

博 士 論 文

新規非対称型 HCV NS5A 阻害薬の開発研究

金沢大学大学院自然科学研究科
物質化学専攻

学 籍 番 号	1824022001
氏 名	中村 洋
主任指導教員名	宇梶 裕
提 出 年 月	2021 年 6 月

目次

目次

序論	-2-
第 1 章 :	-11-
第 2 章 :	-16-
第 3 章 :	-20-
総括	-26-
略号一覧	-29-
実験項	-30-
参考文献	-57-
謝辞	-59-

序章

肝臓は人間の体内で最大の臓器であり，消化管から吸収した栄養を利用しやすい形に変えたり，有害物を分解したり，体内の物質のバランスを維持したりするなど，生命維持に多くの重要な役割を担っている。肝炎は何らかの要因により肝臓に炎症が生じ，肝細胞が破壊されて肝機能が徐々に低下する疾患である。炎症が続く期間が6ヶ月以内なものを急性肝炎，それ以上の長い期間持続するものを慢性肝炎と分類され，急性期には急激に肝細胞が障害され，発熱，全身倦怠感，黄疸などの症状を起こすが，自然経過で治癒する例が多い。一方で慢性化すると，症状を認めない軽い炎症が長期間にわたり持続する場合が多く，治療せずに放置すると肝線維化が引き起こされて，肝硬変や肝細胞癌へと進展する場合がある（Figure 1）。¹⁾

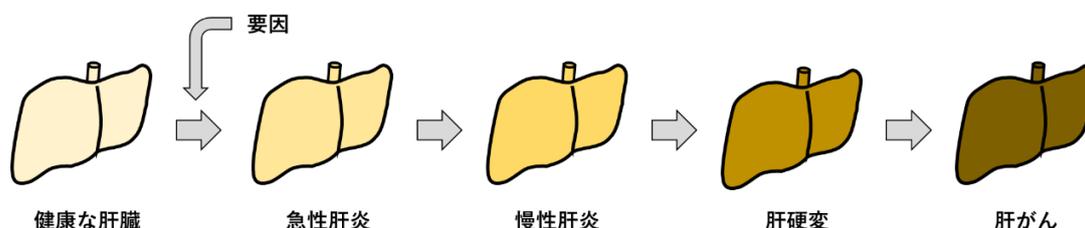


Figure 1

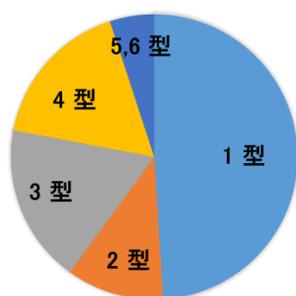
肝炎はアルコールの摂取や肥満など様々な原因で起こるが，最も多いものはウイルス感染によって肝臓に炎症が起こる「ウイルス性肝炎」である。ウイルス性肝炎の原因となるウイルスはA～E型等が知られており，いずれもウイルス感染による自己免疫反応によって肝臓の細胞が障害される。A型肝炎ウイルスは貝類や海外旅行での飲食によって感染して急性肝炎の原因になるが，ほとんどが自然治癒する。B型肝炎ウイルスは輸血や出産，性交渉などにより感染して急性肝炎となり，一部は劇症化する場合があるが，大部分は治癒する。A型およびB型肝炎は慢性肝炎となる場合が少なく，また，日本ではそれぞれのウイルスに対するワクチンが導入されているため，その感染数は減少している。D型肝炎ウイルスは，B型肝炎ウイルスを持つ人だけに感染して増殖することがわかっており，また，E型肝炎ウイルスは発展途上国に多く，D，E型共に日本における感染者はほとんどいないとされている。²⁾

一方，C型肝炎ウイルス（hepatitis C virus; HCV）は他のウイルス型よりも発見が遅く，1989年に米国のChooらによって発見され，非A非B型肝炎と診断されていた患者の90%以上，アルコール性肝障害と診断されていた患者の半数以上がHCVによる肝障害であることが明らかとなった。現在，HCV感染者は全世界で1億7,000万人，日本では100万～150万人存在すると推定されている。輸血や血液製剤，刺青により感染が拡大したことが知られて

いるが、有効なワクチンはなく、感染すると急性期で治癒するものは約 30% 程度であり、約 70% が慢性化する。慢性化した場合、ウイルスが自然排除されることはほとんどなく、HCV 感染による炎症の持続により肝硬変や肝細胞癌へと進展するため、無治療の場合には少なくとも 20%～30% が死亡すると推定されている。³⁾

Figure 2 に、世界および日本における HCV の遺伝子型の割合を示す。HCV には大きく分けると構成する塩基配列が異なる 6 つの遺伝子型が確認されている。⁴⁾ 特に感染者の半数が 1 型の遺伝子型であることが知られており、アメリカに多い 1a 型、日本の感染者の 70% を占める 1b 型といくつかのサブタイプに分類される。また、日本では 1b 型の他に 2a 型が 20%、2b 型が 10% 存在するとされており、この HCV の遺伝子型の違いによって治療効果が異なることが知られている。⁵⁾

世界の HCV 遺伝子型割合



日本の HCV 遺伝子型割合

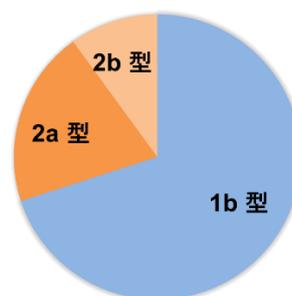


Figure 2

HCV の遺伝子構造は 1990 年に解明され、約 9,600 ヌクレオチドからなる 1 本鎖のプラス鎖 RNA から 10 種類のタンパクが産生されることがわかっている。推定されている HCV のライフサイクルを **Figure 3** に示す。⁶⁾ HCV は受容体を介して肝細胞に吸着、侵入し、ウイルス粒子よりその RNA が細胞内に放出されて翻訳され、大きな前駆体タンパクが合成される。その後、細胞およびウイルス自身がコードする酵素によって切断され、前半部からウイルス粒子を形成する構造タンパクであるコアやエンベロープ (E1 と E2) が、また、後半部からはウイルス粒子形成に関与しない一連の非構造 (non-structural = NS) タンパクが産生される。非構造タンパクは HCV ゲノムの複製に必要であり、特に NS2 タンパクはシステインプロテアーゼ (システインのチオール基を求核基として用いるタンパク質分解酵素)、NS3 はヘリケース (絡み合う核酸をほどく酵素) 活性を有するセリンプロテアーゼ (活性中心にセリン残基をもつタンパク質分解酵素)、そして NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA を鋳型に RNA を合成する酵素) として酵素活性を示すことがわかっている。その他の非構造タンパクは酵素活性がなく、その機能は明確には判明していないものの、これらのタンパクもウイルスの複製に重要な役割を果たすとされている。中でもリン酸化タンパクの NS5A は、他の非構

造タンパク及び多くの宿主タンパクと相互作用してウイルス複製複合体を構築する中心となっている。この形成されたウイルス複製複合体を介してウイルス RNA が複製され、コアタンパクおよびエンベロープタンパクとウイルス粒子を再形成し、細胞外へ放出されるものと考えられている。

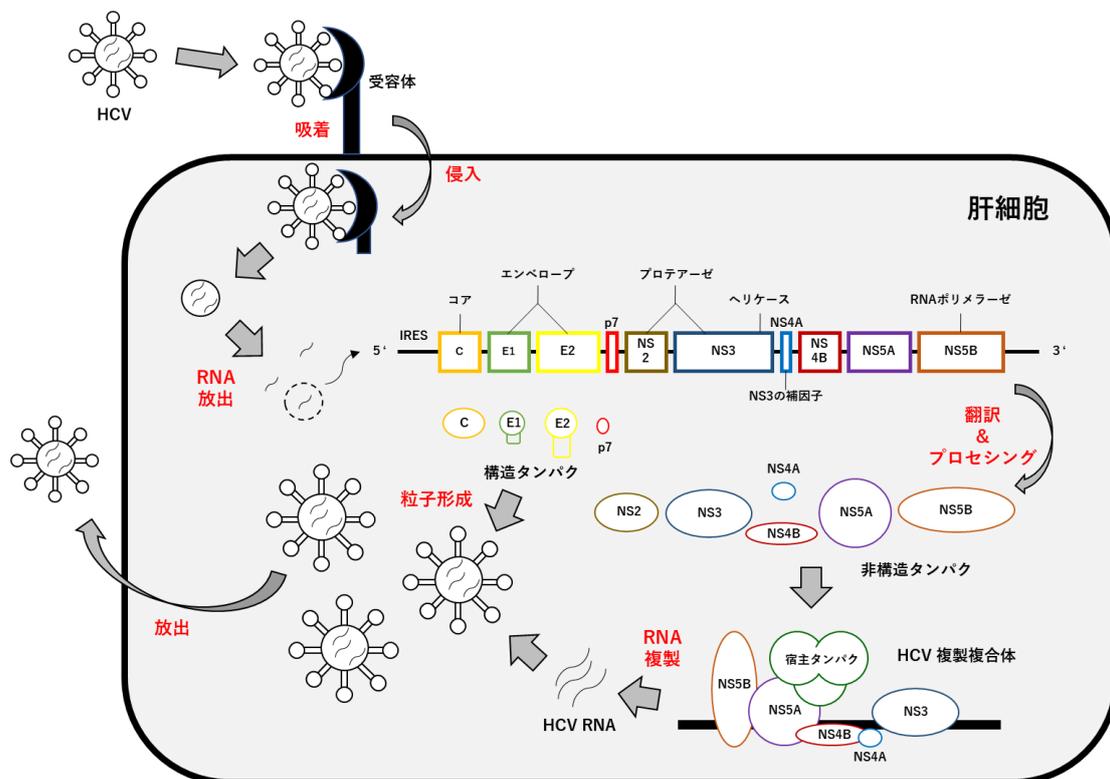


Figure 3. Overview of HCV life cycle.

C型肝炎治療ガイドラインによると、C型肝炎の治療目標は、HCV持続感染によって引き起こされる慢性肝疾患の長期予後の改善、すなわち、肝発癌ならびに肝疾患関連死を抑止することにあるとされている。³⁾ この目標を達成するためには抗ウイルス治療を行い、HCVを排除することが必要となる。初期のC型肝炎の治療は、インターフェロン(IFN)とRNAウイルスに対する抗ウイルス作用を有するribavirinとの併用療法が中心であった。⁷⁾ IFNは、体内で異物の侵入に反応して細胞が分泌するタンパク質の一つであり、免疫系および炎症の調節などの働きを担う。⁸⁾ IFNが細胞に作用すると、ウイルス遺伝子を切断する物質やウイルスのタンパク生成を妨げる物質が作り出され、ウイルス増殖の阻止や細胞増殖の抑制等の効果を示す。この人間が持ち合わせているIFNを人工的に生産して体外から注射によって補うのが、IFN療法である。医薬品として用いられているIFNは、遺伝子操作された細菌や培養細胞により大量生産されており、B型肝炎やC型肝炎などのウイルス性肝炎の他、いくつかの腫瘍の治療や白血病の治療に用いられている。現在は血液の中に長居させるために、従来のIFNにポリエチレングリコール(PEG)を結合させたPEG-IFNが主流として使用されている。一方、ribavirin (Figure

4) は 1972 年に開発されたヌクレオシドのグアノシンアナログの医薬品で、ウイルスの複製に必須の RNA 合成を妨害すること知られているが、正確な機序は判っていない。⁹⁾ 1990 年代に HCV に有効であることがわかり、その治療薬として実用化された。この IFN と ribavirin の 48 週間の併用療法において 45~50% の著効が得られるようになったが、治療が無効な患者も多く、また、強い副作用を伴う問題があった。投与された IFN の急激な増加に体が対応できず、発熱と全身倦怠感ほぼ全例に発症し、頭痛、筋肉痛、食欲不振なども高率で現れ、なかには白血球や血小板の著しい減少、糖尿病の悪化、重いうつ症状、甲状腺の異常、間質性肺炎など重度の副作用が現れることもあり、その場合は治療が中止される。また、併用される ribavirin にも貧血の副作用が全例にみられ、まれに溶血性貧血と呼ばれる赤血球が破壊される重度の貧血もみられることもある。以上のように、IFN と ribavirin の併用療法には著効率や副作用の面で課題が残るため、より効果が高く副作用の少ない薬剤の開発が期待されていた。



Figure 4

初期の HCV 研究において、効率の良いウイルス培養系が存在しないことが治療薬開発の妨げになってきたが、1990 年後半に培養細胞内で HCV の増殖複製が簡単に再現できる HCV レプリコンシステムが報告された (Figure 5)。^{6) 10)} HCV レプリコン RNA は、効率的に複製するように人工的に遺伝子操作された HCV RNA であり、HCV の構造領域がネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^R) とその下流に脳心筋炎ウイルス (EMCV) の internal ribosomal entry site (IRES) で置換した構造となっている。HCV レプリコンシステムは、HCV レプリコン RNA をヒト肝細胞癌細胞株 HuH-7 に導入して培養することで、レプリコン RNA が効率よく複製する細胞のみが増殖する細胞系である。この HCV 増殖複製システムを利用した細胞評価系の利用により、薬剤の評価が可能となり、HCV タンパクを標的とした様々な作用メカニズムの薬剤開発が盛んに進められるようになった。

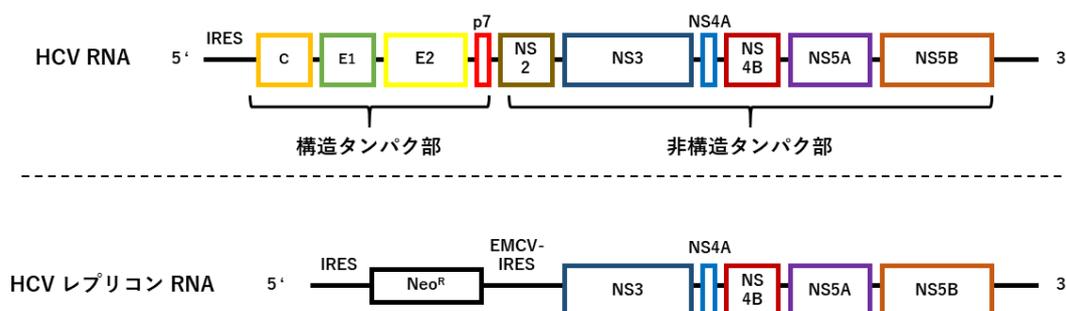


Figure 5

HCV タンパクを標的として最初に開発されたのは、HCV NS3/4 阻害薬である。HCV NS3/4 阻害薬は、NS3 タンパクのプロテアーゼ活性を示す酵素活性部位にて基質結合部を化合物が競合的に結合することで、ウイルスのライフサイクルの中の HCV タンパクを切断する過程を阻害し、ウイルスの複製に必要な NS タンパクの生成を抑える薬剤である (Figure 6)。¹¹⁾ HCV NS3/4 プロテアーゼ阻害薬として最初に開発された telaprevir と boceprevir は、抗ウイルス効果を有していたものの、貧血や重篤な皮膚病変の出現などのさまざまな副作用を伴い、患者への負担が大きい薬剤であった。

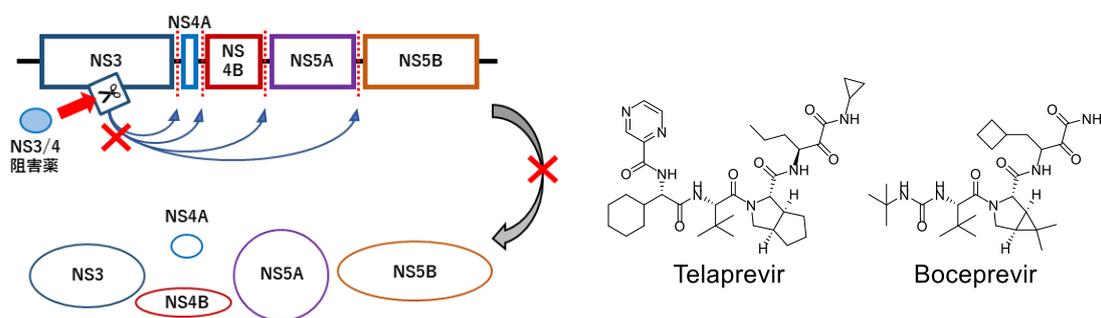


Figure 6

また、HCV NS3/4 阻害薬と平行して開発が進められた HCV NS5B 阻害薬は、HCV RNA を合成する NS5B タンパクのポリメラーゼ活性を阻害し、HCV RNA の複製を直接抑える薬剤である (Figure 7)。HCV NS5B 阻害薬は、HCV RNA 複製の際にウイルス遺伝子に取り込まれて阻害する核酸型 NS5B ポリメラーゼ阻害薬と、NS5B ポリメラーゼの触媒ドメインに結合して酵素活性を阻害する非核酸型 NS5B ポリメラーゼ阻害薬の 2 つに分類される。¹²⁾ HCV NS5B 阻害薬の多くは有効性や副作用の面で開発中止に追い込まれたが、2013 年に承認された核酸型 NS5B 阻害薬である sofosbuvir は、副作用も少なく高い効果を示したことから HCV 治療に大きな進展を与える薬剤となった。¹³⁾ しかしながら、薬剤耐性株の出現のリスクもあり、発売当初は IFN/ribavirin との併用療法が標準とされ、副作用の面で課題が残った。

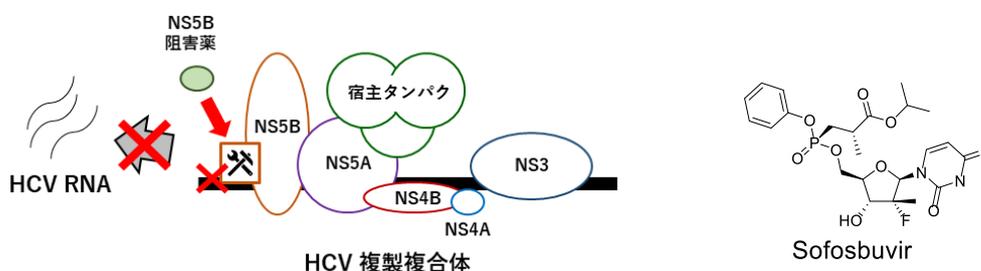


Figure 7

一方、NS5A をターゲットとした阻害薬は、その機能が明確に判明していないことや NS3/4 や NS5B のようにタンパク自身が酵素活性を持たないこと

から、NS3/4 や NS5B よりも阻害薬の開発研究は遅れていた。このような状況の中で、2008年に Bristol-Myers Squibb (BMS) から HCV NS5A 阻害薬である daclatasvir の第 I 相の臨床結果が報告された。¹⁴⁾ この化合物は、HCV レプリコン細胞において pM オーダーの常に強力なウイルス RNA 複製阻害活性を示し、また、臨床試験において、単剤の一回投与で他のメカニズムの薬剤より HCV RNA 量を劇的に低下させた。当時、daclatasvir の構造は明らかにされていなかったが、同時期に公開された物質特許から中央部分にビフェニル構造を有し、その左右にイミダゾール-ピロリジン-アミノ酸構造を持つ分子サイズの大きい対称型化合物であることが推測された (Figure 8)。¹⁵⁾ NS5A は複製複合体を構築する際に 2 量体を形成することがわかっており¹⁶⁾、daclatasvir はこの NS5A の 2 量体に結合することで複製複合体の構築を阻害し、ウイルス RNA の複製を抑制すると考えられている。この BMS 社の非常にインパクトの大きい臨床報告を受け、我々も含めて多くの競合他社にて NS5A をターゲットとした治療薬の開発研究が盛んに行われるようになった。しかしながら、強力な抗ウイルス作用を示した daclatasvir においても、他のメカニズムの薬剤と同様、単剤のみでは短期間に薬剤耐性株が出現することがわかった。¹⁷⁾ 現在の治療法は、ウイルス活性を完全に抑え込むために NS5A 阻害薬を含め、NS3/4 阻害薬や NS5B 阻害薬の異なるメカニズムの薬剤を複数用いる併用療法が主流になっている。

