

博士論文

2 型糖尿病治療薬の開発を目的とした
GPR119 アゴニストの創薬研究

2019 年

越澤 智章

目次

略語表		
序論		1
第 1 章	第 1 世代化合物の探索	
第 1 節	GPR119 アゴニストの構造	11
第 2 節	新規リンカーの探索	11
第 3 節	ヘッド部位の探索	15
第 4 節	テール部位の最適化	20
第 5 節	まとめ	24
第 6 節	引用文献	24
第 2 章	第 2 世代化合物の創製	
第 1 節	化合物デザイン	26
第 2 節	ヘッド部位の検討	27
第 3 節	ヘッド部位の最適化	32
第 4 節	テール部位の最適化	35
第 5 節	まとめ	39
第 6 節	引用文献	39
第 3 章	(R)-K-23217 の効率的な大量合成法の確立	
第 1 節	初期合成法の課題と検討方針	41
第 2 節	鍵中間体 14 の合成	44
第 3 節	鍵中間体 14 から (R)-K-23217 の合成	49
第 4 節	まとめ	56
第 5 節	引用文献	58
総括		60
実験の部		
第 1 章に関する実験		63
第 2 章に関する実験		80
第 3 章に関する実験		90

謝辭	96
主要論文目錄	97
審查委員	98

略語表

Ac	: acetyl
Ac ₂ O	: acetic anhydride
AcOEt	: ethyl acetate
ADDP	: 1,1'-(azodicarbonyl)dipiperidine
AlCl ₃	: aluminium chloride
ATP	: adenosine triphosphate
BF ₃ ·OEt ₂	: boron trifluoride diethyl ether complex
BH ₃ ·THF	: boron trifluoride tetrahydrofuran complex
Bn	: benzyl
Boc	: <i>tert</i> -butoxycarbonyl
Boc ₂ O	: di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
^t Bu	: <i>tert</i> -butyl
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
CHO	: chineese hamster ovary
CMMP	: cyanomethylenetrimethylphosphorane
<i>m</i> CPBA	: <i>m</i> -chloroperbenzoic acid
Cy	: cyclohexyl
dba	: dibenzylideneacetone
DBN	: 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIAD	: diisopropyl azodicarboxylate
DMAP	: <i>N,N</i> -4-dimethylaminopyridine
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	: dimethylsulfoxide
DPP-4	: dipeptidyl peptidase-4
dppf	: 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
EC ₅₀	: half maximal (50%) effective concentration
Epac2A	: exchange protein activated by cAMP II
Et	: ethyl
EtOH	: ethanol
GIP	: gastric inhibitor polypeptide or glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	: glucagon like peptide-1
GPR (GPCR)	: G-protein coupled receptor
iv	: intravenous
LDA	: lithium diisopropylamide
MeOH	: methanol

Me	: methyl
MeI	: iodomethane
mRNA	: messenger RNA
MS4A	: molecular sieves 4A
MsCl	: methansulfonyl chloride
Ns	: 2-nitrobenzenesulfonyl
Oxone [®]	: potassium peroxymonosulfate
OGTT	: oral glucose tolerance test
Pd/C	: palladium on carbon
PDX-1	: pancreatic and duodenal homeobox 1
PhSH	: thiophenol
PK	: pharmacokinetics
PKA	: protein kinase A
po	: per os
ⁱ Pr	: isopropyl
ⁱ PrOH	: 2-propanol
ⁿ Pr	: <i>n</i> -propyl
Py	: pyridyl
PyBop	: (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
Red-Al [®]	: sodium bis(2-methoxyethoxy)aluminium hydride
rt	: room temperature
SGLT-2	: sodium-glucose linked transporter-2
THF	: tetrahydrofurane
TLC	: thin-layer chromatography
XantPhos	: 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene

序論

世界保健機関 (WHO) の報告によると⁰⁻¹、世界の糖尿病患者数は劇的に増加しており、1980 年に約 1 億人であった糖尿病患者は、2014 年には約 4 億人に達している。さらに、糖尿病に関連した疾患を原因とする死亡者数は、2012 年に 150 万人であったと報告されている。糖尿病患者数の増加は先進国のみならず新興国にも及んでおり、医療費の増加および労働力の損失など世界経済に与える影響は深刻である。

糖尿病は 1 型と 2 型に大別され、糖尿病患者の 90% 以上が 2 型糖尿病に分類される。2 型糖尿病は膵 β 細胞からのインスリン分泌不足および筋肉、脂肪組織や肝臓など各組織のインスリン感受性低下に起因する慢性の高血糖状態を主徴とした病態であり、高血糖状態が続くと心疾患に代表される大血管合併症、網膜症、神経症や腎症といった細小血管合併症を引き起こす⁰⁻²。

したがって、糖尿病治療の目的は、血糖値をコントロールして合併症の発症を防ぎ、健康な人と変わらない日常生活の質 (QOL) の維持、大血管合併症に伴う糖尿病関連死を減らすことである⁰⁻³。

2 型糖尿病患者の治療には、主にインスリン抵抗性改善、インスリン分泌促進または糖吸収・排泄調節をターゲットとした薬剤 (表 0-1) が投与され、単剤で目標とする血糖値を達成できない場合には、作用メカニズムの異なる複数の薬剤による併用療法が行われている。

表 0-1. 経口糖尿病薬⁰⁻³

機序	種類	主な作用
インスリン抵抗改善	ビグアナイド薬	肝臓における糖新生の抑制
	チアゾリジン薬	骨格筋・肝臓におけるインスリン感受性の改善
インスリン分泌促進	スルホニル尿素薬	インスリン分泌の促進
	グリニド薬	速やかなインスリン分泌の促進
	DPP-4 阻害薬	血糖依存性のインスリン分泌促進とグルカゴン分泌抑制
糖吸収・排泄調節	α-グルコシダーゼ阻害薬	炭水化物の吸収遅延
	SGLT-2 阻害薬	腎における糖再吸収阻害による尿中ブドウ糖排泄促進

インスリン抵抗改善薬に分類されるビグアナイド薬⁰⁻⁴は体重増加を起こさないため、肥満症例に使用されることが多い。単剤では低血糖を起こす可能性は低いが、重篤な副作用として乳酸アシドーシスが知られている。チアゾリジン薬⁰⁻⁵はインスリン抵抗性の強い症例でより高い効果を

期待できるが、副作用として、体重増加、骨量低下、膀胱癌のリスクがある。

インスリン分泌促進薬に分類されるスルホニル尿素薬⁰⁶は、経口糖尿病薬として最も古い歴史を持つ薬剤であり、強力な血糖低下作用を有するが、血糖値に非依存的なインスリン分泌作用を示すことから、低血糖が副作用として問題となっている。さらに、体重増加および二次無効（長期投与における膵臓機能の低下により薬剤の効果が消失すること）が生じやすいことも知られている。グリニド薬は、スルホニル尿素薬と比較すると、インスリン分泌刺激作用は弱いですが、作用が短時間であることから食後高血糖の改善作用に効果がある。副作用として低血糖が知られている。近年承認された dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬⁰⁷は、有効性と安全性の観点から第一選択薬として認知されつつある。

糖吸収・排泄調節薬に分類される α -グルコシダーゼ阻害薬⁰⁸は、炭水化物の吸収を抑制することから、食後血糖の上昇抑制を目的に使用される。食前に服用する必要があるが、血糖低下作用は弱いが、低血糖、体重増加は起こしにくい。sodium-glucose linked transporter-2 (SGLT-2) 阻害薬⁰⁹はインスリンに依存しない血糖低下作用を示すことから空腹時血糖低下に寄与し、血糖値を改善する。体重低下も認められているが、脱水症状やそれに伴う脳梗塞が副作用として知られている。

通常、インスリンは、図 1 に示す惹起経路によって分泌される。つまり、食事によって摂取されたグルコースによって adenosine triphosphate (ATP) が産生され、ATP 感受性カリウムチャンネルが閉口することによって細胞膜脱分極が起こり、電位依存性カルシウムチャンネルが開口することで細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、インスリンが分泌される。また、食後に分泌されるインクレチン（消化管ホルモン）によってインスリン分泌が促される増幅経路も知られている。インクレチンは glucagon like peptide-1 (GLP-1) および gastric inhibitory polypeptide (GIP、glucose-dependent insulinotropic polypeptide と称されることもある) の総称であり、それぞれ小腸の L 細胞および K 細胞から分泌され、膵 β 細胞にある各受容体に結合して、膵 β 細胞内の cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 濃度を上昇させて protein kinase A (PKA) や exchange protein activated by cAMP II (Epac2A) を活性化することでインスリン分泌を促す（図 0-1）。しかし、GLP-1 と GIP は分泌後に DPP-4 によって速やかに分解されるため、その半減期は短い。DPP-4 阻害薬は、GLP-1 および GIP を分解する DPP-4 を阻害し、GLP-1 および GIP の作用を高める薬剤である。

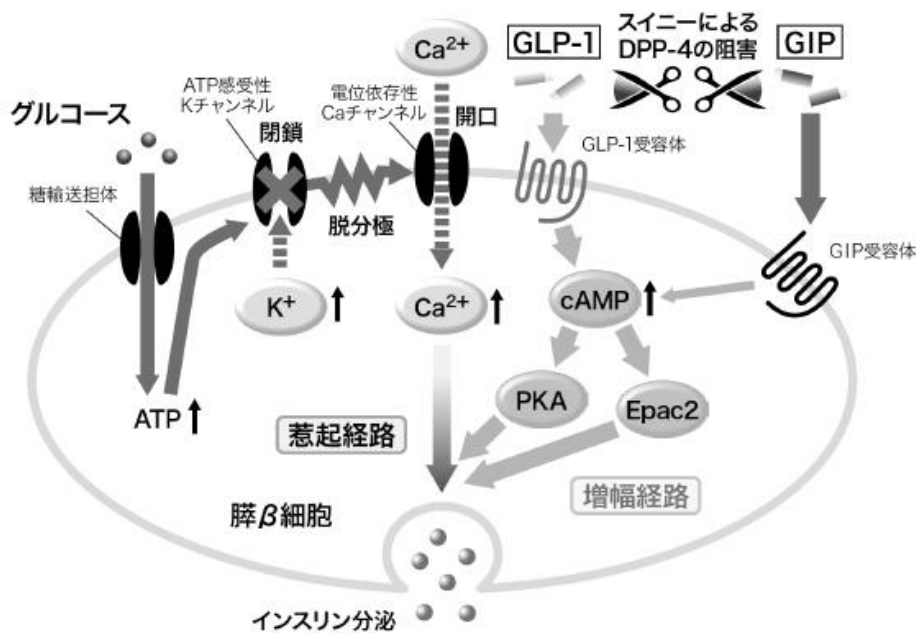


図 0-1. 膵 β 細胞に対するインクレチンの作用 (アナグリプチン (スイニー) インタビューフォームより抜粋)⁰⁻¹⁰

インクレチンは血糖上昇に伴って分泌されるため、DPP-4 阻害薬は本質的に低血糖を誘発しない。また、体重増加および二次無効が認められないことも大きなメリットとなっている。しかし、スルホニル尿素薬と比較した場合、DPP-4 阻害薬はインスリン分泌を能動的には亢進せず、その作用は GLP-1 と GIP の分泌量に依存する。そのため、単剤では十分な血糖低下作用が認められず、併用療法が用いられており、スルホニル尿素薬と併用した場合には、重篤な低血糖を起こすケースが見られる⁰⁻¹¹。

このように、患者の病態に合わせて様々な治療薬が選択可能になってきているものの、依然として治療効果は十分ではなく、合併症の罹患患者数は増加している⁰⁻¹²。さらに、最近では、β 細胞の機能的障害と β 細胞数の減少が 2 型糖尿病の基本病態であることが報告され⁰⁻¹³、β 細胞の保護作用が注目されている。β 細胞の機能は、2 型糖尿病と診断された時点で既に健常人の約半分に低下しており、さらに、診断後の生活習慣の改善や薬物療法とは無関係に、進行性に低下することも報告されている⁰⁻¹⁴。

以上から、十分な血糖低下作用を示し、低血糖および体重増加を起こさず、かつ β 細胞の保護作用を有する新規糖尿病治療薬が求められている。

GPR119 は 2003 年にリガンドが不明なオーファン GPCR として同定されたロドプシン様クラス A 受容体であり⁰⁻¹⁵、ヒトおよびラットにおいては、膵臓ランゲルハンス島と消化管に多く発現している⁰⁻¹⁶。内因性リガンドとしてリン脂質のリゾホスファチジルコリン (LPC) やカンナビノイドのオレオイルエタノールアミド (OEA) などが同定されている⁰⁻¹⁷。内因性リガンドは GPR119 高発現膵臓 β 細胞株においてリガンド濃度依存的な細胞内 cAMP 濃度の上昇作用を示

し、PKA を活性化してインスリン分泌を促すことが確認されている (図 0-2)^{0-16a}。つまり、GPR119 アゴニストによるインスリン分泌作用は、インクレチンと同様にグルコース依存的な分泌増幅経路の活性化を機序としているため、低血糖を誘発する可能性が低い。また、GPR119 アゴニストは小腸 L 細胞において GLP-1 の分泌を促すため、GLP-1 を介して間接的にインスリン分泌を促進すること^{0-16b}、および DPP-4 阻害薬との併用によってこの効果を最大限に利用し得ることが期待される。さらに、GPR119 アゴニストは体重抑制作用⁰⁻¹⁸ および膵 β 細胞の保護作用を併せ持つことが報告されている。すなわち、GPR119 アゴニストである AS1907417 を肥満糖尿病モデル db/db マウスに投与することによって、β 細胞の分化および機能維持に関わる転写因子である pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) の mRNA 発現が上昇することが⁰⁻¹⁹、また、内因性リガンドである OEA が *in vitro* および *in vivo* において β 細胞の複製を促すことが報告されている⁰⁻²⁰。

以上のように、GPR119 アゴニストは、直接的および GLP-1 を介する間接的なインスリン分泌促進作用により十分な血糖低下を示し、低血糖および体重増加のリスクが低く、β 細胞保護作用を有する新規 2 型糖尿病治療薬として期待される。

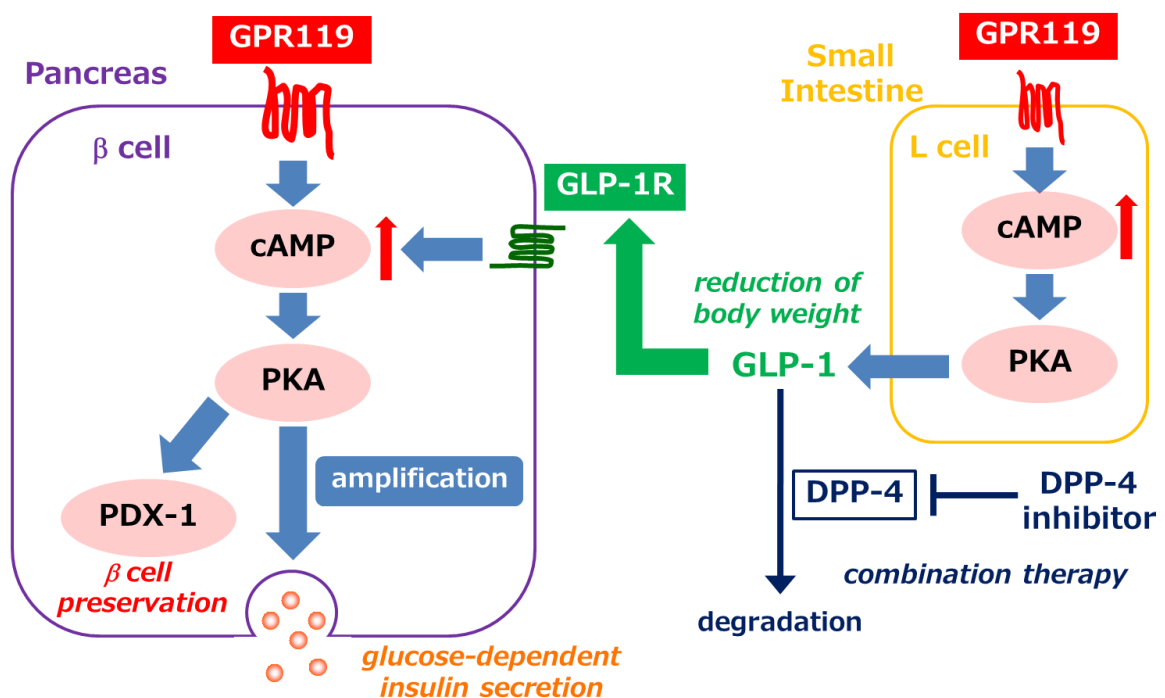


図 0-2. GPR119 アゴニストの作用メカニズム

2003 年に Arena および Prosidion が GPR119 アゴニストに関する報告を行って以来、多くの企業が GPR119 アゴニストの開発に参入している (図 0-3)⁰⁻²¹。その後、2008 年に Arena から GPR119 選択的なアゴニストとして AR231453⁰⁻²² の創薬研究に関する論文が発表され、AR231453 が十分な *in vitro* および *in vivo* 活性を示すことが報告された。

Arena は AR231453 をもとに APD-597⁰⁻²³ を創出し、臨床試験で血糖値の低下および GLP-1 濃度の増加を確認している。

その他、MBX-2982 (Metabolex)⁰⁻²⁴、GSK1292263 (Glaxo SmithKline)⁰⁻²⁵、BMS-903452 (Bristol-Myers Squibb)⁰⁻²⁶、DS-8500a (第一三共、フィルグリペル)⁰⁻²⁷ なども GPR119 アゴニストとして報告されている。

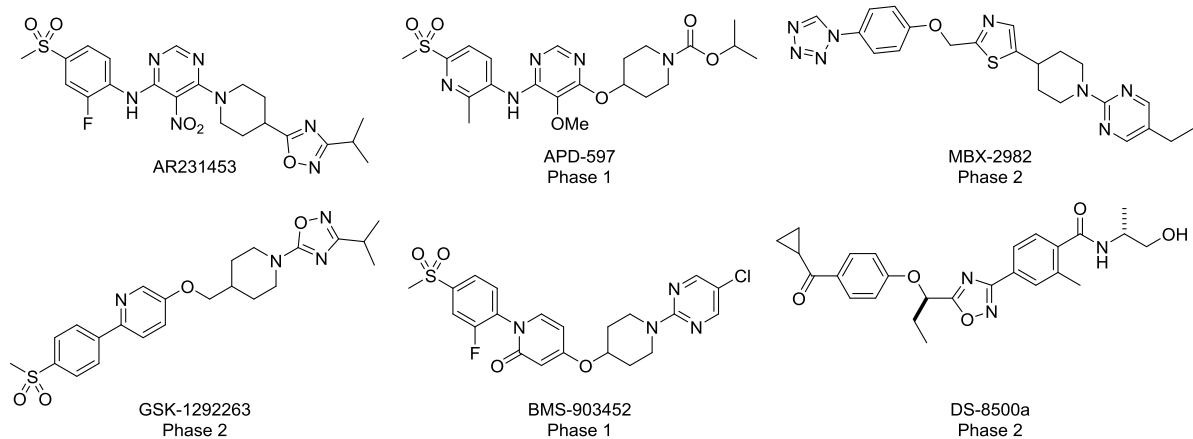


図 0-3. GPR119 アゴニスト

以上のような背景のもと、著者は新規糖尿病治療薬として期待される GPR119 アゴニストの創薬研究に着手した。

GPR119 アゴニストの構造は、ヘッド部位、リンカー部位、テール部位の 3 つの要素から構成され、ヘッド部位は電子求引性基 (スルホニル基やフッ素原子) を有する芳香環、テール部位は嵩高いアルキルカルバミン酸エステルまたはその生物学的等価体を有するピペリジン環であることが提唱されている (図 0-4)^{0-21, 0-28}。

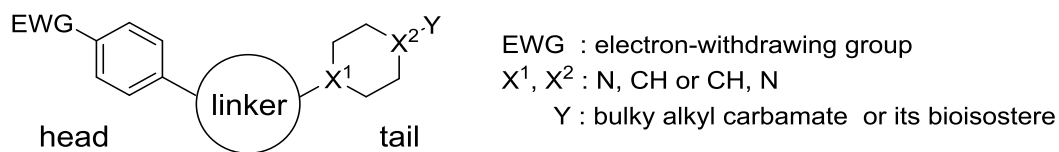


図 0-4. GPR119 アゴニスト

著者は、この提唱に沿って、新規リンカーとしてフロ[2,3-*d*]ピリミジン骨格を有する化合物 **1** ($EC_{50} = 129$ nM, $E_{max} = 123\%$) を創出した。さらに、GPR119 アゴニスト活性の発現にはリガンド分子の立体配座制御が重要であるとの仮定に基づき、ヘッド部位の立体配座制御を強固にするため、ヘッド部位の 2 位フッ素原子とアニリン水素原子の分子内水素結合を炭素-炭素共有結合に置換することで、化合物 **1** の活性が向上することを明らかにし、インドリン誘導体 **2** ($EC_{50} = 53$ nM, $E_{max} = 123\%$) を見出した。次いで、インドリン誘導体 **2** のテール部位を最適化し、肝ミクロ

ソームにおける固有クリアランスを改善した化合物 **3** ($EC_{50} = 42 \text{ nM}$, $E_{\text{max}} = 117\%$) を第 1 世代化合物として創製した (図 0-5)⁰⁻²⁹。化合物 **3** は C57BL/6N マウスを用いた経口グルコース負荷試験において開発候補となり得る血糖低下作用を示した。

第 1 章では、第 1 世代化合物 **3** のドラッグデザイン、合成、構造活性相関、薬理試験結果について詳細を述べる。

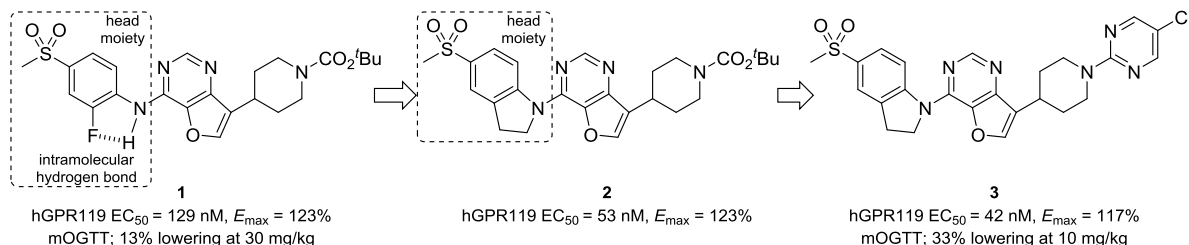


図 0-5. 第 1 世代化合物の創製

続いて、第 1 世代化合物 **3** のバックアップ化合物の探索に着手した。第 1 世代化合物の創製に有効であったリンカーによるリガンド分子の立体配座制御の概念を発展させ、リンカー部位とテール部位を統合したリンカー-テール部位としてスピロクロマンピペリジン構造を有する、一般構造式 **4** をデザインした (図 0-6)。本アプローチにより、リード化合物 **5** ($EC_{50} = 369 \text{ nM}$, $E_{\text{max}} = 82\%$) を見出し、上記の立体配座の制御を GPR119 アゴニストの設計に適用し得ることを実証した。リード化合物 **5** の最適化によって創製した第 2 世代化合物 (**R**)-**K-23217** ($EC_{50} = 54 \text{ nM}$, $E_{\text{max}} = 181\%$) の構造的な特徴は、リンカー部位とテール部分を統合したスピロ環構造、ヘッド部位末端の嵩高いベンジルタイプ置換基、および同部位のスルホニル基とフェニル基を連結するメチレン基である。

C57BL/6N マウスを用いた経口グルコース負荷試験において、(**R**)-**K-23217** が第 1 世代化合物 **3** より低い用量で同等の血糖低下作用を示したことから⁰⁻³⁰、(**R**)-**K-23217** を開発候補化合物として選択した。

第 2 章では、開発候補化合物として選択された第 2 世代化合物 (**R**)-**K-23217** のドラッグデザイン、合成、構造活性相関、薬理試験結果について詳細を述べる。

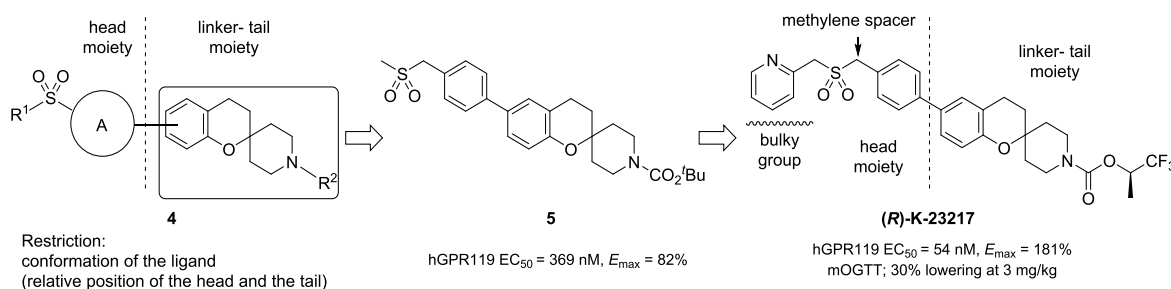


図 0-6. 第 2 世代化合物の創製

上記の化合物探索に続いて、著者は、開発候補化合物 **(R)-K-23217** を薬物動態試験および安全性試験、さらに臨床試験に安定供給するため、効率的な大量合成法の確立を目的に検討を行った⁰⁻³¹。

まず、**(R)-K-23217** の初期合成法 (図 0-7) の課題が、鈴木-宮浦カップリング反応によるビフェニル骨格の構築を回避した合成ルート の確立であると考え (第 1 の課題)、容易に入手可能な 4-(4-ヒドロキシフェニル)安息香酸 **11** を原料とする鍵中間体 **14** の実用的な合成法の構築を検討した。

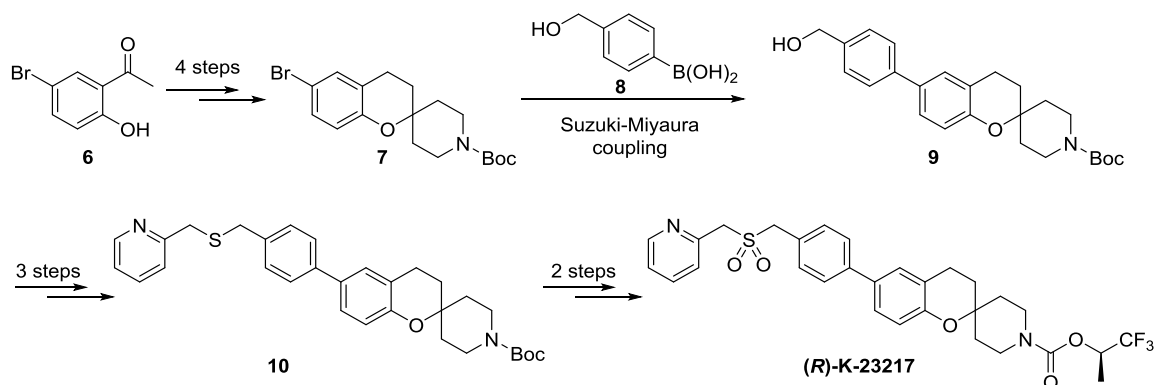


図 0-7. **(R)-K-23217** の初期合成法

その結果、安価な安息香酸 **11** から 3 工程でケトスピロクロマン体 **12** へと誘導する経路を構築した。次に、ケトスピロクロマン体 **12** のカルボニル基の除去およびエステルの還元条件を検討し、カルボニル基の除去にジメチルアミン・ボラン錯体と四塩化チタン、エステルの還元に取り扱いが容易な水素化ホウ素ナトリウムとピリジンとの組み合わせが、それぞれ効率的であることを見出した。これら検討によって、鈴木-宮浦カップリング反応によるビフェニル骨格の構築を回避した鍵中間体 **14** の合成を達成した (図 0-8)。

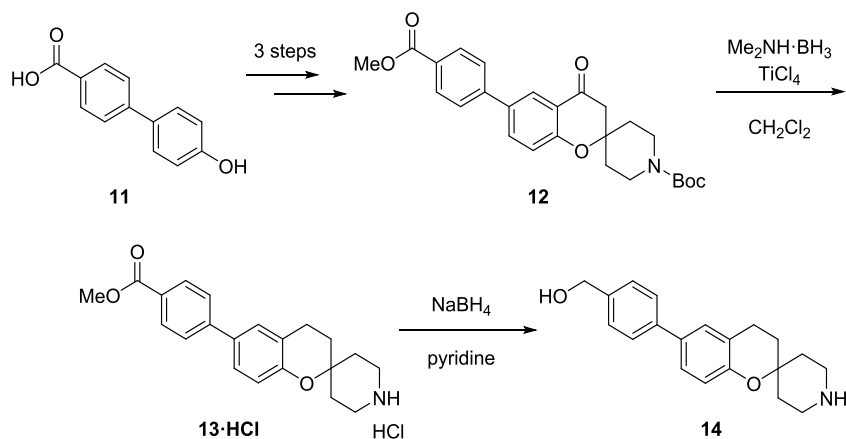


図 0-8. 鍵中間体 **14** の合成

- 新田 孝作, *日本透析医学会雑誌* **2016**, 49, 1.
- 0-13. Florez, J. C. *Diabetologia* **2008**, 51, 1100.
- 0-14. 杉本一博, *月刊糖尿病* **2011**, 3, 41.
- 0-15. (a) Fredriksson, R.; Höglund, P. J.; Gloriam, D. E. I.; Lagerström, M. C.; Schiöth, H. B. *FEBS Lett.* **2002**, 554, 381; (b) Costanzi, S.; Neumann, S.; Gershengorn, M. C. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 16269.
- 0-16. (a) Chu, Z. L.; Jones, R. M.; He, H.; Carroll, C.; Gutierrez, V.; Lucman, A.; Moloney, M.; Gao, H.; Mondala, H.; Bagnol, D.; Unett, D.; Liang, Y.; Demarest, K.; Semple, G.; Behan, D. P.; Leonard, J. *Endocrinology*, **2007**, 148, 2601; (b) Chu, Z. L.; Carroll, C.; Alfonso, J.; Gutierrez, V.; He, H.; Lucman, A.; Pedraza, M.; Mondala, H.; Gao, H.; Bagnol, D.; Chen, R.; Jones, R. M.; Behan, D. P.; Leonard, J. *Endocrinology*, **2008**, 149, 2038.
- 0-17. (a) Soga, T.; Ohishi, T.; Matsui, T.; Saito, T.; Matsumoto, M. Takasaki, J.; Matsumoto, S.; Kamohara, M.; Hiyama, H.; Yoshida, S.; Momose, K.; Ueda, Y.; Matsushime, H.; Kobori, M.; Furuichi, K.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 326, 744; (b) Overton, H. A.; Babbs, A. J.; Doel, S. M.; Fyfe, M. C.; Gardner, L. S.; Griffin, G.; Jackson, H. C.; Procter, M. J.; Rasamison, C. M.; Tang-Christensen, M.; Widdowson, P. S.; Williams, G. M.; Reynet, C. *Cell. Metab.* **2006**, 33, 167.
- 0-18. Shah, U. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2009**, 12, 519.
- 0-19. Yoshida, S.; Tanaka, H.; Oshima, H.; Yamazaki, T.; Yonetoku, Y.; Ohishi, T.; Matsui, T.; Shibasaki, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 400, 745.
- 0-20. Gao, J.; Tian, L.; Weng, G.; Bhagroo, N. V.; Sorenson, R. L.; O'Brien, T. D.; Luo, J.; Guo, Z. *transpl. Int.* **2011**, 24, 1124.
- 0-21. 総説 (a) Jones, R. M.; Leonard, J. N.; Buzard, D. J.; Lehmann, J. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, 19, 1339; (b) Ritter, K.; Buning, C.; Halland, N.; Pöverlein, C.; Schwink, L. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 3579; (c) Yang, J. W.; Kim, H. S.; Choi, Y. W.; Kim, Y. M.; Kang, K. W. *Diabetes Obes. Metab.* **2017**, 1.
- 0-22. Semple, G.; Fioravanti, B.; Pereira, G.; Calderon, I.; Uy, J.; Choi, K.; Xiong, Y.; Ren, A.; Morgan, M.; Dave, V.; Thomsen, W.; Unett, D. J.; Xing, C.; Bossie, S.; Carroll, C.; Chu, Z.-L.; Grottick, A. J.; Hauser, E. K.; Leonard, J.; Jones, R. M. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5172.
- 0-23. (a) Semple G.; Lehmann, J.; Wong, A.; Ren, A.; Bruce, M.; Shin, Y. J.; Sage, C. R.; Morgan, M.; Chen, W. C.; Sebring, K.; Chu, Z. L.; Leonard, J. N.; Al-Shamma, H.; Grottick, A. J.; Du, F.; Liang, Y.; Demarest, K.; Jones, R. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 1750; (b) Katz, L. B.; Gambale, J. J.; Rothenberg, P. L.; Vanapalli, S. R.; Vaccaro, N.; Xi, L.; Sarich, T. C.; Stein, P. P. *Diabetes Obes. Metab.* **2012**, 14, 709.
- 0-24. (a) Jones, R. M.; Leonard, J. N.; Buzard, D. J.; Lehmann, J. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, 19, 1339; (b) Kang, S.-U. *Drug Discovery Today* **2013**, 18, 1309.
- 0-25. (a) Fang, J.; Tang, J.; Carpenter, A. J.; Peckham, G.; Conlee, C. R.; Du, K. S.; Katamreddy, S. R. WO2008/070692, **2008**; (b) Matsuoka, R. T.; Boros, E. E.; Brown, A. D.; Bullock, K. M.; Canoy, W. L.; Carpenter, A. J.; Cobb, J. D.; Condon, S. E.; Deschamps, N. M.; Elitzin, V. I.; Erickson, G.; Fang,

- J. M.; Igo, D. H.; Joshi, B. K.; Kaldor, I. W.; Mitchell, M. B.; Peckham, G. E.; Reynolds, D. W.; Salmon, M. C.; Sharp, M. J.; Tabet, E. A.; Toczek, J. F.; Wu, L. M.; Zhou, X. M. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 1469.
- 0-26. Wacker, D. A.; Wang, Y.; Broekema, M.; Rossi, K.; O'Connor, S.; Hong, Z.; Wu, G.; Malmstrom, S. E.; Hung, C.-P.; LaMarre, L.; Chimalakonda, A.; Zhang, L.; Xin, L.; Cai, H.; Chu, C.; Boehm, S.; Zalaznick, J.; Ponticiello, R.; Sereda, L.; Han, S.-P.; Zebo, R.; Zinker, B.; Luk, C. E.; Wong, R.; Everlof, G.; Li, Y.-X.; Wu, C. K.; Lee, M.; Griffen, S.; Miller, K. J.; Krupinski, J.; Robl, J. A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7499.
- 0-27. (a) Inagaki, N.; Chou, H. S.; Tsukiyama, S.; Washio, T.; Shiosakai, K.; Nakatsuka, Y.; Taguchi, T. *BMJ Open Diabetes Res. Care*, **2017**, *5*, e000424; (b) Yamada, Y.; Terauchi, Y.; Watada, H.; Nakatsuka, Y.; Shiosakai, K.; Washio, T.; Taguchi, T. *Adv Ther.* **2018**, *35*, 367; (c) Matsumoto, K.; Yoshitomi, T.; Shimada, T. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **2018**, *152*, 119.
- 0-28. Futatsugi, K.; Mascitti, V.; Guimarães, C. R. W.; Morishita, N.; Cai, C.; DeNinno, M. P.; Gao, H.; Hamilton, M. D.; Hank, R.; Harris, A. R.; Kung, D. W.; Lavergne, S. Y.; Lefker, B. A.; Lopaze, M. G.; McClure, K. F.; Munchhof, M. J.; Preville, C.; Robinson, R. P.; Wright, S. W.; Bonin, P. D.; Cornelius, P.; Chen, Y.; Kalgutkar, A. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 194.
- 0-29. Koshizawa, T.; Morimoto, T.; Watanabe, G.; Watanabe, T.; Yamasaki, N.; Sawada, Y.; Fukuda, T.; Okuda, A.; Shibuya, K.; Ohgiya, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3249.
- 0-30. Koshizawa, T.; Morimoto, T.; Watanabe, G.; Fukuda, T.; Yamasaki, N.; Hagita, S.; Okuda, A.; Shibuya, K.; Ohgiya, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3236.
- 0-31. (a) Koshizawa, T.; Hosoi, H.; Watanabe, G.; Morimoto, T.; Ohgiya, T.; Shibuya, K. *Heterocycles* **2014**, *89*, 1632; (b) Koshizawa, T.; Yamazaki, Y.; Ohgiya, T.; Shibuya, T. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3231.
- 0-32. (a) Kubota, T.; Miyashita, S.; Kitazume, T.; Ishikawa, N. *Chem. Lett.* **1979**, *8*, 845; (b) Kubota, T.; Miyashita, S.; Kitazume, T.; Ishikawa, N. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5052.

