

DPP-IV 阻害剤の創薬研究

2010 年

福島 浩

DPP-IV 阻害剤の創薬研究

福島 浩

目次

総論

- 第1節 はじめに
- 第2節 DPP-IV 阻害剤について
- 第3節 研究の概要

本論

第1章 2-シアノピロリジン誘導体の置換基変換及び DPP-IV 阻害作用

- 第1節 置換ピロリジン誘導体のデザイン
- 第2節 置換ピロリジン誘導体の合成
- 第3節 置換ピロリジン誘導体の DPP-IV 阻害作用
- 第4節 (2*S*,4*S*)-4-Fluoro-1-*L*-isoleucylpyrrolidine-2-carbonitrile の体内動態及び in vivo 薬効試験

第2章 α -アミノ酸側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の合成及び DPP-IV 阻害作用

- 第1節 α -アミノ酸側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の合成
- 第2節 α -アミノ酸側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の DPP-IV 阻害作用及び化学的安定性
- 第3節 α -アミノ酸側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の in vivo 薬効試験
- 第4節 (2*S*,4*S*)-4-Fluoro-1-(3-methyl-*L*-valyl)pyrrolidine-2-carbonitrile の立体異性体の合成、DPP-IV 阻害作用、及び立体構造確認

第3章 *N*-置換グリシン側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の合成及び DPP-IV 阻害作用

- 第1節 *N*-置換グリシン側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の合成
- 第2節 *N*-置換グリシン側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の DPP-IV 阻害作用
- 第3節 (2*S*,4*S*)-4-Fluoro-1-[*N*-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile の体内動態及び in vivo 薬効試験

第4節 TS-021の合成

結論

謝辞

実験の部

第1章に関する実験

第2章に関する実験

第3章に関する実験

薬理実験

引用文献

総論

第1節 はじめに

近年、研究開発技術の進展により医薬の標的となりうる生体分子が多数発見されている。しかしながら、これらは安全性や人での有効性といった点から医薬品の標的としては適さない生体分子を数多く含んでおり、現実的に研究対象となる標的分子は多くはない。たとえその標的分子に作用する化合物が医薬品に成り得る場合でも、市販に至るには数多くのハードルを乗り越えなくてはならず、幸運にも多くの人々に供される薬になるのは数多く合成された化合物の中のほんの一握りの化合物だけである。

最近では更にこのハードルが高くなり、医薬品開発の成功確率は益々低下している。一方、この成功確率を高めるべく数々の新技術が発展してきた。合成効率を高めたコンビナトリアルケミストリー、X線やNMRなどの測定装置や計算化学を活用しデザインの精度を高める手法、などの成功例も相次いで報告されている。これら新技術の発展はあるもののメディシナルケミストリー（創薬化学）の本質は変わらず、多くのトライアルアンドエラーの繰り返し、即ち地道な研究の積み重ねによって新薬が見出される場合が多い。

一方、患者や医療現場の立場から医薬品を見てみると、まだまだ満足のいく医薬品が十分に揃っていない疾患が多いと言われている。癌やアルツハイマー病など治療効果が十分でない疾患は勿論、耐性菌や新型ウイルスの出現が問題となっている感染症も高い治療効果を持つ薬剤が望まれている。そのような領域に比べ、糖尿病領域は一部に新規薬剤不要論がある。既に血糖低下薬があり且つ食事と運動による治療が大切であることが不要論の理由であるが、現実には治療効果が十分に得られているとは言い難い。長年糖尿病治療の中心的な薬剤であったスルホニル尿素（SU）薬では、長期使用により膵臓ランゲルハンス島β細胞（膵β細胞）を疲弊させ膵β細胞のアポトーシスを促進するため、薬が効かなくなる所謂「二次無効」となる。SU薬以降に開発されたα-グルコシダーゼ阻害薬やチアゾリジン誘導体、ビッグアニド薬は膵β細胞をアポトーシスから保護するとの意見もあるが、明確な証明、特にヒトにおける証明は乏しい。最近の検討では、ビッグアニド薬でも6~7年の経過をみると、薬剤の効果が不十分になり、SU薬の「二次無効」と同様な事象が認められるとの報告もある。加えて血糖低下作用を有する薬剤は、副作用として低血糖を招くなど決して完成度が高いとは言えない。更に、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経症といった合併症についてもその進展を十分に阻止できていないといった指摘もある。

このように、糖尿病領域では Table 1 に示すように多くの経口糖尿病薬が提供されるものの治療効果や患者のクオリティオブライフ (QOL) の面で十分とは言い難い¹⁾。これらの問題を解決するには、新規作用メカニズムを有する医薬品の登場が望まれている。

Table 1 経口糖尿病薬の分類¹⁾

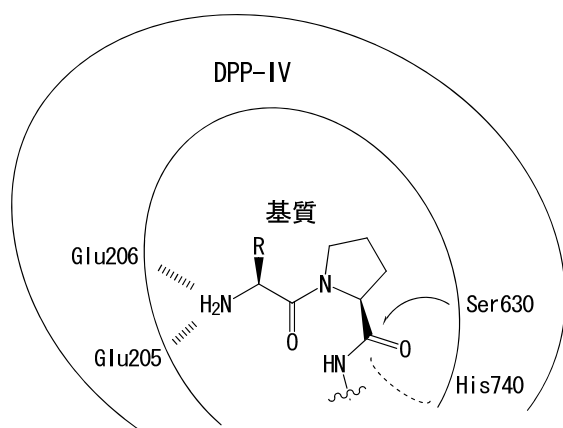
分類	特徴
スルホニル尿素 (SU) 薬	膵β細胞のK _{ATP} チャンネルに結合し、インスリン分泌を促進させる。長期間臨床の場で使用されていて、年齢、体重を問わず、第一選択薬として有用である。長期間使用していると多くの患者で血糖は次第に上昇してくる(二次無効)ことがあるが、他の系統の薬剤でも二次無効は同様に起こると推測される。低血糖と体重増加に注意が必要である。
ビグアナイド薬	肝臓からのグルコース放出を抑制する作用が強く、筋肉を中心とした抹消組織でのインスリン感受性を高める作用も有している。副作用で、まれに重篤な乳酸アシドーシスが起こる危険があるため注意が必要である。
α-グルコシダーゼ阻害薬	腸管での糖の分解を抑制して吸収を遅らせ、食後の高血糖・高インスリン血症を抑える効果がある。副作用として放屁や下痢がしばしばみられ、まれに重篤な肝障害が起こるので十分注意が必要である。
チアゾリジン薬	主として抹消組織でのインスリンの感受性を高め、肝臓からのグルコース放出を抑制する作用もある。血糖改善効果SUに次いで大きい。副作用として体液貯留作用と脂肪細胞の分化を促進する作用があるため体重がしばしば増加する。時に浮腫、貧血、心不全をきたすことがある。
速効型インスリン分泌促進薬	SU薬と同様の機序でインスリン分泌を促進するが、効果がより速やかに起こり、また短時間で消失する。血糖改善効果はSU薬ほど大きくない。副作用として低血糖に注意が必要である。

第2節 DPP-IV 阻害剤について

2007年、FDA がジペプチジルペプチダーゼ-IV (DPP-IV) 阻害剤²⁾として初めての薬剤である Sitagliptin (メルク社) を糖尿病治療薬として承認した。この Sitagliptin はブロックバスターになりうる薬剤として、その治療効果に注目が集まっている。

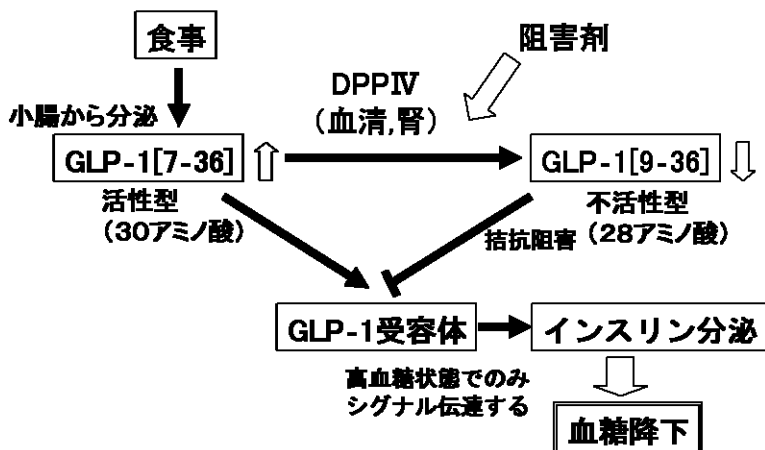
DPP-IV とは、N 末端から 2 番目にプロリン又はアラニンを有するペプチドの N 末端からジペプチドを切り出す酵素で、GLP-1 の不活性化や IFN- γ や TNF- α の生成などに関与することが知られている³⁾ (Figure 1)。更に、DPP-IV は CD26 抗原と同一物質であり、免疫応答に関与する T 細胞のレセプターとしての機能も知られている。そこで、DPP-IV 阻害剤は当初炎症免疫領域の薬剤を目指した研究が行われていたが、炎症免疫領域での開発には成功せず、1990 年代前半で他の領域での研究も下火となった。

Figure 1 DPP-IVとDPP-IV基質との反応様式



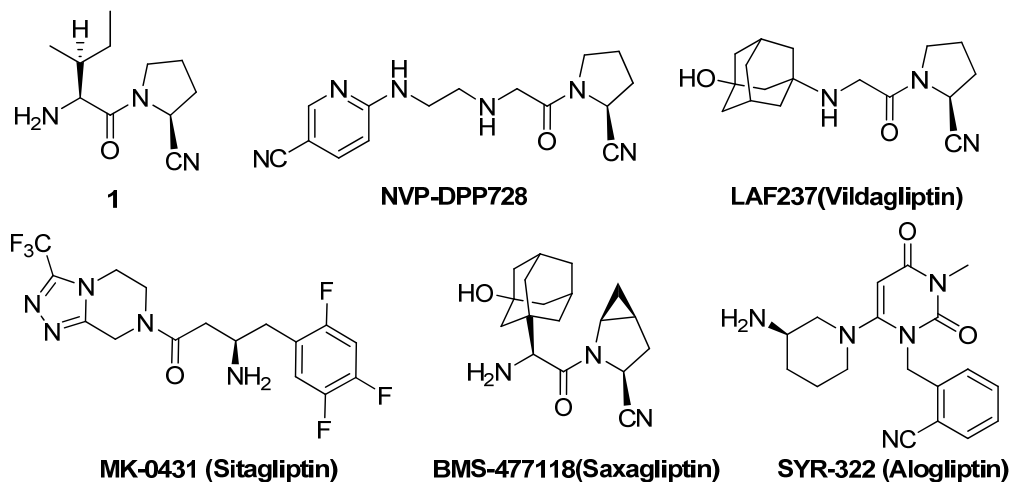
DPP-IV 阻害剤の炎症免疫領域での研究に代わり糖尿病領域での研究が盛んになったのは、1990 年代後半である⁴⁾。これは、血糖コントロールに重要と考えられたグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)の分解即ち不活性化の主役が DPP-IV であることが分かったからである (Figure 2)。30 アミノ酸からなる活性型 GLP-1 は、DPP-IV により速やかに2 アミノ酸が切断され、28 アミノ酸の不活性型 GLP-1 に分解される。この GLP-1 というペプチドは、炭水化物や脂質の摂取後に消化管細胞より分泌され、GLP-1 受容体に作用し膵臓からのインスリン分泌を増強させる消化管ホルモンである。しかし、DPP-IV による分解が速いため GLP-1 自体を薬として開発するのは困難であった。最近、この GLP-1 を改良し安定化したペプチド薬 (GLP-1 アナログ) が承認されている。この GLP-1 のインスリン分泌作用はグルコース依存的であり、低血糖時にはインスリン分泌を増強しない。即ち低血糖を起こしにくいメカニズムを有している。この GLP-1 はこれ以外にも、糖尿病治療に有益な膵β細胞増殖作用、グルカゴン分泌抑制、胃排泄能抑制、中枢性食欲抑制作用などが知られており、これら作用は当然 GLP-1 の分解を阻害してその作用を増強する DPP-IV 阻害剤でも期待される効果である。特に膵β細胞増殖作用は膵β細胞の疲弊を防ぎ、二次無効を引き起こさない薬剤となりうる期待が持たれた。

Figure 2 DPP-IV阻害剤による血糖降下作用



1997年にDPP-IV阻害剤を糖尿病治療に用いるというコンセプト (WO1997040832) がDemuthらにより提唱され、著者もこれまでの糖尿病治療薬には無い優れた特徴を有するDPP-IV阻害剤を創薬ターゲットに選び2000年に創薬研究に着手した。研究開始当時は、基質を模倣したシアノピロリジン部位を有する化合物 **1** (フェーリング社、WO1995015309) やNVP-DPP728 (ノバルティス社、WO1998019998) といった化合物が研究されていた。それから10年以上経ち、現在ではシアノピロリジン骨格のVildagliptin (ノバルティス社、WO2000034241) とシアノピロリジン部位をトリフルオロベンゼンに変換したSitagliptin (メルク社、WO2003004498) が海外で市販されている。更にピロリジン環部分を変換したSaxagliptin (ブリストル・マイヤーズ スクイブ社、WO2004052850) や全く異なる骨格のAlogliptin (武田薬品工業、WO2005095381) が臨床第3相試験を実施するなど開発競争が激化している (Figure 3)。

Figure 3 Structures of representative DPP-IV inhibitors.



第3節 研究の概要

著者が DPP-IV 阻害剤の創薬研究に着手した時には、血糖低下薬としての研究が開始され、化合物としてはフェーリング社の 2-シアノピロリジン誘導体が知られていた⁵⁾。

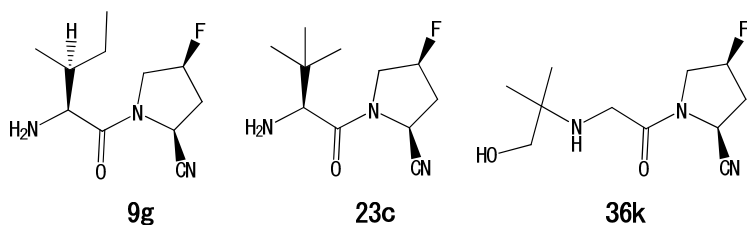
そこで、更に強い薬効を目指して 2-シアノピロリジン **1** からの誘導体展開を計画した (Figure 3)。この化合物 **1** は DPP-IV で分解される基質ペプチドの模倣であり、活性中心にあるセリン残基の水酸基がシアノ基と親和性を有することで強い阻害活性が得られている。著者は、これら誘導体で全く検討がなされていなかったピロリジン環上の置換基に着目して展開した。そして、4 位にフッ素を導入した化合物 **9g** に DPP-IV 阻害活性の向上と経口投与時の薬物血中濃度改善を見出した⁶⁾ (Figure 4)。このフッ素原子の導入は構造を大きく変えずに静電ポテンシャルを変化させることができるため、この合成を計画した時点から本化合物の活性に注目していた。

更にイソロイシン側鎖部分の変換を行い、より立体的に嵩高い側鎖の導入により溶液中での安定性が改善されることを確認し、その中で *tert*-ブチルグリシン誘導体 **23c** が良好な活性と安定性を有することを見出した⁷⁾。

そして、更に側鎖の変換として *N*-置換グリシン誘導体を検討し、2-ヒドロキシー-1, 1-ジメチルエチル基を有する **36k** が、持続性を有する体内動態を示し、病態動物にて良好な血糖低下作用を有することを見出した⁸⁾ (WO2002038541)。

著者は良好な阻害活性と体内動態を有する **23c** と **36k** を見出したが、より化学的に安定な **36k** を選択し、更にこの塩検討により見出されたベンゼンスルホン酸塩 TS-021 を得て、2003年に TS-021 の臨床試験実施に至った。

Figure 4 4-Fluoro-2-cyanopyrrolidines.



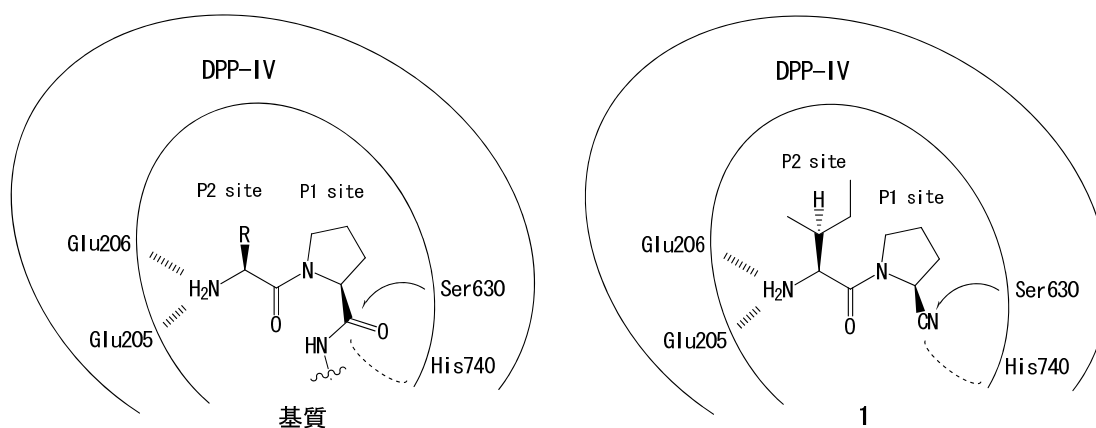
本論

第1章 2-シアノピロリジン誘導体の置換基変換及び DPP-IV 阻害作用

第1節 置換ピロリジン誘導体のデザイン

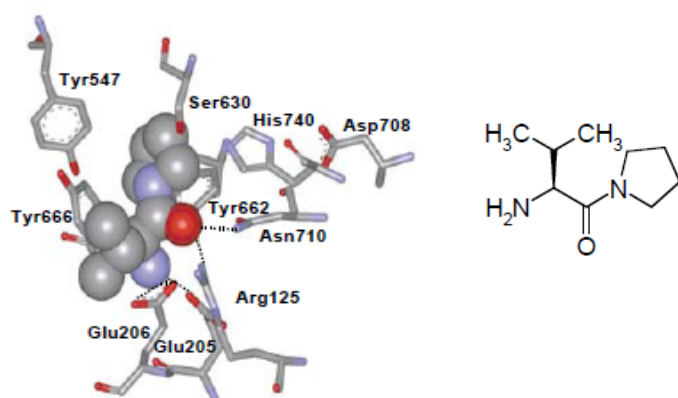
DPP-IV は、基質となるペプチドの N 末端から 2 番目のアミノ酸がプロリン又はアラニンのペプチドを認識し、2 番目と 3 番目のアミノ酸のアミド結合を切断してジペプチドを切り出すセリンプロテアーゼである⁹⁾。DPP-IV の構造及び基質を模倣した阻害剤の研究によって、DPP-IV と DPP-IV 基質との反応様式が Figure 5 のように推定されている¹⁰⁾。即ち、基質のペプチドを DPP-IV が切断する場合はセリン 630 がアミドのカルボニル基を攻撃して加水分解が促進されるのに対し、シアノピロリジンを有する DPP-IV 阻害剤 **1** の場合はセリン 630 とシアノ基の双極子相互作用により強い阻害作用が得られると考えられている。

Figure 5 DPP-IV基質及びDPP-IV阻害剤の反応様式



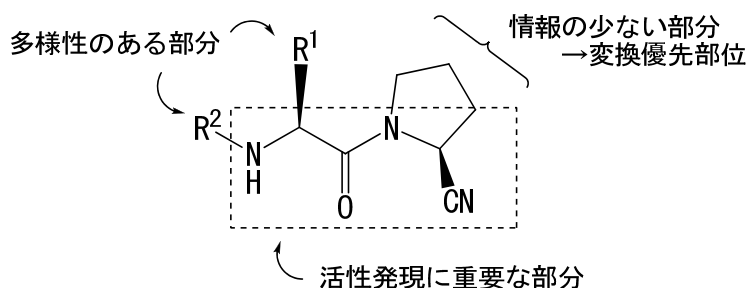
一般にプロテアーゼとその基質の構造を論じる際、基質の部位を表現するのにアルファベットの P と番号を用いる。基質の切断されるペプチド結合を境に、N 端方向に 1, 2, 3...、C 端方向に 1', 2', 3'...、の番号がアミノ酸に振られる¹¹⁾。即ち、Figure 5 ではプロリン部分が P1 site となる。ペプチドを模倣した阻害剤についても同様な番号が付けられる。

Figure 6 DPP-IVとDPP-IV阻害剤との共結晶構造¹⁰⁾



この DPP-IV の阻害剤研究は、基質模倣のジペプチド誘導体が中心であった。実際著者が研究に着手した時に DPP-IV 阻害薬として知られていたのは、プロリン及びその類縁体を有するジペプチド化合物が大部分であった。このペプチド類似の阻害剤との結合様式から考えると、末端アミノ基、P1 site 及び P2 site の構造、Ser630 及び His740 に親和性のある官能基、といった部位の構造が阻害活性に大きな影響を及ぼすと考えられる。これは、後に明らかにされた DPP-IV と DPP-IV 阻害剤との共結晶構造からも示唆されている (Figure 6)。¹⁰⁾

Figure 7 DPP-IV阻害剤の変換優先部位



当時の DPP-IV 阻害剤研究では、プロリン含有ジペプチド骨格を有しプロリンのカルボン酸をシアノ基に変換した化合物が強い阻害活性を示すことが知られていた (Figure 7)^{2), 5)}。そこで著者はまず、当時ほとんど検討されておらず活性に関する情報が少ないピロリジン環部分に着目した。先に述べたように、DPP-IV がプロリン含有ペプチドを強く認識することから、DPP-IV の基質特異性は主にプロリン骨格に依存すると考えられた。環構造のプロリンはカルボン酸の位置と N 端側のアミノ酸の位置を限定しており、そのコンフォメーションが DPP-IV に良くフィットしていると考えられるからである。

そして、そのコンフォメーションを変えずにより強い親和性を得るために、ピロリ

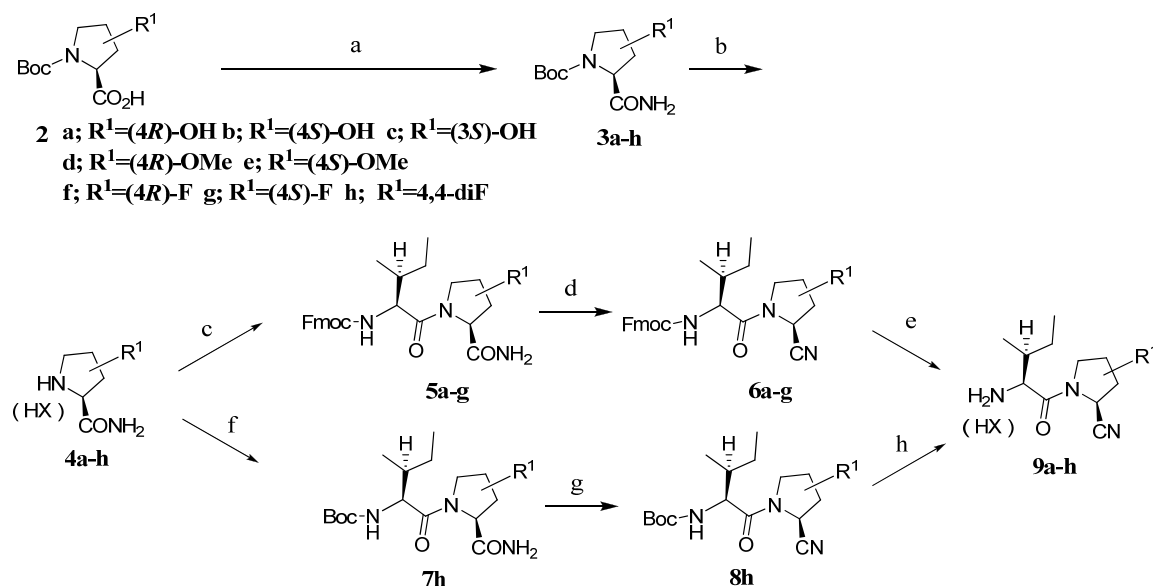
ジン環への置換基導入を検討することにした。その際、基本骨格はシアノ基を有する化合物 **1** を選定した。

置換基については、主に 4-ヒドロキシピロリンを原料として、4 位へ水酸基、ハロゲン原子、アルコキシ基、オキシ基の導入を検討した。また、3 位についても水酸基、フッ素原子の導入を検討した。

第2節 置換ピロリジン誘導体の合成

Scheme 1 に示すように、4 位水酸基、3 位水酸基、4 位メトキシ基、4 位フルオロ基¹²⁾、4,4-ジフルオロ基を有する既知の原料 **2a-h** を用いた。このカルボン酸 **2a-h** を、EDC-HOBt を用いアンモニアと縮合してカルバモイル体 **3a-h** へ変換した。

Scheme 1

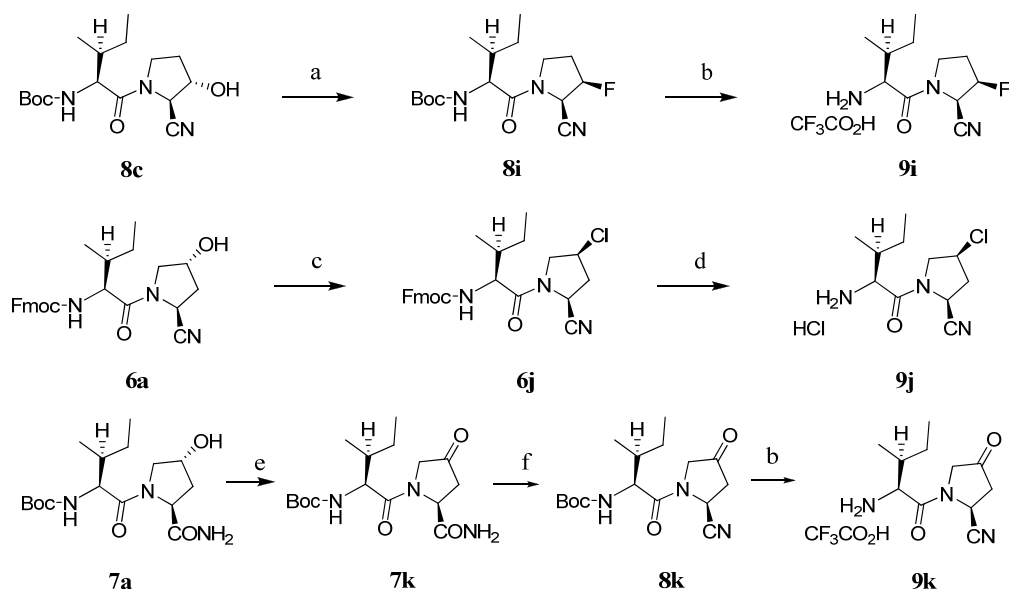


(a) EDC, HOBt, 25%NH₃aq., DMF or CH₃CN, (b) 4M HCl / AcOEt; or 4M HCl / 1,4-dioxane, (c) Fmoc-L-isoleucine, EDC, HOBt, *N,N*-diisopropylethylamine, DMF or CH₃CN, (d) (CF₃CO)₂O, THF, (e) Et₂NH, 1,2-dichloroethane; then HCl, (f) Boc-L-isoleucine, EDC, HOBt, *N,N*-diisopropylethylamine, THF-DMF, (g) Cyanuric chloride, DMF, (h) 2M HCl.