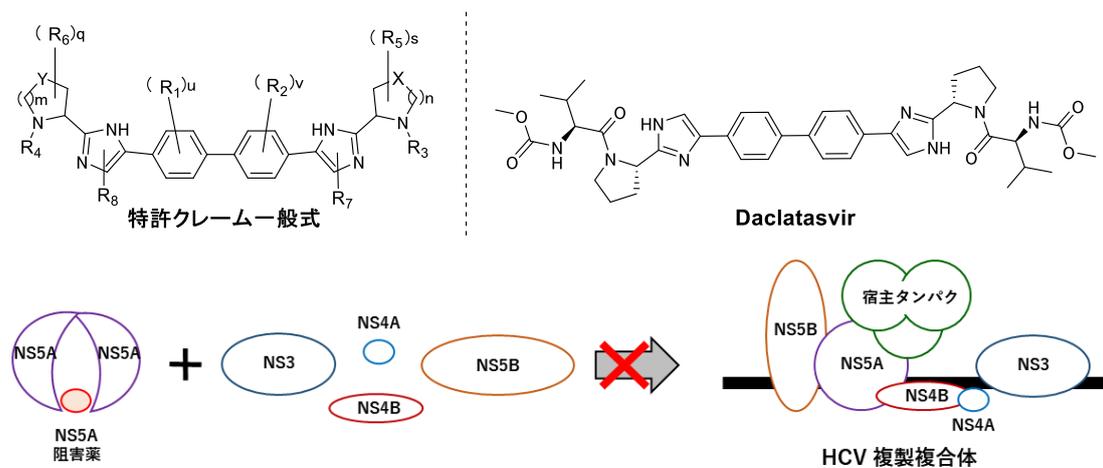


Figure 8

Figure 9 に現在承認されている代表的な HCV NS5A 阻害薬の構造を示す。¹⁸⁾ これら阻害薬は daclatasvir を基にして開発研究が行われたと考えられ、すべての化合物に高い対称性や両側末端にあるメチルカーバメート基が存在するなど、共通の構造特性を持っている。そのため、構造類似性によってこれらの阻害薬は同様の薬剤性質を示すことを予想された。実際、構造的に特徴のある pibrentasvir を除き、多く阻害薬が共通した抗ウイルス作用と交差耐性を示すことが報告されている。^{17), 19)-22)} そこで、これまでの対称型阻害薬が持たないユニークな置換基を有する阻害薬を創出できれば、これまでと異なる抗ウイルス作用を示す次世代の阻害薬となると考え、新規 NS5A 阻害

薬の創製を目指し、研究を開始した。

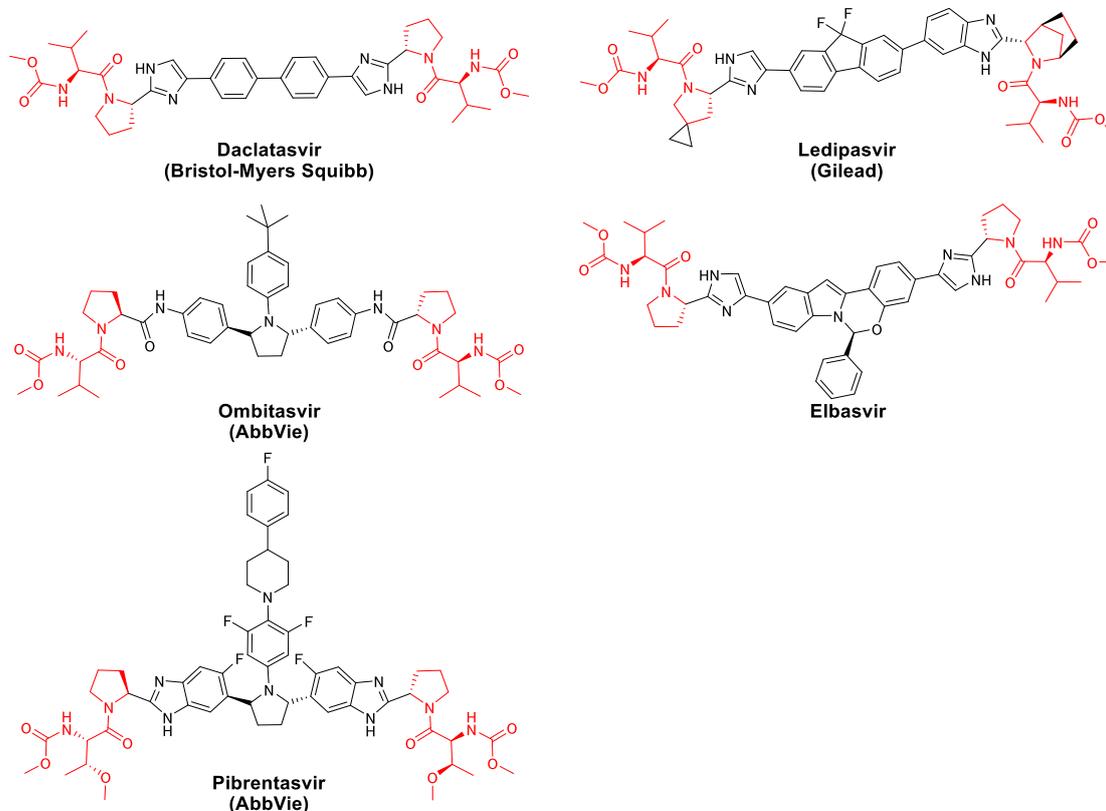


Figure 9. HCV NS5A inhibitors on market.

しかし、既知の対称型 NS5A 阻害薬へ置換基を導入した場合、分子量が非常に大きくなることが予想され、経口投与可能な薬剤を目指す上で薬物動態学的に問題を引き起こす可能性が大きいと予想された。そこで本研究では、分子サイズを抑えるために、既知の対称型阻害薬からダウンサイズして最小活性発現構造を見出した後、既知の阻害薬と異なる形へ変換する方針で検討を行った (**Figure 10**)。研究当初、daclatasvirをはじめ他社開発化合物の具体的な構造が明らかになっていなかったため、基準となる対称型化合物の設定にあたっては、BMS 社の物質特許情報¹⁵⁾を解析し、その特許記載の化合物から選択することにした。その選択にあたり、強力な抗ウイルス作用を示すこと、また、末端部分から先へ置換基導入が容易であり、且つ、元の相互作用部への影響が少ないことを考慮した。解析の結果、D-フェニルグリシンの導入によって阻害活性が向上した例が BMS 社より報告²³⁾されていることから、D-フェニルグリシン基を有する対称型化合物を基準化合物として設定した。

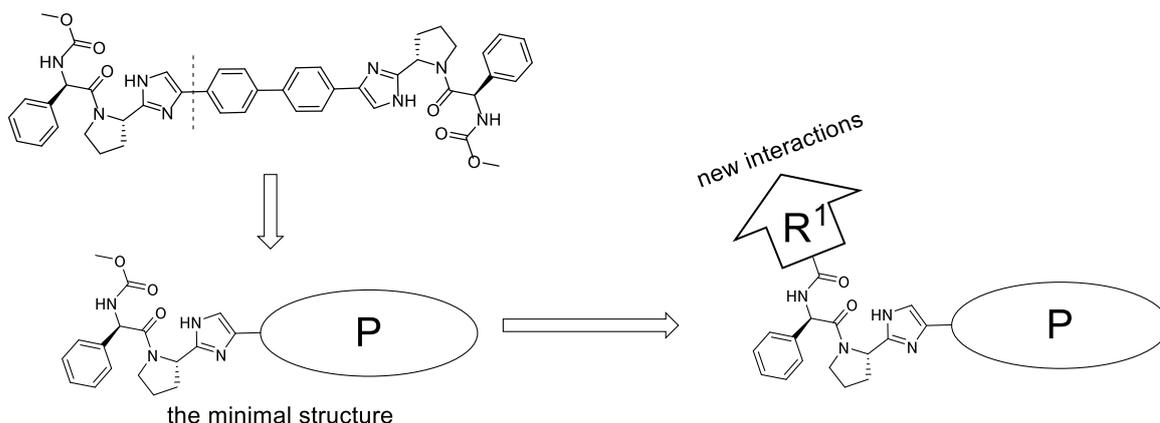


Figure 10. Strategy for discovery of a novel structural class of HCV NS5A inhibitors.

設定した基準の対称型化合物から分子サイズが低減したリード化合物の創出を目指し、ダウンサイズした各化合物の合成およびその薬理評価を実施した。その結果、1a および 1b 型レプリコン阻害活性を示す非対称型リード化合物を見出した。詳細を第 1 章で述べる (**Figure 11**)。

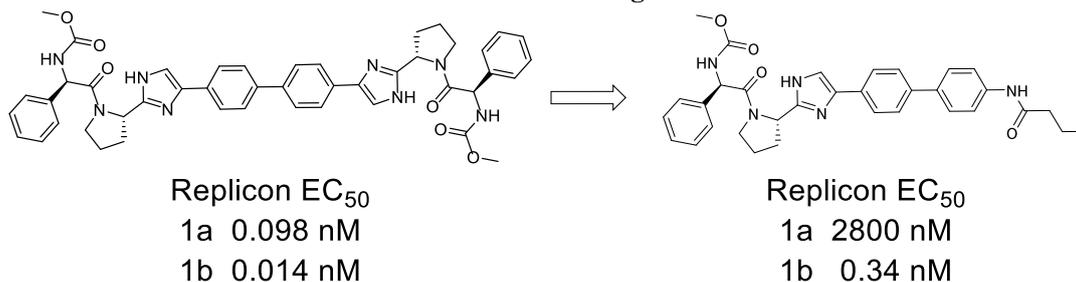


Figure 11

次に見出したリード化合物をもとに、NS5A タンパクとの新しい相互作用の獲得を目指し、末端カーバメート部分の先を変換した各化合物の合成およびその薬理評価を実施した。その結果、既知の対称型阻害薬が持たないユニークな構造によって、大きく阻害活性が向上する新規知見を得た。詳細を第 2 章で述べる (**Figure 12**)。

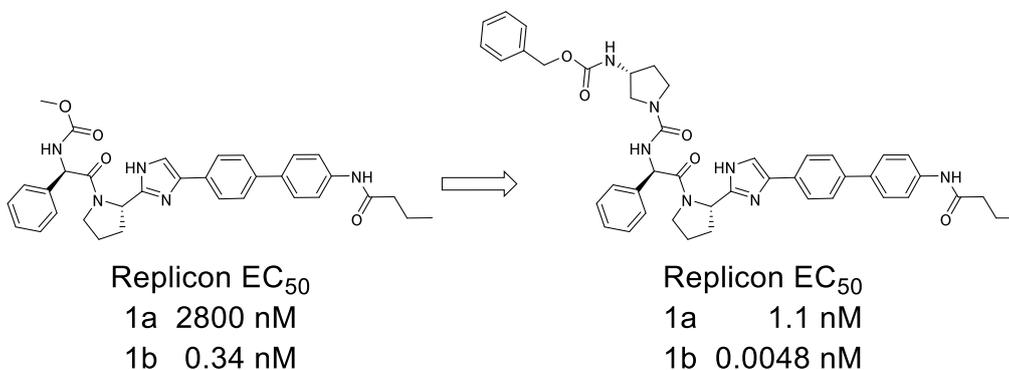


Figure 12

次にこの見出した新規知見を利用して、強力な抗ウイルス作用を有する新規 NS5A 阻害薬の創製を目指し、ブタン酸アミドの脂溶性部分の構造最適化を実施した。この詳細を第 3 章で述べる (Figure 13)。

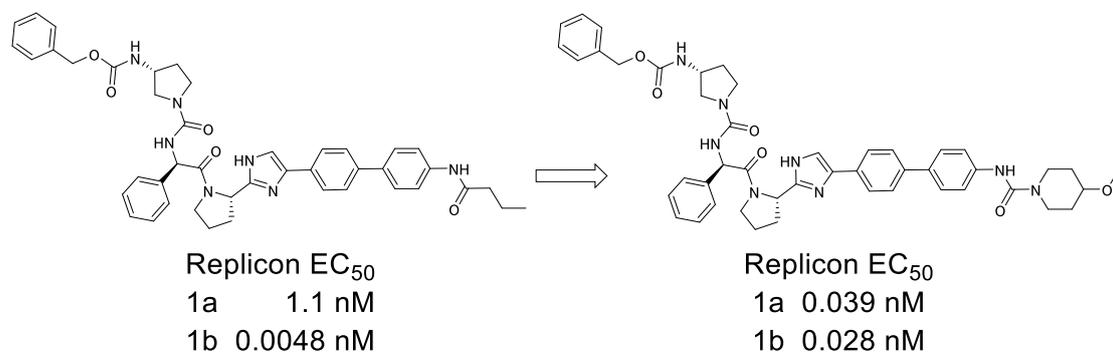


Figure 13

第1章

第1章 分子サイズが低減した非対称型リード化合物の設定

序章で述べたように、新規非対称型 NS5A 阻害薬の創製を目指した最初のステップとして、本研究では既知の対称型阻害薬から分子サイズが低減したリード化合物を見出すために検討を実施した。基準とする対称型化合物を選抜するにあたり、BMS 社の物質特許情報を解析し、強力な抗ウイルス作用を示すこと、末端部分から先へ置換基導入が容易であり、且つ、元の相互作用部への影響が少ないことを考慮し、D-フェニルグリシン基を有する対称型化合物 **1** を基準化合物として設定した。この化合物 **1** の薬理活性を確認するため、文献記載の方法により化合物 **1** を合成した。²³⁾ 次に、この化合物 **1** の最小活性発現構造を確認するため、ビフェニル部分から先を除去した化合物 **2** および無置換のビフェニルを残した化合物 **3** をデザインし、合成検討を実施した (Figure 1-1)。

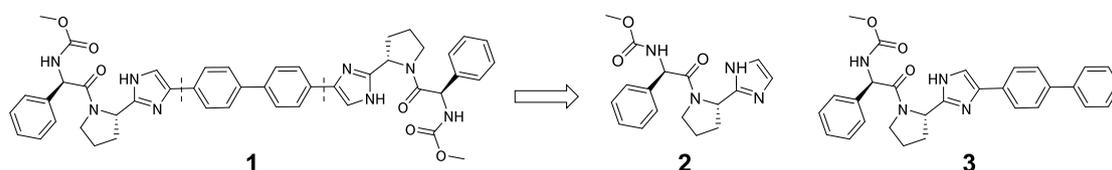
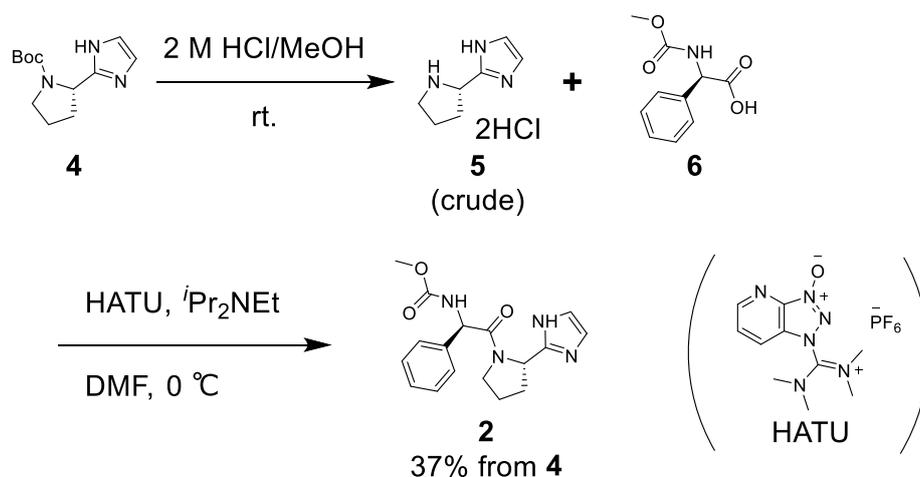


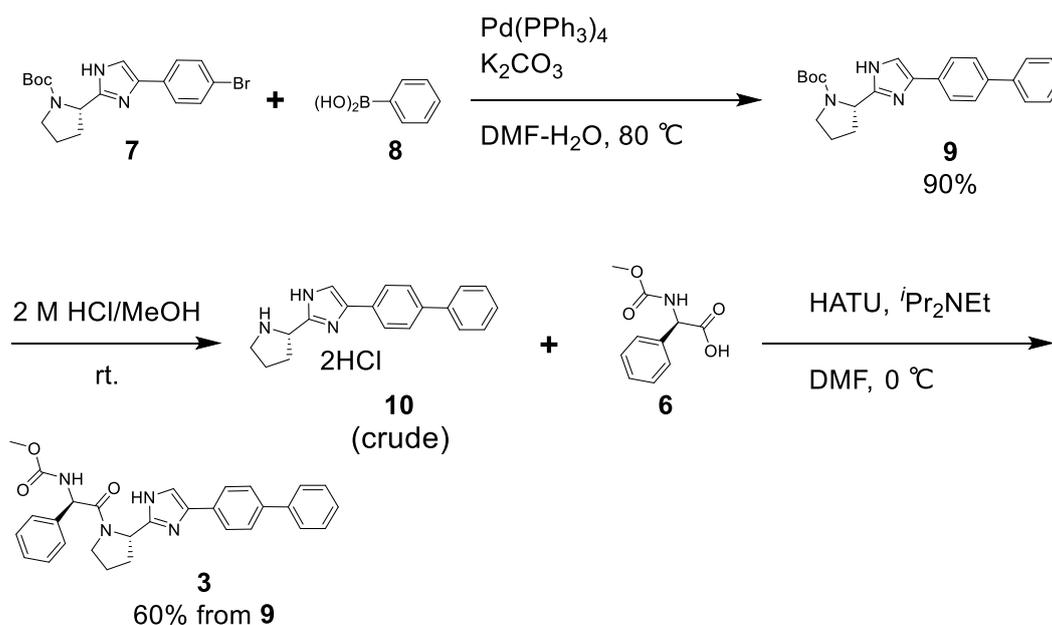
Figure 1-1

化合物 **2** の合成法を Scheme 1-1 に示す。市販の光学活性 (*N*-Boc-ピロリジン) イミダゾール (**4**) を出発物質とし、Boc 基を塩化水素メタノール溶液により脱保護してアミン誘導体 **5** の塩酸塩を粗生成物として得た後、市販の D-フェニルグリシン誘導体 **6** と HATU を用いて縮合することで化合物 **2** を合成した。



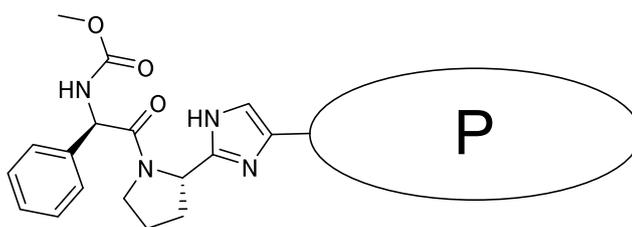
Scheme 1-1

次に、化合物 **3** の合成法を **Scheme 1-2** に示す。まず、市販の光学活性イミダゾール誘導体 **7** を出発物質とし、フェニルボロン酸 (**8**) との Pd(PPh₃)₄ を用いた鈴木宮浦クロスカップリング反応によりビフェニル化合物 **9** を合成した。化合物 **9** の Boc 基を脱保護してアミン誘導体 **10** の塩酸塩を粗生成物として得た後、D-フェニルグリシン誘導体 **6** と HATU を用いて縮合することで化合物 **3** を合成した。



Scheme 1-2

合成した各化合物の抗ウイルス作用は、全世界での HCV 患者数の最も多い 1a 型と日本の感染者の 70%を占める 1b 型の Huh7 細胞を用いたレプリコンアッセイにて行った。評価結果を **Table 1-1** に示す。まず化合物 **1** は報告の通り、1a 型および 1b 型ともに強力な抗ウイルス作用を示した。しかしながら、部分構造を大きく削除した化合物 **2** は、1a 型および 1b 型共にレプリコン阻害活性を示さなかった。一方で、無置換のビフェニルを残した化合物 **3** は、1a 型に対して弱いながらも EC₅₀ が 2800 nM, 1b 型に対しては 57 nM の阻害活性を示した。この結果より、対称型阻害薬 **1** の最小活性発現構造としてビフェニルまで構造が重要であることがわかった。



Compound	P	MW	Replicon EC ₅₀ (nM)	
			1a	1b
1		806	0.098	0.014
2	*-H	328	> 10000	> 10000
3		480	2800	57

Table 1-1. Molecular weight and inhibitory activities of compounds 1-3

一方で化合物 **1** との比較から、イミダゾール部分も活性向上には重要な部分構造であると考察した。そこで、より高い抗ウイルス作用を示すリード化合物を創出するため、ピロリジン-イミダゾール部分を単純な構造へ模倣した化合物を探索した。一般的に、イミダゾール内の NH はプロトドナー、アゾの N はプロトンアクセプターとして機能することが知られており、その機能によりアミドの代替構造として使われることがある。そこで、化合物 **1** のイミダゾールをアミド構造へ、また、アミドの先にピロリジン部分の脂溶性部分を単純な炭素鎖に代替した化合物 **11** をデザインし、その合成を実施した (**Figure 1-2**)。

