

# 脳梗塞急性期治療薬を指向したNa<sup>+</sup>チャネル阻害薬 の創製

関, 真紀

<https://doi.org/10.15017/1470647>

---

出版情報：九州大学, 2014, 博士（薬学）, 論文博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

脳梗塞急性期治療薬を指向した  
 $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の創製

2014

関 真紀

# 目次

## 序論

- 第一節 脳梗塞概説 - 1 -
- 第二節 脳梗塞治療薬としての  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬 - 5 -
- 第三節 本研究の方針と概要 - 10 -

## 本論

- 第一章 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール系  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬
  - 第一節 研究方針 - 14 -
  - 第二節 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体の合成 - 16 -
  - 第三節 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体の生理活性および薬理活性 - 21 -
  - 第四節 本章のまとめ - 26 -
- 第二章 ピロリジン系  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬
  - 第一節 研究方針 - 27 -
  - 第二節 ピロリジン誘導体の合成 - 30 -
  - 第三節 ピロリジン誘導体の生理活性および薬理活性 - 35 -
  - 第四節 本章のまとめ - 41 -
- 第三章 ピラジノイソキノリン骨格の高ジアステレオ選択的構築法の開発
  - 第一節 序説 - 43 -
  - 第二節 1,3-キラル転移によるピラジノイソキノリン骨格のジアステレオ選択的な構築法 - 48 -
  - 第三節 新規ピラジノイソキノリン骨格構築法の反応性 - 55 -
  - 第四節 本章のまとめ - 58 -

結語	- 60 -
実験の部	- 63 -
引用文献	- 96 -
投稿論文一覧	- 100 -
謝辞	- 101 -

## 序論

### 第一節 脳梗塞概説

脳卒中は脳梗塞、脳出血、くも膜下出血に分類され、それぞれ約 70%、20%、10% と脳梗塞が最も多い。2011 年の脳梗塞診断患者数は日米欧で 158 万人、日本においては 23 万人であり、死亡原因の第三位、寝たきりになる原因第一位となっている。<sup>1)</sup> わが国では高齢化社会を迎え脳卒中患者の増加が見込まれており、2020 年には 300 万を超えると予測されている。介護が必要になった原因疾患としては脳血管疾患が全体の 35.5% と第一位を占めており、また要介護者が増加する傾向にあることから、大きな社会問題になっている。<sup>2)</sup> さらにこの治療に要する医療費は 1 兆 7000 億円に上り（全医療費の 5.4%）、入院医療費は全体の 80% 以上を占める。<sup>3)</sup> 一方で、脳梗塞急性期の治療の難しさや広く認知され実行されている治療薬や内科的療法が無いことが、今後の大きな臨床的、医療経済的な課題となっていくことが予想される。

現在脳梗塞の治療として、Figure 1 に示す治療法が用いられている。脳卒中ガイドラインである「脳卒中治療ガイドライン 2009」でグレード A（行うよう強く勧められる）に位置付けられた治療法は少なく、脳梗塞急性期においては血栓溶解療法（静脈内投与）のグルトパ®（アルテプラゼ、t-PA）、抗血小板療法の経口アスピリンのみである。脳梗塞治療薬として承認を受けている薬剤は t-PA のみであるが、t-PA の適用は脳梗塞発症後 4.5 時間までの患者に限られており、虚血再灌流時の脳出血が問題視されている。したがって、発症後 4.5 時間以上経過した患者や出血が疑われる CT 像を呈する患者に対しては、温存療法などの消極的療法が対象となっているのが現状である。一方抗血小板薬も用いられるが、血栓溶解剤と比較して効果は劣る。本邦では脳保護療法としてフリーラジカル消去剤のラジカット®（エダラボン）が承認されており、脳梗塞急性期治療に大きな貢献を果たしているが、これに続く有効性の高い新薬の開発が望まれている。

近年脳梗塞を“ブレインアタック”と呼び、急性期の治療を積極的に、しかも可能な限り早く行う動きが出てきている（“Time is Brain”）。虚血性細胞傷害を決定する因子として、虚血持続時間が重要である。空間的には梗塞巣と正常脳組織の中間に位置し、虚血中心領域（core）の周辺に存在する領域をペナンブラ（penumbra）と称する。この領域では ATP 減少に伴う神経機能抑制は生じて

いるが、虚血性脱分極に伴う電位依存性イオンチャネルの爆発的開口が生じておらず、細胞死に至っていないと考えられる。このペナンプラはまだ梗塞化しておらず、適切な治療によって回復しうる領域として急性期治療の重要なターゲットとなっている。しかしながらペナンプラ領域では、血流低下による障害が徐々に発現し、アポトーシス様の選択的神経細胞死や微小循環の障害が発生することが認められている。すなわち再灌流なく虚血が続く時は、ペナンプラ領域は約半日から 24 時間で梗塞化してくる (Therapeutic time window)。脳梗塞急性期は 80% 以上が虚血性脳梗塞であり、脳梗塞巣の拡大を防ぐために出来るだけ早く血流を再開する目的で、血栓溶解療法が試みられている。この血行再建と並んで脳梗塞治療のもう 1 つの柱となっているのが脳保護療法である。グルタミン酸などの興奮性アミノ酸や  $\text{Ca}^{2+}$  を介する興奮性細胞傷害 (excitotoxicity) が虚血性神経細胞死に大きな役割を果たしている可能性が明らかとなったことから、細胞傷害の一連のカスケード (Figure 1)<sup>4)</sup> を抑制することにより脳梗塞の進行抑制が期待できる脳保護薬として、これまでに NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) 型受容体拮抗薬、AMPA ( $\alpha$ -amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionic acid) 受容体拮抗薬、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネル阻害薬、一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬などの臨床試験が行われてきた。これらの薬剤は動物実験では効果が認められてきたにもかかわらず、臨床試験ではほとんど効果が認められていない (Table 1)。<sup>5)</sup> したがって、t-PA、ラジカット® に続く有効性の高い新薬の開発が切に望まれている。

臨床試験に付された多くの脳保護薬が、動物実験の結果を再現できず臨床応用を断念した理由の一つは、げっ歯類とヒトの脳の神経解剖学および生化学的相違である。<sup>5)</sup> ヒトの脳では灰白質は脳全体の約 50% であるのに対し、ラットやマウスなど小動物の脳ではその 85%~90% を占めており、<sup>6)</sup> また白質の虚血性傷害機序は灰白質のそれとは大きく異なっている (Figure 1)。灰白質の主要な構成要素は神経細胞の細胞体 (soma) と樹状突起 (dendrites) であり、多くの電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルや NMDA 受容体などのグルタミン酸受容体が存在する。したがって虚血が灰白質に生ずると、細胞体や樹状突起内の ATP 減少に伴って脱分極が生じ、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介し細胞内に多量の  $\text{Ca}^{2+}$  の流入、またグルタミン酸作動性神経線維終末から多くのグルタミン酸が放出され、NMDA 受容体や AMPA/kainite 受容体の活性化に引き続く細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の異常上昇が起こる。

一方白質の主要な構成要素は神経線維の軸索 (axon) であり、ランビエ絞輪部では電位依存性  $\text{Na}^+$  チャネルが高密度で存在し、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase も多く存在するが、<sup>7)</sup> NMDA 受容体などのグルタミン酸受容体や電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネ

ルは存在しない。したがってランビエ絞輪部では、虚血時には  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の抑制によって細胞膜の脱分極は生ずるが、灰白質の場合とは異なり、電位依存性  $\text{Na}^+$  チャネルを通して  $\text{Na}^+$  が軸索内に大量に流入、同時に水分子流入も伴うため軸索浮腫が急速に進行する。

すなわち灰白質ではグルタミン酸や  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞傷害に関与するが、白質では  $\text{Na}^+$  流入による細胞傷害や軸索浮腫が重要であると考えられる (Figure 1). <sup>8)</sup>  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬は、白質傷害が主体のヒト脳梗塞において、 $\text{Na}^+$  の流入による神経細胞死や細胞傷害性浮腫を抑制することによって脳梗塞を減少させ、神経症状や脳浮腫を改善することが期待される。したがって、筆者は  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬が臨床において有効な急性期脳梗塞治療薬になり得ると考えて、本研究を開始した。

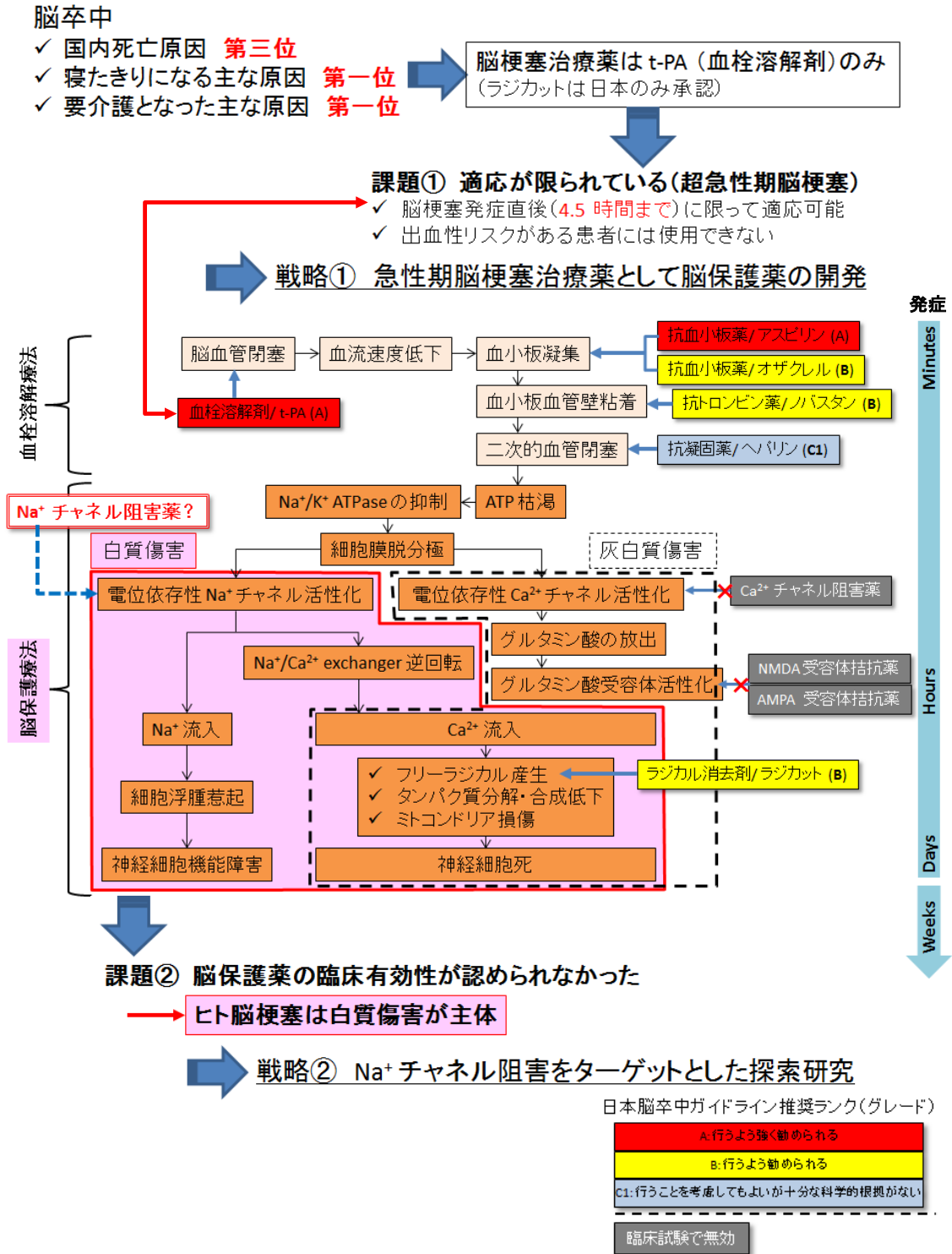
**Table 1.** 脳保護薬の臨床試験結果<sup>4,5)</sup>

Class	Product	Result
$\text{Na}^+$ チャネル阻害薬	Fosphenytoin	無効
$\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬	Nimodipine	無効
	Flunarizine	無効
NMDA 受容体拮抗薬 (競合阻害)	Selfotel	有害 <sup>a</sup>
NMDA 受容体拮抗薬 (ポリアミン結合部位阻害)	Eliprodil	無効
NMDA 受容体拮抗薬 (チャネル拮抗)	Aptiganel	有害
グリシン拮抗薬	Gavestinel	無効
AMPA 受容体拮抗薬	ZK200775	開発断念
$\text{GABA}_A$ 受容体作動薬	Clomethiazole	無効
イオンチャネル阻害薬/ NO 阻害薬	Lubeluzole	無効 <sup>b</sup>
フリーラジカル消去剤	Tirilazad	無効
	Ebselen	無効
抗炎症薬 (抗 ICAM 抗体)	Enlimomab	有害
細胞膜作用薬	GMI-ganglioside	無効

<sup>a</sup> Potential neurotoxic effects.

<sup>b</sup> Significant increase in heart conductance disorders.

Figure 1. 急性期脳梗塞治療薬の現状と課題, および脳虚血後の細胞傷害カスケード





## 第二節 脳梗塞治療薬としての Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬

電位依存性 Na<sup>+</sup> チャネルは膜電位の変化によって開閉する典型的なイオンチャネルであり，神経や筋肉のような興奮性膜に見られ，活動電位の発生と伝導に関わっている．また神経ネットワークにおいては，シナプス間の情報伝達の即時応答性に重要な役割を果たしており，運動機能から認識機能に至るまでの幅広い神経活動を支えるネットワーク形成に関わっている．電位依存性 Na<sup>+</sup> チャネルは特に神経軸索のランビエ絞輪に比較的多く局在し，神経における活動電位の跳躍伝導に関与している．

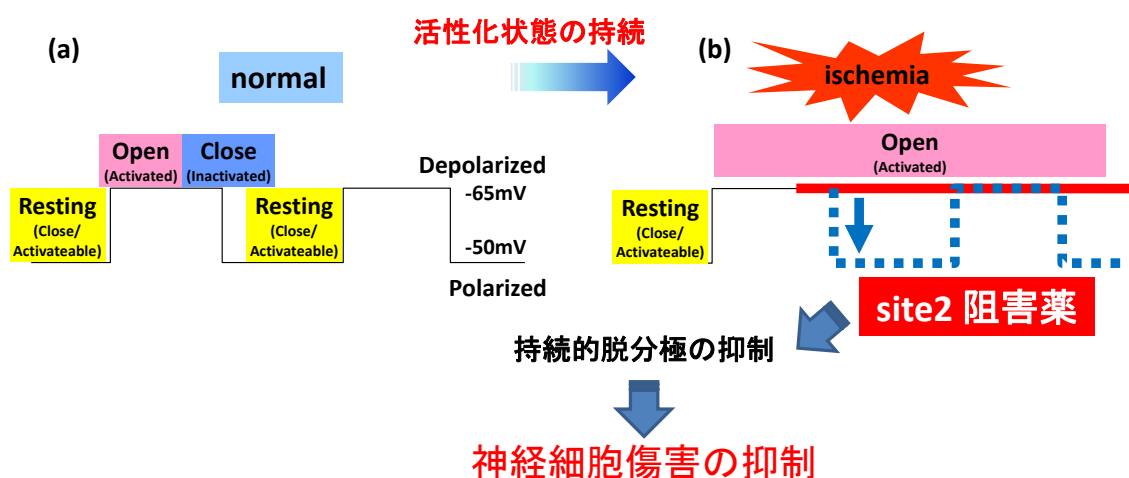
Na<sup>+</sup> チャネルは 4 つのドメインから成る  $\alpha$ -サブユニットと 2 つの  $\beta$ -サブユニットから構成されており，ポアや電位感受性などのチャネル機能は， $\alpha$ -サブユニットにあるといわれている． $\alpha$ -サブユニットから Table 2 に示す 9 つの遺伝子が同定されており，遺伝子によって発現している器官や組織，および発生段階における発現のタイミングが異なる．<sup>9)</sup> 脳に比較的多く局在する遺伝子は SCN1A, 2A, 3A であり，これらで脳の 90% 以上を占めている．また中枢神経の主に軸索に多く発現が見られる Nav. 1.2 において，ラットとヒトの相同性は 70% である．一方，神経と同じく活動電位の伝達に Na<sup>+</sup> チャネルが関わっている心臓の Na<sup>+</sup> チャネル遺伝子は，SCN5A である．またラットにおける脳と心臓の相同性は約 50% 程度と低く，組織特異性が高いと思われる．

**Table 2.** 哺乳類の Na<sup>+</sup> チャネル  $\alpha$  サブユニットとその発現場所<sup>9)</sup>

遺伝子	チャネル名称	主要発現場所
SCN1A	Nav.1.1	中枢神経系（主に神経細胞の細胞体），末梢神経系
SCN2A	Nav.1.2	中枢神経系（主に軸索），グリア
SCN3A	Nav.1.3	中枢神経系（主に初期胚），グリア
SCN4A	Nav.1.4	骨格筋
SCN5A	Nav.1.5	心筋
SCN8A	Nav.1.6	中枢，末梢神経系，グリア
SCN9A	Nav.1.7	末梢神経系，グリア
SCN10A	Nav.1.8	末梢神経系
SCN11A	Nav.1.9	末梢神経系

神経の活動電位の発生は  $\text{Na}^+$  および  $\text{K}^+$  の細胞への出入りによるものであり、それは  $\text{Na}^+$  チャネルおよび  $\text{K}^+$  チャネルの開閉に帰属される。特に活動電位の速い立ち上がりは  $\text{Na}^+$  チャネルによるとされている。<sup>10)</sup> 通常、細胞外に  $\text{Na}^+$  と  $\text{Ca}^{2+}$  を、細胞内に  $\text{K}^+$  を多く含んだ状態で神経細胞は電氣的に平衡状態（静止膜電位）を保っており、これらのイオン勾配の維持には  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase が関与している。活動電位が発生する時には細胞膜電位が低下して細胞内  $\text{K}^+$  の流出が起これ、脱分極が起こると膜電位依存性の  $\text{Na}^+$  チャネルが速い速度で開き始める。これが  $\text{Na}^+$  チャネルの活性化（open state）であり、その後ある閾値の膜電位を越えると大量に  $\text{Na}^+$  が細胞内へ流入する。通常  $\text{Na}^+$  チャネルは急速に不活性化状態になって閉じ（closed state）、静止状態に戻る前に 2~3 ミリ秒間この状態にとどまっている。その後、膜電位の変化を察知してゆっくりと開く  $\text{K}^+$  チャネルによって再分極が起こり、この時点では  $\text{Na}^+$  チャネルは静止状態（resting state）に戻り、次の活動電位の発生に備えている（Figure 2a）。虚血状態では、この脱分極の状態が持続すると言われている（Figure 2b）。

**Figure 2.**  $\text{Na}^+$  チャネル site 2 を阻害する意義. (a) 膜電位変化と  $\text{Na}^+$  チャネルの 3 つの状態の関係. (b) 虚血状態における持続的脱分極.



### 課題③ $\text{Na}^+$ チャネル阻害による毒性の懸念

➡ 戦略③ 持続的脱分極に関連する **site 2** を特異的に阻害する薬剤の探索

これまでに  $\text{Na}^+$  チャネルの遮断作用が知られている神経毒のテトロドトキシンや、抗てんかん薬のフェニトインについて、脳梗塞の治療薬としての可能性が検討されてきた。しかしこれらによる  $\text{Na}^+$  チャネル遮断作用では、 $\text{Na}^+$  チャネルのポアの部分に作用して  $\text{Na}^+$  の透過を阻止することによって神経や筋肉の

通常機能を阻害し、神経活動そのものを抑制することにより神経に対する毒性を呈す、あるいは細胞膜の安定化（不応答性の獲得）により局所麻酔薬のような作用を引き出すとされている。Na<sup>+</sup> チャネルには、ある部位に特異的に結合し、様々な阻害様式を示す種々の神経毒が知られており、現在のところ Table 3 に示す 9 つのサイトに機能別に分別されている。<sup>9)</sup> 上記のテトロドトキシンや抗てんかん薬あるいは局所麻酔薬は、それぞれ site 1 および site 9 に結合して、Na<sup>+</sup> の透過そのものを阻止する。一方、site 2 に結合するバトラコトキシン (BTX) やベラトリジン、アコニチン (Figure 3) は、活性化状態にある Na<sup>+</sup> チャネルに選択的に結合して活性化状態の安定化を引き起こし、不活性化状態を阻害することにより持続的な脱分極を引き起こすとされている。<sup>11)</sup> 脳梗塞治療薬として望まれる Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の作用は、虚血によって引き起こされた脱分極の持続状態のみを特異的に抑制することである。すなわち、Na<sup>+</sup> チャネルの活性化状態の持続に関連している site 2 を特異的に遮断する Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬は、安全性が高く、神経細胞傷害を強く抑制する脳梗塞治療薬となると考えられる (Figure 2)。

これまでに脳梗塞治療薬として、いくつかの Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の開発がなされてきた (Figure 4)。<sup>12)</sup> しかし、抗てんかん薬のフェニトインでは Na<sup>+</sup> チャネル遮断作用の弱さにより臨床試験では無効であったこと、また lubeluzole では QT 延長作用を理由に開発を断念している。<sup>13)</sup> 脳梗塞は、脳内小動脈病変が原因の「ラクナ梗塞」、頸部～頭蓋内の比較的大きな動脈のアテローム硬化が原因の「アテローム血栓性脳梗塞」、心疾患による「心原性脳塞栓症」および「その他」に大別されるが、そのうち心原性脳塞栓症は脳梗塞の 27% を占めており、その割合の増加が顕著となっている。<sup>14)</sup> このような背景から、薬効や選択性など Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の探索において克服すべき課題は多く、また脳梗塞患者には心臓に既往歴を持つケースが想定されることから、特に心臓に対する安全性の確保は重要であると考えられる。筆者は既存の Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬が有していた課題解決のために、選択性が高く心臓に対する安全性が確保された、site 2 を阻害する Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の創製を目指すこととした。またこのような Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬が創製できれば、既存薬にない強い神経細胞傷害抑制作用を有し、安全性が担保された急性期脳梗塞治療薬になり得ると考えた。

**Table 3.** 電位依存性 Na<sup>+</sup> チャネルにおける神経毒の結合部位<sup>9)</sup>

Site	Neurotoxin <sup>a</sup>	Physiological effect
1	tetrodotoxin (TTX) saxitoxin, μ-conotoxin	inhibition of transport
2	batrachotoxin (BTX) veratridine, aconitine grayanotoxin, <i>N-alkylamides</i>	persistent activation
3	α-scorpion toxins sea anemone II toxin (ATXII) δ-atracotoxins	inhibition of activation enhancement of persistent activation slow sodium current inactivation
4	β-scorpion toxins	shifting of voltage dependence
5	brevetoxins ciguatoxins	repetitive firing shifting of voltage dependence
6	δ-conotoxins (δ-TxVIA)	inhibition of activation
7	<i>DDT</i> and analogues <i>pyrethroids</i>	inhibition of activation shifting of voltage dependence
8	goniopora coral toxin conus stratus toxin	inhibition of activation
9	局所麻酔薬 (lidocaine, mexiletine など) 抗てんかん薬 (phenytoin など) <i>dihydropyrazoles</i>	inhibition of ion transport

<sup>a</sup> Insecticides are shown in italic type.

**Figure 3.** Na<sup>+</sup> チャネル site 2 に結合する代表的なトキシン.

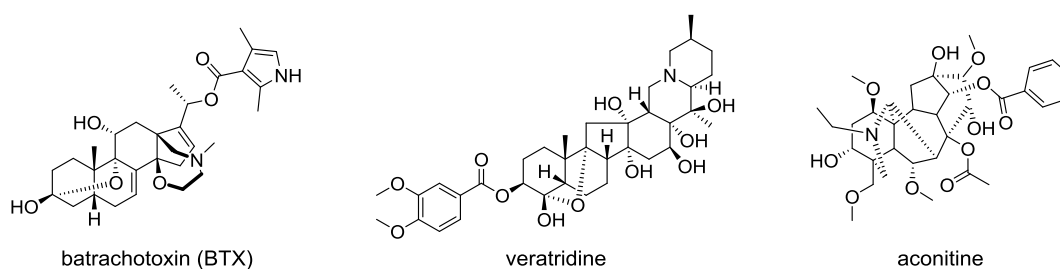
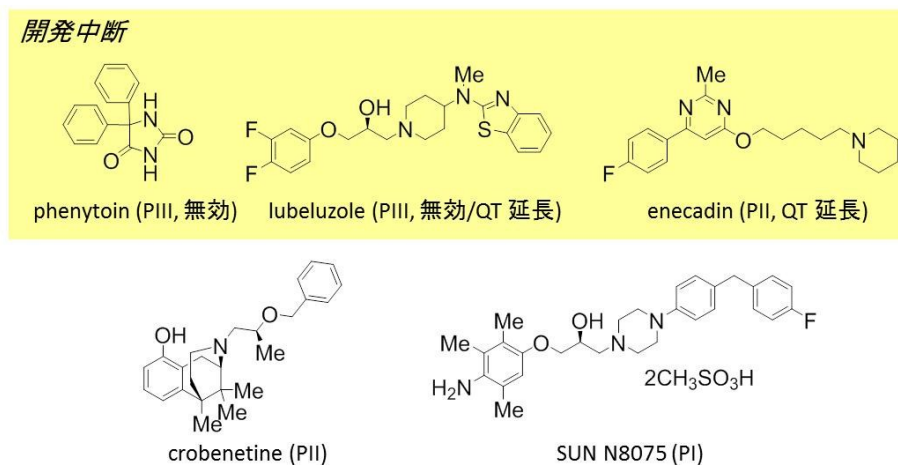


Figure 4. 既存の Na<sup>+</sup> チャンネル阻害薬が有する課題.



課題④ 既存の Na<sup>+</sup> チャンネル阻害薬が有する課題の克服



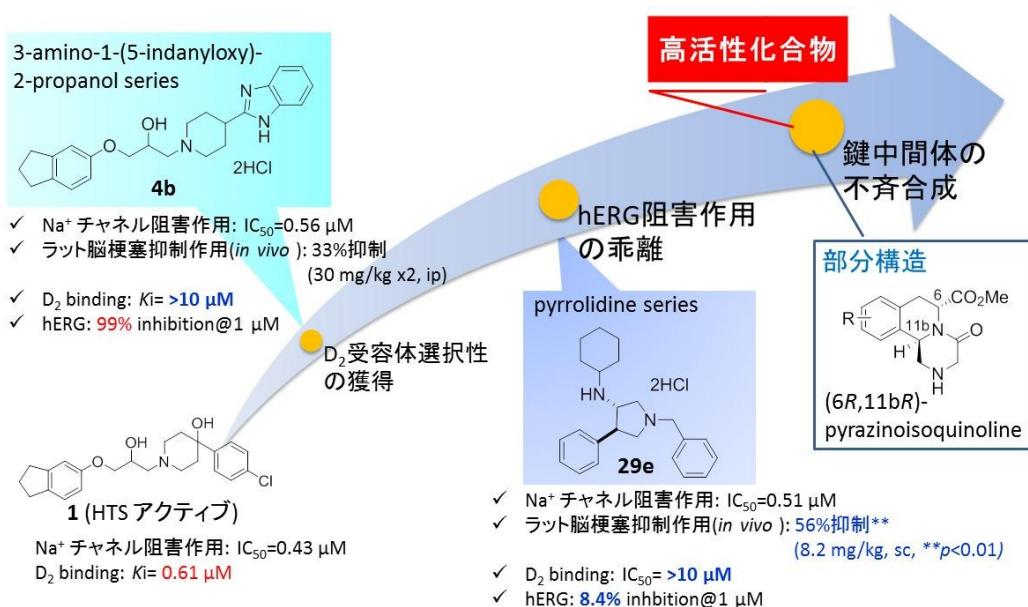
戦略④ 選択性の獲得

1. ドパミン D<sub>2</sub> 受容体に対する選択性 → 薬剤性パーキンソニズムの回避
2. hERG K<sup>+</sup> チャンネルに対する選択性 → 薬物性 QT 延長症候群の回避

### 第三節 本研究の方針と概要

筆者は  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬が、臨床で有効な脳梗塞急性期治療薬になり得ると考えて本研究を開始した。本研究では HTS (high-throughput screening) により得られた HTS アクティブ化合物 **1** から合成展開を開始し、3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール系統およびピロリジン系統という異なる2つのケモタイプを経て、動物モデルにおいて強力な薬効を示す化合物の取得に至った (Figure 5)。既存の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬が有していた課題を回避するために、臨床において問題となる作用との乖離を目指した合成研究を実施し、3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール系統からは化合物 **4b** の、ピロリジン系統からは化合物 **29e** の取得に至った。また本研究において見出された高活性化合物は、その部分構造としてピラジノイソキノリン骨格を有していた。本研究の過程において本骨格のジアステレオ選択的な構築法の開発が必要となったため、新規骨格構築法の検討についても実施した。

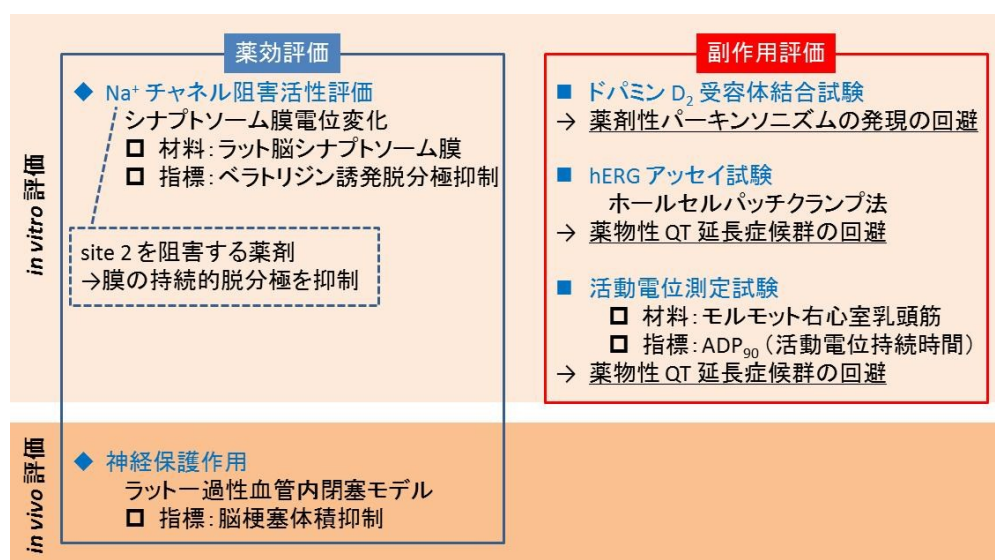
Figure 5. 本研究における化合物の変遷。



本研究では脳梗塞治療薬を指向した  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の創製を行うために、Figure 6 に示した評価フローを計画した。 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性 (*in vitro*) の評価には、ラット脳のシナプトソーム膜電位変化を指標とした機能的評価が選択された。また神経保護作用 (*in vivo*) の評価には、ラット一過性血管内閉塞モデ

ルにおける，脳梗塞体積の抑制作用を指標とした評価法が選択された．臨床での副作用の発現に関連すると考えられる受容体やチャネルに対する選択性については，(1) 薬剤性パーキンソニズムの発現が疑われるドパミン D<sub>2</sub> 受容体に対する選択性は，ドパミン D<sub>2</sub> 受容体結合試験における結合親和性を，(2) 薬物性 QT 延長症候群については，その要因である hERG (human ether-a-go-go-related gene) チャネルに対する阻害作用を指標とした評価法が選択された．既存の Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬に限らず，多くの薬剤が薬物性 QT 延長症候群を理由に市場から撤退を余儀なくされていること，また脳梗塞患者には心臓に既往歴を持つケースが想定されることから，筆者は特に心臓に対する安全性に留意した創薬研究を行うこととした．

Figure 6. 化合物の評価フロー．

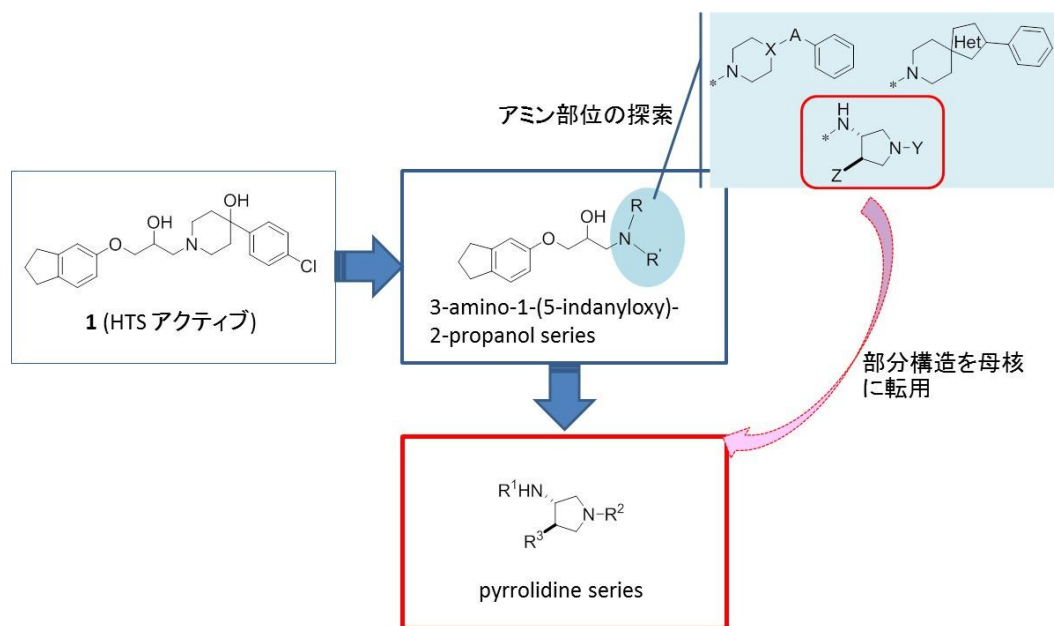


第一章および第二章では，ラット薬効モデルで有効性を示し，かつ Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性と副作用とが乖離した阻害剤を見出すことを目的として合成研究を実施した．第一章に 3-アミノ-1- (5-インダニルオキシ) -2-プロパノール系統化合物の合成研究を，第二章にピロリジン系統化合物の合成研究をまとめた (Figure 7)．また筆者は，研究の過程で得られた高活性化合物の部分構造である，ピラジノイソキノリン骨格の高ジアステレオ選択的な新規構築法の開発についても検討を行い，第三章にその結果をまとめた．

第一章に述べる 3-アミノ-1- (5-インダニルオキシ) -2-プロパノール系統化合物の合成研究では，Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性と，臨床における副作用として薬剤性パーキンソニズムの発現が疑われるドパミン D<sub>2</sub> 受容体に対する親和性との乖離を目指して，HTS により得られたアクティブ化合物から新規の Na<sup>+</sup> チャネル

阻害薬を設計し合成した。アクティブ化合物のアミン部位を変換した化合物の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性とドパミン  $\text{D}_2$  受容体親和性を評価した結果、ドパミン  $\text{D}_2$  受容体に対する親和性が低減し、かつラット薬効モデルにおいて対照化合物である SUN N8075 (Figure 4) と同等の有効性を示した化合物 **4b** の取得に成功した。

Figure 7. 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノールおよびピロリジン系統.