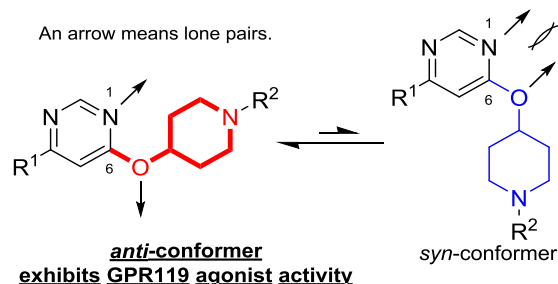


図 1-3. 非共有電子対の静電的な反発による配座制御

さらに、分子の配座が *anti-conformer* に固定されている、二環性ピリミジン骨格をリンカーとした GPR119 アゴニストも、Bristol-Myers Squibb¹⁻⁷ および Roche¹⁻⁸ から報告されている (図 1-4)。

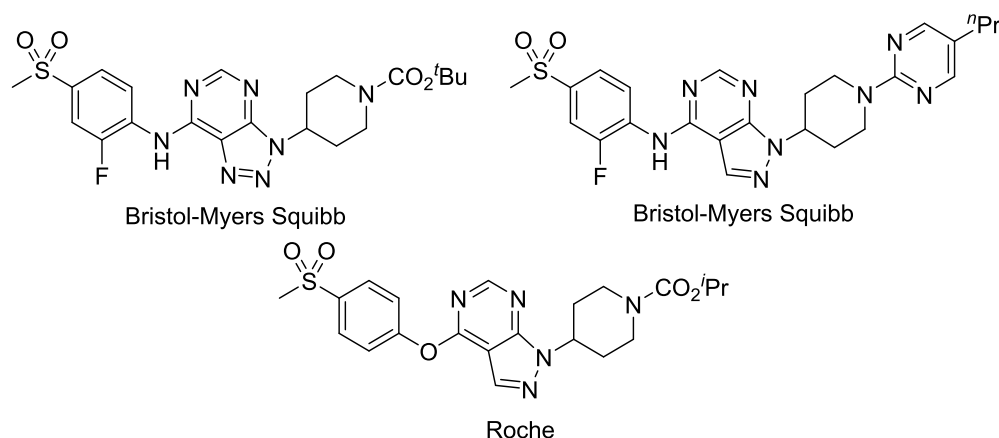


図 1-4. 二環性ピリミジン骨格を有する GPR119 アゴニスト

そこで、この配座固定が高活性 GPR119 アゴニストの創製において重要であると考え、新規二環性ピリミジン骨格をリンカーに有する化合物 **18** をデザインした (図 1-5)。

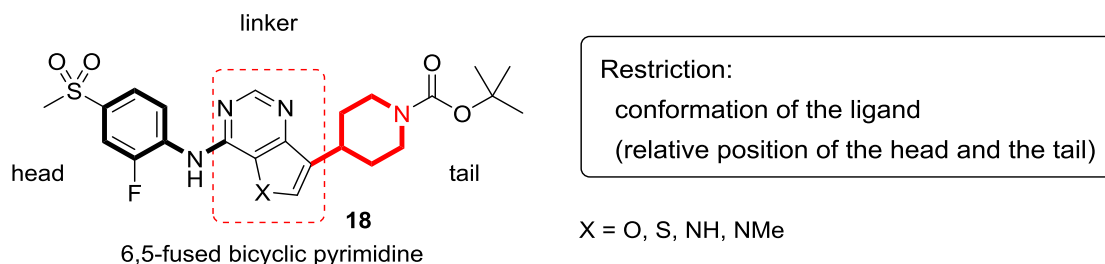
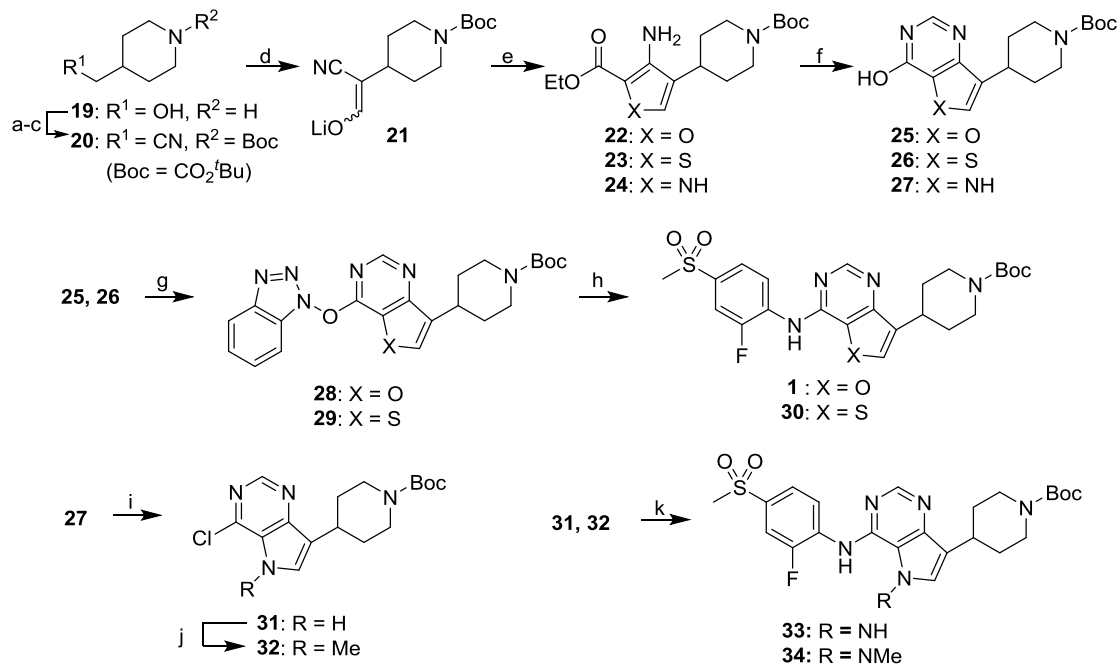


図 1-5. 新規リンカーのデザイン

2-2. 二環性ピリミジ化合物の合成

デザインした 3 種のリンカー (フロ[2,3-*d*]ピリミジン、チエノ[2,3-*d*]ピリミジン、ピロロ[2,3-*d*]ピリミジン) を有する誘導体を、以下の方法で合成した (Scheme 1-1)¹⁻⁹。



Scheme 1-1. Synthesis of compound **1**, **30**, **33** and **34**. Reagents and conditions: (a) Boc₂O, Na₂CO₃, THF, H₂O, rt; (b) MsCl, Et₃N, THF, 0 °C; (c) NaCN, EtOH-H₂O, 80 °C, 77% (3 steps); (d) (i) LDA, THF, -78 °C; (ii) ethyl formate, -30 °C to rt, 92%; (e) X = O; (i) diethyl chloromalonate, DMF, rt; (ii) DBU, EtOH, rt, 50%; X = S; (i) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C; (ii) ethyl thioglycolate, DBN, CH₂Cl₂, 0 °C, 22% (2 steps); X = NH; (i) diethyl 2-aminomalonate, NaOAc, MeOH-H₂O; (ii) NaOEt, EtOH, reflux, rt, 46% (2 steps); (f) formamidine acetate, EtOH, reflux, 30-70%; (g) PyBop, DBU, THF, rt, 83-85%; (h) NaH, 2-fluoro-4-(methylsulfonyl)aniline, DMF, 0-80 °C, 24-49%; (i) POCl₃, 100 °C then Boc₂O, *aq.* NaOH, rt, 43%; (j) MeI, NaH, DMF, rt, 92%; (k) 2-fluoro-4-(methylsulfonyl)aniline, Pd(^tBu₃P)₂, NaO^tBu, 1,4-dioxane, microwave, 130 °C, 7-32%.

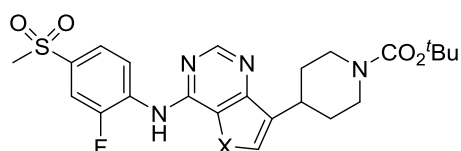
4-ピペリジンメタノール (**19**) の窒素原子を *tert*-ブトキシカルボニル (Boc) 基で保護した後、水酸基をメシル化し、シアン化ナトリウムで処理してニトリル **20** を得た。続いて、LDA を用いてリチオ化した後、ギ酸エチルで処理し、リチウムエノラート **21** に誘導した。リチウムエノラート **21** に対して、塩化マロン酸ジエチルとの求核置換反応、続く環化反応によりフラン **22** を、メシル化、続くチオグリコール酸エチルとの求核置換反応、および環化反応によってチオフェン **23** を、アミノマロン酸ジエチルとのエナミン形成反応、および環化反応によりピロール **24** を、それぞれ合成した。さらに、複素環 **22-24** とホルムアミジン酢酸塩の環化縮合反応により、二環性ピリミジン **25-27** を合成した。次いで、二環性ピリミジン **25** および **26** の水酸基を 1*H*-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (PyBop)

で活性化し、2-フルオロ-4-(メチルスルホニル)アニリンと反応させてフロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **1** およびチエノ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **30** を合成した。また、二環性ピリミジン **27** を塩素化した後、パラジウム触媒によるアミノ化反応でピロロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **33** を合成した。*N*-メチルピロロ[2,3-*d*]ピリミジン体 **34** は、クロロ体 **31** を *N*-メチル化後、**33** と同様の方法でアールアミノ化して合成した。

2-3. 二環性ピリミジン誘導体の *in vitro* 活性評価

各化合物の GPR119 に対する *in vitro* 活性の評価は、ヒト GPR119 を安定的に高発現する CHO-K1 細胞株を用いるルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによって行った。すなわち、レポーターとしたルシフェラーゼ遺伝子の発現に及ぼす評価対象化合物の効果を、50% 効果濃度 (EC₅₀) および最大強度 (*E*_{max}) を指標として評価した¹⁻¹⁰。なお、最大強度は、評価対象化合物の最大ルシフェラーゼ発現亢進量を、100 nM における AR231453 (EC₅₀ = 31 nM) のルシフェラーゼ発現亢進量を 100% とする相対強度として表記した。

表 1-1. 二環性ピリミジン誘導体の *in vitro* 評価



Compound	X	hGPR119 agonist activities	
		EC ₅₀ (nM) ^a	<i>E</i> _{max} (%)
1	O	129	123
30	S	79	82
33	NH	>1000	9
34	NMe	>1000	3

^a Assay values were reported as a single determination performed in quadruplets.

フロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **1** および チエノ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **30** は、GPR119 アゴニスト活性を示したが (**1**: EC₅₀ = 129 nM, *E*_{max} = 123%、**30**: EC₅₀ = 79 nM, *E*_{max} = 82%)、ピロロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **33** および **34** はアゴニスト活性を示さなかった (表 1-1)。

フロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **1** とチエノ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **30** を比較すると、50% 効果濃度は **30** のほうが低く、最大強度は **1** のほうが高かった。50% 効果濃度はリガンドと受容体の親和性と相関し、最大強度はリガンド結合後の GPR119 の高次構造変化に基づく G-タンパク質活性化強度との相関性が高いと考えられる。一般に、リガンド構造とその受容体親和性の関係と比較して、リガンド構造が受容体と結合した後にその高次構造変化に与える影響を解析して最適化することのほうが困難である。そこで、基本構造を選択する本段階では、受容体との親和性よりも受容体の高次構造変化に与える影響に着目したほうが、その後の最適化によってより良い

化合物に到達する可能性が高いと考え、チエノ[2,3-*d*]ピリミジンよりも高い最大強度を示したフロ[2,3-*d*]ピリミジンを新規リンカーとして選択した。

第 3 節 ヘッド部位の探索

3-1. 立体配座制御を利用した化合物デザイン

Sample らは¹⁻¹¹、ヘッド部位の 2 位フッ素体 AR231453 が、50% 効果濃度を指標として無置換体 **35** よりも約 8 倍高い活性を示し、3 位へのフッ素導入は活性にほぼ影響を与えないことを報告している (図 1-6)。同様に、Park らも¹⁻¹²、ヘッド部位の 2 位フッ素体 **37** が無置換体 **38** よりも高活性であることを報告している。

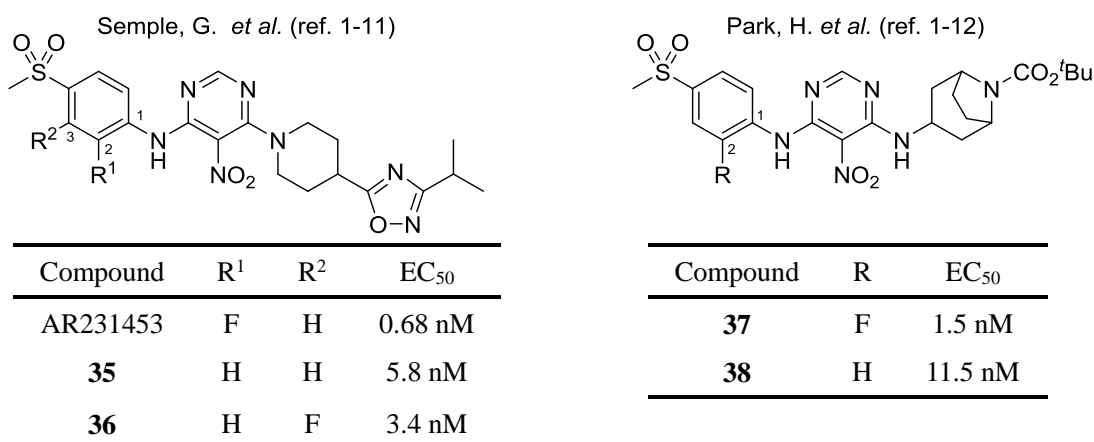


図 1-6. ヘッド部位の 2 位フッ素原子の効果

分子全体あるいは部分構造の立体配座制御が薬理活性の向上に寄与する例は多数報告されていることから¹⁻¹³、著者は、この 2 位フッ素原子の活性増強効果が、フッ素原子とアニリン窒素上の水素原子との分子内水素結合による立体配座制御に起因していると考えた。

そこで、フロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体について、2 位無置換体 **39** と 2 位フッ素体 **1** の ¹H NMR スペクトルを比較したところ、アニリンプロトンの化学シフトは、それぞれ 7.36 ppm および 7.42 ppm であった (図 1-7)。つまり、フロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **1** のアニリンプロトンは、フッ素原子との分子内水素結合の形成によって低磁場シフトしていることが示唆された。しかし、フッ素原子は弱い水素結合受容体であるため、水素-フッ素原子間の水素結合は弱いことが報告されている¹⁻¹⁴。そこで、ヘッド部位の立体配座制御を強固にし、活性を向上させる目的で、この分子内水素結合を炭素-炭素共有結合に置換した、縮環構造をヘッド部位に有する化合物 **40** をデザインした (図 1-8)。

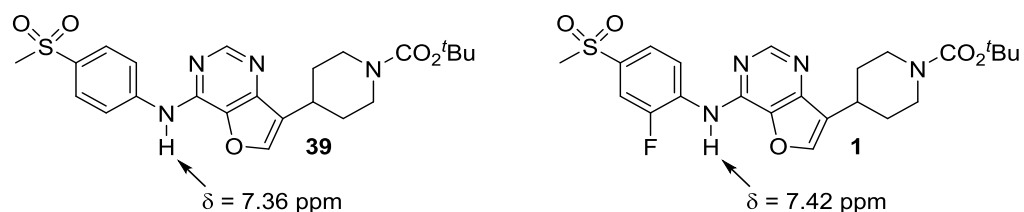


図 1-7. アニリンプロトンの化学シフト

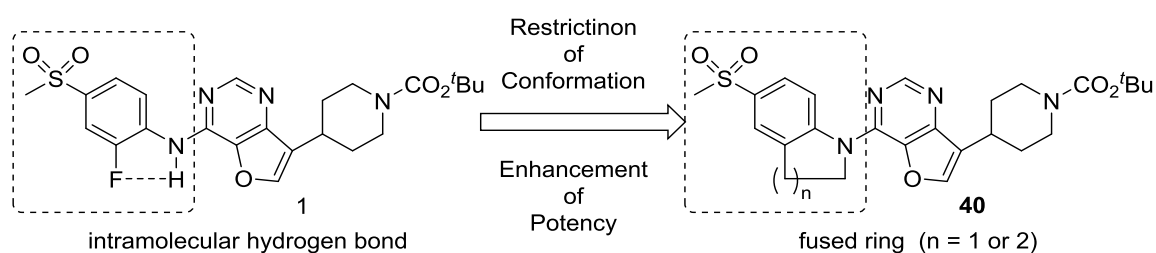
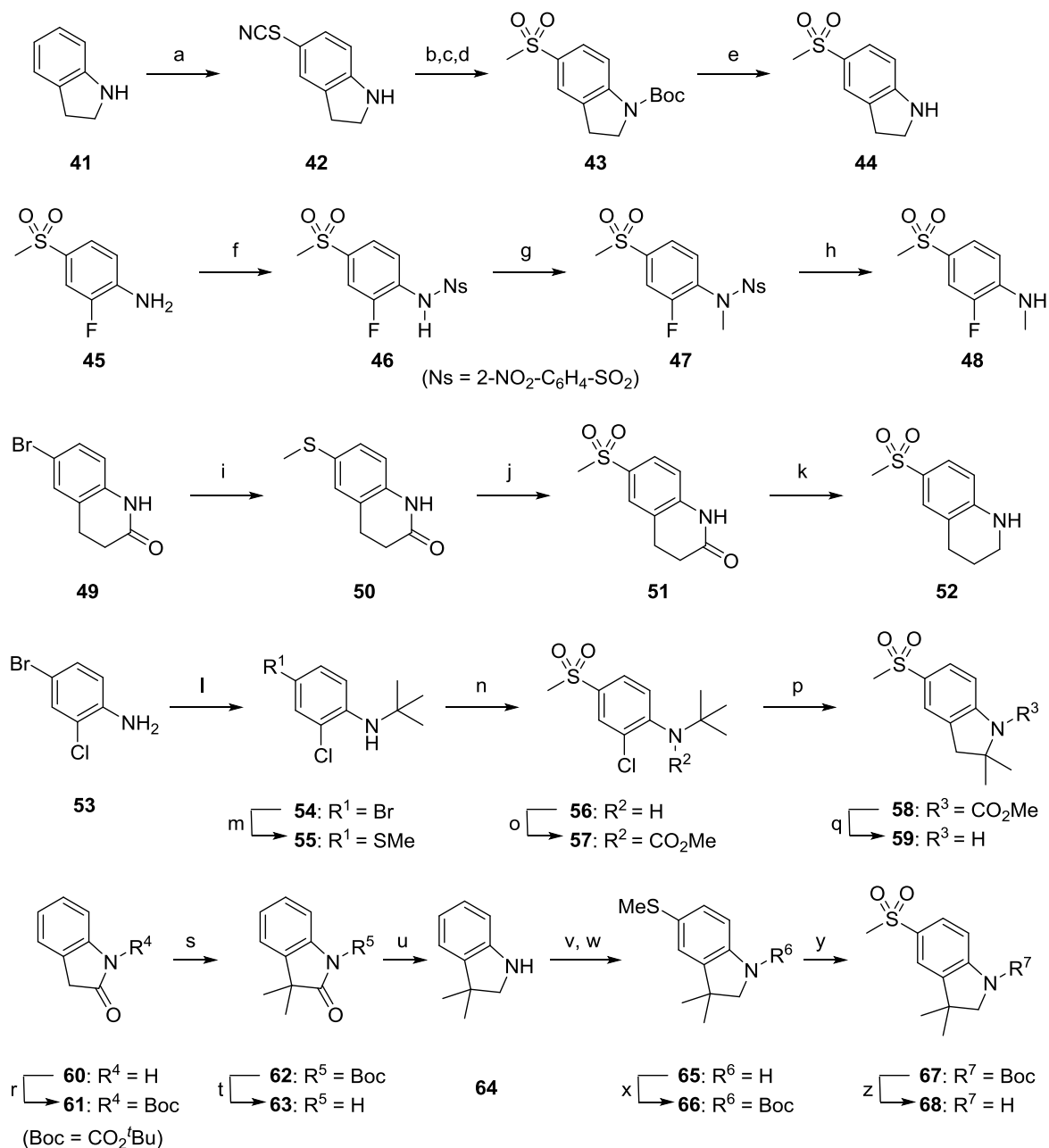


図 1-8. 立体配座を制御するヘッド部位のデザイン

3-2. ヘッド部位の合成

上記仮説の検証に必要な化合物を下記の方法で合成した (Scheme 1-2)。

インドリン (41) にチオシアナート基を導入した後、チオシアナート基をメチルスルフィド基に変換し、窒素原子の保護、硫黄原子の酸化、脱保護を経てインドリン 44 を得た。続いて、アニリン 45 を 2-ニトロベンゼンスルホニル (Ns) 基で保護した後、*N*-メチル化、脱保護を経て *N*-メチルアニリン 48 を合成した。また、6-ブロモ-3,4-ジヒドロキノリン-2-オン 49 にメチルチオ基を導入した後、酸化してスルホン 51 へ導き、ボラン-テトラヒドロフラン錯体でアミドを還元してテトラヒドロキノリン 52 を得た。さらに、4-ブロモ-2-クロロアニリン 53 のアルキル化により *N*-アルキル体 54 とした後、チオメチル基を導入してメチルスルフィド体 55 を得た。次いで、硫黄原子を酸化、アミノ基をメトキシカルボニル基で保護してスルホン体 57 とした後、パラジウム触媒を用いた環化反応¹⁻¹⁵によりインドリン 58 とし、脱保護を行い、2,2-ジメチルインドリン体 59 を得た。また、オキシインドール (60) の窒素原子を Boc 基で保護した後、カルボニル基の α 位をジメチル化し、脱保護およびアミドの還元を経て 3,3-ジメチルインドリン (64) とした。続いて、インドリン (41) からインドリン 44 の調製と同様の方法で 3,3-ジメチルインドリン体 68 を合成した。

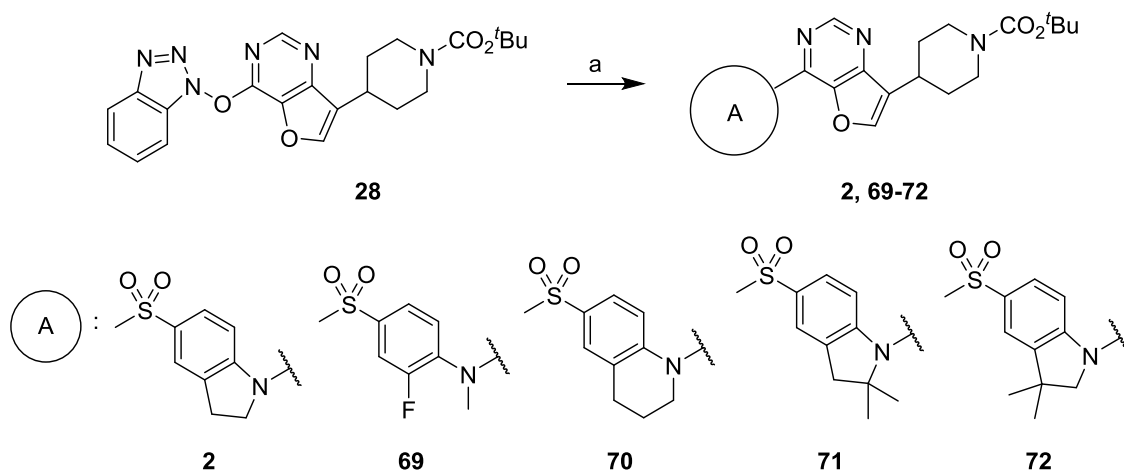


Scheme 1-2. Synthesis of compound **44**, **48**, **52**, **59** and **68**. Reagents and conditions: (a) KSCN, Br₂, MeOH, -10 °C to rt; (b) Na₂S·H₂O, *aq.* EtOH, 50 °C, then MeI, rt; (c) Boc₂O, DMAP, THF, rt; (d) *m*CPBA, CH₂Cl₂, -20 °C, 42% (4 steps); (e) 4 N HCl in AcOEt, MeOH, rt, 80%; (f) NsCl, pyridine, 60 °C, 82%; (g) MeI, K₂CO₃, DMF, rt; (h) PhSH, K₂CO₃, DMF, 59% (2 steps); (i) Pd₂(dba)₃·CHCl₃, XantPhos, NaSMe, toluene, microwave, 120 °C, 70%; (j) *m*CPBA, CH₂Cl₂, 0 °C, 51%; (k) BH₃·THF, THF, 0 °C, 90%; (l) *tert*-butyl 2,2,2-trichloroacetimidate, BF₃·OEt₂, cyclohexane, rt, 44%; (m) Pd₂(dba)₃·CHCl₃, XantPhos, NaSMe, toluene, microwave, 160 °C, 55%; (n) *m*CPBA, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 76%; (o) ClCO₂Me, NaH, CH₂Cl₂, rt, 36%; (p) Pd(OAc)₂, PCy₃·HBF₄, Cs₂CO₃, pivalic acid, xylene, 140 °C, 17%; (q) 1 M LiOH, MeOH, reflux °C, >98%; (r) Na₂CO₃, Boc₂O, THF, rt to 40 °C, 77%; (s) MeI, NaH, THF, rt, 46%; (t) 2,2,2-trifluoroacetic acid, CH₂Cl₂, 0 °C, 95%; (u) Red-Al[®], THF, 80 °C, 86%; (v) KSCN, Br₂, MeOH, 0 °C to rt, 8%; (w) Na₂S·H₂O,

aq. EtOH, 50 °C, then MeI, rt; (x) Boc₂O, Na₂CO₃, THF, rt, 98%; (y) *m*CPBA, CH₂Cl₂, rt, 79%; (z) 2,2,2-trifluoroacetic acid, CH₂Cl₂, rt, >98%.

3-3. フロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体の合成および *in vitro* 活性評価

2-2. で合成したフロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **28** に 3-2.にて合成したアニリン誘導体または複素環化合物を導入し、フロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **2** および **69-72** を合成した (Scheme 1-3)。



Scheme 1-3. Synthesis of furo[2,3-*d*]pyrimidine derivatives **2** and **69-72**. Reagents and conditions: (a) anilines or heterocyclic compounds, NaH, DMF, 0-100 °C, 13-91%.

次いで、得られたフロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **2** および **69-72** の GPR119 に対する *in vitro* 活性を 2-3. に記載した方法で評価した (表 1-2)。

表 1-2. フロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体の *in vitro* 活性評価

Compound	A	hGPR119 agonistic activities	
		EC ₅₀ (nM) ^a	E _{max} (%)
1		129	123
2		53	123
69		>1000	6
70		793	1
71		not active	-
72		not active	-

^a Assay values were reported as a single determination performed in quadruplets.

予想したように、インドリン誘導体 **2** は 2-フルオロアニリン誘導体 **1** よりも活性が増強した (50% 効果濃度が低くなった)。一方、分子内水素結合の形成が阻害されると考えられる *N*-メチル体 **69** の活性は消失した。

ヘッド部位の構造がその立体配座に与える影響を解析することを目的として、2-フルオロアニリン誘導体 **1**、インドリン誘導体 **2** および *N*-メチル体 **69**、それぞれにおける C2-C1-N-R(C1') の二面面の分布を分子動力学計算ソフトウェアで算出した (図 1-9)¹⁻¹⁶。その結果、各化合物の主要な二面面の分布域 (および配座) は、2-フルオロアニリン誘導体 **1** が $-60^{\circ} \sim +60^{\circ}$ (periplanar conformation に clinal conformation が混在)、インドリン誘導体 **2** が $-30^{\circ} \sim +30^{\circ}$ (periplanar conformation)、*N*-メチル誘導体 **69** が $-180^{\circ} \sim -30^{\circ}$ および一部 $+30^{\circ} \sim +180^{\circ}$ (clinal conformation) であることが示唆された。この結果は、ヘッド部位の C2-C1-N-R(C1') を平面性の高い配座 (periplanar conformation) に制御することがアゴニスト活性増強に寄与すると考え

た著者の仮説を支持している。

一方、テトラヒドロキノリン誘導体 **70** についても同様に二面角の分布を算出したところ、**periplanar conformation** を示唆する結果であったことから、インドリン誘導体 **2** と同等の活性を示すことを期待したが、低活性であった。これは、テトラヒドロキノリンが半いす型配座をとることにより、ヘッド部位の縮環構造の平面性が失われたことによると推察される。また、インドリンの 2 位または 3 位にジメチル基を導入したインドリン誘導体 **71** および **72** も活性を示さなかった。これは、メチル基の立体障害によるものと考えられた。したがって、本化合物群のヘッド部位については、その立体配座だけでなく、環状構造およびその周辺の立体的な嵩高さも GPR119 アゴニスト活性に影響を与える因子として重要であると推察される。

以上の結果より、ヘッド部位の最適構造として 5-(メチルスルホニル)インドリンを選択した。

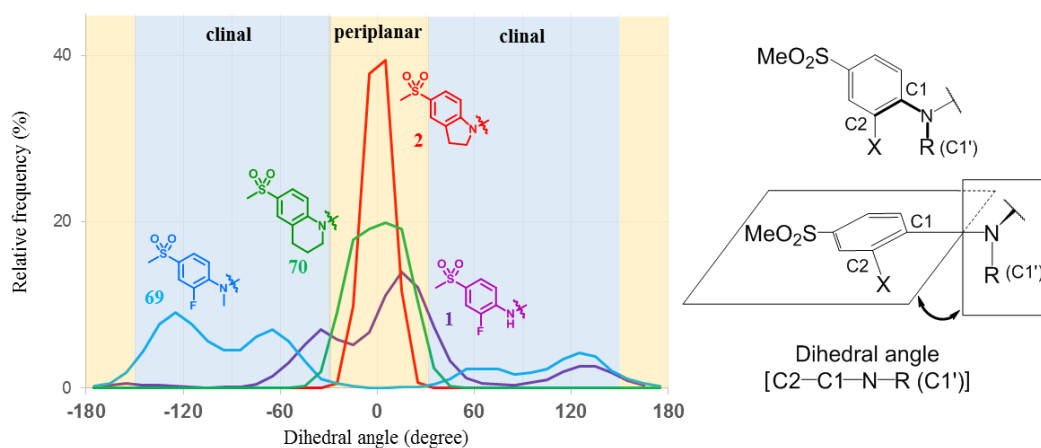


図 1-9. ヘッド部位の二面角分布図

第 4 節 テール部位の最適化

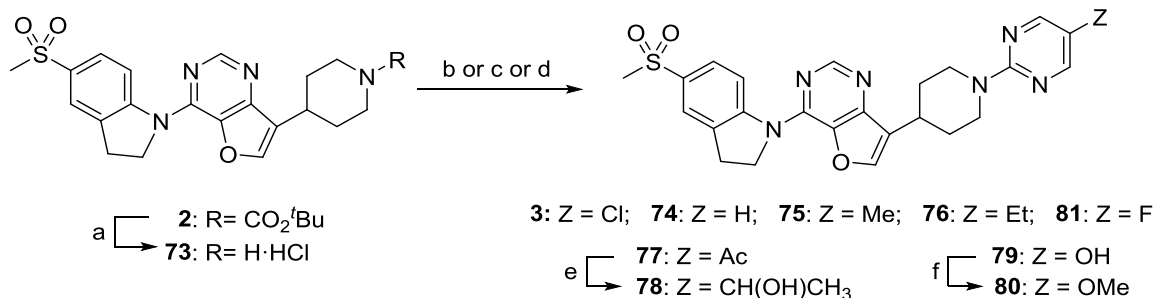
4-1. 合成方針

化合物 **2** は、対照化合物とした AR231453 と同等の *in vitro* 活性を示したが、テール部位に酸に不安定な *tert*-ブトキシカルボニル (Boc) 基を有しており、かつ肝マイクロソーム (ヒトおよびマウス) に対する代謝安定性が低いため、経口投与に適さないと考えられた。そこで、Boc 基を、近年カルバミン酸エステルの生物学的等価体として報告されている 5 位置換ピリミジン¹⁷に変換することを試みた。

4-2. 5 位置換ピリミジン誘導体の合成

Boc 体 **2** を脱保護して塩酸塩 **73** とした後、対応する 2-クロロピリミジンとの芳香族求核置換反応により、5-塩素体 **3**、無置換体 **74**、5-エチル体 **76**、5-アセチル体 **77** および 5-フッ素体

81 を合成した。また、塩酸塩 **73** に 5-ブロモ-2-クロロピリミジン を芳香族求核置換反応させた後、メチル基を導入し、5-メチル体 **75** を得た。さらに、塩酸塩 **73** に 2-クロロ-5-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボラン-2-イル) ピリミジン を芳香族求核置換反応させた後、過酸化水素で酸化することにより 5-水酸化体 **79** を得た。最後に、5-水酸化体 **79** をメチル化して 5-メトキシ体 **80** を合成した (Scheme 1-3)。

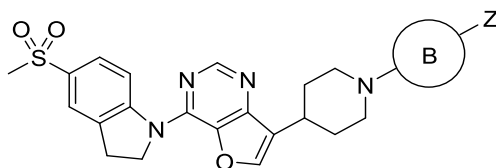


Scheme 1-3. Synthesis of furo[2,3-*d*]pyrimidine derivatives **3** and **74-81**. Reagents and conditions: (a) 4N HCl in AcOEt, MeOH, CHCl₃, rt, 73%; (b) for **3**, **74**, **76**, **77** and **81**; 2-chloropyrimidine derivatives, ^tPr₂NEt, DMF or ⁱPrOH, rt to 100 °C, 15-98%; (c) for **75**; (i) 5-bromo-2-chloropyrimidine, ^tPr₂NEt, DMF, 100 °C, 84%; (ii) MeB(OH)₂, Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂, Cs₂CO₃, THF, DMF, 100 °C, 26%; (d) for **79**; (i) 2-chloro-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyrimidine, ^tPr₂NEt, ⁱPrOH, reflux; (ii) H₂O₂, THF, rt, 27% (2 steps); (e) NaBH₄, MeOH, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 80%; (f) MeI, K₂CO₃, DMF, rt, 16%.

4-3. 5 位置換ピリミジン誘導体の *in vitro* 活性評価

得られた 5 位置換ピリミジン誘導体 **3** および **74-81** の GPR119 に対する *in vitro* 活性を 2-3. に記載した方法で評価した (表 1-3)。

表 1-3. 5 位置換ピリミジン誘導体の *in vitro* 活性評価



Compound	B	Z	hGPR119 agonist activities		LMCl _{int} ^b	
			EC ₅₀ (nM) ^a	E _{max} (%)	human	mouse
2	-CO ₂ ⁻	^t Bu	53	123	550	508
3		Cl	42	117	113	108
74		H	512	196	NT ^c	NT ^c
75		Me	252	159	349	145
76		Et	41	154	412	187
77		Ac	78	12	74	154
78			586	33	102	66
79		OH	391	145	132	107
80		OMe	310	186	255	189
81		F	201	229	257	154

^a Assay values were reported as a single determination performed in quadruplets.

^b Liver microsome clearance (μL/min/mg protein).

5 位アルキル基の炭素数増加に伴い、50% 効果濃度が低下し、活性が向上した (**74**、**75**、**76**)。その中でも、5-エチル体 **76** は Boc 体 **2** と同等以上の *in vitro* 活性を示した。しかし、5-エチル体 **76** の肝ミクロソーム (ヒトおよびマウス) に対する代謝安定性は、Boc 体 **2** よりも向上したものの、ヒト肝ミクロソームに対する代謝安定性は依然として改善が必要な水準であった。芳香環のアルキル側鎖の α 位は代謝感受性が高いことが知られていることから、5-エチル体 **76** の予想代謝物¹⁻¹⁸ として、エチル基の 1 位を酸化したアセチル体 **77** および水酸化体 **78** を合成したが、活性を示さなかった。また、エチル基を水酸基に置換した水酸化体 **79**、メトキシ基に置換した 5-メトキシ体 **80** も低い活性であった。以上の結果に基づいて、代謝感受性が高い α 位炭素を有さずかつ脂溶性が高い官能基として、ハロゲン原子を 5 位に導入した化合物を合成

したところ、5-フッ素体 **81** は低活性であったが、5-クロロ体 **3** は、Boc 体 **2** と同等の活性を示した (50% 効果濃度は低く、最大強度は同等であった)。さらに、肝ミクロソーム (ヒトおよびマウス) に対する固有クリアランスも本検討の目的に沿って改善され、許容される範囲内であった。

以上より、5-クロロ体 **3** はさらなる評価を進める価値のある化合物であると判断し、*in vivo* 評価を行った。

4.4. 薬物動態試験

5-クロロ体 **3** は、マウスを用いた経口投与薬物動態試験において良好な結果を示した (表 1-4)。

表 1-4. 5-クロロ体 **3** の薬物動態パラメータ ^a

CL _{p iv} (mL/min/kg)	V _{ss iv} (L/kg)	t _{1/2 iv} (h)	C _{max po} (ng/mL)	AUC _{po} (ng h/mL)	BA ^b (%)
6.5	2.3	5.1	2,015	9,386	37

^a **3** was administered to mice at 0.5 mg/kg (iv) and 10 mg/kg (po) in vehicle of PET (80% PEG400, 10% Ethanol, 10% Tween80TM).

^b Bioavailability.