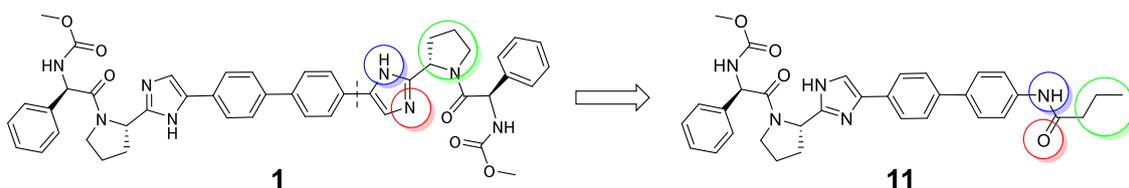
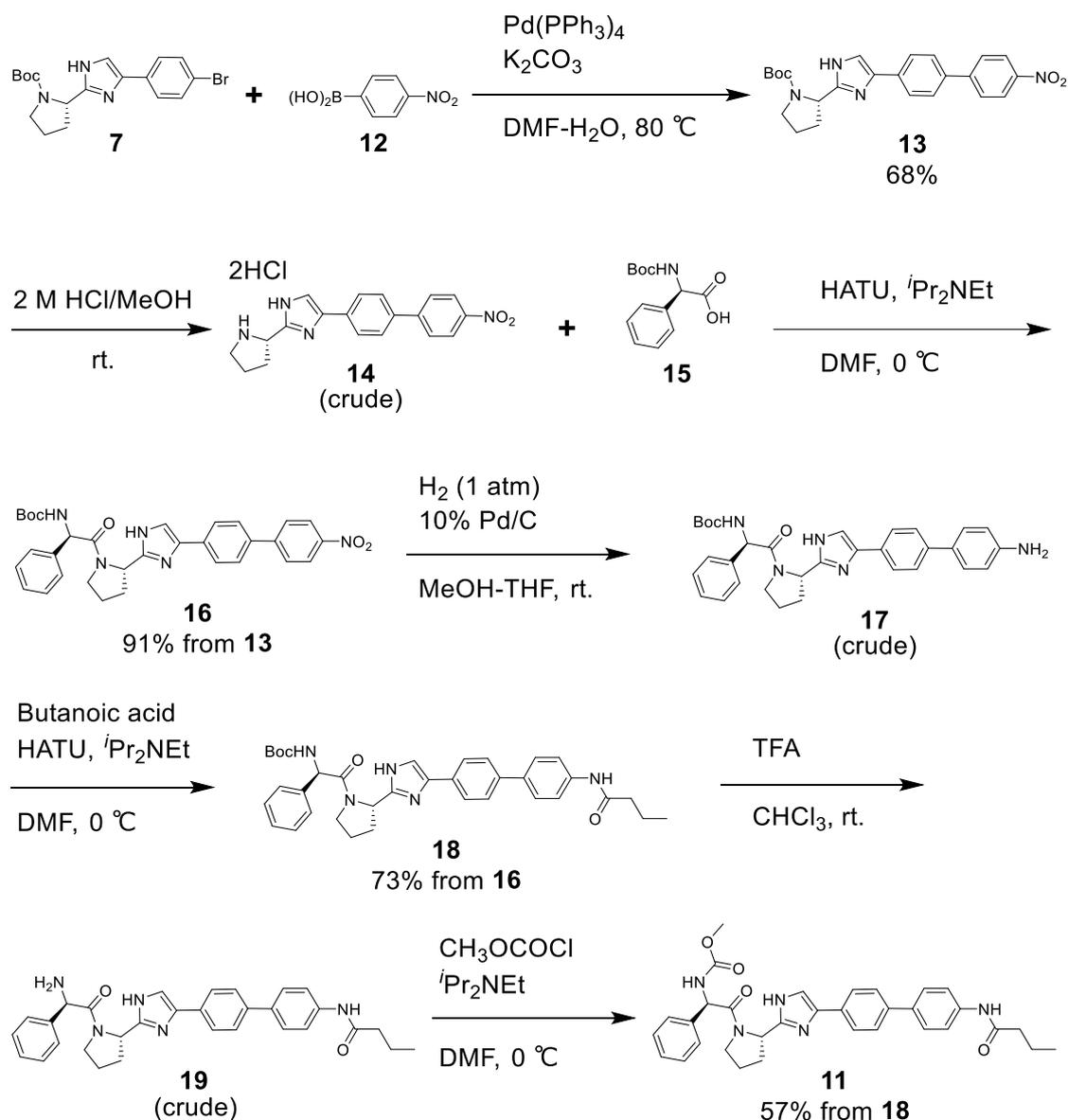


Figure 1-2

化合物 **11** の合成法を **Scheme 1-3** に示す。化合物 **3** の合成法に従い、市販のイミダゾール誘導体 **7** を出発物質とし、4-ニトロフェニルボロン酸 (**12**)

と鈴木宮浦クロスカップリング反応によりニトロビフェニル誘導体 **13** を合成した。化合物 **13** の Boc 基を脱保護してアミン誘導体 **14** の塩酸塩を粗生成物として得た後、*N*-Boc-D-フェニルグリシン (**15**) との HATU を用いた縮合により化合物 **16** を合成した。化合物 **16** のニトロ基を水素添加により還元して粗生成物として得られたアニリン誘導体 **17** を、ブタン酸と HATU を用いて縮合することでアミド化合物 **18** を合成した。化合物 **18** の Boc 基を TFA にて脱保護してアミン誘導体 **19** を粗生成物として得た後、クロロギ酸メチルを作用させることで目的の化合物 **11** を合成した。

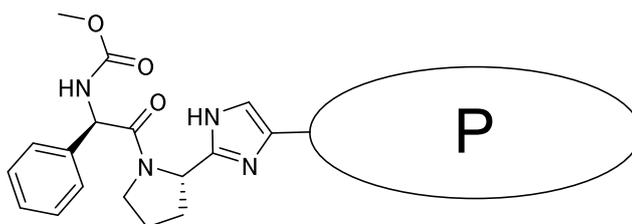


Scheme 1-3

化合物 **11** のレプリコンアッセイの評価結果を **Table 1-2** に示す。結果、**1b** 型のレプリコン阻害活性の向上が見られたが、**1a** 型の阻害活性は変化がなか

第1章

った。遺伝子型間で阻害活性の差が認められた結果から、化合物のアミド部分が位置する HCV タンパクのサイトに 1a 型と 1b 型の遺伝子型で違いがあることが推察された。この化合物は 1a 型に対してそれほど強い阻害作用は示さなかったものの、対称型化合物 **1** と比較して分子サイズが小さく、1b 型は化合物 **1** と同程度の強い阻害活性を示したことから、化合物 **11** をリード化合物として設定することにした。



Compound	P	MW	Replicon EC ₅₀ (nM)	
			1a	1b
1		806	0.098	0.014
3		480	2800	57
11		565	2800	0.34

Table1-2. Molecular weight and inhibitory activities of compounds **1**, **3**, **11**

第2章 NS5A タンパクと新規相互作用の獲得を目指した合成研究

前章で述べたように、既存の対称型阻害薬 **1** から変換を実施し、分子サイズが低減した非対称型リード化合物 **11** を見出した。このリード化合物 **11** から NS5A タンパクの新規相互作用の獲得を目指す方針として、既存の NS5A 阻害薬の開発研究であまり変換例がないフェニルグリシン部分の末端メチルカーバメートの先 (R^1 部位) への伸長を試みることにした (**Figure 2-1**)。

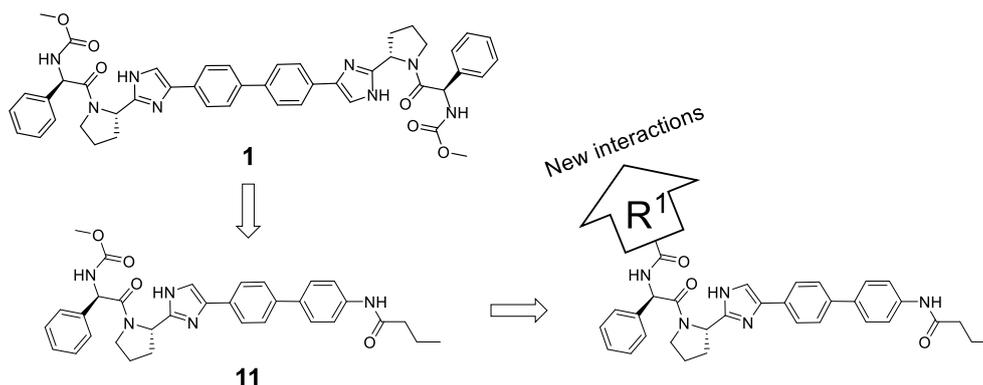
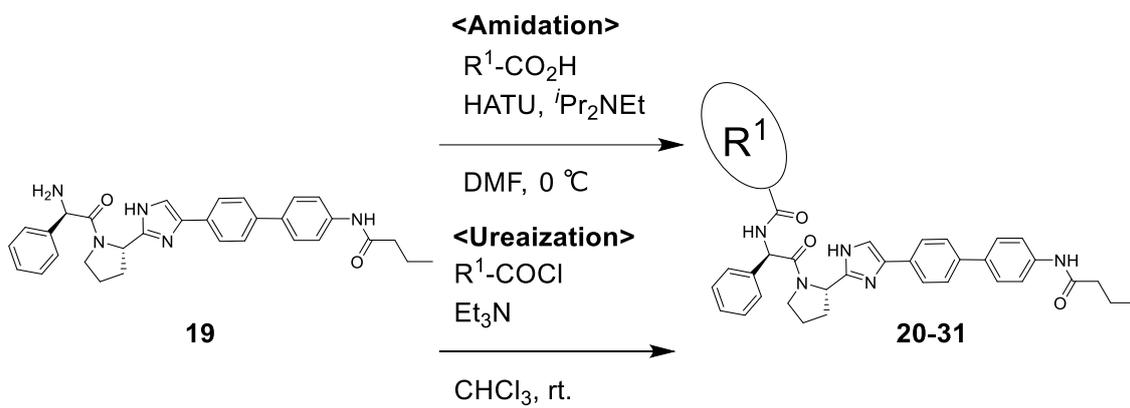
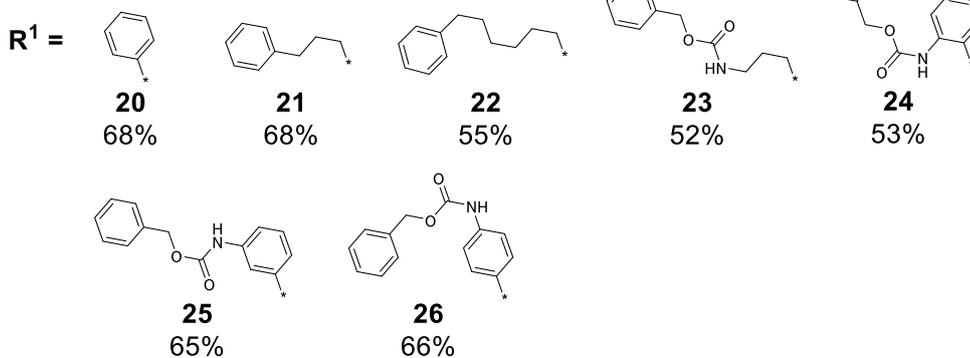


Figure 2-1

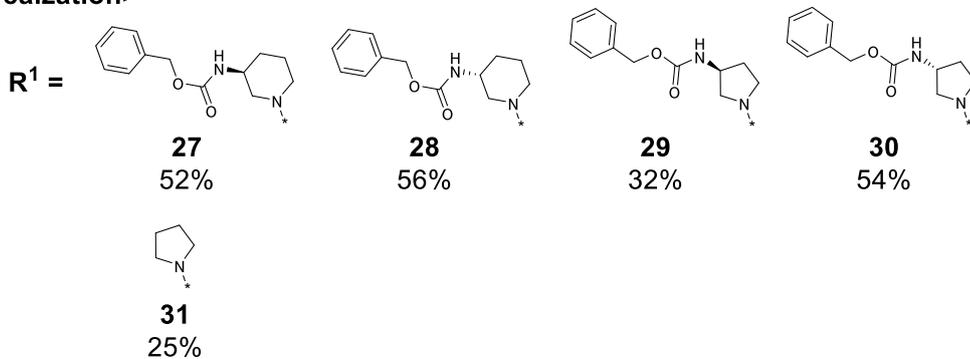
リード化合物 **11** のメチルカーバメート部分を変換した化合物群の一般的合成法を **Scheme 2-1** に示す。合成戦略として、異なる構造を有する多数の化合物を効率よく合成するため、リード化合物の合成中間体 **19** からアミド化およびウレア化により合成した。アミド化合物 **20**~**26** は市販の各カルボン酸と HATU を用いた縮合により、また、ウレア化合物 **27**~**31** はカルバモイルクロリドとの縮合により合成した。



<Amidation>

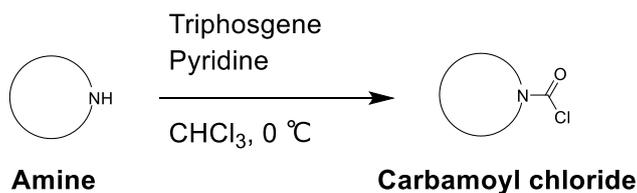


<Ureaization>



Scheme 2-1

なお、反応に用いたカルバモイルクロリドは市販の各アミンとトリホスゲンから合成し、粗生成物として反応に用いた (Scheme 2-2)。



Scheme 2-2

合成した化合物の抗ウイルス作用を **Table 2** に示す。まず化合物 **20, 21, 22** の評価結果から、大きな脂溶性基を含めてすべて化合物 **11** と同等以上の 1a 型阻害活性を示した。このことから、この部位が位置する HCV タンパクのサイトは比較的広い空間があることが推察された。これら化合物のうち、化合物 **22** はリード化合物と比較して 1a 型阻害活性が 5 倍向上したことから、この置換基は弱いながらも標的タンパクと相互作用していることが考えられた。そこで、この化合物をもとに直鎖炭素鎖の一部を別構造へ変換した。その結果、カーバメートに置き換えた化合物 **23** がリード化合物 **11** から 1a 型阻害活性が 50 倍向上した。この阻害活性が向上した理由は、自由度が高い炭素直鎖がカーバメートへ変換されたことでコンホメーションが固定され、末端ベンゼン環が適当な位置へ配置されたため、或は、新たに導入したカーバメート基の官能基が HCV 蛋白質と極性相互作用を獲得したためと推測した。そこで、更に強固にコンホメーションを固定することで阻害活性が向上するのではないかと考え、化合物 **23** のエチレン鎖をベンゼン環に置換した化合物 (**24, 25, 26**) をデザインし、合成した。しかし、メタ位に置換した化合物 **25** のみが同程度の阻害活性を示したのみで、それ以外は阻害活性が減弱した。この結果は、ベンジルカーバメート基が不適切な位置で固定化されて相互作用が獲得できなくなったため、化合物 **24, 26** の阻害活性が減弱したと考えられる。化合物 **25** は化合物 **23** と同程度の作用を示したことから、メタ位方向に相互作用する箇所があることが推測された。そこでメタ位方向に重点を置き、ベンジルカーバメート基の位置を調整するため、ベンゼン環を各種飽和環へ変換した。その結果、6 員環のピペリジン環を有する化合物 **27** および **28** は共に活性が減弱したものの、5 員環の (*R*)-3-置換ピロリジン環を有する化合物 **30** がリード化合物 **11** と比較し、1a 型は 2500 倍、1b 型は 70 倍の阻害活性を示した。一方、化合物 **30** の (*S*)-異性体である化合物 **29** は化合物 **30** と比較して 70 倍 1a 型阻害活性が低かった。化合物 **30** の大幅な活性向上の要因を考察するために、ベンジルカーバメート基を除去した化合物 **31** を合成し、抗ウイルス作用を比較した。予想通り 1a 型および 1b 型ともに阻害活性が大幅に減弱したことから、化合物 **30** の強力な阻害活性は HCV タンパクとの新たに得られた相互作用、すなわち、ベンジルカルバメート部分の相互作用に起因していることが示唆された。フェニルグリシン部分の末端メチルカーバメートの先 (R^1 部位) の変換によって阻害活性が大きく向上するという結果はこれまでに報告例がなく、新規阻害薬を創出するための重要な知見であることが言える。

The core molecule consists of a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a propylamide group (-NH-CH2-CH2-CH3). The other nitrogen is substituted with a 4-phenylphenyl group. The 2-position of the benzimidazole is substituted with a 1-phenylpyrrolidine-2-carbonyl group. The R¹ group is attached to the carbonyl carbon of this group.

Comp.	R ¹	Replicon EC ₅₀ (nM)		Comp.	R ¹	Replicon EC ₅₀ (nM)	
		1a	1b			1a	1b
11		2800	0.34	26		131	N/A
20		2400	N/A	27		247	N/A
21		1300	N/A	28		100	0.023
22		642	N/A	29		82	0.037
23		56	0.15	30		1.1	0.0048
24		614	N/A	31		353	N/A
25		44	0.076				

Table 2. Inhibitory activities of compounds 20–31

第3章 ブタン酸アミド部分の構造最適化による新規 HCV NS5 阻害薬の創出

前節に述べたように、リード化合物 **11** からフェニルグリシン部分の末端メチルカーバメートの先の変換を実施した結果、NS5A タンパクと新しい相互作用を獲得することに成功した。一方で、合成した中で最も抗ウイルス作用した化合物 **30** は、**1b** 型に関しては対称型阻害薬 **1** と同程度の阻害活性を示したものの、**1a** 型は **1b** 型の阻害活性に比べて 10 倍以上弱いものであった。そこで、**1a** 型の更なる抗ウイルス作用の向上を目指して検討を実施した。この課題の達成に向け、新しい基準化合物として検討中に見出した化合物 **23** を選択し、本研究で見出したフェニルグリシンアミド側の構造を固定し、リード化合物探索時に仮置いたブタン酸アミドの脂溶性部分の変換を実施した (**Figure 3-1**)。

