

## PKC $\theta$ を標的とした新規免疫抑制剤の合成研究

國川, 茂輝

<https://hdl.handle.net/2324/2236341>

---

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (創薬科学), 論文博士  
バージョン :  
権利関係 :

博士論文

PKC $\theta$  を標的とした新規免疫抑制剤の合成研究

2019 年

國川 茂輝

## 目次

### 序論

- 第一節 臓器移植と免疫抑制剤概説
- 第二節 免疫抑制剤としての Protein kinase C  $\theta$  (PKC $\theta$ ) 阻害剤概説
- 第三節 本研究の目的と方針

### 本論

#### 第一章 PKC $\theta$ 阻害活性を有する新規 2,4-ジアミノ-5-フルオロピリジン誘導体の創出

- 第一節 研究方針
- 第二節 2,4-ジアミノ-5-フルオロピリミジン誘導体の合成
- 第三節 PKC $\theta$  阻害活性・CYP3A4 阻害活性・P-gp 基質性評価
- 第四節 本章のまとめ

#### 第二章 PKC $\theta$ 阻害活性を有する新規 2,4-ジアミノ-5-シアノピリジン誘導体の創出

- 第一節 研究方針
- 第二節 2,6-ジアミノ-3-カルバモイル-5-シアノピラジン誘導体・2,4-ジアミノ-5-シアノピリジン誘導体及び 2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体の合成
- 第三節 PKC $\theta$  阻害活性評価
- 第四節 薬物動態評価
- 第五節 ラット心移植試験における *in vivo* 薬効評価
- 第六節 本章のまとめ

#### 第三章 CYP3A4 時間依存的阻害作用を軽減した新規 PKC $\theta$ 阻害剤の創出

- 第一節 研究方針
- 第二節 2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体の合成
- 第三節 CYP3A4 時間依存的阻害の回避に向けた取り組み

第四節 薬物動態評価

第五節 ラット心移植試験における in vivo 薬効評価（単剤及び併用試験）

第六節 本章のまとめ

結論

実験の部

参考文献

謝辞

## 略語表

本論文において以下に示す略語及び略号を用いた。

Ac	: acetyl
ATP	: adenosine triphosphate
AUC	: area under the blood concentration time curve
Boc	: <i>t</i> -butoxycarbonyl
Bu	: butyl
CL	: clearance
CL <sub>int</sub>	: intrinsic clearance
CN	: calcineurin
CNI	: calcineurin inhibitor
DIPEA	: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMI	: 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone
EDC	: 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide
Et	: ethyl
F	: bioavailability
HOBt	: 1-hydroxybenzotriazole
<i>i</i> -	: iso-
<i>i.v.</i>	: intravenous
<i>i.m.</i>	: intramuscular
IMPDH	: inosine monophosphate dehydrogenase
IPA	: <i>iso</i> -propyl alcohol
LAH	: lithium aluminium hydride
<i>m</i> -CPBA	: <i>m</i> -chloroperbenzoic acid
Me	: methyl
<i>n</i> -	: normal-
NMP	: <i>N</i> -methylpyrrolidone
NT	: not tested
MMF	: mycophenolate mofetil

MST	: median survival time
Ph	: phenyl
<i>p.o.</i>	: per os
PSA	: polar surface area
<i>t-</i>	: tertiary-
TBAF	: tetrabutylammonium fluoride
TDI	: time dependent inhibition
TFA	: trifluoroacetic acid
TFAA	: trifluoroacetic anhydride
THF	: tetrahydrofuran
TPSA	: topological PSA
$V_d$	: volume of distribution at steady state

## 序論

### 第一節 臓器移植と免疫抑制剤概説

臓器移植は、肝臓・心臓・腎臓・肺などの臓器がほとんど機能しなくなった際に、第三者から提供された臓器と入れ替える治療法であり、日本では1万人以上が臓器移植を希望して待機しているとされている<sup>1),2)</sup>。世界中で臓器移植が行われている一方、その際に起きる免疫拒絶反応が臨床上問題となっている。免疫の最も基本的な働きは、外来の攻撃から個体を防御することであり、IL-2 (interleukin-2) が重要な役割を担っている。IL-2 は T 細胞において産生され、T 細胞の活性化や B 細胞の増殖分化に関与しており、免疫反応における中枢的な役割を果たしている。臓器移植時に、移植臓器由来の主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) が認識され、自身の分化・増殖に関わるサイトカインである IL-2 の産生を誘導し、細胞傷害性 T 細胞、B 細胞・マクロファージなどを活性化し、移植された臓器を損傷させる (Figure 1)。このようなことから移植臓器の生着率を向上させるためには IL-2 シグナル伝達を遮断し、拒絶反応を抑制することが極めて重要であると言える。

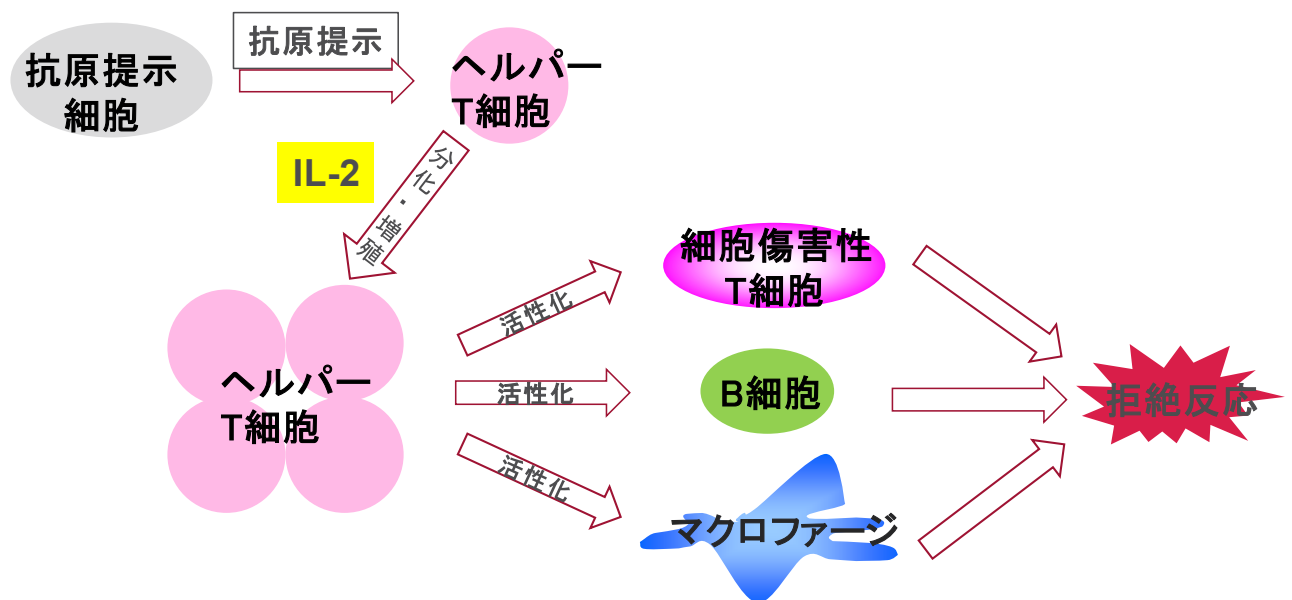
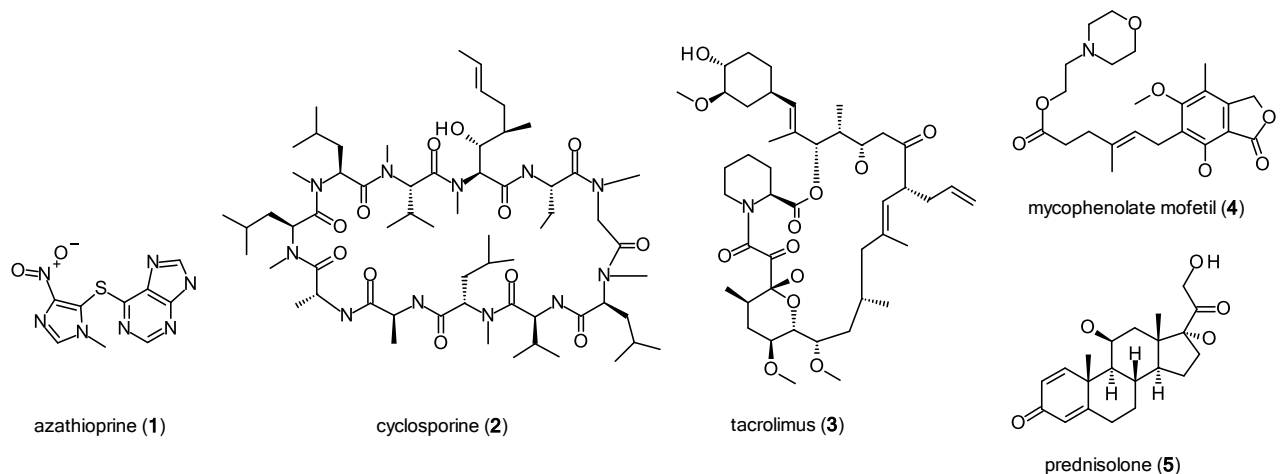


Figure 1. Mechanism of rejection

このような背景の元に、臓器移植時に起こる拒絶反応を抑制し、移植臓器の生着率を向上させるために、免疫抑制作用を有する種々の薬剤が開発されてきた<sup>3)</sup>。1960年代には核酸合成阻害剤であるアザチオプリン (azathioprine, **1**) とステロイド剤との併用療法が移植療法に有用であると報告された (Figure 2)<sup>4)</sup>。アザチオプリンは細胞核内で DNA 合成経路を阻害し、リンパ球を含む種々の細胞の増殖を阻害することで免疫抑制作用を示す。一方、ステロイド剤は細胞レベルでの作用機序はいまだ明確ではないが、核内受容体に作用して広範な遺伝子発現を抑制し、免疫反応に関与する様々なサイトカイン産生を阻害することで免疫抑制作用を示すと言われている。以後両者の薬剤の併用療法が標準的な免疫抑制療法となったものの、有効性が不十分であり副作用も発生することから、これらに代わる新たな免疫抑制剤の開発が望まれた。

その後、1990年代にカルシニューリン阻害剤 (calcineurin inhibitor: CNI) であるシクロスポリン (cyclosporine, **2**) 及びタクロリムス (tacrolimus, **3**) が強力な免疫抑制作用を有することが報告された<sup>5)</sup>。CNI はヘルパーT細胞の細胞質内でシクロフィリン及びFK結合タンパクと結合し、カルシニューリンの脱リン酸化を阻害することで NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) が核内に移行し、IL-2 が産生するのを抑制し、T細胞の増殖を阻害することにより免疫抑制作用を示す。CNI は強力な免疫抑制作用を示すことから、種々の臓器移植の際に用いられるようになり、臓器移植医療の進展に大きく貢献した。特にタクロリムスはシクロスポリンよりも強力な免疫抑制作用を示し、臓器移植において中心的に用いられるようになった。また、2000年代には、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ (inosine monophosphate dehydrogenase: IMPDH)阻害剤であるミコフェノール酸モフェチル (mycophenolate mofetil: MMF, **4**) が臨床において用いられるようになった<sup>6)</sup>。MMF はプリン核酸合成の内、リンパ球系細胞に存在する *de novo* 経路を阻害することでT細胞及びB細胞の増殖を阻害し、免疫抑制作用を示す。





**Figure 2.** Structure of immunosuppressive agents.

現在の急性拒絶反応における治療体系を Figure 3 に示した。タクロリムスのような CNI を主剤として、MMF 及びステロイド剤 (prednisolone, **5**) を補助剤として用いる併用療法が標準療法であり、2010-2014 年に日本で実施された腎移植において移植後 1 年後及び 5 年後の生存率はそれぞれ 99.1%、97.2%まで向上させるなど高い効果を示している<sup>7)</sup>。このように、既存の薬剤による免疫抑制療法が高い効果を示す一方、薬剤の標的が免疫系以外の広範な細胞に存在するため、目的とする免疫系細胞以外へ作用することが課題である。CNI の免疫系以外の作用として、主に腎障害作用等が報告されているが、その作用発現は薬剤の血中濃度の上昇と相関しており、CNI の使用時には血中濃度を適切に管理する必要がある<sup>8)</sup>。また補助剤である MMF に関しては消化管障害、ステロイド剤に関しては易感染性などの副作用が報告されている<sup>6)</sup>。そのため、より副作用が低減された新たな作用機序をもつ免疫抑制剤の開発が望まれている。

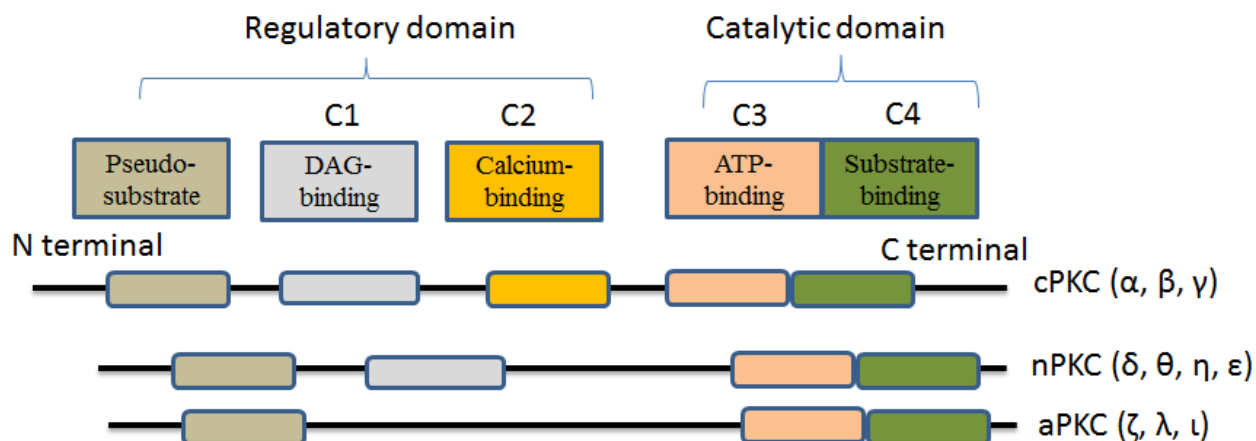
近年、免疫系に関与する細胞の分化、増殖に重要な役割を果たすシグナル伝達経路中に特定の分子を標的とする薬剤の開発が行われており、免疫反応のシグナル伝達を選択的に調節できれば、広範な作用を示す既存の免疫抑制剤と比較して、より免疫系選択的に作用することが出来、既存の薬剤を代替したりや併用効果により使用する薬剤投与量を減量させることで副作用の低減につながる可能性がある<sup>10)</sup>。

	薬剤	主な副作用
主剤	タクロリムス (CNI)	腎機能障害 高血圧 高血糖など
	シクロスポリン (CNI)	腎機能障害 肝機能障害 高血圧 高血糖など
補助剤	MMF (IMPDH inhibitor)	消化管障害 貧血など
	プレドニゾロン (steroid)	易感染性 中枢神経障害など

**Figure 3.** Standard therapy for transplant.

## 第二節 免疫抑制剤としての Protein kinase C $\theta$ (PKC $\theta$ ) 阻害剤概説

セリン/スレオニンキナーゼはタンパク質のセリン、スレオニン残基をリン酸化するキナーゼであり、全キナーゼの約 90% を占め、細胞内の多彩なシグナル伝達に関与している<sup>11)</sup>。その一つである Protein kinase C (PKC) は、細胞の増殖や分化・細胞死に密接に関わっており、他のタンパク質キナーゼと同様に、触媒領域と調節領域を有していることが知られている (Figure 4)<sup>12)</sup>。触媒領域は C 末端側に存在し、基質タンパク質上のリン酸残基を認識する配列と ATP/Mg<sup>2+</sup> 結合する配列から構成される。一方、調節領域は N 末端側に位置し、C1 と C2 ドメインから構成される。PKC は不活性化状態では触媒領域と調節領域が結合しており、触媒ドメインから調節領域が外れることによって活性化される。

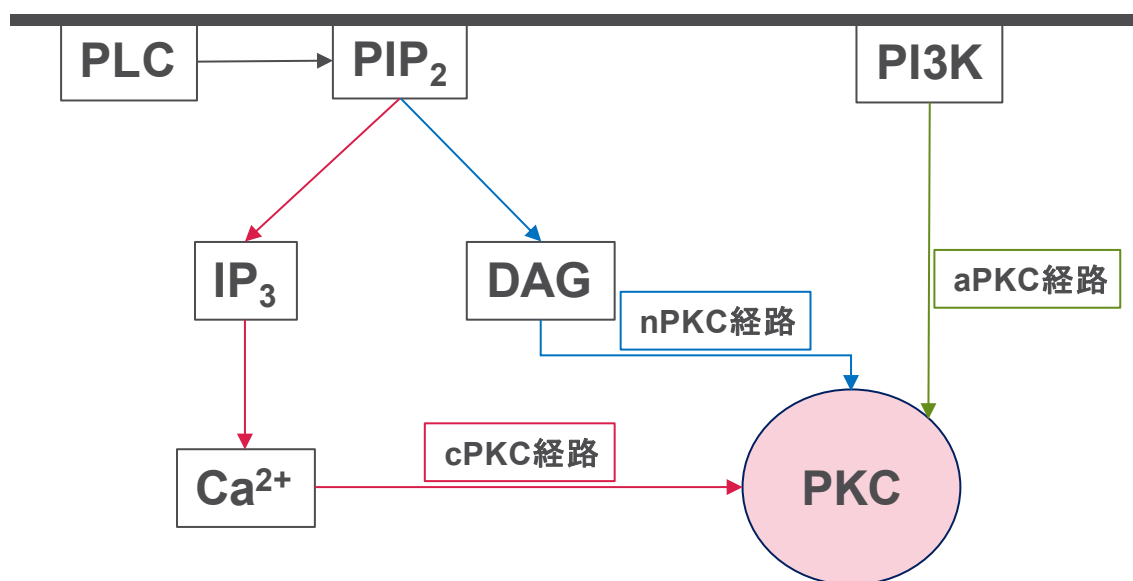


**Figure 4.** Isoforms of PKC.

各調整領域ドメインに関して、C1 ドメインはジアシルグリセロール (DAG) や発がんプロモーターであるホルボールエステルを結合し、C2 ドメインは Ca<sup>2+</sup> イオンを結合することが知られている。分子クローニングの結果、PKC は単一の酵素ではなく、少なくとも 11 種のアイズォイムから形成され、そのドメイン構造や活性化機序などにより conventional あるいは classic PKC (cPKC) , novel PKC (nPKC) , atypical PKC (aPKC) の 3 つのサブファミリーに分類されている<sup>13)</sup>。

cPKC は C1, C2 ドメインを有し活性化のために DAG と Ca<sup>2+</sup> を必要とする。DAG はホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP<sub>2</sub>) とホスホリターゼ C (PLC) によって加水

分解されることによって、ホスファチジルイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) と共に生成する。IP<sub>3</sub> が細胞内に拡散し、小胞体上にある IP<sub>3</sub> 感受性 Ca<sup>2+</sup>イオンが PKC と結合することで、PKC は細胞膜へ移動し、C1 ドメインを介し、DAG と相互作用する。そして PKC が触媒ドメインから調節領域が外れるように構造を変化させ活性化する。nPKC は C2 ドメインが欠損し C1 ドメインを有し、DAG によって活性化される。また aPKC はその活性化に DAG や Ca<sup>2+</sup>を必要とせず、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 等の様々な脂質代謝産物のセカンドメッセンジャーによって活性化されることが知られている (Figure 5)。



**Figure 5.** PKC signal pathway

着目した PKC $\theta$  は nPKC の一つであり C2 ドメインを持たない Ca<sup>2+</sup>非依存型のプロテインキナーゼであり、CN とは異なる伝達経路を経て IL-2 を産生させる。抗原提示細胞によって刺激された T 細胞受容体により活性化された PKC $\theta$  は AP-1, NF- $\kappa$ B を活性化し、それらが核内に移行することによって IL-2 を産生させ、その結果免疫作用が惹起される (Figure 6) <sup>14)</sup>。PKC $\theta$  はこのように既存の免疫抑制ターゲットとは異なる伝達経路に位置しているため、既存薬が引き起こす腎毒性などの副作用を回避できると考えられている。また PKC $\theta$  は他の nPKC と比較して発現部位が T リンパ球や骨格筋に局限していることから副作用の少ない免疫抑制剤のターゲットとして期待されている (Figure 7) <sup>15)</sup>。

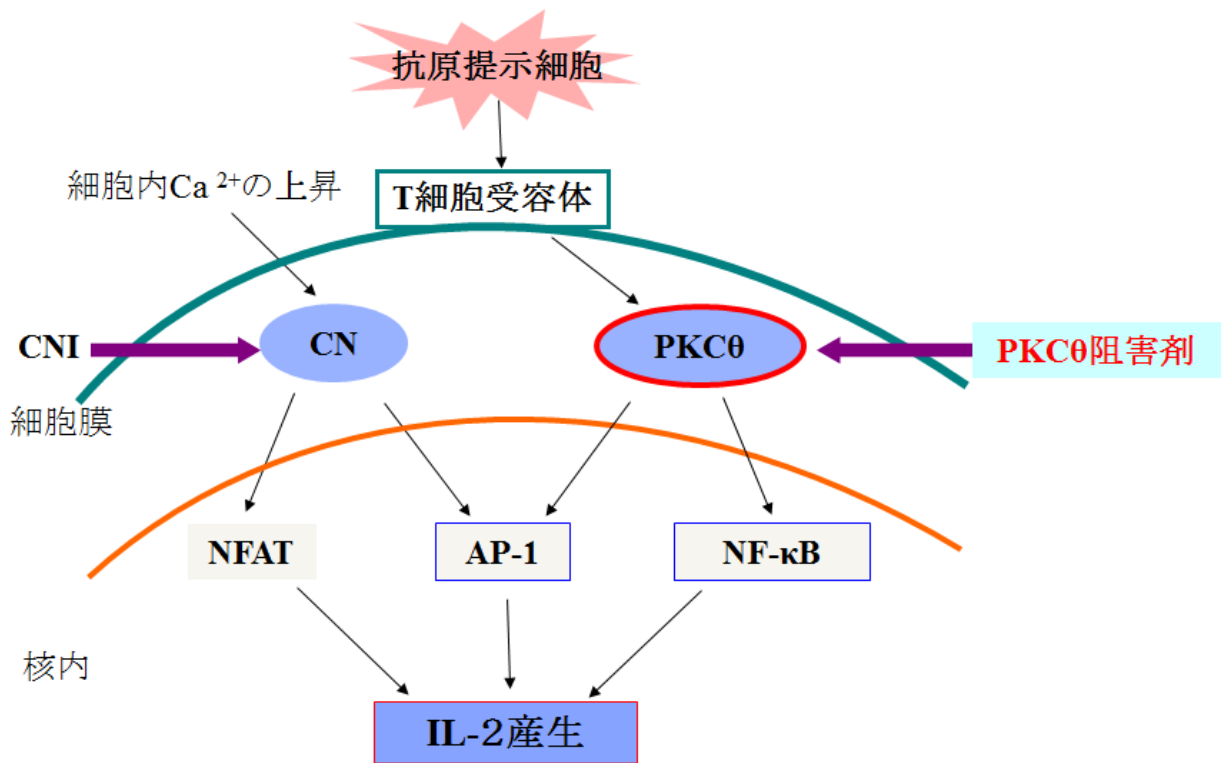
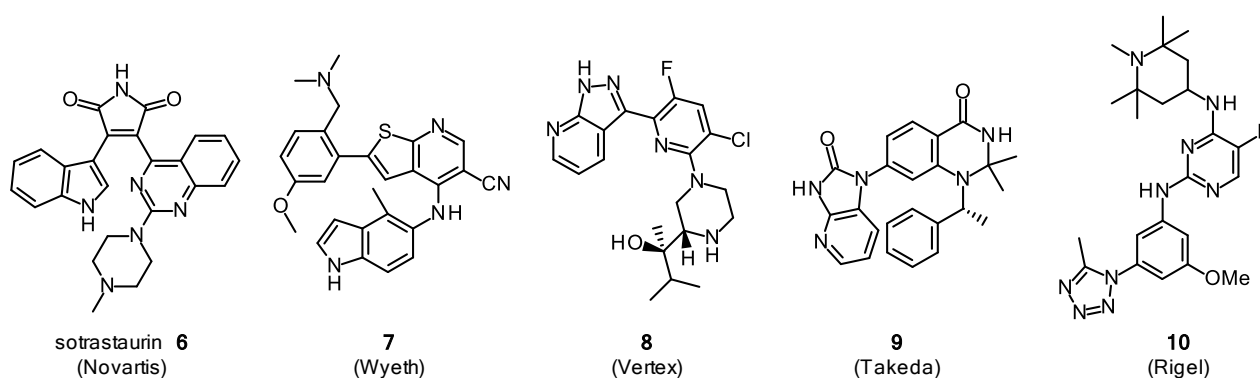


Figure 6. Signal induction mediated by PKCθ and CN

分類	分子種	発現部位	KO mice の表現型
classical PKC (c PKC)	$\alpha$	ほとんど全て	インスリン刺激によるシグナル上昇
	$\beta 1$	一部の臓器	インスリン刺激による糖輸送上昇 B cell および肥満細胞の機能低下
	$\beta 2$		
	$\gamma$	脳、脊髄のみ	空間認識能低下、運動失調
novel PKC (n PKC)	$\delta$	ほとんど全て	移植後動脈硬化症の増悪
	$\epsilon$	脳及び一部末梢組織	痛覚低下、アルコール消費上昇
	$\eta$	肺、皮膚、心臓	(報告無)
	$\theta$	Tリンパ球、骨格筋	T細胞シグナル伝達阻害 T cell anergy の誘導 (骨格筋の異常なし)
atypical PKC (a PKC)	$\zeta$	ほとんど全て	B cell の機能低下
	$\lambda$	網膜、卵巣、精巣	光受容器発育不全

Figure 7. Location of PKC isoforms.