モノフルオロ体の原料 **2f**、**2g** は、文献に従い 4-ヒドロキシピロリン誘導体にジメチルアミノサルファトリフルオリド (DAST) を反応させて得た¹²⁾。この反応は SN2 にて進行し、1,3-*trans* のヒドロキシピロリンからは 1,3-*cis* のフッ素体が、1,3-*cis* のヒドロキシピロリンからは 1,3-*trans* のフッ素体が、単一物として得られた。又、4,4-ジフルオロ体は 4-オキシ体に DAST を反応させて得た。

カルバモイル体 **3a-h** は、塩酸で脱 Boc しアミン体 **4a-h** へ導いた。次いでイソロイシンと縮合するが、イソロイシンのアミン保護基は、Fmoc と Boc のどちらを用いても最終物 **9** を合成することができる。Fmoc で保護したイソロイシンを EDC-HOBt を用いてアミン体 **4a-g** と縮合し **5a-g** へ導き、次いで無水トリフルオロ酢酸を用いて脱水反応を行いシアノ体 **6a-g** へ導き、更にジエチルアミンによる脱 Fmoc 反応を経て **9a-g** を合成した。Boc で保護したイソロイシンは同様に **4h** と縮合して **7h** へ導き、次いで無水トリフルオロ酢酸よりも酸性度が低く脱 Boc の懸念が少ないと思われる塩化シアヌル-DMF を用いて脱水反応を行いシアノ体 **8h** へ導き、最後に塩酸による脱 Boc 反応により **9h** を得た。

Scheme 2



(a) DAST, CH₂Cl₂; (b) TFA; (c) Ph₃P, CCl₄; (d) Et₂NH, 1,2-dichloroethane; then HCl; (e) PCC, MS4A, AcOH, CH₂Cl₂; (f) (CF₃CO)₂O, *N,N*-diisopropylethylamine, THF.

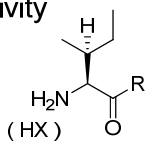
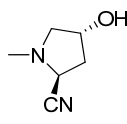
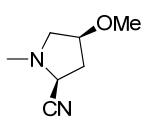
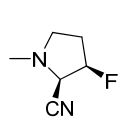
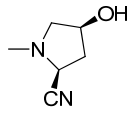
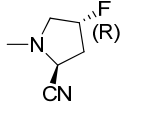
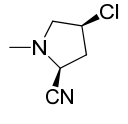
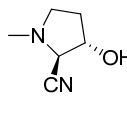
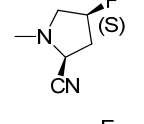
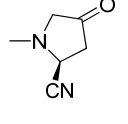
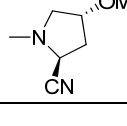
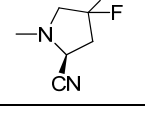
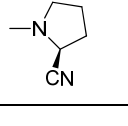
3位フルオロ体については、3-ヒドロキシピロリンから導かれた **8c** を用い、DAST によるフッ素導入 (収率 38%)、トリフルオロ酢酸による脱 Boc 反応により収率 51% で **9i** を得た (Scheme 2)。4位クロル体については、4-ヒドロキシピロリンから導かれた **6a** を用い、トリフェニルホスフィン-四塩化炭素を用いた塩素化により収率 60% で **6j** を得て、次いでジエチルアミンによる脱 Fmoc 反応により収率 53% で **9j** を得た。4-ケト体については、4-ヒドロキシピロリンから導かれた **7a** を PCC 酸化

でケトン体 **7k** に収率 72% で変換し、無水トリフルオロ酢酸を用いた脱水反応、トリフルオロ酢酸による脱 Boc 反応を経て **9k** を収率 80% で得た。

第3節 置換ピロリジン誘導体の DPP-IV 阻害作用

DPP-IV 阻害活性は、ヒト血漿を DPP-IV 酵素源とし Gly-Pro-4-methylcoumaryl-7-amide を基質に用いて測定した。Gly-Pro-4-methylcoumaryl-7-amide は DPP-IV で分解して蛍光を発する 7-amino-4-methylcoumarin に変換されるため、反応液の蛍光強度を測定することにより DPP-IV 阻害活性を算出することができる。

Table 2. DPP-IV inhibitory activity

								
Compd	R	IC ₅₀ (nM)	Compd	R	IC ₅₀ (nM)	Compd	R	IC ₅₀ (nM)
9a		5,700	9e		850	9i		65
9b		350	9f		290	9j		23
9c		>10,000	9g		0.6	9k		21
9d		>30,000	9h		0.8	1		1.5

置換基として水酸基を導入した化合物 **9a-c**、及びメトキシ基を導入した **9d** と **9e** は、すべて置換基のない **1**^{5), 6)} よりも弱い阻害活性であった (Table 2)。立体化学について見ると、4*R*体の **9a** や **9d** よりも、4*S*体の **9b** や **9e** の方が強い阻害活性を示した。4-ケトン体の **9k** は、IC₅₀=21 nM を示し、無置換体よりも活性が低下していた。(4*S*)-フルオロ体 **9g** は、IC₅₀=0.6 nM と非常に強い活性を示し、これは公知の DPP-IV 阻害剤の中で最も強い化合物の1つであった。4,4-ジフルオロ体 **9h** も、IC₅₀=0.8 nM と(4*S*)-フルオロ体 **9g** と同様に強い活性を示した。しかしながら、(4*R*)-フルオロ体 **9f** は IC₅₀=290 nM を示し、(4*S*)-フルオロ体 **9g** の 1/480 の活性であ

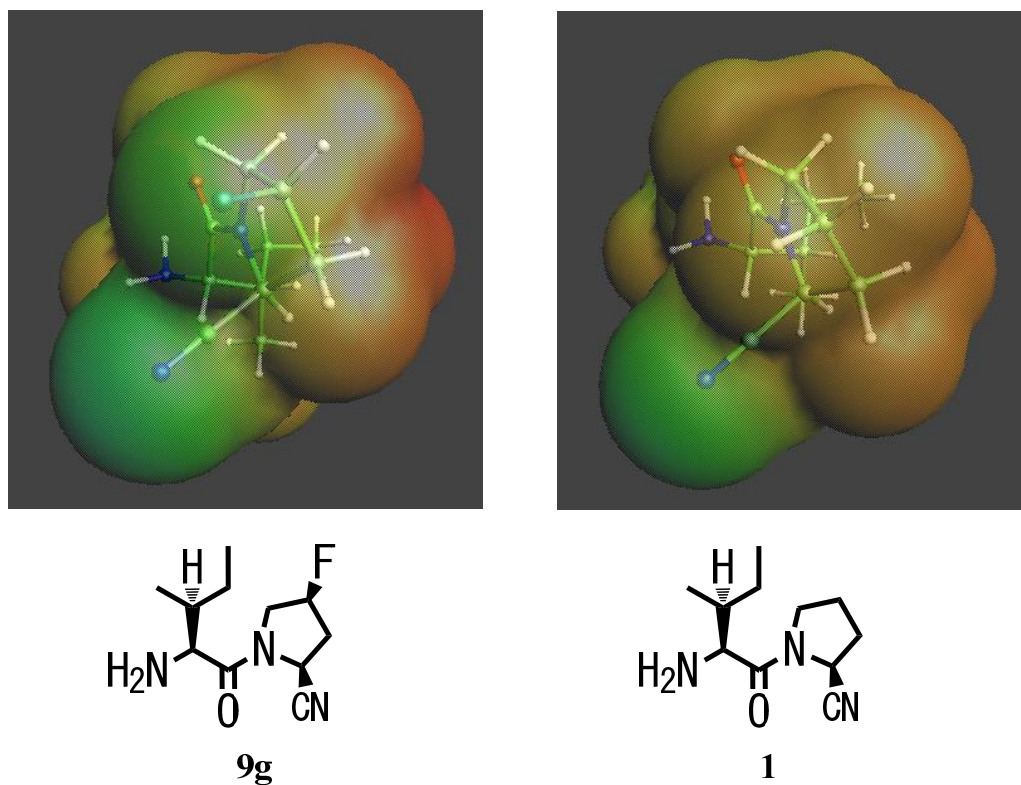
った。

(3*R*)-フルオロ体 **9i** 及び(4*S*)-クロロ体 **9j** は、それぞれ IC₅₀=65 nM、23 nM と、無置換体 **1** より活性が減弱した。

ピロリジン環の置換基として、(4*S*)-フルオロ体以外の置換基では活性の向上は見られなかった。このことより、DPP-IV のピロリジンが結合する部分は狭く、フッ素以上の大きさの置換基を許容できないと考えられた。

(4*S*)-フルオロ基が阻害活性を増強する理由は明確ではないが、DPP-IV の X 線構造解析の情報⁹⁾を利用して次のように考察した。即ち、(4*R*)-置換基が結合する部位は若干陰性のチャージを有するチロシンのπ電子雲が占有しているのに対し、(4*S*)-置換基が結合する部位はチロシンのOHやトリプトファンのNHといった若干陽性のチャージを有する水素原子が位置するため、この水素原子と電気陰性度の高いフッ素原子との親和性が活性増強をもたらした可能性がある。Figure 8 に示すように、フッ素原子の導入によりフッ素周辺が陰性の電荷（緑色）を帯びているのが分かる。

Figure 8 フッ素導入による静電ポテンシャルの変化



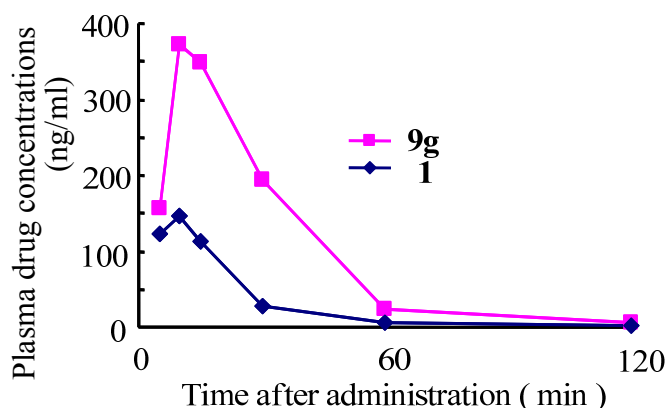
第4節 (2*S*,4*S*)-4-Fluoro-1-*L*-isoleucylpyrrolidine-2-carbonitrile の体内動態及び in vivo 薬効試験

一般に、薬物の薬効発現には標的分子に対する活性と標的部位での薬物濃度が重要となる。DPP-IV は血漿中に存在し活性型 GLP-1 を分解するため、DPP-IV 阻害剤は血中に存在する必要がある。又、長期間使用する糖尿病薬であることより、本薬剤は経口剤が好ましい剤形となる。従って、DPP-IV 阻害剤は経口吸収性に優れ薬効発現に十分な血中濃度を有する必要がある。

著者は2-シアノピロリジン誘導体の置換基導入を検討し、その結果(4*S*)-フルオロ体 **9g** に活性向上が認められたため、その経口吸収性を調べた (Figure 7)。

ジフルオロ体 **9h** も活性が向上したが、第2章で述べるように化学的安定性に問題があったため、詳細な検討は行わなかった。

Figure 7 Plasma drug concentrations after oral administration of **9g** or **1** at a dose of 1 mg/kg to Wistar rats.



(4*S*)-フルオロ体 **9g** と無置換体 **1**^{5), 6)} をそれぞれ 1mg/kg の用量でラットに経口投与し、5分、10分、15分、30分、60分、120分後の血漿中薬物濃度を測定した。最高血中濃度 (Cmax) を比較すると、**1** が投与 10 分後に 147 ng/ml であったのに対し **9g** は投与後 10 分後に 372 ng/ml と、フッ素原子の導入により約 2.5 倍の向上を示した。詳細な検討をしていないため Cmax の向上理由は明確ではないが、消化管からの吸収性向上又は分布容積の低下が考えられる。分布容積とは薬物が瞬時に血漿中と等しい濃度で各組織に分布すると仮定したときに求められる容積で、体内薬物量を血漿中濃度で割った薬物固有の値である。体内薬物量が同じであれば、分布容積が小さいほど血漿中濃度が高くなる。

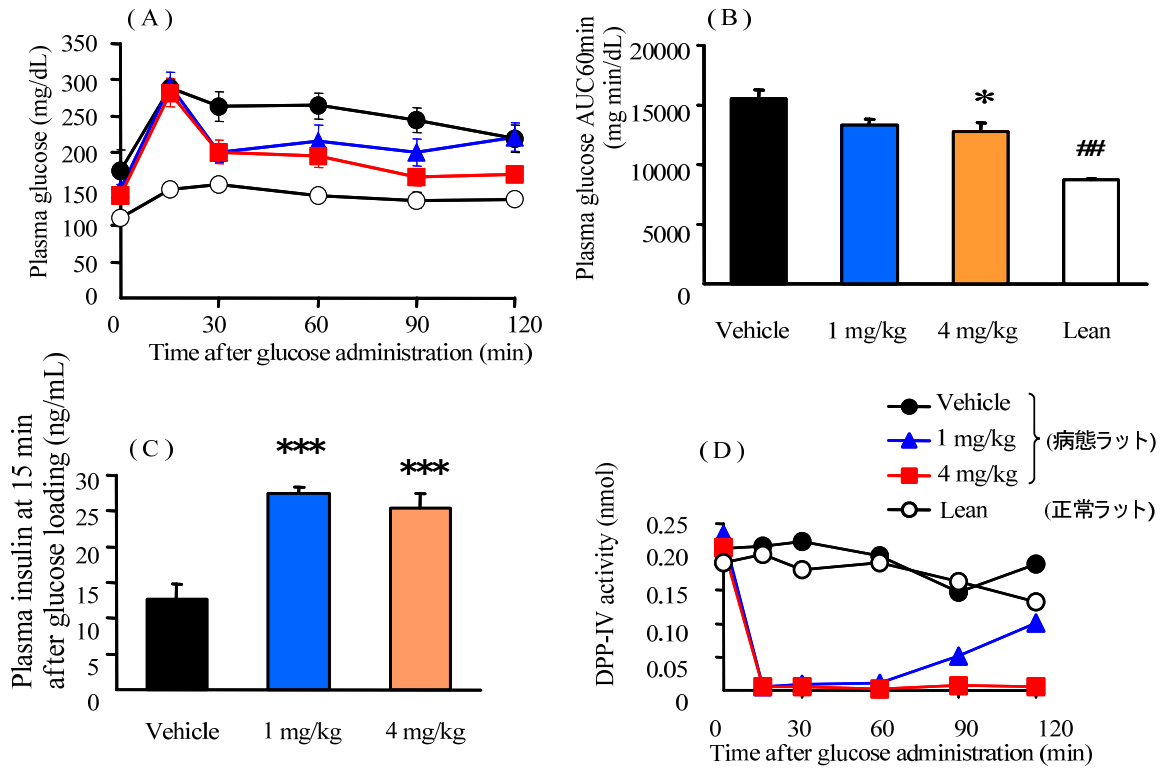
このように活性や体内動態で優れた特徴を有する **9g** について、in vivo 薬効試験を行った。肥満で耐糖能異常を示すモデル動物である Zucker fatty rats を用いて実施した¹³⁾。この試験は経口糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test ; OGTT) と呼ばれ、糖を経口投与することで血糖上昇を引き起こし、薬剤を用いて血糖上昇抑制効果をみる試験であり、食後高血糖改善作用をみる代表的な試験方法である。今回の試験では、薬剤投与 30 分後にラット体重 1kg あたり 2g のグルコースを経口投与し、経時的に採血した。

正常な Zucker rats を用い薬剤の入っていない水を投与した群 (Lean) では糖負荷後の血糖上昇は少ないが、耐糖能異常を示す Zucker fatty rats を用いて薬剤の入っていない水を投与した群 (Vehicle) では糖負荷後に血糖が大きく上昇した (Figure 8A)。Zucker fatty rats に化合物 **9g** を 1mg/kg 及び 4mg/kg の用量で経口投与すると、糖負荷 30 分後に Vehicle に比べ血糖低下が見られた。そして、60 分までの血糖値曲線下面積 (Area under the Curve ; AUC) では、4 mg/kg で有意に高血糖を改善した (Figure 8B)。

血漿中の DPP-IV 活性は、どちらの投与量においても糖負荷後 15 分でほぼ完全に阻害された (Figure 8D)。そして、1 mg/kg では糖負荷後 90 分後から徐々に DPP-IV 活性が上昇を始めた。又、糖負荷 15 分後の血漿中インスリン濃度は、1 mg/kg 及び 4 mg/kg の両用量で Vehicle 群の 2 倍以上を示した (Figure 8C)。

このことは、化合物 **9g** が DPP-IV を阻害することで活性型 GLP-1 の分解を抑制し、これにより活性型 GLP-1 が増え、膵臓 β 細胞でインスリン分泌を刺激するというメカニズムを支持する結果である。このように著者は、糖負荷試験にて血糖上昇を抑制する新規な DPP-IV 阻害剤 **9g** を見出すことができた。

Figure 8



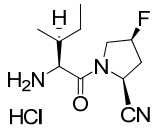
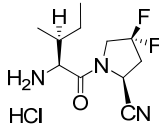
Effects of oral administration of 9g (1 or 4 mg/kg) on plasma glucose (A), plasma glucose AUC_{60min} (B), plasma insulin at 15 min after glucose loading (C) and plasma DPP-IV activity (D) during OGTT in Zucker fatty rats. Each point represents the mean \pm S.E. (n=6). * p<0.05, *** p<0.001 vs. Vehicle, Dunnett's test. ## p<0.01 vs. Vehicle, Student's t-test.

第2章 α -アミノ酸側鎖を有する2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の合成及びDPP-IV阻害作用

第1節 α -アミノ酸側鎖を有する2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の合成

著者の見出した2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体 **9g** は、pH 1.2 の酸性水溶液中では安定であったが pH 6.8 の中性水溶液中で若干安定性に欠けており、37 °C で6時間加温すると、残存率 70%であった (Table 3)。ジフルオロ体 **9h** は、更に安定性に欠け pH 6.8 の中性水溶液中で残存率 8%であったが、分解物を精査していないため不安定性の原因は明らかではない。

Table 3. Chemical stability of **9g** and **9h**

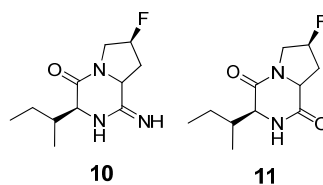
Comp		residual amount (%) ^{a)}	
		pH 1.2	pH 6.8
9g		> 95	70
9h		> 95	8

a) HPLC determination after 24 h (pH 1.2) or 6 h (pH 6.8) incubation at 37 °C in aqueous solution.

4-フルオロ体 **9g** の分解の最初のステップは塩基性窒素原子のシアノ基への分子内求核攻撃と考えられ、この結果環状アミジン **10** が生成し、引き続きジケトピペラジン体 **11** に分解すると推定できる (Table 4)。化合物 **9g** を pH 6.8 のバッファー中 60 °C で2時間加熱すると、逆相 HPLC にて保持時間 4.7 分のピークが 67%生成し、これは環状アミジン体 **10** と推定された。そして更に加熱すると 10 時間後には保持時間 7.4 分のピーク (86%) に変化し、これはジケトピペラジン体 **11** と推定された。

Table 4. Degradation peaks of 9g

	HPLC retention time ^{a)}		
	4.7min	7.4min	8.7min
incubation time ^{b)}			
0h	trace	0%	>97%
2h	67%	12%	20%
10h	13%	86%	0%
estimated structure	10	11	9g



a) The solution was then analyzed using reverse phase HPLC using a CAPCELL PAK UG120 (5 mm particle size, ϕ 4.6 × 150 mm; SHISEIDO) and eluted at 1.0 ml/min with acetonitrile–H₂O (15 : 85 v/v, 10 mM ammonium acetate solution); its UV absorbance was monitored at 210 nm.

b) Compound **9g** was dissolved in pH 6.8 Britton–Robinson buffer solution and incubated at 60 °C.

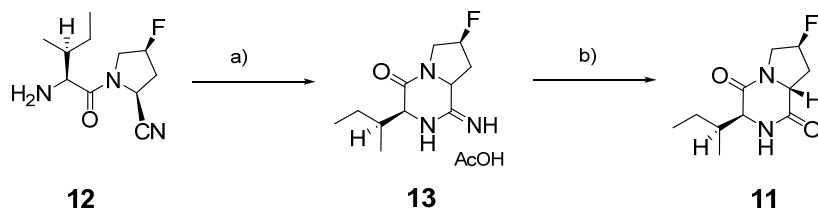
次いで、**10** 及び **11** の構造確認を行った。環状アミジン体 **10** は、中性溶液中で **9g** から生成するが水溶性が高く且つ化学的安定性に欠けるため、水溶液中から単離するのは困難であった。そこで、**9g** のフリー体である **12** の環化反応をカルボン酸存在下有機溶媒中で行った。即ち、**12** をエタノール–*n*-ヘキサン中で 1.1 当量の酢酸を加えると容易に環化し環状アミジンの酢酸塩 **13** の結晶が得られた。構造は、NMR、Mass、元素分析により確認した。このカルボン酸による環化促進効果は、**9g** のカルボン酸塩形成を検討している際偶然観察されたものである。

得られた **13** を pH 6.8 のバッファー中 80°C で加熱すると、ジケトピペラジン体 **11** が得られた (Scheme 3)。化合物 **13** と **11** は各種スペクトルデータからその構造が支持され、HPLC の保持時間は **9g** のバッファー中での分解物と一致した。しかし、NMR の *J* 値からではその立体化学については明らかではなかった。立体構造を明らかにするために **11** の X 線結晶解析を実施したところ、環連結部位の立体化学が反転していることが判明した。しかし、環状アミジン体 **13** の立体化学が分からないためどの段階で反転したかは明らかではない。環化体 **11** のエネルギーをその 8a-*epi* 体のエネルギーと比較すると **11** の方が 0.93 kcal/mol 安定であり、従って安定な方に異性化したと考察した。

9g 又は **12** の立体化学に関しては直接的な確認はできていないが、原料 **15** の立体化学が X 線結晶解析によりにより明らかなことと、後述する化合物 **23c** ではその立体異性体の阻害活性が大幅に低下することより、**9g** 又は **12** の立体化学は (2*S*,4*S*) で

あることは疑いないと考える。

Scheme 3

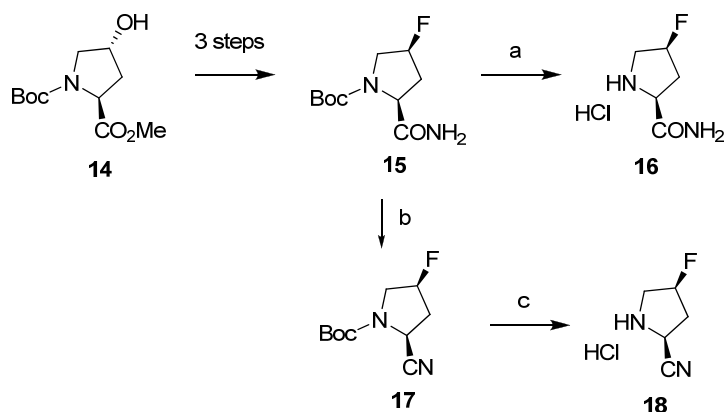


Reagents: (a) AcOH, EtOH, n-hexane, rt, overnight; (b) pH 6.8 buffer, 80 °C, 5h.

このように **9g** の分解が分子内環化によることが分かったので、より安定な化合物を得るために 1 級アミンの周辺環境を変えることとした。即ち、P2 site を変換することで環化を起こしにくくする検討を行った。まず、**9g** の合成方法と同様に、Boc 体 **15** から **16** を合成し中間体とした^{6), 12)} (Scheme 4)。

又、誘導体合成をより効率的に行うために、シアノ体中間体として **18** を用いることを考えた。化合物 **15** を DMF 中で塩化シアヌル¹⁴⁾を用いて脱水することで化合物 **17** を得て、次いで塩酸により中間体 **18** を得た。アミン塩酸塩 **16**、**18** は共に中間体として用いた。

Scheme 4



Reagents: (a) 4M-HCl / AcOEt ; (b) cyanuric chloride / DMF ; (c) 2M-HCl / H₂O-MeOH

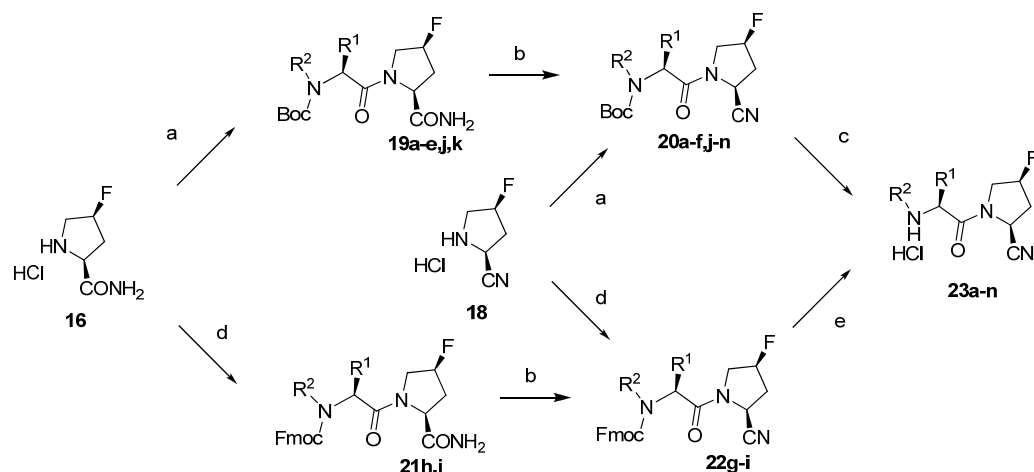
P2 site 変換体合成ルートを Scheme 5 に示す。P2 site アミノ酸の保護基としては、Boc 又は Fmoc の何れも用いることができる。又、フッ素体中間体として **16** 或いは **18** の何れも利用可能であるが、**18** を用いる方が 1 工程少なく効率的に合成すること

ができる。

化合物 **16** は、EDC-HOBt を用いて *N*-Boc 又は *N*-Fmoc アミノ酸と縮合し、**19a-e**、**19j**、**19k**、**21i** を合成した。同様の方法で、シアノ体 **18** は **20h** と **22g** に変換した。

アミノ酸保護基に関しては Boc 基及び Fmoc 基の何れでも合成可能であるが、Fmoc 基の場合は脱保護の際に残骸であるフルオレン部分の除去に手間取ることもあり、Boc 基を中心に合成した。*O*-*tert*-ブチルトレオニン体 **23g** の場合は、酸性条件での脱 Boc で *O*-*tert*-ブチル基が分解する可能性があったため Fmoc 基を用いた。**23h**、**23i** の場合は、どちらの保護基を用いても問題ないと考えられる。

Scheme 5



Reagents: (a) $\text{BocNR}^2\text{CH(R}^1\text{)CO}_2\text{H}$, EDC, HOBT, DMF; (b) cyanuric chloride, DMF; or $(\text{CF}_3\text{CO})_2$, THF; (c) 2M-HCl / $\text{H}_2\text{O-MeOH}$; (d) $\text{FmocNR}^2\text{CH(R}^1\text{)CO}_2\text{H}$, EDC, HOBT, DMF; (e) Et_2NH , 1,2-dichloroethane; then HCl

先に述べたように、分子内環化を防ぎ化学的安定性を増すために P2 site の変換を試みた。天然のアミノ酸だけでなく非天然のアミノ酸や側鎖が修飾してあるアミノ酸誘導体を用い多様な側鎖を検討した。側鎖部分で立体的に混み合う方がより環化が起こりにくいと考えられたため嵩高い側鎖を導入した。又、それ以外にも長鎖の側鎖や環状 α -アミノ酸であるプロリンなど多様な側鎖を導入した。

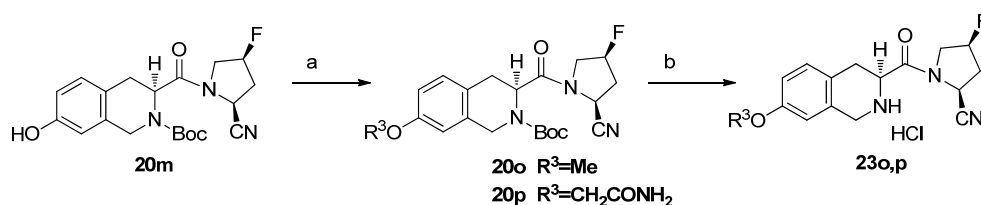
P2 site には、天然のアミノ酸 (バリン、プロリン)、非天然アミノ酸 (アロイソロイシン、*tert*-ブチルグリシン、シクロヘキシルグリシン)、アミノ酸誘導体 (*N*-Cbz-セリン、*O*-メチルトレオニン、*O*-ベンジルトレオニン、*O*-*tert*-ブチルトレオニン) を用いた。

シアノ体 **20a-e**、**22h**、**22i** は、カルバモイル体 **19a-e**、**21h**、**21i** を塩化シアヌルと DMF、又は無水トリフルオロ酢酸と *N,N*-ジイソプロピルエチルアミンで処理することにより得られた。

Boc で保護した化合物 **20a-f**、**20j-n** を、塩酸を用いて脱保護して **23a-f**、**23j-n** に導いた。一方、Fmoc で保護した化合物 **22g-i** を、ジエチルアミンを用いて **23g-i** に導いた。

環状側鎖として 7-ヒドロキシテトラヒドロイソキノリン誘導体 **20m** に比較的良好な活性が見られたので、更に水酸基を修飾した誘導体を合成した。7-メトキシテトラヒドロイソキノリン誘導体 **20o** と 7-カルバモイルメトキシテトラヒドロイソキノリン誘導体 **20p** は、7-ヒドロキシテトラヒドロイソキノリン誘導体 **20m** をアルキル化することで得た (Scheme 6)。そして、**20o**、**20p** を塩酸で処理して脱 Boc 化反応を行い **23o**、**23p** を得た。

Scheme 6



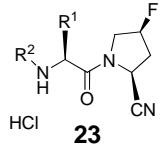
Reagents: (a) $\text{R}^3\text{-X}$, K_2CO_3 , DMF ; (b) 2M-HCl / $\text{H}_2\text{O-MeOH}$.