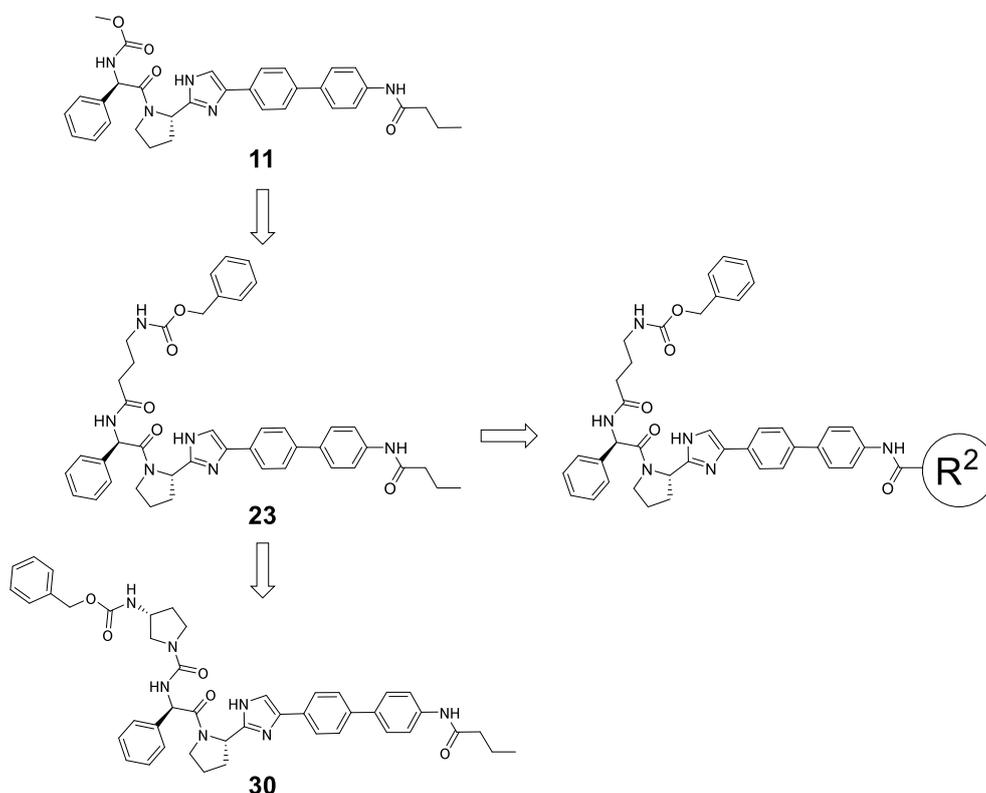
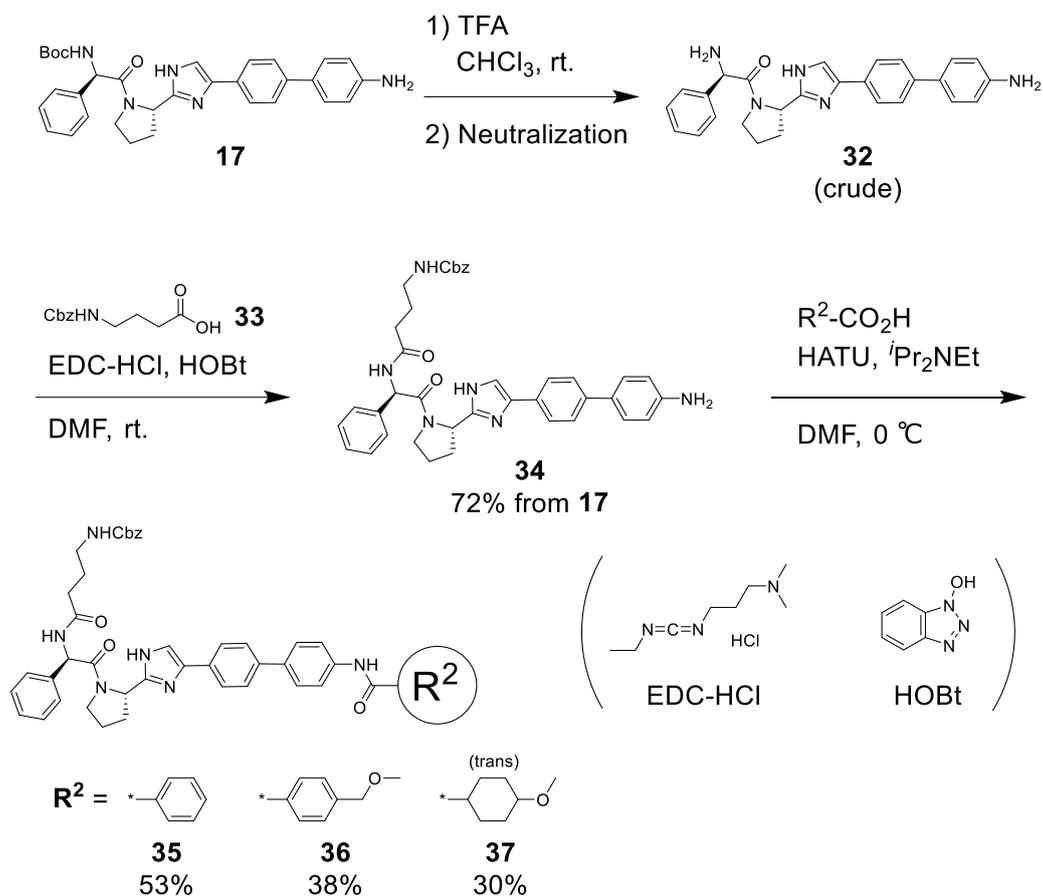


Figure 3-1

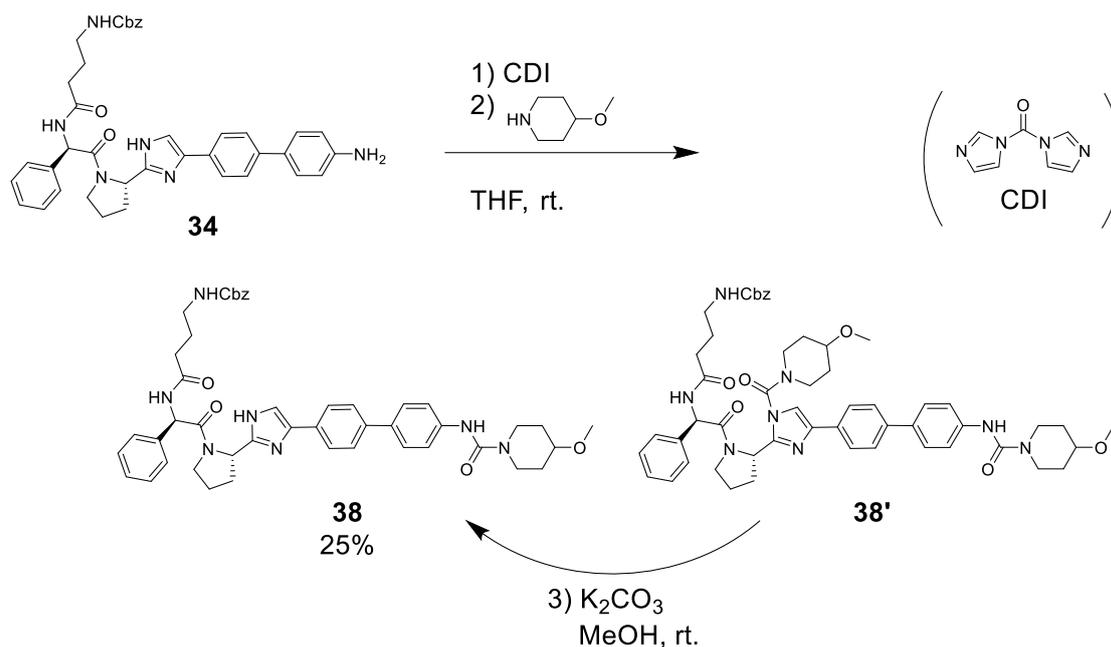
評価に用いた各化合物の合成法を **Scheme 3-1** に示す。合成戦略として、リード化合物 **11** の合成法を基に、各化合物が効率よく合成できるように合成ルートを構築した。まず、リード化合物 **11** の合成中間体 **17** から TFA を用いて脱 Boc 化し、ジアミン誘導体 **32** を得た。化合物 **32** のフェニルグリシン部のアミノ基とピフェニル部のアミノ基の反応性の差を利用して、選択的縮合反応を試みた。これまで縮合に使用してきた HATU は高い反応性を有してお

り，選択性の低下が懸念された。そこで HATU よりも反応性が低い EDC·HCl を用いてカルボン酸 **33** とフェニルグリシン部のアミノ基と選択的縮合反応を実施した。その結果，選択的に反応が進行し，目的のアミドアニリン化合物 **34** を合成できた。引き続き，化合物 **34** から市販の各カルボン酸と HATU を用いた縮合によりアミド化合物 **35**, **36**, **37** を合成した。



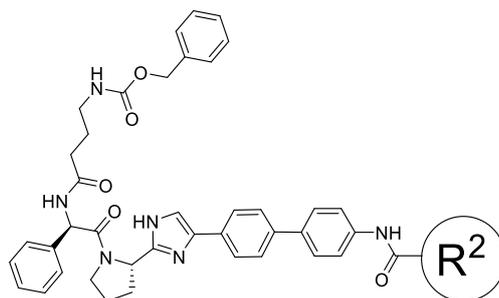
Scheme 3-1

ウレア化合物 **38** は，化合物 **34** と CDI との反応で生成する活性中間体に 4-メトキシピペリジンと反応させることにより合成した (**Scheme 3-2**)。一部イミダゾールにも反応した副生成物 **38'** が生成したが，反応系内へ炭酸カリウムおよびメタノールを添加することで **38** へ誘導することができた。



Scheme 3-2

合成した化合物の抗ウイルス作用を **Table 3-1** に示す。化合物 **23** のブタン酸アミド部分を安息香酸アミドに置換した化合物 **35** は、**1a** 型に対する阻害活性が 8 倍向上したが、**1a** 型に対しては 2 倍程度だった。一方、この安息香酸アミドを含め、シクロヘキサンアミド、ピペリジンウレアの 4 位にメトキシメチル基やメトキシ基を導入した化合物 **36**, **37**, **38** は有意に **1a** 型の阻害活性が向上し、中でも化合物 **38** が最も強力な **1a** 型阻害活性を示した。これらの結果は、ベンゼン環、シクロヘキサン環およびピペリジン環それぞれの 4 位の置換基が **1a** 型に対して強力な阻害活性を示すために重要であることを示唆している。一方で、4 位の置換基によって **1a** 型と **1b** 型の阻害活性の動きに差が見られ、**1a** 型と **1b** 型間の遺伝子型に対する置換基の効果が異なることがわかった。



Comp.	R ²	Replicon EC ₅₀ (nM)		Comp.	R ²	Replicon EC ₅₀ (nM)	
		1a	1b			1a	1b
23		56	0.15	37		8.1	0.0049
35		34	0.025	38		2.3	0.020
36		3.5	0.0042				

Table 3-1. Inhibitory activities of compounds 35–38

以上の結果から、R²部は化合物 38 の構造が最適な構造であることがわかった。一方で、第2章で述べた様に R¹部は化合物 30 の構造が最適であることがわかっている。そこで、その相加効果を狙って両方の構造を合わせ持つ化合物 39 の合成を行った (Figure 3-2)。

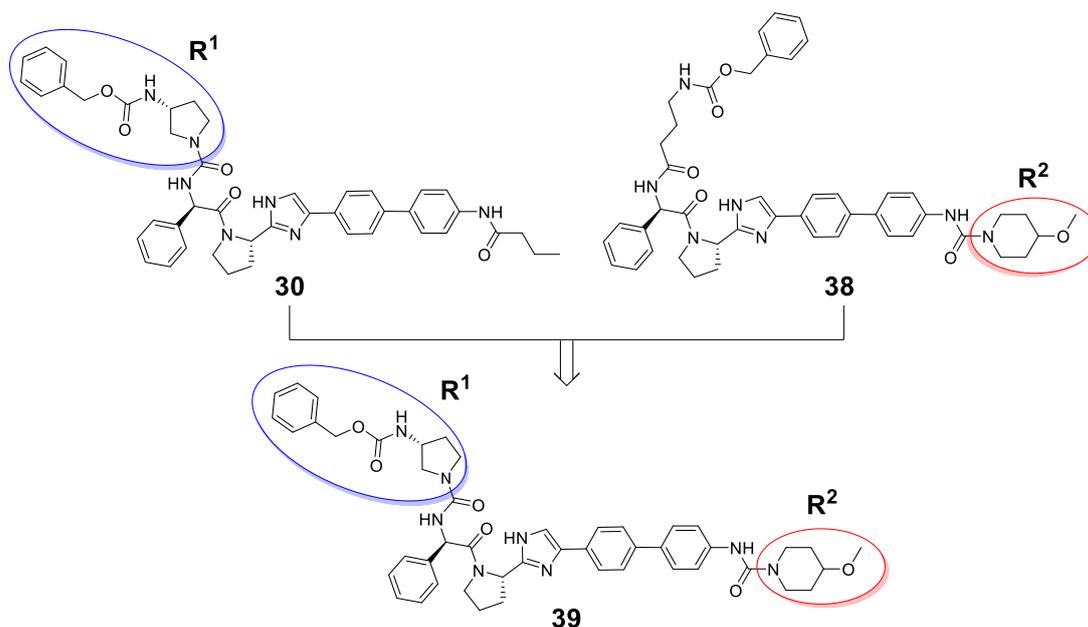
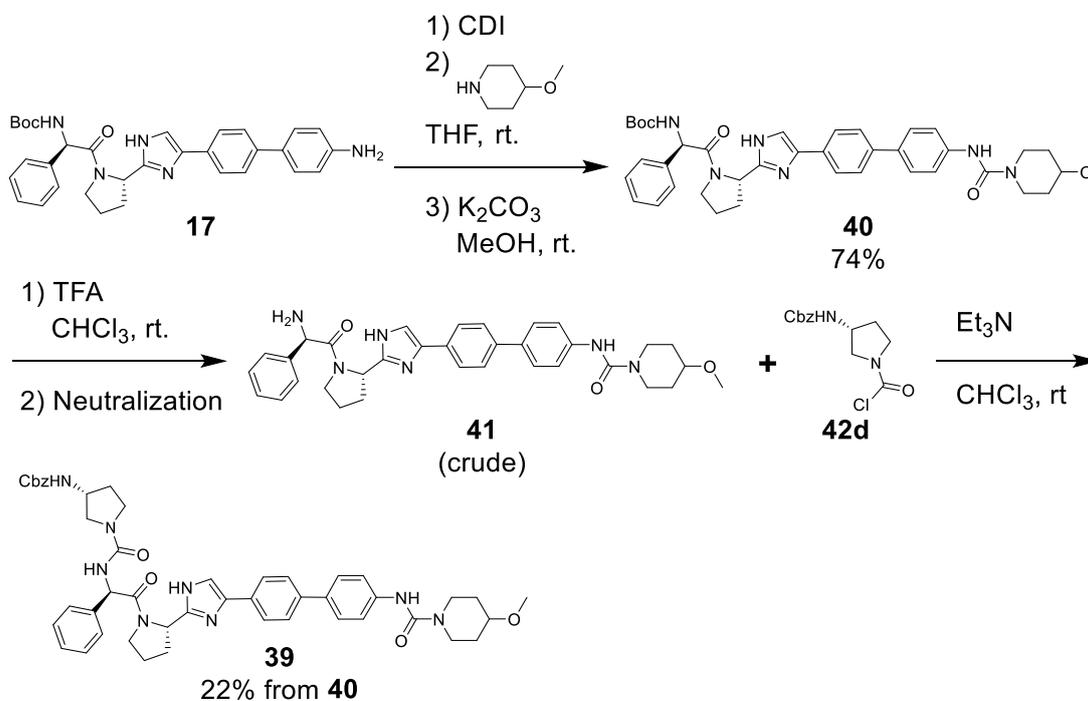


Figure 3-2

化合物 **39** の合成法を **Scheme 3-3** に示す。リード化合物 **11** の合成中間体 **17** から 4-メトキシピペリジンと CDI を用いて縮合してウレア誘導体 **40** を合成し、フェニルグリシン部の窒素上の Boc 基を TFA にて脱保護した後、別途調製したカルバモイルクロリド **42d** との縮合により合成した。



Scheme 3-3

第3章

合成した化合物 **39** の抗ウイルス作用を **Table 3-2** に示す。また、比較データとして daclatasvir の文献報告値^{14), 17)} を合わせて示す。当初の期待通り、この化合物は 1a 型および 1b 型を強く阻害し、EC₅₀ はそれぞれ 0.039 nM と 0.028 nM を示した。加えて 2a 型のレプリコン細胞に対する評価も実施したが、この遺伝子型に対しても強力な抗ウイルス作用を示した。また、daclatasvir の抗ウイルス作用と比較した場合、daclatasvir は 1b 型に対して 1a 型および 2a 型よりも強いレプリコン阻害活性を示すのに対し、化合物 **39** は、1a, 1b および 2a 型のどのレプリコン細胞に対しても同等の強い阻害活性を示した。さらに興味深いことに、臨床試験で確認された daclatasvir の耐性変異株の 1 つである 1a Q30K 型に対する本化合物のレプリコン阻害活性を測定したところ、阻害活性の減弱度合は daclatasvir と比べるとかなり小さかった。以上の評価結果から、当初の想定通り、非対称型阻害薬は対称型の daclatasvir とは異なる抗ウイルス作用を示すことが明らかとなった。

Compound	Replicon EC ₅₀ (nM)			NS5A mutants Replicon EC ₅₀ (nM)
	1a	1b	2a	1a Q30K
39	0.039	0.028	0.018	4.7
daclatasvir	0.050 ^a	0.009 ^a	0.071 ^a	1227 ^b

^a Reported data, see Ref. 14

^b Reported data, see Ref. 17

Table 3-2. Antiviral profiles of **39** and daclatasvir

総括

肝炎はアルコールの摂取や肥満など様々な原因で起こるが、最も多いものはウイルス感染によって肝臓に炎症が起こる「ウイルス性肝炎」である。その中でも C 型肝炎ウイルス (HCV) が引き起こす肝炎は、その感染により約 70% で慢性肝炎へと移行し、肝硬変や肝細胞癌へと進展するため、無治療の場合に少なくとも 20%~30% が死亡すると推定されている。初期の C 型肝炎の治療には、インターフェロンと ribavirin との併用療法が中心であったが、著効率や副作用の面で課題が残っていた。一方、1990 年後半に報告された培養細胞内で HCV の増殖複製が再現できる HCV レプリコンシステムを利用した細胞評価系により、HCV タンパクを標的とした様々なメカニズムの薬剤開発が盛んに行われるようになった。HCV NS5A は非構造タンパクの一つであり、その機能は明確には判明していないものの、HCV 複製複合体の構成因子としてウイルスの複製に重要な役割を果たすとされている。その阻害薬である daclatasvir は、HCV レプリコン細胞を用いた評価で他の薬剤と比較しても非常に強力な複製阻害活性を示し、また臨床試験においても単剤で HCV 量を劇的に低下させた。しかしながら、他のメカニズムの薬剤と同様、単剤のみでは短期間に薬剤耐性株が出現することがわかった。

現在承認されている HCV NS5A 阻害薬は高い対称性や両側にある末端メチルカーバメートの存在など共通の構造特性を持っているため、その構造類似性によってこれらの阻害薬は同様の薬剤特性を示すことが予想された。そこで、これまでの対称型阻害薬が持たないユニークな置換基を有する非対称型阻害薬を創出できれば、これまでと異なる抗ウイルス作用を示す次世代の阻害薬となると考えた。本研究では、強力な抗ウイルス作用を有する新規 NS5A 阻害薬の創製を目指し、既知の対称型阻害薬からダウンサイズして最小活性発現構造を見出した後、既知の阻害薬と異なる形へ変換する方針で阻害薬の開発を行った (Figure 14)。

1 章では分子サイズが低減した非対称型リード化合物の探索検討に関して述べた。文献報告の対称型 NS5A 阻害薬 **1** から最小活性発現構造を確認するため、部分構造の削減した化合物を合成した。その結果、対称型阻害薬 **1** の最小活性発現構造としてビフェニル構造までが重要であることがわかった。また、ビフェニルから先のイミダゾール部分を単純な構造へ模倣した化合物を探索した結果、アミド構造へ変換した化合物 **11** が **1b** 型に対して対称型阻害薬と同程度の強い阻害活性を示した。本化合物は分子サイズが低減し、**1a** 型および **1b** 型ともに抗ウイルス作用を示したことから、リード化合物として設定した。

2 章では NS5A タンパクとの新規相互作用の獲得を目指した検討に関して述べた。既知の NS5A 阻害薬の変換例があまりないフェニルグリニン部分の末端メチルカーバメートの先への伸長を実施した結果、ベンジルカーバメー

ト基を導入した化合物 **23** に阻害活性の大幅な向上が見られた。さらに環構造を介してカーバメート基を適切な位置に固定した化合物 **30** がリード化合物 **11** と比較し、**1a** 型は 2500 倍、**1b** 型は 70 倍の強い阻害活性を示した。フェニルグリシン部分の末端メチルカーバメートの先の変換によって阻害活性が大きく向上する本結果はこれまでに報告例がなく、新規阻害薬を創出するうえで重要な知見である。

3 章ではブタン酸アミド部分の構造最適化による新規 HCV NS5A 阻害薬の創出検討に関して述べた。見出したフェニルグリシンアミド側の構造を固定し、仮置いたブタン酸アミドの脂溶性部分の変換を実施した結果、メトキシピペリジンウレア構造へ変換した化合物 **38** が **1a** 型に対して最も強力な阻害活性を示した。そこで、第 2 章で見出した最適な部分構造を合わせ持つ化合物 **39** を合成したところ、**1a**、**1b** および **2a** 型のレプリコン細胞に対して既存の対称型阻害薬である **daclatasvir** と同等の強力な抗ウイルス作用を示した。また、臨床で確認された **daclatasvir** の耐性変異株の 1 つである **1a Q30K** 型に対する阻害活性の減弱度合は **daclatasvir** と比較するとかなり小さいことがわかった。以上の評価結果から、本研究で見出した新規非対称型 NS5A 阻害薬は **daclatasvir** と異なる抗ウイルス作用を示すことを明らかにすることができた。

以上述べたように、本研究では既存の対称型 NS5A 阻害薬から非対称型のリード化合物を設定し、この化合物からの構造最適化の結果、強力な抗 HCV 作用を示す新規非対称型 NS5A 阻害薬を創製した。本化合物は野生型の HCV レプリコン細胞に対して **daclatasvir** と同等の阻害作用を示しただけではなく、その変異遺伝子型に対しても強い作用を示した。以上の結果から、本研究内容は、次世代の NS5A 阻害薬を創出する上での新しい方法論を示すものと期待される。