そのため、これまで多くの PKC $\theta$  阻害剤の開発及び報告がされてきた。その中でもノバルティス社によって見出された sotrastaurin (**6**)は PKC $\theta$  に対する IC<sub>50</sub> = 1 nM と強力な阻害作用を示し、免疫抑制剤として第二相試験まで開発されている<sup>16)</sup>。sotrastaurin (**6**)の臨床での薬理作用が報告され、PKC $\theta$  が免疫抑制剤の創薬ターゲットとして有望であることが明らかになった以降、各社から Figure 8 に示すような多くの PKC $\theta$  阻害剤が報告されている<sup>17)</sup>。マレイミド類縁体である sotrastaurin (**6**)は PKC $\theta$  以外のアイソザイムに対しても阻害活性を有する pan-PKC 阻害剤であり、臨床試験において、副作用が報告されている一方、非マレイミド類縁体 **7-9** は PKC $\theta$  選択的阻害作用を有していることが報告されている。



**Figure 8.** Structure of PKC $\theta$  inhibitors.

### 第三節 本研究の目的と方針

本研究では臓器移植時の拒絶反応抑制への適応を指向し、PKC $\theta$  を標的とした新規免疫抑制剤の創出を検討した。

化合物の合成展開において、既存の免疫抑制剤の置き換えだけでなく、標準療法である併用療法に新たな薬剤を追加する手法を選択した。それによって同時に併用する薬剤の投与量を下げ、問題となっている副作用を低減できるのではないかと考えた。目標とする PKC $\theta$  阻害剤のプロファイルとして以下の項目を設定した。

- (1) PKC $\theta$  に対して高い阻害活性を示す
- (2) 動物移植モデルにおいて、単剤、経口投与で有効性を示す
- (3) 薬物間相互作用、難水溶性などの臨床上の薬物使用を制限させる懸念が少ない
- (4) 動物移植モデルにおいて、補助薬として有効性を示す。

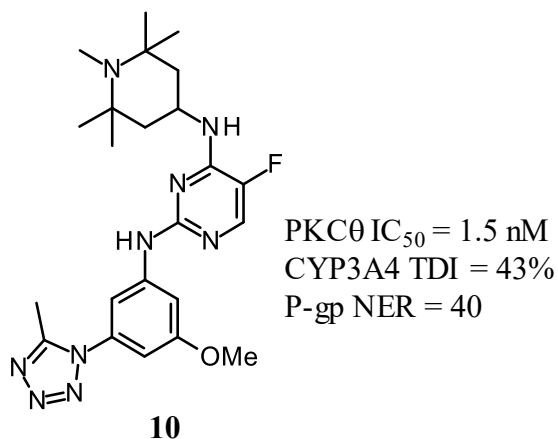
以上のプロファイルを持つ化合物を創出すべく研究を開始した。研究方針として、臨床試験において副作用が報告されている sotrastaurin とは構造が大きく異なる化合物から新規化合物をデザイン・合成し、ラット心移植モデルにおいて有効性を示す化合物を見出すこととした。その後、CYP 阻害作用や水溶性を改善し、最終的に上記のプロファイルを満たす化合物の創製を目指した。

## 本論

### 第一章 PKC $\theta$ 阻害活性を有する新規 2,4-ジアミノ-5-フルオロピリジン誘導体の創出

#### 第一節 研究方針

PKC $\theta$  阻害活性を有する化合物を探索するにあたり、水素結合能を有するヘテロ芳香環に着目し研究を開始した。キナーゼを標的とする低分子阻害薬はアデノシン三リン酸 (ATP) と競合し標的タンパクに結合することにより薬理作用を示す。特に、ATP 結合部位とヒンジ領域との水素結合による相互作用は阻害活性発現に重要であり、ATP のアデニン環を模倣したヘテロ芳香環を有するキナーゼ阻害剤が数多く報告されている<sup>18)</sup>。既知の PKC $\theta$  阻害剤のいくつかのヘテロ芳香環化合物を合成し、阻害活性を評価したところ Rigel 社特許記載の化合物 **10**<sup>19)</sup>が IC<sub>50</sub> = 1.5 nM と良好な PKC $\theta$  阻害活性を有していた。しかしながら本化合物は CYP3A4 時間依存的阻害活性 (CYP3A4 time dependent inhibitor: CYP3A4 TDI) 及び P-gp (P-glycoprotein) 基質性を有していることがさらなるプロファイル評価の過程において判明した。

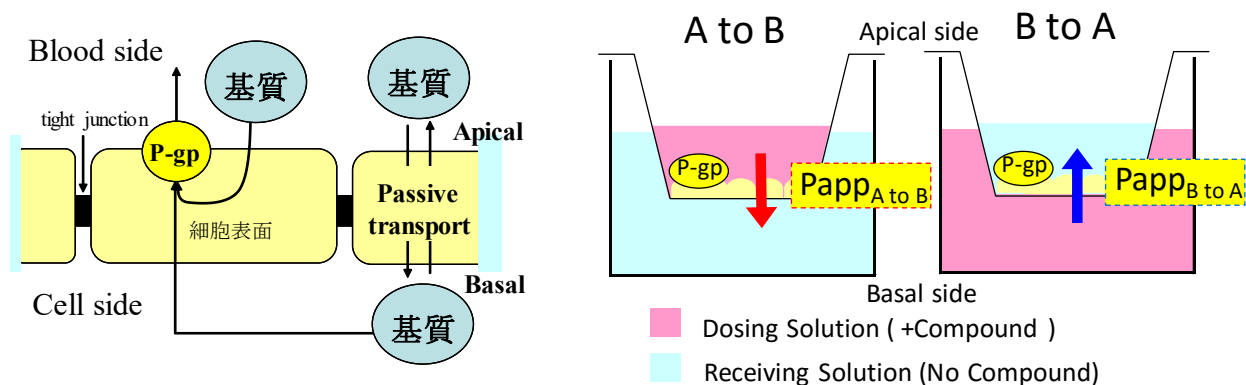


**Figure 9.** Structure of compound **10**.

タクロリムスなどの CNI は CYP3A4 によって代謝されるため、併用薬が CYP3A4 阻害を有している際は、薬物相互作用によって CNI の血中濃度の上昇を招き、副作用の発現を引き起こす可能性がある。そのため CNI の補助剤として開発するためには CYP3A4 阻害の懸念の少ないことが求められる<sup>20)</sup>。



また P-gp は 170kDa の膜タンパク質で、ATP 加水分解エネルギーを利用し、薬剤を細胞内から細胞外へと排出することが知られている。P-gp はガン細胞だけでなく、血液脳関門や小腸・腎臓・肝臓にも分布しており、P-gp の基質になる場合、P-gp によって排出されるために吸収性は著しく低下してしまうことが知られている<sup>21)</sup>。以上のことから CYP3A4 時間依存的阻害活性及び P-gp 基質性の改善を目的に最適化研究を開始することとした。以下に今回用いた評価系について述べる。



・使用細胞:wild type (WT)、MDR1発現細胞

ER (Efflux Ratio) : 各細胞の方向性

$$ER = \frac{Papp_{B \text{ to } A}}{Papp_{A \text{ to } B}}$$

$$NER = \frac{ER\_MDR1}{ER\_WT}$$

Figure 10. Evaluation for P-gp substrate.

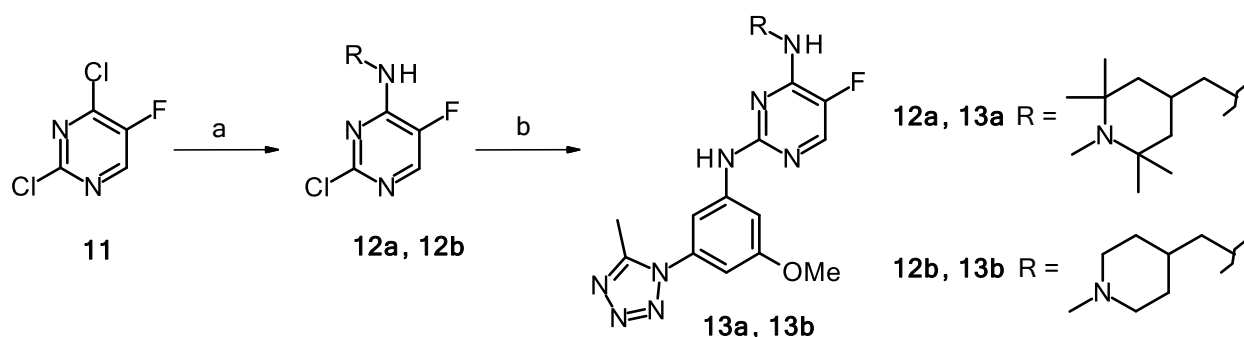
P-gp 評価系：ヒト P-gp 遺伝子である MDR1 を導入した LLC-PK1 細胞を用い、化合物の細胞輸送能を評価した<sup>22)</sup>。LLC-PK1 細胞は極性を有しているためフィルター上で培養すると P-gp は apical 側に局在する。そのため、評価化合物の apical 側から basal 側へに輸送と basal 側から apical 側への輸送を比較することで P-gp の輸送能を評価できる。コントロールの細胞 (WT) と比べて P-gp にどの程度輸送されるかを評価し、体内動態改善の指標とした (Figure 10)。

CYP3A4 時間依存的阻害評価系：評価化合物と代謝酵素である CYP3A4 を 30 分間インキュベートした場合としない場合とで、CYP3A4 の残存活性を評価した。残存活性は CYP3A4 の基質であるミダゾラムがヒドロキシ体に代謝される割合より算出し、本残存活性が 80% 未満の場合、TDI の懸念ありと判断することとした。

## 第二節 2,4-ジアミノ-5-フルオロピリミジン誘導体の合成

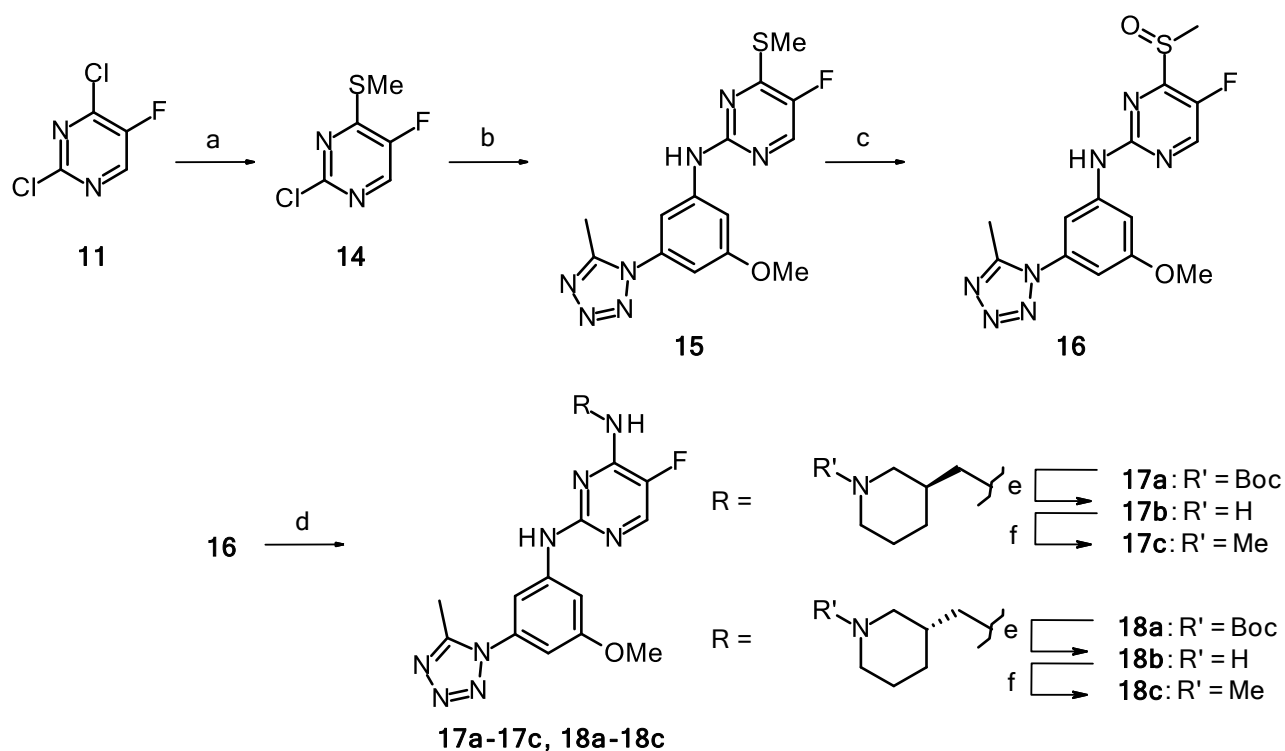
2,4-ジアミノ-5-フルオロピリミジン誘導体の合成法を Scheme 1 に示す。

市販の化合物 2,4-ジクロロ-5-フルオロピリジン **11** に対して、塩基性条件下、脂肪族アミンと反応させると 4 位選択的に反応が進行し、**12a** 及び **12b** が得られる。続いて酸性条件下で 3-メトキシ-5-(5-メチル-1*H*-テトラゾール-1-イル)アニリンと反応させることで目的とする **13a** 及び **13b** を得た。



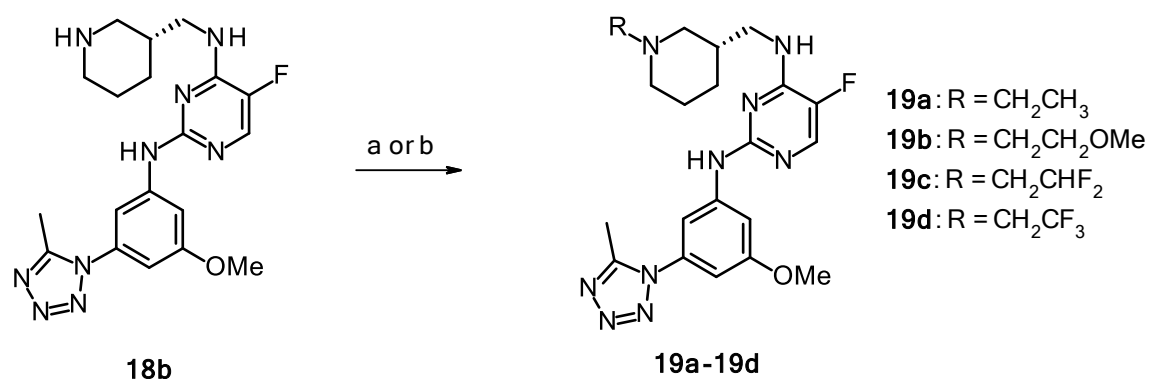
**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) RNH<sub>2</sub>, DIPEA, MeOH, rt, 16 h, **12a**: 66%, **12b**: 38%; (b) 3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)aniline, HCl, IPA, microwave, 140 °C, 1 h, **13a**: 33%, **13b**: 36%.

次に、C4 位を変換した化合物を効率的に合成するための改良合成ルートを Scheme 2 に示す。化合物 **11** に対して低温下、ナトリウムチオメトキシドを反応させ、4 位がチオメトキシド基で置換された化合物 **14** を得た。化合物 **14** をマイクロウェーブ照射下、酸性条件下で 3-メトキシ-5-(5-メチル-1*H*-テトラゾール-1-イル)アニリンと反応させることで化合物 **15** を得た。化合物 **15** に対して *m*-CPBA を用い酸化させ、スルホキシド **16** を得た。本化合物に対して塩基性条件下、各種アミンとの求核置換反応を行い、**17a**, **18a** へと導いた。続いて酸性条件下での Boc 基の除去と還元的アルキル化を行い **17c**, **18c** を得た。スルホキシド **16** を経る本改良合成ルートの構築によって効率的に C4 位のアミノ基の変換を行うことが可能となった。



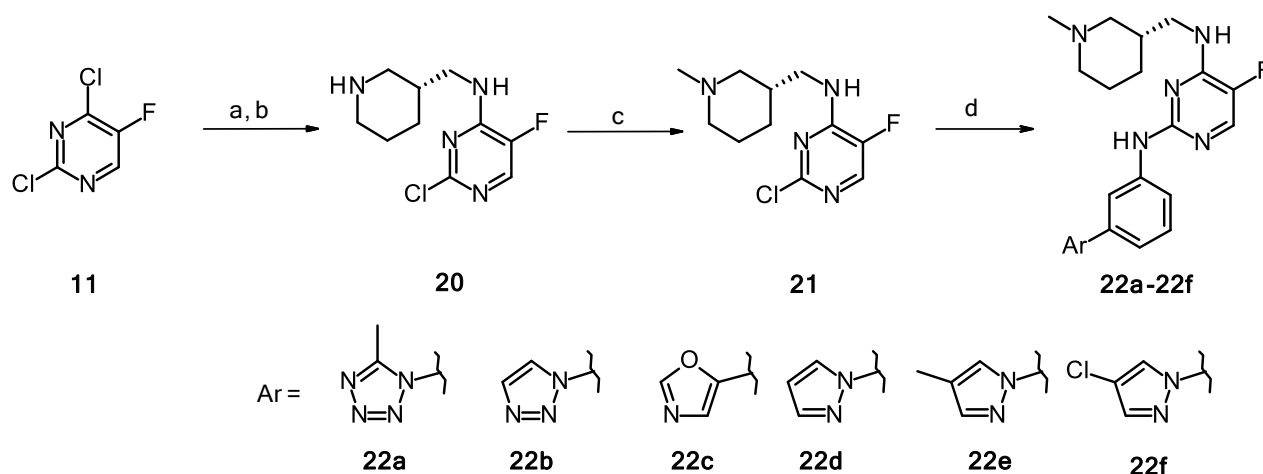
**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a) NaSMe, THF,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 h, 96%; (b) 3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)aniline, HCl, IPA, microwave,  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 h, 83%; (c) *m*-CPBA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 h, 54%; (d)  $\text{RNH}_2$ , DIPEA, NMP, microwave,  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 h, **17a**: 99%, **18a**: 85%; (e) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 1 h, **17b**: 81%, **18b**: 99%; (f) 36% HCHO aq.,  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 3 h, **17c**: 62%, **18c**: 61%.

化合物 **18b** の C4 位ピペリジンのアミノ基を修飾した **19a-19d** の合成法を Scheme 3 に示す。**18b** に対して塩基性条件下、種々のアルキルブロマイドやトリフルオロメタンスルホン酸アルキルを作用させ化合物 **19a-19d** を得た。



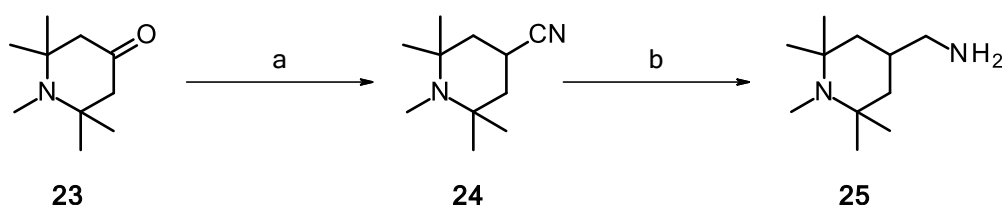
**Scheme 3.** Reagents and conditions: (a) RBr, DIPEA, NMP, microwave,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 h (for **19a**: 68% and **19b**: 64%); (b)  $\text{ROSO}_2\text{CF}_3$ , DIPEA, THF, reflux, 14 h (for **19c**: 51% and **19d**: 64%).

続いて C2 位の置換基を変換した **22a-22f** の合成法を Scheme 4 に示す。2,4-ジクロロ-5-フルオロピリジン **11** に対して(3*S*)-3-アミノメチル-1-Boc-ピペリジンを塩基性条件下反応させ、続く酸性条件での脱 Boc 化及びホルムアルデヒドを用いた還元的アルキル化により中間体 **21** を得た。本化合物に対して種々のアニリンを酸性条件で反応させることにより C2 位が変換された **22a-22f** を得た。



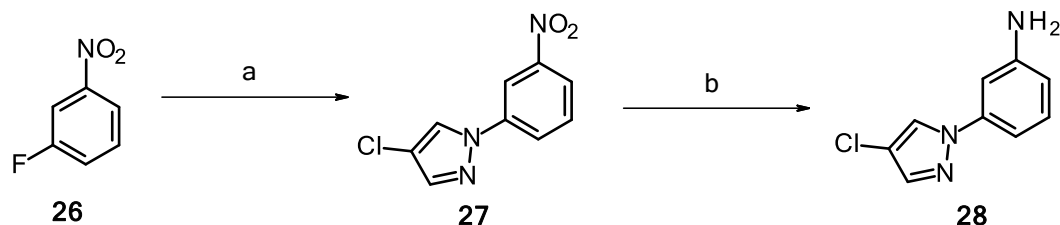
**Scheme 4.** Reagents and conditions: (a) *tert*-butyl (3*S*)-3-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate, DIPEA, DMF, rt, 14 h; (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 4h, 87% (2 steps); (c) 36% HCHO aq., NaBH(OAc)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1 h, 59%; (d) ArNH<sub>2</sub>, HCl, IPA, 120 °C, 9 h, **22a**: 59%, **22b**: 74%, **22c**: 72%, **22d**: 86%, **22e**: 93%, **22f**: 92%.

1,2,2,6,6,-ペンタメチルピペリジン誘導体 **25** は Scheme 5 に示す方法にて合成した。市販化合物 **23** にシアノ化試薬である *p*-トルエンシルホノルメチルイソシアニド (TosMIC) を作用させ、シアノ体 **24** へと変換した後、Lithium aluminum hydride (LAH) を用いた還元により化合物 **25** を得た。



**Scheme 5.** Reagents and conditions: (a) TosMIC, <sup>t</sup>BuOK, DME, rt, 2 h, 56%; (b) LAH, THF, 0 °C, 3 h, 98%.

アニリン誘導体 **28** は Scheme 6 に示す方法にて合成した。市販化合物 **26** に対して塩基性条件下、4-クロロ-1*H*-ピラゾールを反応させ、続くスズ試薬を用いたニトロ基の還元により **28** を得た<sup>23)</sup>。

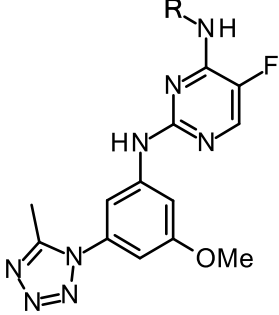


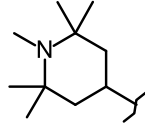
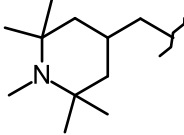
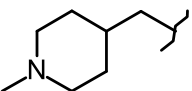
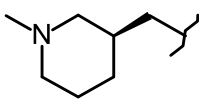
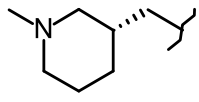
**Scheme 6.** Reagents and conditions: (a) 4-Cl-1*H*-pyrazole, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMI, 130 °C, 16 h, 92%; (b) SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, EtOH, reflux, 6 h, 94%.

### 第三節 PKCθ 阻害活性・CYP3A4 阻害活性・P-gp 基質性評価

2,4-ジアミノ-5-フルオロピリミジン誘導体に関してヒト PKCθ 阻害活性・CYP3A4 阻害活性及び P-gp 基質性を評価した (Table 1)。

出発物質である化合物 **10** は IC<sub>50</sub> = 1.5 nM と良好な PKCθ 阻害活性を示す一方、CYP3A4 残存活性 (CYP3A4 TDI) は 43% と低く、P-gp の基質性の指標である NER も 40 と高いものであった。初めに CYP3A4 の低減を図るべく、母核であるピリミジン環と 4 位の末端のピペリジン環の窒素原子との距離に着目した。一般的に CYP3A4 酵素は代謝部位から 5.5-7.8Å の距離にある水素原子アクセプターと相互作用することが知られている<sup>24)</sup>。そこでこの距離を変換すべくメチレン鎖を一つ伸長した **13a** を合成し評価したものの、残念ながら十分な CYP3A4 TDI の改善には至らなかった。一般的に CYP3A4 の基質ポケットは大きく、また可動性も高いことが知られている。そのため既知の基質との複合体 X 線結晶構造解析より薬剤がポケットの様々なサイトに結合しやすく、一般的に疎水性の高い化合物が CYP3A4 の基質になりやすいということが報告されている<sup>25)</sup>。この報告を参考にし、脂溶性を下げることで CYP3A4 による代謝を抑制し TDI の改善を目指すこととした。脂溶性の指標として簡便に算出できる ACDlogP を用いることとした<sup>26)</sup>。化合物 **13a** の特徴的なピペリジン環の 4 つのメチル基を除去した化合物 **13b** は予想通り脂溶性が軽減され TDI の改善に成功した。またピペリジン環の窒素原子の位置を 4 位から 3 位に変換した **17c** も活性は良好であり、異性体である *S* 体 **18c** においては IC<sub>50</sub> = 0.32 nM と活性の向上に成功した。

**Table 1.** Conversion of pentamethylpiperidyl group of compound **10**.

Compound	R	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	CYP3A4 TDI (residual activity, %) <sup>b</sup>	ACDlogP <sup>c</sup>	P-gp NER <sup>d</sup>	pK <sub>a</sub> <sup>c</sup>
<b>10</b>		1.5	43	4.00	40	10.21
<b>13a</b>		4.0	48	3.76	24	10.85
<b>13b</b>		0.68	89	1.93	8.0	9.19
<b>17c</b>		5.2	86	2.54	8.2	9.40
<b>18c</b>		0.32	85	2.54	9.3	9.40

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in duplicate in one experiment.

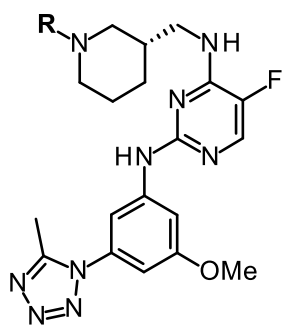
<sup>b</sup> Activities of HLMs for metabolism of midazolam were measured and residual activities are shown as percentage of remained metabolic activity following preincubation for 30 min in presence of test compounds (5  $\mu$ M).

<sup>c</sup> ACDlogP and pK<sub>a</sub> values were calculated with ACD/PhysChem Batch (version 12.01).

<sup>d</sup> Net efflux ratio was LLC-PK1-MDR1 efflux ratio to LLC-PK1-wild type efflux ratio.

良好な活性を有し、TDIが改善した化合物 **18c** の創出に成功したので、次に P-gp の基質性改善に向けて新たな戦略をとることとした。pKa と P-gp 基質性に相関が見られるという報告<sup>28)</sup>及び化合物 **13a** から **13b** に変換したことによる pKa の低減が P-gp 基質性の改善に至ったという実験事実より、pKa の低減による P-gp 基質性の改善を試みた。ピペリジンの窒素原子の置換基を変換することによる pKa の低減と P-gp 基質性の結果を Table2 に示す。pKa を 8-9 に調整した **19a, 19b** では大きな改善は見られなかった一方、ジフルオロエチル基を導入し pKa = 6.29 まで低減させた **19c** は P-gp 基質性が改善され、トリフルオロエチル基を導入し pKa = 4.81 まで低減させた化合物 **19d** は P-gp NER = 2.4 と P-gp 基質性の改善に成功した。しかしながら、主活性である PKC $\theta$  阻害活性も pKa と相関しており、**19c** は活性が減弱し、**19d** に至っては活性が消失した。

**Table 2.** Conversion of *N*-alkyl group on the piperidine side chain



Compound	R	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	P-gp NER <sup>b</sup>	pKa <sup>c</sup>
<b>18c</b>	Me	0.32	9.3	9.40
<b>19a</b>	Et	0.14	19	9.25
<b>19b</b>	MeOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	0.46	9.6	8.43
<b>19c</b>	CHF <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	30	4.0	6.29
<b>19d</b>	CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	>100	2.4	4.81

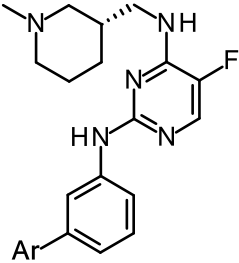
<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in duplicate in one experiment.

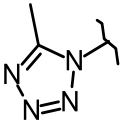
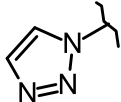
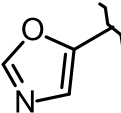
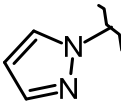
<sup>b</sup> Net efflux ratio was ratio of LLC-PK1-MDR1 efflux ratio to LLC-PK1-wild type efflux ratio.

<sup>c</sup> pKa values were calculated with ACD/PhysChem Batch (version 12.01).

塩基性が PKC $\theta$  阻害活性発現に重要であることが判明したので、異なる方策を用い P-gp 質性の改善を試みることにした。新たな指標として P-gp との相関が報告されている極性表面積 (total polar area, TPSA) に着目した<sup>28)</sup>。つまり TPSA を減少させ受動拡散を増大させることによって P-gp が改善できるのではないかと考えた。TPSA を減少すべく 2 位のテトラゾールに着目し、窒素原子の数を減少させることで TPSA を減少させ、P-gp 基質性が改善できるのではないかと考えた。その結果を Table 3 に示す。トリアゾールに変換した **22b** は P-gp 基質性がわずかしか改善しなかった一方、オキサゾールやピラゾールに変換した **22c**、**22d** は P-gp 基質性を大きく改善することに成功した。

**Table 3.** Conversion of the tetrazole moiety on the phenyl ring



Compound	Ar	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	P-gp NER <sup>b</sup>	TPSA <sup>c</sup>
<b>18c</b>	-	0.32	9.3	105.9
<b>22a</b>		2.1	11.7	96.7
<b>22b</b>		10	10.7	83.8
<b>22c</b>		27	4.5	79.1
<b>22d</b>		28	3.5	70.9

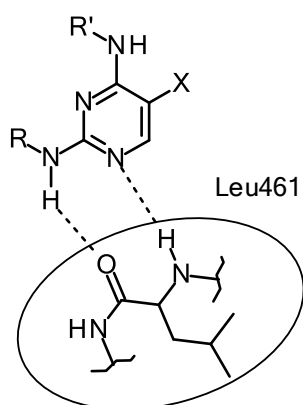


<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in duplicate in one experiment.

