

2019年度

博士学位論文

中枢作用性抗肥満薬の開発

中部大学大学院

工学研究科 応用化学専攻

羽下 裕二

目次

序章 肥満と肥満治療薬.....	- 1 -
第一節 肥満症.....	- 1 -
第二節 標的分子と肥満治療薬.....	- 2 -
第一項 標的分子と肥満治療薬の現状.....	- 2 -
第二項 NPY と MCH.....	- 3 -
第一章 NPY Y5 受容体拮抗薬の開発.....	- 5 -
第一節 経口活性のある新規スピロインドリン NPY Y5 受容体拮抗薬の開発.....	- 5 -
第二節 NPY Y5 受容体拮抗薬としてのスピロペリジンのウレア誘導体の開発.....	- 13 -
第三節 トランス-N-[1-(2-フルオロフェニル)-3-ピラゾリル]-3-オキソスピロ[6-アザ イソベンゾフラン-1(3H), 1'-シクロヘキサン]-4'-カルボキサミド(MK-0557)、強力かつ経 口活性のある NPY Y5 受容体拮抗薬の開発.....	- 21 -
第四節 実験の部.....	- 32 -
第二章 MCH1 受容体拮抗薬の開発.....	- 60 -
第一節 強力かつ選択的な MCH1R 拮抗薬としてのフェニルピリドン誘導体の開発...	- 60 -
第二節 実験の部.....	- 72 -
Reference	- 88 -
論文目録.....	- 101 -
謝辞.....	- 102 -

序章 肥満と肥満治療薬

第一節 肥満症

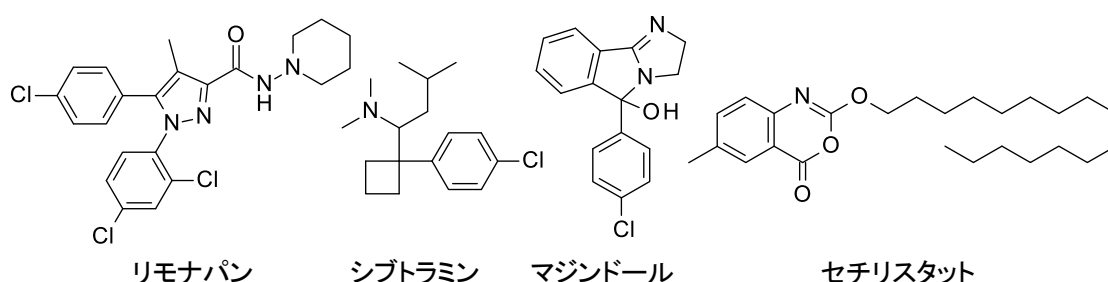
日本人の死因の第1位は悪性新生物（27.4%）、第2位は心疾患（高血圧性を除く、15.3%）、第3位は老衰（8.0%）、第4位は脳血管疾患（7.9%）、5位は肺炎（6.9%）となっている。¹心疾患及び脳血管疾患などの循環器系疾患は、全体の約1/4を占めており、これらを引き起こす危険因子として、高血圧症²⁻⁶、脂質異常症⁷⁻⁹及び糖尿病¹⁰⁻¹⁵などの生活習慣病が挙げられている。多くの製薬会社により、この分野の治療薬は精力的に開発が行われてきた結果、高血圧、脂質異常及び糖尿病に対する効果的な治療薬が開発され、一定の治療効果と死亡率低下に貢献してきた。しかし、これらの単独の治療だけでは心疾患及び脳血管疾患の発症リスク低下には十分でない場合もある。肥満がこれら疾患の関連危険因子として認識されるようになり、肥満と併せてコントロールする事が重要と考えられ、メタボリックシンドロームという新たな概念も導入された。さて、肥満と肥満症は区別されて議論されることがある。「肥満とは体脂肪組織に脂肪が過剰に蓄積した状態」と定められているが、体脂肪量を正確に測定することは容易ではないため、身長と体重より算出できるBMI（**B**ody **M**ass **I**ndex、体重(kg)÷身長(m)÷身長(m)）が肥満の判定に用いられ、日本では、BMIが25以上（欧米では30以上）を肥満、35以上を高度肥満と定めている。¹⁶しかし、BMIは単に身長と体重の関係であり、脂肪量や疾患であるかどうかは反映されていない。「肥満症は肥満に起因ないし関連する健康障害を合併するか、その合併が予測される場合で、医学的に減量を必要とする病態をいい、疾患単位として取り扱う」と定義されている。肥満でも治療を必要としない状態が存在し、過体重のみではなく健康障害や過度の内臓脂肪蓄積などの有無から総合的に判断される。肥満症の治療は、単にBMIを25以下に減量することを目標とするのではなく、体重を減らす事で合併する疾患を改善あるいは解消することにある。2006年までは体重の5%減量を目標とされていたが、減量による効果が疾患により様々であることがわかり、併発疾患により減量の目標値を定めて治療を行うようになった。体重の1~3%の減量でコレステロールや中性脂肪、HbA1c、肝機能の有意な改善が認められ、3~5%の減量で血圧、尿酸、空腹時血糖の有意な改善が認められることが報告されている。体重の増減は摂取エネルギーと消費エネルギーでの差で決まる。つまり、摂取エネルギーを減

らし、消費エネルギーを増やし、これらを維持することで体重を減らすことができる。そのための治療方法として、生活習慣改善療法(食事療法、運動療法、行動療法)、薬物療法、外科療法などがある。高血圧、脂質異常及び糖尿病の治療薬と同様に、多くの製薬会社により、薬物療法に用いられる肥満治療薬も精力的に開発が行われてきたが、現在のところ、肥満に対する効果的な治療薬の開発は、十分とは言えない状況である。

第二節 標的分子と肥満治療薬

第一項 標的分子と肥満治療薬の現状

肥満治療薬の開発ではこれまでに、①中枢神経系に作用して食欲減少させる、②消化酵素を阻害またはエネルギーの吸収過程を阻害する事により抹消での摂取エネルギーを減少させる、③エネルギー産生の過程に作用し消費エネルギーを増大させる、或いは、これら複数の効果を持った薬剤の開発など様々なアプローチがとられてきた。

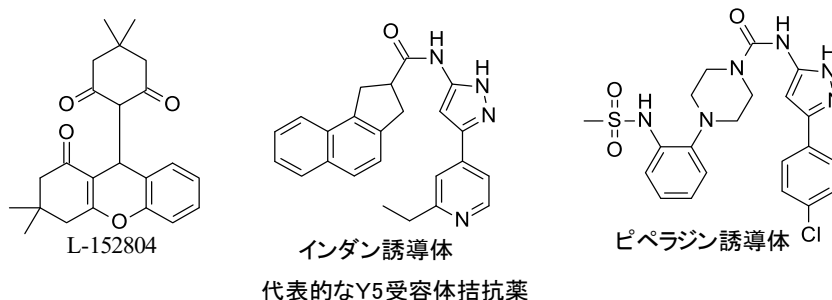
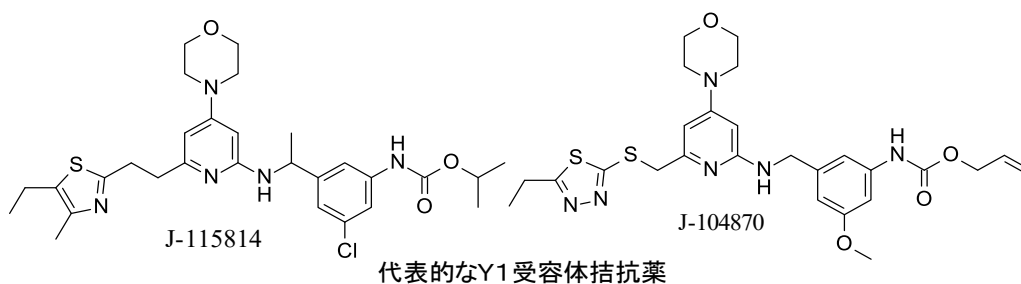


①としては、脳内モノアミン類の作動薬或いは再吸収抑制薬、および、カンナビノイド1 (CB1) 受容体阻害薬などが挙げられる。しかし、これらは、循環器や精神機能などへの副作用が出やすく食欲だけを調節することが困難な状況である。欧米では、これまでにリモナパン¹⁷⁻¹⁹ (CB1 受容体阻害剤) 及びシブトラミン²⁰⁻²² (セロトニン/ノルアドレナリン再取り込み阻害剤) が承認され、国内での開発が検討されたが、いずれの薬剤も欧米で重篤な副作用のため発売中止となった事を受け、国内開発は中止された。唯一マジンドール^{23,24} (摂食調節中枢への直接作用及びノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニンの再吸収阻害剤) が国内で承認されているが、依存症の副作用があるため長期投与に制限がある。②としては、腸管内リパーゼの阻害薬が挙げられる。海外で市販されているセチリスタット²⁵⁻²⁷ は、武田薬品工業が開発元から導入し国内開発を実施した。承認されたが薬価未収載で国内販売はされないまま、導入元へ返還された。③としては、 β 3 アドレナリン

受容体作動薬などが挙げられる。ラットで作用は確認されたが、ヒトで十分な作用が確認される薬剤はなく、医薬品としての臨床応用はされていない。このような状況から安全性が高い経口投与可能な抗肥満薬の開発が期待されている。

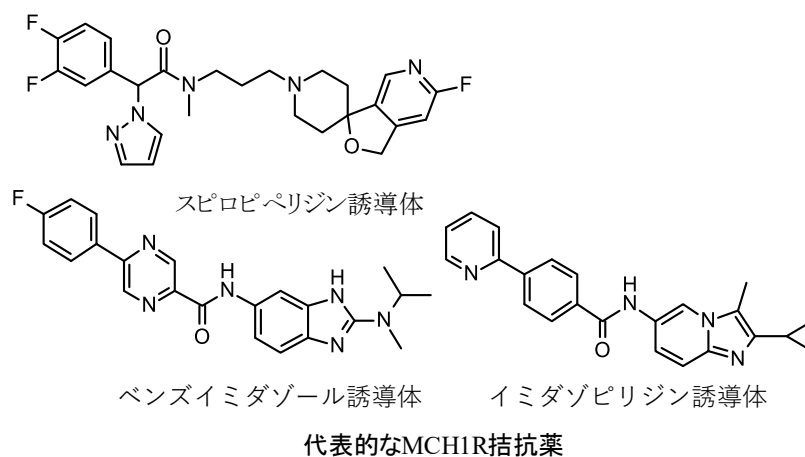
第二項 NPY と MCH

ニューロペプチド Y (NPY) は、1982年に立元らによりブタの脳から単離された36のアミノ酸からなるペプチド神経伝達物質の一種で、強力な中枢性食欲促進効果があることが示されている。²⁸⁻³¹ NPY は、視床下部および大脳皮質など中枢神経系に広く存在し、末梢では、交感神経に、特に血管周辺に存在している。NPY は、単独或いはノルエピネフリンやグルタミン酸などの神経伝達物質と組み合わせで、中枢及び抹消での作用が報告されている。NPY 受容体は、7回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、少なくとも6つの受容体サブタイプの存在がクローニングおよび/または薬理学的手法により知られている。³²⁻⁴⁶ 受容体欠損マウスやサブタイプ選択的アゴニストおよびアンタゴニストを用いた様々な薬理学的研究から視床下部に多く発現している Y1 および Y5 受容体が体重調節に関与していることが示唆されている。⁴⁵⁻⁵⁴



万有製薬つくば研究所では、社内ライブラリのスクリーニング及びそれに続く構造最適化研究によりここに示す NPY Y1 及び Y5 受容体にそれぞれ特異的な拮抗薬⁵⁸⁻⁶²を見出し、これらを用いた薬理学的研究からげっ歯類においては Y1 及び Y5 の両受容体ともエネルギー代謝に関与することを明らかにし、Y1 および Y5 受容体拮抗薬は、共に肥満症治療薬となる可能性があることを示してきた。⁵⁵⁻⁶²

MCH は、脳全体に、特に、視床下部および大脳で多く発現する 19 アミノ酸の環状神経ペプチドである。MCH は、食物摂取とエネルギー恒常性の調節を担っている。^{63,64}MCH を継続して脳室内投与 (icv) すると、食欲を刺激し過食となり肥満を引き起こす。^{64,65} また、MCH 遺伝子ノックアウトマウスは、食欲不振、代謝率の上昇により痩せとなる。⁶⁷ MCH が過剰発現しているトランスジェニックマウスでは、対照的に、インシュリン感受性となり、肥満になりやすい。⁶⁸ さらに、ラット及びマウス食餌誘発性肥満 (DIO) において、MCH1R 阻害薬の慢性投与は食物摂取と体重増加抑制する。^{69,70} これらの発見は、MCH1R が肥満治療のための魅力的な標的となり得ることを示唆している。万有製薬つくば研究所では、社内ライブラリのスクリーニング及びそれに続く構造最適化研究により MCH1R に特異的な拮抗剤を見出し、これらを用いた薬理学的研究からげっ歯類において MCH1R はエネルギー代謝に関与することを明らかにし、MCH1R 拮抗薬は、肥満症治療薬となる可能性があることを示してきた。⁷¹⁻⁷⁵



本論文では、これら知見に基づき行われた、臨床応用を目指した新たな Y5 受容体拮抗薬及び MCH1R 拮抗薬創出に関する研究に関して報告する。

第一章 NPY Y5 受容体拮抗薬の開発

第一節 経口活性のある新規スピロインドリン NPY Y5 受容体拮抗薬の開発

数多くの研究グループから様々な構造群の NPY Y5 受容体拮抗薬が報告されている。⁷⁶⁻⁹⁹ 我々は、米国メルク社の社内化合物ライブラリのスクリーニングにより得られたインダン化合物 **1a**、ピペラジン化合物 **1b** などの誘導化により強力な NPY Y5 受容体阻害剤を発見し報告している。⁶⁰⁻⁶¹ これらを用いた解析などから NPY Y5 受容体阻害薬が抗肥満薬として有望であることが示されているが、経口吸収性や脳移行性など医薬品としては十分なプロファイルではなかった。これらを改善した化合物を得るために、インダンやピペラジンに代わる新たな骨格構造を探索したところ、化合物 **1c** に代表されるスピロインドリン誘導体が高い NPY Y5 受容体阻害活性⁹⁹ を示す事を新たに見出した。化合物 **1a** のインダン構造及び化合物 **1b** のフェニルピペラジン構造を化合物 **1c** の様にスピロインドリン-ピペリジン構造で、置き換えることができたため、更なる探索研究を実施することにした。さらに、ピラゾール環を持たないアニリン誘導体 **1c** が、強力な Y5 受容体阻害活性を示した事から、化合物 **1a** 及び **1b** のアリアルピラゾール構造は Y5 受容体結合活性に必須ではなく、スピロインドリン-ピペリジン構造との組み合わせでは、許容範囲がある程度広い事がわかり、医薬品開発に非常に重要なプロファイルである経口吸収性や脳移行性などプロファイルを調整するためにこのアミン部分を利用できる新たな可能性を得た。(Figure 1)

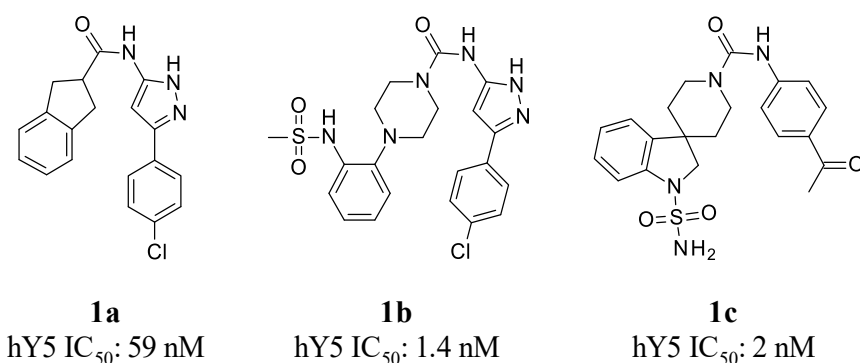


Figure 1. Y5 leads (in vitro data are the average of at least two experiments).

そこで、このスピロインドリンに代わる別の構造の探索とアミン部分の構造活性相関の取得と活性及びプロファイルの改善のため、Figure 2 に示すアミンと Figure 3 に示すイソ

シアナートの反応によるカスタム化合物ライブラリの合成をコンビナトリアル合成の手法を用いることにした。

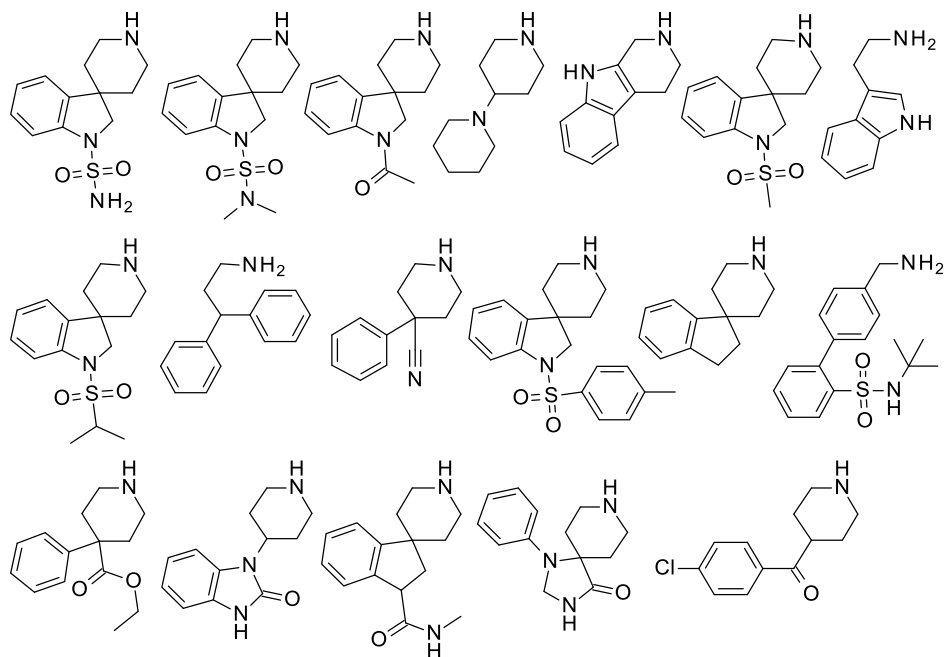


Figure 2. Amines used for the combinatorial library.

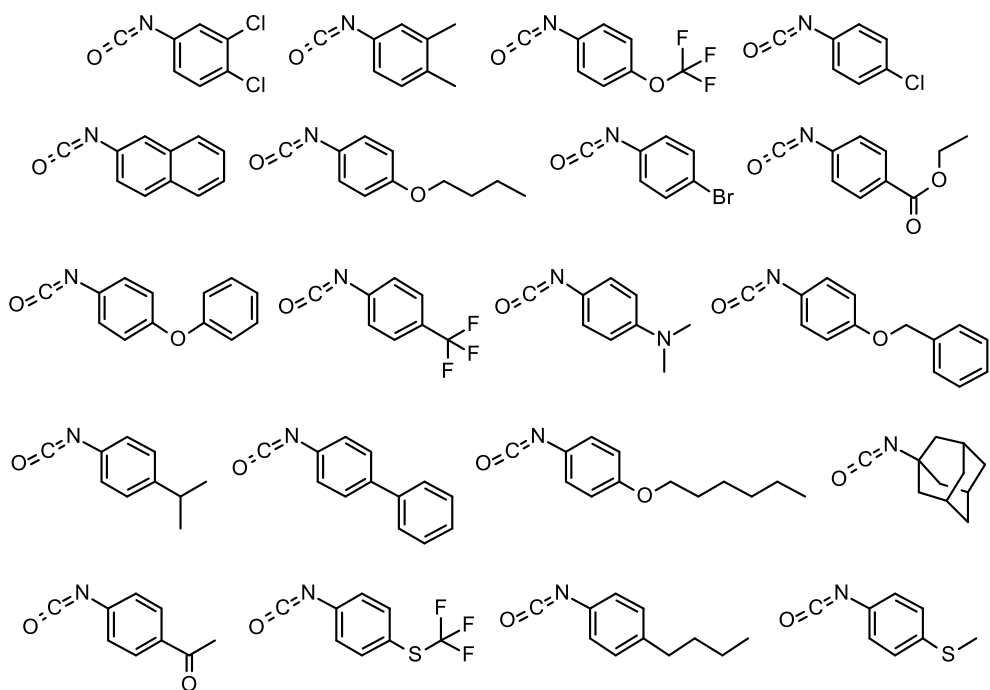


Figure 3. Isocyanates used for the combinatorial library.

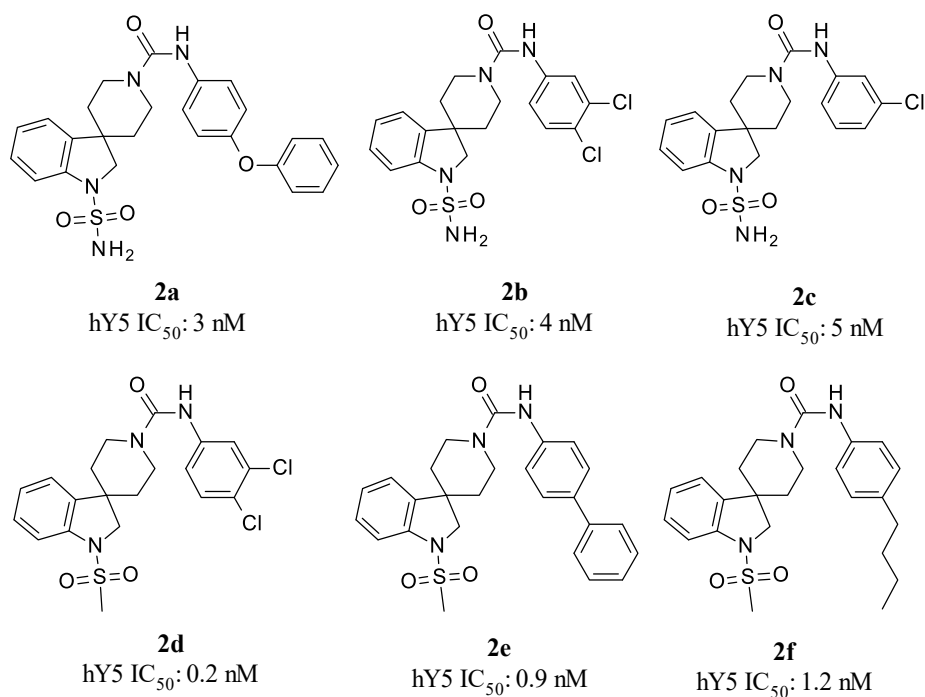
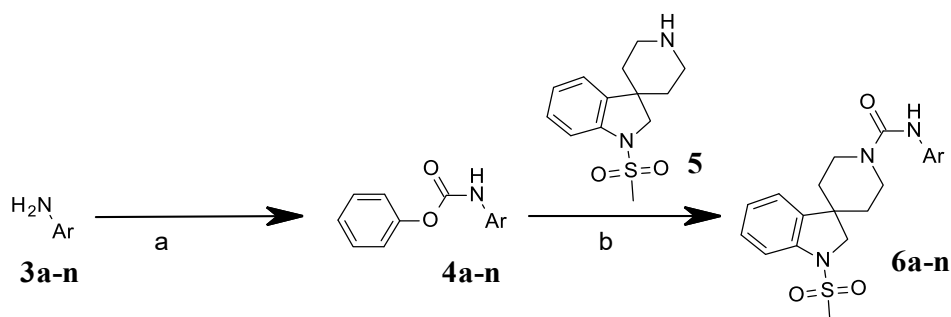


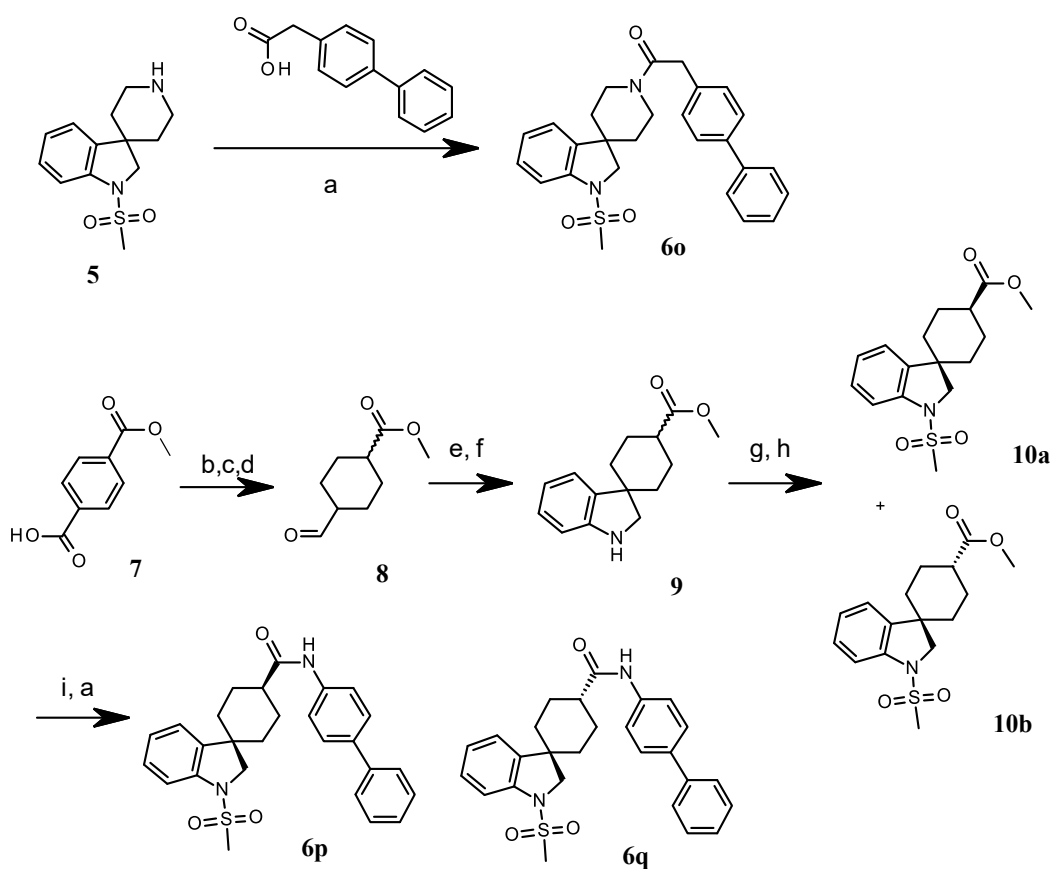
Figure 4. Additional potent Y5 antagonists

その結果、スピロインドリン構造を有する化合物群が強力な Y5 受容体結合活性を示す化合物を得た (**Figure 4**)。残念ながら、経口吸収性を示す化合物は得られなかったが、これらの内、化合物 **2e** は脳への移行性は優れていた。アミン部分の違いで脳への移行性が変化したことに注目し、脳への移行性を維持したままその経口吸収性の改善できる構造を探索するために、ビフェニル部分の変換を実施した。ウレア誘導体 **6a-n** は、対応するアミン **3a-n** をフェニルカーボナート **4a-n** とした後、スピロインドリン誘導体 **5** とトリエチルアミンの存在下反応させることで得た (**Scheme 1**)。ウレア結合をアミド結合への変換したアミド誘導体 **6o-q** の合成もおこなった (**Scheme 2**)。



Scheme 1. Synthesis of urea analogs **6a-n**.

(a) PhOCOCl, pyridine, room temperature; (b) Et₃N, CHCl₃, reflux.



Scheme 2. Synthesis of amide analog **60** and two isomers of spiro(indoline-3,4'-cyclohexane)-1'-carboxamide, **6p** and **6q**. (a) WSC-HCl, pyridine, room temperature; (b) 5% Rh/C (wet), 50atm H₂, 1,4-dioxane/MeOH (5/4); (c) Me₂S-BH₃, THF, 0 °C -> room temperature; (d) PCC, Celite, CH₂Cl₂, room temperature; (e) phenylhydrazine, TFA, toluene/acetonitrile (39/1), 0 °C -> room temperature; (f) NaBH₄, MeOH, 0 °C; (g) MeSO₂Cl, Et₃N, THF, 0 °C; (h) separation on silica gel, hexane/ethyl acetate (3/1 -> 4/3); (i) 4N NaOH, MeOH, room temperature.

