1.49 mmol) および DMA (1 mL)の混合物を、200 °C で 30 分間マイクロ波照射下で加熱した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/メタノール = 100/0 to 80/20) で精製し、酢酸エチル/ヘキサンから再結晶化して、**23** (83 mg, 35%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.71-1.84 (2H, m), 1.94 (2H, m), 2.17 (3H, s), 2.53-2.80 (3H, m), 2.97 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.14 (2H, m), 7.53 (1H, s), 7.61 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 8.34 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 8.37 (1H, s), 8.40 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 9.0, 28.6, 35.7, 37.1, 38.3, 50.9, 118.2, 118.5, 128.6, 139.4, 139.6, 142.3, 142.5, 145.5, 174.4. MS (ESI) *m/z* 314.3 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₇H₂₃N₅O: C, 65.15; H, 7.40; N, 22.35. Found: C, 65.05; H, 7.20; N, 22.11. Purity: 100%.

^1H and ^{13}C NMR chart for compound 23.

^1H NMR (CDCl_3) of 23



^{13}C NMR (CDCl_3) of 23



***N,N*-Dimethyl-1-(4-(4-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin-3-yl)piperidine-4-carboxamide (27)**

41 (80.4 mg, 0.30 mmol)、4-(トリフルオロメチル)-1*H*-ピラゾール (61.3 mg, 0.45 mmol)、炭酸セシウム (196 mg, 0.60 mmol) および DMA (1 mL) の混合物を、200 °C で 14 時間マイクロ波照射下で加熱した。混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH、ヘキサン/酢酸エチル、その後 SI、酢酸エチル/メタノール = 70/30 to 30/70) で精製し、**27** (15.3 mg, 14%) を無色の油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.73-1.99 (4H, m), 2.56-2.70 (1H, m), 2.78 (2H, ddd, *J* = 11.6, 11.6, 2.8 Hz), 2.96 (3H, s), 3.02-3.15 (2H, m), 3.06 (3H, s), 7.62 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 7.93 (1H, s), 8.42 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.50 (1H, s), 8.87 (1H, s). MS (ESI) *m/z* 368.1 [M+H]⁺. Purity: 99.5%.

3-Fluoro-*N*-(2-hydroxypropyl)isonicotinamide (43)

3-フルオロイソニコチン酸 (**42**) (4.5 g, 31.9 mmol) と SOCl₂ (20 mL, 274 mmol) の混合物を、窒素雰囲気下、4 時間加熱還流した。混合物を減圧下濃縮した。残渣をトルエンに懸濁し、再び減圧下濃縮した。残渣を THF (20 mL) に懸濁し、その混合物を 1-aminopropan-2-ol (2.87 g, 38.3 mmol)、DIPEA (12.3 mL, 70.2 mmol) および THF (20 mL) の混合物に 0 °C で滴下した。混合物を室温で終夜攪拌した。混合物は減圧下濃縮し、残渣を THF に懸濁した。生じた不溶物はセライトを用いてろ去し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣は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 = 100/0 to 90/10) で精製し、**43** (4.85 g, 77%) を淡黄色の油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), 2.19 (1H, br d, *J* = 4.2 Hz), 3.35 (1H, dddd, *J* = 13.9, 7.7, 4.9, 1.1 Hz), 3.72 (1H, dddd, *J* = 13.9, 6.4, 3.3, 1.3 Hz), 3.99-4.14 (1H, m), 7.13 (1H, br s), 7.93 (1H, dd, *J* = 6.4, 4.9 Hz), 8.52-8.62 (2H, m). MS (ESI) *m/z* 199.1 [M+H]⁺.

