

乳癌治療薬としての

**Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK)**

非直接的活性化剤の合成と

構造活性相関に関する研究

2020 年

倉本 和幸

## 目次

序論.....	7
本論	
第一章 新規3,5-ジメチルピリジン-4(1H)-オン誘導体の合成及び構造活性相関	
第一節 リード化合物とその課題 .....	18
第二節 フォーカスライブラリ構築を目的とした化合物の合成法.....	21
第三節 合成したライブラリ化合物のスクリーニング結果・考察.....	28
第四節 本章のまとめ .....	37
第二章 開発化合物 ASP4132並びにその周辺化合物の合成及び構造活性相関	
第一節 リード化合物とその課題 .....	38
第二節 フォーカスライブラリ構築を目的とした化合物の合成法.....	42
第三節 合成したライブラリ化合物のスクリーニング結果・考察.....	49
第四節 <i>In vivo</i> 薬物動態の改善と ASP4132 (90)の発見及び高次評価結果.....	55
第五節 本章のまとめ .....	61
第三章 第二世代開発候補化合物としてのエーテルリンカー誘導体の合成及び構造活性相関	
第一節 リード化合物とその課題 .....	62
第二節 フォーカスライブラリ構築を目的とした化合物の合成法.....	65
第三節 合成したライブラリ化合物のスクリーニング結果・考察.....	72
第四節 第二世代開発候補化合物122の高次評価.....	81
第五節 本章のまとめ .....	84
結論.....	86
実験の部.....	89
参考文献.....	122



## 略語表

本論文において以下に示す略語及び略号を用いた。

ACC	acetyl-CoA carboxylase
AcOH	acetic acid
ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion
ADP	adenosine diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside
AMP	adenosine monophosphate
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
Ar	aryl
ATP	adenosine triphosphate
aq.	aqueous
AUC	area under the curve
BID	twice daily
BINAP	2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BRCA	breast cancer susceptibility gene
BuLi	butyllithium
<i>t</i> -BuOK	potassium <i>tert</i> -butoxide
<i>t</i> -BuONa	sodium <i>tert</i> -butoxide
CaMKK	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase
Cbz	benzyloxycarbonyl
CDK	cyclin-dependent kinase
CL <sub>int, vitro</sub>	<i>in vitro</i> intrinsic clearance
CL <sub>tot</sub>	total body clearance
C <sub>max</sub>	maximum plasma concentration
conc.	concentrated
CYP	cytochrome P450
d	day(s)

DCE	1,2-dichloroethane
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DME	1,2-dimethoxyethane
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EC <sub>50</sub>	half maximal (50%) effective concentration
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Eq.	equivalent
ER	estrogen receptor
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
Et <sub>2</sub> O	diethylether
Et <sub>3</sub> N	triethylamine
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
F	bioavailability
FBS	fetal bovine serum
FKBP	FK506 binding protein
h	hour(s)
HBOC	hereditary breast and ovarian cancer
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hERG	human ether-a-go-go related gene
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2
HLM	human liver microsomes
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-CoA
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
i.v.	intravenous
IC <sub>50</sub>	half maximal (50%) inhibitory concentration

IPA	2-propanol
IPE	diisopropyl ether
<i>i</i> Pr	isopropyl
JP1	1st fluid for disintegration test in the Japanese Pharmacopeia
JP2	2nd fluid for disintegration test in the Japanese Pharmacopeia
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry
LKB1	liver kinase B1
log <i>D</i>	distribution coefficient
log <i>P</i>	partition coefficient
M	mol/L
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
min	minute(s)
MOA	mode of action
MOE	molecular operating environment software
MS	mass spectra
MsOH	methanesulfonic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
NaBH(OAc) <sub>3</sub>	sodium triacetoxyborohydride
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NGS	next generation sequencing
p.o.	oral administration
PARP	poly ADP-ribose polymerase
PBS	phosphate-buffered saline
PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride
Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)
Pd/C	palladium on carbon
PD-L1	programmed death-ligand 1
Pd(OAc) <sub>2</sub>	palladium(II) acetate
Pd(OH) <sub>2</sub> /C	palladium hydroxide on carbon

Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)
PEG	polyethylene glycol
PG	propylene glycol
Ph	phenyl
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PK	pharmacokinetics
PR	progesteron receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
<i>p</i> -TsCl	4-methylbenzene-1-sulfonyl chloride
<i>p</i> -TsOH·H <sub>2</sub> O	4-methylbenzene-1-sulfonic acid monohydrate
quant.	quantitative yield
r.t.	room temperature
SAR	structure-activity relationship
SD	sprague-dawley
SEM	standard error of the mean
Ser	serine
SPhos	2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl
t <sub>1/2</sub>	elimination half-life
TAK	transforming growth factor-β-activated kinase
TBS	tris-buffered saline
TC	sodium taurocholate
TFA	trifluoroacetic acid
TGI	tumor growth inhibition
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
t <sub>max</sub>	time to maximum plasma concentration
TsOH	4-methylbenzene-1-sulfonic acid
V <sub>dss</sub>	volume of distribution at steady state
WSC·HCl	<i>N</i> -[3-(dimethylamino)propyl]- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
y	yield

## 序論

### 1. 乳癌とその治療薬について

乳癌は、乳房の正常な細胞が遺伝子変異や DNA 損傷によって変化し、無秩序に増殖することにより発生する疾患である。女性の悪性腫瘍の中で、罹患率・死亡率共に最も多い癌であり、全世界で年間約 210 万人が罹患し、約 63 万人が命を落とすとされている<sup>1)</sup>。我が国においても、年間約 8 万人が新たに乳癌に罹患し、約 14,000 人が命を落とすことが知られている<sup>2)</sup>。日本において、女性の全癌の罹患率は 1985 年以降増加傾向であるが、胃癌・肝臓癌などで減少傾向が見られる一方で、乳癌は、卵巣癌・子宮癌・肺癌と同様に増加傾向となっている<sup>3)</sup>。

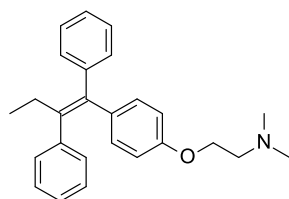
乳癌は、その原因となる遺伝子背景から 5 つのサブタイプに分類され、その背景の違いに応じて、推奨される薬剤治療が異なっている (**Table 1**)。例えば、ホルモン受容体である ER や PR が陽性の場合には、タモキシフェン、フルベストラントなどを代表とする抗エストロゲン療法や、レトロゾールなどのアロマターゼ阻害剤といった内分泌療法が主流となる (**Figure 1**)。一方で、HER2 が陽性の場合には、抗 HER2 抗体であるトラスツズマブなどの抗 HER2 療法が主軸となる。このように、乳癌治療はその遺伝的背景に応じて細分化が進んでおり、数多くある癌種の中で、最も個別化が進んでいる領域の一つである。

**Table 1.** 遺伝子背景別乳癌の分類と推奨される治療法<sup>4)</sup>

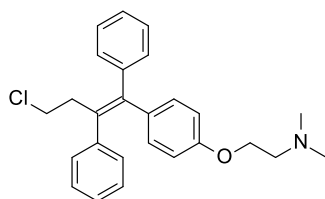
サブタイプ	遺伝子背景	推奨される治療
Luminal A-like (HER2 negative)	ホルモン受容体 (ER かつ PR) 陽性 HER2 陰性	内分泌療法 (タモキシフェン、アロマターゼ阻害剤)
Luminal B-like (HER2 negative)	ER 陽性、PR 陰性あるいは低発現 HER2 陰性	内分泌療法+化学療法
Luminal B-like (HER2 positive)	ER 陽性 HER2 過剰発現あるいは増幅	化学療法+抗 HER2 療法+内分泌療法
ErB-B2 overexpression	ER かつ PR 陰性 HER2 過剰発現あるいは増幅	化学療法+抗 HER2 療法
basal-like	ER、PR、HER2 全て陰性 (トリプルネガティブ)	化学療法



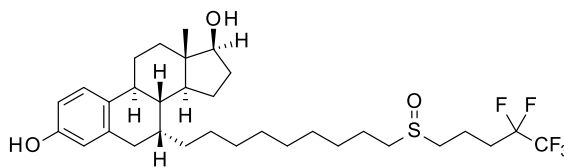
<ER antagonist>



NOLVADEX  
(Tamoxifen)

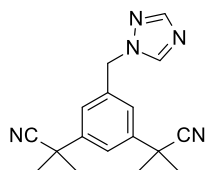


FARESTON  
(Toremifene)

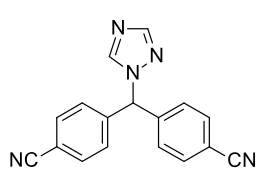


FASLODEX  
(Fulvestrant)

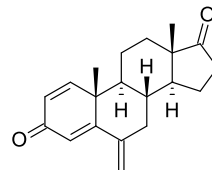
<Aromatase inhibitor>



ARIMIDEX  
(Anastrozole)



FEMARA  
(Letrozole)

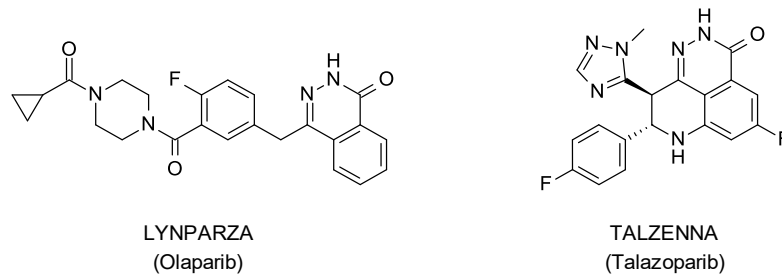


AROMASIN  
(Exemestane)

Figure 1. 乳癌内分泌療法に用いられる医薬品の構造

加えて、近年では NGS 解析などの著しい進歩により、ゲノムや生体分子情報が個人レベルで迅速かつ精密に分析可能となった。このことは、様々な疾病の原因や発症の過程を分子レベルで理解するのに大きく役立っている。癌領域においても、多くの癌種において NGS を用いた腫瘍の遺伝子変異解析から重要な体細胞遺伝子変異 (driver mutation) が発見され、その変異に対応した薬剤が創製されるようになってきている。

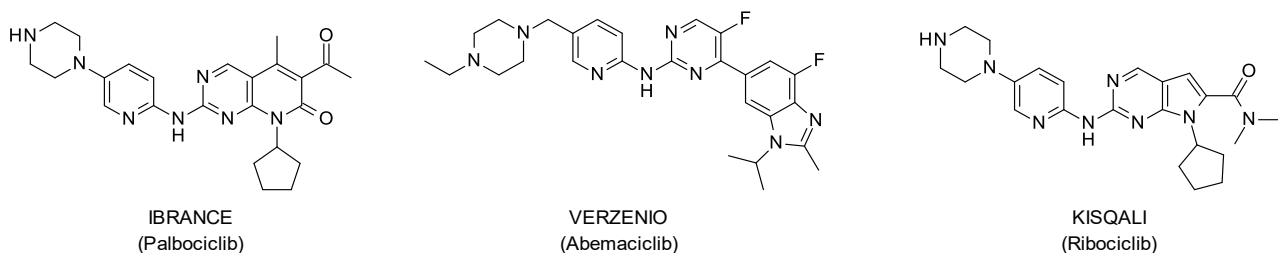
乳癌の発症に遺伝的素因が関与していることは古くから知られており、そのうち、単一遺伝子変異によるもの (monogenic disorder) が 5–10%を占める<sup>3)</sup>。乳癌の原因遺伝子の代表的なものとして、BRCA1 遺伝子と BRCA2 遺伝子がある<sup>5,6)</sup>。BRCA1、2 を原因遺伝子として持つ乳癌及び卵巣癌を総称して HBOC と呼び、乳癌全体の 3–5%が当てはまると言われている。BRCA 遺伝子はゲノムの安定性維持に関与しており、これら遺伝子の変異に伴い、その安定性維持機構が機能不全に陥ることでゲノムが不安定となり、最終的に細胞が癌化すると考えられている。近年、このような BRCA 遺伝子変異陽性乳癌・卵巣癌に対して著効を示す新規薬剤として、PARP 阻害剤が複数承認された (Figure 2)。



**Figure 2.** 乳癌を適応症として承認された PARP 阻害剤

癌細胞においては、自身の生存のため特定のゲノム修復機構が活性化していることがある。PARP は DNA 修復において重要な役割を果たす酵素であり、DNA 一本鎖切断修復を行う<sup>7)</sup>。通常、癌細胞において PARP が阻害されると、DNA 修復は二本鎖切断修復へと変更される。一方で、この二本鎖切断修復機構を担う BRCA 遺伝子に変異している癌細胞において PARP が阻害された場合、このような細胞ではゲノムの修復を行うことができず、最終的に細胞死が誘導されると考えられている<sup>7)</sup>。このように、複数の遺伝子を同時に阻害することで細胞死を誘導する手法は合成致死 (synthetic lethality) と呼ばれ、新たなメカニズムの分子標的薬の創製を推進する一つの軸となってきている。

ER 陽性型乳癌に対する内分泌療法の治療抵抗性を引き起こす因子として、サイクリン D の持続的な発現及び RB 蛋白質の持続的なリン酸化が知られている<sup>8)</sup>。サイクリン D の発現は、MAPK・PI3K・ホルモン受容体経路の活性化によって上昇する。サイクリン D は CDK4 及び 6 と結合してこれらを活性化し、その結果 RB 蛋白質がリン酸化されることにより、細胞周期が G1 期から S 期へと移行する。こうした知見の下、近年、CDK4/6 阻害剤であるパルボシクリブやリボシクリブなどが乳癌治療薬として相次いで承認された (Figure 3)。臨床試験では、ER 陽性進行・再発乳癌に対し、内分泌療法との併用で高い治療効果が得られている<sup>9)</sup>。



**Figure 3.** 乳癌を適応症として承認された CDK4/6 阻害剤

そのほか、mTOR 阻害剤であるエベロリムスは ER 陽性・HER2 陰性乳癌に、また、抗 PD-L1 抗体であるアテゾリズマブはトリプルネガティブ・PD-L1 陽性乳癌に対して、それぞれ承認されている。アテゾリズマブは 2019 年に承認された、日本で初めて乳癌を適応症とした癌免疫療法である。このように、乳癌の治療はゲノム医療の発達に伴って今もなお急速に発展している。一方で、ゲノムベースの創薬が進むにつれ、一つの薬剤が有効な患者層が細分化されてきていることに加え、内分泌療法を含む既存療法には耐性化の課題が存在する。さらに、トリプルネガティブ乳癌のように未だ化学療法を標準治療とする患者層も存在する。これらの課題に対しては現在のところ、複数薬剤による併用療法やシーケンス治療による対応が進んでいるが、このような環境下において、新規なメカニズムによる乳癌治療薬は未だ強く望まれており、その研究的意義は極めて高いと考えられる。

## 2. ケミカルバイオロジー研究について

ケミカルバイオロジーとは、機能が明らかとなっていない生理活性分子を起点とし、その生命科学的な背景を解き明かすことを目的とした研究分野である。ケミカルバイオロジーと対を為す研究分野として、バイオケミストリーが挙げられる。バイオケミストリーが、生命現象を出発点としてそれらを構成する要素を化学によって説明する学問であるのに対し、ケミカルバイオロジーは、化学物質、主として低から中分子有機化合物を出発点として生物を理解する学問であると考えられている<sup>10)</sup>。薬理学、分子生物学に有機化学が参入することで生まれたケミカルバイオロジー研究は、近年盛んに行われてきており、新たな生命現象とメカニズムの発見や、新たな医薬品の開発に大きく貢献している。

ケミカルバイオロジー研究が新たな医薬品の開発に発展した例として、免疫抑制剤タクロリムス (FK506) が挙げられる (Figure 4)。タクロリムスは、つくば付近の土壌より単離された放線菌の一種である *Streptomyces tsukubaensis* が産生するマクロライド化合物である。藤沢薬品工業 (現アステラス製薬) が実施した *in vitro* 混合リンパ球反応系をスクリーニング系とし、カビ約 8,000 株、放線菌約 12,000 株の培養液をスクリーニングした結果、上記の放線菌培養液中に存在する物質が強力なリンパ球反応抑制作用を有することが明らかとなった。その後、タクロリムスは肝移植を対象とした米国における臨床試験をきっかけとして各国にて承認された。タクロリムスは現在、臓器移植における拒絶反応抑制に加え、リウマチやアトピー性皮膚炎など免疫が関連する疾患の治療薬として幅広く使用されている<sup>11)</sup>。

また、タクロリムスに関するケミカルバイオロジー研究によって、その作用機序と共に T 細胞シグナル伝達経路が解明された。Schreiber らは、タクロリムスを化学合成することに成功し、さらにタクロリムスをアフィニティ樹脂に結合させて細胞内タンパク質を作用させることにより、タクロリムスの標的が FKBP であることを突き止めた<sup>12)</sup>。その後、タクロリムス-FKBP 複合体が脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを不活性化することにより、免疫活性化遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。

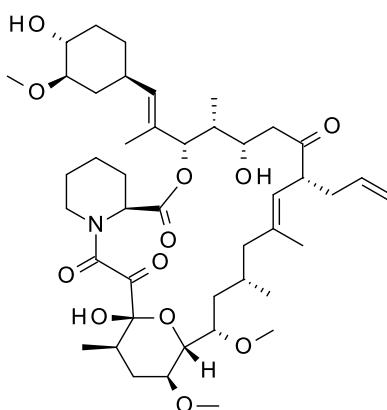


Figure 4. タクロリムスの構造

また、近年、ケミカルバイオロジーを基軸とした医薬品の開発が実を結んだ例として、乳癌治療薬として承認されたエリブリンが挙げられる<sup>13)</sup>。エリブリンは、*Halichondria okadai* より単離されたポリエーテルマクロライド天然物であるハリコンドリン B<sup>14)</sup>をメディシナルケミストリーによって展開し、見出された化合物である (Figure 5)。ハリコンドリン B は *in vitro* 及び *in vivo* において強力な抗腫瘍作用を示す一方で、天然においてはごく微量しか得られず、前臨床・臨床研究に向けた量的確保が大きな課題であった。岸らにより初の全合成が達成された後、各フラグメントの変換による様々な誘導体合成が可能となったことにより、構造活性相関研究が可能となり、その結果、エリブリンが創出された<sup>15)</sup>。エリブリンは微小管機能を阻害することにより細胞の有糸分裂を阻害することで癌細胞にアポトーシスを誘導するが、その機能解析により、微小管への結合や阻害様式がタキサン系化合物に代表される従来の微小管機能阻害化合物とは大きく異なることが見出された。また最近では、乳癌細胞の形質転換を促すことによって上皮系細胞様に復帰させる作用<sup>16)</sup>や、腫瘍組織内の血管密度を上昇させて血液還流を増加させることにより、腫瘍内低酸素状態を解消する作用<sup>17)</sup>が確認されてきており、これまでにない特徴的な薬理作用が次々と明らかにされている。

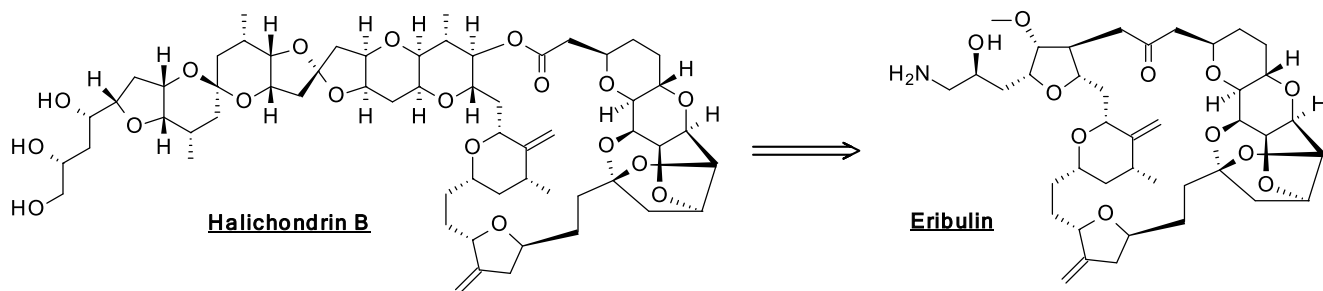


Figure 5. ハリコンドリン B からエリブリンへの変換

以上のように、魅力的な生理活性を有する有機化合物に有機合成化学、さらにはメディシナルケミストリーが融合してケミカルバイオロジー研究を進めていくことで、これまでにない機序を持つ新たな医薬品候補が見出されることが実証されてきている。また、近年では、古典的な標的的同定法である多点同時修飾・構造活性相関法や光親和性小分子固定化法などに加え、パネルによるプロファイリングやオミクス解析、さらにはビッグデータを利用した手法など、標的探索に関する科学も著しく進歩してきている。以上のことから、新規メカニズムによる新薬が望まれる乳癌治療薬研究において、このようなケミカルバイオロジー研究は一つの有力な手法となり得ると考えられる。

### 3. AMPK について

AMPK は、哺乳類などの真核生物において、高度に保存されているセリン・スレオニンキナーゼである<sup>18)</sup>。当初、AMPK は ACC 及び HMG-CoA 還元酵素を基質とし、それらを不活性化する酵素として発見されたが<sup>19,20)</sup>、20 年以上に渡る研究によって数多くの下流因子をリン酸化することを通じてエネルギー消費機構（同化作用）を抑制し、エネルギー産生機構（異化作用）を活性化することが明らかとなった<sup>21)</sup>。一般に、AMPK は細胞内 AMP : ATP 比及び ADP : ATP 比の増加、即ち細胞内エネルギー低下を感知することで活性化し、細胞内エネルギーバランスを回復する<sup>22)</sup>。低栄養状態におけるエネルギー恒常性の維持及び適応は全ての細胞において重要な機構であるが、AMPK は本機構において主要な役割を担い、局所のみならず全身レベルにおける成長及び代謝を制御することから、代謝のマスタースイッチと呼ばれている。また、AMPK はシグナルカスケードの上流に位置する種々のキナーゼ（LKB1、CaMKK、TAK1 など）による Thr172 残基のリン酸化を受けることで活性化することも知られている<sup>23,24)</sup>。

AMPK は約 145 kDa の分子量から成り、触媒活性を担う  $\alpha$  サブユニットに加え、活性を制御する  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットを有するタンパク複合体である (Figure 6)<sup>18, 25</sup>。  $\alpha$  サブユニットの N 末端側には触媒中心である kinase domain が位置し、主に  $\beta$ -シート構造から成る小さな N 末端ローブ (N-lobe) と、大部分が  $\alpha$ -ヘリックス構造から成る大きな C 末端ローブ (C-lobe) から構成される。また、C 末端側には  $\beta \cdot \gamma$  サブユニットと相互作用する部位を有し、これらの相互作用を制御する autoinhibitory domain や  $\alpha$ -linker、並びに CTD (C-terminus domain) が位置している。  $\beta$  サブユニットの N 末端側には AMPK がグリコーゲンを感知できるようにする CBM (carbohydrate-binding module) が位置し、そこから C 末端側に向かって、  $\alpha$  サブユニット kinase domain の C-helix と相互作用する C-interacting helix、CTD となっている。  $\gamma$  サブユニットは核酸結合部位 (nucleotide-binding module) であり、AMP、ADP 及び ATP が競合的に結合する 4 つのサイトを有している。 AMPK は、これらの複数のサイトによって細胞内の核酸を検知することにより、細胞のエネルギー状態を精密に感知していると考えられている<sup>26, 27</sup>。

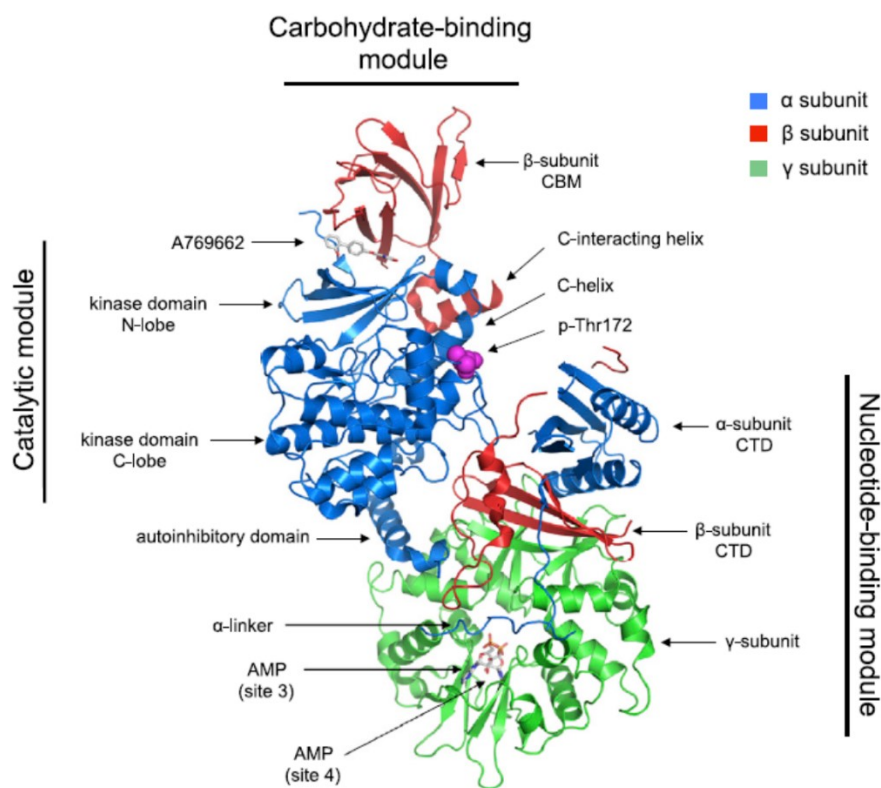


Figure 6. AMPK の構造 (出典：参考文献 18 より)

近年、様々な癌遺伝子の変異に伴い、AMPK の転写・リン酸化・ユビキチン化に変化が生じることにより、その活性が低下することが報告されている<sup>28,29)</sup>。一方で、AMPK の発現増加及び活性向上が、ヒトにおける複数の腫瘍タイプの生存率の改善に寄与することが知られている<sup>28)</sup>。実際に、細胞内において AMPK が活性化されることにより、主要な癌抑制遺伝子の一つである p53 の活性化や<sup>30-32)</sup>、細胞周期の制御因子であるサイクリン D1 の発現抑制<sup>33)</sup>、及び細胞増殖シグナル伝達に関わる mTOR の阻害<sup>34-36)</sup>等、複数の経路を介して抗腫瘍作用が発揮されることが報告されている。また、シグナルカスケードにおいて AMPK の上流に位置する LKB1 が変異し、AMPK が正常に活性化されなくなる Peutz-Jeghers 症候群患者において、悪性腫瘍の発症率が高まることが知られている<sup>23)</sup>。以上のことから、癌細胞において AMPK を活性化することは抗腫瘍効果に繋がると考えられる<sup>37)</sup>。

細胞内で AMPK を活性化する低分子化合物は、これまでに数多く報告されている<sup>28,38)</sup>。例えば、AICAR は最初に報告された AMPK 活性化剤であり、細胞内に取り込まれた後にリン酸化を受けることにより AMP と同様のアロステリック部位に結合することで、AMPK を直接的に活性化することが知られている<sup>39,40)</sup>。また、A-769662 は AMPK のアロステリック部位に結合するだけでなく、 $\alpha$  サブユニットの Thr172 残基を保護して脱リン酸化を妨げることにより AMPK を活性化する化合物として報告されている<sup>41)</sup>。近年では、1*H*-インドール-3-カルボン酸骨格を有する PF-06409577 が、新規な AMPK 直接活性化剤として報告されている<sup>42)</sup>。また、糖尿病治療薬として知られるメトホルミンは、ミトコンドリア Complex I を阻害することにより細胞内 AMP : ATP 比を上昇させ、間接的に AMPK を活性化することが知られている<sup>43,44)</sup>。

現在までに知られている AMPK 活性化剤の一例を、**Figure 7, 8** に示す。

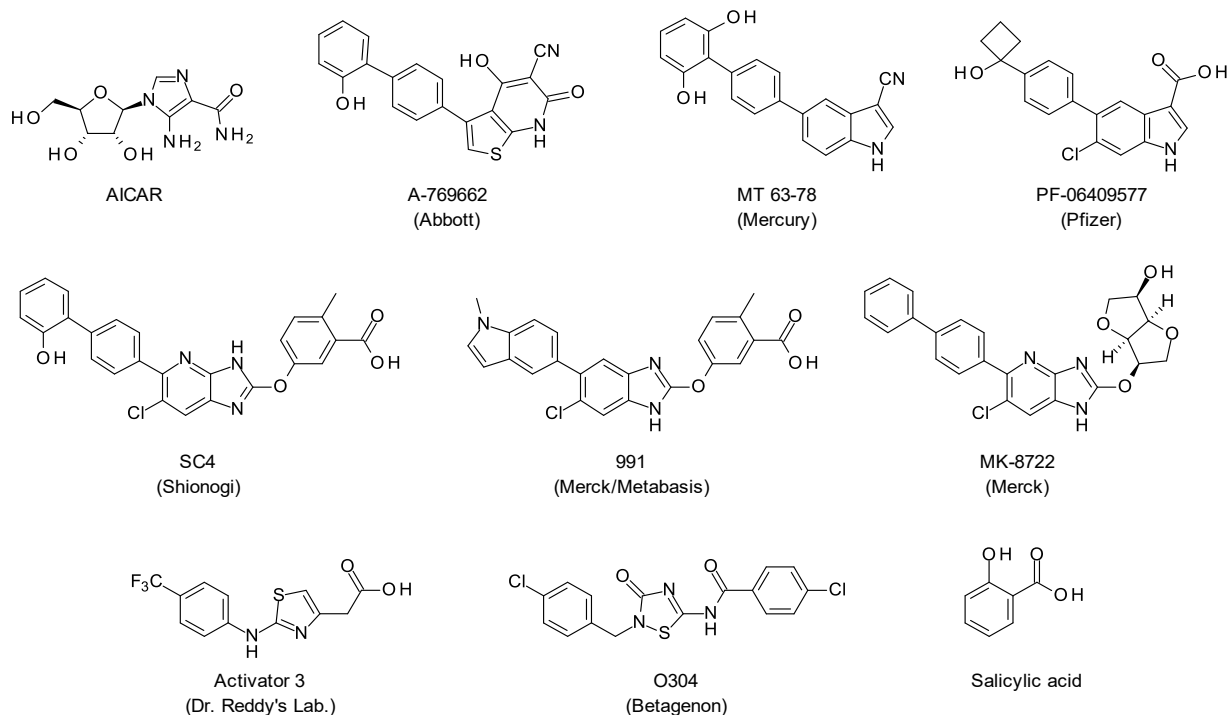


Figure 7. 直接的 AMPK 活性化剤の例 <sup>28, 38)</sup>

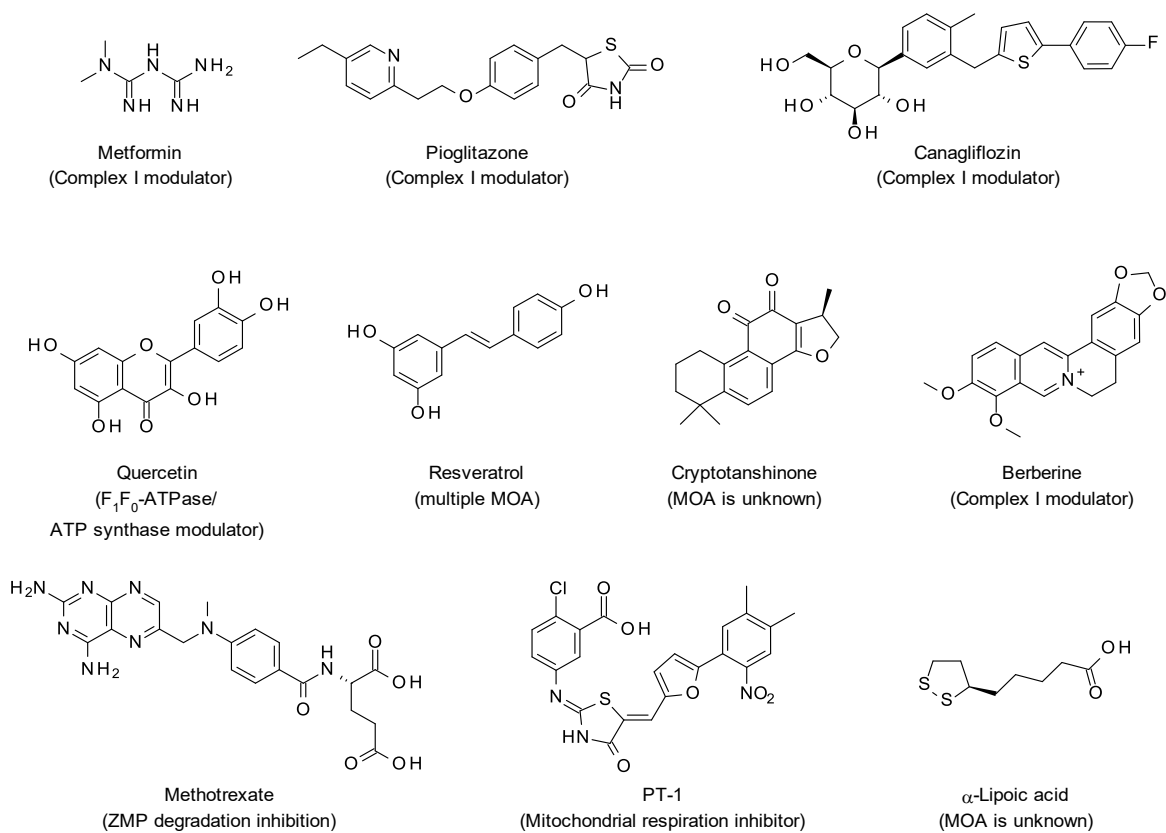


Figure 8. 非直接的 AMPK 活性化剤の例 <sup>28, 38)</sup>



以上のように、AMPK 活性化作用を示す化合物は数多く報告されているものの、現在までに、癌を適応とした医薬品として承認された AMPK 活性化剤は存在しない。一方で、先に述べた通り、AMPK 活性化と抗腫瘍作用との間には多くの知見が示されていることから、これまでにない新規な構造あるいはメカニズムを以て AMPK を活性化する化合物を創出することは、新たな作用機序に基づく治療薬が望まれている乳癌の領域において一層有意義な研究となり得ると考えられる。

#### 4. 本研究の目的

本研究は、これまでの AMPK 活性化剤とは異なる構造及び薬理作用を有する低分子有機化合物を基盤とし、ケミカルバイオロジー研究によって、新規なメカニズムを有する乳癌治療薬を創製することを目的としたものである。まず初めに、ヒト乳癌細胞株を用いたフェノタイプスクリーニングを行い、既存の AMPK 活性化剤とは異なる構造を有し、ヒト乳癌細胞株において AMPK 活性化作用を示す 3,5-ジメチルピリジン-4(1H)-オン誘導体、及びベンジルアミン誘導体の二つのケモタイプを取得した。これらの化合物は、既知の直接的 AMPK 活性化剤とは異なる細胞選択性を以てヒト乳癌細胞株の増殖を阻害したことから、乳癌治療において新たな患者層に有効なプレジジョンメディシンとなり得ると考えられた。そこで著者は、これらの誘導体から臨床試験に進める化合物を創出するべく、以下の目標を設定した。

- 1) リード化合物の持つ細胞選択性を維持し、特定の乳癌細胞株に対して強力な *in vitro* 活性を示す
- 2) ヒト肝ミクロソーム中において、十分な代謝安定性を有する
- 3) *In vivo* において、良好な薬物動態 (PK) プロファイルを示す
- 4) *In vivo* において、顕著な毒性を伴わず強力な抗腫瘍作用を示す
- 5) hERG チャンネル阻害あるいは難水溶性などの、臨床上の薬物使用を制限させる懸念が少ない

研究方針として、フェノタイプスクリーニングにより得られたリード化合物から新規化合物をデザイン・合成してフォーカスライブラリを構築し、それらの化合物群について主活性である AMPK 活性化作用及び細胞増殖阻害作用・水溶性・ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性・hERG チャンネル阻害活性、並びに *in vivo* における薬物動態プロファイルを評価して構造活性相関を明らかにすると共に、ヒト乳癌細胞株

(MDA-MB-453) 担癌ヌードマウスモデルを用いた経口反復投与抗腫瘍試験を通じて *in vivo* における抗腫瘍作用及び毒性を評価することで、臨床開発可能な化合物の創製を目指すこととした (Figure 9)。

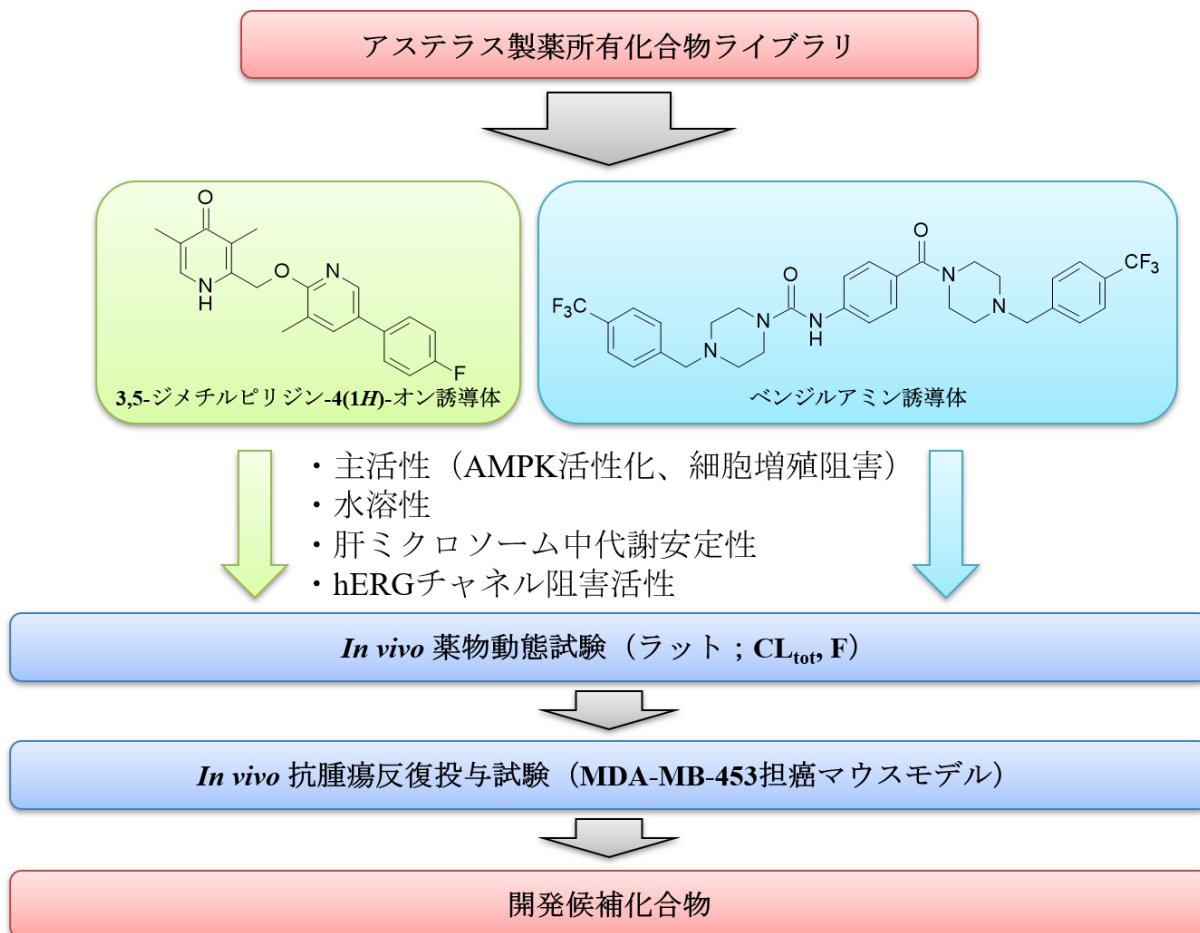


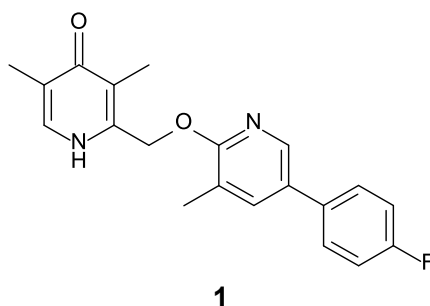
Figure 9. 研究方針

## 本論

### 第一章 新規 3,5-ジメチルピリジン-4(1H)-オン誘導体の合成及び構造活性相関

#### 第一節 リード化合物とその課題

まず初めに、ヒト乳癌細胞株において AMPK 活性化作用を示し、且つ既存の AMPK 活性化剤とは異なる構造を有する化合物の取得を目的とし、アステラス製薬所有ライブラリ化合物に対し、ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-453 細胞を用いて AMPK の下流因子の一つである ACC の Ser79 のリン酸を測定する whole cell ELISA アッセイを行った。その結果、新規な 3,5-ジメチルピリジン-4(1H)-オン骨格を有し、中程度の AMPK 活性化作用を示す化合物 **1** を見出した (Figure 10)。



**1**

AMPK activation (MDA-MB-453)  $EC_{50}$ : 0.89  $\mu$ M

**Figure 10.** リード化合物 **1** の構造及び AMPK 活性化作用

次に、既知の AMPK 直接活性化剤である AICAR との比較を目的とし、先の MDA-MB-453 細胞株に加え、同じくヒト乳癌細胞株である SK-BR-3 に対する細胞増殖阻害作用を評価した (Table 2)。その結果、MDA-MB-453 細胞に対し、**1** は AICAR よりも 1000 倍以上強力な増殖阻害作用を示した。さらに、SK-BR-3 細胞及び MDA-MB-453 細胞に対して非選択的に細胞増殖阻害作用を示した AICAR とは異なり、**1** は SK-BR-3 細胞に対して極めて弱い増殖阻害作用を示した。**1** が、既知の AMPK 直接活性化剤とは異なる細胞選択性を示

したことから、**1**の直接的な標的は AMPK ではなく、別の標的への作用を介することにより、特定のヒト乳癌細胞内において AMPK を活性化することが示唆された。

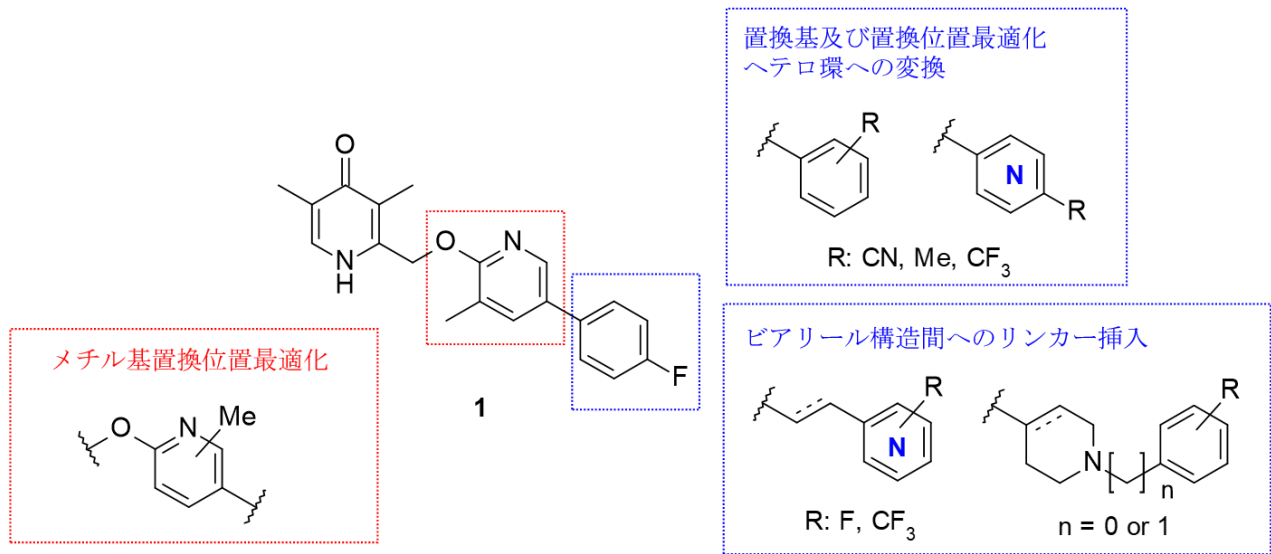
**Table 2.** *In Vitro* Antiproliferative Activity of AICAR and **1**

Compound	MDA-MB-453	SK-BR-3
	growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
AICAR	1700	180
<b>1</b>	0.39	29% inh. at 1 μM

<sup>a</sup>The IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment.

