

博士論文

新規テルアリアル型およびクロメノピリジン型リードスルー誘導薬 の創製研究

北里大学大学院薬学研究科

河合 翔太

目次

略語表	3
緒言	5
第一章 研究の背景および目的	7
第一節 希少疾患とナンセンス変異	7
第二節 真核生物の翻訳終結機構とリードスルー	9
第三節 ムコ多糖症 I 型とその治療法	15
第四節 研究の目的および方針	17
第二章 テルアリアル型リードスルー誘導薬の創製	19
第一節 はじめに	19
第二節 設計	20
第三節 化合物の合成ルート	21
第四節 化合物の合成	23
第五節 構造活性相関	37
第六節 KY-516 の生物学的評価	44
第七節 小括	46
第三章 クロメノピリジン型リードスルー誘導薬の創製	48
第一節 はじめに	48
第二節 設計	50
第三節 化合物の合成ルート	51
第四節 化合物の合成	52
第五節 構造活性相関	62
第六節 KY-640 の生物学的評価	68
第七節 小括	71
総括	73

実験の部	76
第二章に関する実験	76
第三章に関する実験	115
引用文献	155
論文目録	160
謝 辞	161

略語表

本論文中における試薬, 用語などの略語を以下に示す.

ABCE1	ATP-binding cassette sub-family E member 1
Ac	acetyl
aq.	aqueous
AUC	area under the curve
BID	bis in die
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Bu	butyl
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cLogP	calculated LogP
cLogD _{7.0}	calculated LogD _{7.0}
dba	dibenzylideneacetone
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPPA	diphenylphosphoryl azide
DS	dermatan sulfate
EC ₂₀₀	200% effective concentration
EDC·HCl	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eRF	eukaryotic translation release factor
Et	ethyl
FGF-2	fibroblast growth factor-2
GAG	glycosaminoglycan
GTP	guanosine triphosphate
GTPase	guanosine triphosphatase
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HS	heparan sulfate
<i>i</i> -	iso-
IDUA	α -L-iduronidase

IPA	isopropanol
<i>m</i> -	meta-
Me	methyl
MEM	minimal essential medium
mRNA	messenger ribonucleic acid
Ms	methanesulfonyl
<i>n</i> -	normal-
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NMD	nonsense mediated mRNA decay
<i>o</i> -	ortho-
<i>p</i> -	para-
PABPC1	poly(A) binding protein cytoplasmic 1
Ph	phenyl
p.o.	per os
Pr	propyl
PK	pharmacokinetics
PTC	premature termination codon
quant.	quantitative
r.t.	room temperature
SD	Sprague-Dawley
<i>t</i> -, <i>tert</i> -	tertiary-
TBAH	tetra- <i>n</i> -butylammonium hydroxide
TBHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
THF	tetrahydrofuran
Tf	trifluoromethylsulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
TFAA	trifluoroacetic anhydride
TLC	thin-layer chromatography
tRNA	transfer ribonucleic acid
Ts	tosyl
y	yield

緒 言

いまだ有効な治療法がない疾患に対する医療ニーズを充たすため、それに応える薬剤の開発が求められ続けている。しかしながら、希少疾患に対する治療薬の研究開発については、患者数が少ない、研究開発に多額の費用をかけにくい、科学的知見が欠如しているなどの理由から開発が進みにくい傾向にある。そのため希少疾患の治療は選択肢が限られており、十分な治療を受けることができないことも多く、新たな治療薬の開発が必要とされている。

希少疾患は、その約 7 割が遺伝性疾患であり、生後早くに発症することから、治療を必要とする重度の患者は小児、特に新生児であることが多い^{1,2)}。そのような小児の希少疾患の中でも、ムコ多糖症はライソゾーム酵素の先天性欠損もしくは活性低下が原因で発症する先天性代謝異常症の一種である。ムコ多糖症は 7 つの臨床型に分類され、その中でもムコ多糖症 I 型はグリコサミノグリカン (GAG) を分解する酵素である α -L-iduronidase (IDUA) が欠損することにより、ライソゾーム内にグリコサミノグリカンが蓄積することで全身性の症状を呈する³⁾。重症型と軽症型に大別され、Hurler 症候群と呼ばれる重症型では残存酵素活性は健常人の 1% 以下であり、生後早期に発症し、中枢神経系も含めた多臓器障害を伴い、10 歳前後で死亡する、非常に重篤な疾患である^{4,5)}。

現在、ムコ多糖症 I 型に対する治療法として、欠損した酵素を補充する酵素補充療法と造血幹細胞移植が用いられている。ムコ多糖症 I 型に対する酵素補充療法は欧米では 2003 年に、わが国では 2006 年に承認され、歩行障害や肺機能障害の進行を抑制させることが確認されているが、中枢神経症状と骨症状の改善は期待できない^{6,7)}。また、造血幹細胞移植は 1980 年代から実施されており、生命予後を改善する有効な治療法の一つとして確立しているが、適切なドナーの確保が困難な場合がある、また、生着不全、移植片対宿主病などの重篤な副作用が起こる可能性があるなど課題も存在する⁸⁾。

ムコ多糖症 I 型は、主に IDUA 遺伝子のナンセンス変異により、酵素が欠損し、発症する。そのようなナンセンス変異型疾患の治療法として、近年、リードスルー誘導薬が注目されている。ナンセンス変異が原因で発症する疾患においては、タンパク質の翻訳過程にて、遺伝子のナンセンス変異により正常終止コドンの上流に新たに終止コドンが出現する。そのような未熟終止コドン (PTC) と呼ばれる終止コドンを含む mRNA は翻訳が早期に終結してしまうことで、正常のものより短く、機能を有さない不安定なタンパク質が生成する。ムコ多糖症や筋ジストロフィーなどナンセンス変異により発症する疾患においては、生成した不安定なタンパク質が分解されてしまい機能せず、疾患の

原因になり得る。リードスルーを誘導する薬剤はそのような未熟終止コドンを読み飛ばすことで、完全長のタンパク質の発現を回復させる。リードスルー誘導薬として唯一 **ataluren** が欧州にてデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対して条件付き承認されているが、米国では承認されていない (図 1)。また、ムコ多糖症 I 型など他の疾患においても開発が中止されており、より明確に薬効を示すリードスルー誘導薬が求められている。そこで本研究では、新規リードスルー誘導薬の創製を目指し、**ataluren** のテルアリール構造および、別骨格として特許報告されている三環性構造を基に種々構造変換を行い、それぞれ独自のリード化合物を取得し、合成展開を行った。その結果、優れたリードスルー誘導作用を有するテルアリール型誘導体 **KY-516** およびクロメノピリジン型誘導体 **KY-640** を見出した (図 1)。

本論文では、第一章で研究の背景および方針について、第二章でテルアリール型誘導体について、第三章でクロメノピリジン型誘導体について述べる。

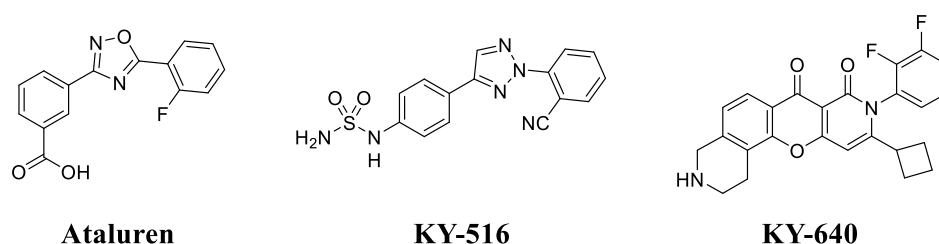


図 1. Ataluren, KY-516 および KY-640 の構造式

第一章 研究の背景および目的

第一節 希少疾患とナンセンス変異

希少疾患とは、患者数が極めて少ない疾患を指す。疾患 1 種類当たりの患者数は少ないが、希少疾患自体は約 7,000 種類存在し、世界全体での人口有病率は 3.5–5.9% という推定値も報告されている¹⁾。これは、ある時点において全世界で 2 億 6300 万～4 億 4600 万人が罹患していることに相当する。各疾患の有病率が低いため、疾患の全体像が明らかなものは僅かであり、発症機序などに対する知見も乏しい。そのため、有効な治療法が限られている疾患がほとんどで、約 95% の疾患に未だ治療薬が存在していない²⁾。わが国の状況に目を向けると、希少疾患用医薬品や医療機器の研究開発を促進するため、1993 年に薬事法を改定する形で希少疾病用医薬品指定制度が導入された。この制度に基づき、患者数 5 万人未満の疾患が希少疾患と定義され、助成金の交付、研究開発に関する指導・助言、税制措置上の優遇措置、優先審査など、さまざまな支援が行われてきたが、欧米に比べて日本の希少疾患治療薬の開発は遅れている^{10,11)}。このように、希少疾患全体の患者数は非常に多いが、各疾患の治療満足度は未だ充分とは言えず、多くの希少疾患において、新たな治療薬の開発が求められている。

約 7,000 種存在すると言われている希少疾患の約 7 割が遺伝性疾患であり、更にそのうちの約 11% がナンセンス変異に由来するとされている¹²⁾。例えば、最も良く知られた遺伝性疾患のひとつである DMD や嚢胞性線維症では、それぞれ患者の 10–20%、約 10% が原因遺伝子にナンセンス変異を有している^{13,14)}。このような疾患においてはナンセンス変異により、正常終止コドンの上流に PTC と呼ばれる異常な終止コドンが挿入される。PTC を含む異常な mRNA は翻訳されると、正常のものより短いタンパク質が生じる。一般的にそのようなタンパク質は不安定で本来の機能を有さないため、疾患の原因になり得る。また、そのような異常なタンパク質の翻訳を防ぐため、真核生物にはナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) と呼ばれる、PTC を含む mRNA を分解、除去する mRNA 品質管理機構が存在する¹⁵⁾。しかし、NMD の効率は変異の種類、組織、個人によっても異なり、PTC を含む全ての転写産物を分解するわけではないため、一部は翻訳されて生体にとって有害となることがある^{15,16)}。例えば、優性遺伝型の希少疾患である β -サラセミアは、NMD を受けないヒト β -グロビン mRNA の PTC により引き起こされ、翻訳される正常より短いポリペプチドがヘモグロビンの構造と機能に影響を与えることが報告されている¹⁶⁾。上述したように PTC に起因する疾患

は多く、世界中で何百万人もの患者が存在している。次章で述べるリードスルー誘導薬をはじめとするナンセンス変異をターゲットとする治療戦略が、様々な遺伝性疾患に効果をもたらす可能性がある。

第二節 真核生物の翻訳終結機構とリードスルー

翻訳の終結はリボソームのアミノアシル部位(A 部位)が mRNA 上の終止コドン(UAA, UAG, UGA)に占有された時に起こる(図 2). ポリペプチド鎖伸長段階においては A 部位にアミノアシル tRNA が結合するが, 翻訳終結段階においてはアミノアシル tRNA の代わりに翻訳終結因子(eRF1)が終始コドンに対応する形で結合する. eRF1 はアミノアシル tRNA とよく似た形と大きさの三次元構造を持っているため, リボソーム A 部位に結合が可能であり, リボソームのペプチジルトランスフェラーゼ活性中心でのペプチジル tRNA の加水分解を誘導し, ポリペプチド鎖の放出, 翻訳の終結を引き起こす^{17,18)}. この時, eRF1 は別の終結因子である eRF3 と結合し, それを活性化する. eRF3 は eRF1 依存的な GTPase であり, eRF1-eRF3-GTP の三者複合体を形成している¹⁹⁾. eRF3 による GTP の加水分解が eRF1 のコンフォメーション変化を引き起こし, eRF1 のペプチジルトランスフェラーゼ中心への移動が起こり, ペプチド鎖が放出され, 翻訳が終結する^{20,21)}. 正常な翻訳終結においては, mRNA の 3' 末端に結合している cytoplasmic 1 poly(A) binding protein (PABPC1) が eRF3 と相互作用することで, eRF1-eRF3 複合体のリボソームへの結合が促進されている²²⁾. 終始コドンがリボソーム A 部位に入る際, 終始コドンに相補的な塩基対結合を形成可能な tRNA は存在しないため, 3 種類の終止コドンは全て eRF1 により, 強固に認識される. このような mRNA と翻訳終結因子を含む複合体の形成により, もともと存在する正常な終始コドンにおいて, 正しく翻訳が終結しない, つまり終止コドンを超えて翻訳が続く確率は 0.1% 以下であり, 翻訳終結機構は高度に正確なプロセスとなっている²³⁾.

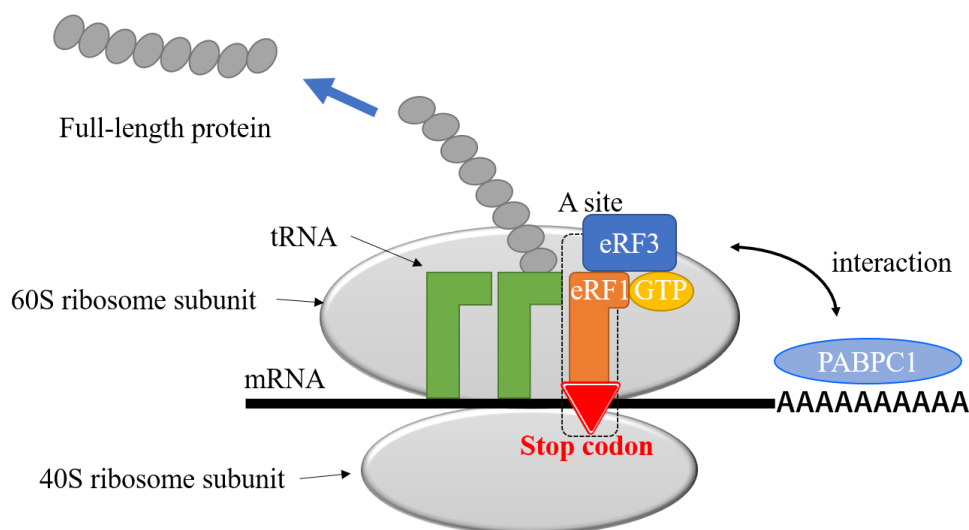


図 2. 真核生物の翻訳終結機構

一方、点変異であるナンセンス変異が起こると、アミノ酸をコードするコドンが終止コドンに変化し、正常な終止コドンより上流に PTC が出現することになる。そのようなナンセンス変異が関与する疾患の治療法として、近年、PTC を読み飛ばし、完全長のタンパク質を発現させる、リードスルーと呼ばれるメカニズムが注目されている。リードスルーメカニズムでは、PTC の 3 塩基の内 2 塩基が相補的な塩基対を形成可能な near-cognate tRNA が eRF1 との競合に打ち勝ち、終止コドンに結合する²⁴⁾ (図 3)。この結果、PTC において 1 アミノ酸残基が挿入されることになり、本来の終止コドンの位置まで翻訳が続行される²⁵⁾。PTC は mRNA の 3' 末端周辺に存在せず、より上流に存在するため、先に述べた PABPC1 と eRF3 の相互作用が起こらず、終止コドンのリードスルーは正常終止コドンより PTC で起こりやすい。リードスルーが起こった結果、near-cognate tRNA の種類により、PTC の位置において様々なアミノ酸が組み込まれる可能性があるが、挿入されるアミノ酸の出現頻度は PTC の種類や周辺配列、near-cognate tRNA の存在量など多くの要因により影響を受けると考えられている²⁶⁾。触媒中心のようなタンパク質の機能に必須なアミノ酸が変異していない限り、PTC の抑制、リードスルー誘導は欠損したタンパク質の完全長での産生を回復させ、タンパク質機能を少なくとも一部は回復させるため、リードスルー誘導薬は PTC が原因の遺伝性疾患の新たな治療法として期待されている。

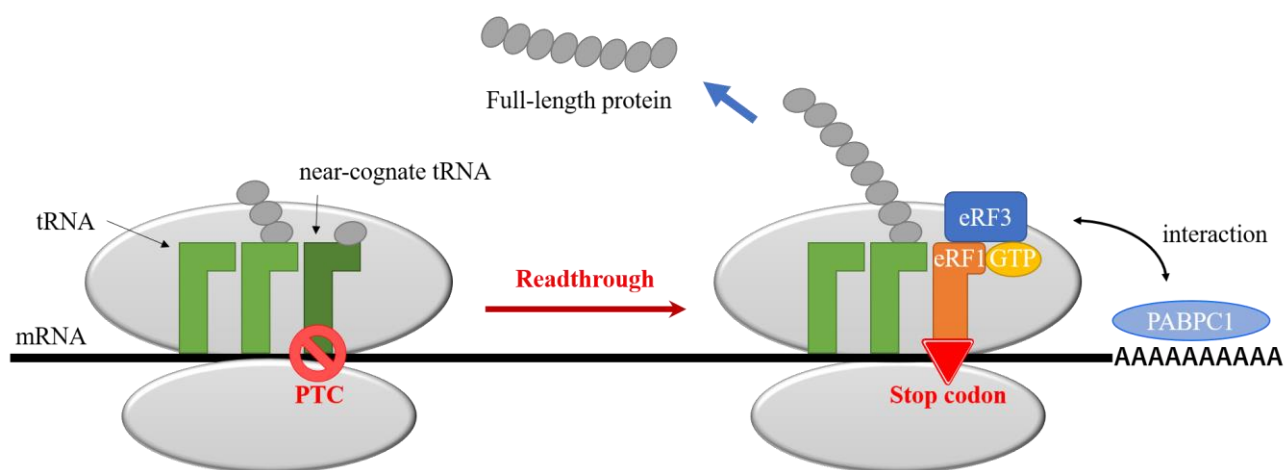


図 3. リードスルーによる完全長タンパク質の発現

これまでにリードスルー誘導作用を示す低分子化合物が数多く報告されている(図 4)．アミノグリコシド系抗生物質誘導体はその代表例であり、古くからそのリードスルー誘導作用が研究されてきた．1985 年、Mogg らはアミノグリコシド系抗生物質である G418(図 4)あるいは paromomycin(図 4)を処置することで、アフリカミドリザル由来の細胞である COS-7 細胞において PTC のリードスルーが誘導されることを初めて報告した²⁷⁾．この報告では TAG 終止コドンに配列中に含むクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を COS-7 細胞に遺伝子導入しており、CAT 活性を測定することでアミノグリコシド誘導体のリードスルー誘導活性を評価している．G418 処置により、CAT 活性は野生型の 19.6%まで回復しており、リードスルー現象の治療上の可能性を初めて哺乳類由来の細胞で示した．この報告以来、疾患治療への応用のためにアミノグリコシド系抗生物質のリードスルー誘導作用は多くの細胞系、遺伝性疾患モデル動物あるいは臨床試験において検討されてきたが、遺伝性疾患に対する評価系を用いた最初の報告は嚢胞性繊維症気管支上皮細胞株を用いたものであった^{28,29)}．嚢胞性繊維症は嚢胞性繊維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)をコードする遺伝子の変異により発症する常染色体劣性遺伝疾患である．CFTR は全身の上皮膜細胞に発現している塩化物イオンチャネルであり、イオンと水の輸送を調節している．CFTR の機能低下の結果、消化管や気道の分泌液が粘稠となり、腭外分泌異常による脂肪吸収不全、栄養障害が起こる．また、気道分泌の異常は排痰困難・難治性気道感染の原因となり、慢性呼吸不全に至る．1997 年、Bedwell らはナンセンス変異を有する嚢胞性繊維症気管支上皮細胞株において、G418 あるいは gentamicin(図 4)処置が全長 CFTR の発現を増加させ、イオンチャネル活性を回復させることを報告している²⁹⁾．嚢胞性繊維症におけるアミノグリコシドの効果は動物モデルにおいても確認され³⁰⁾、ヒトにおいても検討されているが³¹⁾、アミノグリコシド系抗生物質には聴覚毒性と腎毒性があるため、遺伝性疾患患者への長期間の投与は困難である^{32,33)}．そのため、アミノグリコシド構造を基にリードスルー活性の増強と毒性の軽減を目指した創薬研究が実施されている．その中の一つに NB54(図 4)などの paromomycin 誘導体がある．NB54 は嚢胞性線維症などの in vitro 評価系において gentamicin よりも優れたリードスルー誘導作用を示し、マウスにおける急性毒性試験等において gentamicin よりもはるかに毒性が低いことが報告されている³⁴⁾．さらに後継の化合物が報告されており、ELX-02(NB124)(図 4)は CFTR G542X トランスジェニックマウスの CFTR 電流値を対照

群に比べ 4.6 倍増加させ、CFTR 活性を野生型の 12.6%まで回復させた³⁵⁾。しかしながら、この化合物は嚢胞性繊維症の適応で第2相臨床試験まで進んだが、有意な薬効を示すことができず、開発中止となっている。

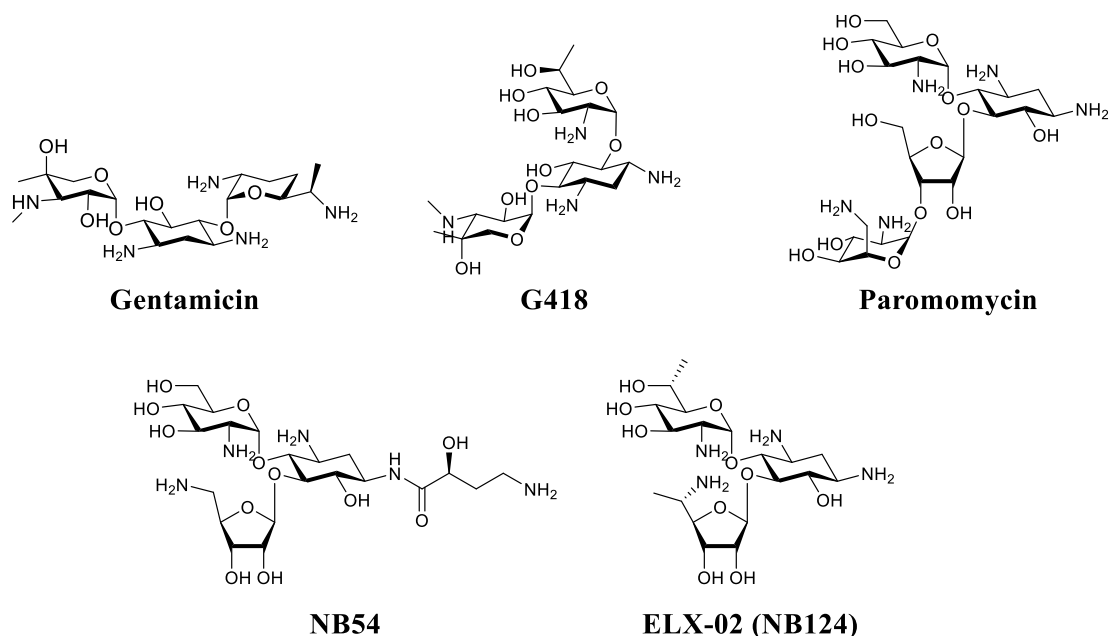


図 4. アミノグリコシド型リードスルー誘導薬

アミノグリコシド骨格を有さないリードスルー誘導化合物の探索もこれまでに精力的に行われてきた(図 5)。その代表的な化合物として挙げられる *ataluren*(図 5)は PTC Therapeutics 社が 800,000 化合物のライブラリーからハイスループットスクリーニングにより見出した低分子化合物である³⁶⁾。2007 年、DMD のモデルマウスである *mdx* マウスに対する 4 週間の投与試験において前脛骨筋、横隔膜、心筋におけるジストロフィンの発現量の回復が報告され、その発現量は野生型マウスの約 20–25%であった³⁶⁾。その後、DMD を対象とした臨床試験が開始された。後期第 2 相臨床試験において、主要評価項目である 6 分間歩行距離は患者群全体では有意な改善は認められなかったが、ベースラインの 6 分間歩行距離が 350 メートル未満のより重症患者のデータをレトロスペクティブ解析したところ、*ataluren* 治療群の 6 分間歩行距離改善はプラセボを上回った。またこの治験において、薬剤関連有害事象の発生頻度はプラセボと差がなかった³⁷⁾。以上の結果を受けて、欧州で本剤は 2014 年に条件付きで承認されたが、米国では承認されていない。また、*ataluren* は、嚢胞性線維症、血友病、ムコ多糖症などの治療薬としても開発が進められていたが、有効性の欠如や臨床試験への患者の組み入れの問題により、開発は中止されている。

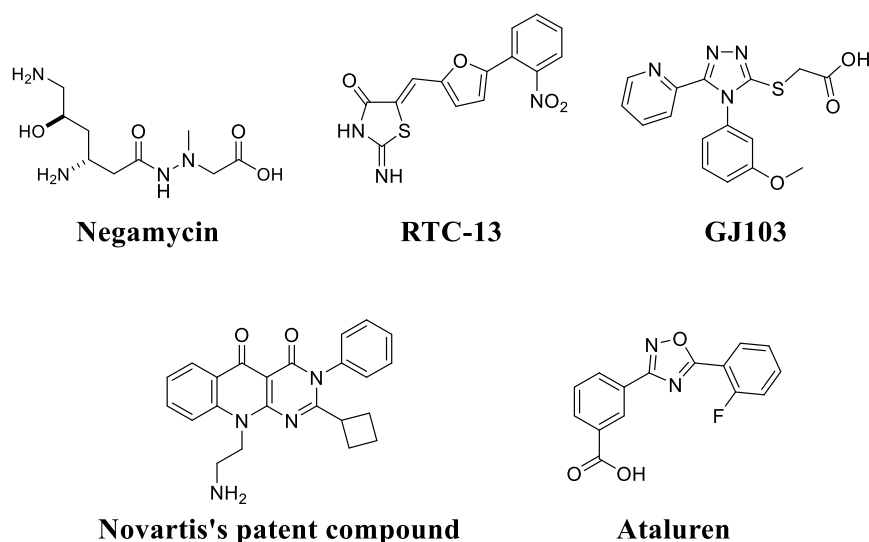


図 5. 非アミノグリコシド型リードスルー誘導薬

Ataluren は前述の臨床試験結果に見られるように、アミノグリコシド型化合物と異なり、毒性の懸念が少ないことが魅力的ではあるが、明確な薬効を示せていない例も散見される³⁸⁻⁴⁰⁾。この原因として次の可能性が考えられる。一つ目は、**ataluren** のリードスルー効果が弱く、各疾患において十分な薬効を示さなかった可能性がある。また、**ataluren** はいくつかの *in vitro* 試験でベルシェイプの濃度反応曲線を示すことが報告されている。これは狭い用量範囲でのみ治療効果を示すことを示しており、この現象は **DMD** 患者から採取した培養筋芽細胞、あるいは **DMD** 患者に対する臨床試験でも確認されている^{36,37,41)}。暴露量、投与間隔などが適切でなかった可能性もある。二つ目として、ナンセンス変異を有する疾患遺伝子の配列の影響が考えられる。リードスルー誘導作用の効率は **PTC** の種類やその周辺配列によっても影響を受けることが知られており、同じ疾患でもナンセンス変異の種類が異なれば、化合物の有効性に影響を与えることが考えられる。例としてアミノグリコシド型化合物は **UGA** の終止コドンに対して効率良くリードスルーを誘導することが知られており (**UGA** > **UAG** > **UAA**)、さらに **UGA** 終止コドンの次の塩基が **C** の場合 (**UGA-C**) が最も効率が高い^{42,43)}。**Ataluren** も同様の傾向があることが報告されているが、**UGA-G** の配列に対しても効率良くリードスルーを起こすことが報告されている³⁶⁾。三つ目として、対象疾患の選択の問題が考えられる。**Ataluren** は **DMD** 患者に対する臨床試験で主要評価項目への効果が認められなかったが、この疾患はジストロフィンと呼ばれる筋肉の構造を保持するのに必須な構成タンパク質が欠損する疾患である。その症状改善には少なくとも健常人の 30% のタンパク質発現が必要であると考えられている⁴⁴⁾。**PTC** に対して **eRF1** が結合し、翻訳が終結するという正常な翻訳終結機構を抑制するリードス

ルーのメカニズムでは、その性質上、ハードルが高く、ataluren の薬効が不十分であった可能性がある。

このように報告されているリードスルー誘導薬は安全性に問題があるか、ヒトにおいて明確な薬効を示すことができておらず、薬効、安全性に優れた新たなリードスルー誘導薬の開発が望まれている。さらにリードスルーというメカニズムには配列特異性があることから、対象とするナンセンス変異に対して最も有効な薬剤候補を探索する必要がある。

第三節 ムコ多糖症 I 型とその治療法

リードスルー誘導作用による薬剤の有効性を決定する重要な要因の一つに、症状の改善に必要な欠損タンパク質の発現量の閾値が挙げられる。この閾値は発現させる欠損タンパク質が酵素であるか、構造タンパク質であるか等、種類により異なり、疾患によって大きく異なる可能性がある。例えばイオンチャネルであり、膜タンパク質として存在する CFTR が欠損する嚢胞性繊維症の改善には健常人の CFTR 活性の 30-35%が必要であり⁴⁵⁾、先に述べたように筋肉の構造を保つのに必須な構成タンパク質であるジストロフィンが欠損する DMD の症状改善には健常人の 30%程が必要であるとされている⁴⁴⁾。一方、ライソゾーム酵素が欠損する疾患であるムコ多糖症 I 型 Hurler 症候群の場合には酵素活性が健常人に対して 1%程度の回復でも症状の改善が見込めると、その軽症型の残存酵素活性等を基に推定されている^{4,46,47)}。

ムコ多糖症 I 型は GAG を分解するライソゾーム酵素の 1 つである IDUA の欠損により、GAG が異常に蓄積して複数の臓器が障害される常染色体劣性遺伝性疾患である^{3,48)}。GAG は、硫酸基が付加したアミノ糖(ガラクトサミン、グルコサミン)とウロン酸(グルクロン酸、イズロン酸)またはガラクトースが結合した 2 糖の繰り返し構造からなる直鎖状の多糖類である。GAG の多くが生体内ではコアタンパク質に結合し、プロテオグリカンの構成成分として全身に広く存在しており、骨、軟骨、皮膚などで組織の支持、潤滑機能を担っている他、細胞表面で様々な生理活性分子と相互作用し、生理機能を調節している⁴⁹⁾。ムコ多糖症 I 型で異常蓄積する GAG には、デルマタン硫酸(DS)とヘパラン硫酸(HS)があり⁴⁸⁾、特に HS の異常蓄積は形態形成と神経発生に関与する塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)との相互作用を介して、ムコ多糖症 I 型の神経障害の原因と推測されている⁵⁰⁾。

ムコ多糖症 I 型は、発症年齢、進行速度、重症度(中枢神経症状の有無)などに基づいて、重症型の Hurler 症候群、中間型の Hurler-Scheie 症候群および軽症型の Scheie 症候群の 3 つに分類されてきた。しかし、その臨床症状には多様性や連続性があるため、早期に症状が顕在化し、中枢神経系を含めた進行性の多臓器障害を伴い、10 歳前後には心不全や呼吸器不全で死亡する重症型と、中枢神経系を含めた多臓器障害がない、もしくは軽度で進行が緩徐な軽症型に現在では大別されている^{3,48)}。主に重症型で見られる症状としては、特異顔貌、鼠径ヘルニア、骨変形、関節拘縮、精神発達遅滞、角膜混濁、反復性中耳炎、心弁膜症など多岐にわたる^{3,48)}。

現在、臨床的に用いられているムコ多糖症 I 型の治療法は個々の症状に対する対症療法と、病因に対する治療法である造血幹細胞移植と酵素補充療法に分けられる。造血幹細胞移植は、生

着後のドナー細胞から永続的な酵素供給が可能であるため、単回で治療が完了し、関節拘縮、心肺機能、特異顔貌などに対して優れた治療効果を期待できる。後述する酵素補充療法と異なり、中枢神経症状の改善も期待できるが、移植を早期に行う必要があり、移植片対宿主病などの重篤な副作用のリスクも存在する。また、骨症状や角膜障害、心弁膜症に対しては効果が無いが、軽微である^{3,48,51)}。

酵素補充療法は、遺伝子組換え技術により作製されたライソゾーム酵素を点滴静注により投与することで、欠損している酵素を補充する治療法である。現在、わが国ではムコ多糖症Ⅰ型に対する酵素製剤として *laronidase* が承認されている。1週間に1回、酵素製剤を3-4時間かけて点滴静注することにより、肝脾腫、呼吸機能、歩行障害、関節拘縮などの改善が期待できるが、酵素が到達しにくい骨や中枢神経系の症状に対しては無効である^{3,48,51)}。

このようにムコ多糖症Ⅰ型に対する治療法にはそれぞれ課題が存在しており、経口製剤や中枢症状にも有効な薬など、新たなタイプの根本的治療薬の開発が求められている。

ムコ多糖症Ⅰ型の患者においては、*IDUA* 変異遺伝子の解析において、2種類のナンセンス変異 **W402X** と **Q70X** が変異遺伝子の約 70%を占めることが知られている⁵²⁾。さらにナンセンス変異の割合は軽症型よりも重症型患者で高く、遺伝子型と表現型の相関が報告されており、*IDUA* 遺伝子のナンセンス変異がムコ多糖症Ⅰ型の重症化に大きく関与している⁵³⁾。従ってナンセンス変異により欠損した酵素活性を回復させるリードスルー作用がムコ多糖症Ⅰ型に対して有効であると考えられる。

第四節 研究の目的および方針

ムコ多糖症 I 型は重篤な疾患であるが、非常に患者数の少ない希少疾患であることもあり、治療薬の開発が進んでおらず、現在、低分子治療薬は存在しない。また、酵素補充療法、造血幹細胞移植が治療法として承認されているが、骨症状や中枢神経系症状への効果は充分でなく、侵襲性も高いため、全身に作用可能な低分子治療薬の開発が望まれている。そこで、ムコ多糖症 I 型に対して有効な、新規リードスルー誘導薬の創製を目指して研究を実施した。

図 4.5 に示したようにこれまでのリードスルー誘導薬は、アミノグリコシド誘導体と非アミノグリコシド化合物に大別され、構造的特徴が大きく異なる。本研究では経口吸収性に優れた化合物を取得するため、水素結合性置換基の少ない非アミノグリコシド構造に注目した。現在、リードスルー誘導薬として唯一、臨床使用されている *ataluren* など、非アミノグリコシド構造を有するリードスルー誘導化合物はその構造的特徴として、芳香環から成る疎水性部位とその末端にカルボキシ基やアミノ基など極性基を有している。

本研究では、これら既報のリードスルー誘導薬のファーマコフォアを参考に構造設計を行い、独自のリード化合物を取得し、強力な活性を有する新規構造のリードスルー誘導薬の設計を目指した(図 6)。具体的には *ataluren* のテルアリアル構造および特許にて複数の評価系でリードスルー誘導作用が報告されているノバルティス社の三環性化合物を基にそれぞれ構造展開を行い、独自構造の取得を目指した。リードスルー誘導薬として唯一臨床使用されている *ataluren* は DMD に対して条件付き承認を受けているが、その他の疾患については開発が中止されている。著者らはこの理由として、*ataluren* の薬効が不十分であるため、または *ataluren* のリードスルー誘導作用に疾患原因遺伝子に対する配列特異性があるため、という仮説を立てた。そこで本研究では 2 種類の構造系で先行化合物より強力なリードスルー誘導作用を有する化合物を見出し、構造系ごとの配列特異性を明らかにすることを目的とした。

非アミノグリコシド型リードスルー誘導薬

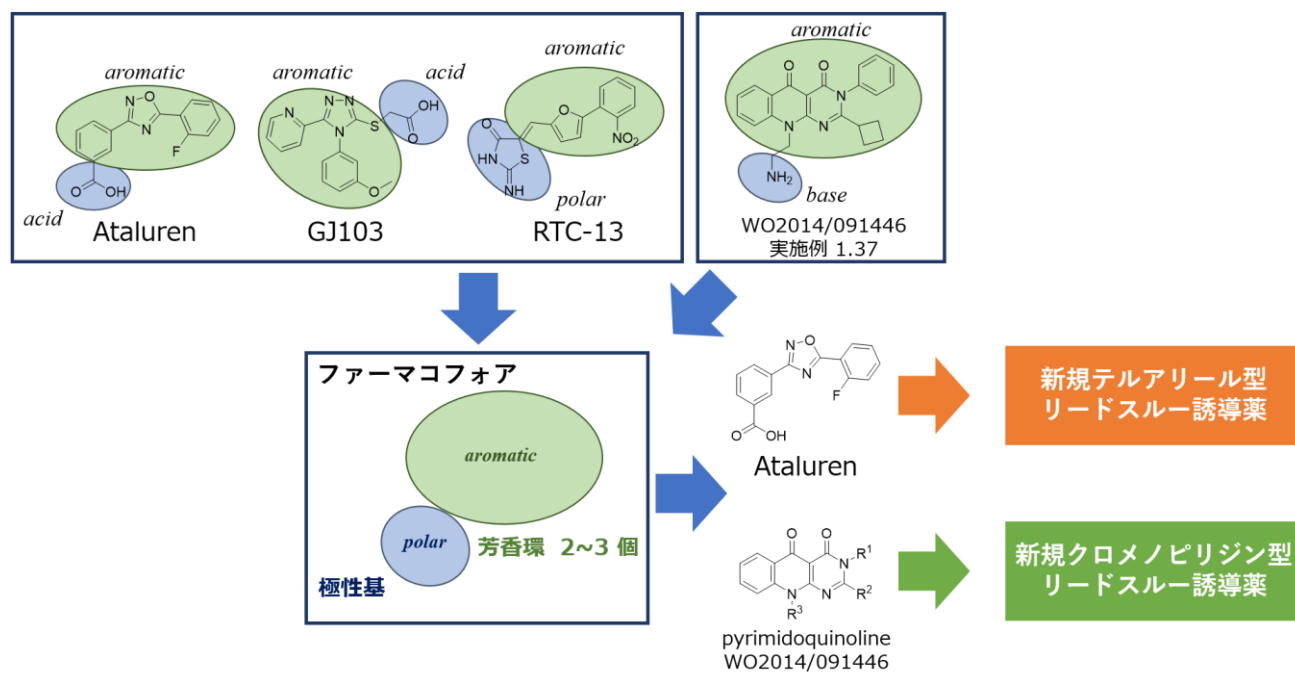


図 6. リードスルー誘導薬の設計

第二章 テルアリアル型リードスルー誘導薬の創製

第一節 はじめに

これまで報告されてきた非アミノグリコシド型リードスルー誘導薬は、その構造的特徴として、芳香環から成る疎水性部位と、その末端にカルボキシ基やアミノ基など極性基を有している。疎水性部位は2から3の芳香環から成る比較的フラットな構造をしており、極性部位は酸性官能基以外も許容されることがわかる。これらの化合物の生体内標的は明らかになっていないが、ある程度共通した構造的特徴を有していることから、同じ標的に作用している可能性が考えられた。そこで、本研究では既報の化合物のファーマコフォアを基に構造設計を行うことにした。

リードスルー誘導薬として唯一、ataluren が DMD の適応で欧州医薬品庁に条件付き承認を受けているが、アメリカ食品医薬品局には承認されていない。これは臨床試験において、明瞭な効果を示さなかったためであり、薬効の不足が ataluren の課題と考えられた。そこで本研究では ataluren のテルアリアル構造を基に構造展開を行い、より強力なリードスルー誘導活性を有する独自構造の化合物の取得を目指した。

第二節 設計

Ataluren からの合成展開概略を図 7 に示す. 図 4,5 に示したようにこれまでに報告されているリードスルー誘導薬の構造を概観すると, 極性部位は酸性官能基以外も許容されることから, ataluren のカルボキシ基は活性に必須ではないと考えられた. カルボン酸構造は高極性であるため, 化合物の水溶性向上には有効であるが, 高極性であるが故, 膜透過性は低くなりやすいことが知られている⁵⁴⁾. また, 薬物代謝的にもグルクロン酸抱合を受け, 反応性代謝物を生じる場合があるなど懸念がある⁵⁵⁾. そこで, ataluren のカルボキシ基を他の酸性生物学的等価基や中性の置換基への変換を検討した. また, ataluren の生物学的標的が不明であるため, 鎖状や環状など多様な置換基への変換を検討した.

また, 化合物の芳香族環から成る疎水性部分は既報の化合物の構造を概観すると, 極性部位との相対的な位置関係についてはある程度柔軟に許容されると考えられた. そこで, 芳香環に付加する極性基の位置についても検討を行うことにした. 加えて, テルアリール構造を形成する芳香環についても, ヘテロ環など種々検討を行うことにし, 特に B 環については, ノバルティス社特許化合物のカルボニル基や RTC-13 のフラン環酸素原子などに見られるように水素結合受容性基として働いている可能性が考えられたため, 種々の環構造を検討することにした.

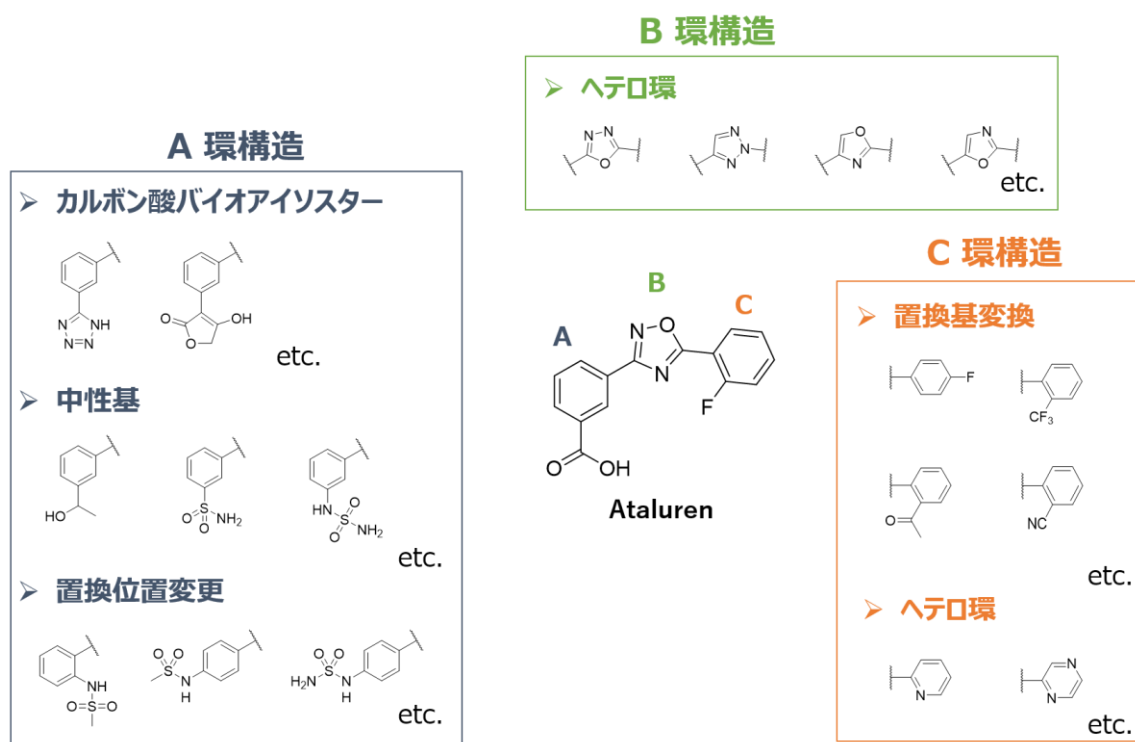
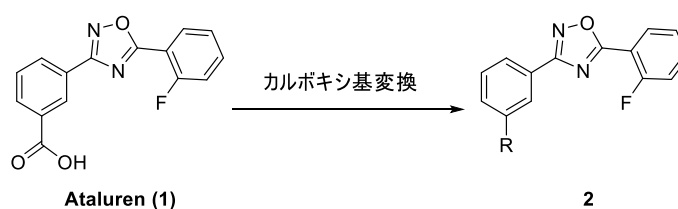


図 7. 化合物設計

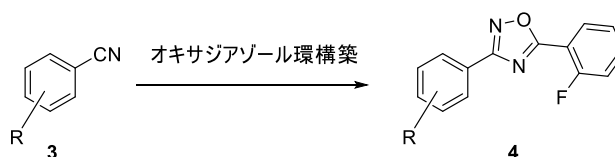
第三節 化合物の合成ルート

Ataluren のカルボキシ基を変換したオキサジアゾール誘導体を 2 種の合成ルートで合成した (スキーム 1). なお, 反応条件, 収率などの詳細は実験の部に記載した. 合成ルート 1 は, ataluren のカルボキシ基を直接変換するルートであり, 合成ルート 2 は, 目的の置換基やその前駆体となる置換基を有するベンズニトリルを出発原料とし, オキサジアゾール環を後から構築するルートである.

<合成ルート1>



<合成ルート2>

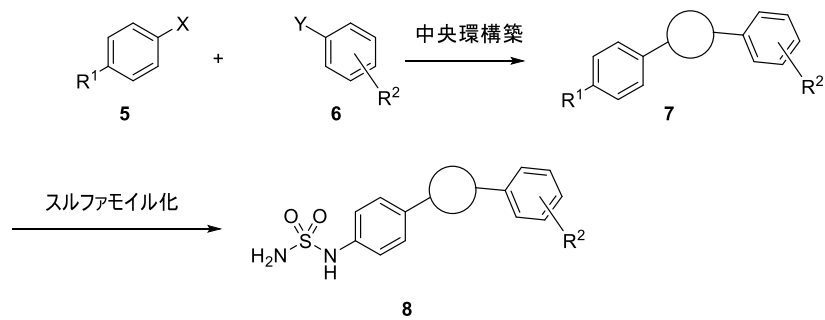


スキーム 1. オキサジアゾール誘導体の合成

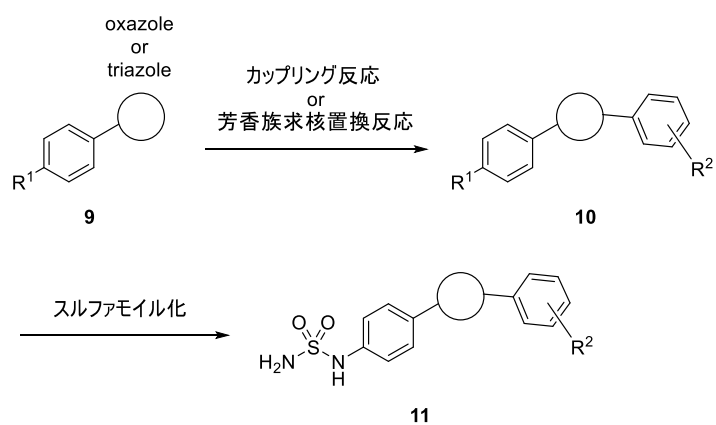
B 環を変換したスルファモイルアミン誘導体については, 芳香環を有する 2 つの出発原料から環化反応により, B 環を構築し, A 環をアニリン誘導体に変換し, スルファモイル化するルート,あるいは既に目的の B 環を有する既知化合物に新たな芳香環を付加し, その後同様にスルファモイルアミノ体に誘導するルートで合成した (スキーム 2).

次節では, 実際に合成した各種誘導体の合成法について具体的に述べる.

<合成ルート1>



<合成ルート2>



スキーム 2. B 環変換誘導体の合成

第四節 化合物の合成

オキサジアゾール誘導体

メタ位あるいはパラ位に置換基を持つフェニル基を有するオキサジアゾール誘導体 8 化合物 (図 8) を合成した (スキーム 3,4).