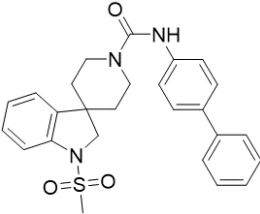
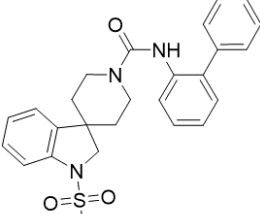
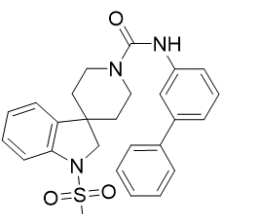
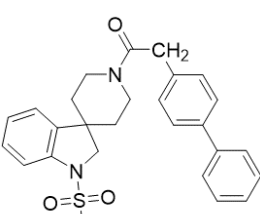
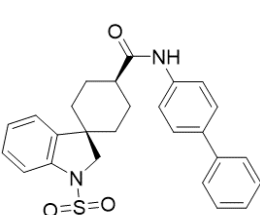
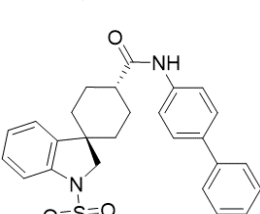
スピロインドリン誘導体 **5** を 4-ビフェニル酢酸と水溶性カルボジイミド塩酸塩 (WSC-HCl) の存在下、ピリジン中で反応させアミド誘導体 **60** を得た。スピロインドリン-シクロヘキサンカルボキサミド誘導体の 2 つの立体異性体 **6p** および **6q** は、テレフタル酸から合成した。テレフタル酸モノメチルエステル **7** のベンゼン環を 5%Rh/C で水素化 (H₂: 50 atm) して、シスとトランスの混合物としてのシクロヘキサン誘導体を得た。カルボキシル誘導体をボラン還元によりアルコール誘導体とし、その後、クロロクロム酸ピリジニウム(PCC)により酸化しアルデヒド誘導体 **8** とした。アルデヒド誘導体 **8** をフェニルヒドラジンと反応させた (フィッシャーのインドール合成) 後、生成した 3*H*-インドールを水素化ホウ素ナトリウムで還元し、スピロインドリン誘導体 **9** をシスおよびトランス異性体の混合物として得た。化合物 **9** をトリエチリアミン存在下、塩化メタンスルホニルと反応さ

せ、続いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで両異性体を分離し、対応するメチルエステル体のシス異性体 **10a** およびトランス異性体 **10b** を得た。化合物 **10a** および **10b** のメチルエステルをそれぞれアルカリ加水分解後、水溶性カルボジイミド塩酸塩 (WSC-HCl) の存在下、ビフェニルアミンとの縮合によりシスおよびトランススピロインドリン-シクロヘキサンカルボキサミド誘導体 **6p** および **6q** をそれぞれ得た。

化合物 **2e** のビフェニルアミン部位のオルト異性体である化合物 **6a** は非常に弱い Y5 受容体結合活性を示したが、メタ異性体である化合物 **6b** はパラ異性体である化合物 **2e** と同等の Y5 受容体結合活性を示した。アミド類縁体に関して、トランス異性体 **6p** は Y5 受容体結合活性を保持したが、シス異性体 **6q** と 4-ビフェニルアセトアミド誘導体 **6o** は Y5 受容体結合活性を失った (Table 1)。化合物 **2e**、**6b** および **6q** は、ラットでの経口吸収率は、いずれも低い結果であった。化合物 **2e** は、非常に低い水溶性と高い脂溶性を示めす ($<0.01 \mu\text{g/ml}$, $\text{pH}=1, 3, 5$ 及び 7 , $\log D_{7.4} >4$) が、この高い脂溶性のために代謝安定性が不十分となり、また、低い溶解度となることで消化管からの吸収が悪くなり低い経口吸収性を示すと仮定し、ビフェニル部位に窒素原子を組み込むことでこの高い脂溶性を下げ、低い経口吸収性と低い溶解度の改善を試みた。

合成した類縁体は、最初に Y5 受容体結合活性を評価し、活性を示した化合物は経口吸収性及び脳内移行性の評価をした (Table 2)。外側のフェニル環への窒素原子を導入した、オルト-、メタ-およびパラ-ピリジン類縁体 **6c-e** の Y5 受容体結合活性はわずかに減少したが、強い Y5 受容体結合活性を維持した。内側のフェニル環への窒素原子を導入したピリジン類縁体 **6f** 及び **6g** の Y5 受容体結合活性は保持したため、窒素原子を 2 原子含む複素芳香環、すなわち、ピリダジン、ピリミジン、ピラジンを合成した。これら類縁体 **6h-k** は強力な Y5 受容体結合活性を示した。窒素置換した化合物の内、良い結果を示した化合物のメタ-ビフェニル型の類縁体 **6l-n** を合成した。メタ-ビフェニル型の類縁体は、窒素置換により、パラ-ビフェニル型の類縁体よりも Y5 受容体結合活性は大きく低下する傾向を示した。経口吸収性の評価は、 3 mg/kg ($n=2$) の静脈内注射と 10 mg/kg の ($n=2$) 経口投与で化合物 **6c-k** のラット PK 試験で実施した。化合物 **6d** および **6e** は、それぞれ 47% および 53% の良好な経口吸収性を、化合物 **6c**、**6h** および **6k** は、それぞれ 12% 、 20% および 24% の中程度の経口吸収性をそれぞれ示したが、他の化合物は経口吸収性を示さなかった。

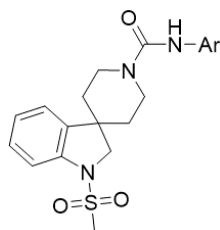
Table 1Y5 binding affinities^a

Compounds	Structure	hY5 binding IC ₅₀ (nM)
2e		0.85
6a		430
6b		1.3
6o		180
6p		200
6q		1.5

^a In vitro data in nM are the average of at least two experiments.

Table 2

Y5 binding affinities and their oral bioavailability/brain penetration data in rat



Compounds	-Ar	hY5 binding		Brain/plasma ratio, rat, iv ^c	
		IC ₅₀ (nM) ^a	Rat F ^b , %	10 min	30 min
2e		0.85	0	1.3	1.93
6c		3.0	12	0.23	0.24
6d		2.1	47	0.13	0.11
6e		4.1	53	0.12	0.12
6f		0.96	0	NT	NT
6g		0.82	0	NT	NT
6h		3.0	20	0.42	0.32
6i		3.0	0	NT	NT
6j		0.86	0	NT	NT
6k		0.57	24	0.14	0.07
6l		7.5	NT	NT	NT
6m		23	NT	NT	NT
6n		9.8	NT	NT	NT

NT, not tested. ^a In vitro data in nM are the average of at least two experiments. ^b 3 mg/kg iv (n = 2) versus 10 mg/kg po (n = 2). ^c n = 2.

経口吸収性を示した化合物 **6c-e**、**6h** および **6k** はラットに 3 mg/kg の静脈内注射での脳内移行性について評価した。これらの化合物は、脳にある程度移行したが、**2e** と比較すると低い結果であった。経口吸収性及び脳内移行性が確認されたことから、これら化合物は、Y5 受容体の選択的拮抗薬であるウシ膵臓ポリペプチド (bPP) 誘発摂食に対する抑制作用をラットに 30 mg/kg で経口投与して評価した。^{100,101} これら化合物のうち、最も強力に摂食を抑制した化合物 **6e** の用量依存性を検討したところ、最小有効用量 10 mg/kg を示した (Figure 5)。この時、試験動物には鎮静など異常な行動を引き起こさなかったため、化合物 **6e** の bPP 誘発摂食に対する抑制作用は Y5 受容体拮抗作用によると考えられる。

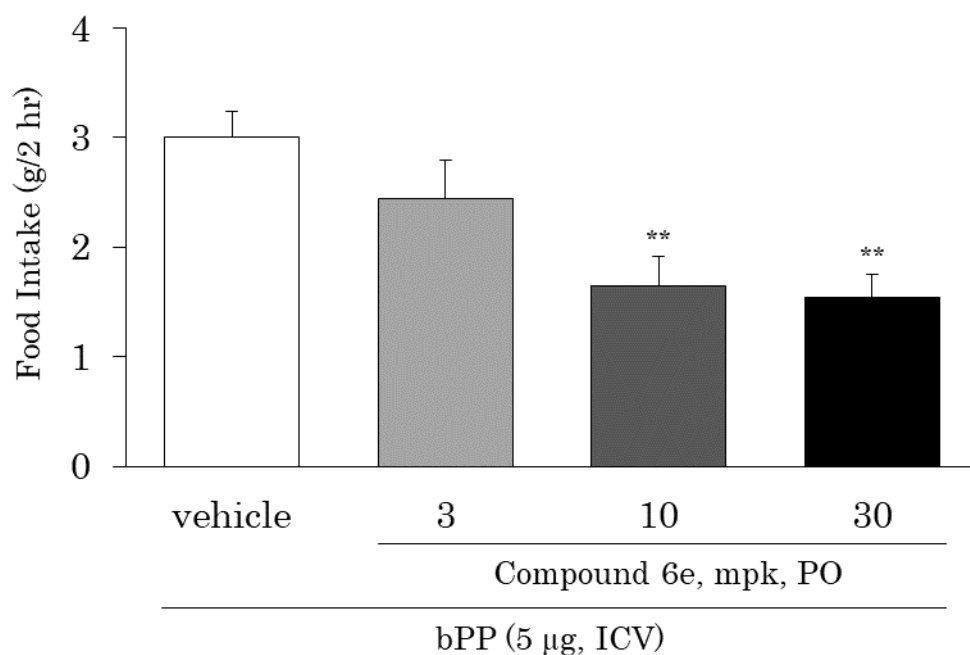


Figure 5. Inhibitory effect of compound **6e** on bPP induced food intake in rats (**P < 0.01 vs vehicle treated group. n = 13-16).

以上まとめると、強力な Y5 受容体結合活性を有する化合物 **2e** で代表されるスピロインドリン誘導体をコンビナトリアル手法による化合物合成と評価から見出した。化合物 **2e** は経口吸収性を示さなかったが、窒素原子の導入により、分子全体の脂溶性を調整した結果、経口吸収性を有した Y5 受容体拮抗薬を見出した。このうち、化合物 **6e** は経口吸収性及び脳内移行性があり、ラットにおける bPP 誘発摂食抑制試験において、用量依存的阻害を示し、最小有効容量は 10 mg/kg の経口投与で有効であった。

第二節 NPY Y5 受容体拮抗薬としてのスピロピペリジンのウレア誘

導体の開発

前節では、経口吸収性を有したスピロインドリン-ピペリジン骨格の NPY Y5 受容体拮抗薬 **6e** を報告した。化合物 **2e** は非常に強力な脳内移行性が高かったが、経口吸収性がなかった。対照的に、化合物 **6e** は経口吸収があり、ラットの Y5 アゴニスト誘発食物摂取モデルで有効であったが、脳内移行性が十分でなかったため、動物試験で薬効を確認するためには、高容量での投与が必要であった。これらの結果の内、スピロ-ピペリジン構造は、いわゆる「privileged structure」と言われる特殊な構造であることに着目した。¹⁰²⁻¹⁰⁶

「privileged structure」は特定の受容体にだけでなく多くの受容体に有用なリガンドを提供できる鍵骨格であり、この構造を変換することで別の受容体の作動薬或いは拮抗薬を創出することも可能であることが報告されている。¹⁰⁷我々は、スピロインドリン-ピペリジン構造を他の「privileged structure」で置き換えることで別骨格の NPY Y5 受容体拮抗薬が得られる可能性があると考えた。さらに、その中には、スピロインドリン-ピペリジン構造よりも、薬物動態、脳内移行性や安全性など臨床的観点から望ましいプロファイルを有する化合物を得られると考えた。そこで、様々なスピロピペリジン誘導体を合成し NPY Y5 受容体拮抗薬として評価した。本節では、得られたスピロピペリジン部分の構造活性相関、及び、最も良い結果を示したスピロ[3-オキソイソベンゾフラン-1(3H),4'-ピペリジン]誘導体に於けるビアリルアミン部分の構造活性相関に関して報告する。

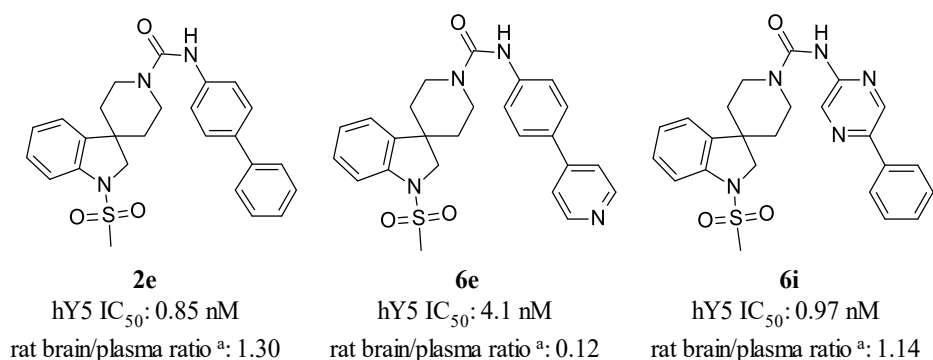
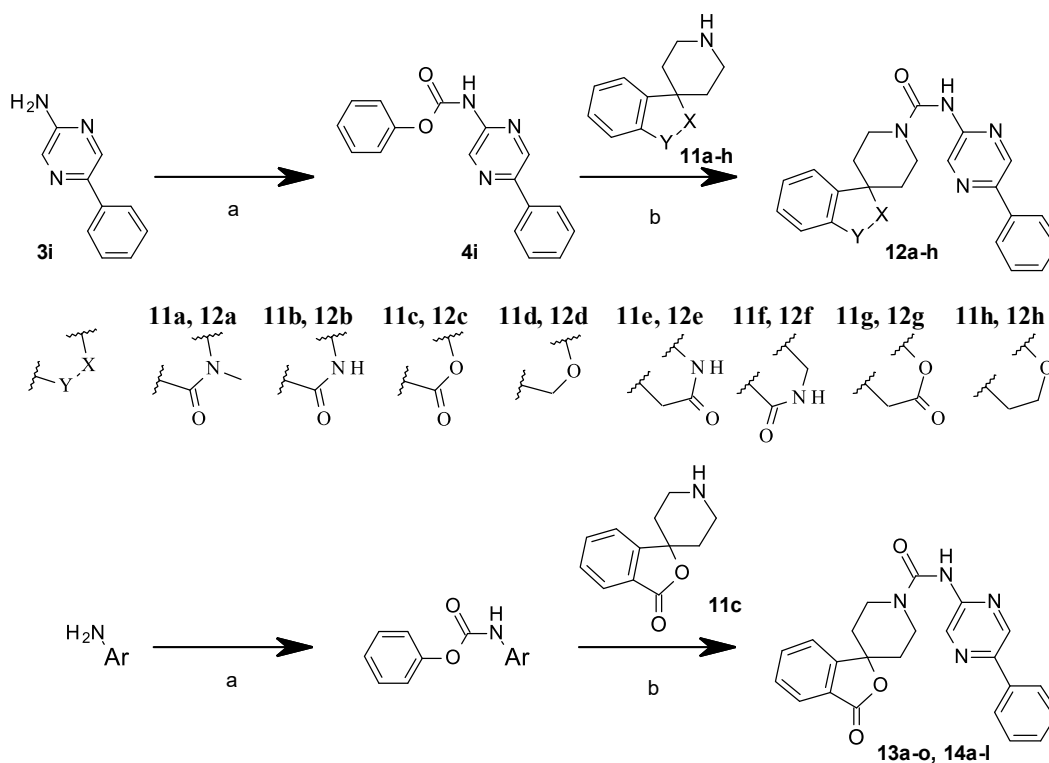


Figure 6. Spiroindoline-3,4'-piperidine Y5 leads. ^a At 10 min after 3 mg/kg iv. n = 2.

強い Y5 受容体結合活性を持っていたが、経口吸収性が低く断念した化合物に関して、ラット iv で脳内移行性を調べたところ、スピロインドリン-フェニルピラジン-ウレア誘導

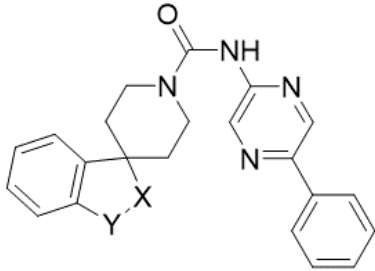
体 **6i** のみが化合物 **2e** と同様に極めて高い脳内移行性を示した (**Figure 6**)。また、ビフェニルアミンは発がん性など安全性に不安のある構造のため¹⁰⁸、2-アミノ-5-フェニルピラジン構造を用いてスピロピペリジン部分の探索を行った。2-アミノ-3-フェニルピラジン **3i** をピラジン中でクロロギ酸フェニルと反応させ、フェニルカルバメート **4i** を得た。これをスピロピペリジン **11a-h** と反応させて、対応するスピロピペリジンのウレア誘導体 **12a-h** を得た。このウレア化反応では、化合物の溶解度などにより次の2つの条件のどちらかで実施した。(a) トリエチルアミン存在下、クロロホルム中還流、または (b) 10N NaOH 水溶液及び DMSO 混合液中室温で反応した (**Scheme 3**)。この二つの方法を用いてフェニルピラジン基を種々変換した誘導体 **13a-o** および **14a-l** の合成も実施した。

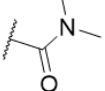
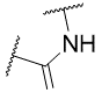
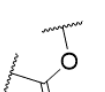
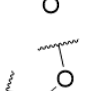
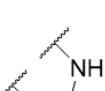
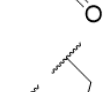
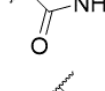
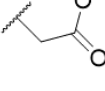


Scheme 3. Synthesis of urea derivatives of spiropiperidines **11a-h** and **12a-h**. (a) PhOCOCl , pyridine, room temperature; (b) Et_3N , CHCl_3 , reflux or 10N aqueous NaOH, DMSO, room temperature.

Table 3

hY5R binding affinities, bioavailability and plasma/brain/CSF exposure data in rats



Compounds	Structure	hY5 binding	Rat F ^b	Brain, plasma and CSF levels at 2 h after 10 mpk po in rats ^c		
		IC ₅₀ ^a (nM)	(%)	Plasma (μM)	Brain (nmol/g tissue)	CSF (μM)
12a		>1000 ^d	NT	NT	NT	NT
12b		3.7	8	0.36	0.029	ND
12c		2.4	49	2.98	2.92	0.10
12d		>1000 ^d	NT	NT	NT	NT
12e		1.7	3%	NT	NT	NT
12f		>1000 ^d	NT	NT	NT	NT
12g		5.7	NT	NT	NT	NT
12h		>1000 ^d	NT	NT	NT	NT

NT, not tested. ND, not detected. ^a In vitro data in nM are the average of at least two experiments. ^b 3 mg/kg iv (n = 2) vs 10 mg/kg po (n = 2). ^c n = 3. ^d n = 1.

先ずは、化合物 **12a-h** を合成し Y5 受容体結合活性を評価した。⁹⁹ 化合物 **12b**、**12c**、**12e** および **12g** は強力な Y5 受容体結合活性を示したが、他の類似体は非常に弱い結果となった。「privileged structure」の変換により、新たに複数のスピロペリジン骨格を有する Y5 受容体阻害薬を見出すことができた。強力な結合活性を示した化合物 **12b**、**12c**、**12e** をラットで経口吸収性を評価した。化合物 **12g** も強力阻害活性を示したが、同時に医薬品として許容できない CYP3A4 の時間依存的阻害活性¹⁰⁹ も示したため、これ以上の評価はしていない。3 化合物のうち、化合物 **12c** が、最も良い経口吸収性 (49%) を示し、さらに、ラットに経口投与後 2 時間で高い脳レベルと高い CSF レベルを示した (**Table 3**)。化合物 **12c** は、ラットおよびマウス Y5 受容体¹⁰¹ に対しても高い結合活性 (IC₅₀ 値はそれぞれ 1.7 nM および 1.7 nM) を示す一方でヒト Y1、Y2 および Y4 受容体への結合活性 (IC₅₀ 値はそれぞれ >10 μM) は非常に弱くサブタイプ選択的であった。化合物 **12c** の Y5 受容体阻害活性は、ヒト Y5 受容体を強制発現させた LMtk 細胞に対する NPY 誘発性の細胞内 Ca 濃度上昇の阻害能力によって評価した。¹⁰¹ この Y5 受容体阻害活性では、化合物 **12c** は 6.1 nM の IC₅₀ で細胞内 Ca 濃度上昇を阻害したので、化合物 **12c** は Y5 受容体選択的阻害剤であることが確認された。Y5 選択的アゴニストである D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルで化合物 **12c** は経口投与により最小有効用量 3 mg/kg で強い阻害作用を示した。¹¹⁰ 一方、NPY によるラット摂食誘発モデルでは 10 mg/kg でほとんど阻害を示さなかった。NPY によるラット摂食誘発は Y1 受容体を介した作用がほとんどであり Y5 受容体を介した作用は 20%程度と考えられていることから、化合物 **12c** によるこの抑制作用は、Y5 受容体選択的阻害作用によるものであると考えられる。 (**Figure 7**)^{60,101}

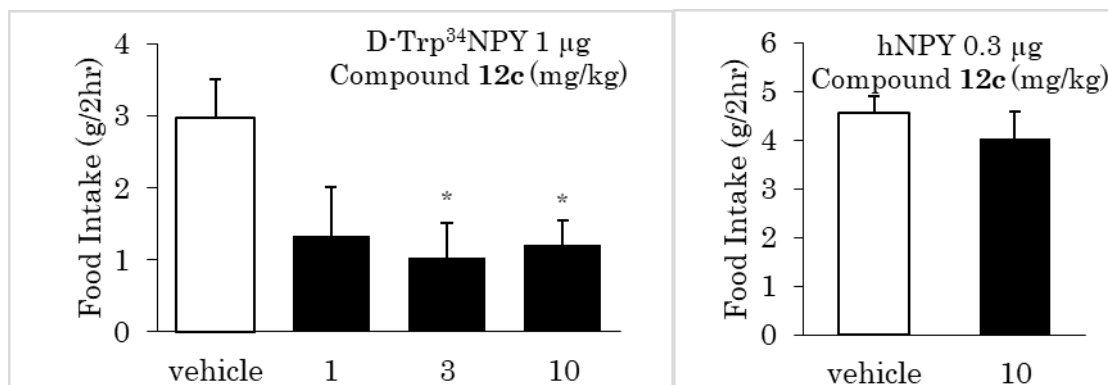
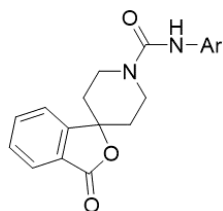


Figure 7. Inhibitory effect of compound **12c** on D-Trp³⁴NPY- or NPY-induced food intake in rats. *P < 0.05 versus vehicle treated group. n = 13–16.

Table 4

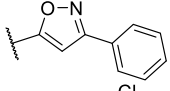
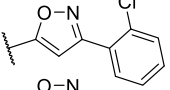
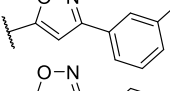
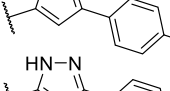
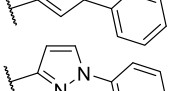
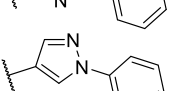
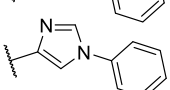
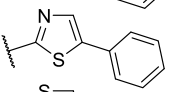
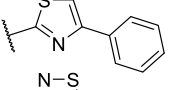
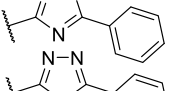
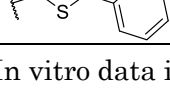
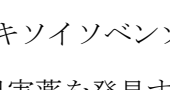
Human Y5 binding affinities and solubility data



Compounds	Structure -Ar	hY5 binding IC ₅₀ ^a (nM)	Solubility (μg/mL)	
			JP1 at pH 1.2	JP2 at pH 6.8
12c		2.4	1.9	1.2
13a		1.4	>100	85
13b		1.1	2.6	0.2
13c		0.9	7.1	0.7
13d		3.9	NT	NT
13e		1.1	3.1	0.1
13f		1.8	NT	NT
13g		14	NT	NT
13h		0.99	5.9	0.6
13i		1.1	43	4.5
13j		2.4	48	4.0
13k		1.3	0.8	0.1
13l		0.85	4.4	0.3
13m		20	NT	NT
13n		2.2	0.6	0.2
13o		6.1	NT	NT

(continued)

Table 4 (continued)

Compounds	Structure -Ar	hY5 binding IC ₅₀ ^a (nM)	Solubility (μg/mL)	
			JP1 at pH 1.2	JP2 at pH 6.8
14a		0.84	0.1	0.2
14b		0.83	NT	NT
14c		1.0	NT	NT
14d		0.69	<0.1	<0.1
14e		1.9	2.5	17
14f		2.9	27	23
14g		2.3	0.8	0.7
14h		3.5	>100	4.3
14i		1.8	0.4	<0.1
14j		7.9	NT	NT
14k		1.2	0.6	0.5
14l		3.4	NT	NT

NT, not tested. ^a In vitro data in nM are the average of at least two experiments.

我々は、スピロ[3-オキソイソベンゾフラン-1(3H),4'-ピペリジン]誘導体という、強力かつ選択的な Y5 受容体阻害薬を発見することができた。化合物 **12c** は *in vivo* で有効だが、水への溶解度は極めて低い結果 (1.9μg/ml、1.2μg/ml、それぞれ pH1.2 の JP1 と pH6.8 の JP2) ¹¹¹ であった。*in vivo* での活性の改善のためには、Y5 受容体結合活性に向上と水溶性の向上が必要と考え、化合物 **12c** のフェニルピラジニル基をさまざまなビアリール基に変換し構造活性相関を取得した (Table 4)。Y5 受容体結合活性の観点からは、さまざまなビアリール基が許容されたが、ほとんどの化合物は低い水溶性を示した。その中で、フェニルピリミジン類縁体 **13a** のみが、良好な溶解性を示した。化合物 **13a** の外側のフェニル環上にクロル基、メトキシ基、フルオロ基或いはトリフルオロメチル基を導入し、置換基効果を調べた。すべての場合において、パラ位への置換基導入は Y5 受容体結合活性を

減少傾向があるが、オルト位またはメタ位への置換基導入は、維持または若干の改善傾向が認められた。フェニルイソオキサゾール誘導体 **14a** も Y5 受容体結合活性は改善されたため、外側のフェニル環へのクロル基の導入による置換基効果を確認したが、Y5 受容体結合活性には大きな変化はなくクロロ誘導体 **14b-d** は無置換の化合物 **14a** と同程度であり、フェニルピリミジン類縁体の場合とは異なり、パラ位への置換基導入でも活性は維持した。最も強い親和性を示したフェニルイソオキサゾール誘導体 **17d** はラットで経口投与可能であったが、化合物 **14a-c** は代謝安定性が不十分であるため経口吸収性はなかった（データ非表示）。化合物 **13a** および **14d** に関して、D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルで評価し、10 mg/kg 経口投与 2 時間後の血漿、脳、CSF の各濃度及びラット Y5 受容体結合活性を測定した結果を **Table 5** に示した。

Table 5

Rat Y5 receptor binding affinities, inhibitory effect in D-Trp³⁴NPY-induced food intake, and plasma/brain/CSF exposure data in rats

Compounds	rY5 binding IC ₅₀ ^a (nM)	Minimum effective dose (mg/kg po) ^b	Brain, plasma and CSF levels at 2 h after 10 mpk po in rats ^c		
			Plasma (μ M)	Brain (nmol/g tissue)	CSF (μ M)
12c	1.7	3	2.98	2.92	0.1
13a	0.67	3	3.86	0.26	0.13
14d	1.3	>30	1.42	1.09	<0.01

^a In vitro data in nM are the average of at least two experiments. ^b Inhibitory effect in D-Trp³⁴NPY-induced food intake. ^c n = 3.

化合物 **12c**、**13a** および **14d** は、ヒト同様にラットでも強力な Y5 受容体結合活性を示した。摂食抑制実験では、評価化合物の経口投与後 1 時間後に D-Trp³⁴NPY を脳室内に注入し、その後 2 時間の食物摂取量を測定した。摂食抑制実験に対する各暴露データとして、経口投与 2 時間後の測定値を示した。化合物 **13a** は最も低い脳レベルを示したが、化合物 **12c** と同じく 3 つの化合物の中では高い CSF レベルを示した。対照的に、化合物 **14d** は化合物 **12c** の 3 分の 1、化合物 **13a** の 4 倍高い脳レベルを示したが、CSF レベルは非常に低く 0.01 μ M 未満であった。D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルでは、化合物 **14d** は 30 mg/kg でも食物摂取を抑制しなかったが、化合物 **13a** は化合物 **12c** と同等に強力な抑制作用を示した。これらより、Y5 を介した薬理作用および脳内 Y5 受容体占有率の予測には、脳レベルよりも CSF レベルが優れた指標であると考えられる。化合物 **12c** は、食

餌誘発性肥満マウスモデル (DIO マウスモデル) に於いて 10 mg/kg の 1 日 1 回経口で有効であったが¹¹²、対照的に、化合物 **13a** は同モデルに於いて 30 mg/kg でさえ有効ではなかった (データ非表示)。マウスでの経口投与後の脳内 Y5 受容体占有率を 2 つの化合物で比較すると¹¹³、化合物 **12c** は 10 mg/kg 経口投与後 16 時間までほぼ完全な受容体占有率を示しましたが、対照的に、化合物 **13a** は同じ条件下で一時的な受容体占有しか示さなかった。このことから、DIO マウスモデルで抗肥満効果を示すためには、持続的に脳内 Y5 受容体を占有する事が必要であることが分かった (Figure 8)。

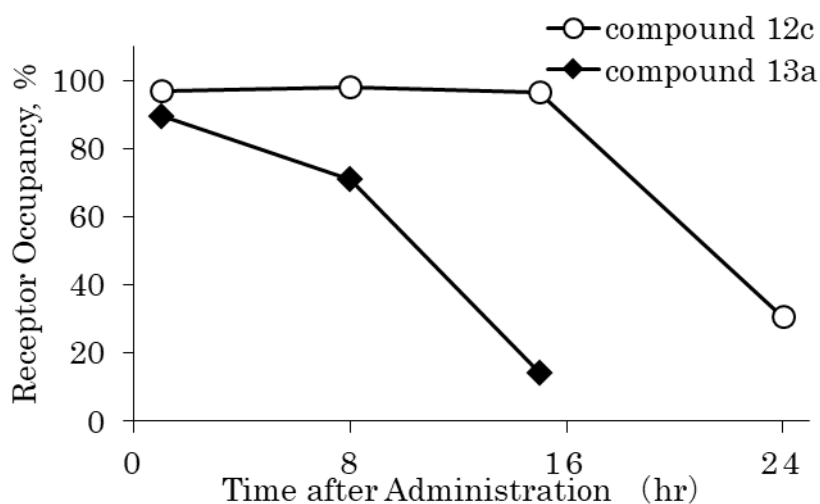


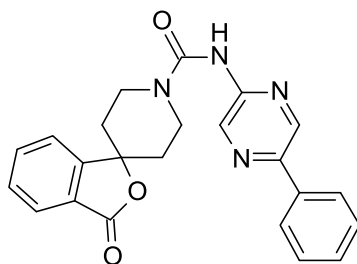
Figure 8. Receptor occupancy data in mice.