第2節 α -アミノ酸側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の DPP-IV 阻害作用及び化学的安定性





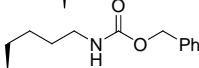



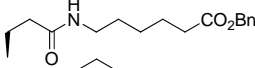


種々のアミノ酸を P2 site に導入し、その DPP-IV 阻害活性を測定した (Table 5)。バリン誘導体 **23a** と *tert*-ブチルグリシン誘導体 **23c** は、イソロイシン誘導体 **9g** ($\text{IC}_{50}=0.6 \text{ nM}$) と同様に、それぞれ IC_{50} 値 0.7、0.6 nM と共に強力な DPP-IV 阻害活性を示した。シクロヘキシルグリシン誘導体 **23i** も $\text{IC}_{50}=1.1 \text{ nM}$ と活性を保持していた。一方、トレオニン誘導体 **23e**、**23f**、**23g** の阻害活性は、それぞれ IC_{50} 値 4.7, 2.1, 4.9 nM と阻害活性は低下した。

DPP-IV の X 線結晶構造解析¹⁰⁾より、側鎖 R^1 が結合する DPP-IV の部位は脂溶性が高いと推定された。トレオニン誘導体側鎖の酸素原子は、タンパクとの反発により活性が低下したと説明できる。又、*O*-ベンジル体 **23f** は、*O*-メチル体 **23e**、*O*-*tert*-ブチル体 **23g** よりも強い活性を示し、これはフェニル基の脂溶性部位に対する親和

Table 5. DPP-IV inhibitory activity and chemical stability of 9g, 23a-j



23

Comp	R ¹	R ²	IC ₅₀ (nM) ^{a)}	remaining amount (%) ^{b)}
9g		H	0.6	70
23a		H	0.7	74
23b		H	1.2	65
23c		H	0.6	93
23d		H	1.4	52
23e		H	4.7	67
23f		H	2.1	73
23g		H	4.9	92
23h		H	0.7	41
23i		H	1.1	68
23j		Me	>100	-

a) DPP-IV inhibitory activity.

b) Residual amount was measured after incubation at 37 °C for 6 h in pH 6.8 aqueous buffer solution.

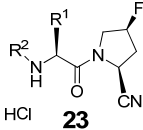
性により活性が回復したためと考えられる。



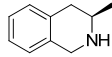
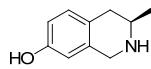
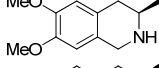
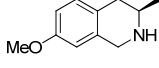
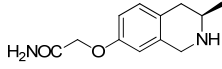
長鎖を有するリジン誘導体 **23d**、グルタミン酸誘導体 **23h** は、それぞれ IC₅₀=1.4 nM、0.7 nM と強い活性を示した。

高活性の **9g** のアミノ基にメチルを導入した *N*-メチルイソロイシン誘導体 **23j** は、IC₅₀>100 nM と、活性が消失した。これは、イソブチル側鎖がポケットに入っている状態でアミノ基にメチル基を導入すると、メチル基が DPP-IV と反発するためと考えられる。

R¹ と R² が環化した誘導体の中では、プロリン誘導体 **23k** が IC₅₀=0.8 nM、テトラヒドロイソキノリン誘導体 **23l-p** が IC₅₀=1.2 - 3.3 nM と、強い活性を示した (Table 6)。

Table 6. DPP-IV inhibitory activity and chemical stability of 23k-p



Comp		IC ₅₀ (nM) ^{a)}	remaining amount (%) ^{b)}
23k		0.8	<20
23l		2.2	<20
23m		1.2	<20
23n		2.5	-
23o		1.7	<20
23p		3.3	-

a) DPP-IV inhibitory activity.

b) Residual amount was measured after incubation at 37 °C for 6 h in pH 6.8 aqueous buffer solution.

先述したようにこれら 2-シアノピロリジン誘導体を開発する場合、化学的安定性は重要な要素となる。リード化合物 **9g** は酸性溶液の中では安定であるが、中性水溶液中では残存率が低下した。

中性水溶液中での化合物 **9g** の分解は、塩基性窒素原子がシアノ基の炭素原子を求核攻撃し、環状アミジンを形成することによる。窒素原子周辺に立体的に混み合った環境を構築することで、このような分解は回避できると考えた。

tert-ブチルグリシン誘導体 **23c** と *O-tert*-ブチルトレオニン **23g** は、pH 6.8 の緩衝液中で 6 時間、37 °C に加温した後の残存率がそれぞれ 93%、92% であり、70% 残存率の **9g** より安定性が向上した。これは、 α -炭素周辺がより混み合っているためと考えられる。

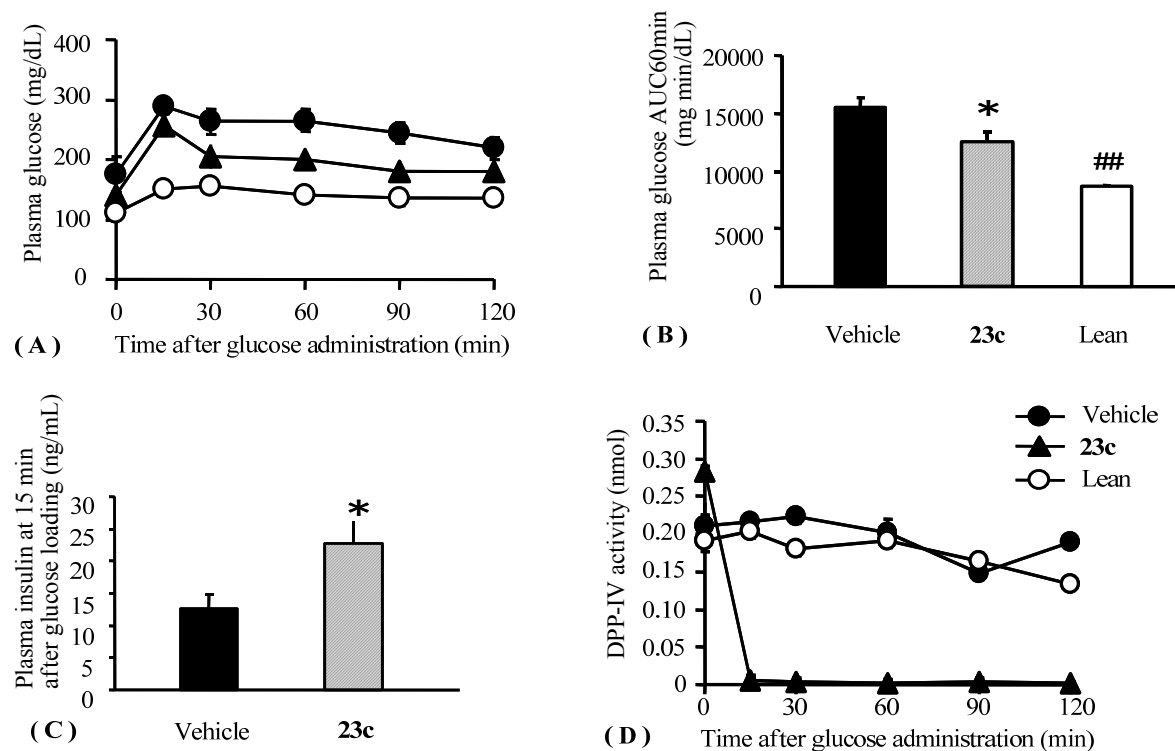
これとは対照的に、 α 位の隣の炭素が枝分かれしておらずメチレンを持つ **23d** や **23h** は、それぞれ残存率 52%、41% と低い値であった。プロリン誘導体 **23k** とテトラヒドロイソキノリン誘導体 **23l**, **23m**, **23o** は、20% 以下の低い残存率であった。これら安定性低下の理由は、これら誘導体がイソロイシンよりも閉環反応しやすいコンフォメーションを取りやすいためと考えられる。

第3節 α -アミノ酸側鎖を有する2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の *in vivo* 薬効試験

最も阻害活性が強く且つ化学的に最も安定であった **23c** を用いて *in vivo* 薬効試験を検討した。*in vivo* 薬効試験には、前述した Zucker fatty rat を用いた。**23c** は 1 mg/kg の用量で糖負荷 30 分前に経口投与され、経時的に血糖値、インスリン量、DPP-IV 活性を測定した (Figure 9)。

糖負荷後の血糖値は、溶媒処理群 (Vehicle) に比べて **23c** 処理群の方が明確に低い値を示した。(Figure 9A,B) DPP-IV 活性は糖負荷 15 分後にはほぼ完全に阻害され、更に 2 時間経っても継続した (Figure 9D)。これらの結果は、血漿中の DPP-IV 活性を阻害することにより、化合物 **23c** が高血糖改善に有用であることを示している。糖負荷後 15 分後のインスリン分泌は、**23c** 投与群の方が溶媒投与群よりも有意に増加していた (Figure 9C)。

Figure 9



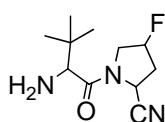
Effects of oral administration of **23c** (1 mg/kg) on plasma glucose (A), plasma glucose AUC_{60min} (B), plasma insulin at 15 min after glucose loading (C) and plasma DPP-IV activity (D) during OGTT in Zucker fatty rats. Each point represents the mean \pm S.E. (n=6). * p<0.05 vs. Vehicle, Dunnett's test. ## p<0.01 vs. Vehicle, Student's t-test.

第4節 (2*S*,4*S*)-4-Fluoro-1-(3-methyl-L-valyl)pyrrolidine-2-carbonitrile の立体異性体の合成、DPP-IV 阻害作用、及び立体構造確認

合成した2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体は3個の不斉中心を持ち8種の立体異性体が存在する。それらの活性の差異に興味を持たれたので、強い活性を有する **23c** についてその立体異性体を合成し阻害活性を測定することにした。4種類のヒドロキシプロリン (L-トランス、L-シス、D-トランス、D-シス) と L-及び D-*N*-Boc-*tert*-ブチルグリシンを用いて、7つの立体異性体 **24**~**30** を合成した (Table 7)。

4-フルオロ基の立体化学の相異による SAR については Table 1 での説明と同様に、(4*R*)-フルオロ体 **24** は IC₅₀=246 nM と大幅に活性が低下した。又、2-シアノ基の立体化学が異なる(2*R*)-シアノ体 **25** は IC₅₀>300 nM、側鎖の立体化学が異なる D-*tert*-ブチルグリシン誘導体 **27** は IC₅₀=42 nM、とやはり大幅な活性低下が見られた。更にその他の立体化学の組み合わせ化合物 **26**、**28**、**29**、**30** についても同様に、IC₅₀>300 nM と阻害活性が見られなかった。以上のことより、(2*S*, 4*S*)及び L-*tert*-ブチルグリシンの立体化学が阻害の高活性に必要であることが確認された。

Table 7. DPP-IV inhibitory activities of stereoisomers of **23c**

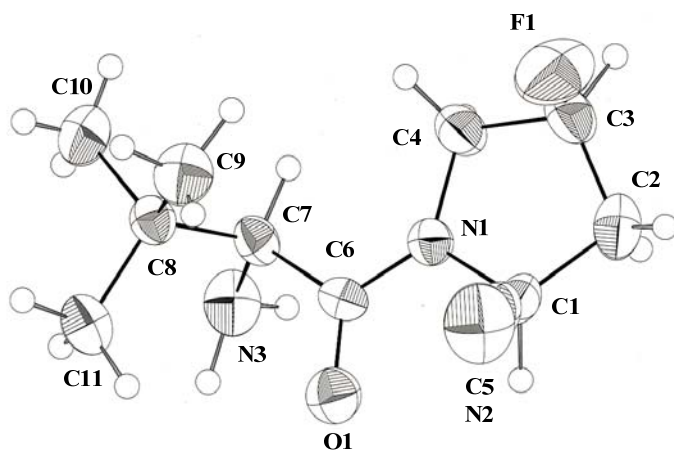


Compd	stereochemistry of t-Bu Gly	stereochemistry of the pyrrolidine	IC ₅₀ (nM) ^{a)}
23c (HCl)	L	(2 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)	0.6
24	L	(2 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)	246
25	L	(2 <i>R</i> , 4 <i>S</i>)	>300
26	L	(2 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)	>300
27	D	(2 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)	42
28	D	(2 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)	>300
29	D	(2 <i>R</i> , 4 <i>S</i>)	>300
30	D	(2 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)	>300

a) DPP-IV inhibitory activity.

又、**23c** のフリー塩基体 **31** の結晶が得られたのでこの X 線結晶構造解析を行い、シアノ基とフッ素原子がシス配置であることとアミド部分がトランス配置であることを確認した (Figure 10)。

Figure 10. X-ray crystal structure of compound **31** (free base of **23c**)



第3章 N-置換グリシン側鎖を有する2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の合成及びDPP-IV阻害作用

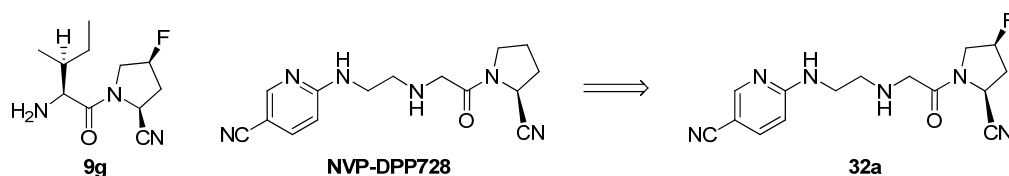
第1節 N-置換グリシン側鎖を有する2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の合成

第1章で、2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体 **9g** (Figure 11) が、4位に置換基の無い誘導体に比べて DPP-IV 阻害活性が高く、ラットに経口投与したときの血漿中薬物濃度が高いことを示した。しかしながら、**9g** は化学的安定性の改善が望まれたため、1位側鎖の変換を行い **23c** を見出したことを第2章で述べた。しかし **23c** においても化学的安定性の更なる改善が望まれるため、その改良を続けた。

2-シアノピロリジンを有する DPP-IV 阻害剤としては、1位側鎖に関して2つのタイプが知られている。1つは α 位に側鎖を有するアミノ酸であり、もう1つは N-置換グリシンタイプであり NVP-DPP728 という化合物に代表される。NVP-DPP728 はノバルティス社により開発され 2002 年に糖尿病患者による臨床試験において初めて有効性が示された DPP-IV 阻害剤である¹⁵⁾。

著者は、より優れた薬剤を見出すために、NVP-DPP728 の側鎖を2-シアノ-4-フルオロピロリジンの1位に導入し、化合物 **32a** を合成した。化合物 **32a** の詳細については後述するが、強い DPP-IV 阻害活性を示すと共に pH 6.8 の 37 °C 水溶液中の安定性試験で 6 時間での残存率が **9g** の 70%を上回る 86%を示した。

Figure 11



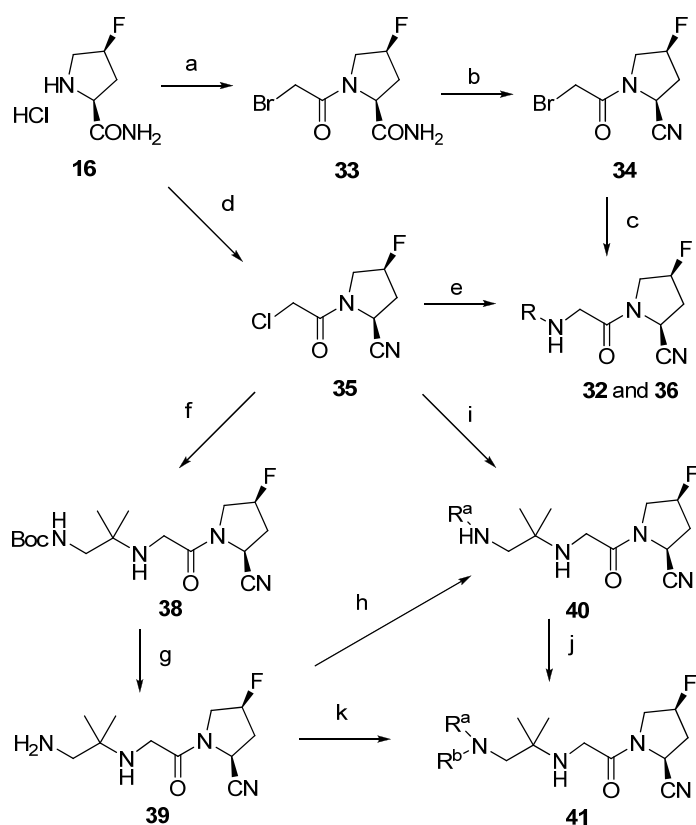
そこで、更に N-置換グリシンタイプの誘導体を合成した。第2章で述べたように、 α -アミノ酸の変換でより嵩高い *tert*-ブチルグリシンを導入することで化学的安定性が改善したため、嵩高さを考慮して側鎖の変換を行った。

合成に関しては、N-置換グリシン誘導体を合成するためにブロモアセチル体 **34** 又はクロロアセチル体 **35** を中間体として選んだ (Scheme 7)。アミン塩酸塩 **16**⁶⁾ は、2-エチルヘキサン酸カリウムを塩基として用いブロモアセチルブロミドと反応を

行いブromoアセチル体 **33** へ導いた。そして、**33** を無水トリフルオロ酢酸で脱水してシアノ体 **34** へ導いた。この **34** は種々の 1 級アミンと反応を行い、**32a**~**32d**, **36f**~**36k**, **36m**~**36v** を得た (Method A)。この時、アミンの当量が少ないとアミンがジアシル化されたと思われる副生成物が増加したため、これを防ぐためにアミンを 2~5 当量用いた。

また、別ルートとして、アミン塩酸塩 **16** を DMF 中でクロロアセチルクロリドとトリエチルアミンを用いて反応を行い、引き続き one pot で塩化シアヌル-DMF を用いて脱水反応を行い、クロロアセチル体 **35** を合成した。クロロアセチル体 **35** と 1 級アミンとの反応は、室温では進行が遅いため、反応を促進するために KI を加えて反応を行い **36a**~**36e**, **36l** を得た (Method B)。

Scheme 7



Reagents: (a) potassium 2-ethylhexanoate, toluene / BrCH_2COBr , THF, (b) $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, THF, (c) R-NH_2 , THF (Method A), (d) (i) ClCH_2COCl , Et_3N , DMF, (ii) cyanuric chloride, (e) R-NH_2 , KI, MeOH, THF (Method B), (f) $\text{BocNHCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$ **37**, KI, MeOH, (g) 4M HCl / AcOEt, (h) acylation (method C), sulfonation (method D), or reductive amination (method E), (i) $\text{R}^a\text{R}^b\text{NCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$, KI, MeOH (method F), (j) methylation (method G) or acylation (method H), (k) dialkylation (method I).

次いで、後述する 2-メチル-2-アミノプロパノールを導入した **36k** が活性及び化学的安定性が良好であったため、1,1-ジメチルエチレンジアミン側鎖を導入した **36k** 類似化合物の合成を展開した。中間体ジアミン体 **39** は、Boc で保護したジアミン誘導体 **37** とクロロアセチル体 **35** を反応させ **38** を得て、これを塩酸で脱 Boc して合成した。

ジアミン体 **39** は、それぞれアシル化 (method C)、スルホニル化 (method D)、還元的アミノ化 (method E) により、**40** へ導いた。アシル化反応としては、酸クロリドを用いる方法やカルボン酸と縮合剤を用いる方法で行い、**40a**~**40h** を合成した。スルホニル化反応は、スルホニルクロリドとトリエチルアミンを用いる方法で **40j** を合成した。還元的アミノ化は、アルデヒドとトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムを用いて行い、**40k** と **40l** を合成した。ジアミン **39** にはアミノ基が 2ヶ所あるが、2級のアミンは立体的に混んでいるため、アシル化、スルホニル化、還元的アミノ化は、1級のアミノ基が選択的に反応した。

また、*N*-置換基である **Ra** が導入されているアミンとクロロアセチル体 **35** との縮合を用いることもでき、この方法で **40i** を合成した (method F)。

フェニルスルホンアミド体 **40j** は、DEAD-Ph₃P-MeOH により *N*-メチル化をして **41a** に導いた (method G)。

N-イソブチル体 **40k** や *N*-(4-シアノベンジル)体 **40l** とベンゾイルクロリドを反応させベンゾイル基を導入し、**41c**, **41d** を合成した (method H)。この場合は、2級のアミノ基が 2ヶ所あるが、ジメチル基の隣のアミノ基は立体的に混んでいるため、よりすいている **R^a** が付いているアミノ基が選択的に反応した。

また、*N,N*-ジエチル体 **41b** は、アセトアルデヒドと **39** を用いた還元的アミノ化により合成した (method I)。

第2節 *N*-置換グリシン側鎖を有する 2-シアノ-4-フルオロピロリジン誘導体の DPP-IV 阻害作用

2-シアノピロリジンの 4 位にフッ素を導入する事で阻害活性が増強され、1 位の側鎖に α -アミノ酸を有する **9g** 及び **23c** が、ラットを用いた OGTT 試験にて血糖上昇抑制作用を示すことを前述した。

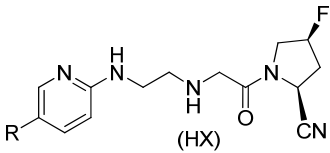
一方 *N*-置換グリシン誘導体に関しては、臨床で高血糖改善に有効である事が示されていた NVP-DPP728 (文献記載の活性値 IC₅₀=7.0 nM)^{15),16)} の側鎖を 2-シアノ

ー4-フルオロピロリジンに導入した **32a** を合成したところ、**32a** は阻害活性が NVP-DPP728 よりも数倍増強し IC₅₀=1.1 nM を示した (Table 8)。

又、化学的安定性に関しては、pH 6.8 の 37 °C 水溶液中の安定性試験で 6 時間での残存率が **32a** は 86% であり、93% の **23c** より劣るものの、70% の **9g** よりは安定であった。

次いで、**32a** の活性向上を目的にピロリジン環上のシアノ基を変換し、無置換体 **32b**、クロル体 **32c**、カルバモイル体 **32d** を合成したが、それぞれ IC₅₀=2.8、2.7、2.4 nM と活性はシアノ体 **32a** より低下し安定性についても改善は見られなかった (Table 8)。

Table 8. DPP-IV inhibitory activity and chemical stability of 32a-d



Comp	R	IC ₅₀ (nM) ^{a)}	remaining amount (%) ^{b)}
32a	CN	1.1	86 ^{c)}
32b	H	2.8	-
32c	Cl	2.7	79
32d	CONH ₂	2.4	80

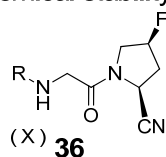
a) DPP-IV inhibitory activity.

b) Residual amount was measured after incubation at 37 °C for 6 h in pH 6.8 aqueous buffer solution.

c) Dihydrochloride salt of **32a** was used in the chemical stability test instead of **32a**.

この様に、NVP-DPP728 の側鎖をそのまま導入しただけでは化学的安定性を改善できなかったが、**9g** よりは安定であったため、安定性を更に改善できると考え *N*-置換グリシン誘導体で側鎖変換を検討した。

まずは、**32a** 同様、芳香環を有する側鎖を検討した。又、より嵩高さを増すためにアミノ基の隣のメチレンにジメチル基を導入し、ピロリジン誘導体 **36a** (IC₅₀=22 nM)、フラン誘導体 **36b** (IC₅₀=8.6 nM)、チオフェン誘導体 **36c** (IC₅₀=12 nM)、ベンゾフラン誘導体 **36d** (IC₅₀=88 nM)、スチレン誘導体 **36e** (IC₅₀=16 nM) を合成したが、**32a** より活性の高い化合物は得られなかった (Table 9)。

Table 9. DPP-IV inhibitory activity and chemical stability of **36a-v**

Comp	R	Synthetic Method	IC ₅₀ ^{a)} (nM)	remaining amount (%) ^{b)}	Comp	R	Synthetic Method	IC ₅₀ ^{a)} (nM)	remaining amount (%) ^{b)}
36a		B	22	-	36m		A	33	-
36b		B	8.6	-	36n		A	3.1	-
36c		B	12	-	36o		A	2.6	97
36d		B	88	-	36p		A	3.3	97
36e		B	16	-	36q		A	3.3	>98
36f		A	27	-	36r		A	4.1	-
36g	t-Bu-	A	2.9	>98	36s		A	3.1	93
36h	i-Pr-	A	7.8	90	36t		A	3.1	>98
36i	i-Pr-O-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	A	8.7	86	36u		A	8.3	-
36j		A	13	-	36v		A	5.3	-
36k		A	4.6	96					
36l		B	>316	-					

a) DPP-IV inhibitory activity.

b) Residual amount was measured after incubation at 37 °C for 6 h in pH 6.8 aqueous buffer solution.

次いで、低級アルキル基である *tert*-ブチル体 **36g** (IC₅₀=2.9 nM)、イソプロピル体 **36h** (IC₅₀=7.8 nM) は、**32a** には劣るものの、比較的強い活性を示すことが分かった。

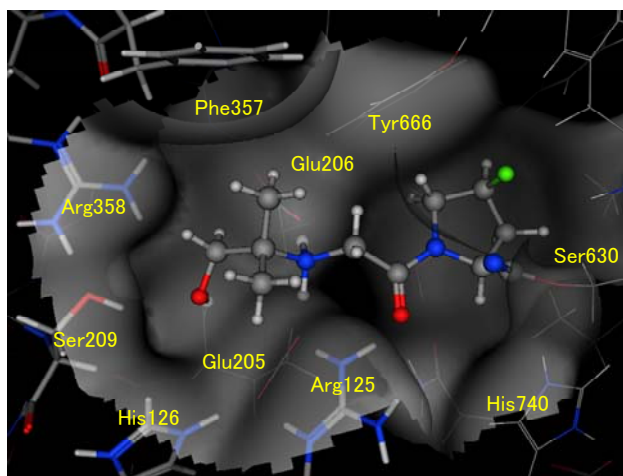
アルコキシ基を有する **36i** と **36j** は、それぞれ IC₅₀=8.7 nM, 13 nM の活性であったが、水酸基を有する **36k** は IC₅₀=4.6 nM と良好な活性であった。しかし、嵩高さが増したアセチレン誘導体 **36l** では IC₅₀>316 nM と活性が大幅に低下した。

更に3員環から8員環の環状アルキル基の導入を行い、活性の強いシクロブチル体 **36n** (IC₅₀=3.1 nM)、シクロペンタン体 **36o** (IC₅₀=2.6 nM)、シクロヘプタン体 **36q** (IC₅₀=3.3 nM) を得た。又、シクロペンタン体にヒドロキシメチル基を導入した **36p** (IC₅₀=3.3 nM) は、**36o** とほぼ同様の活性を示した。しかし、3員環のシクロプロピル体 **36m** (IC₅₀=33 nM) は、側鎖が小さすぎたためか活性が低下した。アダマンチル誘導体は、無置換 **36r** (IC₅₀=4.1 nM) 及び **36s** (IC₅₀=3.1 nM)、水酸化体 **36t** (IC₅₀=3.1 nM) 及び **36v** (IC₅₀=5.3 nM)、メトキシ体 **36u** (IC₅₀=8.3 nM) と何れも良好な活性を示し、置換基の有無・種類による活性への影響は小さいものだった。また、アダマンチル基の結合位置については、架橋頭部位で結合した **36r** (IC₅₀=4.1 nM) でも、メチレン部位で結合した **36s** (IC₅₀=3.1 nM) でも活性に大きな差はなかった。

これらの活性が良好な化合物について化学的安定性を調べた (Table 9)。全般に、 α -アミノ酸側鎖タイプよりも *N*-置換グリシン側鎖タイプの方が押し並べて安定性は良好で、特にアミノ基周辺が嵩高くなっている化合物は、pH 6.8 水溶液中での 37 °C における 24 時間後の残存率は 95%以上であった。

このように DPP-IV 阻害活性及び化学的安定性が良好な化合物が複数得られ、その 1 つに **36k** がある。化合物 **36k** については、DPP-IV への結合様式をその X 線結晶構造情報¹⁰⁾ を用いて予測した (Figure 12)。2-ヒドロキシ-1,1-ジメチルエチル基の側鎖は、His126、Ser209、Phe357、Arg358 からなるポケットの形状に良く収まっており、これが高親和性に貢献していると考えられる。又、シアノピロリジン骨格を有する阻害剤のシアノ基が Ser630 と共有結合している結晶の X 線構造が得られていることより、**36k** においても同様に共有結合の形を推定結合様式とした。

Figure 12. Predicted binding model of compound **36k** in DPP-IV active site.



