

スピロピペリジノジケトピペラジン骨格を有する
CCR5 阻害剤の開発研究

西澤 玲奈

2011 年 10 月

Abbreviations

Ac	: acetyl
Alloc	: allyloxycarbonyl
Ar	: aryl
Bn	: benzyl
Boc	: tert-butoxycarbonyl
Bu	: butyl
<i>c</i>	: cyclo
calc.	: calculated
DIBAL	: diisobutylaluminium hydride
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	: dimethyl sulfoxide
EDC	: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)
Et	: ethyl
FAB	: fast atom bombardment
Hept	: heptyl
Hex	: hexyl
HOBt	: 1-hydroxybenzotriazole
<i>i</i>	: iso
IR	: infrared
Me	: methyl
mp	: melting point
MS	: molecular sieves
Ms	: methanesulfonyl
<i>n</i>	: normal
NaH	: sodium hydride
NMR	: nuclear magnetic resonance
<i>p</i>	: para
Pent	: pentyl
Ph	: phenyl
Py	: pyridine
Pr	: propyl
quant.	: quantitative yield
<i>t</i>	: tertiary
TBAF	: tetrabutylammonium fluoride

Tf	: trifluoromethanesulfonyl
TFA	: trifluoroacetic acid
THF	: tetrahydrofuran
THP	: tetrahydropyranyl
TBS	: <i>t</i> -butyldimethylsilyl
TMS	: trimethylsilyl

目次

第 1 章 緒言	1
1-1. ケモカインとケモカイン受容体	
1-2. AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome; 後天性免疫不全症候群) とその治療	
1-3. HIV と CCR5	
1-4. 参考文献	
第 2 章 活性代謝物の情報を用いたリード化合物の構造変換	9
2-1. 序論	
2-2. 代謝物の情報を活用したリード化合物の構造変換	
2-3. 合成	
2-4. 小括	
2-5. 実験の部	
2-6. 参考文献	
2-7. 本章に関連する投稿論文	
第 3 章 酸性官能基導入による経口吸収性の改善	29
3-1. 序論	
3-2. 経口吸収性の改善を目的とした構造変換と考察	
3-3. 合成	
3-4. 小括	
3-5. 実験の部	
3-6. 参考文献	
3-7. 本章に関連する投稿論文	
第 4 章 最適化による経口 CCR5 阻害剤の創出	63
4-1. 序論	
4-2. 化合物の最適化	
4-3. 経口吸収性	
4-4. 抗 HIV 活性	
4-5. 有望化合物 85a のプロファイル	
4-6. 合成	
4-7. 小括	
4-8. 実験の部	
4-9. 参考文献	

4-10. 本章に関連する投稿論文

第5章 まとめと構造化学的考察

97

5-1. まとめ

5-2. 構造化学的考察

5-3. 参考文献

謝辞

第 1 章

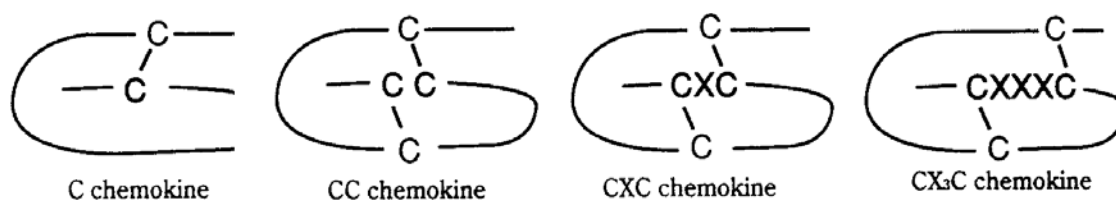
緒言

1-1. ケモカインとケモカイン受容体

生体に炎症がおこった時、炎症が起った場所にはリンパ球、単球、好酸球といった白血球が血流に乗って移動、集積（走化・遊走）し、集まってきた白血球が炎症の原因となった細菌・ウイルスなどの異物や腫瘍細胞、役目を終えた細胞などの排除を行い、炎症を鎮める役割を担う。これが免疫生体防御反応であり、この免疫反応により、動物は外界からの様々な攻撃に対抗している。

ケモカインとは、特定の白血球が炎症部位に移動する走化(または遊走)作用に関与する塩基性低分子タンパク質群である。1987年にNCI (National Cancer Institute) の吉村、松島らによりLPS刺激ヒト末梢血単球培養上清から好中球の走化能を亢進させる因子としてIL-8 (Interleukin-8) が同定されて以来¹、ケモカインはアレルギー性反応、自己免疫性炎症等との深い関わりが予想され、注目を集めてきた²。ケモカインは92-99残基のアミノ酸からなる塩基性ペプチドであり、それぞれがジスルフィド結合を形成する4つのCys残基を保有する。このCys残基の配列の違いにより、Cケモカイン、CCケモカイン、CXCケモカイン、CX₃Cケモカインの四つのサブファミリーに分類されている (Figure 1.1)。これまでに50種以上のケモカイン分子が発見され、種々の役割が報告されている。

Figure 1.1 ケモカインの構造と分類^{1a}



これらのケモカインはGタンパク共役型の7回膜貫通型受容体 (GPCR : G-protein-coupled receptor) であるケモカイン受容体を介してその作用を発揮する。これまでに19種類のケモカイン受容体が同定されている。ケモカインとケモカイン受容体の相互作用は複雑であり、多くのケモカイン受容体は複数のケモカインを結合し、またケモカインの多くは複数のケモカイン受容体と結合することが知られている。表 1.1 にこれまでに報告されているケモカインとその結合受容体、また1999年に定められた新命名法を示した^{2d}。

CCR5 は352個のアミノ酸からなるCCケモカイン受容体のひとつであり、RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, CCL-3)、MIP1-α (macrophage inflammatory protein 1-α, CCL-4)、MIP1-β (macrophage inflammatory protein 1-β, CCL-5) といった炎症性ケモカインの受容体として、1996年に同定された。他のケモカイン受容体と同様に、種々の免疫やアレルギー反応に関与している。

表 1.1 ケモカインとケモカイン受容体^{2d}

新体系名	ヒトリガンド	マウスリガンド	ケモカイン受容体
CXCケモカイン受容体			
CXCL1	GRO α /MGS α	GRO/KC?	CXCR2>CXCR1
CXCL2	GRO β /MGS β	GRO/KC?	CXCR2
CXCL3	GRO γ /MGS γ	GRO/KC?	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	Unknown
CXCL5	ENA-78	LIX?	CXCR2
CXCL6	GCP-2	Cka-3	CXCR1,CXCR2
CXCL7	NAP-2	Unknown	CXCR2
CXCL8	IL-8	Unknown	CXCR1,CXCR2
CXCL9	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	Unkown	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α/β	SDF-1	CXCR4
CXCL13	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	BRAK/bolekine	BRAK	Unknown
CXCL15	Unknown	Lungkine/WECH	Unknown
CCケモカイン受容体ファミリー			
CCL1	I-309	TCA-3/P500	CCR8
CCL2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	MIP-1 α /LD78 α	MIP-1 α	CCR1,CCR5
CCL4	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1,CCR3,CCR5
CCL6	Unkown	C10/MRP-1	Unkown
CCL7	MCP-3	MARC?	CCR1,CCR2,CCR3
CCL8	MCP-2	MCP-2?	CCR3
CCL9/10	Unkown	MRP-2/CCF18/MIP-1 γ	Unkown
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
CCL12	Unkown	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4	MCP-4	CCR2,CCR3
CCL14	HCC-1	Unkown	CCR1
CCL15	HCC-2/MIP-1 δ /Lkn-1	Unkown	CCR1,CCR3
CCL16	HCC-4/LEC	Unkown	CCR1
CCL17	TARC	TARC	CCR4
CCL18	PARC/DC-CK1/MIP4/AMAC-1	Unkown	Unkown
CCL19	ELC/MIP-3 β /exodus-3/CK β 11	ELC/MIP-3 β /exodus-3/CK β 11	CCR7
CCL20	LARC/MIP-3 α /exodus-1	LARC/MIP-3 α /exodus-1	CCR6
CCL21	SLC/6Ckine/exodus-2	SLC/6Ckine/exodus-2/tca-4	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1	MDC/abcd-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	Unkown	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	Unkown	CCR3
CCL25	TECK	TECK	CCR-9
CCL26	Eotaxin-3	Unkown	CCR3
CCL27	ILC/CTACK	ALP/ILC/CTACK/Eskine	CCR-10
Cケモカイン受容体			
XLC1	Lymphotactin/SMC-1 α /ATAC	Lymphotactin	XCR1
XLC2	SCM-1 β	Unknown	XCR1
CX ₃ Cケモカイン受容体			
CX ₃ CL1	Fractalkine	Neurotactin	CX3CR1

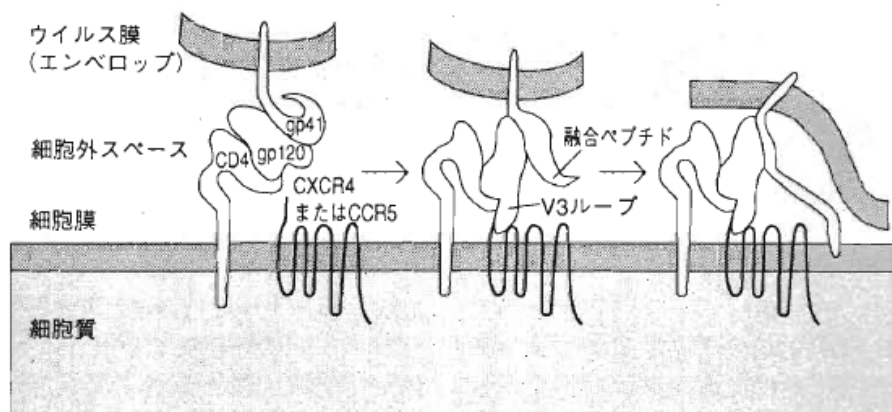
1-2. AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome;後天性免疫不全症候群) とその治療³

AIDS は 1981 年にアメリカで発見された免疫不全症であり、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus : HIV) の感染に伴う免疫細胞の破壊・免疫不全が原因とされている。現在の感染者は全世界で 5 千万人に達する。HIV は HIV-1 と HIV-2 という 2 種類のウイルスが知られているが、世界中に蔓延し問題となっているのは HIV-1 の感染によるものがほとんどであり、HIV-2 は主に西アフリカを中心に感染が広がっている。HIV-1 はもともと、チンパンジーに免疫不全を起こすウイルス (Simian Immunodeficiency Virus : SIV) で、それが人間に感染して生じたと考えられている。一方、HIV-2 は西アフリカに生息するスーティーマンガベイという、オナガザル科の猿に免疫不全を起こすウイルスが起源と考えられており、HIV-1 に比べ、感染力は弱く、進行も遅いと言われている。