以上要約すると、新規スピロ[3-オキシソベンゾフラン-1(3H),4'-ピペリジン]ウレア誘導体を合成し、これらが、強力で経口吸収性がある選択的 NPY Y5 受容体阻害剤であることを見出した。特に、化合物 **12c** は、D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルに於いて、3 mg/kg の最小有効量で有意に抑制した。CSF レベルが、同モデルの有効性を予測する有用な指標であることを見出した。化合物 **12c** は、経口投与で持続的なマウス脳内 Y5 受容体占有を示し、DIO マウスモデルでは、10 mg/kg の 1 日 1 回経口投与で優位な効果を示した。同モデルで有効性を示すためには、持続的に脳内 Y5 受容体を占有することが必要であることを見出した。どちらのモデルでも有効性を示した化合物 **12c** は、臨床開発の候補化合物となった。

第三節 トランス-N-[1-(2-フルオロフェニル)-3-ピラゾリル]-3- オキソスピロ[6-アザイソベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]- 4'-カルボキサミド(MK-0557)、強力かつ経口活性のある NPY Y5 受容 体拮抗薬の開発

前節で報告したスピロ[3-オキソイソベンゾフラン-1(3H),4'-ピペリジン]ウレア誘導体

(**12c**、**Figure 9**) は、強力な Y5 受容体阻害活性、ラット、イヌ、および、アカゲザルを含む実験動物で経口吸収性、ラットおよびマウスで脳内移行性を有しており、最初の臨床試験の候補化合物となった。化合物 **12c** は、DIO マウスで脂肪選択的に体重を減少させたが、有意な効果を示すには、比較的高い投与量 10 mg/kg が必要であった。^{112, 113}



12c

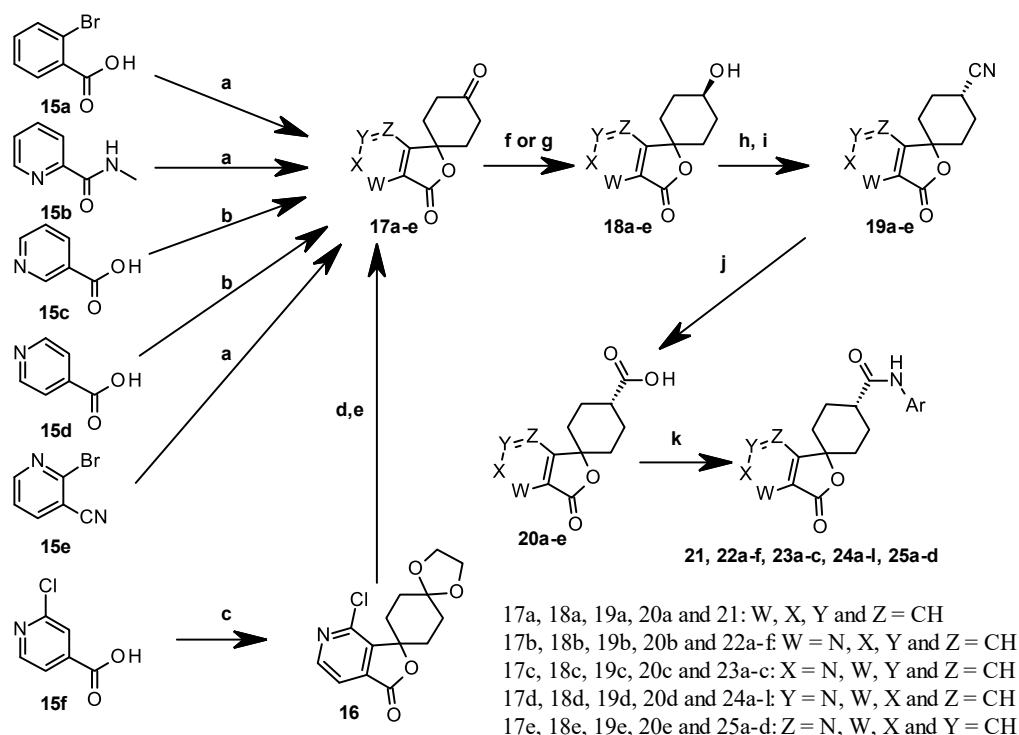
hY5 IC₅₀: 2.4 nM

Figure 9. Structure of compound **12c**

臨床試験で明確な結果を得るためには、より強力な化合物が必要となると考え、生体内でより強力な作用を示す化合物取得を目指し、化合物 **12c** のさらなる改良のために誘導化を実施した。生体内でより強力な作用を示すためには、より強力な Y5 受容体結合阻害活性に加え、薬物動態プロファイル及び脳内や CSF への移行の改善が求められる。スピロ[3-オキソイソベンゾフラン-1(3H),4'-ピペリジン]ウレア誘導体の開発の過程で、*in vivo* での有効性を予測する指標として、CSF レベルが脳内レベルより重要な指標であることを見出した。また、スピロピペリジンウレア誘導体の構造活性相関取得研究の過程で、ウレア結合をアミド結合へ変換することにより得られるアミド誘導体は、Y5 受容体拮抗作用は維持したまま、対応するウレア誘導体より高い脳内移行性を示すことを見出していた。同時に脂溶性が増加すると CSF/脳 の濃度比率は低くなることも見出していた。つまり、ウレ

ア誘導体からアミド誘導体への変換では化合物の脂溶性が増加するため、高い CSF レベルを目指すためには不利であり、脂溶性が高くなり過ぎることを避ける必要がある。これらより、強力な Y5 受容体拮抗作用と高い脳および CSF 移行性を得るためにスピロ[3-オキソイソベンゾフラン-1(3H),4'-ピペリジン]アミド誘導体を合成展開する事としたが、この場合には、脂溶性は適切なレベルを維持できるような化合物設計が必要となる。ウレア誘導体からアミド誘導体への変換で増加する脂溶性をベンゾ部分への窒素原子の導入及び、ビアリアル部分へテロ環の変換で減少させる方針をたて、さまざまな 3-オキソスピロ[アザイソベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-4'-カルボキサミド誘導体をデザイン及び合成した結果、後に臨床研究で試験された化合物 **24j** に代表される一連の非常に強力な Y5 受容体拮抗薬を見出した。1 mg の化合物 **24j** をヒトに経口投与すると、24 時間以上でほぼ完全に脳内の Y5 受容体を占有し、統計学的には優位に体重は減少したが、临床上は十分な作用ではいと判断された。¹¹⁴ 本節では、強力かつ経口吸収性がある NPY Y5 受容体拮抗薬トランス・N-[1-(2-フルオロフェニル)-3-ピラゾリル]-3-オキソスピロ[6-アザイソベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-4'-カルボキサミド (**24j**) の開発の経緯に関して報告する。

3-オキソスピロ[(アザ)イソベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-4'-カルボキサミド誘導体の合成は、トランス-3-オキソスピロ[(アザ)イソベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-4'-カルボン酸 (**20a-f**) の合成およびその後の芳香族アミンとの縮合反応におこなった。2-ブロモ安息香酸 (**15a**) および N-メチル-2-ピリジンカルボキサミド (**15b**) を n-BuLi (2.1 当量) と反応させて、ジアニオンを生成し、その後、1,4-シクロヘキサンジオンモノエチレンケタールと反応させ、続けて、酸性下ケタールを加水分解しスピロ[ベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-3,4'-ジオン (**17a**, 38%) およびスピロ[4-アザベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-3,4'-ジオン (**17b**, 62%) を得た。2-ブロモ-3-シアノピリジン (**15e**) を 1.1 当量の n-BuLi と反応し、生成したモノアニオンを同様に処理して、スピロ[7-アザベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-3,4'-ジオン (**17e**, 39%) を得た。ピリジン-3-カルボン酸 (**15c**) およびピリジン-4-カルボン酸 (**15d**) をリチウム 2,2,6,6-テトラメチルピペリジド (2.1 当量) と反応させて、生成したジアニオンを同様に処理して、スピロ[5-アザベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-3,4'-ジオン (**17c**, 30%) およびスピロ[6-アザベンゾフラン-1(3H),1'-シクロヘキサン]-3,4'-ジオン (**17d**, <27%) を得た。化合物 **17d** の合成の収率は一般に低く、再現性が低かった。



Scheme 4. Synthesis of 3-oxospiro[(aza)isobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide derivatives.

Reagents and conditions: (a) *n*-BuLi, 1,4-cyclohexanedione monoethyleneketal, THF, -70°C; then concd HCl, H₂O, acetone, 80°C, 38-62%; (b) *n*-BuLi, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine, 1,4-cyclohexanedione mono-ethylene ketal, THF, -40°C; then 6*N* HCl, 80°C, 30% for the step from **15c**, 10-27% for the step from **15d**; (c) *n*-BuLi, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine, 1,4-cyclohexanedione monoethyleneketal, THF, -50°C, 49%; (d) H₂, Pd/C, Et₃N, THF, quant.; (e) TsOH, H₂O, acetone, 80°C, 91%; (f) NaBH₄, THF, H₂O, 0°C, 76-77% for the step from **17a** and **17d**; (g) LiAl(O*t*Bu)₃H, THF, 0°C, 87-98% for the step from **17b**, **17c** and **17e**; (h) MsCl, Et₃N, 0°C; (i) Et₄NCN, DMF, 100°C, 31-70% over all yield for the steps (h) and (i); (j) 30% H₂SO₄, 100°C, 90-92%; (k) Ar-NH₂, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, pyridine.

これは、中間ジアニオンの溶解度が低いためと考え、別方法を検討した。原料のカルボン酸の溶解度を上げるためにクロロ基を導入した 2-クロロピリジン-4-カルボン酸 (**15f**) に変更し、同様に、リチウム 2,2,6,6-テトラメチルピペリジド (2.1 当量) と反応させ、続いて 1,4-シクロヘキサジオンモノエチレンケタールと反応させ、スピロラクトン誘導体 **16** (49%) を得、水素化分解に引き続き酸性下加水分解によりジケトン体 **17d** (91%) を得た。このルート変更において、収率改善は十分ではなかったが、再現性は向上したためメディシナルケミストリーの目的には十分実用であった。ケトン体 **17a** および **17d** は NaBH₄ により立体選択的に還元されシスアルコール **18a** および **18d** をそれぞれ 76% 及び 77% の収率で得た。ケトン体 **17b**、**17c**、および **17e** の還元は、LiAl(O*t*Bu)₃H で立体選択

的に行いそれぞれ対応するシスアルコール **18b**、**18c**、**18e** を 87%、94%、98%の収率で得た。アルコール **18a-e** は、トリエチルアミン存在下塩化メタンスルホニルと反応し、得られたメシラートをテトラエチルアンモニウムシアニドと反応させ、その後、酸加水分解にて、トランス-スピロ[(アザ)イソベンゾフラン-1(3*H*), 1'-シクロヘキサン]-4'-カルボン酸 (**20a-e**) を収率 31-70%で得た。カルボン酸はピリジン中、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩を用い、各種芳香族アミンと縮合し、所望の 3-オキソスピロ[(アザ)イソベンゾフラン-1(3*H*), 1'-シクロヘキサン]-4'-カルボキサミド誘導体を得た (Scheme 4)。

合成した化合物は、最初にヒト Y5 受容体結合親和性^{99,101} を評価し、次に、ラット肝細胞での代謝安定性及び脂溶性を評価した。¹⁰⁹ 良い結果を示した化合物は、さらにラットで脳および CSF 移行性について評価した。その結果を table 6 に示します。化合物 **12c** のウレア結合をアミド結合に変換したトランス-*N*-[5-フェニル-2-ピラジニル]-3-オキソスピロ[イソベンゾフラン-1(3*H*), 1'-シクロヘキサン]-4'-カルボキサミド (**21**) は、強力なヒト Y5 受容体結合親和性を示したが、ラット肝細胞では不安定であった。この低い代謝安定性は、その高い脂溶性 (LogD_{7.4}>4) が原因であり、脂溶性を下げれば、代謝安定はよくなると考え、脂溶性を低下させるために、3-オキソイソベンゾフラン部分のベンゼン環に窒素原子を導入した 4-、5-、6-および 7-アザ類縁体 **22a**、**23a**、**24a** および **25a** を合成した。これらの化合物は、数 nM と高い Y5 受容体結合活性を示し、化合物 **22a** および **24a** では、窒素原子の導入により、脂溶性 (それぞれ LogD_{7.4} = 3.10 および 3.39) が効果的に減少した。化合物 **22a** では予想通り代謝安定性が改善され、更に、ラットで良好な脳および CSF 移行性を示したことから、この部位への窒素原子の導入は有効な手段であることが分かり、更なる探索に期待が持てる結果であった。2-アミノ-5-フェニルピラジン、2-アミノ-5-フェニルピリミジン、3-アミノ-5-フェニルイソオキサゾール、3-アミノ-5-フェニルピラゾールなどのヘテロ芳香族アミンを検討した結果、強力な Y5 受容体阻害剤が得られ、ヘテロ環は幅広く許容されることが分かった。アザイソベンゾフラン部分の異性体は、すべてで同程度の Y5 受容体結合親和性を示したが、5-アザイソベンゾフラン類縁体 **23a-c** は医薬品としては許容できない CYP3A4 阻害活性 (>50% @ 10μM) を示したため、薬物候補から除外した。¹¹⁵

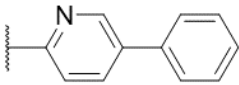
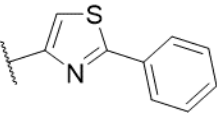
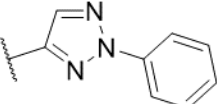
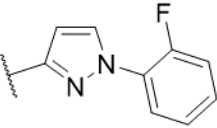
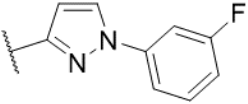
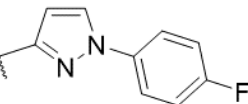
Table 6

hY5R binding affinities, hepatic availability and Log D_{7.4}

Compounds	Structure -Ar	hY5 binding	Metabolic	Log D _{7.4}
		IC ₅₀ ^a (nM)	stability in rat hepatocytes CL _h (mL/min/kg)	
21		1.5	35	>4
22a		4.2	18	3.10
23a		2.4	42	NT
24a		2.2	36	3.39
25a		3.9	39	NT
22b		2.1	49	2.32
23b		2.0	42	NT
24b		1.8	39	2.65
25b		2.9	49	2.71
22c			2.8	6
24c	2.1		6	NT
25c	2.4		36	3.70
22d		5.4	2	NT
23c		2.9	9	NT
24d		2.7	3	3.16
25d		26	NT	NT
22e		4.4	4	2.80
24g		2.3	20	3.10
22f		1.3	1	2.90
24h		2.2	<1	NT

(continued)

Table 6 (continued)

Compounds	Structure	hY5 binding	Metabolic stability	Log D _{7.4}
		IC ₅₀ ^a (nM)	in rat hepatocytes CL _h (mL/min/kg)	
24e		2.1	14	NT
24f		1.2	12	NT
24i		0.89	21	3.40
24j		1.3	9	3.20
24k		2.0	10	3.40
24l		0.92	7	3.20

NT, not tested. ND, not detected. ^a In vitro data in nM are the average of at least two experiments.

7-アザイソベンゾフラン類縁体 **25a-d** は、アミン部分が同じ構造の他の 4-、5-、6-アザ類縁体と比較して、全般的にラット肝細胞安定性が低かったため、7-アザ類縁体の更なる誘導化は断念した。4-アザおよび6-アザ類縁体 (**22a-d** 及び **24a-d**) では、アミン部分が同じ構造で比較すると、6-アザ類縁体の方がより高い脳内移行性を示す傾向があった。そのためさらなるアミン部分の探索は6-アザイソベンゾフランを主に用い実施した。5-フェニル-2-ピリジルおよび2-フェニル-4-チアゾリル類縁体 (**24e** および **24f**) は強い Y5 受容体結合親和性とラット肝細胞での安定性を示した。しかしながら、これらはラットに 10 mg/kg で経口投与後の血漿中濃度は予想外に低い暴露しか示さなかった。1-フェニル-3-ピラゾリル類縁体 **24g** は高い Y5 受容体結合活性とラット肝細胞安定性、および高い脳と CSF 移行性 (脳/血漿比= 1.06、CSF/脳比= 0.088) を示した。構造的に非常に近い異性体、1-フェニル-4-ピラゾリル類縁体 **24h** は高い Y5 受容体結合親和性とラット肝細胞安定

性を示したが、脳内移行性は低かった。2-フェニル-4-トリアゾリル類縁体 **24i** も高い Y5 受容体結合親和性とラット肝細胞安定性及び脳内移行性を示したが、CSF 移行性 (CSF/脳比=0.032) は **24g** および **24h** (CSF/脳比 0.088 及び 0.115) に比較して低かった。

最後に、高い結合活性、優れた代謝安定性、良好な脳および CSF 移行性を示した 1-フェニル-3-ピラゾール誘導体を選択し、フェニル基に F 基を導入し、**24g** の代謝安定性の更なる改善を試み類似体 **24j**、**24k** および **24l** を合成した。これらは期待通り高い Y5 受容体結合活性とラット肝細胞安定性及び脳内移行性を示した。

Table 7

plasma, brain and CSF exposure data in rats

Compounds	Brain, plasma and CSF levels at 2 h after 10 mpk po in rats ^a		
	Plasma (μM)	Brain (nmol/g tissue)	CSF (μM)
22a	3.75	2.5	0.174
22c	0.83	0.23	0.016
22e	6.46	2.79	0.416
22f	6.68	0.50	0.091
24c	(0.29) ^b	NT	NT
24d	6.1	0.50	0.059
24e	(0.02) ^b	NT	NT
24f	(0.19) ^b	NT	NT
24g	2.94	3.13	0.276
24h	1.52	0.39	0.045
24i	0.68	1.33	0.042
24j	1.59	2.15	0.152
24k	1.09	1.36	0.077
24l	0.89	1.24	0.081

NT, not tested. ^a n = 3. ^b Plasma exposure screening data using 2 animals.

6-アザ誘導体で良い結果を与えた 1-フェニル-3-ピラゾリルおよび 1-フェニル-4-ピラゾリル構造は、4-アザ誘導体でも組み合わせも試すことにした。**22e** および **22f** は、期待通り高い Y5 受容体結合親和性とラット肝細胞安定性を示した。化合物 **22e** および **22f** の CSF

移行性 (CSF /脳比=0.15 及び 0.18) は非常に良かったが、脳/血漿比は対応する 6-アザ類縁体よりも低い結果であった。

脳内濃度は、P 糖タンパク質 (P-gp) トランスポーターに対する基質性が高いと低くなること知られている。また、これまでの我々の研究から、脂溶性が高くなると、CSF 濃度は低くなる傾向にあることが見出されてきた。さらに、CSF 濃度が *in vivo* 薬効モデルでの有効性に重要であること見出したことを前節で報告している。つまり、P-gp トランスポーターに対する基質性および脂溶性が共に低いことが高い CSF 濃度を得るためには必要である。化合物 **22e**、**22f**、**24g**、**24j** および **24l** に対して、D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルに於ける抑制効果、ヒトおよびマウスの P-gp トランスポーターに対する基質性評価^{116, 117} を実施した。化合物 **12c** のデータと合わせて **table 8** に結果を示す。

Table 8

Rat Y5 receptor binding affinities, inhibitory effect in D-Trp³⁴NPY-induced food intake, and plasma, brain and CSF exposure data in rats and susceptibility to P-gp transporters

Compounds	rY5 binding IC ₅₀ ^a (nM)	Minimum effective dose (mg/kg po) ^b	Susceptibility to P-gp transporters	
			B-to-A/A-to-B ratio ^c	
			Human LMDR1 ^d	Mouse Lmdr1a ^e
12c	1.7	3	0.99	1.36
22e	4.7	10	1.97	6.05
22f	2.2	>10	6.13	21.1
24g	2.1	3	1.05	1.74
24j	2.1	1	1.29	1.57
24l	2.5	>10	1.28	2.41

^a *In vitro* data in nM are the average of at least two experiments. ^b Inhibitory effect on D-Trp³⁴NPY-induced food intake. ^c Transcellular transport across the monolayers of L-MDR1 or L-mdr1a. Values represent the ratio of basal-to-apical (B-to-A) versus apical-to-basal (A-to-B) at 3 h. ^d Human MDR1 transfectants. ^e Mouse mdr1a transfectants.

これらの化合物は、ヒトとラットで同等の Y5 受容体結合親和性を示した。1-フェニル-4-ピラゾリル類縁体 **22f** は、D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルに於いて弱い抑制効

果しか示さなかった。マウスの P-gp トランスポーターアッセイの結果は、B-to-A/A-to-B 比=21.1 と、この化合物が良好なマウス P-gp トランスポーターの基質であることを示していた。化合物 **22e** は、4-ピラゾリル類縁体 **22f** の対応する 3-ピラゾリル類縁体だが、ヒトおよびマウスの P-gp トランスポーターへの基質性は大きく異なっていた。さらに、4-アザ類縁体 **22f** と対応する 6-アザ類縁体 **24g** の間にも P-gp のトランスポーターに対する基質性に大きな差が観察された。この様に小さな構造変化にもかかわらず、P-gp トランスポーターに対する基質性は大きく変化するが、脂溶性 (**22e**、**22f** および **24g** それぞれ $\text{LogD}_{7.4} = 2.80$ 、 2.90 および 3.10) には大きな違いは無かった。ヒト P-gp トランスポーターへの基質性が低い化合物 **22e**、**24g**、**24j** および **24i** の内、**24j** が D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルで最小有効用量、経口 1 mg/kg と最も強い抑制作用を示した。NPY によるラット摂食誘発モデルでの **24j** の抑制作用は、対照的に非常に弱かったため、D-Trp³⁴NPY による摂食誘発への **24j** の抑制効果は、Y5 受容体選択的拮抗作用によると確認された (Figure 10)。

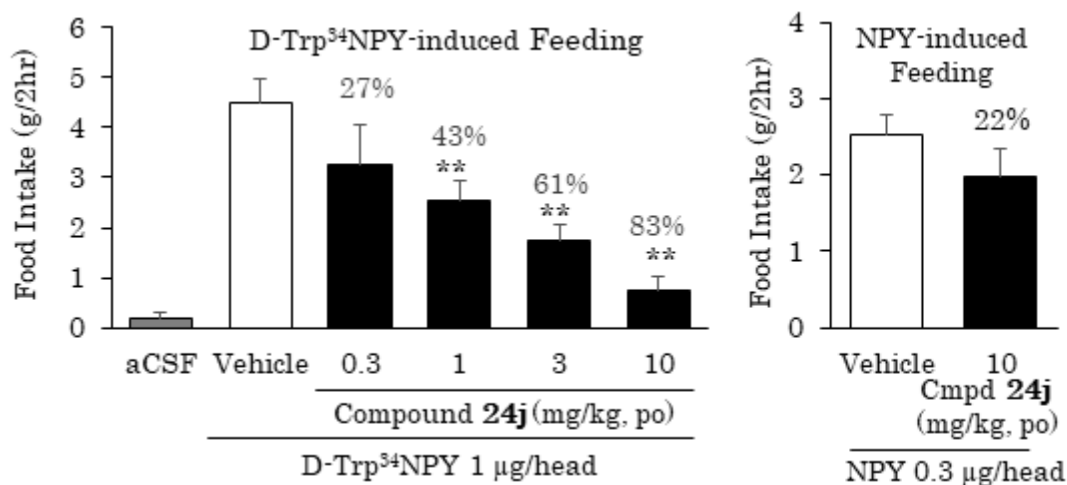


Figure 10. D-Trp³⁴NPY-induced food intake of compound **24j** in SD rats. Compound **24j** was orally administered 2 h before the 3rdV-injection of the agonists. **p < 0.01 versus vehicle-treated group (Dunnett). n = 8–18.

in vitro P-gp トランスポーターアッセイでは、**24j** の B-to-A/A-to-B 比率はヒトとマウスでそれぞれ 1.29 と 1.57 で、ヒト及びマウス P-gp トランスポーターの非常に弱い基質であった。化合物 **24j** と **12c** は、共に、ヒトおよびマウス P-gp トランスポーターの弱い基質であり、D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルで強い抑制効果でした。次に、マウス

での脳 Y5 受容体占有率で **24j** と **12c** を比較した¹¹³。Figure 11 に示すように、**12c** 及び **24j** は血漿レベルと脳 Y5 受容体占有率には相関が見られた。ほぼ完全に受容体を占有するために、化合物 **12c** は 100-200 ng/ml の血漿レベルが必要であったが、**24j** は 10~20 ng/mL の血漿レベルと 10 倍程度低い濃度良いことが分かった。血漿レベルは全身暴露を反映しており、全身暴露は肝臓障害などの副作用の原因となると考えると、10~20 ng/mL と比較的低い血漿レベルでほぼ完全な受容体占有を生じる化合物 **24j** は、特に魅力的な化合物である。したがって、化合物 **24j** は Y5 受容体拮抗薬として臨床研究を行う候補化合物となった。

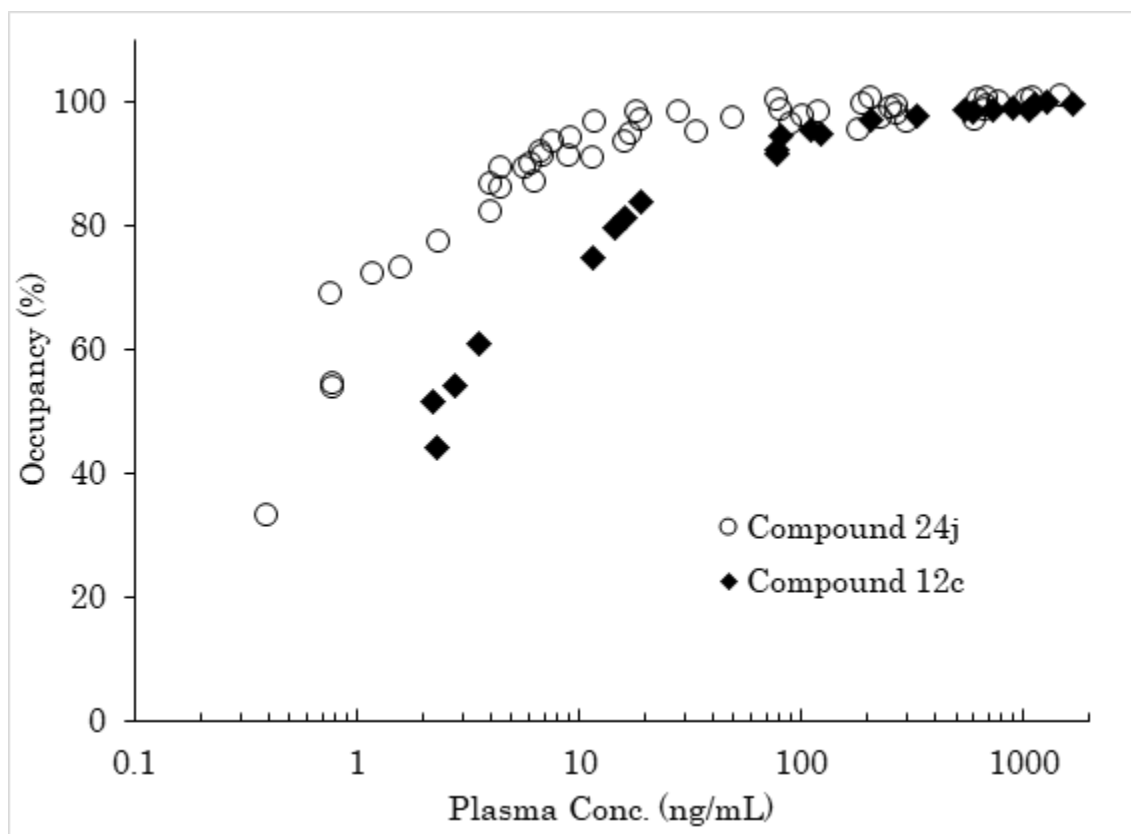


Figure 11. Receptor occupancy and plasma level data of compounds **12c** and **24j**.

