

博士論文

関節リウマチ治療薬の開発を目的とした
PI3K γ 阻害物質の創薬研究

東京薬科大学

岡 裕輔

**Structure-activity relationship and synthetic
studies on PI3K γ inhibitors
for the treatment of rheumatoid arthritis**

Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Yusuke Oka

目次

緒言	1
第一章 PI3K γ 阻害活性を有する新規 2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体の創出	12
第一節 ドラッグデザイン	12
第二節 オキサゾール 2 位誘導体の合成および構造活性相関	16
第三節 PI3K γ 阻害活性と溶解性を併せもつ化合物 4 の創出	25
第四節 小括	30
第二章 経口投与可能な新規 2-アミノ-5-オキサジアゾリルチアゾール誘導体の創出	31
第一節 変異原性の回避を狙ったドラッグデザインおよび 2-アミノ-5-オキサジアゾリルチアゾール誘導体の創出	31
第二節 オキサジアゾール 3 位誘導体の合成および構造活性相関	35
第三節 誘導体の薬物動態学的特性	41
第四節 化合物 8 (TASP0415914) の薬理学的評価	43
第五節 小括	45
第三章 2-スルファニルオキサゾール誘導体の新規合成法の開発	46
第一節 既存法の問題点および新規合成法の開発	46
第二節 基質一般性	49
結語	51

実験の部	53
第一章の合成に関する実験	54
第二章の合成に関する実験	63
第三章の合成に関する実験	69
薬理, 物性, 動態, 安全性, <i>in silico</i> に関する実験	70
参考文献	74
謝辞	80

略語表

AcOH	acetic acid
ADME-T	absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
ATP	adenosine 5'-triphosphate
AUC	area under the curve
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
CI	chemical ionization
cLogD	calculated logarithm of the octanol/water distribution coefficient
CIA	collagen induced arthritis
CYP	cytochrome P450
DMARDs	disease modifying antirheumatic drugs
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EI	electron ionization
ESI	electrospray ionization
FAB	fast atom bombardment
GPCRs	G-protein-coupled receptors
hMS	human liver microsome
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HRMS	high resolution mass spectra
HTS	high-throughput screening
mCPBA	<i>m</i> -chloroperoxybenzoic acid
MOE™	molecular operating environment
MS	mass spectrometry, microsomal stability
NMR	nuclear magnetic resonance
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
PCC	pyridinium chlorochromate
PDB	protein data bank

PI	phosphatidylinositol
PI3K	phosphoinositide (phosphatidylinositol) 3-kinase
PyBOP [®]	1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yloxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate
rMS	rat liver microsome
THF	tetrahydrofuran
TMS	tetramethylsilane
TOF	time-of-flight
EDC·HCl	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

緒言

本論文は新規関節リウマチ治療薬の開発を目指した、経口投与可能な低分子 PI3K γ 阻害物質の創薬研究に関するものである。はじめに研究の背景と概要を述べる。

関節リウマチは慢性炎症性自己免疫疾患であり、自己の免疫が主に手足の関節を異物と認識し、免疫応答によって関節滑膜に腫れ・痛みが多発的に生じ、やがては運動機能障害に至る。¹⁾ 国内の関節リウマチ患者数は約 70–80 万人、世界中で約 2,370 万人とされているが、関節リウマチの年間発症数および潜在的な患者数等に関する情報は詳細には把握されていない。また、その病因に関しても十分に解明されておらず、効果的な対症療法は存在するものの、根治的な治療法は未だ確立されていない。さらに、関節リウマチは病態の進展とともに骨・軟骨が破壊される疾患であるため、悪化するまで適切な治療をしない場合には、関節機能が低下して日常生活動作に障害を来し、生活の質が低下する。²⁾ そのため、現在、世界的に疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) を用いた、早期かつ積極的な薬物療法がとられている。³⁾ Figure 1 に主な DMARDs の構造を示す。

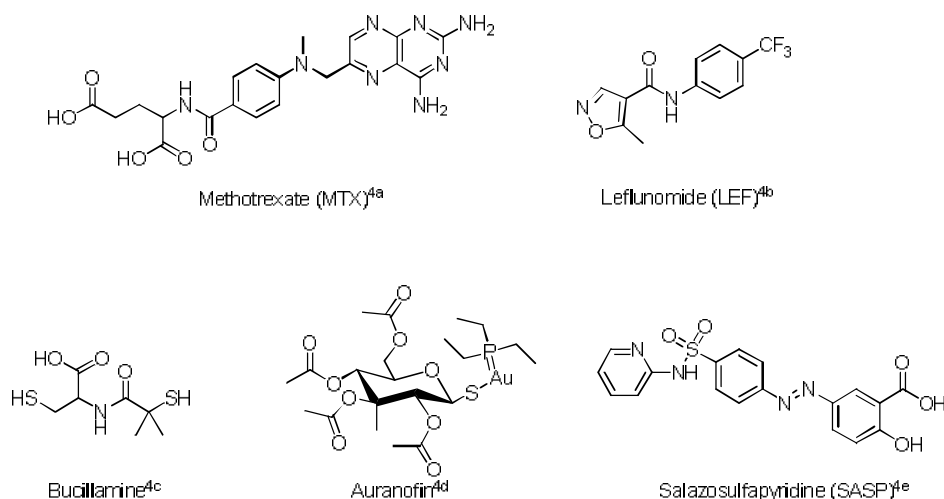


Figure 1. Chemical structure of DMARDs.^{4a-4e)}

しかし、薬剤ごとに差はあるが DMARDs の有効率は 20–50%であり、関節リウマチ治療の第一選択薬とされるメトトレキサート (MTX) の有効率でさえ 50–60%に留まる。⁵⁾ MTX にはこのように半分程度の患者に無効であること (ノンレスポnderの存在) に加え、間質性肺炎等の重篤な副作用のために高用量の投与ができないといった問題がある。⁶⁾ さらに、MTX を含む DMARDs 全般について、実際の臨床治療において薬剤が効かなくなるエスケープ現象が確認されている。¹⁾ 関節リウマチは完治することが困難であり、長期間薬剤を投与することが必要となるため、作用機序が異なり、エスケープ現象の起こり難い薬剤が望まれている。また、一般的に DMARDs は効果発現までに時間を要するため、それまでの期間は非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の投与が必要であり、⁷⁾ 速やかな抗炎症作用と関節組織破壊の抑制作用を併せもつ薬剤が望まれている。

医療現場における関節リウマチの薬物療法に関して、これまでに「目標達成に向けた治療」(Treat to Target: T2T) のガイドラインがまとめられ、⁸⁾ 2011 年には関節リウマチの新寛解基準が定められた。⁹⁾ その勧告では、MTX がすべての治療法の基本とされ、さらなる寛解基準に達するには MTX と他の DMARDs もしくはインフリキシマブ等の生物学的製剤の併用が推奨されている。しかし、生物学的製剤については、悪性腫瘍、感染症等の副作用が発現することや、患者の薬剤費負担が大きいことが問題として挙げられる。¹⁰⁾

以上より、関節リウマチ治療における薬剤選択の観点から、新規な作用機序を有する経口低分子薬の登場が望まれる。

第一節 関節リウマチのメカニズムと生体における PI3K γ の役割

関節リウマチは自己免疫疾患の一種であり、滑膜炎の進行とともに徐々に骨・軟骨の破壊が進行する疾患である。関節リウマチの発症から骨破壊に至る過程の中で大きな役割を演じているのが、活性化 T 細胞による初期自己免疫応答の開始、炎症性マクロファージの浸潤と活性化、滑膜線維芽細胞の炎症・増殖、破骨細胞の活性化であると考えられている。近年、関節リウマチの病態が明らかになるにつれて、これらに関するシグナルを標的にした新しい関節リウマチ治療薬の研究が注目されるようになってい

る。¹¹⁾ ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3Ks) は、ホスファチジルイノシトール (PI) の 3 位のヒドロキシ基をリン酸化する酵素である。PI3Ks を介して産生されたホスファチジルイノシトール-3,4,5-トリリン酸 (PIP3) がセカンドメッセンジャーとなり、その下流の Akt のリン酸化を引き起こすことで、細胞の成長・分化・遊走・代謝等の生物学的プロセスを制御している。¹²⁾ そのため、細胞内シグナル伝達において PI3Ks は重要な役割を担っている (Figure 2)。

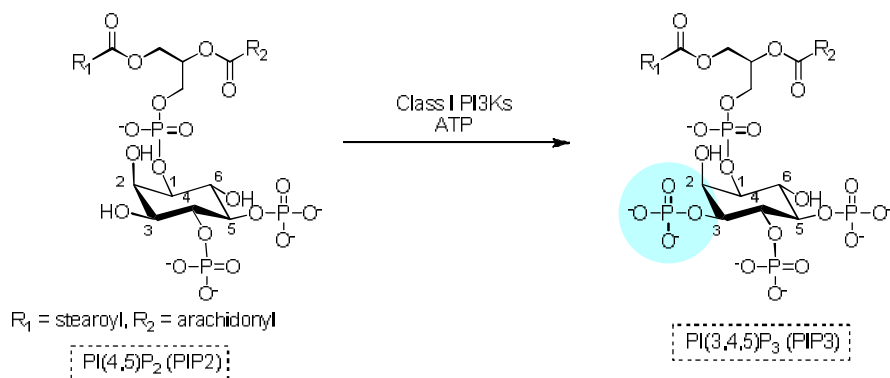


Figure 2. The representative role of class I PI3Ks.

また、PI3Ks は細胞増殖およびアポトーシスにも深く関与しており、関節リウマチの滑膜組織でも活性化していることが報告されている。¹³⁾ PI3Ks ファミリーは、その構造の相同性と基質特異性から、三つのクラス (I, II および III) に分類されるが、そのうちシグナル伝達に重要であるのはクラス I の PI3Ks である。ヒトの PI3Ks ファミリーのうち、クラス I に属するものは触媒サブユニット (分子量: 約 110 kDa) および非触媒サ

ブユニット (分子量 : 50, 55, 85 もしくは 101 kDa) からなり, ホスファチジルイノシトール (PI), ホスファチジルイノシトール-4-モノリン酸 (PIP) およびホスファチジルイノシトール-4,5-ジリン酸 (PIP2) をリン酸化することが知られている.¹⁴⁾

クラス I の PI3Ks は, さらにクラス IA (α, β, δ) および IB (γ) に分類される. クラス IA の PI3Ks は, ホルモンおよび増殖因子等の様々な細胞表面レセプターと会合しており, チロシンキナーゼのシグナル伝達により活性化される. 一方, クラス IB の PI3Ks は, 主にケモカイン等のレセプターである 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 (GPCRs) と会合しており, PIP2 のリン酸化により産生された PIP3 は細胞内でのシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして働く (Figure 3).^{15,16)}

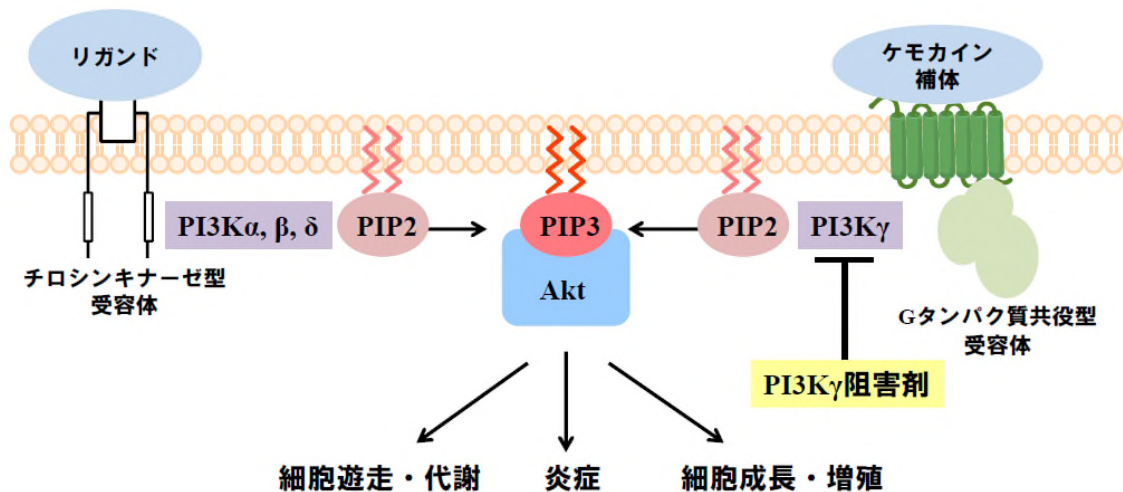


Figure 3. The proposed mechanism of intracellular signaling and mode of action of PI3K γ inhibitors.

PI3K α と PI3K β は種々の細胞に遍在的に存在するのに対し, PI3K γ と PI3K δ は主に造血細胞 (血液・免疫) 系に局在している (Table 1).¹⁷⁾ さらに, PI3K γ の欠損マウスでは, 抗 CD3 および抗 CD28 抗体を用いた T 細胞の共刺激により T 細胞数が減少し, IL-2, IFN γ の産生等も抑制されることが報告されている.¹⁸⁾ このことから, PI3K γ が T 細胞の活性化, 炎症性サイトカインの浸潤および活性化に深く関与していることが明らかとなっており, 関節リウマチの発症において PI3K γ は重要な酵素であると考えられている.¹⁹⁾ また, PI3K γ の欠損マウスでは関節炎の改善のみならず, 骨・軟骨の破壊も抑制されることが報告されている.²⁰⁾

Table 1. The Classification of class I PI3Ks, their distributions and functions.

	クラス	分布	機能
PI3K α	クラス IA	遍在	インスリン受容体シグナル伝達
PI3K β	クラス IA	遍在	インテグリン発現調節
PI3K δ	クラス IA	血液・免疫系	T細胞, B細胞の活性化
PI3K γ	クラス IB	血液・免疫系	ケモカインシグナル, T細胞の活性化

以上, これまでの知見から, 経口投与可能な PI3K γ 選択的阻害剤は, PI3K γ の分布が局在していることから安全性が高く, 既存薬とは作用機序が異なり, かつ他剤では進行を抑制しにくい関節組織の破壊を制御しうる画期的な新規関節リウマチ治療薬になると期待される.²¹⁾

第二節 PI3K γ 阻害薬研究の現況²²⁾

Lilly 社で見出された LY294002²³⁾ および真菌 *Penicillium funiculosum* の発酵産物である Wartmannin²⁴⁾ は PI3K 阻害剤として *in vitro* の研究に広く用いられてきた。しかし、LY294002 は経口投与することができず、さらにマウスへの投与で重篤な皮膚の障害が認められている。²⁵⁾ また、Wartmannin は肝毒性を示すことが報告されている。²⁶⁾ これらの阻害剤はクラス I PI3Ks 以外のキナーゼも阻害することから、非選択的なキナーゼ阻害による毒性が懸念されてきた。²⁷⁾

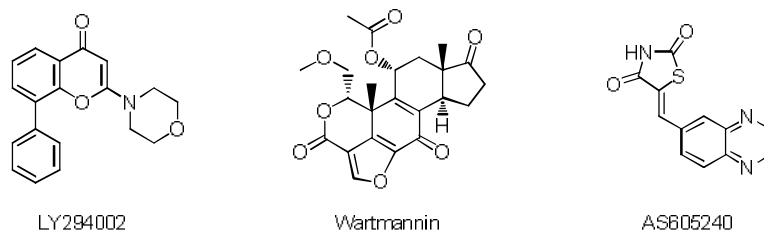


Figure 4. Known PI3K inhibitors and AS605240 as PI3K γ inhibitor.

一方、PI3K γ 阻害剤として 2005 年に Serono 社の Camps らのグループにより報告された AS605240 には明らかな毒性所見は認められず、PI3K γ 選択的な阻害を起こすため、生体への影響が少ないことが示された。また AS605240 は、好中球等の炎症細胞が関節局所へ遊走することを阻害し、2 種の関節炎モデル (コラーゲン誘発性関節炎マウス (CIA) と全身性エリテマトーデスモデルマウス) において、経口投与で有効であることが示された (Figure 4).^{28,29)} この報告を契機として、PI3K γ 阻害剤の創出を目指して本研究を始めることとした。

PI3K γ をターゲットとした低分子阻害薬として AS605240 を見出した Serono 社は、続く 2006 年に、PI3K γ 選択性により優れた AS252424 を報告している。³⁰⁾ 近年も、前臨床段階の化合物として Cellzome (現 GlaxoSmithKline) 社からトリアゾロピリジン誘導体³¹⁾ が、Exelixis 社からアミノピラジン誘導体³²⁾ が報告された。さらに Novartis 社からアミノチアゾール誘導体³³⁾、TargeGen (現 Sanofi) 社からプテリジン誘導体である TG100-115³⁴⁾ 等が報告されており、創薬標的としての PI3K γ に対する関心の高さが伺える。また、Intellikine (現 Takeda) 社から見出された Duvelisib (INK-1197)³⁵⁾ は、PI3K γ

および PI3K δ を阻害し、関節リウマチ、喘息等の免疫介在性の炎症性疾患および血液腫瘍を適応として第二相臨床試験を実施中である (Figure 5).

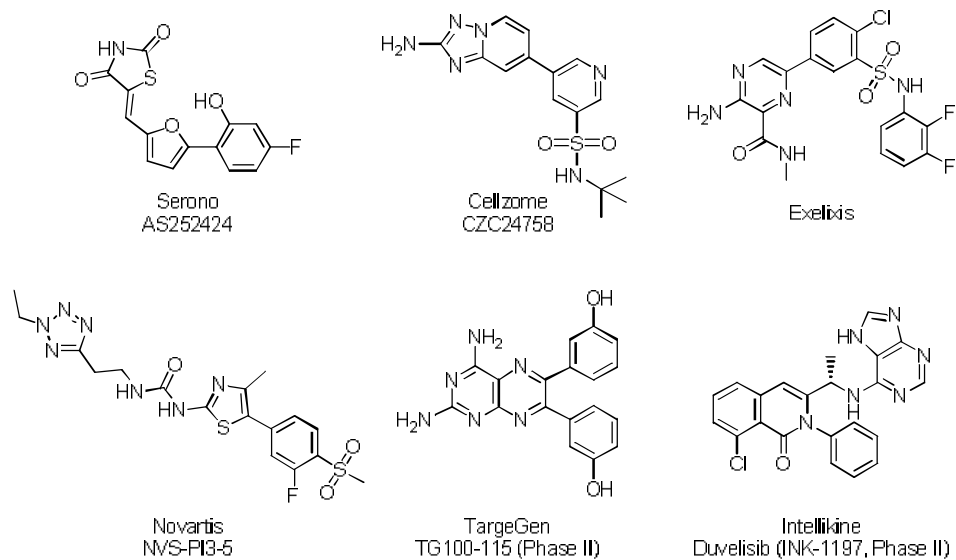


Figure 5. Representative PI3K γ inhibitors.

第三節 本研究成果の概略

関節リウマチ治療の現状，疾患のメカニズムおよび従来の PI3K γ 阻害薬研究の知見をふまえ，安全に長期間使用可能な新規関節リウマチ治療薬の創出を目指し，経口投与可能な PI3K γ 阻害剤の創薬研究に着手した．

本論第一章では，社内 HTS により得られたヒット化合物 **1** からの 2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体 **2** の創出，およびオキサゾール環の 2 位置換基の構造活性相関について論じる (Figure 6)．すなわち，まず，タンパク質構造データベース (PDB) に登録された PI3K γ 阻害剤である PIK-93 の複合体 X 線共結晶構造の情報を利用して，PIK-93 と同じアセチルアミノチアゾール構造をもつ化合物 **1** と PI3K γ の ATP binding site との結合を予測し，ファーマコフォアを抽出した．その後，活性への寄与が小さいと推察された分子中央のチアゾール環を別のヘテロ芳香環に変換することで，新規性と PI3K γ 阻害活性を併せもつ化合物へと展開し，オキサゾール環をもつ新規リード化合物 **2** を見出した．しかし，**2** はマウス由来の株を用いた細胞評価系では阻害作用を示さなかった (Akt IC₅₀ > 10,000 nM)．著者は，酵素系と細胞系での阻害活性の乖離は，カルボン酸部位の存在のために膜透過性が低いことに起因すると考察した．そこで，その改善を目指した誘導体合成の結果，細胞系でも阻害活性をもつ化合物 **3** (PI3K γ IC₅₀ = 3 nM, Akt IC₅₀ = 59 nM) を見出した．化合物 **3** は水への溶解度を高めることが課題であったが (0.39 μ g/mL in water)，オキサゾール環の 2 位に脂肪族側鎖を導入し，芳香環数を減らして平面性を緩和させることで克服された．すなわち，PI3K γ 酵素系および細胞系での阻害活性を示し，水溶性が約 100 倍 (35.20 μ g/mL in water) 改善された化合物 **4** を創出することに成功した (Figure 6).³⁶⁾ しかしながら，化合物 **4** の脱アセチル体は，ラット肝ホモジネートである S9 処理により変異原性をもつことが判明し，その回避が新たな課題となった．

本論第二章では，まず，化合物 **4** の脱アセチル体 **4'** がもつ変異原性を回避するためのドラッグデザインについて述べ，次にオキサジアゾール誘導体 **5** の脱アセチル体 **5'** が変異原性を回避できた理由について，**4'** との静電ポテンシャルの比較から論じる．

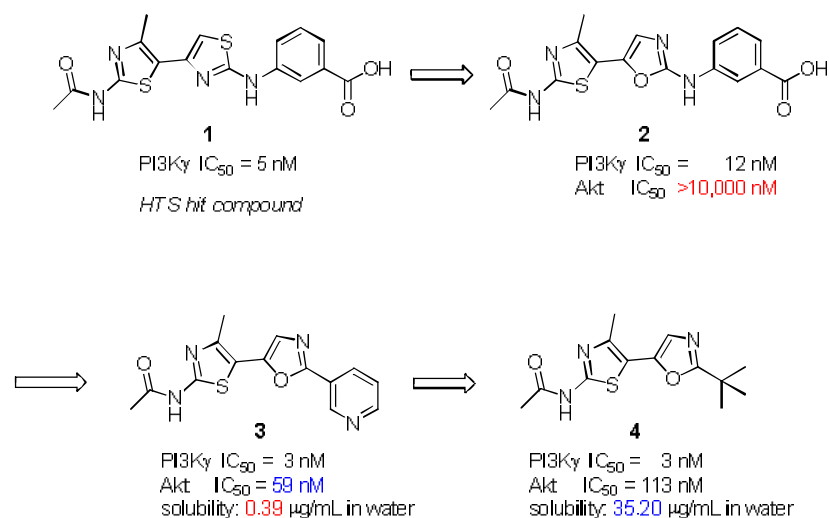


Figure 6. Structural modification of HTS hit compound **1** (chapter 1).

脱アセチル体 **4'** の変異原性は、S9 非存在下では認められず、S9 存在下で確認された。一方で、化合物 **4** 自体は S9 の有無にかかわらず変異原性を示さなかったことから、脱アセチル化された **4'** の変異原性は、チアゾール 2 位のアミノ基が代謝活性化されることで誘発された遺伝子突然変異性であることが判明した。すなわち、S9 存在下では、芳香族アミンが水酸化酵素である CYP により代謝され、ヒドロキシルアミンが形成されることで変異原性が誘発されると推察した。そこで、アミノ基の酸化電位を低下させて CYP による酸化を妨げ、ヒドロキシルアミンの形成を阻害することとした。著者は、アミノ基の酸化電位を低下させるアプローチとして、分子中央のオキサゾール環を電子欠乏型のヘテロ芳香環に置き換えるドラッグデザインを立案した。すなわち、二つのヘテロ芳香環を介した電子求引性共鳴効果を利用し、活性発現に必須であるアミノチアゾール構造自体を変えることなく、そのアミノ基の酸化電位だけを低下させることを計画した。その結果、中心のオキサゾール環を π -電子欠乏型のオキサジアゾール環に変換した化合物 **5** は PI3K γ に対して良好な阻害活性を示し、かつ期待通り脱アセチル体 **5'** の Ames 試験結果は陰性であった (Figure 7)。

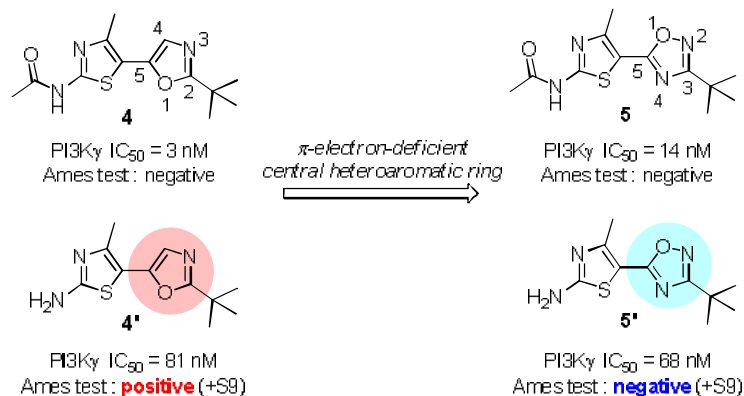


Figure 7. Drug design based on the mutagenic mechanism (chapter 2).