HIV-1 はレトロウイルスであり、その感染・増殖機構は以下のように考えられている (Figure 1.2)。

- ① ウィルス外膜のエンベロップタンパク (Env) が宿主であるヒトの CD4 を発現している T 細胞に接着・融合する。
- ② コレセプターとして CCR5・CXCR4 を足掛かりとして宿主に侵入する。
- ③ ウィルスの持つ逆転写酵素により DNA を複製し、翻訳、さらにプロテアーゼによって切り出され増殖する。

Figure 1.2 HIV-1 の細胞侵入機構^{2g}



1987 年、NIH (National Institutes of Health)の満屋らにより開発されたジドブジン (zidovudine, 別名 : AZT) が最初の抗 HIV 薬として FDA に承認された。この薬はレトロウイルスである HIV が宿主であるヒトの細胞内に侵入し、増殖のため DNA を合成・逆転写する際の逆転写酵素を阻害する薬剤である。その後、現在までにジデオキシシチジン (dideoxycytidine : ddC)、ジデオキシイノシン (dideoxyinosine : ddI)、ネビラピン (Nevirapine : NVP) といった多くの逆転写酵素阻害剤が抗 HIV 薬として上市されている (Figure 1.3)。

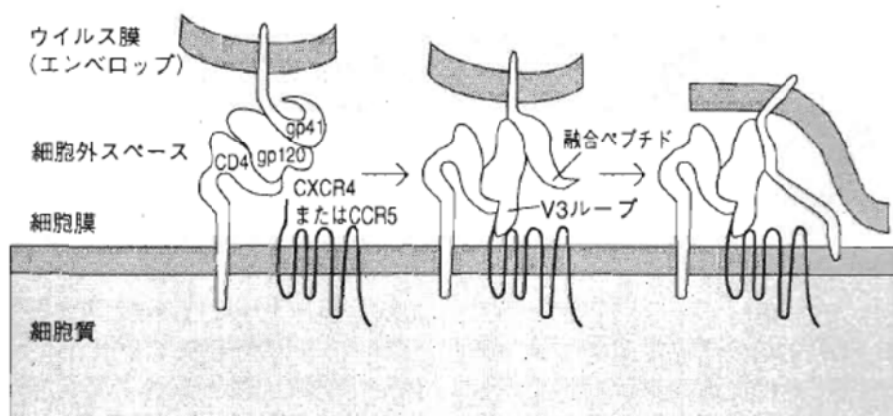
1-2. AIDS (Acquired Immune Deficiency Sndrome;後天性免疫不全症候群) とその治療³

AIDS は 1981 年にアメリカで発見された免疫不全症であり、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus : HIV) の感染に伴う免疫細胞の破壊・免疫不全が原因とされている。現在の感染者は全世界で 5 千万人に達する。HIV は HIV-1 と HIV-2 という 2 種類のウイルスが知られているが、世界中に蔓延し問題となっているのは HIV-1 の感染によるものがほとんどであり、HIV-2 は主に西アフリカを中心に感染が広がっている。HIV-1 はもともと、チンパンジーに免疫不全を起こすウイルス (Simian Immunodeficiency Virus : SIV) で、それが人間に感染して生じたと考えられている。一方、HIV-2 は西アフリカに生息するスーティーマンガベイという、オナガザル科の猿に免疫不全を起こすウイルスが起源と考えられており、HIV-1 に比べ、感染力は弱く、進行も遅いと言われている。

HIV-1 はレトロウイルスであり、その感染・増殖機構は以下のように考えられている (Figure 1.2)。

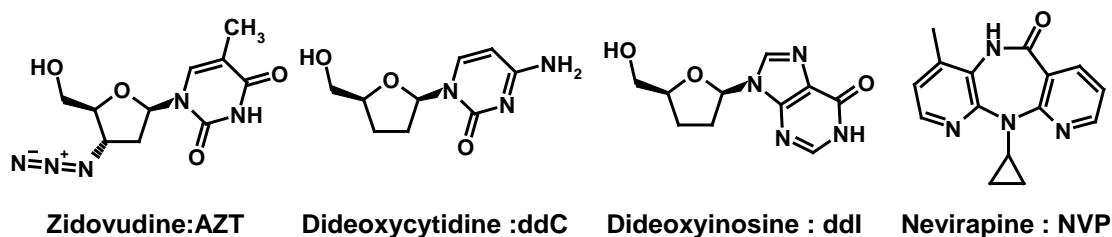
- ① ウィルス外膜のエンベロップタンパク (Env) が宿主であるヒトの CD4 を発現している T 細胞に接着・融合する。
- ② コレセプターとして CCR5・CXCR4 を足掛かりとして宿主に侵入する。
- ③ ウィルスの持つ逆転写酵素により DNA を複製し、翻訳、さらにプロテアーゼによって切り出され増殖する。

Figure 1.2 HIV-1 の細胞侵入機構^{3g}



1987 年、NIH (National Institutes of Health)の満屋らにより開発されたジドブジン (zidovudine, 別名 : AZT) が最初の抗 HIV 薬として FDA に承認された。この薬はレトロウイルスである HIV が宿主であるヒトの細胞内に侵入し、増殖のため DNA を合成・逆転写する際の逆転写酵素を阻害する薬剤である。その後、現在までにジデオキシシチジン (dideoxycytidine : ddC)、ジデオキシイノシン (dideoxyinosine : ddI)、ネビラピン (Nevirapine : NVP) といった多くの逆転写酵素阻害剤が抗 HIV 薬として上市されている (Figure 1.3)。

Figure 1.3 既存の逆転写酵素阻害剤



また、1995 年には異なったメカニズムの抗 HIV 薬であるプロテアーゼ阻害剤が承認された。サキナビル (saquinavir : SQV)、リトナビル (ritonavir : RTV) に代表されるプロテアーゼ阻害剤は HIV が増殖のために必要な種々の酵素(プロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ)や構造タンパク質を前駆体タンパク質から生成し、感染ウイルスへと導くプロセッシングの過程を阻害する(**Figure 1.4**)。

Figure 1.4 既存のプロテアーゼ阻害剤

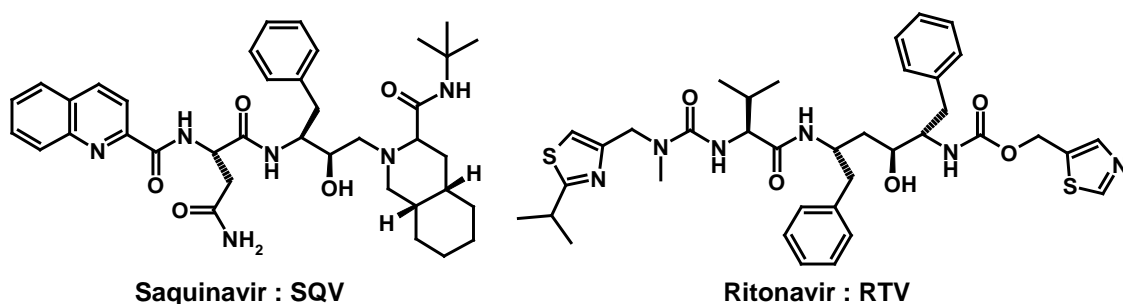
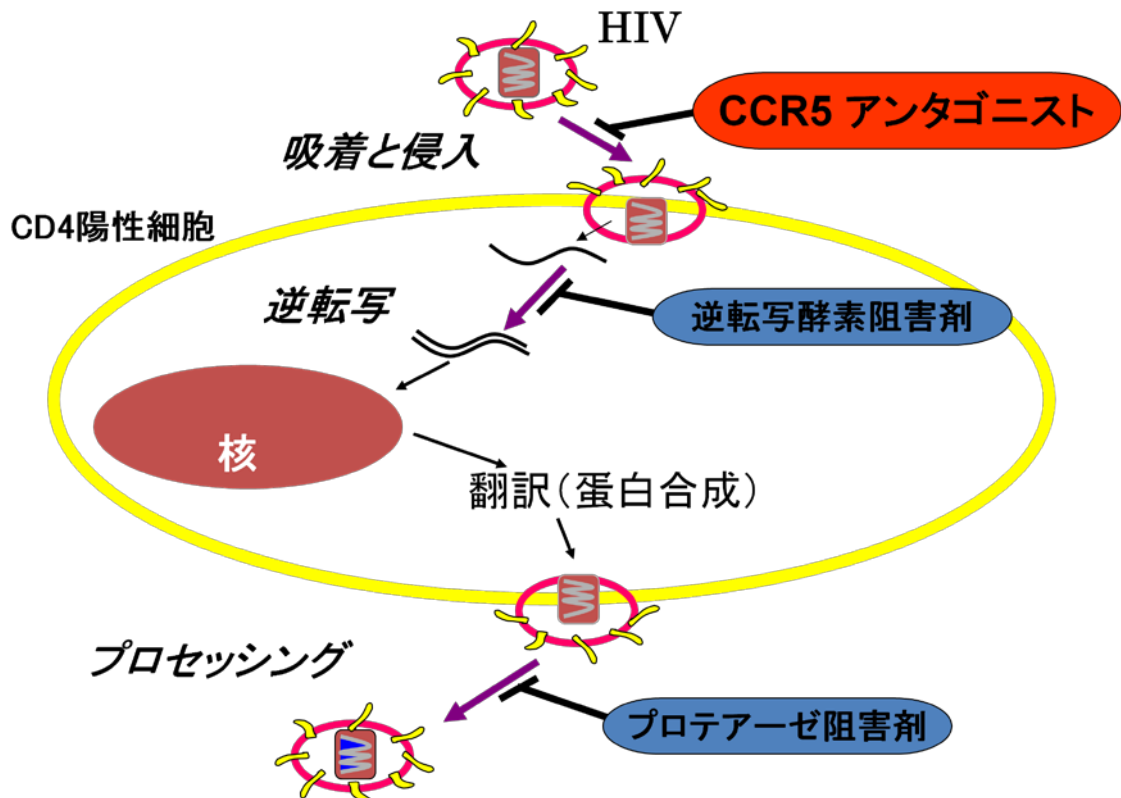


