

新規サイクリン依存性カイネース **CDK4**
阻害活性を有する抗癌剤の開発研究

2011 年

堀内 貴雄

略号表

本論文に用いた略語および略記号は以下の通りである。

Ac	acetyl
AcOH	acetic acid
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Cbz	carbobenzoxy (benzyloxycarbonyl)
CDK	cyclin dependent kinase
CDI	1,1'-carbonylbis-1 <i>H</i> -imidazole
DAST	diethylaminosulfur trifluoride
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
E2F	E2 promoter binding factor
Et ₃ N	triethylamine
Et ₂ O	diethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
GI ₅₀	50% inhibitory concentration of cell growth
IC ₅₀	50% inhibitory concentration of Rb phosphorylation
LAH	lithium aluminum hydride
Me	methyl
Ms	methanesulfonyl
MTD	maximum tolerated dose (最大耐量)
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NMO	<i>N</i> -methyldmorpholine- <i>N</i> -oxide
PCC	pyridinium chlorochromate
Pd(OAc) ₂	palladium acetate
Ph	phenyl
Rb	retinoblastoma
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
TFAA	trifluoroacetic anhydride
THF	tetrahydrofuran
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl

目次

ページ

序論

第一章 研究の背景	1
第二章 CDK 阻害剤に関する従来の研究	5
第三章 研究成果の概略	6
第一節 リード化合物への合成展開	6
第二節 CADD による薬剤設計	8
第三節 活性向上と物性改善	9
第四節 化学的安定性と抗腫瘍効果	10

本論

第一章 HTS ヒット化合物からリード化合物への合成展開	12
第一節 研究の背景と合成デザイン	12
第二節 HTS ヒット周辺化合物の合成	13
第三節 In vitro 酵素阻害活性・細胞増殖抑制活性と構造活性相関	16
第四節 小括	20
第二章 CADD によるホモロジーモデル作成とドッキングスタディー	22
第一節 研究の背景	22
第二節 CDK4 ホモロジーモデル構築	22
第三節 ドッキングスタディーによるファーマコフォアの抽出	30
第四節 小括	34
第三章 4 位ベンゼン環化合物による活性向上と物性改善	36
第一節 研究の背景	36
第二節 4 位ヒドラゾン末端ベンゼン環体の合成	36
第三節 In vitro 酵素阻害活性・細胞増殖抑制活性と構造活性相関	39
第四節 In vivo 抗腫瘍効果	42
第五節 小括	43
第四章 4 位チアゾール環化合物による化学的安定性確保と抗腫瘍効果	45
第一節 研究の背景	45
第二節 4 位ヒドラゾン末端チアゾール環体の合成	50
第三節 In vitro 酵素阻害活性・細胞増殖抑制活性と構造活性相関	54
第四節 In vivo 抗腫瘍効果	60

第五節 小括	61
結論	63
謝辞	65
実験の部	66
本論第一章の実験	67
本論第二章の実験	88
本論第三章の実験	92
本論第四章の実験	110
<i>in vitro</i> 評価に関する実験	140
<i>in vivo</i> 評価に関する実験	143
参考文献およびノート	145
論文目録	149
論文審査の主査および副査名	150

序論

第一章 研究の背景

抗癌剤において、副作用の軽減は抗癌剤治療後や術後における長期間投与を可能とし、再発防止や Quality of Life (QOL) 向上に有効であるため、その様な経口可能な薬剤の開発が求められている。また、近年注目されている分子標的薬は、癌で亢進している特定分子を標的とするため、癌細胞に対する特異性が高く、化学療法薬のように正常細胞まで影響を与える事が少なく、副作用が低減できると考えられている。著者は、従来の化学療法剤とは異なる作用機作であるサイクリン依存性カイネース 4 (CDK4) 活性を阻害する細胞周期調節作用に着目し、癌細胞増殖を停止させる新規分子標的薬の創製を目指した。

細胞増殖と発癌

細胞増殖は生命が持つ基本的かつ重要な特徴の 1 つであり、一連の過程は細胞周期と呼ばれている。細胞周期は通常 4 つの時期に分けられ、DNA の複製が起る時期を S 期、細胞分裂 (有糸分裂) が起る時期を M 期、M 期と次の S 期の間に G1 期、S 期と M 期の間に G2 期がある。G1 期において、細胞が外界から増殖シグナル (栄養状態やリンホカインなどの増殖因子) を受け取ると G1 期→S 期→G2 期→M 期と細胞周期が進行する。加えて、細胞は細胞周期を逸脱し成長も増殖もしない G0 期に入る事ができ、非増殖性の細胞は G0 期にあると考えられているが、増殖シグナルが入力されることで G1 期に戻って成長と分裂を再び誘導する。¹⁻³⁾

また、細胞周期の制御には癌抑制遺伝子が密接に関わっているが、癌ではこれらの遺伝子の機能欠損が頻繁に認められ細胞増殖における制御機構が破綻しているため、非正常な細胞周期を進行させ癌化の原因となっている。⁴⁾

なお、一般に抗腫瘍剤として利用される多くの化学療法剤は、細胞周期の増殖期である S 期および M 期における遺伝子複製や細胞分裂の機構に作用し、増殖期の細胞を非特異的に死滅させる。そのため、骨髄造血細胞などに代表される正常細胞増殖にも影響を与え、副作用の原因となっている。重篤な副作用としては、血液細胞の減少による免疫力低下とそれに伴う感染、消化管粘膜細胞

障害による下痢、肝機能障害、吐き気、脱毛および手足のしびれなどが知られている。したがって患者への負担が大きく、治療後や術後への長期間投与による再発防止は困難となっている。

これらを踏まえ、著者は、細胞増殖制御機構が破綻している癌細胞（肺非小細胞癌・大腸直腸癌・乳癌・悪性黒色腫・卵巣癌など）を G1 期に誘導し（G1 期誘導作用）、増殖を抑制すること（増殖抑制作用）が癌そのものの抑制に有効であると考えた。また、癌で亢進している特定分子を標的とするため、癌細胞に対する特異性が高く、化学療法薬のように正常細胞まで影響を与える事が少なく、副作用が低減できると考えた。

サイクリン依存性カイネース (CDKs)

哺乳動物細胞の細胞周期に関わる因子として、セリン/スレオニンカイネース・ファミリーであるサイクリン依存性カイネース (CDKs) が知られている。セリン/スレオニンをリン酸化するカイネースであり、単体では酵素活性を示さず、制御サブユニットとなるサイクリンと複合体を形成することにより活性化される。リン酸化標的配列は Ser/Thr-Pro-X-塩基性残基 (X は極性アミノ酸) である。現在、10 種類以上の CDK の存在が報告されているが、実際に細胞周期の進行に中心的な役割を担っている複合体の種類は限られていると言われている。

- ・ G1 期の進行：CDK4/6-サイクリン D
- ・ S 期の開始：CDK2-サイクリン E
- ・ S 期の進行：CDK2-サイクリン A
- ・ G2 期の進行：CDK1(Cdc2)-サイクリン A
- ・ M 期の開始：CDK1(Cdc2)-サイクリン B
- ・ CDK 複合体の活性化：CDK7-サイクリン H

また、これらの CDK の活性は、細胞周期のそれぞれ機能する時期に必要なが、他の時期においては CDK 阻害タンパク質などにより抑制されている。⁵⁻⁷⁾

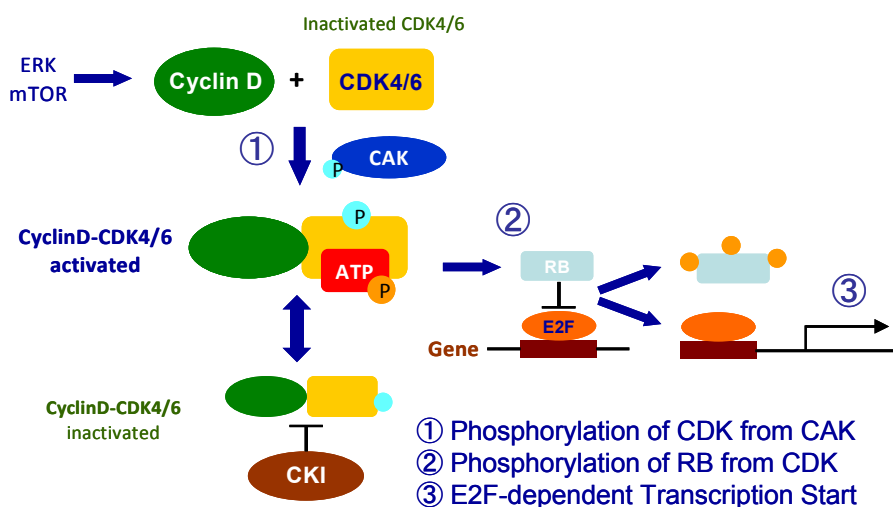
多様なサイクリン-CDK 複合体および制御タンパク質が機能する中で、哺乳動物の G1 期進行から S 期開始においては、サイクリン D-CDK4/6 およびサイクリン E-CDK2 が関与することが報告されている。CDK4 とそのホモログである

CDK6 は、非常に相同性が高く (70%)、CDK6 は造血幹細胞や肝芽細胞に特異的に見られる。この CDK4/6 は G1 期の進行に関与し、G1 チェックポイントとして G1 期の停止機構を制御する。一方、CDK2 は G1 期にサイクリン E と結合して Rb リン酸化を活性化し、S 期へ移行させ、更に S 期においてもサイクリン A と結合して DNA 合成に関与し、S 期を進行させる。⁸⁾

細胞周期 S 期進行のメカニズム

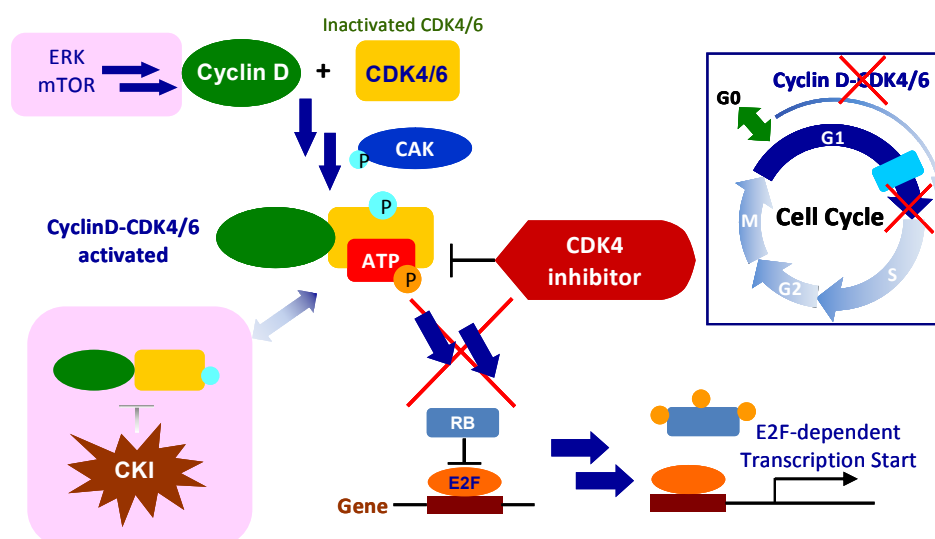
細胞周期が G1 期または G0 期で停止している正常細胞において、増殖因子の刺激により発現誘導されたサイクリン D と CDK4 との複合体は、ATP の結合とともに、CDK Activating Kinase (CAK, サイクリン H/CDK7/p36MAT1 複合体) によって CDK4 自身のスレオニン残基 T172 がリン酸化され、構造変化を伴い、活性化される (Figure 1, process ①)。活性化サイクリン D1-CDK4 複合体は、基質となる癌抑制遺伝子タンパク質 Retinoblastoma protein (Rb) のリン酸化を開始する (process ②)。Rb は、転写因子 E2F と結合して E2F の転写活性を抑制しているが、サイクリン D-CDK4 複合体によるリン酸化を受けることで E2F と解離する。これにより、E2F の転写活性抑制が解除され、DNA 複製に必要な遺伝子群の転写が誘導されて (process ③)、S 期へ細胞周期が進行する。なお、癌抑制タンパク質 p16 などの INK4 ファミリーや p21 などの Cip/Kip ファミリーという CDK 阻害タンパク質 (CKI) によりサイクリン D-CDK4 の活性は、適切に調節されている。⁸⁻¹⁰⁾ (Figure 1)。

Figure 1. Mechanism of cell cycle progression in G1 phase.



一方、悪性黒色腫・扁平上皮食道癌や乳癌の患者で、サイクリンの過剰発現が報告されている。また、多くの癌細胞において、癌抑制タンパク質 p16 の突然変異・欠失変異・サイレンシングが見られる。これら CDK4/6 活性の制御機構の破綻により、CDK4/6 活性が亢進され続け、Rb リン酸化が亢進される状態となり、細胞周期が異常に S 期へ進行する。¹¹⁻¹³⁾ 更に、乳癌細胞の CDK4 欠損株では癌化が抑制されることが Malumbres らによって報告されている。¹⁴⁾ このことから、CDK4/6 を制御することにより、癌細胞の増殖が抑えられると考えられる (Figure 2)。

Figure 2. Our strategy for the CDK4 inhibitor.



なお、前述の通り、もう一つのドライブファクターである CDK2 は、S 期においてもサイクリン A と結合して DNA 合成に関与する。そのため、選択的な CDK2 阻害または CDK2 と CDK4 の両方を阻害した場合に、コンセプトである特異的に G1 期のみ細胞周期を集積させるのは難しいと考えた。また、G1 期から S 期にかけての長期間作用することから、他の化学療法剤と同様に正常細胞への副作用も懸念された。更に、研究開始当初は、既に世界的に CDK2 阻害が広く研究され、競争の激しいターゲットであり、遅れて参入するのは難しい状況であった。更に、CDK2 を阻害しても癌細胞の増殖は抑えられないことが McCormick らにより報告¹⁵⁾されており、抗癌剤のターゲットとしての魅力は薄い。

以上により、細胞増殖制御機構が破綻した癌細胞の細胞周期を G1 期に特異的に誘導する化合物が抗腫瘍剤となりうると考えた。そこで、G1 期にのみ亢進される CDK4 活性に着目し、その活性阻害による G1 期集積をメカニズムとした新規な分子標的薬の創製を目的として、本研究に着手した (Figure 3)。

Figure 3. Concept of our CDK4 inhibitor drug.

- ・ 対象腫瘍：正常Rbを有するCDK4活性化腫瘍（約50%の腫瘍）
- ・ 主な適応癌：
 - p16活性消失：大腸癌、肺癌、メラノーマ
 - サイクリンD増加：大腸癌、乳癌
 - CDK4活性型変異：メラノーマ
- ・ 用法：長期服用可能な経口剤
術後の維持療法あるいは化学療法剤との併用

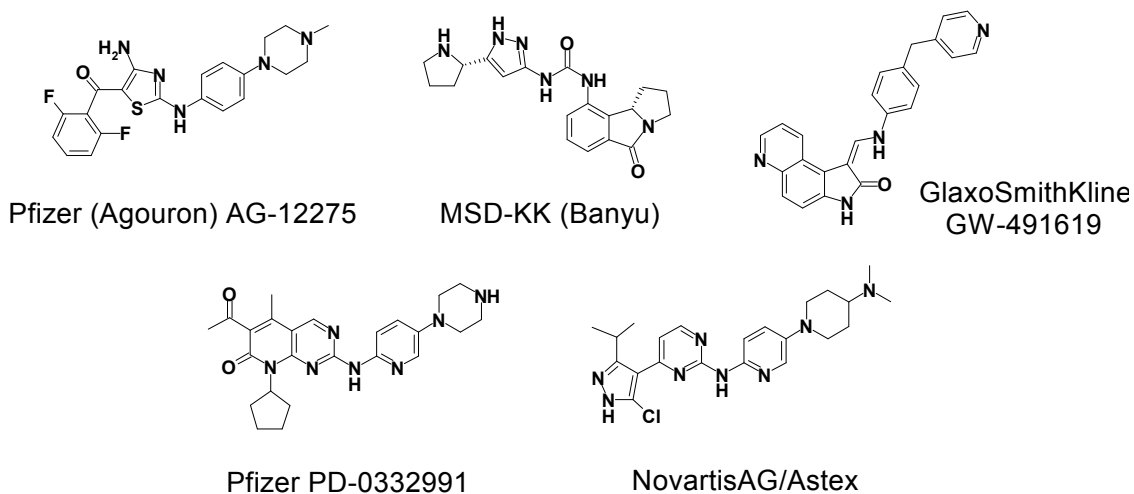
第二章 CDK 阻害剤に関する従来の研究

1990 年代より低分子 CDK 阻害剤としてフラボピリドール¹⁶⁾、ロスコビチン¹⁷⁾、UCN-01¹⁸⁾など多くの低分子化合物が報告されているが、CDK4 に対する阻害の特異性は無い。¹⁹⁻²¹⁾

しかし近年、著者らと同様の製品コンセプトを有する化合物も多く報告されはじめ、Pfizer 社 (Agouron 社) AG-12275、MSD-KK 社 (Banyu 社化合物)、GSK 社 GW-491619、臨床開発中の Onyx Pharmaceuticals/Pfizer 社の PD-0332991²²⁾ および Astex/Novartis 社の LEE-011 (構造未発表)²³⁾ などが CDK4 選択的阻害剤として知られている。

2010 年代に入っても Eli Lilly 社、Curis 社などの製薬企業・ベンチャー企業および欧米の大学研究機関による特許が公開され、世界的に研究が続けられている状況にある (Figure 4)。

Figure 4. Compounds reported as selective CDK4 inhibitor.



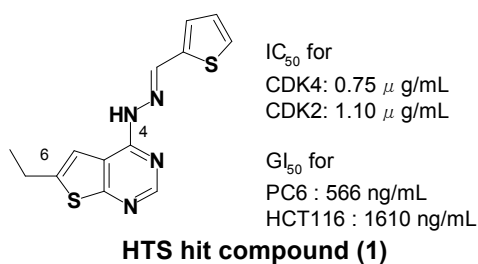
第三章 研究成果の概略

第一節 リード化合物への合成展開

本論第一章では、活性の増強と選択性の向上を目的に、社内ライブラリーHTS ヒット化合物 **1** に対し各種官能基変換を実施し、リード化合物を獲得するに至る誘導体合成・構造活性相関・明らかになった問題点について詳述する。

G1 期集積による癌細胞増殖抑制を可能にする、新規な分子標的薬の創製を目的として、G1 期のみには作用する CDK4 を標的に選定した。ATP 共存下でのサイクリン D1-CDK4 複合体の Rb タンパク質リン酸化阻害活性 (IC_{50} 値 : Rb リン酸化を 50%抑制する濃度) を指標として、社内ライブラリー11 万検体のランダムスクリーニングを行い、ATP 拮抗型の新規チエノピリミジン誘導体 **1** を発見した (**Figure 5**)。

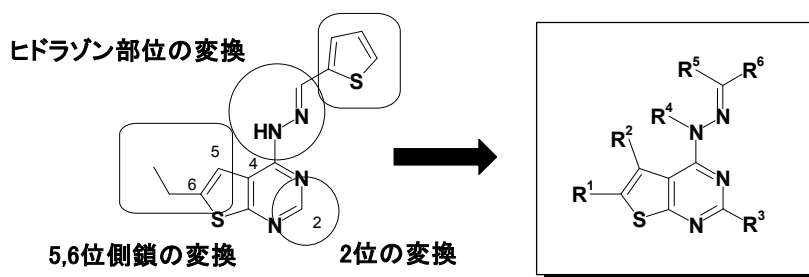
Figure 5. HTS hit compound.



本化合物は、CDK4 酵素阻害活性 (IC_{50}) が弱く、ヒト肺小細胞癌由来細胞株 PC6 ないしヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 を用いた細胞増殖抑制活性 (GI_{50} 値：細胞増殖を 50%抑制する濃度) 評価において、明確な細胞増殖抑制活性は得られていない。しかしながら、わずかに CDK2 阻害との選択性を有し、権利化可能な新規な構造であったことから、ヒット化合物と位置づけられた。本化合物およびその類縁体の医薬品としての可能性を見極めるため、広い範囲の構造活性相関情報の集積を目指した。そのため、チエノピリミジン-4-ヒドラジン母核 2,5,6 位への各種置換基導入、4 位ヒドラゾン部位の変換および 4 位末端チオフェン環の変換を考え、化合物展開を行った (Figure 6)。

Figure 6. Design of new CDK4 inhibitor.

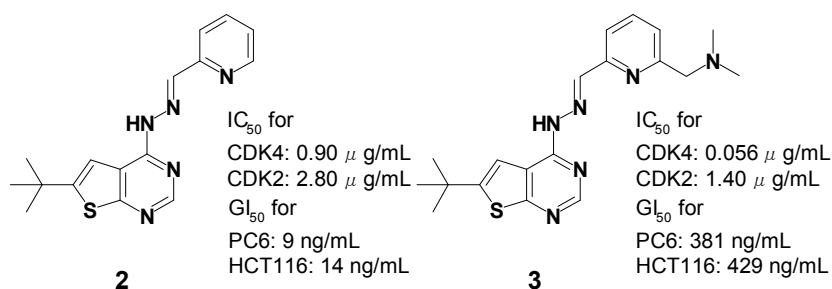
4位置換基末端芳香環の変換



その結果、2 位への置換基導入および 4 位ヒドラゾン部位の変換では、CDK4 阻害活性が著しく減弱することがわかった。そこで、4 位末端へテロ環部位および 6 位側鎖部位の誘導体合成を集中して行い、6 位 *tert*-Bu 基を有した 4 位末端 2-ピリジン体 **2** において、CDK2 との選択性向上と細胞増殖抑制活性の増強を見出した。更に、4 位置換基末端の誘導体合成を行い、酵素阻害活性が著しく向上した塩基性基を有するピリジン体 **3** を見出した (Figure 7)。²⁴⁾

その後の評価により、**2** は、細胞増殖を 50%抑制する濃度である GI_{50} 値 (14 ng/mL) 近傍の濃度では S 期集積作用を示すことが判明し、CDK4 阻害以外の活性を有する可能性が明らかとなった。また、本化合物群は脂溶性が高く、中性付近での溶解性がほとんど得られないことがわかり、経口投与に向け、物性改善という課題が明白となった。

Figure 7. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for **2** and **3**.



第二節 CADD による薬剤設計

本論第二章では、前述した **3** の強い酵素阻害活性などの構造活性相関情報を踏まえ、計算化学手法による標的 CDK4 タンパク質の三次元構造 (ホモロジーモデル) の構築と、作成した三次元構造を利用した低分子化合物とのドッキングスタディーの結果について記述する。

当時 CDK4 タンパク質の結晶構造は、世界的にも解明されておらず、社内関連部署においても CDK4 の結晶は得られていなかった。著者はコンピューター上で、蛋白質構造データベース RCSB Protein Data Bank (PDB) より立体構造が公開されている活性型 CDK2 (PDB code: **1jst**)²⁵⁾、CDK4 と相同性の高い非活性型 CDK6 (PDB code: **1blx**)²⁶⁾ およびタンパク質/アミノ酸配列データベース UniProtKB/Swiss-Prot より公開されている CDK4 の一次構造 (code: **P11802**) を利用して CDK4 ホモロジーモデリングを行い、その立体構造モデルを構築した。続いて、前述した **3** の強い酵素阻害活性などの構造活性相関情報を踏まえ、ドッキングスタディーを試みた。

構築した CDK4 モデルと CDK2 構造との比較の結果、ATP ポケットの出入口にあたる Solvent Accessible 部近傍で CDK2 との構造上の違いを確認した。また、**3** とのドッキングスタディーでは、母核ピリミジン環から 4 位ピリジン環上のジメチルアミノメチル基にかけて、タンパク質 Hinge 部位に沿って ATP ポケットに収まることで、複数の水素結合が形成されることがわかった。更に、4 位ピリジン環内の窒素原子は、CDK4 阻害活性発現に殆ど寄与していないことがわかり、他の芳香環への変換の可能性を見出した。²⁷⁾

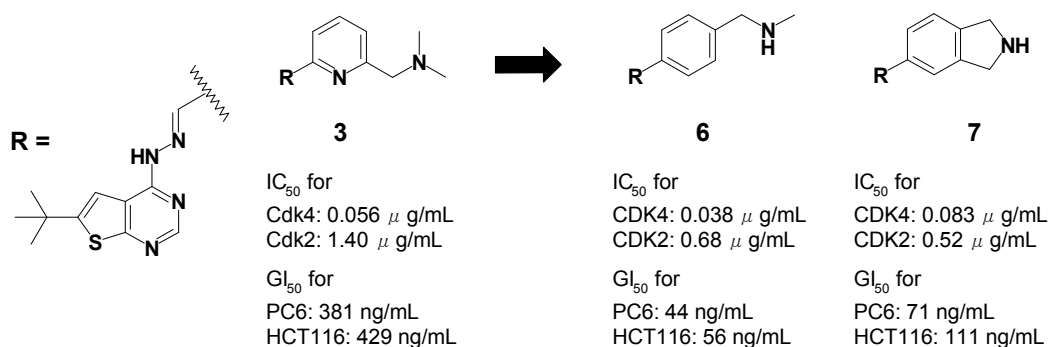
第三節 活性向上と物性改善

本論第三章では、更なる活性・選択性の向上と物性の改善を目的として、4位末端ピリジン環に代わるベンゼン環化合物での誘導体合成・構造活性相関について記述する。

前述した **2** について、CDK4 阻害以外の活性を有する可能性が示唆され、その別作用の回避が課題となっていた。一方、CADD によるドッキングスタディーにおいて、4位ピリジン環内の窒素原子が CDK4 阻害活性発現に寄与していないという知見を得た。そこで、ベンゼン環化合物 **4** をデザイン・合成したところ、酵素阻害活性が **3** とほぼ同等であった。この結果により、G1 集積作用が明確であった 4 位末端ベンゼン環での誘導体を集中して行うこととした。

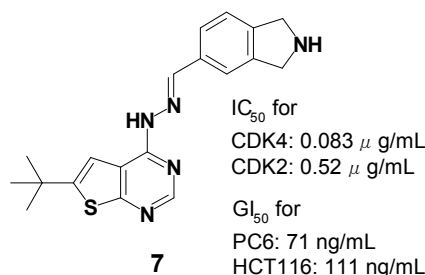
ベンゼン環上に塩基性基を中心とした各種ヘテロ原子を有する側鎖を導入する中で、パラ位にアミノ官能基を有し、高活性・選択的な **5** を見出した。しかし、本化合物の *in vivo* 試験においてヌードマウスへの静注投与時に中枢抑制作用に由来する痙攣が確認された。本副作用は **5** の分子全体の脂溶性に起因すると考え、脂溶性低減を目的に 2 級アミン体 **6** を合成し評価した。その結果、**6** は細胞増殖抑制活性の向上とともに日本薬局方崩壊試験第 2 液 (日局 2 液 (JP2)、pH 6.8 緩衝液) への溶解度が改善し、痙攣などの中枢抑制作用を回避し、*in vivo* 試験においても静注・経口のいずれの投与方法においても抗腫瘍増殖活性 (腫瘍径から算出された腫瘍増殖抑制率 IRTV: iv = 54%, po = 57%) を示すことがわかった (Figure 8)。

Figure 8. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for **4**, **5** and **6**.



また、4位末端にベンゼン環を含む二環性化合物を導入したところ、強いCDK4阻害活性と細胞増殖抑制活性を有し、G1期を増加させ、抗腫瘍増殖活性を示すイソインドール体 **7** (IRTV: iv = 61%) を見出した (Figure 9)。²⁷⁾

Figure 9. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for **7**.



第四節 化学的安定性と抗腫瘍効果

本論第四章では、研究の進捗に伴い 4 位ベンゼン環化合物で明らかとなった強酸性条件での化学的不安定性の改善、酵素阻害活性・選択性の向上および抗腫瘍増殖活性の獲得を目的として、4 位芳香環の変換および 6 位の各種官能基変換を実施し、上記課題を解決した化合物を獲得するに至る誘導体合成・構造活性相関について記述する。

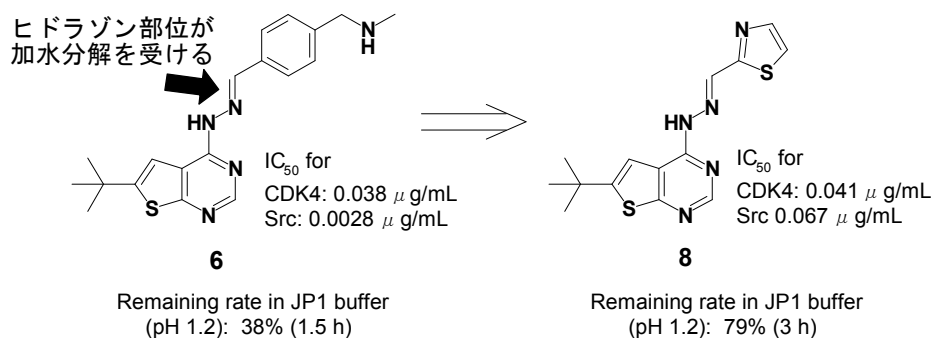
前述の化合物の高次評価が進む中で、高い阻害活性を有した 4 位ベンゼン環誘導体全般において、ヒドラゾン部位が強酸性下 (日本薬局方崩壊試験第 1 液、日局 1 液 (JP1)、pH 1.2 緩衝液) に非常に不安定であることがわかった。更に、チロシンカイネース c-Src 阻害作用も認められた。

そのため、改めてベンゼン環に代わるヘテロ環化合物の検討を行い、4 位末端チアゾール体 **8** が、CDK4 阻害活性を保持しつつ c-Src 阻害を低減し、酸性条件下でも安定に存在することを見出した (Figure 10)。

更に、アミノ基の導入などチアゾール環上の官能基変換を検討した。また、活性向上と物性改善を目的として、母核 6 位側鎖の修飾も検討した。

母核 6 位置換基においては、*tert*-Bu 基に代わる分岐アルキル基において、c-Src 酵素阻害活性を CDK4 阻害活性の同等以下まで減弱させた化合物を得た。さら

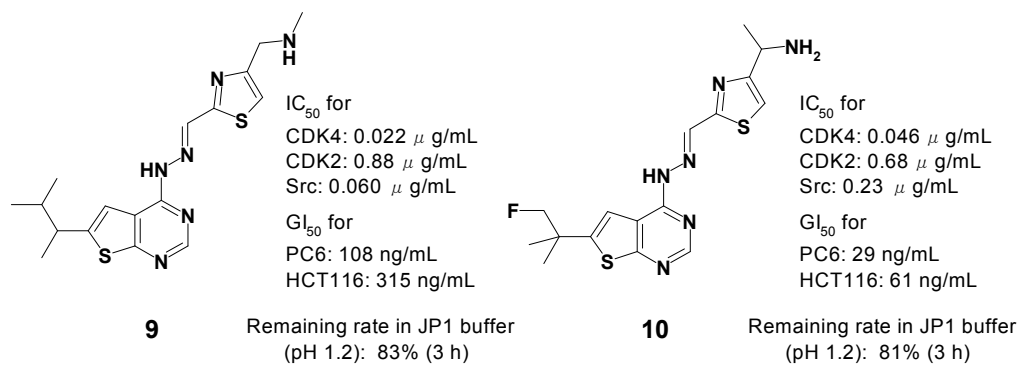
Figure 10. Inhibitory activities and chemical stability of **6** and **8**.



に、フッ素原子を導入することにより、細胞増殖抑制活性が向上することがわかった。

その中で、有望化合物として 6 位分岐アルキル体 **9** および 6 位末端フッ素化アルキル体 **10** を見出した。これらの化合物は、強い CDK4 阻害活性に基づく G1 期集積作用と細胞増殖抑制を有し、**9** は in vivo 試験で静注および経口投与にかかわらず明確な抗腫瘍増殖活性 (IRTV: iv = 52%, po = 45%) を示した (Figure 11)。²⁸⁾

Figure 11. Inhibitory activities and chemical stability of **9** and **10**.



以下、得られた結果について四章にわたり詳細に記述する。

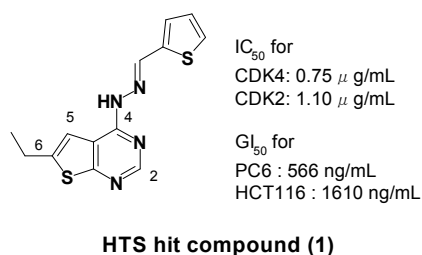
本論

第一章 HTS ヒット化合物からリード化合物への合成展開

第一節 研究の背景と合成デザイン

癌における細胞周期 G1 期チェックポイントの破綻を修復する新規分子標的薬の創製を目的として、CDK4 を標的に選定した。ATP 共存下でのサイクリン D1-CDK4 複合体の Rb タンパク質リン酸化阻害活性を指標として、社内ライブラリー11 万検体のランダムスクリーニングを行い、ATP 拮抗型の新規チエノピリミジン誘導体 **1** を発見した (**Figure 12**)。

Figure 12. A compound identified by in-house high-throughput screening.

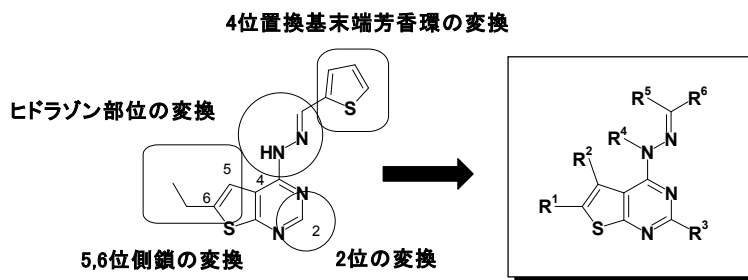


本化合物は、CDK4 酵素阻害活性 (IC₅₀ = 0.75 μg/mL) を有しているが、明確な細胞増殖抑制活性は得られていない。しかしながら、PC-6 株で G1 期を増加させることが確認され、わずかに CDK2 との選択性を有しており、権利化も可能な構造であることから、有望ヒット化合物と位置づけられた。また、ヒドラゾン構造を有する化合物として、インターロイキン-12 (IL-12) 産生阻害剤 STA-5326 やリボヌクレオチド還元酵素阻害剤 Triapine などが臨床試験を行っていることから、医薬品として許容される構造であると考えられた。

著者は、CDK4 阻害作用が抗癌剤として有効であるかどうかの妥当性検証を始めとし、本化合物およびその類縁体の医薬品としての可能性を見極めるため、その周辺化合物の合成研究を展開した。

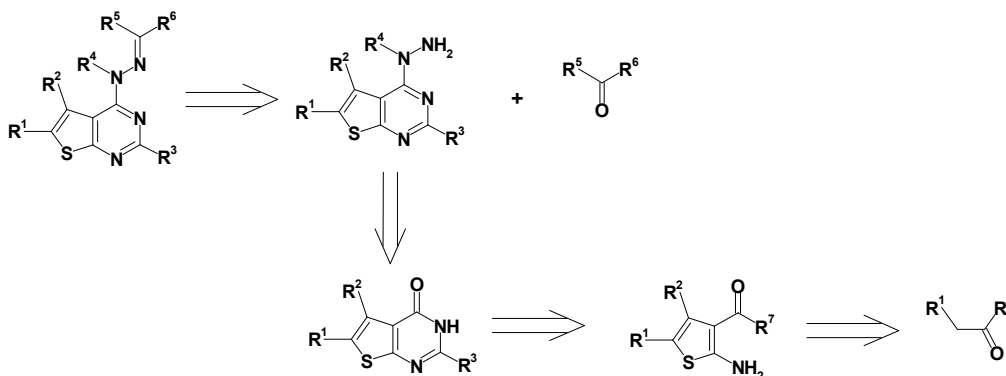
合成ターゲットのデザインとして、**Figure 13** に示すように、チエノピリミジン母核 2,5,6 位への各種置換基導入、4 位ヒドラゾン部位の変換および 4 位末端チオフェン環の変換を考えた。

Figure 13. Design of new CDK4 inhibitor.



逆合成解析として、Figure 14 に示すように、チエノピリミジン母核 4-ヒドラジン体と各種アルデヒドまたはケトンから合成が可能であると考えた。この 4-ヒドラジン体は、 R^1, R^2, R^3 置換チエノピリミドン体から誘導できると考えた。チエノピリミドン体は、 R^1, R^2 置換 2-アミノ-3-エステルチオフェン体から合成し、このチオフェン体は、各種アルデヒドまたはケトンから合成することを考えた。

Figure 14. Retrosynthetic analysis.

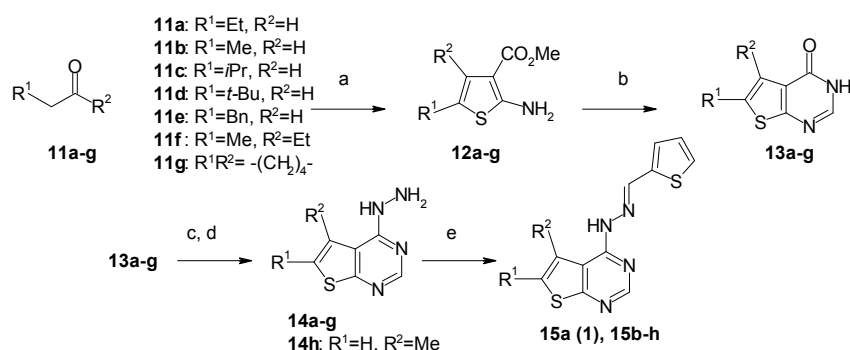


以上の逆合成解析に従い、(i) チエノピリミジン-4-ヒドラジン母核への各種置換基導入および (ii) 4 位ヒドラゾン末端に該当するアルデヒド体の変換という二つの方向での化合物展開を行うこととした。

第二節 HTS ヒット周辺化合物の合成

5 位 (R^1) および 6 位 (R^2) 置換基として各種アルキル側鎖を導入したチエノピリミジン母核の合成を Scheme 1 に示す。チエノピリミジン母核の構築は、一般的に知られる以下の方法を用いた。チオフェン中間体 **12a-g** は、Tinney らの方法^{29a)}に従い、トリエチルアミン存在下に市販のアルデヒド **11a-f** またはケトン

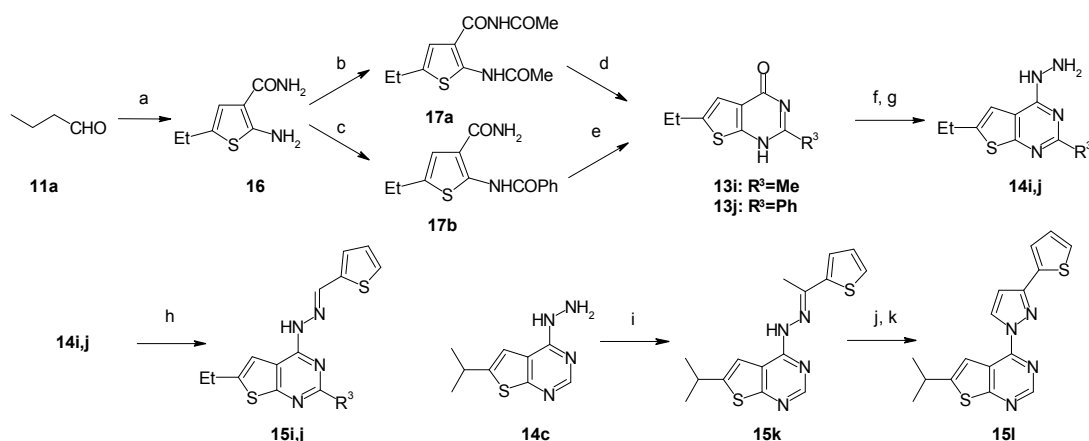
11g とシアノ酢酸メチルと硫黄により合成した。210℃にてホルムアミドを反応させ、ピリミドン環化体 **13a-g** を得た。続いて、Hozien らの方法³⁰⁾に従い、オキシ塩化リンによる 4 位カルボニル基のクロル化に続き、エタノール加熱還流下にヒドラジン 1 水和物を反応させ、**14a-g** を得た。市販の **14h** も含め、ベンゼン加熱還流中に 2-チオフェンカルボアルデヒドと反応させて、目的物 **15a** (compound **1**), **15b-h** を得た。



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) methyl cyanoacetate (1 eq.), S₈ (1 eq.), Et₃N (1 eq.), DMF (2 eq.); (b) HCONH₂ (5 倍量), 210 °C, 7–84% from **11a-g**; (c) POCl₃ (20 倍量), 110 °C; (d) NH₂NH₂·1H₂O (10 倍量), EtOH, reflux, 33–57% from **13a-g**; (e) 2-thiophene-carboxaldehyde (1 eq.), benzene, reflux, 9–92%.

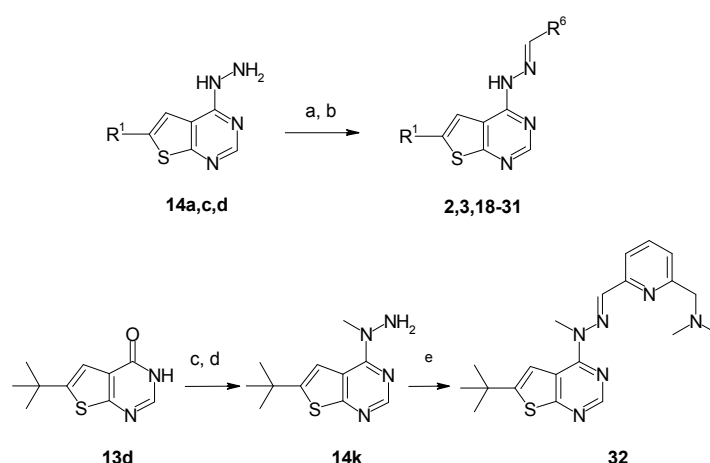
続いて、2 位 (R³) および 4 位 (R⁴, R⁵) へ置換基を導入したチエノピリミジン母核の合成を **Scheme 2** に示す。2-アミノチオフェン体 3 位のアミド体は Gewalt らの方法^{29b)}に従い、DMF 中 *n*-ブチルアルデヒド、2-シアノアセトアミドおよび硫黄よりチオフェン体 **16** を得た。**16** を無水酢酸と加熱還流することで **17a** とし、ナトリウムエトキシド (NaOEt) を作用させて環化させ、**13i** を得た。また、**16** に対して、ベンゾイルクロリド (BzCl) を作用させることで **17b** を得、続いて水酸化ナトリウム水溶液で加熱還流し、縮環体 **13j** を得た。以下、**Scheme 1** と同様にして最終体 **15i,j** を得た。また、4 位置換体となるエチリデンヒドラジン **15k** およびピラゾール環化体 **15l** は、ヒドラジン **14c** から合成した。**14c** を市販の 2-アセチルチオフェンと縮合させ **15k** を得、続いて、Beam らの方法³¹⁾に従い、*n*-ブチルリチウムでのメチルヒドラゾン部位のジアニオン化によるギ酸エステルとのアシル化と塩酸処理による閉環反応を行い、チエニルピラゾリル体 **15l** を得た。**15k** の立体化学については、安定化コンフォメーション検索にてボルツマン分布を計算したところ、97%以上の確率で表記の立体で存在すると見積もられた。実際の ¹H-NMR による差 NOE 測定の結果、メチル基を照射するとヒドラ

ズン N-H とチオフェン環上のプロトンの両方に NOE が観測され、ヒドラゾン N-H を照射するメチル基にのみ NOE が観測されました。逆にチオフェン環上のプロトンを照射するとメチル基にのみ NOE が観測され、ヒドラゾン N-H との NOE は観測されなかったことを確認している。



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) 2-cyanoacetamide (1 eq.), S₈ (1 eq.), Et₃N (1 eq.), DMF (2 eq.), 62%; (b) Ac₂O (15 倍量), reflux, 24%; (c) BzCl (1.5 eq.), Et₃N (4 eq.), benzene, reflux, quant.; (d) NaOEt (3 eq.), EtOH, reflux, 57%; (e) NaOH aq. (10 倍量), reflux, 25%; (f) POCl₃ (20 倍量), 110 °C; (g) NH₂NH₂·1H₂O (10 倍量), EtOH, reflux, 2steps, 97% from **14i**, 60% from **14j**; (h) 2-thiophene-carboxaldehyde (1~1.1 eq.), benzene, reflux, 65% from **15i**, 56% from **15j**; (i) 2-acetylthiophene (1 eq.), toluene, reflux, 34%; (j) *n*-BuLi (2 eq.), HCO₂Et (1 eq.); (k) HCl aq. at pH2, reflux, 80% from **15k**.

最後に、4 位ヒドラゾン末端 (R⁶) のチオフェンに代わるアルキルまたはアール官能基導入の合成を **Scheme 3** に示す。



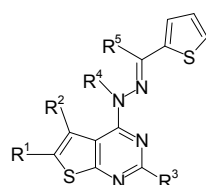
Scheme 3. Reagents and conditions: (a) aldehyde (1 eq.), benzene or toluene, reflux; (b) deprotection if necessary, 41–95% from **14a,c,d**; (c) POCl₃ (20 倍量), 110 °C; (d) MeNHNH₂ (5 倍量), EtOH (5 倍量), reflux, 51% from **13d**; (e) 6-[(dimethylamino)methyl]-pyridine-2-carbaldehyde (1 eq.), EtOH, reflux, 73%.

常法にしたがって、ヒドラジン体 **14a,c,d** と各種アルデヒドにより、目的物 **2**, **3**, **18-31** を得た。また、4 位ピリジン体においては、Hosmane らの方法³²⁾に従い、**13d** のクロル化とメチルヒドラジンにより (R^4) ヘメチル基を導入した **14k** を利用し、*N*-メチルヒドラゾン体 **32** を合成した。**14k** は、立体障害のあるものの求核性の強いメチル側で反応しており、¹H-NMR スペクトルにおいてシングレットのメチル基 ($\delta = 3.51$) およびアミノ基の 2 プロトン ($\delta = 4.17$) を確認している。

第三節 In vitro 酵素阻害活性・細胞増殖抑制活性、溶解度と構造活性相関

化合物 **1** および **15b-h** の酵素阻害活性を **Table 1** に示す。

Table 1. Enzyme inhibitory activity for substituted thieno[2,3-*d*]pyrimidines (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$) **1**, **15b-l** against CDK4 and CDK2.



Compd	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	CDK4 IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a	CDK2 IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a
15a (1)	Et	H	H	H	H	0.75	1.10
15b	Me	H	H	H	H	1.90	1.70
15c	<i>i</i> Pr	H	H	H	H	0.05	0.35
15d	<i>t</i> -Bu	H	H	H	H	0.12	0.56
15e	Bn	H	H	H	H	>20.0	6.50
15f	Me	Et	H	H	H	16.00	12.00
15g	-(CH ₂) ₄ -		H	H	H	>20.0	>20.0
15h	H	Me	H	H	H	>20.0	>20.0
15i	Et	H	Me	H	H	>20.0	>20.0
15j	Et	H	Ph	H	H	>20.0	>20.0
15k	<i>i</i> Pr	H	H	H	Me	2.80	8.90
15l	<i>i</i> Pr	H	H	-CH=CH-		>20.0	>20.0

^aConcentration ($\mu\text{g/mL}$) needed to inhibit Rb phosphorylation by 50%, as determined from the dose-response curve. Values are the means of at least two determinations.

15c,d に見られるように、6 位 (R^1) をエチル基からイソプロピル基または *tert*-ブチル基に変換すると、CDK4 阻害活性が向上し ($IC_{50} = 0.05$ and $0.12 \mu\text{g/mL}$)、

CDK2 との選択性も 5~7 倍向上することがわかった。一方、より分子量の大きく

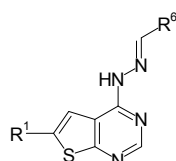
フレキシブルに回転が可能なベンジル基では、タンパク質と立体障害が生じるためか、活性が消失してしまう。また、**15f-h** のように 5 位 (R^2) に直鎖状アルキル基または環状アルキル基を導入した場合も、阻害活性が減弱または消失してしまうことが明らかとなった。2 位 (R^3) については、メチル基を導入した **15i** においても完全に活性が消失することから、2 位のプロトンが活性発現に必須であることが考えられた。更に、4 位 (R^5) にメチル基を導入した **15k** などにおいては、活性が大きく減弱する傾向にあることがわかった。また、4 位ヒドラゾン部位 (R^4, R^5) のもう一つの知見として、ピラゾール環化した **15l** においては、活性が消失してしまった。

加えて、物性面の知見として、上記の化合物 **1, 15b-h** は中性付近での溶解性が殆ど得られないことがわかり、例えば **15c** は $0.1 \mu\text{g/mL}$ 以下の溶解度しか得られていない。分子全体の脂溶性の高さに起因すると考えられることから、CDK4 酵素阻害活性の向上に加え、チオフェン環部位の変換による物性の改善を目指し、更なる合成展開を行った。母核側には、比較的阻害活性が高い 6 位エチル体、イソプロピル体または *tert*-ブチル体を用い、4 位末端部位は、チオフェンに代わりアルキル鎖およびアリール基を導入した化合物を合成した。

化合物 **1-3** および **18-31** の酵素阻害活性および細胞増殖抑制活性を **Table 2** に示す。細胞増殖抑制活性評価の癌株として、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 およびヒト肺小細胞癌由来細胞株 PC-6 を用いた。

アルキル基を導入した **18, 19** は、CDK4 阻害活性が減弱した。一方、ヘテロアリール環を導入した **2** および **20-25** においては、ヒット化合物 **1** に比べて同等~同等以上の活性を有することがわかった。しかしながら、2-ピリジン体以外は、CDK2 選択性が失われてしまう結果となった。2-ピリジン体は 3.1~3.5 倍の選択性を有した。そこで、2-ピリジン環に固定して各種の置換基の導入を検討し、ピリジン環 5 位または 6 位にメチル基を導入した **26, 27** において、13.3~13.6 倍の CDK2 との選択性向上が得られた。

Table 2. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for substituted thieno[2,3-*d*]-pyrimidines.