さらに、化合物 **5** を新規リードとして、前章の 2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体の構造活性相関の情報を活用し、オキサジアゾール環 3 位の側鎖構造が異なる種々の誘導体を合成した。その結果、酵素系でも細胞系においても、化合物 **5** と同等以上の活性をもつ化合物 **6, 7** および **8** を創出するに至った (Figure 8)。

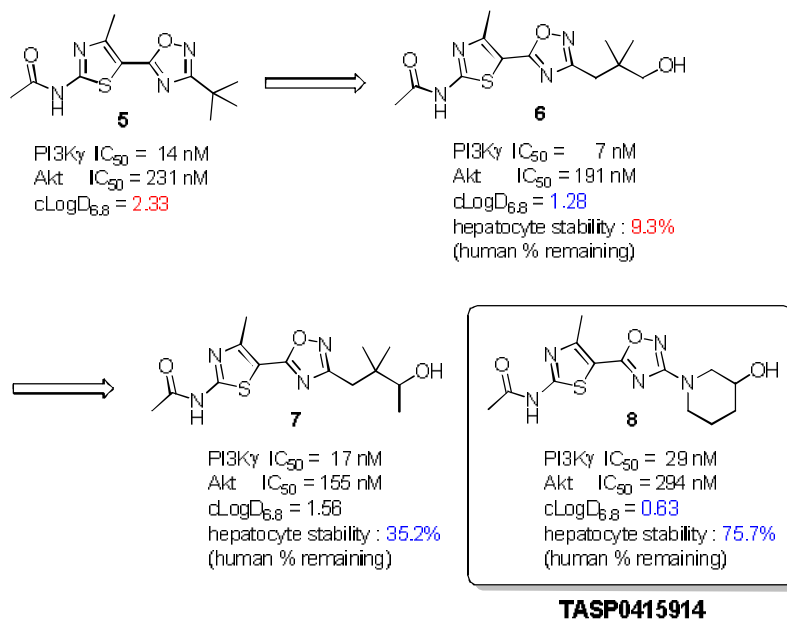


Figure 8. Structural modification (chapter 2).

それらの代謝安定性、ラットの血漿中薬物曝露量を調べ、*in vitro* プロファイルと薬物動態学的特性を勘案することにより、化合物 **8** を *in vivo* 薬効試験に供する化合物として選抜した。リウマチ関節炎に類似したマウスコラーゲン誘発関節炎 (CIA) モデル^{37,38)} での薬効試験から、この新規 PI3K γ 阻害剤 **8** (TASP0415914) が、経口投与で用量依存的に炎症スコアを改善することを明らかとした。³⁹⁾

本論第三章では、新規 2-スルファニルオキサゾール合成法の開発およびその基質一般性について論じる。化合物 **11** は、オキサゾール構造の 2 位に種々のヘテロ置換基をもつ各種誘導体を合成する際の共通中間体として、構造活性相関研究を遂行する上で、効率的に供給することが不可欠であった。しかし、従来の合成法では、副生物の生成および硫化水素の発生を伴う反応段階を経ること等の問題があった。そのため、これらの課題を解決する新規合成法を開発した。β-ケトアジドに対して、二硫化炭素の存在下、トリフェニルホスフィンを作用させる新規合成法は、既存の方法と比べて工程数が少なく、収率も高い。また、毒性の強い硫化水素を発生しないため、より安全である (Figure 9)。さらに、基質一般性の検討から、本反応は基質である β-ケトアジドの置換基による電子的な効果が収率に影響を与えるが、脂肪族および芳香族性の置換基をもつ様々な β-ケトアジドに広く適用可能であり、5 位に種々の置換基をもつ 2-スルファニルオキサゾール誘導体の合成に有用であることを明らかとした。⁴⁰⁾

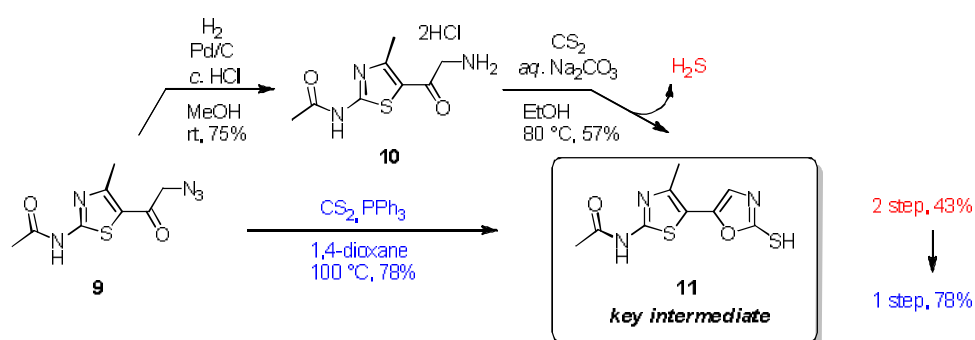


Figure 9. Novel and convenient synthesis of 2-sulfanyloxazole **11** (chapter 3).

第一章

PI3K γ 阻害活性を有する新規 2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体の創出³⁰⁾

第一節 ドラッグデザイン

キナーゼはリン酸化酵素とも呼ばれ、ATP のリン酸基を基質や標的分子のヒドロキシ基に転移させる酵素の総称である。その働きとしては、細胞機能を精密に調節し、生体内作用を制御する情報伝達プロセスにおいて重要な役割を担っている。PI3K γ が属する Class IB PI3K の触媒サブユニットの立体構造は、三つのドメイン、すなわち Ras-binding ドメイン、helical ドメイン (a PI3K accessory domain)、触媒ドメイン (kinase domain) で形成され、基質 (PIP, PIP₂) およびリン酸供与体 (ATP) を一つの複合体として結合し、次に γ -リン酸を供与体から基質のヒドロキシ基に転移させる。⁴¹⁾

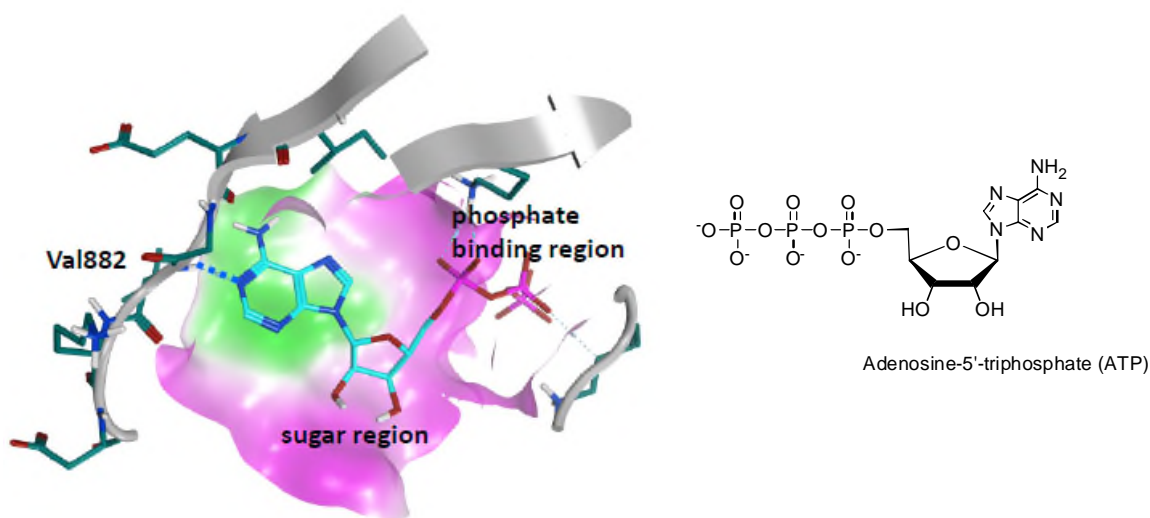


Figure 10. (left) X-ray co-crystal structure of PI3K γ catalytic domain and ATP (PDB code: 1E8X).⁴³⁾ Hydrogen bond is shown by dotted line (light blue). (right) Chemical structure of ATP.

PI3K γ 阻害剤および既知のキナーゼ阻害剤のほとんどは ATP の結合部位を標的とし、ATP に対して競合的に働く化合物である。その構造としては、ATP のアデニン部位をミ

ミックし、ヘテロ芳香環に適切に置換基を配置して水素結合ドナー部およびアクセプター部を併せもつように設計されたものが多い。⁴²⁾ さらに **sugar region** と呼ばれる親水性の領域等を効率的に利用することで、活性と選択性を確保している。一方で、ATP のリン酸部分に相当する **phosphate binding region** と呼ばれる領域は溶媒への露出が高く、キナーゼ阻害剤での利用度は低い (Figure 10)。

PI3K γ 阻害剤の創出にあたり、まず市販品を含む社内ライブラリー化合物を用いた HTS を実施した。はじめに、社内ライブラリーの中から、(1) ATP と競合可能な水素結合ドナー部およびアクセプター部をもつ低分子化合物、(2) 既知の PI3K γ 阻害剤の情報を基に類似構造検索および部分構造検索により集めた化合物、の合計約 12,000 種を選抜した。その後、この選抜化合物セットを用いて、HTS をスクリーニング部門において実施した。その結果、ヒット化合物として得られた化合物の多くが、プロテインキナーゼ阻害作用をもつことがすでに知られているアミノキナゾリン等の構造をもつものであり、他のキナーゼとの選択性に懸念のある化合物であった。その他のヒット化合物としては、多環式の不飽和化合物や α,β -不飽和カルボニル構造等をもつ化合物があったが、それらは合成面での展開性もしくは反応性代謝物の生成等の毒性面に懸念があった。このような状況下、著者は、自社 HTS で PI3K γ 酵素阻害活性が 5 nM であった化合物 **1** (Figure 11) に着目した。

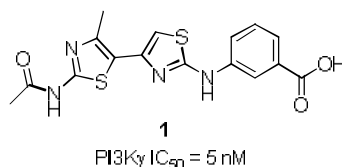


Figure 11. Chemical structure and PI3K γ inhibitory activity of the initial hit compound **1**.

調査の結果、この化合物は PI3K γ 阻害剤 (IC₅₀ = 10 nM) として Serono 社より特許請求されている化合物⁴⁴⁾ ではあったものの、合成展開によって新規性を確保しつつ、優れた PI3K γ 阻害活性をもつ誘導体の創製につながるのではないかと期待した。

アミノチアゾール構造をもつ PI3K γ 阻害剤としては、これまでに Novartis 社から PIK-93 や NVS-PI3-5³³⁾ が報告されている。なお、PIK-93 については、PI3K γ との X 線共結晶構造⁴⁵⁾ (PDB code: 2CHZ) が報告されていた (Figure 12)。

その結果, PIK-93 と同様に, ATP の水素結合部位であるバリン 882 がアミノチアゾール窒素原子およびアミノ基とそれぞれ水素結合していることが示された. また, アミノチアゾールの 4 位メチル基が疎水ポケットに適合すること, およびカルボキシ基がリジン 807, 833 と水素結合していることが示され, これが酵素系での強い阻害活性に寄与していると推察された. この結合予測から得られたファーマコフォアは, (1) ATP 結合部位と水素結合する基本骨格 (化合物 **1** ではアミノチアゾール部), (2) 塩基性アミノ酸であるリジンと相互作用しうる負電荷を帯びた官能基 (化合物 **1** では安息香酸部) の二つから構成される (Figure 13). そこで, 化合物 **1** のアミノチアゾール部と安息香酸部を固定し, 分子中央のチアゾール環を変換することで新規性を確保し, 活性を維持・向上させることを目指した.

第二節 オキサゾール 2 位誘導体の合成および構造活性相関

前節で述べたように、著者は、分子の中央に位置するチアゾール環の変換は PI3K γ 阻害活性に許容性が高いと推測し、それを別のヘテロ芳香環に変換することで新規性のある化合物を創出しようと考えた。本研究を始めた当初、PI3K γ 阻害剤として、アミノチアゾール構造にベンゼン環やピリジン等のヘテロ 6 員環が結合した構造をもつ化合物は報告されていたものの、ヘテロ 5 員環が結合した化合物は他社特許や文献にも、チアゾール環を除きほとんど報告例がなかった。そのため、新規性のあるヘテロ 5 員環の結合した誘導体を種々合成することとした。

先述の PIK-93 と PI3K γ との共結晶においては、チアゾール環とベンゼン環が互いに同一平面を占める立体配座をとっており、その平面性 (二面角 $\theta \cong 1^\circ$) が活性に重要であることが示唆された (PIK-93 IC₅₀ = 16 nM).⁴⁵⁾ そこで、予め Chem 3D Pro (ver. 12.0) を用いた MM2 の最安定配座計算により、二つの環構造の平面性を確認した上で各種の誘導体を合成した。その結果、2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体 **2** が、PI3K γ 阻害活性 (IC₅₀ = 12 nM) をもつことが判明した (Figure 14).

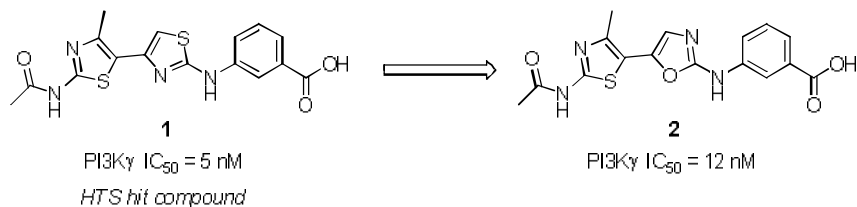
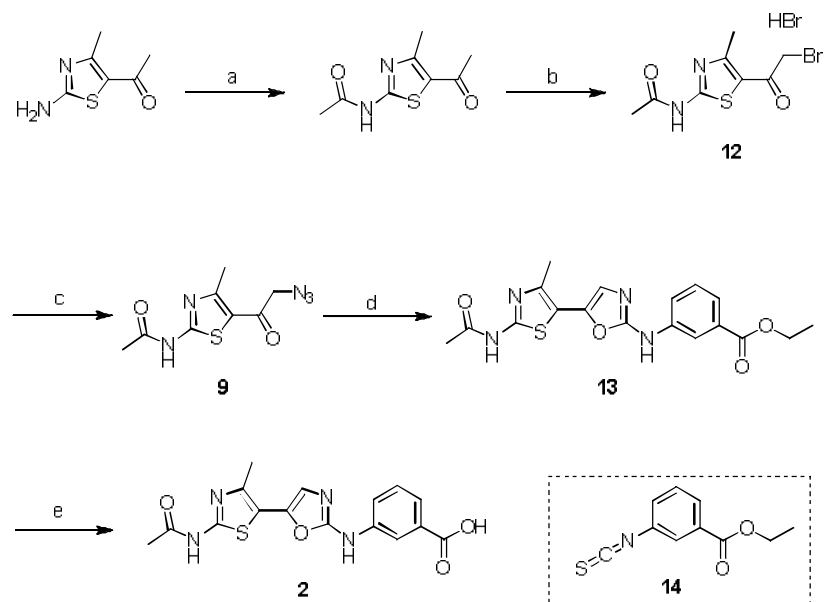


Figure 14. Modification of central heterocycle and the discovery of 2-amino-5-oxazolyl thiazole derivative **2**.

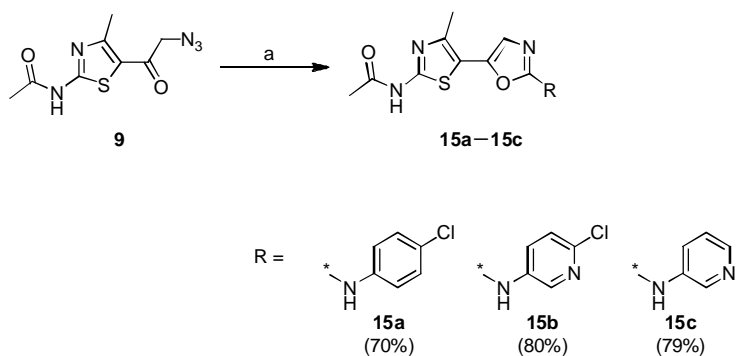
<合成>

まず文献既知の方法⁴⁴⁾に従い、市販の 2-アミノ-4-メチル-5-アセチルチアゾールからアセチル化、ブロモ化の 2 工程を経て、化合物 **12** を合成した (収率 46%)。次に、化合物 **12** をアジド **9** へと変換した後 (収率 90%)、これを市販の 3-エトキシカルボニルフェニル イソチオシアナート (**14**) とトリフェニルホスフィン存在下に反応させ、オキ

サゾール環を構築した (収率 79%).⁴⁷⁾ 続いて, 化合物 **13** をアルカリ加水分解反応に付すことで, 目的の 2-アミノチアゾリルオキサゾール誘導体 **2** を収率 51%で得た (Scheme 1).

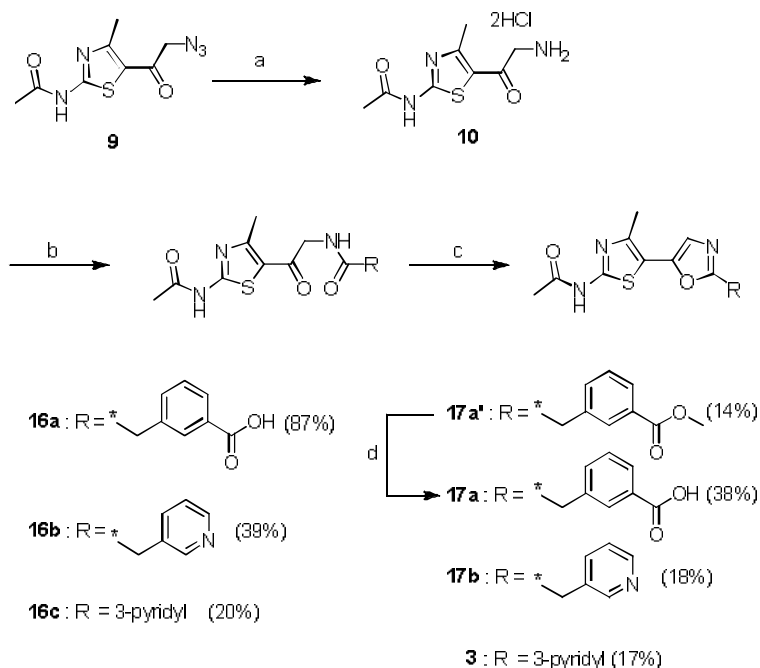


Scheme 1. Reagents and conditions: (a) acetyl chloride, pyridine, THF-CHCl₃, rt, 72 h, 92%; (b) bromine, 1,4-dioxane, rt, 14 h, 50%; (c) NaN₃, Et₃N, MeOH, rt, 3 h, 90%; (d) **14**, PPh₃, 1,4-dioxane, 100 °C, 1 h, 79%; (e) aq. KOH, THF-MeOH, 60 °C, 3 h, 51%.



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) R-NCS, PPh₃, 1,4-dioxane, 100 °C.

また、3-エトキシカルボニルフェニル イソチオシアナート (**14**) の代わりに、市販の各種イソチオシアナート誘導体を用いることにより化合物 **15a–15c** を合成した (Scheme 2, 収率 70–80%).

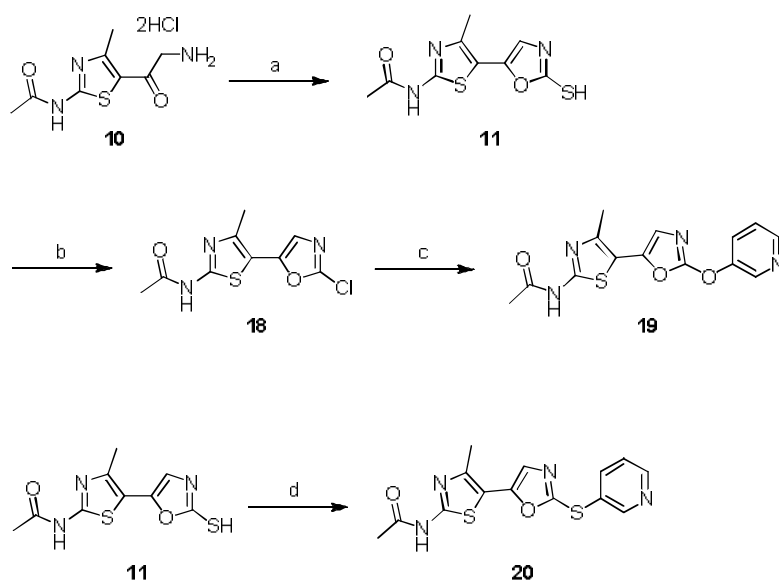


Scheme 3. Reagents and conditions: (a) H_2 , 10% Pd/C, c.HCl, MeOH, rt, 18 h, 75%; (b) R-COOH, PyBOP[®], Et₃N, DMF, rt, or R-COCl, Et₃N, THF-CHCl₃, rt; (c) POCl₃, reflux, or Burgess reagent, THF, 80 °C; (d) aq. KOH, THF-MeOH, 60 °C, 5 h, 38%.

さらに、オキサゾール環 2 位にピリジン構造が直接結合した化合物 **3**, およびメチレン基を介して安息香酸もしくはピリジン構造が結合した化合物 **17a**, **17b** を、化合物 **9** から 3–4 工程にて合成した (Scheme 3). すなわち、まず化合物 **9** を酸性条件下で接触水素還元して化合物 **10** に変換した (収率 75%). 続いて、市販の各種 2-アリーール酢酸もしくは酸塩化物と縮合させた後、得られたアミド誘導体 **16a–16c** にオキシ塩化リンまたは Burgess 試薬を作用することにより脱水環化させ、対応するオキサゾール誘導体 **17a'**, **17b**, **3** を収率 14–18% で合成した. さらに、化合物 **17a'** をアルカリ加水分解して、化合物 **17a** を得た (収率 38%).

また、オキサゾール環 2 位に酸素または硫黄原子を介してピリジン環が結合した化合物 **19** および **20** を、化合物 **10** からそれぞれ 3 または 2 工程にて合成した (Scheme 4).

すなわち、まず化合物 **10** に炭酸ナトリウム存在下、二硫化炭素を作用させて 2-スルファニルオキサゾール **11** とした後、オキシ塩化リンを用いて 2 位に脱離基となる塩素原子を導入した (収率 52%)。得られた化合物 **18** に炭酸カリウム存在下、3-ヒドロキシピリジンを作用させて化合物 **19** を合成した (収率 26%)。さらに、銅 (I) 触媒を用いて化合物 **11** と 3-ヨードピリジンとをカップリング反応⁴⁸⁾ させることにより化合物 **20** を合成した (収率 56%)。



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) CS₂, aq. Na₂CO₃, EtOH, 80 °C, 9 h, 57%; (b) POCl₃, 120 °C, 6 h, 52%; (c) 3-hydroxypyridine, K₂CO₃, DMSO, 100 °C, 6 h, 26%; (d) 3-iodopyridine, NaOt-Bu, CuI, 1,10-phenanthroline, DMF, 100 °C, 11 h, 56%.