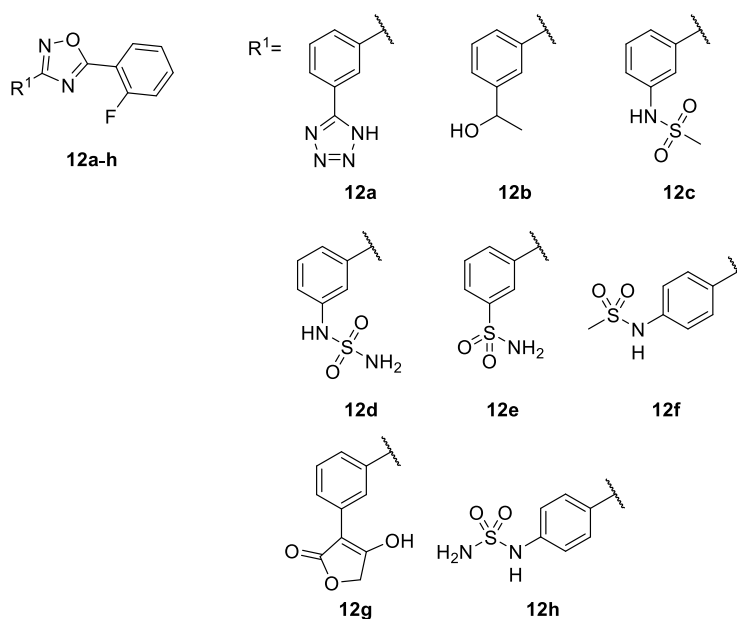
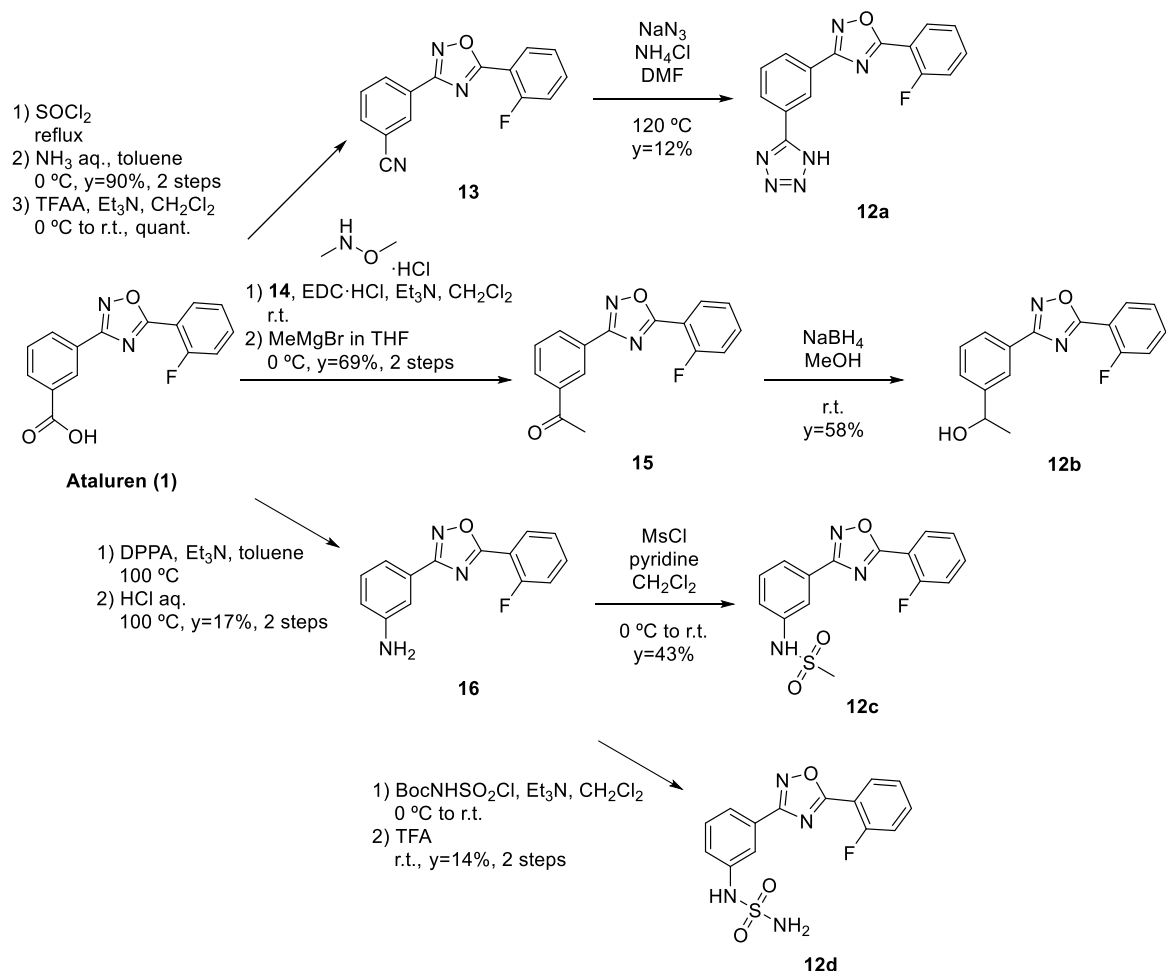


図 8. オキサジアゾール誘導体

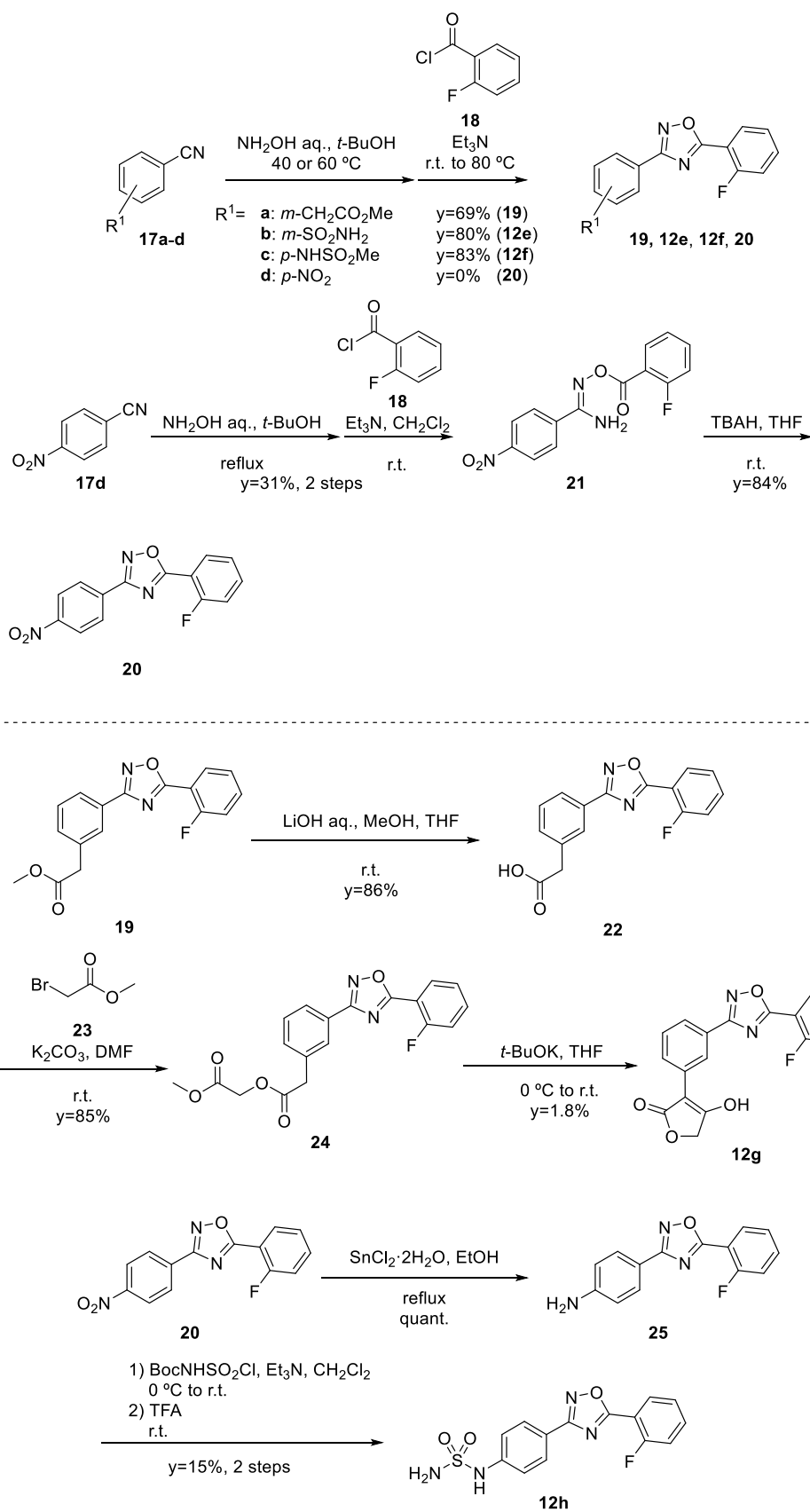
Ataluren のカルボキシ基を変換したオキサジアゾール誘導体の合成法をスキーム 3 に示す. 既知の方法³⁶⁾で合成した ataluren (1) を塩化チオニルおよびアンモニア水を用いてアミド化し, 続いて TFAA を用いて脱水することでニトリル 13 を得た. 次に, 得られたニトリル体 13 と NaN₃ のテトラゾール環化反応を行った. 目的の化合物 12a が主の複雑な粗生成物を精製し, 化合物 12a を合成した. 同様に ataluren を出発原料とし, Weinreb アミドを経由することでアセチル体 15 を得た. NaBH₄を用いて, 得られたアセチル体 15 を還元することでベンジルアルコール体 12b を合成した. 続いて, ataluren のカルボキシ基を Curtius 反応によりアミノ基へと変換した. 二量化し, ウレアとなった副生成物などを含む複雑な混合物となったが, 精製し, アニリン 16 を得た. アニリン 16 のメシル化により化合物 12c を, スルファモイル化により化合物 12d を得た. スルファモイル化は目的物が主の複雑な混合物を与えたが, これは使用した BocNHSO₂Cl の CH₂Cl₂ 溶液が冷蔵保存中に水分を含み一部分解していたためと考えられる. そのため, 後述する化合物 26c 以降の反応はイソシアヌ酸クロロスルホニルと *t*-BuOH を用いて, 系中で BocNHSO₂Cl を生成する手法を取った.



スキーム 3. オキサジアゾール誘導体の合成

その他のオキサジアゾール誘導体の合成法をスキーム 4 に示す. 市販のベンゾニトリル誘導体 **17a–d** にヒドロキシルアミンを付加し中間体ベンズアミドキシムを得, 続く *O*-アシル化およびオキサジアゾール環化の 3 反応をワンポットで行うことにより化合物 **19**, **12e**, **12f** を良好な収率 ($y = 69\text{--}83\%$) で得た. 同様の方法で化合物 **20** の合成を試みたが, オキサジアゾール環化の際に反応が複雑化し, 目的物が得られなかったため, 中間体の *O*-アシルベンズアミドキシム **21** を単離し, 続いて室温にて塩基として tetrabutylammonium hydroxide (TBAH)⁵⁶⁾ を作用させることで目的のオキサジアゾール体 **20** を合成した. 電子不足のベンズアミドキシムで反応性が低下することが報告されており⁵⁷⁾, 4 位ニトロ基の存在により, アミドキシムの -NH_2 の求核性が低いことが原因と考えられた.

得られた化合物 **19** のメチルエステルを加水分解し, 続いてブromo酢酸メチルでアルキル化し, 環化した. 環化の際に複雑な混合物が得られたが, 精製し, 化合物 **12g** を得た. また, 化合物 **20** の還元とそれに続くスルファモイル化により, スルファモイルアミノ体 **12h** を得た.



スキーム 4. オキサジアゾール誘導体の合成

B 環變換誘導體

B 環を種々のヘテロ環に変換した誘導体 9 化合物 (図 9) を合成した (スキーム 5-10).

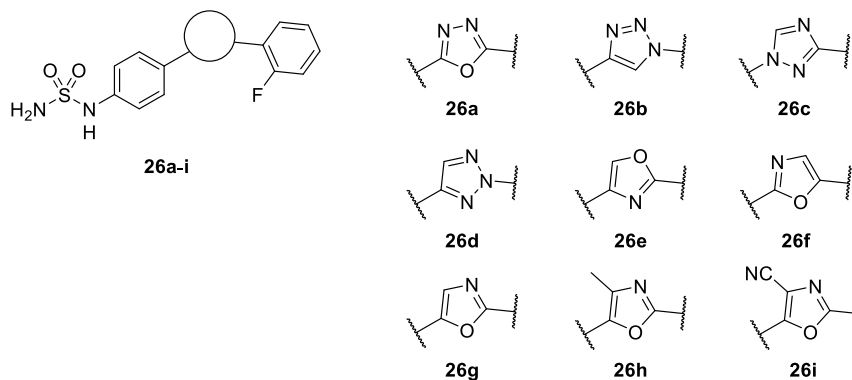
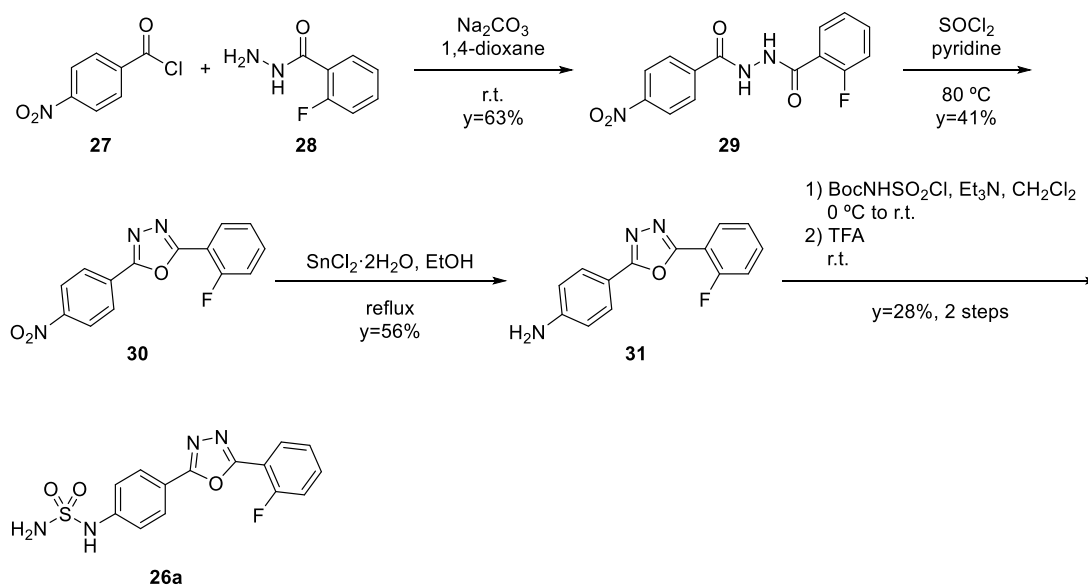


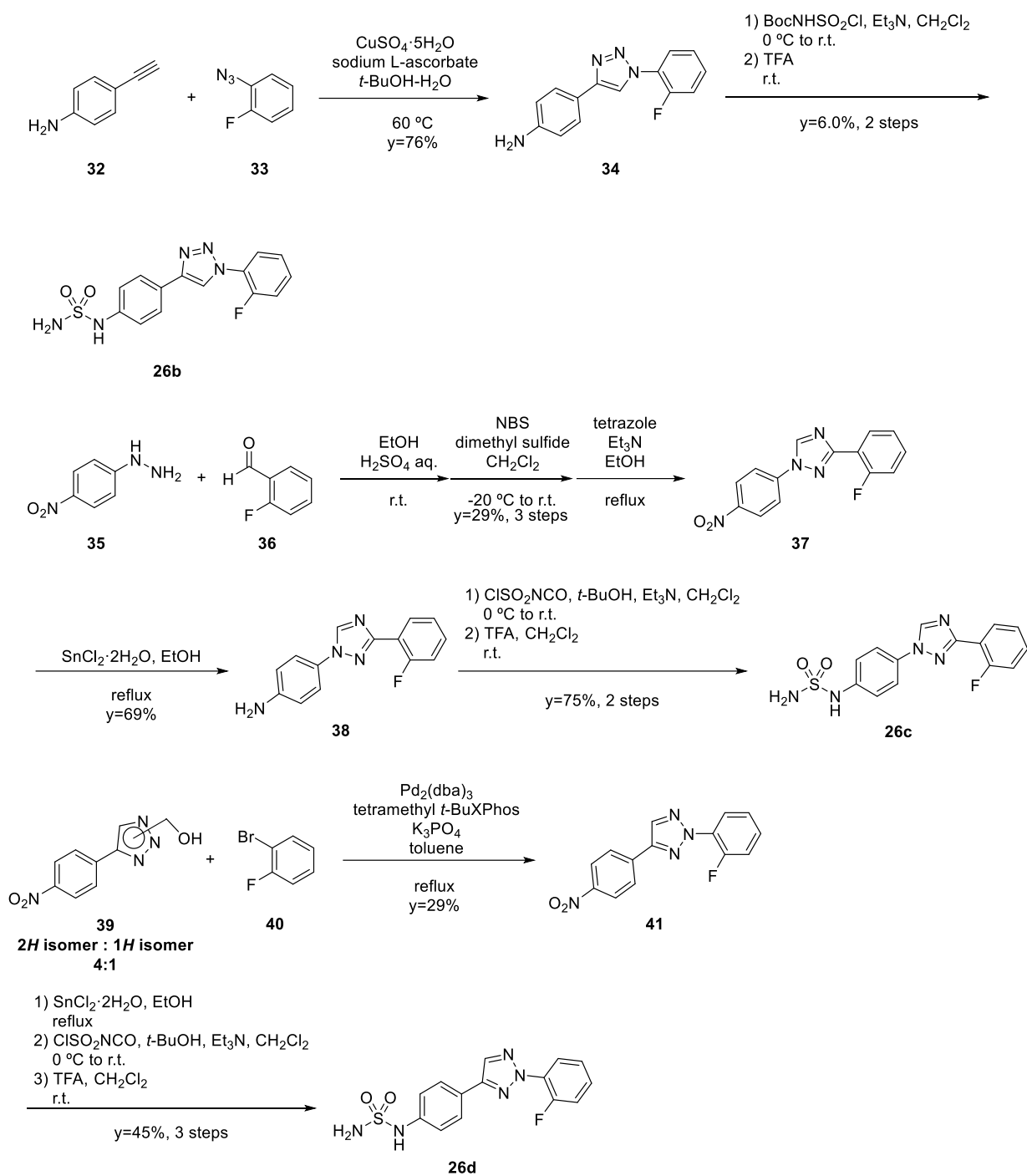
図 9. B 環変換誘導体

ベンゾヒドラジド **28** を *p*-ニトロベンゾイルクロリド(**27**)でアシル化し、続いて SOCl₂ で処理して環化し 1,3,4-オキサジアゾール環を構築した。ニトロ基の還元、続くスルファモイル化により化合物 **26a** を得た(スキーム 5)。後述の種々の方法で合成したテルアリール誘導体も同様にアニリン誘導体のスルファモイル化により、最終化合物であるスルファモイルアミン誘導体 **26b-i** に誘導体化した。

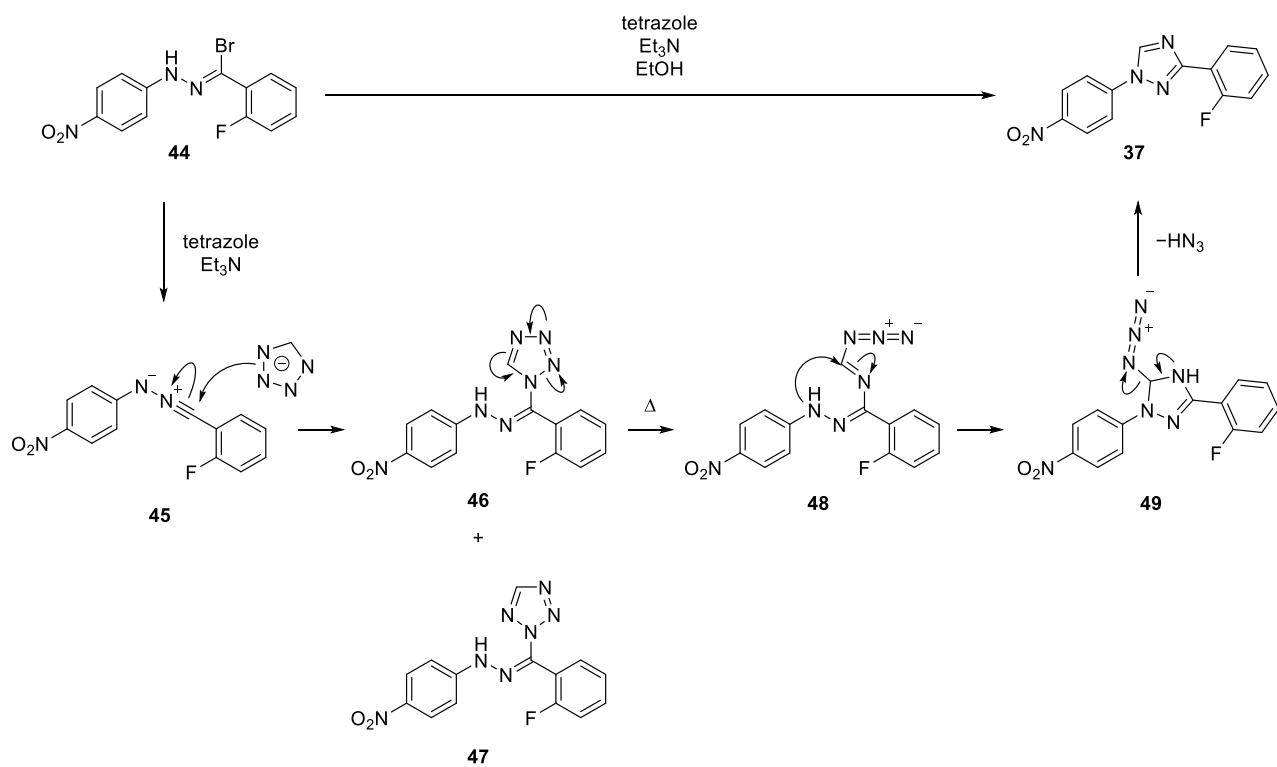
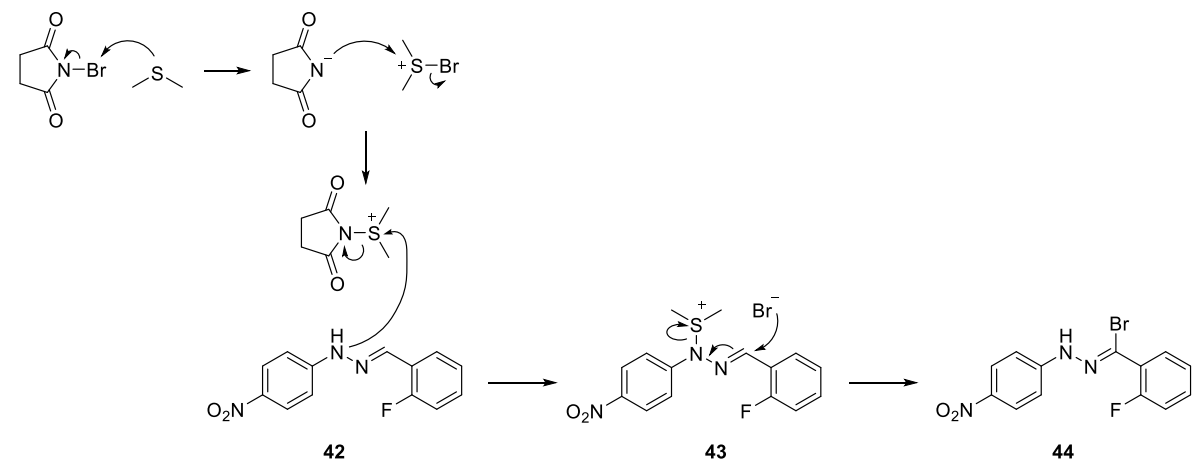
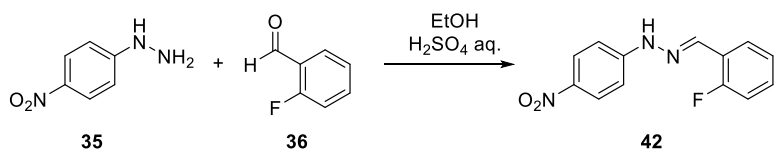


スキーム 5. 1,3,4-オキサジアゾール誘導体の合成

続いて、種々のトリアゾール誘導体の合成をスキーム 6 に示す。1*H*-1,2,3-トリアゾール誘導体 **26b** は Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) 反応⁵⁸⁾ によりトリアゾール環を構築して合成した。1,2,4-トリアゾール誘導体 **26c** は市販のヒドラジン **35** とベンズアルデヒド **36** から合成したヒドラゾンを経由して *N*-bromosuccinimide (NBS) と dimethyl sulfide を用いてヒドラゾニルブロミドとし⁵⁹⁾、テトラゾールで処理して 1,2,4-トリアゾール環を構築した。1,2,4-トリアゾール合成に関しては、Butler らにより、テトラゾールがヒドラゾニルブロミド **44** から生成した 1,3-双極子 **45** と反応し、*N*-ヒドラゾニルテトラゾール **46** が生成した後、テトラゾールが熱的に開環し、アジ化水素の脱離を伴う環化反応により 1,2,4-トリアゾール環が形成される反応機構が提唱されている(スキーム 7)⁶⁰⁾。2*H*-1,2,3-トリアゾール誘導体 **26d** は既報の方法⁶¹⁾ で合成した 2*H*-1,2,3-トリアゾール誘導体 **39** と 2-ブロモフルオロベンゼン(**40**)を Pd 触媒を用いてカップリングさせて合成した。この反応においては系中で塩基により、ヒドロキシメチル基が外れた後、カップリング反応が起こっていると推察された。Tetramethyl *t*-BuXPhos をリガンドに用いることにより、*N*² 位選択的なカップリング反応が起こることが報告されており⁶²⁾、収率は低いですが、目的のトリアゾール体 **41** を得た。

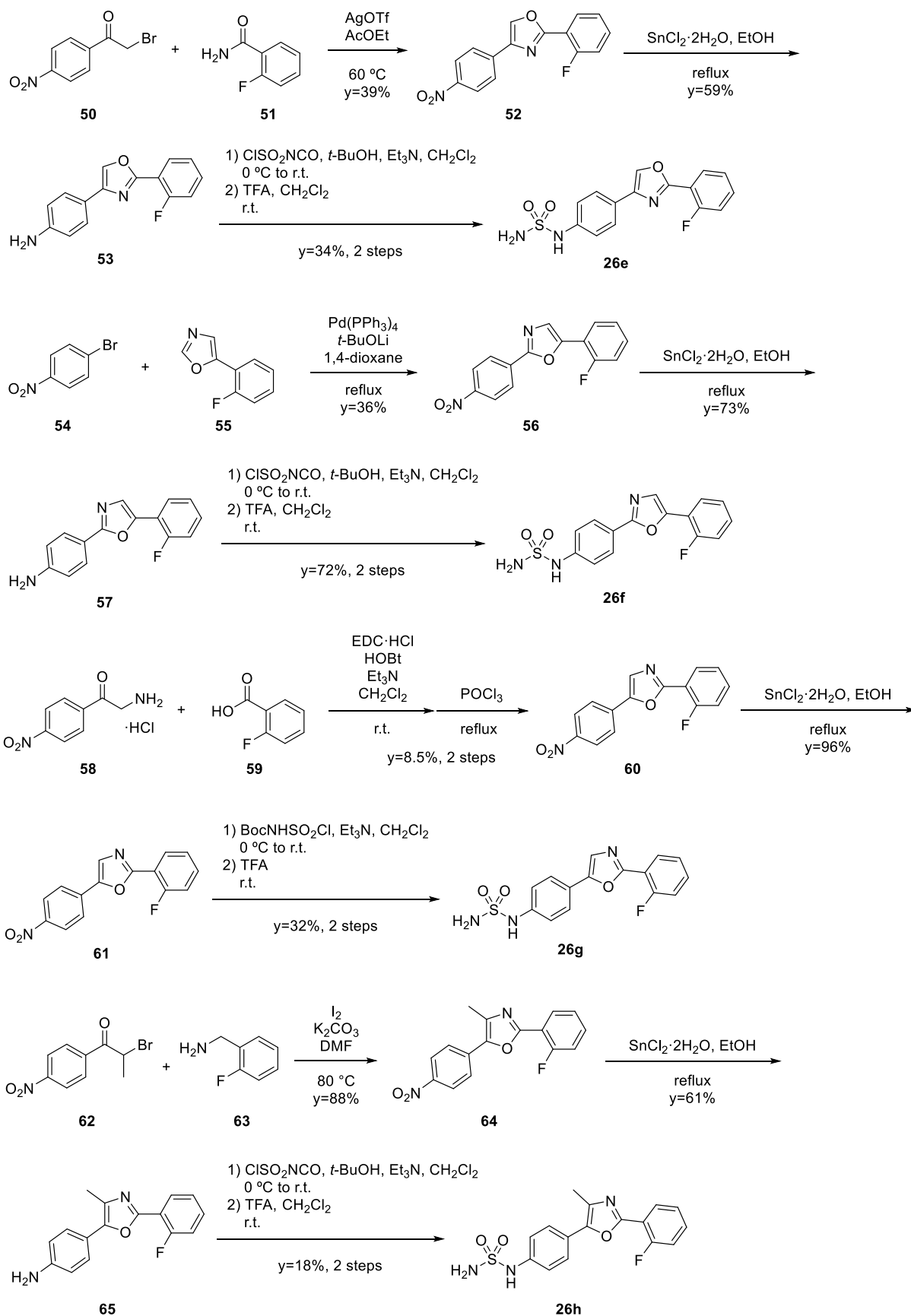


スキーム 6. トリアゾール誘導体の合成

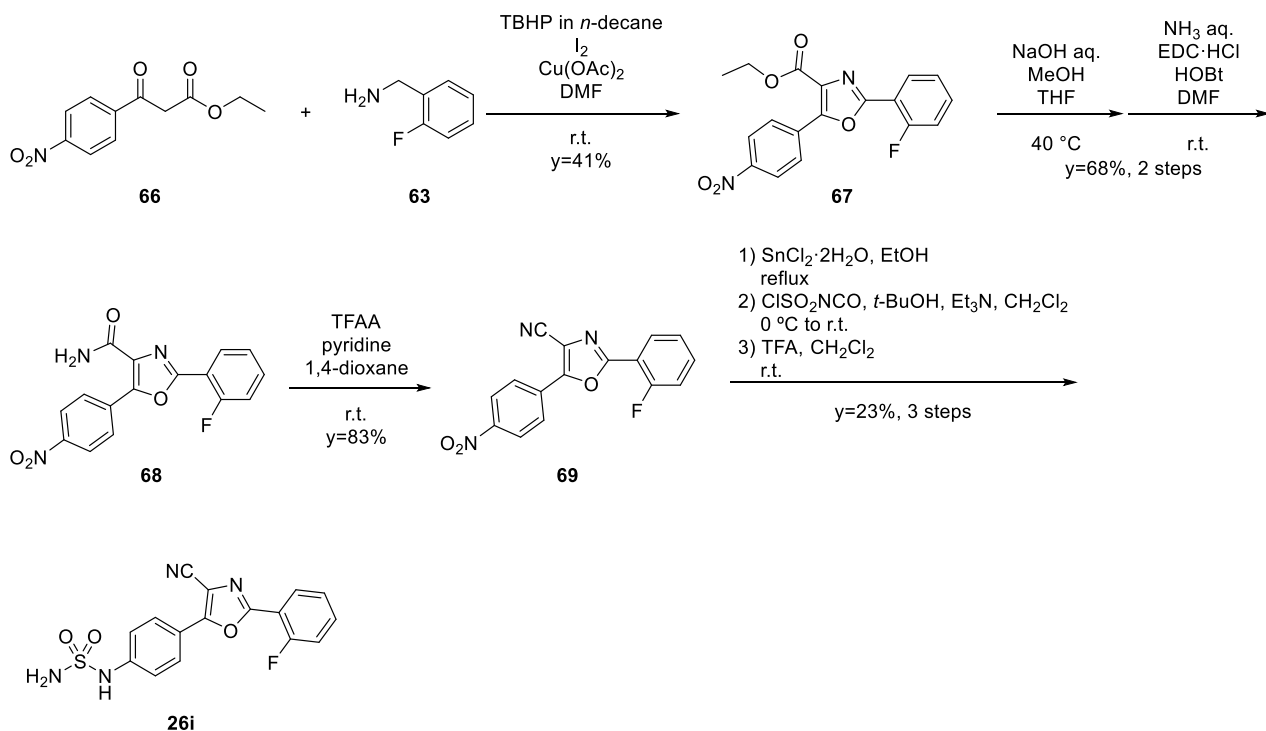


スキーム 7. ヒドラゾニルブロミドと 1,2,4-トリアゾール環合成の反応機構

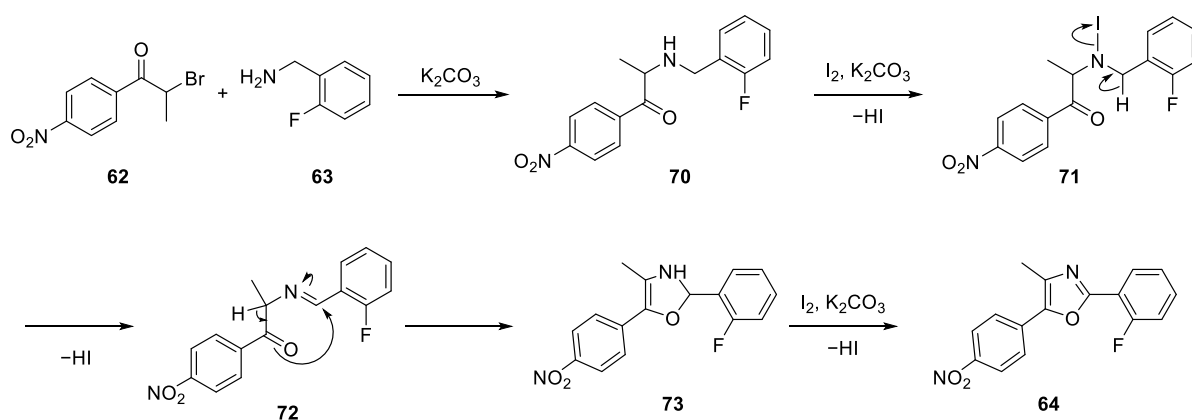
次に、オキサゾール誘導体の合成をスキーム 8 および 9 に示す。AgOTf 存在下、ブロモアセトフェノン **50** を 2-フルオロベンズアミド (**51**) と反応させることでオキサゾール環を構築し⁶³⁾, **26e** を合成した。また、4-ブロモニトロベンゼン (**54**) と既報の方法⁶⁴⁾ で合成した 5-アリール-1,3-オキサゾール誘導体 **55** の C-H 活性化カップリング反応により⁶⁵⁾, 化合物 **26e** の位置異性体であるオキサゾール誘導体 **26f** を合成した。 α -アミノ-4-ニトロアセトフェノン (**58**) を 2-フルオロ安息香酸 (**59**) でアシル化し、得られた生成物を POCl₃ で処理する Robinson-Gabriel オキサゾール合成反応により、オキサゾールの位置異性体 **26g** を合成した。4 位に置換基を有するオキサゾール誘導体 (**26h**, **26i**) は以下の方法で合成した。すなわち、2-ブロモプロピオフェノン **62** を I₂ および K₂CO₃ の存在下、2-フルオロベンジルアミン (**63**) と反応させ、4-メチルオキサゾール誘導体 **26h** を合成した⁶⁶⁾。この反応においては I₂/K₂CO₃ による酸化により生成したイミンを経るルートが想定されている (スキーム 10)⁶⁶⁾。4-シアノオキサゾール誘導体 **26i** の合成においては、 β -ケトエステル誘導体 **66** のハロゲン化と続く 2-フルオロベンジルアミン (**63**) との環化をワンポットで行い⁶⁷⁾, エステル基置換オキサゾール誘導体 **67** を得た。この反応においても先の反応と同じく、TBHP が酸化剤として働き、イミンを経由する反応機構が提唱されており、Cu(OAc)₂ が環化の触媒として働くことが報告されている⁶⁷⁾。得られたエステルを加水分解し、アンモニア水を用いてアミド化した後、TFAA で脱水して 4-シアノオキサゾール誘導体 **26i** を合成した。



スキーム 8. オキサゾール誘導体の合成 1



スキーム 9. オキサゾール誘導体の合成 2



スキーム 10. オキサゾール合成の反応機構

オキサゾール誘導体

オキサゾール2位を種々の芳香環に変換した誘導体5化合物(図10)を合成した(スキーム11)。

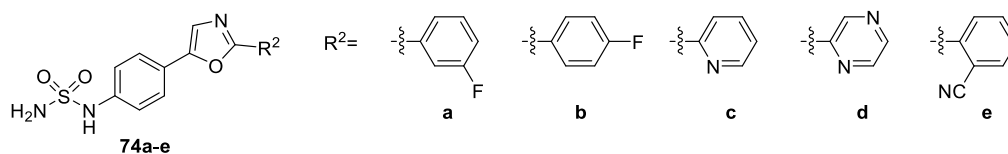
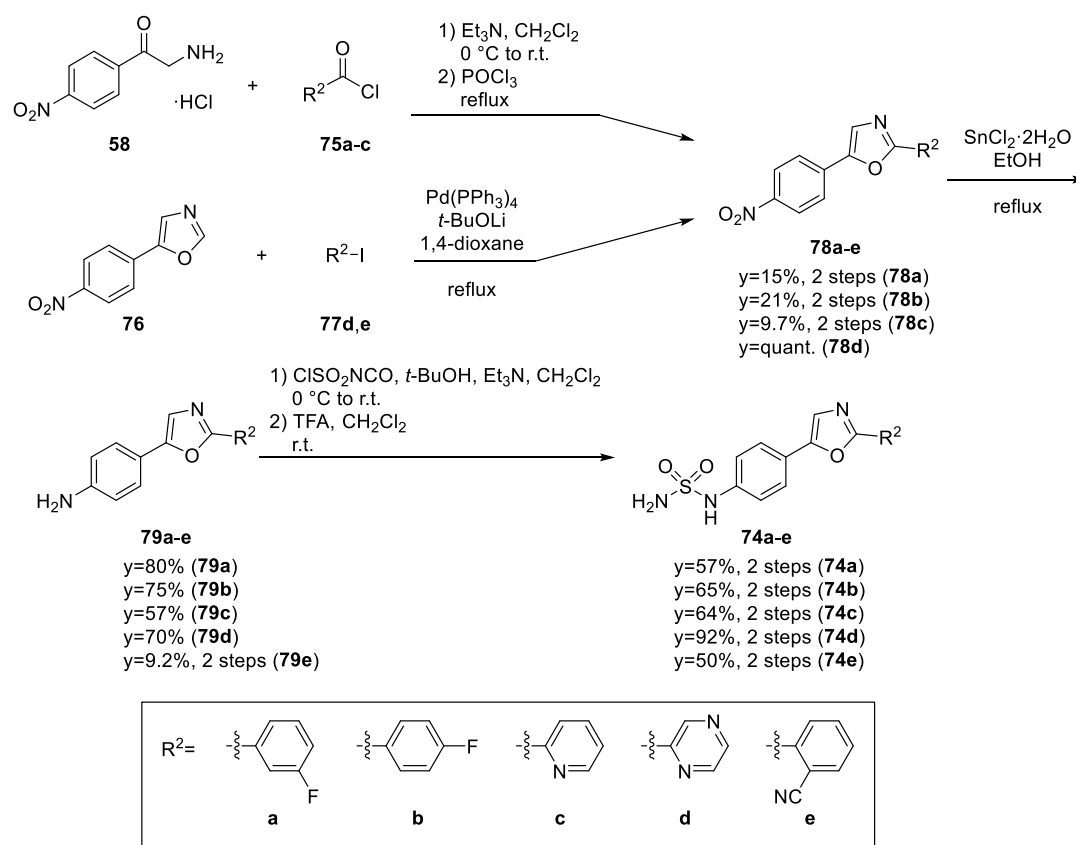


図 10. オキサゾール誘導体

α -アミノ-4-ニトロアセトフェノン (**58**) を種々のアリールカルボニルクロリド **75a-c** でアシル化した。反応は複雑な混合物を与えたが、続く POCl₃ を用いた環化反応の後に精製し、低収率だが化合物 **78a-c** を得た。得られた化合物 **78a-c** は前述と同様の方法でスルファモイルアミン誘導体 **74a-c** に変換した。ピラジン誘導体 **74d** およびシアノベンゼン誘導体 **74e** の場合においては、オキサゾール誘導体 **76** とヨウ化アリール **77d** または **77e** との C-H 活性化カップリング反応⁶⁵⁾、続く還元によってアニリン **79d** および **79e** を合成した。ヨードピラジンとのカップリングは定量的に目的物が得られたが、ヨードベンゾニトリルとの反応は複雑な混合物を与えた。詳細は不明であるが、オルト位シアノ基の電子的要因が影響した可能性が考えられる。



スキーム 11. オキサゾール誘導体の合成

トリアゾール誘導体

トリアゾール 2 位を種々の芳香環に変換した誘導体 5 化合物 (図 11) を合成した (スキーム 12)。

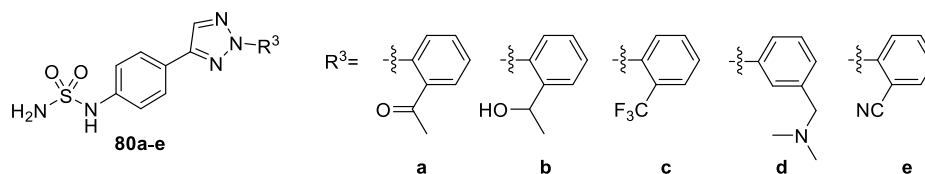
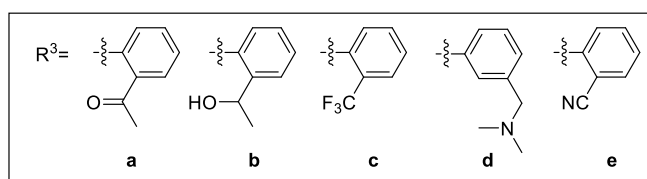
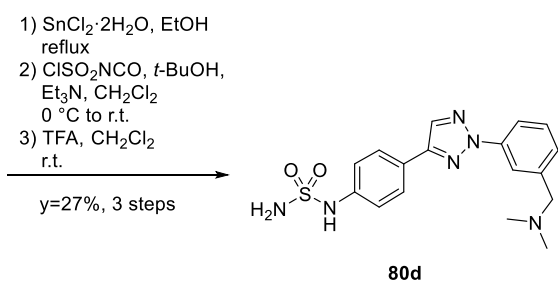
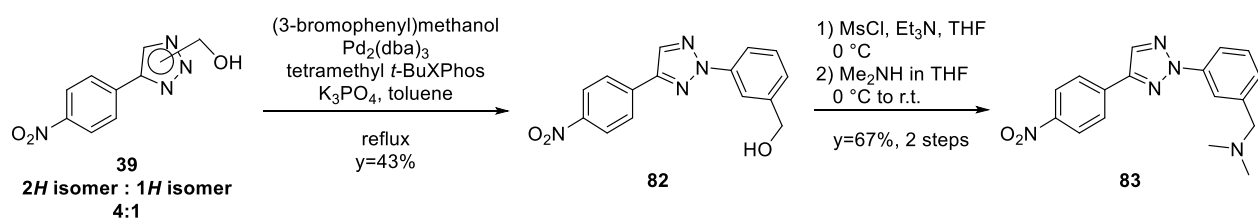
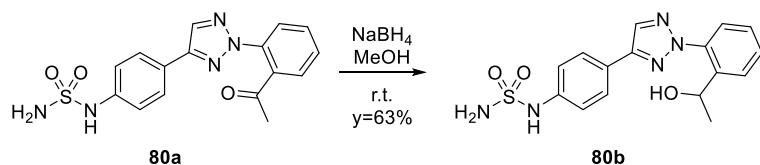
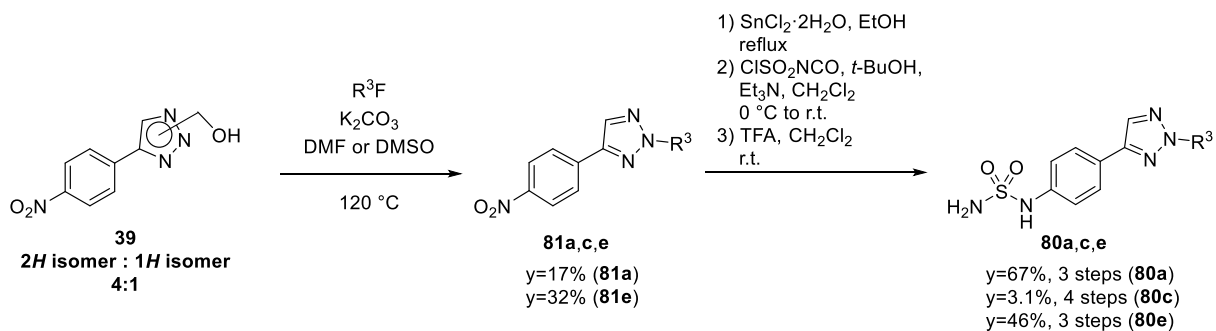


図 11. トリアゾール誘導体

化合物 **80a**, **80c** および **80e** は種々のフッ化アリールとトリアゾール誘導体 **39** との芳香族求核置換反応により合成した. 先と同様に, この反応においても K_2CO_3 により系中でヒドロキシメチル基が外れた後, 芳香族求核置換反応が進行していると推察された. 得られた化合物 **81a**, **81c** および **81e** は前述と同様の方法でスルファモイルアミン誘導体 **80a**, **80c** および **80e** に変換した. アセチル誘導体 **80a** を還元し, 化合物 **80b** を合成した. また, トリアゾール誘導体 **39** と (3-ブロモフェニル) メタノールとのカップリング反応⁶²⁾ により化合物 **82** を得た. 得られた化合物 **82** のヒドロキシメチル基をメシル化後, Me_2NH を用いてジメチルアミノメチル基に変換し, 化合物 **83** を得た. 得られた化合物 **83** からスルファモイルアミン誘導体 **80d** への変換は前述の方法で同様に行った.



スキーム 12. トリアゾール誘導体の合成

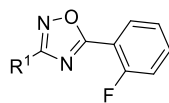
第五節 構造活性相関

Ataluren はムコ多糖症 I 型 Hurler 症患者の *IDUA* W402X ナンセンス変異に対応する変異を有する *Idua* W392X ノックインモデルマウスを用いて、そのリードスルー誘導作用が評価されており、脳を含む複数の組織で GAG 量を減少させることが報告されている⁶⁸⁾。W402X ナンセンス変異と同程度の頻度の原因変異である Q70X ナンセンス変異に対する効果は明らかになっていない。そこで、本研究では創製した化合物の *IDUA* Q70X および W402X ナンセンス変異に対するリードスルー誘導作用の評価を行い、ataluren と比較し、その特徴を明らかにすることにした。合成した化合物のリードスルー誘導活性は、ルシフェラーゼアッセイ系を構築し、評価を行った。PTC 配列 (Q70X) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を含むベクターを作製し、HeLa 細胞で安定発現させた。リードスルー誘導活性を持つ化合物の存在下では、PTC はスキップされ、翻訳が進行し、下流のルシフェラーゼも発現する。発現したルシフェラーゼの活性を指標とし、化合物処置による発光量が無処置コントロールの 2 倍に増大する薬物濃度 (EC_{200}) を算出し、リードスルー誘導活性を評価した。

Q70X ルシフェラーゼアッセイ系において、ataluren は弱いながらもリードスルー誘導活性 (EC_{200} = 22.9 μ M) を示した。Ataluren のリードスルー誘導活性をさらに増強するために、初めに ataluren のカルボキシ基を様々な置換基に変換した誘導体を合成し、評価した (表 1)。カルボン酸のバイオアイソスターであるテトラゾール誘導体 **12a** およびヒドロキシフラノン誘導体 **12g** の活性は著しく低下したが、中性のヒドロキシ基を有する化合物 **12b** は、ataluren (EC_{200} = 22.9 μ M) の約 2 倍の活性 (EC_{200} = 10.8 μ M) を示した。中性から弱酸性の置換基をさらに探索した結果、スルファモイル体 **12e** は ataluren と同等の活性を示し、メチルスルホンアミド体 **12c** とスルファモイルアミノ体 **12d** で活性の増強が見られた (それぞれ EC_{200} = 4.2 μ M, 6.1 μ M)。メチルスルホンアミド基の最適な置換位置を調べたところ、オルト置換体では活性が消失したが (data not shown)、パラ置換体では 2 倍に増加した (化合物 **12f**, EC_{200} = 2.1 μ M)。同じく良好な活性を示したスルファモイルアミノ基を同様にパラ位に移動させたところ、活性の顕著な増加が観察された (化合物 **12h**, EC_{200} = 0.39 μ M)。

最も高活性であった化合物 **12h** について、その薬物動態を調べたところ、化合物 **12h** の SD ラットにおける 10 mg/kg 経口投与後の最大血漿中濃度 (C_{max}) は 4.16 μ M であり、ataluren (C_{max} = 21.4 μ M) に比べ低値ではあったが、良好な値であった。さらに、化合物 **12h** の EC_{200} 比は ataluren の約 59 倍であった。そこで、化合物 **12h** をリード化合物としてさらなる最適化を行った。

表 1. オキサジアゾール誘導体の構造式, 分子量, clogP 値, EC₂₀₀ 値, 最大活性および最大血漿中濃度



Compound	R ¹	M.W.	clogP	EC ₂₀₀ (μM)	Max (%) ^{a)}	Rat PK ^{b)}	
						C _{max} (μM)	AUC (μM·h)
Ataluren (1)		284.24	3.47	22.9	360	21.4	161.3
12a		308.27	2.40	>100	-		
12b		284.29	2.74	10.8	392		
12c		333.34	2.27	4.2	487	2.37	8.97
12d		334.33	1.35	6.1	488		
12e		319.31	1.67	21.4	238		
12f		333.34	2.30	2.1	470	2.73	31.9
12g		338.29	2.40	>100	-		
12h		334.33	1.37	0.39	426	4.16	57.1

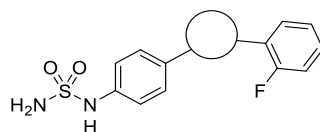
a) 化合物無処置の細胞の活性を 100%とした.

b) 化合物 10 mg/kg 経口投与.

化合物 **12h** のオキサジアゾール環を様々な芳香族複素環に変換し、更なる活性向上を目的に合成した化合物の評価結果を表 2 に示す。1,3,4-オキサジアゾール **26a**, 1*H*-1,2,3-トリアゾール **26b**, 1,2,4-トリアゾール **26c** およびオキサゾール **26e** への変換では活性が向上しなかったが, 2*H*-1,2,3-トリアゾール **26d** およびオキサゾール **26f** および **26g** への変換では活性が 3–8 倍向上した (化合物 **26d**, $EC_{200} = 0.15 \mu M$; 化合物 **26f**, $EC_{200} = 0.08 \mu M$; 化合物 **26g**, $EC_{200} = 0.05 \mu M$)。オキサゾールやトリアゾールのヘテロ原子の位置により活性に違いが見られたことから、詳細は不明ではあるが、適切な位置にある窒素原子が水素結合受容体として働く可能性が示唆された。続いて化合物 **26g** のオキサゾール環に置換基の導入を検討した。メチル基の導入 (**26h**) は活性を維持したが、シアノ基やカルボキシ基を導入すると活性は消失した (data not shown)。このことから、極性基の導入は許容されず、置換基の大きさも活性に影響することが示唆された。

化合物 **12h** より強い活性を示し、 EC_{200} が $0.1 \mu M$ 以下と顕著に高活性であったオキサゾール **26f** および **26g** について動態を調べたが、経口吸収性は不良であった (**26f**, $C_{max} = 0.18 \mu M$, $AUC = 0.72 \mu M \cdot h$; **26g**, $C_{max} = 0.33 \mu M$, $AUC = 1.32 \mu M \cdot h$)。

表 2. B 環変換化合物の構造式, 分子量, clogP 値, EC₂₀₀ 値, 最大活性および最大血漿中濃度



Compound	ring	M.W.	clogP	EC ₂₀₀ (μM)	Max (%) ^{a)}	Rat PK ^{b)}	
						C _{max} (μM)	AUC (μM·h)
12h		334.33	1.37	0.39	426	4.16	57.1
26a		334.33	1.89	0.45	431		
26b		333.34	1.91	0.83	439		
26c		333.34	1.41	0.49	377	0.23	0.39
26d		333.34	1.95	0.15	405		
26e		333.34	1.80	0.37	386	1.50	5.67
26f		333.34	2.15	0.08	428	0.18	0.72
26g		333.34	1.80	0.05	394	0.33	1.32
26h		347.37	2.47	0.08	406	0.46	4.38
26i		358.35	1.42	1.1	413		

a) 化合物無処置の細胞の活性を 100%とした.

b) 化合物 10 mg/kg 経口投与.

種々の 5 員環芳香族複素環を検討した結果, トリアゾール **26d** (EC₂₀₀ = 0.15 μM), オキサゾール **26f** (EC₂₀₀ = 0.08 μM) および **26g** (EC₂₀₀ = 0.05 μM) が良好な活性を示した. そこでトリアゾール **26d** とオキサゾール **26g** の 2 つの化合物から更なる最適化を行った. オキサゾール **26g** は, まだ不十分ではあるものの **26f** と比較して C_{max} が高く, オキサゾール環を有するリード化合物として **26g** を選択した.

オキサゾール誘導体 **26g** の最適化を試みるため、*o*-フルオロベンゼン環フルオロ基の置換位置を変更した誘導体 (**74a** および **74b**) および芳香族複素環に変更した誘導体 (**74c** および **74d**) について評価した (表 3). パラ位のフッ素原子 (**74b**) は活性を低下させたが、メタ位 (**74a**) は活性を維持した. 薬物動態プロファイルを改善するために含窒素芳香族複素環を検討したが、ピリジン環 (**74c**) およびピラジン環 (**74d**) への変換により活性が低下した. これらの結果から、疎水性の置換基が活性に好ましいことが示唆された. 化合物 **26g** の *o*-フッ素の代わりにフッ素のバイオアイソスターとしても知られるシアノ基を導入すると、活性は向上したが ($EC_{200} = 0.02 \mu M$), 経口吸収性は悪化した (C_{max} 検出限界以下). シアノ基の電子的性質が活性向上に有効であったと考えられる.

表 3. オキサゾール誘導体の構造式, 分子量, clogP 値, EC_{200} 値, 最大活性および最大血漿中濃度

Compound	R ²	M.W.	clogP	EC_{200} (μM)	Max (%) ^{a)}	Rat PK ^{b)}	
						C_{max} (μM)	AUC ($\mu M \cdot h$)
26g		333.34	1.80	0.05	394	0.33	1.32
74a		334.34	2.02	0.04	385		
74b		333.34	2.01	0.75	401		
74c		333.34	1.43	1.9	430		
74d		317.32	0.92	1.5	398		
74e		340.36	1.60	0.02	427	n.d. ^{c)}	-

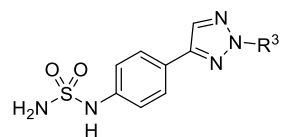
a) 化合物無処置の細胞の活性を 100%とした.

b) 化合物 10 mg/kg 経口投与.

c) not detected.