4.5. 経口グルコース負荷試験

5-クロロ体 **3** (経口投与 10 mg/kg) は、C57BL/6N マウスを用いた経口グルコース負荷試験 (OGTT) において、対照化合物とした AR231453 (経口投与 20 mg/kg) と同等の血糖低下作用を有しており、開発候補となり得る化合物であると考えられた (図 1-10)。

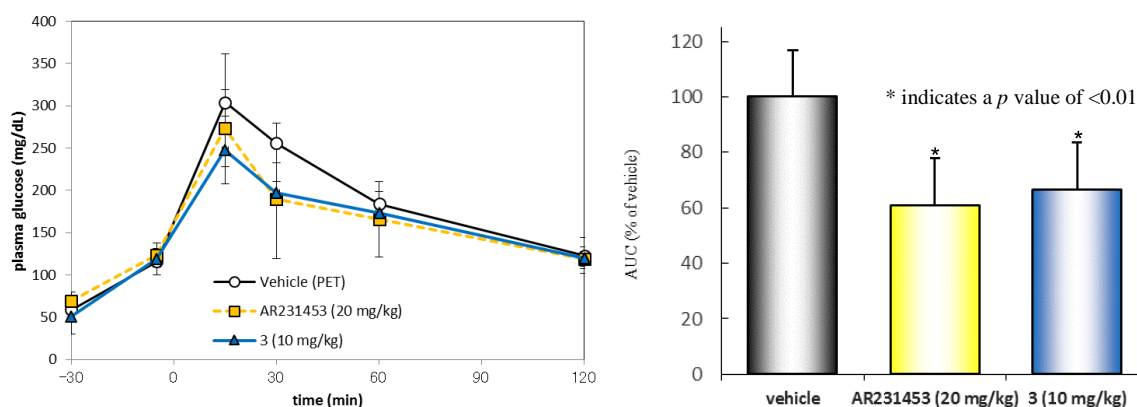


図 1-10. 5-クロロ体 **3** の経口グルコース負荷試験

第 5 節 まとめ

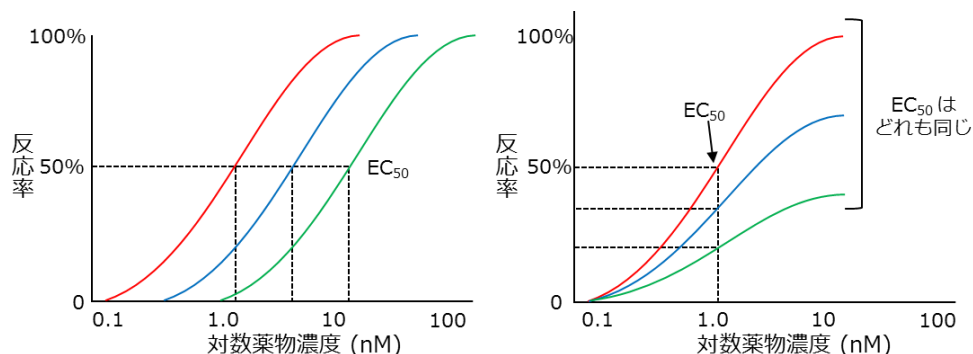
著者は、GPR119 アゴニストの構造がヘッド部位、リンカー部位、テール部位から構成されるという提唱に沿って新規 GPR119 アゴニストの探索研究を行い、新規リンカーとしてフロ [2,3-*d*]ピリミジン骨格を有する化合物 **1** ($EC_{50} = 129 \text{ nM}$, $E_{\max} = 123\%$) を創出した。さらに、GPR119 アゴニスト活性の発現にはリガンド分子の立体配座制御が重要であるとの仮定に基づき、ヘッド部位の立体配座制御を強固にするため、ヘッド部位の 2 位フッ素原子とアニリン水素原子の分子内水素結合を炭素-炭素共有結合に置換することで、化合物 **1** の活性が向上することを明らかにし、インドリン誘導体 **2** ($EC_{50} = 53 \text{ nM}$, $E_{\max} = 123\%$) を見出した。次いで、インドリン誘導体 **2** のテール部位を最適化し、肝ミクロソームにおける固有クリアランスを改善した化合物 **3** ($EC_{50} = 42 \text{ nM}$, $E_{\max} = 117\%$) を第 1 世代化合物として創製した。化合物 **3** は C57BL/6N マウスを用いた経口グルコース負荷試験において開発候補となり得る血糖低下作用を示した。

第 6 節 引用文献

- 1-1. 総説 (a) Jones, R. M.; Leonard, J. N.; Buzard, D. J.; Lehmann, J. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 1339; (b) Ritter, K.; Buning, C.; Halland, N.; Pöverlein, C.; Schwink, L. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3579; (c) Yang, J. W.; Kim, H. S.; Choi, Y. W.; Kim, Y. M.; Kang, K. W. *Diabetes Obes. Metab.* **2017**, *1*.
- 1-2. Futatsugi, K.; Mascitti, V.; Guimarães, C. R. W.; Morishita, N.; Cai, C.; DeNinno, M. P.; Gao, H.; Hamilton, M. D.; Hank, R.; Harris, A. R.; Kung, D. W.; Lavergne, S. Y.; Lefker, B. A.; Lopaze, M. G.; McClure, K. F.; Munchhof, M. J.; Preville, C.; Robinson, R. P.; Wright, S. W.; Bonin, P. D.; Cornelius, P.; Chen, Y.; Kalgutkar, A. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 194.
- 1-3. Semple G.; Lehmann, J.; Wong, A.; Ren, A.; Bruce, M.; Shin, Y. J.; Sage, C. R.; Morgan, M.; Chen, W. C.; Sebring, K.; Chu, Z. L.; Leonard, J. N.; Al-Shamma, H.; Grottick, A. J.; Du, F.; Liang, Y.; Demarest, K.; Jones, R. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1750.
- 1-4. Semple, G.; Ren, A.; Fioravanti, B.; Pereira, G.; Calderon, I.; Choi, K.; Xiong, Y.; Shin, Y. J.; Gharbaoui, T.; Sage, C. R.; Morgan, M.; Xing, C.; Chu, Z. L.; Leonard, J. N.; Grottick, A. J.; Al-Shamma, H.; Liang, Y.; Demarest, K. T.; Jones, R. M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3134.
- 1-5. Chein, R. J.; Corey, E. J. *Org. Lett.* **2009**, *12*, 132.
- 1-6. Sato, K.; Sugimoto, H.; Rikimaru, K.; Imoto, H.; Kamaura, M.; Negoro, N.; Tsujihata, Y.; Miyashita, H.; Odani, T.; Murata, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1649.
- 1-7. Fevig, J. M.; Wacker, D. A. WO 2008137436, **2008**.
- 1-8. Gillespie, P.; Goodnow, R. A. Jr.; Saha, G.; Bose, G.; Moulik, K.; Zwingelstein, C.; Myers, M.; Conde-Knape, K.; Pietrani-co-Cole, S.; So, S. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 949.
- 1-9. (a) Carceller, G. E.; Medina, F. E.; Virgili, B. M.; Marti, V. J. WO 2009115496, **2009**; (b) Morimoto,

T.; Koshizawa, T.; Watanabe, G.; Ohgiya, T.; Yamasaki, N.; Inoue, N. WO 2011162368, 2011.

- 1-10. 最大強度 (E_{\max}) が同一の化合物に対しては、50% 効果濃度 (EC_{50}) がより低い化合物の方が有利である (左図)。一方、50% 効果濃度 (EC_{50}) が同一の化合物に対しては、最大強度 (E_{\max}) が高い化合物の方がより有利である (右図)。よって、本研究では、50% 効果濃度 (EC_{50}) がより低く、最大強度 (E_{\max}) がより高い化合物の創製を目指した。



図は http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/basic_principles_of_pharm を参照した。

- 1-11. Semple, G.; Fioravanti, B.; Pereira, G.; Calderon, I.; Uy, J.; Choi, K.; Xiong, Y.; Ren, A.; Morgan, M.; Dave, V.; Thomsen, W.; Unett, D. J.; Xing, C.; Bossie, S.; Carroll, C.; Chu, Z.-L.; Grottick, A. J.; Hauser, E. K.; Leonard, J.; Jones, R. M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5172.
- 1-12. Yang, Z.; Fang, Y.; Pham, T.-A. N.; Lee, J.; Park, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1519.
- 1-13. (a) Kobayashi, T.; Suemasa, A.; Igawa, A.; Ide, S.; Fukuda, H.; Abe, H.; Arisawa, M.; Minami, M.; Shuto, S. *Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 889; (b) Bakali, J. E.; Muccioli, G. G.; Body-Malapel, M.; Djouina, M.; Klupsch, F.; Ghinet, A.; Barczyk, A.; Renault, N.; Chavatte, P.; Desreumaux, P.; Lambert, D. M.; Millet, R. *Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 198; (c) Yan, Q.; Wang, Y.; Zhang, W.; Li, Y. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 85.
- 1-14. Howard, J. A. K.; Hoy, V. J.; O'Hagan, D.; Smith, G. T. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12613.
- 1-15. Watanabe, T.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1759.
- 1-16. Molecular dynamics simulations were performed with the gromacs 5.1.1 package employing General AMBER Force Field and periodic boundary conditions in saline solution at 310K.
- 1-17. (a) Shah, U.; Kowalski, T. J. *Vitam. Horm.* **2010**, *84*, 415; (b) Wacker, D. A.; Wang, Y.; Broekema, M.; Rossi, K.; O'Connor, S.; Hong, Z.; Wu, G.; Malmstrom, S. E.; Hung, C. P.; LaMarre, L.; Chimalakonda, A.; Zhang, L.; Xin, L.; Cai, H.; Chu, C.; Boehm, S.; Zalaznick, J.; Ponticiello, R.; Sereda, L.; Han, S. P.; Zebo, R.; Zinker, B.; Luk, C. E.; Wong, R.; Everlof, G.; Li, Y. X.; Wu, C. K.; Lee, M.; Griffen, S.; Miller, K. J.; Krupinski, J. Robl, J. A. L. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7499.
- 1-18. Metabolic stability predictions were performed with StarDrop (Optibrium. StarDrop. www.optibrium.com/stardrop). The calculation suggested that the ethyl group of compound **76** was easily metabolized by cytochrome P450.

第 2 章 第 2 世代化合物の創製

第 1 節 化合物デザイン

著者は、第 1 章に記載した化合物探索によって開発候補となり得る化合物 **3** を見出した。しかし、前臨床試験あるいは臨床試験の段階において基礎研究の段階では予測が困難な問題点が見出され、選択した化合物の開発研究を中断せざるを得ない場合も想定される。そこで、より確実に新規 GPR119 アゴニストの創薬研究を進めることを目的として、第 2 世代の開発候補化合物を見出すための研究に着手した。

本化合物探索の目的から、第 2 世代の開発候補化合物の構造は第 1 世代と類似していないことが望ましい。しかし、第 1 章第 1 節に記載したように、ヘッド部位およびテール部位の構造多様性には GPR119 アゴニスト構造の共通要素としての制約がある。そのため、リンカーには、第 1 世代化合物において採用したフロ[2,3-*d*]ピリミジンと性格の異なる構造を選択したいと考えた。具体的には、芳香族縮環構造であるフロ[2,3-*d*]ピリミジンに対して芳香族性を低下させた構造が候補になると考えた。

上記の観点から GPR119 アゴニスト研究初期の情報を見直すと、アルキル鎖を含むリンカーを有する化合物が報告されており、たとえば、化合物 **82**²⁻¹ はマウス用いた経口グルコース負荷試験における血糖低下作用、化合物 **83**²⁻² は 200 nM 以下の 50% 効果濃度を示すことがそれぞれ報告されている (図 2-1)。一方、リンカーによってリガンド分子の配座を適切に制御することにより活性が向上することが、第 1 章に記載した化合物探索を含めたこれまでの GPR119 アゴニスト研究において示されている。そこで、第 2 世代化合物の探索において、スピロピペリジン **84** の利用を検討することとした。スピロピペリジン **84** は、privileged structure²⁻³ の 1 つとして知られており、ステアロイル CoA 不飽和化酵素やヒストン脱アセチル化酵素などを標的とした化合物にも利用されている、薬らしさの高い (ドラッグライクな) 構造である²⁻⁴。本研究においては、スピロピペリジン **84** の具体的な構造としてスピロクロマンピペリジン **85** をデザインした。本骨格は、化合物 **83** のリンカーのアルキル鎖を芳香族環と縮環させ、この環とテール部位のピペリジン環でスピロ構造が形成された骨格とみなすことができる。3 環性スピロ構造とすることでヘッド部位とテール部位の相対的な配置を制御することができ、ヘッド部位の置換位置およびその構造の最適化によって、高活性化合物に到達し得る可能性があると考えた。

なお、privileged structure という用語は、元来は複数の分類の受容体に対して親和性を示す特別な構造という意味で用いられ²⁻⁵、IUPAC は本用語を「Substructural feature which confers desirable (often drug - like) properties on compounds containing that feature. Often consists of a semi - rigid scaffold which is able to present multiple hydrophobic residues without undergoing hydrophobic collapse」と定義している²⁻⁶。現在は、たとえば、化合物ライブラリに関する論文において、展開可能性の高い構造の総称として用いられている。

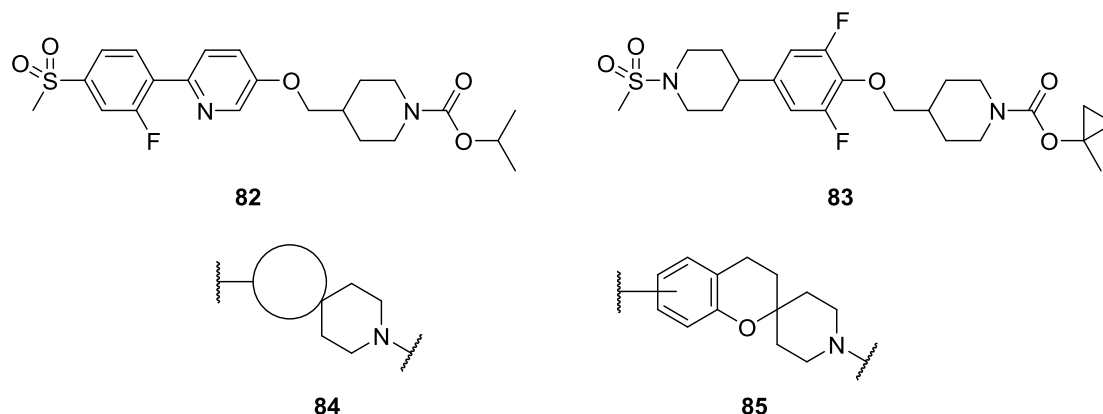


図 2-1. 脂肪族部分構造を含むリンカー

上記のように、第 2 世代化合物の創製にあたり、第 1 世代化合物の創製に有効であったリンカーによるリガンド分子の立体配座制御の概念を発展させ、リンカー部位とテール部位を連結した部分構造 (リンカー-テール部位) としてスピロクロマンピペリジン **85** を有する、第 2 世代化合物の一般構造式 **4** をデザインした (図 2-2)。

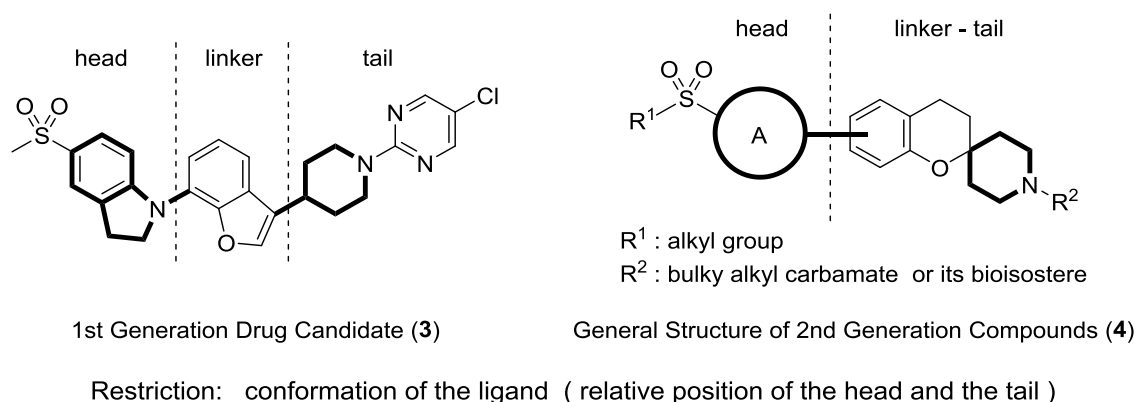


図 2-2. 第 2 世代化合物のデザイン

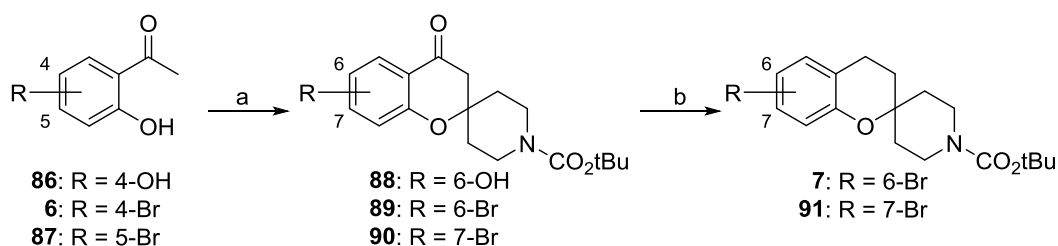
第 2 節 ヘッド部位の検討

まず、テール部位のアルキルカルバミン酸エステルを *tert*-ブトキシカルボニル基として、スピロクロマンピペリジン化合物に適したヘッド部位の探索を行った。

2-1. スピロクロマンピペリジン誘導体の合成

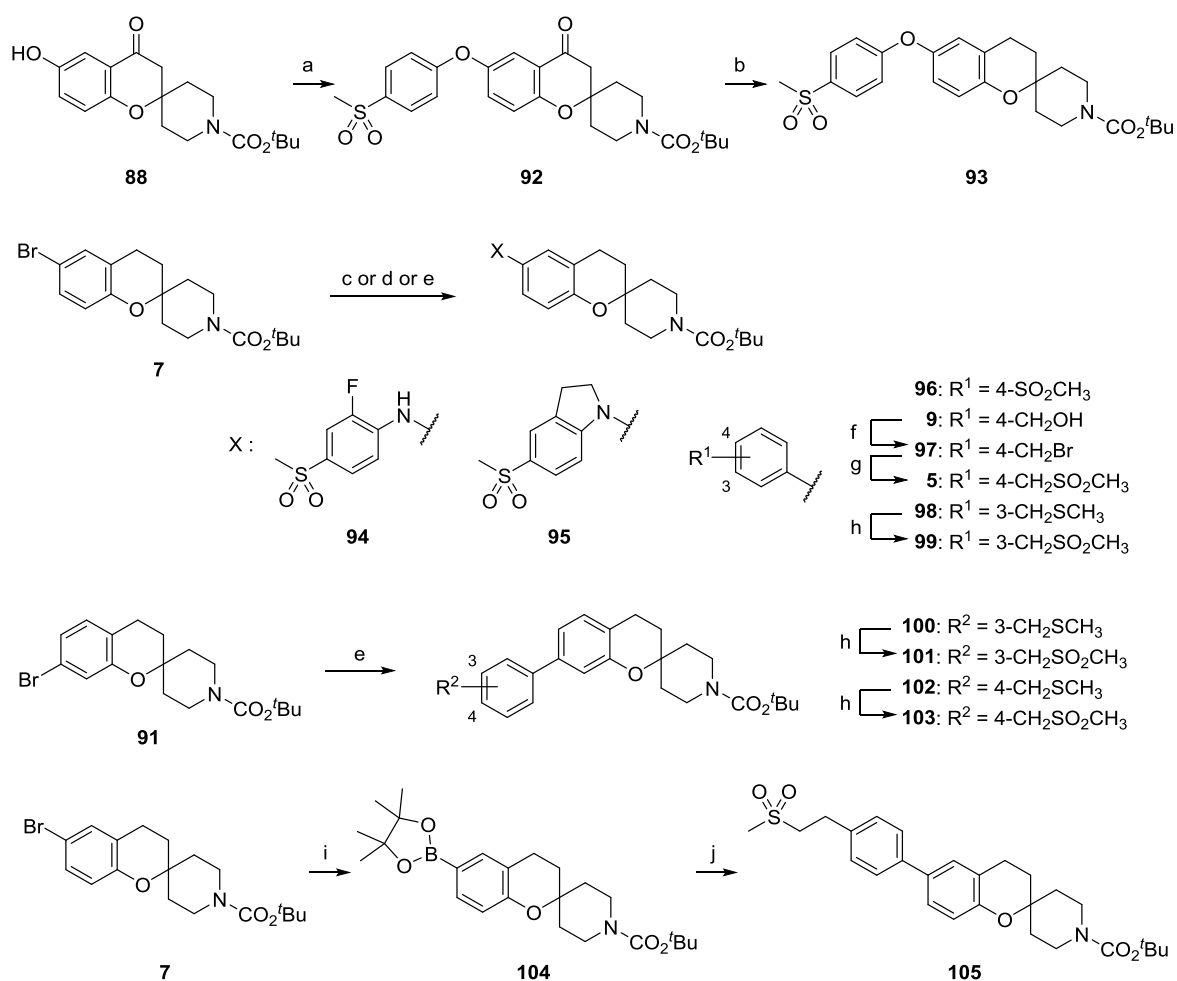
原料として使用した 6-ヒドロキシ-4-オキソスピロクロマン誘導体 **88**²⁻⁷、6-ブロモスピロクロマン誘導体 **7**^{2-3,2-8}、および 7-ブロモスピロクロマン誘導体 **91**²⁻⁹ は文献記載の方法で合成した (Scheme 2-1)。つまり、アセトフェノン **6**、**86** および **87** と 1-*tert*-ブトキシカルボニル-4-オキソピペリジンから、それぞれ 4-オキソスピロクロマン誘導体 **88**、**89** および **90** を合成した。さら

に、4-オキソスピロクロマン誘導体 **89** および **90** のカルボニル基を水素化ホウ素ナトリウムおよびトリエチルシランで還元し、それぞれからブロモスピロクロマン誘導体 **7** および **91** を得た。



Scheme 2-1. Synthesis of spirochromane derivatives **7**, **88**, and **91**. Reagents and conditions: (a) *tert*-butyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate, pyrrolidine, MeOH, reflux, 91-92%; (b) (i) NaBH₄, EtOH, 50 °C; (ii) Et₃SiH, 2,2,2-trifluoroacetic acid, reflux; (iii) Boc₂O, K₂CO₃, acetone, rt, 87-94% (3 steps).

続いて、上記の方法で合成した原料から、ヘッド部位の最適化に必要なスピロクロマンピペリジン誘導体を合成した (Scheme 2-2)。4-オキソスピロクロマン誘導体 **88** を Chan-Lam-Evens カップリング反応²⁻¹⁰によってフェニルエーテル **92** に変換した後、カルボニル基の還元、および還元反応で脱保護されたピペリジン窒素原子の再保護によりスピロクロマンピペリジン誘導体 **93** を得た。次いで、6-ブロモスピロクロマン誘導体 **7** に、2-フルオロ-4-メチルスルホニルアニリンおよび 5-(メチルスルホニル)インドリンを Buchwald-Hartwig アミノ化反応²⁻¹¹で導入し、それぞれの生成物としてスピロクロマンピペリジン誘導体 **94** および **95** を得た。さらに鈴木-宮浦カップリング反応²⁻¹²により、6-ブロモスピロクロマン誘導体 **7** からビフェニル誘導体 **9**、**96**、および **98** を、7-ブロモスピロクロマン誘導体 **91** からビフェニル誘導体 **100** および **102** を、それぞれ合成した。次いで、上記の方法で合成したベンジルアルコール **9** の水酸基を臭素化した後、メタンサルフィン酸ナトリウムとの求核置換反応によってスピロクロマンピペリジン誘導体 **5** を合成した。また、3-クロロ過安息香酸を用いてスルフィド **98**、**100** および **102** を酸化し、それぞれの生成物としてスピロクロマンピペリジン誘導体 **99**、**101** および **103** を得た。最後に、6-ブロモスピロクロマン誘導体 **7** をボロン酸エステル **104** に誘導した後、鈴木-宮浦カップリング反応によってスピロクロマンピペリジン誘導体 **105** を合成した。

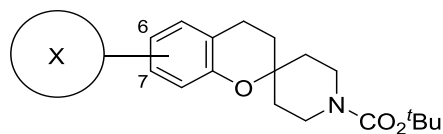


Scheme 2-2. Synthesis of spirochromane derivatives **5**, **93**, **94**, **95**, **96**, **99**, **101**, **103** and **105**. Reagents and conditions: (a) 4-(methylsulfonyl)phenylboronic acid, Cu(OAc)₂, Et₃N, MS4A, CH₂Cl₂, rt, 39%; (b) (i) NaBH₄, EtOH, 50 °C; (ii) Et₃SiH, 2,2,2-trifluoroacetic acid, reflux; (iii) Boc₂O, K₂CO₃, acetone, rt, 85% (3 steps); (c) for **94**; 2-fluoro-4-(methylsulfonyl)aniline, Pd₂(dba)₃, P^tBu₃, NaO^tBu, toluene, 90 °C, 89%; (d) for **95**; 5-(methylsulfonyl)indoline, Pd(P^tBu₃)₂, NaO^tBu, toluene, 100 °C, 98%; (e) for **9**, **96**, **98**, **100**, and **102**; boronic acid, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 90-95 °C, 46-72%; (f) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, rt, 93%; (g) NaSO₂CH₃, DMSO, 120 °C, >98%; (h) *m*CPBA, CH₂Cl₂, rt, 30-40%; (i) Bis(pinacolato)diboron, PdCl₂(PPh₃)₂, KOAc, 1,4-dioxane, 90 °C, 72%; (j) 1-bromo-4-(2-(methylsulfonyl)ethyl)benzene, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DME, H₂O, 90 °C, 62%.

2-2. スピロクロマンピペリジン誘導体の *in vitro* 活性評価

2-1. で合成したスピロクロマンピペリジン誘導体の GPR119 に対する *in vitro* 活性を第 1 章 2-3. に記載した方法で評価した (表 2-1)。

表 2-1. スピロクロマンピペリジン誘導体の *in vitro* 活性評価



Compound	Substitution pattern	X	hGPR119 agonistic activities	
			EC ₅₀ (nM) ^a	E _{max} (%)
93			Not active	Not active
94			Not active	Not active
95			Not active	Not active
96			>1,000	60
5			369	82
105			>1,000	69
99			Not active	Not active
101			Not active	Not active
103			Not active	Not active

^a Assay values were reported as a single determination performed in quadruplet.

既知の GPR119 アゴニスト (GSK1292263^{2-1,2-13} および AR231453²⁻¹⁴) または第 1 世代化合物のヘッド部位を利用したスピロクロマンピペリジン誘導体 **93**、**94** および **95** は活性を示さなかったが、ビフェニル誘導体 **96** はわずかに活性を示した。そこで、以下に示した 2 つの効果による活性向上を期待し、ヘッド部位のスルホニル基と芳香環の間にアルキレン基を導入した、ビフェニル誘導体 **96** の同族体を合成した。

- (1) スルホニル基の電子供与性が増加し、GPR119 のリガンド結合部位との結合能が向上する。
- (2) 配座の自由度が増加し、スルホニル基が GPR119 との結合に最適な位置をとることができるようになる。

その結果、スルホニル基と芳香環の間にメチレン基を導入したスピロクロマンピペリジン誘導体 **5** が、メチレン基を持たない **96** およびエチレン基を導入した **105** よりも高い活性を示した ($EC_{50} = 369 \text{ nM}$, $E_{\max} = 82\%$)。量子力学計算ソフトを用いて、スピロクロマンピペリジン誘導体 **5** および **96** のスルホニル基酸素原子の部分原子電荷を算出したところ²⁻¹⁵、それぞれ -0.555 および -0.536 であり、アルキレン基の導入によりスルホニル基酸素原子の電子密度が増加し、GPR119 のリガンド結合部位との結合能が向上するという仮説が支持された。

一方、メチルスルホニルメチル基をヘッド部位ベンゼン環の 3 位に導入したスピロクロマンピペリジン誘導体 **99** は活性を示さなかった。また、メチルスルホニルメチル基を有するヘッド部位をスピロクロマン骨格の 7 位に導入したスピロクロマンピペリジン誘導体 **101** および **103** も活性を示さなかった。

上記の検討によって、GPR119-リガンド複合体におけるヘッド部位スルホニル基の電子供与基としての機能を向上させることができた。しかし、現時点では GPR119-リガンド複合体の結合様式に関する情報が得られていないため、アルキレン基導入に際して期待した上記 2 つの効果それぞれの寄与度は解析できておらず、今後の課題である。

また、リンカー-テール部位上のヘッド部位の置換位置およびその構造の検討によって確実に活性が向上したことから、2 つのファーマコフォア (ヘッド部分のスルホニル基およびテール部位のアルキルカルバミン酸エステル) の相対的な配置がアゴニスト活性発現にとって重要であることが改めて示唆されるとともに、スピロクロマンピペリジン骨格をリンカー-テール部位として用いることで、その要求を満たすことができると考えられた。

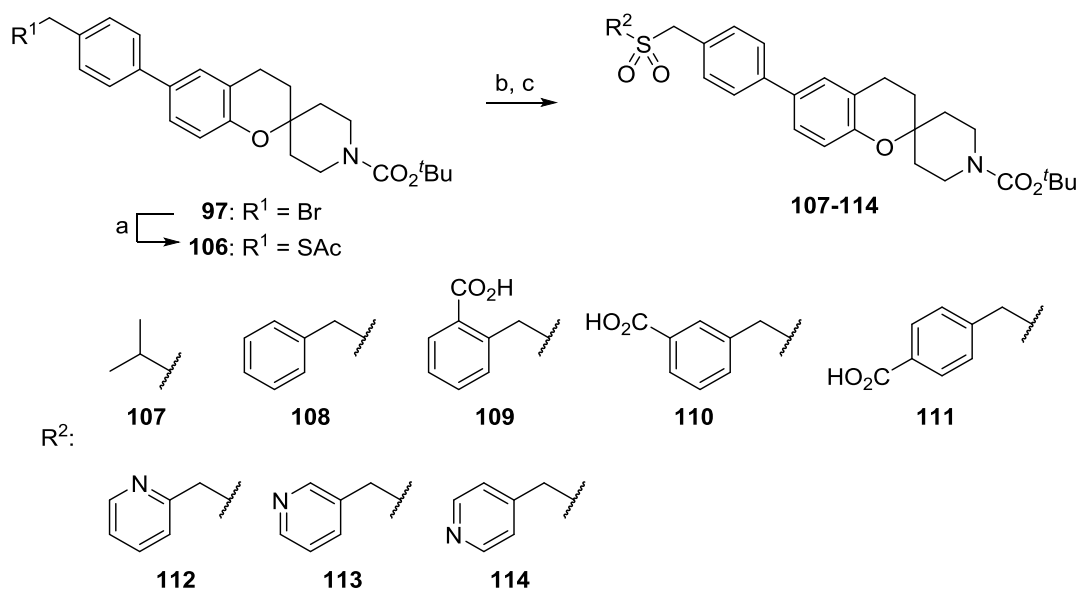
以上の結果より、スピロクロマンピペリジン誘導体 **5** をリード化合物として選択した。

第 3 節 ヘッド部位の最適化

続いて、リード化合物 **5** のヘッド部位を最適化するため、ヘッド部位末端スルホン基のアルキル置換基について検討した。

3-1. スルホン基のアルキル置換基の変換

臭化ベンジル **97** をチオアセタート **106** に誘導した後、脱アセチル化、チオールのアルキル化、続くスルフィドの酸化反応によりスルホン基のアルキル置換基を変換したスピロクロマンピペリジン誘導体 **107-114** を合成した (Scheme 2-3)。

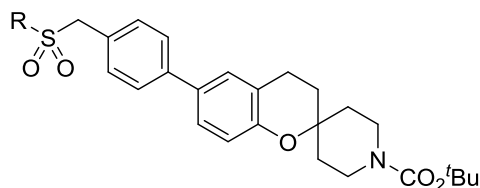


Scheme 2-3. Synthesis of spirochromane derivatives **107-114**. Reagents and conditions: (a) KSAc, DMF, rt, 84%; (b) R²-X, NaOH *aq.*, MeOH-THF, 0-50 °C, 14-100%; (c) *m*CPBA, CH₂Cl₂, rt or Na₂WO₄·2H₂O, H₂O₂ *aq.*, *i*PrOH, rt to 50 °C, 48-100%.

3-2. スルホン基のアルキル置換基の構造活性相関

3-1. で合成したスピロクロマンピペリジン誘導体の GPR119 に対する *in vitro* 活性を第 1 章 2-3. に記載した方法で評価した (表 2-2)。

表 2-2. アルキルスルホニル部位の構造活性相関



Compound	R	hGPR119 agonistic activities		AUC ^b (ng h/mL)	ClogP ^c
		EC ₅₀ (nM) ^a	E _{max} (%)		
5	CH ₃ -	369	82	17,401	4.13
107	^t Pr-	142	145	—	4.96
108	PhCH ₂ -	56	169	2,176	5.78
109	2-CO ₂ H-C ₆ H ₄ CH ₂ -	334	45	—	5.23
110	3-CO ₂ H-C ₆ H ₄ CH ₂ -	321	91	—	5.53
111	4-CO ₂ H-C ₆ H ₄ CH ₂ -	360	87	—	5.53
112	2-PyCH ₂ -	46	150	9,134	4.29
113	3-PyCH ₂ -	68	153	—	4.29
114	4-PyCH ₂ -	98	122	—	4.29

^a Assay values were reported as a single determination performed in quadruplets.

^b Oral exposures (0-24 h) in mice at a dose of 3 mg/kg administered in vehicle of 0.5% MC and 1% Tween80TM.

^c ClogP was calculated using ChemDraw Professional (PerkinElmer, Boston, MA, v. 16.0).

置換基の大きさの増大に伴い 50% 効果濃度が低下し、最大強度も強くなった (誘導体 **5**、**107** および **108**)。ベンジル誘導体 **108** は、第 1 世代化合物探索におけるヘッド部位最適化合物 **2** (EC₅₀ = 53 nM, E_{max} = 123%) を凌ぐ *in vitro* 活性を示したが、マウスに経口投与した際の血漿中への暴露はリード化合物 **5** よりも低下した。日局崩壊試験第 1 液および第 2 液におけるベンジルスルホニル体 **108** の溶解度は、いずれも 0.4 μg/mL 未満であり、血漿中暴露の低下は、ベンジル誘導体 **108** の水溶性の低さに起因し、その原因は脂溶性が高いことにあると推察された。

そこで、ベンジル誘導体 **108** の活性を維持しつつ水溶性を改善するための方策として、ベンジル基のベンゼン環へのカルボキシル基の導入、およびベンジル基からピリジルメチル基への変換を検討した。この検討においては、脂溶性が水溶性に対して大きく影響すると考え、その指標として ClogP²⁻¹⁶ を参照した。

いずれの方法においても、得られた誘導体の ClogP は期待通りに低下したが、両方法を比較す

るとベンジル基をピリジルメチル基へ変換した際の効果が大きかった。さらに、カルボン酸誘導体 **109-111** では、ベンジル誘導体 **108** と比較して活性の低下が認められたが、ピリジルメチル誘導体 **112-114** は活性を維持した。なかでも、2-ピリジル誘導体 **112** は、ベンジル誘導体 **108** と比較して最大強度はやや劣ったが 50% 効果濃度が低下し、第 1 世代の最適化途上化合物 **2** を凌ぐ活性を示すとともに、リード化合物 **5** と比較した血漿中暴露の低下も小さかった。なお、2-ピリジル誘導体 **112** と同等の活性を示した 3-ピリジル誘導体 **113** には、*in vitro* 活性評価の際に高濃度領域 (100 μ M) における細胞増殖抑制作用が認められた。そのため、3-ピリジル基は以降の最適化の検討対象から除外することとした。

本検討は、ヘッド部位の末端に嵩高い置換基を導入することが活性向上に効果的であること示した特異な例である。GPR119 アゴニストに関するこれまでの報告では、ヘッド部位のスルホニル基のアルキル置換基をメチル基から他の嵩高いアルキル基に変換することで活性が低下することが一般的である。たとえば、Semple²⁻¹⁴らは、メチルスルホニル基をエチルスルホニル基またはイソプロピルスルホニル基へ変更した場合、活性が低下すると報告している。さらに、Liu ら²⁻¹⁷や Han ら²⁻¹⁸も同様の報告をしている (図 2-3)。

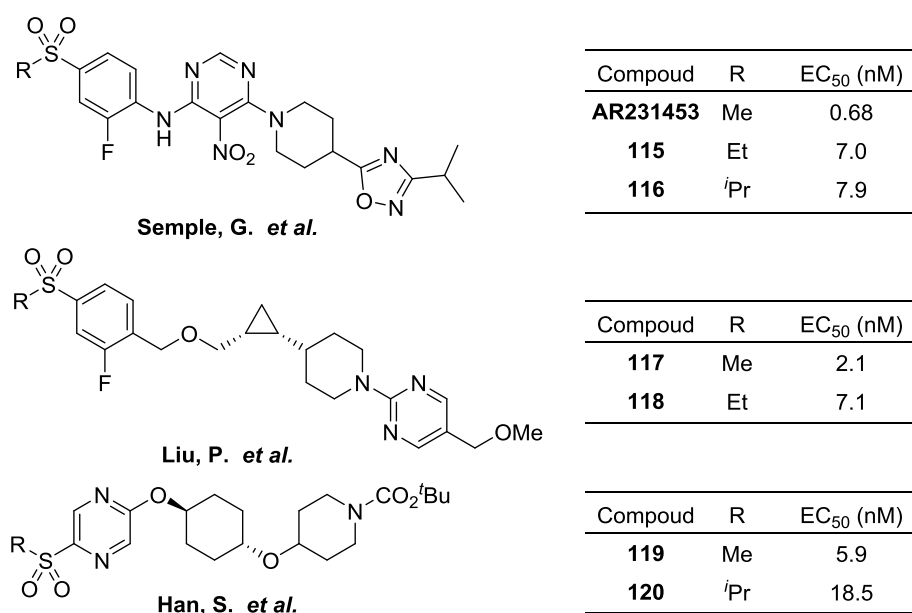


図 2-3. ヘッド部位末端置換基の効果

本検討においてヘッド部位末端に嵩高い置換基を導入することが高活性化につながった理由は、ヘッド部位のスルホニル基と芳香環の間にメチレン基を導入したことにより、ヘッド部位末端部の配座自由度が増し、ヘッド部位末端部の配座自由度が低い従来のリガンドでは十分に利用できなかった受容体の疎水性ポケットを、嵩高いベンジル型置換基が有効に利用したためであると推察される。なお、2-2. にも記載したように、現時点では GPR119-リガンド複合体の結合様式に関する情報が得られていないため、この推察を検証することも今後の課題である。

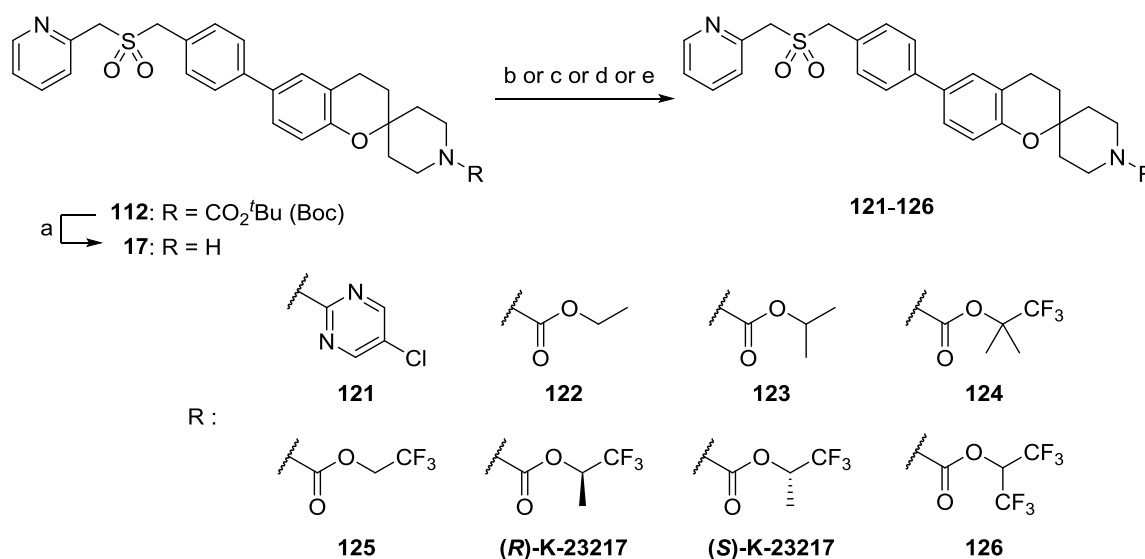
以上の結果より、ヘッド部位のスルホニル基アルキル置換基の最適構造として 2-ピリジルメチル基を選択した。

第 4 節 テール部位の最適化

スピロクロマンピペリジン誘導体 **112** はテール部位に酸に不安定な *tert*-ブトキシカルボニル基を有しており、経口投与に適さないため、*tert*-ブトキシカルボニル基の変換を試みた。

4-1. ピリミジン誘導体およびカルバミン酸エステル誘導体の合成

スピロクロマンピペリジン誘導体 **112** の *tert*-ブトキシカルボニル基を脱保護し、ピペリジン誘導体 **17** を合成した後、2,5-ジクロロピリミジンに対する芳香族求核置換反応によりピリミジン誘導体 **121** を得た。続いて、カルバミン酸エステル誘導体を合成した。ピペリジン誘導体 **17** をクロロギ酸エチルおよびクロロギ酸イソプロピルと反応させ、それぞれの生成物としてエチル誘導体 **122** およびイソプロピル誘導体 **123** を得た。また、カルボニルジイミダゾール (CDI) と 2-トリフルオロメチル-2-プロパノールおよび 1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールから調製したカルボニルイミダゾリド試薬²⁻¹⁹を、それぞれピペリジン誘導体 **17** と反応させ、トリフルオロブチル誘導体 **124** および **K-23217** を合成した。最後に、トリホスゲンと 2,2,2-トリフルオロエタノールおよび 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールから、それぞれ対応するクロロギ酸エステルを調製し、ピペリジン誘導体 **17** と反応させてトリフルオロエチル誘導体 **125** およびヘキサフルオロプロピル誘導体 **126** を合成した (Scheme 2-4)。

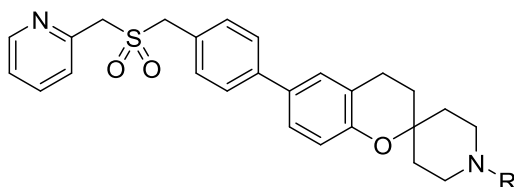


Scheme 2-4. Synthesis of spirochromane derivatives **121-126** and **K-23217**. Reagents and conditions: (a) 4N HCl in AcOEt, 0 °C to rt; (b) for **121**; 2,5-dichloropyrimidine, ⁱPr₂NEt, ⁱPrOH, reflux, >98% (2 steps); (c) for **122** and **123**; alkyl chloroformate, ⁱPr₂NEt, CH₂Cl₂, rt, , 80-96% (2 steps); (d) for **124**, **(R)-K-23217** and **(S)-K-23217**; alkyl 1*H*-imidazole-1-carboxylate, ⁱPr₂NEt, DMF, 80 °C, 55-98% (2 steps); (e) for **125** and **126**; triphosgene, alcohol, ⁱPr₂NEt, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 47-68% (2 steps).