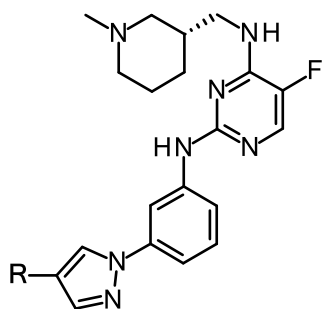
<sup>b</sup> Net efflux ratio was ratio of LLC-PK1-MDR1 efflux ratio to LLC-PK1-wild type efflux ratio.

<sup>c</sup> TPSA values were calculated with ACD/PhysChem Batch (version 12.01).

TPSA に着目した構造変換により合成したピラゾール化合物 **22d** は P-gp の改善に成功したものの、PKCθ IC<sub>50</sub> = 28 nM と中程度の活性に減弱してしまった。そこで次に減弱した活性を向上させるため、他社から報告されているジアミノピリミジン化合物と PKCθ のドッキングスタディーを利用することとした。彼らはピリミジンの 1 位の窒素原子と 2 位のアミノ基が ATP との結合サイトにおいてヒンジ部と相互作用することを報告している<sup>29)</sup>。具体的にはピリミジン 2 位のアミノ基の NH と Leu461 のカルボニル基との水素結合とピリミジン 1 位の窒素原子と Leu461 の NH との相互作用である (Figure 11)。そこでピラゾール環に置換基を導入し C2 位のアミノ基の電子密度を下げることで前者の水素結合が強くなり活性向上につながるのではないかと考えた。本合成戦略に基づいたピラゾール環への置換基導入の結果を Table 4 に示す。電子供与基であるメチル基を導入した **22e** は活性が向上しなかった一方、電子吸引基であるクロロ基を導入した **22f** は PKCθ IC<sub>50</sub> = 3.0 nM と無置換体 **22d** と比較し 9 倍以上の活性向上に成功した。



**Figure 11.** Binding mode of 2,4-diaminopyrimidine derivative with PKCθ

**Table 4.** PKC $\theta$  inhibitory activity and P-gp liability of pyrazole derivatives

Compound	R	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	P-gp NER <sup>b</sup>	CYP3A4 TDI (residual activity, %) <sup>c</sup>
<b>22d</b>	H	28	3.5	85
<b>22e</b>	Me	32	-	-
<b>22f</b>	Cl	3.0	2.3	98

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in duplicate in one experiment.

<sup>b</sup> Net efflux ratio was ratio of LLC-PK1-MDR1 efflux ratio to LLC-PK1-wild type efflux ratio.

<sup>c</sup> Activities of HLMs for metabolism of midazolam were measured and residual activities are shown as percentage of remained metabolic activity following preincubation for 30 min in presence of test compounds (5  $\mu$ M).

#### 第四節 本章のまとめ

PKC $\theta$  を標的とした新規な免疫抑制剤として 2,4-ジアミノ-5-フルオロピリミジン誘導体を合成し、PKC $\theta$  阻害活性・CYP3A4TDI 及び P-gp 基質性を評価した。脂溶性の低減が CYP3A4 改善に重要であるという知見を利用し化合物 **18c** を見出した。さらに **18c** の P-gp を改善すべく TPSA に着目した合成展開を行い、P-gp が改善した **22d** を見出すことに成功した。続いて他社のドッキングスタディーを基に活性向上を図り、クロロ基を導入した **22f** が良好な活性を示すことを明らかにした。これらの結果により CYP3A4 TDI, P-gp 基質性の懸念が少なく、活性が良好な PKC $\theta$  阻害剤を見出すことができ、移植試験において単剤だけでなく補助剤としても使用可能と言えるプロファイルを有する有望な化合物の創出に成功した。

## 第二章 PKC $\theta$ 阻害活性を有する新規 2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体の創出

### 第一節 研究方針

PKC $\theta$  阻害活性を有する化合物を探索するにあたり、他社化合物からの合成展開を行う一方、自社ライブラリからの化合物創出についても同時に行った。各種自社化合物を評価した結果、2,6-ジアミノ-3-カルバモイル-5-シアノピラジン誘導体 **29** を見出した (Figure 12)。化合物 **29** は PKC $\theta$  に対して IC<sub>50</sub>=24 nM の阻害活性を示したが、先行品の Sotrastaurin (IC<sub>50</sub>=1.0 nM) や先に見出した化合物 **22f** (IC<sub>50</sub>=3.0 nM) と比較して 10 倍程度活性が減弱しており、活性向上のための構造変換が必要であった。

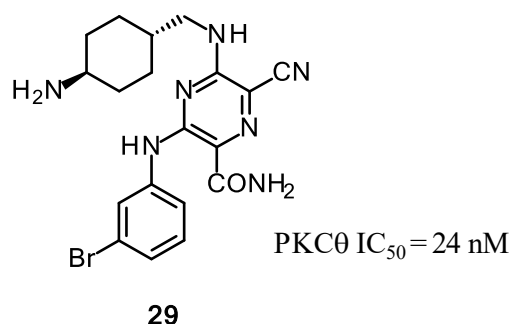
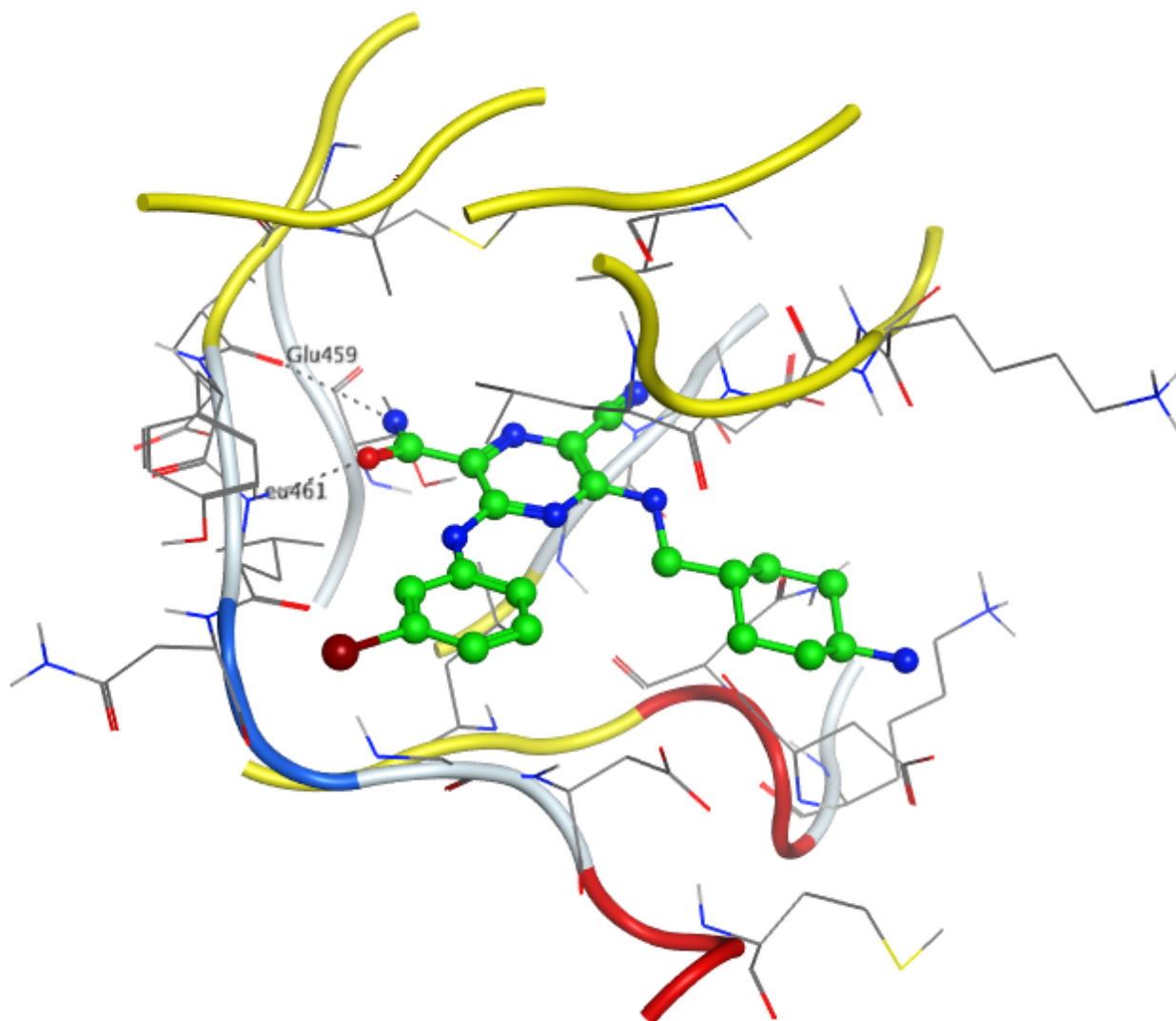


Figure 12. Structure of PKC inhibitors

より高活性な化合物をデザインするにあたり、PKC $\theta$  のホモロジーモデルを用いた。PKC $\theta$  の ATP binding site は hinge 領域及び疎水性領域から構成されている。**29** と PKC $\theta$  のドッキング解析の結果、カルバモイル基はヒンジ領域に位置する Glu459 及び Leu461 と水素結合を介して相互作用することが推定された (Figure 13)。このようにドッキングスタディーよりカルバモイル基が活性発現に重要であると判明した一方、一般的にカルバモイル基は膜透過性が不良で体内動態が不良であることが知られている<sup>30)</sup>。そこで体内動態に懸念のあるカルバモイル基を変換し、活性が良好な化合物の創出を目指し合成展開を行った。カルバモイル基が利用しているヒンジ領域との相互作用を母核変換することによっても利用できるのではないかと考えた。つまり、母核に窒素原子を導入することでヒンジ領域との相互作用が獲得できるのではないかと推測した。このような仮説の基づき、新規母核の探索を行った。

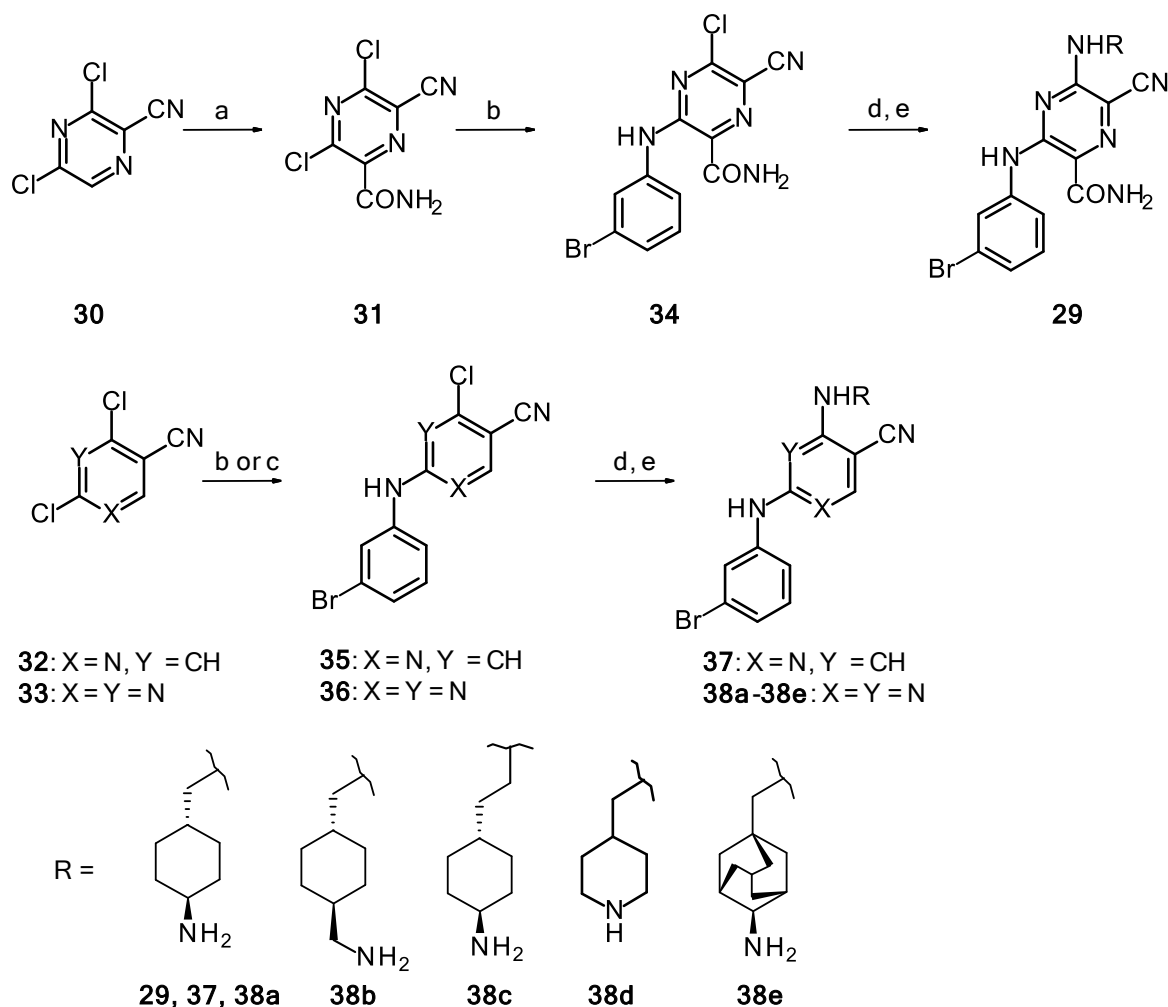


**Figure 13.** Molecular modeling results for **29** with human PKCθ

## 第二節 2,6-ジアミノ-3-カルバモイル-5-シアノピラジン誘導体・2,4-ジアミノ-5-シアノピリジン誘導体及び2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体の合成

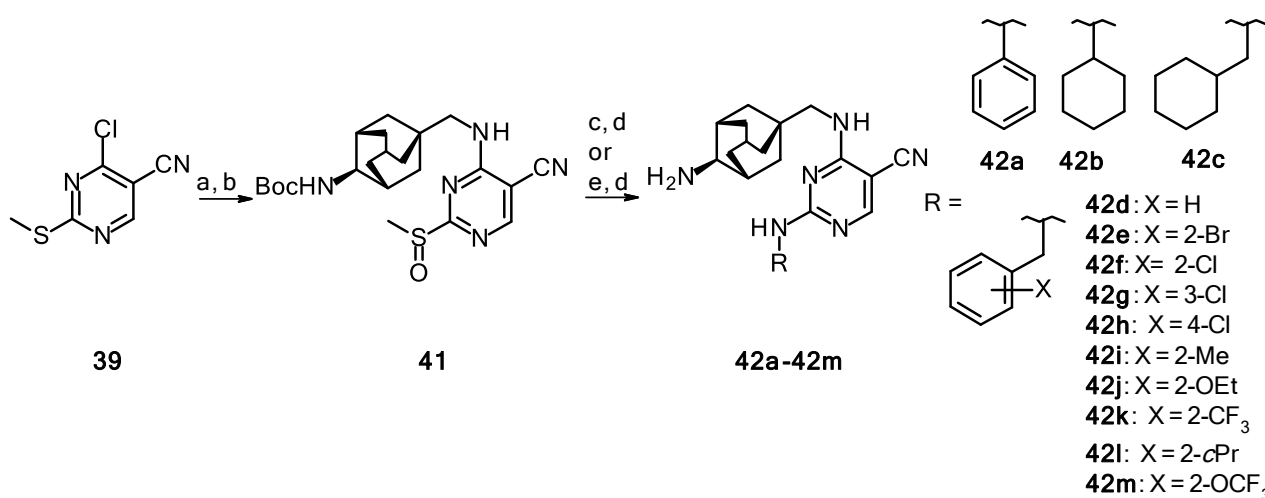
2,6-ジアミノ-3-カルバモイル-5-シアノピラジン誘導体の合成法を Scheme 7 に示す。市販の化合物 3,5-ジクロロ-2-シアノピラジン **30** に対して文献既知の方法によりカルバモイル基を導入した **31** を合成した<sup>31)</sup>。その後塩基性条件下、3-ブロモアニリンを 2 位に導入し、化合物 **34** を得た。続く塩基性条件下、脂肪族アミンを 6 位に導入し、酸性条件による脱 Boc 基により目的とするピラジン誘導体 **29** を得た。2,4-ジアミノ-5-シアノピリジン誘導体 **37** の合成法を次に示す。市販の化合物 2,4-ジクロロ-5-シアノピリジン **32** を酸性条件下、

3-ブロモアニリンと反応させ、化合物 **35** を得た。化合物 **35** を塩基性条件下、脂肪族アミンと反応させ、続いて酸性条件下にて Boc 基を脱保護し、化合物 **37** を得た。続いて 2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体 **38a-38e** の合成法を以下に示す。市販の化合物 **33** を塩基性条件下、3-ブロモアニリンと反応させ、化合物 **36** を得た。化合物を塩基性条件下、種々の脂肪族アミンと反応させ、続いて酸性条件下にて Boc 基を脱保護し、化合物 **38a-38e** を得た。



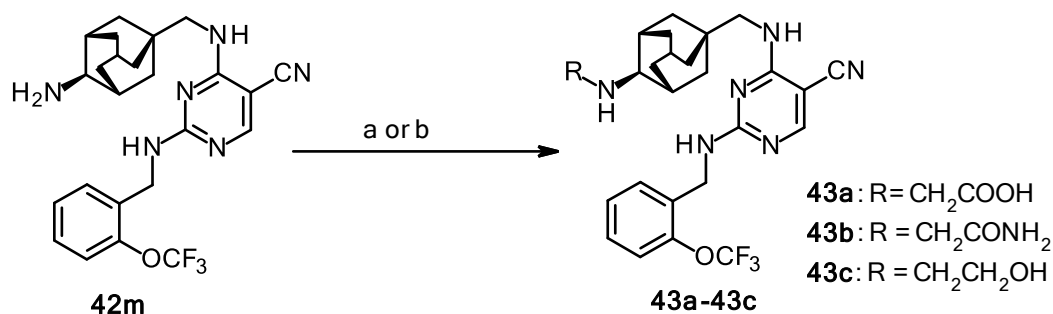
**Scheme 7.** Reagents and conditions: (a)  $\text{HCONH}_2$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 66%; (b) 3-bromoaniline, DIPEA, DMI,  $60^\circ\text{C}$  for **34**: 81% or  $0^\circ\text{C}$  for **36**: 41%; (c) 3-bromoaniline, HCl, DMF,  $150^\circ\text{C}$  for **35**: 7.5%; (d)  $\text{RNH}_2$ , DIPEA, DMI or DMF, rt or  $60^\circ\text{C}$ ; (e) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, **29**: 37% (2 steps), **37**: 19% (2 steps), **38a**: 74% (2 steps), **38b**: 53% (2 steps), **38c**: 89% (2 steps), **38d**: 78% (2 steps), **38e**: 51% (2 steps).

2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体に関して、ピリミジン 2 位のアミノ基部分を変換した化合物の合成法を Scheme 8 に示す。市販の化合物 **39** と別途合成した脂肪族アミン **40** (Scheme 10 にて後述) を塩基性条件にて反応させた後、2 位の硫黄原子を *m*-CPBA を用いて酸化し、スルホキシド体 **41** を得た。化合物 **41** と各種アミンを作用させ求核置換反応を行った。アニリンを用いた場合は酸性条件下で反応を行い、脂肪族アミンを用いた場合は塩基性条件下にて反応を行った。続いて酸性条件下にて Boc 基を脱保護し、化合物 **42a-42m** を得た。



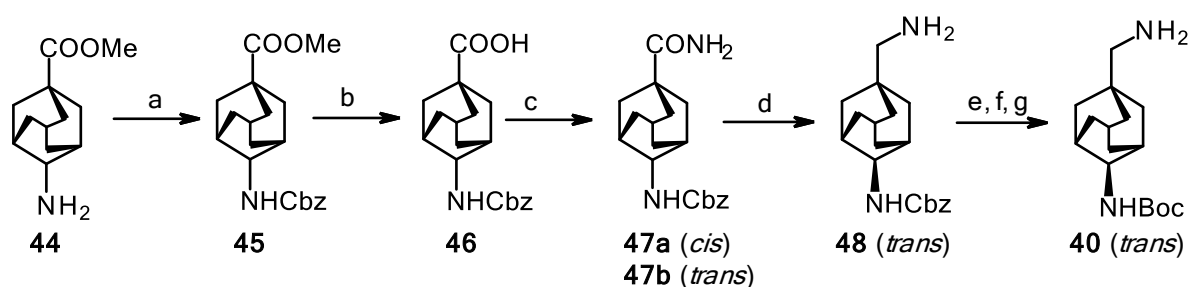
**Scheme 8.** Reagents and conditions: (a) *tert*-butyl [(1*R*,2*s*,3*S*,5*s*,7*s*)-5-(aminomethyl)adamantan-2-yl]carbamate **40**, DIPEA, DMI, 0 °C; (b) *m*-CPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 81% (2 steps); (c) aniline, cat. HCl, DMI, 100°C; (d) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt; (e) RNH<sub>2</sub>, DMI or DMF, rt, **42a**: 36% (2 steps), **42b**: 47% (2 steps), **42c**: 47% (2 steps), **42d**: 34% (2 steps), **42e**: 79% (2 steps), **42f**: 69% (2 steps), **42g**: 68% (2 steps), **42h**: 71% (2 steps), **42i**: 16% (2 steps), **42j**: 62% (2 steps), **42k**: 80% (2 steps), **42l**: 81% (2 steps), **42m**: 76% (2 steps).

2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体に関して、C4 位のアダマンチルアミンの窒素原子上に置換基を導入した化合物 **43a-43c** の合成法を Scheme 9 に示す。化合物 **42m** とエチルブロモアセテートを反応させ、続いて水酸化リチウム水溶液を用いたエステルの加水分解反応を行い化合物 **43a** を得た。また化合物 **42m** を塩基性条件下、アルキルブロマイドと反応させることで **43b**, **43c** を得た。



**Scheme 9.** Reagents and conditions: (a) ethyl bromoacetate, DIPEA, DMF, 60 °C, then LiOHaq., THF, rt (for **43a**: 33%); (b) RBr, DIPEA, DMF, 60 °C (for **43b**: 33% and **43c**: 42%).

2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体に関して、C4位に導入したアミノ化合物 **40** の合成法を Scheme 10 に示す。市販化合物 **44** を CbzCl と反応させ、アミノ基を Cbz 基で保護した化合物 **45** を得た。次いで、水酸化ナトリウム水溶液を用いた加水分解反応によりカルボン酸体 **46** を得た。得られたカルボン酸体に対し、EDC, HOBT を用いて塩化アンモニウムと縮合することでシス体 **47a** 及びトランス体 **47b** を混合物として得た。両化合物はシリカゲルクロマトグラフィーにて分離精製することによりシス体 **47a**, トランス体 **47b** をそれぞれ単品として得た。トランス体 **47b** のアミド基をボラン還元によりメチルアミン体 **48** へと変換し、無水トリフルオロ酢酸によるアミノ基の保護、Pd 触媒下での脱 Cbz 基を行った。続いて Boc<sub>2</sub>O を用いて Boc 基で保護した後、トリフルオロアシル基を塩基性条件下、脱アシル化し、化合物 **40** を得た。



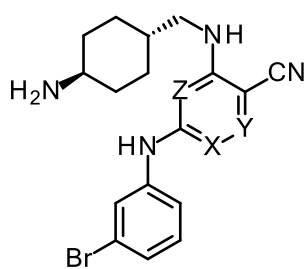
**Scheme 10.** Reagents and conditions: (a) CbzCl, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 73%; (b) 1 M NaOHaq, 1,4-dioxane, MeOH, 60 °C, quant; (c) NH<sub>4</sub>Cl, EDC·HCl, HOBT·H<sub>2</sub>O, DIPEA, DMF, 60 °C, **47a**: 41%, **47b**: 50%; (d) BH<sub>3</sub>·THF, THF, reflux, quant; (e) (CF<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; (f) 10% Pd/C(wet), 1,4-cyclohexadiene, Boc<sub>2</sub>O, EtOH, rt; (g) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, THF, H<sub>2</sub>O, rt, 78% (3 steps).

### 第三節 PKC $\theta$ 阻害活性評価

2,4-ジアミノ-5-シアノピリジン誘導体及び 2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体に関して PKC $\theta$  阻害活性を評価した (Table 5)。化合物 **29** の物性に懸念のあるカルバモイル基の変換を行い、環内に窒素原子を導入したピリジン誘導体 **37** 及びピリミジン誘導体 **38a** を合成し、評価を行った。ピリジン **37** は活性が減弱した一方、ピリミジン **38a** は IC<sub>50</sub> = 4.6 nM と大きく向上した。ピリミジン **38a** で見られた活性向上の要因を解明すべく **38a** と PKC $\theta$  とのドッキング解析を行った (Figure 14)。その結果、予想通り導入したピリミジン 1 位の窒素原子がヒンジ領域に位置する Leu461, Leu462 と相互作用していることが明らかになっただけでなく、4 位のシクロヘキシルアミンの窒素原子が Asp509, Asp522 との相互作用を新たに獲得し、これらが活性向上に寄与したと推察される。一方、ピリジン **37** とピリミジン **38a** を比較すると 27 倍以上の活性の違いがあることは興味深い。Hinge 領域の相互作用獲得のために必要な母核一位の窒素原子の電子密度の違いが活性の違いに寄与していると考え、MOE 計算 (半経験的分子軌道法 AM1: Austin Model 1) により窒素上の電子密度の計算を行ったところ、ピリミジンの 1 位の窒素原子 (-0.255) の方がピリジンの 1 位の窒素原子 (-0.179) よりも電子密度が大きいことがわかり、これがヒンジ領域との水素結合を増大させ、活性向上につながったと推測される。

**Table 5**

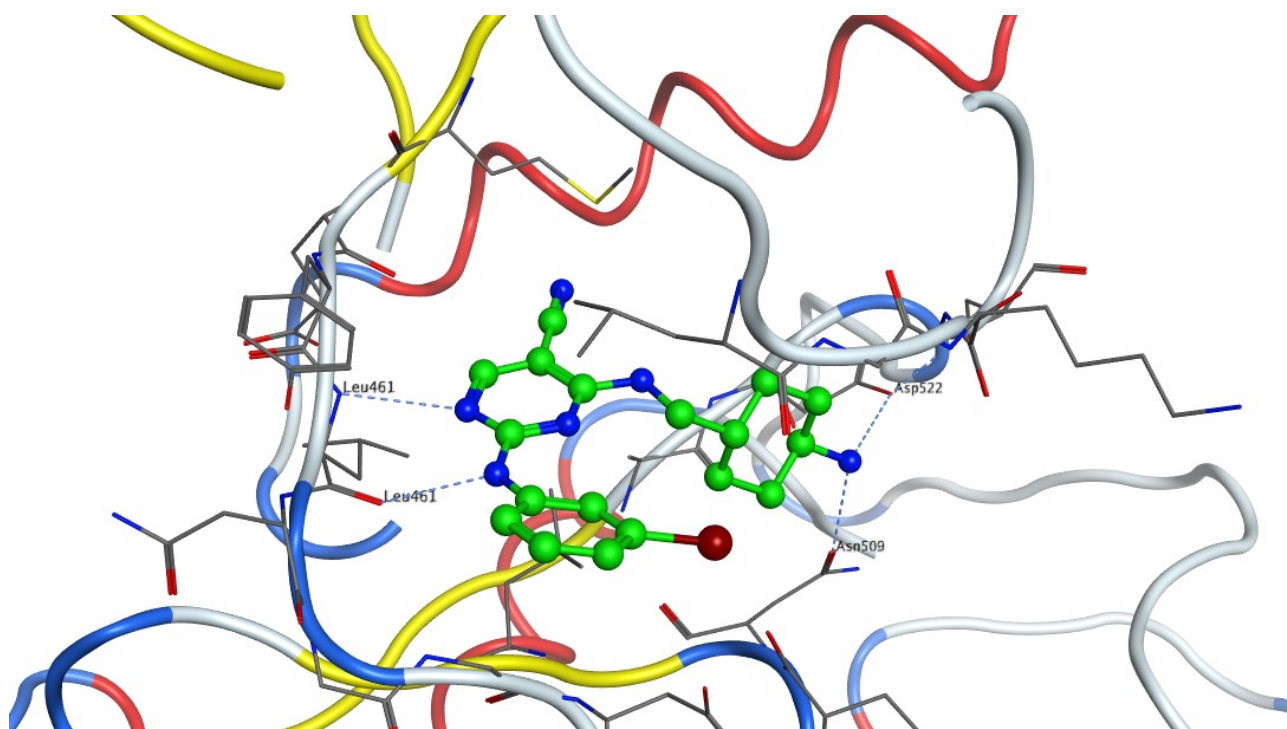
PKC $\theta$  inhibitory activity for core heterocycles



Compound	X	Y	Z	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)
<b>29</b>	C-CONH <sub>2</sub>	N	N	24
<b>37</b>	N	CH	CH	130
<b>38a</b>	N	CH	N	4.6

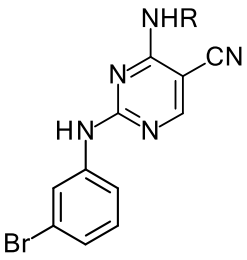
<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment.