**1**が直接作用する標的分子は不明であったが、著者は、既知の AMPK 直接活性化剤に見られない乳癌細胞株選択性を示すフェノタイプが、これまでにない乳癌患者層に対するプレシジョンメディシンに繋がる可能性を示唆していると考えた。一方で、**1**の主活性は AMPK 活性化作用、細胞増殖阻害作用共にまだ十分とは言えず、*in vivo* 試験の実施等、高次の評価を行うためには、さらに強力な *in vitro* 活性と良好な物性を併せ持つ化合物が必要であった。

そこで著者は、これらの課題を解決し得る化合物の創出を目的としたフォーカスライブラリを構築することとした。ライブラリ構築のためのリード化合物 **1** からの合成展開概略を **Figure 11** に示す（詳細は本章第三節を参照）。中央ピリジン環においては、メチル基置換位置の最適化を行った。また、末端芳香環においては、置換基・置換位置の最適化に加え、ヘテロ環への変換及びビアリアル構造間へのリンカー挿入を行った。

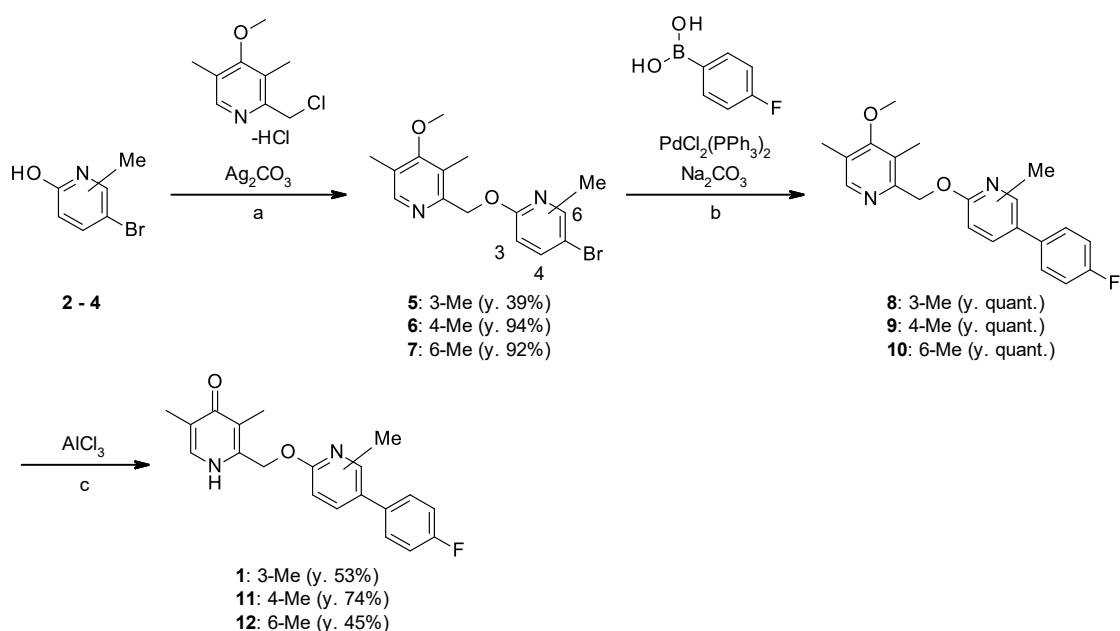


**Figure 11.** リード化合物 **1** からの合成展開

次節では、実際に合成した各種誘導体の合成法について述べる。

## 第二節 フォーカスライブラリ構築を目的とした化合物の合成法

リード化合物 **1** 及び化合物 **11**、**12** の合成法を **Scheme 1** に示す。まず、市販のヒドロキシピリジン誘導体 **2-4** を、炭酸銀共存下、2-クロロメチル-4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン塩酸塩を用いて *O*-アルキル化し、メチル基の置換位置が異なる **5-7** を得た。次に、これらの化合物を、それぞれ 4-フルオロフェニルボロン酸との鈴木カップリング反応に付すことで、カップリング体 **8-10** とした。最後に、塩化アルミニウムを用いてメチルエーテル部位のメチル基を除去し、リード化合物 **1** 及びメチル基の置換位置が異なる **11** 及び **12** を合成した。

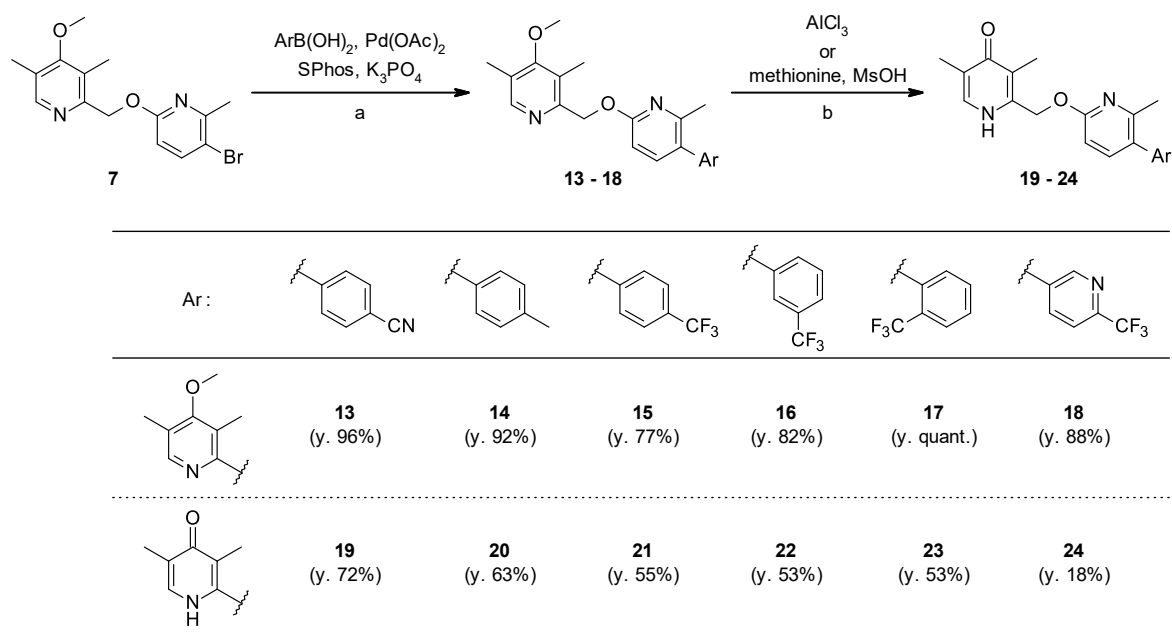


### Scheme 1. Synthesis of **1**, **11** and **12**

Reagents and conditions: (a) 2-(chloromethyl)-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine hydrochloride,  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ , toluene,  $110^\circ\text{C}$ , in the dark, 39–94%; (b) (4-fluorophenyl)boronic acid,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1,4-dioxane,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $90^\circ\text{C}$ , quant.; (c)  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 45–74%.

化合物 **19-24** は以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 2**)。まず、**Scheme 1** で得られた **7** に対し、市販されている種々のボロン酸試薬を鈴木カップリング反応にてカップリングし、**13-18** を得た。次に、得られた化合物に対し、**Scheme 1** と同様に塩化アルミニウムを用いたエーテル結合の切断を行い、**19**、**20**、**24** を合成した。この際、**Scheme 1** 中の **1**、**11**、**12** の合成の際にも一部見られた左部ベンジル部位の脱落が認めら

れ、基質によっては大幅な収率低下を引き起こしたことから、別条件下におけるエーテル結合の切断を検討した。その結果、メシル酸溶媒中、求核種としてメチオニンを加えて加熱することで、所望の脱メチル体 **21–23** を中程度の収率にて合成した。

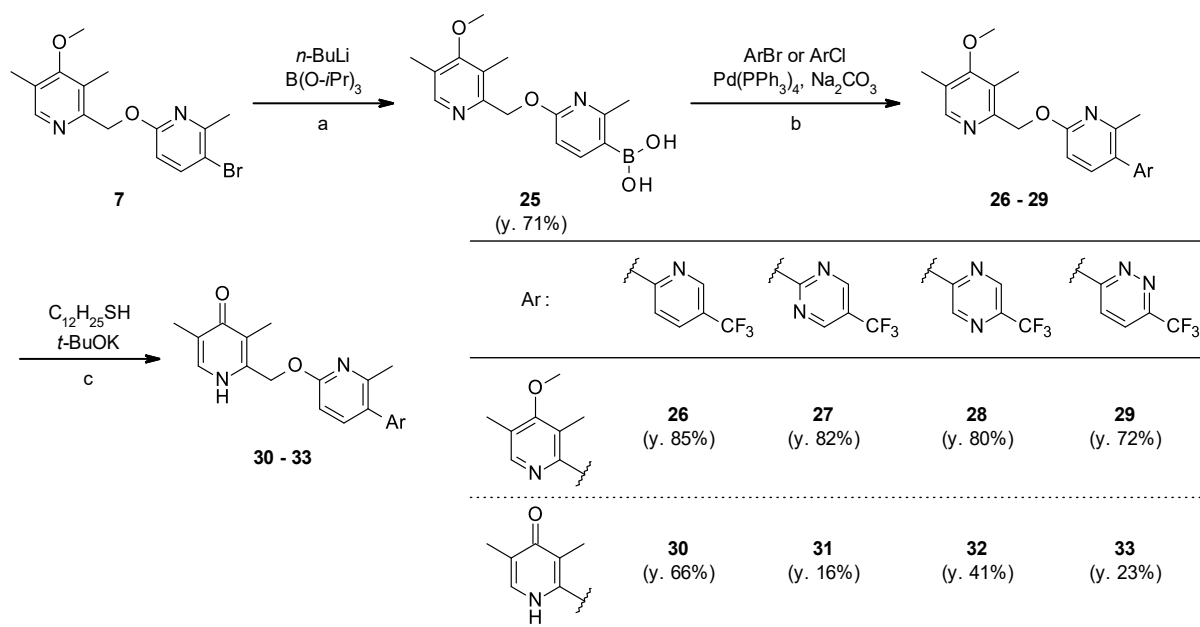


### Scheme 2. Synthesis of 19–24

Reagents and conditions: (a) ArB(OH)<sub>2</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, SPhos, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, toluene, H<sub>2</sub>O, 110°C, 77%–quant.; (b) **19**, **20**, **24**: AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 18–72%; **21–23**: methionine, MsOH, 90°C, 53–55%.

化合物 **30–33** は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 3)。一般に、含窒素ヘテロ芳香環の窒素隣接部位におけるボロン酸試薬は不安定であることが知られていることから<sup>45)</sup>、これらの化合物の合成においては、**7** をボロン酸へと変換し、ハロゲン化ヘテロ芳香環と鈴木カップリング反応を行うことで効率よく合成できると考えた。まず初めに、**7** を *n*-BuLi を用いてハロゲン–リチウム交換した後、ホウ酸試薬で生じたアニオンをトラップし、系中にてボロン酸エステルを加水分解することにより、所望のボロン酸 **25** を合成した。続いて、得られた **25** と、各種ハロゲン化ヘテロ芳香環とで鈴木カップリング反応を行ったところ、望み通り、所望のカップリング体 **26–29** を良好な収率で得た。最後に、得られた **26–29** に対し、メチルエーテル部のメチル基を除去することにより、**30–33** を合成した。メチルエーテル部の切断については、Scheme 1, 2 で用いた条件とは異なり、DMF 中、*t*-BuOK で活性化したドデカン-1-チオールを求核種として用いる条件を

試みた。しかしながら、これまでの条件と同様にいずれの基質においても望みの反応とベンジル部の脱落が並行して進行したため、収率は他条件と変わらず中程度となった。

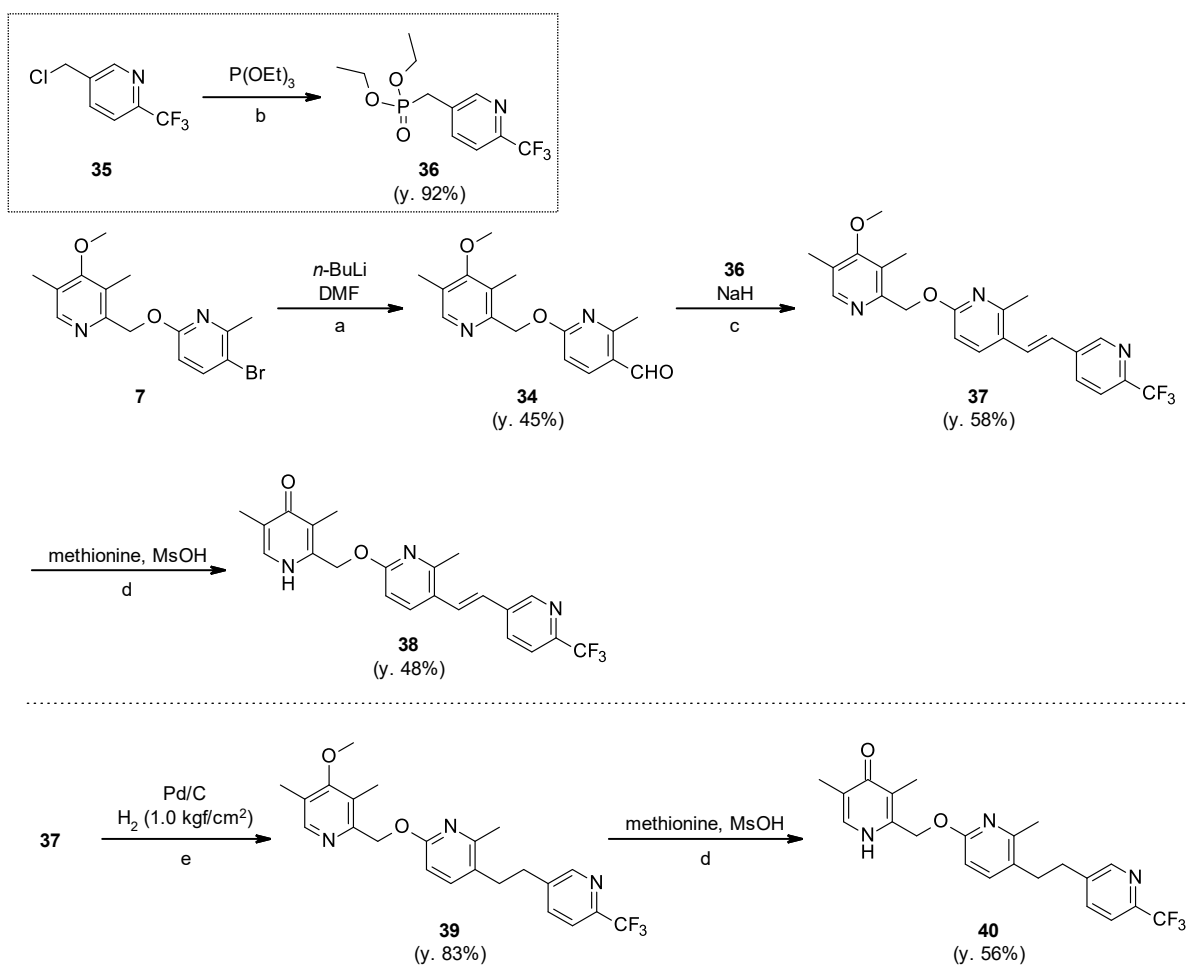


### Scheme 3. Synthesis of 30–33

Reagents and conditions: (a) *n*-BuLi (1.7 M in hexane), B(O-*i*Pr)<sub>3</sub>, THF, –62 to 0°C, 71%; (b) ArBr or ArCl, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-dioxane, H<sub>2</sub>O, 100°C, 72–85%; (c) dodecane-1-thiol, *t*-BuOK, DMF, r.t. to 60°C, 16–66%.

化合物 **38** 及び **40** は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 4)。まず、**7** を *n*-BuLi を用いてハロゲンリチウム交換した後、DMF を作用させることにより、アルデヒド **34** とした。次に、市販の **35** をホスホネート **36** へと変換した後、先に得られた **34** と Horner–Wadsworth–Emmons 反応<sup>46, 47)</sup> を行い、**37** を得た。得られた **37** を、Scheme 2 で用いたメチオニン・メシル酸条件を用いて脱メチル化し、**38** を合成した。また、**37** を水素添加反応に付すことにより **39** とし、得られた **39** を **37** と同様に脱メチル化することにより **40** を合成した。

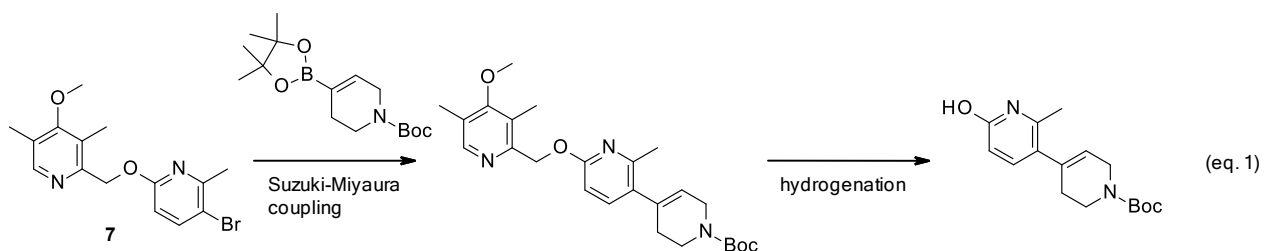




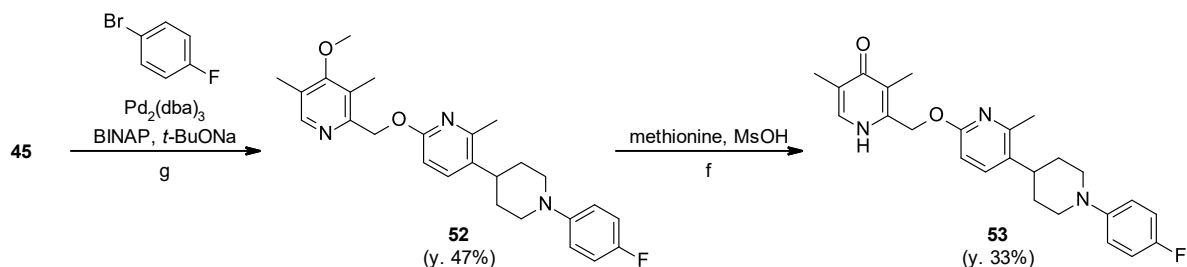
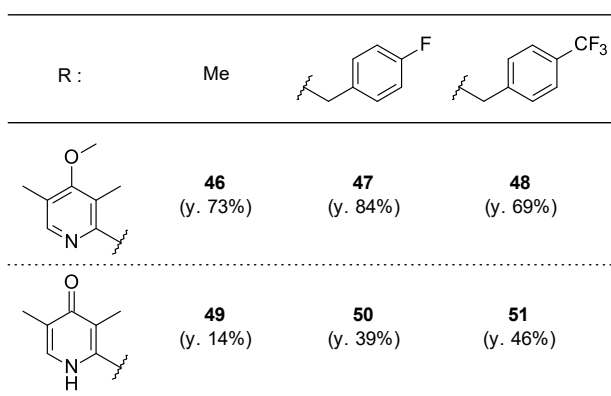
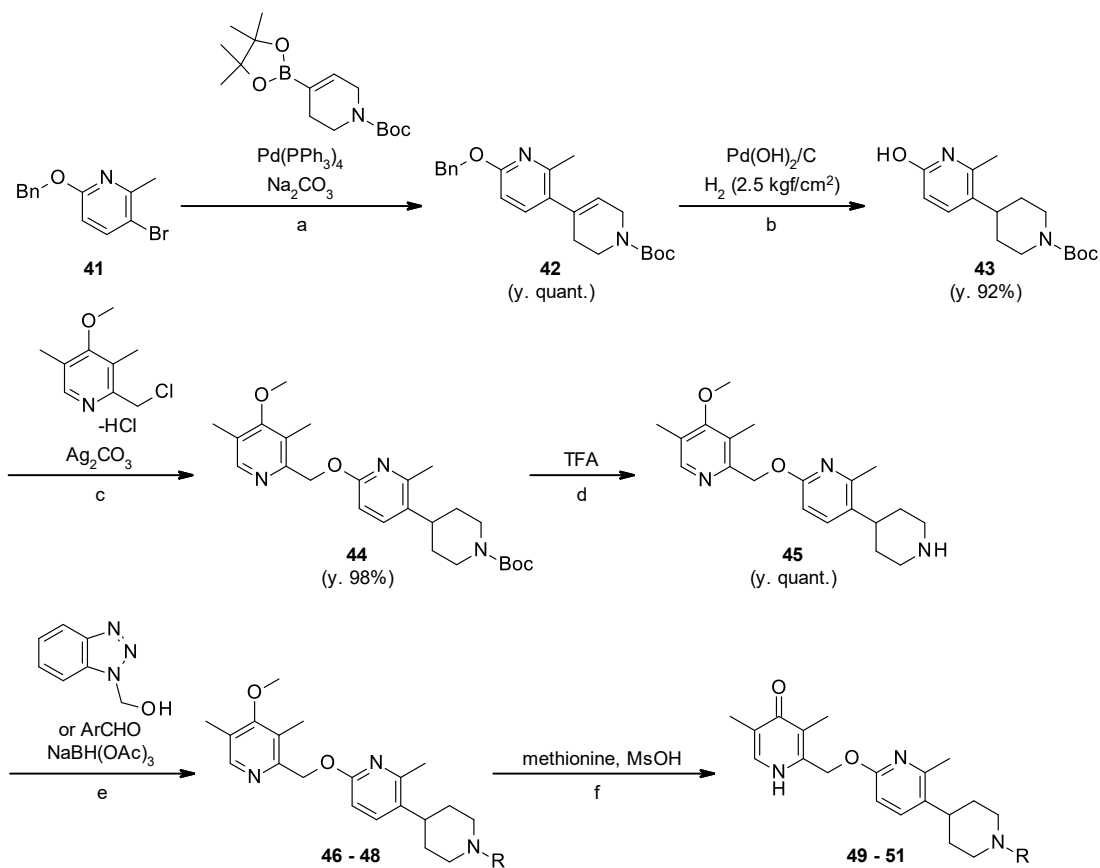
#### Scheme 4. Synthesis of 38 and 40

Reagents and conditions: (a) *n*-BuLi (1.7 M in hexane), THF,  $-64^\circ\text{C}$  then DMF,  $-63^\circ\text{C}$ , 45%; (b)  $\text{P(OEt)}_3$ ,  $150^\circ\text{C}$ , 92%; (c) 36, NaH, DME,  $0^\circ\text{C}$  to r.t., 58%; (d) methionine, MsOH,  $50^\circ\text{C}$ , 48–56%; (e) 10% Pd/C (wetted with approx. 50% water),  $\text{H}_2$  (1.0 kgf/cm<sup>2</sup>), THF, EtOH, r.t., 83%.

化合物 49–51 及び 53 は Scheme 5 に示す方法を用いて合成した。まず初めに、7 に対してテトラヒドロピリジンユニットを鈴木カップリング反応にて導入し、次いで内部オレフィンの水素添加反応で還元する手法での合成を試みた (eq. 1)。しかしながら、本合成法においては、常圧水素条件下で内部オレフィン還元反応の進行が遅く、水素加圧下ではベンジル位の還元による 4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジンユニットの脱落が優先し、所望の化合物を効率よく得ることが困難であったため、別法での合成に切り替えることとした。



そこで、文献既知化合物である **41**<sup>48)</sup> に対してテトラヒドロピリジンユニットを鈴木カップリング反応にて導入した後、水素加圧条件下にて保護基の除去及び内部オレフィンの還元を同時に行い、**43** とした (**Scheme 5**)。次いで、**Scheme 1** と同様に 4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジンユニットを導入し、Boc 基を除去して **45** を得た。最後に、**45** に対し、種々のアルデヒドを還元的アミノ化反応にて導入して **46-48** を得た後、**Scheme 2** 及び **Scheme 4** と同様の手法にて脱メチル化し、**49-51** を合成した。また、先に得られた **45** に対し 1-ブロモ-4-フルオロベンゼンを Buchwald-Hartwig 反応<sup>49, 50)</sup>にてカップリングし、同様に脱メチル化することで **53** を合成した。

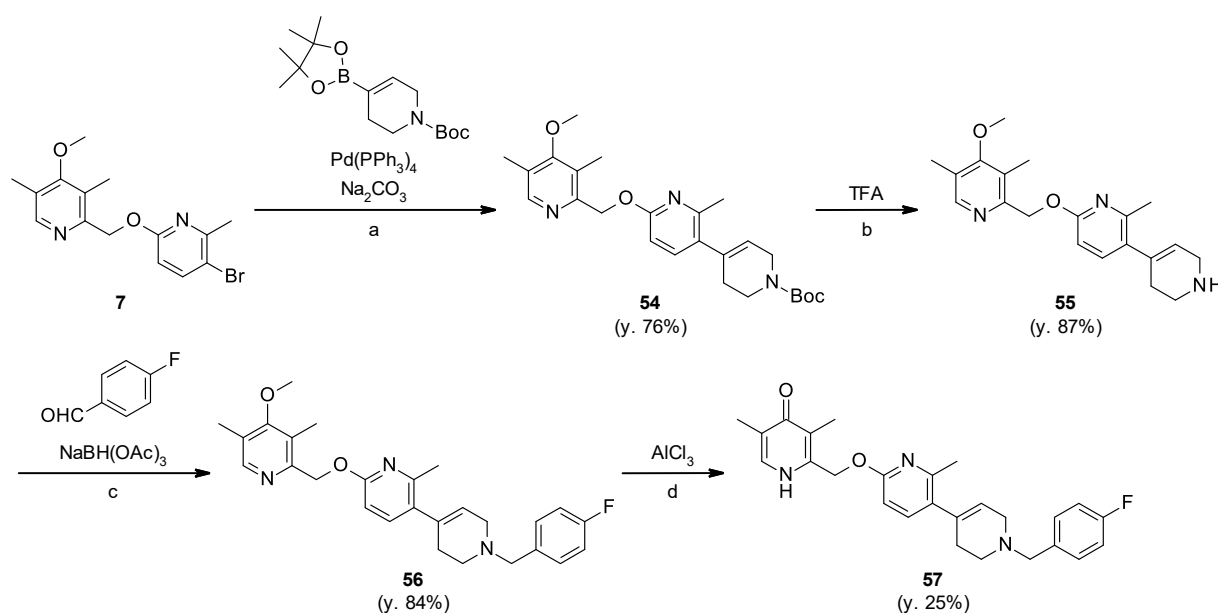


### Scheme 5. Synthesis of 49–51 and 53

Reagents and conditions: (a) *tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-dioxane, H<sub>2</sub>O, 100°C, quant.; (b) 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (wetted with approx. 50% water), H<sub>2</sub> (2.5 kgf/cm<sup>2</sup>), THF, MeOH, r.t., 92%; (c) 2-(chloromethyl)-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine hydrochloride, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,

toluene, 110°C, 98%; (d) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., quant.; (e) **46**: 1*H*-benzotriazol-1-ylmethanol, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, THF, EtOH, r.t., 73%; **47**, **48**: ArCHO, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 69–84%; (f) methionine, MsOH, 60°C, 14–46%; (g) 1-bromo-4-fluorobenzene, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, BINAP, *t*-BuONa, toluene, reflux, 47%.

化合物 **57** は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 6)。まず、鈴木カップリング反応を用いて、先に得られた **7** にテトラヒドロピリジンユニットを導入して **54** を得た後、Boc 基を除去して **55** とした。続いて、得られたアミン **55** と 4-フルオロベンズアルデヒドとを還元的アミノ化反応に付し、得られた **56** を Scheme 1 で用いた塩化アルミニウムの条件で脱メチル化することで、所望の **57** を合成した。



### Scheme 6. Synthesis of **57**

Reagents and conditions: (a) *tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-dioxane, H<sub>2</sub>O, 100°C, 76%; (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 87%; (c) 4-fluorobenzaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 84%; (d) AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 25%.

### 第三節 合成したライブラリ化合物のスクリーニング結果・考察

リード化合物 **1** を取得した際、アステラス製薬所有ライブラリ化合物スクリーニング結果より想定された **1** の周辺 SAR を以下に示す (Figure 12)。ピリドン部位に関しては、合成中間体であるメトキシ体が全く活性を示さなかったことから、3,5-ジメチルピリドン骨格は活性発現に重要であることが示唆された。また、中央ピリジン環については、その位置異性体において主活性の減弱傾向が見られたため、窒素原子の位置は主活性に重要であることが予想された。以上の予備情報から、まずは中央ピリジン環及び末端ベンゼン環の置換基変換に関する構造活性相関を取得することとした。

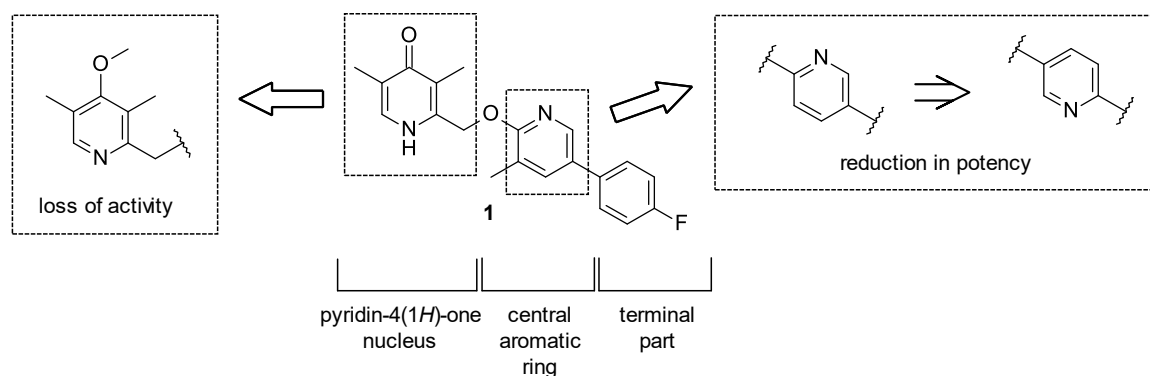
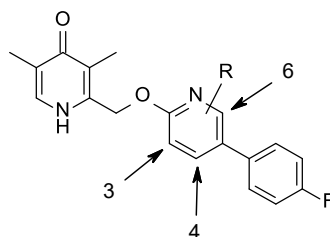


Figure 12. リード化合物 **1** の初期 SAR

まず、中央ピリジン環のメチル基の最適位置を探るべく、構造変換を行った (Table 3)。その結果、4-メチル体 **11** で3倍程度の主活性向上が認められ、さらに6-メチル体 **12** において10倍以上の主活性向上が認められた。

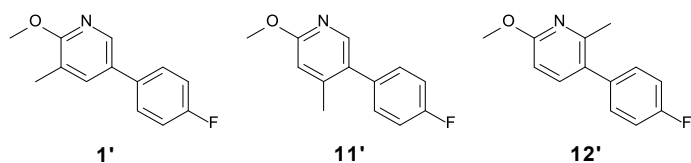
**Table 3.** SARs of Methyl Group-Substituted Derivatives



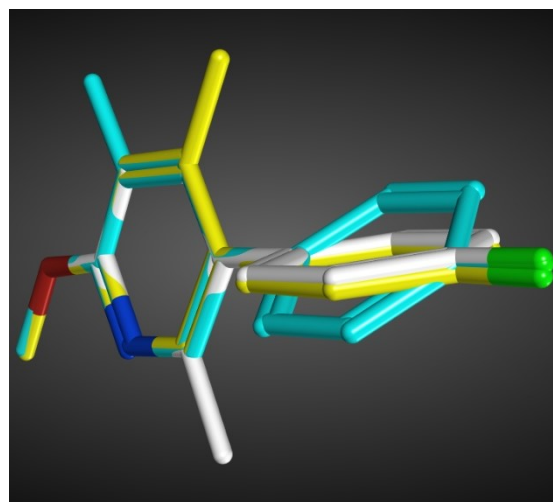
Compound	R	AMPK activation
		EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
<b>1</b>	3-Me	0.89
<b>11</b>	4-Me	0.28
<b>12</b>	6-Me	0.074

<sup>a</sup>The EC<sub>50</sub> values were examined by phospho-ACC whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment.

主活性向上におけるメチル基の効果を考察する目的で、各化合物の最安定構造を MOE<sup>51)</sup>を用いて計算した (Figure 13)。なお、計算を簡略化するため、共通構造である 3,5-ジメチルピリドン部位を除去したモデル化合物 **1'**、**11'**及び **12'**を発生させ、実際の計算を行った。各化合物の最安定構造に関してピアリール部分の二面角を算出したところ、オルト位にメチル基を持つ **11'**及び **12'**において、**1'**と比べて大きな二面角が認められた。このことから、高い主活性を示すのにピアリール部位が直交に近い構造を取ることが有効であることが示唆された。一方で、**11'**と **12'**は同程度の二面角であったため、**11**と **12**の主活性の差に影響する別要因があることが推測された。これら化合物の標的が不明であるため、これ以上詳細な考察は困難であるが、6位メチル基周辺に脂溶性ポケットが存在する可能性があると考えた。



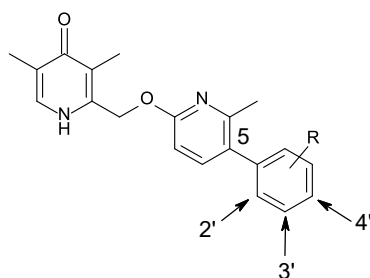
Compound	Dihedral angle (°)
<b>1'</b>	52.6
<b>11'</b>	81.4
<b>12'</b>	81.2



<sup>a</sup>Global minimum energy conformations and dihedral angles were calculated using MOE (ver. 2016.0802).<sup>51)</sup>

**Figure 13.** モデル化合物 **1'** (シアン)、**11'** (黄色) 及び **12'** (白) の最安定構造及び二面角 <sup>a</sup>

さらなる活性向上を目的とし、**12** の末端ベンゼン環の置換基変換を行った (**Table 4**)。フッ素基をシアノ基へと変換した **19** は、**12** と同程度の AMPK 活性化作用を示した。一方で、メチル基へと変換した **20** において主活性の向上が認められた。また、トリフルオロメチル基へと変換した **21** においてさらなる主活性の向上が認められた。ベンゼン環上の最適な置換位置を探る目的で、トリフルオロメチル基の位置を 4'位から 3'位及び 2'位へと移した化合物 **22**、**23** においては主活性の減弱が認められたことから、置換位置は 4'位が最適と考えられた。また、フッ素基と比較して脂溶性が増したトリフルオロメチル基の導入により主活性が向上したことから、4'位周辺は脂溶性を好む領域であることが示唆された。

**Table 4.** SAR of 5-Aryl-Type Compounds

Compound	R	AMPK activation
		EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
<b>12</b>	4'-F	0.074
<b>19</b>	4'-CN	0.089
<b>20</b>	4'-Me	0.018
<b>21</b>	4'-CF <sub>3</sub>	0.010
<b>22</b>	3'-CF <sub>3</sub>	0.19
<b>23</b>	2'-CF <sub>3</sub>	0.30

<sup>a</sup>The EC<sub>50</sub> values were examined by phospho-ACC whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment.

良好な主活性を示した **21** が得られたため、*in vivo* における高次評価を見据え、腸管 pH 付近における水溶性を評価した。一般に、腸管 pH 付近の水溶性が乏しい化合物は経口吸収性が乏しいことが知られているため<sup>52)</sup>、*in vivo* における評価を行うにあたり、被験化合物の当該 pH 付近での水溶性は良好であることが望まれる。評価の結果、残念ながら **21** の水溶性は著しく不良であることが分かり、*in vivo* での評価に適さないことが示唆された (**Table 5**)。そこで著者は、**21** の主活性を保持したまま腸管 pH 付近における水溶性の良好な化合物の創出に向け、さらなる構造変換を行うこととした。まず、**21** の水溶性が不良である要因を探るべく、化合物の脂溶性の指標である pH 7.4 における Log<sub>D</sub> (log<sub>D7.4</sub>) を測定した。その結果、**21** の log<sub>D7.4</sub> は 4.6 となり、高い値を示した。一般に、脂溶性の高さは水溶性不良の要因となることが知られており<sup>53)</sup>、脂溶性を低減し水溶性を改善する方法としてヘテロ原子の導入が挙げられる<sup>54)</sup>。そこで、著者は **21** の末端ベンゼン環に窒素原子を導入することによる主活性及び水溶性への影響を調べることにした (**Table 5**)。ピリジンへと変換した **24** 及び **30** では脂溶性が低減し、水溶性はある程度改善した。一方で、主活性が 3–5 倍程度減弱することが分かった。二つの窒素原子を導入したピリミジン **31** 及びピラジン **32** では、より脂溶性



が低下したが、水溶性は **24**、**30** と同程度であり、主活性はさらに減弱した。ピリダジンは、同様に二つの窒素原子を有するピリミジンやピラジンと比べて高い双極子モーメント及び  $pK_{HBX}$ 、 $pK_a$  を有し、これらの中で最も脂溶性が低くなることが知られている<sup>55)</sup>。著者が合成した **33** は本知見と同様の傾向を示し、これらの誘導体の中で最も低い脂溶性を示し、また、最も良好な水溶性を示した。しかしながら、**33** においては主活性の大幅な減弱が見られた。以上のことから著者は、末端ベンゼン環へのヘテロ原子導入による脂溶性の低減のみでは、水溶性の改善と主活性との両立が困難であると結論付けた。

**Table 5.** SAR of 5-Heteroaryl-Type Compounds

Compound	R	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	Measured logD <sub>7.4</sub>
<b>21</b>		0.010	< 1	4.6
<b>24</b>		0.034	7.8	3.2
<b>30</b>		0.042	9.6	3.3
<b>31</b>		0.10	6.3	3.0
<b>32</b>		0.098	3.8	2.8
<b>33</b>		1.1	22.8	2.1

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by phospho-ACC whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8).

芳香環と芳香環が直結したビアリール構造は、乏しい水溶性の要因の一つとして知られており、これまでに、本構造を回避することにより水溶性を改善する手法が報告されている<sup>56,57</sup>。ビアリール構造を解消する方法としては、スペーサーを導入する方法と片方の芳香環を飽和環へと変換する方法が考えられる。そこで著者は、本誘導体にこれらの手法をそれぞれ適応することによる、水溶性及び主活性への影響を調べることとした。

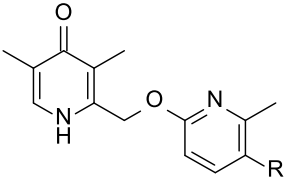
まず、**24** に対し二つの芳香環の間に二炭素分のスペーサーを導入した (**Table 6**)。その結果、*E*-オレフィンを導入した **38** 及びエチレンリンカーを導入した **40** では水溶性の改善は見られず、一方で主活性はわずかに減弱した。このことから著者は、炭素スペーサーの導入による水溶性改善と主活性の両立は困難であると結論付けた。

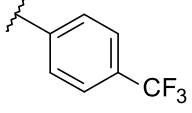
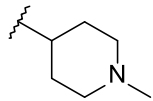
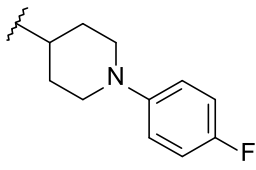
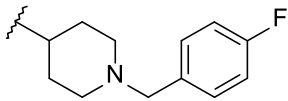
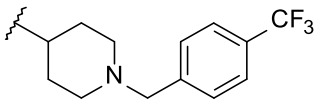
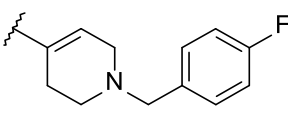
**Table 6.** SAR of Ethylene or Alkene Spacer Compounds

Compound	R	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	Measured logD <sub>7.4</sub>
<b>24</b>		0.034	7.8	3.2
<b>38</b>		0.13	< 1	3.9
<b>40</b>		0.13	2.7	3.2

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by phospho-ACC whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8).

次に、末端芳香環を飽和環へと変換することとした (Table 7)。化合物 **21** の末端ベンゼンを飽和化したシクロヘキサン誘導体の  $\log D$  を計算にて予測したところ、脂溶性が増大することが示唆された。脂溶性の増大は、それ自体が水溶性のさらなる低下をもたらすことが懸念されたため、著者は飽和環リンカーとして、窒素原子を含むピペリジンを設計した。窒素原子を付与することにより新たな極性部位 (アミン) が生じるため、このことも水溶性の改善に繋がることが期待された。このようにして設計された **49** は、残念ながら主活性が大きく減弱してしまったものの、期待通り、水溶性は大幅に改善することが分かった。そこで、**49** の水溶性を維持したまま主活性を向上させるため、さらなる SAR 探索を行った。その結果、**49** のメチル基を 4-フルオロフェニル基へと変換した **53** において、比較的高い活性が認められた。アニリンタイプの化合物である **53** は水溶性に乏しかったため、ベンジルアミンタイプの **50** を合成したところ、水溶性が大幅に改善した。一方で、**50** の主活性は **21** と比較してまだ 10 倍以上弱いものであったため、これまで得られた SAR を基に、主活性のさらなる向上を目的とした構造変換を行った。まず、末端ベンゼン環 4 位の置換基変換による主活性への影響を考慮し (Table 4: **12**⇒**21**)、**50** のフッ素基をトリフルオロメチル基へと変換した。その結果、合成した **51** の主活性はわずかながら向上した一方で、顕著な水溶性の低下が認められた。**51** は **50** と比較して  $\log D_{7.4}$  が大幅に増大していたことから、脂溶性の増大が水溶性の低下の要因と推測された。このことから、主活性と水溶性を両立するためには、脂溶性の増大を最小限に抑えると共に主活性を向上させる必要があると考えられた。そこで著者は、前述した二面角が主活性に与える影響に着目した。Figure 13 で述べた通り、中央ピリジン環と隣接する環の二面角が垂直に近づくことが主活性の向上につながることを示唆されている。著者は、完全な飽和環であるピペリジンに対して不飽和結合を導入することにより、中央ピリジン環とピペリジン環との間の二面角が垂直に近づき、分子が主活性にとって望ましい立体構造を取り得ると仮定し、テトラヒドロピリジンタイプの化合物を設計・合成した。その結果、合成した **57** は、良好な水溶性と高い主活性を示し、目的とする化合物プロファイルを満たすものであった。

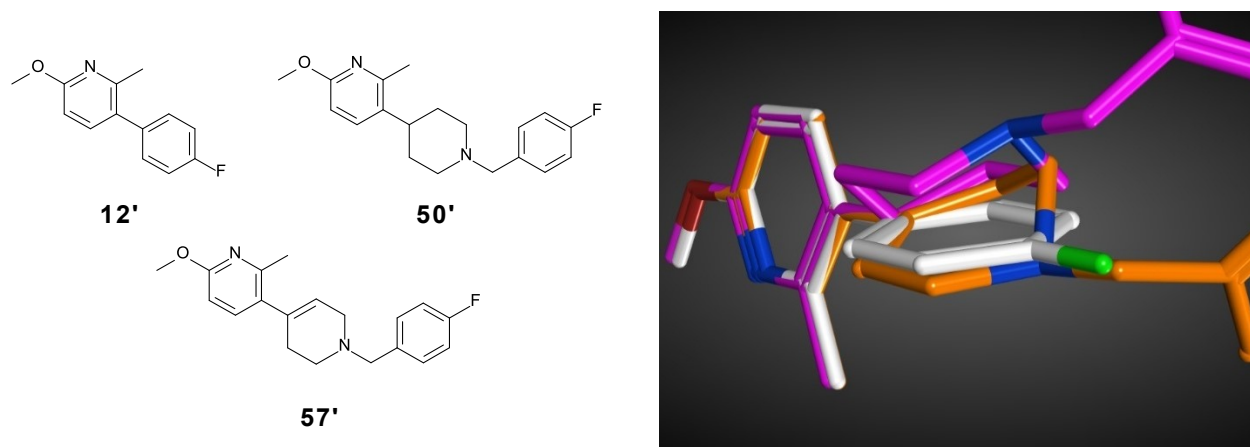
**Table 7.** SAR of Piperidine or Tetrahydropyridine-Type Compounds


Compound	R	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	Measured logD <sub>7.4</sub>
21		0.010	< 1	4.6
49		> 3	≥ 100	NT <sup>c</sup>
53		0.074	1.7	3.8
50		0.14	≥ 100	2.8
51		0.095	2.6	4.2
57		0.016	≥ 100	3.2

<sup>a</sup>The EC<sub>50</sub> values were examined by phospho-ACC whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup>Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>c</sup>NT: not tested.

不飽和結合導入による立体構造と主活性への影響を考察する目的で、各化合物の最安定構造を MOE を用いて計算した (Figure 14)。なお、Figure 13 と同様の理由で、共通構造である 3,5-ジメチルピリドン部位を除去したモデル化合物 **12'**、**50'** 及び **57'** について実際の計算を行った。各化合物の最安定構造を比較すると、

期待通り、不飽和結合の導入により最安定構造が変化し、**50'**と比較して、**57'**が**12'**と近いコンホメーションを取ることが支持された。



<sup>a</sup> Global minimum energy conformations were calculated using MOE (ver. 2016.0802)<sup>51</sup>.

**Figure 14.** モデル化合物 **12'** (白)、**50'** (紫) 及び **57'** (橙色) の最安定構造 <sup>a</sup>

最後に、主活性及び水溶性の良好な **57** について、MDA-MB-453 及び SK-BR-3 に対する細胞増殖阻害作用を評価した (**Table 8**)。その結果、**57** は **1** と比べ、AMPK 活性化作用の向上に伴った強力な細胞増殖阻害作用を示した。さらに **57** は、直接的 AMPK 活性化剤である AICAR と異なり、リード化合物 **1** と同様の選択性を以てヒト乳癌細胞の増殖を阻害した。

**Table 8.** *In Vitro* Activities of **57** Compared to Those of AICAR and **1**

Compound	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	MDA-MB-453 growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	SK-BR-3 growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
AICAR	NT <sup>c</sup>	1700	180
<b>1</b>	0.89	0.39	29% inh. at 1 μM
<b>57</b>	0.016	0.0058	13% inh. at 3 μM

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by phospho-ACC whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> The IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment. <sup>c</sup> NT: not tested.