Figure 1.5 に HIV のライフサイクルと既存の抗 HIV 薬の作用点を図示した。現在では逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤を 3 剤、もしくは 4 剤を組み合わせる多剤併用療法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy : HAART 療法) が主となっており、これにより先進国では AIDS による死亡率が顕著に低下し、患者予後が著しく改善された。なお HIV-1 と HIV-2 の感染・増殖の機構はほぼ同じと考えられているが、HIV-1 の逆転写酵素に特徴的な構造である疎水性ポケットが HIV-2 では認められず、非核酸系逆転写酵素阻害剤に対して自然耐性をもっていることが知られている。このことから、HIV-2 に対する HAART 療法においては、非核酸系逆転写酵素阻害剤を避けた薬剤の組合せを用いることが推奨されている。

しかしながら、HAART 療法が功を奏している一方で、この治療法はたくさんの錠剤を、それぞれ異なる決まった時間に、忘れずに服用する必要がある、用法用量を守れなかった場合には、耐性ウイルス発現の可能性が飛躍的に向上してしまう。また投薬が長期に渡ることで、肝障害、体脂肪異常といった副作用も深刻化しており、耐性の生じにくい、副作用の少ない、新たなメカニズムの抗 HIV 薬が求められている。

Figure 1.5 HIV のライフサイクルと抗 HIV 薬



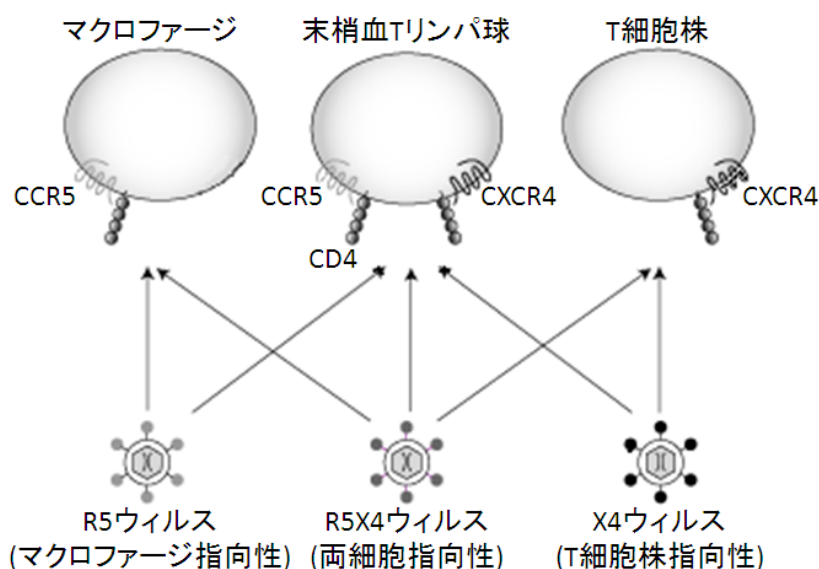
1-3. HIVとCCR5⁴

CCR5 が同定されたのと同じ 1996 年、白人の約 1%にCCR5 遺伝子の 32 個の塩基を欠損 (Δ32)し、CCR5 が正常に発現していない個体が存在していることが明らかになった⁵。さらにこれらの個体はHIV-1 感染に抵抗し、たとえ感染したとしてもAIDSを発症しにくいことが報告された。その後の研究の結果、HIVはヒトの細胞に感染する際に、受容体としてCD4の他に、CCR5 およびCXCR4 といったケモカイン受容体をコレセプターとして利用しており、これらのケモカイン受容体がHIVの増殖に必須であることが明らかになった。

HIV-1 は生物学的特性の違いにより、CD4 陽性の末梢血 T リンパ球とマクロファージで増殖可能なウイルス(マクロファージ指向性)、CD4 陽性の末梢血 T リンパ球と T 細胞株で増殖するウイルス(T 細胞株指向性)、及び末梢血 T リンパ球、マクロファージ、T 細胞株のすべてで増殖可能なウイルス(両細胞指向性)の 3 つのカテゴリーに分類される(Figure 1.6)。このうち、マクロファージ指向性のウイルスは宿主侵入の際にコレセプターとして CCR5 を利用し、T 細胞株指向性のウイルスは CXCR4 を、両細胞指向性のウイルスは CCR5 と CXCR4 の両方を利用することができる。マクロファージ指向性ウイルスは感染全体を通して分離されており、すなわち CCR5 が個体から個体への伝搬といった持続感染に重要な役割を果たしている。一方で、T 細胞株・両細胞指向性ウイルスは AIDS 発症など病態の悪化

した患者からのみ分離されていることから、AIDS 病態の進行に伴って感染者体内でマクロファージ指向性株より生じており、これらの細胞に発現する CXCR4 が AIDS 病態進行の増悪に関与していることが伺える。

Figure 1.6 HIV-1 の細胞指向性とコレセプター使用域



このような理由から、ウィルスが宿主の CCR5、CXCR4 といったコレセプターに結合するのを阻害する低分子の阻害剤を設計できれば、HIV の増殖を防ぐ新たな抗 HIV 薬となりうることが考えられる。特に CCR5 に関しては、先述したように、遺伝子欠損者($\Delta 32$ -CCR5)が特に健康上の問題なく生存していること、さらには CCR5-KO マウスが問題なく誕生、成長することから、安全な薬剤になりうることが示唆されている。さらに、CCR5 阻害剤は宿主の細胞に作用する薬剤となるため、ウィルス自身の酵素に作用する既存の逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤と比較し、耐性株が発現しにくい可能性が期待される。

以上のことから、筆者らはこの CCR5 に着目し、選択的で経口投与可能な CCR5 阻害剤の開発に着手した。

1-4. 参考文献

1. Yoshimura, T.; Matsushima, K.; Tanaka, S; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, 84, 9233.
2. (a) 平井浩一, 「臨床免疫」, **2000**, 33, 181. (b) 松島綱治, 「細胞工学」, **1998**, 17, (7), 1022. (c) Murphy P. M.; Baggiolini M.; Charo I. F.; Hebert C. A.; Horuk R.; Matsushima K.; Miller L. H.; Oppenheim J. J.; Power A.A., *Pharmacological Reviews*, **2002**, 52, 145. (d) 稗島州雄, 「細胞工学」, **2000**, 19, (5), 708. (e) Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E.; Berger, E. A. *Science* **1996**, 272, 872. (f) 加藤佳代子, 武部豊, 「細胞工学」, **1998**, 17,

1082.

3. (a) Kuritzkes, D. R. *Curr Opin HIV AIDS*, **2009**, *4*, 82. (b) Mitsuya, H.; Erickson, J. In *Textbook of AIDS Medicine*, Second Edition, Williams & Wilkins, **2001** 751-780. (c) Hoffmann, C.; Mulcahy, F. Overview of Antiretroviral Agents. In *HIV Medicine 2006*; Hoffmann, C., Rockstroh, J. K., Kamps, B. S., Eds.; Flying Publisher (FlyingPublisher.com): Paris, 2006; pp 94. (d) Mehellou, Y.; Clercq, E. D. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 521. (e) 厚生労働省, 「抗 HIV 薬治療ガイドライン」, **2010**. (f) 上野貴将, 満屋裕明, 「実験医学」, **1996**, *14*, 653. (g) 塩田達雄, 「臨床免疫」, **1999**, *31*, 304.
 4. (a) Deng, H. K.; Liu, R.; Ellmeier, W.; Choe, S.; Unutmaz, D.; Burkhart, M.; Marzio, P. D.; Marmon, S.; Sutton, R. E.; Hill, C. M.; Davis, C. B.; Peiper, S. C.; Schall, T. J.; Littman, D. R.; Landau, N. R. *Nature*, **1996**, *381*, 661. (b) Dragic, T.; Litwin, V.; Allaway, G. P.; Martin, S. R.; Huang, Y.; Nagashima, K. A.; Cayanan, C.; Maddon, P. J.; Koup, R. A.; Moore, J. P.; Paxton, W. A. *Nature*, **1996**, *381*, 667. (c) Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E.; Berger, E. A. *Science*, **1996**, *272*, 872. (d) Alkhatib, G.; Combadiere, C.; Broder, C. C.; Feng, Y.; Kennedy, P. E.; Murphy, P. M.; Berger, E. A. *Science*, **1996**, *272*, 1955. (e) Berger E. A, Murphy P. M., Farber J. M., *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 657. (f) Caldwell, D. J. and Evans J. D. *Expert Opinion Pharmacother.* **2008**, *9*, 3231.
 5. Huang, Y.; Paxton, W. A.; Wolinsky, S. M.; Neumann, A. U.; Zhang, L.; He, T.; Kang, S.; Ceradini, D.; Jin, Z.; Yazdanbakhsh, K.; Kunstman, K.; Erickson, D.; Dragon, E.; Landau, N. R.; Phair, J.; Ho, D. D.; Koup, R. A. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 1240.
-

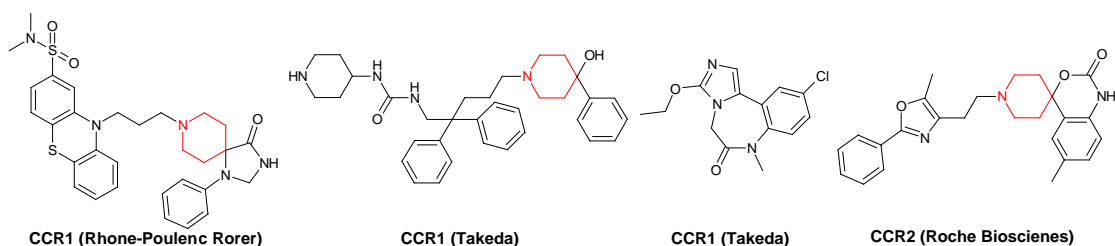
第 2 章

活性代謝物の情報を用いたリード化合物の構造変換

2-1. 序論

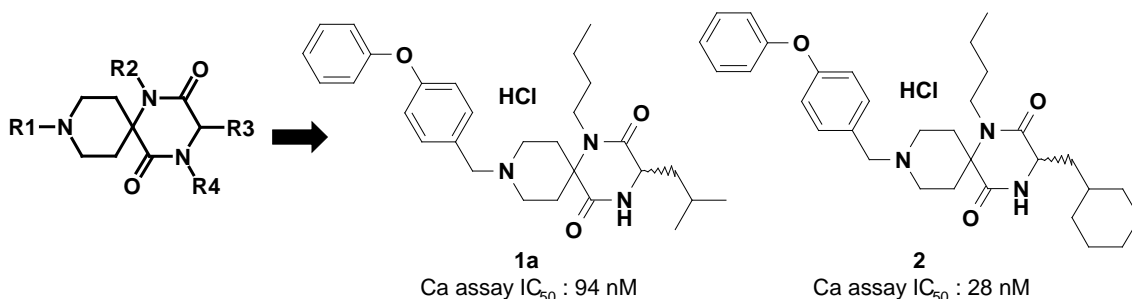
CCR5 阻害剤の開発に先立ち、巾下らは種々の免疫疾患への関わりが報告され注目を集めていたケモカインに対する指向性ライブラリーの作成を行った¹。当時ケモカイン阻害剤として**Figure 2.1**のような化合物が報告されており²、まずこれらの共通構造であるピペリジン環に着目した。

