

有糸分裂制御に基づく抗癌薬を目指した

新規 CENP-E 阻害薬の合成研究

2016 年

平山孝治

## 目次

略語表.....	1
第1章 序論.....	3
1.1 はじめに.....	3
1.2 有糸分裂キネシン阻害薬.....	3
1.3 研究の目的と方針.....	4
第2章 縮合二環性コア骨格の探索と生物評価.....	6
2.1 はじめに.....	6
2.2 CENP-E ホモロジーモデルの構築.....	6
2.3 化合物デザイン.....	6
2.4 合成.....	8
2.5 生物評価の結果と考察.....	13
2.6 結論.....	19
第3章 CENP-E タンパクの部位特異的変異体解析および新規イミダゾ[1,2- <i>a</i> ]ピリジン誘導体探索を目的とした静電ポテンシャルマップ (EPM)の応用.....	20
3.1 はじめに.....	20
3.2 化合物デザイン.....	20
3.3 合成.....	22
3.4 生物評価の結果と考察.....	26
3.5 結論.....	37
第4章 L5 loop との効果的な相互作用獲得を目指したベンジル位縮合二環性構造のデザインと生物評価.....	38
4.1 はじめに.....	38
4.2 化合物デザイン.....	38
4.3 合成.....	39
4.4 生物評価の結果と考察.....	42
4.5 結論.....	44

第 5 章 総括.....	45
実験項.....	47
引用文献.....	91
本論文に関わる研究業績.....	94
謝辞.....	95

## 略語表

本論文中に使用した略語・略号を以下に記した。

略語・略号	正式名称
Ac	acetyl
ATP	adenosine triphosphate
bid	bis in die
Boc	( <i>tert</i> -butoxy)carbonyl
Bu	butyl
CENP-E	centromere-associated protein-E
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DME	1,2-dimethoxyethane
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
dppf	1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
EPM	electrostatic potential map
Et	ethyl
Et <sub>3</sub> N	triethyl amine
Et <sub>2</sub> O	diethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Glu	glutamic acid
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
h	hour
His	histidine
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
Ile	isoleucine
ip	intraperitoneal
<sup>i</sup> Pr <sub>2</sub> O	diisopropyl ether
<sup>i</sup> PrOH	isopropyl alcohol
<sup>i</sup> Pr <sub>2</sub> EtN	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
KHC	kinesin heavy chain
KSP	kinesin spindle protein
LDA	lithium diisopropylamide

LLC	Limited Liability Company
Lys	lysine
Met	methionine
MMFF	Merck Molecular Force Field
mp	melting point
Me	methyl
MS	mass spectrometry
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NMP	1-methyl-2-pyrrolidone
NMR	proton nuclear magnetic resonance
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PD	pharmacodynamic
PDB	The Protein Data Bank
Phe	phenylalanine
$\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$	[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) dichloromethane complex
$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	tris(dibenzylideneacetone) dipalladium (0)
p-HH3	phosphorylated histone H3
Pro	proline
SAC	spindle assembly checkpoint
SAR	structure-activity relationship
Ser	serine
<i>tert</i>	tertiary
<i>T/C</i>	treatment group / control group
TEA	trimethylamine
temp	temperature
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
Tyr	tyrosine
WSC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
WT	wild type
3D	three-dimensional, three dimensions

## 第1章 序論

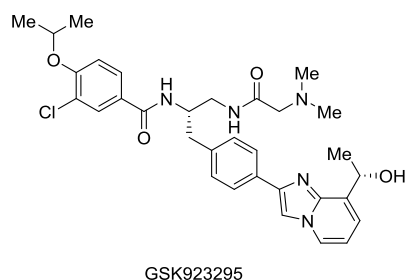
### 1.1 はじめに

我々の体内に無数に存在する正常な細胞は、生命維持のために必要な場合や損傷などに対する修復・再生が必要な場合を除き、不必要な細胞増殖が起こらないよう様々な調節機構によって制御されている。何らかの外的要因や遺伝子的要因等によりその制御機構が破綻することで、細胞増殖が異常亢進し、細胞の運命を癌化へと向かわせる。近年、癌の治療オプションとして、細胞増殖の重要過程である細胞周期を阻害する抗癌薬が注目されている。実際、癌の臨床治療において、タキサンやビンカアルカロイドなど微小管重合を直接的なターゲットとする有糸分裂阻害剤が広く使用されている<sup>1</sup>。しかしながら、これらの薬剤がターゲットとする微小管は、正常な神経細胞における軸索輸送においても重要な役割を担っている為、中枢・末梢神経障害が重大な副作用として生じ<sup>2</sup>、これにより継続的な治療が困難となる場合がある。このような副作用の発生を可能な限り取り除くために、近年、有糸分裂に不可欠な他の紡錘体構成タンパクが、次世代抗癌薬ターゲットとして注目されている<sup>3</sup>。有糸分裂キネシン Eg5 (別名 kinesin spindle protein; KSP) および Centromere-Associated Protein E (CENP-E) も、このような次世代の有糸分裂関連分子として研究が行われている。Eg5 および CENP-E はともに、有糸分裂キネシンファミリーに属するモータータンパクで<sup>4</sup>、細胞分裂 M 期中期から後期への移行に必須の分子である。両者の細胞分裂期における分子制御機構は異なり、Eg5 は中心体の分離と双極紡錘体形成の制御を担っている<sup>5-7</sup>。一方、CENP-E は染色体の動原体に局在化し<sup>4,8</sup>、C 末端部分で動原体と結合している<sup>9-11</sup>。CENP-E は N 末端にモーター領域と呼ばれる分子機械を有し、本部位で微小管を捕捉するとともに、ATP の加水分解によって生じた化学エネルギーを駆動力に変換し、微小管上をプラス端方向に移動することで染色体を赤道面上に運搬・整列させる重要な役割を担っている<sup>10,12,13</sup>。CENP-E の機能を消失させると、有糸分裂の中期において、赤道面上への染色体整列が阻害され不均衡を生じる。染色体の不整列状態が長引くと、染色体分配を保障するための監視機構である紡錘体チェックポイント (spindle assembly checkpoint; SAC) が活性化し、細胞分裂を停止した後、細胞死へと誘導することが報告されている<sup>1,14-17</sup>。

### 1.2 有糸分裂キネシン阻害薬

有糸分裂キネシン阻害薬の研究において、最も開発が進んでいるのは Eg5 阻害剤の ispinesib で、臨床での第 II 相試験が実施された<sup>6,18-20</sup>。その他にも数多くの低分子 Eg5 阻害剤が臨床および非臨床において盛んに評価されている。一方、CENP-E に関しては低分子阻害剤の報告例は少なく、臨床試験で検証された低分子化合物も唯一 GSK923295 (Figure 1-1)のみである。この GSK923295 は、非臨床研究において CENP-E 阻害に基づく抗腫瘍作用を示した最初の例で、CENP-E タンパクが新規癌治療ターゲットとなり得る可能性を示した<sup>21-25</sup>。

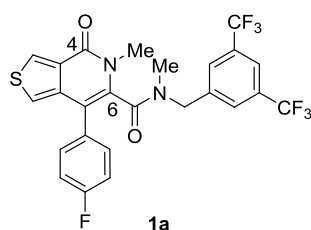
癌細胞の増殖速度は、正常細胞と比較して劇的に亢進していることが知られているので、CENP-E 阻害剤による癌細胞と正常細胞への影響度合いは切り分けられると考えられる。加えて、微小管に直接作用しないため、タキサンやビンカアルカロイドで問題となっている重大な副作用を引き起こさない理想的な薬剤となる可能性がある。このように、CENP-E は有望な抗癌薬ターゲットではあるものの、ケミカルツールが限られていることも起因し、分子機構の全容は未だ解明されていないと言える。こうした背景をもとに著者は新規 CENP-E 阻害薬の創製を目指して合成研究を行った。



**Figure 1-1.** CENP-E 阻害薬 GSK923295 の構造

### 1.3 研究の目的と方針

前述したように、CENP-E は染色体を赤道面上に運搬・整列させる際に、そのエネルギー供給源としてモーター領域の ATPase 活性を利用している。従って、CENP-E 阻害剤としては、CENP-E のモーター領域と結合親和性を示し ATPase 活性を抑制するような低分子化合物が理想といえる。微小管存在下に CENP-E の ATPase 活性を測定するアッセイ系を用いて、社内化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを実施した結果、CENP-E の ATPase 活性を阻害する幾つかのヒット化合物を見出すことに成功した。ヒット化合物の一つである 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-c]ピリジン-6-カルボキサミド誘導体 **1a** は (Figure 1-2)、ATPase 活性を 50%阻害する化合物濃度 (IC<sub>50</sub>)が 2100 nM と活性は強くなかったが、(1) 既知の Eg5 阻害薬<sup>3</sup>とも構造が大きく異なり新規性がある、(2) 構造的に変換可能な部位が複数ある、ことを考慮し本化合物を最適化研究のリード化合物として選定した。



**Figure 1-2.** 化合物 **1a** の構造

本研究の目的は、化合物 **1a** をリード化合物とし、種々の構造変換を行うことで CENP-E 阻害活性を向上させ、医薬品として開発可能なプロファイルを有する低分子 CENP-E 阻害薬を

創製することである。同時に、デザイン化合物に関する生物評価を基に、構造活性相関を明らかとすることを目的とした。

以下に各章の研究方針を述べる (Figure 1-3)。

第2章：効率的に化合物の最適化研究を進めるために、CENP-E のホモロジーモデルを構築し活用することにした。化合物近傍に位置する酸性アミノ酸残基との相互作用が活性向上に重要ではないかと仮説を立て、塩基性置換基の導入を検討することにした。また、母骨格である 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン環の変換にも注力し、新たな骨格の創出を目指した。合成化合物の難解な構造活性相関を理解する中で、化合物表面の静電ポテンシャルマップ (EPM)の差異が活性と相関しているのではないかと仮説を立て、新規骨格のデザインへ応用可能かを検討することにした。

第3章：前章で構築したホモロジーモデルの妥当性を検証するために、CENP-E 変異体タンパク質を用いた部位特異的変異体解析試験を実施することにした。再構築したホモロジーモデルを基に、活性向上に重要と推察される構造変換部位は3箇所あるとの仮説を立て、各々の箇所に関して構造変換を検討することにした。前章で得られた EPM と活性との関連を、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環 5 位置換基の最適化に応用できるのではないかと作業仮説を立て、これを検証することにした。ベンジル位の固定化された構造が CENP-E の loop 構造に強く認識されるのではないかと仮説を立て、光学活性な化合物を用いて検証することにした。

第4章：前章までの検討により EPM による活性予測が、CENP-E 阻害薬の探索に有効であると分かった。本章では、CENP-E の L5 loop 上の EPM 解析を実施し、これと効果的に静電相互作用し得る EPM を有する化合物をデザインし、検証することにした。また、医薬品として開発可能なプロファイルとして良好な薬物体内動態を有する化合物の創製に取り組むことにした。

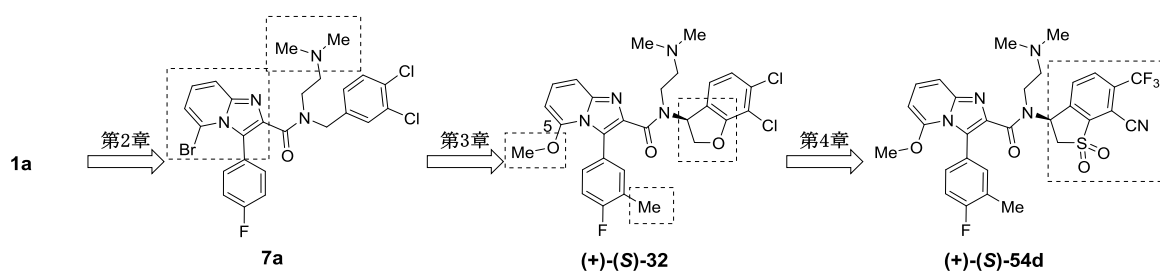


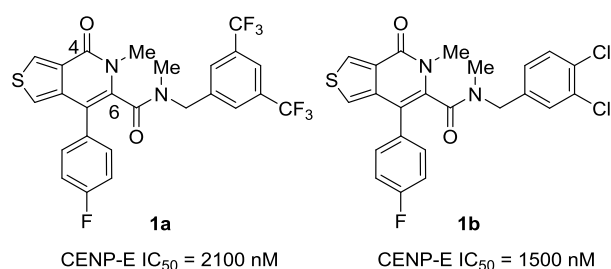
Figure 1-3. 各章における CENP-E 阻害薬の最適化研究



## 第2章 縮合二環性コア骨格の探索と生物評価

### 2.1 はじめに

CENP-E タンパクのモーター領域に結合する化合物を探索すべく、ハイスループットスクリーニングを実施した結果、4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボキサミド誘導体 **1a** がヒット化合物として見出された ( $IC_{50} = 2100$  nM)。初期の構造活性相関研究により、アミド側鎖末端のベンゼン環上に 3,4-ジクロロ基を有する化合物 **1b** が、僅かながら化合物 **1a** を上回る CENP-E 阻害活性を示した ( $IC_{50} = 1500$  nM) (Figure 2-1)。そこで、化合物 **1b** をリード化合物として、種々の縮合二環性コア骨格を有する新規 CENP-E 阻害薬の探索を開始した。



**Figure 2-1.** 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン誘導体 **1a**、**1b** の構造および CENP-E 阻害活性 ( $IC_{50}$  値)

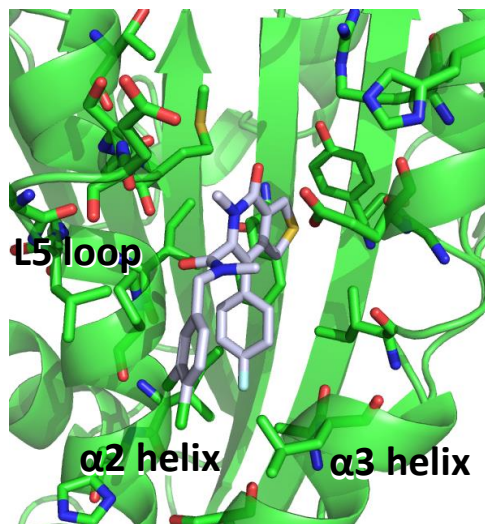
### 2.2 CENP-E ホモロジーモデルの構築

ターゲットタンパク質と低分子阻害薬との共結晶情報を用いたドラッグデザインは、効率的な低分子創薬の手法として近年盛んに行われている。研究当初、CENP-E と低分子阻害薬との共結晶情報は報告例がなく、低分子が結合し得るバインディングサイトの情報も乏しかった<sup>26</sup>。第1章で述べたように、Eg5 タンパクは、CENP-E と同じくキネシンスーパーファミリーに属し、種々の低分子阻害薬との共結晶情報も報告されていた<sup>27</sup>。これらの低分子薬はいずれも、Eg5 の L5 loop、 $\alpha 2$  helix および  $\alpha 3$  helix によって形成される L5 サイトに結合することが報告されている<sup>28,29</sup>。Eg5 のモーター領域は、CENP-E のそれとアミノ酸配列の相同性が高いことから (36%の相同性)<sup>26</sup>、著者は CENP-E も Eg5 と同様に L5 結合サイトを有する可能性が高いと仮定し、Eg5 とピロロトリアジノン阻害薬との共結晶情報 (PDB: 2GM1)<sup>27</sup> を基に、CENP-E ホモロジーモデルの構築を検討した。化合物 **1b** を用いて構築した CENP-E ホモロジーモデルを Figure 2-2 に示す。

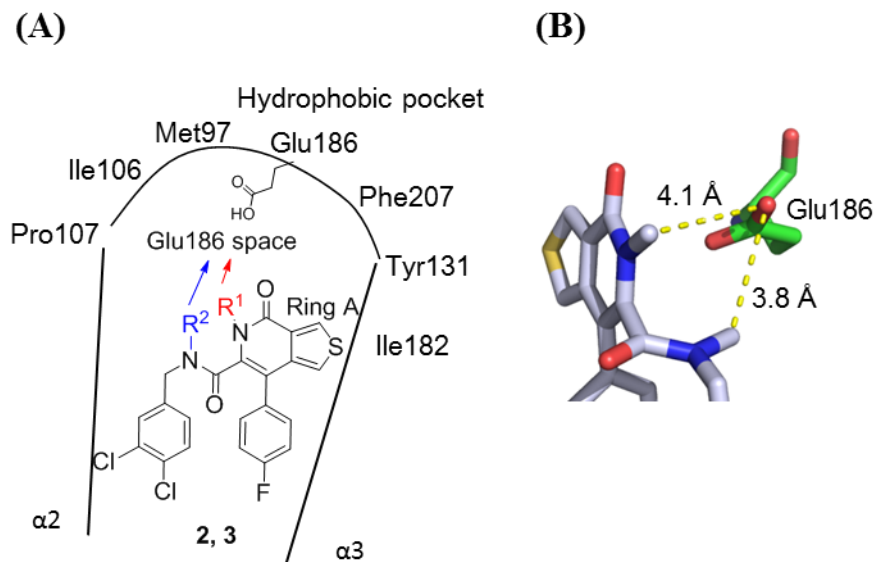
### 2.3 化合物デザイン

構築したドッキングモデルによると、化合物 **1b** が有する、二環性 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン環は、CENP-E のモーター領域内に存在する Ile182、Tyr131、Phe207 および Met97 によって形成される疎水性ポケットに結合することが示唆された (Figure 2-3A)。加えて、化合物 **1b** の 3,4-ジクロロベンジル基は、L5 loop に沿うように  $\alpha 2$  helix 近傍に位置し

ている。一方、化合物 **1b** 近傍に存在し、**1b** 方向へと伸びるアミノ酸残基 Glu186 との間には明確な相互作用は観測されなかった。化合物 **1b** から Glu186 にかけての空間の広さ (Glu186 space、Figure 2-3A)を理解するために、Glu186 のカルボキシ基と化合物 **1b** の置換基 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> との距離を測定したところ、それぞれ 4.1 Å および 3.8 Å であった (Figure 2-3B)。これらの考察から、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> 周辺には置換基導入可能な十分なスペースがあり、Glu186 との相互作用を獲得することで、CENP-E 阻害活性を増強できるのではないかと考えた。



**Figure 2-2.** チエノ[3,4-*c*]ピリジン誘導体 **1b** の CENP-E モーター領域におけるドッキングモデル (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3. Schrödinger, LLC)

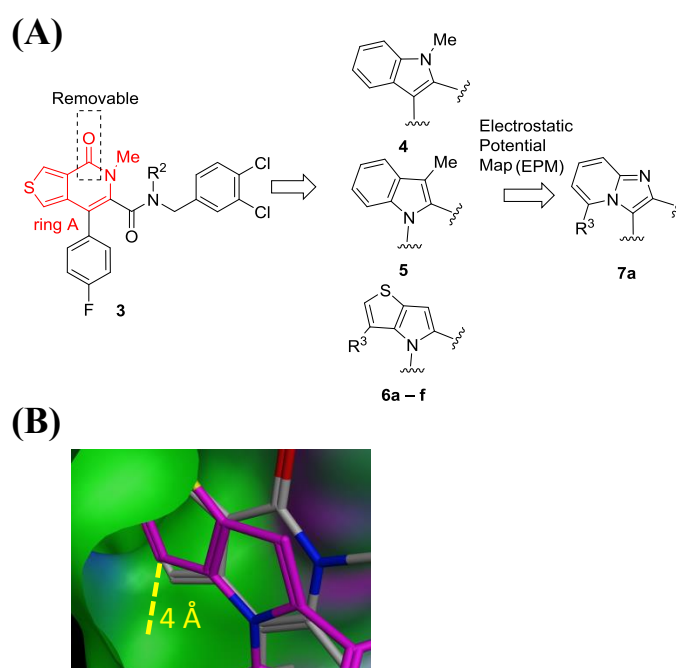


**Figure 2-3.** ドッキングモデルにおける考察 (A) 化合物 **2** および **3** の結合様式とデザイン、(B) Glu186 のカルボキシ基と化合物 **1b** の置換基 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> との距離 (PyMOL を用いて計算)

ドッキングモデルによると、4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン環の 4-オキソ基

は、疎水性ポケット内のどのアミノ酸残基とも明確な相互作用をしておらず、阻害活性発現には必須ではないと推察された。この考察を基に、二環性骨格 (ring A) は、オキシ基を有さないインドール環 (**4** および **5**) あるいはチエノ[3,2-*b*]ピロール環 **6** に変換することが可能であると考えた (Figure 2-4A)。ドッキングモデルでの更なる検証の結果、チエノ[3,2-*b*]ピロール環 3 位周辺には、リガンドと  $\alpha 2$  helix との間に疎水性ポケットが存在し (約 4 Å)、種々の置換基  $R^3$  の導入が可能であることが示唆された (Figure 2-4B)。

置換基  $R^3$  の構造活性相関の理解を深めるために、二環性骨格部位 (ring A) の分子表面に対して、静電ポテンシャルマップ (EPM)<sup>30-34</sup> を計算し、視覚化した分子表面を比較した。EPM による考察は、生物評価によって得られた構造活性相関とよく一致しており、新たなリード骨格である 5 位置換イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン体 **7a** のデザインへと繋がった (Figure 2-4A)。

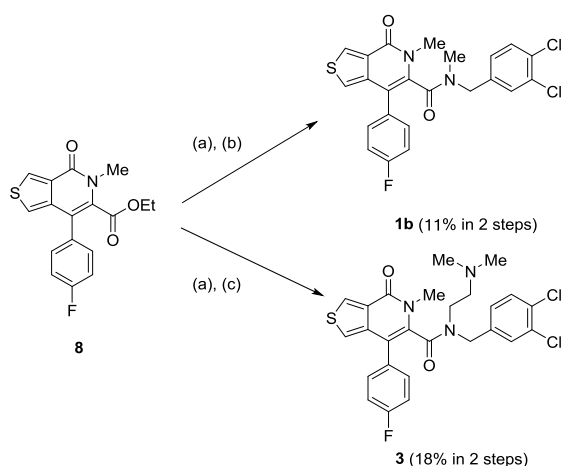


**Figure 2-4.** (A) 種々の二環性骨格 (ring A) を有する化合物 **4-7a** のデザイン、(B) 化合物 **3** (灰色) および **6b** ( $R^3=H$ ) (ピンク色) の ring A 周辺の疎水性ポケット

## 2.4 合成

5-メチル-4-オキシ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン誘導体 **1b** および **3** の合成法を Scheme 2-1 に示す。既知のエチルエステル化合物 **8**<sup>35</sup> を水酸化ナトリウムを用いて加水分解し、得られたカルボン酸体をトリエチルアミン存在下 HATU を用いて、市販の 1-(3,4-ジクロロフェニル)-*N*-メチルメタンアミン **9** と縮合させ、目的の *N*-メチルアミド体 **1b** を 11% (2 steps) の収率で得た。2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチル体 **3** は、**1b** と同様の方法に従い、対応する市販の *N*'-(3,4-ジクロロベンジル)-*N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **10** を用いて、18% (2 steps) の収率で合成した。

**Scheme 2-1<sup>a</sup>.** 5-メチル-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン誘導体 **1b** および **3** の合成



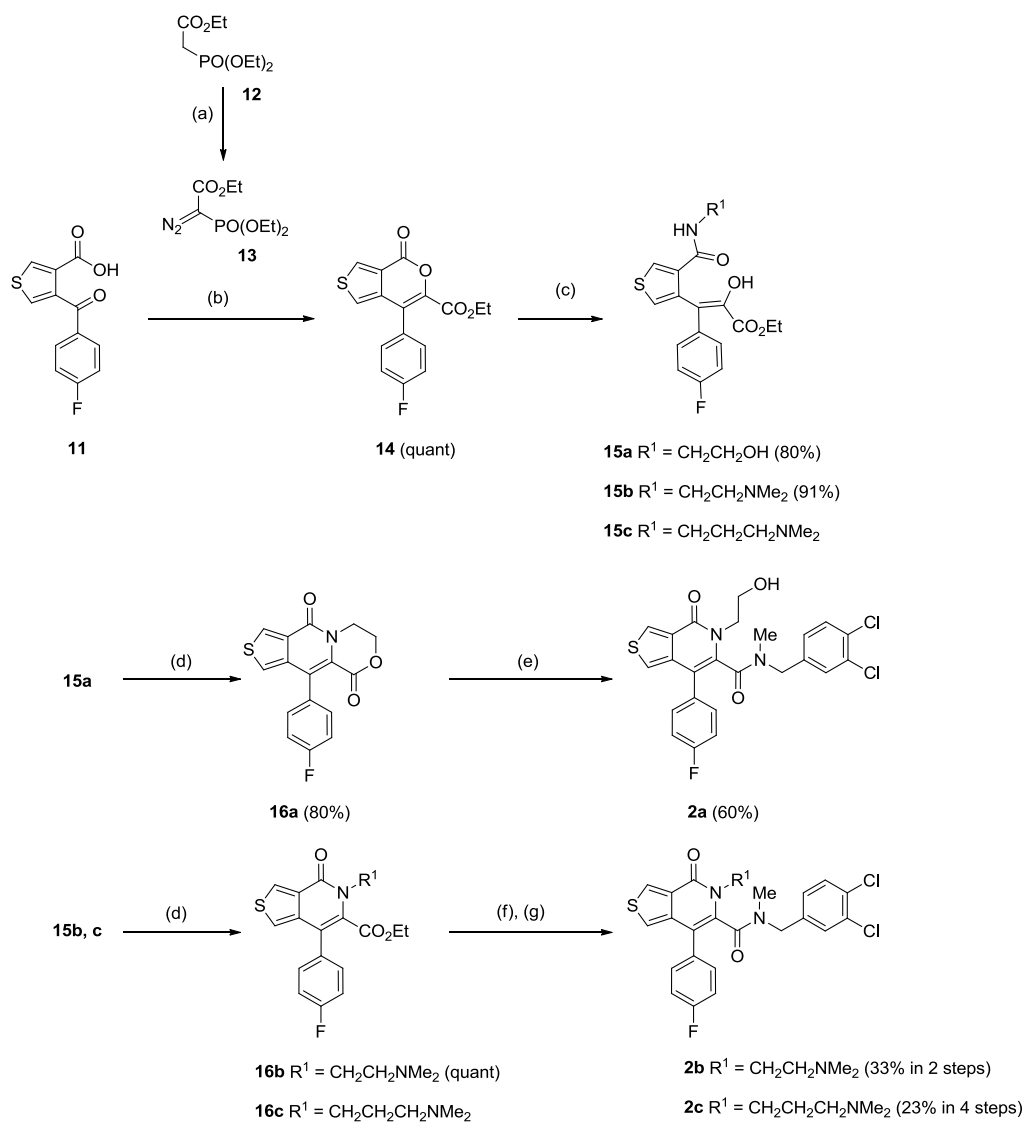
<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) 1 M NaOH, EtOH, THF, 還流, 6 h; (b) 1-(3,4-ジクロロフェニル)-*N*-メチルメタンアミン **9**, HATU, Et<sub>3</sub>N, DMF, room temp, 36 h; (c) *N'*-(3,4-ジクロロベンジル)-*N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **10**, HATU, Et<sub>3</sub>N, DMF, room temp, 36 h.

5 位に種々の置換基  $R^1$  を有する 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン誘導体 **2a-c** の合成法を Scheme 2-2 に示す。市販のエチル (ジエトキシホスホリル) アセタート **12** および 4-アセトアミドベンゼンスルホン酸 アジドから調製した  $\alpha$ -ジアゾホスホナート **13** を用いて、既知のチオフェンカルボン酸誘導体 **11**<sup>35</sup> へのロジウム触媒によるヘテロ原子-水素挿入反応を実施した。反応混合物への DBU 添加により、分子内 Horner–Wadsworth–Emmons 反応<sup>36</sup> が進行し、二環性ラクトン体 **14** を定量的に得ることが出来た。得られた **14** に 2 種類のアミンをそれぞれ作用させることで、ラクトン環の開環反応が進行し、対応するエノールエステル体 **15a** および **15b** を 80–91% の収率で得た。*p*-トルエンスルホン酸・一水和物を用いた **15a** の分子内縮合反応により、三環性ラクトン体 **16a** を 80% の収率で得た。得られた **16a** に、アミン **9** とトリメチルアルミニウムから調製したアルミニウムアミド試薬を作用させ、目的の 2-ヒドロキシエチル誘導体 **2a** を 60% の収率で得た。化合物 **15b** の分子内縮合反応を **15a** と同様の手法で実施し、化合物 **16b** を定量的に得た。化合物 **16b** の加水分解、次いでアミン **9** との縮合反応により、目的の 2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチル誘導体 **2b** を 33% (2 steps) の収率で得た。目的の 3-(*N,N*-ジメチルアミノ)プロピル誘導体 **2c** は、上記と同様の方法により 23% (4 steps) の収率で得た。

4-フルオロフェニル基を有するインドール体 **4** および **5** の合成法を Scheme 2-3 に示す。3-アリーールインドール **4** は、市販の *N*-メチル 3-ブロモインドール **17** から合成した。原料である **17** と 4-フルオロフェニルボロン酸との Suzuki–Miyaura カップリング反応<sup>37,38</sup> により、エステル体 **18** を 80% の収率で得た。化合物 **18** の加水分解によって得られたカルボン酸体と対応するアミン **10** との縮合反応により、目的の化合物 **4** を 38% (2 steps) の収率で得た。2 当量の酢酸銅(II)およびトリエチルアミン存在下、市販の化合物 **19** と 4-フルオロフェニルボロン酸との Chan–Lam–Evans カップリング反応<sup>39,40</sup> を実施した。本反応は、*C*-3 位付加体の生成を伴わず、*N*-1 位選択的に付加反応が進行し、化合物 **20** を 78% の収率で与えた。得られた **20** は、

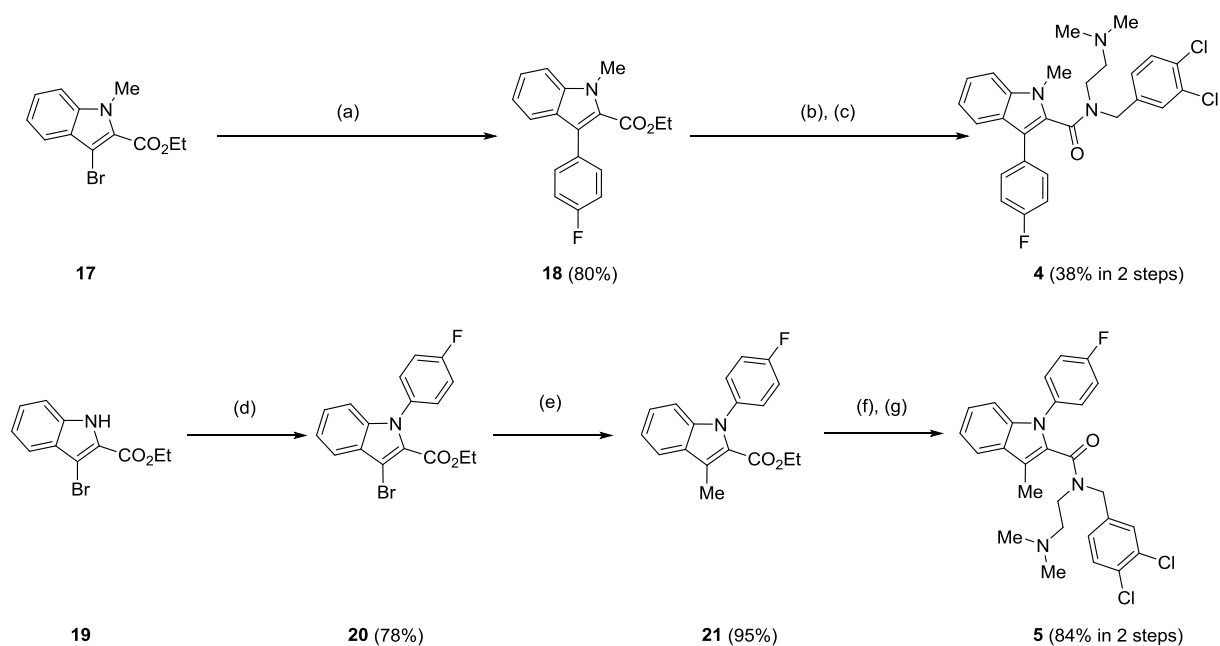
Pd 触媒存在下、カップリング反応によるメチル化により 3-メチル体 **21** に 95% の収率で変換された。化合物 **21** の加水分解と、続く縮合反応により、目的のインドール体 **5** を 84% (2 steps) の収率で得た。

**Scheme 2-2<sup>a</sup>**. 5 位置換 ( $R^1$ ) 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン誘導体 **2a-c** の合成



<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) NaH, 4-アセトアミドベンゼンスルホンイル アジド, THF, 0 °C to room temp, 1.5 h (b) **13**,  $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ , トルエン, 80 °C, 3 h, 次いで DBU, room temp, 終夜; (c)  $\text{H}_2\text{NR}^1$ , THF, room temp; (d)  $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ , トルエン, 還流, 2 h; (e) **9**, 1.8 M  $\text{Me}_3\text{Al}$  / トルエン, トルエン, room temp, 1 h, 次いで 80 °C, 2 h; (f) 8 M NaOH, EtOH, THF, 80 °C, 6 h; (g) **9**, HATU,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF, room temp, 24 h.

**Scheme 2-3<sup>a</sup>.** インドール誘導体 **4** および **5** の合成

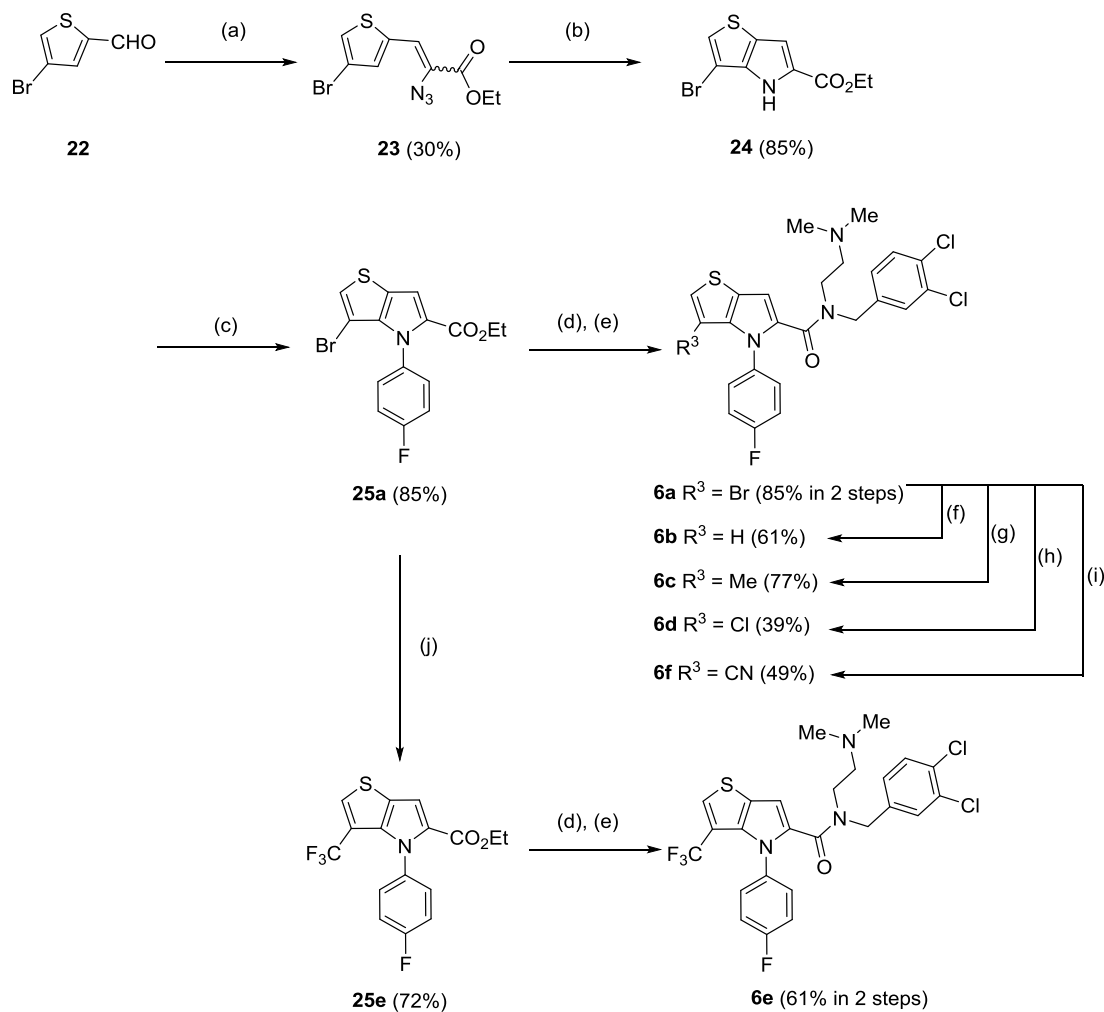


<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) 4-フルオロフェニルボロン酸, PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2 M Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DME, 90 °C, 2 h; (b) 8 M NaOH, 2 M NaOH, EtOH, THF, 75 °C, 1 h; (c) **10**, HATU, Et<sub>3</sub>N, DMF, room temp, 18 h; (d) 4-フルオロフェニルボロン酸, Cu(OAc)<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, ピリジン, モレキュラーシーブ 4A, トリフルオロメチルベンゼン, room temp to 45 °C, 2 h; (e) (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Sn, PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMF, 120 °C, 1 h; (f) 2 M NaOH, EtOH, THF, 65 °C, 1.5 h, 次いで 8 M NaOH, 75 °C, 1 h; (g) **10**, HATU, Pr<sub>2</sub>EtN, DMF, room temp, 30 h.