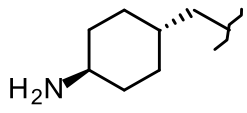
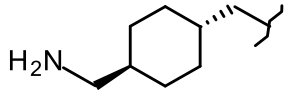
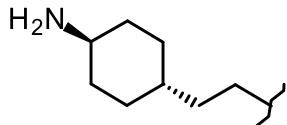
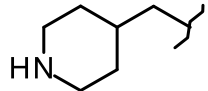
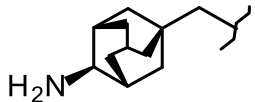




**Figure 14.** Molecular modeling results for **38a** with human PKC $\theta$

ピリミジン誘導体 **38a** が C4 位の末端窒素原子の新たな相互作用獲得により良好な PKC $\theta$  阻害活性を示したことから、さらなる活性の向上を目指し C4 位のシクロヘキシルアミン部分に着目した。ピリミジン部分はヒンジ領域と相互作用する一方、C4 位は空間的許容性の高い溶媒側に位置しているため変換可能ではないかと考えた (Table 6)。Asn509 及び Asp522 とのさらなる相互作用を獲得するためにメチレン鎖を伸長させた **38b** 及び **38c** は活性の減弱が見られた。またピペリジン環に変換した **38d** も活性が減弱してしまった。以上のことから許容性は低いと考え、末端窒素原子の位置は変えずにシクロヘキサン環をアダマンタン環に変換した **38e** を合成し、評価したところ  $IC_{50} = 3.9 \text{ nM}$  とわずかながら活性の向上が見られた。

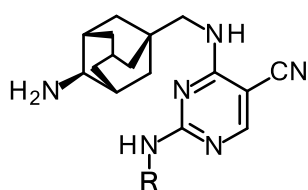
**Table 6**Conversion of the cyclohexylamine group of compound **38a**

Compound	R	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)
<b>38a</b>		4.6
<b>38b</b>		14
<b>38c</b>		51
<b>38d</b>		36
<b>38e</b>		3.9

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment.

C4 位の変換により得られた構造活性相関より、末端窒素原子の位置が活性に重要であることが示唆された。そこで4位アミノ基を **38e** のアダマンチルアミンに固定し、C2 位のアミノ基部分の構造変換を行った (Table 7)。シクロヘキサン環に変換した **42b** は対応するベンゼン環体 **42a** と比較して大きく活性が減弱した。メチレン鎖を伸長させた **42c** は **42b** と

比較して阻害活性の向上が見られたので、**38e** に対しても同様の方策を用い **42e** を合成し、評価したところ、**38e** と同等の阻害活性を示し、細胞系の指標である IL-2 シグナル伝達による T 細胞の増殖阻害活性は 3 倍以上向上した。IL-2 のシグナル伝達は PKC を介して行われており、PKC 阻害活性と化合物の細胞膜透過性を総合的に評価している系であると言える。アニリンからベンジルアミンに変換することで膜透過性が向上したため、細胞活性が向上したのではないかと推察している。

**Table 7**Conversion of the phenyl ring of compound **38e**

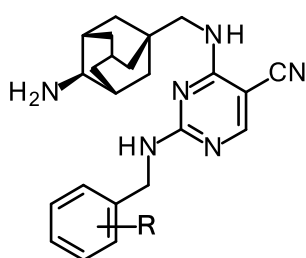
Compound	R	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	IL-2 IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (nM)
<b>38e</b>		3.9	100
<b>42a</b>		28	660
<b>42b</b>		170	NT
<b>42c</b>		130	NT
<b>42d</b>		39	NT
<b>42e</b>		5.9	31

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment.<sup>b</sup> Inhibition of IL-2 production in Jurkat cells. IC<sub>50</sub> values were determined in duplicate in one experiment.

続いて、化合物 **38a** と PKC $\theta$  のドッキングスタディーより、ベンゼン環部分が疎水性ポケットに位置していると推察されたので、ベンゼン環上への疎水性置換基導入による活性向上を試みた。その結果を Table 8 に示す。まず、ベンゼン環上への置換基導入の最適な位置を探索するために 2,3,4 位にクロロ基を導入した化合物 **42f-42h** を合成し評価したところ、**42f** が最も活性が良好であり、置換位置としては 2 位が最適ということが判明したので 2 位に種々の置換基を導入することとした。PKC $\theta$  阻害活性と脂溶性は相関しており、トリフルオロメトキシ基を導入した **42m** が PKC $\theta$  IC<sub>50</sub> = 1.3 nM と最も活性が良好であった。

**Table 8**

Conversion of the substituent on the phenyl ring



Compound	R	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	ACDlogP <sup>b</sup>
<b>42e</b>	2-Br	5.9	3.63
<b>42f</b>	2-Cl	5.4	3.36
<b>42g</b>	3-Cl	33	3.36
<b>42h</b>	4-Cl	60	3.36
<b>42i</b>	2-Me	6.4	3.17
<b>42j</b>	2-OEt	5.4	3.68
<b>42k</b>	2-CF <sub>3</sub>	5.2	3.89
<b>42l</b>	2- <i>c</i> Pr	2.7	4.01
<b>42m</b>	2-OCF <sub>3</sub>	1.3	4.22

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment.

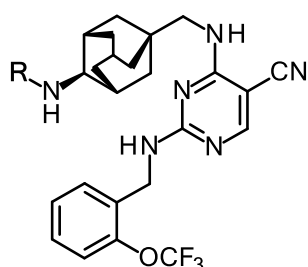
<sup>b</sup> ACDlogP values were calculated by ACD/Percepta. (version 14.0.0)

良好な活性を示した **42m** の各種プロファイルを評価した結果、pH 6.8 での溶解度が 0.1

$\mu\text{M}$  以下と低値であり、経口吸収性に懸念があることが判明した。そこで親水基を導入し溶解度の改善を試みるため、親水性置換基の導入を行うこととした。2位は疎水性ポケットが占めているとドッキングスタディーより推察されたことから溶媒側のポケットに位置している4位の末端の窒素原子に置換基導入を行うこととした。その結果を Table 9 に示す。カルボン酸やカルバモイル基を導入した **43a**, **43b** は溶解度が改善したものの不十分であった一方、水酸基を導入した **43c** は活性を保持したまま、溶解度が  $100 \mu\text{M}$  以上と大幅な改善に成功した。

**Table 9**

Conversion of *N*-alkyl group on the adamantamine side chain



Compound	R	PKC $\theta$ IC $_{50}$ <sup>a</sup> (nM)	IL-2 IC $_{50}$ <sup>b</sup> (nM)	Solubility <sup>c</sup> ( $\mu\text{M}$ )
<b>42m</b>	H	1.3	22	<1
<b>43a</b>	CH $_2$ COOH	3.1	NT	2.6
<b>43b</b>	CH $_2$ CONH $_2$	1.9	41	2.1
<b>43c</b>	CH $_2$ CH $_2$ OH	0.70	6.3	>100

<sup>a</sup> IC $_{50}$  values were determined in triplicate in one experiment.

<sup>b</sup> Inhibition of IL-2 production in Jurkat cells. IC $_{50}$  values were determined in duplicate in one experiment.

<sup>c</sup> Solubility of the test compound in a buffer solution of pH 6.8.

#### 第四節 薬物動態評価

良好な阻害活性及び溶解性を示した 2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体 **43c** のラットでの薬物動態プロファイルを評価した (Table 10)。化合物 **43c** は経口投与において以下の血漿中暴露及び経口バイオアベイラビリティを示した。

**Table 10**

Pharmacokinetic parameters of compound **43c** in rats<sup>a</sup>

i.v. (1 mg/kg)				p.o. (1 mg/kg)			
AUC <sub>24h</sub> <sup>b</sup>	t <sub>1/2</sub> <sup>c</sup>	V <sub>ss</sub> <sup>d</sup>	CL <sub>tot</sub> <sup>e</sup>	AUC <sub>24h</sub> <sup>b</sup>	C <sub>max</sub> <sup>f</sup>	t <sub>max</sub> <sup>g</sup>	F <sup>h</sup>
(ng·h/mL)	(h)	(L/kg)	(mL/min/kg)	(ng·h/mL)	(ng/mL)	(h)	(%)
329	2.8	16.5	53.9	59.8	12.3	0.25	19.7

<sup>a</sup> Each value is an average of data from three animals.

<sup>b</sup> Area under the plasma concentration versus curve from time zero to 24 hours after dosing.

<sup>c</sup> Elimination half-life from plasma.

<sup>d</sup> Volume of distribution at steady state.

<sup>e</sup> Total body clearance.

<sup>f</sup> Maximum plasma concentration.

<sup>g</sup> Time to reach maximum plasma concentration.

<sup>h</sup> Absolute oral bioavailability.

またアイソザイム選択性について評価した (Table 11)。その結果、化合物 **43c** は PKC $\theta$  選択的阻害作用を有し、最も選択性の低い  $\epsilon$  に対しても **43c** は 20 倍以上の選択性があることが判明した。

**Table 11**

Selectivity of compound **43c** across PKC isoforms

IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)							
$\theta$	$\alpha$	$\beta 1$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	$\eta$	$\zeta$
<b>0.70</b>	84	410	>1000	18	16	>300	>1000

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment.

以上良好な PKC $\theta$  選択性及び薬物動態の結果が得られたので、次に動物モデルでの実験を行うこととした。

## 第五節 ラット心移植試験における in vivo 薬効評価

2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体の検討の結果、強力な PKC $\theta$  阻害活性を有する **43c** を創出した。続いて **43c** の臓器移植の拒絶反応の抑制効果を確認するために、ラット異所性心移植モデル試験での評価を検討した。ドナーである ACI ラットの心臓を、レシピエントである Lewis ラットの腹部に移植した後、化合物を単剤にて 14 日間、1 日 2 回経口投与した。移植心の拍動を触診により観察し、拍動の停止を拒絶と確認した。化合物を投与後、14 日目までに拒絶が確認された場合には、その時点で化合物の投与を中止した。生着日数は拒絶の前日までとし、生着期間中央値 (median survival time, MST) を算出することで、有効性を評価した。本モデルにおいては、化合物を投与しない対照群では、移植片は 6 日後に拒絶される。

化合物 **43c** に関して、上記の心移植モデル試験にて、臓器移植時の拒絶反応に対する作用を評価した (Table 12)。その結果、化合物 **43c** は経口投与において移植片の拒絶反応を抑制し、用量依存的に生着延長作用を示し (10mg/kg 経口投与時の MST: 11 日、30mg/kg 経口投与時の MST: 17 日)、代表的な免疫抑制剤である MMF と同等の MST を示した。この結果から、PKC $\theta$  阻害活性を有する化合物が、臓器移植時の拒絶反応に対して有効であることが示された。既存の PKC $\theta$  阻害剤である sotrastaurin は他のアイソザイムに対しても阻害活性を示すことが知られており<sup>33)</sup>、本化合物において PKC $\theta$  選択的化合物が移植においても有効であることが示されたと考えている。PKC $\theta$  選択性が高いことにより、他のアイソザイムによる副作用の回避が期待でき、より副作用の懸念の少ない化合物として期待できる。



**Table 12**Effect of compounds on graft survival in a rat cardiac transplantation model<sup>a</sup>

Treatment	n	Graft survival time (days)	MST <sup>b</sup> (days)
Vehicle	-	-	6 <sup>c</sup>
MMF (20 mg/kg) <sup>d, e</sup>	8	7, 8, 11, 14, 15, 17, 26, >28	14.5
<b>43c</b> (10mg/kg) <sup>d, e</sup>	6	10, 11, 11, 11, 11, 14	11
<b>43c</b> (30mg/kg) <sup>d, e</sup>	7	15, 16, 16, 17, 17, 18, 20	17

<sup>a</sup> ACI rats, cardiac donors; Lewis rats, cardiac recipients.<sup>b</sup> Median survival time.<sup>c</sup> Standard data in our laboratory.<sup>d</sup> Orally administered.<sup>e</sup> Compound was administered twice daily from day of transplantation for 14 days or by day of graft rejection.

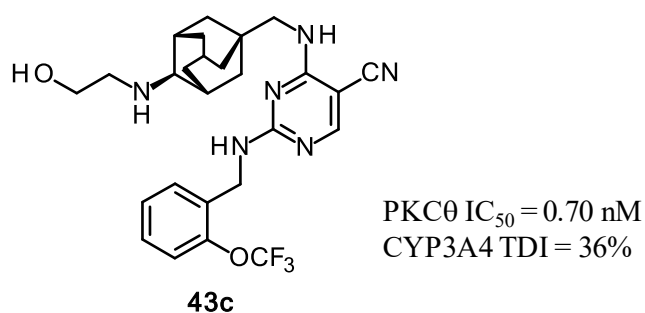
## 第六節 本章のまとめ

本研究で創出した 2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体 **43c** について臓器移植時の拒絶反応に対する作用を確認するために、ラット心移植モデルにて評価を行った。その結果、**43c** は単剤経口投与にて、移植片の拒絶反応を抑制し、生着延長効果を示した。また **43c** は良好なアイソザイム選択性を示し、移植モデルにおいて有効性を示す初めての PKC $\theta$  選択的な阻害剤である。

### 第三章 CYP3A4 時間依存的阻害作用を軽減した新規 PKC $\theta$ 阻害剤の創出

#### 第一節 研究方針

良好な PKC $\theta$  阻害活性を有し、ラット心移植モデルで生着延長効果を示した化合物 **43c** の補助剤としての可能性を探るため、CYP3A4 阻害活性の評価を行った。現在主剤として用いられているタクロリムスの主代謝酵素は CYP3A4 であるため、CYP3A4 阻害による薬物間相互作用によってタクロリムスの血中濃度の上昇を招く可能性がある。補助剤として用いるためには、CYP3A4 阻害活性の懸念が少ないことが求められる。

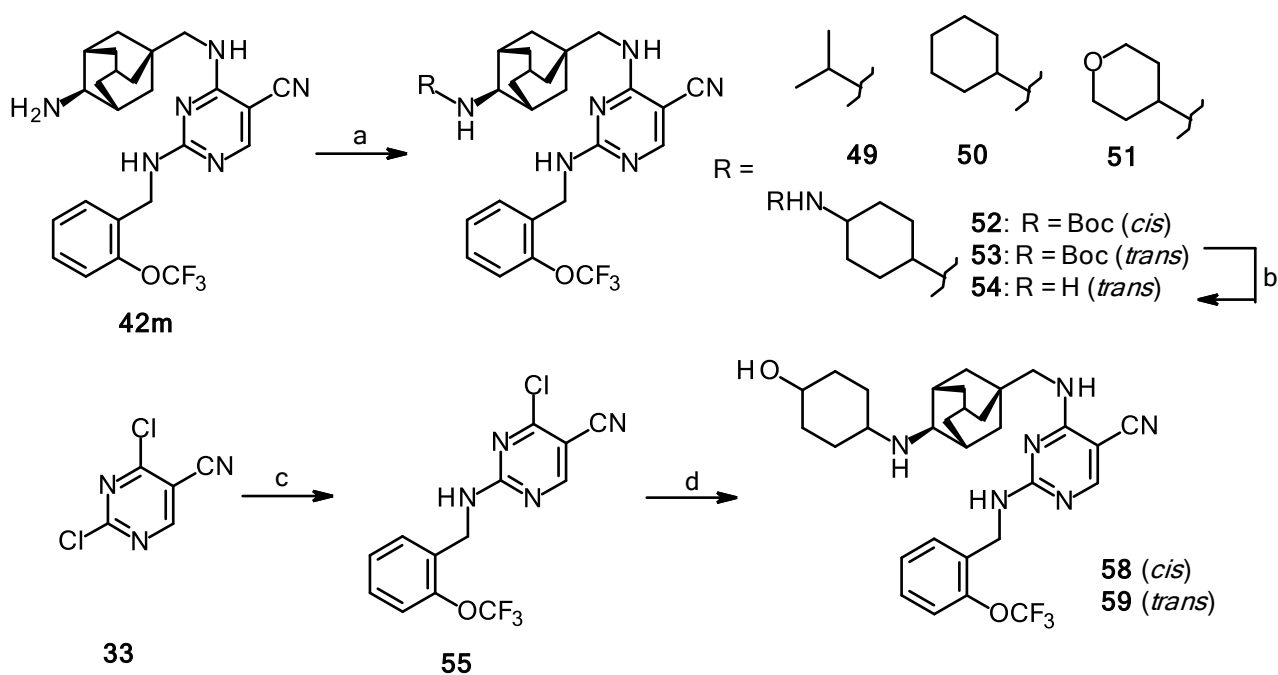


**Figure 15.** Structure of PKC inhibitor **43c**

そこで、**43c** に薬物間相互作用の懸念がないかを確認するために CYP3A4 阻害試験を行った。その結果、**43c** は CYP3A4 残存活性が 36% と時間依存的阻害作用 (time dependent inhibition, TDI) を示すことが明らかになった。そこで補助剤としても開発するために TDI の回避を目指し研究を行い、動物モデルで補助剤として使用可能な化合物の創出を目指すこととした。

## 第二節 2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体の合成

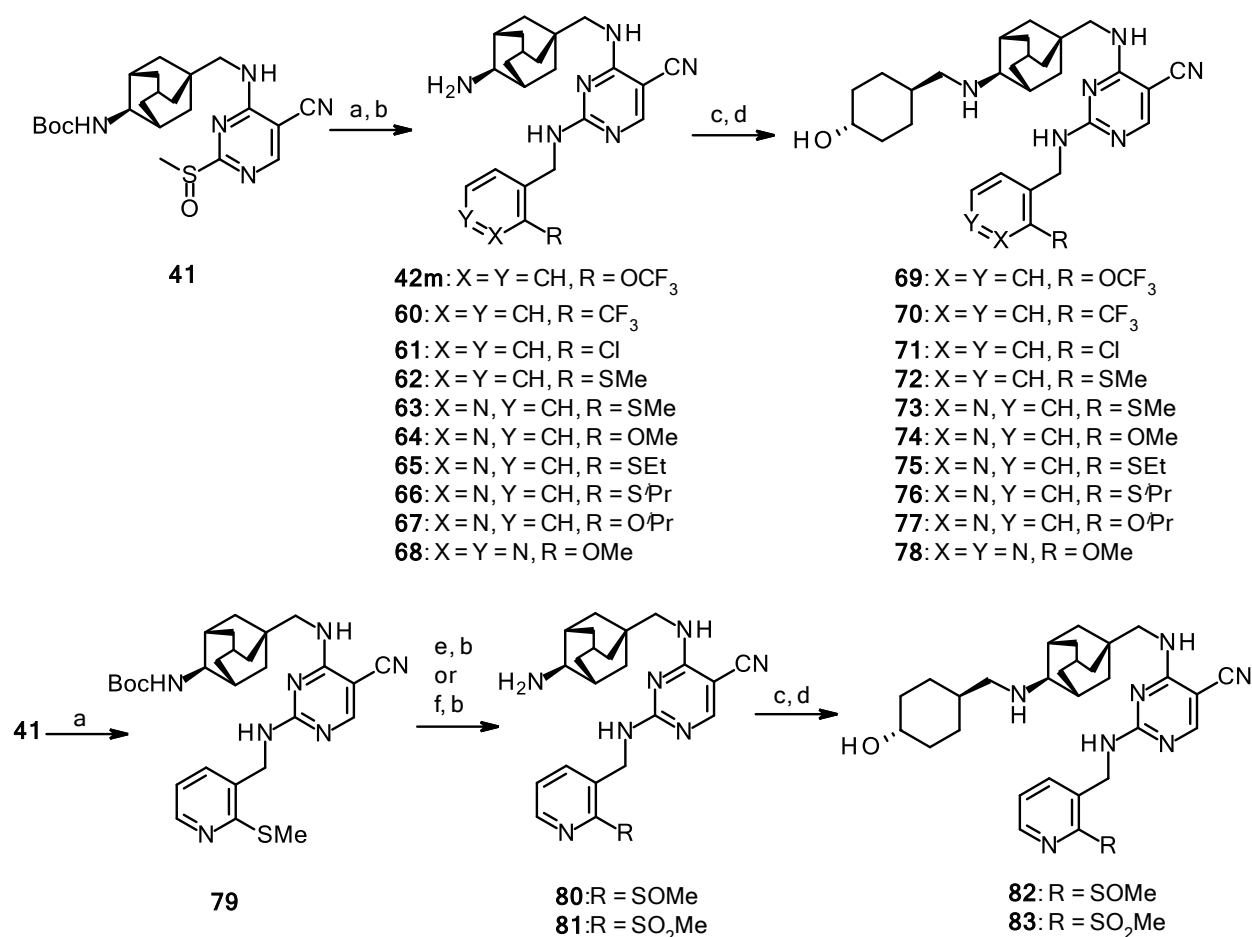
2,4-ジアミノ-5-シアノピリミジン誘導体の合成の C4 位アダマンチルアミンの修飾体の合成法を Scheme 11 に示す。二章で合成済みの **42m** と種々のケトンとの還元的アルキル化により、化合物 **38-40** を得た。また 4-Boc アミノシクロヘキサノンを用いた場合、*cis* 体 **52** 及び *trans* 体 **53** との混合物として得られた。両者はカラムクロマトグラム精製により分離精製可能であり、トランス体 **53** を単離後、酸性条件下、脱 Boc 化を行い化合物 **54** を得た。一方、化合物 **33** に対して、低温下、2-トリフルオロメトキシベンジルアミンと反応させ、化合物 **55** を得たのち、別途合成した脂肪族アミン **56** または **57** と反応させることで化合物 **58** または **59** を得た。



**Scheme 11.** Reagents and conditions: (a) various ketones, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> or THF, rt, **49**: 98%, **50**: 91%, **51**: 67%, **52**: 29%, **53**: 25%; (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 72%; (c) 2-(trifluoromethoxy)benzylamine, DIPEA, DMF, -50 °C, 42%; (d) amine **56** or **57**, DIPEA, DMI, rt, **58**: 68%, **59**: 53%.

続いて化合物 **69-78**, **82**, **83** の合成法を Scheme 12 に示す。第二章で既報のスルホキシド **41** と種々の脂肪族アミンを反応させた後、TFA による脱 Boc 化を行い化合物 **42m**, **60-68** を

得た。続いてアルデヒドと還元的アルキル化を行い目的とする化合物 **69-78** を得た。化合物 **82, 83** に関しては同様に合成した **79** に対して、*m*-CPBA を作用させ合成した。*m*-CPBA の当量を調整することによってスルホキシド体及びスルホン体の作り分けが可能であった。*m*-CPBA の当量を 1.2 当量と小過剰用いた場合にはスルホキシド体 **80** が主生成物として得られ、3.8 当量と大過剰用いた場合はスルホン体 **81** が主生成物として得られた。*m*-CPBA を大過剰用いた際は、一部ピリミジン環が酸化された化合物の副生も確認できたが、カラムクロマトグラム精製により容易に目的とするスルホン体の単離精製が可能であった。得られた化合物に対して前述と同様に酸性条件下での脱 Boc 化・還元的アルキル化・酸性条件下での脱シリル化を行い **82, 83** を得た。

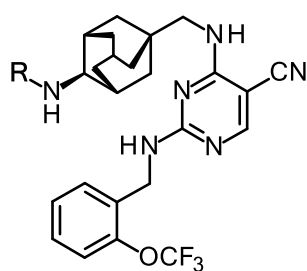


**Scheme 12.** Reagents and conditions: (a) various amines, DIPEA, DMF, rt; (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, **42m**: 76% (2 steps), **60**: 80% (2 steps), **61**: 69% (2 steps), **62**: 79% (2 steps), **63**: 69% (2 steps), **64**: 80% (2 steps), **65**: 70% (2 steps), **66**: 71% (2 steps), **67**: 80% (2 steps), **68**: 72% (2 steps), **79**: 86%, **80**: 95% (2 steps), **81**: 73% (2 steps) (c) *trans*-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)cyclohexanecarbaldehyde, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMF, rt; (d) HCl, MeOH, rt, **69**: 49% (2 steps), **70**: 70% (2 steps), **71**: 74%



阻害することで、TDIが改善できるのではないかと考えた。その結果を Table 13 に示す。

イソプロピル基を導入した **49** は TDI が改善しなかったものの、シクロヘキサン環を導入した **50** は TDI=43%とやや改善傾向を示した。続いてシクロヘキサン環内に酸素原子を導入したテトラヒドロピラン誘導体 **51** を合成し、評価したところ大きな改善は得られなかった一方、シクロヘキサノールを導入した **58** は TDI=64%と大きく改善した。シス体 **59** (TDI = 43%) よりトランス体 **58** の方が改善度は大きく、CYP3A4 は立体異性を認識していると推察される。そこで、トランスシクロヘキシルアミン体 **54** を合成し評価したが、TDI = 59%と **58** と比較して改善は見られなかった。続いてシクロヘキサン環とピリミジン母核との間にメチレン鎖を伸長させて **69** を合成し評価した結果、TDI = 70%と大きく改善されており、PKC $\theta$  阻害活性も IC<sub>50</sub> = 0.42 nM と良好であった。

**Table 13**Conversion of *N*-alkyl group on the adamantyl amine

Compound	R	PKC $\theta$ IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	CYP3A4 TDI <sup>b</sup> (residual activity, %)
43c	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	0.70	36
49	- <i>i</i> Pr	< 1.0	29
50		1.9	43
51		<1.0	41
58		0.38	64
59		0.66	43
54		0.10	59
69		0.42	70

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment.<sup>b</sup> Activities of HLMs for metabolism of midazolam were measured and residual activities are shown as percentage of remained metabolic activity following preincubation for 30 min in presence of test compounds (5  $\mu$ M).