#### 第四節 本章のまとめ

本章では、新規 AMPK 活性化剤の取得を目的とし、ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-453 を用いたフェノタイプアッセイを行った。その結果、既存の AMPK 活性化剤とは異なる構造を有し、且つ直接的 AMPK 活性化剤である AICAR とは異なる選択性でヒト乳癌細胞増殖阻害作用を示すリード化合物 **1** を取得した。

次に、主活性の向上を目的とし、リード化合物 **1** の構造変換を行った。その結果、主活性が 80 倍以上向上した化合物 **21** を見出した。活性向上の要因を考察すべく、鍵となる化合物のモデル構造を用いて MOE による最安定構造計算を行った。その結果、中央ピリジン部と末端ベンゼン環の二面角が活性向上に重要であることが示唆された。得られた **21** の水溶性を評価したところ、腸管 pH 付近の水溶性が著しく低く、*in vivo* におけるさらなる評価に適さないことが示唆された。

そこで、**21** の主活性を保持すると共に腸管 pH 付近における水溶性が改善した化合物の創出を目的とし、さらなる構造変換を行った。その結果、**21** と同等の主活性を有し、且つ腸管 pH 付近での水溶性に優れる化合物 **57** を見出した。**57** の発見においては、前述した中央ピリジン環とその隣接する環との二面角が活性向上に重要であるという知見から着想を得、ピペリジンをテトラヒドロピリジンへと変換することにより、脂溶性の増大を最小限に抑え、水溶性を損なうことなく主活性を向上させた。**57** は AMPK 活性化作用向上に伴い、フェノタイプスクリーニングにて見出した **1** と比較して 70 倍程度強力な細胞増殖阻害作用を示し、且つヒト乳癌細胞株である SK-BR-3 に対して、より明確な細胞選択性を示した。

一方で **57** は、薬物動態及び毒性の観点から *in vivo* におけるこれ以上の検証が困難であった。次章では新たなケモタイプからの合成展開・最適化研究による、開発化合物 **ASP4132** の創出について述べる。

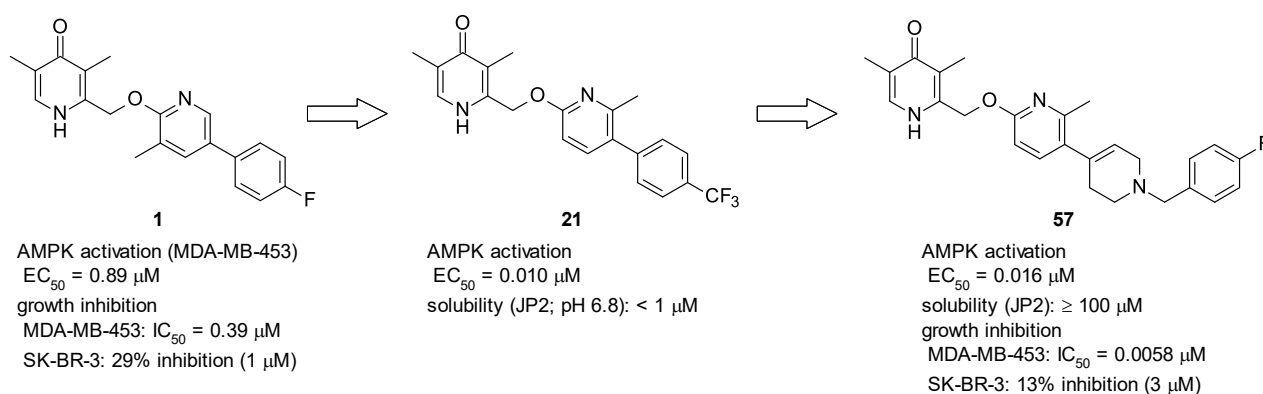


Figure 15. 第一章のまとめ

## 第二章 開発化合物 ASP4132 並びにその周辺化合物の合成及び構造活性相関

### 第一節 リード化合物とその課題

ヒト乳癌細胞株に対して特徴的な選択性を示す非直接的 AMPK 活性化剤について *in vivo* における薬理作用の検証を進めるべく、著者は、第一章にて述べた 3,5-ジメチルピリジン-4(1*H*)-オン骨格化合物群とは異なる構造を有し、ヒト乳癌細胞において AMPK 活性化作用を示す化合物として、両末端にベンジルアミンを有する化合物 **58** に着目した (Figure 16)。本化合物は第一章にて述べたリード化合物 **1** と同様に、アステラス製薬所有ライブラリ化合物に対し、MDA-MB-453 細胞を用いた whole cell ELISA アッセイによるフェノタイプスクリーニングを行うことにより見出された化合物である。

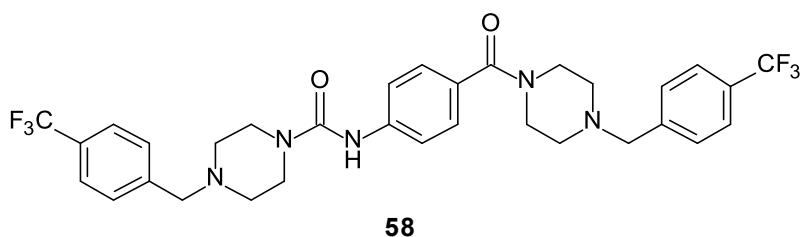
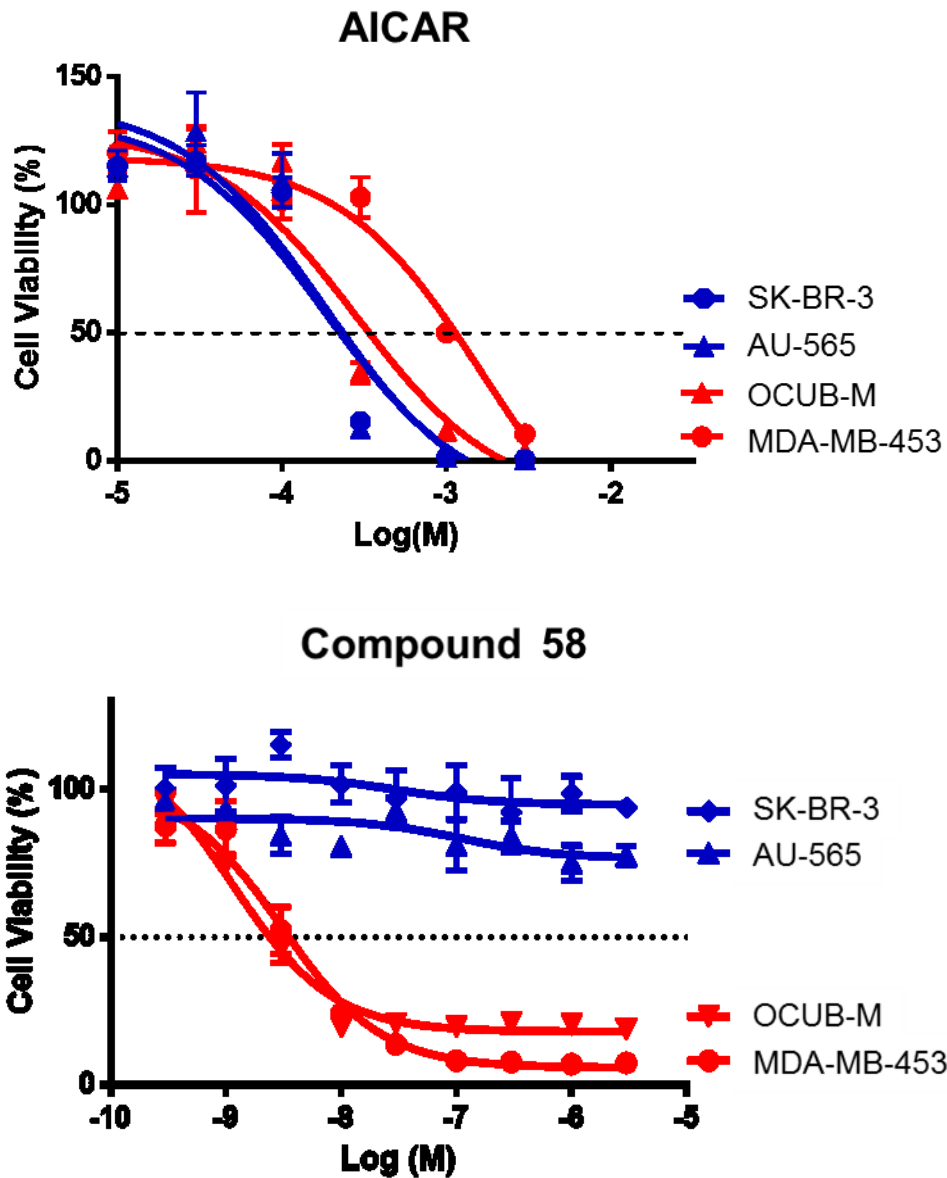


Figure 16. 化合物 **58** の構造

化合物 **58** のヒト乳癌細胞株に対する細胞増殖阻害選択性を AICAR と比較する目的で、複数のヒト乳癌細胞株を用いて細胞増殖阻害作用を評価した (Figure 17)。その結果、直接的 AMPK 活性化剤である AICAR が全ての細胞株に対して増殖阻害作用を示したのに対し、**58** は高感受性株 (MDA-MB-453、OCUB-M) と低感受性株 (SK-BR-3、AU-565) が確認され、前述のリード化合物 **1** をはじめとする一連の誘導体と同様に細胞株選択的な増殖阻害作用を示すことが明らかとなった。第一章において述べたことと同様に、既知の AMPK 活性化剤に見られない特徴的なフェノタイプを有する本化合物群は、これまでにない乳癌患者層に対するプレジジョンメディシンに繋がる可能性を示していると考えられた。



\* Each cell viability data point was determined in triplicate in one experiment.

Figure 17. AICAR (top)及び化合物 58 (bottom)の複数のヒト乳癌細胞株に対する増殖阻害作用の比較

以上の結果から、58 は新たなリード化合物として十分なプロファイルを有すると考えられたため、*in vivo* 薬理評価を含むさらなる評価に向けた課題を抽出する目的で、*in vitro* における種々の薬理・非薬理作用を評価した (Table 9)。その結果、58 は強力な AMPK 活性化作用及び選択的かつ強力な細胞増殖阻害作用を示す一方で、腸管 pH 付近における水溶性に乏しく、ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性において改善の余地があることが分かった。



次に、これら課題の解決方法を探るべく、脂溶性の指標となる化合物の  $\log P$  値を計算した。その結果、**58** は、脂溶性に富んだ化合物であることが予測された ( $\text{clog}P=4.6$ )。 **58** は、*in vitro* における薬理活性において十分に強力な作用を有することから、著者は、**58** の主活性を大きく損なうことなく非薬効薬理面の課題を解決することが、有望な化合物の創製に繋がると考えた。

**Table 9.** *In Vitro* Profiles of Compound **58**<sup>58)</sup>

AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	MDA-MB-453 growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	SK-BR-3 growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg) <sup>c</sup>	Aqueous solubility (μM) <sup>d</sup> JP1 JP2 JP2+TC	cLogP <sup>e</sup>	calc. most basic pKa <sup>e</sup>
				≥ 100		
0.0079	0.0030	> 3	158	< 1	4.6	5.5
				< 1		

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> value was examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> The IC<sub>50</sub> value was determined in triplicate in one experiment. <sup>c</sup> *In vitro* intrinsic clearance with human liver microsomes in the presence of a NADPH-generating system. <sup>d</sup> Aqueous solubility in JP1 (pH 1.2) and JP2 (pH 6.8). <sup>e</sup> pKa and clogP values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup>

そこで著者は、これらの課題を解決し得る化合物の創出を目的としたフォーカスライブラリを構築することとした。ライブラリ構築のためのリード化合物 **58** からの合成展開概略を **Figure 18** に示す（後述する、合成展開中に新たに生じた課題の解決を目的とした化合物群を一部含む。詳細は本章第三節を参照）。左端ベンゼン環においては、パラ位置置換基の最適化、及びヘテロ環への変換を行った。また、ピペラジン環においては、ホモピペラジン環への変換による対称構造の解消、並びにピペリジン環への変換による塩基性調整を行った。さらに、中央ベンゼン環においては、置換位置の変更やベンゼン環の除去による対称構造の解消、及び隣接するアニリン性アミド結合のヘテロ環への変換、また、中央ベンゼン環との縮環によるベンゾイミダゾールへの変換を行った。

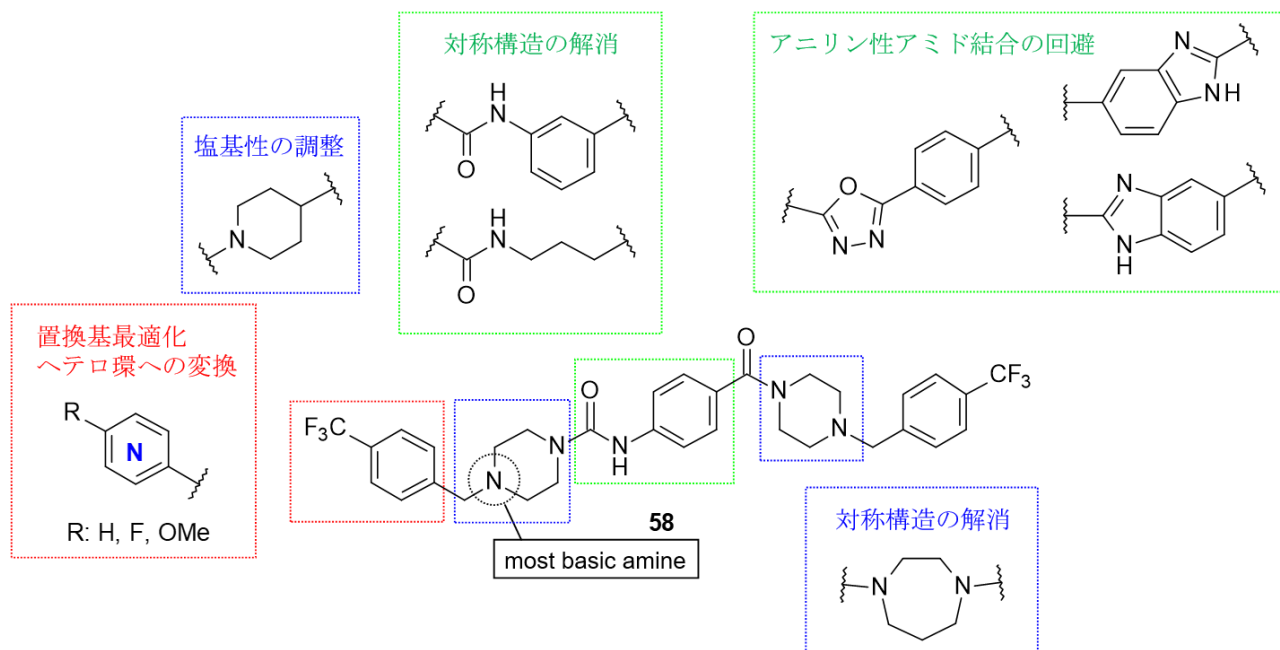
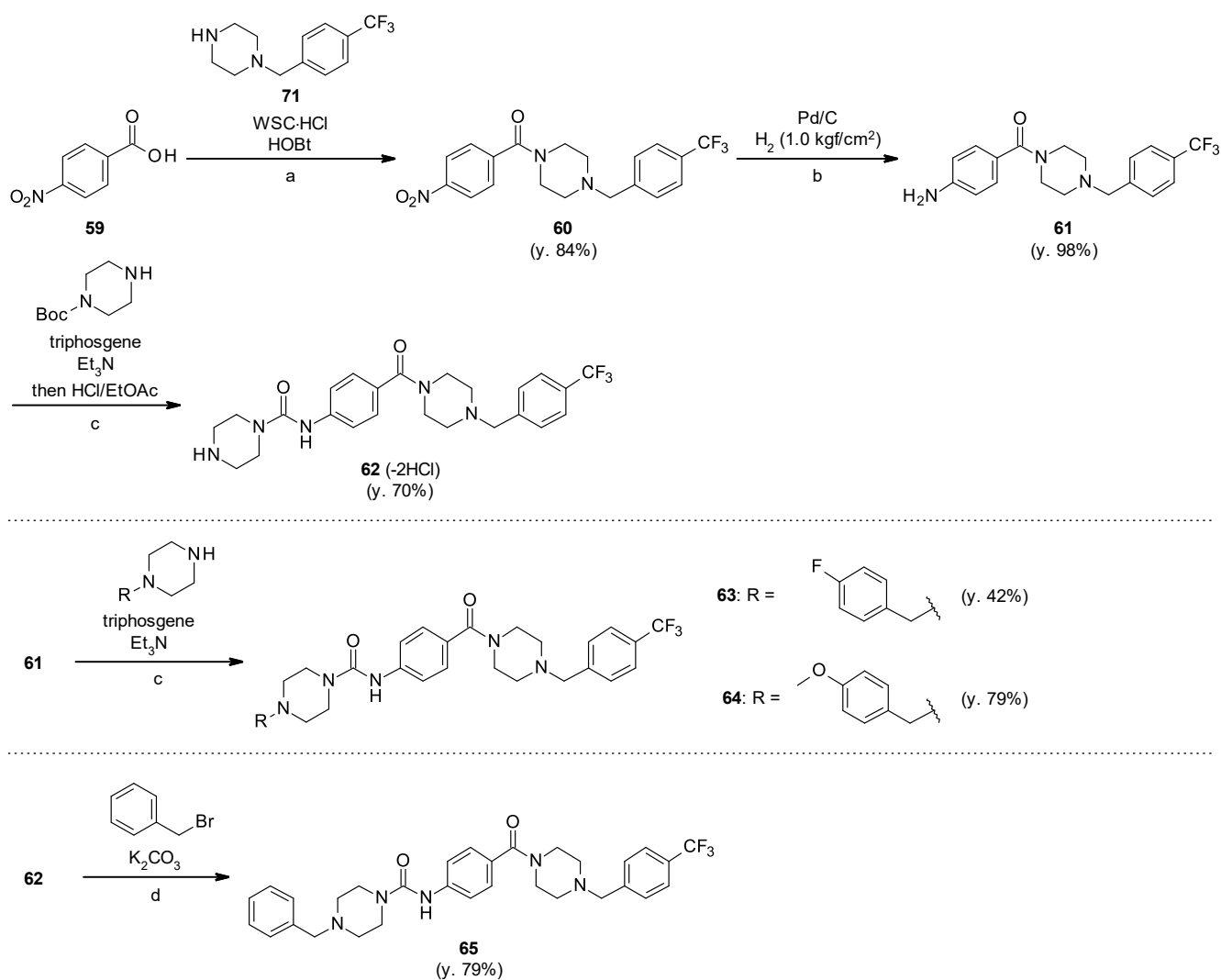


Figure 18. リード化合物 58 からの合成展開

次節では、実際に合成した各種誘導体の合成法について述べる。

## 第二節 フォーカスライブラリ構築を目的とした化合物の合成法

化合物 **62–65** は以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 7**)。まず、市販の **59** と **71** を縮合して **60** とした後、ニトロ基を水素添加反応にて還元し、**61** を得た。次に、得られた **61** に対し、トリエチルアミン共存下にてトリホスゲンを作用させてイソシアナートとした後、1-Boc-ピペラジンを加えてウレア結合を形成した。その後、酸性条件下にて Boc 基を除去し、**62** を合成した。また、**63** 及び **64** は、**62** の合成と同様、**61** にトリホスゲンを作用させた後、それぞれ対応するベンジルピペラジンを付加することにより合成した。さらに、**65** は、塩基性条件下にて **62** をベンジル化することで合成した。

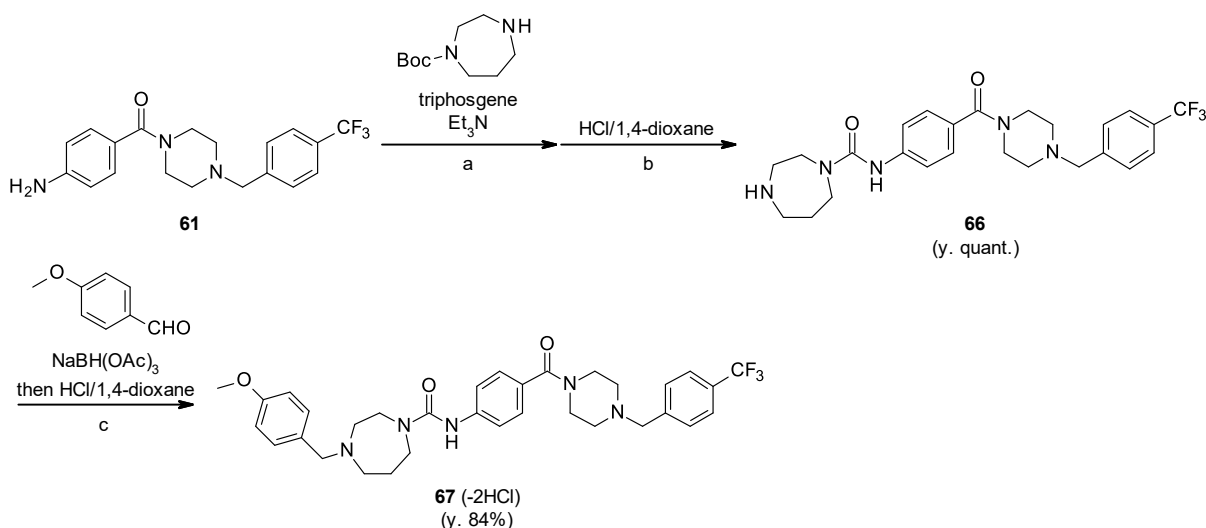


### Scheme 7. Synthesis of **62–65**

Reagents and conditions: (a) 1-[(4-(trifluoromethyl)phenyl)methyl]piperazine (**71**), WSC·HCl, HOBt, DMF, r.t., 84%;

(b) 10% Pd/C, H<sub>2</sub> (1.0 kgf/cm<sup>2</sup>), EtOAc, r.t., 98%; (c) **62**: triphosgene, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 to 60°C, then *tert*-butyl piperazine-1-carboxylate, r.t., then 4.0 M HCl in EtOAc, EtOAc, MeOH, r.t., 70%; **63**: triphosgene, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 to 60°C, then 1-[(4-fluorophenyl)methyl]piperazine, r.t., 42%; **64**: triphosgene, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 to 60°C, then 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperazine, r.t., 79%; (d) benzyl bromide, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, r.t., 79%.

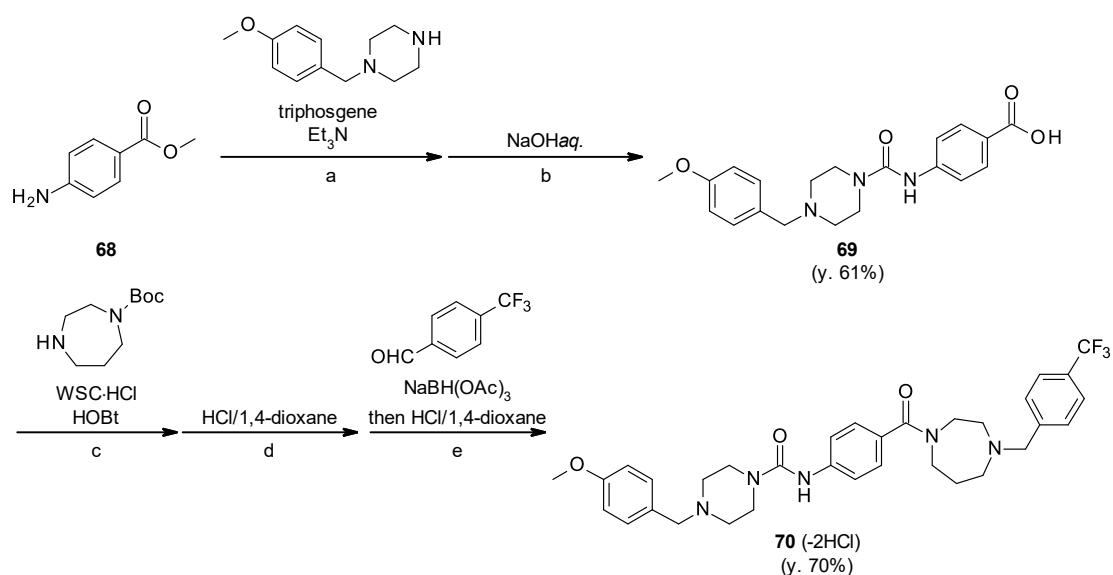
化合物 **67** は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 8)。まず、Scheme 7 にて得られた **61** を同様の条件にてイソシアナートとした後、1-Boc-ホモピペラジンを作用させた。続いて、酸性条件下にて Boc 基を除去し、**66** とした。最後に、**66** と 4-メトキシベンズアルデヒドとを還元的アミノ化反応に付し、造塩工程を経て **67** を合成した。



### Scheme 8. Synthesis of **67**

Reagents and conditions: (a) triphosgene, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 to 60°C, then *tert*-butyl 1,4-diazepane-1-carboxylate, r.t.; (b) 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., quant. for 2 steps; (c) 4-methoxybenzaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., 84%.

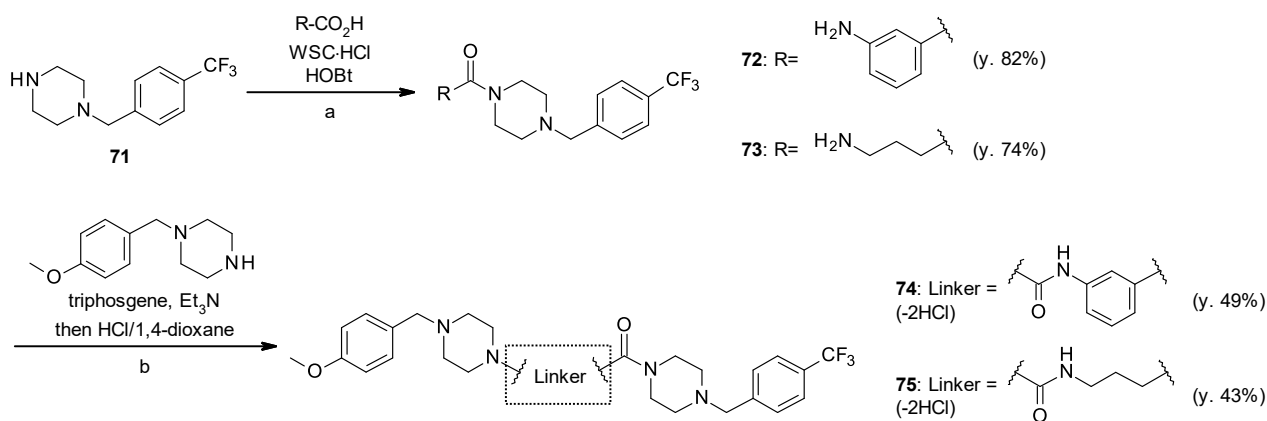
化合物 **70** は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 9)。初めに、市販の **68** をトリエチルアミン共存下、トリホスゲンにてイソシアナートとした後、4-メトキシベンジルピペラジンを作用させた。続いて、塩基性条件下、エステル部を加水分解することで **69** を得た。さらに、得られた **69** と 1-Boc-ホモピペラジンを縮合した後、酸性条件下にて Boc 基を除去した。最後に、得られたアミンと 4-トリフルオロメチルベンズアルデヒドとを還元的アミノ化反応に付し、造塩工程を経て **70** を合成した。



### Scheme 9. Synthesis of 70

Reagents and conditions: (a) triphosgene, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 to 60°C, then 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperazine, r.t.; (b) 1.0 M NaOHaq., MeOH, 60°C, 61% for 2 steps; (c) *tert*-butyl 1,4-diazepane-1-carboxylate, WSC·HCl, HOBt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (d) 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t.; (e) 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., 70% for 3 steps.

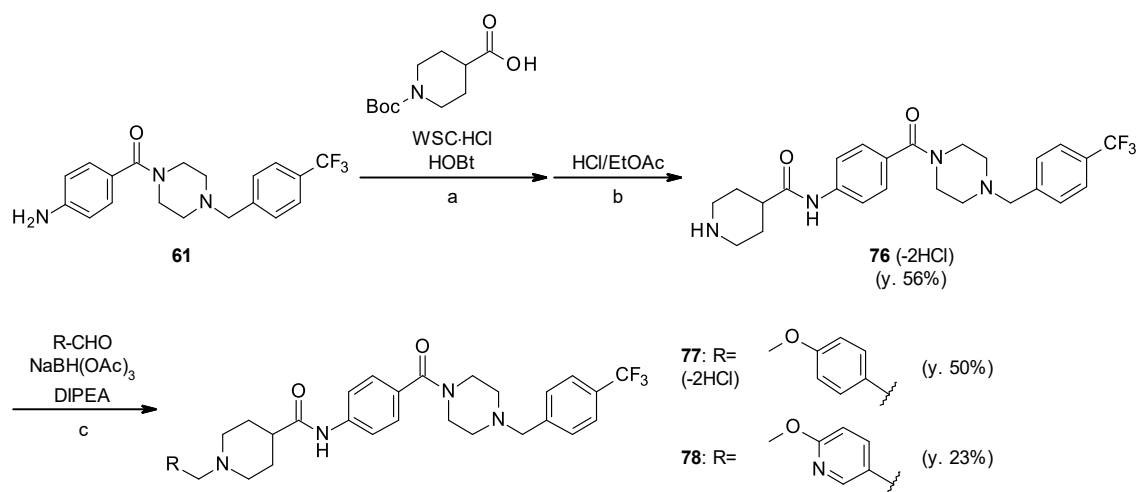
化合物 **74**、**75** は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 10)。まず、市販の **71** と 3-アミノ安息香酸を縮合することで **72** を得た。また、同様に **71** と 4-アミノ酪酸 Boc 保護体とを縮合した後、酸性条件下にて Boc 基を除去して **73** を得た。最後に、得られたそれぞれのアミンを Scheme 7-9 と同様の条件にてイソシアナートとした後、4-メトキシベンジルピペラジンを作用させてウレア結合を形成し、造塩工程を経て **74**、**75** を合成した。



### Scheme 10. Synthesis of 74 and 75

Reagents and conditions: (a) **72**: 3-aminobenzoic acid, WSC·HCl, HOBt, DMF, r.t., 82%; **73**: 4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]butanoic acid, WSC·HCl, HOBt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH r.t., 74% for 2 steps; (b) triphosgene, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 to 60°C, then 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperazine, r.t., then 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., 43–49%.

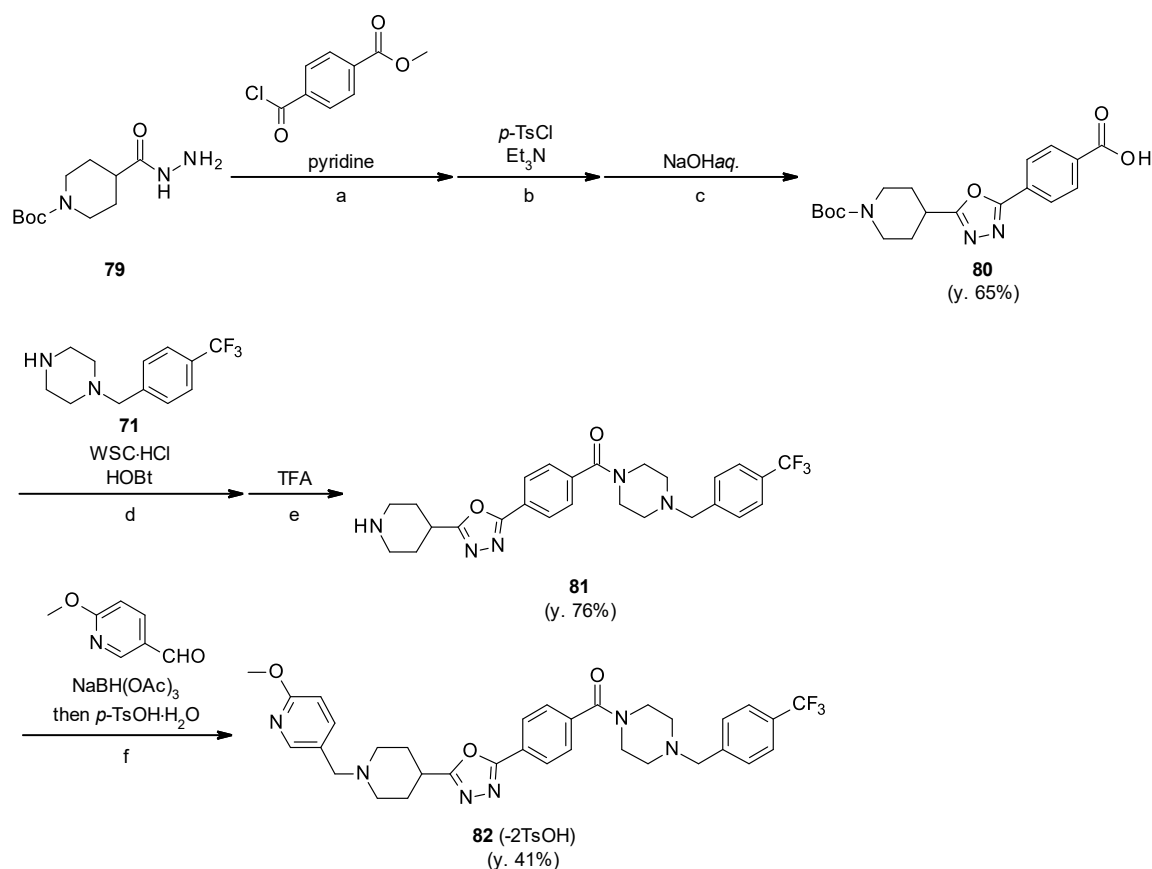
化合物 **77**、**78** は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 11)。まず初めに、Scheme 7 にて得られた **61** をピペリジン-4-カルボン酸 Boc 保護体と縮合し、酸性条件下にて Boc 基を除去して **76** を得た。次に、得られた **76** と 4-メトキシベンズアルデヒドとを還元的アミノ化反応に付し、造塩工程を経て **77** を合成した。同様に、対応するアルデヒドと **76** とを還元的アミノ化反応に付すことで、**78** を合成した。



### Scheme 11. Synthesis of 77 and 78

Reagents and conditions: (a) 1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidine-4-carboxylic acid, WSC·HCl, HOBt, DMF, r.t.; (b) 4.0 M HCl in EtOAc, EtOAc, MeOH, r.t., 56% for 2 steps; (c) **77**: 4-methoxybenzaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, DIPEA, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then 4.0 M HCl in EtOAc, MeOH, r.t., 50%; **78**: 6-methoxypyridine-3-carbaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, DIPEA, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 23%.

化合物 **82** は以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 12**)。まず初めに、市販の **79** を、対応する酸塩化物を用いてアシル化した後、塩化トシルを用いて 1,3,4-オキサジアゾール環を構築した。次に、塩基性条件下、エステル部を加水分解して **80** を得た。続いて、**80** と **71** とを縮合した後、酸性条件下にて Boc 基を除去し、**81** とした。最後に、**81** と 6-メトキシピリジン-3-カルバルデヒドとを還元的アミノ化反応に付し、造塩工程を経て **82** を合成した。

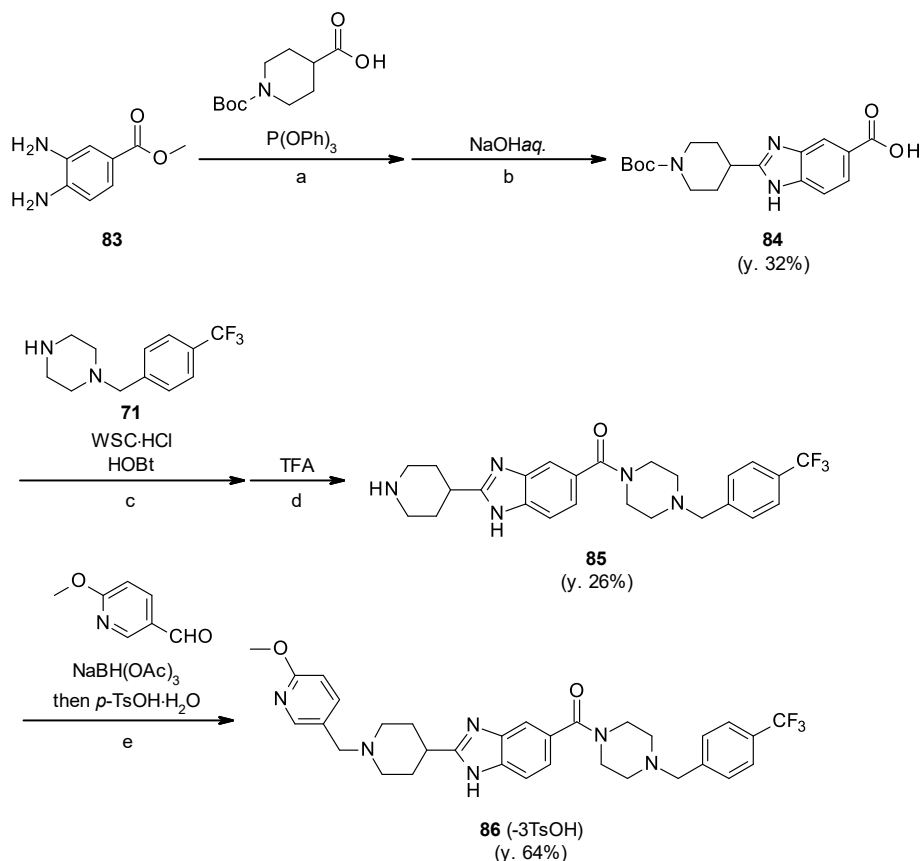


### Scheme 12. Synthesis of **82**

Reagents and conditions: (a) methyl 4-(chlorocarbonyl)benzoate, pyridine, THF, 0°C to r.t.; (b) *p*-TsCl, Et<sub>3</sub>N, DCE, r.t.; (c) 8.0 M NaOH<sub>aq.</sub>, THF, MeOH, r.t., 65% for 3 steps; (d) **71**, WSC·HCl, HOBT, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (e) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 76% for 2 steps; (f) 6-methoxypyridine-3-carbaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, acetone, r.t., 41%.

化合物 **86** は以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 13**)。まず、市販の **83** とピペリジン-4-カルボン酸 Boc 保護体とを亜リン酸トリフェニル中にて加熱還流してベンゾイミダゾール環を構築した後、エステル部

を加水分解して **84** とした。続いて、得られた **84** に対し、**71** との縮合及び Boc 基の除去を経て **85** を得た後、6-メトキシピリジン-3-カルバルデヒドとの還元的アミノ化反応、及び造塩工程を経て **86** を合成した。

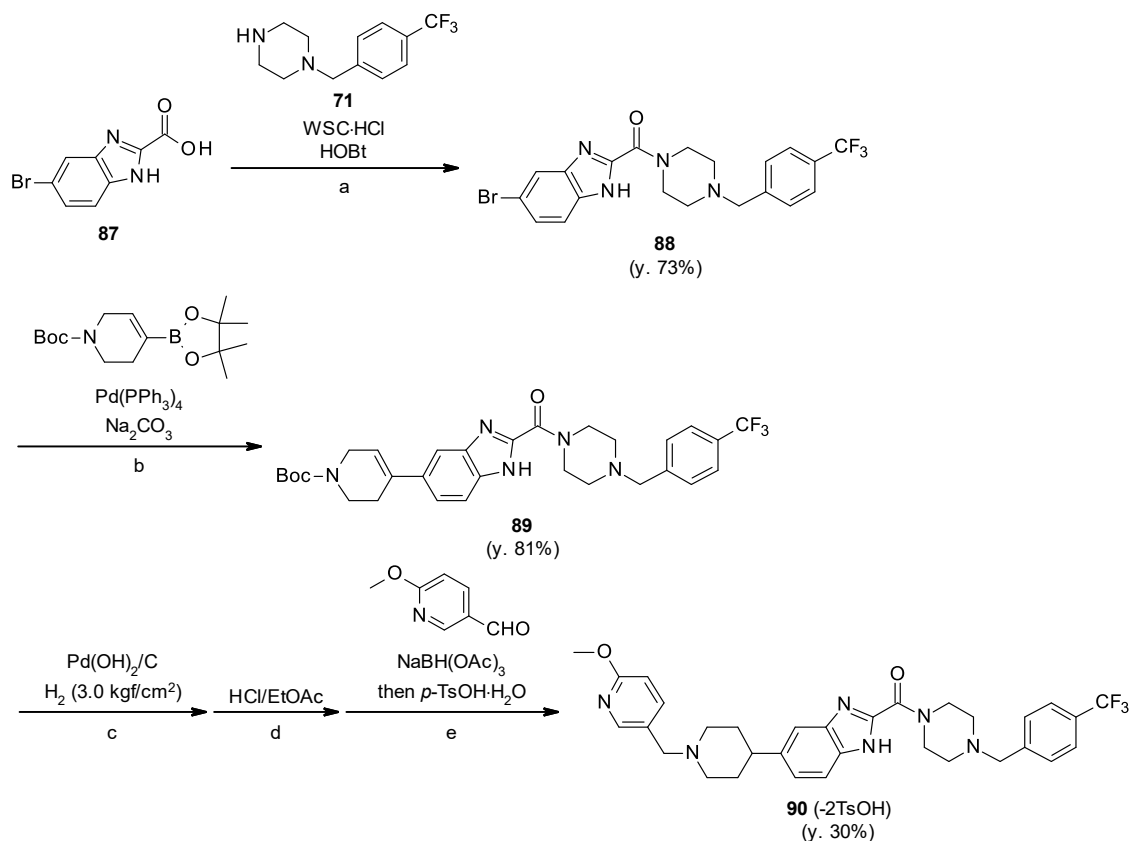


### Scheme 13. Synthesis of **86**

Reagents and conditions: (a) 1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidine-4-carboxylic acid, pyridine, P(OPh)<sub>3</sub>, reflux; (b) 1.0 M NaOH aq., MeOH, 55°C, 32% for 2 steps; (c) **71**, WSC·HCl, HOBt, DMF, r.t.; (d) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 26% for 2 steps; (e) 6-methoxypyridine-3-carbaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, acetone, r.t., 64%.

化合物 **90** は以下に示す方法を用いて合成した (Scheme 14)。まず初めに、市販の **87** と **71** とを縮合して **88** とした後、対応するボロン酸誘導体を用いて鈴木カップリング反応を行い、**89** を得た。続いて、パラジウム触媒を用いた中圧水素添加反応にて内部オレフィンを還元し、酸性条件下、Boc 基を除去した。最後に、得られたアミンと 6-メトキシピリジン-3-カルバルデヒドとを還元的アミノ化反応に付し、造塩工程を経て **90** を合成した。





#### Scheme 14. Synthesis of 90

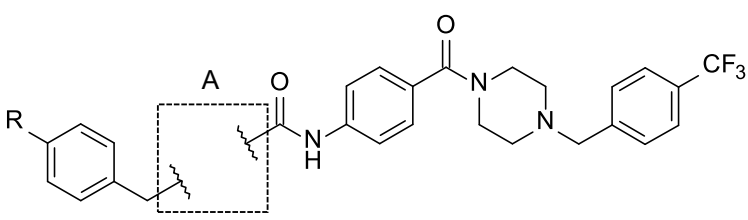
Reagents and conditions: (a) **71**, WSC·HCl, HOBT, DMF, r.t., 73%; (b) *tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-dioxane, H<sub>2</sub>O, 95°C, 81%; (c) 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (wetted with approx. 50% water), H<sub>2</sub> (3.0 kgf/cm<sup>2</sup>), MeOH, r.t.; (d) 4.0 M HCl in EtOAc, EtOAc, r.t.; (e) 6-methoxypyridine-3-carbaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, acetone, r.t., 30% for 3 steps.