Compd	R ¹	R ⁶	CDK4	CDK2	HCT116	PC-6
			IC ₅₀ (μg/mL) ^a	IC ₅₀ (μg/mL) ^a	GI ₅₀ (μg/mL) ^b	GI ₅₀ (μg/mL) ^b
1	Et	thiophenyl	0.75	1.10	1.610	0.566
18	Et	<i>t</i> -Bu	4.40	3.80	1.660	1.550
19	Et	cyclopropyl	3.20	4.10	NT ^c	NT ^c
20	<i>i</i> Pr	2-pyridinyl	0.88	3.10	0.010	0.003
21	<i>i</i> Pr	3-pyridinyl	0.55	0.70	NT ^c	0.889
22	<i>i</i> Pr	4-pyridinyl	0.24	0.33	NT ^c	>10.0
23	<i>i</i> Pr	phenyl	0.47	0.88	NT ^c	0.651
24	<i>i</i> Pr	2-franyl	0.39	0.55	NT ^c	3.780
2	<i>t</i> -Bu	2-pyridinyl	0.90	2.80	0.014	0.009
25	<i>t</i> -Bu	3-pyridinyl	0.50	0.56	NT ^c	1.450
26	<i>t</i> -Bu	5-methyl-2-pyridinyl	0.88	12.00	0.020	0.009
27	<i>t</i> -Bu	6-methyl-2-pyridinyl	0.52	6.90	0.268	0.258
28	<i>t</i> -Bu	6-aminomethyl-2-pyridinyl	0.59	3.60	0.059	0.036
29	<i>t</i> -Bu	6-[(methylamino)methyl]-2-pyridinyl	0.25	7.10	0.185	0.189
3	<i>t</i> -Bu	6-[(dimethylamino)methyl]-2-pyridinyl	0.056	1.40	0.429	0.381
30	<i>t</i> -Bu	6-(morpholin-4-ylmethyl)-2-pyridinyl	0.17	5.50	0.363	0.261
31	<i>t</i> -Bu	6-hydroxymethyl-2-pyridinyl	0.35	2.10	0.039	0.034

^aConcentration (μg/mL) needed to inhibit Rb phosphorylation by 50%, as determined from the dose-response curve. Values are the means of at least two determinations.

^bDose-response curves were determined at ten concentrations. The GI₅₀ values are the concentrations needed to inhibit cell growth by 50%, as determined from these curves.

^cNT=not tested.

ピリジン環上に置換基が導入できるという知見から、水溶性向上を期待し、ヘテロ原子を有する側鎖官能基を導入することとした。その結果、メチレンを介さないアミノピリジンタイプの置換様式では活性が減弱したものの、末端に脂肪族アミノ基を有する **3**, **28-30** は CDK4 酵素阻害活性を向上させることがわかり、更に **3**, **29**, **30** においては、CDK2 阻害活性との選択性も一段と向上することがわかった。特に、6-[(ジメチルアミノ)メチル]ピリジン体 **3** は、強い CDK4 酵素阻害活性 (IC₅₀ = 0.056 μg/mL) を有し、日局 2 液 (pH 6.8) への溶解性が 44 μg/mL に向上することがわかり、物性改善の方策への知見も得られた。6-ヒドロキシメチル体 **31** は、末端に塩基性基を有する化合物に比べて CDK4 阻害活性が

弱くなった。このことから、末端部位の塩基性基が活性増強および選択性向上に有効であることが明らかとなった。更に、重要な構造活性相関の知見として、高活性化合物 **3** に対応する 4 位ヒドラゾン部位 (R^4) を *N*-メチル化した化合物 **32** は活性が消失することから、このヒドラゾン部位 N-H プロトンも CDK4 阻害活性に必須であると考えられた。

一方、細胞増殖抑制活性についての知見として、化合物 **2**, **20**, **26**, **28** および **31** は増殖抑制能が向上したが、CDK4 酵素阻害活性が強い **3** は、細胞増殖抑制活性が弱いことが明らかとなった。そこで、**1**, **2** および **3** について、各種の癌株に対する細胞増殖抑制能を評価した。その結果、化合物 **2** が評価に付した全ての癌株に対して、強い細胞増殖抑制能を有していた。一方、化合物 **3** は、**1** よりは抑制活性が向上するものの、各種の癌株に対して細胞増殖抑制能が不十分であることが確認された (**Table 3**)。

Table 3. Cytotoxic activity for **1**, **2** and **3** (GI_{50} : ng/mL)^a against various tumor cell lines.

Compd	WiDr ^b	DLD-1 ^b	HCT116 ^b / Tere-1 ^c	HCT116 ^b / SN2-3 ^d	MKN28 ^e	MDA-MB-231 ^f	MDA-MB-468 ^f	BL-6 ^g	P388 ^h
1	1360	1120	1210	1340	2860	1870	48	2440	1010
2	19	37	7	5	49	19	8	45	6
3	889	506	973	755	1390	919	315	1090	370

^aThe GI_{50} values are the concentrations needed to inhibit cell growth by 50% by MTT assay.

^bHuman colon cancer. ^cDocetaxal-resistant cell established in-house. ^dSN-38-resistant cell established in-house.

^eHuman gastric cancer. ^fHuman breast cancer. ^gMurine melanoma. ^hMurine leukemia

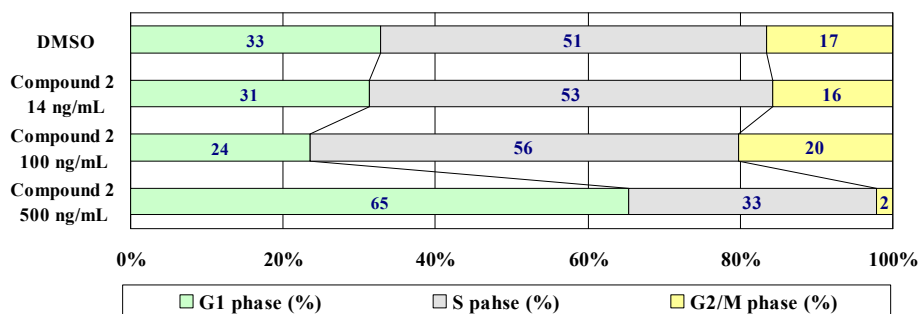
化合物 **2** および **3** について、CDK4 酵素阻害活性と細胞増殖抑制活性の相関が取れておらず、今後の研究を進める上で重要な問題となった。

序論で述べたように、研究のコンセプトとしては、細胞周期 G1 期の CDK4 活性を阻害することで、S 期への移行が妨げられ、細胞分布が G1 期に集積することになる。そこで、得られた化合物における G1 期への集積誘導を評価するため、フローサイトメトリー法に準じて、HCT116 株へ化合物 **2** を添加し、16 時間後に回収した細胞に対して、ファクスキャン³³⁾による DNA 含量を測定することで、細胞周期の分布比率を算出した。

評価の結果、化合物 **2** は 500 ng/mL の濃度では、S 期および G2/M 期の比率を減少させ、G1 期を 65%に増加させたが、 GI_{50} 値 (14 ng/mL) 近傍の低い濃度および 10 倍用量 (100 ng/mL) では G1 集積作用が見られず、逆に 60%程度の高い

S 期集積が観測された。このことから、**2** は DNA 合成阻害という既存の化学療法剤と同様な活性を持ち、本研究のコンセプトである分子標的薬にはならないことが明らかとなった (**Figure 15**)。

Figure 15. Cell cycle distribution of HCT116 cells treated with compound **2**.



これらの結果を踏まえ、ピリジン環の置換基を変換することによって CDK4 酵素阻害活性が強い化合物 **3** が得られてきていることから、更なる細胞増殖抑制作用の増強が見込まれれば、コンセプトに合致する化合物も得られると考えた。**3** においては、細胞内の標的に薬剤が届いていないために細胞増殖抑制活性が弱くなってしまっていると考えられ、今後は、細胞に取り込まれるようなデザイン・構造変換が必要であることが明らかとなった。

第四節 小括

以上より、HTS ヒット化合物 **1** からのチエノピリミジン母核部位の官能基変換およびヒドラゾン側鎖へテロ環化合物展開において、以下の知見が得られ、阻害活性が向上した化合物を見出した (**Figure 16**)。

1. チエノピリミジン母核 2 位について、置換基導入により活性が消失したことから、標的タンパク質はピリミジン環部位との強い相互作用を有することが示唆された。
2. チエノピリミジン母核 4 位についても、置換基導入により活性が消失したことから、ヒドラゾン N-H プロトンは CDK と相互作用していることが示唆され、活性発現に必須であると考えられた。

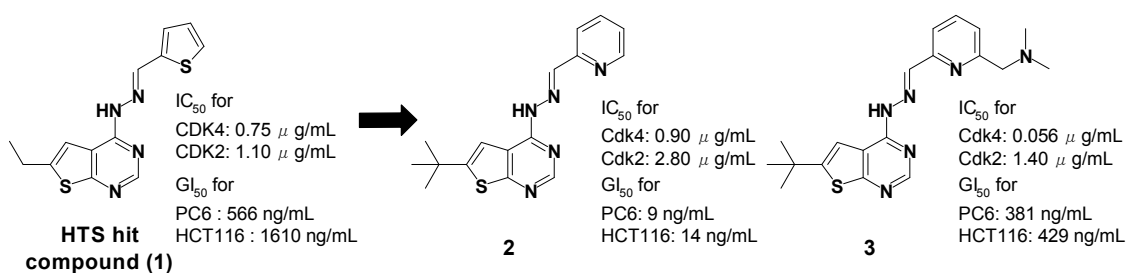
3. チェノピリミジン母核 6 位について、イソプロピル基および *tert*-ブチル基では活性が増強されることが明らかとなった。また、5 位方向は、活性を低減・焼失させることがわかり、空間的に置換基を許容しないことがわかった。

4. 母核 4 位ヒドラゾン末端 2-ピリジン環化合物は、細胞増殖抑制作用が HTS ヒット化合物に比べて増強された。しかしながら CDK4 阻害活性自体は増強されず、細胞分布評価において S 期集積が見られたことから、別の活性での細胞増殖抑制が起こっていると考えられ、DNA 合成阻害などの既存の化学療法剤との差別化ができず、本研究の目指す分子標的薬にはならないと判断した。

5. ピリジン環 6 位の置換基を探索した中で、CDK4 酵素阻害活性が増強され、良好な CDK2 選択性を有する **3** を見出し、阻害活性向上の有用な知見を得た。本化合物は細胞増殖抑制作用が弱く、細胞内の標的に薬剤が届いていないことが考えられ、**3** からの更なる構造変換により、細胞増殖抑制活性の向上を目指すこととなった。

6. HTS ヒット化合物および合成展開した化合物の多くは、脂溶性が高く、中性付近での溶解性がほとんど得られないため、経口投与可能な薬剤の創出に向けた物性改善という課題も明らかとなった。その中で、化合物 **3** に見られるような塩基性基を導入することにより、水溶性が向上することを明らかにし、物性改善に向けた一つの方策を見出した。

Figure 16. Structures of **2**, **3**.



第二章 CADD によるホモロジーモデル作成とドッキングスタディー

前述した 3 の強い酵素阻害活性などの構造活性相関情報を踏まえ、CDK4 ホモロジーモデルへのドッキングスタディーを行った。

第一節 研究の背景

研究開始当時、CDK4 タンパク質の結晶構造は、世界的に解明されておらず、社内関連部署においても共結晶法およびソーキング法などでの結晶化ができない標的であった。

一方、著者は株式会社医薬分子設計研究所 (板井昭子先生)³⁵⁾へ国内派遣留学を通じ計算化学手法に接する機会を得ていたことから、本研究において、CADD を利用した CDK4 タンパク質の三次元構造 (ホモロジーモデル) の構築を行い、低分子化合物の薬剤設計に活用することを考えた。

ホモロジーモデリングとは、アミノ酸配列のデータベース上で、タンパク質の立体構造が未知のアミノ酸配列についてホモロジー検索を行い、立体構造が既知のアミノ酸配列と有意なホモロジーを見つけ、その鋳型を基に構造未知のタンパク質の立体構造をモデリングする手法である。

一般的に、同じあるいは類似した機能のタンパク間では立体構造が似ていることや、アミノ酸配列が 20-30% しか一致していなくても立体的モチーフは保存されやすく、活性部位はよく保存される傾向があることが知られている。このことから、モデリングしたいタンパク質のアミノ酸配列を、蛋白質構造データベース RCSB Protein Data Bank (PDB) に登録されている複数の類縁タンパク質と比較し、アミノ酸配列および立体構造からのアラインメントを行うこととした。その結果をもとに、主鎖による構造保存領域 Structure Conserved Regions (SCR) を構築し、その後不確定要素の高い部分へとタンパク質立体構造を組み立てて行き、側鎖を含めた構造の修正・エネルギー最適化を行い、タンパク質モデルを作成することとした。

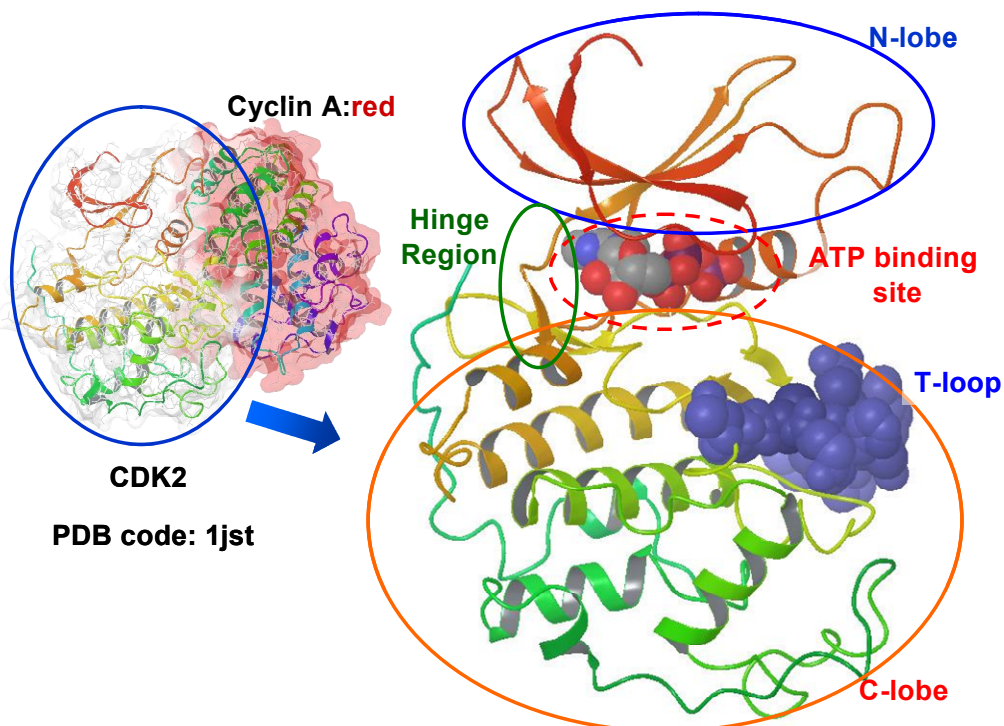
また、時を同じくして、UC Berkeley 大学の Sung-Hou Kim 教授³⁶⁾のコンサルティングを受ける機会にも恵まれ、モデル構築およびドッキングスタディーへの助言を頂く事ができ、本研究に反映することができた。

第二節 CDK4 ホモロジーモデル構築

第一項 CDK4 の立体構造および構造変化のメカニズムについて

CDK は、ヒトで約 500 種類あると言われるタンパク質カイネースの一種である。その構造的長として、NH₂ 末端部位 (N-lobe) と COOH 末端部位 (C-lobe) および二つのローブを繋ぐ Hinge 部位で構成され、Hinge 部位と N-lobe および C-lobe に挟まれた狭い空間が ATP 結合サイトになる (Figure17)。

Figure 17. Structure of CDK-Cyclin complex.

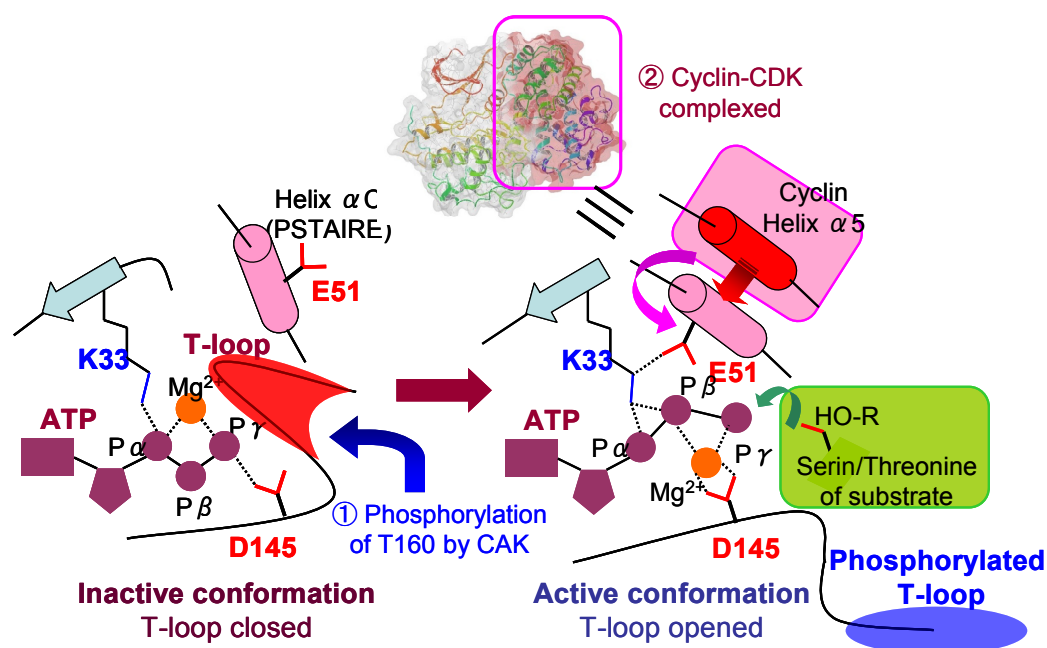


CDK が不活性な状態では C-lobe の T-loop と言われているフレキシブルなループ部分が、ATP 結合部位を塞いでおり、ATP が結合できない状態と考えられている。ところが、対応するサイクリンと結合すると、ATP 結合サイトの環境が変化し、ATP と結合できることが知られている。

研究の進んでいる CDK2 の場合、サイクリンの helix $\alpha 5$ が CDK2 の Glu51 を含む PSTAIRE の helix αC と相互作用し、helix 自体も 90 度程回転することで ATP 結合サイトの環境が変化し、Glu51 が Lys33 と相互作用して ATP γ 位のリン酸 (γ Pi) がフリーの状態となり、T-loop 部位が開く。更に Thr160 が CDK Activating Kinase (CAK, サイクリン H/CDK7/p36^{MAT1} 複合体) によりリン酸化され、より安定化されると考えられている。³⁷⁾ 同様に、CDK4/6 の構造変化について、増殖因子の刺激により発現誘導されたサイクリン D と CDK4 が結合することで CDK4

に構造変化がおこり、CDK4 の ATP 結合部位を塞いでいる T ループが開き、活性中心となる ATP ポケットおよび触媒裂が構築される。ATP の結合に加え、CDK 自身のスレオニン残基 T172 が CAK によってリン酸化されると、構造が安定化され、基質となる癌抑制遺伝子タンパク質 Retinoblastoma protein (Rb) タンパク質の標的配列が配位し、触媒裂と特異的に相互作用すると考えられる (Figure 18)。

Figure 18. Conformational change in the active site of CDK2 induced by cyclin binding. (ref. 37 を一部修正)



著者が創薬を目指している CDK4 阻害剤は、活性化されたサイクリン-CDK4 複合体が ATP と結合する際に、化合物が ATP と拮抗することで、Rb タンパク質のリン酸化を阻害すると考えている。このことから、目標とするホモロジーモデルは、活性状態の CDK4 構造であり、ATP 結合サイトを中心とした再現モデルである。

第二項 アラインメント

前述のとおり、CDK4 に関して X 線結晶構造解析は報告されていなかったため、まずはアラインメントの作成を行った。

CDK4 のアミノ酸配列としては、タンパク質/アミノ酸配列データベース UniProtKB/Swiss-Prot より入手可能であった CDK4_HUMAN (code: **P11802**) のアミノ酸配列を利用した。次に、相同性の高い CDK6 (similarity : 92.3%、identity :

70.3%) および ATP が結合した活性型の結晶が複数知られている CDK2 の二種類タンパク質と比較することとした。使用するタンパク質の一次配列および X線結晶構造としては、PDB にて X線構造が公開されており入手可能であった (i) 阻害タンパク質である p19INK4d が結合した非活性型 CDK6 (PDB code: **1blx**²⁶)および (ii) 活性型 CDK2 とした。

活性型 CDK2 の選択に関しては、ATP および Mg²⁺ または Mn²⁺を一つだけ有している化合物を検索した。また、属するファミリーが異なっても、ATP 結合サイトの形は一般に良く保存されていることから、CDK 以外のタンパク質も考慮した。その結果、Keyword: ATP and Kinase and human での検索において、PDB ID: **1b38, 1b39, 1fin, 1hck, 1ir3** (Insulin Receptor), **1jst**²⁵)を得た。また、ヒト以外では、**1a6o, 1ayl, 1csn, 1gol, 1kdn, 3pgk** を得た。

上記のアミノ酸一次配列を CLUSTALW 1.4 を用いてマルチプルアラインメントした。アラインメントから保存されているタンパク質を絞り込み、**1gol** (RAT), **1ayl** (E coli)と **1jst** および **1blx_A** 鎖を選び、相同性の更なる絞り込みを行った。その結果、**1gol** の相同性が比較的少なく、**1ayl** は全体の配列が長く、大きくずれることがわかった。よって **1gol, 1ayl** を除いてアラインメントし直したところ、アミノ酸配列が良く相同されていることが確認できることから **1jst** を利用する事とした (Table 4)。

Table 4. CLUSTALW(1.4) multiple sequence alignment.

1jst_A_CDK2	-----MENFQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTG-EVVALKK
1blx_A_CDK6	-----MEKDGLCRADQQYECVAEIGEGAYGKVKARDLKNNGRFFVALKR
p11802_CDK4	-----MATSRYPVAEIGVGAYGTVYKARDPHSG-HFVALKS
	. . . * **.* ** *.***. * .****
1jst_A_CDK2	IRLDTET---EGVPSTAIRESLLKELN---HPNIVKLLDVIHT-----ENKLYLVFEFL
1blx_A_CDK6	VRVQTGE---EGMPLSTIREVAVLRHLETFEHPNVVRLFDVCTVSRTDRETKLTLVFEHV
p11802_CDK4	VRVPNGGGGGGLPISTVREALLRRLEAFEHPNVVRLMDVCATSRTDREIKVTLVFEHV
	.*. . . . * * . . . **.* * . * .***.* * ** * * .****..
1jst_A_CDK2	HQDLKKFMDASALTGIPLPLIKSYLFQLLQGLAFCHSHRVLHRDLKPQNLLINTEGAIKL
1blx_A_CDK6	DQDLTTYLDKVPPEGVPTETIKDMMFQLLRGLDFLHSHRVVHRDLKPQNILVTSSGQIKL
p11802_CDK4	DQDLRTYLDKAPPPLPAETIKDLMRQFLRGLDFLHANCIVHRDLKPENILVTSGGTVKL
	.*** . . . * . . * * . . . ** . . * . * . * . * ****.* * . . . * . **

1jst_A_CDK2	ADFLARAFGVPVRTYTHEVVTLWYRAPEILLGCKYYSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALF
1blx_A_CDK6	ADFLARIYSFQM-ALTSVVVTLWYRAPEVLLQS-SYATPVDLWSVGCIFAEMFRRKPLF
p11802_CDK4	ADFLARIYSYQM-ALTPVVVTLWYRAPEVLLQS-TYATPVMWSVGCIFAEMFRRKPLF *****..... ..* .*****.**,. *.* ** *.*****.**,.**
1jst_A_CDK2	PGDSEIDQLFRIFRTLGTPEVVVPGVTSMPDYKPSFPKWARQDFSKVVPPLDEDGRSLL
1blx_A_CDK6	RGSSDVDQLGKILDVIGLPEEDWPRDVALP--RQAFHSKSAQPIEKFVTDIDELGKDLL
p11802_CDK4	CGNSEADQLGKIFDLIGLPEDDWPRDVSLLP--RGAFPPRGRPVQSVVPEMEESGAQLL *.* ***.**,.**,.**,.....* .*, .. **, .** **
1jst_A_CDK2	SQMLHYDPNKRISAKAALAHPPFQDVTKPVPHLRL-----
1blx_A_CDK6	LKCLTFNPAKRISAYSALSHYPYQDLERCKENLDSHLPPSQNTSELNTA
p11802_CDK4	LEMLTFNPHKRISAFRALQHSYLHKDEGNPE----- ..*...* ***** ** *,..... . .

. : 相同している

* : 完全に一致している

第三項 立体構造の重ね合わせ

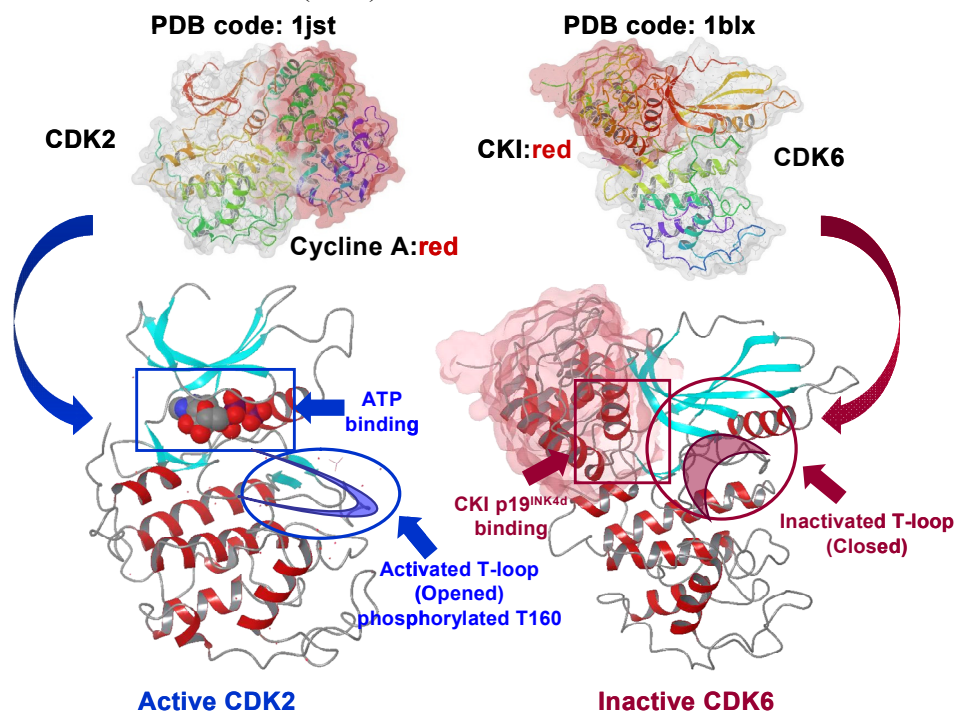
今回のモデリングにおいて、利用する活性型 CDK2 と不活性型 CDK6 の結晶構造は、T-loop と言われる部分の位置が大きく異なることがわかっており、全体的な重なり具合に影響することが明らかだったため、部分ごとに各構造を組み合わせたキメラ型の構築法を考えた。

サイクリン A-CDK2 複合体である **1jst** は、ATP および Mg^{2+} を含み、T-loop 部位が十分に開いた部分的な活性化状態となっており、標的タンパク質が導かれる catalytic cleft (触媒裂) がはっきりと確認できる立体構造である。更に、X 線の分解能も比較的高い (Resolution: 2.6Å) ことから、活性型 CDK4 の ATP 結合サイトや T-loop を再現するには、**1jst** に合わせて構築するのが妥当と考えた

一方、非活性型 CDK6 構造である **1blx** は、CDK 阻害タンパク質 p19^{INK4d} が結合しており、T-loop 部位が閉じて ATP は結合しておらず、不活性型のコンフォメーションである。X 線結晶解析における分解能が高く (Resolution: 1.9Å)、特に C-lobe の SCR が、CDK4 に対して良く保存されていることがわかっていることから、CDK4 全体の構造は **1blx** を参照にして構築できると考えた。ただし、p19INK4d は ATP 結合サイトを側面よりブロックし、中央部に位置する ATP 結合サイトの環境が活性体と異なってくる可能性が大きいいため、文献²⁶⁾を参照し

て CDK 阻害タンパク質と相互作用している側鎖を中心の修正が必要と考えられた (Figure 19)。

Figure 19. Comparisons of X-ray crystal structure between active CDK2 (**1jst**) and inactive CDK6 (**1blx**).



第四項 ホモロジーモデルの作成

CDK4 ホモロジーモデルの作成には Accelrys Software Inc.社 InsightII を利用した。大まかなデザインとして、N 末端側ローブは主に CDK2 由来とし、C 末端側は CDK6 による構築とした。

タンパクの構造は、① 構造保存領域 SCR 部 (α -ヘリックス・ β -シート部位)、② レファレンスと異なるために置換された MUTATED 部、③ LOOP 部、および④ 連結させる SPLICE 部に大別される。

一般にタンパク構造の大きな差異の見られる ③ LOOP 部分に関しては、長さの同じものを利用し、構造が無い場合は Loop Search を主体にして構築を行った。構造が大きく異なり、平均二乗偏差 (RMS) が高い場合は Loop Generate を利用して構築した。

InsightII のアラインメントでは、Homology>>Alignment>>Pairwise Sequence および Structure Module を利用し、前出のアラインメント表を参考に相同性の高い部分を指定した。このままでは接合部分の強い歪みやアミノ酸側鎖同士のぶつかり合いなどが見られ、リラックス処理を行った。しかしながら、頻繁に計算

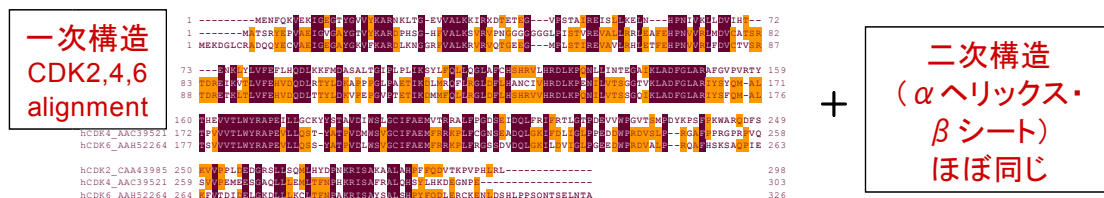
が破綻したため、Pro50, Lys88, Val89, Pro170, Val185 においては Gly に変更してモデルを構築した。これらのアミノ酸残基は ATP 結合サイト以外の場所にあり、残基を変換しても大きな問題はないと考えた。

ATP 結合サイト内のアミノ酸残基側鎖においては事前にマニュアルでロータマーを補正した。N 末端および C 末端の自動構築を行った後、構造に信頼性の低い SPLICE 部から段階的に LOOP 部、MUTATED 部、SCR 部と部分的なリラックスをさせてゆく。この際、結合が切れてしまう個所があり、これらは Biopolymer Module にて結合の再生成を行った。最後に Discover_3 Module にて構造全体のエネルギー最適化 (Molecular Mechanics, MM) 計算および分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) 計算を行い、モデルを完成した。電荷の割り付けは InsightII 標準の CVFF 力場を利用した。得られた構造のロータマーをマニュアル補正し、Homology Module の ProStat による構造の検証を行い、修正と検証を繰り返した (Figure 20)。

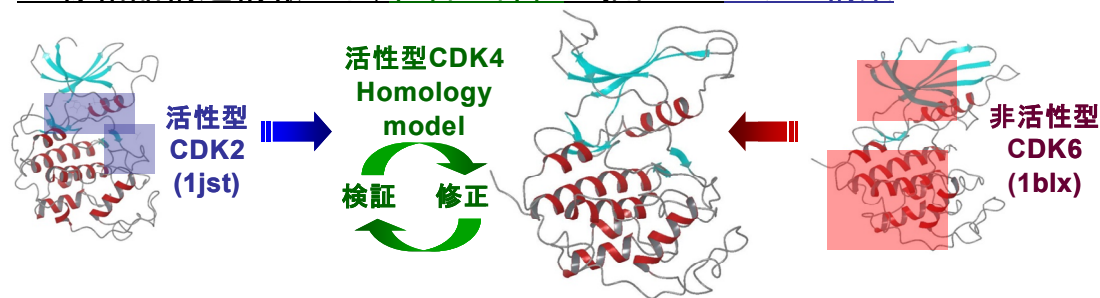
Figure 20. Molecular modeling of CDK4 with CDK2 (1jst) and CDK6 (1blx).

・構造保存領域 (SCR)・構造可変領域 (loop・splice部位) の抽出

- ・CDK2 との相同性 Similarity: **80.7%**, Identity: **45.9%**
- ・CDK6 との相同性 Similarity: **92.3%**, Identity: **70.3%**



・X線結晶構造情報から、組合せ部位の抽出 ⇒ モデル構築



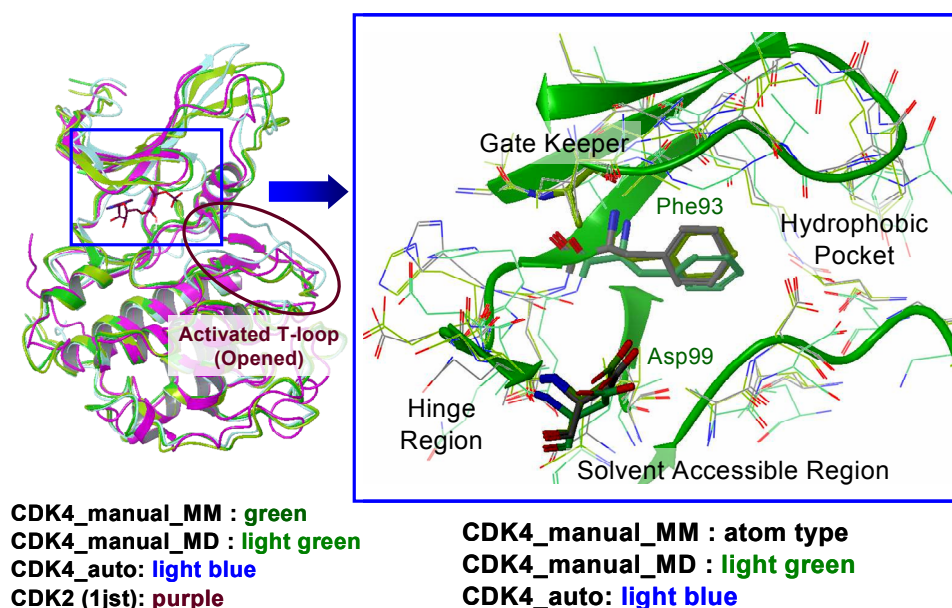
また、InsightII には Modeler Module というプログラムがあり、上述の操作を自動的に行うことができる。この Module はアラインメント表が適切であれば、比較的信頼度の高いモデルを短時間で得ることができる利点がある。そこで、マニュアル操作と同様に、CDK6 と CDK2 のアラインメントを組み合わせたキ

メラ型のアラインメントを作成し、ホモロジーモデルを作成して、評価することとした。(詳細は 第二章の実験 に記述)

第五項 構造の評価・考察

ホモロジーモデルとして、マニュアル操作による SCRs から構築した 2 モデル (CDK4_manual_MM、CDK4_manual_MD) および Modeler Module による自動構築した 1 モデル (CDK4_auto) の 3 モデルを作成した (Figure 21)。

Figure 21. Superposition of CDK4 models with CDK2 (1jst).



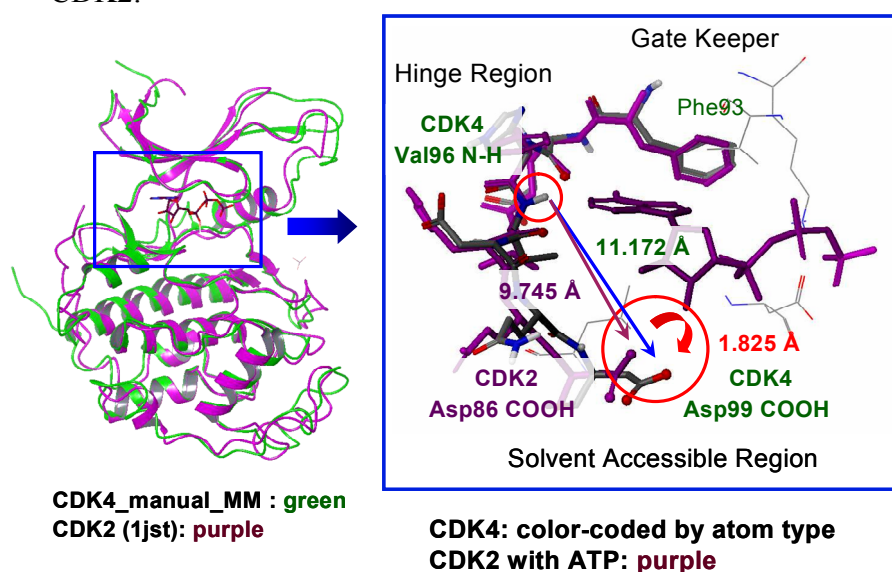
全モデルで T-loop が開いた状態を再現している。また、N-lobe 側 (図上側) において、不活性型 CDK6 よりも Helix αC が内側にあることから、PSTAIRE 部は活性型 CDK2 の構造を反映している。このことから、どのモデルもサイクリンによる構造変化を再現できていると考えられる。

なお、T-loop はマニュアル構築モデルのほうが活性型 CDK2 に近く、CDK4_manual_MD では、ATP 結合サイトの側鎖が予想よりも動くことが確認され、CDK4_manual_MM のほうが CDK2 結晶構造に近い構造を有すると考えられた。CDK2 に近いものが正解に近いとは限らないことが留意されるものの、ATP 結合サイトを再現したモデルとして、MM 計算で構築したホモロジーモデルをドッキングスタディーに採用することとした。

また、作成した CDK4 モデルと CDK2 構造との違いについても検証した。ATP ポケット奥側 (Gate Keeper, Hydrophobic Pocket) の環境は非常に似ていることが

わかり、母核部分で選択性を向上させる事は難しいと考えられた。一方、ATP ポケットの出入口にあたる Solvent Accessible 部近傍で CDK2 との構造上の違いを確認した。化合物との相互作用点と考えられる CDK4 の Hinge 部位 Val96 主鎖カルボニル基およびアミノ基を CDK2 構造重ね合わせると、同じ配列番号に該当する CDK2 の Asp86 側鎖に比べ、CDK4 の Asp99 側鎖カルボン酸の位置が 1.8Å 程度異なってくるのがわかった。Hinge 部位までの距離も違ってくることから、これらの情報は選択性発現に利用できると考えられた (Figure 22)。

Figure 22. Protein Superposition of CDK4 homology model bound to the ATP site of CDK2.



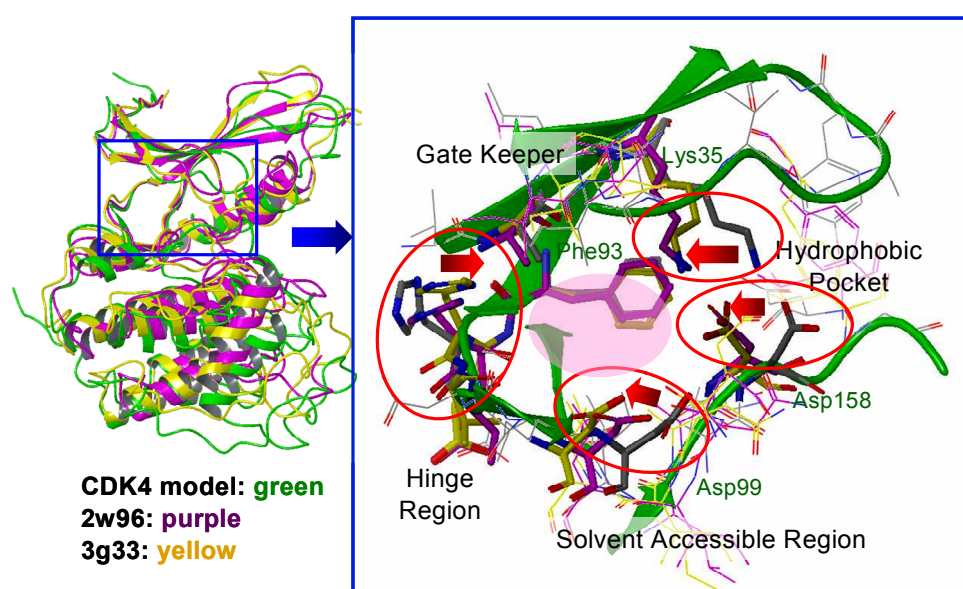
なお、2009年に二つのグループから、サイクリン D-CDK4 複合体の X線結晶構造が発表された。**2w96**³⁹⁾は、サイクリン D1 との複合体であるものの、T-loop の閉じた不活性型のコンフォメーションと報告された。また、**3g33**⁴⁰⁾は、サイクリン D3 との複合体であるが、こちらも不活性型のコンフォメーションであることが報告された。どちらの構造においても、ATP は挿入されていない。著者の作成したホモロジーモデルを重ね合わせて比較したところ、これらの構造の ATP 結合サイトは、化合物 **3** を挿入するには空間 (図中紫色楕円) が狭いことがわかった。このことから、著者の展開する阻害化合物は、CDK4 が ATP を取り込む活性型コンフォメーションを取らないと、阻害活性を発現しないと考えている。(Figure 23)。

第三節 ドッキングスタディーによるファーマコフォアの抽出

第一項 化合物 **3** と AG12275 との比較

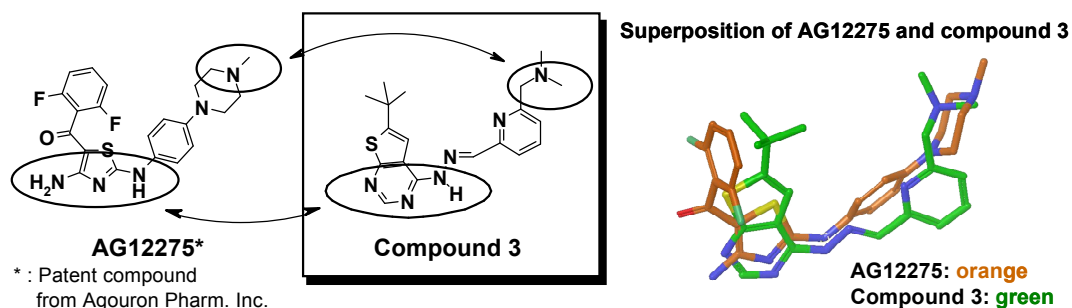
4 位末端ピリジン化合物で得られた構造活性相関情報より、ヒドラゾン部位 N-H が活性発現に必須であることから、タンパク質側との相互作用が示唆された。また、学会情報⁴¹⁾より得られた Agouron 社 CDK4 活性阻害化合物 **AG12275** と CDK2 タンパク質との相互作用の情報を参考にして、結合様式および空間配座の考察を行った。

Figure 23. Protein Superposition of CDK4 homology model bound to the ATP site of **2w96** and **3g33**.



CDK2 の ATP ポケットに収まった **AG12275** は、芳香環部位の平面性が保たれているものの、**Figure 24** に示すように、チアゾールアミン部でV字型に折れ込んだ立体配座を取っていた。一方、**3** の安定構造においても、非常に平面性が保たれており、ヒドラゾンの窒素原子も sp³ ではなく、共役によりほぼ sp² 様の電子分布となっていた。なお、ヒドラゾン部位 N-H がタンパク質と強い相互作用を得るためには、ヒドラゾン側鎖は母核チオフェン側に折れ曲がるように位置し、分子はV字型の空間配座を取るであろう事が考えられた。更に化合物 **3** は、母核およびヒドラゾン窒素原子に加え、**AG12275** の側鎖メチルアミンの窒素原子が重なり、CDK4 阻害活性の発現に重要な役割を果たしていると考えられた (**Figure 24**)。

Figure 24. Comparison between compound 3 and AG12275.



第二項 ドッキングスタディーによるファーマコフォアの抽出

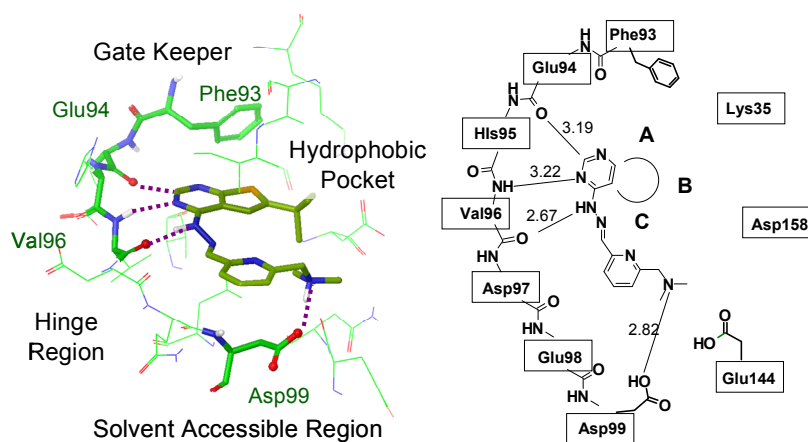
第二節で得られた CDK4 ホモロジーモデルを利用し、第一章で展開した 4 位末端ピリジン化合物とのドッキングスタディーを展開して、ATP 結合サイト内での結合様式および許容される空間情報や相互作用しうる部位などを検証した。ドッキングスタディーには Accelrys Software Inc.社 InsightII および Schrödinger Inc.社 Glide プログラムを利用した。

化合物の各種コンフォメーションにおける ATP 結合サイトへのドッキングを検討したところ、前項で推察したように、(i) タンパク質の Hinge 部位に対して、アデニンミミックな母核ピリミジン部位およびヒドラゾン窒素原子を配し、(ii) 化合物が V 字型の空間配座を取り、(iii) 4 位末端のピリジン環部位を Solvent Accessible 部位方向に配することで、ATP 結合サイトにおさまることがわかり、サイト内のアミノ酸側鎖との立体障害も回避されており、化合物 3 と CDK4 との相互作用点の特徴として、以下の知見を得た (Figure 25)。

① Hinge 部位 (Glu94, Val96) においては、強い水素結合が期待されることがわかった。母核ピリミジン部位の窒素原子がプロトンアクセプターとして働き、CDK4 タンパク質の Val96 主鎖アミノ基と水素結合を形成し、更に、ヒドラゾンの二級アミン部位がプロトンドナーとして Val96 主鎖カルボニル基と水素結合を形成する。更に、Glu94 のカルボニル基とピリミジン環 3 位の C-H が吸引的に相互作用^{42, 43)}する可能性も示唆された。

② Gate Keeper 部位 (Phe93) 近傍においては、Phe93 のベンゼン環により母核部

Figure 25. Predicted binding mode of compound **3** in ATP binding site of CDK4 model.



The inhibitor is color-coded by atom type, where carbon is yellow, oxygen is red, sulfur is orange, and nitrogen is blue. The enzyme is color-coded by atom type in a similar fashion except that carbon is gray. Key enzyme residues are labeled and hydrogen bonds are shown as cyan dotted lines.

チオフェン環の **Figure 25** 右図中・A 方向は空間に許容が乏しいことがわかった。

また、チエノピリミジン 5 位に相当する C 方向は、実際に第一章で報告した化合物 **15f,g,h** で活性の減弱・消失が見られたことから、4 位側鎖部位との立体障害が考えられ、展開は難しいことが確認された。一方で、B 方向となるチエノピリミジン 6 位側には比較的許容される空間が存在することを見出した。

③ATP ポケットの Hinge 部位から Solvent Accessible 部位までは N-lobe のイソロイシン側鎖 (Ile12) とバリン側鎖 (Val20) および C-lobe のバリン側鎖 (Val72) とロイシン側鎖 (Leu147) に挟まれているため上下方向には空間的な余裕が少ないことがわかった。実際に前述の化合物 **18** や **19** のアルキル基では、阻害活性がヒット化合物 **1** よりも減弱することから、化合物に平面性が求められ、4 位ヒドラゾンの先にも芳香環が必須であることもわかった。

なお、本ドッキングスタディーからは、第一章で展開してきた 4 位ピリジン環内の窒素原子は、CDK4 阻害活性発現に殆ど寄与しないことが推測され、ピリジン環から他の芳香環への変換の可能性も示唆された。

④ Solvent Accessible 部位におけるアスパラギン酸側鎖 (Asp99) とピリジン環 6'位末端のイオン化可能なアミノ基との水素結合の可能性を見出し、高い阻害活性発現に末端アミノ基などの水素結合能を有する官能基の有用性が示唆された。

また、該当する CDK2 の Asp86 側鎖との位置および Hinge 部位からの距離の違いは、選択性発現にも利用できると考えられた。更に ATP 結合サイトの外側

に位置することから、更なる親水性官能基を導入できる可能性も推察された。

第四節 小括

以上より、X線結晶構造が解かれていない標的 CDK4 タンパク質に対して、類縁タンパク質の構造データを活用し、計算化学手法によりその三次元モデルを構築した。更に、ドッキングスタディーを行い、以下の知見を得た。

1. X線結晶構造が解かれていない標的 CDK4 タンパク質に対して、CDK2 (活性型) および CDK6 (相同性が高いが非活性型) の三次元構造データ **1blx**, **1jst** から、CDK4 の三次元ホモロジーモデルを構築した。本モデルの ATP ポケットの出入口にあたる Solvent Accessible 部近傍で、CDK2 との三次元構造上の違いを確認した。

2. ドッキングスタディーの結果、構造活性相関情報を得た。

① Hinge 部位 (Glu94, Val96) と化合物の母核ピリミジン部位およびヒドラゾン部位 N-H 基との強い水素結合が期待され、活性発現に必須であることを明らかにした。

② Gate Keeper 部位 (Phe93) 近傍においては、Phe93 方向への化合物展開は空間に許容が乏しいことがわかった。母核チエノピリミジン 5 位方向は、4 位側鎖部位との立体障害が考えられ、展開は難しいことが確認された。一方で、チエノピリミジン 6 位方向には比較的許容される空間が存在することを見出した。

③ ATP ポケットは N-lobe の側鎖 (Ile12・Val20) および C-lobe の側鎖 (Val72・Leu147) に挟まれ、上下方向には空間的な余裕が少ないことがわかり、平面性が求められ、4 位ヒドラゾン部位につながる芳香環が必要であることもわかった。更に、第一章で展開してきた 4 位ピリジン環内の窒素原子は、CDK4 阻害活性発現に殆ど寄与しないことが推測され、ピリジン環から他の芳香環への変換の可能性を見出した。

④ Solvent Accessible 部位での酸性側鎖 (Asp99) とピリジン環 6 位アミノ基との水素結合の可能性を見出し、高い阻害活性発現に末端アミノ基などの水素結合能を有する官能基の有用性を見出した。また、CDK2 との選択性向上およびタ

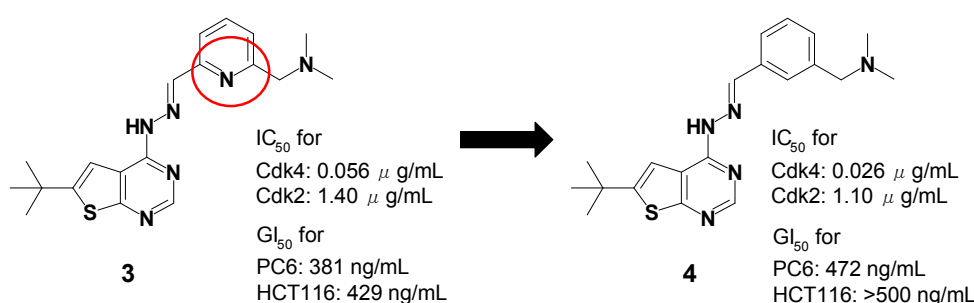
ンパク質外側部分への水溶性基の導入の可能性なども示唆された。

第三章 4位ベンゼン環化合物による活性向上と物性改善

第一節 研究の背景

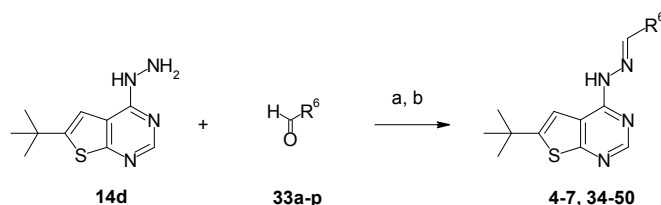
前述した **2** について、CDK4 阻害以外の活性を有する可能性が示唆され、その別作用の回避が課題となっていた。一方、CADD によるドッキングスタディーにおいて、4位ピリジン環内の窒素原子が CDK4 阻害活性発現に寄与していないという知見を得た。そこで、ベンゼン環化合物 **4** をデザイン・合成したところ、酵素阻害活性が **3** とほぼ同等であった。また、明確な G1 集積作用が確認されたことから、更なる活性・選択性の向上と物性の改善を目的として、チエノピリミジン母核 4 位において、ベンゼン環に置換基を導入した誘導体合成と活性評価を検討することとした (Figure 26)。

Figure 26. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for **3** and **4**.