次に、トリアゾール誘導体 **26d** の最適化のため、*o*-フルオロベンゼン環を種々の置換基を有するベンゼン環に変換した誘導体の評価を行った(表 4)。フッ素と同様に電子求引性を有するアセチル基(**80a**)やトリフルオロメチル基(**80c**)の導入,あるいはヒドロキシエチル基(**80b**)やジメチルアミノメチル基(**80d**)等の中性または塩基性置換基の導入により活性の低下が見られた。B 環がオキサゾール環の際に活性増加が見られた,シアノ基の導入についてトリアゾール誘導体でも検討した結果,活性の増加($EC_{200} = 0.05 \mu M$)と良好な薬物動態($C_{max} = 5.44 \mu M$, $AUC = 26.1 \mu M \cdot h$)を示す化合物 **80e** を得た。フルオロ基からシアノ基への変換により, B 環オキサゾール誘導体とトリアゾール誘導体で活性は共に同程度増加したが,オキサゾール誘導体の C_{max} は検出限界以下であったのに対し,トリアゾール誘導体では良好な C_{max} を示した。サイズが小さく,電子求引性の置換基で活性が良好なことから,芳香環の電子密度や全体的な大きさが活性に影響していると考えられた。また,詳細は検討していないが,オキサゾール誘導体はトリアゾール誘導体に比べ,環電子密度が高く,代謝を受けやすいために経口吸収性が低かった可能性が考えられる。オキサゾール環とシアノフェニル基を有する化合物 **74e** と比較して,トリアゾール環を有する化合物 **80e** は, 2-3 倍活性は低い,薬物動態プロファイルは顕著に良好であった。そこで,化合物 **80e** を KY-516 と命名し,さらなる生物学的評価を行った。

表 4. トリアゾール誘導体の構造式, 分子量, clogP 値, EC₂₀₀ 値, 最大活性および最大血漿中濃度



Compound	R ³	M.W.	clogP	EC ₂₀₀ (μM)	Max (%) ^{a)}	Rat PK ^{b)}	
						C _{max} (μM)	AUC (μM•h)
26d		333.34	1.95	0.15	405		
80a		357.39	1.66	1.5	329		
80b		359.40	1.25	1.2	328		
80c		383.35	2.43	0.43	352		
80d		372.45	1.80	2.3	298		
80e (KY-516)		340.36	1.49	0.05	374	5.44	26.1

a) 化合物無処置の細胞の活性を 100%とした.

b) 化合物 10 mg/kg 経口投与.

第六節 KY-516 の生物学的評価

KY-516 は Q70X/ルシフェラーゼアッセイにおいて濃度依存的なリードスルー誘導活性を示し、その活性は ataluren の約 460 倍であった(図 12A). 一方, Q70X と同様に Hurler 症に一般的な変異である W402X ナンセンス変異についても評価を行った結果, Q70X 変異とは対照的に, KY-516 は W402X 変異配列に対しては効果が認められなかった(図 12B). また, ataluren も KY-516 と同様の傾向を示し, Q70X ナンセンス変異配列に対しては活性を示したが, W402X 配列では無効であった.

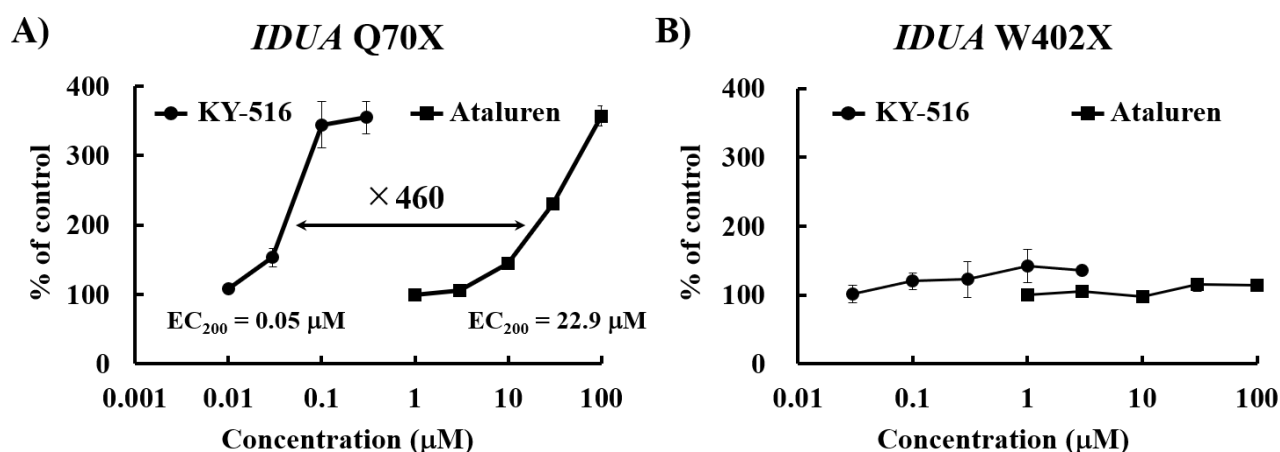


図 12. ルシフェラーゼアッセイによる KY-516 のリードスルー誘導作用の評価.

平均値 ± 標準誤差 (n = 4–7)

続いて全長配列の変異 IDUA 酵素を発現する IDUA ノックアウト細胞を作製し, KY-516 のリードスルー誘導活性を評価した. この評価系においては, 4-methylumbelliferyl- α -iduronide を蛍光基質として用いて, リードスルー誘導により生成した IDUA 酵素の活性を評価した. Q70X 変異 cDNA を遺伝子導入した IDUA ノックアウト細胞において, ataluren は 100 μ M で有効であったのに対し, KY-516 は 0.1 μ M から IDUA 酵素活性を有意に増加させた(図 13A). この結果はルシフェラーゼアッセイと同様の結果であった. また, Q70X 変異とは対照的に, W402X 変異の場合には KY-516 は IDUA 酵素活性を有意には増加させなかった(図 13B). これらの結果は KY-516 が IDUA Q70X 変異を有するムコ多糖症 I 型 Hurler 症患者など, 特定のナンセンス変異を持つ疾患, 患者群に有効である可能性を示している.

2種類の変異におけるKY-516の効果の差異は、KY-516のリードスルー誘導作用における配列特異性の存在を示唆している。Q70X 変異と W402X 変異は同じ UAG 終止コドンをもっているが、終止コドンの次の塩基が Q70X 変異はシトシン、W402X 変異はグアニンなど、その周辺配列が異なる。PTC 周辺の配列はリードスルーの効率に大きな影響を与えることが知られており、特に終止コドンの次の塩基がシトシンである時にアミノグリコシドによるリードスルーが最も起こりやすいことが報告されている⁶⁹⁾。KY-516 はアミノグリコシド系化合物と同様の現象を示し、終止コドンの次の塩基がシトシンの Q70X ナンセンス変異に対してより強いリードスルー誘導作用を示したことから、詳細は不明であるが、KY-516 はアミノグリコシド系化合物と似た機序でリードスルーを誘導している可能性がある。

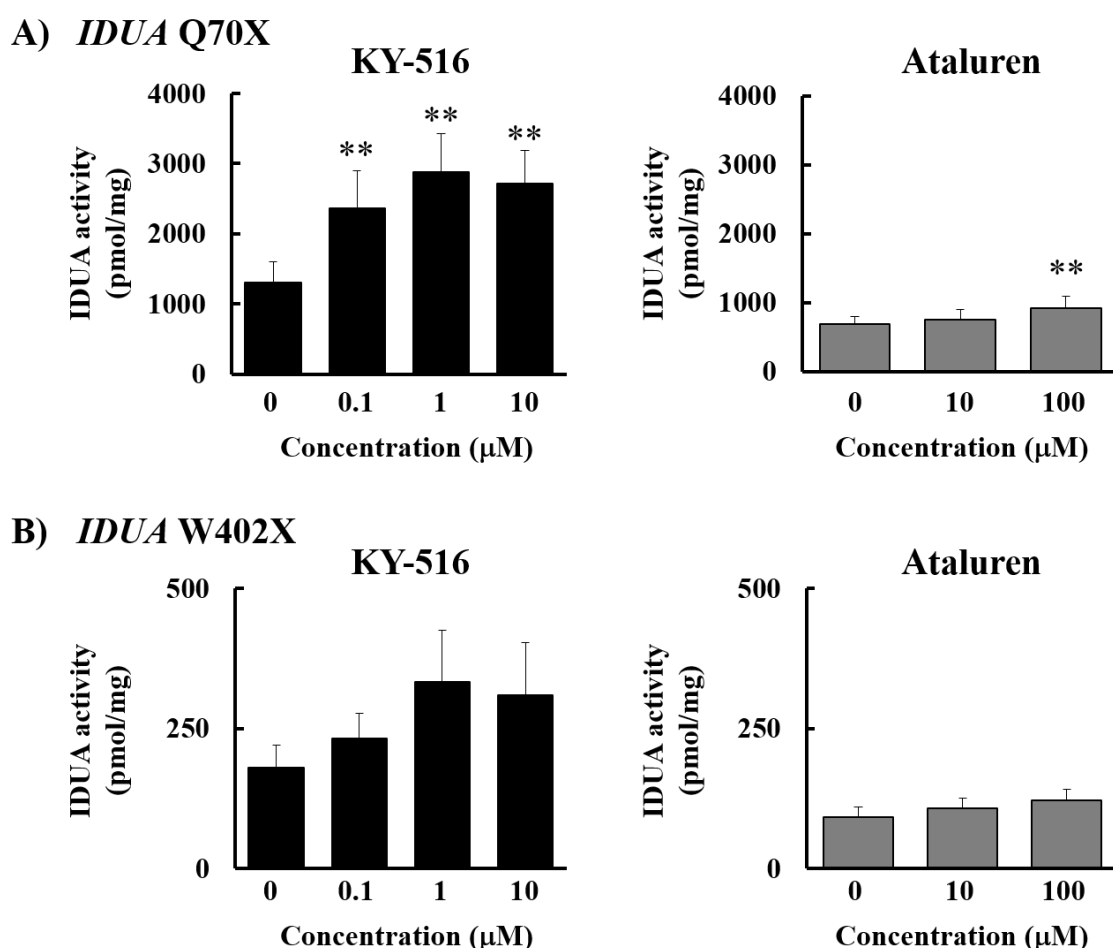


図 13. 全長配列の変異 IDUA 酵素を発現する IDUA ノックアウト細胞における KY-516 と ataluren のリードスルー誘導作用の評価。

平均値 ± 標準誤差 (n = 4-8). ** $p < 0.01$, Student's *t*-test.

第七節 小括

ムコ多糖症 I 型治療薬を志向した高活性の新規リードスルー誘導薬の創製を目的に、新規化合物の設計および合成を行った。分子設計にあたり、これまでに報告されてきた非アミノグリコシド型リードスルー誘導薬に共通したファーマコフォアに着目し、臨床使用されている *ataluren* のテルアリアル構造を基に構造展開を行い、より強力なリードスルー誘導活性を有する化合物の取得を目指した。また、取得した有望化合物の *IDUA* Q70X および W402X ナンセンス変異に対するリードスルー誘導作用の評価を行い、*ataluren* と比較し、その特徴を明らかにすることにした。

Ataluren のメタ位カルボキシ基をパラ位スルファモイルアミノ基に変換することにより、活性が約 59 倍増加し、良好な最大血漿中濃度を示すリード化合物 **12h** を得た。続いて、リード化合物 **12h** の B 環のオキサジアゾール環を各種芳香族複素環に変換したところ、オキサゾール環とトリアゾール環で活性の更なる向上が確認された。B 環がオキサゾール、トリアゾールの誘導体どちらも C 環フルオロベンゼン環をシアノベンゼン環とすることで活性が更に向上し、B 環トリアゾール環、C 環シアノベンゼン誘導体を高活性かつ良好な経口吸収性を併せ持つ代表化合物 KY-516 として見出した(図 14)。

KY-516 は Q70X ナンセンス変異を含む *IDUA* 部分配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて *ataluren* の約 460 倍の活性を示し、Q70X 変異 *IDUA* 遺伝子導入細胞において 0.1 μM で酵素活性を有意に増加させた。一方、W402X ナンセンス変異に対しては両評価系で効果が認められなかった。2 種類の変異における KY-516 の効果の差異は、KY-516 のリードスルー誘導作用における配列特異性の存在を示唆しており、その原因として PTC 周辺配列の影響が考えられた。

ラットにおいて、KY-516 (10 mg/kg) 経口投与後の最高血漿中濃度は 5 μM に達し、KY-516 の経口吸収性は良好であった。KY-516 は、*IDUA* Q70X 変異を有するムコ多糖症 I 型 Hurler 症の治療薬として有効である可能性があり、また、リードスルーの基礎となるメカニズムを解明するための貴重なツールとなる可能性がある。

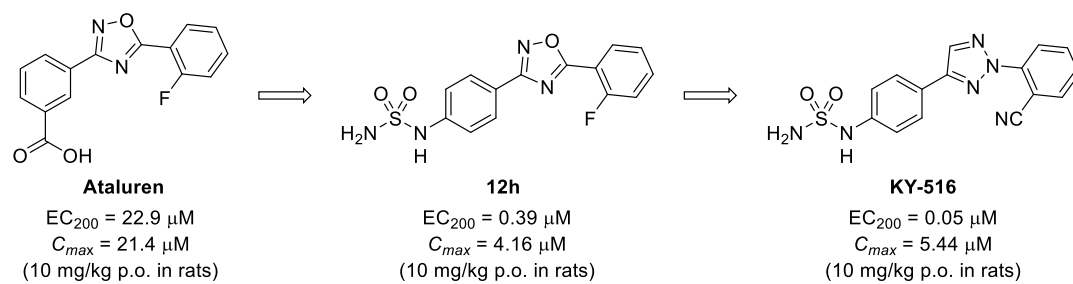


図 14. 新規テルアリール型リードスルー誘導薬のまとめ

第三章 クロメノピリジン型リードスルー誘導薬の創製

第一節 はじめに

前章では、臨床使用されている *ataluren* を基に構造展開を行い、より強力なリードスルー誘導活性を有する KY-516 の創出について述べた。KY-516 は Q70X ルシフェラーゼアッセイにおいては *ataluren* の約 460 倍の活性を示したが、W402X ナンセンス変異に対しては効果が認められなかった。*Ataluren* も同様の傾向を示したことから、このリードスルー誘導活性の配列特異性は構造的特徴に由来するものである可能性が高いと考えた。ムコ多糖症 I 型は Q70X と W402X の 2 種類のナンセンス変異が同程度の割合で、原因変異の併せて約 7 割を占めるため⁵²⁾、W402X ナンセンス変異に対しても有効な治療薬の創製は重要である。

そこで、著者は KY-516 とは異なる配列特異性を有する化合物を取得できるか検討するため、異なる構造系からの構造展開を行うこととした。ノバルティス社は 2014 年に、リードスルー誘導作用を有するピリミドキノリン誘導体の特許を公開している⁷⁰⁾。ピリミドキノリン誘導体は *ataluren* やアミノグリコシド系化合物とは構造系が異なり、特徴的な三環性骨格を有している。特許の評価方法として、嚢胞性繊維症の原因遺伝子である *CFTR* の Y122X ナンセンス変異を含む部分配列を組み込んだルシフェラーゼアッセイ、血友病 B の原因遺伝子である血液凝固因子 F9 の R29X ナンセンス変異体発現系を用いた ELISA アッセイ、*IDUA* Q70X および W402X 発現系を用いた酵素活性アッセイが実施されており、ムコ多糖症 I 型 Hurler 症に対しても検討が行われているが、臨床開発などその後の続報は無い。特許では実施例化合物は数 μM からリードスルー誘導活性を示し、陽性対照として用いている *paromomycin* の 2–4 倍の酵素活性の増加を示すことが報告されており、*ataluren* との比較などその他のデータは開示されておらず詳細は不明であるが、良好なリードスルー誘導作用を有する可能性が考えられた。このピリミドキノリン誘導体から着想を得て、様々な骨格変換を行い、新規骨格の取得を目指した。三環性骨格の開環体などは全て活性が消失したが、キノリン環の窒素原子を酸素原子に変更し、ピリミジン環をピリジン環にしたクロメノピリジン誘導体がリードスルー誘導活性を保持した(図 15)。ノバルティス社の特許はキノリン環部分の窒素原子に限定されて

いるため、クロメノピリジン骨格は新規性のある構造であった。このクロメノピリジン誘導体を基に更に誘導体展開を行うことで、KY-516とは特性の異なるリードスルー誘導薬の創製を目指した。

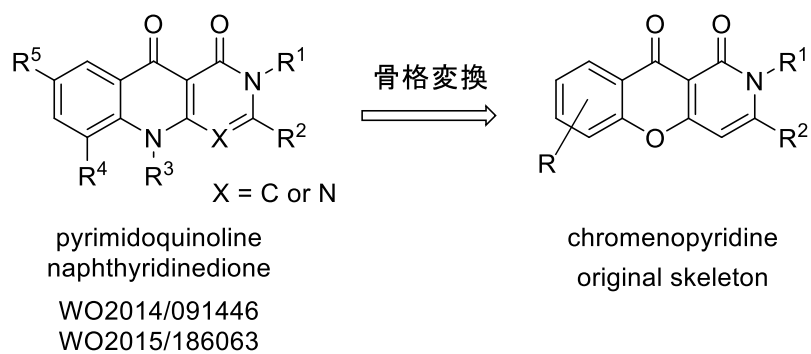


図 15. 独自骨格の取得

第二節 設計

クロメノピリジン誘導体の合成展開概略を図 16 に示す. 合成展開にあたり, クロメノピリジンの三環性骨格は平面性の高さが懸念点であった. 一般的に平面性の高い化合物は水溶性が低く, 臨床試験成功率が低いことが報告されている⁷¹⁾. また, 平面性の高い構造は核酸にインターカレートする為に遺伝毒性を呈しやすいことも知られている⁷²⁾. そこで, 設計の方針として, 芳香環も検討しつつ, より立体的な飽和環や水溶性を高めるためヘテロ原子の導入を試みることとした. また, 活性を更に向上させるため, A 環構造については側鎖や縮環構造の導入により, より離れた位置にある相互作用可能スペースを探索した.

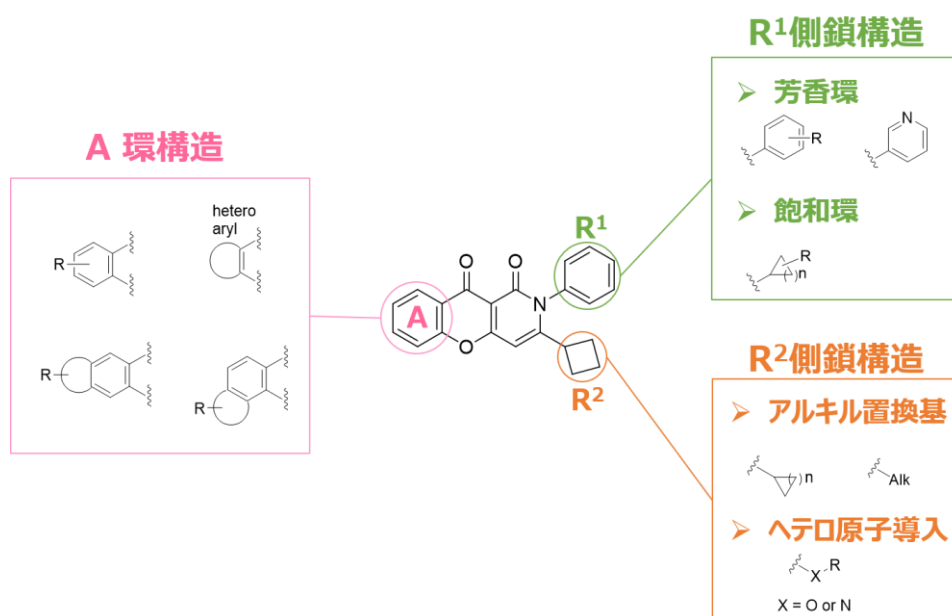


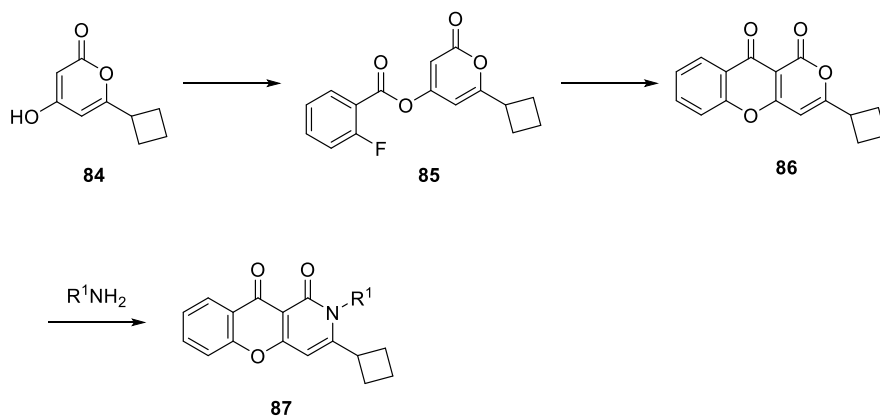
図 16. 化合物設計

第三節 化合物の合成ルート

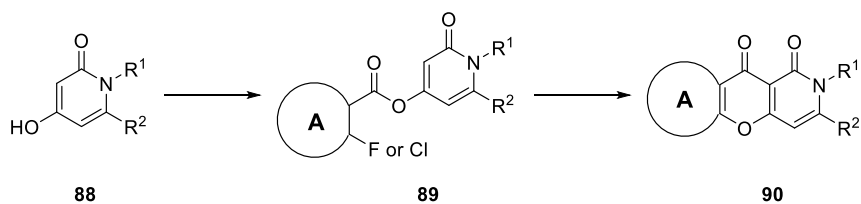
種々のクロメノピリジン誘導体を 2 種類の合成ルートで合成した(スキーム 13). R^2 側鎖にシクロブチル基を有する誘導体の合成は合成ルート 1 を採用した. すなわち, 既知化合物 **84**⁷³⁾ をベンゾイル化し, 得られたエステル体 **85** を Fries 転位, 芳香族求核置換反応に付すことで環化した化合物 **86** を得, 最後に R^1 側鎖アミンを付加するルートである.

A 環変換誘導体などその他の誘導体については先に R^1 側鎖と R^2 側鎖を導入した化合物 **88** を合成し, 合成ルート 1 と同様にアシル化, 環化することで合成した(合成ルート 2).

<合成ルート1>



<合成ルート2>



スキーム 13. クロメノピリジン誘導体の合成ルート

第四節 化合物の合成

R¹ 側鎖変換誘導体

クロメノピリジン骨格 R¹ 側鎖を種々の環構造に変換した誘導体 9 化合物 (図 17) を合成した (スキーム 14, 15).

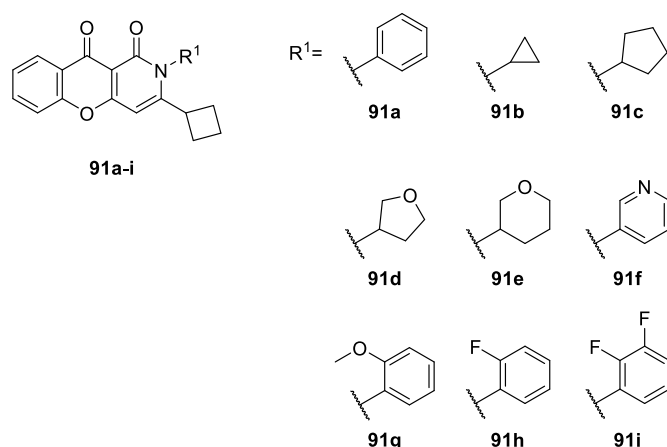
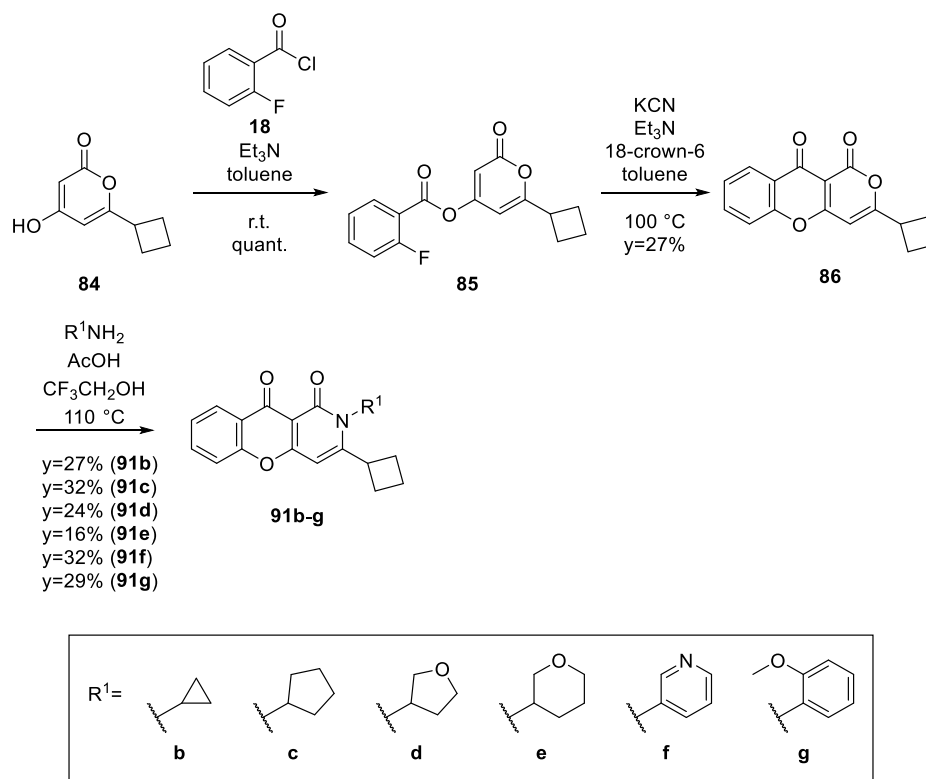


図 17. R¹ 側鎖変換誘導体

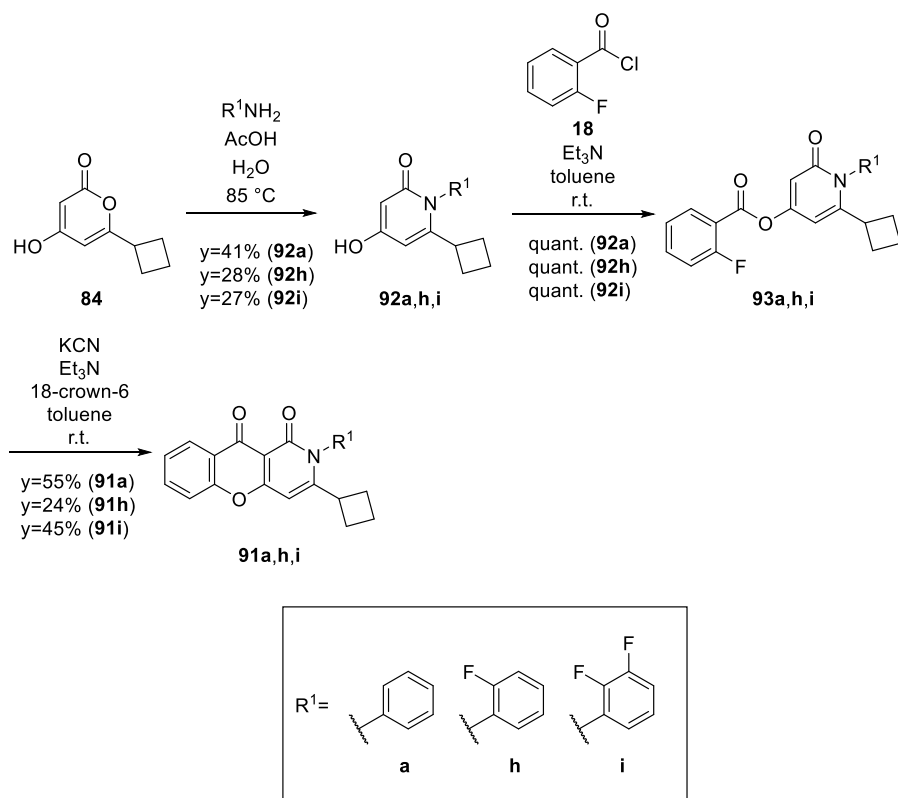
既報の方法⁷³⁾で合成した 6-シクロブチル-4-ヒドロキシ-2*H*-ピラン-2-オン (**84**) を 2-フルオロベンゾイルクロリド (**18**) でアシル化してエステル **85** を得, これを KCN, Et₃N および 18-クラウン-6 で処理し, Fries 転位と芳香族求核置換反応を順次進行させてピラノ[4,3-*b*]クロメン-1,10-ジオン **86** を得た. この反応においては, 生成した化合物 **85** が脱炭酸などを起こし分解しやすいため, 短時間 (60 °C 30 分で攪拌後 100 °C 45 分) で反応を止め, 原料を回収した (回収率 40%). 得られた化合物 **86** を AcOH 存在下, 種々のアミンと反応させた. なお, アミンが塩酸塩の場合にはトリエチルアミンでフリー化して反応に用いた. このアミンの付加反応は目的物と共に複数の副生成物が生成したため, 低収率ではあったが, 対応するクロメノピリジン誘導体 **91b-g** を得た (スキーム 14).

R¹ 側鎖フェニル基誘導体 **91a**, **91h** および **91i** の合成法をスキーム 15 に示す. 化合物 **84** を対応するアニリン誘導体と AcOH 存在下で反応させ, 6-シクロブチル-4-ヒドロキシピリジン-2(1*H*)-オン **92a**, **92h** および **92i** を得た. この反応においても, 先のアミンの付加と同じく, 反応が複雑化し, 1 当量のアニリン誘導体を用いたが, 2 分子のアニリンが付加した副生成物などが確認された. 得ら

れた化合物 **92a**, **92h** および **92i** を 2-フルオロベンゾイルクロリド(**18**)でアシル化し, 前と同様の方法で環化し, フェニル基誘導体 **91a**, **91h** および **91i** を得た.



スキーム 14. R^1 側鎖変換誘導体の合成 (1)



スキーム 15. R^1 側鎖変換誘導体の合成 (2)

R^2 側鎖変換誘導体

クロメノピリジン骨格 R^2 側鎖を種々の置換基に変換した誘導体 7 化合物 (図 18) を合成した (スキーム 16, 17) .

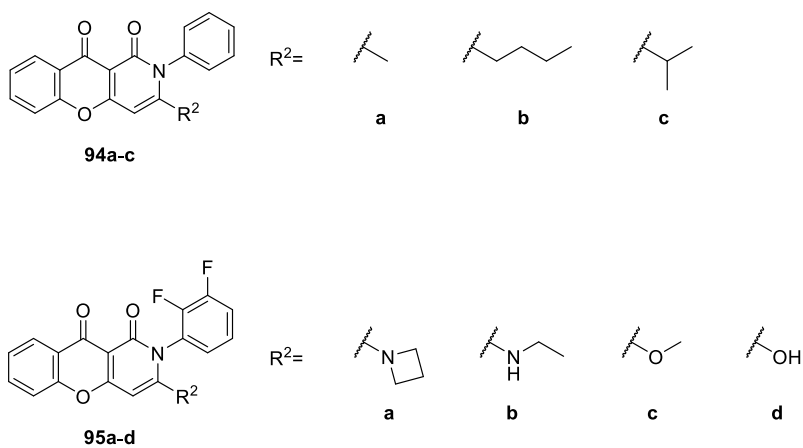
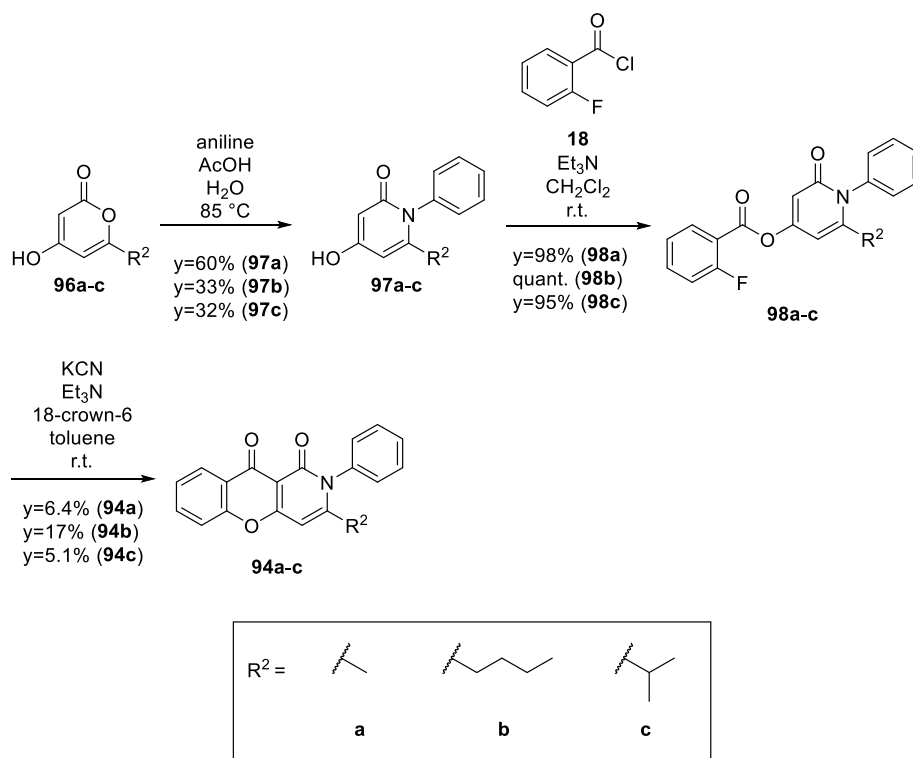


図 18. R^2 側鎖変換誘導体

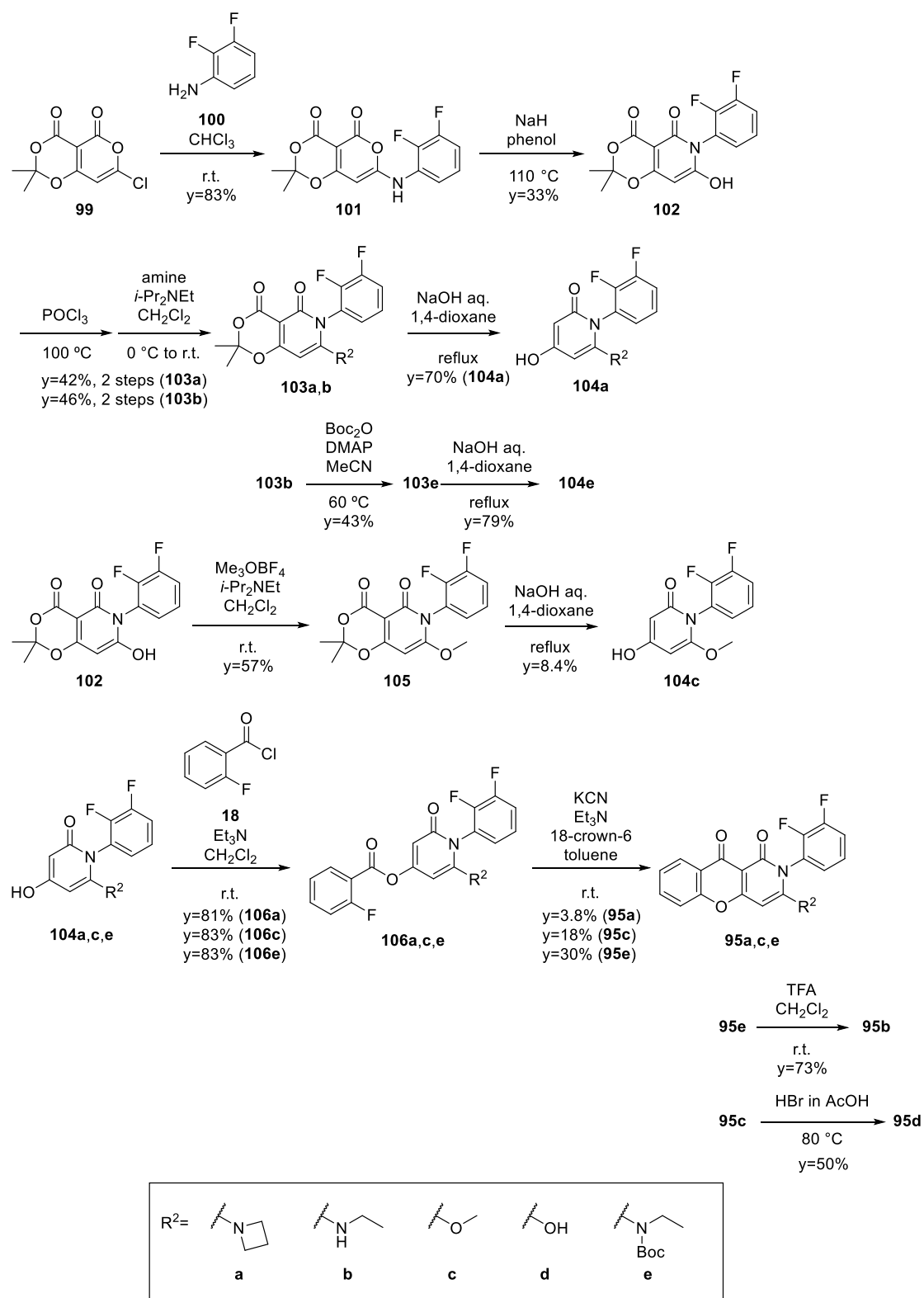
R^2 側鎖変換クロメノピリジン誘導体 **94a-c** の合成法をスキーム 16 に示す. 所望の置換基を有する 6 位置換 4-ヒドロキシ-2*H*-ピラン-2-オン **96a-c** をアニリンと反応させ, 4-ヒドロキシ-1-フェニルピリジン-2(1*H*)-オン **97a-c** を得, 上記と同様の方法で最終化合物に誘導体化した. なお, 出発物質 **96a** は購入し, **96b** および **96c** は化合物 **84** の合成法⁷³⁾ に従って合成した.



スキーム 16. R^2 側鎖変換誘導体の合成 (1)

R^1 側鎖がジフルオロフェニル基, ヘテロ原子を含む R^2 側鎖を有する誘導体の合成法をスキーム 17 に示す. 既報⁷⁴⁾ の方法で合成した化合物 **99** を 2,3-ジフルオロアニリン(**100**)と反応させ, 次いで NaH で処理して 7-ヒドロキシジオキシノピリジンジオン **102** を得た. 化合物 **102** のヒドロキシ基を POCl₃ で塩素化し, 対応するアミンと反応させ, 化合物 **103a** および **103b** を得た. 化合物 **103a** は NaOH 水溶液で加水分解し, 化合物 **104a** を得た. 化合物 **103b** は Boc 保護した後, NaOH 水溶液で処理し, 化合物 **104e** を得た. 化合物 **104a** および **104e** を前記と同様の方法でクロメノピリジン誘導体 **95a** および **95e** に誘導体化し, 化合物 **95e** の Boc 基を脱保護してエチルアミノ基誘導体 **95b** を得た. メトキシ基またはヒドロキシ基を有する誘導体の合成については, 先に得られた化合物 **102**

をトリメチルオキシニウムテトラフルオロボラートでメチル化した後, NaOH 水溶液で加水分解しメキシ基を有する化合物 **104c** を得た. NaOH 水溶液による加水分解, 脱炭酸反応の際に脱メチル体などが副生し, 低収率となった. 得られた化合物 **104c** をクロメノピリジン誘導体 **95c** に誘導体化し, 酢酸溶液中 HBr で処理して脱メチル化することで化合物 **95d** を得た.



スキーム 17. R² 側鎖変換誘導体の合成 (2)

A 環変換誘導体

骨格変換化合物およびクロメノピリジン骨格への置換基導入誘導体 15 化合物(図 19)を合成した(スキーム 18-20). 2 位がフェニル基とジフルオロフェニル基の 2 系統で合成した詳細については後述する.

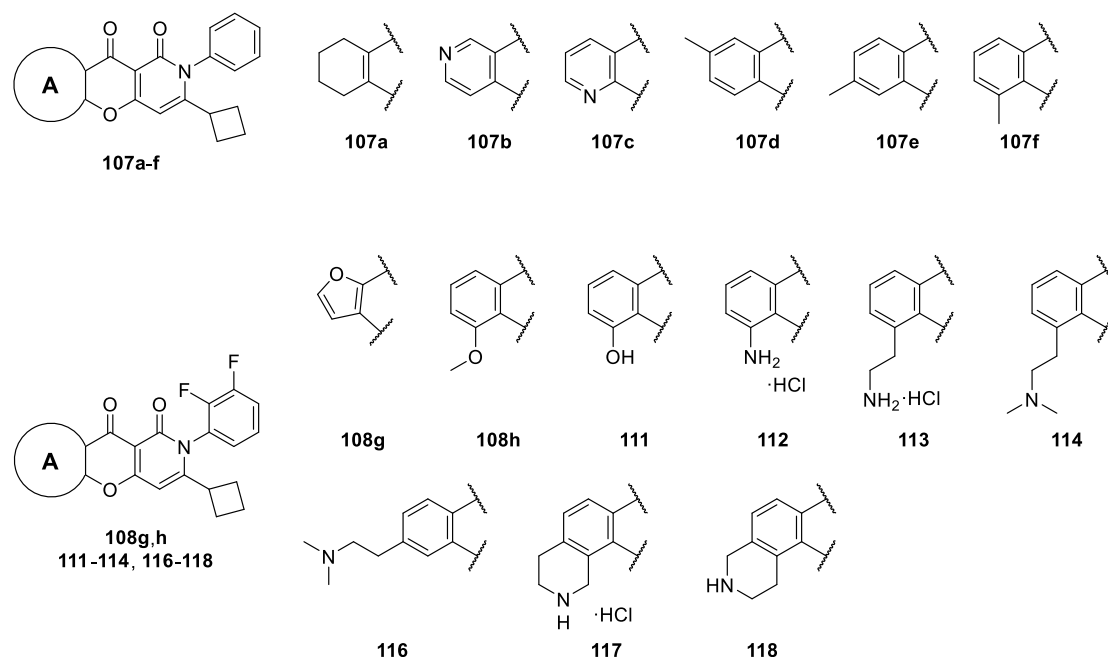
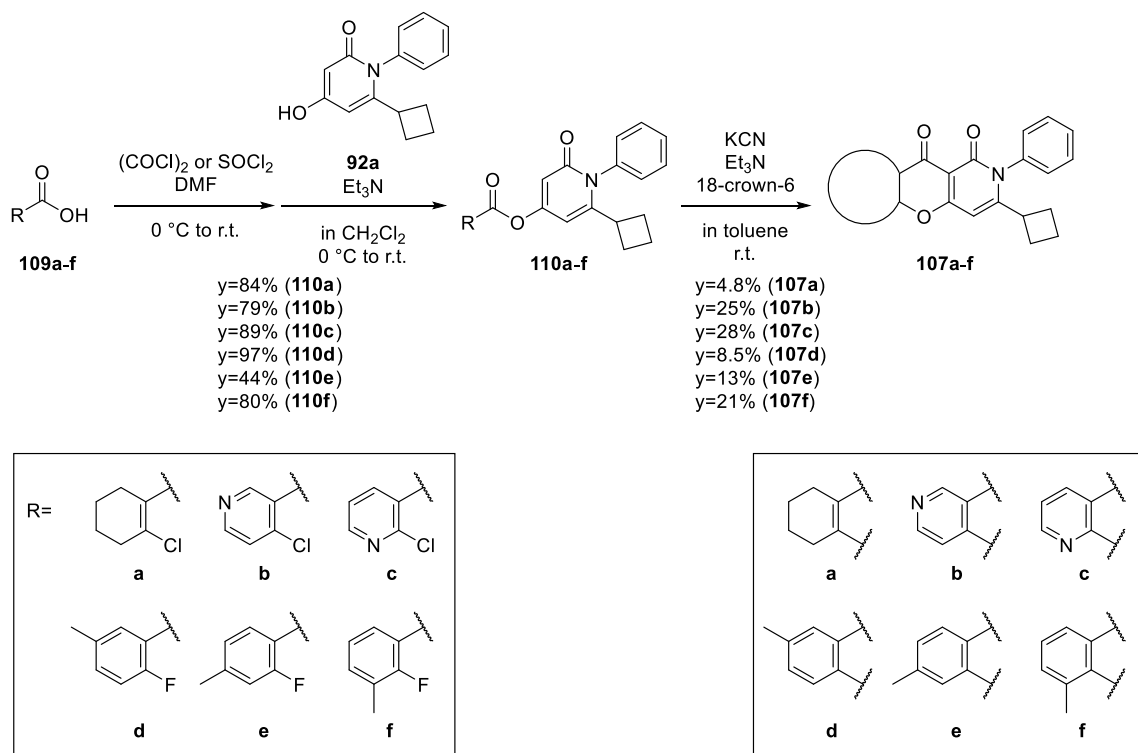


図 19. A 環変換誘導体

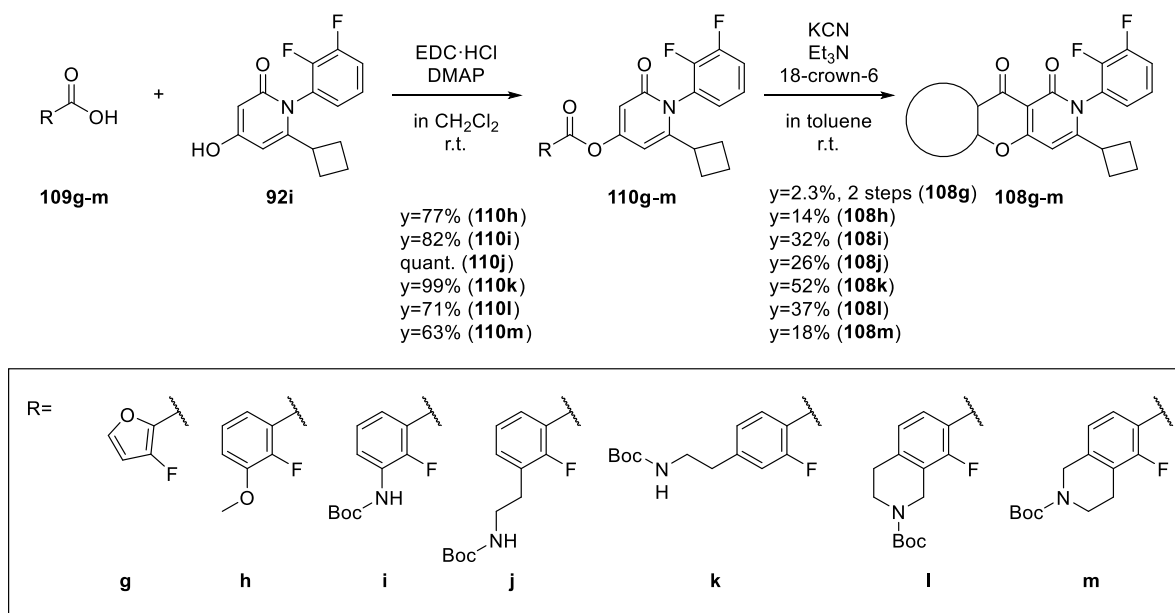
R¹ 側鎖がフェニル基の骨格変換化合物およびクロメノピリジン骨格へのメチル基導入誘導体の合成法をスキーム 18 に示す. 購入した, または既報の方法で合成したカルボン酸 **109a**⁷⁵⁾, **109b-f** を(COCl)₂ または SOCl₂ を用いてカルボン酸クロリドに変換し, 続いて化合物 **92a** と縮合して中間体のエステル **110a-f** を得た. 化合物 **110a-f** を前と同様の方法で三環骨格を有する化合物 **107a-f** に変換した.

スキーム 19 に R¹ 側鎖が 2,3-ジフルオロフェニル基の骨格変換化合物の合成法を示す. 出発原料となるカルボン酸 **109h**⁷⁶⁾, **109i**⁷⁷⁾ および **109m**⁷⁸⁾ は既報の方法に従って合成した. 他のカルボン酸 **109g**, **109j**, **109k** および **109l** の合成は後述する. カルボン酸 **109g-m** を EDC·HCl および DMAP を用いて化合物 **92i** と縮合させ, 中間体のエステル **110g-m** を得, 前記と同じ条件で転位反応および環化反応を行った.

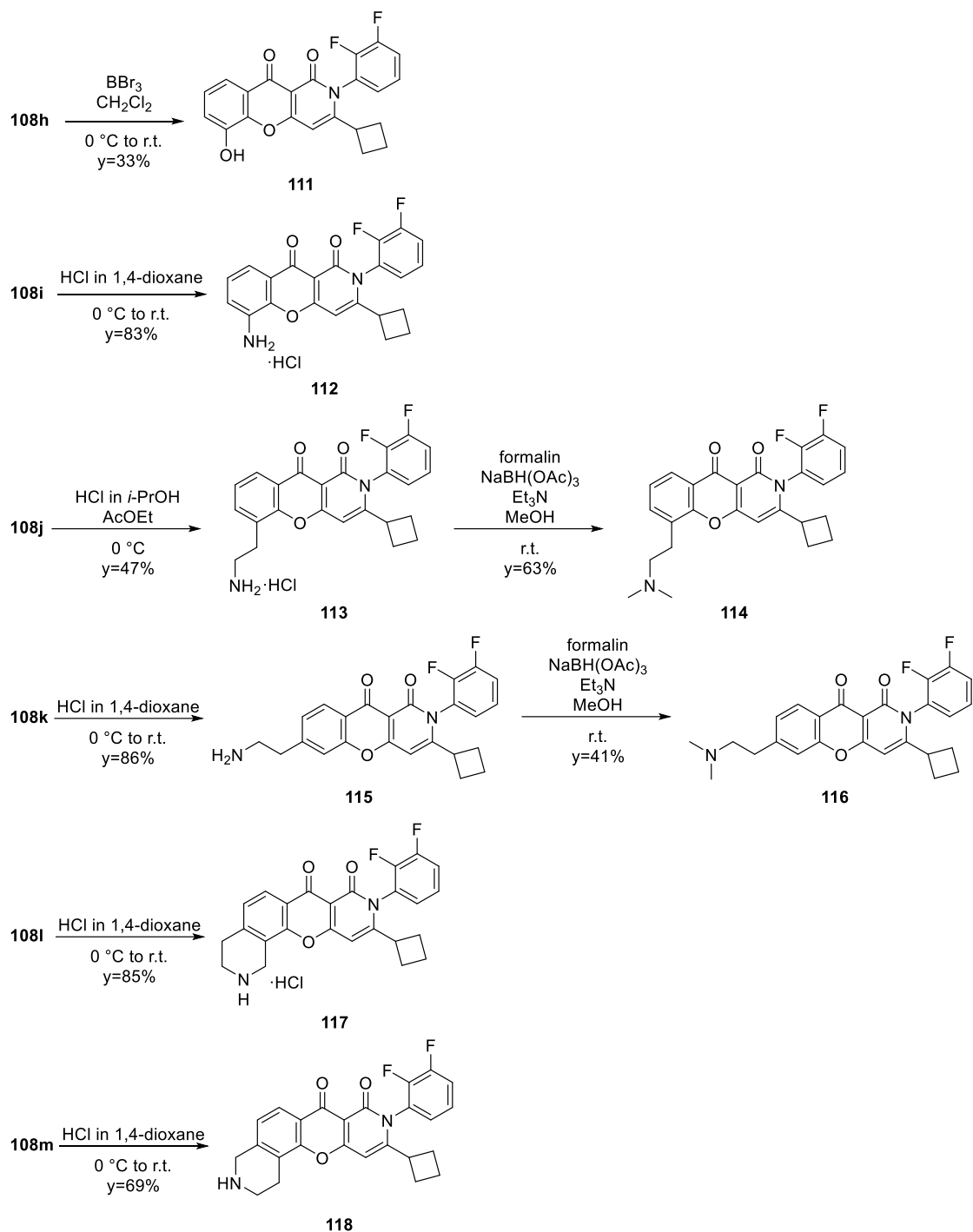
メキシ体 **108h** の BBr_3 を用いた脱メチル化によりヒドロキシ体 **111** を得た. また, 化合物 **108i–108m** の Boc 基の脱保護により, 化合物 **112**, **113**, **115**, **117** および **118** を得, 化合物 **113** および **115** は還元的アミノ化によりジメチル化し, それぞれ化合物 **114** および **116** に誘導した (スキーム 20).