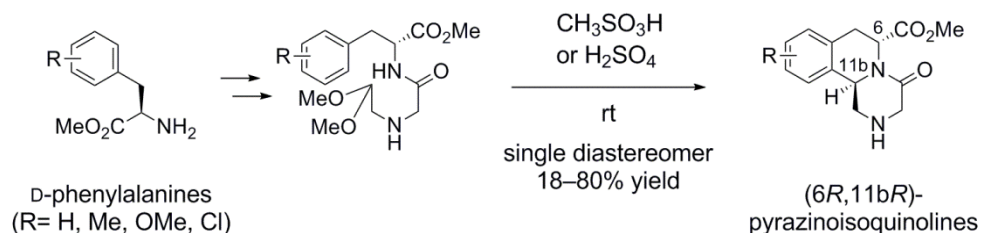
第二章に述べるピロリジン系統化合物の合成研究では、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性と、臨床において重篤な副作用となる薬物性 QT 延長症候群の要因である hERG  $\text{K}^+$  チャネルに対する阻害作用との乖離を目指して、新規ピロリジン誘導体の設計と合成を実施した。合成された化合物の構造活性相関より、ピロリジン誘導体の 3 位の置換基が hERG  $\text{K}^+$  チャネルとの相互作用に関与しており、3 位に導入されたシクロヘキシル基は、hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用の低下に大きく寄与することを見出した。さらに hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用との乖離に成功し、ラット薬効モデルにおいて高い脳梗塞抑制作用を示した化合物 **29e** について、心筋活動電位測定試験が行われた結果、化合物 **29e** の QT 延長作用のリスクは低いことが示された。

筆者は、第二章で見出された化合物 **29e** から、心毒性に対するリスクがより低減された  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の創製を目指して創薬研究を行った。その過程において、部分構造としてピラジノイソキノリン骨格を有する化合物が、高活性でかつ心臓に対して高い安全性を有する化合物として見出された。これまでにピラジノイソキノリン骨格の立体選択的な構築法は数例報告されているが、



簡便で汎用性の高い構築法の報告はなく、既存の合成法では本骨格の立体選択的な合成は不可能であった。第三章ではピラジノイソキノリン骨格の新規骨格構築法を検討し、高ジアステレオ選択的かつ汎用性の高い合成法の開発に成功したので、その結果について述べる (Figure 8)。

**Figure 8.** ピラジノイソキノリン骨格のジアステレオ選択的構築法.



本研究の開始時点で既に複数の Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬が臨床試験を実施していたが (Figure 4), いまだ臨床において有効な薬剤は見出されていない。第一章および第二章の結果より, Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬はラット動物モデルにおいて強い脳梗塞体積抑制作用を示すことが分かった。さらに本研究により, 従来臨床において問題となっていた, QT 延長作用に代表される心臓に対する毒性の回避は可能であることが示され, Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の急性期脳梗塞治療薬としての可能性が示された。また第三章では, ピラジノイソキノリン骨格の簡便で高ジアステレオ選択的な構築法を開発し, 本研究において見出された Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の部分構造の合成法としての用途のみならず, 多様な薬理活性が期待されているピラジノイソキノリン誘導体の合成にも応用可能であることを示した。

詳細について, 以下に論述する。

# 本論

## 第一章 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール系 Na<sup>+</sup> チャンネル阻害薬

### 第一節 研究方針

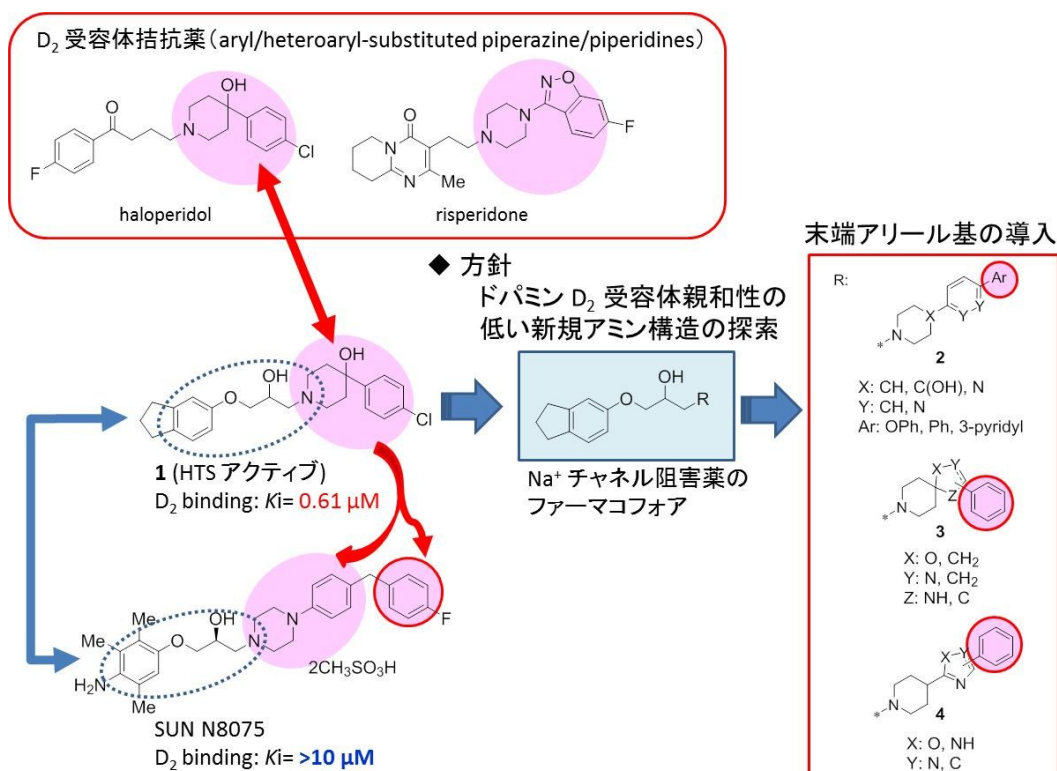
Na<sup>+</sup>チャンネル阻害薬の探索を目的とした HTS により, Na<sup>+</sup>チャンネルのsite 2 に結合するトキシンである BTX (Figure 3) に対して強い結合阻害作用を示す化合物 **1** が見出された.<sup>15)</sup> しかしながら, 化合物 **1** はドパミン D<sub>2</sub> 受容体に対しても, Na<sup>+</sup>チャンネル結合阻害作用と同程度の強い結合阻害作用を示す化合物であることが判明した. ドパミン D<sub>2</sub> 受容体拮抗作用を有する化合物は, 臨床において薬剤性パーキンソニズムを発現することが懸念される.<sup>16)</sup> 筆者は, Na<sup>+</sup>チャンネル阻害作用とドパミン D<sub>2</sub> 受容体結合親和性が乖離し, かつ強力な神経保護作用を有する化合物の取得を目的として本研究を開始した.

ハロペリドールやリスペリドン (Figure 9) の構造に代表される, 置換アリーールおよびヘテロアリーールピペリジンやピペラジン構造を有する化合物群は, 一般的にドパミン D<sub>2</sub> 受容体に対する拮抗作用を有する主要なケミカルクラスであると報告されている.<sup>17)</sup> 化合物 **1** はハロペリドールのアミン部位と同じ構造を有しており, 筆者はこのアミン部分構造が, ドパミン D<sub>2</sub> 受容体への親和性に寄与していると考えた. 一方で化合物 **1** は, その部分構造として 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール部位を有するが, これは研究開始当時臨床試験を実施していた SUN N8075 (Figure 4) と共通であった. SUN N8075 はアリーールピペラジン構造を有するにもかかわらず, そのドパミン D<sub>2</sub> 受容体に対する親和性は弱いことが報告されている.<sup>12d)</sup> 筆者は, ドパミン D<sub>2</sub> 受容体への親和性に寄与していると思われるアミン部位を変換することにより, ドパミン D<sub>2</sub> 受容体親和性の低下は可能であろうと考えた. そこで 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール部位を Na<sup>+</sup>チャンネル阻害薬のファーマコフォアとみなし, アミン部位の変換を計画した (Figure 9). すなわち新たなアミン構造として, 末端にアリーール基を導入したビアリーールピペリジンおよびピペラジン構造 (**2**) やスピロピペリジン構造 (**3**), ヘテロアリーールピペリジン構造 (**4**) を

設計し、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体拮抗作用を有する化合物に広く共通の置換フェニルピペリジンおよびピペラジン構造から、これらアミン構造への変換を計画した。

また *in vivo* 動物モデルにおいて神経保護作用を発現するには、化合物が良好な脳移行性を有することが必要である。上市されている中枢薬および非中枢薬の物性パラメータの解析から、分子量、極性表面積 (polar surface area)、脂溶性の 3 つのパラメータが脳移行性に関係しており、そのうち脂溶性に関して至適な log*D* (オクタノール/水系の分配係数, pH 7.4) は、1 から 4 の範囲であるという報告がなされている。<sup>18)</sup> そこで筆者は、pH 7.4 における Clog*D* 値 (Clog*P* 値 (Daylight version 4.9) と p*K*<sub>a</sub> (ChemAxon's Calculator Plugins version 5.0.0) から算出された計算値) を脳移行性の指標として、化合物設計を行うこととした。

**Figure 9.** 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール系統の合成展開戦略。

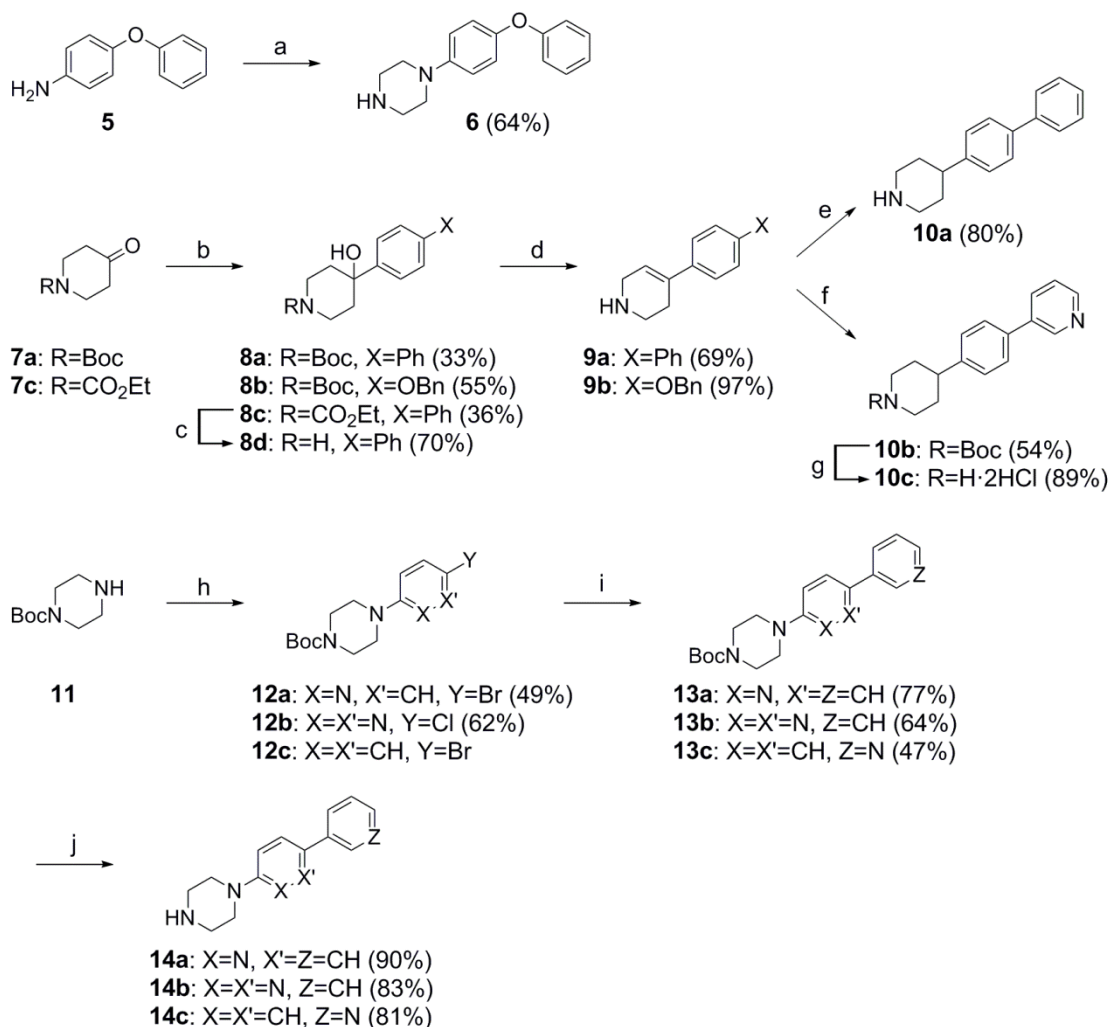


## 第二節 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体

### の合成

筆者は、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体親和性の低下を図る目的で、受容体親和性に寄与していると想定されたアミン部位の変換を行った。各アミン部位は Scheme 1-3 に示す方法にて合成された。まずビアリアルピペリジン体 **8c**, **10a**, **10c**, フェノキシフェニルピペラジン体 **6**, およびビアリアルピペラジン体 **14a-c** について合成を行った (Scheme 1)。

市販されている 4-フェノキシアニリン (**5**) とビス-2-クロロエチルアミン塩酸塩とを 200°C にて加熱し、化合物 **6** が得られた。4-ヒドロキシピペリジン誘導体 **8a, b** は、市販の 4-オキソピペリジン **7a** からグリニャール反応により合成された。<sup>19)</sup> 4-ヒドロキシピペリジン誘導体 **8c** も、4-オキソピペリジン **7c** から同様にして合成された。4-ヒドロキシピペリジン誘導体 **8a, b** は、トリフルオロ酢酸 (TFA) による脱水反応と *tert*-ブチルカルバメート (Boc) 基の脱保護が同時に進行し、化合物 **9a, b** がそれぞれ得られた。化合物 **9a** の二重結合を水素添加反応により還元し、ビフェニルピペリジン誘導体 **10a** が得られた。化合物 **10b** は化合物 **9b** から以下 4 工程で合成された。すなわち、(1) 化合物 **9b** のピペリジニル基を Boc 基で保護し、(2) 水素下接触水素還元により二重結合の還元とベンジルエーテルの開裂を行い、(3) フェノキシ基をトリフルオロメタンスルホン酸エステルへと変換後、(4) テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (0) 触媒下で、ピリジン-3-ボロン酸と鈴木-宮浦カップリング<sup>20)</sup> を行うことにより化合物 **10b** が合成された。その後、化合物 **10b** の Boc 基を塩酸-メタノールにて脱保護し、ビアリアルピペリジン誘導体 **10c** が得られた。4-ヒドロキシピペリジン誘導体 **8d** は、化合物 **8c** のエチルカルバメート基を塩基性条件下で脱保護することにより得られた。ピペラジン誘導体 **12a, b** は 2,5-ジブromoピリジン、および 3,6-ジクロロピリダジンに対する 1-Boc-ピペラジン **11** の求核置換反応により合成された。得られた化合物 **12a, b** および市販の化合物 **12c** は、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (0) 触媒下でフェニルボロン酸、もしくはピリジン-3-ボロン酸と鈴木-宮浦カップリングを行うことにより、化合物 **13a-c** に誘導された。TFA にて化合物 **13a-c** の Boc 基の脱保護を行うことにより、ビアリアルピペラジン体 **14a-c** が合成された。



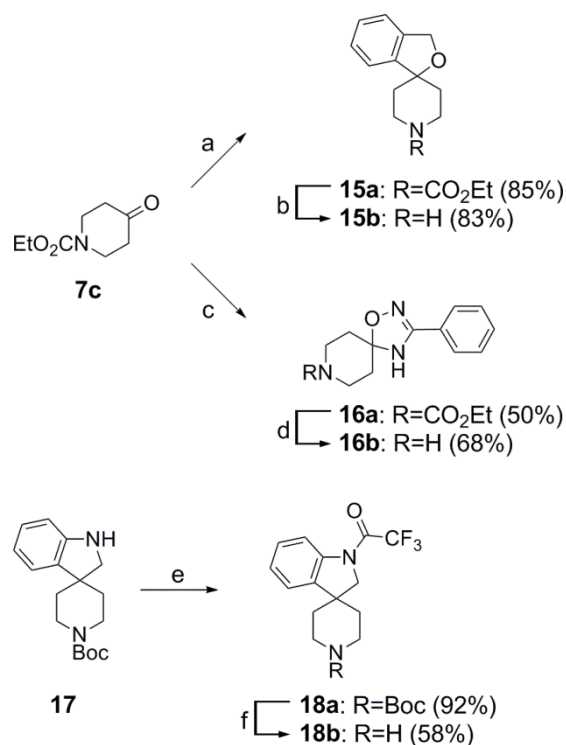
**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) bis(2-chloroethyl)amine hydrochloride, 200°C; (b) 4-biphenyl magnesium bromide (for **8a** and **8c**) or 4-(benzyloxy)bromobenzene, Mg (for **8b**), THF, 0°C; (c) 5 N aqueous NaOH, EtOH, reflux; (d) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C to rt; (e) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH/H<sub>2</sub>O, 60°C; (f) (i) (Boc)<sub>2</sub>O, THF, reflux, (ii) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH/THF, 50°C, (iii) trifluoromethanesulfonic anhydride, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C to rt, (iv) pyridine-3-boronic acid, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (cat.), 2 N aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, toluene/EtOH, 100°C; (g) 2 N HCl/MeOH, EtOAc, rt; (h) 2,5-dibromopyridine (for **12a**) or 3,6-dichloropyridazine (for **12b**), *N,N*-diisopropylethylamine, *N*-methylpyrrolidone, 120°C; (i) phenylboronic acid (for **13a** and **13b**) or pyridine-3-boronic acid (for **13c**), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (cat.), 2 N aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxane, 100°C; (j) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C to rt.

良好な脳移行性を確保することを目的に、次に至適な ClogD 値を有する化合物の設計を行った。アミン部位としてスピロピペリジン (**15b**, **16b**, and **18b**), およびヘテロアリアルピペリジン (**20b**, and **22b**) を設計した。まずスピロピペリ

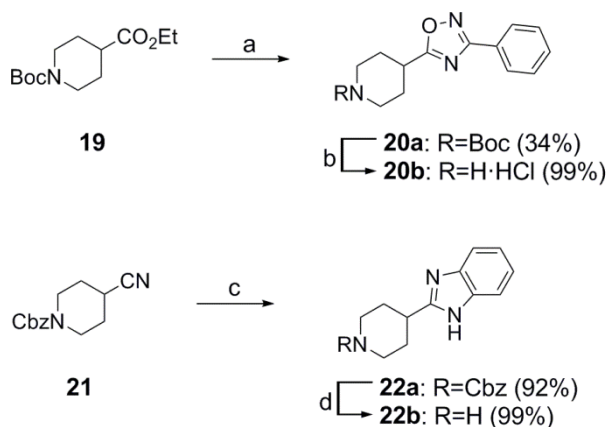
ジン誘導体 **15b**, **16b**, **18b** の合成を行った (Scheme 2). 化合物 **15b** は 4-オキソピペリジン **7c** から Kubota らの方法<sup>21)</sup> に従って合成された. 化合物 **16b** は *p*-トルエンスルホン酸 (TsOH) 存在下, 4-オキソピペリジン **7c** とベンズアミドオキシムとの縮合反応により化合物 **16a** へ誘導された後, エチルカルバメート基を水酸化バリウムにて脱保護<sup>22)</sup> することにより得られた. 化合物 **18b** は, 市販の化合物 **17** にトリフルオロアセチル基を導入して化合物 **18a** を得た後, 化合物 **18a** の Boc 基を塩酸-酢酸エチルにて脱保護することにより合成された.

次にヘテロアリアルピペリジン誘導体 **20b**, **22b** の合成を行った (Scheme 3). 化合物 **19** とベンズアミドオキシムの塩基性条件下における環化反応<sup>23)</sup> により化合物 **20a** が得られた後, 化合物 **20a** の Boc 基を塩酸-酢酸エチルにて脱保護することにより, オキサジアゾール誘導体 **20b** が合成された. ベンズイミダゾール誘導体 **22a** は, 化合物 **21** を塩化アセチルにてイミドエステルに変換した後, *o*-フェニレンジアミンと縮合させることにより得られた.<sup>24)</sup> その後, 化合物 **22a** のベンジルカルバメート (Cbz) 基を水素下接触水素還元にて脱保護することにより, ベンズイミダゾール誘導体 **22b** が得られた.

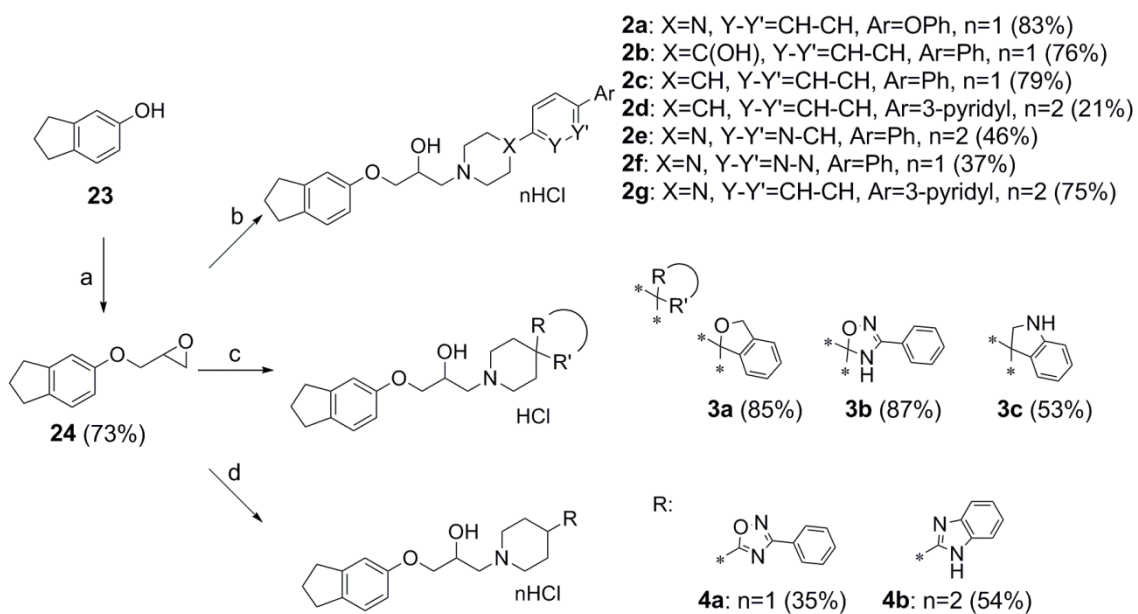
得られたアミン体 (**6**, **8d**, **10a**, **10c**, **14a-c**, **15b**, **16b**, **18b**, **20b**, and **22b**) を用いて, 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体 **2a-g**, **3a-c**, **4a**, **b** が合成された (Scheme 4). 各誘導体の共通原料となるエポキシ体 **24** は, 市販の 5-インダノール (**23**) とエピクロロヒドリンとの反応により得られた. エポキシ体 **24** と各アミン体 (**6**, **8d**, **10a**, **10c**, **14a-c**, **15b**, **16b**, **18b**, **20b**, and **22b**) を 2-プロパノール溶媒中加熱還流した後, 塩酸-酢酸エチルにて塩酸塩とし, 目的物である **2a-g**, **3a-c**, **4a**, **b** が得られた.



**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a) (i) 2-bromobenzyl alcohol, *n*-BuLi (2.1 eq), THF,  $-78^{\circ}\text{C}$ , (ii) TsCl, pyridine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt; (b) 5 N aqueous NaOH, EtOH, reflux; (c) benzamidoxime, *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, toluene, reflux; (d) Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, EtOH/H<sub>2</sub>O, reflux; (e) trifluoroacetic anhydride, Et<sub>3</sub>N,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^{\circ}\text{C}$ ; (f) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc, rt.



**Scheme 3.** Reagents and conditions: (a) benzamidoxime, NaOEt, THF/EtOH,  $70^{\circ}\text{C}$ ; (b) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc, rt; (c) (i) EtOH, acetyl chloride,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^{\circ}\text{C}$  to rt, (ii) *o*-phenylenediamine, EtOH, reflux; (d) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, rt.



**Scheme 4.** Reagents and conditions: (a) (i) NaH, DMF, 0°C to rt, (ii) epichlorohydrin, 0°C to rt; (b) (i) **6** (for **2a**), **8d** (for **2b**), **10a** (for **2c**), **10c** (for **2d**), **14a** (for **2e**), **14b** (for **2f**), or **14c** (for **2g**), 2-propanol, reflux, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc, rt; (c) (i) **15b** (for **3a**), **16b** (for **3b**), or **18b** (for **3c**), 2-propanol, reflux, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc, rt; (d) (i) **20b** (for **4a**) or **22b** (for **4b**), 2-propanol, reflux, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc, rt.



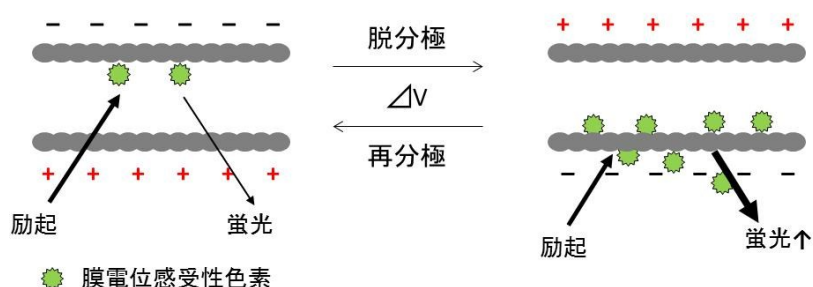
### 第三節 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体の

#### の生理活性および薬理活性

合成された 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体について、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性およびドパミン  $\text{D}_2$  受容体結合親和性を評価した結果を Table 4, 5 にまとめた。

$\text{Na}^+$  チャネル阻害活性の評価は、機能的評価法であるラット脳シナプトソーム膜を用いた蛍光膜電位測定法により行われた。Rhodamine 6G はカチオン性の膜透過性蛍光色素であり、膜電位の変化に応じて細胞内外に移動する (Figure 10)。Aiuchi ら<sup>25)</sup>の方法に従い、ラット脳より調製したシナプトソームの膜電位を測定した結果、site 2 に結合するトキシンであるベラトリジン (Figure 3) の濃度を増加させるに従って蛍光強度比は増加し、シナプトソーム膜電位の脱分極が観測された。 $\text{Na}^+$  チャネルの site 2 を阻害する化合物を加えると、 $\text{Na}^+$  チャネルの阻害に伴い膜電位が再分極し、蛍光強度比が減少する。すなわち、ベラトリジンで脱分極を誘発したシナプトソーム膜電位の蛍光強度比の変化を測定することにより、化合物の  $\text{Na}^+$  チャネル site 2 阻害活性の評価が可能である。またドパミン  $\text{D}_2$  受容体結合親和性は、ラット脳線条体の膜画分を用い、 $[^3\text{H}]$ -spiperone を放射性リガンドとする結合試験により評価された。

Figure 10. 膜電位感受性蛍光色素法.



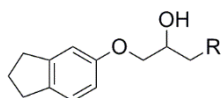
ビアリアルピペリジンおよびビアリアルピペラジン誘導体 **2a-g** は、HTS アクティブ化合物 **1** と同程度の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性を示した (Table 4)。一方化合物 **2a-g** は、既知のドパミン  $\text{D}_2$  受容体拮抗薬と同様の部分構造であるアリアルピペリジンやアリアルピペラジン構造を有するが、そのドパミン  $\text{D}_2$  受容体結合親和性は非常に弱いことが分かった ( $K_i > 10 \mu\text{M}$ )。筆者はこの結果から、アリアルピペリジンおよびアリアルピペラジンの末端に導入した芳香環が、ド

パミン D<sub>2</sub> 受容体に対する結合を妨げているのではないかと考察した。

ビアリールピペリジンおよびビアリールピペラジン誘導体 **2a-g** は, Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性とドパミン D<sub>2</sub> 受容体結合親和性が乖離していた. しかしながらそれらの ClogD 値は 4 以上と高い脂溶性を有することが示唆され, 脳移行性が低いことが懸念された. そこで良好な脳移行性を示す化合物の取得を目的として, ClogD 値が 4 以下となるよう設計し合成されたスピロピペリジン誘導体 **3a-c**, およびヘテロアリールピペリジン誘導体 **4a, b** の評価が行われた. その結果, 化合物 **3b, 4a, 4b** は高い Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性を保持し, かつドパミン D<sub>2</sub> 受容体結合親和性が非常に弱いことが分かった (Table 5). 一方 1,3-イソベンゾフラン構造を有する化合物 **3a** は, 高い Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性を有するものの, ドパミン D<sub>2</sub> 受容体に対しても中程度の結合親和性を示した. またインドリン構造を有する化合物 **3c** は, ドパミン D<sub>2</sub> 受容体結合親和性は低下したが, Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性も減弱した.

ClogD 値が 4 以下となるよう設計した化合物 **3b, 4a, 4b** は, それぞれ同程度の Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性を有していた. これら 3 化合物のラット肝ミクロソームにおける代謝安定性を検討した結果, 化合物 **4b** が最も高い代謝安定性を示すことが分かった (Table 5). そこで化合物 **4b** の, Na<sup>+</sup> チャネルの site 2 に対する結合試験を実施した. その結果, 化合物 **4b** の結合阻害濃度は IC<sub>50</sub>=0.30 μM と, SUN N8075 の結合阻害濃度 (IC<sub>50</sub>=0.75 μM) より強く, 化合物 **4b** は site 2 を遮断する Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬であることが示唆された.

そこで次に, 化合物 **4b** の動物モデル (*in vivo*) における神経保護作用の評価が行われた. *In vivo* 評価は, 血管内閉塞モデルであるラット一過性中大脳動脈 (middle cerebral artery, MCA) 閉塞モデル<sup>26)</sup> を用いて, 脳梗塞体積抑制作用を指標に評価が行われた. 化合物 **4b** を MCA 閉塞直後と再開通直後にそれぞれ 30 mg/kg 腹腔内投与し, MCA 閉塞から約 24 時間後に摘出した脳を 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) で染色することにより, 梗塞巣面積および体積が算出された (Figure 11).<sup>27)</sup> また対照薬として, SUN N8075 (Figure 4) の脳梗塞抑制作用についても同様に評価が行われた. その結果, 化合物 **4b** はコントロール群に対して 33% の梗塞体積の減少を示した [201.1 ± 50.2 mm<sup>3</sup> (n = 4) vs. 302.3 ± 26.5 mm<sup>3</sup> (n = 6) (mean ± SEM)]. 一方, 対照薬の SUN N8075 の梗塞体積減少作用はコントロール群に対して 35% であり [166.2 ± 38.1 mm<sup>3</sup> (n = 8) vs. 255.8 ± 31.0 mm<sup>3</sup> (n = 8) (mean ± SEM)], 化合物 **4b** のラット動物モデルにおける脳梗塞抑制作用は対照薬と同等であることが示された.

**Table 4.** Biological activity of biaryl piperidine and biaryl piperazine derivatives (**2a–g**)

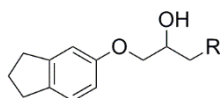
Compd. <sup>a</sup>	R	Na <sup>+</sup> チャネル阻害活性 <sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (μM)	D <sub>2</sub> 受容体結合親和性 <sup>c</sup> K <sub>i</sub> (μM)	ClogD <sup>d</sup>
<b>1</b>		0.43	0.61	3.21
<b>2a</b>		0.74	>10	6.08
<b>2b</b>		0.22	>10	4.34
<b>2c</b>		0.24	>10	5.48
<b>2d</b>		0.29	>10	3.99
<b>2e</b>		0.85	>10	5.04
<b>2f</b>		0.64	>10	4.35
<b>2g</b>		0.75	>10	4.46

<sup>a</sup> Each assay was carried out using the hydrochloride or dihydrochloride salt of the synthesized compounds.

<sup>b</sup> Inhibitory effect on veratridine-induced depolarization in rat cerebrocortical synaptosomes. See Experimental.

<sup>c</sup> Determined by a competition assay using [<sup>3</sup>H]-spiperone.

<sup>d</sup> ClogD values at pH 7.4 were calculated from ClogP using Daylight version 4.9 and pKa using ChemAxon's Calculator Plugins version 5.0.0.

**Table 5.** Biological activity of spiro-piperidines **3a–c** and heteroarylpiperidines **4a,b**

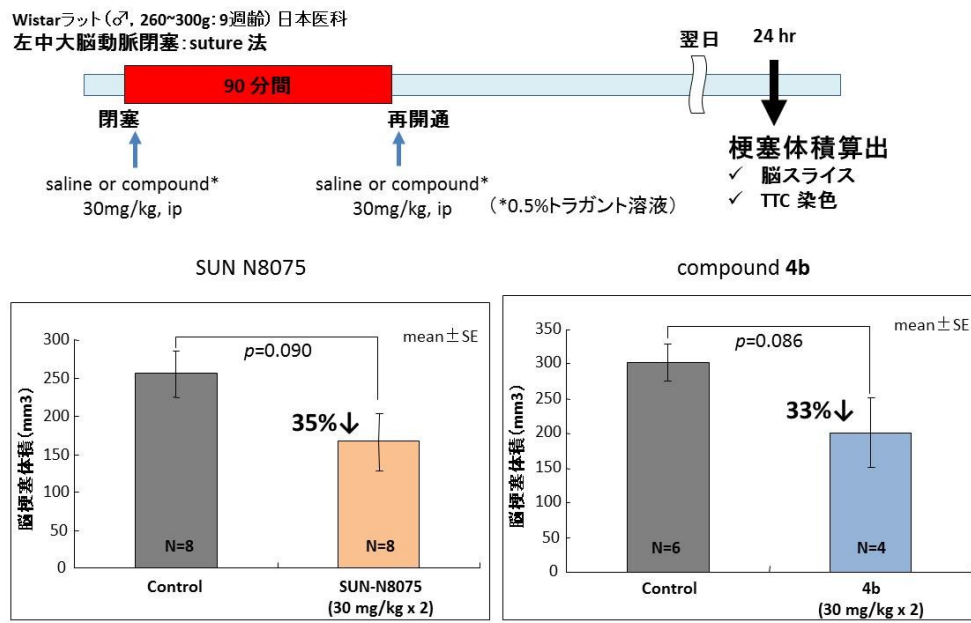
Compd. <sup>a</sup>	R	Na <sup>+</sup> チャネル阻害 活性 <sup>b</sup> , IC <sub>50</sub> (μM)	D <sub>2</sub> 受容体結合親和 性 <sup>c</sup> , Ki (μM)	ClogD <sup>d</sup>	CL (male rats) <sup>e</sup>
<b>3a</b>		0.44	2.68	2.62	
<b>3b</b>		0.46	>10	2.26	0.32
<b>3c</b>		1.20	>10	2.63	
<b>4a</b>		0.37	>10	3.39	0.15
<b>4b</b>		0.56	>10	2.83	0.10
SUN N8075 <sup>12d)</sup>		0.42	>10	5.37	

<sup>a, b, c, d</sup> See footnotes in Table 4.

<sup>e</sup> Microsomal intrinsic clearance (ml/min/mg protein).

