

リン脂質症リスクの低減を意図した  
bFGF 様低分子化合物の探索研究

2020

坂井 啓紀

# 目次

理論の部	1
第1章 緒言	2
第1節 脳梗塞治療に対するアンメットニーズと塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)	2
第2節 本研究の目的と方針	3
第3節 本研究の概要	4
第2章 ジアミン化合物のデザインと合成、リン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) 評価	6
第1節 研究の背景	6
第2節 リン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) の測定方法ならびに判定基準	8
第3節 ジアミン化合物の物理化学的性質とリン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) の相関ならびに化合物デザイン	9
第4節 second basic pKa (pKa <sub>2</sub> ) を低減させたジアミン化合物のリン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) 評価	12
第5節 ジアミン化合物のリン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) と物理化学的性質の関係性に関する分析と考察	18
第6節 合成	22
第7節 小括	28
第3章 リン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) 陰性のジアミン化合物を用いた SUN13837 誘導体の合成及び生物評価	29
第1節 研究の背景	29
第2節 <i>in vitro</i> 評価及びラット薬物動態評価	30
第3節 <i>in vivo</i> 薬効評価	34
第4節 合成	35
第5節 小括	36
第4章 1,2,3-トリアゾール誘導体の生物評価	37
第1節 研究の背景	37
第2節 <i>in vitro</i> 評価及びラット薬物動態評価	37
第3節 1,2,3-トリアゾール 5 位置換基効果に関する考察	42
第4節 合成	43
第5節 小括	44
第5章 結論	45
実験の部	47
実験及び測定に関する一般事項	48
第2章に関する実験	49
第3章に関する実験	68

第4章に関する実験 .....	77
引用文献・備考 .....	84
論文目録 .....	87
謝辞 .....	88

## 略語一覧

略語	略していない表現
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion
AUC	area under the curve
BBB	blood brain barrier
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	<i>N</i> -benzyl-4-(methylamino)piperidine
Boc	tert-butoxycarbonyl
CAD	cationic amphiphilic drug
Cbz	benzyloxycarbonyl
CHO	chinese hamster ovary
CL	clearance
CYP	cytochrome P
EDC	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride
EWG	electron-withdrawing group
FGF	fibroblast growth factor
$K_{p,1h}$	brain-to-plasma partition coefficient at 1 h after intravenous administration
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -chloroperoxybenzoic acid
MBI	Mechanism-based inhibition
NADPH	dihyronicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBD-PC	1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine
NC	net charge
NMR	nuclear magnetic resonance
NV	normalized value
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
P-gp	P-glycoprotein
$pK_{a1}$	most basic $pK_a$
$pK_{a2}$	second basic $pK_a$
PK	pharmacokinetics
PLIP	phospholipidosis-inducing potential
PSA	polar surface area
rt	room temperature
$T_{1/2}$	elimination half life
t-PA	tissue plasminogen activator
VDW	van der Waals

## 理論の部

## 第1章 緒言

### 第1節 脳梗塞治療に対するアンメットニーズと塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)

脳梗塞は脳血管障害（脳卒中）の一つであり、脳動脈が閉塞することにより支配領域の血流が途絶して脳組織が壊死に陥る病態である<sup>1</sup>。脳卒中は日本人の死因の第4位であり、患者総数は100万人を超えている。脳梗塞は脳卒中全体の4分の3を占めており、高齢者の増加や、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病の増加により、今後も患者数の増加が見込まれる<sup>2,3</sup>。近年の脳血管疾患治療技術の発達により脳梗塞の死亡率は低下傾向にあるが<sup>4</sup>、家族や周囲の介護又は介助が必要となる様々な後遺症を残すケースが多く、患者の生活の質 (quality of life; QOL) が大きく低下することが問題視されている<sup>5</sup>。

脳梗塞発症後数時間以内（急性期）に治療を開始した場合、t-PA 製剤を用いた血栓溶解療法<sup>6</sup>及び／又はカテーテルを用いて血栓を除去する血管内治療<sup>7</sup>により閉塞血管を再開通させることで、神経症状や後遺症の改善が期待できる。発症後すぐに脳梗塞に伴う症状に気づき、数時間以内に治療を開始できるケースは多くないが、これらの治療法は脳梗塞の急性期治療において世界的にも一定の有効性が示されている。

一方、急性期から亜急性期にかけて投与される脳保護薬に関して、その効果は限定的である。本邦で承認されているエダラボンはフリーラジカル消去及び脂質過酸化抑制により神経細胞を酸化的傷害から保護すると考えられており、日本脳卒中学会より公表された「脳卒中治療ガイドライン 2015 [追補 2017]」では「脳保護作用が期待される薬剤について、脳梗塞急性期の治療として用いることを正当化するに足る臨床的根拠は、現在のところエダラボンに関する報告のみで、推奨グレード B」と記載されている<sup>8</sup>。しかし、米国脳卒中学会及び米国心臓協会が公表している「脳卒中患者の初期管理のためのガイドライン」では「神経保護剤による治療は推奨しない (No benefit)」と記載されており<sup>9</sup>、世界的に脳保護薬として利用されている薬剤は存在しない。

また、亜急性期以降は主に再発予防を意図した抗血小板療法及び抗凝固療法等が行われており<sup>8</sup>、根本的な薬物治療法、すなわち脳梗塞で失われた機能を改善又は治療しうる脳機能改善薬等は存在しない。

以上のことから、十分な脳保護作用及び脳機能改善作用を有する脳梗塞治療薬を見いだすことができれば、脳梗塞の薬物治療において、有用な選択肢を提供することになると考えられる。

線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor、以下 FGF) は、線維芽細胞をはじめとする様々な細胞に作用し、形態形成、組織修復、再生、及び生体の恒常性を維持するための代謝調節に働く、多機能性の分泌タンパク質である<sup>10,11,12,13</sup>。現在、哺乳類で確認されている FGF は 23 種類あり、この中で、塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF-2 又は basic FGF、以下 bFGF) はその強力な血管新生作用と細胞増殖作用から高い創傷治療効果を示し、本邦において褥瘡・潰瘍治療薬としてスプレー式外用薬が市販されている<sup>14</sup>。bFGF は神経栄養因子の一つとしても知られ

ており、神経機能回復に寄与し得る細胞分化作用（神経細胞保護作用、神経軸索・突起伸展作用、神経幹細胞分化誘導作用等）を有している。実際に、bFGFはラット中大脳動脈塞栓モデルにおいて脳虚血後の運動機能回復を促進することが報告されており、脳梗塞治療薬として有効性を示す可能性が示唆されている<sup>15</sup>。しかしながらbFGFは細胞増殖作用を有するため、全身曝露した際に炎症反応の亢進や腫瘍増殖等を引き起こす懸念がある<sup>16,17</sup>。また、bFGFは高分子タンパク質であるために血液脳関門（blood brain barrier: BBB）透過性に限界があり、これは中枢神経用薬として使用する上で重大な欠点である。したがって、これらの欠点を廃したbFGF様低分子化合物を見いだすことができれば、理想的な脳梗塞治療薬となると考えられる。

## 第2節 本研究の目的と方針

SUN13837 (1) は サントリー生物医学研究所で合成された低分子化合物であり、FGF 受容体シグナルを活性化して bFGF 様の細胞分化作用をもたらす (図 1-1)<sup>18</sup>。一方で 1 は bFGF 様の細胞増殖作用をしめさず、bFGF シグナルに起因する炎症反応や腫瘍増殖を誘起しない。さらに、化合物 1 は経口吸収性を有することから長期投与に適した経口剤での開発が可能であり、また低分子化合物であることから脳組織への移行が期待できる。これらの理由より、化合物 1 は bFGF の欠点を廃した、理想的な脳梗塞治療薬になり得ると考えられた。

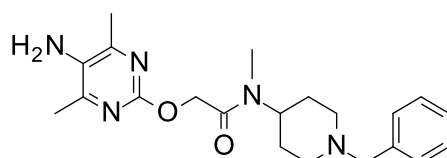


図 1-1 SUN13837 (1) の構造

化合物 1 は脳梗塞治療薬として望ましい薬理作用プロファイル及び薬物動態プロファイルを有していたが、化合物 1 に含まれるアミド結合が生体内で加水分解を受け、結果として生じる *N*-benzyl-4-(methylamino)piperidine (BMP、2) がリン脂質症を誘発することが明らかとなった (図 1-2、未公表データ)。リン脂質症はリソソーム中にリン脂質が蓄積することを特徴とする病態であり、細胞機能を障害することで時に致命的な結果を招くことが報告されている<sup>19</sup>。

また、リン脂質症は特に薬物が長期間投与された場合にみられる毒性所見である。脳梗塞亜急性期以降の神経機能改善を意図した脳梗塞治療薬としては長期投与が想定されること、さらに bFGF 様の薬理作用を有する化合物は他の慢性神経疾患治療薬にもなり得ることを考慮すると、リン脂質症を誘発するリスクがない長期投与可能な bFGF 様低分子化合物を見いだす意義は大きい。こうした背景をもとに、著者は 1 をリード化合物とし、リン脂質症を誘発する懸念が小さい bFGF 様化合物の探索研究に着手した。

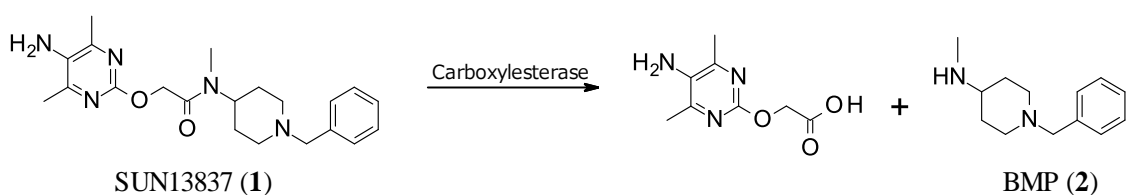


図 1-2 BMP (2) の構造および生成メカニズム

上述の目的を達成するため、化合物 **1** をリード化合物とし、図 1-3 に示す 2 つの方針に従い構造変換を行うこととした。方針 1 では **1** の BMP 構造を、リン脂質症を起こしにくいジアミン構造に変換することで、生体内で加水分解を受けた場合でもリン脂質症を誘起しない化合物を見いだすことを企図した。方針 2 では、化合物 **1** のアミド構造を生体内で加水分解を受けない構造に変換し、リン脂質症を誘起しやすいジアミン体を生成しない化合物を見いだすことを企図した。

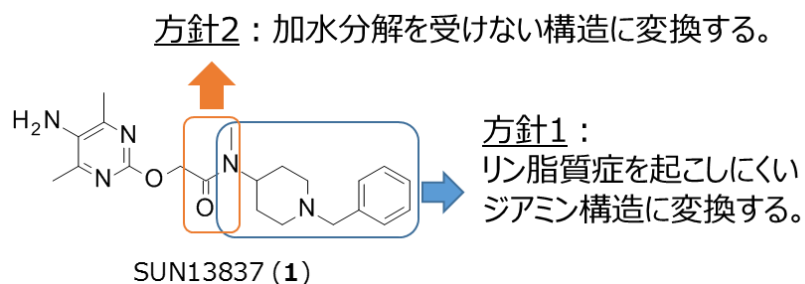


図 1-3 リン脂質症リスクが低下した bFGF 様化合物取得に向けた化合物デザイン

### 第 3 節 本研究の概要

本研究では、まず方針 1 に用いるジアミン化合物の探索を目的とし、BMP と構造類似の 40 種のジアミン化合物について *in vitro* でリン脂質症誘起ポテンシャル (phospholipidosis-inducing potential、PLIP) を評価した。先行研究においてジアミン化合物は PLIP 陽性となる可能性が非常に高いことが示唆されていたが、本研究において PLIP 陰性となるジアミン化合物が複数存在することが明らかにした。また、評価したジアミン化合物の PLIP と *in silico* 物理化学パラメータの関係性を分析し、低分子量のジアミン化合物においてはこれまで PLIP との相関が報告されていた ClogP 又は most basic pKa ではなく、second basic pKa を用いることで PLIP の有無を予測できる可能性があることを明らかにした。本内容について本論の第 2 章で述べる。

第 2 章で見いだした、PLIP 陰性のジアミン化合物を用いて **1** の誘導体を合成し、生物評価を行ったところ、2,2-ジフルオロシクロプロピル基を有する **82** が最も強力な *in vitro* 神経細胞保護作用 (**1** と比較して 189% efficacy) を示し、良好な薬物動態プロファイルを有していることが判明した。さらに **82** は薬物排出トランスポーターである P 糖タンパク質の基質でなく、



また十分な脂溶性を有していることに注目し、脳移行性向上を目指して水素結合供与基を減らす構造変換を行ったところ、*in vitro* 神経細胞保護作用は **1** と同等であり、脳移行性が格段に向上した **93** を見いだすことに成功した (図 1-4)。本内容について本論の第 3 章で述べる。

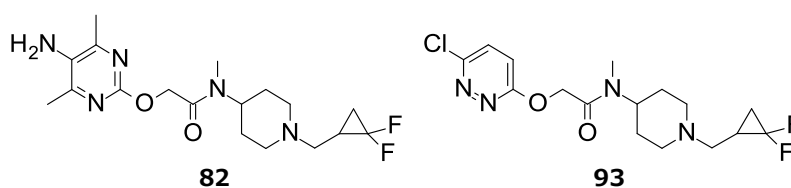


図 1-4 方針 1 から見いだした **82** 及び **93** の構造

次に、方針 2 に従い **1** のアミド構造を 1,4-二置換 1,2,3-トリアゾールに変換したところ、*in vitro* 神経細胞保護作用を示す **99** を得た。**99** は CYP3A4 に対する Mechanism-based inhibition 作用を有していたことから、これを低減させるために芳香族アミノ基を除去し、更に代謝安定性を改善する目的でフェニル基をシクロプロピル基に変換することで、強力な *in vitro* 神経細胞保護作用 (同 162% efficacy)、優れた薬物動態プロファイル及び良好な脳移行性を有する **107** を見出した。さらに、**107** のトリアゾール環 5 位にメチル基を導入した **108** では *in vitro* 神経細胞保護作用が大きく向上したことから (同 311% efficacy)、1,4,5-三置換 1,2,3-トリアゾールが **1** の 3 級アミド構造と類似の性質を有する可能性が示唆された (図 1-5)。本内容について本論の第 4 章で述べる。

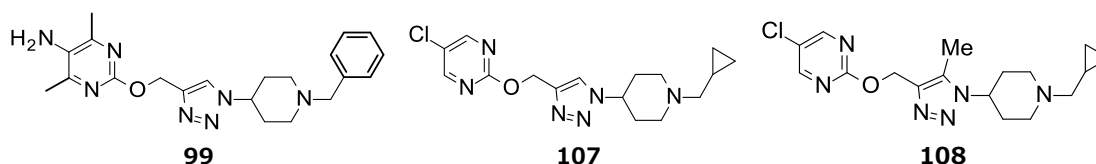


図 1-5 方針 2 から見いだした **99**、**107**、及び **108** の構造

以下、これら詳細について述べる。

## 第2章 ジアミン化合物のデザインと合成、リン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) 評価

本章では、前章第2節で記載した方針1に用いる、リン脂質症を起こしにくいジアミン化合物を見いだすことを目的とし、各種ジアミン化合物のデザイン、合成、PLIP 評価を行い、ジアミン化合物の構造、物性値、PLIP との関係について検討を行ったのでその詳細について述べる。

### 第1節 研究の背景

リン脂質症は肺、腎臓、又は肝臓をはじめとする全身の器官にリン脂質が過剰に蓄積する病態であり、遺伝的にリン脂質代謝に機能不全がある場合（ニーマン・ピック病など）や、カチオン性両親媒性薬物（CAD）を長期投与した場合に生じることが知られている。後者は薬物誘発性リン脂質症と呼ばれ、CAD がリソソーム内に蓄積することでリソソーム中の微小環境が変化し、ホスホリパーゼによるリン脂質代謝が阻害されることが主な原因の一つと考えられている<sup>20</sup>。

リン脂質症は薬剤に長期間曝露されることで生じる毒性であり、動物を用いた長期反復投与毒性試験で初めて明らかとなるケースが多いことから、その発症リスクを早期に見積もるために種々の *in vitro* 評価法が開発されてきた。これらの *in vitro* 評価法はリン脂質症誘起ポテンシャル（phospholipidosis-inducing potential、以下 PLIP）を有する化合物を開発の初期段階で排除することを可能とただけでなく、多くの化合物の PLIP に関するデータが蓄積されることで、*in silico* 物理化学パラメータから PLIP を予測する手法の開発に貢献してきた。現在の創薬化学研究では、化合物のデザインを行う段階から *in silico* 物理化学パラメータを用いて PLIP の有無を予測する手法が広く用いられている<sup>21</sup>。

*in silico* 物理化学パラメータにもとづく PLIP 予測法のうち、Ploemen らが提唱した予測法及び Tomizawa らが提唱した予測法について以下に述べる。Ploemen らは、化合物の塩基性を表す pKa と脂溶性を表す ClogP を用いた PLIP 予測法を報告している（図 2-1）<sup>22</sup>。本法は (most basic pKa)  $\geq 8$ 、かつ ClogP  $\geq 1$ 、かつ (most basic pKa)<sup>2</sup> + (ClogP)<sup>2</sup>  $\geq 90$  を満たす場合に PLIP 陽性、いずれか一つでも満たさない場合に PLIP 陰性と判断するものであり、化合物の塩基性又は脂溶性が増大するにつれて PLIP 陽性となる可能性が高くなることを示唆している。平易な数式を用いること、及び ClogP 及び pKa は化合物の構造からプログラムを用いて計算可能であることから、本予測法は簡便で実用的な方法として広く用いられている。

PLIP-positive	PLIP-negative
(most basic pKa) $\geq$ 8, and ClogP $\geq$ 1, and (most basic pKa) <sup>2</sup> + (ClogP) <sup>2</sup> $\geq$ 90	(most basic pKa) $<$ 8, or ClogP $<$ 1, or (most basic pKa) <sup>2</sup> + (ClogP) <sup>2</sup> $<$ 90

図 2-1 Ploemen らによる PLIP 予測モデル

Tomizawa らは ClogP 及びリソソーム中の pH (pH=4.0) における正味の正電荷 (net charge: NC) を用いた予測法を報告している (図 2-2) <sup>23</sup>。NC は化合物のイオン化状態を数値化したものであり、酸性官能基を持たないジアミン化合物の場合、pH に応じて 0 から 2.0 の間で連続的な値をとる (図 2-3)。

PLIP-positive	PLIP-positive/negative	PLIP-negative
NC $>$ 1	NC = 1 As ClogP increases, the likelihood of PLIP-positive increases.	NC $<$ 1

図 2-2 Tomizawa らによる PLIP 予測モデル

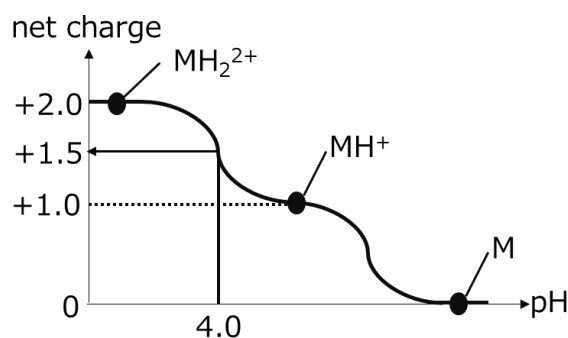


図 2-3 Net charge (NC) 図説 : 本図の場合、pH = 4.0 における NC は 1.5 となる。

本予測法は、NC が 1 を超える場合に PLIP 陽性、1 に満たない場合に PLIP 陰性、NC=1 の場合は ClogP が高くなるにつれて PLIP 陽性となる確率が上昇すると判断する。NC は化合物の塩基性を反映する指標であることから、Ploemen らの予測法と同様に、本予測法も化合物の塩基性又は脂溶性が増大するにつれて PLIP 陽性となる可能性が高くなることを示唆している。

上記予測法に基づく、BMP のように高い塩基性と適度な脂溶性を有するジアミン化合物は PLIP 陽性になり易いことが予想される。特に Tomizawa らの予測法によれば、ジアミン化

化合物 (NC > 1) であるというだけで PLIP 陽性となる可能性が非常に高いとされていることから、PLIP 陰性となるジアミン化合物を見いだすことは困難と思われた。しかしながら、これらの予測法は主に市販薬物及びその誘導体の PLIP をもとに開発されており、本研究の対象とするジアミン化合物の PLIP に関する情報は殆ど考慮されていないことから、ジアミン化合物の PLIP を精度高く予測できていない可能性があると考え、PLIP 陰性ジアミン化合物の探索に着手した。

生体内で加水分解を受けた場合にジアミン化合物を生成しうる構造は **1** に限定されたものではなく、他の医薬品にも広く用いられている (図 2-4)。ジアミン化合物の PLIP に関する知見はこれら医薬品のリン脂質症に係るリスク評価に広く応用可能であり創薬化学研究全般に有用な知見を与えることになると考え、ジアミン化合物の構造と PLIP の関係について検討を行った。

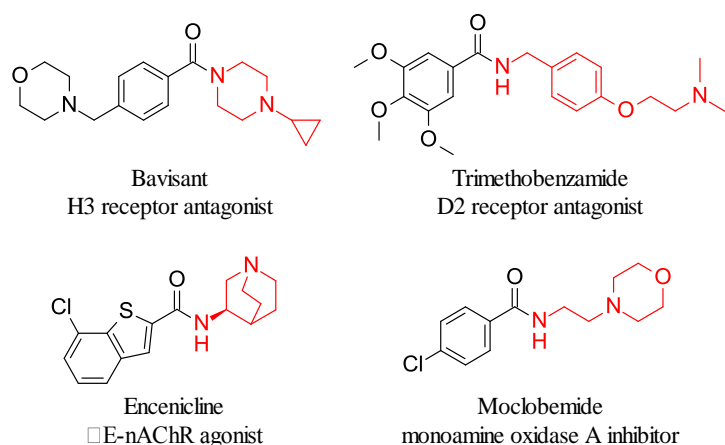


図 2-4 アミド構造を介してジアミン化合物を含有する医薬品

## 第 2 節 リン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) の測定方法ならびに判定基準

リン脂質は水中で自発的に二重膜を形成するため、リン脂質が蓄積した細胞ではリソソーム内に多層板構造物 (ラメラ体) が認められる。よって、リン脂質症であることを確認するには透過型電子顕微鏡を用いてラメラ体を直接確認することが最も確実な方法である。しかしながら電子顕微鏡を用いた方法はスループットが低く、創薬研究の初期段階ではより簡便かつ迅速な方法が求められる。Ulrich らは、蛍光標識リン脂質の 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine (NBD-PC) を用いて、リソソーム内の多層板構造物を蛍光顕微鏡によって検出できる事を報告した<sup>24</sup>。Kasahara らは Ulrich らの方法を改良し、96 穴マイクロプレートを用いたハイスループットアッセイ系を構築した<sup>25</sup>。すなわち蛍光リン脂質と被験物質を 96 well で培養した CHO-K1 細胞に添加し、24 時間培養後、蛍光強度を測定することで取り込まれたリン脂質を定量し、さらに別の波長で励起される

蛍光色素で核を染色することにより求めた生細胞数を用いて normalized value (NV) (=細胞内蛍光強度/生細胞数) を算出した。NV は病理学的変化の度合いと相関し、その値が 1.5 を超えるとラメラ体の産生が誘起されることを報告している。

本研究は Kasahara らの方法に準じて PLIP を評価した<sup>26</sup>。偽陰性を可能な限り排除する目的で Kasahara らが評価した化合物濃度である 30 μM より 10 倍高い 300 μM において NV が 1.5 以下となるジアミン化合物を見出すことを目指した。本研究では、300 μM において NV が 1.5 以下である場合に「PLIP 陰性」、1.5 を超える場合に「PLIP 陽性」と定義する。

### 第3節 ジアミン化合物の物理化学的性質とリン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) の相関ならびに化合物デザイン

化合物の構造と PLIP の傾向を把握するため、まず **2** 及びそれに類似したジアミン化合物 **3-8** を合成、その PLIP を評価し、*in silico* 物理化学パラメータ (ClogP 及び pKa) と NV の関係を調査した (表 2-1)。ジアミン化合物は 2 つの塩基性窒素を有するため 2 つの pKa 値を有しており、分子の正味正電荷が +0.5 となる pH を most basic pKa (pKa<sub>1</sub>)、+1.5 となる pH を second basic pKa (pKa<sub>2</sub>) とした (図 2-5)。なお、特に断りのない限り、本論文で用いた pKa (ジアミン化合物の場合は pKa<sub>1</sub> 及び pKa<sub>2</sub>) は ADMET predictor, Simulation.plus.inc. Version 7.2.0001. を用いて計算した値である。

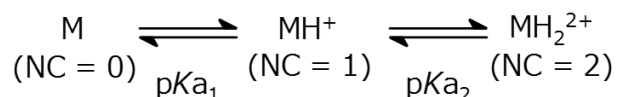
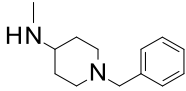
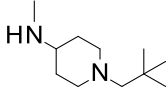
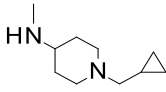
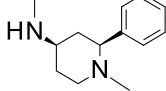
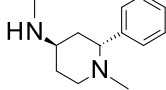
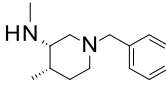
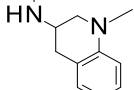


図 2-5 pKa<sub>1</sub> 及び pKa<sub>2</sub> の定義

化合物 **2** の NV は 3.3 であり、1.5 を上回っていることから、本評価系においても高い PLIP を有していることが示された。*tert*-butyl 基を有する **3** の NV は **2** より低下したが、依然 1.5 より高い値を示した。シクロプロピル基を有する **4** は、その脂溶性が非常に低い (ClogP=0.3) にもかかわらず **2** と同等の NV を示したことから、PLIP に対する脂溶性の寄与は限定的であると考えられた。また、化合物 **2** の位置異性体である **5** 及び **6** の NV も **2** と同程度であり、PLIP に対する分子の形状の寄与も限定的であると考えられた。一方、ピペリジン窒素の位置を移動させた **7** 及び縮環ピペリジン **8** は、それらの脂溶性が非常に高いにもかかわらず 1.5 より低い NV を示した。化合物 **4-8** の結果から、Ploemen や Tomizawa らの予測法を用いてジアミン化合物の PLIP を予測することは困難であることが示された。

著者は、NV が低値を示した **7** 及び **8** の pKa<sub>2</sub> が他のジアミン化合物より低いことに注目し、pKa<sub>2</sub> がこれらジアミン化合物の PLIP を予測するうえで良い指標になるのではと考えた。そこで、pKa<sub>2</sub> が低下したジアミン化合物の NV を測定し、本仮説 (以下、pKa<sub>2</sub> 仮説) を検証することとした。

表 2-1 BMP 様ジアミン化合物の ClogP、pKa<sub>1</sub>、pKa<sub>2</sub>、NV 及び PLIP 予測結果.

Cmpd.	Structure	ClogP <sup>c</sup>	pKa <sub>1</sub> <sup>d</sup>	pKa <sub>2</sub> <sup>d</sup>	NV	Prediction by Ploemen's model	Prediction by Tomizawa's model
BMP (2)		1.3	10.2	6.3	3.3	positive	positive
3 <sup>a</sup>		1.2	10.3	7.6	2.3	positive	positive
4 <sup>a</sup>		0.3	10.2	7.5	3.2	negative	positive
5 <sup>a,b</sup>		0.7	9.8	6.4	3.0	negative	positive
6 <sup>a,b</sup>		0.7	9.8	6.4	2.7	negative	positive
7		2.8	10.2	5.0	1.4	positive	positive
8 <sup>a,b</sup>		2.0	9.3	2.8	1.1	positive	positive

<sup>a</sup> 2 HCl salt. <sup>b</sup> Racemate. <sup>c</sup> Calculated using ChemBioDraw Ultra 12.0. <sup>d</sup> Calculated using ADMET predictor, version 7.2.0001.

$pK_{a2}$  を低下させると考えられる構造変換を図 2-6 に示す。ベンジル基は弱い電子求引基として機能するため、化合物 **2** の  $pK_{a2}$  は、ピペリジンの窒素の  $pK_a$  と見なすことができる。一般的に、窒素原子の近傍に電子求引基を導入することでその塩基性が低下することから<sup>27</sup>。ベンジル基をより強力な電子求引基である芳香族ヘテロ環、又はフッ素原子または酸素原子を有するアルキル鎖に変換した場合 (Option 1) や、ピペリジン環の 3 位に電子求引基を導入した場合 (Option 2) にピペリジン窒素の塩基性、即ち  $pK_{a2}$  が低下すると考えられる。メチルアミノ基のメチル基をベンジル基より強い電子求引基に変換した場合 (Option 3)、ピペリジン 4 位の窒素が less basic amine となり、その  $pK_a$  ( $pK_{a2}$ ) は **2** より低下すると考えられる。

化合物 **2** のピペリジン窒素がプロトン化を受ける pH では、メチルアミノ基の窒素原子はほぼ完全にプロトン化を受けて強力な電子求引基であるアンモニウムイオンとして存在している。そのため、外から電子求引基を付与せずとも、化合物 **2** の 2 つの窒素原子が  $\beta$  位に配置されるような構造変換 (例えば、環を縮小したピロリジン構造 (a) やアゼチジン構造 (b)、メチルアミノ基をピペリジン環に組み込んだホモピペラジン構造 (c) やホモピペラジンを縮環させたジアザビシクロヘプタン構造 (d) など) を行うことでも  $pK_{a2}$  が低下すると考えられる (Option 4)。

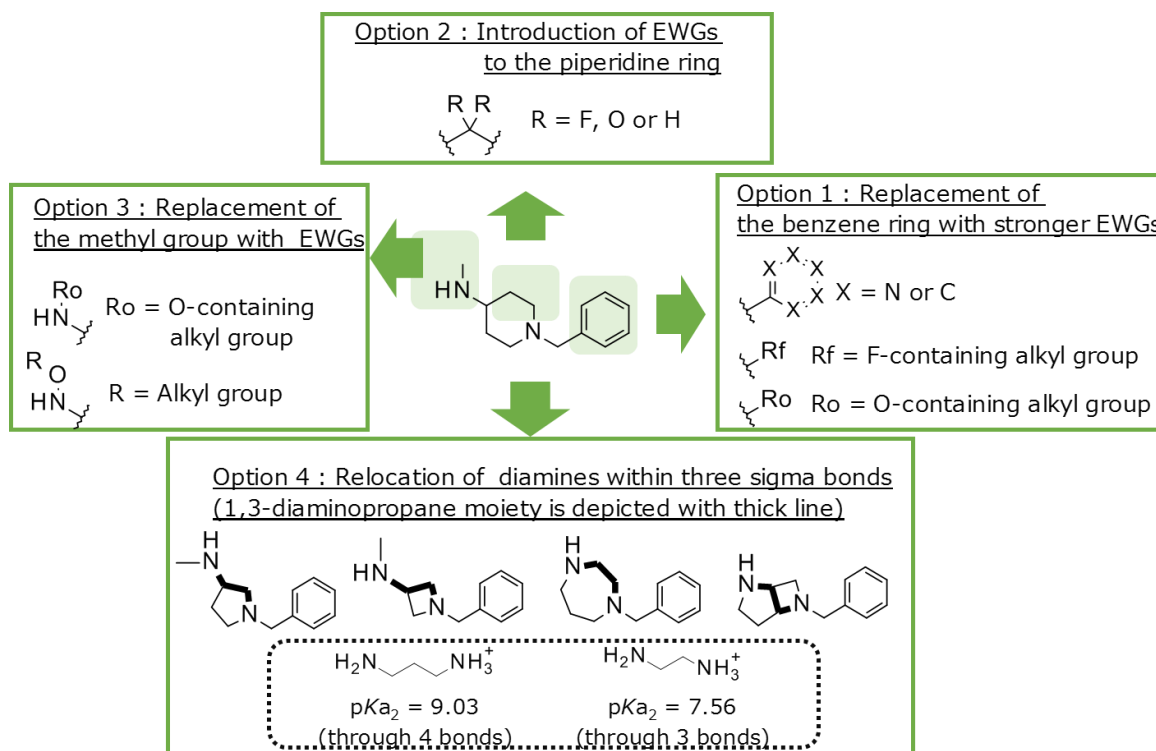


図 2-6  $pK_{a2}$  を低下させる化合物デザイン

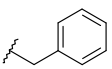
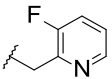
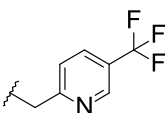
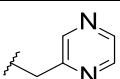
第4節 second basic pKa (pKa<sub>2</sub>) を低減させたジアミン化合物のリン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) 評価

Option 1 (図 2-6) に示した化合物の ClogP、pKa<sub>1</sub>、pKa<sub>2</sub>、及び NV を表 2-2 に示す。化合物 9-25 は類似した pKa<sub>1</sub> 値を有するが、窒素の置換基により pKa<sub>2</sub> は大きく異なる。ベンゼン環をピリジン環 (9, 10)、ピラジン環 (11)、ピリダジン環 (12)、及びピリミジン環 (13, 14) に変換したジアミン化合物の pKa<sub>2</sub> は 2 のそれより低く、NV は 1.5 を下回った。ベンゼン環をアルキン鎖に変換したジアミン化合物 (15, 16) でも同様に pKa<sub>2</sub> は 2 のそれより低く、NV は 1.5 を下回った。フッ化アルキル基を有するジアミン化合物 (17-21) では、導入するフッ素原子の数及び窒素原子からの距離に応じて pKa<sub>2</sub> が変化する。ピペリジン窒素の γ 位ではフッ素原子を 1 つ導入した 17 で pKa<sub>2</sub> は 2 のそれより高く、NV は 1.5 を上回った。同位置にフッ素原子を二つ導入した場合 (18)、pKa<sub>2</sub> は 2 のそれより低下し、NV は 1.5 を下回った。ピペリジン窒素の β 位の場合 (19-21)、1 つ以上のフッ素原子を導入することで pKa<sub>2</sub> は 2 のそれより低下し、これら化合物の NV は 1.5 を下回った。

電子求引基として酸素原子を用いた場合、酸素の電気陰性度はフッ素のそれより小さいため、pKa<sub>2</sub> の低下度合は対応するフッ素誘導体に比べて小さい。化合物 22 及び 23 の pKa<sub>2</sub> は 2 のそれより高く、NV は 1.5 を上回った。しかしながらオキセタンを有する 24 及び 25 は 2 のそれと同等の pKa<sub>2</sub> を有しているにもかかわらず 1.5 を下回る NV を示した (化合物 24 及び 25 については本章第 5 節でさらに検討、考察)。

化合物 16 及び 21 は、非常に ClogP が低い (ClogP=0.3) にもかかわらず 2 と同等の NV を示した 4 と同程度の ClogP 及び pKa<sub>1</sub> を有している一方で pKa<sub>2</sub> と NV が共に低下しており、pKa<sub>2</sub> が NV を予測する上で有用なパラメータであることを示唆する結果であった。

表 2-2 Option 1 に示す化合物の ClogP、pKa<sub>1</sub>、pKa<sub>2</sub>、及び NV.