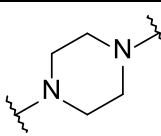
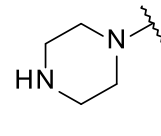
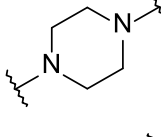
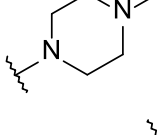
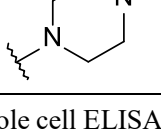
### 第三節 合成したライブラリ化合物のスクリーニング結果・考察

一般に、脂溶性が高い化合物に対して極性官能基を導入し、分子の脂溶性を低減することにより水溶性が改善することが知られているため<sup>60, 61)</sup>、著者は、脂溶性が高い化合物 **58** に対しても同様の戦略が有効であると考えた。一方で、化合物への極性官能基の導入は、化合物と標的分子との本来の相互作用が損なわれることにより主活性が減弱する、あるいは、極端な脂溶性の低減によって細胞膜透過性が損なわれることにより細胞活性が減弱するなど、薬理活性に対して負の影響が生じることがしばしば問題となる<sup>62)</sup>。そこで著者は、脂溶性の低減に頼らず水溶性を改善する戦略を合わせて進めることとした。近年、橋本らによって化合物の対称構造を解消することによって結晶性を低下させ、脂溶性を大きく変動させることなく水溶性を改善する手法が報告されている<sup>62)</sup>。リード化合物である **58** は構造的に対称性に富む特徴を有していたため、著者は対称構造の解消を水溶性改善に向けたもう一つの戦略とすることとした。

まず初めに、著者は **58** の脂溶性を低減した化合物を設計・合成した。**Table 10** に、置換基 R 及び A 部を変換した化合物について、主活性・水溶性の評価結果及び脂溶性の計算値を示す。トリフルオロメチルベンジル基を除去した **62** は脂溶性が大きく低下し、水溶性が大幅に改善した一方で、薬理活性である AMPK 活性化作用が大幅に減弱した。**58** から脂溶性置換基であるトリフルオロメチル基を除去した **65** も同様に、脂溶性が低下して水溶性が改善した一方で、主活性が 3 倍程度減弱することが分かった。また、**58** の R 部のトリフルオロメチル基をフッ素基に置換した **63** においても、**65** と同様の傾向が見られた。一方で、R 部にメトキシ基を導入した **64** では、主活性を損なうことなく脂溶性が低減し、それに伴い水溶性の改善も見られた。以上のことから、A 部の側鎖であるベンジル基が強力な AMPK 活性化作用の維持に重要であることが分かった。また、ベンゼン環上の置換基としてはメトキシ基が主活性及び水溶性において最もバランスの取れたものであることを見出した。

**Table 10.** AMPK Activation Activity and Aqueous Solubility of **62–65** Compared to Those of **58**



Compound	R	A	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	cLogP <sup>c</sup>
<b>58</b>	CF <sub>3</sub>		0.0079	< 1	4.6
<b>62<sup>d</sup></b>	-		> 3	≥ 100	2.4
<b>65</b>	H		0.027	12	3.7
<b>63</b>	F		0.022	3.1	3.8
<b>64</b>	OMe		0.0047	6.0	4.0

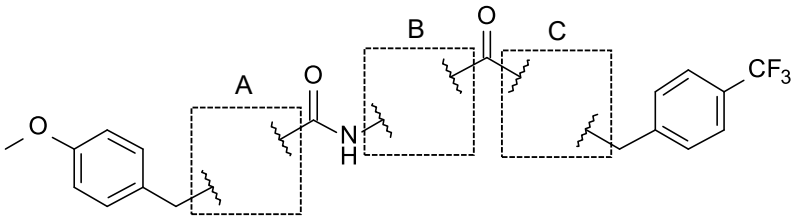
<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>c</sup> clogP values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>d</sup> Dihydrochloride.

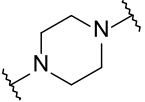
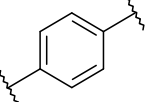
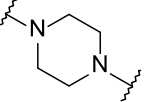
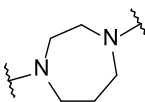
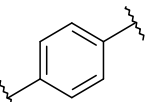
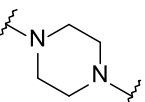
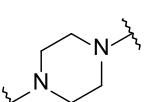
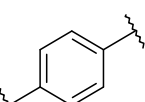
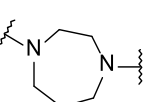
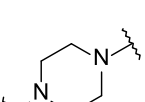
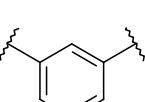
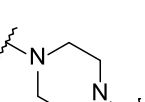
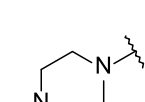
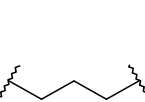
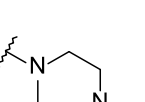
続いて、化合物 **64** に対し、対称構造を解消することによる水溶性改善効果について検討した。**Table 11** に、A、B 及び C 部を変換した化合物の評価結果を示す。対称構造であるピペラジンに代わり、A 部に非対称構造であるホモピペラジンを導入した **67** は、**64** と比較して脂溶性が同等であるにも関わらず、水溶性の改善が認められた。C 部にホモピペラジンを導入した **70** においても同様の傾向が認められた。一方で、AMPK 活性化作用については、**64** と比較していずれの化合物においても 10 倍程度の減弱が見られた。また、B 部を対称なパラ置換から非対称なメタ置換とした **74** においては水溶性の改善は見られず、**64** と比較して主活性

が 5 倍程度減弱した。さらに、B 部の芳香環をアルキル鎖とした **75** では対称構造の解消と共に脂溶性も低減し、水溶性は大幅に向上した。一方で、**64** と比較して主活性は 100 倍程度減弱することが分かった。

以上の結果より、化合物の構造対称性を解消することにより、期待通り水溶性が改善することを見出した。一方で、本手法は、本研究の誘導体においては薬理活性との両立が困難であることが分かった。著者は、ここまでの結果から **64** を有望化合物として選択し、次なる課題であるヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性改善を目的としたさらなる合成展開を実施することとした。

**Table 11.** AMPK Activation Activity and Aqueous Solubility of **67–75** Compared to Those of **64**



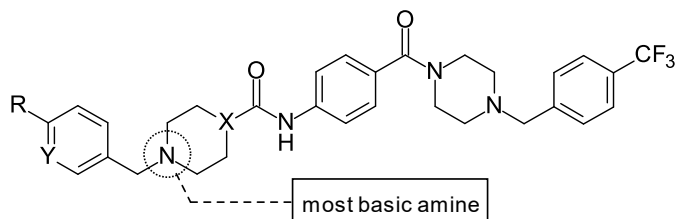
Compound	A	B	C	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	cLogP <sup>c</sup>
<b>64</b>				0.0047	6.0	4.0
<b>67<sup>d</sup></b>				0.046	98	4.1
<b>70<sup>d</sup></b>				0.042	15	4.0
<b>74<sup>d</sup></b>				0.022	4.5	3.8
<b>75<sup>d</sup></b>				0.58	≥ 100	3.3

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>c</sup> clogP values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>d</sup> Dihydrochloride.

一般に、肝ミクロソーム中における代謝安定性は、脂溶性を低減することによって水溶性と同様に改善することが知られている<sup>63)</sup>。この手法とは別に、化合物の塩基性を増大することによって代謝安定性を改善する手法が報告されている<sup>64)</sup>。Piersonらは本報告において、塩基性を増大することにより中性付近において分子のプロトネーションが可能となり、イオン化に伴う極性の増大が代謝安定性の改善に寄与することを提唱している。

まず初めに、化合物 **64** のヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性を評価した結果、リード化合物 **58** と比較して改善が見られないことが分かった (Table 12)。一方で、**58** と **64** の脂溶性を比較したところ、化合物 **64** の方が低い脂溶性を示した。以上の結果より著者は、本誘導体において分子全体の脂溶性を単純に低下させるだけでは、代謝安定性改善に向けた戦略として不十分であると考えた。そこで著者は、本課題の解決に向け、もう一つの戦略である化合物の塩基性を増大させる手法を試みることにした。

設計した化合物について most basic pKa 値を計算した結果、ウレアリンカーをアミドへと変換することにより塩基性が大幅に増大することが示唆された。そこで著者は、**64** に対しウレアに代わりアミドを組み込んだ化合物 **77** を合成した。その結果、**77** は **64** と比較してヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性が大きく改善した。一方で、**77** の水溶性は **64** と比較して低下した。**77** の clogP 値が **64** と比較して増大していたことから、著者は脂溶性の増大が水溶性低下の原因であると考えた。そこで、化合物 **77** の脂溶性低減を目的とし、左部ベンゼン環へのヘテロ原子の導入を試みた結果、Y 部に窒素原子を導入した **78** において良好な主活性及び肝ミクロソーム中における代謝安定性を保持すると共に、水溶性の改善が認められた。以上の結果より、リード化合物 **58** の課題であった水溶性及び代謝安定性を改善し、主活性である AMPK 活性化作用を保持した化合物 **78** を見出すことができた。

**Table 12.** AMPK Activation Activity, Aqueous Solubility and Metabolic Stability of **77** and **78** Compared to Those of**58** and **64**

Compound	X	Y	R	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg) <sup>b</sup>	JP2 (μM) <sup>c</sup>	Calculated most basic pKa <sup>d</sup>	cLogP <sup>d</sup>
<b>58</b>	N	CH	CF <sub>3</sub>	0.0079	158	< 1	5.5	4.6
<b>64</b>	N	CH	OMe	0.0047	185	6.0	6.1	4.0
<b>77<sup>e</sup></b>	CH	CH	OMe	0.011	39 <sup>f</sup>	< 1	9.0	4.9
<b>78</b>	CH	N	OMe	0.012	77	4.6	7.8	3.6

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> *In vitro* intrinsic clearance with human liver microsomes in the presence of a NADPH-generating system. <sup>c</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>d</sup> cLogP and pKa values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>e</sup> Dihydrochloride. <sup>f</sup> Substrate concentration < 0.2 μM.

*In vitro*において、主活性・水溶性・ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性のバランスが良好な化合物**78**を取得したため、続いて**78**の*in vivo*におけるプロファイリングを進めることとした。臨床試験に向けてヒトの薬物動態を予測するに当たり、一般にラットやイヌ・サルなどの動物におけるPK試験のデータが用いられる。そこで著者は、有望化合物**78**のラットのPK試験を実施した(**Table 13**)。その結果、化合物**78**の全身クリアランス(CL<sub>tot</sub>)はラットの肝血流量(55.2 mL/min/kg<sup>65)</sup>)を超えて非常に大きく、また、生物学的利用率(F)も10%程度に留まることが分かった。このことは、化合物**78**が*in vivo*において経口吸収性に乏しく、また、血漿中から速やかに消失することを示していた。以上の結果より、臨床開発可能な化合物の取得に向け、*in vivo*における薬物動態プロファイルの改善が新たな課題として浮上した。一方で、**78**は*in*

*vitro* において良好なプロファイルを示すため、これを維持した上で *in vivo* 薬物動態上の課題を解決する必要があると考えられた。次節では、新たに生じた課題の解決に向けた取り組み及びその結果見出した開発化合物 **ASP4132** の各種プロファイリング結果について述べる。

**Table 13.** Pharmacokinetic Properties of **78** in SD Rats

i.v. (1 mg/kg)				p.o. (1 mg/kg)			
AUC <sub>24h</sub> <sup>a</sup> (ng·h/mL)	t <sub>1/2</sub> (h)	V <sub>dss</sub> (L/kg)	CL <sub>tot</sub> (mL/min/kg)	AUC <sub>24h</sub> <sup>a</sup> (ng·h/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	t <sub>max</sub> (h)	F (%)
123	3.5	50.9	137	13.3	1.9	0.5	11

<sup>a</sup> Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 24 h after dosing.

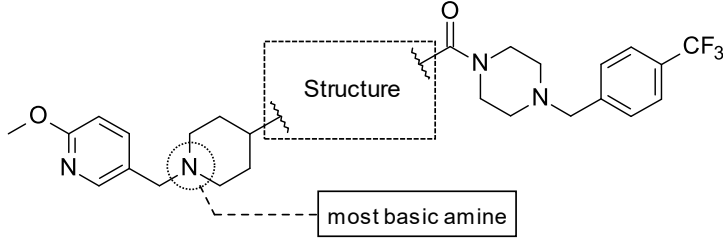
#### 第四節 *In vivo* 薬物動態の改善と ASP4132 (90)の発見及び高次評価結果

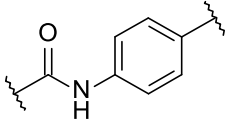
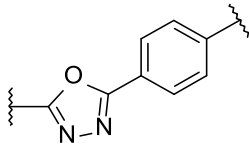
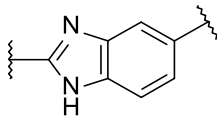
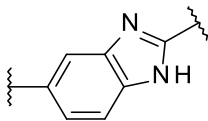
前節にて新たに明らかとなった化合物 **78** の *in vivo* 薬物動態プロファイルの課題を改善するに当たり、まず初めに、化合物 **78** に対してラット肝細胞を用いた *in vitro* 代謝物探索を実施した。その結果、化合物 **78** のアニリン性アミド結合が開裂して生じたと推測される代謝物が見出された。一般に、生体に取り込まれた医薬品などの化合物は肝臓において CYP に代表される酵素群により酸化的に代謝されて消失する。一方で、エステルやアミド部位を有する化合物においては、これら通常の代謝経路に加えて血漿中に存在するエステラーゼによる加水分解代謝を受けることが知られている<sup>66)</sup>。著者は、ラットにおける化合物 **78** の極めて大きな全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) の要因にアニリン性アミド結合の加水分解代謝が寄与していると仮定し、*in vivo* における薬物動態改善のため、想定される加水分解代謝を回避する化合物を設計することとした。アミド結合の代謝的開裂の回避は、当該構造の生物学的等価体 (bioisostere) への変換により達成し得ることが報告されている<sup>67)</sup>。著者はこれらの情報に基づき、**78** のアニリン性アミド結合を 5 員環ヘテロ芳香環へと変換することとした。合成した化合物について、主活性・水溶性及びヒト肝ミクロソーム中の代謝安定性 (注：新たな課題である加水分解代謝に対する安定性を評価するものではなく、主に肝臓における CYP 等による酸化代謝を評価する系。化合物 **78** と同等であることを目標とした) の評価結果、さらに脂溶性及び塩基性 (most basic pKa) の計算値を **Table 14** に示す。

まず、化合物 **78** のアニリン性アミド結合を 1,3,4-オキサジアゾール環へと変換した **82** を合成した。その結果、**82** は AMPK 活性化作用において **78** よりやや強い活性を示した一方で、水溶性が低下した。次に、アニリン性アミド結合をイミダゾール環とし、中央ベンゼン環と縮環したベンゾイミダゾール体 **86** を合成した。しかしながら **86** においては主活性の減弱と共に水溶性の低下が認められた。一方で、**86** のベンゾイミダゾールの向きを反転した化合物 **90** において **78** と同等の AMPK 活性化作用、水溶性及びヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性が認められた。以上の結果より、**78** の良好な *in vitro* プロファイルの保持に加え、当初の課題であるアニリン性アミド結合を回避した化合物として化合物 **90** を創出することができた。



**Table 14.** AMPK Activation Activity, Aqueous Solubility and Metabolic Stability of **82**, **86** and **90** Compared to Those of **78**



Compound	Structure	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM)	JP2 (μM) <sup>a</sup>	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg) <sup>b</sup>	Calculated most basic pKa <sup>c</sup>	cLogP <sup>c</sup>
<b>78</b>		0.012 <sup>f</sup>	4.6	77	7.8	3.6
<b>82<sup>d</sup></b>		0.0045 <sup>f</sup>	< 1	NT <sup>h</sup>	8.3	3.9
<b>86<sup>c</sup></b>		0.091 <sup>f</sup>	< 1	NT <sup>h</sup>	8.3	3.8
<b>90<sup>d</sup></b>		0.018 <sup>g</sup> (0.0056–0.056)	5.6	61	8.3	3.5

<sup>a</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>b</sup> *In vitro* intrinsic clearance with human liver microsomes in the presence of a NADPH-generating system. <sup>c</sup> pKa and clogP values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>d</sup> Ditosylate. <sup>e</sup> Tritosylate. <sup>f</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>g</sup> The geometric mean of the EC<sub>50</sub> value from 3 independent experiments was examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and shown along with the 95% confidence interval. <sup>h</sup> NT: not tested.

次に、**90** の *in vivo* における体内動態を評価する目的で、**78** と同様にラットを用いた PK 試験を実施した (**Table 15**)。その結果、期待した通り、化合物 **90** の全身クリアランス (CL<sub>tot</sub>) は **78** と比較して大きく低下

した。さらに、生物学的利用率 (F) についても良好な値が認められた。以上の結果より、アニリン性アミド結合を生物学的等価体へと変換することにより、*in vitro* において良好なプロファイルを示し、且つ *in vivo* における体内動態において優れたプロファイルを有する化合物 **90** を見出すことができた。

**Table 15.** Pharmacokinetic Properties of **90** in SD Rats Compared to Those of **78**

	i.v. (1 mg/kg)				p.o. (1 mg/kg)			
	AUC <sub>24h</sub> <sup>b</sup> (ng·h/mL)	t <sub>1/2</sub> (h)	V <sub>dss</sub> (L/kg)	CL <sub>tot</sub> (mL/min/kg)	AUC <sub>24h</sub> <sup>b</sup> (ng·h/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	t <sub>max</sub> (h)	F (%)
<b>90</b> <sup>a</sup>	887	3.6	4.6	19	705	72	1.7	80
<b>78</b>	123	3.5	50.9	137	13.3	1.9	0.5	11

<sup>a</sup> Ditosylate. <sup>b</sup> Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 24 h after dosing.

続いて、有望化合物 **90** についてさらに詳細な *in vitro* プロファイルを評価した。薬理活性である AMPK 活性化作用及び細胞増殖阻害作用、並びに水溶性・ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性の評価結果を **Table 16** に示す。ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-453 及び SK-BR-3 に対する化合物 **90** の細胞増殖阻害作用を評価したところ、MDA-MB-453 細胞に対してはリード化合物 **58** と比較して作用を大きく損なうことなく増殖を阻害した。一方で、SK-BR-3 に対しては **58** と同様に極めて弱い増殖阻害作用を示し、これら一連の化合物群の特徴である特定のヒト乳癌細胞株選択的な増殖阻害作用を維持していることが分かった。

また、物性に関しては **Table 14** にて示した通り、腸管 pH 付近における水溶性がある程度改善したことに加え、ヒト胆汁酸成分の一つであるタウロコール酸を添加した系において顕著な水溶性の改善が見られた。さらに、もう一つの課題であったヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性についても **Table 14** にて示した通り、リード化合物 **58** と比較して改善が見られた。

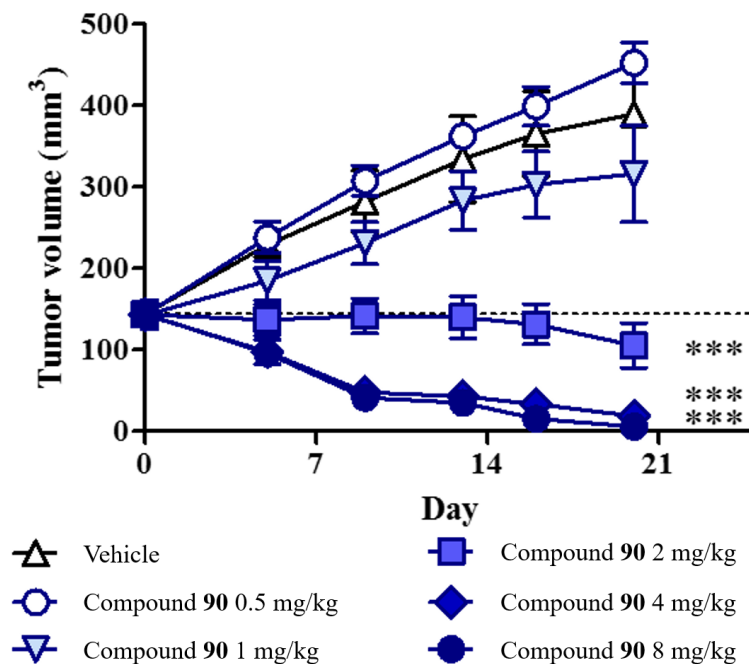
**Table 16.** AMPK Activation Activity, Antiproliferative Activity, Aqueous Solubility and Metabolic Stability of **90**Compared to Those of **58**

Compound	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM)	MDA-MB-453 growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM)	SK-BR-3 growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM)	Aqueous solubility (μM) <sup>a</sup> JP1/JP2/JP2+TC	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg) <sup>b</sup>
<b>58</b>	0.0079 <sup>c</sup>	0.0030 <sup>d</sup>	> 3 <sup>d</sup>	≥ 100/< 1/< 1	158
<b>90<sup>e</sup></b>	0.018 <sup>f</sup> (0.0056–0.056)	0.014 <sup>f</sup> (0.0084–0.022)	> 3 <sup>f</sup>	≥ 100/5.6/≥ 100	61

<sup>a</sup> Aqueous solubility in JP1 (pH 1.2) and JP2 (pH 6.8). <sup>b</sup> *In vitro* intrinsic clearance with human liver microsomes in the presence of a NADPH-generating system. <sup>c</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by ELISA assay using the MDA-MB-453 cell line, and determined in triplicate in one experiment. <sup>d</sup> The IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment. <sup>e</sup> Ditosylate. <sup>f</sup> The geometric mean of the EC<sub>50</sub> value from 3 independent experiments was examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and shown along with the 95% confidence interval. The geometric mean of the IC<sub>50</sub> values from 3 independent experiments are also shown along with the 95% confidence interval.

最後に、化合物 **90** の *in vivo* における抗腫瘍作用を評価した。評価するに当たり MDA-MB-453 細胞を担癌したヌードマウスを作成し、化合物 **90** を一日一回、経口投与にて 0.5、1、2、4、8 mg/kg の投与量で 20 日間反復投与した。腫瘍径をベースとした抗腫瘍作用並びに投与時の体重変化の測定結果を **Figure 19**、**20** 及び **Table 17** に示す。

評価の結果、**90** は 1 mg/kg の用量から腫瘍増殖抑制作用を示した。また、2 mg/kg の用量において 26%腫瘍退縮作用を示し、8 mg/kg の用量においては 96%腫瘍退縮作用を示した (**Figure 19**、**Table 17**)。加えて、全ての投与量群において反復投与期間中における体重への影響は見られず、化合物投与による重篤な毒性は見られなかった (**Figure 20**)。以上の結果から、著者は化合物 **90** を開発化合物 **ASP4132** として選択した。



<sup>a</sup>Mice were treated with **90** from Days 0 to 19. Each point represents the mean  $\pm$  SEM (N = 5). Statistical analysis was performed on the values obtained on Day 20. \*\*\*P < 0.001 compared to the value obtained in the vehicle-treated group on Day 20 (Dunnett's multiple comparisons test).

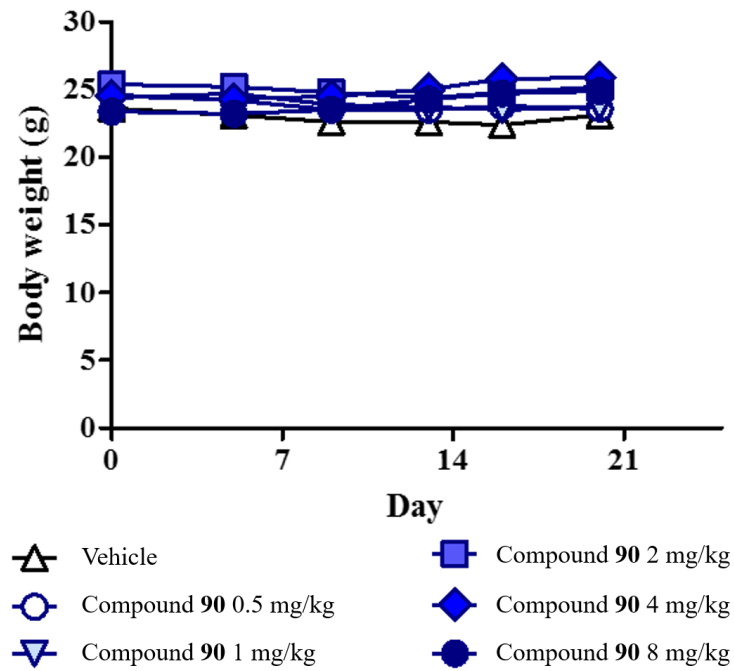
**Figure 19.** MDA-MB-453 担癌ヌードマウスモデルにおける化合物 **90** の抗腫瘍効果 <sup>a</sup>

**Table 17.** Antitumor Growth Inhibition and Regression Rate in an MDA-MB-453 Xenograft Mouse Model<sup>a</sup>

Compound	Dose (mg/kg)	Inhibition of tumor growth (%)	Tumor Regression (%)
	0.5	< 0	- <sup>c</sup>
	1	29	- <sup>c</sup>
<b>90<sup>b</sup></b>	2	> 100	26
	4	> 100	87
	8	> 100	96

<sup>a</sup>Mice were orally treated with **90** once daily from Day 0 to Day 19. The percent inhibition of tumor growth and the percent of tumor regression on Day 20 were calculated using the mean tumor volume in each group (N = 5). <sup>b</sup>Ditosylate.

<sup>c</sup> not applicable.



<sup>a</sup>Mice were treated with **90** from Days 0 to 19. Each point represents the mean  $\pm$  SEM (N = 5). Statistical analysis was performed on the values obtained on Day 20 (Dunnett's multiple comparisons test). The body weight in 2 and 4 mg/kg-treated groups was significantly greater than that in the vehicle-treated group ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively).

**Figure 20.** MDA-MB-453 担癌ヌードマウスモデルにおける化合物 **90** の反復投与期間中における体重推移 <sup>a</sup>

## 第五節 本章のまとめ

本章では、第一章で得られた化合物群とは異なる構造を有し、且つ同様の細胞選択性を以て増殖阻害作用を示すと共に *in vivo* における高次評価可能な化合物の創出を目的とした合成展開を行った。アステラス製薬化合物ライブラリから得られた、第一章にて示した誘導体と同様の細胞選択性を有し、且つ構造の大きく異なる化合物 **58** を新たなリード化合物として選択し、水溶性及びヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性の改善を目的とし、**58** の構造変換を行った。塩基性、脂溶性及び分子の構造対称性に着目して化合物展開を行った結果、**58** と比較して同等の主活性を有すると共に中程度の水溶性を有し、且つ代謝安定性が向上した化合物 **78** を見出した。続いて、*in vivo* における薬物動態プロファイルの評価を目的としたラット PK 試験を実施したところ、**78** は血漿中から速やかに消失し、経口吸収性も不良であることが分かった。

ラット肝細胞を用いた **78** の代謝物検索の結果から、化合物の消失経路の一つとしてアニリン性アミド結合の加水分解代謝が示唆された。そこで、アニリン性アミド結合の生物学的等価体への変換を試みた結果、**78** と同等の主活性・水溶性・肝ミクロソーム中における代謝安定性を示すと共に、ラット PK 試験において良好な体内動態プロファイルを示す化合物 **90** を見出した。最後に、化合物 **90** の *in vivo* における抗腫瘍作用を評価した。その結果、担癌マウスモデルにおいて、一日一回、2 mg/kg の経口投与から体重減少なく腫瘍退縮を誘導したことから、著者は、**90** を開発化合物 **ASP4132** として選択した。次章では、第二世代開発候補化合物として、**ASP4132** の課題をさらに改善した化合物の創出に関する構造活性相関研究について述べる。

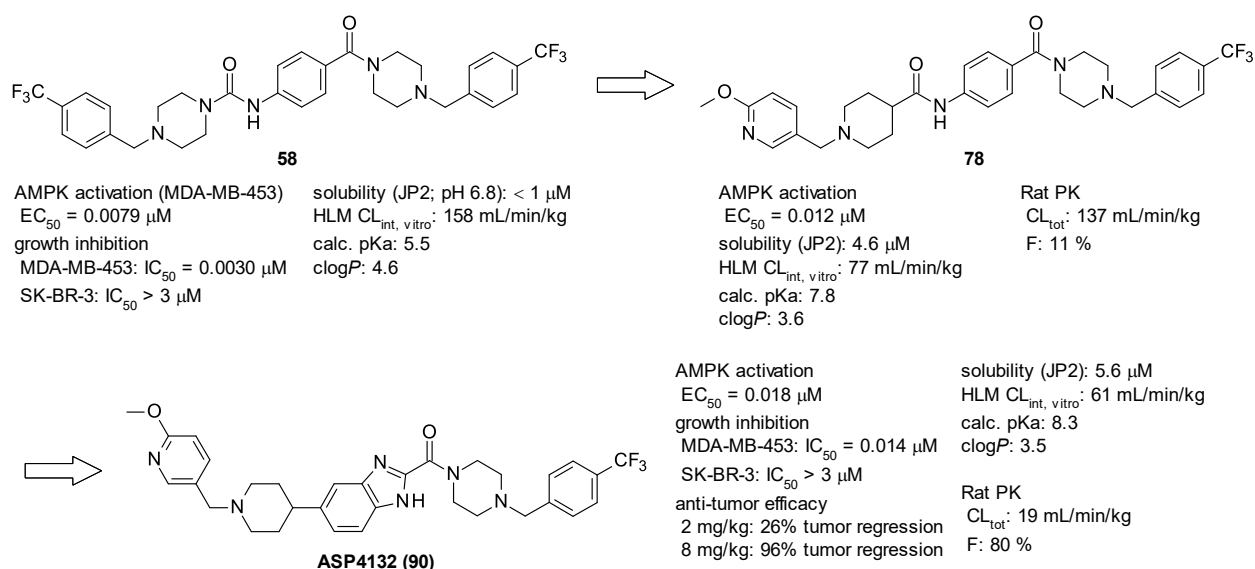


Figure 21. 第二章のまとめ

### 第三章 第二世代開発候補化合物としてのエーテルリンカー誘導体の合成及び構造活性相関

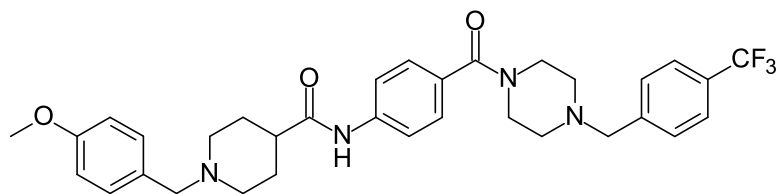
#### 第一節 リード化合物とその課題

第二章では、特定のヒト乳癌細胞株に対して強力な AMPK 活性化作用並びに細胞増殖阻害作用を示し、*in vivo* において強力な抗腫瘍作用を示す開発化合物 **ASP4132 (90)**の創出に向けた取り組みについて述べた。**ASP4132** は良好な薬理プロファイルに加えてヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性に優れ、ラットを用いて評価した *in vivo* における薬物動態プロファイルも良好であった。一方で、腸管 pH 付近における水溶性は十分とは言えず、改善の余地があると考えられた。一般に、消化管内における水溶性が不十分なことに起因して化合物が消化管内で析出すると、消化管から化合物が十分に吸収されなくなることが知られている<sup>52)</sup>。このような水溶性に課題を有する化合物では、臨床試験において、1) 投与量に応じた化合物吸収が妨げられ、薬理作用を示すために必要な濃度まで化合物を暴露することができない、2) 化合物の暴露が非線形になることによって予期せぬ薬物間相互作用や毒性を発現する、などのリスクが高くなると考えられる。

また、**ASP4132** は中程度の hERG チャンネル阻害活性を示すことが分かった（後述；**Table 19**）。一般に、hERG チャンネルを阻害することによって心室細胞再分極の遅延に伴う QT 間隔の延長が引き起こされ、不整脈や突然死などの深刻な毒性を生じ得ることが知られているため、本作用は臨床試験における毒性リスクにつながる可能性があると考えられた。

以上のことから、著者は第二世代開発候補化合物として **ASP4132** と同等以上の *in vitro* 及び *in vivo* プロファイルを有し、且つ **ASP4132** と比較して腸管 pH 付近における水溶性及び hERG チャンネル阻害活性が明確に改善した化合物の創出を目指すこととした。

近年、Ritchie らは、化合物中の芳香環数が 3 を超える化合物の臨床試験成功率が低いことを報告し、その要因の一つとして、分子内の芳香環数が増加することで水溶性が損なわれることを述べている<sup>68)</sup>。本報告の手法によれば **ASP4132** は 4 つの芳香環を有することから、著者は、芳香環数を減じることが水溶性を根本的に改善する戦略となると考えた。これまでの構造活性相関研究から、左右のベンジル基が AMPK 活性化作用発現に重要であることが分かっているため、**ASP4132** が有する二環性ヘテロ芳香環であるベンゾイミダゾールを単環に戻すことを考え、第二章にて得られた化合物 **77** に着目した (**Figure 22**)。



77

Figure 22. 化合物 77 の構造

第二章においては、*in vivo* における薬物動態プロファイルを改善するため、加水分解代謝による開裂が想定されたアニリン性アミド結合を生物学的等価体であるヘテロ芳香環へと変換したことを述べた。しかしながら、第二世代開発候補化合物の創出においては水溶性改善の観点から、芳香環の数を増やすことなくアニリン性アミド結合を回避する別戦略が必要と考えた。

また、もう一つの課題である hERG チャンネル阻害作用の回避については、本作用を有する化合物の特徴として一般的に強い塩基性及び高い脂溶性を有することが挙げられることから（後述；Figure 24）、本課題の解決には塩基性及び脂溶性を指標とした合成展開が有効であると考えた。

著者は、これらの課題を解決し得る化合物創出を目的としたフォーカスライブラリ構築のため、77 をリード化合物とした合成展開を行うこととした。その概略を Figure 23 に示す（詳細は本章第三節を参照）。アニリン性アミド部位においては、エーテルリンカーへと変換することにより芳香環数を増加させることなく回避できると考えた。一方で、このような変換に伴い脂溶性の増大が予想され、水溶性のさらなる増悪が懸念されたため、中央ベンゼン環をピリジン環へと変換することを考え<sup>54)</sup>、その上で、変換したピリジン環上の置換基最適化を行うこととした。両末端ベンゼン環においては、パラ位置置換基の最適化、及びヘテロ環への変換を行った。また、最も強い塩基性部位を有するピペリジンにおいては、4 位に電子求引基を導入することにより塩基性の調整を試みた。



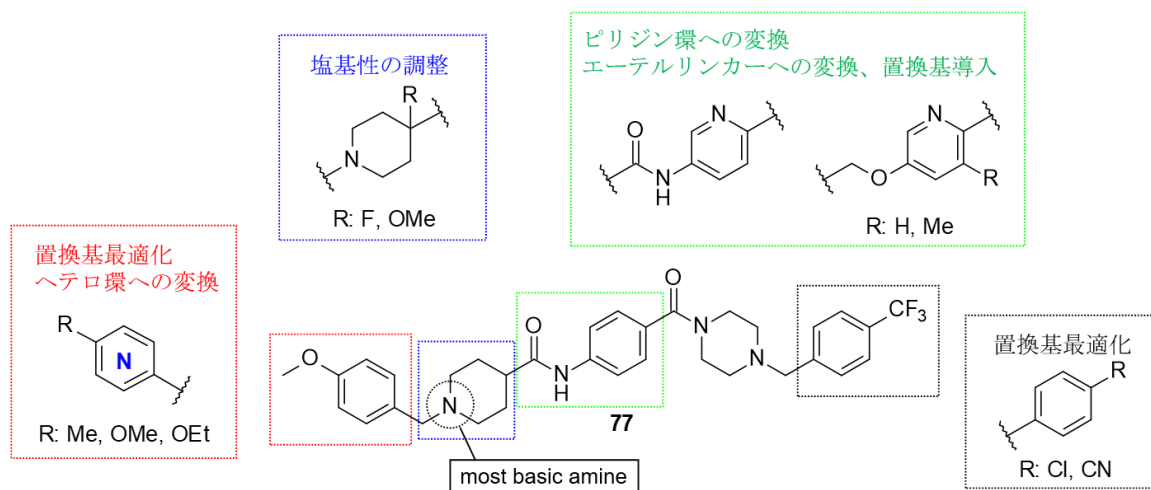
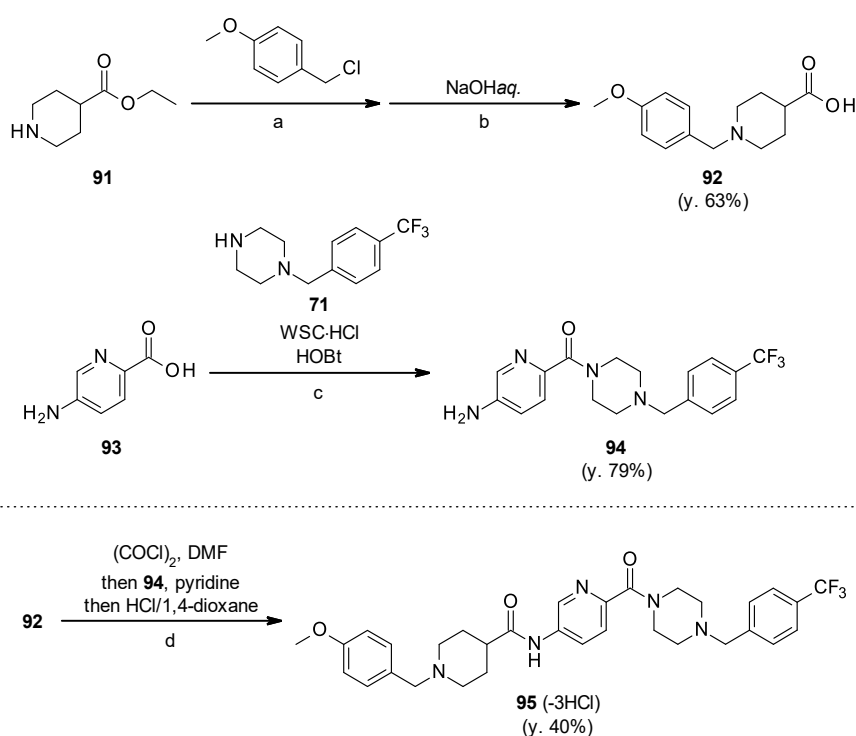


Figure 23. リード化合物 77 からの合成展開

次節では、実際に合成した各種誘導体の合成法について述べる。

## 第二節 フォーカスライブラリ構築を目的とした化合物の合成法

化合物 **95** は以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 15**)。まず初めに、市販の **91** を、4-メトキシベンジルクロリドを用いてアルキル化した後、塩基性条件下、エステル部を加水分解して **92** とした。また、市販の **93** を **71** と縮合し、**94** とした。続いて **92** を DMF 触媒下、二塩化オキサリルにて酸塩化物として **94** と反応させた後、造塩工程を経て **95** を合成した。

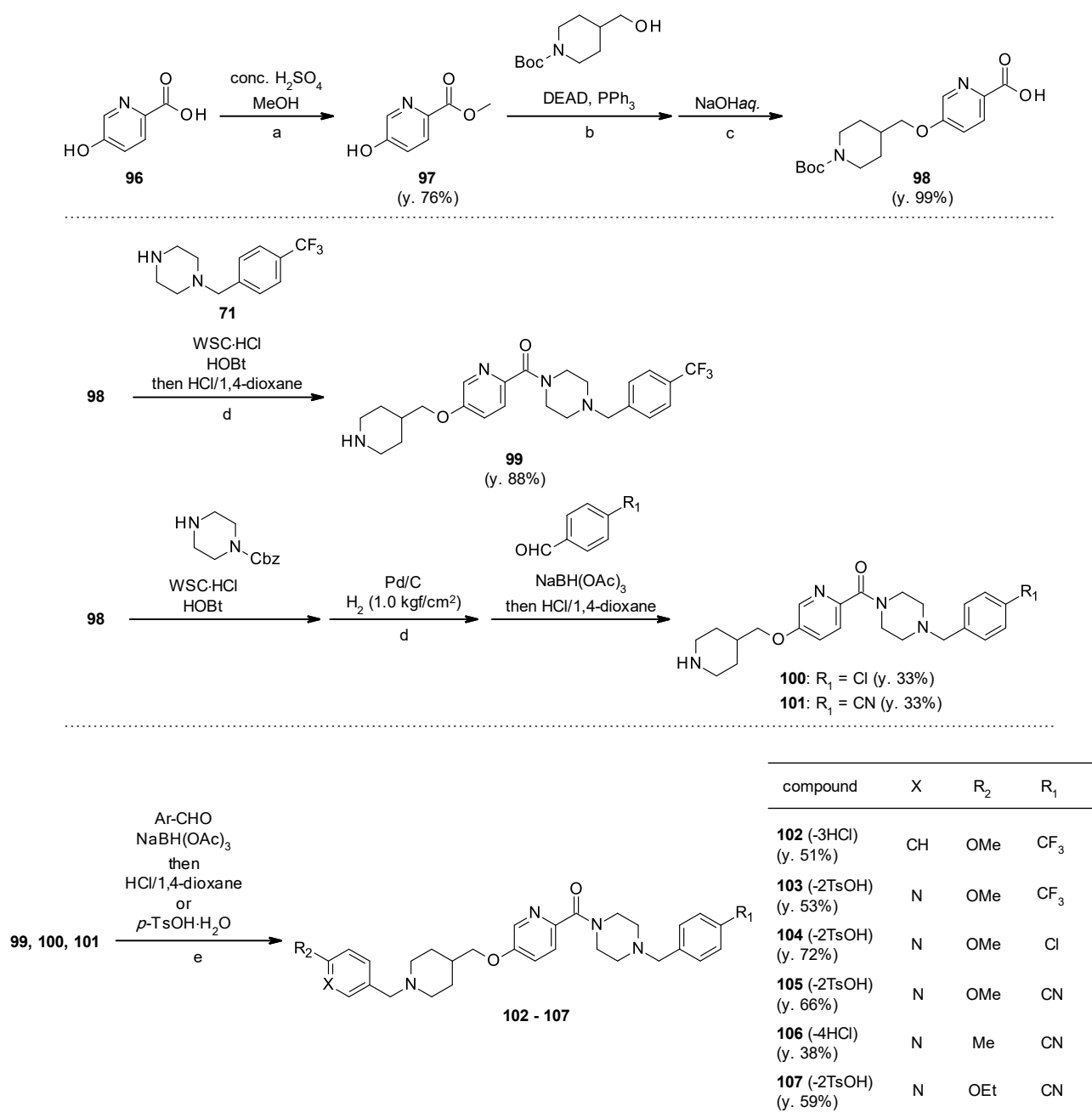


### Scheme 15. Synthesis of **95**

Reagents and conditions: (a) 4-methoxybenzyl chloride, DMF, r.t.; (b) 4.0 M NaOH aq., THF, EtOH, r.t., 63% for 2 steps; (c) **71**, WSC·HCl, HOBT, DMF, r.t., 79%; (d) **92**,  $(\text{COCl})_2$ , DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0°C to r.t., then **94**, pyridine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0°C to r.t., then 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., 40%.

化合物 **102–107** は以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 16**)。まず初めに、市販の **96** をエステル化した後、ピペリジン-4-メタノール Boc 保護体との光延反応を行い、エステル部を加水分解して共通中間体 **98** とした。続いて、得られた共通中間体 **98** と市販のベンジルピペラジン誘導体 **71** とを縮合した後、酸性条件下にて Boc 基を除去し、**99** とした。さらに、得られたアミン **99** とそれぞれ対応するアルデヒドとを還元的

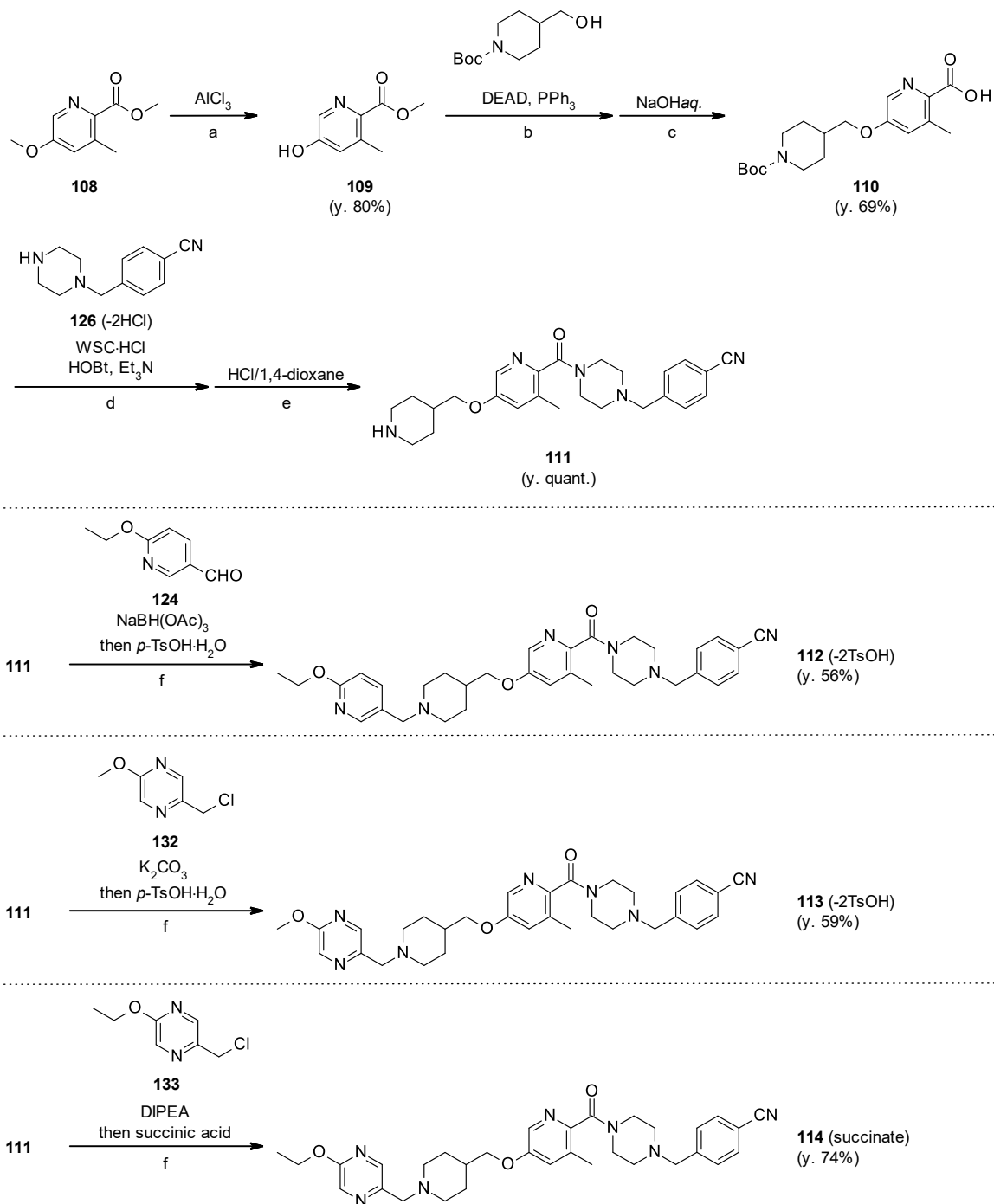
アミノ化反応に付した後、造塩工程を経てトリフルオロメチル体 **102**、**103** を合成した。また、共通中間体 **98** と 1-Cbz-ピペラジンとを縮合し、水素添加反応にて Cbz 基を除去した後、それぞれ対応するアルデヒドを用いて還元的アミノ化反応を行い、酸性条件下、Boc 基を除去して **100**、**101** とした。最後に、得られたそれぞれのアミンを用いて **102**、**103** と同様に還元的アミノ化反応を行った後、造塩工程を経てクロロ体 **104** あるいはシアノ体 **105–107** を合成した。



Scheme 16. Synthesis of **102–107**

Reagents and conditions: (a) conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MeOH, 85°C, 76%; (b) *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate, 2.2 M DEAD in toluene, PPh<sub>3</sub>, THF, 0°C to r.t.; (c) 1.0 M NaOH<sub>aq.</sub>, THF, MeOH, 60°C, 99% for 2 steps; (d) **99**: **71**, WSC·HCl, HOBT, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., 88%; **100**, **101**: benzyl piperazine-1-carboxylate, WSC·HCl, HOBT, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then 10% Pd/C (wetted with approx. 50% water), H<sub>2</sub> (1.0 kgf/cm<sup>2</sup>), EtOH, r.t., then ArCHO, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., 33%; (e) **103**, **104**, **105**, **107**: ArCHO, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, acetone, r.t., 53–72%; **102**, **106**: ArCHO, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., 38–51%.