以上まとめると、一連のトランス-3-オキソスピロ[アザイソベンゾフラン-1(3*H*),1'-シクロヘキサン]-4'-カルボキサミド誘導体を合成した。これらうち、トランス-*N*[1-(2-フルオロフェニル)-3-ピラゾリル]-3-オキソスピロ[6-アザイソベンゾフラン-1(3*H*),1'-シクロヘキサン]-4'-カルボキサミド (**24j**) は、代謝的に安定かつ脳および CSF 移行性に優れた非常に強力な Y5 受容体結合阻害剤であり、経口投与により、D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘

発モデルで、1 mg/kg の最小有効用量で有効であった。Y5 選択的アゴニストである D-Trp³⁴NPY によるラット摂食誘発モデルでは有効である一方で、非選択的アゴニストである NPY による摂食誘発モデルでは、弱い作用しか示さなかった事から、**24j** の抑制効果は Y5 選択的拮抗作用あることが確認できた。ヒトおよびマウスの P-gp トランスポーターの基質が乏しい化合物 **24** は、10~20 ng/mL の血漿レベルでほぼ完全なマウス脳内 Y5 受容体を占有しました。化合物 **24j** は、化合物 **12c** よりも優れた Y5 受容体結合阻害剤として、臨床開発候補化合物として選択された。

中枢作用性の薬剤の開発では、投与量設定のために作用部位である脳内薬剤濃度を知ることが重要であるが、人で脳内薬剤濃度を直接測ることは容易ではない。そのため、脳内薬剤濃度を予測する方法が種々提案されている。そのうちの一つにポジトロン断層法(PET、Positron emission tomography)がある。PET は、生体へのダメージが少ない陽電子崩壊する核種でラベル化された薬剤を用いて、生体内の状況を測定できる方法であり、がん検診などで臨床応用されている測定方法である。本研究でも化合物 **24j** の類縁体から PET トレーサーの探索も同時に実施し、臨床開発での人の脳内濃度測定用に MK-0233 を創出した。(Figure 12) ¹¹⁵ 化合物 **24j** は、安全性試験を経て MK-0557 として臨床実験が行われた。その際に、¹¹¹C]MK-0233¹¹⁸ を用いて人の脳内濃度測定がなされた結果、MK-0557 は 1.25 mg の経口投与で、24 時間以上でほぼ完全に人の脳内の Y5 受容体を占有する事がわかり、臨床投与量の設定がおこなわれた。⁴⁰

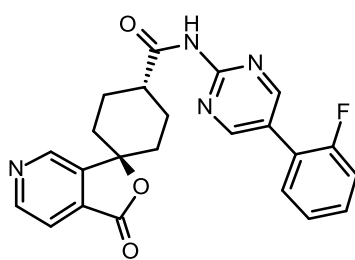


Figure 12. PET tracer MK-0233

第四節 実験の部

試薬及び溶媒は、市販品を精製することなく使用した。カラムクロマトグラフィーによる精製、分離には Wakogel C 300 (mesh 45 75 μm) を用いた。また薄層クロマトグラフィーには Merck silica gel 60 F254 pre coated plates を用いた。 ^1H NMR スペクトルは、JEOL JNM AL 400 spectrometer、Varian Gemini 300 spectrometer 又は Varian Gemini 200 spectrometer を使用した。重クロロホルム溶媒の場合はテトラメチルシラン (TMS, δ 0.00 ppm)、重メタノール溶媒の場合はメタノール (CD_3OD , δ 3.30 ppm)、重ジメチルスルホキシド溶媒の場合はジメチルスルホキシド ($\text{DMSO } d_6$, δ 2.49 ppm) またはテトラメチルシラン (TMS, δ 0.00 ppm) を内部標準として測定し ppm 単位で記載した。重量スペクトルは、Waters micromass ZQ、micromass Quattro II、又は、micromass Q Tof 2 を用いて electrospray ionization (ESI) または atmospheric pressure chemical ionization (APCI) で測定した。

General procedure for the synthesis of compound 2a-2f.

To a stirred solution of 1-methylsulfonyl-spiro[indoline-3,4'-piperidine] or 1-sulfamoyl-spiro[indoline-3,4'-piperidine] (1 mmol) in dichloromethane (5 mL), was added the appropriate isocyanate (1 mmol) at room temperature. The resulting Solution was stirred for four hours during which time precipitation occurred. The mixture was evaporated to remove dichloromethane, and then was suspended in methanol (20 mL), filtration followed by washing with cold methanol gave **2a-2f**.

1-Sulfamoyl-N-(3,4-dichlorophenyl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (2b)

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 8.84 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.47 (s, 2H), 7.31–7.25 (m, 4H), 7.18 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.98 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.13 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.02–2.94 (m, 2H), 1.79-1.74 (m, 2H), 1.65 (d, $J=13.2$ Hz, 2H); ESI-MS: 455 (M+1)

1-Sulfamoyl-N-(4-phenoxyphenyl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (2a)

ESI-MS: 479 (M+1)

1-Sulfamoyl-N-(2-chlorophenyl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (2c)

ESI-MS: 421 (M+1)

1-Methylsulfonyl-N-(3,4-dichlorophenyl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (2d)

ESI-MS: 454 (M+1)

1-Methylsulfonyl-N-(4-phenylphenyl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (2e)

ESI-MS: 462 (M+1)

1-Methylsulfonyl-N-(4-butylphenyl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (2f)

ESI-MS: 442(M+1)

Phenyl N-(5-phenyl-2-pyrazinyl)carbamate (3i)

Phenyl chloroformate (0.64 mL, 5.1 mmol) was added to a vigorously stirred solution of 2-amino-5-phenylpyrazine (**2i**, 794 mg, 4.64 mmol) in pyridine (10 mL) at room temperature. After being stirred at room temperature overnight, the mixture was diluted with EtOAc to give a suspension, in which the desired compound precipitated out. The suspension was successively washed with 1N KHSO₄, brine and dist. water. The precipitate was collected by filtration and dried to give phenyl N-(5-phenyl-2-

pyrazinyl)carbamate (**3i**, 847 mg, 63%). The filtrate was concentrated under reduced pressure to produce precipitate, which was collected and dried to give the second crop (340 mg, 25%).

General procedure for the synthesis of the phenyl carbamate 3a-3h and 3j-3n.

To the solution of the corresponding amine **2a-2h** and **2j-2n** (2.00 mmol) in pyridine (5.00 mL) was added phenyl chloroformate (274 μ L, 2.20 mmol) at room temperature. After stirring overnight, AcOEt and 10% aqueous citric acid were added and the mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, and filtered. The solvent was removed under reduced pressure to give crude phenyl carbamates **3a-3h** and **3j-3n**, which were used in the next reaction without further purification.

1-Methylsulfonyl-N-(5-phenyl-2-pyrazinyl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6i**)**

A mixture of phenyl N-(5-phenyl-2-pyrazinyl)carbamate (**3i**, 7.350 mg, 1.20 mmol), 1-methylsulfonylspiro[indoline-3,4'-piperidine] hydrochloride (**5**, 400 mg, 1.32 mmol) and Et₃N (0.5 mL, 3.6 mmol) in CHCl₃ (6 mL) was heated under reflux for 3 h. After cooling, the mixture was diluted with EtOAc, washed with 10% citric acid, sat. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure to start precipitation. The precipitate was collected by filtration and dried in vacuo to give **6i** (517 mg, 93%) as a white powder.: m.p.: 201-203°C; ¹HNMR(300 MHz;DMSO-d₆) δ : 9.67 (1H, brs), 9.13 (1H, d, J = 1.4 Hz), 8.90 (1H, d, J = 1.5 Hz), 8.08 (2H, dd, J = 8.3, 1.4 Hz), 7.53–7.39 (6H, m), 7.34 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.30–7.19 (2H, m), 7.05 (1H, td, J = 7.5, 1.5 Hz), 4.23 (2H, d, J = 14.8 Hz), 3.93 (2H, s), 3.09–3.00 (2H, m), 3.05 (3H, s), 1.84–1.67 (4H, m); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 464.1750 (C₂₄H₂₆N₅O₃S requires: 464.1756).

1-Methylsulfonyl-N-[4-(2-pyridyl)phenyl]spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6c).

To a solution of phenyl N-[4-(2-pyridyl)phenyl]carbamate (**3c**, 130 mg, 0.450 mmol) and 1-methylsulfonylspiro[indoline-3,4'-piperidine] hydrochloride (**5**, 136 mg, 0.490 mmol) in DMSO (2.00 mL) was added aqueous 10M NaOH (50.0 μ L, 0.500 mmol). After stirring vigorously for 2 h, H₂O was added and the mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (Hexane/EtOAc: 1/2) to give (123 mg, 70%) as a white solid. compound **6c** was treated with 4 N HCl in AcOEt to afford compound **6c** HCl salt: ¹H-NMR (300 MHz; CD₃OD) δ : 8.75 (1H, d, J = 5.4 Hz), 8.62 (1H, t, J = 7.7 Hz), 8.38 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.98–7.93 (1H, m), 7.92 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.78 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.39 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.22–7.29 (2H, m), 7.09 (1H, t, J = 7.7 Hz), 4.26 (2H, d, J = 13.2 Hz), 3.99 (2H, s), 3.18 (2H, t, J = 13.0 Hz), 2.99 (3H, s), 2.05–1.94 (2H, m), 1.83 (2H, d, J = 13.6 Hz); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 463.1806 (C₂₅H₂₇N₄O₃S requires: 463.1804).

1-Methylsulfonyl-N-[4-(3-pyridyl)phenyl]spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6d).

To the solution of N-[4-(2-pyridyl)phenyl]carbamate (**3d**, 2.94 g, 10.1 mmol) and 1-methylsulfonylspiro[indoline-3,4'-piperidine] hydrochloride (**5**, 3.37 g, 11.1 mmol) in 1,2-dichloroethane (6.00 mL) was added Et₃N (5.70 mL, 40.9 mmol). After reflux for 1.5 h, diluted aqueous NaOH was added and the mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and filtered. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was collected by filtration and washed with EtOH to give compound **6d** (2.86 g, 61%) as a yellow solid. Compound **6d** was treated with 4 N HCl in AcOEt to afford compound **6d** HCl salt: ¹H NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ : 8.86 (1H, d, J = 1.8 Hz), 8.51–8.49 (1H, m), 8.05–8.01 (1H, m), 7.64

(4H, s), 7.44 (1H, dd, J = 7.9, 4.4 Hz), 7.37–7.21 (3H, m), 7.05 (1H, td, J = 7.3, 1.4 Hz), 4.18 (2H, br d, J = 13.6 Hz), 3.93 (2H, s), 3.06 (3H, s), 3.06–2.97 (2H, m), 1.85–1.68 (4H, m); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 463.1795 (C₂₅H₂₇N₄O₃S requires: 463.1804).

Synthesis of the piperidine-1-carboxamide **6a**, **6b**, **6e-6h**, **6j-6n**, **12a-h**, **13a-o**, and **14a-l**.

Compounds **6a**, **6b**, **6e-6h**, **6j-6n**, **12a-h**, **13a-o**, and **14a-l** were prepared from the corresponding piperidine **5** and **11a-h** with the corresponding phenyl carbamate according to the procedure described in synthesis of compounds **6c**, **6d** or **6i**.

N-3-Biphenyl-1-methylsulfonylspiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6b)

m.p.: 211-212°C.

1-Methylsulfonyl-N-[4-(pyridin-4-yl)phenyl]spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6e).

1.65g (97%). Compound **6e** was treated with 4 N HCl in AcOEt to afford compound **6e** HCl salt: ¹H NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ: 8.78 (1H, s), 8.57 (2H, d, J = 5.3 Hz), 7.76–7.66 (6H, m), 7.35–7.02 (4H, m), 4.19 (2H, d, J = 13.5 Hz), 3.94 (2H, s), 3.07 (3H, s), 3.07–2.99 (2H, m), 1.89–1.73 (4H, m); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 463.1802 (C₂₅H₂₇N₄O₃S requires: 463.1804).

1-Methylsulfonyl-N-(5-phenylpyridin-2-yl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6f).

200 mg (84%). ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃) δ: 8.45 (1H, d, J = 1.8 Hz), 8.13 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.91 (1H, dd, J = 8.7, 2.5 Hz), 7.57 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.49–7.37 (4H, m), 7.30–7.23 (1H, m), 7.17 (1H, dd, J = 7.6, 1.0 Hz), 7.09 (1H, dd, J = 7.4, 1.0 Hz), 4.21 (2H, d, J

= 13.4 Hz), 3.90 (2H, s), 3.20–3.05 (2H, m), 2.94 (3H, s), 2.05–1.93 (2H, m), 1.82 (2H, d, J = 13.8 Hz); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 463.1794 (C₂₅H₂₇N₄O₃S requires: 463.1804).

1-Methylsulfonyl-N-(6-phenylpyridin-3-yl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6g).

180 mg (87%). ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃) δ: 8.52 (1H, d, J = 2.6 Hz), 8.15–8.10 (1H, m), 7.95 (2H, dd, J = 7.6 Hz), 7.71 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.50–7.38 (4H, m), 7.30–7.23 (1H, m), 7.18–7.17 (1H, m), 7.09 (1H, t, J = 7.5 Hz), 6.58 (1H, s), 4.20–4.10 (2H, d), 3.90 (2H, s), 3.20–3.05 (2H, m), 2.95 (3H, s), 2.05–1.93 (2H, m), 1.90–1.80 (2H, m); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 463.1813 (C₂₅H₂₇N₄O₃S requires: 463.1804).

1-Methylsulfonyl-N-(6-phenylpyridazin-3-yl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6h).

177 mg (76%). ¹H NMR (400 MHz; CDCl₃) δ: 8.37 (1H, brs), 8.00 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.85 (1H, d, J = 9.3 Hz), 7.54–7.45 (4H, m), 7.42 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.16 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.08 (1H, t, J = 7.6 Hz), 4.29 (2H, brs), 3.91 (2H, s), 3.17–3.07 (2H, m), 2.94 (3H, s), 1.99 (2H, td, J = 13.2, 4.4 Hz), 1.84 (2H, d, J = 13.2 Hz); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 464.1764 (C₂₄H₂₆N₅O₃S requires: 464.1756).

1-Methylsulfonyl-N-(2-phenylpyrimidin-5-yl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6j).

161 mg (54%). ¹H NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ: 9.02 (2H, s), 8.34–8.30 (2H, m), 7.53–7.45 (3H, m), 7.36 (1H, d, J = 7.2 Hz), 7.30–7.20 (2H, m), 7.05 (1H, td, J = 7.1, 1.4 Hz), 4.19 (2H, d, J = 14.8 Hz), 3.94 (2H, s), 3.12–3.01 (2H, m), 3.06 (3H, s), 1.98–1.70 (4H, m); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 464.1754 (C₂₄H₂₆N₅O₃S requires: 464.1756).

1-Methylsulfonyl-N-(5-phenylpyrimidin-2-yl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6k).

165 mg (80%). ¹H NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ: 9.68 (1H, brs), 8.88 (2H, s), 7.73 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.49 (2H, d, J = 7.4 Hz), 7.43–7.40 (6H, m), 7.38–7.20 (3H, m), 7.06 (1H, td, J = 7.5, 1.5 Hz), 4.11 (2H, d, J = 13.8 Hz), 3.92 (2H, s), 3.09–2.98 (2H, m), 3.05 (3H, s), 1.87–1.66 (4H, m); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 464.1745 (C₂₄H₂₆N₅O₃S requires: 464.1756).

1-Methylsulfonyl-N-(2-phenylpyrimidin-4-yl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6l).

134 mg (78%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.66 (1H, d, J = 5.9 Hz), 8.36 (2H, td, J = 5.2, 2.6 Hz), 7.92 (1H, d, J = 5.9 Hz), 7.50–7.41 (5H, m), 7.30–7.25 (1H, m), 7.18 (1H, dd, J = 7.8, 1.0 Hz), 7.09 (1H, td, J = 7.6, 1.0 Hz), 4.22 (2H, d, J = 13.7 Hz), 3.91 (2H, s), 3.14 (2H, td, J = 13.3, 2.3 Hz), 2.95 (3H, s), 1.98 (2H, td, J = 13.2, 4.2 Hz), 1.85 (2H, d, J = 13.7 Hz); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 464.1750 (C₂₄H₂₆N₅O₃S requires: 464.1756).

1-Methylsulfonyl-N-[3-(pyridin-4-yl)phenyl]spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6m).

315 mg (99%). Compound **2l** was treated with 4N HCl in AcOEt to afford **6m** HCl salt (240 mg, 75%): ¹H NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ: 8.97–8.92 (3H, m), 8.26–8.19 (3H, m), 7.76–7.72 (1H, m), 7.58–7.47 (2H, m), 7.34–7.21 (3H, m), 7.06 (1H, t, J = 7.2 Hz), 4.28–4.20 (2H, m), 3.95 (2H, s), 3.07 (3H, s), 3.10–2.99 (2H, m), 1.88–1.70 (4H, m); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 463.1811 (C₂₅H₂₇N₄O₃S requires: 463.1804).

1-Methylsulfonyl-N-(4-phenylpyrimidin-2-yl)spiro[indoline-3,4'-piperidine]-1'-carboxamide (6n).

167 mg (75%). ¹H NMR (300MHz; DMSO-d₆) δ: 9.53 (1H, s), 8.61 (1H, d, J = 5.2 Hz), 8.18–8.14 (2H, m), 7.59–7.52 (4H, m), 7.29–7.19 (3H, m), 7.07–7.01 (1H, m), 4.12 (1H, d, J=13.9Hz), 3.92 (2H, s), 3.09–3.00 (2H, m), 3.04 (3H, s), 1.88–1.77 (2H, m), 1.71–1.66 (2H, m); HRMS (ESI⁺) m/z [M+H]⁺ 464.1764 (C₂₄H₂₆N₅O₃S requires: 464.1756).

trans-1'-methylsulfonyl-N-(4-phenylphenyl)spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxamide (6q).

Step 1: Preparation of 4-methoxycarbonylcyclohexanecarboxylic acid.

A mixture of terephthalic acid monomethylester (**7**, 40.0 g, 0.222 mol) and 5% Rh-C (wet, 40 g) in 1,4-dioxane (200 mL) and MeOH (160 mL) was stirred under H₂ at 50 atm for 18 h. The catalyst was then filtered off and the filtrate was concentrated to give 41.0 g (99%) of the corresponding carboxylic acid.

Step 2: Preparation of methyl 4-(hydroxymethyl)cyclohexanecarboxylate.

To a stirred solution of 4-methoxycarbonylcyclohexanecarboxylic acid (41.0 g, 0.220 mol) in THF (200 mL) cooled at 0°C, was added Me₂S-BH₃ (27.4 mL, 0.289 mol). The solution was stirred at room temperature. After 3 h, AcOH (6 mL) was added. The resulting mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated to give 36.1 g (95%) of 4-(hydroxymethyl)cyclohexanecarboxylate.

Step 3: Preparation of methyl 4-formylcyclohexanecarboxylate (8).

To a stirred mixture of Celite (10 g) and methyl 4-(hydroxymethyl)cyclohexanecarboxylate (3.00 g, 17.4 mmol) in CH₂Cl₂ (60 mL), was added PCC (11.3 g, 52.3 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After 3 h, hexane (100 mL) was added. The resulting mixture was filtered and the filtrate was concentrated to give methyl 4-formylcyclohexanecarboxylate (**8**, 2.65 g, 90%).

Step 4: Preparation of methyl spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylate (9).

To a stirred solution of methyl 4-formylcyclohexanecarboxylate (**8**, 2.65 g; 15.6 mmol) in 35 mL of PhMe-MeCN (39:1) cooled at 0°C, were added phenylhydrazine (1.54 mL, 15.6 mmol) and TFA (3.61 mL, 46.8 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 16 h and MeOH (35 mL) was added. The mixture was cooled to 0°C and NaBH₄ (885 mg; 23.4 mmol) was added and the mixture was stirred at 0°C for 1 h. The reaction mixture was poured into sat. NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated to give the crude methyl spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylate (**9**, 3.60 g).

Step 5: Preparation of **methyl cis-1'-methylsulfonylspiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylate (10a)** and **methyl trans-1'-methylsulfonylspiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylate (10b)**

To a stirred solution of crude methyl spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylate (**9**, 3.65 g) in THF (50 mL) cooled at 0°C, were added Et₃N (6.52 mL, 46.8 mmol) and MsCl (2.41 mL, 31.2 mmol). The mixture was stirred at 0°C for 1 h then poured into 10% citric acid. The resulting mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with sat. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residual oil was purified by Silica gel column chromatography (100 g, hexane-EtOAc 3:1->2:1->4:3) to give methyl cis-1'-methylsulfonylspiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylate (**10a**) and methyl trans-1'-methylsulfonylspiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylate (**10b**).

Step 6: Preparation of **trans-1'-methylsulfonyl-N-(4-phenylphenyl)spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylic acid**.

To a stirred solution of methyl trans-1'-methylsulfonylspiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylate (1.18 g; 3.65 mmol) in MeOH (10 mL), was added 4N NaOH (3.7 mL; 14.8 mmol). The solution was stirred at room temperature for 3 h and the MeOH was concentrated. 1N HCl (15 mL) was added and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residual oil was purified

by silica gel column chromatography (60 g, CHCl₃-MeOH 1:0 200:1100:1) to give trans-1'-methylsulfonyl-N-(4-phenylphenyl)spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylic acid.

Step 7: Preparation of **trans-1'-methylsulfonyl-N-(4-phenylphenyl)spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxamide (6q)**.

To a stirred solution of trans-1'-methylsulfonylspiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylic acid (100 mg; 0.323 mmol) and 4-biphenylamine (55 mg; 0.323 mmol) in pyridine (1 mL), was added WSC-HCl (124 mg; 0.647 mmol). The solution was stirred at room temperature overnight. H₂O was added and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residual oil was purified by silica gel column chromatography (10 g, hexane-EtO Ac 3:1->2:1->1:1) to give trans-1'-methylsulfonyl-N-(4-phenylphenyl)spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxylic acid. m.p.: 119.8–120.5 °C.

cis-1'-methylsulfonyl-N-(4-phenylphenyl)spiro[cyclohexane-4,3'-indoline]-1-carboxamide (6p) and **1'-(2-(4-biphenyl)acetyl)-1-methylsulfonylspiro[indoline-3,4'-piperidine] (6o)** were prepared from the corresponding aime and the corresponding calboxylic acid according to the procedure described in synthesis of compounds **6q**.

3H,4'H-Spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-3,4'-dione (17b)

n-Butyllithium (1.5 M in hexane, 500 mL, 750 mmol) was added dropwise to a solution of N-methylpyridine-2-carboxamide (**15b**, 48.6 g, 357 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (1.5 L) below -50 °C under a nitrogen atmosphere. A solution of 1,4-cyclohexanedione mono-ethylene ketal (55.7 g, 357 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (0.25 L) was added to the solution at -50 °C to -10 °C. The mixture was poured into water (1 L), which was washed with hexane (1 L) and ether (0.5 L). The aqueous layer was adjusted to pH 3 with concd HCl, and the mixture was stirred for 1 h. The mixture was adjusted to pH 7 with K₂CO₃, and the produced solid was collected

by filtration. The solid was taken into a mixture of 2N HCl and acetone, and the mixture was refluxed for 15 h. After being cooled to room temperature, the mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated. The residue was crystallized (EtOAc/hexane) to yield 28.3 g (62%) of the desired compound. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.11–2.22 (m, 2H), 2.37–2.58 (m, 4H), 2.93–3.08 (m, 2H), 7.60 (dd, J = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.97 (d, J = 4.7 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 218 [M+H]⁺.

3H,4'H-Spiro[2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-3,4'-dione (17a)

Compound **17a** was prepared from the corresponding starting material **15a** in a manner similar to that described for **17b** as a yellow solid in 38% yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.08–2.21 (m, 2H), 2.34–2.58 (m, 4H), 2.92–3.07 (m, 2H), 7.40 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.72 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 7.1 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 217 [M+H]⁺.

3H,4'H-Spiro[7-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-3,4'-dione (17e)

Compound **17e** was prepared from the nitrile **15e** in a manner similar to that described for **17b** as a yellow solid in 39% yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.09–2.11 (m, 2H), 2.52–2.70 (m, 4H), 2.82–2.98 (m, 2H), 7.53 (dd, J = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.88 (d, J = 4.7 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 218 [M+H]⁺.

3H,4'H-Spiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-3,4'-dione (17c)

n-Butyllithium (1.6 M in hexane, 500 mL, 800 mmol) was added to a solution of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (81 mL, 480 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (1.6 L) at -40 °C under a nitrogen atmosphere, and nicotinic acid (**15c**, 39.4 g, 320 mmol) was added to the solution after 5 min. The mixture was stirred at the same temperature for

1 h. To the mixture was added dropwise a solution of 1,4-cyclohexanedione mono-ethylene ketal (50 g, 320 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (370 mL) at -40 °C. After being stirred at -40 °C for 30 min, the mixture was allowed to warm to room temperature and poured into water, which was extracted with diethyl ether. The aqueous layer was acidified (about pH 3) with 6N hydrochloric acid. The mixture was stirred at room temperature for 15 h to produce precipitate. The precipitate was collected by filtration, taken into satd sodium hydrogencarbonate, which was extracted with chloroform. The organic layer was dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo. The residual solid was washed with ethyl acetate/hexane = 1/1 to afford

28.45 g of crude 3H-dispiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane-4',2''-[1,3]dioxolan]-3-one as a pale brown solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.77–1.89 (m, 4H), 2.09–2.31 (m, 4H), 3.98–4.08 (m, 4H), 7.42 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.84 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 9.15 (s, 1H); MS (ESI) m/z = 296 [M+H]⁺.

2 N Hydrochloric acid (109 mL, 218 mmol) was added to a mixture of the ketal (28.45 g, 109 mmol) in acetone (31 mL). The mixture was stirred under reflux for 2 days, cooled to room temperature, neutralized with potassium carbonate, and extracted with chloroform. The organic layer was dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo. The residual solid was washed with ethyl acetate/hexane = 1/1 to afford 21.17 g of the title compound as pale brown solid in 30% yield. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 2.09–2.23 (m, 2H), 2.31–2.62 (m, 4H), 2.89–3.08 (m, 2H), 7.40 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.90 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 9.21 (s, 1H); MS (ESI) m/z = 218 [M+H]⁺.

7-Chloro-3H-dispiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane-4',2''-[1,3]dioxolane]-3-one (16)

n-Butyllithium (2.46 M in hexane, 427 mL, 1.05 mol) was added to a solution of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (177 mL, 1.05 mol) in anhydrous tetrahydrofuran (1.25 L) at -50 to -45 °C under a nitrogen atmosphere, and 2-chloroisonicotinic acid (**15f**, 78.8 g, 0.500 mol) was added to the mixture after 20 min. The mixture was stirred at the same

temperature for 3.5 h. To the mixture was added dropwise a solution of 1,4-cyclohexanedione mono-ethylene ketal (78.1 g, 0.500 mol) in anhydrous tetrahydrofuran (0.25 L) at -55 to -50 °C. After being stirred at -50 °C for 10 min, the mixture was allowed to warm to -30 °C, and 2N hydrochloric acid (525 mL, 1.05 mol) was added dropwise. The mixture was stirred for additional 30 min at 15 °C, poured into water (0.50 L), which was extracted with ethyl acetate (0.75 L, twice). The combined organic layers were washed with 1 N hydrochloric acid (1.2 L), saturated aqueous NaHCO₃ (1.0 L) and brine (0.50 L) successively, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo. The residual solid was stirred in ethanol/hexane = 1/3 (0.4 L) at room temperature overnight. The solid was collected by filtration and washed with ethanol/hexane = 1/3 (0.4 L) to afford 72.4 g (49%) of the title compound as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.64–1.72 (m, 2H), 1.81–1.89 (m, 2H), 2.14 (dt, J = 13.5, 4.5 Hz, 2H), 2.86 (dt, J = 13.5, 4.5 Hz, 2H), 4.03 (s, 4H), 7.73 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.62 (d, J = 4.9 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 296 [M+H]⁺.

3H,4'H-Spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-3,4'-dione (17d)

To a solution of 7-Chloro-3H-dispiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane-4',2''-[1,3]dioxolane]-3-one (**16**, 72.4 g, 245 mmol) and triethylamine (51 mL, 367 mmol) in tetrahydrofuran (0.5 L) was added 10% palladium on activated carbon (7.2 g, type M, water 50%, Pd 10%, dry weight basis) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred for 5.5 h under a hydrogen atmosphere at room temperature, diluted with ethyl acetate (0.5 L) and filtered through a celite pad to remove the catalyst and triethylammonium chloride. The filtrate was concentrated in vacuo to afford 64.0 g (100%) of **3H-dispiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane-4',2''-[1,3]dioxolane]-3-one** as a pale yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.80–1.89 (m, 4H), 2.14 (dt, J = 14.0, 4.0 Hz, 2H), 2.34 (dt, J = 14.0, 4.0 Hz, 2H), 4.00–4.06 (m, 4H), 7.76 (dd, J = 4.9, 1.3 Hz, 1H), 8.85 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.89 (d, J = 1.3 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 262 [M+H]⁺.