Cmpd.	Structure	ClogP <sup>d</sup>	pKa <sub>1</sub> <sup>e</sup>	pKa <sub>2</sub> <sup>e</sup>	NV
2		1.3	10.2	6.3	3.3
9 <sup>a</sup>		0.1	9.9	5.1	1.0
10		0.9	10.0	5.4	1.2
11		-1.1	9.8	5.4	1.1

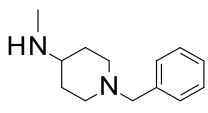
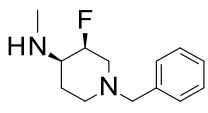
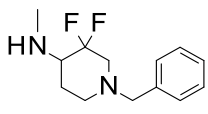
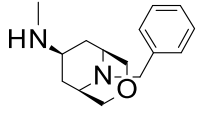


12		-1.4	9.7	5.3	1.1
13		-1.1	9.8	5.2	0.9
14		-0.4	9.6	5.1	0.8
15 <sup>b</sup>		0.0	10.1	6.1	0.8
16 <sup>b</sup>		0.3	10.1	4.9	1.1
17 <sup>b</sup>		0.6	10.2	6.8	1.7
18 <sup>b,c</sup>		-0.3	10.1	5.9	1.0
19		0.6	10.2	6.2	1.4
20 <sup>b</sup>		0.0	10.1	4.7	1.0
21 <sup>b</sup>		0.2	10.0	3.2	0.9
22		-0.2	10.2	7.2	2.7
23 <sup>b</sup>		-0.5	10.2	7.0	2.5
24		-1.0	9.8	6.4	1.2
25		-0.5	9.9	6.8	1.0

<sup>a</sup> 3 HCl salt. <sup>b</sup> 2 HCl salt. <sup>c</sup> Racemate. <sup>d</sup> Calculated using ChemBioDraw Ultra 12.0. <sup>e</sup> Calculated using ADMET predictor, version 7.2.0001.

ピペリジン環に電子求引基を導入した化合物 (Option 2、図 2-6) の ClogP、pKa<sub>1</sub>、pKa<sub>2</sub>、及び NV を表 2-3 に記載した。導入したフッ素原子の数に応じて pKa<sub>2</sub> が低下し、1 つ導入した 26、2 つ導入した 27 共に NV は 1.5 より低値であった。酸素原子を用いた縮環構造を有する 28 は、ピペリジン窒素の両側から酸素による電子求引効果が働くことで pKa<sub>2</sub> は大きく低下し、NV は 1.5 を下回った。

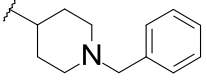
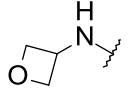
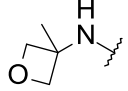
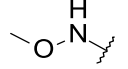
表 2-3 Option 2 に示す化合物の ClogP、pKa<sub>1</sub>、pKa<sub>2</sub> 及び NV

Cmpd.	Structure	ClogP <sup>d</sup>	pKa <sub>1</sub> <sup>e</sup>	pKa <sub>2</sub> <sup>e</sup>	NV
2		1.3	10.2	6.3	3.3
26 <sup>a,b,c</sup>		1.6	8.6	4.9	1.2
27 <sup>b,c</sup>		2.5	7.4	3.8	1.1
28 <sup>b</sup>		0.3	9.7	4.6	0.9

<sup>a</sup> A mixture of cis/trans isomers (cis/trans = 4/1). <sup>b</sup> Racemate. <sup>c</sup> HCl salt. <sup>d</sup> Calculated using ChemBioDraw Ultra 12.0. <sup>e</sup> Calculated using ADMET predictor, version 7.2.0001.

メチルアミノ基のメチル基を電子求引基に変換した化合物 (Option 3、図 2-6) の ClogP、pKa<sub>1</sub>、pKa<sub>2</sub>、及び NV を表 2-4 に記載した。オキセタンを導入した **29** 及び **30** は **2** より ClogP が増加するにもかかわらず、NV は 1.5 以下であった。メトキシアミノ基を有する **31** においても NV は 1.5 を下回った。

表 2-4 Option 3 に示す化合物の ClogP、pKa<sub>1</sub>、pKa<sub>2</sub> 及び NV.

Compd.	Structure	ClogP <sup>b</sup>	pKa <sub>1</sub> <sup>c</sup>	pKa <sub>2</sub> <sup>c</sup>	NV
2		1.3	10.2	6.3	3.3
29		1.6	8.6	5.8	1.0
30		2.2	8.6	5.9	1.5
31 <sup>a</sup>		1.5	8.1	2.9	0.8

<sup>a</sup> 2 HCl salt. <sup>b</sup> Calculated using ChemBioDraw Ultra 12.0. <sup>c</sup> Calculated using ADMET predictor, version 7.2.0001.

これらのジアミン化合物のプロトン化様式は **2** と異なることが *in silico* 計算で示唆されている (図 2-7) <sup>28</sup>。 **2** は二つの窒素原子の塩基性の差が比較的大きいため、pH の低下に伴い段階的にプロトン化を受け、全体の正電荷 (net charge: NC) が 1.0 となる pH においてメチルアミノ基がプロトン化された分子種の存在比率が 99% とされる。一方、化合物 **29** の二つの窒素原子の塩基性は類似しており、pH の低下に伴いほぼ同時にプロトン化を受け始める。NC が 1.0 となる pH ではピペリジン窒素がプロトン化された分子種が 62%、ピペリジン 4 位の窒素原子がプロトン化された分子種が 38% の比率で存在する。化合物 **31** は段階的にプロトン化を受けるものの、その順序は **2** と反対であり、NC が 1.0 となる pH でピペリジン窒素がプロトン化された分子種の存在比率は 100% である。プロトン化様式が多様なこれらの化合物においても pKa<sub>2</sub> と NV が同時に低下しており、pKa<sub>2</sub> 仮説の汎用性を示唆する結果であった。

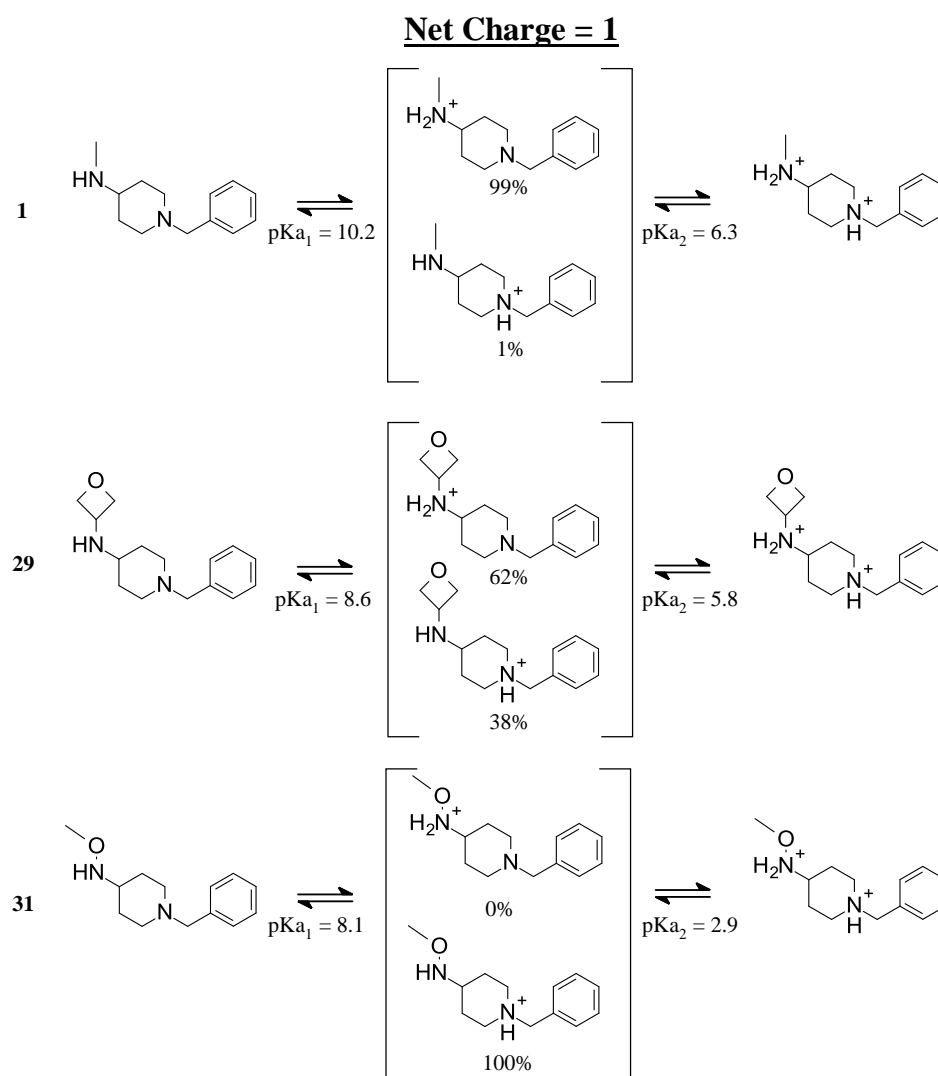
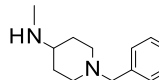
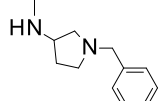
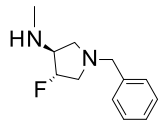
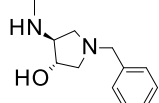
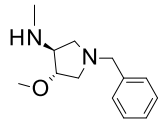
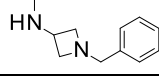
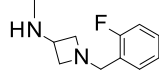
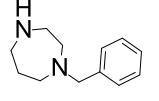
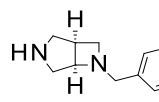
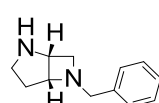
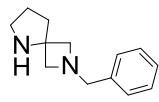


図 2-7 1、29、及び 31 のプロトン化様式。

分子内の2つの窒素原子の距離を近づけた化合物 (Option 4、図 2-6) の ClogP、 $pK_{a1}$ 、 $pK_{a2}$ 、及び NV を表 2-5 に記載した。ピペリジン環をピロリジン環に変換した **32** は **2** と比較し ClogP 及び  $pK_{a1}$  に大きな変化はないものの、 $pK_{a2}$  及び NV が共に低下した。ピロリジン環をフッ素化又はヒドロキシル化した **33** 及び **34** は更に  $pK_{a2}$  が低下し、これらの NV は 1.5 を下回った。化合物 **34** のヒドロキシル基をメチル化した **35** は ClogP が 0.9 上昇するにもかかわらずその  $pK_{a2}$  及び NV に変化は見られなかった。環を縮小したアゼチジン誘導体 **36** はピロリジン誘導体 **32** より  $pK_{a2}$  が低下し、電子求引基を付与せずとも NV は 1.5 まで低下した。ベンゼン環にフッ素原子を導入した **37** は **36** と比較して ClogP 及び  $pK_{a1}$  に大きな変化はないものの、 $pK_{a2}$  及び NV が共に低下した。環拡大したホモピペラジン誘導体 **38**、縮環構造を有する **39** 及び **40**、及びスピロ構造を有する **41** の  $pK_{a2}$  も **2** のそれより低く、NV は 1.5 より低値であった。本表の化合物においても NV は  $pK_{a2}$  と連動する傾向にあり、 $pK_{a2}$  仮説を支持する結果であった。

表 2-5 Option 4 に示す化合物の ClogP、pKa<sub>1</sub>、pKa<sub>2</sub>、及び NV.

Cmpd.	Structure	ClogP <sup>c</sup>	pKa <sub>1</sub> <sup>d</sup>	pKa <sub>2</sub> <sup>d</sup>	NV
<b>2</b>		1.3	10.2	6.3	3.3
<b>32<sup>a,b</sup></b>		1.7	10.0	5.2	1.6
<b>33<sup>b</sup></b>		2.2	8.7	3.8	1.0
<b>34<sup>a,b</sup></b>		1.4	9.4	4.6	0.9
<b>35<sup>a,b</sup></b>		2.3	9.4	4.4	0.8
<b>36</b>		2.1	9.5	4.5	1.5
<b>37<sup>a</sup></b>		2.3	9.3	3.9	1.0
<b>38</b>		1.9	9.9	5.3	1.3
<b>39<sup>b</sup></b>		1.8	9.6	5.1	1.3
<b>40</b>		1.6	9.5	4.1	1.1
<b>41<sup>a</sup></b>		2.2	9.7	4.2	1.4

<sup>a</sup> 2 HCl salt. <sup>b</sup> Racemate. <sup>c</sup> Calculated using ChemBioDraw Ultra 12.0. <sup>d</sup> Calculated using ADMET predictor, version 7.2.0001.

## 第5節 ジアミン化合物のリン脂質症誘起ポテンシャル (PLIP) と物理化学的性質の関係性に関する分析と考察

第3節で提唱した  $pK_{a2}$  仮説を検証するため、本研究で評価した 40 種のジアミン化合物の NV と ClogP、 $pK_{a1}$  または  $pK_{a2}$  の関係を分析した。図 2-8 はジアミン化合物を青色の点で表しており、それぞれの図は PLIP と ClogP (A)、 $pK_{a1}$  (B)、及び  $pK_{a2}$  (C) との関係を表す。各図の赤線は  $NV=1.5$  を示しており、赤線より上側が PLIP 陽性、下側が PLIP 陰性を表す。(A) では ClogP の値によらず PLIP を有するジアミン化合物が存在することから、ClogP と PLIP の相関はないと考えられた。(B) では図右側にいくほど ( $pK_{a1}$  が大きくなるほど) PLIP を有するジアミンの割合が増えるものの、 $pK_{a1}$  が高値であっても PLIP 陰性となるジアミン化合物が存在することから、 $pK_{a1}$  を用いて PLIP を予測することは困難と考えられた。一方、(C) では  $pK_{a2}=6.2$  を境に PLIP 陽性化合物と PLIP 陰性化合物を区別できること示唆された。化合物 **24** 及び **25** がこの仮説の外れ値であったが、両化合物が共にオキセタン構造を有していることから、本研究で用いた *in silico* 計算ソフトでオキセタンの塩基性低下効果が過小評価されているのではないかと考えた。

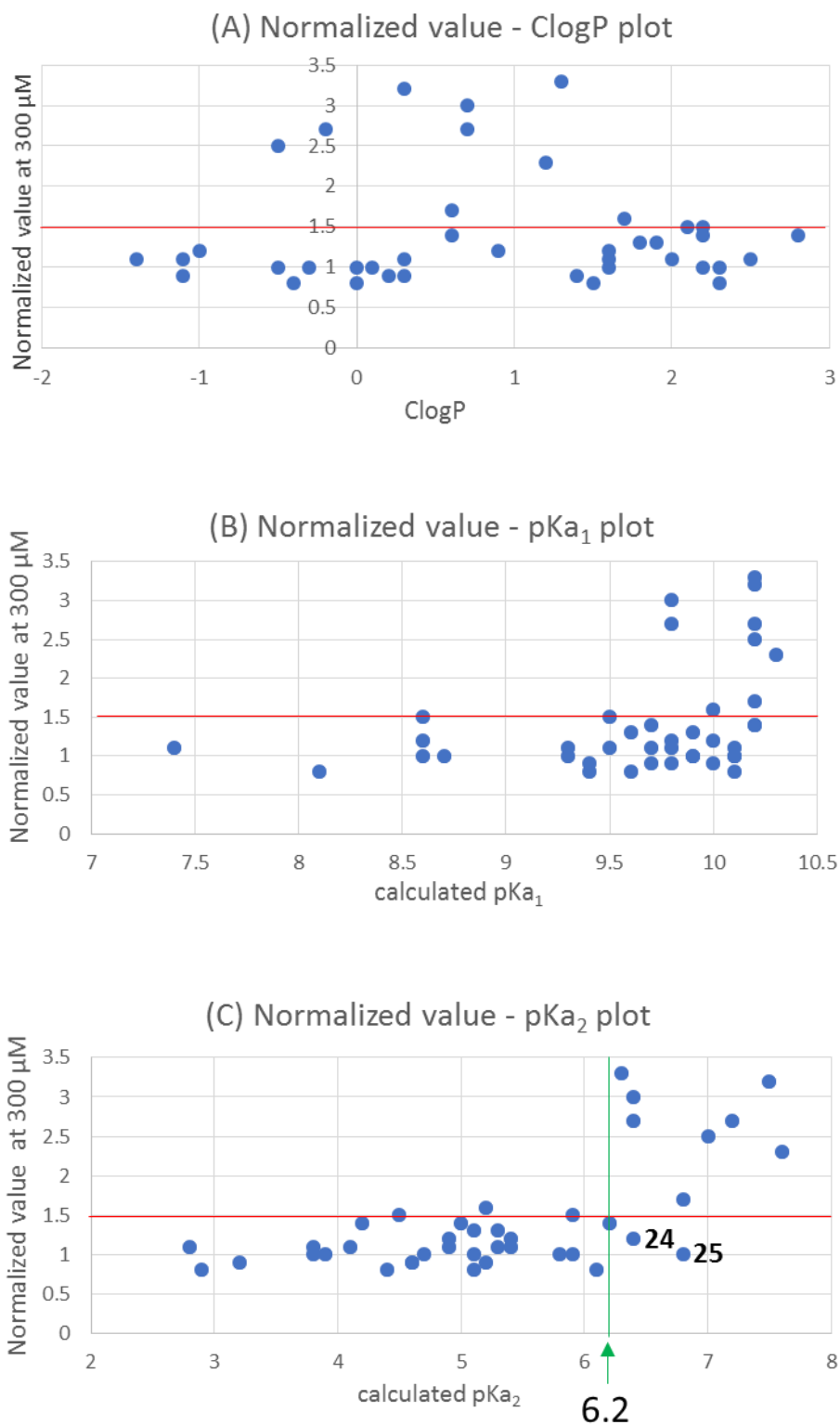
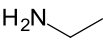
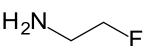
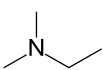
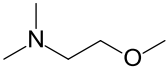
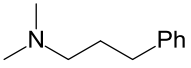
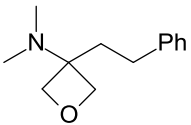


図 2-8 ジアミン化合物の NV と ClogP (A)、pKa<sub>1</sub> (B)、又は pKa<sub>2</sub> (C) の関係

pKa (実測値) が報告されている代表的な脂肪族アミンを表 2-6 に示した<sup>27</sup>。フッ素原子及び酸素原子は  $\beta$  位の窒素原子の pKa をそれぞれ 1.7 及び 1.2 低下させ、オキシタニル基は  $\alpha$  位の窒素原子の pKa を 2.7 低下させることが実験的に示されている。一方、本研究で用いた *in silico* ソフトウェアを用いて求めた pKa (計算値) の場合、フッ素原子及び酸素原子は  $\beta$  位の窒素原子の pKa をそれぞれ 1.3 及び 0.9 低下させ、オキシタニル基が  $\alpha$  位の窒素原子の pKa を 0.8 低下させるとされた<sup>26</sup>。これらの結果から、フッ素原子及び酸素原子の塩基性低下効果は計算値と実測値で 0.3~0.4 程度の違いであるのに対し、オキシタニル基の塩基性低下効果は計算値と実測値で 1.9 も異なり、オキシタニルの電子求引効果が他の電子求引基のそれと比較して非常に弱く見積もられていることが判明した。オキシタニル基の電子求引効果が他の電子求引基と同様の精度で見積もられていた場合、**24** および **25** の pKa<sub>2</sub> はそれぞれ 5.0 および 5.4 程度となり、本仮説の例外ではなかったと考えられる。

表 2-6 電子求引基の塩基性低下効果 (実測値及び計算値)。

Cmpd.	Structure	pKa <sub>exp</sub> <sup>a</sup>	$\Delta$ pKa <sub>exp</sub>	pKa <sub>calcd</sub> <sup>b</sup>	$\Delta$ pKa <sub>calcd</sub>	$\Delta\Delta$ pKa <sup>c</sup>
<b>42</b>		10.7		10.4		
			-1.7		-1.3	0.4
<b>43</b>		9.0		9.1		
<b>44</b>		10.2		9.8		
			-1.2		-0.9	0.3
<b>45</b>		9.0		8.9		
<b>46</b>		9.9		9.6		
<b>47</b>		7.2	-2.7	8.8	-0.8	1.9

<sup>a</sup> experimentally measured pKa values reported in ref. 27. <sup>b</sup> calculated using ADMET predictor, version 7.2.0001.

<sup>c</sup>  $\Delta\Delta$ pKa is defined as  $\Delta$ pKa<sub>calcd</sub> -  $\Delta$ pKa<sub>exp</sub>. It gives the difference in basicity-lowering effects as obtained from the calculated and the experimental values.

リン脂質蓄積の機序は十分に解明されていないが、薬物がリソソームに蓄積することでリン脂質代謝を阻害することが原因であるとされている<sup>20</sup>。化合物がリソソームに蓄積されるまでの想定メカニズムを図 2-9 に示す。化合物がリソソームに蓄積するためにはまずリソソーム膜を透過する必要があり、脂溶性の高い化合物は容易にリソソームに到達できると考えられる。リソソーム内部は酸性 (pH=4-5) であるため、リソソームに到達した塩基性化合物はその塩基性に応じて一定の割合でプロトン化を受ける。電荷を帯びた分子は生体膜透過性が著し



く低下することから、プロトン化された分子種の割合が大きい化合物はリソソームに蓄積され易いと考えられる (図 2-9 (A))。この想定メカニズムは脂溶性 (ClogP) 及び塩基性 ( $pK_{a1}$ ) がリン脂質誘起物質の主要な物理化学的性質となることを示唆しており、実際、多くの PLIP 予測モデルが ClogP と  $pK_{a1}$  に基づいて構築されている。

しかし、本研究においてジアミン化合物の NV と ClogP に相関はなく、 $pK_{a1}$  が大きい化合物でも PLIP 陰性となる化合物が存在することが示された。また、これまで PLIP との関連が報告されていない  $pK_{a2}$  によって NV を予測可能であることを示唆する結果を得た。このことは本研究が比較的分子量のジアミン化合物のみを評価対象としたことが影響していると考えられる。PLIP 予測法に関する先行研究では分子量 300~500 程度の市販薬及びその誘導体の PLIP を評価しているが、本研究では分子量 200 程度のジアミン化合物のみを評価対象とした。分子量が小さく、適度な脂溶性を有する塩基性化合物はモノカチオン状態の分子種がリソソーム膜を受動的に透過し、リソソーム外に拡散する可能性が報告されている<sup>29,30</sup>。モノカチオンがリソソームに蓄積されない状況では、より膜透過性が低いジカチオン分子種の存在割合 ( $pK_{a2}$ ) により蓄積度合いが決定され (図 2-9 (B))、その結果リン脂質症惹起ポテンシャルと  $pK_{a2}$  の関連性が明確に現れたものと考えられる。

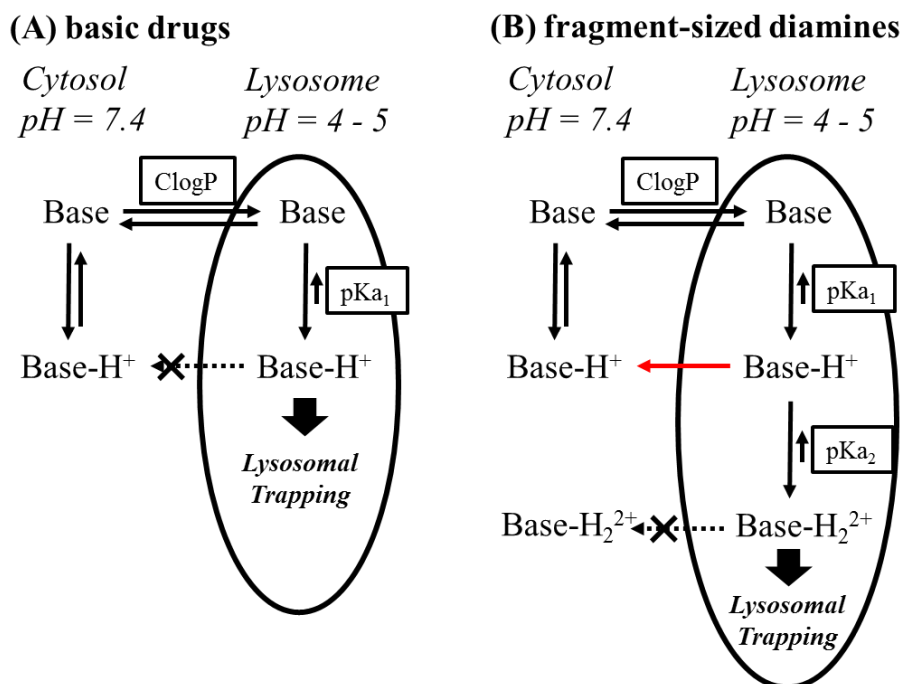
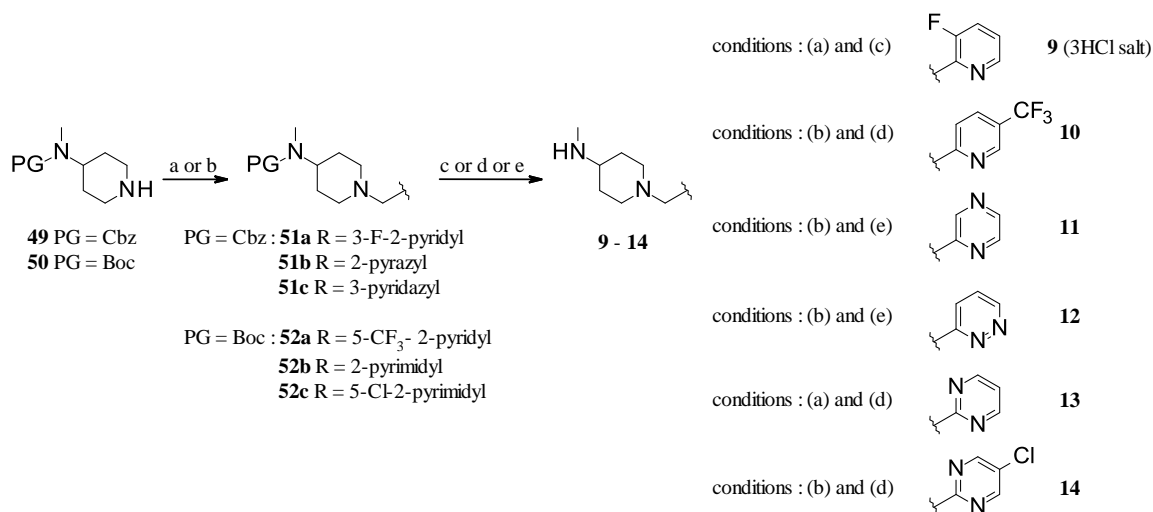


図 2-9 ジアミン化合物のリソソーム蓄積の想定メカニズム

## 第6節 合成

本節では本研究で評価したジアミン化合物の合成法を記載する。なお、塩酸塩として合成した化合物に含まれる塩化水素の量論比は実験的に決定していないが、先行研究においてジアミン又はトリアミン化合物を塩酸<sup>31</sup>又は塩化水素エタノール溶液<sup>32,33</sup>に付すことですべての窒素原子がプロトン化されることが元素分析で確認されていることから、本研究で合成した塩酸塩においてもすべての塩基性窒素原子がプロトン化されているものと判断した。なお、化合物**2**、**7**、**32**、**36**、**38**及び**41**は市販化合物を購入し、評価した。

ベンゼン環をヘテロ環に変換した化合物の合成法を図2-10に記載した。市販のCbz保護ジアミン**49**を原料とし、アルキルハライドを用いたアルキル化反応、またはアルデヒドを用いた還元的アミノ化反応によってピペリジン窒素に置換基を導入した**51a-c**を合成した。化合物**51a**のCbz基を、水酸化パラジウムを用いた加水素分解によって除去し、**9**に導いた。**51b**および**51c**は同様の加水素分解条件下で副反応が進行し、Cbz基の除去が困難であったため、6 mol/L塩酸を用いた加水分解条件に付すことで**11**および**12**に導いた。Boc保護ジアミン**50**を原料とした場合も同様の方法でピペリジン窒素に置換基を導入し(**52a-c**)、酸性条件下、Boc基を除去することで**10**、**13**及び**14**を合成した。

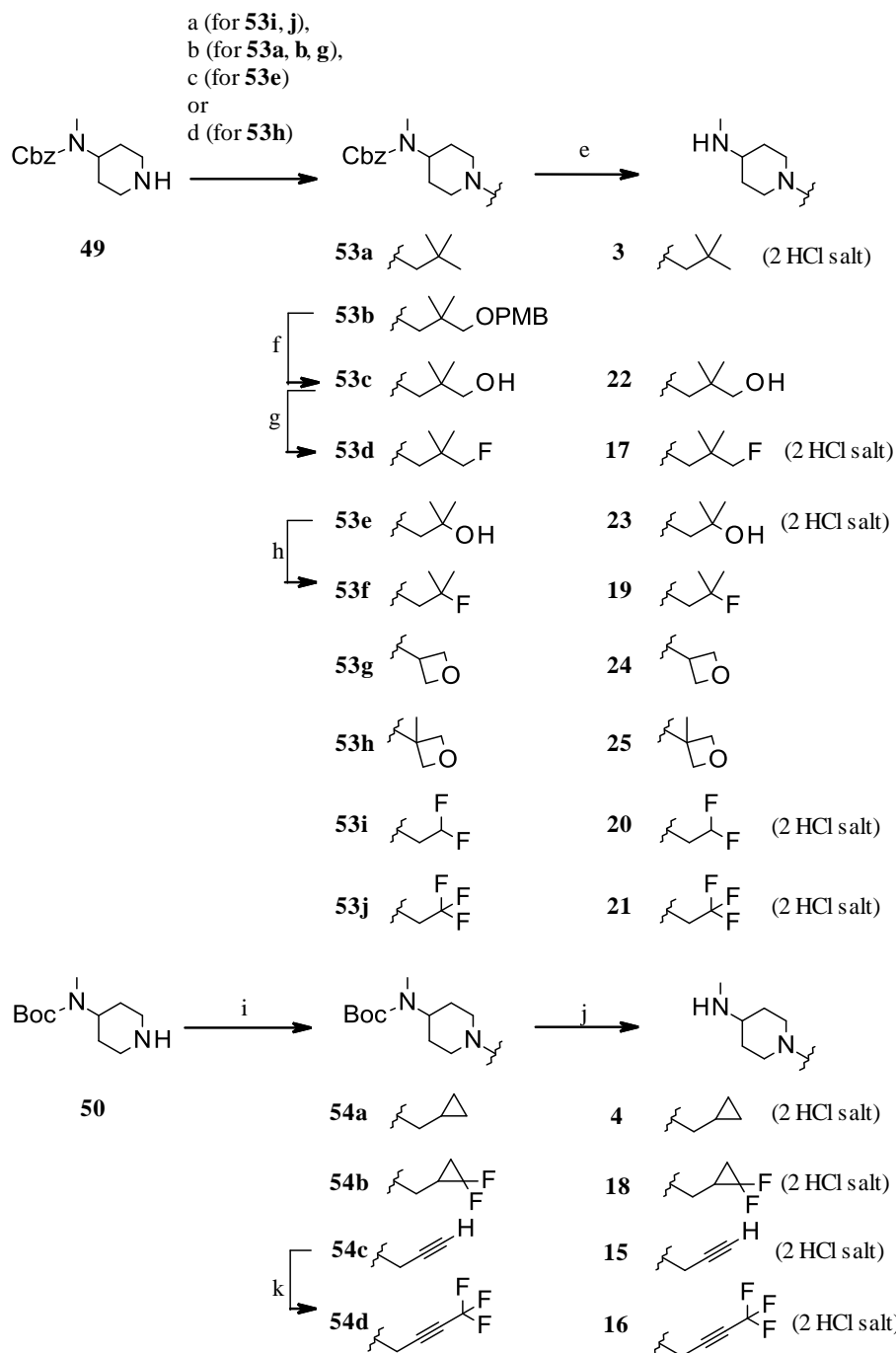


Reagents and conditions: (a) Alkyl halide, Et<sub>3</sub>N or iPr<sub>2</sub>NEt, dichloromethane or acetonitrile, rt to 60 °C; (b) Aldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, 1,2-dichloroethane or tetrahydrofuran; (c) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, H<sub>2</sub>, iPrOH, rt; then 4 mol/L HCl in EtOAc, rt; (d) Trifluoroacetic acid, dichloromethane, rt; (e) 6 mol/L aq. HCl, 60 °C; (f) 4 mol/L HCl in EtOAc, rt.