4-2. テール部位の構造活性相関

4-1.で合成したスピロクロマンピペリジン誘導体の GPR119 に対する *in vitro* 活性を第 1 章 2-3. に記載した方法で評価した (表 2-3)。

表 2-3. テール部位の構造活性相関



Compound	R	hGPR119 agonistic activities		Volume of the alkyl group ^b (Å ³)
		EC ₅₀ (nM) ^a	E _{max} (%)	
112		46	150	80
121		716	88	—
122		235	102	48
123		128	116	63
124		101	167	88
125		169	191	56
(R)-K-23217		54	181	73
(S)-K-23217		126	173	73
126		17	121	81

^a Assay values were reported as a single determination performed in quadruplets.

^b Volumes were calculated with Molecular Operating Environment (MOE), 2018.01; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018.

第 1 世代化合物の最適化において有用であった 5-クロロピリミジル基を導入したピリミジン誘導体 **121** の活性は低下した。5-クロロピリミジル基が今回の基本骨格に適さなかったため、*tert*-ブチル基の代替アルキル基を探索した。*tert*-ブトキシカルボニル基が酸に不安定な理由は、*tert*-ブチルカチオンの安定性が高いためである。一方、活性発現の観点では *tert*-ブチル基の代替アルキル基には嵩高さが必要であると考えられる。そこで、対応するアルキルカチオンの安定性と嵩高さに着目して、*tert*-ブトキシカルボニル基のアルキル基の変換を試みた。エチル誘導体 **122** およびイソプロピル誘導体 **123** の活性は *tert*-ブチル誘導体 **112** よりも著しく低下した。これらよりも嵩高く、耐酸性に優れると報告されている 1,1,1-トリフルオロ-2-メチルプロパン-2-イル基²⁻¹⁸を導入したトリフルオロブチル誘導体 **124** の最大強度が改善したことから、本検討における 1,1,1-トリフルオロメチル基の有用性が示唆された。そこで、1,1,1-トリフルオロメチル基を有する誘導体として、トリフルオロエチル誘導体 **125**、ヘキサフルオロプロピル誘導体 **126**、**(R)-K-23217** および **(S)-K-23217** を合成した。これらのうち、ヘキサフルオロプロピル誘導体 **126** および **(R)-K-23217** は本検討の目的を満たす化合物であると考えられた。すなわち、*tert*-ブチル誘導体 **112** と比較して、ヘキサフルオロプロピル誘導体 **126** は、最大強度は低下したが 50% 効果濃度が低下し、**(R)-K-23217** は、50% 効果濃度はわずかに上昇したが最大強度が向上した。

本検討においては、*tert*-ブチル基の代替アルキル基の嵩高さが重要であると考えられたため、その指標として、計算化学により各アルキル基の体積を計算した。精密な解析には至っていないが、テール部位末端カルバミン酸エステルのアルキル基の最適体積は 70–80 Å³ であると推察された。また、既に記載したように 1,1,1-トリフルオロメチル基の導入によってヘキサフルオロプロピル誘導体 **126** を除いて最大強度が増加したが、第 1 章 2-3. に記載したように、最大強度はリガンド結合後の GPR119 の高次構造変化に基づく G-タンパク質活性化強度との相関性が高いと考えられ、現時点ではその理由は解析できていない。

以上の結果から、50% 効果濃度が最も低かったヘキサフルオロプロピル誘導体 **126** および 50% 効果濃度と最大活性のバランスが最も優れていた **(R)-K-23217** はさらなる評価を進める価値のある化合物であると判断し、経口グルコース負荷試験を実施した。

4-3. 経口グルコース負荷試験

ヘキサフルオロプロピル誘導体 **126** (経口投与 10 mg/kg) は、C57BL/6N マウスを用いた経口グルコース負荷試験 (OGTT) において血糖低下作用を有することが示唆されたが、その結果は統計学的有意差を伴わなかった (図 2-4)。

一方、**(R)-K-23217** (経口投与 3, 10 mg/kg) は、同試験において第 1 世代化合物 **3** (経口投与 10 mg/kg) と同程度の血糖低下作用を示した (図 2-5)。より低い用量 (3 mg/kg) で同等の作用を示したことから、**(R)-K-23217** は第 1 世代化合物 **3** よりも強い血糖低下作用を有すると判断し、**(R)-K-23217** を開発候補化合物として選択した。なお、本試験において示唆された **(R)-K-23217** の血糖低下作用の用量相関性は、より精密な試験で検証する必要がある。

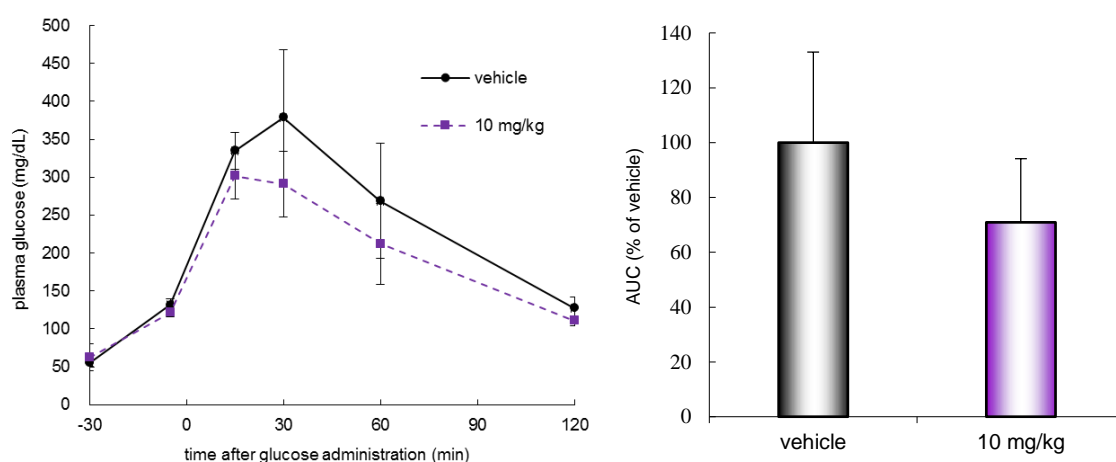


図 2-4. **126** の経口グルコース負荷試験

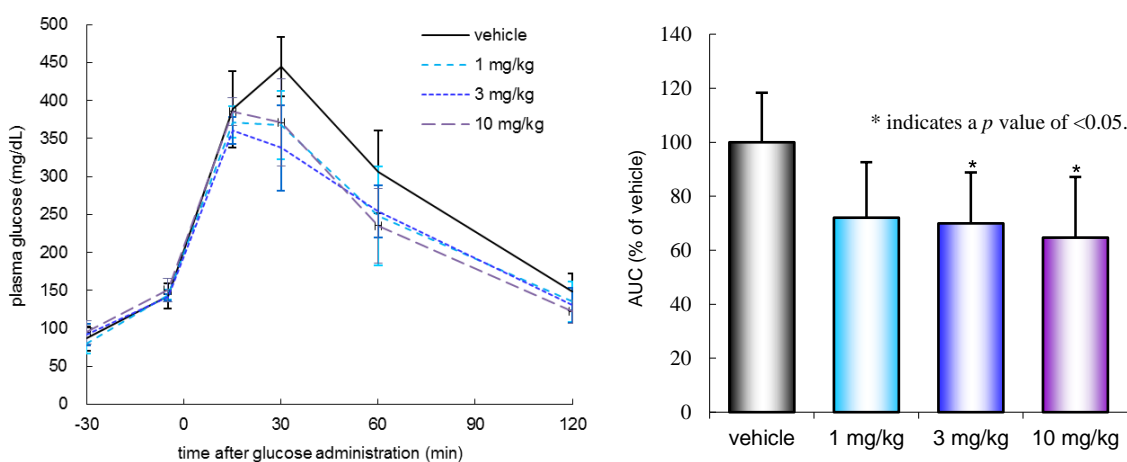


図 2-5. **(R)-K-23217** の経口グルコース負荷試験

第 5 節 まとめ

第 2 世代化合物の創製にあたり、第 1 世代化合物の創製に有効であったリンカーによるリガンド分子の立体配座制御の概念を発展させ、リンカー部位とテール部位を統合したリンカー-テール部位としてスピロクロマンピペリジン構造を有する、一般構造式 **4** をデザインした。本アプローチにより、リード化合物 **5** ($EC_{50} = 369 \text{ nM}$, $E_{\max} = 82\%$) を見出し、上記の立体配座の制御を GPR119 アゴニストの設計に適用し得ることを実証した。リード化合物 **5** の最適化によって創製した第 2 世代化合物 (**R**)-**K-23217** ($EC_{50} = 54 \text{ nM}$, $E_{\max} = 181\%$) の構造的な特徴は、リンカー部位とテール部分を統合したスピロ環構造、ヘッド部位末端の嵩高いベンジルタイプ置換基、および同部位のスルホニル基と芳香環基を連結するメチレン基である。

C57BL/6N マウスを用いた経口グルコース負荷試験において、(**R**)-**K-23217** が第 1 世代化合物 **3** よりも低い用量で同等の血糖低下作用を示したことから、(**R**)-**K-23217** を開発候補化合物として選択した。

第 6 節 引用文献

- 2-1. Fang, J.; Tang, J.; Carpenter, A. J.; Peckham, G.; Conlee, C. R.; Du, K. S.; Katamreddy, S. R. WO2008/070692, **2008**.
- 2-2. Alper, P.; Azimioara, M.; Cow, C.; Epple, R.; Jiang, S.; Lelais, G.; Michellys, P.; Mutnick, D.; Nikulin, V.; Westcott-Baker, L. WO2009/038974, **2009**.
- 2-3. (a) Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 347; (b) Varasi, M.; Thaler, F.; Abate, A.; Bigogno, C.; Boggio, R.; Carezzi, G.; Cataudella, T.; Dal, Z. R.; Fulco, M. C.; Rozio, M. G.; Mai, A.; Dondio, G.; Minucci, S.; Mercurio, C. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3051; (c) Yet, L. *Privileged Structures in Drug Discovery, Medicinal Chemistry and Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., **2018**.
- 2-4. (a) Uto, Y.; Ueno, Y.; Kiyotsuka, Y.; Miyazawa, Y.; Kurata, H.; Ogata, T.; Takagi, T.; Wakimoto, S.; Ohsumi, J. *Eur J Med Chem.* **2011**, *46*, 1892; (b) Varasi, M.; Thaler, F.; Abate, A.; Bigogno, C.; Boggio, R.; Carezzi, G.; Cataudella, T.; Dal, Z. R.; Fulco, M. C.; Rozio, M. G.; Mai, A.; Dondio, G.; Minucci, S.; Mercurio, C. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3051.
- 2-5. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; Lotti, D. J.; Cerino, V. J.; Chen, T. B.; Kling, P. J.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfield, J. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235.
- 2-6. Maclean, D.; Baldwin, J. J.; Ivanov, V. T.; Kato, Y.; Shaw, A.; Schenider, P.; Gordon, E. M. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 562.
- 2-7. Becknell, N. C.; Dandu, R. R.; Lyons, J. A.; Aimone, L. D.; Raddatz, R.; Hudkins, R. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 186.
- 2-8. (a) Corbett, J. W.; Elliott, R. L.; Bell, A. S. WO 2008065508, **2008**; (b) Bacon, E. R.; Dandu, R.;

- Guise-Z., L.; Huang, C.-Y.; Hudkins, R. L.; Tao, M. WO 2009097567, **2009**; (c) McCormick, K. D.; Mangiaracina, P.; Berlin, M. Y.; Ruiz, M. D. L.; Chao, J.; Ting, P. C.; Zheng, J.; Rosenblum, S. B. US20110166124, **2011**.
- 2-9. Morimoto, T.; Koshizawa, T.; Watanabe, G.; Fukuda, T.; Ohgiya, T.; Yamasaki, N.; Inoue, N.; Araki, T.; Tsukagoshi, H.; Hagita, S. WO 2012161119, **2012**.
- 2-10. (a) Ley, S. V.; Thomas, A. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5400; (b) Qiao, J. X.; Lam, P. Y. S. *Synthesis* **2011**, 829.
- 2-11. (a) Hartwig, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2046; (b) Surry, D. S.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6338.
- 2-12. Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457.
- 2-13. Matsuoka, R. T.; Boros, E. E.; Brown, A. D.; Bullock, K. M.; Canoy, W. L.; Carpenter, A. J.; Cobb, J. D.; Condon, S. E.; Deschamps, N. M.; Elitzin, V. I.; Erickson, G.; Fang, J. M.; Igo, D. H.; Joshi, B. K.; Kaldor, I. W.; Mitchell, M. B.; Peckham, G. E.; Reynolds, D. W.; Salmon, M. C.; Sharp, M. J.; Tabet, E. A.; Toczko, J. F.; Wu, L. M.; Zhou, X. M. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 1469.
- 2-14. Semple, G.; Fioravanti, B.; Pereira, G.; Calderon, I.; Uy, J.; Choi, K.; Xiong, Y.; Ren, A.; Morgan, M.; Dave, V.; Thomsen, W.; Unett, D. J.; Xing, C.; Bossie, S.; Carroll, C.; Chu, Z.-L.; Grottick, A. J.; Hauser, E. K.; Leonard, J.; Jones, R. M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5172.
- 2-15. The calculation was conducted by Jaguar based on the density functional theory (B3LYP/6-31G**) for the energy-minimized structures which were calculated by MacroModel. Both Jaguar and MacroModel were applied under license from Schrödinger, Inc.
- 2-16. van De Waterbeemd, H.; Smith, D. A.; Beaumont, K.; Walker, D. K. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1313.
- 2-17. Liu, P.; Hu, Z.; DuBois, B. G.; Moyes, C. R.; Hunter, D. N.; Zhu, C.; Kar, N. F.; Zhu, Y.; Garfunkle, J.; Kang L.; Chicchi, G.; Ehrhardt, A.; Woods, A.; Seo, T.; Woods, M., van Heek, M.; Dingley, K. H.; Pang, J.; Salituro, G. M.; Powell, J.; Terebetski, J. L.; Hornak, V.; Campeau, L. C.; Lamberson, J.; Ujjainwalla, F.; Miller, M.; Stamford, A.; Wood, H. B.; Kowalski, T.; Nargund, R. P.; Edmondson, S. D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *10*, 936.
- 2-18. Han, S.; Narayanan, S.; Kim, S. H.; Calderon, I.; Zhu, X.; Kawasaki, A.; Yue, D.; Lehmann, J.; Wong, A.; Buzard, D. J.; Semple, G.; Carroll, C.; Chu, Z. L.; Al-Shamma, H.; Shu, H. H.; Tung, S. F.; Unett, D. J.; Behan, D. P.; Yoon, W. H.; Morgan, M.; Usmani, K. A.; Chen, C.; Sadeque, A.; Leonard, J. N.; Jones, R. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3034.
- 2-19. Chonan, T.; Wakasugi, D.; Yamamoto, D.; Yashiro, M.; Oi, T.; Tanaka, H.; Ohoka-Sugita, A.; Io, F.; Koretsune, H.; Hiratate, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1580.

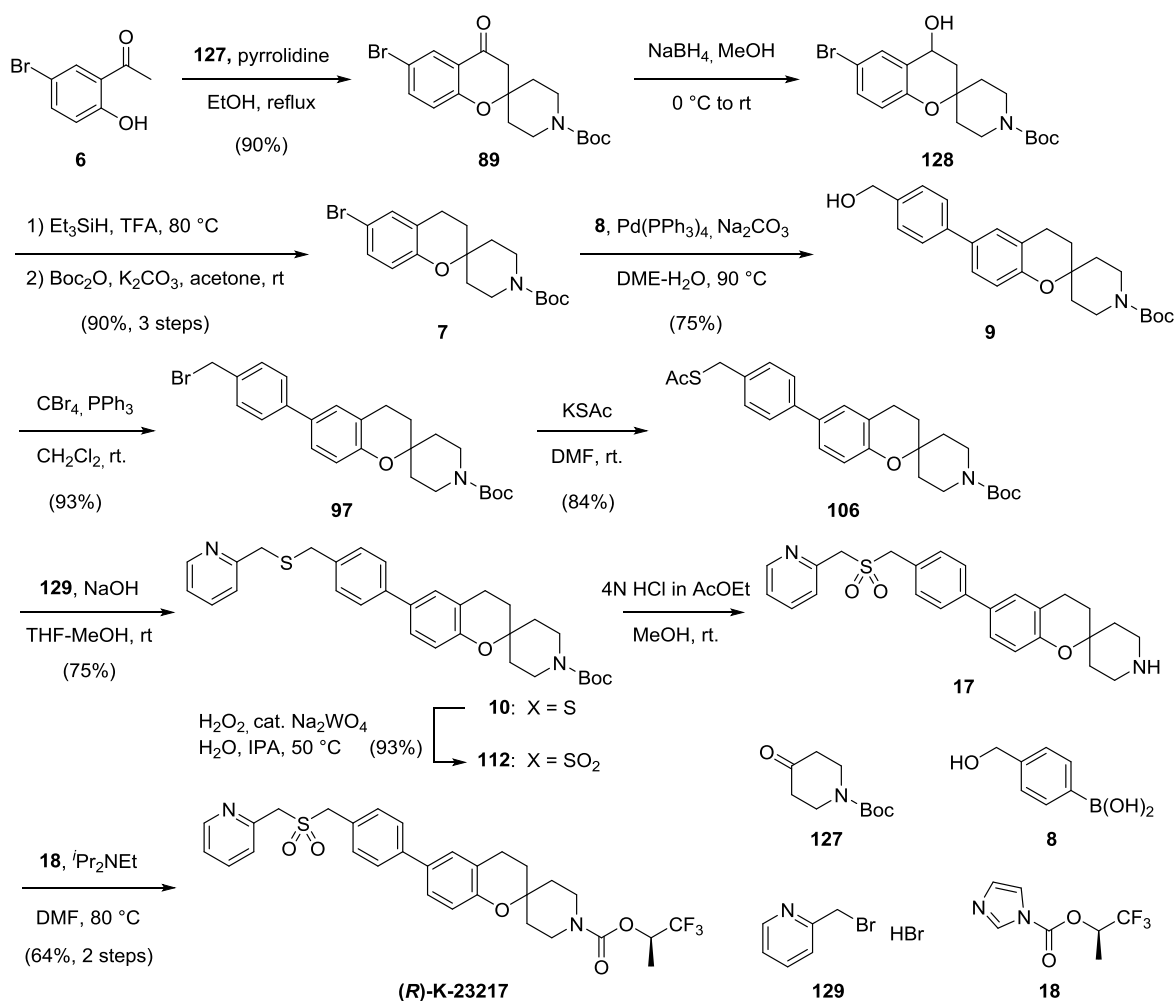
第 3 章 (R)-K-23217 の効率的な大量合成法の確立

第 1 節 初期合成法の課題と検討方針

1-1. 初期合成法

第 2 章に記載した化合物探索に続いて、開発候補化合物 (R)-K-23217 を薬物動態試験および安全性試験、さらに臨床試験に安定供給するため、効率的な大量合成法の確立を目的に検討を行った。

創薬段階における初期合成法を以下に示す (Scheme 3-1)。アセトフェノン **6** を *N*-tert-ブトキシカルボニル-4-オキシピペリジン **127** と反応させ、ケトスピロクロマン **89** へと変換した後、得られた **89** のカルボニル基を 2 段階で還元してスピロクロマン **7** を得た。続いて、フェニルボロン酸 **8** との鈴木-宮浦カップリング反応³⁻¹によりビフェニル骨格を構築し、臭素化、チオアセチル化およびアルキル化を経てスルフィド **10** を得た。最後に、過酸化水素とタングステン酸ナトリウムにより硫黄原子を酸化³⁻²した後に脱保護して得たアミン **17** と、別途調製したカルボニルイミダゾリド **18**³⁻³を反応させて (R)-K-23217 を合成した。



Scheme 3-1. 初期合成法

1-2. 検討課題

まず、初期合成法においてビフェニル骨格の構築 (化合物 **7** → 化合物 **9**) に利用している鈴木-宮浦カップリング反応について、その有用性と利用することによる負荷を考察した。

第 2 章 2-1. に記載したように、様々なボロン酸を用いて所望の官能基を有するビフェニル骨格を構築することができる鈴木-宮浦カップリング反応は、第 2 世代化合物のヘッド部位最適化において非常に有用であった。また、2010 年のノーベル化学賞受賞対象となったように、鈴木-宮浦カップリング反応は液晶材料、有機 EL 材料、農薬や医薬品の製造に応用されており^{3,4}、工業的実用性も高い。たとえば、チッソ株式会社では、液晶材料の約 6 割を鈴木-宮浦カップリング反応で製造しており、メルクでは、年間で約 1 トンのロサルタン (血圧降下剤) を鈴木-宮浦カップリング反応を利用して製造している (図 3-1)。

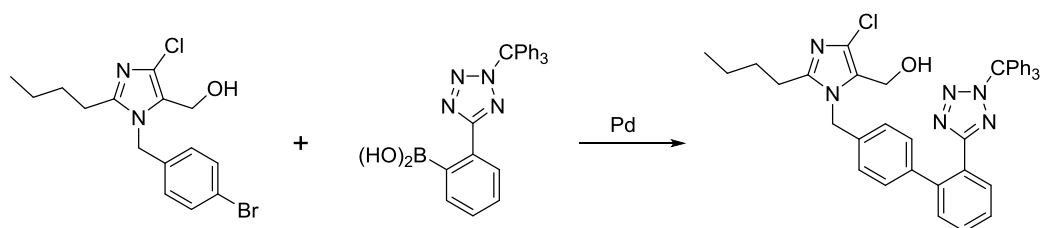


図 3-1. ロサルタンの製造法

しかし、鈴木-宮浦カップリング反応を医薬品の有効成分 (原薬) の製造に使用する際には、一般的に以下の点に留意する必要がある。

- ① 経済性 (アリールボロン酸およびパラジウム触媒)
- ② 不純物の毒性 (アリールボロン酸およびパラジウム)
- ③ 反応条件設定 (触媒、塩基、水分量、酸素濃度) の煩雑性

医薬品の品質は厳密に管理されなければならないことから、本研究においては特に ② の観点から考察した。

原薬には、その製造に使用した原料や試薬、溶媒、および副生成物や分解物などが不純物として残存する可能性があり、これらが、低暴露量で変異原性物質としての発がんリスクを有するなど、毒性を示す場合もある。原薬中に残留した場合に毒性を示す化合物、あるいは毒性が懸念される化合物については、その残留量を厳密に管理する必要があることから、ガイドラインで化合物の性質に応じた管理基準が定められている³⁻⁵。

最近の研究では、変異原性を示すアリールボロン酸が報告されており³⁻⁶、アリールボロン酸 **8** も変異原性不純物となる可能性がある。また、不純物としての金属も患者に対してリスクをもたらす。たとえば、パラジウムは、アミノ酸、たんぱく質あるいは核酸に配位することで生体機能を阻害する恐れがあることから³⁻⁷、原薬における残留限度値が定められており、残留パラジウムの効率的除去が原薬製造上の課題となることも多い³⁻⁸。

上記のように、原薬中に残存したアリールボロン酸および (あるいは) パラジウムが不純物として毒性を発現するリスクがあること、および、そのリスクを回避するためにこれらの不純物の残存量を制御することが原薬製造上の課題になる可能性があることが危惧された。したがって、

(R)-K-23217 の合成においては、鈴木-宮浦カップリング反応の適用による負荷が原薬製造上の有用性を上回る可能性があるかと判断し、同反応の利用を回避したビフェニル骨格の構築法を探索する方針とした (第 1 の課題)。

次に、スルフィド **10** の合成効率について考察した。

チオアセチル体 **106** を共通中間体とする合成経路は、多くの誘導体が市販されている種々のハロゲン化アルキルを用いてビフェニル誘導体、スルホン誘導体およびカルバミン酸エステル誘導体などの所望の化合物を容易に合成することができるという観点から、第 2 世代化合物のヘッド部位最適化において有用であった (図 3-2)。しかし、(R)-K-23217 の合成経路としては、アルコール **9** をスルフィド **10** に変換するために 3 工程を要しており効率が低い。そこで、この変換をより効率的に達成する方法を探索することとした (第 2 の課題)。

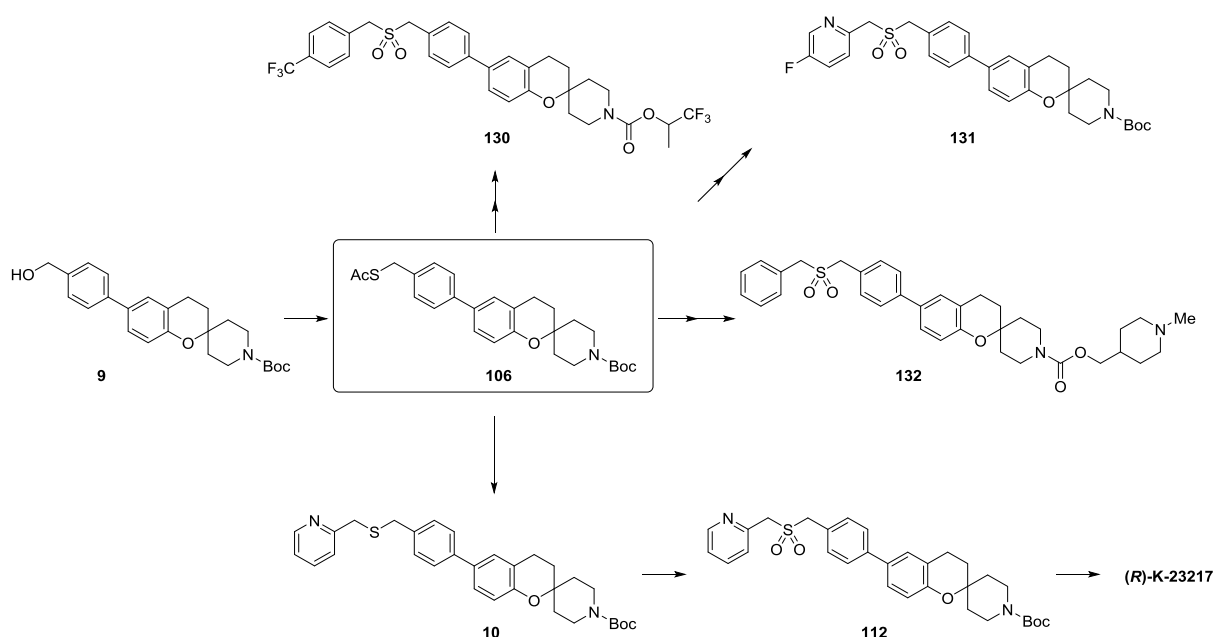


図 3-2. チオアセチル体を経由した誘導体合成

1-3. 合成計画

前述の 2 つの合成課題を解決することを目的とした逆合成解析を図 3-3. に示す。(R)-K-23217 の前駆体であるスルフィド **133** は、アルコール **134** より 1 段階で直接的に合成できると考えた (第 2 の課題の解決)。また、アルコール **134** のスピロクロマン骨格は、初期合成法を踏襲したアセトフェノン **135** と 4-オキソピペリジン **127** の環化反応により構築できると考えた。さらに、安価な市販のビフェニル化合物 **11³⁻⁹** の位置選択的なアシル化 (フリース転位反応³⁻¹⁰ もしくはフリーデル・クラフツ反応³⁻¹¹) によってアセトフェノン **135** を合成することで、鈴木-宮浦カップリング反応の利用を回避したビフェニル骨格の導入が可能であると考えた (第 1 の課題の解決)。

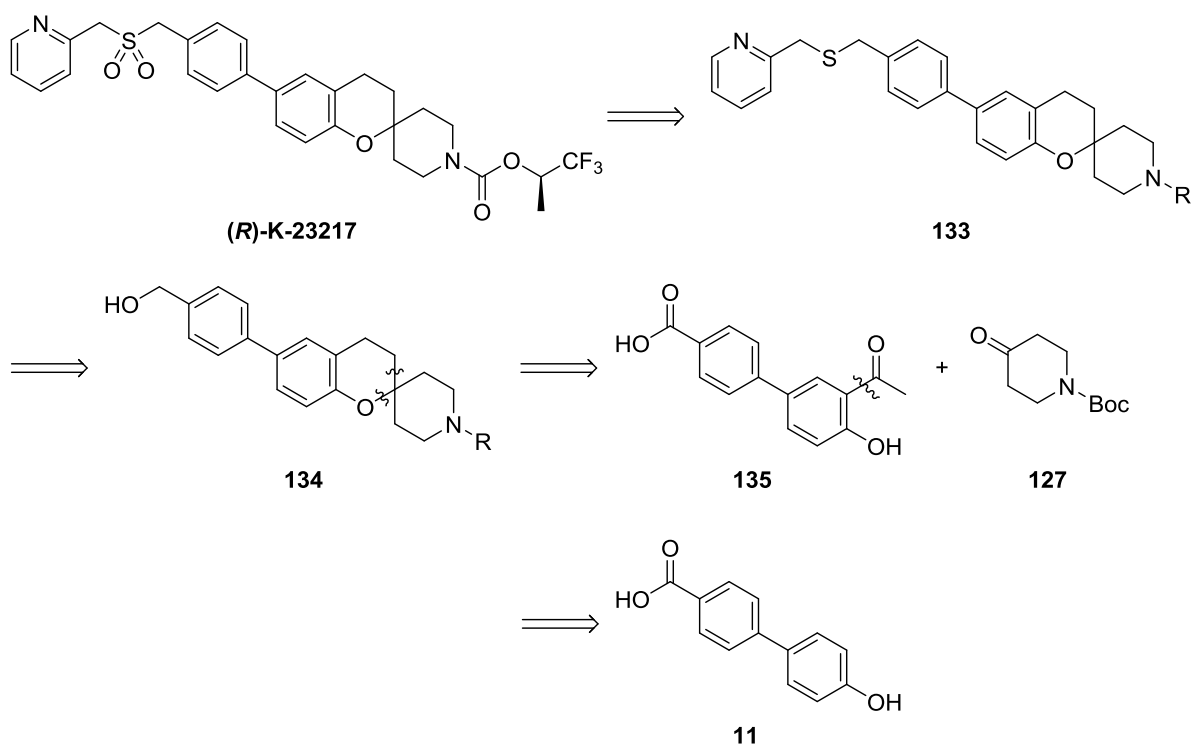
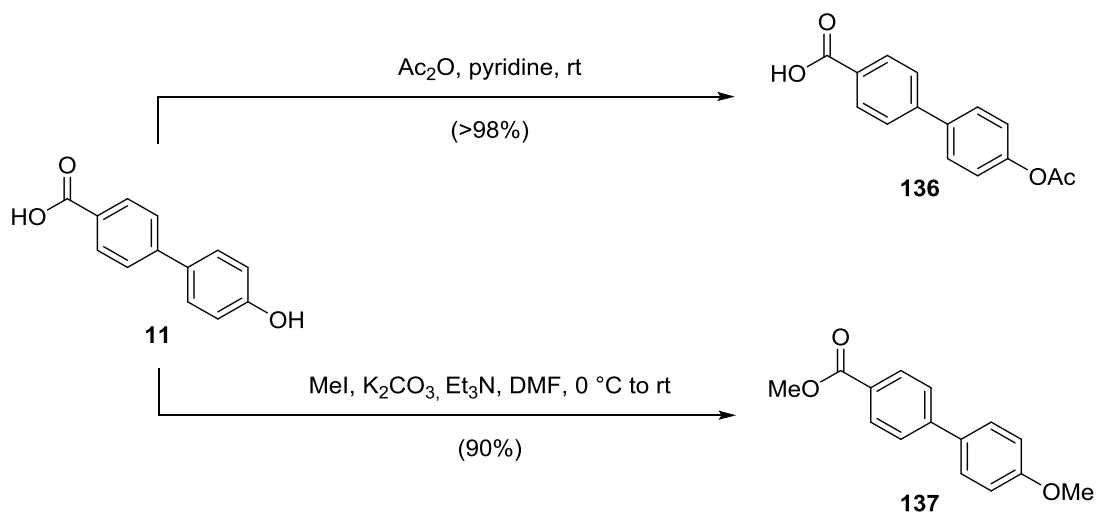


図 3-3. (R)-K-23217 の逆合成解析

第 2 節 鍵中間体 14 の合成

2-1. アセトフェノン 135 および 138 の合成

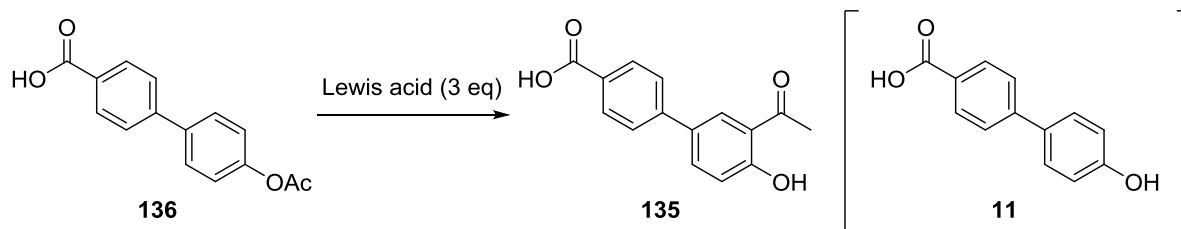
まず、ビフェニル化合物 **11** からフリーズ転位反応の前駆体としてアセチル体 **136**、フリーデル・クラフツ反応の前駆体としてメトキシ体 **137** をそれぞれ合成した (Scheme 3-2)。



Scheme 3-2. 反応前駆体の合成

続いて、アセチル体 **136** を基質としたフリース転位反応を検討した (表 3-1)。

表 3-1. フリース転位反応の検討



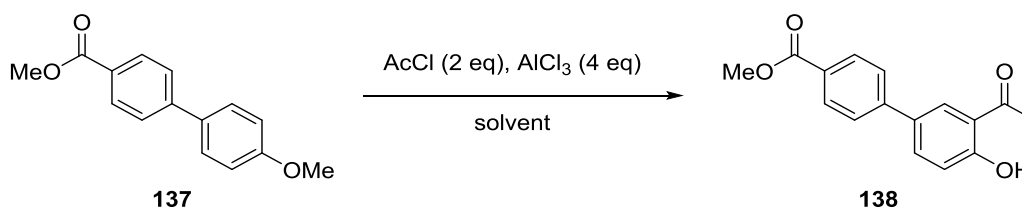
Entry	Lewis acid	Solvent	Temp. (°C)	Time (h)	Product ratio (%) ^a		
					135	11	136
1	AlCl ₃	nitrobenzene	120	14	83	17	0
2	AlCl ₃	1,2-dichlorobenzene	120	14	71	21	7
3	BF ₃ •Et ₂ O	nitrobenzene	100	9	0	33	67
4	BF ₃ •Et ₂ O	1,2-dichlorobenzene	80	9	0	17	83

a) Calculated on the basis of ¹H NMR analysis.

ルイス酸として塩化アルミニウムを用いところ、目的物のアセトフェノン **135** と脱アセチル体 **11** の混合物を与えた (Entry 1, 2)。得られた混合物を再結晶により精製したが、脱アセチル体 **11** を除去することは困難であった。また、ルイス酸を三フッ化ホウ素に変更したところ、アセトフェノン **135** は全く得られず、脱アセチル体 **11** および未反応原料 **136** の混合物が得られた。以上の結果から、フリース転位反応によるアセトフェノン **135** の合成を断念した。

次いで、フリーデル・クラフツ反応によるアセチル基の導入を検討した (表 3-2)。

表 3-2. フリーデル・クラフツ反応の検討



Entry	Solvent	Temp.	Time (h)	Yield (%) ^a
1	1,2-dichloroethane	rt	14	>98
2	CH ₂ Cl ₂	rt	14	94
3	1,2-dichloroethane	70 °C	1	>98

a) Isolated yield.