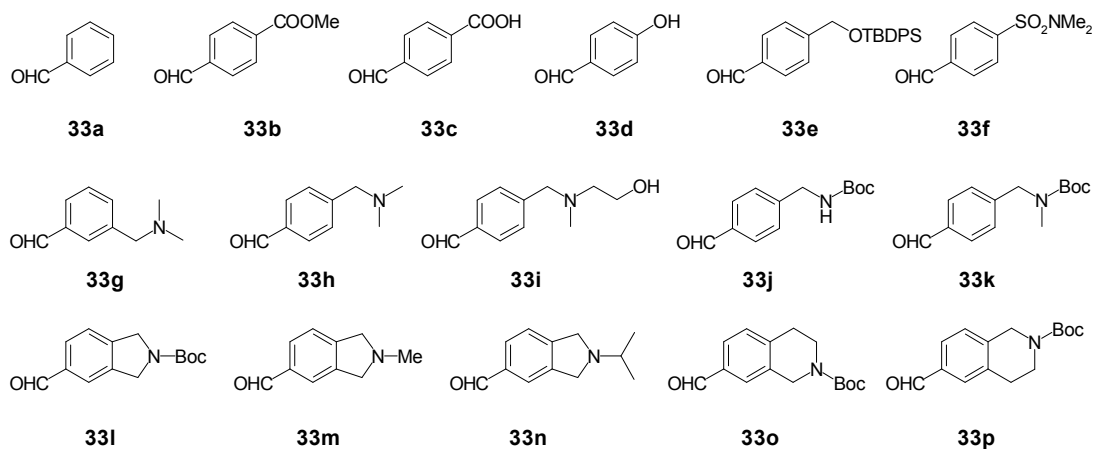
第二節 4位ベンズアルデヒドヒドラゾン体の合成

以上の結果を踏まえ、Scheme 4 に示すように、6位 *tert*-ブチル基に固定したチエノピリミジン母核ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33a-p** (Figure 27) を用い、化合物 **4-7** および **34-50** を合成した。**33a-d,j** は市販の試薬を利用した。

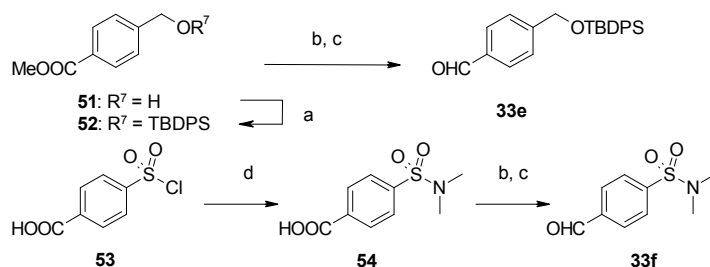


Scheme 4. Reagents and conditions: (a) aldehydes **33a-p** (1.1 eq.), benzene, reflux, 15-100%; (b) deprotection in the case of **6**, **7**, **39**, **43**, **49** and **50**, 81-97%.

Figure 27. Structures of 33a-p.

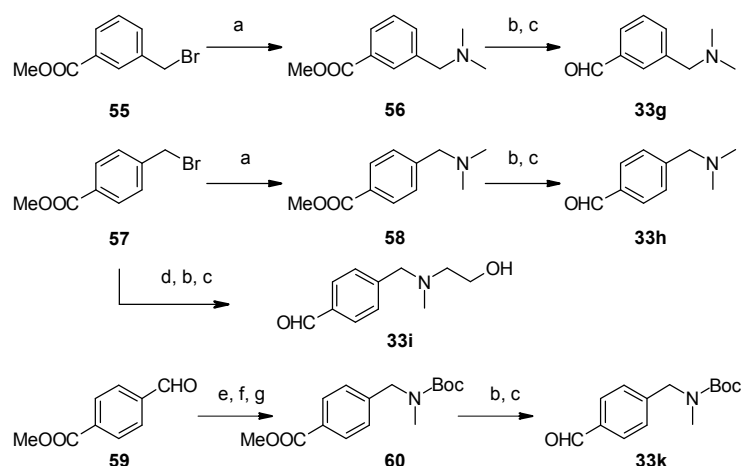


アルデヒド **33e,f** は、以下の方法で合成した。市販の **51** の水酸基を *tert*-ブチルジフェニルシリル基 (TBDPS) で保護し、メチルエステルをリチウムアルミニウムヒドライド (LAH) で還元後、二酸化マンガン (MnO_2) にて酸化し、アルデヒド **33e** を合成した。市販の **53** にジメチルアミンを作用させて **54** とし、**33e** と同様に LAH 還元および MnO_2 で酸化し、**33f** を得た (Scheme 5)。



Scheme 5. Synthesis of aldehydes **33e** and **33f**. Reagents and conditions: (a) TBDPSCl (1.1 eq.), imidazole (2.1 eq.), THF; (b) LAH (2 eq.), THF, 0°C; (c) MnO_2 (アルコール中間体の 5 倍量, w/w), CH_2Cl_2 , reflux, 3 steps 81% from **51**, 2 steps 58 % from **54**; (d) Me_2NH (2.1 eq.), THF, 57%.

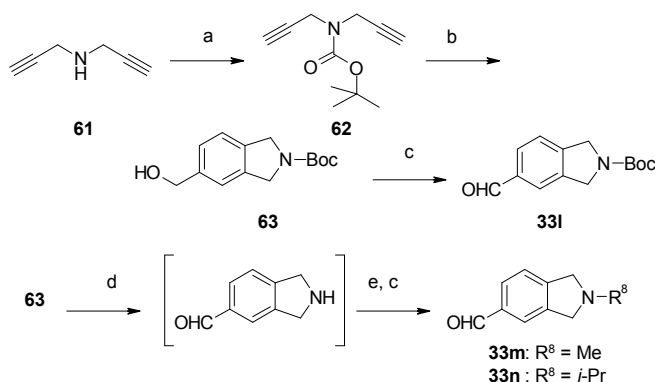
塩基性基を末端部位に持つアルデヒド体 **33g-i,k** は、以下の方法で合成した。市販のブロム体 **55** および **57** をジメチルアミンにてアミノ化し、得られたメチルエステル体 **56** および **58** を **33e** と同様の方法でアルデヒド **33g** および **33h** に導いた。**57** に対し、*N*-メチルエタノールアミンを作用させ、**33e** と同様の方法でアルデヒド **33i** を得た。市販の **59** に対し、メチルアミンと水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) による還元的アミノ化を行い、得られたアミンを Boc 基で保護し、**60** を得た。続いて、**33e** と同様の方法でアルデヒド **33k** へ導いた (Scheme 6)。



Scheme 6. Synthesis of aldehydes **33g-i** and **33k**. Reagents and conditions: (a) Me_2NH (2 eq.), THF, 98% from **55**, 78% from **57**; (b) LAH (2 eq.), THF, 0 °C; (c) MnO_2 (アルコール中間体の 5 倍量, w/w), CH_2Cl_2 or CCl_4 , reflux, 2 steps 68% from **56**, 86% from **58**, 75% from **57**, 58% from **60**; (d) *N*-methylethanolamine (1.2 eq.), Et_3N (5 eq.), toluene, 70°C, 74%; (e) MeNH_2 (1 eq.), toluene; (f) NaBH_4 (1.1 eq.), MeOH; (g) Boc_2O (1 eq.), cat. DMAP, CH_2Cl_2 , 3 steps, 18%.

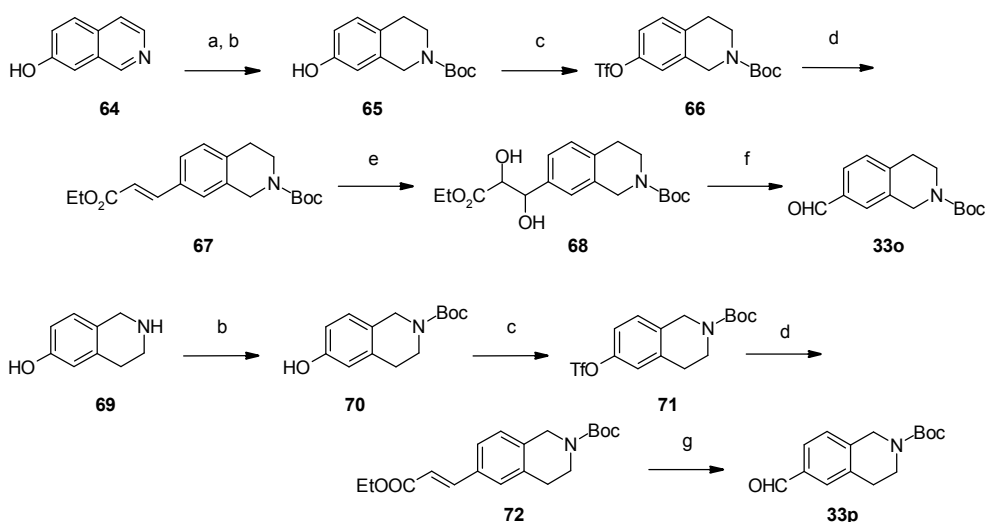
次に、単環ベンズアルデヒドに替わる二環性化合物を導入すべく、イソインドルインカルボアルデヒド **33l-n** の合成を検討した (**Scheme 7**)。

Middleton ら方法⁴⁴に従い、市販のジプロパルギルアミン **61** の保護に続き、プロパルギルアルコールと Wilkinson's catalyst を利用したベンゼン環の構築により **63** を得た。ベンジル位アルコールを MnO_2 酸化し、**33l** を得た。また、中間体 **63** の *N*-Boc 基をトリフルオロ酢酸にて除去し、ホルムアルデヒドおよびアセトンとの還元的アミノ化反応を行い、続く MnO_2 酸化によりアルデヒド **33m** および **33n** を得た。



Scheme 7. Synthesis of aldehydes **33l-n**. Reagents and conditions: (a) Boc_2O (1.1 eq.), Et_3N (1.2 eq.), CH_2Cl_2 , quant.; (b) propargyl alcohol (4 eq.), chlorotris(triphenylphosphine)rhodium (I) (3 mol%), EtOH, 2 steps, 44%; (c) MnO_2 (4~5 倍量), CCl_4 , reflux, 66% (**33l**), 92% (**33m**), 33% (**33n**); (d) TFA (アルコール中間体の 5 倍量, w/w), CH_2Cl_2 ; (e) HCHO or Acetone (2.5 eq.), $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1.6 eq.), CH_2Cl_2 , 2 steps, 84% ($\text{R}^3=\text{Me}$), 38% ($\text{R}^3=i\text{Pr}$).

ジヒドロイソキノリン体 (**33o,p**) の合成法を **Scheme 7** に示す。Haginoya らの方法⁴⁵に従って合成した。市販のイソキノリン-7-オール **64** のピリジン環を酸化白金にて還元し、得られたアミンを Boc 基で保護した。得られた **65** に対し、*N*-フェニル-ビス(トリフルオロメタンスルホンイミド) ($\text{ Tf}_2\text{NPh}$) を作用させ、*O*-トリフレート体 **66** を得た。**66** に対し、酢酸パラジウム存在下にアクリル酸エチルを作用させ、 α,β -不飽和エステル **67** を得た。二重結合を四酸化オスミウム (OsO_4) により酸化し、得られたジオール体を過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) で開裂し、アルデヒド **33o** を得た。アルデヒド **33p** も、市販の **69** からほぼ同様にして合成した。



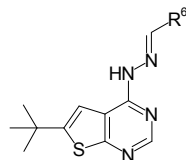
Scheme 8. Synthesis of aldehydes **33o** and **33p**. Reagents and conditions: (a) PtO_2 (5 mol%), AcOH , H_2 (40 psi); (b) $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.1 eq.), Et_3N (1.2 eq.), THF, H_2O , 2 steps, 82% from **64**, 91% from **69**; (c) Tf_2NPh (1.1 eq.), Et_3N (1.1 eq.), CH_2Cl_2 , quant. from **65**, quant. from **70**; (d) ethyl acrylate (1.3 eq.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10 mol%), tri(*o*-tolyl)phosphine (0.2 eq.), Et_3N (2 eq.), CH_3CN , reflux, 61% from **66**, 18% from **71**; (e) OsO_4 (10 mol%), NMO (2 eq.), THF:acetone: H_2O (1:1:1), 76%; (f) NaIO_4 (2 eq.), THF:MeOH: H_2O (1:1:1), 91%; (g) OsO_4 (1 mol%), NaIO_4 (7 eq.), THF, H_2O , 46%.

第三節 *In vitro* 酵素阻害活性・細胞増殖抑制活性と構造活性相関

合成した化合物 **4-7**, **34-50** について、CDK4 および CDK2 の酵素阻害活性と細胞増殖抑制活性を **Table 5** に示す。細胞増殖抑制活性評価の癌株として、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 およびヒト肺小細胞癌由来細胞株 PC-6 を用いた。

ピリジン化合物 **3** は、6 位 (R^1) に *tert*-ブチル基を有し、4 位置換基末端部位 (R^6) に塩基性基を導入したことで CDK4 阻害活性の向上を見出した。そのため、6 位 (R^1) を *tert*-ブチル基に固定して、4 位末端 (R^6) に各種アルデヒドを反応させ、4 位側鎖におけるベンゼン置換体の構造活性相関情報を得た。

Table 5. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for substituted benzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazones.



Compd	R ⁶	CDK4 IC ₅₀ (μg/mL) ^a	CDK2 IC ₅₀ (μg/mL) ^a	CDK4 Selectivity ^b	HCT-116 GI ₅₀ (μg/mL) ^c	PC-6 GI ₅₀ (μg/mL) ^c
3	6-[(Dimethylamino)methyl]-2-pyridinyl	0.056	1.40	25.0	0.419	0.381
34	Phenyl	0.61	>20	>33	NT ^d	6.540
35	4-(Methoxycarbonyl)phenyl	>20	>20		NT ^d	NT ^d
36	4-Carboxyphenyl	0.98	0.39	0.4	9.990	7.220
37	4-Hydroxyphenyl	>20	11.0		0.844	>10
39	4-(Hydroxymethyl)phenyl	0.40	0.26	0.7	0.665	0.556
40	4-(<i>N,N</i> -Dimethylsulfonamide)phenyl	>20	1.22		1.420	2.120
4	3-[(Dimethylamino)methyl]phenyl	0.026	1.10	42.3	0.405	0.598
5	4-[(Dimethylamino)methyl]phenyl	0.077	0.60	7.8	0.128	0.107
41	4-[(2-Hydroxyethyl)(methylamino)methyl]phenyl	0.028	0.29	10.4	0.169	0.124
43	4-(Aminomethyl)phenyl	0.021	1.60	76.2	0.334	0.214
6	4-[(Methylamino)methyl]phenyl	0.038	0.68	17.9	0.056	0.044
7	Isoindolin-5-yl	0.083	0.52	6.3	0.111	0.071
46	2-Methylisoindolin-5-yl	0.096	1.00	10.4	0.088	0.050
47	2-Isopropylisoindolin-5-yl	0.080	3.00	37.5	0.206	0.134
49	1,2,3,4-Tetrahydro-isoquinolin-7-yl	0.034	0.18	5.3	0.107	0.069
50	1,2,3,4-Tetrahydro-isoquinolin-6-yl	0.038	0.64	16.8	0.046	0.049

^aConcentration (μg/mL) needed to inhibit the Rb phosphorylation by 50%, as determined from the dose-response curve. Values are the means of at least two experiments.

^bThe values are calculated by using the following equation (CDK2 IC₅₀)/(CDK4 IC₅₀).

^cDose-response curves were determined at ten concentrations. The GI₅₀ values are the concentrations needed to inhibit cell growth by 50%, as determined from these curves.

^dNT=not tested.

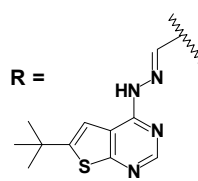
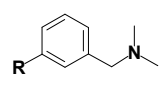
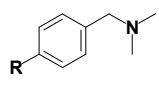
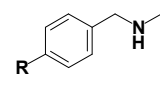
まず、無置換のフェニル基を導入した **34**、メトキシカルボニルフェニル体 **35**、ヒドロキシフェニル体 **37** においては、CDK4 阻害活性が減弱または消失した。また、カルボキシフェニル体 **36** や 4-(ヒドロキシメチル)フェニル体 **39** では、CDK4 阻害活性は弱いままで、CDK2 との選択性が逆転することがわかった。加えて、スルホンアミド体 **40** においては、CDK2 阻害活性のみが増強された。

一方、前述のとおり、ベンゼン環上メタ位への塩基性基の導入により CDK4

阻害活性の向上が期待された **4** は、CDK4 阻害活性が増強され、CDK2 との選択性も向上していることがわかった。更に、パラ位へ 3 級アミンを導入した 4-[(ジメチルアミノ)メチル]フェニル体 **5** において、更なる阻害活性、細胞増殖抑制活性の増強と選択性の向上を見出した。加えて、日局 2 液 (pH 6.8) への溶解性が 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、難溶解性であったピリジン化合物に比べて僅かに改善されていることがわかった。

そのため、脂溶性低減を目的に 2 級アミン体 **6**、ヒドロキシエチル基を有する 3 級アミン体 **41** および 1 級アミン体 **43** などを合成した。評価の結果、これらの化合物は強い CDK4 阻害活性が得られ、特に **6** は強い細胞増殖抑制活性を有し、更に日局 2 液 (pH 6.8) への溶解性が 783 $\mu\text{g}/\text{mL}$ へと大きく向上することがわかった (Figure 28)。

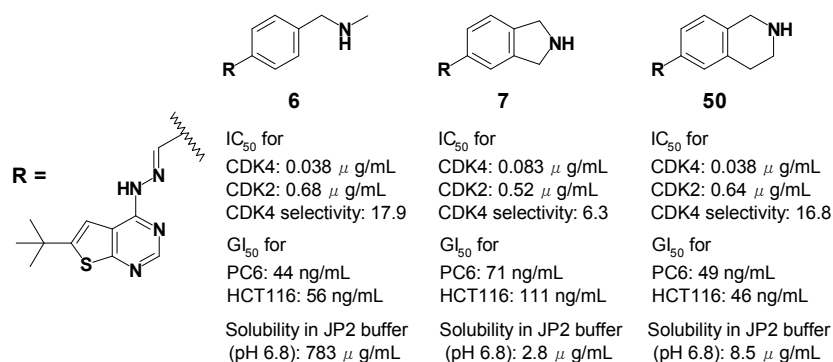
Figure 28. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for **4**, **5** and **6**.

 R =	 4	 5	 6
	IC ₅₀ for CDK4: 0.026 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDK2: 1.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDK4 selectivity: 42.3 GI ₅₀ for PC6: 598 ng/mL HCT116: 405 ng/mL	IC ₅₀ for CDK4: 0.077 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDK2: 0.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDK4 selectivity: 7.8 GI ₅₀ for PC6: 107 ng/mL HCT116: 128 ng/mL Solubility in JP2 buffer (pH 6.8): 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$	IC ₅₀ for CDK4: 0.038 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDK2: 0.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDK4 selectivity: 17.9 GI ₅₀ for PC6: 44 ng/mL HCT116: 56 ng/mL Solubility in JP2 buffer (pH 6.8): 783 $\mu\text{g}/\text{mL}$

周辺化合物の活性を探索するために、4 位末端にベンゼン環を含む二環性化合物の導入検討も行った。**5**や**6**に見られるアミノメチレン部位を固定する目的で、ジヒドロインドリン体 **7**, **46**, **47** およびテトラヒドロイソキノリン **49**, **50** を合成し、活性を評価した。

その結果、これらの化合物においても強い CDK4 阻害活性が得られ、5.3 倍から 37.5 倍の CDK2 との選択性も有していた。化合物 **7**, **46**, **49** および **50** には細胞増殖抑制活性の増強も見られた。しかしながら、二環性化合物においては、リード化合物 **2** (44 $\mu\text{g}/\text{mL}$) よりも溶解度が低く、日局 2 液 (pH 6.8) への溶解性が **7** で 2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、**50** で 8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、二環性化合物は溶解性面に問題が残ることもわかった (Figure 29)。

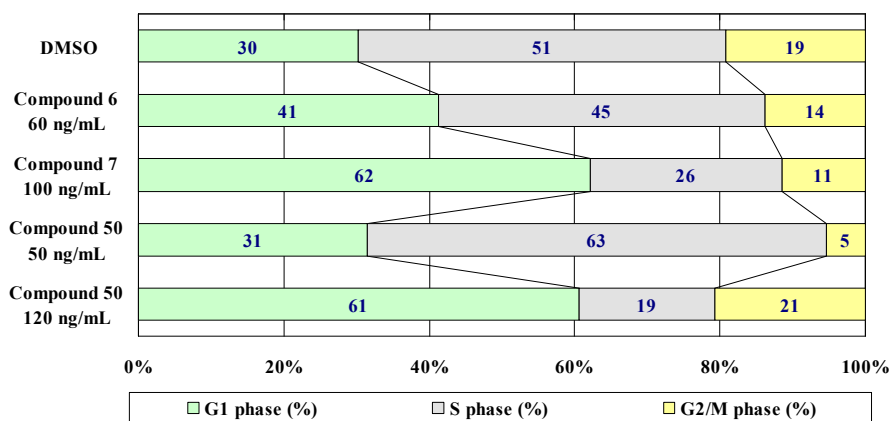
Figure 29. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for **6**, **7** and **50**.



続いて、HCT116 株を用いて、細胞増殖抑制活性の強かった **6**, **7** および **50** における G1 期への集積誘導を評価した。第一章の方法と同様に、フローサイトメトリー法に準じて、HCT116 株へ化合物を添加し、16 時間後に回収した細胞に対して、DNA 含量を測定した。

その結果、**7** においては、GI₅₀ 値 (100 ng/mL) 近傍の濃度で 62% も G0/G1 期に細胞分布を集積させることがわかった。**6** (GI₅₀ 値 56 ng/mL) においても、GI₅₀ 値近傍の濃度で G1 集積作用が観測された。一方、**50** (GI₅₀ 値 49 ng/mL) は GI₅₀ 値近傍濃度では、G1 期が増加せず S 期が増加したが、2 倍用量では G1 期集積が確認された。 (**Figure 30**)。

Figure 30. Cell cycle distribution of HCT116 cells treated with **6**, **7** and **50**.



第四節 In vivo 抗腫瘍効果

ヌードマウスへのヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 移植モデルを利用し、1 日間

隔4回投与のスケジュールにて、細胞増殖抑制活性の強かった **5**, **6**, **7** および **50** における抗腫瘍効果の評価を行った (**Table 5**)。すべての化合物は、可溶剤 20% Captisol³⁴⁾に溶解させたものを利用した。

その結果、**5** は静注投与時に中枢抑制作用に由来する痙攣が確認された。この副作用は分子全体の高い脂溶性に起因すると考えられ、脂溶性低減が不十分であったと考えた。

一方、**6** は痙攣が観察されず、静注・経口の両方で抗腫瘍増殖活性 (腫瘍径から算出された最大腫瘍増殖抑制率 $IRTV_{max}$: iv = 54% at 300 mg/kg, po = 57% at 350 mg/kg) を示すことがわかった。また、**7** においては、中枢作用が観察されたものの、静注で高い抗腫瘍増殖活性 ($IRTV$: iv = 61%) を示すことを見出した。化合物が酸性条件下に不安定のため、経口投与は実施しなかった。**50** は明確な薬効を示さなかった。腫瘍体積の縮小を確認できなかった理由は不明であるが、化合物の組織移行性が低かったのではないかと考えている (**Table 6**)。表中、投与期間中の体重測定も経日的に行い、毒性の指標として体重減少率 (BWL) を算出し、その最大値を BWL_{max} (%) として示した。更に、使用したマウス数のうち、毒性で死亡したマウスの数を T/N 欄に示した。

Table 6. Antitumor effects of **6**, **7** and **50** against HCT116 solid tumors.

Compd	Route	Dose/day (mg/kg)	Total dose (mg/kg)	Administration schedule	$IRTV_{max}$ (%) (day) ^a	BWL_{max} (%) (day) ^b	T/N ^c
6	i.v.	300	1200	4-day, continuous	54 (9)	9.7 (7)	0/5
6	p.o.	350	1400	4-day, continuous	57 (6)	16.0 (5)	0/5
7	i.v.	260	1040	4-day, continuous	61 (5)	<0	0/5
50	i.v.	300	1200	4-day, continuous	5 (7)	2.2 (1)	0/5

^aMaximum inhibition rate of tumor volume. Numbers in parentheses indicate the day after initial drug administration on which $IRTV_{max}$ was reached.

^bMaximum rate of body weight loss. Numbers in parentheses indicate the day of BWL_{max} .

^cNumber of toxicity-related death/Number of mice used.

第五節 小括

活性向上と物性改善を目的に、4位ベンゼン誘導体での最適化を行い、以下の知見が得られ、酵素阻害活性の向上と溶解度が改善した化合物 **6** および **7** を見出した (**Figure 31**)。

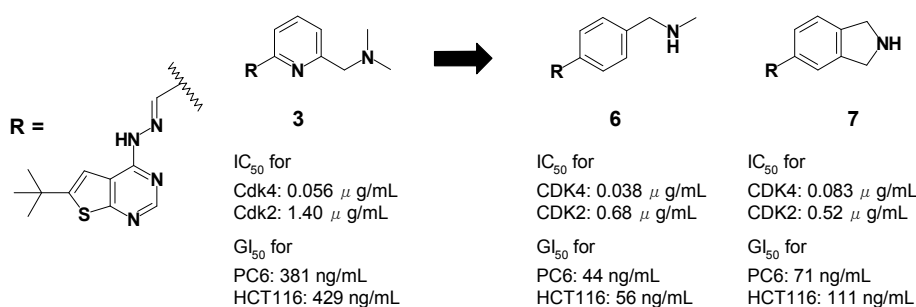
1. ドッキングスタディーで得られた、ピリジン体 **3** の4位ピリジン環内の窒素

原子が CDK4 阻害活性発現に寄与していないという仮説の検証を行い、化合物 4 の CDK4 阻害活性が 3 とほぼ同等であることを明らかにした。

2. ベンゼン環上に塩基性基を中心とした側鎖の導入を展開し、ジメチルアミノメチル基の位置異性体である化合物 5 が、細胞増殖抑制活性を向上させることがわかった。しかし、*in vivo* 試験においてヌードマウスへの静注投与時に中枢抑制作用に由来する痙攣が確認された。この副作用は分子の高い脂溶性に起因すると考えられ、更なる脂溶性低減の試みが必要であることがわかった。

3. 強い酵素阻害活性と細胞増殖抑制活性を維持しつつ、脂溶性を低減させた 2 級アミン体 6 を見出した。また、縮環型のイソインドール体 7 においても、強い酵素阻害活性と細胞増殖抑制活性を見出した。6 は細胞増殖抑制活性の向上とともに日局 2 液への溶解度が改善し、痙攣などの中枢抑制作用を回避し、*in vivo* 試験においても静注・経口の両方で薬効を示すことを明らかにした。化合物 7 においては、痙攣が観察されるものの、静注で強い抗腫瘍活性を示すことを見出した。

Figure 31. Structures of 6, 7.

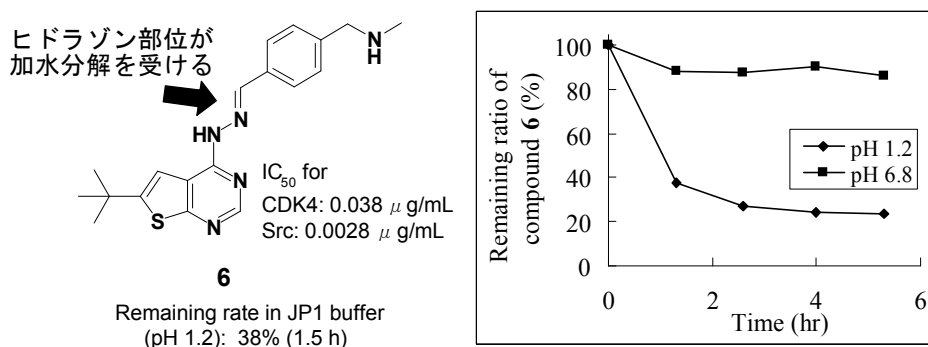


第四章 4位チアゾール環化合物による化学的安定性確保と薬効獲得

第一節 研究の背景

第三章において、強い酵素阻害活性と細胞増殖抑制活性を有する4位ベンゼン体**6**などを見出していた。しかしながら、高次評価が進めて行く中で、37°C条件において、中性での安定性は確保されているものの強酸性下(日局1液(JP1)、pH 1.2)に**6**が速やかに消失することが確認され、化学的に不安定であることがわかった(Figure 32)。

Figure 32. Plots of the remaining ratio of compound **6** versus time in buffers.



HPLCによる酸加水分解の解析の結果、化合物**6**の消失と共に、ヒドラジン体**14d**の生成が確認された。また、4位にベンゼン環を有する周辺化合物では、高い阻害活性を有した化合物全般で、強酸性条件下での化学的安定性が確保できないことがわかった。

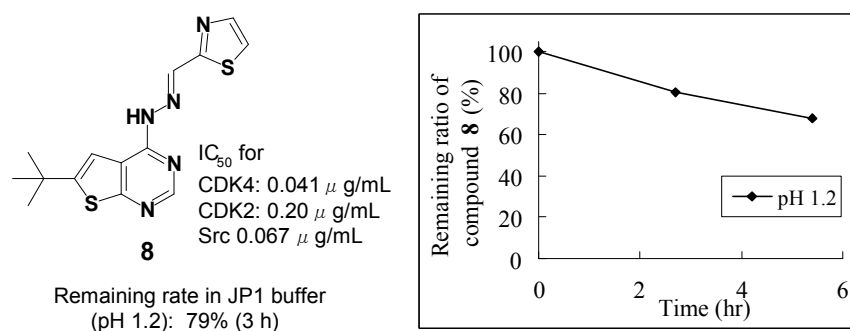
更に、もう一つの問題として、社内でのカイネース選択性試験により、化合物**6**は増殖シグナルの膜受容体近傍に位置するチロシンカイネース c-Src への強い阻害作用が認められた。

以上より、加水分解の回避および c-Src との選択性を見出す目的で、ベンゼン部位を他の複素環に変換することとした。4位置換基末端部位へのヘテロ環化合物(オキサゾール・イソキサゾール・イミダゾール・ピラゾール)の導入検討を行った。

その結果、4位チアゾール体**8**が、CDK4阻害活性およびCDK2との選択性(4.9

倍) を保持しつつ c-*Src* 阻害活性を低減し、酸性条件下で安定に存在することを見出した (**Figure 33**)。しかしながら、化合物 **8** は溶解性が悪く、中性付近ではほとんど溶解しなかった。

Figure 33. Plots of the remaining ratio of compound **8** versus time in buffers.



また、**Table 7** に示すとおり、チアゾール位置異性体 **74**, **75** においても、強酸性条件下での化学的安定性が確保されることがわかった。しかしながら、**74** は CDK4 阻害活性が弱く、**75** は、c-*Src* 阻害活性のほうが強く、CDK2 阻害との選択性も殆ど見出せなかった。以上から、化合物 **8** をリード化合物として、更なる合成研究を展開した。

Table 7. Enzyme inhibitory activity and chemical stability of **6**, **8**, **74** and **75**.

Compd	CDK4 IC ₅₀ (μg/mL) ^a	CDK2 IC ₅₀ (μg/mL) ^a	c- <i>Src</i> IC ₅₀ (μg/mL) ^a	Remaining rate (%) ^b in pH 1.2 buffer
6	0.038	0.68	0.0028	38 (1.5 h)
8	0.041	0.20	0.067	79 (3 h)
74	0.89	2.2	0.041	75 (1 h)
75	0.052	0.059	<0.02	86 (1.5 h)

^aConcentration (μg/mL) needed to inhibit the Rb phosphorylation by 50%, as determined from the dose-response curve. Values are the means of at least two determinations.

^bRemaining rate of the substrate after incubation with pH 1.2 buffer at 37 °C. Numbers in parentheses indicate the incubation time.

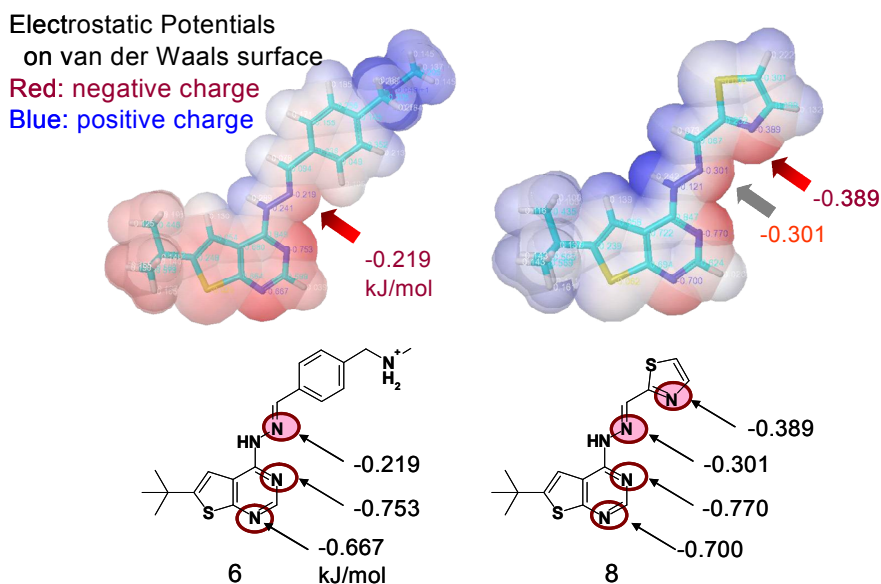
チアゾールで化学的な安定化が得られた理由として、オキサゾールなどでも化学的安定性が高かったことから、以下のように考察した。

一つには、 π 電子過剰の複素環が隣接するため、水分子が付加する位置の炭素の正電性が下がり、窒素原子のプロトン化に続く水分子の求電子的な攻撃が遅くなっていることが考えられた。

もう一つの考察として、**6** および **8** の安定コンフォメーション座標 (Macro Model, OPLS-2005 力場を利用) における電荷分布を比較したところ、静電ポテンシャルを基にした電荷 (ESP 電荷、計算条件: Jaguar、B3LYP 密度汎関数法、3-21G*基底条件) において、ヒドラゾン部位から 4 位置換末端芳香環にかけての電荷環境が全く異なることがわかった。

ベンゼン体においては、母核ピリミジン環上の窒素原子の他には、速やかなヒドラゾン部位のプロトン化が起こる窒素原子しか負電荷を持っていない。それに比べ、化合物 **8** はチアゾール環上に窒素原子を有し、負の部分電荷はヒドラゾン部位より強いため、チアゾール環上の窒素原子へプロトンがトラップされ、ヒドラゾン部位が酸性プロトンの攻撃を受けにくい環境となっていると考えられた (Figure 34)。

Figure 34. ESP charges on nitrogen atoms of **6** and **8**.



もう一つの問題として、当初社内で保有していたカイネースライブラリーでの選択性試験により、化合物 **6** は増殖シグナルの膜受容体近傍に位置するチロシンカイネース c-*Src* への強い阻害作用が認められた。なお、同じ *Src* ファミリー

一で基質が共通な Lyn や Fyn に対しては、阻害活性が 1/700~1/58 程度と低く、Src ファミリー全般に対する阻害活性ではなく、c-Src 特異的と考えられた。

c-Src は、非受容体チロシンカイネース群のひとつで、タンパク質のチロシン残基のリン酸化修飾を行い、正常組織において発生・分化や機能の維持・制御に関わる細胞内シグナル伝達を担っている。また、ヒトの癌への関与が示唆されており、大腸癌や乳癌などでタンパク質の発現・亢進が見られるという報告⁴⁶⁾があり、接着・浸潤などの癌の進行にも関わっていると考えられており、その役割や分子機構は解明途上にある。

この c-Src 阻害作用の回避を目的に、c-Src の X 線結晶構造である PDB code: **2src**⁴⁷⁾と CDK4 モデルとの ATP 結合サイトの重ね合わせ検証を行った。**2src** は、分解能 (Resolution: 1.5Å) が高く、ATP 結合部位に Phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester (ANP) が挿入されている構造であり、loop 部位も活性化された状態であることが報告されている。

その結果、ATP 結合サイトの Hinge 部位から溶媒側にかけて、構成アミノ酸残基による違いが観察されるものの、① 化合物と相互作用する部位の立体構造は似ており、c-Src のほうが 1 アミノ酸残基分多いため、空間に余裕があることがわかった。また、② Gate Keeper に相当する部分は、嵩高いフェニルアラニンに替わって、比較的小さく水酸基を有するスレオニン側鎖であることを確認した。③ 化合物の塩基性部位が相互作用すると考えられる Asp99 (CDK4) カルボン酸側鎖には、一次配列では水酸基を有する Ser345 (c-Src) が相当し、化合物の塩基性置換基との相互作用は減弱すると考えられた。しかしながら、三次元構造においては、Asp348 (c-Src) のカルボン酸側鎖が Asp99 (CDK4) カルボン酸側鎖の近傍に位置することがわかり、化合物 **6** は、このカルボン酸側鎖と強く相互作用をしている可能性が考えられた。この問題を回避するための方策として、4 位置換基末端が 5 員環の複素環化合物に変わったことで、チアゾール上に塩基性側鎖を導入した場合、Asp348 (c-Src) のカルボン酸側鎖からの距離・角度がベンゼン体と異なってくることが予想され、CDK4 優位な選択性を見出せるのではないかと考えられた (Figure 35, 36)。

なお、塩基性置換基を持たないチアゾール体 **8** において、CDK4 と c-Src の選

択性がほぼ同等まで改善していることから、上記以外にも選択性に影響する要因があると考えられるが、詳細は不明である。

更に、細胞増殖抑制活性向上を目的として、母核 6 位側鎖の修飾にも着手した。

Figure 35. Superposition of CDK4 model bound to the ATP site of c-Src (2src).

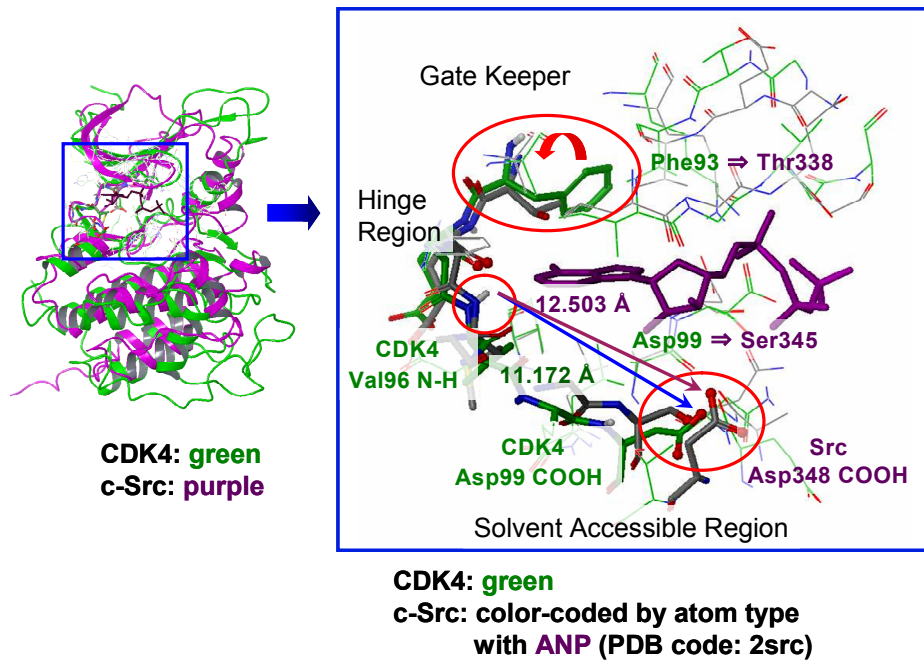
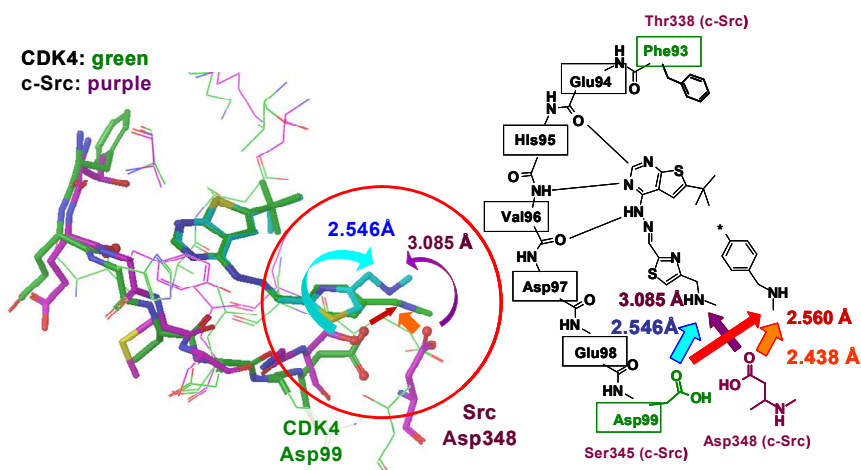
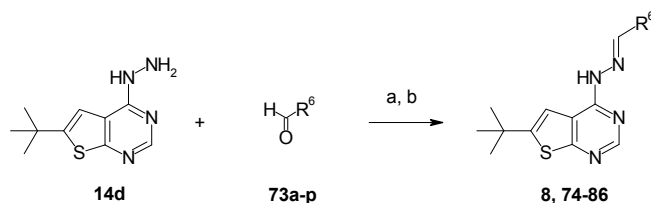


Figure 36. Docking study of 6 and thiazole compound in ATP binding site of CDK4 model and 2src.



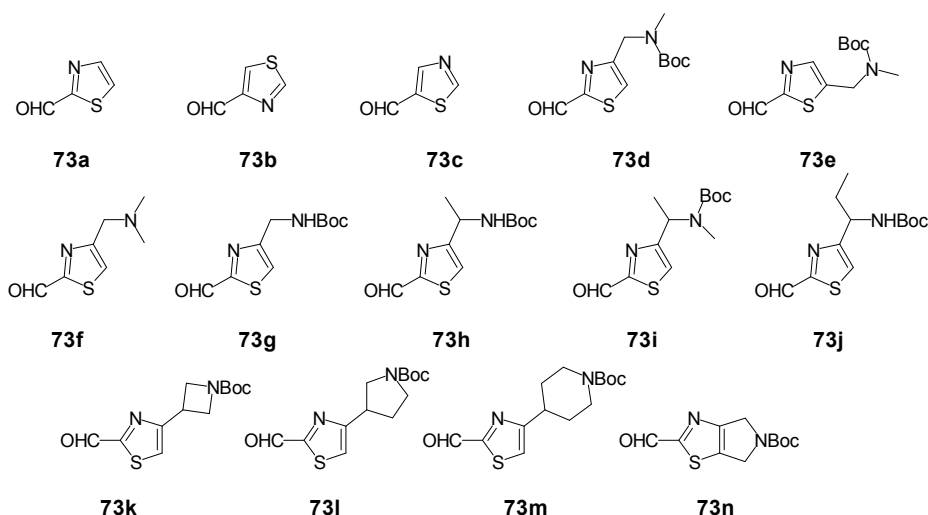
第二節 4位ヒドラゾン末端チアゾール環体の合成

チアゾール体 **8** の結果を踏まえ、前述の方法に従って 6 位 *tert*-ブチル基に固定したチエノピリミジン母核ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73a-n** (Figure 37) からヒドラゾン体を得、*N*-Boc 保護体は脱保護を経て、化合物 **8**, **74-86** を合成した (Scheme 9)。



Scheme 9. Reagents and conditions: (a) aldehydes **73a-n** (1.1 eq.), benzene, reflux; (b) deprotection in the case of **76,77**, **79-86**, 21-88% from **14d**.

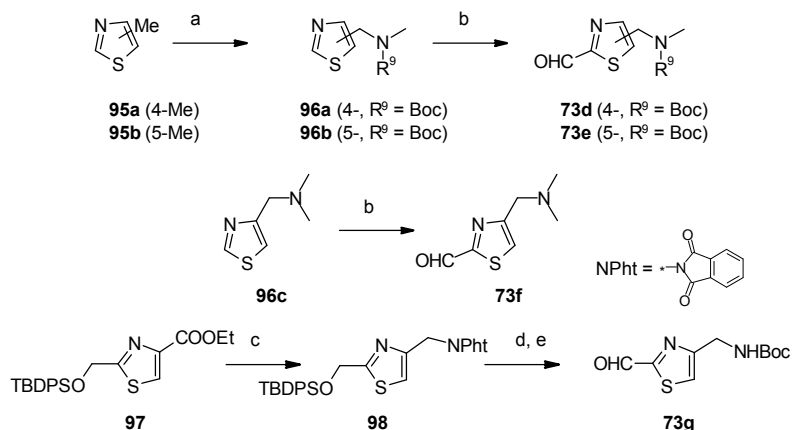
Figure 37. Structures of **73a-n**.



以下にアルデヒドの合成法を示す (Scheme 10)。

アルデヒド体 **73a-c** は市販試薬を利用した。置換チアゾールアルデヒド **73d-f** は、Dority Jr.ら方法⁴⁸⁾に従い合成した。NBS によるチアゾール体 **95a,b** メチル基のブロム化に続き、メチルアミンでアミノ化し、得られた 2 級アミンを Boc 基で保護して、**96a,b** を得た。**96a,b** に *n*-BuLi および *N*-ホルミルモルホリンを作用させ、アルデヒド体 **73d,e** を得た。**73f** も市販のジメチルアミン体 **96c** より同様に導いた。アルデヒド **73g** は、Sinha ら方法⁴⁹⁾に従い合成した **97** より合成した。エチルエステルを LAH にて還元した後、光延反応によりフタルイミドを導入することで、アミノメチル基を導入した。ヒドラジン・一水和物にてフタルイミドの

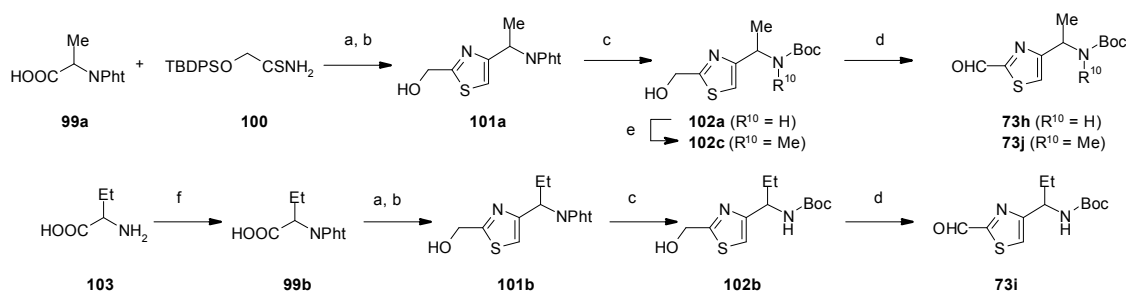
脱保護し、生成した一級アミンを Boc 基で保護した。水酸基側の *tert*-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) 基をテトラブチルアンモニウムフロリド (TBAF) にて脱保護した後、MnO₂にて酸化しアルデヒド **73g** を得た。



Scheme 10. Reagents and conditions: (a) NBS (1.1 eq.), AIBN (5 mol%), CCl₄, 90 °C; MeNH₂ (3 eq.), THF, 0 °C; (Boc)₂O (1 eq.), Et₃N (1.1 eq.), THF, 35% from **95a**, 57% from **95b**; (b) *n*-BuLi (1.05 eq.), *N*-formylmorpholine (1.05 eq.), THF, -78 °C, 35% from **96a**, 32% from **96b**, 44% from **96c**; (c) LAH (1 eq.), THF, 0 °C; phthalimide (1 eq.), PPh₃ (1 eq.), DEAD (1 eq.), 2 steps 49%; (d) NH₂NH₂·1H₂O (2.2 eq.), EtOH; (Boc)₂O (3.3 eq.), satd NaHCO₃ aq. (10 倍量), CH₂Cl₂, 2 steps, 44%; (e) TBAF (1 eq.), THF; MnO₂ (5 倍量), CCl₄, reflux, 2 steps, 20%.