種々の 3 位置換基を有するチエノ[3,2-*b*]ピロール体 **6**<sup>41</sup> の合成法を Scheme 2-4 に示す。市販の 4-ブロモ-2-チオフェンカルバルデヒド **22** に、塩基存在下、エチル 2-アジドアセタートを作用させ、アジド体 **23** を 30% の収率で得た。得られた **23** の分子内環化反応を制御するために、**23** のキシレン希釈液を、沸騰させたキシレン溶媒へゆっくりと添加し、3-ブロモチエノ[3,2-*b*]ピロール **24** を 85% の収率で得た。続く 4-フルオロフェニルボロン酸との Chan-Lam-Evans カップリング反応<sup>39,40</sup> を 2.5 当量の酢酸銅(II)およびモレキュラーシーブ 3A 存在下で実施し、目的の *N*-付加体 **25a** を 85% の収率で得た。モレキュラーシーブの添加は反応促進に極めて有効であり、非添加条件 (収率 < 40%) と比較して収率に関しても顕著な改善を示した。詳細な理由は不明であるが、モレキュラーシーブ 3A の使用は、4A よりも効果的であった (収率 85% vs. 75%)。本反応は空気下で実施する必要があり、多孔質であるモレキュラーシーブが効率的に空気を系内に導入する役割を担っていると考察している。さらに、溶媒検討を実施した結果、トリフルオロメチルベンゼンは DMF、DME、アセトニトリルあるいはピリジン (収率 < 20%) と比較して、収率に関してより優れた結果を与えた。目的の 3-ブロモ体 **6a** は、化合物 **25a** の加水分解およびアミンとの縮合反応により 85% (2 steps) の収率で得た。3 位水素化体 **6b** は、**6a** を Pd 触媒下、ギ酸を水素源として用いた脱ブロモ化反応により、61% の収率で得た。化合物 **6a** のカップリング反応を用いたメチル化により 3-メチル体 **6c**

を 77% の収率で得た。化合物 **6a** を、マイクロ波照射下、塩化銅によるハロゲン交換反応に付すことにより、目的の 3-クロロ体 **6d** を 39% の収率で得た。同じくマイクロ波照射下、シアン化銅による **6a** のシアン化反応により、目的の 3-シアノ体 **6f** を 49% の収率で得た。トリフルオロメチル体に関しては、**6a** から誘導することが出来なかったため、**25a** に 2 当量のヨウ化銅 (I) 存在下、トリフルオロ酢酸カリウムを作用させ、化合物 **25e** に変換し (収率 72%)、前述と同様の方法に従い、目的の 3-トリフルオロメチル体 **6e** へと 61% (2 steps) の収率で導いた。

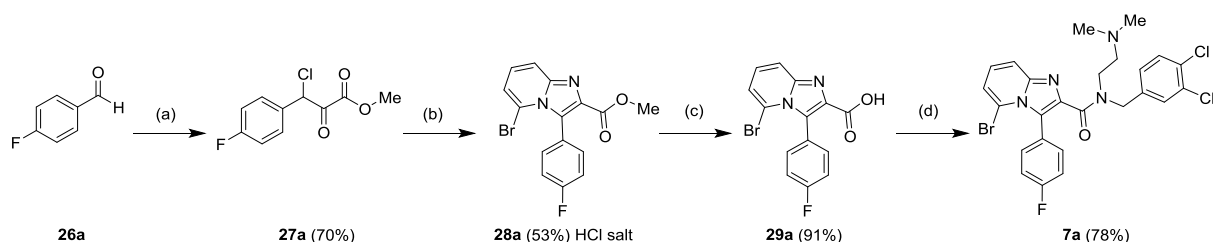
**Scheme 2-4<sup>a</sup>**. 種々の 3 位置換基を有するチエノ [3,2-*b*] ピロール誘導体 **6a-f** の合成



<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) エチル 2-アジドアセタート, NaOEt, EtOH,  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1.5 h, 次いで room temp, 1 h; (b) xylene,  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 h; (c) 4-フルオロフェニルボロン酸,  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , ピリジン, モレキュラーシーブ 3A, トリフルオロメチルベンゼン, room temp, 21 h; (d) 2 M NaOH, EtOH, THF,  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 h; (e) **10**, HATU,  $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ , DMF, room temp, 18 h; (f) ギ酸,  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{dp}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DME,  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 8 h; (g)  $(\text{CH}_3)_4\text{Sn}$ ,  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , DME,  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 h; (h)  $\text{CuCl}$ , DMF,  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ , マイクロウェーブ照射, 0.7 h; (i)  $\text{CuCN}$ , NMP,  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ , マイクロウェーブ照射, 0.7 h; (j)  $\text{CF}_3\text{COOK}$ ,  $\text{CuI}$ , DMF, トルエン,  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 4 h.

5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a**<sup>42</sup>の合成法を Scheme 2-5 に示す。塩基存在下、市販の 4-フルオロベンズアルデヒド **26a** とジクロロ酢酸メチルを用いた Darzens 反応<sup>43</sup>により生成したエポキシド体は、系内でクロロ基の転位に伴う開環反応が速やかに進行し β-クロロ-α-ケトエステル体 **27a** へと 70%の収率で変換された。得られた **27a** を 2-アミノ-6-ブロモピリジンとともに加熱することで、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環形成反応が進行し、化合物 **28a** (塩酸塩)を 53%の収率で得た。続く加水分解により得られたカルボン酸体 **29a** とアミン **10** との縮合反応により、目的の 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン体 **7a** を 78%の収率で得た。

**Scheme 2-5<sup>a</sup>**. 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** の合成



<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) ジクロロ酢酸メチル, NaOMe, THF, 0 °C to room temp, 1 h, then 85 °C, 2 h; (b) 2-アミノ-6-ブロモピリジン, EtOH, 還流, 12 h; (c) 2 M NaOH, EtOH, THF, 65 °C, 0.5 h; (d) **10**, HATU, <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>EtN, DMF, room temp, 24 h.

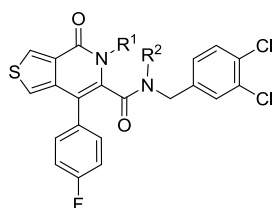
## 2.5 生物評価の結果と考察


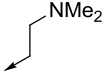
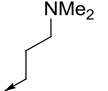

### 2.5.1 置換基 R<sup>1</sup>あるいは R<sup>2</sup>と CENP-E タンパクとの効果的な相互作用獲得

4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン骨格上の *N*-5-アルキル基 (R<sup>1</sup>)および *C*-6-カルボキサミド *N*-アルキル基 (R<sup>2</sup>)に関する構造活性相関を Table 2-1 に示す。化合物 **1b**, **2a-c** および **3** について、CENP-E の ATPase 活性に対する阻害活性を評価した。R<sup>1</sup>として 2-ヒドロキシエチル基を有する **2a** は、メチル体 **1b** と同等の CENP-E 阻害活性を示した。一方、2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチル体 **2b** の阻害活性は、興味深いことに **2a** と比較して 25 倍 (IC<sub>50</sub> = 72 nM) 向上した。この結果は、ドッキングモデルでの考察を支持するものであり、*N,N*-ジメチルアミノ基が α3 helix 上の Glu186 と効果的に相互作用したことによるものと推察される。次に、R<sup>1</sup> のリンカーの伸長を検討した結果、化合物 **2c** の阻害活性は **2b** と比較して減弱した。この結果から、R<sup>1</sup> のリンカーとしては 2 炭素鎖が最適であると判断した。CENP-E タンパクと効果的に相互作用する 2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチル基をアミド側鎖部位 (R<sup>2</sup>)に移すことができれば、母骨格の探索をより効率的に実施できると考えた。期待した通り、新たにデザインした化合物 **3** は、**2b** に匹敵する阻害活性を示した。ここで見出された鍵構造 *N*-(3,4-ジクロロベンジル)-*N*-2-(ジメチルアミノ)エチルアミノ基およびその生物評価の結果が、次節で述べる効率的な縮合二環性骨格探索への大きな動機付けとなった。



**Table 2-1.** 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン誘導体の *N*-5 位アルキル基  $R^1$  (**1b**, **2a-c**) および *C*-6-カルボキサミド *N*-アルキル基  $R^2$  (**3**) の構造活性相関



Compound	$R^1$	$R^2$	CENP-E
			IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
<b>1b</b>	Me	Me	1500
<b>2a</b>		Me	1800
<b>2b</b>		Me	72
<b>2c</b>		Me	300
<b>3</b>	Me		100

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values are the means of duplicate measurements.

### 2.5.2 縮合二環性骨格の探索

母骨格の探索をより効率的に実施するため、強力な CENP-E 阻害活性発現に重要な *N*-(3,4-ジクロロベンジル)-*N*-2-(ジメチルアミノ)エチルアミノ構造に固定し、CENP-E 阻害活性の更なる改善を目的に、化合物 **3** の 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン骨格を種々の縮合二環性骨格へと変換した。生物評価の結果を Table 2-2 に示す。4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン環上の 4-オキソ基は CENP-E のどのアミノ酸残基とも明確な相互作用をしていないと推察されたため、4-オキソ基を有さない 3-アリアルインドール体 **4** および 1-アリアルインドール体 **5** を検証した。生物評価の結果、残念ながらこれらの化合物は、化合物 **3** と比較して大幅に阻害活性が減弱した。ここから更に、ベンゼン環のバイオアイソスターであるチオフェン環へと左環を変換し、化合物 **5** と同等の阻害活性を有する 4-アリアルチエノ[3,2-*b*]ピロール体 **6b** を見出した。ドッキングモデルにおいて、化合物 **6b** の 3 位周辺には  $\alpha 2$  helix との間に空間 (約 4 Å) が存在することが推察されたため (Figure 2-4B)、この空間を埋めるようデザインした 3 位置換基 ( $R^3$ ) に関する構造活性相関を検証した。期待した通り、3-メ

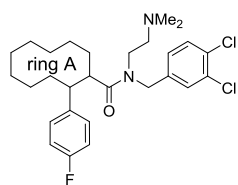
チル体 **6c** の阻害活性は、3 位無置換体 **6b** と比較して 5 倍向上した ( $IC_{50} = 370 \text{ nM}$ )。驚いたことに、**6b** および **6c** を合成するにあたって鍵中間体として準備した 3-ブロモ体 **6a** は、**6c** よりも 10 倍強力な阻害活性を示した ( $IC_{50} = 32 \text{ nM}$ )。3-クロロ体 **6d** も、**6a** と同等の阻害活性を示した ( $IC_{50} = 35 \text{ nM}$ )。一方、3-トリフルオロメチル体 **6e** および 3-シアノ体 **6f** においては、3 位ハロゲン置換体 **6a** および **6d** と比較して、阻害活性が減弱する結果となった。化合物 **6a**, **6c-f** の 3 位置換基のファンデルワールス体積は  $12\text{--}16 \text{ cm}^3/\text{mol}$  の範囲で<sup>44</sup>、置換基のサイズに大きな違いはなく、3 位置換基の立体的な要因だけでは、前述の構造活性相関を説明することは困難であった。

### 2.5.3 デザイン化合物の静電ポテンシャルマップ (EPM)解析および骨格変換への応用

静電ポテンシャルは、電子密度分布に関連する物理化学的な指標の一つである。そして、分子表面上の電子密度の等値面に静電ポテンシャルの大きを基に色付けしたものが静電ポテンシャルマップ (EPM)である。近年、EPM 解析が、低分子化合物とターゲットタンパクとの結合親和性の評価やその理解に有用であることが幾つか報告されている<sup>30-34</sup>。そこで、チエノ[3,2-*b*]ピロール骨格への 3 位置換基による影響を EPM 解析により視覚化し、その差異を検証した。

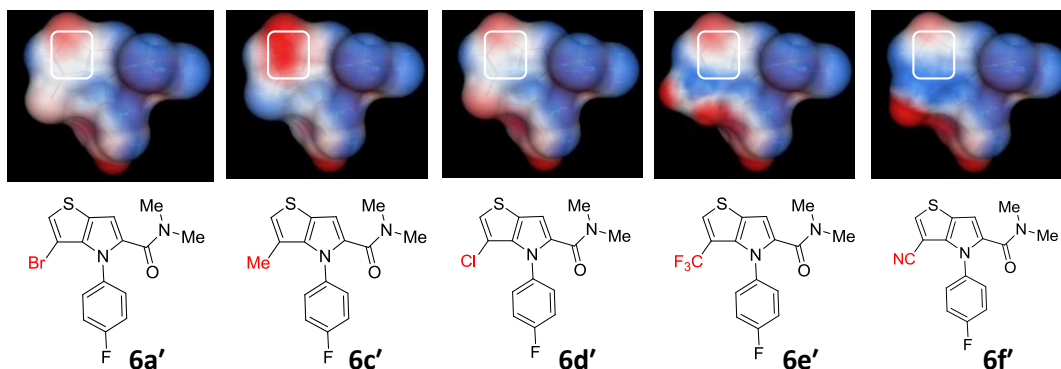
3 位置換チエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体の静電的特性を、計算化学ソフトウェア MOE<sup>45</sup> を用いて計算した。3 位置換基による影響を最も受けるのは母骨格部位であり、アミド側鎖部位の置換基による影響は無視し得るものと考えた。母骨格の EPM に限局するために、*N,N*-ジメチルアミド類縁体 **6a'**, **6c'-f'**を、それぞれ **6a**, **6c-f** に対応するモデル分子として使用した。Figure 2-5 に示すように EPM では、**6a'**, **6c'-f'**の分子表面の静電ポテンシャルが色付けされ視覚化されており、正・負・中性のそれぞれの電荷状態が、青・赤・白で表されている。高活性を示した 3-ブロモ体 (**6a'**)および 3-クロロ体 (**6d'**)では、チオフェン環上の静電ポテンシャルは中性 (白)を示した。対照的に、3-メチル体 (**6c'**)は負の電荷状態 (赤)を示し、3-トリフルオロメチル体 (**6e'**)および 3-シアノ体 (**6f'**)は正の電荷状態 (青)を示した。これら EPM の差異は、3 位置換基の電子的な特性によって引き起こされていると考えられる。これらの結果を基に、縮合二環性骨格の最適な EPM として、母骨格左環上の電荷が中性状態であることが望ましいと仮定した。ドッキングモデルによると、ring A 部位は Ile182 を含む中性のアミノ酸残基によって構成される疎水性ポケットに結合していると推察され、これは前述の仮定を支持するものと考えている。

**Table 2-2.** 種々の縮合二環性骨格 **4–6** (ring A)の構造活性相関



Compound	Bicyclic scaffold (ring A)	CENP-E IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
<b>3</b>		100
<b>4</b>		8500
<b>5</b>		2100
<b>6b</b>		2000
<b>6c</b>		370
<b>6a</b>		32
<b>6d</b>		35
<b>6e</b>		140
<b>6f</b>		540

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values are the means of duplicate measurements.



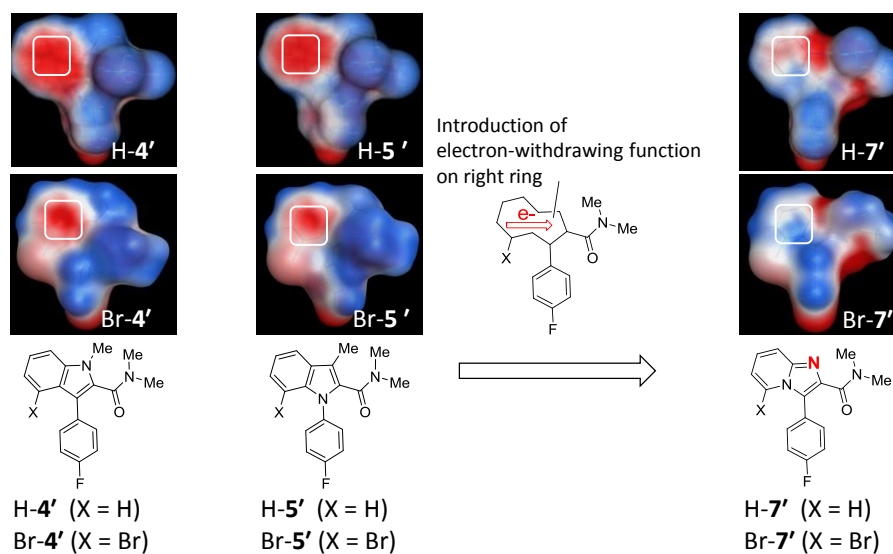
**Figure 2-5.** チエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体 **6a'**, **6c'**-**f'** の静電ポテンシャルマップ (EPM) (EPM は MOE<sup>45</sup> を用いて計算した。正・負・中性の電荷状態はそれぞれ青・赤・白で表される。各化合物のチオフェン環部位は白枠内に位置する。)

強力な酵素阻害活性を有するにも関わらず、化合物 **6a** の細胞活性は不十分であり、強力な細胞活性を示す他の骨格を見出す必要があった。実際に化合物の合成に着手する前に、種々の二環性骨格に関して EPM を駆使した *in silico* での評価を実施した。例えば、ブロモインドール体 **Br-4'** および **Br-5'** は負電荷を帯びた EPM (赤) を示したため、実際には合成に着手していない。母骨格自体が極めて負の電荷を帯びているため (**H-4'** および **H-5'**, Figure 2-6)、ブロモ基の導入効果が得られないと判断した。このようにして種々の二環性骨格について EPM を用いた *in silico* 評価を実施した結果、最終的に、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン骨格 (**H-7'**) が CENP-E 阻害活性を発現し得る有望な骨格であると同定した。モデル化合物 **H-7'** の EPM 解析から、右環上の N-1 位窒素原子が、左環を含めた母骨格上の電子密度を自身に局在化させており、インドール体と比較して、左環がより好ましい EPM になっている様子が伺える。チエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体での構造活性相関 (Table 2-2) から、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環 5 位への X 基の導入は、脂溶性ポケットの空間占有率を高めることから CENP-E 阻害活性増強に効果的であると考えた。イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環と 5-ブロモ基との組み合わせは (**Br-7'**)、インドール誘導体 (**Br-4'** および **Br-5'**) と比較して、より好ましい EPM を示したため、5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** の合成を実施した。EPM 解析から予想された通り、化合物 **7a** は **6a** と同等の阻害活性を示した ( $IC_{50} = 50$  nM, Table 2-3)。

#### 2.5.4 化合物 **6a** および **7a** の生物評価および物理化学的特性

化合物 **6a** および **7a** の細胞活性および物理化学的特性を Table 2-3 に示す。これら 2 化合物について HeLa 細胞内のリン酸化ヒストン H3 (p-HH3) の集積を FACS を用いて測定した。尚、ヒストン H3 は細胞周期の M 期にのみ特異的にリン酸化されるため、p-HH3 の集積は、細胞分裂の M 期停止状態を表す PD マーカーとして知られている。測定の結果、化合物 **6a** および **7a** はそれぞれ  $EC_{50}$  で 3000 nM および 1540 nM の p-HH3 集積作用を示した。これらの結果は、両化合物が CENP-E 阻害に基づく細胞分裂の停止を HeLa 細胞内で引き起こしていることを示唆している。一方、化合物 **7a** がより強い細胞活性を示す理由を検証するために、物理化学的

特性として膜透過性を測定した。その結果、化合物 **7a** (PAMPA pH 7.4: 353 nm/sec)は **6a** (PAMPA pH 7.4: 41 nm/sec)と比較して高い膜透過性を示した。この大きな膜透過性の改善は、分子の脂溶性の低下 (CLog P: 5.3 vs 5.7)により引き起こされたと推察している。加えて、生理的な条件下でプロトン化されたジメチルアミノ基と、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環 *N*-1 位窒素原子の電子対との分子内水素結合が、膜透過性の改善に寄与している可能性も考えられる (Figure 2-7) <sup>46,47</sup>。これらの結果および考察に基づき、5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** が、更なる新規 CENP-E 阻害薬探索のためのリード化合物として選出された。

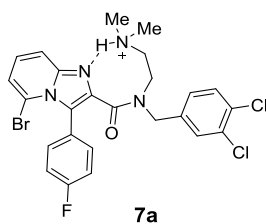


**Figure 2-6.** 水素化あるいはブロモ化されたインドール誘導体 **H-4'**, **H-5'**あるいは **Br-4'**, **Br-5'**、および 5 位水素化あるいは 5 位ブロモ化されたイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **H-7'**あるいは **Br-7'**。

**Table 2-3.** 3-ブロモチエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体 **6a** および 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** に関する特性の比較

Compound	CENP-E IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	p-HH3 <sup>b</sup> EC <sub>50</sub> (nM)	PAMPA (pH 7.4) (nm/sec)	CLogP <sup>c</sup>
<b>6a</b>	32	3000	41	5.7
<b>7a</b>	50	1540	353	5.3

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values are the means of duplicate measurements. <sup>b</sup> % of phosphorylated histone H3-positive cells were detected using FACS caliber (cell cycle was synchronized) (n = 1). <sup>c</sup> calculated partition coefficient to evaluate lipophilicity by ACD version 12.



**Figure 2-7.** 生理的条件下でプロトン化されたジメチルアミノ基とイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環 *N*-1 位窒素原子の電子対との分子内水素結合

## 2.6 結論

本章では、4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボキサミド誘導体 **1b** をリード化合物とし、縮合二環性骨格を有する新規 CENP-E 阻害薬の探索を検討した。CENP-E のホモロジードッキングモデルを活用し、リガンド近傍に位置する Glu186 との相互作用を指向した 2-(ジメチルアミノ)エチル基の母骨格への導入が、CENP-E 阻害活性を顕著に向上させることを見出した。また、鍵となる本構造をアミド側鎖上に転位させることで、効率的な母骨格探索の実施が可能となった。種々の縮合二環性骨格を探索した結果、強力な CENP-E 阻害活性を有する 3-ブロモチエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体 **6a** を見出した。3 位置換チエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体の構造活性相関を理解するにあたり、分子表面の EPM 解析を行い、その比較が阻害活性予測に有用であるということを見出した。この発見を基に、新たにデザインした 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** は、強力な CENP-E 酵素阻害活性 ( $IC_{50} = 50 \text{ nM}$ )を示すとともに、細胞分裂の停止を意味する p-HH3 集積作用 ( $EC_{50} = 1540 \text{ nM}$ )を示した。構築した CENP-E ホモロジーモデルや EPM を用いた解析手法は、CENP-E 阻害薬をデザインする上で有効であることが示された。

### 第3章 CENP-E タンパクの部位特異的変異体解析および新規イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体探索を目的とした静電ポテンシャルマップ (EPM)の応用

#### 3.1 はじめに

更なる化合物の最適化には、第2章で構築したホモロジードッキングモデルの妥当性の検証および精度の向上が求められる。そこで、CENP-E 変異体タンパク質を用いた変異解析試験により、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体の結合サイトの特定を試みた。また、5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** (Figure 3-1)を新たなリードとして、5位置換基の最適化検討にEPMによる解析を応用した。加えて、アミド側鎖ベンジル部位の最適化研究を実施した。本章では、新規イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体のデザイン・合成および生物評価に関して詳細を述べる。

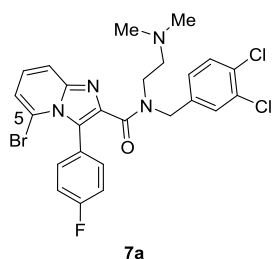


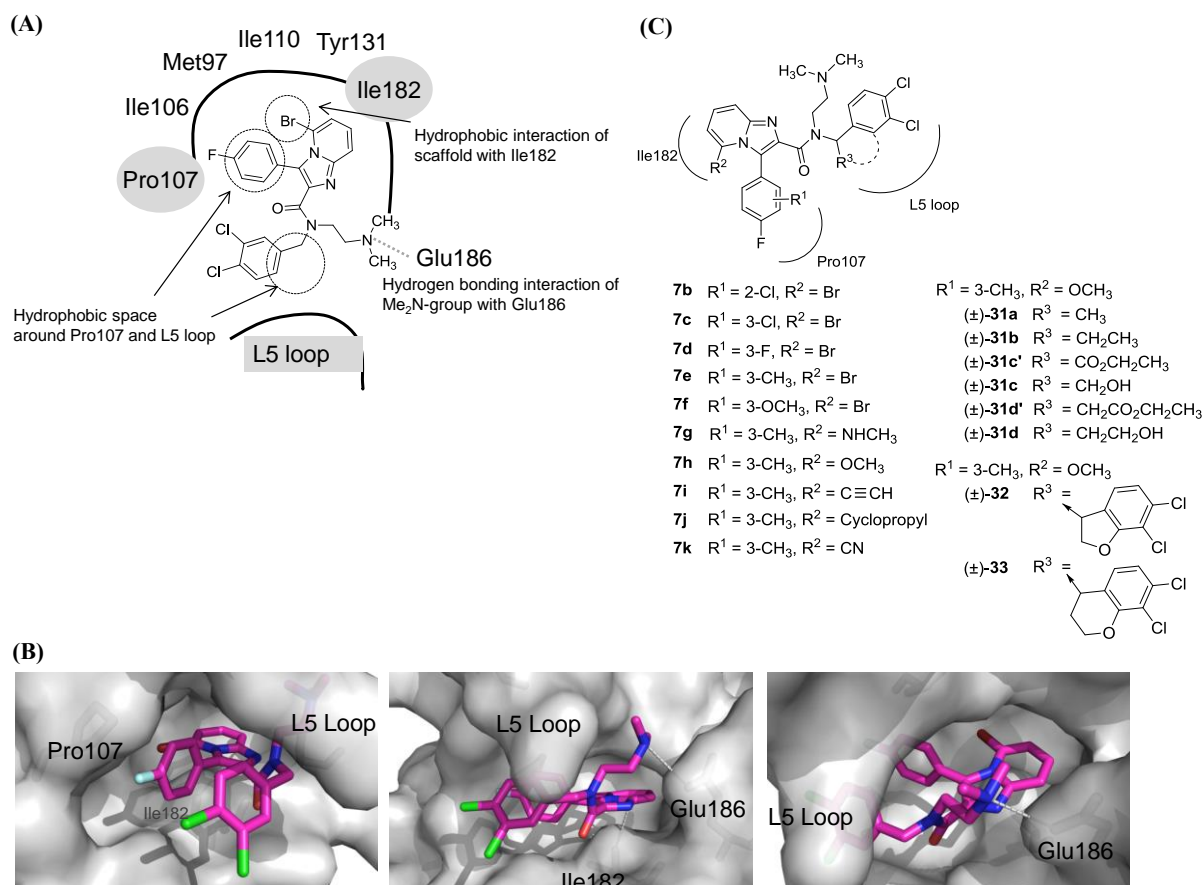
Figure 3-1. リード化合物 **7a** の構造

#### 3.2 化合物デザイン

リード化合物 **7a** の予測され得る CENP-E タンパクへの結合様式を Figure 3-2A および 3-2B に示す。後述する CENP-E 変異体解析試験により、化合物 **7a** は前述の L5 サイトに結合している可能性が高まった。本知見を基に再構築したドッキングモデルは、これまで得られている構造活性相関ともよく一致している。例えば、化合物 **7a** の *N,N*-ジメチルアミノエチル基は、 $\alpha 3$  helix 上の Glu186 と明確に相互作用しており、強力な CENP-E 阻害活性を発現するために重要なファーマコフォアであることが伺える。

さらに、このドッキングモデルは、リガンド結合サイト内の3箇所別のポケットの存在を示唆しており、これらのポケットを効果的に狙った置換基導入・変換が、結合親和性を更に向上させるために有効であると考えた (Figure 3-2C)。3箇所別のポケットを狙った具体的な化合物デザインを次に示す。(1) Pro107 を含む疎水性ポケットとの相互作用獲得を指向した  $R^1$  基の導入、(2) Ile182 を含む疎水性ポケットとの親和性向上を指向したイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン骨格上  $R^2$  基の最適化、(3)  $\alpha 2$  helix および疎水性の L5 loop との親和性獲得を指向した  $R^3$  基の導入。

まず、Pro107 近傍に存在する疎水性ポケットへの置換基挿入を指向し、サイズの小さな置換基  $R^1$  を有する 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7b** (2-クロロ)、**7c** (3-クロロ)、**7d** (3-フルオロ)、**7e** (3-メチル)、**7f** (3-メトキシ)をデザインした。

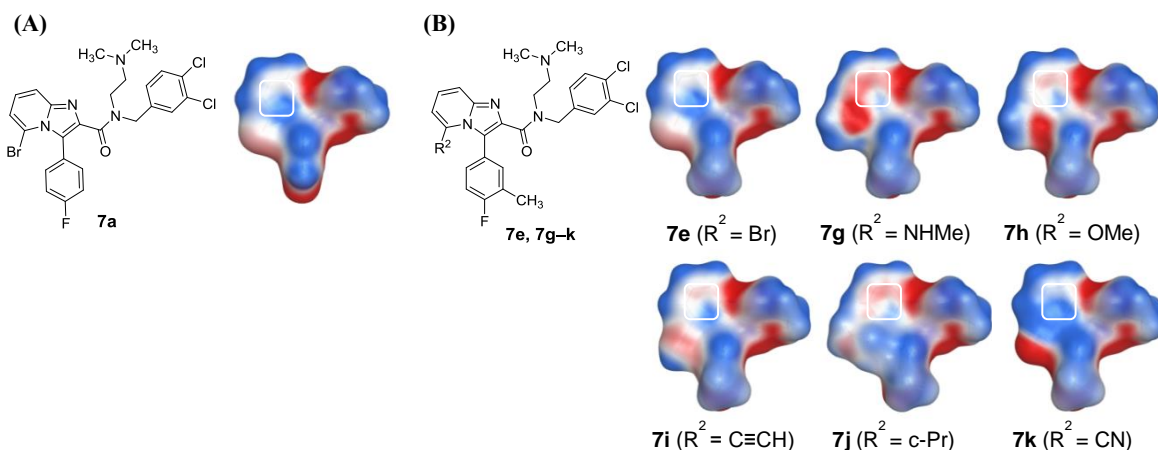


**Figure 3-2.** (A) リード化合物 **7a** の結合様式および CENP-E モーター領域内の標的アミノ酸残基、(B) CENP-E と **7a** の 3D モデル図、(C) 化合物 **7b-f** ( $R^1$ ), **7g-k** ( $R^2$ ) および **31-33** ( $R^3$ ) のデザイン

次に、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン骨格の 5 位置換基  $R^2$  の最適化検討に EPM 解析を適用した。第 2 章 2.5.3 で述べたように、EPM 解析に基づく経験的な考察から、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン左環の電荷状態が阻害活性予測に有用であると考えた。種々の 5 位置換基  $R^2$  を有するイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7e**, **7g-k** をデザインし、EPM 解析を実施した結果、化合物 **7g-j** は **7a** (Figure 3-3A) あるいは **7e** と同様に、縮合ピリジン環部位が中性に近い電荷状態になることが明らかとなった。この考察を基に、これらの化合物は十分な CENP-E 阻害活性を示すと推察した。一方、5-シアノ体 **7k** については、縮合ピリジン環部位は好ましくない正の電荷状態 (青) を示した (Figure 3-3B)。これらの解析に基づき、デザイン化合物の CENP-E 阻害活性は次に示す序列になると予測した：メトキシ (**7h**)、エチニル (**7i**) > シクロプロピル (**7j**)、メチルアミノ (**7g**)、ブromo (**7e**) > シアノ (**7k**)。

最後に、L5 loop との相互作用獲得を指向し、置換基  $R^3$  を導入した化合物 **31** あるいは  $R^3$  位置での環化体 **32** および **33** をデザインした。





**Figure 3-3.** (A) 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** の構造およびEPM (EPMは、簡易化したジメチルアミド体に対して計算し、ピリジン環部位を白枠で示した)、(B) 種々の5位置置換基を有するイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7e** および **7g-k** のEPM

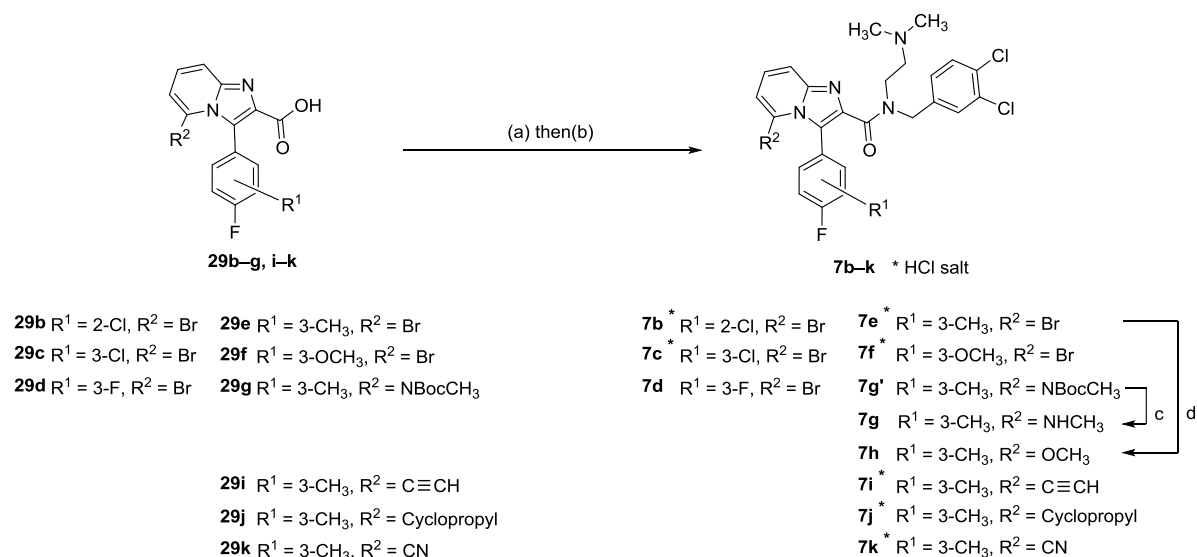
### 3.3 合成

イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボキサミド **7b-k** の合成法を Scheme 3-1 に示す。イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボン酸 **29b-g** および **29i-k** (Scheme 3-2)を、アミン **10** との縮合反応に付すことで、対応する2-カルボキサミド体 **7b-f**, **7g'** および **7i-k** を得た。なお、油状化合物はそれぞれ塩酸を作用させることで、対応する塩酸塩 (固体)へと変換した (**7b**, **7c**, **7e**, **7f** および **7i-k**)。Boc 保護されたメチルアミノ体 **7g'**は、TFAによる脱保護反応により目的の5-メチルアミノ誘導体 **7g** へと71%の収率で導いた。5-ブロモ基 (**7e**)のメトキシ基への変換は、ナトリウム メトキシドを作用させることで達成でき、目的の化合物 **7h** が49%の収率で得られた。

イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボン酸 **29b-g** および **29i-k** の合成法を Scheme 3-2 に示す。 $\beta$ -クロロ- $\alpha$ -ケトエステル中間体 **27c-f** は、塩基存在下、対応するベンズアルデヒド **26c-f** およびジクロロ酢酸メチルを原料として Darzens 反応<sup>43</sup>の条件に付すことで合成した。続いて、 $\beta$ -クロロ- $\alpha$ -ケトエステル **27d**, **27e** と市販の2-アミノ-6-ブロモピリジンをエタノール中、加熱還流することでイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボキシラート<sup>42</sup>**28e**を24%の収率で (**26e** から 2 steps)、**28d**を19%の収率で得た。2-クロロ-4-フルオロベンズアルデヒド **26b**をジクロロ酢酸メチルと Darzens 反応<sup>43</sup>の条件に付した際、メチル 2-クロロ-3-(2-クロロ-4-フルオロフェニル)オキシラン-2-カルボキシラート **27b'**が安定な中間体として単離された。得られた **27b'**は臭化マグネシウムと作用させることでマグネシウムがルイス酸様に働き  $\beta$ -ブロモ- $\alpha$ -ケトエステル **27b** へと変換された。続いて、**27b** と2-アミノ-6-ブロモピリジンをエタノール中加熱還流することで、目的の化合物 **28b**を15%の収率 (3 steps)で得た。環化反応時に溶媒としてエタノールを使用したため、メチルエステルの一部がエステル交換し、メチルエステルとエチルエステルの混合物 **28c/30c**, **28f/30f**, **28g'/30g'**, **28j/30j** が得られた。エステル混合物 **28c/30c**,

**28f/30f** および **28j/30j** は通常の加水分解反応により、対応するカルボン酸体 **29c**, **29f** および **29j** へ 13–29%の収率 (3 steps)で変換された。混合物 **28g'/30g'**は、ヨウ化メチルとの反応により *N*-メチル体 **28g/30g** とし (収率 85%)、続く加水分解反応により目的のカルボン酸体 **29g** へと導いた。他のエステル体 **28b**, **28d** および **28e** の加水分解反応により、それぞれ対応するカルボン酸体 **29b**, **29d** および **29e** を 71–98%の収率で得た。

**Scheme 3-1<sup>a</sup>**. イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボキサミド誘導体 **7b–k** の合成



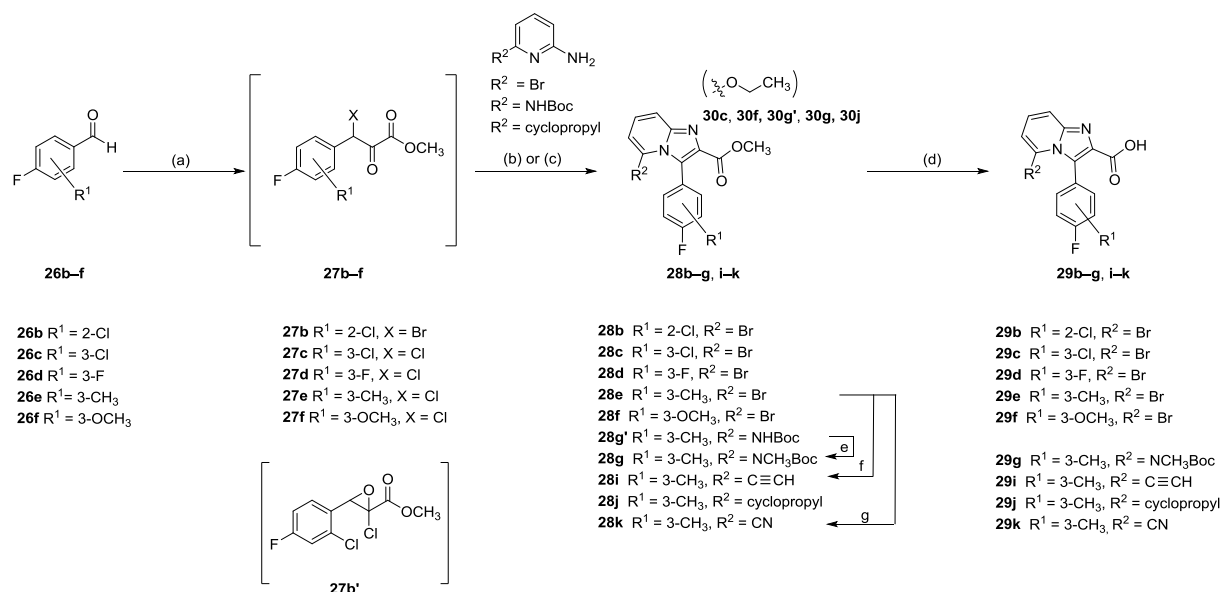
<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) *N'*-(3,4-ジクロロベンジル)-*N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **10**, HATU, 塩基, 71% for **7d** and 16% for **7g'** from **26e**; (b) 4M HCl / EtOAc, 38–83% for **7b**, **7c**, **7e**, **7f** and **7i–k**; (c) TFA, room temp, 1 h, 次いで 4M HCl in EtOAc 71%; (d) NaOMe, DMF, room temp, 12 h, 49%.