A solution of 3H-dispiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane-4',2''-[1,3]dioxolane]-3-one (64.0 g, 245 mmol) and p-toluenesulfonic acid monohydrate (9.3 g, 49.0 mmol) in acetone (0.70 L) and water (0.70 L) was heated overnight at 70 °C, and then acetone was removed in vacuo. The residual aqueous solution was neutralized by addition of NaHCO₃ (4.2 g, 50 mmol) and extracted with ethyl acetate (0.60 L + 0.30 L x 2). The combined organic layers were washed with brine (0.30 L) dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo to afford 48.3 g (91%) of the title compound as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.14–2.24 (m, 2H), 2.49 (dt, J = 14.0, 5.0 Hz, 2H), 2.51–2.60 (m, 2H), 2.95 (dt, J = 14.0, 5.0 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.91 (d, J = 5.0 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 218 [M+H]⁺.

cis-40-Hydroxy-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexan]-3-one (18d)

Sodium borohydride (6.73 g, 178 mmol) was added slowly to a suspension of 3H,4'H-Spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexan]-3,4'-dione (10d, 48.3 g, 222 mmol) in anhydrous ethanol (0.4 L) below -10 °C. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0 °C, and then saturated aqueous ammonium chloride (400 mL) was added slowly to the mixture at 0 °C. The mixture was diluted with water and extracted with chloroform (0.80 L + 0.40 L x 2). The combined organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo. The residual solid was stirred in ethanol/hexane = 1/2 (0.30 L) overnight at room temperature. The solid was collected by filtration and washed with ethanol/hexane = 1/2 (0.3 L) to afford 37.5 g (77%) of the title compound as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.56 (dq, J = 13.5, 3.6 Hz, 2H), 1.70–1.82 (m, 2H), 1.84–1.94 (m, 2H), 2.15 (dt, J = 13.5, 4.0 Hz, 2H), 3.66 (tt, J = 10.7, 4.3 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 5.0, 1.3 Hz, 1H), 8.84 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 9.10 (d, J = 1.3 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 220 [M+H]⁺.

cis-4'-Hydroxy-3H-spiro[2-benzofuran-1,1'-cyclohexan]-3-one (18a)

Compound **18a** was prepared from **17a** in a manner similar to that described for **18d** as a white solid in 76% yield. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.59 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 1.78–2.11 (m, 8H), 3.77–3.89 (m, 1H), 7.37 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.67 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.1 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 219 [M+H]⁺.

cis-4'-Hydroxy-3H-spiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexan]-3-one (18c)

Lithium tri-*tert*-butoxyaluminumhydride (1.0 M in tetrahydrofuran, 117 mL, 117 mmol) was added dropwise to a suspension of 3H,4'H-Spiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-3,4'-dione (**17c**, 21.17 g, 97.4 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (500 mL) at 0 °C under a nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at 0 °C for 30 min and quenched with 2N hydrochloric acid. Tetrahydrofuran was evaporated in vacuo. The residue was adjusted to pH 3 with potassium carbonate and extracted with chloroform. The organic layer was dried over magnesium sulfate. The solvent was evaporated to give 20.20 g (94%) of the title compound as a pale brown solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.80–2.15 (m, 8H), 3.80–3.90 (m, 1H), 7.38 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.86 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 9.15 (s, 1H); MS (ESI) m/z = 220 [M+H]⁺.

cis-4'-Hydroxy-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexan]-3-one (18b)

Compound **18b** was prepared from ketone **17b** in a manner similar to that described for **18c** as a yellow solid in 87% yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.81–2.11 (m, 8H), 3.78–3.90 (m, 1H), 7.55 (dd, J = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.90 (d, J = 4.8 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 220 [M+H]⁺.

cis-4'-Hydroxy-3H-spiro[7-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexan]-3-one (18e)

Compound **18e** was prepared from ketone **17e** in a manner similar to that described for **11c** as a yellow solid in 98% yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.55–1.62 (m, 2H),

1.80–1.98 (m, 3H), 2.09–2.31 (m, 3H), 3.81–3.96 (m, 1H), 7.49 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.90 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H); MS (ESI) $m/z = 220$ [M+H]⁺.

trans-3-Oxo-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carbonitrile (19d)

Methanesulfonyl chloride (16.1 mL, 207 mmol) was added dropwise to a solution of cis-4'-hydroxy-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexan]-3-one (18d, 37.5 g, 171 mmol) and triethylamine (34.1 mL, 244 mmol) in anhydrous dimethylformamide (0.40 L) below 4 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 10 min, diluted with ethyl acetate (0.80 L) and washed with water (0.80 L). The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (0.40 L + 0.40 L). The combined organic layers were washed with water (0.40 L), saturated aqueous NaHCO₃ (0.40 L) and brine (0.30 L) successively, dried over magnesium sulfate and silica gel (40 g, Wakogel C-300, WAKO), filtered and concentrated in vacuo to afford 41.3 g (81%) of cis-3-oxo-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexan]-4'-yl methanesulfonate as a pale brown solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.92–2.00 (m, 2H), 2.11 (dt, $J = 12.0, 4.3$ Hz, 2H), 2.15–2.32 (m, 4H), 3.07 (s, 3H), 4.89 (tt, $J = 10.0, 5.0$ Hz, 1H), 7.77 (dd, $J = 5.0, 1.0$ Hz, 1H), 8.84 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 8.87 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H); MS (ESI) $m/z = 298$ [M+H]⁺.

Tetraethylammonium cyanide (28.2 g, 180 mmol) was added to a solution of the methanesulfonate (41.3 g, 139 mmol) in anhydrous dioxane (0.30 L). The mixture was heated at 100 °C for 3 h, and then ca. 150 mL of dioxane was removed in vacuo. The mixture was diluted with ethyl acetate (0.60 L) and washed with water (0.60 mL). The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (0.30 L x 2). The combined organic layers were washed with water (0.50 L) and brine (0.30 L) successively, dried over magnesium sulfate, filtered through a short pad of silica gel column (40 g, Wakogel C-300, WAKO) and concentrated in vacuo. The residual solid was stirred in methanol (80 mL) overnight at room temperature. The solid was collected by filtration and washed with methanol (80 mL) to afford 18.6 g (59%) of the title compound as a pale yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.80–1.88 (m, 2H), 2.08–2.19 (m, 2H), 2.20 (tt, $J =$

13.5, 3.5 Hz, 2H), 2.37 (dt, J = 13.5, 4.5 Hz, 2H), 3.15–3.21 (m, 1H), 7.78 (dd, J = 5.0, 1.2 Hz, 1H), 8.90 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.95 (d, J = 1.2 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 229 [M+H]⁺.

trans-3-Oxo-3H-spiro[2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carbonitrile (19a)

Compound **19a** was prepared from the corresponding alcohol **18a** in a manner similar to that described for **19d** as a white solid in 79% yield.

trans-3-Oxo-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carbonitrile (19b)

Compound **19b** was prepared from the corresponding alcohol **18b** in a manner similar to that described for **19d** as a white solid in 45% yield.

trans-3-Oxo-3H-spiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carbonitrile (19c)

Compound **19c** was prepared from the corresponding alcohol **18c** in a manner similar to that described for **19d** as a white solid in 58% yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.78–1.86 (m, 2H), 2.06–2.36 (m, 6H), 3.15–3.21 (m, 1H), 7.49 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.91 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 9.185 (s, 1H); MS (ESI) m/z = 229 [M+H]⁺.

trans-3-Oxo-3H-spiro[7-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carbonitrile (19e)

Compound **19e** was prepared from the corresponding alcohol **18e** in a manner similar to that described for **19d** as a white solid in 33% yield.

trans-3-Oxo-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxylic acid (20d)

A solution of *trans*-3-oxo-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carbonitrile (**19d**, 18.5 g, 81.1 mmol) in 47% sulfuric acid (90 mL, 548 mmol) and water (30 mL) was heated at 100 °C for 48 h. After cooling to room temperature, the mixture was adjusted to pH 4 with 5N sodium hydroxide to produce precipitate. The precipitate was collected by filtration and washed with water to afford 18.4 g (92%) of the title compound as an off-white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.76–1.85 (m, 2H), 1.90–2.11 (m, 6H), 2.68–2.74 (m, 1H), 7.84 (dd, J = 5.0, 1.0 Hz, 1H), 8.87 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 9.06 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 12.35 (brs, 1 H); MS (ESI) m/z = 248 [M+H]⁺.

***trans*-3-Oxo-3H-spiro[2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxylic acid (20a)**

Compound **20a** was prepared from the corresponding carbonitrile **19a** in a manner similar to that described for **20d** as a white solid in 92% yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.68–1.87 (m, 2H), 2.03–2.37 (m, 6H), 3.13–3.20 (m, 1H), 7.49 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.73 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 7.1 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 247 [M+H]⁺.

***trans*-3-Oxo-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxylic acid (20b)**

Compound **20b** was prepared from the corresponding carbonitrile **19b** in a manner similar to that described for **20d** as a white solid in 90% yield. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.64–1.82 (m, 2H), 1.90–2.06 (m, 6H), 2.64–2.74 (m, 1H), 7.72 (dd, J = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.85 (d, J = 4.7 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 248 [M+H]⁺.

***trans*-3-Oxo-3H-spiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxylic acid (20c)**

Compound **20c** was prepared from the corresponding carbonitrile **19c** in a manner similar to that described for **20d** as a white solid in 92% yield. ¹H NMR (300 MHz,

DMSO-d₆) δ : 1.67–1.81 (m, 2H), 1.86–2.10 (m, 6H), 2.68–2.75 (m, 1H), 7.77 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.86 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 9.06 (s, 1H); MS (ESI) m/z = 248 [M+H]⁺.

trans-3-Oxo-3H-spiro[7-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxylic acid (20e)

Compound **20e** was prepared from the corresponding carbonitrile **19e** in a manner similar to that described for **20d** as a white solid in 90% yield. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.73–1.85 (m, 2H), 1.85–1.99 (m, 2H), 1.99–2.13 (m, 2H), 2.14–2.27 (m, 2H), 2.64–2.73 (m, 1H), 7.65 (dd, J = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.90 (d, J = 4.8 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 248 [M+H]⁺.

trans-N-[1-(2-Fluorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-3-oxo-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24j)

1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (14.0 g, 0.073 mol) was added to a mixture of trans-3-oxo-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxylic acid (**20d**, 15.9 g, 0.064 mol) and 3-amine-1-(2-fluorophenyl)-1H-pyrazole (12.0 g, 0.068 mol) in pyridine (100 mL), and the mixture was stirred overnight. The reaction mixture was poured into a mixture of H₂O (1 L) and EtOAc (250 mL), and the mixture was stirred for 30 min. Precipitate was collected by filtration to yield 17.45 g (67%) of the title compound as a white solid. The filtrate was separated, and the organic layer was washed with 10% citric acid (300 mL + 200 mL), satd NaHCO₃ (200 mL) and brine (200 mL), dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/hexane), and crystallized from EtOAc to yield 4.34 g (17%) of the title compound as a white solid. Mp: 238–239 °C (EtOAc); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.8–2.2 (m, 8H), 2.7–2.9 (m, 1H), 6.91 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.3–7.5 (m, 3H), 7.7–7.8 (m, 1H), 7.87 (dd, J = 4.9, 1.1 Hz, 1H), 8.11 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 8.89 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 9.13 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 10.82 (brs, 1H); HRMS

(ESI) $m/z = 407.1517$ [M+H]⁺ (C₂₂H₁₉N₄O₃ requires: 407.1519). Elemental Anal. Calcd: C, 65.02; H, 4.71; N, 13.79. Found: C, 64.88; H, 4.59; N, 13.70.

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrazin-2-yl)-3H-spiro[2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (21)

Compound **21** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 73% yield. Mp: 223–225 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.75–2.30 (m, 8H), 2.93–2.95 (m, 1H), 7.30–7.90 (m, 9H), 8.20–8.60 (m, 3H), 9.05 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 9.46 (d, *J* = 1.2, 1H), 10.93 (s, 1H); HRMS (ESI) $m/z = 400.1655$ [M+H]⁺ (C₂₄H₂₁N₃O₃ requires: 400.1661).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrazin-2-yl)-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (22a)

Compound **22a** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 58% yield. Mp: 237–239 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.84–1.92 (m, 2H), 2.12–2.20 (m, 6H), 2.93–2.97 (m, 1H), 7.45–7.55 (m, 3H), 7.76 (dd, *J* = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 2H), 8.25 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 8.89 (dd, *J* = 4.6, 1.3 Hz, 1H), 9.01 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 9.46 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 10.94 (s, 1H); HRMS (ESI) $m/z = 401.1607$ [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrimidin-2-yl)-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (22b)

Compound **22b** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 35% yield. Mp: 237–239 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.82–1.89 (m, 2H), 1.97–2.06 (m, 4H), 2.12–2.19 (m, 2H),

2.99–3.04 (m, 1H), 7.43–7.54 (m, 3H), 7.73–7.80 (m, 3H), 8.21 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 8.88 (dd, J = 4.7, 1.2 Hz, 1H), 9.00 (s, 2H), 10.77 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1610 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylisoxazol-3-yl)-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (22c)

Compound **22c** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 84% yield. Mp: 260–262 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.87–2.00 (m, 2H), 2.19–2.50 (m, 6H), 2.96–3.08 (m, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.48–7.64 (m, 4H), 7.78–7.88 (m, 2H), 8.01 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.91 (dd, J = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 10.00 (brs, 1H); HRMS (ESI) m/z = 390.1460 [M+H]⁺ (C₂₂H₁₉N₃O₄ requires: 390.1454).

trans-3-Oxo-N-(3-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (22d)

Compound **22d** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white amorphous solid in 24% yield. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.83–1.90 (m, 2H), 1.97–2.02 (m, 4H), 2.10–2.17 (m, 2H), 2.78–2.79 (m, 1H), 6.97 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.33–7.37 (m, 1H), 7.42–7.48 (m, 2H), 8.22 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.87–8.90 (m, 1H), 10.50 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1610 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(1-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (22e)

Compound **22e** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 71% yield. Mp: 204–206 °C; ¹H

NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.8–2.2 (m, 8H), 2.75–2.85 (m, 1H), 6.86 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.2–7.3 (m, 1H), 7.4–7.55 (m, 2H), 7.7–7.8 (m, 3H), 8.23 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.41 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.85–8.9 (m, 1H), 10.78 (brs, 1H); HRMS (ESI) m/z = 389.1609 [M+H]⁺ (C₂₂H₂₀N₄O₃ requires: 389.1614).

trans-3-Oxo-N-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-3H-spiro[4-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (22f)

Compound **22f** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 63% yield. Mp: 225–227 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.8–2.2 (m, 8H), 2.7–2.8 (m, 1H), 7.25–7.3 (m, 1H), 7.4–7.55 (m, 2H), 7.7–7.8 (m, 3H), 8.21 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.88 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 10.22 (brs, 1H); HRMS (ESI) m/z = 389.1611 [M+H]⁺ (C₂₂H₂₀N₄O₃ requires: 389.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrazin-2-yl)-3H-spiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (23a)

Compound **23a** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a pale yellow solid in 43% yield. Mp: 269–271 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.80–1.96 (m, 2H), 1.98–2.22 (m, 6H), 2.95 (m, 1H), 7.40–7.56 (m, 3H), 7.82 (dd, J = 5.2, 1.0 Hz, 1H), 8.06–8.13 (m, 2H), 8.91 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 9.00 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 9.09 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 9.46 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 10.93 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1609 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrimidin-2-yl)-3H-spiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (23b)

Compound **23b** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 20% yield. Mp: 219–221 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.80–1.92 (m, 2H), 1.93–2.22 (m, 6H), 3.02 (m, 1H), 7.40–7.56 (m, 3H), 7.72–7.81 (m, 3H), 8.90 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 9.00 (s, 2H), 9.08 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 10.77 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1607 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(3-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)-3H-spiro[5-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (23c)

Compound **23c** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white amorphous solid in 24% yield. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.80–2.20 (m, 8H), 2.79 (m, 1H), 6.97 (brs, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.40–7.50 (m, 2H), 7.72 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.78 (dd, J = 5.2, 1.0 Hz, 1H), 8.91 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 9.09 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 10.49 (brs, 1H), 12.82 (brs, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1608 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrazin-2-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24a)

Compound **24a** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 44% yield. Mp: 239–241 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.88–1.94 (m, 2H), 2.25–2.45 (m, 6H), 2.84–2.88 (m, 1H), 7.46–7.54 (m, 3H), 7.78 (dd, J = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.99–8.01 (m, 3H), 8.70 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.89 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 9.05 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 9.63 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1621 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrimidin-2-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24b)

Compound 24b was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 13% yield. Mp: 193–195 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.81–1.90 (m, 2H), 2.04–2.30 (m, 4H), 2.47–2.58 (m, 2H), 3.22 (m, 1H), 7.45–7.58 (m, 5H), 7.77 (dd, J = 5.0, 1.3 Hz, 1H), 8.18 (brs, 1H), 8.85 (s, 2H), 8.87 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 9.03 (d, J = 1.3 Hz, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1615 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylisoxazol-3-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24c)

Compound 24c was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 76% yield. Mp: 262–264 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.89–1.99 (m, 2H), 2.23–2.49 (m, 6H), 2.95–3.03 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.50–7.58 (m, 3H), 7.78–7.88 (m, 3H), 8.88 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 9.04 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 9.86 (brs, 1H); HRMS (ESI) m/z = 390.1456 [M+H]⁺ (C₂₂H₁₉N₃O₄ requires: 390.1454).

trans-3-Oxo-N-(3-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24d)

Compound **24d** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 33% yield. Mp: 196–198 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.87–2.26 (m, 8H), 2.72–2.79 (m, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.34–7.36 (m, 1H), 7.42–7.48 (m, 2H), 7.71–7.73 (m, 2H), 7.87 (dd, J = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 8.89 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 9.12 (s, 1H), 10.50 (brs, 1H), 12.82 (brs, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1609 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyridin-2-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24e)

Compound **24e** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 54% yield. Mp: 238–239 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.80–1.98 (m, 2H), 2.14–2.51 (m, 6H), 2.73–2.88 (m, 1H), 7.41 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 7.5, 6.9 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.77 (dd, J = 5.1, 0.9 Hz, 1H), 7.97 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 8.15 (brs, 1H), 8.33 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.88 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 9.04 (d, J = 0.9 Hz, 1H); HRMS (ESI) m/z = 400.1664 [M+H]⁺ (C₂₄H₂₁N₃O₃ requires: 400.1661).

trans-3-Oxo-N-(2-phenyl-1,3-thiazol-4-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24f)

Compound **24f** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a pale yellow solid in 65% yield. Mp: 288–289 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.82–2.23 (m, 8H), 2.80–2.91 (m, 1H), 7.44–7.56 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.83–7.97 (m, 3H), 8.88 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 9.12 (s, 1H), 11.2 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 406.1232 [M+H]⁺ (C₂₂H₁₉N₃O₃S requires: 406.1225).

trans-3-Oxo-N-(1-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24g)

Compound **24g** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 86% yield. Mp: 249–250 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.85–2.2 (m, 8H), 2.75–2.85 (m, 1H), 6.86 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.2–7.3 (m, 1H), 7.4–7.55 (m, 2H), 7.7–7.8 (m, 2H), 7.87 (dd, J = 4.9, 1.0 Hz, 1H),

8.42 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.89 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 9.13 (s, 1H), 10.79 (brs, 1H); HRMS (ESI) $m/z = 389.1612$ [M+H]⁺ (C₂₂H₂₀N₄O₃ requires: 389.1614).

trans-3-Oxo-N-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24h)

Compound **24h** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white amorphous solid in 98% yield. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.85–2.2 (m, 8H), 2.8–2.9 (m, 1H), 7.28 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.45–7.50 (m, 2H), 7.75–7.85 (m, 3H), 7.87 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.89 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 9.11 (s, 1H), 10.23 (s, 1H); HRMS (ESI) $m/z = 389.1606$ [M+H]⁺ (C₂₂H₂₀N₄O₃ requires: 389.1614).

trans-3-Oxo-N-(2-phenyl-2H-1,2,3-triazol-4-yl)-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24i)

Compound **24i** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 89% yield. Mp: 231–232 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.80–1.90 (m, 2H), 2.15–2.50 (m, 6H), 2.80–2.90 (m, 1H), 7.30–7.40 (m, 1H), 7.45–7.55 (m, 2H), 7.78 (dd, $J = 1.2$ Hz, 4.9 Hz, 1H), 7.95–8.00 (m, 2H), 8.07 (brs, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.88 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 9.03 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H); HRMS (ESI) $m/z = 390.1554$ [M+H]⁺ (C₂₁H₁₉N₅O₃ requires: 390.1566).

trans-N-[1-(4-Fluorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-3-oxo-3H-spiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24k)

Compound **24k** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 60% yield. Mp: 257–259 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.80–2.25 (m, 8H), 2.70–2.90 (m, 1H), 6.86 (d, $J = 2.5$ Hz,

1H), 7.33 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 7.71–7.83 (m, 2H), 7.88 (dd, J = 10.5, 4.9 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.88 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 9.13 (s, 1H), 10.8 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 407.1516 [M+H]⁺ (C₂₂H₁₉FN₄O₃ requires: 407.1519).

trans-N-[1-(3-Fluorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-3-oxo-3Hspiro[6-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (24l)

Compound **24l** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 75% yield. Mp: 247–249 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.78–2.25 (m, 8H), 2.70–2.90 (m, 1H), 6.90 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.03–7.18 (m, 1H), 7.43–7.59 (m, 1H), 7.59–7.70 (m, 2H), 7.87 (dd, J = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.83 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 9.13 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 10.81 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 407.1514 [M+H]⁺ (C₂₂H₁₉FN₄O₃ requires: 407.1519).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrazin-2-yl)-3H-spiro[7-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (25a)

Compound **25a** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a pale yellow solid in 7% yield. Mp: 246–248 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.93–2.01 (m, 2H), 2.20–2.37 (m, 4H), 2.47–2.58 (m, 2H), 2.76–2.80 (m, 1H), 7.45–7.54 (m, 4H), 7.98–8.05 (m, 3H), 8.19 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 8.68 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.88 (dd, J = 4.9, 1.6 Hz, 1H), 9.66 (d, J = 1.5 Hz, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1614 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylpyrimidin-2-yl)-3H-spiro[7-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (25b)

Compound **25b** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 45% yield. Mp: 201–203 °C; ¹H

NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.80–2.01 (m, 4H), 2.10–2.22 (m, 2H), 2.23–2.37 (m, 2H), 2.96 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.47–7.55 (m, 2H), 7.65 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H), 7.75–7.80 (m, 2H), 8.29 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 8.92 (dd, J = 4.9, 1.6 Hz, 1H), 9.00 (s, 2H), 10.71 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1607 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

trans-3-Oxo-N-(5-phenylisoxazol-3-yl)-3H-spiro[7-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (25c)

Compound **25c** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a white solid in 86% yield. Mp: 253–255 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.90–2.02 (m, 2H), 2.20–2.44 (m, 4H), 2.46–2.60 (m, 2H), 2.86–2.96 (m, 1H), 7.40–7.59 (m, 5H), 7.78–7.83 (m, 2H), 8.19 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 8.87 (dd, J = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 9.60–9.70 (m, 1H); HRMS (ESI) m/z = 390.1458 [M+H]⁺ (C₂₂H₁₉N₃O₄ requires: 390.1454).

trans-3-Oxo-N-(3-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)-3H-spiro[7-aza-2-benzofuran-1,1'-cyclohexane]-4'-carboxamide (25d)

Compound **25d** was prepared from the corresponding acid and amine in a manner similar to that described for **24j** as a pale white solid in 2.7% yield. Mp: 245–247 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.18–1.96 (m, 4H), 2.15–2.34 (m, 4H), 2.71–2.75 (m, 1H), 6.89 (s, 1H), 7.30–7.35 (m, 1H), 7.41–7.46 (m, 2H), 7.64 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H), 7.72–7.74 (m, 2H), 8.29 (dd, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 8.91 (dd, J = 4.9, 1.5 Hz, 1H); HRMS (ESI) m/z = 401.1609 [M+H]⁺ (C₂₃H₂₀N₄O₃ requires: 401.1614).

第二章 MCH1 受容体拮抗薬の開発

第一節 強力かつ選択的な MCH1R 拮抗薬としてのフェニルピリドン誘導体の開発

これまでに様々な構造群の強力な低分子 MCH1R 拮抗薬が多くの文献や特許で報告されている。¹¹⁹⁻¹²⁴ 武田薬品工業により最初に報告された強力な MCH1R 拮抗薬 T-226296 (1) は、ラット MCH 誘発摂食作用を 30 mg/kg で抑制した (Figure 1)。¹²⁵ GSK はビフェニルカルボキサミド類縁体 2 が良好な MCH1R 結合親和性とラットで中程度の脳内移行性 (脳血液比: 1) を示すことを見出した。¹²⁶ アボットは、インダゾール 3 が *in vitro* および *in vivo* で顕著な効力を示すことを見出した。¹²⁷ 万有製薬でも社内化合物のハイスループットスクリーニングで得られたヒット化合物の誘導化から複数の MCH1R 拮抗薬を見出してきた。⁷³⁻⁷⁵

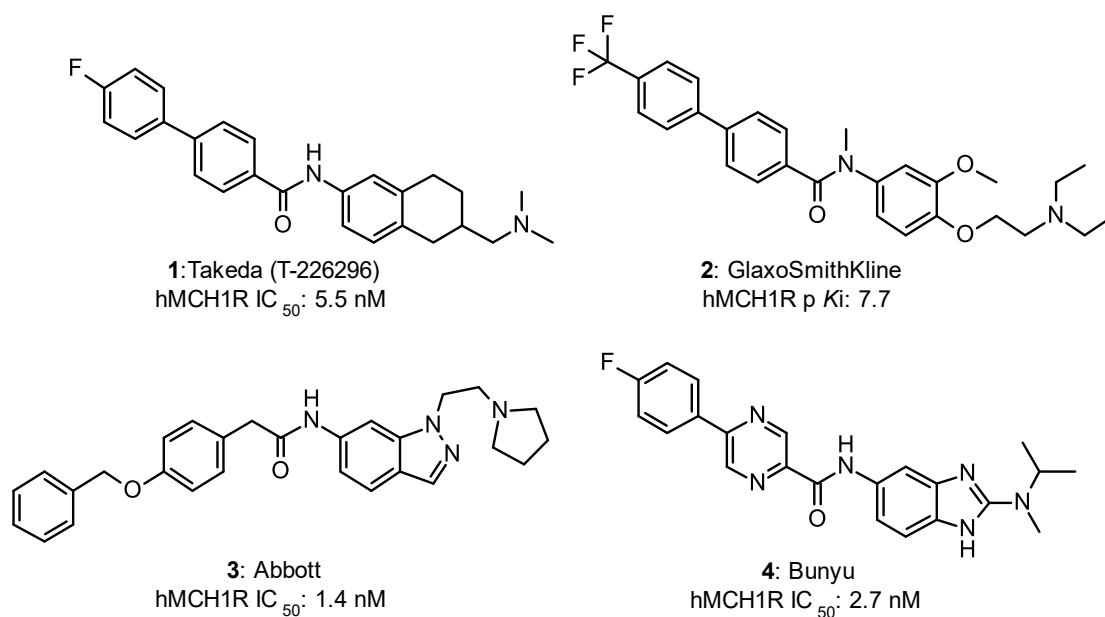


Figure 1. Structure of MCH1R antagonists.

これら MCH1R に対して強力な結合活性を持つ化合物には、次のように 3 つの共通するファーマコフォアに分解可能である: 末端疎水性アリール基 (A)、N 上にアリール基が置換したカルボキサミドコア (B) 及びリンカーに結合した塩基性アミン置換基 (C)。

報告されている低分子 MCH1R 拮抗薬はいずれも MCH1R への拮抗作用に加え hERG への非常に高い親和性を有しているが、これは、高い脂溶性と強い塩基性を有することに起因していると考えられる。また同時に、代謝安定性や選択制へも好ましくない影響を与えていると考えられる。これらを同時に解決するためには、構造的に異なる新たな MCH1R 拮抗作用を持つリード分子が必要であると考え、**Figure 2** に示すように、中央のカルボキサミド部分をピリドンに置き換える事を試みた。その結果、新規構造を有した選択的 MCH1R 拮抗薬の創出に至ることができた。この報告では、新たに見出された強力かつ選択的な MCH1R アンタゴニストである *N*-フェニルピリドン誘導体のデザイン、合成、構造活性相関 (SAR) 及び、抗肥満活性について報告する。

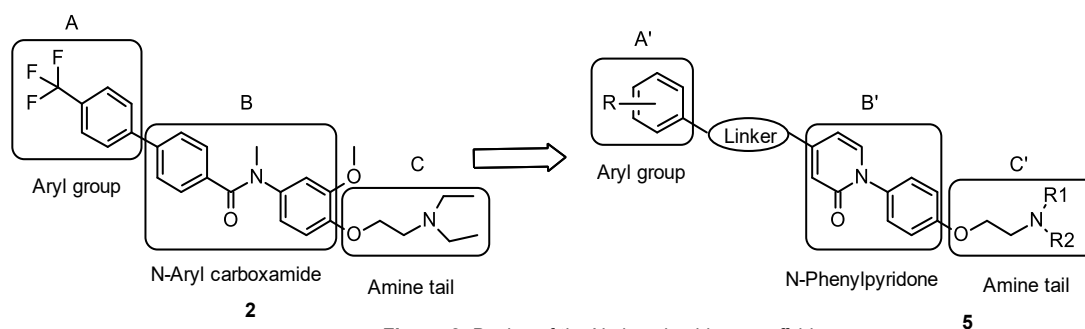
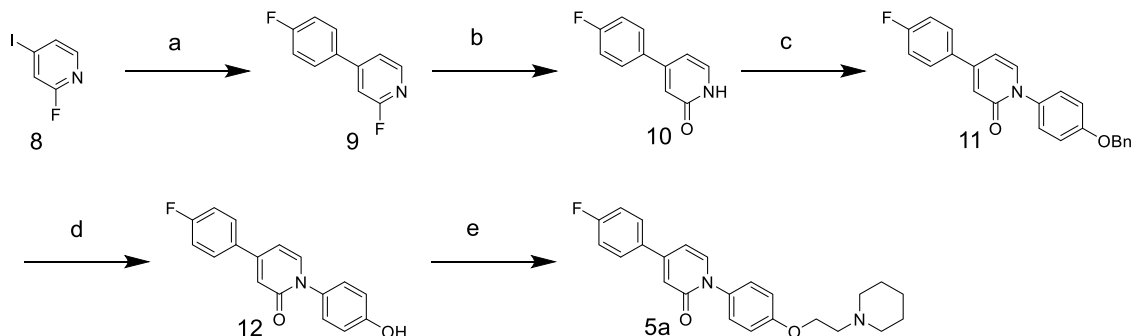


Figure 2. Design of the *N*-phenylpyridone scaffold.