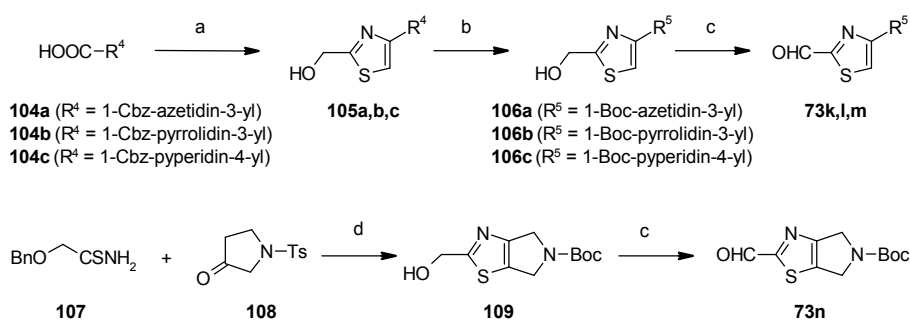
置換基を有するチアゾールアルデヒド体 **73h-j** の合成を **Scheme 11** に示す。

Illig ら方法⁵⁰⁾に従い、**101a** を合成した。市販の **99a** を酸クロリド化し、トリメチルシリルジアゾメタンにより 1-ジアゾ-3-フタルイミドブタン-2-オンとし、47% HBr を作用させてブromoメチルケトン中間体を得た。続いてチオアミド **100**⁴⁹⁾と反応させて、チアゾール **101a** を得た。**73g** と同様に、ヒドラジン・一水和物にてフタルイミドの脱保護し、生成したアミンを Boc 基で保護して、水酸基を MnO₂にて酸化しアルデヒド **73h** を得た。市販の **103** をフタルイミド化し **99b** を得、**73h** と同様の方法で **73i** を合成した。**102a** の保護基をトリフルオロアセチル基に掛け替えた後にモノ-*N*-メチル化し、脱保護の後、改めてアミンを Boc 基で保護して、**102c** を得た。以下、**73h** と同様の方法で **73j** を合成した (**Scheme 11**)。



Scheme 11. Reagents and conditions: (a) SOCl_2 (1.5 eq.), cat. DMF, reflux; TMSCHN_2 (2.5 eq.), THF, 0 °C; (b) 47% HBr (1.2 eq.), Et_2O ; thioamide **100** (1 eq.), EtOH, reflux, 67% from **99a**, 60% from **99b**; (c) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3 eq.), EtOH; $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.1 eq.), THF, 89% from **101a**, quant. from **101b**; (d) MnO_2 (1.5-3 倍量), CCl_4 , reflux, 82% from **102a**, 93% from **102b**, 95% from **102c**; (e) HCl in EtOH (1.05 eq.); TFAA (2.5 eq.), Et_3N (5 eq.), CH_2Cl_2 ; MeI (1.2 eq.), K_2CO_3 (2.4 eq.), DMF; 1N NaOH aq, THF; $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.5 eq.), 11%; (f) phthalic anhydride (1 eq.), 120 °C, 99%.

次に、環状アルキル基または縮環構造を有するチアゾールアルデヒド体 **73k-n** の合成を **Scheme 12** に示す。



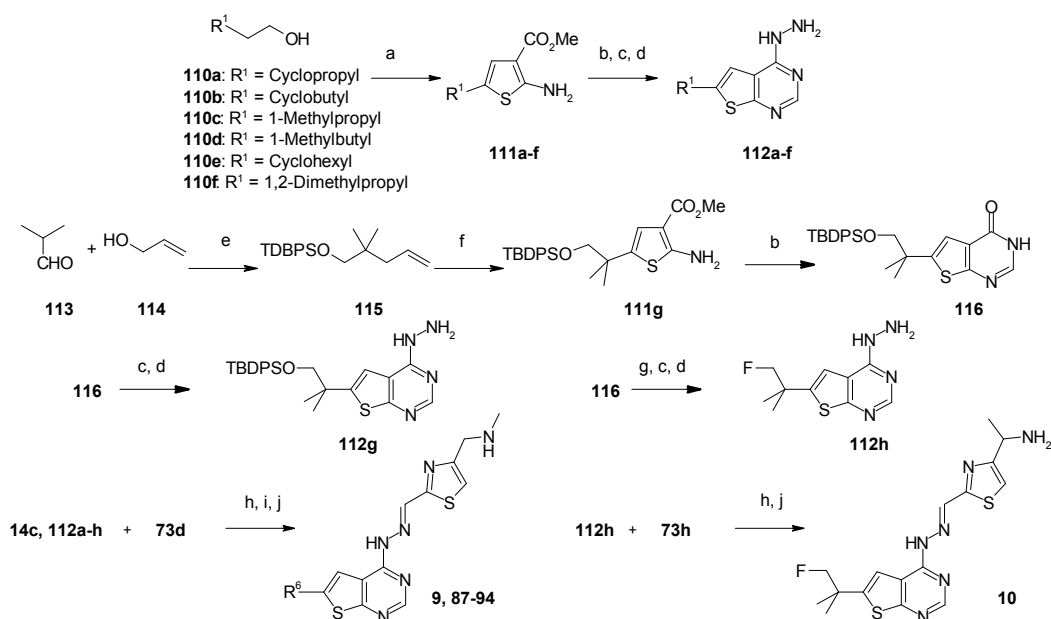
Scheme 12. Reagents and conditions: (a) $(\text{COCl})_2$ (1.5 eq.), cat. DMF, reflux; TMSCHN_2 (2.5 eq.), THF, 0 °C; 47% HBr (1.2 eq.), Et_2O ; thioamide **100** (1 eq.), EtOH, reflux, 26% from **104a**, 44% from **104b**, 70% from **104c**; (b) BCl_3 (3 eq.), CH_2Cl_2 ; $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.5 eq.), 1N NaOH aq (20 倍量), THF, 11% from **15a**, 64% from **15b**, 69% from **15c**; (c) MnO_2 (3 倍量), CHCl_3 , reflux, 68% from **106a**, 83% from **106b**, 60% from **106c**, 81% from **109**; (d) **108**, Br_2 (1.1 eq.), AcOH (20 倍量), 50 °C; **107** (1.1 eq.), DMF, 50°C; MsCl (2 eq.), Et_3N (5 eq.); 47% HBr, phenol, reflux; $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1 eq.), CH_2Cl_2 , 5 steps, 9%.

105a-c は、**104a-c** を原料として、**101a** と同様の合成方法で合成した。**105a-c** の *N*-Cbz 基を脱保護し、*N*-Boc 基で再保護して **106a-c** を得た。**73h** と同様の方法で **106a-c** の水酸基を酸化し、アルデヒド **73k-m** を合成した。

縮環体 **73n** は、チオアミド体 **107** およびピロリジン-3-オン体 **108** より合成した。**108** にブロミンを作用させ、カルボニルの α 位をブロム化し、**107** と環化反応を行った後、メタンシルホニルクロリド (MsCl) による芳香環化した。続いて、HBr による *O*-ベンジル基および *N-p*-トルエンシルホニル (Ts) 基の脱保護と、*N*-Boc 化を行い、**109** を得た。**73h** と同様の方法で水酸基を酸化し、アルデヒド **73n** を合成した。

今までの知見から分岐アルキル基で阻害活性が増強されることが分っており、そのため、活性向上と物性改善を目的として、チエノピリミジン母核 6 位の異なる展開を行った。以下に、6 位に分岐アルキル基を有するチエノピリミジン体 **10**, **87-94** の合成を **Scheme 13** に示す。

チオフェン **111a-f** は、アルコール **110a-f** の水酸基をピリジニウム クロクロメイト (PCC) にて酸化し、得られたアルデヒドより前述の Tinney らの方法^{29a)} に従って合成した。**115** は、Magnus らの方法⁵¹⁾ に従い、酸触媒下のアルデヒド **113** およびアリルアルコール **114** によるアセタール生成と続く転移反応により



Scheme 13. Reagents and conditions: (a) PCC (1.5 eq.), CH₂Cl₂; methyl cyanoacetate (1 eq.), Et₃N (1 eq.), DMF (2 eq.), S₈ (1 eq.), 5-37% from **110a-f**; (b) HCONH₂ (10 倍量), 210°C, 58% from **111g**; (c) POCl₃ (10 倍量), 110 °C; (d) NH₂NH₂·1H₂O (10 倍量), EtOH, reflux, 31–58% from **111a-f**, 33–76% from **116**, 33% in the case of **112h**; (e) **113** (1.5 eq.), cat. *p*-TsOH, *p*-cymene, reflux; LAH (0.3 eq.), Et₂O; TBDPSCI (1.1 eq.), imidazole (1.1 eq.), THF, 3 steps, 38%; (f) OsO₄ (5 mol%), NaIO₄ (2 eq.), THF, H₂O; methyl cyanoacetate (1 eq.), Et₃N (1 eq.), DMF (2 eq.), S₈ (1 eq.), 2 steps, 38%; (g) TBAF (2 eq.), THF, 70 °C; DAST (1.5 eq.), CH₂Cl₂; (h) aldehyde **73d** or **73h** (1.1 eq.), benzene, reflux; (i) TBAF, THF, 70 °C in the case of **112g**; (j) 4N HCl in 1,4-dioxane or 1N HCl in EtOH, 2-97% from **14c**, **112a-h**.

2,2-ジメチル-4-ペンテナールを得、アルデヒドの LAH 還元と生成した水酸基の TBDPS 保護により合成した。チオフェン **111g** は、**115** を Lemieux-Johnson 酸化した後、**111a-f** と同様に合成した。常法に従い、得られた **111a-g** をホルムアミドで環化し、4 位クロル化およびヒドラジン化を経て母核ヒドラジン体 **112a-g** を合成した。6 位末端にフッ素を導入したヒドラジン体 **112h** は、中間体 **116** より導いた。**116** の TBDPS 基を脱保護し、得られた水酸基を(ジエチルアミノ)サルファートリフロリド (DAST) にてフッ素化した後、4 位クロル化およびヒド

ラジン化を行い、**112h** を得た。常法に従い、ヒドラジン **14c**, **112a-h** およびアルデヒド **73d**, **73h** を反応させ、脱保護を経て **87-94** および **10** を合成した。

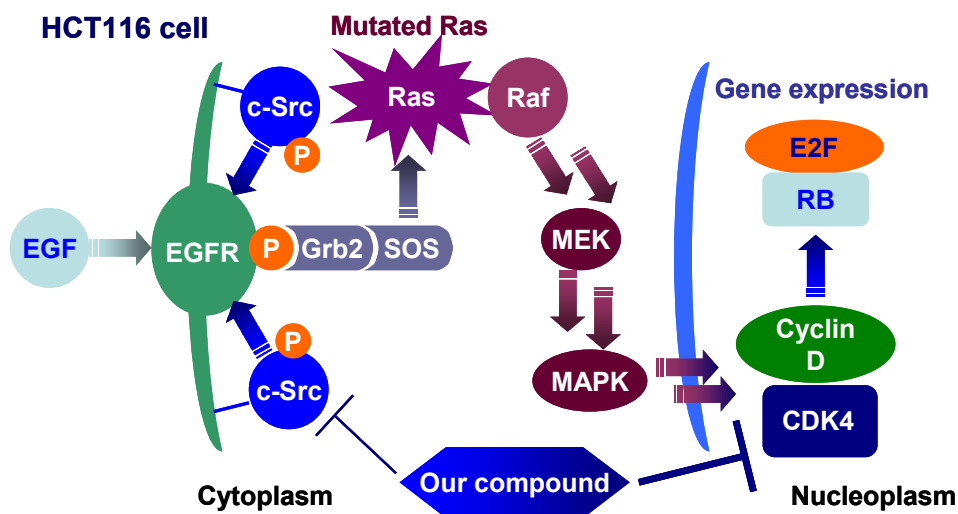
第三節 In vitro 酵素阻害活性・細胞増殖抑制活性と構造活性相関

本化合物群は、シグナル伝達系の c-Src 阻害活性が確認されていることから、評価試験系の妥当性が懸念された。

c-Src などのチロシンリン酸化酵素は、Ras のシグナル伝達系を介して、核内に増殖シグナルを伝達させる。その結果、下流に位置するサイクリン D1 の産生と CDK4 の活性化が起こり、Rb リン酸化が促進されて、E2F の転写機能が活性化される。

In vivo 薬効試験にも利用している HCT116 細胞は、変異により Ras が活性化されている。そのため、シグナル伝達の上流に位置する EGF 受容体や PI3K の阻害剤を作用させても、細胞周期はほとんど G1 期に誘導されない。逆に、Ras より下流に位置する MEK の阻害剤を作用させた場合、G1 期が誘導される。更に、MEK 阻害剤などで CDK4 よりも上流のシグナル伝達系を阻害した場合、サイクリン D1 および CDK4 の量が低下し、p27 の増加が見られる¹⁵⁾。しかし、本化合物系統を作用させた場合は、それらの発現量が変化しない。従って、HCT116 細胞において、c-Src 阻害による G1 期誘導の可能性は低く、CDK4 阻害作用による G1 期誘導の評価が可能と考えた (Figure 38)。

Figure 38. Intercellular signaling pathway.



合成した化合物 **8**, **74-86** について、CDK4・CDK2・c-Src の酵素阻害活性と細胞増殖抑制活性を **Table 8** に示す。細胞増殖抑制活性評価の癌株として、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 およびヒト肺小細胞癌由来細胞株 PC-6 を用いた。

第三章で、4 位ベンゼン環上に塩基性基を有する置換基を導入することにより、CDK4 酵素阻害活性と細胞増殖抑制活性が向上することを見出している。そのため、チアゾール体においても、4'位および5'位にアルキルアミノ基を導入することとした。

その結果、CDK4 阻害活性・CDK2 選択性・強酸性条件下での安定性については、良好な結果を得た。チアゾール環 4'位置換体 **76** は CDK4 阻害活性を維持しつつ、CDK2 選択性 (28.8 倍) および c-Src 選択性 (3.2 倍) も向上している。一方、5'位置換体 **77** は c-Src との選択性は得られず、CDK2 選択性も劣ることがわかり、4'位置換での化合物展開を行った。

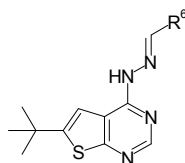
ジメチルアミン体 **78** は、c-Src 阻害活性がほぼ同等であるものの、CDK2 選択性が向上している。他方、一級アミン体 **79** は、CDK2 選択性が減弱し、c-Src 阻害活性は増強する。このことは、アルキルアミン部位の窒素原子を取り巻くアミノ酸側鎖との立体的な要因も、選択性の向上に重要であることを示唆している。

そこで、分岐アルキルアミン体 **80-82** を合成した。1-アミノエチル体 **80** は、CDK4 阻害活性の向上とともに、CDK2 選択性 (43.7 倍) および c-Src 選択性 (2.1 倍) の向上を確認した。更に、細胞増殖抑制能も向上し、HCT116 株に対して GI₅₀ 値 0.177 μg/mL および PC-6 株に対して GI₅₀ 値 0.103 μg/mL の活性を有することがわかった。一方、1-アミノプロピル体 **82** は CDK4 阻害活性が減弱し、メチルアミノエチル体 **83** では、阻害活性を維持するものの、選択性が逆転し c-Src 阻害活性が増強することがわかった。

また、双環アルキルアミン体 **83-85** および縮環体 **86** においては、標的阻害活性を維持し、選択性を有する化合物も得ていたが、これらは細胞増殖抑制活性が減弱してしまうことが明らかとなった。

以上より、チアゾール環 4'位のアルキルアミノ基導入は、数倍程度の酵素選択性の向上をもたらすことが分かった。また、アミノ基周辺アルキル鎖の立体によっても、CDK2 および c-Src の選択性に違いが出ることもわかった。更に、**80** において、細胞増殖抑制活性を向上させる構造の知見も得た。一方で、この 4 位置換基末端部分の変換だけでは、劇的な阻害活性増強・選択性向上・細胞増殖抑制活性向上には結びつかないことも明らかとなった。

Table 8. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for substituted thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazones.



Compd	R ⁶	CDK4 IC ₅₀ (μg/mL) ^a	CDK2 IC ₅₀ (μg/mL) ^a	c-Src IC ₅₀ (μg/mL) ^b	HCT116 GI ₅₀ (μg/mL) ^c	PC-6 GI ₅₀ (μg/mL) ^c	Remaining rate (%) ^d
8	1,3-Thiazol-2-yl	0.041	0.20	0.067	0.419	0.381	80
76		0.034	0.98	0.11	0.343	0.214	85
77		0.042	0.35	0.046	0.156	0.108	NT ^e
78		0.043	1.4	0.048	0.328	0.241	80
79		0.090	0.38	<0.02	0.730	0.490	89
80		0.019	0.83	0.039	0.177	0.103	81
81		0.058	1.4	<0.02	0.211	0.107	84
82		0.037	1.1	<0.02	0.320	0.171	85
83		0.073	1.0	<0.02	0.768	0.706	81
84		0.070	1.8	NT ^e	0.812	0.635	NT ^e
85		0.014	1.7	0.026	0.929	NT ^e	NT ^e
86		0.025	0.20	0.12	0.458	0.240	90

^aConcentration (μg/mL) needed to inhibit the Rb phosphorylation by 50%, as determined from the dose-response curve. Values are the means of at least two determinations.

^bThe IC₅₀ values are determined by Src kinase inhibition assay as described in experimental section.

^cDose-response curves were determined at ten concentrations. The GI₅₀ values are the concentrations needed to inhibit cell growth by 50%, as determined from these curves.

^dRemaining rate of the substrate after 3 h incubation with pH 1.2 buffer at 37 °C.

^eNT=not tested.

以上の知見から、細胞増殖抑制活性の向上に向けて、母核 6 位側鎖の修飾を

検討した。6位周辺の環境は脂溶性ポケットと考えており、当初6位 *tert*-ブチル体で高い阻害活性を見出し、逆にフレキシブルに回転が可能なベンジル基では、タンパク質と立体障害が生じるため、活性が消失してしまうことが分かっていた。CADDの知見からは、*tert*-ブチルの先にもアルキル鎖を伸長できる空間があると考えられた。また、脂溶性ポケットと言うもののアミノ酸残基のヘテロ原子との相互作用する可能性もあり、極性基などの導入も検討した。合成した化合物 **9**, **10**, **87-94** について、CDK4・CDK2・c-Srcの酵素阻害活性・細胞増殖抑制活性・強酸性条件下での化学的安定性を **Table 9** に示す。

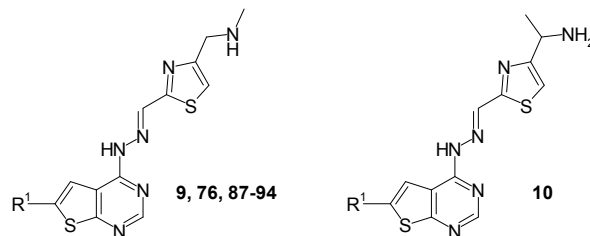
各種分岐したアルキル基を導入した化合物 **9**, **87-92** は、CDK4 阻害活性を維持し、CDK2 との選択性 (15~47 倍) や化学的安定性も確保したが、細胞増殖抑制活性への影響が小さい。特に、飽和環状アルキル基の導入は、細胞増殖抑制活性が減弱する傾向が見られ、シクロブタン環を有する **89** では c-Src 活性が増強されてしまう知見も得られた。その中で、鎖状の分岐側鎖を有する **9** および **90** は、PC-6 株で 100 ng/mL 程度の比較的強い細胞増殖抑制活性を有することが分かった。

次に、タンパク質側のアミノ酸側鎖との相互作用を期待して、6位へのヘテロ原子を含むアルキル鎖の導入を考えた。

一つの方策として、ヒドロキシル体 **93** は、CDK4 阻害活性を維持するものの、細胞増殖抑制活性が大きく減弱することがわかった。脂溶性が大きく低減したことにより、細胞へ入りにくくなっている可能性も示唆され、更なる変換が必要となった。

また、もう一つの方策として、フッ素の導入を考えた。フッ素は、電気陰性度が高く分極率が小さいことから、電子を水素に与え難く、吸引的相互作用は弱いと言われている。しかしながら、静電的相互作用があり、負に部分電荷しているフッ素は、カルボニル炭素に対し、垂直方向から van der Waals 距離での相互作用があることが報告⁵²⁾されている。このことから、母核6位の疎水性ポケットに存在する Asp158 のカルボン酸側鎖との相互作用を期待した。また、結合部位近傍の電子状態を変化させることで、化合物全体の性質にも変化を与えることを期待した。

Table 9. Enzyme inhibitory and cytotoxic activity for substituted thieno[2,3-*d*]-pyrimidines focused on the C-6 (R¹) position



Compd	R ¹	CDK4 IC ₅₀ (μg/mL) ^a	CDK2 IC ₅₀ (μg/mL) ^a	c-Src IC ₅₀ (μg/mL) ^b	HCT116 IC ₅₀ (μg/mL) ^c	PC-6 IC ₅₀ (μg/mL) ^c	Remaining rate (%) ^d
76		0.034	0.98	0.11	0.343	0.214	85
87		0.058	1.50	0.11	0.380	0.221	85
88		0.260	>2.0	0.16	0.421	0.271	83
89		0.045	1.4	0.024	0.521	0.393	80 (4h)
90		0.029	0.44	0.053	0.203	0.114	80 (4h)
91		0.030	1.40	NT ^e	0.431	0.201	NT ^e
92		0.020	0.81	NT ^e	0.340	0.166	NT ^e
9		0.022	0.88	0.060	0.315	0.108	83
93		0.069	1.8	0.10	1.32	0.681	NT ^e
94		0.140	1.8	0.28	0.184	0.078	80
10		0.046	0.68	0.23	0.061	0.029	81

^aConcentration (μg/mL) needed to inhibit the Rb phosphorylation by 50%, as determined from the dose-response curve. Values are the means of at least two determinations.

^bThe IC₅₀ values are determined by Src kinase inhibition assay as described in experimental section.

^cDose-response curves were determined at ten concentrations. The GI₅₀ values are the concentrations needed to inhibit cell growth by 50%, as determined from these curves.

^dRemaining rate of the substrate after 3 h incubation with pH 1.2 buffer at 37 °C.

^eNT=not tested.

評価の結果、化合物 **94** は、CDK4 阻害活性が減弱したが、4 位チアゾール環を **80** のタイプに変更した **10** において、CDK4 阻害活性を維持し、CDK2/c-Src 選択性と化学的安定性を確保しつつ、細胞増殖抑制活性が向上することがわかった。本化合物の活性プロファイルはベンゼン体 **6** とほぼ同等であった。

以上から、母核 6 位アルキル側鎖へのヘテロ原子導入が、細胞増殖抑制活性の向上に有効であり、薬物動態にも影響を及ぼす部位になることを見出し、今後の化合物展開へ向けた重要な構造活性相関情報となった。

得られた化合物 **9** および **10** の ADME プロファイルは以下のとおりであった (Table 10)。日局二液 (JP2) での溶解性がベンゼン体 **6** (783 $\mu\text{g}/\text{mL}$) よりも低いものの、pH7.4 における物質の電離を考慮した分配係数である LogD (distribution coefficient) 値および cLogP 値が **6** の LogD 値・cLogP 値に比べて低下している。また、タンパク結合率も高いが、フッ素化アルキル基を導入した **10** では改善が見られた。

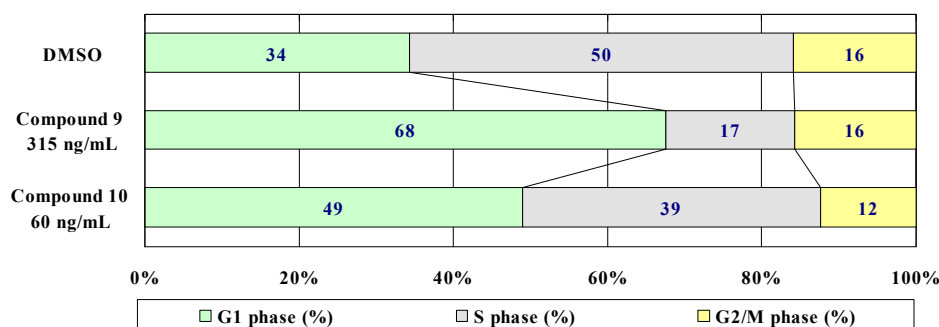
更に、社内の指標である代謝安定性 (Metabolic stability (%), ヒト肝ミクロソームおよび補酵素溶液との混合物を 30 分間インキュベーションした後の残存率) は、**9** で 64%と中程度であったが、**10** では 90%に改善していることがわかった。また、人工脂質膜を用いて薬物膜透過性を測定する手法である PAMPA 法を社内の腸管吸収率の指標として用いており、いずれの化合物も膜透過性は良好であると予測された。

Table 10. ADME profiles of **9** and **10**.

Compd	Solubility JP1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$, pH6.8)	Solubility JP2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$, pH6.8)	LogD (pH 7.4)	cLogP	Protein Binding human (%)	Metabolic Stability (%)
6	520	783	3.1	4.580	99.6	100
9	> 1000	58.0	3.0	3.836	99.2	64
10	> 1000	53.0	2.0	2.473	96.0	90

続いて、HCT116 株を利用し、**9** および **10** における G1 期への集積誘導を評価した。第一章の方法と同様に、フローサイトメトリー法に準じて、HCT116 株へ化合物を添加し、16 時間後に回収した細胞に対して、DNA 含量を測定した。その結果、両化合物とも GI_{50} 値近傍の濃度で、細胞分布を 50%程度に G0/G1 期集積させることがわかった (Figure 39)。

Figure 39. Cell cycle distribution of HCT116 cells treated with **9** and **10**.



第四節 In vivo 抗腫瘍効果

第三章と同様に、ヌードマウスへのヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 移植モデルを利用し、1 日間隔 5 回投与のスケジュールにて、細胞増殖抑制活性の強かった **9** および **10** における抗腫瘍効果の評価を行った。

化合物 **9** は、5 連投にて重篤な副作用所見も無く、観察期間中の腫瘍増殖を完全に抑制し、静注・経口の両方で抗腫瘍増殖活性 (IRTV_{max}: iv = 52% at 300 mg/kg, po = 45% at 300 mg/kg) を示すことを見出した。

一方、化合物 **10** においては、2 連投後の体重減少が著しかったため投薬スケジュールを変更したが、死亡例は無く、観察期間中の腫瘍増殖は完全に抑制され、静注で抗腫瘍増殖活性 (腫瘍増殖抑制率 IRTV_{max}: iv = 47%) を示した。代謝安定性・蛋白結合率などの改善により薬物動態が変わり、他の化合物では今まで見えてこなかった毒性により、体重減少が見えてきたと思われ、今後の安全性面での課題が明らかとなった (Table 11, Figure 40)。

Table 11. Antitumor effects of **9** and **10** against HCT116 solid tumors.

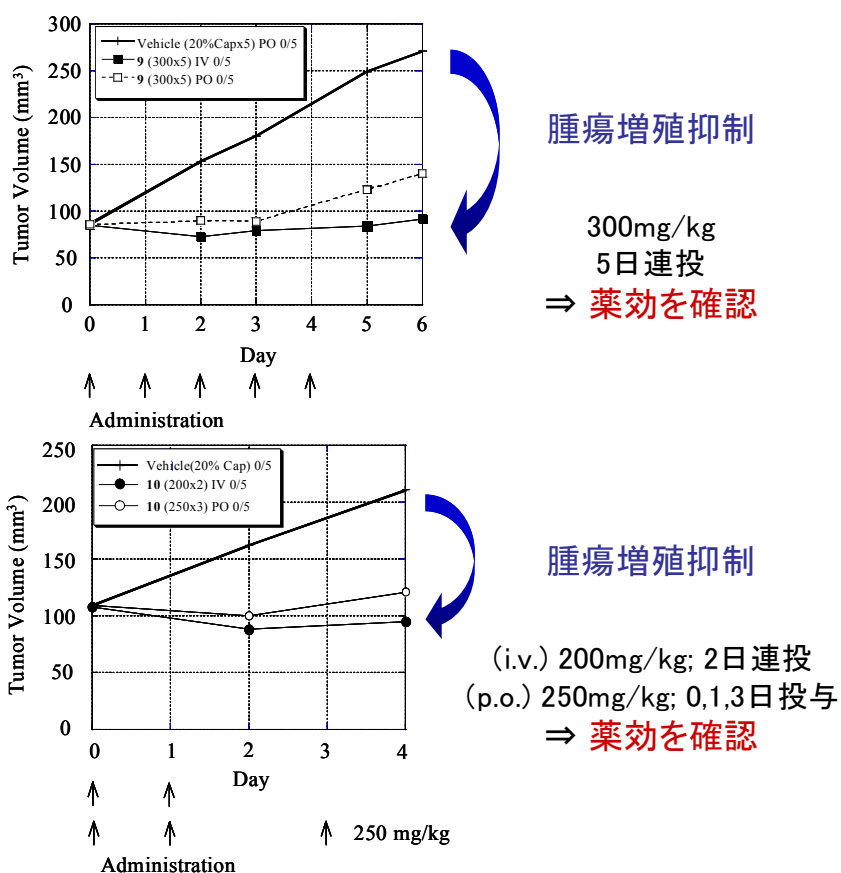
Compd	Route	Dose/day (mg/kg)	Total dose (mg/kg)	Administration schedule	IRTV _{max} (%) (day) ^a	BWL _{max} (%) (day) ^b	T/N ^c
9	i.v.	300	1500	5-day, continuous	52.4 (7)	9.5 (5)	0/5
9	p.o.	300	1500	5-day, continuous	45.3 (6)	16.0 (5)	0/5
10	i.v.	200	400	2-day, continuous	47.3 (4)	17.9 (3)	0/5
10	p.o.	250	750	day 0, 1, 3	37.5 (4)	11.4 (3)	0/5

^aMaximum inhibition rate of tumor volume. Numbers in parentheses indicate the day after initial drug administration on which IRTV_{max} was reached.

^bMaximum rate of body weight loss. Numbers in parentheses indicate the day of BWL_{max}.

^cNumber of toxicity-related death/Number of mice used.

Figure 40. Tumor growth inhibition curves of 9 and 10.



第五節 小括

4位チアゾール体の展開および6位側鎖の修飾により、以下の知見を得た。その結果、4位ベンゼン誘導体で問題となった (i) 強酸性溶液条件での化学的安定性確保および (ii) c-Src 阻害活性の低減を達成し、in vivo 試験においても抗腫瘍効果を有する6位分岐アルキル体 **9** および6位末端フッ素化アルキル体 **10** を見出した (Figure 41)。

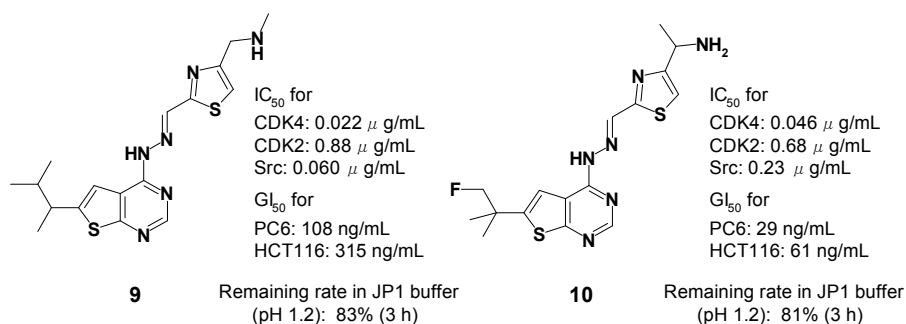
1. 4位ベンゼン体を2-および5-チアゾール体に変換すると CDK4 阻害活性を保持し、かつ酸性条件下での科学的安定性が確保されることがわかった。一方、4-チアゾール体は、CDK4 酵素阻害活性が減弱した。この結果を踏まえ、CDK2 との選択性が高かった 2-チアゾール体による塩基性基を中心とした置換基の導入を展開した。

2. チアゾール環への塩基性基導入により、阻害活性の向上を図ることができた。4位・5位ともに高い阻害活性を示すが、5位への塩基性基の導入は、CDK2阻害活性の増強にもつながり、酵素選択性が低下することがわかった。4位への塩基性基導入の検討の中で、1-アミノエチル体 **80** が細胞増殖抑制活性を向上させることを見出した。

3. 空間的に展開の余地があると考えられた母核6位において、イソプロピル基・*tert*-ブチル基以外の分岐アルキル側鎖を導入することでも CDK4阻害活性を維持することを確認し、その中で細胞増殖抑制活性を有する **9** を見出した。また、酸素原子などの極性基の導入においても、酵素阻害活性が保持することを見出した。しかしながら、ヒドロキシル体 **93** では細胞増殖抑制活性は減弱する傾向にあることがわかった。一方で、フッ素原子の導入においては、4位チアゾールの置換基との組み合わせ検討により、CDK4阻害活性を維持しつつ細胞増殖抑制活性が向上する **10** を見出した。

以上から、4位チアゾール体による化学的安定性の向上を達成し、4位および6位の展開により CDK2 および c-Src の阻害活性を減弱させ、有望化合物としての資質を有する6位分岐アルキル体 **9** および6位末端フッ素化アルキル体 **10** を見出した。これらの化合物は、細胞増殖抑制活性と G1 期集積作用を有した。更に、**9, 10** は *in vivo* 試験で静注および経口で明確な抗腫瘍増殖活性を示すことを明らかにした。更に **10** は細胞増殖抑制活性の向上と物性プロファイルの改善が見られ、ヘテロ原子導入などの6位側鎖の修飾により動態の改善につながり、今後の更なる展開の可能性を示すことができた。

Figure 41. Structures of **9**, **10**.



結論

以上述べてきたように、著者は、再発防止・QOL 向上に有効で、利便性に優れた経口可能な抗癌剤の創出に向け、従来の化学療法剤とは異なるサイクリン依存性カイネース CDK4 選択的な ATP 拮抗作用を有し、細胞周期を G1 期に集積させる新規分子標的薬の創製を目的に、本研究に着手し、下記に示した成果を得た。

1. 社内ライブラリーHTS ヒット化合物 **1** からの活性の増強と選択性の向上を目的に、チエノピリミジン母核および4位チオフェン環部位の構造変換を実施し、構造活性相関を明らかにした。

その中で、細胞増殖抑制作用が増強した化合物 **2** を見出したが、CDK4 阻害活性自体は増強されておらず、細胞分布評価において低濃度で S 期集積が見られたことから、別の活性による細胞増殖抑制が考えられた。

更に、ピリジン環上の置換基探索により、強い CDK4 酵素阻害活性と CDK2 との選択性を有する **3** を見出し、ピリジン環 6'位へのアミノ基の導入が、阻害活性および選択性向上に有用であることを明らかにした。また、HTS ヒット化合物および類縁体の多くは脂溶性が非常に高く、中性付近での溶解性がほとんど得られない中で、**3** に見られるような塩基性基を導入する事により水溶性が向上することを明らかにし、物性改善に向けた一つの方策を見出した。

2. X線構造が明らかとなっていなかった CDK4 に対し、計算化学手法による三次元構造ホモロジーモデルの構築を行い、低分子化合物とのドッキングスタディにより、ATP binding site 内での **3** との結合様式に関する有用な知見を得た。

化合物 **3** が ATP binding site で V 字形の配座を取る事で、(i) Hinge 部位との強固な水素結合、(ii) Gate Keeper 部位や上下方向の脂溶性側鎖によるブロッキング、および (iii) Solvent Accessible 部位での酸性側鎖と末端アミノ基との水素結合の形成が確認され、**3** の強い CDK4 酵素阻害活性および CDK2 との選択性の発現が説明可能となり、その後の化合物展開に向けた末端アミノ基などの水素結合能を有する官能基の有用性や、ピリジン環から他の芳香環への変換の可能性を見出した。

3. ピリジン体は、CDK4 以外の作用機序を有する可能性が示唆され、その回避が課題となっていた。その中で、CADD の知見を基に合成したベンゼン体 **4** の阻害活性が **3** とほぼ同等であり、G1 集積作用も明確であったことから、4 位置換基末端ベンゼン体への展開に移行・注力した。

ベンゼン環上に塩基性基を中心とした側鎖の導入を展開し、2 級アミン体 **6** および縮環型のイソインドール体 **7** を見出した。化合物 **6** は細胞増殖抑制活性の向上とともに日局 2 液への溶解度が改善し、痙攣などの中枢抑制作用を回避し、in vivo 試験においても静注・経口の両方で薬効を示すことを明らかにした。化合物 **7** においても、静注投与で抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。

4. 研究の進捗に伴い、高活性を有するベンゼン誘導体において、(i) 強酸性溶液条件 (pH1.2) での化学的安定性を確保できず、(ii) c-Src 阻害活性も併せ持つことが明らかとなった。そのため、これらの問題を回避し、in vivo 試験においても抗腫瘍効果を有する化合物の獲得を目標に、4 位ベンゼン環に代わるヘテロ環化合物の検討および母核 6 位側鎖の修飾を行った。

その結果、酸性条件下でも安定に存在し、CDK4 阻害活性を保持しつつ c-Src 阻害を低減する 4 位チアゾール誘導体を見出し、更に母核 6 位での活性向上と物性改善を図り、6 位分岐アルキル体 **9** および 6 位末端フッ素化アルキル体 **10** を見出した。これらの化合物は、強い CDK4 阻害活性に基づく G1 期集積作用と細胞増殖抑制を有し、**9** は in vivo 薬効試験において静注および経口で明確な抗腫瘍活性を示した。また、**10** は動態改善により細胞増殖抑制活性が向上しており、有望化合物としての資質を有していることが判明した。

以上により、チエノピリミジン母核を有する HTS ヒット化合物 **1** から、計算化学の手法も取り入れ、母核 4 位および 6 位側鎖を変換・最適化することにより、CDK4 酵素阻害活性・細胞増殖抑制活性・G1 期集積作用を有し、腫瘍移植マウス in vivo 試験において明確な抗腫瘍効果を示す **9** および **10** の創製に成功した。本研究により見出された成果は今後、新たな抗癌剤開発に有効なものと期待される。

謝辞

本論文をまとめるに際し、御懇篤な御指導および御高閲を賜りました千葉大学大学院薬学研究院研究院長・千葉大学薬学部長・千葉大学大学院薬学研究院 薬品合成化学研究室教授 西田篤司博士に慎んで感謝致します。

また、本論文に関して審査および貴重な御教示と御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院教授 石川勉博士、石橋正己博士、高山廣光博士、並びに濱田康正博士に厚く御礼申し上げます。

発表の機会を与えていただき、終始御激励を賜った、第一三共（株）機能分子第二研究所所長 曾我恒彦博士、同研究所前所長 竹村真博士、機能分子第二研究所グループ長 長谷川雅司博士、同研究所グループ長 魚戸浩一博士、並びに機能分子第一研究所グループ長 高橋寿博士に深謝致します。

本研究は、第一三共（株）機能分子第二研究所所長 曾我恒彦博士、並びに同研究所グループ長 魚戸浩一博士の指導のもとに行われたものであり、ここに厚く感謝致します。

合成研究に御協力を頂きました第一三共（株）機能分子第二研究所主任研究員 武田泰幸博士、同研究所主任研究員 萩野谷憲康博士、同研究所副主任研究員 千葉淳博士、並びに同研究所副主任研究員 宮崎理樹氏に謹んで感謝致します。

また、評価研究を担当して頂きました第一三共（株）癌研究所所長 赤羽浩一博士、同研究所副主任研究員 永田基子博士、並びに同研究所専門研究員 北川麻弓博士に厚く感謝致します。

また、計算化学で貴重な御助言・御協力を頂きました第一三共（株）機能分子第二研究所副主任研究員 島田多堅氏、並びに同研究所副主任研究員 安松勲氏、化学的安定性試験および各種 ADME データを測定してくださいました薬物動態研究所の諸氏、並びに各種スペクトルを測定してくださいました第一三共 RD ノバーレ株式会社 分析グループの諸氏に感謝致します。

実験の部

本実験に際し、用いた機器・試薬などは以下のとおりである。

・シリカゲルクロマトグラフィー担体には、Merck Silica Gel 60 (particle size 0.060-0.200 mm または 0.040-0.063 mm) を使用し、薄層クロマトグラフィー (TLC) には Merck Pre-coated Silica Gel 60F₂₅₄ TLC plates (0.25 mm) を用いた。分取薄層クロマトグラフィー (pTLC) には、Whatman PLK-5F (1.0 mm, 200 x 200 mm) または Merck 60F₂₅₄ (1.0 mm, 200 x 200 mm) を用いた。フラッシュクロマトグラフィーは Merck silica gel 60 (230-400) または Biotage FLASH system (Biotage Si) を用いた。

・核磁気共鳴スペクトル (NMR) は、¹H NMR には JEOL JNM-EX400 spectrometer また ¹³C NMR では JEOL JNM-ECP500 spectrometer を用い、tetramethylsilane (TMS) または溶媒ピークを内部標準とした δ 値 (ppm) で表示し、結合定数は Hz で示した。多重度は s (singlet)、d (doublet)、t (triplet)、q (quartet)、m (multiplet)、br (broad) などを用いた。

・赤外スペクトル (IR) は、日立製作所 HITACHI 270-30 spectrometer、堀場製作所 FT-270 または JASCO FT/IR-6100 を用い、KBr 法または顕微 ATR 法を用いて測定した。

・質量分析 (MS) は、JEOL JMS-AX505W (EI), JEOL JMS-HX110 (FAB), Agilent 1100 series LC/MS (ESI), SCIEX API-150EX (ESI), JEOL JMS-100LP AccuTOF LC-plus (HR-FAB) および JEOL JMS-700 (HR-FAB) を用いて測定した。高速液体クロマトグラフィーには、日立 L-6000 型を用い、紫外吸収により検出した。

・元素分析は、Perkin-Elmer CHNS/O 2400II, Elemental Vario EC, Leco CHNS-932, 横河アナリシス IC7000RS および Dionex DX-320 を用いて測定した。

・融点 (mp) は、Büchi B545 型融点測定装置もしくは Yanaco MP-500D 型微量融点測定装置を使用して測定した (未補正)。

本論第一章の実験

Thiophene-2-carbaldehyde (6-ethylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (1)

化合物 **14a** (50 mg, 0.26 mmol) および 2-チオフェンカルボアルデヒド (24 μ L, 0.26 mmol) の無水ベンゼン溶液 (1 mL) をディーン-スターク脱水装置を用い、100°C に加温し 3 時間攪拌した。反応液を室温に戻し、溶媒を留去した。得られた粗結晶をクロロホルム-*n*-ヘキサンにて再結晶精製し、標記化合物 **1** (67 mg, 91%) を黄白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.37 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.94 (2H, dq, $J = 1.5, 7.4$ Hz), 7.13 (1H, dd, $J = 3.7, 5.1$ Hz), 7.40 (1H, dd, $J = 3.7, 1.0$ Hz), 7.61 (1H, dt, $J = 5.1, 1.0$ Hz), 7.77 (1H, s), 8.37 (1H, s), 8.41 (1H, s), 11.56 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃) δ : 15.0 (CH₃), 24.3 (CH₂), 116.2 (C_{ar}), 118.4 (CH_{ar}), 127.1 (CH_{ar}), 127.6 (CH_{ar}), 128.7 (CH_{ar}), 138.1 (C_{ar}), 140.0 (CH-N), 144.2 (C_{ar}), 151.7 (CH_{ar}), 154.3 (C_{ar}-N), 168.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3042, 2969, 1555, 1427, 1119; MS (EI) m/z : 289 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 289.05670 (Calcd for C₁₃H₁₃N₄S₂: 289.05816); *Anal.* Calcd for C₁₃H₁₂N₄S₂: C, 54.14; H, 4.19; N, 19.43; S, 22.24. Found: C, 53.99; H, 4.34; N, 19.34; S, 22.15.; mp: 200-201°C (dec.).

Pyridine-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (2)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** および 2-ピリジンカルボアルデヒドより標記化合物 **2** (98%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 1.51 (9H, s), 7.28 (1H, m), 7.79 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 7.85 (1H, s), 7.98 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 8.01 (1H, s), 8.52 (1H, br), 8.64 (1H, d, $J = 4.9$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃) δ : 31.5 (CH₃) 34.7 [C(CH₃)₃], 115.0 (C_{ar}), 119.1 (CH_{ar}), 123.7 (CH_{ar}), 128.2 (CH_{ar}), 136.7 (CH_{ar}), 143.8 (C_{ar}), 150.0 (CH_{ar}), 152.4 (C_{ar}), 153.4 (CH_{ar}), 153.5 (C_{ar}-N), 154.5 (C_{ar}), 167.9 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3178, 2966, 1554, 1425, 1161; MS (EI) m/z : 311 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 312.12829 (Calcd for C₁₆H₁₇N₅S: 312.12829); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₇N₅S: C, 61.71; H, 5.50; N, 22.49; S, 10.30. Found: C, 61.97; H, 5.41; N, 22.54; S, 10.27.; mp: 222-227°C (dec.).

6-[(Dimethylamino)methyl]pyridine-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-

pyrimidin-4-yl)hydrazone (3)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** および 6-(ジメチルアミノ)メチルピリジン-2-カルボアルデヒドより標記化合物 **3** (49%) を黄白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.51 (9H, s), 2.33 (6H, s), 3.63 (2H, s), 7.40 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.76 (1H, dd, $J = 7.6, 7.8$ Hz), 7.84 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.86 (1H, br), 8.03 (1H, br), 8.52 (1H, br), 9.11 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 31.8 [$(\text{CH}_3)_3\text{C}$], 35.5 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 43.1 (2 CH_3), 60.7 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 115.3 (C_{ar}), 116.3 (2 CH_{ar}), 125.7 (CH_{ar}), 138.4 (CH-N , CH_{ar}), 142.4 (C_{ar}), 150.4 (CH_{ar}), 152.5 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 158.5 (C_{ar}), 165.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2962, 1556, 1453, 775; MS (FAB) m/z : 369 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 369.18673 (Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{S}$: H 369.18614); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{S}$: C, 61.93; H, 6.56; N, 22.81; S, 8.70. Found: C, 61.47; H, 6.55; N, 22.78; S, 8.72.; mp: 180-181°C (dec.).

2-Amino-5-ethyl-3-methoxycarbonylthiophene (12a)^{29a)}

窒素雰囲気下、室温にてトリエチルアミン (4.18 mL, 30 mmol) およびジメチルホルムアミド (4.65 mL, 60 mmol) の混合溶液に、シアノ酢酸メチル (2.65 mL, 30 mmol) およびアルデヒド **11a** (2.70 mL, 30 mmol) を加え 45 分間攪拌し、硫黄 (962 mg, 30 mmol) を加えさらに 18 時間攪拌した。反応液に水を加えた後、 Et_2O にて希釈抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 4 : 1 にて溶出し、標記化合物 **12a** (2.41 g, 43%) を一部油状成分含む黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.22 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.60 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 3.79 (3H, s), 5.78 (2H, br), 6.62 (1H, d, $J = 1.3$ Hz).

6-Ethyl-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine (13a)

化合物 **12a** (2.0 g, 12.4 mmol) のホルムアミド溶液 (10 mL) を、210°C にて 14 時間加熱還流した。反応液を室温に戻し、析出した結晶をろ取した。得られた結晶を *n*-ヘキサンにて洗浄し、標記化合物 **13a** (1.12 g, 50%) を黒褐色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.26 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.85 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 7.11 (1H, s),

8.05 (1H, s), 12.41 (1H, br).

6-Ethyl-4-hydrazinothieno[2,3-*d*]pyrimidine (14a)

化合物 **13a** (3.0 g, 16.7 mmol) のオキシ塩化リン溶液 (60 mL) を 110°C にて 40 分間加熱した。反応液を室温に戻した後、0°C に冷却し飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を少量ずつ加え、酢酸エチルにて希釈抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣に *n*-ヘキサン、Et₂O を加え析出した結晶を原料 **13a** (173 mg, 0.87 mmol) として回収し、母液を減圧下にて濃縮し、4-chloro-6-ethylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (1.56 g) を粗生成物・褐色油状物質として得た。得られた粗 4-chloro-6-ethylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (970 mg, 4.88 mmol) のエタノール溶液 (30 mL) に、室温にてヒドラジン 1 水和物 (30 mL) を加え 80°C に加温にして 50 分間攪拌した。反応液を室温に戻した後、減圧下にて溶媒を留去し、Et₂O を加え析出した結晶をろ取した。減圧下、室温にて半日乾燥し、標記化合物 **14a** (660 mg, 70%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.27 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.86 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 4.55 (2H, br), 7.32 (1H, br), 8.30 (1H, s), 9.00 (1H, br); IR (KBr) cm⁻¹: 3194, 1578, 1504, 1304, 869; MS (ESI) *m/z*: 195 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 195.06828 (Calcd for C₈H₁₁N₄S: 195.07044); mp: 172-174°C (dec.).

2-Amino-3-methoxycarbonyl-5-methylthiophene (12b)^{29a)}

化合物 **12a** の合成法に従い、化合物 **11b** より粗生成物として標記化合物 **12b** を褐色油状物質として得、引き続き次の反応に供した。

6-Methyl-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine (13b)

化合物 **13a** の合成法に従い、粗生成物として得られた化合物 **12b** より標記化合物 **13b** (2steps 7%) を褐色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.56 (3H, s, *J* = 1.0 Hz), 7.14 (1H, d, *J* = 1.3 Hz), 7.95 (1H, br).