<構造活性相関>

化合物選抜フローと各段階での確認項目を以下に示す (Figure 15). 合成した各化合物について、まず PI3K γ 酵素阻害活性を測定した. PI3K γ 酵素阻害活性は、阻害剤存在下、PI3K γ により PI(4,5)P₂ (PIP₂) がリン酸化されることで産生される ³³P-PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) の放射エネルギーを測定することで算出した (Figure 16).

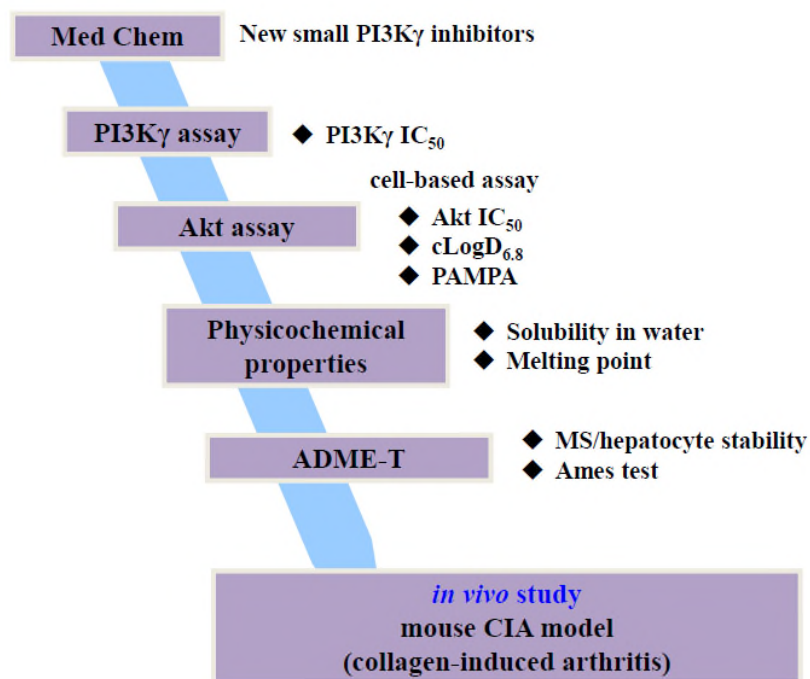


Figure 15. Screening flow of drug discovery program in PI3K γ inhibitors.

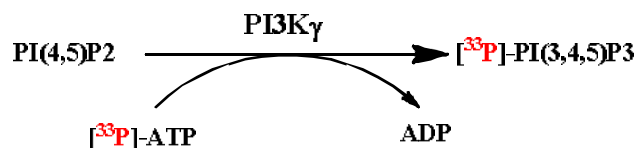


Figure 16. The mechanism of PI3K γ enzyme assay.

また、PI3K γ 阻害剤により PIP₃ 産生が阻害されると Akt のリン酸化も阻害されることから、マウスマクロファージ様細胞株を用いた Akt のリン酸化阻害率を算出することで、各化合物の細胞レベルの PI3K γ 阻害作用を確認した (Figure 17).

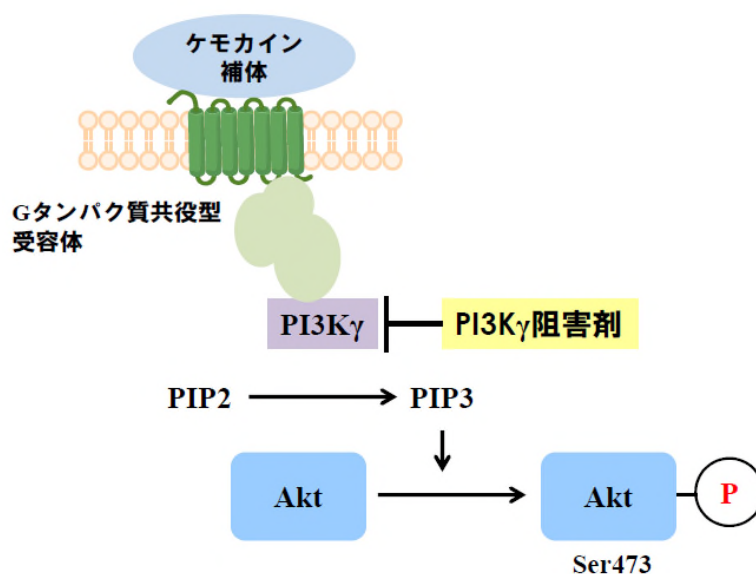
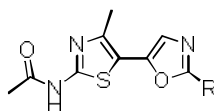


Figure 17. The mechanism of intracellular signaling and cellular assay.

阻害剤が細胞系で活性を示すには細胞膜を透過する必要がある。そこで、膜透過性を見積もる指標として、pH 6.8でのLogD計算値であるcLogD_{6.8}、および人工脂質膜を用いた膜透過性スクリーニングであるPAMPA⁴⁹⁾を必要に応じて測定した。細胞系で活性を示したものに関しては、水への溶解性および融点等の物理的および化学的な性質を確認した。さらに、*in vivo*薬効試験を実施する化合物を選抜するために、マイクロソームおよび肝細胞中での代謝安定性、血漿中薬物曝露量、変異原性等のADME-Tプロファイルを確認した。なお、*in vivo*薬効は、抗炎症作用をマウスコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルで評価することとした。

合成した2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体**2**, **3**, **15a–15c**, **17a**, **17b**, **19**, **20**のPI3K γ 阻害試験およびAktリン酸化阻害試験の結果をTable 2に示す。

化合物**2**は酵素系では高いPI3K γ 阻害活性を示すにも関わらず、細胞系では阻害活性を示さなかった。なお、化合物**2**のcLogD_{6.8}は0.21であり、PAMPAの膜透過係数は 1.4×10^{-6} cm/s (pH 6.2)であった。そのため、細胞系で阻害活性を示さなかった原因は、膜透過性が低いことにあるのではないかと考えた。そこで、脂溶性を増加させることで膜透過性が向上することを期待した。しかし、中心オキサゾール環と安息香酸部との窒素原子を炭素原子とした**17a**は、酵素系の阻害活性が減弱し、細胞系の阻害活性も示さなかった。

Table 2. *In vitro* data of oxazole derivatives with various kinds of R groups.

Compd	R	PI3K γ IC ₅₀ (nM) ^a	Akt IC ₅₀ (nM) ^a	cLogD _{6.8} ^b
2		12	>10000	0.21
17a		223	>10000	0.29
15a		346	NT ^c	3.31
15b		24	1040	2.47
15c		12	431 ^d	1.57
17b		95	NT ^c	1.75
19		117	1666 ^d	1.70
20		16	279	2.08
3		3	59	1.67

^a The IC₅₀ values represent the mean of at least two independent experiments.

^b cLogD_{6.8} values were estimated with ACD/Percepta 2012, released by Advanced Chemistry Development, Inc.

^c NT = not tested.

^d Data from one experiment (n = 1).

また、化合物 **2** の安息香酸部位を 4-クロロフェニル基に代えた⁴⁴⁾ **15a** では、脂溶性は増加したものの、酵素阻害活性は大幅に減弱した。一方で、**15a** のベンゼン環に窒素原子を導入してピリジン環とした化合物 **15b** では ($c\text{LogD}_{6.8} = 2.47$)、**15a** に比べて酵素阻害活性が 10 倍以上向上し、細胞系でも阻害作用を示すことが判明した。また、**15b** の塩素原子をなくし、脂溶性を低減させた化合物 **15c** では、さらに酵素系と細胞系の阻害活性が 2 倍程度増強した。ピリジン窒素原子の位置については、対応する 2-ピリジン体、4-ピリジン体、ピリミジン体、およびピラジン体等を合成したが、3-ピリジン体が最も強い活性を示した。**15c** が細胞系での阻害活性を示したことから、オキサゾール環とピリジル基の間の窒素原子を炭素原子、酸素原子に代えた化合物 **17b**, **19** の活性にも期待がもたれたが、残念ながら阻害活性は大幅に減弱した。しかし、硫黄原子を介した化合物 **20** は **15c** と同等の酵素阻害活性を示し、細胞系での阻害活性は **15c** よりも向上した。最終的には、オキサゾール環とピリジン環が直結した構造をもつ **3** において、酵素系および細胞系での阻害活性が飛躍的に向上することが判明した ($\text{PI3K}\gamma \text{ IC}_{50} = 3 \text{ nM}$, $\text{Akt IC}_{50} = 59 \text{ nM}$)。なお、化合物 **3** の $c\text{LogD}_{6.8}$ は 1.67 であり、PAMPA の膜透過係数は $77.3 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (pH 6.2) であった。

ここまでの構造活性相関研究から、想定通りカルボキシ基のない化合物では、 $c\text{LogD}_{6.8}$ の増加に伴って膜透過性が向上し、細胞系でも阻害活性を示すことが判明した。そこで、構造最適化により見出され、 $\text{PI3K}\gamma$ 阻害作用の強かった **3** について、Figure 13 と同様の手法により結合予測を行った。その結果、**3** のピリジル基の向きについては複数の可能性が示されたが、リジン 807, 833 と水分子を介して水素結合しているものと仮定すると、化合物 **3** の $\text{PI3K}\gamma$ に対する強い結合親和性の説明がつく結果となった。最近報告された $\text{PI3K}\gamma$ 阻害剤の X 線結晶構造でも、ピリジン環がリジン 833 と水を介して相互作用していることが示されている。⁵⁰⁾ このことから、推測の域を出ないが、化合物 **3** はタンパクとの結合に有利な架橋水を利用しているのではないかと考察している (Figure 18)。

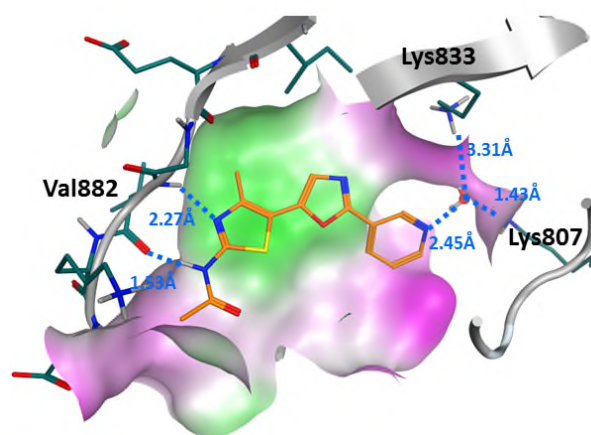


Figure 18. Predicted binding model of compound **3** (orange) bound to the ATP site of PI3K γ .

以上、まず、化合物 **2** においては、芳香族置換基の最適化から、 $c\text{LogD}_{6.8}$ および PAMPA 膜透過性の示す通り、カルボキシ基がその高い極性により膜透過性を低くし、細胞系での阻害活性に不利に働いていることが判明した。そこで、脂溶性の増加により膜透過性を改善させることを意図して合成展開を行った結果、化合物 **3** が酵素系と細胞系での強い阻害活性をもつことを見出した (Figure 19)。また、化合物 **3** と PI3K γ タンパクとの結合予測から、その強い PI3K γ 阻害活性は架橋水を介したリジン 807, 833 との水素結合によるものと推測された。

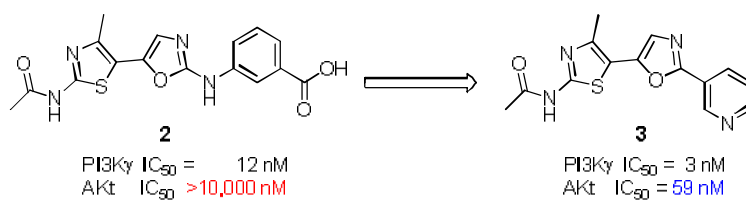


Figure 19. Structural modification from compound **2** to compound **3**.

第三節 PI3K γ 阻害活性と溶解性を併せもつ化合物 **4** の創出

前節では、PI3K γ 酵素阻害および細胞系の阻害活性を併せもつ化合物 **3** を、リード化合物 **2** から創出した過程について述べた。しかし、残念ながらこの化合物は水への溶解性が低いことが判明し (0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in water), その改善が課題となった。

溶解性は、消化管からの経口吸収性に影響をおよぼす重要な要素である。そのため、化合物を探索する早い段階から、薬理活性だけでなく、溶解性を考慮することの重要性が提唱されてきた。⁵¹⁾ 一般的に溶解性を向上させるためには、(1) 極性基の導入および脂溶性の低減により、化合物と溶媒の相互作用を強めて熱力学的な溶解性を向上させる、⁵²⁾ (2) 分子の結晶パッキングを崩すことにより、化合物間の相互作用を弱めて速度論的な溶解性を向上させる、⁵³⁾ (3) 塩形成および結晶形・粒子状態を変えることにより、溶解速度を変化させて溶解性を向上させる、⁵⁴⁾ 等の手法がとられる。著者は、化合物 **3** の低い溶解性の本質的な原因が、チアゾール-オキサゾール-ピリジン環が直接結合した三環性の分子構造にあると推察した。すなわち、その平面性により結晶パッキングが強固になっているのではないかと考えた。そこで、オキサゾール環の2位に脂溶性の側鎖を導入することで、芳香環数を減らしパッキング作用を緩和させ、さらに側鎖上に極性基を導入して溶解性を改善する戦略を立てた。同様の取り組みの例としては Amgen 社による TRPV アンタゴニストの事例等が挙げられる。彼らは、臨床化合物で課題となった低い溶解性を改善するために、ベンゼン環を一部飽和化し、分子全体としての平面性を緩和させることで結晶パッキングを弱め (融点もそれに応じて低下)、溶解性が狙い通り改善したことを報告している (Figure 20).^{55,56)}

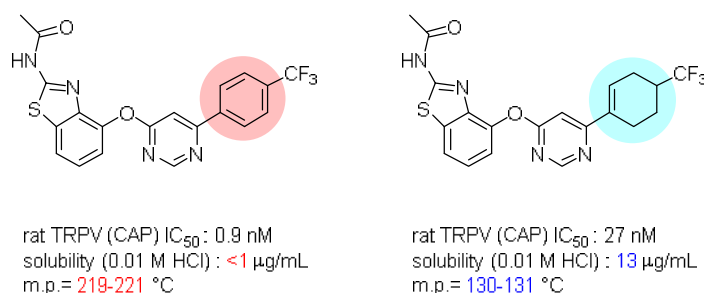
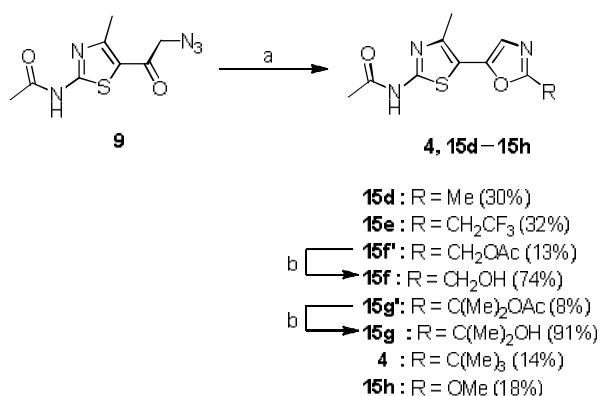


Figure 20. Improvement of aqueous solubility by removing aromaticity.

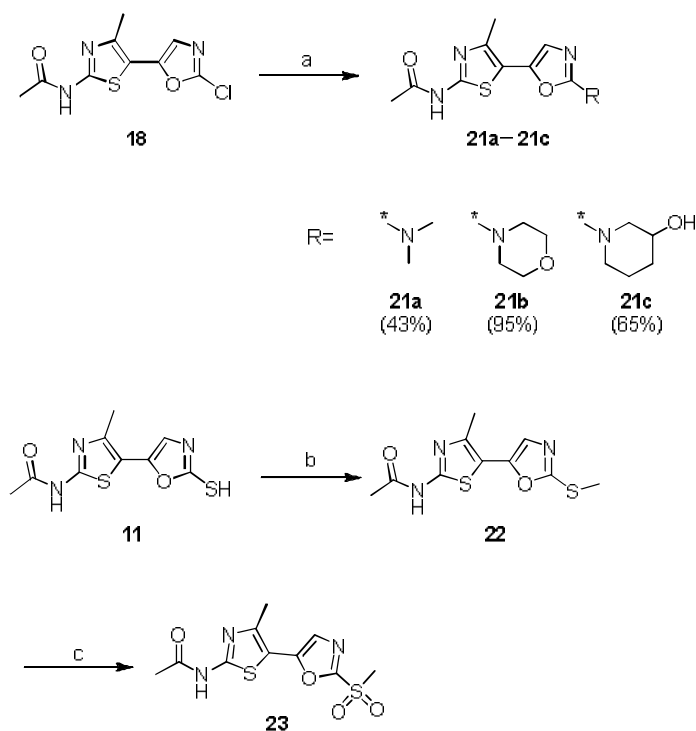
<合成>

まず、化合物 **9** (Scheme 1) と各種酸塩化物をトリフェニルホスフィン存在下に反応させ、オキサゾール環の 2 位に脂肪族側鎖をもつ化合物 **4**, **15d–15h** を合成した (Scheme 5, 収率 8–32%)。また、化合物 **15f'**, **15g'** を塩基性条件で加水分解して、**15f**, **15g** を合成した (収率 74–91%)。



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) R-COCl, PPh₃, THF or 1,4-dioxane, rt; (b) aq. KOH, THF-MeOH, 60 °C.

次に、置換基として第 3 級アミン部位をもつ化合物 **21a–21c** を、対応する第 2 級アミンと化合物 **18** (Scheme 4) との芳香族求核置換反応により合成した (Scheme 6, 収率 43–95%)。また、化合物 **11** (Scheme 4) のメチル化によりスルフィド **22** を (収率 45%)、続く酸化によりスルホン **23** を合成した。なお、酸化においては、mCPBA を用いると (クロロホルム, 室温) スルホキシドが副生したが、Mo₇O₂₄(NH₄)₆ 触媒下、過酸化水素を用いると、**23** を単一生成物として得ることができた (収率 62%)。⁵⁷⁾

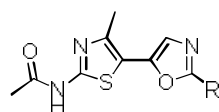


Scheme 6. Reagents and conditions: (a) amine, THF, 80 °C; (b) MeI, K₂CO₃, DMF, rt, 3 h, 45%; (c) H₂O₂, Mo₇O₂₄(NH₄)₆ · 4H₂O, THF-EtOH, rt, 19 h, 62%.

<構造活性相関>

これまでの構造活性相関の結果をふまえて、PI3K γ 酵素阻害活性値が 50 nM 以下の化合物に限定して、細胞系の Akt リン酸化阻害活性を測定することとした。その結果を Table 3 に示す。

化合物 **15d** およびヒドロキシメチル体 **15f** に比べ、より嵩高いトリフルオロエチル体 **15e** では PI3K γ 酵素阻害活性が 10 倍以上増強した。また、**15f** のメチレン部位に二つのメチル基が導入されると (**15g**)、活性が 6 倍向上した。また、*tert*-ブチル体 **4** は、PI3K γ 酵素阻害活性 (IC₅₀ = 3 nM) を示すだけでなく、細胞系での阻害活性も強いことが判明した (Akt IC₅₀ = 113 nM)。これらの構造活性相関の結果から、オキサゾール環近傍に嵩高い置換基を許容できる空間があり、その空間をうまく満たすことが、PI3K γ 阻害活性の増強につながるものと推察した。さらに、**4** の sp³ 炭素を第 3 級アミンに置換した誘導体 **21a** も阻害活性を示したことから、第 3 級アミン構造をもつ各種誘導体を合成した。

Table 3. *In vitro* data of oxazole derivatives with aliphatic R groups.

Compd	R	PI3K γ IC ₅₀ (nM) ^a	Akt IC ₅₀ (nM) ^a	cLogD _{6.8} ^b
15d	*-Me	181	NT ^c	1.43
15e	*-C(F)(F)F	10	88	2.16
15f	*-CH ₂ OH	161	NT ^c	0.49
15g	*-C(OH)(CH ₃) ₂	25	369 ^d	1.14
4	*-C(CH ₃) ₃	3	113	2.55
21a	*-N(CH ₃) ₂	46	1222 ^d	1.27
21b	*-N(CH ₂) ₄ O	24	599 ^d	0.72
21c	*-N(CH ₂) ₅ OH	14	237	0.76
15h	*-OCH ₃	250	NT ^c	1.08
22	*-SCH ₃	22	322 ^d	1.92
23	*-SO ₂ CH ₃	12	222	0.43

^a The IC₅₀ values represent the mean of at least two independent experiments.

^b cLogD_{6.8} values were estimated with ACD/Percepta 2012, released by Advanced Chemistry Development, Inc.

^c NT = not tested.

^d Data from one experiment (n = 1).

その結果、化合物 **21b** や **21c** が、10–20 nM 程度の PI3K γ 酵素阻害活性を示すことが判明した。これらの二つの化合物は、化合物 **21a** よりも脂溶性が低いながらも、細胞系での PI3K γ 阻害作用が増強されている。そのため、導入した官能基が PI3K γ タンパクと効果的に相互作用しているのではないかと考えている。一方で、**21a** の窒素原子を酸素原子に代えた **15h** では活性が大幅に減弱したことから、オキサゾール環 2 位に酸素原子を介して置換基を配置する合成展開は PI3K γ 阻害活性の向上にはつながらぬものと判断した。スルフィド **22** は **21b** と同程度の PI3K γ 酵素阻害活性を示し、スルホン **23** では酵素阻害活性がさらに 2 倍程度増強することも判明した。

このオキサゾール環 2 位の置換基に関する構造活性相関研究から、オキサゾール環の近傍に、ある程度以上の嵩高さのある置換基を導入することで PI3K γ 阻害活性が向上すること、置換基上にカルボキシ基がない場合の cLogD_{6.8} は 0.4 程度まで下げても細胞系の阻害活性を示すこと、オキサゾール環に直結する原子としては、炭素原子・窒素原子・硫黄原子が適切であることが明らかになった。

なお、最も強い PI3K γ 阻害活性を示した化合物 **4** の溶解度は、化合物 **3** (0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in water) に比べて 100 倍程度改善されており (35.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in water), その融点についても **3** (294.0–296.0 $^{\circ}\text{C}$) よりも 100 $^{\circ}\text{C}$ 低く、194.0–196.0 $^{\circ}\text{C}$ であった。このように、意図した通り、パッキング作用の緩和により、^{53a)} 溶解性の改善を果たすことに成功した。

第四節 小括

HTSにより得られたヒット化合物 **1** から結合予測を用いてファーマコフォアを抽出し、分子中央部のチアゾール環をオキサゾール環に変換することで、新規性のあるリード化合物 **2** を得た。しかしながら、**2** は細胞系の評価では阻害作用を示さなかった。その原因を、カルボキシ基の存在によって膜透過性が低いことにあると考察した。そこで、脂溶性を増加させて膜透過性を改善することを意図し、各種誘導体を合成した。その結果、オキサゾール環とピリジン環とが直接結合した化合物 **3** が、酵素系でも細胞系でも強い PI3K γ 阻害活性をもつことが明らかになった。また、結合予測から、**3** の強い阻害活性は、架橋水を利用した PI3K γ タンパクとの相互作用によるものと推察した。さらに、化合物 **2** と **3** の脂溶性 (cLogD_{6.8}) および膜透過性 (PAMPA) を比較し、**3** の細胞系での活性が、脂溶性の増大による膜透過性の改善と相関があることを検証した。また、**3** の課題として判明した溶解性の改善を意図して、オキサゾール環 2 位の置換基を変換した。その結果、芳香族の置換基に比べて、分子の結晶パッキングを崩すことができる脂肪族の置換基の方が、溶解性の観点からは優れていることを明らかにし、溶解性と PI3K γ 阻害活性を併せもつ化合物 **4** を創出することに成功した。

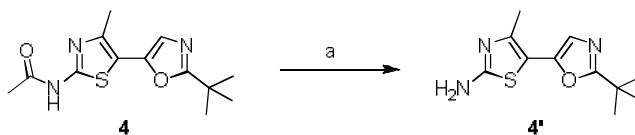
第二章

経口投与可能な新規 2-アミノ-5-オキサジアゾリルチアゾール誘導体の創出³³⁾

第一節 変異原性の回避を狙ったドラッグデザインおよび 2-アミノ-5-オキサジアゾリルチアゾール誘導体の創出

医薬品の開発において、変異原性を示す化合物はがん原性を示す確率が高くなることから、臨床試験の実施が困難となる。そのため、製薬会社は各社とも未変化体のみならず、代謝物、さらには動物種により代謝プロファイルが異なることを懸念して推定代謝物にいたるまで変異原性の有無を確認する。変異原性試験の中で、Ames 試験は、短時間、低コストで実施できる点で有効であり、化学物質のがん原性スクリーニング法として広く用いられている。この試験でわずかでもそのリスクが明らかとなった場合には、いかに薬理活性や薬物動態学的特性が魅力的であっても、開発化合物には適さないと判断され、変異原性を回避するためにさらなる合成展開を実施することとなる。⁵⁸⁾

前章では、強い PI3K γ 阻害活性をもつ新規 2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体 **4** の創出について述べた。一般に、アミノチアゾール構造は PI3Ks に対して優れた hinge-binder (ATP 結合部位と水素結合する部分) となるが、化合物 **4** の脱アセチル体 **4'** は、CYP を誘導したラットの肝ホモジネート (S9 分画) 処理群で Ames 陽性であることが判明した。なお、化合物 **4'** は、化合物 **4** をエタノール溶媒中、酸性条件で加熱することで合成した (Scheme 7, 収率 76%)。



Scheme 7. Reagents and conditions: (a) 6 N HCl, EtOH, 80 °C, 24 h, 76%.