Figure 2.1 ケモカイン阻害剤として報告されていた構造



さらに独自性が高く、かつ構造的多様性を持たせることが可能なスピロジクトピペラジン骨格(**Figure 2.2**)の R1、R2、R3 部位を変換した化合物のコンビナトリアル合成を行い、約 3000 化合物のライブラリーを作成した。

Figure 2.2 新たにデザインされたケモカイン指向性ライブラリーとリード化合物



このケモカイン指向性ライブラリーの CCR5 に対するスクリーニングより、リード化合物となりうる化合物 **1a**、**2** が見出され、この化合物を出発点として、CCR5 阻害剤の創製に着手した。

一般的に医薬品の創製においては、適応とする疾患のマウスやラットなどを用いた動物の病態モデルを作成し、病態モデル動物に投与した際に高い有効性を示す化合物を目指すことが第一の目標とされる。しかしながら、我々の目標は抗 HIV 薬であり、AIDS を発症したげっ歯類の動物モデルは存在しない。ネコやサルといったウィルスの感染による AIDS の発症が知られている動物もあるが、これらの動物を病態モデルとして使用することは安全面の問題から不可能であった。そのため、抗 HIV 薬の開発に当たっては、*in vitro* での抗 HIV

活性と化合物を動物に投与したときの血中濃度から有効性を見積もることが有効とされている。そこで、「強い *in vitro* 抗 HIV 活性を持ち、かつ動物に経口投与した時にその IC₉₀ 値を上回る血中濃度を長時間維持すること」を指標に化合物の創製を目指すこととした。

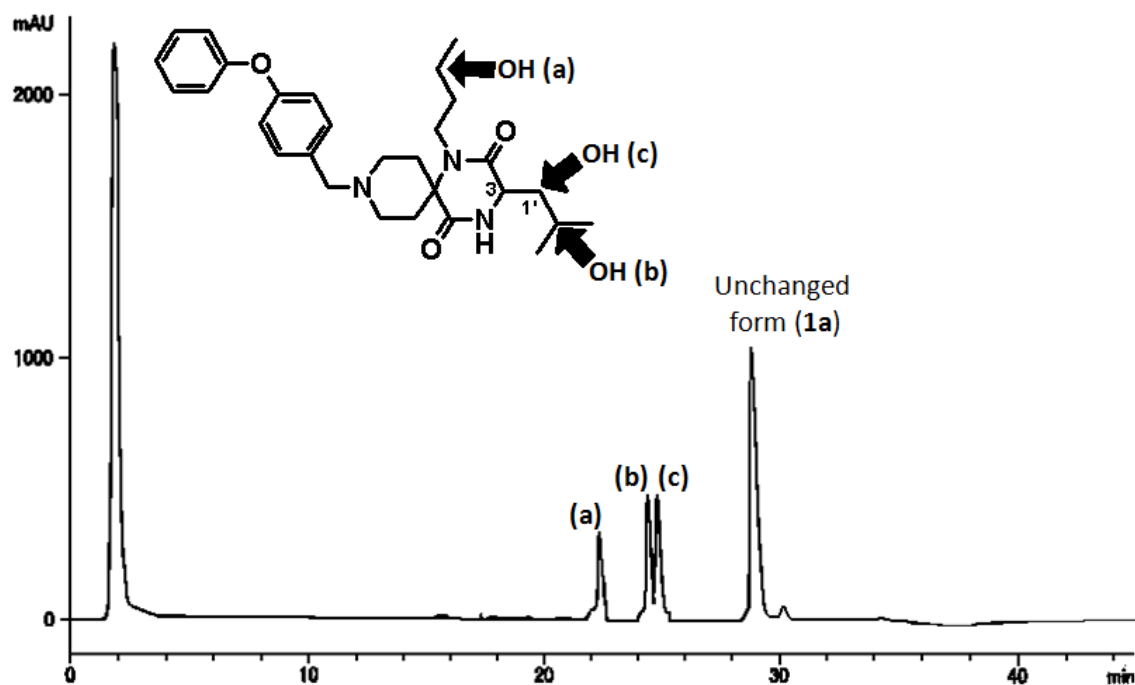
化合物のCCR5 阻害活性はCCR5 を強制発現させたChinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用い、内因性リガンドの一つであるMIP-1 α で惹起される細胞内Ca²⁺濃度上昇を化合物がどれだけ抑制するかで評価した(Caアッセイ)。化合物評価は複数の濃度で行い、50%抑制する濃度をIC₅₀ 値として記した。Ca²⁺濃度測定は比色法で行った。また代表となる化合物については実際にウィルスを用いた抗HIV活性の測定を行った。抗HIV活性の測定はCCR5 を発現させたHeLa CD4/LTR- β -Gal細胞 (MAGI細胞: Multiple nuclear Activation of Galactosidase Indicator cell)を化合物及びウィルスの共存下、48 時間インキュベートした後、HIV感染多核細胞を計数するMAGIアッセイ系を用いた³。

2-2. 代謝物の情報を活用したリード化合物の構造変換

GPCR 指向性ライブラリーから見出したリード化合物 **1a**、**2** はそれぞれ IC₅₀ 94 nM、28 nM の CCR5 阻害活性を有していた (**Figure 2.2**)。しかしながら抗 HIV 活性という点では MAGI アッセイ系³で IC₅₀ 値が 60 nM、31 nM と若干の改善が必要と考えられた。さらに動物に経口投与した時の体内動態が非常に悪く、生物学的利用率は軒並み 1%程度であり、大きな改善が必須であった。

一般的に、薬物を経口投与した後の体内動態の悪い原因としては、消化管から血流（門脈）へと吸収される際の消化管膜の透過性が低いこと、また消化管や肝臓に存在する代謝酵素による化合物の代謝速度が速いことなどが主な原因と考えられている。膜透過性は *in vitro* で Caco-2 細胞を用いた透過性試験により見積もることができる。また肝臓での代謝については肝臓をホモジネートし、遠心分離して得られる肝代謝酵素を含む画分、肝ミクロソーム中で化合物をインキュベートしたときの化合物の代謝酵素に対する安定性で見積もることが一般的である。**Figure 2.2** に示したリード化合物については、特に肝代謝に問題があり、それが経口吸収性の悪い原因の一つであることが明らかになった。そこで、もっともシンプルな構造である化合物 **1a** に関して、肝ミクロソーム中でインキュベートした際の代謝物の同定を試みた。通常の *in vitro* 試験では 0.2 -1.0 mg/mL 程度のミクロソーム蛋白を用いて代謝の度合いを検証するが、今回の目的は代謝物の同定であったため、通常より多い 5.0 mg/mL のミクロソーム蛋白を用い、化合物を 1.5 時間インキュベートすることで強制的に代謝物を生成させた。この代謝物を LC-MS を用いて解析した結果を **Figure 2.3** に示した。リード化合物 **1a** は **Figure 2.3** に示す a)、b)、c) の 3 つの部位がそれぞれ酸化され、水酸化された化合物が代謝物として生成していることが明らかになった。そこで得られた各代謝物を単離し、概算濃度で CCR5 阻害活性の IC₅₀ 値を見積もったところ、(b)、(c) の部位が酸化された化合物は親化合物 **1a** と同等と予測される阻害活性が推測された。

Figure 2.3 Metabolites of the compound **1a**. Three main metabolites were identified on LC-MS after incubation with human liver microsome (5.0 mg protein/ml) for 1.5 hr.



実際に代謝物として予測された化合物を合成し、評価した結果を **Table 2.1** に示した。(a)の部位に水酸基を導入した化合物 **3** は活性が大きく減弱した。また(b)の部位が水酸化された化合物 **4** は親化合物 **1a** と同等の活性を示した。(c)の部位の水酸化体は2つの不斉中心を持つため、4つの立体異性体を作り分け、評価を行った。親化合物である **1a** においては **Table 2.2** に示すように3位の立体化学の違いによる活性への影響はほとんど見られず、Ca アッセイにおいて *R* 体 **1b** の IC_{50} 値は 130 nM、*S* 体 **1c** の IC_{50} 値は 84 nM であったが、1'位のヒドロキシ体においては異性体間で活性に大きな差がみられ、(3*R*, 1'*R*)体の **5a** が IC_{50} 値 33 nM とその他の異性体の 4.5 倍から 12 倍強い活性を示すことが明らかになった。

Table 2.1 Activity of the expected metabolites **3**, **4**, **5a-d**

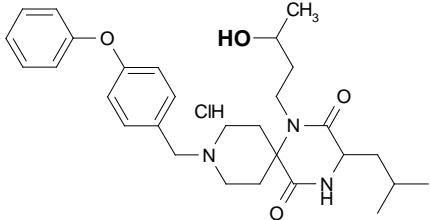
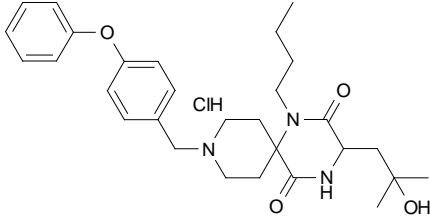
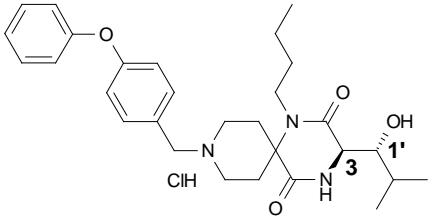
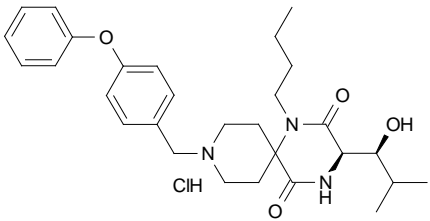
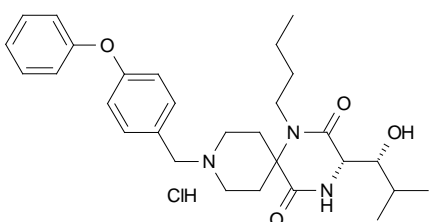
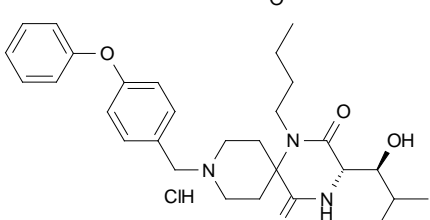
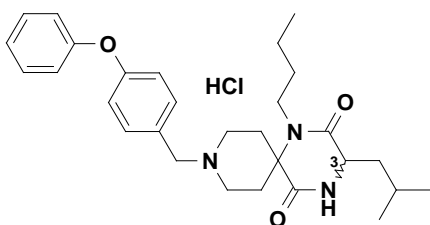
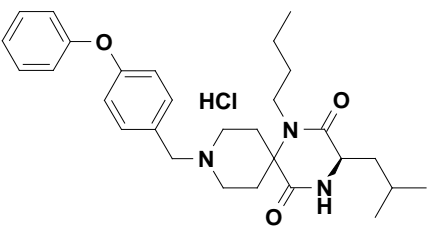
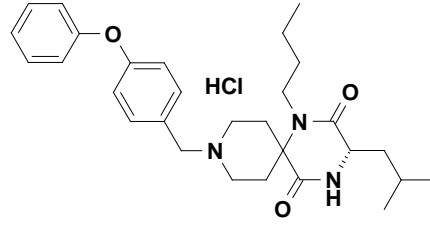
Compound	Structure	Ca Assay IC ₅₀ (nM)
3		ca. 10,000
4		79
5a (3 <i>R</i> ,1' <i>R</i>) form		33
5b (3 <i>R</i> ,1' <i>S</i>) form		210
5c (3 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) form		400
5d (3 <i>S</i> ,1' <i>S</i>) form		150