以上の結果から、Na<sup>+</sup> チャネルの site 2 を阻害する化合物はラット脳梗塞モデルにおいて脳梗塞体積を抑制することが示され、Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の急性期脳梗塞治療薬としての可能性が示唆された。またドパミン D<sub>2</sub> 受容体拮抗作用を有する主要なケミカルクラスの一つである、アリアルピペリジンやアリアルピペラジン構造を有する化合物から、アミン部位を構造変換することで、Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性とドパミン D<sub>2</sub> 受容体親和性との乖離は可能であることが示された。

Figure 11. ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルにおける脳梗塞抑制作用の評価.<sup>28)</sup>

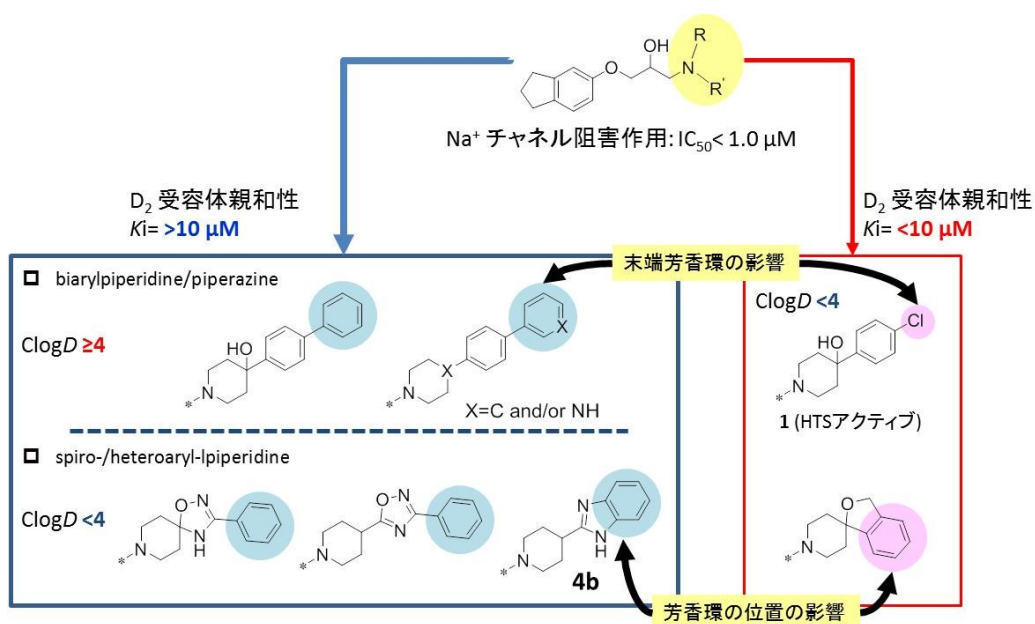


## 第四節 本章のまとめ

筆者は  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の創製を目指して、3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体の設計と合成を行った。臨床において薬剤性パーキンソニズムの発現が懸念されるドパミン  $\text{D}_2$  受容体結合親和性の低下を目的として、HTS により得られたアクティブ化合物 **1** のアミン部位の変換を実施し、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性とドパミン  $\text{D}_2$  受容体結合親和性が乖離した化合物を複数取得した。それらの構造活性相関から、ビアリールピペリジンおよびビアリールピペラジンの末端の芳香環が、ドパミン  $\text{D}_2$  受容体に対する結合を妨げている可能性が示唆された (Figure 12)。また本研究では、 $\text{ClogD}$  値を脳移行性の指標に用いて化合物設計を行った。 $\text{ClogD}$  値が低下し、ラット肝ミクロソームにおける代謝安定性が良好であった化合物 **4b** は、site 2 に対して対照薬である SUN N8075 より強い結合阻害作用を有していた。また脳梗塞モデルであるラット一過性 MCA 閉塞モデルにおいて、化合物 **4b** は SUN N8075 と同等の脳梗塞抑制作用を有することが示された。

以上の検討結果より、化合物 **4b** は虚血によって引き起こされた脱分極の持続状態を特異的に抑制する  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬である可能性が示唆された。化合物 **4b** はヒット化合物として有用な化合物であると考えられ、脳梗塞急性期治療薬の創製に向けて、化合物 **4b** からさらなる合成展開を行うこととした。

Figure 12. 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール系統の構造活性相関.

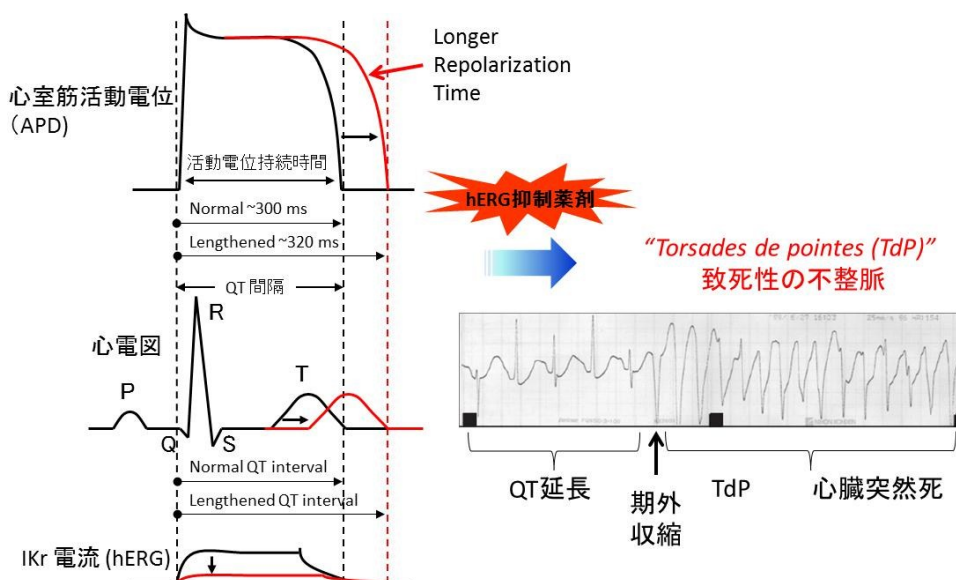


## 第二章 ピロリジン系 Na<sup>+</sup> チャンネル阻害薬

### 第一節 研究方針

既存の Na<sup>+</sup> チャンネル阻害薬が臨床試験を中断した原因の一つに、QT 延長作用に代表される心臓に対する安全性の問題が挙げられる。<sup>13b,29)</sup> 薬物性 QT 延長症候群は時に Torsades de pointes (TdP) といわれる致死性心室不整脈を誘発することがあり、K<sup>+</sup> チャンネル遮断作用を併せ持つ抗不整脈薬以外の薬剤が、この薬物性 QT 延長症候群が原因で市場から数多く撤退している (Figure 13).<sup>30)</sup> QT 間隔延長 (心室再分極遅延) は、心筋にある HERG 遺伝子でコードされる K<sup>+</sup> チャンネル (hERG K<sup>+</sup>) の遮断により引き起こされ、<sup>31)</sup> 薬物性 QT 延長症候群により市場から撤退した薬剤の大部分が hERG K<sup>+</sup> チャンネルを阻害して QT 延長作用を示すことが知られている (Figure 14a) .

Figure 13. 薬物性 QT 延長症候群. 活動電位の延長と TdP.

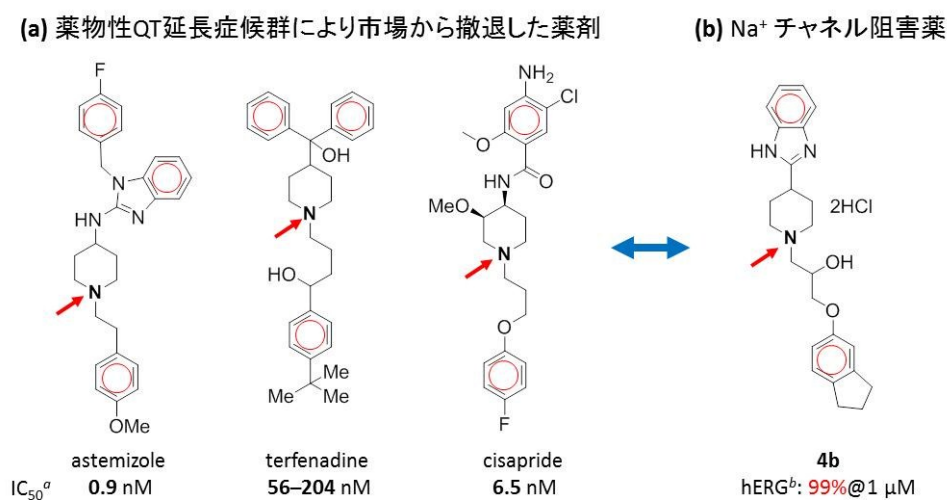


実際、本研究開始当時臨床試験を実施していた enecadin,<sup>12b)</sup> crobenetine,<sup>12c)</sup> SUN N8075<sup>12d)</sup> (Figure 4) は、*in vitro* hERGアッセイ試験 (ホールセルパッチクランプ法) の結果、1  $\mu$ M でそれぞれ 60%, 69%, 78% の高い hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害率を示した。同様に、我々が新たに見出した 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体 **4b** も、1  $\mu$ M で 99% と非常に高い阻害を示すことが分かり、QT 延長を示す可能性が示唆された。脳梗塞患者は心臓に既往歴を持つケースが想定されることから、脳梗塞治療薬は特に心臓に対する高い安

全性が求められる。そこで筆者は、強い神経保護作用を示し、かつ QT 延長リスクが低い Na<sup>+</sup> チャンネル阻害薬の創製を目的として研究を開始した。

Figure 14a に示すように、薬物性 QT 延長症候群により市場から撤退した薬剤の大部分は、塩基性アミンもしくは正電荷を持つアミンと、芳香環などの脂溶性置換基がリンカーを介した構造を有している。第一章で見出された化合物 **4b** もこれらと同様の構造を有しており、強い hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性を示す (Figure 14b)。薬物-hERG K<sup>+</sup> チャンネル相互作用におけるファーマコフォアや構造活性相関については、QT 延長作用を示す薬剤の構造を基にした計算化学による研究が多くなされている。<sup>32)</sup> それらの報告から、hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害作用を減弱させる合成展開の戦略として (1) 塩基性アミンの pK<sub>a</sub> 低下、(2) 脂溶性低下、(3) hERG K<sup>+</sup> チャンネル結合部位における部分構造を減らす、(3) 酸性官能基の導入、(4) リンカーのフレキシビリティの低下等が考えられる。筆者は上述の戦略を基に、化合物 **4b** のアミン部位の構造変換を行い、hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性の低下を試みたが、Na<sup>+</sup> チャンネル阻害活性と hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性とが乖離した化合物の取得には至らなかった。しかしながら、アミン部位の変換の過程で見いだされたピロリジンアナログ **25** も、Na<sup>+</sup> チャンネル阻害活性を有することが分かった。ピロリジンアナログ **25** は分子量が小さく、かつ構造展開可能な 3 つの部位を有するため、合成展開するにあたって有用な骨格であるといえる。本研究では Na<sup>+</sup> チャンネル阻害活性と hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性との乖離を目的として、ピロリジンアナログ **25** の各置換基 (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> および R<sup>3</sup>) の変換、ならびに立体異性体の合成を計画した (Figure 15)。

Figure 14. QT 延長により撤退した薬剤 (a) と化合物 **4b** (b) の構造類似性。

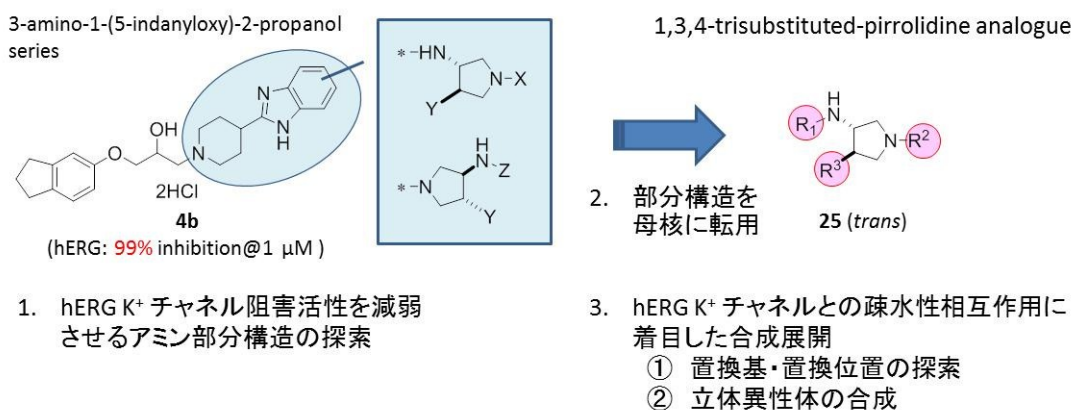


<sup>a</sup> hERG K<sup>+</sup> channel blocking activity in human embryonic kidney (HEK) cells.<sup>32d)</sup>

<sup>b</sup> Inhibition rate determined by a voltage patch clamp technique using HEK293 cells expressing hERG channels.

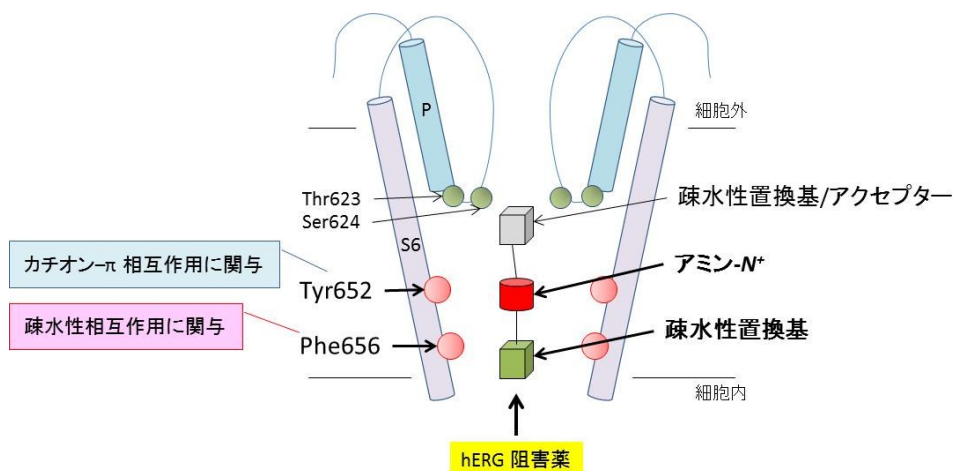


**Figure 15.** ピロリジンアナログ **25** の発見と hERG 阻害減弱のための合成展開方針.



筆者は hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性の低下に向けて、hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害の発現において重要と報告されているアミノ酸残基のうち (Figure 16), 疎水性相互作用に関わるとされている Phe656 に着目した合成展開戦略を立案した。<sup>32a-c)</sup> すなわち、Phe656 と化合物との疎水性相互作用を回避し得るような置換基の導入および最適な置換位置の探索を行うこととした。

**Figure 16.** hERG K<sup>+</sup> チャンネルのイオン孔部位のモデル図.



合成化合物の QT 延長作用の予測のために、2 段階の *in vitro* 試験が導入された (Figure 6). すなわち、まず hERG アッセイ試験を実施し、次にモルモットの右心室乳頭筋を用いた活動電位測定試験を実施する評価フローである。これら 2 つの試験により化合物の QT 延長作用に対するポテンシャルを評価し、心臓に対して高い安全性を有する Na<sup>+</sup> チャンネル阻害薬の創製を行うこととした。

## 第二節 ピロリジン誘導体の合成

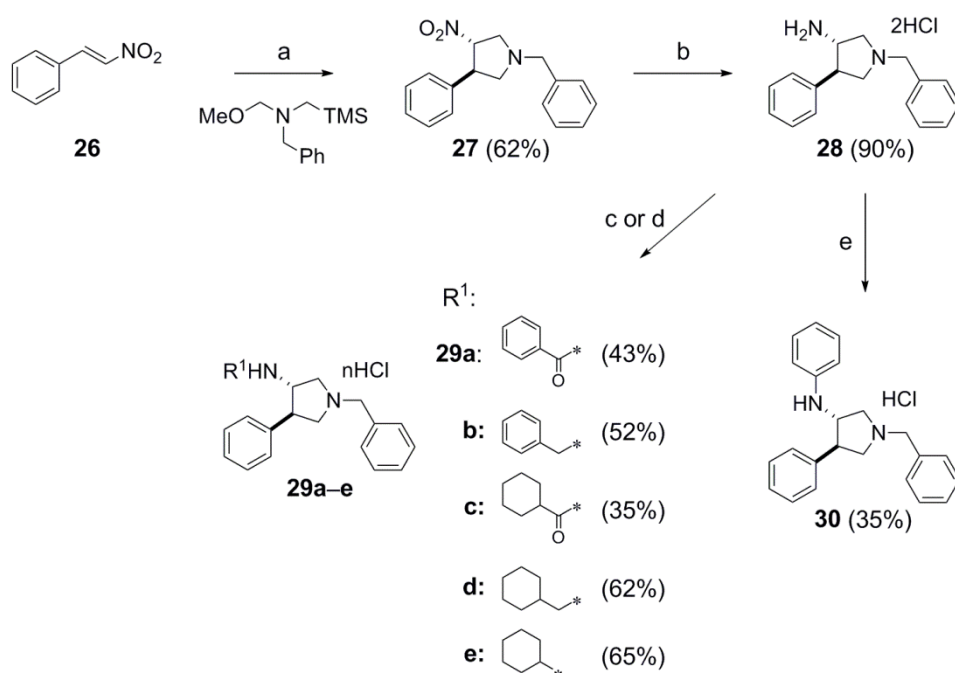
### 2-2-1. トランス-ピロリジン誘導体の置換基変換体の合成

筆者は hERG K<sup>+</sup> チャネルとの疎水性相互作用に着目した合成展開を実施するために、ピロリジンアナログ **25** に導入する置換基として、フェニル基およびシクロヘキシル基を有する置換基を選択した。最初に 1-ベンジル-4-フェニルピロリジン誘導体の 3 位に、フェニル基およびシクロヘキシル基を有する種々の置換基を導入した化合物を合成した (Scheme 5)。なお Scheme 5-8 で合成された化合物はすべてラセミ体である。

TFA 触媒下、市販のトランス-1-ニトロ-2-フェニルエチレン (**26**) と、*N*-メトキシメチル-*N*-[(トリメチルシリル)メチル]ベンジルアミンから *in situ* で生成されたアゾメチンイリドとの立体特異的な [3+2]-環化付加反応<sup>33)</sup>により、トランス-3-ニトロピロリジン体 **27** が中程度の収率で得られた。化合物 **27** のニトロ基を酢酸存在下、鉄を用いてアミノ基に還元することにより、トランス-3-アミノピロリジン体 **28** が合成された。塩化ベンゾイルもしくは塩化シクロヘキサンカルボニルを用いて化合物 **28** の *N*-アシル化を行い、アミド体 **29a**, **29c** がそれぞれ得られた。化合物 **29a** および **29c** のアミド基をボラン・THF 錯体によりアミノ基へと還元し、アミン体 **29b**, **29d** がそれぞれ得られた。またシクロヘキサノンを用いた還元的アルキル化により、化合物 **28** から化合物 **29e** が得られた。化合物 **28** とヨウ化ベンゼンの銅 (I) 触媒下のカップリング反応により、化合物 **30** が合成された。

ピロリジン 3 位に導入されたシクロヘキシル基が、hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性の低下に有効であることが判明した。そこで次に、シクロヘキシル基の最適な置換基位置を検証することを目的として、ピロリジンアナログ **25** の 1 位 (R<sup>2</sup>) および 4 位 (R<sup>3</sup>) にシクロヘキシル基を導入した誘導体を合成した。まず 1-ベンジル-4-シクロヘキシルピロリジン誘導体の 3 位に、フェニル基およびシクロヘキシル基を有する種々の置換基を導入した化合物 **35a-d** を合成した (Scheme 6)。市販のシクロヘキサンカルボキシアルデヒドから Horner-Emmons 反応により合成された (2*E*)-3-シクロヘキシルアクリル酸エチルエステル (**31**) と、*N*-メトキシメチル-*N*-[(トリメチルシリル)メチル]ベンジルアミンとの [3+2]-環化付加反応により、トランス-4-シクロヘキシルピロリジン体 **32** が得られた。化合物 **32** のエチルエステル基を加水分解してカルボキシル基へと変換した後、ジフェニルリン酸アジド (DPPA) を用いた Curtius 転移

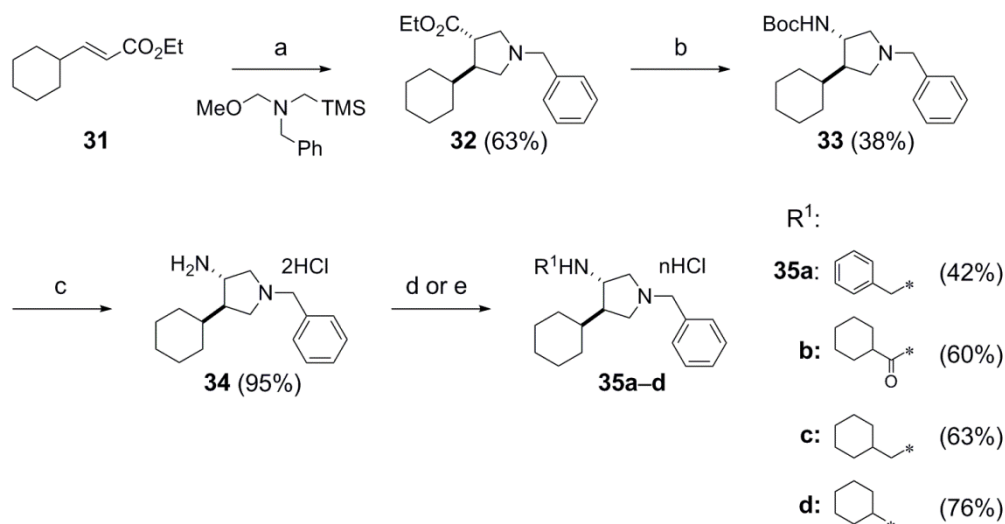
反応により、*N*-Boc 体 **33** が合成された。化合物 **33** の Boc 基を塩酸-ジオキサンにて脱保護し、4-シクロヘキシルピロリジン誘導体の共通中間体となる化合物 **34** が得られた。塩化ベンゾイルを用いて化合物 **34** の *N*-アシル化を行った後、アミド基をボラン・THF 錯体にて還元することにより、ベンジルアミン体 **35a** が得られた。同様にして塩化シクロヘキサニルカルボニルを用いて化合物 **34** の *N*-アシル化を行い、シクロヘキシルアミド体 **35b** に変換された後、化合物 **35b** のアミド基をボラン・THF 錯体にて還元し、シクロヘキシルアミン体 **35c** が得られた。またシクロヘキサノンを用いた還元的アルキル化により、化合物 **34** から化合物 **35d** が合成された。



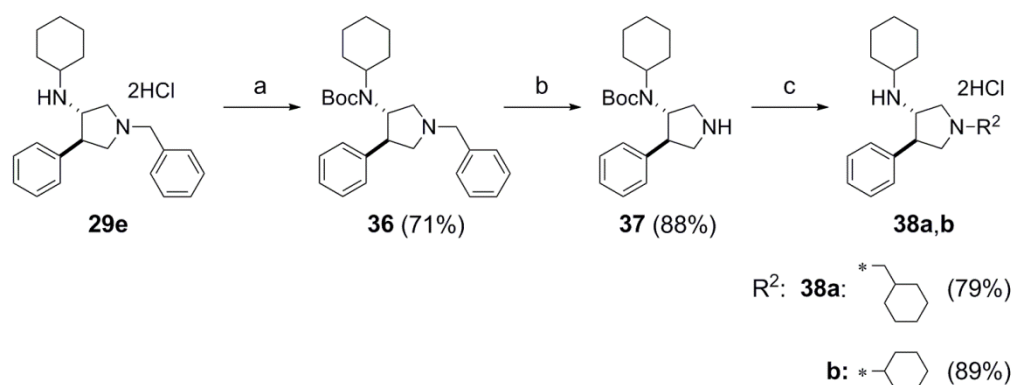
**Scheme 5.** Reagents and conditions: (a) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (b) (i) Fe, acetic acid, 2-PrOH/H<sub>2</sub>O, 80°C, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc; (c) (i) benzoyl chloride (for **29a**) or cyclohexanecarbonyl chloride (for **29c**), Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (ii) BH<sub>3</sub>·THF, THF, reflux, (for **29b** and **29d**) (iii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc; (d) (i) cyclohexanone, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, acetic acid, Et<sub>3</sub>N, acetonitrile (for **29e**), (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc; (e) (i) iodobenzene, CuI, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ethylene glycol, 80°C, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc.

シクロヘキシル基の置換基効果を検証するために、次にピロリジン環 1 位にシクロヘキシル基が導入された誘導体 **38a, b** の合成を行った (Scheme 7) . Scheme 5 で合成された化合物 **29e** の 2 級アミンを Boc 基で保護し、化合物 **36** が得られた。化合物 **36** は水素化接触水素還元による脱ベンジル化により、化合物 **37** に変換された。シクロヘキサニルカルボキシアリドもしくはシク

ロヘキサノンを用いた還元的アルキル化により，化合物 **37** から 1-シクロヘキシルピロリジン誘導体 **38a, b** がそれぞれ合成された。



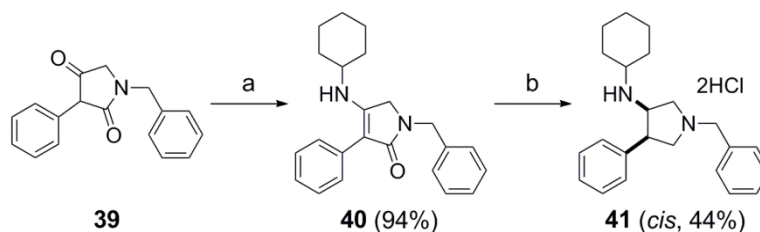
**Scheme 6.** Reagents and conditions: (a) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (b) (i) 1 N NaOH, THF/EtOH, (ii) DPPA, Et<sub>3</sub>N, toluene, reflux, then *tert*-BuOH, 100°C; (c) 4 N HCl/dioxane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (d) (i) benzoyl chloride (for **35a**) or cyclohexanecarbonyl chloride (for **35b**), Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (ii) BH<sub>3</sub>·THF, THF, reflux (for **35a** and **35c**), (iii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc; (e) (i) cyclohexanone, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, acetic acid, acetonitrile (for **35d**), (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc.



**Scheme 7.** Reagents and conditions: (a) (Boc)<sub>2</sub>O, *i*-Pr<sub>2</sub>NEt, CHCl<sub>3</sub>, reflux; (b) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>, EtOH, 50°C; (c) (i) cyclohexanecarboxaldehyde (for **38a**) or cyclohexanone (for **38b**), NaBH(OAc)<sub>3</sub>, acetonitrile, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc.

## 2-2-2. トランス-ピロリジン誘導体 29e の立体異性体の合成

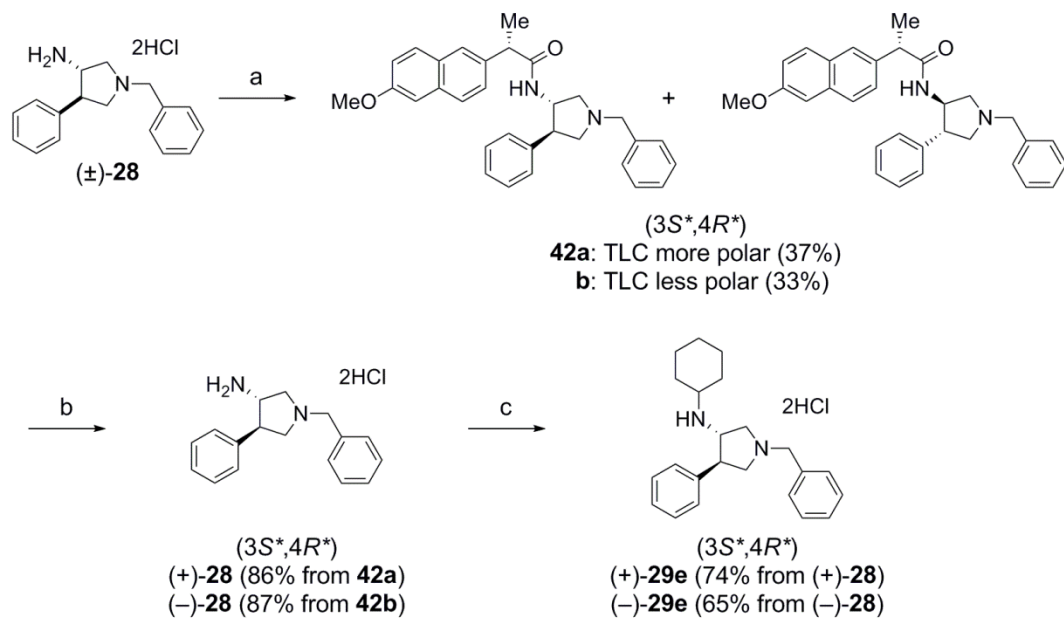
筆者は hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性に対するピロリジン誘導体の立体効果を検証するために、hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性の大幅な減弱が見られた化合物 29e について、その立体異性体の合成を行った。まずシス体 41 の合成を行った (Scheme 8)。既知の方法<sup>34)</sup> に従って合成された化合物 39 の 4 位を、*p*-TsOH 触媒下でシクロヘキシルアミンを用いてアミノ化し、化合物 40 が得られた。次にボラン・THF 錯体を用いて化合物 40 の  $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アミドを還元した。その結果、シス体 41 とトランス体 29e はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離可能であり、その単離生成比は 81/19 と、シス体 41 が主生成物として得られることが分かった。



**Scheme 8.** Reagents and conditions: (a) cyclohexylamine, *p*-TsOH (cat.), toluene, reflux; (b) (i) BH<sub>3</sub>·THF, THF, reflux, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc.

シス体 41・トランス体 29e それぞれの hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害作用を比較した結果、トランス体 29e はシス体 41 より hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性が弱いことが分かった。そこで次に、トランス体 29e の光学活性体の合成を行った (Scheme 9)。トランス体のエナンチオ選択的な合成法は報告されているが、<sup>35)</sup> 本研究では両光学活性体とも合成する必要があったため、ジアステレオマー分割法を選択した。すなわち、市販の (*S*)-ナプロキセンを用いて化合物 28 をアミド化することにより、ジアステレオマー体 42a, b が合成された。アミド体 42a, b はジアステレオマー間で結晶性が異なっており、最初に得られた結晶を再結晶することにより、42a が収率 37%、ジアステレオマー過剰率 (de) 99.8% で得られた。またカラムクロマトグラフィーにより再結晶のろ液を精製した後、得られた結晶を再結晶することにより、42b が収率 33%、 $\geq 99.8\%$  de で得られた。なお、各々の de は HPLC 分析により決定された。アミド体 42a, b のアミド基を酢酸中 6 N 塩酸を用いて加水分解することにより、化合物 28 の鏡像体 (+)-28 および (-)-28 がそれぞれ得られた。シクロヘキサノンを用いて両鏡像体 (+)- および (-)-28 をそれぞれ還元的アルキル化に付した後、4 N 塩酸-酢酸エチルにて 2 塩酸塩とし、化合物 29e の鏡像体 (+)-29e および (-)-29e が

それぞれ合成された.



**Scheme 9.** Reagents and conditions: (a) (i) (*S*)-naproxen, Et<sub>3</sub>N, 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride, 1-hydroxybenzotriazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (ii) crystallization; (b) (i) 6 N HCl, acetic acid, reflux, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc; (c) (i) cyclohexanone, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, acetonitrile, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc.

### 第三節 ピロリジン誘導体の生理活性および薬理活性

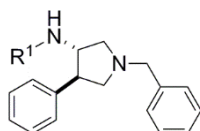
合成されたピロリジン誘導体について、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性評価および hERG アッセイ試験が行われた。 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性の評価は、機能的評価法であるラット脳シナプトソーム膜を用いた蛍光膜電位測定法により行われた。hERG アッセイ試験は、遺伝子操作によって hERG  $\text{K}^+$  チャネルを HEK (human embryonic kidney) 293 細胞に発現させた細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法によって細胞の電流を測定し、hERG  $\text{K}^+$  チャネルに対する作用を検討する方法である。hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用があると電流量が減少することから、化合物の持つ QT 延長作用の程度を判断する。また  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性と hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害活性との乖離が図られた化合物は、モルモット右心室乳頭筋を用いた活動電位測定試験により、QT延長を伴う催不整脈作用の評価が行われた。<sup>36)</sup> hERGチャネルは遅延整流外向き K 電流の早い成分 ( $\text{I}_{\text{Kr}}$ ) を示す  $\text{K}^+$  チャネルであり、モルモット右心室乳頭筋の活動電位では、第 3 相に  $\text{I}_{\text{Kr}}$  が強く関与している。したがって本試験では、 $\text{I}_{\text{Kr}}$  電流の影響を知るために心臓が興奮してから最大電位に達し、最大電位値が 90% 低下するまでの活動電位持続時間 (action potential duration at 90% repolarization,  $\text{APD}_{90}$ ) を測定する。薬剤に  $\text{I}_{\text{Kr}}$  電流抑制作用があれば  $\text{APD}_{90}$  は延長する (Figure 13)。

筆者は hERG  $\text{K}^+$  チャネルとの疎水性相互作用に着目した化合物設計を行い、ピロリジンアナログ **25** の 1, 3, および 4 位にフェニル基、およびシクロヘキシル基を有する種々の置換基を導入した化合物を合成した。これら化合物の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性評価、および hERG アッセイ試験が実施された (Table 6 and 7)。

1-ベンジル-4-フェニルピロリジン誘導体の 3 位置換基を変換した化合物 **29a-e** および **30** の結果を Table 6 に示す。3 位にシクロヘキシル基を有する化合物 **29c** および **29d** は、その芳香族化体 **29a** および **29b** より高い  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性を示した。それに対してシクロヘキシル基を有する **29e** の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性は、その芳香族化体 **30** と同程度であった。また化合物 **29a-e** および **30** の hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用は、既存の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬<sup>12b-d)</sup> および化合物 **4b** と比較して、いずれも減弱していた (8.4–60% at 1  $\mu\text{M}$ )。3 位にシクロヘキシル基を有する化合物と、それらの芳香族化体の hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害活性を比較した結果 (**29c vs 29a**, **29d vs 29b**, and **29e vs 30**)、3 位にシクロヘキシル基を導入した場合 (化合物 **29e**) において、著しい hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害の減弱効果が認められた。この結果から、ピロリジン環 3 位のシ

クロヘキシル基が hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害作用の減弱に重要な置換基であり、また 3 位の置換基は、hERG K<sup>+</sup> チャンネルのアミノ酸残基 Phe656 との相互作用に関与しているのではないかと考察した。すなわち、3 位の置換基をフェニル基からシクロヘキシル基に変換することにより、Phe656 との  $\pi$ - $\pi$  相互作用が回避され、大幅な hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性の低下につながったと考えた。<sup>32a-c)</sup>

**Table 6.** Inhibition of Na<sup>+</sup> and hERG channels of 4-phenylpyrrolidines **29a–e** and **30**<sup>a</sup>



Compd.	R <sup>1</sup>	Na <sup>+</sup> チャンネル阻害活性 <sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (μM)	hERG チャンネル阻害率 <sup>c</sup> (% inhibition, 1 μM)
<b>29a</b>		1.90	45
<b>29b</b>		0.64	57
<b>29c</b>		0.48	31
<b>29d</b>		0.32	60
<b>29e</b>		0.51	8.4
<b>30</b>		0.48	43

<sup>a</sup> All compounds are racemic and were tested using the hydrochloride or dihydrochloride salt of the synthesesided compounds except **29a** and **29c**.

<sup>b</sup> Inhibitory activity on veratridine-induced depolarization in rat cerebrocortical synaptosomes using voltage-sensitive dye Rhodamine 6G.<sup>25)</sup>

<sup>c</sup> Inhibition rates were determined by a voltage patch clamp technique using HEK293 cells expressing hERG channels.

そこで次に、hERG K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性に対するシクロヘキシル基の置換基効果の検証を目的として、ピロリジン環 4 位および 1 位にシクロヘキシル基を導入した化合物 **35a–d** および **38a, b** の合成を行った。合成された 4-シクロヘキシルピロリジン誘導体 (**35a–d**) と 1-シクロヘキシルピロリジン誘導体

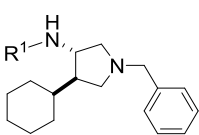




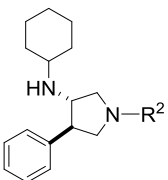




(**38a, b**) の評価結果を Table 7 に示す. ピロリジン環 4 位のフェニル基をシクロヘキシル基に変換した結果, その  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性はいずれの化合物においても 4-フェニルピロリジン誘導体より減弱することが分かった (**29b vs 35a, 29c vs 35b, 29d vs 35c, and 29e vs 35d**). 一方 4-シクロヘキシルピロリジン誘導体 **35a, 35b, 35d** は, それぞれ対応する 4-フェニルピロリジン誘導体 **29b, 29c, 29e** と比較して, hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用が増強する傾向にあった. したがって 4 位の置換基は, hERG  $\text{K}^+$  チャネルとの疎水性相互作用において関与が低いと考えられた. 1-シクロヘキシルピロリジン誘導体 **38a** は, その芳香族化体 **29e** と同程度の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性を示したが, hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用は増強した. したがって 1 位の置換基も, hERG  $\text{K}^+$  チャネルとの疎水性相互作用において関与が低いと考えられた. また 1 位にシクロヘキシル基を導入した化合物 **38b** では,  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性の大幅な減弱が見られた.

以上の結果より, ピロリジン誘導体において hERG  $\text{K}^+$  チャネルとの疎水性相互作用に関与する部位は 3 位であることが示唆され, 3 位へのシクロヘキシル基の導入が, hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用の減弱に最も有効であると考えられた.