図 2-10 化合物 9-14 の合成.

化合物 **2** のベンゼン環をアルキル鎖に変換した化合物の合成法を図 2-11 に記載した。市販原料 **49** から還元的アミノ化反応によって **53a**、**53b**、及び **53g** を、アルキルハライド/トリフレート、またはエポキシドを用いたアルキル化反応によって **53e**、**53i**、および **53j** を合成した。窒素に隣接する 4 級炭素を有する **53h** は  $\alpha,\beta$ -不飽和スルホニル化合物に対するマイケル付加反応、続くナトリウムアマルガムを用いる脱スルホニル化反応によって合成した<sup>34</sup>。**53b** のパラメキシベンジル (PMB) 基を酸性条件下で除去することで水酸化体 **53c** を得た。**53c** の水酸基をトリフルオロメタンスルホニル化し、テトラブチルアンモニウムフルオリドを作用させることでフッ素化体 **53d** に導いた。**53e** から Deoxofluor を用いた求核的フッ素化反応により **53f** を合成した。**53a** および **53c-j** を、パラジウム炭素触媒を用いた水素添加条件に付すことで **3**、**17**、**19-25** を合成した。

シクロプロピル基およびアルキニル基はパラジウム炭素触媒を用いる水素添加反応条件下で分解が見られたため、市販原料 **50** より合成した。アルキルブロミドを用いたアルキル化反応により **54a-c** を合成した。Chu らの方法<sup>35</sup>を用いて **54c** をトリフルオロメチル化することで **54d** へと導いた。酸性条件下、Boc 基を除去することで **4**、**15**、**16** および **18** に導いた。

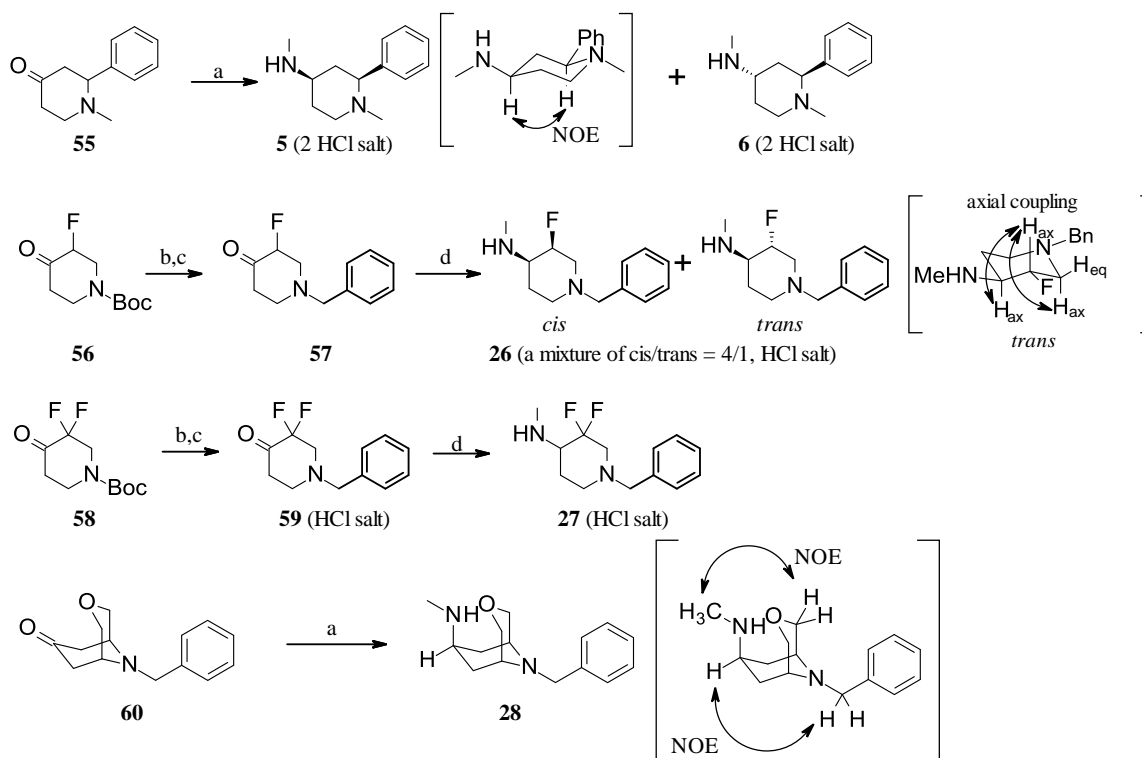


Reagents and conditions: (a) Alkyl iodide or alkyl triflate, Et<sub>3</sub>N or iPr<sub>2</sub>NEt, dichloromethane or MeCN, rt to 60 °C; (b) Aldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, 1,2-dichloroethane or tetrahydrofuran; (c) 2,2-Dimethyloxiran, iPrOH, 120 °C; (d) 3-(Benzenesulfonylmethylene)oxetane, MeOH, then Na(Hg), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MeOH, rt; (e) Pd(OH)<sub>2</sub>/C or Pd/C, H<sub>2</sub>, iPrOH or MeOH, rt, (then 4 mol/L HCl in EtOAc, rt for **3**, **17**, **20**, **21** and **23**); (f) Trifluoroacetic acid, dichloromethane, rt; (g) Tf<sub>2</sub>O, iPr<sub>2</sub>NEt, dichloromethane, then tetrabutylammonium fluoride, tetrahydrofuran, rt; (h) Deoxofluor, dichloromethane, rt; (i) 2-Bromomethyl-1,1-difluorocyclopropane, Et<sub>3</sub>N, MeCN; (j) 4 mol/L HCl in 1,4-dioxane, rt; (k) CuI, 1,10-Phenanthroline, TMSCF<sub>3</sub>, KF, *N,N*-dimethylformamide, 100 °C.

図 2-11 化合物 3、4、15-25 の合成

ピペリジン環上に置換基を有する化合物の合成法を図 2-12 に示す。市販原料 **55** (ラセミ体) からメチルアミンを用いた還元的アミノ化反応を行うことで **5** および **6** を合成した。**5** のピペリジン環 2 位の水素原子と 4 位の水素原子に NOE が観測されたため、**5** をシス体、**6** をトランス体と決定した。ピペリジン環上にフッ素原子を 1 つ導入した **26** は、市販原料 **56** (ラセミ体) から合成した。**Boc** 基を除去し  $S_N2$  反応によりベンジル基導入後、還元的アミノ化反応によりメチルアミノ基を導入した。 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル解析より **26** は cis/trans = 4/1 の混合物であった。ピペリジン環上にフッ素原子を 2 つ導入した **27** は  $\alpha,\alpha$ -ジフルオロケトン **58** を出発物質とし、モノフルオロ体と同様の方法で合成した。

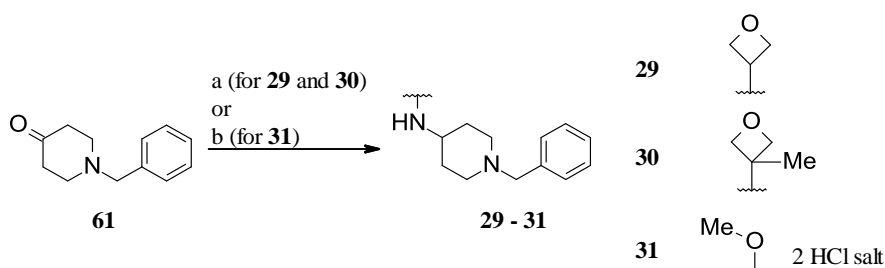
ビスクロ構造を有する **28** は、市販原料 **60** から還元的アミノ化反応によってメチルアミノ基を導入することで合成した。2 次元 NMR スペクトル解析において、ベンジル位の水素とピペリジン 4 位の水素、およびメチル基の水素と酸素原子の  $\alpha$  位の水素に NOE が観測されたため、相対立体配置は cis と決定した。



Reagents and conditions: (a) MeNH<sub>2</sub>, NaBH<sub>4</sub>, Acetic acid, MeOH, rt then 4 mol/L HCl in EtOAc, rt. (b) 4 mol/L HCl in 1,4-dioxane, rt; (c) Benzyl bromide or cyclopropylmethyl bromide, Et<sub>3</sub>N, MeCN or *N,N*-dimethylformamide, (then 6 mol/L aq. HCl for **59**); (d) MeNH<sub>2</sub>, NaBH<sub>4</sub>, MeOH, rt, then 4 mol/L HCl in 1,4-dioxane, rt.

図 2-12 化合物 **5**、**6**、**26-28** の合成

化合物 **2** のメチルアミノ基のメチル基を電子求引基に変換した化合物の合成法を図 2-13 に示す。市販原料 **61** に対し、ナトリウムトリアセトキシ硼ヒドリドを用いた還元的アミノ化反応によって **29** 及び **30** を得た。メトキシアミンを用いた還元的アミノ化反応はナトリウムトリアセトキシ硼ヒドリドでは進行せず、中間体であるオキシムで反応が停止したため、還元剤に 2-ピコリン-ボラン錯体を用いることで **31** を得た。

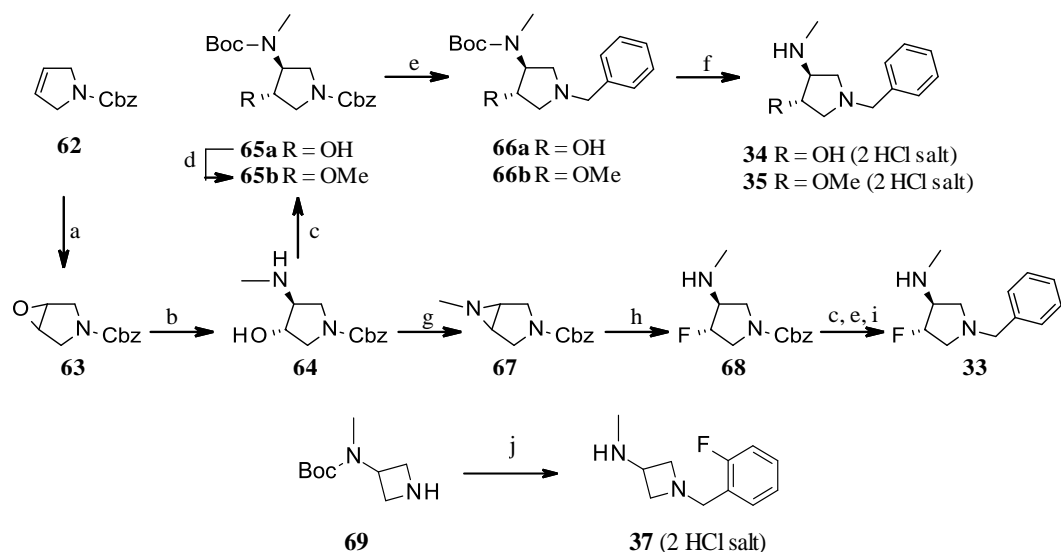


Reagents and conditions: (a) Amine,  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , AcOH, 1,2-dichloroethane, rt; (b)  $\text{MeONH}_2\text{Cl}$ , 2-picoline-borane, MeOH, rt, then 1 mol/L aq. HCl, rt.

図 2-13 化合物 **29-31** の合成.

ピペリジン環から環縮小および環拡大を行った化合物の合成法を図 2-14 に記載した。市販原料 **62** に *m*-クロロ過安息香酸を作用させエポキシ体 **63** を得たのち、メチルアミンによる開環反応 (**64**)、続く Boc 保護により **65a** (ラセミ体) を得た。**65a** の水酸基をメチル化し、**65b** を合成した。**65a** 及び **65b** からパラジウム触媒を用いた加水素分解により Cbz 基を除去し、続く還元的アミノ化反応によってベンジル基を導入することで **66a** 及び **66b** をそれぞれ合成した。最後に、酸性条件下 Boc 基を除去することでそれぞれ **34** および **35** に導いた。エポキシド **64** をアジリジン **67** に導き、Kalow らの方法<sup>36</sup>を用いてフッ素化体 **68** (ラセミ体) を得た。**68** の Cbz 基をベンジル基へと変換することで **33** を合成した。

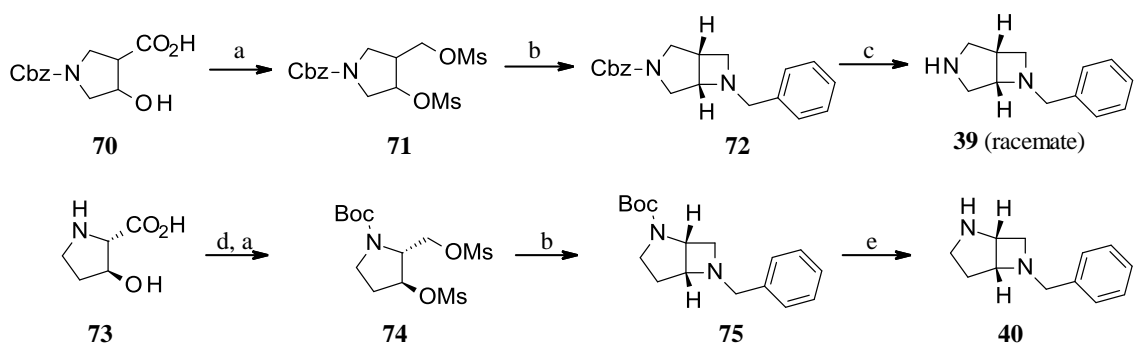
アゼチジン誘導體 **37** は、市販原料 **69** から還元的アミノ化反応により 2-フルオロベンジル基を導入した後、酸性条件下 Boc 基を除去することで得た。



Reagents and conditions: (a) *m*-Chloroperbenzoic acid, dichloromethane, rt; (b) MeNH<sub>2</sub>, MeOH, 100 °C; (c) Boc<sub>2</sub>O, dichloromethane, rt; (d) MeI, NaH, *N,N*-dimethylformamide, rt; (e) Pd/C H<sub>2</sub>, MeOH, rt; then benzaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, 1,2-dichloroethane, rt; (f) 4 mol/L HCl in EtOAc, rt; (g) *N,N,N',N'*-tetramethylazodicarboxamide, PPh<sub>3</sub>, tetrahydrofuran, rt; (h) Benzoyl fluoride, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, hexafluoro-2-propanol, tert-butyl methyl ether, 50 °C, rt; (i) Trifluoroacetic acid, dichloromethane, rt; (j) 2-Fluorobenzaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, 1,2-dichloroethane, rt; then 4 mol/L HCl in EtOAc, rt.

図 2-14 化合物 **33-35**、**37** の合成

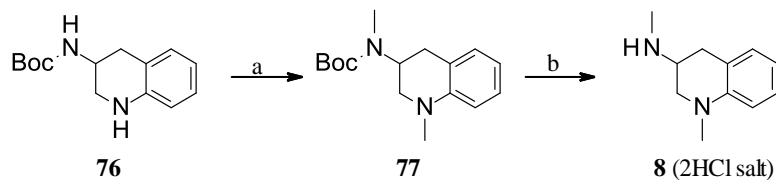
[3,2,0]-ジアザビシクロヘプタン構造を有する化合物 **39** および **40** の合成法を図 2-15 に示す。市販原料 **70** (ジアステレオ混合物) をボラン還元によってジオールに変換した後、過剰量のメタンスルホニルクロリドを用いてジメシル体 **71** へと導いた。ベンジルアミンを用いた連続 S<sub>N</sub>2 反応により 3,6-ジアザビシクロ [3,2,0] ヘプタン骨格を構築し、**72** (ラセミ体) を得た。加水素分解によって Cbz 基を除去し、**39** を得た。同様の方法を用いて市販原料 **73** から **75** を合成した。**75** に TFA を作用させて Boc 基を除去することで **40** を得た。



Reagents and conditions: (a) BH<sub>3</sub>-tetrahydrofuran, rt; then methanesulfonyl chloride, Et<sub>3</sub>N, dichloromethane, rt; (b) Benzylamine, toluene, 60 °C; (c) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, rt; (d) Boc<sub>2</sub>O, NaOH, tetrahydrofuran, water, rt.; (e) Trifluoroacetic acid, dichloromethane, rt.

図 2-15 化合物 **39** 及び **40** の合成

アニリン性窒素原子を有する **8** の合成法を図 2-16 に示す。市販原料 **76** を過剰量のヨウ化メチルを用いてメチル化することで **77** を得た後、酸性条件下 Boc 基を除去することで **8** を合成した。



Reagents and conditions: (a) 2.5eq. MeI, NaH, *N,N*-dimethylformamide, rt; (b) 4 mol/L HCl in 1,4-Dioxane, rt.

図 2-16 化合物 **8** の合成

## 第 7 節 小括

本章では前章 2 節で記載した方針 1 に用いる、リン脂質症を起こしにくいジアミン化合物の探索を目的に、各種ジアミン化合物のデザイン、合成、PLIP 評価を行い、ジアミン化合物の構造、物性値、PLIP との関係について検討を行った。先行研究からジアミン化合物は PLIP 陽性となる可能性が非常に高いことが示唆されたが、本研究において PLIP 陰性となる複数のジアミン化合物を見いだすことに成功した。また、40 のジアミン化合物について PLIP と物理化学的性質の関係を分析し、低分子量のジアミン化合物においては、これまで PLIP との関係が報告されていた  $\text{ClogP}$ 、 $\text{pKa}_1$  ではなく、 $\text{pKa}_2$  を用いてジアミン化合物の PLIP の有無を予測する事が可能であることを明らかにした。



### 第3章 リン脂質症誘起ポテンシャル（PLIP）陰性のジアミン化合物を用いた SUN13837 誘導体の合成及び生物評価

本章では、第1章第2節で述べた方針1に従い、生体内で加水分解を受けてもリン脂質症を誘起しない bFGF 様低分子化合物を見いだすことを目的に、SUN13837 誘導体の合成、及び生物評価を行ったのでその詳細について述べる。

#### 第1節 研究の背景

本章では、第1章第2節で示した方針1に従い、化合物**1**のBMP構造を、前章で見いだしたPLIP陰性ジアミン構造に変換したSUN13837誘導体の合成及び生物評価について述べる。PLIP陰性ジアミン構造を導入する事により、生体内で加水分解を受けても生じるジアミン化合物がリン脂質症を引き起こすことはなく、リン脂質症リスクが低下したbFGF様低分子化合物を見いだすことができると考えられる。

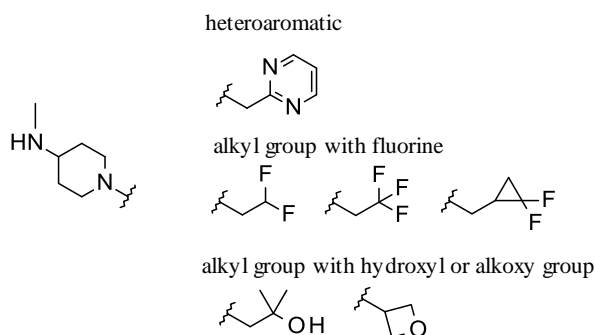
SUN13837誘導体の薬理作用として、細胞分化作用の一つである神経細胞保護作用を *in vitro* 試験により評価した。グルタミン酸は中枢神経における興奮性神経伝達物質である一方、過剰量では神経細胞障害を引き起こす<sup>37</sup>。ラット初代培養海馬神経細胞にグルタミン酸を添加すると生細胞数が減少するが、bFGF又は**1**をグルタミン酸添加前に加えることで細胞死を有意に抑制することが報告されている<sup>18</sup>。本研究では、**1**を陽性対照とし、化合物を添加した際の細胞生存率を**1**に対する比で表した。また、本研究で評価した全ての化合物について、その薬理作用がFGFR-1の選択的阻害剤であるPD166866<sup>38</sup>添加により拮抗されることを確認し、その薬理作用が**1**同様にFGF受容体シグナルを介したメカニズムに由来することを担保した。さらに、*in vitro*薬理評価及び薬物動態評価に基づき選抜した化合物について、*in vivo*ラット亜急性脳梗塞モデルにより運動機能改善作用を評価した。

化合物**1**は弱いながらもCYP3A4の代謝的不活化（Mechanism-based inhibition、MBI）作用を有している。CYPの代謝的不活化とは、CYPでの代謝反応の中間体が反応性を持ち、CYP蛋白のアミノ酸残基と共有結合を形成すること、あるいはヘム鉄に強くキレートすることによりCYPの不活化を起こす現象であり、基質競合による可逆的なCYP阻害とは異なる<sup>39</sup>。MBI作用によりCYPの阻害作用が長期間に渡るため、薬剤の蓄積性と薬物相互作用が問題となる可能性があること、反応性代謝物との結合により異常コンホメーションを取ったCYP蛋白が免疫原性を持ち、非常に稀ながら重篤な（時に致死的な）有害作用を引き起こす可能性があることから、特に投与期間の長い医薬品を研究開発する上で回避すべき課題である<sup>40</sup>。本研究ではSUN13837誘導体のMBI作用も併せて評価することで、MBI作用を低減させる方策を同時に探ることとした。

## 第2節 *in vitro* 評価及びラット薬物動態評価

前章で見出した PLIP 陰性ジアミン化合物は、電子求引基を導入することで  $pK_{a2}$  を低下させた Type 1 と、環を縮小することで2つの窒素原子が近づき、一方の窒素原子が電子求引基としてはたらき他方の窒素原子の  $pK_{a2}$  を低下させた Type 2 に大別できる (図 3-1)。

### Type 1: Substitution of the benzene ring with stronger electron withdrawing group



### Type 2: Ring contraction to arrange two nitrogens within three sigma bonds

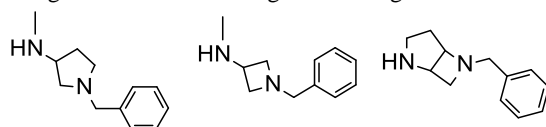


図 3-1 代表的な PLIP 陰性ジアミン化合物

Type 1 に示したジアミン化合物を導入した SUN13837 誘導体の生物評価を表 3-1 に示す。含窒素ヘテロ環を導入した **79** は **1** と同等の *in vitro* 神経細胞保護作用を有していた。フルオロアルキル基を有する化合物の構造活性相関は明確ではなく、ジフルオロエチル基を有する **80** は *in vitro* 神経細胞保護作用が大きく低下したが、ジフルオロシクロプロピルメチル基を導入した **82** は **1** と比較して非常に優れた *in vitro* 神経細胞保護作用を示した。これはシクロプロパン環とベンゼン環が標的タンパク質と類似の相互作用を形成しうることによるものと考えられる<sup>41</sup>。酸素原子を含むアルキル基に変換した化合物 (**83 - 85**) は、**1** と比較して *in vitro* 神経細胞保護作用の低下が見られた。極性を有する飽和アルキル鎖は *in vitro* 神経細胞保護作用に好ましくない影響を与えることが示唆された。表 3-1 に示した一連の化合物において、ClogP の低下と MBI 作用の低減がみられており、脂溶性の低下が MBI 作用低減に寄与したものと考えられる。

表 3-1 Type 1 ジアミン化合物を導入した SUN13837 誘導体の生物評価

compound	structure	logP <sup>c</sup>	Neuroprotective Activity <sup>d</sup>	MBI (% remaining) <sup>e</sup>
<b>1</b>		2.3	100	60
<b>79</b>		1.0	96	99
<b>80</b>		2.0	76	98
<b>81</b>		2.6	103	75
<b>82<sup>a,b</sup></b>		2.2	189	86
<b>83</b>		0.7	74	97
<b>84</b>		1.1	78	95
<b>85</b>		1.2	59	97

<sup>a</sup> HCl salt. <sup>b</sup> racemate. <sup>c</sup> Determined by reverse phase high-performance liquid chromatography. <sup>d</sup> At 10 μM, in reference to **1**. <sup>e</sup> Remaining CYP3A4 activity with human liver microsomes. (30-min preincubation by 100 μM)

Type 2 ジアミン化合物を導入した SUN13837 誘導体の生物評価結果を表 3-2 に示す。**1** のピペリジン環をピリミジン環に変換した **86** は **1** と比較して *in vitro* 神経細胞保護作用が低下した。**1** のピペリジン環をアゼチジン環に変換した **89** は優れた *in vitro* 神経細胞保護作用を有していたが、**89** の配座固定を意図した **90** において *in vitro* 神経細胞保護作用が低下したことから *in vitro* 神経細胞保護作用を示す活性配座をとることができなくなったためと考えられる。ClogP が上昇したことに起因すると考えられる MBI 作用の増強が **90** でみられた。

表 3-2 Type 2 ジアミン化合物を導入した SUN13837 誘導体の生物評価

Compound	Structure	logP <sup>c</sup>	Neuroprotective Activity <sup>d</sup>	MBI (% remaining) <sup>e</sup>
<b>86</b> <sup>a,b</sup>		2.6	77%	55
<b>89</b>		2.1	127%	58
<b>90</b> <sup>a</sup>		2.8	87%	40

<sup>a</sup> HCl salt. <sup>b</sup> racemate. <sup>c</sup> Determined by reverse phase high-performance liquid chromatography. <sup>d</sup> At 10 μM, in reference to **1**. <sup>e</sup> Remaining CYP3A4 activity with human liver microsomes (30-min preincubation by 100 μM).

最も強い *in vitro* 神経細胞保護作用を有する **82** のラット薬物動態試験を実施した。表 3-3 にラット PK プロファイル及び *in vitro* ADME パラメータを示す。化合物 **82** は **1** と比較して血中半減期 ( $T_{1/2}$ ) が延長し、中程度の生物学的利用率 (Bioavailability, BA) を有していた。また、静脈内投与 1 時間後の脳血中濃度比 ( $K_{p,1h}$ ) は **1** と同様に低値であった。

興味深いことに、両化合物の構造は類似しているにも関わらず、化合物 **1** は P-糖タンパク質 (P-glycoprotein; P-gp) の良好な基質である一方、化合物 **82** は P-gp の基質ではないことが判明した。ペペリジン窒素の塩基性が低下したことで、P-gp に対する親和性が低下した可能性がある<sup>43</sup>。また、化合物 **1** 及び **82** は共に BCRP の基質ではなかった。これらの結果から、化合物 **82** は P-gp 及び BCRP による薬物排出を受けないことで十分な脳移行が期待できるものの、受動的膜透過性 (PAMPA) が低いために静脈内投与後 1 時間では血漿と脳組織間の薬物分布が平衡状態に達しておらず、 $K_{p,1h}$  が低値を示した可能性が示唆された。

表 3-3 **1** 及び **82** の PK プロファイル<sup>a</sup> 及び *in vitro* ADME パラメータ

	Intravenous <sup>d</sup>			Oral		Bioavail ability	P-gP efflux ratio <sup>f</sup>	PAMPA (-Log P <sub>app</sub> (cm/s)) <sup>g</sup>
	$T_{1/2}$ (h)	CL (L/h/kg)	Vd (L/kg)	Dose (mg/kg)	AUC (ng·h/mL)			
<b>1</b>	1.4	2.5	2.3	10	3704	70	0.15	6.3
<b>82</b> <sup>b,c</sup>	2.7	2.3	3.2	5	1102	52	0.12	1.1

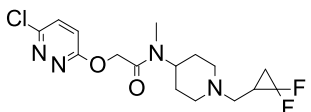
<sup>a</sup> Sprague-Dawley rats (n = 2). <sup>b</sup> HCl salt. <sup>c</sup> racemate. <sup>d</sup> Both compounds were administered at 1 mg/kg. <sup>e</sup> Brain-to-plasma concentration ratio at 1 h after intravenous administration. <sup>f</sup> Caco-2 cell monolayer was used with quinidine as a P-gp inhibitor. <sup>g</sup> determined at pH 7.4.

$T_{1/2}$ , elimination half life; CL, clearance; AUC, area under the curve.