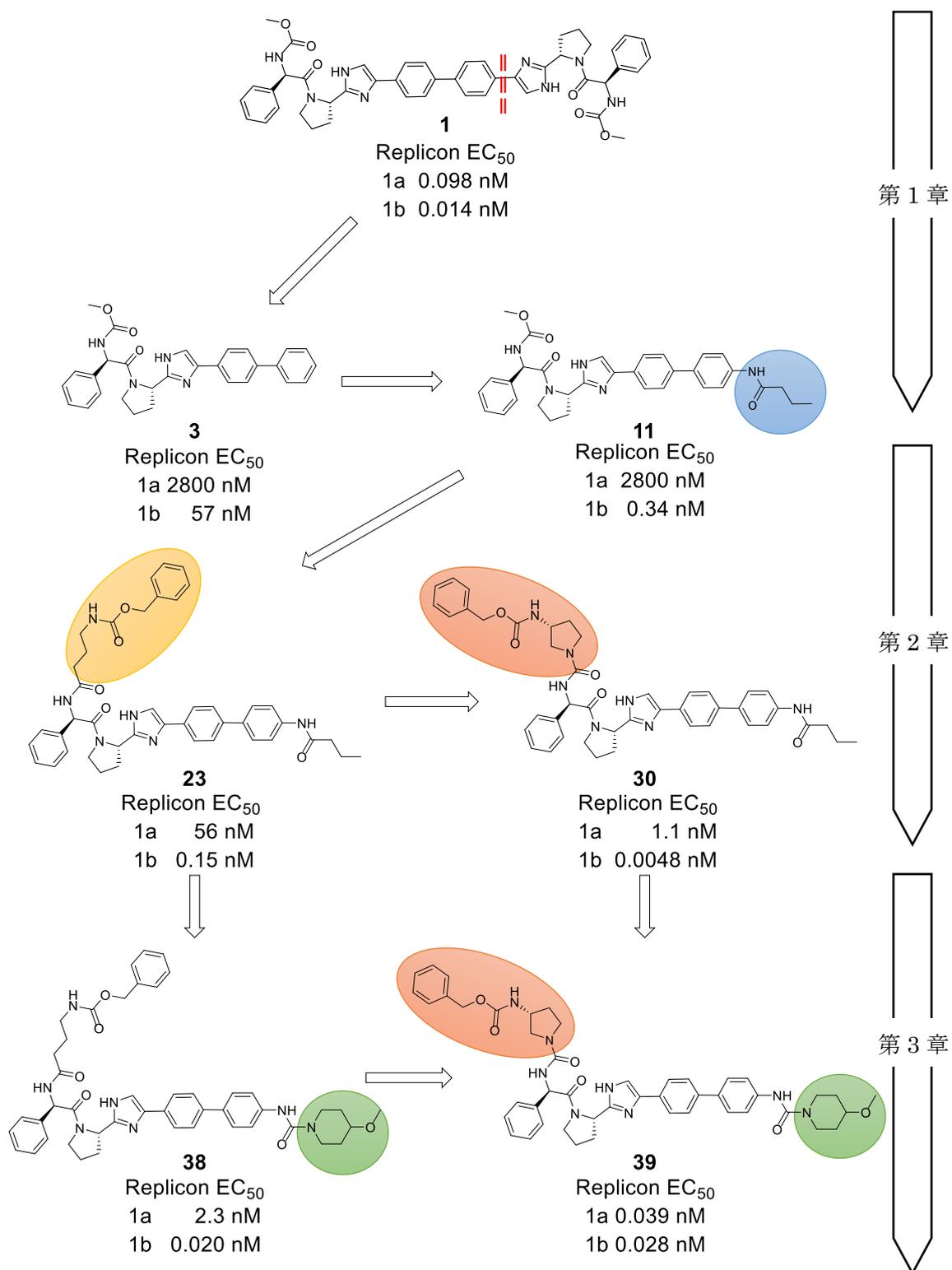


Figure 14

略号一覧

略号一覧

置換基の略号

Boc	Tertiary-butoxycarbonyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Et	Ethyl
Me	Methyl
Ph	Phenyl
<i>i</i> Pr	Isopropyl

試薬の略号

Ac	Acetyl
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazole
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamide
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
Hex	Hexane
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
Triphosgene	Bis(trichloromethyl) carbonate

反応式の略号

cat.	catalytic amount
rt.	room temperature

その他

RNA	Ribonucleic acid
-----	------------------

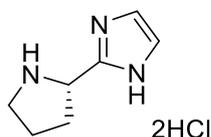
実験項

融点は柳本微量融点測定器 (MP-500D) を用いて測定した。核磁気共鳴スペクトルは Agilent 400-MR, Bruker AVANCE III 400, Varian MERCURY plus-AS400, JEOL JNM-AL400, JEOL JNM-ECZ400S を用いて測定し, ケミカルシフト値はテトラメチルシランを内部標準物質として ppm で記載した。質量分析は Agilent 1290 Infinity LC / Thermo Fisher Orbitrap ID-X spectrometer を用いて測定した。赤外吸収スペクトルは Shimadzu IRAffinity-1S spectrometer を用いて測定した。旋光度は Rudolph Research Analytical AUTOPOL V polarimeter を用いて測定した。薄層シリカゲルクロマトグラフィーは Merck シリカゲルプレート (60F-254) を用いた。カラムクロマトグラフィーは YMC-DispoPack AT(SIL-25) を用いて Biotage Isolera One により行った。市販の溶媒および試薬は追加精製せずに使用した。

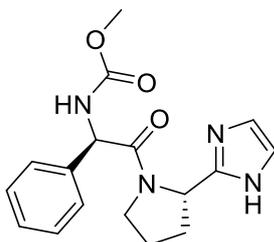
HCV レプリコンアッセイ

評価化合物の抗ウイルス評価は, レポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を導入した HCV レプリコン細胞を用いて実施した。化合物を HCV レプリコン細胞に添加し, 37°C, 5% CO₂ で 2 日間インキュベートした後, ルシフェラーゼ活性を測定することにより HCV 複製量を算出した。なお, ルシフェラーゼ活性は Steady-Glo ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を使用して測定した。

第 1 章

(S)-2-(Pyrrolidin-2-yl)-1H-imidazole dihydrochloride (5)

市販の *tert*-butyl (S)-2-(1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate (**4**) (150 mg, 0.630 mmol) にクロロホルム (2 ml) を加えて溶解し, TFA (1 ml) を加えて 30 分間室温撹拌した。反応液を減圧濃縮し, 4 M 塩化水素酢酸エチル溶液を加えた後, 得られた懸濁液を減圧濃縮することにより, 目的物 **5** (143 mg) の粗生成物を無色固体として得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

Methyl ((R)-2-((S)-2-(1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate (2)

窒素雰囲気下, **5** の粗生成物 (70 mg, 0.3 mmol) および市販の (*R*)-2-((methoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetic acid (**6**) (94 mg, 0.45 mmol) に DMF (2 ml) を加え, 氷冷下, HATU (171 mg, 0.45 mmol) を加えた後, ^tPr₂NEt (0.187 ml, 1.05 mmol) を滴下した。氷冷下で 1 時間撹拌した後, 反応液に酢酸エチル/水を加え, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH = 15/1) で精製することにより, 目的物 **2** (36 mg, 37%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -178$ (*c* 0.27, MeOH)

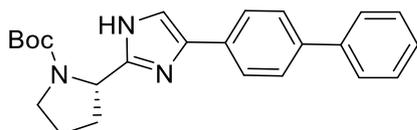
¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz) δ 10.36 (br s, 1H), 7.47–7.33 (m, 5H), 6.97 (s, 2H), 6.09–5.94 (m, 1H), 5.43–5.35 (m, 1H), 5.26–5.18 (m, 1H), 3.71–3.60 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.20–3.10 (m, 1H), 2.94–2.86 (m, 1H), 2.31–2.09 (m, 1H), 2.02–1.83 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) 169.9, 156.1, 147.2, 136.1, 129.1, 128.7, 127.9, 57.4, 55.1, 52.3, 47.1, 27.9, 24.8.

IR (ATR) 3255, 2940, 1700, 1633, 1494, 1417, 1240, 1180, 1055, 845, 750, 721, 698, 609, 553, 524, 486 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$, 329.1608; found, 329.1606.

***tert*-Butyl (*S*)-2-(4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate (**9**)**



市販の *tert*-butyl (*S*)-2-(4-(4-bromophenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate (**7**) (500 mg, 1.27 mmol), フェニルボロン酸 (**8**) (171 mg, 1.40 mmol) および炭酸カリウム (705 mg, 5.1 mmol) に DMF (10 ml) および水 (2.5 ml) を加え, この反応液に 10 分間アルゴンを通した後, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (148 mg, 0.128 mmol) を加え, アルゴン雰囲気下, 80 $^\circ\text{C}$ で 2 時間攪拌した。室温に戻した後, 反応液に酢酸エチル/水を加え, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和食塩水で順次洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Hex/AcOEt = 50/50 - 25/75) で精製することにより, 目的物 **9** (445 mg, 90%) を無色固体として得た。

Mp 184 $^\circ\text{C}$ (from Hex/AcOEt)

$[\alpha]_D^{25}$ -46 (c 0.34, MeOH)

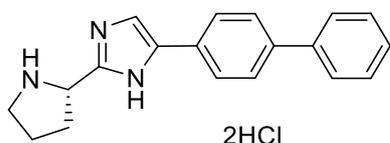
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.21-11.76 (m, 1H), 7.87-7.25 (m, 10H), 4.91-4.72 (m, 1H), 3.62-3.47 (m, 1H), 3.42-3.32 (m, 1H), 2.35-2.11 (m, 1H), 2.09-1.79 (m, 3H), 1.41 (s, 4H), 1.16 (s, 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 Hz) 156.5, 149.7, 149.5, 141.1, 140.5, 139.7, 139.1, 133.8, 128.7, 127.6, 127.2, 126.8, 125.2, 124.5, 123.7, 112.1, 80.3, 54.1, 47.3, 28.5, 28.0, 24.8.

IR (ATR) 3195, 2985, 1662, 1479, 1417, 1363, 1346, 1294, 1157, 1126, 1076, 904, 842, 769, 754, 731, 692, 590, 557, 536, 505, 493, 424 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$ 390.2176, found 390.2173.

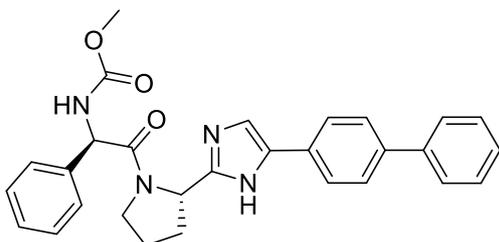
(*S*)-5-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-2-(pyrrolidin-2-yl)-1*H*-imidazole dihydrochloride (10**)**



実験項

9 (100 mg, 0.278 mmol) に 2 M 塩酸メタノール溶液 (2 ml) を加え, 60 °C で 50 分攪拌した。室温まで放冷した後, 溶媒を減圧濃縮し, 酢酸エチル (2 ml) を加えて再度減圧留去する操作を 3 回繰り返すことにより, 目的物 10 の粗生成物 (100 mg) を無色固体として得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

Methyl ((R)-2-((S)-2-(5-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate (3)



窒素雰囲気下, 10 の粗生成物 (100 mg) および市販の 6 (58 mg, 0.278 mmol) に DMF (2 ml) を加え, 氷冷下, HATU (111 mg, 0.292 mmol) を加えた後, $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (0.15 ml, 0.862 mmol) を滴下した。氷冷下で 1 時間攪拌した後, 反応液に酢酸エチル/水を加え, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt) で精製することにより, 目的物 3 (80 mg, 60%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -133$ (c 0.30, MeOH)

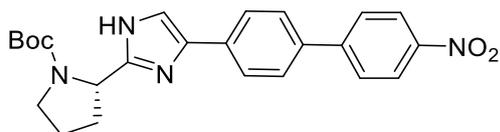
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.15–11.70 (m, 1H), 8.00–6.88 (m, 16H), 5.58–5.33 (m, 1.3H), 5.12–5.00 (m, 0.7H), 3.95–3.81 (m, 0.7H), 3.70–3.44 (m, 3.6H), 3.22–3.06 (m, 0.7H), 2.13–1.75 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) 169.9, 156.3, 147.8, 140.8, 139.3, 135.8, 129.2, 128.8, 128.7, 127.9, 127.2, 127.1, 126.8, 125.0, 57.6, 55.4, 52.4, 47.1, 28.2, 24.8.

IR (ATR) 3285, 2925, 1700, 1651, 1633, 1494, 1417, 1236, 1188, 1155, 1076, 1055, 842, 759, 725, 696, 553, 408 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C $_{29}$ H $_{29}$ N $_4$ O $_3$ 481.2234, found 481.2242.

tert-Butyl (S)-2-(4-(4'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate (13)



市販の **7** (4.0 g, 10.2 mmol), 4-ニトロフェニルボロン酸(**12**) (1.87 g, 11.2 mmol)および炭酸カリウム (5.64 g, 40.8 mmol) に DMF (80 ml) および水 (20 ml) を加え, この反応液に 10 分間アルゴンを通した後, Pd(PPh₃)₄ (1.18 g, 1.02 mmol) を加え, アルゴン雰囲気下, 80 °C で 2 時間攪拌した。室温に戻した後, 反応液に酢酸エチル/水を加え, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣に酢酸エチル (40 ml) を加えて 5 分間室温で懸濁攪拌した後, ヘキサン (40 ml) を加えてさらに 30 分間室温で懸濁攪拌した。得られた固体をろ取し, ヘキサン/酢酸エチル (1/1) で洗浄することにより, 目的物 **13** の一次晶 (2.67 g, 60%) を黄色結晶として得た。また, ろ液を濃縮し, 同様な操作により二次晶 (360 mg, 8%) を得た。

Mp 204 °C (from Hex/AcOEt)

[α]²⁵_D -46 (c 0.32, MeOH)

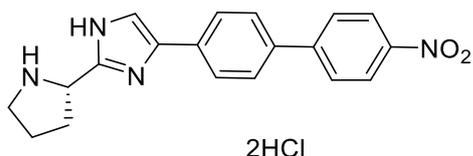
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ 12.30–11.88 (m, 1H), 8.33–8.27 (m, 2H), 8.04–7.95 (m, 2H), 7.93–7.84 (m, 2H), 7.83–7.71 (m, 2H), 7.65–7.57 (m, 0.8H), 7.41–7.34 (m, 0.2H), 4.89–4.73 (m, 1H), 3.61–3.49 (m, 1H), 3.41–3.28 (m, 1H), 2.31–2.12 (m, 1H), 2.09–1.79 (m, 3H), 1.41 (br s, 4H), 1.16 (br s, 5H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) δ 156.7, 156.5, 150.3, 149.7, 147.5, 147.0, 146.8, 139.1, 136.9, 136.3, 135.6, 130.9, 130.8, 127.94, 127.5, 127.4, 127.4, 125.5, 124.6, 124.5, 124.2, 124.1, 112.8, 80.6, 80.4, 77.3, 77.2, 77.0, 76.7, 60.4, 54.2, 54.1, 47.4, 28.5, 28.1, 27.9, 24.9, 14.2.

IR (ATR) 3190, 2965, 1668, 1593, 1520, 1506, 1479, 1444, 1418, 1369, 1337, 1302, 1157, 1126, 1111, 854, 831, 768, 752, 732, 687 cm⁻¹.

HRMS(ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₄H₂₇N₄O₄ 435.2027, found 435.2028.

(S)-4-(4'-Nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(pyrrolidin-2-yl)-1H-imidazole dihydrochloride (14)

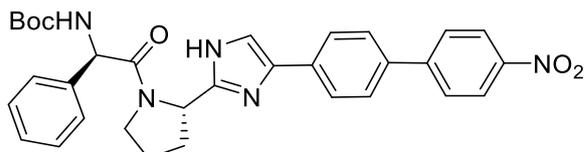


13 (1.0 g, 2.30 mmol) に 2 M 塩酸メタノール溶液 (10 ml) を加え, 60 °C で 2 時間攪拌した。室温まで放冷した後, 溶媒を減圧濃縮し, 酢酸エチル (10 ml) を加えて再度減圧留去する操作を 3 回繰り返すことにより, 目的物 **14** の

実験項

粗生成物 (937 mg) を黄色固体として得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

tert-Butyl ((*R*)-2-((*S*)-2-(4-(4'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate (**16**)



窒素雰囲気下, **14** (937 mg) および市販の(*R*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetic acid (**15**) (578 mg, 2.3 mmol) に DMF (10 ml) を加え, 氷冷下, HATU (918 mg, 2.42 mmol) を加えた後, ⁱPr₂NEt (1.25 ml, 7.13 mmol) を滴下した。氷冷下で 40 分撹拌した後, 反応液に酢酸エチル/水を加え, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Hex/AcOEt = 25/75 - 0/100) で精製することにより, 目的物 **16** (1.19 g, 91%) を黄色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -141$ (*c* 0.28, MeOH)

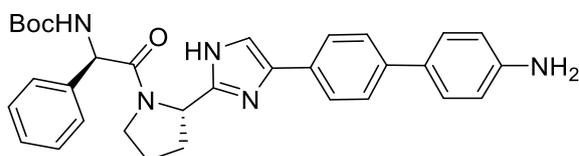
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ 12.05–11.74 (m, 1H), 8.35–8.26 (m, 2H), 8.06–7.96 (m, 2H), 7.94–7.76 (m, 4H), 7.66–7.60 (m, 0.7H), 7.53–7.29 (m, 4.6H), 7.18–6.56 (m, 1.7H), 5.56–5.35 (m, 1.3H), 5.27–4.99 (m, 0.7H), 3.92–3.85 (m, 0.7H), 3.72–3.56 (m, 0.3H), 3.55–3.46 (m, 0.3H), 3.19–3.07 (m, 0.7H), 2.11–1.77 (m, 4H), 1.42–1.16 (m, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) δ 170.4, 155.7, 148.5, 147.4, 146.8, 136.5, 135.5, 129.3, 128.9, 128.1, 127.6, 127.4, 125.4, 124.1, 80.4, 77.2, 57.5, 55.5, 47.0, 28.8, 28.4, 24.7.

IR (ATR) 3320, 3285, 2980, 1705, 1683, 1635, 1593, 1514, 1485, 1456, 1442, 1367, 1338, 1246, 1159, 1109, 846, 829, 771, 755, 696, 619, 551, 530, 499, 478 cm⁻¹.

HRMS(ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₂H₃₄N₅O₅ 568.2554, found 568.2551.

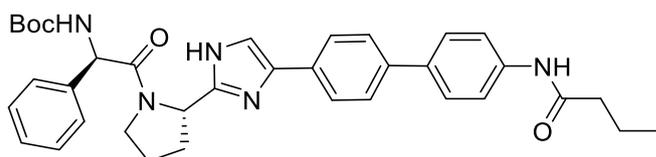
tert-Butyl ((*R*)-2-((*S*)-2-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate (**17**)



16 (1.5 g, 2.64 mmol) をメタノール (12 ml) および THF (6 ml) に溶解し、10%Pd-C (50% wet, 300 mg) を加えた後、水素雰囲気下 (1 atm) で 43 時間室温撹拌した。反応液から不溶物を酢酸エチルにてセライト濾去した後、濾液を減圧濃縮することにより、目的物 **17** の粗生成物 (1.42 g) を無色アモルファスとして得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.29–11.53 (m, 1H), 7.99–7.24 (m, 11H), 7.22–6.84 (m, 2H), 6.73–6.54 (m, 2H), 5.85–4.95 (m, 4H), 3.93–3.82 (m, 0.7H), 3.53–3.44 (m, 0.3H), 3.18–3.06 (m, 0.7H), 2.74–2.69 (m, 0.3H), 2.12–1.77 (m, 4H), 1.44–1.11 (m, 9H).

tert-Butyl ((R)-2-((S)-2-(4-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate (18)



窒素雰囲気下、**17** の粗生成物 (1.42 g) およびブタン酸 (0.242 ml, 2.64 mmol) に DMF (15 ml) を加え、氷冷下、HATU (1.06 g, 2.77 mmol) を加えた後、 $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (0.708 ml, 2.91 mmol) を滴下した。4 時間室温撹拌した後、反応液に酢酸エチル/水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水で 2 回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Hex/AcOEt = 25/75 - 0/100) で精製することにより、目的物 **18** (1.18 g, 73%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -128$ (c 0.45, MeOH)

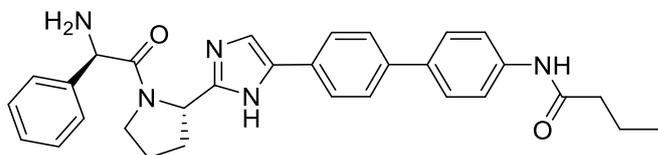
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.08–11.64 (m, 1H), 9.97–9.91 (m, 1H), 7.83–6.56 (m, 15H), 5.56–5.49 (m, 0.3H), 5.47–5.34 (m, 0.7H), 5.28–5.21 (m, 0.3H), 5.09–5.00 (m, 0.7H), 3.93–3.83 (m, 0.7H), 3.72–3.56 (m, 0.3H), 3.55–3.44 (m, 0.3H), 3.19–3.07 (m, 0.7H), 2.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.10–1.77 (m, 4H), 1.63 (tq, $J = 7.4$, 7.4 Hz, 2H), 1.42–1.17 (m, 9H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (CDCl $_3$, 100 Hz) δ 171.3, 170.4, 155.7, 148.1, 138.6, 137.2, 136.7, 135.6, 129.2, 128.8, 128.1, 127.6, 127.3, 127.0, 125.2, 120.1, 80.4, 60.4, 57.5, 55.5, 47.0, 39.7, 28.8, 28.3, 24.7, 21.1, 19.1, 14.2, 13.8.