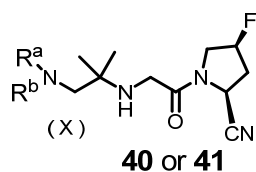
化合物 **36k** は、比較的活性も良好で化学的安定性も良好であったため、更に誘導体展開を考え、デザインを行った。化合物 **36k** の水酸基をメチルエーテルとした化合物 **36j** は活性が 1/3 に減弱しており、水酸基のプロトドナーとしての作用が示唆された。そこで、水酸基をアミド NH に置き換えたエチレンジン側鎖を導入した **40a,b** をデザインし合成したところ、ベンゾイル体 **40b** ($IC_{50}=4.5$ nM) では活性を保持することができた。加えて、pH 6.8 の緩衝液中で 24 時間、37 °C に加温した後の残存率が 98% 以上と極めて安定であった (Table 10)。

次いで、アシル部分を変換し、**40b** と同等の活性を有するチオフェン誘導体 **40c** ($IC_{50}=5.4$ nM) を得た。更に縮環を導入したところ、ベンゾジヒドロフラン体 **40d** ($IC_{50}=2.9$ nM)、ベンゾトリアゾール体 **40f** ($IC_{50}=1.5$ nM) で活性が向上した。しかし、アリファティックなアシル基を導入した *tert*-ブチル体 **40g** と 1-メチルシクロヘキシル体 **40h** は、それぞれ $IC_{50}=5.8, 13$ nM と活性向上は認められなかった。又、ビス(4-クロロフェニル)メチル体 **40i** ($IC_{50}=109$ nM) は大幅な活性低下が見られたが、これは立体的に大き過ぎることが原因と考察した。

フェニルスルホンアミド体 **40j** は、ベンズアミド体 **40b** に比べ約 1/7 分の 1 の活性 ($IC_{50}=75$ nM) であった。活性低下の原因は特定できなかったが、スルホンアミドの酸性プロトン無くした *N*-メチル体 **41a** でも $IC_{50}=31$ nM であったことから、**40j** の活性が低い理由は酸性プロトンではないと考えられる。

次いで、窒素原子へアルキル基を導入した *N*-イソアミル体 **40k** は $IC_{50}>316$ nM、*N,N*-ジエチル体 **41b** は $IC_{50}=252$ nM と活性は低かった。これはアミノ基の塩基性が活性を減弱させているものと考えられる。

Table 10. DPP-IV inhibitory activity and chemical stability of **40a-j** and **41a-d**



Comp	R ^a	R ^b	synthetic method	IC ₅₀ (nM) ^{a)}	remaining amount (%) ^{b)}
40a		H	C	8.2	>98
40b	PhCO-	H	C	4.5	>98
40c		H	C	5.4	>98
40d		H	C	2.9	>98
40e		H	C	5.7	93
40f		H	C	1.5	>98
40g		H	C	5.8	>98
40h		H	C	13	-
40i	(4-Cl-Ph) ₂ CHCO-	H	F	109	-
40j		H	D	75	-
41a		Me	G	31	-
40k		H	E	>316	-
40l		H	E	39	-
41b	Et	Et	I	252	-
41c		PhCO-	H	7.3	-
41d		PhCO-	H	6.2	-

a) DPP-IV inhibitory activity.

b) Residual amount was measured after incubation at 37 °C for 24 h in pH 6.8 aqueous buffer solution.

中程度の活性を示した *N*-(4-シアノベンジル)体 **40l** (IC₅₀=39 nM) は、シアノフェニル基が DPP-IV と親和性を持つことより *N*-イソアミル体 **40k** より活性が向上したと考えられる。

N-イソアミル体 **40k** 及び *N*-(4-シアノベンジル)体 **40l** をベンゾイル化して合成した *N,N*-ジアルキルベンズアミド体 **41c**、**41d** は、それぞれ IC₅₀=7.3、6.2 nM と活性が改善された。これは、ベンズアミド体 **40b** の窒素原子にイソアミル基や 4-

シアノベンジル基を導入しても活性はほとんど変わらなかったと言い換えることもできる。

このように種々誘導体を合成し、*in vitro* 活性を測定したが、**32a** を上回る活性を有する化合物は得られなかった。しかし、**40f** (IC₅₀=1.5 nM) をはじめ阻害活性が良好で且つ化学的に安定な化合物を複数得ることができた。

第3節 (2*S*,4*S*)-4-Fluoro-1-[*N*-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile **36k** の体内動態及び *in vivo* 薬効試験

複数得られた活性及び安定性が良好な化合物については、ラット体内動態を調べて開発候補化合物を絞込んだ。代表的化合物のラット体内動態を Table 11 に示す。化合物 **40a** は、Table 10 に示したエチレンジアミン側鎖誘導体の代表として体内動態を記載したが、これを含めエチレンジアミン側鎖誘導体の中では薬物血中濃度の持続性が **36k** を超えるものは得られなかった。

N-置換グリシン誘導体の中では、**36k** に最も薬物血中濃度の持続性が認められた。**36k** の2時間後或いは6時間後の血中濃度は **9g**、**32a** の血中濃度よりも明らかに高い値であった。このように、**36k** は良好な血中濃度の持続性を有する薬剤であることが分かった。**36k** の化学的安定性は、**40a** には劣るものの **9g**、**32a** よりは大幅に改善しており、開発するに十分な安定性を示した。

Table 11. Chemical stability and plasma drug concentrations after oral administration of **9g**, **32a**, **36a** and **40a**

Comp	residual amount (%) ^{a)}	plasma drug concentrations ^{b)} (ng/mL)			
		0.5	1	2	6 (h)
9g	70	195	24	5	1
32a	86 ^{c)}	157	62	8	6
36k	96	355	274	168	31
40a	>98 ^{d)}	93	39	8	<1 ^{e)}

a) HPLC determination after 6 h of incubation at 37 °C in pH 6.8 aqueous buffer solution.

b) LC-MS determination after oral administration at a dose of 1 mg/kg to Wistar rats.

c) Dihydrochloride salt of **32a** was used in the chemical stability test instead of **32a**.

d) HPLC determination after 24 h of incubation at 37 °C in pH 6.8 aqueous buffer solution.

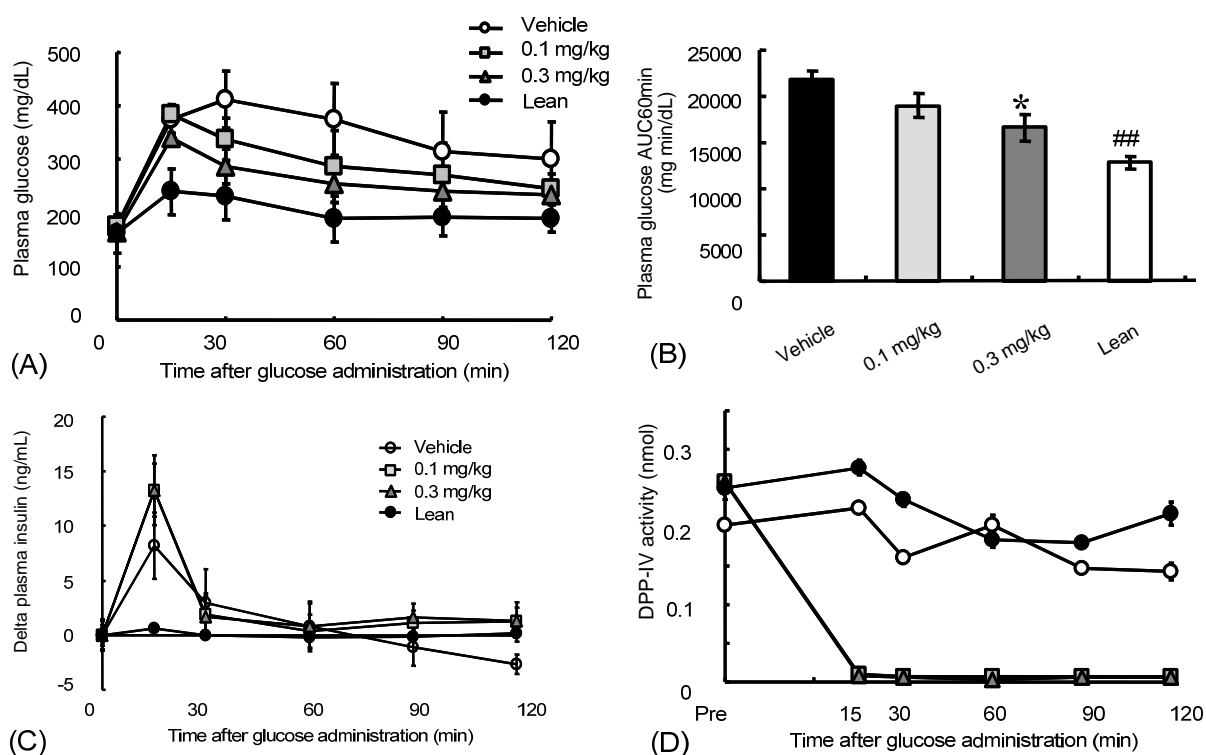
e) 化合物 **40a** は4時間後に 1 ng/mL 以下の薬物濃度であった。

化合物 **36k** の血糖低下作用を、肥満で耐糖能異常を示すモデル動物である Zucker fatty rat を用いて調べた。0.1 mg/kg 及び 0.3 mg/kg の用量で化合物 **36k** を経口投与すると、糖負荷後 30 分後には血糖上昇の抑制が見られた (Figure 13A)。そして、0.3 mg/kg では有意に高血糖を改善した (Figure 13B)。

何れの投与量においても糖負荷後 15 分後には血漿中の DPP-IV 活性はほぼ完全に阻害された。そして、これは 120 分後まで阻害されていた (Figure 13D)。又、インスリン分泌は 0.1 mg/kg 及び 0.3 mg/kg の両用量で促進された (Figure 13C)。

このように、**36k** は 0.1 mg/kg という低容量でもラットで薬効を示しており、ヒトにおいても強い効果が期待された。

Figure 13

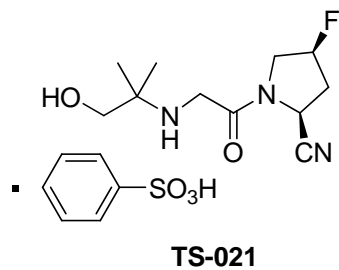


Effects of oral administration of **36k** (0.1 or 0.3 mg/kg) on plasma glucose (A), plasma glucose AUC_{60min} (B), plasma insulin (C) and plasma DPP-IV activity (D) during OGTT in Zucker fatty rats. Each point represents the mean \pm S.E. (n=6). * p<0.05 vs. Vehicle, Dunnett's test. ## p<0.01 vs. Vehicle, Student's t-test.

著者は、2-シアノー-4-フルオロピロリジン誘導体の1位側鎖に種々のN-置換グリシンを導入した化合物をデザイン・合成し、化学的安定性や経口投与時の持続性が

改善され、強力な血糖低下作用を示す **36k** を見出した。**36k** は塩検討によりベンゼンスルホン酸塩を選定し、これを開発化合物 TS-021 とした (Figure 14)。

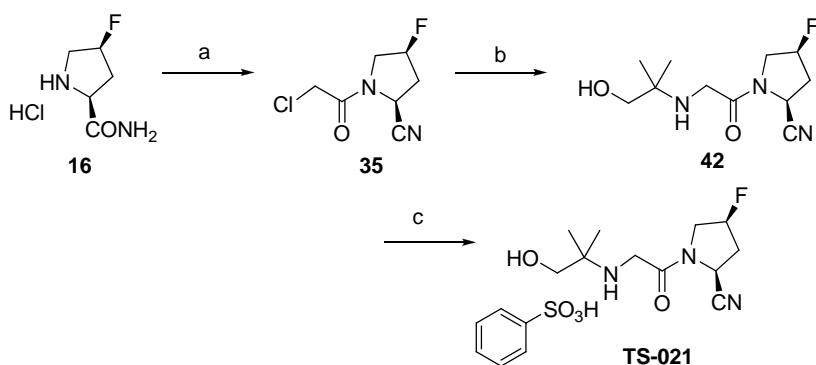
Figure 14



第4節 TS-021の合成

TS-021 が開発候補化合物に選ばれたが、初期合成方法のままでは評価用検体の供給が困難であった。そこで、スケールアップ合成のために中間体 **16** 以降について中間体・試薬・条件等の改良を検討し、その結果検体供給が可能になった。スクリーニングの検体合成の際は、ブロモアセチル中間体 **34** を用いていたがスケールアップにはより化学的に安定なクロロアセチル中間体 **35** を用いることにした。

Scheme 8



Reagents: (a) chloroacetyl chloride, triethylamine / DMF; then cyanuric chloride; (b) 2-amino-2-methyl-1-propanol / iPrOH; (c) benzenesulfonic acid / MeOH-IPE.

ブロモアセチル中間体を用いた合成ルートでは、アシル化反応とカルバモイル基の脱水反応を別々の工程として行っていたが、アシル体 **33** の抽出が容易ではなかったためこの2工程を1ポットで行う検討をした。溶媒としては、どちらの反応でも使用可能な DMF を用いた。最初の工程のアシル化反応はクロロアセチルクロリドとトリエチルアミンを用いることで、tlc 上定量的に進行した。2工程目の脱水反応は、簡便な脱水試薬である塩化シアヌルを用いた。後処理を水で行い、析出した結晶を濾取することで簡便に且つ 86%の高収率で **35** を得ることができた。

又、アミノ化についても試薬当量、溶媒、濃度を検討した結果、IPA を溶媒として用いることで反応系中から目的物が結晶として析出し、カラム精製を行うことなく **42** を単離することができた。フリー体 **42** は、メタノール中でベンゼンスルホン酸と塩形成と結晶化を行い、IPE を添加することで収量を向上させた。このような検討により **16** より総収率 61%で、カラム精製を用いることなく TS-021 を合成することができた。

このような合成方法改良により、高純度の TS-021 を k g オーダーで製造できるようになった。

総論

糖尿病の予防や治療において、運動・食事・薬剤治療が重要な役割を果たしていることは広く知られているが、予防や治療方法が分かっているにも関わらず糖尿病患者は増加しているのが現状である。糖尿病の増加を是正する1つの方法は、これまでとは異なるメカニズムの糖尿病治療薬を開発し患者に提供することである。

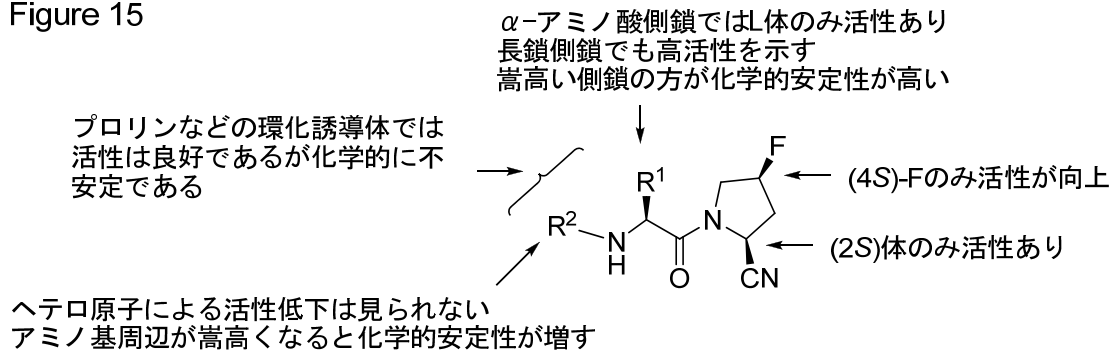
そこで、著者は新規メカニズムの糖尿病治療薬として DPP-IV 阻害剤に興味を持ち、この創薬研究を開始した。既存の 2-シアノピロリジン骨格のピロリジン環部分に着目し、置換基導入を検討した。特異な性質を持つフッ素原子の導入を行うと、一方の立体だけが強い活性を示し無置換体よりも活性が向上することが分かった。又、他の置換基に関してはすべて無置換体より活性が低下することも分かった。フッ素体 **9g** については、ラットに経口投与した際に無置換体よりも大幅に血中濃度が上昇することを見出した。

しかし、フッ素体 **9g** は化学的安定性に問題があり、中性水溶液中では環化による分解が生じることが分かった。そこで、**9g** のイソロイシン側鎖を他の α -アミノ酸に変換して安定性の改善を図った。予想されたように嵩高い側鎖を導入した化合物に安定性の向上が見られ、*tert*-ブチルグリシン側鎖を有する **23c** では、中性水溶液中の安定性を大幅に改善することができた。また、**23c** の立体異性体について調べ、ピロリジン環部分が (2*S*,4*S*) の立体、側鎖部分が L-アミノ酸の立体が必須であることを確認した。

そして、安定性を含め薬剤としてより良い性質の薬剤を得るべく更なる誘導体展開を図った。側鎖として *N*-置換グリシンを導入し、DPP-IV 阻害活性、化学的安定性、更には体内動態に優れた化合物として **36k** を見出した。

又、これら誘導体検討の結果、Figure 15 に示すようにシアノピロリジン誘導体の構造活性相関を把握することができた。

Figure 15



この **36k** は、塩検討の結果得られたベンゼンスルホン酸塩 TS-021 として臨床試験を開始した。TS-021 は、強力で且つ1日1回の投与で有効な、持続性を有する DPP-IV 阻害剤として期待される。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、御指導、御高配を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 西田篤司教授に衷心より感謝の意を表します。

本研究の機会を与えて頂きました大正製薬株式会社副会長 大平明氏、同情報システム部顧問 北村一泰博士、同常任監査役 森本繁夫博士に厚く御礼申し上げます。

また本研究の実施にあたり、終始ご指導と御教示を賜りました、大正製薬株式会社執行役員 亀尾一弥博士、同開発企画部CPL 中里篤朗博士ならびに同創薬化学第2研究室長 太田知己博士に深く感謝いたします。

実験に協力していただいた大正製薬株式会社創薬化学第2研究室主任研究員 平舘彰氏、同主任研究員補 高橋正人博士、同研究員 三上綾子氏、薬理実験を実施していただいた大正製薬株式会社創薬薬理第2研究室次席研究員 山本浩二博士、同主任研究員補 宗友栄二氏、同主任研究員補 長南寿実氏、同主任研究員補 斉藤雅子氏、大正製薬株式会社開発薬理研究室主任研究員 北野清和氏、体内動態試験をしていただいた大正製薬株式会社試験保証室主任研究員 斉藤秀隆氏、同品質試験センター部長 鈴木章夫博士、分子シミュレーションをしていただいた大正製薬株式会社研究システム部主任研究員 高岡雄司博士に深く感謝いたします。

物性試験をしていただいた大正製薬株式会社製剤研究室主任研究員補 国府田歩氏、同主任研究員補 高橋哲子氏、X線結晶解析をしていただいた大正製薬株式会社資源化学研究室次席研究員 松本慶太博士、同主任研究員補 岡田敦司博士に心から感謝いたします。

また、数々のご助言をいただきました大正製薬株式会社製剤研究室長 伊藤修正博士、同知的財産部長 佐藤正和博士、同薬理機能研究所長兼研究企画部長 宮田則之博士に御礼を申し上げます。

実験の部

^1H 核磁気共鳴スペクトルは Varian VXR-300 又は JEOL GX500 で測定し、化学シフト値は tetramethylsilane を内部標準として ppm (δ) で記載した。(NMR 表記の中で、s は singlet、d は doublet、t は triplet、q は quartet、m は multiplet、br は broad peak を示す) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトルは JEOL GX500 で、 ^{19}F 核磁気共鳴スペクトルは Varian VXR-300 で測定した。質量スペクトル (MS) は Shimadzu/Kratos HV-300 で測定した。融点は Buchi 535 融点測定器で (温度は未補正)、赤外吸収スペクトル (IR) は Perkin-Elmer 1760 spectrometer で測定した。元素分析は Perkin-Elmer 240C を用いて炭素、水素、窒素の含有率を測定し、ハロゲンと硫黄については Yokokawa-Denki IC7000P を用いて測定した。薄層クロマトグラフィーは silica gel 60 F254 (Merck) で、シリカゲルカラムクロマトグラフィーは 100~200-mesh silica gel C-200 (Wako Pure Chemical) で行った。

N-アシルプロリン誘導体は、溶液中でシス及びトランスのロータマー混合物として存在することが知られている¹⁶⁾。化合物によっては NMR でコンホマーが見られ、ピロリジン環の 2 位及び 4 位の水素は NMR のピークが分かれて観測される。実験項の NMR データでは、マイナーコンホマーのピークは、明確に観測されるものについて記載した。

第 1 章に関する実験

***tert*-Butyl (2*S*,4*S*)-2-(aminocarbonyl)-4-fluoropyrrolidine-1-carboxylate (3g)**

(4*S*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-fluoro-L-proline **2g**¹²⁾ (4.5 g, 19.3 mmol) をアセトニトリル (50 mL) に溶かし、1-hydroxybenzotriazole monohydrate (3.6 g, 23.5 mmol) と 1-(3,3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (4.5 g, 23.5 mmol) を加えて氷冷した。徐々に昇温し室温にて一晩攪拌した。反応液を再び氷冷し、25% アンモニア水 (5 mL) を加え、氷冷で 30 分間、室温で 30 分間攪拌した。アセトニトリル (50 mL) を反応液に加え、不溶物を濾去した。濾液を減圧にて濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; hexane : EtOAc = 4:1 - 1:5) で精製し、濃縮後ヘキサンを加えることで無色粉末の目的物 (4.2 g, 94%) を得た。mp 169–170 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 7.21, 7.15 and 6.95 (2H, each br, CONH₂), 5.21 (1H, br d, J = 54.0 Hz, H-4), 4.13 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-2), 3.47-3.68 (2H, m, H-5), 2.26-2.55 (1H, m, H-3), 2.09-2.22 (1H, m, H-3), 1.41 and 1.36 (9H, each s, (CH₃)₃CO). MS (ESI pos.) m/z 255 ([M+Na]⁺). Anal. calcd for C₁₀H₁₇FN₂O₃: C, 51.71; H, 7.38; F, 8.18; N, 12.06. Found: C, 51.72; H, 7.46; F, 8.14; N, 11.90. IR (KBr) 3474, 3283, 3218, 3162, 2990, 1696, 1649, 1397, 1378, 1360, 1223, 1167, 1119, 1072, 848 cm⁻¹. $[\alpha]_D^{22}$ -56.3 (c=0.5, MeOH).

(4S)-4-Fluoro-L-prolinamide hydrochloride (4g)

4M HCl / ジオキサン (45 mL) に **3g** (4.2 g, 18.1 mmol) を懸濁し、室温で 2 時間攪拌した後、溶媒を減圧にて留去した。残渣にトルエン(50 mL)を加え、再度溶媒を減圧にて留去した。この操作を 3 回繰り返し、目的物(3.1 g, 100%)を無色粉末として得た。この中間体は、これ以上の精製を行わずに次の反応に用いた。mp 230–231 °C (decomp.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.72 (2H, br s, H₂N⁺), 8.10 (1H, br s, CONH₂), 7.70 (1H, br s, CONH₂), 5.38 (1H, dt like, *J* = 52.5, 3.6 Hz, H-4), 4.31 (1H, dd, *J* = 10.4, 3.7 Hz, H-2), 3.56 (1H, ddd, *J* = 19.9, 13.4, 1.7 Hz, H-5), 3.39 (1H, ddd, *J* = 36.5, 13.4, 3.6 Hz, H-5), 2.48-2.72 (1H, m, H-3), 2.24-2.40 (1H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 155 ([M+Na]⁺). Anal. calcd for C₅H₉FN₂O HCl: C, 35.62; H, 5.98; Cl, 21.03; F, 11.27; N, 16.62. Found: C, 35.57; H, 5.95; Cl, 21.03; F, 11.26; N, 16.46. IR(KBr) 3319, 3174, 3063, 2902, 2778, 2731, 1707, 1626, 1583, 1399, 1340, 1322, 1207, 1162, 1055, 1026, 965, 863, 635 cm⁻¹. [α]_D²⁶ -48.8 (c=0.5, MeOH).

***N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-isoleucyl-(4S)-4-fluoro-L-prolinamide (5g)**

N-[(9*H*-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-isoleucine (5.1 g, 14.4 mmol) を、THF (40 mL) と DMF (10 mL) の混合溶媒に溶解し、氷冷下で 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (2.6 g, 17.0 mmol)、1-(3,3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (3.3 g, 17.2 mmol) 及び *N,N*-diisopropylethylamine (2.5 mL) を加え、徐々に昇温し室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧で留去し、残渣に水を加えた。生成した粉末を濾取し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; hexane : EtOAc = 4:1 - 1:4) で精製して、目的物(6.9 g, quant)を淡黄色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.89 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 7.72 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 7.41 (2H, t like, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 7.32 (2H, t like, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 7.05 (1H, br s, NH), 6.91 (1H, br s, NH), 5.31 (1H, br d, *J* = 52.5 Hz, H-4), 4.45 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, H-2), 4.32-3.96 (5H, m), 3.89-3.74 (1H, dd, *J* = 25.6, 12.6 Hz, H-5), 2.45-2.12 (2H, m, H-3), 1.88-1.76 (1H, m), 1.61-1.49 (1H, m), 1.20-1.10 (1H, m), 0.95 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me), 0.84 (3H, dd, *J* = 7.5, 7.3 Hz, Me).

9*H*-Fluoren-9-ylmethyl

((1*S*,2*S*)-1-[(2*S*,4*S*)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl carbamate (6g)

THF (70 mL) に **5g** (6.9 g, 14.8 mmol) を溶解し、氷冷にて trifluoroacetic anhydride (4.0 mL, 28.3

mmol)を加えた。氷冷にて 1.5 時間攪拌した後、反応液を減圧で濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; hexane : EtOAc = 8:1 - 3:2) で精製して目的物(6.2 g, 97%)を淡黄色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.91 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, NH), 7.89 (2H, d, *J* = 7.3 Hz, aromatic H), 7.72 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 7.42 (2H, t like, *J* = 7.3 Hz, aromatic H), 7.35-7.29 (2H, m, aromatic H), 5.49 (1H, br d, *J* = 50.5 Hz, H-4), 5.05-4.98 (1H, m, H-2), 4.34-3.80 (6H, m), 2.60-2.30 (2H, m, H-3), 1.90-1.74 (1H, m), 1.65-1.48 (1H, m), 1.20-1.13 (1H, m), 0.87 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me), 0.86 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, Me). MS(ESI pos.) *m/z* 472 ([M+Na]⁺).