スキーム 18. A 環変換誘導体の合成 (1)



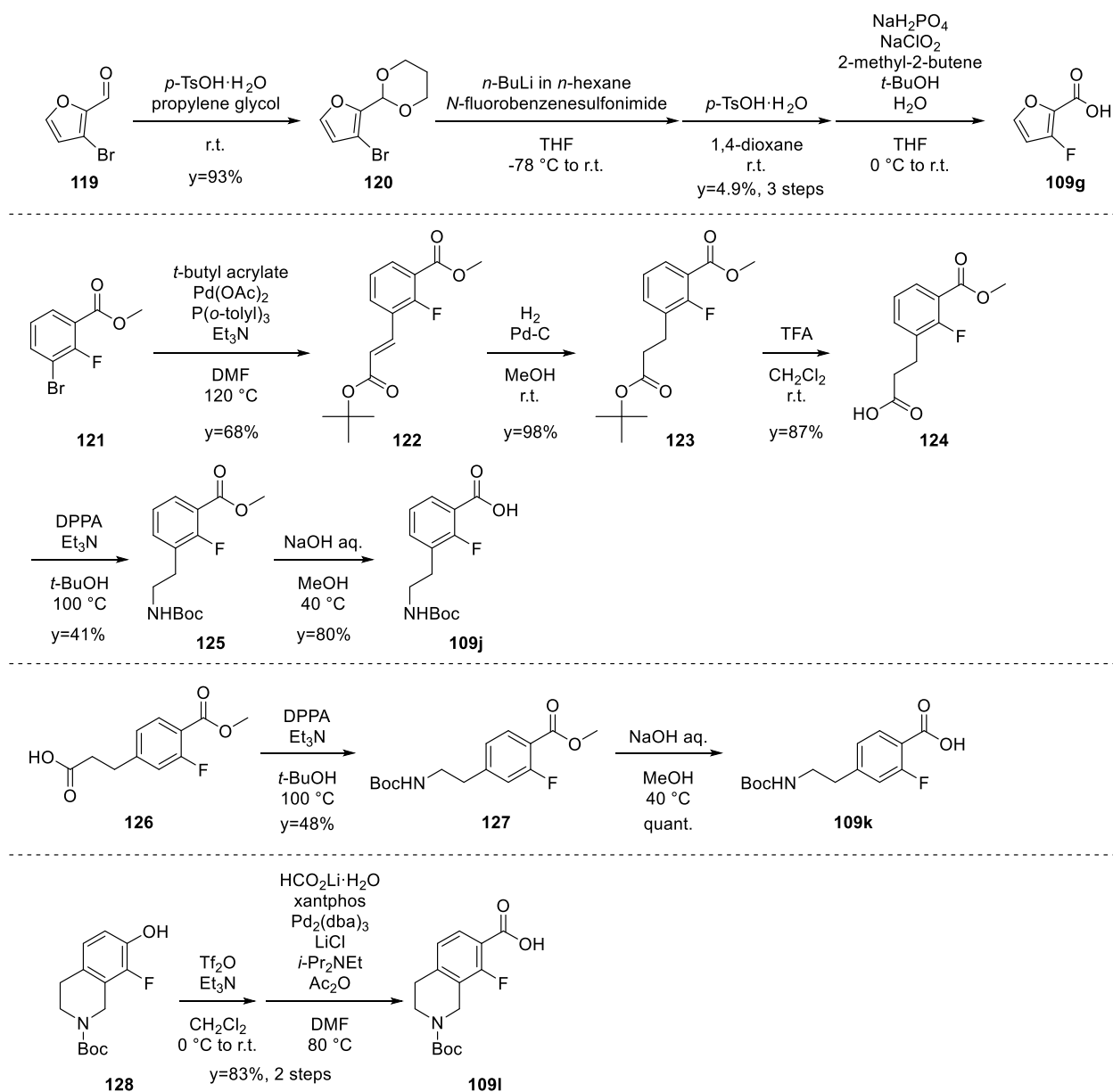
スキーム 19. A 環変換誘導体の合成 (2)



スキーム 20. A 環変換誘導体の合成 (3)

カルボン酸 **109g**, **109j**, **109k** および **109l** の合成法をスキーム 21 に示す. 3-フルオロフラン-2-カルボン酸 (**109g**) は 3-ブロモフラン-2-カルボアルデヒド (**119**) より合成した. 化合物 **119** をアセタール保護し **120** を得, 化合物 **120** 中のブロモ基をフッ素に変換した. アセタールを脱保護した後, アルデヒドを酸化し, カルボン酸 **109g** を得た. カルボン酸 **109j** は 3-ブロモ-2-フルオロ安息香酸メチル (**121**) より合成した. 化合物 **121** とアクリル酸 *t*-ブチルの Heck 反応により化合物 **122** を得, 接触

還元により化合物 **123** を得た. 化合物 **123** を TFA で処理してカルボン酸 **124** を得た. 得られたカルボン酸 **124** の Curtius 転位により Boc 保護されたアミン **125** を得, メチルエステルの加水分解により化合物 **109j** を得た. 既報⁷⁹⁾ の方法に従って合成した化合物 **126** を同様に, Curtius 転位と続くエステル加水分解により化合物 **109k** を合成した. テトラヒドロイソキノリン **109l** は既報⁸⁰⁾ の方法に従って合成した化合物 **128** から, ヒドロキシ基のトリフラート化, 続く Pd 触媒によるカルボキシル化⁸¹⁾ によって合成した.



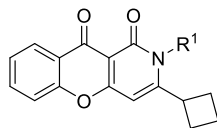
スキーム 21. 出発原料 **109g**, **109j**, **109k** および **109l** の合成

第五節 構造活性相関

W402X ナンセンス変異に有効な化合物を見出すため、原因変異の約 30–40%を占める⁵²⁾ IDUA W402X ナンセンス変異を有する Hurler 症患者由来線維芽細胞を用いて評価を行った。臨床使用での症状改善にはリードスルーにより回復した欠損酵素の最大活性が重要である。そこで既述の蛍光基質を用いて、IDUA 酵素活性を測定し、構造活性相関を議論した。

1 および 3 μM の化合物 **91a** で処置した Hurler 症患者由来細胞では、IDUA 酵素活性はコントロールに比べて 1.6 倍および 7.4 倍であった。化合物 **91a** のリードスルー誘導活性をさらに増強するために、化合物 **91a** の R^1 側鎖を変換した(表 5)。まず、化合物 **91a** のフェニル基を脂肪族環に変換することを試みた。シクロペンチル基を持つ化合物 **91c** を 1 μM 処置した細胞では、コントロールに比べて酵素活性が 4.4 倍であった。一方、シクロプロピル基を有する化合物 **91b**, 酸素原子を導入したテトラヒドロフラン環を有する化合物 **91d**, テトラヒドロピラン環を有する化合物 **91e** は活性が消失した。続いて、ピリジン環を有する化合物 **91f** と芳香環に酸素官能基を導入した誘導體 (**91g**)を検討したが、いずれも活性が消失した。活性を維持したまま薬物動態プロファイルを改善するために、フッ素の導入を検討したところ、*o*-フルオロフェニル基を導入した化合物 **91h** は活性を維持した。オルト位とメタ位の両方にフッ素を導入した化合物 **91i** は活性がさらに向上し、酵素活性はコントロールの活性から 1 μM で 6.7 倍, 3 μM で 10.2 倍に増加した。

表 5. R¹ 側鎖変換クロメノピリジン誘導体の構造式, 分子量, clogD_{7.0} 値および
リードスルー誘導活性

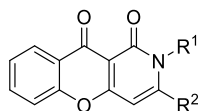


Compound	R ¹	M.W.	clogD _{7.0}	Ratio vs. control ^{a)}	
				1 μM	3 μM
91a		343.38	3.41	×1.6	×7.4
91b		307.35	2.69	×0.88	×0.95
91c		335.40	3.30	×4.4	×9.7
91d		337.37	2.08	×1.0	×1.1
91e		351.40	2.50	×0.98	×4.3
91f		344.37	2.52	×1.4	×1.1
91g		373.41	3.60	×0.88	×0.87
91h		361.37	3.52	×3.1	×7.4
91i		379.36	3.59	×6.7	×10.2

a) 患者由来細胞におけるコントロールに対するリードスルー誘導活性比

次に, 化合物 **91a** および **91i** を基に R² 側鎖を変換した化合物について評価した(表 6). シクロブチル基を鎖状アルキル基に変換した化合物 **94a**, **94b**, **94c** の活性は消失した. 次に, ヘテロ原子の導入を検討した. しかしながらシクロブタン環をアゼチジン環に変換した化合物 **95a** の活性は低下した. エチルアミノ基 **95b**, メキシ基 **95c**, ヒドロキシ基 **95d** への変換でも活性が低下し, R² へのヘテロ原子の導入は活性上許容されないことが示唆された. R² 側鎖は許容性が低く, シクロブチル基が最適であった.

表 6. R²側鎖変換クロメノピリジン誘導体の構造式, 分子量, clogD_{7.0} 値および
リードスルー誘導活性



Compound	R ¹	R ²	M.W.	clogD _{7.0}	Ratio vs. control ^{a)}	
					1 μM	3 μM
91a			343.38	3.41	×1.6	×7.4
94a			303.32	2.68	×0.96	×1.0
94b			345.40	3.66	×0.93	×3.2
94c			331.36	3.22	×0.86	×1.1
91i			379.36	3.59	×6.7	×10.2
95a			380.34	2.42	×1.0	×4.8
95b			368.33	2.64	×1.9	×2.5
95c			355.29	2.49	×1.4	×1.3
95d			341.27	-0.76	×1.2	×1.2

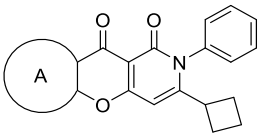
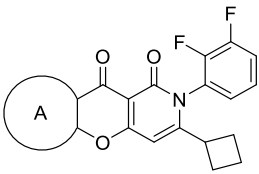
a) 患者由来細胞におけるコントロールに対するリードスルー誘導活性比
















次に、クロメノピリジン骨格のベンゼン環部分を変換した化合物について評価した(表 7)。脂肪族環を有する化合物 **107a**, 窒素原子を導入しピリジン環を有する化合物 **107b**, **107c** はいずれも活性が消失した。5員環芳香族化合物も検討したが、フラン誘導体 **108g** の活性も消失したため、ベンゼン環に固定して置換基の導入を検討した。各位置にメチル基を導入した化合物はすべて活性が低下した(化合物 **107d-f**)。ヘテロ原子を含む置換基を導入したメキシ体 **108h** やヒドロキシ体 **111** も活性が低下した。種々の置換基を検討した結果、アミノ基を有する化合物 **112** は活性を保持して

いたため、(3 μM でコントロールの 7.6 倍), 塩基性側鎖の導入を検討した. アミノエチル基を導入した化合物 **113** は活性が良好であったが(1 μM でコントロールの 10.0 倍), 雄性 C57BL/6J マウスに 30 mg/kg で経口投与した際の経口吸収性は不良であった(C_{max} 検出限界以下). この結果に基づき, 膜透過性を改善するために化合物 **113** のアミノ基をジメチル化したところ, 酵素活性は 1 μM でコントロールの 14.1 倍までさらに上昇し, 最大血漿中濃度も改善された($C_{\text{max}} = 4.97 \mu\text{M}$) (化合物 **114**). ジメチルアミノメチル基またはジメチルアミノプロピル基の場合, 活性は低下し, 炭素鎖長は 2 つが最適であった(data not shown). ジメチルアミノエチル基を 6 位に移動した化合物 **116** も活性を保持していた. 化合物 **113**, **114** および **116** は高濃度でリードスルー誘導活性が減少するベルシェイプの濃度反応曲線を示した. この現象は第一章で述べたように ataluren においても観察されており^{36,37,41)}, 詳細は不明であるが, リードスルーのメカニズムに由来する現象と推察される.

本実験(表 5-7)では, ヒト線維芽細胞増殖用低血清液体培地(FibroLife S2; LifeLine Cell Technology, Frederick, MD)で Hurler 症患者由来線維芽細胞を培養し, 合成した化合物のリードスルー誘導活性の評価を行った. FibroLife S2 培地の利用は, 健常人線維芽細胞よりも細胞死を起こしやすい患者由来線維芽細胞が急速な増殖を示し, 安定した化合物スクリーニングが可能になる利点がある. しかし, このような急速な細胞増殖は実際の生体環境を反映していない可能性があるため, 有望な化合物が取得されつつあったこの時点で, より実際の生体に近い条件下で化合物を評価するため, 使用する培地を細胞増殖が遅い 10% FBS 含有最小必須培地(MEM)に変更した(表 8). FibroLife S2 培地使用時と同様に MEM 培地でも 5 位または 6 位にジメチルアミノエチル基を有する化合物(**114**, **116**)が良好な活性を示すことが確認された. このことからクロメノピリジン環の 5 位または 6 位から適切な位置に窒素原子を配置することが活性に重要であることが示唆された. そこで, 5 位と 6 位を環化したテトラヒドロイソキノリン誘導体 **117**, **118** を合成し評価した. 両化合物とも良好な活性を示し, 0.3 μM からコントロールの約 3 倍の活性を示した. また, 化合物 **118** は化合物 **117**($C_{\text{max}} = 2.95 \mu\text{M}$)よりも優れた最大血漿中濃度($C_{\text{max}} = 8.82 \mu\text{M}$)を示し, KY-640 と命名し, さらなる評価を行うことにした.

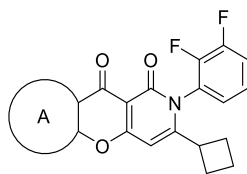
表 7. 骨格変換誘導体の構造式, clogD_{7.0} 値およびリードスルー誘導活性(細胞増殖条件)

Compound	A	clogD _{7.0}	Ratio vs. control ^{a)}	
			1 μM	3 μM
91a		3.41	×1.6	×7.4
107a		3.22	×1.3	×1.5
107b		2.68	×0.95	×1.0
107c		2.75	×0.92	×0.93
107d		3.76	×1.6	×5.9
107e		3.76	×0.86	×2.5
107f		3.76	×0.92	×4.0
91i		3.59	×6.7	×10.2
108g		2.73	×1.2	×1.4
108h		3.62	×1.2	×8.5
111		2.81	×0.80	×4.3
112		2.88	×6.4	×7.6
113		0.33	×10.0	×7.0
114		1.60	×14.1	×10.8
116		1.66	×12.5	×11.2

a) 患者由来細胞におけるコントロールに対するリードスルー誘導活性比

表 8. 骨格変換誘導体の構造式, clogD_{7.0} 値およびリードスルー誘導活性 (細胞非増殖条件)



Compound	A	clogD _{7.0}	Ratio vs. control ^{a)}		C _{max} (μM)	AUC _{0→24} (μM·h)
			0.3 μM	1 μM		
113		0.33	×3.0	×2.9	N.D. ^{b)}	N.D. ^{b)}
114		1.60	×2.5	×3.7	4.97	17.1
116		1.66	×1.8	×4.0	-	-
117		1.38	×2.8	×3.8	2.95	12.6
118 (KY-640)		1.44	×3.2	×4.1	8.82	35.1

a) 患者由来細胞におけるコントロールに対するリードスルー誘導活性比

b) not detected.

第六節 KY-640 の生物学的評価

IDUA W402X ナンセンス変異を有する Hurler 症患者由来線維芽細胞に対する KY-640 の効果の曝露時間依存性を調べた(図 20). 2 日間の KY-640 処置により, Hurler 症患者由来線維芽細胞における *IDUA* 活性は, 0.3 および 1 μM で濃度依存的に有意に上昇したが, ataluren は 100 μM 処置でも活性の増加が見られなかった. この *IDUA* 活性の上昇が細胞内 GAG 量を低下させるのに十分であるかどうかを確認するため, GAG 結合 Blyscan™ dye を用いて GAG 量を定量した. Hurler 症患者由来の線維芽細胞では, 正常ヒト線維芽細胞よりも細胞内 GAG 量が有意に高かった. KY-640 を 0.1–1 μM で 2 日間処置しても GAG 量には影響しなかったが, 6 日間処置すると濃度依存的に GAG が有意に減少した. KY-640 のリードスルー誘導活性による酵素発現後, GAG は *IDUA* 酵素によって徐々に代謝されたと考えられる.

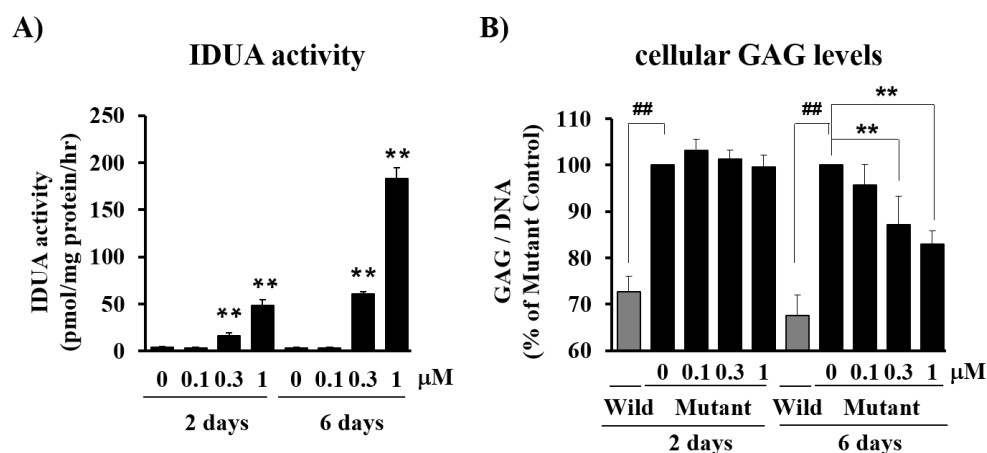


図 20. Hurler 症患者由来線維芽細胞における KY-640 のリードスルー誘導作用の評価.

A) *IDUA* 酵素活性 B) 細胞内 GAG 量

平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3-6$). ** $p < 0.01$, ## $p < 0.01$, Student's t -test.

第 2 章で述べた KY-516 は Q70X ナンセンス変異に対しては有効であったが, W402X ナンセンス変異に対しては効果が認められなかった. また, 本研究で用いた W402X 変異を持つ Hurler 症患者由来線維芽細胞では, KY-516 は 30 μM 処置でも効果がなかった. そこで, 既述のルシフェラ

一ゼアッセイ系を用いて、KY-640 のリードスルー誘導活性の配列特異性を検討した。その結果、KY-640 のリードスルー誘導活性は Q70X 変異よりも W402X 変異に対して強く、KY-516 とは対照的であった(図 21)。KY-516 と KY-640 のリードスルー作用の塩基配列特異性が異なる理由は不明であるが、これまでに報告されているリードスルー誘導化合物はそれぞれ塩基配列特異性が異なることが示されており、ナンセンス変異の周辺配列によっても影響を受けた可能性が考えられる。

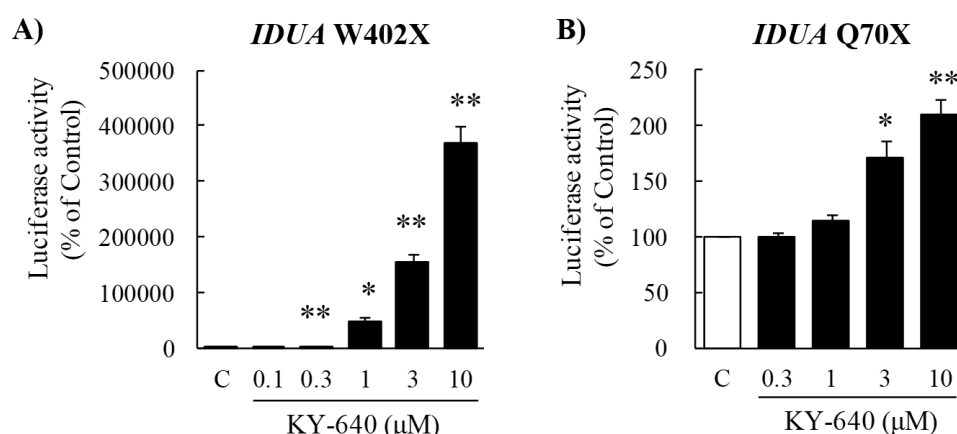


図 21. ルシフェラーゼアッセイによる KY-640 のリードスルー誘導作用の評価。

C: Control, 平均値 ± 標準誤差 (n = 4), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's t -test.

次に、KY-640 が in vivo でナンセンス変異を抑制するかどうかを調べるため、ヒトの IDUA W402X 変異のホモログである *Idua* W392X (TGG→TAG) 変異を有するノックインマウスを作製した。ホモ接合性の *Idua* W392X 変異は、すべての臓器で重度の IDUA 欠損をもたらし、肝臓、心臓、腎臓、肺で GAG の蓄積が観察された。KY-640 (30 および 100 mg/kg) を 1 日 2 回 (BID), 8 日間経口投与した結果、KY-640 30 mg/kg (BID) では効果が認められなかったが、100 mg/kg (BID) 投与群では肝臓、脾臓および脳で IDUA 活性の有意な増加が確認された(図 22)。

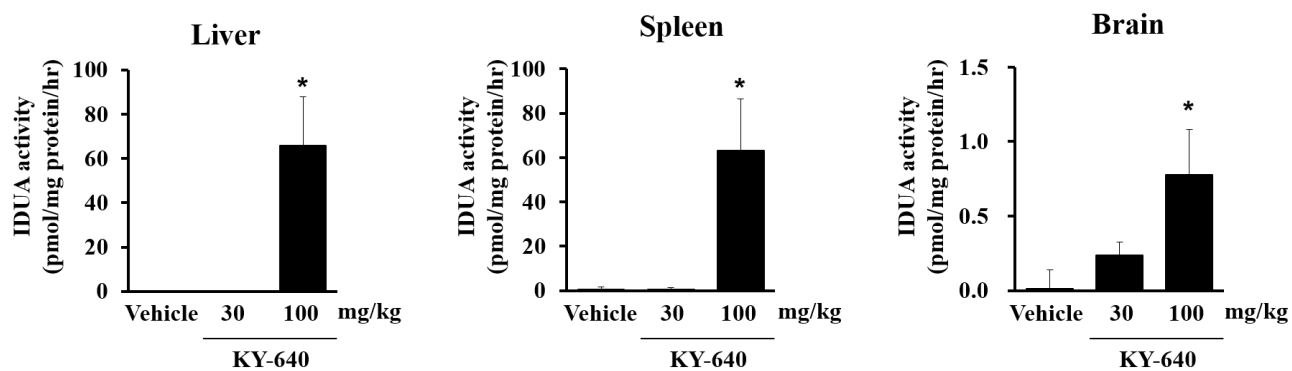


図 22. 雌性 *Idua* W392X ノックインマウスにおける KY-640 のリードスルー誘導作用
 平均値 \pm 標準誤差 (n = 3-6). * $p < 0.05$, Student's *t*-test.

第七節 小括

第二章で述べた KY-516 は Q70X ルシフェラーゼアッセイにおいて臨床使用されている ataluren の約 460 倍の活性を示したが、W402X ナンセンス変異に対しては効果が弱く、配列特異性が確認された。ムコ多糖症 I 型は Q70X と W402X の 2 種類のナンセンス変異が同程度の割合で、原因変異の併せて約 7 割を占めるため、W402X ナンセンス変異に対しても有効な治療薬の創製は重要である。配列特異性に関して、ataluren も KY-516 と同様の傾向を示したことから、このリードスルー誘導活性の配列特異性はその構造的特徴に由来するものである可能性が高いと考えられた。

そこで、著者は KY-516 とは異なる配列特異性を有する化合物を取得するため、異なる構造系からの構造展開を行うこととし、ataluren 等と異なる特徴的な三環性構造を有するノバルティス社のピリミドキノリン誘導体に着目した。ピリミドキノリン誘導体から着想を得て、骨格変換研究を行い、独自の新規骨格であるクロメノピリジン誘導体を見出し、構造展開を行った。IDUA W402X 変異を有する Hurler 症患者由来線維芽細胞を用いて、合成化合物のリードスルー誘導作用を評価した。化合物 **91a** のリードスルー誘導作用による IDUA 酵素活性の増加は 1 μM 処置でコントロールの 1.6 倍、3 μM で 7.4 倍であり、さらなるリードスルー誘導活性の増強を目指した。化合物設計にあたり、リード化合物の高い平面性に由来する低水溶性や毒性を懸念し、ヘテロ原子の導入や飽和環への変換等を試みた。しかしながら、化合物 **91a** の R¹ 側鎖のヘテロ原子を含むテトラヒドロピラン環やピリジン環への変換はすべて活性が消失した。活性を維持したまま薬物動態プロファイルを改善するためにフッ素の導入を検討したところ、2,3-ジフルオロフェニル基を有する化合物 **91i** が良好な活性を示し、IDUA 酵素活性は 1 μM でコントロールの 6.7 倍、3 μM で 10.2 倍であった。続いて、化合物 **91a** および **91i** を基に R² 側鎖を変換したが、鎖状アルキル基やヘテロ原子の導入は活性上許容されなかった。次に、クロメノピリジン骨格のベンゼン環部分の構造変換を行った結果、塩基性側鎖の導入により活性が向上することを見出した。クロメノピリジン骨格 5 位または 6 位から適切な位置に塩基性窒素原子を配置することで活性の向上が見られたことから、5 位と 6 位を環化し、窒素原子の位置を固定したテトラヒドロイソキノリン誘導体 **118** は 0.3 μM からコントロールの 3.2 倍と良好

な活性を示した. 加えて化合物 **118** はマウスにおいて良好な経口吸収性を示したことから, **KY-640** と命名し, さらなる生物学的評価を行った (図 23).

KY-640 は Hurler 症患者由来線維芽細胞において IDUA 活性を, 0.3 および 1 μM で濃度依存的に有意に上昇させ, 6 日間処置により濃度依存的に GAG 量を有意に低下させた. ルシフェラーゼアッセイ系を用いて, **KY-640** のリードスルー誘導活性の配列特異性を検討した結果, **KY-640** のリードスルー誘導活性は Q70X 変異よりも W402X 変異に対して強く, **KY-516** とは対照的であった. **KY-516** と **KY-640** のリードスルー作用の塩基配列特異性が異なる理由の詳細は不明であるが, ナンセンス変異の周辺配列の違いにより影響を受けた可能性が考えられる. また, **KY-640** はヒトの IDUA W402X 変異のホモログである *Idua* W392X 変異を有するノックインモデルマウスにおいて, 肝臓, 脾臓および脳 IDUA 活性を有意に増加させた. **KY-640** はムコ多糖症 I 型 Hurler 症に対して, **KY-516** を補完する配列特異性を有する新規治療薬として期待される.

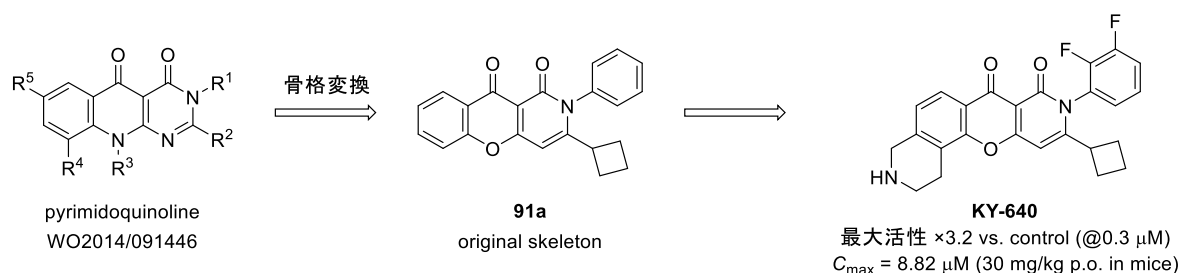


図 23. 新規クロメノピリジン型リードスルー誘導薬のまとめ

総括

約 7,000 種存在すると言われている希少疾患に対する治療薬は発症機序に対する知見の乏しさ等の理由で充足しておらず、世界的な課題となっている。希少疾患の約 7 割は遺伝性疾患であり、そのうち約 10% がナンセンス変異に由来している。このようなナンセンス変異を原因とする疾患に対して、近年、リードスルー誘導薬に代表されるナンセンス変異を抑制する治療戦略が注目されている。リードスルー誘導薬はナンセンス変異により正常終止コドンの上流に現れた未熟終止コドンを読み飛ばし、欠損タンパク質の完全長での産生を回復させる根治的治療法として期待されている。これまでに多くのリードスルー誘導薬が報告されてきたが、上市に至ったのはデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬 **ataluren** のみである。**Ataluren** は欧州において条件付き承認を受け、臨床使用されているが、その臨床試験においては明確な薬効を示せておらず、米国では承認が拒否されている。そのため、新たな薬効、安全性に優れたリードスルー誘導薬の開発が望まれている。新規リードスルー誘導薬を開発するにあたり、そのメカニズム特性から欠損タンパク質が酵素である疾患が有効であると考えられた。そこで、本研究ではライソゾーム酵素が欠損するムコ多糖症 I 型に対する新規リードスルー誘導薬の創製を目指した。ムコ多糖症 I 型、特に重症型の **Hurler** 症候群は生まれてすぐに中枢も含めた全身症状を呈する非常に重篤な疾患であり、現在、酵素補充療法と造血幹細胞移植が根本的治療法として利用可能であるが、低分子治療薬は存在しない。また、ムコ多糖症 I 型の変異遺伝子は **Q70X** と **W402X** の 2 種類のナンセンス変異が約 70% を占めており、リードスルー作用による欠損タンパク質の回復が治療法として有効であると考えられた。新規リードスルー誘導薬の創製にあたり、これまでに報告されているリードスルー誘導薬のファーマコフォアを参考に、臨床使用されている **ataluren** と、それと異なる構造系である三環性構造を有するピリミドキノリン誘導体の 2 種類の構造系を基に構造展開を行い、それぞれ独自の構造の取得を目指した。**Ataluren** は **DMD** に対して条件付き承認を受けているが、その他の疾患については開発が中止されている。これは、**ataluren** の薬効が不十分であるため、または **ataluren** のリードスルー誘導作用に疾患原因遺伝子配列特異性があるためであると考えられた。そこで本研究では 2 種類の構造系で先行化合物より強力なリードスルー誘導作用を有する化合物を見出し、構造系ごとの配列特異性を明らかにすることを目的とした。

テルアリール型リードスルー誘導薬の創製では、**ataluren** を基に構造展開を行い、リードスルー誘導活性の増強を目指した。**Ataluren** のメタ位カルボキシ基をパラ位スルファモイルアミノ基に変換

することにより、活性の増加が認められた。さらに B 環のオキサジアゾール環をトリアゾール環、C 環フルオロベンゼン環をシアノベンゼン環とすることで、ataluren に比べて約 460 倍高活性で良好な経口吸収性を有する KY-516 を見出した。KY-516 は Q70X ナンセンス変異に対して良好なリードスルー誘導活性を示した一方、W402X 変異に対しては効果が弱く、配列特異性が認められた (図 24)。

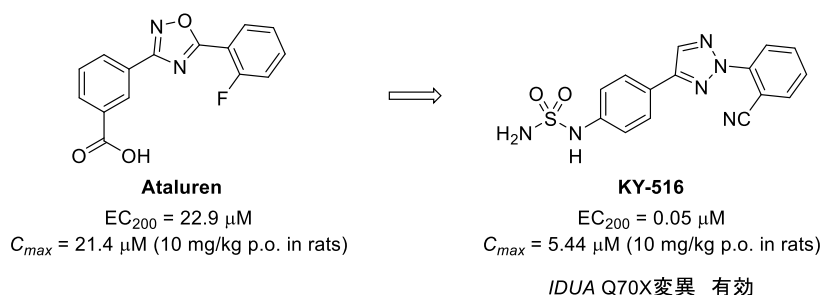


図 24. 新規テルアリール型リードスルー誘導薬

クロメノピリジン型リードスルー誘導薬の創製では、特許にて報告されているピリミドキノリン誘導体から着想を得て、得られたリード化合物から更なる構造展開を行い、KY-516 と特性が異なる強力なリードスルー誘導薬の創製を目指した。クロメノピリジン骨格 2 位の側鎖を 2,3-ジフルオロフェニル基とした化合物で活性の向上が認められ、環骨格をピペリジン環と縮環させ、塩基性窒素原子を導入した KY-640 が $0.3 \mu M$ から良好な活性を有することを見出した。KY-640 は W402X 変異を有する Hurler 症患者由来細胞や相当する変異を有するモデルマウスにおいて有効であったが、Q70X 変異に対しては効果が弱く、KY-516 とは対照的な配列特異性を示した (図 25)。

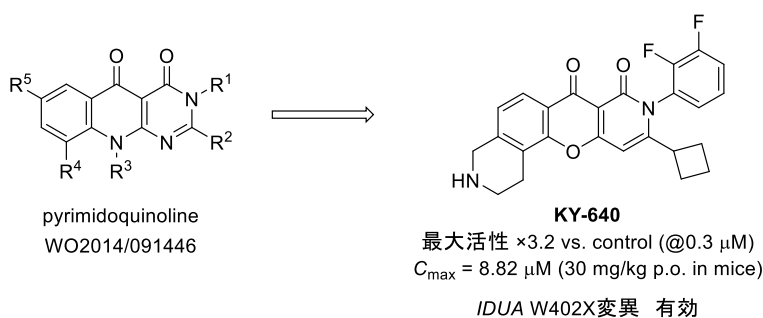


図 25. 新規クロメノピリジン型リードスルー誘導薬

本研究において、テルアリール構造およびクロメノピリジン構造の異なる 2 種類の構造系の新規リードスルー誘導薬を見出し、そのムコ多糖症 I 型における変異遺伝子配列特異性を明らかにした。テルアリール誘導体 KY-516 およびクロメノピリジン誘導体 KY-640 は、それぞれ IDUA Q70X

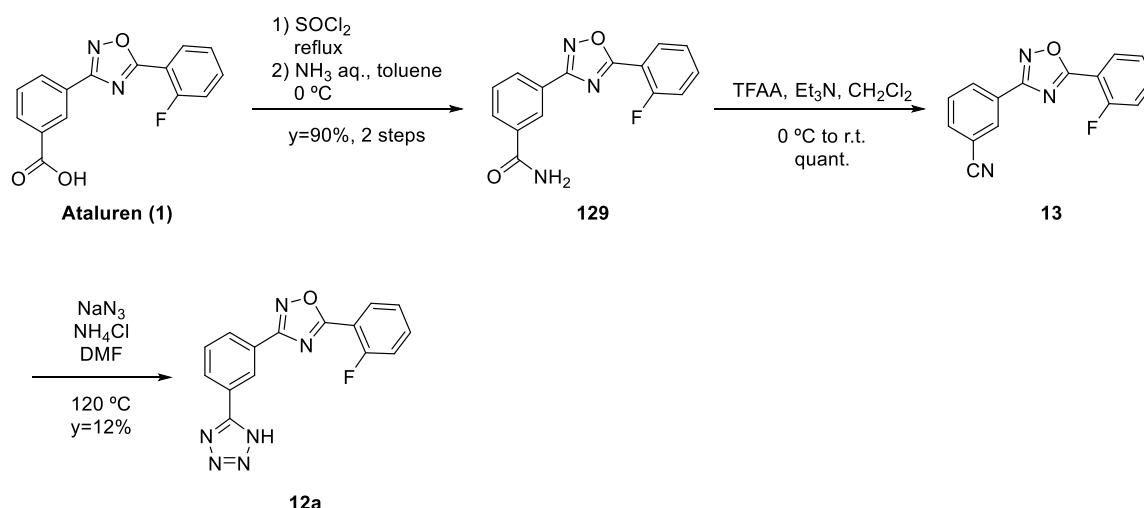
および W402X ナンセンス変異に対して選択的なリードスルー誘導活性を示した. これら 2 種類の相補的なリードスルー誘導薬に関する更なる研究により, 新規ムコ多糖症 I 型治療薬としての可能性, 未だ不明な部分が多いリードスルーメカニズムを解明するツールとしての利用が期待される.

実験の部

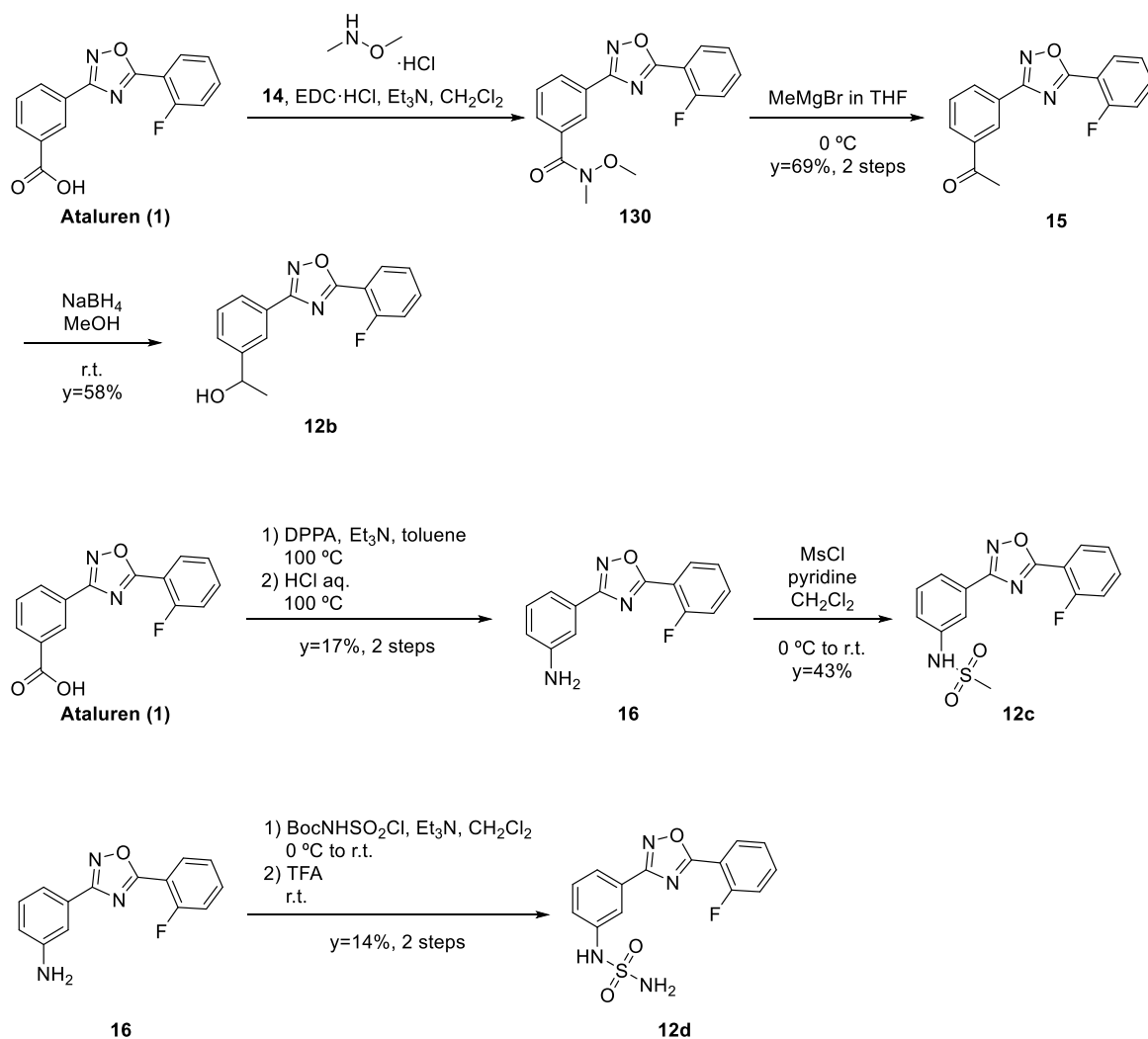
融点測定装置 MP-500P (ヤナコテクニカルサイエンス, 東京) により融点 (mp) を測定し, 未補正值を記載した. 核磁気共鳴装置 JNM-AL-400 および JNM-ECZL400S (JEOL, 東京) によりプロトン核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR) および炭素-13 核磁気共鳴スペクトル (^{13}C -NMR) を測定した. 化学シフトはテトラメチルシランを内部標準として使用し, δ 値 (ppm) を記載した. シグナル分裂は s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), t (triplet), q (quartet), quintet, m (multiplet), br (broad) を用いて表記した. フーリエ変換赤外分光光度計 FT-720 (堀場製作所, 京都) により赤外吸収スペクトル (IR) を測定した. Expression CMS-L ESI-MS 装置 (Advion, Ithaca, U.S.A.) および micrOTOF2-kp ESI-TOF/MS (Bruker, Massachusetts, U.S.A.) によりマスペクトルを測定した. シリカゲルとして Daisogel No.1001W (大阪ソーダ, 大阪) を用いてカラムクロマトグラフィーを行った. TLC プレートとして TLC silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて反応をモニターした. 化合物の cLogP, cLogD_{7.0} は ACD/Percepta (Advanced Chemistry Development, Ontario, Canada) を用いて計算した.

第二章に関する実験

オキサジアゾール誘導体の合成



スキーム 22. 化合物 **12a** の合成



スキーム 23. 化合物 **12b**, **12c** および **12d** の合成

スキーム 22, 23 に記載の化合物 **12a**, **12b**, **12c** および **12d** は、以下の方法にて ataluren (**1**) より中間体 **13**, **15** および **16** を経て合成した。

3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzamide (**129**)

3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzoic acid (**1**)³⁶⁾ (470 mg, 1.65 mmol) を SOCl₂ (5.0 mL, 69 mmol) に懸濁し、1 時間加熱還流した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣を toluene (20 mL) に溶解し、氷冷下、28% アンモニア水 (1.0 mL, 15 mmol) を加え、同温にて 15 分攪拌した。析出物をろ取し、化合物 **129** の粉末 (420 mg, 収率 90%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.48–7.60 (3H, m), 7.70 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.78–7.85 (1H, m), 8.09–8.14 (1H, m), 8.20–8.30 (3H, m), 8.57–8.62 (1H, m).

3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzonitrile (13)

化合物**129** (420 mg, 1.48 mmol) をCH₂Cl₂ (2 mL) に懸濁し、氷冷下、Et₃N (0.41 mL, 3.0 mmol) および trifluoroacetic anhydride (TFAA) (0.41 mL, 2.9 mmol) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、CH₂Cl₂にて抽出後、有機層を乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、化合物**13**の粉末 (420 mg, quant.) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.48–7.60 (2H, m), 7.77–7.87 (2H, m), 8.08–8.14 (1H, m), 8.20–8.30 (1H, m), 8.37–8.43 (1H, m), 8.52–8.56 (1H, m).

3-(3-(1H-Tetrazol-5-yl)phenyl)-5-(2-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazole (12a)

化合物**13** (173 mg, 0.652 mmol) をDMF (2 mL) に溶解し、塩化アンモニウム (52 mg, 0.98 mmol) および NaN₃ (64 mg, 0.98 mmol) を加え、120 °Cにて 14 時間攪拌した。放冷後、反応液に 2.0 M 塩酸 (10 mL) を加え、不溶物をろ取した。得られた粉末を水 (5 mL) および *t*-BuOMe (5 mL) にて順次洗浄し、ODSカラムクロマトグラフィー (0.01 M KH₂PO₄水溶液:MeCN:AcOH = 60:40:0.2) にて精製した。目的分画をAcOEtにて抽出後、有機層を水および飽和食塩水にて順次洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、得られた白色粉末に *t*-BuOMe (2 mL) および *n*-hexane (5 mL) を加え不溶物をろ取し、化合物**12a**の粉末 (25 mg, 収率12%) を得た。

mp 227–230 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.45–7.65 (2H, m), 7.77–7.92 (2H, m), 8.20–8.35 (3H, m), 8.75–8.82 (1H, m); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 111.6 (d, *J* = 11.6 Hz), 117.3 (d, *J* = 20.7 Hz), 125.3, 125.5, 125.5, 127.0, 129.4, 129.9, 130.6, 130.9, 135.7, 135.8, 159.9 (d, *J* = 258.2 Hz), 167.3, 172.7 (d, *J* = 4.3 Hz); IR (ATR) cm⁻¹: 1620; HR-MS ESI-TOF Calcd for C₁₅H₉FN₆NaO [M + Na]⁺ 331.0720. Found 331.0721.

3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-*N*-methoxy-*N*-methylbenzamide (130)

N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride (**14**) (190 mg, 1.95 mmol) をCH₂Cl₂ (5 mL) に溶解し、Et₃N (0.30 mL, 2.2 mmol), 化合物**1** (500 mg, 1.76 mmol) およびEDC·HCl (405 mg, 2.11

mmol) を加え、室温にて1 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去後、残渣をAcOEtにて希釈し、水および飽和食塩水にて順次洗浄後、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、粗生成物として化合物**130**の油状物 (629 mg) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.40 (3H, s), 3.60 (3H, s), 7.26–7.37 (2H, m), 7.54–7.65 (2H, m), 7.84 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 8.14–8.32 (2H, m), 8.50 (1H, s).

1-{3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl}ethen-1-one (**15**)

化合物**130**の粗生成物 (620 mg) をTHF (10 mL) に溶解し、氷冷下1.0 M MeMgBr in THF (2.1 mL, 2.1 mmol) を加え30 分攪拌後、同温にて1.0 M MeMgBr in THF (2.1 mL, 2.1 mmol) を追加し、さらに30 分攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 mL) を加え、氷冷下15 分攪拌後、AcOEtにて抽出し、有機層を水および飽和食塩水にて順次洗浄後、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的分画の溶媒を減圧下留去し、得られた粉末に*t*-BuOMe (5 mL) を加え不溶物をろ取し、化合物**15**の粉末 (341 mg, 収率69%, 2 steps) を得た。

mp 145–147 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.68 (3H, s), 7.47–7.59 (2H, m), 7.75–7.84 (2H, m), 8.21 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.23–8.29 (1H, m), 8.33 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.58 (1H, s); IR (ATR) cm⁻¹; 1680.

1-{3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl}ethan-1-ol (**12b**)

化合物**15** (100 mg, 0.354 mmol) をMeOH (1 mL) に懸濁し、NaBH₄ (14 mg, 0.37 mmol) を加え、室温にて30 分攪拌した。反応液に水を加えAcOEtにて抽出後、有機層を飽和食塩水にて洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的分画の溶媒を減圧下留去し、得られた残渣に*t*-BuOMe (1 mL) および*n*-hexane (5 mL) を加えた後、減圧下溶媒を留去し、白色粉末を得た。得られた粉末に*t*-BuOMe-*n*-hexane (1:3) (4 mL) を加え不溶物をろ取し、化合物**12b**の粉末 (58 mg, 収率58%) を得た。

mp 99–100 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.39 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 4.81–4.90 (1H, dq, *J*

= 6.4, 4.2 Hz), 5.37 (1H, d, J = 4.2 Hz), 7.47–7.60 (4H, m), 7.77–7.84 (1H, m), 7.93–7.98 (1H, m), 8.11 (1H, s), 8.22–8.28 (1H, m); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 25.8, 67.6, 111.7 (d, J = 11.1 Hz), 117.2 (d, J = 20.7 Hz), 123.9, 125.3, 125.4 (d, J = 3.4 Hz), 125.6, 128.7, 128.9, 130.8, 135.6 (d, J = 8.7 Hz), 148.6, 159.9 (d, J = 257.7 Hz), 168.1, 172.4 (d, J = 3.9 Hz); IR (ATR) cm^{-1} ; 1618; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{NaO}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 307.0859. Found 307.0830.

3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenylamine (16)

化合物**1** (3.00 g, 10.6 mmol) をtoluene (30 mL) に懸濁し, Et_3N (1.90 mL, 13.7 mmol) および DPPA (2.72 mL, 12.7 mmol) を加え, 100 °Cにて 1 時間攪拌後, 6.0 M 塩酸 (20 mL) を加え, さらに同温にて 1 時間攪拌した. 放冷後, 反応液を飽和重曹水にて中和後, 減圧下濃縮し, 不溶物をろ取した. 得られた粉末を水にて洗浄し, Et_2O に溶解した. 溶液を飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na_2SO_4) し, 減圧下溶媒を留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物**16**の粉末 (450 mg, 収率17%) を得た.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.45 (2H, s), 6.72–6.81 (1H, m), 7.18–7.25 (2H, m), 7.33 (1H, s), 7.45–7.58 (2H, m), 7.74–7.85 (1H, m), 8.16–8.24 (1H, m).

N-{3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl}methanesulfonamide (12c)

化合物 **16** (100 mg, 0.392 mmol) を CH_2Cl_2 (0.5 mL) に懸濁し, 氷冷下 pyridine (0.05 mL, 0.6 mmol) および MsCl (0.03 mL, 0.4 mmol) を加え, 室温にて 1 時間攪拌した. 反応液に 1.0 M 塩酸を加え, CHCl_3 にて抽出し, 乾燥 (Na_2SO_4) 後, 減圧下溶媒を留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 得られた残渣に *t*-BuOMe (5 mL) を加え, 不溶物をろ取し, 化合物 **12c** の粉末 (56.8 mg, 収率 43%) を得た.