5-ブロモ体 **28e** は中間体としても有用であり、Pd 触媒を用いたトリブチル (エチニル) スタンナンとの Stille カップリング反応<sup>48</sup>によりエチニル体 **28i** を 18%の収率で得た。また、ブロモ基のシアノ基への変換は、Pd 触媒およびシアン化銅 (I)により達成され、目的の 5-シアノ体 **28k** を 32%の収率で得た。エステル体 **28i** および **28k** を加水分解することで、対応するカルボン酸体 **29i** および **29k** を 69–94%の収率で得た。

ベンジル位に種々の置換基を有する 5-メトキシイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボキサミド誘導体 **31a–d** および **32–34** の合成法を Scheme 3-3 に示す。3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-5-メトキシイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボン酸 **35** (Scheme 3-4)と種々のジアミン (市販の (±)-**36a** および (±)-**36b**, 合成した (±)-**36c**, (±)-**36d** および (±)-**37–39** (Scheme 3-5))との縮合反応により、ラセミ化合物の 2-カルボキサミド体 **31a**, **31b**, **31c'**, **31d'** および **32–34** を 45–88%の収率で得た。アミド基の還元を避けるために、テトラヒドロホウ酸ナトリウムと塩化カルシウムを用いて (±)-**31c'** および (±)-**31d'** のエステル基を還元し、目的のヒドロキシメチル体 (±)-**31c**、ヒドロキシエチル体 (±)-**31d** をそれぞれ 29% および 12%の収率で得た。キラル分取による光学分割を行い、ラセミ化合物 **31a**, **31b**, **32–34** から、それぞれ対応する (+)-および (-)-

エナンチオマーを取得した。

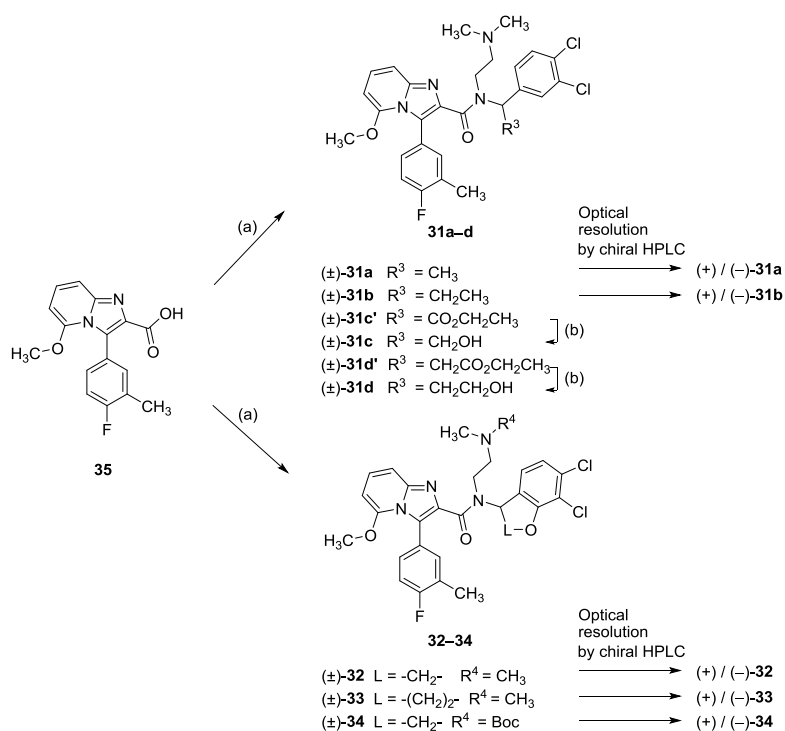
**Scheme 3-2<sup>a</sup>**. イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボン酸 **29b-g** および **29i-k** の合成



<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) ジクロロ酢酸メチル, NaOMe or NaO<sup>t</sup>Bu, THF; (b) 2-アミノ-6-置換ピリジン, EtOH, 還流, 4 h, 24% in 2 steps (**28e** from **26e**), 19% (**28d** from **27d**); (c) MgBr<sub>2</sub>, THF, 80 °C, 0.5 h, 次いで 2-アミノ-6-ブロモピリジン, EtOH, 還流, 終夜, 15% in 3 steps (**28b**); (d) 2 M LiOH or 2 M NaOH, THF, MeOH or EtOH, 40–65 °C, 0.5–4 h, 69–98% (**29b**, **29d**, **29e**, **29i**, **29k**), 13–29% in 3 steps (**29c**, **29f** and **29j**); (e) MeI, NaH, THF, room temp, 1 h, 85%; (f) トリブチル (エチニル) スタンナン, PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DME, H<sub>2</sub>O, 100 °C, 16 h, 18%; (g) CuCN, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, dppf, シクロペンチル メチル エーテル, 還流, 20 h, 32%.

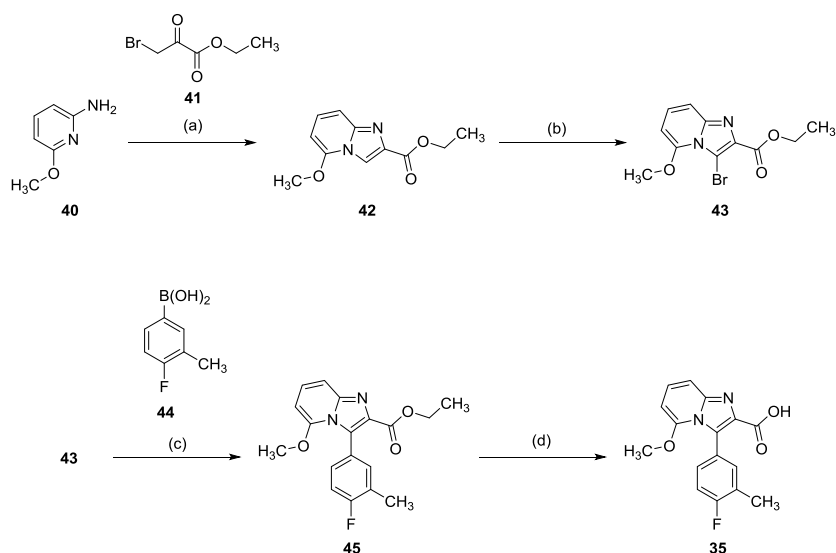
カルボン酸体 **35** の合成を Scheme 3-4 に示す。市販の 2-アミノ-6-メトキシピリジン **40** をエチル 3-ブロモ-2-オキソプロパノアート **41** とエタノール中 40 °C で作用させ、同温度を維持することで目的のイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン エステル体 **42** を 52% の収率で得た。反応温度が 40 °C を越えると系内で発生した臭化水素により、予期せぬ 5-メトキシ基の脱メチル化が進行した。このため、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環形成時の反応温度を 40 °C に維持することが非常に重要であった。次に、化合物 **42** に NBS を作用させることで、3-ブロモ体 **43** を 96% の収率で得た。得られた **43** と 4-フルオロ-3-メチルフェニルボロン酸 **44** との Suzuki–Miyaura カップリング反応<sup>37,38</sup> によりエステル体 **45** を 89% の収率で得た。続く加水分解反応により目的のカルボン酸体 **35** を 74% の収率で得た。

**Scheme 3-3<sup>a</sup>.** ベンジル位に種々の置換基 R<sup>3</sup> あるいは L を有する 5-メトキシイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボキサミド誘導体 **31a-d**, **32-34** の合成



<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) ジアミン誘導体(±)-**36a-d**, **37-39**, HATU, 塩基, 溶媒, (HCl), 45–88%; (b) CaCl<sub>2</sub>, NaBH<sub>4</sub>, EtOH, THF, room temp, 0.3 h, 次いで 0 °C, 0.7 h, 12–29%.

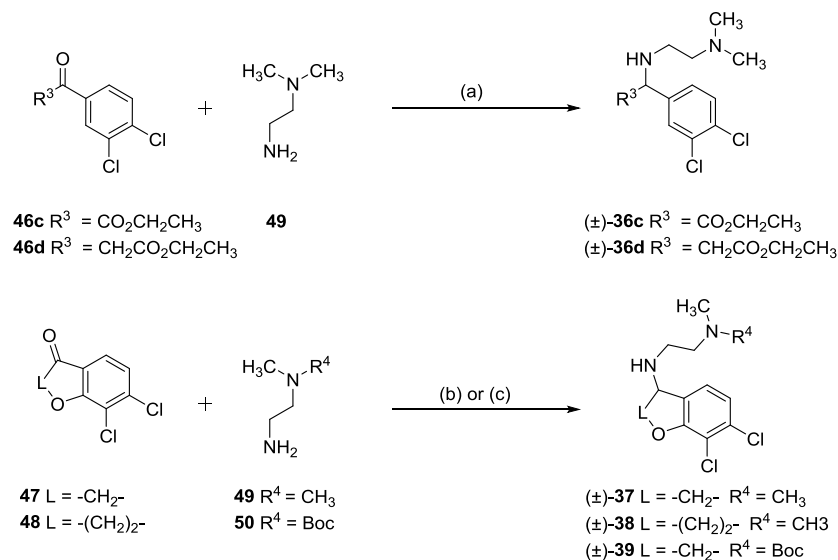
**Scheme 3-4<sup>a</sup>.** 3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-5-メトキシイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボン酸 **35** の合成



<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) EtOH, 40 °C, 14 h, 52%; (b) NBS, DMF, room temp, 1 h, 96%; (c) PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DME, H<sub>2</sub>O, 90 °C, 1.5 h, 89%; (d) 2 M NaOH, THF, MeOH, room temp, 8 h, 74%.

ジアミン中間体(±)-**36c**、(±)-**36d** および(±)-**37-39** の合成法を Scheme 3-5 に示す。市販のケトン **46c**、**46d**、**47** および **48** と *N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **49** あるいは *tert*-ブチル (2-アミノエチル)メチルカルバマート **50** との還元的アミノ化反応により(±)-**36c**、(±)-**36d** および(±)-**37-39** を 4-59%の収率で得た。

**Scheme 3-5<sup>a</sup>**. ジアミン誘導体(±)-**36c**, **36d** および **37-39** の合成

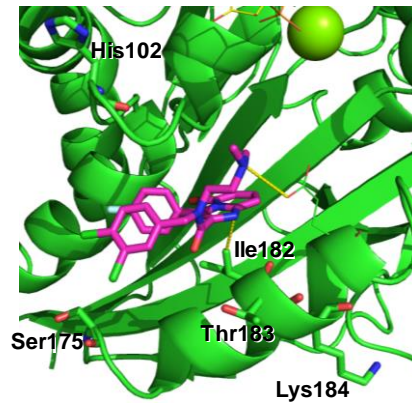


<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) AcOH, EtOH, room temp, 1.5 h, 次いで NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C, 1 h 次いで room temp, 0.5 h, 5% for **36c**, 4% for **36d**; (b) AcOH, THF, MeOH, room temp, 1 h 次いで 50 °C, 2 h, 次いでボラン-2-ピコリン錯体, room temp, 14 h, 46% for **37**, 59% for **38**; (c) AcOH, THF, MeOH, NaBH<sub>3</sub>CN, 50 °C, 18 h, 24% for **39**.

### 3.4 生物評価の結果と考察

#### 3.4.1 CENP-E タンパクの部位特異的変異体解析試験によるリガント結合サイトの特定

第2章でも述べたように、著者は Eg5 タンパクと低分子との結晶情報を基に CENP-E ホモロジーモデルを構築し、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体に関しても L5 サイトに結合していると推察している (Figure 3-4)。CENP-E ホモロジーモデルの妥当性を確認するために、CENP-E モーター領域において部位特異的変異体解析試験を実施した。アラニンスキニング法<sup>49</sup>は、結合部位特定を目的にしばしば利用されるが、必ずしもいつも有効であるとは限らない。その理由は、変異体タンパクの3次構造が崩壊し、酵素機能も消失してしまうというケースが時折見られるからである。



**Figure 3-4.** 化合物 **7a** のドッキングモデル (PyMOL)および CENP-E の L5 サイトにおいて種差のあるアミノ酸残基 (His102, Ser175, Ile182, Thr183, Lys184).

一方、種差間のアミノ酸置換は酵素活性を維持する可能性が高いため、種差のあるアミノ酸残基は、部位特異的変異体解析の理想的なターゲットになり得ると考えた。ヒトおよびマウス CENP-E<sup>50</sup> のアミノ酸配列を比較し (Figure 3-5)、L5 サイトにおいて種差のある 5 残基を選択した (His102 (Cys)、Ser175 (Ala)、Ile182 (Leu)、Thr183 (Ala)、Lys184 (Thr)、マウスのアミノ酸残基は括弧内に記載)。

ドッキングモデルによると、これら 5 つのターゲットの中でも  $\alpha 3$  helix 上の Ile182 は、化合物 **7a** と疎水性相互作用を形成している可能性が高いため、最も有望なターゲットであると考えた。一方、同様に  $\alpha 3$  helix 上に位置する Thr183 の側鎖は、予想され得る結合サイトの外側を向いており、化合物 **7a** との直接的な相互作用は期待できない。そのため Ile182 との対照実験用に最適であると考えた。これらの考察を基に、2 種類の変異体ヒト CENP-E<sup>I182L</sup> およびヒト CENP-E<sup>T183A</sup> を調製した。期待した通り、種差間のアミノ酸置換は酵素活性を消失させることなく、野生型と匹敵する ATPase 活性を示した。調製した変異体 (CENP-E<sup>I182L</sup>、CENP-E<sup>T183A</sup>) および野生型に対する化合物 **7a** の ATPase 阻害活性を評価した (Table 3-1)。化合物 **7a** の CENP-E<sup>I182L</sup> に対する阻害活性は、野生型 CENP-E (WT) に対する阻害活性と比較して 12.6 倍減弱した。一方、CENP-E<sup>T183A</sup> を用いた場合の減弱は 2.4 倍に留まった。これらの結果は、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体が L5 サイト内の Ile182 を含む疎水性ポケットに結合していることを強く示唆しており、構築したホモロジーモデルは妥当であると判断した。

	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70		71	72	73	74	75	76	77	78	79	80		81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Human	N	V	Y	E	E	I	A	A	P	I		I	D	S	A	I	Q	G	Y	N	G		T	I	F	A	Y	G	Q	T	A	S
Mouse	N	V	Y	E	E	I	A	V	P	I		I	S	S	A	I	Q	G	Y	N	G		T	I	F	A	Y	G	Q	T	A	S
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100		101	102	103	104	105	106	107	108	109	110		111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Human	G	K	T	Y	T	M	M	G	S	E		D	H	L	G	V	I	P	R	A	I		H	D	I	F	Q	K	I	K	K	F
Mouse	G	K	T	H	T	M	M	G	S	E		D	C	L	G	V	I	P	R	A	I		H	D	I	F	Q	R	I	K	K	F
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130		131	132	133	134	135	136	137	138	139	140		141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
Human	P	D	R	E	F	L	L	R	V	S		Y	M	E	I	Y	N	E	T	I	T		D	L	L	C	G	T	Q	K	M	K
Mouse	P	E	R	E	F	L	L	R	V	S		Y	M	E	I	Y	N	E	T	I	T		D	L	L	C	N	A	Q	K	M	K
	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160		161	162	163	164	165	166	167	168	169	170		171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Human	P	L	I	I	R	E	D	V	N	R		N	V	Y	V	A	D	L	T	E	E		V	V	Y	T	S	E	M	A	L	K
Mouse	P	L	I	I	R	E	D	T	N	R		T	V	Y	V	S	D	L	T	E	E		V	V	Y	T	A	E	M	A	L	K
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190		191	192	193	194	195	196	197	198	199	200		201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
Human	W	I	T	K	G	E	K	S	R	H		Y	G	E	T	K	M	N	Q	R	S		S	R	S	H	T	I	F	R	M	I
Mouse	W	L	A	T	G	E	K	N	R	H		Y	G	I	T	K	M	N	Q	R	S		S	R	S	H	T	I	F	R	M	I

Figure 3-5. ヒトおよびマウス CENP-E のアミノ酸配列比較

Table 3-1. 化合物 **7a** の変異体 CENP-Es<sup>I182L</sup> and <sup>T183A</sup> と野生型 CENP-E に対する阻害活性の比較

Compound	Reduction ratio of IC <sub>50</sub> s for ATPase activity	
	based on CENP-E <sup>WT</sup>	
	CENP-E <sup>I182L</sup>	CENP-E <sup>T183A</sup>
<b>7a</b>	12.6 (150 / 12) <sup>a</sup>	2.4 (30 / 12) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Values shown as IC<sub>50</sub> ratio for mutant and wild-type with IC<sub>50</sub> values given in parenthesis (mutant CENP-E / WT CENP-E). The IC<sub>50</sub> values with inhibitor compounds could be measured under similar ATP concentrations to that used in the CENP-E (WT) assay, wherein the ATP concentration (24.7 μM) was set near the K<sub>m</sub> value.

### 3.4.2 ペンダントフェニル環上の置換基 R<sup>1</sup> の構造活性相関

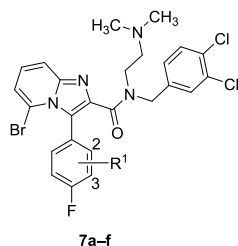
ドッキングモデルによると、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環 3 位のペンダントフェニルは Pro107 近傍の疎水性ポケットに結合していると予想される。この疎水性ポケットとの更なる効果的な相互作用を指向し、種々の置換基 R<sup>1</sup> を有する 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7b-f** をデザインした。これら化合物の CENP-E 阻害活性を Table 3-2 に示す。導入した置換基の影響でペンダントフェニル部位のコンフォメーションが異なると推測される化合物 **7b** (R<sup>1</sup> = 2-Cl) は **7a** (R<sup>1</sup> = H) と比較して大幅に減弱した阻害活性を示した (IC<sub>50</sub> = 7900 nM)。一方、ペンダントフェニル環 3 位へのクロロ基の導入は活性向上に有効であり、**7c** (R<sup>1</sup> = 3-Cl) の活性は **7a** よりも 3 倍向上した (IC<sub>50</sub> = 15 nM)。同様に、3-F (**7d**) および 3-CH<sub>3</sub> (**7e**) 体も阻害活性の向上を示した (IC<sub>50</sub> = 28 nM, 22 nM)。3-OMe 基を有する化合物 **7f** は、他の 3 位置換体と比較して、減弱した阻害活性を示した (IC<sub>50</sub> = 82 nM)。これらの結果は、ペンダントフェニル環 3 位の置換基 3-Cl (**7c**)、3-F (**7d**) および 3-Me (**7e**) が、Pro107 を含む疎水性ポケットを適切に占有し

ていることを示唆している。一方、**7f** (3-OMe)における活性の減弱は、ペンダントフェニル環上の置換基とタンパクとの立体障害が原因であると推察される (Figure 3-2B)。

次に、p-HH3の集積を指標に、これらデザイン化合物の細胞活性を評価した (Table 3-2)。予想とは異なり、3-CH<sub>3</sub>体**7e**のみが顕著な細胞活性を有し、同等の酵素阻害活性を持つ3-Cl体**7c**と比較して2.6倍強力な細胞活性を示した。一般的に、細胞内のATP濃度は約1 mMと高濃度であることが知られている。そこで、化合物**7e** (3-Me)および**7c** (3-Cl)の細胞活性の差異を理解するために、高濃度ATP (500 μM)存在下における、**7e**および**7c**のATPase阻害活性を測定した。前述の細胞活性の評価結果と一致して、高濃度ATP存在下では、**7e** (7.6 nM)の方が**7c** (14 nM)よりも低いIC<sub>50</sub>値を示した (Table 3-2)。これらの結果に基づき、3-CH<sub>3</sub>体**7e**は無細胞条件下および細胞条件下の両方において3-Cl体**7c**よりも強力なCENP-E阻害活性を有すると結論付けた。



**Table 3-2.** 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a-f** のペンダントフェニル環上の置換基 R<sup>1</sup>に関する構造活性相関



Compound	R <sup>1</sup>	CENP-E <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (nM)		p-HH3 <sup>d</sup> EC <sub>50</sub> (nM)
		25 μM ATP <sup>b</sup>	500 μM ATP <sup>b,c</sup>	
<b>7a</b>	H	50 (24–110)		1540 <sup>e</sup>
<b>7b</b>	2-Cl	7900 (4500–14000)		>3000 <sup>f</sup>
<b>7c</b>	3-Cl	15 (9.9–23)	14 (8.3–24)	1650 <sup>f</sup>
<b>7d</b>	3-F	28 (19–41)		1210 <sup>f</sup>
<b>7e</b>	3-CH <sub>3</sub>	22 (17–29)	7.6 (5.0–12)	636 <sup>f</sup>
<b>7f</b>	3-OCH <sub>3</sub>	82 (58–120)		1270 <sup>f</sup>

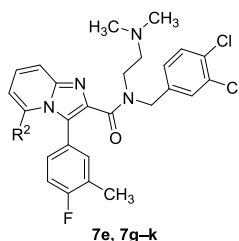
<sup>a</sup> n = 2. 95% Confidence interval (CI) value. <sup>b</sup> ATP concentration used in ATPase assay. <sup>c</sup> Prior to catalytic initiation with 500 μM ATP, compound and enzyme were incubated for 1h at room temp (pre-incubation). <sup>d</sup> % of phosphorylated histone H3 positive cells was detected using FACS (n = 1). <sup>e</sup> Cell cycle synchronized cells were used. <sup>f</sup> Asynchronous cells were used.

### 3.4.3 イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環上の5位置換基 R<sup>2</sup>の構造活性相関

化合物 **7g-k** の CENP-E 阻害活性 (IC<sub>50</sub>)および HeLa 細胞増殖阻害活性 (GI<sub>50</sub>)を評価した (Table 3-3)。期待した通り、これら化合物の CENP-E 阻害活性の相対的な序列は、EPM による予測 (Figure 3-3B)と概ね一致していた。5-NHCH<sub>3</sub> (**7g**)あるいは5-OCH<sub>3</sub> (**7h**)基のような電子供与性基の導入は、CENP-E 阻害活性の増強効果をもたらした。特に、化合物 **7h** (IC<sub>50</sub> = 1.0 nM) の EPM は好ましい中性電荷を示しており、僅かに正電荷を帯びている 5-Br 体 **7e** (22 nM)と比較して 22 倍もの活性向上を示した。5-エチニル (**7i**) あるいは5-シクロプロピル (**7j**) 基については、母核左環上が好ましい中性電荷を帯びている **7i** (IC<sub>50</sub> = 5.7 nM)が、僅かに負電荷を帯

びている **7j** (17 nM)よりも強力な阻害活性を示した。一方、5-CN 体 **7k** の母核左環は強い正電荷を帯びており、これを反映して減弱した阻害活性を示した (83 nM)。このように、EPM 解析を用いた CENP-E 阻害活性の予測は、R<sup>2</sup> 基を最適化するための実用的かつ効率的な手法であると分かった。EPM 解析は、電子求引性の 5-Br 基を電子供与性の 5-OCH<sub>3</sub> 基へと変換する大きな動機付けとなっており、**7h** を効率的に見出すことに大きく貢献した。強力な CENP-E 阻害活性を反映して、**7h** は有意な HeLa 細胞増殖阻害活性を示した (GI<sub>50</sub> = 240 nM)。

**Table 3-3.** イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7e** および **7g-k** の 5 位置換基 R<sup>2</sup> の構造活性相関



Compound	R <sup>2</sup>	CENP-E <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (nM)	Cell (HeLa) <sup>b</sup> GI <sub>50</sub> (nM)
<b>7e</b>	Br	22 (17–29)	2700
<b>7g</b>	NHCH <sub>3</sub>	9.2 (8.1–10)	810
<b>7h</b>	OCH <sub>3</sub>	1.0 (0.84–1.2)	240
<b>7i</b>	←≡—H	5.7 (4.5–7.3)	460
<b>7j</b>	←◻	17 (12–25)	1800
<b>7k</b>	CN	83 (58–120)	N.D. <sup>c</sup>

<sup>a</sup> n = 2. 95% Confidence interval (CI) value. <sup>b</sup> Cell proliferation of HeLa cells was determined by cellular ATP content (n = 1). Cells collected 3 days after drug treatment. <sup>c</sup> Not determined.

#### 3.4.4 ベンジル部位と L5 loop との効果的な相互作用獲得を指向した置換基 R<sup>3</sup> および L の構造活性相関

化合物 **7h** は強力な *in vitro* 細胞活性を示したにも関わらず、体内動態が乏しいことも起因し *in vivo* において十分な効果を示さなかった (データ未記載)。そこで、更なる活性の増強を目指し、**7h** のベンジル位への化学修飾を検討した。ベンジル位に種々の置換基 R<sup>3</sup> および L を有する 5-メトキシイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体に関する生物評価の結果を Table 3-4 に示す。メチル ((±)-**31a**)あるいはエチル ((±)-**31b**)基の導入により、CENP-E 阻害活性と細胞活性

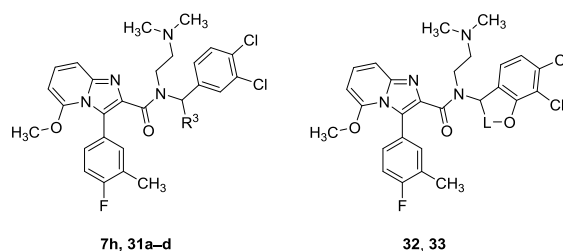
がともに減弱した。注目すべき事は、**31a** あるいは **31b** のエナンチオマー間で、活性の差が認められなかった事である。その他の置換基としてヒドロキシメチル (**(±)-31c**)およびヒドロキシエチル (**(±)-31d**)基の導入も同様に、活性を減弱する結果となった。

次に、ベンジル位における環形成は、構造的に固定された二環式構造を与え、これにより L5 loop 近傍の結合サイトとより効果的に相互作用できるのではないかと考えた。期待した通り、ジヒドロベンゾフラン誘導体の eutomer (+)-**32** (CENP-E IC<sub>50</sub> = 3.6 nM, GI<sub>50</sub> = 130 nM)およびジヒドロベンゾピラン誘導体の eutomer (+)-**33** (CENP-E IC<sub>50</sub> = 9.0 nM, GI<sub>50</sub> = 190 nM)は、1桁 nM の CENP-E 阻害活性を示すとともに、**7h** (GI<sub>50</sub> = 240 nM)と比較して僅かに向上した細胞活性を示した。興味深い事に、これら化合物の distomer (-)-**32** および(-)-**33** は、対応する eutomer と比較して大幅に減弱した CENP-E 阻害活性を示した。特に、化合物(+)-**32** (IC<sub>50</sub> = 3.6 nM)は、(-)-**32** (IC<sub>50</sub> = 2300 nM)よりも 640 倍強力な活性を示しており、これは(+)-**32** の構造的に固定された二環性部位と L5 loop 近傍のポケットとの間に、非常に特異的な相互作用が存在する事を示唆している。化合物(+)-**32** は、強力な抗増殖活性 (GI<sub>50</sub> = 130 nM)を示すとともに、有意な p-HH3 の集積作用 (EC<sub>50</sub> = 180 nM)も示したことから、更なる生物評価を実施することとした (3.4.7 項)。

#### 3.4.5 化合物(+)-**32** の絶対配置の決定

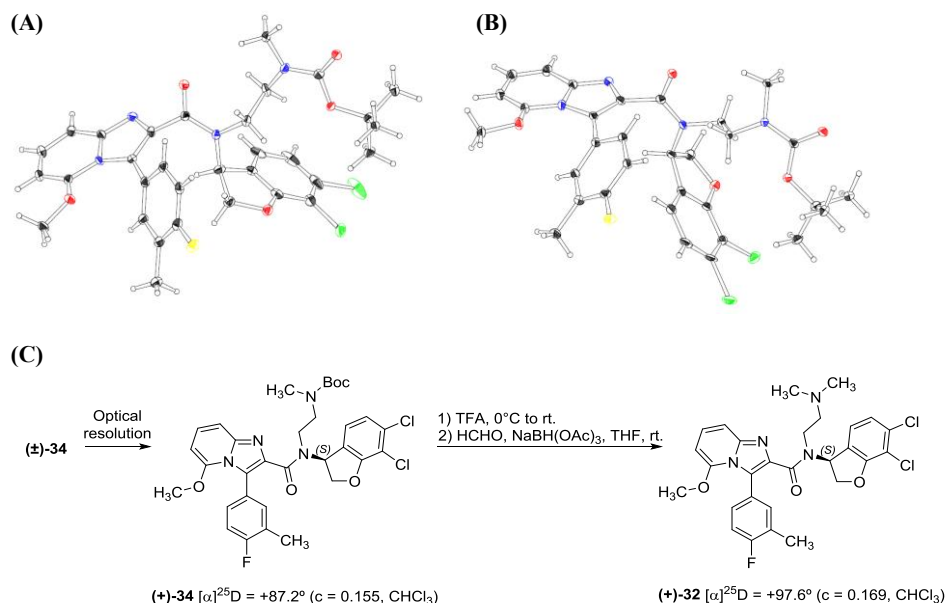
Eutomer (+)-**32** の絶対配置を決定するために、(+)-**32** の単結晶取得を試みたが、フリー体 (+)-**32** はアモルファス状の固体であり、単結晶を取得することは出来なかった。さらに、(+)-**32** に種々の酸 (マンデル酸、ジベンズイル-L-酒石酸、*p*-トルエンスルホン酸、(+)-タルトラニル酸、L-乳酸)を作用させ塩形成させた後、単結晶の取得を試みたが、フリー体と同様、その取得には至らなかった。次に、(+)-**32** 自身の結晶化は困難であると判断し、類縁体である Boc 体(+)-**34** および(-)-**34** の結晶化を検討した。溶媒検討の結果、それぞれの光学異性体はジイソプロピルエーテル / 酢酸エチル (5 / 1 容量比)から結晶化し、板状の単結晶を与えた。X 線結晶解析の結果、(+)-**34** および(-)-**34** の絶対配置はそれぞれ(*S*)および(*R*)であることが明らかとなった (Figure 3-6A および 3-6B)。Boc 体(+)-(*S*)-**34** に TFA を作用させることで Boc 基を除去し、続いてアミノ基をメチル化することで(+)-**32** に導いた。この時得られた(+)-**32** の旋光度 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +97.6^\circ$  ( $c = 0.169$ , CHCl<sub>3</sub>))は、別法で合成した基準試料である(+)-**32** の旋光度 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +101.0^\circ$  ( $c = 0.231$ , CHCl<sub>3</sub>))と一致した。これらの結果より、(+)-**32** の絶対配置は(*S*)であると決定した (Figure 3-6C)。

**Table 3-4.** 5-メトキシイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7h**, **31a–d**, **32** および **33** のベンジル位置換基 ( $R^3$  および L)に関する構造活性相関



Compound	$R^3$	L	CENP-E <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (nM)	Cell (HeLa) <sup>b</sup> GI <sub>50</sub> (nM)
<b>7h</b>	H		1.0 (0.84–1.2)	240
(±)- <b>31a</b>			10 (8.7–12)	820
(+)- <b>31a</b>	CH <sub>3</sub>		5.7 (3.7–8.8)	N.D. <sup>c</sup>
(-)- <b>31a</b>			9.5 (6.9–13)	N.D. <sup>c</sup>
(±)- <b>31b</b>			16 (15–18)	N.D. <sup>c</sup>
(+)- <b>31b</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		10 (8.7–12)	1900
(-)- <b>31b</b>			19 (15–23)	1600
(±)- <b>31c</b>	CH <sub>2</sub> OH		7.1 (4.9–10)	810
(±)- <b>31d</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH		18 (14–22)	810
(±)- <b>32</b>			4.8 (3.1–7.5)	270
(+)- <b>32</b>		-(CH <sub>2</sub> )-	3.6 (3.1–4.2)	130
(-)- <b>32</b>			2300 (1800–2900)	>3000
(±)- <b>33</b>			14 (12–16)	390
(+)- <b>33</b>		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	9.0 (7.7–11)	190
(-)- <b>33</b>			71 (43–110)	1400

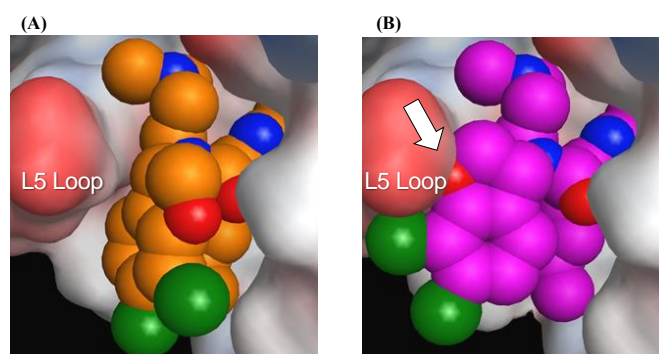
<sup>a</sup> n = 2. 95% Confidence interval (CI) value. <sup>b</sup> Cell proliferation of HeLa cells was determined by cellular ATP amounts (n = 1). Cells collected at 3 days after drug treatment. <sup>c</sup> Not determined.



**Figure 3-6.** (A) 化合物(+)-(S)-34 の ORTEP 図、(B) 化合物(-)-(R)-34 の ORTEP 図 (Displacement ellipsoids are drawn at the 20% probability level)、(C) 化合物(+)-34 を用いた(+)-32 の合成

### 3.4.6 Eutomer (+)-(S)-32 および distomer (-)-(R)-32 のドッキングモデルを用いた考察

Eutomer (+)-(S)-32 および distomer (-)-(R)-32 の CENP-E 阻害活性の差異を説明するために、ホモロジーモデルを使って両者の結合状態を比較検証した。その結果、(S)配置の場合、ジクロロベンゼン環は L5 loop 上のアミノ酸残基 Glu100 の側鎖カルボン酸近傍に結合しており、タンパクとの衝突もなく、効果的な相互作用を生み出しているように推察された (Figure 3-7A)。一方、(R)配置の場合、ジヒドロベンゾフラン部位が L5 loop と衝突するため、結合サイトとの相互作用を十分に獲得できないと推察された (Figure 3-7B)。このようにベンジル位における二環式構造は固定化された分子構造を与え、結果として生じる 2 種類のエナンチオマーは CENP-E の L5 サイトにより明確に区別されることが明らかとなった。



**Figure 3-7.** Eutomer および distomer の L5 loop 周辺でのドッキングモデル図 (MOE<sup>45</sup>, version 2011.10) (A) eutomer (+)-(S)-32、(B) distomer (-)-(R)-32 (ジヒドロベンゾフラン部位と L5 loop との立体反発を白矢印で指し示した。)

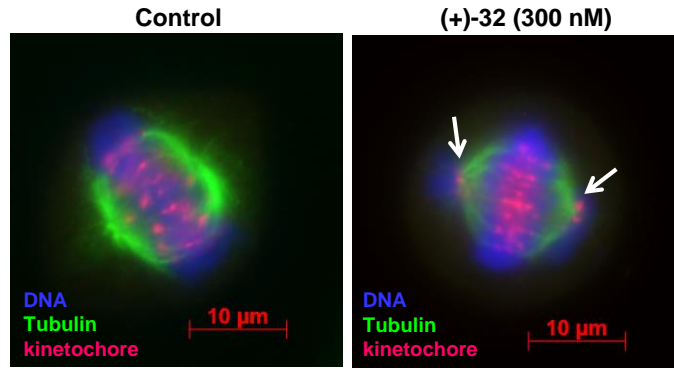
### 3.4.7 代表化合物(+)-(S)-32 の生物評価

代表化合物(+)-(S)-32 について、他のキネシンタンパク Eg5 および kinesin heavy chain (KHC) に対する作用を評価した結果、顕著な阻害活性は認められなかった (Eg5 および KHC IC<sub>50</sub> >10000 nM)。さらに、(+)-(S)-32 は、36 種のキナーゼタンパク (Table 3-5)に対しても目立った阻害活性を示さなかった (IC<sub>50</sub> > 1000 nM)。このことから、(+)-(S)-32 はおそらく高選択的な CENP-E 阻害薬であると考えられる。

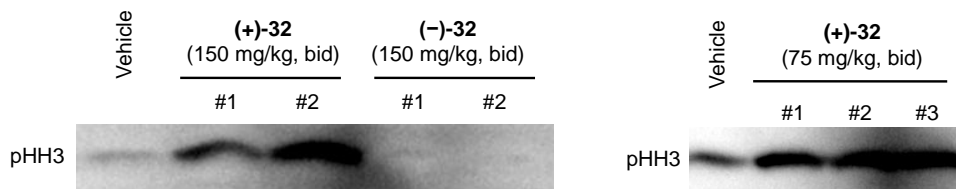
次に、細胞分裂の停止を示す細胞内表現型を確認するために免疫蛍光分析を実施した。300 nM の(+)-(S)-32 を HeLa 細胞に作用させた結果、強力な酵素阻害活性を反映して、染色体の不整列が観測された (Figure 3-8)。この現象は、長期に渡る分裂停止期間内の p-HH3 の集積作用 (EC<sub>50</sub> = 180 nM)とも相関しており、これらが契機となって抗増殖作用 (GI<sub>50</sub> = 130 nM、Table 3-4)が発現すると考えられる。p-HH3 の集積レベルは、*in vivo* PD マーカーとしても使用することができ、(+)-(S)-32 および(-)-(R)-32 による p-HH3 レベルの変動を、腫瘍異種移植モデルを用いてウェスタンブロット法により測定した。ヒト大腸癌由来細胞株 Colo205 異種移植マウスモデルに対し (+)-(S)-32 あるいは(-)-(R)-32 を、それぞれ 150 mg/kg の投与量で 1 日 2 回 (bid.)腹腔内 (ip.)投与したところ、eutmomer (+)-(S)-32 のみ腫瘍内の p-HH3 レベルを上昇させた (Figure 3-9)。さらに、(+)-(S)-32 の投与量を 75 mg/kg に減じて、p-HH3 の集積が確認できた。*In vivo* PD 作用を反映し、(+)-(S)-32 は同腫瘍モデルを用いた試験において、深刻な体重減少を伴わず、用量依存的な抗腫瘍作用 (T/C = 55% at 50 mg/kg、40% at 75 mg/kg (ip, bid.))を示した (Figure 3-10)。*In vivo* においても CENP-E 阻害による抗腫瘍効果を示した化合物(+)-(S)-32 は、更なる最適化のためのリード化合物として有望であると考えた。

**Table 3-5.** 化合物(+)-(S)-32 を用いて阻害活性を評価したキナーゼリスト

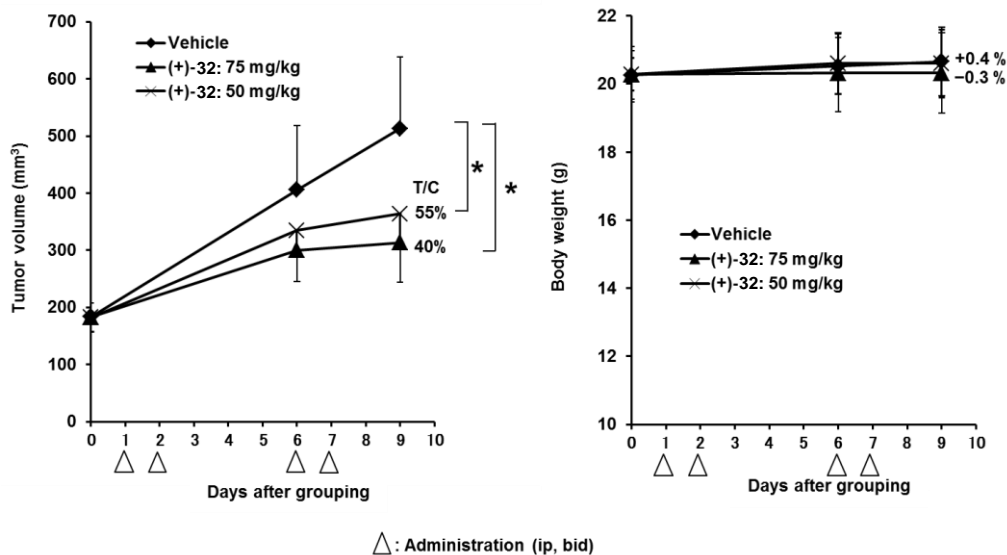
AKT1	c-Kit	IKKβ	PDGFRβ
ASK1	c-Met	INSR	PI3Kα
Aurora-B	CSK	JAK1	PKA
BRAF	EGFR	JNK1	PLK1
CDC7	EPHA5	MAPKAPK2	ROCK1
CDK1	ERK1	MEK1	SRC
CDK2	FAK	MEKK1	SRPK1
CHK1	FGFR1	NEK2	Tie2
CK1δ	GSK3β	p38α	VEGFR2



**Figure 3-8.** 化合物(+)-*(S)*-32 (300 nM)をHeLa細胞に作用させた際の免疫蛍光染色 (不整列状態にある染色体を矢印で指し示した。青、緑およびピンク色のシグナルは、それぞれ DNA、 $\alpha$ -tubulin および CENP-B (動原体)を示している。)