3-Fluoro-*N*-(2-oxopropyl)isonicotinamide (44)

43 (4.38 g, 22.1 mmol)、トリエチルアミン (6.16 mL, 44.2 mmol) および DMSO (70 mL) の混合物に、三酸化硫黄ピリジン錯体 (7.03 g, 44.2 mmol) を室温下に加え、室温で終夜攪拌した。混合物を減圧下濃縮した。残渣を水と酢酸エチルに溶解し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液で塩基性にした。混合物に飽和食塩水を加え、酢酸エチル

/THF で抽出した。抽出物を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮された。残渣は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 = 50/50 to 0/100）で精製し、白色の固体として **44** (1.93 g, 45%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.29 (3H, s), 4.40 (2H, d, *J* = 4.5 Hz), 7.50 (1H, br s), 7.92 (1H, dd, *J* = 6.4, 4.9 Hz), 8.53-8.66 (2H, m). MS (ESI) *m/z* 197.2 [M+H]⁺.

3-Fluoro-4-(5-methyl-1,3-thiazol-2-yl)pyridine (**45**)

44 (340 mg, 1.73 mmol) をトルエン (5 mL) に加熱下で溶解させた。その溶液にローソン試薬 (841 mg, 2.08 mmol) を加え、2 時間加熱還流した。混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（NH、ヘキサン/酢酸エチル = 90/10 to 70/30）で精製し、**45** (281 mg, 83%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.58 (3H, d, *J* = 1.1 Hz), 7.67-7.70 (1H, m), 8.12 (1H, dd, *J* = 6.2, 5.1 Hz), 8.50 (1H, dd, *J* = 4.9, 1.1 Hz), 8.60 (1H, d, *J* = 2.7 Hz). MS (ESI) *m/z* 195.1 [M+H]⁺.

N,N-dimethyl-1-(4-(5-methyl-1,3-thiazol-2-yl)pyridin-3-yl)piperidine-4-carboxamide (**29**)

45 (50 mg, 0.26 mmol)、*N,N*-ジメチルピペリジン-4-カルボキサミド (201 mg, 1.29 mmol)、炭酸カリウム (71.2 mg, 0.51 mmol) および NMP (0.5 mL) の混合物を、150 °C で 5 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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 = 100/0 to 90/10）で精製し、酢酸エチル/ヘキサンから再結晶化して、**29** (53.6 mg, 63%) を白色の固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.85 (2H, d, *J* = 12.5 Hz), 2.14-2.34 (2H, m), 2.53 (3H, d, *J* = 1.1 Hz), 2.70 (1H, tt, *J* = 11.6, 3.5 Hz), 2.88-3.02 (5H, m), 3.12 (3H, s), 3.16-3.26 (2H, m), 7.59-7.61 (1H, m), 8.09 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.44 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 8.59 (1H, s). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 12.0, 28.8, 35.7, 37.1, 38.5, 53.2, 121.1, 136.5, 137.9, 140.5, 145.1, 145.3, 146.5, 158.9, 174.7. MS (ESI) *m/z* 331.2 [M+H]⁺. Purity: 99.6%.

X線共結晶構造解析に関する実験

タンパク質の結晶化および構造解析

N 末端に 6xHIS-tag を付加したヒト型 CH24H (aa 28-494) を、pCWOri ベクター (Addgene 社) にクローニングした。このプラスミドを pGro7 (TaKaRa 社) と共に大腸菌 DH5 α 株に導入した。この細胞を 2XYT 培地で培養し、OD が 0.8 から 1 の時に 1 mM IPTG、0.5 mM 5-アミノレブリン酸塩酸塩、および 0.02%アラビノースで誘導し、30 °Cで 72 時間培養した。その後、細胞を精製した⁴³。結晶化のための最終タンパク質濃度は、50 mM KPi 7.4、500 mM NaCl、0.5 mM EDTA、2 mM DTT、10% グリセロールを含む緩衝液中で 28 mg/mL であった。CH24H の複合体結晶は、シッティングドロップ蒸気拡散法により調製した。2 mM の化合物を添加し、0.4 M 塩化カルシウムおよび 18% (w/v) PEG 3350 を含むリザーバ液から 20 °Cで実施した。データ収集の前に、結晶をクライオプロテクタントとして 25% エチレングリコールを含むリザーバ溶液に浸し、液体窒素で急速凍結した。回折データは、Advanced Light Source のビームライン 5.0.3 で CCD 検出器 Quantum 315R (ADSC 社) を使用し、100K において単結晶から収集した。回折データはプログラム HKL2000⁴⁴ を用いて処理した。結晶構造は、CCP4 Program Suite の Molrep を用い^{45,46}、CH24H の結晶構造 (PDB code: 2Q9F) をサーチモデルとした分子置換法によって決定した。結晶構造は REFMAC⁴⁷ と COOT⁴⁸ を用いて構造精密化した。リガンドのパラメーターファイルは、AFITT (OpenEye Scientific Software 社) で作成した。最終モデルは MolProbity⁴⁹ でその整合性を確認した。回折データ処理および構造精密化の統計値を以下に示した (Table 7)。すべての Figure は、PyMOL (Schrödinger, LLC 社) および LIGPLOT⁵⁰ を使用して生成した。