化合物 **4** 自体は、S9 処置の有無にかかわらず Ames 陰性であったことから、**4'** の変異原性は脱アセチル化されたチアゾール 2 位のアミノ基に由来するものであることがわ

かる。また、4'でも S9 未処理群では変異原性を示さずに、S9 処理により陽性となったことから、芳香族アミン部が代謝活性化されることに起因した遺伝子突然変異性であると考えられた。ラットの代謝物を解析した結果、脱アセチル体は検出されていなかったが、先に述べたとおり、動物種が変わると代謝物も異なる可能性がある。したがって、適応疾患が長期投与の想定される関節リウマチであることも考慮し、あらためて変異原性リスクを回避した化合物の創出を目指すこととした。

芳香族アミンの変異原性は、代謝酵素によるアミン窒素のヒドロキシ化の後に反応性の高いニトロニウムイオンが形成され、それが DNA と不可逆的な反応を起こすことによると考えられている (Figure 21).⁵⁹⁾ そのため、必ずしも芳香族アミンを骨格として含むすべての化合物が変異原性を示すわけではなく、酸化代謝物であるヒドロキシルアミンの形成し易さが主な毒性発現の要因となる。したがって、芳香族アミンによる変異原性を回避・低減するアプローチとして、しばしば、電子求引基の導入によりアミノ基の酸化電位を低下させる、もしくはアミノ基近傍へ立体的に嵩高い置換基を導入する等によりヒドロキシルアミンの形成を阻害する方法がとられる。⁶⁰⁾

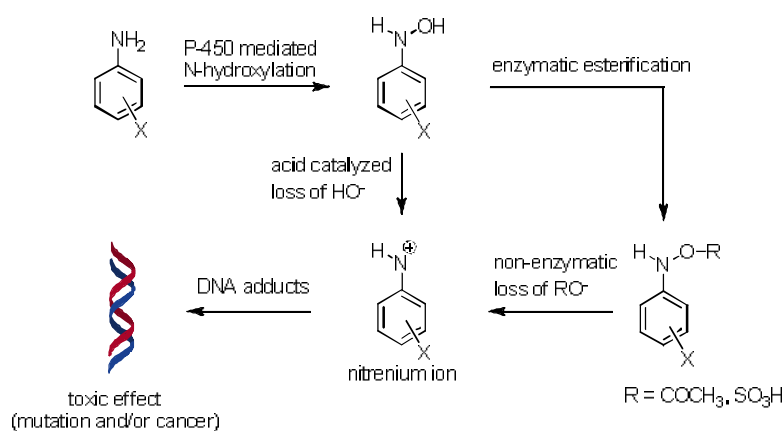


Figure 21. Aryl amine activation to mutagenic species and factors affecting mutagenic potential. X: electronic and steric factors.

著者のケースでは、アミノ基近傍への置換基導入は、アミノ基がチアゾール環2位にあることから困難であった。そこで、アミノ基の酸化電位を下げるアプローチをとることとし、まずは、チアゾール環4位のメチル基を電子求引基であるトリフルオロメチル基に代えてみた。その結果、確かに脱アセチル体の変異原性を回避することには成

功したが、PI3K γ 酵素阻害活性自体がなくなってしまうこととなった (PI3K γ IC₅₀ >3000 nM). これは、チアゾール環の 4 位にメチル基よりも嵩高い置換基を導入すると酵素阻害活性に悪影響をもたらすという、Figure 13 の結合予測から想定された通りの結果であった。

そこで、電子求引基を導入することなく変異原性を回避する新たな戦略として、アミノチアゾール構造に結合しているオキサゾール環を π -電子欠乏型のヘテロ芳香環に変換するドラッグデザインを立案した. すなわち、活性発現に必須な構造である 4-メチルアミノチアゾール構造を変えることなく、二つのヘテロ芳香環を介した電子求引性共鳴効果を利用し、酸化電位だけを低下させることを目論んだ. ヘテロ芳香環を最適化した結果、オキサジアゾール誘導体 **5** が PI3K γ 酵素阻害活性を示すことを見出し、同時に脱アセチル体 **5'** が、**4'** が強い毒性を示した 2000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度においても変異原性を示さないことが明らかになった (Figure 22).

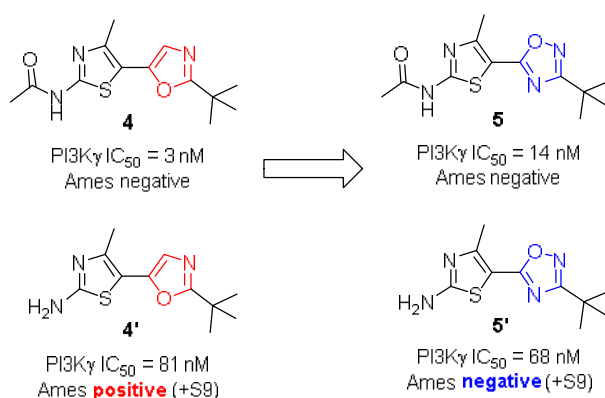


Figure 22. PI3K γ inhibitory activities and the results of the Ames test for 2-amino-5-oxazolyl thiazole (**4** and **4'**) and 2-amino-5-oxadiazolyl thiazole (**5** and **5'**).

単結晶 X線構造解析の結果、化合物 **5** においては、チアゾール環とオキサジアゾール環の二面角 (θ) がほぼ 0° であった (実験項参照). 前章第二節で述べた PIK-93 と PI3K γ の共結晶の構造を合わせて考えると、チアゾール環とオキサジアゾール環が平面性を保つことが、PI3K γ 阻害活性の発現に重要であるものと推察される. さらに、その平面性によってオキサジアゾール環の電子求引性共鳴効果が機能することにもなり、アミノチアゾール構造に由来する変異原性が抑制されたものと考察している.

Figure 23 は, Ames 陽性であった **4'** と Ames 陰性であった **5'** の分子表面上の静電ポテンシャルを比較したものである. オキサゾール **4'** の方が, その芳香族アミンの窒素原子がより負に帯電していることがわかる. また **5'** では, アミノ基上の電子密度が減り, その分がオキサジアゾール環に流れ込んでおり, チアゾール 2 位炭素とアミン窒素間の結合距離が短くなり, 二重結合性を帯びていることも判明した. このことは, 意図した通り, オキサジアゾール環の電子求引性共鳴効果が CYP によるアミノ基の酸化を起こりにくくし, それが変異原性の回避につながったことを支持している.

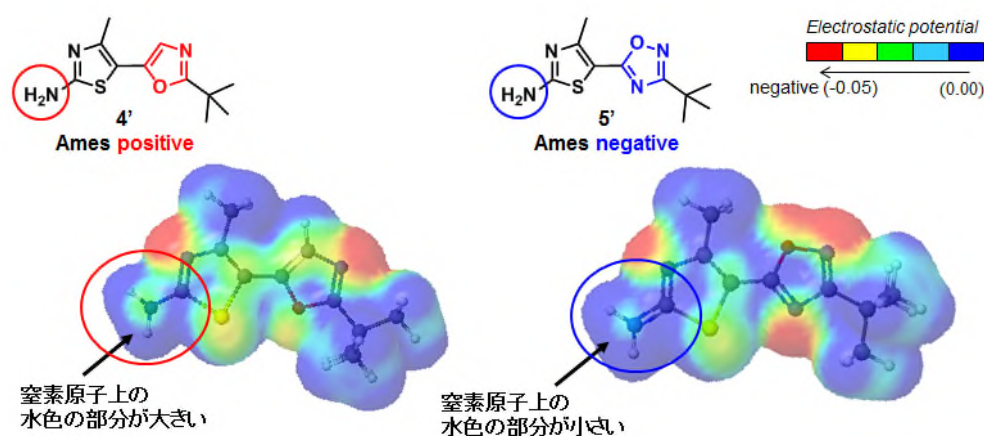


Figure 23. The electrostatic potential of nitrogen atom of aryl amine **4'** and **5'**.

第二節 オキサジアゾール 3 位誘導体の合成および構造活性相関

<合成>

前章第二節において、2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体に関し、(1) オキサゾール環 2 位の置換基としては、オキサゾール環近傍を立体的に嵩高くするものが活性増強に有効であること、(2) 化合物 **21c** のようにオキサゾール環 2 位の置換基にヒドロキシ基を導入すると脂溶性の低減と PI3K γ 阻害活性の両立に有効であること等が明らかになっていた。そこで、これらの構造活性相関情報を活用して、オキサゾール環をオキサジアゾール環に代えた各種誘導体を合成することとした (Figure 24)。なお、経口活性をもつ化合物の創出にむけ、肝ミクロソームおよび肝細胞中での代謝安定性を見据えて、化合物 **5** よりも cLogD_{6.8} 値の小さな誘導体を中心に合成した。

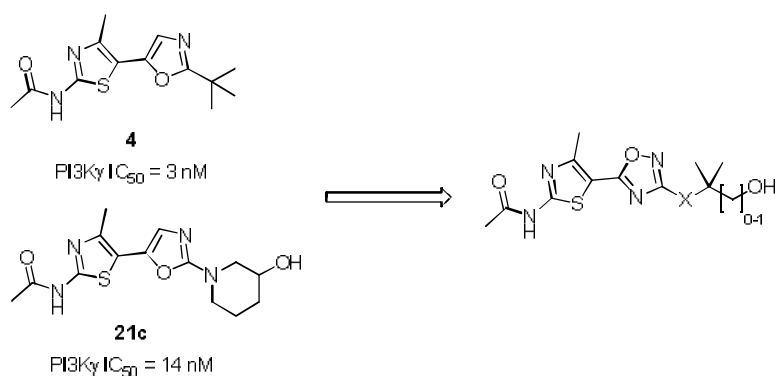
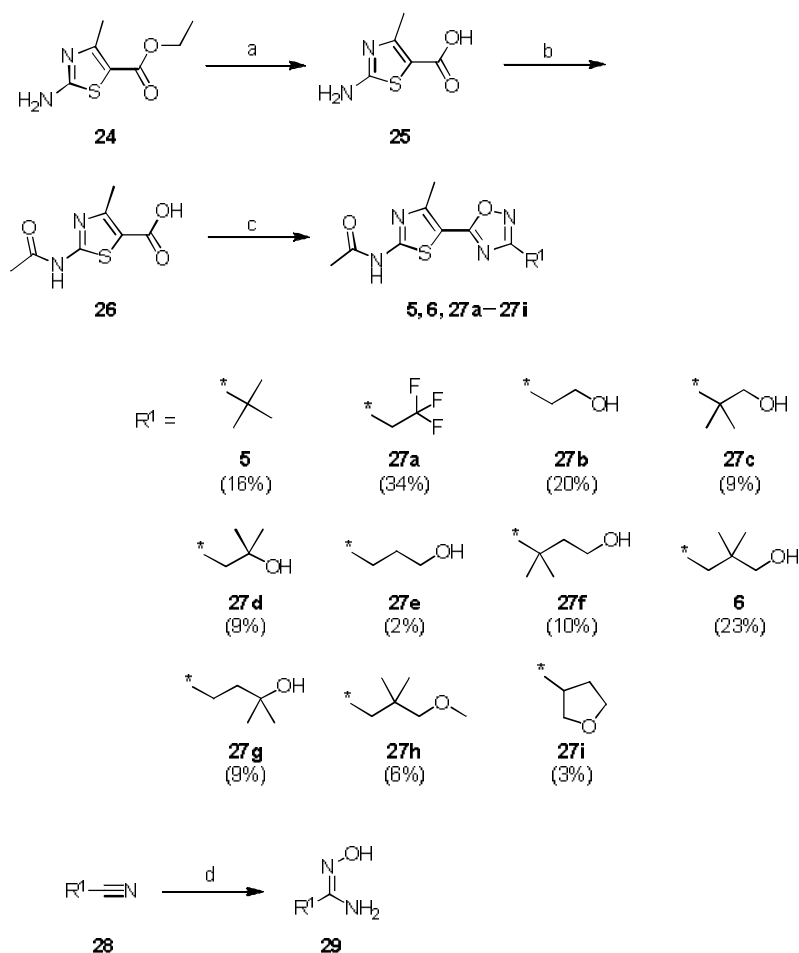


Figure 24. The drug design based on the SAR of chapter 1.

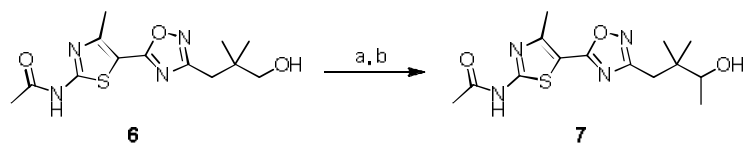
まず、市販の 2-アミノ-4-メチルチアゾール-5-カルボン酸エチル (**24**) をアルカリ加水分解反応よりカルボン酸 **25** とした後 (収率 97%), ピリジン存在下に塩化アセチルを作用させてアセトアミド **26** を得た (収率 91%)。一方、市販、あるいはアルキルハライドとシアン化ナトリウムから定法⁶¹⁾に従い調製した各種ニトリル **28** と、ヒドロキシルアミン水溶液をエタノール中で加熱還流することにより、対応するカルボキサミドオキシム **29** を合成した。アセトアミド **26** とカルボキサミドオキシム **29** を EDC·HCl, HOBt·H₂O を用いて縮合させた後、加熱条件に付すことでオキサジアゾール環を構築し、化合物 **5**, **6**, **27a–27i** を合成した (Scheme 8)。全般的に、オキサジアゾール環構築

の反応は2–34%と低収率であった。この際、原料であるアセトアミド**26**は完全に消失していることから、低収率の原因は、チアゾール4位メチル基による立体反発によって、縮合反応後のエステルカルボニルへのアミノ基の求核付加反応が起こりにくくなっていることによると推察している。



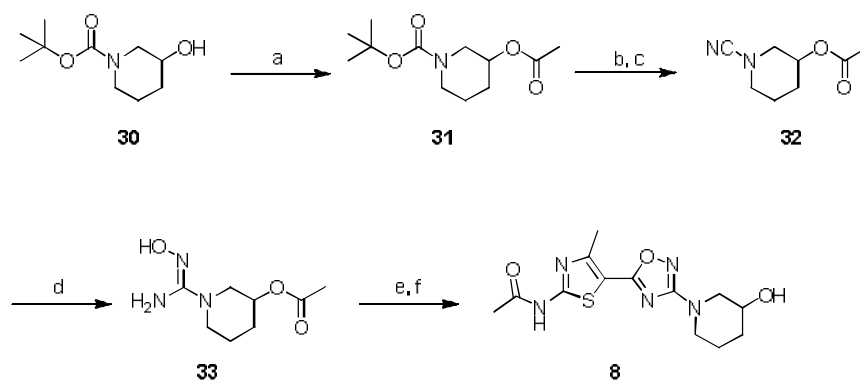
Scheme 8. Reagents and conditions: (a) aq. NaOH, EtOH, rt, 26 h, 97%; (b) acetyl chloride, pyridine, THF, rt, 21 h, 91%; (c) **29**, EDC·HCl, HOBT·H₂O, DMF, rt then 100 °C; (d) 50% hydroxylamine solution, EtOH, reflux.

また、第2級アルコール部位をもつ化合物**7**を、化合物**6**から2工程で合成した (Scheme 9). すなわち、化合物**6**のアルコール部をPCCで酸化してアルデヒドに変換後、臭化メチルマグネシウムと反応させ、化合物**7**を合成した (収率 15%).



Scheme 9. Reagents and conditions: (a) PCC, CHCl_3 -THF, 6 h, rt, (b) MeMgBr, THF, rt, 3 h, 15% (2 steps).

さらに、オキサジアゾール環の 3 位に 3-ヒドロキシピペリジル基をもつ化合物 **8** を Scheme 10 にしたがって合成した。まず、1-Boc-3-ヒドロキシピペリジン (**30**) から 3 工程、79% 収率でシアナミド **32** を合成した。すなわち、**30** をピリジン溶媒中で塩化アセチルと反応させヒドロキシ基を保護し、得られた **31** から Boc 基を除去した後、塩基性条件下で臭化シアンと反応させることで **32** を合成した。シアナミド **32** をエタノール中、ヒドロキシルアミンと加熱還流させることでカルボキサミドオキシム **33** へと変換し、そのままアセトアミド **26** と縮合した後に、加熱による環化芳香化を行い、最後に脱アセチル化することで化合物 **8** へと導いた (3 工程、収率 10%)。また、3-ヒドロキシピペリジンに代えてモルホリンを出発原料として用いることにより、同様の経路で化合物 **27j** を合成した (3 工程、収率 7%)。

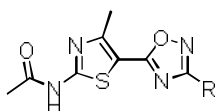


Scheme 10. Reagents and conditions: (a) acetyl chloride, pyridine, rt, 4 h; (b) 4 M HCl-AcOEt, AcOEt, rt, 24 h; (c) cyanogen bromide, K_2CO_3 , CH_3CN , rt, 4 h, 79% (3 steps); (d) 50% hydroxylamine solution, EtOH, reflux, 1 h; (e) **26**, EDC·HCl, HOBT· H_2O , DMF, rt, 15 h, then 100 °C, 3 h; (f) 2 M NaOH, THF-EtOH, rt, 15 h, 10% (3 steps).

<構造活性相関>

合成した 2-アミノ-5-オキサジアゾリルチアゾール誘導体 **5–8**, **27a–27j** の PI3K γ 阻害試験および Akt リン酸化阻害試験の結果を Table 4-1, 4-2 に示す.

Table 4-1. *In vitro* data of oxadiazole derivatives with various kinds of R groups.



Compd	R	PI3K γ IC ₅₀ (nM) ^a	Akt IC ₅₀ (nM) ^a	cLogD _{6.8} ^b
5	*	14	231	2.33
27a	*	28	278 ^c	1.75
27b	*	158	NT ^d	0.26
27c	*	52	NT ^d	1.05
27d	*	68	NT ^d	1.05
27e	*	121	NT ^d	0.61
27f	*	62	NT ^d	1.29
6	*	7	191	1.28
27g	*	203	NT ^d	1.28

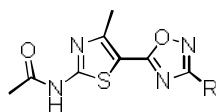
^a The IC₅₀ values represent the mean of at least two independent experiments.

^b cLogD_{6.8} values were estimated with ACD/Percepta 2012, released by Advanced Chemistry Development, Inc.

^c Data from one experiment (n = 1).

^d NT = not tested.

Table 4-2. *In vitro* data of oxadiazole derivatives with various kinds of R groups.



Compd	R	PI3K γ IC ₅₀ (nM) ^a	Akt IC ₅₀ (nM) ^a	cLogD _{6.8} ^b
7		17	155	1.56
8		29	294	0.63
27h		68	NT ^d	2.11
27i		57	558	1.05
27j		100	NT ^d	0.75

^a The IC₅₀ values represent the mean of at least two independent experiments.

^b cLogD_{6.8} values were estimated with ACD/Percepta 2012, released by Advanced Chemistry Development, Inc.

^c Data from one experiment (n = 1).

^d NT = not tested.

tert-ブチル基およびトリフルオロエチル基といった嵩高い側鎖をもつオキサジアゾール誘導体 (**5** および **27a**) は、相当するオキサゾール誘導体と同様に PI3K γ 酵素阻害活性および細胞系での強い阻害作用を示した。それら二つの化合物の cLogD_{6.8} は、それぞれ 2.33 と 1.75 であった。

次に、炭素鎖の長さをエチレン、プロピレンとし、極性基としてヒドロキシ基をもつ化合物 **27b**, **27e** では、化合物 **5** に対して 1/10 程度に PI3K γ 酵素阻害活性が減弱した。そこで、これまでの知見を活かして環の近傍にジェミナルジメチル構造を導入したところ、酵素阻害活性の向上が見られた。化合物 **27b** にジェミナルジメチル構造を導入したことに相当する化合物 **27c**, **27d** については、化合物 **27b** よりも 3 倍程度、また、化

化合物 **27e** にジェミナルジメチル構造を導入したことに相当する **27f, 6, 27g** では、特に化合物 **6** で大幅に酵素阻害活性が向上した ($IC_{50} = 7 \text{ nM}$). さらに、**6** の側鎖 3 位にもう一つメチル基を導入した化合物 **7** も強い PI3K γ 酵素阻害活性および細胞系での阻害活性を示した.

オキサゾール誘導体での構造活性相関の結果から期待された通り、3-ヒドロキシピペリジル基を側鎖にもつ化合物 **8** においては、 $cLogD_{6.8}$ が低減され、酵素系、細胞系ともに強い阻害活性を示した. なお、化合物 **8** がもつヒドロキシ基の立体化学の影響を検証するべく、市販の光学活性原料を用いて Scheme 10 と同じ経路で、**8** の両エナンチオマーを合成したが、PI3K γ 酵素阻害活性に大きな違いは見られなかった (< 2-fold). また、酸化的な代謝を回避する目的で、ヒドロキシ基をエーテル構造に代えた **27h, 27i, 27j** についても酵素阻害活性を調べたが、化合物 **6** と比較して 1/8 以下の活性であった.

第三節 誘導体の薬物動態学的特性

前節で述べたように、変異原性を回避した 2-アミノ-5-オキサジアゾリルチアゾール誘導体の最適化により、酵素系および細胞系での阻害活性に優れた化合物 **6**, **7** および **8** を創出することに成功した。

これら三つの化合物ならびに **27a** について、ヒトおよびラットの肝ミクロソーム、肝細胞中の代謝安定性試験と 30 mg/kg での経口投与時の血漿中薬物曝露量を調べた (Table 5)。肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験は、代謝安定性が低い化合物のスクリーニングとして用いた。さらに *in vivo* での肝代謝安定性をより精密に予測するために、ヒトおよびラットの肝細胞を用いて試験化合物の代謝安定性を測定した。その結果、脂溶性の側鎖をもつ **27a** はヒト、ラット肝ミクロソームの代謝安定性がそれぞれ 79.1%、72.9% であり、他の化合物と比較して低かった。化合物 **6** は、肝ミクロソーム中では安定であったが、肝細胞中の代謝安定性が低く、ラット経口投与後の血漿中曝露量は最も低かった。そこで、代謝物を解析したところ、末端のアルコール部位が酸化され、カルボン酸が生成していることが判明した。この酸化代謝が化合物 **6** の血漿中曝露量が低い原因であると考えられた。一方で、化合物 **7** および **8** は、**6** に比べて肝細胞中での代謝安定性が改善されており、血漿中に 100 倍以上の濃度で曝露されていた。血漿中薬物曝露量の改善については、三つの化合物の PAMPA 膜透過性 (吸収) に大きな違いはないことから、代謝の安定化が大きく影響していると考えている。すなわち、水酸基近傍にメチル基が置換したこと (**7**) や水酸基が 6 員環構造上に配置され、その立体的配向の柔軟性が乏しくなったこと (**8**) により、酸化代謝を受けにくくなったものと考えている。さらに、化合物 **8** については、他の化合物に比べてより脂溶性が低いこと自体が、その代謝安定化に寄与していると考えられている。

以上のように、化合物 **8** が最も代謝安定性に優れ、 C_{max} は化合物 **7** の半分程度にもかかわらず、AUC 値は **7** と同等であり、持続性も期待された。そこで、この化合物について ADME 評価と Ames 試験を実施した。その結果、10 μ M の濃度で CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 および 3A4 のいずれの分子種も阻害せず、Ames 試験の結果は化合物 **8**, その脱アセチル体ともに陰性であった。

Table 5. Metabolic stabilities in human/rat liver microsomes and hepatocytes, and systemic exposure level after an oral administration of the selected compounds in rats.