**Figure 3-9.** 化合物(+)-*(S)*-32 および(-)-*(R)*-32 を Colo205 異種移植マウスモデルに腹腔内投与した際の腫瘍内 p-HH3 レベル (ウェスタンブロッティング解析 (n = 2-3))



**Figure 3-10.** 化合物(+)-*(S)*-32をColo205異種移植マウスモデルに腹腔内投与した際の腫瘍体積および体重の変化 (n = 5,  $P \leq 0.05$  (\*) vs control at day 10 (*t*-test))

### 3.5 結論

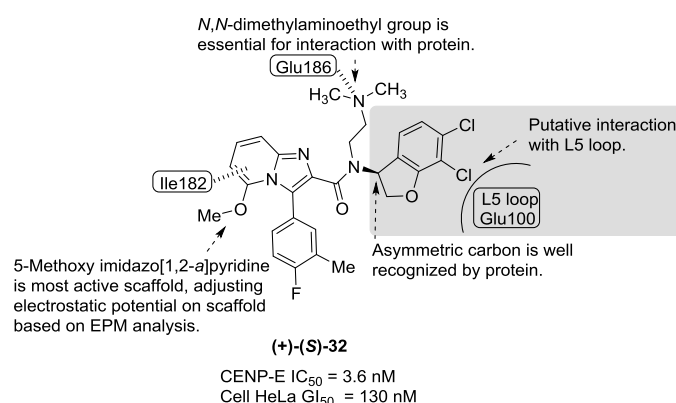
化合物 **7a** をリードとして、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体の最適化研究を行った。CENP-E 変異体タンパク質を用いた部位特異的変異体解析試験により、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体の結合サイトを明らかとした。変異解析の情報から再構築したドッキングモデルに基づき、ペンダントフェニル部位への置換基導入を検討し、高濃度 ATP 存在下でも強力な CENP-E 阻害活性を有する化合物 **7e** を見出した。さらに、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環 5 位置換基の最適化検討に EPM による解析を応用し、5-ブロモ基に変わる置換基として drug likeness 性を高めた 5-メトキシ基を見出した (**7h**)。最適化研究の中で、CENP-E タンパクがベンジル部位の不斉構造を強く認識することが明らかとなった。最終的に得られた(+)-(**S**)-**32** は強い CENP-E 酵素阻害活性 ( $IC_{50} = 3.6 \text{ nM}$ ) と細胞増殖阻害活性 ( $GI_{50} = 130 \text{ nM}$ ) を示すとともに、ヒト大腸癌由来細胞株 Colo205 異種移植マウスモデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示した ( $T/C = 40\%$  at 75 mg/kg, bid.)。



## 第4章 L5 loop との効果的な相互作用獲得を目指したベンジル位縮合二環性構造のデザインと生物評価

### 4.1 はじめに

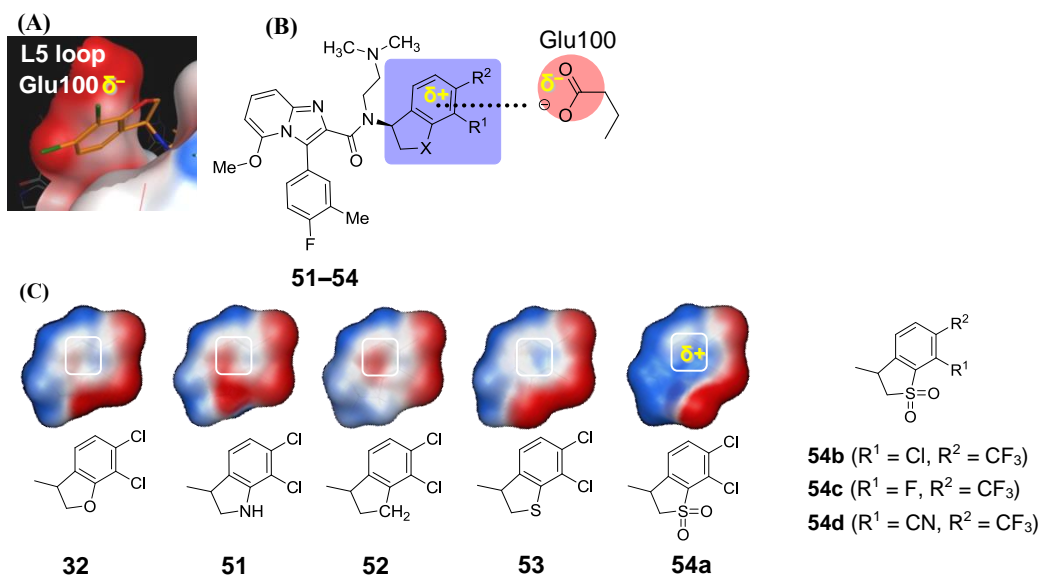
第2章および第3章で述べたデザイン化合物の構造活性相関、およびホモロジーモデルは、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体の構造的に重要な部位を明確に指し示している (Figure 4-1) : (1) 塩基性の *N,N*-ジメチルアミノエチル基は Glu186 と強く相互作用し、(2) イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環 5 位へのメトキシ基の挿入はピリジン環上の電子密度分布を調整し、母骨格と Ile182 との疎水性相互作用を高め、(3) ベンジル位における環形成は固定された構造を生み出し、生じた2種類のエナンチオマーは L5 サイトによって明確に区別される。結果として片方の eutomer のみ L5 loop と効果的に相互作用することが明らかとなっている。本章では、L5 loop サイトを標的とし、(+)-**(S)**-32 のジヒドロベンゾフラン部位の最適化を検討した。



**Figure 4-1.** リード化合物(+)-**(S)**-32 の構造およびイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体の構造活性相関の概略

### 4.2 化合物デザイン

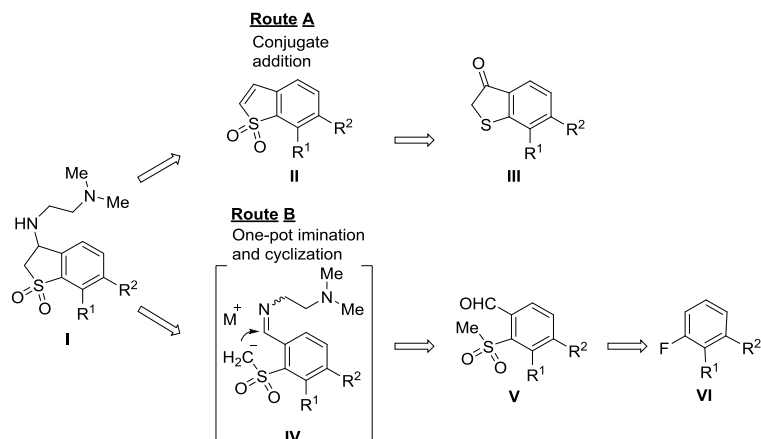
ドッキングモデルによると、(+)-**(S)**-32 のジヒドロベンゾフラン部位のベンゼン環は、L5 loop 上の Glu100 の負に帯電したカルボン酸側鎖の近傍に位置している (Figure 4-2A)。負に帯電した L5 loop と最適に相互作用するためのデザインコンセプトとして、ベンジル位の縮合二環部位を化学修飾することにより、ベンゼン環上の電子密度分布を調整し、強く正に帯電させることを考えた (Figure 4-2B)。デザインした縮合二環部位の構造および、それらの EPM 解析を Figure 4-2C に示す。大きく分けて次の2点に着目し化合物をデザインした：(1) ベンゼン環上に正電荷を誘発させるための最適な X 原子の同定 (化合物 **51–54a**)、(2) 好ましい静電的特性を維持するため、ベンゼン環へ導入する電子求引性基  $R^1$  および  $R^2$  の最適な組み合わせの特定 (化合物 **54b–d**)。



**Figure 4-2.** (A) L5 loop 周辺における化合物(+)-(S)-32 のジヒドロベンゾフラン部位のドッキングモデル、(B) 負に帯電した L5 loop 上の Glu100 とジヒドロベンゾフラン部位との理想的な相互作用、(C) デザイン化合物 51-54 およびベンジル位縮合二環性部位の EPM (ベンゼン環部位を白枠で示した)

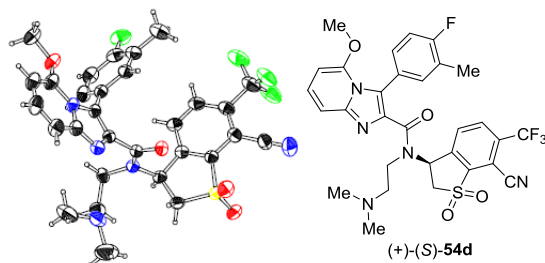
#### 4.3 合成

生物評価の結果 (Table 4-1)、デザイン化合物の内、2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキシド誘導体が最も有望なシリーズであった ((+)-54a-d)。本章では、2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキシド誘導体の合成法に関して主眼を置き、その詳細を記述する (他の誘導体に関する合成は実験項に記述)。本骨格の効率的な合成法の報告例は少なく、新たな合成法を開発する必要があった。鍵中間体 **I** への逆合成解析を Figure 4-3 に示す。鍵中間体 **I** を合成するにあたり、次に示す 2 種の異なるアプローチを適用した：(1) ベンゾチオフェン 1,1-ジオキシド誘導体 **II** とアミンとの共役付加反応<sup>51</sup> を経由した従来の合成法 (Route A)、(2) *o*-メタンシルホニル基を有するベンズアルデヒド **V** のイミン化反応と続く分子内環化反応をワンポットで実施する、新たに開発した合成法 (Route B)。



**Figure 4-3.** 鍵中間体であるジアミン誘導體 (**I**)の逆合成解析 (Route A および新たに開発した Route B)

化合物 **54a-d** の合成法を Scheme 4-1 に示す。3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-5-メトキシイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボン酸 **35** と鍵中間体であるジアミン体(±)-**55a-d** との縮合反応により、対応するラセミ化合物(±)-**54a-d** を 68–80%の収率で得た。化合物(±)-**54a-d** を光学分割することで、対応する 2 種の (+)-および(-)-エナンチオマーを取得した。代表化合物 (+)-**54d** を用いた単結晶 X 線構造解析を実施し、(+)-エナンチオマーの絶対配置は(*S*)-配置であると決定した (Figure 4-4)。



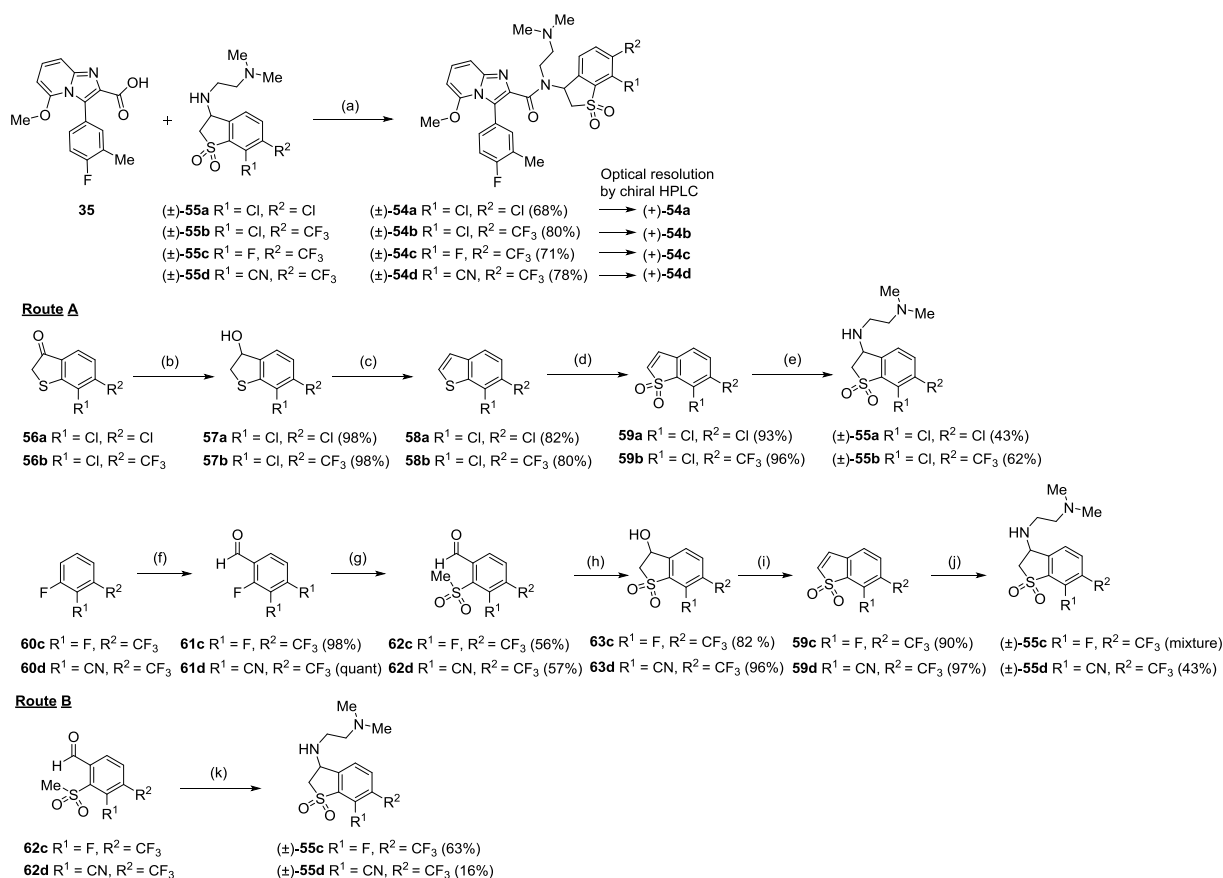
**Figure 4-4.** 化合物(+)-(*S*)-**54d** の ORTEP 図 (Displacement ellipsoids are drawn at the 20% probability level)

重要中間体であるアミン体(±)-**55a-b** (**I**)を合成するにあたり、まず、前述の Route A を採用した。ケトン体 **56a-b** を還元反応に付し、アルコール体 **57a-b** を得た。得られた **57a-b** を、三ふっ化ほう素-ジエチルエーテル錯体 ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ )と作用させることで脱水反応による芳香族化を促し、ベンゾチオフェン体 **58a-b** を良好な収率で得た。化合物 **58a-b** を、触媒量のタングステン(VI)酸ナトリウム二水和物存在下、過酸化水素を用いて酸化し、ベンゾチオフェン 1,1-ジオキソ誘導體 **59a-b** を高収率で得た (前駆体 **II**)。化合物 **59a-b** と *N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **49** との共役付加反応により、目的のジアミン誘導體(±)-**55a** および(±)-**55b** をそれぞれ 43%および 62%の収率で得た。化合物 **59c-d** (前駆体 **II**)は、市販の 1,2-ジフルオロ-3-(トリフルオロメチル)ベンゼン **60c** あるいは 2-フルオロ-6-(トリフルオロメチル)ベンゼン

トリル **60d** を原料として用い、次に示す 4 工程で合成を達成した。フッ素原子の隣接基効果を利用した **60c-d** のリチオ化と続くホルミル化反応により、ホルミル体 **61c-d** を高収率で得た。得られた **61c-d** にメタンスルフィン酸ナトリウムを作用させ、メタンスルホニル体 **62c-d** を中程度の収率で得た。化合物 **62c-d** を塩基性条件下に付すことで分子内環化反応が進行し、アルコール体 **63c-d** を得た。次いで脱水反応によりベンゾチオフェン 1,1-ジオキソド誘導体 **59c-d** を良好な収率で得た。化合物 **59d** とアミンとの共役付加反応により、目的の(±)-**55d** を 43%の収率で得た (Route A)。一方、化合物 **59c** ( $R^1 = F, R^2 = CF_3$ )とアミンとの共役付加反応においては、予想に反し、原料 **59c** あるいは生成物 **55c** のフッ素基 ( $R^1$ )とアミン **49** が反応したことによる副生成物が主に生じ、目的の(±)-**55c** を単離することが出来なかった。これは、スルホニル基とトリフルオロメチル基によりフッ素基の求核置換に対する反応性が高まったためであると考察している。本結果が、ワンポットでのイミン化-分子内環化反応 (Route B) を新たに検討する動機付けとなった。

種々の条件検討の結果、まず化合物 **62c** (前駆体 **V**)と *N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **49** を酢酸を添加した酸性条件下でイミン形成させ、次いで、LDA を系内に添加することで分子内環化反応が進行し、目的の(±)-**55c** を 63%の収率で得ることが出来た (Route B)。酢酸の添加はアミン **49** の求核性を弱め、フッ素基 ( $R^1$ )部位との芳香族求核置換反応を防ぐ為に必須であった。一方、化合物 **62d** ( $R^1 = CN, R^2 = CF_3$ )を出発原料として Route B を適用した場合は、求核置換に対して反応性を示す置換基を持たないため酢酸の添加は不要で、Route A と比較して総収率は低下するものの目的の(±)-**55d** を 16%の収率で得ることが出来た。この 3-アミノ-2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキソド骨格は、医薬品のビルディングブロックとしても創薬研究に新たな広がりをもたらすと考えられ、本骨格の簡便なワンポット合成法は有用であると期待している。

**Scheme 4-1<sup>a</sup>.** Route A または Route B を経由した(+)-**54a-d** の合成



<sup>a</sup> 試薬および反応条件: (a) HATU, ピリジン, THF (for (±)-**54a**) or DIPEA, DMF (for (±)-**54b-d**), room temp to 60°C, 3 h–6 h. (b) 水素化ホウ素ナトリウム, MeOH, 0 °C to room temp, 1 h–4 h; (c) BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, AcOH, room temp, 0.25 h, 次いで 100–120 °C, 0.3 h; (d) 過酸化水素, タングステン(VI)酸ナトリウム二水和物, AcOH, MeOH, 60–80 °C, 3 h–4 h; (e) *N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **49**, EtOH, 40 °C, 4 h 次いで room temp, 3 days (for (±)-**55a**) or <sup>i</sup>PrOH, 60 °C, 12h (for (±)-**55b**). (f) 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン, 1.6M ブチルリチウム / ヘキサン, THF, –60 to –50 °C, 0.5 h, 次いで DMF, –50 °C, 0.25 h, 次いで –10 °C, 0.5 h–1 h; (g) メタンサルフィン酸ナトリウム, DMSO, room temp, 1.5 h–2 h; (h) NaOEt, EtOH, 0 °C to room temp, 0.7 h–1 h; (i) メタンサルホニルクロリド, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 °C to room temp, 0.5–4 h; (j) **49**, EtOH, 70 °C, 4.5 h. (k) **49**, AcOH (for (±)-**55c**), THF, room temp, 0.3 h–2 h, 次いで 1.11 M LDA / ヘキサン, 0 °C or –50 °C, 0.3 h–1 h.

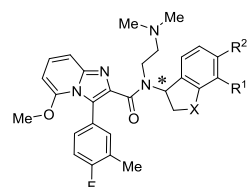
#### 4.4 生物評価の結果と考察

##### 4.4.1 ベンジル位縮合二環性化合物の構造活性相関

化合物 **51–54d** の CENP-E 阻害活性 (IC<sub>50</sub>)および HeLa 細胞増殖阻害活性 (GI<sub>50</sub>)を評価した (Table 4-1)。化合物(±)-**51** (X = NH, IC<sub>50</sub> = 24 nM)および(±)-**52** (X = CH<sub>2</sub>, 19 nM)は、(±)-**32** (X = O, 4.8 nM)と比較して減弱した CENP-E 阻害活性を示した。一方、酸化体(±)-**54a** (X = SO<sub>2</sub>, 2.7 nM)

は、未酸化体(±)-**53** (X = S, IC<sub>50</sub> = 14 nM)、前述の(±)-**51** および(±)-**52** よりも強力な CENP-E 阻害活性を示した。そこで次に、光学分割によって得られた eutomer (+)-**54a** (IC<sub>50</sub> = 1.6 nM, GI<sub>50</sub> = 81 nM)を新たなリードとし、ベンゼン環上の電子求引性基 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> の組み合わせを検討した。その結果、置換基の組み合わせによる大きな差異はなく、化合物(+)-**54b-d** は、(+)-**54a** と同レベルの酵素阻害活性を維持した (IC<sub>50</sub> = 1.5–2.2 nM)。検討した化合物の中でも、特に(+)-**54a** (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = Cl) および(+)-**54d** (R<sup>1</sup> = CN, R<sup>2</sup> = CF<sub>3</sub>)は、HeLa 細胞に対して強力な抗増殖作用を示した(GI<sub>50</sub> = 81 nM および 80 nM)。

**Table 4-1.** ベンジル位縮合二環性化合物 **32** および **51–54** の構造活性相関



Compound	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	CENP-E IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	HeLa GI <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup>
(±)- <b>32</b>				4.8 (3.1–7.5)	270
(+)- <b>32</b>	O	Cl	Cl	3.6 (3.1–4.2)	130
(±)- <b>51</b>	NH	Cl	Cl	24 (16–37)	870
(±)- <b>52</b>	CH <sub>2</sub>	Cl	Cl	19 (15–24)	>1000
(±)- <b>53</b>	S	Cl	Cl	14 (11–17)	850
(±)- <b>54a</b>	SO <sub>2</sub>	Cl	Cl	2.7 (2.0–3.8)	160
(+)- <b>54a</b>				1.6 (1.2–2.1)	81
(+)- <b>54b</b>	SO <sub>2</sub>	Cl	CF <sub>3</sub>	1.7 (1.3–2.1)	110
(+)- <b>54c</b>	SO <sub>2</sub>	F	CF <sub>3</sub>	1.5 (1.3–1.8)	130
(+)- <b>54d</b>	SO <sub>2</sub>	CN	CF <sub>3</sub>	2.2 (1.9–2.6)	80

<sup>a</sup> n = 2. 95% Confidence interval (CI) value. <sup>b</sup> Cell proliferation of HeLa cells was determined by measuring cellular ATP amount (n = 1). Cells were collected 3 days after drug treatment.

#### 4.4.2 代表化合物(+)-**54a** および(+)-**54d** の生物評価

化合物(+)-**54a** および(+)-**54d** が細胞分裂の停止を引き起こすかどうかを確認するために、FACS 解析を実施した。その結果、これら化合物の細胞への添加により、細胞内 p-HH3 レベルの有意な上昇が観測され、細胞分裂が停止していることが示された (EC<sub>50</sub> = 79 nM および 39 nM) (Table 4-2)。p-HH3 集積作用の EC<sub>50</sub> 値は、同細胞に対する増殖阻害作用の GI<sub>50</sub> 値と近い値であり、これは、長引く細胞分裂の停止が結果として抗細胞増殖を引き起こすことを裏付けている。化合物(+)-**54a** および(+)-**54d** は CENP-E 阻害に基づく十分な *in vitro* 細胞活性を同等に示したため、次に *in vivo* での作用を評価し比較することとした。Colo205 異種移植マウスモデルに両化合物を腹腔内投与し、p-HH3 集積レベルと血漿中および腫瘍内の化合物濃度を測定した。両化合物を 100 mg/kg の投与量で 1 日 1 回投与(qd)したところ、(+)-**54d** は(+)-**54a**

よりも有意な p-HH3 レベルの上昇を示した。薬物濃度を測定した結果、血漿中および腫瘍内ともに、(+)-54d は(+)-54a よりも良好な暴露を示しており、これはより高い p-HH3 集積作用とも一致する結果であった。これらの結果を基に、最終的に、良好な薬物体内動態を有する(+)-54d を更なる開発研究の候補化合物として選定した。

**Table 4-2.** 化合物(+)-54a, (+)-54d を処置した際の HeLa 細胞内 p-HH3 レベルおよび Colo205 異種移植マウスモデルにおける薬物体内動態と腫瘍内 p-HH3 レベル

Compound	In vitro p-HH3 EC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	Dose <sup>b</sup> (mg/kg)	Drug concentration		Accumulation of p-HH3 levels in tumor <sup>d, e</sup>
			Plasma <sup>c, d</sup> (µg/mL)	Tumor <sup>c, d</sup> (µg/g)	
(+)-54a	79	100	0.003	0.623	6.9
(+)-54d	39	100	0.047	9.121	22.2

<sup>a</sup> % of p-HH3 positive cells were determined using FACS in HeLa cells ( $n=3$ ). <sup>b</sup> Dose of (+)-54a and (+)-54d is described. Compounds were treated by ip administration. <sup>c</sup> Compound concentration in a Colo205 xenograft model in mice, 24 hours after the administration of (+)-54a and (+)-54d. <sup>d</sup> Mean ( $n=2$ ). <sup>e</sup> p-HH3 in tumors was detected by Western blotting, 24 hours after administration of (+)-54a and (+)-54d. Accumulation of p-HH3 levels were evaluated as band intensities based on vehicle.

#### 4.5 結論

本章では、ジヒドロベンゾフラン誘導体(+)-(S)-32 をリードとして、CENP-E 阻害活性に重要な L5 loop サイトを標的とした縮合二環性部位の最適化検討を中心に詳述した。リガンドの分子表面およびタンパク質表面の EPM 解析に基づき、ジヒドロベンゾフラン環上の静電ポテンシャルを正電荷に調整することで、負電荷を帯びた L5 loop とのより効果的な相互作用の獲得を図った。検討の結果、デザイン化合物の中で、二環性部位が最も正に帯電する 2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキシド誘導体(+)-54a および(+)-54d が、リード化合物(+)-(S)-32 を凌ぐ細胞活性を示した。In vivo での比較評価の結果、化合物(+)-54d は(+)-54a よりも良好な薬物体内動態を有し、これを反映して、強力な in vivo PD 作用 (p-HH3 集積)を示した。CENP-E 阻害薬として有望な 2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキシド誘導体を合成するにあたり、簡便なワンポット合成法を開発した。本合成法は医薬品のビルディングブロックとして 3-アミノ-2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキシド骨格を導入する際に、非常に有用であると期待している。著者の所属する研究グループが別途報告している通り<sup>52,53</sup>、(+)-54d は、CENP-E 阻害による細胞死の詳細なメカニズムを分子生物学的に解明するための、in vitro および in vivo ケミカルツールとしても有用であり、更なる評価を進めている。

## 第5章 総括

有糸分裂制御に基づく抗癌薬を目指した新規 CENP-E 阻害薬の合成研究を行い、以下の研究成果を得た。

1. 社内ハイスループットスクリーニングより見出されたヒット化合物 4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボキサミド誘導体 **1a** の構造最適化を行った。独自に構築した CENP-E ホモロジーモデルを活用し、塩基性の 2-(ジメチルアミノ)エチル基の導入が CENP-E 阻害活性向上に重要であることを明らかにした。4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン環に代わる新たな母骨格を探索した結果、強力な CENP-E 阻害活性を有する 3-ブロモチエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体 **6a** を見出した。分子表面の電荷状態を視覚化した静電ポテンシャルマップ (EPM) を活用して、3-ブロモ基の電子的な特性が母骨格上に最適な電荷状態をもたらすことを明らかにし、これを応用することで、強力な細胞活性を有する 5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** を見出した。

2. CENP-E 変異体タンパク質を用いた部位特異的変異体解析試験を実施し、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体が CENP-E の L5 サイトに結合していることを明らかにした。これにより、構築した CENP-E ホモロジーモデルが妥当であることを明らかとした。イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体のペンダントフェニル部位の最適化を行い、置換基によって高濃度 ATP 下での阻害活性に差が生じ、これが細胞活性の差異と相関していることを明らかにした。イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環 5 位置換基の最適化研究の中で、EPM 解析が CENP-E 阻害活性予測のための強力なツールとなり得ることを明らかにし、化合物 **7h** の発見に至った。ベンジル位を環化することで固定された不斉構造が、CENP-E の L5 loop に強く認識されることを明らかにした。生じた 2 種類のエナンチオマーの内、(S)-体 ((+)-(S)-**32**) のみが強力な阻害活性を示し、*in vivo* においても効果を示すことを明らかにした。化合物(+)-(S)-**32** が他のキネシタンパク (Eg5 および KHC) を阻害しないこと、特定のキナーゼタンパクを阻害しないこと、もう片方の (-)-(R)-**32** が *in vivo* で効果を示さないこと、を確認することで(+)-(S)-**32** の *in vivo* での抗腫瘍作用が CENP-E 選択的な阻害に基づくものであることを明らかにした。

3. EPM 解析による CENP-E 阻害活性予測が、ベンジル位縮合二環性部位の最適化にも適用可能であることを明らかにし、強力な酵素および細胞活性を有する 2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキシド誘導体(+)-(S)-**54d** を見出だした。さらに、化合物(+)-(S)-**54d** が良好な薬物体内動態を有することを明らかにし、*in vivo* においても強力な有糸分裂抑制作用を示すことを明らかにした。医薬品のビルディングブロックとしても有用な 3-アミノ-2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキシド骨格を得る効率的な合成法を開発した。

冒頭でも述べたとおり、CENP-E は有望な抗癌薬ターゲットではあるものの、その機能を検証するためのツール化合物は限られている。本研究で得られた構造活性相関の知見、およ



び得られた低分子 CENP-E 阻害薬は、今後の CENP-E タンパクの生物学的な研究および阻害剤の開発研究に大きく貢献すると考えている。また、定性的特性である EPM を構造活性相関と紐付けた方法論は、本薬効分野に限らず、創薬研究全般に助言と示唆を与えるものである。加えて、本研究において 3-アミノ-2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン 1,1-ジオキソド骨格の効率的な合成を達成したことは、創薬化学の分野においても意義のある成果であると考えている。

## 実験項

反応に用いた全ての市販溶媒および試薬は、試薬等級 (reagent-grade)を購入手続きを使用した。分析用薄層クロマトグラフィー (TLC)は silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck) あるいは NH TLC plates (Fuji Silysia Chemical Ltd.)を用いて実施した。フラッシュクロマトグラフィーによる分離は、Purif-Pack (SI or NH, Fuji Silysia Chemical Ltd.)を用いて実施した。融点は SRS OptiMelt 融点測定装置を用いて測定した。核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H NMR あるいは <sup>13</sup>C NMR)スペクトルは、Bruker AVANCE II (300 MHz)、Bruker AVANCE III (300 MHz, 400 MHz)、Varian mercury plus (300 MHz) あるいは Bruker AVANCE II<sup>+</sup> (600 MHz)を用いて測定し、内部標準としてテトラメチルシラン (TMS)を用いた。NMR データは次のように表される：化学シフト ( $\delta$ ) (単位 ppm)、多重度、スピン結合定数 ( $J$ ) (単位 Hz)、および積分値。多重度は次のように表される：s (singlet)、d (doublet)、t (triplet)、q (quartet)、dd (double doublets)、dt (double triplet)、dq (double quartet)、br s (broad singlet)あるいは m (multiplet)。マスペクトル (MS)は、Agilent LC/MS system (Agilent1200SL/Agilent6130MS)、Shimadzu LC/MS system (LC-10ADvp high pressure gradient system/LCMS-2010A)あるいは Shimadzu UFLC/MS (Prominence UFLC high pressure gradient system/LCMS-2020)を用いて、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)で測定した。使用したカラムおよび条件を次に示す：L-column 2 ODS (3.0 x 50 mm I.D., 3  $\mu$ m, CERI, Japan)、温度 40 °C、流速 1.2 あるいは 1.5 mL/min、移動相 A ; 0.05% TFA / 超純水および移動相 B ; 0.05% TFA / アセトニトリル (次の条件に従い含有率を変化させた：5% to 90% over 2 minutes, 90% over the next 1.5 minutes, after which the column was equilibrated to 5% for 0.5 minutes). 元素分析 (Anal.) および高分解能質量分析 (high resonance mass spectra, HRMS)の測定は、旧 武田分析研究所において実施した。各化合物は、LC/MS あるいは元素分析によって $\geq$ 95%純度を確認した。収率は最適化したものではない。

## 第 2 章に関する実験項

### 合成

#### ***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-7-(4-fluorophenyl)-*N*,5-dimethyl-4-oxo-4,5-dihydrothieno[3,4-*c*]pyridine-6-carboxamide (1b).**

エチル 7-(4-フルオロフェニル)-5-メチル-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボキシレート **8**<sup>35</sup> (290 mg, 0.88 mmol)の THF/EtOH (1:1, 5 mL)溶液に 1 M NaOH (3.5 mL, 3.5 mmol)を加え、反応混合物は 6 時間加熱還流した。室温まで冷却した後、溶媒を減圧下留去した。得られた固体を水 (10 mL)に溶解させ、1 M HCl を加えて pH を 3 に調整した。混合物を EtOAc/THF (1:1, 3 x 50 mL)で抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮して 7-(4-フルオロフェニル)-5-メチル-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボン酸 (230 mg, 88%) を淡黄色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3.42 (3H, s), 7.28–7.34 (3H, m), 7.41–7.45 (2H, m), 8.59 (1H, d,  $J$  = 3.3 Hz), 14.01 (1H, br s).

得られた 7-(4-フルオロフェニル)-5-メチル-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボン酸 (101 mg, 0.33 mmol)の DMF (2.0 mL)溶液に、1-(3,4-ジクロロフェニル)-*N*-メチルメタンアミン **9** (95 mg, 0.50 mmol)、HATU (190 mg, 0.50 mmol) および Et<sub>3</sub>N (101 mg, 1.0 mmol) を室温に加え、混合物を同温度で 36 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc / 水 (1:1, 60 mL) で希釈し、水層を EtOAc (2 × 20 mL)で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ(SI、EtOAc / ヘキサン) で精製し、得られた固体を Et<sub>2</sub>O から結晶化させ **1b** (18.6 mg, 12%) を無色結晶状固体として得た; mp 113–115 °C. MS (ESI+): 475.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.71 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.93–4.02 (1H, m), 4.85–4.94 (1H, m), 6.49–6.55 (1H, m), 7.02–7.25 (5H, m), 7.27–7.55 (2H, m), 8.42–8.45 (1H, m). HRMS (ESI): calcd for C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 475.0445. Found 475.0406.

***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-7-(4-fluorophenyl)-5-(2-hydroxyethyl)-*N*-methyl-4-oxo-4,5-dihydrothieno[3,4-*c*]pyridine-6-carboxamide (2a).**

化合物 **9** (950 mg, 5.0 mmol) の トルエン (2.0 mL)溶液に 1.8 M トリメチルアルミニウム / トルエン溶液 (2.8 mL, 5.0 mmol) を室温にて加え、混合物を同温度で 30 分間攪拌した。反応混合物に 10-(4-フルオロフェニル)-3,4-ジヒドロ-1*H*,6*H*-チエノ[3',4':4,5]ピリド[2,1-*c*][1,4]オキサジン-1,6-ジオン **16a** (155 mg, 0.5 mmol) のトルエン (2.0 mL)溶液を室温に加え、反応混合物を同温度で 30 分間、次いで 80 °C で 2 時間攪拌した。室温まで冷却した後、反応混合物に水 (20 mL) および EtOAc (20 mL)を加え反応を停止させた。不溶物を濾去し、濾液を EtOAc (2 × 20 mL)で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **2a** (150 mg, 60%) を淡褐色のアモルファス状固体として得た。MS (ESI+): 505.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.69–2.72 (3H, m), 3.34 (1H, t, *J* = 5.1 Hz), 3.79–4.02 (3H, m), 4.06 (1H, d, *J* = 14.7 Hz), 4.42–4.52 (1H, m), 4.74 (1H, d, *J* = 14.5 Hz), 6.56–6.61 (1H, m), 7.05–7.14 (4H, m), 7.28–7.50 (3H, m), 8.44–8.48 (1H, m). Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S·0.2H<sub>2</sub>O: C, 56.63; H, 3.84; N, 5.50. Found: C, 56.68; H, 3.93; N, 5.46.

***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-5-(2-(dimethylamino)ethyl)-7-(4-fluorophenyl)-*N*-methyl-4-oxo-4,5-dihydrothieno[3,4-*c*]pyridine-6-carboxamide (2b).**

エチル 5-(2-(ジメチルアミノ)エチル)-7-(4-フルオロフェニル)-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボキシレート **16b** (96 mg, 0.25 mmol)の EtOH/THF (1:1, 2.0 mL)溶液に、8 M NaOH (1.0 mL, 8.0 mmol)を加え、混合物を 80 °C で 6 時間攪拌した。反応混合物に 6 M HCl を加え中和した後、反応混合物を減圧下濃縮した。残渣を 50 °C で EtOH に溶解させ、不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮し 5-(2-(ジメチルアミノ)エチル)-7-(4-フルオロフェニル)-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボン酸 (89 mg, quantitative) を無色固体として得た。MS (ESI+): 361.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.18 (6H, s), 2.54–2.61 (2H, m), 4.01–4.11 (2H, m), 7.05 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.10–7.20 (2H, m), 7.48–7.56 (2H, m), 8.39 (1H, d, *J* = 3.2 Hz).

化合物 **2b** (115 mg) は 5-(2-(ジメチルアミノ)エチル)-7-(4-フルオロフェニル)-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボン酸 (89 mg, 0.25 mmol)、**9** (70 mg, 0.37 mmol)、HATU (141 mg, 0.37 mmol) および Et<sub>3</sub>N (62 mg, 0.62 mmol) を用いて、**1b** と同様の方法により合成した。収率 33% in 2 steps、淡黄色アモルファス状固体。MS (ESI<sup>+</sup>): 532.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.30 (6H, s), 2.56–2.67 (1H, m), 2.70 (3H, s), 2.73–2.81 (1H, m), 3.67–3.82 (1H, m), 3.89 (1H, d, *J* = 14.5 Hz), 4.23–4.38 (1H, m), 4.90 (1H, d, *J* = 14.5 Hz), 6.53 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz), 7.02–7.16 (4H, m), 7.22–7.50 (3H, m), 8.43 (1H, d, *J* = 3.2 Hz). Anal. Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S: C, 58.65; H, 4.54; N, 7.89. Found: C, 58.38; H, 4.66; N, 7.74.

***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-5-(3-(dimethylamino)propyl)-7-(4-fluorophenyl)-*N*-methyl-4-oxo-4,5-dihydrothieno[3,4-*c*]pyridine-6-carboxamide (2c).**

化合物 **14** (160 mg, 0.50 mmol) の THF (2.0 mL) 溶液に *N,N*-ジメチルプロパン-1,3-ジアミン (102 mg, 1.0 mmol) を室温にて加え、同温度で 2 時間攪拌した。反応混合物をカラムクロマトグラフィ (SI、EtOAc / ヘキサン) で精製し、エチル 3-(4-((3-(ジメチルアミノ)プロピル)カルバモイル)-3-チエニル)-3-(4-フルオロフェニル)-2-ヒドロキシアクリラート **15c** (210 mg, quantitative) を無色油状物として得た。MS (ESI<sup>+</sup>): [M + H]<sup>+</sup> 421.1.

得られた **15c** (210 mg, 0.50 mmol) のトルエン (5.0 mL) 溶液に 4-トルエンスルホン酸 一水和物 (190 mg, 1.0 mmol) を室温にて加え、混合物を 80 °C で 2 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc/water (1:1, 40 mL) で希釈し、水層を EtOAc (2 × 20 mL) で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI、EtOAc / ヘキサン) で精製し、エチル 5-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)-7-(4-フルオロフェニル)-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボキシラート **16c** (201 mg, quantitative) を薄茶色油状物として得た。MS (ESI<sup>+</sup>): 403.1 [M + H]<sup>+</sup>.