化合物 **82** は平衡状態で良好な脳中濃度が期待できるものの、脳保護薬として用いる場合は投与後速やかに脳に移行する、すなわちより高い  $K_{p,1h}$  値を有することが望ましい。そこで、 $K_{p,1h}$  値の向上を目的として、化合物 **82** の 5-アミノピリミジル基を 6-クロロピリダジル基に変換した **93** を合成した。6-クロロピリダジル基は  $-NH_2$  基のような水素結合供与基を持たないことから、受動的膜透過性の改善が期待できる<sup>44,45</sup>。また、化合物 **1** の 5-アミノピリミジル構造を 6-クロロピリダジル基に変換した化合物が *in vivo* ラット脳梗塞モデルで有効性を示すことが報告されていることから<sup>46</sup>、bFGF 様の薬理作用が保持されるものと考えた。

化合物 **93** の生物評価を表 3-4 に示す。化合物 **93** は **82** と比較して大きく低下したものの、化合物 **1** と同程度の *in vitro* 神経細胞保護作用を示し、選択的 FGF-1 受容体阻害薬である PD166866 の添加 (3  $\mu$ M) により本作用の 96% が阻害された。また、化合物 **93** は **82** と比較して脂溶性が向上したものの、MBI 作用を示さなかった。

表 3-4 **93** の生物評価

Compound	Structure	logP <sup>c</sup>	Neuroprotective activity <sup>d</sup>	MBI (% remaining) <sup>e</sup>
<b>93</b> <sup>a,b</sup>		3.1	105	99

<sup>a</sup> HCl salt. <sup>b</sup> racemate. <sup>c</sup> Determined by reverse phase high-performance liquid chromatography. <sup>d</sup> At 10  $\mu$ M, in reference to **1**. <sup>e</sup> Remaining CYP3A4 activity with human liver microsomes (30-min preincubation by 100  $\mu$ M).

化合物 **93** の PK プロファイル及び *in vitro* ADME パラメータを表 3-5 に示す。経口での投与量が **1** の 2 倍であることを考慮すると、化合物 **93** の AUC は **1** と同等であった。また、企図した通り **93** の受動的膜透過性は **82** と比較しておよそ 10 倍程度向上した。水素結合供与基の除いたことだけでなく、脂溶性が増加したことも受動的膜透過性の向上に寄与したと考えられる。化合物 **93** の  $K_{p,1h}$  は 1.0 に近く、静脈内投与 1 時間後でも十分に脳移行性していることが示された。化合物 **1** と **93** を NADPH 非存在下ヒト肝臓ミクロソーム中でインキュベートしたところ、化合物 **93** のアミド結合が加水分解されることで生じるジアミンの生成量が **1** のそれに比べ大きく低下した。これらの結果から、化合物 **93** は質的な観点 (PLIP 陰性ジアミン化合物を導入していること)、及び量的な観点 (加水分解によるジアミン生成が遅いこと) から **1** と比較してリン脂質症リスクが大きく低下したと結論づけた。化合物 **93** が十分な脳移行性を有していること、及びリン脂質症リスクが低下したことを確認できたため、*in vivo* にて **93** の薬効評価を行うこととした。

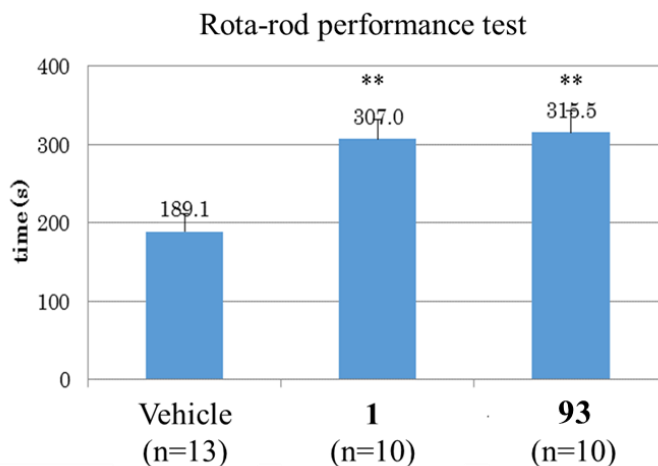
表 3-5 1 及び 93 の PK プロファイル<sup>a</sup> 及び *in vitro* ADME パラメータ

Cmpd	Intravenous <sup>d</sup>			Oral		Bioavaila bility (%)	K <sub>p,1h</sub> <sup>e</sup>	P-gP efflux ratio <sup>f</sup>	PAMPA	Hydrolytic
	T <sub>1/2</sub> (h)	CL (L/h/kg)	Vd (L/kg)	Dose (mg/kg)	AUC (ng·h/mL)				(-Log P <sub>app</sub> (cm/ s)) <sup>g</sup>	rate (pmol/min/ mg p) <sup>h</sup>
<b>1</b>	1.4	2.5	2.3	10	3704	70	0.15	6.3	-5.4	7.2
<b>93<sup>b,c</sup></b>	1.7	2.3	4.2	5	1589	73	0.92	1.1	-5.2	0.0

<sup>a</sup> Sprague-Dawley rats (n = 2), <sup>b</sup> HCl salt. <sup>c</sup> racemate. <sup>d</sup> All compounds were administered at 1 mg/kg. <sup>e</sup> Brain-to-plasma concentration ratio at 1 h after intravenous administration, <sup>f</sup> Caco-2 cell monolayer was used with quinidine as a P-gp inhibitor. <sup>g</sup> determined at pH 7.4. <sup>h</sup> The hydrolytic rate was calculated based on the amount of the diamine compounds generated by hydrolysis of the amide bond using human liver microsome in the absence of NADPH *in vitro*. T<sub>1/2</sub>, elimination half life; CL, clearance; AUC, area under the curve.

### 第 3 節 *in vivo* 薬効評価

化合物 **93** の神経保護作用を、ラット亜急性脳梗塞モデルを用いて *in vivo* で評価した。8 週齢の雄性 SD ラットを用い、麻酔下に右頸動脈より右中大脳動脈灌流域にマイクロスフェアを注入することにより脳梗塞モデルを作成した。中大脳動脈塞栓 24 時間後より **1** (1 mg/kg)、**93** (1 mg/kg)、又は媒体を 1 日 1 回、10 日間経口投与した。評価は加速度式ロタロッドを用い、マイクロスフェア投与 2 週間後の協調運動能を測定した。即ち、回転するロッド上を歩かせ、動物が落下するまでの時間を 5 回測定し、合計時間を指標とした (図 3-2)。**1** 及び **93** 投与群は溶媒投与群と比較して協調運動の有意な回復が認められたことから、化合物 **93** は *in vivo* においても **1** と同様の細胞分化作用を有していることが確認できた。

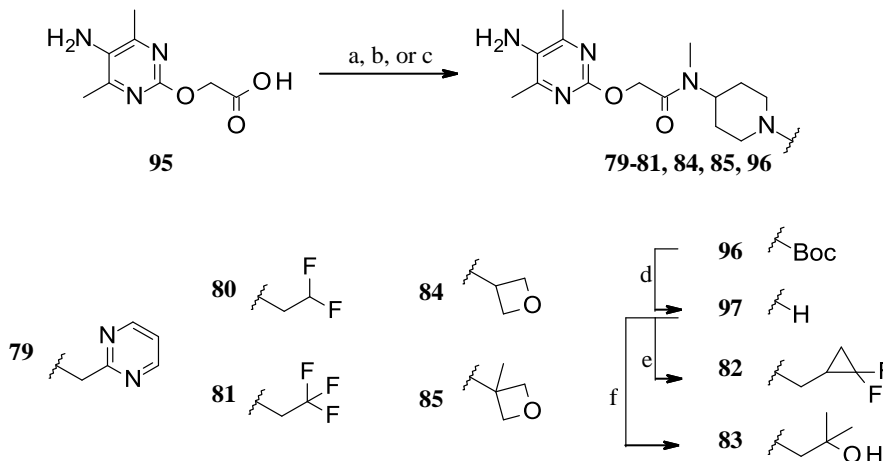


Compounds **1** and **93** were administrated, respectively, at 1 mg/kg daily for 10 days starting at one day after microspheres injection. Data are presented as mean ± S.E.M. for 10 rats. \*\*P < 0.01 by Dunnett's test compared with the vehicle-treated group.

図 3-2 ラット亜急性脳梗塞モデルを用いた機能改善作用評価

## 第4節 合成

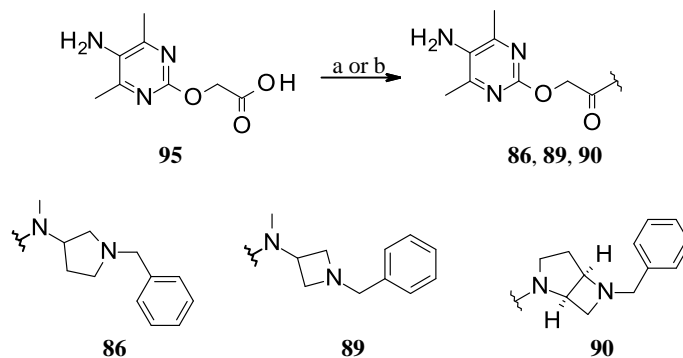
Type 1 ジアミン化合物を用いた SUN13837 誘導体 (79-85) の合成を図 3-3 に示す。化合物 79 - 81、84、85、及び 96 はカルボン酸 95 とジアミン化合物又は Boc 保護ジアミン化合物を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) を縮合剤に用いた縮合反応により合成した。酸性条件下、96 の Boc 基を除去し、化合物 97 を得た。化合物 82 及び 83 は 97 のピペリジン窒素原子を S<sub>N</sub>2 反応によりアルキル化することで合成した。



Reagents and conditions: (a) amine, EDC, 1-hydroxy-7-azabenzotriazole, *N,N*-diisopropylethylamine, acetonitrile, *N,N*-dimethylformamide, rt; (b) amine, EDC, 1-hydroxybenzotriazole, *N,N*-diisopropylethylamine, *N,N*-dimethylformamide, rt; (c) amine, EDC, 1-hydroxybenzotriazole, *N,N*-diisopropylethylamine, acetonitrile, rt; (d) trifluoroacetic acid, dichloromethane, rt; (e) 2-(bromomethyl)-1,1-difluorocyclopropane, triethylamine, acetonitrile, then 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane, rt; (f) 2,2-dimethyloxirane, 2-propanol, 120°C.

図 3-3 化合物 79-85 の合成

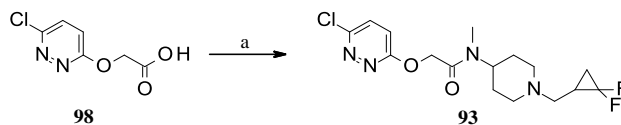
Type 2 ジアミン化合物を用いた誘導体の合成を図 3-4 に示す。全ての化合物はカルボン酸 95 とジアミン化合物を EDC 又はプロピルリン酸無水物を用いて縮合することで合成した。



Reagents and conditions: (a) propylphosphonic acid anhydride, ethyl acetate, dichloromethane, rt, then 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane, rt; (b) amine, EDC, 1-hydroxybenzotriazole, *N,N*-diisopropylethylamine, acetonitrile, rt.

図 3-4 化合物 86、89 及び 90 の合成。

化合物 **93** はカルボン酸 **98** とジアミン化合物を、EDC を用いて縮合することで合成した (図 3-5)。



Reagents and conditions: (a) amine, EDC, 1-hydroxybenzotriazole, *N,N*-diisopropylethylamine, acetonitrile, rt.

図 3-5 化合物 **93** の合成

## 第5節 小括

本章では、第1章第2節で述べた方針1に従い、化合物**1**のBMP構造をPLIP陰性ジアミン構造に変換したSUN13837誘導体の合成及び生物評価について述べた。第一に、PLIP陰性ジアミン化合物を導入したアミノピリミジン誘導体を合成し、それらの*in vitro*神経細胞保護作用を評価した。その結果、化合物**1**のベンジル基を2,2-ジフルオロシクロプロピル基(**82**)に変換すること、又はピペリジン環をアゼチジン環(**89**)に変換することで*in vitro*神経細胞保護作用が増強することが明らかにした。特に**82**はアミノピリミジン誘導体の中で最も強い*in vitro*神経細胞保護作用を示した。化合物**82**の $K_{p,1h}$ は**1**と同様に低値であったが、P-gp及びBCRPの基質でないことから、血漿と脳組織間の薬物分布が平衡状態にあれば十分な脳移行性を有することが期待された。最後に、膜透過性の向上を意図し、化合物**82**のアミノピリミジン基を6-クロロピリダジル基の変換したところ、化合物**1**と同程度の*in vitro*神経細胞保護作用を有し、 $K_{p,1h}$ が大きく改善した**93**を見いだすことに成功した。化合物**93**は高脂溶性にも関わらずMBI作用を示さなかった。化合物**93**の運動機能改善作用をラット亜急性脳梗塞モデル評価したところ、化合物**1**と同等の有効性を示した。化合物**93**は**1**と比較してリン脂質症が低下し、脳移行性が改善した脳梗塞治療薬として有用な薬剤となり得ると考えられる。



## 第4章 1,2,3-トリアゾール誘導体の生物評価

本章では、第1章で述べた方針2に従い、生体内で加水分解を受けないbFGF様低分子化合物を見いだすことを目的に、SUN13837誘導体の合成、及び生物評価を行ったのでその詳細について述べる。

### 第1節 研究の背景

本章では、第1章第2節に示した方針2に従い、生体内でジアミン化合物が生成しないbFGF様低分子化合物を見いだすことを目的とし、化合物1のアミド構造を、加水分解を受けない構造に変換したSUN13837誘導体の合成及び生物評価について述べる。アミド構造（特に2級アミド構造）と1,2,3-トリアゾールは置換基の距離および方向に多少違いが見られるものの、4位の炭素が求電子性を有すること、5位の水素が水素結合供与基として働き、3位の窒素の不対電子対が水素結合受容基として機能し得ることなど多くの類似点を有している(図4-1)<sup>47,48</sup>。また、エステラーゼによる加水分解を受けないと考えられることから、化合物1のアミド構造を1,2,3-トリアゾール構造に変換することで、神経細胞保護活性を保持しつつ、リン脂質症リスクを低下させることが可能と考えた。なお、SUN13837誘導体の薬理作用は、第3章と同様、細胞分化作用の一つである神経細胞保護作用を*in vitro*試験により評価した。

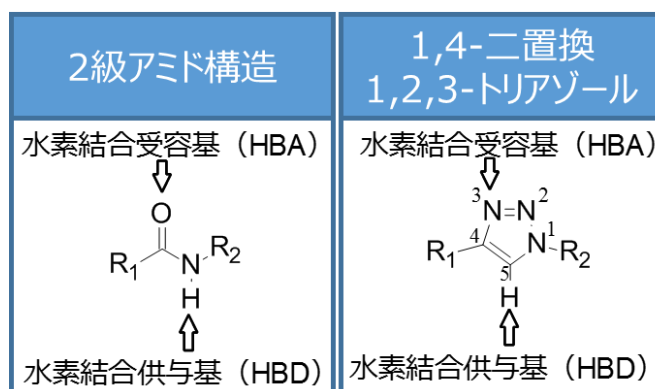


図 4-1 2級アミド構造と1,4-二置換1,2,3-トリアゾール構造の類似性.

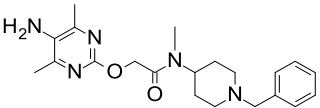
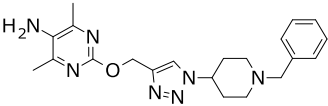
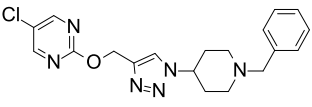
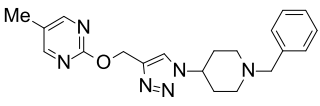
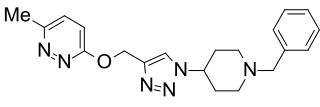
### 第2節 *in vitro* 評価及びラット薬物動態評価

1,2,3-トリアゾール誘導体の*in vitro*神経細胞保護作用は第3章と同じ方法で評価した。即ち、ラット初代培養海馬神経細胞を用いたグルタミン酸による細胞傷害に対する抑制作用により評価した。SUN13837のアミド構造を1,2,3-トリアゾールに変換した化合物99は、SUN13837

と比較して優れた *in vitro* 神経細胞保護作用を有していた。また、選択的 FGF-1 受容体阻害薬である PD166866 により拮抗されたことから、1,2,3-トリアゾール誘導体が有する *in vitro* 神経細胞保護作用も **1** と同じ bFGF 受容体シグナルを介した作用であることを確認した。

化合物 **99** は CYP3A4 に対して強力な MBI 作用を有していることが明らかとなった。第 3 章の結果から、**1** のアミノピリミジン構造を有する化合物は脂溶性の増加に伴い MBI 作用が増強される傾向があることが示唆されており、アミド構造から 1,2,3-トリアゾールに変換することで脂溶性が増大した結果、MBI 作用が顕在化したと考えられた。そこで、アミノピリミジン構造を他のヘテロ環構造に変換し、MBI 作用の低減を試みた。

表 4-1 1,2,3-トリアゾール誘導体の生物評価

Cpd.	Structure	LogP <sup>a</sup>	Neuroprotective activity(%) <sup>b</sup>	MBI remaining) <sup>c</sup>	Metabolic rate (% (pmol/min/mg protein) <sup>d</sup>
<b>1</b>		2.3	100	60	<10
<b>99</b>		3.0	134	19	19
<b>100</b>		5.0	43	99	86
<b>101</b>		4.0	66	100	40
<b>102</b>		3.5	135	100	45

<sup>a</sup> Determined by reverse phase high-performance liquid chromatography. <sup>b</sup> At 10 μM, in reference to **1**. <sup>c</sup> Remaining CYP3A4 activity with human liver microsomes (30-min preincubation by 100 μM). <sup>d</sup> *in vitro* mouse liver microsomes with NADPH.

第 3 章で述べた通り、化合物 **1** の 5-アミノピリミジル基を 6-クロロピリダジル基に変換した化合物がラット脳梗塞モデルで有効性を示すことが報告されており、1,2,3-トリアゾール誘導体でも同様の変換が可能であると考えた。一方で、6-クロロピリダジル基はアミノピリミジル基と比較して *in vitro* 神経細胞保護作用の減弱が見られること（第 3 章第 2 節参照）、化学的反応性が高い位置にクロロ基を有しており代謝活性化を受けずとも生体内化合物と共有結合を形成する可能性があることから、これらの懸念を払拭するため、両方のヘテロ環構造をマー

ジした3つのヘテロ環をデザインした(図4-2)。(a)は6-クロロピリダジル基(B)のピリダジン構造をピリミジン構造に変換することで、クロロ基の位置を変えることなく化学的反応性を低下させている<sup>49</sup>。(b)及び(c)はクロロ基の代わりに、脂溶性や大きさが類似したメチル基を用いることで、化学的反応性を低下させている。これらのヘテロ環は水素結合供与基を有しておらず、脳移行性の向上にも寄与するものと期待した。

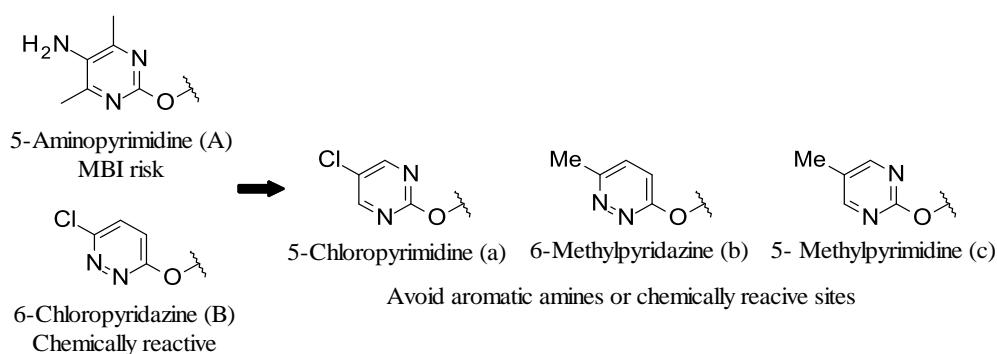


図 4-2 新規ヘテロ環構造のデザイン。

これらのヘテロ環を導入した化合物の生物評価結果を表4-1に記載した。ヘテロ環(a)を導入した**100**、およびヘテロ環(c)を導入した**101**では*in vitro*神経細胞保護作用の減弱が見られた。一方、ヘテロ環(b)を導入した**102**では*in vitro*神経細胞保護作用が保持され、MBI作用を有していなかった。

**102**は*in vitro*神経細胞保護作用に優れ、MBI作用を有さない化合物であったが、更なるADME試験によりマウスマイクロソーム中における安定性に課題がある事が判明した( $CL_{int} = 45 \text{ pmol/min/mg p}$ )。化合物**102**の脂溶性が高い( $\text{LogP} = 3.5$ )事が原因と考え、脂溶性を下げることによって代謝安定性の向上を図った。脂溶性を下げる方法として、極性官能基の導入や炭素原子をヘテロ原子に置換する方法が一般的である。しかしながらこれらの方法は極性表面積(polar surface area, PSA)や分子量の増加に繋がり、中枢神経用薬に望まれるプロファイルからの解離が懸念される<sup>50</sup>。そこで第3章においてジフルオロシクロプロピル基がベンゼン環の代替基となり得る可能性が示唆されたことからベンゼン環をシクロプロパン環に変換することとした。ベンゼン環をシクロプロパン環に変換してもPSA及び分子量は増加せず、脂溶性が低下すると考えられるため、*in vitro*神経細胞保護作用と代謝安定性の向上を両立させる事が可能であると考えた。

シクロプロピル基を有する1,2,3-トリアゾール誘導体の*in vitro*神経細胞保護作用を表4-2に記載した。ベンゼン環を有する化合物(**100-102**)と異なり全てのシクロプロパン誘導体は**1**と比較して同等以上の*in vitro*神経細胞保護作用を示した。更に、これらの化合物の脂溶性は**102**より低下した。特に化合物**107**は、1,4-2置換-1,2,3-トリアゾールを有する化合物の中で最も強い*in vitro*神経細胞保護作用を示し、脂溶性の低下( $\text{LogP} = 2.6$ )とマウスマイクロソーム中での安定性に改善がみられた( $CL_{int} = 24 \text{ pmol/min/mg p}$ )。

最後に、1,2,3-トリアゾールの5位にメチル基を導入することで *in vitro* 神経細胞保護作用にどのような影響が生じるか検討した。1,2,3-トリアゾールの5位メチル基は、化合物 **1** のような3級アミド構造が有する *N*-メチル基の疎水性相互作用又は Van der Waals (VDW) 相互作用を模倣できるため、**1** との類似性がより高くなるのではないかと考えた。(図 4-3)。化合物 **107** の5位にメチル化を導入した **108** は1,2,3-トリアゾール誘導体の中で最も強い *in vitro* 神経細胞保護作用を示し、選択的 FGF-1 受容体阻害薬である PD166866 の添加 (3 μM) により本作用の100%が阻害された(表 4-2)。興味深いことに **108** はメチル基を導入する前の **107** より脂溶性が低いことが判明した。これにより、**108** は更に代謝安定性が向上したと考えられる。

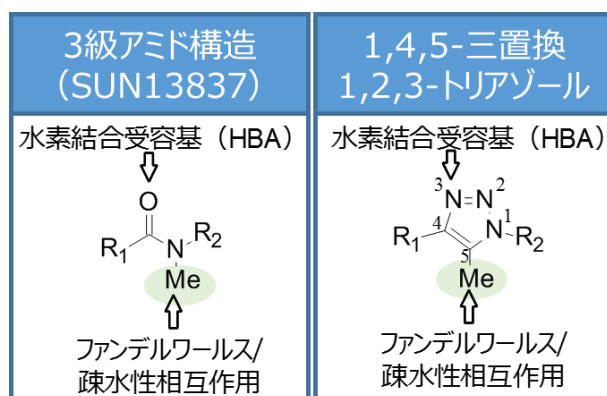


図 4-3 3級アミド構造と1,4,5-三置換-1,2,3-トリアゾールの構造類似性.

化合物 **107** 及び **108** の PK プロファイルを表 4-3 に示す。両化合物は良好な血中曝露量及び脳移行性を示した。加えて、**108** はおそらくその良好な血中安定性により非常に長い血中半減期を示した。中枢神経用薬を志向した合成展開が奏功し、脳移行性は **1** と比較しておよそ9倍に向上した。

表 4-2 シクロプロピル基を有する 1,2,3-トリアゾール誘導体の生物評価

Cmpd	Structure	LogP <sup>a</sup>	Neuro-protective activity (%) <sup>b</sup>	MBI (% remaining) <sup>c</sup>	Metabolic rate (pmol/min/mg p) <sup>d</sup>
99		3.0	134	19	19
104		1.4	116	100	<10
105		1.4	118	100	34
106		1.7	100	100	n.t.
107		2.6	162	100	24
108		2.4	311	94	<10

<sup>a</sup> Determined by reverse phase high-performance liquid chromatography. <sup>b</sup> At 10  $\mu$ M, in reference to **1**. <sup>c</sup> Remaining CYP3A4 activity with human liver microsomes (30-min preincubation by 100  $\mu$ M). <sup>d</sup> *in vitro* mouse liver microsomes with NADPH.

表 4-3 **1**、**107** 及び **108** の PK プロファイル<sup>a</sup>

	Intravenous <sup>b</sup>		Oral			
	T <sub>1/2</sub> (h)	CL (L/h/kg)	Dose (mg/kg)	AUC (ng·h/mL)	Bioavailability (%)	K <sub>p,1h</sub> <sup>c</sup>
<b>1</b>	1.4	2.5	10	3704	70	0.15
<b>107</b>	1.6	1.3	5	2118	58	1.1
<b>108</b>	4.0	0.6	5	4517	57	1.3

<sup>a</sup> Sprague-Dawley rats (n = 2). <sup>b</sup> Compounds **1** and **107** were administered at 1 mg/kg respectively. Compound **108** was administered at 3 mg/kg. <sup>c</sup> Brain-to-plasma concentration ratio at 1 h after intravenous administration. T<sub>1/2</sub>, elimination half life; CL, clearance; AUC, area under the curve.

### 第3節 1,2,3-トリアゾール5位置換基効果に関する考察

先行研究において、ただ一つのメチル基を導入することで p38 $\alpha$  MAP3 キナーゼ阻害活性やオレキシン受容体阻害活性等の薬理活性が大きく向上する例が知られている<sup>51</sup>。これらのケースでは、新しく導入されたメチル基がリガンドのコンホメーションを変化させ、分子の形状をより活性コンホメーションに近づけた場合に起こるとされている。そこで、本研究においてもトリアゾールの5位に導入したメチル基によりコンホメーションが変化した可能性があると考え、トリアゾールとピペリジル基の結合を回転させた際のポテンシャルエネルギーを quantum mechanics software を用いてシミュレーションした (図 4-4)<sup>52</sup>。ポテンシャルエネルギーが最大となる配座と最小となる配座のエネルギー差は 5-メチルトリアゾールの場合 3.5 kcal/mol、5-H トリアゾールでは 0.94 kcal/mol であった。このことから、5-Me トリアゾールはペリプラナー配座( $\phi = \pm 180^\circ$  及び  $0^\circ$ )の存在確率が 5-H トリアゾールより高いと考えられる。活性コンホメーションがこの結合角領域に含まれている場合、メチル基はそれ自体がタンパク質と形成する相互作用だけでなく、分子全体のコンホメーションが変化させることで活性を大きく向上させた可能性が考えられる。

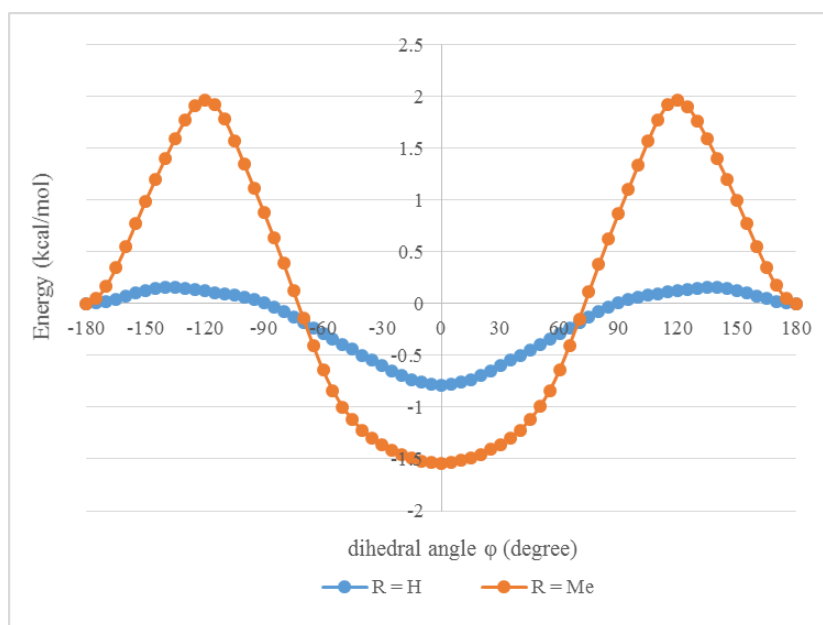
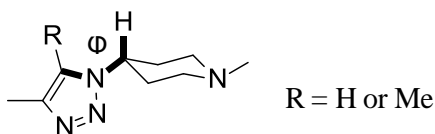
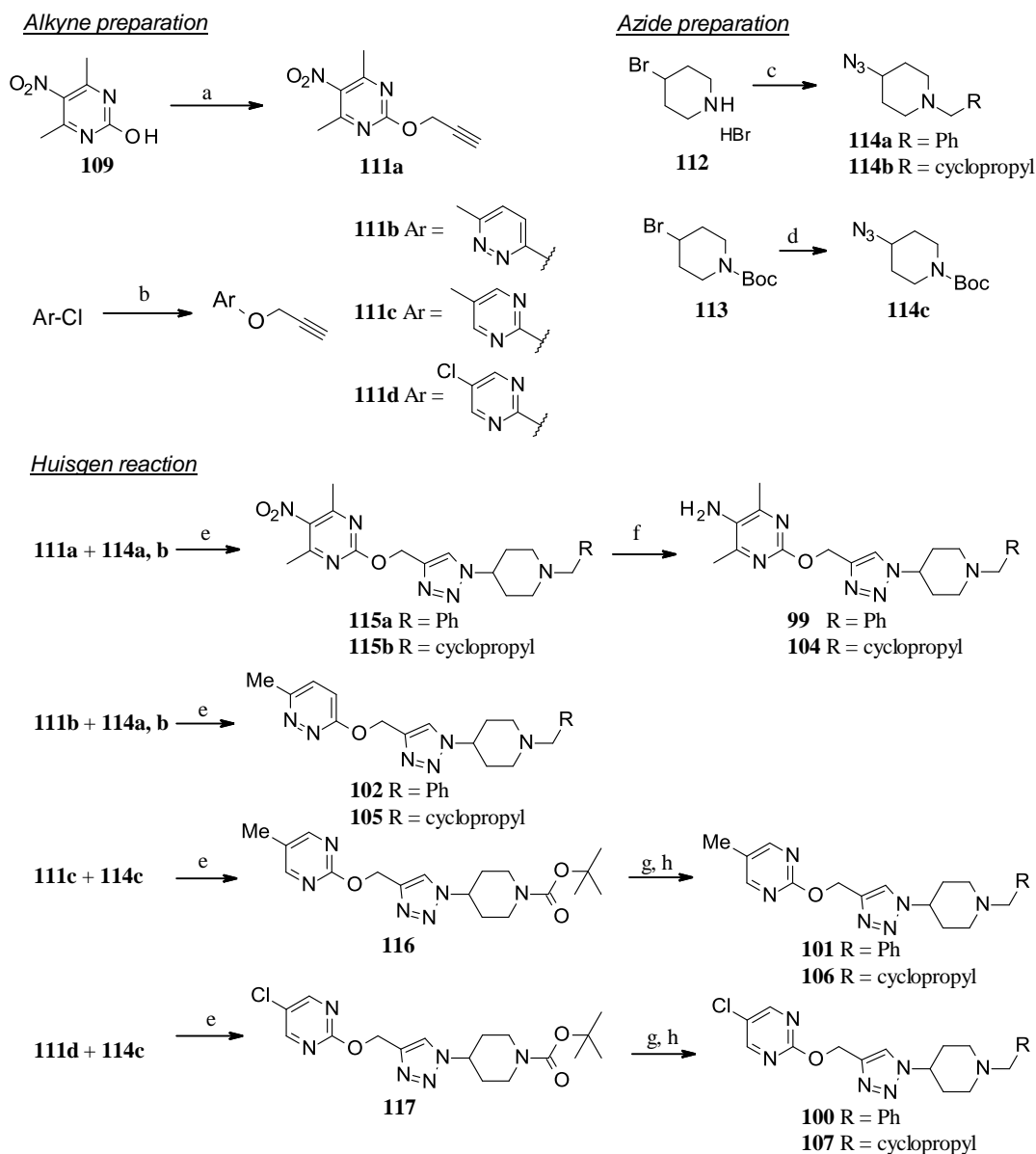


図 4-4 トリアゾール-ピペリジル結を回転させた際のポテンシャルエネルギー

## 第4節 合成

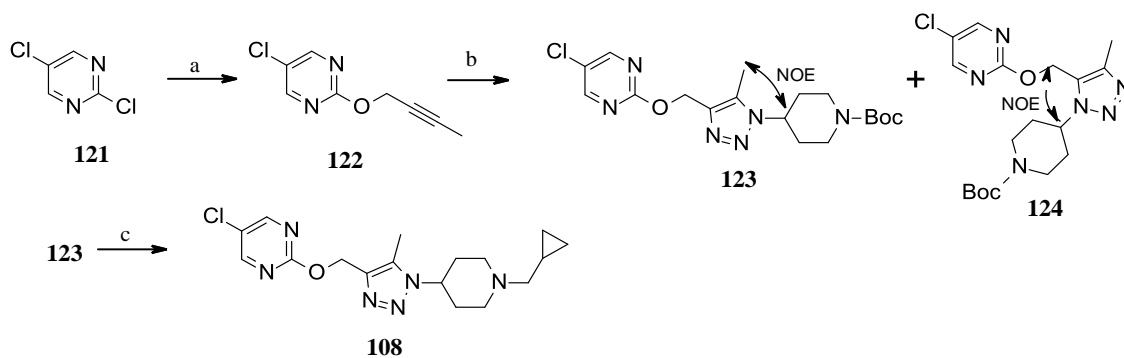
1,4-2 置換-1,2,3-トリアゾール誘導体の合成法を図 4-5 に記載した。アルキン **111a-d** のうち、**111a** はニトロヒドロキシピリミジン **109** からアルキル化反応によって合成し、**111b-d** は種々のヘテロ芳香環から  $S_NAr$  反応によって合成した。アジド **114a-c** は4-ブロモピペリジン **112** または **113** から合成した。銅触媒を用いた双極子付加環化反応<sup>53</sup>により 1,4-2 置換-1,2,3-トリアゾール骨格を構築し、適宜誘導化を行うことで **99-102**, **104-107** を合成した。



Reagents and conditions: (a) 3-Bromopropyne,  $Ag_2CO_3$ , *N,N*-dimethylformamide, 100°C, 15%; (b) Propargyl alcohol, NaH, 18-crown-6 (for **111b**), tetrahydrofuran or *N,N*-dimethylformamide, 0°C to 70°C, 80-88%; (c) Benzyl bromide or cyclopropylmethyl bromide,  $Et_3N$ ,  $CHCl_3$ , rt, then  $NaN_3$ , dichloromethane, 70°C, 2 steps, 42-50%; (d)  $NaN_3$ , *N,N*-dimethylformamide, 70°C, 93%; (e)  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , L-Ascorbic acid sodium salt, MeOH, 60°C, 35-81%; (f)  $PtO_2$ ,  $H_2$ , MeOH, 68-79%; (g) Trifluoroacetic acid, dichloromethane, rt; (h) Benzyl bromide or cyclopropylmethyl bromide,  $K_2CO_3$ , *N,N*-dimethylformamide, rt, 2 steps, 27-75%.