Compd	Metabolic stability		Plasma exposure after <i>p.o.</i> ^a	
	microsome (h/r) ^b	hepatocyte (h/r) ^c	C _{max} (ng/mL)	AUC ^d (ng·hr/mL)
27a	79.1/72.9	NT ^e /NT ^e	345	1180
6	102.1/94.0	9.3/11.3	38	92
7	94.1/91.5	35.2/20.9	7800	10900
8	96.9/97.1	75.7/62.1	3920	10800

^a Dosed *p.o.* at 30 mg/kg as a 0.5% methyl cellulose (MC) solution to male SD rats.

^b % remaining after 15 min incubation with human/rat liver microsomes.

^c % remaining after 1 h incubation with human/rat hepatocytes.

^d Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 8 h.

^e NT = not tested.

第四節 化合物 **8** (TASP0415914) の薬理的評価

前節までに述べたように、化合物 **8** は、水への溶解性に問題がなく (10.4 µg/mL in water), 脱アセチル体の変異原性も回避されており、経口投与時の血漿中曝露量が高かった。そこで、この化合物 (TASP0415914) について、*in vivo* 薬効試験を実施することとした。まず、クラス I の PI3Ks サブタイプ選択性を調べた。その結果、PI3K α との選択性が 4 倍程度であることがわかった。PI3K α は種々の細胞に遍在しており、安全性の観点からは、是非とも乖離が望まれる。その意味において、この選択性は満足できるものとはいえないが、少なくとも PI3K γ 阻害活性に優れた化合物を創出することができたと考えている (Figure 25)。

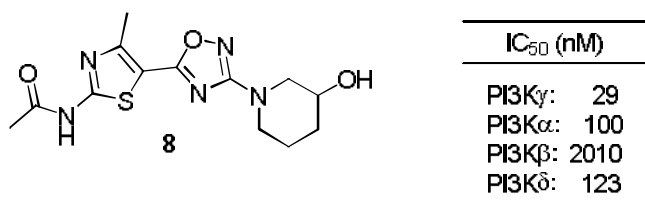


Figure 25. Class I PI3Ks subtype selectivity of compound **8** (TASP0415914).

In vivo 試験における薬効評価は、関節等の軟骨中に多量に含まれる II 型コラーゲンをマウスに免疫することにより、ヒトリウマチ関節炎に類似した多発性関節炎を誘導させるマウスコラーゲン誘発関節炎 (CIA) モデルを用いて行った。^{37,38,62} マウスに TASP0415914 を一日 2 回、14 日間連続的に経口投与し、その炎症スコアを測定したところ、コントロール群に対して TASP0415914 は用量依存的に、かつ 30 および 100 mg/kg の投与量で有意に炎症作用を抑制した (Figure 26)。

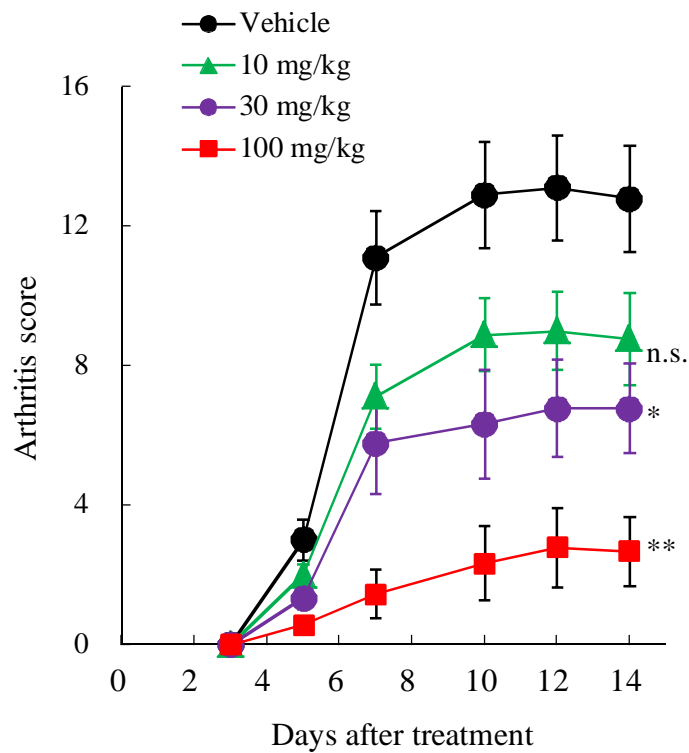


Figure 26. Suppression of the development of acute collagen-induced arthritis by **TASP0415914**. Collagen-primed DBA/1 mice (n = 9 mice/group) were treated orally with vehicle (n = 10 mice) or the indicated dosages of **TASP0415914** twice daily from days 0 to 14 and monitored for disease progression in arthritis scores. Data are represented as mean \pm SEM (n = 9 or 10). n.s.: no significant differences, *: p < 0.05, **: p < 0.01, Steel's test to vehicle-treated group.

第五節 小括

前章で見出した 2-アミノ-5-オキサゾリルチアゾール誘導体 **4** の潜在的な代謝物である脱アセチル体 **4'** は, Ames 試験の結果が陽性であった. そこで, オキサゾール環を π -電子欠乏型のヘテロ環に変換させて変異原性を回避するドラッグデザインを立案した. すなわち, 活性発現に必須のアミノチアゾール構造を変えることなく, 二つのヘテロ芳香環を介した電子求引性共鳴効果によって, 酸化電位を下げるコンセプトである. そのコンセプトに基づいて誘導体を合成した結果, 脱アセチル体が変異原性を示さない 2-アミノ-5-オキサジアゾリルチアゾール誘導体 **5** を創出するに至った. **5** を新規リード化合物として, 第一章の構造活性相関の情報を活かした最適化を行い, 酵素系と細胞系での活性に優れた化合物 **6**, **7** および **8** を創出することに成功した. 化合物の薬物動態学的特性の比較から, オキサジアゾールの 3 位置換基が疎水性の高い脂溶性側鎖 (**27a**) や第 1 級アルコール部位をもつ化合物 (**6**) では代謝を受けやすいこと, それらと比べて分岐第 2 級アルコール (**7**) もしくは環状に配座固定された第 2 級アルコール部位をもつ化合物 (**8**) では肝細胞中の代謝安定性が向上し, 経口投与時の血漿中曝露量が増加することを明らかとした. *In vitro* 薬理活性, 代謝安定性および血漿中薬物曝露量から, 化合物 **8** (**TASP0415914**) を *in vivo* 薬効試験を行う化合物として選抜した. その結果, **TASP0415914** はマウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて, 30 mg/kg の経口投与から有意に炎症作用を抑制することが明らかになった.

第三章

2-スルファニルオキサゾール誘導体の新規合成法の開発³⁴⁾

第一節 既存法の問題点および新規合成法の開発

第一章第二節および第三節で述べた通り、オキサゾール誘導体の2位にアミノ基、アルコキシ基、スルホキシ基をもつ誘導体は、いずれも共通の中間体である化合物 **11** を利用して合成した。そのため、広範な構造活性相関研究を行う上で化合物 **11** の効率的な供給が不可欠であった。

既知の合成法は、 β -ケトアジドを酸性条件で還元した後、塩基性条件で二硫化炭素を反応させて環化芳香化することで 2-スルファニルオキサゾール構造を形成するというものである。⁶³⁾ 著者もそれにしたがって、化合物 **11** の合成を試みたが、いくつかの問題が生じた。すなわち、1 工程目の還元反応時に分離困難な脱アセチル体が副生すること、2 工程目の塩基性条件での環化芳香化の際に硫化水素の発生を伴うことである。そこで、より効率的、かつ毒性の強い硫化水素を発生しない、安全な合成法を検討することとした (Figure 27)。

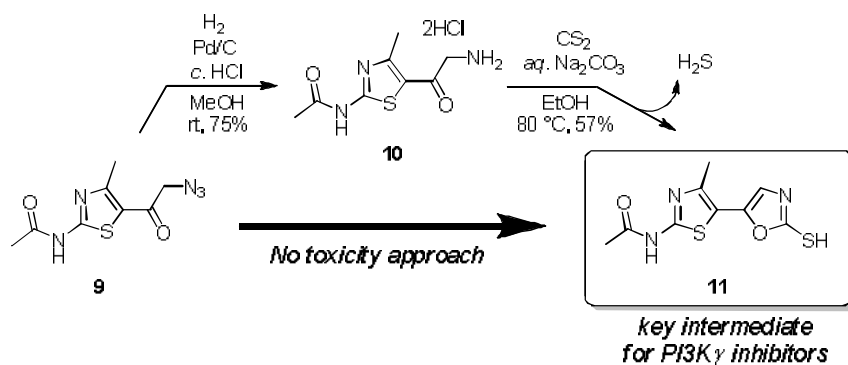
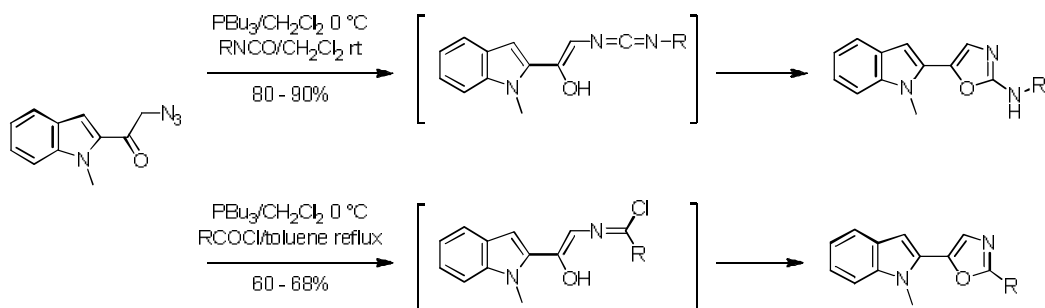


Figure 27. A key intermediate for PI3K γ inhibitors and comparison between reported synthetic method and our approach.

2 位に置換基をもつオキサゾール環の構築法としては、イミノホスホランを利用する Molina らの合成法が知られている (Scheme 11).⁶⁴⁾



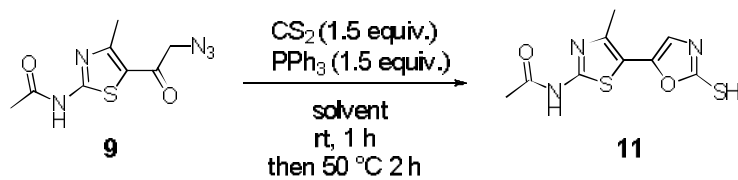
P. Molina et al. *Synthesis* **1993**, 54-56.

Scheme 11. Known approach for oxazoles having various substitutions.

著者は、この反応条件においてイソシアナートや酸塩化物の代わりに二硫化炭素を用いることができるなら、2 位にスルファニル基をもつオキサゾール環を **one-pot** で構築することが可能になると考えた。またこの手法では、先に述べた還元反応条件での脱アセチル体の副生や、硫化水素の発生を回避できるメリットもあった。なお、スケールアップ時の安全性を考慮して、Molina らが使用していたトリブチルホスフィンに代え、空気中での安定性に優れ、より安価なトリフェニルホスフィンを用いることを考えた。

β -ケトアジド **9** と二硫化炭素、トリフェニルホスフィン存在下、既報⁶⁴⁾ で良好な結果を与えていた条件 (クロロホルムまたはトルエン溶媒中 50 °C で 2 時間加熱攪拌) にて反応を実施したところ、予想通り目的物 **11** を得ることができた。しかし、**11** の単離収率はこれまでの 2 工程収率と同程度であった (Table 6, entry 1, 2)。そこで、反応溶媒を検討したところ、アセトニトリルを用いると収率が 51% と改善され、テトラヒドロフランおよび 1,4-ジオキサン等のエーテル系溶媒を用いるとさらに改善することを明らかにした。最終的に、1,4-ジオキサンを溶媒として、反応温度を 100 °C まで上げることで単離収率を 78% まで向上させることに成功した。その結果、これまでの 2 工程を経る合成法から工程数を減らし、収率も向上させることができた (43% \rightarrow 78%)。さらに、毒性の強い硫化水素を発生させることなく **11** を効率的に供給することが可能となった。実際に、10 g スケールの合成でも同程度の収率で化合物 **11** を得ることに成功し、本合成法が構造活性相関研究の中間体供給に有用であることを示すことができた。

Table 6. Effects of solvents on the synthesis of 2-sulfanyloxazole **11**.



entry	solvent	yield (%) ^a
1	CHCl_3	31
2	Toluene	43
3	CH_3CN	51
4	THF	67
5	1,4-dioxane	63
6	1,4-dioxane	78 ^{b,c}

^a Isolated yield (100 mg scale).

^b Temp.; $100\text{ }^\circ\text{C}$.

^c 500 mg scale.

第二節 基質一般性

前節で見出した新規反応条件の基質一般性を検討した (Table 7, **34a**–**34i**).

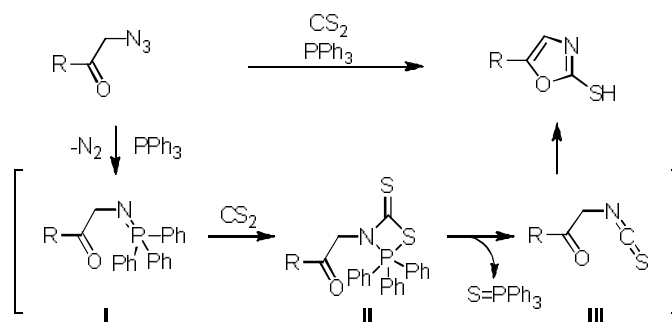
Table 7. Results of the preparation of 2-sulfanyloxazoles using various kinds of substrates.

entry	R ¹	R ²	35	yield (%) ^a
1		H		82
	34a		35a	
2		H		88
	34b		35b	
3		H		73
	34c		35c	
4		H		65
	34d		35d	
5		H		88
	34e		35e	
6		H		28
	34f		35f	
7		H		18
	34g		35g	
8		Me		94
	34h		35h	
9		H		86
	34i		35i	

^a Isolated yield.

電子供与性置換基であるメトキシ基 (**34b–34d**), あるいはブロモ基 (**34e**) をもつ β -ケトアジドは高収率 (65–88%) で目的物を与えた. その置換位置としてはパラ位のときに最も収率が良く, メタ位, オルト位の順で低下する傾向にあった. オルト位の場合に収率が低下する理由としては, 立体的な嵩高さによる反応性の低下であると考察している. また, 電子求引基であるエステルをもつ基質および π -電子欠乏型であるピリジン環をもつ基質の反応は, 原料は消失したが低収率 (18–28%) であった (**34f** および **34g**). 一方, α -メチル- β -ケトアジド **34h** および嵩高い脂肪族の側鎖をもつ **34i** は高収率で目的物を与えた (86–94%) ことから, 基質の立体的な要因よりも電子的な効果に強く影響を受ける反応であることが明らかになった.

反応機構としては, Molina らのイミノホスホラン経由のオキサゾール環構築の反応機構から次のように推測している (Scheme 12). まず, β -ケトアジドがトリフェニルホスフィンと反応してイミノホスホランが形成される (Staudinger 反応). 次に, 二硫化炭素とイミノホスホラン **I** との aza-Wittig 反応が進行し, トリフェニルホスフィンチオオキシドの脱離によってイソチオシアナート **III** が生成する. その後, カルボニル基酸素もしくはエノラートアニオンからのイソチオシアナート炭素への求核攻撃によりオキサゾール環が構築されるという反応機構である. 電子求引基もしくは π -電子欠乏型のヘテロ環をもつ基質では, 中間体 **III** の単離には至っていないものの原料の消失は確認できていることから, 中間体 **III** のカルボニル基酸素 (あるいはエノラートアニオン) の求核力が小さくなり, 分子内環化の反応性が低下していることが低収率の要因であると推察している (Table 7, entry 6, 7).



Scheme 12. plausible mechanism of iminophosphorane-mediated 2-sulfanyloxazole formation.

結語

T細胞の活性化に關与する脂質キナーゼ PI3K γ を標的とし、PI3K γ 阻害作用に基づいて細胞内シグナルの伝達を遮断することで炎症作用を抑制する、新規経口関節リウマチ治療薬の創出を目的として本研究を行った。

第一章では、まず、HTS より得られたヒット化合物 **1** から PI3K γ タンパクとの結合予測に基づいたドラッグデザインにより化合物 **2** を見出した経緯、およびその構造活性相関について述べた。リード化合物 **2** は細胞系の阻害活性を示さなかったが、その原因を、カルボキシ基の存在による低い膜透過性のためであると考察した。そこで、脂溶性を増加させて膜透過性を改善させることを意図して構造を変換した結果、酵素系および細胞系での強力な阻害活性を併せもつ化合物 **3** を創出するに至った。しかし、**3** はチアゾール-オキサゾール-ピリジン環が直結した構造に起因した分子の高い平面性により、水への溶解性が低いことが判明し、その改善が課題となった。そのため、ピリジン部位を脂肪族側鎖に変換し、平面性を崩して活性と物性の両立を目指した合成展開を行った。その結果、溶解性と PI3K γ 阻害活性を併せもつ化合物 **4** を創出することに成功した。

第二章では、化合物 **4** の新たな課題として判明した脱アセチル体の変異原性を回避するために立案したドラッグデザイン、新規リード化合物 **5** の創出およびその構造活性相関について述べた。活性発現に重要なアミノチアゾール構造を残したまま、**4** のオキサゾール環を π -電子欠乏型のオキサジアゾール環に変換し、変異原性を回避した新規リード化合物 **5** を創出した。さらに、第一章で得られた構造活性相関の情報を活かした最適化を行い、酵素系および細胞系での阻害活性に優れた化合物を創出した。*In vitro* 薬理活性の強い化合物について、代謝安定性および経口投与時の血漿中曝露量を調べ、最終的に化合物 **8** (**TASP0415914**) を *in vivo* 試験実施化合物として選抜した。**TASP0415914** は、マウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて用量依存的な関節炎の抑制作用を示し、本化合物が新規作用機序をもつ関節リウマチ治療薬となる可能性を有していることを見出した (Figure 28)。

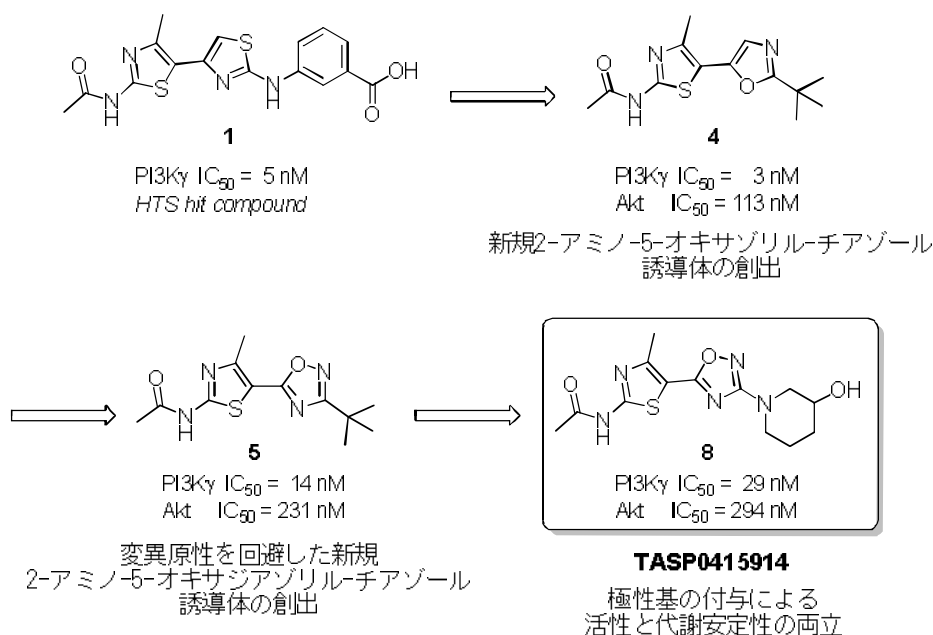


Figure 28. Summary of structural modification.

第三章では、新規 2-スルファニルオキサゾール合成法の開発と基質一般性について述べた。化合物供給時の課題をふまえた検討により、高収率、かつ毒性の強い硫化水素を発生しない新規合成法を開発することに成功した。また、基質一般性の検討によって本反応が 5 位に置換基をもつ 2-スルファニルオキサゾール誘導体の合成に、広く適用可能であることを明らかとした。

本論文は、アミノチアゾール構造をもつ PI3K γ 阻害剤の開発において、代謝物の変異原性にまで言及し、その課題を克服した初めての報告例である。また、複数の課題を一つずつ解決して見出された **TASP0415914** に至るまでの構造活性相関は、今後の PI3K γ 阻害薬の合成研究の進展に有用である。さらに、遺伝毒性回避の方策は、アミノ基をもつヘテロ環を薬剤に応用することを促進し、ヘテロ環を利用した創薬化学のさらなる進展に寄与するものとする。

実験の部

市販品の試薬および溶媒を用いた。反応の進行を確認する際は、silica gel 60-F254ガラスプレート (Merck), またはNH-silica gelガラスプレート (Fuji Silysia) を用いた。粗生成物の精製手段として中圧液体クロマトグラフィー, またはフラッシュカラムクロマトグラフィーを用い, その担体としてOH-silica gel Wako Pure Chemical C-200 (和光純薬工業), またはNH-silica gel Chromatorex DM1020 (Fuji Silysia) を用いた。質量分析スペクトル (MS) および高分解能質量分析スペクトル (HRMS) は, 島津LCMS-2010EV (ESI/APCI Dual) を用いて測定した。プロトン核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトルは, Varian Instruments Gemini 2000 (200 MHz), Varian Instruments INOVA 300 (300 MHz) およびJEOL ECA 600 (600 MHz) を用いて測定し, カーボン核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトルは, JEOL JNM-ECA500 (126 MHz) もしくはJEOL ECA600 (151 MHz) を用いて測定した。化学シフトはtetramethylsilane (TMS) を内部標準として用い, δ 値 (ppm) で示した。また, カップリング定数 (J 値, Hz) は, 1重線 (s), 2重線 (d), 3重線 (t), 4重線 (q), 多重線 (m), 2重2重線 (dd), 広幅線 (br s) および広幅3重線 (br t) で示した。元素分析は, Perkin-Elmer 2400もしくはElementar vario MICRO cube elemental analyzers (炭素, 水素, および窒素) を用いて測定した。融点は, Yanaco MP-500D を用いて測定し, その測定値は全て未補正值である。

第一章の合成に関する実験

***N*-[5-(Azidoacetyl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl]acetamide (9)**

既知化合物 **12**⁴⁴⁾ (10 g, 28 mmol) を MeOH (100 mL) に懸濁し, triethylamine (12 mL, 84 mmol) および sodium azide (5.5 g, 84 mmol) を加え, 室温にて 3 時間攪拌した. 減圧下に溶媒を留去した後, 飽和食塩水を加え, EtOAc で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 Na₂SO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc /hexane) を用いて精製し, **9** (6.1 g, 90%) を無色固体として得た. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.31 (s, 3 H), 2.68 (s, 3 H), 4.29 (s, 2 H), 9.93 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 240 [M+H]⁺, 262 [M+Na]⁺, 238 [M-H]⁻.