Table 7. X-ray data collection and refinement statistics for the crystal structures of CH24H in complex with compounds **4** and **23**.

	Compound 4 (PDB: 7N3L)	Compound 23 (PDB: 7N3M)
Wavelength	0.976	0.976
Resolution range	35.44 - 1.631 (1.689 - 1.631)	44.63 - 1.7 (1.761 - 1.7)
Space group	P 21 21 21	P 21 21 21
Unit cell	58.494 63.679 124.637 90 90 90	58.572 63.717 125.061 90 90 90
Total reflections	1024836	967202
Unique reflections	58262 (5648)	51648 (4610)
Multiplicity	6.8	6.6
Completeness (%)	99.17 (97.77)	98.74 (89.45)
Mean I/sigma(I)	18.20 (2.19)	15.8 (1.86)
Wilson B-factor	15.99	18.10
R-merge	0.104 (0.980)	0.109 (0.746)
Reflections used in refinement	58260 (5648)	51648 (4610)
Reflections used for R-free	2875 (292)	2527 (221)
R-work	0.1752 (0.2495)	0.1745 (0.2790)
R-free	0.2044 (0.2823)	0.2024 (0.3275)
Number of non-hydrogen atoms	3979	4041
macromolecules	3532	3585
ligands	81	66
solvent	366	390
Protein residues	434	437
RMS(bonds)	0.017	0.018
RMS(angles)	1.92	2.02

Ramachandran favored (%)	98.13	98.14
Ramachandran allowed (%)	1.64	1.86
Ramachandran outliers (%)	0.23	0.00
Rotamer outliers (%)	2.84	2.29
Clashscore	5.10	6.00
Average B-factor	22.34	24.40
macromolecules	21.56	23.44
ligands	13.49	11.43
solvent	31.88	35.41
Number of TLS groups	7	2

Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

薬理作用および薬物動態に関する実験

CH24H 阻害活性の測定

全長 *CH24H* 遺伝子 (NCBI Accession Num. BC022539) を FreeStyle 293-F 細胞 (Invitrogen 社) に形質導入してヒト型 CH24H を発現させた。ホモジネートを遠心分離し、得られた上清から CH24H のライセートを得た。CH24H の酵素活性は薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて測定した。

段階希釈した化合物 2 μL を反応緩衝液 (0.1% BSA および cOmplete、EDTA フリータブレット (Roche 社) を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液[pH7.4]) 中で CH24H 酵素 3 μL と室温下で 15 分間インキュベートした。アッセイは 384 ウェルプレートを用いて duplicate で実施し、DMSO の最終濃度は 0.2% であった。2 mM β -NADPH を含むバッファーに溶解させた [^{14}C] コレステロール (PerkinElmer 社, NEC018250UC) を最終濃度 15 μM となるように 5 μL を加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 時間インキュベーションさせた。クロロホルム/メタノール (1:2 v/v) 35 μL を加え反応を停止させた後、混合物に 0.0024% のトリパンプルーを含む蒸留水 25 μL を加えた。Bligh と Dye の脂質抽出法に従い、抽出した下層 4.5 μL を TLC プレートにスポットした。TLC プレートは酢酸エチル/トルエン (2:3 v/v) で展開し、FLA7000 (Fujifilm 社) で可視化した。