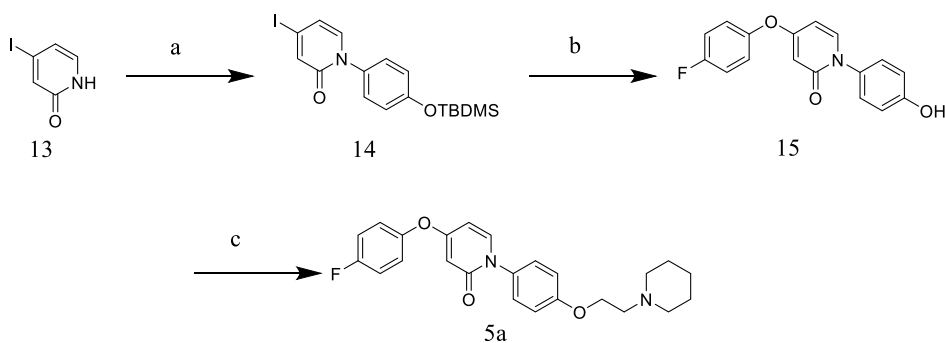
Scheme 1-5 に今回の仮説に基づきデザインした *N*-フェニルピリドン誘導体の合成を示す。リンカーがない化合物、すなわち、末端アリール基とピリドンコアが直接つながった化合物 **5a** は、市販の 2-フルオロ-4-ヨードピリジン (**8**) から合成した。化合物 **8** と 4-フルオロフェニルボロン酸との鈴木カップリング反応により化合物 **9** とし、続いて酸性下で加水分解してピリドン誘導体 **10** を得た。化合物 **10** はウルマンカップリング条件下、1-ベンジルオキシ-4-ブロモベンゼンと反応させ、*N*-フェニルピリドン誘導体 **11** を得た。酸性条件下、ベンジル基を脱保護しフェノール誘導体 **12** とし、その後、2-(ピペリジン-1-イル) エタノールとの光延反応により、化合物 **5a** を高収率で得た (**Scheme 1**)。

Scheme 2 には末端アリール基とピリドンコアが 1 原子介してつながった化合物 **5b** の合成法を示す。酢酸銅 (II) 存在下、4-ヨード-2-ピリドン (**13**) と 4-(*tert*-ブチルジメチルシリルオキシ) フェニルボロン酸のカップリング反応により *N*-フェニルピリドン誘導体 **14** を得た。ウルマンカップリング条件下、化合物 **14** と 4-フルオロフェノールとをカップリングさせ、その後の処理で脱保護されたフェノール誘導体 **15** を中程度の収量で得、得

られたフェノール誘導体 **15** を 2-(ピペリジン-1-イル) エタノールと光延条件下反応させることで化合物 **5b** を得た。



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) 4-Fluorophenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, 2M Na₂CO₃, dimethoxyethane; (b) aq. HCl; (c) 1-benzyloxy-4-bromobenzene, CuI, K₂CO₃, DMF, 150 °C; (d) concd HCl, water, MeOH, reflux; (e) diethyl azodicarboxylate, PPh₃, 2-(piperidin-1-yl)ethanol, THF.

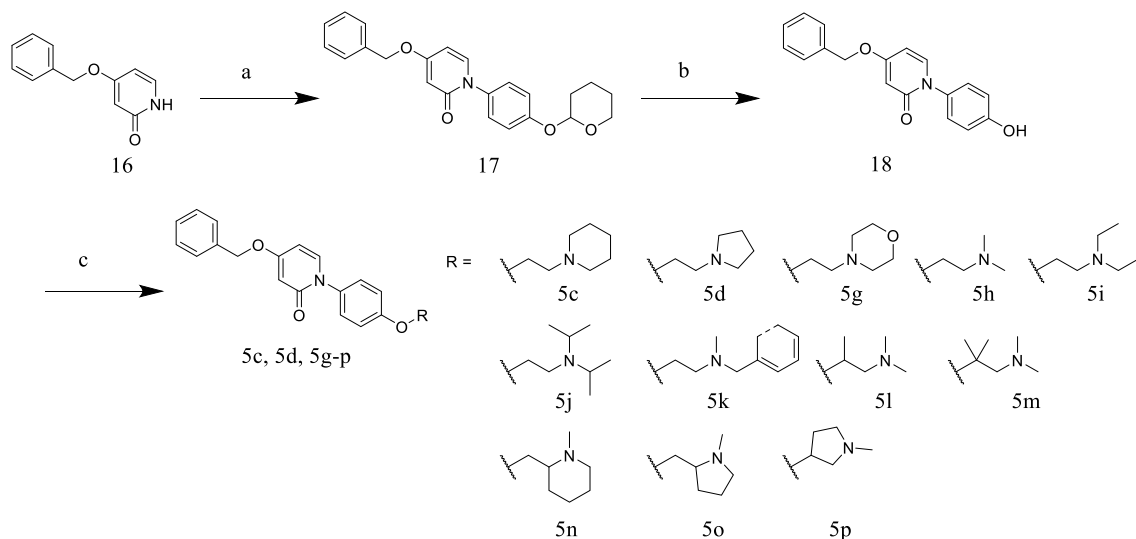


Scheme 2. Reagents and conditions: (a) 4-(tert-Butyldimethylsilyloxy)phenylboronic acid, Cu(OAc)₂, molecular sieves 4A, pyridine, CH₂Cl₂; (b) 4-fluorophenol, CuI, K₂CO₃, DMF, 150 °C; (c) diethyl azodicarboxylate, PPh₃, 2-(piperidin-1-yl)ethanol, THF.

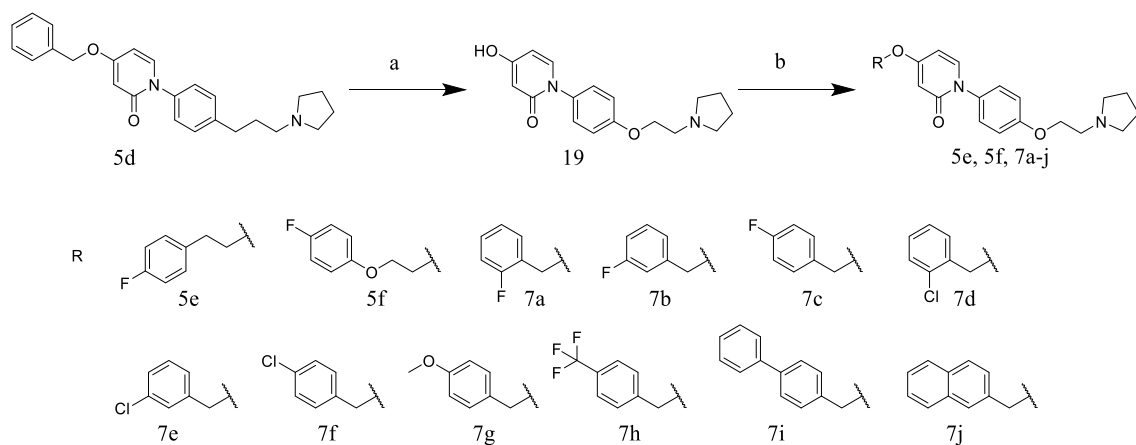
Scheme 3 には末端アリール基とピリドンコアが 2 原子介してつながった化合物の合成法を示す。触媒量のヨウ化銅 (I) 存在下、市販のピリドン誘導体 (**16**) と 2-(4-ヨードフェノキシ) テトラヒドロ-2 H-ピランを反応させることで鍵中間体である *N*-フェニルピリドン誘導体 **17** を中程度の収率で得た。化合物 **17** は、触媒量の *p*-トルエンスルホン酸ピリジニウムで EtOH 中処理し、フェノール誘導体 **18** とし、続いて 2-アミノエタノール類との光延反応条件下縮合させ化合物 **5c-d** および **5g-p** を中程度から高収率で得た。

Scheme 4 には、ベンゼン環上に置換基を有する誘導体、リンカーの長さが異なる誘導体及びベンゼン環が他のアリール基で置換された誘導体など、左側ベンジル基部分を返還した誘導体の合成法を示す。パラジウム触媒存在下、水素雰囲気下で化合物 **5d** を水素化分

解し、フェノール誘導体 **19** とし、その後、光延反応により化合物 **5e-f** および **7a-j** を得た。

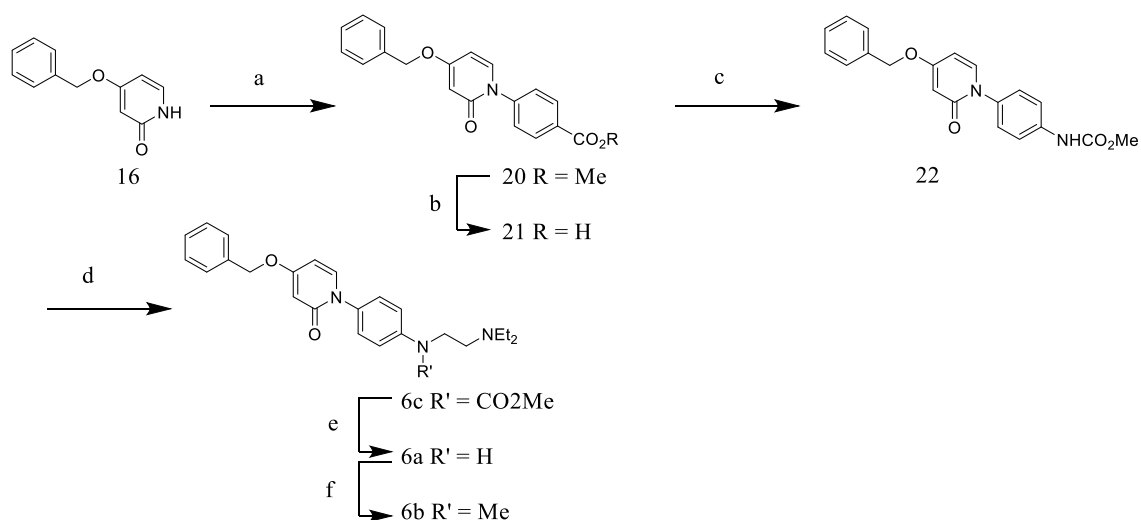


Scheme 3. Reagents and conditions: (a) 2-(4-Iodophenoxy)tetrahydro-2H-pyran, CuI, K₂CO₃, DMF, 150 °C; (b) pyridinium p-toluenesulfonate, EtOH, reflux; (c) diethyl azodicarboxylate, PPh₃, ROH, THF.



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) Pd on carbon, H₂, MeOH, THF; (b) 1,1'-(azodicarbonyl)dipiperidine, PBU₃, ROH, THF.

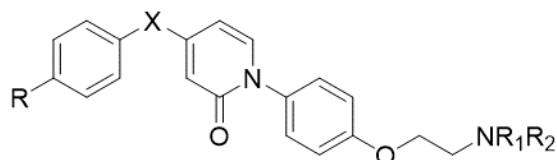
Scheme 5 には、アミン部分のリンカーの酸素原子を窒素原子に置き換えた化合物の合成を示す。化合物 **16** と 4-(メトキシカルボニル)フェニルボロン酸のウルマンカップリング反応により、化合物 **20** を得た。これを加水分解しカルボン酸 **21** とした後、MeOH-THF 中のアジ化ジフェニルホスホリルと反応させカルバメート誘導体 **22** を得、それに続く 2-(ジエチル-アミノ)エチルブロミドとの反応で化合物 **6c** とし、メトキシカルボニル基を除去し化合物 **6a** を得、さらに、パラホルムアルデヒドによる還元的アミノ化により N-メチル化合物 **6b** を得た。



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) 4-(Methoxycarbonyl)phenylboronic acid, Cu(OAc)₂, molecular sieves 4A, pyridine, CH₂Cl₂; (b) 4N NaOH, MeOH, THF; (c) diphenylphosphoryl azide, triethylamine, MeOH, THF; (d) 2-(diethylamino)ethyl bromide hydrobromide, potassium tert-butoxide, THF; (e) LiAlH₄, THF; (f) paraformaldehyde, ZnCl₂, NaB(CN)H₃, MeOH.

化合物の一次スクリーニングとして、ヒト MCH1R を発現する CHO 細胞から調整したメンブレンへの [¹²⁵I]MCH を使用した競合結合アッセイで結合親和性を評価した。その後、拮抗作用は、ヒトを MCH1R 発現する CHO 細胞で MCH により誘発される細胞内カルシウム濃度に対する化合物の阻害効果を FLIPR 測定し評価した。QTc 延長能を評価するため [³⁵S]N-[(4R)-1'-[(2R)-6-シアノ-1,2,3,4-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-3,4-ジヒドロ-4-ヒドロキシスピロ-[2H-1-ベンゾピラン-2,4'-ピペリジン]-6-イル]メタンスルホンアミド (MK-499) を使用した hERG カリウムチャネル阻害活性を評価した。¹²⁸

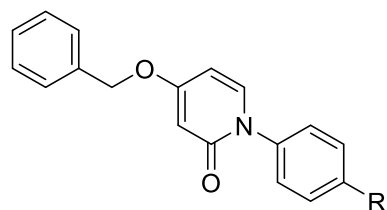
最初にフェニルピリドンと末端アリール基の最適距離を検証した (Table 1)。化合物 5a 及び化合物 5b のようにフェニル基とピリドン部位が直接もしくは酸素原子で結合した誘導体は MCH1R に対して結合親和性を示さなかった。興味深いことに、リンカーとしてのメチレンオキシ基を用いた化合物 5c および化合物 5d は、MCH1R に対して非常に良好な結合親和性 (それぞれ IC₅₀=4.4 および 5.8 nM) を示した。さらに、化合物 5c と化合物 5d はそれぞれ IC₅₀=19 および 27 nM と両方とも良好なセルでの阻害活性を示した。しかしながら、スペーサーがさらに伸びると、化合物 5e および化合物 5f で例示されるように、IC₅₀ 値は 650 および 150 nM のと低下した。これらの結果より、メチレンオキシ基で結合したフェニル基とフェニルピリドン部位は、想定した MCH1R のファーマコフォアと一致したことを示唆している。

Table 1hMCHIR binding affinity of compounds **5a–5f**

Compound	R	X (Linker)	NR ₁ R ₂	binding	FLIPR
				IC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^a (nM)
5a	F	Null		>1000	nt
5b	F	O		>1000	nt
5c	H	CH ₂ O		4.4	19
5d	H	CH ₂ O		5.8	27
5e	F	CH ₂ CH ₂ O		650	nt
5f	F	OCH ₂ CH ₂ O		150	nt

^a Values are means of two experiments. Compounds competed with [¹²⁵I]-MCH for binding at the human MCH1 receptor. nt = not tested.

末端アリアル基がメチレンオキシ基で結合した距離が高い親和性を得るために適している事が分かったため、リンカーをメチレンオキシ基に固定した 4-ベンジルオキシ-N-フェニルピリドンに対し、右側のアミン部分の最適化を行った。

Table 2Profiles of compounds **5c–d**, **5g–p** and **6a–c**

Compound	R	hMCH1R	FLIPR	hERG
		IC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^b (μM)
5c		4.4	19	5.8
5d		5.8	27	8.1
5g		24	34	>10
5h		9.5	18	>10
5i		6.6	24	9.8
5j		5.1	22	4.3
5k		3.8	nt	0.81
5l		51	nt	nt
5m		180	nt	nt

cotinued

Table 2 (cotinued)

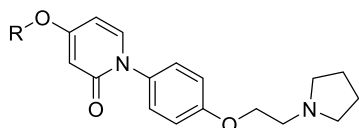
Compound	R	hMCH1R	FLIPR	hERG
		IC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^b (μM)
5n		18	nt	5.8
5o		12	23	9.3
5p		18	nt	>10
6a		6.8	nt	7
6b		16	nt	1.7
6c		>1000	nt	nt

^a Values are means of two experiments. Compounds competed with [¹²⁵I]-MCH for binding at the human MCH1 receptor. ^b Inhibition of [³⁵S]N-[(4R)-1'-[(2R)-6-cyano-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthyl]-3,4-dihydro-4-hydroxyspiro[2H-1-benzopyran-2,4'-piperidin]-6-yl]methanesulfonamide binding to hERG in HEK293 cells. nt = not tested.

Table 2 に *N*-フェニルピリドン誘導体のさまざまなアミン部分に対する MCH1R および hERG の阻害活性に関する SAR をまとめた。ピペリジン基 (5c) をモルホリン基 (5g) で置換すると hERG 阻害活性を低下 (IC₅₀ >10 μM) できたが、MCH1R 結合親和性も 5 倍弱くなった。ジメチルアミン (5h)、ジエチルアミン (5i) およびジイソプロピルアミン (5j) など非環式アミン誘導体の MCH1R 結合親和性 (IC₅₀ 値はそれぞれ 9.5 の 6.6 及び 5.1 nM) は、環式アミン化合物 5c 及び化合物 5d と同等であった。さらに、最小であるジメチルアミン誘導体 5h は、hERG の阻害活性を低下できた。化合物 5k のように窒素原子に大きなベンジル基も MCH1R 結合親和性には許容したが、hERG 阻害活性は有意に増加し

た ($IC_{50} = 0.81 \mu M$)。エチレンリンカー上にメチル基又はジメチル基を導入した化合物 **5l** および化合物 **5m** はの MCH1R 親和性 (それぞれ IC_{50} 値=51 および 180 nM) は大きく低下した。しかし、N 上の置換基とリンカー上で環化したピペリジニル (**5n**) およびピロリジニル類縁体 (化合物 **5o** および化合物 **5p**) のようなアミン側鎖への変換は MCH1R 親和性をわずかに低下させたが、単純なリンカーへのメチル基ほどではなかった。化合物 **5d** のアミン部位とフェニル基のリンカー上の酸素原子を窒素原子へ変換した化合物 **6a** は、化合物 **5d** と同等の MCH1R 結合親和性と hERG 阻害活性を示した。更に、化合物 **6a** の窒素原子上にメチルを導入した化合物 **6b** の MCH1R 結合親和性わずかに低下したが、hERG 阻害は逆に $1.7 \mu M$ と増加傾向を示した。メチルカーバメイトを導入した化合物 **6c** の MCH1R 結合親和性は失活した。

Table 3
Profiles of compounds **7a–7j**



Compound	R	hMCH1R	FLIPR	hERG
		IC_{50}^a (nM)	IC_{50}^a (nM)	IC_{50}^b (μM)
7a	o-F-Bn-	8.7	30	4.3
7b	m-F-Bn-	5.9	22	2.9
7c	p-F-Bn-	5.6	23	9
7d	o-Cl-Bn-	12	nt	nt
7e	m-Cl-Bn-	4.2	nt	1.9
7f	p-Cl-Bn-	1.4	17	1.7
7g	p-MeO-Bn-	7	11	1.2
7h	p-CF ₃ -Bn-	6.7	49	2.4
7i	p-Ph-Bn-	640	nt	nt
7j	2-Naphtyl-CH ₂ -	7.7	175	0.67

^a Values are means of two experiments. Compounds competed with [¹²⁵I]-MCH for binding at the human MCH1 receptor. ^b Inhibition of [³⁵S]N-[(4R)-1'-[(2R)-6-cyano-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthyl]-3,4-dihydro-4-hydroxyspiro[2H-1-benzopyran-2,4'-piperidin]-6-yl]methanesulfonamide binding to hERG in HEK293 cells. nt = not tested.

Table 3 に示した通り、MCH1R の *in vitro* プロファイルをさらに改善するため、左側フェニル基の SAR を探索した。フェニル環にフッ素原子または塩素原子を導入した化合物 (**7a-7f**) は、良い MCH1R 結合親和性を示した。これらの化合物のうち、パラ位に置換した化合物 **7c** 及び化合物 **7f** ($IC_{50} = 5.6$ および 1.4 nM) は、特に良い MCH1R 結合親和性を示した。さらに、化合物 **7c** と化合物 **7f** の MCH1R 阻害活性は、化合物 **5d** と同等であった。比較的小さな置換基を導入したフルオロ誘導体 **7c** の hERG 阻害活性は、は同程度 ($9.0 \mu M$) であったが、クロロ誘導体 **7f** では、増加 ($1.7 \mu M$) した。フルオロ誘導体 **7c** とは対照的に電子供与性のメトキシ基 (**7g**) および電子吸引性のトリフルオロメチル基 (**7h**) のパラ位への導入では、両化合物とも MCH1R 阻害活性では許容されたが、hERG 阻害活性は増加した。ビフェニル基 (**7i**) の導入は許容せず、ナフチル基 (**7j**) の導入は、MCH1R 結合親和性を保持したが、hERG 阻害活性は逆に増悪した。代表的な化合物 **5c**、**7c** および **7f** のラットの C S F 移行性を評価した。

Table 4

Biological properties of the representative phenylpyridone compounds

Compound	Brain penetration in SD rats 2 h @10 mpk			
	Plasma (μM)	Brain (nmol/g)	CSF (μM)	Brain/plasma ratio
5c	0.2	0.76	nd	3.8
7c	1	2.4	0.055	2.4
7f	0.47	1.67	0.01	3.6

nd = Not detected.

SD ラットで脳と C S F 濃度 (10 mg/kg、経口投与後 2 時間) を測定した結果を **table 4** にまとめる。*N*-フェニルピリドンシリーズの化合物は、**5c**、**7c** および **7f** の脳/血漿比がそれぞれ 3.8、2.4 および 3.6 とすべて良好な脳移行性を示した。**5c** の比較的低い血漿レベルは、**7c** に比べてラットの代謝安定性が悪い事に起因すると考えらる (データは非表示)。化合物 **7c** は、脳濃度 $2.4 \mu M$ と優れた脳移行性を示し、化合物 **7f** よりはるかに高い CSF 濃度を示した。さらに、化合物 **7c** は、hERG 阻害活性だけでなく、150 種のパネルアッセイに対しても優れた選択性を有することが確認された (いずれも、MCH1R 結合親和性より 500 倍低い親和性であった)。

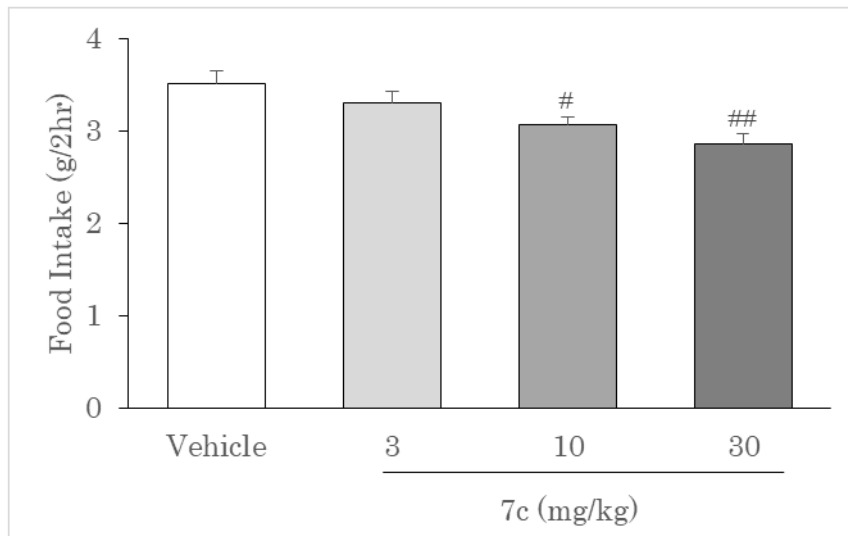


Figure 3. Effect of **7c** on spontaneous food intake in DIO mice. Food intake was measured 24 h after **7c** was orally administrated. #P <0.05 versus vehicle treated control group. ##P <0.01 versus vehicle treated control group.

活性、選択性、および優れた脳移行性のすべてで優れた結果が得られたので、急性食物摂取モデルにおける化合物 **7c** の評価を実施した。化合物 **7c** の摂食抑制効果は、エスタブリッシュ DIO マウスで評価した。化合物 **7c** の急性経口投与は、**Figure 3** に示す様に、DIO マウスで 24 時間の自発的食摂取を用量依存的に抑制した (3、10、30 mg/kg でそれぞれ 6%、13%、19%)。⁷¹ 化合物 **7c** は食物摂取モデルでの優れた in vivo 活性を示したため、さらに慢性拮抗薬モデルで評価した。3、10、30mg/kg の化合物 **7c** を 1.5 か月間、1 日 1 回、経口投与すると、エスタブリッシュ DIO マウスの食物摂取量と体重が減少した。投与終了時の体重の減少は、3、10、30 mpk, q. d. でそれぞれ体重の 4%、11%、21%と用量依存的に減少した (**Figure 4**)。⁷² このマウスを詳しく調べたところ、この体重減少は、脂肪選択的で骨や筋肉の減少は認められなかった。更に血中レプチン濃度も用量依存的に減少していた (データは非表示)。

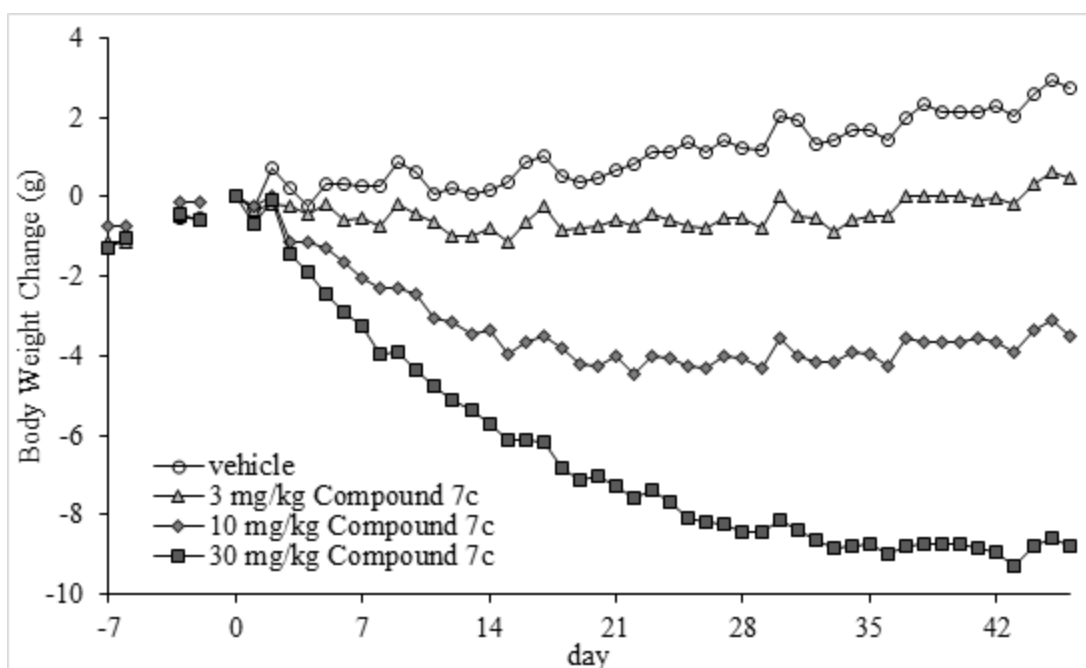


Figure 4. Body weight change in DIO mice with administration of compound **7c** for 1.5 months (q.d). Data are mean. #P <0.05 versus vehicle treated control group. ##P <0.01 versus vehicle treated control group.

結論として、強力な MCH1R 阻害薬の創出と hERG 阻害回避を目的として、N-フェニルピリドン構造を中心コアとして設計し、側鎖部分の最適化研究を行い、新しい化合物群を MCH1R 阻害薬として見出した。この新規化合物群は、これまで問題とされていた hERG 阻害も回避する事ができた。合成した化合物の構造活性相関とその後の解析により、化合物 **7c** は優れた脳移行性を持ち、強力かつ選択的な MCH1R 阻害薬であることが明らかになった。化合物 **7c** は、DIO マウスモデルで用量依存的に優れた体重減少を示した事から、N-フェニルピリドン誘導体は、肥満治療の臨床開発候補としての可能性の評価と更なる探索研究が実施された。

第二節 実験の部

試薬及び溶媒は、市販品を精製することなく使用した。カラムクロマトグラフィーによる精製、分離には Wakogel C 300 (mesh 45 75 μm) 又は Biotage silica gel columns (KP-Sil silica) を用いた。分取用 HPLC による精製、分離には YMC-Pack Pro C18 (YMC, 50 _ 30 mm i.d.) を用い $\text{CH}_3\text{CN}/\text{aqueous CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (0.1%) 10:90 から 50:50 (8 分グラジエント、流速 40 mL/min) を用いた。また薄層クロマトグラフィーには Merck silica gel 60 F254 pre coated plates を用いた。 ^1H NMR スペクトルは、JEOL JNM AL 400 spectrometer、Varian Gemini 300 spectrometer 又は Varian Mercury 400 spectrometer を使用した。重クロロホルム溶媒の場合はテトラメチルシラン (TMS, δ 0.00 ppm)、重メタノール溶媒の場合はメタノール (CD_3OD , δ 3.30 ppm)、重ジメチルスルホキシド溶媒の場合はジメチルスルホキシド ($\text{DMSO } d_6$, δ 2.49 ppm) またはテトラメチルシラン (TMS, δ 0.00 ppm) を内部標準として測定し ppm 単位で記載した。重量スペクトルは、Waters micromass ZQ、micromass Quattro II、又は、micromass Q Tof 2 を用いて electronspray ionization (ESI) または atmospheric pressure chemical ionization (APCI) で測定した。融点は、ヤナコ微量融点測定装置 MP-S3 で測定した。

1-[4-(Benzyloxy)phenyl]-4-(4-fluorophenyl)pyridin-2(1H)-one (11)

A mixture of 2-fluoro-4-iodopyridine (**8**, 2.0 g, 8.97 mmol), (4-fluorophenyl)boronic acid (1.4 g, 10.0 mmol), tetrakis(triphenylphosphine) palladium (270 mg, 0.234 mmol), 2 M Na_2CO_3 (10 mL) in DME (20 mL) was stirred at 80 °C overnight. The mixture was cooled and diluted with EtOAc (20 mL), then washed with water (20 mL) and brine (20 mL). The organic fraction was dried over MgSO_4 and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/hexane) to give compound **9** (1.70 g, 99%) as a white solid. A mixture of 2-fluoro-4-(4-fluorophenyl)pyridine (**9**, 1.70 g, 8.97 mmol) in concd HCl (5 mL) and water (10 mL) was refluxed for 4 h and stirred at room temperature overnight. The precipitate was collected and washed with water and acetone to afford compound **10** (1.46 g, 87%) as a white solid. Compound **10** was used without further purifications.

A mixture of 4-(4-fluorophenyl)pyridin-2(1H)-one (**10**, 300 mg, 1.58 mmol), 1-(benzyloxy)-4-bromobenzene (500 mg, 1.90 mmol), CuI (90 mg, 0.48 mmol), K₂CO₃ (440 mg, 3.17 mmol) in DMF (6 mL) was stirred at 150 °C overnight. Furthermore, 1-(benzyloxy)-4-bromobenzene (180 mg, 0.684 mmol) and CuI (150 mg, 0.80 mmol) were added to the mixture and stirred at 150 °C for 6 h and then cooled. The mixture was diluted with CHCl₃ (200 mL), then washed with water (200 mL) and brine (100 mL). The organic fraction was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/hexane) and crystallized (EtOAc/hexane) to provide compound **11** (458 mg, 78%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 5.18 (s, 2H), 6.64 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.28–7.51 (m, 9H), 7.69 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.83 (dd, J = 8.9, 5.4 Hz, 2H).