図 4-5 化合物 **99-107** の合成

1,4,5-置換-1,2,3-トリアゾールの合成を図 4-6 に記載した。2,5-ジクロロピリミジンに  $S_NAr$  反応で 2-ブチン-1-オールを導入し、続く双極子付加環化反応により位置異性体 **123** および **124** を得た。2次元 NMR スペクトル解析により、メチル基のプロトンとピペリジン 4 位のプロトンに NOE が観測された **123** を所望の異性体であると決定した。酸性条件下で Boc 基を除去し、続くアルキル化反応により **108** を合成した。



Reagents and conditions: (a) 2-Butyn-1-ol, NaH, tetrahydrofuran, 60°C, 71%; (b) **114c**, toluene, 110°C, 15%; (c) Trifluoroacetic acid, dichloromethane, rt.; (d) Cyclopropylmethyl bromide, Et<sub>3</sub>N, *N,N*-dimethylformamide, 50°C, 2 steps, 60%.

図 4-6 化合物 **108** の合成

## 第 5 節 小括

本章では、第 1 章で示した方針 2 に従い、**1** のアミド構造を生体内で加水分解を受けない構造に変換し、リン脂質症を誘起しやすいジアミン体を生成しない SUN13837 誘導体の合成及び生物評価について述べた。加水分解を受けない構造として、構造類似性の観点から 1,2,3-トリアゾールを選択した。第一に、**1** のアミド構造を 1,2,3-トリアゾールに変換した **99** では bFGF 受容体を介する *in vitro* 神経保護作用は保持することが明らかになった。第二にアミノピリミジン環を他のヘテロ環に変換することで **99** の MBI 作用が消失し、更に脂溶性を低下させることで代謝安定性が改善した **107** を見いだした。最後に、**107** の 1,2,3-トリアゾールの 5 位にメチル基を導入した **108** では *in vitro* 神経細胞保護作用が大きく向上した。これらの結果は、1,2,3-トリアゾール構造、特に 1,4,5-三置換 1,2,3-トリアゾール構造が **1** の 3 級アミド構造と類似の性質を有すること示唆するものであった。



## 第5章 結論

本研究ではリン脂質症を誘発する懸念が小さい bFGF 様化合物を探索すること目的に、リード化合物 **1** から方針 1 及び方針 2 にもとづく構造変換を行った。方針 1 では生体内で加水分解を受けた場合でもリン脂質症を誘起しない化合物を見いだすため、化合物 **1** の BMP 構造を PLIP 陰性のジアミン構造に変換した。さらに膜透過性改善を意図した構造変換を行うことで **1** と同等の *in vitro* 神経細胞保護作用を示し、脳移行性が向上した **93** を見いだした。方針 2 では生体内でジアミン化合物を生成しない化合物を見いだすため、化合物 **1** のアミド構造を 1,2,3-トリアゾール構造に変換した。さらに MBI 作用の低減および代謝安定性の改善を意図した構造変換を行い、1,2,3-トリアゾールの 5 位にメチル基を導入することで *in vitro* 神経細胞保護作用が大きく向上し、脳移行性に優れた **108** を見いだすことに成功した (図 5-1)。本研究で得られた構造活性相関に関する知見及びこれらの成果物は今後の bFGF 受容体の生物学的な研究及び bFGF 受容体を介する神経細胞保護作用に基づく脳梗塞治療薬の開発研究に寄与するものとする。

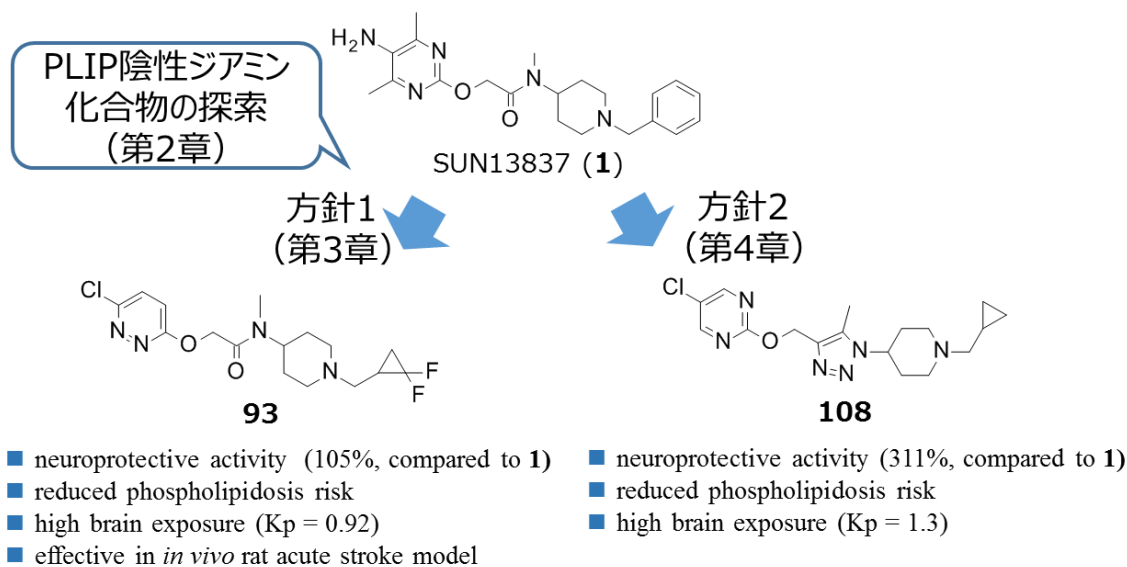


図 5-1 本研究で見いだした新規 bFGF 様低分子化合物

本研究の過程において、PLIP 陰性となるジアミン化合物が複数存在すること、低分子量ジアミン化合物の PLIP の有無がこれまで報告例のない  $pK_{a2}$  により予測できる可能性があることを明らかにした。近年、配座固定を意図したジアミンビルディングブロックの合成例が頻繁に報告されており<sup>55</sup>、そのうち一部は市販され<sup>56</sup>、容易に入手可能であることから低分子量ジアミン化合物を代謝物として生じ得る化合物が頻繁に合成されていると推測される。このような状況を考慮すると、低分子量ジアミン化合物の毒性プロファイルを把握しておくことは非常に重要であり、本研究の成果はそれに資するものである。

また、1,2,3-トリアゾールを導入した SUN13837 誘導体の生物評価を行う過程で、1,4-二置換-1,2,3-トリアゾールの 5 位にメチル基を導入することで *in vitro* 薬理活性が大きく向上することを見いだした。アミド構造は創薬化学研究で頻繁に合成される官能基であるが、その代謝安定性の低さと極性の高さから PK プロファイルに悪影響を与える要因となることが知られている<sup>57</sup>。この問題を解決するため、アミド構造を他の構造に置き換える例が数多く報告されているが、著者が知る限りこれまでに 3 級アミド構造を三置換-1,2,3-トリアゾールに置き換えた報告例はない。本研究で得られた知見はアミド構造の欠点を解決しうる選択肢を提供するものであり、創薬化学研究に広く応用できる成果である。

## 実験の部

## 実験及び測定に関する一般事項

### General procedures

Infrared (IR) spectra were recorded on FT-IR 4200 spectrometer (JASCO) with substance as a neat film on KBr plate or a pellet in a mixture with KBr and described as wavenumbers ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Proton nuclear magnetic resonance spectra ( $^1\text{H}$  NMR) and carbon nuclear magnetic resonance spectra ( $^{13}\text{C}$  NMR) were recorded on Bruker Avance III (400MHz) spectrometer or JEOL JNM ECX-400 in the indicated solvent. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in parts per million (ppm) relative to the internal standard tetramethylsilane.

High-resolution mass spectra (HRMS) by fast atom bombardment (FAB) method were recorded on JEOL JMS-700 mass spectrometer. HRMS by atmospheric pressure chemical ionization (APCI) were recorded on Bruker timsTOF mass spectrometer. HRMS by Electro-spray ionization (ESI) mass spectra were recorded on Waters XEVO QToF mass spectrometer. ESI mass spectra were recorded on Agilent G1956A MSD spectrometer system.

Chemical reagents and solvents were purchased from Aldrich, Tokyo Kasei Kogyo, Wako Pure Chemical Industries, Kanto Kagaku or Nacalai Tesque and used without purification. Flash column chromatography was performed using Purif-Pack® SI 30um supplied by Shoko Scientific.

## 第2章に関する実験

### 1. Chemistry

#### 1-(2,2-Dimethylpropyl)-*N*-methyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**3**)

To a solution of benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 202 mg, 0.81 mmol), pivalaldehyde (107  $\mu$ L, 1.0 mmol) and acetic acid (115  $\mu$ L, 2.0 mmol) in tetrahydrofuran (3 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (306 mg, 1.4 mmol). The mixture was stirred for 2 h at 60 °C. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 90:10 to 50:50) to give **53a** as colorless solid (127 mg, 49%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.35-7.31 (5H, m), 5.14 (2H, s), 4.00-3.84 (1H, br m), 2.82 (5H, t, *J* = 5.5 Hz), 2.29 (2H, br s), 2.03 (2H, s), 1.75-1.72 (2H, m), 1.54-1.51 (2H, m), 0.85 (9H, s). MS (ESI): 319 (M + H)<sup>+</sup>.

A solution of **53a** (126 mg, 0.40 mmol) and palladium hydroxide on carbon (20 wt%, 14 mg) in 2-propanol (4.5 mL) was stirred for 1 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated. The residue was diluted with chloroform, followed by the addition of 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (250  $\mu$ L, 1.0 mmol). The mixture was concentrated to give **3** as colorless solid (74 mg, 72%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.27 (3H, br s), 3.59 (2H, d, *J* = 12.5 Hz), 3.27-3.07 (4H, m), 3.02 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 2.96 (2H, d, *J* = 4.0 Hz), 2.55-2.51 (3H, m), 2.21-2.14 (4H, br m). MS (ESI): 185 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 185.2012, observed 185.2031.

#### 1-(Cyclopropylmethyl)-*N*-methyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**4**)

To a solution of *tert*-butyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**50**, 100 mg, 0.47 mmol) and triethylamine (78  $\mu$ L, 0.56 mmol) in acetonitrile (1 mL) was added (bromomethyl)cyclopropane (69 mg, 0.51 mmol). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 95:5 to 85:15) to give **54a** as colorless oil (92 mg, 73%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3.99 (1H, br s), 3.13 (2H, dd, *J* = 9.5, 2.1 Hz), 2.74 (3H, s), 2.24 (2H, d, *J* = 6.7 Hz), 2.01 (2H, t, *J* = 11.3 Hz), 1.71-1.77 (2H, m), 1.61-1.65 (2H, m), 1.46 (9H, s), 0.84-0.88 (1H, m), 0.49-0.53 (2H, m), 0.07-0.11 (2H, m). MS (ESI): 269 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution of **54a** (150 mg, 0.56 mmol) in tetrahydrofuran (3 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (3 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 3 h at room temperature. After the mixture was concentrated, diethyl ether was added and the appeared precipitate was collected by filtration to give **4** as colorless solid (110 mg, 82%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 3.80 (2H, d, *J* = 11.8 Hz), 3.47-3.41 (1H, m), 3.14 (2H, br s), 3.08 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 2.76 (3H, s), 2.39 (2H, d, *J* = 13.3 Hz), 2.12-

2.02 (2H, m), 1.20-1.13 (1H, m), 0.81-0.76 (2H, m), 0.48-0.46 (2H, m). MS (ESI): 169 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 169.1699, observed 169.1719.

*cis-N*,1-Dimethyl-2-phenyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**5**), *trans-N*,1-Dimethyl-2-phenyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**6**)

A solution of 1-methyl-2-phenylpiperidin-4-one (**55**, 630 mg, 3.3 mmol), acetic acid (0.95 mL, 16.6 mmol) and 9.8 mol/L methylamine solution in methanol (20 mL) was stirred for 30 min at room temperature. To the mixture was added sodium borohydride (504 mg, 13.3 mmol), then stirred for 1 h at the same temperature. After addition of sat. aq. NaHCO<sub>3</sub>, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5:47.5:5 to 42.5:42.5:15) to **5** (free base, 440 mg) and **6** (free base, 90 mg) as yellow oil. Each product was diluted with chloroform, followed by the addition of 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (2 mL). After the mixture was concentrated, the appeared precipitate was collected by filtration and washed with a mixture of diethyl ether and methanol to give **5** (66 mg, 11%) and **6** (20 mg, 16%) as colorless solid, respectively. Analytical data for **5**: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.61 (1H, br s), 9.41 (2H, br s), 7.69 (2H, br s), 7.51-7.44 (3H, m), 4.35 (1H, t, *J* = 10.0 Hz), 3.64 (1H, d, *J* = 12.5 Hz), 3.38 (1H, br s), 3.24-3.16 (1H, m), 2.54-2.53 (3H, m), 2.35-2.26 (7H, m). MS (ESI): 205 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 205.1699, observed 205.1711. Analytical data for **6**: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.65-7.64 (2H, m), 7.53-7.52 (3H, m), 5.01 (1H, dd, *J* = 13.2, 2.1 Hz), 3.90-3.84 (1H, m), 3.75 (1H, br s), 3.68 (1H, dq, *J* = 13.3, 2.1 Hz), 3.31-3.30 (1H, m), 2.83 (3H, s), 2.73-2.59 (5H, m), 2.43 (2H, d, *J* = 14.7 Hz). MS (ESI): 205 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 205.1699, observed 205.1717.

*N*,1-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-quinolin-3-amine dihydrochloride (**8**)

To a solution of *tert*-butyl *N*-(1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate (**76**, 100 mg, 0.40 mmol), iodomethane (126 μL, 2.0 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added 60% dispersion of sodium hydride (81 mg, 2.0 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 30:70) to give dimethylated product as colorless oil. The dimethylated product was diluted with chloroform (2 mL) followed by the addition of 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (0.5 mL). After the mixture was stirred overnight at room temperature, the appeared precipitate was collected by filtration and washed with diethyl ether to give **8** as colorless solid (79 mg, 74%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.93 (2H, br s), 7.08 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.00 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 6.69-6.65 (2H, m), 3.61 (1H, br s), 3.43-3.31 (2H, m), 3.16 (1H, dd, *J* = 16.8, 5.3 Hz), 2.91 (1H, dd, *J* = 16.6, 5.5 Hz), 2.86 (3H, s), 2.61 (3H, t, *J* = 5.5 Hz). MS (ESI): 177 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 177.1386, observed 177.1401.

1-[(3-Fluoro-2-pyridyl)methyl]-*N*-methyl-piperidin-4-amine trihydrochloride (**9**)

To a solution of benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 202 mg, 0.81 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (424  $\mu$ L, 2.4 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added 2-(chloromethyl)-3-fluoropyridine hydrochloride (153 mg, 0.81 mmol). The mixture was refluxed overnight, then concentrated. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 97.5:97.5:5 to 40.5:40.5:9) to give **51a** as colorless oil (245 mg, 84%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.43 (1H, d, *J* = 4.5 Hz), 7.40-7.23 (7H, m), 5.13 (2H, s), 4.14-3.87 (1H, m), 3.75 (1H, s), 3.03 (2H, br s), 2.80 (3H, br s), 2.20 (1H, br s), 1.80 (1H, br s), 1.63-1.56 (2H, m). MS (ESI): 358 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **51a** (245 mg, 0.69 mmol) and palladium hydroxide on carbon (20 wt%, 60 mg) in 2-propanol (5 mL) was stirred for 1 h at room temperature under hydrogen atmosphere. After the mixture was filtered and the filtrate was concentrated, the residue was diluted with a mixture of chloroform (3 mL) and methanol (3 mL) followed by the addition of 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (0.50 mL, 2.0 mmol). The volatiles were removed to give **9** as colorless solid (220 mg, 96 % over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.56 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.79 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 7.62-7.57 (1H, m), 4.68 (2H, d, *J* = 1.2 Hz), 3.84 (2H, d, *J* = 12.9 Hz), 3.53 (1H, t, *J* = 12.3 Hz), 3.42 (2H, t, *J* = 12.0 Hz), 2.76 (3H, s), 2.43 (2H, d, *J* = 13.5 Hz), 2.20-2.11 (2H, m). MS (ESI): 224 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>3</sub><sup>+</sup> 224.1558, observed 224.1565.

*N*-Methyl-1-[[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyl]methyl]piperidin-4-amine (**10**)

To a solution of *tert*-butyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**50**, 1.10 g, 5.1 mmol), 5-(trifluoromethyl)pyridine-2-carbaldehyde (1.00 g, 5.7 mmol), acetic acid (0.33 mL, 5.7 mmol) in 1,2-dichloroethane (10 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (1.82 g, 8.6 mmol). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 30:70) to give the corresponding reductive amination product **52a** as colorless oil. A solution of the product in 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (5 mL) was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 42.5:42.5:15) to give **10** as yellow oil (700 mg, 45% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.80 (1H, t, *J* = 1.0 Hz), 7.89 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 3.71 (2H, s), 2.88-2.83 (2H, m), 2.43 (3H, s), 2.42-2.36 (1H, m), 2.17 (2H, td, *J* = 11.6, 2.4 Hz), 1.90-1.87 (2H, m), 1.47-1.37 (2H, m). MS (ESI): 274 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub><sup>+</sup> 274.1526, observed 274.1535.

*N*-methyl-1-(pyrazin-2-ylmethyl)piperidin-4-amine (**11**)

To a solution of benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 1.91 g, 7.7 mmol), pyrazine-2-carbaldehyde (1.00 g, 9.3 mmol), acetic acid (0.44 mL, 7.7 mmol) in 1,2-dichloroethane (10 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (1.82 g, 8.6 mmol). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 30:70) to give the corresponding reductive amination product **51b** as colorless oil. To a solution of the product in methanol (3 mL) was added 6 mol/L hydrochloric acid (3 mL). The mixture was stirred for 3 h at 80 °C. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol; 95:5 to 85:15) to give **11** as yellow oil (58 mg, 4% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.69 (1H, d, J = 1.3 Hz), 8.52 (1H, dd, J = 2.4, 1.6 Hz), 8.45 (1H, d, J = 2.5 Hz), 2.87 (2H, dt, J = 11.6, 2.9 Hz), 2.43-2.35 (4H, m), 2.17 (2H, td, J = 11.5, 2.4 Hz), 1.89-1.88 (2H, m), 1.47-1.37 (2H, m). MS (ESI): 207 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> 207.1604, observed 207.1617.

*N*-methyl-1-(pyridazin-3-ylmethyl)piperidin-4-amine (**12**)

A mixture of benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 850 mg, 3.4 mmol), 3-(bromomethyl)pyridazine hydrobromide (1.00 g, 3.9 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (1.0 mL, 5.7 mmol), potassium carbonate (1.27 g, 9.2 mmol) in acetonitrile (5 mL) was stirred for 2 hr at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 30:70) to give the corresponding reductive amination product **51c** as colorless oil. The product was diluted with methanol (3 mL) followed by the addition of 6 mol/L hydrochloric acid (3 mL). The mixture was stirred for 3 h at 80 °C. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol; 95:5 to 85:15) to give **12** as yellow oil (103 mg, 15% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.08 (1H, dd, J = 4.9, 1.6 Hz), 7.69 (1H, dd, J = 8.5, 1.8 Hz), 7.45 (1H, dd, J = 8.5, 4.8 Hz), 3.87 (2H, s), 2.85-2.81 (2H, m), 2.43-2.36 (4H, m), 2.24-2.18 (2H, m), 1.91-1.86 (2H, m), 1.43-1.34 (3H, m). MS (ESI): 207 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> 207.1604, observed 207.1618.

*N*-Methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)piperidin-4-amine trihydrochloride (**13**)

A mixture of *tert*-butyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**50**, 371 mg, 1.73 mmol), 2-(chloromethyl)pyrimidine hydrochloride (300 mg, 1.81 mmol), sodium iodide (26 mg, 0.17 mmol) and triethylamine (0.60 mL, 4.33 mmol) in tetrahydrofuran (10 mL) was stirred at reflux for 12 h. After water was added to the mixture at room temperature, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by



silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 100:0) to give **52b** as colorless oil (298 mg, 56%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.74 (2H, d, J = 4.8 Hz), 7.19 (1H, t, J = 4.9 Hz), 4.13-3.91 (1H, m), 3.81 (2H, s), 3.03 (2H, d, J = 11.0 Hz), 2.73 (3H, s), 2.23-2.21 (2H, m), 1.89-1.84 (2H, m), 1.62-1.58 (2H, m), 1.46 (8H, d, J = 5.3 Hz). MS (ESI): 307 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution of **52b** (296 mg, 0.97 mmol) in chloroform (4 mL) was added trifluoroacetic acid (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (chloroform/methanol; 99:1 to 95:5) to give the corresponding reductive amination product. The product was diluted with methanol (1 mL) followed by the addition of 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (1.0 mL). The volatiles were removed to give **13** as colorless solid (229 mg, 75% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 8.87 (2H, d, J = 5.0 Hz), 7.58 (1H, t, J = 5.1 Hz), 4.65 (2H, s), 3.87 (2H, d, J = 13.3 Hz), 3.55-3.51 (1H, m), 3.37 (3H, t, J = 11.2 Hz), 2.78 (3H, s), 2.46 (2H, d, J = 14.3 Hz), 2.13-2.02 (2H, m). MS (ESI): 207 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> 207.1604, observed 207.1615.

#### 1-[(5-Chloropyrimidin-2-yl)methyl]-*N*-methyl-piperidin-4-amine (**14**)

To a solution of *tert*-butyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**50**, 1.35 g, 6.3 mmol), 5-chloropyrimidine-2-carbaldehyde (1.00 g, 7.0 mmol), acetic acid (0.40 mL, 7.0 mmol) in 1,2-dichloroethane (10 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (2.23 g, 10.5 mmol). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 30:70) to give the corresponding reductive amination product **52c** as colorless oil. A solution of the product in 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (5 mL) was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 42.5:42.5:15) to give **14** as yellow oil (1.69 g, 36% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.68 (2H, s), 3.79 (2H, s), 2.92 (2H, dt, J = 11.5, 3.0 Hz), 2.43 (3H, s), 2.41-2.35 (1H, m), 2.19 (2H, td, J = 11.5, 2.5 Hz), 1.90-1.87 (2H, m), 1.52-1.42 (4H, m). MS (ESI): 241 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>4</sub><sup>+</sup> 241.1214, observed 241.1238.

#### *N*-Methyl-1-prop-2-ynyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**15**)

To a solution of *tert*-butyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**50**, 2.00 g, 9.3 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (1.79 mL, 10.3 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL) was added propargyl bromide (0.74 mL, 9.8 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 1 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 85:15 to 50:50) to give the corresponding alkylated product **54c** as colorless oil. A solution of the product in ethyl acetate (5 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride

in ethyl acetate (10 mL). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The appeared precipitate was collected by filtration and washed with diethyl ether to give **15** as colorless solid (1.60 g, 76% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.48 (1H, s), 9.37 (2H, s), 4.02 (2H, br s), 3.84 (1H, s), 3.54 (2H, d, J = 10.3 Hz), 3.00 (2H, br s), 2.33-2.25 (3H, m), 2.02-1.94 (2H, m). MS (ESI): 153 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 153.1386, observed 153.1411.

#### *N*-Methyl-1-(4,4,4-trifluorobut-2-ynyl)piperidin-4-amine dihydrochloride (**16**)

To a solution of copper(I) iodide (679 mg, 3.57 mmol), 1,10-phenanthroline (643 mg, 3.57 mmol) and potassium fluoride (1.04 g, 17.8 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (1 mL) was added trifluoromethyl trimethylsilane (3.35 mL, 17.8 mmol). The mixture was stirred for 20 min at 100 °C. To the mixture was added the previously prepared solution of **54c** (900 mg, 3.57 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (1 mL) dropwise. The mixture was stirred for 2 h at 100 °C. After water was added at room temperature, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 30:70) to give the corresponding trifluoromethylated product **54d** as colorless oil. A mixture of the product in 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (5 mL) was stirred for 2 h at room temperature. After the mixture was concentrated, the resulting solid was washed with diethyl ether to give **16** as colorless solid (110 mg, 11% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.19 (2H, br s), 4.26 (2H, br s), 3.43 (1H, br s), 3.17 (2H, br s), 2.87 (2H, br s), 2.21 (2H, d, J = 11.3 Hz), 1.91 (2H, br s). MS (ESI): 221 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 221.1260, observed 221.1259.

#### 1-(3-Fluoro-2,2-dimethyl-propyl)-*N*-methyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**17**)

To a solution of 3-[(4-methoxyphenyl)methoxy]-2,2-dimethyl-propan-1-ol (672 mg, 3.0 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added Dess-Martin Periodinane (2.0 g, 4.8 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. The mixture was diluted with diethyl ether (30 mL), then sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (25 mL) and sodium thiosulfate (2.2 g, 9.1 mmol) was added. The mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was diluted with tetrahydrofuran (10 mL), then benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 504 mg, 2.0 mmol), acetic acid (115 μL) and sodium triacetoxyborohydride was added to the mixture in this order. After the mixture was stirred for 3 h at 60 °C, sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added. The mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 90:10 to 80:20) to give **53b** as colorless oil (411 mg, 45%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.36-7.30 (5H, m), 7.24 (3H, dt, J = 8.9, 2.2 Hz), 6.87 (2H, dt, J = 9.2, 2.4 Hz), 5.13 (2H, s), 4.40 (2H, s), 3.96 (1H, br s), 3.80 (3H, s), 3.14 (2H, s), 2.79-2.77 (5H, m), 2.29 (2H, s), 1.68-1.65 (2H, m), 1.53-1.48 (2H, m), 0.84 (6H, s). MS (ESI): 455 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution of **53b** (226 mg, 0.50 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added trifluoroacetic acid (3 mL). The mixture was stirred for 2 hr at room temperature, then concentrated. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 0:100) to give **53c** as colorless solid (155 mg, 93%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.38-7.27 (5H, m), 5.13 (2H, s), 4.13-3.83 (1H, m), 3.50 (2H, s), 3.03 (2H, d, J = 11.3 Hz), 2.80 (3H, br s), 2.38 (2H, br s), 2.27 (2H, br s), 1.72-1.62 (4H, m), 0.92 (6H, s). MS (ESI): 335 (M + H)<sup>+</sup>.

To an ice-cooled solution of **53c** (155 mg, 0.46 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (224 μL, 1.4 mmol) in dichloromethane (3 mL) was added trifluoromethanesulfonic anhydride (95 μL, 0.56 mmol). The mixture was stirred for 30 min at the same temperature. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was diluted with acetonitrile (3 mL), then 1.0 M tetrabutylammonium fluoride solution in tetrahydrofuran (1.4 mL, 1.4 mmol) was added. The mixture was heated to 60 °C, then stirred for 6 h. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added at room temperature, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 95:5 to 80:20) to give **53d** as colorless oil (29 mg, 18%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.34-7.31 (5H, m), 5.14 (2H, s), 4.14 (2H, d, J = 47.9 Hz), 4.00-3.87 (1H, m), 2.81-2.80 (5H, m), 2.35 (2H, s), 2.18 (2H, d, J = 1.3 Hz), 1.75-1.68 (2H, m), 1.56-1.53 (4H, m), 0.86 (6H, d, J = 1.8 Hz). MS (ESI): 337 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **53d** (28.7 mg, 0.085 mmol), palladium hydroxide on carbon (20 wt%, 12 mg) in 2-propanol (3 mL) was stirred for 3 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated. The residue was diluted with dichloromethane (1 mL), followed by the addition of 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (0.50 mL). The volatiles were removed under reduced pressure to give **17** as yellow solid (11.1 mg, 47%). <sup>1</sup>H-NMR 400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.88 (1H, br s), 9.35 (2H, br s), 4.39 (2H, dd, J = 47.3, 8.7 Hz), 3.59 (1H, d, J = 12.5 Hz), 3.37-3.35 (5H, m), 3.17-3.07 (4H, m), 2.33-2.14 (4H, m), 1.11 (6H, br s). MS (ESI): 203 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>2</sub><sup>+</sup> 203.1918, observed 203.1934.

#### 1-[(2,2-Difluorocyclopropyl)methyl]-*N*-methyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**18**)

To a solution of *tert*-butyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**50**, 170 mg, 0.79 mmol) and triethylamine (221 μL, 1.6 mmol) in acetonitrile (2 mL) was added 1,1-difluoro-2-(bromomethyl)cyclopropane (203 mg, 1.2 mmol). The mixture was stirred overnight at 50 °C. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol; 99:1 to 98:2) to give **54b** as colorless oil (214 mg, 89%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.06-3.65 (1H, m), 3.05-3.04 (1H, m), 2.99-2.94 (1H, m), 2.74 (3H, s), 2.66-2.64 (1H, m), 2.37 (1H, dd, J = 13.1, 8.0 Hz), 2.17-2.04 (2H, m), 1.79-1.61 (5H, m), 1.51-1.41 (10H, m), 1.01-0.97 (1H, m).