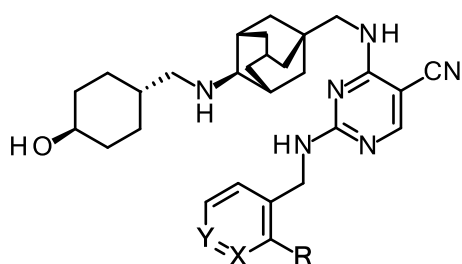
良好な活性及び TDI を示した **69** の各種プロファイルを評価した結果、pH 6.8 での溶解度が 0.1  $\mu\text{M}$  以下と低値であり、経口吸収性に懸念があることが判明した。そこで溶解度改善のため、ACDlogP を指標として合成展開を行った。また、TDI と ACDlogP には相関が得られるとの報告より、溶解度及び TDI のさらなる改善を目指し、合成展開を行った。その結果を Table 14 に示す。

クロロ基に変換した **71** は TDI, 溶解度ともに改善した。またメチルスルフィド基を導入した **72** は TDI, 溶解度ともに大きく改善した。またベンゼン環上に窒素原子を導入することも有効であり、**73** は TDI, 溶解度ともに良好な値を示した。一方、脂溶性ポケットに位置しているため、大幅な脂溶性の低減は活性低下に結びついた。メトキシ基に変換した **74** は TDI, 溶解度は良好なものの阻害活性は減弱してしまい、さらに脂溶性を低減したスルホキシド体 **82**, スルホニル体 **83** は活性が大きく減弱してしまった。そこで硫黄原子上に脂溶性の高い置換基を導入し、脂溶性を調整することで活性が向上しないかと考え、エチル基やイソプロピル基を導入したところ、予想通り活性は向上したものの、TDI や溶解度が悪化し、適度な脂溶性が阻害活性と TDI 及び溶解度の両立には重要であることが判明した。そこで脂溶性のバランスをとるために酸素原子上にイソプロピル基を導入した **77** を合成し、評価したところ、良好な活性と TDI, 溶解度を示した。一方、ピリダジン環に変換した **78** は活性が消失した。以上の化合物展開より活性・TDI・溶解度の観点から、**73** が最も有望であると考えさらなる評価を行うこととした。



**Table 14.**

Conversion of the 2-trifluoromethoxy benzene ring



Compound	R	X	Y	PKC $\theta$	IL-2	CYP3A4	TDI <sup>c</sup>	Solubility <sup>d</sup>	ACDlogP <sup>e</sup>
				IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (nM)	(residual activity, %)	( $\mu$ M)		
<b>69</b>	OCF <sub>3</sub>	CH	CH	0.42	11	70		<1	5.11
<b>70</b>	CF <sub>3</sub>	CH	CH	0.57	17	63		NT <sup>f</sup>	5.10
<b>71</b>	Cl	CH	CH	1.4	22	77		1.1	5.10
<b>72</b>	SMe	CH	CH	0.94	16	92		45	4.98
<b>73</b>	SMe	N	CH	0.44	10	98		>50	4.07
<b>74</b>	OMe	N	CH	1.9	43	94		>50	3.49
<b>82</b>	SOMe	N	CH	32	170	NT <sup>f</sup>		>100	2.58
<b>83</b>	SO <sub>2</sub> Me	N	CH	NT <sup>f</sup>	140	NT <sup>f</sup>		>100	2.60
<b>75</b>	SEt	N	CH	0.46	<3.0	80		16	4.46
<b>76</b>	S <sup>i</sup> Pr	N	CH	0.23	3.0	66		<1	4.76
<b>77</b>	O <sup>i</sup> Pr	N	CH	0.59	18	87		>100	4.13
<b>78</b>	OMe	N	N	>100	NT <sup>f</sup>	NT <sup>f</sup>		>100	2.72

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in triplicate in one experiment.<sup>b</sup> Inhibition of IL-2 production in Jurkat cells. IC<sub>50</sub> values were determined in duplicate in one experiment.<sup>c</sup> Activities of HLMs for metabolism of midazolam were measured and residual activities are shown as percentage of remained metabolic activity following preincubation for 30 min in presence of test compounds (5  $\mu$ M).<sup>d</sup> Solubility of the test compound in a buffer solution of pH 6.8.

<sup>e</sup> ACDlogP values were calculated by ACD/Percepta. (version 14.0.0)

<sup>f</sup> Not tested.

#### 第四節 薬物動態評価

良好なプロファイルを示した **73** の薬物動態試験を行った。その結果、 $F = 58.3\%$ と良好なバイオアベイラビリティと十分な暴露を示した。

**Table 15**

Pharmacokinetic parameters of compound **73** in rats<sup>a</sup>

i.v. (1 mg/kg)				p.o. (1 mg/kg)			
AUC <sub>24h</sub> <sup>b</sup>	t <sub>1/2</sub> <sup>c</sup>	V <sub>ss</sub> <sup>d</sup>	CL <sub>tot</sub> <sup>e</sup>	AUC <sub>24h</sub> <sup>b</sup>	C <sub>max</sub> <sup>f</sup>	t <sub>max</sub> <sup>g</sup>	F <sup>h</sup>
(ng·h/mL)	(h)	(L/kg)	(mL/min/kg)	(ng·h/mL)	(ng/mL)	(h)	(%)
248	3.97	12.9	66.7	145	12.4	3.33	58.3

<sup>a</sup> Each value is an average of data from three animals.

<sup>b</sup> Area under the plasma concentration versus curve from time zero to 24 hours after dosing.

<sup>c</sup> Elimination half-life from plasma.

<sup>d</sup> Volume of distribution at steady state.

<sup>e</sup> Total body clearance.

<sup>f</sup> Maximum plasma concentration.

<sup>g</sup> Time to reach maximum plasma concentration.

<sup>h</sup> Absolute oral bioavailability.

**73** に関して他のアイソザイムに対する選択性を評価した。その結果を Table 16 に示した。その結果、**73** は他のアイソザイムに対して 37 倍以上の高い選択性を示した。また続いて代表的な 32 種類のキナーゼに対して選択性を評価したところ、CDK2 以外の 31 種類のキナーゼに対して阻害活性を示さなかった。阻害活性を示した CDK2 に関して、IC<sub>50</sub> を算出したところ、IC<sub>50</sub> = 84 nM であり、170 倍以上の高い選択性を有していることが判明した (Table 17)。

以上のことから良好なアイソザイム及びキナーゼ選択性を有する **73** を動物モデルにて薬効評価を行うこととした。

**Table 16**Selectivity of compound **73** for PKC isoforms<sup>a</sup>

IC <sub>50</sub> (nM)							
$\theta$	$\alpha$	$\beta 1$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	$\eta$	$\zeta$
<b>0.48</b>	160	>840	>1000	160	18	>1000	>1000

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in duplicate in one experiment.**Table 17**Kinase selectivity of compound **73**<sup>a</sup>

Tyrosine kinases	IC <sub>50</sub> (nM)	Serine/threonine kinases	IC <sub>50</sub> (nM)
ABL	>1000	AKT1	>1000
BTK	>1000	AurC	>1000
CSK	>1000	BMPR1A	>1000
EGFR	>1000	CaML2a	>1000
EphA1	>1000	CDK2	84
FAK	>1000	CHK1	>1000
HER2	>1000	CK1d	>1000
IGF1R	>1000	GSK3b	>1000
ITK	>1000	JNK3	>1000
SYK	>1000	MLK1	>1000
TEC	>1000	p70S6K	>1000
TIE2	>1000	RAF1	>1000
TRKA	>1000	ROCK1	>1000
ZAP70	>1000		

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined in duplicate in one experiment.

## 第五節 ラット心移植試験における in vivo 薬効評価 (単剤及び併用試験)

化合物 **73** に関して、2 章で記述した心移植モデル試験にて、臓器移植時の拒絶反応に対する作用を評価した (Table 18)。その結果、化合物 **73** は経口投与において移植片の拒絶反応を抑制し、用量依存的に生着延長作用を示した (10mg/kg 経口投与時の MST: 14 日、30mg/kg 経口投与時の MST: 20 日)。活性がほぼ同等の化合物 **43c** と比較して、体内動態の改善 (F. **43c**: 19.7%, **73**: 58.3%) が MST の延長 (10mg/kg 経口投与時の MST: 11 日、30mg/kg 経口投与時の MST: 17 日) に繋がったと考えられる。

**Table 18**

Effect of compound **73** monotherapy on graft survival in a rat cardiac transplantation model<sup>a</sup>

Treatment	n	Graft survival time (days)	MST <sup>b</sup> (days)
Vehicle	-	-	6 <sup>c</sup>
10mg/kg <sup>d, e</sup>	9	5, 6, 7, 7, 14, 20, 20, 22, 25	14
30mg/kg <sup>d, e</sup>	10	14, 14, 16, 16, 20, 20, 20, 20, 21, 22	20

<sup>a</sup> ACI rats, cardiac donors; Lewis rats, cardiac recipients.

<sup>b</sup> Median survival time.

<sup>c</sup> Standard data in our laboratory.

<sup>d</sup> Orally administered.

<sup>e</sup> Compound was administered twice daily from day of transplantation for 14 days or by day of graft rejection.

**73** は CYP3A4 阻害を改善した化合物であり、併用療法における補助剤としての可能性も有しているため、一般的な免疫抑制剤であるタクロリムスとの併用下におけるラット心移植モデルでの評価を行った (Table 19)。タクロリムスを 0.02 mg/kg 筋肉内投与した場合 MST = 7days に延長する。この場合のタクロリムスの投与量は sub-optimal dose であり、本投与量のタクロリムスと PKC $\theta$  阻害剤 **73** の併用によって、移植臓器の生着延長効果が得られた場合、タクロリムスの投与量の低減、毒性懸念の低減が達成できたものとして判断できる。併用療法における拒絶反応に対する作用を評価した結果、化合物 **73** は用量依存的な生着延長効果を示した (1 mg/kg: MST = 20 days, 3 mg/kg: MST = 23 days, 5 mg/kg: MST > 26 days)。

以上の結果より、PKC $\theta$  阻害剤 **73** が臓器移植時の拒絶反応において既存の免疫抑制剤であるタクロリムスへの相加的効果を有しており、補助剤としても有望であることが示された。

**Table 19**

Effect of compounds **73** concomitant treatment with tacrolimus on graft survival of rat cardiac transplantation model<sup>a</sup>

Compound	Combined drug	n	Graft survival time (days)	MST <sup>b</sup> (days)
Vehicle	none	-		6 <sup>c</sup>
Vehicle	tacrolimus <sup>d</sup>	11	5, 5, 6, 6, 6, 7, 7, 7, 9, 11, 11	7 <sup>c</sup>
1 mg/kg	tacrolimus <sup>d</sup>	9	9, 11, 13, 17, 20, 23, 24, 24, 26	20 <sup>c</sup>
3 mg/kg	tacrolimus <sup>d</sup>	8	16, 16, 19, 23, 23, 24, 24, 28	23 <sup>c</sup>
5 mg/kg	tacrolimus <sup>d</sup>	6	20, 21, 24, >28, >28, >28	>26 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Compound was administered twice daily from day of transplantation for 14 days or by day of graft rejection.

<sup>b</sup> Median survival time.

<sup>c</sup> Standard data in our laboratory.

<sup>d</sup> 0.02 mg/kg, q.d., i.m.

<sup>e</sup> ref 35.

## 第六節 本章のまとめ

第二章で見出した **43c** の CYP3A4 阻害活性を評価したところ、TDI を示すことが判明した。既存の免疫抑制剤であるタクロリムスの補助剤として開発するためには、TDI の改善が不可欠であると考え、代謝部位の推定を行い、立体的にかさ高い置換基を導入することで代謝をブロックすることで TDI の懸念の少ない **58** を見出した。本化合物の TDI の改善は不十分であり、溶解性にも懸念があったため、脂溶性と TDI 及び溶解性の相関に着目し、さらなる研究を行った結果、より TDI の懸念が少なく、溶解性も良好な化合物 **73** を見出すことに成功した。**73** は良好な経口吸収性・アイソザイム選択性及びキナーゼ選択性を有

することが判明したため、動物モデルにて評価を行う化合物として選択した。ラット心移植モデルにおいて評価を行ったところ、**73** は単剤投与だけでなく、タクロリムスとの併用投与においても移植片の拒絶反応を抑制し、生着延長効果を示した。

以上の結果から、強力な PKC $\theta$  選択的阻害剤 **73** が、臓器移植時の拒絶反応の抑制を適応とした新規な免疫抑制剤として有用であることを明らかとした。

## 結論

本研究は、臓器移植の拒絶反応抑制への適応を指向し、PKC $\theta$  を標的とした新規な免疫抑制剤の創出を目的として行った。

第一章では、CYP3A4 阻害活性及び P-gp 基質性のある 2,4-ジアミノ-5-フルオロピリジン誘導体 **10** を出発物質とし、C2 位及び C4 位の変換を行い CYP3A4 阻害活性及び P-gp 基質性を改善した **22f** を創出した。

第二章では自社ライブラリ由来の 2,6-ジアミノ-3-カルバモイル-5-シアノピラジン誘導体 **23** より化合物展開を行った。**23** と PKC $\theta$  タンパクとのドッキング計算解析を利用し、ピリミジン母核に変換した **32a** が同様の相互作用だけでなく新たな相互作用を獲得し、活性の向上に成功した。さらに C2 位近傍の疎水性ポケットを利用することにより活性が良好な **36m** を見出し、さらなる変換を行い活性及び溶解性が良好な **37c** を創出することに成功した。本化合物は他のアイソザイムに対して良好な選択性を有し、ラット心移植モデルにおいて臓器移植時の拒絶反応に対する抑制作用を評価した結果、単剤経口投与において生着延長効果を示し、PKC $\theta$  選択的阻害剤が免疫抑制剤として有望であることを明らかにした。

第三章では、臓器移植において既存の免疫抑制剤の補助剤として開発を行うために上述した **43c** の CYP3A4 阻害活性を改善すべく化合物展開を行った。C4 位の末端アミノ基及び C2 位の変換を行い、CYP3A4 阻害の懸念が低減され、活性及び溶解性が良好な **73** を創出することに成功した。本化合物は良好なアイソザイム選択性及びキナーゼ選択性を示し、ラット移植モデルにて評価を行った結果、単剤経口投与における生着延長効果だけでなく、タクロリムス併用下においても生着延長作用が確認できた。このように CYP3A4 阻害活性を改善した分子をデザインすることは単剤だけでなく補助剤としての開発も可能にし、創薬化学上有用であると言える。

本研究において、既存の PKC $\theta$  阻害作用を有する免疫抑制剤とは異なる新規な母核構造を有し、PKC $\theta$  に対して強い阻害活性を有する化合物 **73** を創出することに成功した。化合物 **73** はラット心移植モデル試験にて有効性を示し、初めての PKC $\theta$  選択的な免疫抑制剤としての開発が期待できる。本研究結果は、今後の PKC $\theta$  阻害に基づく免疫抑制剤の研究及び開発に有用な知見を与えるものである。

## 実験の部

### 第一章 Chemistry

#### General

Melting point (mp) was determined on a Buchi BM-565 melting point apparatus and uncorrected.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  spectra were recorded on a Varian VNS-400, JEOL JNM-LA400, or JEOL JNM-AL400 and chemical shifts were expressed in  $\delta$  (ppm) values with tetramethylsilane as an internal reference (s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet, dd=double doublet, tt=triple triplet, q=quartet, ddd=double double doublet, and br=broad peak). Mass spectra (MS) were recorded on a Waters UPLC/SQD[413W]-LC/MS system. Elemental analyses were performed using a Yanaco MT-6 (C, H, N), Elementar Vario EL III (C, H, X), and Dionex ICS-3000 (S, halogene) and were within  $\pm 0.4\%$  of theoretical values. Electrospray ionization positive high-resolution mass spectrum (HRMS) was obtained using a Waters LCT Premier. Unless otherwise noted, all reagents and solvents obtained from commercial suppliers were used without further purification.

#### 本論第一章の実験

##### **2-Chloro-5-fluoro-N-[(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yl)methyl]pyrimidin-4-amine (12a)**

To a solution of 2,4-dichloro-5-fluoropyrimidine **11** (400 mg, 2.4 mmol) in MeOH (6 mL), 1-(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yl)methanamine **25** (480 mg, 2.6 mmol) and DIPEA (820  $\mu\text{L}$ , 4.8 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h, concentrated in vacuo and triturated with (*n*-hexane-EtOAc) (50:50) to give **12a** (500 mg, 66%) as a colorless solid.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.28 (6H, s), 1.47 (6H, s), 1.58–1.92 (5H, m), 2.64 (3H, s), 3.22–3.29 (2H, m), 8.09 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz), 8.13–8.36 (1H, m); MS (ESI)  $m/z$  315, 317 [M+H]<sup>+</sup>.

##### **2-Chloro-5-fluoro-N-[(1-methylpiperidin-4-yl)methyl]pyrimidin-4-amine (12b)**

To a solution of **11** (500 mg, 3.0 mmol) in MeOH (5 mL), (1-methyl-4-piperidinyl)methanamine (380 mg, 3.0 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h and then diluted with  $\text{CHCl}_3$  and basified with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$ . The organic layer was washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with elution using ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH) (97:3) to give **12b** (295 mg, 38%) as a colorless solid.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.09–1.23 (2H, m), 1.48–1.66 (3H, m), 1.72–1.83 (2H, m), 2.12 (3H, s), 2.67–2.77 (2H,



m), 3.17–3.25 (2H, m), 8.04 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz), 8.18 (1H, br s); MS (ESI)  $m/z$  259, 261  $[M+H]^+$ .

**5-Fluoro- $N^2$ -[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]- $N^4$ -[(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yl)methyl]pyrimidine-2,4-diamine (13a)**

To a solution of **12a** (200 mg, 0.64 mmol) in IPA (2 mL), 3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)aniline (110 mg, 0.54 mmol) and 4 M HCl-EtOAc (310  $\mu$ L, 1.3 mmol) were added in a 10 mL microwave vial. The reaction mixture was heated with stirring at 140 °C in a Biotage auto-sampling microwave reactor for 1 h. The reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub> and washed with H<sub>2</sub>O. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (90:10) to give **13a** (100 mg, 33%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.81–1.12 (2H, m), 0.86 (6H, s), 1.03 (6H, s), 1.40–1.52 (2H, m), 1.92–2.08 (1H, m), 2.14 (3H, s), 2.58 (3H, s), 3.14–3.23 (2H, m), 3.80 (3H, s), 6.77 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz), 7.56–7.74 (3H, m), 7.90 (1H, d,  $J = 3.8$  Hz), 9.43 (1H, s); MS (ESI)  $m/z$  484  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>FN<sub>9</sub>O  $[M+H]^+$ : 484.2949, Found; 484.2946.

**5-Fluoro- $N^2$ -[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]- $N^4$ -[(1-methylpiperidin-4-yl)methyl]pyrimidine-2,4-diamine dihydrochloride (13b)**

To a solution of **12b** (120 mg, 0.48 mmol) in IPA (3 mL), 3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)aniline (98 mg, 0.48 mmol) and 4 M HCl-EtOAc (240  $\mu$ L, 0.96 mmol) were added in a 10 mL microwave vial. The reaction mixture was heated with stirring at 140 °C in a Biotage auto-sampling microwave reactor for 1 h. The reaction mixture was washed with IPA to give an ivory solid. The solid was washed with EtOAc and MeOH to give **13b** (86 mg, 36%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.41–1.93 (2H, m), 1.74–1.77 (2H, m), 1.84–1.94 (1H, m), 2.60 (3H, s), 2.67–2.71 (3H, m), 2.78–2.87 (2H, m), 3.27–3.30 (2H, m), 3.34–3.37 (2H, m), 3.38 (3H, s), 6.96 (1H, br), 7.50–7.51 (1H, m), 7.58–7.59 (1H, m), 8.12–8.13 (1H, m), 8.66 (1H, br), 10.31 (1H, br); MS (ESI)  $m/z$  428  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>9</sub>O  $[M+H]^+$ : 428.2322, Found: 428.2326.

**2-Chloro-5-fluoro-4-(methylsulfanyl)pyrimidine (14)**

To a solution of **11** (3.0 g, 18.0 mmol) in THF (30 mL), sodium thiomethoxide (1.35 g, 19.3 mmol) was added under -30 °C in dry ice-acetone bath and stirred at -30 °C for 2 h. The reaction

mixture was warmed to room temperature and poured into H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was then washed with H<sub>2</sub>O, brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give **14** (24 g, 96%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.62 (3H, s), 8.09 (1H, d, *J* = 1.4 Hz); MS (ESI) *m/z* 179, 181 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **5-Fluoro-*N*-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]-4-(methylsulfanyl)pyrimidin-2-amine (15)**

To a solution of **14** (550 mg, 3.1 mmol) in IPA (5 mL), 3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)aniline (710 mg, 3.5 mmol) and 4 M HCl-EtOAc (850 μL, 3.4 mmol) were added in a 25 mL microwave vial. The reaction mixture was heated with stirring at 130 °C in a Biotage auto-sampling microwave reactor for 1 h. The reaction mixture was poured into H<sub>2</sub>O and the precipitate was washed with H<sub>2</sub>O to give **15** (890 mg, 83%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.58 (3H, s), 2.59 (3H, s), 3.82 (3H, s), 6.88 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.56 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.70 (1H, t, *J* = 1.8 Hz), 8.31 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 10.02 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 348 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **5-Fluoro-*N*-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]-4-(methylsulfinyl)pyrimidin-2-amine (16)**

To a solution of **15** (800 mg, 2.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL), *m*-CPBA (650 mg, 2.9 mmol) was added at 0 °C and stirred for 3h at 0 °C. The reaction mixture was poured into saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with elution using EtOAc to give **16** (450 mg, 54%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.62 (3H, s), 2.94 (3H, s), 3.84 (3H, s), 6.91 (1H, t, *J* = 1.9 Hz), 7.71–7.75 (2H, m), 8.77 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 10.52 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 364 [M+H]<sup>+</sup>.

#### ***tert*-Butyl (3*R*)-3-[[5-fluoro-2-[[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]amino]pyrimidin-4-yl]amino]methyl}piperidine-1-carboxylate (17a)**

To a solution of **16** (300 mg, 0.83 mmol) in NMP (3 mL), (3*R*)-3-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester (210 mg, 0.99 mmol) and DIPEA (180 μL, 1.1 mmol) were added in a 10 mL microwave vial. The reaction mixture was heated with stirring at 110 °C in a Biotage auto-

sampling microwave reactor for 0.5 h. The reaction mixture was poured into saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl and collected by vacuum filtration to give **17a** (420 mg, 99%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.18–1.83 (5H, m), 1.32 (9H, s), 2.58 (3H, s), 2.63–2.84 (2H, m), 3.17–3.29 (2H, m), 3.62–3.93 (2H, m), 3.80 (3H, s), 6.78 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.54 (1H, t, *J* = 1.9 Hz), 7.59–7.64 (1H, m), 7.71–7.74 (1H, m), 7.92 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 9.44 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 514 [M+H]<sup>+</sup>.

**5-Fluoro-*N*<sup>2</sup>-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]-*N*<sup>4</sup>-[(3*S*)-piperidin-3-ylmethyl]pyrimidine-2,4-diamine (17b)**

To a solution of **17a** (400 mg, 0.78 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL), TFA (2.0 mL, 26 mmol) was added and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was added to saturated aqueous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (96:4) to give **17b** (260 mg, 81%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.80–1.71 (6H, m), 2.05–2.40 (2H, m), 2.57 (3H, s), 2.71–2.87 (2H, m), 3.14–3.24 (2H, m), 3.80 (3H, s), 6.77 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.52–7.75 (3H, m), 7.89 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 9.41 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 414 [M+H]<sup>+</sup>.

**5-Fluoro-*N*<sup>2</sup>-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]-*N*<sup>4</sup>-{[(3*R*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}pyrimidine-2,4-diamine (17c)**

To a solution of **17b** (50 mg, 0.12 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL), 36% aqueous formaldehyde solution (11 μL, 0.15 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (33 mg, 0.16 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub> and basified with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using EtOAc to give **17c** (32 mg, 62%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.74–1.93 (7H, m), 2.09 (3H, s), 2.48–2.64 (2H, m), 2.57 (3H, s), 3.18–3.33 (2H, m), 3.79 (3H, s), 6.77 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.52–7.75 (3H, m), 7.89 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 9.42 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 428 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 428.2322, Found: 428.2331. [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> (*c* = 0.1, MeOH) -5.5 °.

*tert*-Butyl

**(3*S*)-3-[[5-fluoro-2-[[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]amino]pyrimidin-4-yl]amino]methyl]piperidine-1-carboxylate (18a)**

Compound **18a** was prepared from compound **16** in 85% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **17a**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.16–1.85 (5H, m), 1.32 (9H, s), 2.31–2.78 (2H, m), 2.58 (3H, s), 3.15–3.29 (2H, m), 3.60–3.94 (2H, m), 3.80 (3H, s), 6.78 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.54 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.59–7.67 (1H, m), 7.71–7.76 (1H, m), 7.92 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 9.44 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 514 [M+H]<sup>+</sup>.

**5-Fluoro-*N*<sup>2</sup>-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]-*N*<sup>4</sup>-[(3*R*)-piperidin-3-ylmethyl]pyrimidine-2,4-diamine (18b)**

Compound **18b** was prepared from compound **18a** in 99% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **17b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.80–1.77 (5H, m), 2.05–2.53 (3H, m), 2.58 (3H, s), 2.72–2.88 (2H, m), 3.14–3.24 (2H, m), 3.80 (3H, s), 6.78 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.52–7.76 (3H, m), 7.89 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 9.42 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 414 [M+H]<sup>+</sup>.

**5-Fluoro-*N*<sup>2</sup>-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]-*N*<sup>4</sup>-{[(3*S*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}pyrimidine-2,4-diamine (18c)**

Compound **18c** was prepared from compound **18b** in 61% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **17c**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.73–1.93 (7H, m), 2.09 (3H, s), 2.44–2.70 (2H, m), 2.57 (3H, s), 3.12–3.36 (2H, m), 3.80 (3H, s), 6.78 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.52–7.76 (3H, m), 7.89 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 9.42 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 428 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 428.2322, Found: 428.2332; Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>9</sub>O: C, 56.19; H, 6.13; N, 29.49; F, 4.44. Found: C, 56.28; H, 6.15; N, 29.45; F, 4.47. [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> (*c* = 0.1, MeOH) 6.0 °.

***N*<sup>4</sup>-{[(3*S*)-1-Ethylpiperidin-3-yl]methyl}-5-fluoro-*N*<sup>2</sup>-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]pyrimidine-2,4-diamine (19a)**

To a solution of **18b** (52 mg, 0.13 mmol) in NMP (500 μL), ethylbromide (12 μL, 0.16 mmol) and DIPEA (28 μL, 0.16 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 1h. To the reaction mixture CHCl<sub>3</sub> was added and chromatographed on amino silica gel with elution using

(*n*-hexane-EtOAc) (1:6) to give **19a** (38 mg, 68%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.77–2.36 (9H, m), 0.94 (3H, t, *J* = 8.0 Hz), 2.40–2.78 (2H, m), 2.57 (3H, s), 3.17–3.37 (2H, m), 3.80 (3H, s), 6.78 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.52–7.76 (3H, m), 7.89 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 9.42 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 442 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 442.2479, Found: 442.2479.

**5-Fluoro-*N*<sup>4</sup>-{[(3*S*)-1-(2-methoxyethyl)piperidin-3-yl]methyl}-*N*<sup>2</sup>-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]pyrimidine-2,4-diamine (19b)**

Compound **19b** was prepared from compound **18b** in 64% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **18a**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.79–1.93 (7H, m), 2.36–2.42 (2H, m), 2.57 (3H, s), 2.65–2.76 (2H, m), 3.18 (3H, s), 3.19–3.39 (4H, m), 3.80 (3H, s), 6.78 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.52–7.76 (3H, m), 7.89 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 9.42 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 472 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 472.2585, Found: 472.2575.

**2-[(3*S*)-3-{[(5-Fluoro-2-{3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]amino}pyrimidin-4-yl)amino]methyl]piperidin-1-yl]ethanol (19c)**

To a solution of **18b** (59 mg, 0.14 mmol) in THF (1.2 ml), 2,2-difluoroethyl trifluoromethanesulfonate (37 mg, 0.17 mmol) and DIPEA (49 μL, 0.29 mmol) were added. The reaction mixture was refluxed for 14 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub> and basified with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (97:3) to give **19c** (35mg, 51%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.80–0.88 (1H, m), 1.31–1.42 (1H, m), 1.53–1.59 (2H, m), 1.82–1.86 (2H, m), 2.05–2.11 (1H, m), 2.57 (3H, s), 2.61–2.70 (2H, m), 2.73–2.80 (2H, m), 3.16–3.31 (2H, m), 3.80 (3H, s), 6.07 (1H, tt, *J* = 55.9, 4.3 Hz), 6.78 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.54–7.59 (2H, m), 7.73 (1H, t, *J* = 1.8 Hz), 7.90 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 9.42 (1H, s). MS (ESI) *m/z* 478 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 478,2291, Found: 478.2288.