Ethyl 3-({5-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-1,3-oxazol-2-yl}amino)benzoate (13)

化合物 **9** (1.3 g, 5.8 mmol) を 1,4-dioxane (50 mL) に溶解し, triphenylphosphine (1.5 g, 5.8 mmol) および 3-ethoxycarbonylphenyl isothiocyanate **14** (1.2 g, 5.8 mmol) を加え, 100 °C にて 1 時間攪拌した. 減圧下に溶媒を留去した後, CHCl₃ を加え懸濁液とし, 1 時間攪拌した. 析出物を濾過し, CHCl₃ にて洗浄後, 乾燥し, **13** (1.8 g, 79%) を褐色固体として得た. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 2.16 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H), 4.33 (q, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 7.17 (s, 1 H), 7.41–7.58 (m, 2 H), 7.82–7.89 (m, 1 H), 8.29–8.33 (m, 1 H), 10.55 (br s, 1 H), 12.23 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 387 [M+H]⁺, 409 [M+Na]⁺, 385 [M-H]⁻.

3-({5-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-1,3-oxazol-2-yl}amino)benzoic acid (2)

化合物 **13** (1.8 g, 4.6 mmol) を THF (30 mL) および MeOH (10 mL) に溶解し, potassium hydroxide (1.3 g, 23 mmol) 水溶液 (6.0 mL) を加え, 60 °C にて 3 時間攪拌した. 1M HCl を加え pH 4.0 に調整し, 水希釈した後, THF で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を無水 Na₂SO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 残渣に CHCl₃ を加え懸濁液とし, 1 時間攪拌した. 析出物を濾過し, CHCl₃ および THF で洗浄後, 乾燥し, **2** (840 mg, 51%) を褐色固体として得た. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.15 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H), 7.16 (s, 1 H), 7.38–7.56 (m, 2 H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 8.30–8.33 (m, 1 H), 10.51 (br s, 1 H), 12.23 (br s, 1 H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16.44, 22.37, 111.44, 117.19, 120.58, 122.05, 123.00, 129.06, 131.72, 137.32, 139.47, 142.73, 155.25, 155.57, 167.37, 168.48; MS

(ESI): m/z 359 $[M+H]^+$, 381 $[M+Na]^+$, 357 $[M-H]^-$; Anal. Calcd for $C_{16}H_{14}N_4O_4S \cdot 0.7H_2O$: C, 51.80; H, 4.18; N, 15.10. Found: C, 51.83; H, 4.12; N, 14.81.

化合物 **13** の合成と同様の操作を行い、化合物 **15a**–**15c** を得た。

***N*-(5-{2-[(4-Chlorophenyl)amino]-1,3-oxazol-5-yl}-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)acetamide (15a)**

褐色固体 (収率 70%); 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 2.15 (s, 3 H), 2.39 (s, 3 H), 7.13 (s, 1 H), 7.35–7.66 (m, 4 H), 10.47 (s, 1 H), 12.22 (br s, 1 H); MS (ESI): m/z 349 $[M+H]^+$, 371 $[M+Na]^+$, 347 $[M-H]^-$; Anal. Calcd for $C_{15}H_{13}ClN_4O_2S \cdot 0.2H_2O$: C, 51.12; H, 3.83; N, 15.90. Found: C, 50.83; H, 3.87; N, 15.76.

***N*-(5-{2-[(6-Chloropyridin-3-yl)amino]-1,3-oxazol-5-yl}-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)acetamide (15b)**

無色固体 (収率 80%); mp 285.0–286.0 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 2.15 (s, 3 H), 2.39 (s, 3 H), 7.17 (s, 1 H), 7.48 (d, $J = 8.71$ Hz, 1 H), 8.13 (dd, $J = 8.71, 2.75$ Hz, 1 H), 8.61 (d, $J = 2.75$ Hz, 1 H), 10.73 (br s, 1 H), 12.21 (br s, 1 H); MS (ESI): m/z 350 $[M+H]^+$, 372 $[M+Na]^+$, 348 $[M-H]^-$; Anal. Calcd for $C_{14}H_{12}ClN_4O_2S \cdot 0.5H_2O \cdot 0.3MeOH$: C, 46.62; H, 3.88; N, 19.01. Found: C, 46.66; H, 3.82; N, 19.11.

***N*-(4-Methyl-5-{2-(pyridin-3-ylamino)-1,3-oxazol-5-yl}-1,3-thiazol-2-yl)acetamide (15c)**

無色固体 (収率 79%); 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 2.16 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H), 7.16 (s, 1 H), 7.35 (dd, $J = 8.4, 4.8$ Hz, 1 H), 8.07–8.14 (m, 1 H), 8.18 (dd, $J = 4.8, 1.3$ Hz, 1 H), 8.76 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H), 10.56 (br s, 1 H), 12.23 (br s, 1 H); MS (ESI): m/z 316 $[M+H]^+$, 338 $[M+Na]^+$, 314 $[M-H]^-$; Anal. Calcd for $C_{14}H_{13}N_5O_2S \cdot 0.3H_2O$: C, 52.42; H, 4.27; N, 21.83. Found: C, 52.62; H, 4.29; N, 21.48.

***N*-(5-Glycyl-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)acetamide dihydrochloride (10)**

化合物 **9** (500 mg, 2.1 mmol) を MeOH (20 mL) に溶解し、Pd/C (150 mg) および HCl (1.0 mL) を加え、水素気流下、室温にて 18 時間攪拌した。Pd/C をセライト[®]濾過にて除去した後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を Et₂O および MeOH から再結晶し、**10** (390 mg, 65%) を無色固体として得た。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 2.20 (s, 3 H), 2.61 (s, 3 H), 4.29–4.42 (m, 2 H), 8.34 (m, 4 H), 12.69 (br s, 1 H); MS (ESI): m/z 214 $[M+H]^+$,

236 [M+Na]⁺, 212 [M-H]⁻.

Methyl 3-[2-({2-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-oxoethyl]benzoate (16a)

2-[3-(methoxycarbonyl)phenyl]acetic acid (82 mg, 0.42 mmol) を DMF (3.0 mL) に懸濁し, 化合物 **10** (100 mg, 0.35 mmol), PyBOP[®] (220 mg, 0.42 mmol) および triethylamine (0.20 mL, 1.4 mmol) を加え, 室温にて 45 時間攪拌した. 反応液を水で希釈し, EtOAc および MeOH で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 MgSO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃) を用いて精製し, **16a** を黄色固体 (120 mg, 87%) として得た. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.17 (s, 3 H), 2.57 (s, 3 H), 3.63 (s, 2 H), 3.86 (s, 3 H), 4.36 (d, *J* = 5.7 Hz, 2 H), 7.40–8.60 (m, 5 H), 12.51 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 412 [M+Na]⁺, 388 [M-H]⁻.

Methyl 3-({5-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-1,3-oxazol-2-yl}methyl)benzoate (17a')

化合物 **16a** を phosphorus oxichloride (5.0 mL) に懸濁し, 120 °C にて 10 時間攪拌した. 溶媒を留去した残渣に, 1 M NaOH 水溶液を加え pH 8.0 に調整後, CHCl₃ で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 Na₂SO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc /hexane) を用いて精製し, **17a'** (18 mg, 14%) を黄色固体として得た. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.27 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 4.20 (s, 2 H), 7.02 (s, 1 H), 7.40–8.04 (m, 4 H); MS (ESI): *m/z* 372 [M+H]⁺, 370 [M-H]⁻.

3-({5-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-1,3-oxazol-2-yl}methyl)benzoic acid (17a)

化合物 **2** の合成と同様の操作を行い, 化合物 **17a** を褐色固体として得た (収率 38%); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.15 (s, 3 H), 2.36 (s, 3 H), 4.28 (s, 2 H), 7.27 (s, 1 H), 7.44–7.94 (m, 4 H), 12.29 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 358 [M+H]⁺, 380 [M+Na]⁺, 356 [M-H]⁻; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₇H₁₅N₃O₄S [M+H]⁺, 358.0856; Found 358.0829.

***N*-{2-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-2-oxoethyl}-2-(pyridin-3-yl)acetamide (16b)**

3-pyridylacetic acid から化合物 **16a** の合成と同様の操作を行い, **16b** を無色固体 (収

率 39%) として得た. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.17 (s, 3 H), 2.57 (s, 3 H), 3.59 (s, 2 H), 4.37 (d, $J = 5.7$ Hz, 2 H), 7.27–8.61 (m, 5 H), 12.51 (br s, 1 H); MS (ESI): m/z 333 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 355 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 331 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

***N*-{4-Methyl-5-[2-(pyridin-3-ylmethyl)-1,3-oxazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (17b)**

化合物 **16b** (29 mg, 0.090 mmol) を THF (3.0 mL) に懸濁し, Burgess 試薬 (31 mg, 0.13 mmol) を加え, 80 °C にて 4 時間攪拌した. 減圧下に溶媒を留去した後, 残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/ CHCl_3) を用いて精製し, **17b** (5.0 mg, 18%) を黄色固体として得た. mp 227.5–229.0 °C; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.15 (s, 3 H), 2.36 (s, 3 H), 4.25 (s, 2 H), 7.26 (s, 1 H), 7.36–8.59 (m, 4 H), 12.25 (br s, 1 H); MS (ESI): m/z 315 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 337 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 313 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS (ESI/APCI Dual) m/z Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, 313.0765; Found 313.0771.

***N*-{2-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-2-oxoethyl}pyridine-3-carboxamide (16c)**

化合物 **10** (370 mg, 1.3 mmol) を THF (5.0 mL) および CHCl_3 (5.0 mL) に懸濁し, nicotinoyl chloride hydrochloride (340 mg, 1.9 mmol) および triethylamine (260 mg, 2.6 mmol) を加え, 室温にて 17 時間攪拌した. 反応液に飽和 NaHCO_3 液を加え, EtOAc で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 Na_2SO_4 で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/ CHCl_3) を用いて精製し, **16c** を黄色結晶 (83 mg, 20%) として得た. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.19 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 4.54 (d, $J = 5.71$ Hz, 2 H), 7.75–7.84 (m, 2 H), 8.71–8.81 (m, 2 H), 9.22 (t, $J = 5.93$ Hz, 1 H), 12.54 (br s, 1 H); MS (ESI): m/z 319 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 317 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

***N*-{4-Methyl-5-[2-(pyridin-3-yl)-1,3-oxazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (3)**

得られた化合物 **16c** に対して, 化合物 **17b** の合成と同様の操作を行い, 化合物 **3** を黄色固体 (収率 17%) として得た. mp 294.0–296.0 °C; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.15 (s, 3 H), 2.47 (s, 3 H), 7.53–7.59 (m, 1 H), 7.54 (s, 1H), 8.31 (dt, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1 H), 8.68 (dd, $J = 4.8, 1.8$ Hz, 1 H), 9.14 (d, $J = 1.8$ Hz, 1 H), 12.33 (br s, 1 H); MS (ESI): m/z 301 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 299 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS (ESI/APCI Dual) m/z Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 301.0754; Found 301.0737.

***N*-[4-Methyl-5-(2-sulfanyl-1,3-oxazol-5-yl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide (11)**

化合物**10** (31 mg, 0.11 mmol) をEtOH (3.0 mL) に懸濁し, carbon disulfide (13 μ L, 0.22 mmol) およびsodium carbonate (13 mg, 0.12 mmol) 水溶液 (1.0 mL) を加え, 80 °Cにて9時間攪拌した. AcOHを加えpH 4.0に調整し, CHCl₃で2回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水MgSO₄で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去し, **11** (16 mg, 57%) を褐色固体として得た. mp 273.0–274.5 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 2.15 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 7.56 (s, 1H), 12.32 (s, 1H), 13.35 (br s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ 16.40, 22.37, 109.87, 112.71, 141.20, 144.88, 156.26, 168.72, 176.84; MS *m/z* 256 [M+H]⁺, 278 [M+Na]⁺, 254 [M–H][–]; Anal.Calcd for C₉H₉N₃O₂S₂·0.1H₂O: C, 42.04; H, 3.61; N, 16.34. Found: C, 41.76; H, 3.48; N, 16.11.

***N*-[5-(2-Chloro-1,3-oxazol-5-yl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl]acetamide (18)**

化合物**17a'**の合成と同様の操作により, 化合物**18**を無色固体として得た. (収率 52%); mp 254.5.0–256.5 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.28 (s, 3 H), 2.45 (s, 3 H), 7.07 (s, 1 H), 9.31 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 258 [M+H]⁺, 256 [M–H][–].

***N*-{4-Methyl-5-[2-(pyridin-3-yloxy)-1,3-oxazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (19)**

化合物 **18** (53 mg, 0.21 mmol) を DMSO (3.0 mL) に溶解し, potassium carbonate (58 mg, 0.42 mmol) および 3-hydroxypyridine (22 mg, 0.23 mmol) を加え, 100 °Cにて6時間攪拌した. 反応液に水を加えた後, EtOAc で2回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 MgSO₄で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) にて精製し, **19** (17 mg, 26%) を無色固体として得た. mp 219.5–221.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.15 (s, 3 H), 2.38 (s, 3 H), 7.17 (s, 1 H), 7.52–8.76 (m, 4 H), 12.20 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 317 [M+H]⁺, 339 [M+Na]⁺, 315 [M–H][–]; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₄H₁₂N₄O₃S [M+Na]⁺, 339.0522; Found 339.0506.

***N*-{4-Methyl-5-[2-(pyridin-3-ylsulfanyl)-1,3-oxazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (20)**

化合物 **11** (14 mg, 0.050 mmol), 3-iodopyridine (33 mg, 0.16 mmol), sodium *tert*-butoxide (11 mg, 0.11 mmol), copper iodide (1.0 mg, 0.010 mmol) および 1,10-phenanthroline (1.1 mg, 0.010 mmol) を DMF (1.0 mL) に懸濁し, 100 °Cにて11時間攪拌した. 反応液に水を加えた後, EtOAc で2回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 MgSO₄で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) および NHシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃)

を用いて精製し, **20** (10 mg, 56%) を黄色固体として得た. mp 221.0–223.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.15 (s, 3 H), 2.32 (s, 3 H), 7.45 (s, 1 H), 7.49–8.80 (m, 4 H), 12.31 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 333 [M+H]⁺, 355 [M+Na]⁺, 331 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₄H₁₂N₄O₂S₂: C, 50.59; H, 3.64; N, 16.86. Found: C, 50.33; H, 3.71; N, 16.71.

***N*-[4-Methyl-5-(2-methyl-1,3-oxazol-5-yl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide (15d)**

化合物 **9** (400 mg, 1.7 mmol) および triphenylphosphine (660 mg, 2.5 mmol) を THF (10 mL) に懸濁し, acetyl chloride (0.18 mL, 2.5 mmol) を加え, 室温にて 2 時間攪拌した. 飽和 NaHCO₃ 液を系中に加え, EtOAc で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 MgSO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) を用いて精製し, **15d** (120 mg, 30%) を無色固体として得た. mp 244.5–246.5 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.27 (s, 3 H), 2.44 (s, 3 H), 2.51 (s, 3 H), 6.98 (s, 1 H), 9.14 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 238 [M+H]⁺, 260 [M+Na]⁺, 236 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₀H₁₁N₃O₂S: C, 50.62; H, 4.67; N, 17.71. Found: C, 50.45; H, 4.68; N, 17.57.

化合物 **15d** の合成と同様の操作を行い, 化合物 **15e**, **15f'**, **15g'**, **4** および **15h** はそれぞれ対応する酸塩化物もしくはクロロギ酸メチルから合成した.

***N*-{4-Methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoroethyl)-1,3-oxazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (15e)**

無色固体 (収率 32%); mp 252.0–253.5 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.16 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 4.16 (q, *J* = 10.8 Hz, 2 H), 7.39 (s, 1 H), 12.33 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 306 [M+H]⁺, 328 [M+Na]⁺, 304 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₁H₁₀F₃N₃O₂S: C, 43.28; H, 3.30; N, 13.67. Found: C, 43.15; H, 3.24; N, 13.67.

{5-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-1,3-oxazol-2-yl}methyl acetate (15f')

無色固体 (収率 13%); mp 238.0–240.0 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.17 (s, 3 H), 2.28 (s, 3 H), 2.48 (s, 3 H), 5.20 (s, 2 H), 7.11 (s, 1 H), 9.74 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 296 [M+H]⁺, 318 [M+Na]⁺, 294 [M–H][–].

***N*-{5-[2-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (15f)**

化合物 **15f'** (80 mg, 0.27 mmol) を THF (2.0 mL) および MeOH (1.0 mL) に懸濁し, potassium hydroxide (30 mg, 0.54 mmol) 水溶液 (1.0 mL) を加え, 室温にて 1 時間攪拌し

た. 反応液を THF にて希釈後, HCl にて中和し, EtOAc で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 Na₂SO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃) を用いて精製し, **15f** (44 mg, 74%) を無色固体として得た. mp 283.0–286.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.16 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H), 4.53 (s, 2 H), 5.71 (br s, 1 H), 7.29 (s, 1 H), 12.28 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 254 [M+H]⁺, 276 [M+Na]⁺, 252 [M-H]⁻; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₀H₁₁N₃O₃S [M-H]⁻, 252.0448; Found 252.0466.

2-{5-[2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl]-1,3-oxazol-2-yl}propan-2-yl acetate (15g')

無色固体 (収率 8%); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.82 (s, 6 H), 2.09 (s, 3 H), 2.25 (s, 3 H), 2.44 (s, 3 H), 7.03 (s, 1 H), 9.39 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 324 [M+H]⁺, 346 [M+Na]⁺, 322 [M-H]⁻.

N-{5-[2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1,3-oxazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (15g)

化合物**15f**の合成と同様の操作を行い, 化合物**15g**を無色固体 (収率 91%) として得た. mp 240.0–242.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.53 (s, 6 H), 2.16 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 5.62 (s, 1 H), 7.23 (s, 1 H), 12.27 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 282 [M+H]⁺, 280 [M-H]⁻; Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₃O₃S·0.1H₂O: C, 50.90; H, 5.41; N, 14.84. Found: C, 50.80; H, 5.37; N, 14.71.

N-[5-(2-*tert*-Butyl-1,3-oxazol-5-yl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl]acetamide (4)

無色固体 (収率 14%); mp 194.0–196.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.36 (s, 9 H), 2.16 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H), 7.19 (s, 1 H), 12.26 (br s, 1 H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16.42, 22.40, 28.25, 33.29, 111.22, 122.53, 143.59, 144.02, 156.00, 168.62, 169.34; MS (ESI): *m/z* 280 [M+H]⁺, 302 [M+Na]⁺, 278 [M-H]⁻; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₃H₁₇N₃O₂S [M-H]⁻, 278.0969; Found 278.0976.

N-[5-(2-Methoxy-1,3-oxazol-5-yl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl]acetamide (15h)

無色固体 (収率 18%); mp 227.0–228.5 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.14 (s, 3 H), 2.34 (s, 3 H), 4.04 (s, 3 H), 7.07 (s, 1 H), 12.24 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 254 [M+H]⁺, 276 [M+Na]⁺, 252 [M-H]⁻; Anal. Calcd for C₁₀H₁₁N₃O₃S: C, 47.42; H, 4.38; N, 16.59. Found: C,

47.12; H, 4.34; N, 16.32.

***N*-{5-[2-(Dimethylamino)-1,3-oxazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (21a)**

化合物**18** (34 mg, 0.13 mmol) に2 M dimethylamine in THF (0.66 mL, 1.3 mmol) を加え、80 °Cで13時間攪拌した。溶媒を留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) を用いて精製し、**21a** (15 mg, 43%) を淡黄色固体として得た。mp 210.0–211.5 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.25 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H), 3.10 (s, 6 H), 6.81 (s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 267 [M+H]⁺, 289 [M+Na]⁺, 265 [M-H]⁻; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₁H₁₄N₄O₂S [M-H]⁻, 265.0765; Found 265.0772.

***N*-{4-Methyl-5-[2-(morpholin-4-yl)-1,3-oxazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (21b)**

無色固体 (収率 95%); mp 255.0–256.0 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.26 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H), 3.50–3.86 (m, 8 H), 6.82 (s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 309 [M+H]⁺, 331 [M+Na]⁺, 307 [M-H]⁻; Anal. Calcd for C₁₃H₁₆N₄O₃S·0.8H₂O: C, 48.37; H, 5.50; N, 17.36. Found: C, 48.33; H, 5.55; N, 17.18.

***N*-{5-[2-(3-Hydroxypiperidin-1-yl)-1,3-oxazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (21c)**

無色固体 (収率 65%); mp 182.0–183.5 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.30–1.55 (m, 2 H), 1.70–1.89 (m, 2 H), 2.13 (s, 3 H), 2.33 (s, 3 H), 2.93 (dd, *J* = 12.38, 8.25 Hz, 2 H), 3.01–3.18 (m, 2 H), 3.52–3.67 (m, 2 H), 3.78 (dd, *J* = 12.38, 4.58 Hz, 1 H), 4.96 (d, *J* = 4.13 Hz, 1 H), 6.94 (s, 1 H), 12.14 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 323 [M+H]⁺, 345 [M+Na]⁺, 321 [M-H]⁻; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₄H₁₈N₄O₃S [M-H]⁻, 321.1027; Found 321.1035.

***N*-{4-Methyl-5-[2-(methylsulfanyl)-1,3-oxazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (22)**

化合物**11** (110 mg, 0.44 mmol) をDMF (3.0 mL) に懸濁し、potassium carbonate (91 mg, 0.66 mmol) およびiodomethane (30 μL, 0.48 mmol) を加え、室温にて3時間攪拌した。反応液に水を加えた後、EtOAcで2回抽出した。合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) を用いて精製し、**22** (53 mg, 45%) を無色固体として得た。mp 217.5–219.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.27 (s, 3 H), 2.44 (s, 3 H), 2.68 (s, 3 H), 7.07 (s, 1 H), 9.48 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 270 [M+H]⁺, 292 [M+Na]⁺, 268 [M-H]⁻; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₀H₁₁N₃O₂S₂ [M+Na]⁺, 292.0185; Found 292.0172.

***N*-{4-Methyl-5-[2-(methylsulfonyl)-1,3-oxazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (23)**

化合物 **22** (240 mg, 0.89 mmol) を THF (20 mL) および EtOH (10 mL) に溶解し, ammonium molybdate tetrahydrate (110 mg, 0.090 mmol) および hydrogen peroxide (4.5 mL) を 0 °C にて加え, 室温にて 19 時間攪拌した. 水を加えた後, EtOAc で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 MgSO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) を用いて精製し, **23** (170 mg, 62%) を無色固体として得た. mp 252.5–254.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.30 (s, 3 H), 2.52 (s, 3 H), 3.37 (s, 3 H), 7.27 (s, 1 H), 8.86 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 302 [M+H]⁺, 324 [M+Na]⁺, 300 [M-H]⁻; Anal. Calcd for C₁₀H₁₁N₃O₄S₂: C, 39.86; H, 3.68; N, 13.94. Found: C, 39.64; H, 3.68; N, 13.77.

第二章の合成に関する実験

5-(2-*tert*-Butyl-1,3-oxazol-5-yl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-amine (4')

化合物 **4** (0.26 g, 0.92 mmol) を EtOH (10 mL) に溶解し, 6 M hydrogen chloride 水溶液 (10 mL) を滴下し, 80 °C にて 24 時間攪拌した. 1 M NaOH 水溶液にて pH = 9 に調整後, EtOAc で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水の順で洗浄し, 無水 MgSO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) を用いて精製し, **4'** (0.17 g, 76%) を無色固体として得た. mp 99.0–101.5 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.41 (s, 9 H) 2.35 (s, 3 H) 4.93 (br s, 2 H) 6.84 (s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 238 [M+H]⁺; Anal. Calcd for C₁₁H₁₅N₃OS·0.1AcOEt: C, 55.63; H, 6.47; N, 17.07. Found: C, 55.82; H, 6.59; N, 16.98.