MS (ESI): 305 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution **54b** (210 mg, 0.69 mmol) in 1,4-dioxane (2 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature. The volatiles were removed under reduced pressure to give **18** as colorless solid (165 mg, 86%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.03 (1H, s), 9.24 (2H, s), 3.60-3.57 (2H, m), 3.18-3.06 (4H, m), 2.53-2.51 (3H, m), 2.30-2.17 (3H, m), 1.98 (2H, br s), 1.87-1.81 (1H, m), 1.64 (1H, br s). MS (ESI): 205 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 205.1511, observed 205.1524.

#### 1-(2-Fluoro-2-methyl-propyl)-*N*-methyl-piperidin-4-amine (**19**)

To a solution of **53e** (231 mg, 0.72 mmol) in dichloromethane (6 mL) was added *N,N*-diethylaminosulfur trifluoride (166 mg, 0.93 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 90:10 to 80:20) to give **53f** as colorless oil (134 mg, 58%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.35-7.31 (5H, m), 5.14 (2H, s), 4.01-3.93 (1H, m), 2.98 (2H, d, *J* = 11.5 Hz), 2.82 (3H, s), 2.42 (2H, d, *J* = 22.3 Hz), 2.22 (2H, s), 1.76 (2H, d, *J* = 10.0 Hz), 1.60-1.55 (2H, m), 1.35 (6H, d, *J* = 21.3 Hz). MS (ESI): 323 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **53f** (134 mg, 0.41 mmol) and palladium hydroxide on carbon (20 wt%, 25 mg) in 2-propanol (6 mL) was stirred for 1 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated to give **19** as yellow oil (35 mg, 46%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.91 (2H, dt, *J* = 12.0, 2.9 Hz), 2.45-2.33 (6H, m), 2.17 (2H, td, *J* = 11.7, 2.5 Hz), 1.83-1.80 (8H, m), 1.46-1.32 (8H, m). MS (ESI): 189 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>2</sub><sup>+</sup> 189.1762, observed 189.1770.

#### 1-(2,2-Difluoroethyl)-*N*-methyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**20**)

A mixture of *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 171 mg, 0.69 mmol), 2,2-difluoro-1-iodoethane (120 μL, 1.4 mmol) and potassium carbonate (191 mg, 1.4 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) for 5 h at 80 °C. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 95:15 to 50:50) to give **53i** as yellow oil (170 mg, 79%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.36-7.26 (5H, m), 5.85 (1H, tt, *J* = 56.0, 4.4 Hz), 5.14 (2H, s), 4.05 (1H, br s), 2.98 (2H, dd, *J* = 9.4, 2.1 Hz), 2.81 (3H, s), 2.72 (2H, td, *J* = 15.0, 4.4 Hz), 2.30 (2H, t, *J* = 10.4 Hz), 1.81-1.73 (2H, m), 1.65-1.59 (3H, m). MS (ESI): 313 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **53i** (170 mg, 0.54 mmol) and palladium on carbon (10 wt%, 20 mg) in methanol (1.5 mL) was stirred for 3 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated. The residue was diluted with diethyl ether (2 mL), followed by the addition of 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (2 mL). The appeared precipitate was collected by filtration and washed with diethyl ether to give **20** as colorless solid (137 mg, 78%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

$\delta$ : 6.50 (1H, tt,  $J = 53.4, 3.7$  Hz), 3.83-3.72 (4H, m), 3.49-3.34 (3H, m), 2.75 (3H, s), 2.41 (2H, d,  $J = 13.5$  Hz), 2.14-2.08 (2H, m). MS (ESI): 179 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 179.1354, observed 179.1361.

#### *N*-Methyl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)piperidin-4-amine dihydrochloride (**21**)

To a solution of benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 2.07 g, 8.3 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (1.89 mL, 10.8 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added trifluoromethyl trifluoromethanesulfonate (2.13 g, 9.2 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 50:50) to give the corresponding alkylated product **53j** as colorless oil. A mixture of the product and palladium hydroxide on carbon (20 wt% , 50 mg) in methanol (10 mL) was stirred for 2 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated. The residue was diluted with ethyl acetate (10 mL), followed by the addition of 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (10 mL). The appeared precipitate was collected by filtration and washed with diethyl ether to give **21** as colorless solid (1.80 g, 80%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 4.25 (2H, q,  $J = 9.0$  Hz), 3.80 (2H, d,  $J = 12.9$  Hz), 3.50-3.35 (3H, m), 2.75 (3H, s), 2.42 (2H, d,  $J = 14.1$  Hz), 2.18-2.11 (2H, m). MS (ESI): 197 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 197.1260, observed 197.1285.

#### 2,2-Dimethyl-3-[4-(methylamino)-1-piperidyl]propan-1-ol (**22**)

A mixture of **53c** (16 mg, 0.049 mmol) and palladium hydroxide on carbon (20 wt%, 6.8 mg) in 2-propanol (1.5 mL) and dichloromethane (1.5 mL) was stirred for 1 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated to give **22** as colorless solid (11 mg, 46%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3.48 (2H, s), 3.10 (2H, d,  $J = 12.8$  Hz), 3.00-2.91 (1H, m), 2.63 (3H, s), 2.42 (2H, s), 2.36 (2H, t,  $J = 11.3$  Hz), 2.16 (2H, d,  $J = 12.3$  Hz), 1.93-1.87 (2H, m), 0.92 (6H, s). MS (ESI): 201 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for C<sub>11</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 201.1961, observed 201.1967.

#### 2-Methyl-1-[4-(methylamino)-1-piperidyl]propan-2-ol dihydrochloride (**23**)

A solution of benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 205 mg, 0.83 mmol) and 2,2-dimethyloxirane (97 mg, 1.3 mmol) in 2-propanol (5 mL) was stirred for 9 h at 120 °C under microwave radiation. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 42.5:42.5:5 to 45:45:10) to give **53e** as colorless oil (244 mg, 92%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.37-7.25 (5H, m), 5.14 (2H, s), 4.11-3.85 (1H, m), 2.95 (2H, d,  $J = 11.8$  Hz), 2.83 (3H, s), 2.43 (2H, br s), 2.31 (2H, s), 1.78-1.76 (2H, m), 1.62-1.58 (2H, m), 1.15 (6H, s). MS (ESI): 321 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **53e** (244 mg, 0.76 mmol) and palladium hydroxide on carbon (20 wt%, 52 mg) in 2-propanol (5 mL) was stirred for 5 h at room temperature under hydrogen atmosphere. After the mixture was filtered, 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (1 mL) was added to the filtrate. The volatiles were removed under reduced pressure to give **23** as colorless solid (194 mg, 99% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3.93-3.92 (1H, m), 3.66-3.41 (2H, m), 3.32-3.21 (4H, m), 2.77 (0.8H, s), 2.74 (2.2H, s), 2.36-2.15 (4H, m), 1.37 (4.4H, s), 1.36 (1.6H, s). MS (ESI): 187 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>10</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 187.1805, observed 187.1835.

#### *N*-Methyl-1-(oxetan-3-yl)piperidin-4-amine (**24**)

To a solution of benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 5.69 g, 22.9 mmol), oxetan-3-one (1.65 g, 22.9 mmol) and acetic acid (1.31 mL, 22.9 mmol) in 1,2-dichloroethane (20 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (4.85 g, 22.9 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. After water was added, potassium carbonate was added until the foaming stopped. The mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 50:50) to give the corresponding reductive amination product **53g** as colorless oil. A mixture of the product and palladium on carbon (10 wt%, 100 mg) in methanol (10 mL) was stirred for 2 days at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated to give **24** as colorless oil (2.50 mg, 64%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.64 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 4.56 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 3.49 (1H, t, *J* = 6.5 Hz), 2.99-2.97 (1H, m), 2.85-2.82 (2H, m), 2.67 (3H, s), 2.19-2.18 (2H, m), 1.95-1.90 (4H, m). MS (ESI): 171 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 171.1492, observed 171.1496.

#### *N*-methyl-1-(3-methyloxetan-3-yl)piperidin-4-amine (**25**)

A solution of benzyl *N*-methyl-*N*-(4-piperidyl)carbamate (**49**, 6.21 g, 25.0 mmol) and (benzenesulfonylmethylene)oxetane (5.26 g, 25.0 mmol) in methanol (20 mL) was stirred for 2 days at 60 °C. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 50:50 to 0:100) to give the corresponding Michael adduct as colorless solid (8.00 g, 70%). To a solution of the Michael adduct (2.10 g, 4.6 mmol) and disodium hydrogen phosphate (2.6 g, 18.3 mmol) in a mixture of methanol (10 mL) and tetrahydrofuran (10 mL) was added 5% sodium amalgam (8.00 g, 4.6 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. The mixture was cooled to -78 °C, then filtered. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 30:70) to give the desulfonation product **53h** as colorless oil. A mixture of the product and palladium hydroxide on carbon (20 wt%, 100 mg) in methanol (10 mL) was stirred for 18 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the mixture was concentrated to give **25** as colorless solid (792

mg, 94% over 3 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.53 (2H, d, J = 5.5 Hz), 4.19 (2H, d, J = 5.8 Hz), 2.89-2.84 (1H, m), 2.62-2.61 (5H, m), 2.14-2.10 (4H, m), 1.90-1.80 (2H, m), 1.34 (3H, s). MS (ESI): 185 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 185.1648, observed 185.1648.

#### 1-Benzyl-3-fluoro-*N*-methyl-piperidin-4-amine hydrochloride (**26**)

To a solution of *tert*-butyl 3-fluoro-4-oxo-piperidine-1-carboxylate (**56**, 0.50 g, 2.3 mmol) in 1,4-dioxane (2.5 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (2.5 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature, then concentrated. To a solution of the residue in *N,N*-dimethylformamide (3.5 mL) was added benzyl bromide (0.41 mL, 3.5 mmol) and potassium carbonate (0.79 g, 5.8 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 83:17 to 67:33) to give **57** as colorless oil (15 mg, 3% in 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.38-7.26 (7H, m), 5.07-4.90 (1H, m), 3.71-3.67 (2H, m), 3.46-3.43 (1H, m), 3.12-3.07 (1H, m), 2.67-2.59 (1H, m), 2.52-2.40 (3H, m). MS (ESI): 208 (M + H)<sup>+</sup>.

A solution of **57** (220 mg, 1.1 mmol) and 40% methylamine solution in methanol (242 μL, 2.4 mmol) in methanol (2 mL) was stirred overnight at room temperature. To the solution was added sodium borohydride (20 mg, 0.50 mmol). The mixture was stirred for 4 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 83:17 to 67:33) to give the corresponding reductive amination product as colorless oil. To a solution of the product in 1,4-dioxane (1 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (51 μL). The mixture was stirred overnight at room temperature, then concentrated to give **26** as colorless solid (51 mg, 18% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) (a mixture of *cis/trans* isomers at the ratio of 4/1) δ: 8.52 (1H, s), 7.36-7.24 (5H, m), 5.00 (0.8H, d, J = 50.2 Hz), 4.67 (0.2H, dtd, J = 50.2, 9.4, 5.2 Hz), 3.56 (0.4H, s), 3.53-3.52 (1.6H, m), 3.12 (2H, m), 2.86 (0.8H, d, J = 12.3 Hz), 2.78 (0.2H, d, J = 11.0 Hz), 2.54 (3H, s), 2.20 (0.8H, dd, J = 38.4, 13.6 Hz), 2.03 (1.2H, m), 1.88 (0.8H, d, J = 9.3 Hz), 1.74 (0.8H, ddd, J = 24.5, 12.2, 4.0 Hz), 1.49 (0.2H, ddd, J = 24.5, 12.4, 3.9 Hz). MS (ESI): 223 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>2</sub><sup>+</sup> 223.1605, observed 223.1600.

#### 1-Benzyl-3,3-difluoro-*N*-methyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (**27**)

To a solution of *tert*-butyl 3,3-difluoro-4-oxo-piperidine-1-carboxylate (**58**, 530 mg, 2.3 mmol) in 1,4-dioxane (5 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (5 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature, then concentrated. To a suspension of the residue in acetonitrile (5 mL) was added benzyl bromide (415 μL, 3.5 mmol) and triethylamine (975 μL, 7.0 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol; 98:2 to 91:9) to give colorless oil. A solution of the oil in 6 mol/L hydrochloric acid (3 mL) was stirred overnight at room temperature. The mixture

was concentrated to give **59** as colorless solid (300 mg, 50% in 3 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.17 (1H, br s), 7.60-7.46 (5H, m), 4.37 (2H, br s), 3.46 (2H, br s), 3.08 (2H, br s), 2.01 (2H, br s). MS (ESI): 226 (M + H)<sup>+</sup>.

A solution of **59** (50 mg, 0.19 mmol), 40% methylamine solution in methanol (275 μL, 2.7 mmol) and acetic acid (11 μL, 0.19 mmol) in methanol (1 mL) was stirred overnight at room temperature. To the solution was added sodium borohydride (7.2 mg, 0.19 mmol). The mixture was stirred for 4 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 83:17 to 50:50) to give the corresponding reductive amination product as colorless oil. To a solution of the product in 1,4-dioxane (1 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (14 μL). The mixture was stirred overnight at room temperature, then concentrated to give **27** as colorless solid (13 mg, 25% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.30 (2H, s), 7.35-7.29 (5H, m), 3.74-3.62 (3H, m), 3.17 (1H, td, J = 11.8, 4.7 Hz), 2.91 (1H, d, J = 11.8 Hz), 2.63 (3H, s), 2.49-2.37 (1H, m), 2.18-2.15 (2H, m), 1.67-1.64 (1H, m). MS (ESI): 241 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 241.1511, observed 241.1522.

#### (1*R*\*,5*S*\*)-9-Benzyl-*N*-methyl-3-oxa-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-amine dihydrochloride (**28**)

To a solution of 9-benzyl-3-oxa-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-one (**60**, 100 mg, 0.43 mmol), acetic acid (0.30 mL) in tetrahydrofuran (2 mL) and 9.8 M methylamine solution in methanol (2 mL) was added sodium borohydride (33 mg, 0.87 mmol). The mixture was stirred for 10 min at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5/47.5/5 to 42.5/42.5/15) to give the corresponding reductive amination product as colorless oil. To a solution of the product in chloroform (2 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (1.0 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature. The appeared precipitate was collected by filtration and washed with hexane to give **28** as colorless solid (55 mg, 40%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.36-7.29 (4H, m), 7.24-7.22 (1H, m), 3.81 (2H, s), 3.75 (2H, d, J = 10.0 Hz), 3.51 (2H, d, J = 11.0 Hz), 2.71-2.67 (1H, m), 2.57-2.55 (2H, m), 2.28 (3H, s), 2.22-2.15 (2H, m), 1.48 (2H, d, J = 14.8 Hz). MS (ESI): 247 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 247.1805, observed 247.1819.

#### 1-Benzyl-*N*-(oxetan-3-yl)piperidin-4-amine (**29**)

To a solution of 1-benzylpiperidin-4-one (**61**, 0.30 g, 1.6 mmol), 3-aminooxetane (0.12 g, 1.6 mmol) and acetic acid (91 μL, 1.6 mmol) in 1,2-dichloroethane (2 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (336 mg, 1.6 mmol), then stirred for 30 minutes at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column



chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5/47.5/5 to 42.5/42.5/15) to give **29** as colorless oil (341 mg, 87%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.33-7.22 (5H, m), 4.81 (2H, t, J = 7.0 Hz), 4.41 (2H, t, J = 6.7 Hz), 4.08-4.02 (1H, m), 3.48 (2H, s), 2.84-2.82 (2H, m), 2.47-2.42 (1H, m), 1.99 (2H, td, J = 11.7, 2.3 Hz), 1.72-1.70 (2H, m), 1.42-1.33 (2H, m). MS (ESI): 247 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 247.1805, observed 247.1803.

#### 1-Benzyl-*N*-(3-methyloxetan-3-yl)piperidin-4-amine (**30**)

To a solution of 1-benzylpiperidin-4-one (**61**, 0.30 g, 1.6 mmol), 3-amino-3-methyloxetane (0.14 g, 1.6 mmol) and acetic acid (91 μL, 1.6 mmol) in 1,2-dichloroethane (2 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (336 mg, 1.6 mmol), then stirred for 30 minutes at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5/47.5/5 to 42.5/42.5/15) to give **30** as yellow oil (326 mg, 79%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.33-7.22 (5H, m), 4.81 (2H, t, J = 7.0 Hz), 4.41 (2H, t, J = 6.7 Hz), 4.08-4.02 (1H, m), 3.48 (2H, s), 2.84-2.82 (2H, m), 2.47-2.42 (1H, m), 1.99 (2H, td, J = 11.7, 2.3 Hz), 1.72-1.70 (2H, m), 1.42-1.33 (2H, m). MS (ESI): 261 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 261.1961, observed 261.1979.

#### 1-Benzyl-*N*-methoxy-piperidin-4-amine (**31**)

To a solution of 1-benzylpiperidin-4-one (**61**, 0.35 g, 1.8 mmol), methoxyamine hydrochloride (0.20 g, 2.2 mmol) and acetic acid (0.10 mL, 1.8 mmol) in methanol (3 mL) was added 2-picoline-borane (0.40 g, 2.8 mmol). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with dichloromethane. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5/47.5/5 to 42.5/42.5/15) to give the corresponding reductive amination product as colorless oil. The product was diluted with 1 mol/L hydrochloric acid (2 mL), and the mixture was concentrated to give **31** as colorless solid (500 mg, 92%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.60-7.58 (2H, m), 7.50-7.48 (3H, m), 4.37 (2H, s), 3.98 (3H, s), 3.92-3.86 (1H, m), 3.63 (2H, d, J = 12.9 Hz), 3.22 (2H, dd, J = 13.2, 10.7 Hz), 2.35 (2H, d, J = 13.5 Hz), 2.16-2.10 (2H, m). MS (ESI): 221 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 221.1648, observed 221.1664.

#### *trans*-1-Benzyl-4-fluoro-*N*-methyl-pyrrolidin-3-amine (**33**)

To an ice-cooled solution of **64** (3.15 g, 12.6 mmol) and triphenylphosphine (3.97 g, 15.1 mmol) in tetrahydrofuran (25 mL) was added *N,N,N',N'*-tetramethylazodicarboxamide (2.74 g, 15.1 mmol). The mixture was stirred for 48 h at room temperature, then concentrated. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 80:20

to 50:50) to give **67** as colorless oil (2.92 g, quant.). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.34-7.26 (5H, m), 5.10 (1H, d, J = 12.3 Hz), 5.05 (1H, d, J = 12.3 Hz), 3.71 (2H, t, J = 11.9 Hz), 3.35-3.29 (2H, m), 2.34 (3H, s), 2.16 (2H, t, J = 2.0 Hz). MS (ESI): 233 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution of **67** (930 mg, 4.0 mmol) and 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene (0.10 mL, 0.80 mmol) in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (1.7 mL) and *tert*-butyl methyl ether (4.0 mL) was added benzoyl fluoride (1.7 mL, 16 mmol). The mixture was stirred for 14 days at 60 °C. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5/47.5/5 to 42.5/42.5/15) to give the corresponding fluorinated product **68** as colorless oil. To a bilayer solution of the product in chloroform (10 mL) and water (10 mL) was added potassium carbonate (550 mg, 4.0 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (870 mg, 4.0 mmol). The mixture was stirred for 2 h at room temperature, then extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was partially purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 90/10 to 70/30). A mixture of the resulting material and palladium hydroxide on carbon (20 wt%, 50 mg) in methanol (5 mL) was stirred for 2 h at room temperature under hydrogen atmosphere. After the mixture was filtrated and the filtrate was concentrated, the residue was diluted with 1,2-dichloromethane (3 mL). Benzaldehyde (96 μL, 0.94 mmol), acetic acid (54 μL, 0.94 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (300 mg, 1.4 mmol) were added to the mixture. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100/0 to 0/100) to give the corresponding reductive amination product as colorless oil. A solution of the product in a mixture of dichloromethane (1.5 mL) and trifluoroacetic acid (1.5 mL) was stirred for 2 h. After the solution was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5/47.5/5 to 42.5/42.5/15) to give **33** as colorless oil. (160 mg, 19% in 5 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.33-7.22 (5H, m), 4.82 (1H, dtd, J = 54.0, 3.7, 1.8 Hz), 3.65 (1H, d, J = 12.8 Hz), 3.58 (1H, d, J = 13.1 Hz), 3.28 (1H, dt, J = 25.3, 6.2 Hz), 3.10 (1H, dd, J = 9.3, 6.8 Hz), 2.89 (1H, ddd, J = 24.6, 11.4, 1.1 Hz), 2.75 (1H, dq, J = 28.5, 5.6 Hz), 2.44 (3H, s), 2.18 (1H, dd, J = 9.4, 5.9 Hz). MS (ESI): 209 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>2</sub><sup>+</sup> 209.1448, observed 209.1463.

#### *trans*-1-Benzyl-4-(methylamino)pyrrolidin-3-ol dihydrochloride (**34**)

To a solution of benzyl 2,5-dihydropyrrole-1-carboxylate (**62**, 5.00 g, 24.6 mmol) in dichloromethane (30 mL) was added *m*-CPBA (8.59 g, 49.2 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was neutralized by using potassium carbonate, then extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 50:50) to give **63** as colorless

oil (4.30 g, 80%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.37-7.29 (5H, m), 5.11 (2H, dd, J = 16.2, 12.4 Hz), 3.86 (2H, dd, J = 19.4, 12.7 Hz), 3.67 (2H, d, J = 2.5 Hz), 3.40-3.36 (2H, m). MS (ESI): 220 (M + H)<sup>+</sup>.

A solution of **63** (0.50 g, 2.3 mmol) in 9.0 mol/L methylamine solution in methanol (5 mL) was stirred for 30 min at 100 °C under microwave radiation. The mixture was concentrated to give **64** as colorless oil (0.62 g, quant.). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.36-7.30 (5H, m), 5.13 (2H, s), 4.11 (1H, s), 3.77-3.70 (2H, m), 3.40-3.21 (2H, m), 3.06-3.05 (1H, m), 2.44 (3H, d, J = 4.3 Hz). MS (ESI): 251 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution of **64** (0.98 g, 3.9 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (1.30 g, 5.9 mol). The mixture was stirred for 12 h at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 95:5 to 50:50) to give **65a** as colorless oil (1.30 g, 95%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47 (9H, s), 2.79 (3H, s), 3.30-3.42 (2H, m), 3.70-3.81 (2H, m), 4.30-4.39 (2H, m), 5.14 (2H, s), 7.32-7.36 (5H, m). MS (ESI): 351 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **65a** (0.20 g, 0.57 mmol) and palladium on carbon (10wt%, 20 mg) in methanol (10 mL) was stirred for 12 h at room temperature under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated. To a solution of the residue in 1,2-dichloroethane (10 mL) was added acetic acid (33 μL, 0.57 mmol), benzaldehyde (87 μL, 0.86 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (0.24 g, 1.1 mmol). The mixture was stirred for 12 h at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 95:5 to 85:15) to give **66a** as colorless oil (0.14 g, 80%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.45 (9H, s), 2.45-2.48 (1H, m), 2.57-2.58 (1H, m), 2.76-2.78 (1H, m), 2.83 (3H, s), 2.98 (1H, s), 3.52-3.66 (2H, m), 4.26 (2H, td, J = 6.9, 4.7 Hz), 7.26-7.31 (5H, m). MS (ESI): 307 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution of **66a** (759 mg, 2.5 mmol) in ethyl acetate (2 mL) was added 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (10 mL). The mixture was stirred for 2 h at room temperature, then concentrated. The resulting solid was washed with diethyl ether to give **34** as yellow solid (680 mg, 98%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.51-11.49 (1H, br m), 10.04-9.57 (2H, br m), 7.56-7.49 (5H, m), 4.66-4.49 (3H, m), 3.82-3.16 (6H, m), 2.63 (3H, s). MS (ESI): 207 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 207.1492, observed 207.1500.

#### *trans*-1-Benzyl-4-methoxy-*N*-methyl-pyrrolidin-3-amine dihydrochloride (**35**)

To an ice-cooled solution of **65a** (1.40 g, 4.0 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (6 mL) was added 60% dispersion of sodium hydride. After the mixture was stirred for 10 min at room temperature, iodomethane (0.50 mL, 8.0 mmol) was added. The mixture was stirred for 18 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 50:50) to give **65b** as colorless oil (1.50 g, quant.). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.36-7.30 (5H, m), 5.14 (2H, s), 4.49 (1H, s), 3.86 (1H, t, J = 4.8 Hz), 3.74-

3.65 (2H, m), 3.49-3.36 (5H, m), 2.78 (3H, s), 1.47 (9H, s). MS (ESI): 365 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **65b** (1.57 g, 4.3 mmol) and palladium hydroxide wetted with ca. 50% water (30 mg) in methanol (10 mL) was stirred for 3 h at room temperature under hydrogen atmosphere. After filtered and concentrated *in vacuo*, the residue was diluted with 1,2-dichloroethane (5 mL), then acetic acid (247  $\mu$ L, 4.3 mmol), benzaldehyde (568  $\mu$ L, 5.6 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (1.34 g, 6.5 mmol) was added. After stirred for 12 h at room temperature, sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added and the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 75:25) to give **66b** as colorless oil (1.13 g, 82%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.33-7.22 (5H, m), 4.47 (1H, s), 3.89-3.87 (1H, m), 3.64 (1H, d, J = 12.8 Hz), 3.50 (1H, d, J = 13.1 Hz), 3.34 (3H, s), 2.88 (3H, s), 2.75 (1H, t, J = 9.2 Hz), 2.55 (1H, dd, J = 9.9, 4.6 Hz), 2.44 (1H, dd, J = 9.5, 5.0 Hz), 1.45 (9H, s). MS (ESI): 321 (M + H)<sup>+</sup>.

A solution of **66b** (1.14 g, 3.6 mmol) in 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (10 mL) was stirred for 2 h at room temperature. After the mixture was concentrated, the resulting solid was washed with diethyl ether to give **35** as colorless solid (915 mg, 88%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 11.66 (1H, s), 10.35-10.02 (2H, m), 7.64-7.43 (5H, m), 4.50-4.41 (3H, m), 4.00-3.33 (8H, m), 2.63 (3H, s). MS (ESI): 221 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> 221.1648, observed 221.1671.

#### 1-[(2-Fluorophenyl)methyl]-*N*-methyl-azetidin-3-amine dihydrochloride (**37**)

To a solution of *tert*-butyl *N*-(azetidin-3-yl)-*N*-methyl-carbamate (**69**, 209 mg, 1.1 mmol), 2-fluorobenzaldehyde (117  $\mu$ L, 1.1 mmol) and acetic acid (64  $\mu$ L, 1.1 mmol) in 1,2-dichloroethane (3 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (238 mg, 1.1 mmol). The mixture was stirred for 2 h at room temperature, then neutralized by potassium carbonate. The mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70/30 to 30/70) to give the corresponding reductive amination product as a colorless solid. A solution of the product in 4 mol/L hydrogen chloride in ethyl acetate (5 mL) was stirred for 2 h at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was washed with diethyl ether to give **37** as colorless solid (163 mg, 54% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 11.74 (1H, s), 10.19 (2H, s), 7.65 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.53-7.50 (1H, m), 7.34-7.28 (2H, m), 4.65 (2H, br s), 4.48 (2H, br s), 4.31 (2H, br s), 4.13-4.12 (1H, m), 2.53 (3H, s). MS (ESI): 195 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>2</sub><sup>+</sup> 195.1292, observed 195.1301.

#### *cis*-6-Benzyl-3,6-diazabicyclo[3.2.0]heptane (**39**)

To an ice-cooled solution of 1-benzyloxycarbonyl-4-hydroxy-pyrrolidine-3-carboxylic acid (**70**, 1.00 g, 3.77 mmol) in tetrahydrofuran (15 mL) was added borane-tetrahydrofuran complex (11.9 mL, 11.3 mmol). The mixture was stirred for 18 h at room temperature under argon atmosphere. The mixture was

cooled in ice bath, then 2 mol/L sodium hydroxide solution (16 mL) was added. The mixture was stirred for 10 min at room temperature, then neutralized by 1 mol/L hydrochloric acid. The mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol; 97:3 to 95:5) to give the corresponding diol as colorless oil (878 mg). To a solution of the diol (878 mg) and triethylamine (2.44 mL, 17.5 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added methanesulfonyl chloride (1.37 mL, 17.5 mmol). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 20:80 to 0:100) to give **71** as colorless oil (0.78 g, 51%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (a mixture of cis/trans isomers (1/1.9)) δ: 7.40-7.34 (7.7H, m), 5.17-5.14 (4.6H, m), 4.43-4.17 (3.1H, m), 3.99-3.41 (6.2H, m), 3.11 (1.6H, s), 3.10 (3H, s), 3.09 (1.6H, s), 3.08 (3H, s), 2.92-2.90 (1.6H, br m). MS (ESI): 408 (M + H)<sup>+</sup>.

A solution of **71** (960 mg, 2.4 mmol) and benzylamine (0.77 mL, 7.1 mmol) in toluene (15 mL) was stirred for 18 h at 100 °C. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 50:50 to 0:100) to give **72** as colorless oil (0.33 g, 43%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.40-7.24 (10H, m), 5.19 (2H, dd, J = 16.3, 12.5 Hz), 3.91-3.81 (2H, m), 3.74-3.57 (3H, m), 3.50 (1H, dd, J = 11.8, 8.3 Hz), 3.26-3.22 (2H, m), 3.09-2.99 (2H, m). MS (ESI): 323 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **72** (300 mg, 0.93 mmol) and Palladium on carbon (10 wt%, 50 mg) in methanol (3 mL) was stirred for 2 h at room temperature under hydrogen atmosphere. After the mixture was filtrated and the filtrate was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5/47.5/5 to 42.5/42.5/15) to give **39** as colorless oil. (162 mg, 92%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.28-7.17 (5H, m), 3.76 (1H, dd, J = 6.3, 3.0 Hz), 3.63 (2H, dd, J = 16.6, 13.1 Hz), 3.17 (1H, t, J = 8.0 Hz), 3.04-2.97 (2H, m), 2.81-2.72 (3H, m), 2.60 (1H, dd, J = 12.5, 6.8 Hz), 2.20 (1H, dd, J = 12.5, 3.0 Hz). MS (ESI): 189 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 189.1386, observed 189.1390.

#### (1*R*,5*R*)-7-Benzyl-4,7-diazabicyclo[3.2.0]heptane (**40**)

A solution of (2*S*,3*S*)-3-hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid (**73**, 4.90 g, 37.4 mmol), 4 mol/L sodium hydroxide solution (10.5 mL, 37.4 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (13.01 g, 56.1 mol) in a mixed solution of tetrahydrofuran (40 mL) and water (20 mL) was stirred for 8 h at room temperature. After almost half of the solvent was removed under reduced pressure, the pH value of the aqueous layer was adjusted to 2.0 by using 10% potassium hydrogen sulfate solution. The mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was washed with a mixed solution of hexane and diethyl ether (3/1) to give a colorless solid (7.85 g). To

an ice-cooled solution of this solid in tetrahydrofuran (120 mL) was added borane-tetrahydrofuran complex (102 mL, 97.0 mmol). The mixture was stirred for 18 h at room temperature under argon atmosphere. 4 mol/L sodium hydroxide solution (80 mL) was added, and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. After the pH value of the solution was adjusted using 2 mol/L hydrochloric acid, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated to give the corresponding diol as colorless oil (7.50 g). To an ice-cooled solution of the diol and triethylamine (24.1 mL, 173 mmol) in dichloromethane (100 mL) was added methanesulfonyl chloride (13.5 mL, 173 mmol). The mixture was stirred for 18 h at room temperature. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 80:20 to 60:40) to give **74** as colorless oil (11.0 g, 79% over 3 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.22 (1H, s), 4.46-4.43 (1H, m), 4.39-4.34 (1H, m), 4.24-4.19 (1H, m), 3.57-3.56 (2H, br m), 3.09 (3H, s), 3.06 (3H, s), 2.27 (2H, br s), 1.50 (9H, s). MS (ESI): 374 (M + H)<sup>+</sup>.