筆者は hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害活性に対するピロリジン誘導体の立体効果を検証するために, hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害活性の大幅な減弱が見られた化合物 **29e** (トランス体) の立体異性体の合成を行った. 合成されたシス体 **41** と, トランス体の両鏡像体 (+)-**29e** および (-)-**29e** の各評価が実施された (Table 8). シス体 **41** の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性はトランス体 **29e** とほぼ同等であったが, その hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用はトランス体 **29e** より増強し, トランス体の方が優れたプロファイルを有することが示唆された. そこでトランス体 **29e** の鏡像体 (+)-**29e** および (-)-**29e** の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性を評価した結果, その  $\text{IC}_{50}$  値はそれぞれ  $0.54 \mu\text{M}$  および  $0.57 \mu\text{M}$  であり, 両鏡像体はほぼ同等の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性を示すことが分かった. またトランス体 **29e** と各立体異性体の,  $\text{Na}^+$  チャネルの site 2 に対する結合試験が実施された. その結果, 立体異性体間で結合阻害活性に大きな違いは見られなかった. したがって, *in vivo* 薬効評価, および QT 延長作用評価のための活動電位測定試験では, ラセミ体 **29e** を用いて評価が行われた.

**Table 7.** Inhibition of Na<sup>+</sup> and hERG channels of 4-cyclohexylpyrrolidines **35a–d** and 1-cyclohexylpyrrolidines **38a,b**<sup>a</sup>

Structure	Compd.	R <sup>1</sup> or R <sup>2</sup>	Na <sup>+</sup> チャネル阻害活性 <sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (μM)	hERG チャネル阻害率 <sup>c</sup> (% inhibition, 1 μM)
	<b>35a</b>		0.90	79
	<b>35b</b>		0.74	45
	<b>35c</b>		0.56	60
	<b>35d</b>		0.74	35
	<b>38a</b>		0.38	45
	<b>38b</b>		3.35	nd <sup>d</sup>

<sup>a</sup> All compounds are racemic and were tested using the dihydrochloride salt of the synthesized compounds except **35b**.

<sup>b, c</sup> See footnotes in Table 6.

<sup>d</sup> nd: not determined.

**Table 8.** Inhibition of Na<sup>+</sup> and hERG channels of the stereoisomers of *trans*-(±)-**29e**<sup>a</sup>

Compd.	Na <sup>+</sup> チャネル阻害活性 <sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (μM)	Na <sup>+</sup> チャネル結合阻害 <sup>c</sup> IC <sub>50</sub> (μM)	hERG チャネル阻害率 <sup>d</sup> (% inhibition, 1 μM)
<i>cis</i> -(±)- <b>41</b>	0.56	0.14	28
<i>trans</i> -(±)- <b>29e</b>	0.51	0.17	8.4
<i>trans</i> -(+)- <b>29e</b>	0.54	0.18	nd <sup>e</sup>
<i>trans</i> -(-)- <b>29e</b>	0.57	0.10	nd <sup>e</sup>

<sup>a</sup> All compounds were tested using the dihydrochloride salt of the synthesized compounds.

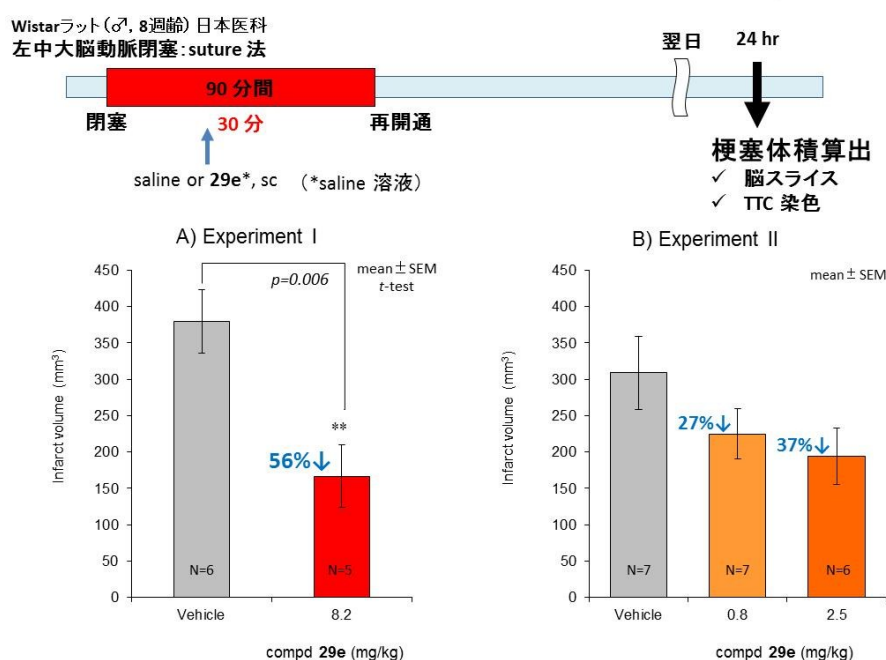
<sup>b, d</sup> See footnotes *b* and *c* in Table 6.

<sup>c</sup> Determined by a competition assay using [<sup>3</sup>H]-BTX-b in synaptosomal preparations of rat cerebral cortex. See Experimental Chapter I.

<sup>e</sup> nd: not determined.

化合物 **29e** の *in vivo* における神経保護作用は、ラット一過性 MCA 閉塞モデルにおける脳梗塞抑制作用を指標に評価された (Figure 17). MCA 閉塞 30 分後に化合物 **29e** を 0.8, 2.5, および 8.2 mg/kg 皮下投与した結果, そのコントロール群に対する梗塞体積抑制率はそれぞれ 27%, 37%, および 56% と, 濃度依存的に梗塞体積を減少させることが分かった. また 8.2 mg/kg 投与群は, コントロール群と比較して有意な梗塞体積抑制作用を示した [ $166.7 \pm 42.9 \text{ mm}^3$  (n=5) vs.  $379.8 \pm 43.8 \text{ mm}^3$  (n=6) (mean $\pm$ SEM),  $**p < 0.01$  (Student's *t*-test)]. 以上結果より, 化合物 **29e** は  $\text{Na}^+$  チャネルの site 2 を阻害し, ラット脳梗塞モデルにおいて後投与でも強力な脳梗塞体積抑制作用を有することが示された.

Figure 17. ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルにおける脳梗塞抑制作用の評価.<sup>28)</sup>



化合物 **29e** の *in vivo* における神経保護作用が示されたため, 次に化合物 **29e** と対照薬である crobenetine (Figure 4) の, QT 延長を伴う催不整脈作用の評価が実施された. モルモット右心室乳頭筋を用いた活動電位測定試験において, 各化合物を作用させた時の  $\text{APD}_{90}$  の変化率を指標として, QT 延長作用のポテンシャルが評価された. 化合物 **29e** (10, 30, and 100  $\mu\text{M}$ ) と crobenetine hydrochloride (3, 10, and 30  $\mu\text{M}$ ) の, 各濃度における  $\text{APD}_{90}$  の評価結果を Table 9 に示す. 両化合物とも最大濃度まで  $\text{APD}_{90}$  の延長作用は認められず, それらの QT 延長作用の可能性は低いことが示唆された. しかしながら crobenetine は, 30  $\mu\text{M}$  において  $\text{APD}_{90}$  を  $27.1 \pm 10.2\%$  短縮させた. 一方化合物 **29e** は 100  $\mu\text{M}$  でも  $\text{APD}_{90}$  を  $9.2 \pm 2.7\%$  減少させるにすぎず, 化合物 **29e** は心臓に

対する影響がより軽減された化合物であることが示唆された。

**Table 9.** Effects of compound **29e** and crobenetine on ADP<sub>90</sub>

Compd.	Concentration ( $\mu$ M)	ADP <sub>90</sub> (%) <sup>a</sup>
crobenetine hydrochloride	3	96.6 $\pm$ 0.6
	10	89.1 $\pm$ 1.6
	30	72.9 $\pm$ 10.2
<b>29e</b>	10	95.3 $\pm$ 0.7
	30	92.3 $\pm$ 0.7
	100	90.8 $\pm$ 2.7

<sup>a</sup>ADP<sub>90</sub>: action potential duration at 90% repolarization; %: percent change from before treatment value.

Each value represents the mean $\pm$ SEM of three cell preparations.

## 第四節 本章のまとめ

筆者は、強い神経保護作用を示し、かつ QT 延長リスクが低い Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の創製を目的として、新規ピロリジン誘導体の設計と合成を行った。QT 延長作用の予測として、hERG アッセイ試験と活動電位測定試験の 2段階の *in vitro* 試験により、QT 延長作用に対するポテンシャルが評価された。臨床試験を実施していた既存の Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬はすべて強い hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害作用を有しており、また第一章で見出された 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体 **4b** も同様に強い hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害作用を有していた。筆者は hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性の低下にむけて化合物 **4b** のアミン部位の構造変換を実施し、その過程において、Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性を有し、かつ合成展開において有用な骨格であるピロリジンアナログ **25** を見出した。

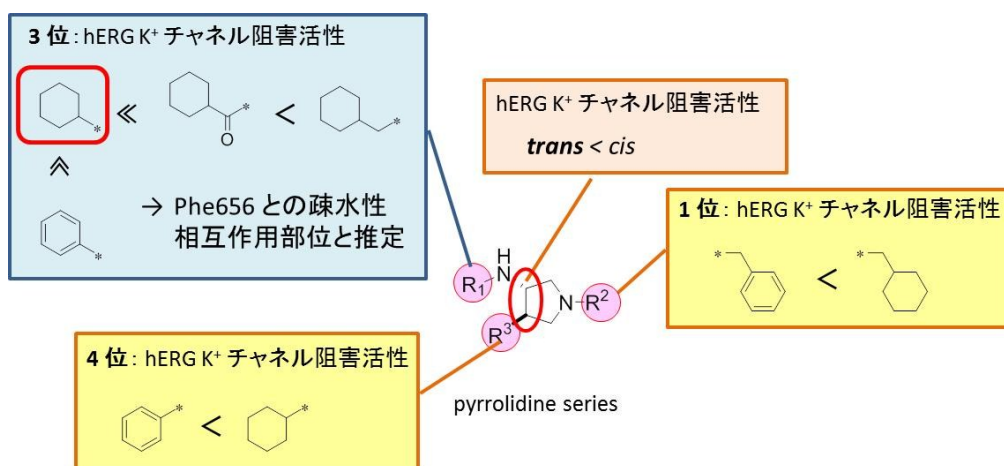
新たに見出されたピロリジンアナログ **25** から、Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性と hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性との乖離を目的として合成展開を実施した。hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性の低減に向けた戦略として、薬物-hERG 相互作用において、疎水性相互作用に関わるとされている Phe656 に着目した化合物設計を行った。筆者は Phe656 との疎水性相互作用を回避し得るような置換基としてシクロヘキシル基を選択し、ピロリジンアナログ **25** の 1, 3 および 4 位にシクロヘキシル基を有する種々の置換基を導入した化合物を合成した。その結果、ピロリジン環 3 位の置換基が、hERG K<sup>+</sup> チャネルとの相互作用に関与していることが示唆された (Figure 18)。また 3 位にシクロヘキシル基を導入した化合物 **29e** では、その芳香族化体 **30** と比較して、著しい hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害の減弱効果が認められた。したがって筆者は、3 位の置換基をフェニル基からシクロヘキシル基に変換することにより、Phe656 との  $\pi$ - $\pi$  相互作用が回避され、大幅な hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性の低下につながったのではないかと考えた。また化合物 **29e** の立体異性体を合成し、hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性に対するピロリジン誘導体の立体効果の検証を行った。その結果、トランス体 **29e** の方が hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性が弱いことが示された。

本研究により見出された化合物 **29e** は Na<sup>+</sup> チャネルの site 2 を阻害し、ラット一過性 MCA 閉塞モデルにおいて、後投与でも有意な脳梗塞体積抑制作用を有することが示された。また QT 延長を伴う催不整脈作用の検証のために、化合物 **29e** と対照薬 crobenetine の活動電位測定試験が実施された。その結果、両化合物とも APD<sub>90</sub> を短縮させることが判明したが、その程度は crobenetine より化合物 **29e** の方が弱いことが示された。したがって、化合物 **29e** は QT 延

長作用のリスクが低く、心臓に対する影響がより軽減された化合物であることが示唆された。

以上の結果から、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性と hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害活性との乖離は可能であることが示された。また化合物 **29e** の結果より、hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害活性が減弱した  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬は、強い神経保護作用を有し、かつ従来の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬で問題とされていた薬物性 QT 延長リスクが低いことが示唆された。したがって  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬は、臨床において安全で有効な脳梗塞治療薬となり得ると考えられる。

**Figure 18.** ピロリジン系統 1, 3, 4 位置換基の hERG  $\text{K}^+$  チャネル阻害作用に及ぼす影響。

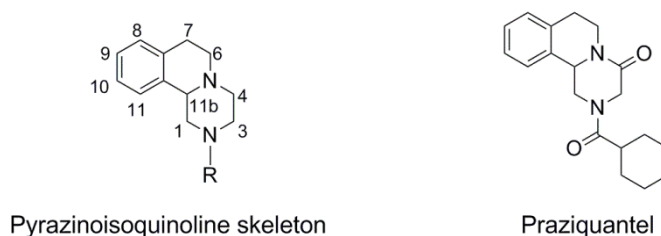


### 第三章 ピラジノイソキノリン骨格の高ジアステレオ選択的構築法の開発

#### 第一節 序説

筆者は、心毒性に対するリスクがより低減された  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の創製を目指して、第二章で見出されたピロリジン誘導体 **29e** から更なる合成展開を実施した。その過程において、高活性でかつ心臓に対して高い安全性を有する化合物の取得に至った (Figure 5)。本化合物は、その部分構造としてピラジノイソキノリン骨格を有していた。ピラジノイソキノリン骨格は核環位 (C-11b) に不斉中心を有する三環性の骨格である (Figure 19)。単純な骨格であることから、これまでにラセミ体でのピラジノイソキノリン誘導体の合成法は数多く報告されているにもかかわらず、簡便で汎用性の高い光学活性体の合成法の報告はなく、本骨格の構築法の開発が急務となった。

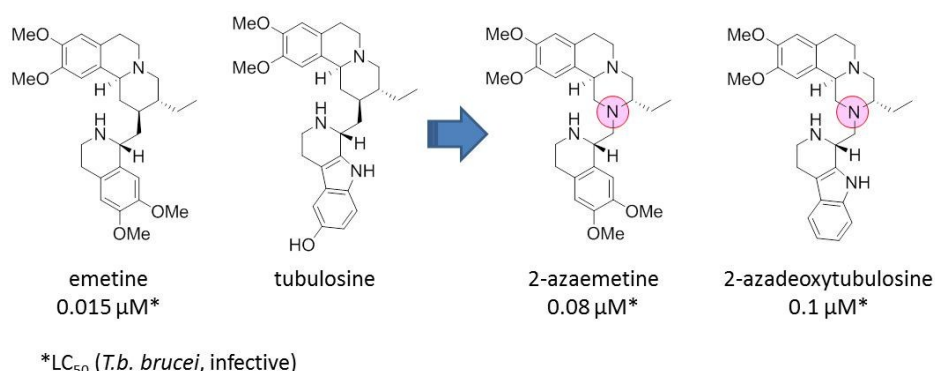
Figure 19. Pyrazinoisoquinoline skeleton and praziquantel.



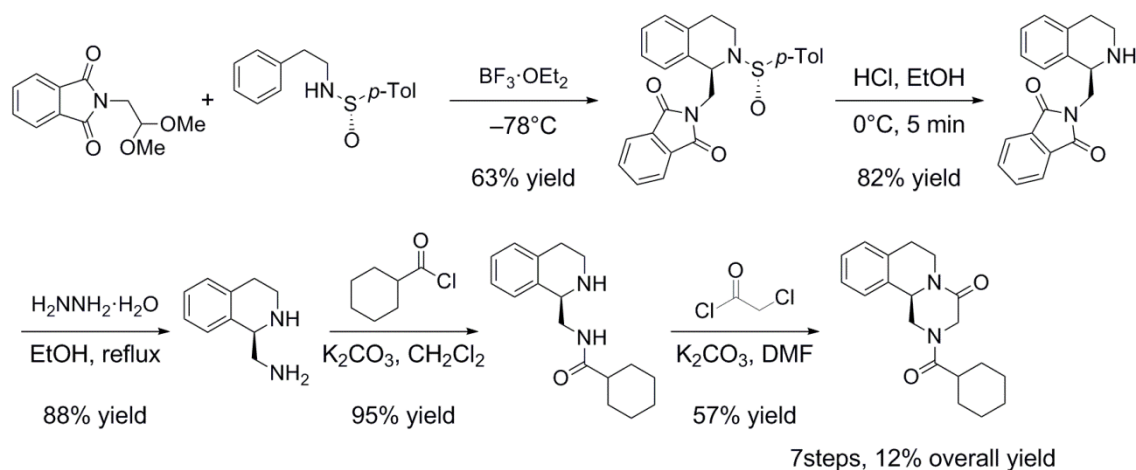
ピラジノイソキノリン誘導体は抗真菌活性や抗住血吸虫作用など、その多様な生理活性から注目を集めている骨格の一つである。<sup>37)</sup> ピラジノイソキノリン骨格を有する代表的な化合物にプラジカンテル (praziquantel, Figure 19) があるが、これは抗住血吸虫薬として現在用いられている唯一の薬剤である。<sup>38)</sup> プラジカンテルは左旋性体 ((*R*)-(-)-praziquantel) が活性本体であるにもかかわらず、臨床においてはより生産コストの低いラセミ体が用いられている。<sup>37a)</sup> 住血吸虫症は neglected tropical disease の一つであり、推定患者数は 2 億人に上ると報告されているが、<sup>38)</sup> その治療薬がプラジカンテル単剤であること、ならびにその高い投与量から、近年プラジカンテルに対する薬剤耐性が報告されている。<sup>39)</sup> 現在までに (*R*)-プラジカンテルのエナンチオ選択的な合成研究は 2 グループより報告されているが、<sup>40)</sup> いずれも小スケールでの合成であり、プロセスでの応用が可能な合成法の開発が望まれている。また天然にイソキノリン骨格を有す

るアルカロイドは数多く存在しており、これらは抗原虫感染作用の他、抗癌作用や抗ウイルス活性など強力な生理活性を示す。しかしながら、強い副作用も有するため治療域 (therapeutic window) が狭いことが問題となっている。そこで近年、より安全性の高い化合物を探索するために、イソキノリンアルカロイドのミメティクスとしてそのアザ体であるピラジノイソキノリン誘導体の研究が行われている (Figure 20)。<sup>37h)</sup> 以上の背景からも、簡便で汎用性の高い光学活性なピラジノイソキノリン骨格構築法の開発は重要であると言える。

**Figure 20.** Bioactive 2-aza-analogues of alkaloids.<sup>37h)</sup>

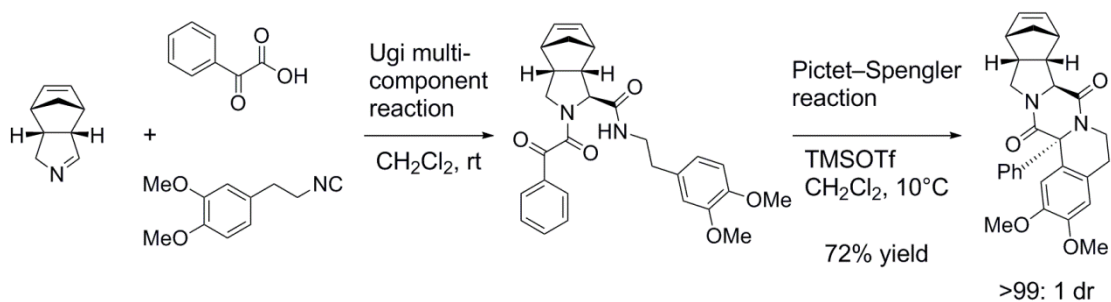


これまでに数例報告されている光学活性なピラジノイソキノリン骨格構築法では、骨格構築における鍵反応として、不斉補助基<sup>40a,41)</sup> やアミノ酸<sup>42)</sup> を不斉誘起剤として用いる Pictet–Spengler 環化反応 (Scheme 10–12) やペプチドアセタールのラジカル環化反応 (Scheme 13),<sup>43)</sup> 不斉触媒を利用した不斉水素化反応 (Scheme 14)<sup>40b)</sup> を用いている。

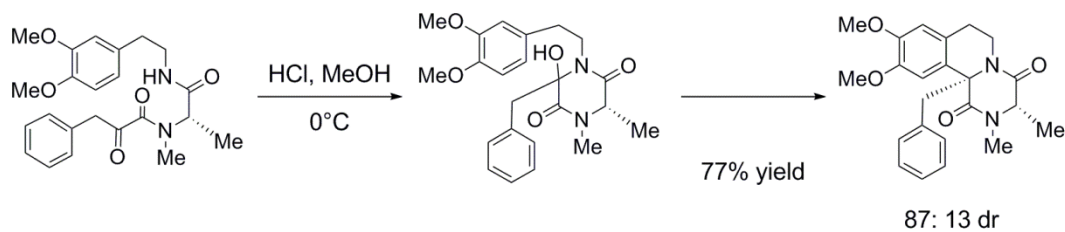


**Scheme 10.** The synthetic route of chiral (-)-praziquantel by a chiral auxiliary mediated Pictet–Spengler reaction by Ma *et al.*<sup>40a)</sup>

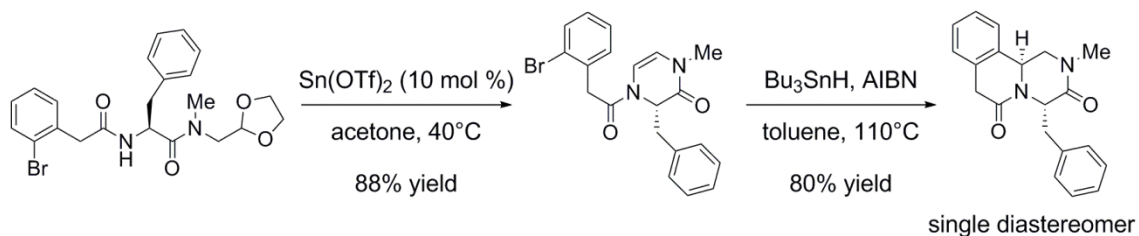




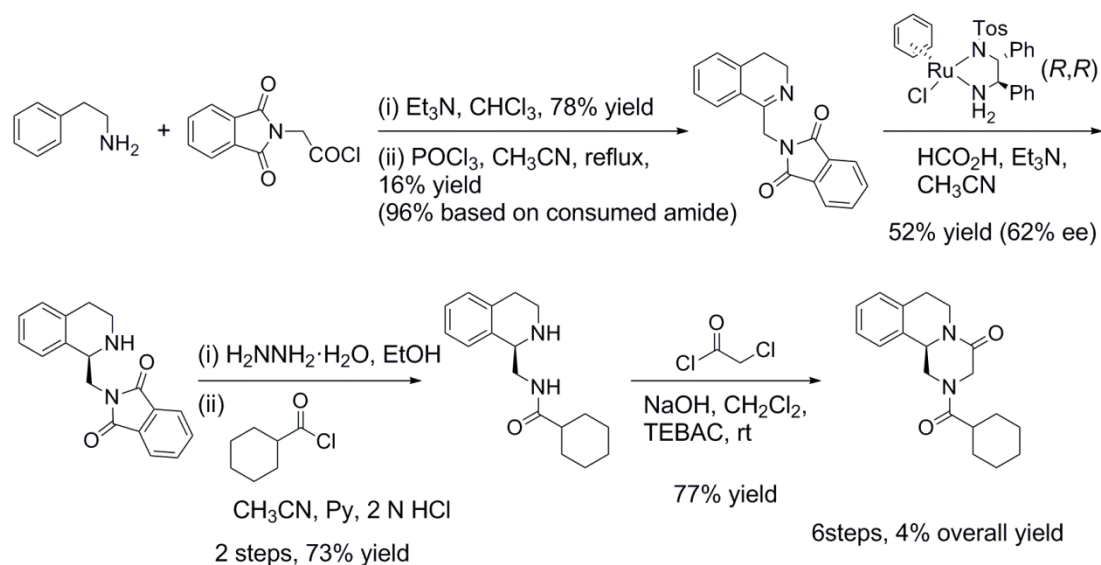
**Scheme 11.** Asymmetric synthesis of diketopiperazine by a tandem biocatalysis/Ugi/Pictet-Spengler-type cyclization by Znabet *et al.*<sup>41)</sup>



**Scheme 12.** Diastereoselective synthesis of diketopiperazine from amino acids by 1,4-chirality transfer by Zawadzka *et al.*<sup>42a)</sup>



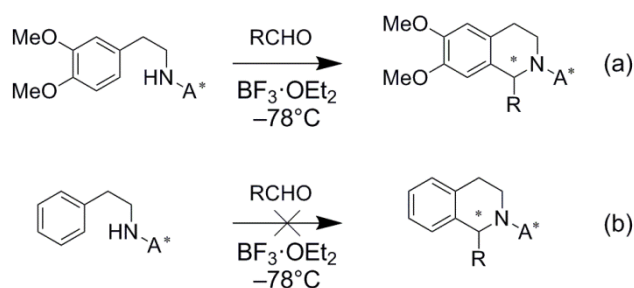
**Scheme 13.** Lewis acid catalyzed and radical cyclization from peptide acetals by Todd *et al.*<sup>43)</sup>



**Scheme 14.** Asymmetric transfer hydrogenation of dihydroisoquinoline using a chiral ruthenium catalyst by Roszkowski *et al.*<sup>40b)</sup>

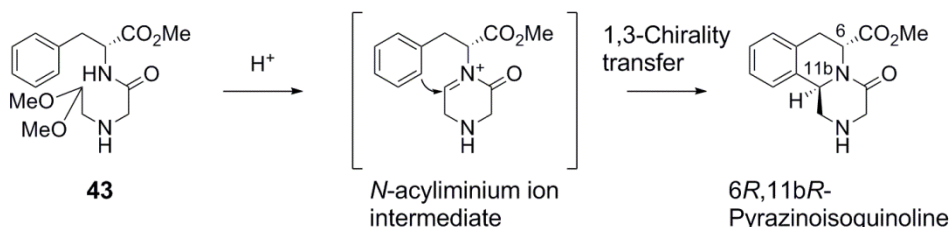
**Pictet–Spengler** 反応はピラジノイソキノリン骨格の構築において広く用いられている手法である。本反応は側鎖芳香環への求電子置換反応であり、一般的に芳香環上の電子密度は高いほうが反応は円滑に進行するため、本反応による多様性を持った光学活性ピラジノイソキノリン誘導体の合成は困難であると言える。Koomen らのキラル補助基を介したフェネチルアミンの不斉 **Pictet–Spengler** 反応においては、芳香環上の置換基としてアルコキシ基やヒドロキシル基が必要であり (Figure 21a), 電子供与性基を有さないフェネチルアミンの環化反応は進行しないことが報告されている (Figure 21b)。<sup>44)</sup> 実際に既報の不斉および立体制御 **Pictet–Spengler** 反応<sup>41,42)</sup> を用いて合成されている化合物は、そのほとんどがアルコキシ基を有するピラジノイソキノリン誘導体である。<sup>45)</sup> また大部分の合成法では三環性骨格を段階的に構築するために、ピラジノイソキノリン誘導体の合成に多工程を要する。

**Figure 21.** Reported asymmetric **Pictet–Spengler** cyclization.<sup>44)</sup>



*N*-アシルイミニウムイオンは有機合成において応用範囲の広い中間体であり、特に天然アルカロイドの合成中間体として有用である。<sup>46)</sup> 環状 *N*-アシルイミニウムイオンと  $\pi$ -求核剤の分子内環化反応は、環上に存在する置換基<sup>47)</sup> もしくは  $\pi$ -求核剤と窒素原子をつなぐ鎖上に存在する置換基<sup>48)</sup> の立体制御により選択的に進行し、1,3-トランス体を優先して生成することが報告されている。筆者は (1) 環状 *N*-アシルイミニウムイオン中間体を *in situ* で生成するアミドアセタール **43** の Pictet–Spengler 反応により、三環性骨格を 1 工程で構築でき、(2) キラル誘起剤としてアミドアセタール **43** に光学活性なアミノ酸を組み込むことで、環化工程における 1,3-キラル転移により 6,11b-トランス-ピラジノイソキノリン骨格が選択的に得られるであろうと想定した (Scheme 15)。本研究の目的は、芳香環上に電子供与性基や電子吸引性基など、多様な置換基を有する光学活性なピラジノイソキノリン誘導体を効率的に合成することである。筆者は市販の光学活性な D-フェニルアラニン誘導体を出発原料として、6*R*,11*bR*-ピラジノイソキノリン骨格を高立体選択的に構築することが可能な新規骨格構築法を見出したので、以下に詳細を述べる。

**Scheme 15.** The Pictet–Spengler reaction of a cyclic *N*-acyliminium ion intermediate.



## 第二節 1,3-キラル転移によるピラジノイソキノリン骨格のジアス

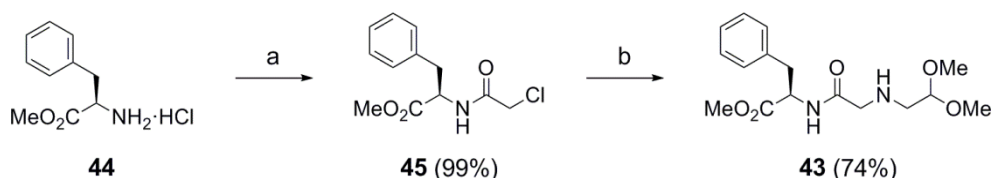
### テレオ選択的な構築法

#### 3-2-1. 環状 *N*-アシルイミニウムイオンの Pictet–Spengler 環化反応の検討

立体制御 Pictet–Spengler 反応の最適な反応条件を検討するために、環状 *N*-アシルイミニウムイオン中間体の前駆体となるアミドアセタール体 **43** が、市販の *D*-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩 (**44**) から 3 工程で合成された (Scheme 16) . 原料 **44** を塩化クロロアセチルによりアシル体 **45** とした後、アミノアセトアルデヒドジメチルアセタールを用いてアミノ化し、アミドアセタール体 **43** が良好な収率で得られた。その後、アミドアセタール体 **43** から環状 *N*-アシルイミニウムイオン中間体の生成、ならびに *N*-アシルイミニウムイオン中間体の環化反応の触媒として Brønsted 酸および Lewis 酸を用い、Pictet–Spengler 反応の条件検討を行った。その結果を Table 10 に示す。トリフルオロメタンスルホン酸と TFA を除く全ての酸では、反応は室温で進行し、目的物 **46a** が単一生成物として得られた。<sup>49)</sup> 濃硫酸を用いた場合、環化反応は円滑に進行し、環化体 **46a** が中程度の収率で得られた (entry 1) . 粗生成物の LC/MS 分析より、主な副反応として **46a** の加水分解が進行したことが示唆された。メタンスルホン酸を用いることにより、検討した酸試薬中で最も高い収率とジアステレオ選択性が得られた (entry 2) . 一方より酸性度の低い TFA を用いた場合、環化体 (**46a** and/or **46b**) を得ることができなかった (entry 4) . おそらく低い酸性度の酸では、*N*-アシルイミニウムイオン中間体は生成するものの Pictet–Spengler 環化反応が進行せず、*N*-アシルイミニウムイオン中間体の分解が生じたことが原因と考えられる。また酸性度を増大させると、ジアステレオ選択性の低下が見られた (entry 3) . 最も良い結果を示したメタンスルホン酸を用いて反応温度を 70°C に昇温した結果、反応速度は加速するが若干のジアステレオ選択性の低下が見られた (entry 7) . また加熱条件下で反応時間を延長させた場合、環化体 **46a** の分解が進行し **46a** の収率が低下することが分かった (entry 8) . Brønsted 酸と比較して、Lewis 酸を用いた Pictet–Spengler 反応はいずれも低収率であった (entries 5 and 6) . 本検討により見出された新規ピラジノイソキノリン骨格構築法における最適な条件は、メタンスルホン酸を用いた室温での環化条件 (entry 2) であることが分かった。

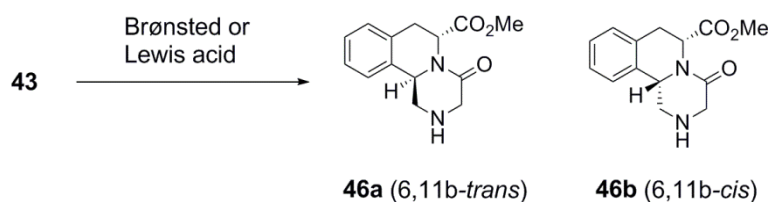
以上の結果から、メタンスルホン酸を用いた室温での Pictet–Spengler 反応により、電子供与性基を持たないアミドアセタール体 **43** から、高いジアステレ

オ選択性で簡便にピラジノイソキノリン骨格を構築できることが分かった。電子供与性基を有さない基質の Pictet–Spengler 環化の例は非常に少なく、本骨格構築法は反応の簡便さ、収率、およびジアステレオ選択性において優れた手法であると言える。第三節では本条件を用いて、新規ピラジノイソキノリン骨格構築法の反応性検討を実施することとした。



**Scheme 16.** Reagents and conditions: (a) chloroacetyl chloride, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt; (b) aminoacetaldehyde dimethyl acetal, NaI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt.

**Table 10.** The Pictet–Spengler cyclization of **43**<sup>a</sup>



Entry	Acid	Solvent	Temperature	Time (h)	Yield of <b>46a</b> (%) <sup>b</sup>	de (%) <sup>c</sup>
1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concd) <sup>d</sup>	-	rt	14	58	96.1
2	CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H	-	rt	48	80	99.0
3	CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H	-	rt	48	47 <sup>f</sup>	74.7
4	TFA	-	rt	48	- <sup>g</sup>	-
5	TiCl <sub>4</sub> <sup>e</sup>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt	48	5	98.2
6	BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub> <sup>e</sup>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt	48	26	98.9
7	CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H	-	70°C	0.5	80	97.4
8	CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H	-	70°C	13	64	97.3

<sup>a</sup> Unless otherwise noted, the reaction was carried out with **43** (0.3 mmol) and acid (3 mmol).

<sup>b</sup> Isolated yield after column chromatography.

<sup>c</sup> Diastereomeric excess (de) was determined by HPLC analysis of the crude product mixture.

<sup>d</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.8 mmol).

<sup>e</sup> TiCl<sub>4</sub> (1.5 mmol) or BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (1.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml).

<sup>f</sup> Compound **46b** was isolated in 8% yield.

<sup>g</sup> The cyclized products were not detected.

### 3-2-2. 環化体 46a の立体配座解析と立体選択性の考察

環化体 **46a** および **46b** の相対配座は NOESY により推定された (Figure 22). マイナー異性体 **46b** (シス) の 2D NOESY において, H-11b プロトン (4.62 ppm) と H-6 プロトン (4.98 ppm) 間, および H-11b プロトンとメチルエステルプロトン (3.53 ppm) 間のどちらにも明確な相関は観測されなかった (Figure 22a). 環化体 **46a** (トランス) の 2D NOESY においても, H-11b プロトン (4.99 ppm) と H-6 プロトン (5.73 ppm) 間に明確な相関は観測されなかったが (Figure 22b), 1D NOESY における H-11b プロトンの選択励起により, メチルエステルプロトン (3.66 ppm) とのクロスピークが観測された (Figure 22c). これらの結果より, 環化体 **46a** の相対配座はトランスであると示唆された.