CYP 阻害活性の測定

インキュベーション混合物は合計 40 μ L 調製し、最終的な成分濃度は以下の通り：50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)、NADPH-generating system (MgCl_2 、 β -NADP⁺、glucose-6-phosphate および glucose-6-phosphate dehydrogenase の混合物)、CYP 発現系ミクロソーム (CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4、BD Biosciences)、基質 (amodiaquine、diclofenac、bufuralol あるいは testosterone) および 10 μ mol/L の評価化合物。基質と阻害剤はメタノールおよび DMSO にそれぞれ溶解させ、インキュベーション混合物に加えた。最終溶媒濃度は 0.5%であった。60 分間インキュベーションし、アセトニトリルで反応を停止させた。遠心分離後、上清を用いて LC/MS/MS (liquid chromatography/tandem mass spectrometry)測定を実施した。全てのインキュベーションは triplicate で実施した。CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 および CYP3A4 の活性はそれぞれ N-desethylamodiaquine、1'-hydroxydiclofenac、1'-hydroxybufuralol および 6 β -hydroxytestosterone のピークから決定した。評価化合物の阻害活性は、阻害剤を含まないコントロール試料と比較した残存する活性から算出し、パーセンテージで表記した。

マウスにおける化合物 23 の脳内および血漿中濃度の測定

動物は 5 週齢の雌性 C57BL/6N マウス(3 匹)を用いた。化合物 23 を 0.5%メチルセルロース水溶液[133-14255 WAKO]に懸濁して 3 mg/mL となるように調製した。その懸濁液を 30 mg/kg で強制経口投与した。投与後 1 時間、4 時間、8 時間、および 24 時間に血液および脳のサンプルを採取した。採取した脳組織は約 4 倍量の生理食塩水でホモジネートした。その血漿および脳ホモジネートサンプルは内部標準を含むアセトニトリルで除タンパク操作を行った。遠心分離後、その上清液を LC/MS/MS 用溶媒 (移動相 A: 10 mM ギ酸アンモニウム/ギ酸 (100/0.2, v/v), 移動相 B: アセトニトリル/ギ酸 (100/0.2, v/v)) で希釈し、Shimadzu Shim-pack XR-ODS (2.2 μ m, 2.0 x 30 mm, Shimadzu Corporation 社) に搭載された LC/MS/MS (API5000, AB Sciex 社) に 50°Cで注入した。化合物 23 は m/z 314.28 \rightarrow 268.95 をトランジションパラメータとして用いた MRM (multiple reaction monitoring) モードで検出した。データの取得および処理には Analyst software TM (version 1.4.2) を用いた。

マウスにおける脳内 24HC の測定

6 週齢の雌性 C57BL/6N マウス（各群 3 匹）を使用した。化合物 **23** は 0.5%メチルセルロース水溶液 [133-14255 WAKO] に懸濁して 1 mg/mL となるように調製した。マウスの体重を測定し、この懸濁液を 30 mg/kg で強制経口投与し、3 日間、1 日 1 回投与した。3 回目の投与 16 時間後に、半脳を回収し、24HC の量を測定した。脳の湿重を測定後、約 4 倍量（0.5 mL）の生理食塩水でホモジネートし、この溶液を脳抽出液として使用した。脳抽出液中の 24HC は、アセトニトリル溶液（98%アセトニトリル、1.98%メタノール、0.02%ギ酸）で抽出し、HPLC によって定量した。24HC の平均値を算出後、結果はコントロール群を 100%とした相対値で示した。

引用文献

1. Björkhem, I.; Meaney, S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 806–815.
2. Dietschy, J. M.; Turley, S. D. Thematic review series: brain lipids. cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 1375–1397.
3. Zhang, J.; Liu, Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* **2015**, *6*, 254–264.
4. Russell, D. W.; Halford, R. W.; Ramirez, D. M. O. ; Shah, R.; Kotti, T. Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 1017-10140.
5. Lund, E. G.; Xie, C.; Kotti, T.; Turley, S. D.; Dietschy, J. M.; Russell, D. W. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22980–22988.
6. Alavi, M. S.; Karimi, G.; Ghanimi, H. A.; Roohbakhsh, A. The Potential of CYP46A1 as a novel therapeutic target for neurological disorders: an updated review of mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *949*, 175726.
7. Hudry, E.; Van Dam, D.; Kulik, W.; De Deyn, P. P.; Stet, F. S.; Ahouansou, O.; Benraiss, A.; Delacourte, A.; Bougnères, P.; Aubourg, P.; Cartier, N. Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 44–53.
8. Mast, N.; Saadane, A.; Valencia-Olvera, A.; Constans, J.; Maxfield, E.; Arakawa, H.; Li, Y.; Landreth, G.; Pikuleva, I. A. Cholesterol-metabolizing enzyme cytochrome P450 46A1