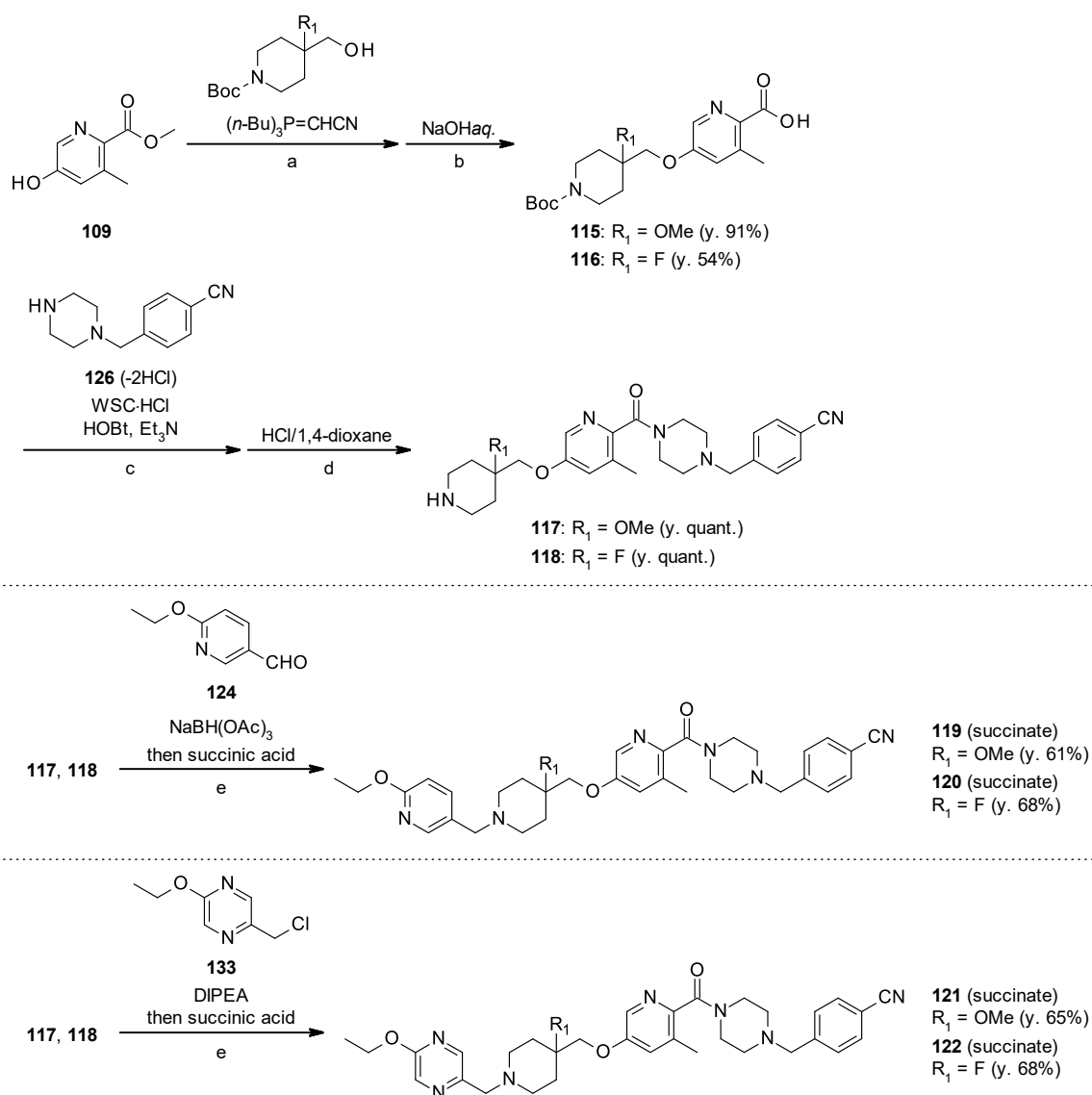
化合物 **112–114** は以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 17**)。初めに、文献既知化合物である **108**<sup>69)</sup> のメチルエーテル部を塩化アルミニウムにて脱メチル化して **109** とした後、ピペリジン-4-メタノール Boc 保護体を用いて光延反応を行い、塩基性条件下にてエステル部を加水分解して **110** を得た。続いて **110** と **126** (合成法は **Scheme 19** に記載) とを縮合し、酸性条件下、Boc 基を除去して共通中間体 **111** とした。次に、共通中間体 **111** と **124** (合成法は **Scheme 19** に記載) とを還元的アミノ化反応に付した後、造塩工程を経て **112** を合成した。また、共通中間体 **111** に対し、**132** あるいは **133** (いずれも、合成法は **Scheme 19** に記載) を用いてアルキル化反応を行い、それぞれ造塩工程を経て **113** 及び **114** を合成した。



### Scheme 17. Synthesis of 112–114

Reagents and conditions: (a)  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , reflux, 80%; (b) *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate, 2.2 M DEAD in toluene,  $\text{PPh}_3$ , THF, 0°C to r.t.; (c) 1.0 M  $\text{NaOH aq.}$ , THF, MeOH, 60°C, 69% for 2 steps; (d) **126**, WSC·HCl, HOBT,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t.; (e) 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., quant. for 2 steps; (f) **112**: **124**,  $\text{NaBH(OAc)}_3$ , AcOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., then  $p\text{-TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , acetone, r.t., 56%; **113**: **132**,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeCN, r.t., then  $p\text{-TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, r.t., 59%; **114**: **133**, DIPEA, MeCN, r.t., then succinic acid, EtOH, r.t., 74%; Preparations of compounds **124**, **126**, **132** and **133** were indicated in **Scheme 19**.

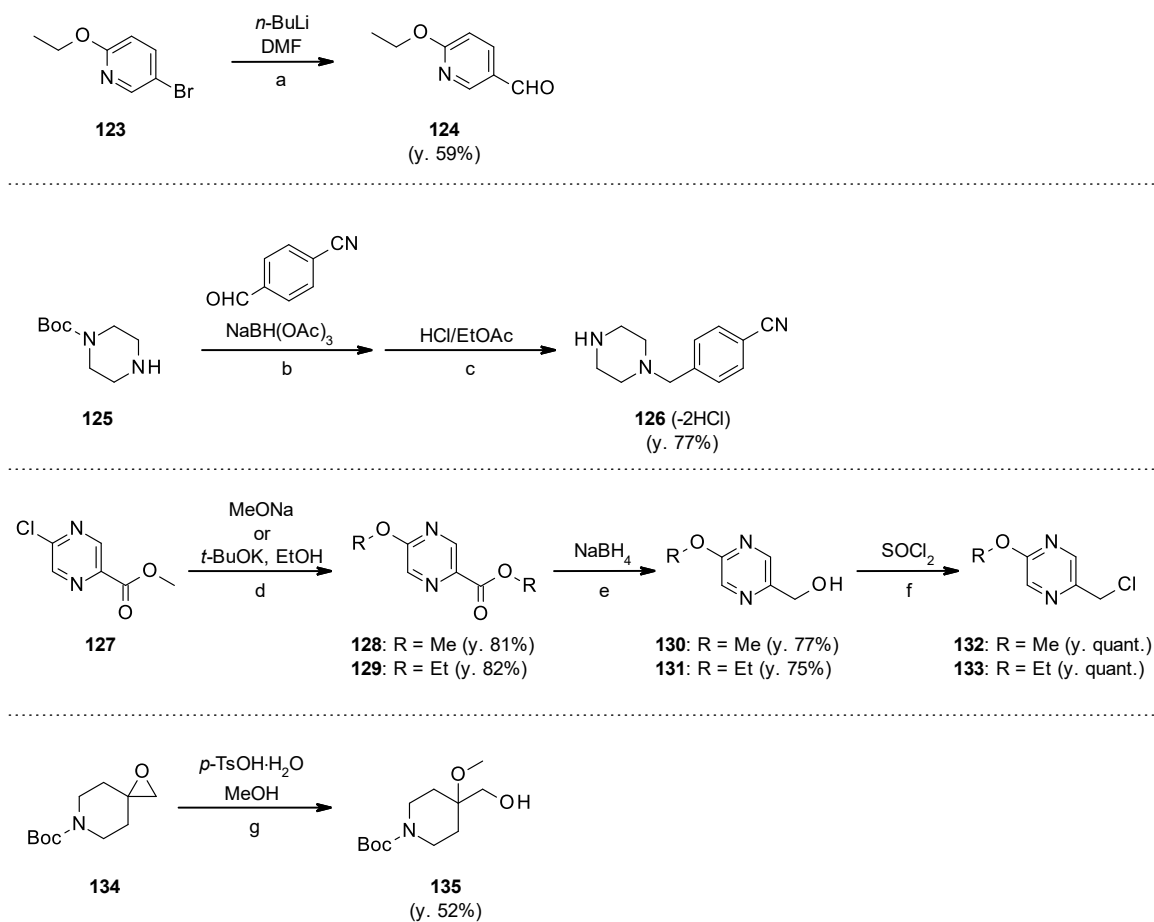
化合物 **119–122** は以下に示す方法を用いて合成した (**Scheme 18**)。まず初めに、**Scheme 17** にて得られた **109** に対し、**135** (合成法は **Scheme 19** に記載) あるいは文献既知化合物である 4-フルオロピペリジン-4-メタノール Boc 保護体<sup>70)</sup>を用い、角田試薬<sup>71)</sup>を用いた光延反応を行った後、塩基性条件下、エステル部を加水分解することで **115** 及び **116** を得た。次に、得られたそれぞれのカルボン酸を **126** (合成法は **Scheme 19** に記載) と縮合し、酸性条件下、Boc 基を除去して **117**、**118** とした。最後に、得られたそれぞれのアミンを用いて **124** (合成法は **Scheme 19** に記載) との還元的アミノ化反応を行った後、造塩工程を経て **119** 及び **120** を合成した。また、それぞれのアミンに対し、**133** (合成法は **Scheme 19** に記載) を用いてアルキル化反応を行い、造塩工程を経て **121** 及び **122** を合成した。



**Scheme 18. Synthesis of 119–122**

Reagents and conditions: (a) **115**: **135**, cyanomethylenetriethylphosphorane, toluene, 100°C; **116**: *tert*-butyl 4-fluoro-4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate,<sup>70)</sup> cyanomethylenetriethylphosphorane, toluene, 110°C; (b) 1.0 M NaOH<sub>aq.</sub>, MeOH, 60°C, 54–91% for 2 steps; (c) **126**, WSC·HCl, HOBT, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (d) 4.0 M HCl in 1,4-dioxane, MeOH, r.t., quant. for 2 steps; (e) **119**, **120**: **124**, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., then succinic acid, MeOH, 61–68%; **121**, **122**: **133**, DIPEA, MeCN, r.t. to 50°C, then succinic acid, EtOH, acetone, 65–68%; Preparations of compounds **124**, **126**, **133** and **135** were indicated in **Scheme 19**.

最後に、**Scheme 17** 及び **Scheme 18** にて用いた合成中間体の合成法を以下に示す (**Scheme 19**)。 **124** は、市販の **123** を *n*-BuLi を用いてハロゲン-リチウム交換した後、DMF を作用させることにより合成した。また **126** は、市販の **125** を用いて 4-ホルミルベンズニトリルとの還元的アミノ化反応を行った後、酸性条件下、Boc 基を除去することで合成した。さらに、**132** は、市販の **127** にナトリウムメトキシドを作用させて **128** とした後、水素化ホウ素ナトリウムを用いてエステル部を還元し、得られたベンジルアルコール **130** を塩化チオニルによりクロロ化することで合成した。また、**127** をエタノール溶媒中、*tert*-ブトキシカリウムを作用させることにより **129** を得た後、**132** の合成と同様に還元、クロロ化工程を経て **133** を合成した。最後に、**135** は文献既知化合物である **134**<sup>72)</sup> のエポキシ環をメタノール溶媒中、酸性条件下にて開環することにより合成した。



### Scheme 19. Synthesis of 124, 126, 132, 133 and 135

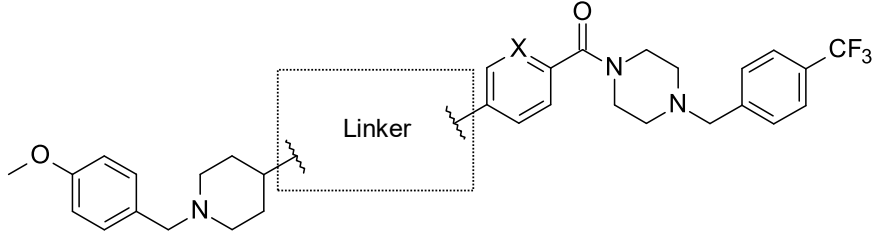
Reagents and conditions: (a) 1.7 M *n*-BuLi in hexane, THF,  $-68^{\circ}\text{C}$  then DMF,  $-68^{\circ}\text{C}$  to r.t., 59%; (b) 4-formylbenzonitrile, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; (c) 4.0 M HCl in EtOAc, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, r.t., 77% for 2 steps; (d) **128**: MeONa, MeOH,  $0^{\circ}\text{C}$  to r.t., 81%; **129**: *t*-BuOK, EtOH,  $0^{\circ}\text{C}$ , 82%; (e) NaBH<sub>4</sub>, MeOH,  $0^{\circ}\text{C}$  to r.t., 75–77%; (f) SOCl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $0^{\circ}\text{C}$  to r.t., quant.; (g) *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, MeOH, r.t., 52%.

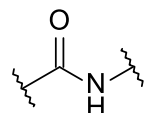
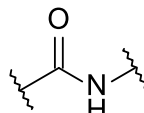
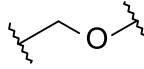


### 第三節 合成したライブラリ化合物のスクリーニング結果・考察

本章第一節の合成展開概略 (Figure 23) にて述べた通り、著者は、リード化合物である **77** の芳香環数を増やすことなく、*in vivo* において加水分解代謝が想定されるアニリン性アミド結合を回避する化合物デザインとして、アルキルエーテルリンカーを考案した。また、最近 Walker らは、分子間水素結合を解消することにより分子の結晶性が低下し、水溶性が改善することを報告している<sup>73)</sup>。**77** のアニリン性アミド結合をアルキルエーテルリンカーへと変換することにより、化合物から水素結合ドナー部位が消失し、分子間水素結合を形成しなくなることから、このような変換は水溶性の改善においても有用であることが期待された。一方で、化合物 **77** のアニリン性アミド結合をアルキルエーテルに変換した化合物そのものは、脂溶性の指標である *LogP* の計算値が 5 を超え、著しく脂溶性の高い化合物となることが示唆された。以上を踏まえ、著者はまず初めに、化合物 **77** に対し、脂溶性低減を目的とした芳香環への窒素原子の導入<sup>54)</sup>を試みた。その結果、中央ベンゼン環をピリジンへと変換した **95** において、8 倍程度の AMPK 活性化作用の減弱を伴うものの、脂溶性の低下と水溶性の大幅な向上が認められた (Table 18)。次に、**95** のアニリン性アミド結合をアルキルエーテルリンカーへと変換した結果、得られた化合物 **102** は化合物 **77** と同等の脂溶性であるにも関わらず、化合物 **95** と同様に極めて良好な水溶性を示した。

さらに驚くべきことに、**102** は **95** と比較して AMPK 活性化作用が 10 倍程度向上し、リード化合物 **77** と同等の主活性を示すことが分かった。以上のように、良好な主活性及び水溶性を併せ持つ **102** を見出したため、続いて **102** について、さらに詳細な *in vitro* プロファイルを評価することとした。

**Table 18.** AMPK Activation Activity and Aqueous Solubility of **95** and **102** Compared to Those of **77**


Compound	X	Linker	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	cLogP <sup>c</sup>
<b>77</b> <sup>d</sup>	CH		0.011	< 1	4.9
<b>95</b> <sup>e</sup>	N		0.089	≥ 100	3.6
<b>102</b> <sup>e</sup>	N		0.0083	≥ 100	4.8

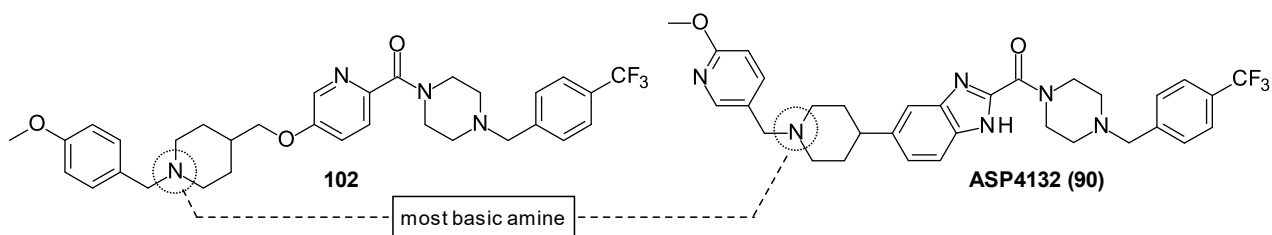
<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>c</sup> cLogP values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>d</sup> Dihydrochloride. <sup>e</sup> Trihydrochloride.

**Table 19** において、評価した化合物 **102** の *in vitro* プロファイルを **ASP4132** と比較した。その結果、化合物 **102** は **ASP4132** と同等の主活性及びヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性を示すと共に、**Table 18** に示した通り腸管 pH 付近の水溶性において明確な改善が認められた。一方で、**102** は **ASP4132** と比較してさらに強力な hERG チャンネル阻害活性を有することが分かった。本章第一節にて述べた通り、hERG チャンネルの阻害は心血管系に対して深刻な毒性を生じ得ることが知られており<sup>74,75)</sup>、また、阻害作用を有する化合物の特徴として強い塩基性及び高い脂溶性を有することが挙げられる<sup>76,77)</sup>。**102** は **ASP4132** と比較して塩基性、脂溶性共に増大した化合物であり、構造的にもこれまで報告されている hERG チャンネル阻害化合物の特徴に当てはまることから (**Figure 24**)、著者は本阻害作用の回避のために塩基性及び脂溶性双方の低減が望

ましいと考えた。加えて、塩基性については代謝安定性への寄与が想定されるため、脂溶性とのバランスを精密に制御することが、全てのプロファイルにおいて良好な化合物創出に向けて鍵となると考えた。

**Table 19.** AMPK Activation Activity, Aqueous Solubility, Metabolic Stability and hERG Inhibitory Activity of **102**

Compared to Those of **ASP4132**



Compound	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg)	hERG inhibition IC <sub>50</sub> (μM)	cLogP <sup>c</sup>	Calculated most basic pKa <sup>c</sup>
<b>102<sup>d</sup></b>	0.0083	≥ 100	97	0.74	4.8	9.2
<b>ASP4132 (90)<sup>e</sup></b>	0.018	5.6	61	2.0	3.5	8.3

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> value was examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line and determined in triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>c</sup> cLogP and pKa values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>d</sup> Trihydrochloride <sup>e</sup> Ditosylate.

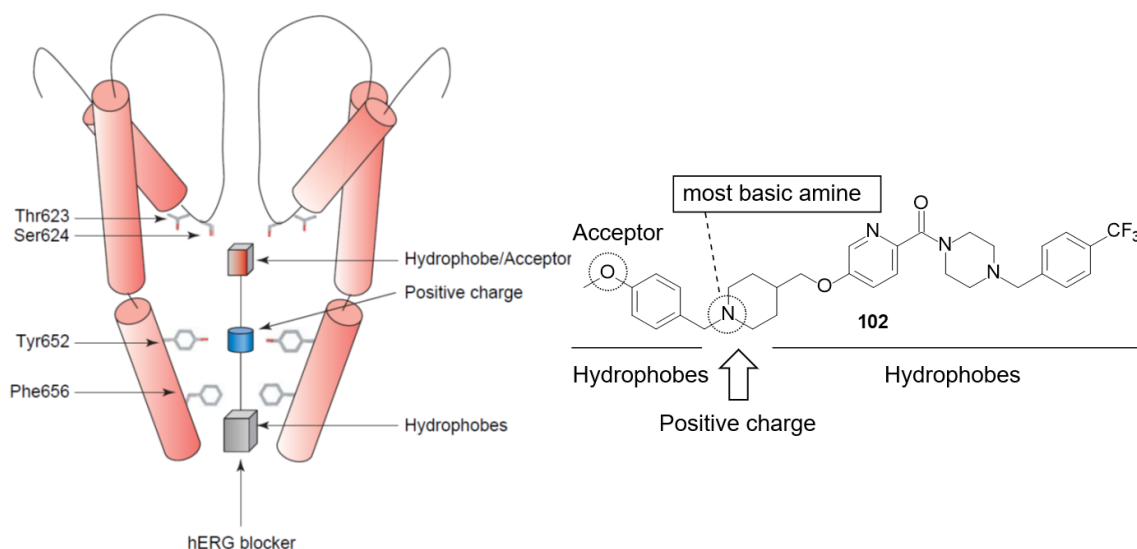


Figure 24. hERG チャンネル阻害作用を有する化合物の構造的特徴と化合物 **102** との比較

(出典：参考文献 77 より、一部改変)

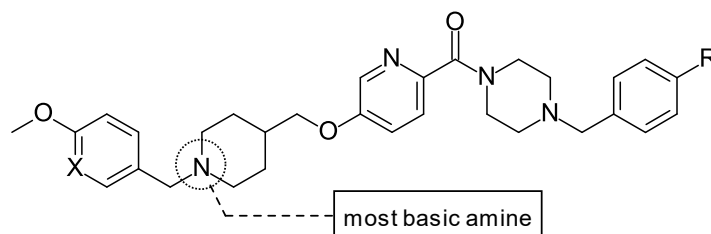
まず初めに、脂溶性低減を目的とし、化合物 **102** に対して左部芳香環への窒素原子の導入を試みた (Table 20)。その結果、**103** は AMPK 活性化作用、水溶性、代謝安定性を維持し、且つ期待通り hERG チャンネル阻害活性が減弱した。

次に、さらなる脂溶性低減を目的とし、脂溶性に富んだ置換基である右部芳香環上のトリフルオロメチル基の変換を行った。クロロ基へと変換した結果、主活性が 3 倍程度減弱したものの、良好な水溶性を示す **104** を得た。一方で、**104** は **103** と比較して、ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性が大幅に低下した。

近年 Jones らは、クロロ基の生物学的等価体として、シアノ基が有望であることを報告している<sup>78)</sup>。彼らは本報告において、シアノ基がクロロ基と比較して脂溶性が低い置換基であるため、水溶性や代謝安定性など、脂溶性が関与する非薬効薬理プロファイルを改善する効果が期待できると述べている。著者は本知見を基に、同じく脂溶性が関与する hERG チャンネル阻害活性の減弱も期待できるのではないかと考え、右部芳香環上の置換基をシアノ基へと変換した。その結果、期待通り水溶性が良好で、化合物 **104** と比較してヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性が大幅に改善した **105** を見出した。加えて、化合物 **105** は **103** と比較して、期待通り hERG チャンネル阻害活性のさらなる減弱が認められた。**105** は **103** と比較して塩基性は同程度であった一方で脂溶性は大幅に低下していたことから、このことが hERG チャンネル阻害活性のさらなる減弱に繋がった要因であると考えられた。

**Table 20.** AMPK Activation Activity, Aqueous Solubility, Metabolic Stability and hERG Inhibitory Activity of **102**–

105



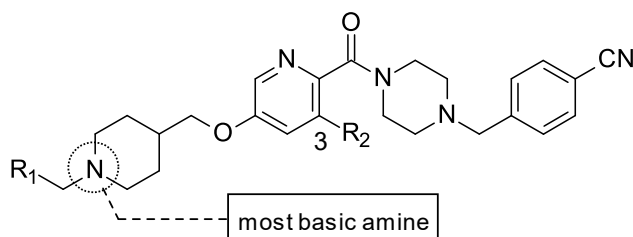
Compound	X	R	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg)	hERG inhibition IC <sub>50</sub> (μM)	cLogP <sup>c</sup>	Calculated most basic pKa <sup>c</sup>
<b>102</b> <sup>d</sup>	CH	CF <sub>3</sub>	0.0083	≥ 100	97	0.74	4.8	9.2
<b>103</b> <sup>e</sup>	N	CF <sub>3</sub>	0.0051	≥ 100	94	3.4	3.8	8.0
<b>104</b> <sup>e</sup>	N	Cl	0.018	≥ 100	523	NT <sup>f</sup>	3.4	8.0
<b>105</b> <sup>e</sup>	N	CN	0.036	≥ 100	58	13	2.5	8.0

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line and determined in duplicate or triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>c</sup> cLogP and pKa values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>d</sup> Trihydrochloride. <sup>e</sup> Ditosylate. <sup>f</sup> NT: not tested.

先に得られた **105** は、水溶性、代謝安定性及び hERG チャンネル阻害活性において良好なプロファイルを示した一方で、**102** と比較して主活性である AMPK 活性化作用が 4 倍程度減弱した。そこで著者は、主活性の向上を目的とし、さらなる構造最適化を進めることとした。まず初めに、置換基を含む中央・左部両ピリジン環の変換を行った (**Table 21**)。左部ピリジン環 2 位の置換基をメトキシ基からメチル基へと変換した **106** は、主活性が減弱した。一方で、メトキシ基をエトキシ基へと変換した **107** において、主活性が 2 倍程度向上した。さらに、中央ピリジン環 3 位 (R<sub>2</sub>) にメチル基を導入することにより、さらに 2 倍程度活性が向上した化合物 **112** を得た。脂溶性置換基であるアルキル基を複数導入したことにより化合物の脂溶性が上昇したため、脂溶性と主活性とのバランスを取ることを目的とし、左部ピリジン環をピラジン環へと変換した。

その結果、メトキシ置換体である **113** においては主活性が減弱した一方で、メトキシ基をエトキシ基へと変換することにより左部ピリジン誘導体で得られた SAR と同様に主活性が向上した。その結果、主活性面では化合物 **112** にやや劣るものの、脂溶性がより低く代謝安定性に優れた化合物 **114** を見出した。

**Table 21.** AMPK Activation Activity, Aqueous Solubility and Metabolic Stability of **105–107** and **112–114**



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg)	cLogP <sup>c</sup>	Calculated most basic pKa <sup>c</sup>
<b>105<sup>d</sup></b>		H	0.036	≥ 100	58	2.5	8.0
<b>106<sup>e</sup></b>		H	0.054	≥ 100	NT <sup>g</sup>	2.7	7.6
<b>107<sup>d</sup></b>		H	0.019	≥ 100	61	2.7	8.0
<b>112<sup>d</sup></b>		Me	0.0093	≥ 100	83	3.2	8.0
<b>113<sup>d</sup></b>		Me	0.043	≥ 100	46	2.7	8.0
<b>114<sup>f</sup></b>		Me	0.025	≥ 100	44	2.9	8.0

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line and determined in duplicate or triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>c</sup> cLogP and pKa values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>d</sup> Ditosylate. <sup>e</sup> Tetrahydrochloride. <sup>f</sup> Succinate. <sup>g</sup> NT: not tested.

続いて、**Table 21** に示した化合物のうち、*in vitro* プロファイルとして最もバランスの取れていたピリジン誘導体 **112** 及びピラジン誘導体 **114** について、構造最適化の観点からさらなる置換基導入を試みることにした。著者は、新たに置換基を導入する部位を決定するに当たり以下の三点を考慮した上で、ピペリジン 4 位を選択することとした。

- 1) 最も強い塩基性を有するピペリジン窒素原子の周辺
- 2) 置換基の導入によって不斉炭素が生じない
- 3) これまで置換基を導入しておらず、構造活性相関が不明

また、導入する置換基としては hERG チャンネル阻害活性のさらなる減弱を念頭に電子求引性の官能基であるフッ素基とメトキシ基を選択し、分子内で最も強いピペリジンの塩基性を調整することを考えた。

合成した化合物を評価した結果、全ての化合物において良好な水溶性が認められた (**Table 22**)。主活性においては、メトキシ基を導入した **119** 及び **121** において AMPK 活性化作用の減弱が見られたが、フッ素基を導入した **120** 及び **122** において主活性の向上が認められた。一方で、**120** 及び **122** のヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性を評価した結果、いずれの化合物においてもフッ素基導入前の化合物と比較して安定性の低下が認められた。

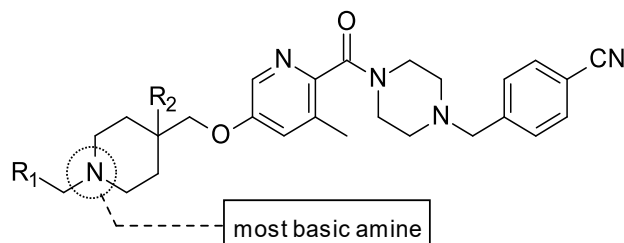
第二章第三節において、塩基性の増大がヒト肝ミクロソーム中の代謝安定性の改善において重要であることを述べた (**Table 12**)。また、化合物 **102** からの合成展開を行うに当たり、塩基性の調整に関しては代謝安定性との関係から、脂溶性とのバランスを精密に制御すべきであることを述べた (**Table 19**、**Figure 24**)。ここで合成した **120** 及び **122** についてはこれらの予測が的中し、電子求引性官能基であるフッ素基を最も強い塩基性を有するピペリジン窒素原子の周辺に導入したことによって most basic pKa が低下し、結果としてヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性が低下したものと考えられる。

しかしながら、左部芳香環をピラジン環とし、脂溶性をより低く調整した化合物 **122** は、フッ素基の導入により most basic pKa を低下させたにも関わらず **ASP4132** と同程度の代謝安定性を保持することができた。

以上のことより、主活性、水溶性並びに肝ミクロソーム中における代謝安定性のバランスを考慮し、ピリジン誘導体の **112** 及びピラジン誘導体の **122** について評価を進めることにした。

**Table 22.** AMPK Activation Activity, Aqueous Solubility and Metabolic Stability of **119–122** Compared to Those of

**112 and 114**



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	JP2 (μM) <sup>b</sup>	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg)	cLogP <sup>c</sup>	Calculated most basic pKa <sup>c</sup>
<b>112<sup>d</sup></b>		H	0.0093	≥ 100	83	3.2	8.0
<b>119<sup>e</sup></b>		OMe	0.035	≥ 100	NT <sup>f</sup>	3.2	7.2
<b>120<sup>e</sup></b>		F	0.0038	≥ 100	168	3.2	7.1
<b>114<sup>e</sup></b>		H	0.025	≥ 100	44	2.9	8.0
<b>121<sup>e</sup></b>		OMe	0.082	≥ 100	NT <sup>f</sup>	2.8	7.2
<b>122<sup>e</sup></b>		F	0.011	≥ 100	89	2.7	7.1

<sup>a</sup> The EC<sub>50</sub> values were examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line and determined in duplicate or triplicate in one experiment. <sup>b</sup> Aqueous solubility in JP2 (pH 6.8). <sup>c</sup> cLogP and pKa values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>d</sup> Ditosylate. <sup>e</sup> Succinate. <sup>f</sup> NT: not tested.

さらなる *in vitro* プロファイリングとして **112** 及び **122** の hERG チャンネル阻害活性を評価し、**102** 及び **ASP4132** と比較した (**Table 23**)。その結果、これらの化合物群の hERG チャンネル阻害活性は、期待した通り塩基性及び脂溶性の低下に伴い減弱する傾向が認められた。さらに、見出した **112** 及び **122** は最初のエーテ



ルリンカータイプ化合物である **102**、及び第二章にて述べた開発化合物 **ASP4132 (90)**と比較して明らかに弱い hERG チャンネル阻害活性を示した。

これらの化合物の内、化合物 **122** は hERG チャンネル阻害活性が最も弱く、且つ主活性・水溶性・肝ミクロソーム中における代謝安定性の全てにおいて最も優れたバランスを有する化合物であった。以上のことより化合物 **122** を有望化合物として選択し、さらなる *in vitro* 及び *in vivo* プロファイリングを進めることとした。

次節では、*in vitro* 及び *in vivo* における化合物 **122** の高次評価結果について述べる。

**Table 23.** hERG Inhibitory Activity of **112** and **122** Compared to That of **102** and **ASP4132 (90)**

Compound	hERG inhibition IC <sub>50</sub> (μM)	cLogP <sup>a</sup>	Calculated most basic pKa <sup>a</sup>
<b>102</b> <sup>b</sup>	0.74	4.8	9.2
<b>112</b> <sup>c</sup>	16	3.2	8.0
<b>122</b> <sup>d</sup>	> 30	2.7	7.1
<b>ASP4132 (90)</b> <sup>c</sup>	2.0	3.5	8.3

<sup>a</sup> cLogP and pKa values were calculated using ACD LogP prediction software.<sup>59)</sup> <sup>b</sup> Trihydrochloride. <sup>c</sup> Ditosylate.

<sup>d</sup> Succinate.

#### 第四節 第二世代開発候補化合物 **122** の高次評価

前節にて見出した有望化合物 **122** について、さらに詳細な *in vitro* プロファイルを評価し、結果を **ASP4132** と比較した (**Table 24**)。先に示した通り、**122** は **ASP4132** と同等の AMPK 活性化作用を示した。また、ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-453 及び SK-BR-3 に対しての細胞増殖阻害作用を評価したところ、MDA-MB-453 に対しては **ASP4132** と同等の増殖阻害作用を示した。さらに、SK-BR-3 に対しては **ASP4132** をはじめとするこれまでの化合物群と同様に極めて弱い増殖阻害作用を示し、特定のヒト乳癌細胞株選択的な増殖阻害作用を示すフェノタイプは保持されていた。また、**122** のヒト肝ミクロソーム中の代謝安定性は **ASP4132** と同等であった。

加えて、本章の研究課題であった腸管 pH 付近における水溶性及び hERG チャネル阻害活性については、いずれも **ASP4132** と比較して大幅に改善した。以上の結果より、化合物 **122** は *in vitro* において **ASP4132** と同等の薬理活性を有し、非薬効薬理面のプロファイルを全て改善した化合物であることが明らかとなった。

**Table 24.** Summary of *In Vitro* Profiles of **122** Compared to Those of **ASP4132 (90)**

Compound	AMPK activation EC <sub>50</sub> (μM)	MDA-MB-453 growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM)	SK-BR-3 growth inhibition IC <sub>50</sub> (μM)	HLM CL <sub>int, vitro</sub> (mL/min/kg)	Aqueous solubility (μM) <sup>a</sup> JP1/JP2/JP2+TC	hERG inhibition IC <sub>50</sub> (μM)
<b>ASP4132 (90)</b>	0.018 <sup>c</sup>	0.014 <sup>c</sup>	>3 <sup>c</sup>	61	≥ 100/5.6/≥ 100	2.0
<b>122<sup>b</sup></b>	0.011 <sup>d</sup>	0.026 <sup>e</sup>	21% inh. at 3 μM <sup>e</sup>	89	≥ 100/≥ 100/≥ 100	> 30

<sup>a</sup> Aqueous solubility in JP1 (pH 1.2) and JP2 (pH 6.8). <sup>b</sup> Succinate. <sup>c</sup> The geometric mean of the EC<sub>50</sub> value from 3 independent experiments was examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line, and the geometric mean of the IC<sub>50</sub> values from 3 independent experiments were also shown. <sup>d</sup> The EC<sub>50</sub> value was examined by whole cell ELISA using the MDA-MB-453 cell line and determined in triplicate in one experiment. <sup>e</sup> The IC<sub>50</sub> value was determined in triplicate in one experiment.

次に、**122** の *in vivo* における体内動態を評価する目的で、第二章にて述べた **78** 及び **ASP4132** と同様にラット PK 試験を実施した (**Table 25**)。その結果、**122** の全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) はアニリン性アミド結合を有する **78** (**Table 13**) と比較して大きく改善しており、さらに **ASP4132** (**Table 15**) よりも良好な値を示した。加えて、生物学的利用率 (F) も **78** と比較して大きく改善すると共に、**ASP4132** と同等の良好な値が認められた。以上より、アニリン性アミド結合をアルキルエーテルリンカーへと変換することで、化合物中の芳香環数を増やすことなく *in vivo* における薬物動態プロファイルを改善することができた。その結果、化合物 **122** は **ASP4132** と比較して同等以上の *in vivo* 薬物動態プロファイルを示すことが分かった。

**Table 25.** Pharmacokinetic Properties of **122** in SD Rats Compared to Those of **78** and **ASP4132 (90)**

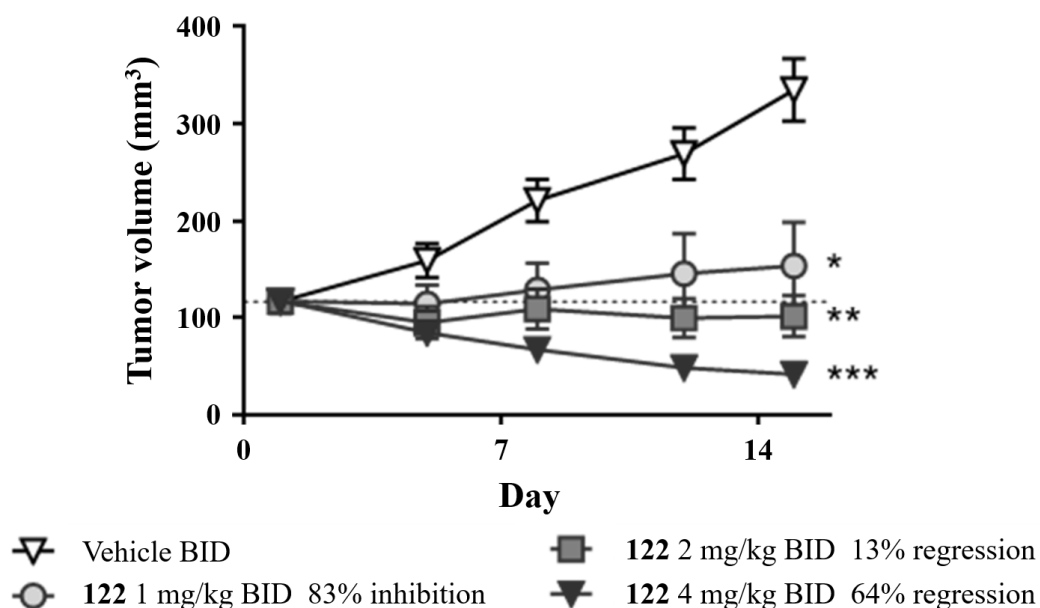
	i.v. (1 mg/kg)				p.o. (1 mg/kg)			
	AUC <sub>24h</sub> <sup>c</sup> (ng·h/mL)	t <sub>1/2</sub> (h)	V <sub>dss</sub> (L/kg)	CL <sub>tot</sub> (mL/min/kg)	AUC <sub>24h</sub> <sup>c</sup> (ng·h/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	t <sub>max</sub> (h)	F (%)
<b>122</b> <sup>a</sup>	6580	2.7	0.42	2.5	5470	1090	1.3	83
<b>78</b>	123	3.5	50.9	137	13.3	1.9	0.5	11
<b>ASP4132 (90)</b> <sup>b</sup>	887	3.6	4.6	19	705	72	1.7	80

<sup>a</sup> Succinate. <sup>b</sup> Ditosylate. <sup>c</sup> Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 24 h after dosing.

最後に、化合物 **122** の *in vivo* における抗腫瘍作用を評価した。評価には、第二章第四節 (**Figure 19、20**) と同様に MDA-MB-453 を担癌したヌードマウスを用い、化合物 **122** を一日二回、経口投与にて 1、2、4 mg/kg の投与量で 14 日間反復投与した。腫瘍径をベースとした抗腫瘍作用並びに投与時の体重変化の測定結果を **Figure 25、26** に示す。

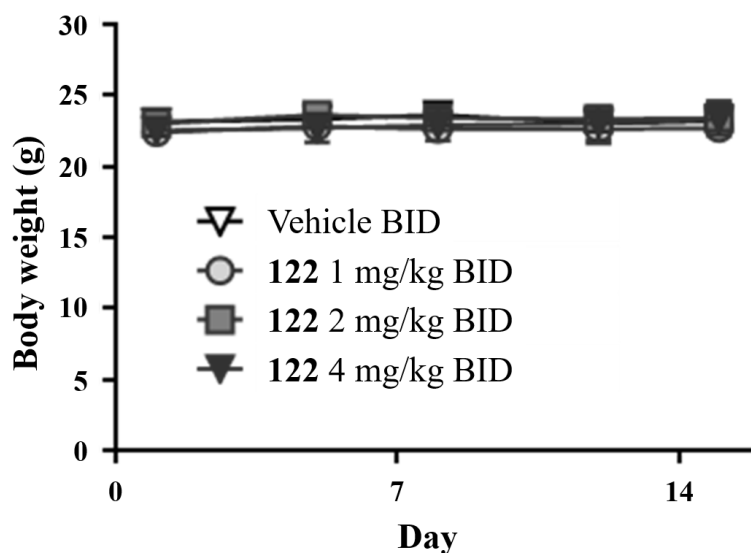
評価の結果、化合物 **122** は 1 mg/kg の一日二回投与の用量から有意な抗腫瘍作用を示した。また、2、4 mg/kg の一日二回投与の用量において腫瘍退縮作用を示し、その作用は投与量に応じて向上した。加えて、全ての用量において反復投与期間中における体重への影響はなく、化合物投与による重篤な毒性は見られなかった。

以上の結果から、著者は、*in vitro*、*in vivo* において **ASP4132** と同等の薬理作用・薬物動態プロファイルを示し、且つ水溶性・hERG チャンネル阻害作用において明確にプロファイルが改善した化合物 **122** を、第二世代開発候補化合物として選択した。



<sup>a</sup> Succinate. <sup>b</sup> Mice were treated with **122** from Days 1 to 14. Each point represents the mean  $\pm$  SEM (N = 5). Statistical analysis was performed the values on Day 15. \*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01, and \*\*\*: P < 0.001 compared with the value of vehicle on Day 15 (Dunnett's multiple comparison test).

**Figure 25.** MDA-MB-453 担癌ヌードマウスモデルにおける化合物 **122**<sup>a</sup> の抗腫瘍効果<sup>b</sup>



<sup>a</sup> Succinate. <sup>b</sup> Mice were treated with **122** from Days 1 to 14. Each point represents the mean  $\pm$  SEM (N = 5).