4-Hydrazino-6-methylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (14b)

化合物 **14a** の合成法に従い、化合物 **13b** より標記化合物 **14b** (57%) を褐色固

体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.58 (3H, d, $J = 1.3$ Hz), 6.35 (1H, br), 6.86 (1H, s), 8.49 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 15.8 (CH_3), 114.9 (CH_{ar}), 116.8 (C_{ar}), 135.5 (C_{ar}), 152.9 (CH_{ar}), 157.1 ($\text{C}_{\text{ar-NH}}$), 164.5 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2913, 1584, 1516, 1312, 1131; MS (ESI) m/z : 181 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 181.05218 (Calcd for $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_4\text{S}$: 181.05479); *Anal.* Calcd for $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{S}\cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C, 46.19; H, 4.54; N, 30.78; S, 17.62. Found: C, 46.18; H, 4.37; N, 30.99; S, 17.92. ; mp: 207-208°C (dec.).

Thiophene-2-carbaldehyde (6-methylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (15b)

化合物 **1** の合成法に従い、**14b** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15b** (53%) を黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.64 (3H, s), 7.09 (1H, dd, $J = 5.1, 3.7$ Hz), 7.26 (1H, br), 7.40 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 7.77 (1H, br), 8.04 (1H, br), 8.45 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 14.2 (CH_3), 116.3 (C_{ar}), 120.3 (CH_{ar}), 127.0 (CH_{ar}), 127.6 ($\text{CH}_{\text{ar}}, \text{CH}_{\text{ar}}$), 128.5 (CH_{ar}), 137.8 (C_{ar}), 140.0 ($\text{C}_{\text{ar-CH}_3}$), 153.1 (CH_{ar}), 154.5 ($\text{CH}_{\text{ar-N}}$), 169.3 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3194, 3037, 1560, 1520, 1437; MS (EI) m/z : 274 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 275.04121 (Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}_2$: 275.04251); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}_2\cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: C, 51.85; H, 3.77; N, 20.16; S, 23.07. Found: C, 52.03; H, 3.73; N, 19.90; S, 22.53.; mp: 218-220°C (dec.).

2-Amino-5-isopropyl-3-methoxycarbonylthiophene (12c)^{29a)}

化合物 **12a** の合成法に従い、化合物 **11c** より標記化合物 **12c** (quant.) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.24 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 2.89 (1H, m), 3.79 (3H, s), 5.78 (2H, br), 6.62 (1H, s).

6-Isopropyl-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine (13c)

化合物 **13a** の合成法に従い、化合物 **12c** より標記化合物 **13c** (79%) を緑黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.39 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 3.20 (1H, qq, $J = 6.8, 6.8$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 8.00 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 8.23 (1H, d, $J = 6.7$ Hz).

4-Hydrazino-6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (14c)

化合物 **14a** の合成法に従い、**13c** より標記化合物 **14c** (52%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.31 (6H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.18 (1H, m), 4.55 (2H, br), 7.35 (1H, br), 8.30 (1H, s), 9.00 (1H, br); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 23.9 (2CH₃), 29.8 [CH(CH₃)₂], 113.6 (C_{ar}), 114.5 (CH_{ar}), 148.0 (C_{ar}), 153.0 (CH_{ar}), 157.3 (C_{ar}-N), 164.5 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3195, 2957, 1576, 1504, 1345, 1306, 1142; MS (ESI) *m/z*: 209 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 209.08350 (Calcd for C₉H₁₃N₄S: 209.08609); *Anal.* Calcd for C₉H₁₂N₄S: C, 51.90; H, 5.81; N, 26.90; S, 15.39. Found: C, 51.71; H, 5.84; N, 26.77; S, 15.41.; mp: 167-168°C.

Thiophene-2-carbaldehyde (6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (15c)

化合物 **1** の合成法に従い、**14c** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15c** (93%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.46 (6H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.97 (1H, qq, *J* = 6.8, 6.8 Hz), 7.09 (1H, dd, *J* = 4.9, 3.7 Hz), 7.26 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 7.40 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.85 (1H, br), 8.06 (1H, br), 8.46 (1H, br); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 23.7 (2CH₃), 29.9 [CH(CH₃)₂], 114.8 (CH_{ar}), 116.8 (C_{ar}), 127.9 (CH_{ar}), 128.0 (CH_{ar}), 129.6 (CH_{ar}), 138.3 (C_{ar}), 139.5 (CH-N), 148.7 (C_{ar}), 152.3 (CH_{ar}), 154.3 (CH_{ar}-N, C_{ar}), 154.4 (C_{ar}), 167.8 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3038, 2869, 1556, 1429, 1091; MS (EI) *m/z*: 302 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 303.07311 (Calcd for C₁₄H₁₅N₄S₂: 303.07381); *Anal.* Calcd for C₁₄H₁₄N₄S₂: C, 55.60; H, 4.67; N, 18.53; S, 21.21. Found: C, 55.47; H, 4.57; N, 18.63; S, 20.88.; mp: 167-168°C.

2-Amino-5-*tert*-butyl-3-methoxycarbonylthiophene (12d)

化合物 **12a** の合成法に従い、化合物 **11d** より標記化合物 **12d** (96%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.29 (9H, s), 3.79 (3H, s), 5.76 (2H, br), 6.62 (1H, s); IR (KBr) cm⁻¹: 2951, 1716, 1614, 1527, 1231, 1144; MS (ESI) *m/z*: 214 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 214.08918 (Calcd for C₁₀H₁₆NO₂S: 214.09017); mp: 165-167°C (dec.).

6-*tert*-Butyl-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine (13d)

化合物 **13a** の合成法に従い、化合物 **12d** より標記化合物 **13d** (88%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.43 (9H, s), 7.21 (1H, s), 8.01 (1H, s), 12.15 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 32.1 (3CH₃), 35.1 [(CH₃)₃C], 114.8 (CH_{ar}), 124.6 (C_{ar}), 142.9 (CH_{ar}), 156.6 (C_{ar}), 160.1 (C_{ar}), 164.3 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2957, 2866, 1650, 1582, 1368, 1270, 1168; MS (ESI) m/z : 209 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 209.07370 (Calcd for C₁₀H₁₃N₂OS: 209.07486); *Anal.* Calcd for C₁₀H₁₂N₂OS: C, 57.67; H, 5.81; N, 13.45; S, 15.40. Found: C, 57.88; H, 5.98; N, 13.46; S, 15.68.; mp: 180-182°C.

6-*tert*-Butyl-4-hydrazinothieno[2,3-*d*]pyrimidine (14d)

化合物 **14a** の合成法に従い、化合物 **13d** より標記化合物 **14d** (36%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.43 (9H, s), 6.89 (1H, s), 8.49 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 32.0 (CH₃) 35.1 [C(CH₃)₃], 110.5 (CH_{ar}), 115.4 (C_{ar}), 152.9 (CH_{ar}), 155.9 (C_{ar}), 158.0 (C_{ar}-N), 165.6 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3233, 2948, 1576, 1440, 1345, 1305, 872; MS (EI) m/z : 222 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 223.10077 (Calcd for C₁₀H₁₅N₄S: 223.10174); *Anal.* Calcd for C₁₀H₁₄N₄S·0.1H₂O: C, 53.59; H, 6.39; N, 25.00; S, 14.31. Found: C, 53.59; H, 6.29; N, 25.24; S, 14.30.; mp: 180-182°C.

Thiophene-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (15d)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15d** (71%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.51 (9H, s), 7.08 (1H, dd, $J = 5.1, 3.0$ Hz), 7.24 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 7.39 (1H, d, $J = 4.6$ Hz), 7.89 (1H, br), 8.05 (1H, br), 8.46 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , TMS) δ : 32.0 [(CH₃)₃C], 35.1 [(CH₃)₃C], 115.9 (C_{ar}), 116.7 (CH_{ar}), 127.1 (CH_{ar}), 127.6 (CH_{ar}), 128.5 (CH_{ar}), 137.6 (CH-N), 140.0 (C_{ar}), 152.2 (CH_{ar}), 154.0 (C_{ar}), 154.8 (C_{ar}-N), 168.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3205, 3059, 2958, 1581, 1558, 1435; MS (EI) m/z : 316 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 317.08781 (Calcd for C₁₅H₁₇N₄S₂: 317.08946); *Anal.* Calcd for C₁₅H₁₆N₄S₂: C, 56.93; H, 5.10; N, 17.71; S, 20.27. Found: C, 57.33; H, 5.08;

N, 17.52; S, 20.27.; mp: 218-220°C (dec.).

2-Amino-5-benzyl-3-methoxycarbonylthiophene (12e)

化合物 **12a** の合成法に従い、化合物 **11e** より粗生成物として標記化合物 **12e** を褐色油状物質として得、引き続き次の反応に供した。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.83 (3H, s), 5.80 (2H, br), 6.66 (1H, s), 7.19-7.32 (5H, m).

6-Benzyl-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine (13e)

化合物 **13a** の合成法に従い、化合物 **12e** より標記化合物 **13e** (2steps 18%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.18 (2H, s), 7.16 (1H, t, $J = 1.2$ Hz), 7.23-7.36 (5H, m), 7.96 (1H, s), 8.23 (1H, d, $J = 13.4$ Hz).

6-Benzyl-4-hydrazinothieno[2,3-*d*]pyrimidine (14e)

化合物 **14a** の合成法に従い、化合物 **13e** より標記化合物 **14e** (57%) を淡褐色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 4.20 (2H, s), 4.56 (2H, br), 7.24-7.37 (6H, m), 8.29 (1H, s), 9.06 (1H, br).

Thiophene-2-carbaldehyde (6-benzylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (15e)

化合物 **1** の合成法に従い、**14e** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15e** (76%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.26 (2H, s), 7.06 (1H, dd, $J = 4.6, 3.7$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 7.27-7.40 (6H, m), 7.74 (1H, br), 8.00 (1H, br), 8.44 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 37.2 (CH_2), 115.9 (C_{ar}), 120.4 (CH_{ar}), 126.8 (CH_{ar}), 127.0 (CH_{ar}), 127.6 (CH_{ar}), 128.3 (CH_{ar}), 128.8 ($\text{CH}_{\text{ar}}, \text{CH}_{\text{ar}}$), 129.0 ($\text{CH}_{\text{ar}}, \text{CH}_{\text{ar}}$), 137.8 (C_{ar}), 138.9 (C_{ar}), 140.1 (CH-N), 140.9 (C_{ar}), 152.4 (CH_{ar}), 154.8 ($\text{CH}_{\text{ar}}\text{-N}$), 169.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3190, 2974, 1589, 1560, 1441; MS (EI) m/z : 350 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 351.07448 (Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{S}_2$: 351.07381); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}_2$: C, 61.69; H, 4.03; N, 15.99; S, 18.30. Found: C, 61.83; H, 4.10; N, 15.97; S, 18.24.; mp: 217-220°C (dec.).

2-Amino-4-ethyl-3-methoxycarbonyl-5-methylthiophene (**12f**)^{29b)}

化合物 **12a** の合成法に従い、化合物 **11f** より粗生成物として標記化合物 **12f** を褐色油状物質として得、引き続き次の反応に供した。

5-Ethyl-6-methyl-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine (**13f**)

化合物 **13a** の合成法に従い、化合物 **12f** より標記化合物 **13f** (2steps 59%) を褐色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.19 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.44 (3H, s), 2.96 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 7.96 (1H, s), 12.06 (1H, br); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 12.8 (CH₃), 15.1 (CH₃), 20.7 (CH₂), 123.4 (C_{ar}), 130.9 (C_{ar}), 136.0 (C_{ar}), 142.7 (CH_{ar}), 160.0 (C_{ar}), 163.5 (C_{ar}-O); IR (KBr) cm⁻¹: 3162, 2927, 1647, 1579, 1363; MS (ESI) *m/z*: 195 (M⁺+1); HRMS (ESI) *m/z*: 195.05905 (Calcd for C₉H₁₁N₂OS: 195.05921); *Anal.* Calcd for C₉H₁₀N₂OS: C, 55.65; H, 5.19; N, 14.42; S, 16.51. Found: C, 55.33; H, 5.28; N, 14.21; S, 16.41.; mp: 180-182°C (dec.).

5-Ethyl-4-hydrazino-6-methylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (**14f**)

化合物 **14a** の合成法に従い、化合物 **13f** より標記化合物 **14f** (35%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.25 (3H, t, *J* = 7.8 Hz), 2.61 (3H, s), 2.78 (2H, q, *J* = 7.8 Hz), 4.22 (2H, br), 6.55 (1H, br), 8.48 (1H, s); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 13.2 (CH₃), 15.2 (CH₃), 21.6 (CH₂), 115.8 (C_{ar}), 129.8 (C_{ar}), 130.8 (C_{ar}), 152.4 (CH_{ar}), 158.4 (C_{ar}-N), 165.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3300, 2961, 1551, 1503, 1166; MS (ESI) *m/z*: 209 (M⁺+1); HRMS (ESI) *m/z*: 209.08515 (Calcd for C₉H₁₃N₄S: 209.08609); *Anal.* Calcd for C₉H₁₂N₄S: C, 50.80; H, 5.92; N, 26.33; S, 15.07. Found: C, 50.83; H, 5.76; N, 26.52; S, 15.12.; mp: 170-171°C.

Thiophene-2-carbaldehyde (5-ethyl-6-methylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl) hydrazone (**15f**)

化合物 **1** の合成法に従い、**14f** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15f** (9%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.24 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.46 (3H, s), 3.31 (2H, q, *J* = 7.3 Hz),

7.10 (1H, dd, $J = 5.1, 3.9$ Hz), 7.42 (1H, dd, $J = 3.7, 0.7$ Hz), 7.57 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 7.74 (1H, s), 7.95 (1H, s); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 12.9 (CH_3), 14.9 (CH_3), 20.9 (CH_2), 120.1 (C_{ar}), 127.6 (CH_{ar}), 127.8 (CH_{ar}), 129.9 (CH_{ar}), 130.5 (C_{ar}), 136.1 (C_{ar}), 140.6 (C_{ar}), 141.1 (CH-N), 148.1 (CH_{ar}), 148.3 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 156.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3059, 2960, 1608, 1558, 1533, 1020; MS (ESI) m/z : 303 ($\text{M}^+ + 1$); HRMS (ESI) m/z : 303.07366 (Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{S}_2$: 303.07381); *Anal.* calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}_2 \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C, 55.27; H, 4.65; N, 18.42; S, 21.08. Found: C, 55.25; H, 4.65; N, 18.34; S, 21.00.; mp: 161-163°C (dec.).

2-Amino-3-methoxycarbonyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzo(b)thiophene (12g)^{29b)}

化合物 **12a** の合成法に従い、化合物 **11g** より標記化合物 **12g** (53%) を無色固体として得た。

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.75 (4H, m), 2.49 (2H, m), 2.68 (2H, m), 3.78 (3H, s), 5.92 (2H, br).

4-Oxo-5,6,7,8-tetrahydrobenzo(b)thieno[2,3-d]pyrimidine (13g)

化合物 **13a** の合成法に従い、化合物 **12g** より標記化合物 **13g** (98%) を淡黄色固体として得た。

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.87 (4H, m), 2.79 (2H, m), 3.03 (2H, m), 7.93 (1H, s), 8.22 (1H, br).

4-Hydrazino-5,6,7,8-tetrahydrobenzo(b)thieno[2,3-d]pyrimidine (14g)

化合物 **14a** の合成法に従い、化合物 **13g** より標記化合物 **14g** (33%) を淡黄色固体として得た。

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.90 (4H, m), 2.81 (2H, m), 2.89 (2H, m), 4.15 (2H, br), 6.50 (1H, br), 8.46 (1H, s).

Thiophene-2-carbaldehyde

(5,6,7,8-tetrahydrobenzo(b)thieno[2,3-d]pyrimidine-4-yl)hydrazone (15g)

化合物 **1** の合成法に従い、**14f** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15g** (65%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.91 (4H, br), 2.82 (2H, br), 3.05 (2H, br), 3.33 (2H, br), 7.08 (1H, m), 7.40 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 4.7 Hz), 7.71 (1H, s), 7.95 (1H, s.); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 21.9 (CH₂), 22.3 (CH₂), 24.6 (CH₂), 26.5 (CH₂), 118.7 (C_{ar}), 127.7 (CH_{ar}), 128.2 (CH_{ar}), 130.4 (CH_{ar}), 130.7 (C_{ar}), 132.2 (C_{ar}), 140.0 (C_{ar}), 143.9 (CH-N), 147.5 (CH_{ar}), 148.2 (C_{ar}-NH), 157.1 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 2918, 1614, 1562, 1537; MS (EI) *m/z*: 314 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 315.07214 (Calcd for C₁₅H₁₅N₄S₂: 315.07381); *Anal.* calcd for C₁₅H₁₄N₄S₂: C, 57.30; H, 4.49; N, 17.82; S, 20.40. Found: C, 57.00; H, 4.20; N, 17.92; S, 20.64.; mp: 78-80°C (dec.).

Thiophen-2-carbaldehyde 1-(5-methylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (15h)

化合物 **1** の合成法に従い、市販の 4-ヒドラジノ-5-メチルチエノ[2,3-*d*]ピリミジン **14h** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15h** (29%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.61 (3H, s), 6.80 (1H, s), 7.08 (1H, dt, *J* = 3.7, 1.7 Hz), 7.29 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 7.36 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 7.72 (1H, s), 8.16 (1H, s), 10.29 (1H, br); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 17.6 (CH₃) 118.3 (CH_{ar}), 120.0 (C_{ar}), 127.6 (CH_{ar}), 128.0 (CH_{ar}), 130.2 (CH_{ar}), 134.6 (C_{ar}-CH₃), 140.3 (C_{ar}), 142.0 (CHN), 148.6 (CH_{ar}), 149.2 (C_{ar}-N), 159.8 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 1620, 1566, 1045. MS (EI) *m/z*: 274 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 275.03840 (Calcd for C₁₂H₁₀N₄S₂: 275.04251); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₀N₄S₂: C, 52.53; H, 3.67; N, 20.42; S, 23.37. Found: C, 52.25; H, 3.66; N, 20.17; S, 23.23.; mp: 152-155°C (dec.).

2-Amino-3-aminocarbonyl-5-ethylthiophene (16)^{29b)}

窒素雰囲気下、室温にてトリエチルアミン (20.9 mL, 150 mmol) およびジメチルホルムアミド (23.2 mL, 300 mmol) の混合溶液に、シアノアセトアミド (12.6 g, 150 mmol) およびブチルアルデヒド (13.5 mL, 150 mmol) を加え 15 分間攪拌し、硫黄 (4.80 g, 150 mmol) を加えさらに 67 時間攪拌した。反応液に水を加えた後、酢酸エチルにて希釈抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム : アセトン = 20 : 1-5 : 1 にて溶出して、標記化合物 **16** (16.8 g, 62%) を

粗生成物として赤褐色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.23 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.62 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 5.34 (2H, br), 6.04 (2H, br), 6.35 (1H, t, $J = 1.2$ Hz).

2-Acetylamino-3-(*N*-acetylaminocarbonyl)-5-ethylthiophene (17a)

化合物 **16** (10.1 g, 55.4 mmol) を無水酢酸 (150 mL) に溶解し、7.5 時間加熱還流した。反応液を室温に戻した後、過剰量の無水酢酸を減圧濃縮し、エタノールで共沸した。酢酸エチル-*n*-ヘキサン-Et₂O 混液にて再結晶精製し、析出した結晶をろ取した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン：酢酸エチル = 3 : 1 にて溶出して、再結晶で得られた固体と合わせ、標記化合物 **17a** (3.35 g, 24%) を淡褐色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.30 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.29 (3H, s), 2.57 (3H, s), 2.75 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 6.64 (1H, s), 8.22 (1H, br), 11.37 (1H, br).

6-Ethyl-2-methyl-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine (13i)

化合物 **17a** (3.35 g, 13.2 mmol) の無水エタノール溶液 (70 mL) に、室温にてナトリウムエトキシド (2.69 g, 39.6 mmol) を加え 100°C にて 3.5 時間加熱還流した。反応液を室温に戻し、減圧下にて溶媒を留去し、水を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去し、標記化合物 **13i** (1.45 g, 57%) を褐色固体として得た。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.35 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.55 (3H, s), 2.87 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 7.13 (1H, d, $J = 1.1$ Hz).

4-Hydrazino-6-ethyl-2-methylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (14i)

化合物 **14a** の合成法に従い、化合物 **13i** より標記化合物 **14i** (97%) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.35 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 1.74 (2H, br), 2.63 (3H, s), 2.89 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 6.44 (1H, br), 6.84 (1H, s).

Thiophene-2-carbaldehyde (6-ethyl-2-methylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)

hydrazone (15i)

化合物 **1** の合成法に従い、**14i** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15i** (65%) を淡褐色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.43 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.59 (3H, d, $J = 1.7$ Hz), 2.95 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 7.08 (1H, dd, $J = 4.9, 3.4$ Hz), 7.24 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 7.37 (1H, dd, $J = 4.9, 0.7$ Hz), 7.75 (1H, br), 8.01 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 14.5 (CH_3), 23.4 (CH_3), 24.9 (CH_2), 112.6 (C_{ar}), 117.8 (CH_{ar}), 127.8 (CH_{ar}), 128.0 (CH_{ar}), 129.3 (CH_{ar}), 137.9 (C_{ar}), 139.6 (CH-N), 141.8 (C_{ar}), 154.2 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 161.0 (C_{ar}), 168.8 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3178, 2966, 1560, 1520, 1149; MS (EI) m/z : 302 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 303.07205 (Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{S}_2$: 303.07381); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}_2 \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: C, 54.79; H, 4.76; N, 18.25; S, 20.89. Found: C, 54.48; H, 4.64; N, 18.30; S, 21.15.; mp: 134-139°C (dec.).

3-Aminocarbonyl-2-benzoylamino-5-ethylthiophene (17b)

化合物 **16** (1.82 g, 10.0 mmol) のベンゼン溶液 (55 mL) に、室温にてトリエチルアミン (5.5 mL, 40.0 mmol)、ベンゾイルクロリド (1.74 mL, 15.0 mmol) を加え、100°Cにて3時間加熱還流した。反応液を室温に戻して、析出した結晶をろ取り、減圧下、50°Cにて6時間乾燥し、標記化合物 **17b** (2.78 g, quant.) を淡褐色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.33 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.80 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 6.71 (1H, t, $J = 1.0$ Hz), 7.36 (1H, s), 7.50-7.57 (3H, m), 8.02 (2H, dd, $J = 7.1, 1.4$ Hz).

6-Ethyl-4-oxo-2-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (13j)

化合物 **17b** (2.78 g, 10.1 mmol) へ2規定水酸化ナトリウム溶液 (50 mL) を加え、100°Cにて2時間加熱還流した。反応液を室温に戻し、1規定塩酸を加え析出した粗結晶をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン：酢酸エチル = 2 : 1-1 : 1 溶出により、標記化合物 **13j** (650 mg, 25%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.39 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.91 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 7.25 (1H, s), 7.55 (3H, m), 8.11 (2H, m), 11.09 (1H, br).

4-Hydrazino-6-ethyl-2-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (14j)

化合物 **14a** の合成法に従い、化合物 **13j** より標記化合物 **14j** (60%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.38 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.92 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 4.28 (2H, br), 6.36 (1H, br), 6.85 (1H, s), 7.45 (3H, m), 8.47 (2H, m).

Thiophene-2-carbaldehyde

(6-ethyl-2-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (15j)

化合物 **1** の合成法に従い、**14j** および 2-チオフェンカルボアルデヒドより標記化合物 **15j** (56%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.47 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.00 (2H, q, $J = 7.6$ Hz), 7.07 (1H, dd, $J = 5.1, 4.1$ Hz), 7.24 (1H, br), 7.37 (1H, d, $J = 4.9$ Hz), 7.46 (3H, m), 7.82 (1H, s), 7.93 (1H, br), 8.41 (2H, d, $J = 6.8$ Hz), 9.10 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 14.9 (CH_3), 24.5 (CH_2), 114.7 (C_{ar}), 118.4 (CH_{ar}), 127.2 (CH_{ar}), 127.5 (2CH_{ar}), 128.1 (CH_{ar}), 128.6 (3CH_{ar}), 130.2 (CH_{ar}), 137.0 (C_{ar}), 137.9 (C_{ar}), 139.4 (CH-N), 144.6 (C_{ar}), 154.6 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 158.5 (C_{ar}), 170.6 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3184, 2968, 1570, 1552, 1402; MS (EI) m/z : 364 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 365.08788 (Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{S}_2$: 365.08946); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}_2 \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: C, 61.85; H, 4.51; N, 15.18; S, 17.38. Found: C, 61.95; H, 4.28; N, 15.34; S, 18.03.; mp: 161-163°C (dec.).

(1E)-1-(2-Thienyl)ethanone (6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (15k)

化合物 **14c** (208 mg, 1.0 mmol) および 2-アセチルチオフェン (0.11 mL, 1.0 mmol) の無水ベンゼン溶液 (4 mL) を 100°C に加温し 2 時間攪拌した。反応がほとんど進行しなかったため、反応溶媒をトルエン (4 mL) に置換し 140°C に昇温しさらに 2 時間攪拌した。反応液を室温に戻し、溶媒を留去した。得られた粗結晶をクロロホルム-*n*-ヘキサンにて再結晶精製し、標記化合物 **15k** (109 mg, 34%) を褐色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.47 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 2.36 (3H, s), 3.28 (1H, qq, $J = 6.8, 6.8$ Hz), 7.07 (1H, dd, $J = 4.9, 3.9$ Hz), 7.28 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 7.36 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 7.94 (1H, s), 8.46 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 12.6 (CH_3) 24.2 [$(\text{CH}_3)_2\text{CH}$], 30.8

[CH(CH₃)₂], 116.2 (C_{ar}), 117.0 (CH_{ar}), 126.1 (CH_{ar}), 127.4 (2CH_{ar}), 143.0 (C_{ar}), 143.7 [C(CH₃)N], 150.7 (C_{ar}), 151.9 (CH_{ar}), 154.3 (C_{ar}-N), 169.4 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3199, 2960, 1552, 1516, 1120; MS (EI) *m/z*: 316 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 317.08907 (Calcd for C₁₅H₁₇N₄S₂: 317.08946); *Anal.* Calcd for C₁₅H₁₆N₄S₂: C, 56.93; H, 5.10; N, 17.71; S, 20.27. Found: C, 56.61; H, 5.00; N, 17.75; S, 20.34.; mp: 120-122°C (dec.).

6-Isopropyl-4-[3-(2-thienyl)pyrazolyl]thieno[2,3-*d*]pyrimidine (15l)

窒素雰囲気下、化合物 **15k** (49 mg, 0.15 mmol) の無水 THF 溶液 (0.6 mL) を 0 °C に冷却し攪拌した。この反応液に同温にて、*n*-ブチルリチウム (1.57M ヘキサン溶液) (0.19 mL, 0.30 mmol) を加え 15 分間攪拌し、さらにぎ酸エチル (12 μL, 0.15 mmol) を加え 20 分間攪拌した。続いてこの反応液に 0 °C にて 1 規定塩酸を加え、pH2 に調製し、1 時間加熱還流した。反応液を室温に戻した後、飽和炭酸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にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣をプレパラティブシリカゲルクロマトグラフィに付し、*n*-ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1 溶出により得られた分画を濃縮した。続いて Et₂O-*n*-ヘキサンにて再結晶精製し、標記化合物 **15l** (26 mg, 80%) を無色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.48 (6H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.35 (1H, qq, *J* = 6.8, 6.8 Hz), 6.77 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.13 (1H, dd, *J* = 4.9, 3.7 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.48 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 8.24 (1H, s), 8.78 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.78 (1H, s); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 24.1 (2CH₃), 31.1 [CH(CH₃)₂], 106.0 (CH_{ar}), 117.3 (CH_{ar}), 119.6 (C_{ar}), 125.3 (CH_{ar}), 126.0 (CH_{ar}), 127.7 (CH_{ar}), 130.1 (CH_{ar}), 135.7 (C_{ar}), 149.3 (C_{ar}), 150.7 (C_{ar}-N), 151.5 (CH_{ar}), 154.2 (C_{ar}), 171.2 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 2960, 1505, 1454, 1379; MS (EI) *m/z*: 326 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 327.07451 (Calcd for C₁₆H₁₅N₄S₂: 327.07381); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₄N₄S₂: C, 58.87; H, 4.32; N, 17.16; S, 19.65. Found: C, 59.00; H, 4.14; N, 17.12; S, 19.53.; mp: 128-130 °C (dec.).

(1*E*)-2,2-Dimethylpropanal (6-ethylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (18)

化合物 **1** の合成法に従い、**14a** およびピバロイルアルデヒドより標記化合物 **18** (47%) を無色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.15 (9H, s), 1.30 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.88 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 7.47 (1H, s), 7.71 (1H, s), 8.33 (1H, s), 11.25 (1H, br); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 14.5 (CH₃), 23.4 (CH₂), 27.3 [(CH₃)₃C], 34.6 [C(CH₃)₃], 114.7 (CH_{ar}), 118.2 (C_{ar}), 142.4 (C_{ar}), 152.2 (CH-N), 154.8 (C_{ar}-NH), 155.1 (CH_{ar}), 167.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3192, 3059, 2964, 1576, 1664; MS (EI) *m/z*: 262 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 263.13429 (Calcd for C₁₃H₁₈N₄S: 263.13304); *Anal.* calcd for C₁₃H₁₈N₄S: C, 59.51; H, 6.91; N, 21.35; S, 12.22. Found: C, 59.18; H, 6.87; N, 21.36; S, 12.06.; mp: 165-168°C (dec.).

Cyclopropancarbaldehyde (6-ethylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (19)

化合物 **1** の合成法に従い、**14a** およびシクロプロパンカルボアルデヒドより標記化合物 **19** (53%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.78 (2H, m), 0.98 (2H, m), 1.39 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.81 (1H, m), 2.93 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 7.61 (1H, br), 8.38 (1H, br), 8.82 (1H, br); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 6.16 (2CH₂), 13.6 (CH₃), 15.0 (CH), 23.4 (CH₂), 114.6 (CH_{ar}), 118.2 (C_{ar}), 142.4 (C_{ar}), 150.9 (CH-N), 152.4 (CH_{ar}), 154.3 (C_{ar}-NH), 167.6 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3197, 3059, 1593, 1566, 1537, 1437; MS (EI) *m/z*: 246 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 247.09857 (Calcd for C₁₂H₁₅N₄S: 247.10174); mp: 142-144°C (dec.).

2-Pyridinecarbaldehyde (6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (20)

化合物 **1** の合成法に従い、**14c** および 2-ピリジンカルボアルデヒドより標記化合物 **20** (74%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.45 (6H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.30 (1H, qq, *J* = 6.8, 6.8 Hz), 7.29 (1H, dd, *J* = 6.8, 5.1 Hz), 7.80 (2H, m), 7.97 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 8.04 (1H, s), 8.53 (1H, s), 9.64 (1H, d, *J* = 4.6 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 23.9 (2CH₃), 30.0 [CH(CH₃)₂], 115.0 (C_{ar}), 119.3 (CH_{ar}), 123.8 (CH_{ar}), 128.2 (CH_{ar}), 136.8 (CH_{ar}), 144.1 (CH-N), 149.6 (CH_{ar}), 152.4 (CH_{ar}), 153.3 (C_{ar}-N, C_{ar}), 154.4 (C_{ar}), 167.9 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3195, 2966, 1552, 1431, 1356; MS (EI) *m/z*: 297 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 298.11038 (Calcd for C₁₅H₁₆N₅S: 298.11264); *Anal.* Calcd for C₁₅H₁₅N₅S: C, 60.58; H, 5.08; N, 23.55; S, 10.78. Found: C, 60.74; H, 5.07; N, 23.19; S, 11.05.; mp: 196-201°C (dec.).

3-Pyridinecarbaldehyde (6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (21)

化合物 **1** の合成法に従い、**14c** および 3-ピリジンカルボアルデヒドより標記化合物 **21** (41%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.45 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 3.31 (1H, qq, $J = 6.8, 6.8$ Hz), 7.40 (1H, dd, $J = 7.8, 4.6$ Hz), 7.75 (1H, s), 7.93 (1H, s), 8.02 (1H, dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz), 8.64 (1H, dt, $J = 4.9, 1.7$ Hz), 8.93 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 24.2 [$(\text{CH}_3)_2\text{CH}$], 30.7 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 115.9 (C_{ar}), 116.3 (CH_{ar}), 123.7 (CH_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 133.2 (CH_{ar}), 140.7 (C_{ar}), 148.3 (CH-N), 150.0 (CH_{ar}), 150.4 (CH_{ar}), 151.8 (C_{ar}), 154.5 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 168.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2965, 1550, 1430, 1354; MS (EI) m/z : 297 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 298.11060 (Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{S}$: 298.11264); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}\cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: C, 59.68; H, 5.18; N, 23.20; S, 10.62. Found: C, 59.41; H, 4.95; N, 23.60; S, 10.99.; mp: 218°C (dec.).

4-Pyridinecarbaldehyde (6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (**22**)

化合物 **1** の合成法に従い、**14c** および 4-ピリジンカルボアルデヒドより標記化合物 **22** (95%) を黄白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.46 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 3.32 (1H, qq, $J = 6.8, 6.8$ Hz), 7.55 (1H, d, $J = 4.9$ Hz), 7.75 (1H, s), 7.83 (1H, s), 8.52 (1H, s), 8.70 (2H, d, $J = 4.9$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 23.8 (2 CH_3), 30.0 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 115.0 (CH_{ar}), 116.1 (C_{ar}), 120.4 (2 CH_{ar}), 141.2 (C_{ar}), 141.5 (CH-N), 149.9 (C_{ar}), 150.2 (2 CH_{ar}), 152.3 (CH_{ar}), 154.3 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 167.9 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3184, 2964, 1558, 1531, 1435; MS (EI) m/z : 297 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 298.11024 (Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{S}$: 298.11264); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}$: C, 60.58; H, 5.08; N, 23.55; S, 10.78. Found: C, 60.28; H, 5.06; N, 23.77; S, 10.79.; mp: 217-219°C (dec.).

Benzaldehyde (6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (**23**)

化合物 **1** の合成法に従い、**14c** およびベンズアルデヒドより標記化合物 **23** (83%) を黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.45 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 3.20 (1H, qq, $J = 6.8, 6.8$ Hz), 7.44 (3H, m), 7.71 (2H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz), 7.84 (1H, br), 7.89 (1H, br), 8.48 (1H, br), 8.98 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 23.8 (2 CH_3), 29.9 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 114.8 (CH_{ar}), 116.6 (C_{ar}), 126.4 (2 CH_{ar}), 128.9 (2 CH_{ar}), 129.5 (CH_{ar}), 134.5 (C_{ar}), 143.8 (CH-N), 148.9 (C_{ar}),

152.4 (C_{ar}), 154.5 (C_{ar}-N), 167.7 (C_{ar}); IR(KBr) cm⁻¹: 3184, 3030, 1570, 1552, 1402; MS (EI) *m/z*: 296 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 297.11517 (Calcd for C₁₆H₁₇N₄S: 297.11739); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₆N₄S: C, 64.84; H, 5.44; N, 18.90; S, 10.82. Found: C, 65.09; H, 5.43; N, 18.85; S, 10.79.; mp: 208-212°C (dec.).

2-Furaldehyde (6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (24)

化合物 **1** の合成法に従い、**14c** および 2-フルフラール (2-フランアルデヒド) より標記化合物 **24** (43%) を褐色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.44 (6H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.29 (1H, qq, *J* = 6.8, 6.8 Hz), 6.53 (1H, dd, *J* = 3.4, 2.4 Hz), 6.74 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 7.86 (1H, s), 7.90 (1H, br), 8.38 (1H, s); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 24.2 (2CH₃), 30.9 (CH), 112.0 (CH_{ar}), 112.3 (CH_{ar}), 116.5 (C_{ar}), 116.9 (CH_{ar}), 133.5 (CH-N), 144.3 (CH_{ar}), 149.7 (CH_{ar}), 150.5 (C_{ar}), 151.2 (C_{ar}-N), 153.8 (C_{ar}), 168.2 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3431, 2960, 1589, 1564, 1435; MS (ESI) *m/z*: 287 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 287.09672 (Calcd for C₁₄H₁₅N₄OS: 287.09666); *Anal.* Calcd for C₁₄H₁₄N₄OS·0.5H₂O: C, 56.93; H, 5.12; N, 18.97; S, 10.86. Found: C, 56.93; H, 4.99; N, 19.00; S, 10.70.; mp: 184-189°C (dec.).

3-Pyridinecarbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (25)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** および 3-ピリジンカルボアルデヒドより標記化合物 **25** (85%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.50 (9H, s), 7.39 (1H, dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz), 7.80 (1H, br), 7.91 (1H, br), 8.02 (1H, dt, *J* = 8.1, 1.7 Hz), 8.50 (1H, br), 8.62 (1H, dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz), 8.92 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 9.18 (1H, br); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 31.9 [(CH₃)₃C], 35.0 [C(CH₃)₃], 115.7 (C_{ar}), 123.7 (CH_{ar}), 128.3 (C_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 133.0 (CH_{ar}), 140.1 (C_{ar}), 148.3 (CH-N), 150.0 (CH_{ar}), 152.3 (CH_{ar}), 154.3 (C_{ar}-N), 154.8 (C_{ar}), 168.6 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3199, 2964, 1552, 1432, 1356; MS (EI) *m/z*: 311 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 312.12756 (Calcd for C₁₆H₁₇N₅S: 312.12829); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₇N₅S: C, 61.71; H, 5.50; N, 22.49; S, 10.30. Found: C, 61.73; H, 5.49; N, 22.60; S, 10.31.; mp: 247°C (dec.).

5-Methylpyridine-2-carbaldehyde [6-(*tert*-butyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl]-

hydrazone (26)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** および 5-メチルピリジン-2-アルデヒドより標記化合物 **26** (77%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 2.40 (3H, s), 7.60 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.84 (1H, s), 7.89 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.99 (1H, s), 8.47 (1H, s), 8.51 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.4 (CH_3), 31.9 [$(\text{CH}_3)_3\text{C}$], 35.0 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 115.8 (C_{ar}), 115.9 (CH_{ar}), 119.3 (CH_{ar}), 133.3 (C_{ar}), 137.0 (CH-N), 144.0 (C_{ar}), 149.8 (CH_{ar}), 151.3 (C_{ar}), 152.5 (CH_{ar}), 154.2 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 154.8 (C_{ar}), 168.5 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2965, 1556, 1427, 1348, 1157, 1120; MS (FAB) m/z : 326 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 326.14502 (Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{S}$: 326.14394); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{S}$: C, 62.74; H, 5.88; N, 21.52; S, 9.85. Found: C, 62.76; H, 5.88; N, 21.80; S, 9.68.; mp: 238-239°C (dec.).

6-Methylpyridine-2-carbaldehyde 6-(*tert*-butyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-ylhydrazone (27)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** および 6-メチルピリジン-2-アルデヒドより標記化合物 **27** (89%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.51 (9H, s), 2.60 (3H, s), 7.16 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.67 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.74-7.76 (1H, m), 7.87 (1H, br), 7.97 (1H, br), 8.51 (1H, br), 9.12 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 24.3 (CH_3), 32.0 [$(\text{CH}_3)_3\text{C}$], 35.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 115.7 (CH_{ar}), 116.3 (C_{ar}), 123.4 (CH_{ar}), 128.3 (CH_{ar}), 136.8 (CH_{ar}), 143.3 (C_{ar}), 152.0 (C_{ar}), 152.6 (CH-N), 154.2 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 155.3 ($\text{C}_{\text{ar-CH}_3}$), 158.6 (CH_{ar}), 169.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3191, 3052, 2900, 1679, 1587; MS (FAB) m/z : 326 ($\text{M}+\text{H}^+$); HRMS (ESI) m/z : 326.14179 (Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{S}$: 326.14394); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 59.45; H, 6.16; N, 20.39; S, 9.34. Found: C, 59.48; H, 5.97; N, 20.42; S, 9.66.; mp: 176-177°C.

6-(Aminomethyl)pyridine-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (28)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** (223 mg, 1.00 mmol) および 2-ホルミル-6-(フタルイミド)メチルピリジン (293 mg, 1.10 mmol) をトルエン (20 mL) に加え、ディーン-スターク脱水装置を用い 2 時間加熱還流した。反応液を濃縮後、得られた残渣をエタノールより固化し、フタルイミド体 (375 mg, 80%) を淡黄色固

体として得た。得られたフタルイミド体 (305 mg, 0.648 mmol) をエタノール (6 mL) に懸濁し、ヒドラジン・1水和物 (3 mL) を加え、60°C にて 3 時間攪拌した。放冷後、不溶物をろ去し、溶媒を減圧濃縮して得られた残渣にクロロホルムを加え、再び不溶物をろ去し、0.5 規定塩酸-エタノール溶液 (12 mL) を加え濃縮乾固させた。得られた残渣をメタノールから固化することにより標記化合物 **28** (155 mg, 63%) を淡黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.45 (9H, s), 4.22 (2H, s), 7.58 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.98 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 8.18 (1H, s), 8.21 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.55 (1H, s), 8.60 (2H, br), 8.76 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 80°C) δ : 31.3 (3CH₃), 34.6 [C(CH₃)₃], 42.6 (CH₂), 115.2 (CH_{ar}), 115.7 (C_{ar}), 115.9 (CH_{ar}), 122.7 (CH_{ar}), 137.4 (CH_{ar}), 137.5 (CH-N), 146.9 (C_{ar}), 152.2 (C_{ar}), 153.2 (C_{ar}), 155.7 (C_{ar}-N), 165.0 (C_{ar}), 165.9 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3396, 2962, 1637, 1587; MS (FAB) m/z : 341 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 341.15154 (Calcd for C₁₇H₂₁N₆S: 341.15484); *Anal.* Calcd for C₁₇H₂₀N₆S·2HCl: C, 49.40; H, 5.36; Cl, 17.15; N, 20.33; S, 7.76. Found: C, 49.71; H, 5.55; Cl, 17.01; N, 20.54; S, 7.79.; mp: 207-210°C (dec.).

6-[(Methylamino)methyl]pyridine-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (29)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** (120 mg, 0.54 mmol) および 2-[(*N-tert*-ブトキシカルボニル-*N*-メチル)アミノ]メチル-4-ホルミルピリジン (148 mg, 0.59 mmol) をベンゼン (20 mL) に加え、ディーン-スターク脱水装置を用い 3 時間加熱還流した。反応液を濃縮後、得られた残渣を 4 規定塩酸ジオキサン (4 mL) に溶解し 1 時間攪拌した。濃縮後、エタノールにて 3 回共沸、得られた残渣をエタノール-水から再結晶することにより標記化合物 **29** (195 mg, 81%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.45 (9H, s), 2.64 (3H, s), 4.33-4.36 (2H, m), 7.61 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 8.06 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 8.20 (1H, br), 8.42 (1H, br), 9.42 (2H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD₃OD) δ : 32.3 (3CH₃), 33.7 [C(CH₃)₃], 36.7 (CH₃), 53.1 (CH₂), 115.2 (C_{ar}), 116.7 (CH_{ar}), 122.7 (CH_{ar}), 125.6 (CH_{ar}), 139.6 (CH_{ar}), 143.9 (CH-N), 147.9 (C_{ar}), 153.3 (CH_{ar}), 153.0 (C_{ar}-N), 156.5 (C_{ar}), 162.7 (C_{ar}), 167.9 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3428, 3399, 1639, 1581; MS (ESI) m/z : 355 (M+H⁺); HRMS (ESI) m/z : 355.17128 (Calcd for

C₁₈H₂₃N₆S: 355.17049); *Anal.* Calcd for C₁₈H₂₂N₆S·2HCl·H₂O: C, 48.54; H, 5.88; Cl, 15.75; N, 18.87; S, 7.35. Found: C, 48.42; H, 5.92; Cl, 15.92; N, 18.94; S, 7.19.; mp: 237-239°C.

6-(Morpholin-4-ylmethyl)pyridine-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone (30)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** および 6-(モルホリノメチル)-2-ピリジンカルボアルデヒドより標記化合物 **30** (81%) を黄白色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.51 (9H, s), 2.56 (4H, br), 3.71 (2H, s), 3.77 (4H, t, *J* = 4.2 Hz), 7.46 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.76 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.84 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.85 (1H, s), 8.01 (1H, s), 8.52 (1H, s), 9.15 (1H, br); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 32.0 [(CH₃)₃C], 35.2 [C(CH₃)₃], 53.8 (2CH₃), 64.8 (CH₂-N), 67.0 (2CH₃), 115.7 (CH_{ar}), 116.2 (C_{ar}), 118.5 (CH_{ar}), 123.2 (CH_{ar}), 136.9 (CH_{ar}), 143.4 (CH-N), 152.1 (CH_{ar}), 152.9 (C_{ar}), 154.4 (C_{ar}-N), 155.3 (C_{ar}), 158.6 (C_{ar}), 169.3 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 2954, 2802, 1549, 1427, 1354, 1114; MS (FAB) *m/z*: 411 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 411.19791 (Calcd for C₂₁H₂₇N₆OS: 411.19670); *Anal.* Calcd for C₂₁H₂₆N₆OS: C, 61.44; H, 6.38; N, 20.47; S, 7.81. Found: C, 61.28; H, 6.41; N, 20.57; S, 7.90.; mp: 177-179°C.

6-Hydroxymethylpyridine-2-carbaldehyde 6-(*tert*-butyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl hydrazone (31)

化合物 **1** の合成法に従い、**14d** (100 mg, 0.45 mmol) および 2-(*tert* ブチルジメチルシリルオキシ)メチル-4-ホルミルピリジン (126 mg, 0.50 mmol) をベンゼン (20 mL) に加え、ディーン-スターク脱水装置を用い 1.5 時間加熱還流した。反応液を濃縮後、得られた残渣を THF (4 mL) に溶解し、テトラブチルアンモニウムフロリド (TBAF, 1M-THF 溶液) (1 mL, 1.0 mmol) を加え室温にて 1 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈、水、飽和食塩水の順に洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣をメタノールから再結晶することにより標記化合物 **31** (88 mg, 57%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.46 (9H, s), 4.60 (2H, s), 5.50 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 7.48 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.76 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.89-7.94 (2H, m), 8.23 (1H, s), 8.46 (1H, s), 12.02 (1H, br); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 31.5 [(CH₃)₃C], 34.7 [C(CH₃)₃], 64.0 (CH₂),

115.0 (C_{ar}), 117.7 (CH_{ar}), 120.0 (2CH_{ar}), 137.2 (CH_{ar}), 143.8 (CH-N), 152.2 (C_{ar}), 152.4 (C_{ar}), 153.5 (C_{ar}), 154.4 (C_{ar}-N), 162.2 (CH_{ar}), 167.9 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 2960, 2925, 1585; MS (FAB) *m/z*: 342 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 342.13842 (Calcd for C₁₇H₂₀N₅OS: 342.13886); *Anal.* Calcd for C₁₇H₁₉N₅OS·1.25H₂O: C, 56.10; H, 5.95; N, 19.24; S, 8.81. Found: C, 56.36; H, 5.63; N, 19.48; S, 9.21.; mp: 150-151°C.

6-(*tert*-Butyl)-4-(1-methylhydrazino)thieno[2,3-*d*]pyrimidine (14k)

化合物 **13d** (250 mg, 1.20 mmol) をエタノール (1 mL) および水 (4 mL) の混液に加え、室温にてメチルヒドラジン (1 mL) を加え 100°C に加温にして 2 時間攪拌した。反応液を水にて希釈、酢酸エチルにて抽出した。飽和食塩水にて洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣を酢酸エチル-*n*-ヘキサンにて再結晶し標記化合物 **14k** (225 mg, 79%) を無色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.42 (9H, s), 3.51 (3H, s), 4.17 (2H, br), 7.77 (1H, s), 8.38 (1H, s).

6-[(Dimethylamino)methyl]pyridine-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)(methyl)hydrazone (32)

化合物 **1** の合成法に従い、**14k** および 6-(ジメチルアミノ)メチルピリジン-2-カルボアルデヒドより標記化合物 **32** (73%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.49 (9H, s), 2.33 (6H, s), 3.63 (2H, s), 3.83 (3H, s), 7.37 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.73 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.91 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 8.03 (1H, s), 8.59 (1H, s); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 30.2 (CH₃), 31.6 [(CH₃)₃C], 34.7 [(CH₃)₃C], 45.2 (2CH₃), 65.1 (CH₂), 117.1 (C_{ar}), 118.1 (CH_{ar}), 118.9 (CH_{ar}), 122.4 (CH_{ar}), 137.1 (CH_{ar}), 140.1 (CH-N), 151.6 (CH_{ar}), 152.9 (C_{ar}), 153.2 (C_{ar}), 155.4 (C_{ar}-N), 159.5 (C_{ar}), 168.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 2960, 2761, 1583, 1546; MS (FAB) *m/z*: 383 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 383.20113 (Calcd for C₂₀H₂₇N₆S: 383.20179); *Anal.* Calcd for C₂₀H₂₆N₆S: C, 62.80; H, 6.85; N, 21.97; S, 8.38. Found: C, 62.84; H, 6.82; N, 21.96; S, 8.48.