IR (ATR) 3285, 2980, 1633, 1487, 1454, 1417, 1365, 1246, 1159, 1050, 821, 756, 698, 555, 518 cm^{-1} .

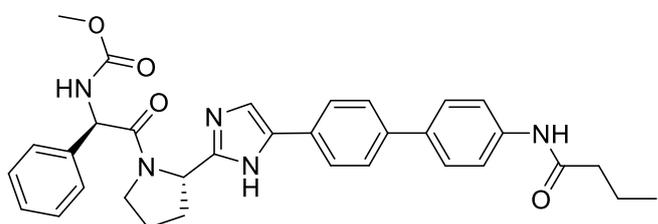
HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C $_{36}$ H $_{42}$ N $_5$ O $_4$ 608.3231, found 608.3231.

N-(4'-(2-((S)-1-((R)-2-Amino-2-phenylacetyl)pyrrolidin-2-yl)-1H-imidazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)butyramide (19)



18 (1.0 g, 1.65 mmol) にクロロホルム (10 ml) を加えて溶解し、TFA (5 ml) を加えて 1 時間室温撹拌した。反応液を減圧濃縮し、酢酸エチル/メタノール (10/1) を加えた後、炭酸水素ナトリウム水溶液にて中和した。これを酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で順次洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧濃縮することにより、目的物 **19** の粗生成物 (830 mg) を無色アモルファスとして得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

Methyl ((R)-2-((S)-2-(5-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate (11)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol) に DMF (0.5 ml) を加え、トリエチルアミン (0.027 ml, 0.197 mmol) を加えた後、クロロギ酸メチル (0.012 ml, 0.148 mmol) を添加し、30 分室温撹拌した。反応液に酢酸エチル/水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水で 2 回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧濃縮し、得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt) で精製することにより、目的物 **11** (32 mg, 57%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -143$ (c 0.30, MeOH)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.26–11.60 (m, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.08–6.84 (m, 15H), 5.59–5.30 (m, 1.3H), 5.19–4.99 (m, 0.7H), 3.97–3.79 (m, 0.7H), 3.76–3.42 (m, 3.6H), 3.25–3.05 (m, 0.7H), 2.31 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.21–1.74 (m, 4H), 1.71–1.55 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) 171.2, 169.9, 156.4, 148.1, 147.7, 138.9, 137.3, 137.0, 136.8, 136.2, 135.8, 135.5, 133.4, 131.5, 129.2, 128.8, 127.9, 127.2, 127.1, 126.8,

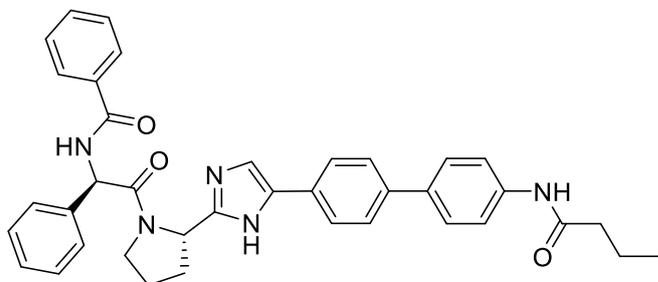
125.2, 124.7, 124.2, 120.1, 112.2, 57.7, 57.5, 55.4, 52.4, 47.1, 39.6, 28.5, 24.8, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3290, 2980, 1633, 1595, 1504, 1417, 1313, 1242, 1184, 1078, 1055, 1002, 821, 763, 698, 609, 555, 516, 430 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_4$ 566.2762, found 566.2769.

第 2 章

N-((R)-2-((S)-2-(5-(4'-Butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)benzamide (20)



窒素雰囲気下，**19** の粗生成物（50 mg, 0.0986 mmol）および市販の安息香酸（12 mg, 0.0986 mmol）に DMF（0.5 ml）を加え，氷冷下，HATU（39 mg, 0.103 mmol）を加えた後，*i*Pr₂NEt（0.019 ml, 0.108 mmol）を滴下した。氷冷下で 1 時間攪拌した後，反応液に酢酸エチル/水を加え，酢酸エチルで抽出し，有機層を水で 2 回，飽和炭酸水素ナトリウム水溶液，飽和食塩水で順次洗浄後，硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後，濾液を減圧濃縮し，得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラフィー（AcOEt/MeOH = 95/5）で精製することにより，目的物 **20**（41 mg, 68%）を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -204$ (*c* 0.43, MeOH)

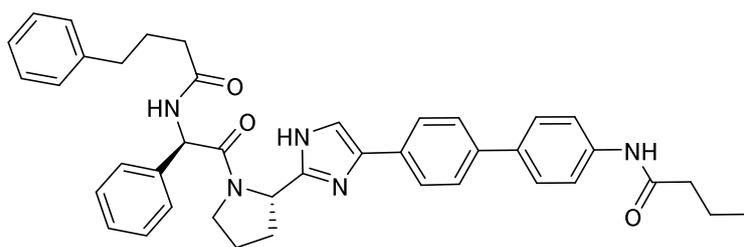
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ 12.14–11.64 (m, 1H), 10.02–9.91 (m, 1H), 9.08–8.81 (m, 1H), 8.01–6.98 (m, 19H), 6.01–5.54 (m, 1.3H), 5.18–5.08 (m, 0.7H), 4.00–3.44 (m, 2H), 2.36–2.28 (m, 2H), 2.14–1.79 (m, 4H), 1.69–1.58 (m, 2H), 0.97–0.90 (m, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) 171.3, 169.8, 167.2, 147.9, 138.6, 137.2, 135.4, 133.4, 131.9, 129.3, 129.0, 128.6, 128.3, 127.2, 127.2, 126.9, 125.1, 120.1, 56.8, 55.6, 47.1, 39.6, 29.0, 24.7, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3230, 2955, 1633, 1598, 1504, 1485, 1420, 1292, 1246, 1180, 1151, 1002, 945, 819, 761, 696, 611, 518 cm⁻¹.

HRMS(ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₈H₃₈N₅O₃ 612.2969, found 612.2972.

N-((R)-2-((S)-2-(4-(4'-Butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)-4-phenylbutanamide (21)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol) , 市販の 4-phenylbutanoic acid (16 mg, 0.0986 mmol) , HATU (39 mg, 0.103 mmol) , DMF (0.5 ml) を用いて, **20** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **21** (44 mg, 68%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ -171 (c 0.34, MeOH)

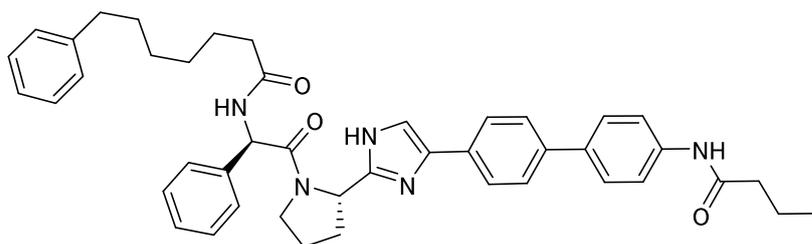
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.16–11.55 (m, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.78–8.42 (m, 1H), 7.92–6.89 (m, 19H), 5.82–5.49 (m, 1.3H), 5.16–5.01 (m, 0.7H), 4.03–3.86 (m, 0.7H), 3.69–3.06 (m, 1.3H), 2.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.25–1.75 (m, 10H), 1.69–1.57 (m, 2H), 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) 172.9, 171.3, 169.7, 148.0, 141.3, 138.6, 137.2, 136.6, 135.3, 129.3, 128.9, 128.4, 128.3, 128.1, 127.3, 126.9, 125.9, 125.1, 120.1, 56.4, 55.6, 47.0, 39.6, 35.3, 35.0, 29.1, 26.8, 24.6, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3255, 2960, 1633, 1597, 1504, 1417, 1311, 1292, 1246, 1182, 1151, 1078, 819, 744, 696, 607, 555, 516, 489, 418 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for C $_{41}$ H $_{44}$ N $_5$ O $_3$ 654.3439, found 654.3441.

N-((R)-2-((S)-2-(4-(4'-Butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)-7-phenylheptanamide (22)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol) , 市販の 7-phenylheptanoic acid (20 mg, 0.0986 mmol) , HATU (39 mg, 0.103 mmol) , DMF (0.5 ml) を用いて, **20** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **22** (38 mg, 55%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ -163 (c 0.24, MeOH)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.21–11.55 (m, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.68–8.42 (m,

実験項

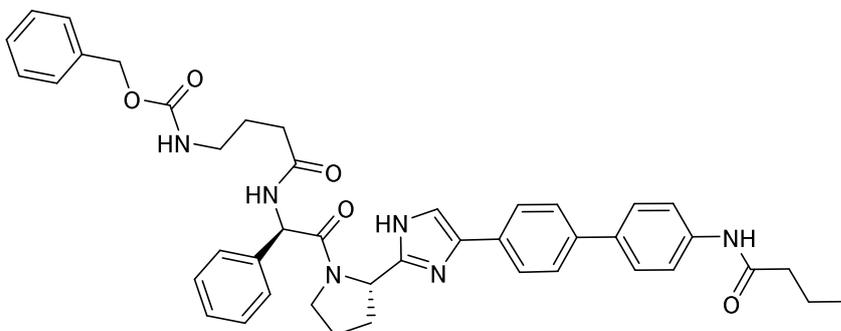
¹H), 7.98–6.90 (m, 19H), 5.78–5.51 (m, 1.3H), 5.11–5.05 (m, 0.7H), 4.01–3.87 (m, 0.7H), 3.67–3.18 (m, 1.3H), 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.21–1.12 (m, 18H), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) 173.3, 171.3, 169.7, 148.0, 142.6, 138.5, 137.2, 136.6, 135.3, 129.3, 128.9, 128.3, 128.2, 128.1, 127.2, 126.9, 125.5, 125.1, 120.1, 56.4, 55.6, 47.0, 39.6, 36.1, 35.8, 31.2, 29.2, 29.0, 28.9, 25.3, 24.6, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3245, 2920, 1633, 1597, 1504, 1454, 1417, 1311, 1292, 1246, 1182, 1078, 821, 696, 605, 555, 516, 418, 401 cm⁻¹.

HRMS(ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₄₄H₅₀N₅O₃ 696.3908, found 696.3906.

Benzyl (4-(((*R*)-2-((*S*)-2-(4-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)amino)-4-oxobutyl)carbamate (23)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol), 市販の 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butanoic acid (23 mg, 0.0986 mmol), HATU (39 mg, 0.103 mmol), DMF (0.5 ml) を用いて, **20** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **23** (37 mg, 52%) を無色アモルファスとして得た。

[α]²⁵_D -143 (*c* 0.27, MeOH)

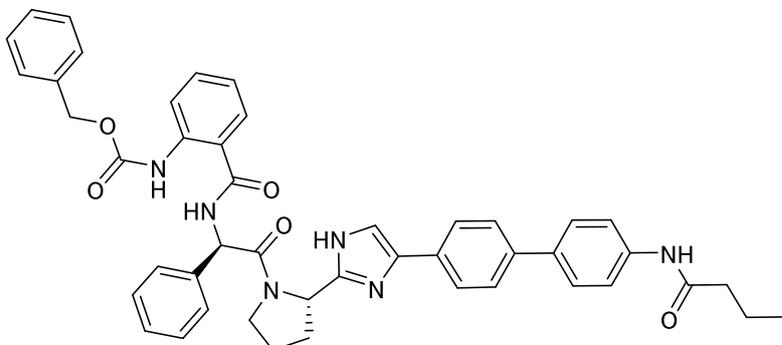
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ 12.16–11.58 (m, 1H), 10.00–9.90 (m, 1H), 8.70–8.39 (m, 1H), 7.90–6.81 (m, 20H), 5.76–5.47 (m, 1.3H), 5.12–4.91 (m, 2.7H), 4.01–3.88 (m, 0.7H), 3.72–3.14 (m, 1.3H), 3.05–2.88 (m, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.24–2.13 (m, 2H), 2.11–1.55 (m, 8H), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) 173.0, 171.4, 169.7, 156.7, 148.1, 138.5, 137.2, 136.5, 135.0, 129.2, 128.9, 128.4, 128.2, 128.0, 127.2, 126.9, 125.1, 120.1, 66.6, 56.7, 55.7, 46.9, 40.0, 39.6, 33.0, 29.5, 25.8, 24.5, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3270, 2970, 1633, 1597, 1504, 1417, 1246, 1182, 1130, 1078, 1002, 821, 734, 696, 605, 555, 516 cm⁻¹.

HRMS(ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₄₃H₄₇N₆O₅ 727.3602, found 727.3604.

Benzyl (2-(((*R*)-2-((*S*)-2-(4-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamoyl)phenyl)carbamate (24)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol), 市販の 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)benzoic acid (27 mg, 0.0986 mmol), HATU (39 mg, 0.103 mmol), DMF (0.5 ml) を用いて, **20** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **24** (40 mg, 53%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -149$ (c 0.29, MeOH)

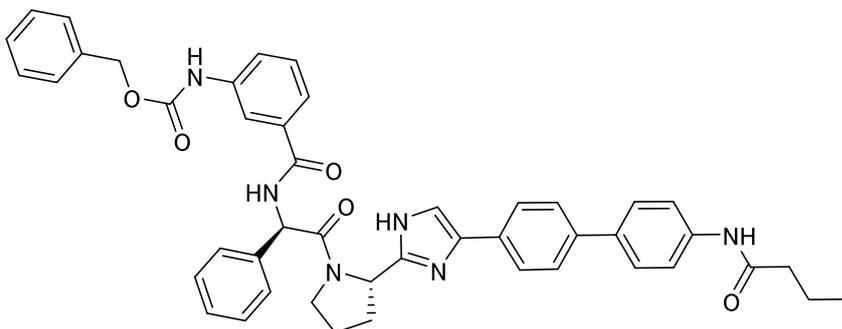
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.08–11.62 (m, 1H), 10.72 (s, 0.7H), 10.56 (s, 0.3H), 9.99–9.91 (m, 1H), 9.26–9.01 (m, 1H), 8.18–8.09 (m, 1H), 7.97–6.95 (m, 22H), 5.96–5.48 (m, 1.3H), 5.22–5.04 (m, 2.7H), 4.00–3.87 (m, 0.7H), 3.70–3.04 (m, 1.3H), 2.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.13–1.75 (m, 4H), 1.69–1.58 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) 171.2, 169.5, 168.1, 153.5, 147.6, 140.1, 139.9, 138.4, 137.0, 136.2, 135.4, 133.4, 132.9, 129.4, 129.0, 128.5, 128.2, 128.1, 127.3, 127.1, 126.8, 125.3, 124.7, 121.9, 120.1, 119.9, 119.1, 112.3, 66.7, 56.4, 55.5, 47.1, 39.7, 28.3, 24.8, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3285, 2955, 1735, 1629, 1587, 1510, 1425, 1207, 1082, 1039, 819, 745, 696, 610, 551, 518 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C $_{46}$ H $_{45}$ N $_6$ O $_5$ 761.3446, found 761.3444.

Benzyl (3-(((*R*)-2-((*S*)-2-(4-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamoyl)phenyl)carbamate (25)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol) , 市販の 3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)benzoic acid (27 mg, 0.0986 mmol) , HATU (39 mg, 0.103 mmol) , DMF (0.5 ml) を用いて, **20** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **25** (49 mg, 65%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_D$ -151 (c 0.37, MeOH)

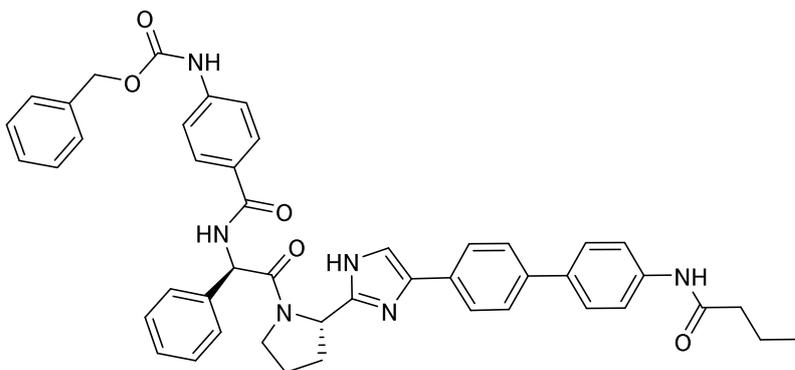
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.16–11.62 (m, 1H), 10.03–9.87 (m, 2H), 8.99–8.56 (m, 1H), 8.13–6.93 (m, 23H), 6.00–5.50 (m, 1.3H), 5.21–5.02 (m, 2.7H), 4.13–3.89 (m, 0.7H), 3.67–3.14 (m, 1.3H), 2.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.12–1.76 (m, 4H), 1.68–1.57 (m, 2H), 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) 171.4, 169.7, 167.1, 153.3, 148.0, 138.4, 137.1, 136.5, 135.9, 135.1, 134.1, 129.3, 129.2, 129.0, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 127.1, 126.8, 125.1, 122.0, 121.9, 120.2, 117.4, 67.0, 56.9, 55.7, 47.0, 39.6, 29.4, 24.6, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3270, 2965, 1633, 1589, 1504, 1487, 1415, 1285, 1213, 1051, 819, 738, 696, 615, 582, 516418, 405 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for C $_{46}$ H $_{45}$ N $_6$ O $_5$ 761.3446, found 761.3447.

Benzyl (4-(((*R*)-2-((*S*)-2-(4-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamoyl)phenyl)carbamate (26)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol), 市販の 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)benzoic acid (27 mg, 0.0986 mmol), HATU (39 mg, 0.103 mmol), DMF (0.5 ml) を用いて, **20** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH=95/5) で精製することにより, 目的物 **26** (50 mg, 66%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -190$ (c 0.33, MeOH)

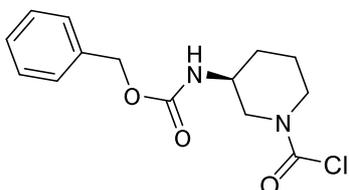
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.17–11.59 (m, 1H), 10.09–10.02 (m, 1H), 9.99–9.92 (m, 1H), 8.96–8.68 (m, 1H), 7.95–7.01 (m, 23H), 5.97–5.59 (m, 1.3H), 5.20–5.09 (m, 2.7H), 4.07–3.90 (m, 0.7H), 3.67–3.16 (m, 1.3H), 2.36–2.26 (m, 2H), 2.13–1.81 (m, 4H), 1.68–1.58 (m, 2H), 0.96–0.88 (m, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100 Hz) δ 171.4, 169.9, 166.7, 153.0, 148.1, 141.5, 138.5, 137.1, 136.6, 135.8, 135.3, 129.4, 129.0, 128.6, 128.4, 128.3, 127.7, 127.2, 126.9, 125.1, 120.2, 117.9, 67.2, 56.9, 55.7, 47.1, 39.6, 29.3, 24.6, 19.1, 13.8.