- as a pharmacologic target for Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **2017**, *123*, 465–476.
9. Paul, S. M.; Doherty, J. J.; Robichaud, A. J.; Belfort, G. M.; Chow, B. Y.; Hammond, R. S.; Crawford, D. C.; Linsenbardt, A. J.; Shu, H. J.; Izumi, Y.; Mennerick, S. J.; Zorumski, C. F. The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 17290–300.
 10. Tian, G.; Kong, Q.; Lai, L.; Ray-Chaudhury, A.; Lin, C.-L. G. Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2010**, *113*, 978–989.
 11. Tanaka K.; Watase K.; Manabe T.; Yamada K.; Watanabe M.; Takahashi K.; Iwama H.; Nishikawa T.; Ichihara N.; Kikuchi T.; Okuyama S.; Kawashima N.; Hori M.; Takimoto M.; Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **1997**, *276*, 1699-702.
 12. Nishi, T.; Kondo, S.; Miyamoto, M.; Watanabe, S.; Hasegawa, S.; Kondo, S.; Yano, J.; Watanabe, E.; Ishi, T.; Yoshikawa, M.; Ando, H. K.; Farnaby, W.; Fujimoto, S.; Sunahara, E.; Ohori, M.; During, M. J.; Kuroita, T.; Koike, T. Soticlestat, a novel cholesterol 24-hydroxylase inhibitor shows a therapeutic potential for neural hyperexcitation in mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17081.
 13. Nishi, T.; Metcalf, C. S.; Fujimoto, S.; Hasegawa, S.; Miyamoto, M.; Sunahara, E.; Watanabe, S.; Kondo, S.; H. Steve White. Anticonvulsive properties of soticlestat, a novel cholesterol 24-hydroxylase inhibitor. *Epilepsia* **2022**, *63*, 1580–1590.
 14. Hahn, C. D.; Jiang, Y.; Villanueva, V.; Zolnowska, M.; Arkilo, D.; Hsiao, S.; Asgharnejad, M.; Dlugos, D. A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of soticlestat as adjunctive therapy in pediatric patients with Dravet

- syndrome or Lennox–Gastaut syndrome (ELEKTRA). *Epilepsia* **2022**, *63*, 2671–2683.
15. Zhao, M.; Ma, J.; Li, M.; Zhang, Y.; Jiang, B.; Zhao, X.; Huai, C.; Shen, L.; Zhang, N.; He, L.; Qin, S. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12808–12823.
 16. Haduch, A.; Daniel, W. A. The engagement of brain cytochrome P450 in the metabolism of endogenous neuroactive substrates: a possible role in mental disorders. *Drug Metab. Rev.* **2018**, *50*, 415–429.
 17. Mast, N.; Liao, W.-L.; Pikuleva, I. A.; Turko, I. V. Combined use of mass spectrometry and heterologous expression for identification of membrane-interacting peptides in cytochrome P450 46A1 and NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *483*, 81–89.
 18. Mast, N.; White, M. A.; Bjorkhem, I.; Johnson, E. F.; Stout, C. D.; Pikuleva, I. A. Crystal structures of substrate-bound and substrate-free cytochrome P450 46A1, the principal cholesterol hydroxylase in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 9546–9551.
 19. Šrejber, M.; Navrátilová, V.; Paloncýová, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Anzenbacher, P.; Otyepka, M. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: an overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *183*, 117–136.
 20. Mast, N.; Charvet, C.; Pikuleva, I. A.; Stout, C. D. Structural basis of drug binding to CYP46A1, an enzyme that controls cholesterol turnover in the brain. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31783–31795.
 21. Koike, T.; Yoshikawa, M.; Ando, H.; Farnaby, W.; Nishi, T.; Watanabe, E.; Yano, J.; Miyamoto, M.; Ishii, T.; Kuroita, T. Discovery of soticlestat, a potent and selective inhibitor for cholesterol 24-hydroxylase (CH24H). *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 12228–12244.
 22. Niwa, T.; Shiraga, T.; Takagi, A. Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP)