**Figure 26.** MDA-MB-453 担癌ヌードマウスモデルにおける化合物 **122**<sup>a</sup> の反復投与期間中における体重推移<sup>b</sup>

## 第五節 本章のまとめ

本章では、第二章で見出した開発化合物 **ASP4132 (90)** の腸管 pH 付近における水溶性改善及び hERG チャネル阻害活性回避を目的とし、同じく第二章にて見出した化合物 **77** を新たなリード化合物とした合成展開を実施した。その結果、AMPK 活性化作用・水溶性・ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性に優れたエーテルリンカータイプの化合物として、**102** を見出した。

続いて、化合物 **102** の hERG チャネル阻害活性の減弱を目的とし、さらなる合成展開を実施した。塩基性及び脂溶性に着目して化合物展開を実施した結果、**102** と比較してやや主活性が劣るものの、良好な水溶性及びヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性を有し、且つ hERG チャネル阻害活性が減弱した化合物 **105** を見出した。

次に、主活性の向上及び hERG チャネル阻害活性のさらなる低減を目的として合成展開を実施した結果、主活性・水溶性・ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性・hERG チャネル阻害活性の全てにおいてバランスの良好な化合物 **112** 及び **122** を創出した。著者は、これらの化合物の内、hERG チャネル阻害活性がより減弱した **122** を有望化合物として選択した。

さらに、化合物 **122** の *in vivo* における薬物動態プロファイルの評価を目的としてラット PK 試験を実施した結果、化合物 **122** が **ASP4132** と比較して同等以上の全身クリアランス ( $CL_{tot}$ )、並びに良好な生物学的利用率 (F) を有することが明らかとなった。

最後に、化合物 **122** の *in vivo* における抗腫瘍作用を評価した結果、担癌マウスモデルにおいて 2 mg/kg の一日二回、経口投与の用量から体重減少を伴わず腫瘍退縮を誘導した。

以上の結果から著者は、*in vitro*、*in vivo* 共にすべてのプロファイルが良好な **122** を第二世代開発候補化合物として見出すことができた。

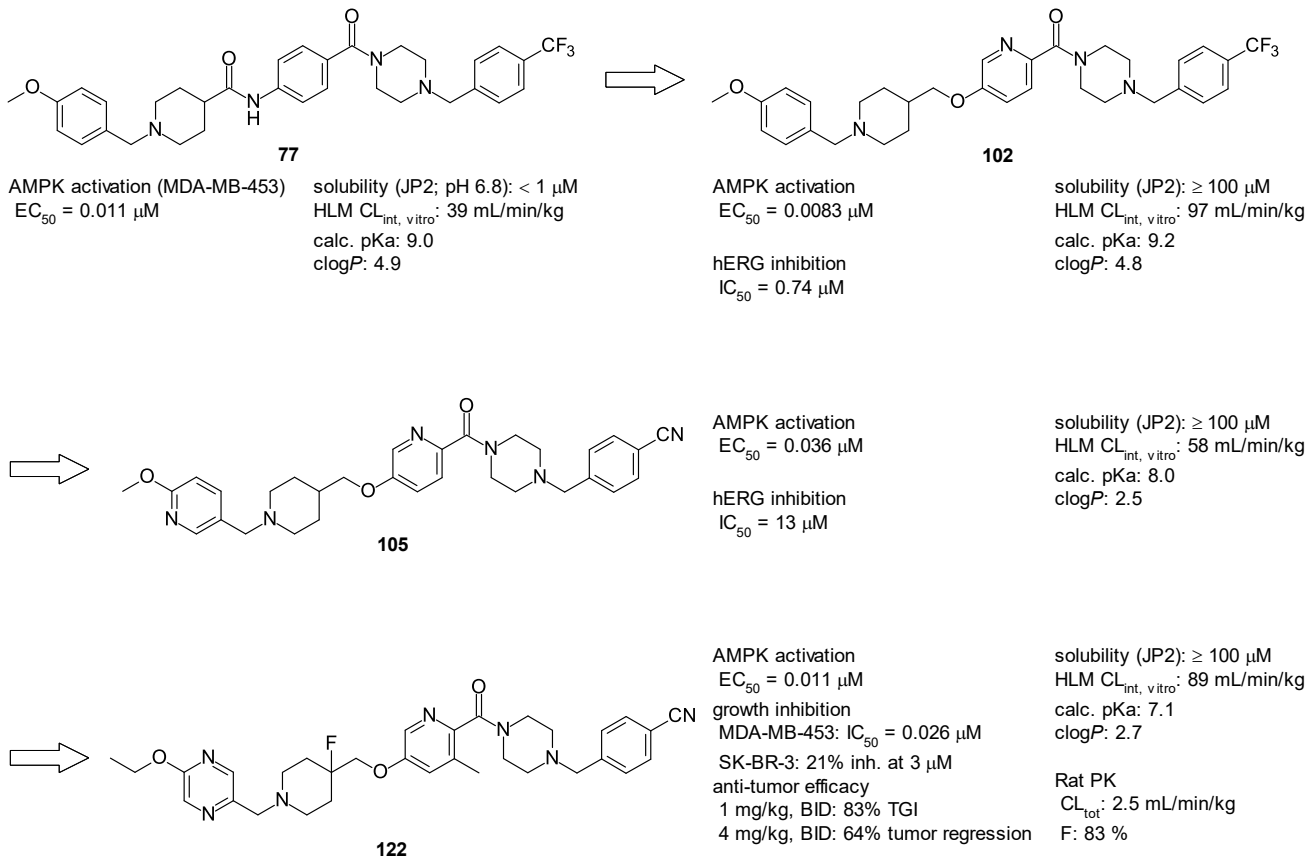


Figure 27. 第三章のまとめ

## 結論

著者は、乳癌治療薬としての新規 AMPK 非直接的活性化剤の創製を目指し、3,5-ジメチルピリジン-4(1*H*)-オン誘導体及びベンジルアミン誘導体の構造活性相関研究を行った。その結果、以下の知見を得た。

第一章では、アステラス製薬所有ライブラリ化合物であるリード化合物 **1** の主活性向上を目的とし、構造変換を行った。その結果、ピリジン環上メチル基の位置を最適化し、末端ベンゼン環のフッ素基をトリフルオロメチル基へと変換することにより、主活性が 80 倍以上向上した化合物 **21** を見出した。この際、ビアリアル間の二面角が主活性向上に重要であるという仮説を得た。

化合物 **21** の水溶性を評価した結果、腸管 pH 付近の水溶性が著しく低く、*in vivo* におけるさらなる評価に適さないことが分かった。そこで、**21** の主活性を維持しつつ腸管 pH 付近における水溶性を改善することを目的とし、さらなる構造変換を行った。その結果、ビアリアル部位間にテトラヒドロピリジンリンカーを導入することにより、**21** と同等の主活性を有し、且つ腸管 pH 付近での水溶性が良好な化合物 **57** を取得した。この際、良好な主活性を維持するため、先に得られた二面角の仮説を適応することで、テトラヒドロピリジンリンカーを見出すことができた。化合物 **57** はリード化合物 **1** と比較して 70 倍程度強力な細胞増殖阻害作用を示し、且つ SK-BR-3 ヒト乳癌細胞株に対して明確な細胞選択性を示した。

一方で、**57** は、薬物動態及び毒性の観点からこれ以上の検証が困難であったため、アステラス製薬ライブラリ化合物の中で同様の薬理プロファイルを有する新たな母核化合物を選択し、さらに研究を進めた。

第二章では、新規リード化合物として化合物 **58** を選択し、水溶性及びヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性の改善を目的とした構造変換を行った。その結果、トリフルオロメチル基のメトキシ基への変換及びウレア部位のアミドへの変換、並びに左部ベンゼン環に窒素原子を導入することにより、**58** と同等の主活性を有すると共に中程度の水溶性を有し、且つヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性が向上した化合物 **78** を見出した。

化合物 **78** を用いてラット PK 試験を実施したところ、**78** の *in vivo* における薬物動態プロファイルは不良であることが示された。そこで、**78** の薬物動態プロファイル改善を目的とし、さらなる構造変換を実施した。

肝細胞を用いた **78** の代謝物検索の結果に基づいてアニリン性アミド結合の回避を計画し、中央ベンゼン環とアニリン性アミド結合を縮環したベンゾイミダゾールタイプの化合物を設計・合成した。その結果得られた化合物 **90** は、**78** と同等の主活性・水溶性・ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性を有し、ラット PK 試験において良好な薬物動態プロファイルを示した。

化合物 **90** の *in vivo* における抗腫瘍作用を評価したところ、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-453 担癌マウスモデルにおいて 2 mg/kg/day の経口投与から体重減少なく腫瘍退縮を誘導した。以上の結果から、**90** は非直接的 AMPK 活性化作用に基づく新たな乳癌治療薬となり得る可能性が示された。なお、化合物 **90** は開発化合物 **ASP4132** として、2015 年に癌を適応とした第 I 相試験を開始した (NCT02383368)。

第三章では、第二章で見出した開発化合物 **ASP4132** の腸管 pH 付近における水溶性改善及び hERG チャネル阻害活性回避を目的とし、新たなリード化合物 **77** より合成展開を実施した。水溶性の根本的な改善に向けて分子の持つ芳香環数に着目して構造変換を行った結果、中央ベンゼン環をピリジンへと変換し、アニリン性アミド結合をアルキルエーテルリンカーへと変換することにより、AMPK 活性化作用・水溶性・ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性に優れた化合物 **102** を見出した。続いて、化合物 **102** の hERG チャネル阻害活性の減弱を目的とし、さらなる合成展開を実施した。各置換基の最適化、及び塩基性・脂溶性に着目して合成展開を行った結果、主活性・水溶性・ヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性、hERG チャネル阻害活性の全てにおいて良好なプロファイルを示す化合物 **122** を見出した。

化合物 **122** は、ラット PK 試験において **ASP4132** と同等以上の *in vivo* 薬物動態プロファイルを示すと共に、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-453 担癌マウスモデルにおける *in vivo* 抗腫瘍作用評価において、2 mg/kg の一日二回経口投与から体重減少なく腫瘍退縮を誘導した。以上の結果から、開発化合物 **ASP4132** の有する水溶性及び hERG チャネル阻害活性の課題を、他のプロファイルを損なうことなく解決した第二世代開発候補化合物 **122** を見出すことができた。

本研究により、3,5-ジメチルピリジン-4(1*H*)-オン誘導体及びベンジルアミン誘導体の構造活性相関に関する多様な知見を得た。また、MDA-MB-453 担癌ヌードマウスモデルにおいて、低用量の経口投与で顕著な毒性を伴わず強力な抗腫瘍作用を示す **ASP4132 (90)** を見出した。さらに、**ASP4132** と同等の薬理・薬物動態プ



ロファイルを有し、且つ優れた水溶性を有するとともに hERG チャンネル阻害活性を回避した **122** を見出した。

なお、本研究において合成した一連の化合物の直接的な標的の同定、並びにその標的を介した AMPK 活性化作用が特定の乳癌細胞において選択的である理由については別研究にて完了しており、今後報告される予定である。

これらの研究成果が、今後の AMPK 活性化剤の研究・開発に応用されることを期待する。

## 実験の部

### Chemistry

IR spectra were obtained using a SHIMADZU IRAffinity-1S spectrophotometer. <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on a Varian VNS-400, Varian 400-MR, JEOL JNM Lambda-300, JEOL JNM Lambda-400 or Bruker AVANCE III-HD500 spectrometer. <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III-HD500 spectrometer. Chemical shifts were expressed in  $\delta$  values (ppm) using tetramethylsilane as the internal standard (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = double doublet, ddd = double double doublet, m = multiplet and br = broad peak). Mass spectra were recorded on a JEOL GC Mate II, Waters SQD, Waters ZQ-2000, Thermo Fisher LCQ Advantage or Thermo Fisher Exactive Plus Orbitrap. All reactions were performed using commercially available reagents and solvents without further purification.

### Chapter 1

#### 2-**[(5-Bromo-3-methylpyridin-2-yl)oxy]methyl**-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (5)

To a mixture of 2-(chloromethyl)-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine hydrochloride (600 mg, 2.7 mmol) and 5-bromo-2-hydroxy-3-methylpyridine (**2**; 510 mg, 2.7 mmol) in toluene (6.0 mL) was added Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.9 g, 6.8 mmol). The mixture was stirred at 110°C in the dark for 6 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (360 mg, 39%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.11 (3H, s), 2.21 (3H, s), 2.23 (3H, s), 3.74 (3H, s), 5.36 (2H, s), 7.78–7.83 (1H, m), 8.09–8.13 (1H, m), 8.19 (1H, s); MS *m/z*: 337 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 2-**[(5-Bromo-4-methylpyridin-2-yl)oxy]methyl**-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (6)

Compound **6** was prepared from 5-bromo-2-hydroxy-4-methylpyridine (**3**) in 94% yield using a similar approach to that described for **5**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.22 (6H, s), 2.31 (3H, s), 3.74 (3H, s), 5.33 (2H, s), 6.92 (1H, s), 8.19 (1H, s), 8.26 (1H, s); MS *m/z*: 337 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 2-**[(5-Bromo-6-methylpyridin-2-yl)oxy]methyl**-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (7)

Compound **7** was prepared from 3-bromo-6-hydroxy-2-methylpyridine (**4**) in 92% yield using a similar approach to that described for **5**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.22 (3H, s), 2.24 (3H, s), 2.49 (3H, s), 3.74 (3H, s), 5.33 (2H, s), 6.67 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.86 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.20 (1H, s); MS *m/z*: 337 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 2-**[(5-(4-Fluorophenyl)-3-methylpyridin-2-yl)oxy]methyl**-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (8)

To a mixture of 2-**[(5-bromo-3-methylpyridin-2-yl)oxy]methyl**-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (**5**; 100 mg, 0.30 mmol) and 1,4-dioxane (3.0 mL) were added (4-fluorophenyl)boronic acid (83 mg, 0.59 mmol), 2.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aqueous solution (0.74 mL, 1.5 mmol) and PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (10 mg, 0.015 mmol). The mixture was stirred at 90°C for 15 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was

purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (100 mg, quantitative yield). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.19 (3H, s), 2.23 (3H, s), 2.26 (3H, s), 3.76 (3H, s), 5.43 (2H, s), 7.24–7.34 (2H, m), 7.66–7.75 (2H, m), 7.86–7.92 (1H, m), 8.21 (1H, s), 8.26–8.33 (1H, m); MS *m/z*: 353 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **2-([5-(4-Fluorophenyl)-4-methylpyridin-2-yl]oxy)methyl-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (9)**

Compound **9** was prepared from **6** in quantitative yield using a similar approach to that described for **8**. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.20 (3H, s), 2.28 (3H, s), 2.34 (3H, s), 3.79 (3H, s), 5.47 (2H, s), 6.73 (1H, s), 7.07–7.16 (2H, m), 7.21–7.30 (2H, m), 7.97 (1H, s), 8.28 (1H, s); MS *m/z*: 353 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **2-([5-(4-Fluorophenyl)-6-methylpyridin-2-yl]oxy)methyl-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (10)**

Compound **10** was prepared from **7** in quantitative yield using a similar approach to that described for **8**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.23 (3H, s), 2.28 (3H, s), 2.36 (3H, s), 3.75 (3H, s), 5.37 (2H, s), 6.75 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.22–7.33 (2H, m), 7.36–7.47 (2H, m), 7.55 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.22 (1H, s); MS *m/z*: 353 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **2-([5-(4-Fluorophenyl)-3-methylpyridin-2-yl]oxy)methyl-3,5-dimethylpyridin-4(1H)-one (1)**

To a solution of 2-([5-(4-fluorophenyl)-3-methylpyridin-2-yl]oxy)methyl-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (**8**; 100 mg, 0.30 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.1 mL) was added AlCl<sub>3</sub> (120 mg, 0.89 mmol). After the mixture was stirred at room temperature for 1 h, H<sub>2</sub>O was slowly added. The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (53 mg, 53%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.87 (3H, s), 1.96 (3H, s), 2.24 (3H, s), 5.32 (2H, s), 7.25–7.32 (2H, m), 7.52 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.66–7.75 (2H, m), 7.88–7.93 (1H, m), 8.27–8.31 (1H, m), 11.11–11.27 (1H, m); MS *m/z*: 339 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 339.1503 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>F: 339.1503).

#### **2-([5-(4-Fluorophenyl)-4-methylpyridin-2-yl]oxy)methyl-3,5-dimethylpyridin-4(1H)-one (11)**

Compound **11** was prepared from **9** in 74% yield using a similar approach to that described for **1**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.87 (3H, s), 1.95 (3H, s), 2.22 (3H, s), 5.28 (2H, s), 6.88 (1H, s), 7.23–7.34 (2H, m), 7.36–7.46 (2H, m), 7.46–7.58 (1H, m), 7.98 (1H, s), 11.26 (1H, br s); MS *m/z*: 339 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 339.1504 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>F: 339.1503).

#### **2-([5-(4-Fluorophenyl)-6-methylpyridin-2-yl]oxy)methyl-3,5-dimethylpyridin-4(1H)-one (12)**

Compound **12** was prepared from **10** in 45% yield using a similar approach to that described for **1**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.86 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.36 (3H, s), 5.29 (2H, s), 6.80 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.23–7.32 (2H, m), 7.36–7.44 (2H, m), 7.48–7.55 (1H, m), 7.58 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 11.25 (1H, br s); MS *m/z*: 339 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 339.1504 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>F: 339.1503).

#### **4-{6-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridin-3-yl}benzotrile (13)**

To a mixture of 2-[(5-bromo-6-methylpyridin-2-yl)oxy]methyl-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (**7**; 400 mg, 1.2

mmol), toluene (7.0 mL) and H<sub>2</sub>O (1.0 mL) were added (4-cyanophenyl)boronic acid (350 mg, 2.4 mmol), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (650 mg, 3.1 mmol), SPhos (60 mg, 0.15 mmol) and Pd(OAc)<sub>2</sub> (30 mg, 0.13 mmol) under an argon atmosphere. The mixture was stirred at 110°C overnight. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, diluted with CHCl<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (410 mg, 96%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.23 (3H, s), 2.28 (3H, s), 2.38 (3H, s), 3.75 (3H, s), 5.39 (2H, s), 6.75–6.83 (1H, m), 7.57–7.65 (3H, m), 7.88–7.96 (2H, m), 8.21 (1H, s); MS *m/z*: 360 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-({6-methyl-5-(4-methylphenyl)pyridin-2-yl}oxy)methylpyridine (14)

Compound **14** was prepared from **7** and (4-methylphenyl)boronic acid in 92% yield using a similar approach to that described for **13**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.23 (3H, s), 2.28 (3H, s), 2.35 (3H, s), 2.36 (3H, s), 3.75 (3H, s), 5.37 (2H, s), 6.73 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.21–7.27 (4H, m), 7.52 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.21 (1H, s); MS *m/z*: 349 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-({6-methyl-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pyridin-2-yl}oxy)methylpyridine (15)

Compound **15** was prepared from **7** and [4-(trifluoromethyl)phenyl]boronic acid in 77% yield using a similar approach to that described for **13**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.23 (3H, s), 2.28 (3H, s), 2.38 (3H, s), 3.75 (3H, s), 5.39 (2H, s), 6.80 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.59–7.65 (3H, m), 7.81 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.22 (1H, s); MS *m/z*: 403 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-({6-methyl-5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]pyridin-2-yl}oxy)methylpyridine (16)

Compound **16** was prepared from **7** and [3-(trifluoromethyl)phenyl]boronic acid in 82% yield using a similar approach to that described for **13**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.23 (3H, s), 2.28 (3H, s), 2.37 (3H, s), 3.75 (3H, s), 5.39 (2H, s), 6.78 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.63 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.66–7.78 (4H, m), 8.22 (1H, s); MS *m/z*: 403 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-({6-methyl-5-[2-(trifluoromethyl)phenyl]pyridin-2-yl}oxy)methylpyridine (17)

Compound **17** was prepared from **7** and [2-(trifluoromethyl)phenyl]boronic acid in quantitative yield using a similar approach to that described for **13**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.10 (3H, s), 2.23 (3H, s), 2.29 (3H, s), 3.75 (3H, s), 5.27–5.48 (2H, m), 6.70–6.77 (1H, m), 7.40 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.45 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.60–7.68 (1H, m), 7.71–7.78 (1H, m), 7.86 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 8.23 (1H, s); MS *m/z*: 403 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 6-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methyl-6'-(trifluoromethyl)-3,3'-bipyridine (18)

Compound **18** was prepared from **7** and [6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]boronic acid in 88% yield using a similar approach to that described for **13**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.23 (3H, s), 2.28 (3H, s), 2.40 (3H, s), 3.75 (3H, s), 5.41 (2H, s), 6.84 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.71 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.98 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.11–8.17 (1H, m), 8.22 (1H, s), 8.78–8.86 (1H, m); MS *m/z*: 404 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-{6-[(3,5-Dimethyl-4-oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridin-3-yl}benzotrile (19)

Compound **19** was prepared from **13** in 72% yield using a similar approach to that described for **1**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.86 (3H, s), 1.97 (3H, s), 2.38 (3H, s), 5.30 (2H, s), 6.85 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.48–7.56 (1H, m), 7.57–7.62 (2H, m),

7.65 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.89–7.97 (2H, m), 11.26 (1H, br s); MS  $m/z$ : 346 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 346.1545 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: 346.1550).

### 3,5-Dimethyl-2-((6-methyl-5-(4-methylphenyl)pyridin-2-yl)oxy)methylpyridin-4(1H)-one (20)

Compound **20** was prepared from **14** in 63% yield using a similar approach to that described for **1**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.86 (3H, s), 1.97 (3H, s), 2.35 (3H, s), 2.36 (3H, s), 5.28 (2H, s), 6.79 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.20–7.30 (4H, m), 7.46–7.60 (1H, m), 7.55 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 11.24 (1H, br s); MS  $m/z$ : 335 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 335.1747 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: 335.1754).

### 3,5-Dimethyl-2-((6-methyl-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pyridin-2-yl)oxy)methylpyridin-4(1H)-one (21)

To a mixture of 4-methoxy-3,5-dimethyl-2-((6-methyl-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pyridin-2-yl)oxy)methylpyridine (**15**; 300 mg, 0.75 mmol) and MsOH (2.0 mL) was added methionine (350 mg, 2.3 mmol). The mixture was stirred at 90°C overnight. After cooling to room temperature, the mixture was poured into a saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution. The mixture was diluted with 10% citric acid aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (160 mg, 55%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.86 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.38 (3H, s), 5.30 (2H, s), 6.85 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.49–7.56 (1H, m), 7.61 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.65 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.81 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz), 11.26 (1H, br s); MS  $m/z$ : 389 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 389.1472 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>F<sub>3</sub>: 389.1471).

### 3,5-Dimethyl-2-((6-methyl-5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]pyridin-2-yl)oxy)methylpyridin-4(1H)-one (22)

Compound **22** was prepared from **16** in 53% yield using a similar approach to that described for **21**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.86 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.37 (3H, s), 5.30 (2H, s), 6.84 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.48–7.56 (1H, m), 7.60–7.80 (4H, m), 7.67 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 11.26 (1H, br s); MS  $m/z$ : 389 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 389.1470 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>F<sub>3</sub>: 389.1471).

### 3,5-Dimethyl-2-((6-methyl-5-[2-(trifluoromethyl)phenyl]pyridin-2-yl)oxy)methylpyridin-4(1H)-one (23)

Compound **23** was prepared from **17** in 53% yield using a similar approach to that described for **21**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.87 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.10 (3H, s), 5.19–5.38 (2H, m), 6.79 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.39 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz), 7.49 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.53 (1H, s), 7.60–7.69 (1H, m), 7.70–7.79 (1H, m), 7.86 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz), 11.26 (1H, br s); MS  $m/z$ : 389 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 389.1469 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>F<sub>3</sub>: 389.1471).

### 3,5-Dimethyl-2-((2-methyl-6'-(trifluoromethyl)[3,3'-bipyridin]-6-yl)oxy)methylpyridin-4(1H)-one (24)

Compound **24** was prepared from **18** in 18% yield using a similar approach to that described for **1**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.86 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.41 (3H, s), 5.31 (2H, s), 6.89 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.52 (1H, s), 7.74 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.99 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 8.11–8.19 (1H, m), 8.78–8.83 (1H, m), 11.27 (1H, br s); MS  $m/z$ : 390 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 390.1419 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F<sub>3</sub>: 390.1424).

### {6-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridin-3-yl}boronic acid (25)

To a solution of 2-[[5-bromo-6-methylpyridin-2-yl]oxy]methyl]-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (**7**; 1.0 g, 3.0 mmol) and triisopropyl borate (1.1 mL, 4.8 mmol) in THF (15 mL) was added *n*-BuLi (2.8 mL, 4.6 mmol, 1.7 M in hexane) at  $-62^{\circ}\text{C}$ . After stirring at  $-60^{\circ}\text{C}$  for 1 h, the mixture was stirred at  $0^{\circ}\text{C}$  for an additional 1 h.  $\text{H}_2\text{O}$  and EtOAc were added, and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The resulting mixture was neutralized with 1.0 M HCl aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ). IPE and hexane were added, and then the precipitated solid was collected by filtration to give the product (640 mg, 71%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 2.21 (3H, s), 2.24 (3H, s), 2.52 (3H, s), 3.74 (3H, s), 5.33 (2H, s), 6.58 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.77 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.99 (2H, s), 8.19 (1H, s); MS  $m/z$ : 303 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### **6'-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2'-methyl-5-(trifluoromethyl)-2,3'-bipyridine (26)**

Compound **26** was prepared from **25**, 2-bromo-5-(trifluoromethyl)pyridine and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in 85% yield using a similar approach to that described for **8**.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.28 (3H, s), 2.36 (3H, s), 2.55 (3H, s), 3.79 (3H, s), 5.51 (2H, s), 6.78 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.54 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.70 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.91–8.06 (1H, m), 8.27 (1H, s), 8.89–8.99 (1H, m); MS  $m/z$ : 404 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### **2-{6-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridin-3-yl}-5-(trifluoromethyl)pyrimidine (27)**

Compound **27** was prepared from **25**, 2-chloro-5-(trifluoromethyl)pyrimidine and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in 82% yield using a similar approach to that described for **8**.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.27 (3H, s), 2.36 (3H, s), 2.82 (3H, s), 3.79 (3H, s), 5.54 (2H, s), 6.79 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 8.27 (1H, s), 8.33 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 8.98–9.06 (2H, m); MS  $m/z$ : 405 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### **2-{6-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridin-3-yl}-5-(trifluoromethyl)pyrazine (28)**

Compound **28** was prepared from **25**, 2-chloro-5-(trifluoromethyl)pyrazine and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in 80% yield using a similar approach to that described for **8**.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.28 (3H, s), 2.37 (3H, s), 2.61 (3H, s), 3.80 (3H, s), 5.52 (2H, s), 6.82 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.76 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 8.28 (1H, s), 8.76–8.87 (1H, m), 8.95–9.05 (1H, m); MS  $m/z$ : 405 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### **3-{6-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridin-3-yl}-6-(trifluoromethyl)pyridazine (29)**

Compound **29** was prepared from **25**, 3-chloro-6-(trifluoromethyl)pyridazine and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in 72% yield using a similar approach to that described for **8**.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.28 (3H, s), 2.37 (3H, s), 2.60 (3H, s), 3.80 (3H, s), 5.53 (2H, s), 6.83 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.73–7.80 (2H, m), 7.87 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz), 8.28 (1H, s); MS  $m/z$ : 405 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### **3,5-Dimethyl-2-([2'-methyl-5-(trifluoromethyl)[2,3'-bipyridin]-6'-yl]oxy)methylpyridin-4(1H)-one (30)**

To a solution of *t*-BuOK (360 mg, 3.2 mmol) in DMF (3.5 mL) was added the solution of dodecane-1-thiol (0.79 mL, 3.3 mmol) in DMF (6.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. A solution of 6'-[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2'-methyl-5-(trifluoromethyl)-2,3'-bipyridine (**26**; 260 mg, 0.65 mmol) in DMF (2.5 mL) was added, and the mixture was stirred at  $60^{\circ}\text{C}$  for 2 h. After the mixture was cooled to room temperature,  $\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 M HCl aqueous solution and brine were successively added. The mixture was extracted with  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (5:1). The

organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH), followed by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH) to give the product (170 mg, 66%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.87 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.52 (3H, s), 5.33 (2H, s), 6.88 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.53 (1H, s), 7.84 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.90 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.25–8.34 (1H, m), 9.02–9.09 (1H, m), 11.26 (1H, br s); MS *m/z*: 390 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 390.1416 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F<sub>3</sub>: 390.1424).

### **3,5-Dimethyl-2-[(6-methyl-5-[5-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl]pyridin-2-yl]oxy)methyl]pyridin-4(1H)-one (31)**

Compound **31** was prepared from **27** in 16% yield using a similar approach to that described for **30**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.80–1.90 (3H, m), 1.98 (3H, s), 2.75 (3H, s), 5.35 (2H, s), 6.93 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.40–7.64 (1H, m), 8.36 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 9.28–9.44 (2H, m), 11.26 (1H, br s); MS *m/z*: 391 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 391.1378 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub>F<sub>3</sub>: 391.1376).

### **3,5-Dimethyl-2-[(6-methyl-5-[5-(trifluoromethyl)pyrazin-2-yl]pyridin-2-yl]oxy)methyl]pyridin-4(1H)-one (32)**

Compound **32** was prepared from **28** in 41% yield using a similar approach to that described for **30**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.87 (3H, s), 1.99 (3H, s), 2.57 (3H, s), 5.34 (2H, s), 6.94 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.49–7.57 (1H, m), 8.02 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 9.09–9.13 (1H, m), 9.25–9.28 (1H, m), 11.27 (1H, br s); MS *m/z*: 391 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 391.1374 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub>F<sub>3</sub>: 391.1376).

### **3,5-Dimethyl-2-[(6-methyl-5-[6-(trifluoromethyl)pyridazin-3-yl]pyridin-2-yl]oxy)methyl]pyridin-4(1H)-one (33)**

Compound **33** was prepared from **29** in 23% yield using a similar approach to that described for **30**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.87 (3H, s), 1.99 (3H, s), 2.52 (3H, s), 5.35 (2H, s), 6.95 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.47–7.60 (1H, m), 7.98 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.25 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.36 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 11.29 (1H, br s); MS *m/z*: 391 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 391.1371 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub>F<sub>3</sub>: 391.1376).

### **6-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridine-3-carbaldehyde (34)**

To a mixture of 2-[(5-bromo-6-methylpyridin-2-yl)oxy]methyl-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (**7**; 1.4 g, 4.0 mmol) in THF (20 mL) was added dropwise *n*-BuLi (2.4 mL, 4.0 mmol, 1.7 M in hexane) at –64°C. DMF (0.65 mL, 8.4 mmol) was added dropwise at –63°C, and the resulting mixture was stirred at the same temperature for 30 min. The reaction was quenched by addition of saturated NH<sub>4</sub>Cl aqueous solution. After warming to room temperature, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (520 mg, 45%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.27 (3H, s), 2.34 (3H, s), 2.78 (3H, s), 3.79 (3H, s), 5.53 (2H, s), 6.75 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.00 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.26 (1H, s), 10.21 (1H, s); MS *m/z*: 287 (M+H)<sup>+</sup>.

### **Diethyl {[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]methyl}phosphonate (36)**

A mixture of 5-(chloromethyl)-2-(trifluoromethyl)pyridine (**35**; 480 mg, 2.5 mmol) in triethyl phosphite (3.0 mL, 17 mmol) was stirred at 150°C for 4 h. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The

residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (670 mg, 92%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.28 (6H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.20 (2H, d, *J* = 21.8 Hz), 4.03–4.13 (4H, m), 7.65 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.82–7.90 (1H, m), 8.62 (1H, s); MS *m/z*: 298 (M+H)<sup>+</sup>.

**4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-[[6-methyl-5-*(E)*-2-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]ethenyl]pyridin-2-yl]oxy]methyl]pyridine (37)**

To a mixture of NaH (55% in oil, 37 mg, 0.85 mmol) in DME (1.0 mL) was added dropwise a solution of diethyl {[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]methyl}phosphonate (**36**; 240 mg, 0.79 mmol) in DME (2.0 mL) at 0°C. The mixture was stirred at the same temperature for 30 min. A solution of 6-[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridine-3-carbaldehyde (**34**; 200 mg, 0.70 mmol) in DME (2.0 mL) was added dropwise, and the resulting mixture was stirred at the same temperature for 1 h, and then stirred at room temperature for 2 h. The mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and then concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (180 mg, 58%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.22 (3H, s), 2.27 (3H, s), 2.59 (3H, s), 3.75 (3H, s), 5.38 (2H, s), 6.77 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.22 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.89 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.08 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.21 (1H, s), 8.29–8.39 (1H, m), 8.93–9.00 (1H, m); MS *m/z*: 430 (M+H)<sup>+</sup>.

**3,5-Dimethyl-2-[[6-methyl-5-*(E)*-2-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]ethenyl]pyridin-2-yl]oxy]methyl]pyridin-4(1*H*)-one (38)**

Compound **38** was prepared from **37** in 48% yield using a similar approach to that described for **21**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.86 (3H, s), 1.97 (3H, s), 2.59 (3H, s), 5.28 (2H, s), 6.82 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.24 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.45–7.57 (1H, m), 7.66 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.11 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.30–8.41 (1H, m), 8.89–9.07 (1H, m), 11.22 (1H, br s); MS *m/z*: 416 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 416.1578 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F<sub>3</sub>: 416.1580).

**4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-[[6-methyl-5-*(E)*-2-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]ethyl]pyridin-2-yl]oxy]methyl]pyridine (39)**

To a solution of 4-methoxy-3,5-dimethyl-2-[[6-methyl-5-*(E)*-2-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]ethenyl]pyridin-2-yl]oxy]methyl]pyridine (**37**; 95 mg, 0.22 mmol) in THF (1.5 mL) and EtOH (1.5 mL) was added 10% Pd/C (wetted with approx. 50% water, 20 mg). After stirring under a hydrogen atmosphere (1.0 kgf/cm<sup>2</sup>) at room temperature for 4 h, the mixture was filtered through a Celite pad and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (79 mg, 83%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.26 (3H, s), 2.34 (3H, s), 2.39 (3H, s), 2.82–2.97 (4H, m), 3.78 (3H, s), 5.41 (2H, s), 6.59 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.21 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.55–7.60 (2H, m), 8.26 (1H, s), 8.54 (1H, s); MS *m/z*: 432 (M+H)<sup>+</sup>.

**3,5-Dimethyl-2-[[6-methyl-5-*(E)*-2-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]ethyl]pyridin-2-yl]oxy]methyl]pyridin-4(1*H*)-one (40)**

Compound **40** was prepared from **39** in 56% yield using a similar approach to that described for **21**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.85 (3H, s), 1.94 (3H, s), 2.37 (3H, s), 2.78–3.02 (4H, m), 5.21 (2H, s), 6.65 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.43–7.54 (2H,



m), 7.82 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.90–7.99 (1H, m), 8.59–8.67 (1H, m), 11.18 (1H, br s); MS  $m/z$ : 418 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 418.1731 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F<sub>3</sub>: 418.1737).

#### ***tert*-Butyl 6-(benzyloxy)-2-methyl-3',6'-dihydro[3,4'-bipyridine]-1'(2'*H*)-carboxylate (42)**

Compound **42** was prepared from **41**,<sup>48</sup> *tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> in quantitative yield using a similar approach to that described for **8**. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.50 (9H, s), 2.25–2.37 (2H, m), 2.41 (3H, s), 3.61 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz), 3.96–4.10 (2H, m), 5.36 (2H, s), 5.48–5.63 (1H, m), 6.55–6.61 (1H, m), 7.25–7.40 (4H, m), 7.44–7.50 (2H, m); MS  $m/z$ : 381 (M+H)<sup>+</sup>.

#### ***tert*-Butyl 4-(6-hydroxy-2-methylpyridin-3-yl)piperidine-1-carboxylate (43)**

To a solution of *tert*-butyl 6-(benzyloxy)-2-methyl-3',6'-dihydro[3,4'-bipyridine]-1'(2'*H*)-carboxylate (**42**; 2.2 g, 5.7 mmol) in THF (20 mL) and MeOH (20 mL) was added 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (wetted with approx. 50% water, 400 mg). After stirring under a hydrogen atmosphere (2.5 kgf/cm<sup>2</sup>) at room temperature for 6 h, the mixture was filtered through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. To the residue was added IPE and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (1.5 g, 92%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.34–1.47 (2H, m), 1.41 (9H, s), 1.47–1.63 (2H, m), 2.20 (3H, s), 2.54–2.92 (3H, m), 3.91–4.14 (2H, m), 6.11 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz), 7.33 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz), 11.39 (1H, br s); MS  $m/z$ : 293 (M+H)<sup>+</sup>.

#### ***tert*-Butyl 4-{6-[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridin-3-yl}piperidine-1-carboxylate (44)**

Compound **44** was prepared from 2-(chloromethyl)-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine hydrochloride and **43** in 98% yield using a similar approach to that described for **5**. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.44–1.58 (2H, m), 1.48 (9H, s), 1.66–1.77 (2H, m), 2.26 (3H, s), 2.34 (3H, s), 2.48 (3H, s), 2.67–2.96 (3H, m), 3.78 (3H, s), 4.15–4.36 (2H, m), 5.41 (2H, s), 6.63 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.35 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 8.25 (1H, s); MS  $m/z$ : 442 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-({6-methyl-5-(piperidin-4-yl)pyridin-2-yl}oxy)methylpyridine (45)**

To a solution of *tert*-butyl 4-{6-[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methylpyridin-3-yl}piperidine-1-carboxylate (**44**; 2.3 g, 5.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was added TFA (5.0 mL, 65 mmol). After stirring at room temperature for 6 h, the mixture was neutralized with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution while cooling on ice. The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (5:1). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (1.8 g, quantitative yield). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.31–1.66 (4H, m), 2.21 (3H, s), 2.24 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.52–2.80 (3H, m), 2.91–3.10 (2H, m), 3.74 (3H, s), 5.29 (2H, s), 6.63 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.51 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 8.19 (1H, s); MS  $m/z$ : 342 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-({6-methyl-5-(1-methylpiperidin-4-yl)pyridin-2-yl}oxy)methylpyridine (46)**

To a solution of 4-methoxy-3,5-dimethyl-2-({6-methyl-5-(piperidin-4-yl)pyridin-2-yl}oxy)methylpyridine (**45**; 200 mg, 0.59 mmol) in THF (3.0 mL) and EtOH (3.0 mL) was added 1*H*-benzotriazol-1-methanol (150 mg, 0.97 mmol).

After the mixture was stirred at room temperature for 10 min, NaBH(OAc)<sub>3</sub> (290 mg, 1.4 mmol) was added. After stirring at room temperature for 18 h, the reaction was quenched by addition of saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution. The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (150 mg, 73%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.58–1.82 (4H, m), 1.99–2.15 (2H, m), 2.26 (3H, s), 2.33 (6H, s), 2.47 (3H, s), 2.53–2.70 (1H, m), 2.91–3.05 (2H, m), 3.77 (3H, s), 5.40 (2H, s), 6.63 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.41 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.25 (1H, s); MS *m/z*: 356 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **2-((5-(1-(4-Fluorophenyl)methyl)piperidin-4-yl)-6-methylpyridin-2-yl)oxy)methyl-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (47)**

To a solution of 4-methoxy-3,5-dimethyl-2-((6-methyl-5-(piperidin-4-yl)pyridin-2-yl)oxy)methylpyridine (**45**; 200 mg, 0.59 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.0 mL) were added 4-fluorobenzaldehyde (77 μL, 0.73 mmol) and AcOH (67 μL, 1.2 mmol). After the mixture was stirred at room temperature for 1 h, NaBH(OAc)<sub>3</sub> (250 mg, 1.2 mmol) was added. After stirring at room temperature for 18 h, the reaction was quenched by addition of saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution. The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (220 mg, 84%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.63–1.77 (4H, m), 2.01–2.15 (2H, m), 2.25 (3H, s), 2.33 (3H, s), 2.46 (3H, s), 2.55–2.72 (1H, m), 2.91–3.06 (2H, m), 3.51 (2H, s), 3.77 (3H, s), 5.40 (2H, s), 6.62 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.93–7.10 (2H, m), 7.27–7.34 (2H, m), 7.42 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.25 (1H, s); MS *m/z*: 450 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4-Methoxy-3,5-dimethyl-2-((6-methyl-5-(1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)methyl)piperidin-4-yl)pyridin-2-yl)oxy)methylpyridine (48)**

Compound **48** was prepared from **45** and 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde in 69% yield using a similar approach to that described for **47**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.53–1.71 (4H, m), 2.05–2.18 (2H, m), 2.21 (3H, s), 2.24 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.56–2.73 (1H, m), 2.84–2.96 (2H, m), 3.60 (2H, s), 3.73 (3H, s), 5.28 (2H, s), 6.62 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.49–7.61 (3H, m), 7.69 (2H, d, *J* = 7.9 Hz), 8.19 (1H, s); MS *m/z*: 500 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **3,5-Dimethyl-2-((6-methyl-5-(1-methylpiperidin-4-yl)pyridin-2-yl)oxy)methylpyridin-4(1H)-one (49)**

Compound **49** was prepared from **46** in 14% yield using a similar approach to that described for **21**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.53–1.67 (4H, m), 1.85 (3H, s), 1.89–2.04 (2H, m), 1.95 (3H, s), 2.19 (3H, s), 2.41 (3H, s), 2.52–2.63 (1H, m), 2.79–2.91 (2H, m), 5.21 (2H, s), 6.68 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.45–7.52 (1H, m), 7.56 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 11.17 (1H, br s); MS *m/z*: 342 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 342.2175 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: 342.2176).

#### **2-((5-(1-(4-Fluorophenyl)methyl)piperidin-4-yl)-6-methylpyridin-2-yl)oxy)methyl-3,5-dimethylpyridin-4(1H)-one (50)**

Compound **50** was prepared from **47** in 39% yield using a similar approach to that described for **21**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.54–1.69 (4H, m), 1.85 (3H, s), 1.94 (3H, s), 2.00–2.13 (2H, m), 2.41 (3H, s), 2.55–2.70 (1H, m), 2.84–2.96 (2H, m), 3.48 (2H, s), 5.20 (2H, s), 6.67 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.07–7.20 (2H, m), 7.27–7.40 (2H, m), 7.44–7.53 (1H, m), 7.58 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 11.16 (1H, br s); MS *m/z*: 436 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 436.2388 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F:

436.2395).

**3,5-Dimethyl-2-([6-methyl-5-(1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl)piperidin-4-yl]pyridin-2-yl]oxy)methylpyridin-4(1H)-one (51)**

Compound **51** was prepared from **48** in 46% yield using a similar approach to that described for **21**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.55–1.71 (4H, m), 1.84 (3H, s), 1.94 (3H, s), 2.04–2.20 (2H, m), 2.42 (3H, s), 2.55–2.73 (1H, m), 2.82–2.97 (2H, m), 3.60 (2H, s), 5.20 (2H, s), 6.68 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.45–7.52 (1H, m), 7.56 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 11.02–11.30 (1H, m); MS *m/z*: 486 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 486.2354 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F<sub>3</sub>: 486.2363).

**2-([5-[1-(4-Fluorophenyl)piperidin-4-yl]-6-methylpyridin-2-yl]oxy)methyl-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine (52)**

To a mixture of 4-methoxy-3,5-dimethyl-2-([6-methyl-5-(piperidin-4-yl)pyridin-2-yl]oxy)methylpyridine (**45**; 200 mg, 0.59 mmol) and toluene (6.0 mL) were added 1-bromo-4-fluorobenzene (0.13 mL, 1.2 mmol), *t*-BuONa (110 mg, 1.2 mmol), BINAP (22 mg, 0.035 mmol) and Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (12 mg, 0.013 mmol) under an argon atmosphere. The mixture was heated under reflux condition for 18 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with EtOAc and filtered through a Celite pad. The filtrate was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH), followed by column chromatography on amino functionalized silica gel (hexane/CHCl<sub>3</sub>) to give the product (120 mg, 47%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.74–1.94 (4H, m), 2.26 (3H, s), 2.34 (3H, s), 2.50 (3H, s), 2.63–2.93 (3H, m), 3.60–3.74 (2H, m), 3.78 (3H, s), 5.42 (2H, s), 6.65 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.87–7.04 (4H, m), 7.43 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.26 (1H, s); MS *m/z*: 436 (M+H)<sup>+</sup>.

**2-([5-[1-(4-Fluorophenyl)piperidin-4-yl]-6-methylpyridin-2-yl]oxy)methyl-3,5-dimethylpyridin-4(1H)-one (53)**

Compound **53** was prepared from **52** in 33% yield using a similar approach to that described for **21**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.64–1.82 (4H, m), 1.85 (3H, s), 1.95 (3H, s), 2.46 (3H, s), 2.63–2.89 (3H, m), 3.62–3.78 (2H, m), 5.22 (2H, s), 6.70 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.90–7.15 (4H, m), 7.41–7.54 (1H, m), 7.60 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 11.18 (1H, br s); MS *m/z*: 422 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 422.2235 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F: 422.2238).

***tert*-Butyl 6-[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methyl-3',6'-dihydro[3,4'-bipyridine]-1'(2'H)-carboxylate (54)**

Compound **54** was prepared from **7**, *tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2H)-carboxylate and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> in 76% yield using a similar approach to that described for **8**. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.50 (9H, s), 2.26 (3H, s), 2.27–2.37 (2H, m), 2.34 (3H, s), 2.40 (3H, s), 3.61 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 3.78 (3H, s), 3.96–4.11 (2H, m), 5.42 (2H, s), 5.50–5.63 (1H, m), 6.61 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.23–7.29 (1H, m), 8.26 (1H, s); MS *m/z*: 440 (M+H)<sup>+</sup>.