IR (ATR) 3250, 2955, 1633, 1487, 1454, 1311, 1213, 1182, 1045, 945, 848, 819, 763, 738, 696, 611, 514, 451, 403 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C₄₆H₄₅N₆O₅ 761.3446, found 761.3443.

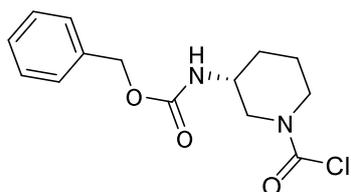
Benzyl (*S*)-(1-(chlorocarbonyl)piperidin-3-yl)carbamate (**42a**)



窒素雰囲気下, 市販の benzyl (*S*)-piperidin-3-ylcarbamate (200 mg, 0.854 mmol) にクロロホルム (2 ml) およびピリジン (0.152 ml, 1.88 mmol) を加えた後, 氷冷下, トリホスゲン (89 mg, 0.299 mmol) を加え, 1 時間 30 分室温攪拌した。反応液に酢酸エチル / 1 N 塩酸を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去し, 濾液を減圧濃縮することにより, 目的物 **42a** の粗生成物 (193 mg) を淡黄色オイルとして得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

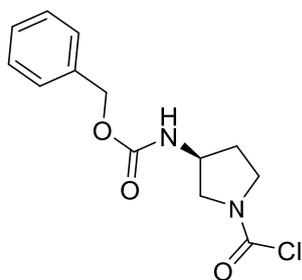
Benzyl (*R*)-(1-(chlorocarbonyl)piperidin-3-yl)carbamate (**42b**)

実験項



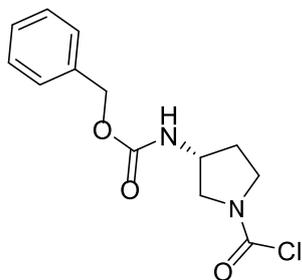
市販の benzyl (*R*)-piperidin-3-ylcarbamate (200 mg, 0.854 mmol) , トリホスゲン (89 mg, 0.299 mmol) , ピリジン (0.152 ml, 1.88 mmol) , クロロホルム (2 ml) を用いて, **42a** と同様の手法により反応を行うことにより, 目的物 **42b** の粗生成物 (156 mg) を淡黄色オイルとして得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

Benzyl (*S*)-(1-(chlorocarbonyl)pyrrolidin-3-yl)carbamate (**42c**)



市販の benzyl (*S*)-(1-(chlorocarbonyl)pyrrolidin-3-yl)carbamate (188 mg, 0.854 mmol) , トリホスゲン (89 mg, 0.299 mmol) , ピリジン (0.152 ml, 1.88 mmol) , クロロホルム (2 ml) を用いて, **42a** と同様の手法により反応を行うことにより, 目的物 **42c** の粗生成物 (190 mg) を淡黄色オイルとして得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

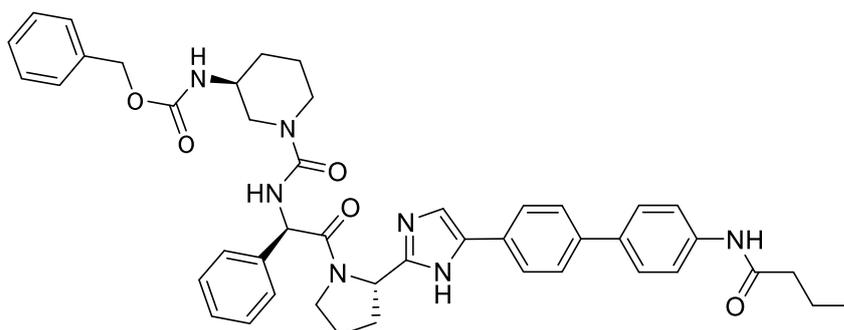
Benzyl (*R*)-(1-(chlorocarbonyl)pyrrolidin-3-yl)carbamate (**42d**)



市販の benzyl (*R*)-(1-(chlorocarbonyl)pyrrolidin-3-yl)carbamate (188 mg, 0.854 mmol) , トリホスゲン (89 mg, 0.299 mmol) , ピリジン (0.152 ml, 1.88 mmol) ,

クロロホルム (2 ml) を用いて, **42a** と同様の手法により反応を行うことにより, 目的物 **42d** の粗生成物 (202 mg) を淡黄色オイルとして得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

Benzyl ((S)-1-(((R)-2-((S)-2-(5-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamoyl)piperidin-3-yl)carbamate (27)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol) に DMF (0.5 ml) を加え, $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$ (0.025 ml) を加えた後, **42a** の粗生成物 (41 mg, 0.138 mmol) を加え, 4 時間室温撹拌した。反応液に酢酸エチル/水を加え, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **27** (39 mg, 52%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -154$ (c 0.34, MeOH)

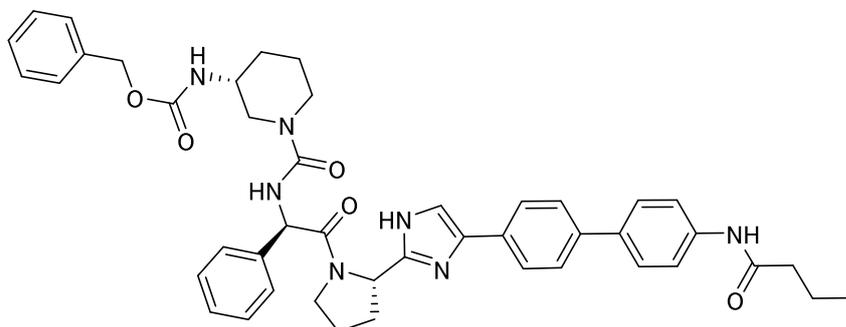
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.13–11.41 (m, 1H), 9.99–9.91 (m, 1H), 7.87–6.79 (m, 21H), 5.70–5.39 (m, 1.3H), 5.17–4.77 (m, 2.7H), 4.09–3.73 (m, 2.7H), 3.63–3.15 (m, 2.3H), 2.82–2.47 (m, 2H), 2.31 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.17–1.74 (m, 5H), 1.68–1.56 (m, 3H), 1.44–1.27 (m, 2H), 0.93 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) 171.2, 170.9, 158.4, 155.9, 136.4, 129.3, 129.0, 128.5, 128.3, 128.0, 127.2, 126.8, 125.2, 120.0, 66.7, 58.3, 55.9, 49.2, 46.7, 46.5, 44.6, 39.7, 30.5, 29.7, 24.2, 22.0, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3250, 2930, 1614, 1504, 1454, 1445, 1309, 1228, 1078, 1045, 1002, 821, 738, 696, 625, 555, 518, 457, 414 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C $_{45}$ H $_{50}$ N $_7$ O $_5$ 768.3868, found 768.3861.

Benzyl ((R)-1-(((R)-2-((S)-2-(4-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamoyl)piperidin-3-yl)carbamate (28)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol) , **42b** の粗生成物 (41 mg, 0.138 mmol) , $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (0.025 ml) , DMF (0.5 ml) を用いて, **27** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **28** (43 mg, 56%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -167$ (c 0.34, MeOH)

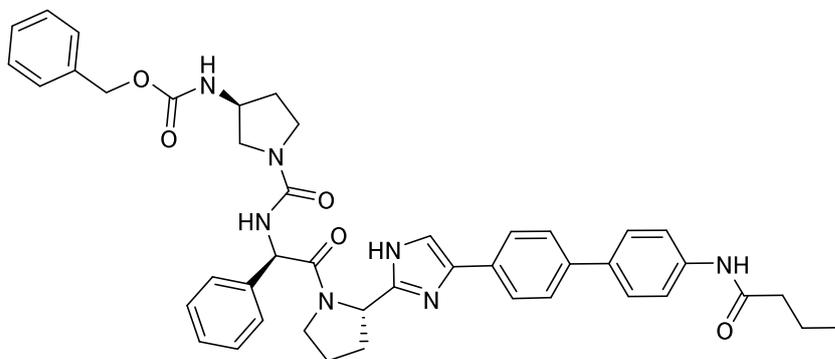
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.16–11.21 (m, 1H), 9.99–9.91 (m, 1H), 7.87–6.79 (m, 21H), 5.70–5.39 (m, 1.3H), 5.15–4.67 (m, 2.7H), 4.25–3.70 (m, 2.7H), 3.61–3.13 (m, 2.3H), 2.81–2.54 (m, 2H), 2.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.17–1.74 (m, 5H), 1.68–1.56 (m, 3H), 1.39–1.27 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) 171.3, 170.8, 158.2, 155.7, 136.3, 129.2, 128.9, 128.5, 128.3, 128.1, 127.2, 126.8, 125.2, 120.0, 66.7, 58.1, 55.8, 49.1, 46.8, 46.6, 44.5, 39.6, 30.2, 30.0, 24.3, 22.4, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3270, 2930, 1614, 1504, 1417, 1309, 1226, 1078, 1047, 1002, 945, 819, 736, 696, 617, 555, 516, 455, 412 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C $_{45}$ H $_{50}$ N $_7$ O $_5$ 768.3868, found 768.3860.

Benzyl ((S)-1-(((R)-2-((S)-2-(4-(4'-butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamoyl)pyrrolidin-3-yl)carbamate (29)



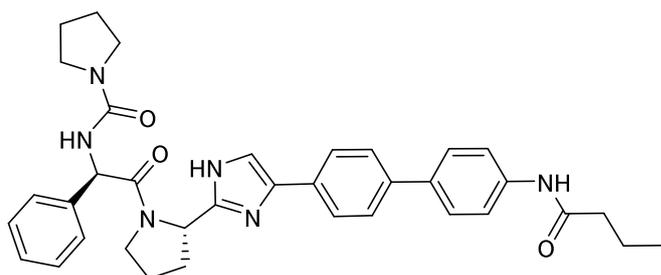
実験項

43.6, 39.6, 31.6, 30.5, 24.2, 19.0, 13.7.

IR (ATR) 3220, 2945, 1633, 1504, 1454, 1417, 1311, 1246, 1185, 1080, 821, 736, 969, 615, 555, 518, 457, 418 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_5$ 754.3711, found 754.3714.

N-((*R*)-2-((*S*)-2-(4-(4'-Butyramido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)pyrrolidine-1-carboxamide (31)



19 の粗生成物 (50 mg, 0.0986 mmol), 市販の pyrrolidine-1-carbonyl chloride (13 mg, 0.0986 mmol), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (0.019 ml), DMF (0.5 ml) を用いて, **27** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **31** (15 mg, 25%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ -205 (c 0.23, MeOH)

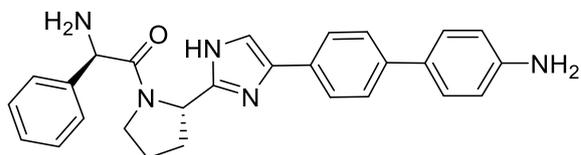
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.14–11.58 (m, 1H), 9.99–9.92 (m, 1H), 7.95–6.91 (m, 14H), 6.58–6.21 (m, 1H), 5.70–5.43 (m, 1.3H), 5.17–5.06 (m, 0.7H), 4.05–3.88 (m, 0.7H), 3.66–3.44 (m, 0.3H), 3.32–3.16 (m, 5H), 2.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.18–1.72 (m, 8H), 1.68–1.58 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 Hz) δ 171.4, 170.9, 157.1, 129.3, 129.0, 128.3, 127.3, 126.8, 125.1, 120.0, 57.8, 55.9, 46.6, 45.8, 39.6, 30.7, 25.4, 24.2, 19.1, 13.8.

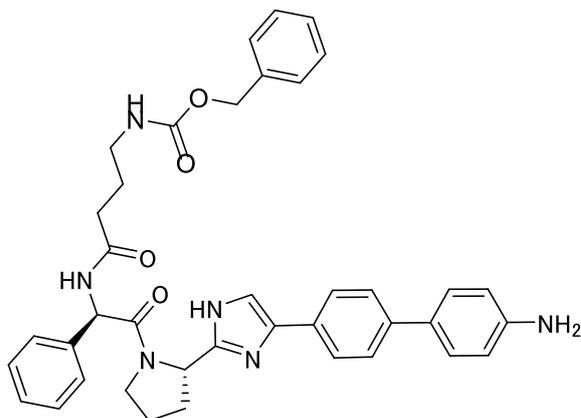
IR (ATR) 3185, 2965, 1614, 1504, 1454, 1417, 1311, 1249, 1182, 1078, 821, 759, 698, 620, 551, 518, 418 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_3$ 605.3235, found 605.3239.

第 3 章

(R)-2-Amino-1-((S)-2-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-phenylethan-1-one (32)

17 の粗生成物 (200 mg, 0.372 mmol) をクロロホルム (2 ml) に溶解し, TFA (1 ml) を加えた後, 3 時間室温撹拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて中和した後, 酢酸エチル (15 ml) を加え, 10 分間室温撹拌した。析出した目的物をろ取し, また, 濾液に含まれる目的物を酢酸エチルで抽出した。有層を水で 2 回洗浄した後, 減圧濃縮し, 得られた残渣に先ほどもろ取した目的物を合わせ, アセトニトリル (10 ml) を加えて減圧濃縮することで, 目的物 **32** の粗生成物 (161 mg) を無色固体として得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

Benzyl 4-(((R)-2-((S)-2-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)amino)-4-oxobutyl)carbamate (34)

窒素雰囲気下, **32** の粗生成物 (155 mg, 0.354 mmol) を DMF (2 ml) に溶解し, 氷冷後, 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butanoic acid **33** (84 mg, 0.354 mmol), HOBt (54 mg, 0.354 mmol) および EDC-HCl (68 mg, 0.354 mmol) を順次加えた。昇温しながら終夜室温撹拌した後, これに酢酸エチルおよび炭酸水素ナトリウム水溶液を加え, 酢酸エチルで抽出した。有層を水で 2 回および飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラ

実験項

フイー (CHCl₃/MeOH = 95/5) で精製することにより, 目的物 **34** (168 mg, 72%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -147$ (c 0.34, MeOH)

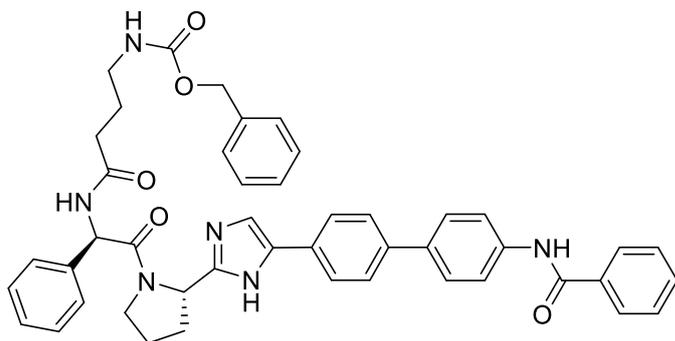
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ 12.09–11.55 (m, 1H), 8.64–8.40 (m, 1H), 7.76–6.61 (m, 20H), 5.78–5.49 (m, 1.3H), 5.25–5.15 (m, 2H), 5.10–5.05 (m, 0.7H), 5.02–4.93 (m, 2H), 3.99–3.87 (m, 0.7H), 3.64–3.43 (m, 0.6H), 3.29–3.16 (m, 0.7H), 3.02–2.90 (m, 2H), 2.34–2.13 (m, 2H), 2.11–1.77 (m, 4H), 1.70–1.55 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) 172.7, 169.7, 156.7, 147.8, 145.7, 139.2, 136.5, 135.1, 131.3, 129.2, 128.8, 128.4, 128.1, 128.0, 127.7, 126.4, 125.0, 115.3, 111.8, 66.6, 56.6, 55.7, 46.9, 40.1, 33.0, 29.2, 25.7, 24.6.

IR (ATR) 3210, 2940, 1699, 1633, 1506, 1417, 1247, 1178, 1130, 1078, 1002, 821, 738, 696, 600, 514, 457 cm⁻¹.

HRMS(ESI) m/z [M + H]⁺ calcd for C₃₉H₄₁N₆O₄, 657.3184; found, 657.3182.

Benzyl (4-(((*R*)-2-((*S*)-2-(5-(4'-benzamido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)amino)-4-oxobutyl)carbamate (**35**)



窒素雰囲気下, **34** (60 mg, 0.0914 mmol) および市販の安息香酸 (11 mg, 0.0914 mmol) に DMF (1 ml) を加え, 氷冷下, HATU (36 mg, 0.0959 mmol) を加えた後, *i*-Pr₂NEt (0.018 ml, 0.101 mmol) を滴下した。氷冷下で 2 時間攪拌した後, 反応液に酢酸エチル/水を加え, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 90/10) で精製することにより, 目的物 **35** (37 mg, 53%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -110$ (c 0.38, MeOH)

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ 10.34 (s, 1H), 8.66–8.40 (m, 1H), 8.06–6.87 (m, 25H), 5.76–5.54 (m, 1.3H), 5.18–4.92 (m, 2.7H), 4.01–3.88 (m, 0.7H), 3.69–3.19 (m, 1.3H), 3.03–2.89 (m, 2H), 2.19 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.13–1.80 (m, 4H), 1.72–1.56 (m, 2H).

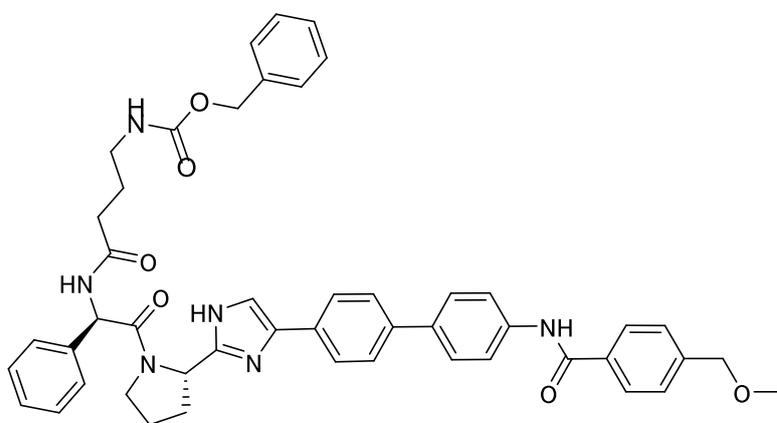
¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) 173.0, 169.7, 165.8, 156.7, 148.1, 138.4, 137.1, 137.0,

136.5, 135.0, 131.8, 129.2, 128.9, 128.7, 128.4, 128.2, 128.0, 127.3, 127.1, 126.9, 125.1, 120.6, 66.6, 56.7, 55.7, 46.9, 40.0, 33.0, 29.5, 25.7, 24.5.

IR (ATR) 3250, 2930, 1699, 1633, 1506, 1417, 1317, 1294, 1242, 1182, 1130, 1074, 1026, 1002, 945, 819, 694, 605, 555, 516, 403 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_5$ 761.3446, found 761.3441.

Benzyl (4-(((*R*)-2-(((*S*)-2-(4-(4'-(4-(methoxymethyl)benzamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)amino)-4-oxobutyl)carbamate (36)



34 (60 mg, 0.0914 mmol), 市販の 4-(methoxymethyl)benzoic acid (15 mg, 0.0914 mmol), HATU (36 mg, 0.0959 mmol), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (0.018 ml, 0.101 mmol), DMF (1 ml) を用いて, **35** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 90/10) で精製することにより, 目的物 **36** (28 mg, 38%) を無色アモルファスとして得た。

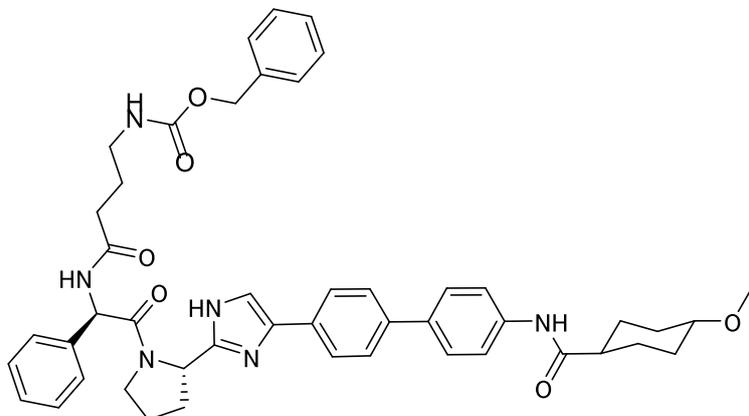
$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -148$ (c 0.27, MeOH)

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.18–11.58 (m, 1H), 10.35–10.30 (m, 1H), 8.68–8.48 (m, 1H), 8.04–6.88 (m, 24H), 5.75–5.52 (m, 1.3H), 5.13–4.92 (m, 2.7H), 4.51 (s, 2H), 4.03–3.86 (m, 0.7H), 3.67–3.13 (m, 1.3H), 3.34 (s, 3H), 3.06–2.90 (m, 2H), 2.28–2.14 (m, 2H), 2.11–1.75 (m, 4H), 1.73–1.51 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl $_3$, 100 Hz) 173.0, 169.7, 165.5, 156.7, 148.1, 142.3, 138.4, 137.2, 136.5, 135.0, 134.1, 129.2, 128.9, 128.4, 128.2, 128.0, 127.6, 127.3, 127.2, 126.9, 125.1, 120.6, 73.9, 66.6, 58.3, 56.7, 55.7, 46.9, 40.1, 38.6, 33.0, 29.5, 25.7, 24.5. IR (ATR) 3285, 2955, 1690, 1633, 1506, 1417, 1319, 1246, 1182, 1130, 1076, 1002, 821, 696, 600, 516, 416 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_6$ 805.3708, found 805.3711.