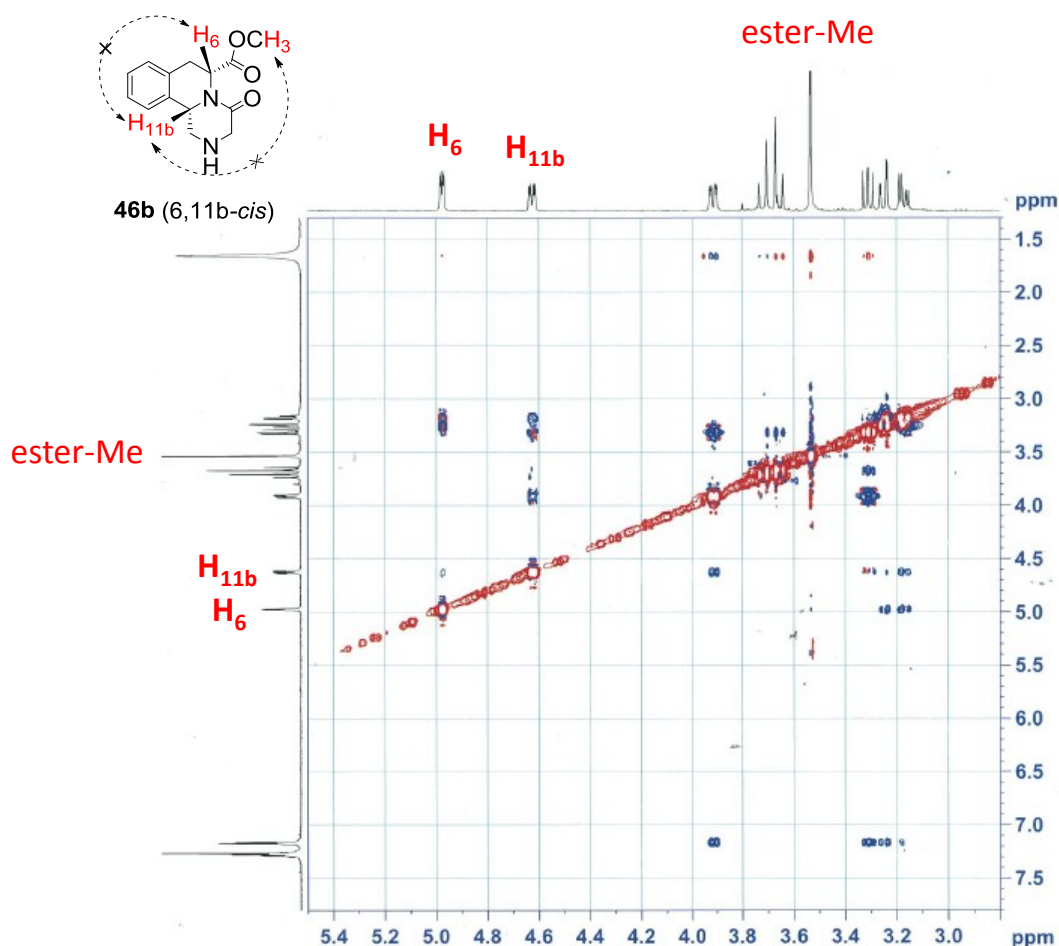


Figure 22a. 2D NOESY of **46b** (6,11b-*cis*).

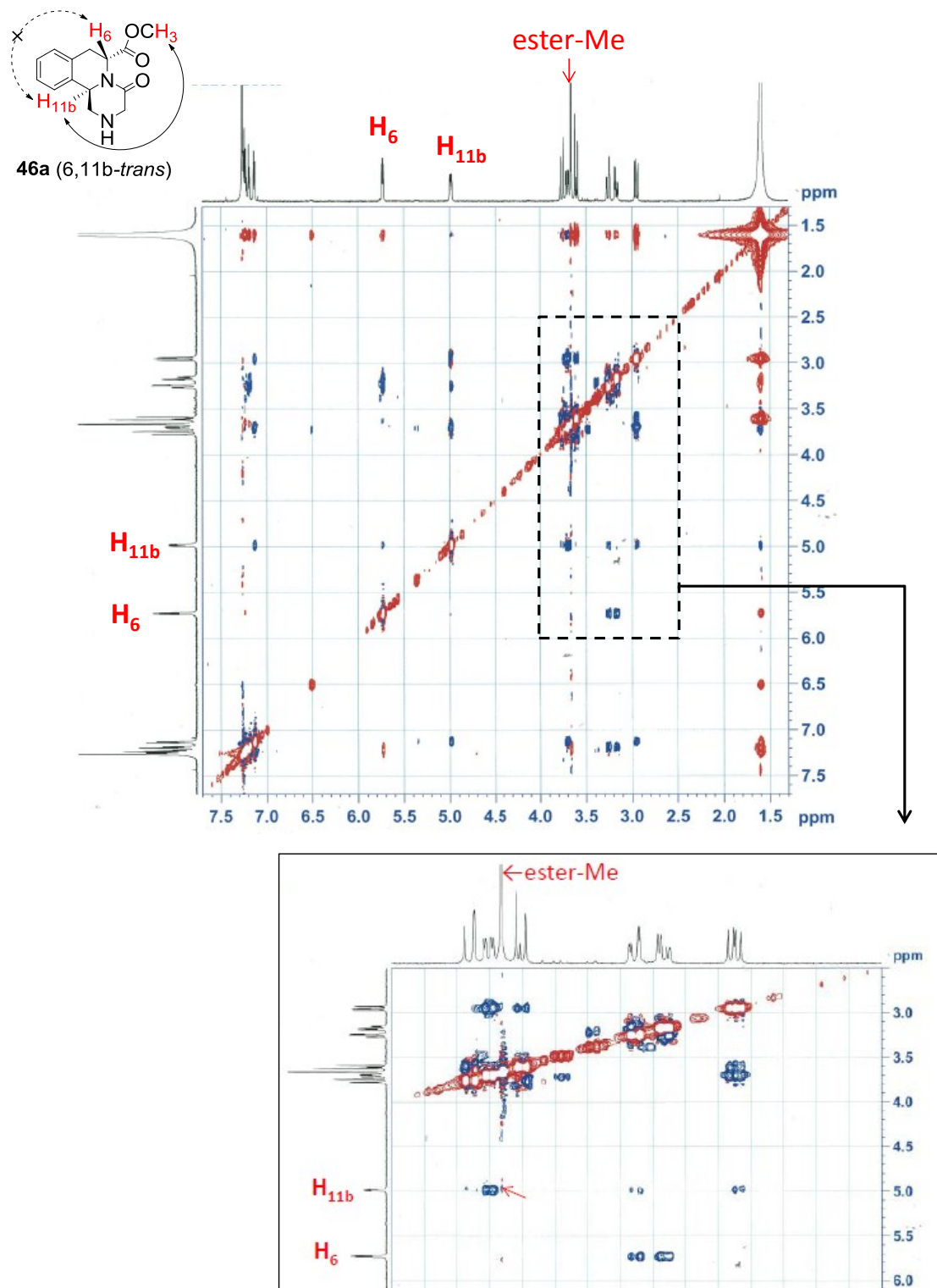


Figure 22b. 2D NOESY of 46a (6,11b-trans).

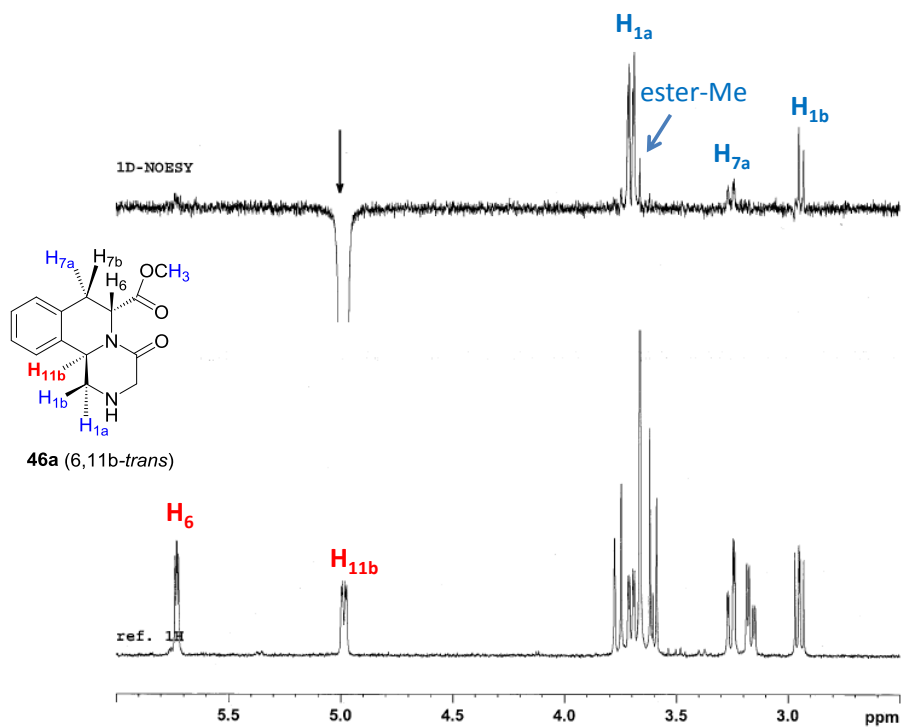
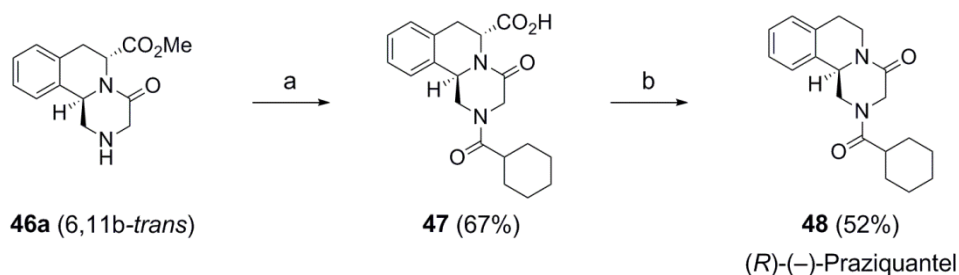


Figure 22c. 1D NOESY of **46a** (6,11b-trans).

環化体 **46a** の立体化学を確定するために、次に **46a** を 2 工程で (*R*)-(-)-プラジカンテルへと変換した (Scheme 17). すなわち、塩酸を用いて環化体 **46a** のエステル基を加水分解した後、塩化シクロヘキサンカルボニルにより *N*-アシル化を行うことにより、化合物 **47** が 67% の収率で得られた. 化合物 **47** に対して Barton 法<sup>50)</sup> による脱炭酸を行い、(*R*)-(-)-プラジカンテル (**48**) が 52% の収率で得られた. 化合物 **48** は、キラルカラムを用いた HPLC による光学純度分析により高い鏡像体過剰率 (ee) を示すことが分かり ( $\geq 99.5\%$  ee), その物性ならびに分光分析データは既報のものと一致した.<sup>37a,40b,51)</sup> また化合物 **47** を合成する過程で得られたカルボン酸体 **49** の単結晶 X 線構造解析を行った結果、その立体配座は 6*R*,11*bR* であることが判明した (Figure 23). 以上の結果を基に、筆者は本骨格構築法により立体選択的に得られる環化体 **46a** の立体化学を、6*R*,11*bR*-トランスであると確定した.

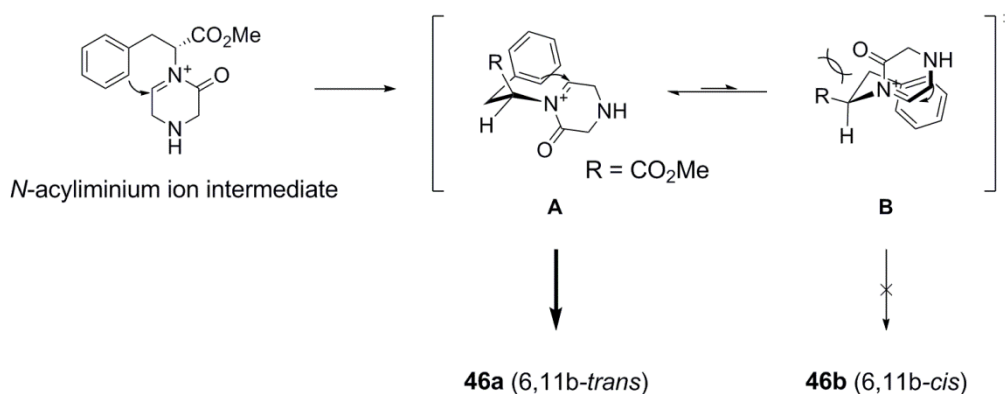


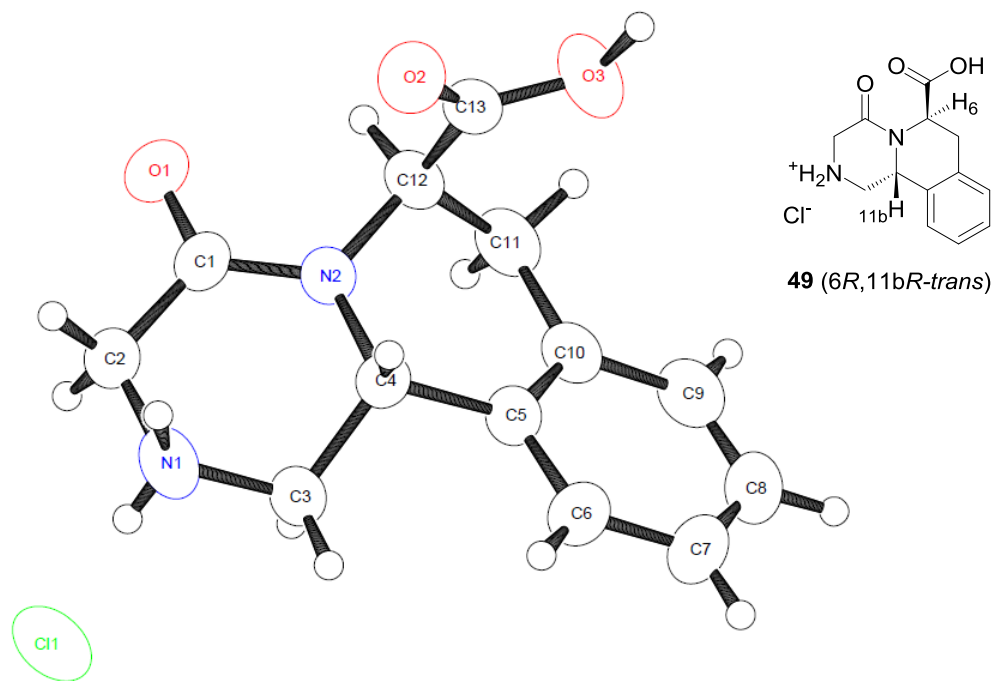


**Scheme 17.** Reagents and conditions: (a) (i) 6 N HCl, 100°C, (ii) cyclohexanecarbonyl chloride, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C; (b) (i) *N*-methylmorpholine, isobutylchloroformate, THF, -15°C, then *N*-hydroxy-2-thiopyridone, Et<sub>3</sub>N, THF, -15°C, (ii) 2-methyl-2-propanethiol, THF, hv, rt.

本骨格構築法で得られる高いジアステレオ選択性は、環化反応の際にとり得る遷移状態により説明できる。Pictet–Spengler 反応の反応速度を決定する工程は、*N*-アシルイミニウムイオン中間体の側鎖芳香環への求電子反応により、アレニウムイオン中間体を形成する工程であり、<sup>52)</sup> 芳香環への求電子攻撃の際にとり得る遷移状態の差により、立体選択性が得られたと考察した (Figure 24)。すなわち、アレニウムイオンの形成においてはボート型およびイス型の 2 つの遷移状態を取ることが可能であるが、ボート型遷移状態を経て形成されるアレニウムイオンは歪みが高いため、より安定な配座であるイス型遷移状態 (A or B) を経ると考えられる。そのうち遷移状態 B は、擬エカトリアルを取る 6 位カルボメトキシ基とピペラジノン環カルボニル基の間の A<sup>(1,3)</sup> strain のため、エネルギー状態が高いと考えられる。<sup>53)</sup> そのため反応はより安定なイス型遷移状態 A を経て進行し、トランス体 **46a** が高選択的に得られたと考察した。

**Figure 24.** Stereochemical outcome of *N*-acyliminium cyclization.

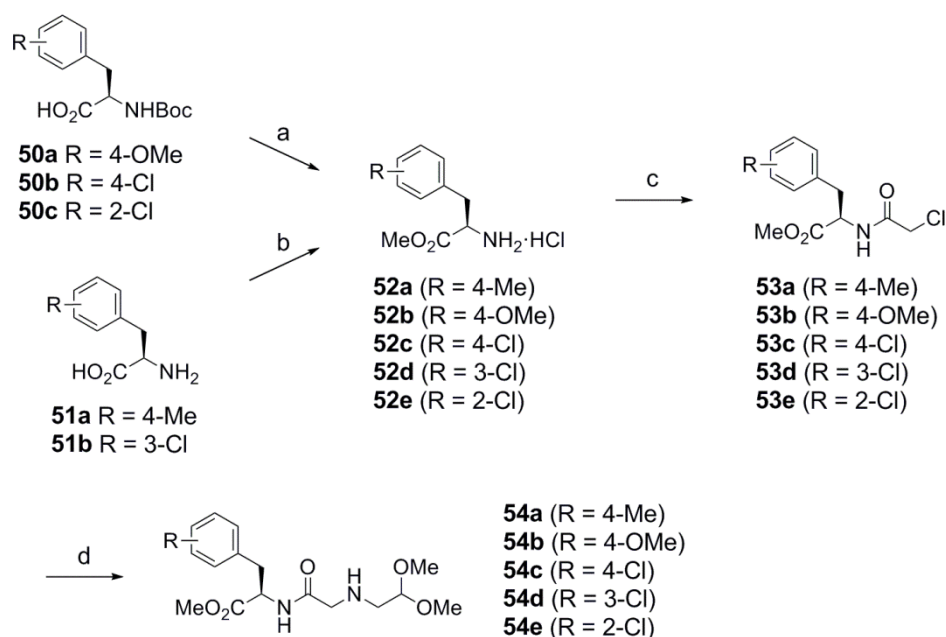




**Figure 23.** ORTEP structure of compound **49**.

### 第三節 新規ピラジノイソキノリン骨格構築法の反応性

次に芳香環上に置換基を有する *N*-アシルイミニウムイオン前駆体 **54a-e** を用いて、第二節で見出したピラジノイソキノリン骨格構築法の反応性の検証を行った。アミドアセタール体 **54a-e** は、市販の (*R*)-フェニルアラニン誘導体 **50a-c** および **51a, b** より誘導される化合物 **52a-e** から、Scheme 16と同様の方法にて合成された (Scheme 18)。すなわち、化合物 **50a-c** をメチルエステルとした後、Boc 基を 4 N 塩酸-酢酸エチルにて脱保護することで、化合物 **52b, c, e** が得られた。また化合物 **51a, b** を、メタノール中塩化アセチルによりメチルエステル化することで、化合物 **52a, d** が得られた。塩化クロロアセチルにより化合物 **52a-e** をアシル体 **53a-e** とした後、アミノアセトアルデヒドジメチルアセタールを用いてアミノ化を行うことにより、アミドアセタール体 **54a-e** が得られた。

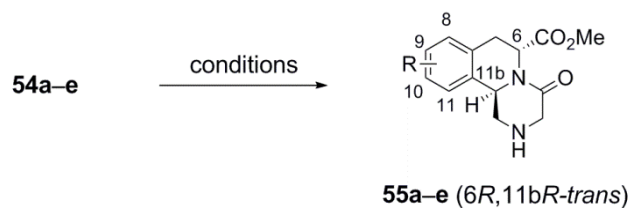


**Scheme 18.** Reagents and conditions: (a) (i) MeI,  $K_2CO_3$ , DMF, rt, (ii) 4 N HCl/EtOAc, EtOAc, rt; (b) acetyl chloride, MeOH, reflux; (c) chloroacetyl chloride,  $Et_3N$ ,  $CH_2Cl_2$ , rt; (d) amino-acetaldehyde dimethyl acetal, NaI,  $CH_2Cl_2$ , rt.

アミドアセタール体 **54a-e** を用いた Pictet-Spengler 反応の検討結果を Table 11 に示す。第二節における検討の結果、本骨格構築法の最適な条件はメタンスルホン酸を用いた室温での環化条件であったことから、まずメタンスルホン酸を用いて、パラ置換体 **54a-c** の環化反応を行った (Table 11, 条件 A)。化合

物 **54a** (*p*-Me) の環化反応は円滑に進行し、目的の環化体 **55a** が高収率で得られた (entry 1) . 一方, 電子供与性基 (*p*-OMe) を持つ化合物 **54b** の環化反応は低収率であり (entry 2) , また電子吸引性基 (*p*-Cl) を持つ化合物 **54c** の環化反応では目的の環化体は得られなかった (entry 4) . そこで反応温度を 70°C に昇温し化合物 **54c** の環化反応を試みたが, 化合物 **43** の場合と異なり, 環化体は得られなかった (entry 5) . これはアミドアセタール体 **54c** および *N*-アシルイミニウムイオン中間体の分解が起こったためと思われる. そこでメタンスルホン酸から, 化合物 **43** の環化反応において反応の進行がより速かった濃硫酸に変更し, 電子欠損性の化合物 **54c-e** に対して環化反応を行った (Table 11, entry 6-8, 条件 B) . その結果いずれも反応はすみやかに完結し, 目的の環化体 **55c-e** が中程度の収率 (43-61%) で, 単一化合物として得られることが分かった. この場合も, 反応の主な副生成物は **55c-e** の加水分解により生じたカルボン酸体であることが, 粗生成物の LC/MS 分析により確認された. 一方化合物 **54b** に対して濃硫酸を用いた環化反応を試みたが, 環化体 **55b** は得られなかった. 濃硫酸を用いた条件では, アミドアセタール体 **54b** および *N*-アシルイミニウムイオン中間体のポリマー化が起こったためと推測した. そこで化合物 **54b** に対してより緩和な酸条件下での環化反応を検討したが, 目的の環化体 **55b** は得られなかった. すなわち化合物 **54b** を, ジクロロメタン中でメタンスルホン酸を用いた環化反応に付したが, 未反応のアミドアセタール体 **54b** の回収と, 環化体 **55b** と副生成物の分離不能な混合物が得られるに終わった (entry 3) . また TFA を用いた環化反応も試みたが, 複雑な混合物と未反応のアミドアセタール体 **54b** が得られるのみであり, 環化体 **55b** の生成は粗生成物の <sup>1</sup>H NMR および LC/MS では確認されなかった. 化合物 **54b** の反応性の低さは, メタ-メトキシ基の誘起効果に因るものと考察される. なおメタンスルホン酸および濃硫酸を用いた環化反応において, いずれのアミドアセタール体を用いた場合にも, **55a-e** のシス体は反応混合物の <sup>1</sup>H NMR および LC/MS において確認されておらず, ジアステレオマー過剰率の算出はできなかった. したがって, 本手法により種々の置換基を有する基質から, 目的のトランス体が高いジアステレオ選択性で得られることが分かった.

以上の検証結果より, 本骨格構築法はこれまでに合成が達成されていなかった電子欠損の基質に対しても適用が可能であり, 高ジアステレオ選択的に, 多様な置換基を有するピラジノイソキノリン誘導体を合成できることが分かった.

**Table 11.** Scope and limitations of the Pictet–Spengler cyclization

Entry	Amido-acetal <b>54</b>	Conditions <sup>a</sup>	Product (yield) <sup>b</sup>	$[\alpha]_{\text{D}}^{25\text{c}}$
1	<b>54a</b> (R = 4-Me)	A	<b>55a</b> : R = 10-Me (80%)	-149.8
2	<b>54b</b> (R = 4-OMe)	A <sup>d</sup>	<b>55b</b> : R = 10-OMe (18%)	-188.3
3	<b>54b</b> (R = 4-OMe)	A <sup>e</sup>	- <sup>g</sup>	-
4	<b>54c</b> (R = 4-Cl)	A	- <sup>h</sup>	-
5	<b>54c</b> (R = 4-Cl)	A <sup>f</sup>	- <sup>h</sup>	-
6	<b>54c</b> (R = 4-Cl)	B	<b>55c</b> : R = 10-Cl (61%)	-153.3
7	<b>54d</b> (R = 3-Cl)	B	<b>55d</b> : R = 9-Cl (61%)	-164.5
8	<b>54e</b> (R = 2-Cl)	B	<b>55e</b> : R = 8-Cl (43%)	-147.8

<sup>a</sup> Unless otherwise noted, the reaction was carried out under the following conditions. Condition A: amido-acetal **54** (0.3 mmol) and CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (3 mmol) at room temperature for 48 h. Condition B: amido-acetal **54** (0.3 mmol) and concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.8 mmol) at room temperature for 14 h.

<sup>b</sup> Isolated yield after column chromatography.

<sup>c</sup> *c* = 0.5, CHCl<sub>3</sub>.

<sup>d</sup> 8 h.

<sup>e</sup> CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (1.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.2 ml).

<sup>f</sup> 70°C, 1 h.

<sup>g</sup> Complex mixture.

<sup>h</sup> The cyclized product was not detected.

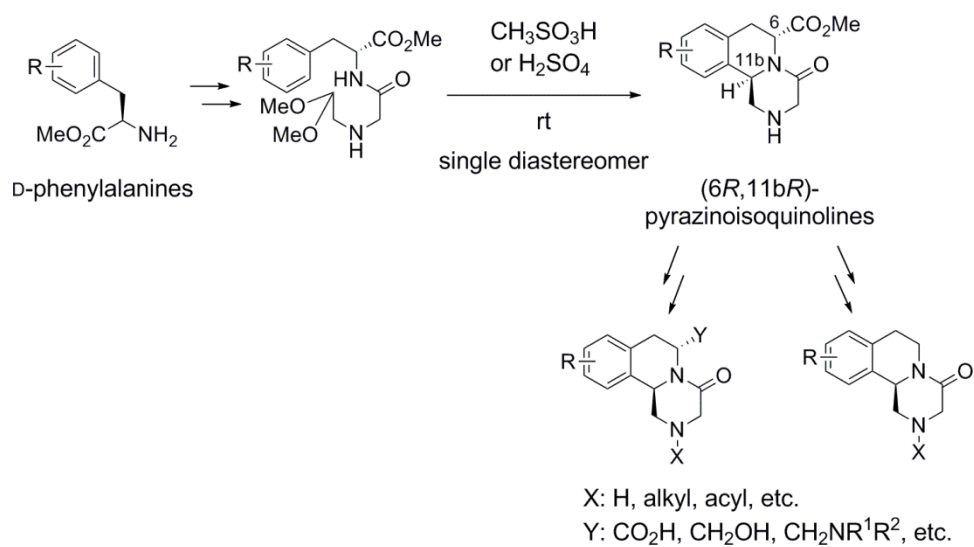
#### 第四節 本章のまとめ

筆者は、心毒性に対するリスクがより低減された  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の創製を目指して、第二章で見出されたピロリジン誘導体 **29e** から更なる合成展開を実施し、その結果、高活性でかつ心臓に対して高い安全性を有する化合物の取得に至った (Figure 5). この高活性化合物は、その部分構造としてピラジノイソキノリン骨格を有しており、既存の合成法では本骨格の立体選択的合成は不可能であったため、本章では新規骨格構築法の開発を行った。

筆者は (1) 入手容易な不斉源を用い、(2) 簡便に三環性骨格を構築でき、かつ (3) 基質多様性のある反応であることを新規骨格構築法開発の目的として、反応の開発を行った。その結果、光学活性なフェニルアラニン誘導体のタンデム環化による、簡便で高立体選択的なピラジノイソキノリン骨格の構築法の開発に成功した。本手法により、D-フェニルアラニンから容易に誘導される環状 N-アシルイミニウムイオン中間体の Brønsted 酸を用いた Pictet-Spengler 反応により、6*R*,11*bR*-トランスの立体化学をもつピラジノイソキノリン骨格を、一挙に高いジアステレオ選択性で構築することが可能となった。さらに本反応では濃硫酸を用いることにより、従来合成が非常に困難であった電子欠損のフェニルアラニン誘導体からも、十分な収率、かつ高いジアステレオ選択性で目的の環化体を得ることが可能であることが分かった。本骨格構築法を用いることで、様々な置換基を有するピラジノイソキノリン誘導体の合成が可能である。また本手法で得られるピラジノイソキノリン誘導体から更なる置換基導入や置換基変換が可能であり、多様な薬理活性が期待されているピラジノイソキノリン誘導体のライブラリー合成法としても応用可能であると考えられる (Figure 25)。

したがって本骨格構築法は、本研究において見出された  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の部分構造の合成法としての用途のみならず、ピラジノイソキノリン誘導体を持つ生理活性や薬理活性を解明する上においても、非常に有用であると考えられる。

Figure 25. 新規ピラジノイソキノリン骨格構築法の応用可能性.



## 結語

筆者は、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬が臨床で有効な脳梗塞急性期治療薬になり得ると考えて本研究を開始した。白質傷害が主体のヒト脳梗塞において、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬は  $\text{Na}^+$  の流入による神経細胞死や細胞傷害性浮腫を抑制することによって脳梗塞を減少させ、神経症状や脳浮腫を改善することが期待できる。また虚血状態では持続的な脱分極が引き起こされていることから、 $\text{Na}^+$  チャネルの活性化状態の持続に関連している site 2 を特異的に遮断する  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬は、神経細胞傷害を強く抑制する脳梗塞治療薬となり得ると考えられる。一方で、既存の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬は薬物性 QT 延長症候群を理由に臨床試験を中断したこと、また脳梗塞患者では心臓に既往歴を持つケースが想定されることから、筆者は特に心臓に対する安全性に留意した創薬研究を行う必要があると考えた。したがって本研究では、選択性が高く、心臓に対する安全性が確保された site 2 を阻害する  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の創製を目指した。

HTS により得られたアクティブ化合物から合成展開を開始し、3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール系統（第一章）およびピロリジン系統（第二章）という 2 つの異なるケモタイプから、本研究開始当時臨床試験を実施していた対照化合物（SUN N8075, crobenetine）と同等以上の薬理活性、および安全性を示す化合物の取得を目的として、化合物の設計と合成を行った。

第一章では、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性と、臨床における副作用として薬剤性パーキンソニズムの発現が疑われるドパミン  $\text{D}_2$  受容体に対する親和性との乖離を目的として、3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール誘導体の設計と合成を行った。対照薬 SUN N8075 との構造類似性から、筆者は 3-アミノ-1-(5-インダニルオキシ)-2-プロパノール部位を  $\text{Na}^+$  チャネル阻害のファーマコフォアとみなし、ドパミン  $\text{D}_2$  受容体拮抗作用を有する化合物に広く共通のアミン構造からの脱却を図ることを目的に、アミン部位の合成展開を実施した。その結果、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害活性とドパミン  $\text{D}_2$  受容体結合親和性が乖離した化合物を複数取得した。また得られた構造活性相関より、ビアリアルピペリジンおよびビアリアルピペラジンの末端芳香環が、ドパミン  $\text{D}_2$  受容体に対する結合を妨げている可能性が示唆された。また  $\text{ClogD}$  値を脳移行性の指標に用いて化合物設計を行った結果、 $\text{ClogD}$  値が低下し、ラット肝ミクロソームにおける代謝安定性が良好な化合物 **4b** を取得した。化合物 **4b** は、site 2 に対して対照薬である SUN N8075 より強い結合阻害作用を有しており、またラット一過性



MCA 閉塞モデルにおいて、SUN N8075 と同等の脳梗塞抑制作用を有することが示された。したがって、化合物 **4b** はヒット化合物として有用な化合物であると考えられ、化合物 **4b** から従来の薬剤の課題であった hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害作用の低下に向けて、さらなる合成展開を実施した。

第二章では臨床において大きな問題となっていた薬物性 QT 延長のリスク低減を目的として、新規ピロリジン誘導体の設計と合成を行った。臨床試験を実施していた既存の Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬はすべて強い hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害作用を有しており、また化合物 **4b** も同様に強い hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害作用を有していたため、hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害作用を指標に合成展開を実施した。ピロリジン誘導体は、化合物 **4b** のアミン部位変換の過程において見出された Na<sup>+</sup> チャネル阻害活性を有する骨格である。ピロリジン誘導体の hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性の低減に向けた戦略として、薬物-hERG 相互作用において疎水性相互作用に関わるとされている、Phe656 に着目した化合物設計を行った。すなわち、ピロリジン誘導体の 1, 3, および 4 位に、Phe656 との疎水性相互作用を回避し得るような置換基として、シクロヘキシル基を有する置換基を導入した化合物を設計し合成した。その結果、ピロリジン環 3 位の置換基が、hERG K<sup>+</sup> チャネルとの相互作用に関与していることが示唆され、また 3 位のシクロヘキシル基が hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害作用の低減に非常に重要な置換基であることが示された。本研究により見出された化合物 **29e** は Na<sup>+</sup> チャネルの site 2 を阻害し、ラット一過性 MCA 閉塞モデルにおいて、後投与でも有意な脳梗塞体積抑制作用を有することが示された。また化合物 **29e** と対照薬 crobenetine の活動電位測定試験の結果から、化合物 **29e** は QT 延長作用のリスクが低く、crobenetine と比較して心臓に対する影響がより軽減された化合物であることが示唆された。以上の結果より、hERG K<sup>+</sup> チャネル阻害活性が減弱した Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬は、強い神経保護作用を有し、かつ従来の Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬で問題とされていた薬物性 QT 延長リスクが低いことが示唆された。したがって Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬は、臨床において安全で有効な脳梗塞治療薬となり得ると考えられる。

筆者は、心毒性に対するリスクがより低減された Na<sup>+</sup> チャネル阻害薬の創製を目指して、第二章で見出されたピロリジン誘導体 **29e** から更なる合成展開を実施した。その結果、部分構造としてピラジノイソキノリン骨格を有する化合物が、高活性でかつ心臓に対して高い安全性を示すことが分かった (Figure 5)。しかしながら、既存の合成法では本骨格の効率的、かつ立体選択的な合成が困難であったことから、第三章ではピラジノイソキノリン骨格の高ジアステレオ選択的な新規構築法の開発を行った。その結果、市販の光学活性なフェニルア

ラニン誘導体を出発原料とし、これから誘導される環状 *N*-アシルイミニウムイオン中間体の 1,3-キラル転移を伴う Pictet–Spengler 反応により、6,11b-トランスの立体化学をもつピラジノイソキノリン骨格を高ジアステレオ選択的に構築できることを明らかにした。本合成法は市販原料の不斉点を基に新たな不斉点を導入しながら、一挙に三環性の骨格を構築できる簡便な骨格構築法である。また従来の骨格構築法では合成が困難であった、芳香環上に電子供与性基を有さない基質に対しても、本合成法の適用が可能であることを示した。本骨格構築法を用いることにより多様なピラジノイソキノリン誘導体の合成が可能になると考えられ、また本反応で得られるピラジノイソキノリン誘導体から更なる置換基導入や置換基変換が可能であることから、本研究において見出された  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の部分構造の合成法としての用途のみならず、現在注目されているピラジノイソキノリン誘導体の生理活性や薬理活性を解明する上でも、非常に有用な合成法であると考えられる。

本論文は脳梗塞急性期治療薬を目指した  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の探索研究について述べた。第一章、第二章では、site 2 を阻害する  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬が、ラット脳梗塞モデルにおいて神経保護作用を発現することを確認した。また既存の  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬において大きな課題となっていた、心臓に対する安全性の問題に対しても、主薬効との乖離が可能であることが本研究より示された。従来の脳梗塞治療薬は、臨床試験において効果が認められない、もしくは QT 延長作用に代表される心臓に対する安全性の問題から中断を余儀なくされていた。本研究の結果から、心毒性に対するリスクがより低減された  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬の創製が可能であれば、臨床において有効性を示し、かつ安全性の高い脳梗塞急性期治療薬になり得ると考えられる。また本研究で確立したピラジノイソキノリン骨格の簡便な構築法は、ピラジノイソキノリンの化学に更なる発展をもたらすものと考えられる。

## 実験の部

### General Information

Melting point (mp) was determined on a Büchi B-535 melting point apparatus and uncorrected.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker ARX300, AVANCE400, or AVANCE600 spectrometer, and chemical shifts are expressed in  $\delta$  (ppm) values with tetramethylsilane as an internal standard. Abbreviations for signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad peak. IR spectra were obtained with a PerkinElmer Spectrum One FT-IR spectrometer. Elemental analyses were performed with a PerkinElmer 2400 II (C, H, N) and were within  $\pm 0.4\%$  of theoretical values. Analytical HPLC was conducted on a Capcellpak  $\text{C}_{18}$  column (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 250 mm) eluted with 0.05% (v/v) TFA in water (solvent A) and 0.05% (v/v) TFA in acetonitrile (solvent B), according to the following elution gradient: 5–100% B over 40 min at a flow rate of 1.0 ml/min. LC/MS spectra were recorded on a Waters LC/MS system using a Acquity UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  column (2 $\times$ 50 mm) coupled with micromass ZQ as a MS detector, and a gradient of 5–98% B over 1 min was used. Mass spectra were obtained on a ThermoFisher FINNIGAN LXQ mass spectrometer. HRMS spectra were recorded on LTQ Orbitrap Velos Pro mass spectrometer equipped with an ESI Lockspray source for accurate mass values. Specific optical rotations were recorded on a Jasco P-2000 polarimeter. X-ray crystallographic intensity data for compound **49** was measured on a Rigaku AFC7R diffractometer using filtered  $\text{Cu-K}\alpha$  radiation and a rotating anode generator.