(2S,4S)-4-Fluoro-1-L-isoleucylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (9g)

1,2-ジクロロエタン(90 mL)に **6g** (6.2 g, 13.8 mmol)を溶解し、氷冷にて diethylamine (10 mL)を加え、そのまま氷冷で 30 分間、次いで室温で 5 時間攪拌した。反応液を減圧で濃縮し、残渣をジエチルエーテル(100 mL)、THF (50 mL)及びクロロホルム(50 mL)の混合溶媒に溶解し、氷冷にて 4M HCl / ジオキサン(4.0 mL)を加えた。生成した粉末を濾取し、ジエチルエーテルで洗浄した。得られた粉末をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃: MeOH : 25% aqueous ammonia = 40:1:0.1 - 25:1:0.1)で精製した。得られた残渣をクロロホルムに溶解し、氷冷で 4M HCl / ジオキサン(4.0 mL)を加え生成した粉末を濾取し、クロロホルムで洗浄し、減圧で乾燥して目的物(2.9 g, 80%)を無色粉末として得た。mp 245–248 °C (decomp.). ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.59 (3H, br s, H₃N⁺), 5.54 (0.9H, br d, *J* = 52.1 Hz, H-4 of the major conformer), 5.45 (0.1H, br d, *J* = 53.3 Hz, H-4 of the minor conformer), 5.39 (0.1H, d, *J* = 6.7 Hz, H-2 of the minor conformer), 5.06 (0.9H, d, *J* = 9.4 Hz, H-2 of the major conformer), 4.07-3.77 (3H, m, H-5 and NCHCO), 2.55-2.34 (2H, m, H-3), 1.94-1.83 (1H, m), 1.66-1.53 (1H, m), 1.22-1.13 (1H, m), 0.94 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me), 0.88 (3H, t, *J* = 7.3Hz, Me); ¹³C NMR (125.4 MHz, DMSO - *d*₆) δ 168.2, 118.3, 92.9 (d, *J*_{C-F} = 175.7 Hz), 54.4, 53.6 (d, *J*_{C-F} = 21.7 Hz), 44.7, 36.3, 35.4 (d, *J*_{C-F} = 20.7 Hz), 23.7, 13.9, 10.9; ¹⁹F NMR (282.2 MHz, DMSO - *d*₆) δ -175.1. MS(ESI pos.) *m/z* 250 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 262 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₁H₁₉FN₃O[M+H]⁺ 228.1512, found (*m/z*) 228.1508. Anal. calcd for C₁₁H₁₈FN₃O HCl 0.5H₂O: C, 48.44; H, 7.39; N, 15.41. Found: C, 48.20; H, 7.37; N, 15.23. [α]_D²⁵ -62.7 (c=0.3, MeOH).

(2S,4R)-4-Hydroxy-1-L-isoleucylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (9a)

化合物 **9g** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。mp 173–176 °C (decomp.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.32 (3H , br s, H₃N⁺), 5.45 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, OH), 4.75 (1H, t

like, $J = 9$ Hz, H-2), 4.38 (1H, br s, H-4), 4.08 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, NCHCO), 3.74 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-5), 3.64 (1H, dd, $J = 10.8, 3.8$ Hz, H-5), 2.37-2.21 (2H, m, H-3), 1.95-1.81 (1H, m), 1.55-1.40 (1H, m), 1.26-1.05 (1H, m), 0.97 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, Me), 0.88 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, Me). MS(ESI pos.) m/z 248 ($[M+Na]^+$), 226 ($[M+H]^+$); (ESI neg.) m/z 260 ($[M+Cl]^-$). HRMS calcd for $C_{11}H_{20}N_3O_2[M+H]^+$ 226.1556, found (m/z) 226.1570.

(2S,4S)-4-Hydroxy-1-L-isooleucylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (9b)

化合物 **9g** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。 1H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 8.40 (3H, br s, H_3N^+), 5.44 (1H, br s, OH), 4.88 (1H, dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, H-2), 4.45-4.38 (1H, m, H-4), 3.94-3.82 (1H, m, NCHCO), 3.75 (1H, dd, $J = 10.8, 4.3$ Hz, H-5), 3.53 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-5), 2.25 (1H, ddd, $J = 13.2, 9.2, 4.1$ Hz, H-3), 2.10 (1H, br d, $J = 13.2$ Hz, H-3), 2.01-1.80 (1H, m), 1.65-1.47 (1H, m), 1.26-1.08 (1H, m), 0.96 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, Me), 0.88 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, Me). MS(ESI pos.) m/z 248 ($[M+Na]^+$), 226 ($[M+H]^+$); (ESI neg.) m/z 260 ($[M+Cl]^-$). HRMS calcd for $C_{11}H_{20}N_3O_2[M+H]^+$ 226.1556, found (m/z) 226.1565.

(2R,3S)-3-Hydroxy-1-L-isooleucylpyrrolidine-2-carbonitrile (9c)

塩酸塩形成の部分を除いて、化合物 **9g** と同様の方法で表題化合物を無色油状物質として得た。 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.76 (1H, br s, H-2), 4.60 (1H, br d, $J = 3.7$ Hz, H-3), 3.83-3.67 (2H, m, H-5), 3.33 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, NCHCO), 2.40-2.26 (1H, m, H-3), 2.19-2.09 (1H, m, H-3), 1.70-1.54 (2H, m), 1.27-1.05 (1H, m), 0.96 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me), 0.92 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, Me). MS(ESI pos.) m/z 248 ($[M+Na]^+$). HRMS calcd for $C_{11}H_{20}N_3O_2[M+H]^+$ 226.1556, found (m/z) 226.1545.

(2S,4R)-1-L-Isoleucyl-4-methoxypyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (9d)

化合物 **9g** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。 1H NMR (500 MHz, DMSO - d_6) δ 8.37 (3H, br s, H_3N^+), 4.70 (1H, dd, $J = 9.1, 7.9$ Hz, H-2), 4.20 (1H, br d, $J = 4.3$ Hz, NCHCO), 4.07 (1H, br s, H-4), 3.99 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-5), 3.63 (1H, dd, $J = 11.5, 3.6$ Hz, H-5), 3.25 (3H, s, OMe), 2.54-2.47 (1H, m, H-3), 2.34-2.27 (1H, m, H-3), 1.95-1.86 (1H, m), 1.53-1.44 (1H, m), 1.26-1.12 (1H, m), 0.98 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, Me), 0.88 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, Me). MS(ESI pos.) m/z 262 ($[M+Na]^+$), 240 ($[M+H]^+$); (ESI neg.) m/z 274 ($[M+Cl]^-$). HRMS calcd for $C_{12}H_{22}N_3O_2[M+H]^+$ 240.1712, found (m/z) 240.1723.

(2S,4S)-1-L-Isoleucyl-4-methoxypyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (9e)

化合物 **9g** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。mp 175–178 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.46 (3H, br s, H₃N⁺), 5.23 (0.05H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2 of the minor conformer), 4.91 (0.95H, dd, *J* = 9.2, 1.6 Hz, H-2 of the major conformer), 4.14 (0.95H, br s, H-4 of the major conformer), 4.09 (0.05H, m, H-4 of the minor conformer), 3.87 (1H, d, NCHCO), 3.80-3.73 (2H, m, H-5), 3.29 (3H, s, OMe), 2.37 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H-3), 2.22 (1H, ddd, *J* = 13.7, 9.5, 4.0 Hz, H-3), 1.91-1.80 (1H, m), 1.64-1.53 (1H, m), 1.23-1.12 (1H, m), 0.94 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me), 0.88 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, Me). MS(ESI pos.) *m/z* 262 ([M+Na]⁺), 240 ([M+H]⁺); (ESI neg.) *m/z* 274 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₂H₂₂N₃O₂[M+H]⁺ 240.1712, found (*m/z*) 240.1717.

(2S,4R)-4-Fluoro-1-L-isoleucylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (9f)

化合物 **9g** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。mp 222–225 °C (decomp.). ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.38 (3H, br s, H₃N⁺), 5.42 (1H, br d, *J* = 51.9 Hz, H-4), 4.87 (1H, dd, *J* = 10.1, 8.0 Hz, H-2), 4.28-4.20 (2H, m, H-5 and NCHCO), 3.81 (1H, ddd, *J* = 39.0, 12.6, 2.5 Hz, H-5), 2.77-2.67 (1H, m, H-3), 2.60-2.45 (1H, m, H-3), 1.95-1.84 (1H, m), 1.52-1.43 (1H, m), 1.23-1.13 (1H, m), 0.98 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me), 0.88 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, Me). MS(ESI pos.) *m/z* 250 ([M+Na]⁺), 228 ([M+H]⁺); (ESI neg.) *m/z* 262 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₁H₁₉FN₃O[M+H]⁺ 228.1512, found (*m/z*) 228.1518.

***tert*-Butyl**

((1S,2S)-1-[(2S)-2-cyano-4,4-difluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl)carbamate (8h)

DMF (2.5 mL) に *tert*-butyl ((1S,2S)-1-[(2S)-2-(aminocarbonyl)-4,4-difluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl)carbamate **7h** (900 mg, 2.48 mmol)を溶解し、塩化シアヌル(280 mg, 1.49 mmol)を加え室温で1時間攪拌した。反応液を水にあげて酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。乾燥剤を濾去後、濾液を減圧で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; hexane : EtOAc = 20:1 - 4:1) で精製して目的物(760 mg, 89%)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.29 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, NH), 5.08 (1H, dd, *J* = 9.1, 4.1 Hz, H-2), 4.34-4.10 (2H, m, H-5), 3.90 (1H, t like, *J* = 8.7 Hz, NCHCO), 3.03-2.73 (2H, m, H-3), 1.83-1.67 (1H, m), 1.59-1.43 (1H, m), 1.36 (9H, s, Boc), 1.26-1.04 (1H, m), 0.87-0.78 (6H, m,

2Me). MS(ESI pos.) m/z 368 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 344 ([M-H]⁻).

(2S)-4,4-Difluoro-1-L-isooleucylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (9h)

化合物 **8h** (560 mg, 1.62 mmol)に 2M 塩酸水溶液(12 mL)を加え、室温で一晩攪拌した。更に 2M 塩酸水溶液(6 mL)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を酢酸エチルで洗浄し、水層に 1M 水酸化ナトリウム水溶液(35 mL)、過剰の食塩、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。乾燥剤を濾去後、濾液を減圧で濃縮し、(2S)-4,4-difluoro-1-L-isooleucylpyrrolidine -2-carbonitrile を得た。これをジエチルエーテル(20 mL)に溶解し、氷冷で 4M HCl /酢酸エチル(0.50 mL)を加えた。析出物を濾取して、目的物(370 mg, 81%)を無色粉末として得た。mp 235–243 °C (decomp.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.38 (3H, br s, H₃N⁺), 5.14 (1H, t like, *J* = 7.1 Hz, H-2), 4.46-4.12 (2H, m, H-5), 4.00 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, NCHCO), 2.98-2.81 (2H, m, H-3), 1.96-1.78 (1H, m), 1.60-1.44 (1H, m), 1.28-1.06 (1H, m), 0.95 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me), 0.88 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, Me). MS(ESI pos.) m/z 268 ([M+Na]⁺), 246 ([M+H]⁺); (ESI neg.) m/z 280 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₁H₁₇F₂N₃O[M]⁺ 245.1340, found (m/z) 245.1353.

tert-Butyl

((1S,2S)-1-[(2R,3R)-2-cyano-3-fluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl]-2-methylbutyl)carbamate (8i)

6g 又は **8h** を得た方法を用いて(3S)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-hydroxy-L-proline から得た *tert*-butyl ((1S,2S)-1-[(2R,3S)-2-cyano-3-hydroxypyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl)carbamate **8c** (168mg, 0.516mmol)を、ジクロロメタン(5 mL)に溶解した。この溶液をドライアイスとアセトンで冷却して、diethylaminosulfur trifluoride (0.206 mL)を加えた。温度を徐々に室温まで上げ、一晩攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。乾燥剤を濾去後、濾液を減圧で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; hexane : EtOAc = 3:2) で精製して目的物(65 mg, 38%)を無色ガム状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.32 (1H, br d, *J* = 51.8 Hz, H-3), 5.09 (1H, br d, *J* = 9.3 Hz, NH), 4.84 (1H, dd, *J* = 21.8, 4.4 Hz, H-2), 4.27-4.08 (2H, m, H-5 and NCHCO), 3.81 (1H, td like, *J* = 10.2, 6.2 Hz, H-5), 2.52-2.36 (1H, m, H-4), 2.31-2.05 (1H, m, H-4), 1.83-1.71 (1H, m), 1.66-1.52 (1H, m), 1.42 (9H, s, Boc), 1.24-1.08 (1H, m), 0.98 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me), 0.92 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, Me). MS(ESI pos.) m/z 350 ([M+Na]⁺).

(2R,3R)-3-Fluoro-1-L-isoleucylpyrrolidine-2-carbonitrile trifluoroacetate (9i)

氷冷したトリフルオロ酢酸(1.0 mL)に **8i** (62mg, 0.18mmol)を加えて溶解し、室温で 30 分間攪拌した後に、減圧で溶媒を留去した。残渣にジイソプロピリエーテル(10 mL)を加え、上澄を除去した。再度ジイソプロピリエーテル(10 mL)を加え、不溶物を濾取して目的物(32 mg, 51%)を黄色ガム状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.22 (3H, br s, H₃N⁺), 5.50 (1H, br d, *J* = 52.8 Hz, H-3), 5.08 (1H, dd, *J* = 26.1, 4.0 Hz, H-2), 4.19 (1H, d, *J* = 5.4 Hz, NCHCO), 4.05 (1H, t like, *J* = 8.9 Hz, H-5), 3.64-3.54 (1H, m, H-5), 2.42-2.00 (2H, m, H-4), 1.99-1.84 (1H, m), 1.54-1.38 (1H, m), 1.26-1.08 (1H, m), 0.96 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me), 0.89 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, Me). MS(ESI pos.) *m/z* 250 ([M+Na]⁺), 228 ([M+H]⁺); (ESI neg.) *m/z* 340 ([M+C₂F₃O₂]⁻). HRMS calcd for C₁₁H₁₉FN₃O[M+H]⁺ 228.1512, found (*m/z*) 228.1525.

9H-Fluoren-9-ylmethyl

((1S,2S)-1-[(2S,4S)-4-chloro-2-cyanopyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl)carbamate (6j)

化合物 **6g** と同様の方法で(4*R*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-hydroxy-L-proline から合成した 9H-fluoren-9-ylmethyl

((1*S*,2*S*)-1-[(2*S*,4*R*)-2-cyano-4-hydroxypyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl)carbamate **6a** (200 mg, 0.45 mmol) を、ジクロロメタン(2 mL)と四塩化炭素(2 mL)の混合溶媒に溶解し、triphenylphosphine (234 mg, 0.89 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。この反応液にエタノール(0.5 mL)を加え、室温で 4 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; hexane : EtOAc = 1:1 - 2:3) で精製して目的物(126 mg, 60%)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.76 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 7.57 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 7.40 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 7.30 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, aromatic H), 5.42 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, NH), 4.88 (1H, dd, *J* = 8.3, 3.5 Hz, H-2), 4.63-4.56 (1H, m, H-4), 4.44-4.08 (5H, m), 3.96 (1H, dd, *J* = 11.5, 1.9 Hz, H-5), 2.73-2.56 (2H, m, H-3), 1.93-1.79 (1H, m), 1.72-1.56 (1H, m), 1.30-1.13 (1H, m), 1.12 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me), 0.96 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, Me). MS(ESI pos.) *m/z* 488 ([M+Na]⁺).

(2S,4S)-4-Chloro-1-L-isoleucylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (9j)

化合物 **9g** と同様の方法で、**6j**(100 mg, 0.22 mmol)から表題化合物(32 mg, 53%)を無色粉末として得た。mp 189–192 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.46 (3H, br s, H₃N⁺), 5.01-4.92 (2H, m,

H-2 and H-4), 4.11 (1H, dd, $J = 12.0, 4.3$ Hz, H-5), 3.98 (1H, br d, $J = 12.0$ Hz, H-5), 3.90 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, NCHCO), 2.73 (1H, ddd, $J = 14.6, 9.4, 4.8$ Hz, H-3), 2.54-2.43 (1H, m, H-3), 2.00-1.80 (1H, m), 1.66-1.48 (1H, m), 1.27-1.10 (1H, m), 0.97 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me), 0.88 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, Me). MS(ESI pos.) m/z 266 ($[M+Na]^+$), 244 ($[M+H]^+$); (ESI neg.) m/z 278 ($[M+Cl]^-$), 242 ($[M-H]^-$). HRMS calcd for $C_{11}H_{19}ClN_3O[M+H]^+$ 244.1217, found (m/z) 244.1231.

***tert*-Butyl ((1*S*,2*S*)-1-[(2*S*)-2-(aminocarbonyl)-4-oxopyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl)-carbamate (7k)**

ジクロロメタン(10 mL)に *tert*-butyl ((1*S*,2*S*)-1-[(2*S*,4*R*)-2-(aminocarbonyl)-4-hydroxy-pyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl)carbamate **7a** (250 mg, 0.73 mmol)を溶解し、Molecular Sieves-4A (1.5 g)、pyridinium chlorochromate (235 mg, 1.09 mmol)及び酢酸(0.07 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。反応液をそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; hexane : EtOAc = 1:1 - 1:3) で精製して目的物(180 mg, 72%)を褐色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.70 and 5.50 (1H each, br s each, CONH₂), 5.25-5.05 (2H, m, BocNH and H-2), 4.41 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-5), 4.17-4.07 (1H, m, NCHCO), 3.92 (1H, d, $J = 17.3$ Hz), 3.05 (1H, br d, $J = 18.2$ Hz, H-3), 2.76-2.60 (1H, m, H-3), 1.80-1.50 (2H, m), 1.43 (9H, s), 1.27-1.07 (1H, m), 0.98-0.85 (6H, m, 2Me). MS(ESI pos.) m/z 364 ($[M+Na]^+$); (ESI neg.) m/z 340 ($[M-H]^-$).

***tert*-Butyl ((1*S*,2*S*)-1-[(2*S*)-2-cyano-4-oxopyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylbutyl)carbamate (8k)**

THF (10 mL)に **7k** (168 mg, 0.49 mmol)を溶解し、氷冷下 trifluoroacetic anhydride (0.21 mL)と *N,N*-diisopropylethylamine (0.51 mL)を加え、氷冷下1時間攪拌した。反応液を酢酸エチル(100 mL)で希釈し、水、10%硫酸水素カリウム水溶液、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤の濾去、溶媒留去して、目的物(174 mg, quant)を褐色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.38 (1H, br d, $J = 7.6$ Hz, H-2), 5.07 (1H, br d, $J = 8.1$ Hz, NH), 4.52 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-5), 4.03-3.95 (1H, m, NCHCO), 4.00 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-5), 3.10-2.86 (2H, m, H-3), 1.90-1.72 (1H, m), 1.70-1.54 (1H, m), 1.41 (9H, s, Boc), 1.34-1.10 (1H, m), 0.98 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, Me), 0.92 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, Me). MS(ESI pos.) m/z 378 ($[M+MeOH+Na]^+$), 346 ($[M+Na]^+$); (ESI neg.) m/z 322 ($[M-H]^-$).

(2S)-1-L-Isoleucyl-4-oxopyrrolidine-2-carbonitrile trifluoroacetate (9k)

化合物 **9i** と同様の方法で、**8k**(91 mg, 0.28 mmol)から表題化合物(76 mg, 80%)を無色粉末として得た。mp 121–124 °C (decomp.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO – *d*₆) δ 8.21 (3H, br s, H₃N⁺), 5.30 (1H, dd, *J* = 9.8, 5.6 Hz, H-2), 4.29 (1H, d, *J* = 17.7 Hz, H-5), 4.18 (1H, d, *J* = 17.7 Hz, H-5), 4.09-3.98 (1H, m, NCHCO), 3.11 (1H, dd, *J* = 19.0, 9.8 Hz, H-3), 3.01 (1H, dd, *J* = 19.0, 5.6 Hz, H-3), 2.00-1.90 (1H, m), 1.54-1.38 (1H, m), 1.34-1.10 (1H, m), 0.98 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, Me), 0.88 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, Me). MS(ESI pos.) *m/z* 278 ([M+MeOH+Na]⁺), 246 ([M+Na]⁺). HRMS calcd for C₁₁H₁₈N₃O₂[M+H]⁺ 224.1399, found (*m/z*) 224.1381.

第2章に関する実験

化合物 9g の分解と HPLC 分析

化合物 9a (5 mg) を pH6.8 の Britton-Robinson 緩衝液(5 mL) に溶解し、60°C に加熱した。この溶液を CAPCELL PAK UG120 (5 μm particle size, ϕ 4.6 \times 150 mm; SHISEIDO) を用いた逆相 HPLC で分析した。分析は、流速 ; 1.0 mL/min、移動相 ; acetonitrile-H₂O (15:85 v/v, 10 mM ammonium acetate solution)、UV 検出波長 ; 210 nm、で行い、他の化学的安定性の測定においても同様の方法で行った。

(3S,7S)-7-Fluoro-1-imino-3-[(1S)-1-methylpropyl]hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-4(1H)-one acetic acid salt (13)

化合物 12 (9g) のフリー体, 1.30 g, 5.72 mmol) をエタノール(4.5 mL) に溶解し、酢酸 (0.36 mL, 6.29 mmol) 及びヘキサン (12 mL) を加え、室温で一晩攪拌した。析出した粉末を濾取し、減圧乾燥して目的物(0.73 g, 44%) を無色粉末として得た。mp 143–146 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.34 (1H, dt like, *J* = 53.1, 3.8 Hz, H-7), 4.35 (1H, dd, *J* = 11.8, 5.7 Hz, H-8a), 3.87 (1H, ddd, *J* = 38.4, 14.4, 4.3 Hz, H-6), 3.66 (1H, d, *J* = 5.3 Hz, H-3), 3.41 (1H, dd, *J* = 28.3, 14.4 Hz, H-6), 2.68 (1H, td like, *J* = 15.1, 5.6 Hz, H-8), 2.04–1.88 (1H, m, H-8), 1.84 (3H, s, AcOH), 1.77–1.65 (1H, m), 1.52–1.42 (1H, m), 1.20–1.08 (1H, m), 0.87 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.85 (3H, t, *J* = 7.3 Hz); ¹³C NMR (125.4 MHz, DMSO - *d*₆) δ 173.4, 167.2, 158.2, 90.5 (d, *J*_{C-F} = 171.5 Hz), 64.1, 54.4, 51.7 (d, *J*_{C-F} = 23.8 Hz), 39.4, 36.5 (d, *J*_{C-F} = 20.7 Hz), 24.7, 22.0, 15.5, 11.2; ¹⁹F NMR (282.2 MHz, DMSO - *d*₆) δ -173.4. MS(ESI pos.) *m/z* 228 (M+H)⁺, 250 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 226 (M-H)⁻. Anal. calcd for C₁₁H₁₈FN₃O C₂H₄O₂ 0.5H₂O: C, 52.69; H, 7.82; N, 14.18; F, 6.41. Found: C, 52.80; H, 7.93; N, 14.30; F, 6.45. [α]_D²³ +99.4 (c=0.3, MeOH).

(3S,7S)-7-Fluoro-3-[(1R)-1-methylpropyl]hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (11)

化合物 13 (240 mg, 1.28 mmol) を pH6.8 の Britton-Robinson 緩衝液(24 mL) に溶解し、80°C で 5 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧で濃縮した。残渣に酢酸エチルとヘキサンを加え、生じた粉末を濾取し乾燥して目的物(128 mg, 44%) を無色粉末として得た。mp 129–131 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.48 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 5.31 (1H, dt like, *J* = 53.0, 3.8 Hz, H-7), 4.36 (1H, dd, *J* = 11.6, 6.1 Hz, H-8a), 3.83 (1H, ddd, *J* = 38.4, 14.3, 4.0 Hz, H-6), 3.55–3.44 (2H, m, H-3 and H-6), 2.38 (1H, td like, *J* = 15.4, 5.9 Hz, H-8), 2.08 (1H, dddd, *J* = 43.2, 15.3, 11.6, 3.7 Hz,

H-8), 1.82–1.73 (1H, m), 1.57–1.47 (1H, m), 1.18–1.08 (1H, m), 0.89 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.87 (3H, t, $J = 7.3$ Hz); ^{13}C NMR (125.4 MHz, DMSO - d_6) δ 168.0, 165.0, 90.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 171.5$ Hz), 61.4, 55.8, 52.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 23.8$ Hz), 38.7, 35.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 20.6$ Hz), 24.6, 15.1, 10.9; ^{19}F NMR (282.2 MHz, DMSO - d_6) δ -172.7. MS(ESI pos.) m/z 251 (M+Na) $^+$; (ESI neg.) m/z 227 (M-H) $^-$. Anal. calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_2$: C, 57.88; H, 7.51; N, 12.27; F, 8.32. Found: C, 57.86; H, 7.44; N, 12.26; F, 8.35. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +76.0$ (c=0.3, MeOH).

***tert*-Butyl (2*S*,4*S*)-2-cyano-4-fluoropyrrolidine-1-carboxylate (17)**

tert-Butyl (2*S*,4*S*)-2-(aminocarbonyl)-4-fluoropyrrolidine-1-carboxylate **15** (697 mg, 3.00 mmol)をDMF (3 mL)に溶解し、cyanuric chloride (332 mg, 1.80 mmol)を加え、室温で20分間攪拌した。反応液を水にあけ酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧で濃縮して目的物(680 mg, quant)を淡褐色粉末として得た。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 5.37 (1H, br d, $J = 53.3$ Hz, H-4), 4.85–4.80 (1H, m, H-2), 3.66–3.38 (2H, m, H-5), 2.58–2.36 (2H, m, H-3), 2.64–2.36 (2H, m), 1.44 (9H, s). MS(ESI pos.) m/z 237 (M+Na) $^+$; (ESI neg.) m/z 249 (M+Cl) $^-$.

(2*S*,4*S*)-4-Fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (18)

化合物 **17** (450 mg, 2.10 mmol)をメタノール(3 mL)と4M 塩酸水溶液 (3 mL)の混合液に溶解し、室温で20時間攪拌した。反応液を減圧で濃縮して目的物(320 mg, quant)を淡褐色粉末として得た。この中間体は精製せずに次の反応に用いた。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 5.53 (1H, br d, $J = 52.4$ Hz, H-4), 4.97 (1H, dd, $J = 8.2, 4.3$ Hz, H-2), 3.59 (1H, dd, $J = 22.1, 13.7$ Hz, H-5), 3.47 (1H, ddd, $J = 35.9, 13.7, 3.7$ Hz, H-5), 2.64–2.43 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) m/z 115 (M+H) $^+$; (ESI neg.) m/z 149 (M+Cl) $^-$.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-valyl-(4*S*)-4-fluoro-L-prolinamide (19a)**

(4*S*)-4-Fluoro-L-prolinamide hydrochloride **16** (500 mg, 2.97 mmol)と *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-valine (645 mg, 2.97 mmol)をDMF (10 mL)に溶解し、氷冷して1-hydroxybenzotriazole monohydrate (455 mg, 2.97 mmol)、1-(3,3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (598 mg, 3.12 mmol)及び *N,N*-diisopropylethylamine (0.54 mL)を加えた。徐々に温度を上げ、室温で一晩攪拌した。反応液を飽和食塩水にあけ酢酸エチルで抽出し、有機層を10%硫酸水素カリウム水溶液、5%炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネ

シウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧で濃縮して目的物(840 mg, 85%)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.02 (1H, br s), 6.95–6.85 (2H, m), 5.33 (1H, br d, *J* = 53.6 Hz, H-4), 4.43 (1H, dd, *J* = 9.8, 1.9 Hz, H-2), 4.09–3.73 (3H, m), 2.50–2.10 (2H, m, H-3), 2.02–1.84 (1H, m), 1.37 (9H, s), 0.94 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.88 (3H, d, *J* = 6.7 Hz). MS(ESI pos.) *m/z* 354 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 330 (M-H)⁻.