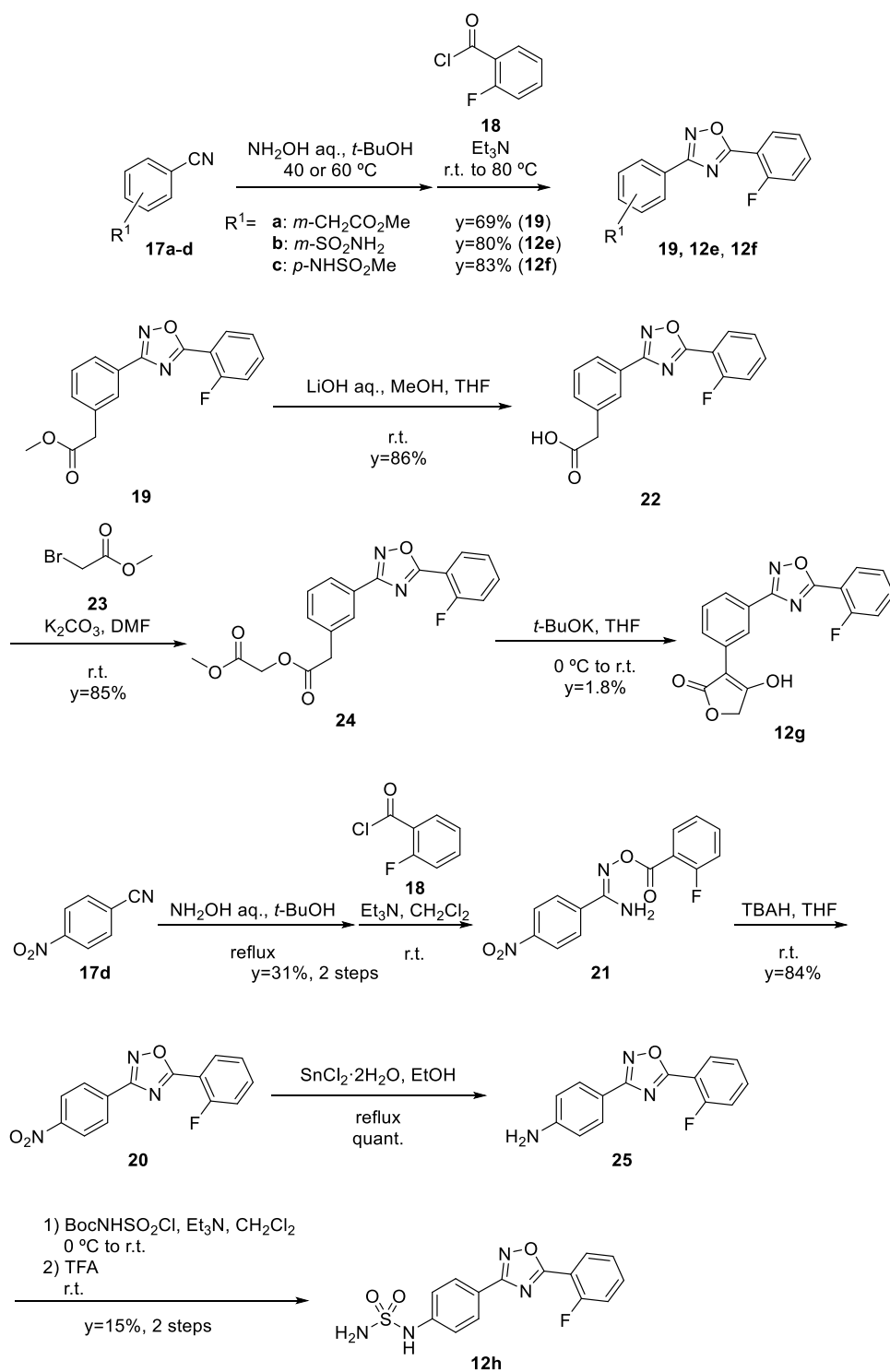
mp 157–158 °C; ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.06 (3H, s), 7.42–7.62 (4H, m), 7.74–7.87 (2H, m), 7.98 (1H, s), 8.16–8.26 (1H, m), 10.05 (1H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 39.4, 111.7 (d, J = 11.1 Hz), 117.3 (d, J = 20.7 Hz), 117.7, 122.3, 122.4, 125.4 (d, J = 3.4 Hz), 126.9, 130.4, 130.8, 135.7 (d, J = 8.7 Hz), 139.3, 159.9 (d, J = 257.7 Hz), 167.7, 172.5 (d, J = 4.3 Hz); IR

(ATR) cm^{-1} ; 1619; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{NaO}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 356.0481. Found 356.0479.

***N*-{3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl}sulfamoylamine (12d)**

化合物 **16** (130 mg, 0.509 mmol) を CH_2Cl_2 (3 mL) に懸濁し、氷冷下 Et_3N (0.21 mL, 1.5 mmol) および 1.0 M $\text{BocNHSO}_2\text{Cl}$ CH_2Cl_2 溶液 (0.76 mL, 0.76 mmol) を加え、室温にて 16 時間撹拌した。反応液に 1.0 M 塩酸を加え、 AcOEt にて 2 回抽出し、有機層を合わせ飽和食塩水にて洗浄後、乾燥 (Na_2SO_4) し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的分画の溶媒を減圧下留去し、得られた残渣に TFA (0.5 mL) を加え、室温にて 30 分撹拌した。反応液を減圧下濃縮し、 CHCl_3 (0.5 mL) を加え、不溶物をろ取し、化合物 **12d** の粉末 (23.7 mg, 収率 14%) を得た。

mp 160–161 °C; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.22 (2H, s), 7.41 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.46–7.59 (3H, m), 7.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.75–7.84 (1H, m), 7.92 (1H, s), 8.17–8.25 (1H, m), 9.80 (1H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 111.7 (d, $J = 11.6$ Hz), 116.4, 117.2 (d, $J = 20.7$ Hz), 120.6, 120.9, 125.4 (d, $J = 3.9$ Hz), 126.5, 129.8, 130.8, 135.6 (d, $J = 9.2$ Hz), 140.3, 159.9 (d, $J = 257.7$ Hz), 167.9, 172.3 (d, $J = 4.3$ Hz); IR (ATR) cm^{-1} ; 1623; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{NaO}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 357.0434. Found 357.0408.



スキーム 24. 化合物 **12e**, **12f**, **12g** および **12h** の合成

スキーム 24 に記載の化合物 **12e**, **12f**, **12g** および **12h** は、以下の方法にて化合物 **17a-d** よりそれぞれ合成した。

Methyl 3-[5-(2-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenylacetate (19)

化合物 **17a** (4.03 g, 23.0 mmol) を *t*-BuOH (40 mL) に溶解し, 50% NH₂OH 水溶液 (1.67 g, 25 mmol) を加え, 60 °C にて 4 時間攪拌した. 室温まで放冷し, 反応液に Et₃N (3.6 mL, 26 mmol) および 2-fluorobenzoyl chloride (**18**) (3.0 mL, 25 mmol) を加え, 室温にて 30 分攪拌後, 80 °C に加温し, さらに 14 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に水 (200 mL) を加え AcOEt にて抽出後, 有機層を飽和食塩水にて洗浄し, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **19** の粉末 (4.97 g, 収率 69%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.72 (3H, s), 3.74 (2H, s), 7.26–7.37 (2H, m), 7.43–7.52 (2H, m), 7.56–7.64 (1H, m), 8.08–8.12 (2H, m), 8.19–8.25 (1H, m).

3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenylacetic acid (22)

化合物 **19** (2.38 g, 7.62 mmol) を MeOH (20 mL) に溶解し, THF (20 mL) および 1.0 M LiOH 水溶液 (15 mL, 15 mmol) を加え, 室温にて 30 分攪拌した. 反応液に 6.0 M 塩酸 (3.0 mL, 18 mmol) を加え, 減圧下約 20 mL まで濃縮後, AcOEt にて抽出し, 有機層を飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 化合物 **22** の粉末 (1.96 g, 収率 86%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.76 (2H, s), 7.25–7.36 (2H, m), 7.43–7.52 (2H, m), 7.56–7.63 (1H, m), 8.09–8.13 (2H, m), 8.18–8.24 (1H, m).

Methoxycarbonylmethyl{3-[5-(2-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl}acetate (24)

化合物 **22** (583 mg, 1.95 mmol) を DMF (5 mL) に溶解し, K₂CO₃ (350 mg, 2.53 mmol) および methyl bromoacetate (**23**) (0.20 mL, 2.2 mmol) を加え室温にて 1 時間攪拌後した. 反応液に水を加え AcOEt にて抽出後, 有機層を飽和食塩水にて洗浄し, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた無色油状物を冷凍庫内 (-19 °C) で一晩放置し, 固形化させた. 得られた固形物に *n*-hexane-*i*-Pr₂O (5:1) (6 mL) を加え, 不溶物をろ取し, 化合物 **24** の粉末 (614 mg, 収率 85%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.75 (3H, s), 3.85 (2H, s), 4.67 (2H, s), 7.25–7.37 (2H, m), 7.47–7.52 (2H, m), 7.56–7.64 (1H, m), 8.08–8.14 (2H, m), 8.19–8.25 (1H, m).

3-{3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl}-4-hydroxy-5H-furan-2-one (12g)

化合物 **24** (610 mg, 1.65 mmol) を THF (10 mL) に溶解し、氷冷下 *t*-BuOK (277 mg, 2.47 mmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。反応液に 0.5 M 塩酸 (20 mL) を加え AcOEt にて抽出後、有機層を飽和食塩水にて洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後、目的分画の溶媒を減圧下留去し、残渣を ODS カラムクロマトグラフィー (0.01 M KH₂PO₄ 水溶液:MeCN = 65:35) にて精製した。目的分画を AcOEt にて抽出後、有機層を飽和食塩水にて洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、得られた白色粉末 22 mg に EtOH (1 mL) を加え減圧下溶媒を留去後、残渣に *t*-BuOMe (1 mL) を加え不溶物をろ取し、化合物 **12g** の粉末 (10.3 mg, 収率 1.8%) を得た。

mp 240–246 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 4.78 (2H, s), 7.48–7.63 (3H, m), 7.76–7.84 (1H, m), 7.91–7.96 (1H, m), 8.17–8.26 (2H, m), 8.75 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 66.3, 111.8 (d, *J* = 11.0 Hz), 117.2 (d, *J* = 20.7 Hz), 124.4, 124.6, 125.4 (d, *J* = 3.4 Hz), 125.7, 128.9, 129.0, 130.8, 132.0, 135.5, 135.6 (d, *J* = 8.6 Hz), 159.9 (d, *J* = 257.4 Hz), 168.1, 172.4 (d, *J* = 4.2 Hz), 172.9, 177.0; IR (ATR) cm⁻¹; 1697; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₈H₁₂FN₂O₄ [M + H]⁺ 339.0781. Found 339.0739.

3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzenesulfonamide (12e)

化合物 **17b** (425 mg, 2.33 mmol) を *t*-BuOH (5 mL) に懸濁し、50% NH₂OH 水溶液 (170 mg, 2.6 mmol) を加え、40 °C にて 14 時間攪拌した。室温まで放冷し、反応液に Et₃N (0.36 mL, 2.6 mmol) および 2-fluorobenzoyl chloride (**18**) (0.29 mL, 2.4 mmol) を加え、室温にて 1.5 時間攪拌後、80 °C に加温し、さらに 22 時間攪拌した。放冷後、反応液に水 (20 mL) を加え析出物をろ取後、得られた粉末を水および *t*-BuOMe (5 mL) にて順次洗浄し、化合物 **12e** の粉末 (592 mg, 収率 80%) を得た。

mp 210–212 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.48–7.62 (4H, m), 7.78–7.86 (2H, m), 8.06 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.22–8.28 (1H, m), 8.31 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.55 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 111.6 (d, $J = 11.1$ Hz), 117.3 (d, $J = 20.7$ Hz), 124.2, 125.5 (d, $J = 3.9$ Hz), 126.6, 128.6, 130.1, 130.3, 130.8, 135.8 (d, $J = 8.7$ Hz), 145.1, 159.9 (d, $J = 258.2$ Hz), 167.1, 172.8 (d, $J = 4.3$ Hz); IR (ATR) cm^{-1} : 3329, 3234; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 320.0505. Found 320.0472.

***N*-{4-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl}methanesulfonamide (12f)**

化合物**12e**の合成法に準じて、化合物**17c**より合成した。収率83%。粉末。

mp 202–205 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.12 (3H, s), 7.38–7.43 (2H, m), 7.47–7.59 (2H, m), 7.77–7.84 (1H, m), 8.04–8.09 (2H, m), 8.19–8.25 (1H, m), 10.27 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 39.9, 112.7 (d, $J = 11.5$ Hz), 117.2 (d, $J = 21.1$ Hz), 119.5 (2C), 123.4, 124.7 (d, $J = 3.8$ Hz), 129.2 (2C), 130.9, 134.7 (d, $J = 8.6$ Hz), 139.4, 160.8 (d, $J = 259.2$ Hz), 167.9, 172.8 (d, $J = 4.3$ Hz); IR (ATR) cm^{-1} : 3207; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 334.0662. Found 334.0624; *Anal.* Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$: C, 54.05; H, 3.63; N, 12.61. Found: C, 54.06; H, 3.42; N, 12.60.

***(Z)*-O-(2-Fluorobenzoyl)-4-nitrobenzamidoxime (21)**

化合物 **17d** (5.00 g, 33.8 mmol) を *t*-BuOH (70 mL) に懸濁し、50% NH_2OH 水溶液 (2.45 g, 37 mmol) を加え、3 時間加熱還流した。放冷後、反応液に水を加え、AcOEt にて抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄し、乾燥 (Na_2SO_4) した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣に *t*-BuOMe (30 mL) を加え、不溶物をろ取し、黄色粉末 3.55 g を得た。

得られた黄色粉末 (2.00 g, 11.0 mmol) を CH_2Cl_2 (20 mL) に溶解し、 Et_3N (1.44 mL, 12.1 mmol) および 2-fluorobenzoyl chloride (**18**) (1.68 mL, 12.1 mmol) を加え、室温にて 30 分撹拌した。反応液に水および AcOEt を加え、不溶物をろ取し、化合物 **21** の淡黄色粉末 (1.79 g, 収率 31%, 2 steps) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.10–7.25 (2H, br), 7.31–7.45 (2H, m), 7.66–7.77 (1H, m), 8.01–8.15 (3H, m), 8.30–8.43 (2H, m).

5-(2-Fluorophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-1,2,4-oxadiazole (20)

化合物 **21** (1.00 g, 3.30 mmol) を THF (7 mL) に懸濁し, 1.0 M tetrabutylammonium hydroxide MeOH 溶液 (3.3 mL, 3.3 mmol) を加え, 室温にて 15 分撹拌した. 反応液に 1.0 M 塩酸 (10 mL) を加え, 析出物をろ取し, 化合物 **20** の粉末 (790 mg, 収率 84%) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.28–7.42 (2H, m), 7.60–7.70 (1H, m), 8.20–8.27 (1H, m), 8.36–8.42 (4H, m).

4-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenylamine (25)

化合物 **20** (778 mg, 2.73 mmol) を EtOH (15 mL) に懸濁し, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.07 g, 9.17 mmol) を加え, 30 分加熱還流した. 放冷後, 反応液に水を加え, AcOEt にて抽出した. 有機層を飽和食塩水にて洗浄し, 乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 化合物 **25** の粉末 (700 mg, quant.) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.80–4.20 (2H, br), 6.73–6.80 (2H, m), 7.26–7.36 (2H, m), 7.54–7.62 (1H, m), 7.95–8.02 (2H, m), 8.15–8.25 (1H, m).

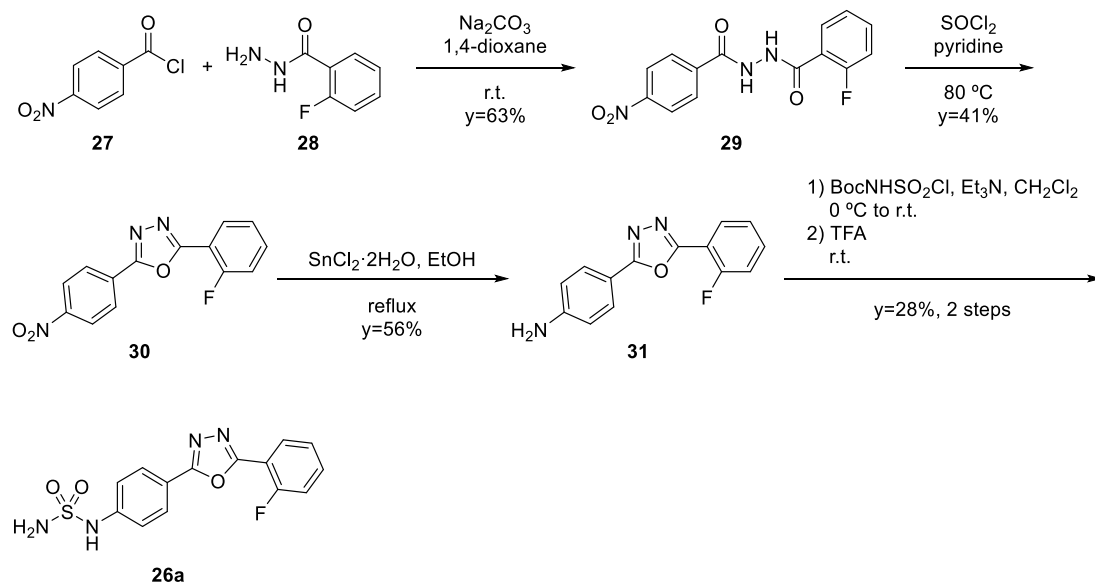
***N*-{4-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl}sulfamide (12h)**

化合物**12d**の合成法に準じて, 化合物**25**より合成した. 収率15%, 2 steps. 粉末.

mp 190–193 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.30–7.40 (4H, m), 7.44–7.63 (2H, m), 7.74–7.85 (1H, m), 7.95–8.05 (2H, m), 8.18–8.30 (1H, m), 10.00–10.15 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 111.8 (d, $J = 11.1$ Hz), 117.2 (d, $J = 19.7$ Hz), 117.3 (2C), 118.8, 125.4 (d, $J = 3.9$ Hz), 128.0 (2C), 130.8, 135.5 (d, $J = 8.7$ Hz), 142.6, 159.9 (d, $J = 257.7$ Hz), 167.7, 172.1 (d, $J = 3.9$ Hz); IR (ATR) cm^{-1} : 3273; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FN}_4\text{O}_3\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 335.0614. Found 335.0579; Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{O}_3\text{S}$: C, 50.30; H, 3.32; N, 16.76. Found: C, 50.25; H,

3.25; N, 16.74.

B 環変換誘導体の合成



スキーム 25. 化合物 **26a** の合成

スキーム 25 に記載の化合物 **26a** は、以下の方法にて合成した。

N'-(2-Fluorobenzoyl)-4-nitrobenzohydrazide (**29**)

2-Fluorobenzohydrazide (**28**) (1.06 g, 6.88 mmol) を 1,4-dioxane (28 mL) に懸濁し、4-nitrobenzoyl chloride (**27**) (1.28 g, 6.88 mmol) および Na_2CO_3 (365 mg, 3.44 mmol) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残渣に水 (20 mL) を加え不溶物をろ取した。得られた粉末を、水 (30 mL), 1.0 M NaOH 水溶液 (2 mL) と水 (10 mL) の混液, 1.0 M 塩酸 (2 mL) と水 (10 mL) の混液, 水 (5 mL) の順で洗浄し、化合物 **29** の粉末 (1.31 g, 収率 63%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.31–7.38 (2H, m), 7.55–7.63 (1H, m), 7.69–7.75 (1H, m), 8.12–8.17 (2H, m), 8.31–8.36 (2H, m), 10.40–11.00 (2H, br).

2-(2-Fluorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazole (30)

化合物 **29** (1.31 g, 4.32 mmol) に thionyl chloride (1.23 mL, 17.0 mmol) および pyridine (2.1 mL) を加え, 80 °C にて 30 分撹拌した. 放冷後, 氷冷下反応液に MeOH (1 mL) および水 (20 mL) を加え, AcOEt にて 10 回抽出後, 有機層を合わせ乾燥 (Na₂SO₄) し, 減圧下溶媒を留去した. 得られた粉末 1.12 g に AcOEt (5 mL) を加え不溶物をろ取し, 化合物 **30** の粉末 (501 mg, 収率 41%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.46–7.58 (2H, m), 7.71–7.78 (1H, m), 8.19–8.25 (1H, m), 8.34–8.39 (2H, m), 8.44–8.49 (2H, m).

4-[5-(2-Fluorophenyl)[1,3,4]oxadiazol-2-yl]phenylamine (31)

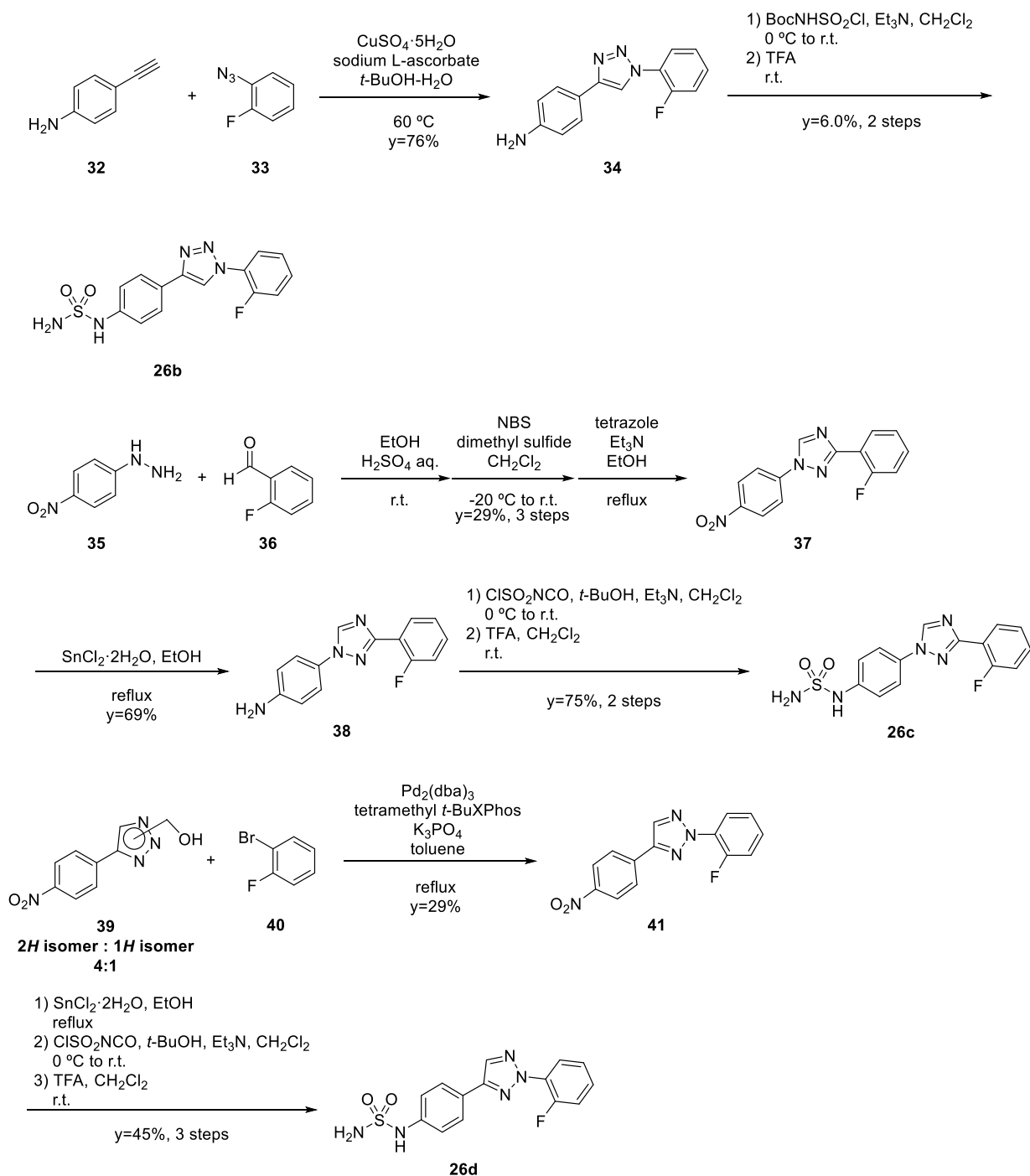
化合物**25**の合成法に準じて, 化合物**30**より合成した. 収率56%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.70–6.75 (2H, m), 7.41–7.52 (2H, m), 7.64–7.71 (1H, m), 7.73–7.78 (2H, m), 8.07–8.13 (1H, m).

N-{4-[5-(2-Fluorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]phenyl}sulfamide (26a)

化合物**12h**の合成法に準じて, 化合物**31**より合成した. 収率28%, 2 steps. 粉末.

mp 226–230 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.32–7.37 (2H, m), 7.37–7.43 (2H, m), 7.43–7.55 (2H, m), 7.67–7.75 (1H, m), 7.98–8.04 (2H, m), 8.12–8.18 (1H, m); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 111.8 (d, *J* = 12.0 Hz), 116.0, 117.1 (d, *J* = 20.3 Hz), 117.3 (2C), 125.3 (d, *J* = 3.9 Hz), 127.8 (2C), 129.7, 134.1 (d, *J* = 8.2 Hz), 143.1, 159.2 (d, *J* = 256.2 Hz), 160.2 (d, *J* = 5.8 Hz), 164.2; IR (ATR) cm⁻¹; 3294, 1614; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₄H₁₂FN₄O₃S [M + H]⁺ 335.0614. Found 335.0571.



スキーム 26. 化合物 **26b**, **26c** および **26d** の合成

スキーム 26 に記載の化合物 **26b–d** は、以下の方法にてそれぞれ合成した。

4-[1-(2-Fluorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]phenylamine (**34**)

1-Azido-2-fluorobenzene (**33**) (1.08 g, 7.89 mmol) を *t*-BuOH (10 mL) に溶解し、水 (10 mL),

4-ethynylaniline (**32**) (924 mg, 7.89 mmol), sodium L-ascorbate (156 mg, 0.789 mmol) および $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 mg, 0.079 mmol) を加え, 60 °C にて 27 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に水 (20 mL) を加え不溶物をろ取し, 化合物 **34** の粉末 (1.52 g, 収率 76%) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.25–5.37 (2H, br), 6.63–6.68 (2H, m), 7.42–7.48 (1H, m), 7.55–7.65 (3H, m), 7.84–7.89 (1H, m), 8.75 (1H, d, $J = 2.0$ Hz).

***N*-{4-[1-(2-Fluorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]phenyl}sulfamide (**26b**)**

化合物**12h**の合成法に準じて, 化合物**34**より合成した. 収率6.0%, 2 steps. 粉末.

mp 213–220 °C (decomp.); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.15–7.22 (2H, br), 7.23–7.28 (2H, m), 7.44–7.50 (1H, m), 7.56–7.67 (2H, m), 7.82–7.92 (3H, m), 8.75 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 9.65–9.72 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 117.1 (d, $J = 19.3$ Hz), 117.9 (2C), 121.9 (d, $J = 4.3$ Hz), 123.5, 124.7 (d, $J = 11.1$ Hz), 125.5 (d, $J = 3.9$ Hz), 125.9, 126.0 (2C), 131.2 (d, $J = 7.7$ Hz), 139.5, 146.8, 153.7 (d, $J = 250.9$ Hz); IR (ATR) cm^{-1} : 3305, 1618; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 334.0774. Found 334.0729.

3-(2-Fluorophenyl)-1-(4-nitrophenyl)-1*H*-1,2,4-triazole (37**)**

(4-Nitrophenyl)hydrazine (**35**) (5.0 g, 33 mmol) を 2.0 M 硫酸水溶液 (33 mL) および EtOH (20 mL) の混液に懸濁し, 2-fluorobenzaldehyde (**36**) (3.58 mL, 34.3 mmol) および EtOH (50 mL) を加え, 室温にて 4.5 時間攪拌した. 不溶物をろ取し, 水, EtOH および *t*-BuOMe にて順次洗浄し, 粉末(11.50 g) を得た.

NBS (1.2 g, 6.8 mmol) を CH_2Cl_2 (25 mL) に溶解し, 氷冷下, dimethylsulfide (0.92 mL, 12.4 mmol) を加え, -20 °C にて, 先の反応で得られた粉末 (1.4 g, 4.0 mmol) の CH_2Cl_2 (25 mL) 溶液を滴下し, 室温にて 3 時間攪拌した. 反応液に CH_2Cl_2 (200 mL) を加え, 水および飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 粉末 (1.18 g) を得た.

得られた粉末 (1.18 g) を EtOH (35 mL) に懸濁し, Et_3N (0.33 mL, 2.4 mmol) および tetrazole (0.17 g, 2.4 mmol) を加え, 4.25 時間加熱還流した. 放冷後, 反応液に水を加え, 析出物をろ取した. 得られた粉末をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合

物 **37** の粉末 (325 mg, 収率 29%, 3 steps) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.15–7.36 (2H, m), 7.42–7.52 (1H, m), 7.93–8.09 (2H, m), 8.11–8.19 (1H, m), 8.35–8.47 (2H, m), 8.76 (1H, s).

4-[3-(2-Fluorophenyl)[1,2,4]triazol-1-yl]phenylamine (38)

化合物**25**の合成法に準じて, 化合物**37**より合成した. 収率69%. 粉末.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.68–3.98 (2H, br), 6.72–6.83 (2H, m), 7.15–7.31 (2H, m), 7.35–7.45 (1H, m), 7.46–7.54 (2H, m), 8.12 (1H, td, $J = 7.6, 1.4$ Hz), 8.46 (1H, s).

***N*-[4-[3-(2-Fluorophenyl)-1*H*-1,2,4-triazol-1-yl]phenyl]sulfamide (26c)**

化合物**12h**の合成法に準じて, 化合物**38**より合成した. 収率75%, 2 steps. 粉末.

mp 191–195 °C (decomp.); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.24 (2H, s), 7.29–7.40 (4H, m), 7.47–7.57 (1H, m), 7.75–7.86 (2H, m), 8.07 (1H, td, $J = 7.6, 1.5$ Hz), 9.27 (1H, s), 9.79 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 116.6 (d, $J = 21.2$ Hz), 118.4 (2C), 120.4 (2C), 124.6, 124.6, 129.9, 131.1, 131.3 (d, $J = 8.2$ Hz), 139.2, 142.7, 158.0 (d, $J = 4.8$ Hz), 159.4 (d, $J = 253.8$ Hz); IR (ATR) cm^{-1} ; 1520; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{NaO}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 356.0593. Found 356.0612.

[4-(4-Nitrophenyl-1,2,3-triazol-1-yl)]methanol (39)

Formalin (P=37%) (44 mL, 0.59 mol) および AcOH (5.1 mL, 89 mmol) を THF (60 mL) に溶解し, 室温にて 15 分攪拌後, 1-ethynyl-4-nitrobenzene (8.63 g, 58.7 mmol) を加えた後, NaN_3 (5.72 g, 88.0 mmol) を加え室温にて 10 分攪拌し, さらに sodium L-ascorbate (2.33 g, 11.8 mmol) および $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (733 mg, 2.94 mmol) の水 (5 mL) 溶液を加え, 室温にて 15 時間攪拌した. 反応液に水 (200 mL) を加え AcOEt にて 3 回抽出後, 有機層を合わせ飽和食塩水にて洗浄し, 乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去した. 得られた粉末に CH_2Cl_2 を加え不溶物をろ取し, 化合物 **39** の粉末 (9.57 g,

収率 86%) (2*H* isomer:1*H* isomer = 4:1) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 5.70 (1.6H, d, *J* = 8.1 Hz), 5.72 (0.4H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.35 (0.2H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.39 (0.8H, t, *J* = 8.1 Hz), 8.12–8.19 (2H, m), 8.30–8.36 (2H, m), 8.52 (0.8H, s), 8.89 (0.2H, s).

2-(2-Fluorophenyl)-4-(4-nitrophenyl)-2*H*-1,2,3-triazole (41)

化合物 **39** (300 mg, 1.58 mmol) を toluene (5 mL) に懸濁し, 1-bromo-2-fluorobenzene (**40**) (0.21 mL, 1.9 mmol), di-*tert*-butyl[3,4,5,6-tetramethyl-2',4',6'-tris(propan-2-yl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl]phosphane (76 mg, 0.16 mmol), Pd₂(dba)₃ (72 mg, 0.079 mmol) および K₃PO₄ (671 mg, 3.16 mmol) を加え, 19 時間加熱還流した. 放冷後, 反応液を AcOEt にて希釈し, 飽和塩化アンモニウム水溶液, 水および飽和食塩水にて順次洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **41** の粉末 (132 mg, 収率 29%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.30–7.37 (2H, m), 7.42–7.49 (1H, m), 7.86–7.93 (1H, m), 8.04–8.09 (2H, m), 8.22 (1H, s), 8.31–8.36 (2H, m).

N-{4-[2-(2-Fluorophenyl)-2*H*-1,2,3-triazol-4-yl]phenyl}sulfamide (26d)

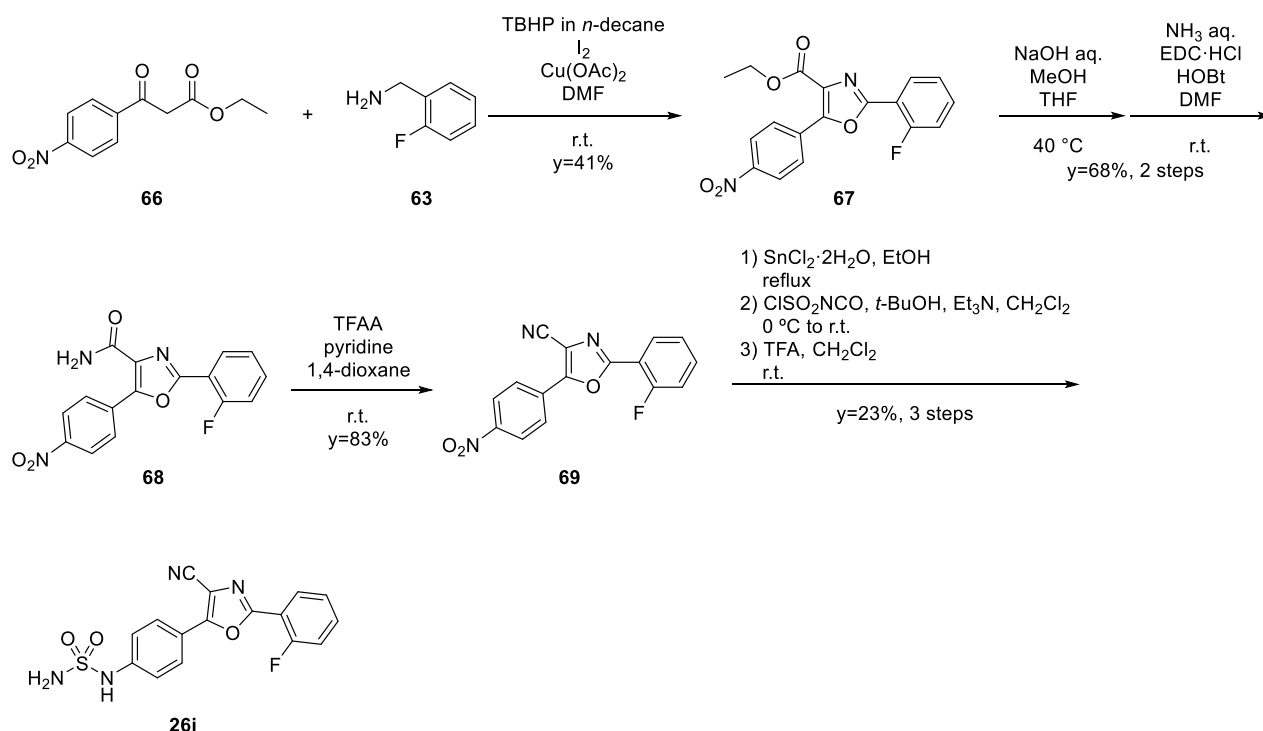
化合物 **41** (132 mg, 0.464 mmol) を EtOH (4.6 mL) に懸濁し, SnCl₂·2H₂O (524 mg, 2.32 mmol) を加え, 45 分加熱還流した. 放冷後, 反応液に水を加え, AcOEt にて抽出した. 有機層を飽和食塩水にて洗浄し, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 粉末 (111 mg) を得た.

t-BuOH (0.051 mL, 0.53 mmol) を CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解し, 氷冷下, ClSO₂NCO (0.046 mL, 0.53 mmol) を加え, 同温にて 20 分攪拌後, 先に得られた得られた粉末 (111 mg) および Et₃N (0.091 mL, 0.66 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (2 mL) を加え, 室温にてさらに 30 分攪拌した. 減圧下溶媒を留去し, 残渣を AcOEt に溶解後, 飽和塩化アンモニウム水溶液および飽和食塩水にて洗浄し, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 粉末 (184 mg) を得た.

得られた粉末 (184 mg) を CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解し, TFA (2 mL) を加え, 室温にて 30 分攪拌

した. 減圧下溶媒を留去し, 残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 得られた残渣に *t*-BuOMe (2 mL) を加え, 不溶物をろ取し, 化合物**26d**の粉末 (70 mg, 収率45%, 3 steps) を得た.

mp 186–189 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.22–7.31 (4H, m), 7.40–7.46 (1H, m), 7.50–7.60 (2H, m), 7.83–7.93 (3H, m), 8.57 (1H, s), 9.78 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 117.4 (d, *J* = 19.7 Hz) 117.8 (2C), 122.5, 125.2 (d, *J* = 3.9 Hz), 125.3, 126.6 (2C), 127.6, 130.3 (d, *J* = 7.7 Hz), 133.4, 140.3, 148.6, 153.8 (d, *J* = 252.9 Hz); IR (ATR) cm⁻¹; 3257; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₄H₁₂FN₅NaO₂S [M + Na]⁺ 356.0593. Found 356.0600; *Anal.* Calcd for C₁₄H₁₂FN₅O₂S·0.125AcOEt: C, 50.59; H, 3.83; N, 20.25. Found: C, 50.30; H, 3.80; N, 20.07.



スキーム 28. 化合物 **26i** の合成

スキーム 27, 28 に記載の化合物 **26e-i** は、以下の方法にてそれぞれ合成した。

2-(2-Fluorophenyl)-4-(4-nitrophenyl)oxazole (**52**)

2-Bromo-1-(4-nitrophenyl)ethan-1-one (**50**) (1.00 g, 4.10 mmol) および 2-fluorobenzamide (**51**) (713 mg, 5.12 mmol) を AcOEt (6 mL) に懸濁し、AgOTf (1.32 g, 5.12 mmol) を加え、60 °C にて 1 時間攪拌後、AgOTf (421 mg, 1.64 mmol) を追加し、同温にてさらに 1.5 時間攪拌した。反応液に AcOEt (20 mL) および 飽和食塩水 (20 mL) を加え、室温にて 10 分攪拌後、不溶物をろ別し、ろ液を分液した。有機層を水、飽和重曹水、1.0 M 塩酸、水および飽和食塩水にて順次洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) 後、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣に *t*-BuOMe (10 mL) を加え、不溶物をろ取し、化合物 **52** の粉末 (458 mg, 収率 39%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.20–7.34 (2H, m), 7.45–7.56 (1H, m), 8.00 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.18 (1H, s), 8.14 (1H, ddd, *J* = 7.6, 7.6, 1.4 Hz), 8.30 (2H, d, *J* = 8.6 Hz).

4-[2-(2-Fluorophenyl)oxazol-4-yl]phenylamine (53)

化合物**25**の合成法に準じて、化合物**52**より合成した。収率59%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.65–3.85 (2H, br), 6.71–6.79 (2H, m), 7.15–7.30 (2H, m), 7.38–7.50 (1H, m), 7.59–7.67 (2H, m), 7.89 (1H, s), 8.08–8.18 (1H, m).

N-{4-[2-(2-Fluorophenyl)oxazol-4-yl]phenyl}sulfamide (26e)

化合物**26d**の合成法に準じて、化合物**53**より合成した。収率34%, 2 steps. 粉末。

mp 174–176 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.15–7.30 (4H, m), 7.35–7.50 (2H, m), 7.54–7.66 (1H, m), 7.72–7.80 (2H, m), 8.05–8.17 (1H, m), 8.67 (1H, s), 9.68 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 114.8 (d, *J* = 11.1 Hz), 116.9 (d, *J* = 20.7 Hz), 117.9 (2C), 124.1, 125.0 (d, *J* = 3.4 Hz), 125.9 (2C), 129.5, 132.7 (d, *J* = 8.2 Hz), 134.8, 139.5, 140.8, 157.3 (d, *J* = 4.3 Hz), 159.1 (d, *J* = 255.0 Hz); IR (ATR) cm⁻¹; 3275; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₅H₁₂FN₃NaO₃S [M + Na]⁺ 356.0481. Found 356.0475.

5-(2-Fluorophenyl)oxazole (55)

2-Fluorobenzaldehyde (2.08 mL, 19.9 mmol) を MeOH (50 mL) に溶解し, 1-isocyanomethanesulfonyl-4-methylbenzene (TosMIC) (4.28 g, 21.9 mmol) および K₂CO₃ (3.58 g, 25.9 mmol) を加え, 室温にて2 時間攪拌した。反応液に水 (40 mL) を加え, AcOEt にて2 回抽出後, 乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **55** の油状物 (0.67 g, 収率 21%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.11–7.39 (3H, m), 7.51 (1H, d, *J* = 3.9 Hz), 7.77 (1H, ddd, *J* = 7.6, 7.6, 1.7 Hz), 7.95 (1H, s).

5-(2-Fluorophenyl)-2-(4-nitrophenyl)oxazole (56)

化合物**55** (286 mg, 1.75 mmol) を1,4-dioxane (10 mL) に溶解し, 1-bromo-4-nitrobenzene (**54**) (531 mg, 2.63 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.10 g, 0.088 mmol) および*t*-BuOLi (0.21 g, 2.6 mmol) を加え,

120 °Cにて200 分攪拌後, Pd(PPh₃)₄ (0.07 g, 0.06 mmol) および*t*-BuOLi (0.20 g, 2.5 mmol) を加え, 120 °Cにてさらに1 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え, AcOEtにて2回抽出し, 有機層を合せて飽和食塩水にて洗浄した. 乾燥 (Na₂SO₄) 後, 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物**56**の粉末 (0.18 g, 収率36%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.18–7.41 (2H, m), 7.50–7.58 (1H, m), 7.68 (1H, d, *J* = 3.9 Hz), 7.89 (1H, dt, *J* = 7.6, 1.3 Hz), 8.25–8.32 (2H, m), 8.33–8.38 (2H, m).

4-[5-(2-Fluorophenyl)oxazol-2-yl]phenylamine (**57**)

化合物**25**の合成法に準じて, 化合物**56**より合成した. 収率73%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.88–4.05 (2H, br), 6.71–6.79 (2H, m), 7.11–7.34 (3H, m), 7.52 (1H, d, *J* = 4.1 Hz), 7.84 (1H, ddd, *J* = 7.6, 7.3, 1.3 Hz), 7.89–7.98 (2H, m).

N-[4-{5-2-Fluorophenyl}oxazol-2-yl]phenylsulfamide (**26f**)

化合物**26d**の合成法に準じて, 化合物**57**より合成した. 収率72%, 2 steps. 粉末.

mp 194–195 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.18–7.49 (7H, m), 7.60 (1H, s), 7.88–8.12 (3H, m), 9.90–10.08 (1H, br); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 115.6 (d, *J* = 13.0 Hz), 116.1 (d, *J* = 20.2 Hz), 117.3 (2C), 119.7, 125.1 (d, *J* = 2.9 Hz), 126.0, 127.1 (2C), 127.3 (d, *J* = 12.0 Hz), 129.9 (d, *J* = 8.2 Hz), 142.0, 144.5 (d, *J* = 2.9 Hz), 157.9 (d, *J* = 249.5 Hz), 160.4; IR (ATR) cm⁻¹; 1490; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₅H₁₃FN₃O₃S [M + H]⁺ 334.0662. Found 334.0594.

2-(2-Fluorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)oxazole (**60**)

2-Amino-1-(4-nitrophenyl)ethan-1-one hydrochloride (**58**) (3.96 g, 18.3 mmol) および 2-fluorobenzoic acid (**59**) (2.56 g, 18.3 mmol) をCH₂Cl₂ (50 mL) に懸濁し, EDC·HCl (4.21 g, 21.9 mmol), HOBt (2.96 g, 21.9 mmol) および Et₃N (3.8 mL, 27 mmol) を加え, 室温にて13 時間攪拌した. 反応液に水およびCHCl₃を加え, 不溶物をろ別した. CHCl₃にて抽出後, 有機層を 5% ク

エン酸水溶液，飽和重曹水および飽和食塩水にて順次洗浄し，乾燥 (Na₂SO₄) した．減圧下溶媒を留去し，得られた残渣に AcOEt を加え，不溶物をろ取し，粉末 (1.31 g) を得た．

得られた粉末 (300 mg) を POCl₃ (5 mL) に懸濁し，4 時間加熱還流した．放冷後，反応液に水を加え，AcOEt にて抽出後，有機層を水，飽和重曹水および飽和食塩水にて順次洗浄し，乾燥 (Na₂SO₄) した．減圧下溶媒を留去し，得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製し，化合物 **60** の粉末 (101 mg, 収率 8.5%, 2 steps) を得た．

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.26–7.34 (2H, br), 7.45–7.56 (1H, m), 7.70 (1H, s), 7.86–7.92 (2H, m), 8.10–8.17 (1H, m), 8.29–8.36 (2H, m).

4-[2-(2-Fluorophenyl)oxazol-5-yl]phenylamine (61)

化合物**25**の合成法に準じて，化合物**60**より合成した．収率96%．粉末．

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 5.53 (2H, s), 6.59–6.72 (2H, m), 7.31–7.62 (6H, m), 8.02–8.13 (1H, m).

***N*-[4-{2-(2-Fluorophenyl)oxazole-5-yl}phenyl]sulfamide (26g)**

化合物**26d**の合成法に準じて，化合物**61**より合成した．収率32%，2 steps．粉末．

mp 187–192 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.19–7.32 (4H, m), 7.35–7.48 (2H, m), 7.55–7.65 (1H, m), 7.72 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.76 (1H, s), 8.05–8.18 (1H, m), 9.81 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 114.9 (d, *J* = 11.1 Hz), 116.9 (d, *J* = 21.2 Hz), 117.8 (2C), 120.6, 122.6, 124.9 (2C), 125.0 (d, *J* = 3.4 Hz), 129.1, 132.4 (d, *J* = 8.2 Hz), 140.0, 151.1, 155.9 (d, *J* = 4.8 Hz), 158.9 (d, *J* = 254.8 Hz); IR (ATR) cm⁻¹; 1616; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₅H₁₃FN₃O₃S [M + H]⁺ 334.0662. Found 334.0608.

2-(2-Fluorophenyl)-4-methyl-5-(4-nitrophenyl)oxazole (64)

2-Bromo1-1-(4-nitrophenyl)propan-1-one (**62**) (2.31 g, 8.95 mmol) を DMF (35.8 mL) に溶解し，2-fluorobenzylamine (**63**) (1.23 mL, 10.7 mmol), K₂CO₃ (4.95 g, 35.8 mmol) および I₂ (5.00 g, 19.7

mmol) を加え, 80 °C にて 5 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に AcOEt (120 mL) を加え, 10% Na₂S₂O₃ 水溶液にて 2 回, 水にて 2 回, 飽和食塩水にて 1 回洗浄し, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **64** の粉末 (2.34 g, 収率 88%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.55 (3H, s), 7.38–7.49 (2H, m), 7.59–7.66 (1H, m), 7.95–8.00 (2H, m), 8.11–8.17 (1H, m), 8.34–8.39 (2H, m).

4-[2-(2-Fluorophenyl)-4-methyloxazol-5-yl]phenylamine (**65**)

化合物**25**の合成法に準じて, 化合物**64**より合成した. 収率61%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.36 (3H, s), 5.45–5.59 (2H, br), 6.65–6.70 (2H, m), 7.32–7.42 (4H, m), 7.50–7.57 (1H, m), 8.00–8.06 (1H, m).

N-{4-[2-(2-Fluorophenyl)-4-methyloxazol-5-yl]phenyl}sulfamide (**26h**)

化合物**26d**の合成法に準じて, 化合物**65**より合成した. 収率18%, 2 steps. 粉末.

mp 193–196 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.42 (3H, s), 7.19–7.25 (2H, m), 7.27–7.32 (2H, m), 7.34–7.45 (2H, m), 7.53–7.65 (3H, m), 8.04–8.10 (1H, m), 9.77 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.9, 114.8 (d, *J* = 11.1 Hz), 116.9 (d, *J* = 20.7 Hz), 117.9 (2C), 121.6, 124.9 (d, *J* = 3.9 Hz), 125.9 (2C), 129.1, 131.8, 132.3 (d, *J* = 8.7 Hz), 139.4, 145.3, 154.3 (d, *J* = 4.8 Hz), 159.0 (d, *J* = 255.0 Hz); IR (ATR) cm⁻¹: 3323, 3260; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₆H₁₅FN₃O₃S [M + H]⁺ 348.0818. Found 348.0756.

Ethyl 2-(2-fluorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)oxazole-4-carboxylate (**67**)

2-Fluorobenzylamine (**63**) (7.2 mL, 64 mmol) を DMF (100 mL) に溶解し, ethyl 3-(4-nitrophenyl)-3-oxopropanoate (**66**) (10.0 g, 42.2 mmol), I₂ (12.9 g, 50.8 mmol), Cu(OAc)₂ (766 mg, 4.22 mmol) および 5.5 M *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) decane 溶液 (15.3 mL, 84 mmol) を加え, 室温にて 1 時間攪拌後, 2-fluorobenzylamine (**63**) (2.4 mL, 21 mmol) を追加し, 室温に

てさらに 1 時間攪拌した. 反応液に水を加え AcOEt にて 2 回抽出後, 有機層を合わせ 10% Na₂S₂O₃ 水溶液および飽和食塩水にて順次洗浄し, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **67** の粉末 (2.66 g, 収率 41%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.46 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.50 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 7.22–7.23 (2H, m), 7.49–7.57 (1H, m), 8.16–8.22 (1H, m), 8.32–8.37 (2H, m), 8.38–8.44 (2H, m).

2-(2-Fluorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)oxazole-4-carboxamide (**68**)

化合物 **67** (2.66 g, 7.47 mmol) を MeOH (30 mL) に懸濁し, THF (30 mL) および 5.0 M NaOH 水溶液 (3.0 mL, 15 mmol) を加え, 40 °C にて 30 分攪拌した. 氷冷下, 反応液に 6.0 M 塩酸 (5.0 mL, 30 mmol) を加え, 減圧下溶媒を留去後, 残渣に水 (50 mL) を加え不溶物をろ取した. 得られた淡黄色粉末を *t*-BuOMe-*n*-hexane (1:1) (50 mL) にて洗浄後, AcOEt-THF (2:1) (50 mL) に溶解し, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 粗生成物の粉末 (1.65 g) を得た.

得られた粗生成物 (1.00 g, 3.05 mmol) を DMF (10 mL) に溶解し, HOBT (617 mg, 4.57 mmol), EDC·HCl (876 mg, 4.57 mmol) および 28% アンモニア水溶液 (0.31 mL, 4.6 mmol) を加え, 室温にて 8 時間攪拌した. 反応液に水 (50 mL) および AcOEt (20 mL) を加え, 室温にて 30 分攪拌後, 析出物をろ取し, 化合物 **68** の粉末 (679 mg, 収率 68%, 2 steps) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.42–7.53 (2H, m), 7.65–7.73 (1H, m), 7.86–7.92 (1H, br), 7.92–7.98 (1H, br), 8.19–8.25 (1H, m), 8.36–8.41 (2H, m), 8.57–8.62 (2H, m).

2-(2-Fluorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)oxazole-4-carbonitrile (**69**)

化合物 **68** (400 mg, 1.22 mmol) を 1,4-dioxane (10 mL) に懸濁し, pyridine (0.20 mL, 2.5 mmol) および TFAA (0.25 mL, 1.8 mmol) を加え, 室温にて 1 時間攪拌した. 反応液に AcOEt を加え, 水, 1.0 M 塩酸および飽和食塩水にて順次洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣に *t*-BuOMe (10 mL) を加え, 不溶物をろ取し, 化合物 **69** の粉末 (314 mg, 収率 83%) を得た.