5-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)-7-(4-フルオロフェニル)-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボン酸 (187 mg) は、**16c** (200 mg, 0.50 mmol) および 8 M NaOH (1.0 mL, 8.0 mmol) を用いて、**2b** と同様の方法により合成した。収率: quantitative、無色固体。MS (ESI<sup>+</sup>): [M + H]<sup>+</sup> 375.1.

化合物 **2c** (62 mg) は、5-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)-7-(4-フルオロフェニル)-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボン酸 (187 mg, 0.50 mmol)、**9** (114 mg, 0.60 mmol)、HATU (460 mg, 0.60 mmol) および Et<sub>3</sub>N (200 mg, 2.0 mmol) を用いて、**1b** と同様の方法により合成した。収率: 23% in 4 steps from **14**、淡黄色アモルファス状固体。MS (ESI<sup>+</sup>): 546.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.85–2.11 (2H, m), 2.25 (6H, s), 2.31–2.50 (2H, m), 2.65–2.74 (3H, m), 3.53–3.65 (1H, m), 4.06 (1H, d, *J* = 14.5 Hz), 4.20–4.35 (1H, m), 4.72 (1H, d, *J* = 14.5 Hz), 6.48–6.62 (1H, m), 7.05–7.25 (4H, m), 7.27–7.55 (3H, m), 8.42 (1H, d, *J* = 3.2 Hz). Anal. Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S: C, 59.34; H, 4.80; N, 7.69. Found: C, 59.67; H, 5.12; N, 7.67.

***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-7-(4-fluorophenyl)-5-methyl-4-oxo-4,5-dihydrothieno[3,4-*c*]pyridine-6-carboxamide (3).**

化合物 **3** (35 mg) は、7-(4-フルオロフェニル)-5-メチル-4-オキソ-4,5-ジヒドロチエノ[3,4-*c*]ピリジン-6-カルボン酸(101 mg, 0.33 mmol)、*N'*-(3,4-ジクロロベンジル)-*N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **10** (124 mg, 0.50 mmol)、HATU (190 mg, 0.50 mmol) および Et<sub>3</sub>N (202 mg, 2.0 mmol)を用いて、**1b**と同様の方法により合成した。収率: 20%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 532.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.03–2.13 (6H, m), 2.23–2.44 (2H, m), 2.64–3.50 (2H, m), 3.54–3.59 (3H, m), 4.01–5.02 (2H, m), 6.49–6.65 (1H, m), 7.05–7.24 (4H, m), 7.28–7.58 (3H, m), 8.40–8.45 (1H, m). Anal. Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S: C, 58.65; H, 4.54; N, 7.89. Found: C, 58.93; H, 4.85; N, 7.64.

#### ***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-3-(4-fluorophenyl)-1-methyl-1*H*-indole-2-carboxamide (**4**).**

エチル 3-(4-フルオロフェニル)-1-メチル-1*H*-インドール-2-カルボキシレート **18** (412 mg, 1.4 mmol) の THF/EtOH (1:2, 9 mL)溶液に、8 M NaOH (3.0 mL, 24 mmol)および 2 M NaOH (5.0 mL, 10 mmol)を 75 °C で加え、混合物を同温度で 1 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去した後、残渣を水 (20 mL)で希釈した。混合物に 6 M HCl (6 mL)を加え pH 2 に調整し、析出物を濾取した後、水で洗浄し 3-(4-フルオロフェニル)-1-メチル-1*H*-インドール-2-カルボン酸 (331 mg, 89%)を無色固体として得た。MS (ESI+): 269.9 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.02 (3H, s), 7.09–7.17 (1H, m), 7.21–7.31 (2H, m), 7.33–7.48 (4H, m), 7.62 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 12.98 (1H, br s).

得られた 3-(4-フルオロフェニル)-1-メチル-1*H*-インドール-2-カルボン酸 (134 mg, 0.50 mmol)の DMF (2.5 mL)溶液に、**10** (130 mg, 0.60 mmol)、HATU (200 mg, 0.60 mmol)および Et<sub>3</sub>N (200 mg, 2.0 mmol) を室温で加え、混合物を同温度で 18 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc/water (1:1, 40 mL)で希釈し、水層を EtOAc (2 × 20 mL)で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **4** (107 mg, 43%)を無色油状物として得た。MS (ESI+): 498.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.07–2.29 (6H, m), 2.38–2.72 (2H, m), 3.36–3.72 (2H, m), 3.76–3.89 (3H, m), 4.02–5.05 (2H, m), 6.51–6.79 (1H, m), 7.07–7.24 (4H, m), 7.31–7.58 (5H, m), 7.69–7.77 (1H, m). HRMS (ESI): calcd for C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 498.1510. Found 498.1467.

#### ***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-1-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamide (**5**).**

エチル 1-(4-フルオロフェニル)-3-メチル-1*H*-インドール-2-カルボキシレート **21** (1.0 g, 3.4 mmol)の THF/EtOH (1:1, 10 mL)溶液に 2 M NaOH (8.0 mL, 16 mmol)を室温で加え、混合物を 65 °C で 1 時間 30 分攪拌した。反応混合物に 8 M NaOH (1.0 mL, 8.0 mmol)を加え、75 °C で更に 1 時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残渣を水 (20 mL)で希釈した。混合物に 6 M HCl (4.5 mL)を加え pH 2 に調整し、析出物を濾取した後、水で洗浄し 1-(4-フルオロフェニル)-3-メチル-1*H*-インドール-2-カルボン酸 (865 mg, 95%)を無色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.59 (3H, s), 6.99 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.13–7.22 (1H, m), 7.25–7.43 (5H, m), 7.76 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 12.82 (1H, br s).

得られた 1-(4-フルオロフェニル)-3-メチル-1*H*-インドール-2-カルボン酸 (192 mg, 0.71 mmol)の DMF (5.0 mL)溶液に **10** (160 mg, 0.65 mmol)、HATU (295 mg, 0.78 mmol)および <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>EtN (251 mg, 1.9 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 30 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (20 mL)および水 (20 mL)で希釈し、水層を EtOAc (3 × 20 mL)で抽出した。合わせた有機層を水 (2 × 20 mL)および飽和食塩水 (20 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **5** (287 mg, 89%)を淡黄色油状物として得た。MS (ESI+): 498.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.96–2.15 (6H, m), 2.19–2.38 (2H, m), 2.39–2.43 (3H, m), 2.93–3.46 (2H, m), 4.21–5.11 (2H, m), 6.70–6.77 (1H, m), 6.90–7.25 (6H, m), 7.27–7.49 (3H, m), 7.59–7.70 (1H, m). Anal. Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O: C, 65.06; H, 5.26; N, 8.43. Found: C, 64.92; H, 5.34; N, 8.41.

### **3-Bromo-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-4-(4-fluorophenyl)-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxamide (6a).**

3-ブロモ-4-(4-フルオロフェニル)-4*H*-チエノ[3,2-*b*]ピロール-5-カルボン酸 (681 mg) はエチル 3-ブロモ-4-(4-フルオロフェニル)-4*H*-チエノ[3,2-*b*]ピロール-5-カルボキシレート **25a** (814 mg, 2.2 mmol)および 2 M NaOH (6 mL, 12 mmol) を用いて、**5** と同様の方法により合成した。収率: 90%、無色固体。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.23–7.32 (2H, m), 7.32 (1H, s), 7.39–7.48 (2H, m), 7.65 (1H, d, *J* = 0.6 Hz), 12.72 (1H, br s).

化合物 **6a** (502 mg)は 3-ブロモ-4-(4-フルオロフェニル)-4*H*-チエノ[3,2-*b*]ピロール-5-カルボン酸 (316 mg, 0.93 mmol)、**10** (275 mg, 1.1 mmol)、HATU (456 mg, 1.2 mmol)および <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>EtN (300 mg, 2.3 mmol)を用いて **5** と同様の方法により合成した。収率: 95%、淡黄色油状物。MS (ESI+): 568.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.13 (6H, d, *J* = 3.4 Hz), 2.30–2.44 (2H, m), 3.39 (2H, dt, *J* = 6.3, 3.2 Hz), 4.67 (2H, br s), 6.67 (1H, br s), 6.86 (1H, br s), 7.07–7.20 (4H, m), 7.31–7.48 (3H, m). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 363 K) δ 44.54, 44.63, 48.05, 56.49, 92.86, 102.29, 114.56 (d, *J* = 23.11 Hz), 122.83, 123.68, 127.02, 128.81, 129.35, 129.82, 130.13 (d, *J* = 8.80 Hz), 130.70, 131.93 (d, *J* = 3.30 Hz), 133.57, 135.80, 138.21, 161.47 (d, *J* = 246.12 Hz), 162.22. Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>BrCl<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>OS: C, 50.63; H, 3.72; N, 7.38. Found: C, 50.81; H, 3.86; N, 7.37.

### ***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-4-(4-fluorophenyl)-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxamide (6b).**

化合物 **6a** (214 mg, 0.38 mmol)の DME (1.5 mL)溶液に PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (31 mg, 0.038 mmol)、Et<sub>3</sub>N (114 mg, 1.1 mmol)および formic acid (28 μL, 0.75 mmol)を室温に加え、混合物を窒素雰囲気下、85 °C で 8 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (15 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL)で希釈し、水層を EtOAc (3 × 15 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (15 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **6b** (113 mg, 61%) を黄色油状物として得た。MS (ESI+): 490.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.13 (6H, s), 2.39 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 3.49 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 4.70 (2H, s), 6.74 (1H, br s), 6.87 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 6.98 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8

Hz), 7.13–7.25 (4H, m), 7.35–7.46 (3H, m). HRMS (ESI): calcd for  $C_{24}H_{22}Cl_2FN_3OS$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup> 490.0917. Found 490.0877.

***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-4-(4-fluorophenyl)-3-methyl-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxamide (6c).**

化合物 **6a** (106 mg, 0.19 mmol)の DME (2 mL)溶液にテトラメチルスズ (IV) (165 mg, 0.93 mmol)および PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mg, 0.037 mmol)を室温に加え、混合物を窒素雰囲気下、90 °C で 1 時間攪拌した。不溶物を濾去し、濾液を減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **6c** (72 mg, 77%) を淡黄色油状物として得た。MS (ESI<sup>+</sup>): 504.1 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.83 (3H, s), 2.14 (6H, s), 2.38 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz), 3.44 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz), 4.64–4.77 (2H, m), 6.66 (1H, s), 6.78 (1H, s), 6.91 (1H, br s), 7.10–7.20 (3H, m), 7.31–7.43 (3H, m). HRMS (ESI): calcd for  $C_{25}H_{24}Cl_2FN_3OS$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup> 504.1074. Found 504.1065.

**3-Chloro-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-4-(4-fluorophenyl)-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxamide (6d).**

化合物 **6a** (102 mg, 0.18 mmol)の DMF (0.5 mL)溶液に塩化銅 (I) (88 mg, 0.89 mmol)を室温に加え、混合物をマイクロ波照射下、220 °C で 45 分間攪拌した。反応混合物を EtOAc (20 mL) および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL)で希釈し、水層を EtOAc (2 × 20 mL)で抽出した。合わせた有機層を水 (2 × 20 mL)および飽和食塩水 (20 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣を分取 HPLC (YMC CombiPrep-ODS-A, eluted with 40–60% acetonitrile in water containing 0.1% TFA)で精製した。目的物を含む画分を減圧下で濃縮し、残渣を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中で中和後、EtOAc (2 × 50 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (50 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し **6d** (36 mg, 39%)を淡黄色油状物として得た。MS (ESI<sup>+</sup>): 524.1 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.13 (6H, s), 2.36 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz), 3.40 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz), 4.67 (2H, br s), 6.67 (1H, br s), 6.78–6.92 (1H, m), 6.98 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz), 7.09–7.20 (3H, m), 7.30–7.44 (3H, m). HRMS (ESI): calcd for  $C_{24}H_{21}Cl_3FN_3OS$  [ $M + H$ ]<sup>+</sup> 524.0528. Found 524.0543.

***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-4-(4-fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxamide (6e).**

4-(4-フルオロフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-4*H*-チエノ[3,2-*b*]ピロール-5-カルボン酸 (310 mg)は、エチル 4-(4-フルオロフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-4*H*-チエノ[3,2-*b*]ピロール-5-カルボキシレート **25e** (430 mg, 1.2 mmol)および 2 M NaOH (3 mL, 6.0 mmol)を用いて、**5**と同様の方法により合成した。収率: 78%、無色固体。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.23–7.33 (2H, m), 7.39–7.46 (3H, m), 8.27 (1H, s), 12.65 (1H, br s).

化合物 **6e** (133 mg)は 4-(4-フルオロフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-4*H*-チエノ[3,2-*b*]ピロール-5-カルボン酸 (101 mg, 0.31 mmol)、**10** (91 mg, 0.37 mmol)、HATU (140 mg, 0.37 mmol)

および  $^i\text{Pr}_2\text{EtN}$  (100 mg, 0.77 mmol)を用いて、**5**と同様の方法により合成した。収率: 78%、淡黄色油状物。MS (ESI+): 558.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.12 (6H, s), 2.25–2.44 (2H, m), 3.37 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz), 4.66 (2H, br s), 6.70 (2H, br s), 7.06–7.20 (3H, m), 7.38 (3H, dd,  $J = 8.7$ , 4.7 Hz), 7.59 (1H, s). Anal. Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{F}_4\text{N}_3\text{OS}$ : C, 53.77; H, 3.79; N, 7.52. Found: C, 54.01; H, 3.63; N, 7.40.

### **3-Cyano-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-4-(4-fluorophenyl)-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxamide (6f).**

化合物 **6a** (100 mg, 0.18 mmol)の NMP (0.5 mL)溶液にシアン化銅 (I) (55 mg, 0.62 mmol)を室温で加え、混合物をマイクロ波照射下、220 °Cで45分間攪拌した。反応混合物を EtOAc (15 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL)で希釈し、水層を EtOAc (3 × 15 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL)、水 (15 mL)および飽和食塩水 (15 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **6f** (44 mg, 49%)を黄色油状物として得た。MS (ESI+): 515.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.11 (6H, s), 2.35 (2H, d,  $J = 3.8$  Hz), 3.31–3.46 (2H, m), 4.66 (2H, br s), 6.74 (1H, br s), 6.90 (1H, br s), 7.13–7.24 (3H, m), 7.29–7.38 (1H, m), 7.40–7.51 (2H, m), 7.81 (1H, d,  $J = 4.3$  Hz). HRMS (ESI): calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{OS}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  515.0870. Found 515.0836.

### **5-Bromo-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide (7a).**

5-ブロモ-3-(4-フルオロフェニル)イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボン酸 **29a** (451 mg, 1.3 mmol)の DMF (6.0 mL) 溶液に **10** (349 mg, 1.4 mmol)、HATU (560 mg, 1.5 mmol)および  $^i\text{Pr}_2\text{EtN}$  (433 mg, 3.4 mmol)を室温で加え、混合物を同温度で24時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (15 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL)で希釈し、水層を EtOAc (3 × 15 mL)で抽出した。合わせた有機層を水 (2 × 15 mL)および飽和食塩水 (15 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **7a** (591 mg, 78%)を無色結晶として得た。mp 114–116 °C. MS (ESI+): 563.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.04–2.20 (6H, m), 2.38–2.48 (2H, m), 3.38–3.45 (2H, m), 4.65–4.80 (2H, m), 6.84–6.99 (1H, m), 7.02–7.19 (5H, m), 7.27–7.35 (1H, m), 7.36–7.41 (1H, m), 7.44–7.51 (1H, m), 7.62–7.72 (1H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , the minor signals are marked with an asterisk)  $\delta$  41.6\*, 44.9, 45.1\*, 45.8, 46.9, 50.6\*, 55.9\*, 57.5, 113.8, 113.8\*, 114.0\* (d,  $J = 21.6$  Hz), 114.1 (d,  $J = 21.7$  Hz), 117.0, 117.0\*, 119.6\*, 119.7, 124.0\*, 124.3, 125.4\* (d,  $J = 3.1$  Hz), 125.5 (d,  $J = 3.2$  Hz), 126.1\*, 126.2, 127.3, 127.8\*, 129.0, 129.3, 129.4\*, 129.8\*, 130.2, 130.4\*, 130.9, 131.0\*, 134.3 (d,  $J = 8.6$  Hz), 134.3\* (d,  $J = 8.6$  Hz), 138.7\*, 139.1, 140.1, 140.2\*, 145.1, 145.3\*, 162.6\* (d,  $J = 246.2$  Hz), 162.6 (d,  $J = 246.3$  Hz), 164.8\*, 165.2. Anal. Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{BrCl}_2\text{FN}_4\text{O}$ : C, 53.21; H, 3.93; N, 9.93. Found: C, 53.44; H, 3.96; N, 10.04.

### **Ethyl diazo(diethoxyphosphoryl)acetate (13).**



60% 水素化ナトリウム (0.6 g, 15 mmol in mineral oil)と THF (100 mL)の混合物にエチル (ジエトキシホスホリル)アセタート **12** (2.2 g, 10 mmol)を 0 °C でゆっくりと滴下し、混合物を同温度で 30 分間攪拌した。反応混合物に 4-アセトアミドベンゼンスルホニル アジド (2.5 g, 10.5 mmol) を 0 °C で加え、反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc/water (1:1, 200 mL)で希釈し、1 M HCl を加え pH 2 に調整し、水層を EtOAc (2 × 50 mL)で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン) で精製し **13** (2.5 g, quantitative)を無色油状物として得た。MS (ESI+): 251.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.24–1.41 (9H, m), 4.10–4.32 (6H, m).

#### **Ethyl 7-(4-fluorophenyl)-4-oxo-4H-thieno[3,4-c]pyran-6-carboxylate (14).**

4-(4-フルオロベンゾイル)チオフェン-3-カルボン酸 **11** (1.0 g, 4.0 mmol)、**13** (1.5 g, 6.0 mmol)、二ロジウム (II) テトラアセタート (18 mg, 0.04 mmol)およびトルエン (20 mL)の混合物を 80 °C で 3 時間攪拌した。室温まで冷却した後、反応混合物に 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エンを室温に加え、同温度で終夜攪拌した。反応混合物を EtOAc/water (1:1, 100 mL)で希釈し、1 M HCl を加え pH 1 に調整し、水層を EtOAc (2 × 50 mL)で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン) で精製し **14** (1.3 g, quantitative)を無色アモルファス状固体として得た。MS (ESI+): 319.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.14 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.17 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 7.12 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.14–7.21 (2H, m), 7.28–7.35 (2H, m), 8.55 (1H, d, *J* = 3.2 Hz).

#### **Ethyl 3-(4-fluorophenyl)-2-hydroxy-3-(4-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)-3-thienyl)acrylate (15a).**

化合物 **14** (160 mg, 0.50 mmol)の THF (2.0 mL)溶液に 2-アミノエタノール (60 mg, 1.0 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 18 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc/water (1:1, 40 mL)で希釈し、水層を EtOAc (2 × 20 mL)で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン) で精製し **15a** (150 mg, 80%)を無色アモルファス状固体として得た。MS (ESI+): 380.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.24 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.33 (1H, t, *J* = 4.6 Hz), 3.22–3.34 (1H, m), 3.68–3.89 (2H, m), 4.04–4.12 (1H, m), 4.20 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 4.83 (1H, s), 5.27 (1H, s), 6.75 (1H, dd, *J* = 3.0, 1.5 Hz), 6.98–7.08 (2H, m), 7.30–7.37 (2H, m), 8.17 (1H, d, *J* = 3.0 Hz).

#### **Ethyl**

#### **3-(4-((2-(dimethylamino)ethyl)carbamoyl)-3-thienyl)-3-(4-fluorophenyl)-2-hydroxyacrylate (15b).**

化合物 **15b** (370 mg)は、**14** (320 mg, 1.0 mmol)および *N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **49** (180 mg, 2.0 mmol)を用いて、**15a** と同様の方法により合成した。収率: 91%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 407.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.16 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.01 (6H, s), 2.15–2.22 (2H, m), 2.48–2.61 (1H, m), 2.89–3.02 (1H, m), 4.08–4.21 (2H, m), 4.31–4.41 (1H, m), 4.82 (1H, s), 6.80 (1H, dd, *J* = 3.1, 1.2 Hz), 6.96–7.05 (2H, m), 7.21–7.28 (2H, m), 8.14 (1H, d, *J* = 3.2 Hz).

**10-(4-Fluorophenyl)-3,4-dihydro-1*H*,6*H*-thieno[3',4':4,5]pyrido[2,1-*c*][1,4]oxazine-1,6-dione (16a).**

化合物 **15a** (150 mg, 0.40 mmol) のトルエン (5.0 mL)溶液に 4-トルエンスルホン酸 一水和物 (95 mg, 0.50 mmol)を室温で加え、混合物を 120 °C で 2 時間加熱還流した。反応混合物を EtOAc/water (1:1, 40 mL)で希釈し、水層 EtOAc で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI、EtOAc / ヘキサン) で精製し **16a** (100 mg, 80%)を無色アモルファス状固体として得た。MS (ESI+): 316.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.35–4.42 (2H, m), 4.56–4.62 (2H, m), 7.13–7.20 (2H, m), 7.21 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 7.26–7.31 (2H, m), 8.48 (1H, d, *J* = 3.2 Hz).

**Ethyl**

**5-(2-(dimethylamino)ethyl)-7-(4-fluorophenyl)-4-oxo-4,5-dihydrothieno[3,4-*c*]pyridine-6-carboxylate (16b).**

化合物 **16b** (380 mg)は、**15b** (400 mg, 0.98 mmol)および 4-トルエンスルホン酸 一水和物 (190 mg, 1.0 mmol)を用いて、**16a** と同様の方法により合成した。収率: quantitative、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 389.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.96 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.32 (6H, s), 2.63–2.72 (2H, m), 4.03 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.07–4.15 (2H, m), 7.08 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.09–7.17 (2H, m), 7.32–7.40 (2H, m), 8.42 (1H, d, *J* = 3.4 Hz).

**Ethyl 3-(4-fluorophenyl)-1-methyl-1*H*-indole-2-carboxylate (18).**

化合物 **17** (496 mg, 1.8 mmol)の DME (13 mL)溶液に 4-フルオロフェニルボロン酸 (492 mg, 3.5 mmol)、PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (144 mg, 0.18 mmol)および 2 M 炭酸セシウム水溶液 (2.7 mL, 5.4 mmol)を室温で加え、窒素雰囲気下、混合物を 90 °C で 2 時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去した後、残渣を EtOAc (30 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (30 mL)で希釈し、不溶物を濾去し、濾液の水層を EtOAc (3 × 30 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **18** (418 mg, 80%)を淡黄色油状物として得た。MS (ESI+): 297.9 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.08 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.08 (3H, s), 4.19 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 7.06–7.17 (3H, m), 7.34–7.43 (4H, m), 7.47–7.53 (1H, m).

**Ethyl 3-bromo-1-(4-fluorophenyl)-1*H*-indole-2-carboxylate (20).**

エチル 3-ブromo-1*H*-インドール-2-カルボキシレート **19** (516 mg, 1.9 mmol)のトリフルオロメチルベンゼン (20 mL)溶液に酢酸銅 (II) (700 mg, 3.9 mmol)、Et<sub>3</sub>N (390 mg, 3.9 mmol)、ピリジン (305 mg, 3.9 mmol)、4-フルオロフェニルボロン酸 (540 mg, 3.9 mmol)およびモレキュラーシーブ 4A (500 mg)を室温で加え、混合物を同温度で 30 分間、次いで 45 °C で 1 時間 30 分攪拌した。減圧下、溶媒を留去した後、残渣を EtOAc (20 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL)で希釈し、水層を EtOAc (3 × 20 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和炭酸

水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および飽和食塩水 (20 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **20** (546 mg, 78%) を無色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.19 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.23 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.16–7.24 (2H, m), 7.26–7.36 (4H, m), 7.73 (1H, d, *J* = 7.2 Hz).

#### **Ethyl 1-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxylate (21).**

化合物 **20** (312 mg, 0.86 mmol) の DMF (3 mL) 溶液にテトラメチルスズ (IV) (358 μL, 2.6 mmol) および PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mg, 0.086 mmol) を室温に加え、混合物を、窒素雰囲気下、120 °C で 1 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (20 mL) および水 (20 mL) で希釈し、水層を EtOAc (3 × 20 mL) で抽出した。合わせた有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **21** (244 mg, 95%) を無色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.16 (3H, dt, *J* = 1.5, 7.1 Hz), 2.67 (3H, d, *J* = 1.5 Hz), 4.19 (2H, dq, *J* = 1.5, 7.1 Hz), 6.97–7.04 (1H, m), 7.13–7.22 (3H, m), 7.25–7.32 (3H, m), 7.72 (1H, d, *J* = 7.9 Hz).

#### **Ethyl 2-azido-3-(4-bromo-2-thienyl)acrylate (23).**

エチル 2-アジド アセタート (172 g, 1.5 mol) および 4-ブロモチオフェン-2-カルバルデヒド **22** (82 g, 0.43 mol) の EtOH (700 mL) 溶液に、ナトリウム エトキシド (102 g, 1.5 mol) の EtOH (500 mL) 溶液を -10 °C でゆっくりと滴下し、混合物を同温度で 1 時間 30 分、次いで室温で 1 h 攪拌した。反応混合物を氷水に加え、析出物を濾取し、減圧下乾燥させ **23** (39 g, 30%) を固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.39 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.34 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 7.03 (1H, s), 7.26 (1H, s), 7.36 (1H, s).

#### **Ethyl 3-bromo-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylate (24).**

化合物 **23** (38 g, 126 mmol) のキシレン (300 mL) 溶液を煮沸したキシレン (500 mL) に加え、混合物を 120 °C で 2 時間攪拌した。室温まで冷却した後、反応混合物を減圧下濃縮した。残渣を EtOAc (300 mL) に溶解させ、シリカパッド (NH、EtOAc / ヘキサン) に通過させ、濾液を減圧下濃縮した。得られた懸濁液に 5% EtOAc / ヘキサンを加え攪拌した後、固体を濾取し **24** (29g, yield 85%) を黄色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.42 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.42 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.25 (1H, s), 9.20 (1H, br s).

#### **Ethyl 3-bromo-4-(4-fluorophenyl)-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylate (25a).**

化合物 **24** (1.5 g, 5.5 mmol) のトリフルオロメチルベンゼン (60 mL) 溶液に 4-フルオロフェニルボロン酸 (1.9 g, 13.6 mmol)、酢酸銅 (II) (2.5 g, 13.7 mmol)、モレキュラーシーブ 3A (5 g)、Et<sub>3</sub>N (1.9 mL, 13.6 mmol) およびピリジン (2.2 mL, 27 mmol) を室温に加え、混合物を開放空気系にて室温で 21 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (200 mL)、ヘキサン (70 mL) および 14% アンモニア水 (conc.NH<sub>3</sub>/water 1:1, 200 mL) で希釈し、水層を EtOAc/ヘキサン (5:2, 70 mL) で抽出

した。合わせた有機層を水および飽和食塩水 (200 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、不溶物を濾去した。濾液をシリカパッド(NH、EtOAc)に通過させ、濾液を減圧下濃縮した。残渣に<sup>1</sup>Pr<sub>2</sub>O / ヘキサン (1:2, 15 mL)を加え、析出物を濾取した後、ヘキサンで洗浄し **25a** (1.7 g, 85%)を無色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.10 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.08 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 7.17–7.38 (2H, m), 7.38–7.57 (3H, m), 7.71 (1H, s).

#### **Ethyl 4-(4-fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylate (25e).**

化合物 **25a** (619 mg, 1.7 mmol)の DMF / トルエン (1:1, 24 mL)溶液にカリウム トリフルオロアセタート (1020 mg, 6.7 mmol)およびヨウ化銅 (I) (640 mg, 3.4 mmol)を室温に加え、混合物を 160 °C で 4 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (20 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL)で希釈し、不溶物を濾去し、濾液の水層を EtOAc (3 × 15 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL)、水 (2 × 15 mL)および飽和食塩水 (15 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し **25e** (430 mg, 72%)を黄色油状物として得た。MS (ESI+): 358.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.20 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.16 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 7.09–7.18 (2H, m), 7.31 (2H, dd, *J* = 8.7, 4.9 Hz), 7.37 (1H, s), 7.73 (1H, s).

#### **Methyl 3-chloro-3-(4-fluorophenyl)-2-oxopropanoate (27a)**

4-フルオロベンズアルデヒド **26a** (5.1 g, 41.1 mmol)の THF (40 mL)溶液にジクロロ酢酸メチル (7.6 g, 53.2 mmol)を加え、混合物を 0 °C まで冷却した。混合物にナトリウム メトキシド (2.9 g, 53.7 mmol) を 0 °C でゆっくりと加え、反応混合物を同温度で 10 分間、次いで室温で 50 分間攪拌した。反応混合物を 85 °C まで加熱し、同温度で 2 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、EtOAc (90 mL)および水 (60 mL)で希釈した。有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI、EtOAc / ヘキサン)で精製し **27a** (6.58 g, 70%)を黄色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.86 (3H, s), 6.14 (1H, s), 7.09 (2H, t, *J* = 8.6 Hz), 7.36–7.47 (2H, m).

#### **Methyl 5-bromo-3-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate hydrochloride (28a)**

2-アミノ-6-ブロモピリジン(1.0 g, 5.85 mmol)の EtOH (5 mL)溶液に **27a** (1.95 g, 8.47 mmol)の EtOH (3 mL)溶液を加え、混合物を 90 °C で 12 時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下、溶媒量が約 3.0 mL になるまで濃縮し、残渣を EtOAc (4.0 mL)で希釈した。析出した固体を濾取し、EtOAc で洗浄し **28a** (1.20 g, 53%)を無色結晶として得た。mp.: 192–194 °C. MS (ESI+): 349.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.66 (3H, s), 7.23–7.32 (2H, m), 7.34–7.41 (2H, m), 7.48–7.59 (2H, m), 7.76–7.85 (1H, m).

#### **5-Bromo-3-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (29a).**

化合物 **28a** (1.2 g, 3.4 mmol)の EtOH (6.0 mL)および THF (4.0 mL) 溶液に 2 M NaOH (7.0 mL)を加え、混合物を 65 °C で 30 分間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下

濃縮した。残渣を 0 °C にて水 (100 mL) および 6 M HCl (2.5 mL) で希釈し、析出した固体を濾取し、水 (2 × 10 mL) で洗浄し **29a** (940 mg, 91%) を無色固体として得た。MS (ESI+): 335.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.18–7.32 (4H, m), 7.44–7.56 (2H, m), 7.70–7.81 (1H, m), 12.63 (1H, br s).

## 計算化学

### CENP-E ドッキングモデルの構築

CENP-E ホモロジーモデルは、Eg5 タンパクと阻害剤との共結晶構造<sup>27</sup> (PDB: 2GM1) を基に、MOE (version 2008.1002)<sup>45</sup> を用いて構築した。構築したホモロジーモデルは、Amber99 力場および距離依存誘電率 (*r*) を用いて最適化した。化合物 **1b** のドッキングモデルを構築するにあたり、2GM1 結晶内の阻害剤と同様の結合様式を **1b** が有すると仮定した。化合物 **1b** と CENP-E タンパクとが立体反発したため、L5 サイト内の幾つかのアミノ酸残基の位置を、MMFF94s 力場および距離依存誘電率 (*r*) を用いたエネルギー極小化により修正した。他のデザイン化合物のドッキングモデルは、同様の条件下で、**1b** を基にエネルギーの極小化により手動修正することで構築した。

### 静電ポテンシャルマップ (EPM) 解析

デザイン化合物に関する静電ポテンシャルマップは次に示す方法により計算した。部分電荷、局所エネルギー最小配座および分子表面は、MOE (version 2008.1002)<sup>45</sup> を用いて計算した。各工程における力場として MMFF94x を用いた。分子表面は、solid display 様式のコノリー表面を使用し、静電ポテンシャルに基づき着色した (Transparency of front: 64; Electrostatic color map ranges: from -15(赤) through 0 (白) to +15(青))。

## 生物評価

### CENP-E 酵素アッセイ

CENP-E の ATPase アッセイは、62.5 ng/mL の CENP-E モーター領域 (Cytoskeleton)、22 μg/mL の微小管 (Cytoskeleton) および 25 μM の ATP 存在下で実施した。反応は、6 μL の反応緩衝溶液 (20 mM PIPES-KOH, pH 6.8, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.0 mM KCl, 1.0 mM EGTA, 1.0 mM dithiothreitol, 0.01% w/v Brij35, and 0.2% w/v BSA) 中、室温で 1 時間実施した。ATPase 反応により生成した ADP 量を ADP-Glo (Promega) を用いて測定した。発光は Envision (PerkinElmer Inc., MA) で測定した。

### 細胞周期の同期

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞を 6 穴マルチウェルプレートに 1 × 10<sup>5</sup> 細胞/ウェルの濃度で播種し、10% ウシ血清を含む Dulbeccos's Modified Eagle medium (DMEM+10%FBS) で炭酸ガスインキュベーター (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 中で細胞がプレート面に接着するまで培養した。2 mM のチミジン (Sigma Aldrich, USA) を含む DMEM+10%FBS で 16 時間処理を行ったのち (1<sup>st</sup> block)、チミジンを含まない DMEM+10%FBS で 8 時間培養した。再度、2 mM のチミジンを含む

DMEM+10%FBS で 16 時間処理を行ったのち (2<sup>nd</sup> block)、チミジンを含まない DMEM+10%FBS で、細胞周期が G2 期到達するまで 7 時間培養を行い、テスト化合物を添加した。テスト化合物添加 4 時間後に細胞をトリプシン処理し、細胞を回収し、70%エタノールで固定を行い細胞周期解析に用いた。

### FACS 解析

FACS 解析は下記の手法を用いて行った<sup>54</sup>。細胞周期を G2 期に同期化した HeLa 細胞をテスト化合物で 4 時間処理を行った後、トリプシン処理で細胞を回収し 70%エタノールを用い一晩-20 度で固定を行った。固定後のサンプルを 4% FBS を含む PBS 溶液 (FACS バッファー) で 2 回洗浄し、FACS バッファーで希釈した AlexaFluor 488-conjugated anti-phospho Histone H3 antibody (1:20 dilution; cell signaling, USA) と RNase (0.2 mg/ml; Invitrogen) の反応液 100  $\mu$ L で室温、遮光条件下で 30 分インキュベートを行った。染色後の細胞サンプルを FACS バッファーで 3 回洗浄し、10 mg/mL of propidium iodide (PI; Sigma Aldrich, USA) を含む FACS バッファーに懸濁した。1 万細胞中の pHH3 陽性細胞を FACScalibur (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) で検出した。pHH3 陽性細胞の割合は下記の式で求めた。

% pHH3 陽性細胞 = pHH3 陽性細胞数 / (1 万-デブリス細胞)  $\times$  100.

### 膜透過試験 (PAMPA)

フィルター表面に GIT-0 Lipid Solution (pION 社製) を塗布した PAMPA サンドイッチプレート (pION 社製) の Donor 側ウェルに 10mmol/L の評価化合物を添加した PRISMA HT universal Buffer (pION 社製、pH7.4 に調整)、Acceptor 側ウェルに Acceptor Sink Buffer (pION 社製) を加え、サンドイッチした後、室温で 3 時間インキュベートした。インキュベート後、サンドイッチプレートを分離し、吸光プレートリーダー (Spectra Max 190、モレキュラーデバイス社製) により 250–400nm の吸光度を測定した。得られた吸光度の積算値を用い、膜透過速度 (Pe, nm/sec) を算出した。

第 3 章に関する実験項

### 合成

#### 5-Bromo-3-(2-chloro-4-fluorophenyl)-N-(3,4-dichlorobenzyl)-N-[2-(dimethylamino)ethyl]imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide hydrochloride (7b)

化合物 **29b** (185 mg, 0.50 mmol) および **10** (124 mg, 0.50 mmol) の THF (2 mL) およびピリジン (1 mL) 溶液に、HATU (228 mg, 0.60 mmol) を室温で加え、混合物を 70 °C で 1 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) を加え反応を停止させ、水層を EtOAc (2  $\times$  20 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (20 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し、目的物を含む画分を減圧下濃縮した。残渣に Et<sub>2</sub>O (10 mL) およ

び 4 M HCl / EtOAc (0.2 mL, 0.80 mmol) を室温で加え、析出物を濾取した後、Et<sub>2</sub>O で洗浄し **7b** (263 mg, 83%) を無色アモルファス状固体として得た。MS (ESI+): 597.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.65–2.83 (6H, m), 3.09–3.88 (4H, m), 4.54–5.10 (2H, m), 7.08–7.94 (9H, m), 10.27–10.66 (1H, m). Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>BrCl<sub>3</sub>FN<sub>4</sub>O·HCl·1.5H<sub>2</sub>O: C, 45.34; H, 3.81; N, 8.46. Found: C, 45.13; H, 3.78; N, 8.27.

**5-Bromo-3-(3-chloro-4-fluorophenyl)-N-(3,4-dichlorobenzyl)-N-[2-(dimethylamino)ethyl]imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide dihydrochloride (**7c**)**

化合物 **29c** (150 mg, 0.41 mmol) の THF (3 mL) 溶液に **10** (100 mg, 0.40 mmol) の THF (1 mL) 溶液、HATU (228 mg, 0.60 mmol) および Et<sub>3</sub>N (275 μL, 2.0 mmol) を室温で加え、混合物を同温度で 14 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (40 mL) および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (40 mL) で希釈し、水層を EtOAc (40 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (40 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し、目的物を含む画分を減圧下濃縮した。残渣に EtOAc (1.0 mL) および 4 M HCl / EtOAc (1.0 mL, 4.0 mmol) を室温で加え、反応混合物を 15 分間攪拌した。反応混合物に Et<sub>2</sub>O (5 mL) を加え、析出物を濾取した後、Et<sub>2</sub>O で洗浄し **7c** (102 mg, 38%) を無色固体として得た。MS (ESI+): 597.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.64–2.88 (6H, m), 3.05–3.24 (1H, m), 3.42–3.72 (3H, m), 4.52–4.88 (2H, m), 6.82–7.99 (9H, m), 10.06–10.72 (1H, m). Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>BrCl<sub>3</sub>FN<sub>4</sub>O·2HCl: C, 44.71; H, 3.45; N, 8.34. Found: C, 44.86; H, 3.73; N, 8.32.

**5-Bromo-N-(3,4-dichlorobenzyl)-3-(3,4-difluorophenyl)-N-[2-(dimethylamino)ethyl]imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide (**7d**)**

化合物 **7d** (170 mg) は **29d** (144 mg, 0.41 mmol) および **10** (89 mg, 0.36 mmol) を用いて、**7a** と同様の方法により合成した。収率: 71%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 581.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.86–2.11 (6H, m), 2.15–2.42 (2H, m), 3.18–3.63 (2H, m), 4.49–4.71 (2H, m), 7.05–7.89 (9H, m). Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>BrCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O: C, 51.57; H, 3.64; N, 9.62. Found: C, 51.73; H, 3.80; N, 9.40.

**5-Bromo-N-(3,4-dichlorobenzyl)-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide dihydrochloride (**7e**)**

化合物 **7e** (437 mg) は **29e** (300 mg, 0.86 mmol) および **10** (212 mg, 0.86 mmol) を用いて、**7b** と同様の方法により合成した。収率: 83%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 577.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.20–2.28 (3H, m), 2.74 (6H, t, *J* = 4.2 Hz), 3.03–3.76 (4H, m), 4.48–4.85 (2H, m), 6.88–7.46 (7H, m), 7.46–7.72 (1H, m), 7.69–7.92 (1H, m), 9.74–10.25 (1H, m). Anal. Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>BrCl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O·2HCl·1H<sub>2</sub>O: C, 46.66; H, 4.22; N, 8.37. Found: C, 46.68; H, 4.24; N, 8.49.