**6-[(4-Methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methyl-1',2',3',6'-tetrahydro-3,4'-bipyridine (55)**

Compound **55** was prepared from **54** in 87% yield using a similar approach to that described for **45**. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.21–2.28 (2H, m), 2.26 (3H, s), 2.34 (3H, s), 2.43 (3H, s), 3.08 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 3.44–3.53 (2H, m), 3.78 (3H, s),

5.42 (2H, s), 5.57–5.65 (1H, m), 6.60 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.23–7.31 (1H, m), 8.26 (1H, s); MS  $m/z$ : 340 (M+H)<sup>+</sup>.

**1'-[(4-Fluorophenyl)methyl]-6-[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methoxy]-2-methyl-1',2',3',6'-tetrahydro-3,4'-bipyridine (56)**

Compound **56** was prepared from **55** and 4-fluorobenzaldehyde in 84% yield using a similar approach to that described for **47**. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.26 (3H, s), 2.30–2.37 (2H, m), 2.34 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.67 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz), 3.07–3.18 (2H, m), 3.61 (2H, s), 3.77 (3H, s), 5.41 (2H, s), 5.52–5.57 (1H, m), 6.59 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.97–7.08 (2H, m), 7.29 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.31–7.37 (2H, m), 8.25 (1H, s); MS  $m/z$ : 448 (M+H)<sup>+</sup>.

**2-[(1'-[(4-Fluorophenyl)methyl]-2-methyl-1',2',3',6'-tetrahydro[3,4'-bipyridin]-6-yl)oxy)methyl]-3,5-dimethylpyridin-4(1H)-one (57)**

Compound **57** was prepared from **56** in 25% yield using a similar approach to that described for **1**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.85 (3H, s), 1.95 (3H, s), 2.22–2.32 (2H, m), 2.36 (3H, s), 2.62 (2H, t,  $J = 5.5$  Hz), 2.98–3.07 (2H, m), 3.58 (2H, s), 5.22 (2H, s), 5.54–5.60 (1H, m), 6.67 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.09–7.21 (2H, m), 7.33–7.41 (2H, m), 7.45 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.47–7.54 (1H, m), 11.20 (1H, br s); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.92, 13.64, 22.40, 30.12, 49.24, 52.09, 60.63, 61.93, 107.41, 114.79 (d,  $J = 20.9$  Hz), 120.91, 121.76, 124.73, 130.57 (d,  $J = 8.0$  Hz), 130.93, 133.01, 133.99, 134.38 (d,  $J = 3.0$  Hz), 139.21, 140.60, 151.94, 160.06, 161.17 (d,  $J = 242.4$  Hz), 177.37; MS  $m/z$ : 434 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 434.2234 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>F: 434.2238); IR (KBr) 1632, 1589, 1570, 1508, 1466, 1449, 1371, 1306, 1269, 1215, 1198, 1155, 1138, 1117, 1030, 993 cm<sup>-1</sup>.

## Chapter 2

**(4-Nitrophenyl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (60)**

To a solution of 1-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine (**71**; 3.0 g, 12 mmol) in DMF (60 mL) were added 4-nitrobenzoic acid (**59**; 2.5 g, 15 mmol), WSC·HCl (3.5 g, 18 mmol) and HOBt (830 mg, 6.1 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and stirred at 0°C for 1 h. The precipitated solid was collected by filtration to give the product (4.1 g, 84%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.31–2.55 (4H, m), 3.23–3.35 (2H, m), 3.56–3.74 (2H, m), 3.62 (2H, s), 7.55 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.63–7.73 (4H, m), 8.25–8.31 (2H, m); MS  $m/z$ : 394 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Aminophenyl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (61)**

To a solution of (4-nitrophenyl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (**60**; 4.1 g, 10 mmol) in EtOAc (60 mL) was added 10% Pd/C (410 mg). After stirring under a hydrogen atmosphere (1.0 kgf/cm<sup>2</sup>) at room temperature for 5 h, the mixture was filtered through a Celite pad and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give the product (3.8 g, 98%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.38 (4H, t,  $J = 4.9$  Hz), 3.43–3.55 (4H, m), 3.59 (2H, s), 5.49 (2H, s), 6.49–6.58 (2H, m), 7.06–7.15 (2H, m), 7.55 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.69 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz); MS  $m/z$ : 364 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-[4-(4-{[4-(Trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperazine-1-carboxamide**

### **dihydrochloride (62)**

To a solution of (4-aminophenyl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (**61**; 300 mg, 0.83 mmol) in THF (7.5 mL) were added triphosgene (82 mg, 0.27 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.12 mL, 0.83 mmol) at 0°C. The mixture was stirred at 60°C for 1 h. After the mixture was cooled to room temperature, *tert*-butyl piperazine-1-carboxylate (230 mg, 1.2 mmol) was added. After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (4:1). The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc/MeOH). To a mixture of the purified product in EtOAc (5.0 mL) was added 4.0 M HCl in EtOAc (0.90 mL, 3.6 mmol). After the mixture was stirred at room temperature overnight, 4.0 M HCl in EtOAc (0.90 mL, 3.6 mmol) and MeOH (4.0 mL) were added. After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with Et<sub>2</sub>O. The mixture was stirred at room temperature for 1 h, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (320 mg, 70%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.96–3.24 (6H, m), 3.25–3.61 (4H, m), 3.71 (4H, t, *J* = 5.3 Hz), 3.85–4.69 (4H, m), 7.37 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.58 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.76–7.95 (4H, m), 9.05–9.15 (1H, m), 9.15–9.39 (2H, m), 11.60–11.88 (1H, m); MS *m/z*: 476 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 476.2262 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>N<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: 476.2268).

### **4-[(4-Fluorophenyl)methyl]-*N*-[4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperazine-1-carboxamide (63)**

To a solution of (4-aminophenyl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (**61**; 200 mg, 0.55 mmol) in THF (5.0 mL) were added triphosgene (54 mg, 0.18 mmol) and Et<sub>3</sub>N (77 μL, 0.55 mmol) at 0°C. The mixture was stirred at 60°C for 1 h. After the mixture was cooled to room temperature, 1-[(4-fluorophenyl)methyl]piperazine (160 mg, 0.83 mmol) was added. After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc/MeOH). To the residue was added hexane, the precipitated solid was collected by filtration to give the product (130 mg, 42%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.28–2.47 (8H, m), 3.35–3.71 (8H, m), 3.50 (2H, s), 3.60 (2H, s), 7.10–7.20 (2H, m), 7.23–7.30 (2H, m), 7.30–7.40 (2H, m), 7.46–7.54 (2H, m), 7.55 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.68 (1H, s); MS *m/z*: 584 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 584.2633 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>N<sub>5</sub>F<sub>4</sub>: 584.2643).

### **4-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-*N*-[4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperazine-1-carboxamide (64)**

Compound **64** was prepared from **61** and 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperazine in 79% yield using a similar approach to that described for **63**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.24–2.48 (8H, m), 3.36–3.66 (10H, m), 3.60 (2H, s), 3.74 (3H, s), 6.80–6.96 (2H, m), 7.19–7.25 (2H, m), 7.24–7.30 (2H, m), 7.47–7.53 (2H, m), 7.55 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.68 (1H, s); MS *m/z*: 596 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 596.2833 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: 596.2843).

### **4-Benzyl-*N*-[4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperazine-1-carboxamide (65)**

To a solution of *N*-[4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperazine-1-carboxamide

dihydrochloride (**62**; 300 mg, 0.55 mmol) in DMF (6.0 mL) were added benzyl bromide (78  $\mu$ L, 0.65 mmol) and  $K_2CO_3$  (260 mg, 1.9 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with  $H_2O$  and stirred at  $0^\circ C$  for 1 h. The precipitated solid was collected by filtration. The obtained solid was purified by column chromatography on silica gel ( $CHCl_3/MeOH$ ). The purified product was triturated with hexane, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (250 mg, 79%).  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 2.28–2.47 (8H, m), 3.36–3.68 (8H, m), 3.51 (2H, s), 3.60 (2H, s), 7.19–7.40 (7H, m), 7.47–7.53 (2H, m), 7.55 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.69 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 8.68 (1H, s); MS  $m/z$ : 566 (M+H) $^+$ ; ESI-MS  $m/z$ : 566.2727 (M+H) $^+$  (Calcd for  $C_{31}H_{35}O_2N_5F_3$ : 566.2737).

#### ***N*-[4-(4-{[4-(Trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]-1,4-diazepane-1-carboxamide (66)**

Compound **66** was prepared from **61** and *tert*-butyl 1,4-diazepane-1-carboxylate in quantitative yield using a similar approach to that described for **62**.  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 1.65–1.75 (2H, m), 2.32–2.48 (4H, m), 2.64–2.75 (2H, m), 2.76–2.86 (2H, m), 3.40–3.66 (8H, m), 3.60 (2H, s), 7.23–7.30 (2H, m), 7.55 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.69 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 8.35 (1H, s); MS  $m/z$ : 490 (M+H) $^+$ .

#### **4-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-*N*-[4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]-1,4-diazepane-1-carboxamide dihydrochloride (67)**

To a solution of *N*-[4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]-1,4-diazepane-1-carboxamide (**66**; 400 mg, 0.83 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (7.0 mL) were added 4-methoxybenzaldehyde (0.28 mL, 0.83 mmol), AcOH (5.0  $\mu$ L, 87  $\mu$ mol) and  $NaBH(OAc)_3$  (500 mg, 2.4 mmol). After stirring at room temperature for 2 h, the mixture was diluted with saturated  $NaHCO_3$  aqueous solution and extracted with  $CHCl_3$ . The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel ( $CHCl_3/MeOH$ ). The purified product was treated with excess 4.0 M HCl in 1,4-dioxane and MeOH. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with  $Et_2O$ , and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (470 mg, 84%).  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 2.04–2.19 (1H, m), 2.24–2.42 (1H, m), 2.96–3.21 (4H, m), 3.24–3.72 (10H, m), 3.78 (3H, s), 3.95–4.57 (6H, m), 7.01 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.36 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.54 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.60 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.78–7.94 (4H, m), 8.71 (1H, s), 10.67–10.89 (1H, m), 11.55–11.83 (1H, m); MS  $m/z$ : 610 (M+H) $^+$ ; ESI-MS  $m/z$ : 610.2991 (M+H) $^+$  (Calcd for  $C_{33}H_{39}O_3N_5F_3$ : 610.3000).

#### **4-({[4-(4-Methoxyphenyl)methyl]piperazine-1-carbonyl}amino)benzoic acid (69)**

To a solution of methyl 4-aminobenzoate (**68**; 1.5 g, 9.9 mmol) in THF (30 mL) were added triphosgene (1.1 g, 3.7 mmol) and  $Et_3N$  (1.7 mL, 12 mmol) at  $0^\circ C$ . The mixture was stirred at  $60^\circ C$  for 1.5 h. After the mixture was cooled to room temperature, 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperazine (2.1 g, 10 mmol) was added. After stirring at room temperature for 2.5 h, the mixture was diluted with  $H_2O$  and  $CHCl_3$ . The precipitated solid was collected by filtration. The filtrate was extracted with  $CHCl_3$ . The organic layer was concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and the collected solid was triturated with  $EtOAc$ , and the precipitated solid was collected by filtration. To a mixture of the obtained solid in MeOH (50 mL) was added 1.0 M NaOH aqueous solution (50 mL, 50 mmol). The mixture was stirred at  $60^\circ C$  for 3.5 h. After cooling to room temperature, the mixture was neutralized with 1.0 M HCl aqueous solution (approx.  $\sim$  pH 7), and then extracted with  $CHCl_3/IPA$  (4:1) and  $CHCl_3/MeOH$  (4:1). The combined organic layer was

dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give the product (2.2 g, 61%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.36 (4H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.41–3.49 (4H, m), 3.43 (2H, s), 3.74 (3H, s), 6.89 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.22 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.80 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.81 (1H, s); MS *m/z*: 370 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-*N*-[4-(4-{4-(trifluoromethyl)phenyl}methyl)-1,4-diazepane-1-carbonyl]phenyl]piperazine-1-carboxamide dihydrochloride (70)**

To a mixture of 4-(4-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperazine-1-carbonyl)amino)benzoic acid (**69**; 200 mg, 0.54 mmol), *tert*-butyl 1,4-diazepane-1-carboxylate (110 mg, 0.57 mmol), HOBt (90 mg, 0.67 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) was added WSC·HCl (130 mg, 0.68 mmol). After stirring at room temperature for 3 d, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and dried over MgSO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a solution of the purified product in MeOH (2.0 mL) was added 4.0 M HCl in 1,4-dioxane (2.0 mL, 8.0 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>/IPA (4:1). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. To a solution of the residue in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) were added 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde (0.20 mL, 0.53 mmol), AcOH (5.0 μL, 87 μmol) and NaBH(OAc)<sub>3</sub> (250 mg, 1.2 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product was treated with excess 4.0 M HCl in 1,4-dioxane and MeOH. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (260 mg, 70%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.91–2.47 (2H, m), 2.84–3.73 (13H, m), 3.79 (3H, s), 4.04–4.36 (5H, m), 4.37–4.58 (2H, m), 6.97–7.07 (2H, m), 7.30–7.43 (2H, m), 7.47–7.61 (4H, m), 7.79–7.98 (4H, m), 9.11 (1H, s), 11.02–11.23 (1H, m), 11.25–11.44 (1H, m); MS *m/z*: 610 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 610.2997 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: 610.3000).

#### **(3-Aminophenyl)(4-{4-(trifluoromethyl)phenyl}methyl)piperazin-1-yl)methanone (72)**

Compound **72** was prepared from 1-{4-(trifluoromethyl)phenyl}methyl}piperazine (**71**) and 3-aminobenzoic acid in 82% yield using a similar approach to that described for **60**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.26–2.47 (4H, m), 3.26 (4H, s), 3.60 (2H, s), 5.23 (2H, s), 6.41–6.47 (1H, m), 6.50–6.55 (1H, m), 6.56–6.62 (1H, m), 7.04 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.0 Hz); MS *m/z*: 364 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4-Amino-1-(4-{4-(trifluoromethyl)phenyl}methyl)piperazin-1-yl)butan-1-one (73)**

To a mixture of 1-{4-(trifluoromethyl)phenyl}methyl}piperazine (**71**; 380 mg, 1.6 mmol), 4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]butanoic acid (310 mg, 1.5 mmol), HOBt (260 mg, 1.9 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.0 mL) was added WSC·HCl (360 mg, 1.9 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a solution of the purified product in MeOH (3.0 mL) was added 4.0 M HCl in 1,4-dioxane (3.0 mL, 12 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried

over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give the product (370 mg, 74%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.43–1.63 (2H, m), 2.24–2.42 (6H, m), 2.48–2.56 (2H, m), 3.40–3.48 (4H, m), 3.58 (2H, s), 7.55 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.0 Hz); MS *m/z*: 330 (M+H)<sup>+</sup>.

**4-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-*N*-[3-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperazine-1-carboxamide dihydrochloride (74)**

To a solution of (3-aminophenyl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (**72**; 650 mg, 1.8 mmol) in THF (13 mL) were added triphosgene (190 mg, 0.64 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.30 mL, 2.2 mmol) at 0°C. The mixture was stirred at 60°C for 2 h. After the mixture was cooled to room temperature, 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperazine (480 mg, 2.3 mmol) was added. After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product was treated with excess 4.0 M HCl in 1,4-dioxane and MeOH. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (600 mg, 49%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.82–3.67 (13H, m), 3.79 (3H, s), 4.20–4.55 (7H, m), 6.99–7.06 (3H, m), 7.34 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.49–7.57 (3H, m), 7.61–7.66 (1H, m), 7.78–7.91 (4H, m), 9.09 (1H, s), 10.99–11.16 (1H, m), 11.57–11.82 (1H, m); MS *m/z*: 596 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 596.2835 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: 596.2843).

**4-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-*N*-[4-oxo-4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)butyl]piperazine-1-carboxamide dihydrochloride (75)**

Compound **75** was prepared from **73** and 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperazine in 43% yield using a similar approach to that described for **74**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.56–1.72 (2H, m), 2.27–2.42 (2H, m), 2.77–3.67 (15H, m), 3.78 (3H, s), 3.94–4.12 (3H, m), 4.24 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 4.34–4.52 (3H, m), 6.81 (1H, t, *J* = 5.1 Hz), 7.00 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.52 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.79–7.93 (4H, m), 10.88–11.14 (1H, m), 11.60–11.91 (1H, m); MS *m/z*: 562 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 562.2992 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: 562.3000).

***N*-[4-(4-{[4-(Trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperidine-4-carboxamide dihydrochloride (76)**

Compound **76** was prepared from **61** and 1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidine-4-carboxylic acid in 56% yield using a similar approach to that described for **73**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.67–1.92 (3H, m), 1.92–2.06 (3H, m), 2.56–4.31 (11H, m), 4.44 (2H, s), 7.41 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.72 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.84 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.89 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.64–9.35 (2H, m), 10.50 (1H, s), 11.78–12.16 (1H, m); MS *m/z*: 475 (M+H)<sup>+</sup>.

**1-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-*N*-[4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperidine-4-carboxamide dihydrochloride (77)**

To a solution of *N*-[4-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)phenyl]piperidine-4-carboxamide dihydrochloride (**76**; 100 mg, 0.18 mmol) in DMF (1.0 mL) were added DIPEA (94 μL, 0.55 mmol), 4-methoxybenzaldehyde (24 μL, 0.20 mmol), AcOH (21 μL, 0.37 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 mL). After the mixture was



stirred at room temperature for 1.5 h, NaBH(OAc)<sub>3</sub> (77 mg, 0.37 mmol) was added. After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product was treated with excess 4.0 M HCl in EtOAc and MeOH. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with EtOAc, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (61 mg, 50%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.87–2.16 (4H, m), 2.57–2.77 (1H, m), 2.78–3.69 (12H, m), 3.79 (3H, s), 4.17–4.30 (2H, m), 4.33–4.56 (2H, m), 7.02 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.41 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.53 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.79–7.94 (4H, m), 10.27–10.44 (1H, m), 10.43–10.56 (1H, m), 11.53–11.96 (1H, m); MS *m/z*: 595 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 595.2895 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>F<sub>3</sub>: 595.2891).

#### **1-[(6-Methoxypyridin-3-yl)methyl]-*N*-[4-(4-{4-(trifluoromethyl)phenyl}methyl)piperazine-1-carbonyl]phenyl]piperidine-4-carboxamide (78)**

Compound **78** was prepared from **76** and 6-methoxypyridine-3-carbaldehyde in 23% yield using a similar approach to that described for **77**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.56–1.69 (2H, m), 1.70–1.82 (2H, m), 1.88–2.01 (2H, m), 2.25–2.47 (5H, m), 2.78–2.91 (2H, m), 3.24–3.72 (4H, m), 3.40 (2H, s), 3.60 (2H, s), 3.83 (3H, s), 6.78 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.32 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.60–7.67 (3H, m), 7.69 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.04 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 10.00 (1H, s); MS *m/z*: 596 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 596.2840 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: 596.2843).

#### **4-{5-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl}benzoic acid (80)**

To a mixture of *tert*-butyl 4-(hydrazinecarbonyl)piperidine-1-carboxylate (**79**; 1.0 g, 4.1 mmol), pyridine (1.0 mL, 12 mmol) and THF (10 mL) was added a solution of methyl 4-(chlorocarbonyl)benzoate (860 mg, 4.3 mmol) in THF (10 mL) at 0°C. The mixture was stirred at same temperature for 0.5 h. After stirring at room temperature for 4 h, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a solution of the purified product in DCE (28 mL) were added *p*-TsCl (790 mg, 4.1 mmol) and Et<sub>3</sub>N (1.0 mL, 7.2 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a mixture of the purified product in THF (8.0 mL) and MeOH (8.0 mL) was added 8.0 M NaOH aqueous solution (1.3 mL, 10 mmol). After stirring at room temperature for 2 h, the mixture was acidified with conc. HCl under water-cooling (approx. ~ pH 3) and concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with H<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (1.0 g, 65%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.42 (9H, s), 1.62–1.75 (2H, m), 2.02–2.12 (2H, m), 2.88–3.11 (2H, m), 3.24–3.36 (1H, m), 3.87–4.00 (2H, m), 8.05–8.18 (4H, m), 13.24–13.41 (1H, m); MS *m/z*: 372 (M-H)<sup>-</sup>.

#### **{4-[5-(Piperidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]phenyl}(4-{4-(trifluoromethyl)phenyl}methyl)piperazine-1-yl}methanone (81)**

To a mixture of 4-{5-[1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl}benzoic acid (**80**; 300 mg, 0.80 mmol), 1-{4-(trifluoromethyl)phenyl}methyl}piperazine (**71**; 220 mg, 0.88 mmol), HOBt (140 mg, 1.1 mmol) and

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9.0 mL) was added WSC·HCl (190 mg, 0.98 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product was triturated with hexane/IPE (1:1), and the precipitated solid was collected by filtration. To a solution of the obtained solid in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL) was added TFA (0.50 mL, 6.5 mmol) in a water bath. After stirring at same temperature for 6 h, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution at 0°C, and then extracted with CHCl<sub>3</sub> and CHCl<sub>3</sub>/MeOH (5:1). The combined organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with hexane/IPE (1:1), and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (310 mg, 76%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.92–2.05 (2H, m), 2.20–2.31 (2H, m), 2.34–2.55 (4H, m), 3.03–3.18 (2H, m), 3.24–3.52 (5H, m), 3.53–3.79 (2H, m), 3.62 (2H, s), 7.56 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.61 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.04 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.27–8.76 (1H, m); MS *m/z*: 500 (M+H)<sup>+</sup>.

**[4-(5-{1-[(6-Methoxypyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl](4-{4-(trifluoromethyl)phenyl)methyl}piperazin-1-yl)methanone ditosylate (82)**

To a mixture of {4-[5-(piperidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]phenyl}(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl)methyl}piperazin-1-yl)methanone (**81**; 200 mg, 0.40 mmol), AcOH (46 μL, 0.80 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) was added 6-methoxypyridine-3-carbaldehyde (68 mg, 0.49 mmol). After the mixture was stirred at room temperature for 1 h, NaBH(OAc)<sub>3</sub> (180 mg, 0.83 mmol) was added. After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (hexane/CHCl<sub>3</sub>). To a solution of the purified product in acetone (3.0 mL) was treated with *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (65 mg, 0.34 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was diluted with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (160 mg, 41%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.91–2.06 (2H, m), 2.11–2.51 (3H, m), 2.28 (6H, s), 2.89–3.72 (12H, m), 3.85–3.92 (3H, m), 4.26–4.70 (4H, m), 6.90–6.98 (1H, m), 7.11 (4H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.48 (4H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.59–7.95 (7H, m), 8.00–8.14 (2H, m), 8.25–8.35 (1H, m), 9.29–9.57 (1H, m), 9.82–10.19 (1H, m); MS *m/z*: 621 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 621.2794 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>N<sub>6</sub>F<sub>3</sub>: 621.2796).

**2-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]-1*H*-benzimidazole-5-carboxylic acid (84)**

To a mixture of methyl 3,4-diaminobenzoate (**83**; 1.3 g, 7.8 mmol), triphenyl phosphite (2.5 mL, 9.4 mmol) and pyridine (5.2 mL) was added 1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidine-4-carboxylic acid (1.8 g, 7.8 mmol). The mixture was stirred under reflux condition overnight. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with EtOAc, and the solution was successively washed with 1.0 M HCl aqueous solution, water, 1.0 M NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc). To a solution of the purified product in MeOH (10 mL) was added 1.0 M NaOH aqueous solution (10 mL, 10 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. After further stirring at 55°C for 5 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with H<sub>2</sub>O and acidified (approx. ~ pH 4). After stirring at room temperature for 2 h, the mixture was sonicated. The precipitated solid was collected by filtration

to give the product (870 mg, 32%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.18–3.20 (8H, m), 1.42 (9H, s), 3.87–4.10 (1H, m), 7.54 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.77 (1H, dd, *J* = 1.5, 8.2 Hz), 8.01–8.13 (1H, m), 12.34–12.84 (2H, m); MS *m/z*: 346 (M+H)<sup>+</sup>.

**[2-(Piperidin-4-yl)-1*H*-benzimidazol-6-yl](4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (85)**

Compound **85** was prepared from **84** in 26% yield using a similar approach to that described for **81**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.61–1.74 (2H, m), 1.86–1.96 (2H, m), 2.34–2.46 (4H, m), 2.54–2.64 (2H, m), 2.87–2.97 (1H, m), 2.98–3.05 (2H, m), 3.42–3.65 (4H, m), 3.61 (2H, s), 7.15 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.33–7.60 (2H, m), 7.55 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 12.18–12.44 (1H, m); MS *m/z*: 472 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2-{1-[(6-Methoxypyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}-1*H*-benzimidazol-6-yl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone tritosylate (86)**

Compound **86** was prepared from **85** in 64% yield using a similar approach to that described for **82**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.93–2.13 (2H, m), 2.28 (9H, s), 2.32–2.42 (2H, m), 3.00–4.27 (13H, m), 3.90 (3H, s), 4.35 (2H, s), 4.48 (2H, s), 6.89–6.98 (1H, m), 7.12 (6H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.42–7.49 (1H, m), 7.49 (6H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.70–7.91 (7H, m), 8.25–8.35 (1H, m), 9.31–10.23 (2H, m); MS *m/z*: 593 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 593.2834 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>N<sub>6</sub>F<sub>3</sub>: 593.2846).

**(5-Bromo-1*H*-benzimidazol-2-yl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (88)**

Compound **88** was prepared from 5-bromo-1*H*-benzimidazole-2-carboxylic acid (**87**) in 73% yield using a similar approach to that described for **60**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.42–2.59 (4H, m), 3.63 (2H, s), 3.69–3.76 (2H, m), 4.36–4.48 (2H, m), 7.31–8.11 (2H, m), 7.42 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.58 (2H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 7.9 Hz), 13.29 (1H, s); MS *m/z*: 469 (M+H)<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl 4-[2-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)-1*H*-benzimidazol-5-yl]-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (89)**

To a mixture of (5-bromo-1*H*-benzimidazol-2-yl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (**88**; 1.2 g, 2.6 mmol), *tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (1.6 g, 5.1 mmol), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.2 g, 21 mmol), 1,4-dioxane (40 mL) and H<sub>2</sub>O (10 mL) was added Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (590 mg, 0.51 mmol). The mixture was stirred at 95°C for 24 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (1.2 g, 81%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.44 (9H, s), 2.42–2.59 (6H, m), 3.53–3.60 (2H, m), 3.63 (2H, s), 3.69–3.76 (2H, m), 3.97–4.06 (2H, m), 4.41–4.53 (2H, m), 6.11–6.22 (1H, m), 6.98–7.77 (7H, m), 13.07–13.14 (1H, m); MS *m/z*: 570 (M+H)<sup>+</sup>.

**(5-{1-[(6-Methoxypyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}-1*H*-benzimidazol-2-yl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone ditosylate (90)**

To a solution of *tert*-butyl 4-[2-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)-1*H*-benzimidazol-5-yl]-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (**89**; 1.4 g, 2.4 mmol) in MeOH (41 mL) was added 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (wetted with approx. 50% water, 800 mg). After stirring under a hydrogen atmosphere (3.0 kgf/cm<sup>2</sup>) at room temperature for 24 h, the

mixture was filtered through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a solution of the purified product in EtOAc (30 mL) was added 4.0 M HCl in EtOAc (5.0 mL, 20 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with EtOAc and hexane, and the precipitated solid was collected by filtration to give the desired intermediate (740 mg). To a mixture of a part of the intermediate obtained above (200 mg, 0.34 mmol), AcOH (0.10 mL, 1.8 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.14 mL, 1.0 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL) was added 6-methoxyppyridine-3-carbaldehyde (100 mg, 0.76 mmol). After the mixture was stirred at room temperature for 10 min, NaBH(OAc)<sub>3</sub> (580 mg, 2.8 mmol) was added. After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product was treated with *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (69 mg, 0.36 mmol) in acetone. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with EtOH and IPE, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (180 mg, 30%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.81–2.13 (4H, m), 2.28 (6H, s), 2.80–3.80 (13H, m), 3.90 (3H, s), 4.35 (2H, d, *J* = 4.6 Hz), 4.37–4.75 (2H, m), 5.80–6.12 (1H, m), 6.92–6.99 (1H, m), 7.07–7.14 (4H, m), 7.13–7.26 (1H, m), 7.27–8.09 (10H, m), 8.29–8.42 (1H, m), 9.14–9.75 (1H, m), 9.80–10.47 (1H, m), 12.74–13.74 (1H, m); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 20.67, 30.18, 38.75, 43.10, 50.57, 51.12, 51.51, 53.35, 56.02, 58.10, 110.59, 112.13, 115.54, 118.51, 122.76, 124.25 (q, *J* = 272.8 Hz), 125.40, 125.67 (q, *J* = 3.5 Hz), 128.03, 129.91 (q, *J* = 29.9 Hz), 132.22, 133.78, 137.72, 139.99, 141.95, 144.81, 145.35, 149.87, 157.87, 164.14; MS *m/z*: 593 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 593.2844 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>N<sub>6</sub>F<sub>3</sub>: 593.2846); IR (KBr) 3013, 1632, 1612, 1497, 1441, 1400, 1323, 1215, 1163, 1121, 1067, 1032, 1009 cm<sup>-1</sup>.

## Chapter 3

### 1-[(4-Methoxyphenyl)methyl]piperidine-4-carboxylic acid (92)

To a solution of 4-methoxybenzyl chloride (1.1 mL, 7.7 mmol) in DMF (10 mL) was added ethyl piperidine-4-carboxylate (**91**; 3.0 mL, 19 mmol). After stirring at room temperature for 16 h, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was successively washed with H<sub>2</sub>O, saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a solution of the purified product in THF (15 mL) and EtOH (10 mL) was added 4.0 M NaOH aqueous solution (13 mL, 52 mmol). After stirring at room temperature for 3 d, the mixture was acidified with conc. HCl (approx. ~ pH 5) and concentrated *in vacuo*. To the residue was added CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:1), and the mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with EtOAc, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (1.2 g, 63%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.46–1.63 (2H, m), 1.69–1.88 (2H, m), 1.90–2.30 (3H, m), 2.64–2.88 (2H, m), 3.08–3.63 (2H, m), 3.73 (3H, s), 6.88 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.21 (2H, d, *J* = 8.4 Hz); MS *m/z*: 250 (M+H)<sup>+</sup>.

### (5-Aminopyridin-2-yl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (94)

To a solution of 5-aminopyridine-2-carboxylic acid (**93**; 200 mg, 1.4 mmol) in DMF (3.3 mL) were added 1-[[4-

(trifluoromethyl)phenyl)methyl}piperazine (**71**; 360 mg, 1.5 mmol), WSC·HCl (330 mg, 1.7 mmol) and HOBt (250 mg, 1.9 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was successively washed with H<sub>2</sub>O, saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the product (420 mg, 79%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.32–2.69 (4H, m), 3.58 (2H, s), 3.72–3.84 (4H, m), 3.90 (2H, s), 7.01 (1H, dd, *J* = 2.7, 8.4 Hz), 7.46 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.54–7.60 (3H, m), 7.98 (1H, d, *J* = 2.7 Hz); MS *m/z*: 365 (M+H)<sup>+</sup>.

### **1-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-*N*-[6-(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazine-1-carbonyl)pyridin-3-yl]piperidine-4-carboxamide trihydrochloride (**95**)**

To a solution of 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]piperidine-4-carboxylic acid (**92**; 110 mg, 0.45 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL) were added (COCl)<sub>2</sub> (44 μL, 0.51 mmol) and DMF (1 drop) at 0°C. After the mixture was stirred at room temperature for 1 h, a solution of (5-aminopyridin-2-yl)(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (**94**; 140 mg, 0.37 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL) and pyridine (76 μL, 0.95 mmol) were added at 0°C. After stirring at room temperature for 4 h, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product was dissolved in MeOH (3.0 mL) and the solution was treated with 4.0 M HCl in 1,4-dioxane (0.50 mL, 2.0 mmol). After stirring at room temperature for 15 min, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (110 mg, 40%). <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.93–2.36 (4H, m), 2.73–2.86 (1H, m), 3.03–3.16 (2H, m), 3.20–3.74 (10H, m), 3.83 (3H, s), 4.28 (2H, s), 4.52 (2H, s), 7.00–7.07 (2H, m), 7.43–7.48 (2H, m), 7.77–7.86 (5H, m), 8.28 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz), 8.94 (1H, d, *J* = 2.4 Hz); MS *m/z*: 596 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 596.2836 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: 596.2843).

### **Methyl 5-hydroxypyridine-2-carboxylate (**97**)**

To a solution of 5-hydroxypyridine-2-carboxylic acid (**96**; 10 g, 72 mmol) in MeOH (120 mL) was added conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8.0 mL, 150 mmol). The mixture was stirred at 85°C overnight. After cooling to 0°C, the mixture was basified with 1.0 M NaOH aqueous solution (approx. ~ pH 9), and then acidified with 10% citric acid aqueous solution (approx. ~ pH 5). The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>/IPA (4:1). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give the product (8.4 g, 76%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.82 (3H, s), 7.27 (1H, dd, *J* = 2.8, 8.6 Hz), 7.94 (1H, dd, *J* = 0.5, 8.6 Hz), 8.22 (1H, dd, *J* = 0.5, 2.8 Hz), 10.81 (1H, s); MS *m/z*: 154 (M+H)<sup>+</sup>.

### **5-[[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]methoxy]pyridine-2-carboxylic acid (**98**)**

To a solution of methyl 5-hydroxypyridine-2-carboxylate (**97**; 2.0 g, 13 mmol), *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (3.0 g, 14 mmol) and PPh<sub>3</sub> (5.0 g, 19 mmol) in THF (40 mL) was added dropwise 2.2 M DEAD in toluene (9.0 mL, 20 mmol) at 0°C. After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc). To a solution of the purified product in THF (20 mL) and MeOH (20 mL) was added 1.0 M NaOH aqueous solution (40 mL, 40 mmol). The mixture was stirred at 60°C for 1 h. After cooling to room temperature, the mixture was acidified with 10% citric acid aqueous solution

(approx. ~ pH 5). The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>/IPA (4:1). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give the product (4.4 g, 99%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.10–1.25 (2H, m), 1.40 (9H, s), 1.70–1.81 (2H, m), 1.91–2.05 (1H, m), 2.60–2.91 (2H, m), 3.91–4.09 (4H, m), 7.50 (1H, dd, *J* = 2.8, 8.6 Hz), 8.01 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.36 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 8.97 (1H, s); MS *m/z*: 337 (M+H)<sup>+</sup>.

**{5-[(Piperidin-4-yl)methoxy]pyridin-2-yl}{4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]piperazin-1-yl}methanone (99)**

To a mixture of 5-[[1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]methoxy]pyridine-2-carboxylic acid (**98**; 1.4 g, 4.2 mmol), 1-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]piperazine (**71**; 0.85 mL, 4.3 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) were added WSC·HCl (1.1 g, 5.7 mmol) and HOBt (750 mg, 5.6 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a solution of the purified product in MeOH (10 mL) was added 4.0 M HCl in 1,4-dioxane (10 mL, 40 mmol). After stirring at room temperature for 2.5 h, the mixture was basified with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>/IPA (4:1). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give the product (1.7 g, 88%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.10–1.24 (2H, m), 1.64–1.74 (2H, m), 1.77–1.93 (1H, m), 2.24–2.57 (6H, m), 2.91–3.02 (2H, m), 3.32–3.73 (6H, m), 3.92 (2H, d, *J* = 6.4 Hz), 7.47 (1H, dd, *J* = 2.9, 8.8 Hz), 7.52–7.58 (3H, m), 7.69 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.24 (1H, dd, *J* = 0.7, 2.9 Hz); MS *m/z*: 463 (M+H)<sup>+</sup>.

**{4-[(4-Chlorophenyl)methyl]piperazin-1-yl}{5-[(piperidin-4-yl)methoxy]pyridin-2-yl}methanone (100)**

To a mixture of 5-[[1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]methoxy]pyridine-2-carboxylic acid (**98**; 3.0 g, 8.8 mmol), benzyl piperazine-1-carboxylate (1.8 mL, 9.3 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) were added WSC·HCl (2.3 g, 12 mmol) and HOBt (1.6 g, 12 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a solution of the purified product in EtOH (40 mL) was added 10% Pd/C (wetted with approx. 50% water, 1.0 g). After stirring under a hydrogen atmosphere (1.0 kgf/cm<sup>2</sup>) at room temperature for 3 d, to the mixture was added 10% Pd/C (wetted with approx. 50% water, 1.5 g). After stirring under a hydrogen atmosphere (1.0 kgf/cm<sup>2</sup>) at room temperature for 2 d, the mixture was filtered through a Celite pad and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give the intermediate (1.2 g). To a solution of the obtained intermediate (600 mg, 1.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 mL) were added 4-chlorobenzaldehyde (240 mg, 1.7 mmol), AcOH (10 μL, 0.17 mmol) and NaBH(OAc)<sub>3</sub> (800 mg, 3.8 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). To a solution of the purified product in MeOH (6.0 mL) was added 4.0 M HCl in 1,4-dioxane (6.0 mL, 24 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>/IPA (4:1). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give the product (640 mg, 33%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.10–1.25 (2H, m), 1.64–1.72 (2H, m), 1.76–1.91 (1H, m), 2.26–2.55 (6H, m), 2.91–3.00 (2H, m), 3.41–3.69 (6H, m), 3.91 (2H, d, *J* = 6.4 Hz), 7.29–7.42 (4H, m), 7.46 (1H, dd, *J* = 2.9, 8.8 Hz), 7.55 (1H, dd, *J* = 0.7, 8.8 Hz), 8.24 (1H, dd, *J* = 0.7, 2.9 Hz); MS *m/z*: 463 (M+H)<sup>+</sup>.

Hz); MS *m/z*: 429 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4-[(4-{5-[(Piperidin-4-yl)methoxy]pyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile (101)**

Compound **101** was prepared from **98** and 4-formylbenzotrile in 33% yield using a similar approach to that described for **100**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.10–1.29 (2H, m), 1.64–1.73 (2H, m), 1.75–1.92 (1H, m), 2.30–2.56 (6H, m), 2.90–3.01 (2H, m), 3.48–3.68 (6H, m), 3.92 (2H, d, *J* = 6.4 Hz), 7.44–7.59 (4H, m), 7.76–7.83 (2H, m), 8.24 (1H, dd, *J* = 0.4, 2.4 Hz); MS *m/z*: 420 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **[5-({1-[(4-Methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy)pyridin-2-yl](4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone trihydrochloride (102)**

To a solution of {5-[(piperidin-4-yl)methoxy]pyridin-2-yl}(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (**99**; 300 mg, 0.65 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.0 mL) were added 4-methoxybenzaldehyde (90 μL, 0.74 mmol), AcOH (5.0 μL, 87 μmol) and NaBH(OAc)<sub>3</sub> (300 mg, 1.4 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). A solution of the purified product in MeOH was treated with excess 4.0 M HCl in 1,4-dioxane. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (230 mg, 51%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.54–2.15 (5H, m), 2.75–3.73 (10H, m), 3.78 (3H, s), 3.91–4.06 (2H, m), 4.11–4.37 (3H, m), 4.38–4.68 (3H, m), 7.01 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.43–7.61 (3H, m), 7.68 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.78–7.97 (4H, m), 8.27 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 10.52 (1H, br s), 11.89 (1H, br s); MS *m/z*: 583 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 583.2888 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>F<sub>3</sub>: 583.2891).

#### **[5-({1-[(6-Methoxypyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy)pyridin-2-yl](4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone ditosylate (103)**

To a solution of {5-[(piperidin-4-yl)methoxy]pyridin-2-yl}(4-{[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)methanone (**99**; 300 mg, 0.65 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.0 mL) were added 6-methoxypyridine-3-carbaldehyde (100 mg, 0.73 mmol), AcOH (5.0 μL, 87 μmol) and NaBH(OAc)<sub>3</sub> (300 mg, 1.4 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). A solution of the purified product (230 mg, 0.40 mmol) in acetone was treated with *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (150 mg, 0.79 mmol). The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (320 mg, 53%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.38–1.65 (2H, m), 1.78–2.17 (3H, m), 2.29 (6H, s), 2.85–3.56 (10H, m), 3.89 (3H, s), 3.99 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.12–4.73 (6H, m), 6.93 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.07–7.16 (4H, m), 7.43–7.60 (5H, m), 7.70 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.75 (2H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.80–7.93 (3H, m), 8.24–8.31 (2H, m), 9.32 (1H, br s), 10.07 (1H, br s); MS *m/z*: 584 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 584.2840 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: 584.2843).

#### **{4-[(4-Chlorophenyl)methyl]piperazin-1-yl}[5-({1-[(6-methoxypyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-**

**yl}methoxy)pyridin-2-yl]methanone ditosylate (104)**

Compound **104** was prepared from **100** in 72% yield using a similar approach to that described for **103**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.39–1.65 (2H, m), 1.81–2.19 (3H, m), 2.29 (6H, s), 2.77–3.60 (10H, m), 3.70–4.74 (11H, m), 6.93 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.12 (4H, dd, *J* = 0.7, 8.4 Hz), 7.45–7.59 (9H, m), 7.62–7.75 (1H, m), 7.80–7.87 (1H, m), 8.18–8.36 (2H, m), 9.27 (1H, br s), 9.89 (1H, br s); MS *m/z*: 550 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 550.2584 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>Cl: 550.2579).

**4-({4-[5-({1-[(6-Methoxypyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy)pyridine-2-carbonyl]piperazin-1-yl}methyl)benzotrile ditosylate (105)**

Compound **105** was prepared from **101** in 66% yield using a similar approach to that described for **103**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.35–1.68 (2H, m), 1.78–2.14 (3H, m), 2.29 (6H, s), 2.77–3.60 (10H, m), 3.89 (3H, s), 3.99 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.09–4.71 (6H, m), 6.93 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.12 (4H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.46–7.60 (1H, m), 7.49 (4H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.65–7.76 (3H, m), 7.83 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz), 7.97 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.20–8.35 (2H, m), 9.27 (1H, br s), 10.01 (1H, br s); MS *m/z*: 541 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 541.2925 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>N<sub>6</sub>: 541.2922).

**4-({4-[5-({1-[(6-Methylpyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy)pyridine-2-carbonyl]piperazin-1-yl}methyl)benzotrile tetrahydrochloride (106)**

Compound **106** was prepared from **101** and 6-methylpyridine-3-carbaldehyde in 38% yield using a similar approach to that described for **102**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.54–2.22 (5H, m), 2.57–4.86 (21H, m), 7.54 (1H, dd, *J* = 2.9, 8.8 Hz), 7.68 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.79–8.04 (4H, m), 8.27 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 8.38–8.68 (2H, m), 8.86–9.08 (1H, m), 11.34 (1H, br s), 11.91 (1H, br s); MS *m/z*: 525 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 525.2971 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>O<sub>2</sub>N<sub>6</sub>: 525.2973).

**4-({4-[5-({1-[(6-Ethoxypyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy)pyridine-2-carbonyl]piperazin-1-yl}methyl)benzotrile ditosylate (107)**

Compound **107** was prepared from **101** and **124** in 59% yield using a similar approach to that described for **103**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.33 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.41–1.63 (2H, m), 1.76–2.17 (3H, m), 2.29 (6H, s), 2.84–3.54 (10H, m), 3.99 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.12–4.77 (8H, m), 6.89 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.11 (4H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.41–7.59 (1H, m), 7.48 (4H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.65–7.75 (3H, m), 7.82 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz), 7.97 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.22–8.34 (2H, m), 9.25 (1H, br s), 10.01 (1H, br s); MS *m/z*: 555 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 555.3079 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>N<sub>6</sub>: 555.3078).

**Methyl 5-hydroxy-3-methylpyridine-2-carboxylate (109)**

To a solution of methyl 5-methoxy-3-methylpyridine-2-carboxylate<sup>69)</sup> (**108**; 2.4 g, 13 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (140 mL) was added AlCl<sub>3</sub> (20 g, 150 mmol). The mixture was heated under reflux condition overnight under an argon atmosphere. After cooling to 0°C, the mixture was diluted with 1.0 M HCl aqueous solution and stirred at room temperature. The mixture was basified with 1.0 M NaOH aqueous solution and acidified with 10% citric acid aqueous solution. The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>/IPA (4:1), and the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give the product (1.8 g, 80%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.44 (3H, s), 3.79 (3H, s), 7.08 (1H, dd, *J* = 0.8, 2.6 Hz), 8.02 (1H, dd, *J* = 0.4, 2.6 Hz), 10.56 (1H, br s); MS *m/z*: 168 (M+H)<sup>+</sup>.