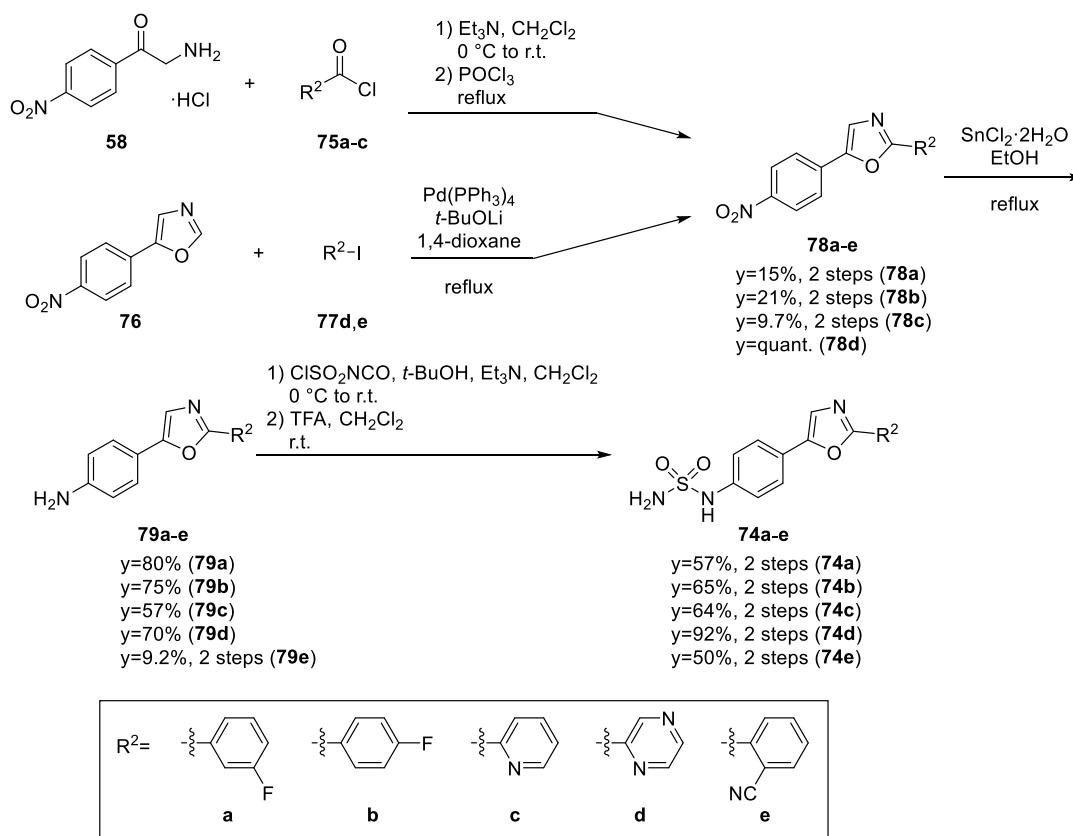
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.26–7.37 (2H, m), 7.55–7.62 (1H, m), 8.11–8.17 (1H, m), 8.20–8.25 (2H, m), 8.39–8.44 (2H, m).

2-(2-Fluorophenyl)-5-(4-sulfamoylamino-phenyl)oxazole-4-carbonitrile (**26i**)

化合物**26d**の合成法に準じて、化合物**69**より合成した。収率23%, 3 steps. 粉末。

mp 199–204 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.35–7.52 (6H, m), 7.65–7.73 (1H, m), 7.88–7.93 (2H, m), 8.12–8.18 (1H, m), 10.19 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 106.7, 113.3 (d, $J = 11.1$ Hz), 114.0, 117.1 (d, $J = 20.7$ Hz), 117.3, 117.4 (2C), 125.2, 126.7 (2C), 129.6, 133.9 (d, $J = 8.2$ Hz), 142.6, 156.0 (d, $J = 4.8$ Hz), 157.8, 159.3 (d, $J = 257.2$ Hz); IR (ATR) cm^{-1} : 3263, 2239; HR-MS (ESITOF) Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{NaO}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 381.0434. Found 381.0440.

オキサゾール誘導体の合成



スキーム 29. 化合物 **74a**, **74b**, **74c**, **74d** および **74e** の合成

スキーム 29 に記載の化合物 **74a–e** は、以下の方法にてそれぞれ合成した。

3-Fluoro-*N*-[2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl]benzamide (**78a**)

化合物**58** (1.00 g, 4.60 mmol) をCH₂Cl₂ (20 mL) に懸濁し、氷冷下、Et₃N (1.92 mL, 13.9 mmol) および化合物**75a** (0.61 mL, 5.1 mmol) を加え、室温にて30 分撹拌した。反応液に水を加え、CHCl₃にて2回抽出し、有機層を合せて、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後、目的分画の溶媒を減圧下留去し、粉末 (248 mg) を得た。

得られた粉末 (248 mg) を POCl₃ (4 mL) に懸濁し、3 時間加熱還流した。放冷後、反応液に水を加え、AcOEt にて抽出後、有機層を水、飽和重曹水および飽和食塩水にて順次洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 **78a** の粉末 (176 mg, 収率 15%, 2 steps) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.16–7.23 (1H, m), 7.45–7.58 (1H, m), 7.66 (1H, s), 7.78–7.85 (1H, m), 7.85–7.90 (2H, m), 7.93 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.28–8.38 (2H, m).

4-[2-(3-Fluorophenyl)oxazol-5-yl]phenylamine (**79a**)

化合物**25**の合成法に準じて、化合物**78a**より合成した。収率80%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.77–3.95 (2H, br), 6.70–6.80 (2H, m), 7.09–7.17 (1H, m), 7.28 (1H, s), 7.39–7.49 (1H, m), 7.48–7.57 (2H, m), 7.71–7.80 (1H, m), 7.86 (1H, d, *J* = 7.6 Hz).

N-[4-{2-(3-Fluorophenyl)oxazole-5-yl}phenyl]sulfamide (**74a**)

化合物**26d**の合成法に準じて、化合物**79a**より合成した。収率57%, 2 steps. 粉末。

mp > 195 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.16–7.33 (4H, m), 7.34–7.43 (1H, m), 7.55–7.69 (1H, m), 7.73 (1H, s), 7.75–7.81 (2H, m), 7.81–7.89 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.92 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 9.80 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 112.4 (d, *J* = 24.1 Hz), 117.2 (d, *J* = 21.2 Hz), 117.8 (2C), 120.7, 121.9 (d, *J* = 2.9 Hz), 122.8, 125.0 (2C), 128.9 (d, *J* = 8.7 Hz), 131.4 (d, *J* = 8.2 Hz), 140.0, 151.3, 158.4 (d, *J* = 3.4 Hz), 162.3 (d, *J* = 244.2 Hz); IR (ATR) cm⁻¹; 1487; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₅H₁₃FN₃O₃S [M + H]⁺ 334.0662. Found 334.0612.

2-(4-Fluorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)oxazole (78b)

化合物78aの合成法に準じて、化合物58より合成した。収率21%, 2 steps. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.18–7.24 (2H, m), 7.63 (1H, s), 7.83–7.88 (2H, m), 8.10–8.17 (2H, m), 8.29–8.35 (2H, m).

4-[2-(4-Fluorophenyl)oxazol-5-yl]phenylamine (79b)

化合物79aの合成法に準じて、化合物78bより合成した。収率75%. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.74–3.95 (2H, br), 6.71–6.77 (2H, m), 7.10–7.19 (2H, m), 7.23 (1H, s), 7.48–7.54 (2H, m), 8.03–8.09 (2H, m).

N-{4-[2-(4-Fluorophenyl)oxazol-5-yl]phenyl}sulfamide (74b)

化合物26dの合成法に準じて、化合物79bより合成した。収率65%, 2 steps. 粉末。

mp > 270 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.21–7.30 (4H, m), 7.36–7.45 (2H, m), 7.69 (1H, s), 7.72–7.79 (2H, m), 8.08–8.17 (2H, m), 9.79 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 116.2 (d, *J* = 22.2 Hz), 117.8 (2C), 120.9, 122.7, 123.5 (2C, d, *J* = 3.4 Hz), 124.8 (2C), 128.2 (2C, d, *J* = 8.7 Hz), 139.9, 150.9, 158.8, 163.2 (d, *J* = 248.5 Hz); IR (ATR) cm⁻¹: 1619, 1506; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₅H₁₃FN₃O₃S [M + H]⁺ 334.0662. Found 334.0597.

2-(4-Fluorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)oxazole (78c)

化合物78aの合成法に準じて、化合物58より合成した。収率9.7%, 2 steps. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.38–7.49 (1H, m), 7.72 (1H, s), 7.82–7.92 (1H, m), 7.91–7.99 (2H, m), 8.22 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.31–8.36 (2H, m), 8.80 (1H, d, *J* = 4.4 Hz).

4-(2-Pyridin-2-yloxazol-5-yl)phenylamine (79c)

化合物79aの合成法に準じて、化合物78cより合成した。収率57%. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.72–3.93 (2H, br), 6.69–6.77 (2H, m), 7.31–7.38 (2H, m),

7.55–7.65 (2H, m), 7.77–7.86 (1H, m), 8.14 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.74 (1H, d, $J = 4.4$ Hz).

***N*-[4-(2-Pyridin-2-yloxazol-5-yl)phenyl]sulfamide (74c)**

化合物**26d**の合成法に準じて、化合物**79c**より合成した。収率64%, 2 steps. 粉末.

mp 205–209 °C (decomp.); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.21–7.32 (4H, m), 7.48–7.58 (1H, m), 7.74 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.82 (1H, s), 7.93–8.05 (1H, m), 8.15 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.73 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 9.78–9.91 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 117.8 (2C), 120.6, 121.8, 123.0, 124.8, 125.0 (2C), 137.4, 140.1, 145.3, 149.8, 151.8, 158.9; IR (ATR) cm^{-1} ; 1590; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{NaO}_3\text{S}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 339.0528. Found 339.0546.

5-(4-Nitrophenyl)oxazole (76)

4-Nitrobenzaldehyde (6.50 g, 43.0 mmol) を MeOH (108 mL) に溶解し, 1-isocyanomethanesulfonyl-4-methylbenzene (9.24 g, 47.3 mmol) および K_2CO_3 (7.73 g, 55.9 mmol) を加え, 室温にて 15.5 時間攪拌後, 6 時間加熱還流した. 放冷後, 反応液に水を加え, AcOEt (100 mL) にて 3 回抽出後, 有機層を合わせ乾燥 (Na_2SO_4) し, 減圧下溶媒を留去した. 得られた残渣に *t*-BuOMe (70 mL) を加え, 不溶物をろ取後, *t*-BuOMe (30 mL) にて洗浄し, 得られた粉末をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **76** の粉末 (3.46 g, 収率 42%) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.94–8.05 (3H, m), 8.33 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 8.59 (1H, s).

5-(4-Nitrophenyl)-2-(pyrazin-2-yl)oxazole (78d)

2-Iodopyrazine (**77d**) (0.52 mL, 5.3 mmol) を 1,4-dioxane (13 mL) に懸濁し, 化合物 **76** (500 mg, 2.63 mmol), *t*-BuOLi (421 mg, 5.26 mmol) および $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (303 mg, 0.263 mmol) を加えて 15 時間加熱還流した. 放冷後, 反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え, AcOEt にて抽出した. 有機層を合わせ飽和食塩水にて洗浄し, 乾燥 (Na_2SO_4) 後, 減圧下溶媒を留去して得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **78d** の

粉末 (730 mg, quant.) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.08–8.20 (2H, m), 8.31 (1H, s), 8.34–8.45 (2H, m), 8.76–8.92 (2H, m), 9.42 (1H, d, $J = 1.2$ Hz).

4-(2-Pyrazin-2-yloxazol-5-yl)phenylamine (79d)

化合物**79a**の合成法に準じて, 化合物**78d**より合成した. 収率70%. 粉末.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.57–5.63 (2H, br), 6.64–6.69 (2H, m), 7.49–7.55 (2H, m), 7.62 (1H, s), 8.71 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.76 (1H, dd, $J = 2.4, 1.2$ Hz), 9.29 (1H, d, $J = 1.2$ Hz).

***N*-{4-(2-Pyrazin-2-yloxazol-5-yl)phenyl}sulfamide (74d)**

化合物**26d**の合成法に準じて, 化合物**79d**より合成した. 収率92%, 2 steps. 粉末.

mp 218–221 °C (decomp.); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.23–7.33 (4H, m), 7.73–7.81 (2H, m), 7.87 (1H, s), 8.75–8.83 (2H, m), 9.35 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 9.86 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 117.7 (2C) 120.3, 123.3, 125.2, 140.4, 141.2, 142.8 (2C), 144.6, 145.3, 152.5, 156.9; IR (ATR) cm^{-1} ; 3134, 1616; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{NaO}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 340.0480. Found 340.0472.

4-[2-(2-Cyanophenyl)oxazol-5-yl]phenylamine (79e)

化合物**79d**の合成法に準じて, 化合物**76**より合成した. 収率9.2%, 2 steps. 粉末.

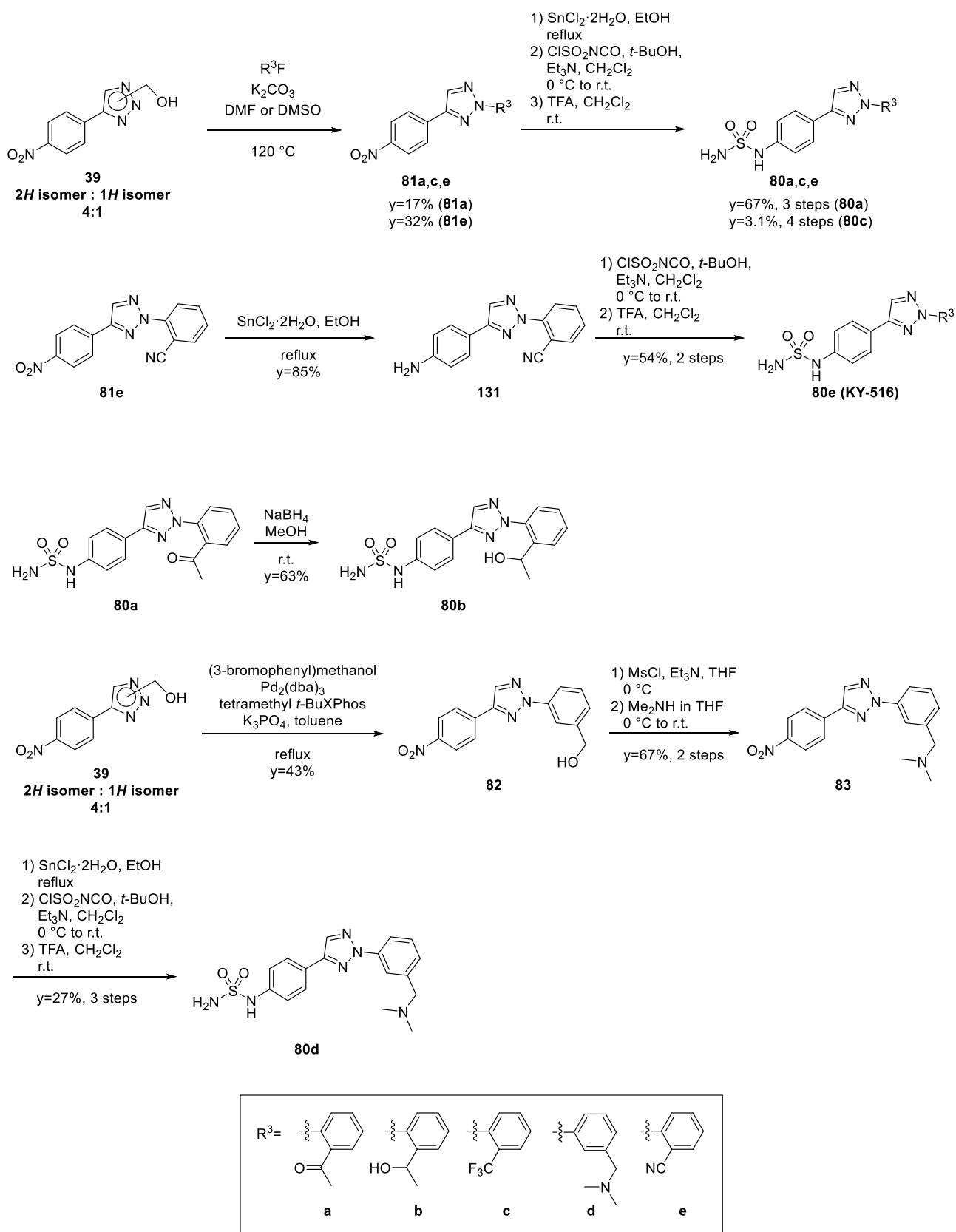
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.55–5.62 (2H, br), 6.66–6.70 (2H, m), 7.51–7.57 (2H, m), 7.61 (1H, s), 7.66 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.85 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 8.01 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.24 (1H, d, $J = 7.8$ Hz).

***N*-{4-[2-(2-Cyanophenyl)oxazol-5-yl]phenyl}sulfamide (74e)**

化合物**26d**の合成法に準じて, 化合物**79e**より合成した. 収率50%, 2 steps. 粉末.

mp 202–206 °C (decomp.); ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.24–7.31 (4H, m), 7.71 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.76–7.82 (2H, m), 7.85 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.88 (1H, s), 8.04 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 8.30 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 9.85 (1H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 107.9, 117.6 (2C), 117.9, 120.3, 123.0, 125.1 (2C), 128.1, 128.2, 130.6, 133.6, 135.1, 140.3, 151.8, 156.6; IR (ATR) cm^{-1} : 3219; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{NaO}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 363.0528. Found 363.0505.

トリアゾール誘導体の合成



スキーム 30. 化合物 **80a**, **80b**, **80c**, **80d** および **80e** の合成

スキーム 30 に記載の化合物 **80a–e** は、以下の方法にて化合物 **39** よりそれぞれ合成した。

1-{2-[4-(4-Nitrophenyl)-2*H*-1,2,3-triazol-2-yl]phenyl}ethan-1-one (81a**)**

化合物 **39** (1.00 g, 5.26 mmol) を DMSO (10 mL) に溶解し、1-(2-fluorophenyl)ethan-1-one (0.70 mL, 5.8 mmol) および K₂CO₃ (872 mg, 6.31 mmol) を加え、120 °C にて 2.5 時間攪拌後、1-(2-fluorophenyl)ethan-1-one (0.30 mL, 2.5 mmol) を追加し、120 °C にてさらに 9 時間攪拌した。放冷後、反応液を AcOEt にて希釈し、飽和塩化アンモニウム水溶液、水および飽和食塩水にて順次洗浄後、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後、目的分画の溶媒を減圧下留去し、化合物 **81a** の粉末 (270 mg, 収率 17%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.33 (3H, s), 7.49–7.57 (2H, m), 7.59–7.65 (1H, m), 7.96 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.00–8.05 (2H, m), 8.19 (1H, s), 8.31–8.35 (2H, m).

***N*-{4-[2-(2-Acetylphenyl)-2*H*-1,2,3-triazol-4-yl]phenyl}sulfamide (**80a**)**

化合物**26d**の合成法に準じて、化合物**81a**より合成した。収率67%, 3 steps. 粉末。

mp 138–140 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.28 (3H, s), 7.21 (2H, s), 7.25–7.30 (2H, m), 7.54–7.64 (2H, m), 7.68–7.74 (1H, m), 7.80–7.84 (2H, m), 7.92 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.55 (1H, s), 9.76 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 30.1 117.8 (2C), 122.4, 122.5, 126.5 (2C), 127.8, 128.4, 131.3, 133.5, 134.7, 135.9, 140.3, 148.8, 200.7; IR (ATR) cm⁻¹: 3348, 1680; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₆H₁₅N₅NaO₃S [M + Na]⁺ 380.0793. Found 380.0794.

***N*-(4-{2-[2-(1-Hydroxyethyl)phenyl]-2*H*-1,2,3-triazol-4-yl}phenyl)sulfamide (**80b**)**

化合物 **80a** (78 mg, 0.22 mmol) を MeOH (2 mL) に溶解し、NaBH₄ (10 mg, 0.26 mmol) を加え、室温にて 30 分攪拌した。反応液に水 (20 mL) および 6.0 M 塩酸 (3 mL) を加え、CH₂Cl₂ にて 3 回抽出後、有機層を合わせ乾燥 (Na₂SO₄) し、減圧下溶媒を留去した。残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後、目的分画の溶媒を減圧下留去した。得られた残渣に *n*-hexane (5 mL) を加え減圧下溶媒を留去し、化合物 **80b** の粉末 (50 mg, 収率 63%) を得た。

mp 62–67 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.27 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 4.94–5.02 (1H, m),

5.25 (1H, d, $J = 4.2$ Hz), 7.15–7.30 (4H, m), 7.41–7.47 (1H, m), 7.51–7.58 (2H, m), 7.78–7.86 (3H, m), 8.50 (1H, s), 9.65–9.84 (1H, br); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 25.3, 63.3, 117.9 (2C), 122.9, 124.8, 126.4 (2C), 126.8, 127.3, 129.2, 132.4, 136.7, 140.1, 142.0, 147.9; IR (ATR) cm^{-1} ; 3301; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{NaO}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 382.0950. Found 382.0945.

***N*-{4-[2-(2-Trifluoromethylphenyl)-2*H*-1,2,3-triazol-4-yl]phenyl}sulfamide (80c)**

化合物**80a**の合成法に準じて、化合物**39**より合成した。収率3.1%, 4 steps. 粉末。

mp 178–180 °C (decomp.); ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.19–7.29 (4H, m), 7.78–7.96 (5H, m), 8.02 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 8.57 (1H, s), 9.74–9.80 (1H, br); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 117.8 (2C), 122.5, 123.6 (q, $J = 31.6$ Hz), 124.2 ($J = 181.1$ Hz), 126.5 (2C), 127.7 (q, $J = 5.0$ Hz), 127.9, 130.1, 133.3, 133.8, 137.2, 140.3, 148.6; IR (ATR) cm^{-1} ; 3275; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_5\text{NaO}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 406.0561. Found 406.0563.

2-(3-Hydroxymethylphenyl)-4-(4-nitrophenyl)-2*H*-1,2,3-triazole (82)

化合物**41**の合成法に準じて、化合物**39**より合成した。収率43%. 粉末。

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.81 (1H, t, $J = 5.8$ Hz), 4.84 (2H, d, $J = 5.8$ Hz), 7.41 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.52 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 8.04–8.24 (5H, m), 8.28–8.41 (2H, m).

2-(3-Dimethylaminomethylphenyl)-4-(4-nitrophenyl)-2*H*-1,2,3-triazole (83)

化合物 **82** (203 mg, 0.685 mmol) を THF (5 mL) に溶解し、氷冷下, Et_3N (0.19 mL, 1.4 mmol) および MsCl (0.083 mL, 1.1 mmol) を加え、同温にて 55 分攪拌後、同温にて 2.0 M dimethylamine in THF (1.71 mL, 3.4 mmol) を加え、室温にて 250 分攪拌した。反応液に水を加え、 CHCl_3 にて抽出後、乾燥 (Na_2SO_4) し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後、目的分画の溶媒を減圧下留去し、化合物 **83** の粉末 (148 mg, 収率 67%, 2 steps) を得た。

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.30 (6H, s), 3.54 (2H, s), 7.37 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.47 (1H, t, $J =$

7.6 Hz), 8.02–8.19 (5H, m), 8.29–8.37 (2H, m).

***N*-{4-[2-(3-Dimethylaminomethylphenyl)-2*H*-1,2,3-triazol-4-yl]phenyl}sulfamide (80d)**

化合物**26d**の合成法に準じて、化合物**83**より合成した。収率27%, 3 steps. 粉末.

mp 146–148 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.20 (6H, s), 3.50 (2H, s), 7.16–7.40 (5H, m), 7.52 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.94–8.09 (4H, m), 8.52 (1H, s), 9.76 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 44.9 (2C), 62.8, 116.8, 117.8 (2C), 118.1, 122.7, 126.6 (2C), 127.7, 129.4, 133.1, 139.1, 140.2, 140.8, 148.3; IR (ATR) cm⁻¹; 1485; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₇H₂₁N₆O₂S [M + H]⁺ 373.1447. Found 373.1458.

2-[4-(4-Nitrophenyl)[1,2,3]triazol-2-yl]benzonitrile (81e)

化合物**81a**の合成法に準じて、化合物**39**より合成した。収率32%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.68–7.74 (1H, m), 7.94–7.99 (1H, m), 8.10–8.14 (1H, m), 8.18–8.23 (1H, m), 8.25–8.30 (2H, m), 8.39–8.44 (2H, m), 8.98 (1H, s).

2-[4-(4-Aminophenyl)[1,2,3]triazol-2-yl]benzonitrile (131)

化合物**25**の合成法に準じて、化合物**81e**より合成した。収率85%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.81–3.90 (2H, br), 6.74–6.79 (2H, m), 7.39–7.45 (1H, m), 7.67–7.75 (3H, m), 7.80–7.85 (1H, m) 8.05 (1H, s) 8.12–8.17 (1H, m).

***N*-{4-[2-(2-Cyanophenyl)-2*H*-1,2,3-triazol-4-yl]phenyl}sulfamide (80e)**

化合物**80a**の合成法に準じて、化合物**131**より合成した。収率54%, 2 steps. 粉末.

mp 186–189 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.23–7.27 (2H, br), 7.27–7.32 (2H, m), 7.61–7.67 (1H, m), 7.88–7.96 (3H, m), 8.05–8.10 (1H, m), 8.14–8.18 (1H, m), 8.69 (1H, s), 9.82 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 103.3, 116.7, 117.7 (2C), 122.1, 122.2, 126.8 (2C), 128.4, 134.3, 134.6, 135.4, 139.5, 140.6, 149.2; IR (ATR) cm⁻¹; 3251, 2229; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₅H₁₂N₆NaO₂S [M + Na]⁺ 363.0640. Found 363.0631; *Anal.* Calcd for C₁₅H₁₂N₆O₂S·0.05AcOEt: C,

52.95; H, 3.63; N, 24.36. Found: C, 52.70; H, 3.60; N, 24.31; HPLC purity 98.8% (eluent: 20 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.0)/MeCN = 50/50).

ベクターの作製

1. pNLF-C-*IDUA*/Q70X ベクター (*IDUA*-Q70X-Luci) の作製

ベクターはGenScript社 (Piscataway, NJ) に作成を依頼した. 上流5コドンおよび下流7コドンを含む*IDUA* cDNA (NM_000203) Q70X (c.208C>T) ナンセンス変異周辺配列の, 5'末端にKozak配列 (GCCACC), 開始コドン(ATG)およびEcoRI配列 (GAATTC) を, 3'末端にXbaI配列 (TCTAGA) を付与した遺伝子を合成した. (i.e. GAA TTC CTA CCG CGG ATG GCC ACC ATG GTC CTC AGC TGG GAC **TAG** CAG CTC AAC CTC GCC TAT GTA TCT AGA) この合成した遺伝子断片をpNLF1-C [CMV/Hygro] Vector (Promega, Madison, WI, U.S.A.) のEcoRI/XbaI制限部位に挿入した.

2. pcDNA6/myc-His/LacZ-*IDUA*/W402X-Nluc ベクター (*IDUA*-W402X-Luci) の作製

ベクターはGenScript社に作成を依頼した. 上流6コドンおよび下流6コドンを含む*IDUA* cDNA (NM_000203) W402X (c.1205G>A) ナンセンス変異周辺配列の3'末端にNlucルシフェラーゼ配列を付与した遺伝子を合成した. (i.e. CTG GAT GAG GAG CAG CTC **TAG** GCC GAA GTG TCG CAG GCC) この合成した遺伝子断片をpcDNA6/myc-His A, B, & C Mammalian Expression Vectors (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) 内のpcDNA6/myc-His/LacZ vectorのNotI制限部位に挿入した.

3. pcDNA6-*IDUA* Mutant ベクターの作製

ベクターはGenScript社に作成を依頼した. 5'末端に Kozak 配列および EcoRI 配列を, 3'末端に NotI 配列を付けた*IDUA* 遺伝子 (NM_000203.4) を合成し, pcDNA3.1 (+) vector へ導入し, *IDUA*野生型ベクターを作製した. *IDUA* の変異ベクターは, 作製した *IDUA* 野生型ベクターを鋳型として Q70X変異あるいはW402X変異を導入した.

作成したpcDNA3.1 (+) - *IDUA* Q70X および W402X ベクターを 5':EcoRI, 3':XhoIとなるようにgccaccATG~TGA をPCR増幅し, pcDNA6 myc-His C ベクター (Thermo Fischer scientific, Waltham, MA) のEcoRI-XhoIサイトにクローニングした.

ルシフェラーゼアッセイ

1. HeLa細胞への遺伝子導入

10% FBS含有MEM培地中で37 °C, 5% CO₂ 気流下, HeLa細胞を継代培養した. 継代時, 5×10^5 cells/dish になるように 10 mL の継代培地を入れておいた 10 cm dish に播種し, 炭酸ガスインキュベーターで37 °C, 5% CO₂気流下培養した. 播種翌日, ベクター 11 µg, Opti-MEM (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) 509 µL, FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, U.S.A.) 22 µLを低吸着チューブに添加し, 室温で10 分静置した. 混液を細胞にゆっくり滴下し, 炭酸ガスインキュベーターで37 °C, 5% CO₂気流下培養した. 遺伝子導入24 時間後, 細胞を2.5 g/L トリプシン/1 mM EDTA溶液で剥がし, 1, 2ないし 4×10^5 cells/dishとなるよう播種し炭酸ガスインキュベーターで37 °C, 5% CO₂気流下培養した. 遺伝子導入翌日, *IDUA*-Q70X-Luciベクター導入の場合はHygromycin B, *IDUA*-W402X-Luciベクターの場合はBlasticidin含有培地で薬剤選択することにより安定発現細胞を作製した.

2. 細胞播種

ナンセンス変異部分配列 (40 bp) にルシフェラーゼを融合したコンストラクトを安定的に発現させた HeLa 細胞懸濁液を, 細胞数が 2×10^5 cells/mL になるよう 10% FBS 含有 MEM 培地に懸濁した. ルシフェラーゼ活性用に, 96 ウェルホワイトハーフエリアマイクロプレート (Greiner, Frickenhausen, Germany) に 50 µL/well 播種し, 炭酸ガスインキュベーターで 37 °C, 5% CO₂ 気流下培養した.

3. 被験化合物の調製および処置

被験化合物を約 2 – 3 mg 秤量した. 秤量値を純度換算し, 10^{-2} – 10^{-1} M となる量の DMSO を加

え溶解した。細胞播種 24 時間後、被験化合物を処置濃度の 1000 倍濃度となるよう DMSO を用いて希釈した。クリーンベンチ内で 1.5 mL ポリプロピレン製サンプルチューブに 10% FBS 含有 MEM 培地 0.75 mL を添加し、1000 倍濃度に調製した被験化合物 DMSO 溶液を 1.5 μ L 添加し、タッチミキサーで攪拌した。対照群には、DMSO を 1.5 μ L 加えた。薬物含有培地を 50 μ L/well ずつ添加し、炭酸ガスインキュベーターで 37 °C, 5% CO₂ 気流下、24 時間培養した。

4. ルシフェラーゼ活性の測定

薬物添加約 24 時間後、プレート逆さにして培養上清を除去し、Nano-Glo 反応液 (Promega) を 20 μ L/well 添加した。マイクロプレートミキサーで 3 分攪拌後、マイクロプレートリーダー (Power Scan HT, BioTek, Winooski, VT, U.S.A.) を用いてルシフェラーゼ発光量を測定した。薬物未処置細胞のルシフェラーゼ活性を 100% として、薬物処置細胞のルシフェラーゼ活性を相対値で表した。

全長配列の変異 IDUA 酵素を発現する IDUA ノックアウト細胞におけるリードスルー誘導作用の評価

1. IDUA ノックアウト細胞の作製

タカラバイオ社に依頼し、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、IDUA ノックアウト HeLa 細胞を作製した。作成したノックアウト細胞は 37 °C, 5% CO₂ 気流下、継代培養した。

2. 細胞播種

細胞を 2.0×10^5 cells/mL となるよう培地で懸濁し、細胞懸濁液を調製した。24 well プレートに 500 μ L/well ずつ播種し、37 °C, 5% CO₂ 気流下で培養した。

3. 遺伝子導入

細胞播種翌日、低吸着チューブに Opti-mem を添加し、プラスミドベクターを壁に添加し、ただちにボルテックスにより攪拌した。必要量の Eugene HD を加えピペッティングし、ただちに転倒混

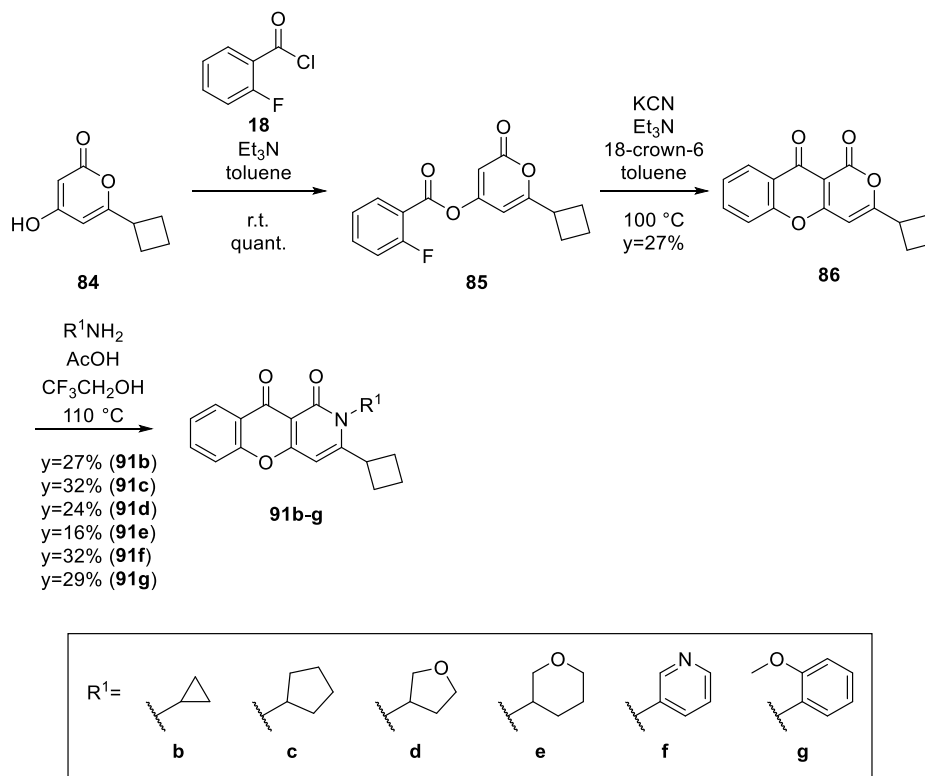
和した. 室温で 15 分静置し, 培養液中に 10 μ L 添加し, 7 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 気流下で培養した.

4. IDUA 酵素活性測定

遺伝子導入 24 時間後に, ハーフエリア 96 ウェルブラックマイクロプレート (Greiner, Frickenhausen, Germany) に, 回収した細胞溶解液 20 μ L および 50 μ M 4-methylumbelliferyl- α -iduronide 基質溶液 (Glycosynth, Cheshire, U.K.) 20 μ L を加え, 37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養した. 0.2 M Sodium glycine 緩衝液 50 μ L を加えて反応を停止し, マイクロプレートリーダー (Power Scan HT, BioTek, Winooski, VT, U.S.A.) で蛍光強度 (Ex 360 nm, Em 460 nm) を測定した. 同時に, 4-methylumbelliferone (4-MU) を用いて検量線を作製し, 単位時間あたりに生成した 4-MU 濃度から酵素活性を算出した. また, Pre 値の測定は 50 μ M 4-methylumbelliferyl- α -iduronide 基質溶液 20 μ L, 0.2 M Sodium glycine 緩衝液 50 μ L および回収した細胞溶解液 20 μ L の順に加え, マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (Ex 360 nm, Em 460 nm) を速やかに測定した.

第三章に関する実験

R¹ 側鎖変換誘導体の合成



スキーム 31. 化合物 **91b**, **91c**, **91d**, **91e**, **91f** および **91g** の合成

スキーム 31 に記載の化合物 **91b–g** は、以下の方法にて化合物 **84** よりそれぞれ合成した。

6-Cyclobutyl-2-oxo-2H-pyran-4-yl 2-fluorobenzoate (**85**)

化合物 **84**⁷³⁾ (2.49 g, 15.0 mmol) を toluene (270 mL) に懸濁し、Et₃N (4.18 mL, 30.0 mmol) を加え、2-fluorobenzyl chloride (**18**) (2.68 mL, 22.5 mmol) を滴下し、室温にて 30 分攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、AcOEt にて抽出し、有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液および飽和食塩水にて順次洗浄後、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後、目的分画の溶媒を減圧下留去し、化合物 **85** の油状物 (4.80 g, quant.) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.84–2.12 (2H, m), 2.22–2.40 (4H, m), 3.32–3.45 (1H, m), 6.04–6.09 (1H, m), 6.14–6.18 (1H, m), 7.16–7.36 (2H, m), 7.59–7.69 (1H, m), 7.97–8.08 (1H, m).

3-Cyclobutylpyrano[4,3-*b*]chromene-1,10-dione (**86**)

化合物**85** (4.80 g, 15.0 mmol) をtoluene (375 mL) に溶解し, KCN (1.47 g, 22.5 mmol), Et₃N (3.14 mL, 22.5 mmol), 18-crown-6 (0.40 g, 1.5 mmol) を順次加え, 室温にて10 分攪拌後, 60 °C にて30 分攪拌し, 100 °Cにてさらに45 分攪拌した. 放冷後, 反応液に水を加え, AcOEtにて抽出し, 有機層を飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物**86**の粉末 (1.08 g, 収率27%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.85–2.19 (2H, m), 2.27–2.46 (4H, m), 3.36–3.50 (1H, m), 6.23 (1H, s), 7.41–7.49 (2H, m), 7.66–7.73 (1H, m), 8.25–8.34 (1H, m).

3-Cyclobutyl-2-(tetrahydrofuran-3-yl)-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (**91e**)

Tetrahydropyran-3-ylamine hydrochloride (920 mg, 6.69 mmol) を CF₃CH₂OH (2.8 mL) に懸濁し, Et₃N (1.1 mL, 8.0 mmol), 化合物 **86** (270 mg, 1.00 mmol) および AcOH (1.4 mL) を加え, 110 °C にて 14 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に水を加え AcOEt にて抽出し, 有機層を飽和重層水および飽和食塩水にて順次洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 得られた残渣に *t*-BuOMe (3 mL) を加えて不溶物をろ取し, 化合物 **91e** の粉末 (57 mg, 収率 16%) を得た.

mp 194–196 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.62–2.00 (4H, m), 2.06–2.36 (3H, m), 2.38–2.52 (2H, m), 3.10–3.26 (1H, m), 3.40–3.64 (2H, m), 3.68–3.78 (1H, m), 3.86–3.97 (1H, m), 4.00–4.12 (1H, m), 4.79 (1H, t, *J* = 10.2 Hz), 6.13 (1H, s), 7.31–7.40 (2H, m), 7.58–7.77 (1H, m), 8.26–8.33 (1H, m); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 17.1, 25.1, 26.3, 27.55, 27.60, 37.7, 56.6, 67.0, 67.2, 95.6, 107.1, 117.5, 123.6, 125.2, 125.6, 134.3, 153.9, 159.6, 159.8, 165.5, 172.8; IR (ATR) cm⁻¹: 1693. HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₁H₂₁NNaO₄ [M + Na]⁺ 374.1368. Found 374.1394.

3-Cyclobutyl-2-cyclopropyl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (91b)

化合物**91e**の合成法に準じて、化合物**86**より合成した。収率27%。粉末。

mp 276–281 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.72–0.81 (2H, m), 1.12–1.22 (2H, m), 1.73–1.85 (1H, m), 1.95–2.11 (1H, m), 2.15–2.27 (2H, m), 2.35–2.45 (2H, m), 2.69–2.78 (1H, m), 3.95–4.08 (1H, m), 6.24 (1H, s), 7.41–7.49 (1H, m), 7.55 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.72–7.83 (1H, m), 8.05 (1H, d, *J* = 7.8 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.9 (2C), 17.2, 27.3, 27.8 (2C), 37.3, 94.9, 106.7, 117.5, 123.5, 125.2, 125.5, 134.2, 154.0, 160.0, 162.3, 165.4, 172.8; IR (ATR) cm⁻¹: 1685. HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₉H₁₇NNaO₃ [M + Na]⁺ 330.1106. Found 330.1128.

3-Cyclobutyl-2-cyclopentyl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (91c)

化合物 **91e** の合成法に準じて、化合物 **86** より合成した。収率 32%。粉末。

mp 230–233 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.47–1.64 (2H, m), 1.66–1.88 (3H, m), 1.90–2.08 (3H, m), 2.10–2.29 (4H, m), 2.30–2.43 (2H, m), 3.72–3.86 (1H, m), 4.43–4.60 (1H, m), 6.22 (1H, s), 7.37–7.49 (1H, m), 7.51–7.59 (1H, m), 7.72–7.83 (1H, m), 8.05 (1H, d, *J* = 7.8 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 17.1, 25.7 (2C), 27.7 (2C), 28.1 (2C), 37.7, 58.4, 94.9, 107.0, 117.5, 123.6, 125.1, 125.5, 134.2, 153.9, 158.8, 159.8, 165.3, 173.0; IR (ATR) cm⁻¹: 1678. HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₁H₂₁NNaO₃ [M + Na]⁺ 358.1419. Found 358.1428.

3-Cyclobutyl-2-(tetrahydrofuran-3-yl)-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (91d)

化合物 **91e** の合成法に準じて、化合物 **86** より合成した。収率 24%。粉末。

mp 205–206 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.70–2.45 (8H, m), 3.80–3.94 (4H, m), 3.99–4.07 (1H, m), 4.70–4.90 (1H, m), 6.29 (1H, s), 7.43–7.50 (1H, m), 7.53–7.61 (1H, m), 7.73–7.84 (1H, m), 8.06 (1H, d, *J* = 7.6 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 17.1, 27.56, 27.62, 28.7, 37.4, 56.7, 66.9, 68.1, 95.5, 107.1, 117.5, 123.6, 125.2, 125.5, 134.3, 153.9, 158.9, 159.9, 165.4, 172.9; IR (ATR) cm⁻¹: 1682. HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₀H₂₀NO₄ (M + H)⁺ 338.1392. Found

338.1372.

3-Cyclobutyl-2-pyridin-3-yl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (91f)

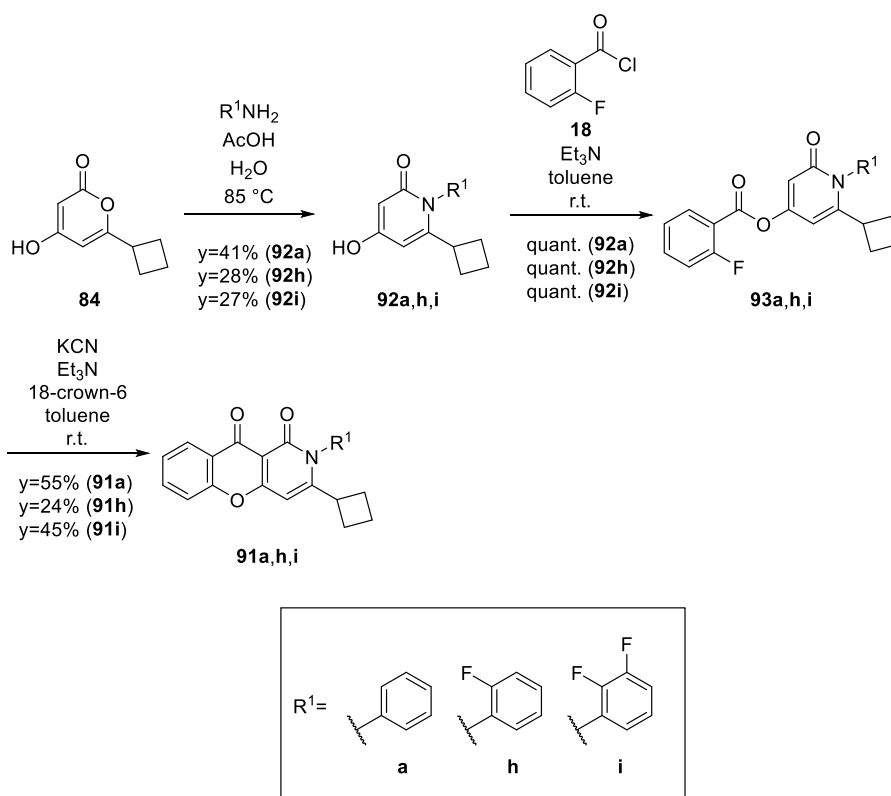
化合物 **91e** の合成法に準じて、化合物 **86** より合成した。収率 32%。粉末。

mp 219–220 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.50–1.78 (4H, m), 2.00–2.20 (2H, m), 3.12–3.30 (1H, m), 6.48 (1H, s), 7.47–7.55 (1H, m), 7.57–7.67 (2H, m), 7.78–7.90 (2H, m), 8.04–8.13 (1H, m), 8.52 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.69 (1H, d, *J* = 4.4 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.7, 26.9, 27.0, 37.7, 95.4, 106.9, 117.7, 123.5, 124.1, 125.4, 125.6, 134.2, 134.5, 136.8, 149.5, 149.6, 154.0, 159.3, 159.4, 166.4, 172.7; IR (ATR) cm⁻¹: 1689. HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₁H₁₆N₂NaO₃ [M + Na]⁺ 367.1059. Found 367.1069.

3-Cyclobutyl-2-(2-methoxyphenyl)-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (91g)

化合物 **91e** の合成法に準じて、化合物 **86** より合成した。収率 29%。粉末。

mp 248–258 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.50–1.81 (4H, m), 1.95–2.22 (2H, m), 3.02–3.15 (1H, m), 3.72 (3H, s), 6.43 (1H, s), 7.07 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.16–7.27 (2H, m), 7.42–7.53 (2H, m), 7.60 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.75–7.86 (1H, m), 8.06 (1H, d, *J* = 7.4 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 26.6, 27.2, 37.6, 55.5, 94.8, 106.8, 112.1, 117.6, 120.5, 123.6, 125.3, 125.5, 125.7, 129.8, 130.5, 134.4, 154.0, 154.5, 158.6, 160.0, 166.4, 172.8; IR (ATR) cm⁻¹: 1697. HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₃H₁₉NNaO₄ [M + Na]⁺ 396.1212. Found 396.1213.



スキーム 32. 化合物 **91a**, **91h** および **91i** の合成

スキーム 32 に記載の化合物 **91a**, **91h** および **91i** は、以下の方法にて化合物 **84** よりそれぞれ合成した。

6-Cyclobutyl-4-hydroxy-1-phenylpyridine-2(1*H*)-one (**92a**)

化合物 **84** (1.86 g, 11.2 mmol) を AcOH (40 mL) および水 (80 mL) の混液に懸濁し、aniline (1.03 mL, 11.2 mmol) を加え 85 °C にて 18 時間攪拌した。放冷後、減圧下溶媒を留去し、得られた残渣に toluene (10 mL) を加え再び減圧下溶媒を留去し、toluene (10 mL) を加え 50 °C にて 10 分攪拌後、析出物をろ取した。得られた粉末を toluene (20 mL) および Et₂O (20 mL) にて順次洗浄し、化合物 **92a** の粉末 (1.11 g, 収率 41%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.45–1.65 (4H, m), 1.81–2.00 (2H, m), 2.94–3.09 (1H, m), 5.54 (1H, s), 5.91 (1H, s), 7.11–7.23 (2H, m), 7.34–7.54 (3H, m), 10.45–10.80 (1H, br).

2-(6-Cyclobutyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridine-4-yl) 2-fluorobenzoate (**93a**)

化合物 **92a** (400 mg, 1.66 mmol) を toluene (40 mL) に懸濁し, Et₃N (0.47 mL, 3.4 mmol) および 2-fluorobenzoyl chloride (**18**) (0.30 mL, 2.5 mmol) を加え室温にて 40 分撹拌した. 反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (20 mL) を加え, AcOEt にて抽出し, 有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液および飽和食塩水にて順次洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **93a** の油状物 (651 mg, quant.) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.71–1.76 (4H, m), 1.93–2.04 (2H, m), 3.10–3.20 (1H, m), 6.16 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.44 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.11–7.24 (3H, m), 7.27–7.33 (1H, m), 7.42–7.54 (3H, m), 7.60–7.67 (1H, m), 8.06–8.15 (1H, m).

3-Cyclobutyl-2-phenyl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (**91a**)

化合物 **93a** (651 mg, 1.66 mmol) を toluene (40 mL) に溶解し, KCN (162 mg, 2.49 mmol), Et₃N 0.35 mL, 2.5 mmol) および 18-crown-6 (44 mg, 0.17 mmol) を加え室温にて 16 時間撹拌した. 反応液に水 (10 mL) を加え, AcOEt にて抽出し, 有機層を飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去した. 得られた残渣 359 mg に *t*-BuOMe (10 mL) を加え, 不溶物をろ取し, 化合物 **91a** の粉末 (312 mg, 収率 55%) を得た.

mp: 240–243 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.56–1.73 (4H, m), 2.02–2.17 (2H, m), 3.11–3.23 (1H, m), 6.44 (1H, s), 7.25–7.33 (2H, m), 7.45–7.57 (4H, m), 7.61 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.77–7.84 (1H, m), 8.07 (1H, d, *J* = 7.6 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.9, 27.3 (2C), 38.0, 94.9, 107.0, 117.7, 123.6, 125.4, 125.6, 128.7, 128.9 (2C), 129.2 (2C), 134.5, 137.4, 154.1, 159.3, 159.6, 166.3, 172.8; IR (ATR) cm⁻¹: 1689; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₂H₁₇NNaO₃ [M + Na]⁺ 366.1106. Found 366.1122.

6-Cyclobutyl-1-(2-fluorophenyl)-4-hydroxy-1*H*-pyridin-2-one (92h)

化合物 **92a** の合成法に準じて、化合物 **84** より合成した。収率 28%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.61–1.81 (4H, m), 1.94–2.08 (2H, m), 3.01–3.13 (1H, m), 5.95–6.02 (2H, m), 7.14–7.26 (3H, m), 7.40–7.48 (1H, m).

2-[6-Cyclobutyl-1-(2-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-4-yl] 2-fluorobenzoate (93h)

化合物 **93a** の合成法に準じて、化合物 **92h** より合成した。quant. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.62–1.85 (4H, m), 1.97–2.12 (2H, m), 3.09–3.21 (1H, m), 6.14–6.19 (1H, m), 6.43–6.47 (1H, m), 7.18–7.34 (5H, m), 7.42–7.50 (1H, m), 7.60–7.69 (1H, m), 8.05–8.12 (1H, m).

3-Cyclobutyl-2-(2-fluorophenyl)-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (91h)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **93h** より合成した。収率 24%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.47–1.89 (4H, m), 1.95–2.09 (1H, m), 2.15–2.29 (1H, m), 3.11–3.25 (1H, m), 6.52 (1H, s), 7.33–7.54 (6H, m), 7.78–7.89 (1H, m), 8.06–8.12 (1H, m); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 26.81, 26.84, 37.6, 95.6, 106.8, 116.2 (d, *J* = 19.3 Hz), 117.7, 123.6, 124.8 (d, *J* = 13.5 Hz), 125.1 (d, *J* = 3.4 Hz), 125.5, 125.6, 130.8, 131.4 (d, *J* = 8.2 Hz), 134.5, 154.0, 157.4 (d, *J* = 248.1 Hz), 158.5, 159.3, 166.6, 172.7; IR (ATR) cm⁻¹: 1693; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₂H₁₆FNNaO₃ [M + Na]⁺ 384.1012. Found 384.1024.

6-Cyclobutyl-1-(2,3-difluorophenyl)-4-hydroxy-1*H*-pyridin-2-one (92i)

化合物 **92a** の合成法に準じて、化合物 **84** より合成した。収率 27%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.40–1.52 (1H, m), 1.53–2.10 (5H, m), 3.07 (1H, quintet, *J* = 8.6 Hz), 5.56 (1H, s), 5.88 (1H, s), 7.10–7.37 (2H, m), 7.50–7.60 (1H, m).

6-Cyclobutyl-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-fluorobenzoate (93i)

化合物 **93a** の合成法に準じて、化合物 **92i** より合成した. quant. 粉末.