本論第二章の実験

参照したX線結晶構造

蛋白質構造データバンク RCSB Protein Data Bank (PDB) に登録されている以下の結晶構造を利用した。

CDK2: PDB code; **1jst** (human cyclinA - Cdk2 - ATP complex)

部分的に活性化されている配座。T-ループ部位の Thr160 がリン酸化されている結晶構造。ATP-Mg²⁺を含む。

CDL6: PDB code; **1blx** (Cdk6-p19^{INK4d} complex)

不活性型配座。CDK4 タンパク質と相同性が非常に高く、ATP ポケットも再現できる、阻害タンパク質 p19^{INK4d} を含む。

アラインメント

CDK4 の一次構造は、タンパク質/アミノ酸配列データベース UniProtKB/Swiss-Prot より入手可能であった CDK4_HUMAN (code: **P11802**) のアミノ酸配列を利用した。**P11802** を利用した。CDK2 および CDK6 の配列は、**1jst** および **1blx** の情報を利用した。

マルチ・シークエンス・アラインメントには、CLUSTALW(1.4)を用いた。ホモロジーモデル構築時の InsightII 上でのアラインメントは、Homology >> Alignment >> Pairwise Sequence および Structure Module を用いた。

CDK ホモロジーモデリング

CDK4 ホモロジーモデルの作成には Accelrys Software Inc.社 InsightII を利用した。

マニュアルでの構築においては、Homology Module を利用した。LOOP 構造などの情報が無い場合は Loop Search を主体にして構築を行い、構造が大きく異なる場合は Loop Generate を利用して構築した。

構造全体の最適化計算および動力学計算は Discover_3 Module を利用した。電荷の割り付けは InsightII 標準の CVFF 力場を利用した。

得られた構造のロータマーをマニュアル補正し、構造検証には Homology

Module の ProStat を利用した。

なお、ProStat による構造の評価では、マニュアル構築モデルの Leu49, Pro109, Tyr167 において、Omega 値から cis-trans が反転していると予想されたが、構造的に重要な部分ではないことから補正を行っていない。

自動でのモデル構築には、Modeler Module を利用した。この Module は、アラインメント表が適切であれば、比較的信頼度の高いモデルを短時間で得ることができると言われている。そこで、Cdk6 と Cdk2 のアラインメントをマニュアル操作と同様に継ぎ接ぎすることで作成することとした (Table)。

Table: Multiple sequence alignment for Modeler Module (CDK4_auto)

```
BLX_A_:
JST_A_: MEN--FQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIRLDTETEG---VP
P11802: matsryepvaeigvgaygtvykardphsghfvalksrvvpnggggggglp

BLX_A_:                EHPNVVRLFDVCTVSRTDRETKLTLVFEHVDQDL
JST_A_: STAIREISLLKELN---HPNI |-----LVFEFLHQDL
P11802: istvreallrrleafehpnvvrldvcatsrtdreikvtlvfehvdqdl

BLX_A_: TTYLDKVPEPGVPTETIKDMMFQLLRGLDFLHSHRVVHRDLKPQNILVTS
JST_A_: |-----
P11802: rtyldkapppglpaetikdlmrqflrgldflhancivhrdlkpenilvts

BLX_A_: SGQIKLADFLGARI |-----SVVVTLWYRAPEVLLQSSYATPVDLWS
JST_A_: ---IKLADFLARAFGVPVRTY |HEVVTWYRAPE
P11802: ggtvkladflariysyqm-altpvvtlwyrapevllqstyatpvdmws

BLX_A_: VGCIFAEMFRRKPLFRGSSDQDLGKILDVIGLPGEDWPRDVALPRQAF
JST_A_:
P11802: vgcifaemfrrkplfcgnseadqlgkifdliglpddwprdvslprgaf
```

BLX_A_: HSKSAQPIEKFVTDIDELGKDLLLCLTFNPAKRISAYSALSHPYFQDLE

JST_A_:

P11802: pprgprpvqsvvpemeesgaqllemltfnphkrisafraqlqhsylhkde

BLX_A_: RCKEN

JST_A_:

P11802: gnpe

入力する PDB ファイルで必要な残基以外は vi などの editor で事前に削除した。また、今回マニュアル方法と同様に、ATP binding site 部分は **1jst** の構造を利用した。(末尾の数字は残基番号)

- Cdk2 上の PSTAIRE 部を再現するため 1 - 61
- ATP binding site の adenine 部環境を再現するため 80 - 85
- T-loop 上で cyclinA と相互作用 (vdW および H-bonds) しているアミノ酸を再現するため 164 - 183

他の構造が良く保存されている SCRs 部分には **1blx** の A 鎖を利用した。ただし、SPLICE 部分を用意しておかないと計算が破綻したため、実際は以下の残基を利用した。

- Cdk2 : 1 - 63, 78 - 87, 141 - 172
- Cdk6 : 72 - 100, 101 - 169, 178 - last

得られた構造のロータマーをマニュアル補正し、構造検証には Homology Module の ProStat を利用した。

低分子化合物の三次元安定コンフォメーション解析

Accelrys Software Inc. 社 InsightII の CDiscover Module を利用した。

電荷の割り付けは InsightII 標準の CVFF 力場および高精度パラメーター化された CFF91 (ClassII) 力場を利用した。非結合エネルギー計算アルゴリズムは、Cell Multipole 法を利用した。

分子力学計算のエネルギー最小化 (MM) での極小化アルゴリズムは、SteepestDescent/Conjugate Gradients/Newton-Raphson の組合せである Discover 標準のメソッドを利用した。

分子動力学 (MD) 計算では、Discover 標準のカノニカルアンサンブル NVT 法 (温度一定、体積一定) を利用し、数値積分アルゴリズム (Verlet Velocity 法) ・タイムステップ (1fs, 10-15 sec) および温度コントロール (Direct Velocity Scaling, 1fs) もデフォルト値を用いた。Run Time fs は 1000~10000 回、設定温度は、298K~2000K を用いた。

ドッキングスタディー

Accelrys Software Inc.社 InsightII の Docking Module および Schrödinger Inc.社 Glide を利用した。自社化合物の SAR 情報および他社化合物情報から結合様式が推察されていたことから、主にマニュアル法によるドッキングを行った。ユーザーがリガンドを画面を見ながらドッキングさせる (会話的ドッキング)。この段階では、受容体・補助因子等は剛体として扱うため、コンフォメーション変化は考慮しておらず、個々のリガンド分子も結合距離・結合角を変更せず、コンフォメーションだけでおおよその空間配座を決定した。次に、より精密な計算を行うため、得られた座標を基にして、ATP binding site 周りを中心に、複合体モデルでのMM/MD 計算を行った。

本論第三章の実験

3-[(Dimethylamino)methyl]benzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (4)

第一章化合物 **1** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33g** より標記化合物 **4** (67%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.52 (9H, s), 2.27 (6H, s), 3.48 (2H, s), 7.35-7.42 (2H, m), 7.57 (1H, d, $J = 7.1$ Hz), 7.73 (1H, s), 7.87 (1H, s), 7.92 (1H, s), 8.48 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.5 (3 CH_3), 34.6 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_3$], 45.0 (2 CH_3), 63.4 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 114.8 (CH_{ar}), 116.2 (C_{ar}), 125.5 (CH_{ar}), 126.3 (CH_{ar}), 128.7 (CH_{ar}), 129.9 (CH_{ar}), 134.4 (C_{ar}), 139.9 (C_{ar}), 143.6 (CH-N), 152.5 (CH_{ar}), 152.9 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 154.6 (C_{ar}), 167.8 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2958, 2775, 1558, 1434, 1346, 1157, 1120, 773; MS (FAB) m/z : 368 ($\text{M}^+\text{+H}$). HRMS (ESI) m/z : 368.19011 (Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{S}$: 368.19089); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{S} \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C, 64.85; H, 6.88; N, 18.96; S, 8.68. Found: C, 64.85; H, 6.80; N, 19.35; S, 8.89.; mp: 155°C.

4-[(Dimethylamino)methyl]benzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-hydrazone (5)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33h** より標記化合物 **5** (54%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 2.30 (6H, s), 3.50 (2H, s), 7.41 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.68 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.87 (1H, s), 7.89 (1H, s), 10.00 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.5 (3 CH_3), 34.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 44.9 (2 CH_3), 63.0 (CH_2), 114.7 (CH_{ar}), 115.9 (C_{ar}), 126.2 (2 CH_{ar}), 129.1 (2 CH_{ar}), 133.2 (C_{ar}), 140.7 (C_{ar}), 143.5 (CH-N), 152.5 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 152.9 (CH_{ar}), 154.6 (C_{ar}), 167.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 1558, 1427, 1348, 773; MS (FAB) m/z : 368 ($\text{M}^+\text{+H}$). HRMS (ESI) m/z : 368.19245 (Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{S}$: 368.19089); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{S}$: C, 65.36; H, 6.86; N, 19.06; S, 8.73. Found: C, 65.14; H, 6.86; N, 19.00; S, 8.60; mp: 183-184°C.

4-[(Methylamino)methyl]benzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-hydrazone hydrochloride (6)

化合物 **44** (49.0 mg, 0.11 mmol) を 4 規定塩酸・ジオキサン溶液 (1.0 mL) を加え、室温にて 6 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、エタノールにて共沸を行った。得られた残渣をエタノールにて再結晶精製し、桐山ロートによりろ取した。40°C にて一晚減圧乾燥し、標記化合物 **6** (38.9 mg, 81%) を黄白色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.46 (9H, s), 2.55-2.57 (3H, m), 4.18 (2H, m), 7.64 (1H, s), 7.66 (1H, s), 7.98 (2H, br), 8.53 (1H, br), 9.19 (2H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (500MHz, CD₃OD, TMS) δ : 32.3 (3CH₃), 32.4 (CH₃), 36.7 [C(CH₃)₃], 53.1 (CH₂-N), 115.3 (CH_{ar}), 116.4 (C_{ar}), 130.2 (2CH_{ar}), 131.6 (2CH_{ar}), 135.3 (C_{ar}), 136.1 (C_{ar}), 143.6 (CH-N), 147.6 (C_{ar}-N), 153.3 (CH_{ar}), 162.5 (C_{ar}), 167.4 (C_{ar}); IR (顕微 ATR) cm⁻¹: 3396, 2738, 2667, 1651, 1595; MS (FAB) m/z : 354 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 354.17533 (Calcd for C₁₉H₂₄N₅S: 354.17524); *Anal.* Calcd for C₁₉H₂₃N₅S·2HCl·1H₂O: C, 51.35; H, 6.12; Cl, 15.95; N, 15.76; S, 7.22. Found: C, 51.63; H, 6.04; Cl, 15.96; N, 15.73; S, 7.28.; mp: 250-251°C (dec.).

Isoindoline-5-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (7)

化合物 **6** の合成法に従い、化合物 **45** より標記化合物 **7** (97%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.44 (9H, s), 4.55 (4H, br), 7.53(1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.85 (1H, br), 7.90 (1H, s), 8.49 (1H, s), 9.80 (2H, br)); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 31.5 (3CH₃), 34.7 [CH(CH₃)₂], 114.8 (C_{ar}), 120.6 (CH_{ar}), 123.5 (2CH_{ar}), 126.6 (C_{ar}), 134.8 (CH_{ar}), 136.0 (CH-N), 136.4 (CH_{ar}), 143.5 (C_{ar}), 152.2 (C_{ar}-N), 153.2 (C_{ar}), 154.0 (C_{ar}), 167.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3388, 2698, 2582, 1643; MS (FAB) m/z : 352 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 352.15884 (Calcd for C₁₉H₂₂N₅S: 352.15959); *Anal.* Calcd for C₁₉H₂₁N₅S·2HCl·0.75H₂O: C, 52.11; H, 5.64; N, 15.99; Cl, 16.19; S, 7.32. Found: C, 52.28; H, 5.55; N, 15.88; Cl, 16.45; S, 7.27.; mp: 265-266°C (dec.).

Benzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-4-yl)hydrazone (34)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびベンズアルデヒド **33a** より標記化合物 **34** (84%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.50 (9H, s), 7.45 (3H, m), 7.70 (2H, m), 7.87 (1H, s), 7.88 (1H, s), 8.47 (1H, s), 8.98 (1H, br); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 31.9 (CH₃), 35.0 [C(CH₃)₃], 115.7 (CH_{ar}), 116.2 (C_{ar}), 126.6 (2CH_{ar}), 128.7 (2CH_{ar}), 129.4 (CH_{ar}), 134.8 (CH-N), 143.4 (C_{ar}), 152.4 (CH_{ar}), 153.8 (C_{ar}), 155.0 (C_{ar}-N), 168.5 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3195, 2966, 1577, 1552, 1429; MS (EI) *m/z*: 310 (M⁺); HRMS (ESI) *m/z*: 311.13045 (Calcd for C₁₇H₁₉N₄S: 311.13304); *Anal.* Calcd for C₁₇H₁₈N₄S: C, 65.78; H, 5.84; N, 18.05; S, 10.33. Found: C, 65.81; H, 5.80; N, 18.06; S, 10.25; mp: 241-242°C (dec.).

Methyl

4-*{(E)-[(6-tert-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazono]methyl}benzoate (35)*

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33b** より標記化合物 **35** (98%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.51 (9H, s), 3.96 (3H, s), 7.77 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.85 (1H, br), 7.92 (1H, br), 8.12 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 8.50 (1H, br); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 31.8 (3CH₃), 35.2 [C(CH₃)₃], 52.3 (CH₃), 115.8 (CH_{ar}), 116.4 (C_{ar}), 126.6 (2CH_{ar}), 130.2 (2CH_{ar}), 130.9 (C_{ar}), 138.4 (CH-N), 142.0 (C_{ar}), 151.3 (C_{ar}), 154.3 (C_{ar}-N), 155.6 (CH_{ar}), 166.5 (C=O), 169.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3253, 3228, 1698; MS (FAB) *m/z*: 369 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 369.13759 (Calcd for C₁₉H₂₁N₄O₂S: 369.13852); *Anal.* Calcd for C₁₉H₂₀N₄O₂S: C, 61.94; H, 5.47; N, 15.21; S, 8.70. Found: C, 62.19; H, 5.53; N, 15.29; S, 8.81.; mp: 220-221°C.

4-*{(E)-[(6-tert-Butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazono]methyl}benzoic acid (36)*

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33c** より標記化合物 **36** (quant.) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.46 (9H, s), 7.82 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.83 (1H, s), 8.02 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.29 (1H, s), 8.46 (1H, s), 11.95 (1H, br); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 31.5 (3CH₃), 34.7 [CH(CH₃)₃], 114.9 (CH_{ar}), 115.7 (C_{ar}), 126.3 (CH_{ar}), 129.3 (C_{ar}), 129.4 (2CH_{ar}), 131.2 (CH_{ar}), 138.6 (CH-N), 142.4 (C_{ar}), 152.5 (C_{ar}-N), 153.4 (CH_{ar}), 154.4 (C_{ar}), 166.6 (COOH), 167.9 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 1701, 1558, 1358, 1273, 885; MS (FAB) *m/z*: 355 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 355.12227 (Calcd for C₁₈H₁₉N₄O₂S:

355.12287); *Anal.* Calcd for C₁₈H₁₈N₄O₂S: C, 61.00; H, 5.12; N, 15.81; S, 9.05. Found: C, 60.65; H, 5.13; N, 15.00; S, 8.78.; mp: 293-294°C (dec.).

4-Hydroxybenzaldehyde *N*-[6-(*tert*-butyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl]hydrazone (37)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33d** より標記化合物 **37** (92%) を無色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.43 (9H, s), 6.84 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.54 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.82 (2H, br), 8.13 (1H, s), 8.36 (1H, s); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 31.5 (3CH₃), 34.7 [CH(CH₃)₃], 114.6 (CH_{ar}), 115.8 (2CH_{ar}), 116.2 (C_{ar}), 125.5 (C_{ar}), 128.1 (2CH_{ar}), 144.1 (CH-N), 152.5 (CH_{ar}), 153.0 (C_{ar}-N), 154.6 (C_{ar}), 159.0 (C_{ar}), 167.6 (C_{ar}); IR (ATR) cm⁻¹: 1564, 1512, 1433, 1292, 1153; MS (FAB) *m/z*: 327 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 327.12799 (Calcd for C₁₇H₁₉N₄OS: 327.12796); *Anal.* Calcd for C₁₇H₁₈N₄OS: C, 62.55; H, 5.56; N, 17.16; S, 9.82. Found: C, 62.42; H, 5.64; N, 17.08; S, 9.96.; mp: 270-273°C (dec.).

4-([1-(*tert*-Butyl)-1,1-diphenylsilyl]oxymethyl)benzaldehyde (33e)

市販の methyl 4-(hydroxymethyl)benzoate **51** (1.0 g, 6.02 mmol)、イミダゾール (860 mg, 12.64 mmol) を THF (20 mL) に溶解し、*tert*-ブチルジフェニルシリルクロリド (1.64 mL, 6.32 mmol) を加え、室温にて 7 時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機相を飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムにより乾燥・溶媒を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン：酢酸エチル = 5 : 1 溶出部から得られた分画を減圧濃縮し、シリル体 **52** を得た。LAH (246 mg, 6.48 mmol) を THF (25 mL) に懸濁させ、氷冷下に得られた **52** を加え、室温にて 5 時間攪拌した。反応液を氷冷しメタノール (0.55 mL)、水 (0.25 mL)、15%水酸化ナトリウム水溶液 (0.25 mL)、水 (0.75 mL) の順に加え室温に戻し攪拌した。不溶物をセライトろ去、溶媒を濃縮・留去し、アルコール体 (2.32 g, quant.) を無色透明油状物質として得た。得られたアルコール体をクロロホルム (46 mL) に溶解し活性 MnO₂ (4.6 g) を加え 6 時間加熱還流した。放冷後、セライトろ過し、溶媒を濃縮、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、クロロホルムにより溶出・精製し、標記

化合物 **33e** (1.86 g, 81%) を黄色透明油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.12 (9H, s), 4.84 (2H, s), 7.39-7.44 (5H, m), 7.51 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.68 (4H, dd, $J = 1.7, 7.8$ Hz), 7.85 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 10.00 (1H, s); MS (FAB) m/z : 375 ($\text{M}^+\text{+H}$).

4-([1-(*tert*-Butyl)-1,1-diphenylsilyl]oxymethyl)benzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (38)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33e** より標記化合物 **38** (90%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.12 (9H, s), 1.50 (9H, s), 4.81 (2H, s), 7.37-7.46 (8H, m), 7.67-7.71 (6H, m), 7.89 (1H, br), 7.96 (1H, br), 8.44 (1H, br); IR (KBr) cm^{-1} : 1558, 1429, 1115, 1074, 702; MS (FAB) m/z : 579 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 579.25812 (Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{OSSi}$: 579.26138); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{OSSi}$: C, 70.55; H, 6.62; N, 9.68; S, 5.54. Found: C, 70.61; H, 6.63; N, 9.70; S, 5.81.

4-(Hydroxymethyl)benzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (39)

化合物 **38** (345 mg, 0.60 mmol) を THF (7 mL) に溶解し、TBAF (1.2 mL, 1.19 mmol) を加え 60°C で4時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムにより乾燥・溶媒を減圧濃縮し、得られた残渣をメタノール-酢酸エチル-*n*-ヘキサンにて再結晶精製し、標記化合物 **39** (191 mg, 94%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 4.76 (2H, s), 7.45 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.70 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.87 (1H, s), 7.90 (1H, s), 8.46 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.5 (3 CH_3), 34.6 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_3$], 62.5 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 114.7 (CH_{ar}), 116.1 (C_{ar}), 126.2 (2 CH_{ar}), 126.8 (2 CH_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 143.7 (C_{ar}), 144.2 (CH-N), 152.5 (CH_{ar}), 152.9 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 154.6 (C_{ar}), 167.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 1577, 1556, 1512, 1431, 1360, 1344; MS (FAB) m/z : 341 ($\text{M}^+\text{+H}$). HRMS (ESI) m/z : 341.14399 (Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{OS}$: 341.14361); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{OS}$ 0.1EtOAc: C, 63.28; H, 6.00; N, 16.04; S, 9.18. Found: C, 63.61; H, 6.26; N, 15.84; S, 9.04.; mp: $225\text{-}226^\circ\text{C}$ (dec.).

4-[(Dimethylamino)sulfonyl]benzoic acid (**54**)

市販の 4-chlorosulfonylbenzoic acid **53** (1.0 g, 4.53 mmol) を THF (20 mL) に溶解し、氷冷下にジメチルアミン (2.0 M-THF 溶液) (4.76 mL, 9.52 mmol) を滴下し、室温にて 16 時間攪拌した。反応液を 1 規定水酸化ナトリウム水溶液で抽出し、水相を 6 規定塩酸で溶液を酸性として、析出した結晶をろ取り、標記化合物 **54** (589 mg, 57%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , TMS) δ : 2.63 (6H, s), 7.86 (2H, d, $J = 6.9$ Hz), 8.16 (2H, d, $J = 7.3$ Hz); MS(FAB) m/z : 230 ($\text{M}^+\text{+H}$).

N,N-Dimethyl-4-formyl-1-benzenesulfonamide (**33f**)

LAH (192 mg, 5.06 mmol) を Et₂O (6 mL) に懸濁させ、氷冷下に化合物 **54** (580 mg, 2.53 mmol) を加え、室温にて 1.5 時間攪拌した。反応液を氷冷しメタノール (0.42 mL)、水 (0.19 mL)、15%水酸化ナトリウム水溶液 (0.19mL)、水 (0.58 mL) の順に加え室温に戻し攪拌した。不溶物をセライトろ去、溶媒を濃縮・留去しアルコール体 (508 mg, 2.36 mmol, 93%) を淡黄色油状物質として得た。得られたアルコール体をクロロホルム (10 mL) に溶解し活性 MnO₂ (1.0 g) を加え 4 時間加熱還流した。放冷後、セライトろ過し、溶媒を濃縮し、得られた残渣を酢酸エチル-*n*-ヘキサンより再結晶し、標記化合物 **33f** (309 mg, 62%) を黄白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 2.76 (6H, s), 7.95 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.06 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 10.12 (1H, s); MS (FAB) m/z : 214 ($\text{M}^+\text{+H}$).

4-*{(E)-[(6-tert-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazono]methyl}*-*N,N*-dimethylbenzenesulfonamide (**40**)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33f** より標記化合物 **40** (quant.) を黄白色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 1.51 (9H, s), 2.76 (6H, s), 7.81 (1H, s), 7.86 (4H, s), 7.99 (1H, s), 8.49 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 31.5 (3CH₃), 34.7 [CH(CH₃)₃], 37.5 (2CH₃), 115.0 (CH_{ar}), 115.6 (C_{ar}), 126.9 (2CH_{ar}), 128.1 (2CH_{ar}), 134.8 (C_{ar}), 138.8 (C_{ar}), 141.8 (CH_{ar}), 152.5 (CH-N), 153.7 (C_{ar}-N), 154.3 (C_{ar}), 167.8 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 1560, 1550, 1435, 1342, 1157, 1128, 750; MS (FAB) m/z : 418 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z :

418.13540 (Calcd for C₁₉H₂₄N₅O₂S₂: 418.13714), *Anal.* Calcd for C₁₉H₂₃N₅O₂S₂: C, 54.65; H, 5.55; N, 16.77; S, 15.36. Found: C, 54.67; H, 5.53; N, 16.83; S, 15.42.; mp: 275-276°C (dec.).

Methyl 3-[(dimethylamino)methyl]benzoate (56)

Methyl 4-(bromomethyl)benzoate **55** (2.3 g, 10.0 mmol) を THF (13 mL) に溶解し、ジメチルアミン (2M THF 溶液) (10 mL, 20.0 mmol) を加え、室温にて 18 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムにより乾燥、溶媒を減圧濃縮し、標記化合物 **56** (1.89 g, 98%) を黄色透明油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.24 (6H, s), 3.46 (2H, s), 3.91 (3H, s), 7.40 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.53 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.94 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.97 (1H, s); MS (EI) *m/z*: 193 (M⁺).

3-[(Dimethylamino)methyl]benzaldehyde (33g)

化合物 **33f** の合成法に従い、エステル **56** より標記化合物 **33g** (68%) を黄色透明油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.24 (6H, s), 3.50 (2H, s), 7.49 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.78 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.83 (1H, s), 10.02 (1H, s); MS (FAB) *m/z*: 164 (M⁺+H).

Methyl 4-[(dimethylamino)methyl]benzoate (58)

化合物 **56** の合成法に従い、methyl 4-(bromomethyl)benzoate **57** より標記化合物 **58** (78%) を黄色透明油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.25 (6H, s), 3.47 (2H, s), 3.91 (3H, s), 7.38 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.99 (2H, d, *J* = 8.3 Hz); MS (FAB) *m/z*: 194 (M⁺+H).

4-[(Dimethylamino)methyl]benzaldehyde (33h)

化合物 **33f** の合成法に従い、エステル **58** より標記化合物 **33h** (86%) を黄色透明油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.26 (6H, s), 3.50 (2H, s), 7.49 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.84 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 10.00 (1H, s); MS (FAB) *m/z*: 164 (M⁺+H).

4-[(2-Hydroxyethyl)(methyl)amino]methylbenzaldehyde (**33i**)

Methyl 4-(bomomethyl)benzoate **57** (1.0 g, 4.37 mmol) をトルエン (10 mL) に溶解し、*N*-methyletanolamine (420 μ L, 5.24 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。さらにトリエチルアミン (3.0 mL, 21.8 mmol) を加え70°Cで19.5時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機相を飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムにより乾燥・溶媒を減圧濃縮して、粗アルコール体 (717.2 mg, 74%) を得た。化合物 **33f** の合成法に従い、得られたアルコール体より標記化合物 **33i** (468 mg, 55% from **57**) を黄色透明油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.26 (3H, s), 2.63 (2H, t, $J = 5.4$ Hz), 3.65 (4H, s), 7.49 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.85 (2H, dd, $J = 1.7, 8.1$ Hz), 10.00 (1H, s); MS (FAB) m/z : 194 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 194.11582 (Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_2$: 194.11810).

4-[(2-Hydroxyethyl)(methyl)amino]methylbenzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone (**41**)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33i** より標記化合物 **41** (80%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.46 (9H, s), 2.17 (3H, s), 2.50 (2H, d, $J = 1.2$ Hz), 3.54 (4H, br), 4.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz), 7.42 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.67 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.86 (1H, br), 8.23 (1H, s), 8.42 (1H, s), 11.77 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.5 (3CH_3), 34.6 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_3$], 42.4 (CH_3), 58.9 (CH_2), 59.0 (CH_2), 59.1 (CH_2), 114.7 (CH_{ar}), 116.1 (C_{ar}), 126.2 (2CH_{ar}), 129.1 (2CH_{ar}), 133.1 (C_{ar}), 141.1 (C_{ar}), 143.6 (CH-N), 152.5 (CH_{ar}), 152.9 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 154.6 (C_{ar}), 167.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 1581, 1558, 1433, 1356; MS (FAB) m/z : 398 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 398.20146 (Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{OS}$: 398.20235); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{OS}$: C, 63.45; H, 6.85; N, 17.62; S, 8.07. Found: C, 63.85; H, 6.79; N, 17.52; S, 8.01.

tert-Butyl (4-{(*E*)-[(6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazono]methyl}-benzyl)carbamate (**42**)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** および *tert*-butyl (4-formylbenzyl)-carbamate **33j** より標記化合物 **42** (90%) を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.48 (9H, s), 1.50 (9H, s), 4.37 (2H, d, *J* = 5.6 Hz), 4.90 (1H, br), 7.36 (1H, s), 7.37 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.68 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.86 (1H, s), 7.87 (1H, s), 8.48 (1H, s); IR (顕微 ATR) cm⁻¹: 2972, 1712, 1558, 1157; MS(FAB) *m/z*: 440 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 440.21149 (Calcd for C₂₃H₃₀N₅O₂S: 440.21202); *Anal.* Calcd for C₂₃H₂₉N₅O₂S: C, 62.84; H, 6.65; N, 15.93; S, 7.29. Found: C, 63.02; H, 6.53; N, 15.75; S, 7.44; m.p.: 207-209°C (dec.)

4-(Aminomethyl)benzaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (43)

化合物 **6** の合成法に従い、化合物 **42** より標記化合物 **43** (87%) を黄白色固体・塩酸塩として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.46 (9H, s), 3.68 (2H, br), 4.08 (2H, s), 7.60 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.83 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.95 (1H, s), 8.46 (1H, s), 8.48 (1H, s); IR (ATR) cm⁻¹: 1641, 1587, 1086; MS (FAB) *m/z*: 340 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 340.15959 (Calcd for C₁₈H₂₂N₅S: 340.15952); *Anal.* Calcd for C₁₈H₂₁N₅S·2HCl·0.25H₂O: C, 51.86; H, 5.68; N, 16.80; S, 7.69. Found: C, 51.90; H, 5.68; N, 16.47; S, 7.77.; mp: 295-298°C (dec.).

Methyl 4-{{(*tert*-butoxycarbonyl)(methyl)amino}methyl}benzoate (60)

市販の methyl 4-formylbenzoate (2.0 g, 12.18 mmol) およびメチルアミン (2.0M THF 溶液) (6.09 mL, 12.18 mmol) をトルエン (200 mL) に溶解し、減圧濃縮を行った。さらにトルエン (200 mL) で共沸し、得られた残渣をメタノール (200 mL) に溶解し、NaBH₄ (510 mg, 13.40 mmol) を加え室温にて 2 時間攪拌した。反応液を 1 規定塩酸により pH2 に調整し、減圧濃縮した。得られた残渣をクロロホルムにて抽出し、10%水酸化ナトリウム水溶液にて中和した。無水硫酸ナトリウムにて乾燥させ、溶媒を減圧濃縮した。得られた残渣をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、Boc₂O (2.8 mL, 12.18 mmol)、ジメチルアミノピリジン (触媒量) を加え、室温にて 4 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10 : 1 溶出部から得られた分画を減圧濃縮し、標記化合物 **60** (600 mg, 18%) を無色透明油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.45-1.49 (9H, br), 2.81-2.88 (3H, br), 3.91 (3H, s), 4.47 (2H, s),

7.30 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 8.00 (2H, d, $J = 8.1$ Hz); MS (FAB) m/z : 280 ($M^+ + H$).

***tert*-Butyl 4-formylbenzyl(methyl)carbamate (33k)**

化合物 **33f** の合成法に従い、エステル **60** より標記化合物 **33k** (58%) を無色透明油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.45-1.50 (9H, br), 2.83-2.89 (3H, br), 4.50 (2H, br), 7.38 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.86 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 10.01 (1H, s); MS (FAB) m/z : 250 ($M^+ + H$).

***tert*-Butyl (4-*{(E)-[(6-tert-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazono]methyl*}-benzyl)methylcarbamate (44)**

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33k** より標記化合物 **44** (37%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.50 (18H, s), 2.89 (3H, br), 4.47 (2H, br), 7.28 (1H, m), 7.67 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.87 (2H, s), 8.47 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 28.5 (3 CH_3), 32.0 (CH_3), 34.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 35.1 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 52.5 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 80.0 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 116.1 (CH_{ar}), 116.1 (C_{ar}), 127.0 (2 CH_{ar}), 127.7 (CH_{ar}), 128.3 (CH_{ar}), 133.3 (C_{ar}), 140.1 (C_{ar}), 142.7 (CH-N), 152.0 (CH_{ar}), 154.7 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 154.8 (C=O), 155.7 (C_{ar}), 169.1 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2962, 1703, 1680, 1556, 1437, 1126; MS (FAB) m/z : 454 ($M^+ + H$); HRMS (ESI) m/z : 454.22882 (Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: 454.22767); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: C, 63.55; H, 6.89; N, 15.44; S, 7.37. Found: C, 63.26; H, 6.81; N, 15.35; S, 7.01.

***N-tert*-Butoxycarbonyl-dipropargylamine (62)⁴⁴⁾**

市販の dipropargylamine **61** (5.45 g, 58.5 mmol) およびトリエチルアミン (10 mL, 72 mmol) のジクロロメタン (60 mL) 溶液を氷冷し、 Boc_2O (15 mL, 65 mmol) を滴下して、室温にて一晩攪拌した。濃縮後、酢酸エチルにて希釈、水、飽和食塩水の順に洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を減圧下留去し、標記化合物 **62** (11.5 g, quant.) を褐色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.48 (9H, s), 2.22 (2H, t, $J = 2.5$ Hz), 4.17 (4H, br).

***tert*-Butyl 5-(hydroxymethyl)-1,3-dihydro-2*H*-isoindole-2-carboxylate (63)⁴⁴⁾**

化合物 **62** (7.35 g, 38 mmol) をエタノール (160 mL) に溶かし、氷冷下に

propargylalcohol (9.0 mL, 0.155 mol) を滴下後、Wilkinson's catalyst (1g, 1 mmol) を加え室温に戻し 24 時間攪拌した。濃縮後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル：*n*-ヘキサン = 1 : 2 溶出にて精製し、ジエチルエーテル-*n*-ヘキサンより再結晶して、標記化合物 **63** (4.17 g, 44%) を無色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.52 (9H, s), 4.62 (4H, br), 4.69 (2H, br), 7.21-7.27 (3H, m); IR (KBr) cm^{-1} : 3421, 2863, 1673; MS (FAB) m/z : 250 ($\text{M}^+\text{+H}$); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3$: C, 67.45; H, 7.68; N, 5.62. Found: C, 67.53; H, 7.58; N, 5.58.

***tert*-Butyl 5-formyl-1,3-dihydro-2*H*-isoindole-2-carboxylate (33l)**

化合物 **63** (500 mg, 2.00 mmol) を四塩化炭素 (15 mL) に溶かし、活性 MnO_2 (2.0 g) を加え 30 分加熱還流した。不溶物をセライトろ過後、ろ液を濃縮して、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル：*n*-ヘキサン = 1 : 4 溶出にて精製し、標記化合物 **33l** (325 mg, 66%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.53 (9H, s), 4.72 (2H, br), 4.76 (2H, br), 7.38-7.45 (1H, m), 7.75-7.81 (2H, m), 10.00 (1H, s); IR (KBr) cm^{-1} : 3050, 1693; MS (EI) m/z : 247 (M^+); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_3 \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C, 67.70; H, 6.98; N, 5.64. Found: C, 67.51; H, 6.98; N, 5.45.

***tert*-Butyl 5-*{(E)-[(6-tert-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazono]methyl}*-1,3-dihydro-2*H*-isoindole-2-carboxylate (45)**

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33l** より標記化合物 **45** (96%) を黄白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 1.54 (9H, s), 4.70 (2H, br), 4.74 (2H, br), 7.31-7.36 (1H, m), 7.56 (1H, s), 7.70 (1H, s), 7.85 (1H, s), 7.94 (1H, s), 8.46 (1H, s); IR (KBr) cm^{-1} : 2968, 1689, 1564, 1433, 1396, 1107; MS (FAB) m/z : 452 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 452.21125 (Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: 452.21202); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: C, 63.83; H, 6.47; N, 15.51; S, 7.10. Found: C, 63.91; H, 6.44; N, 15.48; S, 7.36.

2-Methyl-5-isoindolinecarbaldehyde (33m)

化合物 **63** (200 mg, 0.80 mmol) をジクロロメタン (0.4 mL) に溶解し、TFA (1

mL) を加え、室温にて 2 分間攪拌して、反応液を減圧下濃縮した。得られた TFA 塩をジクロロメタン (2.4 mL) に溶解し、トリエチルアミン (223 μ L, 1.60 mmol) を加え、室温で 15 分間攪拌した。さらに酢酸 (115 μ L, 2.00 mmol) およびホルムアルデヒド (35%溶液) (138 μ L, 1.60 mmol) を加え 5 分間攪拌した。最後にナトリウムトリアセトキシボロヒドリド (272 mg, 1.28 mmol) を加え 1.5 時間攪拌した。反応液に 1 規定水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムにより乾燥・溶媒を減圧下濃縮し、粗アルコール体 (109.9 mg) を得た。得られたアルコール体を四塩化炭素 (2 mL) に溶解し活性 MnO_2 (220 mg) を加え 7 時間加熱還流した。放冷後、セライトろ過し、溶媒を濃縮し、粗生成物の標記化合物 **33m** (100 mg, 77% from **63**) を淡黄色透明油状物質として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.60 (3H, s), 3.91 (4H, d, $J=2.9\text{Hz}$), 7.16 (2H, d, $J=1.7\text{Hz}$), 7.71 (1H, s), 9.97 (1H, s); MS (FAB) m/z : 162 (M^+H).

2-Methylisoindoline-5-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl) hydrazone (**46**)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33m** より標記化合物 **46** (15%) を黄色固体として得た。

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 2.64 (3H, s), 3.97 (4H, s), 7.28 (1H, s), 7.50 (1H, d, $J=7.1\text{Hz}$), 7.61 (1H, s), 7.86 (1H, s), 7.88 (1H, s), 8.48 (1H, s); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 31.4 (CH_3), 34.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 41.7 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 59.9 (CH_2), 60.0 (CH_2), 114.7 (CH_{ar}), 115.9 (C_{ar}), 119.3 (CH_{ar}), 122.5 (CH_{ar}), 125.6 (CH_{ar}), 133.2 (C_{ar}), 141.6 (CH-N), 142.5 (C_{ar}), 143.6 (C_{ar}), 152.5 (CH_{ar}), 152.8 (C_{ar}), 154.7 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 168.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2954, 1562, 1429, 1354, 1344; MS (FAB) m/z : 366 (M^+H); HRMS (ESI) m/z : 366.17483 (Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{S}$: 366.17524); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{S}$: C, 65.72; H, 6.34; N, 19.16; S, 8.77. Found: C, 65.34; H, 6.40; N, 19.02; S, 8.91.; mp: 192-193°C (dec.).

2-Isopropyl-5-isoindolinecarbaldehyde (**33n**)

化合物 **33m** の合成法に従い、化合物 **63** の Boc 基を TFA にて脱保護し、ホルムアルデヒドの代わりにアセトンとの還元的アミノ化反応を行うことにより、標記化合物 **8n** (13%) を黄色透明油状物質として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.21 (6H, d, $J = 6.3$ Hz), 2.75-2.80 (1H, m), 3.95 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 4.02 (2H, s), 7.16 (1H, s), 7.36 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.72 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 9.98 (1H, s); MS (FAB) m/z : 190 (M^+H); HRMS (ESI) m/z : 190.12308 (Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}$: 190.12319).

2-Isopropylisoinoline-5-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-hydrazone (47)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33n** より標記化合物 **47** (21%) を黄白色固体として得た。

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.22 (6H, d, $J = 6.3$ Hz), 1.50 (9H, s), 2.81 (1H, m), 4.02 (4H, s), 7.29 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.52 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.60 (2H, s), 7.86 (1H, s), 7.88 (1H, s), 8.47 (1H, s); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 21.6 (2 CH_3), 32.0 (3 CH_3), 35.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 54.6 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 56.7 (CH_2), 56.9 (CH_2), 116.1 (C_{ar}), 116.2 (CH_{ar}), 120.4 (CH_{ar}), 122.8 (CH_{ar}), 126.0 (CH_{ar}), 128.3 (C_{ar}), 133.2 (C_{ar}), 140.9 (C_{ar}), 142.1 (C_{ar}), 143.2 (CH-N), 152.0 (CH_{ar}), 154.6 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 169.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2964, 1556, 1427, 1354, 1107; MS (FAB) m/z : 394 (M^+H). HRMS (ESI) m/z : 394.20572 (Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{S}$: 394.20654); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{S}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 65.64; H, 7.01; N, 17.40; S, 7.97. Found: C, 65.68; H, 6.80; N, 17.00; S, 8.25.; mp: 194-195°C (dec.).

***tert*-Butyl 7-hydroxy-3,4-dihydro-1*H*-isoquinoline-2-carboxylate (65)**

市販の isoquinolin-7-ol **64** (1.50 g, 10.3 mmol) を酢酸 (15 mL) に溶かし、酸化白金 (100 mg) を加え、水素雰囲気下 (3 atm) にて接触還元を付した。反応液をセライトろ過し、エタノールにて洗浄後、ろ液を減圧下、留去した。得られた残渣を THF-水 (3:1) (20 mL) に溶解し、トリエチルアミン (1.67 mL, 12 mmol) および Boc_2O (2.50 mL, 10.9 mmol) を加え室温にて 2 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルにて希釈し、水、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル : *n*-ヘキサン = 1:4 溶出にて精製し、標記化合物 **65** (2.05 g, 82%) を無色固体として得た。

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 2.75 (2H, t, $J = 6.0$ Hz), 3.62 (2H, t, $J = 6.0$ Hz), 4.53 (2H, s), 6.74-6.63 (2H, m), 6.98 (2H, t, $J = 6.0$ Hz); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 28.1 (CH_2),

28.5 (3CH₃), 42.3 (CH₂), 45.6 (CH₂), 80.3 [C(CH₃)₃], 112.8 (CH_{ar}), 114.2 (CH_{ar}), 125.8 (C_{ar}), 129.7 (CH_{ar}), 134.6 (C_{ar}), 154.9 (C=O), 155.2 (C_{ar}-OH); IR (ATR) cm⁻¹: 3337, 1654, 1435, 1159; MS (FAB) *m/z*: 250 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 272.12681 (Calcd for C₁₄H₁₉NNaO₃: 272.12626); *Anal.* Calcd for C₁₄H₁₉NO₃·0.1H₂O: C, 66.96; H, 7.71; N, 5.58. Found: C, 66.85; H, 7.58; N, 5.46.

***tert*-Butyl 7-(trifluoromethanesulfonyl)oxy-3,4-dihydro-1*H*-isoquinoline-2-carboxylate (66)**

化合物 **65** (2.00 g, 8.00 mmol) をジクロロメタン (30 mL) に溶かし、トリエチルアミン (1.25 mL, 9.00 mmol) および *N*-phenylbis(trifluoromethanesulfonylimide) (Tf₂NPh, 3.15 g, 8.8 mmol) を加え室温にて 24 時間攪拌した。濃縮後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル : *n*-ヘキサン = 1:9 溶出にて精製し、標記化合物 **66** (3.05 g, quant.) を無色透明油状物質として得た。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.49 (9H, s), 2.83 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.65 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.58 (2H, s), 7.02 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.06 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.5 Hz), 7.19 (1H, d, *J* = 8.5 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 28.5 (3CH₃), 28.5 (CH₂), 40.4 (CH₂), 45.8 (CH₂), 80.4 [C(CH₃)₃], 114.9, 117.5, 120.0, 122.6 (CF₃), 119.3 (CH_{ar}), 123.6 (CH_{ar}), 129.7 (CH_{ar}), 130.6 (C_{ar}), 135.4 (C_{ar}), 147.8 (C_{ar}), 154.7 (C=O); IR (ATR) cm⁻¹: 2987, 1670, 1423, 1208; MS (ESI) *m/z*: 404 (M⁺+Na); HRMS (ESI) *m/z*: 404.07421 (Calcd for C₁₅H₁₈F₃NNaO₅S: 404.07555).

***tert*-Butyl 7-[(*E*)-3-ethoxy-3-oxo-1-propenyl]-3,4-dihydro-1*H*-isoquinoline-2-carboxylate (67)**

化合物 **66** (3.00 g, 7.86 mmol) のアセトニトリル (30 mL) 溶液に、アクリル酸エチル (1.1 mL, 10 mmol), 酢酸パラジウム (176 mg, 10 mol%), tri(*o*-tolyl)phosphine (530 mg, 1.74 mmol) およびトリエチルアミン (2.2 mL, 15.8 mmol) を加えた。この溶液を脱気し、18 時間加熱還流した。濃縮後、酢酸エチルにて希釈し、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル : *n*-ヘキサン = 1 : 10–1 : 3 溶出にて精製し、標記化合物 **67** (1.59 g, 61%) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.34 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.49 (9H, s), 2.85 (2H, t, $J = 5.9$ Hz), 3.65 (2H, t, $J = 5.9$ Hz), 4.26 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.58 (2H, s), 6.40 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.15 (1H, q, $J = 8.1$ Hz), 7.27-7.42 (2H, m), 7.65 (1H, d, $J = 4.3, 16.1$ Hz); MS (ESI) m/z : 354 ($\text{M}^+\text{+Na}$), 276 (M-tBu).

***tert*-Butyl 7-(1,2-dihydroxy-3-ethoxy-3-oxopropyl)-3,4-dihydro-1*H*-isoquinoline-2-carboxylate (68)**

化合物 **67** (1.50 g, 4.52 mmol) を THF : アセトン : 水 = 1 : 1 : 1 (30 mL) に溶解し、NMO (1.06 g, 9.0 mmol) および四酸化オスミウム (115 mg, 10 mol%) を加え室温にて 7 時間攪拌した。反応液に飽和亜硫酸ナトリウムを加え酢酸エチルにて抽出し、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル : *n*-ヘキサン = 1:2–2:1 溶出にて精製し、標記化合物 **68** (1.26 g, 76%) を無色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.30 (3H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.49 (9H, s), 2.71 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 2.82 (2H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.11 (1H, d, $J = 5.5$ Hz), 3.63 (2H, t, $J = 5.5$ Hz), 4.29 (2H, q, $J = 7.0$ Hz), 4.34 (1H, dd, $J = 5.5, 3.0$ Hz), 4.58 (2H, s), 4.99 (1H, dd, $J = 7.3, 3.0$ Hz), 7.13-7.22 (3H, m); MS (ESI) m/z : 388 ($\text{M}^+\text{+Na}$).

***tert*-Butyl 7-formyl-3,4-dihydro-1*H*-isoquinoline-2-carboxylate (33o)**

化合物 **68** (1.20 g, 3.28 mmol) を THF : メタノール : 水 = 1 : 1 : 1 (36 mL) に溶解し、過よう素酸ナトリウム (1.40 g, 6.55 mmol) を加え室温にて 1 時間攪拌した。水にて希釈し、酢酸エチルにて抽出し、水、飽和食塩水の順に洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル : *n*-ヘキサン = 1:4 溶出にて精製し、標記化合物 **33o** (777 mg, 91%) を無色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 2.92 (2H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.68 (2H, t, $J = 5.5$ Hz), 4.65 (2H, s), 7.30 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.63 (1H, s), 7.68 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 9.97 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 28.5 (3 CH_3), 29.5 (CH_2), 80.3 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 127.6 (CH_{ar}), 128.0 (CH_{ar}), 129.6 (CH_{ar}), 134.8 (C_{ar}), 135.0 (C_{ar}), 142.2 (C_{ar}), 154.8 ($\text{C}=\text{O}$), 191.9 (CHO); IR (KBr) cm^{-1} : 3366, 2976, 1690, 1415, 1365, 1159; MS (FAB) m/z : 284 ($\text{M}^+\text{+Na}$).

***tert*-Butyl 7-*-(E)*-[(6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazono]methyl}-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylate (48)**

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33o** より標記化合物 **48** (77%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.51 (18H, s), 2.88 (2H, br), 3.68 (2H, br), 4.63 (2H, s), 7.21 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.46-7.50 (2H, m), 7.87 (2H, s), 8.45 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 28.5 (3 CH_3), 29.1 (CH_2), 32.0 (3 CH_3), 35.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 40.5 (CH_2), 46.0 (CH_2), 80.0 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 116.0 (C_{ar}), 116.0 (CH_{ar}), 124.2 (CH_{ar}), 125.1 (CH_{ar}), 129.4 (CH_{ar}), 132.3 (C_{ar}), 134.5 (C_{ar}), 135.0 (C_{ar}), 136.9 (C_{ar}), 142.4 (CH-N), 152.1 (CH_{ar}), 154.6 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 154.8 (C=O), 169.2 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2962, 1695, 1562, 1425, 1163; MS (FAB) m/z : 466 ($\text{M}^+\text{+H}$). HRMS (ESI) m/z : 466.22667 (Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: 466.22767); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: C, 64.49; H, 6.71; N, 15.04; S, 6.89. Found: C, 63.74; H, 6.66; N, 14.38; S, 6.93.

1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-7-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (49)

化合物 **6** の合成法に従い、化合物 **48** より標記化合物 **49** (97%) を無色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 1.52 (9H, s), 3.21 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 3.56 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 4.46 (2H, s), 7.41 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.80 (1H, s), 7.88 (1H, s), 7.91 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.55 (1H, s), 8.59 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 26.3 (CH_2), 32.3 (3 CH_3), 36.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 42.6 (CH_2), 45.7 (CH_2), 115.0 (CH_{ar}), 116.4 (C_{ar}), 128.1 (CH_{ar}), 128.9 (C_{ar}), 130.4 (CH-N), 131.0 (2 CH_{ar}), 133.3 (C_{ar}), 136.8 (C_{ar}), 143.7 (C_{ar}), 147.8 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 153.2 (CH_{ar}), 167.0 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 2627, 1641, 1587; MS (FAB) m/z : 366 ($\text{M}^+\text{+H}$). HRMS (ESI) m/z : 366.17704 (Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{S}$: 366.17524); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{S} \cdot 1.9\text{HCl} \cdot 0.75\text{H}_2\text{O}$: C, 53.59; H, 5.94; Cl, 15.03; N, 15.62; S, 7.15. Found: C, 53.71; H, 5.85; Cl, 14.93; N, 15.69; S, 7.16.; mp: 204-206°C (dec.).

***tert*-Butyl 6-hydroxy-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylate (70)**⁴⁵⁾

市販の 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline **69** (500 mg, 2.17 mmol) とトリエ

チルアミン (0.40 mL, 2.85 mmol) を THF (7.5 mL) に溶解し、水 (2.5 mL) および Boc₂O (569 mg, 2.61 mmol) を加え、室温にて 24 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルにて希釈し、水、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル：*n*-ヘキサン = 1:1 溶出にて精製し、標記化合物 **70** (493 mg, 91%) を黄色透明油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.49 (9H, s), 2.77 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 3.61 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 4.49 (2H, s), 4.95 (1H, s), 6.62 (1H, s), 6.67 (1H, t, *J* = 8.3 Hz), 6.96 (1H, t, *J* = 8.3 Hz); MS (ESI) *m/z*: 272 (M⁺+Na).

***tert*-Butyl 6-(trifluoromethanesulfonyl)oxy-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylate (71)**⁴⁵⁾

化合物 **66** の合成法に従い、化合物 **70** より標記化合物 **71** (quant.) を無色透明油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.49 (9H, s), 2.85 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.64 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.57 (2H, s), 7.05 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.08 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.5 Hz), 7.15 (1H, d, *J* = 8.5 Hz); IR (ATR) cm⁻¹: 2979, 1693, 1663, 1418, 1205, 1130; MS (ESI) *m/z*: 404 (M⁺+Na), 326 (M⁺-tBu); HRMS (ESI) *m/z*: 404.07534 (Calcd for C₁₅H₁₈F₃NNaO₅S: 404.07555).

***tert*-Butyl 6-[(1*E*)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylate (72)**

化合物 **67** の合成法に従い、化合物 **71** より標記化合物 **72** (18%) を黄色透明油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.34 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.49 (9H, s), 2.85 (2H, m), 3.65 (2H, m), 4.26 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 4.58 (2H, s), 6.41 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 7.12 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.29 (1H, s), 7.35 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 16.1 Hz); MS (FAB) *m/z*: 332 (M⁺+H).

***tert*-Butyl 6-formyl-3,4-dihydro-2(1*H*)-isoquinolinecarboxylate (33p)**

化合物 **72** (309 mg, 0.93 mmol) を THF (4.0 mL) に溶解し、水 (2.0 mL) を加えた。四酸化オスミニウム (2.4 mg, 1mol%) を加え、50°C にて攪拌した。反応液

に過ヨウ素酸ナトリウム (398 mg, 1.86 mmol) を少量ずつ加え、同温度にて 3.5 時間攪拌した。反応終了後、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルにて抽出し、水・飽和食塩水で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムにより乾燥させ、溶媒を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し *n*-ヘキサン:酢酸エチル = 4:1 溶出部より得られた分画を減圧濃縮し、標記化合物 **33p** (111.7 mg, 46%) を無色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.50 (9H, s), 2.92 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 3.68 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 4.65 (2H, s), 7.28 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.66 (1H, s), 7.69 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 9.96 (1H, s); MS (FAB) *m/z*: 262 (M⁺+H).