### 第一章に関する実験

**1-(4-Phenoxyphenyl)piperazine (6)**. A mixture of 4-phenoxyaniline (**5**) (5.0 g, 27.0 mmol) and 2,2'-dichloroethylamine hydrochloride (4.8 g, 27.0 mmol) was heated to 200°C with stirring for 4 h. After cooling, 1 N aqueous NaOH was added, and the whole was extracted with ethyl acetate (EtOAc). The extract was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$ ) to give **6** as a pale yellow solid (4.4 g, 64% yield). Mp 114°C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.03–3.06 (m, 4H),

3.09–3.12 (m, 4H), 6.90–7.05 (m, 7H), 7.27–7.32 (m, 2H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 255.3  $[M+H]^+$ .

***tert*-Butyl 4-Biphenyl-4-yl-4-hydroxypiperidine-1-carboxylate (8a).** A 0.5 N solution of 4-biphenyl magnesium bromide (11 ml, 5.5 mmol) in tetrahydrofuran (THF) was added dropwise to a solution of *tert*-butyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate (**7a**) (1.0 g, 5.0 mmol) in THF (25 ml) at 0°C under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred for 2 h at the same temperature. 1 N aqueous HCl was then added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc= 4/1) to give **8a** as a colorless solid (0.58 g, 33% yield). Mp 159–163°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.49 (s, 9H), 1.78 (d,  $J$ = 12.3 Hz, 2H), 2.04 (m, 2H), 3.27 (t,  $J$ = 12.3 Hz, 2H), 4.04 (m, 2H), 7.35 (t,  $J$ = 7.5 Hz, 1H), 7.44 (t,  $J$ = 7.5 Hz, 2H), 7.53–7.62 (m, 6H); MS (APCI)  $m/z$ : 352  $[M-H]^-$ .

***tert*-Butyl 4-[4-(Benzyloxy)phenyl]-4-hydroxypiperidine-1-carboxylate (8b).** This compound was prepared as a colorless solid (55% yield) by the same procedure as described for **8a** using 4-benzyloxyphenyl magnesium bromide prepared from (4-benzyloxy)bromobenzene instead of 4-biphenyl magnesium bromide. Mp 123°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.48 (s, 9H), 1.72–1.75 (m, 2H), 1.97 (m, 2H), 3.24 (t,  $J$ = 12.3 Hz, 2H), 4.00 (br s, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.95–6.98 (m, 2H), 7.32–7.35 (m, 1H), 7.36–7.44 (m, 6H); MS (APCI)  $m/z$ : 383  $[M-H]^-$ .

**Ethyl 4-Biphenyl-4-yl-4-hydroxypiperidine-1-carboxylate (8c).** This compound was prepared as a colorless solid (36% yield) by the same procedure as described for **8a** using ethyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate (**7c**) instead of **7a**. Mp 95–100°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.29 (t,  $J$ = 7.2 Hz, 3H), 1.80 (d,  $J$ = 12.6 Hz, 2H), 2.05 (m, 2H), 3.32 (t,  $J$ = 13.1 Hz, 2H), 4.14 (m, 2H), 4.17 (q,  $J$ = 7.2 Hz, 2H), 7.35 (t,  $J$ = 7.2 Hz, 1H), 7.45 (t,  $J$ = 7.4 Hz, 2H), 7.53–7.62 (m, 6H); MS (APCI)  $m/z$ : 324  $[M-H]^-$ .

**4-Biphenyl-4-ylpiperidin-4-ol (8d).** A mixture of **8c** (1.4 g, 4.2 mmol) and 5 N aqueous NaOH (10 ml) in ethanol (20 ml) was refluxed overnight, and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with H<sub>2</sub>O, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on NH-silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH= 2/1) to give **8d** as a colorless solid (0.74 g, 70% yield). Mp 183–186°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.77–1.81 (m, 2H),

2.08 (dt,  $J = 12.8, 4.5$  Hz, 2H), 2.98–3.02 (m, 2H), 3.15 (dt,  $J = 12.0, 2.4$  Hz, 2H), 7.34 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 7.44 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 7.58–7.61 (m, 6H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 254.4  $[M+H]^+$ .

**4-Bihenyl-4-yl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (9a).** To a solution of **8a** (0.58 g, 1.6 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (5 ml) was added TFA (1.4 ml) at  $0^\circ C$ . After stirring for 6 h at room temperature, the reaction mixture was poured into 1 N aqueous NaOH, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous  $MgSO_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure to give compound **9a** as a colorless solid (0.33 g, 69% yield). Mp  $261^\circ C$ ;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2.48–2.57 (m, 2H), 3.15 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 3.58 (q,  $J = 2.9$  Hz, 2H), 6.19–6.21 (m, 1H), 7.32–7.36 (m, 1H), 7.42–7.48 (m, 4H), 7.56–7.61 (m, 4H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 236.4  $[M+H]^+$ .

**4-[4-(Benzyloxy)phenyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridine (9b).** To a solution of **8d** (1.53 g, 4.0 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (20 ml) was added TFA (3.1 ml) at  $0^\circ C$ . After stirring for 1 h at room temperature, the reaction mixture was poured into 1 N aqueous NaOH, and the precipitate was collected by filtration to give compound **9b** as a colorless solid (1.03 g, 97% yield).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2.40–2.50 (m, 2H), 3.12 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 3.53 (dd,  $J = 5.7, 2.6$  Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.00–6.09 (m, 1H), 6.94 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.29–7.35 (m, 3H), 7.36–7.46 (m, 4H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 266.3  $[M+H]^+$ .

**4-Biphenyl-4-ylpiperidine (10a).** To a solution of **9a** (0.32 g, 1.2 mmol) in MeOH (20 ml) and  $H_2O$  (5 ml) was added 10% palladium on carbon (0.10 g), and the mixture was stirred at  $60^\circ C$  under hydrogen atmosphere for 4 h. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate was evaporated under reduced pressure. To the residue was added 1 N aqueous NaOH, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous  $MgSO_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure to give compound **10a** as a colorless solid (0.22 g, 80% yield). Mp  $109$ – $114^\circ C$ ;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.68 (dq,  $J = 12.5, 3.9$  Hz, 2H), 1.88 (d,  $J = 13.2$  Hz, 2H), 2.63–2.68 (m, 1H), 2.77 (dt,  $J = 12.2, 2.4$  Hz, 2H), 3.21 (d,  $J = 12.0$  Hz, 2H), 7.29–7.35 (m, 3H), 7.43 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.56 (dd,  $J = 11.6, 7.7$  Hz, 4H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 238.4  $[M+H]^+$ .

**tert-Butyl 4-(4-Pyridin-3-ylphenyl)piperidine-1-carboxylate (10b).** To a solution of **9b** (0.98 g, 3.7 mmol) in THF (20 ml) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (0.89 g, 4.1 mmol). The mixture was heated to reflux with stirring for 3 h, and then the solution was evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous  $MgSO_4$ , and the solvent was evaporated under re-

duced pressure. The resulting crystals were dissolved in ethanol (14 ml) and THF (7 ml), and 10% palladium on carbon (0.34 g) was added. The mixture was then stirred at 50°C under hydrogen atmosphere for 5 h. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate was evaporated under reduced pressure. To the resulting crystals and pyridine (0.35 ml) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) was added dropwise a solution of trifluoromethanesulfonic anhydride (0.52 ml) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 ml) at 0°C. After stirring for 1 h at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residual oil was dissolved in toluene (10 ml) and ethanol (1.0 ml). To the solution was added pyridine-3-boronic acid (0.35 g, 2.8 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (0.13 g, 0.12 mmol), and 2 N aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.3 ml). The mixture was then heated to 100°C with stirring for 15 h. After cooling, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc= 2/1) to give **10b** (0.67 g, 4 steps 54% yield) as a colorless solid. Mp 104°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.49 (s, 9H), 1.61–1.71 (m, 2H), 1.85–1.88 (m, 2H), 2.68–2.74 (m, 1H), 2.77–2.93 (m, 2H), 4.27 (m, 2H), 7.31–7.38 (m, 3H), 7.54 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 7.85–7.88 (m, 1H), 8.58 (dd, *J*= 5.1, 1.5 Hz, 1H), 8.84 (m, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 339.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**3-(4-Piperidin-4-ylphenyl)pyridine Dihydrochloride (10c).** To a solution of **10b** (0.59 g, 1.7 mmol) in EtOAc (8 ml) was added 2 N HCl/MeOH solution (8.7 ml). After stirring for 1 h at room temperature, the precipitate was collected by filtration to give compound **10c** as a colorless solid (0.48 g, 89% yield). Mp 276–280°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.92–2.03 (m, 2H), 2.11–2.15 (m, 2H), 3.04 (tt, *J*= 12.3, 3.6 Hz, 1H), 3.15–3.21 (m, 2H), 3.52–3.55 (m, 2H), 7.53 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 7.83 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 8.15 (dd, *J*= 8.2, 5.7 Hz, 1H), 8.82 (d, *J*= 5.7 Hz, 1H), 8.89–8.92 (m, 1H), 9.17 (d, *J*= 2.1 Hz, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 239.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-(5-Bromopyridin-2-yl)piperazine-1-carboxylate (12a).** A mixture of *tert*-butyl piperazine-1-carboxylate (**11**) (5.0 g, 26.9 mmol), 2,5-dibromopyridine (6.4 g, 26.9 mmol), and *N,N*-diisopropylethylamine (6.9 g, 51.7 mmol) in *N*-methylpyrrolidone (70 ml) was heated to 120°C with stirring for 5 h. After cooling, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc= 10/1) to give

**12a** as a pale yellow solid (4.5 g, 49% yield). Mp 89°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.48 (s, 9H), 3.47–3.57 (m, 8H), 6.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H); MS (APCI) *m/z*: 342, 344 [M+H]<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-(6-Chloropyridazin-3-yl)piperazine-1-carboxylate (12b)**. This compound was prepared as a pale yellow solid (62% yield) by the same procedure as described for **12a** using 3,6-dichloropyridazine instead of 2,5-dibromopyridine. Mp 172°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.49 (s, 9H), 3.56–3.62 (m, 8H), 6.90 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 299.0 [M+H]<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-(5-Phenylpyridin-2-yl)piperazine-1-carboxylate (13a)**. To a solution of **12a** (0.68 g, 2.0 mmol) and 2 N aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 ml) in dioxane (10 ml) was added phenylboronic acid (0.36 g, 3.0 mmol) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (0.11 g, 0.10 mmol). The mixture was heated to 100°C with stirring for 6 h. After cooling, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc = 4/1) to give **13a** as a pale yellow solid (0.52 g, 77% yield). Mp 133–137°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.46 (s, 9H), 3.58 (m, 8H), 6.73 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.31–7.34 (m, 1H), 7.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.51–7.54 (m, 2H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 340.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-(6-Phenylpyridazin-3-yl)piperazine-1-carboxylate (13b)**. This compound was prepared as a pale yellow solid (64% yield) by the same procedure as described for **13a** using **12b** instead of **12a**. Mp 177–180°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.50 (s, 9H), 3.59–3.62 (m, 4H), 3.71 (m, 4H), 7.00 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.41–7.51 (m, 3H), 7.69 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 2H); LC/MS (ESI) *m/z*: 341.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-(4-Pyridin-3-ylphenyl)piperazine-1-carboxylate (13c)**. This compound was prepared as a pale yellow solid (47% yield) by the same procedure as described for **13a** using commercially available **12c** instead of **12a** and pyridine-3-boronic acid instead of phenylboronic acid. Mp 150°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.49 (s, 9H), 3.20–3.23 (m, 4H), 3.59–3.63 (m, 4H), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.32 (dd, *J* = 7.8, 5.1 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.82–7.85 (m, 1H), 8.53 (dd, *J* = 5.1, 1.5 Hz, 1H), 8.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 340.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**1-(5-Phenylpyridin-2-yl)piperazine (14a)**. To a solution of **13a** (0.52 g, 1.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) was added TFA (2 ml) at 0°C. After stirring for 1 h at room tempera-

ture, the reaction mixture was poured into 1 N aqueous NaOH, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure to give compound **14a** as a colorless solid (0.33 g, 90% yield). Mp 150–153°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.00–3.03 (m, 4H), 3.54–3.58 (m, 4H), 6.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.31–7.45 (m, 1H), 7.40–7.45 (m, 2H), 7.51–7.54 (m, 2H), 7.72 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 8.45 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 240.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**3-Phenyl-6-piperazin-1-ylpyridazine (14b)**. This compound was prepared as a pale yellow solid (83% yield) by the same procedure as described for **14a** using **13b** instead of **13a**. Mp 156–158°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.02–3.05 (m, 4H), 3.68–3.70 (m, 4H), 6.98 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 7.38–7.42 (m, 1H), 7.45–7.49 (m, 2H), 7.66 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 8.00–8.02 (m, 2H); LC/MS (ESI) *m/z*: 241.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**1-(4-Pyridin-3-ylphenyl)piperazine (14c)**. This compound was prepared as a pale yellow solid (81% yield) by the same procedure as described for **14a** using **13c** instead of **13a**. Mp 156–158°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.04–3.08 (m, 4H), 3.21–3.24 (m, 4H), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.32 (dd, *J* = 8.0, 4.5 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.81–7.85 (m, 1H), 8.52 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 1H), 8.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 240.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**Ethyl Spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidine]-1'-carboxylate (15a)**. This compound was synthesized as colorless oil (85% yield) by the procedure of Kubota *et al.*<sup>21)</sup> <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.71–1.75 (m, 2H), 1.84 (dt, *J* = 13.0, 4.8 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 12.2 Hz, 2H), 4.09–4.14 (m, 2H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.08 (s, 2H), 7.07–7.10 (m, 1H), 7.20–7.29 (m, 3H); LC/MS (ESI) *m/z*: 262.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**Spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidine] (15b)**. This compound was synthesized as a colorless solid (83% yield) by the procedure of Kubota *et al.*<sup>21)</sup> Mp 88–89°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.73–1.91 (m, 4H), 3.01–3.11 (m, 4H), 5.08 (s, 2H), 7.13–7.16 (m, 1H), 7.21–7.29 (m, 3H); LC/MS (ESI) *m/z*: 190.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 3-Phenyl-1-oxa-2,4,8-triazaspiro[4,5]dec-2-ene-8-carboxylate (16a)**. A mixture of **7c** (5.0 g, 29.2 mmol), benzamidoxime (4.0 g, 29.2 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (1.0 g, 5.8 mmol) in toluene (30 ml) was heated to reflux with a Dean-Stark apparatus for 7 h. After cooling, the resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from 2-propanol/EtOAc to give **16a** as a colorless solid (4.2 g, 50% yield). Mp 189°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.73–1.83 (m, 2H), 2.04–2.08 (m, 2H), 3.40 (ddd, *J* = 13.8, 10.8, 3.0 Hz, 2H),



3.91–3.95 (m, 2H), 4.16 (q,  $J=7.2$  Hz, 2H), 4.43 (br s, 1H), 7.39–7.47 (m, 3H), 7.68 (td,  $J=6.3, 1.8$  Hz, 2H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 290.4  $[M+H]^+$ .

**3-Phenyl-1-oxa-2,4,8-triazaspiro[4,5]dec-2-ene (16b).** A mixture of **16a** (4.2 g, 14.6 mmol) and  $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$  (6.4 g, 20.4 mmol) in ethanol (30 ml) and  $H_2O$  (20 ml) was heated to reflux with stirring overnight. The mixture was then evaporated under reduced pressure, and the residue was diluted with  $H_2O$ . The resulting precipitate was removed by filtration, and the filtrate was extracted with  $CH_2Cl_2$ . The extract was dried over anhydrous  $MgSO_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was washed with hexane/EtOAc (1/1) to give **16b** as a colorless solid (2.2 g, 68% yield). Mp 169°C;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.79–1.85 (m, 2H), 2.0–2.06 (m, 2H), 2.93–2.97 (m, 2H), 2.99–3.08 (m, 2H), 4.45 (br s, 1H), 7.27–7.46 (m, 3H), 7.68–7.71 (m, 2H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 218.3  $[M+H]^+$ .

***tert*-Butyl 1-(Trifluoroacetyl)-1,2-dihydro-1'*H*-spiro[indole-3,4'-piperidine]-1'-carboxylate (18a).** To a solution of commercially available *tert*-butyl 1,2-dihydro-1'*H*-spiro[indole-3,4'-piperidine]-1'-carboxylate (**17**) (0.8 g, 2.8 mmol) and triethylamine (0.46 ml, 3.3 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (10 ml) was added trifluoroacetic anhydride (0.41 ml, 2.9 mmol) at 0°C. After stirring for 4 h at the same temperature,  $H_2O$  was added, and the whole was extracted with  $CH_2Cl_2$ . The extract was dried over anhydrous  $MgSO_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc= 5/1) to give **18a** as a colorless solid (0.99 g, 92% yield). Mp 124–125°C;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.49 (s, 9H), 1.66–1.70 (m, 2H), 1.88 (dt,  $J=13.2, 4.2$  Hz, 2H), 2.89 (t,  $J=12.6$  Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 4.19 (m, 2H), 7.21 (d,  $J=4.2$  Hz, 2H), 7.29–7.35 (m, 1H), 8.20 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H); MS (APCI)  $m/z$ : 402  $[M+NH_4]^+$ .

**2,2,2-Trifluoro-1-(spiro[indole-3,4'-piperidin]-1-(2*H*)-yl)ethanone (18b).** To a solution of **18a** (0.97 g, 2.5 mmol) in EtOAc (10 ml) was added 4 N HCl/EtOAc solution (6 ml). After stirring for 6 h at room temperature, saturated  $NaHCO_3$  solution was added, and the whole was extracted with  $CH_2Cl_2$ . The extract was dried over anhydrous  $MgSO_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure to give **18b** as pale yellow oil (0.41 g, 58% yield).  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.67–1.71 (m, 2H), 1.95 (dt,  $J=13.2, 4.5$  Hz, 2H), 2.78 (dt,  $J=12.6, 2.4$  Hz, 2H), 3.16–3.20 (m, 2H), 4.13 (s, 2H), 7.19–7.34 (m, 3H), 8.19 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 285.3  $[M+H]^+$ .

***tert*-Butyl 4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidine-1-carboxylate (20a).** To a solution of *tert*-butyl 4-(ethoxycarbonyl)-piperidine-1-carboxylate (**19**) (6.4 g, 25.0

mmol) in THF (20 ml) and ethanol (20 ml) was added benzamidoxime (3.4 g, 25.0 mmol), then NaOEt (1.7 g, 25 mmol). After stirring for 3 h at 70°C, 1 N aqueous HCl was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc= 4/1) to give **20a** as a colorless solid (2.8 g, 34% yield). Mp 101–102°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.48 (s, 9H), 1.85–1.95 (m, 2H), 2.12 (dd, *J*= 13.1, 3.3 Hz, 2H), 3.00 (t, *J*= 11.6 Hz, 2H), 3.15–3.20 (m, 1H), 4.11–4.14 (m, 2H), 7.44–7.54 (m, 3H), 8.03–8.11 (m, 2H); MS (APCI) *m/z*: 330 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidine Hydrochloride (20b).** To a solution of **20a** (0.99 g, 3.0 mmol) in EtOAc (3 ml) was added 4 N HCl/EtOAc solution (3 ml). After stirring for 4 h at room temperature, the resulting precipitate was collected by filtration and washed with EtOAc to give **20b** as a colorless solid (0.79 g, 99% yield). Mp 250–251°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 2.15 (dtd, *J*= 14.8, 12.0, 3.9 Hz, 2H), 2.41–2.46 (m, 2H), 3.21–3.27 (m, 2H), 3.49–3.56 (m, 3H), 7.49–7.57 (m, 3H), 8.04–8.07 (m, 2H); LC/MS (ESI) *m/z*: 230.0 [M+H]<sup>+</sup>.

**Benzyl 4-(1H-Benzimidazol-2-yl)piperidine-1-carboxylate (22a).** To a solution of anhydrous ethanol (16 ml) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (18 ml) was added dropwise acetyl chloride (18 ml) at 0°C. To the reaction mixture was added dropwise benzyl 4-cyanopiperidine-1-carboxylate (**21**) (2.1 g, 8.4 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) at the same temperature. After stirring for 2 h at room temperature, the resulting precipitate was collected by filtration and then dissolved in anhydrous ethanol (50 ml). To the solution was added *o*-phenylenediamine (1.2 g, 11.0 mmol), and the mixture was heated to reflux with stirring for 4 h. After cooling, 1 N aqueous NaOH was added, and the whole was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The extract was washed with 1 N aqueous HCl, then brine, and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH= 10/1) to give **22a** as a colorless solid (2.6 g, 92% yield). Mp 185–186°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.64–1.77 (dq, *J*= 12.2, 4.1 Hz, 2H), 1.92–1.95 (m, 2H), 2.58–2.69 (m, 2H), 2.92 (tt, *J*= 11.6, 3.9 Hz, 1H), 3.00–3.09 (m, 2H), 7.06–7.15 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 12.11 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 336.0 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Piperidin-4-yl-1H-benzimidazole (22b).** To a solution of **22a** (2.5 g, 7.5 mmol) in MeOH (50 ml) was added 10% palladium on carbon (0.50 g), and the mixture was stirred at room temperature under hydrogen atmosphere for 4 h. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate was evaporated under reduced pressure to give **22b**

as a pale yellow solid (1.5 g, 99% yield). Mp 259–265°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.70 (dq, *J*= 12.2, 4.1 Hz, 2H), 1.92–1.95 (m, 2H), 2.60–2.66 (m, 2H), 2.92 (tt, *J*= 11.6, 3.9 Hz, 1H), 3.03–3.06 (m, 2H), 7.09–7.12 (m, 2H), 7.47 (br s, 2H), 12.11 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 202.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-[(2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)methyl]oxirane (24).** To a solution of 5-indanol (**23**) (10.0 g, 74.5 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) (100 ml) was added 60% sodium hydride in mineral oil (3.3 g, 82.0 mmol) at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for 30 min, then at room temperature for 1 h. To the resulting mixture was added epichlorohydrin (6.5 ml, 82.0 mmol) at 0°C. After stirring overnight at room temperature, 1 N aqueous HCl was added, and the whole was extracted with diethyl ether. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc= 20/1) to give **24** as colorless oil (10.3 g, 73% yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.08 (q, *J*= 7.5 Hz, 2H), 2.74 (dd, *J*= 5.0, 2.7 Hz, 1H), 2.81–2.91 (m, 5H), 3.33–3.35 (m, 1H), 3.95 (dd, *J*= 11.1, 5.4 Hz, 1H), 4.17 (dd, *J*= 11.1, 3.3 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J*= 8.1, 2.7 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 7.11 (d, *J*= 8.1 Hz, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 191.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**General procedure for the synthesis of 3-amino-1-(5-indanyloxy)-2-propanol derivatives (2a–g, 3a–c, and 4a–b).** A mixture of **24** and a corresponding piperidine (**8c**, **10a**, **10c**, **15b**, **16b**, **18b**, **20b**, and **22b**) or piperazine (**6** and **14a–c**) in 2-propanol was heated to reflux with stirring for 3 h. After cooling, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residual oil product was purified by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH= 30/1), or the crystalline product was collected by filtration. The obtained compounds were dissolved in EtOAc, and excess 4 N HCl/EtOAc solution was added. After stirring for 1 h at room temperature, the resulting precipitate was collected by filtration and washed with EtOAc to give the piperidine derivatives (**2b–d**, **3a–c**, or **4a,b**) or piperazine derivatives (**2a** or **2e–g**), respectively.

**1-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)-3-[4-(4-phenoxyphenyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol Hydrochloride (2a).** This compound was obtained in 83% yield from **6** as a colorless solid. Mp 163°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.96–2.06 (m, 2H), 2.78 (t, *J*= 7.5 Hz, 2H), 2.83 (t, *J*= 7.2 Hz, 2H), 3.02–3.20 (m, 2H), 3.22–3.32 (m, 4H), 3.58–3.82 (m, 4H), 3.88–3.99 (m, 2H), 4.39 (br s, 1H), 6.00 (br s, 1H), 6.72 (dd, *J*= 8.2, 2.6 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.92 (dd, *J*= 8.7, 1.0 Hz, 2H), 6.97–7.01 (m, 2H), 7.02–7.16 (m,

4H), 7.31–7.39 (m, 2H), 10.03 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 445.1  $[M+H]^+$ ; IR (ATR)  $\nu$  3235, 2944, 1585, 1509, 1485, 1451, 1240, 869, 765, 519  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ : C, 68.63; H, 6.99; N, 5.72; Found: C, 68.48; H, 6.86; N, 5.66.

**4-Biphenyl-4-yl-1-[3-(2,3-dihydro-1H-inden-5-yloxy)-2-hydroxypropyl]piperidin-4-ol Hydrochloride (2b).** This compound was obtained in 76% yield from **8d** as a colorless solid. Mp 228°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 1.85 (t,  $J=15.4$  Hz, 2H), 1.96–2.07 (m, 2H), 2.30–2.42 (m, 2H), 2.74–2.88 (m, 4H), 3.27–3.45 (m, 4H), 3.48–3.61 (m, 2H), 3.89–4.02 (m, 2H), 4.31–4.45 (m, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.96 (d,  $J=5.1$  Hz, 1H), 6.69–6.77 (m, 1H), 6.86 (s, 1H), 7.13 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.37 (t,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.47 (t,  $J=7.7$  Hz, 2H), 7.56 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.68 (m, 4H), 9.63 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 444.0  $[M+H]^+$ ; IR (ATR)  $\nu$  3312, 3179, 2924, 1604, 1488, 1473, 1049, 763, 635  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ : C, 72.56; H, 7.14; N, 2.92; Found: C, 72.36; H, 7.12; N, 2.89.

**1-(4-Biphenyl-4-ylpiperidin-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1H-inden-5-yloxy)propan-2-ol Hydrochloride (2c).** This compound was obtained in 79% yield from **10a** as a colorless solid. Mp 243°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 1.94–2.20 (m, 6H), 2.74–2.94 (m, 5H), 3.05–3.24 (m, 4H), 3.62–3.73 (m, 2H), 3.89–3.99 (m, 2H), 4.31–4.42 (m, 1H), 5.95 (d,  $J=5.1$  Hz, 1H), 6.73 (dd,  $J=8.0, 2.3$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.31–7.39 (m, 3H), 7.46 (t,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.61–7.69 (m, 4H), 9.60 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 428.1  $[M+H]^+$ ; IR (ATR)  $\nu$  3278, 2939, 1604, 1483, 1251, 1045, 832, 760, 693  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl} \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$ : C, 74.77; H, 7.40; N, 3.01; Found: C, 74.62; H, 7.24; N, 2.98.

**1-(2,3-Dihydro-1H-inden-5-yloxy)-3-[4-(4-pyridin-3-ylphenyl)piperidin-1-yl]propan-2-ol Dihydrochloride (2d).** This compound was obtained in 21% yield from **10c** as a colorless solid. Mp 216°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 1.95–2.22 (m, 6H), 2.78 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 2.83 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.88–2.98 (m, 1H), 3.25 (m, 4H), 3.63–3.74 (m, 2H), 3.90–4.01 (m, 2H), 4.34–4.44 (m, 1H), 6.69–6.77 (m, 1H), 6.86 (s, 1H), 7.13 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.42 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.70–7.83 (m, 3H), 8.33–8.43 (m, 1H), 8.69 (d,  $J=4.6$  Hz, 1H), 9.03 (s, 1H), 9.66 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 429.0  $[M+H]^+$ ; IR (ATR)  $\nu$  3281, 2918, 2662, 1473, 1044, 808  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ : C, 63.63; H, 7.06; N, 5.30; Found: C, 63.28; H, 7.01; N, 5.24.

**1-(2,3-Dihydro-1H-inden-5-yloxy)-3-[4-(5-phenylpyridin-2-yl)piperazin-1-yl]propan-2-ol Dihydrochloride (2e).** This compound was obtained in 46% yield from **14a** as

a colorless solid. Mp 237°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.95–2.06 (m, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.10–3.43 (m, 6H), 3.60–3.71 (m, 2H), 3.89–3.99 (m, 2H), 4.32–4.52 (m, 3H), 6.72 (dd, *J* = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.31–7.38 (m, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.95–8.02 (m, 1H), 8.50 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 10.03 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 430.1 [M+H]<sup>+</sup>; IR (ATR) ν 3682, 3325, 2952, 2844, 2722, 1649, 1616, 1492, 1440, 1277, 1244, 1055, 1033, 990, 797, 757, 693 cm<sup>-1</sup>; *Anal.* Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·2HCl·0.5H<sub>2</sub>O: C, 63.40; H, 6.70; N, 8.22; Found: C, 63.66; H, 6.47; N, 8.20.

**1-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)-3-[4-(6-phenylpyridazin-3-yl)piperazin-1-yl]propan-2-ol Hydrochloride (2f).** This compound was obtained in 37% yield from **14b** as a colorless solid. Mp 229°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.95–2.05 (m, 2H), 2.80 (dt, *J* = 19.4, 7.3 Hz, 4H), 3.19–3.30 (m, 4H), 3.42–3.57 (m, 2H), 3.63–3.74 (m, 2H), 3.89–4.00 (m, 2H), 4.33–4.43 (m, 1H), 4.47–4.63 (m, 2H), 6.72 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.41–7.56 (m, 4H), 8.01–8.12 (m, 3H), 10.06 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 431.1 [M+H]<sup>+</sup>; IR (ATR) ν 3306, 2937, 2578, 1642, 1592, 1548, 1481, 1462, 1442, 1419, 1239, 1055, 1033, 779, 690 cm<sup>-1</sup>; *Anal.* Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·HCl·0.5H<sub>2</sub>O: C, 65.60; H, 6.78; N, 11.77; Found: C, 65.36; H, 6.47; N, 11.67.

**1-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)-3-[4-(4-pyridin-3-ylphenyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol Dihydrochloride (2g).** This compound was obtained in 75% yield from **14c** as a yellow solid. Mp 199°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.95–2.06 (m, 2H), 2.80 (dt, *J* = 19.8, 7.3 Hz, 4H), 3.22 (m, 4H), 3.61–3.74 (m, 4H), 3.88–4.05 (m, 4H), 4.34–4.44 (m, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.71–7.83 (m, 3H), 8.42–8.51 (m, 1H), 8.65 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 9.05 (s, 1H), 10.10 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 430.0 [M+H]<sup>+</sup>; IR (ATR) ν 3269, 2968, 2596, 1607, 1522, 1471, 1258, 1241, 1044, 1034, 799, 678, 618 cm<sup>-1</sup>; *Anal.* Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·2HCl·2H<sub>2</sub>O: C, 60.22; H, 6.93; N, 7.80; Found: C, 60.34; H, 6.70; N, 7.73.

**1-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)-3-(1'*H*,3*H*-spiro[2-benzofuran-1,4'-piperidin]-1'-yl)propan-2-ol Hydrochloride (3a).** This compound was obtained in 85% yield from **15b** as a colorless solid. Mp 207°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.85 (t, *J* = 15.7 Hz, 2H), 2.01 (m, 2H), 2.22–2.46 (m, 2H), 2.81 (dt, *J* = 19.8, 7.6 Hz, 4H), 3.19–3.38 (m, 4H), 3.55–3.65 (m, 2H), 3.88–4.02 (m, 2H), 4.32–4.42 (m, 1H), 5.06 (s, 2H), 5.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 7.09–7.20 (m, 2H), 7.30–7.39 (m, 3H), 9.73 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 380.0 [M+H]<sup>+</sup>; IR (ATR) ν 3681, 3215,

2937, 2844, 1606, 1494, 1475, 1252, 1046, 1038, 1017, 833, 749  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ : C, 69.30; H, 7.27; N, 3.37; Found: C, 68.97; H, 7.16; N, 3.32.

**1-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)-3-(3-phenyl-1-oxa-2,4,8-triazaspiro[4,5]dec-2-en-8-yl)propan-2-ol Hydrochloride (3b).** This compound was obtained in 87% yield from **16b** as a colorless solid. Mp 241°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1.99–2.15 (m, 6H), 2.80 (dt,  $J= 19.5, 7.5$  Hz, 4H), 3.17–3.40 (m, 4H), 3.62 (m, 2H), 3.87–3.99 (m, 2H), 4.31 (m, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.72 (d,  $J= 8.7$  Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 7.13 (d,  $J= 8.2$  Hz, 1H), 7.48–7.52 (m, 3H), 7.68 (d,  $J= 7.7$  Hz, 2H), 7.84 (m, 1H), 9.53 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 408.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; IR (ATR)  $\nu$  3682, 3234, 2938, 2667, 1607, 1513, 1461, 1433, 1051, 1033, 839, 770, 692  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$ : C, 64.93; H, 6.81; N, 9.46; Found: C, 64.71; H, 6.44; N, 9.36.

**1-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)-3-(1,2-dihydro-1'*H*-spiro[indole-3,4'-piperidin]-1'-yl)propan-2-ol Hydrochloride (3c).** This compound was obtained in 53% yield from **18b** as a colorless solid. Mp 250°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1.74–1.83 (m, 2H), 1.97–2.12 (m, 3H), 2.18–2.24 (m, 1H), 2.80 (dt,  $J= 19.8, 7.3$  Hz, 4H), 3.06–3.38 (m, 6H), 3.55 (m, 2H), 3.88–4.00 (m, 2H), 4.33 (m, 1H), 5.66 (br s, 1H), 5.97 (d,  $J= 4.6$  Hz, 1H), 6.51 (d,  $J= 7.7$  Hz, 1H), 6.60 (t,  $J= 7.2$  Hz, 1H), 6.71–6.73 (m, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.91–6.98 (m, 2H), 7.13 (d,  $J= 8.2$  Hz, 1H), 9.42 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 379.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; IR (ATR)  $\nu$  3244, 2961, 2837, 2693, 1606, 1486, 1463, 1251, 1048, 1033, 830, 734  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot 0.2\text{H}_2\text{O}$ : C, 68.87; H, 7.56; N, 6.69; Found: C, 68.55; H, 7.17; N, 6.65.

**1-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)-3-[4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-1-yl]propan-2-ol Hydrochloride (4a).** This compound was obtained in 35% yield from **20b** as a colorless solid. Mp 202°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1.97–2.29 (m, 4H), 2.35–2.43 (m, 2H), 2.80 (dt,  $J= 20.0, 7.1$  Hz, 4H), 3.15–3.30 (m, 4H), 3.63–3.77 (m, 2H), 3.91–3.99 (m, 2H), 4.33 (m, 1H), 5.98 (d,  $J= 4.6$  Hz, 1H), 6.71–6.73 (m, 1H), 6.82–6.85 (m, 1H), 7.10–7.14 (m, 1H), 7.57–7.63 (m, 3H), 8.00–8.08 (m, 2H), 9.58 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 420.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; IR (ATR)  $\nu$  3682, 3257, 2967, 2845, 2519, 1570, 1493, 1474, 1447, 1047, 1033, 1015, 695  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$ : C, 65.85; H, 6.63; N, 9.22; Found: C, 65.95; H, 6.48; N, 9.18.