メトキシ体 **137** をフリーデル・クラフツ反応に付したところ、3 位にアセチル基が導入され、かつ 4 位メトキシ基が脱メチル化したアセトフェノン **138** を高収率で得ることができた (Entry 1、2)。さらに、加熱することで、反応時間の短縮が可能となった (Entry 3)。アセトフェノン **138** は、フリーデル・クラフツ反応によりアセチル基が導入された後、塩化アルミニウムがアセチル基のカルボニル酸素に配位し、隣接基関与による脱メチル化で生成したと推察される (図 3-4)。

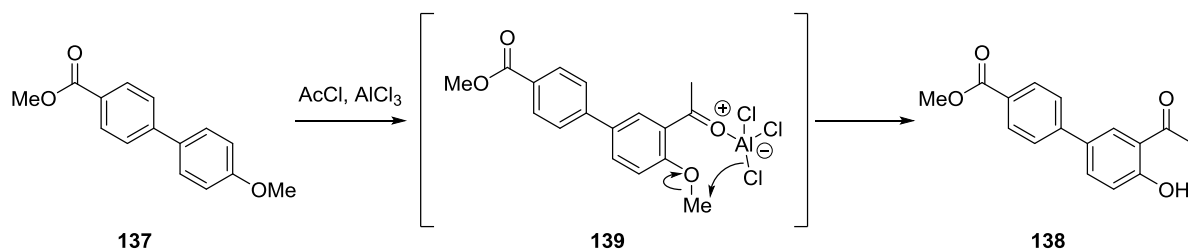
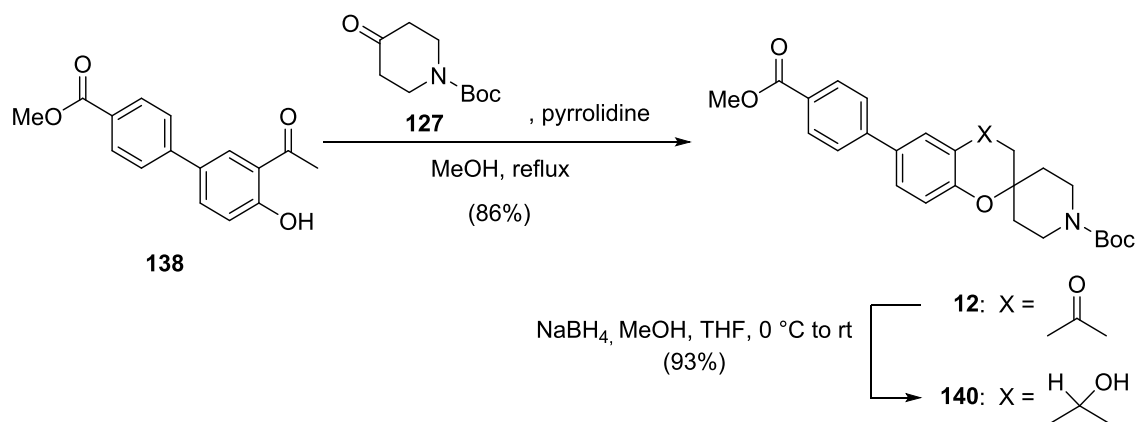


図 3-4. アセトフェノン **138** の生成機構

2-2. スピロクロマン骨格の構築

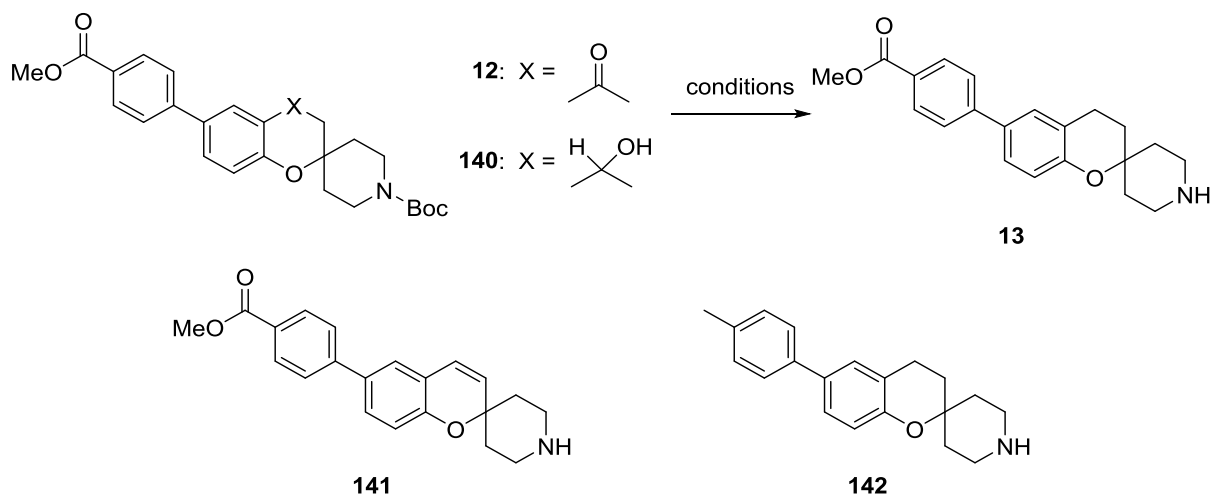
アセトフェノン **138** を効率よく調製する方法を確立したので、初期合成法を踏襲して、塩基性条件下でアセトフェノン **138** と 4-オキシピペリジン **127** を反応させてケトスピロクロマン体 **12** へと変換した後、水素化ホウ素ナトリウムでカルボニル基を還元してクロマノール体 **140** に誘導した (Scheme 3-3)。



Scheme 3-3. スピロクロマン骨格の構築

次いで、ケトスピロクロマン体 **12** またはクロマノール体 **140** をスピロクロマン体 **13** に変換する還元条件を検討した (表 3-3)。

表 3-3. ケトスピロクロマン体 **12** またはクロマノール体 **140** の還元条件の検討



Entry	Substrate	Reagent (eq.)	Solvent	Temp. (°C)	Time (h)	Results
1	140	Et ₃ SiH (10.7), CF ₃ CO ₂ H	CH ₂ Cl ₂	25	12	13 (96%) ^a
2		H ₂ , Pd/C	AcOH	80	8	13 (95%) ^a
3	12	Zn (25)	AcOH	80	5	13:141 = 64:4 ^b
4		Et ₃ SiH (2.4), InCl ₃ (0.05)	CH ₂ Cl ₂	25	12	No reaction
5		Et ₃ SiH (4), InBr ₃ (0.05)	CHCl ₃	60	12	No reaction
6		NaBH ₄ (5), AlCl ₃ (3)	THF	65 (reflux)	2	141 (30%) ^a
7		Me ₂ NH•BH ₃ (1.4), TiCl ₄ (1.4)	CH ₂ Cl ₂	0 to 25	3	13:142 = 83:8 ^c
8		Me ₂ NH•BH ₃ (1.2), TiCl ₄ (1.2)	CH ₂ Cl ₂	-20 to 25	3.5	13•HCl (79%) ^{a,d}

a) Isolated yield.

b) Each yield was calculated on the basis of ¹H NMR analysis for an inseparable mixture of **13** and **141**.

c) Each yield was calculated on the basis of ¹H NMR analysis for a mixture of **13** and **142** as hydrochloride salts.

d) A mixture of **13** and **142** (¹H NMR analytical ratio of 50:1) hydrochloride salts was crystallized from MeOH to give the pure hydrochloride salt of **13**.

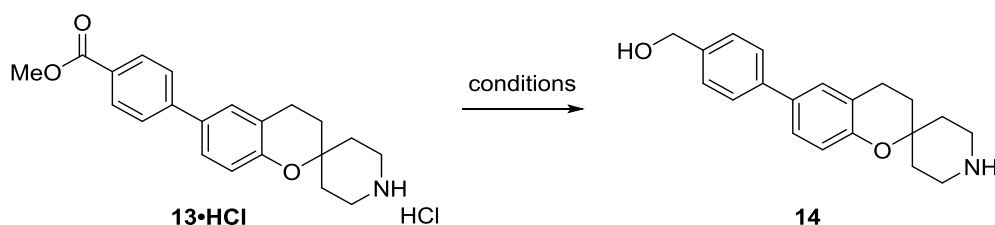
まず、クロマノール体 **140** のベンジル位水酸基をトリフルオロ酢酸とトリエチルシランによる Kursanov-Parnes 条件³⁻¹² で還元したところ、*tert*-ブトキシカルボニル基が除去されたスピロクロマン **13** が良好な収率で得られた (Entry 1)。続いて、高価かつ腐食性を有するトリフルオロ酢酸の使用を避けるため、酢酸中、パラジウム炭素を触媒にした接触還元を行ったところ、この条件でもクロマン体 **13** を高収率で得ることができた (Entry 2)。

さらに、工程数の削減を目的にケトン **12** からクロマン体 **13** への直接的な変換を検討した。Clemmensen 還元³⁻¹³ では、クロマン体 **13** が得られたものの、分離困難なオレフィン体 **141** が

副生した (Entry 3)。塩化インジウムまたは臭化インジウムを添加したシラン還元³⁻¹⁴では、反応が進行せず (Entry 4, 5)、水素化ホウ素ナトリウムと塩化アルミニウムを用いた還元条件³⁻¹⁵では、原料 **12** が残存してオレフィン体 **141** が生成するのみであった (Entry 6)。次に、還元剤とルイス酸の組み合わせとしてジメチルアミン・ボラン錯体と四塩化チタンによる還元条件³⁻¹⁶を試みたところ、良好な収率でクロマン体 **13** を得ることができたが、過剰還元反応によりメチル体 **142** が生成した (Entry 7)。そこで、過剰還元反応を抑制するため、還元剤を削減し、低温から徐々に反応温度を上げる条件に調整したところ、メチル体 **142** の生成を抑制することができた。さらに、後処理後に得られる塩酸塩の粗結晶を再結晶することで、目的物 **13** を塩酸塩として良好な収率および品質で単離することができた (Entry 8)。

クロマン体塩酸塩 **13·HCl** を効率的に得る方法を確立することができたので、最後に、クロマン体塩酸塩 **13·HCl** から鍵中間体 **14** への変換反応を検討した (表 3-4)。

表 3-4. エステルの還元



Entry	Reagent (eq.)	Solvent	Temp.	Time (h)	Yield ^a
1	LiAlH ₄ (3)	THF	0 °C	1	77 %
2	NaBH ₄ (10)	MeOH	reflux	14	trace
3	NaBH ₄ (3)	^t BuOH-MeOH	reflux	5	trace
4	NaBH ₄ (2.5)	pyridine	100 °C	14	75%

a) Isolated yield.

還元剤として水素化アルミニウムリチウムを用いることにより、良好な収率でアルコール体 **14** を得た (Entry 1)。しかし、安全性の観点から水素化アルミニウムリチウムの大量製造法での使用は避けるほうが望ましいと考え、取扱いが容易な水素化ホウ素ナトリウムを用いる条件を検討した。

一般に、水素化ホウ素ナトリウムはエステルを還元しないことが知られている³⁻¹⁷。しかし、大過剰の水素化ホウ素ナトリウムを用いることにより、エステルをアルコールへ還元した例が報告されているため³⁻¹⁸、この条件を試みたが、反応はわずかに進行するのみであった (Entry 2)。また、硯合らは、原料、水素化ホウ素ナトリウムおよび *tert*-ブチルアルコールの混合物に、加熱還流下でメタノールをゆっくり滴下することによって安息香酸メチルが還元されることを報告している³⁻¹⁹。しかし、硯合らの方法においても反応はわずかに進行するのみであった (Entry 3)。一方、ステロイド骨格中のカルボニル基の還元³⁻²⁰およびアミドの還元³⁻²¹での使用例が報告されている水素化ホウ素ナトリウムとピリジンの組み合わせを試したところ、良好な収率で鍵中間体 **14** を得ることができた (Entry 4)。

以上の検討によって、第 1 の課題とした鈴木-宮浦カップリング反応の利用を回避したビフェニル骨格の導入を達成し、効率的に鍵中間体 **14** を製造する方法を確立した。

第 3 節 鍵中間体 **14** から (*R*)-**K-23217** の合成

3-1. 合成計画

本章 1-3. で策定した方針に基づいて、第 2 の課題とした鍵中間体 **14** から 1 段階でスルフィド **16** を合成する方法³⁻²²を探索した (図 3-5)。

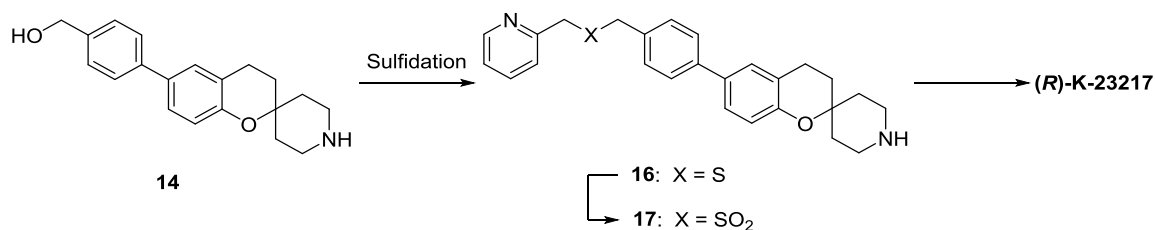
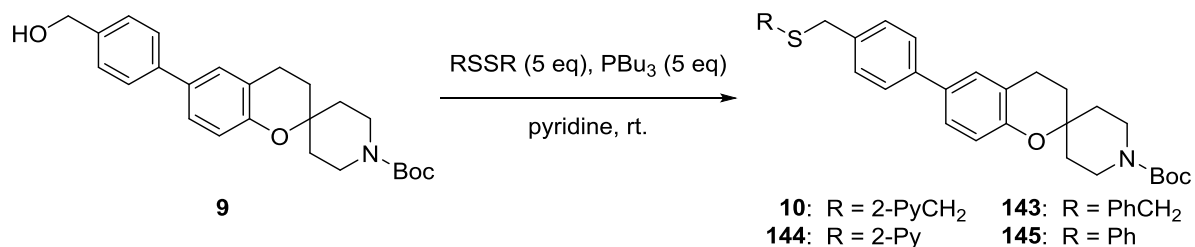


図 3-5. 鍵中間体 **14** から (*R*)-**K-23217** の合成計画

3-2. 酸化還元縮合反応を利用したスルフィド体の合成

まず、畑らの報告³⁻²³をもとに、ピペリジンの窒素原子を *tert*-ブトキシカルボニル基で保護したアルコール **9** を 1 段階でスルフィドへ変換する酸化還元縮合反応を検討した (表 3-5)。

表 3-5. 酸化還元縮合反応の検討結果



Entry	R	RSSR	Time (h)	Results (yield ^a)
1		146	24	No reaction
2		147	24	No reaction
3		148	1.5	144 (99%)
4		149	1.5	145 (62%)

a) Isolated yield.

アルコール **9** とビス(2-ピリジルメチル)ジスルフィド **146** を反応させたところ、対応するスルフィド **10** は全く得られなかった (entry 1)。そこで、反応が進行しない原因を究明するため、他のジスルフィド **147-149** の反応性を確認した。その結果、ジベンジルジスルフィド **147** を用いた場合は、**146** の場合と同様に反応は進行しなかったが、2,2'-ジピリジルジスルフィド **148** およびジフェニルジスルフィド **149** を用いた場合は対応するスルフィド **144** および **145** が得られた。

この結果について、畑らが提唱している反応機構³⁻²³に基づき、次節に示す各チオールの酸性度から、アリールチオ基 (2-ピリジルチオ基およびフェニルチオ基) の場合は、脱離基として十分な脱離能を有しているためにホスホニウムカチオン **150** とアルコール **9** からホスホニウムカチオン **151** が生成するが、アルキルチオ基 (2-ピリジルメチルチオ基およびベンジルチオ基) の場合は、脱離能が不十分なためにこの反応が進行しなかったと考察した (図 3-6)。

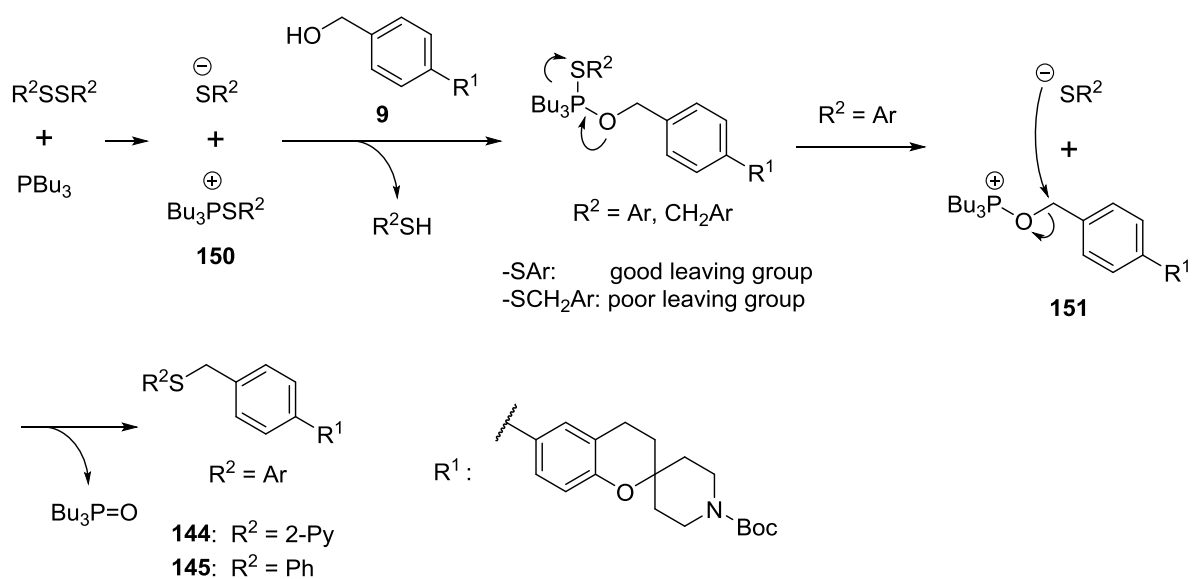
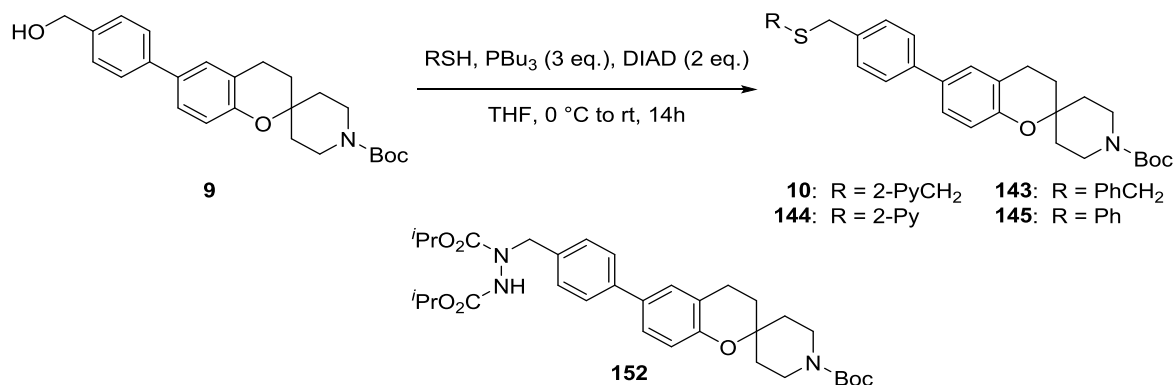


図 3-6. 反応機構

3-3. 光延反応を利用したスルフィド体の合成

次に、類似の酸化還元縮合反応である光延反応の適用を検討した (表 3-6)。前節の結果と比較するため、2-ピリジルメタンチオール **15** 以外に、フェニルメタンチオール **153**、2-ピリジルチオール **154** およびベンゼンチオール **155** についても検討を行った。

表 3-6. 光延反応の検討 1



Entry	R	RSH (pKa)	Major Product (yield ^a , %)
1		15 (8.93 ^b)	152 (52) ^d
2		153 (9.43 ^c)	152 (64) ^d
3		154 (-1.07 ^c)	144 (99)
4		155 (6.52 ^c)	145 (87)

a) Isolated yield.

b) Predicted value.³⁻²⁴

c) Measured value.³⁻²⁵

d) Corresponding disulfide (RSSR) was also obtained.

アルキルチオール (2-ピリジルメタンチオール **15** およびフェニルメタンチオール **153**) を用いた場合の主成物は、目的物ではないヒドラジンジカルボン酸誘導体 **152** であった。また、アゾジカルボン酸エステルとの酸化還元反応によりジスルフィド体も生成した (図 3-7)³⁻²⁶。一方、アリールチオール (2-ピリジルチオール **154** およびベンゼンチオール **155**) を用いた場合は、目的物であるスルフィド **144** および **145** が高収率で得られた。

この結果は、アルキルチオールの酸性度がアリールチオールと比較して低く、ヒドラジンジカルボン酸誘導体アニオン **156** によるアルキルチオールの脱プロトン化が進行しなかったことに起因していると推察される (図 3-8)。

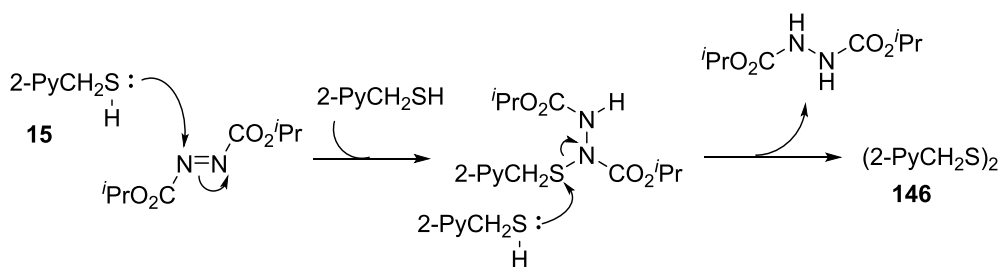


図 3-7. ジスルフィドの生成機構 (推定)

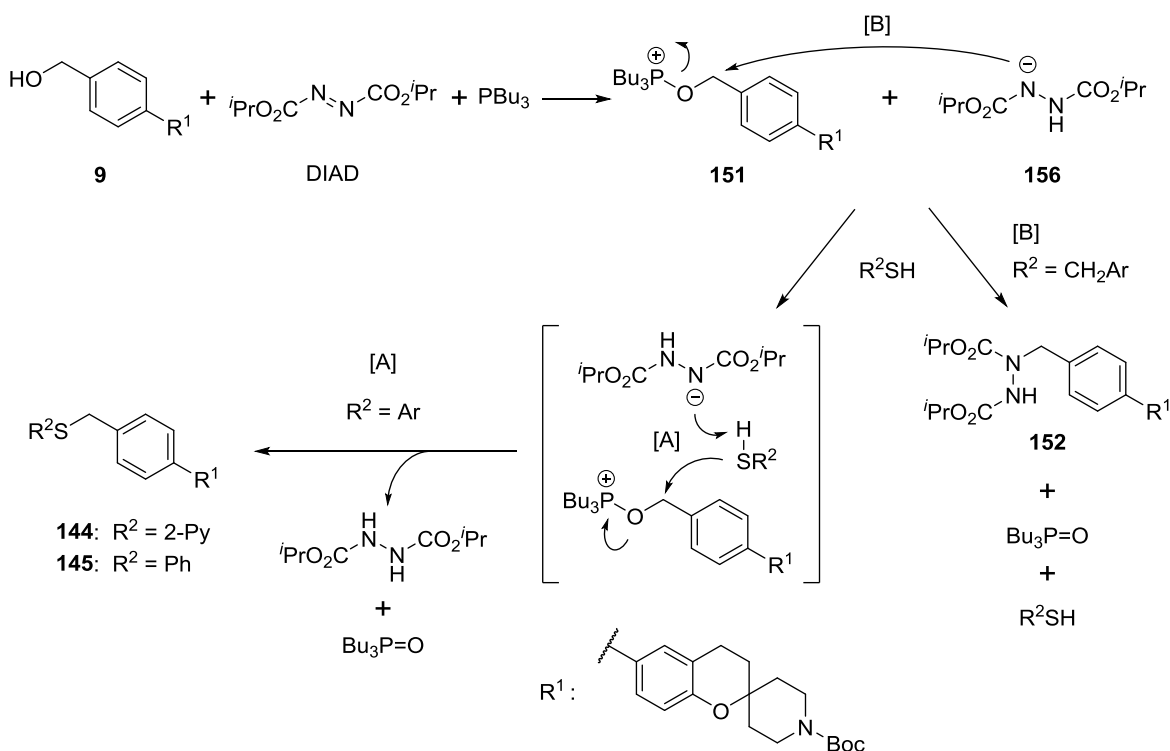
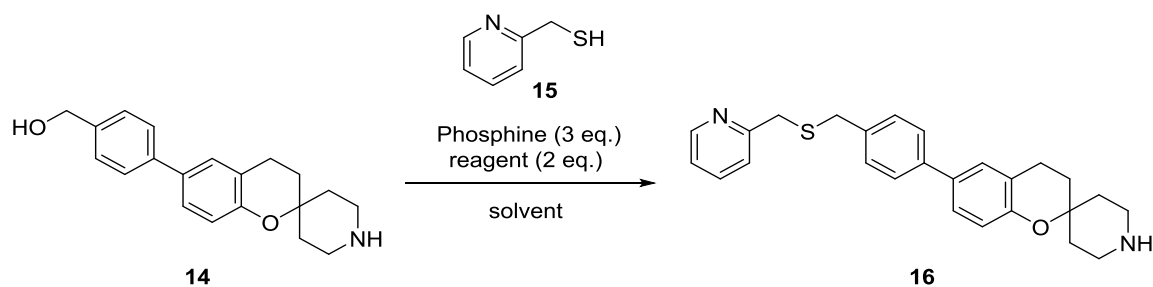


図 3-8. 光延反応におけるスルフィドおよび副生成物の生成機構

そこで、アルキルチオール脱プロトン化を促進するため、アルコール **9** のピペリジン窒素の塩基性 ($pK_a = 11.2$)³⁻²⁷ を利用することとし、アルコール **9** の *tert*-ブトキシカルボニル基を除去したアルコール **14** を用いて 2-ピリジルメタンチオール **15** との光延反応を検討した (表 3-7)。ピペリジン窒素の塩基性を利用して中性の不純物 (ホスフィン化合物、ヒドラジン化合物) との分離精製が容易になることも期待した³⁻²⁸。

表 3-7. 光延反応の検討 2



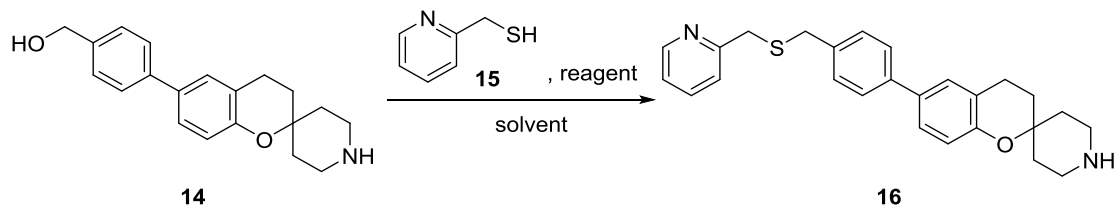
Entry	Phosphine	Reagent	Solvent	Temp.	Time	Yield ^{a)}
1			THF	0 °C to rt	14 h	0%
2	PBU ₃	DIAD	toluene	0 °C to rt	1 h	trace
3			CH ₃ CN	0 °C to rt	1 h	18%
4			CH ₂ Cl ₂	0 °C	10 min	34%
5			PPh ₃	CH ₂ Cl ₂	0 °C to rt	14 h
6	PBU ₃	ADDP	THF	0 °C to rt	11 h	11%
7			CH ₂ Cl ₂	0 °C	30 min	75%

a) Isolated yield.

溶媒を THF およびトルエンとした場合、目的物は得られなかったが、アセトニトリルおよび塩化メチレンとした場合、低収率ながら目的物を得ることが出来た (Entry 1-4)。トリブチルホスフィンに求核性の低いトリフェニルホスフィンに変更すると、目的物は得られなかった (Entry 5)。ついで、ヒドラジンアニオン **156** の塩基性を高めてアルキルチオールの脱プロトン化を促進するため、アゾジカルボン酸ジイソプロピル (DIAD) を 1,1'-(アゾジカルボニル)-ジピペリジン (ADDP³⁻²⁹) に変更したところ、収率が向上した (Entry 7)。

しかし、ADDP は高価であり³⁻³⁰、アゾ化合物は毒性の懸念もあることから、ホスホラン試薬を利用した光延反応の変法を検討した (表 3-8)。

表 3-8. ホスホラン試薬を用いた光延型反応の検討



Entry	Reagent (eq.)	Solvent	Temp.	Time	Yield (%) ^a
1	CMMP ^b	EtCN	90 °C	2 h	0
2	CMMP (2) ^c	THF	60 °C	14 h	55
3	PPh ₃ (OCH ₂ CF ₃) ₂ (2)	CH ₂ Cl ₂	0 °C to rt	1 h	>98

a) Isolated yield.

b) CMMP was prepared in situ from (cyanomethyl)trimethylphosphonium iodide (6 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (7 eq.) in EtCN.

c) 0.5 M solution in THF was used.

角田試薬 (シアノメチレントリメチルホスホラン³⁻³¹ (CMMP))は、*p*-トルエンスルホンアミド ($pK_a=11.7$) などの酸性度が低い基質に対しても適用可能である。よって、チオール **15** からの脱プロトン化を促進し、所望の光延反応が進行することを期待した。CMMP は酸素や湿気で容易に分解することから、反応系内で発生させる方法³⁻³²を初めに検討した。(シアノメチル)トリメチルホスホニウムヨードと *N,N*-ジイソプロピルエチルアミンから CMMP を調製した後、チオール **15** とアルコール **14** の反応に付したが、目的物は得られなかった (Entry 1)。これは、活性中間体 **157** が CMMP の調製で発生したヨウ化物イオンと反応してヨウ化物 **158** が生成し、副反応が進行したためであると推察された (図 3-9)。そこで、ヨウ化物イオンの影響を避けるために、市販の CMMP を使用したところ、中程度の収率で目的物を得ることができた (Entry 2)。

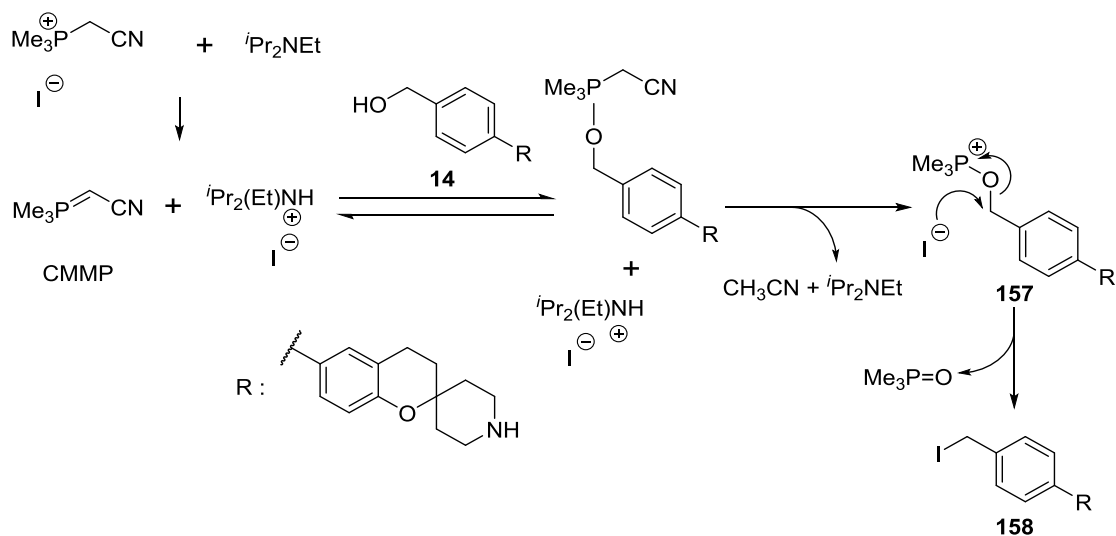


図 3-9. 反応機構

続いて、ホスホニウム中間体の生成が重要であると考え、石川らが開発したホスホラン試薬、ビス(2,2,2-トリフルオロエトキシ)トリフェニルホスホラン³⁻³³を試した。本試薬は、トリフェニルホスフィンジブロミドと 2,2,2-トリフルオロエトキシドナトリウムから容易に調製可能である。リンの配位子である 2,2,2-トリフルオロエトキシ基の強力な電子吸引効果により本試薬のリン原子は吸電子性が高く、また 2,2,2-トリフルオロエタノールの脱離能が高いことから、効率よくホスホニウム **159** が生成し、目的とする置換反応が進行することを期待した (図 3-10)。予想通り、反応は円滑に進行し、良好な収率で目的物を得た (Entry 3)。さらに、抽出操作によって、トリフェニルホスフィンオキシドなどの副生成物を容易に分離することができた。

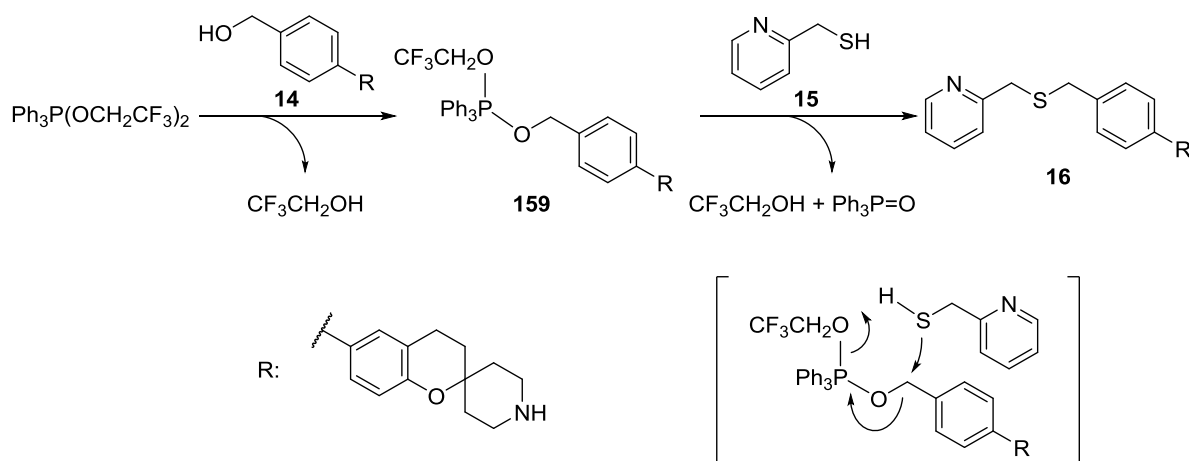
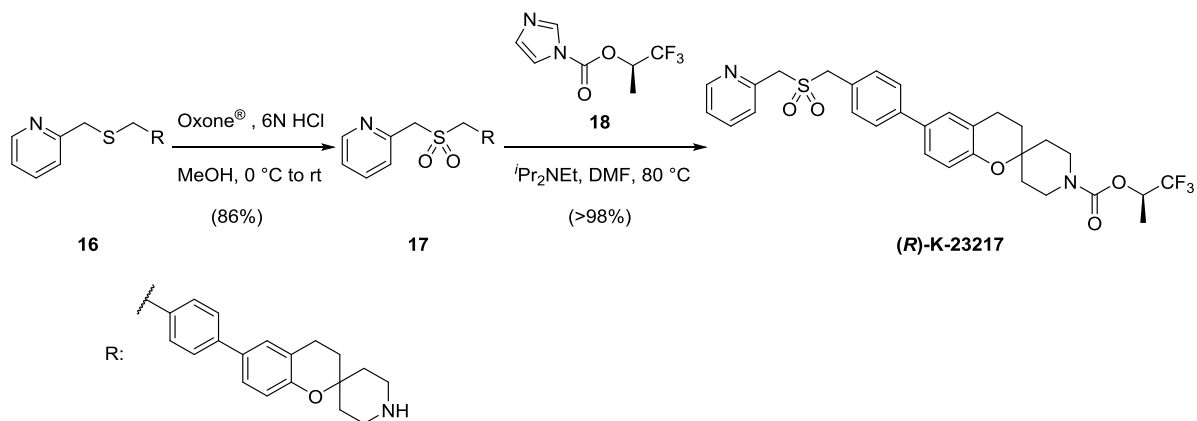


図 3-10. 石川試薬を用いたスルフィド化の反応機構

3-4. スルフィド **16** から (R)-K-23217 の合成

鍵中間体 **14** から 1 段階でスルフィド **16** を収率よく合成することに成功したことから、引き続きスルフィドの酸化³⁻³⁴を検討した。初期合成法で使用していた過酸化水素とタングステンによる硫黄原子の酸化法³⁻²は非常に優れた方法ではあるが、ピペリジンとピリジンの窒素原子を酸化する可能性がある。そこで、酸性条件下で、これらの窒素原子をアンモニウムイオンとして保護し、オキソ³⁻³⁵で酸化したところ、期待通り窒素原子を酸化することなく所望のスルホン **17** を高収率で得ることに成功した (86%)。最後に、初期合成法と同様に、スルホン **17** と、1,1,1-トリフルオロメチル-2-プロパノールと 1,1-カルボジイミダゾール (CDI) より調製したカルボニルイミダゾリド **18**³⁻³を縮合させ、(R)-K-23217 へ誘導した (Scheme 3-5)。



Scheme 3-5. スルフィド **16** から **(R)-K-23217** の合成

第 4 節 まとめ

著者は、開発候補化合物 **(R)-K-23217** を薬物動態試験および安全性試験、さらに臨床試験に安定供給するため、効率的な大量合成法の確立を目的とした検討を行った。

まず、**(R)-K-23217** の初期合成法 (図 3-11) の課題が、鈴木-宮浦カップリング反応によるビフェニル骨格の構築を回避した合成ルートの確立であると考え (第 1 の課題)、容易に入手可能な安息香酸 **11** を原料とする鍵中間体の実用的な合成法の構築を検討した。