**5-Fluoro-*N*<sup>2</sup>-[3-methoxy-5-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]-*N*<sup>4</sup>-{[(3*S*)-1-(2,2,2-trifluoroethyl)piperidin-3-yl]methyl}pyrimidine-2,4-diamine (19d)**

Compound **19d** was prepared from compound **18b** in 64% yield as a colorless solid, using a

similar approach to that described for **19c**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.81–0.91 (1H, m), 1.33–1.43 (1H, m), 1.53–1.59 (2H, m), 1.84–1.91 (1H, m), 1.98–2.03 (1H, m), 2.21–2.27 (1H, m), 2.57 (3H, s), 2.77–2.80 (1H, m), 2.83–2.86 (1H, m), 3.10 (2H, q,  $J = 10.3$  Hz), 3.21–3.25 (2H, m), 3.79 (3H, s), 6.78 (1H, t,  $J = 2.1$  Hz), 7.55–7.60 (2H, m), 7.72 (1H, t,  $J = 1.8$  Hz), 7.90 (1H, d,  $J = 3.8$  Hz), 9.43 (1H, s). MS (ESI)  $m/z$  496  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 496.2196, Found: 496.2206.

### 2-Chloro-5-fluoro-*N*-[(3*R*)-piperidin-3-ylmethyl]pyrimidin-4-amine (**20**)

To a solution of **11** (3.4 g, 20 mmol) in DMF (34 mL), (3*S*)-3-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester (5.2 g, 24 mmol) and DIPEA (4.5 mL, 26 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 14 h. The reaction mixture was poured into saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with  $\text{H}_2\text{O}$  and brine and then dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo to give a brown solid. To a solution of the residue in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 mL), TFA (13 mL, 170 mmol) was added and stirred at room temperature for 4h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was added to saturated aqueous  $\text{K}_2\text{CO}_3$  and extracted with ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH) (80/20). The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo to give **20** (4.2 g, 87%) as a pale solid.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.99–1.12 (1H, m), 1.24–1.39 (1H, m), 1.52–1.61 (1H, m), 1.66–1.79 (2H, m), 2.21 (1H, dd,  $J = 11.8, 9.4$  Hz), 2.38–2.48 (1H, m), 2.77–2.85 (1H, m), 2.85–2.93 (1H, m), 3.15–3.24 (3H, m), 8.04 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz), 8.15–8.24 (1H, m); MS (ESI)  $m/z$  245, 247  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 2-Chloro-5-fluoro-*N*-{[(3*S*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}pyrimidin-4-amine (**21**)

To a solution of **20** (2.1 g, 8.6 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (21 mL), 36% aqueous formaldehyde solution (1.0 g, 13 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (2.7 g, 13 mmol) were added and then stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with  $\text{CHCl}_3$  and basified with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$ . The organic layer was washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using  $\text{CHCl}_3$  to give **21** (1.3 g, 59%) as a colorless solid.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.82–0.97 (1H, m), 1.34–1.49 (1H, m), 1.54–1.70 (3H, m), 1.78–1.94 (2H, m), 2.12 (3H, s), 2.53–2.69 (2H, m), 3.12–3.29 (2H, m), 8.04 (1H, d,  $J = 3.5$  Hz), 8.14–8.24 (1H, m); MS (ESI)  $m/z$  259, 261  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**5-Fluoro-*N*<sup>4</sup>-{[(3*S*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}-*N*<sup>2</sup>-[3-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]pyrimidine-2,4-diamine (22a)**

To a solution of **21** (355 mg, 1.4 mmol) in IPA (14 mL), 3-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)aniline (313 mg, 1.3 mmol) and 4 M HCl-EtOAc (1.0 mL, 4.1 mmol) were added and stirred at 120 °C for 9 h. The reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub> and washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (90:10) to give **22a** (320 mg, 59%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.74–0.87 (1H, m), 1.28–1.41 (1H, m), 1.54–1.64 (3H, m), 1.74–1.92 (2H, m), 2.10 (3H, s), 2.52–2.70 (2H, m), 2.57 (3H, s), 3.15–3.28 (2H, m), 7.10–7.18 (1H, m), 7.47 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.55–7.63 (1H, m), 7.77–7.83 (1H, m), 7.90 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 8.24 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 9.49 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 398 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 398.2217, Found: 398.2208.

**5-Fluoro-*N*<sup>4</sup>-{[(3*S*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}-*N*<sup>2</sup>-[3-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl]pyrimidine-2,4-diamine (22b)**

Compound **22b** was prepared from compound **21** in 74% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **22a**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.81–0.95 (1H, m), 1.27–1.42 (1H, m), 1.50–1.64 (3H, m), 1.71–1.82 (1H, m), 1.83–1.94 (1H, m), 2.07 (3H, s), 2.47–2.66 (2H, m), 3.23–3.37 (2H, m), 7.27–7.33 (1H, m), 7.41 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.52–7.61 (1H, m), 7.65–7.72 (1H, m), 7.90 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 7.95 (1H, d, *J* = 3.8 Hz), 8.57 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 8.71 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 9.4 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 383 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 383.2108, Found: 383.2106.

**5-Fluoro-*N*<sup>4</sup>-{[(3*S*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}-*N*<sup>2</sup>-[3-(1,3-oxazol-5-yl)phenyl]pyrimidine-2,4-diamine (22c)**

Compound **22c** was prepared from compound **21** in 72% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **22a**. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.80–0.95 (1H, m), 1.30–1.46 (1H, m), 1.52–1.71 (3H, m), 1.74–1.84 (1H, m), 1.84–1.98 (1H, m), 2.08 (3H, s), 2.42–2.70 (2H, m), 3.23–3.39 (2H, m), 7.21–7.27 (1H, m), 7.31 (1H, t, *J* = 7.9 Hz), 7.50–7.56 (1H, m), 7.57 (1H, s), 7.63–7.69

(1H, m), 7.88 (1H, d,  $J = 3.8$  Hz), 8.20–8.24 (1H, m), 8.42 (1H, s), 9.19 (1H, s); MS (ESI)  $m/z$  383  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{20}H_{23}FN_6O$   $[M+H]^+$ : 383.1996, Found: 383.1994.

**5-Fluoro- $N^4$ -{[(3*S*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}- $N^2$ -[3-(1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl]pyrimidine-2,4-diamine (22d)**

Compound **22d** was prepared from compound **21** in 86% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **22a**.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.82–0.97 (1H, m), 1.31–1.45 (1H, m), 1.53–1.68 (3H, m), 1.74–1.97 (2H, m), 2.08 (3H, s), 2.50–2.71 (2H, m), 3.21–3.41 (2H, m), 6.52 (1H, dd,  $J = 2.4, 1.6$  Hz), 7.24–7.34 (2H, m), 7.48–7.59 (2H, m), 7.71 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz), 7.88 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz), 8.34 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 8.44 (1H, dd,  $J = 1.6, 1.6$  Hz), 9.24 (1H, s); MS (ESI)  $m/z$  382  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{20}H_{24}FN_7$   $[M+H]^+$ : 382.2155, Found: 382.2148.

**5-Fluoro- $N^4$ -{[(3*S*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}- $N^2$ -[3-(4-methyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl]pyrimidine-2,4-diamine (22e)**

Compound **22e** was prepared from compound **21** in 93% yield as a white solid, using a similar approach to that described for **22a**.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.83–0.97 (1H, m), 1.32–1.45 (1H, m), 1.53–1.69 (3H, m), 1.74–1.84 (1H, m), 1.84–1.96 (1H, m), 2.08 (3H, s), 2.10 (3H, s), 2.52–2.62 (1H, m), 2.62–2.70 (1H, m), 3.26–3.38 (2H, m), 7.17–7.23 (1H, m), 7.27 (1H, dd,  $J = 8.0, 8.0$  Hz), 7.46–7.56 (3H, m), 7.88 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz), 8.10 (1H, s), 8.38 (1H, dd,  $J = 2.0, 2.0$  Hz), 9.21 (1H, s); MS (ESI)  $m/z$  396  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{21}H_{26}FN_7$   $[M+H]^+$ : 396.2312, Found: 396.2308.

**$N^2$ -[3-(4-Chloro-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl]-5-fluoro- $N^4$ -{[(3*S*)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl}pyrimidine-2,4-diamine (22f)**

Compound **22f** was prepared from compound **21** in 92% yield as a white solid, using a similar approach to that described for **22a**. Mp 136°C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.80–0.95 (1H, m), 1.30–1.44 (1H, m), 1.52–1.68 (3H, m), 1.73–1.96 (2H, m), 2.08 (3H, s), 2.49–2.70 (2H, m), 3.24–3.39 (2H, m), 7.21–7.27 (1H, m), 7.32 (1H, dd,  $J = 8.0, 8.0$  Hz), 7.49–7.58 (2H, m), 7.83 (1H, d,  $J = 0.4$  Hz), 7.89 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz), 8.45 (1H, dd,  $J = 2.2, 2.2$  Hz), 8.65 (1H, d,  $J = 0.4$  Hz), 9.28 (1H, s);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  24.31, 27.56, 35.43, 43.71, 46.33, 55.67, 59.54, 108.37, 110.47, 110.61, 116.44, 126.05, 129.08, 138.41, 138.56, 138.77, 139.49, 142.38, 152.19, 144.40; MS (ESI)  $m/z$  416, 418  $[M+H]^+$ ;



HRMS (ESI) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>ClFN<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 416.1766, Found: 416.1770; IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 1429; Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>ClFN<sub>7</sub>: C, 57.76; H, 5.57; N, 23.57; Cl, 8.52; F, 4.57. Found: C, 57.79; H, 5.46; N, 23.64; Cl, 8.49; F, 4.59. [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> (c = 0.1, MeOH) -4.5 °.

#### **1,2,2,6,6-Pentamethylpiperidine-4-carbonitrile (24)**

Under argon atmosphere, to a solution of **23** (3.0 g, 18 mmol) and TosMIC (3.8 g, 19 mmol) in DME (63 mL) and *tert*-BuOH (21 mL), *tert*-BuOK (4.0 g, 35 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was allowed to room temperature and stirred for 2 h. The reaction mixture was poured into H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was triturated with (*n*-hexane-EtOAc) (50:50) to give **24** (1.8 g, 56%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.00 (6H, s), 1.16 (6H, s), 1.63–1.74 (2H, m), 1.78–1.88 (2H, m), 2.22 (3H, s), 2.73–2.84 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 181 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **1-(1,2,2,6,6-Pentamethylpiperidin-4-yl)methanamine (25)**

Under argon atmosphere, to a suspension of LAH (210 mg, 5.5 mmol) in THF (20 mL), **24** (1.0 g, 5.5 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h then cautiously quenched with saturated aqueous Rochelle's salt and stirred at room temperature for 15 min. The precipitate was filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (98:2) to give **25** (1.0 g, 98%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.97–1.17 (4H, m), 1.01 (6H, s), 1.14 (6H, s), 1.48–1.58 (2H, m), 1.61–1.75 (1H, m), 2.25 (3H, s), 2.53 (2H, d, *J* = 6.4 Hz); MS (ESI) *m/z* 185 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **4-Chloro-1-(3-nitrophenyl)-1H-pyrazole (27)**

To a solution of **26** (400 mg, 2.8 mmol) in DMI (2.4 mL), 4-chloro-1H-pyrazole (440 mg, 4.3 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.78 g, 5.7 mmol) were added and stirred at 130 °C for 16 h. The mixture was partitioned with EtOAc and H<sub>2</sub>O. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (90:10) to give **27** (583 mg, 92%) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.82 (1H, dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz), 8.00 (1H, d, *J* = 0.4 Hz), 8.16–8.21 (1H, m), 8.27–

8.32 (1H, m), 8.64 (1H, dd,  $J = 2.4, 2.4$  Hz), 9.04 (1H, d,  $J = 0.4$  Hz); MS (ESI)  $m/z$  224, 226  $[M+H]^+$ .

### **3-(4-Chloro-1H-pyrazol-1-yl)aniline (28)**

To a solution of **27** (580 mg, 2.6 mmol) in EtOH (14 mL),  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2.3 g, 10 mmol) was added and refluxed for 6 h. The mixture was partitioned with EtOAc and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  and filtered with celite. The residue was extracted, washed with brine, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (45:55) to give **28** (467 mg, 94%) as a pale yellow solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  5.38 (2H, s), 6.49–6.54 (1H, m), 6.84–6.88 (1H, m), 7.01 (1H, dd,  $J = 2.0, 2.0$  Hz), 7.10 (1H, dd,  $J = 8.0, 8.0$  Hz), 7.79 (1H, d,  $J = 0.8$  Hz), 8.59 (1H, d,  $J = 0.8$  Hz); MS (ESI)  $m/z$  194, 196  $[M+H]^+$ .

本論第二章の実験

### **3,5-Dichloro-6-cyanopyrazine-2-carboxamide (31)**

To a solution of 3,5-dichloropyrazine-2-carbonitrile (**30**) (120 mg, 0.69 mmol) in formamide (5.3 g, 120 mmol) were added  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (37  $\mu\text{L}$ , 0.69 mmol),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (190 mg, 0.69 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (700  $\mu\text{L}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (230  $\mu\text{L}$ , 2.1 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (700  $\mu\text{L}$ ) dropwise at 0 °C, and the mixture was stirred at the same temperature for 30 min. The reaction mixture was quenched with ice water and extracted with EtOAc. The aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with water, saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  and brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo to give **31** (99 mg, 66%) as a pale yellow solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.18 (1H, br s), 8.28 (1H, br s); MS (ESI)  $m/z$  197, 199  $[M-\text{HCl}+\text{H}_2\text{O}]^-$ .

### **3-(3-Bromoanilino)-5-chloro-6-cyanopyrazine-2-carboxamide (34)**

To a solution of **31** (110 mg, 0.51 mmol) in DMI (2 mL) were added 3-bromoaniline (74 mg, 0.43 mmol) and DIPEA (106  $\mu\text{L}$ , 0.61 mmol). The reaction mixture was heated with stirring at 60 °C in a Biotage auto-sampling microwave reactor for 20 min. The mixture was poured into saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and collected by vacuum filtration to give **34** (145 mg, 81%) as a yellow solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.35–7.42 (2H, m), 7.54–7.60 (1H, m), 8.01 (1H, br s), 8.26 (1H, br s), 8.63

(1H, s), 12.0 (1H, br s); MS (ESI)  $m/z$  350, 352 [M-H]<sup>-</sup>.

### **6-(3-Bromoanilino)-4-chloropyridine-3-carbonitrile (35)**

To a solution of 2,4-dichloro-5-cyanopyridine **32** (300 mg, 1.7 mmol) in DMF (2 mL) were added 3-bromoaniline (290 mg, 1.7 mmol) and 4 M HCl (43  $\mu$ L, 0.17 mmol). The reaction mixture was heated with stirring at 150 °C in a Biotage auto-sampling microwave reactor for 1.5 h. The mixture was diluted with EtOAc and washed with brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silicagel with elution using (*n*-hexane-CHCl<sub>3</sub>) (5:95) and recrystallized with EtOAc and *n*-hexane to give **35** (40 mg, 7.5%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.49–7.56 (3H, m), 7.77 (2H, br s), 8.75 (1H, s), 10.39 (1H, s); MS (ESI)  $m/z$  306, 308 [M-H]<sup>-</sup>.

### **2-(3-Bromoanilino)-4-chloropyrimidine-5-carbonitrile (36)**

To a solution of 2,4-dichloro-5-cyanopyrimidine **33** (700 mg, 4.0 mmol) in DMF (7 mL) were added 3-bromoaniline (710 mg, 4.1 mmol) and DIPEA (750  $\mu$ L, 4.3 mmol) at 0 °C, and stirred at the same temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silicagel with elution using (*n*-hexane-CHCl<sub>3</sub>) to give **36** (510 mg, 41%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.28–7.38 (2H, m), 7.63–7.69 (1H, m), 7.99 (1H, br s), 8.97 (1H, s), 10.99 (1H, s); MS (ESI)  $m/z$  307, 309 [M-H]<sup>-</sup>.

### **5-{{(trans-4-Aminocyclohexyl)methyl}amino}-3-[(3-bromophenyl)amino]-6-cyanopyrazine-2-carboxamide (29)**

To a solution of **34** (60 mg, 0.17 mmol) in DMI (1 mL) were added *tert*-butyl (*trans*-4-aminomethylcyclohexyl)carbamate (78 mg, 0.34 mmol) and DIPEA (89  $\mu$ L, 0.51 mmol). The reaction mixture was heated with stirring at 60 °C in a Biotage auto-sampling microwave reactor for 20 min. The mixture was chromatographed on silicagel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (100:0 to 98:2) and concentrated in vacuo. To the residue in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) was added TFA (450  $\mu$ L, 5.8 mmol) at 0 °C and stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was basified with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give **29** (28 mg, 37%) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$

0.83–1.09 (4H, m), 1.50–1.65 (1H, m), 1.68–1.88 (4H, m), 2.40–2.50 (1H, m), 3.08–3.28 (2H, m), 7.22–7.44 (3H, m), 7.67 (1H, br s), 8.01 (1H, br s), 8.09 (1H, br s), 8.28 (1H, br s), 12.05 (1H, br s); MS (ESI)  $m/z$  444, 446  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{19}H_{23}ON_7Br$   $[M+H]^+$ : 444.1142, Found: 444.1144.

#### **4-{{(trans-4-Aminocyclohexyl)methyl}amino}-6-[(3-bromophenyl)amino]nicotinonitrile (37)**

Compound **37** was prepared from compound **35** in 19% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **29**.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.75–1.32 (4H, m), 1.48–1.68 (1H, m), 1.69–1.95 (4H, m), 2.71–2.84 (1H, m), 2.85–3.09 (2H, m), 5.32 (2H, br s), 5.98 (1H, s), 6.76–6.82 (1H, m), 7.06–7.11 (1H, m), 7.21 (1H, t,  $J = 8.1$ Hz), 7.43–7.48 (1H, m), 8.00–8.03 (1H, m), 8.20 (1H, s), 9.38 (1H, s); MS (ESI)  $m/z$  400  $[M+H]^+$ .

#### **4-{{(trans-4-Aminocyclohexyl)methyl}amino}-2-[(3-bromophenyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (38a)**

Compound **38a** was prepared from compound **36** in 74% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **29**.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.87–1.06 (4H, m), 1.27–1.47 (2H, m), 1.53–1.65 (1H, m), 1.67–1.81 (4H, m), 2.39–2.55 (1H, m), 3.21–3.42 (2H, m), 7.14–7.19 (1H, m), 7.23 (1H, t,  $J = 8.0$ Hz), 7.56–7.62 (1H, m), 7.88 (1H, br s), 8.22 (1H, s), 8.35 (1H, s), 9.94 (1H, br s); MS (ESI)  $m/z$  401, 403  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{18}H_{22}N_6Br$   $[M+H]^+$ : 401.1084, Found: 401.1086.

#### **4-({[trans-4-(Aminomethyl)cyclohexyl]methyl}amino)-2-[(3-bromophenyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (38b)**

Compound **38b** was prepared from compound **36** in 53% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **29**.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.64–1.32 (8H, m), 1.56–1.87 (4H, m), 2.30–2.39 (2H, m), 3.25–3.33 (2H, m), 7.12–7.29 (2H, m), 7.56–7.67 (1H, m), 7.89 (1H, br s), 8.22 (1H, br s), 8.35 (1H, s), 9.94 (1H, br s); MS (ESI)  $m/z$  415, 417  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{19}H_{24}N_6Br$   $[M+H]^+$ : 415.1240, Found: 415.1242.

#### **4-{{2-(trans-4-Aminocyclohexyl)ethyl}amino}-2-[(3-bromophenyl)amino]pyrimidine-5-**

### carbonitrile (38c)

Compound **39c** was prepared from compound **36** in 89% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **29**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.78–1.33 (5H, m), 1.39–1.55 (2H, m), 1.59–1.86 (4H, m), 2.35–2.56 (1H, m), 3.36–3.50 (2H, m), 7.17–7.28 (2H, m), 7.58–7.67 (1H, m), 7.85 (1H, br s), 8.17 (1H, s), 8.35 (1H, s), 9.97 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* 415 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>Br [M+H]<sup>+</sup>: 415.1240, Found: 415.1240.

### 2-(3-Bromoanilino)-4-[(piperidin-4-yl)methyl]amino}pyrimidine-5-carbonitrile (38d)

Compound **38d** was prepared from compound **36** in 78% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **29**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.95–1.17 (2H, m), 1.56–1.67 (2H, m), 1.68–1.85 (1H, m), 2.27–2.45 (2H, m), 2.81–3.01 (2H, m), 3.07–3.57 (3H, m), 7.14–7.20 (1H, m), 7.23 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.56–7.66 (1H, m), 7.89 (1H, br s), 8.19 (1H, s), 8.36 (1H, s), 9.96 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* 387, 389 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>Br [M+H]<sup>+</sup>: 387.0927, Found: 387.0928.

### 4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-(3-bromoanilino)pyrimidine-5-carbonitrile (38e)

Compound **38e** was prepared from compound **36** in 51% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **29**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.17–1.87 (13H, m), 1.92–2.06 (2H, m), 2.77–2.83 (1H, m), 3.18–3.28 (2H, m), 7.14–7.20 (1H, m), 7.25 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.46–7.57 (1H, m), 7.58–7.72 (1H, m), 8.32–8.41 (2H, m), 9.96 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* 453 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BrN<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 453.1397, Found: 453.1396.

### *tert*-Butyl [(1*R*,2*s*,3*S*,5*s*,7*s*)-5-([5-cyano-2-(methanesulfinyl)pyrimidin-4-yl]amino)methyl]adamantan-2-yl]carbamate (41)

To a solution of 4-chloro-2-(methylsulfonyl)pyrimidine-5-carbonitrile **39** (4.9 g, 26 mmol) in DMI (50 mL), *tert*-butyl [(1*R*,2*s*,3*S*,5*s*,7*s*)-5-(aminomethyl)adamantan-2-yl]carbamate **40** (7.4 g, 26 mmol) and DIPEA (9.1 mL, 52 mmol) were added at 0 °C and stirred at 0 °C for 1 h. The reaction mixture was poured into saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl and resulted precipitate was collected by vacuum filtration to give a colorless solid. To a solution of the residue in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (110 mL), 75% *m*-CPBA

(6.5 g, 28 mmol) was added at 0 °C. After stirring at 0 °C for 3 h, 75% *m*-CPBA (0.44 g, 2.6 mmol) was added and stirred at 0 °C for 1 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silicagel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (25:75 to 10:90) to give **14** (9.5 g, 81%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.22–1.58 (8H, m), 1.38 (9H, s), 1.76–1.97 (5H, m), 2.81 (3H, s), 3.15–3.30 (2H, m), 3.41–3.52 (1H, m), 6.75–6.82 (1H, m), 8.48–8.55 (1H, m), 8.72 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 468 [M+Na]<sup>+</sup>.

#### **4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-anilinopyrimidine-5-carbonitrile (42a)**

To a solution of **41** (50 mg, 0.11 mmol) in DMI (1 mL), aniline (20 μL, 0.22 mmol) and 4 M HCl-dioxane (3 μL, 0.011 mmol) were added and stirred at 100°C for 3 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. To the residue in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was added TFA (500 μL) and stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silicagel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (98:2 to 90:10) to give **42a** (15 mg, 36%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.10–2.20 (15H, m), 2.75–2.81 (1H, m), 3.22 (2H, d, *J* = 6.3Hz), 6.98-7.04 (1H, m), 7.26–7.32 (2H, m), 7.51–7.60 (1H, br), 7.73–7.79 (2H, m), 8.32 (1H, s), 9.74 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* 375 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 375.2292, Found: 375.2290.

#### **4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-(cyclohexylamino)pyrimidine-5-carbonitrile (42b)**

To a solution of **41** (50 mg, 0.11 mmol) in DMI (1ml), cyclohexylamine (30 μL, 0.26 mmol) was added and stirred at room temperature for 14 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. To the residue in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL), TFA (85 μL, 1.1 mmol) was added and stirred at room temperature for 5 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo and chromatographed on amino silicagel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (98:2 to 90:10) to give **42b** (20 mg, 47%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.03–1.88 (23H, m), 1.96–2.06 (2H, m), 2.74–2.80 (1H, m), 3.08–3.17 (2H, m), 3.62–3.74 (1H, m), 7.22–7.31 (1H, m), 7.45–7.51 (1H, m), 8.09 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 381 [M+H]<sup>+</sup>;

HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 381.2761, Found: 381.2762.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-[(cyclohexylmethyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42c)**

Compound **42c** was prepared from compound **41** in 47% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.81–1.88 (24H, m), 1.95–2.07 (2H, m), 2.76–2.81 (1H, m), 3.00–3.19 (4H, m), 7.21–7.28 (1H, m), 7.64–7.71 (1H, m), 8.08 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 395 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 395.2918, Found: 395.2918.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-(benzylamino)pyrimidine-5-carbonitrile (42d)**

Compound **42d** was prepared from compound **41** in 34% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.10–2.10 (15H, m), 2.71 and 2.81 (total 1H, each br s), 3.03 and 3.13 (total 2H, each d, *J* = 6.4Hz), 4.45 and 4.47 (total 2H, each d, *J* = 6.4Hz), 7.03–7.38 (6H, m), 7.88–8.22 (2H, m); MS (ESI) *m/z* 389 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 389.2448, Found: 389.2446.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-[(2-bromobenzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42e)**

Compound **42e** was prepared from compound **41** in 79% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.13–2.01 (15H, m), 2.74 and 2.91 (total 1H, each br s), 2.94 and 3.16 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 4.46 (2H, d, *J* = 6.0Hz), 7.14–7.20 (2H, m), 7.29–7.33 (2H, m), 7.60 (1H, d, *J* = 7.8Hz), 7.91 and 8.21 (total 1H, each t, *J* = 6.3Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 467, 469 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>Br [M+H]<sup>+</sup>: 467.1553, Found: 467.1556.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-[(2-chlorobenzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42f)**

Compound **42f** was prepared from compound **41** in 69% yield as a colorless solid, using a similar

approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.07–2.03 (15H, m), 2.62 and 2.80 (total 1H, each br s), 2.94 and 3.16 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 4.51–4.54 (2H, m), 7.15–7.31 (4H, m), 7.42 (1H, d, *J* = 7.4Hz), 7.92 and 8.19 (total 1H, each t, *J* = 6.3Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 423 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 423.2058, Found: 423.2059.

**4-({(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl)methyl}amino)-2-[(3-chlorobenzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42g)**

Compound **42g** was prepared from compound **41** in 68% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.13–2.02 (15H, m), 2.68 and 2.79 (total 1H, each br s), 2.99 and 3.13 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 4.44 and 4.47 (total 2H, each d, *J* = 6.2Hz), 7.13–7.35 (5H, m), 7.96 and 8.19 (total 1H, each t, *J* = 6.3Hz), 8.17 and 8.20 (total 1H, each s); MS (ESI) *m/z* 423 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 423.2058, Found: 423.2057.

**4-({(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl)methyl}amino)-2-[(4-chlorobenzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42h)**

Compound **42h** was prepared from compound **41** in 71% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.12–2.02 (15H, m), 2.66 and 2.79 (total 1H, each br s), 2.98 and 3.12 (total 2H, each d, *J* = 6.1Hz), 4.42 and 4.45 (total 2H, each d, *J* = 6.4Hz), 7.11–7.28 (1H, m), 7.25 (2H, d, *J* = 8.4Hz), 7.35 (2H, d, *J* = 8.4Hz), 7.95 and 8.17 (total 1H, each t, *J* = 7.6Hz), 8.15 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 423 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 423.2058, Found: 423.2059.

**4-({(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl)methyl}amino)-2-[(2-methylbenzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42i)**

Compound **42i** was prepared from compound **41** in 16% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.03–2.06 (15H, m), 2.27 and 2.31 (total 3H, each s), 2.64 and 2.79 (total 1H, each br s) 2.95–3.04 and 3.10–3.18 (total 2H, each m), 4.38–4.49 (2H, m), 7.04–7.28 (5H, m), 7.79–7.86 and 8.05–8.13 (total 1H, each m), 8.15 and 8.18 (total 1H, each s); MS (ESI) *m/z* 403 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 403.2605, Found:



403.2605.