**1-[4-(1*H*-Benzimidazol-2-yl)piperidin-1-yl]-3-(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yloxy)-propan-2-ol Dihydrochloride (4b).** This compound was obtained in 54% yield from **22b** as a colorless solid. Mp 264°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1.97–2.03 (m, 2H), 2.41 (m, 4H), 2.81 (dt,  $J= 19.8, 7.2$  Hz, 4H), 3.15–3.30 (m, 4H), 3.68–3.80 (m, 2H),

3.87–4.01 (m, 2H), 4.39 (m, 1H), 5.99 (br s, 1H), 6.73 (d,  $J= 8.7$ , 1H), 6.83–6.86 (m, 1H), 7.08–7.14 (m, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.72 (m, 2H), 9.58 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 392.1  $[M+H]^+$ ; IR (ATR)  $\nu$  3681, 2939, 2844, 2725, 1608, 1491, 1461, 1054, 1033, 1017, 819, 742  $\text{cm}^{-1}$ ; *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ : C, 60.89; H, 6.81; N, 8.88; Found: C, 60.74; H, 6.67; N, 8.79.

**Inhibitory effect on veratridine-induced  $\text{Na}^+$  channel depolarization.** The membrane potential of synaptosomes was measured according to the procedure of Aiuchi *et al.*<sup>25)</sup> The standard medium consisted of 132 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), and 10 mM glucose. Synaptosomes were prepared from rat brain membranes (male Wister rats, 7–15 weeks old). Fluorescence was measured with a spectrofluorometer (an excitation wavelength of 520 nm and an emission wavelength of 550 nm). Rhodamine 6G, each test compound, and veratridine were added to 1 ml of the standard medium in a fluorometer cuvette, and the initial fluorescence,  $f_i$ , was measured. Then, 50  $\mu\text{l}$  of synaptosome suspension was added to the cuvette, and the fluorescence in the steady state,  $f_s$ , was measured. The fluorescence,  $f$ , was defined as  $f = (f_s / f_i)$ .

**Binding affinity for dopamine  $\text{D}_2$  receptors.** A membrane fraction prepared from the striatum of female Lewis rats (450  $\mu\text{l}$ ) was incubated with each test compound and 0.2 nM  $[^3\text{H}]$ -spiperone in a buffer solution (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4) at 37°C for 20 min. Bound radioactivity was counted after rapid vacuum filtration through a GF/B glass filter. Nonspecific binding was determined using 100  $\mu\text{M}$  (-)-sulpiride.

**Effect of compound 4b on ischemic brain damage in a rat transient middle cerebral artery (MCA) occlusion model.** Wister rats (male, 8 weeks old) were anesthetized with halothane. They were then subjected to transient MCA occlusion for 90 min according to the modified method of Koizumi *et al.*,<sup>26)</sup> followed by reperfusion. Compound 4b was administered intraperitoneally immediately after both occlusion and reperfusion at a dose of 30 mg/kg (salt form) each time. Control rats that also underwent transient MCA occlusion received an equal volume of saline at the corresponding time points. The brains were dissected into 7 slices 24 h after the occlusion, and the slices were stained with TTC.<sup>25)</sup> The area of infarct tissue for each slice was determined with a computerized image analysis system, and the infarct volume was calculated.

**Binding affinity for  $[^3\text{H}]$ -BTX.**  $[^3\text{H}]$ -Batrachotoxin-A-20- $\alpha$ -benzoate (BTX-b) was purchased from PerkinElmer.  $[^3\text{H}]$ -BTX-b binding was measured in synaptosomal preparations of rat cerebral cortex using a modified procedure previously described. The

standard binding medium consisted of 130 mM chlorine chloride, 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (adjusted to pH 7.4 at 36°C with Tris base), 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 5.4 mM KCl, 1 mg/ml of bovine serum albumin. Binding reactions were initiated by addition of synaptosomes suspended in 100 μM of the standard binding medium to a reaction mixture containing 10 nM [<sup>3</sup>H]-BTX, 300 μM veratridine, and 30 μg/ml of scorpion toxin in 150 μM of the standard binding medium. Compound **4b** was mixed, and the reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C. The reactions were stopped by addition of 3 ml of ice-cold wash medium consisting of 163 mM chlorine chloride, 5 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (adjusted to pH 7.4 at 36°C with Tris base), 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mg/ml of bovine serum albumin. The synaptosomes were immediately collected on GF/C glass filters under vacuum and washed 3 times with 3 ml of the wash medium. The filters were suspended in liquid scintillation fluid, and bound radioactivity was counted in a liquid scintillation spectrometer. For reference: Catterall, W. A.; Morrow, C. S.; Daly, J. W.; Brown, G. B. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 8922.

***In vitro* metabolic stability in rat liver microsomes.** To a 0.1 N potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing a test compound (1 μM), 0.25 mg/ml of male rat liver microsomes, and 5 mM MgCl<sub>2</sub> was added 1 mM NADPH to start a reaction. After incubation for 0, 5, or 10 min at 37°C, acetonitrile was added to stop the reaction. The concentration of the test compound at each time point was measured by LC/MS. Hepatic intrinsic clearance (CL) was determined by the temporal changes in the concentration of the test compound.



## 第二章に関する実験

**(±)-*trans*-1-Benzyl-3-nitro-4-phenylpyrrolidine (27).** To a solution of *trans*-1-nitro-2-phenylethylene (**26**) (5.0 g, 33.5 mmol) and *N*-(methoxymethyl)-*N*-(trimethylsilylmethyl)benzylamine (8.8 g, 36.9 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) was added TFA (0.26 ml, 3.4 mmol) at 0°C, and the solution was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was poured into saturated NaHCO<sub>3</sub> solution, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with hexane to give **27** as a pale yellow solid (5.9 g, 62% yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.70 (t, *J*= 8.5 Hz, 1H), 3.08–3.18 (m, 1H), 3.30 (t, *J*= 8.7 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J*= 11.1, 3.9 Hz, 1H), 3.67–3.80 (m, 2H), 4.00–4.08 (m, 1H), 4.91–4.99 (m, 1H), 7.27–7.39 (m, 10H); LC/MS (ESI) *m/z*: 283.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-*trans*-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-ylamine Dihydrochloride (28).** To a solution of **27** (17.4 g, 61.6 mmol) in 2-propanol (120 ml), MeOH (30 ml), and H<sub>2</sub>O (30 ml) was added iron (17.2 g, 308 mmol) and acetic acid (8.5 g, 141 mmol). The mixture was heated to 80°C with stirring for 2 h. After cooling to room temperature, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21.5 g, 156 mmol) was added to the reaction mixture. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, and 4N HCl/EtOAc solution (35 ml) was added. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with EtOAc to give **28** as a pale yellow solid (18.1 g, 90% yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3.56–4.10 (m, 5H), 4.36 (m, 1H), 4.60 (s, 2H), 7.36–7.50 (m, 8H), 7.65 (m, 2H); LC/MS (ESI) *m/z*: 253.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-*trans*-*N*-(1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)benzamide (29a).** To a solution of **28** (0.15 g, 0.46 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 ml) was added benzoyl chloride (0.07 g, 0.51 mmol) and triethylamine (0.2 ml, 1.4 mmol) at 0°C. After stirring at 0°C for 30 min, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–50% hexane/EtOAc) to give **29a** as a colorless solid (0.07 g, 43% yield). Mp 177–178°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.52–2.60 (m, 1H), 2.98–3.08 (m, 2H), 3.36–3.46 (m, 2H), 3.77 (s, 2H), 4.78–4.82 (m, 1H), 6.91 (br s, 1H), 7.21–7.51 (m, 13H), 7.79 (d, *J*= 7.8 Hz, 2H); LC/MS (ESI) *m/z*: 357.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**Benzyl-((±)-*trans*-1-benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)amine Dihydrochloride (29b).**

To a solution of **29a** (0.07 g, 0.20 mmol) in THF (0.5 ml) was added 1 N boran tetrahydrofuran complex solution (0.8 ml), and the mixture was heated to 60°C with stirring for 8 h. To the reaction mixture was added dropwise MeOH (4 ml) and 6 N aqueous HCl (4 ml), and the mixture was heated to reflux with stirring for 3 h. After cooling, 10% aqueous NaOH was added, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (40–100% hexane/EtOAc) to give the target compound as colorless oil (0.35 g, 52% yield), which was subsequently converted to the dihydrochloride salt, **29b**, as a colorless solid. Mp 239–241°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3.47–3.53 (m, 1H), 3.98–4.23 (m, 6H), 4.47–4.51 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 7.39–7.57 (m, 12H), 7.64–7.65 (m, 2H); LC/MS (ESI) *m/z*: 343.1 [M+H]<sup>+</sup>.

(±)-*trans*-**N**-(1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)cyclohexanecarboxamide (**29c**). To a solution of **28** (0.31 g, 0.95 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) was added cyclohexanecarbonyl chloride (0.15 g, 1.0 mmol) and triethylamine (0.5 ml, 3.3 mmol) at 0°C. After stirring at 0°C for 2 h, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–50% hexane/EtOAc) to give **29c** as a colorless solid (0.12 g, 35% yield). Mp 148–149°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.17–1.29 (m, 2H), 1.34–1.43 (m, 2H), 1.66–1.82 (m, 6H), 1.98–2.05 (m, 1H), 2.45 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 2.77–2.78 (m, 1H), 2.90 (dd, *J* = 10.2, 8.6 Hz, 1H), 3.14–3.18 (m, 1H), 3.30 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.67 (s, 2H), 4.50–4.52 (m, 1H), 5.88 (br s, 1H), 7.19–7.34 (m, 10H); LC/MS (ESI) *m/z*: 363.1 [M+H]<sup>+</sup>.

(±)-*trans*-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)cyclohexylmethanamine Dihydrochloride (**29d**). To a solution of **29c** (0.10 g, 0.28 mmol) in THF (1 ml) was added 1 N boran tetrahydrofuran complex solution (4 ml), and the mixture was heated to 60°C with stirring for 2 h. To the reaction mixture was added dropwise MeOH (4 ml) and 6 N aqueous HCl (4 ml), and the mixture was heated to reflux with stirring for 1 h. After cooling, 10% aqueous NaOH was added, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (30–100% hexane/EtOAc) to give the target compound as colorless oil (0.06 g, 62% yield), which was subsequently converted to the dihydrochloride salt, **29d**, as a colorless solid. Mp 262–266°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.86–0.91 (m, 2H), 1.09–1.13 (m, 3H), 1.59–1.73 (m, 6H), 2.67–2.73 (m, 2H), 3.35–3.65 (m, 2H), 3.89–3.95 (m, 3H),

4.23 (m, 1H), 4.47–4.58 (m, 2H), 7.35–7.73 (m, 10H), 9.42 (br s, 1H), 9.61 (br s, 1H), 11.49 (br s, 1H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 349.1  $[M+H]^+$ .

**((±)-*trans*-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)cyclohexylamine Dihydrochloride (29e).** To a solution of **28** (2.0 g, 6.1 mmol) and triethylamine (1.7 ml, 12.3 mmol) in acetonitrile (100 ml) was added cyclohexanone (0.66 g, 0.69 mmol), sodium triacetoxyborohydride (2.6 g, 6.8 mmol), and acetic acid (0.74 g, 12.3 mmol). After stirring at room temperature overnight, 1N aqueous NaOH was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (20–100% hexane/EtOAc) to give the target compound, which was subsequently converted to the dihydrochloride salt, **29e**, as a colorless solid (1.6 g, 65% yield). Mp 288–289°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 0.87–1.03 (m, 1H), 1.08–1.30 (m, 4H), 1.56–1.74 (m, 3H), 1.74–1.89 (m, 1H), 2.04–2.18 (m, 1H), 2.99–3.11 (m, 1H), 3.39–3.53 (m, 1H), 3.85–4.10 (m, 4H), 4.44–4.68 (m, 3H), 7.36–7.57 (m, 8H), 7.62 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 25.2, 25.4, 25.8, 29.6, 30.7, 48.2, 56.5, 57.2, 58.6, 59.3, 60.7, 129.2, 130.1, 130.6, 130.8, 131.2, 131.4, 131.7, 136.6; LC/MS (ESI)  $m/z$ : 335.2  $[M+H]^+$ ; *Anal.* Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>·2HCl: C, 67.80; H, 7.92; N, 6.88; Found: C, 67.57; H, 7.75; N, 6.86.

**((±)-*trans*-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)phenylamine Hydrochloride (30).** Compound **28** (3.0 g, 9.2 mmol) was treated with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution to disacidify, and the residual oil was dissolved in 2-propanol (10 ml). To the solution was added copper (I) iodide (0.09 g, 0.46 mmol), ethylene glycol (1.0 ml, 18.4 mmol), iodobenzene (2.1 g, 10.1 mmol) and tripotassium phosphate (3.9 g, 18.4 mmol), and the mixture was heated to 80°C with stirring overnight. After cooling, 1 N aqueous NaOH was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–50% hexane/EtOAc) to give the target compound, which was subsequently converted to the hydrochloride salt, **30**, as a pale yellow solid (1.2 g, 35% yield). Mp 158–163°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3.37–3.54 (m, 3H), 3.87–3.98 (m, 2H), 4.45–4.51 (m, 3H), 6.59–6.68 (m, 3H), 7.06–7.11 (m, 2H), 7.29–7.41 (m, 5H), 7.48–7.58 (m, 5H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 329.1  $[M+H]^+$ .

**Ethyl (±)-*trans*-1-Benzyl-4-cyclohexylpyrrolidine-3-carboxylate (32).** To a solution of diethyl [(ethoxycarbonyl)methyl]phosphonate (14.1 g, 66.9 mmol) in THF (200 ml) was added 60% sodium hydride in mineral oil (2.3 g, 58.0 mmol) at 0°C, and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then, the reaction mixture was cooled

to 0°C, and cyclohexanecarboxaldehyde (5.0 g, 44.6 mmol) was added. After stirring at room temperature overnight, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5–20% hexane/EtOAc) to give ethyl (2*E*)-3-cyclohexylacrylate (**31**) as pale yellow oil (6.5 g, 80% yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.12–1.43 (m, 7H), 1.66–1.78 (m, 6H), 2.12 (m, 1H), 4.18 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.76 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H).

The title compound, **32**, was prepared as pale yellow oil (63% yield) by the same procedure as described for **27** using **31** instead of **26**. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.92–0.95 (m, 2H), 1.14–1.26 (m, 7H), 1.64–1.73 (m, 5H), 2.29–2.31 (m, 2H), 2.65–2.82 (m, 4H), 3.59 (dd, *J* = 38.1, 13.2 Hz, 2H), 4.13 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.20–7.34 (m, 5H); LC/MS (ESI) *m/z*: 316.0 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-trans-(1-Benzyl-4-cyclohexylpyrrolidin-3-yl)carbamic acid tert-butyl ester (33)**. To a solution of **32** (6.0 g, 19.0 mmol) in THF (80 ml) and ethanol (80 ml) was added 1 N aqueous NaOH (40 ml). After stirring at room temperature overnight, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. To the residue was added 1N aqueous HCl (40 ml), and the whole was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. To the solution of the crude product (5.6 g) in toluene (50 ml) was added DPPA (5.9 g, 21.5 mmol) and triethylamine (3.3 ml, 23.4 mmol). The mixture was heated to 90°C with stirring for 3 h. To the reaction mixture was then added 2-methyl-2-propanol (50 ml), and the resulting mixture was heated to 100°C with stirring for 6 h. After cooling, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (10–30% hexane/EtOAc) to give **33** as a colorless solid (2.7 g, 38% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.84–0.97 (m, 2H), 1.11–1.29 (m, 3H), 1.58 (s, 9H), 1.59–1.69 (m, 6H), 1.83–1.96 (m, 2H), 2.43 (dd, *J* = 9.8, 6.6 Hz, 1H), 2.68–2.70 (m, 1H), 2.93–2.97 (m, 1H), 3.49 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 3.55 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.87–4.89 (m, 1H), 7.21–7.33 (m, 5H); LC/MS (ESI) *m/z*: 359.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-trans-1-Benzyl-4-cyclohexylpyrrolidin-3-ylamine Dihydrochloride (34)**. To a solution of **33** (1.2 g, 3.4 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) was added 4 N HCl/dioxane solution (8 ml). The mixture was stirred at room temperature overnight. To the reaction mixture was added diethyl ether, and the supernatant liquid was removed. The residue was dried

to give **34** as a colorless solid (1.1 g, 95% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.94–0.99 (m, 2H), 1.15–1.20 (m, 3H), 1.56–1.70 (m, 6H), 2.28 (m, 1H), 3.04 (m, 1H), 3.43–3.52 (m, 3H), 3.88 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 7.45–7.47 (m, 3H), 7.58–7.67 (m, 2H), 8.50 (br s, 2H), 8.68 (br s, 1H), 11.37 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 259.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**Benzyl-((±)-*trans*-1-benzyl-4-cyclohexylpyrrolidin-3-yl)amine Dihydrochloride (35a)**. This compound was prepared as a colorless solid (42% yield) by the same procedure as described for **29a** and **29b** using **34** instead of **28**. Mp 238–241°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.97–1.23 (m, 5H), 1.57–1.72 (m, 6H), 2.60 (m, 1H), 3.58 (m, 3H), 3.92–4.02 (m, 2H), 4.26 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 7.43–7.46 (m, 6H), 7.55–7.64 (m, 4H), 9.65 (br s, 1H), 9.76 (br s, 1H), 11.12 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 349.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**((±)-*trans*-*N*-(1-Benzyl-4-cyclohexylpyrrolidin-3-yl)cyclohexanecarboxamide (35b)**. This compound was prepared as a colorless solid (60% yield) by the same procedure as described for **29c** using **34** instead of **28**. Mp 142–143°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.86–0.92 (m, 2H), 1.10–1.29 (m, 5H), 1.38–1.41 (m, 2H), 1.55–1.83 (m, 12H), 1.96–2.04 (m, 3H), 2.52–2.56 (m, 1H), 2.78–2.80 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.65 (s, 2H), 4.29 (m, 1H), 6.23 (br s, 1H), 7.28–7.35 (m, 5H); LC/MS (ESI) *m/z*: 369.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**((±)-*trans*-1-Benzyl-4-cyclohexylpyrrolidin-3-yl)cyclohexylmethanamine Dihydrochloride (35c)**. This compound was prepared as a colorless solid (63% yield) by the same procedure as described for **29d** using **35b** instead of **29c**. Mp 244–246°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.93–0.99 (m, 4H), 1.15–1.24 (m, 6H), 1.63–1.78 (m, 12H), 2.84 (m, 2H), 2.34–2.52 (m, 4H), 3.85–3.88 (m, 2H), 4.50 (m, 2H), 7.46 (m, 3H), 7.57 (m, 2H), 9.14 (br s, 1H), 9.38 (br s, 1H), 11.30 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 355.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**((±)-*trans*-1-Benzyl-4-cyclohexylpyrrolidin-3-yl)cyclohexylamine Dihydrochloride (35d)**. This compound was prepared as a colorless solid (76% yield) by the same procedure as described for **29e** using **34** instead of **28**. Mp 306–309°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.93–1.40 (m, 11H), 1.49–1.75 (m, 10H), 2.05–2.13 (m, 2H), 2.40 (m, 1H), 3.07–3.10 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 3.91–3.94 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 4.44–4.54 (m, 2H), 7.47 (m, 3H), 7.57–7.67 (m, 2H), 9.09 (br s, 1H), 9.47 (br s, 1H), 11.18 (br s, 1H); LC/MS (ESI) *m/z*: 341.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**((±)-*trans*-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)cyclohexylcarbamic acid *tert*-butyl ester (36)**. To a solution of **29e** (0.6 g, 1.5 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (8 ml) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (0.96 g, 4.4 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (0.38 ml,

2.2 mmol). The mixture was heated to reflux with stirring for 15 h. After cooling, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–30% hexane/EtOAc) to give **36** as pale yellow oil (0.45 g, 71% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.91–1.28 (m, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.42–1.50 (m, 3H), 1.68–1.71 (m, 1H), 2.78–2.85 (m, 3H), 3.08 (m, 1H), 3.53–3.79 (m, 4H), 4.00 (m, 1H), 7.17–7.19 (m, 1H), 7.28–7.38 (m, 9H); LC/MS (ESI) *m/z*: 435.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**Cyclohexyl-((±)-*trans*-4-phenylpyrrolidin-3-yl)carbamic acid *tert*-butyl ester (37).** To a solution of **36** (0.45 g, 1.0 mmol) in ethanol (8 ml) was added 20% palladium hydroxide on carbon (90 mg), and the mixture was stirred at 50°C under hydrogen atmosphere for 5 h. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–22% CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give **37** as pale yellow oil (0.31 g, 88% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.64–0.67 (m, 1H), 0.86–0.89 (m, 1H), 1.07–1.26 (m, 5H), 1.49 (s, 9H), 1.49–1.55 (m, 3H), 3.01 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.20 (m, 2H), 3.57–3.75 (m, 4H), 7.19–7.22 (m, 3H), 7.28–7.32 (m, 2H); LC/MS (ESI) *m/z*: 345.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**Cyclohexyl-((±)-*trans*-1-cyclohexylmethyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)amine Dihydrochloride (38a).** To a solution of **37** (0.12 g, 0.35 mmol) in acetonitrile (5 ml) was added cyclohexanecarboxaldehyde (0.04 g, 0.37 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (0.16 g, 0.70 mmol). After stirring at room temperature overnight, 1N aqueous NaOH was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (1.5 ml) and ethanol (1.5 ml). To the solution was added 4N HCl/EtOAc solution (0.9 ml), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with diethyl ether/EtOAc (2/1) to give **38a** as a colorless solid (0.11 g, 79% yield). Mp 284–286°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.95–1.04 (m, 4H), 1.13–1.23 (m, 6H), 1.52–1.99 (m, 12H), 3.11–3.26 (m, 3H), 3.86–3.94 (m, 2H), 4.09–4.12 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 7.34–7.44 (m, 3H), 7.54–7.58 (m, 2H); LC/MS (ESI) *m/z*: 341.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**Cyclohexyl-((±)-*trans*-1-cyclohexyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)amine Dihydrochloride (38b).** This compound was prepared as a colorless solid (89% yield) by the same procedure as described for **38a** using cyclohexanone instead of cyclohexanecarboxaldehyde. Mp 259–261°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.94–1.29 (m, 9H), 1.39–1.82

(m, 10H), 1.99 (m, 1H), 2.11 (m, 2H), 3.12 (m, 1H), 3.87–4.04 (m, 3H), 4.16 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 7.34–7.44 (m, 3H), 7.52–7.60 (m, 2H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 327.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**1-Benzyl-4-cyclohexylamino-3-phenyl-1,5-dihydropyrrol-2-one (40).** To a solution of 1-benzyl-3-phenylpyrrolidine-2,4-dione (**39**)<sup>34</sup> (2.0 g, 7.5 mmol) in toluene (35 ml) was added cyclohexylamine (1.0 ml, 9.0 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.14 g, 0.75 mmol). The mixture was heated to 120°C with stirring for 6 h. After cooling, saturated NaHCO<sub>3</sub> solution was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with hexane/EtOAc (3/1) to give **40** as a colorless solid (2.4 g, 94% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.10–1.31 (m, 5H), 1.59–1.62 (m, 1H), 1.71–1.74 (m, 2H), 1.87–1.90 (m, 2H), 2.94–3.02 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.95 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.28–7.42 (m, 7H), 7.53 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 347.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**(±)-*cis*-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)cyclohexylamine Dihydrochloride (41).** To a solution of **40** (0.10 g, 0.29 mmol) in THF (0.5 ml) was added 0.95 N boran tetrahydrofuran complex solution (3 ml), and the mixture was heated to 60°C with stirring for 5 h. To the reaction mixture was added dropwise MeOH (2 ml) and 10% aqueous NaOH (3 ml), and the mixture was heated to 100°C with stirring for 3 h. After cooling, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–15% EtOAc/MeOH) to give the target compound (*cis*) as colorless oil (0.04 g, 44% yield) and the isomer (*trans*) as colorless oil (0.01 g, 10% yield). The target compound (*cis*) was subsequently converted to the dihydrochloride salt, **41**, as pale yellow viscous oil (0.04 g, 90% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 0.93–1.13 (m, 5H), 1.37 (m, 1H), 1.54–1.60 (m, 2H), 1.71–1.74 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 2.96 (dd, *J* = 11.0, 4.4 Hz, 1H), 3.17–3.22 (m, 2H), 3.82 (q, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.91–4.00 (m, 2H), 4.06–4.07 (m, 1H), 4.60 (br s, 1H), 7.31–7.49 (m, 10H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 335.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**(*S*)-*N*-((3*S*\*,4*R*\*)-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propionamide (42a and 42b).** To a solution of **28** (1.0 g, 3.1 mmol) and (*S*)-naproxen (0.71 g, 3.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) was added 1-hydroxybenzotriazole (0.46 g, 3.4 mmol), 1-ethyl-3-(3'-dimethylamino-propyl)-carbodiimide hydrochloride (0.65 g, 3.4 mmol), and triethylamine (1.3 ml, 9.2 mmol). After stirring overnight at room temperature, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The ex-

tract was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was crystallized with EtOAc (10 ml), and the resulting precipitate was then recrystallized from hexane/EtOAc (1/2) to give **42a** as a colorless crystal (0.53 g, 37% yield). The filtrate was evaporated under reduced pressure. The residual solid was purified by silica gel column chromatography (0–75% hexane/EtOAc), and the resulting solid was recrystallized from hexane/EtOAc (1/1) to give **42b** as a colorless crystal (0.48 g, 33% yield). Compound **42a**:  $R_f = 0.15$  (50% hexane/EtOAc);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.53 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 2.42 (t,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 2.65 (dd,  $J = 10.0$ , 3.9 Hz, 1H), 2.82–2.89 (m, 2H), 3.11 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 3.58 (dd,  $J = 17.8$ , 13.1 Hz, 2H), 3.63 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 4.49 (m, 1H), 5.70 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 7.09–7.25 (m, 12H), 7.27–7.31 (m, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.67–7.71 (m, 2H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 465.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Compound **42b**:  $R_f = 0.27$  (50% hexane/EtOAc);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.54 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 2.39 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 2.55 (dd,  $J = 10.3$ , 3.6 Hz, 1H), 2.81 (dd,  $J = 9.8$ , 7.2 Hz, 1H), 2.98 (dd,  $J = 13.9$ , 8.3 Hz, 1H), 3.14 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 3.55 (dd,  $J = 18.8$ , 13.1 Hz, 2H), 3.64 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 4.45–4.51 (m, 1H), 5.71 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.14–7.22 (m, 10H), 7.27–7.33 (m, 3H), 7.63 (s, 1H), 7.71 (dd,  $J = 9.0$ , 2.8 Hz, 2H); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 465.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**(+)-(3*S*\*,4*R*\*)-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-ylamine Dihydrochloride ((+)-28).** To a solution of **42a** (0.15 g, 0.32 mmol) in acetic acid (2 ml) was added 6 N aqueous HCl (4 ml), and the mixture was heated to reflux with stirring for 14 h. After cooling at room temperature, the resulting solution was poured into ice-water, and the whole was washed with EtOAc. The aqueous layer was basified with 12 N aqueous NaOH, and the whole was extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The extract was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–20%  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to give the target compound as colorless oil, which was subsequently converted to the dihydrochloride salt, **(+)-28**, as a colorless solid (0.09g, 86% yield).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +10.8$  ( $c$  0.5, MeOH), and its spectroscopic data were identical with those of the racemate.

**(-)-(3*S*\*,4*R*\*)-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-ylamine Dihydrochloride ((-)-28).** This compound was prepared as a colorless solid (87% yield) by the same procedure as described for **(+)-28** using **42b** instead of **42a**.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -13.6$  ( $c$  0.5, MeOH), and its spectroscopic data were identical with those of the racemate.

**((+)-(3*S*\*,4*R*\*)-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)cyclohexylamine Dihydrochloride ((+)-29e).** This compound was prepared as a colorless solid (74% yield) by the same procedure as described for **(±)-29e** using **(+)-28** instead of **(±)-28**.  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +25.7$  ( $c$



1.2, CHCl<sub>3</sub>) for its free amine, and its spectroscopic data were identical with those of the racemate.

**(-)-(3*S*\*,4*R*\*)-1-Benzyl-4-phenylpyrrolidin-3-yl)cyclohexylamine Dihydrochloride ((-)-29e).** This compound was prepared as a colorless solid (65% yield) by the same procedure as described for (±)-29e using (-)-28 instead of (±)-28.  $[\alpha]_D^{27} = -25.1$  (*c* 1.2, CHCl<sub>3</sub>) for its free amine, and its spectroscopic data were identical with those of the racemate.

***In vitro* biological evaluation.** Inhibitory effect on veratridine-induced Na<sup>+</sup> channel depolarization was measured by the same procedure as described in Experimental section for Chapter I. The hERG inhibitory activity was assessed by a conventional voltage patch-clamp technique.

**Effect of compound 29e on ischemic brain damage in a rat transient MCA occlusion model.** The method employed was performed as described in Experimental section for Chapter I. Namely, Wister rats (female, 8 weeks old) were subjected to transient MCA occlusion for 90 min, followed by reperfusion. Compound 29e was subcutaneously administered 30 min after the occlusion at doses of 1, 3, and 10 mg/kg (salt form). Control rats underwent MCA occlusion and received an equal volume of saline dosed at the corresponding time point. The brains were dissected into 7 slices 24 h after the occlusion, and the slices were stained with TTC. The area of infarct tissue for each slice was determined with a computerized image analysis system, and the infarct volume was calculated.

**Influence of compound 29e on cardiac action potential.** The electrophysiological evaluation was performed by the conventional microelectrode technique using guinea pig papillary muscles. Cells were prepared from tissue taken from the ventricle muscle of guinea pig hearts. In brief, the heart of guinea pigs was excised, and the papillary muscles were dissected in the Tyrode solution. The cell preparation was fixed on the paraffin base of the bath and was usually driven at constant frequencies (1 Hz) of field stimulation. Action potentials through microelectrode amplifier were recorded using a conventional glass microelectrode technique (resistance: 10–50 MΩ). The duration of stimulation was 1 ms, and 1.5–3 times the voltage threshold in strength was used. The temperature of all solutions was maintained at 36°C. APD<sub>90</sub> was measured before treatment and 30 min after treatment of the test compounds.

## 第三章に関する実験

### 3-1. Synthesis of *D*-phenylalanine methyl ester hydrochlorides **52a–e**

3-1-1. Synthesis of **52a,d**. Acetyl chloride (1.0 ml, 14.1 mmol) was added dropwise to MeOH (15 ml) at 0°C. After stirring for 15 min at 0°C, 4-methyl-*D*-phenylalanine (**51a**) (1.0 g, 5.6 mmol) was added, and the reaction mixture was heated to reflux with stirring for 38 h. After cooling, the solvent was evaporated under reduced pressure to give **52a** as a colorless solid, which was used in the next step without further purification.

**(*R*)-4-Methylphenylalanine methyl ester Hydrochloride (52a)**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.28 (s, 3H), 3.05 (dd, *J*= 13.9, 6.1 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J*= 13.9, 6.7 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 4.23 (t, *J*= 6.4 Hz, 1H), 7.10–7.16 (m, 4H), 8.58 (br s, 3H); LC/MS (ESI) *m/z*: 194.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**(*R*)-3-Chlorophenylalanine methyl ester Hydrochloride (52d)**. Yield 94%, amorphous solid. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.10 (d, *J*= 6.2 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 4.38 (t, *J*= 6.0 Hz, 1H), 7.19–7.20 (m, 1H), 7.35–7.40 (m, 3H), 8.38 (br s, 3H); LC/MS (ESI) *m/z*: 214.3 [M+H]<sup>+</sup>.

3-1-2. Synthesis of **52b,c,e**. To a solution of (*R*)-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methoxyphenylalanine (**50a**) (1.0 g, 3.4 mmol) in DMF (10 ml) was added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.51 g, 3.7 mmol) and iodomethane (0.22 ml, 3.6 mmol). After stirring at room temperature for 3 h, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with diethyl ether. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure to give *N*-Boc-phenylalanine methyl ester. To a solution of the obtained compound in EtOAc (5 ml) was added 4 N HCl/EtOAc solution (15 ml). After stirring for 3 h at room temperature, the solution was evaporated under reduced pressure. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with diethyl ether to give **52b** as a colorless solid (0.72 g, 92% yield).

**(*R*)-4-Methoxyphenylalanine methyl ester Hydrochloride (52b)**. Yield 92%, colorless solid. Mp 181–182°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.03 (dd, *J*= 13.8, 6.7 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J*= 13.9, 5.9 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.22 (t, *J*= 6.6 Hz, 1H), 6.89 (d, *J*= 8.7 Hz, 2H), 7.15 (d, *J*= 8.7 Hz, 2H), 8.56 (br s, 3H); LC/MS (ESI) *m/z*: 210.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**(*R*)-4-Chlorophenylalanine methyl ester Hydrochloride (52c)**. Yield 95%,

colorless solid. Mp 202–203°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.15 (ddd, *J* = 22.9, 14.2, 6.7 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 4.29 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.39–7.42 (m, 2H), 8.64 (br s, 3H); LC/MS (ESI) *m/z*: 214.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**(*R*)-2-Chlorophenylalanine methyl ester Hydrochloride (52e).** Yield 98%, colorless solid. Mp 155°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.26 (ddd, *J* = 24.1, 13.9, 7.7 Hz, 2H), 3.61 (s, 3H), 4.17 (dd, *J* = 8.7, 6.6 Hz, 1H), 7.32–7.36 (m, 2H), 7.38–7.42 (m, 1H), 7.45–7.50 (m, 1H), 8.73 (br s, 3H); LC/MS (ESI) *m/z*: 214.2 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3-2. Synthesis of (*R*)-*N*-(2-chloroacetyl)phenylalanine methyl esters **45** and **53a–e**

To a solution of D-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**44**) (10.0 g, 46.4 mmol) and triethylamine (14 ml, 102 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) was added chloroacetyl chloride (4.4 ml, 55.6 mmol) at 0°C. After stirring at room temperature for 1 h, H<sub>2</sub>O was added, and the whole was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–50% hexane/EtOAc) to give **45** as colorless oil (11.8 g, 99% yield).

**(*R*)-*N*-(2-Chloroacetyl)phenylalanine methyl ester (45).** Colorless oil. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = –54.4 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.15 (ddd, *J* = 20.1, 13.9, 6.2 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.03 (dd, *J* = 17.0, 15.4 Hz, 2H), 4.87 (dt, *J* = 8.2, 6.2 Hz, 1H), 6.95 (br s, 1H), 7.11–7.13 (m, 2H), 7.24–7.33 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 37.79, 42.37, 52.49, 53.38, 127.35, 128.70, 129.20, 135.30, 165.55, 171.23; IR (ATR)  $\nu$  3326, 3031, 2944, 1728, 1645, 1536, 1496, 1446, 1368, 1350, 1225, 1205, 1154, 1117 cm<sup>–1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClNO<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 256.0735, found: 256.0732.