2-Amino-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid (25)

ethyl 2-amino-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (**24**) (3.0 g, 16 mmol) を EtOH (100 mL) に溶解し, 1 M NaOH 水溶液 (50 mL) を加え, 室温にて 26 時間攪拌した. 溶媒を留去した後, 水, AcOH の順に加え, pH 5.0 に調整した. 析出物を濾過した後, 水洗浄, 乾燥し, **25** (2.5 g, 97%) を無色固体として得た. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.35 (s, 3 H), 7.57 (s, 2 H); MS (ESI): *m/z* 159 [M+H]⁺, 157 [M-H]⁻.

2-(Acetylamino)-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid (26)

化合物 **25** (500 mg, 3.2 mmol) を THF (20 mL) に懸濁し, pyridine (1.3 mL, 16 mmol) および acetyl chloride (0.60 mL, 7.9 mmol) を 0 °C にて加え, 室温にて 21 時間攪拌した. 減圧下に溶媒を留去した後, 残渣に水を加え, そのまま 1 時間攪拌した. 析出物を濾過後, 水洗浄, 乾燥し, **26** (590 mg, 91%) を無色固体として得た. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.15 (s, 3 H), 2.52 (s, 3 H), 12.35 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 201 [M+H]⁺, 223 [M+Na]⁺, 199 [M-H]⁻.

tert-Butyl 3-(acetyloxy)piperidine-1-carboxylate (31)

1-boc-3-hydroxypiperidine (**30**) (2.5 g, 12 mmol) を pyridine (15 mL) に溶解し, acetic anhydride (12 mL, 120 mmol) を 0 °C にて加え, 室温にて 4 時間攪拌した. 反応液を氷冷下にて水希釈をした後, EtOAc で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和 NaHCO₃ 液, 飽和食塩水の順で洗浄し, 無水 MgSO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去し, **31** (3.3 g, 99%) を無色油状物として得た. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.45 (s, 9 H), 1.48–1.92 (m, 4 H), 2.05 (s, 3

H), 3.24–3.55 (m, 4 H), 4.71–4.84 (m, 1 H); MS (ESI): m/z 266 [M+Na]⁺.

1-Cyanopiperidin-3-yl acetate (32)

化合物**31** (1.0 g, 4.1 mmol) をEtOAc (5.0 mL) に溶解し, 4 M hydrogen chloride in EtOAc (5.0 mL, 20 mmol) を加え, 室温で1日間攪拌した. 減圧下に溶媒を留去した後, CHCl₃を反応液に加え, triethylamine (1.7 mL, 12 mmol) を用いて反応系を中和させた後, 減圧下に溶媒を留去した. 残渣をCH₃CN (5.0 mL) に懸濁し, potassium carbonate (0.68 g, 4.9 mmol) およびcyanogen bromide (0.44 g, 4.1 mmol) を加え, 室温にて4時間攪拌した. 析出物を濾別後, 減圧下で溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) を用いて精製し, **32** (0.55 g, 79%) を無色油状物として得た. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.55–2.05 (m, 4 H), 2.11 (s, 3 H), 3.07–3.39 (m, 4 H), 4.81–4.95 (m, 1 H); MS (ESI): m/z 169 [M+H]⁺, 191 [M+Na]⁺.

1-(*N'*-Hydroxycarbamimidoyl)piperidin-3-yl Acetate (33)

化合物**32** (0.33 g, 2.0 mmol) をEtOH (5.0 mL) に溶解し, 50% hydroxylamine 水溶液 (0.39 g, 5.9 mmol) を加え, 室温にて1時間攪拌後, 減圧下に溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃) を用いて精製し, **33** (0.23 g, 58%) を無色油状物として得た. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.52–2.09 (m, 7 H), 2.87–3.03 (m, 2 H), 3.14–3.28 (m, 1 H), 3.33–3.46 (m, 1 H), 4.35 (br s, 2 H), 4.71–4.90 (m, 1 H); MS (ESI): m/z 202 [M+H]⁺, 224 [M+Na]⁺.

N-{5-[3-(3-Hydroxypiperidin-1-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (8)

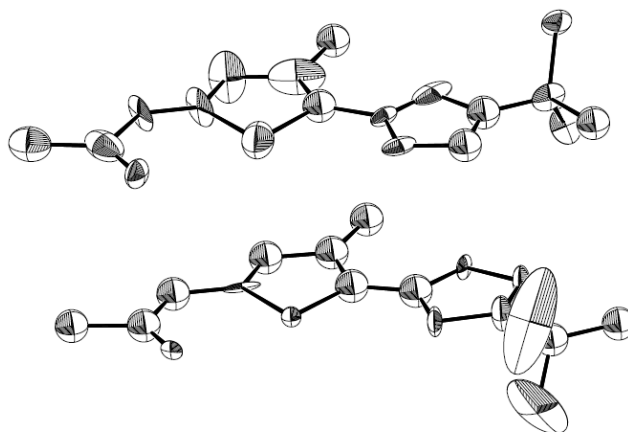
化合物 **33** (0.23 g, 1.1 mmol), **26** (0.23 g, 1.1 mmol) および 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (0.26 g, 1.4 mmol) をDMF (3.0 mL) に溶解し, 室温にて15時間攪拌した. その後, 100 °Cに昇温してさらに3時間攪拌後, 減圧下に溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃) を用いて精製し, 得られた油状物を EtOHおよびTHF (1 : 1, 2.0 mL) に溶解し, 2 M NaOH 水溶液 (1.0 mL) を加え, 室温にて15時間攪拌した. 反応液を氷冷下にて2 M HClを用いて中和した後, EtOAcで2回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水MgSO₄で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃), NHシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃) を用いて精製し, **8** (36 mg, 10%) を無色固体として得た. mp

257.5–259.5 °C; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.31–1.41 (m, 1 H), 1.43–1.53 (m, 1 H), 1.71–1.79 (m, 1 H), 1.83–1.90 (m, 1 H), 2.19 (s, 3 H), 2.61 (s, 3 H), 2.83 (dd, $J = 12.4, 8.7$ Hz, 1 H), 2.94–3.03 (m, 1 H), 3.51–3.65 (m, 2 H), 3.78 (dd, $J = 12.4, 4.1$ Hz, 1 H), 4.93 (d, $J = 4.1$ Hz, 1 H), 12.61 (br s, 1 H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 17.10, 22.07, 22.45, 32.54, 45.52, 52.85, 64.49, 107.90, 153.54, 159.67, 169.24, 169.38, 169.62; MS (ESI): m/z 324 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 346 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 322 $[\text{M}-\text{H}]^-$; Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$: C, 48.28; H, 5.30; N, 21.66. Found: C, 48.24; H, 5.33; N, 21.70.

上記と同様の操作を行い、化合物**5**, **6**, **27a–27j** を対応したヒドロキシム**29**より合成した。

***N*-[5-(3-*tert*-Butyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl]acetamide (**5**)**

無色固体 (収率 16%); mp 237.5–239.5 °C; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.41 (s, 9 H), 2.30 (s, 3 H), 2.72 (s, 3 H), 9.11 (br s, 1 H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 17.35, 23.20, 28.42, 32.48, 110.46, 152.93, 160.02, 167.90, 170.17, 177.97; MS (ESI): m/z 281 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 279 $[\text{M}-\text{H}]^-$; Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: C, 51.41; H, 5.75; N, 19.98. Found: C, 51.24; H, 5.71; N, 19.97.



The crystal structure of compound **5**.

装置 : R-AXIS RAPID II (リガク)

結晶パラメータ : crystal system: orthorhombic, space group : Pbam , $Z = 8$, $a = 9.5760(4)$ Å, $b = 44.241(2)$ Å, $c = 6.6653(3)$ Å, $R = 0.2013$, $wR = 0.5357$

5-(3-*tert*-Butyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-amine (5')

化合物**26**の代わりに化合物**25** を用いて、化合物**8**の合成と同様の操作を行い、**5'**を無色固体 (収率 45%) として得た. mp 194.5–195.5 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.39 (s, 9 H), 2.62 (s, 3 H), 5.44 (br s, 2 H); MS (ESI): *m/z* 239 [M+H]⁺, 237 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₀H₁₄N₄OS: C, 50.40; H, 5.92; N, 23.51. Found: C, 50.19; H, 5.82; N, 23.30.

***N*-{4-Methyl-5-[3-(2,2,2-trifluoroethyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (27a)**

無色固体 (収率 34%); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.21 (s, 3 H), 2.66 (s, 3 H), 4.11 (q, *J* = 10.9 Hz, 2 H), 12.73 (br s, 1 H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 17.26, 22.45, 30.55 (q, *J* = 33.0 Hz), 106.94, 124.71 (q, *J* = 276.3 Hz), 155.05, 160.46, 162.47, 169.56, 171.29; MS (ESI): *m/z* 307 [M+H]⁺, 305 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₀H₉F₃N₄O₂S: C, 39.22; H, 2.96; N, 18.29. Found: C, 39.47; H, 3.08; N, 18.01.

***N*-{5-[3-(2-Hydroxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (27b)**

無色固体 (収率 20%); mp 229.0–233.0 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.20 (s, 3 H), 2.65 (s, 3 H), 2.86 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 3.79 (br t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 4.82 (br s, 1 H), 12.70 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 269 [M+H]⁺, 291 [M+Na]⁺, 267 [M–H][–]; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₀H₁₂N₄O₃S [M+Na]⁺, 291.0522; Found 291.0522.

***N*-{5-[3-(1-Hydroxy-2-methylpropan-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (27c)**

無色固体 (収率 9%); mp 225.0–227.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.28 (s, 6 H), 2.20 (s, 3 H), 2.64 (s, 3 H), 3.54 (d, *J* = 5.5 Hz, 2 H), 4.82 (t, *J* = 5.5 Hz, 1 H), 12.63 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 297 [M+H]⁺, 319 [M+Na]⁺, 295 [M–H][–]; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₂H₁₆N₄O₃S [M+H]⁺, 297.1016; Found 297.1011.

***N*-{5-[3-(2-Hydroxy-2-methylpropyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}-acetamide (27d)**

無色固体 (収率 9%); mp 213.0–216.0 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (s, 6 H), 2.32 (s, 3 H), 2.72 (s, 3 H), 2.99 (s, 2 H), 3.42 (br s, 1 H), 9.68 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 297 [M+H]⁺, 319 [M+Na]⁺, 295 [M–H][–]; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₂H₁₆N₄O₃S [M+H]⁺, 297.1016; Found 297.1009.

***N*-{5-[3-(3-Hydroxypropyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}acetamide**

(27e)

無色固体 (収率 2%); mp 212.0–214.0 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.80–1.90 (m, 2 H), 2.19 (s, 3 H), 2.64 (s, 3 H), 2.78 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H), 3.44–3.51 (m, 2 H), 4.59 (br s, 1 H), 12.58 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 283 [M+H]⁺, 305 [M+Na]⁺, 281 [M–H][–]; HRMS (ESI/APCI Dual) *m/z* Calcd for C₁₁H₁₄N₄O₃S [M+Na]⁺, 305.0679; Found 305.0674.

***N*-{5-[3-(4-Hydroxy-2-methylbutan-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}-acetamide (27f)**

無色固体 (収率 10%); mp 177.5–179.5 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (s, 6 H), 2.03 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H), 2.30 (s, 3 H), 2.69 (s, 3 H), 3.75 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H), 9.20 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 311 [M+H]⁺, 333 [M+Na]⁺, 309 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₃H₁₈N₄O₃S: C, 50.31; H, 5.85; N, 18.05. Found: C, 50.29; H, 5.86; N, 18.04.

***N*-{5-[3-(3-Hydroxy-2,2-dimethylpropyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}-acetamide (6)**

無色固体 (収率 23%); mp 200.0–203.0 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.03 (s, 6 H), 2.32 (s, 3 H), 2.71 (s, 3 H), 2.77 (s, 2 H), 2.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 1 H), 3.40 (d, *J* = 6.8 Hz, 2 H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 17.49, 23.21, 24.77, 34.45, 36.20, 70.62, 109.76, 154.04, 159.89, 167.79, 168.57, 170.48; MS (ESI): *m/z* 311 [M+H]⁺, 333 [M+Na]⁺, 309 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₃H₁₈N₄O₃S: C, 50.31; H, 5.85; N, 18.05. Found: C, 50.19; H, 5.83; N, 18.08.

***N*-{5-[3-(3-Hydroxy-3-methylbutyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}-acetamide (27g)**

無色固体 (収率 9%); mp 211.0–215.0 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.15 (s, 6 H), 1.73–1.82 (m, 2 H), 2.20 (s, 3 H), 2.64 (s, 3 H), 2.72–2.81 (m, 2 H), 4.37 (s, 1 H), 12.66 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 311 [M+H]⁺, 333 [M+Na]⁺, 309 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₃H₁₈N₄O₃S·0.7H₂O: C, 48.34; H, 6.05; N, 17.35. Found: C, 48.19; H, 5.81; N, 17.41.

***N*-{5-[3-(3-Hydroxy-2,2-dimethylbutyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}-acetamide (7)**

化合物6 (800 mg, 2.6 mmol) をCHCl₃ (10 mL) およびTHF (2.0 mL) に溶解し, PCC

(1.1g, 5.2 mmol) およびシリカゲルを加え、室温にて6時間攪拌した。反応混合物をセライト®濾過後、減圧下に溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) を用いて精製した。得られたアルデヒドをTHF (5.0 mL) に溶解し、3 M methylmagnesium bromide in Et₂O (410 μL, 1.2 mmol) を−20 °Cにて加え、室温にて3時間攪拌した。反応液に飽和NH₄Cl水溶液を加え、EtOAcで2回抽出した。合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) を用いて精製し、**7** (82 mg, 15%) を無色固体として得た。mp 183.0–184.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 0.98 (s, 3 H), 1.03 (s, 3 H), 1.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 3 H), 2.31 (s, 3 H), 2.67 (d, *J* = 13.7 Hz, 1 H), 2.71 (s, 3 H), 2.81 (br s, 1 H), 2.92 (d, *J* = 13.7 Hz, 1 H), 3.57–3.60 (m, 1 H), 9.39 (br s, 1 H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 17.33, 17.51, 22.36, 23.20, 24.20, 35.08, 38.69, 109.80, 153.87, 160.14, 167.96, 168.76, 170.31; MS (ESI): *m/z* 325 [M+H]⁺, 347 [M+Na]⁺, 323 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₄H₂₀N₄O₃S·0.5H₂O: C, 50.43; H, 6.35; N, 16.80. Found: C, 50.39; H, 6.33; N, 16.87.

***N*-{5-[3-(3-Methoxy-2,2-dimethylpropyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl}-acetamide (27h)**

無色固体 (収率 6%); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.02 (s, 6 H), 2.30 (s, 3 H), 2.72 (s, 3 H), 2.76 (s, 2 H), 3.19 (s, 2 H), 3.38 (s, 3 H), 8.96 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 325 [M+H]⁺, 347 [M+Na]⁺, 323 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₄H₂₀N₄O₃S: C, 51.83; H, 6.21; N, 17.27. Found: C, 51.81; H, 6.27; N, 17.30.

***N*-{4-Methyl-5-[3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (27i)**

無色固体 (収率 3%); mp 245.0–247.0 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.31 (s, 3 H), 2.33–2.39 (m, 2 H), 2.72 (s, 3 H), 3.64 (dt, *J* = 14.7, 7.3 Hz, 1 H), 3.94–4.08 (m, 3 H), 4.16–4.21 (m, 1 H), 9.18 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 295 [M+H]⁺, 317 [M+Na]⁺, 293 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₂H₁₄N₄O₃S: C, 48.97; H, 4.79; N, 19.04. Found: C, 49.03; H, 4.73; N, 18.90.

***N*-{4-Methyl-5-[3-(morpholin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1,3-thiazol-2-yl}acetamide (27j)**

無色固体 (収率 7%); mp 272.0–274.0 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.19 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 3.30–3.42 (m, 4 H), 3.64–3.76 (m, 4 H), 12.62 (br s, 1 H); MS (ESI): *m/z* 310 [M+H]⁺, 332 [M+Na]⁺, 308 [M–H][–]; Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₅O₃S: C, 46.59; H, 4.89; N, 22.64. Found: C, 46.47; H, 4.88; N, 22.35.

第三章の合成に関する実験

2-sulfanyloxazole 誘導体の一般合成法

化合物 **9** (15 g, 63 mmol) および triphenylphosphine (25 g, 94 mmol) を 1,4-dioxane (300 mL) に溶解し, carbon disulfide (5.7 mL, 94 mmol) を加え, 室温で 0.5 時間攪拌した後, 100 °C に昇温して 4 時間攪拌した. 放冷後, 1 M NaOH 水溶液 (500 mL) を反応液に加え, CHCl₃ で洗浄した. 水層を, AcOH を用いて酸性とし, CHCl₃-MeOH (20 : 1) で 2 回抽出した. 合わせた抽出液を飽和食塩水で洗浄し, 無水 MgSO₄ で乾燥後, 減圧下に溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/hexane) もしくは EtOAc にて洗浄し, **11** (10 g, 63%) を淡黄色固体として得た.

上記と同様の操作を行い, 化合物 **35d**, **35f**, **35h** を得た.

5-(2-Methoxyphenyl)-1,3-oxazole-2-thiol (**35d**)

淡黄色固体 (収率 65%); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.93 (s, 3 H), 7.07 (td, *J* = 7.64, 0.83 Hz, 1 H), 7.14 (d, *J* = 7.84 Hz, 1 H), 7.34–7.39 (m, 1 H), 7.55 (s, 1 H), 7.60 (dd, *J* = 7.84, 1.65 Hz, 1 H), 13.29 (br s, 1 H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 55.53, 111.38, 114.94, 115.08, 120.74, 124.32, 129.47, 143.88, 154.75, 176.53; MS *m/z* 208 [M+H]⁺, 230 [M+Na]⁺, 206 [M-H]⁻; Anal. Calcd for C₁₀H₉NO₂S: C, 57.95; H, 4.38; N, 6.76. Found: C, 57.82; H, 4.34; N, 6.70.

Methyl 4-(2-Sulfanyl-1,3-oxazol-5-yl)benzoate (**35f**)

淡黄色固体 (収率 28%); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.86 (s, 3 H), 7.75 (d, *J* = 8.26 Hz, 2 H), 8.03 (d, *J* = 8.26 Hz, 2 H), 8.08 (s, 1 H), 13.46 (br s, 1 H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52.20, 114.78, 123.18, 128.67, 128.77, 128.88, 129.95, 130.56, 146.15, 165.60, 177.67; MS *m/z* 236 [M+H]⁺, 258 [M+Na]⁺, 234 [M-H]⁻; HRMS *m/z* Calcd for C₁₁H₉NO₃S [M+H]⁺, 236.0376. Found: 236.0371.

4-Methyl-5-phenyl-1,3-oxazole-2-thiol (**35h**)

淡黄色固体 (収率 94%); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.39 (s, 3 H), 7.32–7.39 (m, 1 H), 7.40–7.48 (m, 2 H), 7.52–7.60 (m, 2 H), 12.00 (br s, 1 H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 9.56, 120.79, 125.11, 126.92, 128.59, 128.91, 144.34, 176.54; MS *m/z* 192 [M+H]⁺, 214 [M+Na]⁺, 190 [M-H]⁻; HRMS *m/z* Calcd for C₁₀H₉NOS: [M+H]⁺, 192.0478. Found: 192.0483.

薬理, 物性, 動態, 安全性, *in silico*に関する実験

*In vitro*薬理試験

PI3K γ 酵素系アッセイ

ヒトPI3K γ タンパク質 (20 ng, ミリポア社製) を, 阻害剤存在または非存在下で, キナーゼ緩衝液 (終濃度; 20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10 μ M ATP/10 μ Ci γ [³³P]ATP) に溶解した. 酵素基質である5 μ M PtdIns (カルビオケム社製) /25 μ M PtdSer (シグマ社製) 脂質小胞を調整後, 30 °Cで2時間基質と反応させた. 酵素による基質リン酸化反応を停止させるため, 25 mMのEDTAを添加した. 酵素反応を停止させたサンプル溶液を, FlashPlate[®] (phospholipid 96-well scintillant-coated microplate) へ全量移し, 基質コーティング緩衝液 (パーキンエルマー社製) を添加することで, 基質をプレートウェルへ吸着反応させた. ウェルをPBSで洗浄し, 酵素反応によってリン酸化した基質中の [³³P]由来の放射エネルギーをPackard Top Count Microplate Scintillation Counter (パーキンエルマー社製) を用いて測定した. なお, α , β , δ の各サブタイプに関しても, ミリポア社製のタンパク質を用いて, 同様の試験方法にて測定した.

PKB/Akt (Akt) 細胞系アッセイ

細胞内の C5a 刺激による PI3K γ /Akt シグナリング経路の活性化は, Akt のリン酸化を指標に評価した. マウスマクロファージ様細胞株である Raw264.7 を, 細胞数 8×10^6 個になるようにプレートに播種し, 5 % CO₂存在下, 37 °C で 24 時間培養した. その後, 無血清培地 (0.1 % BSA 添加培地) を用いて, 37 °C で 3 時間培養した. さらに, 各濃度の阻害剤存在または非存在下で 30 分間前処理した. 細胞を 5 nM C5a (R&D システムズ社製) により 37 °C で 5 分間刺激し, Akt におけるセリン残基のリン酸化レベルを phospho-Ser-473 Akt-specific antibody kit (CST) で測定した. なお, phospho-Ser-473 Akt-specific antibody kit の測定は, キット添付プロトコルにしたがって行った.

*In vivo*薬理試験

コラーゲン誘発関節炎マウスモデルにおける関節炎の抑制評価

DBA/1 雄性マウスに免疫して関節炎を誘発した. ウシII型コラーゲンと完全フロイントアジュバントを 1対1で混合し, エマルジョンを作製した. マウスにエマルジョンを尾根部皮内へ注入した. 3週間後にウシII型コラーゲンと不完全フロイントアジュバントで作製したエマルジョン (100 μ g/100 μ L) を追加免疫した. その後, LPS (25 μ g) を 3日間腹腔内投与することで関節炎を誘発した.