4-(4-Fluorophenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)pyridin-2(1H)-one (12**)**

A mixture of 1-[4-(benzyloxy)phenyl]-4-(4-fluorophenyl)pyridin-2(1H)-one (**11**, 200 mg, 0.539 mmol) in concd HCl (2 mL) water (2 mL) MeOH (2 mL) was refluxed for 1 h. Concd H₂SO₄ (0.5 mL) was added to the mixture and the mixture was refluxed for 3 h. The mixture was diluted with water (5 mL) and cooled to room temperature with stirring. The precipitate was collected and washed with water and MeOH to afford compound **12** (141 mg, 93%) as a pale yellow solid. The solid was used without further purifications.

4-(4-Fluorophenyl)-1-{4-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (5a**)**

To a solution of 4-(4-fluorophenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)pyridin-2(1H)-one (**12**, 40 mg, 0.142 mmol), PPh₃ (56 mg, 0.213 mmol), 2-(piperidin-1-yl)ethanol (0.025 mL, 0.170 mmol) in THF (2 mL) was added diethyl azodicarboxylate (37 mg, 0.213 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 4 h and concentrated under reduced

pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (MeOH/CHCl₃) and crystallized (EtOAc/hexane) to give compound **5a** (41 mg, 73%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.32–1.42 (m, 2H), 1.43–1.54 (m, 4H), 2.38–2.46 (m, 4H), 2.66 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.11 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 6.63 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.29–7.37 (m, 4H), 7.68 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.83 (dd, J = 8.9, 5.5 Hz, 2H); MS (ESI) m/z = 393 [M+H]⁺; HRMS (ESI); calcd for C₂₄H₂₆FN₂O₂ 393.1978; found 393.1977 [M+H]⁺.

1-[4-(tert-Butyldimethylsilyloxy)phenyl]-4-iodopyridin-2(1H)-one (14)

A mixture of 4-iodopyridin-2(1H)-one (**13**, 2.0 g, 9.05 mmol), 4-(tert-butyl dimethylsilyloxy)phenylboronic acid (6.8 g, 27.1 mmol), Cu(OAc)₂ (2.46 g, 13.6 mmol), pyridine (0.73 mL, 27.1 mmol), molecular sieves 4A (2.0 g) in CH₂Cl₂ (40 mL) was stirred at room temperature for 2.5 days. The mixture was filtrated and washed with brine (100 mL). The organic fraction was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/hexane) and crystallized (hexane) to give compound **14** (439 mg, 11%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.22 (s, 6H), 0.96 (s, 9H), 6.60 (dd, J = 7.0, 1.8 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 7.0 Hz, 1H).

4-(4-Fluorophenoxy)-1-(4-hydroxyphenyl)pyridin-2(1H)-one (15)

A mixture of 1-[4-(tert-butyl dimethylsilyloxy)phenyl]-4-iodopyridin-2(1H)-one (**14**, 100 mg, 0.23 mmol), 4-fluorophenol (29 mg, 0.26 mmol), CuI (50 mg, 0.26 mmol), K₂CO₃ (65 mg, 0.27 mmol) in DMF (1 mL) was stirred at 150 °C for 1.5 h. CHCl₃ (20 mL) and water (20 mL) were added to the mixture, and then the mixture was filtrated. The organic layer was washed with brine (10 mL). The organic fraction was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was

purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/hexane) and crystallized (EtOAc/hexane) to provide compound **15** (18 mg, 26%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 5.84 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.19 (dd, J = 7.5, 2.6 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.07–7.15 (m, 4H), 7.32 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 298 [M+H]⁺.

4-(4-Fluorophenoxy)-1-{4-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**5b**)

Compound **5b** was prepared from **15** and 2-(piperidin-1-yl)ethanol using the procedure described for **5a** with 55% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.31–1.40 (m, 2H), 1.42–1.52 (m, 4H), 2.36–2.43 (m, 4H), 2.65 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.09 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 5.45 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 6.14 (dd, J = 7.6, 2.9 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.27–7.37 (m, 4H), 7.65 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 409 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₆N₂O₃ 409.1927; found 409.1922 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-[4-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)phenyl]pyridin-2(1H)-one (**17**)

A mixture of 4-(benzyloxy)pyridin-2(1H)-one (**16**, 26.06 g, 129.5 mmol), 2-(4-iodophenoxy)tetrahydro-2H-pyran (50.3 g, 165.4 mmol), CuI (7.78 g, 40.85 mmol), K₂CO₃ (38.12 g, 275.8 mmol) in DMF (500 mL) was stirred at 150 °C for 24 h. The mixture was cooled and poured into water (3.0 L) to appear a precipitate. The precipitate was collected and then the precipitate was dissolved in CHCl₃ (1 L). The organic layer was washed with brine (500 mL) and dried over MgSO₄. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was crystallized (EtOAc) to give compound **17** (28.12 g, 60%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.46–1.58 (m, 3H), 1.58–1.93 (m, 3H), 3.50–3.60 (m, 1H), 3.70–3.81 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.52 (s, 1H), 5.95 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 7.7, 2.7 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.32–7.49 (m, 5H), 7.53 (d, J = 7.7 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 378 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-(4-hydroxyphenyl)pyridin-2(1H)-one (**18**)

A mixture of 4-(benzyloxy)-1-[4-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]phenylpyridin-2(1H)-one (**17**, 982 mg, 2.60 mmol), pyridinium p-toluenesulfonate (65 mg, 0.26 mmol) in EtOH (16 mL) was refluxed for 1 h. The mixture was cooled and water (60 mL) was added to the mixture to appear a precipitate. The precipitate was collected and washed with water and EtOAc to afford compound **18** (746 mg, 98%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 5.06 (s, 2H), 6.08–6.15 (m, 2H), 6.73 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.38–7.44 (m, 5H); MS (ESI) m/z = 294 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-{4-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**5c**)

Compound **5c** was prepared from **18** and 2-(piperidin-1-yl)ethanol using the procedure described for **5a** with 72% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.32–1.42 (m, 2H), 1.43–1.55 (m, 4H), 2.38–2.47 (m, 4H), 2.66 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 4.09 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 7.7, 2.6 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.32–7.47 (m, 5H), 7.50 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 405 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₂₉N₂O₃ 405.2178; found 405.2177 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**5d**)

Compound **5d** was prepared from **18** and 2-(pyrrolidin-1-yl)ethanol using the procedure described for **5a** with 85% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.80–1.85 (m, 4H), 2.62–2.67 (m, 4H), 2.93 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 4.15 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 6.03 (dd, J = 7.8, 2.4 Hz, 1H), 6.06 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.40 (dd, J = 13.7, 4.3 Hz, 5H); MS (ESI) m/z =

391 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₇N₂O₃ 391.2022; found 391.2021 [M+H]⁺;
mp 109–111 °C.

4-(Benzyloxy)-1-{4-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (5g)

Compound **5g** was prepared from **18** and 2-(morpholin-4-yl)ethanol using the procedure described for **5a** with 82% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.40–2.55 (m, 4H), 2.70 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.53–3.60 (m, 4H), 4.12 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 7.6, 2.6 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.50 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 407 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₇N₂O₄ 407.1971; found 407.1974 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (5h)

Compound **5h** was prepared from **18** and 2-(dimethylamino)ethanol using the procedure described for **5a** with 60% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.21 (s, 6H), 2.63 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.08 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 7.6, 2.6 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.51 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 365 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₂H₂₅N₂O₃ 365.1865; found 365.1863 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-{4-[2-(diethylamino)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (5i)

Compound **5i** was prepared from **18** and 2-(diethylamino)ethanol using the procedure described for **5a** with 73% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.97 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 2.54 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.78 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.04 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 7.6, 2.6 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.51 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 393 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₉N₂O₃ 393.2178; found 393.2171 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-{4-[2-(diisopropylamino)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (5j)

Compound **5j** was prepared from **18** and 2-(diisopropylamino)ethanol using the procedure described for **5a** with 73% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.98 (d, J = 6.5 Hz, 12H), 2.79 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.01 (h, J = 6.5 Hz, 2H), 3.90 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 7.6, 2.7 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.50 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 421 [M+H]⁺; HRMS(ESI) calcd for C₂₆H₃₃N₂O₃ 421.2491; found 421.2490 [M+H]⁺.

1-(4-{2-[Benzyl(methyl)amino]ethoxy}phenyl)-4-(benzyloxy)pyridin-2(1H)-one (5k)

Compound **5k** was prepared from **18** and 2-[benzyl(methyl)amino]ethanol using the procedure described for **5a** with 70% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.23 (s, 3H), 2.75 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 4.13 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 7.6, 2.8 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.20–7.48 (m, 10H), 7.51 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 441 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₈H₂₉N₂O₃ 441.2178; found 441.2180 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-(4-{[1-(dimethylamino)propan-2-yl]oxy}phenyl)pyridin-2(1H)-one (5l)

Compound **5l** was prepared from **18** and 1-(dimethylamino)propan-2-ol (racemate) using the procedure described for **5a** with 9% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.24 (d, J = 6.0 Hz, 3H), 2.19 (s, 6H), 2.36 (dd, J = 12.7, 5.5 Hz, 1H), 2.45–2.55 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.95 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 7.5, 2.7 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.52 (d, J = 7.5 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 379 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₇N₂O₃ 379.2022; found 379.2031 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-(4-([1-(dimethylamino)-2-methylpropan-2-yl]oxy)phenyl)pyridin-2(1H)-one (5m)

Compound **5m** was prepared from **18** and 2-(dimethylamino)-2-methylpropan-1-ol using the procedure described for **5a** with 61% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.27 (s, 6H), 2.29 (s, 6H), 2.47 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.96 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 7.6, 2.8 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.54 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 393 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₉N₂O₃ 393.2178; found 393.2181 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-(4-[(1-methylpiperidin-2-yl)methoxy]phenyl)pyridin-2(1H)-one (5n)

Compound **5n** was prepared from **18** and (1-methylpiperidin-2-yl)methanol (racemate) using the procedure described for **5a** with 16% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.10–1.85 (m, 6H), 2.00–2.90 (m, 6H), 3.90–4.15 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 7.6, 2.6 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.51 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 405 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₂₉N₂O₃ 405.2178; found 405.2177 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-(4-[(1-methylpyrrolidin-2-yl)methoxy]phenyl)pyridin-2(1H)-one (5o)

Compound **5o** was prepared from **18** and (1-methylpyrrolidin-2-yl)methanol (racemate) using the procedure described for **5a** with 17% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.50–1.75 (m, 3H), 1.90–2.05 (m, 1H), 2.13–2.28 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.53–2.63 (m, 1H), 2.92–3.00 (m, 1H), 3.82–3.90 (m, 1H), 3.97–4.05 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 7.6, 2.9 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.51 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 391 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₇N₂O₃ 391.2022; found 391.2022 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-{4-[(1-methylpyrrolidin-3-yl)oxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (5p)

Compound **5p** was prepared from **18** and 1-methylpyrrolidin-3-ol (racemate) using the procedure described for **5a** with 28% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.70–1.85 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.25–2.40 (m, 2H), 2.53–2.81 (m, 3H), 4.85–4.95 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 7.6, 2.7 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.32–7.48 (m, 5H), 7.51 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 377 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₅N₂O₃ 377.1865; found 377.1866 [M+H]⁺.

4-Hydroxy-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (19)

To a solution of 4-(benzyloxy)-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**5d**, 395 mg, 1.01 mmol) in THF (5 mL) and MeOH (5 mL) was added Pd (10 wt % on activated carbon, 200 mg). The mixture was stirred at room temperature under H₂ atmosphere for 2 h. The mixture was filtrated and washed with MeOH. The filtrate was concentrated to give compound **19** (303 mg, 99%) as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.82–1.87 (m, 4H), 2.68–2.74 (m, 4H), 2.96 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.12 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 5.84 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.92 (dd, J = 7.8, 2.4 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 8.8 Hz, 2H); MS (ESI) m/z = 301 [M+H]⁺.

4-[2-(4-Fluorophenyl)ethoxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (5e)

To a solution of 4-hydroxy-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**19**, 30 mg, 0.10 mmol), PBu₃ (0.075 mL, 0.30 mmol), 2-(4-fluorophenyl)ethanol (0.025 mL, 0.20 mmol) in THF (1 mL) was added 1,10-(azodicarbonyl)dipiperidine (76 mg, 0.30

mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (MeOH/CHCl₃) to give compound **5e** (24 mg, 57%) as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.82–1.86 (m, 4H), 2.65–2.71 (m, 4H), 2.95 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.07 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 4.12–4.18 (m, 4H), 5.92–5.96 (m, 2H), 6.97–7.04 (m, 4H), 7.27–7.16 (m, 5H); MS (ESI) m/z = 423 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₂₈FN₂O₃ 423.2084; found 423.2081 [M+H]⁺.

4-[2-(4-Fluorophenoxy)ethoxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (5f)

Compound **5f** was prepared from **19** and 2-(4-fluorophenoxy)ethanol using the procedure described for **5e** with 7% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.32–1.43 (m, 2H), 1.44–1.55 (m, 4H), 1.82–1.93 (m, 2H), 2.28–2.47 (m, 6H), 4.05 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 6.64 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.29–7.37 (m, 4H), 7.69 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.83 (dd, J = 7.8, 5.3 Hz, 2H); MS (ESI) m/z = 439 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd C₂₅H₂₈FN₂O₄ 439.2033; found 439.2025 [M+H]⁺.

4-[(2-Fluorobenzyl)oxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (7a)

Compound **7a** was prepared from **19** and 2-fluorophenylmethanol using the procedure described for **5e** with 41% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.93–1.99 (m, 4H), 2.88–3.04 (m, 4H), 3.14–3.20 (m, 2H), 4.28–4.33 (m, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.04 (dd, J = 7.8, 2.4 Hz, 1H), 6.08 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.95–7.49 (m, 9H); MS (ESI) m/z = 409 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₆FN₂O₃ 409.1927; found 409.1932 [M+H]⁺.

4-[(3-Fluorobenzyl)oxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (7b)

Compound **7b** was prepared from **19** and 3-fluorophenylmethanol using the procedure described for **5e** with 29% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.90–1.94 (m, 4H), 2.82–2.90 (m, 4H), 3.08 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 4.26 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 5.04 (s, 2H), 6.01 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 7.7, 2.7 Hz, 1H), 6.97–7.41 (m, 9H); MS (ESI) m/z = 409 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₆FN₂O₃ 409.1927; found 409.1931 [M+H]⁺.

4-[(4-Fluorobenzyl)oxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**7c**)

Compound **7c** was prepared from **19** and 4-fluorophenylmethanol using the procedure described for **5e** with 48% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.81–1.86 (m, 4H), 2.64–2.70 (m, 4H), 2.95 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.99 (s, 2H), 6.01 (dd, J = 7.4, 2.9 Hz, 1H), 6.04 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.10 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.40 (dd, J = 8.6, 5.5 Hz, 2H); MS (ESI) m/z = 409 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₆FN₂O₃ 409.1927; found 409.1933 [M+H]⁺; mp 124–126 °C.

4-[(2-Chlorobenzyl)oxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**7d**)

Compound **7d** was prepared from **19** and 2-chlorophenylmethanol using the procedure described for **5e** with 42% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.66–1.69 (m, 4H), 2.45–2.55 (m, 4H), 2.79 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.10 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.17 (s, 2H), 5.98 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.06 (dd, J = 7.6, 2.6 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.39–7.45 (m, 2H), 7.51–7.55 (m, 2H), 7.61 (d, J = 7.6 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 425 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₆ClN₂O₃ 425.1632; found 425.1628 [M+H]⁺.

4-[(3-Chlorobenzyl)oxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**7e**)

Compound **7e** was prepared from **19** and 3-chlorophenylmethanol using the procedure described for **5e** with 45% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.64–1.70 (m, 4H), 2.44–2.54 (m, 4H), 2.78 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.09 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 5.93 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 7.6, 2.8 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.40–7.48 (m, 3H), 7.52 (m, 2H); MS (ESI) m/z = 425 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₆ClN₂O₃ 425.1632; found 425.1630 [M+H]⁺.

4-[(4-Chlorobenzyl)oxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**7f**)

Compound **7f** was prepared from **19** and 4-chlorophenylmethanol using the procedure described for **5e** with 46% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.62–1.73 (m, 4H), 2.45–2.55 (m, 4H), 2.78 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.09 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 6.08 (dd, J = 7.8, 2.9 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.39–7.48 (m, 3H), 7.50–7.56 (m, 2H); MS (ESI) m/z = 425 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₆ClN₂O₃ 425.1632; found 425.1630 [M+H]⁺.

4-[(4-Methoxybenzyl)oxy]-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (**7g**)

Compound **7g** was prepared from **19** and 4-methoxyphenylmethanol using the procedure described for **5e** with 34% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.64–1.70 (m, 4H), 2.44–2.54 (m, 4H), 2.78 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 4.09 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.02 (dd, J = 7.8, 2.8 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H); MS (ESI) m/z = 421 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₂₉N₂O₄ 421.2127; found 421.2130 [M+H]⁺.

1-{4-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}-4-{[4-(trifluoromethyl)benzyl]oxy}pyridin-2(1H)-one (**7h**)

Compound **7h** was prepared from **19** and 4-trifluoromethylphenylmethanol using the procedure described for **5e** with 54% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.83–1.88 (m, 4H), 2.68–2.75 (m, 4H), 2.98 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 4.18 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.02 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 7.8, 2.4 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 7.22–7.27 (m, 3H), 7.54 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 7.8 Hz, 2H); MS (ESI) m/z = 459 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₂₆F₃N₂O₃ 459.1896; found 459.1904 [M+H]⁺.

4-(Biphenyl-4-ylmethoxy)-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (7i)

Compound **7i** was prepared from **19** and biphenyl-4-ylmethanol using the procedure described for **5e** with 38% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.81–1.86 (m, 4H), 2.64–2.70 (m, 4H), 2.95 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.08 (s, 2H), 6.05 (dd, J = 7.8, 2.3 Hz, 1H), 6.09 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.35–7.40 (m, 1H), 7.43–7.51 (m, 4H), 7.65–7.59 (m, 4H); MS (ESI) m/z = 467 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₃₀H₃₁N₂O₃ 467.2335; found 467.2326 [M+H]⁺.

4-(Naphthalen-2-ylmethoxy)-1-{4-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy]phenyl}pyridin-2(1H)-one (7j)

Compound **7j** was prepared from **19** and naphthalen-2-ylmethanol using the procedure described for **5e** with 43% as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.66–1.69 (m, 4H), 2.47–2.53 (m, 4H), 2.78 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 4.09 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 5.30 (s, 2H), 6.01 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.10 (dd, J = 7.6, 2.6 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.51–7.58 (m, 4H), 7.91–8.01 (m, 4H); MS (ESI) m/z = 441 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₂₈H₂₉N₂O₃ 441.2178; found 441.2170 [M+H]⁺.

Methyl 4-[4-(benzyloxy)-2-oxopyridin-1(2H)-yl]benzoate (20)

Compound **20** was prepared from **16** using the procedure described for **14** with 80% as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.93 (s, 3H), 5.05 (s, 2H), 6.04–6.13 (m, 2H), 7.21–7.25 (m, 1H), 7.33–7.50 (m, 7H), 8.12–8.18 (m, 2H); MS (ESI) m/z = 336 [M+H]⁺.

4-[4-(Benzyloxy)-2-oxopyridin-1(2H)-yl]benzoic acid (21)

A mixture of methyl 4-[4-(benzyloxy)-2-oxopyridin-1(2H)-yl]benzoate (**20**, 0.39 g, 1.16 mmol), 4N NaOH (3.2 mL, 12.8 mmol), MeOH (20 mL) and THF (20 mL) was stirred at 90 °C for 5 h. The mixture was cooled and 1N HCl was added until the mixture was adjusted to pH 2–3. The mixture was extracted with EtOAc (100 mL). The organic fractions were dried over MgSO₄. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford compound **21** (0.31 g, 83%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 5.15 (s, 2H), 6.08–6.10 (m, 1H), 6.25–6.30 (m, 1H), 7.30–7.56 (m, 8H), 8.11–8.16 (m, 2H); MS (ESI) m/z = 322 [M+H]⁺.

Methyl N-{4-[4-(benzyloxy)-2-oxopyridin-1(2H)-yl]phenyl}carbamate (22)

A mixture of 4-[4-(benzyloxy)-2-oxopyridin-1(2H)-yl]benzoic acid (**21**, 0.31 g, 0.97 mmol), diphenylphosphoryl azide (0.11 mL, 1.15 mmol), triethylamine (0.16 mL, 1.15 mmol), MeOH (0.2 mL) and DMF (5 mL) was stirred at 100 °C overnight. The mixture was cooled and brine (20 mL) was added. The mixture was extracted with CHCl₃ (40 mL). The organic fractions were dried over MgSO₄. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (MeOH/CHCl₃) to provide compound **22** (203 mg, 60%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.99 (s, 3H), 5.05 (s, 2H), 6.04–6.08 (m, 2H), 6.86 (brs, 1H), 7.17–7.50 (m, 10H); MS (ESI) m/z = 351 [M+H]⁺.

Methyl N-{4-[4-(benzyloxy)-2-oxopyridin-1(2H)-yl]phenyl}-N-[2-(diethylamino)ethyl]carbamate (6c)

To a solution of methyl N-{4-[4-(benzyloxy)-2-oxopyridin-1(2H)-yl]phenyl}carbamate (**22**, 90 mg, 0.257 mmol), potassium tert-butoxide (86 mg, 0.766 mmol) in THF (10 mL) was added 2-(diethylamino)ethyl bromide hydrobromide (135 mg, 0.517 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was diluted with sat. NaHCO₃ (20 mL) and extracted with CHCl₃ (20 mL). The organic fraction was dried over MgSO₄. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (MeOH/CHCl₃) to give compound **6c** (107 mg, 93%) as a yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.00 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 2.48–2.60 (m, 4H), 2.62–2.74 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.68–3.80 (m, 2H), 5.05 (s, 2H), 6.02–6.10 (m, 2H), 7.21–7.48 (m, 10H); MS (ESI) m/z = 450 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-(4-{[2-(diethylamino)ethyl]amino}phenyl)pyridin-2(1H)-one (6a)

To a solution of methyl N-{4-[4-(benzyloxy)-2-oxopyridin-1(2H)-yl]phenyl}-N-[2-(diethylamino)ethyl]carbamate (**6c**, 100 mg, 0.222 mmol) in THF (10 mL) was added lithium aluminum hydride (LiAlH₄: 10 mg, 0.264 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. Additional LiAlH₄ (10 mg, 0.264 mmol) was added to the mixture and stirred for 1.5 h. The reaction mixture was quenched by Na₂SO₄·10H₂O, EtOAc were added to the mixture and stirred overnight. The precipitate was removed by filtration and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by preparative HPLC to give compound **6a** (8 mg, 9%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.03 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 2.57 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.71 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.08–3.19 (m, 2H), 4.50–4.67 (m, 1H), 5.03 (s, 2H), 6.00 (dd, J = 7.6, 2.6 Hz, 1H), 6.06 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.30–7.48 (m, 5H); MS (ESI) m/z = 392 [M+H]⁺.

4-(Benzyloxy)-1-(4-{[2-(diethylamino)ethyl](methyl)amino}phenyl)pyridin-2(1H)-one (6b)

To a solution of 4-(benzyloxy)-1-(4-{[2-(diethylamino)ethyl]amino}phenyl)pyridin-2(1H)-one (**6a**, 7 mg, 0.018 mmol) and paraformaldehyde (1 mg) in MeOH (1 mL) was added ZnCl₂ (41 mg, 0.3 mmol) and NaB(CN)H₃ (23 mg, 0.6 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was diluted with CHCl₃ (20 mL), washed with 1N NaOH (10 mL) and brine (10 mL). The organic fraction was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure to give compound **6b** (2.8 mg, 39%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.06 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 2.52–2.72 (m, 2H), 2.61 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.42–3.52 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 5.03 (s, 2H), 6.00 (dd, J = 7.6, 2.7 Hz, 1H), 6.06 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.17 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.32–7.45 (m, 5H); MS (ESI) m/z = 406 [M+H]⁺.

Biology

In vivo efficacy in diet-induced obese mice

C57BL/6J mice were fed moderately high-fat diet for about 10 months before the experiment was initiated. The mice were then divided into three groups, and each group was orally administrated either vehicle (0.5% methylcellulose in water) or compound **7c** at doses of 3, 10 and 30 mg/kg once-daily for 1.5 month. Compound **7c** was administered after measurement of daily food intake and body weight, 1–2 h before the beginning of the dark period.

Reference

1. 厚生労働省、平成30年(2018)人口動態統計月報年計(概数)の概況
2. 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会編、高血圧治療ガイドライン2019、日本高血圧学会、2019.
3. Imano H, Kitamura A, Sato S, Kiyama M, Ohira T, et al. *Stroke*. 2009, 40, 1571.
4. Fujiyoshi A, Ohkubo T, Miura K, Murakami Y, Nagasawa SY, et al. *Hypertens Res*. 2012, 35, 947.
5. Ikeda A, Iso H, Yamagishi K, Inoue M, Tsugane S. *Am J Hypertens*. 2009, 22, 273.
6. Arima H, Tanizaki Y, Yonemoto K, Doi Y, Ninomiya T, et al. *J Hypertens*. 2009, 27, 2437.
7. 一般社団法人動脈硬化学会編、動脈硬化性疾患予防ガイドライン2017年版、一般社団法人動脈硬化学会、2017.
8. Soyama Y, Miura K, Morikawa Y, Nishijo M, Nakanishi H, et al. *Stroke*. 2003, 34, 863.
9. Zhang X, Patel A, Horibe H, Wu Z, Barzi F, et al. *Int J Epidemiol*. 2003, 32, 563.
10. 日本糖尿病学会編 科学的根拠に基づく糖尿病診断ガイドライン2013、日本糖尿病学会、2013.
11. Kannel WB, McGee DL. *JAMA*. 1979, 241, 2035.
12. Abbott RD, Donahue RP, MacMahon SW, Reed DM, Yano K. *JAMA*. 1987; 257: 949-52.
13. Singer DE, Nathan DM, Anderson KM, Wilson PW, Evans JC. *Diabetes*. 1992; 41: 202-8.
14. 大村隆夫, 上田一雄, 清原裕. *糖尿病* 1993; 36: 17-24.

15. Saito I, Kokubo Y, Yamagishi K, Iso H, Inoue M, et al. *Atherosclerosis*. 2011; 216: 187-91.
16. 日本肥満学会肥満症診療ガイドライン作成委員会編、肥満症診療ガイドライン 2016、日本肥満学会、2016.
17. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. *Lancet*. 2007; 370: 1706 13.
18. Moreira FA, Crippa JA. *Rev Bras Psiquiatr*. 2009 ; 31(2) 2): 145 53.
19. Jun Goo Kang Cheol Young Park. *Diabetes Metab J*. 2012 ; 36(1): 13 25.
20. Fanghänel G, Cortinas L, Sánchez Reyes L, Berber A. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24(2): 144 50.
21. James WP, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal LF, et al. *N Engl J Med*. 2010; 363: 905 17.
22. Astrup A. *N Engl J Med*. 2010; 363: 288 90.
23. Walker BR, Ballard IM, Gold JA. *J Int Med Res*. 1977; 5(2): 85 90.
24. Inoue S, Egawa M, Satoh S, Saito M, Suzuki H. *Am J Clin Nutr*. 1992; 55: 199S 202S.
25. Kopelman, P; Bryson, A; Hickling, R; Rissanen, A; Rossner, S; Toubro, S; Valensi, P. *International journal of obesity* (2005) 31 (3): 494
26. Padwal, R. *Current opinion in investigational drugs* (London, England: 2000) 9 (4): 414–21
27. Kopelman P, Groot Gde H, Rissanen A, Rossner S, Toubro S, Palmer R, Hallam R, Bryson A, Hickling RI. *Obesity*. (Jan 2010).
28. Tatemoto, K.; Mutt, V. *Nature* 1980, 285, 417.
29. Tatemoto, K.; Carlquist, M.; Mutt, V. *Nature* 1982, 296, 659.

30. Clark, J. T.; Kalra, P. S.; Crowley, W. R.; Kalra, S. P. *Endocrinology* 1984, 115, 427.
31. Mccarthy, H. D.; Mckibbin, P. E.; Holloway, B.; Mayers, R.; Williams, G. *Life Sci.* 1991, 49, 1491.
32. Eva, C.; Oberto, A.; Sprengel, R.; Genazzani, E. *FEBS Lett.* 1992, 314, 285.
33. Gregor, P.; Millham, M. L.; Feng, Y.; Decarr, L. B.; McCaleb, M. L.; Cornfield, L. J. *FEBS Lett.* 1996, 381, 58.
34. Larhammar, D.; Blomqvist, A. G.; Yee, F.; Jazin, E.; Yoo, H. Y.; Wahlestedt, C. J. *Biol. Chem.* 1992, 267, 10935.
35. Rose, P. M.; Fernandes, P.; Lynch, J. S.; Frazier, S. T.; Fisher, S. M.; Kodukula, K.; Kienzle, B.; Seethala, R. J. *Biol. Chem.* 1995, 270, 22661.
36. Gerald, C.; Walker, M. W.; Vaysse, P. J. J.; He, C. G.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26758.
37. Bard, J. A.; Walker, M. W.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26762.
38. Lundell, I.; Blomqvist, A. G.; Berglund, M. M.; Schober, D. A.; Johnson, D.; Statnick, M. A.; Gadski, R. A.; Gehlert, D. R.; Larhammar, D. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 29123.
39. Matsumoto, M.; Nomura, T.; Momose, K.; Ikeda, Y.; Kondou, Y.; Akiho, H.; Togami, J.; Kimura, Y.; Okada, M.; Yamaguchi, T. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 27217.
40. Weinberg, D. H.; Sirinathsinghji, D. J. S.; Tan, C. P.; Shiao, L. L.; Morin, N.; Rigby, M. R.; Heavens, R. H.; Rapoport, D. R.; Bayne, M. L.; Cascieri, M. A.; Strader, C. D.; Linemeyer, D. L.; MacNeil, D. J. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 16435.
41. Hu, Y. H.; Bloomquist, B. T.; Cornfield, L. J.; Decarr, L. B.; FloresRiveros, J. R.; Friedman, L.; Jiang, P. L.; LewisHiggins, L.; Sadlowski, Y.; Schaefer, J.; Velazquez, N.; McCaleb, M. L. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 26315.