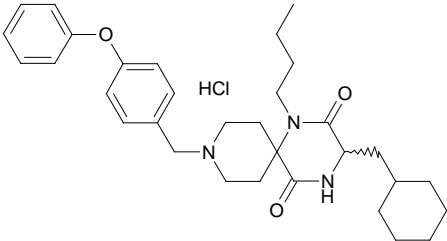
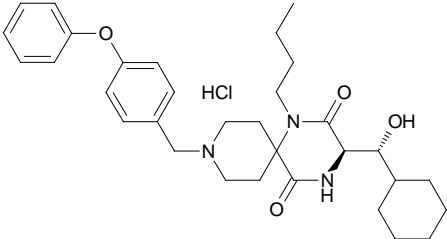
Table 2.2 Activity profiles of stereoisomers **1a-c**

Compound	Structure	Ca Assay IC ₅₀ (nM)
1a racemic form		94
1b <i>R</i> form		130
1c <i>S</i> form		84

より強い活性を持ったシクロヘキシル体のリード化合物 **2** についても、同様の化学変換によって、化合物 **6** を合成したところ、この化合物においても非水酸化体 **2** とほぼ同等の強いCCR5 阻害活性を示した (Table 2.3)。さらにMAGIアッセイ系で抗HIV活性の測定を行ったところ、この水酸化体 **6** はリード化合物 **2** の約 50 倍以上強い抗HIV活性を示すことが明らかになった。このようなCCR5 阻害活性と抗HIV活性の非相関は過去にも報告例があり⁴、Caアッセイの頭打ちの可能性も考えられるが、CaアッセイではCCR5 の内因性リガンド MIP-1 α を用いているのに対し、抗HIV活性では実際にCCR5 指向性のウィルスを用いて実施しており、両者のCCR5 への結合様式が異なることに起因すると考えている。

1'位水酸基の CCR5 阻害活性、および抗 HIV 活性の向上に対する寄与は何に起因するものかは明確にはできていないが、ヒドロキシ基自身が受容体 CCR5 と何らかの相互作用している、もしくはヒドロキシ基が 2 位の NH 基と分子内水素結合することにより、シクロヘキシル基やイソプロピル基が受容体の疎水性ポケットに入りやすくなったという二つの可能性が考察できる。

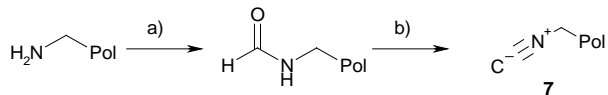
Table 2.3 Antagonistic activity and anti-HIV activity in compounds **2** and **6**

Compound	Structure	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	Anti-HIV MAGI Assay (nM)	
			IC ₅₀	IC ₉₀
2		28	31	337
6		53	0.6	6.0

次に抗 HIV 活性の大きく改善した化合物 **6** について肝ミクロソーム中の安定性を測定したが、期待したような代謝改善は見られず、カセット投与による経口吸収性の評価においても経口吸収性の改善は全く認められなかった。しかしながら分子内に水酸基を導入することで分子全体の水溶性が向上し、溶解度の向上(**2**: <0.2 µg/mL, **6**: 2.7 µg/mL)や、薬物代謝酵素 (CYP 3A4) に対する阻害活性の低下 (**2**: IC₅₀ = 9.3 µM, **6**: >30 µM) といった医薬品らしさ(drug likeness)の改善につなげることができた。

2-3. 合成

化合物 **1a-c**、**2**、**3** についてはライブラリー合成の手法に基づき、Ugi反応⁵を用いた固相合成法によって合成した¹。固相合成に用いたイソシアニド樹脂 **7** は市販のアミノメチル樹脂を蟻酸エチルで処理し、N-ホルミル化した後、トリエチルアミン存在下、四塩化炭素、トリフェニルフォスフィンを用いて脱水させることで調製した(Scheme 2.1)。

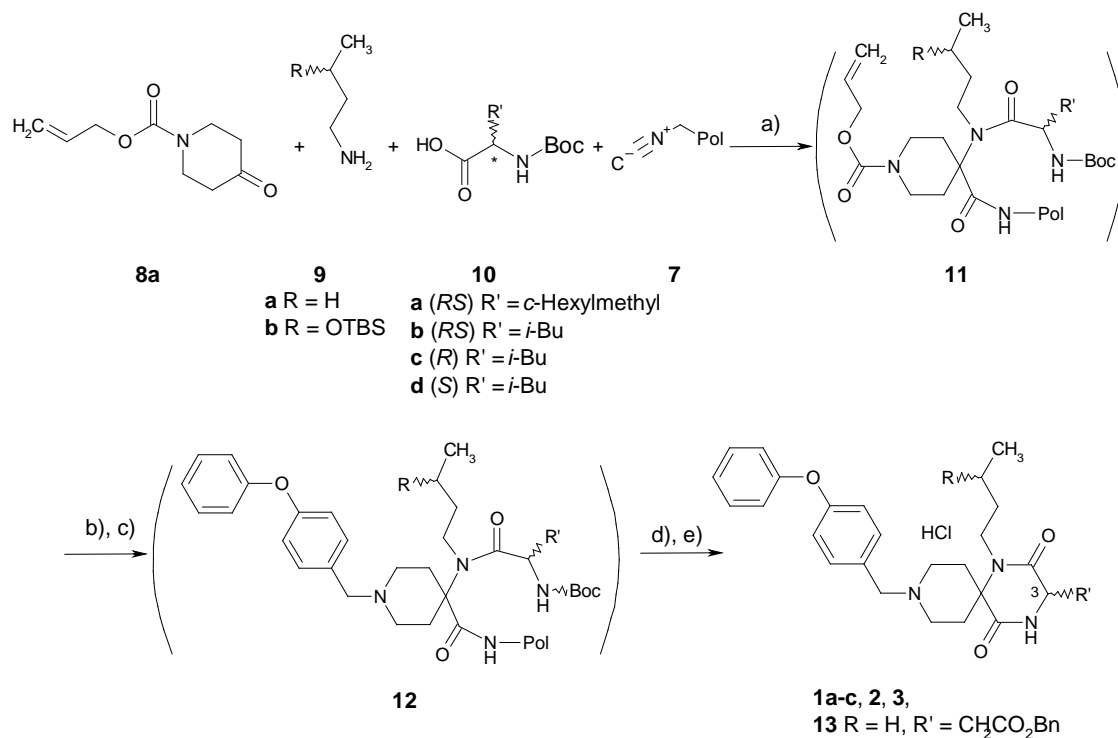


Scheme 2.1 Preparation for methylene-isonitrile resin **7**

a) ethyl formate, DMF, reflux; b) CCl_4 , PPh_3 , Et_3N , CH_2Cl_2 , reflux

化合物 **1a-c**、**2**、**3** の固相合成による合成法を **Scheme 2.2** に示した。1-*N*-アリルオキシカルボニル-4-ピペリドン **8a**、対応するアルキルアミン **9**、*N*-Boc アミノ酸 **10**、イソシアニド

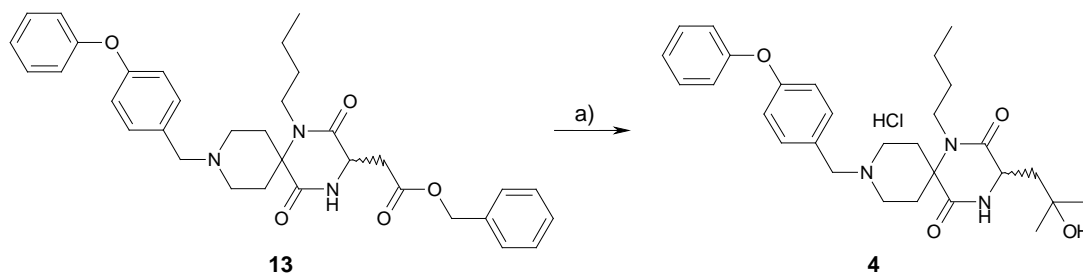
樹脂 **7** を THF/メタノール中、65 °C で一晩振盪させて **11** とし、Pd 触媒下アロック基を脱保護後、4-フェノキシベンズアルデヒドとの還元的アルキル化によって R1 部位を導入した。さらにトリフルオロ酢酸/ジクロロメタンで処理して Boc 基を除去し、酢酸存在下、トルエン中 90 °C で攪拌することで、環化とともに樹脂からの脱離が起り、目的物 **1a-c**、**2**、**3** を得た。シリル化されたアミン **9b** を用いた反応では、Ugi 反応及び 9*N* 置換基の変換後、脱 Boc 化と同時に TBS 基が脱離し、環化してアルコール体 **3** を得た。



Scheme 2.2 Solid phase synthesis of spirodiketopiperazines

a) THF/MeOH (1/1), 65 °C; b) Pd(PPh₃)₄, Bu₃SnH, AcOH/CH₂Cl₂, rt; c) 4-phenoxy-benzaldehyde, NaBH(OAc)₃, AcOH/DMF; d) TFA/CH₂Cl₂ (1/1); e) AcOH/toluene, 90 °C and then 4N HCl/AcOEt