(4S)-1-((2S)-2-Cyclohexyl-2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino)acetyl-4-fluoro-L-prolinamide (21i)

化合物 **19a** と同様の方法で、**16** (300 mg, 1.78 mmol) と (2S)-cyclohexyl{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}acetic acid (709 mg, 1.87 mmol)から表題化合物(880 mg, quant)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.88 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.73 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.41 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.32 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.06 (1H, br s), 6.89 (1H, br s), 5.32 (1H, br d, *J* = 53.8 Hz, H-4), 4.44 (1H, dd, *J* = 9.7, 2.1 Hz, H-2), 4.33–3.74 (6H, m), 2.50–2.10 (2H, m, H-3), 1.90–0.90 (11H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 516 (M+Na)⁺.

tert-butyl ((1S)-1-[(2S,4S)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl)-2-methylpropyl carbamate (20a)

化合物 **17** と同様の方法で、**19a** (760 mg, 2.29 mmol)から表題化合物(656 mg, 91%)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.17 (1H, br d, *J* = 7.9 Hz), 5.49 (1H, br d, *J* = 51.5 Hz, H-4), 5.01 (1H, dd, *J* = 7.3, 2.0 Hz, H-2), 4.11–3.76 (3H, m), 2.60–2.25 (2H, m, H-3), 2.01–1.83 (1H, m), 1.36 (9H, s), 0.94 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.88(3H, d, *J* = 6.8 Hz). MS(ESI pos.) *m/z* 336 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 312 (M-H)⁻.

9H-Fluoren-9-ylmethyl

((1S,2R)-2-tert-butoxy-1-[(2S,4S)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl)propyl carbamate (22g)

化合物 **19a** と同様の方法で、**18** (301 mg, 2.0 mmol)と *O*-(tert-butyl)-*N*-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-threonine (795 mg, 2.0 mmol)から表題化合物(870 mg, 88%)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.89 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.74 (2H, dd, *J* = 7.3, 2.2 Hz), 7.41 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.37–7.28 (2H, m), 5.48 (1H, br d, *J* = 51.6 Hz, H-4), 5.04–4.97 (1H, m, H-2), 4.36–4.16 (4H, m), 3.94–3.70 (2H, m, H-5), 2.60–2.30 (2H, m, H-3), 1.16 (9H, s), 1.09

(3H, d, $J = 6.2$ Hz). MS(ESI pos.) m/z 516 (M+Na)⁺.

9H-Fluoren-9-ylmethyl

{(1S)-2-[(2S,4S)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-1-cyclohexyl-2-oxoethyl}carbamate (22i)

化合物 **21i** (860 mg, 1.74 mmol)を THF (20 mL)に溶解し、氷冷下 trifluoroacetic anhydride (0.49 mL, 3.48 mmol)を加え 1 時間攪拌した。反応液を減圧で濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; hexane : EtOAc = 3:1 - 1:2) で精製して目的物(760 mg, 92%)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 7.90–7.82 (3H, m), 7.72 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.45–7.28 (5H, m), 5.49 (1H, br d, $J = 51.6$ Hz, H-4), 5.04–4.97 (1H, m, H-2), 4.32–3.78 (6H, m), 2.60–2.25 (2H, m, H-3), 1.92–0.92 (11H, m). MS(ESI pos.) m/z 498 (M+Na)⁺.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-L-valylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23a)

化合物 **20a** (1.70 g, 5.43 mmol)をメタノール(10.9 mL) と 4M 塩酸(10.9 mL)の混合液に溶解し、室温で一晩攪拌した。4M 水酸化ナトリウム水溶液(12 mL)と過剰量の食塩を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧で濃縮して(2S,4S)-4-fluoro-1-L-valylpyrrolidine-2-carbonitrile (800 mg, 70%)を得た。この内 600 mg を、氷冷下メタノール(1.2 mL) と 4M 塩酸–酢酸エチル溶液(0.77 mL)の混合液に溶解し、1 時間攪拌し、ジイソプロピルエーテル(20 mL)に分散させた。析出不溶物を濾取して、目的物(750 mg)を無色粉末として得た。mp 256–259 °C (decomp.). ¹H NMR (500 MHz, DMSO - d_6) δ 8.57 (3H, br s), 5.55 (1H, br d, $J = 51.8$ Hz, H-4), 5.06 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-2), 4.08–3.90 (2H, m, H-5), 3.83 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 2.55–2.34 (2H, m, H-3), 2.17–2.07 (1H, m), 1.01 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.98 (3H, d, $J = 6.7$ Hz); ¹³C NMR (125.4 MHz, DMSO - d_6) δ 168.2, 118.3, 92.9 (d, $J_{C-F} = 174.7$ Hz), 55.2, 53.5 (d, $J_{C-F} = 21.7$ Hz), 44.7, 35.4 (d, $J_{C-F} = 20.7$ Hz), 29.9, 17.8, 17.7; ¹⁹F NMR (282.2 MHz, DMSO - d_6) δ –175.2. MS(ESI pos.) m/z 214 (M+H)⁺, 236 (M+Na)⁺; (ESI neg.) m/z 248 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₀H₁₇FN₃O(M+H)⁺ 214.1356, found (m/z) 214.1355. Anal. calcd for C₁₀H₁₆FN₃O HCl H₂O: C, 44.86; H, 7.15; N, 15.69; F, 7.10; Cl, 13.24. Found: C, 44.67; H, 7.09; N, 15.75; F, 6.97; Cl, 12.90. $[\alpha]_D^{25}$ –68.2 (c=0.3, MeOH).

(2S,4S)-1-L-Alloisoleucyl-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23b)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 8.35 (3H, br s), 5.55 (1H, br d, $J = 51.0$ Hz, H-4), 5.12–5.06 (1H, m, H-2), 4.02–3.80 (3H, m),

2.60–2.25 (2H, m, H-3), 1.92–1.80 (1H, m), 1.56–1.40 (1H, m), 1.34–1.15 (1H, m), 0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.91 (3H, t, $J = 7.3$ Hz). MS(ESI pos.) m/z 228 (M+H)⁺, 250 (M+Na)⁺; (ESI neg.) m/z 262 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₁H₁₈FN₃O(M)⁺ 227.1434, found (m/z) 227.1438.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-(3-methyl-L-valyl)pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23c)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。mp 265–269 °C (decomp.). ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.54 (3H, br s), 5.55 (1H, br d, $J = 51.5$ Hz, H-4), 5.07 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-2), 4.15–3.93 (2H, m, H-5), 3.79 (1H, s), 2.55–2.32 (2H, m, H-3), 1.05 (9H, s); ¹³C NMR (125.4 MHz, DMSO - *d*₆) δ 167.8, 118.3, 92.9 (d, $J_{C-F} = 174.7$ Hz), 57.5, 54.2 (d, $J_{C-F} = 22.8$ Hz), 44.5, 35.4 (d, $J_{C-F} = 20.7$ Hz), 34.0, 25.7; ¹⁹F NMR (282.2 MHz, DMSO - *d*₆) δ -175.4. MS(ESI pos.) m/z 228 ([M+H]⁺), 250 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 262 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₀H₁₆FN₃O(M+H)⁺ 228.1512, found (m/z) 228.1513. *Anal.* calcd for C₁₁H₁₈FN₃O HCl H₂O: C, 46.89; H, 7.51; N, 14.91. Found: C, 46.74; H, 7.56; N, 14.78. $[\alpha]_D^{25} -44.4$ (c=0.3, MeOH).

Benzyl {(5S)-5-amino-6-[(2S,4S)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-6-oxohexyl}carbamate hydrochloride (23d)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.42 (3H, br s), 7.42–7.21 (6H, m), 5.54 (1H, br d, $J = 51.0$ Hz, H-4), 5.08 (1H, br d, $J = 8.2$ Hz, H-2), 5.00 (2H, s), 4.06–3.66 (3H, m), 3.09–2.90 (2H, m), 2.62–2.26 (2H, m, H-3), 1.85–1.65 (2H, m), 1.50–1.25 (4H, m). MS(ESI pos.) m/z 399 (M+Na)⁺; (ESI neg.) m/z 411 (M+Cl)⁻, 375 (M-H)⁻. HRMS calcd for C₁₉H₂₅FN₄O₃ (M)⁺ 376.1911, found (m/z) 376.1930.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-(*O*-methyl-L-threonyl)pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23e)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。mp 149–152 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.62 (3H, br s), 5.54 (1H, br d, $J = 51.7$ Hz, H-4), 5.07 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2), 4.17–3.93 (3H, m), 3.70 (1H, quintet, $J = 6.4$ Hz), 3.33 (3H, s), 2.55–2.33 (2H, m, H-3), 1.17 (3H, d, $J = 6.4$ Hz); ¹³C NMR (125.4 MHz, DMSO - *d*₆) δ 166.5, 118.2, 92.9 (d, $J_{C-F} = 174.7$ Hz), 75.5, 56.5, 54.3, 53.4 (d, $J_{C-F} = 22.7$ Hz), 44.9, 35.4 (d, $J_{C-F} = 19.6$ Hz), 14.6; ¹⁹F NMR (282.2 MHz, DMSO - *d*₆) δ -174.8. MS(ESI pos.) m/z 252 (M+Na)⁺; (ESI neg.) m/z 264 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₀H₁₇FN₃O₂(M+H)⁺ 230.1305, found (m/z) 230.1308. *Anal.* calcd for C₁₀H₁₆FN₃O₂ HCl 1/3H₂O: C, 44.20; H, 6.55; N, 15.46; F, 6.99; Cl, 13.05. Found: C, 44.58; H, 6.77; N, 15.03; F, 6.87; Cl, 12.71.

$[\alpha]_D^{25} -80.8$ (c=0.3, MeOH).

(2S,4S)-1-(O-Benzyl-L-threonyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23f)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を褐色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.57 (3H, br s), 7.42–7.23 (5H, m), 5.53 (1H, br d, *J* = 52.1 Hz, H-4), 5.12 (1H, br d, *J* = 8.4 Hz, H-2), 4.62 and 4.56 (2H, ABq, *J* = 11.8 Hz), 4.20–3.85 (4H, m), 2.60–2.30 (2H, m, H-3), 1.23 (3H, d, *J* = 6.4 Hz). MS(ESI pos.) *m/z* 306 (M+H)⁺, 328 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 340 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₆H₂₁FN₃O₂ (M+H)⁺ 306.1618, found (*m/z*) 306.1615.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-(N-methyl-L-isoleucyl)pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23j)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 5.48 (1H, br d, *J* = 51.9 Hz, H-4), 5.12 (1H, br d, *J* = 8.2 Hz, H-2), 4.19–3.80 (3H, m), 2.71–2.33 (2H, m, H-3), 2.68 (3H, s), 2.10–1.93 (1H, m), 1.79–1.63 (1H, m), 1.37–1.17 (1H, m), 1.13 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.02 (3H, t, *J* = 7.3 Hz). MS(ESI pos.) *m/z* 242 (M+H)⁺, 264 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 276 (M+Cl)⁻.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-L-prolylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23k)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を淡橙色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.56 (1H, br d, *J* = 51.6 Hz, H-4), 5.12–5.05 (1H, m, H-2), 4.37 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 3.96–3.74 (2H, m, H-5), 2.62–2.32 (2H, m), 2.00–1.87 (2H, m), 1.85–1.71 (1H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 212 (M+H)⁺, 234 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 246 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₀H₁₄FN₃O(M)⁺ 211.1121, found (*m/z*) 211.1129.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[(3S)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-ylcarbonyl]pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23l)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.94 (2H, br s), 7.34–7.24 (4H, m), 5.59 (1H, br d, *J* = 52.7 Hz, H-4), 5.19–5.13 (1H, m, H-2), 4.50 (1H, dd, *J* = 12.1, 4.4 Hz), 4.32 (2H, s), 4.18–3.87 (2H, m, H-5), 3.40 (1H, dd, *J* = 16.6, 4.4 Hz), 3.01 (1H, dd, *J* = 16.6, 12.1 Hz), 2.63–2.34 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 274 (M+H)⁺, 296 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 272 (M-H)⁻, 308 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₅H₁₇FN₃O (M+H)⁺ 274.1356, found (*m/z*) 274.1339.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[(3S)-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-yl]carbonylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23m)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.81 (2H, br s), 9.57 (1H, s), 7.09 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.72 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 5.57 (1H, br d, *J* = 52.1 Hz, H-4), 5.18–5.12 (1H, m, H-2), 4.43 (1H, dd, *J* = 12.1, 4.2 Hz), 4.22 (2H, s), 4.14–3.87 (2H, m, H-5), 3.27 (1H, dd, *J* = 16.2, 4.2 Hz), 2.88 (1H, dd, *J* = 16.2, 12.1 Hz), 2.62–2.32 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 290 (M+H)⁺, 312 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 288 (M-H)⁻, 324 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₅H₁₇FN₃O₂ (M+H)⁺ 290.1305, found (*m/z*) 290.1304.

(2S,4S)-1-[(3S)-6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-yl]carbonyl-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23n)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.86 (2H, br s), 6.91 (1H, s), 6.87 (1H, s), 5.56 (1H, br d, *J* = 52.4 Hz, H-4), 5.19–5.13 (1H, m, H-2), 4.44 (1H, dd, *J* = 12.4, 4.4 Hz), 4.21 (2H, s), 4.15–3.85 (2H, m, H-5), 3.733 (3H, s), 3.730 (3H, s), 3.35–3.25 (1H, m), 2.91 (1H, dd, *J* = 16.1, 12.4 Hz), 2.63–2.34 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 334 (M+H)⁺, 356 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 368 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₇H₂₁FN₃O₃ (M+H)⁺ 334.1567, found (*m/z*) 334.1566.

(2S,4S)-1-[O-(tert-Butyl)-L-threonyl]-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23g)

化合物 **22g** (710 mg, 1.44 mmol)を THF (7 mL)に溶解し、diethylamine (0.7 mL)を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応液を減圧で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃-MeOH = 100:3 - 100:5) で精製した。得られた残渣にジエチルエーテル(20 mL)と 4 M 塩酸-酢酸エチル溶液(0.36 mL) を加え、得られた粉末を濾取し減圧乾燥して目的物(278 mg, 59%)を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.38 (3H, br s), 5.53 (1H, br d, *J* = 52.4 Hz, H-4), 5.09 (1H, br d, *J* = 8.2 Hz, H-2), 4.33–3.83 (4H, m), 2.58–2.25 (2H, m, H-3), 1.18 (9H, s), 1.15 (3H, d, *J* = 6.2 Hz). MS(ESI pos.) *m/z* 294 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 306 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₃H₂₃FN₃O₂ (M+H)⁺ 272.1774, found (*m/z*) 272.1793.

Benzyl

**6-({5-[(2S,4S)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-(4S)-4-amino-5-oxopentanoyl}amino)hexanoate
(23h)**

化合物 **23g** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.49 (3H, br s), 8.06 (1H, t, *J* = 5.6 Hz), 7.42–7.29 (5H, m), 5.54 (1H, br d, *J* = 51.9 Hz, H-4), 5.08 (2H, s), 5.08–5.04 (1H, m, H-2), 4.13–3.66 (3H, m), 3.10–2.96 (2H, m), 2.55–2.18 (6H, m), 2.00–1.83 (2H, m), 1.60–1.48 (2H, m), 1.45–1.34 (2H, m), 1.32–1.20 (2H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 469 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 481 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₂₃H₃₁FN₄O₄ (M)⁺ 446.2329, found (*m/z*) 446.2328.

**(2S,4S)-1-[(2S)-2-Amino-2-cyclohexylacetyl]-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride
(23i)**

化合物 **23g** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.48 (3H, br s), 5.54 (1H, br d, *J* = 51.6 Hz, H-4), 5.06 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2), 4.10–3.78 (3H, m), 2.60–2.26 (2H, m, H-3), 1.86–1.51 (6H, m), 1.30–1.00 (5H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 276 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 288 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₃H₂₀FN₃O (M)⁺ 253.1590, found (*m/z*) 253.1605.

***tert*-Butyl**

**(3S)-3-[[[(2S,4S)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl]-7-methoxy-3,4-dihydroisoquinoline-2
(1H)-carboxylate (20o)**

化合物 **20m** (630 mg, 1.62 mmol)を DMF (6 mL)に溶解し、炭酸カリウム (250 mg, 1.81 mmol)と methyl iodide (0.15 mL, 2.41 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、0.5M 塩酸、炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧で濃縮し、残渣にジイソプロピルエーテルを加えた。析出物を濾取し減圧乾燥して、目的物(420 mg, 64%)を淡黄色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.22–7.10 (1H, m), 6.88–6.73 (2H, m), 5.56 (1H, br d, *J* = 52.5 Hz, H-4), 5.06–3.78 (6H, m), 3.73 (3H, s), 3.20–2.25 (4H, m), 1.43, 1.37 and 1.33 (total 9H, each s). MS(ESI pos.) *m/z* 426 (M+Na)⁺.

***tert*-Butyl**

**(3S)-7-(2-amino-2-oxoethoxy)-3-[[[(2S,4S)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl]-3,4-dihydro
isoquinoline-2(1H)-carboxylate (20p)**

化合物 **20o** と同様の方法で、**20m** (600 mg, 1.54 mmol)と 2-bromoacetamide (320 mg, 2.27 mmol)から表題化合物(550 mg, 80%)を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.47 (1H, br s), 7.36 (1H, br s), 7.23–7.11 (1H, m), 6.88–6.75 (2H, m), 5.55 (1H, br d, *J* = 53.9 Hz, H-4), 5.07–4.46 (3H, m), 4.39 (2H, s), 4.35–3.60 (3H, m), 3.18–3.02 (1H, m), 2.94–2.70 (1H, m), 2.58–2.20 (2H, m), 1.43, 1.38 and 1.33 (total 9H, each s). MS(ESI pos.) *m/z* 469 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 445 (M-H)⁻.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[(3S)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-yl]carbonylpyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (23o)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.96 (2H, br s), 7.21 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 6.90–6.85 (2H, m), 5.58 (1H, br d, *J* = 52.3 Hz, H-4), 5.19–5.13 (1H, m, H-2), 4.46 (1H, dd, *J* = 12.2, 4.3 Hz), 4.28 (2H, s), 4.16–3.87 (2H, m, H-5), 3.74 (3H, s), 3.34 (1H, dd, *J* = 16.4, 4.3 Hz), 2.92 (1H, dd, *J* = 16.4, 12.2 Hz), 2.63–2.33 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 304 (M+H)⁺, 326 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 338 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₆H₁₉FN₃O₂ (M+H)⁺ 304.1461, found (*m/z*) 304.1456.

2-[(3S)-3-[(2S,4S)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]carbonyl]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-7-yl]oxy]acetamide hydrochloride (23p)

化合物 **23a** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.78 (2H, br s), 7.52 (1H, br s), 7.39 (1H, br s), 7.23 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.94–6.85 (2H, m), 5.58 (1H, br d, *J* = 52.1 Hz, H-4), 5.19–5.13 (1H, m, H-2), 4.47 (1H, dd, *J* = 11.8, 4.0 Hz), 4.42 (2H, s), 4.27 (2H, s), 4.16–3.84 (2H, m, H-5), 3.41–3.25 (1H, m), 2.92 (1H, dd, *J* = 16.6, 12.4 Hz), 2.60–2.34 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 347 (M+H)⁺, 369 (M+Na)⁺; (ESI neg.) *m/z* 345 (M-H)⁻, 381 (M+Cl)⁻. HRMS calcd for C₁₇H₂₀FN₄O₃ (M+H)⁺ 347.1519, found (*m/z*) 347.1527.

(2S,4R)-4-Fluoro-1-(3-methyl-L-valyl)pyrrolidine-2-carbonitrile (24)

化合物 **23c** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.37 (1H, br d, *J* = 52.1 Hz, H-4), 4.75 (1H, dd, *J* = 9.4, 7.9 Hz, H-2), 4.13 (1H, ddd, *J* = 21.1, 12.7, 2.0 Hz, H-5), 3.72 (1H, ddd, *J* = 38.5, 12.6, 2.8 Hz, H-5), 3.22 (1H, s), 2.73–2.63 (1H, m, H-3), 2.55–2.40 (1H, m, H-3), 1.63 (2H, br s), 0.91 (9H, s); ¹³C NMR (125.4 MHz, DMSO - *d*₆) δ 174.2, 118.5, 91.8 (d, *J*_{C-F} = 176.7 Hz), 59.2, 53.3 (d, *J*_{C-F} = 21.7 Hz), 44.3, 35.4 (d, *J*_{C-F} = 21.7

Hz), 35.2, 25.9; ^{19}F NMR (282.2 MHz, DMSO - d_6) δ -176.9. MS(ESI pos.) m/z 250 (M+Na) $^+$; (ESI neg.) m/z 226 (M-H) $^-$. HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}(\text{M}+\text{H})^+$ 228.1512, found (m/z) 228.1517. *Anal.* calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}$: C, 58.13; H, 7.98; N, 18.49; F, 8.36. Found: C, 57.93; H, 8.00; N, 18.34; F, 8.60. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -60.1 (c=0.3, MeOH).

(2R,4R)-4-Fluoro-1-(3-methyl-L-valyl)pyrrolidine-2-carbonitrile (26)

化合物 **23c** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO - d_6) δ 5.45 (1H, br d, J = 48.8 Hz, H-4), 4.96–4.88 (1H, m, H-2), 4.08 (1H, dd, J = 25.0, 12.2 Hz, H-5), 3.73 (1H, ddd, J = 38.8, 12.2, 3.4 Hz, H-5), 3.12 (1H, s), 2.58–2.35 (2H, m, H-3), 1.70 (2H, br s), 0.89 (9H, s); ^{13}C NMR (125.4 MHz, DMSO - d_6) δ 174.2, 118.8, 93.1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 174.3 Hz), 59.3, 53.2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22.7 Hz), 44.4, 35.6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 20.6 Hz), 34.7, 26.0; ^{19}F NMR (282.2 MHz, DMSO - d_6) δ -174.3. MS(ESI pos.) m/z 250 (M+Na) $^+$; (ESI neg.) m/z 226 (M-H) $^-$. HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}(\text{M}+\text{H})^+$ 228.1512, found (m/z) 228.1515. *Anal.* calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}$: C, 58.13; H, 7.98; N, 18.49; F, 8.36. Found: C, 58.01; H, 8.04; N, 18.45; F, 8.35. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +163.4 (c=0.3, MeOH).

(2S,4R)-4-Fluoro-1-(3-methyl-D-valyl)pyrrolidine-2-carbonitrile (28)

化合物 **23c** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO - d_6) δ 5.39 (1H, br d, J = 52.1 Hz, H-4), 4.79 (1H, t, J = 8.6 Hz, H-2), 4.08 (1H, ddd, J = 20.3, 13.0, 1.8 Hz, H-5), 3.79 (1H, ddd, J = 37.8, 12.8, 3.1 Hz, H-5), 3.19 (1H, s), 2.73–2.63 (1H, m, H-3), 2.53–2.38 (1H, m, H-3), 1.68 (2H, br s), 0.90 (9H, s); ^{13}C NMR (125.4 MHz, DMSO - d_6) δ 174.2, 118.7, 91.9 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 175.7 Hz), 59.0, 52.9 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 21.7 Hz), 44.3, 35.6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 21.7 Hz), 34.6, 25.9; ^{19}F NMR (282.2 MHz, DMSO - d_6) δ -178.0. MS(ESI pos.) m/z 250 (M+Na) $^+$; (ESI neg.) m/z 226 (M-H) $^-$. HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}(\text{M}+\text{H})^+$ 228.1512, found (m/z) 228.1514. *Anal.* calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}$: C, 58.13; H, 7.98; N, 18.49; F, 8.36. Found: C, 57.99; H, 8.05; N, 18.42; F, 8.39. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -190.0 (c=0.3, MeOH).

(2R,4R)-4-Fluoro-1-(3-methyl-D-valyl)pyrrolidine-2-carbonitrile (30)

化合物 **23c** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO - d_6) δ 5.47 (1H, br d, J = 52.5 Hz, H-4), 4.98 (1H, br d, J = 5.5 Hz, H-2), 3.98 (1H, dd like, J = 25.7, 12.5 Hz, H-5), 3.82 (1H, ddd, J = 39.6, 12.5, 3.3 Hz, H-5), 3.14 (1H, s), 2.48–2.33 (2H, m, H-3), 1.60 (2H, br s), 0.93 (9H, s); ^{13}C NMR (125.4 MHz, DMSO - d_6) δ 174.1, 118.8, 93.2 (d, $J_{\text{C-F}}$

= 174.3 Hz), 58.9, 53.4 (d, J_{C-F} = 21.7 Hz), 44.1, 35.3 (d, J_{C-F} = 20.6 Hz), 35.0, 25.8; ^{19}F NMR (282.2 MHz, DMSO - d_6) δ -174.5. MS(ESI pos.) m/z 250 (M+Na) $^+$; (ESI neg.) m/z 226 (M-H) $^-$. HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}(\text{M}+\text{H})^+$ 228.1512, found (m/z) 228.1517. Anal. calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}$: C, 58.13; H, 7.98; N, 18.49; F, 8.36. Found: C, 57.78; H, 8.06; N, 18.42; F, 8.38. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +33.7 (c=0.3, MeOH).

X 線結晶解析

31 (free base of **23c**)は、クロロホルム-酢酸エチルの混合溶媒で再結晶を行い、X線結晶解析に適した単結晶を得た。Cu- K_{α} radiation ($\lambda = 1.54178$)を用いた Mac Science/Bruker axs MXC18 四サイクル自動回折計を用いて、288Kのデータを集積した。示性式が $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{F}_1\text{N}_3\text{O}_1$ であるこの化合物は、 $P2_1$, $a = 9.642(2)$, $b = 10.662(2)$, $c = 6.1103(11)$ Å, $\beta = 106.793(13)^\circ$, $V = 601.4(2)$ Å 3 , $Z = 2$ という単斜晶系空間群を形成している。構造は、*maXus* というプログラムを用いて解かれ、full-matrix least square method を使って改善した。すべての水素原子の位置は、異なるフーリエ合成による。水素以外のすべての原子は異方的に、すべての水素原子は等方的に改善した。最終的に R は 0.039、Rw は 0.068 となった。

第3章に関する実験

(4S)-1-(Bromoacetyl)-4-fluoro-L-prolinamide (33)

(4S)-4-Fluoro-L-prolinamide hydrochloride **16** (650 mg, 3.9 mmol)を THF (10 mL)に懸濁し、氷冷下 potassium 2-ethylhexanoate (90 % purity, 1.6 g, 7.9 mmol)を加え1時間攪拌した。氷冷下、Bromoacetyl bromide (0.37 mL, 4.3 mmol)を加え氷冷で30分間、室温で1時間攪拌した。反応液にクロロホルム-メタノール混合溶媒(10:1, 50 mL)を加え、室温で15分間攪拌した。析出不溶物を濾去し、濾液を減圧で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒; CHCl₃-MeOH = 40:1 - 25:1)で精製して目的物(570 mg, 58%)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.56 and 7.19 (0.3H each, br s each), 7.23 and 7.03 (0.7H each, br s each), 5.35 (0.7H, br d, *J* = 51.9 Hz, H-4 of major isomer), 5.26 (0.3H, br d, *J* = 52.9 Hz, H-4 of minor isomer), 4.58–4.53 (0.3H, m, H-2 of minor isomer), 4.36–4.31 (0.7H, m, H-2 of major isomer), 4.21 and 4.09 (1.4H, ABq., *J* = 12.1 Hz, COCH₂), 3.92–3.55 (2H, m, H-5), 2.48–2.16 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 275 and 277 ([M+Na]⁺).