関節炎の評価は、前肢と後肢の四肢関節について、以下のクリニカルスコアの基準にしたがって実施した。

- 0 点：正常
- 1 点：軽度の腫脹と発赤を認める
- 2 点：明瞭な腫脹を認める
- 3 点：高度の腫脹・浮腫を認める
- 4 点：関節の拘縮を認める

各個体において、四肢関節すべての平均関節炎点数（最大スコア/マウス 1 匹 = 16）を算出し、14 日間の経時的变化を評価した。大正製薬医薬化学研究所内において合成した化合物 **8** は DBA/1 雄性マウスへ 30 もしくは 100 mg/kg を 14 日間、一日 2 回経口投与することで評価した。実験動物の取り扱いは、日本実験動物学会の実験動物に関する指針（1987 年）および大正製薬動物管理委員会の実験動物規定に基づいて行われた。

CIAマウス関節炎スコアのつけ方

1 肢につき 4 点満点、計 16 点満点で評価

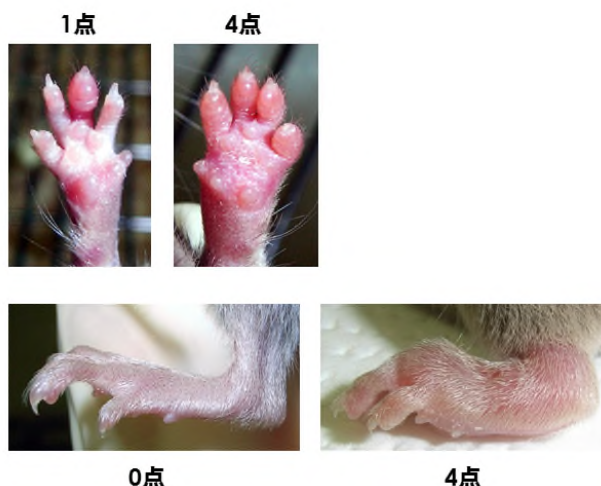
0 点：症状無し

1 点：前（後）肢指 1～2 本の腫れ、または手首（踵）の弱い腫れ
歩行に殆ど異常なし

2 点：前（後）肢指の複数本の腫れ、および手首（踵）の弱い腫れの併発
歩行に弱い違和感

3 点：前（後）肢指の複数本の腫れ、および手首（踵）の中程度の腫れの併発
歩行に強い違和感

4 点：全ての前（後）肢指の腫れ、および手首（踵）の重度（最大）の腫れの併発
歩行困難



溶解度確認試験

化合物 1.0 mg を細口のネジロ試験管にはかりとり、水を 1.0 mL ずつ加えた。超音波照射を 3 分以上行い、試料を分散させた後、25 °C で 24 時間激しく振盪した。振盪後、遠心分離し (3,000 rpm, 25 °C, 10 min.)、上清をとった。再び遠心分離し (11,000 rpm, 25 °C, 10 min.)、上清を 100 μL とり、水 : CH₃CN 混液 (1 : 1) にて適宜希釈した。調製した試料につき、HPLC にて定量した。

肝ミクロソームにおける代謝安定性試験

被験物質 (5.0 μ M) のヒトおよびラット肝ミクロソーム (蛋白濃度 : 1 mg/mL) における代謝率を測定した。インキュベーション緩衝液の組成および反応条件は以下のとおりである : 1.5 mM glucose-6-phosphate, 0.16 mM oxidized β -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, 0.18 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 100 mM phosphate buffer, 2.5 mM magnesium chloride, 反応温度 : 37 $^{\circ}$ C. 被験物質濃度は LC-MS/MS により測定した。代謝率は、初濃度に対する 15 分間反応後の残存濃度より算出した。

肝細胞における代謝安定性試験

被験物質 (1.0 μ M) のヒト肝細胞 (Celsis In Vitro Technologies) およびラット肝細胞 (XenoTech, LLC) における代謝率を測定した (細胞数 : 0.5×10^6 cells/mL; 反応温度 : 37 $^{\circ}$ C). 反応は、所定時間に $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (9 : 1, v/v) を添加することにより停止させ、4 $^{\circ}$ C 下 1,650 $\times g$ 10 min. の遠心分離により上澄を採り、LC-MS/MS にて被験物質濃度を測定した。代謝率は、初濃度に対する 1 時間反応後の残存濃度より算出した。

PAMPA 膜透過試験

評価化合物溶液 (DMSO 原液を pH 6.2 に調整した system solution に添加希釈したもの) を調製し、人工脂質 (GIT-0) で脂質二重膜を形成させた sandwich プレートの下段 (Donor) に添加した。上段 (Acceptor) には acceptor sink buffer を添加し、一定時間経過後、Donor 及び Acceptor 溶液の UV 測定から得られた化合物の累積透過量より膜透過係数 P_e ($\times 10^{-6}$ cm/sec) を算出し、化合物の膜透過性を評価した。なお、本試験は、pION 社の推奨プロトコルに準じて行った。

Ames 試験による突然変異原活性の評価

化合物の突然変異原性能を評価するために、ネズミチフス菌株の TA98 と TA100 を用いたマイクロプレートによる簡易型 Ames 試験ならびにネズミチフス菌株の TA98 と TA100, 大腸菌株の WP2uvrA を用いた Ames 試験を実施した。簡易型 Ames 試験は、最高濃度を 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (化合物 5 のみ溶解性の関係で 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Ames 試験は最高濃度を 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、いずれもラット肝ホモジネート S9 分画による代謝活性化の存在下または非存在下で試験を実施した。

***In silico* 結合予測 計算方法**

In silico 結合予測の計算には、Chemical Computing Group 社 (Montreal, Canada) のソフトウェア MOE™ (version 2012.12) を使用した。すべての PI3K γ タンパクの立体構造情報は、PI3K γ タンパクと PIK-93 の複合体の X線共結晶構造 (PDB code: 2CHZ) を使用した。³⁶⁾ PI3K γ タンパクの水素付加には、MOE の protonate3D を用いた。化合物 **1** と PI3K γ タンパクの複合体の初期構造は、化合物 **1** と PIK-93 はアミノチアゾール部分に共通骨格をもつことから、MOE の superpose を用いて共通骨格が重なるように重ね合わせを行い、得られた化合物 **1** の座標を水素付加させた複合体の PI3K γ タンパク構造の座標に合わせるにより作成した。化合物 **1** と PI3K γ タンパクの複合体の初期構造に対して、MOE の energy minimize を用いて構造最適化を行うことにより、結合様式を仮定した (Figure 13)。このとき、力場は MMFF94x を用い、タンパクの構造最適化は化合物 **1** から 4.5 Å 以内に存在するアミノ酸残基の側鎖部分のみ実施した。他の化合物に関しても同様な方法で *in silico* 結合予測を実施した。

静電ポテンシャルの算出方法

静電ポテンシャル計算と構造最適化は量子化学計算プログラム Gaussian03⁶⁵⁾を用い、静電ポテンシャルによる分子表面の表示は WebMO Pro 6.0 を用いた。静電ポテンシャルの計算は、各分子の最安定配座に対して実行した。最安定配座の探索は、MOE™ (version 2007.09) の Stochastic Conformational Search により立体配座を生成し、探索された複数配座の構造パラメータを初期値として、B3LYP 法による構造最適化を行い、最もエネルギーの低い配座を最安定配座とした。なお、構造最適化の基底関数は 6-31G (d) を用いた。静電ポテンシャルの計算は、基底関数に 6-31G (d,p) を用いて、B3LYP 法により計算した。

参考文献

1. 診断マニュアルと EBM に基づく診療ガイドライン 財団法人 日本リウマチ財団. **2004**.
2. (a) 厚生労働省, リウマチ・アレルギー対策委員会報告書, **2011**. (b) World Health Organization, The Global Burden of Disease, **2004** update.
3. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. *Arthritis Rheum.* **2002**, 46, 328–346.
4. (a) Alarcón, G. S.; Bartolucci, A. A. *J. Rheumatol.* **2000**, 27, 530–534. (b) Emery, P.; Breedveld, F. C.; Lemmel, E. M.; Kaltwasser, J. P.; Dawes, P. T.; Gömör, B.; Van Den Bosch, F.; Nordström, D.; Bjorneboe, O.; Dahl, R.; Horslev-Petersen, K.; Rodriguez De La Serna, A.; Molloy, M.; Tikly, M.; Oed, C.; Rosenburg, R.; Loew-Friedrich, I. *Rheumatology (Oxford)* **2000**, 39, 655–665. (c) Yasuda, M.; Sakai, K.; Oribe, M.; Yoshioka, K.; Takahashi, H.; Ohtsuka, E.; Wada, T.; Shiokawa, S.; Yamamoto, M.; Ichibangase, Y. *J. Rheumatol.* **1994**, 21, 44–50. (d) Johnsen, V.; Borg, G.; Trang, L. E.; Berg, E.; Brodin, U. *Scand. J. Rheumatol.* **1989**, 18, 251–260. (e) The Australian Multicentre Clinical Trial Group. *J. Rheumatol.* **1992**, 19, 1672–1677.
5. Eguchi, K. *Nichinikaishi.* **2000**, 89, 2138–2145.
6. Morgan, S. L.; Baggott, J. E.; Vaughn, W. H.; Young, P. K.; Austin, J. V.; Krumdieck, C. L. Alarcón, G. S. *Arthritis Rheum.* **1990**, 33, 9–18.
7. Gøtzsche, P. C. *J. Clin. Epidemiol.* **1990**, 43, 1313–1318.
8. Smolen, J. S.; Aletaha, D.; Bijlsma, J.W.; Breedveld, F.C.; Boumpas, D.; Burmester, G.; Combe, B.; Cutolo, M.; de Wit, M.; Dougados, M.; Emery, P.; Gibofsky, A.; Gomez-Reino, J. J.; Haraoui, B.; Kalden, J.; Keystone, E.C.; Kvien, T. K.; McInnes, I.; Martin-Mola, E.; Montecucco, C.; Schoels, M.; van der Heijde, D. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, 69, 931–937.
9. Felson, D. T.; Smolen, J. S.; Wells, G.; Zhang, B.; van Tuyl, L. H.; Funovits, J.; Aletaha, D.; Allaart, C. F.; Bathon, J.; Bombardieri, S.; Brooks, P.; Brown, A.; Matucci-Cerinic, M.; Choi, H.; Combe, B.; de Wit, M.; Dougados, M.; Emery, P.; Furst, D.; Gomez-Reino, J.; Hawker, G.; Keystone, E.; Khanna, D.; Kirwan, J.; Kvien, T. K.; Landewé, R.; Listing, J.; Michaud, K.; Martin-Mola, E.; Montie, P.; Pincus, T.; Richards, P.; Siegel, J. N.; Simon, L. S.; Sokka, T.; Strand, V.; Tugwell, P.; Tyndall, A.; van der Heijde, D.; Verstappen, S.; White, B.; Wolfe, F.; Zink, A.; Boers, M. *Arthritis Rheum.* **2011**, 63, 573–586.
10. Choi, H. K.; Seeger, J. D.; Kuntz, K. M. *Arthritis Rheum.* **2000**, 43, 2316–2327.

11. (a) Stanczyk, J.; Kowalsk, M. L.; Grzegorzcyk, J.; Szkudlinska, B.; Jarzebska, M.; Marciniak, M.; Synder, M. *Mediators Inflamm.* **2005**, 6, 343–348. (b) Harris, E. D. Jr. *N. Eng. J. Med.* **1990**, 322, 1277–1287.
12. Engelman, J. A.; Luo, J.; Cantley, L. C. *Nature Rev. Genet.* **2006**, 7, 606–619.
13. Balla, T. *Curr. Pharm. Design* **2001**, 7, 475–507.
14. Fruman, D. A.; Meyers, R. E.; Cantley, L. C. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 481–507.
15. (a) Katso, R.; Okkenhaug, K.; Ahmadi, K.; White, S.; Timms, J.; Waterfield, M. D. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, 17, 615–675. (b) Vanhaesebroeck, B.; Leever, S. J.; Ahmadi, K.; Timms, J.; Katso, R.; Driscoll, P. C.; Woscholski, R.; Parker, P. J.; Waterfield, M. D. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 535–602.
16. Ohashi, P. S.; Woodgett, J. R. *Nat. Med.* **2005**, 11, 924–925.
17. Tamura, N.; Haruta, K. *Jpn. J. Clin. Immunol.* **2007**, 30, 369–374.
18. Sasaki, T.; Irie-Sasaki, J.; Jones, R. G.; Oliveira-dos-Santos, A. J.; Stanford, W. L.; Bolon, B.; Wakeham, A.; Itie, A.; Bouchard, D.; Kozieradzki, I.; Joza, N.; Mak, T. W.; Ohashi, P. S.; Suzuki, A.; Penninger, J. M. *Science* **2000**, 287, 1040–1046.
19. Alcázar, I.; Marqués, M.; Kumar, A.; Hirsch, E.; Wymann, M.; Carrera, A. C.; Barber, D. F. *J. Exp. Med.* **2007**, 204, 2977–2987.
20. (a) Chen, Q.; Casali, B.; Pattacini, L.; Boiardi, L.; Salvarani, C. *J. Rheumatol.* **2006**, 33, 1061–1068. (b) Palacio, S.; Felix, R. *Eur. J. Endocrinol.* **2001**, 144, 431–440.
21. (a) Rommel, C.; Camps, M.; Ji, H. *Nature Rev. Immunol.* **2007**, 7, 191–201. (b) Rückle, T.; Schwarz, M. K.; Rommel, C. *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 903–918.
22. Ameriks, M. K.; Venable, J. D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, 9, 738–753.
23. Vlahos, C. J.; Matter, W. F.; Hui, K. Y.; Brown R. F. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 5241–5248.
24. Wymann, M. P.; Bulgarelli-Leva, G.; Zvelebil, M. J.; Pirola, L.; Vanhaesebroeck, B.; Waterfield, M. D.; Panayotou, G. *Mol. Cell Biol.* **1996**, 16, 1722–1733.
25. Hu, L.; Zaloudek, C.; Mills, G. B.; Gray, J.; Jaffe, R. B. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 880–886.
26. Lemke, L. E.; Paine-Murrieta, G. D.; Taylor, C. W.; Powis, G. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, 44, 491–497.
27. Davis, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2000**, 351, 95–105.
28. Barber, D. F.; Bartolomé, A.; Hernandez, C.; Flores, J. M.; Redondo, C.; Fernandez-Arias, C.; Camps, M.; Rückle, T.; Schwarz, M. K.; Rodríguez, S.; Martínez-A, C.; Balomenos, D.; Rommel, C.; Carrera, A. C. *Nat. Med.* **2005**, 11, 933–935.

29. Camps, M.; Rückle, T.; Ji, H.; Ardissonne, V.; Rintelen, F.; Shaw, J.; Ferrandi, C.; Chabert, C.; Gillieron, C.; Francon, B.; Martin, T.; Gretener, D.; Perrin, D.; Leroy, D.; Vitte, P. A.; Hirsch, E.; Wymann, M. P.; Cirillo, R.; Schwarz, M. K.; Rommel, C. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 936–943.
30. Pomel, V.; Klicic, J.; Covini, D.; Church, D. D.; Shaw, J. P.; Roulin, K.; Burgat-Charvillon, F.; Valognes, D.; Camps, M.; Chabert, C.; Gillieron, C.; Françon, B.; Perrin, D.; Leroy, D.; Gretener, D.; Nichols, A.; Vitte, P. A.; Carboni, S.; Rommel, C.; Schwarz, M. K.; Rückle, T. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3857–3871.
31. Sunose, M.; Bell, K.; Ellard, K.; Bergamini, G.; Neubauer, G.; Werner, T.; Ramsden, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4613–4618.
32. Leahy, J. W.; Buhr, C. A.; Johnson, H. W. B.; Kim, B. G.; Baik, T.; Cannoy, J.; Forsyth, T. P.; Jeong, J. W.; Lee, M. S.; Ma, S.; Noson, K.; Wang, L.; Williams, M.; Nuss, J. M.; Brooks, E.; Foster, P.; Goon, L.; Heald, N.; Holst, C.; Jaeger, C.; Lam, S.; Lougheed, J.; Nguyen, L.; Plonowski, A.; Song, J.; Stout, T.; Wu, X.; Yakes, M. F.; Yu, P.; Zhang, W.; Lamb, P.; Raeber O. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5467–5482.
33. Bruce, I.; Akhlaq, M.; Bloomfield, G. C.; Budd, E.; Cox, B.; Cuenoud, B.; Finan, P.; Gedeck, P.; Hatto, J.; Hayler, J. F.; Head, D.; Keller, T.; Kirman, L.; Leblanc, C.; Grand, D. L.; McCarthy, C.; O'Connor, D.; Owen, C.; Oza, M. S.; Pilgrim, G.; Press, N. E.; Sviridenko, L.; Whitehead, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5445–5450.
34. Palanki, M. S. S.; Dneprovskaia, E.; Doukas, J.; Fine, R. M.; Hood, J.; Kang, X.; Lohse, D.; Martin, M.; Noronha, G.; Soll, R. M.; Wrasidlo, W.; Yee, S.; Zhu, H. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4279–4294.
35. Porter, J. R.; Adams, J.; Castro, A.; DiNitto, J. P.; Dunbar, J.; Faia, K.; Kelly, P.; Li, L.-S.; McKee, C.; Nevejans, J.; Niu, W.; Palombella, V. J.; Pink, M.; Ren, P.; Rommel, C.; Soglia, J.; White, K.; Winkler, D. G. 245th ACS, New Orleans: MEDI 11, Apr **2013**.
36. Oka, Y.; Yabuuchi, T.; Fujii, Y.; Ohtake, H.; Wakahara, S.; Matsumoto, K.; Endo, M.; Tamura, Y.; Sekiguchi, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7534–7538.
37. Trentham, D. E. *Arthritis Rheum.* **1982**, *25*, 911–916.
38. Fujii, Y.; Hirayama, T.; Ohtake, H.; Ono, N.; Inoue, T.; Sakurai, T.; Takayama, T.; Matsumoto, K.; Tsukahara, N.; Hidano, S.; Harima, N.; Nakazawa, K.; Igarashi, Y.; Goitsuka, R. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 206–215.
39. Oka, Y.; Yabuuchi, T.; Oi, T.; Kuroda, S.; Fujii, Y.; Ohtake, H.; Inoue, T.; Wakahara, S.; Kimura, K.; Fujita, K.; Endo, M.; Taguchi, K.; Sekiguchi, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**,

- 21, 7578–7583.
40. Oka, Y.; Yabuuchi, T.; Sekiguchi, Y. *Heterocycles* **2013**, 87, 1881–1887.
 41. Domin, J.; Waterfield, M. D. *FEBS Lett.* **1997**, 410, 91–95.
 42. Vieth, M.; Higgs, R. E.; Robertson, D. H.; Shapiro, M.; Gragg, E. A.; Hemmerle, H. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, 1697, 243–257.
 43. Walker, E.H.; Pacold, M.E.; Perisic, O.; Stephens, L.; Hawkins, P. T.; Wymann, M. P.; Williams, R. L. *Mol. Cell* **2000**, 6, 909–919.
 44. Anna, Q.; Thomas, R.; Matthias, S.; Jérôme, D.; Wolfgang, S.; Christophe, C.; Gwénaëlle, D. WO2005068444
 45. Knight Z. A.; Gonzalez B.; Feldman M. E.; Zunder E. R.; Goldenberg D. D.; Williams O.; Loewith R.; Stokoe D.; Balla A.; Toth B.; Balla T.; Weiss W. A.; Williams R. L.; Shokat K. M. *Cell* **2006**, 125, 733–747.
 46. The binding model was examined and visualized using MOE™ (Molecular Operating Environment) version 2012.12, Chemical Computing Group: Montreal, Canada.
 47. Bursavich, M. G.; Parker, D. P.; Willardsen, J. A.; Gao, Z.; Davis, T.; Ostanin, K.; Robinson, R.; Peterson, A.; Cimborá, D. M.; Zhu, J.; Richards, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1677–1679.
 48. Llauger, L.; He, H.; Kim, J.; Aguirre, J.; Rosen, N.; Peters, U.; Davies, P.; Chiosis, G. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2892–2905.
 49. Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1007–1010.
 50. Collier, P.; Martinez-Botella, G.; Cornebise, M.; Cottrell, K.; Doran, J. D.; Griffith, J. P.; Mahajan, S.; Maltais, F.; Moody, C. S.; Huck, E. P.; Wang, T.; Aronov, A. M. *J. Med. Chem.* **2014**, Just Accepted Manuscript. DOI: 10.1021/jm500362j
 51. Lipinski, C. A.; Franco Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 23, 3–25.
 52. Kim, I. H.; Morisseau, C.; Watanabe, T.; Hammock, B. D. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2110–2122.
 53. (a) Ishikawa, M.; Hashimoto, Y. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1539–1554. (b) Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J. F. *Drug Dis. Today* **2009**, 14, 1011–1020. (c) Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6752–6756.
 54. Stahl, P. H.; Wermuth, C. G. (Eds.) **2002** “*Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*” Zurich: Wiley-VCH.
 55. Wang, H. L.; Katon, J.; Balan, C.; Bannon, A. W.; Bernard, C.; Doherty, E. M.;

- Dominguez, C.; Gavva, N.; Gore, V.; Ma, V.; Nishimura, N.; Surapaneni, S.; Tang, P.; Tamir, R.; Thiel, O.; Treanor, J. J. S.; Norman, M. H. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3528–3539.
56. Doherty, E. M.; Fotsch, C.; Bannon, A. W.; Bo, Y.; Chen, N.; Dominguez, C.; Falsey, J.; Gavva, N. R.; Katon, J.; Nixey, T.; Ognyanov, V. I.; Pettus, L.; Rzasz, R. M.; Stec, M.; Surapaneni, S.; Tamir, R.; Zhu, J.; Treanor, J. J.; Norman, M. H. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3415–3527.
57. Arima, Y.; Kinoshita, M.; Akita, H. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18*, 1701–1711.
58. Hamann, L. G.; Manfredi, M. C.; Sun, C.; Krystek, Jr. S. R.; Huang, Y.; Bi, Y.; Augeri, D. J.; Wang, T.; Zou, Y.; Betebenner, D. A.; Fura, A.; Seethala, R.; Golla, R.; Kuhns, J. E.; Lupisella, J. A.; Darienzo, C. J.; Custer, L. L.; Price, J. L.; Johnson, J. M.; Biller, S. A.; Zahler, R.; Ostrowski, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1860–1864.
59. (a) Chung, K. T.; Kirkovsky, L.; Kirkovsky, A.; Purcell, W. P. *Mutat. Res.* **1997**, *387*, 1–16. (b) Ford, G. P.; Herman, P. S. *Chem. Biol. Interact.* **1992**, *81*, 1–18. (c) Ford, G. P.; Griffin, G. R. *Chem. Biol. Interact.* **1992**, *81*, 19–33. (d) Novak, M.; Rajagopal, S. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1495–1503.
60. Maran, U.; Karelson, M.; Katritzky, A. R. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1999**, *18*, 3–10. (b) Kazius, J.; McGuire, R.; Bursi, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 312–320.
61. Pattenden, G.; Robertson, G. M. *General and Synthetic Methods* **1994**, *16*, 250–291.
62. Trentham, D. E.; Townes, A. S.; Kang, A. H. *J. Exp. Med.* **1977**, *146*, 857–868.
63. Harris, P. A.; Cheung, M.; Hunter III, R. N.; Brown, M. L.; Veal, J. M.; Nolte, R. T.; Wang, L.; Liu, W.; Crosby, R. M.; Johnson, J. H.; Epperly, A. H.; Kumar, R.; Luttrell, D. K.; Stafford, J. A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1610–1619.
64. Molina, P.; Fresneda, P. M.; Almendros, P. *Synthesis*, **1993**, 54–56.
65. Gaussian 03, Revision D.02, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr. J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.;

Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

謝辞

本論文の作成および発表にあたり、終始、御懇篤な御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京薬科大学大学院薬学研究科薬品製造学教室教授 松本隆司先生に深甚なる謝意を表します。

また、本論文に関して審査および御指導と御助言を賜りました東京薬科大学大学院薬学研究科 分子機能解析学教室教授 横松力先生、薬品化学教室教授 林良雄先生、薬化学教室教授 三浦剛先生に深謝致します。

本研究の機会および本論文発表の許可を与えて頂きました大正製薬株式会社社長 上原茂氏、同専務取締役 藤田憲一氏、同医薬研究本部本部長 奥山茂博士、同医薬研究本部副本部長 ロドニー W. スティーブンス博士、同化学研究所所長 大嶽憲一博士に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の実施に当たり、御指導と御鞭撻を賜りました大正製薬株式会社化学第3研究室室長 吉住隆博士、同研究総務部 関口喜功博士、同人材開発部 樫村政人博士、同化学第3研究室 安原明登博士、小野直哉博士、鹿沼幸祐博士、杉本智洋博士、天田英明博士、河口尚則博士に謹んで感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、御指導と御協力を頂きました大正製薬株式会社化学第3研究室 藪内哲也博士、同プロセス化学研究室 大井隆宏氏、同化学第2研究室 黒田翔一氏、同薬理第3研究室 藤井康行博士、同薬理第2研究室 大竹秀典氏、同開発推進部 井上知之博士、同生物資源研究室 若原俊一氏、同研究推進室 木村佳代氏、同薬理第3研究室 藤田記代子氏、同化学資源研究室 遠藤真弓博士、田村勇之進氏、同研究・生産業務管理部 田口恭子氏、同薬物動態研究室 皆川俊哉博士、同安全性研究室 山田久陽博士、渡邊久美子氏、同化学資源研究室 岡田敦司博士、関根寿代氏、樋口彰氏、同製剤研究室 野副晶子氏、同知的財産部 片貝博典氏、ならびに同化学第3研究室の諸氏に深く感謝致します。

最後に、常に暖かく見守り育ててくれた両親と、本論文の作成に当たって様々な面で支え励ましてくれた妻をはじめ家族に感謝致します。