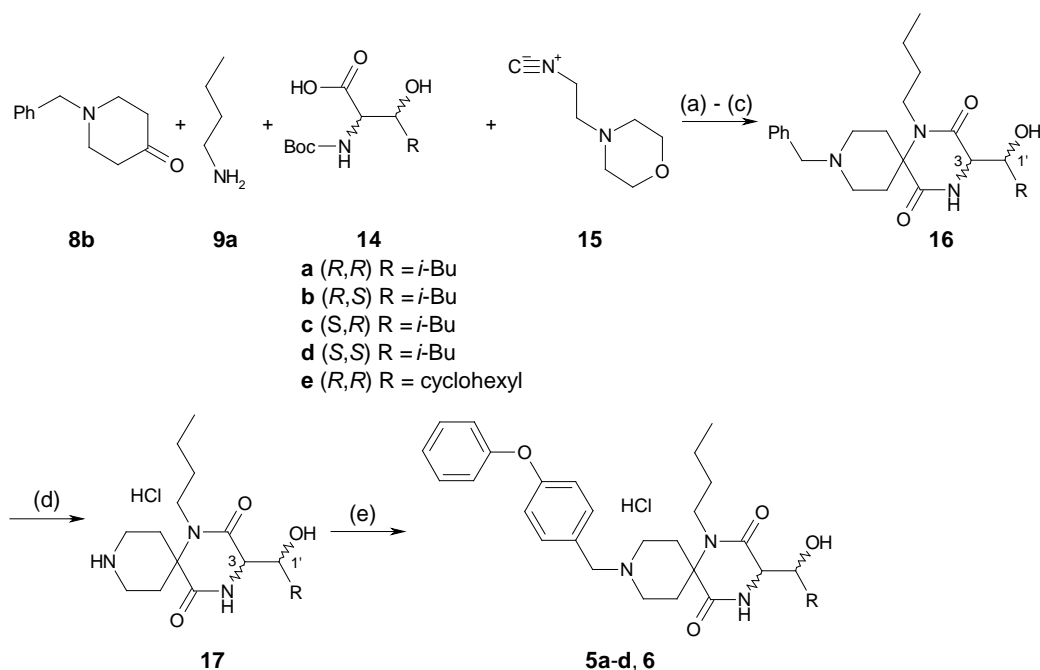
化合物 **4** に関しては、固相合成法を用いて合成したベンジルエステル体 **13** にメチル Grignard 試薬を付加させることで合成した(**Scheme 2.3**)。



Scheme 2.3 Synthetic procedure of compound **4**

a) MeMgBr, THF, then 4N HCl/AcOEt, 15%

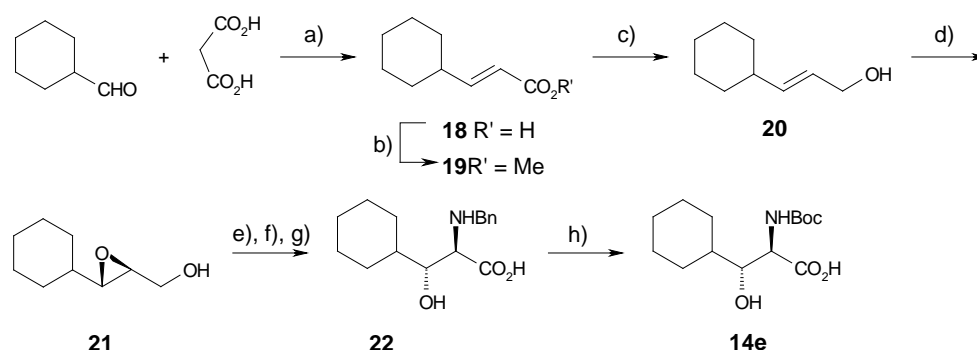
化合物 **5a-d**、**6** に関しては **Scheme 2.2** の固相合成法を用いた場合、脱水反応が懸念されることから、**Scheme 2.3** に示す液相合成法で合成した。*N*-ベンジル 4-ピペリドン **8b**、*n*-ブチルアミン **9a**、対応する *N*-Boc- α -ヒドロキシアミノ酸 **14**、2-(4-メルホリニル)エチルイソシアニド **15** をメタノール中 55°C で一晩加熱することで Ugi 反応を行い、濃塩酸にて Boc 基を脱保護、さらに酢酸/トルエン中で加熱することで環化反応が進行し、*N*-ベンジルスピロジケトピペラジン **16** を得た。接触水素添加により脱ベンジル化を行い **17** へと誘導し、4-フェノキシベンズアルデヒドと還元的アルキル化を行うことで化合物 **5a-d**、**6** を得た。



Scheme 2.3 Solution phase synthesis of spirodiketopiperazines

(a) MeOH, 55°C; (b) conc. HCl, 55°C; (c) AcOH/toluene, 80°C; (d) H₂, Pd(OH)₂/C, EtOH, 55°C then 4N HCl/AcOEt (60-70% in 4 steps); (e) 4-phenoxy-benzaldehyde, NaBH(OAc)₃, AcOH, DMF (80%)

N-Boc- α -ヒドロキシアミノ酸 **14a-d** は試薬メーカーより市販されているものを使用し、**14e** に関しては **Scheme 2.4** に示した様に、シャープレス不斉エポキシ化反応を用いて合成した⁶。シクロヘキシルアルデヒドとマロン酸をピリジン中、ピペリジン存在下 Doebner 縮合させることで 3-シクロヘキシル-2-プロペン酸 **18** を得た。メチルエステルへと変換後、DIBAL 還元によりシャープレス不斉エポキシ化の原料となるアリルアルコール **20** を得た。アリルアルコール **20** にジクロロメタン中、(-)-酒石酸ジエチル、Ti(O*i*-Pr)₄、*t*-ブチルヒドロペルオキシドを作用させることでエポキシ体 **21** を得た。アルコールをアルデヒド、さらにカルボン酸へと酸化した後、*N*-ベンジルアミンと反応させてエポキシドを選択的に開環し、**22** を得た。*N*-ベンジルアミノ酸 **22** を接触水素添加反応に付し、反応の完結を確認後、系内に水酸化ナトリウム水溶液、Boc₂O を加え、*N*-Boc- α -ヒドロキシアミノ酸 **14e** を得た。



Scheme 2.4 Synthetic method of optically-active β -hydroxy-*N*-Boc- α -amino acid

a) piperidine, pyridine; b) conc H_2SO_4 , MeOH; c) DIBAL, THF; d) (-)-diethyl-D-tartrate, $\text{Ti}(\text{Oi-Pr})_4$, *t*-butyl hydroxy hydroperoxide, MS4A, CH_2Cl_2 ; e) SO_3 .pyridine, Et_3N , DMSO; f) 2-methyl-2-butene, NaClO_2 , NaH_2PO_4 , MeCN, H_2O ; g) BnNH_2 , 5.0 M NaOH, H_2O ; h) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, MeOH, then Boc_2O , 1.0 M NaOH

2-4. 小括

筆者らは構造的に新規なスピロピペリジノジケトピペラジン骨格を有するリード化合物 **1a**、**2** を出発点として、抗 HIV 活性、経口吸収性の向上を目指した構造変換を開始した。まず、経口吸収性の悪い原因が肝代謝にあると考え、肝ミクロソーム中における代謝物の同定に着目した。リード化合物 **1a** は主に 3 つの酸化的代謝物を与え、これらの CCR5 結合阻害活性を概算した結果、親化合物 **1a** と同等の活性を示す活性代謝物の存在が明らかになった。活性代謝物についてそれぞれ合成を行い、さらに化合物 **5** の 1'-ヒドロキシ-アミノ酸構造の立体化学について活性を精査したところ、(3*R*, 1'*R*) の絶対配置が活性の発現に非常に重要なことがわかり、2'位にシクロヘキシル基を有する化合物 **2** にもこのヒドロキシ基の導入を応用したところ、CCR5 阻害活性は同等ながら、抗 HIV 活性が飛躍的に向上した化合物 **6** を見出すに至った。残念ながら経口吸収性の改善は認められなかったが、酸化的活性代謝物の情報を有効活用することで、抗 HIV 活性向上の糸口となる有用な置換基を見出すことができ、さらには水酸基の導入により化合物の脂溶性が低下し、溶解度、薬物代謝酵素阻害作用といった医薬品らしさの改善につなげることができた。

2-5. 実験の部

General directions

Analytical samples were homogeneous as confirmed by thin layer chromatography (TLC), and afforded spectroscopic results consistent with the assigned structures. Proton nuclear magnetic resonance spectra (^1H NMR) were recorded on a Varian Gemini-200 or a MERCURY-300 spectrometer with tetramethylsilane as an internal standard. The chemical shift values δ are reported in ppm and coupling constants (*J*) in Hertz (Hz). Fast atom bombardment (FAB) and electron

ionization (EI) mass spectra were obtained with a JEOL JMS-700 spectrometer. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectra were obtained on Perseptive Voyager Elite. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) mass spectra were determined by Hitachi M-1200H spectrometer. IR spectra were measured on a JASCO FTIR-430 spectrometer. Elemental analyses were performed with a Perkin-Elmer PE2400 series II CHNS/O Analyzer and were only indicated as the elements within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values unless otherwise noted. Column chromatography was carried out on silica gel [Merck silica gel 60 (0.063 ~ 0.200 mm), Fuji Silysia BW235 or Fuji Silysia FL60D]. TLC was performed on silica gel (Merck TLC, silica gel 60 F₂₅₄).

Methylene-isonitrile resin (7)

The aminomethyl resin (0.52 mmol/g, 10.0 g, 5.2 mmol) was washed with DMF (40 mL x 2), and suspended in a mixture of DMF (40 mL) and ethyl formate (60 mL). The suspension was stirred under reflux for 6 h. After cooling to room temperature, the resin was filtrated and washed with DMF (50 mL x 2), CH₂Cl₂ (50 mL x 4), MeOH (50 mL x 4) and CH₂Cl₂ (50 mL x 4). The resin was dried under reduced pressure to give the *N*-formylated aminomethyl resin (10.0 g, 0.44 mmol/g calculated by nitrogen content of elementary analysis) as a white resin. IR (KBr) 1682 (CONH) cm⁻¹. The *N*-formylated aminomethyl resin (0.52 mmol/g, 10.0 g, 5.2 mmol) was washed with CH₂Cl₂ (100 mL x 2) and then suspended in CH₂Cl₂ (100 mL). To it were successively added triethylamine (3.62 mL, 26.0 mmol), CCl₄ (2.51 mL, 26.0 mmol), and triphenylphosphine (6.82 g, 26.0 mmol). The suspension was stirred under reflux for 1 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtrated. The resin was successively washed with CH₂Cl₂ (100 mL x 4), MeOH (100 mL x 2) and CH₂Cl₂ (100 mL x 4). Drying under reduced pressure gave the methylene-isonitrile resin **7** (9.73 g, 0.45 mmol/g) as a pale yellow resin. IR (KBr) 2146 cm⁻¹.