**4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-[(2-ethoxybenzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42j)**

Compound **42j** was prepared from compound **41** in 62% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.10–2.10 (15H, m), 1.36 (3H, t, *J* = 6.9 Hz), 2.69–2.75 and 2.85–2.89 (1H, each m), 2.98 and 3.15 (2H, each d, *J* = 6.4Hz), 4.00–4.11 (2H, m), 4.41–4.48 (2H, m), 6.79–6.88 (1H, m), 6.91–6.98 (1H, m), 7.03–7.31 (3H, m), 7.66 and 7.92 (total 1H, each t, *J* = 6.4Hz), 8.15 and 8.17 (total 1H, each s); MS (ESI) *m/z* 433 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 433.2710, Found: 433.2708.

**4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-[(2-(trifluoromethyl)benzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42k)**

Compound **42k** was prepared from compound **41** in 80% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.95–2.09 (15H, m), 2.50–2.58 and 2.77–2.83 (1H, each m), 2.90 and 3.17 (2H, each d, *J* = 6.4Hz), 4.61–4.72 (2H, m), 7.14–7.76 (5H, m), 7.92–8.01 and 8.16–8.27 (total 2H, each m); MS (ESI) *m/z* 457 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 457.2322, Found: 457.2321.

**4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-[(2-cyclopropylbenzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42l)**

Compound **42l** was prepared from compound **41** in 81% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.57–0.68 (2H, m), 0.85–0.97 (2H, m), 1.02–2.06 (16H, m), 2.61 and 2.79 (1H, each br s), 2.98 and 3.14 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 4.60–4.71 (2H, m), 6.93–7.29 (5H, m), 7.80–7.87 and 8.06–8.13 (total 1H, each m), 8.16 and 8.18 (total 1H, each s); MS (ESI) *m/z* 429 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-[(2-(trifluoromethoxy)benzyl)amino]pyrimidine-5-carbonitrile (42m)**

Compound **42m** was prepared from compound **41** in 76% yield as a colorless solid, using a similar

approach to that described for **42b**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.01–2.02 (15H, m), 2.63 and 2.79 (total 1H, each s), 2.94 and 3.14 (total 2H, each d, *J* = 6.4Hz), 4.54 (2H, d, *J* = 6.1Hz), 7.14–7.34 (5H, m), 8.90 and 8.14 (total 1H, each t, *J* = 6.4Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 473 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 473.2271, Found: 473.2276. Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O: C, 61.01; H, 5.76; N, 17.79; F, 12.06. Found: C, 61.08; H, 5.84; N, 17.47; F, 11.84.

**{{(1*R*,2*S*,3*S*,5*S*,7*S*)-5-({[5-Cyano-2-({[2-(trifluoromethoxy)phenyl]methyl}amino)pyrimidin-4-yl]amino}methyl)adamantan-2-yl]amino}acetic acid (43a)**

To a solution of **42m** (30 mg, 0.063 mmol) in DMF (0.6 mL), ethyl bromoacetate (7.0 μL, 0.063 mmol) and DIPEA (22 μL, 0.13 mmol) were added and stirred at 60 °C. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with H<sub>2</sub>O. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was purified with preparative TLC with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) and concentrated in vacuo. To a solution of the residue in THF (2.4 mL), 4M LiOH aqueous solution (0.1 mL, 0.4 mmol) was added and stirred at room temperature. To the reaction mixture, 1M HCl aqueous solution (0.4 mL, 0.4 mmol) was added and concentrated in vacuo. To the residue was added H<sub>2</sub>O and filtrated and washed with EtOAc/IPE to give **43a** (11mg, 33%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.06–2.12 (14H, m), 2.82 and 3.04 (total 1H, each s), 2.94 (2H, d, *J* = 6.3Hz), 3.07–3.21 (2H, m), 4.45–4.58 (2H, m), 7.24–7.41 (5H, m), 7.93 and 8.18 (total 1H, each t, *J* = 6.2Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 531 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 531.2326, Found: 531.2329.

**2-{{(1*R*,2*S*,3*S*,5*S*,7*S*)-5-({[5-Cyano-2-({[2-(trifluoromethoxy)phenyl]methyl}amino)pyrimidin-4-yl]amino}methyl)adamantan-2-yl]amino}acetamide (43b)**

To a solution of **42m** (30 mg, 0.063 mmol) in DMF (0.6 mL), 2-bromoacetamide (8.8 mg, 0.063 mmol) and DIPEA (22 μL, 0.13 mmol) were added and stirred at 60 °C. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with H<sub>2</sub>O. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was purified with preparative TLC with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) to give **43b** (11mg, 33%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.03–2.09 (14H, m), 2.27 (1H, br s), 2.93 and 3.14 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 2.99 and 3.04 (total 2H, each s), 4.50–4.57 (2H, m), 7.00–7.40 (7H, m), 7.91 and 8.16 (total 1H, each t, *J* = 6.3Hz), 8.18 (1H,

s); MS (ESI)  $m/z$  530  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{26}H_{31}F_3N_7O_2$   $[M+H]^+$ : 530.2486, Found: 530.2488.

**4-[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-[(2-Hydroxyethyl)amino]adamantan-1-yl)methyl]amino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl)methyl]amino)pyrimidine-5-carbonitrile (43c)**

Compound **43c** was prepared from compound **42m** in 42% yield as a colorless solid, using a similar approach to that described for **43b**. Mp 148 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.08–2.34 (15H, m), 2.53–2.61 (2H, m), 2.94 and 3.14 (total 2H, each d,  $J = 6.3$ Hz), 3.40–3.48 (2H, m), 4.44 (1H, br s), 4.54 (2H, d,  $J = 6.0$ Hz), 7.18–7.34 (5H, m), 7.91 and 8.15 (total 1H, each t,  $J = 6.3$ Hz), 8.18 (1H, s);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  27.07, 29.93, 30.16, 31.28, 31.340, 34.18, 34.42, 49.05, 49.80, 49.96, 60.58, 60.65, 60.91, 78.76, 80.36, 117.27, 119.24, 120.64, 121.28, 127.31, 127.79, 128.10, 132.32, 145.79, 161.74, 161.80; MS (ESI)  $m/z$  517  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{26}H_{32}F_3N_6O_2$   $[M+H]^+$ : 517.2533, Found: 517.2524; IR (ATR,  $cm^{-1}$ ) 1541, 2360, 3736; Anal. Calcd for  $C_{26}H_{31}F_3N_6O_2$ : C, 60.45; H, 6.05; N, 16.27; F, 11.03. Found: C, 60.38; H, 6.05; N, 16.19; F, 10.90.

**Methyl (1*s*,3*R*,5*S*,7*s*)-4-[(benzyloxy)carbonyl]amino}adamantane-1-carboxylate (45)**

To a solution of **44** (1.0 g, 4.7 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (10 mL) were added diisopropylethylamine (1.3 mL, 7.5 mmol) and Cbz-Cl (1.1 mL, 7.5 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was diluted with EtOAc and saturated aqueous  $NaHCO_3$ . The organic layer was washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (1:1) to give **45** (1.2 g, 73%).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.50–2.26 (13H, m), 3.61–3.70 (3H, m), 3.74–3.86 (1H, m), 5.02–5.18 (3H, m), 7.29–7.40 (5H, m); MS (ESI)  $m/z$  344  $[M+H]^+$ .

**(1*s*,3*R*,5*S*,7*s*)-4-[(Benzyloxy)carbonyl]amino}adamantane-1-carboxylic acid (46)**

To a solution of **45** (1.0 g, 2.9 mmol) in 1,4-dioxane (5.0 mL) and MeOH (5.0 mL) was added 1 M NaOH (5.8 mL, 5.8 mmol) and the mixture was stirred at 60 °C for 4 h. The reaction mixture was poured into potassium sulfate aqueous solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and concentrated in vacuo to give **46** (1.0 g, 104%).  $^1H$  NMR

(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.52–2.25 (14H, m), 3.60–3.87 (1H, m), 5.01–5.21 (3H, m), 7.27–7.40 (5H, m); MS (ESI)  $m/z$  352 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Benzyl [(1*R*,2*r*,3*S*,5*S*,7*S*)-5-carbamoyladamantan-2-yl]carbamate (47a) and**

**Benzyl [(1*R*,2*s*,3*S*,5*S*,7*S*)-5-carbamoyladamantan-2-yl]carbamate (47b)**

To a solution of **46** (1.0 g, 3.0 mmol) in DMF (10 mL) were added ammonium chloride (210 mg, 3.9 mmol), HOBt·H<sub>2</sub>O (600 mg, 3.9 mmol), DIPEA (1.3 mL, 7.6 mmol), EDC·HCl (870 mg, 4.5 mmol). The mixture was stirred at 60 °C for 2 h. The reaction mixture was poured into H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (1:1 to 0:1) to give **47a** (410 mg, 41%, less polar) and **47b** (500 mg, 50%, high polar).

**47a** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.46 (2H, br d,  $J$  = 13 Hz), 1.67 (6H, br s), 1.88 (3H, br s), 2.01 (2 H, br d,  $J$  = 13 Hz), 3.56–3.64 (1H, m), 5.02 (2H, s), 6.67 (1H, br s), 6.94 (1 H, br s), 7.26–7.39 (6H, m); MS (ESI)  $m/z$  329 [M+H]<sup>+</sup>.

**47b** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.35 (2H, br d,  $J$  = 12.5 Hz), 1.70–1.90 (9H, m), 1.94 (2H, br d,  $J$  = 13 Hz), 3.55–3.62 (1H, m), 5.02 (2H, s), 6.69 (1H, br s), 6.96 (1H, br s), 7.28–7.39 (6H, m); MS (ESI)  $m/z$  329 [M+H]<sup>+</sup>.

**Benzyl [(1*R*,2*s*,3*S*,5*S*,7*S*)-5-(aminomethyl)adamantan-2-yl]carbamate (48)**

Under ice-cooling, to a solution of **47b** (500 mg, 1.5 mmol) in THF (5.0 ml) was added dropwise a 1.17 M solution of a borane-tetrahydrofuran complex in THF (3.9 mL, 4.6 mmol) under a nitrogen air flow, followed by heating and refluxing for 3 h. The reaction mixture was cooled, water was carefully added dropwise, and diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aqueous solution. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The obtained organic layer was combined and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give **48** (530 mg, 110%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.25–1.49 (8H, m), 1.78–1.89 (3H, m), 1.90–2.00 (2H, m), 2.17 (2H, s), 3.50–3.56 (1H, m), 5.02 (2H, s), 7.24–7.41 (6H, m); MS (ESI)  $m/z$  315 [M+H]<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl [(1*R*,2*s*,3*S*,5*S*,7*S*)-5-(aminomethyl)adamantan-2-yl]carbamate (40)**

To a solution of **48** (13 g, 41 mmol) and pyridine (4.3 mL, 54 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (130 mL), trifluoroacetic anhydride (7.6 mL, 54 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) were added at 0 °C and stirred at 0 °C for 30 min. To the reaction mixture, H<sub>2</sub>O was added and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. To the residue in EtOH (450 mL), di-*tert*-butyl dicarbonate (14 g, 66 mmol), 10% Pd/C (3.6 g, 3.4 mmol) and cyclohexa-1,4-diene (42 mL, 440 mmol) were added and stirred at room temperature for 1 h. The precipitate was filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silicagel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (5:1) to give a Boc protected compound (11 g). To the residue in MeOH (270 mL) / H<sub>2</sub>O (110 mL) / THF (110 mL), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 g, 0.29 mol) was added and stirred at room temperature. The reaction mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give **40** (9.0 g, 78%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.25–1.47 (17H, m), 1.77–1.86 (3H, m), 1.89–1.98 (2H, m), 2.18 (2H, s), 3.41–3.50 (1H, m), 6.75 (1H, d, *J* = 6.5 Hz); MS (ESI) *m/z* 281 [M+H]<sup>+</sup>.

本論第三章の実験

**4-[(1*S*,3*R*,4*S*,5*S*,7*S*)-4-[(Propan-2-yl)amino]adamantan-1-yl]methyl)amino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (**49**)**

To a solution of **42m** (50 mg, 0.11 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 mL), acetone (23 μL, 0.32 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (67 mg, 0.32 mmol) were added and then stirred at room temperature for 5 h. The reaction mixture was basified with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) to give **49** (53 mg, 98%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.94 (6H, d, *J* = 6.2 Hz), 0.97–1.97 (14H, m), 2.46 and 2.65 (total 1H, each brs), 2.70–2.75 (1H, m), 2.94 and 3.15 (total 2H, each d, *J* = 6.3 Hz), 4.54 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.16–7.35 (5H, m), 7.90 and 8.14 (total 1H, each t, *J* = 6.3 Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 515 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 515.2741, Found: 515.2740.

**4-[(1*S*,3*R*,4*S*,5*S*,7*S*)-4-(Cyclohexylamino)adamantan-1-yl]methyl)amino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (**50**)**

Compound **50** was prepared from compound **42m** in 91% yield as a colorless solid, using similar

approach to that described for **49**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.91–1.22 (14H, m), 1.45–1.99 (11H, m), 2.32 (1H, m), 2.93 and 3.15 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 4.54 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.16–7.35 (5H, m), 7.89 and 8.14 (total 1H, each t, *J* = 6.3 Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 555 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 555.3054, Found: 555.3047.

**4-[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-[(Oxan-4-yl)amino]adamantan-1-yl)methyl]amino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (**51**)**

Compound **51** was prepared from compound **42m** in 67% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **49**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.02–1.89 (18H, m), 2.54–2.74 (2H, m), 2.94 and 3.17 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 3.27 (2H, t, *J* = 11.6 Hz), 3.81 (2H, d, *J* = 11.6 Hz), 4.54 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.16–7.34 (5H, m), 7.89 and 8.14 (total 1H, each t, *J* = 6.3Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 557 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 557.2846, Found: 557.2839.

**4-[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-[(*cis*-4-*tert*-Butoxycarbonylamino)cyclohexyl]amino]adamantan-1-yl)methyl]amino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (**52**) and **4-[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-[(*trans*-4-*tert*-Butoxycarbonylamino)cyclohexyl]amino]adamantan-1-yl)methyl]amino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (**53**)****

To a solution of **42m** (75 mg, 0.16 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) and THF (2 mL), 4-(*tert*-butoxycarbonylamino)cyclohexanone (76 mg, 0.36 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (150 mg, 0.71 mmol) were added and then stirred at room temperature. The reaction mixture was basified with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (1:1) to give **52** (30 mg, 29%, less polar) and **53** (27 mg, 25%, high polar). **52** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.89–1.89 (24H, m), 1.37 (9H, m), 2.39–2.44 (1H, m), 2.90–2.97 (2H, m), 4.51–4.58 (2H, m), 6.54–6.66 (1H, m), 7.22–7.40 (5H, m), 8.10–8.16 (1H, m), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 670 [M+H]<sup>+</sup>; **53** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.89–1.90 (24H, m), 1.37 (9H, m), 2.18–2.29 (1H, m), 2.88–2.98 (2H, m), 4.46–4.59 (2H, m), 6.61–6.73 (1H, m), 7.22–7.42 (5H, m), 8.01–8.16 (1H, m), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 670 [M+H]<sup>+</sup>;

**4-[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-[(*trans*-4-Aminocyclohexyl)amino]adamantan-1-yl)methylamino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl)methyl]amino)pyrimidine-5-carbonitrile (54)**

To a solution of **53** (21 mg, 0.03 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL), TFA (0.12 mL, 1.6 mmol) was added and stirred at room temperature. The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) to give **54** (13 mg, 72%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.94–2.67 (27H, m), 2.93–3.15 (2H, m), 4.53–4.55 (2H, m), 7.15–7.35 (5H, m), 7.89–8.15 (1H, m), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 570 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 570.3163, Found: 570.3162.

**4-Chloro-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl)methyl]amino)pyrimidine-5-carbonitrile (55)**

To a solution of 2,4-dichloropyrimidine-5-carbonitrile **33** (5.1 g, 29 mmol) in DMF (50 mL), 2-(trifluoromethoxy)benzylamine (5.9 g, 31 mmol) in DMF (13 mL) and DIPEA (6.1 mL, 35 mmol) were added under -50 °C in dry ice-acetone bath and stirred at -50 °C. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with H<sub>2</sub>O, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with elution using CHCl<sub>3</sub> 4 times to give **55** (4.0 g, 42%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.58–4.69 (2H, m), 7.31–7.50 (4H, m), 8.75 and 8.77 (1H, each s), 9.23–9.33 (1H, br); MS (ESI) *m/z* 351, 353 [M+Na]<sup>+</sup>.

**4-[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-[(*cis*-4-Hydroxycyclohexyl)amino]adamantan-1-yl)methylamino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl)methyl]amino)pyrimidine-5-carbonitrile (58)**

To a solution of **55** (43 mg, 0.13 mmol) in DMI (0.6 mL), **56** (30 mg, 0.11 mmol) and DIPEA (75 μL, 0.43 mmol) were added and stirred at room temperature over night. The reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub> and chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) to give **58** (42 mg, 68%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.71–2.70 (24H, m), 2.90–3.19 (2H, m), 3.56–3.64 (1H, m), 4.23–4.59 (3H, m), 7.14–7.41 (5H, m), 7.90 and 8.14 (total 1H, each t, *J* = 6.3 Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 571 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 571.3003, Found: 571.3001.

**4-[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-[(*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)amino]adamantan-1-yl)methylamino]-2-([2-(trifluoromethoxy)phenyl)methyl]amino)pyrimidine-5-carbonitrile (59)**

Compound **59** was prepared from compound **55** in 53% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **58**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.69–2.69 (24H, m), 2.88–3.17 (2H, m), 3.22–3.41 (1H, m), 4.41–4.59 (3H, m), 7.13–7.43 (5H, m), 7.90 and 8.14 (total 1H, each t, *J* = 6.3 Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 571 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 571.3003, Found: 571.3001.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-{[2-(trifluoromethoxy)benzyl]amino}pyrimidine-5-carbonitrile (**42m**)**

To a solution of **41** (2.1 g, 4.7 mmol) in DMI (20 mL), 2-(trifluoromethoxy)benzylamine (1.8 g, 9.4 mmol) was added at 0 °C and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was poured into H<sub>2</sub>O, collected by vacuum filtration and chromatographed on silica gel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (8:2 to 7:3) to give a colorless solid. To a suspension of obtained product in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL), TFA (14 mL) was added at 0 °C and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. To the residue, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> was added and the precipitate was washed with H<sub>2</sub>O and *n*-hexane to give **3** (1.7 g, 76%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.01–2.02 (15H, m), 2.63 and 2.79 (total 1H, each s), 2.94 and 3.14 (total 2H, each d, *J* = 6.4Hz), 4.54 (2H, d, *J* = 6.1Hz), 7.14–7.34 (5H, m), 8.90 and 8.14 (total 1H, each t, *J* = 6.4Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 473 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 473.2271, Found: 473.2276. Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O: C, 61.01; H, 5.76; N, 17.79; F, 12.06. Found: C, 61.08; H, 5.84; N, 17.47; F, 11.84.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-{[2-(trifluoromethyl)benzyl]amino}pyrimidine-5-carbonitrile (**60**)**

Compound **60** was prepared from compound **41** in 80% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.95–2.09 (15H, m), 2.50–2.58 and 2.77–2.83 (1H, each m), 2.90 and 3.17 (2H, each d, *J* = 6.4Hz), 4.61–4.72 (2H, m), 7.14–7.76 (5H, m), 7.92–8.01 and 8.16–8.27 (total 2H, each m); MS (ESI) *m/z* 457 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 457.2322, Found: 457.2321.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-{[2-**



**(chlorophenyl)methyl]amino}pyrimidine-5-carbonitrile (61)**

Compound **61** was prepared from compound **41** in 69% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.07–2.03 (15H, m), 2.62 and 2.80 (total 1H, each br s), 2.94 and 3.16 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 4.51–4.54 (2H, m), 7.15–7.31 (4H, m), 7.42 (1H, d, *J* = 7.4Hz), 7.92 and 8.19 (total 1H, each t, *J* = 6.3Hz), 8.18 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 423 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 423.2058, Found: 423.2059.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-{{2-(methylsulfanyl)benzyl]amino}pyrimidine-5-carbonitrile (62)**

Compound **62** was prepared from compound **41** in 79% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.07–2.03 (15H, m), 2.49 (3H, s), 2.63 and 2.81 (total 1H, each brs), 2.95 and 3.15 (total 2H, each d, *J* = 6.3Hz), 4.44 (2H, d, *J* = 5.8Hz), 7.06–7.27 (5H, m), 7.84 and 8.11 (total 1H, each t, *J* = 6.0Hz), 8.16 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 435 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 435.2325, Found: 435.2324.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-({[2-(methylsulfanyl)pyridin-3-yl]methyl}amino)pyrimidine-5-carbonitrile (63)**

Compound **63** was prepared from compound **41** in 69% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.01–2.07 (15H, m), 2.54 and 2.55 (total 3H, each s), 2.58–2.82 (1H, m), 2.90–3.18 (2H, m), 4.29–4.41 (2H, m), 7.02–7.11 (1H, m), 7.14–7.41 (2H, m), 7.86–8.23 (2H, m), 8.29–8.37 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 436 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 436.2278, Found: 436.2278.

**4-({[(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl}amino)-2-({[2-(methoxy)pyridin-3-yl]methyl}amino)pyrimidine-5-carbonitrile (64)**

Compound **64** was prepared from compound **41** in 80% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.02–2.05 (15H, m), 2.61–2.82 (1H, m), 2.90–3.17 (2H, m), 3.89 and 3.92 (total 3H, each s), 4.34–4.41 (2H, m), 6.87–6.95 (1H, m), 7.10–7.31 (1H, m), 7.36–7.43 (1H, m), 7.78–8.09 (2H, m), 8.16 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 420 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 420.2506, Found: 420.2507.

**4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-([2-(ethylsulfanyl)pyridin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (65)**

Compound **65** was prepared from compound **41** in 70% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.06–2.02 (15H, m), 1.32 (3H, t, *J* = 8.0 Hz), 2.61–2.79 (1H, m), 2.93–3.17 (2H, m), 3.22 (2H, q, *J* = 8.0 Hz), 4.31–4.34 (2H, m), 7.04–7.35 (3H, m), 7.87–8.17 (2H, m), 8.29–8.33 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 450 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 450.2434, Found: 450.2434.

**4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-([2-(isopropylsulfanyl)pyridin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (66)**

Compound **66** was prepared from compound **41** in 71% yield, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.07–2.02 (21H, m), 2.62–2.80 (1H, m), 2.94–3.16 (2H, m), 4.07–4.14 (1H, m), 4.29–4.33 (2H, m), 7.03–7.39 (3H, m), 7.82–8.11 (1H, m), 8.17 (1H, s), 8.30–8.33 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 464 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-([2-(isopropoxy)pyridin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (67)**

Compound **67** was prepared from compound **41** in 80% yield, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.06–2.03 (21H, m), 2.61–2.79 (1H, m), 2.94–3.15 (2H, m), 4.34–4.38 (2H, m), 5.26–5.34 (1H, m), 6.83–8.01 (5H, m), 8.17 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 448 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-([(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl]methyl)amino)-2-([2-(methoxy)pyridazin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (68)**

Compound **68** was prepared from compound **41** in 72% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **42m**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.95–2.08 (13H, m), 2.58–3.19 (3H, m), 3.22–3.40 (2H, m), 4.03–4.16 (3H, m), 4.32–4.48 (2H, m), 7.16–7.27 (1H, m), 7.28–8.23 (3H, m), 8.71–8.84 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 421 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>8</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 421.2459, Found: 421.2460.

**4-(((1*S*,3*R*,4*S*,5*S*,7*S*)-4-(((*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl)amino)adamantan-1-yl)methyl)amino)-2-((2-(trifluoromethoxy)phenyl)methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (69)**

Under ice-cooling, to a solution of (1*S*,4*S*)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)cyclohexanecarbaldehyde (28 mg, 0.12 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 mL), **42m** (50 mg, 0.11 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (67 mg, 0.32 mmol) were added and then stirred at room temperature for 2 h. To the reaction mixture, aldehyde (10 mg, 0.04 mmol) was added and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was basified with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (*n*-hexane- CHCl<sub>3</sub>) (2:8) to give a white solid (41 mg). To the obtained product (38 mg, 0.05 mmol) in MeOH (0.7 mL), 1N aqueous HCl (10 mL) was added under ice-cooling and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo and diluted with CHCl<sub>3</sub>, basified with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The mixture was extracted with 10% MeOH/CHCl<sub>3</sub>, the organic layer was washed with H<sub>2</sub>O, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (97:3 to 90:10) to give **69** (29 mg, 49% from **42m**) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.78–2.62 (26H, m), 2.89–3.18 (2H, m), 3.25–3.37 (1H, m), 4.41–4.45 (1H, m), 4.50–4.58 (2H, m), 7.10–7.40 (5H, m), 7.85–8.21 (2H, m); MS (ESI) *m/z* 585 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 585.3159, Found: 585.3153.

**4-(((1*S*,3*R*,4*S*,5*S*,7*S*)-4-(((*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl)amino)adamantan-1-yl)methyl)amino)-2-((2-(trifluoromethyl)phenyl)methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (70)**

Compound **70** was prepared from compound **60** in 70% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.79–2.58 (26H, m), 2.86–3.19 (2H, m), 3.26–3.38 (1H, m), 4.43–4.48 (1H, m), 4.62–4.71 (2H, m), 7.18–7.73 (5H, m), 7.93–8.01 and 8.16–8.27 (total 2H, each m); MS (ESI) *m/z* 569 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 569.3210, Found: 569.3200.

**4-({(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-{{(*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl}amino}adamantan-1-yl)methyl}amino)-2-{{2-(chlorophenyl)methyl}amino}pyrimidine-5-carbonitrile (71)**

Compound **71** was prepared from compound **61** in 74% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.79–2.03 (23H, m), 2.20–2.61 (3H, m), 2.89–3.19 (2H, m), 3.26–3.37 (1H, m), 4.40–4.45 (1H, m), 4.48–4.56 (2H, m), 7.12–7.45 (5H, m), 7.87–8.22 (2H, m); MS (ESI) *m/z* 535, 537 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>ClN<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 535.2947, Found: 535.2946.

**4-({(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-{{(*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl}amino}adamantan-1-yl)methyl}amino)-2-({2-(methylsulfanyl)phenyl)methyl}amino)pyrimidine-5-carbonitrile (72)**

Compound **72** was prepared from compound **62** in 58% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.79–2.03 (23H, m), 2.21–2.62 (6H, m), 2.90–3.19 (2H, m), 3.24–3.39 (1H, m), 4.38–4.50 (3H, m), 7.04–7.31 (5H, m), 7.78–8.22 (2H, m); MS (ESI) *m/z* 547 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>31</sub>H<sub>43</sub>N<sub>6</sub>OS [M+H]<sup>+</sup>: 547.3214, Found: 547.3217.

**4-({(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-{{(*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl}amino}adamantan-1-yl)methyl}amino)-2-({2-(methylsulfanyl)pyridin-3-yl)methyl}amino)pyrimidine-5-carbonitrile (73)**

Compound **73** was prepared from compound **63** in 82% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. Mp 229 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.79–2.04 (23H, m), 2.21–2.62 (6H, m), 2.88–3.18 (2H, m), 3.24–3.38 (1H, m), 4.30–4.40 (2H, m), 4.41–4.45 (1H, m), 7.03–7.12 (1H, m), 7.13–7.41 (2H, m), 7.84–8.21 (2H, m), 8.26–8.37 (1H, m); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.11, 27.11, 29.27, 29.41, 29.94, 30.07, 30.21, 31.28, 34.16, 34.30, 34.43, 35.15, 35.29, 37.20, 37.31, 49.97, 52.92, 60.70, 69.32, 78.75, 117.25, 118.94, 132.12, 132.16, 146.85, 155.39, 155.53, 161.60, 161.66, 161.81; MS (ESI) *m/z* 548 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>OS [M+H]<sup>+</sup>: 548.3166, Found: 548.3166; IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 2203, 3524; Anal. Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>OS: C, 65.78; H, 7.54; N, 17.90; S, 5.85. Found: C, 65.74; H, 7.57; N, 17.89; S, 5.94.