(2S,4S)-1-(Bromoacetyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile (34)

化合物 **33** (560 mg, 2.2 mmol)を THF (6 mL)に溶解し、氷冷して trifluoroacetic anhydride (0.62 mL, 4.4 mmol)を加え、氷冷下1時間攪拌した。反応液を減圧で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒; CHCl₃-MeOH = 50:1 - 30:1)で精製して目的物(540 mg, quant)を無色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.52 (1H, br d, *J* = 52.5 Hz, H-4), 5.02–4.96 (1H, m, H-2), 4.23 and 4.19 (2H, ABq., *J* = 12.3 Hz, COCH₂), 4.00 (1H, dd like, *J* = 23.9, 12.5 Hz, H-5), 3.78 (1H, ddd, *J* = 39.6, 12.5, 3.4 Hz, H-5), 2.46–2.32 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 257 and 259 ([M+Na]⁺).

(2S,4S)-1-(Chloroacetyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile (35)

化合物 **34** (43.0 g, 255 mmol)を DMF (255 mL)に溶解し、氷冷して chloroacetyl chloride (22.3 mL, 281 mmol)を加えて10分間攪拌し、次いで triethylamine (74.7 mL, 536 mmol)を加えた。氷冷のまま1時間攪拌した後、cyanuric chloride (28.2 g, 153 mmol)を加え、18°Cまで昇温させた。50分間攪拌した後に、反応液を氷水に注いだ。析出固体を濾取し、水で洗浄し、乾燥することで目的物(41.9 g, 86%)を無色固体として得た。mp 140–141 °C (decomp.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.50 (1H, d, *J* = 51.8 Hz, H-4), 5.02–4.96 (1H, m, H-2), 4.51 and 4.39 (2H, ABq., *J* = 14.2 Hz, COCH₂), 3.97 (1H, dd like, *J* = 23.6, 12.4 Hz, H-5), 3.76 (1H, ddd, *J* = 39.3, 12.4, 3.4 Hz,

H-5), 2.6–2.3 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) m/z 213 ($[M+Na]^+$). HRMS calcd for $C_7H_8ClFN_2ONa[M+Na]^+$ 213.0207, found (m/z) 213.0201. Anal. calcd for $C_7H_8ClFN_2O$: C, 44.11; H, 4.23; N, 14.70; Cl, 18.60. Found: C, 43.91; H, 4.21; N, 14.56; Cl, 18.47. $[\alpha]_D^{25}$ -125 ($c=0.3$, MeOH).

(2S,4S)-4-Fluoro-1-(N-{2-[(5-cyanopyridin-2-yl)amino]ethyl}glycyl)pyrrolidine-2-carbonitrile maleate (32a). (Method A)

6-(2-Amino-ethylamino)-nicotinonitrile (520 mg, 3.2 mmol)を THF (10 mL) に溶解し、氷冷して (2S,4S)-1-bromoacetyl-2-cyano-4-fluoropyrrolidine **34** (250 mg, 1.1 mmol)の THF (5 mL) 溶液を加えた。温度を徐々に上げ、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; $CHCl_3$ -MeOH = 50:1 – 25:1) で精製した。得られた残渣(80 mg)を EtOH (1 mL)に溶解し、maleic acid (30 mg, 0.26 mmol)の EtOH (1 mL)溶液を加えた。ジエチルエーテルを加え上澄液を除き、析出物をジエチルエーテルで洗浄した。残渣を減圧で乾燥することで目的物(70 mg, 15 %)を無色粉末として得た。 1H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 8.44 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.80-7.70 (2H, m), 6.62 (1H, d, J = 8.9 Hz), 6.03 (2H, s, maleic acid), 5.55 (1H, br d, J = 52.2 Hz, H-4), 5.09-5.03 (1H, m, H-2), 4.23 and 3.98 (2H, ABq, J = 16.5 Hz, $COCH_2$), 4.00-3.87 (1H, m, H-5), 3.80-3.58 (3H, m, H-5 and NCH_2), 3.20-3.06 (2H, m, NCH_2), 2.67-2.32 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) m/z 339 ($[M+Na]^+$), 317 ($[M+H]^+$); (ESI neg.) m/z 315 ($[M-H]$). HRMS calcd for $C_{15}H_{18}FN_6O$ $[M+H]^+$ 317.152613.0207, found (m/z) 317.1536.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-[2-(pyridin-2-ylamino)ethyl]glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile dihydrochloride (32b). (Method A')

N^1 -(Pyridin-2-yl)ethane-1,2-diamine (823mg, 6.0 mmol)を THF (10 mL)に溶解し、氷冷下、THF (5 mL) と EtOH(5 mL)の混合溶媒に懸濁した (2S,4S)-1-bromoacetyl-2-cyano-4- fluoropyrrolidine **34** (705 mg, 3.0 mmol)を加え、氷冷で 30 分間、室温で 1 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; $CHCl_3$ - MeOH - 25% aqueous ammonia = 30:1:0 – 20:1:0 to 20:1:0.1) で精製した。目的物と N^1 -(pyridin-2-yl)- ethane-1,2-diamine の混合物と思われる残渣を THF (20 mL)に溶解し、di-tert-butyl dicarbonate (1.31g, 6.0 mmol)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; n-hexane - EtOAc = 1:1 - 1:3 to EtOAc – MeOH = 20:1) で精製し、tert-butyl 2-((2S,4S)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl(2-(pyridin-2-ylamino)- ethyl)carbamate (600 mg, 51 %)を得た。得られた化合物の一部(540 mg, 1.38 mmol)に、氷冷下 4M HCl / ジオキサン

(7.5 mL) と ジオキサン (2.5 mL)の混合溶媒を加え、1 時間攪拌した。上澄液を除去し、残渣をジオキサンで洗浄した。イソプロパノール(2 mL)とジイソプロピルエーテル(20 mL)を残渣に加え、生成した粉末を濾取し、目的物(416 mg, 43 % from **5**)を得た。この一部(334 mg)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃ – ammonia in MeOH = 100:3 –100:7 to CHCl₃–MeOH = 100:5 – 100:7) で精製し、残渣に 4 M HCl / EtOAc (0.55 mL)とジイソプロピルエーテル(15 mL)を加えた。生成した粉末を濾取して、目的物(266 mg)を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.50 (2H, br s, NH₂⁺), 7.96 (1H, br d, *J* = 7 Hz), 7.82 (1H, br t, *J* = 8 Hz), 7.03 (1H, br d, *J* = 8 Hz), 6.83 (1H, br t, *J* = 7 Hz), 5.55 (1H, br d, *J* = 52.7 Hz, H-4), 5.10-5.03 (1H, m, H-2), 4.32 and 4.09 (2H, ABq, *J* = 16.7 Hz, COCH₂), 4.04-3.66 (2H, m, H-5), 3.80 (2H, br s, NCH₂), 3.21 (2H, br s, NCH₂), 2.7-2.3 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 292 ([M+H]⁺), 314 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 326 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₄H₁₈FN₅O[M]⁺ 291.1495, found (*m/z*) 291.1503.

(2*S*,4*S*)-1-(*N*-{2-[(5-Chloropyridin-2-yl)amino]ethyl}glycyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile dihydrochloride (32c**)**

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.47 (2H, br s, NH₂⁺), 8.04 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.72 (1H, dd, *J* = 9.3, 2.4 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 5.55 (1H, br d, *J* = 52.7 Hz, H-4), 5.09-5.03 (1H, m, H-2), 4.29 and 4.05 (2H, ABq, *J* = 16.8 Hz, COCH₂), 4.05-3.60 (4H, m, H-5 and NCH₂), 3.18 (2H, br s, NCH₂), 2.67-2.32 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 326 ([M+H]⁺), 348 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 324 ([M-H]⁻), 360 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₄H₁₇ClFN₅O[M]⁺ 325.1106, found (*m/z*) 325.1112.

6-[[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)ethyl]amino]nicotinamide dihydrochloride (32d**)**

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を淡桃色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.42 (2H, br s, NH₂⁺), 8.52 (1H, s), 8.17 (1H, d, *J* = 10.1 Hz), 8.10 (1H, br s, CONH), 7.42 (1H, br s, CONH), 6.99 (1H, d, *J* = 10.1 Hz), 5.55 (1H, br d, *J* = 52.5 Hz, H-4), 5.10-5.04 (1H, m, H-2), 4.44-3.50 (4H, m, H-5 and COCH₂), 3.83 (2H, br s, NCH₂), 3.23 (2H, br s, NCH₂), 2.68-2.32 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 357 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 369 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₅H₂₀FN₆O₂[M+H]⁺ 335.1632, found (*m/z*) 335.1638.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(1-methyl-1-pyridin-2-ylethyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile (36a).

(Method B)

1-Methyl-1-pyridin-2-yl-ethylamine (177 mg, 1.3 mmol)をメタノール(10 mL)に溶解し、化合物 **35** (112 mg, 0.59 mmol)と potassium iodide (98 mg, 0.59 mmol)を加え、室温で3日間攪拌した。反応液を減圧で濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; CHCl₃-MeOH = 50:1 - 25:1) で精製して、目的物(104 mg, 61 %)を褐色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.61-8.54 (1H, m), 7.67 (1H, td, *J* = 7.7, 1.9 Hz), 7.49-7.39 (1H, m), 7.19-7.12 (1H, m), 5.48-5.16 (1H, m, H-4), 4.92 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-2), 4.03-3.26 (4H, m, H-5 and CH₂), 2.63 (1H, t, *J* = 15.8 Hz), 2.40-2.12 (2H, m, H-3), 1.53 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 291 ([M+H]⁺), 313 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 289 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₅H₂₀FN₄O [M+H]⁺ 291.1621, found (*m/z*) 291.1612.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-{N-[1-(2-furyl)-1-methylethyl]glycyl}pyrrolidine-2-carbonitrile (36b)

化合物 **36a** と同様の方法で、表題化合物を褐色ガム状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.55 (1H, dd, *J* = 1.8, 0.9 Hz), 6.35 (1H, m), 6.21 (1H, dd, *J* = 3.2, 0.9 Hz), 5.40 (1H, br d, *J* = 50.8 Hz, H-4), 4.95-4.87 (1H, m, H-2), 3.84 (1H, dd, *J* = 23.9, 12.6 Hz, H-5), 3.61 (1H, ddd, *J* = 39.6, 12.5, 3.3 Hz, H-5), 3.21 and 3.02 (2H, ABq, *J* = 16.0 Hz, COCH₂), 2.60-2.22 (2H, m, H-3), 1.44-1.32 (6H, m, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 302 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 278 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₄H₁₈FN₃O₂Na [M+Na]⁺ 302.1281, found (*m/z*) 302.1277.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-{N-[1-methyl-1-(2-thienyl)ethyl]glycyl}pyrrolidine-2-carbonitrile (36c)

化合物 **36a** と同様の方法で、表題化合物を黒色油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.45 (1H, dd, *J* = 5.0, 3.0 Hz), 7.23 (1H, dd, *J* = 3.0, 1.4 Hz), 7.13 (1H, dd, *J* = 5.0, 1.4 Hz), 5.40 (1H, br d, *J* = 52.1 Hz, H-4), 4.95-4.87 (1H, m, H-2), 3.82 (1H, dd, *J* = 24.1, 12.4 Hz, H-5), 3.60 (1H, ddd, *J* = 39.7, 12.4, 3.4 Hz, H-5), 3.18 and 3.00 (2H, ABq, *J* = 16.1 Hz, COCH₂), 2.56-2.22 (2H, m, H-3), 1.40-1.35 (6H, m, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 318 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 294 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₄H₁₈FN₃ONaS [M+Na]⁺ 318.1052, found (*m/z*) 318.1060.

(2S,4S)-1-{N-[1-(1-Benzofuran-2-yl)-1-methylethyl]glycyl}-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile (36d)

化合物 **36a** と同様の方法で、表題化合物を淡黄色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.59-7.48 (2H, m), 7.28-7.26 (2H, m), 6.70 (1H, s), 5.38 (1H, br d, *J* = 52.2 Hz, H-4), 4.90-4.83 (1H, m, H-2), 3.85 (1H, dd, *J* = 23.2, 12.3 Hz, H-5), 3.60 (1H, ddd, *J* = 39.6, 12.5, 3.4 Hz, H-5), 3.38-3.04 (2H, m, COCH₂), 2.60-2.18 (2H, m, H-3), 1.48 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 352 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 328 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₈H₂₀FN₃O₂Na [M+Na]⁺ 352.1437, found (*m/z*) 352.1454.

(2*S*,4*S*)-1-[*N*-[(2*E*)-1,1-Dimethyl-3-phenylprop-2-en-1-yl]glycyl]-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile (36e)

化合物 **36a** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.44-7.38 (2H, m), 7.35-7.27 (2H, m), 7.25-7.17 (1H, m), 6.40 (1H, d, *J* = 16.3 Hz, C=CH), 6.21 (1H, d, *J* = 16.3 Hz, C=CH), 5.42 (1H, br d, *J* = 51.8 Hz, H-4), 4.91 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-2), 3.90 (1H, dd, *J* = 23.5, 12.4 Hz, H-5), 3.78-3.56 (1H, m, H-5), 3.44-3.14 (2H, m, COCH₂), 2.60-2.20 (2H, m, H-3), 2.06-1.98 (1H, m), 1.22 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 338 ([M+Na]⁺). HRMS calcd for C₁₈H₂₂FN₃ONa [M+Na]⁺ 338.1645, found (*m/z*) 338.1641.

(2*S*,4*S*)-1-[*N*-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]glycyl]-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36f)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 6.89 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.83 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.74 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz), 5.52 (1H, br d, *J* = 53.0 Hz, H-4), 5.05-5.00 (1H, m, H-2), 4.02-3.61 (4H, m, H-5 and COCH₂), 3.75 (3H, s, OCH₃), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.07-2.92 (2H, m, NCH₂), 2.87-2.77 (2H, m, PhCH₂), 2.64-2.30 (2H, m, H-3). MS(ESI pos.) *m/z* 336 ([M+H]⁺), 358 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 334 ([M-H]⁻), 370 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₇H₂₂FN₃O₃Na [M+Na]⁺ 335.1645, found (*m/z*) 335.1670.

(2*S*,4*S*)-1-[*N*-(*tert*-Butyl)glycyl]-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36g)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。 mp 247–250 °C (decomp.). ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.10 (2H, br s, NH₂⁺), 5.56 (1H, br d, *J* = 52.9 Hz, H-4), 5.09-5.06 (1H, m, H-2), 4.16 (1H, dd, *J* = 24.4, 12.5 Hz, H-5), 4.12 and 3.88 (2H, ABq, *J* = 16.5 Hz, COCH₂), 3.86 (1H, ddd, *J* = 39.9, 12.5, 3.3 Hz, H-5), 2.54-2.40 (2H, m, H-3), 1.33 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (125.4 MHz, DMSO - *d*₆) δ 165.1, 118.4, 93.0 (d, *J*_{C-F} = 174.7 Hz), 56.4, 52.1 (d, *J*_{C-F} = 22.7 Hz), 44.8,

42.0, 35.7 (d, $J_{C-F} = 19.6$ Hz), 25.0; ^{19}F NMR (282.2 MHz, DMSO - d_6) δ -174.5. MS(ESI pos.) m/z 250 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$); (ESI neg.) m/z 226 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), 262 ($[\text{M}+\text{Cl}]^-$). HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 228.1512, found (m/z) 228.1515. Anal. calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}$ HCl: C, 50.09; H, 7.26; N, 15.93; Cl, 13.44; F, 7.20. Found: C, 50.11; H, 7.37; N, 15.89; Cl, 13.38; F, 7.19. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -101.5$ ($c=0.3$, MeOH).

(2S,4S)-4-Fluoro-1-(N-isopropylglycyl)pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36h)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 5.52 (1H, br d, $J = 51.4$ Hz, H-4), 5.03-4.97 (1H, m, H-2), 3.98 (1H, dd, $J = 23.2, 12.4$ Hz, H-5), 3.84-3.64 (1H, m, H-5), 3.74 and 3.55 (2H, ABq, $J = 16.6$ Hz, COCH_2), 3.02-2.88 (1H, m, CHMe_2), 2.62-2.26 (2H, m, H-3), 1.09 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, CH_3). MS(ESI pos.) m/z 214 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 236 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$); (ESI neg.) m/z 212 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), 248 ($[\text{M}+\text{Cl}]^-$). HRMS calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O} [\text{M}]^+$ 213.1277, found (m/z) 213.1297.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(3-isopropoxypropyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36i)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 9.23 (2H, br s, NH_2^+), 5.54 (1H, br d, $J = 52.5$ Hz, H-4), 5.10-5.03 (1H, m, H-2), 4.21 and 3.96 (2H, ABq, $J = 16.6$ Hz, COCH_2), 4.04-3.90 (1H, m, H-5), 3.84-3.76 (1H, m, H-5), 3.58-3.48 (1H, m, CHMe_2), 3.43 (2H, t, $J = 5.8$ Hz, OCH_2), 3.10-2.85 (2H, m, NCH_2), 2.67-2.31 (2H, m, H-3), 1.95-1.82 (2H, m, CH_2), 1.09 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, CH_3). MS(ESI pos.) m/z 294 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$); (ESI neg.) m/z 270 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) 306 ($[\text{M}+\text{Cl}]^-$). HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{FN}_3\text{O}_2 [\text{M}+\text{H}]^+$ 272.1774, found (m/z) 272.1785. Anal. calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_2$ HCl: C, 50.73; H, 7.53; N, 13.65; Cl, 11.52; F, 6.17. Found: C, 50.44; H, 7.49; N, 13.44; Cl, 11.39; F, 5.92.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(2-methoxy-1,1-dimethylethyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36j)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 8.82 (2H, br s, NH_2^+), 5.56 (1H, br d, $J = 53.0$ Hz, H-4), 5.09-5.04 (1H, m, H-2), 4.18-3.66 (4H, m, H-5 and COCH_2), 3.42 (2H, s, OCH_2), 3.32 (3H, s, OCH_3), 2.58-2.32 (2H, m, H-3), 1.27 (6H, s, CH_3). MS(ESI pos.) m/z 258 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 280 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$); (ESI neg.) m/z 292 ($[\text{M}+\text{Cl}]^-$). HRMS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_2 [\text{M}+\text{H}]^+$ 258.1618, found (m/z) 258.1603.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36k)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を淡桃色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.75 (2H, br s, NH₂⁺), 5.57 (1H, br s, OH), 5.56 (1H, br d, *J* = 52.7 Hz, H-4), 5.10-5.04 (1H, m, H-2), 4.20-3.70 (4H, m, H-5 and COCH₂), 3.48 (2H, s, OCH₂), 2.70-2.30 (2H, m, H-3), 1.24 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 244 ([M+H]⁺), 266 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 242 ([M-H]⁻), 278 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₁H₁₈FN₃O₂ [M+H]⁺ 244.1461, found (*m/z*) 244.1449. Anal. calcd for C₁₁H₁₈FN₃O₂ HCl 0.3H₂O: C, 46.33; H, 6.93; N, 4.74; Cl, 12.43; F, 6.66. Found: C, 46.68; H, 6.98; N, 14.29; Cl, 12.20; F, 6.43.

(2S,4S)-1-[N-(1,1-Diethylprop-2-yn-1-yl)glycyl]-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36l)

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.48 (1H, br d, *J* = 51.5 Hz, H-4), 4.99-4.93 (1H, m, H-2), 3.95 (1H, dd, *J* = 24.6, 12.6 Hz, H-5), 3.72 (1H, ddd, *J* = 39.6, 12.6, 3.4 Hz, H-5), 3.50-3.27 (2H, m, COCH₂), 3.18 (1H, s, CH), 2.62-2.28 (2H, m, H-3), 2.06 (1H, t, *J* = 5.9 Hz), 1.53 (4H, q, *J* = 7.4 Hz), 0.87 (6H, t, *J* = 7.4 Hz). MS(ESI pos.) *m/z* 288 ([M+Na]⁺). HRMS calcd for C₁₄H₂₁FN₃O [M+H]⁺ 266.1669, found (*m/z*) 266.1654.

(2S,4S)-1-(N-Cyclopropylglycyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36m)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.50 and 9.35 (2H, br s each, NH₂⁺), 5.55 (1H, br d, *J* = 53.0 Hz, H-4), 5.10-5.04 (1H, m, H-2), 4.31 and 4.05 (2H, ABq, *J* = 16.9 Hz, COCH₂), 4.12-3.65 (2H, m, H-5), 2.76-2.64 (1H, m, NCH), 2.62-2.32 (2H, m, H-3), 0.96-0.88 (2H, m, CH₂), 0.77-0.69 (2H, m, CH₂). MS(ESI pos.) *m/z* 212 ([M+H]⁺), 234 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 246 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₀H₁₅FN₃O [M+H]⁺ 212.1198, found (*m/z*) 212.1208.

(2S,4S)-1-(N-Cyclobutylglycyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36n)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.98 (2H, br s, NH₂⁺), 5.52 (1H, br d, *J* = 53.0 Hz, H-4), 5.05-4.99 (1H, m, H-2), 4.04-3.34 (5H, m, H-5, NCH and COCH₂), 2.63-2.30 (2H, m, H-3), 2.18-1.90 (4H, m, CH₂), 1.80-1.57 (2H, m, CH₂). MS(ESI pos.) *m/z* 226 ([M+H]⁺), 248 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 260 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for

C₁₁H₁₇FN₃O [M+H]⁺ 226.1356, found (m/z) 226.1352.

(2S,4S)-1-(N-Cyclopentylglycyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36o)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.11 (2H, br s, NH₂⁺), 5.55 (1H, br d, *J* = 52.7 Hz, H-4), 5.09-5.03 (1H, m, H-2), 4.30-3.60 (4H, m, H-5 and COCH₂), 3.52-3.36 (1H, m, NCH), 2.66-2.32 (2H, m, H-3), 2.02-1.87 (2H, m, CH₂), 1.78-1.46 (6H, m, CH₂). MS(ESI pos.) m/z 240 ([M+H]⁺), 262 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 238 ([M-H]⁻), 274 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₂H₁₆FN₃O [M+H]⁺ 240.1512, found (m/z) 240.1499.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-{N-[1-(hydroxymethyl)cyclopentyl]glycyl}pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36p)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。mp 175–178 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.99 (2H, br s, NH₂⁺), 5.68 (1H, br s, OH), 5.55 (1H, br d, *J* = 52.4 Hz, H-4), 5.08-5.05 (1H, m, H-2), 4.17 and 3.98 (2H, ABq, *J* = 16.5 Hz, COCH₂), 4.09 (1H, dd, *J* = 23.1, 12.2 Hz, H-5), 3.82 (1H, ddd, *J* = 39.3, 12.2, 3.1 Hz, H-5), 3.51 and 3.48 (2H, ABq, *J* = 12.5 Hz, OCH₂), 2.56-2.36 (2H, m, H-3), 1.86-1.68 (6H, m, CH₂), 1.59-1.48 (2H, m, CH₂); ¹³C NMR (125.4 MHz, DMSO - *d*₆) δ 165.1, 118.4, 93.0 (d, *J*_{C-F} = 174.7 Hz), 69.6, 62.7, 52.1 (d, *J*_{C-F} = 22.7 Hz), 44.8, 43.5, 35.7 (d, *J*_{C-F} = 20.7 Hz), 31.6, 31.2, 23.9; ¹⁹F NMR (282.2 MHz, DMSO - *d*₆) δ -174.5. MS(ESI pos.) m/z 270 ([M+H]⁺), 292 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 304 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₃H₂₁FN₃O₂[M+H]⁺ 270.1618, found (m/z) 270.1614. Anal. calcd for C₁₃H₂₀FN₃O₂ HCl: C, 51.06; H, 6.92; N, 13.74; Cl, 11.59; F, 6.21. Found: C, 50.85; H, 7.02; N, 13.54; Cl, 11.53; F, 6.16. [α]_D²⁵ -89.3 (c=0.3, MeOH).

(2S,4S)-1-(N-Cyclooctylglycyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36q)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.09 and 8.96 (2H, br s each, NH₂⁺), 5.56 (1H, br d, *J* = 52.6 Hz, H-4), 5.10-5.04 (1H, m, H-2), 4.21 and 3.96 (2H, ABq, *J* = 17.0 Hz, COCH₂), 4.04 (1H, dd, *J* = 23.6, 12.4 Hz, H-5), 3.78 (1H, ddd, *J* = 39.5, 12.4, 3.3 Hz, H-5), 3.24 (1H, br s, NCH), 2.67-2.33 (2H, m, H-3), 2.00-1.88 (2H, m, CH₂), 1.78-1.34 (12H, m, CH₂). MS(ESI pos.) m/z 282 ([M+H]⁺), 304 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 280 ([M-H]⁻), 316 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₅H₂₄FN₃O [M]⁺ 281.1903, found (m/z) 281.1911.

(2S,4S)-1-(N-1-Adamantylglycyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36r)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.04 and 8.91 (2H, br s each, NH₂⁺), 5.56 (1H, br d, *J* = 52.4 Hz, H-4), 5.10-5.04 (1H, m, H-2), 4.22-3.72 (4H, m, H-5 and COCH₂), 2.68-2.34 (2H, m, H-3), 2.12 (3H, br s), 1.91 (6H, br s), 1.71-1.52 (6H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 306 ([M+H]⁺), 328 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 304 ([M-H]⁻), 340 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₇H₂₅FN₃O [M+H]⁺ 306.1982, found (*m/z*) 306.1973.

(2S,4S)-1-(N-2-Adamantylglycyl)-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36s)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.01 (2H, br s, NH₂⁺), 5.55 (1H, br d, *J* = 53.0 Hz, H-4), 5.10-4.99 (1H, m, H-2), 4.24 and 3.98 (2H, ABq, *J* = 16.8 Hz, COCH₂), 4.06 (1H, dd, *J* = 24.4, 12.8 Hz, H-5), 3.78 (1H, ddd, *J* = 39.2, 12.6, 3.3 Hz, H-5), 3.29 (1H, br s, NCH), 2.68-2.32 (2H, m), 2.28-2.08 (4H, m), 1.90-1.78 (4H, m), 1.74-1.64 (4H, m), 1.60-1.49 (2H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 306 ([M+H]⁺), 328 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 304 ([M-H]⁻), 340 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₇H₂₄FN₃O [M]⁺ 305.1903, found (*m/z*) 305.1913.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(3-hydroxy-1-adamantyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36t)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.55 (1H, br d, *J* = 52.7 Hz, H-4), 5.08-5.02 (1H, m, H-2), 4.75 (1H, s, OH), 4.19-3.70 (4H, m, H-5 and COCH₂), 2.65-2.32 (2H, m, H-3), 2.22 (2H, br s), 1.80-1.43 (12H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 322 ([M+H]⁺), 344 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 320 ([M-H]⁻), 356 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₇H₂₅FN₃O₂ [M+H]⁺ 322.1931, found (*m/z*) 322.1913.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(3-methoxy-1-adamantyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36u)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 9.04 (2H, br s, NH₂⁺), 5.57 (1H, br d, *J* = 52.4 Hz, H-4), 5.10-5.04 (1H, m, H-2), 4.24-3.66 (4H, m, H-5 and COCH₂), 3.14 (3H, s, OCH₃), 2.58-2.38 (2H, m, H-3), 2.36-2.24 (2H, m), 1.88-1.78 (6H, m), 1.72-1.42 (6H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 336 ([M+H]⁺); (ESI neg.) *m/z* 370 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₈H₂₇FN₃O₂ [M+H]⁺ 336.2087, found (*m/z*) 336.2101.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(5-hydroxy-2-adamantyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile hydrochloride (36v)

化合物 **32a** と同様の方法で、表題化合物（ジアステレオマー混合物）を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.53 (1H, br d, *J*=52.8Hz, H-4), 5.06-5.00 (1H, m, H-2), 4.49 (0.3H, s, OH), 4.40 (0.7H, s, OH), 4.08-3.63 (4H, m, H-5 and COCH₂), 3.03 (0.3H, br s, NCH), 2.89 (0.7H, br s, NCH), 2.63-2.33 (2H, m, H-3), 2.30-2.15 (2H, m), 2.05-1.89 (3H, m), 1.68-1.48 (6H, m), 1.42-1.27 (2H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 322 ([M+H]⁺), 344 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 356 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₇H₂₅FN₃O₂ [M+H]⁺ 322.1931, found (*m/z*) 322.1949.

tert-Butyl

[2-({2-[(2S,4S)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]carbamate (38)

化合物 **35** (0.95 g, 5.0 mmol)と tert-butyl (2-amino-2-methylpropyl) carbamate **37** (1.88 g, 10 mmol)をメタノール(20 mL)に溶解し、ヨウ化カリウム(0.83 g, 5.0 mmol)を加え室温で一晩攪拌した。更に 50°C に加温して 2 時間攪拌し、反応液を減圧で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒 ; CHCl₃-MeOH-25% aqueous ammonia = 100:2:0.2）で精製して、化合物 **7** と **8** の混合物が得られた。これを THF (30 mL)に溶解し、di-tert-butyl dicarbonate (1.09 g, 5.0 mmol)、 4-dimethylaminopyridine (12 mg, 0.1 mmol)、及び 0.5 M NaOH 水溶液 (10 mL)を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、飽和食塩水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、乾燥剤を濾去後、減圧で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒 ; CHCl₃-MeOH-25% aqueous ammonia = 100:2:0.2）で精製して、目的物(1.08 g, 63 %)を淡黄色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 6.64 (1H, br t, *J* = 6.1 Hz), 5.48 (1H, br d, *J* = 53.5 Hz, H-4), 4.97-4.91 (1H, m, H-2), 3.91 (1H, dd, *J* = 24.6, 12.5 Hz, H-5), 3.71 (1H, ddd, *J* = 39.6, 12.5, 3.5Hz, H-5), 3.38 and 3.23 (2H, ABq, *J* = 16.5 Hz, COCH₂), 2.87 (2H, d, *J* = 6.1 Hz, CH₂), 2.60-2.25 (2H, m, H-3), 1.76 (1H, br s, NH), 1.38 (9H, s, CH₃), 0.94 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 343 ([M+H]⁺), 365 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 341 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₆H₂₈FN₄O₃[M+H]⁺ 343.2145, found (*m/z*) 343.2134.