**5-Bromo-N-(3,4-dichlorobenzyl)-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide dihydrochloride (7f)**

化合物 **7f** (53 mg) は **29f** (60 mg, 0.20 mmol) および **10** (55 mg, 0.20 mmol) を用いて、**7b** と同様の方法により合成した。収率: 45%、無色アモルファス状固体。MS (ESI<sup>+</sup>): 593.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.72 (6H, d, *J* = 4.5 Hz), 2.94–3.69 (4H, m), 3.77 (3H, s), 4.57–4.75 (2H, m), 6.89–7.14 (2H, m), 7.20–7.44 (5H, m), 7.46–7.65 (1H, m), 7.70–7.95 (1H, m), 9.94–10.64 (1H, m). Anal. calcd for C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>BrCl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·2HCl·1.5H<sub>2</sub>O: C; 44.98, H; 4.21, N; 8.07. Found: C; 44.92, H; 4.34, N; 8.06.

**tert-Butyl**

**[2-((3,4-dichlorobenzyl)[2-(dimethylamino)ethyl]carbamoyl)-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-5-yl]methylcarbamate (7g')**

化合物 **26e** (691 mg, 5.0 mmol) の THF (15 mL) 溶液にジクロロ酢酸メチル (858 g, 6.0 mmol) を加え、混合物を -78 °C に冷却した。混合物にナトリウム メトキシド (324 mg, 6.0 mmol) を -78 °C でゆっくりと加え、反応混合物を室温まで昇温しながら 30 分間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣を水 (40 mL) で希釈し、水層を EtOAc/Et<sub>2</sub>O (1:1, 40 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、残渣を EtOH (20 mL) に溶解させた。混合物に *tert*-ブチル (6-アミノピリジン-2-イル) カルバマート **7** (1.05 g, 5.0 mmol) を室温で加え、混合物を 90 °C で 4 時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下濃縮した。反応混合物を EtOAc および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、水層を EtOAc (2 × 50 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (40 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し、メチルエステル体 **28g'** およびエチルエステル体 **30g'** (514 mg) の混合物を黄色固体として得た。**28g'**/**30g'** (ca. 7 : 3) の含有比率は <sup>1</sup>H NMR により決定した。For **28g'**: MS (ESI<sup>+</sup>): 400.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.36 (9H, s), 2.37 (3H, d, *J* = 1.5 Hz), 3.86 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 6.49 (1H, s), 7.14–7.24 (2H, m), 7.28–7.41 (3H, m), 7.45–7.53 (1H, m). For **30g'**: MS (ESI<sup>+</sup>): 414.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.29 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.36 (9H, s), 2.37 (3H, d, *J* = 1.5 Hz), 4.31 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.49 (1H, s), 7.10–7.23 (2H, m), 7.28–7.39 (3H, m), 7.46–7.53 (1H, m).

化合物 **28g'** および **30g'** の混合物 (121 mg) の DMF (2 mL) 溶液に 60% 水素化ナトリウム (14 mg, 0.36 mmol in mineral oil) およびヨウ化メチル (37 μL, 0.60 mmol) を室温で加え、混合物を同温度で 2 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc および水で希釈し、水層を EtOAc (2 × 30 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI、EtOAc / ヘキサン) で精製し、メチルエステル体 **28g** およびエチルエステル体 **30g** (107 mg) の混合物を黄色固体として得た。化合物 **28g/30g** (ca. 7:3) の含有比率は <sup>1</sup>H NMR により決定した。For **28g**: MS (ESI<sup>+</sup>): 414.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.28–1.34 (9H, m), 2.26–2.38 (3H, m), 2.48–2.62 (3H, m), 3.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 6.58 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 6.98–7.12 (1H, m), 7.13–7.37 (3H, m), 7.65–7.72 (1H, m). **30g**: MS (ESI<sup>+</sup>): 428.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.21–1.29 (3H, m, CH<sub>3</sub>), 1.28–1.43 (9H,



m), 2.26–2.38 (3H, m), 2.63–2.79 (3H, m), 4.29 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 6.65–6.74 (1H, m), 6.98–7.11 (1H, m), 7.13–7.35 (3H, m), 7.69–7.75 (1H, m).

化合物 **28g** および **30g** の混合物 (107 mg)の MeOH (2 mL)および THF (2 mL)溶液に、1 M NaOH (1 mL)を室温に加え、混合物を 60 °C で 1 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、水 (20 mL)で希釈した。水層を EtOAc (2 × 30 mL)で抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、crude material of 5-[(*tert*-ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ]-3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-2-カルボン酸 **29g** の粗生成物を得た。得られた **29g** を THF (3 mL)に溶解させ、**10** (64 mg, 0.26 mmol)、HATU (119 mg, 0.31 mmol)およびピリジン (0.5 mL)を室温に加えた。反応混合物を同温度で終夜攪拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL)で希釈し、水層を EtOAc (2 × 30 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し、**7g'** (117 mg, 16% in 4 steps from **26e**)を無色油状物として得た。MS (ESI+): 628.3 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.28–1.42 (9H, m), 1.99–2.72 (14H, m), 3.26–3.63 (2H, m), 4.53–4.87 (2H, m), 6.50–6.78 (1H, m), 6.85–7.48 (7H, m), 7.57–7.66 (1H, m).

#### ***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-(methylamino)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide dihydrochloride (**7g**)**

化合物 **7g'** (117 mg, 0.19 mmol)および TFA (0.5 mL)の混合物を室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、水層を EtOAc (2 × 30 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣を Et<sub>2</sub>O (4 mL)および EtOAc (1 mL)に溶解させ、4 M HCl / EtOAc (0.2 mL, 0.8 mmol)および Et<sub>2</sub>O (5 mL)を加えた。析出物を濾取し、Et<sub>2</sub>O で洗浄し、**7g** (80 mg, 71%)を無色固体として得た。MS (ESI+): 528.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  2.22–2.30 (3H, m), 2.67–2.87 (9H, m), 3.10–3.70 (4H, m), 4.16–4.92 (4H, m), 6.04–6.31 (1H, m), 7.01–7.95 (8H, m), 9.57–10.82 (1H, m). Anal. Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>5</sub>O·2HCl·2.8H<sub>2</sub>O: C, 49.75; H, 5.51; N, 10.74. Found: C, 49.86; H, 5.31; N, 10.74.

#### ***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide (**7h**)**

化合物 **7e** (148 mg, 0.26 mmol)の DMF (1.2 mL)溶液にナトリウム メトキシド (28 mg, 0.51 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 12 時間攪拌した。反応混合物に EtOAc (15 mL)および水 (15 mL)を加え、水層を EtOAc (2 × 10 mL)で抽出した。合わせた有機層を水 (2 × 10 mL)および飽和食塩水 (15 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン)で精製し **7h** (68 mg, 49%)を紫色油状物として得た。MS (ESI+): 529.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.01–2.19 (6H, m), 2.29 (3H, br s), 2.32–2.50 (2H, m), 3.32–3.49 (2H, m), 3.73 (3H, d,  $J = 9.6$  Hz), 4.66 (2H, d,  $J = 4.2$  Hz), 5.96–6.06 (1H, m), 6.85–7.09 (3H, m), 7.15–7.24 (3H, m), 7.27–7.34 (2H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , the minor signals are marked with an asterisk)  $\delta$  14.0<sup>#</sup>, 14.1<sup>\*\*</sup>, 41.8<sup>\*</sup>, 44.8, 45.1<sup>\*</sup>, 45.9, 47.1,

50.5\*, 55.9\*, 56.5, 56.5\*, 57.4, 89.9, 90.0\*, 109.3, 109.3\*, 113.4\* (d,  $J = 22.5$  Hz), 113.4 (d,  $J = 22.3$  Hz), 121.0\*, 121.5, 122.3\* (d,  $J = 17.4$  Hz), 122.4 (d,  $J = 17.6$  Hz), 126.2\* (d,  $J = 3.6$  Hz), 126.5 (d,  $J = 3.6$  Hz), 127.2, 127.2\*, 127.5, 127.7\*, 129.1, 129.3\*, 129.3, 129.7\*, 129.9 (d,  $J = 8.2$  Hz), 129.9\* (d,  $J = 8.2$  Hz), 130.2, 130.3\*, 130.8, 130.9\*, 133.6\* (d,  $J = 4.9$  Hz), 133.8 (d,  $J = 5.2$  Hz), 138.7\*, 138.8, 138.9\*, 139.3, 145.1, 145.3\*, 151.7, 151.7\*, 160.2\* (d,  $J = 243.9$  Hz), 160.2 (d,  $J = 244.2$  Hz), 165.6\*, 165.9 (#assignments may be interchangeable). Anal. Calcd for  $C_{27}H_{27}Cl_2FN_4O_2 \cdot 1.5H_2O$ : C, 58.28; H, 5.43; N, 10.07. Found: C, 58.19; H, 5.31; N, 9.87.

***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-5-ethynyl-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide dihydrochloride (7i)**

化合物 **7i** (78 mg)は **29i** (55.0 mg, 0.187 mmol)および **10** (42 mg, 0.17 mmol)を用いて、**7c** と同様の方法により合成した。収率: 77%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 523.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2.25 (3H, d,  $J = 0.8$  Hz), 2.67–2.82 (6H, m), 3.10–3.78 (4H, m), 4.55–4.65 (2H, m), 4.74–4.81 (1H, m), 7.06–7.46 (7H, m), 7.50–7.66 (1H, m), 7.73–7.91 (1H, m), 9.99–10.50 (1H, m). Anal. Calcd for  $C_{28}H_{25}Cl_2FN_4O \cdot 2HCl \cdot 0.8H_2O$ : C, 55.06; H, 4.72; N, 9.17. Found: C, 55.11; H, 4.68; N, 9.10.

**5-Cyclopropyl-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide dihydrochloride (7j)**

化合物 **7j** (83 mg)は **29j** (85 mg, 0.275 mmol)および **10** (61.8 mg, 0.25 mmol)を用いて、**7c** と同様の方法により合成した。収率: 54%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 539.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.24–0.56 (2H, m), 0.54–0.84 (2H, m), 1.37–1.73 (1H, m), 2.24 (3H, s), 2.68–2.78 (6H, m), 3.06–3.24 (1H, m), 3.42–3.72 (3H, m), 4.58–4.82 (2H, m), 6.78–7.81 (9H, m), 10.19–10.92 (1H, m). Anal. Calcd for  $C_{29}H_{29}Cl_2FN_4O \cdot 2HCl \cdot 0.5H_2O$ : C, 56.05; H, 5.19; N, 9.02. Found: C, 55.89; H, 5.41; N, 8.78.

**5-Cyano-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide dihydrochloride (7k)**

化合物 **7k** (83 mg)は **29k** (62.0 mg, 0.21 mmol)および **10** (48.0 mg, 0.195 mmol)を用いて、**7c** と同様の方法により合成した。収率: 71%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 524.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2.27 (3H, d,  $J = 1.3$  Hz), 2.68–2.79 (6H, m), 3.14–3.25 (1H, m), 3.39–3.74 (3H, m), 4.57–4.86 (2H, m), 7.08–7.68 (7H, m), 7.79–7.95 (1H, m), 8.02–8.24 (1H, m), 9.75–10.48 (1H, m). Anal. Calcd for  $C_{27}H_{24}Cl_2FN_5O \cdot 2HCl \cdot 0.5H_2O$ : C, 53.48; H, 4.49; N, 11.55. Found: C, 53.73; H, 4.59; N, 11.29.

**5-Bromo-3-(2-chloro-4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (29b)**

化合物 **28b** (483 mg, 1.26 mmol)の MeOH (6.0 mL)および THF (6.0 mL) 溶液に 2 M LiOH (3.0 mL, 6.0 mmol)を室温で加え、混合物を 40 °C で 1 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却

した後、減圧下濃縮した。残渣に 1 M HCl (10 mL) および EtOAc を加え、水層を EtOAc/THF (4:1, 2 × 15 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (20 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。得られた固体を Et<sub>2</sub>O で洗浄し、**29b** (456 mg, 98%) を無色固体として得た。MS (ESI+): 368.9 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.26–7.37 (3H, m), 7.58 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz), 7.65 (1H, dd, *J* = 8.6, 6.3 Hz), 7.75–7.83 (1H, m), 12.74 (1H, br s).

#### 5-Bromo-3-(3-chloro-4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (**29c**)

3-クロロ-4-フルオロベンズアルデヒド **26c** (945 mg, 6.0 mmol) の THF (6.0 mL) 溶液にジクロロ酢酸メチル (1.07 g, 7.5 mmol) を室温に加え、混合物を 0 °C に冷却した。混合物にナトリウム メトキシド (405 mg, 7.5 mmol) を 0 °C でゆっくり加え、同温度で 10 分間、次いで室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を 80 °C まで昇温し、同温度で 1 時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、水 (30 mL) を加えた。水層を EtOAc (2 × 40 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン) で精製し、メチル 3-クロロ-3-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-2-オキシプロパノアート **27c** を得た。得られた **27c** を EtOH (4.5 mL) に溶解させ、混合物に 2-アミノ-6-ブロモピリジン (318 mg, 1.8 mmol) を加え、90 °C で 14 時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下濃縮した。残渣を Et<sub>2</sub>O (5.0 mL) に懸濁させ、固体を濾取した後、Et<sub>2</sub>O (5.0 mL) で洗浄しメチルエステル体 塩酸塩 **28c** およびエチルエステル体 塩酸塩 **30c** の混合物を得た。For **28c**; MS (ESI+): 383.0 [M + H]<sup>+</sup>. For **30c**; MS (ESI+): 397.0 [M + H]<sup>+</sup>.

得られた混合物を THF (2.0 mL) および MeOH (2.0 mL) に溶解させ、混合物を 60 °C に昇温した。混合物に同温度で 2 M NaOH (2.0 mL, 4 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、EtOAc (30 mL) および水 (30 mL) で希釈し、水層を EtOAc (2 × 30 mL) で洗浄した後、2 M HCl (2 mL, 4.0 mmol) を加え pH 4 に調整した。水層を EtOAc (2 × 30 mL) で抽出した後、合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し **29c** (284 mg, 13% in 3 steps from **26c**) を黄色固体として得た。MS (ESI+): 369.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.22–7.66 (4H, m), 7.68–7.85 (2H, m), 12.76 (1H, br s).

#### 5-Bromo-3-(3,4-difluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (**29d**)

化合物 **29d** (1.25 g) は **28d** (1.41 g, 3.84 mmol) を用いて、**29b** と同様の方法により合成した。収率: 92%、無色油状物。MS (ESI+): 353.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.24–7.38 (3H, m), 7.48 (1H, dt, *J* = 11.0, 8.5 Hz), 7.67 (1H, ddd, *J* = 11.5, 7.9, 2.1 Hz), 7.72–7.82 (1H, m), 12.69 (1H, br s).

#### 5-Bromo-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (**29e**)

化合物 **29e** (1.46 g) は **28e** (2.0 g, 5.50 mmol) を用いて、**29b** と同様の方法により合成した。収率: 71%、淡茶色結晶。mp.: 211 °C (decomposition). MS (ESI+): 349.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.26 (3H, d, *J* = 1.5 Hz), 6.87–7.59 (5H, m), 7.54–8.01 (1H, m), 12.59 (1H, br s).

### 5-Bromo-3-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (29f)

4-フルオロ-3-メトキシベンズアルデヒド **26f** (1.5 g, 9.73 mmol)の THF 溶液にジクロロ酢酸メチル (1.46 g, 10.2 mmol)を室温で加え、 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却した。混合物にナトリウム メトキシド (525 mg, 9.72 mmol)を同温度で加え、10 分間攪拌した。反応混合物を 30 以上かけて徐々に室温まで昇温し、同温度で 6 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣を EtOAc (100 mL)および水 (100 mL)で希釈した。水層を EtOAc で抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水 (100 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、メチル 3-クロロ-3-(4-フルオロ-3-メトキシフェニル)-2-オキソプロパノアート **27f** を黄色油状物として得た。得られた **27f** を EtOH (20 mL)に溶解させ、混合物に 2-アミノ-6-ブロモピリジン (1.68 g, 9.73 mmol)を室温で加え、混合物を  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 12 時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下濃縮した。残渣を EtOAc (100 mL)希釈し、飽和食塩水 (100 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI、EtOAc / ヘキサン)で精製しメチルエステル体 **28f** およびエチルエステル体 **30f** の混合物を得た。For **28f**; MS (ESI+): 379.0 [M + H]<sup>+</sup>. For **30f**; MS (ESI+): 393.0 [M + H]<sup>+</sup>.

得られた混合物を THF (15 mL)および MeOH (3.0 mL)に溶解させ、混合物に 2 M LiOH (6.0 mL, 12 mmol)を室温で加え、 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 4 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣に 2 M HCl (7.0 mL, 14 mmol)を加えた。析出物を濾取し、水で洗浄後、減圧下乾燥させ **29f** (1.02 g, 29% in 3 steps from **26f**) を無色結晶として得た。mp.:  $214\text{--}217\text{ }^{\circ}\text{C}$ . MS (ESI+): 365.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3.80 (3H, s), 7.04 (1H, ddd, *J* = 8.3, 4.5, 2.1 Hz), 7.13–7.52 (4H, m), 7.65–8.10 (1H, m).

### 5-Ethynyl-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (29i)

化合物 **29i** (51.8 mg)は **28i** (58.0 mg, 0.187 mmol)を用いて、**29b** と同様の方法により合成した。収率: 94%、黄色固体、MS (ESI+): 295.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2.26 (3H, d, *J* = 1.3 Hz), 4.50 (1H, s), 7.04–7.42 (5H, m), 7.73–7.81 (1H, m), 12.46 (1H, br s).

### 5-Cyclopropyl-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (29j)

4-フルオロ-3-メチルベンズアルデヒド **26e** (4.00 g, 29.0 mmol)の THF (45 mL)溶液にジクロロ酢酸メチル (1.46 g, 10.2 mmol)を加え、混合物を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却した。混合物に同温度でナトリウム *tert*-ブトキシド (3.34 g, 34.8 mmol)を加え、同温度で 20 分間、次いで室温で 3 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣を水および EtOAc で希釈した。水層を EtOAc (50 mL)で抽出し、有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI、EtOAc / ヘキサン)で精製しメチル 3-クロロ-3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-2-オキソプロパノアート **27e** を黄色油状物として得た。6-シクロプロピルピリジン-2-アミン (1.03 g, 7.70 mmol)の EtOH (6.0 mL)溶液に、得られた **27e** の EtOH (2.0 mL)溶液を室温で加え、窒素雰囲気下、混合物を  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 17 時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後、残渣を EtOAc (30 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (30 mL)で希釈し、不溶物を濾去し、濾液の水層を EtOAc (3 × 20 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽

和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン)で精製した。目的物を含む画分を濃縮し、得られた固体を濾取し、ヘキサン / EtOAc (10:1)で洗浄しメチルエステル体 **28j** およびエチルエステル体 **30j** の混合物 (1.39 g)を得た。For **28j**; MS (ESI+): 325.1 [M + H]<sup>+</sup>. For **30j**; MS (ESI+): 339.1 [M + H]<sup>+</sup>.

得られた混合物を THF (6.0 mL)および MeOH (6.0 mL)に室温で溶解させ、60 °C に昇温した。混合物に 2 M NaOH (8 mL, 16.0 mmol)を同温度で加え、40 分撹拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下濃縮した。残渣に 6 M HCl (2 mL, 12 mmol)および 2 M HCl (2.0 mL, 4.0 mmol)を 0 °C で加え、析出物を濾取し、水で洗浄し、減圧下 60 °C で乾燥させ **29j** (1.21 g, 25% yield in 3 steps from **26e**)を無色結晶として得た。mp.: 208–210 °C. MS (ESI+): 311.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.30–0.42 (2H, m), 0.60–0.70 (2H, m), 1.37–1.54 (1H, m), 2.26 (3H, s), 6.71 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.14 (1H, dd, *J* = 9.8, 8.3 Hz), 7.25 (1H, dd, *J* = 9.0, 6.9 Hz), 7.34–7.48 (2H, m), 7.55 (1H, d, *J* = 8.9 Hz).

#### 5-Cyano-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (**29k**)

化合物 **29k** (63.0 mg)は **28k** (96 mg, 0.31 mmol)を用いて **29b** と同様の方法により合成した。収率: 69%、無色固体。MS (ESI+): 296.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.28 (3H, s), 7.21–7.31 (1H, m), 7.36–7.56 (3H, m), 7.82 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 8.05–8.15 (1H, m).

#### Methyl 5-bromo-3-(2-chloro-4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (**28b**)

2-クロロ 4-フルオロベンズアルデヒド **26b** (1.59 g, 10 mmol)の THF (30 mL)溶液にジクロロ酢酸メチル (2.86 g, 20 mmol)を室温で加え、混合物を−78 °C に冷却した。混合物にナトリウム *tert*-ブトキシド (1.92 g, 20 mmol)を同温度で加え 30 分間撹拌し、次いで室温まで昇温しながら 3 時間撹拌した。反応混合物を EtOAc (50 mL)および水 (50 mL)で希釈し、水層を EtOAc (50 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (50 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン)で精製し、2-クロロ-3-(2-クロロ-4-フルオロフェニル)オキシラン-2-カルボキシラート **27b'** (2.53 g, 96%) を無色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.94 (3H, s), 4.65 (1H, s), 6.99–7.10 (1H, m), 7.14–7.21 (1H, m), 7.29–7.39 (1H, m).

得られた **27b'** (2.17 g, 8.19 mmol)の THF (20 mL)溶液に臭化マグネシウムを室温で加え、混合物を 80 °C で 30 分間撹拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、不溶物を濾別した。濾液を EtOAc (30 mL)および水 (30 mL)で希釈し、有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、メチル 3-ブロモ-3-(2-クロロ-4-フルオロフェニル)-2-オキソプロパノアート **27b** を油状物として得た。得られた **27b** に 2-アミノ-6-ブロモピリジン (1.42 g, 8.19 mmol)の EtOH (20 mL)溶液を加え、混合物を 80 °C で終夜撹拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)を加え、水層を EtOAc (2 × 50 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (50 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサ

ン)で精製し、**28b** (481 mg, 15% in 3 steps from **26b**)を無色アモルファス固体として得た。MS (ESI+): 383.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.86 (3H, s), 7.05–7.28 (4H, m), 7.44 (1H, dd, *J* = 8.6, 5.9 Hz), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.9, 1.1 Hz).

#### **Methyl 5-bromo-3-(3,4-difluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (28d)**

ジクロロ酢酸メチル (10 g, 70.3 mmol)の THF (100 mL)溶液に 3,4-ジフルオロベンズアルデヒド **26d** (10.5 g, 73.4 mmol) の THF (20 mL)溶液を室温で加え、混合物を 0 °C に冷却した。混合物にナトリウム メトキシド (3.8 g, 70.3 mmol)を 0 °C でゆっくり加え、混合物を室温で 2 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣を EtOAc (200 mL)および水 (100 mL)で希釈した。有機層を飽和食塩水 (100 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン)で精製しメチル 3-クロロ-3-(3,4-ジフルオロフェニル)-2-オキソプロパノアート **27d** を得た。得られた **27d** の一部 (5.0 g, 20 mmol)を EtOH (50 mL)に溶解させ、混合物に 2-アミノ-6-ブロモピリジン (3.5 g, 20 mmol)を室温で加え、混合物を 90 °C で 6 時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下濃縮した。残渣を EtOAc (200 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL)を加え、水層を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水 (100 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン)で精製し **28d** (1.41 g, 3.84 mmol, 19% from **27d**)を無色アモルファス状固体として得た。MS (ESI+): 367.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.67 (3H, s), 7.23–7.42 (3H, m), 7.50 (1H, dt, *J* = 10.9, 8.4 Hz), 7.61–7.88 (2H, m).

#### **Methyl 5-bromo-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (28e)**

化合物 **28e** (3.07 g)は **26e** (5.0 g, 36 mmol)、ジクロロ酢酸メチル (5.4 g, 37.6 mmol)および 2-アミノ-6-ブロモピリジン (6.23 g, 36 mmol)用いて、**28a** と同様の方法により合成した。収率: 24%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 363.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.27 (3H, d, *J* = 1.5 Hz), 3.66 (3H, s), 7.07–7.55 (5H, m), 7.67–7.93 (1H, m).

#### **Methyl 5-ethynyl-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (28i)**

化合物 **28e** (184 mg, 0.50 mmol)の DME (2.5 mL)および水 (0.5 mL)溶液に、PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (62 mg, 0.075 mmol)およびトリブチル(エチニル)スタンナン (0.22 mL, 0.75 mmol)を、窒素雰囲気下、室温で加え、混合物を 100 °C で 16 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)で希釈し、水層を EtOAc (2 × 50 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (50 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン)次いで分取 HPLC (YMC CombiPrep-ODS-A, eluted with 10–95% acetonitrile in water containing 0.1% TFA)で精製した。目的物を含む画分を減圧下で濃縮し、残渣を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和後、EtOAc (2 × 75 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (50 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し **28i** (27.7 mg, 18%)を黄色アモルファス状固体として得た。MS

(ESI+): 309.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.27 (3H, d, *J* = 1.7 Hz), 3.67 (3H, s), 4.52 (1H, s), 7.09–7.21 (1H, m), 7.21–7.43 (4H, m), 7.67–7.88 (1H, m).

#### Methyl 5-cyano-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (**28k**)

化合物 **28e** (364 mg, 1.0 mmol) のシクロペンチル メチル エーテル (5 mL) 溶液にシアン化銅 (I) (359 mg, 4 mmol)、dppf (222 mg, 0.2 mmol) および Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (92 mg, 0.1 mmol) を室温で加え、混合物を 120 °C で 14 時間加熱還流した。反応混合物に dppf (111 mg, 0.1 mmol) および Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (46 mg, 0.05 mmol) をさらに加え、120 °C で 6 時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) で希釈し、水層を EtOAc (2 × 50 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (50 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン) で精製し **28k** (97.6 mg, 32%) を無色アモルファス状固体として得た。MS (ESI+): 310.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.28 (3H, d, *J* = 1.5 Hz), 3.69 (3H, s), 7.26 (1H, dd, *J* = 9.8, 8.5 Hz), 7.38–7.54 (3H, m), 7.84 (1H, dd, *J* = 7.1, 1.0 Hz), 8.09 (1H, dd, *J* = 9.2, 1.0 Hz).

#### (±)-*N*-[1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide dihydrochloride ((±)-**31a**)

化合物(±)-**31a** (205 mg) は **35** (120 mg, 0.4 mmol) および using (±)-*N*'-[1-(3,4-ジクロロフェニル)エチル]-*N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン(±)-**36a** (125 mg, 0.4 mmol) を用いて、**7b** と同様の方法により合成した。収率: 88%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 543.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.20–1.76 (3H, m), 2.13–2.35 (3H, m), 2.55–3.20 (9H, m), 3.69 (1H, t, *J* = 10.9 Hz), 3.74–3.86 (3H, m), 4.86–5.62 (1H, m), 6.51 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.98–8.05 (8H, m), 9.71–10.36 (1H, m).

#### 化合物(±)-**31a** の光学分割

ラセミ化合物(±)-**31a** (130 mg, 0.224 mmol) をキラル分取 HPLC (CHIRALCEL OD 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 6/4) を用いて光学分割し、1 番目に溶出したエナンチオマー tR1 (49 mg) および 2 番目に溶出したエナンチオマー tR2 (51 mg) を得た。キラル HPLC による分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALCEL OD column with ヘキサン/EtOH = 6/4 at 0.5 mm/min): For tR1; *t*<sub>R</sub> = 8.50 min and >99.5% ee, For tR2; *t*<sub>R</sub> = 10.30 min and 99.5% ee. 得られたエナンチオマー tR2 および tR1 をそれぞれ Et<sub>2</sub>O (10 mL) に溶解させ、4 M HCl / EtOAc (0.5 mL, 2.0 mmol) を加え、析出物を濾取し、(+)-**31a** (50.5 mg, 0.082 mmol) を無色アモルファス状固体として、(-)-**31a** (57.7 mg, 0.094 mmol) を淡茶色アモルファス状固体としてそれぞれ得た。For (+)-**31a**: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +138.3° (*c* = 0.667, DMSO); MS (ESI+): 543.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.18–1.66 (3H, m), 2.15–2.34 (3H, m), 2.55–2.81 (6H, m), 2.85–3.21 (2H, m), 3.46–3.77 (2H, m), 3.74–3.88 (3H, m), 5.05 (1H, q, *J* = 6.6 Hz), 6.54 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.03–7.47 (6H, m), 7.47–7.74 (2H, m), 10.04–10.83 (1H, m). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·2HCl·2.5H<sub>2</sub>O: C; 50.85, H; 5.49, N; 8.47. Found C; 50.71, H; 5.37, N; 8.43. For (-)-**31a**: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -147.9° (*c* = 0.667, DMSO); MS (ESI+): 543.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.16–1.78 (3H, m), 2.12–2.36 (3H, m),

2.56–2.81 (6H, m), 2.83–3.32 (3H, m), 3.60–3.91 (4H, m), 4.97–5.14 (1H, m), 6.44–6.67 (1H, m), 7.05–7.47 (6H, m), 7.48–7.69 (2H, m), 9.99–10.85 (1H, m). Anal. Calcd for  $C_{28}H_{29}Cl_2FN_4O_2 \cdot 2HCl \cdot 3.0H_2O$ : C; 50.16, H; 5.56, N; 8.36. Found : C; 50.34, H; 5.36, N; 8.37.

**(±)-*N*-[1-(3,4-Dichlorophenyl)propyl]-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide hydrochloride ((±)-**31b**)**

化合物(±)-**31b** (53 mg)は **35** (60 mg, 0.20 mmol)および(±)-*N*'-[1-(3,4-ジクロロフェニル)プロピル]-*N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン(±)-**36b** (55 mg, 0.20 mmol)を用いて、**7b**と同様の方法により合成した。収率: 45%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 557.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.44–0.89 (3H, m), 1.93–2.15 (1H, m), 2.16–2.38 (3H, m), 2.56–3.63 (11H, m), 3.69–3.88 (3H, m), 4.88 (1H, s), 6.47 (1H, s), 6.97–7.67 (8H, m), 10.00 (1H, br s).

**化合物(±)-**31b**の光学分割**

ラセミ化合物(±)-**31b** (195 mg, 0.35 mmol) をキラル分取 HPLC (CHIRALPAK AD, 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 1/1)を用いて光学分割し、1番目に溶出したエナンチオマー tR1 (93 mg) および2番目に溶出したエナンチオマー tR2 (85 mg)を得た。キラル HPLC による分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALPAK AD column with ヘキサン/EtOH = 1/1 at 0.5 mm/min): For tR1; *t*<sub>R</sub> = 9.08 min and >99.9% ee. For tR2; *t*<sub>R</sub> = 12.08 min and 99.9% ee. 得られたエナンチオマー tR2 および tR1 をそれぞれ Et<sub>2</sub>O (10 mL)に溶解させ、4 M HCl / EtOAc (0.5 mL, 2.0 mmol)を加え、析出物を濾取し、(+)-**31b** (87.0 mg, 0.14 mmol) を無色固体として、(-)-**31b** (95.0 mg, 0.15 mmol) を無色固体としてそれぞれ得た。For (+)-**31b**: [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> = +144.0° (*c* = 0.667, DMSO); MS (ESI+): 557.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.42–0.93 (3H, m), 1.02–2.16 (2H, m), 2.14–2.37 (3H, m), 2.53–2.81 (6H, m), 2.81–3.72 (4H, m), 3.70–3.94 (3H, m), 4.75–5.41 (1H, m), 6.43–6.86 (1H, m), 6.94–7.23 (1H, m), 7.23–7.47 (4H, m), 7.47–7.67 (3H, m), 10.06–11.38 (1H, m). Anal calcd for  $C_{29}H_{31}Cl_2FN_4O_2 \cdot 2HCl \cdot 1.5H_2O$ : C; 52.98, H; 5.52, N; 8.52. Found C; 52.70, H; 5.51, N; 8.57. For (-)-**31b**: [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> = -145.6° (*c* = 0.667, DMSO); MS (ESI+): 557.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.41–0.91 (3H, m), 1.02–2.14 (2H, m), 2.14–2.35 (3H, m), 2.53–2.82 (6H, m), 2.81–3.71 (4H, m), 3.71–4.04 (3H, m), 4.76–5.24 (1H, m), 6.08–6.69 (1H, m), 6.76–7.83 (8H, m), 10.40–11.16 (1H, m). Anal calcd for  $C_{29}H_{31}Cl_2FN_4O_2 \cdot 2HCl \cdot 1.5H_2O$ : C; 52.98, H; 5.52, N; 8.52. Found: C; 52.67, H; 5.57, N; 8.52.

**(±)-Ethyl**

**(3,4-dichlorophenyl)[2-(dimethylamino)ethyl][3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl]carbonyl]amino]acetate ((±)-**31c'**)**

化合物(±)-**31c'** (274 mg)は **35** (238 mg, 0.79 mmol)および(±)-エチル (3,4-ジクロロフェニル)[2-(ジメチルアミノ)エチル]アミノ}アセタート(±)-**36c** (278 mg, 0.87 mmol)を用いて、**7a**と同様の方法により合成した。収率: 58%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 601.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.19–1.29 (3H, m), 1.94–2.07 (6H, m), 2.07–2.14 (1H, m), 2.31 (3H, s),



2.40–2.59 (1H, m), 3.06–3.72 (2H, m), 3.76 (3H, s), 4.13–4.22 (2H, m), 5.69 (1H, s), 6.00–6.08 (1H, m), 6.95–7.05 (1H, m), 7.13–7.25 (3H, m), 7.27–7.45 (4H, m).

**(±)-N-[1-(3,4-Dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((±)-31c)**

化合物(±)-31c' (153 mg, 0.26 mmol)の EtOH / THF (2:1, 4 mL)溶液に、塩化カルシウム (63 mg, 0.51 mmol)を室温に加え、混合物を 0 °C に冷却した。混合物に To the mixture was slowly added テトラヒドロホウ酸ナトリウム (39 mg, 1.0 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 20 分間、次いで 0 °C で 40 分間攪拌した。反応混合物を EtOAc (15 mL)および水 (15 mL)で希釈し、水層を EtOAc (3 × 15 mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (15 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン)、次いで分取 HPLC (YMC CombiPrep-ODS-A, eluted with 20–65% acetonitrile in water containing 0.1% TFA)で精製した。目的物を含む画分を減圧下で濃縮し、残渣を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和後、EtOAc で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し(±)-31c (42 mg, 29%)を無色油状物として得た。MS (ESI+): 559.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.23 (6H, s), 2.27 (3H, s), 2.81–3.20 (2H, m), 3.71 (3H, s), 3.72–3.80 (2H, m), 3.81–4.02 (2H, m), 5.43 (1H, dd, *J* = 8.9, 4.3 Hz), 6.00 (1H, dd, *J* = 7.2, 0.9 Hz), 6.92–7.09 (3H, m), 7.16–7.24 (3H, m), 7.28–7.36 (2H, m). HRMS (ESI): Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 559.1674, found 559.1643.

**(±)-Ethyl**

**3-(3,4-dichlorophenyl)-3-([2-(dimethylamino)ethyl][3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl]carbonyl)amino)propanoate ((±)-31d')**

化合物(±)-31d' (92 mg)は 35 (90 mg, 0.27 mmol)および(±)-エチル 3-(3,4-ジクロロフェニル)-3-[[2-(ジメチルアミノ)エチル]アミノ]プロパノート(±)-36d (81 mg, 0.27 mmol)を用いて、7a と同様の方法により合成した。収率: 55%、黄色油状物。MS (ESI+): 615.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.08–1.22 (3H, m), 1.91–2.05 (3H, m), 2.11–2.31 (6H, m), 2.31–2.52 (2H, m), 2.89–3.50 (4H, m), 3.75–3.77 (3H, m), 3.94–4.15 (2H, m), 5.47–5.70 (1H, m), 5.99–6.09 (1H, m), 7.00 (1H, s), 7.13 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.17–7.25 (2H, m), 7.27–7.42 (4H, m).

**(±)-N-[1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((±)-31d)**

化合物(±)-31d (10 mg)は(±)-31d' (88 mg, 0.14 mmol)を用いて、(±)-31c と同様の方法により合成した。収率: 12%、淡橙色アモルファス状固体。MS (ESI+): 573.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.03–2.25 (8H, m), 2.32 (3H, d, *J* = 1.5 Hz), 2.34–2.44 (2H, m), 2.72–2.88 (1H, m), 3.33–3.47 (1H, m), 3.72–3.74 (3H, m), 3.80–4.15 (2H, m), 5.54 (1H, dd, *J* = 11.1, 3.0 Hz), 6.03–6.10 (1H, m), 6.90 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz), 6.96–7.14 (3H, m), 7.19–7.26 (2H, m), 7.28–7.38 (2H, m). HRMS (ESI): Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 573.1830, found 573.1815.

**(±)-*N*-(6,7-Dichloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((±)-32)**

化合物(±)-32 (675 mg)は 35 (452 mg, 1.51 mmol)および(±)-37 (456 mg, 1.66 mmol)を用いて、7a と同様の方法により合成した。収率: 80%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 557.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.78–1.88 (3H, m), 2.04–2.12 (4H, m), 2.33 (3H, s), 2.40–2.63 (1H, m), 3.02–3.46 (2H, m), 3.77 (3H, s), 4.41–4.87 (2H, m), 5.71–6.25 (2H, m), 6.82–7.09 (3H, m), 7.19–7.26 (2H, m), 7.27–7.35 (2H, m).

**化合物(±)-32 の光学分割**

ラセミ化合物(±)-32 (670 mg, 1.20 mmol)をキラル分取 HPLC (CHIRALPAK AD, 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 1/1)を用いて光学分割し、1 番目に溶出したエナンチオマー (+)-32 (316 mg)を無色アモルファス状固体として、2 番目に溶出したエナンチオマー (-)-32 (319 mg) を無色固体として得た。For (+)-32: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +101.0° (c = 0.231, CHCl<sub>3</sub>); MS (ESI+): 557.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.74–1.87 (3H, m), 2.05–2.14 (4H, m), 2.33 (3H, s), 2.44–2.62 (1H, m), 3.04–3.54 (2H, m), 3.77 (3H, s), 4.38–4.89 (2H, m), 5.70–6.27 (2H, m), 6.81–7.12 (3H, m), 7.18–7.26 (2H, m), 7.27–7.37 (2H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, the minor signals are marked with an asterisk) δ 14.02\* (d, *J* = 2.21 Hz), 14.03 (d, *J* = 2.76 Hz), 40.15, 44.73\*, 44.89, 45.56\*, 56.42\*, 56.51, 56.59, 58.32\*, 58.41\*, 59.71, 76.10\*, 76.23, 90.00, 90.00\*, 109.24\*, 109.43, 112.63\*, 113.23, 113.39\* (d, *J* = 22.11 Hz), 113.51 (d, *J* = 22.11 Hz), 121.40\*, 121.69\*, 121.77, 122.41\* (d, *J* = 17.69 Hz), 122.53 (d, *J* = 17.69 Hz), 122.55, 123.74\*, 124.89, 125.86, 126.32 (d, *J* = 3.87 Hz), 126.39\* (d, *J* = 3.87 Hz), 127.03\*, 127.31\*, 127.32, 129.88\* (d, *J* = 8.29 Hz), 130.06 (d, *J* = 8.29 Hz), 131.34\*, 132.30, 133.59\* (d, *J* = 4.98 Hz), 133.72 (d, *J* = 5.53 Hz), 138.64, 138.69\*, 145.10\*, 145.61, 151.68\*, 151.70, 157.28, 157.77\*, 160.11\* (d, *J* = 243.81 Hz), 160.23 (d, *J* = 244.36 Hz), 165.06, 165.64\*. Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>·0.3H<sub>2</sub>O: C, 59.75; H, 4.94; N, 9.95. Found: C, 59.78; H, 5.02; N, 9.72. For (-)-32: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -97.4° (c = 0.231, CHCl<sub>3</sub>); MS (ESI+): 557.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.75–1.99 (3H, m), 2.03–2.14 (4H, m), 2.33 (3H, s), 2.46–2.61 (1H, m), 3.01–3.54 (2H, m), 3.78 (3H, s), 4.40–4.89 (2H, m), 5.71–6.25 (2H, m), 6.81–7.11 (3H, m), 7.17–7.26 (2H, m), 7.28–7.36 (2H, m). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>·0.3H<sub>2</sub>O: C, 59.75; H, 4.94; N, 9.95. Found: C, 59.74; H, 5.02; N, 9.77. キラル HPLC 分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALPAK AD column with ヘキサン/EtOH = 1/1 at 0.5 mm/min): For (+)-32; *t*<sub>R</sub> = 14.20 min and >99.9% ee. For (-)-32; *t*<sub>R</sub> = 18.82 min and >99.9% ee.