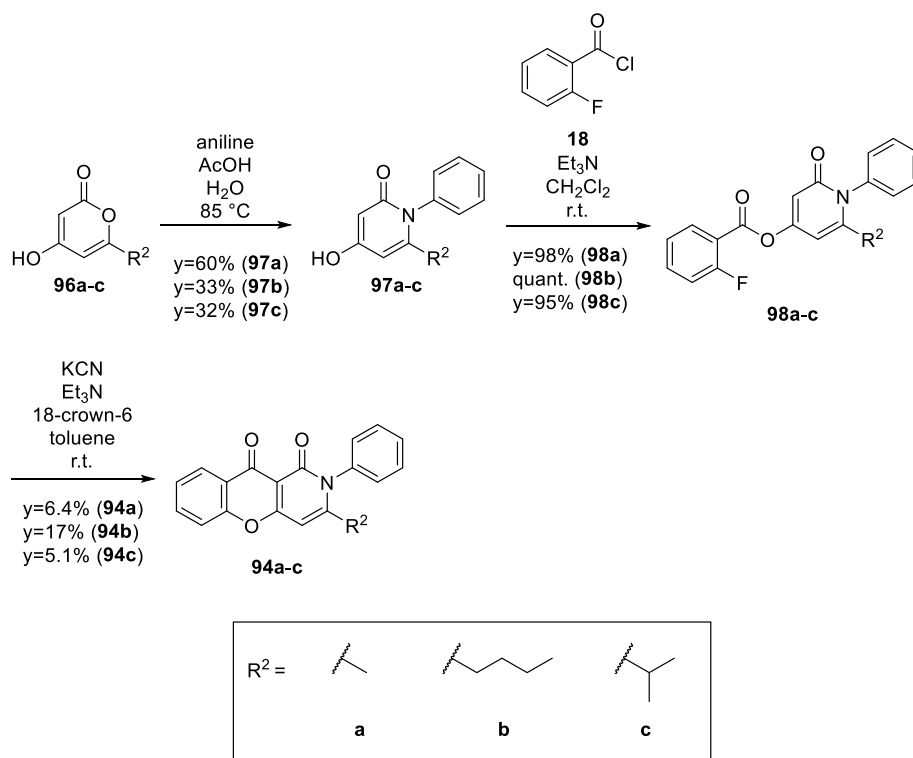
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.65–1.88 (4H, m), 1.99–2.15 (2H, m), 3.07–3.23 (1H, m), 6.18 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.46 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.98–7.07 (1H, m), 7.19–7.36 (4H, m), 7.60–7.70 (1H, m), 8.06–8.12 (1H, m).

3-Cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (91i)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **93i** より合成した. 収率 45%. 粉末.

mp 230–233 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.50–1.95 (4H, m), 1.97–2.10 (1H, m), 2.18–2.30 (1H, m), 3.18–3.30 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.31–7.46 (2H, m), 7.47–7.55 (1H, m), 7.60–7.75 (2H, m), 7.78–7.89 (1H, m), 8.08 (1H, d, *J* = 7.6 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 26.8, 26.9, 37.4, 96.0, 106.8, 117.7, 118.7 (d, *J* = 16.9 Hz), 123.5, 125.0 (dd, *J* = 7.7, 4.8 Hz), 125.5, 125.6, 126.2 (d, *J* = 3.4 Hz), 126.5 (d, *J* = 11.6 Hz), 134.6, 146.0 (dd, *J* = 250.5, 14.0 Hz), 149.9 (dd, *J* = 247.1, 11.1 Hz), 154.0, 158.4, 159.0, 166.7, 172.7; IR (ATR) cm⁻¹: 1697; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₂H₁₅F₂NNaO₃ [M + Na]⁺ 402.0918. Found 402.0927.

R² 側鎖変換誘導体の合成



スキーム 33. 化合物 **94a**, **94b** および **94c** の合成

スキーム 33 に記載の化合物 **94a-c** は、以下の方法にてそれぞれ合成した。

4-Hydroxy-6-methyl-1-phenyl-1*H*-pyridin-2-one (**97a**)

化合物 **92a** の合成法に準じて、化合物 **96a** より合成した。収率 60%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.82 (3H, s), 5.54 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 5.86–5.89 (1H, m), 7.16–7.21 (2H, m), 7.39–7.51 (3H, m), 10.51–10.64 (1H, br).

6-Methyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-fluorobenzoate (**98a**)

化合物 **93a** の合成法に準じて、化合物 **97a** より合成した。収率 98%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.99 (3H, s), 6.15–6.18 (1H, m), 6.45 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.19–7.32 (4H, m), 7.44–7.56 (3H, m), 7.60–7.67 (1H, m), 8.07 (1H, td, *J* = 7.8, 1.7 Hz).

3-Methyl-2-phenyl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (94a)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **98a** より合成した。収率 6.4%。粉末。

mp 255–259 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.02 (3H, s), 6.57 (1H, s), 7.30–7.35 (2H, m), 7.45–7.63 (5H, m), 7.77–7.83 (1H, m), 8.07 (1H, d, *J* = 7.8 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 21.8, 97.6, 107.0, 117.7, 123.6, 125.4, 125.6, 128.4 (2C), 128.8, 129.5 (2C), 134.4, 137.9, 153.98, 154.01, 159.3, 166.0, 172.9; IR (ATR) cm⁻¹: 1685; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₁₉H₁₃NNaO₃ [M + Na]⁺ 326.0793. Found 326.0794.

6-Butyl-4-hydroxy-1-phenyl-1*H*-pyridin-2-one (97b)

化合物 **92a** の合成法に準じて、化合物 **96b**⁸²⁾ より合成した。収率 33%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.67 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.01–1.15 (2H, m), 1.21–1.34 (2H, m), 2.23 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 5.53 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 5.83 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.13–7.22 (2H, m), 7.37–7.53 (3H, m), 10.58 (1H, s).

6-Butyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-fluorobenzoate (98b)

化合物 **93a** の合成法に準じて、化合物 **97b** より合成した。quant. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.77 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.13–1.30 (2H, m), 1.37–1.49 (2H, m), 2.23 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 6.15 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.44 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.18–7.34 (4H, m), 7.43–7.58 (3H, m), 7.60–7.69 (1H, m), 8.05–8.15 (1H, m).

3-Butyl-2-phenyl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (94b)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **98b** より合成した。収率 17%。粉末。

mp 244–247 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.70 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.07–1.20 (2H, m), 1.35–1.47 (2H, m), 2.27 (2H, t, *J* = 8.6 Hz), 6.50 (1H, s), 7.30–7.38 (2H, m), 7.44–7.66 (5H, m), 7.76–7.85 (1H, m), 8.06 (1H, d, *J* = 8.0 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.3, 21.5, 29.1, 33.2, 96.7, 107.0, 117.7, 123.6, 125.4, 125.6, 128.80 (2C), 128.83, 129.4 (2C), 134.5, 137.5, 154.1,

157.5, 159.4, 166.1, 172.9; IR (ATR) cm^{-1} : 1685; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NNaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 368.1263. Found 368.1272.

4-Hydroxy-6-isopropyl-1-phenyl-1*H*-pyridin-2-one (97c)

化合物 **92a** の合成法に準じて、化合物 **96c**⁸²⁾ より合成した。収率 32%。粉末。

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.04 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 2.46 (1H, septet, $J = 6.8$ Hz), 5.97–6.03 (2H, m), 7.61–7.22 (2H, m), 7.41–7.54 (3H, m).

6-Isopropyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-fluorobenzoate (98c)

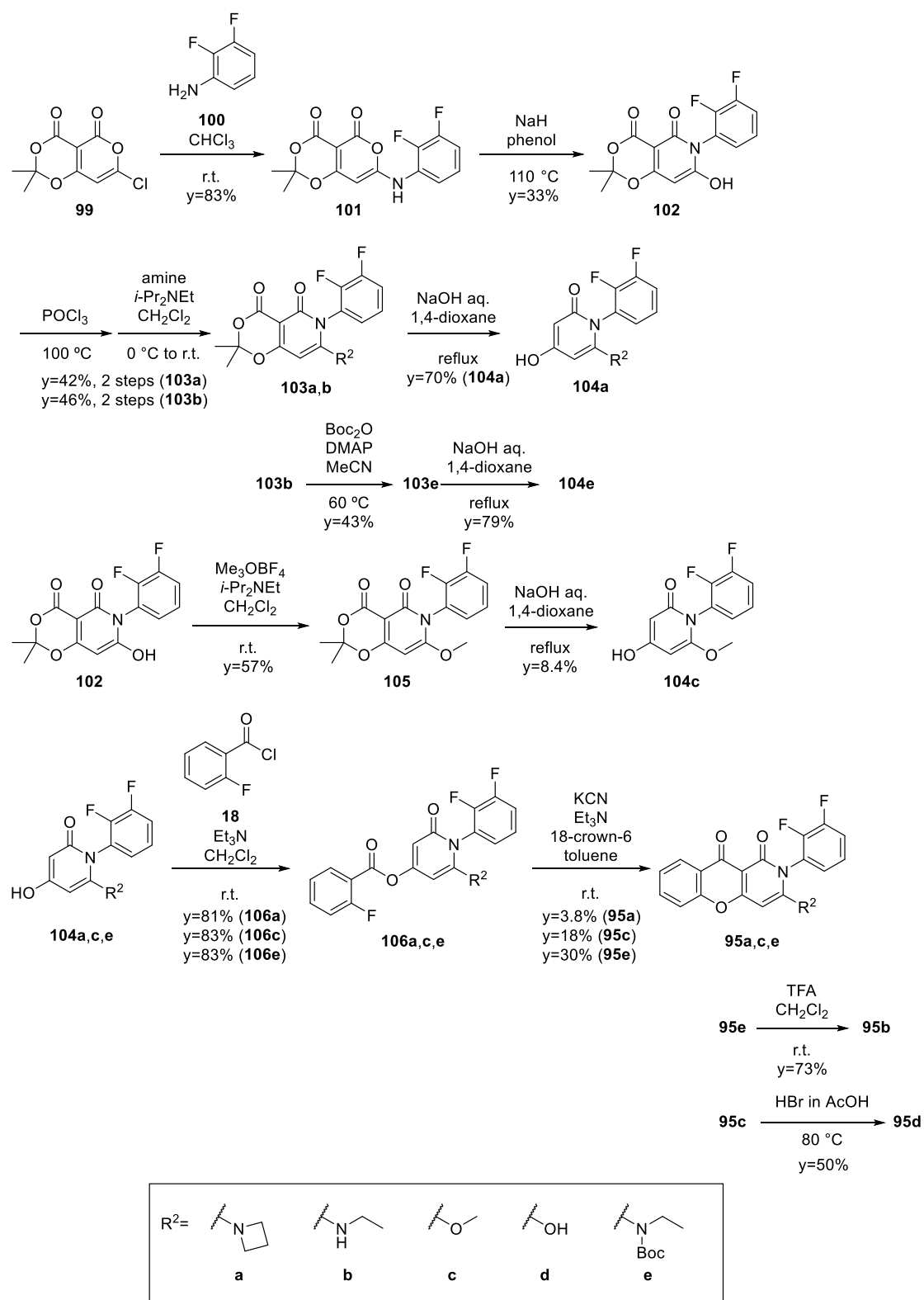
化合物 **93a** の合成法に準じて、化合物 **97c** より合成した。収率 95%。粉末。

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.11 (6H, d, $J = 6.7$ Hz), 2.57 (1H, septet, $J = 6.7$ Hz), 6.17 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.43 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.19–7.33 (3H, m), 7.43–7.57 (4H, m), 7.60–7.68 (1H, m), 8.05–8.13 (1H, m).

3-Isopropyl-2-phenyl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (94c)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **97c** より合成した。収率 5.1%。粉末。

mp 209–211 °C; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.13 (6H, d, $J = 6.6$ Hz), 2.43 (1H, septet, $J = 6.6$ Hz), 6.55 (1H, s), 7.32–7.39 (2H, m), 7.45–7.64 (5H, m), 7.76–7.85 (1H, m), 8.07 (1H, d, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 21.5 (2C), 31.1, 94.0, 106.8, 117.6, 123.5, 125.3, 125.6, 128.7 (2C), 128.8, 129.4 (2C), 134.4, 137.5, 154.0, 159.3, 163.6, 166.4, 172.7; IR (ATR) cm^{-1} : 1693; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NNaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 354.1106. Found 354.1118.



スキーム 34. 化合物 **95a**, **95b**, **95c** および **95d** の合成

スキーム 34 に記載の化合物 **95a–d** は、以下の方法にて化合物 **99** よりそれぞれ合成した。

7-(2,3-Difluorophenylamino)-2,2-dimethylpyrano [4,3-*d*][1,3]dioxine-4,5-dione (**101**)

化合物 **99**⁷⁴⁾ (3.00 g, 13.0 mmol) を CHCl₃ (30 mL) に溶解し, 2,3-difluoroaniline (**100**) (2.9 mL, 29 mmol) を加え, 室温にて 1 時間攪拌した. 減圧下溶媒を留去し, 残渣に水 (40 mL) および *t*-BuOMe (40 mL) を加え, 室温にて 30 分攪拌後, 不溶物をろ取した. 得られた粉末を *t*-BuOMe (20 mL) にて 2 回洗浄し, 化合物 **101** の粉末 (3.47 g, 収率 83%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.67 (6H, s), 5.36 (1H, s), 7.24–7.49 (3H, m), 10.93–11.07 (1H, br).

6-(2,3-Difluorophenyl)-7-hydroxy-2,2-dimethyl-6*H*-[1,3]-dioxino[5,4-*c*]pyridine-4,5-dione (**102**)

60% NaH (1.72 g, 43 mmol) を phenol (20 mL) に懸濁し, 氷冷下, 化合物 **101** (3.47 g, 10.7 mmol) を加え, 110 °C にて 15 分攪拌した. 放冷後, 反応液に水 (120 mL) を加え, Et₂O (100 mL) にて 2 回洗浄した. 水層に 6.0 M 塩酸を加え pH 2 とした後, AcOEt にて 2 回抽出し, 有機層を合わせ飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 反応液を減圧下濃縮し, 得られた残渣に *t*-BuOMe (20 mL) を加え, 不溶物をろ取し, 化合物 **102** の粉末 (1.13 g, 収率 33%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.63 (6H, s), 5.09 (1H, s), 7.07–7.18 (1H, m), 7.20–7.30 (1H, m), 7.40–7.58 (1H, m).

6-(2,3-Difluorophenyl)-7-ethylamino-2,2-dimethyl-6*H*-[1,3]-dioxino[5,4-*c*]pyridine-4,5-dione (**103b**)

化合物 **102** (2.04 g, 6.31 mmol) を POCl₃ (17 mL) に懸濁し, 100 °C にて 15 分攪拌した. 放冷後, 反応液を減圧下濃縮し, 飽和重曹水を加え, AcOEt にて 2 回抽出した. 有機層を合わせ, 飽和重層水および飽和食塩水にて順次洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 粉末 1.54 g (crude) を得た.

得られた粉末 1.54 g を CH₂Cl₂ (15 mL) に溶解し, 氷冷下, *i*-Pr₂NEt (1.09 mL, 6.31 mmol) および 2.0 M EtNH₂ in THF (2.5 mL, 5.0 mmol) を加え, 室温にて 2.5 時間攪拌した. 反応液に水を加え CHCl₃ にて 2 回抽出し, 有機層を合わせ乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られ

た残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的分画の溶媒を減圧下留去し、化合物 **103b** の油状物 (1.02 g, 収率 46%, 2 steps) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.20 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.74 (3H, s), 1.75 (3H, s), 3.14–3.26 (2H, m), 4.23–4.34 (1H, br), 5.16 (1H, s), 7.00–7.11 (1H, m), 7.26–7.42 (2H, m).

***tert*-Butyl [6-(2,3-difluorophenyl)-2,2-dimethyl-4,5-dioxo-5,6-dihydro-4*H*-[1,3]dioxino[5,4-*c*]-pyridin-7-yl](ethyl)carbamate (**103e**)**

化合物 **103b** (100 mg, 0.285 mmol) を MeCN (1 mL) に溶解し、DMAP (52 mg, 0.43 mmol) および Boc₂O (93 mg, 0.43 mmol) を加え、室温にて 16 時間攪拌した。Boc₂O (93 mg, 0.43 mmol) を追加し、40 °C にてさらに 2 時間攪拌後、60 °C に昇温し、3 時間攪拌した。反応液に水を加え AcOEt にて抽出し、有機層を飽和食塩水にて洗浄後、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的分画の溶媒を減圧下留去し、化合物 **103e** の油状物 (55 mg, 収率 43%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.12–1.20 (3H, m), 1.37 (9H, s), 1.77–1.82 (6H, m), 2.80–3.10 (1H, br), 3.30–3.50 (1H, br), 5.92 (1H, s), 7.00–7.19 (2H, m), 7.26–7.34 (1H, m).

***tert*-Butyl [1-(2,3-difluorophenyl)-4-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridin-2-yl](ethyl)carbamate (**104e**)**

化合物 **103e** (50 mg, 0.11 mmol) を 1,4-dioxane (1 mL) に溶解し、4.0 M NaOH 水溶液 (0.40 mL, 1.6 mmol) を加え、15 時間加熱還流した。放冷後、反応液に 0.1 M 塩酸 (30 mL) を加え、AcOEt にて 2 回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水にて洗浄後、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、化合物 **104e** の粉末 (32 mg, 収率 79%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.09 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.38 (9H, s), 2.70–3.00 (1H, br), 3.25–3.45 (1H, br), 6.01 (1H, s), 6.08 (1H, s), 7.03–7.17 (2H, m), 7.24–7.33 (1H, m).

**6-(*tert*-Butoxycarbonylethylamino)-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl
2-fluorobenzoate (106e)**

化合物 **93a** の合成法に準じて、化合物 **104e** より合成した。収率 83%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.13 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.40 (9H, s), 2.70–3.06 (1H, br), 3.20–3.52 (1H, br), 6.17–6.30 (1H, m), 6.55–6.65 (1H, m), 7.00–7.32 (5H, m), 7.60–7.69 (1H, m), 8.02–8.10 (1H, m).

***tert*-Butyl [2-(2,3-difluorophenyl)-1,9-dioxo-2,9-dihydro-1*H*-10-oxa-2-azaanthracen-3-yl]-
(ethyl)carbamate (95e)**

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **106e** より合成した。収率 30%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.00–1.45 (12H, m), 3.20–3.60 (2H, m), 6.75–6.90 (1H, m), 7.27–7.46 (2H, m), 7.49–7.56 (1H, m), 7.57–7.75 (2H, m), 7.81–7.89 (1H, m), 8.07–8.13 (1H, m).

2-(2,3-Difluorophenyl)-3-ethylamino-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (95b)

化合物 **95e** (82 mg, 0.18 mmol) を CH₂Cl₂ (0.5 mL) に溶解し、TFA (0.5 mL) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、CHCl₃ にて 2 回抽出し、有機層を合わせ乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的分画の溶媒を減圧下留去し、得られた残渣に *t*-BuOMe (5 mL) を加えて不溶物をろ取し、化合物 **95b** の粉末 (47 mg, 収率 73%) を得た。

mp 305–310 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.09 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.24 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 5.71 (1H, s), 6.80–6.88 (1H, m), 7.21–7.30 (1H, m), 7.34–7.48 (3H, m), 7.61–7.75 (2H, m), 7.99 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.8, 37.2, 75.2, 98.8, 116.9, 119.0 (d, *J* = 16.9 Hz), 123.3, 123.9 (d, *J* = 10.1 Hz), 124.6, 125.5, 125.7 (dd, *J* = 7.7, 4.8 Hz), 126.9 (d, *J* = 3.4 Hz), 133.6, 147.0 (dd, *J* = 250.2, 13.7 Hz), 150.7 (dd, *J* = 246.4, 11.3 Hz), 153.5, 154.1, 158.2, 167.7, 171.6; IR (ATR) cm⁻¹: 1685; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₀H₁₄F₂N₂NaO₃ [M + Na]⁺ 391.0870. Found 391.0900.

7-Azetidin-1-yl-6-(2,3-difluorophenyl)-2,2-dimethyl-6H-[1,3]dioxino[5,4-*c*]pyridine-4,5-dione (103a)

化合物 **103b** の合成法に準じて、化合物 **102** より合成した。収率 42%, 2 steps. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.70–1.75 (6H, m), 2.20 (2H, quintet, *J* = 7.8 Hz), 3.55–3.75 (4H, m), 4.88 (1H, s), 7.02–7.12 (1H, m), 7.14–7.35 (2H, m).

6-Azetidin-1-yl-1-(2,3-difluoro-phenyl)-4-hydroxy-1H-pyridin-2-one (104a)

化合物 **104e** の合成法に準じて、化合物 **103a** より合成した。収率 70%. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.99 (2H, quintet, *J* = 7.6 Hz), 3.34–3.44 (4H, m), 4.96 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 5.14 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.14–7.22 (1H, m), 7.26–7.36 (1H, m), 7.50–7.60 (1H, m), 10.45 (1H, s).

6-Azetidin-1-yl-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-fluorobenzate (106a)

化合物 **93a** の合成法に準じて、化合物 **104a** より合成した。収率 81%. 粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.12 (2H, quintet, *J* = 7.6 Hz), 3.47–3.63 (4H, m), 5.26 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 5.94 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.08–7.15 (1H, m), 7.17–7.34 (4H, m), 7.58–7.66 (1H, m), 8.01–8.11 (1H, m).

3-Azetidin-1-yl-2-(2,3-difluorophenyl)-2H-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (95a)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **106a** より合成した。収率 3.8%. 粉末。

mp > 265 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.02–2.18 (2H, m), 3.54–3.73 (4H, m), 5.43 (1H, s), 7.32–7.50 (4H, m), 7.56–7.75 (2H, m), 7.94–8.04 (1H, m); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 15.0, 53.1 (2C), 76.8, 98.7, 116.9, 119.0 (d, *J* = 16.9 Hz), 123.2, 124.6, 124.8 (dd, *J* = 7.7, 3.9 Hz), 125.2 (d, *J* = 11.6 Hz), 125.5, 127.5 (d, *J* = 3.4 Hz), 133.7, 147.1 (dd, *J* = 250.9, 14.0 Hz), 149.9 (dd, *J* = 247.3, 11.8 Hz), 154.0, 154.2, 157.9, 166.8, 171.5; IR (ATR) cm⁻¹: 1682; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₁H₁₄F₂N₂NaO₃ [M + Na]⁺ 403.0870. Found 403.0905.

6-(2,3-Difluorophenyl)-7-methoxy-2,2-dimethyl-6*H*-[1,3]-dioxino[5,4-*c*]pyridine-4,5-dione (105)

化合物 **102** (1.45 g, 4.49 mmol) を CH₂Cl₂ (15 mL) に懸濁し, *i*-Pr₂NEt (0.77 mL, 4.5 mmol) および trimethyloxonium tetrafluoroborate (697 mg, 4.71 mmol) を加え窒素雰囲気下, 室温にて 15 時間攪拌した. *i*-Pr₂NEt (0.39 mL, 2.3 mmol) および trimethyloxonium tetrafluoroborate (350 mg, 2.28 mmol) を追加し, さらに 5 時間攪拌した. 反応液に 1.0 M 塩酸を加え, CHCl₃ にて 2 回抽出した. 有機層を合わせ乾燥 (Na₂SO₄) し, 減圧下溶媒を留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **105** の粉末 (860 mg, 収率 57%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.78 (6H, s), 3.88 (3H, s), 6.21 (1H, s), 6.98–7.07 (1H, m), 7.12–7.20 (1H, m), 7.22–7.32 (1H, m).

1-(2,3-Difluorophenyl)-4-hydroxy-6-methoxy-1*H*-pyridin-2-one (104c)

化合物 **104e** の合成法に準じて, 化合物 **105** より合成した. 収率 8.4%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.73 (3H, s), 5.37 (1H, s), 5.47 (1H, s), 7.10–7.22 (1H, m), 7.23–7.35 (1H, m), 7.45–7.58 (1H, m), 10.88 (1H, s).

1-(2,3-Difluorophenyl)-6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-fluorobenzoate (106c)

化合物 **93a** の合成法に準じて, 化合物 **104c** より合成した. 収率 83%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.81 (3H, s), 5.65 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.23 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.03–7.10 (1H, m), 7.15–7.34 (4H, m), 7.60–7.68 (1H, m), 8.03–8.11 (1H, m).

2-(2,3-Difluorophenyl)-3-methoxy-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (95c)

化合物 **91a** の合成法に準じて, 化合物 **106c** より合成した. 収率 18%. 粉末.

mp: 246–254 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.97 (3H, s), 6.26 (1H, s), 7.30–7.43 (2H, m), 7.54–7.53 (1H, m), 7.54–7.67 (2H, m), 7.75–7.84 (1H, m), 8.02–8.11 (1H, m); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 58.5, 78.3, 103.4, 117.5, 118.4 (d, *J* = 16.9 Hz), 123.3, 124.0 (d, *J* = 9.2 Hz), 124.9 (dd,

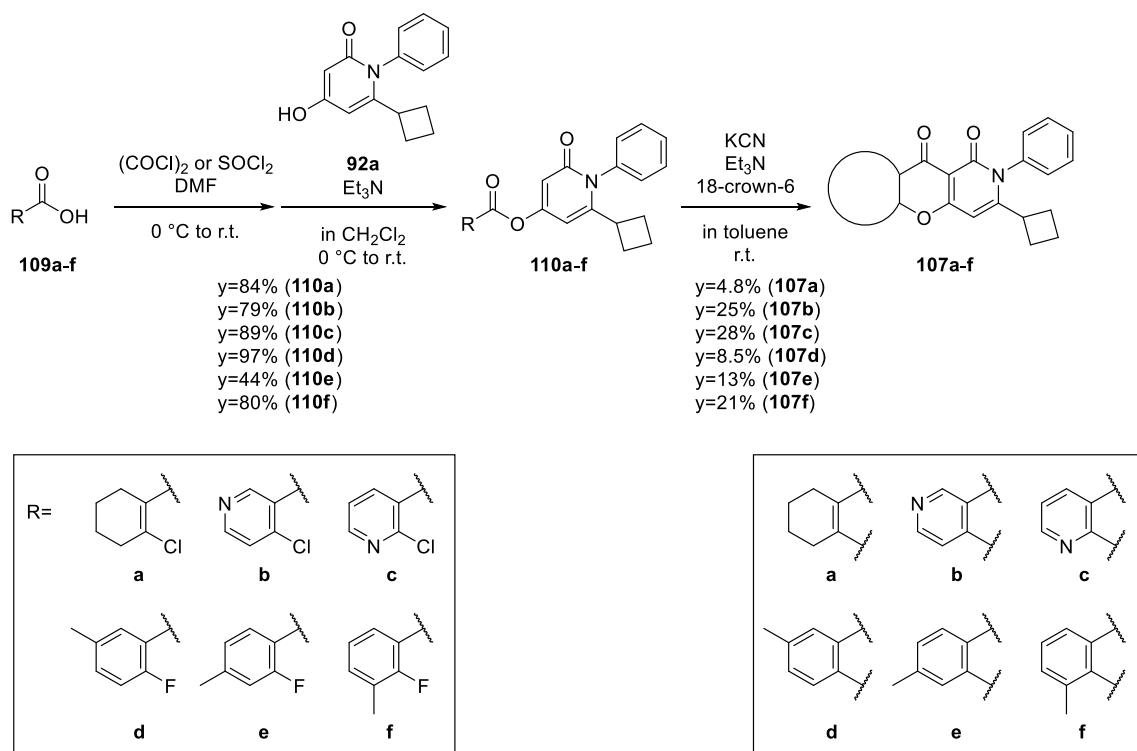
$J = 7.2, 4.8$ Hz), 125.5, 125.6, 126.5 (d, $J = 2.9$ Hz), 134.4, 145.9 (dd, $J = 250.2, 13.7$ Hz), 150.0 (dd, $J = 246.4, 11.3$ Hz), 154.1, 157.3, 160.4, 168.7, 172.2; IR (ATR) cm^{-1} : HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 378.0554. Found 378.0581.

2-(2,3-Difluorophenyl)-3-hydroxy-2H-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (**95d**)

化合物 **95c** (50 mg, 0.14 mmol) を 5.1 M HBr in AcOH (1.3 mL, 6.6 mmol) に懸濁し, 80 °C にて 1 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に飽和重曹水を加え, AcOEt にて 3 回抽出した. 水層を NaCl にて飽和させ, AcOEt にて 3 回抽出した. 有機層を合わせ飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na_2SO_4) し, 減圧下溶媒を留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後, 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 得られた残渣に *t*-BuOMe を加え不溶物をろ取し, 化合物 **95d** の粉末 (24 mg, 収率 50%) を得た.

mp: 336–341 °C; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.10–5.51 (1H, m), 6.60–7.98 (8H, m); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 85.6, 116.7, 120.6 (d, $J = 4.8$ Hz), 123.5, 124.1, 125.2, 126.0 (dd, $J = 21.2, 4.8$ Hz), 128.8 (d, $J = 11.6$ Hz), 131.5 (d, $J = 9.6$ Hz), 132.1, 134.6, 147.9 (dd, $J = 250.2, 10.1$ Hz), 149.9 (dd, $J = 259.6, 15.9$ Hz), 154.6, 162.1, 164.2, 165.0, 174.0. HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{F}_2\text{NO}_4$ ($\text{M} - \text{H}$) $^-$ 340.0421. Found 340.0425.

A 環変換誘導体の合成



スキーム 35. 化合物 **107a**, **107b**, **107c**, **107d**, **107e** および **107f** の合成

スキーム 35 に記載の化合物 **107a-f** は、以下の方法にて化合物 **109a-f** より中間体 **110a-f** を経てそれぞれ合成した。

6-Cyclobutyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-chlorocyclohexenecarboxylate (**110a**)

化合物 **109a** (300 mg, 1.87 mmol) を CH_2Cl_2 (5 mL) に溶解し、氷冷下 $(\text{COCl})_2$ (0.25 mL, 2.9 mmol) および DMF 1 滴を加え、室温にて 30 分攪拌後、減圧下溶媒を留去し、油状物 (0.40 g) を得た。

化合物 **92a** (300 mg, 1.24 mmol) を CH_2Cl_2 (5 mL) に溶解し、氷冷下 Et_3N (0.35 mL, 2.5 mmol) および先に得られた油状物 (0.40 g) を加え、同温にて 1 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残渣に水を加え AcOEt にて抽出後、有機層を飽和食塩水にて洗浄し、乾燥 (Na_2SO_4) した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後、目的分画の溶媒を減圧下留去し、化合物 **110a** の油状物 (398 mg, 収率 84%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.61–1.84 (8H, m), 1.95–2.03 (2H, m), 2.50–2.57 (4H, m),

3.06–3.17 (1H, m), 6.07 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.34 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.13–7.18 (2H, m), 7.40–7.51 (3H, m).

3-Cyclobutyl-2-phenyl-5,6,7,8-tetrahydro-2H-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (107a)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110a** より合成した。収率 4.8%。粉末。

mp: 185–188 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.54–1.69 (6H, m), 1.72–1.82 (2H, m), 1.97–2.10 (2H, m), 2.26–2.34 (2H, m), 2.57–2.63 (2H, m), 3.04–3.16 (1H, m), 6.32 (1H, s), 7.20–7.26 (2H, m), 7.44–7.54 (3H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.9, 20.6, 20.9, 21.2, 26.6, 27.3 (2C), 37.8, 94.6, 108.4, 121.2, 128.6, 128.9 (2C), 129.1 (2C), 137.6, 157.5, 159.3, 160.8, 165.6, 174.0; IR (ATR) cm^{-1} : 1682; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NNaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 370.1419. Found 370.1425.

3-(6-Cyclobutyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridine-4-yl) 4-chloronicotinate (110b)

化合物 **109b** (1.00 g, 6.35 mmol) を SOCl_2 (9.0 mL, 0.12 mol) に懸濁し、DMF 200 μL を加え 2 時間加熱還流した。減圧下溶媒を留去し、粉末 (1.37 g) を得た。

化合物 **92a** (100 mg, 0.414 mmol) を toluene (10 mL) に懸濁し、 Et_3N (0.12 mL, 0.83 mmol) および先に得られた粉末 (133 mg, 0.622 mmol) を加え、室温にて 1.5 h 攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水を加え AcOEt にて 2 回抽出し、有機層を合わせ飽和塩化アンモニウム水および飽和食塩水にて順次洗浄後、乾燥 (Na_2SO_4) し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製後、目的分画の溶媒を減圧下留去し、化合物 **110b** の粉末 (125 mg, 収率 79%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.64–1.78 (4H, m), 1.93–2.04 (2H, m), 3.09–3.21 (1H, m), 6.16 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.47 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.16–7.22 (2H, m), 7.43–7.55 (4H, m), 8.69 (1H, d, $J = 5.4$ Hz), 9.24 (1H, s).

3-Cyclobutyl-2-phenyl-2*H*-10-oxa-2,7-diazaanthracene-1,9-dione (107b)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110b** より合成した。収率 25%。粉末。

mp: 267–272 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.57–1.75 (4H, m), 2.03–2.18 (2H, m), 3.13–3.24 (1H, m), 6.50 (1H, s), 7.26–7.32 (2H, m), 7.47–7.58 (3H, m), 7.63 (1H, d, *J* = 5.6 Hz), 8.84 (1H, d, *J* = 5.6 Hz), 9.17 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.9, 27.4 (2C), 38.1, 94.9, 108.3, 112.5, 119.3, 128.7 (2C), 128.9, 129.3 (2C), 137.2, 148.8, 153.9, 158.9, 159.5, 160.7, 166.6, 172.2; IR (ATR) cm⁻¹: 1701; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₁H₁₆N₂NaO₃ [M + Na]⁺ 367.1059. Found 367.1077.

6-Cyclobutyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-chloronicotinate (110c)

化合物 **110a** の合成法に準じて、化合物 **109c** より合成した。収率 89%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.62–1.78 (4H, m), 1.92–2.09 (2H, m), 3.09–3.23 (1H, m), 6.19 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.50 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.16–7.22 (2H, m), 7.40–7.54 (4H, m), 8.43–8.40 (1H, m), 8.60–8.66 (1H, m).

7-Cyclobutyl-6-phenyl-6*H*-9-oxa-1,6-diazaanthracene-5,10-dione (107c)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110c** より合成した。収率 28%。粉末。

mp: 215–216 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.56–1.75 (4H, m), 2.05–2.21 (2H, m), 3.12–3.24 (1H, m), 6.57 (1H, s), 7.25–7.33 (2H, m), 7.46–7.58 (3H, m), 7.61 (1H, dd, *J* = 7.6, 4.6 Hz), 8.51 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz), 8.74 (1H, dd, *J* = 4.6, 1.8 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 27.3 (2C), 38.0, 95.1, 106.9, 118.5, 122.6, 128.7 (2C), 128.8, 129.2 (2C), 136.4, 137.2, 153.1, 158.7, 159.1, 160.2, 166.4, 173.4; IR (ATR) cm⁻¹: 1693; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₁H₁₆N₂NaO₃ [M + Na]⁺ 367.1059. Found 367.1062.

(6-Cyclobutyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridin-4-yl) 2-fluoro-5-methylbenzoate (110d)

化合物 **110a** の合成法に準じて、化合物 **109d** より合成した。収率 97%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.63–1.77 (4H, m), 1.92–2.05 (2H, m), 2.41 (3H, s), 3.09–3.21 (1H, m), 6.15 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.43 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.07–7.15 (1H, m), 7.15–7.22 (2H, m), 7.38–7.54 (4H, m), 7.83–7.89 (1H, m).

3-Cyclobutyl-7-methyl-2-phenyl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (107d)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110d** より合成した。収率 8.5%。粉末。

mp: 247–251 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.53–1.73 (4H, m), 2.00–2.17 (2H, m), 2.43 (3H, s), 3.10–3.23 (1H, m), 6.43 (1H, s), 7.23–7.34 (2H, m), 7.44–7.57 (4H, m), 7.62 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.86 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 20.3, 27.2 (2C), 37.9, 94.8, 106.9, 117.4, 123.2, 125.0, 128.6, 128.8 (2C), 129.1 (2C), 134.8, 135.3, 137.4, 152.2, 159.28, 159.33, 166.2, 172.8; IR (ATR) cm⁻¹: 1689; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₃H₁₉NNaO₃ [M + Na]⁺ 380.1263. Found 380.1274.

6-Cyclobutyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihdropyridin-4-yl 2-fluoro-4-methylbenzoate (110e)

化合物 **110a** の合成法に準じて、化合物 **109e** より合成した。収率 44%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.62–1.75 (4H, m), 1.95–2.05 (2H, m), 2.45 (3H, s), 3.09–3.19 (1H, m), 6.16 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.43 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.04 (1H, d, *J* = 11.7 Hz), 7.09 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.16–7.21 (2H, m), 7.42–7.53 (3H, m), 7.97 (1H, t, *J* = 7.8 Hz).

3-Cyclobutyl-6-methyl-2-phenyl-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (107e)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110e** より合成した。収率 13%。粉末。

mp: 239–244 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.50–1.72 (4H, m), 2.02–2.16 (2H, m), 2.48 (3H, s), 3.11–3.22 (1H, m), 6.41 (1H, s), 7.26–7.32 (3H, m), 7.42 (1H, s), 7.47–7.57 (3H, m), 7.95 (1H, d, *J* = 8.1 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 21.1, 27.3 (2C), 37.9, 94.8, 106.9, 117.3, 121.3, 125.4, 126.6, 128.6, 128.8 (2C), 128.9, 129.1 (2C), 137.4, 145.4, 154.1, 159.3, 166.2, 172.6; IR (ATR) cm⁻¹: 1689; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₃H₁₉NNaO₃ [M + Na]⁺ 380.1263.

Found 380.1273.

(6-Cyclobutyl-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydropyridin-4-yl) 2-fluoro-3-methylbenzoate (**110f**)

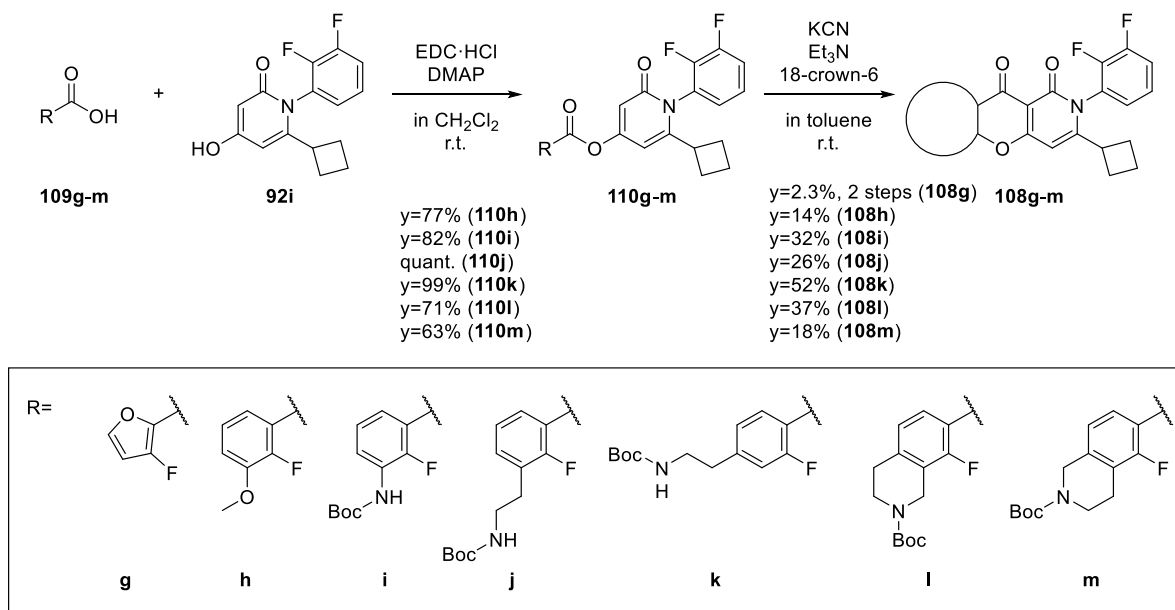
化合物 **110a** の合成法に準じて、化合物 **109f** より合成した。収率 80%。粉末。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.63–1.76 (4H, m), 1.92–2.06 (2H, m), 2.37 (3H, d, $J = 2.0$ Hz), 3.09–3.22 (1H, m), 6.16 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.43 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.12–7.21 (3H, m), 7.42–7.54 (4H, m), 7.86–7.96 (1H, m).

3-Cyclobutyl-5-methyl-2-phenyl-2H-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (**107f**)

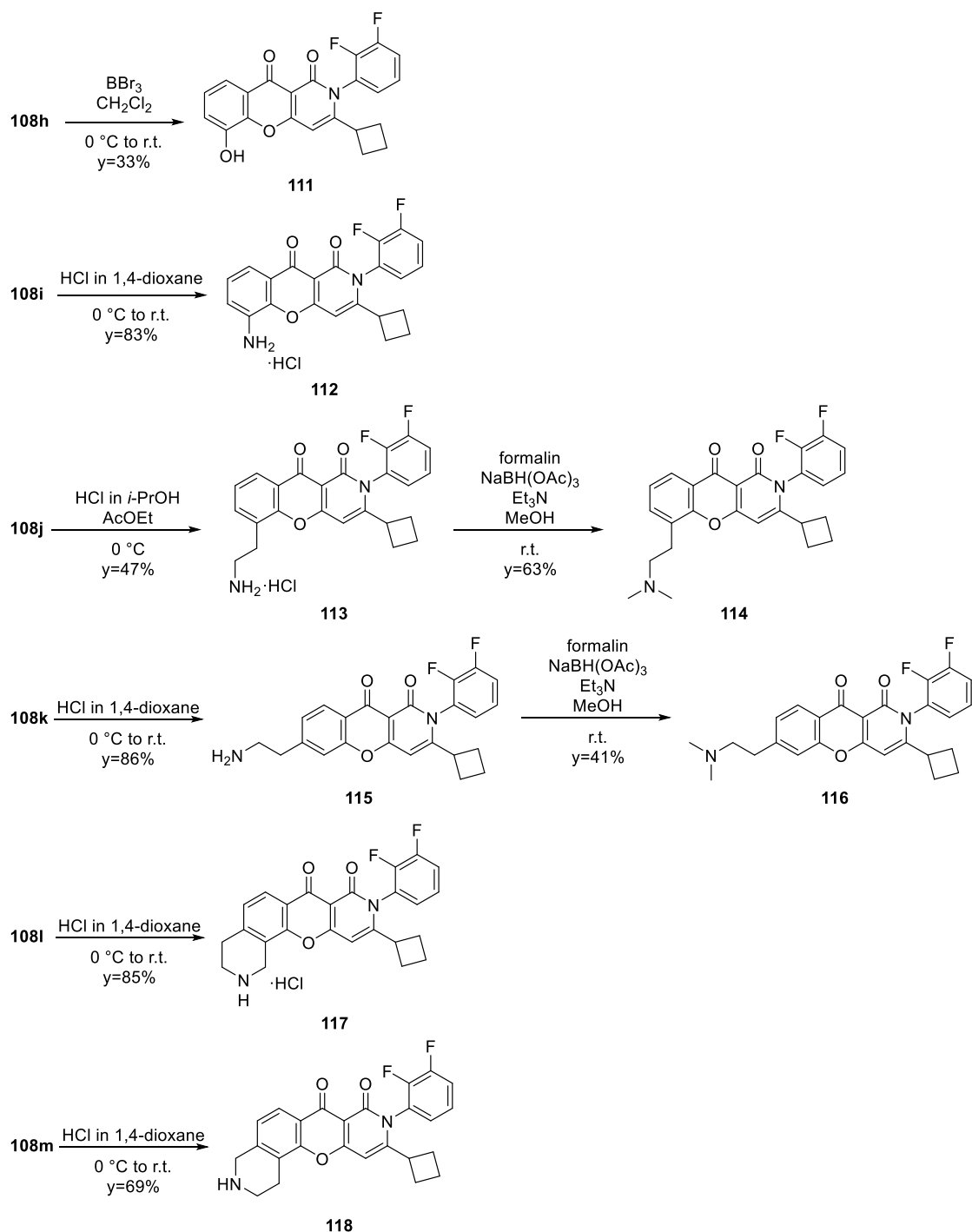
化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110f** より合成した。収率 21%。粉末。

mp: 239–242 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.55–1.74 (4H, m), 2.05–2.19 (2H, m), 2.52 (3H, s), 3.12–3.23 (1H, m), 6.49 (1H, s), 7.24–7.32 (2H, m), 7.33–7.39 (1H, m), 7.45–7.58 (3H, m), 7.63–7.69 (1H, m), 7.85–7.93 (1H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 14.9, 16.8, 27.3 (2C), 38.0, 95.0, 106.7, 123.1, 123.5, 124.7, 126.7, 128.7, 128.8 (2C), 129.1 (2C), 135.1, 137.4, 152.4, 159.29, 159.31, 166.0, 173.0; IR (ATR) cm^{-1} : 1693; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{NNaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 380.1263. Found 380.1268.



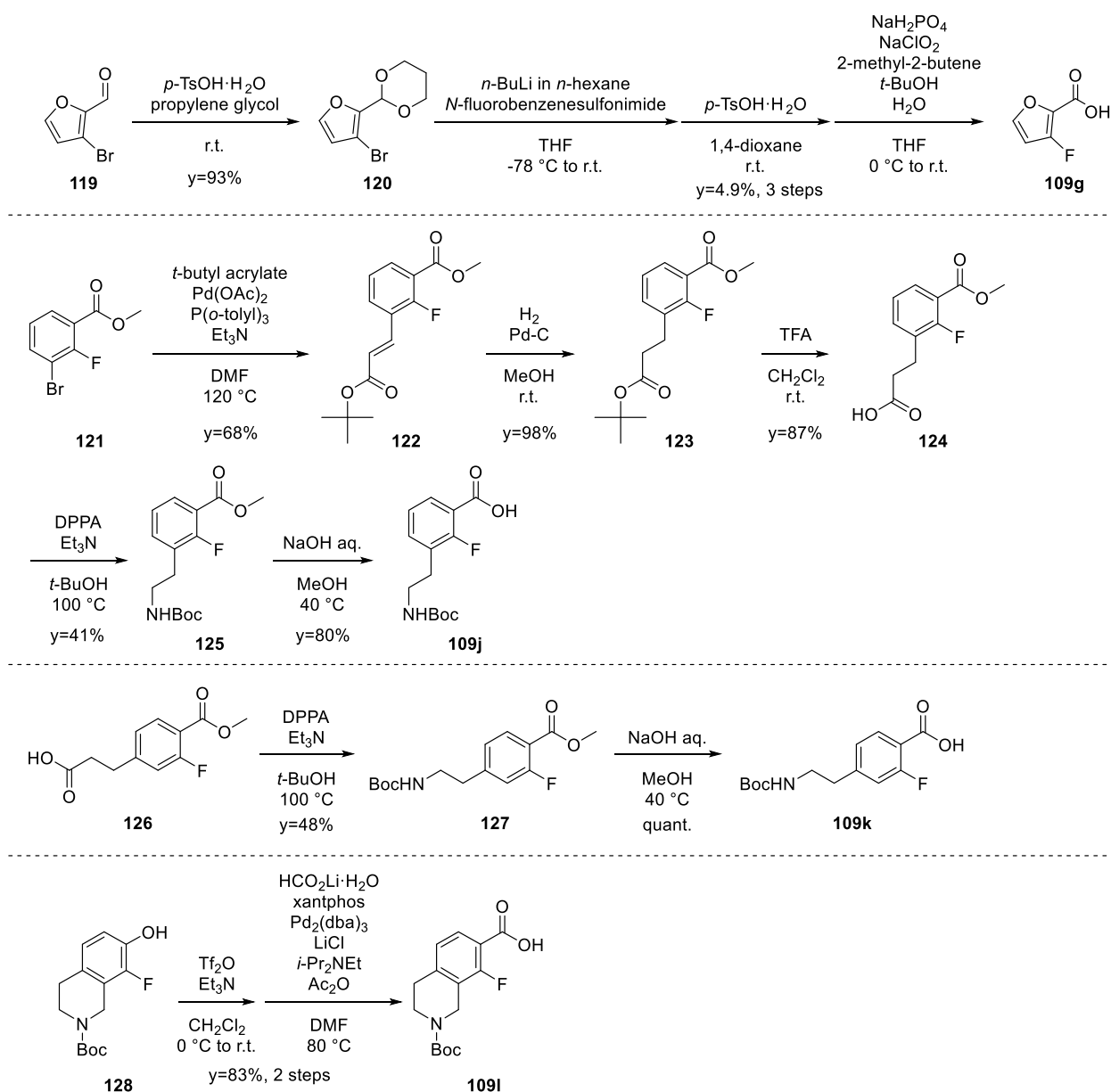
スキーム 36. 化合物 **108g**, **108h**, **108i**, **108j**, **108k**, **108l** および **108m** の合成

スキーム 36 に記載の化合物 **108g-m** は、以下の方法にて化合物 **109g-m** より中間体 **110g-m** を経てそれぞれ合成した。



スキーム 37. 化合物 **111**, **112**, **114**, **116**, **117** および **118** の合成

化合物 **108h**, **108i**, **108j**, **108k**, **108l** および **108m** はそれぞれ化合物 **111**, **112**, **114**, **116**, **117** および **118** へと導いた(スキーム 37).



スキーム 38. 化合物 **109g**, **109j**, **109k** および **109l** の合成

スキーム 38 に記載の化合物 **109g**, **109j**, **109k** および **109l** は、市販の化合物よりそれぞれ合成した。

2-(3-Bromofuran-2-yl)-[1,3]dioxane (**120**)

3-Bromofuran-2-carbaldehyde (**119**) (3.81 g, 21.8 mmol) を propylene glycol (20 mL, 0.27 mol) に溶解し、*p*-TsOH·H₂O (1.66 g, 8.71 mmol) を加え、室温にて 2 時間撹拌した。反応液を 10% K₂CO₃ 水溶液にて中和後、AcOEt を加え、水にて洗浄後、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留

去し, 化合物 **120** の粉末 (4.70 g, 収率 93%) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.40–1.49 (1H, m), 2.21–2.38 (1H, m), 3.92–4.05 (2H, m), 4.18–4.35 (2H, m), 5.65 (1H, s), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.37 (1H, d, $J = 2.0$ Hz).

3-Fluorofuran-2-carboxylic acid (**109g**)

化合物 **120** (4.70 g, 20.2 mmol) を THF (20 mL) に溶解し, 窒素雰囲気下, -78°C にて 1.6 M $n\text{-BuLi}$ in $n\text{-hexane}$ (13.2 mL, 21.2 mmol) を 30 分かけて滴下後, 同温にて 15 分攪拌し, 同温にて $N\text{-fluorobenzenesulfonimide}$ (6.69 g, 21.2 mmol) の THF (20 mL) 溶液を 45 分かけて滴下後, 室温にて 1 時間攪拌した. 氷食塩浴下, 反応液に水 (18 mL) および Et_3N (1.8 mL) を加え, Et_2O にて希釈後, 水にて洗浄し, 乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 油状物 (1.64 g) を得た.

得られた油状物 (1.64 g) を 1,4-dioxane (8 mL) および水 (4 mL) の混媒に溶解し, $p\text{-TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.72 g, 3.8 mmol) を加え, 室温にて 1 時間攪拌した. 反応液を 10% K_2CO_3 水溶液にて中和後, AcOEt を加え, 水にて洗浄後, 乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 油状物 (420 mg) を得た.