(2S,4S)-1-[N-(2-Amino-1,1-dimethylethyl)glycyl]-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile dihydrochloride (39)

化合物 **38** (100 mg, 0.29 mmol)を酢酸エチル(0.5 mL)に溶解し、4-M HCl / EtOAc (0.5 mL)を加

えた。室温で4時間攪拌後、析出結晶を濾取し、乾燥して目的物(88 mg, 96 %)を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.61 (3H, br s, NH₃⁺), 5.57 (1H, br d, *J* = 50.7 Hz, H-4), 5.11-5.04 (1H, m, H-2), 4.32-3.72 (4H, m, H-5 and COCH₂), 3.21 (2H, s, CH₂), 2.58-2.33 (2H, m, H-3), 1.43 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 243 ([M+H]⁺); (ESI neg.) *m/z* 277 ([M+Cl]⁻). HRMS calcd for C₁₁H₂₀FN₄O[M+H]⁺ 243.1621, found (*m/z*) 243.1639.

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]pyridine-2-carboxamide (40a). (Method C)**

化合物 **39** (100 mg, 0.32 mmol) と triethylamine (0.177 mL, 1.3 mmol) を DMF (0.5 mL) に溶解し、氷冷下で nicotinoyl chloride hydrochloride (51 mg, 0.29 mmol) と DMF (0.5 mL) を加え、室温で10分間攪拌した。反応液に10%炭酸水素ナトリウム水溶液(10 mL)と飽和食塩水(10 mL)を加え、クロロホルム(25 mL, 3回)で抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤を濾去後、減圧で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒; CHCl₃-MeOH-28% aqueous ammonia = 20:1:0.1)で精製して、目的物(31 mg, 31%)を黄色油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.69-8.63 (1H, m), 8.61-8.52 (1H, m), 8.05 (1H, m), 8.00 (1H, td, *J* = 7.3, 1.7 Hz), 7.65-7.57 (1H, m), 5.46 (1H, brd, *J* = 52.8 Hz, H-4), 5.01-4.94 (1H, m, H-2), 3.96 (1H, dd, *J* = 23.9, 11.8 Hz, H-5), 3.86-3.64 (1H, m, H-5), 3.54-3.24 (4H, m, CH₂), 2.62-2.25 (2H, m, H-3), 1.04 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 348 ([M+H]⁺), 370 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 346 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₇H₂₃FN₅O₂[M+H]⁺ 348.1836, found (*m/z*) 348.1831.

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]benzamide (40b)**

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.23 (1H, m), 7.86 (1H, br d), 7.83 (1H, br d), 7.55-7.43 (3H, m), 5.50 (1H, br d, *J* = 52.8 Hz, H-4), 4.98-4.95 (1H, m, H-2), 3.96 (1H, dd, *J* = 23.8, 12.4 Hz, H-5), 3.74 (1H, ddd, *J* = 39.7, 12.5, 3.3 Hz, H-5), 3.55-3.30 (2H, m, CH₂), 3.27-3.20 (2H, m, CH₂), 2.59-2.28 (2H, m, H-3), 1.98 (1H, br s, NH), 1.02 (6H, br s, CH₃).

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]thiophene-2-carboxamide (40c)**

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO

- d_6) δ 8.30-8.21 (1H, m), 7.80 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 7.74 (1H, d, $J = 4.8$ Hz), 7.15 (1H, dd, $J = 4.8, 3.7$ Hz), 5.45 (1H, br d, $J = 50.4$ Hz, H-4), 5.00-4.93 (1H, m, H-2), 3.96 (1H, dd, $J = 23.8, 12.4$ Hz, H-5), 3.73 (1H, ddd, $J = 39.5, 12.4, 3.4$ Hz, H-5), 3.52-3.28 (2H, m, CH₂), 3.26-3.12 (2H, m, CH₂), 2.62-2.25 (2H, m, H-3), 1.98-1.86 (1H, br s, NH), 1.02 (3H, s, CH₃), 1.01 (3H, s, CH₃). MS(ESI pos.) m/z 353 ([M+H]⁺), 375 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 351 ([M-H]⁻).

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-carboxamide (40d)**

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を無色ガム状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 8.07-7.95 (1H, m), 7.75-7.73 (1H, m), 7.69-7.61 (1H, m), 6.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 5.46 (1H, br d, $J = 51.4$ Hz, H-4), 4.99-4.92 (1H, m, H-2), 4.59 (2H, t, $J = 8.8$ Hz, OCH₂), 3.96 (1H, dd, $J = 23.5, 12.6$ Hz, H-5), 3.74 (1H, ddd, $J = 39.8, 12.5, 3.3$ Hz, H-5), 3.52-3.14 (6H, m, CH₂), 2.62-2.26 (2H, m, H-3), 2.10-1.80 (1H, m, NH), 1.01 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃). MS(ESI pos.) m/z 411 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 387 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₂₀H₂₆FN₄O₃ [M+H]⁺ 389.1989, found (m/z) 389.1977.

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-1*H*-benzimidazole-5-carboxamide (40e)**

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を黄色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 12.80-12.50 (1H, m), 8.38-8.18 (3H, m), 7.82-7.70 (1H, m), 5.47 (1H, br d, $J = 51.8$ Hz, H-4), 5.04-4.90 (1H, m, H-2), 4.10-3.18 (6H, H-5 and CH₂), 2.62-2.25 (2H, H-3), 1.06 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) m/z 387 ([M+H]⁺), 409 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 385 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₉H₂₄FN₆O₂ [M+H]⁺ 387.1945, found (m/z) 387.1959.

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-1*H*-1,2,3-benzotriazole-5-carboxamide (40f)**

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を淡黄色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - d_6) δ 8.49-8.38 (2H, m), 7.99-7.82 (2H, m), 5.46 (1H, br d, $J = 51.0$ Hz, H-4), 5.03-4.90 (1H, m, H-2), 3.97 (1H, dd, $J = 24.2, 12.7$ Hz, H-5), 3.86-3.00 (5H, H-5 and CH₂), 2.64-2.25 (2H, m, H-3), 1.07 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) m/z 410 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 386 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₈H₂₃FN₇O₂ [M+H]⁺ 388.1897, found (m/z) 388.1881.

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-2,2-dimethylpropanamide (40g)**

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を無色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.27-7.15 (1H, m), 5.62-5.30 (1H, m, H-4), 4.99-4.92 (1H, m, H-2), 3.94 (1H, dd, *J* = 24.1, 11.9 Hz, H-5), 3.72 (1H, ddd, *J* = 39.6, 12.5, 3.5 Hz, H-5), 3.47-3.21 (2H, m, COCH₂), 3.08-2.92 (2H, m, CH₂), 2.56-2.26 (2H, m, H-3), 1.12 (9H, s, CH₃), 0.94 (6H, d, *J* = 2.5 Hz, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 349 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 325 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₆H₂₈FN₄O₂ [M+H]⁺ 327.2196, found (*m/z*) 327.2185.

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-1-methylcyclohexanecarboxamide (40h)**

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を淡黄色オイル状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.29-7.19 (1H, m), 5.43 (1H, br d, *J* = 51.5 Hz, H-4), 4.99-4.90 (1H, m, H-2), 3.94 (1H, dd, *J* = 24.0, 11.6 Hz, H-5), 3.82-3.61 (1H, m, H-5), 3.48-3.22 (2H, m, COCH₂), 3.10-2.95 (2H, m, CH₂), 2.62-2.26 (2H, m, H-3), 2.04-1.75 (3H, m), 1.54-1.10 (8H, m), 1.05 (3H, s, CH₃), 0.96 (3H, s, CH₃), 0.95 (3H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 367 ([M+H]⁺), 389 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 365 ([M-H]⁻).

2,2-Bis(4-chlorophenyl)-*N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]acetamide (40i). (method F)

化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を淡黄色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 8.22-8.13 (1H, m), 7.41-7.27 (8H, m), 5.45 (1H, br d, *J* = 53.2 Hz, H-4), 5.10 (1H, s, CH), 4.97-4.90 (1H, m, H-2), 3.90 (1H, dd, *J* = 24.2, 12.0 Hz, H-5), 3.78-3.58 (1H, m, H-5), 3.48-3.20 (2H, m, COCH₂), 3.15-2.90 (2H, m, CH₂), 2.60-2.25 (2H, m, H-3), 0.94 (6H, s, CH₃).

***N*-[2-({2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]benzenesulfonamide (40j). (method D)**

benzenesulfonyl chloride を用い化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を無色粉末として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.82 (2H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz), 7.67-7.55 (4H, m), 5.49 (1H, br d, *J* = 53.0 Hz, H-4), 4.98-4.92 (1H, m, H-2), 3.87 (1H, dd, *J* = 24.3, 12.1 Hz, H-5), 3.66 (1H, ddd, *J* =

39.4, 12.5, 3.4 Hz, H-5), 3.33 and 3.18 (2H, ABq, $J = 16.5$ Hz, COCH₂), 2.63 (2H, s, CH₂), 2.53-2.30 (2H, m, H-3), 0.96 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) m/z 383 ([M+H]⁺), 405 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 381 ([M-H]). HRMS calcd for C₁₇H₂₄FN₄O₃S[M+H]⁺ 383.1551, found (m/z) 383.1551.

***N*-[2-((2-[(2*S*,4*S*)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl)amino)-2-methylpropyl]-*N*-methylbenzenesulfonamide (41a). (Method G)**

化合物 **40d** (57 mg, 0.15 mmol) と triphenylphosphine (59 mg, 0.23 mmol)を THF (3 mL) に溶解し、室温でメタノール(0.009 mL) と diethyl azodicarboxylate (40% toluene solution, 98 mg, 0.23 mmol)を加え、そのまま一晩攪拌した。反応液を減圧で濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃-MeOH-25% aqueous ammonia = 100:3:0.3 - 100:5:0.5) で精製して、目的物(25 mg, 42 %)を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.79 (2H, br d, $J = 8.4$ Hz), 7.72-7.60 (3H, m), 5.49 (1H, br d, $J = 52.7$ Hz, H-4), 4.98-4.92 (1H, m, H-2), 3.94 (1H, dd, $J = 24.1, 12.0$ Hz, H-5), 3.70 (1H, ddd, $J = 39.5, 12.5, 3.2$ Hz, H-5), 3.46 and 3.30 (2H, ABq, $J = 17.4$ Hz, COCH₂), 2.92 (2H, s, CH₂), 2.78 (3H, s, CH₃), 2.60-2.26 (2H, m, H-3), 1.07 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) m/z 397 ([M+H]⁺), 419 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 395 ([M-H]). HRMS calcd for C₁₉H₂₆FN₄O₃S[M+H]⁺ 397.1710, found (m/z) 397.1718.

(2*S*,4*S*)-4-Fluoro-1-{*N*-[2-(isobutylamino)-1,1-dimethylethyl]glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile (40k). (Method E)

化合物 **39** (150 mg, 0.48 mmol)と isobutyraldehyde (34 mg, 0.48 mmol)をクロロホルム(2 mL)に懸濁し、室温で 30 分間攪拌した。次いで、Sodium triacetoxyborohydride (202 mg, 0.95 mmol)を加え、更に室温で 30 分間攪拌した。反応液に 10%炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、乾燥剤を濾去後、減圧で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃-MeOH-25% aqueous ammonia = 100:3:0.3 - 100:5:0.5) で精製して、目的物(99 mg, 52 %)を無色油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.60-5.28 (1H, m, H-4), 4.98-4.90 (1H, m, H-2), 3.93 (1H, dd, $J = 23.5, 12.4$ Hz, H-5), 3.71 (1H, ddd, $J = 39.6, 12.4, 3.4$ Hz, H-5), 3.41-3.16 (2H, m, COCH₂), 2.62-2.28 (6H, m), 1.64 (1H, m), 0.97 (6H, s, CH₃), 0.85 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, CH₃). MS(ESI pos.) m/z 299 ([M+H]⁺); (ESI neg.) m/z 297 ([M-H]). HRMS calcd for C₁₅H₂₈FN₄O [M+H]⁺ 299.2247, found (m/z) 299.2236.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-(N-[2-[(4-cyanobenzyl)amino]-1,1-dimethylethyl]glycyl)pyrrolidine-2-carbonitrile (40l)

4-cyanobenzaldehyde を用い化合物 **40e** と同様の方法で、表題化合物を無色ガム状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.77 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.54 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 5.49 (1H, br d, *J* = 52.8 Hz, H-4), 4.99-4.93 (1H, m, H-2), 3.89 (1H, dd, *J* = 24.1, 11.6 Hz, H-5), 3.68 (1H, ddd, *J* = 39.6, 12.4, 3.3 Hz, H-5), 3.32 and 3.17 (2H, ABq, *J* = 16.3 Hz, COCH₂), 2.60-2.25 (4H, m, H-3 and CH₂), 0.98 (6H, s, CH₃). MS(ESI pos.) *m/z* 358 ([M+H]⁺), 380 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 356 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₉H₂₅FN₅O [M+H]⁺ 358.2043, found (*m/z*) 358.2044.

(2S,4S)-1-[N-[2-(Diethylamino)-1,1-dimethylethyl]glycyl]-4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile (41b). (Method I)

acetaldehyde を用い化合物 **40e** と同様の方法で、表題化合物を無色油状物質として得た。ジアルキル化された **41b** がマイナー成分として得られた。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 5.60-5.30 (1H, m, H-4), 4.99-4.90 (1H, m, H-2), 3.93 (1H, dd, *J* = 23.3, 12.5 Hz, H-5), 3.71 (1H, ddd, *J* = 39.6, 12.5, 3.4 Hz, H-5), 3.44-3.20 (2H, m, COCH₂), 2.62-2.30 (6H, m, H-3 and CH₂), 2.28-2.18 (2H, m, CH₂), 1.01-0.85 (12H, m, CH₃).

N-[2-({2-[(2S,4S)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-N-isobutylbenzamide (41c). (Method H)

benzoyl chloride と **40e** を用い化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を無色油状物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.50-7.28 (5H, m), 5.46 (1H, br d, *J* = 51.1 Hz, H-4), 5.01-4.91 (1H, m, H-2), 4.06-3.18 (8H, m, H-5 and CH₂), 2.62-2.35 (2H, m, H-3), 1.90-1.78 (1H, m), 1.13-0.88 (6H, m), 0.86-0.54 (6H, m). MS(ESI pos.) *m/z* 403 ([M+H]⁺), 425 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) *m/z* 401 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₂₂H₃₂FN₄O₂ [M+H]⁺ 403.2509, found (*m/z*) 403.2524.

N-[2-({2-[(2S,4S)-2-Cyano-4-fluoropyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-N-(4-cyanobenzyl)benzamide (41d)

benzoyl chloride と **40f** を用い化合物 **40a** と同様の方法で、表題化合物を無色アモルファス物質として得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ 7.88-7.72 (2H, m), 7.60-7.20 (7H, m), 5.61-5.30 (1H, br d, *J* = 51.8 Hz, H-4), 5.08-4.92 (1H, m, H-2), 4.81 (2H, br s, PhCH₂), 3.89 (1H, dd, *J* = 24.0, 12.5 Hz, H-5), 3.80-3.54 (1H, m, H-5), 3.50-3.20 (4H, m, COCH₂ and CH₂), 2.60-2.25 (2H, m, H-3),

1.11 (4.3H, s, CH₃ of major isomer), 0.85 (1.7H, s, CH₃ of minor isomer). NMR revealed that compound **41d** occurred as mixtures of conformers in solution. By heating, two peaks of methyl group tended to converge. MS(ESI pos.) m/z 462 ([M+H]⁺), 484 ([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 460 ([M-H]⁻). HRMS calcd for C₂₆H₂₉FN₅O₂ [M+H]⁺ 462.2305, found (m/z) 462.2307.

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile (42)

2-Amino-2-methyl-1-propanol (47.9g, 538mmol)をイソプロパノール(717mL)に溶解し、**35**(41.0g, 215mmol)を加えた。内温 66~71°Cで4時間攪拌した後、室温まで冷却した。析出した結晶を濾取して、イソプロパノール(250mL)で洗浄し、乾燥して無色粉末の **42**(39.03g, 75%)を得た。mp (148 – 149 °C) and 154 – 155 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO - d₆) δ 5.48 (1H, br d, J = 51.9 Hz, H-4), 4.95 (1H, d, J=7.9Hz, H-2), 4.60 (1H, br s, – OH), 3.93 (1H, dd, J = 24.7, 12.5Hz, H-5), 3.72 (1H, ddd, J = 39.7, 12.5, 3.4Hz, H-5), 3.38 and 3.25 (2H, ABq, J=16.5Hz, COCH₂), 3.20 – 3.12 (2H, m, – CH₂OH), 2.58 – 2.32 (2H, m, H-3), 1.92 (1H, br s, NH), 0.94 (3H, s, Me), 0.93 (3H, s, Me); ¹³C NMR (125.7MHz, DMSO- d₆) δ 170.9, 118.9, 93.2 (d, J_{C-F}=174.7Hz), 68.0, 53.1, 51.9 (d, J_{C-F}=22.8Hz), 44.5, 44.3, 35.6 (d, J_{C-F}=20.7Hz), 23.6, 23.5; ¹⁹F NMR (282.2MHz, DMSO- d₆) δ – 174.2. MS(ESI pos.) m/z 244([M+H]⁺), 266([M+Na]⁺); (ESI neg.) m/z 242([M-H]⁻). HRMS calcd for C₁₁H₁₉FN₃O₂[M+H]⁺ 244.1461, found (m/z) 244.1460. Anal. Calcd for C₁₁H₁₈FN₃O₂: C, 54.31; H, 7.46; N, 17.27; F, 7.81. Found: C, 54.10; H, 7.66; N, 17.13; F, 7.77. IR (KBr) 2973,2243,1545,1418,1018,1061,857,838 cm⁻¹. [α]_D²³ -102 (c=0.3, MeOH).

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile benzenesulfonate (TS-021)

(2S,4S)-4-Fluoro-1-[N-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)glycyl]pyrrolidine-2-carbonitrile (free base of **36k**, 20.0 g, 82.2 mmol)をメタノール(300 mL)に溶解し、benzenesulfonic acid mono hydrate (15.2 g, 86.3 mmol)を加え、室温で30分間攪拌した。次いで、イソプロピルエーテル(330 mL)を加え室温で2時間攪拌した。生成した粉末を濾取し乾燥して、目的物(31.5 g, 95%)を無色粉末として得た。mp 220–221 °C (dec.). ¹H NMR (500 MHz, DMSO - d₆) δ 8.64 (1H, br s), 8.57 (1H, br s), 7.62 – 7.58 (2H, m), 7.35 – 7.28 (3H, m), 5.54 (1H, br d, J = 52.1Hz), 5.52 – 5.44 (1H, br s), 5.06 (1H, d, J=8.5Hz), 4.15 – 3.70 (4H, m), 3.47 (2H, s), 2.54 – 2.38 (2H, m), 1.23 (3H, s), 1.22 (3H, s); ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO - d₆) δ 165.1, 148.3, 128.3, 127.6, 125.4, 118.4, 93.0 (d, J_{C-F} = 174.7 Hz), 65.2, 59.8, 52.1 (d, J_{C-F} = 22.7 Hz), 44.8, 42.2, 35.7 (d, J_{C-F} = 20.7 Hz), 20.2, 20.0; ¹⁹F NMR (282.2

MHz, DMSO - d_6) δ -174.5. MS(ESI pos.) m/z 266 ($[M+Na]^+$), 244 ($[M+H]^+$); (ESI neg.) m/z 400 ($[M+BsOH-H]^-$). Anal. calcd for $C_{17}H_{24}FN_3O_5S$: C, 50.86; H, 6.03; N, 10.47; F, 4.73; S, 7.99. Found: C, 50.80; H, 6.00; N, 10.34; F, 4.73; S, 7.95. $[\alpha]_D^{23}$ -61 ($c=0.3$, MeOH).

5.2. Biological methods

5.2.1. DPP-IV inhibitory activity.

DPP-IV活性阻害実験は Deacon らの方法¹⁷⁾に従って行った。DPP-IVを含む血漿は、健康人ボランティアから血液を採取し、遠心分離により調製した。酵素反応は 96 穴平底プレートを用い、25 mM HEPES、140 mM NaCl、1% BSA を含む pH7.8 の緩衝液中で行った。100 μ M Gly-Pro-4-methylcoumaryl-7-amide (ペプチド研究所製) 溶液 25 μ L、133 mM $MgCl_2$ 溶液 7.5 μ L、化合物溶液 5 μ L を混合し、次いで上記緩衝液で 1/100 倍に希釈した血漿 12.5 μ L を加えた。室温で 2 時間反応させた後、25%酢酸水溶液 50 μ L を添加し反応を止めた。生成した 7-amino-4-methylcoumarin を、蛍光プレートリーダー(1420 ARVOTM Multilabel Counter Wallac 社製) を用いて 390nm で励起させたときの 460nm の蛍光強度を測定した。溶媒添加して反応時間を 0 分としたときの蛍光強度をブランク値とし、各測定値からブランク値を差し引いたものを特異的蛍光強度とした。得られた特異的蛍光強度から、下式により DPP-IV活性阻害率 (%) を求めた。被検化合物は 1000 倍高濃度のジメチルスルフォキシド溶液を調製し、上記緩衝液で希釈して使用した。各濃度の阻害率から 50%阻害を示す化合物濃度 (IC50 値) を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = A \div B \times 100$$

(A = 溶媒添加における蛍光強度 - 検体化合物添加における蛍光強度)

(B = 溶媒添加における蛍光強度)

5.2.2. ラット経口投与時の血漿中薬物濃度測定試験

試験実施前日より絶食させた wistar 系ラット (雄、8 週齢) を用い、被検化合物の水溶液 (精製水を用いて溶解し、1mg/mL 水溶液を調製した) を 1mg/kg (1ml/kg) で経口投与した。

検体投与後、5 分、10 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間毎に頸静脈より 0.2mL を採取し、遠心分離後の血漿を試料とした。血漿中薬物濃度は液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC/MS/MS) により測定した。すなわち、血漿 50 μ L にアセトニトリル 200 μ L を加えて攪拌し、遠心後その上清を液体クロマトグラフに注入した。カラムは CAPCEL PAK C18

UG120 5 μ m (長さ 150 mm、直径 2 mm) のものを用いた。溶離液は 10mM 酢酸アンモニウム水溶液-90%アセトニトリル水溶液 (1:9) 混液を用いた。MS/MS 条件については、Sciex API3000 LC/MS/MS System (Perkin Elmer Sciex) を使用し、イオン化法には ESI を用い、モニタリング法としては正イオン, SRM (プレカーサーイオンおよびドーターイオン) で測定した。

5.3.2. Zucker fatty rats を用いた Oral glucose tolerance test (OGTT)

Zucker fatty ラットでの OGTT は Balkan¹³⁾らの方法を参考にして行った。試験には 10 週齢の雄性 Zucker fatty ラットを一晩絶食後に使用した。被験化合物は蒸留水に溶解して経口投与した。投与から 30 分後に 2ml/kg 体重の容量でグルコース溶液を経口投与した。眼底静脈から採血し、血糖値、インスリン濃度、DPP-IV 活性を測定した。

引用文献

1. 糖尿病学 基礎と臨床、P734 (西村書店)
2. Havale, S. H.; Pal, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1783.
3. De Meester, I.; Durinx, C.; Bal, G.; Proost, P.; Struyf, S.; Goossens, F.; Augustyns, K.; Scharpe, S. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, *477*, 67.
4. (a) Zhang, B. B.; Moller, D. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 461; (b) Deacon, C. F.; Holst, J. J.; Carr, R. D. *Drugs Today* **1999**, *35*, 159; (c) Holst, J. J.; Deacon, C. F. *Diabetes* **1998**, *47*, 1663.
5. Ashworth, D. M.; Atrash, B.; Baker, G. R.; Baxter, A. J.; Jenkins, P. D.; Jones, D. M.; Szelke, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1163.
6. Fukushima, H.; Hiratate, A.; Takahashi, M.; Saito, M.; Munetomo, E.; Kitano, K.; Saito, H.; Takaoka, Y.; Yamamoto, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 6053.
7. Fukushima, H.; Hiratate, A.; Takahashi, M.; Saito, M.; Munetomo, E.; Kitano, K.; Saito-Hori, H.; Takaoka, Y.; Yamamoto, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1110.
8. Fukushima, H.; Hiratate, A.; Takahashi, M.; Mikami, A.; Saito-Hori, M.; Munetomo, E.; Kitano, K.; Chonan, S.; Saito, H.; Suzuki, A.; Takaoka, Y.; Yamamoto, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4093.
9. Yaron, A.; Nadier, F. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 31.
10. (a) Rasmussen, H. B.; Branner, S.; Wiberg, F. C.; Wagtmann, N. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 19; (b) Hiramatsu, H.; Kyono, K.; Higashiyama, Y.; Fukushima, C.; Shima, H.; Sugiyama, S.; Inaka, K.; Yamamoto, A.; Shimizu, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *302*, 849; (c) Engel, M.; Hoffmann, T.; Wagner, L.; Wermann, M.; Heiser, U.; Kiefersauer, R.; Huber, R.; Bode, W.; Demuth, H.-U.; Brandstetter, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 5063.
11. Gante, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699.
12. Demange, L.; Menez, A.; Dugave, C. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1169.
13. Balkan, B.; Kwasnik, L.; Miserendino, R.; Holst, J. J.; Li, X. *Diabetologia* **1999**, *42*, 1324.
14. Maetz, P.; Rodriguez, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4221.
15. Ahrén, B.; Simonsson, E.; Larsson, H.; Landin-Olsson, M.; Torgeirsson, H.;

Jansson, P. A.; Sandqvist, M.; Båvenholm, P.; Efendic, S.; Eriksson, J. W.;

Dickinson, S.; Holmes, D. *Diabetes Care* **2002**, *25*, 869.

16. Villhauer, E. B.; Brinkman, J. A.; Naderi, G. B.; Burkey, B. F.; Dunning, B. E.; Prasad, K.; Mangold, B. L.; Russell, M. E.; Hughes, T. E. *J. Med.Chem.* **2003**, *46*, 2774.

17. Deacon, C. F.; Hughes, T. E.; Holst, J. *J. Diabetes* **1998**, *47*, 764.