A typical procedure for the Ugi four-component condensation using Rink-isonitrile resin. (1a-c, 2-4)

1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (2)

The Rink-isonitrile resin **7** (0.45 mmol/g, 500 mg, 0.23 mmol) was washed with THF/MeOH (1/1, 4 mL x 2). To a suspension of the resin in THF/MeOH (1/1, 4 mL) were added *N*-allyloxycarbonyl-4-piperidone **8** (206 mg, 1.13 mmol), *n*-butylamine **9a** (82 mg, 1.13 mmol) and *N*-Boc-*dl*-cyclohexylalanine **10a** (305 mg, 1.13 mmol). The mixture was shaken for 16 h at 65 °C. After cooling to room temperature, the resin was collected by filtration and successively washed with THF/MeOH (1/1, 4 mL x 3) and then CH₂Cl₂ (4 mL x 3). To a suspension of the resin in

CH₂Cl₂ (4 mL) were successively added acetic acid (135 mg, 2.25 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (52.0 mg, 0.045 mmol) and tributyl tin hydride (327 mg, 1.13 mmol). The mixture was shaken for 4 h at room temperature. The resin was collected by filtration and successively washed with CH₂Cl₂ (4 mL x 4) and DMF (4 mL x 4). To a suspension of the resin in 1% acetic acid in DMF (4 mL) were successively added 4-phenoxybenzaldehyde (223 mg, 1.13 mmol) and then sodium triacetoxyborohydride (238 mg, 1.13 mmol). The mixture was shaken for 6 h at room temperature. The resin was collected by filtration and successively washed with MeOH (4 mL x 2), DMF (4 mL x 4) and then CH₂Cl₂ (4 mL x 4). The resin was suspended in 25% TFA in CH₂Cl₂ (4 mL) at 0 °C. The mixture was allowed to warm up to room temperature and then stirred for 30 min. The resin was collected by filtration and rinsed with CH₂Cl₂ (4 mL x 3), toluene (4 mL x 3) and 1.25 M acetic acid in toluene (4 mL). The resin was suspended in 1.25 M acetic acid in toluene (4 mL). The suspension was shaken for 24 h at 90 °C. After cooling to room temperature, the resin was collected by filtration and washed with CHCl₃/MeOH (1/1, 4 mL). The combined filtrate and washings were evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel with a gradient of AcOEt/MeOH (from 1/0 to 10/1). The resulting residue after evaporation was treated with 4N HCl in AcOEt and then washed with Et₂O to afford the title compound **2** (23 mg, 70% yield) as a white powder. TLC *R_f* 0.73 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 7.74-7.56 (m, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.10-7.00 (m, 3H), 4.33 (s, 2H), 4.04 (dd, *J* = 7.4, 4.8 Hz, 1H), 3.80 (m, 2H), 3.60-3.35 (m, 4H), 2.43 (m, 2H), 2.17 (m, 2H), 1.90-1.60 (m, 7H), 1.60-1.45 (m, 2H), 1.45-1.30 (m, 2H), 1.30-1.15 (m, 4H), 1.10-0.80 (m, 5H); IR (KBr) 3434, 3210, 3064, 2926, 2851, 2664, 2558, 1672, 1590, 1509, 1489, 1418, 1373, 1241, 1173, 1118, 1072, 1048 cm⁻¹; MS (FAB, Pos) *m/z* 518 (M + H)⁺; Elemental Analysis Calcd for C₃₂H₄₃N₃O₃.HCl.0.5H₂O : C, 68.25; H, 8.05; N, 7.46. Found : C, 68.23; H, 7.88; N, 6.77.

1-Butyl-3-isobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione

Hydrochloride (1a)

The title compound was synthesized in 48% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*dl*-leucine **10b** for **10a**. TLC *R_f* 0.63 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.11-7.00 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.01 (dd, *J* = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 3.80 (m, 2H), 3.60-3.35 (m, 4H), 2.43 (m, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.80 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.54 (m, 2H), 1.37 (m, 3H), 1.00-0.90 (m, 9H); IR (KBr) 3440, 3221, 3066, 2957, 2871, 2559, 1673, 1590, 1509, 1489, 1419, 1371, 1329, 1242, 1172 cm⁻¹; MS (FAB, Pos., Glycerin + *m*-NBA) *m/z* 478 (M + H)⁺, 183 (base peak); Elemental Analysis Calcd for C₂₉H₃₉N₃O₃.HCl.H₂O : C, 65.46; H, 7.96; N, 7.90. Found : C, 65.67; H, 7.89; N, 7.83.

(3S)-1-Butyl-3-isobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione

Hydrochloride (1b)

The title compound was synthesized in 13% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*L*-leucine **10d** for **10a**. $[\alpha]_D^{22} - 2.11^\circ$ (C 0.95, MeOH); TLC *R_f* 0.29 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.05-7.02 (m, 2H), 4.33 (s, 2H), 3.98 (dd, *J* = 8.1, 4.5 Hz, 1H), 3.86-3.72 (m, 2H), 3.53-3.37 (m, 4H), 2.47-2.36 (m, 2H), 2.24-2.12 (m, 2H), 1.80-1.30 (m, 7H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); IR (KBr) 3445, 2956, 2565, 1676, 1590, 1509, 1489, 1418, 1329, 1242, 1172, 1073, 1049 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 478 (M + H)⁺; HRMS Calcd 478.307, Obsd 478.3069.

(3R)-1-Butyl-3-isobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione

Hydrochloride (1c)

The title compound was synthesized in 14% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*D*-leucine **10c** for **10a**. $[\alpha]_D^{22} + 2.25^\circ$ (C 1.15, MeOH); TLC *R_f* 0.29 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.05 - 7.02 (m, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.01 (dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 3.85-3.72 (m, 2H), 3.50-3.39 (m, 4H), 2.52-2.38 (m, 2H), 2.24-2.11 (m, 2H), 1.84-1.20 (m, 7H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); IR (KBr) 3444, 2957, 2565, 1676, 1590, 1509, 1489, 1418, 1242, 1172 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 478 (M + H)⁺; HRMS Calcd 478.307, Obsd 478.3069.

1-(3-Hydroxybutyl)-3-isobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione

Hydrochloride (3)

The title compound was synthesized in 31% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using 3-*t*-butyldimethylsilylhydroxybutylamine **9b** for **9a**. TLC *R_f* 0.49 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.04 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.02 (m, 1H), 3.80 (m, 3H), 3.51 (m, 4H), 2.46 (m, 2H), 2.19 (m, 2H), 1.85-1.57 (m, 5H), 1.17 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 6H); IR (KBr) 3405, 2960, 1675, 1590, 1510, 1489, 1421, 1242, 1172, 1048 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 494 (M + H)⁺; HRMS Calcd 494.3019, Obsd 494.3025.

Benzyl [1-butyl-2,5-dioxo-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-3-yl]acetate Hydrochloride (34)

The title compound was synthesized in 36% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*dl*-aspartic acid β -benzyl ester **10e** for **10a**. TLC *R_f* 0.74 (CHCl₃/MeOH, 9/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.52 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.33 (m, 5H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.05 (m, 4H), 5.12 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 4.31 (m, 1H), 3.88 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.50-3.35 (m, 4H), 3.08 (dd, *J* = 17.7, 4.8 Hz, 1H), 2.86 (dd, *J* = 17.7, 3.0 Hz, 1H), 2.34 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); IR (KBr) 3735, 3412, 1736, 1675, 1489, 1423, 1242, 1175 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 570 (M + H)⁺; HRMS Calcd 570.2968, Obsd 570.297.

(2-Hydroxy-2-methylpropyl)-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (4)

To a stirred solution of **13** (133 mg, 0.233 mmol) in dry tetrahydrofuran (10 mL) was added methylmagnesiumbromide (1.0 M/tetrahydrofuran, 0.77 mL, 0.77 mmol) at -20 °C in Argon atmosphere. After being stirred at 0 °C for 1 hour, the reaction mixture was added methylmagnesium bromide (1.0 M/tetrahydrofuran, 1.0 mL, 1.0 mmol). After being stirred for 16 hours at room temperature, the reaction mixture was added water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel and treated with 4N hydrogen chloride/ethyl acetate (2 mL) to give the title compound **4** (18.9 mg, 15%). TLC *R_f* 0.29 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.05 - 7.02 (m, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.01 (dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 3.85-3.72 (m, 2H), 3.50-3.39 (m, 4H), 2.52-2.38 (m, 2H), 2.24-2.11 (m, 2H), 1.84-1.20 (m, 7H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); IR (KBr) 3444, 2957, 2565, 1676, 1590, 1509, 1489, 1418, 1242, 1172 cm⁻¹; MS (APCI, Pos.) *m/z* 478 (M + H)⁺; HRMS Calcd 478.3070, Obsd 478.3069.

A typical procedure for the solution phase Ugi four-component condensation

(3*R*)-1-Butyl-3-[(*R*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (6)

To a stirred solution of 1-benzyl-4-piperidone **8b** (75 g, 261 mmol), *n*-butylamine **9a** (258 mL, 261 mmol) and (2*R*,3*R*)-2-(*t*-butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid **14e** (49.4 g, 261 mmol) in methanol (1.0 L) was added 2-morpholinoethyl isocyanide **15** (36 mL, 261 mmol). After being stirred at 55 °C overnight, the reaction mixture was treated with concentrated hydrochloric acid (261 L) with cooling. After being stirred at 55 °C for another 2 h, the reaction

mixture was evaporated, treated with water, sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated to give deprotected Ugi product as a yellow oil, a solution of which dissolved in acetic acid/toluene (1.25 M/ 1.1 L) was stirred at 80 °C for 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate and washed twice with a small amount of water. The organic layer was washed with aqueous sodium hydrogen carbonate, brine, dried over sodium sulfate and evaporated to afford *N*-benzylpiperidinodiketopiperazine **16** as an oil (103 g). Debenzylation of the resulting oily product was carried out by the catalytic hydrogenation at an atmospheric pressure in ethanol (1.0 L) in the presence of 20% Pd(OH)₂/C (20 g) for 3 h at 50 °C. Catalyst was removed by filtration through a pad of Celite. The filtrate was treated with 4N hydrogen chloride/ethyl acetate (130 mL) and evaporated. The resulting powder was washed with *t*-butyl methyl ether to afford the title compound as a white powder **17** (83 g, 82% yield in four steps). To a stirred solution of the resulting residue (100 mg, 0.258 mmol), 4-phenoxybenzaldehyde (61 mg, 0.309 mmol) in 1% acetic acid/*N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (71 mg, 0.335 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel and treated with 4N hydrogen chloride/ethyl acetate (2 mL) to give the title compound **6** in 46% yield. $[\alpha]_D^{29} + 2.51^\circ$ (*c* 0.97, MeOH) TLC *R_f* 0.46 (AcOEt/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.42–7.37 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.07–7.01 (m, 4H), 4.31 (s, 2H), 4.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.60–3.05 (m, 5H), 2.55–1.90 (m, 6H), 1.90–1.60 (m, 5H), 1.60–1.10 (m, 6H), 1.10–0.90 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3365, 3190, 2924, 2852, 2362, 1660, 1590, 1509, 1489, 1469, 1423, 1243, 1172, 1115 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20v) *m/z* 534 (M+H)⁺, 422; HRMS Calcd 534.3332, Obsd 534.3332.