得られた油状物 (420 mg) を $t\text{-BuOH}$ (12 mL) および THF (6 mL) の混液に溶解し, 2-methyl-2-butene (3.90 mL, 36.8 mmol) を加え, 氷冷下, NaH_2PO_4 (3.53 g, 29.4 mmol) および NaClO_2 (520 mg, 4.60 mmol) の水溶液 (4 mL) を滴下し, 室温にて 1.5 時間攪拌した. 反応液に 1.0 M 塩酸を加え, AcOEt にて 2 回抽出後, 有機層を合わせて乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **109g** の粉末 (157 mg, 収率 4.9%, 3 steps) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.41–6.50 (1H, m), 7.41–7.48 (1H, m).

6-Cyclobutyl-7-(2,3-difluorophenyl)-7H-1,4-dioxo-7-azacyclopenta[*b*]naphthalene-8,9-dione (108g)

化合物 **108h** の合成法に準じて、化合物 **109g** より合成した。収率 2.3%, 2 steps. 粉末。

mp: 247–264 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.47–1.95 (4H, m), 1.95–2.09 (1H, m), 2.15–2.29 (1H, m), 3.15–3.28 (1H, m), 6.60 (1H, s), 7.14 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.28–7.46 (2H, m), 7.58–7.72 (1H, m), 8.21 (1H, d, *J* = 2.0 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.7, 26.7, 26.8, 37.1, 96.1, 103.0, 109.7, 118.7 (d, *J* = 16.9 Hz), 125.0 (dd, *J* = 7.5, 5.1 Hz), 126.2 (d, *J* = 3.1 Hz), 126.5 (d, *J* = 10.1 Hz), 138.0, 148.7 (dd, *J* = 250.6, 14.0 Hz), 148.8, 149.9 (dd, *J* = 235.5, 11.1 Hz), 150.9, 157.0, 158.9, 163.3, 166.5; IR (ATR) cm⁻¹: 1689; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₀H₁₃F₂NNaO₄ [M + Na]⁺ 392.0710. Found 390.0740.

6-Cyclobutyl-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-fluoro-3-methoxybenzoate (110h)

化合物 **109h** (92 mg, 0.54 mmol) および化合物 **92i** (150 mg, 0.54 mmol) を CH₂Cl₂ (10 mL) および DMF (1 mL) の混媒に懸濁し、EDC·HCl (114 mg, 0.595 mmol) および DMAP (7 mg, 0.05 mmol) を加え、室温にて 1.5 時間攪拌後、化合物 **92i** (28 mg, 0.16 mmol) および EDC·HCl (34 mg, 0.18 mmol) を追加し、室温にて 30 分攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt にて抽出後、有機層を 1.0 M 塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水にて順次洗浄し、乾燥 (Na₂SO₄) した。減圧下溶媒を留去し、化合物 **110h** の油状物 (0.18 g, 収率 77%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.65–1.89 (4H, m), 1.94–2.14 (2H, m), 3.08–3.20 (1H, m), 3.95 (3H, s), 6.15–6.21 (1H, m), 6.45–6.50 (1H, m), 6.98–7.05 (1H, m), 7.17–7.35 (4H, m), 7.56–7.65 (1H, m).

3-Cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-5-methoxy-2H-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (108h)

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110h** より合成した。収率 14%. 粉末。

mp: 217–218 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.49–1.95 (4H, m), 1.96–2.12 (1H, m),

2.17–2.31 (1H, m), 3.17–3.28 (1H, m), 3.99 (3H, s), 6.53 (1H, s), 7.31–7.56 (4H, m), 7.57–7.74 (2H, m); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.9, 26.9, 27.0, 37.5, 56.3, 96.2, 106.8, 116.0, 116.1, 118.7 (d, $J = 16.9$ Hz), 124.6, 125.1 (dd, $J = 7.5, 5.1$ Hz), 125.4, 126.3 (d, $J = 2.9$ Hz), 126.7 (d, $J = 7.7$ Hz), 144.1, 146.1 (dd, $J = 250.2, 13.7$ Hz), 148.1, 150.0 (dd, $J = 246.8, 10.8$ Hz), 158.5, 159.0, 166.4, 172.7; IR (ATR) cm^{-1} : 1697; HR-MS (ESITOF) Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 432.1023. Found 432.1050.

3-Cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-5-hydroxy-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (111)

化合物 **108h** (1.1 g, 2.7 mmol) を CH_2Cl_2 (20 mL) に溶解し、氷冷下 1.0 M BBr_3 in CH_2Cl_2 (27 mL, 27 mmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。氷冷下、水 (100 mL) に反応液を滴下し、 AcOEt (100 mL) を加え、不溶物をろ取した。得られた粉末を MeOH に溶解後、乾燥 (Na_2SO_4) した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣に $t\text{-BuOMe}$ (10 mL) を加えて、不溶物をろ取し、化合物 **111** の粉末 (346 mg, 収率 33%) を得た。

mp: 298–301 °C; ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.50–1.83 (4H, m), 1.84–1.94 (1H, m), 1.96–2.09 (1H, m), 3.19–3.32 (1H, m), 6.49 (1H, s), 7.24–7.30 (2H, m), 7.33–7.51 (3H, m), 7.61–7.71 (1H, m), 10.55 (1H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.8, 26.8, 26.9, 37.3, 96.0, 106.5, 114.8, 118.6 (d, $J = 16.9$ Hz), 119.7, 124.8, 125.0 (dd, $J = 7.2, 4.8$ Hz), 125.3, 126.2 (d, $J = 3.4$ Hz), 126.6 (d, $J = 9.2$ Hz), 143.4, 146.1 (dd, $J = 250.0, 13.5$ Hz), 146.3, 149.9 (dd, $J = 246.8, 11.3$ Hz), 158.5, 158.7, 166.2, 172.9; IR (ATR) cm^{-1} : 1685; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 418.0867. Found 418.0905.

6-Cyclobutyl-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl 3-*tert*-butoxycarbonylamino-2-fluorobenzoate (110i)

化合物 **110h** の合成法に準じて、化合物 **109i** より合成した。収率 82%。粉末。

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.56 (9H, s), 1.64–1.88 (4H, m), 1.98–2.13 (2H, m), 3.08–3.21 (1H, m), 6.14–6.20 (1H, m), 6.46 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.80–6.90 (1H, m), 6.98–7.04 (1H, m),

7.19–7.35 (3H, m), 7.65–7.71 (1H, m), 8.38–8.48 (1H, m).

***tert*-Butyl [3-cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-1,9-dioxo-2,9-dihydro-1*H*-10-oxa-2-aza-anthracen-5-yl]carbamate (108i)**

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110i** より合成した. 収率 32%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.60 (9H, s), 1.70–1.94 (4H, m), 2.09–2.26 (2H, m), 3.14–3.28 (1H, m), 6.38 (1H, s), 6.97–7.04 (1H, m), 7.05–7.13 (1H, m), 7.18–7.38 (3H, m), 7.93 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 8.34–8.46 (1H, m).

5-Amino-3-cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione hydrochloride (112)

化合物 **108i** (117 mg, 0.237 mmol) に、氷冷下、4.0 M HCl in 1,4-dioxane (0.89 mL, 3.6 mmol) を加え、同温にて 50 分攪拌後、室温にて 1 時間攪拌した. 反応液に 1,4-dioxane (2 mL) および AcOEt (1 mL) を加えて、不溶物をろ取後、AcOEt (2 mL) にて 3 回洗浄し、化合物 **112** の粉末 (84.8 mg, 収率 83%) を得た.

mp > 152 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.53–2.25 (6H, m), 3.20–3.32 (1H, m), 6.60 (1H, s), 7.01–7.06 (1H, m), 7.11–7.21 (2H, m), 7.32–7.46 (2H, m), 7.62–7.72 (1H, m); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 26.8, 26.9, 37.3, 96.1, 106.3, 111.6, 117.8, 118.6 (d, *J* = 16.9 Hz), 123.9, 125.0 (dd, *J* = 7.2, 4.8 Hz), 125.4, 126.3 (d, *J* = 2.9 Hz), 126.7 (d, *J* = 10.6 Hz), 137.0, 142.2, 146.1 (dd, *J* = 249.5, 13.0 Hz), 149.9 (dd, *J* = 247.1, 11.1 Hz), 158.2, 158.6, 166.0, 173.2; IR (ATR) cm⁻¹: 1689; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₂H₁₆F₂N₂NaO₃ [*M* + Na]⁺ 417.1027. Found 417.1068.

Methyl 3-(2-*tert*-butoxycarbonylvinyl)-2-fluorobenzoate (122)

Pd(OAc)₂ (449 mg, 2.00 mmol) および P(*o*-tolyl)₃ (1.22 g, 4.00 mmol) を DMF (20 mL) に懸濁し、室温にて 5 分攪拌後、methyl 3-bromo-2-fluorobenzoate (**121**) (4.66 g, 20.0 mmol), *t*-butyl

acrylate (5.8 mL, 40 mmol) および Et₃N (5.8 mL, 40 mmol) を加え, 100 °C にて 16 時間, 120 °C にて 2 時間撹拌した. 放冷後, 反応液に AcOEt を加え, 水にて 2 回洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **122** の粉末 (4.20 g, 収率 68%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.54 (9H, s), 3.94 (3H, s), 6.47 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 7.21 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.64–7.80 (2H, m), 7.86–7.96 (1H, m).

Methyl 3-(2-*tert*-butoxycarbonylethyl)-2-fluorobenzoate (**123**)

10% Pd-C 0.77 g を AcOEt にて湿らせ, 化合物 **122** (4.24 g, 13.7 mmol) の MeOH (75 mL) 溶液を加え, 室温, 0.4 MPa にて 15 時間接触水素添加した. 不溶物をセライトにてろ別後, ろ液を減圧下濃縮し, 化合物 **123** の油状物 (3.80 g, 収率 98%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.40 (9H, s), 2.55 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.98 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 3.92 (3H, s), 7.07–7.14 (1H, m), 7.36–7.44 (1H, m), 7.72–7.80 (1H, m).

3-(2-Fluoro-3-methoxycarbonylphenyl)propionic acid (**124**)

化合物 **123** (3.80 g, 13.5 mmol) を CH₂Cl₂ (13.5 mL) および TFA (13.5 mL) の混液に溶解し, 室温にて 2.5 時間撹拌した. 減圧下, 反応液の溶媒を留去し, 得られた残渣に含まれる TFA を toluene にて 2 回共沸した. 得られた残渣に AcOEt を加え, 水にて洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) した. 減圧下溶媒を留去し, 化合物 **124** の油状物 (3.67 g, 収率 87%) を得た.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.55 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.89 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 3.85 (3H, s), 7.19–7.28 (1H, m), 7.54–7.62 (1H, m), 7.64–7.78 (1H, m).

Methyl 3-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)-2-fluorobenzoate (**125**)

化合物 **124** (3.67 g, 11.7 mmol) を *t*-BuOH (25 mL) に懸濁し, Et₃N (2.43 mL, 17.5 mmol) および DPPA (3.77 mL, 17.5 mmol) を加え, 室温から 100 °C に 23 分かけて昇温しながら撹拌後, 100 °C にて 1.5 時間撹拌した. 放冷後, 反応液に水を加え, AcOEt にて抽出後, 乾燥 (Na₂SO₄)

した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **125** の油状物 (1.41 g, 収率 41%) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.42 (9H, s), 2.82–2.97 (2H, m), 3.29–3.45 (2H, m), 3.92 (3H, s), 4.48–4.64 (1H, br), 7.13 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.32–7.44 (1H, m), 7.74–7.83 (1H, m).

3-(2-*tert*-Butoxycarbonylaminoethyl)-2-fluorobenzoic acid (**109j**)

化合物 **125** (1.41 g, 4.74 mmol) を MeOH (36 mL) に溶解し, 1.0 M NaOH 水溶液 (14.2 mL, 14 mmol) を加え, 40 °C にて 40 分撹拌した. 放冷後, 反応液に 1.0 M 塩酸を加えて弱酸性とし, AcOEt にて抽出後, 乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 化合物 **109j** の粉末 (1.07 g, 収率 80%) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.34 (9H, s), 2.70–2.83 (2H, m), 3.05–3.20 (2H, m), 6.81–6.99 (1H, m), 7.19 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.35–7.53 (1H, m), 7.56–7.78 (1H, m).

6-Cyclobutyl-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl 3-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)-2-fluorobenzoate (**110j**)

化合物 **110h** の合成法に準じて, 化合物 **109j** より合成した. quant. 粉末.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.43 (9H, s), 1.67–1.90 (4H, m), 1.97–2.16 (2H, m), 2.83–3.03 (2H, m), 3.05–3.26 (1H, m), 3.34–3.48 (2H, m), 4.52–4.67 (1H, m), 6.17 (1H, s), 6.46 (1H, s), 6.97–7.06 (1H, m), 7.15–7.36 (3H, m), 7.47–7.57 (1H, m), 7.91–7.99 (1H, m).

tert-Butyl {2-[3-cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-1,9-dioxo-2,9-dihydro-1*H*-10-oxa-2-aza-anthracen-5-yl]ethyl}carbamate (**108j**)

化合物 **91a** の合成法に準じて, 化合物 **110j** より合成した. 収率 26%. 粉末.

mp: 264–265 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.29 (9H, s), 1.51–2.11 (5H, m), 2.17–2.32 (1H, m), 2.94–3.09 (2H, m), 3.18–3.42 (3H, m), 6.70 (1H, s), 6.85–6.98 (1H, m), 7.30–7.49 (3H, m), 7.56–7.73 (2H, m), 7.93 (1H, d, $J = 7.3$ Hz); IR (ATR) cm^{-1} : 1685.

5-(2-Aminoethyl)-3-cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-2H-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione hydrochloride (113)

化合物 **108j** (134 mg, 0.256 mmol) を AcOEt (0.57 mL) に懸濁し、氷冷下、9.1 M HCl in IPA (0.28 mL, 2.6 mmol) を加え、同温にて 2 時間攪拌後、同温にて 9.1 M HCl in IPA (0.28 mL, 2.6 mmol) を加え、同温にて 1 時間攪拌した。反応液の不溶物をろ取後、AcOEt 2 mL にて洗浄し、化合物 **113** の粉末 (51 mg, 収率 47%) を得た。

mp > 242 °C (decomp.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.52–1.98 (4H, m), 1.98–2.13 (1H, m), 2.19–2.34 (1H, m), 3.14–3.29 (5H, m), 6.81 (1H, s), 7.27–7.52 (3H, m), 7.60–7.79 (2H, m), 7.97 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 8.02–8.19 (3H, br); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.9, 26.9, 27.1, 27.2 (2C), 37.5, 96.8, 106.6, 118.8 (d, *J* = 16.9 Hz), 123.7, 124.4, 125.2, 125.3, 126.3 (d, *J* = 2.9 Hz), 126.6, 126.7, 135.6, 146.0 (dd, *J* = 236.0, 13.0 Hz), 150.0 (dd, *J* = 246.8, 11.3 Hz), 152.7, 158.6, 158.9, 166.6, 173.1; IR (ATR) cm⁻¹: 1689; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₄H₂₀F₂N₂NaO₃ [M + Na]⁺ 445.1340. Found 445.1368.

3-Cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-5-(2-dimethylaminoethyl)-2H-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (114)

化合物 **113** (51 mg, 0.11 mmol) を MeOH (1.0 mL) に溶解し、Et₃N (0.015 mL, 0.11 mmol), formalin (P=37%) (0.041 mL, 0.55 mmol) および NaBH(OAc)₃ (116 mg, 0.55 mmol) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。減圧下、反応液の溶媒を留去し、飽和重曹水を加え、AcOEt にて 2 回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄後、乾燥 (Na₂SO₄) し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的分画の溶媒を減圧下留去し、得られた残渣に AcOEt (1 mL) および *n*-hexane (2 mL) を加え、不溶物をろ取し、化合物 **114** の粉末 (32 mg, 収率 63%) を得た。

mp: 191–194 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.51–2.14 (5H, m), 2.16–2.31 (1H, m), 2.43 (6H, s), 2.74–2.93 (2H, m), 3.05–3.50 (3H, m), 6.58 (1H, s), 7.24–7.55 (3H, m), 7.57–7.82 (2H, m), 7.94 (1H, d, *J* = 7.6 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 26.5, 26.9, 27.0, 37.4, 45.1 (2C),

59.1, 96.2, 106.5, 118.7 (d, $J = 16.9$ Hz), 123.4, 123.6, 125.0, 125.1 (d, $J = 9.6$ Hz), 126.3 (d, $J = 2.9$ Hz), 126.7 (d, $J = 10.1$ Hz), 129.8, 135.0, 146.1 (dd, $J = 249.7, 13.2$ Hz), 150.0 (dd, $J = 246.8, 11.3$ Hz), 152.3, 158.5, 159.0, 166.5, 173.0; IR (ATR) cm^{-1} : 1685; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_2\text{NaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 473.1653. Found 473.1697.

Methyl 4-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)-2-fluorobenzoate (**127**)

3-(3-Fluoro-4-(methoxycarbonyl)phenyl)propanoic acid (**126**) (11.4 g, 46.6 mmol) を *t*-BuOH (94 mL) に懸濁し, Et_3N (9.7 mL, 70 mmol) および DPPA (15 mL, 70 mmol) を加え, 室温から 100 °C に 30 分かけて昇温した後に 3.5 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に水 (150 mL) を加え, AcOEt にて 2 回抽出し, 合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し, 化合物 **127** の粉末 (6.61 g, 収率 48%) を得た.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.43 (9H, s), 2.55 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 3.30–3.46 (2H, m), 3.92 (3H, s), 4.41–4.60 (1H, br), 6.92–7.06 (2H, m), 7.82–7.90 (1H, m).

4-(2-*tert*-Butoxycarbonylaminoethyl)-2-fluorobenzoic acid (**109k**)

化合物 **127** (6.61 g, 22.2 mmol) を MeOH (130 mL) に溶解し, 1.0 M NaOH 水溶液 (67 mL, 67 mmol) を加え, 40 °C にて 1 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に 1.0 M 塩酸 (80 mL, 80 mmol) を加え, AcOEt にて 2 回抽出し, 合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し, 化合物 **109k** の粉末 (6.28 g, quant.) を得た.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.34 (9H, s), 2.72–2.82 (2H, m), 3.12–3.23 (2H, m), 6.78–6.94 (1H, m), 7.03–7.23 (2H, m), 7.70–7.83 (1H, m), 12.84–13.19 (1H, br).

6-Cyclobutyl-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl 4-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)-2-fluorobenzoate (**110k**)

化合物 **110h** の合成法に準じて, 化合物 **109k** より合成した. 収率 99%. 粉末.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.45 (9H, s), 1.64–1.93 (4H, m), 1.96–2.18 (2H, m), 2.81–2.98 (2H, m), 3.08–3.23 (1H, m), 3.35–3.52 (2H, m), 4.47–4.64 (1H, m), 6.15–6.20 (1H, m), 6.41–6.47 (1H, m), 6.97–7.17 (5H, m), 7.70–7.83 (1H, m).

***tert*-Butyl {2-[3-cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-1,9-dioxo-2,9-dihydro-1*H*-10-oxa-2-aza-anthracen-6-yl]ethyl}-carbamate (108k)**

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110k** より合成した。収率 52%。粉末。

mp:228–231 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.11 (9H, s), 1.50–1.94 (4H, m), 1.97–2.10 (1H, m), 2.17–2.30 (1H, m), 2.87 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 3.18–3.30 (3H, m), 6.51 (1H, s), 6.90–6.99 (1H, br), 7.30–7.47 (4H, m), 7.60–7.72 (1H, m), 7.98 (1H, d, *J* = 8.1 Hz).

6-(2-Aminoethyl)-3-cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (115)

化合物 **112** の合成法に準じて、化合物 **108k** より合成した。収率 86%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.72–1.93 (4H, m), 2.07–2.23 (2H, m), 2.89 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.07 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.13–3.26 (1H, m), 6.28 (1H, s), 6.98–7.07 (1H, m), 7.18–7.38 (4H, m), 8.23 (1H, d, *J* = 7.8 Hz).

3-Cyclobutyl-2-(2,3-difluorophenyl)-6-(2-dimethylaminoethyl)-2*H*-10-oxa-2-azaanthracene-1,9-dione (116)

化合物 **115** (91 mg, 0.22 mmol) を MeOH (10 mL) に溶解し, Et₃N (0.030 mL, 0.22 mmol), formalin (P=37%) (0.080 mL, 1.1 mmol) および NaBH(OAc)₃ (228 mg, 1.08 mmol) を加え, 室温にて 1 時間攪拌した。減圧下, 反応液の溶媒を留去し, 飽和重曹水を加え, AcOEt にて 2 回抽出し, 合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄後, 乾燥 (Na₂SO₄) し, 減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的分画の溶媒を減圧下留去し, 得られた残渣に AcOEt (1 mL) および *n*-hexane (2 mL)を加え, 不溶物をろ取し, 化合物 **116** の粉末 (40 mg,

収率 41%) を得た.

mp: 174–177 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.51–1.94 (4H, m), 1.97–2.09 (1H, m), 2.17–2.30 (1H, m), 2.34 (6H, s), 2.75 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 2.95 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 3.22–3.26 (1H, m), 6.50 (1H, s), 7.31–7.47 (3H, m), 7.51 (1H, s), 7.60–7.71 (1H, m), 7.98 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 16.8, 26.8, 26.9, 32.8, 37.3, 44.9 (2C), 59.6, 96.0, 106.7, 117.2, 118.6 (d, $J = 16.9$ Hz), 121.6, 125.0 (dd, $J = 7.5, 5.1$ Hz), 125.3, 126.2 (d, $J = 2.9$ Hz), 126.4, 126.6 (d, $J = 9.6$ Hz), 146.0 (dd, $J = 249.7, 13.7$ Hz), 148.6, 149.9 (dd, $J = 246.8, 11.3$ Hz), 154.0, 158.4, 158.8, 166.6, 172.5; IR (ATR) cm^{-1} ; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_2\text{NaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 473.1653. Found 473.1683.

2-*tert*-Butoxycarbonyl-8-fluoro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-carboxylic acid (**109I**)

tert-Butyl 8-fluoro-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-2-carboxylate (**128**) (4.44 g, 16.6 mmol) を CH_2Cl_2 (60 mL) に溶解し、氷冷下, pyridine (6.7 mL, 83 mmol) および Ti_2O (4.08 mL, 24.9 mmol) を滴下し、同温にて 1 時間攪拌した. 反応液に水を加え, CHCl_3 にて 2 回抽出し、有機層を合わせ 1.0 M 塩酸にて洗浄後、乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し、油状物 (7.03 g) を得た.

得られた油状物 (4.22 g) を DMF (70 mL) に溶解し, $\text{HCO}_2\text{Li} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.50 g, 50.0 mmol), 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene (xantphos) (577 mg, 0.997 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (912 mg, 0.996 mmol), LiCl (2.53 g, 59.7 mmol), *i*- Pr_2NEt (6.8 mL, 40 mmol) および Ac_2O (3.8 mL, 40 mmol) を加え、窒素雰囲気下, 80 °C にて 14 時間攪拌した. 放冷後, 反応液に水 (200 mL) を加え不溶物をセライトにてろ別し, AcOEt にて洗い込んだ. ろ液を AcOEt にて 2 回抽出し、水層に 1.0 M 塩酸を加え酸性とし, AcOEt にて 2 回抽出した. それぞれの有機層を水および飽和食塩水にて順次洗浄後、有機層をすべて合わせ乾燥 (Na_2SO_4) した. 減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製した. 目的分画の溶媒を減圧下留去し、化合物 **109I** の粉末 (2.61 g, 収率 83%, 2 steps) を得た.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 2.82–2.93 (2H, m), 3.57–3.76 (2H, m), 4.60–4.73

(2H, br), 7.02 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.78–7.86 (1H, m).

6-Cyclobutyl-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl 2-*tert*-butoxycarbonyl-8-fluoro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-carboxylate (110l)

化合物 **110h** の合成法に準じて、化合物 **109l** より合成した。収率 71%。粉末。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.51 (9H, s), 1.64–1.89 (4H, m), 1.96–2.14 (2H, m), 2.84–2.98 (2H, m), 3.07–3.22 (1H, m), 3.61–3.76 (2H, m), 4.58–4.73 (2H, br), 6.14–6.20 (1H, m), 6.41–6.47 (1H, m), 6.95–7.35 (4H, m), 7.81–7.92 (1H, m).

***tert*-Butyl 10-cyclobutyl-9-(2,3-difluorophenyl)-7,8-dioxo-4,7,8,9-tetrahydro-1*H*,3*H*-12-oxa-2,9-diazabenz[*a*]anthracene-2-carboxylate (108l)**

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110l** より合成した。収率 37%。粉末。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.54 (9H, s), 1.72–1.96 (4H, m), 2.07–2.26 (2H, m), 2.89–3.02 (2H, m), 3.14–3.29 (1H, m), 3.62–3.83 (2H, m), 4.71–4.95 (2H, m), 6.32 (1H, s), 6.97–7.06 (1H, m), 7.16–7.36 (3H, m), 8.11 (1H, d, $J = 8.3$ Hz).

10-Cyclobutyl-9-(2,3-difluorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-9*H*-12-oxa-2,9-diazabenz[*a*]anthracene-7,8-dione hydrochloride (117)

化合物 **112** の合成法に準じて、化合物 **108l** より合成した。収率 85%。粉末。

mp: 235–243 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.51–2.12 (5H, m), 2.16–2.31 (1H, m), 3.13–3.20 (2H, m), 3.21–3.31 (1H, m), 3.43–3.53 (2H, m), 4.43–4.60 (2H, m), 6.68 (1H, s), 7.25–7.48 (1H, m), 7.58–7.74 (3H, m), 7.96 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 9.51–9.88 (2H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 16.8, 18.5, 25.0, 26.9, 27.0, 37.5, 56.0, 96.3, 106.9, 118.4, 118.8 (d, $J = 16.9$ Hz), 121.7, 124.0, 125.1 (dd, $J = 7.0, 4.6$ Hz), 125.9, 126.3 (d, $J = 2.4$ Hz), 126.6 (d, $J = 10.6$ Hz), 139.5, 146.0 (dd, $J = 250.2, 13.7$ Hz), 150.0 (dd, $J = 246.1, 10.6$ Hz), 150.8, 158.5, 159.2, 166.4, 172.4; IR (ATR) cm^{-1} : 1689; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_2\text{NaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 457.1340. Found

457.1391.

6-[6-Cyclobutyl-1-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl] 2-*tert*-butoxycarbonyl-5-fluoro-3,4-dihydro-1*H*-isoquinoline-6-carboxylate (110m)

化合物 **110h** の合成法に準じて、化合物 **109m** より合成した。収率 63%。粉末。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.50 (9H, s), 1.65–1.88 (4H, m), 2.00–2.14 (2H, m), 2.85–2.95 (2H, m), 3.08–3.22 (1H, m), 3.65–3.75 (2H, m), 4.61–4.70 (2H, m), 6.15–6.21 (1H, m), 6.44–6.50 (1H, m), 6.97–7.10 (2H, m), 7.18–7.37 (2H, m), 7.82–7.94 (1H, m).

***tert*-Butyl 10-cyclobutyl-9-(2,3-difluorophenyl)-7,8-dioxo-1,2,4,7,8,9-hexahydro-12-oxa-3,9-diazabenz[*a*]anthracene-3-carboxylate (108m)**

化合物 **91a** の合成法に準じて、化合物 **110m** より合成した。収率 18%。粉末。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.52 (9H, s), 1.70–1.95 (4H, m), 2.08–2.22 (2H, m), 3.02–3.11 (2H, m), 3.15–3.28 (1H, m), 3.70–3.84 (2H, m), 4.65–4.75 (2H, m), 6.31 (1H, s), 6.95–7.38 (4H, m), 8.13 (1H, d, *J* = 8.1 Hz).

10-Cyclobutyl-9-(2,3-difluorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-9*H*-12-oxa-3,9-diazabenz[*a*]anthracene-7,8-dione (118)

化合物 **112** の合成法に準じて、化合物 **108m** より合成した。収率 69%。粉末。

mp: 228–232 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.50–1.94 (4H, m), 1.96–2.10 (1H, m), 2.17–2.30 (1H, m), 2.90–3.30 (5H, m), 4.01–4.10 (2H, m), 6.56 (1H, s), 7.20 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.32–7.48 (2H, m), 7.60–7.72 (1H, m), 7.83 (1H, d, *J* = 8.1 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 16.8, 22.5, 26.8, 26.9, 37.3, 42.1, 47.8, 96.2, 106.6, 118.6 (d, *J* = 16.9 Hz), 121.2, 121.9, 123.4, 124.3, 125.0 (dd, *J* = 7.2, 4.8 Hz), 126.2 (d, *J* = 2.9 Hz), 126.6 (d, *J* = 11.6 Hz), 143.9, 146.0 (dd, *J* = 250.0, 13.5 Hz), 149.9 (dd, *J* = 246.8, 11.3 Hz), 152.1, 158.5, 158.6, 166.3, 172.8; IR (ATR) cm⁻¹: 1682; HR-MS (ESI-TOF) Calcd for C₂₅H₂₀F₂N₂NaO₃ [M + Na]⁺ 457.1340. Found 457.1388; *Anal.* Calcd

for C₂₅H₂₀F₂N₂O₃: C, 69.12; H, 4.64; N, 6.45. Found: C, 68.92; H, 4.68; N, 6.41; HPLC purity 99.4% (eluent: 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.0):MeCN = 35:65)

Hurler 症患者由来細胞を用いたリードスルー誘導作用の評価

1. 細胞培養

健常人由来線維芽細胞は, Zen-Bio 社 (Research Triangle Park, NC, U.S.A.) から購入した正常ヒト線維芽細胞を継代培養し, 凍結保存したものを融解し実験に用いた.

Hurler 症患者由来線維芽細胞 (GM00798; *IDUA*-W402X) は Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, U.S.A.) より入手した. 細胞情報を表 9 に示す.

表9. 細胞情報

Disease	ID	Mutation	Product	Sex	Age	Passage
Wild	-	-	Fibroblast	Male	Neonatal	
Hurler	GM00798	<i>IDUA</i> -W402X	Fibroblast	Female	1 YR	2

皮膚サンプルは審査委員会の承認のもと, 患者のインフォームド・コンセントを得て採取されたことをCoriell Instituteに保証されている. ヒトサンプルの使用は京都薬品工業株式会社の倫理委員会の承認を得て行った.

2. 薬物処置

継代時, 1.25×10^5 cells/mL となるよう FibroLife S2 Comp kit 培地 (LifeLine Cell Technology, Frederick, MD, U.S.A.) ないし MEM/10% FBS 培地で懸濁し, 24 ウェルプレートに 500 μ L/well ずつ播種し, 37 °C, 5% CO₂ 気流下培養した. 播種翌日に 2 倍濃度に調製した薬物含有培地を 500 μ L/well 加え, 37 °C, 5% CO₂ 気流下, 2 日間あるいは 6 日間培養した.

3. IDUA 酵素活性測定

Mammalian Cell PE LB (G-Bioscience, St. Louis, MO, U.S.A.) を 100 μ L 添加し, 10 分以上静置後, 細胞溶解液を 0.5 mL チューブに回収した. プロテインアッセイビシンコニン酸キット (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて, 蛋白定量した. 96 ウェルハーフエリアブラックマイクロプレート (Greiner, Frickenhausen, Germany) に, 回収した細胞溶解液 20 μ L および 50 μ M 4-methylumbelliferyl- α -iduronide 基質溶液 (Glycosynth, Cheshire, U.K.) 20 μ L を加え, 37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養した. 0.2 M Sodium glycine 緩衝液 50 μ L を加えて反応を停止し, マイクロプレートリーダー (Power Scan HT, BioTek, Winooski, VT, U.S.A.) で蛍光強度 (Ex 360 nm, Em 460 nm) を測定した. 同時に, 4-methylumbelliferone (4-MU) を用いて検量線を作製し, 単位時間あたりに生成した 4-MU 濃度から酵素活性を算出した.

4. GAG 測定

細胞を D-PBS で洗浄し, GAG 抽出液 (125 μ g/mL papain in 0.2 M リン酸緩衝液) を 0.5 mL/well 添加し, 氷上で超音波分散機を用いて超音波処理を 5 秒間行った. 1.5 mL 低吸着チューブに回収し, 乾熱滅菌器内で 65 $^{\circ}$ C, 24 時間培養した. 65 $^{\circ}$ C 培養後, 10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C で 10 分遠心し, 上清を 0.5 mL ポリプロピレン製サンプルチューブに回収し, Blyscan Glycosaminoglycan Assay キット (Biocolor, Country Antrim, U.K.) のプロトコールに従い, GAG を定量した. 細胞溶解液を 1.5 mL ポリプロピレン製サンプルチューブに 200 μ L 添加した後, キットに付属の Blyscan dye reagent を 1.0 mL 添加し, 振とう器で 30 分混合後 12,000 rpm で 10 分遠心した. 上清を除去し, キットに付属の Dye dissociation reagent を 0.5 mL 添加した. タッチミキサーで激しく攪拌して沈査を溶解し, 溶解液を 96 ウェルプレートに 2 ウェルずつ 200 μ L 加え, 656 nm における吸光度をマルチプレートリーダー (Power Scan HT, BioTek, Winooski, VT, U.S.A.) にて測定した.

DNA 定量キット (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) のプロトコールに従い, DNA を定量した. 96 ウェルハーフエリアブラックプレートに細胞溶解液 40 μ L, キットに付属の AK06 緩衝液 160 μ L および AK06 発色原液を 10 μ L 添加し, マルチプレートリーダー (Power Scan HT, BioTek, Winooski, VT, U.S.A.) で蛍光強度 (Ex. 360 nm, Em. 460 nm) を測定した.

Hurler 症モデルマウスに対する反復投与試験

1. 使用動物

筑波大学生命科学動物資源センターに依頼し、雌性 *Idua*-W392X (TGG→TAG) ノックインマウス (C57BL/6J バックグラウンド) を CRISPR/ Cas9 システムを用いて樹立し、5–7 週齢で使用した。全ての手順は「京都薬品工業株式会社における動物実験に関する規程・手順」に従い、京都薬品工業株式会社動物倫理委員会の承認を得て実施した。

2. 化合物投与

KY-640 (30 または 100 mg/10 mL/kg) を 0.5% メチルセルロース#400 に懸濁し、1 日 2 回 (BID), 8 日間経口投与した。投与期間中、体重および摂餌量を測定し、一般状態を観察した。

3. IDUA 活性

8 日目の最終投与から 3 時間後の午前中に、ケタミン 37.5 mg/kg とキシラジン 7.5 mg/kg 麻酔液の腹腔内投与による深麻酔下、心臓採血により安楽死させた。肝臓、脾臓、脳および腎臓を摘出し、それらの湿重量を測定した。相対臓器重量は、体の重量に対するパーセンテージとして計算した。組織サンプルは、0.1% Triton X-100 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, U.S.A.) と Protease Inhibitor Cocktail (100 mg tissue/mL) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイズし、続いて 20,000 × g, 4 °C で 20 分間遠心分離した。プロテインアッセイビシンコニン酸キット (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて、上清を蛋白定量した。96 ウェルプレートに、肝臓サンプルは 100 倍、脾臓サンプルは 30 倍、脳サンプルは 10 倍に希釈した組織ホモジネート液 40 μL および 200 μM 4-methylumbelliferyl- α -iduronide 基質溶液 (0.1 M ギ酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5) 40 μL を添加し、37 °C で 2, 6 および 24 時間インキュベートした。0.5 M Sodium glycine 緩衝液 100 μL を加えて反応を停止し、マイクロプレートリーダー (Power Scan HT, BioTek, Winooski, VT, U.S.A.) で蛍光強度 (Ex 360 nm, Em 460 nm) を測定した。同時に、4-methylumbelliferone (4-MU) を用いて検量線を作製し、単位時間あたりに生成した 4-MU 濃度から酵素活性を算出した。

引用文献

- 1) Nguengang Wakap S., Lambert D. M., Olry A., Rodwell C., Gueydan C., Lanneau V., Murphy D., Le Cam Y., Rath A., *Eur. J. Hum. Genet.*, **28**, 165–173 (2020).
- 2) Bavisetty S., Grody W. W., Yazdani S., *Rare Dis.*, **1**, e23579 (2013).
- 3) ムコ多糖症 (MPS) I 型診療ガイドライン2020 (2020).
- 4) Oussoren E., Keulemans J., van Diggelen O. P., Oemardien L. F., Timmermans R. G., van der Ploeg A. T., Ruijter G. J., *Mol. Genet. Metab.*, **109**, 377–381 (2013).
- 5) Moore D., Connock M. J., Wraith E., Lavery C., *Orphanet J. Rare Dis.*, **3**, 24–30 (2008).
- 6) Sifuentes M., Doroshov R., Hoft R., Mason G., Walot I., Diamant M., Okazaki S., Huff K., Cox G. F., Swiedler S. J., Kakkis E. D., *Mol. Genet. Metab.*, **90**, 171–180 (2007).
- 7) Dornelles A. D., de Camargo Pinto L. L., de Paula A. C., Steiner C. E., Lourenço C. M., Kim C. A., Horovitz D. D., Ribeiro E. M., Valadares E. R., Goulart I., Neves de Souza I. C., da Costa Neri J. I., Santana-da-Silva L. C., Silva L. R., Ribeiro M., de Oliveira Sobrinho R. P., Giugliani R., Schwartz I. V., *Genet. Mol. Biol.*, **37**, 23–29 (2014).
- 8) Kato S., Yabe H., Takakura H., Mugishima H., Ishige M., Tanaka A., Kato K., Yoshida N., Adachi S., Sakai N., Hashii Y., Ohashi T., Sasahara Y., Suzuki Y., Tabuchi K., *Pediatr. Transplant.*, **20**, 203–214 (2016).
- 9) Miyamoto B. E., Kakkis E. D., *Orphanet J. Rare Dis.*, **6**, 49–61 (2011).
- 10) 厚生労働省, 希少疾病用医薬品・希少疾病用医療機器・希少疾病用再生医療等製品の指定制度の概要
- 11) Enya K., Lim Y., Sengoku S., Kodama K., *Drug Discov. Today*, **28**, 103755 (2023).
- 12) Mort M., Ivanov D., Cooper D. N., Chuzhanova N. A., *Hum. Mutat.*, **29**, 1037–1047 (2008).
- 13) Roberts R. G., Gardner R. J., Bobrow M., *Hum. Mutat.*, **4**, 1–11 (1994).
- 14) De Boeck K., Zolin A., Cuppens H., Olesen H. V., Viviani L., *J. Cyst. Fibros.*, **13**, 403–409 (2014).
- 15) Holbrook J. A., Neu-Yilik G., Hentze M. W., Kulozik A. E., *Nat. Genet.*, **36**, 801–808 (2004).
- 16) Ho P. J., Wickramasinghe S. N., Rees D. C., Lee M. J., Eden A., Thein S. L., *Blood*, **89**, 322–328 (1997).
- 17) Song H., Mugnier P., Das A. K., Webb H. M., Evans D. R., Tuite M. F., Hemmings B. A., Barford D., *Cell*, **100**, 311–321 (2000).

- 18) Frolova L., Le Goff X., Rasmussen H. H., Cheperegin S., Dugeon G., Kress M., Arman I., Haenni A. L., Celis J. E., Philippe M., Justesen J., Kisselev L., *Nature*, **372**, 701–703 (1994).
- 19) Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtormov S., Kisselev L., Philippe M., *EMBO J.*, **14**, 4065–4072 (1995).
- 20) Hellen C. U. T., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, 1–19 (2018).
- 21) Salas-Marco J., Bedwell D. M., *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7769–7778 (2004).
- 22) Ivanov A., Mikhailova T., Eliseev B., Yeramala L., Sokolova E., Susorov D., Shuvalov A., Schaffitzel C., Alkalaeva E., *Nucleic Acids Res.*, **44**, 7766–7776 (2016).
- 23) Dugeon G., Jean-Jean O., Frolova L., Le Goff X., Philippe M., Kisselev L., Haenni A. L., *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2254–2258 (1997).
- 24) Keeling K. M., Bedwell D. M., *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **2**, 837–852 (2011).
- 25) Fearon K., McClendon V., Bonetti B., Bedwell D. M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 17802–17808 (1994).
- 26) Blanchet S., Cornu D., Hatin I., Grosjean H., Bertin P., Namy O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **115**, 3018–3023 (2018).
- 27) Burke J. F., Mogg A. E., *Nucleic Acids Res.*, **13**, 6265–6272 (1985).
- 28) Howard M., Frizzell R. A., Bedwell D. M., *Nat. Med.*, **2**, 467–469 (1996).
- 29) Bedwell D. M., Kaenjak A., Benos D. J., Bebok Z., Bubien J. K., Hong J., Tousson A., Clancy J. P., Sorscher E. J., *Nat. Med.*, **3**, 1280–1284 (1997).
- 30) Du M, Jones J. R., Lanier J., Keeling K. M., Lindsey J. R., Tousson A., Bebök Z., Whitsett J. A., Dey C. R., Colledge W. H., Evans M. J., Sorscher E. J., Bedwell D. M., *J. Mol. Med.*, **80**, 595–604 (2002).
- 31) Clancy J. P., Bebök Z., Ruiz F., King C., Jones J., Walker L., Greer H., Hong J., Wing L., Macaluso M., Lyrene R., Sorscher E. J., Bedwell D. M., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **163**, 1683–1692 (2001).
- 32) Huth M. E., Ricci A. J., Cheng A. G., *Int. J. Otolaryngol.*, **2011**, 937861–937879 (2011).
- 33) Mingeot-Leclercq M. P., Tulkens P. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1003–1012 (1999).
- 34) Nudelman I., Rebibo-Sabbah A., Cherniavsky M., Belakhov V., Hainrichson M., Chen F., Schacht J, Pilch D. S., Ben-Yosef T., Baasov T., *J. Med. Chem.*, **52**, 2836–2845 (2009).
- 35) Rowe S. M., Mutyam V., Alroy I., Huertas P., 41st ECFS Conf. Seville: Abs WS01.3, Jun 2018.
- 36) Welch E. M., Barton E. R., Zhuo J., Tomizawa Y., Friesen W. J., Trifillis P., Paushkin S., Patel M., Trotta C. R., Hwang S., Wilde R. G., Karp G., Takasugi J., Chen G., Jones S., Ren H., Moon Y. C., Corson D., Turpoff A. A., Campbell J. A., Conn M. M., Khan A., Almstead N. G., Hedrick J., Mollin A., Risher N., Weetall M., Yeh S., Branstrom A. A., Colacino J. M., Babiak J.,

- Ju W. D., Hirawat S., Northcutt V. J., Miller L. L., Spatrick P., He F., Kawana M., Feng H., Jacobson A., Peltz S. W., Sweeney H. L., *Nature*, **447**, 87–91 (2007).
- 37) Bushby K., Finkel R., Wong B., Barohn R., Campbell C., Comi G. P., Connolly A. M., Day J. W., Flanigan K. M., Goemans N., Jones K. J., Mercuri E., Quinlivan R., Renfroe J. B., Russman B., Ryan M. M., Tulinius M., Voit T., Moore S. A., Lee Sweeney H., Abresch R. T., Coleman K. L., Eagle M., Florence J., Gappmaier E., Glanzman A. M., Henricson E., Barth J., Elfring G. L., Reha A., Spiegel R. J., O'donnell M. W., Peltz S. W., McDonald C. M., *Muscle Nerve*, **50**, 477–487 (2014).
- 38) McElroy S. P., Nomura T., Torrie L. S., Warbrick E., Gartner U., Wood G., McLean W. H., *PLoS Biol.*, **11**, e1001593 (2013).
- 39) Bolze F., Mocek S., Zimmermann A., Klingenspor M., *Sci. Rep.*, **7**, 1020 (2017).
- 40) Harmer S. C., Mohal J. S., Kemp D., Tinker A., *Biochem. J.*, **443**, 635–642 (2012).
- 41) Finkel R. S., Flanigan K. M., Wong B., Bönnemann C., Sampson J., Sweeney H. L., Reha A., Northcutt V. J., Elfring G., Barth J., Peltz S. W., *PLoS One*, **8**, e81302 (2013).
- 42) Manuvakhova M., Keeling K., Bedwell D. M., *RNA*, **6**, 1044–1055 (2000).
- 43) Floquet C., Hatin I., Rousset J. P., Bidou L., *PLoS Genet.*, **8**, e1002608 (2012).
- 44) Neri M., Torelli S., Brown S., Ugo I., Sabatelli P., Merlini L., Spitali P., Rimessi P., Gualandi F., Sewry C., Ferlini A., Muntoni F., *Neuromuscul. Disord.*, **17**, 913–918 (2007).
- 45) Kerem E., *Curr. Opin. Pulm. Med.*, **10**, 547–552 (2004).
- 46) Ashton L. J., Brooks D. A., McCourt P. A., Muller V. J., Clements P. R., Hopwood J. J., *Am. J. Hum. Genet.*, **50**, 787–794 (1992).
- 47) Bunge S., Clements PR, Byers S, Kleijer WJ, Brooks DA, Hopwood JJ., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1407**, 249–256 (1998).
- 48) Muenzer J., *Rheumatology*, **50**, 4–12 (2011).
- 49) Rabenstein D. L., *Nat. Prod. Rep.*, **19**, 312–331 (2002).
- 50) Pan C., Nelson M. S., Reyes M., Koodie L., Joseph J. Brazil J. J., Stephenson E. J., Zhao R. C., Peters C., Selleck S. B., Stringer S. E., Gupta P., *Blood*, **106**, 1956–1964 (2005).
- 51) Kubaski F., de Oliveira Poswar F., Michelin-Tirelli K., Matte U. D. S., Horovitz D. D., Barth A. L., Baldo G., Vairo F., Giugliani R., *Diagnostics*, **10**, 161–183 (2020).
- 52) Bunge S., Kleijer W. J., Steglich C., Beck M., Zuther C., Morris C. P., Schwinger E., Hopwood J. J., Scott H. S., Gal A., *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 861–866 (1994).
- 53) Clarke L. A., Giugliani R., Guffon N., Jones S. A., Keenan H. A., Munoz-Rojas M. V., Okuyama T., Viskochil D., Whitley C. B., Wijburg F. A., Muenzer J., *Clin. Genet.*, **96**, 281–289 (2019).

- 54) Böcker A., Bonneau P. R., Hucke O., Jakalian A., Edwards P. J., *ChemMedChem*, **5**, 2102–2113 (2010).
- 55) Stepan A. F., Walker D. P., Bauman J., Price D. A., Baillie T. A., Kalgutkar A. S., Aleo M. D., *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, 1345–1410 (2011).
- 56) Okada H., Ikeda J., Tanaka D., Tobe M., *Tetrahedron Lett.*, **55**, 979–981 (2014).
- 57) Ooi N. S., Wilson D. A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **12**, 1792–1799 (1980).
- 58) Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2596–2599 (2002).
- 59) Patel H. V., Vyas K. A., Pandey S. P., Fernandes P. S., *Tetrahedron*, **52**, 661–668 (1996).
- 60) Butler R. N., Fitzgerald K. J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **6**, 1587–1591 (1988).
- 61) Kalisiak J., Sharpless K. B., Fokin V. V., *Org. Lett.*, **10**, 3171–3174 (2008).
- 62) Ueda S., Su M., Buchwald S. L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 8944–8947 (2011).
- 63) Bailey J. L., Sudini R. R., *Tetrahedron Lett.*, **55**, 3674–3677 (2014).
- 64) Boss C., Brotschi C., Heidmann B., Sifferlen T., Williams J. T., WO2012/85852 (2012).
- 65) Besselièvre F., Lebrequier S., Mahuteau-Betzer F., Piguel S., *Synthesis*, **20**, 3511–3518 (2009).
- 66) Gao W. C., Wang R. L., Zhang C., *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 7123–7128 (2013).
- 67) Wan C., Zhang J., Wang S., Fan J., Wang Z., *Org. Lett.*, **12**, 2338–2341 (2010).
- 68) Wang D., Xue X., Gunn G., Du M., Siddiqui A., Weetall M., Keeling K. M., *J. Mol. Med.*, **100**, 1223–1235 (2022).
- 69) Dabrowski M., Bukowy-Bieryllo Z., Zietkiewicz E., *RNA Biol.*, **12**, 950–958 (2015).
- 70) Jacoby E., Reinhardt J., Schmiedeberg N., Spanka C., WO2014/091446 (2014).
- 71) Lovering F., Bikker J., Humblet C., *J. Med. Chem.*, **52**, 6752–6756 (2009).
- 72) Lerman L. S., *J. Mol. Biol.*, **3**, 18–30 (1961).
- 73) Reinhardt, J., Schmiedeberg N., Spanka C., US2015/344476 (2015).
- 74) Brackley J. A. III, Shaw A. N., Tedesco R., Wang Y., Wiggall K. J., Yu H., WO2009/158315 (2009).
- 75) Uscumlic G. S., Krstic V. V., Muskatirovic M. D., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **5**, 999–1002 (1993).
- 76) Favor D. A., Powers J. J., Repine J. T., White A. D., WO2008/20306 (2008).
- 77) Menzella H. G., Tran T., Carney J. R., Lau-Wee J., Galazzo J., Reeves C. D., Carreras C., Mukadam S., Eng S., Zhong Z., Timmermans P. B. M. W. M., Murli S., Ashley G. W., *J. Med. Chem.*, **52**, 1518–1521 (2009).
- 78) Ban, H., Kusagi M., Takanashi Y., Hasegawa F., EP3323809 (2018).

- 79) Yoon S. H., Joo H. W., Seo B. K., Lee E. J., Jung J. Y., Yoon S. Y., Kwak Y. S., Cho W. Y., Jo M. M., EP4074701 (2022).
- 80) Kucznierz R., Grams F., Leinert H., Marzenell K., Engh R. A., Von der Saal W., *J. Med. Chem.*, **41**, 4983–4994 (1998).
- 81) Cacchi S., Fabrizi G., Goggiamani A., *Org. Lett.*, **5**, 4269–4272 (2003).
- 82) Kögl F., Salemink C. A., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **71**, 779–785 (1952).

論文目録

- 1) Kawai S., Takashima S., Ando M., Shintaku S., Takeda S., Otake K., Ito Y., Fukui M., Yamamoto M., Shoji Y., Shirahase H., Kitao T.
Synthesis and Evaluation of Novel Triaryl Derivatives with Readthrough-Inducing Activity.
Chem. Pharm. Bull., **2023**, 71, 701–716. doi: 10.1248/cpb.c23-00387.

- 2) Kawai S., Takashima S., Ando M., Shintaku S., Takeda S., Otake K., Ito Y., Fukui M., Yamamoto M., Shoji Y., Shirahase H., Kitao T.
Discovery of Novel Chromenopyridine Derivatives as Readthrough-Inducing Drugs.
Chem. Pharm. Bull., **2023**, 71, 859–878. doi: 10.1248/cpb.c23-00488.

謝 辞

本論文に関し、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました北里大学薬学部創薬物理化学教室教授 田中信忠先生に深く感謝し、衷心より御礼申し上げます。

主査として本論文について議論いただきました北里大学薬学部生命薬化学研究室教授 藤井秀明先生に心から感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて頂いた京都薬品工業株式会社代表取締役会長 北尾和彦博士並びに同代表取締役社長 北尾誠史様に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都薬品工業株式会社専務取締役 北尾達哉博士に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。

本論文に際し御助言、御指導を賜りました京都薬品工業株式会社顧問 白波瀬弘明博士並びに同創薬研究部長 庄子幸倫博士に心より感謝し、御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、合成および生物評価にご協力いただいた、全ての関係者の皆様に心から感謝申し上げます。