#### 5-**{[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]methoxy}**-3-methylpyridine-2-carboxylic acid (**110**)

Compound **110** was prepared from **109** in 69% yield using a similar approach to that described for **98**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.03–1.27 (2H, m), 1.40 (9H, s), 1.66–1.82 (2H, m), 1.86–2.06 (1H, m), 2.46–2.54 (3H, m), 2.61–2.92 (2H, m), 3.92–4.03 (2H, m), 3.99 (2H, d, *J* = 6.4 Hz), 7.36 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 8.16 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 12.57 (1H, br s); MS *m/z*: 351 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-**{[4-{3-Methyl-5-[(piperidin-4-yl)methoxy]pyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile (**111**)**

To a solution of 5-**{[1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]methoxy}**-3-methylpyridine-2-carboxylic acid (**110**; 600 mg, 1.7 mmol), 4-**[(piperazin-1-yl)methyl]benzotrile dihydrochloride (**126**; 480 mg, 1.8 mmol)**, Et<sub>3</sub>N (0.49 mL, 3.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9.0 mL) were added WSC·HCl (450 mg, 2.3 mmol), HOBt (320 mg, 2.4 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product was dissolved in MeOH (5.0 mL) and treated with 4.0 M HCl in 1,4-dioxane (5.0 mL, 20 mmol). After stirring at room temperature for 1.5 h, the mixture was basified with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>/IPA (4:1). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give the product (790 mg, quantitative yield). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.07–1.33 (2H, m), 1.62–1.73 (2H, m), 1.75–1.91 (1H, m), 2.21 (3H, s), 2.25–2.37 (2H, m), 2.38–2.55 (4H, m), 2.89–3.04 (2H, m), 3.06–3.16 (2H, m), 3.58–3.61 (2H, m), 3.61–3.69 (2H, m), 3.88 (2H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.32 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.52 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.79 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.6 Hz); MS *m/z*: 434 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-**{[4-[5-**{[1-[(6-Ethoxypyridin-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy}**-3-methylpyridine-2-carbonyl]piperazin-1-yl)methyl]benzotrile ditosylate (**112**)**

Compound **112** was prepared from **111** and **124** in 56% yield using a similar approach to that described for **103**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.33 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.41–1.59 (2H, m), 1.78–2.14 (3H, m), 2.26 (3H, s), 2.29 (6H, s), 2.79–3.78 (10H, m), 3.95 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.06–4.82 (8H, m), 6.90 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.07–7.15 (4H, m), 7.37 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.48 (4H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.61–7.76 (2H, m), 7.82 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz), 7.91–8.02 (2H, m), 8.08 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.26 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 9.27 (1H, br s), 10.04 (1H, br s); MS *m/z*: 569 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 569.3238 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>O<sub>3</sub>N<sub>6</sub>: 569.3235).

#### 4-**{[4-[5-**{[1-[(5-Methoxypyrazin-2-yl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy}**-3-methylpyridine-2-carbonyl]piperazin-1-yl)methyl]benzotrile ditosylate (**113**)**

To a mixture of 4-**[(4-{3-methyl-5-[(piperidin-4-yl)methoxy]pyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile (**111**; 410 mg, 0.94 mmol)** and MeCN (8.0 mL) were added 2-(chloromethyl)-5-methoxypyrazine (**132**; 170 mg, 1.1 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (390 mg, 2.8 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product (380 mg, 0.68 mmol) was dissolved in MeOH and treated with *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (240 mg, 1.3 mmol). The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (500 mg, 59%). <sup>1</sup>H-NMR

(DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.42–1.65 (2H, m), 1.76–2.16 (3H, m), 2.26 (3H, s), 2.29 (6H, s), 2.81–3.82 (10H, m), 3.85–4.05 (5H, m), 4.34–4.75 (4H, m), 4.41 (2H, d,  $J = 4.9$  Hz), 7.07–7.15 (4H, m), 7.37 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 7.48 (4H, d,  $J = 7.9$  Hz), 7.70 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.97 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz), 8.09 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 8.38 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 8.43 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 9.66 (1H, br s), 9.78–10.19 (1H, m); MS  $m/z$ : 556 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 556.3030 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>N<sub>7</sub>: 556.3031).

#### **4-({4-[5-({1-[(5-Ethoxypyrazin-2-yl)methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl]piperazin-1-yl)methyl}benzotrile succinate (114)**

To a solution of 4-[(4-{3-methyl-5-[(piperidin-4-yl)methoxy]pyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile (**111**; 3.2 g, 7.3 mmol), DIPEA (4.0 mL, 23 mmol) and MeCN (30 mL) was added a solution of 2-(chloromethyl)-5-ethoxypyrazine (**133**; 1.5 g, 8.4 mmol) in MeCN (20 mL). After stirring at room temperature for 14 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (hexane/EtOAc), followed by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product (3.2 g, 5.7 mmol) was dissolved in EtOH (12 mL) and treated with succinic acid (670 mg, 5.7 mmol). After stirring at room temperature for 0.5 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was treated with heptane. After stirring at room temperature overnight, the precipitated solid was collected by filtration to give the product (3.7 g, 74%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.19–1.43 (2H, m), 1.34 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz), 1.64–1.85 (3H, m), 1.98–2.17 (2H, m), 2.20 (3H, s), 2.25–2.36 (2H, m), 2.39–2.45 (2H, m), 2.41 (4H, s), 2.79–2.96 (2H, m), 3.03–3.21 (2H, m), 3.54–3.69 (6H, m), 3.91 (2H, d,  $J = 6.0$  Hz), 4.33 (2H, q,  $J = 6.9$  Hz), 7.32 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 7.52 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.79 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 8.06 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 8.16 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 8.21 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 12.10 (2H, br s); MS  $m/z$ : 570 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 570.3185 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>N<sub>7</sub>: 570.3187).

#### **5-{{1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-methoxypiperidin-4-yl}methoxy}-3-methylpyridine-2-carboxylic acid (115)**

To a mixture of methyl 5-hydroxy-3-methylpyridine-2-carboxylate (**109**; 960 mg, 5.7 mmol), *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)-4-methoxypiperidine-1-carboxylate (**135**; 1.4 g, 5.7 mmol) and toluene (20 mL) was added cyanomethylenetriethylphosphorane (2.2 mL, 8.3 mmol). The mixture was stirred at 100°C overnight under an argon atmosphere. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc). The purified product was dissolved in MeOH (20 mL) and treated with 1.0 M NaOH aqueous solution (20 mL, 20 mmol). The mixture was stirred at 60°C for 1 h. After cooling to room temperature, the mixture was washed with Et<sub>2</sub>O and the aqueous layer was acidified with 10% citric acid aqueous solution. The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>, and the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (2.0 g, 91%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.40 (9H, s), 1.45–1.60 (2H, m), 1.73–1.88 (2H, m), 2.51 (3H, s), 2.85–3.16 (2H, m), 3.19 (3H, s), 3.61–3.82 (2H, m), 4.11 (2H, s), 7.42 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 8.20 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 12.60 (1H, br s); MS  $m/z$ : 381 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **5-{{1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-fluoropiperidin-4-yl}methoxy}-3-methylpyridine-2-carboxylic acid (116)**

Compound **116** was prepared from **109** and *tert*-butyl 4-fluoro-4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate<sup>70</sup> in 54%

yield using a similar approach to that described for **115**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.41 (9H, s), 1.55–1.82 (2H, m), 1.83–2.01 (2H, m), 2.51 (3H, s), 2.89–3.18 (2H, m), 3.73–3.93 (2H, m), 4.27 (2H, d, *J* = 21.2 Hz), 7.42 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.21 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 12.64 (1H, br s); MS *m/z*: 369 (M+H)<sup>+</sup>.

**4-[(4-{5-[(4-Methoxypiperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile (117)**

Compound **117** was prepared from **115** in quantitative yield using a similar approach to that described for **111**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.41–1.62 (2H, m), 1.64–1.83 (2H, m), 2.22 (3H, s), 2.26–2.36 (2H, m), 2.37–2.48 (2H, m), 2.63–2.81 (4H, m), 3.06–3.18 (2H, m), 3.16 (3H, s), 3.60 (2H, s), 3.60–3.70 (2H, m), 4.00 (2H, s), 7.37 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.52 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.80 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.11 (1H, d, *J* = 2.4 Hz); MS *m/z*: 464 (M+H)<sup>+</sup>.

**4-[(4-{5-[(4-Fluoropiperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile (118)**

Compound **118** was prepared from **116** in quantitative yield using a similar approach to that described for **111**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.52–1.90 (4H, m), 2.21 (3H, s), 2.26–2.35 (2H, m), 2.37–2.48 (2H, m), 2.63–2.87 (4H, m), 3.05–3.19 (2H, m), 3.60 (2H, s), 3.61–3.69 (2H, m), 4.14 (2H, d, *J* = 21.0 Hz), 7.38 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.52 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.79 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.12 (1H, d, *J* = 2.4 Hz); MS *m/z*: 452 (M+H)<sup>+</sup>.

**4-[(4-{5-[(1-[(6-Ethoxypyridin-3-yl)methyl]-4-methoxypiperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile succinate (119)**

To a solution of 4-[(4-{5-[(4-methoxypiperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile (**117**; 370 mg, 0.79 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.0 mL) were added 6-ethoxypyridine-3-carbaldehyde (**124**; 120 mg, 0.79 mmol), AcOH (5.0 μL, 87 μmol) and NaBH(OAc)<sub>3</sub> (450 mg, 2.1 mmol). After stirring at room temperature for 4 h, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). The purified product (370 mg, 0.62 mmol) was dissolved in MeOH and treated with succinic acid (72 mg, 0.61 mmol). The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with heptane, and the precipitated solid was collected by filtration to give the product (340 mg, 61%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.30 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.50–1.70 (2H, m), 1.73–1.87 (2H, m), 2.14–2.63 (8H, m), 2.21 (3H, s), 2.41 (4H, s), 3.05–3.16 (2H, m), 3.15 (3H, s), 3.44 (2H, s), 3.54–3.72 (2H, m), 3.59 (2H, s), 4.00 (2H, s), 4.28 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 6.75 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.52 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.61 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz), 7.79 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.03 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.10 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 12.22 (2H, br s); MS *m/z*: 599 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS *m/z*: 599.3348 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>34</sub>H<sub>43</sub>O<sub>4</sub>N<sub>6</sub>: 599.3340).

**4-[(4-{5-[(1-[(6-Ethoxypyridin-3-yl)methyl]-4-fluoropiperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzotrile succinate (120)**

Compound **120** was prepared from **118** in 68% yield using a similar approach to that described for **119**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.30 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.55–2.06 (4H, m), 2.14–2.48 (6H, m), 2.21 (3H, s), 2.42 (4H, s), 2.58–2.74 (2H, m),

3.03–3.18 (2H, m), 3.46 (2H, s), 3.59 (2H, s), 3.60–3.70 (2H, m), 4.15 (2H, d,  $J = 20.5$  Hz), 4.28 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 6.75 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.37 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz), 7.52 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.62 (1H, dd,  $J = 2.4, 8.5$  Hz), 7.79 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 8.03 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz), 8.11 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 12.17 (2H, br s); MS  $m/z$ : 587 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 587.3137 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>N<sub>6</sub>F: 587.3140).

#### **4-({4-[5-({1-[(5-Ethoxypyrazin-2-yl)methyl]-4-methoxypiperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl]piperazin-1-yl)methyl}benzonitrile succinate (121)**

Compound **121** was prepared from **117** and **133** in 65% yield using a similar approach to that described for **114**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.34 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.53–1.72 (2H, m), 1.72–1.88 (2H, m), 2.21 (3H, s), 2.25–2.47 (6H, m), 2.41 (4H, s), 2.53–2.65 (2H, m), 3.05–3.18 (2H, m), 3.15 (3H, s), 3.59 (4H, s), 3.61–3.69 (2H, m), 4.01 (2H, s), 4.33 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 7.37 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 7.52 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.79 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 8.10 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 8.17 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 8.21 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 12.22 (2H, br s); MS  $m/z$ : 600 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 600.3292 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>N<sub>7</sub>: 600.3293).

#### **4-({4-[5-({1-[(5-Ethoxypyrazin-2-yl)methyl]-4-fluoropiperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl]piperazin-1-yl)methyl}benzonitrile succinate (122)**

To a solution of 4-[(4-{5-[(4-fluoropiperidin-4-yl)methoxy]-3-methylpyridine-2-carbonyl}piperazin-1-yl)methyl]benzonitrile (**118**; 2.0 g, 4.4 mmol) in MeCN (20 mL) were added DIPEA (2.7 mL, 16 mmol) and 2-(chloromethyl)-5-ethoxypyrazine (**133**; 960 mg, 5.5 mmol) in MeCN (5.0 mL). After stirring at 50°C for 18 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH), followed by column chromatography on amino functionalized silica gel (hexane/EtOAc). The obtained product was suspended in Et<sub>2</sub>O and the mixture was stirred at room temperature overnight. The precipitated solid was collected by filtration. The obtained solid was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/EtOAc). The obtained product was triturated with Et<sub>2</sub>O, and the precipitated solid was collected by filtration. The obtained solid (2.0 g, 3.3 mmol) was dissolved in acetone (15 mL) and EtOH (15 mL) and treated with succinic acid (390 mg, 3.3 mmol). After stirring at room temperature 15 min, EtOH (15 mL) was added. After stirring at room temperature 0.5 h, the mixture was stirred at 50°C for additional 15 min. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. To the residue was suspended in heptane. After stirring at room temperature for 0.5 h, the precipitated solid was collected by filtration to give the product (2.1 g, 68%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.34 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.61–2.01 (4H, m), 2.21 (3H, s), 2.26–2.47 (6H, m), 2.42 (4H, s), 2.62–2.81 (2H, m), 3.05–3.19 (2H, m), 3.53–3.72 (2H, m), 3.59 (2H, s), 3.62 (2H, s), 4.16 (2H, d,  $J = 20.7$  Hz), 4.34 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 7.37 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 7.52 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.79 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz), 8.12 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 8.18 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 8.22 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 12.16 (2H, br s); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 14.21, 17.16, 28.76, 30.96 (d,  $J = 20.9$  Hz), 40.79, 45.91, 48.01, 52.18, 52.83, 60.08, 60.96, 61.72, 72.23 (d,  $J = 23.4$  Hz), 92.59 (d,  $J = 174.5$  Hz), 109.71, 118.77, 123.19, 129.52, 131.27, 132.09, 133.78, 134.08, 140.24, 143.93, 144.83, 146.21, 154.25, 158.67, 166.36, 173.50; MS  $m/z$ : 588 (M+H)<sup>+</sup>; ESI-MS  $m/z$ : 588.3092 (M+H)<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>N<sub>7</sub>F: 588.3093); IR (KBr) 2228, 1717, 1626, 1585, 1531, 1427, 1368, 1335, 1312, 1213, 1177, 1047, 1016, 1003 cm<sup>-1</sup>.

#### **6-Ethoxypyridine-3-carbaldehyde (124)**

To a solution of 5-bromo-2-ethoxypyridine (**123**; 5.0 g, 25 mmol) in THF (70 mL) was added dropwise *n*-BuLi (16 mL, 26 mmol, 1.7 M in hexane) at  $-68^{\circ}\text{C}$  under a nitrogen atmosphere. After the mixture was stirred at the same temperature for 0.5 h, DMF (10 mL, 130 mmol) was added dropwise. The mixture was allowed to warm gradually to room temperature and stirred for 3 h. The mixture was diluted with 10% citric acid aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (2.2 g, 59%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1.35 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 4.43 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 6.96 (1H, ddd,  $J = 0.7, 0.7, 8.7$  Hz), 8.11 (1H, dd,  $J = 2.4, 8.7$  Hz), 8.75 (1H, dd,  $J = 0.7, 2.4$  Hz), 9.96 (1H, d,  $J = 0.7$  Hz); MS  $m/z$ : 152 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### 4-[(Piperazin-1-yl)methyl]benzotrile dihydrochloride (**126**)

To a solution of *tert*-butyl piperazine-1-carboxylate (**125**; 7.0 g, 38 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (47 mL) were added 4-formylbenzotrile (5.9 g, 45 mmol) and AcOH (4.3 mL, 75 mmol). After the mixture was stirred at room temperature for 0.5 h,  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (16 g, 75 mmol) was added. After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was diluted with saturated  $\text{NaHCO}_3$  aqueous solution and extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ). The purified product was dissolved in EtOAc (60 mL) and  $\text{CHCl}_3$  (60 mL) and treated with 4.0 M HCl in EtOAc (60 mL, 240 mmol). After stirring at room temperature for 3 d, the mixture was diluted with hexane, and then the precipitated solid was collected by filtration to give the product (8.0 g, 77%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 3.59 (8H, s), 4.52 (2H, s), 7.70 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.90 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz); MS  $m/z$ : 202 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### Methyl 5-methoxypyrazine-2-carboxylate (**128**)

To a solution of methyl 5-chloropyrazine-2-carboxylate (**127**; 10 g, 58 mmol) in MeOH (100 mL) was added portion-wise sodium methoxide (5.0 g, 93 mmol) at  $0^{\circ}\text{C}$  under a nitrogen atmosphere. After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was diluted with 10% citric acid aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (7.9 g, 81%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3.88 (3H, s), 4.00 (3H, s), 8.41 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 8.84 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz); MS  $m/z$ : 169 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### Ethyl 5-ethoxypyrazine-2-carboxylate (**129**)

To a solution of *t*-BuOK (2.3 g, 21 mmol) in EtOH (30 mL) was added portion-wise methyl 5-chloropyrazine-2-carboxylate (**127**; 3.0 g, 17 mmol) at  $0^{\circ}\text{C}$ . After stirring at the same temperature for 1 h, the mixture was neutralized with 1.0 M HCl aqueous solution and extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel ( $\text{CHCl}_3$ ) to give the product (2.8 g, 82%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1.33 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.37 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 4.34 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 4.44 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 8.37 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 8.81 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz); MS  $m/z$ : 197 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### (5-Methoxypyrazin-2-yl)methanol (**130**)

To a mixture of methyl 5-methoxypyrazine-2-carboxylate (**128**; 2.3 g, 14 mmol) and MeOH (45 mL) was added  $\text{NaBH}_4$

(1.6 g, 42 mmol) at 0°C. After stirring at the same temperature for 15 min, the mixture was stirred at room temperature for an additional 2 h. The mixture was acidified with 1.0 M HCl aqueous solution and basified with 1.0 M NaOH aqueous solution. The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>/IPA (4:1), and the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (1.5 g, 77%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.90 (3H, s), 4.55 (2H, d, *J* = 5.7 Hz), 5.40 (1H, t, *J* = 5.7 Hz), 8.20–8.22 (1H, m), 8.22–8.24 (1H, m); MS *m/z*: 141 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **(5-Ethoxy-pyrazin-2-yl)methanol (131)**

Compound **131** was prepared from **129** in 75% yield using a similar approach to that described for **130**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.34 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.34 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 4.54 (2H, d, *J* = 5.7 Hz), 5.39 (1H, t, *J* = 5.7 Hz), 8.07–8.32 (2H, m); MS *m/z*: 155 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **2-(Chloromethyl)-5-methoxypyrazine (132)**

To a solution of (5-methoxypyrazin-2-yl)methanol (**130**; 700 mg, 5.0 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) was added SOCl<sub>2</sub> (1.0 mL, 14 mmol) at 0°C. After stirring at room temperature for 0.5 h, the mixture was concentrated *in vacuo* to give the product (800 mg, quantitative yield). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.98 (3H, s), 4.65 (2H, s), 8.19–8.20 (1H, m), 8.20–8.21 (1H, m); MS *m/z*: 159 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **2-(Chloromethyl)-5-ethoxypyrazine (133)**

Compound **133** was prepared from **131** in quantitative yield using a similar approach to that described for **132**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.35 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.36 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 4.80 (2H, s), 8.29 (1H, d, *J* = 1.3 Hz), 8.33 (1H, d, *J* = 1.3 Hz); MS *m/z*: 173 (M+H)<sup>+</sup>.

#### ***tert*-Butyl 4-(hydroxymethyl)-4-methoxypiperidine-1-carboxylate (135)**

To a solution of *tert*-butyl 1-oxa-6-azaspiro[2.5]octane-6-carboxylate<sup>72)</sup> (**134**; 10 g, 47 mmol) in MeOH (150 mL) was added *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (300 mg, 1.6 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and H<sub>2</sub>O. The mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to give the product (6.0 g, 52%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.23–1.43 (2H, m), 1.39 (9H, s), 1.53–1.67 (2H, m), 2.77–3.06 (2H, m), 3.13 (3H, s), 3.30–3.34 (2H, m), 3.53–3.73 (2H, m), 4.54 (1H, t, *J* = 5.5 Hz); MS *m/z*: 246 (M+H)<sup>+</sup>.

## **Pharmacology**

All animal experiments were performed in accordance with the regulation of the Animal Ethics Committee of Astellas Pharma Inc.

## **Cell Lines**

The breast cancer cell lines MDA-MB-453, SK-BR-3 and AU565 were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and OCUB-M was purchased from RIKEN BRC (Tsukuba, Japan). MDA-MB-453 was cultured in Leibovitz's L-15 Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) under CO<sub>2</sub>-free conditions at 37°C. OCUB-M was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (SIGMA Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. SK-BR-3 and AU565 were cultured in RPMI 1640 medium (SIGMA Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. All medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (SIGMA Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies [Cat. No. 15070-063]).

### **Whole Cell ELISA**

MDA-MB-453 cells were seeded onto 384-well clear flat plates at  $1.5 \times 10^4$  cells/well. The following day, the cells were treated with the test compound at final concentrations of 0 (DMSO only), 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 and 10000 nM. The final concentration of DMSO in each well was 0.1% (v/v). Two hours after addition of the test compound, the cells were fixed in 40% glyoxal solution (Nakarai Chemical Ltd, Kyoto, Japan) for 30 min at room temperature. For probing, the supernatant was discarded and the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature. Subsequently, the supernatant was discarded and the cells were blocked with ODYSSEY Blocking solution (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) for 1 h at room temperature. After discarding the supernatant, a primary phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) Antibody (1:500 in ODYSSEY Blocking solution; Cat. No. 3661, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) was added. After incubating overnight at 4°C, the plates were washed 3 times with TBS containing 0.05% Tween20 (TBS/Tween). Goat anti-rabbit IRDye 800CW (Li-Cor Biosciences; 1:1,000 in ODYSSEY Blocking solution) was added, and the plates were incubated for 1 h at room temperature. After the incubation, the plates were washed 3 times with TBS/Tween and dried for at least 3 h at room temperature. Fluorescence signals were quantified using the Aeries automated infrared imaging system (Li-Cor Biosciences). The assays were performed in triplicate, and the data were analyzed using Prism5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The EC<sub>50</sub> value of each test compound was calculated using Sigmoid-Emax model non-linear regression analysis. The average signal was normalized by regarding the signal in the DMSO-treated group as 0% in each experiment.

### **Cell Growth Inhibition Assay**

Each breast cancer cells above were seeded onto non-adherent 384-well white plates at 500 cells/well or 96-well white plates at 1000 cells/well. The following day, the test compound was added to each well at final concentrations of 0 (DMSO only), 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, and 3000 nM. The final concentration of DMSO in each well was 0.1% (v/v). Four days after addition of the test compound, cell viability was determined using a CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA). CellTiter-Glo® Reagent was added to each well, and luminescence was measured using ARVO SX® (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA). The assay was performed in triplicate. Cell viability according to luminescence intensity was normalized by regarding the average luminescence intensity following treatment with DMSO only as 100% and no luminescence intensity as 0%. The IC<sub>50</sub> value of each test compound was calculated by Sigmoid-Emax non-linear regression analysis using Prism5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## Animals

Five-week-old male nude mice (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrJ[nu/nu]) were purchased from Charles River Laboratories Japan, Inc. (Kanagawa, Japan). They were maintained on a standard diet and water throughout the experiments under specific-pathogen-free conditions.

### *In Vivo* Antitumor Evaluation of ASP4132 (90)

MDA-MB-453 cells were suspended in a 1:1 BD Matrigel Matrix (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) to PBS solution at  $3 \times 10^7$  cells/mL. The cell suspension was subcutaneously implanted at  $3 \times 10^6$  cells/animal/100  $\mu$ L around the lumbar region and allowed to grow. Mice were divided into 6 groups (N = 5) at 21 d after inoculation such that the mean tumor volume was comparable among the groups. The first day of administration was designated Day 0, and observation was continued until Day 20. ASP4132 was dissolved in 6% (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin (SIGMA Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) solution as the vehicle, to obtain concentrations of 0.5, 1, 2, 4 and 8 mg/10 mL. Vehicle or 0.5, 1, 2, 4 or 8 mg/kg of ASP4132 was orally administered (10 mL/kg) to nude mice once-daily for 20 d. All dose levels of ASP4132 are expressed as the free base. Tumor diameter and body weight were measured on Days 0, 5, 9, 13, 16 and 20. Tumor volume was calculated as follows:

$$\text{Tumor volume [mm}^3\text{]} = (\text{Length of tumor long axis [mm]}) \times (\text{Length of tumor short axis [mm]})^2 \times 0.5$$

Dunnett's multiple comparisons test was used to compare the tumor volume and body weight the day after the last treatment (Day 20) between the vehicle- and ASP4132-treated groups.  $P < 0.05$  was used to indicate statistical significance. The tumor growth inhibition rate was calculated as follows:

$$\text{Tumor growth inhibition rate [\%]} = 100 \times \{1 - [(\text{Mean tumor volume of each group on Day 20 [mm}^3\text{)} - (\text{Mean tumor volume of each group on Day 0 [mm}^3\text{)}) / ((\text{Mean tumor volume of the vehicle group on Day 20 [mm}^3\text{)} - (\text{Mean tumor volume of the vehicle group on Day 0 [mm}^3\text{)})]\}$$

The tumor regression rate was calculated in groups whose tumor growth inhibition exceeded 100% as follows:

$$\text{Tumor regression rate [\%]} = 100 \times [1 - (\text{Mean tumor volume of each group on Day 20 [mm}^3\text{)}) / (\text{Mean tumor volume of each group on Day 0 [mm}^3\text{)})]$$

### *In Vivo* Antitumor Evaluation of Compound 122

MDA-MB-453 cells were suspended in a 1:1 BD Matrigel Matrix (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) to PBS solution at  $3 \times 10^7$  cells/mL. The cell suspension was subcutaneously implanted at  $3 \times 10^6$  cells/animal/100  $\mu$ L around the lumbar region and allowed to grow. Mice were divided into 4 groups (N = 5) approximately 3 weeks after inoculation such that the mean tumor volume was comparable among the groups. The first day of administration was designated Day 1, and observation was continued until Day 15. Compound 122 was dissolved in 6% (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin (Sigma Aldrich Co. LLC.) solution as the vehicle, to obtain concentrations of 1, 2 and 4 mg/10 mL. Vehicle or 1, 2 or 4 mg/kg of 122 was orally administered (10 mL/kg) to nude mice twice-daily for 14 days. All dose levels of 122 are expressed as the free base. Tumor diameter and body weight were measured on Days 0, 5, 8, 12 and 15. Tumor volume was calculated as follows:

$$\text{Tumor volume [mm}^3\text{]} = (\text{Length of tumor long axis [mm]}) \times (\text{Length of tumor short axis [mm]})^2 \times 0.5$$

Dunnett's multiple comparisons test was used to compare the tumor volume and body weight the day after the last



treatment (Day 15) between the vehicle- and **122**-treated groups.  $P < 0.05$  was used to indicate statistical significance.

The tumor growth inhibition rate was calculated as follows:

Tumor growth inhibition rate [%] =  $100 \times \{1 - [(Mean\ tumor\ volume\ of\ each\ group\ on\ Day\ 15\ [mm^3]) - (Mean\ tumor\ volume\ of\ each\ group\ on\ Day\ 0\ [mm^3])] / [(Mean\ tumor\ volume\ of\ the\ vehicle\ group\ on\ Day\ 15\ [mm^3]) - (Mean\ tumor\ volume\ of\ the\ vehicle\ group\ on\ Day\ 0\ [mm^3])]\}$

The tumor regression rate was calculated in groups whose tumor growth inhibition exceeded 100% as follows:

Tumor regression rate [%] =  $100 \times [1 - (Mean\ tumor\ volume\ of\ each\ group\ on\ Day\ 15\ [mm^3]) / (Mean\ tumor\ volume\ of\ each\ group\ on\ Day\ 0\ [mm^3])]$

### ***In Vitro* hERG Inhibition Assay**

CHO cells that stably expressed hERG channels were cultured in Ham's F12 containing 10% FBS, 5% geneticin and 5% hygromycin B. Prior to experiment, the culture medium was removed and the cells were washed with PBS. Cell was suspended with Serum Free Media containing CHO-S-SFM II, 25 mM HEPES, 100 units/mL P/S at concentration of  $2-5 \times 10^6$  cells/mL. Cell suspension, test compounds solution on plate, and extracellular and intracellular solutions were set at Qpatch system. Used solutions are followings:

Extracellular (mM): 145 NaCl, 4 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 D(+)-Glucose, adjust pH to 7.4 with NaOH

Intracellular (mM): 120 KCl, 4 Na<sub>2</sub>-ATP, 10 EGTA, 10 HEPES, 1.75 MgCl<sub>2</sub>, 5.374 CaCl<sub>2</sub>, adjust pH to 7.2 with KOH

The application of pressure for forming gigaseals and the whole-cell patch clamp configuration were established using QPatch Assay Software (Sophion Bioscience).

Addition of test compounds was also set up using the QPatch Assay Software. Compounds were added to the cells with the eight pipettes via the QPlate integrated glass microfluidic pathways. hERG inhibition was evaluated using a stimulus voltage protocol consisting of a 4.8 s activating pulse to 20 mV from a holding potential of -80 mV and a 5 s test pulse to -50 mV (tail current). The pulse pattern was repeated continuously at 15 sec intervals. All QPatch data were analyzed and IC<sub>50s</sub> were calculated using Sophion's QPatch Assay software.

### **Measured log*D*<sub>7.4</sub>**

The Log*D*<sub>7.4</sub> value was calculated as the natural logarithm of the compound concentration ratio between 1-octanol and Dulbecco's phosphate buffered salts aqueous solution (pH 7.4). The concentration within each of the two layers was evaluated using LC-MS after 10 mM DMSO stock solution of the compound was dissolved and partitioned at 23°C.

### **Aqueous Solubility**

The test compounds in 10 mM DMSO solution (13 µL) were diluted to 130 µM by adding the fluid for disintegration test (JP1: pH 1.2, JP2: pH 6.8, JP2+TC). After incubation at 25°C for 20 h, precipitates were separated by filtration. The filtrate and a standard solution comprising a 100 µM DMSO solution of the test compound were examined using liquid chromatography. The ratio of the peak area of the sample solution to the peak area of the standard solution was calculated to determine the aqueous solubility.

### ***In Vitro* Intrinsic Clearance with Human Liver Microsomes**

The test compounds (0.1–0.2  $\mu\text{M}$ ) were incubated with pooled human liver microsomes (0.2 mg protein/mL), NADPH (1 mM) and EDTA (0.1 mM) in pH 7.4 phosphate buffer (100 mM) at 37°C for 30 min. The peak area of the test compound was measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to calculate the *in vitro* intrinsic clearance ( $\text{CL}_{\text{int, vitro}}$ ).

## **Pharmacokinetic study**

### **Compound 78 and 90**

Male SD rats were administered orally and intravenously with compound **78** and **90**. Compound **78** was dissolved in 30–40% PEG400, and compound **90** was dissolved in DMF/PG/water (10/10/80), respectively, for oral and intravenous administration. Blood samples were collected using syringes containing heparin sodium at multiple time points up to 24 h after oral or intravenous administrations. Compound concentrations were determined using LC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters were calculated by non-compartment analysis.

### **Compound 122**

Male SD rats were administered orally and intravenously with compound **122**. Compound **122** was dissolved in 30–40% PEG400 for oral and intravenous administration. Blood samples were collected using syringes containing heparin sodium at multiple time points up to 24 h after oral or intravenous administrations. Compound concentrations were determined using LC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters were calculated by non-compartment analysis.

## 参考文献

- 1) GLOBOCAN 2018 (<https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>)
- 2) 国立がん研究センターがん情報サービス (<http://ganjoho.jp/public/index.html>)
- 3) 日本臨床 75 巻 増刊号 3 乳癌学 最新の診断と治療 (2017)
- 4) 日本医事新報, No. 4726, 11 月 4 週号 (2014).
- 5) Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P. A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L. M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P. K., Norris F. K., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett J. C., Lewis C., Neuhausen S., Cannon-Albright L., Goldgar D., Wiseman R., Kamb A., Skolnick M. H., *Science*, **266**, 66–71 (1994).
- 6) Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., Gumbs C., Micklem G., Barfoot R., Hamoudi R., Patel S., Rices C., Biggs P., Hashim Y., Smith A., Connor F., Arason A., Gudmundsson J., Ficenc D., Kelsell D., Ford D., Tonin P., Bishop D. T., Spurr N. K., Ponder B. A. J., Eeles R., Peto J., Devilee P., Cornelisse C., Lynch H., Narod S., Lenoir G., Egilsson V., Barkadottir R. B., Easton D. F., Bentley D. R., Futreal P. A., Ashworth A., Stratton M. R., *Nature*, **378**, 789–792 (1995).
- 7) Konecny G. E., Kristeleit R. S., *Br. J. Cancer*, **115**, 1157–1173 (2016).
- 8) Rugo H. S., Vidula N., Ma C., *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, **35**, e40–54 (2016).
- 9) Johnston S. R. D., *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **107**, 1–10 (2017).
- 10) 入門ケミカルバイオロジー, オーム社, 入門ケミカルバイオロジー編集委員会編
- 11) ケミカルバイオロジー化合物集, オーム社, 日本学術振興会ケミカルバイオロジー第 189 委員会編
- 12) Nakatsuka M., Ragan J. A., Sammakia T., Smith D. B., Uehling D. E., Schreiber S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5583–5601 (1990).
- 13) 生理活性分子のケミカルバイオロジー 標的の同定と作用機序, 化学同人, 日本化学会編
- 14) Hirata Y., Uemura D., *Pure & Appl. Chem.*, **58**, 701–710 (1986)
- 15) Aicher T. D., Buszek K. R., Fang F. G., Forsyth C. J., Jung S. H., Kishi Y., Matelich M. C., Scola P. M., Spero D. M., Yoon S. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3162–3164 (1992).
- 16) Yoshida T., Ozawa Y., Kimura T., Sato Y., Kuznetsov G., Xu S., Uesugi M., Agoulnik S., Taylor N., Funahashi Y., Matsui J., *Br. J. Cancer*, **110**, 1497–1505 (2014).
- 17) Funahashi Y., *et al.*, The 11<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology (2013).
- 18) Garcia D., Shaw R. J., *Mol. Cell*, **66**, 789–800 (2017).
- 19) Carling D., Zammit V. A., Hardie D. G., *FEBS Lett.*, **223**, 217–222 (1987).
- 20) Hardie D. G., Carling D., Sim A. T. R., *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 20–23 (1989).
- 21) Carling D., Mayer F. V., Sanders M. J., Gamblin S. J., *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 512–518 (2011).
- 22) Herzig S., Shaw R. J., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 121–135 (2018).
- 23) Shaw R. J., Kosmatka M., Bardeesy N., Hurley R. L., Witters L. A., DePinho R. A., Cantley L. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3329–3335 (2004).
- 24) Chen Z., Shen X., Shen F., Zhong W., Wu H., Liu S., Lai J., *Mol. Cell. Biochem.*, **377**, 35–44 (2013).

- 25) Calabrese M. F., Rajamohan F., Harris M. S., Caspers N. L., Magyar R., Withka J. M., Wang H., Borzilleri K. A., Sahasrabudhe P. V., Hoth L. R., Geoghegan K. F., Han S., Brown J., Subashi T. A., Reyes A. R., Frisbie R. K., Ward J., Miller R. A., Landro J. A., Londregan A. T., Carpino P. A., Cabral S., Smith A. C., Conn E. L., Cameron K. O., Qiu X., Kurumbail R. G., *Structure*, **22**, 1161–1172 (2014).
- 26) Chen L., Xin F. J., Wang J., Hu J., Zhang Y. Y., Wan S., Cao L. S., Lu C., Li P., Yan S. F., Neumann D., Schlattner U., Xia B., Wang Z. X., Wu J. W., *Nature*, **498**, E8–E10 (2013).
- 27) Xiao B., Sanders M. J., Underwood E., Heath R., Mayer F. V., Carmena D., Jing C., Walker P. A., Eccleston J. F., Haire L. F., Salu P., Howell S. A., Aasland R., Martin S. R., Carling D., Gamblin S. J., *Nature*, **472**, 230–233 (2011).
- 28) Steinberg G. R., Carling D., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 527–551 (2019).
- 29) He X., Li C., Ke R., Luo L., Huang D., *Tumor Biol.*, <http://doi.org/10.1177/1010428317697576> (2017).
- 30) Lee C. W., Wong L. L. Y., Tse E. Y. T., Liu H. F., Leong V. Y. L., Lee J. M. F., Hardie D. G., Ng I. O. L., Ching Y. P., *Cancer Res.*, **72**, 4394–4404 (2012).
- 31) Li J., Jiang P., Robinson M., Lawrence T. S., Sun Y., *Carcinogenesis*, **24**, 827–834 (2003).
- 32) Jones R. G., Plas D. R., Kubek S., Buzzai M., Mu J., Xu Y., Birnbaum M. J., Thompson C. B., *Mol. Cell*, **18**, 283–293 (2005).
- 33) Zhuang Y., Miskimins W. K., *J. Mol. Signal.*, **3:18** (2008).
- 34) Hadad S. M., Fleming S., Thompson A. M., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **67**, 1–7 (2008).
- 35) Inoki K., Zhu T., Guan K. L., *Cell*, **115**, 577–590 (2003).
- 36) Feng Z., Hu W., Stanchina E., Teresky A. K., Jin S., Lowe S., Levine A. J., *Cancer Res.*, **67**, 3043–3053 (2007).
- 37) Li W., Saud S. M., Young M. R., Chen G., Hua B., *Oncotarget*, **6**, 7365–7378 (2015).
- 38) Kim J., Yang G., Kim Y., Kim J., Ha J., *Exp. Mol. Med.*, **48**, e224 (2016).
- 39) Corton J. M., Gillespie J. G., Hawley S. A., Hardie D. G., *Eur. J. Biochem.*, **229**, 558–565 (1995).
- 40) Sullivan J. E., Brocklehurst K. J., Marley A. E., Carey F., Carling D., Beri R. K., *FEBS Lett.*, **353**, 33–36 (1994).
- 41) Cool B., Zinker B., Chiou W., Kifle L., Cao N., Perham M., Dickinson R., Adler A., Gagne G., Iyengar R., Zhao G., Marsh K., Kym P., Jung P., Camp H. S., Frevert E., *Cell Metab.*, **3**, 403–416 (2003).
- 42) Cameron K. O., Kung D. W., Kalgutkar A. S., Kurumbail R. G., Miller R., Salatto C. T., Ward J., Withka J. M., Bhattacharya S. K., Boehm M., Borzilleri K. A., Brown J. A., Calabrese M., Caspers N. L., Cokorinos E., Conn E. L., Dowling M. S., Edmonds D. J., Eng H., Fernando D. P., Frisbie R., Hepworth D., Landro J., Mao Y., Rajamohan F., Reyes A. R., Rose C. R., Ryder T., Shavnya A., Smith A. C., Tu M., Wolford A. C., Xiao J., *J. Med. Chem.*, **59**, 8068–8081 (2016).
- 43) Owen M. R., Doran E., Halestrap A. P., *Biochem. J.*, **348**, 607–614 (2000).
- 44) Rena G., Hardie D. G., Pearson E. R., *Diabetologia*, **60**, 1577–1585 (2017).
- 45) Knapp D. M., Gillis E. P., Burke M. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6961–6963 (2009).
- 46) Horner L., Hoffmann H. M. R., Wippel H. G., *Ber.*, **91**, 61–63 (1958).
- 47) Wadsworth W. S., Emmons W. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1733–1738 (1961).
- 48) Shiao M. J., Tarng K. Y., *Heterocycles*, **31**, 819–824 (1990).
- 49) Paul F., Patt J., Hartwig J. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5969–5970 (1994).
- 50) Guram A. S., Buchwald S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7901–7902 (1994).

- 51) MOE2016.0802, Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2016.
- 52) Lipinski C. A., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **44**, 235–249 (2000).
- 53) Valvani S. C., Yalkowsky S. H., Roseman T. J., *J. Pharm. Sci.*, **70**, 502–507 (1981).
- 54) Zou Y., Yan C., Zhang H., Xu J., Zhang D., Huang Z., Zhang Y., *Eur. J. Med. Chem.*, **138**, 313–319 (2017).
- 55) Walker M. A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 5100–5108 (2017).
- 56) Brown A., Brown L., Brown T. B., Calabrese A., Ellis D., Puhalo N., Smith C. R., Wallace O., Watson L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 5242–5244 (2008).
- 57) Brown A., Brown T. B., Calabrese A., Ellis D., Puhalo N., Ralph M., Watson L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 516–520 (2010).
- 58) This compound previously reported as a myosin activator in WO2001/036386.
- 59) ACD/Percepta, version 14.0.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2013.
- 60) Cisneros J. A., Robertson M. J., Mercado B. Q., Jorgensen W. L., *ACS Med. Chem. Lett.*, **8**, 124–127 (2016).
- 61) Hill A. P., Young R. J., *Drug Discov. Today*, **15**, 648–655 (2010).
- 62) Fujita Y., Yonehara M., Tetsuhashi M., Noguchi-Yachide T., Hashimoto Y., Ishikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 1194–1203 (2010).
- 63) Arnott J. A., Planey S. L., *Expert Opin. Drug Discov.*, **7**, 863–875 (2012).
- 64) Pierson P. D., Fettes A., Freichel C., Gatti-McArthur S., Hertel C., Huwyler J., Mohr P., Nakagawa T., Nettekoven M., Plancher J. M., Raab S., Richter H., Roche O., Rodríguez Sarmiento R. M., Schmitt M., Schuler F., Takahashi T., Taylor S., Ullmer C., Wiegand R., *J. Med. Chem.*, **52**, 3855–3868 (2009).
- 65) Davies B., Morris T., *Pharm. Res.*, **10**, 1093–1095 (1993).
- 66) 横井 毅, *Folia Pharmacol. Jpn.*, **134**, 334–337 (2009).
- 67) Meanwell N. A., *J. Med. Chem.*, **54**, 2529–2591 (2011).
- 68) Ritchie T. J., Macdonald S. J. F., *Drug Discov., Today*, **14**, 1011–1020 (2009).
- 69) Zhou H., Sun G., Liu Z., Zhan X., Mao Z., *Heterocycles*, **87**, 2071–2079 (2013).
- 70) Shipe W. D., Barrow J. C., Yang Z. Q., Lindsley C. W., Yang F. V., Schlegel K. A. S., Shu Y., Rittle K. E., Bock M. G., Hartman G. D., Tang C., Ballard J. E., Kuo Y., Adarayan E. D., Prueksaritanont T., Zrada M. M., Uebele V. N., Nuss C. E., Connolly T. M., Doran S. M., Fox S. V., Kraus R. L., Marino M. J., Graufelds V. K., Vargas H. M., Bunting P. B., Hasbun-Manning M., Evans R. M., Koblan K. S., Renger J. J., *J. Med. Chem.*, **51**, 3692–3695 (2008).
- 71) Tsunoda T., Nagino C., Oguri M., Ito S., *Tetrahedron Lett.*, **37**, 2459–2462 (1996).
- 72) Cui J. J., Tran-Dubè M., Shen H., Nambu M., Kung P. P., Pairish M., Jia L., Meng J., Funk L., Botrous I., McTigue M., Grodsky N., Ryan K., Padrique E., Alton G., Timofeevski S., Yamazaki S., Li Q., Zou H., Christensen J., Mroczkowski B., Bender S., Kania R. S., Edwards M. P., *J. Med. Chem.*, **54**, 6342–6363 (2011).
- 73) Walker M. A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 5100–5108 (2017).
- 74) Cavero I., Mestre M., Guillon J. M., Crumb W., *Exp. Opin. Pharmacother.*, **1**, 947–973 (2000).
- 75) Vandenberg J. I., Walker B. D., Campbell T. J., *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 240–246 (2001).
- 76) Aronov A. M., *J. Med. Chem.*, **49**, 6917–6921 (2006).

77) Aronov A. M., *Drug Discov. Today*, **10**, 149–155 (2005).

78) Jones L. H., Summerhill N. W., Swain N. A., Mills J. E., *Med. Chem. Commun.*, **1**, 309–318 (2010).

## 謝辞

本論文の発表及び作成にあたり、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました北里大学薬学部教授 牧野一石博士に心より御礼申し上げます。

また、本論文に関して審査及び貴重な御教示と御鞭撻を賜りました北里大学大村智記念研究所教授・所長 砂塚敏明博士、北里環境科学センター常務理事・所長 味戸慶一博士、並びに北里大学薬学部名誉教授 梶英輔博士に厚く御礼申し上げます。

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

本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻をいただきましたアステラス製薬株式会社ファイナンス長 平野祐明博士、日本医療研究開発機構創薬戦略部 寺坂忠嗣博士に深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、一方ならぬご支援を賜りました松嶋雄司博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の実施及び遂行において、終始ご協力いただきました大貫圭博士、進崇史氏、澤田由紀博士、薊英範博士、石橋直樹氏、山田弘美博士に心より感謝いたします。

各種薬理試験を行っていただきました長島建之博士、山田知広博士、下重幸則博士、池田隆光博士及び薬物動態試験を行っていただきました北村吏司博士、赤羽隆文博士に厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、有益なるご助言とご協力を賜りました四月朔日晋博士に心より感謝いたします。

最後に、私の研究生活を激励し、常に支えてくれた家族に深く感謝いたします。