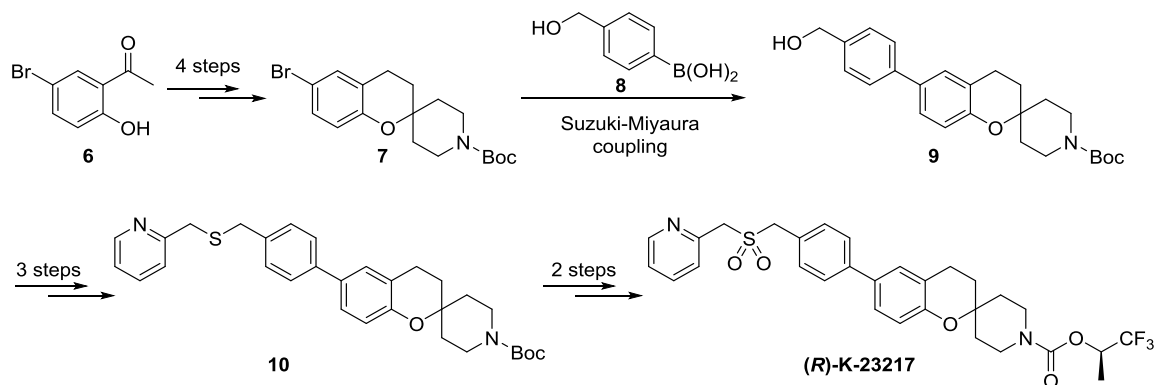


図 3-11. **(R)-K-23217** の初期合成法

その結果、安価な安息香酸 **11** から 3 工程でケトスピロクロマン体 **12** へと誘導する経路を構築した。次に、ケトスピロクロマン体 **12** のカルボニル基の除去およびエステル還元条件を検討し、カルボニル基の除去にジメチルアミン・ボラン錯体と四塩化チタン、エステル還元に取り扱いが容易な水素化ホウ素ナトリウムとピリジンの組み合わせが、それぞれ効率的であることを見出した。これら検討によって、鈴木-宮浦カップリング反応によるビフェニル骨格の構築を回避した鍵中間体 **14** の合成を達成した (図 3-12)。



図 3-12. 鍵中間体 **14** の合成

次いで、鍵中間体 **14** からスルフィド体へ変換する方法を検討した。初期合成法では、ベンジルアルコール **9** から臭素化、チオアセチル化を経て 3 工程でスルフィド **10** に変換していたため、鍵中間体 **14** のピペリジン部位を保護せずにスルフィド体 **16** へ 1 段階で直接的に変換する方法を探索した (図 3-13、第 2 の課題)。光延反応では、2-ピリジルメタンチオール (**15**) とアゾジカルボン酸エステルとの酸化還元反応が進行してビス(2-ピリジルメチル)ジスルフィドが生成し、スルフィド体 **16** はわずかに得られるのみであった。そこで、石川らの方法を適用してホスホラン試薬 (ビス(2,2,2-トリフルオロエトキシ)トリフェニルホスホラン) を用いたところ、鍵中間体 **14** より所望のスルフィド体 **16** を 1 工程で定量的に得ることに成功した。最後に、ピリジンおよびピペリジン窒素の酸化を避けるため酸性条件下でオキソン®によりスルフィドを酸化する条件を見出した。

上記の検討により初期合成法の 2 つの課題を解決し、**(R)-K-23217** の効率的な製造法を確立した。

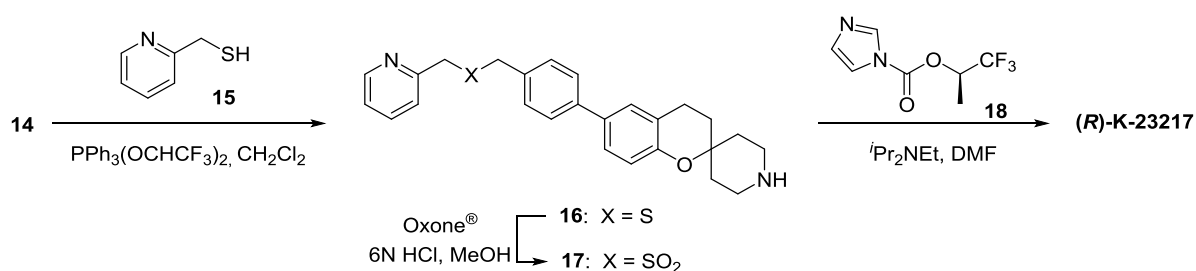


図 3-13. 鍵中間体 **14** から **(R)-K-23217** の合成

第 5 節 引用文献

- 3-1. Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457.
- 3-2. Sato, K.; Hyodo, M.; Aoki, M.; Zheng, X. Q.; Noyori, R. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2469.
- 3-3. Chonan, T.; Wakasugi, D.; Yamamoto, D.; Yashiro, M.; Oi, T.; Tanaka, H.; Ohoka-Sugita, A.; Io, F.; Koretsune, H.; Hiratate, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1580.
- 3-4. Smith, G. B.; Dezeny, G. C.; Hughes, D. L.; King, A. O.; Verhoeven, T. R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 8151.
- 3-5. (a) ICH-Q7 「原薬 GMP」のガイドライン, ステップ 5; (b) ICH-M7 「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理」, ステップ 5; (c) ICH-Q3D 「医薬品の元素不純物ガイドライン」, ステップ 5
- 3-6. (a) O'Donovan, M. R.; Mee, C. D.; Fenner, S.; Teasdale, A.; Phillips, D. H. *Mutation Research* **2011**, *724*, 1; (b) Judson, P. N.; Stalford, S. A.; Vessey, J. *Toxicol. Res.* **2013**, *2*, 70; (c) Hansen, M. M.; Jolly, R. A. Linder, R. J. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 1507.
- 3-7. Garrett, C. E.; Prasad, K. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 889.
- 3-8. Urawa, Y.; Miyazawa, M.; Ozeki, N.; Ogura, K. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 191.
- 3-9. 4'-Hydroxy-biphenyl-4-carboxylic acid (**11**) in bulk for multi-kg scale is commercially available from Nanjing Chemlin Chemical Co., Ltd. (China).
- 3-10. (a) Fries, K.; Finck, G. *Chem. Ber.* **1908**, *41*, 4271; (b) Burdera, K. *Synthesis* **1982**, 941.
- 3-11. (a) Crafts, J. M., Ador, E. *Chem. Ber.* **1877**, *10*, 2173; (b) Calloway, N. O. *Chem. Rev.* **1935**, *17*, 327.
- 3-12. Kursanov, D. N.; Parnes, Z. N.; Loim, N. M. *Synthesis* **1974**, 633.
- 3-13. (a) Clemmensen, E. *Chem. Ber.* **1913**, *46*, 1837; (b) Toda, M.; Hayashi, M.; Hirata, Y.; Yamamura, S. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1972**, *45*, 264.
- 3-14. (a) Baba, A.; Miyai, T.; Ueba M., *Synlett* **1999**, 182.; (b) Sakai, N.; Nagasawa, K.; Ikeda, R.; Nakaike, Y.; Konakahara, T. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3133.
- 3-15. Ono, A.; Suzuki, N.; Kamimura, J. *Synthesis*, **1987**, 736.
- 3-16. Dehmlow, E. V.; Niemann, T.; Kraft, A. *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 1467.
- 3-17. Yamada, S. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **1970**, *28*, 1083.
- 3-18. Brown, M. S.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3261.
- 3-19. (a) Soai, K.; Oyamada, H.; Ookawa, A. *Synth. Commun.* **1982**, *12*, 463; (b) Soai, K.; Oyamada, H.; Takase, M.; Ookawa, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57*, 1948.
- 3-20. Mancera, B. O.; Rincold, H. J.; Djerassi, C.; Rosenkranz, G.; Sondheimer, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1286.
- 3-21. Kikugawa, Y.; Ikegami, S.; Yamada, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, *17*, 98.
- 3-22. A variety of methods for the preparation of thioether from alcohol were reported.
(a) Kawada, A.; Yasuda, K.; Abe, H.; Harayama, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 380; (b) Kobayashi, S.; Imura, S.; Manabe, K. *Chem. Lett.* **2002**, *10*; (c) Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Jafarpour, M.

- Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 93; (d) Bahrami, K.; Khodaei, M. M.; Khodadoustan, N. *Synlett* **2011**, 2206.
- 3-23. (a) Nakagawa, I.; Hata, T. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *17*, 1409; (b) Nakagawa, I.; Aki, K.; Hata, T. *J. Chem. Soc. Pekin Trans. I* **1983**, 1315.
- 3-24. The pKa of pyridine-2-ylmethanethiol was calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02.
- 3-25. (a) The pKa of phenylmethanethiol and benzenethiol were determined by the acid dissociation constants of mercaptans. Kreevoy, M. M.; Harper, E. T.; Duvall, R. E.; Wilgus, III, H. S.; Ditsch, L. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4899; (b) The pKa of pyridin-2-thiol was referred in the following. Brocklehurst, K.; Little, G. *Biochem. J.* **1973**, *133*, 67.
- 3-26. (a) Hall, H. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *79*, 5441; (b) Lai, J. Y.; Yu, J.; Hawkins, D.; Falck, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5691; (c) Falck, J. R.; Lai, J. Y.; Cho, S. D.; Yu, J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2903.
- 3-27. (a) Mukaiyama, T.; Takahashi, K. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 5907; (b) Kato, K.; Mitsunobu, O. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 4227.
- 3-28. Gomi, N.; Kouketsu, A.; Ohgiya, T.; Shibuya, K. *Synthesis* **2012**, *44*, 3171.
- 3-29. (a) Tsunoda, T.; Yamamiya, T.; Ito, S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1639; (b) Humphries, P. S.; Do, Q. T.; Wilhite, D. M. *Beilstein J. Org. Chem.* **2006**, *2*, 21.
- 3-30. DIAD : ¥13,000 / 100 mL (富士フィルム和光純薬工業)、 ADDP : ¥80,000 / 100 g (富士フィルム和光純薬工業)。 2018/12/26 時点
- 3-31. (a) Tsunoda, T.; Ozaki, F.; Ito, S. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5081; (b) Tsunoda, T.; Nagaku, M.; Nagino, C.; Kawamura, Y.; Ozaki, F.; Hioki, H.; Ito, S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2531; (c) Tsunoda, T.; Nagino, C.; Oguri, M.; Ito, S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2459; (d) Ito, S.; Tsunoda, T. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1053.
- 3-32. Zaragoza, F. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 5451.
- 3-33. (a) Kubota, T.; Miyashita, S.; Kitazume, T.; Ishikawa, N. *Chem. Lett.* **1979**, *8*, 845; (b) Kubota, T.; Miyashita, S.; Kitazume, T.; Ishikawa, N. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5052.
- 3-34. (a) Djerassi, C.; Engle, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 3838; (b) Gokel, G. W.; Gerdes, H. M.; Dishong, D. M. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3634; (c) Kaldor, S. W.; Hammond, M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5043; (d) Adam, W.; Hadjirapoglou, L. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 469; (e) Khurana, J. M.; Panda, A. K.; Ray, A.; Gogia, A. *Org. Prep. Proc.* **1996**, *28*, 234; (f) Varma, R. S.; Saini, R. K.; Meshram, H. M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6525.
- 3-35. a) Kennedy, R. J.; Stock, A. M. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1901; (b) Trost, B. M.; Curran, D. P. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1287.

総括

著者は低血糖および体重増加のリスクが低く、 β 細胞保護作用も併せ持つ新規糖尿病治療薬として期待される GPR119 アゴニストの創薬研究に着手した。

GPR119 アゴニストの構造は、ヘッド部位、リンカー部位、テール部位の 3 つの要素から構成され、ヘッド部位は電子求引性基 (スルホニル基やフッ素原子) を有する芳香環、テール部位は嵩高いアルキルカルバミン酸エステルまたはその生物学的等価体を有するピペリジン環であることが提唱されていることから (図 4-1)、著者は、この提唱に沿って、新規リンカーとしてフロ[2,3-*d*]ピリミジン骨格を有する化合物 **1** ($EC_{50} = 129$ nM) を創出した (図 4-2)。さらに、GPR119 アゴニスト活性の発現にはリガンド分子の立体配座制御が重要であるとの仮定に基づき、ヘッド部位の立体配座制御を強固にするため、ヘッド部位の 2 位フッ素原子とアニリン水素原子の分子内水素結合を炭素-炭素共有結合に置換することで、化合物 **1** ($EC_{50} = 129$ nM) の活性が向上することを明らかにし、インドリン誘導体 **2** ($EC_{50} = 53$ nM) を見出した。次いで、インドリン誘導体 **2** のテール部位を最適化し、肝ミクロソームにおける固有クリアランスを改善した化合物 **3** ($EC_{50} = 42$ nM) を第 1 世代化合物として創製した。化合物 **3** は C57BL/6N マウスを用いた経口グルコース負荷試験において開発候補となり得る血糖低下作用を示した。(第 1 章)

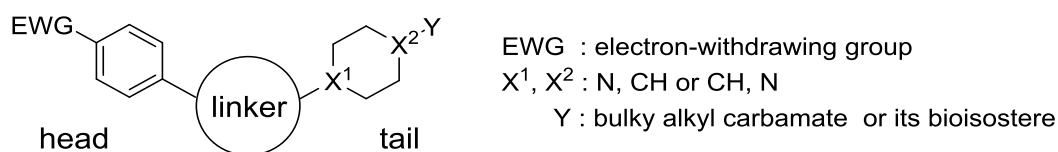


図 4-1. GPR119 アゴニスト

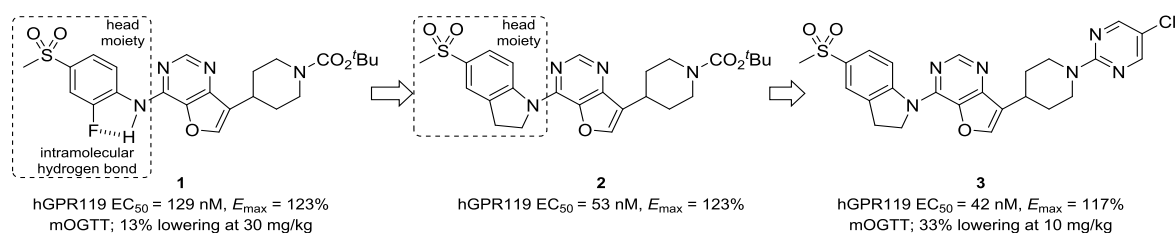


図 4-2. 第 1 世代化合物の創製

続いて、第 1 世代化合物 **3** のバックアップ化合物の探索に着手した。第 1 世代化合物の創製に有効であった分子の立体配座制御の概念を、ヘッド部位ではなくリンカー部位とテール部位に適用し、これらを連結した部位として、テール部位の共通構造であるピペリジン環を含むスピロ環構造を有する化合物 **4** をデザインした (図 4-3)。本アプローチにより、リード化合物としてスピロ[クロマン-2,4'-ピペリジン]誘導体 **5** ($EC_{50} = 369$ nM, $E_{max} = 82\%$) を見出し、リンカー部位とテール部分における立体配座の制御が GPR119 アゴニストの設計に適用し得ることを実証した。リ

ード化合物 **5** の最適化によって創製した第 2 世代化合物 **(R)-K-23217** ($EC_{50} = 54 \text{ nM}$, $E_{\max} = 181\%$) は、リンカー部位とテール部分を連結したスピロ環構造のみならず、ヘッド部位に、ベンジルタイプの嵩高い置換基およびスルホニル基とフェニル基の間にメチレン鎖を含む構造的長を有している。また、C57BL/6N マウスを用いた経口グルコース負荷試験において、**(R)-K-23217** は第 1 世代化合物 **3** よりも低い用量で同等の血糖低下作用を示した。(第 2 章)

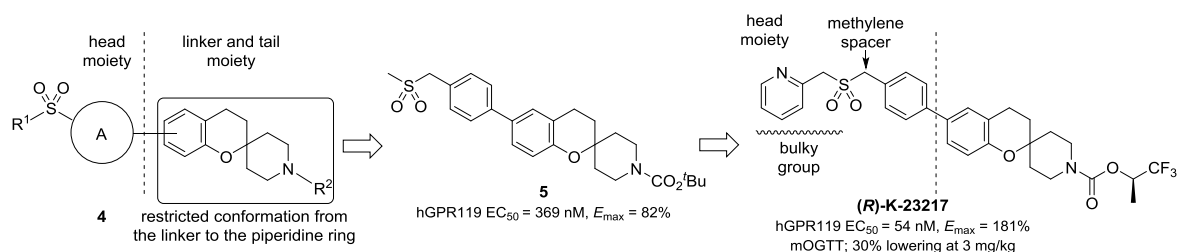


図 4-3. 第 2 世代化合物の創製

上記の化合物探索に続いて、著者は、開発候補化合物 **(R)-K-23217** を薬物動態試験および安全性試験、さらに臨床試験に安定供給するため、効率的な大量合成法の確立を目的に検討を行った。

まず、**(R)-K-23217** の初期合成法 (図 4-4) の課題が、鈴木-宮浦カップリング反応によるビフェニル骨格の構築を回避した合成ルート確立であると考え (第 1 の課題)、容易に入手可能な安息香酸 **11** を原料とする鍵中間体の実用的な合成法の構築を検討した。

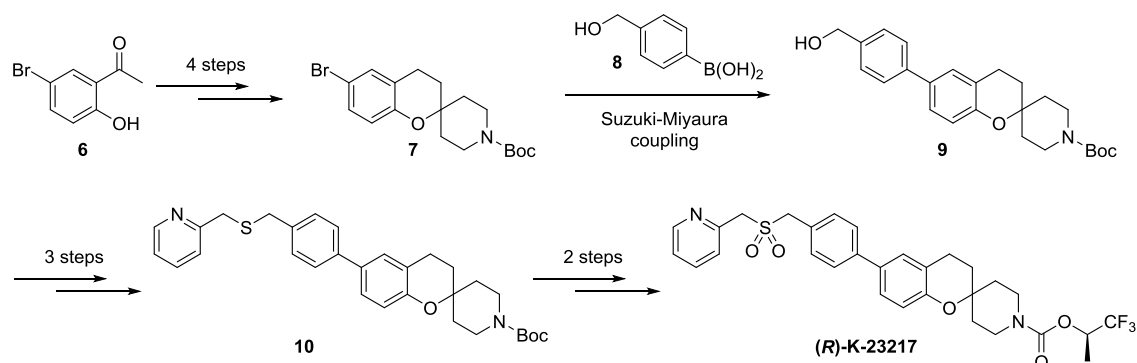


図 4-4. **(R)-K-23217** の初期合成法

その結果、安価な安息香酸 **11** から 3 工程でケトスピロクロマン体 **12** へと誘導する経路を構築した。次に、ケトスピロクロマン体 **12** のカルボニル基の除去およびエステルの還元条件を検討し、カルボニル基の除去にジメチルアミン・ボラン錯体と四塩化チタン、エステルの還元に取り扱いが容易な水素化ホウ素ナトリウムとピリジンの組み合わせが、それぞれ効率的であることを見出した。これら検討によって、鈴木-宮浦カップリング反応によるビフェニル骨格の構築を回避した鍵中間体 **14** の合成を達成した (図 4-5)。

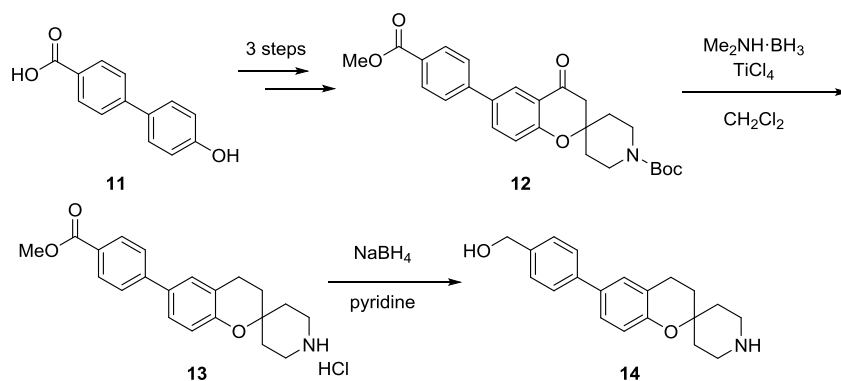


図 4-5. 鍵中間体 **14** の合成

次いで、鍵中間体 **14** からスルフィド体へ変換する方法を検討した。初期合成法では、ベンジルアルコール **9** から臭素化、チオアセチル化を経て 3 工程でスルフィド **10** に変換していたため、鍵中間体 **14** のピペリジン部位を保護せずにスルフィド体 **16** へ直接的に変換する方法を探索した (図 4-6、第 2 の課題)。光延反応では、2-ピリジルメタンチオール (**15**) とアゾジカルボン酸エステルとの酸化還元反応が進行してビス(2-ピリジルメチル)ジスルフィドが生成し、スルフィド体 **16** はわずかに得られるのみであった。そこで、石川らの方法を適用してホスホラン試薬 (ビス(2,2,2-トリフルオロエトキシ)トリフェニルホスホラン) を用いたところ、鍵中間体 **14** より所望のスルフィド体 **16** を 1 工程で定量的に得ることに成功した。最後に、ピペリジン部位の酸化を避けるため酸性条件下でオキソン®によりスルフィドを酸化する条件を見出した。

上記の検討により初期合成法の 2 つの課題を解決し、**(R)-K-23217** の効率的な製造法を確立した。(第 3 章)

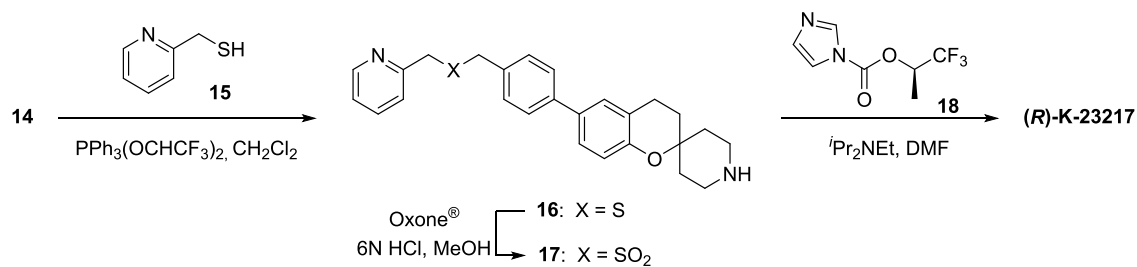


図 4-6. 鍵中間体 **14** から **(R)-K-23217** の合成

Experimental procedure

General

All reactions sensitive to air or moisture were carried out under argon atmosphere in dry solvents, unless otherwise noted. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using Merck Silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated plates (0.25 mm). Preparative thin-layer chromatography was performed using Merck silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated plates (0.5, 1.0, 2.0 mm). Automated flash column chromatography system was performed by Purif- α 2 (SHOKO SCIENTIFIC). The ¹H NMR spectra and ¹³C NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-AL spectrometer and JEOL ECS spectrometer using the solvent CDCl₃, CD₃OD or DMSO-*d*₆ with tetramethylsilane as an internal standard, unless otherwise noted. Signal patterns are indicated as s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broaden peak. Infrared (IR) spectra were recorded on a Thermo Nicolet 370 FT-IR (KBr or ATR) spectrometer. Mass spectra were obtained on a JMS-T100GCV mass spectrometer. Elemental analysis (C, H, N) were performed using a Yanaco NT-5 instrument. Melting points were determined in open glass capillaries on a Buchi B-545 melting point apparatus.

第 1 章に関する実験

Chemical Experimental Details

Synthesis of *tert*-butyl 4-(cyanomethyl)piperidine-1-carboxylate (**20**)

Boc₂O (9.60 g, 44.0 mmol) and NaHCO₃ (5.10 g, 48.0 mmol) at room temperature were added to a stirred solution of 4-piperidinemethanol (**19**) (4.60 g, 40.0 mmol) in tetrahydrofuran (THF) (40 mL) and H₂O (40 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After completing the reaction, H₂O (60 mL) was added to the reaction mixture. The aqueous layer was extracted with AcOEt (200 mL × 2). The combined organic layers were concentrated *in vacuo* to give *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (12.9 g) as a white solid.

MsCl (1.52 g, 40.0 mmol) was added dropwise at 0 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (12.9 g) and triethylamine (TEA) (17 mL, 120 mmol) in dry THF (100 mL). After stirring at this temperature for 30 min, the reaction mixture was quenched with H₂O (100 mL) at 0 °C. The aqueous layer was extracted with AcOEt (200 mL × 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to give *tert*-butyl 4-(((methylsulfonyl)oxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (15.3 g) as a white solid.

NaCN (4.00 g, 80.0 mmol) and H₂O (20 mL) at room temperature were added to a stirred solution of *tert*-butyl 4-(((methylsulfonyl)oxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (15.3 g) in EtOH (80 mL). The reaction

mixture was stirred at 80 °C for 24 h. After completing the reaction, the solvents were concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in AcOEt (300 mL) and H₂O (100 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (300 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-AcOEt) to give **20** (6.87 g, 76.6% from **19**) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.21-1.31 (2H, m), 1.46 (9H, s), 1.78-1.86 (3H, m), 2.31 (2H, d, *J* = 6.4 Hz), 2.64-2.78 (2H, m), 4.07-4.21 (2H, m).

Synthesis of lithium 2-(1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl)-2-cyanoethen-1-olate (**21**)

1.65 M *n*-BuLi in hexane (21 mL, 33.7 mmol) was added dropwise at -78 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of ¹Pr₂NH (4.8 mL, 33.7 mmol) in dry THF (100 mL). After stirring at this temperature for 1 h, **20** (6.87 g, 30.6 mmol) in dry THF (50 mL) was added dropwise to the resulting mixture at -78 °C. The reaction mixture was allowed to warm to -30 °C and was stirred for 1 h. Ethyl formate (3.0 mL, 36.7 mmol) was added dropwise to the resulting mixture at -30 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and was stirred overnight. The precipitate was filtered off and washed with Et₂O to give **21** (7.14 g, 92%) as white powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.08-1.25 (2H, m), 1.39 (9H, s), 1.44-1.50 (2H, m), 2.57-2.71 (2H, m), 3.86-3.97 (2H, m), 7.93 (1H, s, major), 8.07 (1H, s, minor).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-amino-5-(ethoxycarbonyl)furan-3-yl)piperidine-1-carboxylate (**22**)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (4.64 g, 30.5 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **21** (7.00 g, 27.7 mmol) and diethyl chloromalonate (6.47 g, 33.2 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (70 mL). After stirring at this temperature for 24 h, the reaction mixture was quenched with H₂O (200 mL) at 0 °C. The aqueous layer was extracted with AcOEt (200 mL × 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-AcOEt) to give **22** (4.67 g, 50%) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.38 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.47 (9H, s), 1.87-1.95 (2H, m), 2.38-2.49 (1H, m), 2.74-2.87 (2H, m), 4.10-4.28 (2H, m), 4.35 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 4.50 (2H, br s), 7.06 (1H, s).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-hydroxyfuro[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (**25**)

Formamidine acetate (2.00 g, 19.2 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **22** (1.30 g, 3.84 mmol) in EtOH (20 mL). After stirring at reflux for 2 days, the solvents were concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with Et₂O (30 mL) and H₂O (10 mL). The precipitate was filtered off to give **25** (825 mg, 68%) as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.61-1.71 (2H, m), 2.03-2.12 (2H, m), 2.80-3.00 (3H, m), 4.08-4.35 (2H, m), 7.61 (1H, d, *J* = 1.0 Hz), 8.04 (1H, s).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-((1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (28)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (656 mg, 4.31 mmol) in dry THF (7 mL) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of **25** (1.06 g, 3.22 mmol) and (benzotriazol-1-yl)oxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (1.81 g, 3.49 mmol) in dry THF (10 mL). After stirring at this temperature for 40 min, the reaction mixture was quenched with H₂O (50 mL) at room temperature. The aqueous layer was extracted with AcOEt (150 mL x 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-AcOEt to CHCl₃-MeOH) to give **28** (1.19 g, 83%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.61-1.71 (2H, m), 2.03-2.12 (2H, m), 2.80-3.00 (3H, m), 4.08-4.35 (2H, m), 7.61 (1H, d, *J* = 1.0 Hz), 8.04 (1H, s).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (1)

NaH in oil (29.0 mg, 0.604 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of **28** (870 mg, 2.00 mmol) and 2-fluoro-4-(methylsulfonyl)aniline (51.0 mg, 0.270 mmol) in dry *N,N*-dimethylformamide (1.5 mL). After stirring at 70 °C for 2.5 h, the reaction mixture was quenched with water (40 mL) at room temperature. The aqueous layer was extracted with AcOEt (40 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine (40 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 1 : 3) to afford **1** (34.3 mg, 24%) as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.63-1.75 (2H, m), 2.11-2.19 (2H, m), 2.87-2.97 (2H, m), 3.01-3.13 (1H, m), 3.08 (3H, s), 4.06-4.36 (2H, m), 7.42 (1H, s), 7.64 (1H, s), 7.76 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 7.81 (1H, dd, *J* = 1.0, 8.8 Hz), 8.74 (1H, s), 9.07 (1H, t, *J* = 8.0 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-amino-5-(ethoxycarbonyl)thiophen-3-yl)piperidine-1-carboxylate (23)

Methanesulfonyl chloride (0.31 mL, 4.05 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was added at 0 °C to a stirred solution of **21** (926 mg, 3.59 mmol) and trimethylamine (0.66 mL, 4.78 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h. After completing the reaction, the reaction mixture was diluted with CHCl₃. The resulting mixture was washed with brine. The organic layer dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (2.13 mL, 17.2 mmol) and ethyl thioglycolate (0.31 mL, 4.05 mmol) was added to at 0 °C to a stirred solution of the residue in CH₂Cl₂ (20 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h. After completing the reaction, the reaction mixture was diluted with CHCl₃. The resulting mixture was washed with 1N HCl. The organic layer dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. NaOEt (2.0 g, 29.4 mmol) was added to at room temperature to a stirred solution of the residue in EtOH (20 mL). The reaction mixture was stirred at reflux for 3 h. After completing the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting mixture was diluted with CHCl₃ and washed with brine. The organic layer dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue purified by column

chromatography on silica gel (CHCl₃ : MeOH = 50 : 1 to 30 : 1) to afford **23** (287 mg, 22%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.47 (9H, s), 1.52-1.69 (2H, m), 1.90 (2H, d, *J* = 13.4 Hz), 2.45 (1H, tt, *J* = 3.5, 12.0 Hz), 2.74-2.88 (2H, m), 4.25-4.36 (4H, m), 5.45 (2H, br), 6.96 (1H, s).

***tert*-Butyl 4-(4-hydroxythieno[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (26)**

Compound **26** was prepared in the same way as compound **25**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.49 (9H, s), 1.56-1.70 (2H, m), 2.04 (2H, d, *J* = 12.4 Hz), 2.81-2.99 (2H, m), 3.15-3.26 (1H, m), 4.25 (2H, br), 7.50 (1H, s), 8.16 (1H, s), 11.9 (1H, br).

***tert*-Butyl 4-(4-((1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (29)**

Compound **29** was prepared in the same way as compound **28**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.49 (9H, s), 1.65-1.76 (2H, m), 2.12 (2H, d, *J* = 12.6 Hz), 2.86-3.02 (2H, m), 3.38 (1H, tt, *J* = 3.4, 12.2 Hz), 4.29 (2H, br), 7.46-7.52 (2H, m), 7.54-7.59 (1H, m), 7.72 (1H, s), 8.13-8.18 (1H, m), 8.66 (1H, s).

***tert*-Butyl 4-(4-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (30)**

Compound **30** was prepared in the same way as compound **1**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.49 (9H, s), 1.61-1.70 (2H, m), 2.12 (2H, d, *J* = 12.9 Hz), 2.86-3.02 (2H, m), 3.09 (3H, s), 3.38 (1H, tt, *J* = 3.4, 12.1 Hz), 4.27 (2H, br), 7.02 (1H, br), 7.51 (1H, s), 7.74-7.84 (2H, m), 8.90 (1H, s), 9.01 (1H, t, *J* = 8.2 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-amino-5-(ethoxycarbonyl)thiophen-3-yl)piperidine-1-carboxylate (24)

Diethyl aminomalonate hydrochloride (952 mg, 4.50 mmol) and sodium acetate (492 mg, 6.00 mmol) were added at room temperature to a stirred solution of **21** (757 mg, 2.93 mmol) in MeOH (6 mL) and H₂O (2 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. After completing the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting mixture was diluted with CHCl₃, and washed with brine. The organic layer dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. NaOEt (510 mg, 7.50 mmol) was added to at room temperature to a stirred solution of the residue in EtOH (6 mL). The reaction mixture was stirred at reflux for 3 h. After completing the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was diluted with AcOEt. The resulting mixture was washed with brine. The organic layer dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃ : MeOH = 100 : 1 to 50 : 1) to afford **24** (466 mg, 46%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.47 (9H, s), 1.88 (2H, d, *J* = 13.1 Hz), 2.41-2.53 (1H, m), 2.74-2.87 (2H, m), 4.06-4.41 (6H, m), 6.51 (1H, br), 8.08 (1H, br).

***tert*-Butyl 4-(4-hydroxy-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (27)**

Compound **27** was prepared in the same way as compound **25**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.41 (9H, s), 1.50-1.63 (2H, m), 1.89 (2H, d, *J* = 12.2 Hz), 2.70-2.92 (1H, m), 3.26-3.39 (2H, m), 7.18 (1H, s), 7.75 (1H, s), 11.7 (1H, br).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-chloro-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (31)

A solution of **27** (466 mg, 1.38 mmol) in POCl₃ (2 mL) was stirred at 100 °C for 5 h. After completing the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. 2*N* NaOH and Boc₂O (602 mg, 2.76 mmol) was added to the residue. The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water. The resulting mixture was extracted with AcOEt and washed with brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃ : MeOH = 10 : 1) to afford **31** (201 mg, 43%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.63-1.74 (2H, m), 2.12 (2H, d, *J* = 13.1 Hz), 2.82-2.99 (2H, m), 3.18 (1H, tt, *J* = 3.5, 12.1 Hz), 4.23 (2H, br), 7.40 (1H, s), 8.79 (1H, s), 9.32 (1H, br).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (33)

NaO*t*Bu (15.9 mg, 0.109 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **31** (54.8 mg, 0.163 mmol), 2-fluoro-4-(methylsulfonyl)aniline (32.0 mg, 0.169 mmol), and Pd(P*t*Bu₃)₂ (5.8 mg, 0.0113 mmol) in 1,4-dioxane (0.5 mL). The reaction mixture was irradiated in a microwave (Initiator; Biotage AB) at 130 °C for 3 h and concentrated *in vacuo*. The residue purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 1 : 3) to afford **32** (3.6 mg, 7%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.49 (9H, s), 1.68-1.85 (2H, m), 1.96-2.18 (2H, m), 2.78-2.99 (2H, m), 3.09 (3H, s), 3.11-3.21 (1H, m), 4.05-4.27 (2H, m), 7.11 (1H, s), 7.64 (1H, dd, *J* = 2.0, 10.2 Hz), 7.73 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.13 (1H, br), 8.63 (1H, s), 8.92 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 10.3 (1H, br).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-chloro-5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (32)

Iodomethane (5.8 μL, 0.0932 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **31** (26.0 mg, 0.0772 mmol) and NaH in oil (6.7 mg, 0.154 mmol) in dry *N,N*-dimethylformamide (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl at room temperature. The aqueous layer was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (CHCl₃ : MeOH = 10 : 1) to afford **32** (28.4 mg, 92%) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.56-1.72 (2H, m), 2.07 (2H, d, *J* = 13.1 Hz), 2.86-2.99 (2H, m), 3.15 (1H, tt, *J* = 3.5, 12.0 Hz), 4.11 (3H, s), 4.14-4.30 (2H, br), 7.15 (1H, s), 8.66 (1H, s).

***tert*-butyl 4-(4-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (34)**

Compound **34** was prepared with compound **32** in place of compound **31** in the same way as compound **33**.
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.56-1.67 (2H, m), 2.09 (2H, d, *J* = 13.4 Hz), 2.81-2.98 (2H, m), 3.07 (3H, s), 3.08-3.19 (1H, m), 4.16 (3H, s), 4.21 (2H, br), 6.99 (1H, s), 7.73 (1H, dd, *J* = 2.1, 10.4 Hz), 7.78 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.60 (1H, br), 8.95-9.01 (1H, m).

***tert*-Butyl 4-(4-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)-piperidine-1-carboxylate (39)**

Compound **39** was prepared with 4-(methylsulfonyl)aniline in place of 2-fluoro-4-(methylsulfonyl)aniline in the same way as compound **1**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.56-1.69 (2H, m), 2.13-2.18 (2H, m), 2.88-2.96 (2H, m), 3.01-3.09 (4H, m), 4.17-4.36 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.61 (1H, s), 7.96 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.01 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.72 (1H, s).

Synthesis of 5-thiocyanatindoline (42)

Bromine (11.3 mL, 220 mmol) in MeOH (50 mL) was added at -10 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of indoline (**41**) (23.8 g, 200 mmol), KSCN (42.8 g, 440 mmol) in MeOH (150 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was diluted with an aqueous K₂CO₃ solution and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to afford crude **42** (31.4 g) as an orange oil. This crude was used for the next step without further purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.06 (2H, t, *J* = 8.4 Hz), 3.64 (2H, t, *J* = 8.4 Hz), 6.57 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.22 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz), 7.29 (1H, d, *J* = 2.0 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 5-(methylsulfonyl)indoline-1-carboxylate (43)

Na₂S·9H₂O (38.4 g, 160 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **42** (200 mmol) in EtOH (180 mL) and H₂O (20 mL). The reaction mixture was stirred at 50 °C for 1 h. Iodomethane (9 mL, 140 mmol) was added at room temperature to the resulting mixture. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was diluted with brine (150 mL) and extracted with toluene (1000 mL). The organic layer was washed with water (150 mL x 2) and concentrated *in vacuo* to afford crude 5-(methylthio)indoline (30.0 g) as an orange oil. This crude was used for the next step without further purification.