**4-({(1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-{{(*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl}amino}adamantan-1-yl)methyl}amino)-2-({2-(methoxy)pyridin-3-yl)methyl}amino)pyrimidine-5-carbonitrile (74)**

Compound **74** was prepared from compound **64** in 90% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.79–2.03 (23H, m), 2.22–2.61 (3H, m), 2.88–3.19 (2H, m), 3.25–3.38 (1H, m), 3.89 and 3.92 (total 3H, each s), 4.33–4.46 (3H, m), 6.86–6.96 (1H, m), 7.08–7.34 (1H, m), 7.34–7.44 (1H, m), 7.75–8.09 (2H, m), 8.16 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 532 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 532.3395, Found: 532.3394.

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-((*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl)amino)adamantan-1-yl)methyl)amino)-2-([2-(ethylsulfanyl)pyridin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (75)**

Compound **75** was prepared from compound **65** in 37% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.81–2.31 (27H, m), 1.32 (3H, t, *J* = 8.0 Hz), 2.93–3.17 (2H, m), 3.22 (2H, q, *J* = 8.0 Hz), 4.31–4.36 (2H, m), 4.43 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 7.03–7.38 (3H, m), 7.85–8.17 (2H, m), 8.26–8.33 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 562 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>OS [M+H]<sup>+</sup>: 562.3323, Found: 562.3318.

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-((*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl)amino)adamantan-1-yl)methyl)amino)-2-([2-(*iso*-propylsulfanyl)pyridin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (76)**

Compound **76** was prepared from compound **66** in 89% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.82–2.32 (33H, m), 2.94–3.17 (2H, m), 4.08–4.15 (1H, m), 4.29–4.33 (2H, m), 4.42–4.43 (1H, m), 7.03–7.08 (1H, m), 7.16–7.39 (2H, m), 7.84–8.17 (1H, m), 8.17 (1H, s), 8.27–8.33 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 576 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>7</sub>OS [M+H]<sup>+</sup>: 576.3479, Found: 576.3477.

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-((*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl)amino)adamantan-1-yl)methyl)amino)-2-([2-(*iso*-propyloxy)pyridin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (77)**

Compound **77** was prepared from compound **67** in 100% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.82–2.67 (33H, m), 2.95–3.18 (2H, m), 4.32–4.42 (3H, m), 5.28–5.34 (1H, m), 6.83–7.40 (3H, m), 7.65–8.00 (2H, m), 8.16 (1H, s); MS (ESI)

$m/z$  560  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{32}H_{46}N_7O_2$   $[M+H]^+$ : 560.3708, Found: 560.3707.

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-((*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl)amino)adamantan-1-yl)methyl)amino)-2-([2-(methoxy)pyridazin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (78)**

Compound **78** was prepared from compound **68** in 59% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.76–1.66 (16H, m), 1.76–1.91 (6H, m), 1.94–2.36 (3H, m), 2.80–3.20 (2H, m), 3.25–3.30 (2H, m), 4.05–4.13 (3H, m), 4.34–4.46 (3H, m), 7.16–7.26 (1H, m), 7.29–8.32 (3H, m), 8.71–8.80 (1H, m); MS (ESI)  $m/z$  533  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $C_{29}H_{41}N_8O_2$   $[M+H]^+$ : 533.3347, Found: 533.3341.

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-*tert*-Butoxycarbonylaminoadamantan-1-yl)methyl)amino)-2-([2-(methylsulfanyl)pyridin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (79)**

To a solution of **41** (700 mg, 1.6 mmol) in DMF (7 mL), [2-(methylsulfanyl)pyridin-3-yl]methanamine (360 mg, 2.4 mmol) and DIPEA (410  $\mu$ L, 2.4 mmol) were added at 0 °C and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc/H<sub>2</sub>O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (98:2 to 90:10) to give **79** (730 mg, 86%) as a pale yellow solid.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.02–1.98 (22H, m), 2.54 and 2.55 (total 3H, each s), 2.90–3.19 (2H, m), 3.28–3.51 (1H, m), 4.31–4.41 (2H, m), 6.63–6.84 (1H, m), 7.03–7.13 (1H, m), 7.20–7.41 (2H, m), 7.87–7.93 and 8.14–8.24 (total 2H, each m), 8.29–8.38 (1H, m); MS (ESI)  $m/z$  558  $[M+Na]^+$ .

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl)methyl)amino)-2-([2-(methanesulfinyl)pyridin-3-yl]methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (80)**

To a solution of **79** (100mg, 0.19 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL), 75% *m*-CPBA (47 mg, 0.21 mmol) was added at 0 °C and stirred at 0 °C for 2 h. To the reaction mixture, 75% *m*-CPBA (4.3 mg, 0.019 mmol) was added at 0 °C and stirred at room temperature for 2 h. To the reaction mixture, aqueous NaHCO<sub>3</sub> was added and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with aqueous NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel

with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (98:2 to 89:11) to give a colorless solid (120 mg). To a suspension of the obtained product (110 mg, 0.2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.7 mL), TFA (1.5 mL, 20 mmol) was added at 0 °C and stirred at room temperature for 0.5 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) (10:1) to give **80** (073 mg, 95% from **79**) as a colorless solid. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.03–2.06 (15H, m), 2.59–2.81 (1H, m), 2.84 and 2.85 (total 3H, each s), 2.89–3.19 (2H, m), 4.69–4.92 (2H, m), 7.16–7.36 (1H, m), 7.49–7.56 (1H, m), 7.72–7.85 (1H, m), 7.90–8.22 (2H, m), 8.55–8.64 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 452 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>OS [M+H]<sup>+</sup>: 452.2227, Found: 452.2232.

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-Aminoadamantan-1-yl)methyl)amino)-2-((2-(methanesulfonyl)pyridin-3-yl)methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (**81**)**

Compound **81** was prepared from compound **79** in 73% yield as a pale yellow solid, using similar approach to that described for **80**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.96–2.07 (15H, m), 2.52–2.83 (1H, m), 2.88–3.20 (2H, m), 3.43 (3H, s), 4.87–4.96 (2H, m), 7.19–7.37 (1H, m), 7.62–7.70 (1H, m), 7.76–7.85 (1H, m), 7.88–8.24 (2H, m), 8.50–8.59 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 468 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 468.2176, Found: 468.2179.

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-((*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl)amino}adamantan-1-yl)methyl)amino)-2-((2-(methanesulfinyl)pyridin-3-yl)methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (**82**)**

Compound **82** was prepared from compound **80** in 79% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.80–2.58 (26H, m), 2.84 and 2.86 (total 3H, each s), 2.88–3.17 (2H, m), 3.25–3.38 (1H, m), 4.42–4.45 (1H, m), 4.69–4.93 (2H, m), 7.16–7.37 (1H, m), 7.48–7.57 (1H, m), 7.71–7.86 (1H, m), 7.89–8.23 (2H, m), 8.52–8.64 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 564 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 564.3115, Found: 564.3116.

**4-(((1*s*,3*R*,4*s*,5*S*,7*s*)-4-((*trans*-4-Hydroxycyclohexyl)methyl)amino}adamantan-1-yl)methyl)amino)-2-((2-(methanesulfonyl)pyridin-3-yl)methyl)amino)pyrimidine-5-carbonitrile (**83**)**

Compound **83** was prepared from compound **81** in 63% yield as a colorless solid, using similar

approach to that described for **69**. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.78–2.55 (26H, m), 2.88–3.20 (2H, m), 3.25–3.37 (1H, m), 3.43 (3H, s), 4.41–4.47 (1H, m), 4.86–4.97 (2H, m), 7.19–7.39 (1H, m), 7.61–7.71 (1H, m), 7.75–7.86 (1H, m), 7.86–8.18 (1H, m), 8.18 and 8.21 (total 1H, each s), 8.45–8.60 (1H, m); MS (ESI) *m/z* 580 [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 580.3064, Found: 580.3061.

#### **Benzyl {(1s,3R,4s,5S,7s)-4-aminoadamantan-1-yl}methyl}carbamate (**84**)**

To solution of **40** (500 mg, 1.8 mmol) and NEt<sub>3</sub> (0.3 mL, 2.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), Z-Cl 0.28 mL, 2.0 mmol) was added at 0°C and stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc, washed with 0.1N aqueous HCl, H<sub>2</sub>O, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine. The separated organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (3:1) to give a white solid (739 mg). To a solution of the residue in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.9 mL), TFA (5.9 mL, 76 mmol) was added at 0 °C and stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was concentrated, then diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and basified with aqueous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give **84** (560 mg, 100%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.19–1.29 (2H, m), 1.33–1.51 (6H, m), 1.60–1.68 (2H, m), 1.74–1.82 (1H, m), 1.93–2.04 (2H, m), 2.28 (2H, br), 2.70 (2H, d, *J* = 6.4Hz), 2.77–2.83 (1H, m), 5.01 (2H, s), 7.18 (1H, t, *J* = 6.4Hz), 7.27–7.41 (5H, m); MS (ESI) *m/z* 315 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **Benzyl** **{(1s,3R,4s,5S,7s)-4-[(*cis*-4-{{*tert*-butyl(dimethyl)silyl}oxy}cyclohexyl)amino]adamantan-1-yl}methyl}carbamate (**85**) and Benzyl** **{(1s,3R,4s,5S,7s)-4-[(*trans*-4-{{*tert*-butyl(dimethyl)silyl}oxy}cyclohexyl)amino]adamantan-1-yl}methyl}carbamate (**86**)**

To a solution of **84** (760 mg, 2.4 mmol) and 4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclohexanone (1.1 g, 4.8 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (23 mL), sodium triacetoxymethylborohydride (1.0 g, 4.8 mmol) was added and then stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was extracted with EtOAc and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on amino silica gel with elution using (*n*-hexane-EtOAc) (10:1 to 1:1) to give **85** (670 mg, 53%, less polar) as a colorless oil and **86** (440 mg,



34%, high polar) as a colorless oil. **85**  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.02 (6H, s), 0.87 (9H, s), 1.08–1.29 (3H, m), 1.33–1.64 (14H, m), 1.70–1.82 (3H, m), 1.91–2.00 (2H, m), 2.42–2.54 (1H, m), 2.62–2.69 (1H, m), 2.70 (2H, d,  $J = 6.3$  Hz), 3.79–3.86 (1H, m), 5.00 (2H, s), 7.18 (1H, t,  $J = 6.3$  Hz), 7.27–7.41 (5H, m); MS (ESI)  $m/z$  527  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . **86**  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.02 (6H, s), 0.85 (9H, s), 0.92–1.29 (7H, m), 1.32–1.48 (6H, m), 1.68–1.85 (7H, m), 1.89–1.98 (2H, m), 2.31–2.44 (1H, m), 2.61–2.67 (1H, m), 2.70 (2H, d,  $J = 6.3$  Hz), 3.50–3.61 (1H, m), 5.00 (2H, s), 7.18 (1H, t,  $J = 6.3$  Hz), 7.27–7.41 (5H, m); MS (ESI)  $m/z$  527  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### ***cis*-4-{\[(1R,2s,3S,5s,7s)-5-(Aminomethyl)adamantan-2-yl]amino}cyclohexan-1-ol (56)**

To a solution of **85** (640 mg, 1.2 mmol) in THF (13 mL), TBAF (1 M THF solution) (3.7 mL, 3.7 mmol) was added and stirred at 70 °C for 13 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was extracted with  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{brine}$ . The organic layer was washed with brine 4 times, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with elution using ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH-28% aqueous  $\text{NH}_3$ ) (20:1:0 to 8:1:0.1) to give a colorless solid (450 mg). To the obtained product (430 mg) in MeOH (13 ml), 10% Pd on carbon (85 mg, 50% wet) was added and stirred at 35 °C under  $\text{H}_2$  for 2.5 h. The reaction mixture was diluted with MeOH and filtered through a Celite® pad. The filtrate was concentrated in vacuo to give **56** (310 mg, 95% from **85**) as a colorless solid.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.25–3.39 (28H, m), 3.75–3.83 (1H, m), 4.47 (1H, br s); MS (ESI)  $m/z$  279  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### ***trans*-4-{\[(1R,2s,3S,5s,7s)-5-(Aminomethyl)adamantan-2-yl]amino}cyclohexan-1-ol (57)**

Compound **57** was prepared from compound **86** in 113% yield as a colorless solid, using similar approach to that described for **57**.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.08–3.28 (28H, m), 4.07–4.15 (1H, m), 4.46–4.72 (1H, m); MS (ESI)  $m/z$  279  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### **Computational analysis**

#### **Docking simulation**

A template coordinate for the docking simulation was prepared from that of PKC $\theta$  complexed with staurosporine (PDB ID: 1XJD) using Protein Preparation Wizard implemented in Maestro 11 (Schrödinger, LLC; New York, NY, USA). Docking simulation was carried out by Glide XP in

Maestro11 with a hydrogen-bond constraint to Leu461 backbone NH atom.

### **PKC $\theta$ inhibitory activity (enzyme assay)**

The reaction mixture contained STK Substrate 1-biotin, full-length human PKC $\theta$  and ATP. Our compound was dissolved in dimethyl sulfoxide and added to the reaction mixture. The reaction mixture was incubated at room temperature for 60 min, followed by incubation with Sa-XL665 and STK Antibody Cryptate for 60 min. The enzyme reaction rate was measured in fluorescence intensity at 620 nm (Cryptate) and 665 nm (XL665). The activity is expressed as “PKC $\theta$  IC<sub>50</sub> (nM)” in Tables.

### **IL-2 inhibitory activity (cellular assay)**

Jurkat cells transiently transfected with the pGL3-IL2 pro 43 plasmid were incubated for 14 h with test compounds in medium containing anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, followed by the addition of substrate solution to measure the firefly luciferase activity.

### **PKC isozyme assays**

Recombinant PKC isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$  and  $\zeta$ ) were purchased from Carna Biosciences Inc. The inhibitory effects of test compounds against all PKC isoforms were measured using the HTRF KinEASE STK S1 kit (Cisbio Bioassays) according to the protocol in the kit.

### **Other kinases assay**

Jak kinases inhibitory activities were measured using a Carna Biosciences Assay kit according to the manufacturer’s instructions. PI3Ks and Syk kinases inhibitory activities were measured using a HTRF Assay kit according to the manufacturer’s instructions.

### **Aqueous solubility**

Small volumes of DMSO solutions of the test compounds were diluted to 130  $\mu$ L by adding the aqueous buffer solution of pH 6.8. After incubation at 25 °C for 20 h, precipitates were separated by filtration. The solubility was determined by HPLC analysis of each filtrates.

### **Rat cardiac transplantation model**

ACI rats were used as cardiac donors and Lewis rats as cardiac recipients. All procedures were conducted under aseptic conditions. Rats were intraperitoneally anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg). Abdominal vascularized heterotopic cardiac transplantation was conducted in accordance with a previously reported method. Compound was dissolved in propylene glycol. Compound was orally administered in combination with tacrolimus. Beginning on the operation day, all test compounds were administered for 14 consecutive days. Cardiac allograft function was assessed by daily palpation for 28 days, and graft rejection was defined as the cessation of palpable cardiac graft beats. All animal experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Astellas Pharma Inc. Further, the Astellas Pharma Inc. Tsukuba Research Center was awarded Accreditation Status by the AAALAC International. All efforts were made to minimize the number of animals used and to avoid suffering and distress.

### **Assessment of inhibition potency of CYP3A4 using human liver microsomes**

The test compounds (5  $\mu$ M) were added to human liver microsomes (HLMs) (0.1 mg/mL) in potassium sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) containing NADPH (1 mM) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 0.1 mM). For reversible inhibition study, midazolam was added to the reaction mixture without pre-incubation. For time-dependent inhibition study, midazolam was added to the mixture after pre-incubation for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped by addition of acetonitrile after incubation for 20 min at 37 °C. The metabolite of midazolam (1'-hydroxymidazolam) was analyzed by LC/MS/MS and the metabolic activity was determined. The residual metabolic activity of HLMs for midazolam in the time-dependent inhibition study was expressed as the percentage of that in the reversible inhibition study.

### **Transcellular transport study in LLC-PK1-MDR1 cells**

Wild type or MDR1-expressing LLC-PK1 cells (LLC-PK1-WT or LLC-PK1-MDR1, respectively) cultured for 5 days on a BD Falcon 96-Multiwell 1.0  $\mu$ m Insert System were pre-incubated with transport buffer (HBSS, pH7.4, for the apical and basolateral sides) for 1h. After aspiration of the transport buffer, the donor solution (transport buffer (0.5% DMSO) containing the test compound (1  $\mu$ M) and Texas Red (1  $\mu$ M)) was added to the apical or basolateral side for the

influx or efflux transport study, respectively, and the receiver solution (transport buffer (0.5% DMSO)) was added to the opposite side. After incubation for 3h, the test compound in both sides was analyzed by LC/MS/MS and the apparent permeability was determined. Efflux ratio (ER) was calculated by dividing the apparent permeability in the direction from the basolateral to the apical side by that in the opposite direction. Net efflux ratio (NER) was the ratio of ER of LLC-PK1-MDR1 to LLC-PK1-WT. Texas Red was used for the estimation of the apparent permeability via paracellular transport.

### **Pharmacokinetic study**

The pharmacokinetic characterization of compound was conducted in female SD rats. Compound was intravenously administered at 1 mg/kg in a mixture of DMF/propylene glycol/1N HCl/ saline (25/25/0.2/49.8) solution, and orally administered at 1 mg/kg in a mixture of DMF/propylene glycol/1N HCl/ saline (25/25/0.2/49.8) solution. Blood samples were taken at multiple time points up to 24 h after a single administration of the compound. Concentrations of unchanged compound in plasma were determined using LC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters after i.v. and p.o. administration were calculated by noncompartmental analysis using Phoenix WinNonlin version 6.3 software (Pharsight Co., St. Louis, MO, USA).

## 参考文献

- 1) 矢田純一 改訂 13 版 医系免疫学 中外医学社
- 2) 小安 重夫 改訂第 2 版 免疫学最新イラストレイテッド 羊土社
- 3) 藤原 大美 新移植免疫学 中外医学社
- 4) Taylor A. L., Watson C. J. E., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **56**, 23–46 (2005).
- 5) Ho S., Clipstone N., Timmermann L., Northrop J., Graef I., Fiorentino D., Nourse J., Crabtree G., *Clin Immunol Immunopathol.*, **80**, S40–S45 (1996).
- 6) Mele T. S., Halloran P.F., *Immunopharmacology*, **47**, 215–245 (2000).
- 7) 日本移植学会広報委員会編 臓器移植ファクトブック 2016
- 8) Liptak, P., Ivanyi, B., *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, **2**, 398–404 (2006).
- 9) (a) Naesens, M.; Kuypers, D. R. J.; Sarwal, M. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 481; (b) Gummert, J. F.; Ikonen, T.; Morris, R. E. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, *10*, 1366.
- 10) Dumont F.J., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **11**, 377–404 (2001).
- 11) 日高弘義 実験医学 1997, vol.15.
- 12) Martin S.; Doreen C., *Nature Immunol.*, **5**, 785–790, (2004)
- 13) Spitaler, M.; Cantrell, A. D. *Nature Immunol.*, **2004**, *5*, 785–790.
- 14) Isakov, N.; Altman, A. *Annu. Rev. Immunol.*, **2002**, *20*, 761–794.
- 15) Meller, N.; Elitzur, Y and Noah Isakov, *Cellular Immunology*. **1999**, *193*, 185–193.
- 16) (a) Wagner, J.; Matt, P. V.; Faller, B.; Cooke, N. G.; Albert, R.; Sedrani, R.; Wiegand, H.; Jean, C.; Beerli, C.; Weckbecker, G.; Evenou, J. P.; Zenke, G.; Cottens, S. *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 6028–6039. (b) Weckbecker, G.; Pally, C.; Beerli, C.; Burkhart, C.; Wieczorek, G.; Metzler, B.; Morris, R. E.; Wagner, J.; Bruns, C. *Transpl. Int.*, **2010**, *23*, 543–552. (c) Matz, M.; Naik, M.; Mashreghi, M. F.; Glander, P.; Neumayer, H. H.; Budde, K. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2011**, *7*, 103–113.
- 17) (a) Niu, C.; Boschelli, D. H.; Tumei, L. N.; Bhagirath, N.; Subrath, J.; Shim, J.; Wang, Y.; Wu, B.; Eid, C.; Lee, J.; Yang, X.; Brennan, A.; Chaudhary, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5829–5832. (b) Jimenez, J.-M.; Boyall, D.; Brenchley, G.; Collier, P. N.; Davis, C. J.; Fraysse, D.; Keily, S. B.; Henderson, J.; Miller, A.; Pierard, F.; Settimo, L.; Twin, H. C.; Bolton, C. M.; Curnock, A. P.; Chiu, P.; Tanner, A. J.; Young, S. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1799–1810. (c) Katoh

- T, Takai T, Yukawa T, Tsukamoto T, Watanabe E, Mototani H, Arita T, Hayashi H, Nakagawa H., *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**, 2466-2475.
- 18) Sawa M., *Mini Rev. Med. Chem.*, **8**, 1291–1297 (2008).
- 19) Singh, R.; Li, Hui.; Zhao, Haoran.; Payan, D. G.; Kolluri, R.; Tso, Kin.; Ramphal, J.; Gu, S. *WO* 2,009,012,421.
- 20) Shiraga, T.; Matsuda, H.; Nagase, K.; Iwasaki, K.; Noda, K.; Yamazaki, H.; Shimada, T.; Funae, Y. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 727.
- 21) (a) Huang, K.; Hu, J.; Li, X.; Li, Y., *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2012**, *27*, 486–494. (b) Zakeri-Milani, P.; Valizadeh, H., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2014**, *10*, 859–871. (c) Woltering, T. J.; Wostl, W.; Hilpert, H.; Rogers-Evans, M.; Pinard, E.; Mayweg, A.; Göbel, M.; Banner, D. W.; Benz, J.; Travagli, M.; Pollastrini, M.; Marconi, G.; Gabellieri, E.; Guba, W.; Mauser, H.; Andreini, M.; Jacobsen, H.; Power, E.; Narquizian, R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 4239–4243.
- 22) Eyal S, Hsiao P, Unadkat J, D., *Pharmacology & Therapeutics*, 2009, **123**, 80-104.
- 23) Bellamy, F. D.; Ou, K. *Tett. Lett.*, **1984**, *25*, 839–842
- 24) (a) Ramesh, M.; Bharatam, P. V. *J. Mol. Model.*, **2012**, *18*, 709–720. (b) Riley, R. J.; Grime, K.; Weaver, R. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2007**, *3*, 51–66.
- 25) (a) Kumar, S.; Sharma, R.; Roychowdhury A. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3605. (b) Bourdonnec, B.; Leister, L. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 3093. (c) de Groot, M. J.; Wakenhut, F.; Whitlock, G.; Hyland, R. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 964.
- 26) ACDlogP, pKa and TPSA values were calculated with ACD/PhysChem Batch (version 12.01).
- 27) Probst, G. D.; Bowers, S.; Sealy, J. M.; Stupi, B.; Dressen, D.; Jagodzinska, B. M.; Aquino, J.; Gailunas, A.; Truong, A. P.; Tso, L.; Xu, Y.-Z.; Hom, R. K.; John, V.; Tung, J. S.; Pleiss, M. A.; Tucker, J. A.; Konradi, A. W.; Sham, H. L.; Jagodzinski, J.; Toth, G.; Brecht, E.; Yao, N.; Pan, H.; Lin, M.; Artis, D. R.; Ruslim, L.; Bova, M. P.; Sinha, S.; Yednock, T. A.; Gauby, S.; Zmolek, W.; Quinn, K. P.; Sauer, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 6034–6039.
- 28) Roberts, L. R.; Bryans, J.; Conlon, K.; McMurray, G.; Stobie, A.; Whitlock, G. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 6437–6440.
- 29) (a) Chand, S.; Mehta, N.; Singh Bahia, M.; Dixit, A.; Silakari, O. *Curr. Pharm. Des.*, **2012**, *18*, 4725–4746. (b) Silakari, O.; Chand, S.; Bahia, M. S. *Mol. Inf.*, **2012**, *31*, 659–668.

- 30) (a) Eastwood, P.; Gonzalez, J.; Paredes, S.; Nueda, A.; Domenech, T.; Alberti, J.; Vidal, B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1697–1700. (b) Dong, L. B.; Rudolf, J. D.; Lin, L.; Ruiz, C.; Cameron, M. D.; Shen, B., *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1990–1996. (c) Wu, C.; Chan, M. F.; Stavros, F.; Raju, B.; Okun, I.; Mong, S.; Keller, K. M.; Brock, T.; Kogan, T. P.; Dixon, R. A. F. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1690-1697.
- 31) Duncton, M. A. *J. Med. Chem. Commn.*, **2011**, *2*, 1135–1161.
- 32) Atomic charges were calculated at AM1 mode using MOE (Molecular Operating Environment, 2016.0802).
- 33) Russ, R. G.; Tedesco-Silva, H.; Kuypers, R. D.; Cohney, S.; Langer, M. R.; Witzke, O.; Eris, J.; Sommerer, C.; Zur-Muhlen, B.; Woodle, E. S.; Gill, J.; Ng, J.; Klupp, J.; Chodoff, L. and Budde, K. *Am. J. Transplant.* **2013**, *13*, 1746–1756.
- 34) (a) S.; Parkkari, T.; Savinainen, J. R.; Arena, C.; Saccomanni, G.; Saguto, S.; Ligresti, A.; Allara, M.; Bruno, A.; Marinelli, L.; Di Marzo, V.; Novellino, E.; Manera, C.; Macchia, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 526–536. (b) Lomos., J. S. *Magn. Reson. Chem.* **2014**, *52*, 87–97. (c) Hwang, S. H.; Tsai, H. J.; Liu, J. Y.; Morisseau, C.; Hammock, B. D. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3825–3840.
- 35) Fukahori, H.; Chida, N.; Maeda, M.; Tasaki, M.; Kawashima, T.; Noto, T.; Tsujimoto, S.; Nakamura, K.; Oshima, S.; Hirose, J.; Higashi, Y.; Morokata, T. *Int Immunopharmacol* **2015**, *27*, 232–237.

## 謝辞

本論文を提出するにあたり、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました、九州大学大学院薬学研究院教授 大嶋 孝志 博士に深く感謝の意を表します。

また、本論文に関して審査および御指導と御助言を賜りました九州大学大学院薬学研究院教授 佐々木 茂貴 博士、同研究院教授 平井 剛 博士、ならびに同研究院講師 森本 浩之 博士に心より御礼申し上げます。

本研究はアステラス製薬株式会社研究本部モダリティ研究所で行われたものであり、前モダリティ研究所所長 平野 祐明 博士(現 経営企画部部长 執行役員)及び現モダリティ研究所所長 増田 典之 博士の御指導に深謝いたします。

本研究の論文発表にあたり、貴重な御指導、御助言をいただきました、モダリティ研究所機能分子研究室室長 四月朔日 晋 博士及び同研究所バイオロジクス研究室室長 守屋 隆一 博士に心より感謝いたします。

本研究を行う機会を与えていただき、御指導、御鞭撻をいただきましたアステラスリサーチテクノロジー株式会社企画総務部部长 大久保 充 博士、アステラス病態代謝研究会事務局長 阿部 義人 博士に深く感謝いたします。

本研究の実施および遂行において、終始ご協力いただきました田中 明 博士、高砂 裕二 氏、永嶋 信也 博士、向吉 耕一郎 氏、富永 博章 博士、白井 文幸 博士、前田 純 氏、今泉 智禎 氏、朝井 範夫 氏・井谷 弘道 氏に心より感謝いたします。

また、化合物の薬理評価、体内動態評価を行っていただきました、千田 昇 博士、田崎 調 氏、川島 朋子 博士、鈴木 恵子 博士、笹川 由香 氏、深堀 英彦 博士、松岡 秀明 博士、前田 雅志 博士、入江 めぐみ 博士、木村 麻友子 氏に深く感謝いたします。

ドッキング解析を行っていただいた、大野 一樹 博士・新実 達也 博士・森友 紋子 博士に感謝申し上げます。

各種データを測定していただいた、アステラス製薬株式会社ならびにアステラスリサーチテクノロジー株式会社の方々心より感謝いたします。

最後に、私の研究生活を激励し、常に支えてくれた家族に深く感謝いたします。

2019年2月 國川 茂輝