A solution of **74** (11.00 g, 29.5 mmol) and benzylamine (12.87 mL, 118 mmol) in toluene (147 mL) was stirred for 18 h at 100 °C. After water was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 80:20 to 60:40) to give **75** as colorless solid (4.70 g, 55%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.34-7.23 (6H, m), 4.35-4.17 (1H, m), 3.92-3.89 (1H, m), 3.82-3.63 (4H, m), 3.36-3.23 (1H, m), 3.18-3.06 (1H, m), 1.66-1.53 (2H, m), 1.49-1.45 (9H, m). MS (ESI): 289 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution of **75** (2.00 mg, 6.9 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added trifluoroacetic acid (10 mL). The mixture was stirred for 2 h at room temperature, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 47.5/47.5/5 to 42.5/42.5/15) to give **40** as colorless oil (1.18 mg, 90%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.30-7.19 (5H, m), 3.92 (1H, t, J = 5.4 Hz), 3.69 (2H, dd, J = 17.4, 13.2 Hz), 3.38-3.28 (2H, m), 3.24-3.15 (2H, m), 1.72 (2H, dt, J = 16.3, 3.8 Hz), 1.30-1.21 (1H, m). MS (ESI): 189 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 189.1386, observed 189.1390.

## 2. *in vitro* evaluation

### *phospholipidosis-inducing potential assay*

*in vitro* phospholipidosis-inducing potential assay: At 24 h after plating the cells, medium in each well of the 96-microplate was removed, 50 μL of medium containing HCS LipidTox Green Phospholipidosis Detection Regent (In vitrogen, Carsbad, CA, USA) was added quickly, and then 50 μL of medium containing various test compounds at two-fold serial concentration was transferred to the cell culture

plate from the chemical preparation plate. At 24 h after addition of HCS Lipid green and test compounds, the plated cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and 50  $\mu$ L of PBS was added to each well. Fluorescence of HCS Lipid green taken up by cells was measured with a fluoro-microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) with an excitation wavelength of 495 nm and emission wavelength of 525 nm. After measuring the fluorescence of HCS Lipid green, and 50  $\mu$ L of medium containing 20  $\mu$ g/ml Hoechst33342 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added. After incubation was continued for 20 min at 37  $^{\circ}$ C, the cellular fluorescence of Hoechst33342 was measured using a fluoro-microplate reader with an excitation wavelength of 355 nm and emission wavelength of 460 nm. To remove the influence of cytotoxicity, the uptake of HCS Lipid green per cell was calculated using the following formula. Normalized value =  $\{(\text{signal of sample's HCS Lipid green} - \text{signal of blank}) / (\text{signal of control's HCS Lipid green} - \text{signal of blank})\} / \{(\text{signal of sample's Hoechst33342} - \text{signal of blank}) / (\text{signal of control's Hoechst33342} - \text{signal of blank})\}$

### 第3章に関する実験

#### 1. Chemistry

##### 2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-methyl-*N*-[1-(pyrimidin-5-ylmethyl)-4-piperidyl]acetamide (**79**)

To a solution of **95** (42 mg, 0.21 mmol), *N*-methyl-1-(pyrimidin-5-ylmethyl)piperidin-4-amine trihydrochloride (68 mg, 0.21 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (29 mg, 0.21 mmol), and triethylamine (179  $\mu$ L, 1.3 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (1 ml) was added EDC (41 mg, 0.21 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature and then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol: 100:0 to 88:22) to give **79** as a colorless solid (58 mg, 71%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of rotamers)  $\delta$ : 8.74–8.73 (2H, m), 7.28–7.25 (1H, m), 7.19–7.18 (1H, m), 4.98 (0.67H, s), 4.91 (1.33H, s), 4.49 (0.67H, t, *J* = 11.9 Hz), 3.82 (2H, s), 3.60 (0.33H, br s), 3.21 (2H, s), 3.11–3.01 (2H, m), 2.93 (2H, s), 2.85 (1H, s), 2.33 (6H, s), 2.24–2.21 (2H, m), 2.08–2.05 (0.67H, m), 1.90–1.88 (1.33H, m), 1.75–1.62 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 167.98 and 167.87 (rotamer), 167.78 and 167.56 (rotamer), 157.30, 157.24, 152.74, 131.82, 119.39 and 119.29 (rotamer), 65.20, 64.74 and 64.49 (rotamer), 54.35 and 50.73 (rotamer), 53.37 and 53.31 (romater), 29.68 and 28.43 (rotamer), 28.73 and 27.38 (rotamer), 19.98. IR (neat) 3351, 2942, 1643, 1567, 1406, 1342, 1088, 1032, 640, 431. MS (ESI): 386 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 386.2299, observed 386.2298.

##### 2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-[1-(2,2-difluoroethyl)-4-piperidyl]-*N*-methyl-acetamide (**80**)

To a solution of **95** (188 mg, 0.95 mmol), 1-(2,2-difluoroethyl)-*N*-methyl-piperidin-4-amine (170 mg, 0.95 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (155 mg, 1.0 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (300  $\mu$ L, 1.7 mmol) in acetonitrile (3 ml) was added EDC (296 mg, 1.5 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture had been concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol: 47.5:47.5:5 to 42.5:42.5:15) to give **80** as a colorless solid (160 mg, 47%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of rotamers)  $\delta$ : 6.00–5.70 (1H, m), 4.95 (0.67H, s), 4.90 (1.33H, s), 4.47–4.41 (0.67H, m), 3.57 (0.33H, br s), 3.36 (2H, br s), 3.02–2.98 (2H, m), 2.93 (2H, s), 2.85 (1H, s), 2.81–2.68 (2H, m), 2.32–2.30 (8H, m), 1.97–1.92 (0.67H, m), 1.82–1.73 (2H, m), 1.61–1.58 (1.33H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 167.49 and 167.34 (rotamer), 155.61, 151.12, 133.22, 118.27, 115.90, 113.54, 63.33, 59.23 and 59.17 (rotamer), 58.99 and 58.92 (rotamer), 58.75 and 58.65 (rotamer), 53.19 and 52.98 (rotamer), 52.83 and 50.11 (rotamer), 29.18 and 28.09 (rotamer), 28.21 and 26.65 (rotamer), 20.15. IR (KBr) 3424, 3318, 2950, 2810, 1638, 1583, 1438, 1405, 1315, 1291, 1122, 1090, 1052, 704. MS (ESI): 358 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 358.2049, observed 358.2046.



2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-methyl-*N*-[1-(2,2,2-trifluoroethyl)-4-piperidyl]acetamide (**81**)

To a solution of **95** (100 mg, 0.51 mmol), *N*-methyl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)piperidin-4-amine dihydrochloride (150 mg, 0.56 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (78 mg, 0.51 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (354  $\mu$ L, 2.0 mmol) in acetonitrile (2 ml) was added EDC (126 mg, 0.66 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature and then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol: 95:5 to 85:15) to give **81** as a colorless solid (109 mg, 57%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 4.95 (0.33, s), 4.90 (0.67H, s), 4.47–4.41 (0.67H, m), 3.60–3.54 (0.33H, m), 3.40 (2H, br s), 3.07–2.85 (7H, m), 2.46 (2H, t, *J* = 11.4 Hz), 2.28 (6H, s), 1.99–1.91 (0.67H, m), 1.83–1.74 (2H, m), 1.59 (1.33H, d, *J* = 11.3 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 167.50 and 167.35 (rotamer), 155.61, 151.13, 133.22, 63.34, 56.72 and 56.44 (rotamer), 53.11 and 52.76 (rotamer), 52.65 and 50.00 (rotamer), 29.19 and 28.10 (rotamer), 28.23 and 26.66 (rotamer), 20.15. IR (KBr) 3428, 3327, 2938, 2828, 1644, 1582, 1444, 1406, 1347, 1325, 1292, 1135, 1089, 662. MS (ESI): 376 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 376.1955, observed 376.1951.

2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-[1-[(2,2-difluorocyclopropyl)methyl]-4-piperidyl]-*N*-methyl-acetamide hydrochloride (**82**)

To a solution of **95** (56.3 g, 286 mmol), *tert*-butyl 4-(methylamino)piperidine-1-carboxylate (61.2 mg, 303 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (3.86 g, 28.6 mmol), and triethylamine (23.9 mL, 172 mmol) in acetonitrile (400 ml) was added EDC (60.2 g, 31.5 mmol). The mixture was stirred overnight at 50°C. After water (700 ml) had been added, the appeared precipitate was collected by filtration to give a Boc-protected intermediate **96** (101 g). To a solution of the intermediate **96** in dichloromethane (300 mL) was added trifluoroacetic acid (300 mL) portionwise. The mixture was stirred overnight at room temperature. After 20% sodium ethoxide solution in ethanol (300 mL) had been added dropwise, the mixture was neutralized using 4 mol/L sodium hydroxide solution (ca. 40 mL). The mixture was concentrated and azeotroped with ethanol (500 mL  $\times$  2). The resulting solid was extracted with a mixed solution of methanol and chloroform (1/9, 500 mL  $\times$  8). The organic layer was dried over sodium sulfate and then concentrated. The resulting solid was washed with ethyl acetate and dried to give **97** as a yellow solid (47.2 g, 56%, over two steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of rotamers)  $\delta$ : 4.98 (0.67H, s), 4.91 (1.33H, s), 4.56–4.48 (0.67H, m), 3.63 (0.33H, t, *J* = 7.7 Hz), 3.23–3.10 (4H, m), 2.94 (2H, s), 2.85 (1H, s), 2.73–2.62 (2H, m), 2.32 (6H, s), 1.76 (1.67H, br s), 1.63–1.58 (2.33H, m). MS (ESI): 294 (M + H)<sup>+</sup>.

A mixture of **97** (100 mg, 0.34 mmol), 2-(bromomethyl)-1,1-difluoro-cyclopropane (87 mg, 0.51 mmol), and triethylamine (95  $\mu$ L, 0.68 mmol) in acetonitrile (2 ml) was stirred overnight at 50°C. After the mixture had been concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol: 98:2 to 90:10) to give **82** (free base) as a yellow oil (91 mg). To a solution of **82** (free base, 91 mg, 0.24 mmol) in 1,4-dioxane (1 ml) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane

(59  $\mu\text{L}$ , 0.24 mmol). The mixture was stirred for 30 min at room temperature and then concentrated to give **82** as a yellow solid (97 mg, 98%, over two steps).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) (mixture of rotamers)  $\delta$ : 10.71–10.57 (1H, br m), 4.98 (0.67H, s), 4.86 (1.33H, s), 4.51–4.43 (0.67H, m), 4.04–3.94 (0.33H, m), 3.86–3.04 (8H, m), 2.88 (2H, s), 2.70 (1H, s), 2.30–2.14 (9H, m), 1.99–1.82 (1.67H, m), 1.72–1.61 (2.33H, m).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 167.95 and 167.55 (rotamer), 155.56, 151.19, 133.26, 63.38 and 63.29 (rotamer), 52.22 and 51.15 (rotamer), 49.86 and 49.72 (rotamer), 47.52 and 45.44 (rotamer), 28.30 and 26.63 (rotamer), 26.16 and 25.01 (rotamer), 26.09 and 24.97 (rotamer), 20.19, 16.70, 16.61, 16.50, 15.37, 15.27, 15.16. IR (KBr) 3555, 3433, 3354, 2940, 2644, 1630, 1584, 1447, 1405, 1352, 1304, 1218, 1099, 1000, 653. MS (ESI): 384 ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ . HRMS (FAB)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_2^+$  384.2206, observed 384.2211.

2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-[1-(2-hydroxy-2-methyl-propyl)-4-piperidyl]-*N*-methyl-acetamide (**83**)

A solution of **97** (201 mg, 0.68 mmol) and 2,2-dimethyloxirane (76  $\mu\text{L}$ , 0.85 mmol) in 2-propanol (3 ml) was heated to 120  $^\circ\text{C}$  for 6 h. After the mixture had been concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol: 75:25 to 67:33) to give **83** as a colorless solid (232 mg, 93%).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mixture of rotamers)  $\delta$ : 4.97 (0.67H, s), 4.91 (1.33H, s), 4.49–4.37 (0.67H, m), 3.63–3.53 (0.33H, m), 3.21 (2H, s), 3.08–2.78 (5H, m), 2.50–2.39 (2H, m), 2.32 (8H, m), 1.97–1.86 (0.67H, m), 1.76–1.56 (3.33H, m) 1.15 (6H, s).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 167.61 and 167.49 (rotamer), 155.83, 151.32, 133.41, 70.43, 68.42 and 68.33 (rotamer), 63.56 and 63.51 (rotamer), 55.06 and 54.80 (rotamer), 53.51 and 50.64 (rotamer), 29.82 and 28.75 (rotamer), 28.41 and 26.86 (rotamer), 28.19, 20.35. IR (KBr) 3437, 3326, 2927, 2783, 1644, 1588, 1452, 1413, 1303, 1113, 1091, 1035, 650. MS (ESI): 366 ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ . HRMS (APCI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_3^+$  366.2500, observed 366.2497.

2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-methyl-*N*-[1-(oxetan-3-yl)-4-piperidyl]acetamide (**84**)

To a solution of **95** (148 mg, 0.75 mmol), *N*-methyl-1-(oxetan-3-yl)piperidin-4-amine (128 mg, 0.75 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (115 mg, 0.75 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (131  $\mu\text{L}$ , 0.75 mmol) in acetonitrile (3 ml) was added EDC (144 mg, 0.75 mmol). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. After the mixture had been concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol: 47.5:47.5:5 to 42.5:42.5:15) to give **84** as a colorless solid (100 mg, 38%).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mixture of rotamers)  $\delta$ : 4.96 (0.54H, s), 4.91 (1.46H, s), 4.65 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz), 4.58 (2H, t,  $J = 6.1$  Hz), 4.49–4.46 (0.73H, m), 3.60 (0.27H, br s), 3.49–3.42 (1H, m), 3.27 (2H, br s), 2.90–2.82 (5H, m), 2.30 (6H, s), 1.94–1.63 (6H, m).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 167.70 and 167.54 (rotamer), 155.81, 151.32, 133.42, 74.97, 63.53, 58.56, 53.28 and 50.56 (rotamer), 49.10 and 48.86 (rotamer), 29.07 and 27.96 (rotamer), 28.42 and 26.91 (rotamer), 20.35. IR (KBr) 3536, 3328, 2946, 2875, 2807, 1656, 1581, 1452, 1408, 1369, 1347, 1307, 1155, 966, 692. MS

(ESI): 350 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 350.2187, observed 350.2186.

2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-methyl-*N*-[1-(3-methyloxetan-3-yl)-4-piperidyl]acetamide (**85**)

To a solution of **95** (321 mg, 1.6 mmol), *N*-methyl-1-(3-methyloxetan-3-yl)piperidin-4-amine (300 mg, 1.6 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (249 mg, 1.6 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (569 μL, 3.3 mmol) in acetonitrile (3 ml) was added EDC (248 mg, 2.4 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. After water had been added, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, and then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol: 47.5:47.5:5 to 42.5:42.5:15) to give **85** as a colorless solid (100 mg, 38%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.95 (0.67H, s), 4.90 (1.33H, s), 4.54 (2H, d, J = 5.3 Hz), 4.46–4.40 (0.67H, m), 4.21 (2H, d, J = 5.3 Hz), 3.55–3.44 (2.33H, m), 2.95 (2H, s), 2.87 (1H, s), 2.64–2.55 (2H, m), 2.27 (6H, s), 2.23–2.17 (2H, m), 1.97–1.89 (0.67H, m), 1.80–1.71 (2H, m), 1.65–1.61 (1.33H, m), 1.34 (3H, s). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 167.31 and 167.21 (rotamer), 155.50, 151.00, 133.10, 80.66, 63.23 and 63.18 (rotamer), 59.53, 53.21 and 50.51 (rotamer), 44.43 and 44.20 (rotamer), 29.43 and 28.14 (rotamer), 28.31 and 26.61 (rotamer), 20.03, 14.12 and 14.08 (rotamer). IR (KBr) 3427, 3343, 3246, 2938, 2862, 1660, 1579, 1445, 1405, 1342, 1296, 1112, 1086, 965, 824. MS (ESI): 364 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 364.2343, observed 364.2340.

2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-(1-benzylpyrrolidin-3-yl)-*N*-methyl-acetamide hydrochloride (**86**)

To a solution of **95** (50 mg, 0.25 mmol) and 1-benzyl-*N*-methyl-pyrrolidin-3-amine (48 mg, 0.25 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added propylphosphoric anhydride solution in ethyl acetate (>50%, 0.5 ml). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. After the mixture had been concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol: 47.5:47.5:5 to 42.5:42.5:15) to give **86** (free base) as a colorless solid (43 mg). To a solution of **86** (free base, 43 mg, 0.12 mmol) in 1,4-dioxane (1 ml) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (31 μL, 0.12 mmol). The mixture was stirred for 30 min at room temperature. The appeared precipitate was collected by filtration and dried to give **86** as a yellow solid (35 mg, 34%, over two steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) (mixture of rotamers) δ: 11.31 (0.5H, s), 11.05 (0.5H, s), 7.60–7.59 (2H, m), 7.43 (3H, br s), 4.97–4.78 (3H, m), 4.44–4.21 (2H, m), 3.66–3.47 (2H, m), 3.39–3.28 (1H, m), 3.17–2.79 (4H, m), 2.24–2.06 (8H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 130.70, 129.52, 129.02, 66.55, 20.36. Other signals were not observed presumably because the intensity was too weak due to signal broadening based on attached nitrogen atom and/or the presence of rotamers derived from amide bond which also observed in <sup>1</sup>H-NMR spectrum. IR (KBr) 3421, 2698, 1652, 1577, 1450, 1404, 1324, 1099, 1028, 756, 703. MS (ESI): 370 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>

370.2238, observed 370.2236.

2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-*N*-(1-benzylazetid-3-yl)-*N*-methyl-acetamide (**89**)

To a solution of **95** (980 mg, 5.0 mmol), 1-benzyl-*N*-methyl-azetid-3-amine (910 mg, 5.2 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (760 mg, 5.0 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (1.77 mL, 10.3 mmol) in acetonitrile (15 ml) was added EDC (1.55 g, 8.1 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. After sat. aq. sodium bicarbonate had been added, the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, and then concentrated. The mixture was concentrated and the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol: 47.5:47.5:5 to 42.5:42.5:15) to give **89** as a colorless solid (680 mg, 39%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of rotamers) δ: 7.33–7.28 (5H, m), 4.88–4.84 (2.62H, m), 4.61 (0.38H, br s), 3.64–3.57 (4H, m), 3.26–3.04 (7H, m), 2.31 (6H, s). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 168.10 and 167.97 (rotamer), 163.20, 155.52, 151.13, 138.33, 133.29, 128.22 and 128.19 (rotamer), 126.85, 63.26, 62.36 and 62.15 (rotamer), 58.07, 57.95, 46.39 and 45.36 (rotamer), 29.73 and 28.50 (rotamer), 20.16. IR (KBr) 3412, 2949, 2798, 1647, 1574, 1451, 1399, 1325, 1133, 1107, 752, 717. MS (ESI): 356 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 356.2081, observed 356.2080.

2-(5-Amino-4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy-1-[(1*R*,5*R*)-7-benzyl-4,7-diazabicyclo[3.2.0]heptan-4-yl]ethanone (**90**)

To a solution of **95** (58 mg, 0.29 mmol), (1*R*,5*R*)-7-benzyl-4,7-diazabicyclo[3.2.0]heptane (55 mg, 0.29 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (45 mg, 0.29 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (102 μL, 0.58 mmol) in acetonitrile (2 ml) was added EDC (84 mg, 0.44 mmol). The mixture was stirred for 6 h at room temperature. After the mixture had been concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol: 95:5 to 80:20) to give **90** as a colorless solid (48 mg, 48%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mixture of rotamers) δ: 7.29–7.24 (5H, m), 4.94–4.83 (1H, m), 4.74 (1H, s), 4.54 (0.5H, t, J = 5.3 Hz), 4.42 (0.5H, t, J = 5.3 Hz), 4.13–3.96 (1.5H, m), 3.90–3.62 (3.5H, m), 3.42–3.40 (0.5H, m), 3.29–3.27 (2.5H, m), 3.21–3.14 (1H, m), 2.28 (3H, s), 2.26 (3H, s), 1.73–1.65 (1.5H, m), 1.56–1.48 (0.5H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 166.66 and 166.45 (rotamer), 155.42 and 155.34 (rotamer), 151.04 and 151.01 (rotamer), 138.38 and 138.34 (rotamer), 133.20 and 133.18 (rotamer), 128.30 and 128.23 (rotamer), 128.04 and 128.02 (rotamer), 126.77 and 126.75 (rotamer), 70.17 and 67.75 (rotamer), 63.37 and 63.33 (rotamer), 60.59 and 60.40 (rotamer), 58.08 and 57.75 (rotamer), 52.12 and 50.98 (rotamer), 45.85 and 45.42 (rotamer), 30.83 and 28.85 (rotamer), 19.98. IR (KBr) 3447, 3350, 3246, 2937, 2783, 1660, 1579, 1447, 1404, 1330, 1128, 1025, 728. MS: 368 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 368.2081, observed 368.2076.

2-(6-Chloropyridazin-3-yl)oxy-*N*-[1-[(2,2-difluorocyclopropyl)methyl]-4-piperidyl]-*N*-methyl-acetamide (**93**)

To a solution of **98** (102 mg, 0.54 mmol), 1-[(2,2-difluorocyclopropyl)methyl]-*N*-methyl-piperidin-4-amine dihydrochloride (150 mg, 0.54 mmol), and triethylamine (528  $\mu$ L, 3.8 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL) was added BOP reagent (287 mg, 0.65 mmol). The mixture was stirred overnight at 50°C. After sat. aq. sodium bicarbonate had been added, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, and then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol; 99:1 to 95:5) to give **93** (free base) as a yellow oil (15 mg). To a solution of **93** (free base, 15 mg, 0.039 mmol) in 1,4-dioxane (1 ml) was added 4 mol/L hydrogen chloride in 1,4-dioxane (9.7  $\mu$ L, 0.39 mmol), which was then stirred for 30 min at room temperature and subsequently concentrated to give **93** as a colorless solid (14 mg, 6%, over two steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) (mixture of rotamers)  $\delta$ : 9.92 (1H, br s), 7.83 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.45 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 5.34 (0.67H, s), 5.24 (1.33H, s), 4.42 (0.67H, s), 3.96 (0.33H, s), 3.63–3.51 (2H, m), 3.20–3.11 (4H, m), 2.88 (2H, s), 2.72 (1H, s), 2.20–1.59 (7H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 165.88 and 165.78 (rotamer), 163.82, 150.68, 131.71, 120.89, 117.72, 114.90, 112.11, 64.35, 54.46 and 54.42 (romater), 53.01 and 50.72 (rotamer), 52.37 and 52.21 (rotamer), 51.51 and 51.56 (rotamer), 29.14 and 28.09 (rotamer), 29.11 and 28.06 (rotamer), 27.95 and 26.75 (rotamer), 19.85 and 19.80 (rotamer), 19.75 and 19.71 (rotamer), 19.65 and 19.60 (rotamer), 14.52, 14.42, 14.33. IR (KBr) 3014, 2938, 2647, 1677, 1584, 1480, 1421, 1295, 1210, 1153, 1052, 1002, 863, 717, 614. MS (ESI): 375 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (FAB) *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 375.1394, observed 375.1384.

## 2. *in vitro* evaluation

### Neuroprotective activity

Cerebrocortical and hippocampal neurons were prepared from embryonic brains [gestation/embryonic day 18 (E18)] of Wistar rats (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan). The cerebral cortices and hippocampus were dissociated with papain for 30 min at 37°C, suspended in neurobasal medium (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) containing 2% Gem-21, 1% TCX (Japan BD, Tokyo, Japan), 1% penicillin–streptomycin, and 1% Glutamax (Life Technologies Corporation), and then seeded onto 0.1% poly-ethyleneimine-coated 96-well microplates (BD Falcon, Tokyo, Japan). The neuronal cultures were maintained in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in a humidified incubator. Four days after seeding, half of the medium was exchanged, and seven days after, the proliferation of non-neuronal cells was inhibited by the addition of 6  $\mu$ M AraC (arabinofuranosyl cytidine) as the final concentration in the culture medium. A test compound (10  $\mu$ M) was applied in 9-day cultures for 24 h prior to the onset of glutamate (30–60  $\mu$ M, for 24 h) toxicity. The selective FGF receptor inhibitor PD166866 (3  $\mu$ M) was performed 30 min before exposure of the test compound.

The neuroprotective effects of the chemical compounds were assessed with a survival indicator of live

cells using CCK8 (Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan). Absorption was measured at 450 nm using a microplate spectrophotometer (SPECTRA Max Plus; Molecular Devices, CA, USA). Cell viability was expressed as the percentage survival, with 100% survival observed in control cultures. All animal experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of Asubio Pharma Co., Ltd., and performed in accordance with the Guidelines for Animal Experiments of the laboratories.

#### *logP value*

Partition coefficients (logP) were determined by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) applying our own procedure as follows. A solution of a test compound (5 µg/mL) in 50% aqueous acetonitrile was prepared and 5 µL of the sample solution was injected into the HPLC system. Analysis was performed on an Inertsil ODS-3 column (2.1 × 50 mm, particle size 5 µm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan). The temperature of the column oven was maintained at 40°C. The flow rate was 0.4 mL/min and the effluents were monitored at 220–350 nm. Mobile phase A was 10 mM ammonium acetate in ultrapure water. Mobile phase B was acetonitrile, which was increased linearly from 2% to 98% over 1.5 min, retained at 98% over the next 0.5 min, after which the column was equilibrated to 2% for 2 min. The retention time of the sample compound ( $t_s$ ) was recorded and the retention time (x) relative to the retention time of propranolol ( $t_p$ ) was calculated using the following equation:  $x = t_s/t_p$ . The logP value (y) of the sample compound was finally determined applying the x value to the formula:  $y = 12.653x - 10.384$ , which was derived from the regression analysis, based on the correlation data between each retention time relative to that of propranolol and the logP value for 27 reference compounds. With this method, for dexamethasone and ibuprofen, logP values of 2.82 and 2.97, respectively, were obtained.

#### *PAMPA assay*

The donor wells were filled with 0.20 mL of 10% DMSO in system solution (pH = 7.4) containing 10 µM test compound. The filter on the bottom of each acceptor well was coated with Lipid Solution (Pion Inc., MA, USA) and filled with 0.20 mL of Acceptor Sink Buffer (Pion Inc.). The acceptor filter plate was put on the donor plate and incubated for 2 h at rt. After incubation, the amount of test compound in both donor and acceptor wells was measured by liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The membrane permeation rate [Pe (cm/s)] was calculated using PAMPA EVOLUTION software (Pion Inc.).

#### *P-gp efflux ratio using Caco-2 cells*

Caco-2 cells were provided by RIKEN BRC (Ibaraki, Japan) through the National Bio-Resource Project of MEXT, Japan. They were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. For the transcellular transport assay, Caco-2 cells were seeded on an HTS Transwell 24-well plate (polycarbonate membrane,

0.4 mm pore size, 0.33 cm<sup>2</sup> culture surface area; Corning, Inc., Corning, NY, USA) at 2×10<sup>6</sup> cells/well for more than 21 days. The culture medium was changed every 3 to 4 days. On the day of the experiment, the transepithelial electrical resistance was measured to check the integrity of the monolayer using an EVOM voltohmmeter (World Precision Instruments Ltd., FL, USA) and the cell monolayers with transepithelial electrical resistance above 600 Ωcm<sup>2</sup> were used for the assay.

For the bidirectional transport assay, the culture medium on both donor and receiver sides was replaced with HBSS buffer and preincubated for 60 min at 37°C. The HBSS buffer on the receiver side was then replaced with fresh HBSS buffer, while the HBSS buffer on the donor side was replaced with HBSS buffer containing 10 μM test compounds. A typical P-gp inhibitor, quinidine (30 μM), was also added to both donor and receiver sides to confirm the effect on P-gp in the bidirectional transport assay. After incubation for 120 min at 37°C, aliquots of the solution from the receiver side were collected and the amounts of compounds on both sides were measured by LC-MS/MS to determine the steady-state appearance rate (dQ/dt) of the test compounds on the receiver side. The P<sub>app</sub> ratio of test compounds was calculated as follows: (dQ/dt<sub>A to B</sub>) / (dQ/dt<sub>B to A</sub>). The P-gp efflux ratio was calculated using the P<sub>app</sub> ratio in the absence of quinidine relative to that in its presence.

#### *MBI assay*

A mixture of human liver microsomes (0.5 mg/mL) and 10 μM test compound was preincubated in phosphate buffer (pH 7.4) for 30 min at 37°C with or without NADPH (1 mM). The mixture was next added to the assay buffer containing testosterone, a probe substrate of CYP3A4, and incubated for an additional 10 min at 37°C. The reaction was quenched with acetonitrile and then the amount of testosterone metabolite was measured by LC-MS/MS to determine the remaining CYP3A4 activity. The remaining activity with/without NADPH was depicted as a percentage.

#### *Measurement of in vitro hydrolytic rate*

A mixture of human liver microsomes (0.5 mg/mL) and 100 μM of test compound was incubated in phosphate buffer (pH 7.4) for 60 min at 37°C. The reaction was quenched with acetonitrile, and then the amount of hydrolysate (i.e, BMP or 1-[(2,2-difluorocyclopropyl)methyl]-N-methyl-piperidin-4-amine) was measured by LC-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to determine the hydrolytic rate.

### *3. Pharmacokinetics*

All animal studies were conducted in facilities approved by the Institutional Animal Care and Use Committees. Compounds were administered to non-fasted CrI:CD(SD) rats (n = 2 per treatment group). Compounds were dissolved in a vehicle of 0.5% HPC in water for p.o. administration or 5% DMSO/1% castor oil/10% HP-β-CyD in saline for i.v. administration. Blood samples were collected sequentially with heparin lithium or sodium as an anticoagulant. The samples were centrifuged at 4°C, and the plasma

was collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before analysis. Brains were excised under anesthesia with isoflurane inhalation and homogenized with saline at  $4^{\circ}\text{C}$ . These samples were analyzed by LC-MS/MS to measure the compound concentration. The pharmacokinetic parameters were calculated by non-compartmental analysis. Oral bioavailabilities were calculated from the ratio of dose-corrected area under the concentration–time curve (AUC) after oral administration to that after intravenous administration. Brain-plasma concentration ratios ( $K_{p,1h}$ ) of the compounds were calculated from the ratio of brain concentration to plasma concentration at 1 h after intravenous administration.

#### *4. In vivo evaluation*

Male Crl:CD(SD) rats were purchased at 7 weeks old from Charles River Laboratories Japan and used at 8 weeks old. Microspheres (2,300/0.1 mL) were injected into the right middle cerebral artery perfusion area from the right common carotid artery under halothane anesthesia. One day after microsphere injection, only animals showing neurological deficits were selected and divided into treatment groups by randomization; then, test compound or vehicle was orally administered daily for 10 days. Motor coordination was evaluated by measuring the time until the animals fell from the rotating rod in accelerating mode (Ugo Basile; 4 to 40 rpm for 5 min) at 2 weeks after microsphere injection. Measurement of rota-rod performance was performed five times at intervals of at least 30 min.