**(±)-*N*-(7,8-Dichloro-3,4-dihydro-2*H*-chromen-4-yl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methyl phenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((±)-33)**

化合物(±)-33 (192 mg)は 35 (148 mg, 0.51 mmol)および(±)-38 (150 mg, 0.52 mmol) を用いて、7a と同様の方法により合成した。収率: 68%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 571.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.85–2.43 (12H, m), 2.52–3.02 (2H, m), 3.20–3.66 (1H, m), 3.73–3.81 (3H, m), 3.92–4.33 (1H, m), 4.36–4.52 (1H, m), 5.05–5.91 (1H, m), 6.00–6.08 (1H, m), 6.24–6.62 (1H, m), 6.71–6.89 (1H, m), 6.99–7.12 (1H, m), 7.18–7.26 (2H, m), 7.27–7.40 (2H, m).

### 化合物(±)-33の光学分割

ラセミ化合物(±)-33 (168 mg, 0.29 mmol) をキラル分取 HPLC (CHIRALCEL OD, 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 4/1) を用いて光学分割し、1 番目に溶出したエナンチオマー(-)-33 (82 mg) を無色固体として、2 番目に溶出したエナンチオマー(+)-33 (81 mg) を無色固体として得た。For (+)-33:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +98.5^\circ$  ( $c = 0.130$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); MS (ESI+): 571.5  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.85–2.43 (12H, m), 2.52–3.02 (2H, m), 3.20–3.66 (1H, m), 3.73–3.81 (3H, m), 3.92–4.33 (1H, m), 4.36–4.52 (1H, m), 5.05–5.91 (1H, m), 6.00–6.08 (1H, m), 6.24–6.62 (1H, m), 6.71–6.89 (1H, m), 6.99–7.12 (1H, m), 7.18–7.26 (2H, m), 7.27–7.40 (2H, m). Anal. Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ : C, 60.00; H, 5.21; N, 9.65. Found: C, 60.23; H, 5.33; N, 9.40. For (-)-33:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -126.0^\circ$  ( $c = 0.150$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); MS (ESI+): 571.5  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.87–2.34 (12H, m), 2.56–3.02 (2H, m), 3.25–3.66 (1H, m), 3.74–3.79 (3H, m), 3.93–4.31 (1H, m), 4.35–4.55 (1H, m), 5.04–5.90 (1H, m), 5.99–6.10 (1H, m), 6.23–6.62 (1H, m), 6.71–6.89 (1H, m), 6.99–7.11 (1H, m), 7.16–7.25 (2H, m), 7.27–7.40 (2H, m). Anal. Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ : C, 60.00; H, 5.21; N, 9.65. Found: C, 59.86; H, 5.26; N, 9.47. キラル HPLC 分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALCEL OD column with ヘキサン/EtOH = 4/1 at 1.0 mm/min): For (-)-33;  $t_{\text{R}} = 6.46$  min and 99.9% ee. For (+)-33;  $t_{\text{R}} = 13.76$  min and 99.3% ee.

### (±)-tert-Butyl

#### **2-[(6,7-dichloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl){3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-a]pyridin-2-yl}carbonyl]aminoethyl)methylcarbamate ((±)-34)**

化合物(±)-34 (145 mg) は 35 (111 mg) および(±)-39 (159 mg, 0.44 mmol) を用いて、7a と同様の方法により合成した。収率: 61%、無色アモルファス状固体。MS (ESI+): 643.3  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.14–1.42 (9H, m), 2.30–2.79 (6H, m), 3.00–3.43 (4H, m), 3.74–3.79 (3H, m), 4.26–4.86 (2H, m), 5.75–6.45 (2H, m), 6.81–7.11 (3H, m), 7.17–7.26 (2H, m), 7.27–7.34 (2H, m).

### 化合物(±)-34の光学分割

ラセミ化合物(±)-34 (140 mg, 0.217 mmol) をキラル分取 HPLC (CHIRALPAK IC, 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 4/6) を用いて光学分割し、1 番目に溶出したエナンチオマー(-)-34 (76 mg) を無色固体として、2 番目に溶出したエナンチオマー(+)-34 (71 mg) を無色固体として得た。For (+)-34:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +87.2^\circ$  ( $c = 0.155$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); MS (ESI+): 643.0  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.25–1.41 (9H, m), 2.24–2.83 (6H, m), 3.00–3.50 (4H, m), 3.77 (3H, s), 4.26–4.88 (2H, m), 5.76–6.41 (2H, m), 6.81–7.12 (3H, m), 7.17–7.26 (2H, m), 7.27–7.35 (2H, m). HRMS (ESI): Calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{O}_5$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  643.1885, found 643.1886. For (-)-34:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -87.0^\circ$  ( $c = 0.195$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); MS (ESI+): 643.0  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.25–1.40 (9H, m), 2.29–2.81 (6H, m), 3.04–3.49 (4H, m), 3.77 (3H, s), 4.27–4.86 (2H, m), 5.77–6.42 (2H, m), 6.83–7.11 (3H, m), 7.18–7.26 (2H, m), 7.27–7.37 (2H, m). HRMS (ESI): Calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{FN}_4\text{O}_5$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  643.1885, found 643.1861. キラル HPLC 分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALPAK IC

column with ヘキサン/EtOH = 4/6 at 1.0 mm/min): (-)-**34**;  $t_R$  = 13.03 min and >99.9% ee. (+)-**34**;  $t_R$  = 16.31 min and 98.6% ee.

### 3-(4-Fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylic acid (**35**)

化合物 **35** (3.87 g)は **45** (5.71 g, 17.4 mmol) を用いて、**29a** と同様の方法により合成した。収率: 74%、淡茶色結晶。mp.: 166–168 °C. MS (ESI+): 301.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2.26 (3H, d,  $J$  = 1.3 Hz), 3.66 (3H, s), 6.35 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz), 7.02–7.19 (1H, m), 7.20–7.36 (3H, m), 7.36–7.49 (1H, m).

### (±)-Ethyl (3,4-dichlorophenyl){[2-(dimethylamino)ethyl]amino}acetate ((±)-**36c**)

エチル (3,4-ジクロロフェニル)(オキソ)アセタート **46c** (3.01 g, 12.2 mmol)の EtOH (20 mL) 溶液に酢酸 (1.40 mL, 24.4 mmol)次いで *N,N*-ジメチルエタン-1,2-ジアミン **49** (1.53 mL, 14 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 1 時間 30 分攪拌した。反応混合物を 0 °C に冷却した後、MeOH (15 mL)およびテトラヒドロホウ酸ナトリウム (691 mg, 18.3 mmol)を加え、混合物を同温度で 1 時間、次いで室温で 30 分間攪拌した。反応混合物に水 (10 mL)を加えた後、減圧下濃縮した。残渣をヘキサン / EtOAc (1:1, 30 mL)および 2 M HCl (30 mL, 60 mmol)で希釈し、水層をヘキサン / EtOAc (1:4, 50 mL)で抽出した。水層に 2 M NaOH (30 mL, 60 mmol)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL)を加え pH を 9 に調整した。水層を EtOAc (3 × 10 mL)で抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、含有する不溶物を除去し(±)-**36c** (206 mg, 5%)を黄色油状物として得た。MS (ESI+): 319.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.19–1.26 (3H, m), 2.27 (6H, s), 2.45–2.64 (4H, m), 4.10–4.25 (2H, m), 4.33 (1H, s), 7.24 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz), 7.39–7.43 (1H, m), 7.52 (1H, d,  $J$  = 1.9 Hz).

### (±)-Ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}propanoate ((±)-**36d**)

化合物(±)-**36d** (84 mg)はエチル 3-(3,4-ジクロロフェニル)-3-オキソプロパノアート **46d** (1.69 mg, 6.5 mmol)および **49** (0.740 mL, 13 mmol)を用いて、(±)-**36c** と同様の方法により合成した。収率: 4%、黄色油状物。MS (ESI+): 333.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.20 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 2.20 (6H, s), 2.39–2.75 (6H, m), 4.02 (1H, dd,  $J$  = 7.7, 6.0 Hz), 4.10 (2H, q,  $J$  = 7.2 Hz), 7.20 (1H, dd,  $J$  = 8.2, 2.0 Hz), 7.39 (1H, d,  $J$  = 8.3 Hz), 7.47 (1H, d,  $J$  = 1.9 Hz).

### (±)-*N'*-(6,7-Dichloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl)-*N,N*-dimethylethane-1,2-diamine ((±)-**37**)

6,7-ジクロロベンゾフラン-3(2*H*)-オン **47** (1.0 g, 4.95 mmol)の THF (10 mL)、MeOH (18.2 mL) および AcOH (1.8 mL)溶液に、**49** (0.703 mL, 6.44 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 1 時間、次いで 45–50 °C で 2 時間攪拌した。反応混合物にボラン-2-ピコリン錯体 (695 mg, 6.50 mmol)を室温に加え、同温度で 14 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣に 2 M HCl (40 mL, 80 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 20 分間攪拌した。不溶物を濾別した後、濾液を EtOAc / ヘキサン (1:1, 40 mL)で希釈し、水層に 8 M NaOH (10 mL, 80 mmol)および 2M

NaOH (2.0 mL, 4.0 mmol)を加えた。水層を EtOAc (3 × 50 mL)で抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水 (100 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し (±)-**37** (626 mg, 46%)を茶色油状物として得た。MS (ESI+): 275.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.18 (6H, s), 2.35–2.44 (2H, m), 2.53–2.64 (2H, m), 2.68–2.80 (1H, m), 4.48–4.59 (2H, m), 4.62–4.74 (1H, m), 7.00 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.15 (1H, d, *J* = 7.9 Hz).

**(±)-*N'*-(7,8-Dichloro-3,4-dihydro-2*H*-chromen-4-yl)-*N,N*-dimethylethane-1,2-diamine ((±)-**38**)**

化合物(±)-**38** (394 mg)は 7,8-ジクロロ-2,3-ジヒドロ-4*H*-クロメン-4-オン **48** (501 mg, 2.31 mmol)および **49** (0.303 mL, 2.77 mmol)を用いて、(±)-**37**と同様の方法により合成した。収率: 59%、黄色油状物。MS (ESI+): 289.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.97–2.04 (2H, m), 2.23 (6H, s), 2.40–2.47 (2H, m), 2.66–2.84 (2H, m), 3.77 (1H, t, *J* = 4.3 Hz), 4.31–4.51 (2H, m), 6.95–7.00 (1H, m), 7.06–7.11 (1H, m).

**(±)-*tert*-Butyl {2-[(6,7-dichloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl)amino]ethyl}methylcarbamate ((±)-**39**)**

*tert*-ブチル (2-アミノエチル)メチルカルバマート **50** (0.287 mL, 1.61 mmol)の THF (2 mL)溶液に **47** (150 mg, 0.74 mmol)を室温で加えた。混合物を MeOH (2 mL)および酢酸 (0.5 mL)で希釈した後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (228 mg, 3.63 mmol)を室温で加え、混合物を 50 °C で 18 時間攪拌した。反応混合物に 2 M HCl (2 mL, 4.0 mmol)を室温で加え、同温度で 10 分間攪拌し、2 M NaOH (10 mL, 20 mmol)を加えた。水層を EtOAc (3 × 20 mL)で抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (SI, EtOAc / ヘキサン)で精製し(±)-**39** (62.8 mg, 24%)を黄色油状物として得た。MS (ESI+): 361.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.44 (9H, s), 2.59–2.96 (5H, m), 3.16–3.46 (2H, m), 4.40–4.52 (1H, m), 4.51–4.61 (1H, m), 4.60–4.76 (1H, m), 6.98 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.14 (1H, d, *J* = 7.9 Hz).

**5-Methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (**42**)**

2-アミノ-6-メトキシピリジン **40** (10 g, 80.6 mmol)の EtOH (150 mL)溶液にエチル 3-ブロモ-2-オキソプロパノアート **41** (21 g, 96.9 mmol)を 40 °C で 30 分以上かけて加え、混合物を同温度で 14 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc / ヘキサン (2:1, 450 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (150 mL)で希釈した。水層を EtOAc (150 mL)で抽出し、有機層を飽和食塩水 (150 mL)で洗浄し、シリカパッド(NH、EtOAc)に通過させ、濾液を減圧下濃縮した。残渣を EtOAc (40 mL)で希釈し、シリカパッド(NH、EtOAc / ヘキサン)に再度通過させ、濾液を減圧下濃縮した。得られた懸濁液をヘキサン (500 mL)で希釈し、室温で 30 分間攪拌した。析出物を濾取し、減圧下乾燥させ **42** (9.30 g, 52%)を黄色固体として得た。MS (ESI+): 221.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.32 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.11 (3H, s), 4.31 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 6.45 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.26 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 7.41 (1H, dd, *J* = 9.1, 7.6 Hz), 8.22 (1H, s).

**Ethyl 3-bromo-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (**43**)**

化合物 **42** (5.0 g, 22.7 mmol)の DMF (150 mL)溶液に NBS (4.04 g, 22.7 mmol)を 4 °C でゆっくりと加え、混合物を室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣に水 (100 mL)を加え、混合物を室温で 1 時間攪拌した。析出物を濾取し、水で洗浄後、減圧下で乾燥させ **43** (6.52 g, 21.80 mmol, 96%)を無色アモルファス状固体として得た。MS (ESI+): 299.0 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.32 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 4.04 (3H, s), 4.31 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 6.42 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 7.10–7.30 (1H, m), 7.30–7.54 (1H, m).

#### **Ethyl 3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (**45**)**

化合物 **43** (6.0 g, 20.1 mmol)、4-フルオロ-3-メチルフェニルボロン酸 **44** (4.63 g, 30.1 mmol) および DME (150 mL)の混合物に 2M 炭酸セシウム水溶液 (30 mL, 60.2 mmol) および PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.64 g, 2.01 mmol)を室温に加え、混合物を、窒素雰囲気下、90 °C で 1 時間 30 分攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、EtOAc (300 mL) および飽和食塩水 (150 mL) で希釈した。不溶物を濾別した後、濾液の水層を EtOAc (100 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (100 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製した。目的物を含む画分を濃縮し、残渣を EtOAc (20 mL) およびヘキサン (100 mL) に懸濁させ、析出物を濾取し、減圧下で乾燥させ **45** (5.83 g, 17.8 mmol, 89%)を淡灰色固体として得た。MS (ESI+): 329.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.06 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.27 (3H, d, *J* = 1.5 Hz), 3.67 (3H, s), 3.99–4.18 (2H, m), 6.32 (1H, dd, *J* = 7.5, 0.8 Hz), 7.03–7.18 (1H, m), 7.19–7.29 (2H, m), 7.29–7.41 (2H, m).

#### **Synthesis of (+)-**32** from (+)-(*S*)-**34****

化合物(+)-(*S*)-**34** (12.8 mg, 0.02 mmol) および TFA (1 mL, 0.02 mmol)の混合物を室温で 30 分間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、水層を EtOAc (3 × 15 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣を THF (2 mL) で希釈し、混合物にホルムアルデヒド (7.40 μL, 0.10 mmol) および水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム (26.3 mg, 0.10 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 16 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (20 mL) および水 (20 mL) で希釈し、水層を EtOAc (3 × 15 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し(+)-**32** を無色アモルファス状固体として得た。[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +97.6° (c = 0.169, CHCl<sub>3</sub>); MS (ESI+): 557.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.78-2.02 (3H, m), 2.04-2.14 (4H, m), 2.34 (3H, s), 2.46-2.63 (1H, m), 3.04-3.55 (2H, m), 3.78 (3H, s), 4.42-4.89 (2H, m), 5.72-6.26 (2H, m), 6.83-7.10 (3H, m), 7.21-7.27 (2H, m), 7.28-7.35 (2H, m).

## 生物評価

### CENP-E 酵素アッセイ

第 2 章に関する実験項に記載の方法を用いて、CENP-E 酵素アッセイを実施した。

高濃度 ATP 下における試験化合物の CENP-E 阻害活性を測定するにあたり、化合物を CENP-E のモーター領域と 1 時間プレインキュベートし、ATP の添加により酵素反応を開始させ、最終的な ATP 濃度を 500  $\mu\text{M}$  とした。室温で 20 分間インキュベートし、ATPase 反応により生成した ADP 量を ADP-Glo (Promega)を用いて測定した。発光は Envision (PerkinElmer Inc., MA)で測定した。

### 部位特異的変異体解析試験

N末端に GST (Glutathione S-transferase) タグを有するヒト CENP-E モーター領域変異体タンパク (I182L および T183A) を、WEPRO7240 extract (CellFree Sciences)を用いた小麦胚芽タンパク質合成系によって調製した。変異はオーバーラップ・エクステンション PCR 法により導入した。発現した変異体タンパクを Glutathione Sepharose 4B 樹脂 (GE Healthcare)を用いて精製した。CENP-E 変異体の ATPase 活性は、ADP-Glo アッセイにより測定した。

### キネシン選択性試験

Eg5 モーター領域 (Cytoskeleton)および KHC モーター領域 (Cytoskeleton)の ATPase アッセイは、微小管および 100  $\mu\text{M}$  の ATP 存在下、反応緩衝液 (20 mM PIPES-KOH, pH 6.8, 3.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3.0 mM KCl, 1.0 mM EGTA, 1.0 mM dithiothreitol, 0.01% w/v Brij35, and 0.2% w/v BSA)中で実施した。ATPase 反応により生成した ADP 量を ADP-Glo (Promega)を用いて測定した。発光は Envision (PerkinElmer Inc., MA)で測定した。

### 細胞周期の同期

第 2 章に関する実験項に記載の方法を用いて、細胞周期の同期を実施した。

### FACS 解析

第 2 章に関する実験項に記載の方法を用いて、FACS 解析を実施した。

### 細胞増殖阻害試験

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞の細胞懸濁液を 96 穴プレートに播き (100 $\mu\text{L}$  / 穴、2,000 細胞 / 穴)、96 穴プレートを 5%炭酸ガスインキュベーターにて細胞がプレートに接地するまで 37 $^{\circ}\text{C}$  で半日間 (8 時間以上)静置した。各濃度のテスト化合物溶液を 100 $\mu\text{L}$  添加して、5%炭酸ガスインキュベーターにて 3 日間静置した。3 日間静置後の 96 穴プレートに 50  $\mu\text{L}$  の CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Assay 試薬 (Promega 社)を添加して、ルミノメーターにて発光量を計測した。

発光量を生存細胞数の指標とした。試験化合物が有する細胞増殖阻害活性を、下記の式を用いて増殖阻害率 (%)として算出した。

増殖阻害率 (%) =  $(1 - (\text{試験化合物の発光量}) / (\text{対照群の発光量})) \times 100$ 。

### 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は既知の方法<sup>54</sup>に従って行い、下記の抗体を用いた:抗 CENP-B 抗体 (sc22788; Santa Cruz Biotechnology)、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (T9026; Sigma-Aldrich)、抗 p53 抗体 (sc126; Santa Cruz Biotechnology)、抗 53BP1 抗体 (sc22760; Santa Cruz Biotechnology)および抗 HEC1 抗体 (ab3613; Abcam)。画像は Plan-APOCHROMAT 100X オイルレンズによる Axiovert 200M 顕微鏡 (Carl Zeiss)で取得した。

### In vivo PD アッセイ

実験操作の簡便性に加え、CENP-E 阻害剤に感受性を示したことから、in vivo 試験のモデルとして Colo205 を選択した。5 週齢ヌードマウスに Colo205 細胞を皮下移植した ( $5 \times 10^6$  細胞 / マウス)。テスト化合物を投与基剤 (0.1 mol/L of citric acid with with 10% DMSO, 9% cremophor EL and 18% PEG 400)で溶解させ、腫瘍サイズが 150–400 mm<sup>3</sup>に到達した個体に化合物溶液を腹腔内投与した (2 回)。1 回目投与から 24 時間後にサンプル腫瘍を回収し、プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤を含む RIPA (radioimmunoprecipitation assay)溶液内でホモジナイズした。細胞抽出液を 2×SDS サンプルバッファーで懸濁し、5 分間煮沸した。ウェスタンブロッティング解析に用いるまで、サンプルは-20 °C で保存した。

### ウェスタンブロッティング解析

ウェスタンブロッティング解析は下記の手法<sup>55</sup>を用いて行った。得られたサンプル溶液中に含まれるリン酸化ヒストン H3 の量はウェスタンブロット法により測定した。すなわち、得られたサンプル溶液を SDS-PAGE に供した後、PVDF メンブレンに転写した。上記 PVDF メンブレンを StartingBlock T20 (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific 社)でブロッキングした後、該 PVDF メンブレンと Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (Toyobo 社)で 1000 倍に希釈した抗リン酸化ヒストン H3 (Ser10) (カタログ番号 06570、Upstate Biotechnology 社) 溶液を反応させた。得られた PVDF メンブレンを、Tween20 (BioRad 社)を 0.05%含むトリス緩衝生理食塩水 (BioRad 社)で洗浄後、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (Toyobo 社)で 10000 倍に希釈した HRP 標識ラビット IgG ポリクローナル抗体 (Amersham Biosciences 社 NA9340)と得られた PVDF メンブレンを 1 時間、室温下で反応させた。PVDF メンブレンをトリス緩衝生理食塩水で洗浄後、SuperSignal West FemtoMaximum Sensitivity Substrate (Pierce Biotechnology)を用いて標識されたタンパク質の量を検出した。なお、検出の際にはルミノイメージアナライザーLAS-1000 (富士フィルム)を使用し、標識されたタンパク質の量を発光量として検出した。

### In vivo 抗腫瘍試験

Colo205 細胞を 50%マトリゲル溶液に懸濁し、6~7 週齢 BALB/c 系雌ヌードマウス (日本クレア)の皮下に  $5.0 \times 10^6$  個の Colo205 細胞を移植した。生着した腫瘍の腫瘍径を測定し、以下の式で腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times (1/2)$$

腫瘍体積が 100–250mm<sup>3</sup>前後の大きさに腫瘍が生着した個体をコントロールと化合物処理



群に各群 5 匹になるよう無作為にグループ化した。テスト化合物は腹腔内投与を行い (twice a day × 2 every 5 days for 2 cycles)、化合物の抗腫瘍作用を検出するためキャリパーで腫瘍径を測定した。腫瘍増殖阻害効果 (%T/C)は下記の式で算出した。

$\%T/C = \{(\text{テスト化合物処理の腫瘍体積} - \text{Day0 のテスト群腫瘍体積}) / (\text{コントロール処理の腫瘍体積} - \text{Day0 のコントロール群腫瘍体積})\} \times 100$

すべての動物試験は著者が所属する武田薬品工業内の Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)で承認されたプロトコールに従って行われた (Experimental Protocol Number: 00004407)。

## 計算化学

### 静電ポテンシャルマップ (EPM)解析

第 2 章に関する実験項に記載の方法を用いて、MOE (version 2011.10)<sup>45</sup>により計算した。

## X 線結晶構造解析

(+)-(S)-**34** の絶対配置は Flack パラメーター<sup>56</sup>(0.05(2))に基づいて *S* と決定した。株式会社リガク製 R-AXIS RAPID により回折データを測定した。直接法 (SHELXS-97<sup>57</sup>)で初期位相を求め、full-matrix 最小二乗法 (SHELXL-97<sup>57</sup>)を用いて構造を精密化した。非水素原子に非等方性温度因子を、水素原子に等方性温度因子を与えた。補助的な結晶学データは The Cambridge Structural Database の CCDC 1037306 に登録されている。(www.ccdc.cam.ac.uk/data\_request/cif 参照)

### Crystal data and data collection for (+)-(S)-**34**

Empirical formula	C <sub>32</sub> H <sub>33</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
Formula weight	643.54
Crystal color, habit	colorless, prism
Temperature (K)	100
Crystal size (mm)	0.17 x 0.05 x 0.04
Crystal system	triclinic
Space group	<i>P</i> 1
Unit cell dimensions (Å, °)	<i>a</i> = 10.5392(2) <i>b</i> = 11.6005(2) <i>c</i> = 12.8463(2) $\alpha$ = 85.8900(10) $\beta$ = 88.4340(11) $\gamma$ = 89.6050(11)
Volume (Å <sup>3</sup> )	1565.95(5)
<i>Z</i>	2
Density (calculated) (g/cm <sup>3</sup> )	1.365

Radiation	Cu-K $\alpha$ (1.5419 Å)
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	2.3114
Goodness-of-fit on $F^2$	1.034
$R_1$ [ $I > 2\sigma(I)$ ]	0.064
$wR_2$ (all data)	0.139
Flack parameter	0.05(2)

---

(-)-**(R)**-**34** の絶対配置は Flack パラメーター<sup>56</sup>(0.04(2))に基づいて  $R$  と決定した。株式会社リガク製 R-AXIS RAPID により回折データを測定した。直接法 (SHELXS-97<sup>57</sup>)で初期位相を求め、full-matrix 最小二乗法 (SHELXL-97<sup>57</sup>)を用いて構造を精密化した。非水素原子に非等方性温度因子を、水素原子に等方性温度因子を与えた。補助的な結晶学データは The Cambridge Structural Database の CCDC 1037305 に登録されている。( [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif) 参照)

#### Crystal data and data collection for (-)-**(R)**-**34**

---

Empirical formula	C <sub>32</sub> H <sub>33</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
Formula weight	643.54
Crystal color, habit	colorless, platelet
Temperature (K)	100
Crystal size (mm)	0.20 x 0.19 x 0.05
Crystal system	triclinic
Space group	$P1$
Unit cell dimensions (Å, °)	$a = 10.5301(2)$ $b = 11.5817(2)$ $c = 12.8513(2)$ $\alpha = 85.8039(8)$ $\beta = 88.4421(8)$ $\gamma = 89.6201(8)$
Volume (Å <sup>3</sup> )	1562.50(5)
$Z$	2
Density (calculated) (g/cm <sup>3</sup> )	1.368
Radiation	Cu-K $\alpha$ (1.5419 Å)
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	2.3165
Goodness-of-fit on $F^2$	1.035
$R_1$ [ $I > 2\sigma(I)$ ]	0.063
$wR_2$ (all data)	0.160
Flack parameter	0.04(2)

---

## 第4章に関する実験項

### 合成

#### 化合物(+)-54d に関する合成

##### 2-Fluoro-3-formyl-6-(trifluoromethyl)benzonitrile (61d)

2,2,6,6-テトラメチルピペリジン (4860 mg, 34.4 mmol)の THF (35 mL)溶液に *n*-ブチルリチウム / ヘキサン溶液 (1.6 M, 19.8 mL, 31.7 mmol)を、窒素雰囲気下、 $-50^{\circ}\text{C}$  でゆっくりと滴下した。混合物を同温度で 30 分間攪拌した。反応混合物に 2-フルオロ-6-(トリフルオロメチル)ベンゾニトリル **60d** (5000 mg, 26.4 mmol)の THF (15 mL)溶液を $-60^{\circ}\text{C}$  でゆっくりと滴下し、反応混合物を、窒素雰囲気下、 $-50^{\circ}\text{C}$  で 30 分間攪拌した。反応混合物に DMF (5810 mg, 79.5 mmol)の THF (5.0 mL)溶液を、窒素雰囲気下、 $-50^{\circ}\text{C}$  でゆっくりと滴下し、同温度で 15 分間攪拌した。反応混合物を $-10^{\circ}\text{C}$  に昇温し 25 分間攪拌した。反応混合物に酢酸 (5.0 mL)および水 (100 mL)を加え反応を停止させた。水層を EtOAc で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮し **61d** (5870 mg, 27.0 mmol, quantitative yield)を茶色油状物として得た。MS (ESI): undetected.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.77 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 8.25 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz), 10.42 (1H, s).

##### 3-Formyl-2-(methylsulfonyl)-6-(trifluoromethyl)benzonitrile (62d)

化合物 **61d** (5870 mg, 27.0 mmol)の DMSO (50 mL)溶液にメタンサルフィン酸ナトリウム (3310 mg, 32.4 mmol)の DMSO (15 mL)懸濁液を室温でゆっくりと加え、混合物を同温度で 2 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc (100 mL)および水で希釈し、水層を EtOAc で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。得られた固体を濾取し、ヘキサン / EtOAc (5 / 1)で洗浄し **62d** (4250 mg, 15.3 mmol, 57%)を茶色固体として得た。MS (ESI<sup>-</sup>): 275.8 [M-H]<sup>-</sup>.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.51 (3H, s), 8.12–8.17 (1H, m), 8.19–8.24 (1H, m), 10.73 (1H, s).

##### 3-Hydroxy-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophene-7-carbonitrile 1,1-dioxide ((±)-63d)

化合物 **62d** (5.04 g, 18.2 mmol)の EtOH (500 mL)溶液にナトリウム エトキシド (1.65 g, 21.8 mmol)の EtOH (50 mL)溶液を  $0^{\circ}\text{C}$  でゆっくりと加えた。混合物を室温まで昇温し、同温度で 40 分間攪拌した。反応混合物に酢酸 (1.25 mL, 21.8 mmol)を室温に加え、pH 6–7 に調整した。減圧下、溶媒を留去した後、残渣を EtOAc (200 mL)および水 (200 mL)で希釈した。水層を EtOAc (100 mL  $\times$  3)で抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。得られた固体を濾取し、ヘキサン / EtOAc (5 / 1)で洗浄し((±)-**63d** (4.85 g, 17.5 mmol, 96 %)を黄色固体として得た。MS (ESI): undetected.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  3.63 (1H, dd,  $J = 13.8, 4.9$  Hz), 4.25 (1H, dd,  $J = 13.8, 7.1$  Hz), 5.48–5.58 (1H, m), 6.76 (1H, br s), 8.23 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 8.38 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz).

##### 6-(Trifluoromethyl)-1-benzothiophene-7-carbonitrile 1,1-dioxide ((±)-59d)

化合物(±)-**63d** (1.98 g, 7.14 mmol)およびTEA (2.49 mL, 17.9 mmol)のTHF (20 mL)溶液にメタンスルホニル クロリド (0.663 mL, 8.57 mmol)を室温でゆっくりと滴下し、混合物を同温度で4時間攪拌した。反応混合物を水に注ぎ、水層をEtOAc (50 mL × 2)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、シリカパッド (SI)に通過させ、濾液を減圧下濃縮し(±)-**59d** (1.80 g, 6.93 mmol, 97%)を茶色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.80–7.85 (1H, m), 7.85–7.90 (1H, m), 8.15 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 8.36 (1H, d, *J* = 7.9 Hz).

**(±)-3-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophene-7-carbonitrile 1,1-dioxide ((±)-55d) (Route A)**

化合物(±)-**59d** (500 mg, 1.93 mmol)、**49** (210 μL, 1.93 mmol)およびEtOH (20 mL)の混合物を70 °Cで4時間攪拌し、次いで室温で終夜攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣をEtOAcおよび水で希釈し、水層をEtOAc (50 mL × 2)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン、次いでMeOH / EtOAc)で精製し(±)-**55d** (287 mg, 0.826 mmol, 43 %)を黄色油状物として得た。MS (ESI+): 348.0 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.12 (6H, s), 2.23–2.42 (2H, m), 2.57–2.74 (3H, m), 3.67 (1H, dd, *J* = 13.6, 6.0 Hz), 4.24 (1H, dd, *J* = 13.4, 7.2 Hz), 4.71–4.84 (1H, m), 8.21–8.28 (1H, m), 8.30–8.37 (1H, m).

**(±)-3-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophene-7-carbonitrile 1,1-dioxide ((±)-55d) (Route B)**

化合物 **62d** (570 mg, 2.06 mmol)のTHF (25 mL)溶液に **49** (290 μL, 2.68 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で2時間攪拌した。反応混合物にリチウム *N,N*-ジイソプロピルアミド(LDA) / ヘキサン溶液 (1.11 M, 3720 μL, 4.13 mmol)を、窒素雰囲気下、0 °Cでゆっくりと滴下し、混合物を同温度で50分間攪拌した。反応混合物をEtOAc (30 mL)および水 (30 mL)で希釈し、水層をEtOAcで抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン、次いでMeOH / EtOAc)で精製し(±)-**55d** (116 mg, 0.334 mmol, 16 %)を黄色油状物として得た。MS (ESI+): 348.2 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.19–2.24 (6H, m), 2.36–2.55 (2H, m), 2.65–2.80 (2H, m), 3.49 (1H, dd, *J* = 13.4, 5.9 Hz), 3.93 (1H, dd, *J* = 13.5, 7.2 Hz), 4.70–4.81 (1H, m), 7.99–8.05 (1H, m), 8.06–8.12 (1H, m).

**(+)-*N*-[7-Cyano-1,1-dioxido-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl]-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((+)-54d)**

化合物 **35** (2390 mg, 7.94 mmol)のDMF (55 mL)溶液に(±)-**55d** (2300 mg, 6.62 mmol)、HATU (3780 mg)およびDIPEA (2480 mg, 19.2 mmol)を室温に加え、混合物を50 °Cで6時間攪拌した。反応混合物をEtOAc (150 mL)および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)で希釈し、水層

を EtOAc (50 mL × 4) で抽出した。合わせた有機層を水 (100 mL × 2) および飽和食塩水 (100 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製した。目的物を含む画分を減圧下濃縮し、得られた固体をヘキサン / EtOAc (1 / 1, 45 mL) で洗浄し(±)-**54d** (3250 mg, 5.16 mmol, 78%) を無色固体として得た。MS (ESI+): 630.1 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.07 (6H, s), 2.25-2.34 (3H, m), 2.37-2.67 (2H, m), 3.54-3.93 (6H, m), 4.17-4.84 (1H, m), 5.26-6.31 (2H, m), 6.91-7.25 (3H, m), 7.27-7.32 (2H, m), 7.50-8.01 (2H, m).

ラセミ化合物(±)-**54d** (3200 mg) をキラル分取 HPLC (CHIRALCEL OD (CA002), 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 1/1) を用いて光学分割し、1 番目に溶出したエナンチオマー-tR1 (1140 mg) および 2 番目に溶出したエナンチオマー-tR2 (1410 mg) を得た。キラル HPLC 分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALCEL OD column with ヘキサン/EtOH = 1/1 at 0.5 mL/min): For tR1; *t*<sub>R</sub> = 8.74 min and 97.7% ee. For tR2; *t*<sub>R</sub> = 12.53 min and 99.6% ee. 2 番目に溶出したエナンチオマー-tR2 が目的の eutomer (+)-**54d** であり、無色結晶として得られた。mp.: 179 °C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +78.2 (*c* = 0.223, CHCl<sub>3</sub>). Anal. Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>F<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S: C, 57.23; H, 4.32; N, 11.12. Found: C, 57.28; H, 4.44; N, 11.04. <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 14.0 (d, *J* = 2.8 Hz), 44.8, 47.7, 53.3, 54.9, 56.5, 58.2, 90.2, 101.9 (q, *J* = 2.1 Hz), 109.3, 110.5, 113.4 (d, *J* = 22.0 Hz), 121.9 (q, *J* = 274.5 Hz), 122.3 (d, *J* = 17.6 Hz), 122.8, 126.2 (d, *J* = 3.3 Hz), 127.6, 130.0 (d, *J* = 8.3 Hz), 130.7, 131.2 (q, *J* = 4.5 Hz), 131.7 (q, *J* = 32.5 Hz), 133.7 (d, *J* = 5.5 Hz), 137.5, 141.3, 144.9, 146.0, 151.7, 160.2 (d, *J* = 243.7 Hz), 165.4.

## 化合物(+)-**54a** に関する合成

### 6,7-Dichloro-2,3-dihydro-1-benzothiophene-3-ol ((±)-**57a**)

6,7-ジクロロ-1-ベンゾチオフエン-3(2*H*)-オン **56a** (700 mg, 3.2 mmol) の MeOH (35 mL) 溶液に水素化ホウ素ナトリウム (245 mg, 6.5 mmol) を 4 °C でゆっくり加え、混合物を室温で 4 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣に 2 M HCl (20 mL) および EtOAc を加えた。水層を EtOAc (50 mL × 2) で抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水 (20 mL × 2) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し(±)-**57a** (695 mg, 3.1 mmol, 98 %) を黄色油状物として得た。MS (ESI): undetected. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.22 (1 H, dd, *J* = 11.7, 5.9 Hz), 3.64 (1 H, dd, *J* = 11.7, 7.0 Hz), 5.39 (1 H, q, *J* = 6.2 Hz), 5.95 (1 H, d, *J* = 5.9 Hz), 7.19-7.30 (1 H, m), 7.31-7.41 (1 H, m).

### 6,7-Dichloro-1-benzothiophene (**58a**)

化合物(±)-**57a** (700 mg, 3.2 mmol) の酢酸 (8 mL) 溶液に、窒素雰囲気下、三ふっ化ほう素-ジエチルエーテル錯体 (2 mL, 15.8 mmol) を 4 °C で加え、混合物を室温で 15 分間、次いで 120 °C で 15 分間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、2 M NaOH (30 mL) を加え pH 8 に調整し、水層を EtOAc (50 mL × 2) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (20 mL × 2) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し **58a** (526 mg, 2.6 mmol, 82 %) を茶色油状物として得た。MS (ESI): undetected. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.58 (1 H, d, *J* = 5.5 Hz), 7.64 (1 H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.79-8.09 (2 H, m).

### 6,7-Dichloro-1-benzothiophene 1,1-dioxide (59a)

化合物 **58a** (525 mg, 2.6 mmol)、タングステン酸 (VI) ナトリウム二水和物 (256 mg, 0.78 mmol)、酢酸 (7.5 mL) および MeOH (15 mL) の混合物に過酸化水素水 (7.5 mL, 86 mmol) を 4 °C で加え、混合物を室温で 2 時間、次いで 60 °C で 3 時間攪拌した。反応混合物を溶媒量が焼く 10 mL になるまで減圧下濃縮し、残渣を EtOAc (50 mL) および 2M NaOH (30 mL) で希釈した。水層を EtOAc (50 mL) で抽出し、合わせた有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液 (50 mL) で洗浄し、ヨウ化カリウムデンプン紙を用いて過酸化水素が残存しないことを確認した。次いで、有機層を飽和食塩水 (50 mL) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し **59a** (568 mg, 2.4 mmol, 93 %) を無色固体として得た。MS (ESI): undetected. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.53 (1 H, d, *J* = 6.7 Hz), 7.59 (1 H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.67 (1 H, d, *J* = 6.8 Hz), 7.97 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz).