Boc₂O (27.3 g, 125 mmol) and *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (488 mg, 4.00 mmol) were added at room temperature to a stirred solution of 5-(methylthio)indoline (30.0 g) in THF (130 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for overnight and diluted with toluene (500 mL). The resulting mixture was washed with 1N HCl (100 mL) and water (50 mL x 2). The organic layer was concentrated *in vacuo* to afford crude *tert*-butyl 5-(methylthio)indoline-1-carboxylate (47.6 g) as a brown solid. This crude was used for the next step without further purification.

3-Chloroperoxybenzoic acid (contains ca. 30% water) (60 g, 243 mmol) was added at -20 °C to a stirred solution of *tert*-butyl 5-(methylthio)indoline-1-carboxylate (47.6 g) in CH₂Cl₂ (200 mL). The reaction mixture was stirred at -20 °C for 50 min. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with 10% Na₂S₂O₃ (150 mL) and 3N NaOH (100 mL). The resulting mixture was extracted with toluene (650 mL). The organic layer was washed with water (50 mL x 2) and concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with AcOEt (40 mL) and hexane (40 mL). The precipitate was filtered to afford **43** (24.9 g, 42% in 4 steps from **41**) as a white pink solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.57 (9H, s), 3.02 (3H, s), 3.16 (2H, t, *J* = 8.8 Hz), 4.06 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.25-7.27 (1H, m), 7.67 (1H, s), 7.75 (1H, d, *J* = 8.4 Hz).

Synthesis of 5-(methylsulfonyl)indoline (**44**)

4 N HCl in AcOEt (25 mL) was added at room temperature to a stirred solution of **43** (24.9 g, 83.7 mmol) in MeOH (25 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature. After completing the reaction, the reaction mixture was diluted with AcOEt (200 mL). The precipitate was filtered to afford **44·HCl** (16.2 g). A saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added to suspension of **44·HCl** in AcOEt (500 mL) was adjusted to a pH of 8. The resulting mixture was extracted with AcOEt (500 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to afford **44** (13.2 g, 80%) as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.00 (3H, s), 3.09 (2H, t, *J* = 8.4 Hz), 3.70 (2H, t, *J* = 8.4 Hz), 4.27 (1H, br), 6.59 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.55-7.67 (3H, m).

Synthesis of *N*-(2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)-4-nitrobenzenesulfonamide (**46**)

2-Nitrobenzenesulfonyl chloride (665 mg, 3.00 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of 2-fluoro-4-(methylsulfonyl)aniline (**45**) (380 mg, 2.01 mmol) in pyridine (4 mL). The reaction mixture was stirred at 60 °C for 4 h. After completing the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 1 : 1) to afford **46** (610 mg, 82%) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.05 (3H, s), 7.60-8.04 (8H, m).

Synthesis of *N*-(2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)-*N*-methyl-4-nitrobenzenesulfonamide (**47**)

Iodomethane (140 mg, 0.986 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **46** (37.0 mg, 0.0988 mmol) and K₂CO₃ (70.0 mg, 0.506 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (0.5 mL). The reaction mixture

was stirred at room temperature for 2.5 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water. The resulting mixture was extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo* to afford crude **47** (29.0 mg) as an orange oil. This crude was used for the next step without further purification.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.10 (3H, s), 3.41 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 7.62-7.90 (7H, m).

Synthesis of 2-fluoro-*N*-methyl-4-(methylsulfonyl)aniline (**48**)

Thiophenol (13.0 mg, 0.118 mmol) was at room temperature to a stirred solution of **47** (29.0 mg) and potassium carbonate (31.0 mg, 0.224 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (1.6 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water. The resulting mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 4 : 1 to 1 : 1) to afford **48** (8.9 mg, 59% in 2 steps from **46**) as a yellow solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.96 (3H, d, $J = 4.9$ Hz), 3.01 (3H, s), 6.71 (1H, t, $J = 8.3$ Hz), 7.50 (1H, dd, $J = 2.0, 10.7$ Hz), 7.62 (1H, dd, $J = 2.0, 8.3$ Hz).

Synthesis of 6-(methylthio)-3,4-dihydroquinolin-2(1*H*)-one (**50**)

NaSMe (139 mg, 1.49 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of 6-bromo-3,4-dihydroquinolin-2(1*H*)-one (**49**) (300 mg, 1.33 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (68.7 mg, 0.0664 mmol), and XantPhos (38.4 mg, 0.0664 mmol) in toluene (2.6 mL). The reaction mixture was irradiated in a microwave (Initiator; Biotage AB) at 120 °C for 30 min and quenched with water. The aqueous layer was extracted with AcOEt. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 1 : 2) to afford **50** (179 mg, 70%) as a yellow solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.46 (3H, s), 2.63 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 2.95 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 6.72 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.09-7.14 (2H, m), 8.22-8.32 (1H, br).

Synthesis of 6-(methylsulfonyl)-3,4-dihydroquinolin-2(1*H*)-one (**51**)

3-Chloroperoxybenzoic acid (contains ca. 30% water) (82.4 mg, 0.334 mmol) was added at 0 °C to a stirred solution of **50** (30.0 mg, 0.155 mmol) in CH_2Cl_2 (0.8 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. The resulting mixture was extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 1 : 3) to afford **51** (17.9 mg, 51%) as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.71 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.03-3.12 (5H, m), 6.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.76-7.80 (2H, m), 8.44-8.48 (1H, br).

Synthesis of 6-(methylsulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (52)

1.06 M Borane – tetrahydrofuran complex in THF (314 μ L, 0.333 mmol) was added at 0 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of **51** (30 mg, 0.133 mmol) in dry THF (0.43 mL). The reaction mixture was stirred 0 °C for 1 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with brine and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 1 : 3) to afford **52** (25.4 mg, 90%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.89-1.96 (2H, m), 2.77 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 2.99 (3H, s), 3.37 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.49-4.58 (1H, br), 6.46 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.44-7.48 (2H, m).

Synthesis of 4-bromo-*N*-(tert-butyl)-2-chloroaniline (54)

tert-Butyl 2,2,2-trichloroacetimidate (2.17 mL, 12.1 mmol) and BF₃·OEt₂ (0.61 mL, 4.84 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of 4-bromo-2-chloroaniline (**53**) (1.00 g, 4.84 mmol) in cyclohexane (16 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. The reaction mixture was quenched with water and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane) to afford **54** (559 mg, 44%) as a brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.38 (9H, s), 4.26-4.34 (1H, br), 6.82 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.18 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz), 7.38 (1H, dd, *J* = 0.4, 2.0 Hz).

Synthesis of *N*-(tert-butyl)-2-chloro-4-(methylthio)aniline (55)

NaSMe (200 mg, 2.86 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of **54** (500 mg, 1.90 mmol), Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (98.3 mg, 0.0950 mmol), and XantPhos (108 mg, 0.187 mmol) in dry toluene (3.6 mL). The reaction mixture was irradiated in a microwave (Initiator; Biotage AB) at 160 °C for 70 min and concentrated *in vacuo*. The residue purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 6 : 1) to afford **55** (242 mg, 55%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.39 (9H, s), 2.41 (3H, s), 4.22-4.36 (1H, br), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.12 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz), 7.25-7.31 (1H, m).

Synthesis of *N*-(tert-butyl)-2-chloro-4-(methylsulfonyl)aniline (56)

3-Chloroperoxybenzoic acid (contains ca. 30% water) (446 mg, 1.68 mmol) was added at 0 °C to a stirred solution of **55** (192 mg, 0.84 mmol) in CH₂Cl₂ (0.8 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and room temperature for 15 min. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with 10% Na₂S₂O₃. The resulting mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 2 : 1) to afford **56** (168 mg, 76%) as a pale yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (9H, s), 3.02 (3H, s), 4.83-5.10 (1H, br), 6.97 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.63 (1H, dd, *J* = 0.4, 2.4 Hz), 7.80 (1H, dd, *J* = 0.4, 2.4 Hz).

Synthesis of methyl *tert*-butyl(2-chloro-4-(methylsulfonyl)phenyl)carbamate (**57**)

Methyl chloroformate (115 mg, 1.22 mmol) was added at 0 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of **56** (160 mg, 0.611 mmol) and NaH in oil (44.0 mg, 0.917 mmol) in CH₂Cl₂. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. The resulting mixture was quenched with water and extracted with CHCl₃. The organic layer dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt) to afford **57** (70.1 mg, 36%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (9H, s), 3.13 (3H, s), 7.36 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.82 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz), 8.03 (1H, dd, *J* = 2.0 Hz).

Synthesis of methyl 2,2-dimethyl-5-(methylsulfonyl)indoline-1-carboxylate (**58**)

57 (68.0 mg, 0.213 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred suspension of Pd(OAc)₂ (2.4 mg, 0.0107 mmol), PCy₃·HBF₄ (7.8 mg, 0.0212 mmol), Cs₂CO₃ (105 mg, 0.322 mmol) and pivalic acid (6.5 mg, 0.0636 mmol) in Xylene. The reaction mixture was stirred at 140 °C for 16 h. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 2 : 1) to afford **58** (10.1 mg, 17%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.59 (6H, s), 3.04 (3H, s), 3.08 (2H, s), 3.89 (3H, s), 7.25-7.27 (1H, m), 7.66 (1H, d, *J* = 0.8 Hz), 7.76 (1H, dd, *J* = 8.4 Hz).

Synthesis of 2,2-dimethyl-5-(methylsulfonyl)indoline (**59**)

1M LiOH (110 μL, 0.11 mmol) was added room temperature to a stirred solution of **58** (10.1 mg, 0.04 mmol) in MeOH (0.7 mL). The reaction mixture was stirred reflux for 16 h. After completing the reaction, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with water and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 2 : 1) to afford **59** (10.2 mg, >98%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (6H, s), 2.89 (2H, s), 3.01 (3H, s), 4.10-4.18 (1H, br), 6.53 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.53-7.59 (3H, m).

Synthesis of *tert*-butyl 2-oxoindoline-1-carboxylate (**61**)

Boc₂O (8.6 mL, 37.5 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of indolin-2-one (**60**) (2.00 g, 15.0 mmol) and Na₂CO₃ (7.95 g, 75.0 mmol) in THF (68 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3.5 h, at 40 °C for 6 h, and at room temperature for 10 h. The reaction mixture was quenched with water (34 mL) and extracted with AcOEt (68 mL). The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 20 : 1 to 10 : 1) to afford **61** (2.71 g, 77%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.65 (9H, s), 3.65 (2H, s), 7.14 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 7.22-7.32 (2H, m), 7.79 (1H, d, *J* = 8.0 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 3,3-dimethyl-2-oxoindoline-1-carboxylate (**62**)

NaH in oil (1.23 g, 25.6 mmol) was added at 0 °C to a stirred solution of **61** (2.71 g, 11.6 mmol) and iodomethane (2.17 mL, 34.9 mmol) in THF (29 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water (15 mL). The resulting mixture was extracted with AcOEt (29 mL). The organic layer was washed brine (15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 20 : 1) to afford **62** (1.40 g, 46%) as a brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (6H, s), 1.65 (9H, s), 7.13 (3H, m), 7.85 (1H, d, *J* = 7.6 Hz).

Synthesis of 3,3-dimethylindolin-2-one (**63**)

2,2,2-Trifluoroacetic acid (5.4 mL) was added at 0 °C to a stirred solution of **62** (1.40 g, 5.36 mmol) in THF (29 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 10 min. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The resulting mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 2 : 1) to afford **63** (0.82 g, 95%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (6H, s), 6.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.04 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.16-7.23 (2H, m).

Synthesis of 3,3-dimethylindoline (**64**)

Sodium bis(2-methoxyethoxy)aluminium dihydride in toluene (1.10 g, 3.72 mmol) was added at 0 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of **63** (0.300 g, 1.86 mmol) in dry THF (10 mL). After the reaction mixture was stirred at 80 °C for 1 h, sodium bis(2-methoxyethoxy)aluminium dihydride in toluene (1.10 g, 3.72 mmol) was added at 0 °C to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 1 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water at 0 °C. The resulting mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 60 : 1 to 1 : 1) to afford **64** (235 mg, 86%) as a brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (6H, s), 3.31 (2H, s), 6.65 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.74 (1H, td, *J* = 0.8, 7.2 Hz), 6.99-7.07 (2H, m).

3,3-Dimethyl-5-(methylthio)indoline (**65**)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.30 (6H, s), 2.43 (3H, s), 3.32 (2H, s), 6.59 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.04-7.10 (2H, m).

***tert*-Butyl 3,3-dimethyl-5-(methylthio)indoline-1-carboxylate (66)**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (9H, s), 2.46 (3H, s), 3.70 (2H, s), 7.06 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.13 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz), 7.25-7.28 (1H, m).

***tert*-Butyl 3,3-dimethyl-5-(methylsulfonyl)indoline-1-carboxylate (67)**

Compound **67** was prepared in the same way as compound **43**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.36 (6H, s), 1.58 (9H, s), 3.04 (3H, s), 3.78 (2H, s), 7.25-7.28 (1H, m), 7.64 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.76 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz).

3,3-Dimethyl-5-(methylsulfonyl)indoline (68)

Compound **68** was prepared in the same way as **44**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.34 (6H, s), 3.01 (3H, s), 3.43 (2H, s), 6.60 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.58 (1H, s), 7.60 (1H, d, *J* = 2.0 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 4-(4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (2)

NaH in oil (140 mg, 2.92 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of **28** (870 mg, 2.00 mmol) and 5-(methylsulfonyl)indoline **44** (355 mg, 1.80 mmol) in dry *N,N*-dimethylformamide (10 mL). After stirring at 70 °C for 3 h, the reaction mixture was quenched with brine (100 mL) at room temperature. The aqueous layer was extracted with CHCl₃ (200 mL × 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-CHCl₃-acetone) to give **2** (598 mg, 69%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.70 (1H, dd, *J* = 3.6, 12.8 Hz), 1.75 (1H, dd, *J* = 3.6, 12.8 Hz), 2.12-2.18 (2H, m), 2.84-2.98 (2H, m), 3.08 (1H, tt, *J* = 3.6, 12.0 Hz), 4.16-4.34 (2H, m), 7.45-7.52 (2H, m), 7.55-7.59 (1H, m), 7.80 (1H, d, *J* = 1.0 Hz), 8.15 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.53 (1H, s).

***tert*-Butyl 4-(4-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)(methyl)amino)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)-piperidine-1-carboxylate (69)**

Compound **69** was prepared with compound **48** in place of compound **44** in the same way as compound **2**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.57-1.65 (2H, m), 2.04-2.14 (2H, m), 2.82-3.05 (3H, m), 3.14 (3H, s), 3.71 (3H, s), 4.12-4.27 (2H, m), 7.36 (1H, s), 7.54 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.76-7.82 (2H, m), 8.59 (1H, s).

***tert*-Butyl 4-(4-(6-(methylsulfonyl)-3,4-dihydroquinolin-1(2*H*)-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (70)**

Compound **69** was prepared with compound **52** in place of compound **44** using an experimental procedure similar to that used for compound **2**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.63 (1H, dd, *J* = 4.4, 12.8 Hz), 1.69 (1H, dd, *J* = 4.4, 12.8 Hz), 2.08-2.18 (4H, m), 2.85-2.98 (4H, m), 3.00-3.11 (4H, m), 4.15-4.35 (4H, m), 7.26-7.30 (1H, m), 7.51 (1H, s), 7.67 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.8 Hz), 7.75 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.72 (1H, s).

***tert*-Butyl 4-(4-(2,2-dimethyl-5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (71)**

Compound **71** was prepared with compound **59** in place of compound **44** in the same way as compound **2**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s) 1.64-1.77 (8H, m), 2.14-2.20 (2H, m), 2.86-2.99 (2H, m), 3.02-3.10 (4H, m), 3.15 (2H, s), 4.18-4.32 (2H, m), 7.58 (1H, s), 7.69-7.73 (2H, m), 7.74 (1H, s), 8.79 (1H, s).

***tert*-Butyl 4-(4-(3,3-dimethyl-5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidine-1-carboxylate (72)**

Compound **72** was prepared with compound **68** in place of compound **44** using an experimental procedure similar to that used for compound **2**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (6H, s), 1.48 (9H, s) 1.59-1.74 (2H, m), 2.11-2.19 (2H, m), 2.85-2.99 (2H, m), 3.01-3.10 (4H, m), 4.20-4.29 (2H, m), 4.44 (2H, s), 7.61 (1H, s), 7.73 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz), 8.69-8.73 (2H, m).

Synthesis of 4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)-7-(piperidin-4-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine hydrochloride salt (73)

4 N HCl in AcOEt (6 mL) was added at room temperature to a stirred solution of **2** (598 mg, 1.20 mmol) in MeOH (6 mL) and CHCl₃ (6 mL). After stirring at room temperature for 2.5 h, the reaction mixture was diluted with AcOEt (15 mL). The precipitate was filtered off to give **73** (382 mg, 73%) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.95-2.08 (2H, m), 2.31-2.40 (2H, m), 3.13 (3H, s), 3.22-3.34 (3H, m), 3.51-3.59 (4H, m), 4.93 (2H, t, *J* = 8.3 Hz), 7.90 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.94 (1H, s), 8.48 (1H, s), 8.88 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.96 (1H, s).

Synthesis of 7-(1-(5-chloropyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine (3)

2,5-Dichloropyrimidine (263 mg, 1.76 mmol) was added at room temperature to a suspension of **73** (511 mg, 1.17 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (0.61 mL, 456 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL). After stirring at 100 °C overnight, the solvents were concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with AcOEt and Et₂O. The precipitate was filtered off to give **3** (381 mg, 59%) as a pale brown solid. The mother liquid was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃ : MeOH) to give **3** (92 mg, 14%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.70 (1H, dd, *J* = 4.0, 12.4 Hz), 1.76 (1H, dd, *J* = 4.0, 12.4 Hz), 2.22-2.30 (2H, m), 3.04-3.14 (2H, m), 3.06 (3H, s), 3.21 (1H, tt, *J* = 3.2, 12.0 Hz), 3.38 (2H, t, *J* = 8.8 Hz), 4.72 (2H, t, *J* = 8.8 Hz), 4.81-4.89 (2H, m), 7.61 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.83 (1H, dd, *J* = 2.2, 9.0 Hz), 8.23 (2H, s), 8.69-8.74

(2H, m); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 27.9, 31.3, 31.8, 44.4, 45.0, 50.6, 116.5, 117.9, 123.8, 125.8, 128.1, 132.8, 133.8, 134.7, 144.7, 145.5, 148.4, 151.9, 152.5, 155.9, 159.8; mp 224-225 °C; IR (ATR): 1566, 1512, 1480, 1300, 1137, 1112 cm^{-1} ; HRMS (FD): Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClN}_6\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}]^+$: 510.1241, Found 510.1242.

4-(5-(Methylsulfonyl)indolin-1-yl)-7-(1-(pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine (74)

Compound **74** was prepared with 2-chloropyrimidine in place of 2,5-dichloropyrimidine in the same way as compound **3**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.70 (1H, dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz), 1.76 (1H, dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz), 2.22-2.31 (2H, m), 3.03-3.13 (5H, m), 3.16-3.25 (1H, m), 3.38 (2H, t, $J = 8.8$ MHz), 4.72 (2H, t, $J = 8.8$ Hz), 4.87-4.95 (2H, m), 6.47 (2H, t, $J = 4.8$ MHz), 7.62 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.83 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 8.32 (2H, d, $J = 4.8$ Hz), 8.69-8.75 (2H, m).

Synthesis of 7-(1-(5-methylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)-furo[3,2-*d*]pyrimidine (75)

7-(1-(5-bromopyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine was prepared with 2-chloropyrimidine in place of 5-bromo-2-chloropyrimidine using an experimental procedure similar to that used for compound **3**.

Cs_2CO_3 (23.0 mg, 0.0706 mmol) was added at room temperature to a suspension of 7-(1-(5-bromopyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine (20.0 mg, 0.0360 mmol), $\text{MeB}(\text{OH})_2$ (6.0 mg, 0.108 mmol), and $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (23.0 mg, 0.0282 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (1 mL) and THF (1 mL). After stirring at 100 °C for 13.5 h, the reaction mixture was filtered off. The filtrate was diluted with AcOEt and washed water. The organic layer was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 1 : 2) to afford **59** (4.6 mg, 26% in 2 steps from **73**) as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.69 (1H, dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz), 1.75 (1H, dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz), 2.13 (3H, s), 2.22-2.30 (2H, m), 2.48 (3H, s), 3.03-3.12 (5H, m), 3.14-3.23 (2H, m), 3.38 (3H, t, $J = 8.8$ Hz), 4.72 (3H, t, $J = 8.8$ Hz), 4.81-4.89 (2H, m), 7.61 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.83 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 8.17 (2H, s), 8.70-8.73 (2H, m).

7-(1-(5-Ethylpyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine (76)

Compound **76** was prepared with 2-chloro-5-ethylpyrimidine in place of 2,5-dichloropyrimidine using an experimental procedure similar to that used for compound **3**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.20 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 1.69 (1H, dd, $J = 4.0, 12.0$ Hz), 1.76 (1H, dd, $J = 4.0, 12.0$ Hz), 2.23-2.30 (2H, m), 2.47 (2H, q, $J = 7.5$ Hz), 3.01-3.12 (2H, m), 3.06 (3H, s), 3.15-3.25 (1H, m), 3.38 (2H, t, $J = 8.8$ Hz), 4.72 (2H, t, $J = 8.5$ Hz), 4.83-4.91 (2H, m), 7.61 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 7.76-7.79 (1H, m), 7.83 (1H, dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz), 8.19 (2H, s), 8.70-8.73 (2H, m).

1-(2-(4-(4-(5-(Methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl)ethan-1-one (77)

Compound **77** was prepared with 1-(2-chloropyrimidin-5-yl)ethan-1-one in place of 2,5-dichloropyrimidine in the same way as compound **3**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.76 (1H, dd, *J* = 3.6, 12.4 Hz), 1.80 (1H, dd, *J* = 3.6, 12.4 Hz), 2.26-2.35 (2H, m), 2.48 (3H, s), 3.06 (3H, s), 3.13-3.30 (3H, m), 3.38 (3H, t, *J* = 8.8 Hz), 4.73 (3H, t, *J* = 8.8 Hz), 5.02-5.20 (2H, m), 7.62 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.83 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.72 (2H, t, *J* = 4.4), 8.45 (2H, s).

Synthesis of 1-(2-(4-(4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl)ethan-1-ol (78)

NaBH₄ (1.0 mg, 0.0264 mmol) was added at 0 °C to a stirred solution of **77** (8.0 mg, 0.0154 mmol) in MeOH (0.5 mL) and CH₂Cl₂ (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with 1N HCl and extracted with CHCl₃. The combine organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (CHCl₃ : MeOH = 20 : 1) to afford **78** (6.4 mg, 80%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.52 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.69 (1H, dd, *J* = 3.6, 12.4 Hz), 1.75 (1H, dd, *J* = 3.6, 12.4), 2.23-2.30 (2H, m), 3.03-3.15 (5H, m), 3.16-3.26 (1H, m), 3.38 (2H, t, *J* = 8.8 Hz), 4.81 (1H, q, *J* = 6.4 Hz), 4.88-4.96 (2H, m), 7.61 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.83 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.35 (2H, s), 8.70-8.78 (2H, m).

Synthesis of 2-(4-(4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)piperidin-1-yl)pyrimidin-5-ol (79)

N,N-diisopropylethylamine (122 μL, 0.700 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **73** (100 mg, 0.230 mmol) and 2-chloro-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyrimidine (84 mg, 0.350 mmol) in 2-propanol (4.6 mL). The reaction mixture was stirred at reflux for overnight. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to afford crude 4-(5-(methylsulfonyl)indo-

lin-1-yl)-7-(1-(5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine (181 mg). This crude was used for the next step without further purification.

H₂O₂ (26 μL, 0.257 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of 4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)-7-(1-(5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine (180 mg). The reaction mixture was stirred at room temperature for overnight. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with aqueous Na₂S₂O₃ and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1) to afford **79** (30.6 mg, 27% in 2 steps from **73**) as a brown solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.70-1.80 (2H, m), 2.21-2.28 (2H, m), 3.01-3.15 (5H, m), 3.38 (2H, t, $J = 10.0$ Hz), 3.64 (1H, s), 7.62 (1H, s), 7.78 (1H, s), 7.83 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 8.10 (2H, s), 8.70-8.73 (2H, m).

Synthesis of 7-(1-(5-methoxypyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine (80)

Iodomethane (10 mg, 0.070 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **79** (15 mg, 0.030 mmol) and K_2CO_3 (10 mg, 0.072 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water and extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (CHCl_3 : MeOH = 50 : 1) to afford **80** (2.5 mg, 16%) as a brown solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.70 (1H, dd, $J = 4.0, 12.4$ Hz), 1.77 (1H, dd, $J = 4.0, 12.4$ Hz), 2.20-2.30 (2H, m), 3.00-3.21 (6H, m), 3.38 (2H, t, $J = 8.8$ Hz), 3.81 (3H, s), 4.69-4.81 (4H, m), 7.72 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.83 (1H, dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz), 8.11 (2H, s), 8.70-8.74 (2H, m).

7-(1-(5-Fluoropyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)-4-(5-(methylsulfonyl)indolin-1-yl)furo[3,2-*d*]pyrimidine (81)

Compound **81** was prepared with 2-chloro-5-fluoropyrimidine in place of 2,5-dichloropyrimidine in the same way as compound **3**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.73 (1H, dd, $J = 3.6, 12.4$ Hz), 1.77 (2H, dd, $J = 3.6, 12.4$ Hz), 2.23-2.30 (2H, m), 3.06 (3H, s), 3.06-3.14 (2H, m), 3.15-3.22 (2H, m), 3.38 (2H, t, $J = 8.8$ Hz), 4.72 (2H, t, $J = 8.8$ Hz), 4.77-4.85 (2H, m), 7.61 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.83 (1H, dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz), 8.20 (2H, s), 8.69-8.73 (2H, m).

Molecular dynamics simulations

The General AMBER Force Field of ligand was calculated by using AMBER TOOLS 14. Molecular dynamics (MD) simulations were performed with the gromacs 5.1.1 as described below. The dodecahedron box type was selected as periodic boundary condition. And the box was filled by saline solution. The energy was minimized by using steepest descent minimization algorithm. NVT (constant Number of particles, Volume, and Temperature) equilibration was calculated 100ps at 310K. NPT (constant Number of particles, Pressure, and Temperature) equilibration was calculated 100ps at 310K. MD simulation was calculated 10ns at 310K. The dihedral angle of trajectory was calculated by using Visual Molecular Dynamics (VMD) 1.9.3.

Pharmacological Experimental Details

Luciferase reporter assays

The assay consists of CHO-K1 CRE-luciferase cells that stably express human GPR119 receptor plated at 20,000 cells/well in 80 μ L of Ham's F12 Nutrient Mixture and 0.1% fetal bovine serum in white 96-well assay plates. On the following day, 20 μ L of the test compound solutions were pipetted into the assay plates. The plates were then incubated for 4 h at 37 $^{\circ}$ C. According to the instruction of Bright-GloTM Luciferase Assay System (Promega), the amount of luciferase generated was quantified in a Centro LB960 luminometer. The efficacy (E_{max}) was defined as the relative ratio of the maximal response of the test compound to the response of AR231453 at 100 nM.

Oral glucose tolerance test (OGTT)

C57BL/6N mice were purchased 11-12 week-old. PET (80% PEG400, 10% EtOH, 10% Tween80TM) was used as a vehicle for administration. Mice were fasted overnight and then received orally administered vehicle or test compound 30 min before the oral glucose tolerance test. Glucose was given orally at 3 g/kg and blood samples were collected from the tail vein at -5, 15, 30, 60, and 120 min. The blood glucose level was measured using ANTSENSE III (HORIBA) and Medisafe (TERUMO), and the area under the curve (AUC) from -5 to 120 min was calculated as the indication.

Pharmacokinetic Experimental Details

Metabolic stability

Metabolic stability was assessed by substrate disappearance rate in incubation with human liver microsomes or mouse liver microsomes, and the clearance (μ L/min/mg protein) was calculated as the indication. The assay was performed by incubation of 0.1, 1 or 10 μ M test compound with the microsomes, NADPH and buffer at 37 $^{\circ}$ C for 0.5 h, and the sample was analyzed by LC-MS/MS with quantitation for a standard curve.

Pharmacokinetic studies

Compound **3** was administered to mice orally at a dose of 10 mg/kg in PET (80% PEG400, 10% EtOH, 10% Tween80TM) or intravenously via the tail vein at a dose 0.5 mg/kg in 75% DMSO. Blood samples were collected from the jugular vein periodically after dosage and immediately centrifuged to obtain the corresponding plasma fractions. The plasma was analyzed by LC-MS/MS with quantitation for a standard curve.

第 2 章に関する実験

Chemical Experimental Details

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4-(methylsulfonyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**96**)

Pd(PPh₃)₄ (19.4 mg, 0.0168 mmol) was at room temperature under an argon atmosphere to a stirred suspension of **7** (107 mg, 0.279 mmol), 4-(methylsulfonyl)phenylboronic acid (67.0 mg, 0.335 mmol) and Na₂CO₃ (522 mg, 4.92 mmol) in 1,2-dimethoxyethane (2 mL) and H₂O (2 mL). The reaction mixture was stirred at 90 °C for 18 h. After completing the reaction, the reaction mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 1 : 1) to afford **96** (59.0 mg, 46%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.52-1.64 (2H, m), 1.78-1.90 (4H, m), 2.87 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.09 (3H, s), 3.16-3.34 (2H, m), 3.77-4.00 (2H, m), 6.95 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.34 (1H, s), 7.38 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.4 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.96 (2H, d, *J* = 8.5 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4-(hydroxymethyl)phenyl)spiro[chroman-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**9**)

Na₂CO₃ (55.0 g, 520 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (2.40 g, 2.10 mmol) were added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of 4-(hydroxymethyl)phenylboronic acid (21.0 g, 140 mmol) and **7** (40.0 g, 100 mmol) in a mixture of 1,2-dimethoxyethane (500 mL) and water (500 mL). The reaction mixture was stirred at 90 °C for 18 h and then allowed to cool to room temperature. The reaction mixture was extracted with AcOEt (300 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude product was crystallized from AcOEt to give **9** (31.0 g, 72%) as a colorless, crystalline powder.

mp 173 °C; IR (KBr): 3462, 2942, 1679, 1488, 1432, 1366, 1234, 1165, 1149, 819;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.47 (9H, s), 1.54-1.67 (2H, m), 1.79-1.87 (4H, m), 2.84 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.14-3.36 (2H, m), 3.75-4.02 (2H, m), 4.69-4.75 (2H, br), 6.90 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.29 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.34 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz), 7.40 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.53 (2H, d, *J* = 8.0 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 26.7, 52.2, 119.2, 119.9, 126.9, 128.9, 129.2, 130.3, 131.1, 135.3, 144.3, 162.5, 166.8, 204.5; MS (EI) *m/z* 409 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₅H₃₁NO₄: C, 73.32; H, 7.63; N, 3.42. Found: C, 73.46; H, 7.69; N, 3.48.

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4-(bromomethyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**97**)

To a stirred solution of **9** (8.50 g, 20.8 mmol) in CH₂Cl₂ (250 mL), CBr₄ (10.3 g, 31.1 mmol) and PPh₃ (7.09 g, 27.0 mmol) were added at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (100 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with CHCl₃ (100

mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 5 : 1 to 3 : 1) to afford **97** (9.16 g, 93%) as a white solid.

The sample was recrystallized from hexane and AcOEt to yield colorless prisms for analysis.

mp 152-154 °C; IR (KBr): 2977, 1698, 1491, 1413, 1233, 1167, 1141, 1066 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.49-1.61 (2H, m), 1.77-1.87 (4H, m), 2.80-2.88 (2H, m), 3.16-3.32 (2H, m), 3.82-3.97 (2H, m), 4.53 (2H, s), 6.90 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.24-7.35 (2H, m), 7.41 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.49 (2H, d, *J* = 8.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.5, 28.4, 32.0, 33.5, 34.4, 39.5, 72.9, 79.4, 117.7, 121.5, 126.1, 126.9, 128.1, 129.4, 132.4, 135.9, 141.1, 153.1, 154.9; MS (EI) *m/z* 471 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₅H₃₀NO₃Br: C, 63.56; H, 6.40; N, 2.96. Found: C, 69.77; H, 6.39; N, 3.02.

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4-((methylsulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**5**)

NaSO₂Me (301 mg, 2.95 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of **93** (398 mg, 0.842 mmol) in dry DMSO (8 mL). The reaction mixture was stirred at 120 °C for 20 min. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water and extracted with AcOEt-hexane. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 1 : 1) to afford **5** (404 mg, >98%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.51-1.64 (2H, m), 1.80-1.86 (4H, m), 2.79 (2H, s), 2.85 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.16-3.34 (2H, m), 3.78-4.01 (2H, m), 4.27 (2H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.30 (1H, s), 7.34 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.4 Hz), 7.44 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.57 (2H, d, *J* = 8.0 Hz).

tert-Butyl 6-(3-((methylsulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**99**)

Compound **99** was prepared with 4,4,5,5-tetramethyl-2-(3-((methylthio)methyl)phenyl)-1,3,2-dioxaborolane in place of 4,4,5,5-tetramethyl-2-(3-((methylthio)methyl)phenyl)-1,3,2-dioxaborolane in the same way as compound **101**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.52-1.62 (2H, m), 1.78-1.88 (4H, m), 2.03 (3H, m), 2.85 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.16-3.34 (2H, m), 3.72 (2H, s), 3.76-4.00 (2H, m), 6.90 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.32-7.37 (2H, m), 7.42 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.47 (1H, s).

Synthesis of *tert*-butyl 7-(3-((methylsulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**101**)

Pd(PPh₃)₄ (23.2 mg, 0.0200 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred suspension of **91** (76.0 mg, 0.199 mmol), 4,4,5,5-tetramethyl-2-(3-((methylthio)methyl)phenyl)-1,3,2-dioxaborolane (58 mg, 0.220 mmol), and Na₂CO₃ (316 mg, 3.00 mmol) in 1,4-dioxane (2 mL) and H₂O (2 mL). The reaction mixture was stirred at 95 °C for 9 h. After completing the reaction, the reaction mixture was

quenched with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 3 : 1) to afford *tert*-butyl 7-(3-((methylthio)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**100**) (56.1 mg, 64%) as a pale yellow oil.

3-Chloroperoxybenzoic acid (contains ca. 30% water) (44.2 mg, 0.256 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of *tert*-butyl 7-(3-((methylthio)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (56.1 mg, 0.128 mmol) in CH₂Cl₂ (1.3 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 3 : 1) to afford **101** (20.6 mg, 34%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.53-1.60 (2H, m), 1.77-1.87 (4H, m), 2.02 (3H, m), 2.82 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 3.16-3.34 (2H, m), 3.73 (2H, s), 3.80-3.96 (2H, m), 7.06-7.15 (3H, m), 7.36 (1H, dd, *J* = 7.2-8.0 Hz), 7.46 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.51 (1H, s).

***tert*-Butyl 7-(4-((methylsulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (103)**

Compound **103** was prepared with 4,4,5,5-tetramethyl-2-(4-((methylthio)methyl)phenyl)-1,3,2-di-oxaborolane in place of 4,4,5,5-tetramethyl-2-(3-((methylthio)methyl)phenyl)-1,3,2-dioxaborolane in the same way as compound **101**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.54-1.60 (2H, m), 1.80-1.89 (4H, m), 2.03 (3H, s), 2.82 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.18-3.32 (2H, m), 3.71 (2H, s), 3.80-3.94 (2H, m), 7.08 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 7.09 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 7.11 (1H, s), 7.34 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.53 (2H, d, *J* = 8.0 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (104)

PdCl₂(PPh₃)₂ (0.23 g, 0.327 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred suspension of **7** (2.50 g, 6.54 mmol), bis(pinacolato)diboron (2.00 g, 7.85 mmol), and potassium acetate (1.93 g, 19.6 mmol) in 1,4-dioxane (33 mL). The reaction mixture was stirred at 90 °C for 12.5 h. After completing the reaction, the reaction mixture was filtered off. The filtrate was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 10 : 1 to 5 : 1) to afford **104** (2.02 g, 72%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.33 (12H, s), 1.46 (9H, s), 1.52-1.60 (2H, m), 1.75-1.84 (4H, m), 2.79 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.10-3.30 (2H, m), 3.74-3.98 (2H, m), 6.84 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.54-7.58 (2H, m).

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4-(2-(methylsulfonyl)ethyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (105)

Pd(PPh₃)₄ (6.7 mg, 0.00580 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred suspension of **104** (50.0 mg, 0.116 mmol), 1-bromo-4-(2-(methylsulfonyl)ethyl)benzene (36.8 mg, 0.139 mmol), and Na₂CO₃ (184 mg, 1.74 mmol) in 1,2-dimethoxyethane (2 mL) and H₂O (2 mL). The reaction mixture was stirred at 90 °C for 18 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 1 : 1) and then purified by preparative TLC (CHCl₃ : MeOH = 10 : 1) to afford **105** (34.9 mg, 62%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.44-1.60 (11H, m), 1.77-1.92 (4H, m), 2.80-2.90 (5H, m), 3.12-3.40 (6H, m), 3.75-4.05 (2H, m), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.23-7.36 (4H, m), 7.50 (2H, d, *J* = 8.4 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4-(acetylthio)methyl)phenyl spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (106)

To a stirred solution of **97** (1.00 g, 2.12 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL), potassium thioacetate (484 mg, 4.23 mmol) was added at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completing the reaction, the reaction mixture was diluted with water (100 mL) and extracted with AcOEt (30 mL x 3). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 5 : 1 to 3 : 1) to afford **106** (827 mg, 84%) as a pale yellow solid.

The sample was recrystallized from hexane and AcOEt to yield pale yellow prisms for analysis.

mp 118-119 °C; IR (KBr): 2940, 1694, 1679, 1491, 1423, 1236, 1152, 954 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.50-1.58 (2H, m), 1.78-1.87 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.80-2.86 (2H, m), 3.17-3.32 (2H, m), 3.79-3.98 (2H, m), 4.14 (2H, s), 6.89 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.24-7.34 (4H, m), 7.45 (2H, d, *J* = 8.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.5, 28.4, 30.3, 32.0, 33.2, 34.5, 39.4, 72.8, 79.4, 117.7, 121.4, 126.1, 126.8, 128.0, 129.1, 132.7, 135.8, 140.0, 152.9, 154.9, 195.1; MS (EI) *m/z* 467 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₇H₃₃NO₄S: C, 69.35; H, 7.11; N, 3.00. Found: C, 69.42; H, 7.17; N, 3.04.