1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-6-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (50)

化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **33p** よりヒドラゾン体を黄色固体として得た。化合物 **6** の合成法に従い、得られたヒドラゾン体に 4 規定塩酸-ジオキサンを作用させ Boc 基を脱保護し、標記化合物 **50** (72%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.53 (9H, s), 3.24 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 3.57 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 4.45 (2H, s), 7.38 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.84 (1H, s), 7.88 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.89 (1H, s), 8.54 (1H, s), 8.60 (1H, br); ¹³C-NMR (CD₃OD) δ: 26.1 (CH₂), 32.3 (3CH₃), 36.7 [C(CH₃)₃], 42.8 (CH₂), 45.8 (CH₂), 115.1 (CH_{ar}), 116.5 (C_{ar}), 127.8 (CH_{ar}), 128.8 (C_{ar}), 130.1 (CH_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 133.9 (CH-N), 134.2 (C_{ar}), 143.9 (C_{ar}), 147.5 (C_{ar}), 153.4 (CH_{ar}), 162.4 (C_{ar}-N), 167.3 (C_{ar}); IR (ATR) cm⁻¹: 2790, 1635, 1587, 1091; MS (FAB) *m/z*: 366 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 366.17526 (Calcd for C₂₀H₂₄N₅S: 366.17524); *Anal.* Calcd for C₂₀H₂₃N₅S·2.25HCl·2H₂O: C, 49.68; H, 6.10; Cl, 16.50; N, 14.48; S, 6.63. Found: C, 49.89; H, 5.79; Cl, 16.68; N, 14.40; S, 6.66; mp: 232-234°C (dec.).

本論第四章の実験

化学的安定性試験

溶液中の安定性試験のため、化合物の 500 $\mu\text{g/mL}$ (メタノール:アセトニトリル = 50:50) 溶液を調製した。この液を日局 1 液、日局 2 液及び pH 4.0 酢酸緩衝液で 200 倍希釈した後、メンブランフィルターでろ過、ただちに遮光下、37°C でインキュベーションし、経時的に HPLC 注入して残存量を測定した。(濃度 ; 2.5 $\mu\text{g/mL}$)。

定量法 (HPLC-UV) は以下の条件を使用した。カラム: Waters Xterra RP18, 2.1 mm ϕ \times 10 cm, 3.5 μm 、移動相: 25 mM pH 6.8 リン酸緩衝液:アセトニトリル = 65:35、カラム温度: 40°C、流速: 0.3 mL/min、注入量: 3~7 μL 、検出波長 : 210 nm および 340 nm。

定量法 (LC-MS) は以下の条件を使用した。カラム: Waters Xterra RP18, 2.1 mm ϕ \times 5 cm, 3.5 μm 、移動相: 10 mM pH 6.8 酢酸アンモニウム-酢酸緩衝液:アセトニトリル = 60:40、その他、HPLC-UV と同様。MS 検出器: ThermoQuest LCQ、イオン化法: Electron spray ionization (ESI)、キャピラリー温度: 250°C、スキャン法: Positive scan (M.W. 100 – 400)

1,3-Thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (8)

第一章化合物 **1** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** および 1,3-チアゾール-2-カルボアルデヒド **73a** より標記化合物 **8** (41%) を黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 1.52 (9H, s), 7.66 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 7.87 (1H, br), 7.99 (1H, d, $J = 3.4\text{Hz}$), 8.35 (1H, s), 8.42 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.4 (3CH_3), 34.5 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 115.0 (CH_{ar}), 115.5 (C_{ar}), 120.7 (CH_{ar}), 137.3 (CH-N), 143.7 (CH_{ar}), 151.9 (C_{ar}), 152.1 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 153.9 (CH_{ar}), 164.2 (C_{ar}), 167.9 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2968, 1552, 1431, 1354, 1124; MS (EI) m/z : 317 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 318.08234 (Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{S}_2$: 318.08471); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}_2$: C, 52.97; H, 4.76; N, 22.06; S, 20.20. Found: C, 52.77; H, 4.83; N, 21.83; S, 20.33.; mp: 232.5-234°C.

1,3-Thiazole-4-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (74)

化合物 **8** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** および 1,3-チアゾール-4-カルボアルデヒド **73b** より標記化合物 **74** (59%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.50 (9H, s), 7.74 (1H, s), 7.87 (1H, s), 8.13(1H, s), 8.51 (1H, s), 8.88 (1H, s), 8.98 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.6 (3 CH_3), 34.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 115.0 (CH_{ar}), 116.6 (C_{ar}), 137.8 (CH-N), 151.9 (CH_{ar}), 152.4 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 153.0 (C_{ar}), 154.6 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 155.1 (CH_{ar}), 167.7 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2960, 1562, 1442; MS (FAB) m/z : 318 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 318.08587 (Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{S}_2$: 318.08471); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}_2$: C, 52.97; H, 4.76; N, 22.06; S, 20.20. Found: C, 53.06; H, 4.68; N, 21.90; S, 20.17.; mp: 210-211°C.

1,3-Thiazole-5-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone (75)

化合物 **8** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** および 1,3-チアゾール-5-カルボアルデヒド **73c** より標記化合物 **75** (85%) を黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.52 (9H, s), 7.77 (1H, s), 8.03 (1H, s), 8.11 (1H, s), 8.50 (1H, s), 8.84 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.6 (3 CH_3), 34.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 114.8 (CH_{ar}), 115.9 (C_{ar}), 135.3 (CH-N), 135.7 (C_{ar}), 144.4 (CH_{ar}), 152.4 (CH_{ar}), 153.3 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 154.3 (C_{ar}), 155.2 (CH_{ar}), 167.9 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 1550, 1427, 1109; MS (FAB) m/z : 318 (M^+); HRMS (ESI) m/z : 318.08159 (Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{S}_2$: 318.08471); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{S}_2$: C, 52.97; H, 4.76; N, 22.06; S, 20.20. Found: C, 53.22; H, 4.67; N, 22.07; S, 20.28.; mp: 270-271°C.

4-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-methylaminomethyl]thiazole (96a)

市販の 4-methylthiazole **95a** (3.0 g, 30.25 mmol) を四塩化炭素 (60 mL) に溶解し、*N*-ブロモスクシンイミド (NBS, 5.6 g, 31.77 mmol)、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN, 250 mg, 1.51 mmol) を加え、90°C にて 30 分間加熱還流した。反応液を室温に放冷し、セライトろ過した。ろ液を溶媒量が約 1/3 量となるまで減圧濃縮し、得られた粗ブロム体を THF (15 mL) に溶解した。この溶液を氷冷下に、メチルアミン (2M-THF 溶液) (45 mL, 90.75 mmol) 溶液へ滴下し、室温

にて 18 時間攪拌した。反応終了後、析出固体をろ去し、ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣を THF (60 mL) に溶解し、Boc₂O (6.9 mL, 30.25 mmol)、トリエチルアミン (4.6 mL, 33.28 mmol) を加え、室温にて 5 時間攪拌した。析出した固体をろ去し、ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 3:1 溶出部より得られた分画を減圧濃縮し、標記化合物 **96a** (2.41 g, 35%) を黄色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.46 (9H, s), 2.94 (3H, s), 4.58 (2H, s), 7.12 (1H, s), 8.74 (1H, d, *J* = 2.2 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 28.4 (3CH₃), 34.7 (CH₃), 49.2 (CH₂), 79.8 [C(CH₃)₃], 114.2 (CH_{ar}), 154.1 (CH_{ar}), 154.9 (C_{ar}), 155.6 (C=O); IR (ATR) cm⁻¹: 2976, 1686, 1390, 1142; MS (ESI) *m/z*: 251 (M⁺+Na); MS (FAB) *m/z*: 229 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 229.10345 (Calcd for C₁₀H₁₇N₂O₂S: 229.10107).

4-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-methylaminomethyl]thiazole-2-carboxaldehyde (73d)

n-ブチルリチウム (1.52 mol *n*-ヘキサン溶液) (3.02 mL, 4.60 mmol) をジエチルエーテル (10.0 mL) に溶解し、-78°C にて化合物 **96a** (1.0 g, 4.38 mmol) のジエチルエーテル (10.0 mL) 溶液を滴下した。同温度にて 1 時間攪拌し、*N*-ホルミルモルホリン (462 μL, 4.60 mmol) を滴下した。徐々に昇温させながら -5°C にて 20 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え、酢酸エチルにて抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 4:1 溶出部から得られた分画を減圧濃縮し、標記化合物 **73d** (392.7 mg, 35%) を黄色透明油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.47 (9H, s), 2.98 (3H, s), 4.62 (2H, s), 7.48–7.58 (1H, br), 9.97 (1H, s); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 28.4 (3CH₃), 34.9 (CH₃), 48.4, 49.1 (CH₂), 80.2 [C(CH₃)₃], 122.0, 123.0 (CH_{ar}), 155.4, 155.9 (C_{ar}), 157.3 (C=O), 165.7 (C_{ar}), 183.7 (CHO); IR (ATR) cm⁻¹: 2975, 2931, 2847, 1683, 1390, 1365, 1141; MS (EI) *m/z*: 256 (M⁺); HRMS (EI) *m/z*: 256.08964 (Calcd for C₁₁H₁₆N₂O₃S: 256.08816).

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (76)

第三章化合物 **4** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73d** よりヒドラゾン体を黄白色固体として得た。続いて第三章化合物 **6** の合成法に従い、得られたヒドラゾン体に 4 規定塩酸-ジオキサンを作用させ Boc 基を脱保護し、標記化合物 **76** (56%) を黄白色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.47 (9H, s), 2.61 (3H, br), 4.28 (2H, d, $J = 4.4$ Hz), 7.83 (1H, s), 7.92 (1H, s), 8.49 (1H, s), 8.54 (1H, s), 9.25 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 31.3 (3CH₃), 32.2 [C(CH₃)₃], 34.6 (CH₃), 46.4 (CH₂), 115.3 (C_{ar}), 115.4, 115.6 (CH_{ar}), 121.2, 121.4 (CH_{ar}), 138.5 (CH-N), 148.0 (C_{ar}), 150.3 (C_{ar}), 152.6 (C_{ar}-N), 154.9 (CH_{ar}), 164.5 (C_{ar}), 166.4 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2359, 1801, 1560, 1417; MS (FAB) m/z : 361 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 361.12640 (Calcd for C₁₆H₂₁N₆S₂: 361.12691); *Anal.* Calcd for C₁₆H₂₀N₆S₂·2HCl·0.25H₂O: C, 43.88; H, 5.18; Cl, 16.19; N, 19.19; S, 14.64. Found: C, 43.67; H, 5.05; Cl, 15.99; N, 18.95; S, 14.56.; mp: 227-229°C (dec.).

5-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-methylaminomethyl]thiazole (**96b**)

化合物 **96a** の合成法に従い、市販の 5-methylthiazole **95b** より標記化合物 **96b** (57%) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 1.50 (9H, s), 2.85 (3H, s), 4.5 (2H, s), 7.73 (1H, s), 8.73 (1H, s); MS (FAB) m/z : 229 (M⁺+H).

5-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-methylaminomethyl]thiazole-2-carboxaldehyde (**73e**)

化合物 **73d** の合成法に従い、化合物 **96b** より標記化合物 **73e** (32%) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 1.50 (9H, s), 2.90 (3H, s), 4.63 (2H, s), 7.93 (1H, s), 9.94 (1H, s); MS (EI) m/z : 256 (M⁺).

5-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (**77**)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73e** よりヒドラゾン体を黄色油状物質として得、続いてヒドラゾン体に 4 規定塩酸-ジオキサンを作用させ Boc 基を脱保護し、標記化合物 **77** (81%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.47 (9H, s), 2.58 (3H, br), 4.48 (2H, br), 7.82 (1H, s), 8.07 (1H, s), 8.50 (1H, br), 8.53 (1H, s), 9.44 (1H, br), 9.52 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.4 (3 CH_3), 31.6 (CH_3), 34.9 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 42.5 (CH_2), 115.3 (C_{ar}), 115.6 (CH_{ar}), 129.7 (CH_{ar}), 129.8 (C_{ar}), 138.6 (C_{ar}), 146.6 (CH-N), 151.7 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 157.9 (CH_{ar}), 165.3 (C_{ar}), 165.5 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2665, 1637, 1591, 1101; MS (ESI) m/z : 361 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 361.12789 (Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{S}_2$: 361.12691); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{S}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 43.44; H, 5.24; Cl, 16.03; N, 18.99; S, 14.50. Found: C, 43.71; H, 5.14; Cl, 15.74; N, 18.74; S, 14.37.; mp: 238-240°C (dec.).

4-(Dimethylaminomethyl)thiazole-2-carbaldehyde (73f)

化合物 **73d** の合成法に従い、市販の 4-(dimethylaminomethyl)thiazole **96c** より標記化合物 **73f** (44%) を褐色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.32 (6H, s), 3.69 (2H, s), 7.58 (1H, s), 10.00 (1H, s); MS (FAB) m/z : 171 ($\text{M}^+\text{+H}$).

4-(Dimethylaminomethyl)thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone (78)

化合物 **8** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73f** より標記化合物 **78** (21%) を黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.52 (9H, s), 2.33 (6H, s), 3.63 (2H, s), 7.20 (1H, s), 3.75 (2H, s), 7.84 (1H, s), 8.14 (1H, s), 8.52 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.3 (3 CH_3), 34.5 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 44.5 (2 CH_3), 58.2 (CH_2), 115.0 (CH_{ar}), 115.6 (C_{ar}), 116.9 (CH_{ar}), 137.3 (CH-N), 151.9 (C_{ar}), 152.2 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 153.9 (C_{ar}), 155.1 (CH_{ar}), 163.3 (C_{ar}), 167.8 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2964, 1549, 1421, 1169; MS (FAB) m/z : 375 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 375.14159 (Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{S}_2$: 375.14256); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{S}_2$: C, 54.52; H, 5.92; N, 22.44; S, 17.12. Found: C, 54.66; H, 5.89; N, 22.44; S, 17.09.; mp: 192-193°C.

2-{2-([*tert*-Butyl(diphenyl)silyl]oxy)methyl)-1,3-thiazol-4-yl]methyl}-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-dione (98)

Sinha らの方法⁴⁹⁾により合成した ethyl 2-([*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy)methyl-

1,3-thiazole-4-carboxylate **97** (748.3 mg, 1.76 mmol) を THF (14 mL) に溶解し、氷冷下に LAH (67 mg, 1.76 mmol) を加え、同温度にて 1 時間攪拌した。反応液を氷冷し、メタノール (0.2 mL)、水 (0.1 mL)、15%水酸化ナトリウム水溶液 (0.1 mL)、水 (0.3 mL) の順に加え室温に戻し 2 時間攪拌した。不溶物をセライトろ去後、ろ液を濃縮下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、ヘキサン:酢酸エチル = 2:1-1:1 溶出部から得られた分画を減圧濃縮し、得られた残渣を THF (20 mL) に溶解した。この溶液にフタルイミド (154.4 mg, 1.05 mmol)、トリフェニルホスフィン (275.3 mg, 1.05 mmol)、アゾジカルボン酸ジエチル (165 μ L, 1.05 mmol) を加え、室温にて 4.5 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 2:1 溶出部から得られた分画を減圧濃縮し、標記化合物 **98** (441.9 mg, 49%) を無色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.10 (9H, s), 4.91 (2H, s), 4.94 (2H, s), 7.17 (1H, s), 7.34-7.42 (6H, m), 7.64-7.78 (8H, m), 7.85-7.88 (2H, m); MS (FAB) m/z : 513 ($\text{M}^+\text{+H}$).

***tert*-Butyl (2-formyl-1,3-thiazol-5-yl)carbamate (73g)**

化合物 **97** (441.9 mg, 0.86 mmol) をエタノール (4.4 mL) に溶解し、ヒドラジン 1 水和物 (0.95 mL, 1.89 mmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。反応液にジクロロメタン (4.4 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (4.4 mL)、 Boc_2O (0.65 mL, 2.84 mmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。反応液をジクロロメタンで抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 4:1 溶出部から得られた分画を減圧濃縮し、*N*-Boc 体 (181.1 mg, 44%) を無色油状物質として得た。得られた *N*-Boc 体を THF (1.8 mL) に溶解し、氷冷下に TBAF (1.0M-THF 溶液) (0.37 mL, 0.37 mmol) を加え、室温にて 16 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 20:1 溶出部から得られた分画を減圧濃縮し、得られた残渣を四塩化炭素 (1 mL) に溶解した。この溶液に活性化 MnO_2 (160 mg) を加え、60°C にて 4.5 時間攪拌した。反応液を室温に戻し、不溶物をセライトろ過後、ろ液を減圧濃縮して、標記化合物 **98** (41.3 mg, 20%) を黄色油状物質として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.46 (9H, s), 4.52 (2H, d, $J = 6.1$ Hz), 5.19 (1H, br), 7.59 (1H, s), 9.96 (1H, s); MS (EI) m/z : 242 (M^+).

4-(Aminomethyl)thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (79)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73g** よりヒドラゾン体を得、続いてヒドラゾン体に 4 規定塩酸-ジオキサンを作用させ Boc 基を脱保護し、標記化合物 **79** (49%) を淡黄色固体・塩酸塩として得た。

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.47 (9H, s), 4.18 (2H, br), 7.87 (1H, br), 7.88 (1H, s), 8.49 (3H, br), 8.53 (1H, s); ^{13}C -NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.3 (3 CH_3), 34.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 39.0 (CH_2), 115.2 (CH_{ar}), 115.5 (C_{ar}), 119.6 (CH_{ar}), 137.7 (CH-N), 149.7 (CH_{ar}), 151.0 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 151.3 (C_{ar}), 153.1 (C_{ar}), 154.5 (C_{ar}), 164.5 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2615, 1637, 1508, 1107; MS (FAB) m/z : 347 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 347.11089 (Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{S}_2$: 347.11126); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{S}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 42.05; H, 4.94; Cl, 16.55; N, 19.62; S, 14.97. Found: C, 42.27; H, 4.65; Cl, 16.74; N, 19.32; S, 14.69.; mp: 264-266°C (dec.).

2-Hydroxymethyl-4-(1-phthalimidoethyl)thiazole (101a)⁵⁰⁾

市販の *N*-phthaloyl-*DL*-alanine **9a** (2.19 g, 10 mmol) に DMF (2 滴) および塩化チオニル (1.09 mL, 15 mmol) を加え、30 分間加熱還流した。反応液を減圧下濃縮し、残渣を THF (10 mL) に溶解した。この溶液を氷冷下、トリメチルシリルジiazometan (2.0M-*n*-へキサン溶液) (12.5 mL, 25 mmol) の THF (25 mL) 溶液に加え 0°C で 18 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣にジエチルエーテル (30 mL) および飽和炭酸水素ナトリウム水 (30 mL) を加えた。二層を分離し、水層をジエチルエーテル (30 mL) で抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水 (30 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-へキサン:酢酸エチル = 2:1 溶出部より得た分画を減圧し、1-diazo-3-phthalimidobutan-2-one (2.35 g, 97%) を橙色油状物質として得た。得られたジアゾ体 (0.49 g, 2.0 mmol) のジエチルエーテル (10 mL) 溶液に氷冷下、47%臭化水素水溶液 (0.28 mL, 2.4 mmol) を加え、室温で 50 分間攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水で中和後、

二層を分離した。水層をジエチルエーテル (20 mL) で抽出し、有機層を合わせ飽和食塩水 (20 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、残渣をエタノール (20 mL) に溶解し、Sinha らの方法⁴⁹⁾により合成した 2-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)thioacetamide **100** (0.66 g, 2.0 mmol) を加え、12 時間加熱還流した。反応液を減圧下濃縮し、残渣に酢酸エチル (20 mL) および飽和炭酸水素ナトリウム水 (40 mL) を加えた。二層を分離し、水層を酢酸エチル (20 mL) で抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水 (20 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 2:3 溶出部より得た分画を減圧濃縮し、標記化合物 **101a** (0.4 g, 69%) を黄色油状物質として得た。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.92 (3H, d, *J* = 7.3 Hz), 2.60 (1H, br), 4.85 (2H, s), 5.66 (1H, q, *J* = 7.3 Hz), 7.24 (1H, s), 7.69-7.72 (2H, m), 7.81-7.84 (2H, m).

4-[1-(*N-tert*-Butoxycarbonylamino)ethyl]-2-hydroxymethylthiazole (**102a**)

化合物 **101a** (0.4 g, 1.39 mmol) のエタノール (10 mL) 溶液にヒドラジン 1 水和物 (0.2 mL, 4.17 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣にクロロホルムを加えた。生じた沈殿物をろ別後、ろ液を減圧下濃縮した。残渣を THF (5 mL) に溶解し、Boc₂O (0.33 g, 1.5 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 40:1 溶出部より得た分画を減圧濃縮し、標記化合物 **102a** (0.32 g, 89%) を淡黄色油状物質として得た。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.44 (9H, s), 1.48 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 2.90 (1H, br), 4.92 (3H, m), 5.09 (1H, br), 7.05 (1H, s).

4-[1-(*N-tert*-Butoxycarbonylamino)ethyl]thiazole-2-carboxaldehyde (**73h**)

化合物 **102a** (0.32 g, 1.24 mmol) のクロロホルム (10 mL) 溶液に活性 MnO₂ (0.5 g) を加え、18.5 時間加熱還流した。反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 100:1 溶出部より得た分画を減圧濃縮し、標記化合物 **73h** (0.26 g, 82%) を黄色油状物質として得た。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.44 (9H, s), 1.56 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 5.01 (1H, br), 5.09 (1H, br),

7.53 (1H, s), 9.95 (1H, d, $J = 1.3$ Hz).

4-(1-Aminoethyl)-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (80)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73h** より標記化合物 **80** (47%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.46 (9H, s), 1.57 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 4.57-4.61 (1H, m), 7.87 (2H, br), 8.52 (4H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 18.8 (CH_3), 31.8 (3CH_3), 35.1 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 46.2 (CH_2), 115.8 (2CH_{ar}), 118.1 (C_{ar}), 137.5 (CH-N), 151.9 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 154.1 (C_{ar}), 154.8 (CH_{ar}), 155.2 (C_{ar}), 165.5 (C_{ar}), 168.1 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3338, 1631, 1587, 1552, 1504, 1421, 1367, 1338; MS (FAB) m/z : 361 ($\text{M}^+ + 1$); HRMS (ESI) m/z : 361.12668 (Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{S}_2$: 361.12691); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{S}_2 \cdot 2.4\text{HCl} \cdot 1.75\text{H}_2\text{O}$: C, 40.08; H, 5.44; Cl, 17.74; N, 17.59; S, 13.37. Found: C, 40.34; H, 5.25; Cl, 17.92; N, 17.74.; S, 13.43; mp: 214-217°C (dec.).

***N*-Phthaloyl-2-aminobutyric Acid (99b)**

市販の 2-aminobutyric acid **103** (10.3 g, 100 mmol) および無水フタル酸 (14.8 g, 100 mmol) の混合物を 120°C で 4 時間攪拌した。反応液にクロロホルム (50 mL) を加え放冷後、1 規定塩酸 (50 mL) を加えた。二層を分離し、水層をクロロホルム (50 mL x 2) で抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水 (100 mL) で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、標記化合物 **99b** (23 g, 99%) を無色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : .95 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.25-2.32 (2H, m), 4.81-4.85 (1H, m), 7.73-7.75 (2H, m), 7.86-7.88 (2H, m).

2-Hydroxymethyl-4-(1-phthalimidopropyl)thiazole (101b)

化合物 **101a** の合成法に従い、カルボン酸 **99b** およびチオアセトアミド **100** より標記化合物 **101b** (60%) を褐色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.00 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.32-2.39 (1H, m), 2.47-2.55 (1H, m), 2.63 (1H, br), 4.85 (2H, s), 5.44 (1H, q, $J = 4.2$ Hz), 7.26 (1H, s), 7.70-7.72 (2H, m), 7.82-7.84 (2H, m).

4-[1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl]-2-hydroxymethylthiazole (102b)

化合物 **102a** の合成法に従い、化合物 **101b** より標記化合物 **102b** (quant.) を褐色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.47 (9H, s), 1.81-1.90 (2H, m), 2.82 (1H, br), 4.67 (1H, br d, $J = 7.1$ Hz), 4.91 (2H, s), 5.12 (1H, br), 7.05 (1H, s).

4-[1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl]thiazole-2-carboxaldehyde (73i)

化合物 **73h** の合成法に従い、化合物 **102b** より標記化合物 **73i** (93%) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.92 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.47 (9H, s), 1.87-1.99 (2H, m), 4.79 (1H, br), 5.13 (1H, br), 7.52 (1H, s), 9.96 (1H, d, $J = 1.2$ Hz).

4-(1-Aminopropyl)-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (81)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73i** より標記化合物 **81** (57%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.82 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.44 (9H, s), 1.88-2.03 (2H, m), 4.36 (1H, m), 7.95 (1H, s), 8.56 (1H, s), 8.66 (4H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.3 (CH_3), 25.9 (CH_2), 31.3 (3 CH_3), 34.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 51.7 (CH), 115.3 (CH_{ar}), 115.7 (CH_{ar}), 119.4 (C_{ar}), 139.3 (CH-N), 149.9 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 153.2 (CH_{ar}), 155.2 (C_{ar}), 161.1 (C_{ar}), 164.2 (C_{ar}), 166.0 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2960, 2069, 1943, 1731, 1633, 1577, 1504, 1482, 1421; MS (FAB) m/z : 375 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 375.13947 (Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{S}_2$: 375.14256); Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{S}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 1.75\text{H}_2\text{O}$: C, 43.45; H, 5.68; Cl, 15.09; N, 17.88; S, 13.65. Found: C, 43.65; H, 5.60; Cl, 14.80; N, 18.23; S, 13.40.; mp: 194-196°C (dec.).

4-[1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methylamino)ethyl]-2-hydroxymethylthiazole (102c)

化合物 **102a** (1.5 g, 5.8 mmol) のエタノール (5 mL) 溶液に塩酸-エタノール (5 mL) を加え、室温で 17 時間攪拌した。減圧下反応液を濃縮し、残渣をジクロロ

メタン (30 mL) に懸濁した。この懸濁液に氷冷下、トリエチルアミン (4.1 mL, 29.1 mmol) およびトリフルオロ酢酸無水物 (TFAA, 2.1 mL, 14.5 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を10%クエン酸水溶液 (30 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水 (30 mL)、飽和食塩水 (30 mL) で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、残渣をDMF (20 mL) に溶解した。この溶液に炭酸カリウム (1.9 g, 13.7 mmol) およびヨウ化メチル (0.43 mL, 6.9 mmol) を加え、室温で4日間攪拌した。反応液に水を加え酢酸エチル (20 mL x 3) で抽出した。抽出液を10%次亜硫酸ナトリウム水溶液 (20 mL)、水 (20 mL)、飽和食塩水 (20 mL) で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、残渣をTHF (10 mL) に溶解した。この溶液に1規定水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL) を加え、室温で1時間攪拌後、Boc₂O (1.5 g, 0.9 mmol) のTHF (5 mL) 溶液を加え、室温で30分間攪拌した。反応液を加え酢酸エチル (20 mL x 2) で抽出し、抽出液を飽和食塩水 (20 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 40:1 溶出部より得た分画を減圧濃縮し、標記化合物 **102c** (0.17 g, 11%) を無色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.47 (9H, s), 1.53 (3H, d, *J* = 7.1 Hz), 2.69 (3H, s), 2.95 (1H, br), 4.90 (2H, s), 7.00 (1H, s).

4-[1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methylamino)ethyl]thiazole-2-carboxaldehyde (**73j**)

化合物 **73h** の合成法に従い、化合物 **102c** より標記化合物 **73j** (95%) を淡黄色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.48 (9H, s), 1.62 (3H, d, *J* = 7.3 Hz), 2.75 (3H, br), 5.62 (1H, br), 7.48 (1H, s), 9.97 (1H, d, *J* = 1.2 Hz).

4-[1-(Methylamino)ethyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (**82**)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73j** より標記化合物 **82** (88%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.45 (9H, s), 1.60 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 2.44 (3H, t, *J* = 5.4 Hz), 4.52-4.57 (1H, m), 7.90 (1H, br), 7.97 (1H, s), 8.53 (1H, s), 8.58 (1H, br), 9.25-9.26 (1H,

br), 9.61 (1H, br); ^{13}C -NMR (CD_3OD) δ : 18.0 (CH_3), 31.3 (CH_3), 32.3 (3CH_3), 36.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 55.8 (CH), 115.5 (CH_{ar}), 116.8 (C_{ar}), 124.1 (CH_{ar}), 143.9 (CH-N), 147.2 (C_{ar}), 154.3 (CH_{ar}), 156.3 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 162.8 (C_{ar}), 165.0 (C_{ar}), 168.0 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2965, 2468, 1735, 1641, 1592, 1546, 1508, 1469, 1428; MS (FAB) m/z : 375 (M^+H); HRMS (ESI) m/z : 375.14256 (Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{S}_2$: 375.1444); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{S}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 44.73; H, 5.52; Cl, 15.53; N, 18.41; S, 14.05. Found: C, 44.41; H, 5.20; Cl, 15.20; N, 18.39; S, 14.05; mp: 202-204°C (dec.).

4-(1-Benzyloxycarbonyl-3-azetidiny)-2-hydroxymethylthiazole (105a)

化合物 **46a** (1.2 g, 5.0 mmol) のジクロロメタン (30 mL) 溶液に氷冷下、DMF (2 滴) および塩化オキサリル (0.63 mL, 7.5 mmol) を加え、同温で 15 分間、室温で 1 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣を THF (30 mL) に溶解した。この溶液に氷冷下、トリメチルシリルジアゾメタン (2.0M-*n*-ヘキサン溶液) (6.25 mL, 12.5 mmol) を加え 0°C で 15 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣に酢酸エチル (20 mL) および飽和炭酸水素ナトリウム水 (40 mL) を加えた。二層を分離し、水層を酢酸エチル (20 mL x 2) で抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水 (20 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、残渣をジエチルエーテル (10 mL) に溶解した。この溶液に氷冷下、47%臭化水素水溶液 (0.7 mL, 6.0 mmol, 1.2 eq.) を加え、同温で 1 時間攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水で中和後、酢酸エチル (20 mL x 2) で抽出し、抽出液を飽和食塩水 (20 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、残渣をエタノール (30 mL) に溶解し、この溶液にチオアセトアミド **100** (1.65 g, 5.0 mmol) を加え、38 時間加熱還流した。反応液を減圧下濃縮し、残渣に酢酸エチル (20 mL) および飽和炭酸水素ナトリウム水 (40 mL) を加えた。二層を分離し、水層を酢酸エチル (20 mL x 2) で抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水 (20 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 1:2 溶出部より得た分画を減圧濃縮し、標記化合物 **105a** (0.4 g, 26%) を褐色油状物質として得た。

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 2.58 (1H, br), 3.92-3.95 (1H, m), 4.19 (2H, dd, $J = 6.1, 8.8$ Hz), 4.36 (1H, t, $J = 8.5$ Hz), 4.94 (2H, s), 5.12 (2H, s), 7.01 (1H, s), 7.35-7.37 (5H, m).

4-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-azetidiny]-2-hydroxymethylthiazole (106a)

化合物 **105a** (0.4 g, 1.3 mmol) のジクロロメタン (20 mL) 溶液に氷冷下、三塩化ホウ素 (1.0M-ジクロロメタン溶液) (4.0 mL, 4.0 mmol, 3 eq.) を加え、室温で3日間攪拌した。反応が終了していなかったため三塩化ホウ素 (1.0M-ジクロロメタン溶液) (4.0 mL) を追加し、さらに室温で23.5時間攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水で中和後、減圧下濃縮した。残渣に Boc_2O (0.43 g, 1.97 mmol) のテトラヒドロフラン (10 mL) 溶液および1規定水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL) を加え、室温で30分間攪拌した。反応液を酢酸エチル (20 mL x 3) で抽出し、抽出液を飽和食塩水 (20 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 40:1 溶出部より得た分画を減圧濃縮し、標記化合物 **106a** (40 mg, 11%) を褐色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.45 (9H, s), 3.21 (1H, br), 3.85-3.91 (1H, m), 4.07 (1H, dd, $J = 6.4, 8.3$ Hz), 4.27 (1H, t, $J = 8.5$ Hz), 4.93 (2H, s), 7.01 (1H, s).

4-[1-(*N-tert*-Butoxycarbonyl)-3-azetidiny]thiazole-2-carboxaldehyde (73k)

化合物 **73h** の合成法に従い、化合物 **106a** より標記化合物 **73k** (68%) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.47 (9H, s), 3.96-4.03 (1H, m), 4.14 (2H, dd, $J = 6.1, 8.3$ Hz), 4.34 (2H, t, $J = 8.5$ Hz), 7.47 (1H, s), 9.98 (1H, d, $J = 0.8$ Hz).

4-Azetidin-3-yl-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (83)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73k** より標記化合物 **83** (85%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.45 (9H, s), 4.15 (2H, m), 4.25 (3H, m), 7.74 (1H, s), 7.88 (1H, br), 8.52 (1H, s), 9.05 (1H, br), 9.37 (1H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 31.5 (3 CH_3), 32.0 (CH), 34.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 50.5 (2 CH_2), 115.2 (CH_{ar}), 115.4 (CH_{ar}), 117.3 (C_{ar}), 145.2 (CH-N), 150.8 (C_{ar}), 152.9 (C_{ar}), 154.6 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 155.0 (CH_{ar}), 164.5 (C_{ar}), 166.8 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 3380, 2962, 1633, 1583, 1560, 1508, 1423, 1365; MS (FAB) m/z : 373

(M⁺+H); MS (ESI) *m/z*: 373 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 373.12682 (Calcd for C₁₇H₂₁N₆S₂: 373.12691); *Anal.* Calcd for C₁₇H₂₀N₆S₂·2.25HCl·1.5H₂O: C, 42.40; H, 5.28; Cl, 16.56; N, 17.45; S, 13.32. Found: C, 42.24; H, 5.32; Cl, 16.35; N, 17.31; S, 13.15.; mp: 213-216°C (dec.).

4-(1-Benzyloxycarbonyl-3-pyrrolidino)-2-hydroxymethylthiazole (105b)

化合物 **105a** の合成法に従い、化合物 **104b** より標記化合物 **105b** (44%) を褐色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.10-2.17 (1H, m), 2.28-2.30 (1H, m), 2.96 (1H, br), 3.44-3.69 (4H, m), 3.84-3.89 (1H, m), 4.91 (2H, s), 5.14 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.32-7.36 (5H, m).

4-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-pyrrolidino]-2-hydroxymethylthiazole (106b)

化合物 **106a** の合成法に従い、化合物 **105b** より標記化合物 **106b** (64%) を褐色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.46 (9H, s), 2.06-2.14 (1H, m), 2.25 (1H, br), 2.76 (1H, br), 3.41-3.59 (4H, m), 3.74-3.77 (1H, m), 4.92 (2H, s), 6.94 (1H, s).

4-[1-(*N-tert*-Butoxycarbonyl)-3-pyrrolidino]thiazole-2-carboxaldehyde (73l)

化合物 **73h** の合成法に従い、化合物 **106b** より標記化合物 **73l** (83%) を黄色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.48 (9H, s), 2.15-2.20 (1H, m), 2.33 (1H, br), 3.46-3.63 (4H, m), 3.81-3.86 (1H, m), 7.41 (1H, s), 9.96 (1H, s).

4-Pyrrolidin-3-yl-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (84)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73l** より標記化合物 **84** (84%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.45 (9H, s), 2.07-2.10 (1H, m), 2.32-2.36 (1H, m), 3.25-3.27 (2H, m), 3.35 (1H, m), 3.58-3.64 (1H, m), 3.66-3.70 (1H, m), 7.70 (1H, s), 7.87 (1H, br), 8.51 (2H, s), 9.32 (2H, br); ¹³C-NMR (CD₃OD) δ: 32.1 (CH₂), 32.3 (3CH₃), 36.8

[C(CH₃)₃], 40.6 (CH₂), 46.6 (CH), 51.1 (CH₂), 115.4 (CH_{ar}), 116.7 (C_{ar}), 120.8 (CH_{ar}), 143.7 (C_{ar}), 147.3 (CH-N), 147.6 (C_{ar}-N), 158.2 (CH_{ar}), 162.8 (C_{ar}), 163.9 (C_{ar}), 167.9 (C_{ar}); IR (ATR) cm⁻¹: 2960, 1735, 1633, 1587, 1556, 1504, 1402; MS (FAB) *m/z*: 387 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 387.14215 (Calcd for C₁₈H₂₃N₆S₂: 387.14256); *Anal.* Calcd for C₁₈H₂₂N₆S₂·2.7HCl·H₂O: C, 42.98; H, 5.35; Cl, 19.03; N, 16.71; S, 12.75. Found: C, 43.14; H, 5.35; Cl, 18.83; N, 16.52; S, 12.66.; mp: 183-185°C (dec.).

4-[1-Benzyloxycarbonyl-4-piperidinyl]-2-hydroxymethylthiazole (105c)

化合物 **105a** の合成法に従い、化合物 **104c** より標記化合物 **105c** (70%) を褐色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.56-1.64 (4H, m), 2.02-2.04 (1H, m), 2.53 (1H, br), 2.89-2.96 (3H, m), 4.27 (1H, br), 4.91 (2H, s), 5.14 (2H, s), 6.86 (1H, s), 7.31-7.37 (5H, m).

4-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]-2-hydroxymethylthiazole (106c)

化合物 **106a** の合成法に従い、化合物 **105c** より標記化合物 **106c** (69%) を黄色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.47 (9H, s), 1.59-1.66 (2H, m), 1.99-2.03 (2H, m), 2.67 (1H, br), 2.802.92 (3H, m), 4.20 (2H, br), 4.92 (2H, s), 6.86 (1H, s).

4-[1-(*N-tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]thiazole-2-carboxaldehyde (73m)

化合物 **73h** の合成法に従い、化合物 **106c** より標記化合物 **73m** (60%) を黄色油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.48 (9H, s), 1.63-1.73 (2H, m), 2.04-2.07 (2H, m), 2.88 (1H, br), 2.99-3.05 (1H, m), 3.49 (2H, d, *J* = 4.6 Hz), 4.22 (1H, br), 7.34 (1H, s), 9.96 (1H, d, *J* = 1.2 Hz).

4-Piperidin-4-yl-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (85)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73m** より標記化合物 **85** (84%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.46 (9H, s), 1.82-1.98 (2H, m), 2.12-2.16 (2H, m), 2.98-3.10

(3H, m), 3.32-3.35 (2H, m), 7.55 (1H, s), 7.86 (1H, s), 8.47 (1H, br), 8.51 (1H, s), 8.71 (1H, br), 8.95 (1H, br); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 27.7 (2CH₂), 31.4 (3CH₃), 34.8 (CH), 35.2 [C(CH₃)₃], 42.6 (2CH₂), 115.3 (CH_{ar}), 115.8 (CH_{ar}), 116.0 (C_{ar}), 140.6 (CH-N), 149.0 (C_{ar}), 150.3 (C_{ar}), 155.6 (C_{ar}-N), 160.1 (CH_{ar}), 163.0 (C_{ar}), 164.8 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2962, 1864, 1631, 1587, 1552, 1504, 1400, 1367; MS (FAB) m/z : 401 (M⁺+H); MS (ESI) m/z : 401 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 401.15792 (Calcd for C₁₉H₂₅N₆S₂: 401.15821); *Anal.* Calcd for C₁₉H₂₄N₆S₂·2.75HCl·1.25H₂O: C, 43.60; H, 5.63; Cl, 18.63; N, 16.06; S, 12.25. Found: C, 43.20; H, 5.36; Cl, 19.02; N, 15.91; S, 12.17; mp: 207-210°C (dec.).

5-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-hydroxymethyl-4,6-dihydro-5H-pyrrolo[3,4-*d*]thiazole (109)

1-(*p*-Toluenesulfonyl)pyrrolidin-3-one **108** (1.4 g, 5.86 mmol) の酢酸溶液(15 mL) に臭素 (0.33 mL, 6.4 mmol) の酢酸溶液(15 mL)を加え、50°C で 10 分間攪拌した。反応液に水 (100 mL) を加えクロロホルム (100 mL x 2) で抽出した。抽出液を飽和食塩水 (100 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、残渣を DMF (15 mL) に溶解した。この溶液に 2-benzyloxythioacetamide **107** (1.2 g, 6.6 mmol) を加え 50°C で 7 時間攪拌した。反応液に炭酸水素ナトリウム (0.5 g, 5.86 mmol) を加え減圧下濃縮後、残渣に酢酸エチル (30 mL) および水 (30 mL) を加えた。二層を分離後、水層を酢酸エチル (30 mL) で抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水 (30 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、残渣をジクロロメタン (50 mL) に溶解した。この溶液に氷冷下、トリエチルアミン (4.1 mL, 29.3 mmol) およびメタンсульホニルクロライド (0.91 mL, 11.7 mmol) を加え、室温で 22 時間攪拌した。反応液に水 (50 mL) を加え、二層を分離し、水層をクロロホルム (50 mL) で抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水 (50 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 100:1 溶出部より得た分画を減圧濃縮した。残渣にフェノール (2.0 g) および 47%臭化水素水溶液 (3 mL) を加え、1 時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、水 (10 mL) およびジエチルエーテル (10 mL) を加え 1 時間攪拌した。二層を分離し、有機層を 1 規定塩酸で抽出した。

抽出液を氷冷下、10 規定水酸化ナトリウム水溶液でアルカリ性とし、Boc₂O (0.55 g, 2.5 mmol) の THF (20 mL) 溶液を加え、室温で 23 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 50:1 溶出部より得た分画を減圧濃縮し、標記化合物 **109** (0.13 g, 9%) を褐色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.52 (s, 9H), 2.48 (br, 1H), 4.52-4.53 (m, 1H), 4.58 (br, 1H), 4.66-4.67 (m, 2H), 4.94 (s, 2H); MS (EI) *m/z*: 257 (M+H)⁺.

5-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4,6-dihydro-5*H*-pyrrolo[3,4-*d*]thiazole-2-carboxaldehyde (73n)

化合物 **73h** の合成法に従い、化合物 **109** より標記化合物 **73n** (81%) を褐色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.53 (s, 9H), 4.64-4.66 (m, 1H), 4.69 (br, 1H), 4.77-4.88 (m, 2H), 9.93 (s, 1H).

5,6-Dihydro-4*H*-pyrrolo[3,4-*d*][1,3]thiazole-2-carbaldehyde (6-*tert*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (86)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14d** およびアルデヒド **73n** より標記化合物 **86** (40%) を褐色固体・塩酸塩として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.47 (9H, s), 4.43 (2H, br), 4.62 (2H, br), 7.77 (1H, s), 8.42 (1H, br), 8.52 (1H, s), 10.26 (1H, br); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 31.1 (3CH₃), 34.5 [C(CH₃)₃], 45.2 (CH₂), 46.6 (CH₂), 115.1 (C_{ar}), 115.3 (CH_{ar}), 128.8 (C_{ar}), 138.8 (CH-N), 150.8 (C_{ar}), 152.8 (C_{ar}), 154.8 (C_{ar}-N), 155.1 (CH_{ar}), 166.6 (C_{ar}), 170.7 (C_{ar}); IR (ATR) cm⁻¹: 2962, 1635, 1581, 1515, 1425, 1365; MS (FAB) *m/z*: 359 (M⁺+H); MS (ESI) *m/z*: 359 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 359.11144 (Calcd for C₁₆H₁₉N₆S₂: 359.11126); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₈N₆S₂·1.9HCl·2H₂O: C, 41.35; H, 5.40; Cl, 14.49; N, 18.08; S, 13.80. Found: C, 41.27; H, 5.06; Cl, 14.68; N, 17.88; S, 13.77.; mp: 232-235°C.

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-isopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (87)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **14c** およびアルデヒド **73d** より標記化合物 **87** (41%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.41 (6H, d, $J = 6.6$ Hz), 2.59-2.61 (3H, br), 4.29 (2H, br), 7.80 (1H, s), 7.93 (1H, s), 8.52 (2H, s), 9.21 (2H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 23.4 (3CH₃), 29.7 (CH₃), 31.9 (CH), 46.4 (CH₂), 115.3 (C_{ar}), 115.9 (CH_{ar}), 121.1 (CH_{ar}), 138.1 (CH-N), 147.9 (C_{ar}), 150.5 (CH_{ar}), 150.6 (C_{ar}-N), 152.8 (C_{ar}), 164.6 (C_{ar}), 166.7 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2696, 1637, 1587; MS (ESI) m/z : 347 (M⁺+H); MS (ESI) m/z : 347 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 347.10962 (Calcd for C₁₅H₁₉N₆S₂: 347.11126); *Anal.* Calcd for C₁₅H₁₈N₆S₂·13/7HCl·2.5H₂O: C, 39.23; H, 5.46; Cl, 14.34; N, 18.30; S, 13.96; Found: C, 39.28; H, 5.20; Cl, 14.12; N, 18.00; S, 13.84; mp: 178°C (dec.).

2-Amino-5-cyclopropyl-3-methoxycarbonylthiophene (**111a**)

PCC (7.50 g, 34.8 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に懸濁させ、市販の 2-cyclopropylethanol **110a** (2.00 g, 23.2 mmol) を一度に添加し 1.5 時間激しく攪拌した。ジエチルエーテル (180 mL) を加え約 30 分間攪拌した後、フロリジルカラム (ジエチルエーテル溶出) に通導し濃縮することにより、アルデヒド (1.59 g) を無色油状物質として得た。次いで、窒素雰囲気下、室温にてトリエチルアミン (2.40 mL, 17 mmol)、DMF (2.65 mL, 34 mmol) の混液に、シアノ酢酸メチル (1.50 mL, 17 mmol) および得られたアルデヒドを加え 3 分間攪拌し、硫黄 (545 mg, 17 mmol) を加えさらに 40 時間攪拌した。反応液に水を加えた後、酢酸エチルにて希釈抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル:*n*-ヘキサン = 1:9 溶出にて精製し、*n*-ペンタンより再結晶させ、標記化合物 **111a** (580 mg, 13%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ : 0.60-0.67 (2H, m), 0.80-0.86 (2H, m), 1.77-1.83 (1H, m), 3.78 (3H, s), 5.78 (2H, br), 6.59 (1H, s); IR (KBr) cm^{-1} : 3423, 3311, 1662, 1602; MS (EI) m/z : 197 (M⁺); *Anal.* Calcd for C₉H₁₁NO₂S: C, 54.80; H, 5.62; N, 7.10; S, 16.26. Found: C, 55.10; H, 5.62; N, 7.02; S, 16.18.

6-Cyclopropyl-4-hydrazinothieno[2,3-*d*]pyrimidine (112a)

化合物 **111a** (550 mg, 2.79 mmol) のホルムアミド溶液 (5.5 mL) を、210°C にて 2 時間加熱還流した。放冷後、析出物をろ取り水にて洗浄、乾燥した。シリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル:ヘキサン = 2:1 溶出にて精製し、*n*-ヘキサン-酢酸エチルから再結晶し、ピリミドン体 (285 mg, 53%) を無色固体として得た。

得られたピリミドン体 (255 mg, 1.32 mmol) のオキシ塩化リン溶液 (3 mL) を 110 °C にて 6 時間加熱した。反応液を室温に戻した後、氷水に注ぎ、0°C にて炭酸ナトリウムを少量ずつ加え中和し、酢酸エチルにて希釈、抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル:ヘキサン = 1:9 溶出にて精製し、クロル体 (275 mg, 99%) を無色固体として得た。

得られたクロル体 (250 mg, 1.18 mmol) のエタノール溶液 (5 mL) に、室温にてヒドラジン 1 水和物 (2.5 mL) を加え 80°C に加温にして 1.5 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、減圧下にて溶媒を留去し水にて希釈、酢酸エチルにて抽出した。飽和食塩水にて洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣を酢酸エチル-*n*-ヘキサンにて再結晶し、標記化合物 **112a** (190 mg, 78%) を無色固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.81-0.86 (2H, m), 1.08-1.12 (2H, m), 2.11-2.18 (1H, m), 6.39 (1H, br), 6.85 (1H, d, *J* = 1.0 Hz), 8.48 (1H, s); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.7 (2CH₂), 11.5 (CH), 114.0 (C_{ar}), 114.7 (CH_{ar}), 144.0 (C_{ar}), 152.9 (CH_{ar}), 157.5 (C_{ar}-N), 163.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm⁻¹: 3243, 3197, 1585; MS (EI) *m/z*: 206 (M⁺). HRMS (ESI) *m/z*: 207.06637 (Calcd for C₉H₁₁N₄S: 207.07044); *Anal.* Calcd for C₉H₁₀N₄S: C, 52.41; H, 4.89; N, 27.16; S, 15.54. Found: C, 52.32; H, 4.85; N, 27.17; S, 15.67.

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-cyclopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (88)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **112a** およびアルデヒド **73d** より標記化合物 **88** (49%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 0.84-0.88 (2H, m), 1.15-1.23 (2H, m), 4.29 (2H, t, *J* = 5.4 Hz),

7.77 (1H, br), 7.98 (1H, s), 8.53 (1H, s), 8.66 (1H, br), 9.83 (2H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.64 (2CH₂), 11.4 (CH), 32.2 (CH₂), 46.4 (CH₂), 115.5 (CH_{ar}), 115.7 (C_{ar}), 121.0 (C_{ar}), 138.0 (CH-N), 146.1 (C_{ar}), 147.9 (CH_{ar}), 150.6 (C_{ar}-N), 152.4 (C_{ar}), 164.6 (C_{ar}), 166.2 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2657, 1630, 1585, 1099; MS (FAB) m/z : 345 (M⁺+H); MS (ESI) m/z : 345 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 345.09333 (Calcd for C₁₅H₁₇N₆S₂: 345.09561); *Anal.* Calcd for C₁₅H₁₆N₆S₂·1.9HCl·0.75H₂O: C, 42.17; H, 4.58; Cl, 15.77; N, 19.67; S, 15.01. Found: C, 42.31; H, 4.44; Cl, 16.17; N, 19.43; S, 14.66.; mp: 218-220°C (dec.).