- 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1805–1808.
23. Zhang, W.; Ramamoorthy, Y.; Kilicarslan, T.; Nolte, H.; Tyndale, R. F.; Sellers, E. M. Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 314–318.
 24. Bunnage, M. E.; Chekler, E. L. P.; Jones, L. H. Target validation using chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 195–199.
 25. Swinney, D. C.; Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 507–519.
 26. Guengerich, F. P. Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10964–10976.
 27. Gibbs, M. A.; Hosea, N. A. Factors affecting the clinical development of cytochrome P450 3A substrates. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 969–984.
 28. Williams, P. A. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* **2004**, *305*, 683–686.
 29. Yano, J. K.; Wester, M. R.; Schoch, G. A.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38091–38094.
 30. Ekroos, M.; Sjogren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 13682–13687.
 31. Kuwabara, H.; Zhang, C.; Saitoh, H.; Sonoda, T. Pyridine derivative production method. *US 7723522 B2*.
 32. Yamamoto, K.; Ikeda, Y. Kinetic solubility and lipophilicity evaluation connecting formulation technology strategy perspective. *J. Drug. Deliv. Sci. Tec.* **2016**, *33*, 13–18.
 33. Leeson, P. D.; Springthorpe, B. The influence of drug-like concepts on decision-making

- in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881-890.
34. Hoveyda, H. R.; Fraser, G. L.; Roy, M.; Dutheuil, G.; Batt, F.; El Bousmaqui, M.; Korac, J.; Lenoir, F.; Lapin, A.; Noël, S.; Blanc, S. Discovery and optimization of novel antagonists to the human neurokinin-3 receptor for the treatment of sex-hormone disorders (part I). *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3060– 3082.
35. Hoveyda, H. R.; Fraser, G. L.; Dutheuil, G.; El Bousmaqui, M.; Korac, J.; Lenoir, F.; Lapin, A.; Noël, S. Optimization of novel antagonists to the neurokinin-3 receptor for the treatment of sex-hormone disorders (part II). *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 736– 740.
36. Leo, A.; Weininger, D. Clogp reference manual, Daylight version 4.9. <http://www.daylight.com/dayhtml/doc/clogp/>
37. Koike, T.; Yoshikawa, M.; Ando, H.; Miyamoto, M.; Nishi, T. Discovery of soticlestat (TAK-935), a first-in-class drug for antiseizure medication (ASM). *Medchem News* **2023**, *33*, 64–69.
38. Björkhem, I.; Lütjohann, D.; Diczfalussy, U.; Ståhle, L.; Ahlborg, G.; Wahren, J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1594–1600.
39. Ikeda, S.; Kajita, Y.; Miyamoto, M.; Matsumiya, K.; Ishii, T.; Nishi, T.; Gay, S. C.; Lane, W.; Constantinescu, C. C.; Alagille, D.; Papin, C.; Tamagnan, G.; Kuroita, T.; Koike, T. Design and synthesis of aryl-piperidine derivatives as potent and selective PET tracers for cholesterol 24-hydroxylase (CH24H). *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *240*, 114612.
40. Koike, T.; Constantinescu, C. C.; Ikeda, S.; Nishi, T.; Sunahara, E.; Miyamoto, M.; Cole, P.; Barret, O.; Alagille, D.; Papin, C.; Morley, T.; Fowles, K.; Seibyl, J.; Tamagnan, G.; Kuroita, T. Preclinical characterization of [¹⁸F]-T-008, a novel PET imaging radioligand for cholesterol 24-hydroxylase. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2022**, *49*, 1148–1156.