**(*R*)-*N*-(2-Chloroacetyl)-4-methylphenylalanine methyl ester (53a).** Yield 73% from **51a**, colorless oil. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = –57.0 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.32 (s, 3H), 3.11 (ddd, *J* = 18.0, 13.9, 5.6 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.03 (dd, *J* = 15.9, 15.4 Hz, 2H), 4.84 (dt, *J* = 7.8, 5.6 Hz, 1H), 6.94 (br s, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 21.09, 37.36, 42.42, 52.48, 53.44, 129.08, 129.43, 132.13, 136.99, 165.56, 171.33; IR (ATR)  $\nu$  3342, 3023, 2942, 1730, 1655, 1533, 1445, 1368, 1353, 1261, 1229, 1150, 1119 cm<sup>–1</sup>; HPLC (220 nm) 99.6% (*t*<sub>R</sub> = 23.4 min); LC/MS (ESI) *m/z*: 270.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**(*R*)-*N*-(2-Chloroacetyl)-4-methoxyphenylalanine methyl ester (53b).** Yield 94%, colorless oil. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = –56.4 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.10 (ddd, *J* = 16.5, 13.9, 5.7 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 4.03 (dd, *J* = 16.2, 15.2 Hz, 2H),

4.83 (dt,  $J = 8.2, 5.7$  Hz, 1H), 6.83–6.86 (m, 2H), 6.95 (br s, 1H), 7.03 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 36.96, 42.42, 52.48, 53.52, 55.23, 114.14, 127.22, 130.25, 158.88, 165.55, 171.34; IR (ATR)  $\nu$  3300, 3006, 2954, 2838, 1741, 1662, 1612, 1511, 1439, 1364, 1245, 1215, 1177, 1118, 1031  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC (220 nm) 98.6% ( $t_{\text{R}} = 21.0$  min); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 286.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**(*R*)-*N*-(2-Chloroacetyl)-4-chlorophenylalanine methyl ester (53c).** Yield 99%, colorless oil.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -53.8$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.10 (dd,  $J = 13.9, 5.6$  Hz, 1H), 3.16 (dd,  $J = 13.9, 5.6$  Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.03 (dd,  $J = 16.4, 15.4$  Hz, 2H), 4.86 (dt,  $J = 7.9, 5.6$  Hz, 1H), 6.96 (br s, 1H), 7.03–7.06 (m, 2H), 7.26–7.30 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 37.23, 42.38, 52.62, 53.29, 128.88, 130.57, 133.34, 133.89, 165.61, 171.04; IR (ATR)  $\nu$  3296, 3048, 2943, 1740, 1729, 1661, 1537, 1491, 1445, 1366, 1265, 1203, 1120, 1087  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC (220 nm) 98.0% ( $t_{\text{R}} = 23.9$  min); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 290.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**(*R*)-*N*-(2-Chloroacetyl)-3-chlorophenylalanine methyl ester (53d).** Yield 92%, colorless oil.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -47.8$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.10 (dd,  $J = 13.9, 6.2$  Hz, 1H), 3.16 (dd,  $J = 13.9, 5.7$  Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 4.04 (s, 2H), 4.86 (dt,  $J = 7.7, 5.9$  Hz, 1H), 6.99–7.02 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.24–7.26 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 37.50, 42.38, 52.64, 53.27, 127.39, 127.60, 129.45, 129.94, 134.51, 137.43, 165.66, 170.98; IR (ATR)  $\nu$  3299, 3063, 2954, 1740, 1661, 1527, 1477, 1435, 1361, 1214, 1179, 1080  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC (220 nm) 92.9% ( $t_{\text{R}} = 23.8$  min); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 290.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**(*R*)-*N*-(2-Chloroacetyl)-2-chlorophenylalanine methyl ester (53e).** Yield 95%, colorless oil.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -21.6$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.21 (dd,  $J = 13.9, 7.7$  Hz, 1H), 3.37 (dd,  $J = 13.9, 6.1$  Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.99 (dd,  $J = 22.4, 15.2$  Hz, 2H), 4.90 (dt,  $J = 8.0, 5.6$  Hz, 1H), 7.05 (br s, 1H), 7.18–7.23 (m, 3H), 7.36–7.39 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 35.37, 42.33, 52.68, 52.74, 127.04, 128.84, 129.78, 131.30, 133.66, 134.50, 165.73, 171.30; IR (ATR)  $\nu$  3300, 3063, 2954, 1741, 1661, 1527, 1476, 1436, 1363, 1265, 1214, 1178, 1053  $\text{cm}^{-1}$ ; HPLC (220 nm) 94.3% ( $t_{\text{R}} = 23.0$  min); LC/MS (ESI)  $m/z$ : 290.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 3-3. Synthesis of amido-acetals 43 and 54a–e

To a solution of **45** (5.0 g, 19.6 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) was added NaI (2.9 g, 19.6 mmol) and aminoacetaldehyde dimethyl acetal (4.3 ml, 40.1 mmol). After stirring at room temperature for 24 h, additional aminoacetaldehyde dimethyl acetal (2.1 ml, 19.6 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h.

The whole was washed with H<sub>2</sub>O, and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–5% CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give **43** as colorless oil (4.7 g, 74% yield).

**(R)-N-[N-(2,2-Dimethoxyethyl)glycinyl]phenylalanine methyl ester (43)**. Colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -43.2$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.60 (dd, *J* = 12.3, 5.7 Hz, 1H), 2.66 (dd, *J* = 12.3, 5.1 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J* = 13.8, 6.7 Hz, 1H), 3.18 (dd, *J* = 13.8, 6.1 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 22.2, 17.2 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.31 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.88 (dt, *J* = 8.2, 6.2 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.23–7.32 (m, 3H), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 37.91, 50.92, 52.12, 52.27, 52.60, 54.02, 54.04, 103.45, 127.08, 128.55, 129.18, 136.01, 171.39, 172.00; IR (ATR)  $\nu$  3335, 2951, 2833, 1741, 1668, 1512, 1455, 1439, 1361, 1197, 1126, 1056 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 325.1758, found: 325.1754.

**(R)-N-[N-(2,2-Dimethoxyethyl)glycinyl]-4-methylphenylalanine methyl ester (54a)**. Yield 79%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -43.2$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.31 (s, 3H), 2.60 (dd, *J* = 12.3, 5.7 Hz, 1H), 2.66 (dd, *J* = 12.3, 5.1 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 13.8, 6.7 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J* = 13.8, 6.2 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 21.5, 16.9 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.31 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.85 (dt, *J* = 8.2, 6.2 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 21.06, 37.50, 50.94, 52.17, 52.26, 52.68, 54.02, 103.48, 129.07, 129.29, 132.86, 136.66, 171.38, 172.09; IR (ATR)  $\nu$  3334, 2950, 2833, 1742, 1668, 1513, 1441, 1362, 1197, 1126, 1056 cm<sup>-1</sup>; HPLC (220 nm) 99.1% (*t*<sub>R</sub> = 18.6 min); LC/MS (ESI) *m/z*: 339.5 [M+H]<sup>+</sup>.

**(R)-N-[N-(2,2-Dimethoxyethyl)glycinyl]-4-methoxyphenylalanine methyl ester (54b)**. Yield 75%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -37.7$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.61 (dd, *J* = 12.3, 5.7 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 12.3, 5.1 Hz, 1H), 3.04 (dd, *J* = 14.2, 6.2 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 14.2, 5.9 Hz, 1H), 3.27 (dd, *J* = 20.6, 17.0 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 4.32 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.84 (dt, *J* = 8.2, 6.0 Hz, 1H), 6.81–6.84 (m, 2H), 7.02–7.06 (m, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 37.11, 50.99, 52.19, 52.25, 52.78, 54.01, 54.05, 55.21, 103.50, 114.01, 127.98, 130.21, 158.71, 171.36, 172.11; IR (ATR)  $\nu$  3335, 2951, 2835, 1742, 1669, 1612, 1511, 1442, 1362, 1246, 1178, 1126, 1057, 1032 cm<sup>-1</sup>; HPLC (220 nm) 96.7% (*t*<sub>R</sub> = 16.9 min); LC/MS (ESI) *m/z*: 355.5 [M+H]<sup>+</sup>.

**(R)-N-[N-(2,2-Dimethoxyethyl)glyciny]l]-4-chlorophenylalanine methyl ester (54c).** Yield 74%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -37.7$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.61 (dd, *J* = 12.4, 5.4 Hz, 1H), 2.68 (dd, *J* = 12.4, 5.2 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 13.9, 6.2 Hz, 1H), 3.16 (dd, *J* = 14.1, 5.9 Hz, 1H), 3.27 (dd, *J* = 20.0, 17.0 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.32 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.87 (dt, *J* = 8.2, 6.2 Hz, 1H), 7.06–7.08 (m, 2H), 7.24–7.28 (m, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 37.34, 51.04, 52.18, 52.38, 52.50, 54.09, 54.15, 103.50, 128.73, 130.57, 133.03, 134.60, 171.41, 171.79; IR (ATR) ν 3331, 2951, 2833, 1742, 1668, 1511, 1492, 1438, 1361, 1197, 1126, 1091, 1057, 1015 cm<sup>-1</sup>; HPLC (220 nm) 98.2% (*t*<sub>R</sub> = 19.2 min); LC/MS (ESI) *m/z*: 359.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**(R)-N-[N-(2,2-Dimethoxyethyl)glyciny]l]-3-chlorophenylalanine methyl ester (54d).** Yield 66%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -39.7$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.63 (dd, *J* = 12.4, 5.6 Hz, 1H), 2.69 (dd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 13.9, 6.7 Hz, 1H), 3.16 (dd, *J* = 13.9, 5.7 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 20.6, 17.0 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.35 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.87 (dt, *J* = 8.5, 6.2 Hz, 1H), 7.01–7.04 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.20–7.23 (m, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 37.61, 51.07, 52.18, 52.39, 52.51, 54.08, 54.16, 103.50, 127.32, 127.37, 129.45, 129.83, 134.31, 138.19, 171.49, 171.70; IR (ATR) ν 3331, 2951, 2833, 1742, 1669, 1510, 1477, 1434, 1360, 1201, 1126, 1056 cm<sup>-1</sup>; HPLC (220 nm) 93.7% (*t*<sub>R</sub> = 19.1 min); LC/MS (ESI) *m/z*: 359.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**(R)-N-[N-(2,2-Dimethoxyethyl)glyciny]l]-2-chlorophenylalanine methyl ester (54e).** Yield 66%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -17.9$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.63 (dd, *J* = 12.3, 5.6 Hz, 1H), 2.68 (dd, *J* = 12.3, 5.1 Hz, 1H), 3.19 (dd, *J* = 14.2, 8.4 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 25.6, 17.5 Hz, 2H), 3.32–3.37 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.38 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.92 (td, *J* = 8.4, 6.1 Hz, 1H), 7.18–7.22 (m, 3H), 7.34–7.37 (m, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 35.41, 50.99, 51.87, 52.14, 52.44, 54.04, 54.10, 103.50, 126.92, 128.55, 129.65, 131.20, 134.27, 134.49, 171.54, 172.01; IR (ATR) ν 3301, 2948, 2838, 1738, 1650, 1519, 1475, 1439, 1230, 1181, 1126, 1048 cm<sup>-1</sup>; HPLC (220 nm) 99.1% (*t*<sub>R</sub> = 18.5 min); LC/MS (ESI) *m/z*: 359.2 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 3-4. Synthesis of pyrazinoisoquinoline derivatives **46a,b** and **55a–e**

To amido acetal **43** or **54a–e** (0.3 mmol) was added CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (3.0 mmol) or concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.8 mmol), and the reaction mixture was stirred at room temperature for the time indicated on Table 9 or Table 10. The resulting reaction mixture was neutral-

ized with 1 N aqueous NaOH, and the whole was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–9% CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to give **46a** or **55a–e** as an oily product.

**(6R,11bR)-4-Oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid methyl ester (46a)**. Yield 80%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -130.2$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.95 (dd, *J* = 13.3, 10.2 Hz, 1H), 3.16 (dd, *J* = 16.1, 6.2 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 16.1, 3.6 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.71 (ddd, *J* = 13.3, 4.2, 1.3 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 17.8, 1.3 Hz, 1H), 4.99 (dd, *J* = 10.2, 4.0 Hz, 1H), 5.73 (dd, *J* = 6.2, 3.6 Hz, 1H), 7.12–7.14 (m, 1H), 7.17–7.25 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 29.93, 49.15, 49.16, 49.20, 51.93, 54.55, 124.22, 126.52, 126.79, 128.63, 131.38, 132.45, 167.46, 170.46; IR (ATR)  $\nu$  3315, 2953, 1736, 1636, 1455, 1434, 1406, 1316, 1200, 1177, 1120, 1030 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 261.1234, found: 261.1228.

**(6R,11bR)-10-Methyl-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid methyl ester (55a)**. Yield 80%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -149.8$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.32 (s, 3H), 2.93 (dd, *J* = 13.3, 10.2 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 16.1, 6.1 Hz, 1H), 3.21 (dd, *J* = 16.1, 3.6 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.68 (dd, *J* = 13.8, 4.1 Hz, 1H), 3.76 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 10.2, 4.1 Hz, 1H), 5.73 (dd, *J* = 6.1, 3.6 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 21.21, 30.13, 49.70, 49.75, 49.84, 52.43, 55.16, 125.33, 128.19, 128.80, 129.03, 132.76, 136.67, 168.02, 171.07; IR (ATR)  $\nu$  3316, 2953, 1737, 1639, 1433, 1404, 1315, 1199, 1177, 1151, 1029 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 275.1390, found: 275.1385.

**(6R,11bR)-10-Methoxy-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid methyl ester (55b)**. Yield 18%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -188.3$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.94 (dd, *J* = 13.4, 10.3 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 15.7, 6.2 Hz, 1H), 3.19 (dd, *J* = 15.7, 3.6 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.66 (dd, *J* = 13.4, 4.1 Hz, 1H), 3.75 (dd, *J* = 18.0, 1.1 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 4.95 (dd, *J* = 10.3, 4.1 Hz, 1H), 5.73 (dd, *J* = 6.2, 3.6 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 29.74, 49.68, 49.83, 49.84, 52.44, 55.22, 55.30, 110.49, 112.92, 123.91, 130.13, 134.02, 158.54, 167.97, 171.06; IR (ATR)  $\nu$  3316, 2953, 2838, 1736, 1638, 1505, 1432, 1405, 1314, 1263, 1199, 1175, 1031 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 291.1339, found: 291.1336.

**(6R,11bR)-10-Chloro-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid methyl ester (55c).** Yield 61%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -153.3$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.93 (dd, *J* = 13.4, 10.3 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J* = 16.4, 6.2 Hz, 1H), 3.23 (dd, *J* = 16.4, 3.1 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.67 (ddd, *J* = 13.4, 4.1, 1.0 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 18.0, 1.0 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 10.3, 4.1 Hz, 1H), 5.77 (dd, *J* = 6.2, 3.1 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 29.99, 49.36, 49.63, 49.68, 52.58, 54.87, 125.08, 127.60, 130.42, 130.60, 132.82, 134.69, 167.87, 170.71; IR (ATR)  $\nu$  3314, 2953, 1736, 1639, 1487, 1430, 1401, 1313, 1201, 1178, 1029 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 295.0844, found: 295.0841.

**(6R,11bR)-9-Chloro-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid methyl ester (55d).** Yield 61%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -164.5$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.90 (dd, *J* = 13.3, 10.2 Hz, 1H), 3.12 (dd, *J* = 16.4, 6.1 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 16.4, 3.1 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.67 (dd, *J* = 13.3, 4.1 Hz, 1H), 3.76 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 4.96 (dd, *J* = 10.2, 4.1 Hz, 1H), 5.79 (dd, *J* = 6.1, 3.1 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.22 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 30.29, 49.17, 49.63, 49.82, 52.60, 54.87, 126.37, 127.36, 129.10, 131.41, 133.10, 133.87, 167.86, 170.64; IR (ATR)  $\nu$  3315, 2953, 1737, 1640, 1434, 1403, 1314, 1296, 1199, 1031 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 295.0844, found: 295.0841.

**(6R,11bR)-8-Chloro-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid methyl ester (55e).** Yield 43%, colorless oil.  $[\alpha]_D^{25} = -147.8$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.89 (dd, *J* = 13.1, 10.0 Hz, 1H), 3.05 (dd, *J* = 17.2, 6.6 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 17.2, 2.6 Hz, 1H), 3.59 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.68 (m, 1H), 3.76 (dd, *J* = 17.9, 1.0 Hz, 1H), 5.01 (dd, *J* = 10.0, 4.1 Hz, 1H), 5.87 (dd, *J* = 6.6, 2.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.20 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 27.89, 48.77, 49.56, 50.01, 52.63, 54.80, 123.37, 127.77, 128.06, 130.19, 134.68, 135.17, 167.81, 170.67; IR (ATR)  $\nu$  3314, 2953, 1737, 1640, 1447, 1405, 1314, 1230, 1201, 1177, 1033 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 295.0844, found: 295.0841.

**(6R,11bS)-4-Oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid methyl ester (46b).** This compound was obtained as the minor isomer by CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H-catalyzed cyclization (Table 9, entry 3). Yield 8%, colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.17 (dd, *J* = 15.2, 6.1 Hz, 1H), 3.25 (dd, *J* = 15.2, 2.5 Hz, 1H), 3.31 (dd, *J* = 12.4, 10.3 Hz, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.65 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 17.4



Hz, 1H), 3.91 (dd,  $J$  = 12.4, 3.8 Hz, 1H), 4.62 (dd,  $J$  = 10.3, 4.0 Hz, 1H), 4.98 (dd,  $J$  = 6.1, 2.5 Hz, 1H), 7.13–7.19 (m, 2H), 7.25–7.29 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 31.15, 46.72, 50.02, 52.20, 54.03, 54.47, 122.81, 127.42, 127.56, 127.97, 133.65, 135.05, 168.19, 170.94; LC/MS (ESI)  $m/z$ : 261.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 3-5. Synthesis of (R)-(-)-praziquantel **48**

3-5-1. (6R,11bR)-2-Cyclohexanecarbonyl-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid (**47**). A solution of **46a** (0.50 g, 1.9 mmol) in 6 N aqueous HCl (5 ml) was heated to reflux with stirring for 39 h. After cooling, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was triturated with EtOAc/ethanol (10/1), and the solid was collected by filtration to give (6R,11bR)-4-oxo-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-6-carboxylic acid hydrochloride (**49**) as a crude solid (0.50 g). To a suspension of crude **49** (0.30 g) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 ml) was added triethylamine (0.3 ml, 2.2 mmol) and cyclohexanecarbonyl chloride (0.16 g, 1.1 mmol) at  $0^\circ\text{C}$ . After stirring at  $0^\circ\text{C}$  for 1 h, 1 N HCl was added, and the whole was extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The extract was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–45%  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to give **47** as an amorphous solid (0.28 g, 67% yield).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -42.0$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.26–1.88 (m, 10H), 2.43–2.48 (m, 1H), 3.11–3.26 (m, 3H), 4.05–5.04 (m, 4H), 5.49–5.56 (m, 1H), 7.20 (m, 4H); IR (ATR)  $\nu$  3285, 2926, 2853, 1617, 1410, 1300, 1217, 748  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 357.1809, found: 357.1803.

3-5-2. (R)-2-Cyclohexanecarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-one, (R)-(-)-praziquantel (**48**). To a solution of **47** (0.15 g, 0.42 mmol) in THF (2 ml) was added *N*-methylmorpholine (51  $\mu\text{l}$ , 0.46 mmol) and isobutyl chloroformate (63 mg, 0.46 mmol) at  $-15^\circ\text{C}$ . After stirring at the same temperature for 30 min, a solution of *N*-hydroxy-2-thiopyridone (64 mg, 0.51 mmol) and triethylamine (70  $\mu\text{l}$ , 0.51 mmol) in THF (0.5 ml) was added. The mixture was stirred at  $-15^\circ\text{C}$  for 1 h under nitrogen atmosphere, sheltered from the light (aluminum foil). The precipitate of *N*-methylmorpholine hydrochloride was filtered and washed with THF. The yellow filtrate was irradiated in the presence of 2-methyl-2-propanethiol (0.47 ml, 4.2 mmol) with a lamp (200 W) at room temperature in a water bath until the color has disappeared. Then,  $\text{H}_2\text{O}$  was added, and the whole was extracted with EtOAc. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0–90% hexane/EtOAc) to give **48** as a colorless solid (68 mg, 52% yield), which was recrystallized from heptane/EtOAc (1/1). Mp  $106\text{--}107^\circ\text{C}$ , lit.<sup>40b</sup> mp  $113\text{--}$

115°C, lit.<sup>51)</sup> mp 107–108°C.  $[\alpha]_D^{25} = -153.6$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>), lit.<sup>40b)</sup>  $[\alpha]_D^{23} = -135.0$  (*c* 1, CHCl<sub>3</sub>), lit.<sup>37a)</sup>  $[\alpha]_D^{20} = -149.4$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.26–1.31 (m, 3H), 1.50–1.82 (m, 7H), 2.44–2.56 (m, 1H), 2.77–3.03 (m, 3.8H), 3.25 (m, 0.2H), 3.87 (d, *J* = 17.5 Hz, 0.2H), 4.08 (d, *J* = 17.5 Hz, 0.8H), 4.36 (m, 0.2H), 4.47 (d, *J* = 17.5 Hz, 0.8H), 4.79–4.88 (m, 2.2H), 5.16 (m, 0.8H), 7.17–7.28 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 25.7, 28.7, 29.0, 29.2, 39.1, 40.8, 45.2, 49.0, 55.0, 125.5, 127.0, 127.5, 129.3, 132.8, 134.8, 164.4, 174.8; IR (ATR)  $\nu$  2924, 2854, 1642, 1440, 757 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 313.1911, found: 313.1906.

**Summary of X-ray data for (6*R*,11*bR*)-4-oxo-1,3,4,6,7,11*b*-hexahydro-2*H*-pyrazino[2,1-*a*]isoquinoline-6-carboxylic acid Hydrochloride (49).**

Formula: C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>1</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; crystal color, habit: colorless, needle.

\*\*\*\* Unit Cell Parameters \*\*\*\*

a: 9.1752(15)  
b: 24.055(5)  
c: 5.9499(10)  
 $\alpha$ : 90.000  
 $\beta$ : 90.000  
 $\gamma$ : 90.000  
Volume: 1313.2(4)

Cell determination ( $2\theta$  range):  
25 (50.24–57.36°)

\*\*\*\* Space Group Information \*\*\*\*

Symbol: P212121  
Number: 19  
Centricity: acentric  
Z value: 4  
Formula weight: 282.73  
Calculated density: 1.430  
 $\mu$  (cm<sup>-1</sup>): 26.444  
Crystal system: orthorhombic  
Laue group: mmm  
Lattice type: P

\*\*\*\* Reflection Processing \*\*\*\*

Total # processed: 2769  
Total # unique: 2332  
R merge (%): 1.58  
Wilson B: 3.58

\*\*\*\* Model Refinement \*\*\*\*

R1 factor [ $I > 2.0\sigma(I)$ ]: 0.0523  
R factor [ $I > 2.0\sigma(I)$ ]: 0.0523  
wR factor [ $I > 2.0\sigma(I)$ ]: 0.1631  
Goodness of fit: 1.004  
# of observations: 1982  
# of variables: 189  
Reflection/parameter ratio: 10.5  
Maximum shift/error: 0.00  
Refinement program: CRYSTALS  
Refinement mode: Single  
Flack Parameter: 0.01(4)

\*\*\*\* Reflection Corrections \*\*\*\*

Absorption applied: Yes  
Absorption type: PSI  
Absorption range: 0.968–0.998  
Decay applied: Yes  
Decay (%): -1.13  
Redundants averaged: Yes

\*\*\*\* Experimental Information \*\*\*\*

Radiation: Cu  
Wavelength: 1.5418  
 $2\theta_{\max}$ : 135.8  
 $\sin(\theta)/\lambda$ : 0.6010  
Temperature (°C): 25.0

## 引用文献

- 1) 平成 19 年 厚生労働省国民生活基盤調査
- 2) 平成 16 年 厚生労働省国民生活基礎調査
- 3) 厚生労働省 平成 15 年度 国民医療費の概況
- 4) Keyser, J. D.; Sulter, G.; Luiten, P. G. *Trends Neurosci.* **1999**, *22*, 535.
- 5) Shuaib, A.; Hussain, M. S. *Eur. Neurol.* **2008**, *59*, 4.
- 6) Tanaka, K. 分子脳血管病 **2002**, *1*, 97.
- 7) Ellisman, M.; Deerinck, T.; Bennett, V. In *Glial Cell Development*; 2<sup>nd</sup> ed; Jessen, K. R., Richardson, W. D., Eds.; Oxford University Press: Oxford, 2001; pp 131–160.
- 8) Stys, P. K. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1998**, *18*, 2.
- 9) Anger, T.; Madge, D. J.; Mulla, M.; Riddall, D. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 115.
- 10) Hodigikin, A. L.; Huxley, A. F. *J. Physiol.* **1952**, *117*, 500.
- 11) Urenjak J.; Obrenovitch T. P. *Pharmacol. Rev.* **1996**, *48*, 21.
- 12) (a) Grotta, J. *Stroke* **1997**, *28*, 2338; (b) Shimdizu, T.; Itou, Y.; Tatsumi, S.; Hayashi, S.; Ukai, Y.; Yoshikuni, Y.; Kimura, K. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1997**, *355*, 601; (c) Carter, A. J.; Grauert, M.; Pschorn, U.; Bechtel, W. D.; Bartmann-Lindholm, C.; Qu, Y.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; Weiser, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 4944; (d) Annoura, H.; Nakanishi, K.; Toba, T.; Take-moto, N.; Imajo, S.; Miyajima, A.; Tamura-Horikawa, Y.; Tamura, S. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3372
- 13) (a) Pulsinelli, W. A.; Mann, M. E.; Welch, K. M. A.; Zivin, J. A.; Biller, J.; Maisel, J.; Rubin, J. J.; Verro, P.; Graham, G. D.; Pierce, M.; Kugler, A. R.; Mohberg, N.; Knapp, L. E.; Poole, R. M. *Neurology* **1999**, *52*, A384; (b) Gandolfo, C.; Sandercock, P. A. G.; Conti, M. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2002**, CD001924.
- 14) 小林祥泰, 大櫛陽一. In 脳卒中データバンク 2009; 小林祥泰, Ed.; 東京: 中山書店, 2004; pp 22–23.
- 15) HTS プライマリースクリーニングは, ラット脳より調製した粗シナプス膜液を用い, リガンドとして [<sup>3</sup>H]-Batrachotoxin-A-20- $\alpha$ -benzoate (BTX-b) を使用した Na<sup>+</sup> チャネル結合試験 (RI フィルトレーション法) により実施された.
- 16) Montastruc, J. L.; Llau, M. E.; Rascol, O.; Senard, J. M. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **1994**, *8*, 293.
- 17) Zhang, A.; Neumeyer, J. L.; Baldessarini, R. J. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 274.
- 18) van de Waterbeemd, H.; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J. R.; Raevsky, O. A. *J. Drug Target.* **1998**, *6*, 151.

- 19) Annoura, H.; Nakanishi, K.; Uesugi, M.; Fukunaga, A.; Imajo, S.; Miyajima, A.; Tamura-Horikawa, Y.; Tamura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 371.
- 20) (a) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457; (b) Suzuki, A. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 576, 147.
- 21) Kubota, H.; Fujii, M.; Ikeda, K.; Takeuchi, M.; Shibamura, T.; Isomura, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 351.
- 22) Wovkulich, P. M.; Uskoković, M. R. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3455.
- 23) Liang, G.-B.; Qian, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2101.
- 24) Kelarev, V. I.; Shvekhgeimer, G. A. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1980**, *16*, 501.
- 25) Aiuchi, T.; Daimatsu, T.; Nakaya, K.; Nakamura, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *685*, 289.
- 26) Koizumi, J.; Yoshida, Y.; Nakazawa, T.; Ooneda, G. *Jpn. J. Stroke* **1986**, *8*, 1.
- 27) Bederson, J. B.; Pitts, L. H.; Germano, S. M.; Nishimura, M. C.; Davis, R. L.; Bartkowski, H. M. *Stroke* **1986**, *17*, 1304.
- 28) 田辺三菱製薬（株）薬理第一研究所のデータを使用した。
- 29) Satoh, H. *Life Sci.* **2003**, *72*, 1039.
- 30) (a) Haverkamp, W.; Breithardt, G.; Camm, A. J.; Janse, M. J.; Rosen, M. R.; Antzelevitch, C.; Escande, D.; Franz, M.; Malik, M.; Moss, A.; Shah, R. *Eur. Heart J.* **2000**, *21*, 1216; (b) Yap, Y. G.; Camm, J. *Br. Med. J.* **2000**, *320*, 1158; (c) De Ponti, F.; Poluzzi, E.; Montanaro, N. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2000**, *56*, 1.
- 31) Vandenberg, J. I.; Walker, B. D.; Campbell, T. J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 240.
- 32) (a) Aronov, A. M. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 149; (b) Mitcheson, J. S.; Chen, J.; Lin, M.; Culberson, C.; Sanguinetti, M. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 12329; (c) Sanguinetti, M. C.; Mitcheson, J. S. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 119; (d) Cavalli, A.; Poluzzi, E.; De Ponti, F.; Recanatini, M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3844.
- 33) Pandey, G.; Banerjee, P.; Gadre, S. R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4484.
- 34) King, J. A.; McMillan, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 1236.
- 35) (a) Chung, J. Y. L.; Cvetovich, R.; Amato, J.; McWilliams, J. C.; Reamer, R.; DiMichele, L. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3592; (b) Ling, R.; Ekhato, I. V.; Rubin, J. R.; Wustrow, D. J. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6579; (c) Ohigashi, A.; Kikuchi, T.; Goto, S. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 127; (d) Li, Q.; Wang, W.-B.; Chu, D. T.; Hasvold, L. A. U.S. Patent 5,703,244, 1997.
- 36) Crumb, W.; Cavero, I. *Pharm. Sci. Technol. Today* **1999**, *2*, 270.
- 37) (a) Andrews, P.; Thomas, H.; Pohlke, R.; Seubert, J. *Med. Res. Rev.* **1983**, *3*, 147;

- (b) Tang, H.; Zheng, C.-H.; Zhu, J.; Fu, B.-Y.; Zhou, Y.-J.; Lv, J.-G. *Arch. Pharm.* **2010**, *343*, 360; (c) Hudack, R. A.; Barta, N. S.; Guo, C.; Deal, J.; Dong, L.; Fay, L. K.; Caprathe, B.; Chatterjee, A.; Vanderpool, D.; Bigge, C.; Showalter, R.; Bender, S.; Augelli-Szafran, C. E.; Lunney, E.; Hou, X. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1202; (d) Dong, Y.; Chollet, J.; Vargas, M.; Mansour, N. R.; Bickle, Q.; Alnouti, Y.; Huang, J.; Keiser, J.; Vennerstrom, J. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2481; (e) Tang, H.; Zheng, C.; Lv, J.; Wu, J.; Li, Y.; Yang, H.; Fu, B.; Li, C.; Zhou, Y.; Zhu, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 979; (f) Sadhu, P. S.; Kumar, S. N.; Chandrasekharan, M.; Pica-Mattoccia, L.; Cioli, D.; Rao, V. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1103; (g) Duan, W.-W.; Qiu, S.-J.; Zhao, Y.; Sun, H.; Qiao, C.; Xia, C.-M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1587; (h) Kölzer, M.; Weitzel, K.; Göringer, H. U.; Thines, E.; Opatz, T. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1456.
- 38) Dömling, A.; Houry, K. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1420.
- 39) (a) Doenhoff, M. J.; Kusel, J. R.; Coles, G. C.; Cioli, D. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 465, and references therein; (b) Alonso, D.; Muñoz, J.; Gascón, J.; Valls, M. E.; Cocharan, M. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *74*, 342.
- 40) (a) Ma, C.; Zhang, Q.-F.; Tan, Y.-B.; Wang, L. *J. Chem. Res.* **2004**, 186; (b) Roszkowski, P.; Maurin, J. K.; Czarnocki, Z. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1415.
- 41) Znabet, A.; Zonneveld, J.; Janssen, E.; De Kanter, F. J. J.; Helliwell, M.; Turner, N. J.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7706.
- 42) (a) Zawadzka, A.; Leniewski, A.; Maurin, J. K.; Wojtasiewicz, K.; Siwicka, A.; Blachut, D.; Czarnocki, Z. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2443; (b) Zawadzka, A.; Leniewski, A.; Maurin, J. K.; Wojtasiewicz, K.; Czarnocki, Z. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 997; (c) Siwicka, A.; Wojtasiewicz, K.; Rosiek, B.; Leniewski, A.; Maurin, J. K.; Czarnocki, Z. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 975.
- 43) Todd, M. H.; Ndubaku, C.; Bartlett, P. A. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3985.
- 44) Gremmen, C.; Wanner, M. J.; Koomen, G.-J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8885.
- 45) We retested the asymmetric Pictet–Spengler cyclization reported by Ma *et al.*<sup>40a)</sup> However, our trial did not reproduced their results. Thus, unlike as reported,<sup>40a)</sup> the cyclization of enantiopure *N*-(*p*-tolylsulfinyl)phenylethylamine lacking electron-donating substituents with *N*-(2,2-dimethoxyethyl)phthalimide under the described conditions did not afford the desired product, and the starting material was recovered instead. Moreover, elevated reaction temperature resulted in a decomposition of the starting material. These results meet the findings of Laurent *et al.* See: Laurent, S. A.-L.; Boissier, J.; Coslédan, F.; Gornitzka, H.; Robert, A.; Meunier, B.

- Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 895.
- 46) Maryanoff, B. E.; Zhang, H.-C.; Cohen, J. H.; Turchi, I. J.; Maryanoff, C. A. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1431, and references therein.
- 47) For selected examples, see: (a) Aubry, S.; Pellet-Rostaing, S.; Lemaire, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5212; (b) González, J. F.; de la Cuesta, E.; Avendaño, C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4395.
- 48) For selected examples, see: (a) Amat, M.; Santos, M. M. M.; Bassas, O.; Llor, N.; Escolano, C.; Gómez-Esqué, A.; Molins, E.; Allin, S. M.; McKee, V.; Bosch, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5193; (b) Allin, S. M.; James, S. L.; Martin, W. P.; Smith, T. A. D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3943; (c) Allin, S. M.; James, S. L.; Martin, W. P.; Smith, T. A. D.; Elsegood, M. R. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 3029; (d) Allin, S. M.; Towler, J.; Gaskell, S. N.; Saha, B.; Martin, W. P.; Page, P. C. B.; Edgar, M. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9538; (e) García, E.; Arrasate, S.; Ardeo, A.; Lete, E.; Sotomayor, N. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1511; (f) García, E.; Arrasate, S.; Lete, E.; Sotomayor, N. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10368.
- 49) Minor isomer **46b** (*cis*) was not detected by TLC analysis of the crude reaction mixture, and **46a** (*trans*) was isolated in a high enantiomeric excess ( $\geq 98.1\%$  ee), which was determined by chiral HPLC using a Chiralpak IA column in comparison with the racemic sample.
- 50) Barton, D. H. R.; Hervé, Y.; Potier, P.; Thierry, J. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5479.
- 51) Seubert, J.; Thomas, H.; Andrews, P. U.S. Patent 4,001,411, **1977**; *Chem. Abstr.* **1977**, *84*, 5007.
- 52) March, J. In *Advanced Organic Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed.; McGraw-Hill: New York, 1997; Chapter 11.
- 53) (a) Hart, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 397; (b) Maryanoff, B. E.; McComsey, D. F.; Duhl-Emswiler, B. A. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 5062.

## 投稿論文一覽

- 1) Synthesis and Pharmacological Evaluation of 3-Amino-1-(5-indanyloxy)-2-propanol Derivatives as Potent Sodium Channel Blockers for the Treatment of Stroke  
Maki Seki, Osamu Tsuruta, Yukio Aoyama, Aki Soejima, Hiroshi Shimada, and Hikaru Nonaka  
*Chem. Pharm. Bull.* **2012**, *60*, 488–498
- 2) Synthesis and biological evaluation of pyrrolidine derivatives as novel and potent sodium channel blockers for the treatment of ischemic stroke  
Maki Seki, Osamu Tsuruta, Ryo Tatsumi, and Aki Soejima  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4230–4234
- 3) A diastereoselective construction of pyrazinoisoquinoline skeletons via tandem cyclization of phenylalanine derivatives: a facile synthesis of optically active pyrazinoisoquinolines  
Maki Seki and Tsuyoshi Ogiku  
*Tetrahedron* **2014**, *70*, 3864–3870



## 謝辞

本論文の作成にあたり，終始ご懇厚なるご指導とご鞭撻を賜りました 九州大学大学院薬学研究院 薬物分子設計学分野 教授 末宗洋博士に心よりお礼申し上げます。

本論文の申請にあたり，ご指導とご助言を賜りました 九州大学大学院薬学研究院教授 佐々木茂貴博士，教授 大嶋孝志博士，准教授 麻生真理子博士に心よりお礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり，直接懇切なるご指導，ご鞭撻をいただきました 田辺三菱製薬株式会社 創薬化学第一研究所前所長（現 探索スクリーニングセンター長）大菊鋼博士に深謝いたします。

本研究の共同研究者として，有益なご助言，ご討論ならびにご援助をいただきました，創薬化学第一研究所 鶴田修博士，辰己亮博士，青山如生氏，薬理第一研究所 副島亜紀氏，島田浩志氏，探索スクリーニングセンター 野中光氏に深く感謝いたします。また NMR 構造解析ならびに X 線結晶構造解析を行っていただきました，創薬化学第一研究所分析グループ 古井恵氏，山下雅己氏の多大なご協力とご支援に深く感謝いたします。

最後に，本研究を行うにあたり多数の方々のご援助をいただきました。心よりお礼申し上げます。