### *N'*-(6,7-Dichloro-1,1-dioxido-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl)-*N,N*-dimethylethane-1,2-diamine ((±)-55a) (Route A)

化合物(±)-**55a** (287 mg, 0.89 mmol) は **59a** (500 mg, 2.1 mmol) を用いて、(±)-**55d** (Route A) と同様の方法により合成した。収率: 43%、黄色油状物。MS (ESI+): 322.9 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.11 (6H, s), 2.22–2.40 (2H, m), 2.56–2.69 (2H, m), 3.56 (1H, dd, *J* = 13.5, 5.6 Hz), 4.08 (1H, dd, *J* = 13.5, 7.4 Hz), 4.55–4.67 (1H, m), 7.68 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.96 (1H, d, *J* = 8.3 Hz).

### (+)-*N*-(6,7-Dichloro-1,1-dioxido-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl)-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((+)-54a)

化合物(±)-**54a** (153 mg, 0.25 mmol) は **35** (123 mg, 0.41 mmol) および(±)-**55a** (120 mg, 0.37 mmol) を用いて、(±)-**54d** と同様の方法により合成した。収率: 68%、無色固体。MS (ESI+): 605.0 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.95 (6H, s), 2.22–2.45 (5H, m), 3.67–4.26 (7H, m), 5.38–6.01 (1H, m), 6.38 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.10–7.59 (6H, m), 7.82–8.09 (1H, m).

ラセミ化合物(±)-**54a** (123 mg) をキラル分取 HPLC (CHIRALCEL OD (CA002), 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 3/2) を用いて光学分割し、1 番目に溶出したエナンチオマー-tR1 (70 mg) および 2 番目に溶出したエナンチオマー-tR2 (66 mg) を得た。キラル HPLC 分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALCEL OD (OG015) column with ヘキサン/EtOH = 3/2 at 1 mL/min): For tR1; *t*<sub>R</sub> = 5.50 min and >99.9% ee. For tR2; *t*<sub>R</sub> = 9.35 min and 99.9% ee. 2 番目に溶出したエナンチオマー-tR2 が目的の eutomer (+)-**54a** であり、無色固体として得られた。[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +98.1 (*c* = 0.113, CHCl<sub>3</sub>). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S: C, 55.54; H, 4.49; N, 9.25. Found: C, 55.71; H, 4.77; N, 8.89.

### 化合物(+)-54b に関する合成

#### 7-Chloro-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophene-3-ol ((±)-57b)

化合物(±)-**57b** (494 mg, 1.9 mmol)は7-クロロ-6-(トリフルオロメチル)-1-ベンゾチオフェン-3-(2*H*)-オン **56b** (500 mg, 2.0 mmol)を用いて、(±)-**57a** と同様の方法により合成した。収率: 98%、紫色油状物。MS (ESI): undetected. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.25 (1H, dd, *J* = 11.6, 6.6 Hz), 3.66 (1H, dd, *J* = 11.6, 7.1 Hz), 5.47 (1H, q, *J* = 6.3 Hz), 6.12 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 7.8 Hz).

#### 7-Chloro-6-(trifluoromethyl)-1-benzothiophene (**58b**)

化合物 **58b** (365 mg, 1.5 mmol)は **57b** (490 mg, 1.9 mmol)を用いて、**58a** と同様の方法により合成した。収率: 80%、無色油状物。MS (ESI): undetected. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.71 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), 7.85 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.09 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.16 (1H, d, *J* = 5.5 Hz).

#### 7-Chloro-6-(trifluoromethyl)-1-benzothiophene 1,1-dioxide (**59b**)

化合物 **59b** (381 mg, 1.4 mmol)は **58b** (350 mg, 1.5 mmol)を用いて、**59a** と同様の方法により合成した。収率: 96%、薄赤色固体。MS (ESI): undetected. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.67–7.73 (1H, m), 7.77 (2H, d, *J* = 7.2 Hz), 8.19 (1H, d, *J* = 7.9 Hz).

#### *N'*-[7-Chloro-1,1-dioxido-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl]-*N,N*-dimethylethane-1,2-diamine ((±)-**55b**) (Route A)

化合物(±)-**55b** (132 mg, 0.37 mmol)は **59b** (160 mg, 0.60 mmol)を用いて、(±)-**55d** (Route A) と同様の方法により合成した。収率: 62%、黄色油状物。MS (ESI+): 356.9 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.12 (6H, s), 2.22–2.42 (2H, m), 2.50–2.76 (3H, m), 3.60 (1H, dd, *J* = 13.5, 6.1 Hz), 4.14 (1H, dd, *J* = 13.5, 7.3 Hz), 4.62–4.75 (1H, m), 7.87 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.17 (1H, d, *J* = 8.1 Hz).

#### (+)-*N*-[7-Chloro-1,1-dioxido-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl]-*N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((+)-**54b**)

化合物(±)-**54b** (182 mg, 0.29 mmol)は **35** (160 mg, 0.53 mmol)および(±)-**55b** (127 mg, 0.36 mmol)を用いて、(±)-**54d** と同様の方法により合成した。収率: 80%、無色固体。MS (ESI+): 639.0 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.90–2.02 (6H, m), 2.21–2.31 (3H, m), 2.37–2.48 (2H, m), 3.70–4.34 (7H, m), 5.41–6.14 (1H, m), 6.39 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.09–7.81 (6H, m), 8.00–8.32 (1H, m).

ラセミ化合物(±)-**54b** (158 mg) をキラル分取 HPLC (CHIRALCEL OD (NL001), 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 7/3)を用いて光学分割し、1 番目に溶出したエナンチオマー-tR1 (77 mg)および 2 番目に溶出したエナンチオマー-tR2 (80 mg)を得た。キラル HPLC 分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALCEL OD (OG015) column with ヘキサン/EtOH = 7/3 at 1 mL/min): For tR1; *t*<sub>R</sub> = 5.75 min and >99.9% ee. For tR2; *t*<sub>R</sub> = 10.34 min and 99.6% ee. 2 番目に溶出したエナンチオマー-tR2 が目的の eutomer (+)-**54b** であり、無色固体として得られた。[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> =

+73.9 ( $c = 0.221$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Anal. Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{ClF}_4\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ : C, 54.5; H, 4.26; N, 8.77. Found: C, 54.51; H, 4.57; N, 8.4.

### Synthetic protocol for (+)-54c

#### 2,3-Difluoro-4-(trifluoromethyl)benzaldehyde (61c)

化合物 **61c** (11.3 g, 53.9 mmol)は1,2-ジフルオロ-3-(トリフルオロメチル)ベンゼン **60c** (10.0 g, 54.9 mmol)を用いて、**61d**と同様の方法により合成した。収率: 98%、茶色油状物。MS (ESI): undetected.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.52 (1H, t,  $J = 6.1$  Hz), 7.70–7.78 (1H, m), 10.40 (1H, d,  $J = 0.6$  Hz).

#### 3-Fluoro-2-(methylsulfonyl)-4-(trifluoromethyl)benzaldehyde (62c)

化合物 **62c** (9.2 g, 34.0 mmol)は **61c** (12.8 g, 60.8 mmol)を用いて、**62d**と同様の方法により合成した。収率: 56%、黄色固体。MS (ESI): undetected.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.43 (3H, d,  $J = 1.7$  Hz), 7.78 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 8.01 (1H, dd,  $J = 7.6, 7.1$  Hz), 10.83 (1H, d,  $J = 0.7$  Hz).

#### 7-Fluoro-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophene-3-ol 1,1-dioxide ((±)-63c)

化合物(±)-**63c** (2.1 g, 7.9 mmol)は **62c** (2.6 g, 9.6 mmol)を用いて、**63d**と同様の方法により合成した。収率: 82%、茶色固体。MS (ESI): undetected.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  3.57 (1H, dd,  $J = 13.8, 4.9$  Hz), 4.19 (1H, dd,  $J = 13.7, 7.0$  Hz), 5.51 (1H, q,  $J = 6.1$  Hz), 6.63 (1H, d,  $J = 6.1$  Hz), 7.71 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 8.19 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz).

#### 7-Fluoro-6-(trifluoromethyl)-1-benzothiophene 1,1-dioxide (59c)

化合物 **59c** (1.3 g, 5.0 mmol)は **63c** (1.5 g, 5.6 mmol)を用いて、**59d**と同様の方法により合成した。収率: 90%、淡黄色固体。MS (ESI): undetected.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.87 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz), 7.22–7.26 (1H, m), 7.27–7.31 (1H, m), 7.80–7.87 (1H, m).

#### *N'*-[7-Fluoro-1,1-dioxido-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl]-*N,N*-dimethylethane-1,2-diamine ((±)-55c) (Route B)

化合物 **62c** (567 mg, 2.1 mmol)の THF (5 mL)溶液に酢酸 (240  $\mu\text{L}$ , 4.2 mmol)、次いで **49** (250  $\mu\text{L}$ , 2.31 mmol)を室温に加え、混合物を同温度で 20 分間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣を THF (30 mL)に溶解させた。混合物に LDA / ヘキサン溶液 (1.11 M, 3830  $\mu\text{L}$ , 4.25 mmol)を、窒素雰囲気下、 $-50^\circ\text{C}$  でゆっくりと滴下し、混合物を同温度で 25 分間攪拌した。反応混合物に 2 M HCl (3 mL)および水 (40 mL)を室温に加え反応を停止させ、EtOAc (30 mL)で希釈した。水層を EtOAc で抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣に 2 M HCl (30 mL)を加え、水層をヘキサン / EtOAc (1 / 1, 20 mL  $\times$  4)で洗浄した。水層に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え塩基性とし、EtOAc で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮し (±)-**55c** (452 mg, 1.3 mmol, 63 %)を淡黄色固体として得た。MS (ESI+): 341.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.23 (6H, s), 2.38–2.56 (2H, m), 2.64–2.81 (2H, m), 3.47 (1H, dd,  $J =$



13.4, 5.8 Hz), 3.87 (1H, dd,  $J = 13.4, 7.2$  Hz), 4.75 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz), 7.59 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.81–7.89 (1H, m).

**(+)-*N*-[2-(Dimethylamino)ethyl]-*N*-[7-fluoro-1,1-dioxido-6-(trifluoromethyl)-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl]-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((+)-54c)**

化合物(±)-54c (256 mg, 0.41 mmol)は 35 (208 mg, 0.69 mmol)および(±)-55c (196 mg, 0.58 mmol)を用いて、(±)-54d と同様の方法により合成した。収率: 71%、淡黄色固体。MS (ESI+): 623.1 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.05–2.12 (6H, m), 2.20–2.69 (6H, m), 3.44–3.86 (6H, m), 4.18–4.74 (1H, m), 6.04–6.09 (1H, m), 6.09–7.26 (4H, m), 7.27–7.34 (2H, m), 7.59–7.84 (1H, m).

ラセミ化合物(±)-54c (243 mg) をキラル分取 HPLC (CHIRALCEL OD (CA002), 50 mm × 500 mm column, ヘキサン/EtOH = 1/1)を用いて光学分割し、1 番目に溶出したエナンチオマー-tR1 (116 mg)および 2 番目に溶出したエナンチオマー-tR2 (120 mg)を得た。キラル HPLC 分析を実施した (4.6 mm × 250 mm CHIRALCEL OD (DB195) column with ヘキサン/EtOH = 1/1 at 0.5 mL/min): For tR1;  $t_R = 8.48$  min and 99.9% ee. For tR2;  $t_R = 11.75$  min and 99.5% ee. 2 番目に溶出したエナンチオマー-tR2 が目的の eutomer (+)-54c であり、無色固体として得られた。 $[\alpha]_D^{25} = +74.4$  ( $c = 0.184$ , CHCl<sub>3</sub>). HRMS (ESI): Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>27</sub>F<sub>5</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 623.1746, found 623.1731.

**化合物(±)-51 に関する合成**

**(±)-*tert*-Butyl 6,7-dichloro-3-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)indoline-1-carboxylate ((±)-64)**

化合物(±)-64 (885 mg, 2.4 mmol)は *tert*-ブチル 6,7-ジクロロ-3-オキソインドリン-1-カルボキシレート 67 (1.2 g, 4.0 mmol)を用いて、(±)-37 と同様の方法により合成した。収率: 60%、茶色油状物。MS (ESI+): 374.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.53 (9H, s), 2.18 (6H, s), 2.28–2.50 (2H, m), 2.59–2.70 (2H, m), 3.96–4.05 (1H, m), 4.06–4.16 (1H, m), 4.19–4.25 (1H, m), 7.12–7.18 (1H, m), 7.18–7.23 (1H, m).

**(±)-*tert*-Butyl**

**6,7-dichloro-3-((2-(dimethylamino)ethyl)((3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)carbonyl)amino)indoline-1-carboxylate ((±)-51')**

化合物(±)-51' (11 mg, 0.02 mmol)は 35 (17 mg, 0.06 mmol)および(±)-64 (21 mg, 0.06 mmol) を用いて、(±)-54d と同様の方法により合成した。収率: 29%、茶色油状物。MS (ESI+): 656.3 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.38–1.65 (9H, m), 1.90–2.29 (7H, m), 2.30–2.36 (3H, m), 2.49–2.87 (1H, m), 3.03–3.52 (2H, m), 3.77 (3H, s), 3.83–4.32 (2H, m), 5.37–5.90 (1H, m), 5.98–6.19 (1H, m), 6.74–7.40 (7H, m).

**(±)-*N*-(6,7-Dichloro-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-yl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((±)-51)**

化合物(±)-**51'** (10.6 mg, 0.016 mmol)および TFA (0.5 mL)の混合物を室温で 2 時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL)を加え、水層を EtOAc (20 mL × 2)で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (20 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン、次いで MeOH / EtOAc)で精製し(±)-**51** (6.20 mg, 0.011 mmol, 69 %)を淡黄色固体として得た。MS (ESI+): 556.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.77–1.89 (2H, m), 1.96–2.68 (9H, m), 3.12–3.70 (4H, m), 3.78 (3H, s), 3.87–4.34 (1H, m), 5.44–6.30 (2H, m), 6.53–7.10 (3H, m), 7.26 (4H, s).

### Synthetic protocol for (±)-**52**

#### *N'*-(4,5-Dichloro-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)-*N,N*-dimethylethane-1,2-diamine ((±)-**65**)

化合物(±)-**65** (384 mg, 1.4 mmol)は4,5-ジクロロインダン-1-オン **68** (501 mg, 2.5 mmol)を用いて、(±)-**37**と同様の方法により合成した。収率: 56%、茶色油状物。MS (ESI+): 272.9 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.84–1.97 (2H, m), 2.21 (6H, s), 2.36–2.50 (3H, m), 2.70–2.75 (2H, m), 2.79–2.91 (1H, m), 3.01–3.14 (1H, m), 4.29 (1H, t, *J* = 6.7 Hz), 7.17 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.27–7.31 (1H, m).

#### (±)-*N*-(4,5-Dichloro-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((±)-**52**)

化合物(±)-**52** (299 mg, 0.538 mmol)は **35** (242 mg, 0.81 mmol)および(±)-**65** (200 mg, 0.73 mmol)を用いて、(±)-**54d**と同様の方法により合成した。収率: 74%、茶色固体。MS (ESI+): 555.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.87–2.16 (7H, m), 2.31 (3H, br s), 2.37–2.53 (2H, m), 2.58–2.74 (1H, m), 2.88–3.07 (2H, m), 3.34–3.53 (1H, m), 3.71–3.80 (4H, m), 5.31–6.02 (1H, m), 6.02–6.07 (1H, m), 6.54–6.64 (1H, m), 6.98–7.25 (4H, m), 7.27–7.39 (2H, m). Anal. Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·0.3H<sub>2</sub>O: C, 62.1; H, 5.32; N, 9.99. Found: C, 62.07; H, 5.36; N, 9.84.

### Synthetic protocol for (±)-**53**

#### 6,7-Dichloro-*N*-hydroxy-1-benzothiophen-3(2*H*)-imine (**70**)

6,7-ジクロロ-1-ベンゾチオフェン-3(2*H*)-オン **69** (11.0 g, 50.5 mmol)の MeOH (440 mL)溶液にヒドロキシルアミン 塩酸塩 (18.5 g, 267.4 mmol)および酢酸ナトリウム (25.6 g, 312.0 mmol)を室温に加え、混合物を 3 時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、減圧下濃縮し、残渣を水 (200 mL)および EtOAc (200 mL × 4)で希釈した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮し **70** (11 g, 47.2 mmol, 93%)を淡灰色固体として得た。MS (ESI-): 232.0 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.26 (2H, s), 7.38 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.51 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 11.77 (1H, s).

#### (±)-6,7-Dichloro-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-amine ((±)-**71**)

化合物 **70** (4.0 g, 17.1 mmol)の MeOH (1300 mL)溶液に、攪拌しながら亜鉛粉末 (27.9 g, 427.4 mmol)を 60 °C で加え、次いで 6 M HCl (127 mL)を同温度で 30 分間かけてゆっくと加え、

同温度で 30 分間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、不溶物を濾別し、濾液を減圧下濃縮した。残渣を水 (100 mL) および EtOAc で希釈し、水層を EtOAc (200 mL × 4) で抽出した。合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮し(±)-**71** の粗生成物を得た。

上記の方法を用いて 4 g、5 g × 4 および 2 g の **70** (total 26 g, 111.1 mmol) から誘導した **71** の粗生成物を合わせてカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製した。目的物を含む画分を減圧下濃縮し、得られた固体をペンタンで洗浄し(±)-**71** (5.1 g, 23.2 mmol, 21 %) を黄色固体として得た。MS (ESI+): 220.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.27 (1H, br s), 3.13 (1H, dd, *J* = 9.4, 10.7 Hz), 3.55 (1H, dd, *J* = 7.5, 11.0 Hz), 4.58 (2H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.24 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.34 (1H, d, *J* = 8.0 Hz).

#### (±)-*N*-(6,7-Dichloro-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl)-*N*,*N*-dimethylglycinamide ((±)-**72**)

化合物(±)-**71** (500 mg, 2.27 mmol)、*N,N*-ジメチルアミノ酢酸 (351 mg, 3.41 mmol)、WSC (653 mg, 3.41 mmol)、HOBt (460 mg, 3.41 mmol) および DMF (10 mL) の混合物を室温で 4 時間攪拌した。反応混合物を 10% 炭酸ナトリウム水溶液で希釈し、水層を EtOAc で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し(±)-**72** (660 mg, 2.16 mmol, 95 %) を淡黄色固体として得た。MS (ESI+): 305.1 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.22 (6H, s), 2.95 (2H, s), 3.40 (1H, dd, *J* = 11.2, 8.5 Hz), 3.64 (1H, dd, *J* = 11.2, 8.1 Hz), 5.61-5.75 (1H, m), 7.08 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 8.45 (1H, d, *J* = 8.4 Hz).

#### (±)-*N'*-(6,7-Dichloro-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl)-*N,N*-dimethylethane-1,2-diamine ((±)-**66**)

化合物(±)-**72** (244 mg, 0.8 mmol) の THF (16 mL) 溶液にボラン THF 錯体 (8.00 mL, 8.00 mmol) を、アルゴン雰囲気下、室温に加え、混合物を 60 °C で終夜攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、混合物に MeOH (5 mL) を慎重に加え、次いで濃塩酸 (5 mL) を加えた。混合物を 60 °C で 1 時間攪拌し、次いで濃塩酸 (5 mL) を更に加え、同温度で 2 時間攪拌した。反応混合物に 8 M NaOH を加え塩基性とし、水層を EtOAc で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィ (NH、EtOAc / ヘキサン) で精製し(±)-**66** の粗生成物を得た (THF が開環したことにより生じた 4-クロロ-1-ブタノールを含有する)。粗生成物を EtOAc / *i*Pr<sub>2</sub>O (1 / 1) で希釈し 1 M HCl (× 2) で逆抽出した。水層に 8 M NaOH を加え塩基性とし、EtOAc で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し(±)-**66** (363 mg) を無色油状物として得た (THF が開環したことにより生じた 4-クロロ-1-ブタノールを含有する)。得られた(±)-**66** は、これ以上の精製を行わず次の反応に用いた。MS (ESI+): 291.1 [M + H]<sup>+</sup>.

#### (±)-*N*-(6,7-Dichloro-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-yl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-3-(4-fluoro-3-methylphenyl)-5-methoxyimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamide ((±)-**53**)

化合物(±)-**53** (139 mg, 0.242 mmol)は **35** (240 mg, 0.80 mmol)および(±)-**66** (363 mg, 4-クロロ-1-ブタノール含有)を用いて、(±)-**54d** と同様の方法により合成した。収率: 30% (based on **35**)、無色固体。MS (ESI+): 573.2 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.81-2.40 (11H, m), 2.95-3.83 (7H, m), 5.68-5.86 (1H, m), 6.33-6.43 (1H, m), 6.75-7.05 (1H, m), 7.10-7.45 (6H, m). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S·0.3H<sub>2</sub>O: C, 58.09; H, 4.81; N, 9.68. Found: C, 57.84; H, 4.86; N, 9.46.

## 生物評価

### CENP-E 酵素アッセイ

第2章に関する実験項に記載の方法を用いて、CENP-E 酵素アッセイを実施した。

### FACS 解析

第2章に関する実験項に記載の方法を用いて、FACS 解析を実施した。

### 細胞増殖阻害試験

第3章に関する実験項に記載の方法を用いて、細胞増殖阻害試験を実施した。

### In vivo PD アッセイ

第3章に関する実験項に記載の方法を用いて、In vivo PD アッセイを実施した。

### ウェスタンブロッティング解析

第3章に関する実験項に記載の方法を用いて、ウェスタンブロッティング解析を実施した。

すべての動物試験は著者が所属する武田薬品工業内の Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)で承認されたプロトコールに従って行われた (Experimental Protocol Number: 00004407)。

### 血漿および腫瘍中の化合物濃度評価

血漿、および腫瘍ホモジネート (20%生理食塩水)に、それぞれ内部標準化合物含有のアセトニトリルを添加した。よく混合した後、遠心分離を実施し、上清を LC-MS/MS 測定用溶媒にて希釈した (移動相 A : 10 mM ギ酸アンモニウム / ギ酸 (100/0.2, v/v)、移動相 B : アセトニトリル / ギ酸 (100/0.2, v/v))。希釈溶液を Shimadzu Shim-pack XR-ODS (2.2 μm, 2.0 × 30 mm)のカラムを備え付けた LC-MS/MS (API5000, AB Sciex, Foster City, CA, USA)に注入し、分離分析した。化合物は次の Multiple Reaction Monitoring (多重反応モニタリング)モードにより検出した: (+)-**54a** m/z 605.09 → 325.94、(+)-**54d** m/z 630.17 → 584.99。

## 計算化学

### 静電ポテンシャルマップ (EPM)解析

第2章に関する実験項に記載の方法を用いて、MOE (version 2011.10)<sup>45</sup>により計算した。

## X 線結晶構造解析

(+)-**54d** の絶対配置は Flack パラメーター<sup>56</sup>(0.06(4))に基づいて *S* と決定した。株式会社リガク製 R-AXIS RAPID-191R により回折データを測定した。直接法 (SIR92<sup>58</sup>)で初期位相を求め、full-matrix 最小二乗法 (SHELXL-97<sup>57</sup>)を用いて構造を精密化した。非水素原子に非等方性温度因子を、水素原子に等方性温度因子を与えた。測定した結晶には溶媒ピーク (イソプロピルエーテルおよび水)が観測されたが、ディスオーダー構造をとりモデル化できないため、PLATON(SQUEEZE)<sup>59</sup>で補正した反射データを用いて精密化した。補助的な結晶学データは The Cambridge Structural Database の CCDC 1439418 に登録されている。

([www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif) 参照)

### Crystal data and data collection for (+)-**54d**

Empirical formula	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> F <sub>4</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S · (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> O · H <sub>2</sub> O · 0.5C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
Formula weight	804.88
Crystal color, habit	colorless, platelet
Temperature (K)	298
Crystal size (mm)	0.21 x 0.19 x 0.04
Crystal system	tetragonal
Space group	<i>P</i> 4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Unit cell dimensions (Å, °)	<i>a</i> = <i>b</i> = 19.6074(4) <i>c</i> = 21.545(2) <i>α</i> = <i>β</i> = <i>γ</i> = 90
Volume (Å <sup>3</sup> )	8282.9(7)
<i>Z</i>	8
Density (calculated) (g/cm <sup>3</sup> )	1.291
Radiation	Cu-Kα (1.5419 Å)
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	1.3041
Goodness-of-fit on <i>F</i> <sup>2</sup>	0.968
<i>R</i> <sub>1</sub> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	0.049
w <i>R</i> <sub>2</sub> (all data)	0.139
Flack parameter	0.06(4)

## 引用文献

- (1) Jackson, J.R.; Patrick, D. R.; Dar, M. M.; Huang, P. S. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 107–117.
- (2) Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253–265.
- (3) Rath, O.; Kozielski, F. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 527–539.
- (4) Miki, H.; Okada, Y.; Hirokawa, N. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 467–476.
- (5) Tao, W.; South, V. J.; Zhang, Y.; Davide, J. P.; Farrell, L.; Kohl, N. E.; Sepp-Lorenzino, L.; Lobell, R. B. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 49–59.
- (6) Luo, L.; Parrish, C. A.; Nevins, N.; McNulty, D. E.; Chaudhari, A. M.; Carson, J. D.; Sudakin, V.; Shaw, A. N.; Lehr, R.; Zhao, H.; Sweitzer, S.; Lad, L.; Wood, K. W.; Sakowicz, R.; Annan, R. S.; Huang, P. S.; Jackson, J. R.; Dhanak, D.; Copeland, R. A.; Auger, K. R. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 722–726.
- (7) Lad, L.; Luo, L.; Carson, J. D.; Wood, K. W.; Hartman, J. J.; Copeland, R. A.; Sakowicz, R. *Biochemistry* **2008**, *47*, 3576–3585.
- (8) Yen, T. J.; Li, G.; Schaar, B. T.; Szilak, I.; Cleveland, D. W. *Nature* **1992**, *359*, 536–539.
- (9) Yao, X.; Anderson, K. L.; Cleveland, D. W. *J. Cell Biol.* **1997**, *139*, 435–447.
- (10) Wood, K. W.; Sakowicz, R.; Goldstein, L. S.; Cleveland, D. W. *Cell* **1997**, *91*, 357–366.
- (11) Barisic, M.; Aguiar, P.; Geley, S.; Maiato, H. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 1249–1256.
- (12) Schaar, B. T.; Chan G. K. T.; Maddox, P.; Salmon, E. D.; Yen, T. J. *J. Cell. Biol.* **1997**, *139*, 1373–1382.
- (13) Sardar, H. S.; Luczak, V. G.; Lopez, M. M.; Lister, B. C.; Gilbert, S. P. *Curr. Biol.* **2010**, *20*, 1648–1653.
- (14) Yao, X.; Abrieu, A.; Zheng, Y.; Sullivan, K. F.; Cleveland, D. W. *Nat. Cell. Biol.* **2000**, *2*, 484–491.
- (15) Abrieu, A.; Kahana, J. A.; Wood, K. W.; Cleveland, D. W. *Cell* **2000**, *102*, 817–826.
- (16) Chan, G. K.; Liu, S.-T.; Yen, T. J. *Trend Cell. Biol.* **2005**, *15*, 589–598.
- (17) Wood, K. W.; Chua, P.; Sutton, D.; Jackson, J. R. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7588–7592.
- (18) Lee, C. W.; Belanger, K.; Rao, S. C.; Petrella, T. M.; Tozer, R. G.; Wood, L.; Savage, K. J.; Eisenhauer, E. A.; Synold, T. W.; Wainman, N.; Seymour, L. *Invest. New Drugs* **2008**, *26*, 249–255.
- (19) Tang, P. A.; Siu, LL.; Chen, E. X.; Hotte, S.J.; Chia, S.; Schwarz, J. K.; Pond, G. R.; Johnson, C.; Colevas, A. D.; Synold, T. W.; Vasist, L. S.; Winkvist, E. *Invest. New Drugs* **2008**, *26*, 257–264.
- (20) Knox, J. J.; Gill, S.; Synold, T. W.; Biagi, J. J.; Major, P.; Feld, R.; Cripps, C.; Wainman, N.; Eisenhauer, E.; Seymour, L. *Invest. New Drugs* **2008**, *26*, 265–272.
- (21) Mayes, P. A.; Degenhardt, Y. Y.; Wood, A.; Toporovskya, Y.; Diskin, S. J.; Haglund, E.; Moy, C.; Wooster, R.; Maris, J. M. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 149–157.
- (22) Chung, V.; Heath, E. I.; Schelman, W. R.; Johnson, B. M.; Kirby, L. C.; Lynch, K. M.; Botbyl, J. D.; Lampkin, T. A.; Holen, K. D. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *69*, 733–741.

- (23) Wood, K. W.; Lad, L.; Luo, L.; Qian, X.; Knight, S. D.; Nevins, N.; Brejc, K.; Sutton, D.; Gilmartin, A. G.; Chua, P. R.; Desai, R.; Schauer, S. P.; McNulty, D. E.; Annan, R. S.; Belmont, L. D.; Garcia, C.; Lee, Y.; Diamond, M. A.; Faucette, L. F.; Giardiniere, M.; Zhang, S.; Sun, C.-M.; Vidal, J. D.; Lichtsteiner, S.; Cornwell, W. D.; Greshock, J. D.; Wooster, R. F.; Finer, J. T.; Copeland, R. A.; Huang, P. S.; Morgans, D. J., Jr.; Dhanak, D.; Bergnes, G.; Sakowicz, R.; Jackson, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 5839–5844.
- (24) Qian, X.; McDonald, A.; Zhou, H.-J.; Adams, N. D.; Parrish, C. A.; Duffy, K. J.; Fitch, D. M.; Tedesco, R.; Ashcraft, L. W.; Yao, B.; Jiang, H.; Huang, J. K.; Marin, M. V.; Aroyan, C. E.; Wang, J.; Ahmed, S.; Burgess, J. L.; Chaudhari, A. M.; Donatelli, C. A.; Darcy, M. G.; Ridgers, L. H.; Newlander, K. A.; Schmidt, S. J.; Chai, D.; Colón, M.; Zimmerman, M. N.; Lad, L.; Sakowicz, R.; Schauer, S.; Belmont, L.; Baliga, R.; Pierce, D. W.; Finer, J. T.; Wang, Z.; Morgan, B. P.; Morgans, D. J., Jr.; Auger, K. R.; Sung, C.-M.; Carson, J. D.; Luo, L.; Hugger, E. D.; Copeland, R. A.; Sutton, D.; Elliott, J. D.; Jackson, J. R.; Wood, K. W.; Dhanak, D.; Bergnes, G.; Knight, S. D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 30–34.
- (25) Logarinho, E.; Maffini, S.; Barisic, M.; Marques, A.; Toso, A.; Meraldi, P.; Maiato, H. *Nat. Cell. Biol.* **2012**, *14*, 295–303.
- (26) Garcia-Saez, I.; Yen, T.; Wade, R. H.; Kozielski, F. *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 1107–1116.
- (27) Kim, K. S.; Lu, S.; Cornelius, L. A.; Lombardo, L. J.; Borzilleri, R. M.; Schroeder, G. M.; Sheng, C.; Rovnyak, G.; Crews, D.; Schmidt, R. J.; Williams, D. K.; Bhide, R. S.; Traeger, S. C.; McDonnell, P. A.; Mueller, L.; Sheriff, S.; Newitt, J. A.; Pudzianowski, A. T.; Yang, Z.; Wild, R.; Lee, F. Y.; Batorsky, R.; Ryder, J. S.; Ortega-Nanos, M.; Shen, H.; Gottardis, M.; Roussell, D. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3937–3942.
- (28) Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J.; King, R. W.; Schreiber, S. L.; Mitchison, T. J. *Science* **1999**, *286*, 971–974.
- (29) Yan, Y.; Sardana, V.; Xu, B.; Homnick, C.; Halczenko, W.; Buser, C. A.; Schaber, M.; Hartman, G. D.; Huber, H. E.; Kuo, L. C. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 547–554.
- (30) Náray-Szabó, G.; Ferenczy, G. G. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 829–847.
- (31) Jagusch, C.; Negri, M.; Hille, U. E.; Hu, Q.; Bartels, M.; Jahn-Hoffmann, K.; Mendieta, M. A. E. P.-B.; Rodenwaldt, B.; Müller-Vieira, U.; Schmidt, D.; Lauterbach, T.; Recanatini, M.; Cavalli, A.; Hartmann, R. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1992–2010.
- (32) Grunewald, G. L.; Seim, M. R.; Bhat, S. R.; Wilson, M. E.; Criscione, K. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 542–559.
- (33) Barazarte, A.; Camacho, J.; Domínguez, J.; Lobo, G.; Gamboa, N.; Rodrigues, J.; Capparelli, M. V.; Álvarez-Larena, Á.; Andujar, S.; Enriz, D.; Charris, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3661–3674.
- (34) Chamorro, E. R.; Sequeira, A. F.; Zalazar, M. F.; Peruchena, N. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8535–8545.
- (35) Ikeura, Y.; Tanaka, T.; Kiyota, Y.; Morimoto, S.; Ogino, M.; Ishimaru, T.; Kamo, I.; Doi, T.; Natsugari, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1642–1652.

- (36) Nakamura, Y.; Ukita, T. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2317–2320.
- (37) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3437–3440.
- (38) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.
- (39) Lam, P. Y. S.; Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Winters, M. P.; Chan, D. M. T.; Combs, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2941–2944.
- (40) Chan, D. M. T.; Monaco, K. L.; Wang, R.-P.; Winters, M. P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2933–2936.
- (41) Parmentier, J.-G.; Portevin, B.; Golsteyn, R. M.; Pierré, A.; Hickman, J.; Gloanec, P.; Nanteuil, G. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 841–844.
- (42) Mamedov, V. A.; Nuretdinov, I. A.; Sibgatullina, F. G. *Russ. Chem. Bull.* **1990**, *39*, 2380–2382.
- (43) Mamedov, V. A.; Berdnikov, E. A.; Tsuboi, S.; Hamamoto, H.; Komiyama, T.; Gorbunova, E. A.; Gubaidullin, A. T.; Litvinov, I. A. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2006**, *55*, 1455–1463.
- (44) Bondi, A. J. *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441–451.
- (45) MOE (Molecular Operating Environment), Chemical Computing Group (CCG) Inc., 1010 Sherbrooke St. W, Suite 910, Montreal, Quebec, Canada, 2008.
- (46) Wermuth, C. G.; Lipinski, C. A.; Academic Press: *The Practice of Medicinal Chemistry Third Edition*, **2008**, Chapter 22, 481–490.
- (47) Rafi, S. B.; Hearn, B. R.; Vedantham, P.; Jacobson, M. P.; Renslo, A. R. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3163–3169.
- (48) Stille, J. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 508–524.
- (49) Morrison, K. L.; Weiss, G. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 302–307.
- (50) NCBI reference sequence, human: NP\_001804.2 , mouse: NP\_776123.3.
- (51) Sauter, F.; Jordis, U.; Stanetty, P.; Hüttner, G.; Otruba, L. *Archiv der Pharmazie*, **1981**, *314*, , 567–572.
- (52) Ohashi, A.; Otori, M.; Iwai, K.; Nakayama, Y.; Nambu, T.; Morishita, D.; Kawamoto, T.; Miyamoto, M.; Hirayama, T.; Okaniwa, M.; Banno, H.; Ishikawa, T.; Kandori, H.; Iwata, K. *Nat. Commun.* **2015**, *6*:7668.
- (53) Ohashi, A.; Otori, M.; Iwai, K.; Nambu, T.; Miyamoto, M.; Kawamoto, T.; Okaniwa, M. *PLoS ONE* **2015**, *10*(12): e0144675. doi:10.1371/journal.pone.0144675.
- (54) Ohashi, A.; Zdzienicka, M. Z.; Chen, J.; Couch, F. J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 14877–14883.
- (55) Ohashi, A.; Minami, N.; Imai, H. *Biol. Reprod.* **2001**, *65*, 1195–1200.
- (56) Flack, H. D. *Acta Crystallogr., A.* **1983**, *39*, 876–881.
- (57) Sheldrick, G.M. *Acta Crystallogr., A.* **2008**, *64*, 112–122.
- (58) Altomare, A., Casciarano, G., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Burla, M., Polidori, G., Camalli, M. *J. Appl. Cryst.* **1994**, *27*, 435.
- (59) Spek, A. L. *Acta Cryst. D*, **2009**, *65*, 148–155.



本論文に関わる研究業績

- (1) **Hirayama, T.**; Okaniwa, M.; Imada, T.; Ohashi, A.; Ohori, M.; Iwai, K.; Mori, K.; Kawamoto, T.; Yokota, A.; Tanaka, T.; Ishikawa, T. Synthetic studies of centromere-associated protein-E (CENP-E) inhibitors: 1. Exploration of fused bicyclic core scaffolds using electrostatic potential map. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5488–5502.
- (2) **Hirayama, T.**; Okaniwa, M.; Banno, H.; Kakei, H.; Ohashi, A.; Iwai, K.; Ohori, M.; Mori, K.; Gotou, M.; Kawamoto, T.; Yokota, A.; Ishikawa, T. Synthetic Studies on Centromere-Associated Protein-E (CENP-E) Inhibitors: 2. Application of Electrostatic Potential Map (EPM) and Structure-Based Modeling to Imidazo[1,2-*a*]pyridine Derivatives as Anti-Tumor Agents. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8036–8053.
- (3) **Hirayama, T.**; Okaniwa, M.; Banno, H.; Kakei, H.; Ohashi, A.; Ohori, M.; Nambu, T.; Iwai, K.; Kawamoto, T.; Yokota, A.; Miyamoto, M.; Ishikawa, T. Design and Synthesis of Fused Bicyclic Inhibitors Targeting the L5 Loop Site of Centromere-Associated Protein E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4296–4300.

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、またこの度の学位取得にあたり、京都薬科大学創薬科学系薬品化学分野 赤路 健一教授に懇切なご指導、ご高配を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

本論文の審査をして頂き、有益なるご助言、ご指導を頂きました京都薬科大学創薬科学系製造学分野 山下 正行教授、分析薬科学系薬品物理化学分野 斎藤 博幸教授に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて下さいました元武田薬品工業株式会社医薬研究本部長 大川 滋紀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 元癌創薬ユニットリサーチマネージャー 石川智康博士、免疫ユニット主席部員 岡庭正格博士、癌創薬ユニット主任研究員 大橋紹宏博士に深く感謝致します。

本論文を作成するにあたり、有益なご助言とご指導を頂きました癌創薬ユニットリサーチマネージャー 今枝泰宏博士に心よりお礼申し上げます。

合成実験を担当して頂きました今田岐氏、坂野浩氏、笥広行氏に深く感謝致します。生物試験を担当して頂きました大堀桃子氏、岩井謙一氏、南部忠洋氏、森考司氏、後藤美香氏、河本朋広氏に厚くお礼申し上げます。計算化学を担当して頂きました横田彰宏氏、田中稔祐氏に深謝致します。薬物動態試験を担当して頂きました宮本真紀氏に深く感謝致します。