***tert*-Butyl 6-(4-(isopropylsulfonyl)methyl)phenyl spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (107)**

To a stirred solution of **106** (30.0 mg, 0.0641 mmol) and 2-iodopropane (16.0 mg, 0.0941 mmol) in a mixed solvent containing THF (0.5 mL) and MeOH (0.5 mL), 6 N NaOH (0.5 mL, 3.0 mmol) was added at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16.5 h. After completing the reaction, the reaction mixture diluted with water and extracted with AcOEt. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (hexane : AcOEt = 3 : 1) to afford *tert*-butyl 6-(4-(isopropylthio)methyl)phenyl spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (17.0 mg, 57%) as a white solid.

3-Chloroperoxybenzoic acid (contains ca. 30% water) (19.7 mg, 0.0800 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of *tert*-butyl 6-(4-((isopropylthio)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-

1'-carboxylate (17.0 mg, 0.0364 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and extracted with CHCl₃. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (CHCl₃ : MeOH = 100 : 1) to afford **107** (13.5 mg, 75%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.39 (6H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.47 (9H, s), 1.50-1.61 (2H, m), 1.78-1.88 (4H, m), 2.85 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.16-3.32 (3H, m), 3.79-4.01 (2H, m), 4.24 (2H, s), 6.91 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.27-7.35 (2H, m), 7.45 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 8.3 Hz).

***tert*-Butyl 6-(4-((benzylsulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (108)**

Compound **108** was prepared with benzyl bromide in place of 2-iodopropane using an experimental procedure similar to that used for compound **107**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.43-1.62 (11H, m), 1.78-1.88 (4H, m), 2.85 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.16-3.34 (2H, m), 3.80-4.00 (2H, m), 4.11-4.18 (4H, m), 6.92 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.30 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.35 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.3 Hz), 7.37-7.44 (7H, m), 7.56 (2H, d, *J* = 8.0 Hz).

2-(((4-(1'-(*tert*-Butoxycarbonyl)spiro[chromane-2,4'-piperidin]-6-yl)benzyl)sulfonyl)methyl)benzoic acid (109)

Compound **109** was prepared with ethyl 2-(bromomethyl)benzoate in place of 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide in the same way as compound **107**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.51-1.60 (2H, m), 1.76-1.85 (4H, m), 2.80 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 3.14-3.34 (2H, m), 3.79-4.03 (2H, m), 4.26 (2H, s), 4.93 (2H, s), 6.87 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.31 (1H, *J* = 8.3 Hz), 7.40-7.60 (8H, m), 8.09 (1H, *J* = 7.8 Hz).

3-(((4-(1'-(*tert*-Butoxycarbonyl)spiro[chromane-2,4'-piperidin]-6-yl)benzyl)sulfonyl)methyl)benzoic acid (106)

Compound **110** was prepared with methyl 3-(bromomethyl)benzoate in place of 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide in the same way as compound **107**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.54-1.61 (2H, m), 1.79-1.89 (4H, m), 2.85 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 3.19-3.32 (2H, m), 3.81-4.00 (2H, m), 4.21 (2H, s), 4.21 (2H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.31 (1H, s), 7.35 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.51-7.59 (3H, m), 7.69 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 8.09 (1H, s), 8.14 (1H, d, *J* = 7.8 Hz).

4-(((4-(1'-(*tert*-Butoxycarbonyl)spiro[chromane-2,4'-piperidin]-6-yl)benzyl)sulfonyl)methyl)benzoic acid (**107**)

Compound **111** was prepared with methyl 4-(bromomethyl)benzoate in place of 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide in the same way as compound **107**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (9H, s), 1.54-1.58 (2H, m), 1.80-1.87 (4H, m), 2.86 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.19-3.32 (2H, m), 3.82-3.96 (2H, m), 4.21 (2H, s), 4.21 (2H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.29-7.32 (1H, m), 7.35 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.5 Hz), 7.42 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.50 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.58 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.14 (2H, d, *J* = 8.3 Hz).

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**112**)

To a stirred solution of **97** (3.00 g, 6.41 mmol) and 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide (3.24 g, 12.8 mmol) in a mixed solvent containing THF (6.4 mL) and MeOH (6.4 mL), 6 N NaOH (4.27 mL, 25.6 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completing the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in water (50 mL) and extracted with CHCl₃ (75 mL x 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 3 : 1 to 1 : 1) to afford *tert*-butyl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)thio)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (2.47 g, 75%) as a white solid. IR (KBr): 2929, 1681, 1488, 1413, 1365, 1234, 1168, 1151 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.50-1.58 (2H, m), 1.82-1.84 (4H, m), 2.80-2.87 (2H, m), 3.20-3.28 (2H, m), 3.72 (2H, s), 3.78 (2H, s), 3.84-3.95 (2H, m), 6.89 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.13-7.16 (1H, m), 7.26-7.28 (1H, m), 7.30-7.33 (2H, m), 7.33 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.46 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.62 (1H, td, *J* = 2.0, 7.8 Hz), 8.55 (1H, d, *J* = 4.9 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.5, 28.4, 32.0, 34.4, 35.6, 37.5, 39.2, 72.8, 79.3, 117.6, 121.3, 121.8, 123.0, 126.0, 126.6, 128.0, 129.3, 132.8, 136.3, 136.5, 139.6, 149.2, 152.8, 154.8, 158.6; MS (EI) *m/z* 516 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₃₁H₃₆N₂O₃S: C, 72.06; H, 7.02; N, 5.42. Found: C, 72.10; H, 7.05; N, 5.41.

To a stirred solution of *tert*-butyl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)thio)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (2.10 g, 4.06 mmol) and Na₂WO₄·2H₂O (135 mg, 0.410 mmol) in 2-propanol (8 mL), 30% H₂O₂ (1.00 mL, 10.2 mmol) was added at 50 °C. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 1.5 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (50 mL) and extracted with CHCl₃ (50 mL x 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃ : MeOH = 1 : 0 to 20 : 1) to afford **112** (2.05 g, 93%) as a white solid.

The sample was recrystallized from hexane and AcOEt to yield colorless prisms for analysis.

mp 150-151 °C; IR (KBr): 2922, 1699, 1489, 1319, 1233, 1170, 1139, 1117 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (9H, s), 1.50-1.60 (2H, m), 1.79-1.87 (4H, m), 2.81-2.87 (2H, m), 3.19-3.31 (2H, m), 3.83-3.95 (2H,

m), 4.34 (4H, s), 6.90 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.25-7.36 (3H, m), 7.47 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.55 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.72-7.78 (1H, m), 8.68 (1H, d, $J = 4.9$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.8, 28.7, 32.2, 34.7, 39.6, 58.2, 59.5, 73.2, 79.7, 118.0, 121.8, 123.8, 126.2, 126.4, 126.4, 127.3, 128.4, 131.8, 132.6, 137.5, 141.9, 150.0, 150.1, 153.4, 155.2; MS (EI) m/z 548 [M^+]; Anal. Calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C, 67.86; H, 6.61; N, 5.11. Found: C, 67.79; H, 6.52; N, 5.12.

***tert*-Butyl 6-(4-(((pyridin-3-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (113)**

Compound **113** was prepared with 3-(bromomethyl)pyridine hydrobromide in place of 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide in the same way as compound **112**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.42-1.68 (11H, m), 1.78-1.90 (4H, m), 2.86 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 3.15-3.35 (2H, m), 3.78-4.01 (2H, m), 4.13 (2H, s), 4.22 (2H, s), 6.92 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.29-7.48 (5H, m), 7.58 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.81 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.55 (1H, $J = 2.0$ Hz), 8.65 (1H, d, $J = 1.4, 4.9$ Hz).

***tert*-Butyl 6-(4-(((pyridin-4-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (114)**

Compound **114** was prepared with 4-(chloromethyl)pyridine hydrochloride in place of 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide in the same way as compound **112**.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.42-1.68 (11H, m), 1.78-1.89 (4H, m), 2.86 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.16-3.34 (2H, m), 3.80-4.00 (2H, m), 4.11 (2H, s), 4.22 (2H, s), 6.93 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.28-7.43 (6H, m), 7.58 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 8.60-8.70 (2H, m).

Synthesis of 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine] (17)

4 N HCl in AcOEt (10.0 mL, 40.0 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **112** (1.17 g, 2.24 mmol) in MeOH (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. After completing the reaction, the precipitate was filtered to afford the hydrochloride of **17** as a white solid. 6 N HCl (20 mL) was added to a stirred suspension containing the hydrochloride of **17** in CHCl_3 (100 mL). The organic layer was extracted with 6 N HCl (10 mL). The combined aqueous layers were adjusted to a pH of 8 with 6 N NaOH (30 mL). The aqueous layers were extracted with CHCl_3 (50 mL x 2). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo* to afford **17** (795 mg) as an orange solid. The crude product was used for the next reaction without further purification.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.53-1.61 (2H, m), 1.78-1.89 (4H, m), 2.81-2.88 (4H, m), 3.02-3.13 (2H, m), 3.72 (2H, s), 3.78 (2H, s), 6.90 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.14-7.18 (1H, m), 7.24-7.37 (5H, m), 7.46 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.63 (1H, td, $J = 1.8, 7.7$ Hz), 8.55 (1H, d, $J = 4.9$ Hz)

1'-(5-Chloropyrimidin-2-yl)-6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine] (121)

Compound **121** was prepared with compound **17** in place of compound **73** in the same way as compound **3**.
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.51-1.65 (2H, m), 1.82-1.98 (6H, m), 2.87 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 3.41-3.51 (2H, m), 4.35 (2H, s), 4.35 (2H, s), 4.40-4.50 (2H, m), 6.94 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.30-7.36 (3H, m), 7.48 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.54-7.64 (4H, m), 7.76 (1H, dt, *J* = 1.8, 7.8 Hz), 8.22 (2H, s), 8.66-8.71 (1H, m).

Ethyl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (122)

Compound **122** was prepared with compound **17** in place of compound **73** and ethyl chloroformate in place of 2,5-dichloropyrimidine using an experimental procedure similar to that used for compound **3**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.27 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.51-1.63 (2H, m), 1.82-1.92 (4H, m), 2.85 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.22-3.38 (2H, m), 3.85-4.06 (2H, m), 4.15 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 4.35 (2H, s), 4.35 (2H, s), 6.91 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.28-7.40 (3H, m), 7.49 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.60 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.76 (1H, td, *J* = 1.6, 7.8 Hz), 8.69 (1H, d, *J* = 4.4 Hz).

Isopropyl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (123)

Compound **123** was prepared with compound **17** in place of compound **73** and isopropyl chloroformate in place of 2,5-dichloropyrimidine in the same way as compound **3**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.53-1.56 (2H, m), 1.79-1.90 (4H, m), 2.85 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.21-3.36 (2H, m), 3.86-4.00 (2H, m), 4.34 (2H, s), 4.34 (2H, s), 4.86-4.97 (1H, m), 6.91 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.29-7.40 (3H, m), 7.48 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.59 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.76 (1H, td, *J* = 1.8, 7.8 Hz), 8.68 (1H, d, *J* = 3.9 Hz).

1,1,1-Trifluoro-2-methylpropan-2-yl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (124)

Compound **124** was prepared with 1,1,1-trifluoro-2-methylpropan-2-yl 1*H*-imidazole-1-carboxylate in place of (*R*)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl 1*H*-imidazole-1-carboxylate in the same way as (*R*)-**K-23217**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53-1.56 (2H, m), 1.70 (6H, s), 1.83-1.94 (4H, m), 2.86 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.19-3.41 (2H, m), 3.79-3.99 (2H, m), 4.35 (2H, s), 4.35 (2H, s), 6.91 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.28-7.31 (1H, m), 7.31-7.38 (2H, m), 7.49 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.60 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.77 (1H, td, *J* = 1.8, 7.7 Hz), 8.69 (1H, d, *J* = 4.4 Hz).

2,2,2-Trifluoroethyl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (125)

Compound **125** was prepared with 2,2,2-trifluoroethanol in place of 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol in the same way as compound **126**.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.55-1.58 (2H, m), 1.82-1.95 (4H, m), 2.86 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 3.26-3.43 (2H, m), 3.91-4.06 (2H, m), 4.35 (2H, s), 4.35 (2H, s), 4.44-4.56 (2H, m), 6.92 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.28-7.38 (3H, m), 7.49 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.60 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.77 (1H, td, *J* = 2.0, 7.8 Hz), 8.69 (1H, d, *J* = 3.9 Hz).

Synthesis of (R)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate ((R)-K-23217)

(R)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl 1*H*-imidazole-1-carboxylate (553 mg, 2.66 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of **17** (795 mg) and *N,N*-diisopropylethylamine (457 mg, 3.54 mmol) in dry *N,N*-dimethylformamide (3.5 mL). The reaction mixture was stirred at 80 °C for 30 min. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water (100 mL). The mixture was extracted with AcOEt : toluene = 2 : 1 (50 mL). The organic layer was washed with water (100 mL) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃ : AcOEt = 1 : 0 to 4 : 1) to yield (R)-K-23217 (840 mg, 64% in 2 steps from **112**) as a white solid.

mp 127-129 °C; IR (KBr): 2923, 1710, 1588, 1489, 1435, 1319, 1232, 1117 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.41 (3H, d, *J* = 6.3 Hz), 1.50-1.69 (2H, m), 1.77-1.90 (4H, m), 2.77-2.85 (2H, m), 3.22-3.41 (2H, m), 3.85-4.03 (2H, m), 4.33 (4H, s), 5.25-5.31 (1H, m), 6.90 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.25-7.30 (2H, m), 7.32 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.44 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.53 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.57 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.66-7.73 (1H, m), 8.65 (1H, d, *J* = 4.9 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 13.6, 21.2, 31.7, 33.7, 34.2, 39.5, 39.7, 57.7, 59.0, 67.6, 72.4, 76.7, 117.5, 121.2, 123.3, 125.9, 126.0, 126.7, 128.0, 131.4, 132.2, 136.9, 141.2, 149.5, 149.6, 152.7, 153.1; MS (EI) *m/z* 588 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₃₀H₃₁N₂F₃O₅S: C, 61.21; H, 5.31; N, 4.76. Found: C, 69.21; H, 5.30; N, 4.91; [α]_D²⁶ +0.3 (c 1.0, CHCl₃).

1,1,1,3,3,3-Hexafluoropropan-2-yl 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (126)

N,N-diisopropylethylamine (240 μL, 0.340 mmol) was added at 0°C under an argon atmosphere to a stirred solution of 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (70 mg, 0.401 mmol) and triphosgene (40 mg, 0.134 mmol) in dry CH₂Cl₂. The reaction mixture was stirred at 0°C. **17** (120 mg, 0.268 mmol) was added at 0°C under an argon atmosphere to the resulting mixture. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel to afford **123** (81 mg, 47% in 2 steps from **112**) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.64-1.66 (2H, m), 1.87 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 1.90-1.98 (2H, m), 2.87 (2H, t, *J*

= 6.8 Hz), 3.35-3.49 (2H, m), 3.94-4.07 (2H, m), 4.35 (2H, s), 4.35 (2H, s), 5.75-5.81 (1H, m), 6.92 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.29-7.39 (3H, m), 7.49 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.56 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.60 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.77 (1H, td, $J = 1.8, 7.7$ Hz), 8.69 (1H, d, $J = 4.4$ Hz).

Quantum mechanics

The ligand conformation was minimized by using MacroModel 11.7 with OPLS3 (Optimized Potentials for Liquid Simulations) molecular force field. The quantum mechanics calculation was conducted by Jaguar 9.7 based on the density functional theory (B3LYP/6-31G**). The electro-static potential (ESP) fitting method is used for determining an effective charge of each atom. Both Jaguar and MacroModel were applied under license from Schrödinger, Inc.

Pharmacokinetic Experimental Details

Pharmacokinetic studies

Test compounds (**5**, **108**, and **112**) were administered to mice orally at a dose of 10 mg/kg in vehicle (0.5% MC and 1% Tween80TM). Blood samples were collected the jugular vein at periodically after dosage and immediately centrifuged to obtain the corresponding plasma fractions. The plasma was analyzed by LC-MS/MS with quantitation for a standard curve.

Pharmacological Experimental Details

Oral glucose tolerance test (OGTT)

C57BL/6N mice were purchased 11-12 week-old. 0.5% MC and 1% Tween80TM was used as a vehicle for administration. Mice were fasted overnight and then received orally administrated vehicle or test compound 30 min before the oral glucose tolerance test. Glucose was given orally at 3 g/kg and blood samples were collected from the tail vein at -5, 15, 30, 60, and 120 min. the blood glucose level was measured using ANTSENSE III (HORIBA) and Medisafe (TERUMO), and the area under the curve (AUC) from -5 to 120 min was calculated as the indication.

第 3 章に関する実験

Chemical Experimental Details

Synthesis of methyl 3'-acetyl-4'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylate (**138**)

Acetyl chloride (1.1 mL, 14.8 mmol) was added at 0 °C under an argon atmosphere to a stirred suspension of AlCl₃ (3.94 g, 29.6 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (15 mL). After stirring for 30 min, **137** (1.79 g, 7.39 mmol) was added to this mixture dropwise. The resulting mixture was stirred at 70 °C for 1 h. After completing the reaction, the reaction mixture was added water and then diluted with AcOEt. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt) to give **138** (1.99 g, >98%) as a white solid.

A sample was crystallized from CHCl₃ and hexane to give colorless prisms for analysis.

mp 150-152 °C; IR (KBr): 3017, 1709, 1641, 1606, 1520, 1433, 1304, 1288, 1216, 1109;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.74 (3H, s), 3.97 (3H, s), 7.11 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.63 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz), 7.98 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.14 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 12.36 (1H, s); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 26.7, 52.2, 119.2, 119.9, 126.9, 128.9, 129.2, 130.3, 131.1, 135.3, 144.3, 162.5, 166.8, 204.5; MS (EI) *m/z* 270 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₄O₄: C, 71.10; H, 5.22. Found: C, 71.12; H, 5.29.

Synthesis of *tert*-butyl 6-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)-4-oxospiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**12**)

At room temperature, **138** (74.8 g, 277 mmol) was added to a stirred solution of *tert*-butyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate (**127**) (55.2 g, 277 mmol) and pyrrolidine (11.4 mL, 138 mmol) in MeOH (277 mL). The reaction mixture was stirred at reflux temperature for 12 h. After completing the reaction, the reaction mixture was cooled to 0 °C. The precipitate was filtered off and washed with cold MeOH to give **12** (107.8 g, 86%) as a yellow solid. A sample was crystallized from AcOEt and hexane to give yellow prisms for analysis.

mp 159-160 °C; IR (KBr): 1722, 1688, 1607, 1433, 1397, 1303, 1249, 1147, 1115, 770;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.49 (9H, s), 1.63-1.71 (2H, m), 2.04-2.12 (2H, br m), 2.79 (2H, s), 3.22-3.34 (2H, br m), 3.96 (5H, s), 7.12 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.67 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.81 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz), 8.14 (3H, dd, *J* = 18.3, 5.1 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 28.3, 33.9, 39.1, 47.9, 52.0, 78.2, 79.8, 119.0, 120.1, 125.0, 126.4, 128.9, 130.1, 133.9, 134.9, 143.8, 154.6, 158.9, 166.7, 191.2; MS (EI) *m/z* 451 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₆H₂₉NO₆: C, 69.16; H, 6.47; N, 3.10. Found: C, 69.24; H, 6.53; N, 3.06.

Synthesis of *tert*-butyl 4-hydroxy-6-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**140**)

NaBH₄ (4.40 g, 116 mmol) was added dropwise at 0 °C to a stirred solution of **12** (52.6 g, 116 mmol) in a mixture of MeOH (50 mL) and THF (200 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1

h. After completing the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in AcOEt (300 mL) and quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (100 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (100 mL). The combined organic layers were washed with brine (40 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in AcOEt (50 mL) and diluted with hexane (150 mL). The precipitate was filtered off and washed with hexane to give **140** (48.9 g, 93%) as a white solid. A sample was crystallized from AcOEt and hexane to give colorless prisms for analysis. mp 168-170 °C; IR (KBr): 3476, 2957, 1713, 1674, 1607, 1488, 1427, 1284, 1236, 1170; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.47 (9H, s), 1.63-2.00 (5H, m), 2.20 (1H, dd, *J* = 13.4, 6.1 Hz), 3.12-3.34 (2H, m), 3.86-3.94 (2H, m), 3.94 (3H, s), 4.99-4.92 (1H, m), 6.96 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.50 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz), 7.63 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.74 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.08 (2H, d, *J* = 8.3 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 28.4, 33.7, 35.9, 41.8, 52.1, 62.8, 74.2, 79.6, 117.9, 125.1, 126.4, 126.9, 128.2, 128.3, 130.1, 132.5, 145.1, 152.8, 154.8, 167.1; MS (EI) *m/z* 453 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₆H₃₁NO₆: C, 68.86; H, 6.89; N, 3.09. Found: C, 68.91; H, 6.94; N, 3.07.

Synthesis of methyl 4-(spiro[chromane-2,4'-piperidin]-6-yl)benzoate (**13**) (表 3-3, Entry 1)

2,2,2-Trifluoroacetic acid (441 mL) and subsequently Et₃SiH (75.0 mL, 470 mmol) were added at 0 °C to a stirred solution of **140** (20.0 g, 44.1 mmol) in CH₂Cl₂ (66 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After completing the reaction, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in AcOEt (50 mL) and diluted with hexane (50 mL). The precipitate was filtered off to give the 2,2,2-trifluoroacetic acid salt of **13** (19.3 g) as a white solid. A saturated aqueous solution of NaHCO₃ (300 mL) was added to a stirred suspension of the 2,2,2-trifluoroacetic acid salt in MeOH (200 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. MeOH was evaporated from the reaction solvent under reduced pressure. The precipitate was filtered off and washed with THF (60 mL) and hexane (60 mL) to give **13** (14.4 g, 96%) as a white solid.

A sample was recrystallized from CHCl₃ and hexane to give a colorless, crystalline powder for analysis.

mp 148-149 °C; IR (KBr): 3340, 2934, 1711, 1605, 1486, 1436, 1284, 1245, 1184, 1110;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.52-1.62 (2H, m), 1.78-1.87 (4H, m), 2.93-2.78 (4H, m), 3.06 (2H, t, *J* = 10.5 Hz), 3.92 (3H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.33 (1H, s), 7.37 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.59 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.05 (2H, d, *J* = 8.3 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 21.1, 31.7, 35.3, 41.6, 51.6, 73.1, 117.5, 121.4, 125.8, 125.9, 127.6, 127.9, 129.6, 131.1, 145.0, 153.5, 166.7; MS (EI) *m/z* 337 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₁H₂₃NO₃: C, 74.75; H, 6.87; N, 4.15. Found: C, 74.77; H, 6.92; N, 4.19.

Hydrogenolysis of **140** (表 3-3, Entry 2)

Under an argon atmosphere, 5% Pd-C (60 mg) was added to a solution of **140** (200 mg, 0.442 mmol) in AcOH (3 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h and heated at 60 °C for 15 h and at 80 °C for 9 h under a hydrogen atmosphere. After completing the reaction, 4 N HCl in AcOEt (9 mL) was

added to the reaction mixture. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. MeOH (10 mL) was added to this mixture to dissolve the precipitate that appeared. The insoluble material (Pd-C) from the reaction mixture was filtered off. The filtrate was concentrated *in vacuo* and diluted with AcOEt (30 mL). The organic solution was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL) and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (20% sat. NH₃/MeOH in CHCl₃) to give **13** (141 mg, 95%) as a white solid.

Clemmensen reduction (表 3-3, Entry 3)

Zinc powder (3.60 g, 552 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of **140** (1.00 g, 22.1 mmol) in AcOH (10 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 5 h. After completing the reaction, the insoluble material was filtered off and washed with a mixed solvent of THF and MeOH (40 mL/10 mL). To cleave the *N*-Boc group, 4 N HCl in AcOEt (20 mL) was added at room temperature to the filtrate. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in CHCl₃ (100 mL). The organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL) and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (20% sat. NH₃/MeOH-CHCl₃) to give an inseparable mixture of **13** and **141** (517 mg) as a white solid. The yield of **13** and **141** were calculated on the basis of ¹H NMR analysis to show 64% and 4%, respectively.

Synthesis of methyl 4-(spiro[chromene-2,4'-piperidin]-6-yl)benzoate (141)

The authentic sample **141** was synthesized after mesylation of **140** and elimination under basic conditions. mp 144-145 °C; IR (KBr): 3351, 2940, 2809, 1705, 1604, 1488, 1429, 1292, 1180, 1106; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.55-1.68 (2H, m), 1.90-2.03 (2H, m), 2.78-2.87 (2H, m), 3.04-3.14 (2H, m), 3.90 (3H, s), 5.65 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 6.39 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.22 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.36 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.04 (2H, d, *J* = 8.0 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 36.3, 41.5, 51.8, 75.5, 116.7, 122.0, 122.7, 124.9, 126.1, 127.7, 128.0, 129.8, 130.2, 132.4, 144.8, 152.7, 166.7; MS (EI) *m/z* 309 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₁H₂₁NO₃: C, 75.20; H, 6.31; N, 4.18. Found: C, 75.16; H, 6.38; N, 4.05.

Reduction of 12 by Me₂NH·BH₃ and TiCl₄ (表 3-3, Entry 7)

A solution of **12** (10.0 g, 22.1 mmol) in dry CH₂Cl₂ (70 mL) was added dropwise at 0 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of TiCl₄ in dry CH₂Cl₂ (1.0 M solution, 26.5 mL) and Me₂NH·BH₃ (1.60 g, 26.5 mmol) in dry CH₂Cl₂ (30 mL). After stirring at this temperature for 30 min, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and was stirred for 3 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with H₂O (100 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred overnight at room

temperature. The precipitate was filtered off to give a mixture of **13** and **142** as hydrochloride salts (7.54 g). The yield of **13** and **142** were calculated on the basis of ¹H NMR analysis to show 83% and 8%, respectively.

Reduction of **12** by Me₂NH·BH₃ and TiCl₄ (表 3-3, Entry 8)

This procedure was the same as that in Entry 6 except for the reaction temperature at -20 °C. The ratio of each compound of hydrochloride salts (**13**:**142** = 50:1) was determined by ¹H NMR analysis. A mixture of products was crystallized from MeOH to give the hydrochloride salt of **13** (6.54 g, 79%)

Synthesis of (4-(spiro[chromene-2,4'-piperidin]-6-yl)phenyl)methanol (**14**)

NaBH₄ (1.52 g, 40.0 mmol) at 0 °C under an argon atmosphere was added to a stirred solution of **13**·HCl (6.00 g, 16.0 mmol) in dry pyridine (100 mL). The stirring reaction mixture was allowed to warm to room temperature and heated at 100 °C for 14 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with MeOH (50 mL) at 0 °C and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in CHCl₃ (200 mL) and H₂O (200 mL). The aqueous layer was extracted with CHCl₃ (200 mL x 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in MeOH (20 mL) and AcOEt (80 mL). At 0 °C, 4 N HCl in AcOEt (20 mL) was added to this solution. The resulting mixture was stirred at 0 °C for 30 min and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in CHCl₃ (200 mL). The organic layer was washed with 1N NaOH (30 mL), and the aqueous layer was extracted with CHCl₃ (200 mL x 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The solid product was crystallized from THF (100 mL) and hexane (50 mL) to give **14** (2.88 g, 58%) as a colorless, crystalline powder. The mother liquid was concentrated *in vacuo* and crystallized from THF (40 mL) and hexane (15 mL) to give **2** (0.83 g, 17%) as a colorless, crystalline powder.

A sample was recrystallized from THF to give a colorless needle for analysis.

mp 190-191 °C; IR (KBr): 3260, 3066, 2924, 1490, 1250, 1160, 1142, 1036, 972, 841;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.61-1.72 (2H, m), 1.81-1.90 (4H, m), 2.71-2.96 (4H, m), 3.08 (2H, t, *J* = 11.7 Hz), 4.62 (2H, s), 6.82-6.88 (1H, m), 7.32-7.39 (4H, m), 7.53 (2H, d, *J* = 8.3 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 20.9, 31.8, 34.4, 40.9, 63.6, 72.8, 117.2, 121.6, 125.4, 126.0, 127.1, 127.5, 132.7, 139.4, 139.9, 152.8; MS (EI) *m/z* 309 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₀H₂₃NO₂: C, 77.64; H, 7.49; N, 4.53. Found: C, 77.46; H, 7.55; N, 4.54.

Synthesis of 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)thio)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine] (16) (表 3-7, Entry 7)

ADDP (163 mg, 0.646 mmol) was added at 0 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of **14** (100 mg, 0.323 mmol), pyridin-2-ylmethanethiol (**15**) (61.0 mg, 0.487 mmol) and PBU₃ (195 mg, 0.962 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3.2 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min. After completing the reaction, the hexane-THF solution (1 : 4) was added to the mixture. The insoluble material in the reaction mixture was removed by filtration. The filtrate was concentrated *in vacuo* and diluted with CHCl₃ (30 mL). The organic layer was extracted with 6 N HCl (20 mL). 6 N NaOH (20 mL) was added to the aqueous layer to adjust the pH to 8. The aqueous layer was extracted with AcOEt (20 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (CHCl₃ : 8 M NH₃ in MeOH = 20 : 1) to afford **16** (100 mg, 75%) as an orange solid.

Synthesis of 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)thio)methyl)phenyl)spiro [chromane-2,4'-piperidine] (16) (表 3-8, Entry 3)

Bromine (1.06 g, 6.46 mmol) was added at -20 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of PPh₃ (1.69 g, 6.46 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL). The reaction mixture was stirred at -20 °C for 20 min. NaH (619 mg, 12.9 mmol) and CF₃CH₂OH (1.29 g, 12.9 mmol) were added at 0 °C under an argon atmosphere to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min. The solution was used for the next reaction without further purification. The prepared PPh₃(OCH₂CF₃)₂ in CH₂Cl₂ was added at 0 °C under an argon atmosphere to a stirred solution of **14** (1.00 g, 3.23 mmol) and pyridin-2-ylmethanethiol (**15**) (606 mg, 4.84 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water (10 mL). The mixture was extracted with 3 N HCl (50 mL). The aqueous layer was washed with CHCl₃ (50 mL x 2). The aqueous layer was adjusted to a pH of 8 with 6 N NaOH (20 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (100 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃ : 8 M NH₃ in MeOH = 99 : 1 to 9 : 1) to afford **16** (1.35 g, >98%) as an orange solid.

The sample was recrystallized from hexane and AcOEt to yield colorless needles for analysis.

mp 91-92 °C; IR (KBr): 3452, 3294, 2964, 1484, 1244, 1138, 966, 827 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53-1.61 (2H, m), 1.78-1.89 (4H, m), 2.81-2.88 (4H, m), 3.02-3.13 (2H, m), 3.72 (2H, s), 3.78 (2H, s), 6.90 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.14-7.18 (1H, m), 7.24-7.37 (5H, m), 7.46 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.63 (1H, td, *J* = 1.8, 7.7 Hz), 8.55 (1H, d, *J* = 4.9 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.5, 32.2, 35.6, 35.7, 37.5, 42.1, 73.3, 117.7, 121.6, 121.8, 123.1, 126.0, 126.7, 128.0, 129.3, 132.6, 136.2, 136.6, 139.8, 149.3, 153.1, 158.7; MS (EI) *m/z* 416 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₆H₂₈N₂OS: C, 74.96; H, 6.77; N, 6.72. Found: C, 74.87; H, 6.87; N, 6.74.

Synthesis of 6-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine] (**17**)

Oxone® (1.81 g, 58.0 mmol) was added at 0 °C to a stirred solution of **16** (1.15 g, 27.6 mmol) in MeOH (24 mL) and 6 N HCl (4 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with water (80 mL), 6 N NaOH (5 mL) and 1 M Na₂S₂O₃ (20 mL). The solvent was removed under reduced pressure and extracted with CHCl₃ (100 mL x 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃ : 8 M NH₃ in MeOH = 1 : 0 to 9 : 1) to afford **17** (1.06 g, 86%) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.54-1.61 (2H, m), 1.79-1.89 (4H, m), 2.80-2.92 (4H, m), 3.03-3.12 (2H, m), 4.34 (4H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.25-7.36 (3H, m), 7.48 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.79-7.72 (1H, m), 8.68 (1H, d, *J* = 4.9 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.5, 32.2, 35.7, 42.0, 58.0, 59.2, 73.4, 117.7, 121.7, 123.5, 125.8, 126.0, 126.2, 127.0, 128.1, 131.5, 132.1, 137.2, 141.7, 149.7, 149.8, 153.4.

The hydrogen carbonate salt of **17** was easily formed during manipulation. The sample was recrystallized from MeOH to yield a colorless prism for analysis.

mp 260-261 °C; IR (KBr): 3311, 2933, 2716, 1588, 1489, 1307, 1454, 1118 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.91-1.97 (2H, m), 2.03-2.17 (4H, m), 2.84-2.89 (2H, m), 3.35-3.44 (4H, m), 4.36 (4H, s), 6.91 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.29-7.38 (3H, m), 7.49 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.60 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.77 (1H, td, *J* = 1.8, 7.7 Hz), 8.69 (1H, d, *J* = 3.6 Hz), 9.65 (2H, br); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.0, 31.0, 31.5, 39.6, 57.8, 59.1, 70.7, 117.6, 121.0, 123.4, 126.0, 126.1, 126.3, 126.9, 128.2, 131.5, 133.0, 137.1, 141.1, 149.5, 149.7, 152.0; MS (FD) *m/z* 448 [M⁺]; Anal. Calcd. for C₂₆H₂₈N₂O₃S·H₂CO₃: C, 63.51; H, 5.92; N, 5.49. Found: C, 63.77; H, 6.09; N, 5.72.

Synthesis of (*R*)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl-6-(4-(((pyridine-2-ylmethyl)sulfonyl)methyl)phenyl)spiro[chromane-2,4'-piperidine]-1'-carboxylate ((*R*)-**K-23217**)

(*R*)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl 1*H*-imidazole-1-carboxylate (974 mg, 4.68 mmol) was added at room temperature under an argon atmosphere to a stirred solution of **17**·H₂CO₃ (1.05 g, 2.06 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (907 mg, 7.02 mmol) in dry *N,N*-dimethylformamide (10 mL). The reaction mixture was stirred at 80 °C for 1 h. After completing the reaction, the reaction mixture was quenched with brine (20 mL). The mixture was extracted with AcOEt (50 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine (50 mL x 2), dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : AcOEt = 7 : 3 to 3 : 7) to afford (*R*)-**K-23217** (1.20 g, >98%) as a white solid.

謝辞

本論文の提出に際し、終始御懇篤なる御指導を賜りました千葉大学大学院 教授 根本 哲宏 博士に深謝申し上げます。さらに、本論文の審査にあたり、御指導を賜りました千葉大学大学院 教授 高山 廣光 博士、教授 西田 篤司 博士、教授 石橋 正己 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さり、多くの御助言および御指導を賜りました興和株式会社 代表取締役専務執行役員 医薬事業部長 田辺 宗平 博士、興和株式会社 東京創薬研究所 所長 水野 憲 博士に深謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大な御指導を頂きました興和株式会社 執行役員 メディシナル化学研究部 主席研究員 扇谷 忠明 博士に深謝申し上げます。

本研究の論文作成にあたり御指導ならびに御鞭撻を賜りました 元 興和株式会社 東京創薬研究所 メディシナル化学研究部 部長 渋谷 公幸 博士、興和株式会社 **Kowa Science Institutes** 研究管理部門長兼代謝性疾患グループ長 山崎 行由 博士、元 興和株式会社 東京創薬研究所 プロセス化学研究部 主席研究員 石渡 博之 博士、興和株式会社 東京創薬研究所 プロセス化学研究部 主任研究員 谷川 慎 博士に深謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大な御協力を頂きました興和株式会社 東京創薬研究所 森元 俊晴 博士、渡部 玄 博士、渡部 敏明 博士、福田 友昭 氏、細井 勇人 博士、奥田 歩 博士ならびに精力的に生物評価を遂行されました興和株式会社 東京創薬研究所 山崎 奈穂 博士、沢田 義一 博士、萩田 澄彦 博士、その他本研究に携わった全ての担当者の皆様に心より感謝申し上げます。

また、多大な御理解と温かい御協力をくださいました興和株式会社 東京創薬研究所 メディシナル化学研究部ならびにプロセス化学研究部の皆様に深くお礼申し上げます。

最後に、様々な面において御理解、御支援くださいました妻をはじめ家族一同に感謝致します。

2019 年 3 月

越澤 智章

主要論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Koshizawa, T.; Hosoi, H.; Watanabe, G.; Morimoto, T.; Ohgiya, T.; Shibuya, K.: A Practical Synthesis of (4-(Spiro[chromane-2,4'-piperidin]-6-yl)phenyl)methanol as a Key Intermediate of Novel GPR119 Agonist. *Heterocycles* **2014**, *89*, 1632.
2. Koshizawa, T.; Yamazaki, Y.; Ohgiya, T.; Shibuya, T. A facile method for converting alcohol to thioether and its application in the synthesis of a novel GPR119 agonist. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3231.
3. Koshizawa, T.; Morimoto, T.; Watanabe, G.; Watanabe, T.; Yamasaki, N.; Sawada, Y.; Fukuda, T.; Okuda, A.; Shibuya, K.; Ohgiya, T.: Optimization of a novel series of potent and orally bioavailable GPR119 agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3249.
4. Koshizawa, T.; Morimoto, T.; Watanabe, G.; Fukuda, T.; Yamasaki, N.; Hagita S.; Sawada, Y.; Okuda, A.; Shibuya, K.; Ohgiya, T.: Discovery of novel spiro[chromane-2,4'-piperidine] derivatives as potent and orally bioavailable G-protein-coupled receptor 119 agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3236.

審査委員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院教授（薬学研究院）	薬学博士	根本 哲宏
副査	千葉大学大学院教授（薬学研究院）	薬学博士	高山 廣光
副査	千葉大学大学院教授（薬学研究院）	薬学博士	西田 篤司
副査	千葉大学大学院教授（薬学研究院）	薬学博士	石橋 正己