Benzyl (4-(((R)-2-((S)-2-(4-(4'-((1*r*,4*r*)-4-methoxycyclohexane-1-carboxamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)amino)-4-oxobutyl)carbamate (37)



34 (60 mg, 0.0914 mmol) , 市販の(1*r*,4*r*)-4-methoxycyclohexane-1-carboxylic acid (15 mg, 0.0914 mmol) , HATU (36 mg, 0.0959 mmol) , *i*Pr₂NEt (0.018 ml, 0.101 mmol) , DMF (1 ml) を用いて, **35** と同様の手法により反応を行い, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 90/10) で精製することにより, 目的物 **37** (22 mg, 30%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_D$ -117 (*c* 0.26, MeOH)

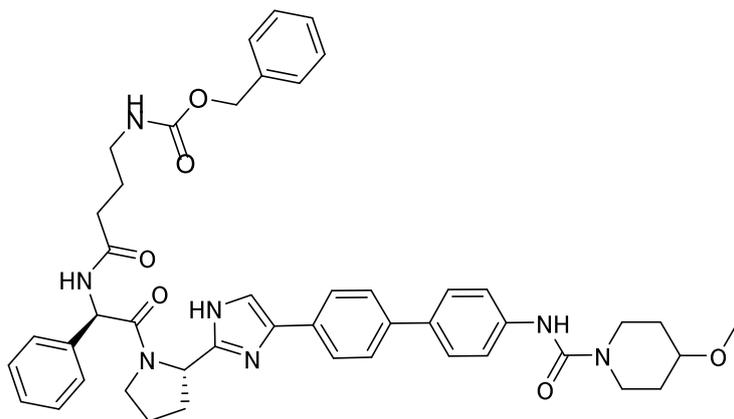
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ 12.17–11.51 (m, 1H), 9.93 (s, 1H), 8.66–8.47 (m, 1H), 7.88–6.88 (m, 20H), 5.73–5.51 (m, 1.3H), 5.12–4.93 (m, 2.7H), 4.00–3.87 (m, 0.7H), 3.66–3.18 (m, 1.3H), 3.25 (s, 3H), 3.17–3.06 (m, 1H), 3.04–2.88 (m, 2H), 2.41–1.75 (m, 11H), 1.69–1.56 (m, 2H), 1.55–1.41 (m, 2H), 1.20–1.07 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 Hz) δ 173.7, 172.9, 169.7, 156.8, 148.0, 137.1, 136.5, 135.0, 129.3, 129.0, 128.5, 128.2, 128.1, 127.3, 126.9, 125.1, 120.1, 78.3, 66.7, 56.7, 55.8, 55.7, 47.0, 45.7, 40.1, 33.1, 31.1, 29.3, 27.8, 25.8, 24.6.

IR (ATR) 3270, 2925, 1697, 1635, 1506, 1417, 1373, 1317, 1244, 1180, 1085, 1024, 1002, 923, 821, 696, 605, 518, 418 cm⁻¹.

HRMS(ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₄₇H₅₃N₆O₆ 797.4021, found 797.4015.

Benzyl (4-(((R)-2-((S)-2-(4-(4'-((4-methoxypiperidine-1-carboxamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1*H*-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)amino)-4-oxobutyl)carbamate (38)



34 (60 mg, 0.0914 mmol) を THF (1 ml) に溶解し, CDI (18 mg, 0.110 mmol) を加え, 終夜室温撹拌した。この反応液に 4-methoxypiperidine (13 mg, 0.110 mmol) を加え, 5 時間室温撹拌した後, 反応液を減圧留去した。これにメタノール (0.5 ml) および炭酸カリウム (13 mg, 0.0914 mmol) を加えて 40 分間室温撹拌した後, 酢酸エチルおよび炭酸水素ナトリウム水溶液を加え, 酢酸エチルで抽出した。有層を水, 食塩水で順次洗浄後, 有層を硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 90/10) で精製することにより, 目的物 **38** (18 mg, 25%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]_D^{25}$ -138 (c 0.25, MeOH)

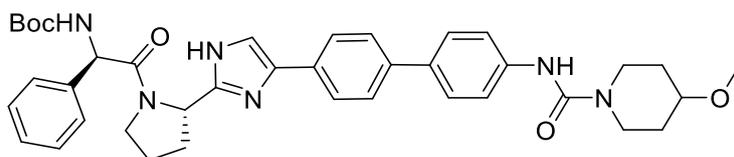
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.04–11.53 (m, 1H), 8.67–8.47 (m, 1H), 7.85–6.86 (m, 21H), 5.77–5.50 (m, 1.3H), 5.14–4.89 (m, 2.7H), 3.98–3.86 (m, 0.7H), 3.84–3.74 (m, 2H), 3.65–3.07 (m, 4.3H), 3.28 (s, 3H), 3.03–2.90 (m, 2H), 2.25–2.15 (m, 2H), 2.11–1.78 (m, 6H), 1.71–1.54 (m, 2H), 1.47–1.32 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) δ 172.8, 169.7, 156.8, 154.9, 147.9, 140.5, 138.6, 136.6, 135.2, 133.4, 129.3, 128.9, 128.5, 128.2, 128.1, 127.2, 126.8, 125.2, 124.8, 120.1, 75.4, 66.6, 56.6, 55.8, 47.0, 41.6, 40.1, 33.1, 30.5, 29.3, 25.8, 24.6.

IR (ATR) 3250, 2920, 1699, 1629, 1508, 1419, 1317, 1232, 1180, 1130, 1095, 1076, 1020, 1002, 821, 696, 601, 516, 405 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C $_{46}$ H $_{52}$ N $_7$ O $_6$ 798.3974, found 798.3972.

tert-Butyl ((R)-2-((S)-2-(4-(4'-methoxypiperidine-1-carboxamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate (40)



実験項

17 (100 mg, 0.186 mmol) を THF (1 ml) に溶解し, CDI (36 mg, 0.223 mmol) を加え, 終夜室温攪拌した。この反応液に市販の 4-methoxypiperidine (26 mg, 0.223 mmol) を加え, 2 時間室温攪拌した後, 反応液を減圧留去した。これにメタノール (0.5 ml) および炭酸カリウム (26 mg, 0.186 mmol) を加えて 1 時間室温攪拌した後, 酢酸エチルおよび炭酸水素ナトリウム水溶液を加え, 酢酸エチルで抽出した。有層を水, 食塩水で順次洗浄後, 有層を硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 100/0 → 90/10) で精製することにより, 目的物 **40** (93 mg, 74%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_D$ -123 (*c* 0.26, MeOH)

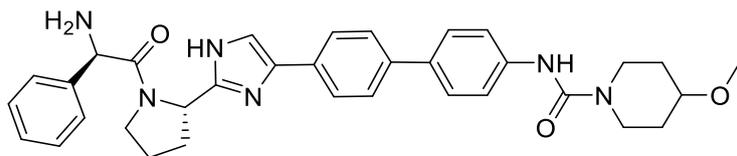
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 11.95–11.63 (m, 1H), 9.42–9.11 (m, 0.3H), 8.64–8.35 (m, 0.7H), 7.90–6.50 (m, 15H), 5.57–5.18 (m, 1.3H), 5.16–4.98 (m, 0.7H), 3.92–3.74 (m, 2H), 3.69–3.30 (m, 9H), 3.29–3.25 (m, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.20–3.07 (m, 2H), 2.11–1.71 (m, 6H), 1.45–1.14 (m, 11H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 100 Hz) 170.3, 155.7, 154.9, 148.0, 138.5, 135.8, 129.2, 128.8, 128.0, 127.2, 126.8, 125.1, 120.2, 112.0, 96.8, 80.3, 75.3, 57.5, 55.7, 55.5, 47.0, 41.6, 30.4, 28.3, 24.7.

IR (ATR) 3280, 2910, 1633, 1504, 1487, 1420, 1365, 1315, 1232, 1157, 1095, 1076, 1053, 1022, 1002, 821, 754, 698, 553, 516 cm^{-1} .

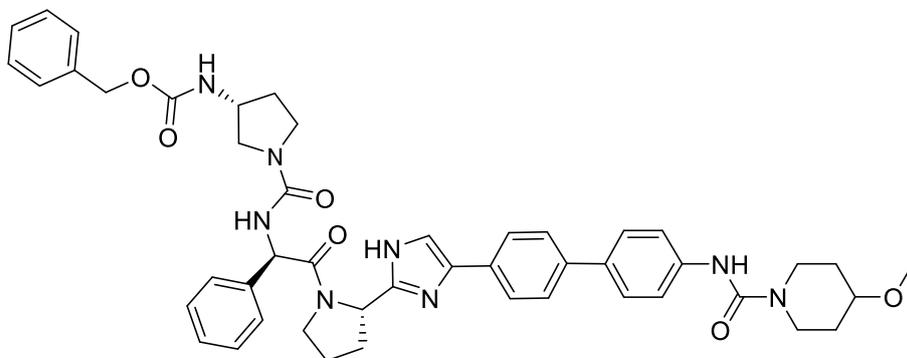
HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C₃₉H₄₇N₆O₅ 679.3602, found 679.3605.

N-(4'-(2-((*S*)-1-((*R*)-2-Amino-2-phenylacetyl)pyrrolidin-2-yl)-1*H*-imidazol-4-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-methoxypiperidine-1-carboxamide (**41**)



40 (60 mg, 0.0884 mmol) にクロロホルム (1 ml) を加えて溶解し, TFA (0.5 ml) を加えて 1 時間室温攪拌した。反応液を減圧濃縮し, 酢酸エチル/メタノール (10/1) を加えた後, 炭酸水素ナトリウム水溶液にて中和した。これを酢酸エチルで抽出し, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮することにより, 目的物 **41** の粗生成物 (50 mg) を無色固体として得た。粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。

Benzyl ((R)-1-(((R)-2-((S)-2-(4-(4'-(4-methoxypiperidine-1-carboxamido)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-imidazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamoyl)pyrrolidin-3-yl)carbamate (39)



41 の粗生成物 (50 mg, 0.0884 mmol) に DMF (0.5 ml) を加え, $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$ (0.023 ml, 0.133 mmol) を加えた後, **42d** の粗生成物 (35 mg, 0.124 mmol) を加え, 4 時間室温撹拌した。反応液に酢酸エチル/水を加え, 酢酸エチルで抽出し, 有機層を水で 2 回, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾去後, 濾液を減圧濃縮し, 得られた残渣を薄層シリカゲルクロマトグラフィー (AcOEt/MeOH = 90/10) で精製することにより, 目的物 **39** (16 mg, 22%) を無色アモルファスとして得た。

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -141$ (c 0.20, MeOH)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 Hz) δ 12.10–11.51 (m, 1H), 8.61–8.56 (m, 1H), 7.88–7.75 (m, 2H), 7.72–7.23 (m, 17H), 7.18–6.91 (m, 1H), 6.69–6.39 (m, 1H), 5.67–5.42 (m, 1.3H), 5.15–4.84 (m, 2.7H), 4.10–3.88 (m, 1.7H), 3.84–3.73 (m, 2H), 3.70–3.07 (m, 8.3H), 3.27 (s, 3H), 2.20–1.55 (m, 8H), 1.48–1.32 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl $_3$, 100 Hz) 170.9, 170.7, 156.9, 156.6, 155.8, 155.3, 154.9, 148.7, 148.0, 140.9, 138.9, 138.8, 138.4, 138.3, 136.2, 135.7, 135.3, 134.9, 134.7, 133.4, 131.3, 129.4, 129.3, 129.1, 128.9, 128.8, 128.6, 128.5, 128.2, 128.1, 127.1, 126.8, 126.7, 125.3, 125.2, 124.8, 120.0, 119.7, 111.8, 75.4, 66.8, 57.9, 57.5, 55.9, 55.8, 55.7, 51.5, 50.6, 46.7, 46.5, 43.9, 43.5, 41.7, 41.6, 30.4, 30.3, 24.3, 24.1.

IR (ATR) 3220, 2960, 1699, 1625, 1506, 1420, 1315, 1230, 1180, 1153, 1093, 1074, 1022, 1002, 939, 854, 821, 752, 696, 615, 555, 518, 428 cm^{-1} .

HRMS(ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for C $_{47}$ H $_{53}$ N $_8$ O $_6$ 825.4083, found 825.4090.

参考文献

- 1) 月刊薬事 2020年1月 臨時増刊号 (Vol.62 No.2)
- 2) 日本臨牀 2011年 69卷 増刊号4号
- 3) 一般社団法人 日本肝臓学会 C型肝炎治療ガイドライン (第8版)
https://www.jsh.or.jp/medical/guidelines/jsh_guidlines/
- 4) Petruzzello, A.; Marigliano, S.; Loquercio, G.; Cozzolino, A.; Cacciapuoti, C. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 7824.
- 5) 鎌江伊三夫; 熊田博光; 小林正宏, Ward, T.; Webster, S.; Yuan, Y.; Kalsekar, A.; 井上幸恵; 鄭珠; McEwan, P. *肝臓* **2014**, *55*, 589.
- 6) Moriishi, K.; Matsuura, Y. *Antivir. Chem. Chemother.* **2003**, *14*, 285.
- 7) Hoofnagle, J. H.; Seeff, L. B. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 2444.
- 8) Parkin, J.; Cohen, B. *Lancet* **2001**, *357*, 1777.
- 9) Feld, J. J.; Hoofnagl, J. H. *Nature* **2005**, *436*, 967.
- 10) 加藤宣之 *ウイルス* **2008**, *58*, 191.
- 11) Götte, M.; Feld J. J. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13*, 338.
- 12) Patil, V. M.; Gupta, S. P.; Samanta, S.; Masand, N. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 5564.
- 13) Stedman, C. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2014**, *7*, 131.
- 14) Gao, M.; Nettles, R. E.; Belema, M.; Snyder, L. B.; Nguyen, V. N.; Fridell, R. A.; Serrano-Wu, M. H.; Langley, D. R.; Sun, J.-H.; O'Boyle, D. R., II; Lemm, J. A.; Wang, C.; Knipe, J. O.; Chien, C.; Colonno, R. J.; Grasela, D. M.; Meanwell, N. A.; Hamann, L. G. *Nature* **2010**, *465*, 96.
- 15) Bachand, C.; Belema, M.; Deon, D. H.; Good, A. C.; Goodrich, J.; James, C. A.; Lavoie, R.; Lopez, O. D.; Martel, A.; Meanwell, N. A.; Nguyen, A. N.; Romine, J. L.; Ruediger, E. H.; Snyder, L. B.; St. Laurent, D. R.; Yang, F.; Langley, D. R.; Wang, G.; Hamann, L. G. World Patent Application WO-2008/021927, February 21, 2008.
- 16) Tellinghuisen, T. L.; Marcotrigiano, J.; Rice, C. M. *Nature* **2005**, *435*, 374.
- 17) Fridell, R. A.; Wang, C.; Sun, J.-H.; O'Boyle, D. R., II; Nower, P.; Valera, L.; Qiu, D.; Roberts, S.; Huang, X.; Kienzle, B.; Bifano, M.; Nettles, R. E.; Gao, M. *Hepatology* **2011**, *54*, 1924.
- 18) Yu, W.; Tong, L.; Selyutin, O.; Chen, L.; Hu, B.; Zhong, B.; Hao, J.; Ji, T.; Zan, S.; Yin, J.; Ruck, R. T.; Curry, S.; McMonagle, P.; Agrawal, S.; Rokosz, L.; Carr, D.; Ingravallo, P.; Bystol, K.; Lahser, F.; Liu, R.; Chen, S.; Feng, K.; Cartwright, M.; Asante-Appiah, E.; Kozlowski, J. A. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3984.
- 19) Wong, K. A.; Worth, A.; Martin, R.; Svarovskaia, E.; Brainard, D. M.; Lawitz, E.; Miller, M. D.; Mo, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 6333.
- 20) Krishnan, P.; Beyer, J.; Mistry, N.; Koev, G.; Reisch, T.; DeGoey, D.; Kati, W.; Campbell, A.; Williams, L.; Xie, W.; Setze, C.; Molla, A.; Collins, C.; Pilot-Matias, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 979.
- 21) Kwo, P.; Gane, E. J.; Peng, C. Y.; Pearlman, B.; Vierling, J. M.; Serfaty, L.; Buti, M.; Shafran, S.; Stryszak, P.; Lin, L.; Gress, J.; Black, S.; Dutko, F. J.; Robertson, M.; Wahl, J.; Lupinacci, L.; Barr, E.; Haber, B. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 164.
- 22) Ng, T. I.; Krishnan, P.; Pilot-Matias, T.; Kati, W.; Schnell, G.; Beyer, J.; Reisch, T.; Lu, L.; Dekhtyar, T.; Irvin, M.; Tripathi, R.; Maring, C.; Randolph, J. T.; Wagner, R.; Collins, C.

- Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02558.
- 23) Belema, M.; Nguyen, V. N.; Romine, J. L.; St. Laurent, D. R.; Lopez, O. D.; Goodrich, J. T.; Nower, P. T.; O'Boyle, D. R., II; Lemm, J. A.; Fridell, R. A.; Gao, M.; Fang, H.; Krause, R. G.; Wang, Y. K.; Oliver, J.; Good, A. C.; Knipe, J. O.; Meanwell, N. A.; Snyder, L. B. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1995.

謝辞

本論文の執筆に際し、終始懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました金沢大学大学院自然科学研究科 宇梶裕 教授に心より厚く御礼申し上げます。また、本論文の審査にあたり、有益なご指導及びご助言を賜りました、金沢大学大学院自然科学研究科 前多肇 教授、金沢大学大学院自然科学研究科 本田光典 教授、金沢大学大学院自然科学研究科 添田貴宏 准教授、金沢大学大学院自然科学研究科 古山溪行 准教授に心より感謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいました、日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 春田純一 前所長、化学研究所 新海久 元所長に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際し、終始多大なるご指導を賜りました日本たばこ産業株式会社 生産技術研究所 稲葉隆之 前所長、化学研究所 前田公也 副所長に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、終始多大なるご協力とご助言を頂きました、日本たばこ産業株式会社 化学研究所 井上照彦 グループリーダー、化学研究所 奥田聡 研究員、化学研究所 近藤健太郎 研究員、化学研究所 青木健太 研究員、化学研究所 玉谷義憲 研究員、化学研究所 藤岡真悟 研究員、研究企画部 照井洸 研究員、化学研究所 堀亜希美 研究員、安全性研究所 赤木祐介 研究員に深謝いたします。また、本研究の薬理試験を実施して頂きました、日本たばこ産業株式会社 生物研究所 菰田泰正 研究員、臨床開発部 木下渉 研究員に深謝いたします。また、本研究の薬物動態試験を実施して頂きました、日本たばこ産業株式会社 薬物動態研究所 伊東惣一郎 副所長に深謝いたします。また、本研究の構造解析や分析を実施して頂きました、日本たばこ産業株式会社 生産技術研究所 高橋光 研究員、生産技術研究所 永尾英太 研究員、生産技術研究所 久保直毅 研究員、生産技術研究所 岩井隆宏 研究員に深謝いたします。また、本論文を纏める機会を与えてくださいました、日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 大川滋紀 所長、生産技術研究所 小野木照二 所長、生産技術研究所 佐川勝一 副所長、化学研究所 佐藤元秀 所長、塩崎真 副所長に深謝いたします。

最後に、本研究の遂行および本論文の執筆に関して終始支えてくれました家族に対し、感謝いたします。