## 第4章に関する実験

### 1. Chemistry

#### 2-[[1-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy]-4,6-dimethylpyrimidin-5-amine (**99**)

To a solution of 4,6-dimethyl-5-nitro-pyrimidin-2-ol (1.18 g, 7.0 mmol) and silver (I) carbonate (2.32 g, 8.4 mmol) in *N,N*-dimethylformamide was added 3-bromopropyne (577  $\mu$ L, 7.7 mmol). The mixture was stirred for 2 h at 100 °C. Water was added to the mixture, and the resulting mixture was filtered. The filtrate was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 95:5 to 80:20) to give **111a** as colorless solid (210 mg, 15%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.06 (2H, d, *J* = 2.3 Hz), 2.56 (6H, s), 2.49 (1H, t, *J* = 2.4 Hz). MS (ESI): 208 (M + H)<sup>+</sup>.

To an ice-cooled solution of 4-bromopiperidine hydrobromide (771 mg, 3.2 mmol) and benzylbromide (410  $\mu$ L, 3.5 mmol) in chloroform (10 mL) was added triethylamine (1.1 mL, 7.9 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was diluted with *N,N*-dimethylformamide (10 mL), followed by the addition of sodium azide (240 mg, 3.7 mmol). The mixture was stirred overnight at 70 °C. Brine was added to the mixture, and the resulting mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 80:20) to give **114a** as colorless oil (338 mg, 50% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.33-7.23 (5H, m), 3.49 (2H, s), 3.42-3.35 (1H, m), 2.78-2.74 (2H, m), 2.18-2.14 (2H, m), 1.92-1.86 (2H, m), 1.71-1.63 (2H, m). MS (ESI): 217 (M + H)<sup>+</sup>

To a solution of **111a** (70 mg, 0.34 mmol), **114a** (77 mg, 0.36 mmol) and sodium L-ascorbate (13 mg, 0.068 mmol) in methanol (4 mL) was added copper (II) sulfate pentahydrate (13 mg, 0.051 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added to the mixture, the resulting mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 70:30 to 20:80) to give **115a** as colorless oil (122 mg, 85%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.69 (1H, s), 7.34-7.25 (5H, m), 5.61 (2H, s), 4.53-4.47 (1H, m), 4.13-4.11 (1H, m), 3.57 (2H, s), 3.03 (2H, d, *J* = 12.0 Hz), 2.56 (6H, s), 2.23-2.04 (6H, m). MS (ESI): 424 (M + H)<sup>+</sup>

A mixture of **115a** (125 mg, 0.30 mmol) and platinum (IV) oxide (>85 wt%, 13 mg) in methanol (12 mL) was stirred for 40 min under hydrogen atmosphere. After the mixture was filtrated, the filtrate was concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography with ethyl acetate as an eluent to give **99** as colorless solid (92 mg, 79%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.68 (1H, s), 7.34-7.25 (5H, m), 5.47 (2H, s), 4.47 (1H, dd, *J* = 13.7, 9.2 Hz), 3.56 (2H, s), 3.24 (2H, s), 3.02 (2H, d, *J* = 12.0 Hz), 2.37 (6H, s), 2.17-2.09 (6H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 157.38, 142.87, 144.34,

138.07, 131.76, 129.04, 128.36, 127.20, 120.44, 62.77, 60.83, 58.31, 52.21, 32.73, 19.99. IR (KBr) 3466, 3370, 2935, 2810, 2768, 1629, 1573, 1418, 1332, 1085, 1053, 1017, 736, 698. MS (ESI): 394 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>7</sub>O<sup>+</sup> 394.2350, observed 394.2348.

#### 2-[[1-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy]-5-chloropyrimidine (**100**)

To an ice-cooled solution of propargyl alcohol (0.51 g, 9.1 mmol) in tetrahydrofuran (18 mL) was added 60% dispersion of sodium hydride (435 mg, 10.9 mmol). The mixture was stirred for 25 min at room temperature. The mixture was cooled to 0 °C, then 2,5-dichloropyrimidine (1.35 g, 9.1 mmol) was added to the mixture portionwise. After the mixture was stirred overnight at room temperature, water was added to the mixture. The resulting mixture was extracted with chloroform 3 times. The organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated to give **111d** as colorless solid (1.35 g, 88%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.49 (1H, s), 5.01 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 2.48 (1H, t, *J* = 2.4 Hz). MS (ESI): 169 (M + H)<sup>+</sup>. This product was used in the next reaction without further purification.

To a solution of **111d** (205 mg, 1.2 mmol), **114c** (276 mg, 1.2 mmol) and sodium L-ascorbate (36 mg, 0.18 mmol) in methanol (5 mL) was added copper (II) sulfate pentahydrate (61 mg, 0.24 mmol), and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added to the mixture, the resulting mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 0:100) to give **117** as colorless oil (309 mg, 78%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.49 (2H, s), 7.68 (1H, s), 5.55 (2H, s), 4.61 (1H, tt, *J* = 11.7, 4.1 Hz), 4.25 (2H, br s), 2.93 (2H, t, *J* = 12.0 Hz), 2.20-2.17 (2H, m), 1.99-1.94 (2H, m), 1.48 (9H, s). MS (ESI): 395 (M + H)<sup>+</sup>

A solution of **117** (154 mg, 0.39 mmol) in chloroform (3 mL) and trifluoroacetic acid (1 mL) was stirred for 90 min at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was diluted with *N,N*-dimethylformamide (3 mL) followed by the addition of benzyl bromide (67 mg, 0.39 mmol) and potassium carbonate (270 mg, 2.0 mmol). The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol; 100:0 to 88:12) to give **100** as colorless solid (108 mg, 72% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.48 (2H, s), 7.69 (1H, s), 7.34-7.27 (5H, m), 5.55 (2H, s), 4.51-4.48 (1H, m), 3.56 (2H, s), 3.03 (2H, d, *J* = 11.8 Hz), 2.19-2.08 (6H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 163.98, 157.56, 142.85, 138.01, 129.04, 128.34, 127.24, 124.48, 120.91, 62.74, 61.76, 58.45, 52.16, 32.71. IR (KBr) 3127, 2938, 2810, 2767, 1577, 1549, 1429, 1398, 1329, 1110, 1012, 792, 740, 530. MS (ESI): 385 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>6</sub>O<sup>+</sup> 385.1538, observed 385.1534.

#### 2-[[1-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy]-5-methylpyrimidine (**101**)

To an ice-cooled solution of propargyl alcohol (92 μL, 1.6 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (3 mL) was added 60% dispersion of sodium hydride (75 mg, 1.9 mmol). After the mixture was stirred for 30 min at 0 °C, 2-chloro-5-methylpyrimidin (200 mg, 1.6 mmol) was added at room temperature. The

resulting mixture was stirred overnight at 70 °C. After the mixture was cooled to room temperature, water was added to the mixture. The resulting mixture was extracted with chloroform 3 times. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate then concentrated to give **111c** as colorless solid (182 mg, 80%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.37 (2H, s), 5.00 (2H, d, J = 2.5 Hz), 2.45 (1H, s), 2.25 (3H, s). MS (ESI): 149 (M + H)<sup>+</sup>. This product was used in the next reaction without further purification.

A mixture of *N*-Boc-4-bromopiperidine (1.2 g, 0.86 mmol) and sodium azide (0.34 g, 5.2 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (11 mL) was stirred overnight at 70 °C. After brine was added to the mixture, the resulting mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated to give **114c** (0.92 g, 93%) as colorless oil. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.84-3.80 (2H, m), 3.59-3.55 (1H, m), 3.12-3.06 (2H, m), 1.89-1.84 (2H, m), 1.58-1.53 (2H, m), 1.46 (9H, s). MS (ESI): 127 (M + H - Boc)<sup>+</sup>. This product was used in the next reaction without further purification.

To a solution of **111c** (185 mg, 1.3 mmol), **114c** (283 mg, 1.3 mmol) and sodium L-ascorbate (37 mg, 0.19 mmol) in methanol (5 mL) was added copper (II) sulfate pentahydrate (62 mg, 0.25 mmol), and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added to the mixture, the resulting mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol; 100:0 to 92:8) to give **116** as colorless solid (316 mg, 68%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.36 (2H, s), 7.68 (1H, s), 5.54 (2H, s), 4.66-4.57 (1H, m), 4.25 (2H, br s), 2.93 (2H, t, J = 12.4 Hz), 2.25 (3H, s), 2.20-2.16 (2H, m), 2.00-1.88 (2H, m), 1.48 (9H, s). MS (ESI): 375 (M + H)<sup>+</sup>

A solution of **116** (225 mg, 0.60 mmol) in chloroform (3 mL) and trifluoroacetic acid (1 mL) was stirred for 80 min at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was diluted with *N,N*-dimethylformamide (4 mL), followed by the addition of benzyl bromide (102 mg, 0.60 mmol) and sodium carbonate (316 mg, 3.0 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 25:75) to give **101** as colorless solid (141 mg, 66%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.36 (2H, s), 7.69 (1H, s), 7.36-7.25 (5H, m), 5.54 (2H, s), 4.49 (1H, tt, J = 11.4, 4.3 Hz), 3.56 (2H, s), 3.02 (2H, d, J = 11.8 Hz), 2.25 (3H, s), 2.22-2.00 (6H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 163.32, 159.22, 143.59, 138.05, 129.05, 128.33, 127.22, 124.14, 120.74, 62.76, 61.10, 58.38, 52.20, 32.71, 14.63. IR (KBr) 3061, 2956, 2808, 2764, 1599, 1567, 1450, 1425, 1309, 1112, 1042, 1009, 735. MS (ESI): 365 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sup>+</sup> 365.2084, observed 365.2083.

### 3-[[1-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy]-6-methylpyridazine (**102**)

To an ice-cooled solution of propargyl alcohol (491 μL, 8.3 mmol) in tetrahydrofuran (15 mL) was added 60% dispersion of sodium hydride (332 mg, 8.3 mmol). After stirring for 10 min at 0 °C, 3-chloro-6-methylpyridazine (712 mg, 5.5 mmol) and 18-crown-6 (146 mg, 0.55 mmol) was added to the mixture at room temperature. The resulting mixture was stirred for 1.5 h at 70 °C. After the mixture was cooled to

room temperature, water was added to the mixture. The resulting mixture was extracted with chloroform. The combined organic layer was dried over sodium sulfate then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/chloroform; 70:30 to 40:60) to give **111b** as yellow solid (657 mg, 80%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.26 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.95 (1H, d, J = 8.8 Hz), 5.15 (2H, d, J = 2.3 Hz), 2.62 (3H, s), 2.53 (1H, t, J = 2.4 Hz). MS (ESI): 149 (M + H)<sup>+</sup>.

To a solution of **111b** (115 mg, 0.78 mmol), **114a** (168 mg, 0.78 mmol) and sodium L-ascorbate (23 mg, 0.12 mmol) in methanol (4 mL) was added copper (II) sulfate pentahydrate (39 mg, 0.16 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 0:100) to give **102** as colorless solid (87 mg, 31%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.77 (1H, s), 7.33 (4H, d, J = 4.3 Hz), 7.28-7.27 (1H, m), 7.23 (1H, d, J = 9.0 Hz), 6.91 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.66 (2H, s), 4.51-4.43 (1H, m), 3.55 (2H, s), 3.01 (2H, d, J = 12.0 Hz), 2.62 (3H, s), 2.21-2.02 (6H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 162.98, 155.55, 143.04, 138.11, 130.15, 129.00, 128.33, 127.20, 121.86, 117.78, 62.72, 60.02, 58.43, 52.18, 32.68, 21.49. IR (KBr) 3063, 2945, 2813, 2767, 1602, 1455, 1341, 1294, 1114, 1042, 806, 741, 700. MS (ESI): 365 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sup>+</sup> 365.2084, observed 365.2082.

#### 2-({1-[1-(Cyclopropylmethyl)piperidin-4-yl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)-4,6-dimethylpyrimidin-5-amine (**104**)

A solution of 4-bromopiperidine hydrobromide (5.0 g, 20.4 mmol), (bromomethyl)cyclopropane (2.76 g, 20.4 mmol) and triethylamine (7.1 mmol, 51 mmol) in dichloromethane (50 mL) was stirred for 3 days at 50°C. Water was added to the mixture, and the resulting mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was diluted with *N,N*-dimethylformamide (30 mL), followed by the addition of sodium azide (2.0 g, 31 mmol). The mixture was stirred overnight at 70 °C. After the mixture was concentrated, water was added and the mixture. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate/methanol; 45:45:10 to 40:40:20 to give **114b** as yellow oil (1.54 g, 42% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.39 (1H, br s), 2.88 (2H, br s), 2.25-2.18 (4H, m), 1.95-1.90 (2H, m), 1.75-1.67 (3H, m), 0.88-0.82 (1H, m), 0.54-0.50 (2H, m), 0.11-0.08 (2H, m). MS (ESI): 181 (M + H)<sup>+</sup>

To a solution of **111a** (40 mg, 0.19 mmol), **114b** (104 mg, 0.58 mmol) and sodium L-ascorbate (7.7mg, 0.039 mmol) in methanol (3 mL) was added copper (II) sulfate pentahydrate (7.2 mg, 0.023 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After addition of sat. aq. NaHCO<sub>3</sub>, the mixture was extracted with chloroform 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 55:45

to 0:100) to give **115b** as colorless solid (64 mg). A mixture of **115b** (64 mg, 0.17 mmol) and platinum (IV) oxide (>85 wt%, 6.4 mg) in methanol (7 mL) was stirred for 40 min under hydrogen atmosphere. After the mixture was filtrated, the filtrate was concentrated, and the residue was purified by amino silica gel column chromatography (chloroform/methanol; 95.5:0.5 to 98.5:1.5) to give **104** as colorless solid (41 mg, 60% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.68 (1H, s), 5.48 (2H, s), 4.50-4.46 (1H, m), 3.24-3.19 (4H, m), 2.37 (6H, s), 2.32-2.30 (2H, m), 2.21-2.15 (4H, m), 2.11-2.01 (2H, m), 0.93-0.84 (1H, m), 0.56-0.54 (2H, m), 0.13 (2H, dd, J = 10.4, 4.6 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 157.38, 152.87, 144.36, 131.78, 120.39, 63.47, 60.79, 58.29, 52.35, 32.67, 20.00, 8.51, 3.99. IR (KBr) 3464, 3359, 3079, 2947, 2771, 1631, 1569, 1417, 1328, 1093, 1057, 1019, 775. MS (ESI): 358 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>7</sub>O<sup>+</sup> 358.2350, observed 358.2348.

3-({1-[1-(Cyclopropylmethyl)piperidin-4-yl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)-6-methylpyridazine (**105**)

To a solution of **111b** (25 mg, 0.17 mmol), **114b** (40 mg, 0.22 mmol) and sodium L-ascorbate (6.7 mg, 0.034 mmol) in methanol (4 mL) was added copper (II) sulfate pentahydrate (6.3 mg, 0.025 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 60°C. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 40:60 to 0:100) to give **105** as colorless solid (28 mg, 51%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.77 (1H, s), 7.23 (1H, d, J = 9.0 Hz), 6.91 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.66 (2H, s), 4.48 (1H, br s), 3.20 (2H, d, J = 11.8 Hz), 2.62 (3H, s), 2.32-2.05 (8H, m), 0.88 (1H, br s), 0.56-0.54 (2H, m), 0.13-0.12 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 162.98, 155.55, 143.09, 130.14, 121.72, 117.75, 63.42, 60.05, 58.38, 52.30, 32.62, 21.49, 8.52, 3.98. IR (KBr) 3094, 2954, 2902, 2802, 1600, 1442, 1308, 1124, 1038, 850. MS (ESI): 329 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sup>+</sup> 329.2084, observed 329.2082.

2-({1-[1-(Cyclopropylmethyl)piperidin-4-yl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)-5-methylpyrimidine (**106**)

A solution of **116** (77 mg, 0.20 mmol) in chloroform (3 mL) and trifluoroacetic acid (1 mL) was stirred for 80 min at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was diluted with *N,N*-dimethylformamide (4 mL), followed by the addition of (bromomethyl)cyclopropane (38 mg, 0.28 mmol) and potassium carbonate (193 mg, 1.4 mmol). The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 25:75) to give **106** as colorless solid (31 mg, 47% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.36 (2H, s), 7.70 (1H, s), 5.54 (2H, s), 4.51 (1H, br s), 4.51 (1H, s), 3.21 (2H, d, J = 8.0 Hz), 2.33-2.06 (11H, m), 0.89 (1H, s), 0.56-0.54 (2H, m), 0.14-0.13 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 163.32, 159.22, 143.61, 124.15, 120.69, 63.45, 61.07, 58.33, 52.33, 32.68, 14.63, 8.51, 3.99. IR (KBr) 3132, 3089, 2993, 2952, 2778, 1601, 1564, 1441, 1340, 1297, 1123, 1051, 1023, 996, 795. MS (ESI): 329 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sup>+</sup> 329.2084, observed 329.2083.

5-Chloro-2-({1-[1-(cyclopropylmethyl)piperidin-4-yl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)pyrimidine (**107**)

A solution of **117** (154 mg, 0.39 mmol) in chloroform (3 mL) and trifluoroacetic acid (1 mL) was stirred for 90 min at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was diluted with *N,N*-dimethylformamide (3 mL), followed by the addition of (bromomethyl)cyclopropane (53 mg, 0.39 mmol) and potassium carbonate (270 mg, 2.0 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/methanol; 100:0 to 88:12) to give **107** as colorless solid (102 mg, 75% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.48 (2H, s), 7.70 (1H, s), 5.55 (2H, s), 4.54-4.47 (1H, m), 3.23-3.19 (2H, m), 2.32 (2H, d, *J* = 6.5 Hz), 2.22-2.02 (5H, m), 0.90-0.84 (1H, m), 0.55 (2H, ddd, *J* = 9.2, 4.6, 3.4 Hz), 0.13 (2H, dd, *J* = 10.4, 4.6 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 162.98, 157.56, 142.88, 124.49, 120.86, 63.44, 61.74, 58.42, 52.31, 32.69, 8.51, 3.99. IR (KBr) 3128, 3001, 2935, 2815, 1580, 1551, 1430, 1400, 1330, 1271, 1116, 1033, 1008, 834. MS (ESI): 349 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (APCI) *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>6</sub>O<sup>+</sup> 349.1538, observed 349.1537.

5-Chloro-2-({1-[1-(cyclopropylmethyl)piperidin-4-yl]-5-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)pyrimidine (**108**)

To a solution of 2-butyne-1-ol (1.1 mL, 14 mmol) in tetrahydrofuran (29 mL) was added 60% dispersion of sodium hydride (860 mg, 21 mmol). The mixture was stirred for 10 min at room temperature under nitrogen atmosphere. To the mixture was added **121** (2.1 g, 14 mmol). The mixture was stirred for 5 h at 60 °C. After sat. NH<sub>4</sub>Cl was added, the mixture was extracted with ethyl acetate 3 times. The combined organic layer was dried over sodium sulfate, then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 95:5 to 85:15) to give **122** as colorless solid (1.85 g, 71%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.48 (2H, s), 4.96 (2H, d, *J* = 2.5 Hz), 1.85 (3H, t, *J* = 2.3 Hz). MS (ESI): 183 (M + H)<sup>+</sup>

A solution of **122** (90 mg, 0.49 mmol) and **114c** (112 mg, 0.49 mmol) in toluene (3 mL) was stirred for 3 days at 110 °C. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 50:50) to give **123** as colorless solid (30 mg, 15%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.47 (2H, s), 5.50 (2H, s), 4.27-4.24 (3H, m), 2.92 (2H, br s), 2.25-2.22 (2H, m), 1.99-1.96 (2H, m), 1.48 (9H, s). MS (ESI): 409 (M + H)<sup>+</sup>

A solution of **123** (29 mg, 0.071 mmol) in chloroform (1 mL) and trifluoroacetic acid (0.33 mL) was stirred for 3.5 h at room temperature. After the mixture was concentrated, the residue was diluted with *N,N*-dimethylformamide (1.2 mL), followed by the addition of (bromomethyl)cyclopropane (10 mg, 0.71 mmol) and potassium carbonate (49 mg, 0.36 mmol). The mixture was stirred overnight at 50 °C. After the mixture was concentrated, the residue was purified by amino silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate; 100:0 to 0:100) to give **108** as colorless solid (15 mg, 60% over 2 steps). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.47 (2H, s), 5.50 (2H, s), 4.15 (1H, br s), 3.25 (2H, d, *J* = 12.0 Hz), 2.40-2.38 (5H, m), 2.34-

2.32 (2H, m), 2.22-2.15 (2H, m), 2.05-1.98 (2H, m), 0.90 (1H, s), 0.56-0.53 (2H, m), 0.14-0.12 (2H, m).  
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 163.06, 157.46, 139.66, 131.65, 124.27, 63.42, 61.16, 56.90, 52.62, 31.66, 8.52, 8.26, 3.96. IR (KBr) 3028, 2970, 2813, 2771, 1574, 1547, 1428, 1372, 1319, 1269, 1116, 993, 791. MS (ESI): 363 (M + H)<sup>+</sup>. HRMS (FAB) *m/z* calculated for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>6</sub>O<sup>+</sup> 363.1695, observed 363.1695.

## 2. *in vitro* evaluation

「第 3 章に関する実験」に記載した方法で実施した。

## 3. *Pharmacokinetics*

「第 3 章に関する実験」に記載した方法で実施した。

## 引用文献・備考

1. Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. *Stroke* 21, 1990, 637-676.
2. 内山真一郎：脳血管障害，黒川清，松澤祐次編，内科学Ⅱ 第2版．文光堂，2003，1707-1715.
3. 荒木信夫，大櫛陽一：病型別・年代別頻度－欧米・アジアとの比較，小林祥泰編，脳卒中データバンク 2009．中山書店，2009，22-23.
4. 小久保喜弘：国内外の脳卒中の推移，循環器病予防総説シリーズ3：記述疫学編1，日循予防誌，2017，52，223-232.
5. 日本脳卒中学会脳卒中治療ガイドライン委員会：脳卒中治療ガイドライン 2015．協和企画，東京，2015，317.
6. 日本脳卒中学会脳卒中医療向上・社会保険委員会 rt-PA（アルテプラゼ）静注療法指針改定部会：rt-PA（アルテプラゼ）静注療法適正治療指針第二版． Available from: <http://www.jsts.gr.jp/img/rt-PA02.pdf>
7. 経皮経管的脳血栓回収用機器 適正使用指針 第2版 2015年4月 日本脳卒中学会、日本脳神経外科学会、日本脳神経血管内治療学会． Available from: <https://www.jsts.gr.jp/img/noukessen.pdf>
8. 脳卒中治療ガイドライン 2015 [追補 2017]． Available from: [https://www.jsts.gr.jp/img/guideline2015\\_tuiho2017.pdf](https://www.jsts.gr.jp/img/guideline2015_tuiho2017.pdf)
9. Guidelines for the Early Management of Patients with Acute Ischemic Stroke. 2018. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/STR.000000000000158>
10. Morrison, R. S.; Sharma, A.; de Vellis, J.; Bradshaw, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, 83, 7537.
11. Walicke, P.; Cowan, W. M.; Ueno, N.; Baird, A.; Guillemin, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, 83, 3012.
12. Sievers, J.; Hausmann, B.; Unsicker, K.; Berry, M. *Neurosci. Lett.* **1987**, 76, 157.
13. Walicke, P. A. *J. Neurosci.* **1997**, 8, 2618.
14. Beenken, A.; Mohammadi, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 235.
15. Kawamata, T.; Dietrich, W. D.; Schallert, T.; Gotts, J. E.; Cocke, R.; Benowitz, L. I.; Finklestein, S. P. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1997**, 94, 8179.
16. Bogousslavsky, J.; Victor, S. J.; Salinas, E. O.; Pallay, A.; Donnan, G. A.; Fieschi, C.; Kaste, M.; Orgogozo, J. M.; Chamorro, A.; Desmet, A. *Cerebrovasc. Dis.* **2002**, 14, 239.
17. Akl, M. R.; Nagpal, P.; Ayoub, N. M.; Tai, B.; Prabhu, S.A.; Capac, C.M.; Gliksman, M.; Goy, A.; Suh, K. S. *Oncotarget.* **2016**, 7, 44735.
18. Imagama, S.; Ogino, R.; Ueno, S.; Murayama, N.; Takemoto, N.; Shimmyo, Y.; et al. *PLoS ONE* **2020**, 15, e0236050.
19. Richer, M.; Robert, S. *Ann. Pharmacother.* 1995, 29 (6), 582-6.
20. Hanumegowda, U. M.; Regueiro-Ren, A. *Top. Med. Chem.* **2015**, 9, 261.
21. Chatman, L. A., Morton, D., Johnson, T. D., Anway, S. D. *Toxicol. Pathol.* **2009**, 37, 997.



22. Ploemen, J. P.; Kelder, J.; Hafmans, T.; van de Sandt, H.; van Burgsteden, J. A.; Salemink, P.J.; van Esch, E. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2004**, *55*, 347.
23. Tomizawa, K.; Sugano, K.; Yamada, H.; Horii, I. *J. Toxicol. Sci.* **2006**, *31*, 315.
24. Ulrich, R. G.; Kligore, K. S.; Sun, E. L.; Cramer, C. T.; Ginsberg, L. C. *Toxicol. Meth.* **1991**, *1*, 89–105.
25. Kasahara, T.; Tomita, K.; Murano, H.; Harada, T.; Tsubakimoto, K.; Ogihara, T.; Ohnishi, S.; Kakinuma, C. *Toxicol. Sci.* **2006**, *90*, 133.
26. PLIP アッセイは pH 指示薬としてフェノールレッドを含む培地を使用した。ジアミン化合物（フリー体）を用いた場合とジアミン化合物（塩酸塩）を用いた場合で培地の色に違いが認められなかったから、フリー体と塩酸塩の違いがアッセイ系の pH に影響を及ぼさないことを確認した。
27. Morgenthaler, M.; Schweizer, E.; Hoffmann-Röder, A.; Benini, F.; Martin, R. E.; Jaeschke, G.; Wagner, B.; Fischer, H.; Bendels, S.; Zimmerli, D.; Schneider, J.; Diederich, F.; Kansy, M.; Müller, K. *Chem. Med. Chem.* **2007**, *2*, 1100.
28. 以下のソフトウェアを用いて計算した値をもとに作図した：ADMET predictor, Simulation.plus.inc. Version 7.2.0001.
29. Andrew, C. L.; Klemm, A. R.; Lloyd, J. B. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, *1330*, 71.
30. Ohkuma, S.; Poole, B. *J Cell Biol.* **1981**, *90*, 656.
31. Reiter, J.; Trinka, P.; Bartha, F. L.; Pongo, L.; Volk, B.; Simig, G. *Org. Process. Res. Dev.* **2012**, *16*, 1279.
32. Veselov, I. S.; Trushkov, I. V.; Zefirov, N. S.; Grishina, G. V.; Russ. *J. Org. Chem.* **2009**, *45*, 1050.
33. Ganina, O. G.; Veselov, I. S.; Grishina, G. V.; Fedorov, A. Y.; Beletskaya, I. P. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2006**, *55*, 1642.
34. Wuitschik, G.; Carreira, E. M.; Wagner, B.; Fischer, H.; Parrilla, I.; Schuler, F.; Rogers, E. M.; Müller, K. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3227.
35. Chu, L.; Qing, F. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7262.
36. Kalow, J. A.; Schmitt, D. E.; Doyle, A. G. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4177.
37. Choi, D. W. *Neuron* **1998**, *1*, 623.
38. Panek, R. L.; Lu, G. H.; Dahring, T. K.; Batley, B. L.; Connolly, C.; Hamby, J. M.; Brown, K. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *286*, 569.
39. Orr, S. T.; Ripp, S. L.; Ballard, T. E.; Henderson, J. L.; Scott, D. O.; Obach, R. S.; Sun, H.; Kalgutkar, A. S. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4896.
40. Shufeng, Z.; Eli, C.; Xiaotian, L.; and Min, H. *Ther. Clin. Risk. Manag.* **2005**, *1*, 3.
41. Abe, H.; Kikuchi, S.; Hayakawa, K.; Iida, T.; Nagahashi, N.; Maeda, K.; Sakamoto, J.; Matsumoto, N.; Miura, T.; Matsumura, K.; Seki, N.; Inaba, T.; Kawasaki, H.; Yamaguchi, T.; Kakefuda, R.; Nanayama, T.; Kurachi, H.; Hori, Y.; Yoshida, T.; Kakegawa, J.; Watanabe, Y.; Gilmartin, A. G.; Richter, M. C.; Moss, K. G.; Laquerre, S. G. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 320.

42. Haojing, L. D.; Feng, B. *J. Med. Chem.* **2013**;56:2.
43. Desai, P. V.; Raub, T. J.; Blanco, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 6540.
44. Winiwarter, S.; Ax, F.; Lennernäs, H.; Hallberg, A.; Pettersson, C.; Karlén, A. *J. Mol. Graph. Model.* **2003**, 21, 273.
45. Waring, M. J. *Expert. Opin. Drug. Discov.* **2010**;5:235.
46. Takemoto, N.; Murata, K.; Murayama, N.; Yamada, C. WO 2008/139894.
47. Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. *Drug. Discov. Today.* **2017**, 22, 1572.
48. Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; Walter, M. A.; Mindt, T. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 8957.
49. Brown, D. J., Mason, S.F.; *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1961**, 16, 8.
50. Ghose, A. K.; Herberz, T.; Hudkins, R. L.; Dorsey, B. D.; Mallamo, J. P. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, 3, 50.
51. Schönherr, H.; Cernak, T. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 12256.
52. Quantum mechanics simulations were performed using Schrodinger's Maestro tool, version 9.1
53. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210.
54. Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8923.
55. Roughley, S. D.; Jordan, A. M. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3451.
56. Selected Building Block Series, BICYCLIC ALIPHATIC AMINES. Available from:  
[http://www.enamine.net/download/catalogs/Enamine\\_BicyclicAmines\\_2014.pdf](http://www.enamine.net/download/catalogs/Enamine_BicyclicAmines_2014.pdf) [Accessed: 1-Sep-2020]
57. Ertl, P.; Altmann, E.; McKenna, J. M. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 8408.

## 論文目録

本論文は、下記の原著論文を基に作成されたものである。

### 第2章

Second basic pKa: An overlooked parameter in predicting phospholipidosis-inducing potential of diamines.

Hiroki Sakai, Hidekazu Inoue, Kenji Murata, Tetsuya Toba, Naohiro Takemoto, Takahiro Matsumoto, Takeo Kawabata.

*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 30(9), 126933, (2020). Corrigendum: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 30(18), 127422, (2020). に掲載

### 第3章

Fibroblast growth factor receptor modulators employing diamines with reduced phospholipidosis-inducing potential.

Hiroki Sakai, Hidekazu Inoue, Kenji Murata, Tetsuya Toba, Yoshiari Shimmyo, Nobuhiro Narii, Shin-ya Ueno, Yoshiyuki Igawa, Naohiro Takemoto.

*Bioorg. Med. Chem.* 28(14), 115562, (2020). に掲載

### 第4章

Discovery of 1,2,3-triazole-based fibroblast growth factor receptor modulators.

Hiroki Sakai, Hidekazu Inoue, Tetsuya Toba, Kenji Murata, Nobuhiro Narii, Yoshiari Shimmyo, Yoshiyuki Igawa, Takahiro Matsumoto, Naohiro Takemoto.

*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29(16), 2332-2337, (2019). に掲載

## 謝辞

この度の学位取得にあたり、京都大学化学研究所 精密有機合成化学分野教授 川端 猛夫先生に懇切なご指導、ご高配を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました、アスピオファーマ株式会社創薬化学ファカルティ長 武藤 毅博士に厚くお礼申し上げます。

本研究の共同研究者で、研究遂行および論文発表に際して終始熱心なご指導と多大なご協力を賜りました竹本 尚弘博士に深く感謝いたします。

合成実験を担当して頂きました井上 英和氏、鳥羽 哲也博士、村田 健司博士に深く感謝致します。生物試験を担当して頂きました上野 新也博士、松本 孝弘氏、新名 芳有博士、成井 信博氏に深く感謝致します。薬物動態試験を担当して頂きました井川 佳之博士に深く感謝致します。

最後に、独創的な医薬品の創製を志し、共に研究に励んだアスピオファーマ株式会社の皆様に感謝いたします。