2-Amino-5-cyclobutyl-3-methoxycarbonyl-thiophene (111b)

化合物 **111a** の合成法に従い、市販の 2-(cyclobutyl)ethanol **110b** より標記化合物 **111b** (37%) を淡黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 1.79-2.34 (6H, m), 3.40-3.49 (1H, m), 3.79 (3H, s), 5.79 (2H, br), 6.62 (1H, s).

4-Hydrazino-6-cyclobutylthieno[2,3-*d*]pyrimidine (112b)

化合物 **112a** の合成法に従い、チオフェン体 **111b** より標記化合物 **112b** (44%) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 1.90-2.12 (2H, m), 2.19-2.29 (2H, m), 2.42-2.50 (2H, m), 3.71-3.80 (1H, m), 6.43 (1H, br), 6.86 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 8.50 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 17.4 (CH₂), 30.1 (2CH₂), 35.3 (CH), 113.7 (C_{ar}), 114.6 (CH_{ar}), 145.4 (C_{ar}), 152.5 (CH_{ar}), 157.2 (C_{ar}-N), 164.2 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3234, 3193, 1585; MS (ESI) m/z : 221 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 221.08765 (calcd for C₁₀H₁₂N₄S₂: 221.08609); *Anal.* Calcd for C₁₀H₁₂N₄S: C, 52.52; H, 5.49; N, 25.43; S, 14.55. Found: C, 52.26; H, 5.41; N, 25.58; S, 14.68.; mp: 175-177°C (dec.).

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-cyclobutylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (89)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **112b** およびアルデヒド **73d** より標記化合物 **89** (55%) を黄白色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.89-1.97 (1H, m), 2.01-2.12 (1H, m), 2.19-2.29 (2H, m),

2.45-2.49 (2H, m), 2.58-2.61 (3H, t, $J = 5.8$ Hz), 3.86 (3H, td, $J = 8.5, 16.8$ Hz), 4.29 (2H, m), 7.83 (1H, s), 7.96 (1H, s), 8.54 (1H, s), 8.61 (1H, br), 9.33 (2H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 17.8 (CH_2), 30.1 (2CH_2), 32.0 (CH_3), 35.6 (CH_3), 46.4 (CH_2), 115.5 (CH_{ar}), 116.6 (CH_{ar}), 121.9 (C_{ar}), 139.8 (CH-N), 148.3 (CH_{ar}), 149.4 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 156.9 (C_{ar}), 164.4 (C_{ar}), 166.1 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2663, 1630, 1589, 1101; MS (FAB) m/z : 359 ($\text{M}^+\text{+H}$); MS (ESI) m/z : 359 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 359.10991 (Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{S}_2$: 359.11126); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{S}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 43.63; H, 4.81; Cl, 16.10; N, 19.08; S, 14.56. Found: C, 43.54; H, 4.65; Cl, 16.07; N, 19.13; S, 14.56; mp: 242-244°C (dec.).

2-Amino-5-(1-methylpropyl)-3-methoxycarbonylthiophene (111c)

化合物 **111a** の合成法に従い、市販の 3-methyl-1-pentanol **110c** より標記化合物 **111c** (36%) を淡黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.22 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.50-1.60 (2H, m), 2.62-2.69 (1H, m), 3.79 (3H, s), 5.79 (2H, br), 6.62 (1H, s); MS (ESI) m/z : 254 ($\text{M}^+\text{+MeCN}$).

4-Hydrazino-6-(1-methylpropyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine (112c)

化合物 **112a** の合成法に従い、チオフェン体 **111c** より標記化合物 **112c** (56%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.91 (3H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.36 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.64-1.72 (2H, m), 2.91-2.99 (1H, m), 6.57 (1H, br), 6.89 (1H, s), 8.50 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 11.8 (CH_3), 22.1 (CH_3), 31.6 (CH_2), 38.0 (CH), 111.9 (CH_{ar}), 115.3 (C_{ar}), 150.6 (C_{ar}), 152.8 (CH_{ar}), 157.9 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 165.7 (C_{ar}); IR (KBr) cm^{-1} : 3270, 2954, 1583; MS (FAB, ESI) m/z : 223 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 223.10034 (Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{S}$: 223.10174); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}$: C, 54.03; H, 6.35; N, 25.20; S, 14.42. Found: C, 53.99; H, 6.39; N, 25.52; S, 14.56.

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-*sec*-butylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (90)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **112c** およびアルデヒド **73d** より標記

化合物 **90** (45%) を黄白色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.92 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.38 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.68-1.76 (2H, m), 2.58-2.61 (3H, m), 3.06-3.13 (1H, m), 4.29 (2H, m), 7.83 (1H, s), 7.95 (1H, s), 8.53 (1H, s), 8.59 (1H, br), 9.29 (2H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 12.0 (CH_3), 22.3 (CH_3), 32.6 (CH_2), 33.4 (CH_3), 39.2 (CH), 48.4 (CH_2), 116.0 (C_{ar}), 116.5 (CH_{ar}), 125.0 (CH_{ar}), 143.9 (CH-N), 145.0 (C_{ar}), 147.0 (C_{ar}), 151.5 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 157.0 (CH_{ar}), 164.9 (C_{ar}), 165.8 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 2692, 1639, 1099; MS (FAB) m/z : 361 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 361.12685 (Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{S}_2$: 361.12691); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{S}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 43.44; H, 5.24; Cl, 16.03; N, 18.99; S, 14.50. Found: C, 43.70; H, 5.07; Cl, 16.04; N, 19.18; S, 14.53.; mp: 233-234°C (dec.).

Methyl 2-amino-5-(1-methylbutyl)thiophene-3-carboxylate (**111d**)

化合物 **111a** の合成法に従い、市販の 3-methylhexan-1-ol **110d** より標記化合物 **111d** (24%) を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.89 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.21 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.26-1.35 (2H, m), 1.41-1.53 (2H, m), 2.75 (1H, td, $J = 13.9, 7.1$ Hz), 3.78 (3H, s), 5.77 (2H, br), 6.61 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 14.0 (CH_3), 20.4 (CH_2), 22.5 (CH_3), 34.9 (CH), 40.8 (CH_2), 50.9 (CH_3), 105.8 (C_{ar}), 119.9 (CH_{ar}), 133.4 (C_{ar}), 161.1 (C_{ar}), 165.8 ($\text{C}=\text{O}$); IR (ATR) cm^{-1} : 3332, 2954, 1664, 1584, 1500, 1439, 1263; MS (ESI) m/z : 228 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 228.10266 (Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_2\text{S}$: 228.10582).

4-Hydrazino-6-(1-methylbutyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine (**112d**)

化合物 **112a** の合成法に従い、チオフェン体 **111d** より標記化合物 **112d** (52%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.91 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.27-1.36 (2H, m), 1.36 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.56-1.69 (2H, m), 2.50 (1H, m), 3.06 (1H, td, $J = 13.9, 6.8$ Hz), 6.48 (1H, br), 6.88 (1H, s), 8.50 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.8 (CH_3), 19.8 (CH_2), 22.4 (CH_3), 35.1 (CH_2), 40.3 (CH), 114.5 (C_{ar}), 114.5 (CH_{ar}), 147.7 (C_{ar}), 153.0 (CH_{ar}), 157.3 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 164.0 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 3260, 2958, 2925, 1579, 1516, 1355; MS (ESI) m/z : 237 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 237.11384 (Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{S}$: 237.11739); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$: C, 55.90; H, 6.82; N, 23.71; S, 13.57. Found: C, 55.96; H,

6.79; N, 23.72; S, 13.41.

**4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde [6-(1-methylbutyl)thieno-
[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl]hydrazone hydrochloride (91)**

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **112d** およびアルデヒド **73d** より標記化合物 **91** (79%) を無色固体・塩酸塩として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 0.91 (3H, t, *J* = 7.3Hz), 1.30-1.36 (2H, m), 1.38 (3H, d, *J* = 6.8Hz), 1.63-1.71 (2H, m), 2.59 (3H, t, *J* = 5.3Hz), 3.17 (1H, q, *J* = 6.6Hz), 4.28 (2H, t, *J* = 5.4Hz), 7.81 (1H, s), 7.95 (1H, s), 8.52 (1H, s), 8.56 (1H, br), 9.27 (2H, br); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 13.3 (CH₃), 19.4 (CH₂), 21.6 (CH₃), 31.8 (CH), 34.6 (CH₃), 35.1 (CH), 46.4 (CH₂), 115.2 (C_{ar}), 116.6 (CH_{ar}), 121.2 (CH_{ar}), 138.4 (CH-N), 148.0 (CH_{ar}), 149.6 (C_{ar}), 150.2 (C_{ar}-N), 152.5 (C_{ar}), 164.5 (C_{ar}), 166.4 (C_{ar}); IR (ATR) cm⁻¹: 1643, 1596, 1550, 1511, 1463, 1423, 1382, 1242, 1101; MS (FAB) *m/z*: 375 (M⁺+H); MS (ESI) *m/z*: 375 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 375.14012 (Calcd for C₁₇H₂₃N₆S₂: 375.14256); *Anal.* Calcd for C₁₇H₂₂N₆S₂·1.8HCl: C, 46.39; H, 5.45; Cl, 14.50; N, 19.09; S, 14.57. Found: C, 46.40; H, 5.34; Cl, 14.24; N, 19.12; S, 14.51.; mp: 238-240°C (dec.).

Methyl 2-amino-5-cyclohexylthiophene-3-carboxylate (111e)

化合物 **111a** の合成法に従い、市販の 2-cyclohexyl-1-ethano **110e** より標記化合物 **111e** (5%) を黄色透明油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.16-1.25 (1H, m), 1.28-1.37 (4H, m), 1.67-1.71 (1H, m), 1.77-1.81 (2H, m), 1.93-1.98 (2H, m), 2.51-2.56 (1H, m), 3.78 (3H, s), 5.78 (2H, br), 6.61 (1H, d, *J* = 1.1 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 25.9 (CH₂), 26.3 (2CH₂), 34.8 (2CH₂), 38.9 (CH), 50.8 (CH₃), 105.9 (C_{ar}), 119.0 (CH_{ar}), 133.4 (C_{ar}), 160.9 (C_{ar}-NH₂), 165.8 (C=O); IR (ATR) cm⁻¹: 3299, 2918, 2851, 1657, 1500, 1439, 1260; MS (ESI) *m/z*: 240 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 240.10716 (Calcd for C₁₂H₁₈NO₂S: 240.10582).

6-Cyclohexyl-4-hydrazinothieno[2,3-*d*]pyrimidine (112e)

化合物 **112a** の合成法に従い、チオフエン体 **111e** より標記化合物 **112e** (31%) を無色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.21-1.24 (1H, m), 1.35-1.43 (4H, m), 1.67-1.70 (1H, m),

1.76-1.80 (2H, m), 2.00-2.04 (2H, m), 2.81-2.86 (1H, m), 4.49 (2H, br), 7.34 (1H, br), 8.28 (1H, s), 8.81 (1H, br); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 25.1 (CH₂), 25.3 (2CH₂), 34.1 (2CH₂), 38.7 (CH), 113.6 (CH_{ar}), 114.5 (C_{ar}), 146.9 (C_{ar}), 152.6 (CH_{ar}), 157.2 (C_{ar}-N), 163.8 (C_{ar}); IR (ATR) cm⁻¹: 3286, 2917, 2849, 1581, 1510; MS (ESI) m/z : 249 (M⁺+H); HRMS (ESI) 249.11937 (Calcd for C₁₂H₁₇N₄S: 249.11739); Anal. Calcd for C₁₂H₁₆N₄S: C, 58.04; H, 6.49; N, 22.56; S, 12.91. Found: C, 57.76; H, 6.83; N, 22.51; S, 12.68.

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde (6-cyclohexylthieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl)hydrazone hydrochloride (**92**)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **112e** およびアルデヒド **73d** より標記化合物 **92** (58%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 1.23-1.34 (1H, m), 1.38-1.57 (4H, m), 1.72 (1H, d, $J = 12.9$ Hz), 1.83 (2H, d, $J = 12.9$ Hz), 2.11 (2H, d, $J = 10.3$ Hz), 2.60 (3H, t, $J = 2.9$ Hz), 2.95 (1H, m), 4.29 (2H, t, $J = 4.6$ Hz), 7.79 (1H, s), 7.94 (1H, s), 8.52 (1H, s), 8.55 (1H, br), 9.23 (2H, br); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 25.0 (CH₂), 25.3 (2CH₂), 32.0 (CH₃), 33.9 (2CH₂), 38.7 (CH), 56.3 (CH₂), 115.35 (CH_{ar}), 116.0 (C_{ar}), 121.6 (C_{ar}), 139.1 (CH-N), 148.1 (C_{ar}), 149.8 (C_{ar}-N, CH_{ar}), 152.1 (C_{ar}), 164.3 (C_{ar}), 165.9 (C_{ar}); IR (ATR) cm⁻¹: 2701, 1633, 1593, 1099; MS (FAB) m/z : 387 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 387.13763 (Calcd for C₁₈H₂₃N₆S₂: 387.14256); Anal. Calcd for C₁₈H₂₂N₆S₂·2.1HCl·0.25H₂O: C, 46.23; H, 5.30; Cl, 15.92; N, 17.97; S, 13.71. Found: C, 45.83; H, 5.30; Cl, 15.92; N, 18.34; S, 13.34.; mp: 236°C (dec.).

Methyl 2-amino-5-(1,2-dimethylpropyl)thiophene-3-carboxylate (**111f**)

化合物 **111a** の合成法に従い、市販の 3,4-dimethylpentan-1-ol **110f** より標記化合物 **111f** (29%) を黄色透明油状物質として得た。

^1H -NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.89 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.19 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.67-1.73 (1H, m), 2.56 (1H, dt, $J = 6.9, 14.9$ Hz), 3.79 (3H, s), 5.78 (2H, s), 6.60 (1H, s); ^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 18.3 (CH₃), 19.4 (CH₃), 20.6 (CH₃), 34.5 (CH), 41.6 (CH), 50.9 (CH₃), 105.7 (C_{ar}), 120.6 (CH_{ar}), 132.1 (C_{ar}), 161.1 (C_{ar}), 165.8 (C=O); IR (ATR) cm⁻¹: 3439, 3334, 2957, 1666, 1583, 1501, 1439, 1265; MS (ESI) m/z : 228 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 228.10542 (Calcd for C₁₁H₁₈NO₂S: 228.10582).

6-(1,2-Dimethylpropyl)-4-hydrazinothieno[2,3-*d*]pyrimidine (112f)

化合物 **112a** の合成法に従い、チオフェン体 **111f** より標記化合物 **112f** (59%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 0.88 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.91 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.27 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.84 (1H, td, $J = 13.5, 6.9$ Hz), 2.85 (1H, dt, $J = 13.5, 6.9$ Hz), 4.51 (2H, br), 7.34 (1H, s), 8.29 (1H, s), 8.82 (1H, br s); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 18.0 (CH₃), 18.8 (CH₃), 20.0 (CH₃), 33.8 (CH), 41.5 (CH), 114.3 (C_{ar}), 115.1 (CH_{ar}), 145.7 (C_{ar}), 152.6 (CH_{ar}), 157.1 (C_{ar}-N), 164.0 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 3289, 2956, 1579, 1508, 1355; MS (ESI) m/z : 237 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 237.11924 (Calcd for C₁₁H₁₇N₄S: 237.11739); *Anal.* Calcd for C₁₁H₁₆N₄S: C, 55.90; H, 6.82; N, 23.71; S, 13.57. Found: C, 56.19; H, 6.99; N, 23.63; S, 13.30.; mp: 156-158.

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde [6-(1,2-dimethylpropyl)-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl]hydrazone hydrochloride (9)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **112f** およびアルデヒド **73d** より標記化合物 **9** (82%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 0.92 and 0.93 (each 3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.35 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.91 (1H, td, $J = 13.2, 6.6$ Hz), 2.59 (3H, t, $J = 5.4$ Hz), 2.99 (1H, q, $J = 6.8$ Hz), 4.29 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 7.89 (1H, br), 7.99 (1H, s), 8.57 (1H, s), 8.68 (1H, br), 9.41 (2H, br); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD₃OD) δ : 19.0 (CH₃), 19.7 (CH₃), 20.9 (CH₃), 33.4 (CH₃), 36.2 (CH), 44.1 (CH), 49.5 (CH₂), 116.7 (C_{ar}), 117.0 (CH_{ar}), 125.1 (CH_{ar}), 143.6 (CH-N), 147.1 (C_{ar}), 148.0 (C_{ar}), 156.7 (C_{ar}-N), 158.3 (CH_{ar}), 164.8 (C_{ar}), 168.0 (C_{ar}); IR (ATR) cm^{-1} : 1635, 1579, 1508, 1460, 1419, 1373, 1247, 1147, 1099; MS (FAB) m/z : 375 (M⁺+H); HRMS (ESI) m/z : 375.14180 (Calcd for C₁₇H₂₃N₆S₂: 375.14256); *Anal.* Calcd for C₁₇H₂₂N₆S₂·2.5HCl·1.25H₂O: C, 41.82; H, 5.44; Cl, 18.29; N, 17.02; S, 12.95. Found: C, 41.68; H, 5.44; Cl, 18.29; N, 17.02; S, 12.95.; mp: 238-239°C (dec.).

2,2-Dimethyl-1-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-4-pentene (115)⁵¹⁾

Magnus らの合成法に従い、isobutyraldehyde **113** (25 mL, 0.275 mol) および allyl alcohol **26** (12.5 mL, 0.183 mol) を *p*-cymene (40 mL) に溶解し、*p*-TsOH (60 mg) を

加えディーンスターク脱水装置を用い 24 時間加熱還流した。蒸留 (bp₇₆₀ 124-128°C) により精製し、2,2-dimethyl-4-pentenal (14.8 g, 72%) を無色油状物質として得た。

水素化リチウムアルミニウム (0.8 g, 21 mmol) をジエチルエーテル (60 mL) に懸濁し、窒素下に室温にて、得られた 2,2-dimethyl-4-pentenal (8.00 g, 71 mmol) のジエチルエーテル溶液 (40 mL) を滴下した後、3 時間加熱還流した。放冷後、氷冷しメタノール (1.8 mL)、水 (0.8 mL)、15% 水酸化ナトリウム水溶液 (0.8 mL)、水 (2.4 mL) の順に加え室温に戻し 30 分撹拌した。不溶物をろ去、濃縮、減圧蒸留により精製し、2,2-dimethyl-4-pentanol (5.9 g, 73%) を無色油状物質として得た。

得られた 2,2-dimethyl-4-pentanol (2.28 g, 20 mmol) および *tert*-ブチルジフェニルシリルクロリド (5.7 mL, 22 mmol) を THF (50 mL) に溶解しイミダゾール (1.50 g, 22 mmol) を加え 20 時間撹拌した。反応液を水にて希釈し酢酸エチルにて抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル:ヘキサン = 1:50 溶出にて精製し、標記化合物 **115** (5.05 g, 72%) を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.85 (6H, s), 1.05 (9H, s), 2.05 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 3.32 (2H, s), 4.95-5.02 (2H, m), 5.71-5.82 (1H, m), 7.35-7.77 (10H, m).

2-Amino-5-[2-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-1,1-dimethyl]ethyl-3-methoxycarbonyl-*thiophene* (111g)

化合物 **115** (5.00 g, 14.2 mmol) および四酸化オスミウム (180 mg, 5 mol%) を THF:水 = 2:1 の混液 (225 mL) に溶解し、50°C に加熱撹拌した。次いで、過よ素酸ナトリウム (6.10 g, 28.5 mmol) を 1 時間かけて少しずつ加え、さらに 1 時間撹拌した。反応液に飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を加え 1 時間撹拌した後、ジエチルエーテルにて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル:ヘキサン = 1:20 溶出にて精製し 2,2-dimethyl-3-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)butanal (2.50 g, 50%) を無色油状物質として得た。

窒素雰囲気下、室温にてトリエチルアミン (1.05 mL, 7.5 mmol) および DMF (1.1 mL, 14 mmol) の混合溶液に、シアノ酢酸メチル (0.65 mL, 7.5 mmol) および 2,2-dimethyl-3-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)butanal (2.50 g, 7.0 mmol) を加え3分間攪拌し、硫黄 (225 mg, 7.0 mmol) を加えて72時間攪拌した。反応液に水を加えた後、酢酸エチルにて希釈抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル:ヘキサン = 1:9–1:4 溶出にて精製し、標記化合物 **111g** (2.50 g, 76%, 2steps 38%) を淡黄色油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.05 (9H, s), 1.29 (6H, s), 3.48 (2H, s), 3.78 (3H, s), 5.77 (2H, br), 6.68 (1H, s), 7.33-7.61 (10H, m).

6-[2-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-1,1-dimethyl]ethyl-4-oxothieno[2,3-*d*]pyrimidine (116)

化合物 **111g** (2.50 g, 5.34 mmol) のホルムアミド溶液 (12.5 mL) を、210°C にて2時間加熱還流した。放冷後、析出物をろ取し、水にて洗浄して、乾燥した。シリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル:ヘキサン = 1:1 溶出にて精製し、標記化合物 **116** (1.43 g, 58%) を無色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.04 (9H, s), 1.42 (6H, s), 3.61 (2H, s), 7.26 (1H, s), 7.32-7.59 (10H, m), 8.01 (1H, br); IR (KBr) cm^{-1} : 3571, 2854, 1689, 1577; MS (FAB) m/z : 463 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 463.18572 (Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2\text{SSi}$: 463.18755); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2\text{SSi}$: C, 67.49; H, 6.54; N, 6.05; S, 6.93. Found: C, 67.54; H, 6.82; N, 6.22; S, 6.67.

6-[2-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-1,1-dimethyl]ethyl-4-hydrazinothieno[2,3-*d*]pyrimidine (112g)

化合物 **116** (800 mg, 1.73 mmol) のオキシ塩化リン溶液 (8 mL) を110°C にて3時間加熱した。反応液を室温に戻した後、氷水に注ぎ、0°C にて炭酸水素ナトリウムを少量ずつ加え中和し、酢酸エチルにて希釈抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。硫酸ナトリウムをろ去後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに

付し、酢酸エチル:ヘキサン = 1:9 溶出にて精製し、6-[2-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-1,1-dimethyl]ethyl-4-chlorothieno[2,3-*d*]pyrimidine (780 mg, 94%) を淡黄色油状物質として得た。

得られた4-クロル体 (780 mg, 1.62 mmol) のエタノール溶液 (8 mL) に、室温にてヒドラジン1水和物 (4 mL) を加え 80°C に加温にして2時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、減圧下にて溶媒を留去し水にて希釈、酢酸エチルにて抽出した。飽和食塩水にて洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を減圧下、留去した。得られた残渣を酢酸エチル-ヘキサンにて再結晶し、標記化合物 **112g** (625 mg, 81%, 2steps 76%) を無色固体として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.02 (9H, s), 1.42 (6H, s), 3.63 (2H, s), 6.35 (1H, br), 6.90 (1H, s), 7.32-7.55 (10H, m), 8.51 (1H, s); IR (KBr) cm⁻¹: 3301, 3268, 2929, 1589, 1548; MS (FAB) *m/z*: 477 (M⁺+H); HRMS (ESI) *m/z*: 477.21018 (Calcd for C₂₆H₃₃N₄OSSi: 477.21443).

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde [6-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl]hydrazone hydrochloride (**93**)

ヒドラジン **112h** (885.6 mg, 1.86 mmol) およびアルデヒド **73d** (500 mg, 1.95 mmol) をベンゼン (17.0 mL) に溶解し、3時間加熱還流した。反応液を室温に戻し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、ヘキサン:酢酸エチル = 2:1 溶出部から得られた分画を減圧濃縮し、粗ヒドラゾン (777.6 mg, 1.08 mmol) を黄色固体として得た。

得られたヒドラゾン (777 mg) を THF (8 mL) に溶解し、氷冷下に TBAF (1.0M-THF 溶液, 1.3 mL, 1.31 mmol) を加え、室温にて15時間、75°C にて4.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、ヘキサン:酢酸エチル = 1:3 溶出部より得られた分画を減圧濃縮し、粗ヒドロキシ体 (35.8 mg) を黄色油状物質として得た。

得られたヒドロキシ体に4規定塩酸-ジオキサン (1.5 mL) を加え、室温にて16時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、エタノールにて共沸した後、エタノール/ヘキサン/酢酸エチルにて再結晶精製し、40°C にて一晩減圧乾燥することにより、標記化合物 **93** (9.3 mg, 3steps 2%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.40 (6H, s), 2.45 (3H, s), 3.49 (2H, s), 4.00 (2H, s), 5.06 (1H, br), 7.70 (1H, s), 7.83 (1H, s), 8.42 (1H, s), 8.50 (1H, s); IR (ATR) cm⁻¹: 1558, 1508,

1348; MS (FAB) m/z : 377 (M^+H); HRMS (ESI) m/z : 377.11975 (Calcd for $C_{16}H_{21}N_6S_2$: 377.12183); *Anal.* Calcd for $C_{16}H_{20}N_6OS_2 \cdot 1.5HCl \cdot 0.25H_2O$: C, 44.11; H, 5.09; N, 19.29; S, 14.72. Found: C, 44.46; H, 4.89; N, 18.98; S, 14.57.; mp: 197-198°C.

6-(1,1-Dimethyl-2-fluoroethyl)-4-hydrazinothieno[2,3-*d*]pyrimidine (112h)

化合物**116** (8.60 g, 18.4 mmol) をTHF (100 mL) に溶解しTBAF (1.0M-THF溶液, 36.7 mL, 36.7 mmol) を加えた。反応混液を70 °Cで一晩攪拌した後、室温まで冷却し減圧下濃縮した。残渣に飽和食塩水とクロロホルムを加え分液操作を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 100:3 溶出にて精製し、褐色油状物質を得た。これにクロロホルムと酢酸エチルの混合液 (1:1) を加え析出した固体をろ取り、6-(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-one (2.01 g) を褐色固体として得た。

得られたヒドロキシル体 (1.60 g, 7.14 mmol) をジクロロメタン (240 mL) に懸濁し、-78 °Cでジメチルアミノスルファトリフロリド (DAST, 3.77 mL, 28.6 mmol) を加え、2 時間かけて室温まで昇温した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を発砲に注意しながら加え中和した後、有機層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム:メタノール = 100:1 溶出にて精製し、6-(2-fluoro-1,1-dimethylethyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-oneを無色固体として得た。

得られたフルオロ体をオキシ塩化リン (25 mL) に懸濁し、1 時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却した後、減圧下濃縮した。残渣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。有機層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した後、溶媒を減圧下留去しシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン:酢酸エチル = 20:1 溶出にて精製し、4-クロル体 (1.31 g) を無色固体として得た。

得られた4-クロル体 (1.30 g, 5.31 mmol) をエタノール (75 mL) に溶解しヒドラジン1 水和物 (2 mL) を加え3 時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却した後、減圧下濃縮した。残渣に水を加え析出した沈殿物をろ取り、標記化合物**112h** (1.16 g, 3steps 33%) を無色固体として得た。

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 1.33 (3H, s), 1.38 (3H, s), 3.17 (2H, d, $J = 22.2$ Hz), 4.57 (2H,

br), 7.39 (1H, br), 8.31 (1H, s), 9.07 (1H, s); IR (ATR) cm^{-1} : 335, 2985, 1580, 1513, 1317; MS (FAB) m/z : 241 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 241.09405 (Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_4\text{S}$: 241.09232); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_4\text{S}$: C, 49.98; H, 5.45; F, 7.91; N, 23.32; S, 13.34. Found: C, 49.99; H, 5.46; F, 7.91; N, 23.12; S, 13.38.; mp: 209-212°C (dec.).

4-[(Methylamino)methyl]-1,3-thiazole-2-carbaldehyde [6-(2-fluoro-1,1-dimethylethyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl]hydrazone hydrochloride (94)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **112h** およびアルデヒド **73d** より標記化合物 **94** (97%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.39 (3H, s), 1.44 (3H, s), 2.59 (3H, t, $J = 5.4$ Hz), 3.30 (2H, d, $J = 22.0$ Hz), 4.28 (2H, t, $J = 5.4$ Hz), 7.89 (1H, s), 7.98 (1H, s), 8.56 (1H, s), 8.65 (1H, br), 9.40 (2H, br); MS (FAB) m/z : 379 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 379.10884 (Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{FN}_6\text{S}_2$: 379.11749); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{FS}_2 \cdot 2\text{HCl}$: C, 42.57; H, 4.69; Cl, 15.71; F, 4.21; N, 18.62; S, 14.21. Found: C, 42.52; H, 4.74; Cl, 15.80; F, 4.27; N, 18.68; S, 14.15.; mp: 224-226°C (dec.).

4-(1-Aminoethyl)-1,3-thiazole-2-carbaldehyde [6-(2-fluoro-1,1-dimethylethyl)-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl]hydrazone hydrochloride (10)

化合物 **76** の合成法に従い、ヒドラジン **112h** およびアルデヒド **73h** より標記化合物 **10** (88%) を黄色固体・塩酸塩として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.39 (3H, s), 1.44 (3H, s), 1.59 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 3.31 (2H, d, $J = 22.2$ Hz), 4.52-4.64 (1H, m), 7.92 (1H, s), 7.94 (1H, s), 8.54-8.90 (6H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 19.0 (CH_3), 26.1 (2CH_3), 41.4 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{F}$], 46.2 (CH), 95.5 (CH_2F), 113.5 (CH_{ar}), 115.3 (CH_{ar}), 119.0 (C_{ar}), 121.4 (CH-N), 138.0 (C_{ar}), 142.8 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 150.5 (C_{ar}), 152.4 ($\text{C}_{\text{ar-N}}$), 153.0 (C_{ar}), 154.9 (CH_{ar}), 164.4 (C_{ar}), 166.5 (C_{ar}); MS (FAB) m/z : 379 ($\text{M}^+\text{+H}$); HRMS (ESI) m/z : 379.11307 (Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{FN}_6\text{S}_2$: 379.11749); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{FN}_6\text{S}_2 \cdot 2.4\text{HCl} \cdot 0.95\text{H}_2\text{O}$: C, 39.78; H, 4.86; Cl, 17.61; F, 3.93; N, 17.40; S, 13.27. Found: C, 40.15; H, 4.80; Cl, 17.66; F, 3.61; N, 17.00; S, 13.01.; mp: 212-214°C (dec.).

In vitro 評価に関する実験

(酵素阻害活性の評価)

細胞の継代および試験条件

評価に使用した細胞の継代および試験は 10%牛胎児血清(Hyclone; USA) を含む RPMI1640 培地 (GIBCO; USA) を用い、37°C、5%CO₂ 条件下で実施した。また、昆虫由来 Sf-9 細胞 (国立感染症研究所より供与) は、10%牛胎児血清を含む グレース培地 (GIBCO) を用い 27°C閉鎖系で培養した。

組み換え蛋白の調製

CDK4 およびサイクリン D1、CDK2 およびサイクリン E の発現遺伝子を有するバキュロウイルス (東大医科研・Dr. H. Matsushima、または UCSF・Dr. D. Morgan 教授から供与) を Sf-9 細胞 (10⁷ 個以上) に感染させ、3 日後に 200-300 mL のカイネースバッファー (50 mM HEPES; pH7.5、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、2.5 mM EGTA、5 mg/mL AMSF、5 mg/mL aprotinine、0.1 mM NaF、10 mM β-glycerophosphate および 0.1 mM sodium-o-vanadate 含有) に細胞を溶解して、得られた遠心上清を Cdk4 および Cdk2 の酵素液として調製した。

CDK4 の基質である Rb はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白として、大腸菌を用いて生産した。GST-Rb 遺伝子を組み込んだ大腸菌を一晩前培養し、10 倍希釈したのちに、2-3 時間培養し、IPTG (終濃度 200 μM) を添加してさらに 6 時間培養した。つぎに、培養液の 1/10 量の TNEN 液 (20 mM Tris-HCl; pH8.0、150 mM NaCl、1 mM EDTA および 0.5% Nonidet P-40) に菌を懸濁し、超音波処理により細胞を破碎した。その遠心 (7,000 rpm) 上清に BSA (4% 液) 処理したグルタチオンビーズ (セファロース 4B、Amersham) を 20%量加えて 4°Cで 4 時間反応させ、GST-Rb 融合蛋白をビーズ上に回収した。

CDK4 および CDK2 阻害活性の評価試験

各検体を 10 mg/mL になるように DMSO にて溶解し、使用濃度の 10 倍濃度まで DMSO で希釈して 96 穴ガラスフィルタープレート (Whatman 社、GF/C フィルター) に 10 μL/well ずつ添加した。サイクリン D1-CDK4 酵素液またはサイクリン E-CDK2 酵素液 (原液を 10 倍希釈) を添加後、GST-Rb ビーズ液 (GST-Rb

ビーズ:カインースバッファー=1:3) および 0.2 mCi [³³P]ATP を含む 10 mM ATP 溶液を各々 30 μL ずつ加えて、溶液全量を 100 μL とし、30°C で 30 分間反応させた。つぎに、吸引しながらビーズを水で 4 回洗浄した。プレートを乾燥させた後に、液体シンチレーター (Microscint 20 ; パッカード社) を各ウェルに 50μL ずつ添加し、トップカウント (パッカード社) を用いてフィルターの放射活性を測定した。酵素液の代わりにバキュロウイルス非感染 Sf-9 昆虫細胞抽出液を添加した時の放射活性を (B)、酵素添加時の放射活性を (C)、および検体添加時の放射活性を (A)として、 $\{(A-B)/(C-B)\} \times 100 (\%)$ により T/C を求め、T/C=50% を挟む 2 用量より放射活性を 50%抑制する濃度 (IC₅₀) を計算し、検体の阻害活性とした。

c-Src カインース特異性の評価試験

酵素阻害における特異性を検討する目的で、Src kinase 阻害活性を測定した。U 底プレートに溶液全量が 50 μL になるように、10 倍濃度の検体 5 μL および酵素 (UBI, Cat#14-117) 15 μL (9U)、基質としてビオチン標識した合成ペプチド (2 μg) を含む ATP 溶液 (1.0 mCi [³³P]ATP、非ラベル ATP 最終濃度:30 μM) を 30 μL 添加し、30°C で 15 分間反応させた。その後、平衡化したアビジンビーズ (Streptavidin Sepharose High Performance, Amersham, Code No.17-5113-01) を 100 μL (ビーズとして 5 μL 含有) ずつ添加し、室温で 30 分間以上反応させた。反応液を 96 穴ガラスフィルタープレートに移して吸引しながらビーズを水で 4 回洗浄した。測定方法および IC₅₀ 算出方法は CDK4、CDK2 阻害活性の測定法と同様に実施した。

(細胞増殖抑制活性の評価)

MTT アッセイ試験

細胞増殖抑制活性は、MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 法⁵³⁾により判定した。HCT116 細胞は American Type Culture Collection (ATCC, USA) より購入した。PC-6 細胞は Immuno Biological Laboratories (群馬) より購入した。細胞 (1~5x10³ 個) を 96 穴プレートに播種し、翌日に検体を 1/1000 量添加して 37°C で 3 日間培養した。検体は最高用量を 10

$\mu\text{g/mL}$ に設定し、Biomek1000 を用いて 1/2 ずつ希釈し、10 用量を設定した。5 mg/mL の MTT 溶液を 10 $\mu\text{L/well}$ 添加して 4 時間培養し、培地除去後、DMSO を 150 $\mu\text{L/well}$ 添加して生成したフォルマザンを溶解し、540 nm で吸光度を測定した。細胞増殖抑制活性として各濃度における T/C (%) を求め、T/C=50%を挟む 2 用量より細胞増殖を 50%抑制する濃度 (GI_{50}) を算出した。

(G1 期集積の評価)

細胞周期分布の測定試験

細胞周期の測定はフローサイトメトリー法に準じて行った。HCT116 細胞を 1×10^5 cells/mL になるように播種し、翌日、16 時間ノコダゾール (50 ng/mL, Sigma, USA) 処理をして浮遊した細胞を回収した。回収した細胞を PBS で洗浄後 1×10^5 cells/mL になるように再播種した。薬剤を添加して 4-24 時間 (スクリーニング時は 16 時間) 処理し、細胞 ($>10^5$ 個) を回収して細胞周期測定キット (Cycle Test, Becton Dickinson) により染色体を染色した。つぎに、ファクスキャン (Becton Dickinson) を用いて細胞の DNA 含量を測定し、細胞周期の分布比率を算出した (Modifit software, Verity Software House, Inc.; Topsham, ME, USA)。

In vivo 評価に関する実験

(抗腫瘍効果の評価)

使用した溶媒

評価化合物を、20% Captisol[®] (β -Cyclodextrin Sulfobutylether Sodium Salt (SBE7- β -CyD), Lot. RPP-96-CDSBE-BA#10, CyDex Inc.) あるいは40% Captisol[®]を加えて超音波処理により溶解し、同溶媒で希釈して10 mL/kg あるいは20 mL/kgの割合で静脈内投与あるいは経口投与を行った。また、0.5% CMC 溶液 (CMC-Na; Carboxymethyl cellulose sodium salt (Medium Viscosity), Sigma-aldrich), 0.9% NaCl; 日本薬局方注射用蒸留水 (大塚製薬株式会社) に懸濁可能な化合物については、同溶媒で希釈して10 mL/kg あるいは20 mL/kg の割合で経口投与を行った。

使用した動物

5~6週令のBALB/c AnNCrj-nu 雄性マウス (日本チャールズ・リバー株式会社、厚木) あるいはBALB/c-nu/nu 雄性マウス (日本エスエルシー株式会社、静岡) を購入し、約1週間馴化させた後、各種検討に使用した。動物は飼育室に収容し、SPF 条件下で市販の固形飼料 (CMF、オリエンタル酵母工業株式会社、東京) とフィルター濾過した水道水を自由摂取させた。

腫瘍細胞の移植

先行他社化合物において、ヌードマウス皮下移植したHCT116細胞株に対し、抗腫瘍効果を示すという学会情報⁵⁴⁾を得、その方法を参考にしてヌードマウスの移植モデルを構築した。HCT116細胞株はATCCから入手した。細胞の維持および継代はin vitro で実施し、ハンクス液 (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS, Cat.No.14170-112) 中に浮遊させた細胞 (5.0×10^6 or 1×10^7 cells/0.1 mL/head) をヌードマウス右鼠蹊部皮下にインシュリン注射用シリンジを用いて移植した。

抗腫瘍効果試験

腫瘍移植後、推定腫瘍体積が $80 \sim 100 \text{ mm}^3$ に達した時点で、その平均値が各群で同等になるように群分けを実施し (5 あるいは6匹/群)、薬剤の投与を開始

した。投与スケジュールは、5日間連続投与を基本とし、4～12日間連続静脈内投与あるいは経口投与を行った。化合物の用量は、事前に実施した Maximum tolerated dose (最大耐量、MTD) 検討の結果をもとに設定した。

投与期間中、体重測定を経日的に実施し、毒性の指標として体重減少率 (BWL(%)) を次式により算出した。

$$\text{BWL(\%)} = \{1 - \text{各測定日の体重(g)} / \text{初回投与前の体重(g)}\} \times 100$$

腫瘍径の測定を2～3日毎に実施し、次式により各日毎の推定腫瘍増殖抑制率 (IRTV(%)) を算出した。

$$\text{IRTV(\%)} = \{1 - \text{薬剤投与群の推定腫瘍体積} / \text{無処置群の推定腫瘍体積}\} \times 100$$

引用文献およびノート

- 1) Pines, J. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 195.
- 2) Pines, J. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, E73.
- 3) Shapiro, G. I. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 1770.
- 4) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; Mcphail, A. T. *Trends in Genetics* **1999**, *15*, M53.
- 5) Hunter, T.; Pines, J. *Cell* **1994**, *79*, 573.
- 6) Sherr, C. *Science* **1996**, *274*, 1672.
- 7) Morgan, D. O. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261.
- 8) Khleif, S. N.; DeGregori, J.; Yee, C. L.; Otterson, G. A.; Kaye, F. J.; Nevins, J. R.; Howley, P. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 4350.
- 9) Dyson, N. *Gene Dev.* **1998**, *12*, 2245.
- 10) Sandhu, C.; Slingerland, J. *Cancer Detect. Prev.* **2000**, *24*, 107.
- 11) Barnes, D. M.; Gillett, C. E. *Breast Cancer Res. Treat.* **1998**, *52*, 1.
- 12) Jiang, W.; Kahn, S. M.; Tomita, N.; Zhang, Y. J.; Lu, S. H.; Weinstein, I. B. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2980.
- 13) Steeg, P. S.; Zhou, Q. *Breast Cancer Res. Treat.* **1998**, *52*, 17.
- 14) Malumbres, M.; Barbacid, M. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 2.
- 15) Tetsu, O.; McCormick, F. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 233.
- 16) (a) Naik, R. G.; Kattige, S. L.; Bhat, S. V.; Alreja, B. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2081. (b) Worland, P. J.; Kaur, G.; Stetler-Stevenson, M.; Sebers, S.; Sartor, O.; Sausville, E. A. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1831. (c) Carlson, B. A.; Dubay, M. M.; Sausville, E. A.; Brizuela, L. Worland, P. J. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2973.
- 17) (a) Takahashi, I.; Saitoh, Y.; Yoshida, M.; Sano, H.; Nakano, H.; Morimoto, M.; Tamaoki, T. *J. Antibiotics* **1989**, *42*, 571. (b) Akinaga, S.; Gomi, K.; Morimoto, M.; Tamaoki, T.; Okabe, M. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4888. (c) Seynaeve, C. M.; Stetler-Stevenson, M.; Sebers, S.; Kaur, G.; Sausville, E. A.; Worland, P. J. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2081.
- 18) (a) Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L. *Eur. J. Biochem.* **1994**,

- 224, 771. (b) Havlicek, L.; Hanus, J.; Vesely, J.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Shaw, G.; Strnad, M. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 408. (c) Wang, S.; McClue, S. J.; Ferguson, J. R.; Hull, J. D.; Stokes, S.; Parson, S.; Westwood, R.; Fischer, P. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2891.
- 19) Buolamwini, J. K. *Curr. Pharm. Design* **2000**, *6*, 379.
- 20) Sanderowicz, A. M. *Cancer Biol. Ther.* **2003**, *2*, S84.
- 21) Hirai, H.; Kawanishi, N.; Iwasawa, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 167.
- 22) (a) Fry, D. W.; Harvey, P. J.; Keller, P. R.; Elliott, W. L.; Meade, M.; Trachet, E.; Albassam, M.; Zheng, X.; Leopold, W. R.; Pryer, N. K.; Toogood, P. L. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1427; (b) VanderWel, S. N.; Harvey, P. J.; McNamara, D. J.; Repine, J. T.; Keller, P. R.; Quin III, J.; Booth, R. J.; Elliott, W. L.; Dobrusin, E. M.; Fry, D. W.; Toogood, P. L. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2371; (c) Toogood, P. L.; Harvey, P. J.; Repine, J. T.; Sheehan, D. J.; VanderWel, S. N.; Zhou, H.; Keller, P. P.; McNamara, D. J.; Sherry, D.; Zhu, T.; Brodfuehrer, J.; Choi, C.; Barvian, M. R.; Fry, D. W. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2388.
- 23) Cho, Y. S.; Borland, M.; Brain, C.; Chen, C. H. -T.; Cheng, H.; Chopra, R.; Chung, K.; Groarke, J.; He, G.; Hou, Y.; Kim, S.; Kovats, S.; Lu, Y.; O'Reilly, M.; Shen, J.; Smith, T.; Trakshel, G.; Vögtle, M.; Xu, M.; Ming Xu, Sung, M. J. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7938.
- 24) Horiuchi, T.; Chiba, J.; Uoto, K.; Soga, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 305.
- 25) Russo, A. A.; Jeffrey, P. D.; Pavletich, N. P. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 696.
- 26) Brotherton, D. H.; Dhanaraj, V.; Wick, S.; Brizuela, L.; Domaille, P. J.; Volyanik, E.; Xu, X.; Parisini, E.; Smith, B. O.; Archer, S. J.; Serrano, M.; Brenner, S. L.; Blundell, T. L.; Laue, E. D. *Nature* **1998**, *395*, 244.
- 27) Horiuchi, T.; Nagata, M.; Kitagawa, M.; Akahane, K.; Uoto, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7850.
- 28) Horiuchi, T.; Takeda, Y.; Haginoya, N.; Miyazaki, M.; Nagata, M.; Kitagawa, M.; Akahane, K.; Uoto, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 991-1002.
- 29) (a) Tinney, F. J.; Cetenko, W. A.; Kerbleski, J. J.; Connor, D. T.; Sorenson, R. J.; Herzig, D. J. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 878; (b) Gewald, K.; Schinke, E.; Böttcher, H. *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 94.

- 30) Hozien, Z. A.; Atta, F. M.; Hassan, Kh. M.; Abdel-Wahab, A. A.; Ahmed, S. A. *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 3733.
- 31) Beam, C. F.; Sandifer, R. M.; Foote, R. S.; Hauser, C. R. *Synth. Commun.* **1976**, *6*, 5.
- 32) Hosmane, R. S.; Lim, B. B. *Synth.* **1988**, *3*, 242.
- 33) Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer was used.
- 34) Solubilizing agent of CyDex Pharmaceuticals, Inc. was used.
- 35) Kadokawa Hongo Bldg. 4F, 5-24-5 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033.
<http://www.immd.co.jp/index.html>
- 36) University of California, Berkeley, Department of Chemistry, 351A Donner Laboratory, Berkeley, CA 94720-1460. <http://www-kimgrp.lbl.gov/>
- 37) Jonathan Pines, *Nature*, **1995**, *376*, 294.
- 38) Russo, A.A.; Tong, L.; Lee, J.-O.; Jeffrey, P.D.; Pavletich, N. P. *Nature*, **1998**, *395*, 237.
- 39) Day, P. J.; Cleasby, A.; Tickle, I. J.; O'Reilly, M.; Coyle, J. E.; Holding, F. P.; McMenamin, R. L.; Yon, J.; Chopra, R.; Lengauer, C.; Jhoti, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 4166.
- 40) Takaki, T.; Echaliier, A.; Brown, N. R.; Hunt, T.; Endicott, J. A.; Noble, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 4171.
- 41) Chong, W. K. M.; Li, L.; Duvadie, R. K.; Chu, S. S.; Yang, Y. M.; Nonomiya, J.; Tucker, K. D.; Knighton, D. R.; Ferre, R. A.; Lundgren, K.; Escobar, J.; Minnick P. S.; Huber, A.; Koudriakova, T.; Arruda, J. M.; Sisson, W.; Aust, R. M.; Verkhivker, G. M.; Schaffer, L.; Rose, P. W.; Lewis, C. T. Unique cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors at the ATP-site. *218th ACS National Meeting* (New Orleans), **1999**, Abstracts MEDI-315.
- 42) Pierce, A. C.; Sandretto, K. L.; Bemis, G. W. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **2002**, *49*, 567.
- 43) Pierce, A. C.; ter Haar, E.; Binch, H. M.; Kay, D. P.; Patel, S. R.; Li, P. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1278.

- 44) Middleton, D. S.; Maw, G. N.; Challenger, C.; Jessiman, A.; Johnson, P. S.; Million, W. A.; Nichols, C. L.; Price, J. A.; Trevethick, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 905.
- 45) Haginoya, N.; Kobayashi, S.; Komoriya, S.; Yoshino, T.; Suzuki, M.; Shimada, T.; Watanabe, K.; Hirokawa, Y.; Furugori, T.; Nagahara, T. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5167.
- 46) Ishizawar, R.; Parsons, J. S. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 209.
- 47) Xu, W. Q.; Doshi, A.; Lei, M.; Eck, M. J.; Harrison, S. C. *Mol. Cell.* **1999**, *3*, 629.
- 48) Dority J. A. Jr.; Earley W. G.; Kumar V.; Mallamo J. P.; Miller M. S.; Subramanyam C. US Patent 5569655 (**1996**).
- 49) Sinha, C.S.; Dutta, S.; Sun J. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8243.
- 50) Illig, C. R.; Subasinghe, N. L.; Hoffman, J. B.; Wilson, K. J.; Rudolph, M. J.; Bone, R. F.; Klein, S. L.; Randle, T. L.; US Patent 2002/0037915 (**2002**).
- 51) Magnus P. D.; Nobbs M. S. *Synth. Commun.* **1980**, *10*, 273.
- 52) Olsen, J. A.; Banner, D. W.; Seiler, P.; Sander, U. O.; D'Arcy, A.; Stihle, M.; Muller, K.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 2507.
- 53) Mitsui, I.; Kumazawa, E.; Hirota, Y. Aonuma, M.; Sugimori, M.; Ohsuki, S.; Uoto, K.; Ejima, A.; Terasawa, H.; Sato, K. *Jpn. J. Cancer Res.* **1995**, *86*, 776.
- 54) Li, L.; Duvadie, R. K.; Chong, W. K. M.; Chu, S. S.; Yang, Y. M.; Nonomiya, J. et al. Novel ATP-Site Cyclin-Dependent Kinase(CDK) Inhibitors. Selective Inhibitors of CDK4., *AACR Meeting*, **1999**, Abstracts #215.

主論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による。

1. Horiuchi, T.; Chiba, J.; Uoto, K.; Soga, T.: Discovery of novel thieno[2,3-*d*]-pyrimidin-4-yl hydrazone-based inhibitors of Cyclin D1-CDK4: Synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 305-308 (2009).
2. Horiuchi, T.; Nagata, M.; Kitagawa, M.; Akahane, K.; Uoto, K.: Discovery of novel thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl hydrazone-based inhibitors of cyclin D1-CDK4: Synthesis, biological evaluation and structure–activity relationships. Part 2. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 7850-7860 (2009).
3. Horiuchi, T.; Takeda, Y.; Haginoya, N.; Miyazaki, M.; Nagata, M.; Kitagawa, M.; Akahane, K.; Uoto, K.: Discovery of Novel Thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl Hydrazone-Based Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation and Structure-Activity Relationships. *Chem. Pharm. Bull.*, 59 (8), 991-1002 (2011).

主査および副査名

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

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	西田 篤司
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	石川 勉
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	理学博士	石橋 正己
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	高山 廣光
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	濱田 康正