42. Krause, J.; Eva, C.; Seeburg, P. H.; Sprengel, R. *Mol. Pharmacol.* 1992, 41, 817.
43. Gehlert, D. R.; Beavers, L. S.; Johnson, D.; Gackenheimer, S. L.; Schober, D. A.; Gadski, R. A. *Mol. Pharmacol.* 1996, 49, 224.
44. Herzog, H.; Hort, Y. J.; Ball, H. J.; Hayes, G.; Shine, J.; Selbie, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89, 5794.
45. Gregor, P.; Feng, Y.; Decarr, L. B.; Cornfield, L. J.; McCaleb, M. L. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 27776.
46. Gerald, C.; Walker, M. W.; Criscione, L.; Gustafson, E. L.; BatzlHartmann, C.; Smith, K. E.; Vaysse, P.; Durkin, M. M.; Laz, T. M.; Linemeyer, D. L.; Schaffhauser, A. O.; Whitebread, S.; Hofbauer, K. G.; Taber, R. I.; Brancheck, T. A.; Weinshank, R. L. *Nature* 1996, 382, 168.
47. Poindexter, G. S.; Bruce, M. A.; LeBoulluec, K. L.; Monkovic, I.; Martin, S. W.; Parker, E. M.; Iben, L. G.; McGovern, R. T.; Ortiz, A. A.; Stanley, J. A.; Mattson, G. K.; Kozlowski, M.; Arcuri, M.; Antal-Zimanyi, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 379.
48. Wieland, H. A.; Engel, W.; Eberlein, W.; Rudolf, K.; Doods, H. N. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 125, 549.
49. Kask, A.; Rago, L.; Harro, J. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 124, 1507.
50. Hipskind, P. A.; Lobb, K. L.; Nixon, J. A.; Britton, T. C.; Bruns, R. F.; Catlow, J.; DieckmanMcGinty, D. K.; Gackenheimer, S. L.; Gitter, B. D.; Iyengar, S.; Schober, D. A.; Simmons, R. M. A.; Swanson, S.; Zarrinmayeh, H.; Zimmerman, D. M.; Gehlert, D. *R. J. Med. Chem.* 1997, 40, 3712.
51. Marsh, D. J.; Hollopeter, G.; Kafer, K. E.; Palmiter, R. D. *Nat. Med.* 1998, 4, 718.
52. Pedrazzini, T.; Seydoux, J.; Kunstner, P.; Aubert, J. F.; Grouzmann, E.; Beermann, F.; Brunner, H. R. *Nat. Med.* 1998, 4, 722.

53. Daniels, A. J.; Matthews, J. E.; Slepatis, R. J.; Jansen, M.; Viveros, O. H.; Tadepalli, A.; Harrington, W.; Heyer, D.; Landavazo, A.; Leban, J. J.; Spaltenstein, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, 92, 9067.
54. Inui, A. *Trends Pharmacol. Sci.* 1999, 20, 43.
55. Kanatani, A.; Ishihara, A.; Asahi, S.; Tanaka, T.; Ozaki, S.; Ihara, M. *Endocrinology* 1996, 137, 3177.
56. Kanatani, A.; Mashiko, S.; Murai, N.; Sugimoto, N.; Ito, J.; Fukuroda, T.; Fukami, T.; Morin, N.; MacNeil, D. J.; Van der Ploeg, L. H. T.; Saga, Y.; Nishimura, S.; Ihara, M. *Endocrinology* 2000, 141, 1011.
57. Kanatani, A.; Ito, J.; Ishihara, A.; Iwaasa, H.; Fukuroda, T.; Fukami, T.; MacNeil, D. J.; Van der Ploeg, L. H. T.; Ihara, M. *Regul. Pept.* 1998, 75–76, 409.
58. Kanatani, A.; Kanno, T.; Ishihara, A.; Hata, M.; Sakuraba, A.; Tanaka, T.; Tsuchiya, Y.; Mase, T.; Fukuroda, T.; Fukami, T.; Ihara, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 266, 88.
59. Kanatani, A.; Hata, M.; Mashiko, S.; Ishihara, A.; Okamoto, O.; Haga, Y.; Ohe, T.; Kanno, T.; Murai, N.; Ishii, Y.; Fukuroda, T.; Fukami, T.; Ihara, M. *Mol. Pharmacol.* 2001, 59, 501.
60. Sato, N.; Jitsuoka, M.; Shibata, T.; Hirohashi, T.; Nonoshita, K.; Moriya, M.; Haga, Y.; Sakuraba, A.; Ando, M.; Ohe, T.; Iwaasa, H.; Gomori, A.; Ishihara, A.; Kanatani, A.; Fukami, T. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 4765.
61. Sato, N.; Takahashi, T.; Shibata, T.; Haga, Y.; Sakuraba, A.; Hirose, M.; Sato, M.; Nonoshita, K.; Koike, Y.; Kitazawa, H.; Fujino, N.; Ishii, Y.; Ishihara, A.; Kanatani, A.; Fukami, T. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 666.
62. Takahashi, T.; Sakuraba, A.; Hirohashi, T.; Shibata, T.; Hirose, M.; Haga, Y.; Nonoshita, K.; Kanno, T.; Ito, J.; Iwaasa, H.; Kanatani, A.; Fukami, T.; Sato, N. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 7501-7511

63. Ogino, Y.; Ohtake, N.; Nagae, Y.; Matsuda, K.; Ishikawa, M.; Moriya, M.; Kanesaka, M.; Mitobe, Y.; Ito, J.; Kanno, T.; Ishihara, A.; Iwaasa, H.; Ohe, T.; Kanatani, A.; Fukami, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 4997.
62. Ogino, Y.; Ohtake, N.; Nagae, Y.; Matsuda, K.; Moriya, M.; Suga, T.; Ishikawa, M.; Kanesaka, M.; Mitobe, Y.; Ito, J.; Kanno, T.; Ishihara, A.; Iwaasa, H.; Ohe, T.; Kanatani, A.; Fukami, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 5010.
63. Saito, Y.; Nothacker, H. P.; Civelli, O. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000, 11, 299.
64. Schwartz, M. W.; Woods, S. C.; Porte, D.; Seeley, R. J.; Baskin, D. G. *Nature* 2000, 404, 661.
65. Marsh, D. J.; Weingarh, D. T.; Novi, D. E.; Chen, H. Y.; Trumbauer, M. E.; Chen, A. S.; Guan, X. M.; Jiang, M. M.; Feng, Y.; Camacho, R. E.; Shen, Z.; Frazier, E. G.; Yu, H.; Metzger, J. M.; Kuca, S. J.; Shearman, L. P.; Gopal-Truter, S.; MacNeil, D. J.; Strack, A. M.; MacIntyre, D. E.; Van der Ploeg, L. H. T.; Qian, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99, 3240.
66. Gomori, A.; Ishihara, A.; Ito, M.; Mashiko, S.; Matsushita, H.; Yumoto, M.; Ito, M.; Tanaka, T.; Tokita, S.; Moriya, M.; Iwaasa, H.; Kanatani, A. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003, 284, E583.
67. Shimada, M.; Tritos, N. A.; Lowell, B. B.; Flier, L. S.; Maratos-Flier, E. *Nature* 1998, 396, 670.
68. Ludwig, D. S.; Tritos, N. A.; Mastaitis, J. W.; Kulkarni, R.; Kokkotou, E.; Elmquist, J.; Lowell, B.; Flier, J. S.; Maratos-Flier, E. *J. Clin. Invest.* 2001, 107, 379.
69. Borowsky, B.; Durkin, M. M.; Ogozalek, K.; Marzabadi, M. R.; DeLeon, J.; Heurich, R.; Lichtblau, H.; Shaposhnik, Z.; Daniewska, I.; Blackburn, T. P.; Branchek, T. A.; Gerald, C.; Vaysse, P. J.; Forray, C. *Nat. Med.* 2002, 8, 825.

70. Mashiko, S.; Ishihara, A.; Gomori, A.; Moriya, R.; Ito, M.; Iwaasa, H.; Matsuda, M.; Feng, Y.; Shen, Z.; Marsh, D. J.; Bednarek, M. A.; MacNeil, D. J.; Kanatani, A. *Endocrinology* 2005, 146, 3080.
71. Ito, M.; Ishihara, A.; Gomori, A.; Egashira, S.; Matsushita, H.; Mashiko, S.; Ito, J.; Ito, M.; Nakase, K.; Haga, Y.; Iwaasa, H.; Suzuki, T.; Ohtake, N.; Moriya, M.; Sato, N.; MacNeil, D. J.; Takenaga, N.; Tokita, S.; Kanatani, A. *Eur. J. Pharmacol.* 2009, 624, 77.
72. Ito, M.; Ishihara, A.; Gomori, A.; Matsushita, H.; Ito, M.; Metzger, J. M.; Marsh, D. J.; Haga, Y.; Iwaasa, H.; Tokita, S.; Takenaga, N.; Sato, N.; MacNeil, D. J.; Moriya, M.; Kanatani, A. *Br. J. Pharmacol.* 2010, 159, 374.
73. Hiroyuki Kishino, Minoru Moriya, Shunji Sakuraba, Toshihiro Sakamoto, Hidekazu Takahashi, Takao Suzuki, Ryuichi Moriya, Masahiko Ito, Hisashi Iwaasa, Norihiro Takenaga, Akane Ishihara, Akio Kanatani, Nagaaki Sato, Takehiro Fukami. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 ; 19 4589 4593.
74. Minoru Moriya, Hiroyuki Kishino, Shunji Sakuraba, Toshihiro Sakamoto, Takuya Suga, Hidekazu Takahashi, Takao Suzuki, Masahiko Ito, Junko Ito, Ryuichi Moriya, Norihiro Takenaga, Hisashi Iwaasa, Akane Ishihara, Akio Kanatani, Takehiro Fukami. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19: 3568 3572.
75. Takao Suzuki, Minoru Moriya, Toshihiro Sakamoto, Takuya Suga, Hiroyuki Kishino, Hidekazu Takahashi, Makoto Ishikawa, Keita Nagai, Yumiko Imai, Etsuko Sekino, Masahiko Ito, Hisashi Iwaasa, Akane Ishihara, Shigeru Tokita, Akio Kanatani, Nagaaki Sato, Takehiro Fukami. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19: 3072 3077.
76. Rueeger, H.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Schmidlin, T.; Schilling, W.; Criscione, L.; Whitebread, S.; Chiesi, M.; Walker, M. W.; Dhanoa, D.; Islam, I.; Zhang, J.; Gluchowski, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 1175.
77. McNally, J. J.; Youngman, M. A.; Lovenberg, T. W.; Nepomuceno, D. H.; Wilson, S. J.; Dax, S. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 213.

78. McNally, J. J.; Youngman, M. A.; Lovenberg, T. W.; Nepomuceno, D.; Wilson, S.; Dax, S. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 1641.
79. Islam, I.; Dhanoa, D.; Finn, J.; Du, P.; Walker, M. W.; Salon, J. A.; Zhang, J.; Gluchowski, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 1767.
80. Finn, J.; Pelham, D.; Walker, M. W.; Gluchowski, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 1771.
81. Satoh, Y.; Hatori, C.; Ito, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 1009.
82. Tabuchi, S.; Itani, H.; Sakata, Y.; Oohashi, H.; Satoh, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 1171.
83. Itani, H.; Ito, H.; Sakata, I.; Hatakeyama, Y.; Oohashi, H.; Satoh, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 757.
84. Itani, H.; Ito, H.; Sakata, Y.; Hatakeyama, Y.; Oohashi, H.; Satoh, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 799.
85. Hammond, M.; Elliott, R. L.; Gillaspay, M. L.; Hager, D. C.; Hank, R. F.; LaFlamme, J. A.; Oliver, R. M.; DaSilva-Jardine, P. A.; Stevenson, R. W.; Mack, C. M.; Cassella, J. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 1989.
86. Elliott, R. L.; Oliver, R. M.; LaFlamme, J. A.; Gillaspay, M. L.; Hammond, M.; Hank, R. F.; Maurer, T. S.; Baker, D. L.; DaSilva-Jardine, P. A.; Stevenson, R. W.; Mack, C. M.; Cassella, J. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 3593.
87. Rueeger, H.; Gerspacher, M.; Buehlmayer, P.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Schmidlin, T.; Whitebread, S.; Nuesslein-Hildesheim, B.; Nick, H.; Cricione, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 2451.
88. Galiano, S.; Erviti, O.; Perez, S.; Moreno, A.; Juanenea, L.; Aldana, I.; Monge, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 597.

89. Juanenea, L.; Galiano, S.; Erviti, H.; Moreno, A.; Perez, S.; Aldana, I.; Monge, A. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 4717.
90. Aquino, C. J.; Ramanjulu, J. M.; Heyer, D.; Daniels, A. J.; Palazzo, F.; Dezube, M. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 2691.
91. Guba, W.; Neidhart, W.; Nettekoven, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 1599.
92. Gillman, K. W.; Higgins, M. A.; Poindexter, G. S.; Browning, M.; Clarke, W. J.; Flowers, S.; Grace, J. E.; Hogan, J. B.; McGovern, R. T.; Iben, L. G.; Mattson, G. K.; Ortiz, A.; Rassnick, S.; Russell, J. W.; Antal-Zimanyi, I. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 5517.
93. Li, G. Q.; Stamford, A. W.; Huang, Y.; Cheng, K. C.; Cook, J.; Farley, C.; Gao, J.; Ghibaudi, L.; Greenlee, W. J.; Guzzi, M.; Van Heek, M.; Hwa, J. J.; Kelly, J.; Mullins, D.; Parker, E. M.; Wainhaus, S.; Zhang, X. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 1146.
94. Youngman, M. A.; McNally, J. J.; Lovenberg, T. W.; Reitz, A. B.; Willard, N. M.; Nepomuceno, D. H.; Wilson, S. J.; Crooke, J. J.; Rosenthal, D.; Vaidya, A. H.; Dax, S. L. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 346.
95. Norman, M. H.; Chen, N.; Chen, Z. D.; Fotsch, C.; Hale, C.; Han, N. H.; Hurt, R.; Jenkins, T.; Kincaid, J.; Liu, L. B.; Lu, Y. L.; Moreno, O.; Santora, V. J.; Sonnenberg, J. D.; Karbon, W. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 4288.
96. Fotsch, C.; Sonnenberg, J. D.; Chen, N.; Hale, C.; Karbon, W.; Norman, M. H. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 2344.
97. Block, M. H.; Boyer, S.; Brailsford, W.; Brittain, D. R.; Carroll, D.; Chapman, S.; Clarke, D. S.; Donald, C. S.; Foote, K. M.; Godfrey, L.; Ladner, A. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 3509.
98. Elliott, R. L.; Oliver, R. M.; Hammond, M.; Patterson, T. A.; She, L.; Hargrove, D. M.; Martin, K. A.; Maurer, T. S.; Kalvass, J. C.; Morgan, B. P.; DaSilva-Jardine, P. A.; Stevenson, R. W.; Mack, C. M.; Cassella, J. V. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 670.

99. [125I]PYY binding to human recombinant Y5 receptors in LMtk-cells; see Ref. 101; see Ref. 86.

100. See Ref. 101 for the protocol used for the in vivo feeding experiments described herein. Compounds were evaluated in groups of 13–16 animals which received injections of 5 µg of bPP (10 µL ICV, solved in 10 mM phosphate buffered saline containing 0.05% bovine serum albumin), and their food intake was monitored for 2 h. Oral dosing of compounds (5 mL/kg, suspended in 0.5% methylcellulose in distilled water) was done 1 h before ICV-agonist dosing.

101. Kanatani, A.; Ishihara, A.; Iwaasa, H.; Nakamura, K.; Okamoto, O.; Hidaka, M.; Ito, J.; Fukuroda, T.; MacNeil, D. J.; Van der Ploeg, L. H. T.; Ishii, Y.; Okabe, T.; Fukami, T.; Ihara, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 272, 169.

102. Chambers, M. S.; Baker, R.; Billington, D. C.; Knight, A. K.; Middlemiss, D. N.; Wong, E. H. F. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 2033.

103. Evans, B. E.; Leighton, J. L.; Rittle, K. E.; Gilbert, K. F.; Lundell, G. F.; Gould, N. P.; Hobbs, D. W.; Dipardo, R. M.; Veber, D. F.; Pettibone, D. J.; Clineschmidt, B. V.; Anderson, P. S.; Freidinger, R. M. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 3919.

104. Patchett, A. A.; Nargund, R. P.; Tata, J. R.; Chen, M. H.; Barakat, K. J.; Johnston, D. B. R.; Cheng, K.; Chan, W. W. S.; Butler, B.; Hickey, G.; Jacks, T.; Schleim, K.; Pong, S. S.; Chaung, L. Y. P.; Chen, H. Y.; Frazier, E.; Leung, K. H.; Chiu, S. H. L.; Smith, R. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, 92, 7001.

105. Chen, M. H.; Steiner, M. G.; Patchett, A. A.; Cheng, K.; Wei, L. T.; Chan, W. W. S.; Butler, B.; Jacks, T. M.; Smith, R. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 2163.

106. Barakat, K. J.; Cheng, K.; Chan, W. W. S.; Butler, B. S.; Jacks, T. M.; Schleim, K. D.; Hora, D. F.; Hickey, G. J.; Smith, R. G.; Patchett, A. A.; Nargund, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 1431.

107. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; Dipardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; Lotti, V. J.; Cerino, D. J.; Chen, T. B.; Kling, P. J.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfield, J. J. *Med. Chem.* 1988, 31, 2235.

108. According to the Merck Index, 14th edition, potential symptoms of overexposure are headache, dizziness; lethargy, dyspnea; ataxia, weakness; methemoglobinemia; urinary burning; acute hemorrhagic cystitis. See NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards (DHHS/NIOSH 97-140, 1997) p 14. This substance is listed as a known human carcinogen: Report on Carcinogens, Eleventh Edition (PB2005-104914, 2004) p III-13.

109. Shibata, Y.; Takahashi, H.; Ishii, Y. *Drug Metabol. Dispos.* 2000, 28, 1518.

110. See Ref. 60 for the protocol used for the in vivo feeding experiments described herein. Y5 antagonists were suspended in 0.5% methylcellulose in water and orally administered to rats. One hour after the oral administration, D-Trp34NPY (1 µg, dissolved in artificial cerebrospinal fluid) was intracerebroventricularly injected and food intake was monitored for 2 h.

111. JP1 and JP2 are defined as an artificial gastric fluid and an artificial intestinal fluid, respectively. JP1 (pH 1.2: 35 mM NaCl, 84 mM HCl in water) was prepared as follows: 2.0 g of NaCl, 7.0 mL of HCl and water were mixed in a measuring flask (1000 mL). JP2 (pH 6.8: 50 mM phosphate buffer) was prepared as follows: 250 mL of 200 mM KH₂PO₄, 118 mL of 200 mM NaOH and water were mixed in a measuring flask (1000 mL).

112. Mashiko, S.; Ishihara, A.; Iwaasa, H.; Moriya, R.; Kitazawa, H.; Mitobe, Y.; Ito, J.; Gomori, A.; Matsushita, H.; Takahashi, T.; MacNeil, D. J.; Van der Ploeg, L. H. T.; Fukami, T.; Kanatani, A. *Obesity* 2008, 16, 1510.

113. Ishihara, A.; Kanatani, A.; Mashiko, S.; Tanaka, T.; Hidaka, M.; Gomori, A.; Iwaasa, H.; Murai, N.; Egashira, S.; Murai, T.; Mitobe, Y.; Matsushita, H.; Okamoto,

O.; Sato, N.; Jitsuoka, M.; Fukuroda, T.; Ohe, T.; Guan, X. M.; MacNeil, D. J.; Van der Ploegn, L. H. T.; Nishikibe, M.; Ishii, Y.; Ihara, M.; Fukami, T. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103, 7154.

114. Erondy, N.; Gantz, I.; Musser, B.; Suryawanshi, S.; Mallick, M.; Addy, C.; Cote, J.; Bray, G.; Fujioka, K.; Bays, H.; Hollander, P.; Sanabria-Bohorquez, S. M.; Eng, W.; Langstrom, B.; Hargreaves, R. J.; Burns, H. D.; Kanatani, A.; Fukami, T.; MacNeil, D. J.; Gottesdiener, K. M.; Amatruda, J. M.; Kaufman, K. D.; Heymsfield, S. B. Cell Metabolism 2006, 4, 275.

115. Takahashi, H.; Haga, Y.; Shibata, T.; Nonoshita, K.; Sakamoto, T.; Moriya, M.; Ohe, T.; Chiba, M.; Mitobe, Y.; Kitazawa, H.; Iwaasa, H.; Ishihara, A.; Ishii, Y.; Kanatani, A.; Fukami, T. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19, 5436.

116. We examined the extent of P-gp-mediated transport by using the polarized pig kidney epithelial cell line (LLC-PK1) transfected with human P-gp cDNA (LMDR1) or mouse P-gp (mdr1a) cDNA. For the P-gp substrate, the transcellular transport of the compound in the direction of the basolateral-to-apical (B-to-A) compartment exceeds that in the opposite direction (A-to-B), since P-gp is located inside cell on the apical membrane catalyzing efflux transport of substrate from inside the cell to the apical compartment. Therefore, the value of the relative rate of polarized transport (B-to-A/A-to-B) serves as an index for the extent of P-gp substrate susceptibility in P-gp-expressing cell monolayers.

117. Yamazaki, M.; Neway, W. E.; Ohe, T.; Chen, I. W.; Rowe, J. F.; Hochman, J. H.; Chiba, M.; Lin, J. H. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001, 296, 723.

118. Burns, H. D.; Gibson, R. E.; Hamill, T. G.; Fukami, T. WO 2003010175, 2002; Chem. Abst. 2002 .138, 137598.

119. Carpenter, A. J.; Al Barazanji, K. A.; Barvian, K. K.; Bishop, M. J.; Britt, C. S.; Cooper, J. P.; Goetz, A. S.; Grizzle, M. K.; Hertzog, D. L.; Ignar, D. M.; Morgan, R. O.; Peckham, G. E.; Speake, J. D.; Swain, W. R. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 4994

120. Hertzog, D. L.; Al Barazanji, K. A.; Bigharn, E. C.; Bishop, M. J.; Britt, C. S.; Carlton, D. L.; Cooper, J. P.; Daniels, A. J.; Garrido, D. M.; Goetz, A. S.; Grizzle, M. K.; Guo, Y. C.; Handlon, A. L.; Ignar, D. M.; Morgan, R. O.; Peat, A. J.; Tavares, F. X.; Zhou, H. Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 4723
121. Kanuma, K.; Omodera, K.; Nishiguchi, M.; Funakoshi, T.; Chaki, S.; Nagase, Y.; Iida, I.; Yamaguchi, J.; Semple, G.; Tran, T. A.; Sekiguchi, Y. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 3307
122. Tavares, F. X.; Al Barazanji, K. A.; Bishop, M. J.; Britt, C. S.; Carlton, D. L.; Cooper, J. P.; Feldman, P. L.; Garrido, D. M.; Goetz, A. S.; Grizzle, M. K.; Hertzog, D. L.; Ignar, D. M.; Lang, D. G.; McIntyre, M. S.; Ott, R. J.; Peat, A. J.; Zhou, H. Q. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 7108
123. Zhang, M. Z.; Tamiya, J.; Nguyen, L.; Rowbottom, M. W.; Dyck, B.; Vickers, T. D.; Grey, J.; Schwarz, D. A.; Heise, C. E.; Haelewyn, J.; Mistry, M. S.; Goodfellow, V. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 2535.
124. For reviews on MCH 1R antagonists, please see: (a) Dyke, H. J.; Ray, N. C. *Expert Opin. Ther. Patents* 2005, 15, 1303; (b) McBriar, M. D. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 2006, 9, 496; (c) Rokosz, L. L. *Expert Opin. Drug Discov.* 2007, 2, 1301.
125. Takekawa, S.; Asami, A.; Ishihara, Y.; Terauchi, J.; Kato, K.; Shimomura, Y.; Mori, M.; Murakoshi, H.; Kato, K.; Suzuki, N.; Nishimura, O.; Fujino, M. *Eur. J. Pharmacol.* 2002, 438, 129.
126. Witty, D. R.; Bateson, J. H.; Hervieu, G. J.; Jeffrey, P.; Johnson, C. N.; Muir, A. I.; O'Hanlon, P. J.; Stemp, G.; Stevens, A. J.; Thewlis, K. M.; Wilson, S.; Winborn, K. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 4865.
127. Souers, A. J.; Gao, J.; Brune, M.; Bush, E.; Wodka, D.; Vasudevan, A.; Judd, A. S.; Mulhern, M.; Brodjian, S.; Dayton, B.; Shapiro, R.; Hernandez, L. E.; Marsh, K. C.; Sham, H. L.; Collins, C. A.; Kym, P. R. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 1318.

128. For hERG binding assay protocol, please see: Butcher, J. W.; Claremon, D. A.; Connolly, T. M.; Dean, D. C.; Karczewski, J.; Koblan, K. S.; Kostura, M. J.; Liverton, N. J.; Melillo, D. G. Radioligand and binding assay. PCT Int. Appl. WO2002005860, 2002.

論文目録

1. Identification of novel and orally active spiroindoline NPY Y5 receptor antagonists. Toshihiro Sakamoto, Minoru Moriya, Yuji Haga, Toshiyuki Takahashi, Takunobu Shibata, Osamu Okamoto, Katsumasa Nonoshita, Hidefumi Kitazawa, Masayasu Hidaka, Akira Gomori, Hisashi Iwaasa, Akane Ishihara, Akio Kanatani, Takehiro Fukami, Ying-Duo Gao, Douglas J. MacNeil, Lihu Yang. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2009), 19(6), 1564-1568.
2. Aryl urea derivatives of spiropiperidines as NPY Y5 receptor antagonists. Toshiyuki Takahashi, Yuji Haga, Toshihiro Sakamoto, Minoru Moriya, Osamu Okamoto, Katsumasa Nonoshita, Takunobu Shibata, Takuya Suga, Hirobumi Takahashi, Tomoko Hirohashi, Aya Sakuraba, Akira Gomori, Hisashi Iwaasa, Tomoyuki Ohe, Akane Ishihara, Yasuyuki Ishii, Akio Kanatani, Takehiro Fukami. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2009), 19(13), 3511-3516.
3. Discovery of trans-N-[1-(2-fluorophenyl)-3-pyrazolyl]-3-oxospiro-[6-azaisobenzofuran-1(3H),10-cyclohexane]-40-carboxamide, a potent and orally active antagonist. neuropeptide Y Y5 receptor. Yuji Haga, Toshihiro Sakamoto, Takunobu Shibata, Katsumasa Nonoshita, Makoto Ishikawa, Takuya Suga, Hirobumi Takahashi, Toshiyuki Takahashi, Hidekazu Takahashi, Makoto Ando, Takashi Murai, Akira Gomori, Zhenjun Oda, Hidefumi Kitazawa, Yuko Mitobe, Maki Kanesaka, Tomoyuki Ohe, Hisashi Iwaasa, Yasuyuki Ishii, Akane Ishihara, Akio Kanatani, Takehiro Fukami. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2009), 17(19), 6971-6982.
4. Discovery of novel phenylpyridone derivatives as potent and selective MCH1R antagonists. Yuji Haga, Sayaka Mizutani, Akira Naya, Hiroyuki Kishino, Hisashi Iwaasa, Masahiko Ito, Junko Ito, Minoru Moriya, Nagaaki Sato, Norihiro Takenaga, Akane Ishihara, Shigeru Tokita, Akio Kanatani, Norikazu Ohtake. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2011), 19(2), 883-893.

謝辞

本論文の発表機会を与えていただき、多くの有益なご助言及び御指導、御鞭撻を賜りました中部大学 分子性触媒研究センター長 総合工学研究所長 山本尚教授に深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、貴重なご助言を賜りました中部大学 工学部 応用化学科幅上茂樹教授に深く感謝いたします。

本論文審査を賜りました中部大学 工学部 応用化学科 二宮善彦教授及び名古屋大学大学院 工学研究科 有機・高分子化学専攻 石原一彰教授に心より感謝いたします。

本研究は旧万有製薬株式会社（現MSD株式会社）つくば研究所で行われてきた研究結果をまとめたものです。本研究にあたり、多くのご助言及び御指導賜りました旧つくば研究所化学研究所所長深見竹広博士に心より感謝いたします。

本研究の化合物合成にあたり、アイディアを出し合い、日々切磋琢磨して化合物合成に励んできた坂本俊浩氏、高橋敏行博士、柴田拓伸氏、野々下克昌博士、高橋博文博士、岸野博之博士、水谷清香氏、納谷朗博士、菅卓哉氏、守谷実博士、岡本収氏、広橋朋子氏、桜庭亜矢氏、石川誠氏、高橋秀和氏、安東誠氏、佐藤長明博士及び大嶽憲一博士に心より感謝いたします。化合物の生理活性の評価をはじめ、動物を用いた薬理試験及び薬効評価試験に御尽力いただきました金谷章生博士、石原あかね博士、武永敬博博士及び石井康行博士に心より感謝いたします。

最後に、医薬品開発のために共に汗を流し、研究に励んできた旧つくば研究所の皆様へ深く感謝の意を表します。

2020年3月

羽下裕二