41. Constantinescu, C.; Brown, T.; Wang, S.; Yin, W.; Barret, O.; Jennings, D.; Tauscher, J. Clinical characterization of [^{18}F]T-008, a cholesterol 24-hydroxylase PET ligand: dosimetry, kinetic modeling, variability, and soticlestat occupancy. *J. Nucl. Med.* **2023**, *64*, 1972–197.
42. Haider, A.; Zhao, C.; Wang, L.; Xiao, Z.; Rong, J.; Xia, X.; Chen, Z.; Pfister, S. K.; Mast, N.; Eylan Yutuc; Chen, J.; Li, Y.; Shao, T.; Warnock, G. I.; Dawoud, A.; Connors, T. R.; Oakley, D. H.; Wei, H.; Wang, J.; Zheng, Z. Assessment of cholesterol homeostasis in the living human brain. *Sci. Transl. Med.* **2022**, *14*, eadc9967.
43. White, M. A.; Mast, N.; Bjorkhem, I.; Johnson, E. F.; Stout, C. D.; Pikuleva, I. A. Use of complementary cation and anion heavy-atom salt derivatives to solve the structure of cytochrome P450 46A1. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2008**, *64*, 487–495.
44. Otwinowski, Z.; Minor, W. [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
45. Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: An automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022–1025.
46. Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760–763.
47. Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355–367.
48. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
49. Chen, V. B.; Arendall, W. B., 3rd; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol.*

Crystallogr. **2010**, *66*, 12–21.

50. Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **1995**, *8*, 127–134.

論文目録

1. **Discovery of Novel 3-Piperidinyl Pyridine Derivatives as Highly Potent and Selective Cholesterol 24-Hydroxylase (CH24H) Inhibitors**

Kajita, Y.; Ikeda, S.; Yoshikawa, M.; Fukuda, H.; Watanabe, E.; Yano, J.; Lane, W.; Miyamoto, M.; Ishii, T.; Nishi, T.; Koike, T. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 3343–3358.

謝辞

本論文の発表および執筆にあたり、終始ご懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました北里大学薬学部生命薬化学教室教授 藤井秀明博士に深く感謝いたします。また、本論文をまとめるにあたり、適切なる御指導と御助言を賜りました北里大学薬学部薬品製造化学教室教授 長光亨博士、北里大学薬学部医薬品化学教室教授 牧野一石博士、ならびに北里大学大村智記念研究所生物有機化学研究室教授 廣瀬友靖博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいました元武田薬品工業株式会社医薬研究本部リサーチマネージャー 黒板孝信博士に深謝申し上げます。

本研究は終始、ニューロサイエンス創薬ユニット NCE プロダクション研究所 (NCEL) ディレクター 小池竜樹博士の御指導のもと行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の推進にあたり、御協力頂きましたすべての方々に感謝いたします。特に、多大なる御支援を賜りました共同研究者の方々に深謝いたします。ニューロサイエンス創薬ユニット NCEL 主席研究員 池田周平博士、ニューロサイエンス創薬ユニット NCEL 主席研究員 吉川真人博士、リサーチストラテジー&オペレーション課長代理 福田広美氏には化合物合成や分子設計において有益な御討論ならびに御協力を頂きました。元医薬研究本部主任研究員 渡辺悦郎博士、元武田カリフォルニア社 Jason K. Yano 博士、Weston Lane 博士 には本研究の X 線共結晶構造解析に御尽力を頂きました。ニューロサイエンス創薬ユニット主席部員 宮本真紀博士には本研究の薬物動態試験を御担当頂きました。元医薬研究本部主任研究員 石井剛博士には本研究の化合物スクリーニングを御担当頂きました。元医薬研究本部主任研究員 西俊哉獣医師には本研究の薬理研究の設計ならびに実施について主担いただきました。

本論文を作成するにあたり、御助言と御配慮を賜りましたニューロサイエンス創薬ユニット NCEL 所長 一川隆史博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文の作成に際して、終始温かく応援し支えてくれた家族に心から感謝いたします。