Compounds **4** and **5a-d** were synthesized according to the same procedures as described above for the preparation of **6** using the corresponding *N*-Boc-amino acid for (2*R*,3*R*)-2-(*t*-butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid.

1-Butyl-3-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (4)

TLC *R_f* 0.52 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (dd, *J* = 8.7, 7.5 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.09–7.00 (m, 4H), 4.32 (brs, 2H), 4.29 (dd, *J* = 9.9, 3.0 Hz, 1H), 4.04–3.88 (m, 2H), 3.59–3.40 (m, 4H), 2.46–2.21 (m, 4H), 2.18 (dd, *J* = 14.4, 3.0 Hz, 1H), 1.75 (dd, *J* = 14.4, 9.9 Hz, 1H), 1.61–1.43 (m, 2H), 1.42–1.29 (m, 2H), 1.28 (s, 6H), 0.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); IR (KBr) 3432, 2962, 1671, 1590, 1509, 1489, 1420, 1242, 1173, 930, 872, 693 cm⁻¹; MS (APCI, Pos.) *m/z* 494 (M + H)⁺; HRMS Calcd 494.3019, Obsd 494.3019.

(3R)-1-Butyl-3-[(1R)-1-hydroxy-2-methylpropyl]-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (5a)

$[\alpha]_{\text{D}}^{29} + 11.1^{\circ}$ (c 1.05, MeOH); TLC R_f 0.51 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.52 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.43-7.35 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.09-7.00 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.14 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.06-3.92 (m, 1H), 3.81-3.66 (m, 1H), 3.58-3.40 (m, 3H), 3.30-3.10 (m, 1H), 3.19 (dd, J = 9.6, 2.1 Hz, 1H), 2.53-2.37 (m, 2H), 2.37-2.20 (m, 1H), 2.18-2.08 (m, 1H), 2.08-1.94 (m, 1H), 1.78-1.60 (m, 1H), 1.50-1.26 (m, 3H), 0.99 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 14.3, 19.8, 20.5, 20.8, 21.5, 31.2, 31.9, 32.5, 43.9, 50.2, 50.7, 58.2, 59.0, 60.9, 81.7, 119.4, 120.6, 124.4, 125.2, 131.0, 134.2, 157.4, 160.5, 166.3, 172.1; IR (KBr) 3366, 3180, 2959, 2926, 2869, 2510, 1672, 1639, 1590, 1509, 1490, 1458, 1425, 1242 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20v) m/z 494 (M + H)⁺, 476, 422, 392; HRMS Calcd 494.3019, Obsbd 494.3019.

(3R)-1-Butyl-3-[(1S)-1-hydroxy-2-methylpropyl]-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (5b)

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} -15.7^{\circ}$ (c 1.06, MeOH); TLC R_f 0.46 (AcOEt/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.01 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.31-1.44 (m, 3H), 1.68-1.80 (m, 2H), 2.13 (m, 1H), 2.38-2.58 (m, 3H), 3.25 (m, 1H), 3.43-3.70 (m, 5H), 4.04 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 4.32 (s, 2H), 7.01-7.06 (m, 4H), 7.17 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.36-7.41 (m, 2H), 7.52 (d, J = 8.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 14.3, 19.5, 20.1, 20.8, 21.4, 31.2, 31.6, 32.6, 44.1, 50.2, 50.9, 58.4, 58.9, 61.0, 79.6, 119.4, 120.6, 124.4, 125.2, 131.0, 134.2, 157.4, 160.5, 168.9, 171.8; IR (KBr) 3365, 2924, 2852, 1657, 1590, 1509, 1489, 1424, 1242 cm⁻¹; MS (FAB, Pos) m/z 494 (M+H)⁺; HRMS Calcd 494.3019, Obsbd 494.3017.

(3S)-1-Butyl-3-[(1R)-1-hydroxy-2-methylpropyl]-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (5c)

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} +16.5^{\circ}$ (c 1.07, MeOH); TLC R_f 0.46 (AcOEt/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.01 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.31-1.44 (m, 3H), 1.68-1.80 (m, 2H), 2.13 (m, 1H), 2.31-2.58 (m, 3H), 3.25 (m, 1H), 3.43-3.72 (m, 5H), 4.04 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 4.32 (s, 2H), 7.02-7.08 (m, 4H), 7.18 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.37-7.42 (m, 2H), 7.52 (d, J = 8.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 14.3, 19.5, 20.1, 20.8, 21.4, 31.2, 31.7, 32.6, 44.1, 50.2, 50.9, 58.4, 58.9, 61.0, 79.6, 119.4, 120.6, 124.4, 125.2, 131.0, 134.2, 157.4, 160.5, 168.9, 171.8; IR (KBr) 3368, 2958, 2925, 2872, 1671, 1590, 1509, 1489, 1424, 1242 cm⁻¹; MS (FAB, Pos.) m/z 494 (M + H)⁺; HRMS Calcd 494.3019, Obsbd 494.3023.

(3S)-1-Butyl-3-[(1S)-1-hydroxy-2-methylpropyl]-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (5d)

$[\alpha]_D^{29}$ -12.4 (c 0.99, MeOH); TLC R_f 0.51 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.52 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.43-7.36 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.10-7.00 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.14 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.06-3.92 (m, 1H), 3.81-3.66 (m, 1H), 3.58-3.40 (m, 3H), 3.30-3.10 (m, 1H), 3.19 (dd, J = 9.6, 2.1 Hz, 1H), 2.53-2.37 (m, 2H), 2.37-2.18 (m, 1H), 2.18-2.08 (m, 1H), 2.06-1.95 (m, 1H), 1.78-1.60 (m, 1H), 1.50-1.26 (m, 3H), 0.99 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 14.3, 19.8, 20.5, 20.8, 21.5, 31.3, 31.9, 32.5, 43.9, 50.3, 50.7, 58.2, 59.0, 61.0, 81.7, 119.4, 120.6, 124.4, 125.2, 131.0, 134.2, 157.4, 160.5, 166.3, 172.1; IR (KBr) 3367, 3193, 2957, 2925, 2853, 2490, 1675, 1639, 1590, 1509, 1489, 1469, 1424, 1242 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20 v) m/z 494 (M + H)⁺, 476, 422, 392; HRMS Calcd 494.3019, Obsd 494.3021.

1. 3-Cyclohexyl-2-propenoic acid (18)

To a stirred solution of cyclohexanecarboxyaldehyde (400 mL, 3.30 mmol) in pyridine (750 mL) were added malonic acid (290 g, 2.78 mol) and piperidine (7.5 mL, 75 mmol) at room temperature. After being stirred at ambient temperature for 1 h, the reaction mixture was heated at 80 °C for 5 h, cooled to room temperature, poured into ice-cooled 3.0 M aqueous hydrochloric acid (1.2 L) and extracted with ethyl acetate. The organic layer was extracted with 2.0 M sodium hydroxide. The aqueous layer was washed with ethyl acetate, acidified with concentrated hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to yield the title compound **18** (442 g, 100%) as a pale yellow solid. TLC R_f 0.78 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 20/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.03 (dd, J = 15.6, 6.6 Hz, 1H), 5.77 (dd, J = 15.6, 1.6 Hz, 1H), 2.30–2.04 (m, 1H), 1.87–1.59 (m, 5H), 1.46–1.02 (m, 5H).

Methyl 3-cyclohexyl-2-propenoate (19)

To a stirred solution of cyclohexyl-2-propenoic acid **18** (442 g, 3.30 mol) in MeOH (1.5 L) was slowly added concentrated sulfuric acid (15 mL) at room temperature. After being stirred under reflux condition for 14 h, the solvent was removed by evaporation. The resulting residue was slowly added to ice water (500 mL) and neutralized with sodium hydrogen carbonate (50 g). The aqueous mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo to yield the title compound **19** (449 g, 96%). TLC R_f 0.83 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.92 (dd, J = 15.6, 6.6 Hz, 1H), 5.77 (dd, J = 15.6, 1.5 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.15 (m, 1H), 1.80–1.61 (m, 4H), 1.19–1.03 (m, 6H).

3-Cyclohexyl-2-propen-1-ol (20)

To a stirred solution of methyl 3-cyclohexyl-2-propenoate **19** (80.0 g, 476 mmol) in dry tetrahydrofuran (1.0 L) was slowly added diisobutyl aluminum hydride/toluene (1.0 M, 1.0 L, 1.0 mol) at -70 °C~-60 °C over 2 h under argon atmosphere. The reaction mixture was warmed up to -10 °C ~ 0 °C, quenched with water (5 mL) and then aqueous saturated sodium sulfate (~ 400 mL). The resulting precipitates were removed by filtration. The filtrate was evaporated, and the resulting residue was purified by distillation (bp 125–128 °C/26 mmHg) to give the title compound **20** (53 g, 88%) as a colorless oil. TLC R_f 0.67 (hexane/AcOEt, 2/1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.70–5.53 (m, 2H), 4.08 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 1.96 (m, 1H), 1.80–1.58 (m, 4H), 1.37–1.00 (m, 6H).

[(2*R*,3*R*)-3-Cyclohexyloxiran-2-yl]methanol (21**)**

To a stirred suspension of dried MS4A (75 g) in dichloromethane (1.3 L) was added titanium(IV) isopropoxide (42 ml, 142 mmol) at room temperature under argon atmosphere and a solution of diethyl D-tartrate (35.3 g, 171 mmol) in dichloromethane at -30 °C~-20 °C, and stirring was continued for 30 min. To the mixture were added a solution of **20** (100 g, 714 mmol) in dichloromethane (100 mL) at -30 °C~-20 °C and a solution of *t*-butyl hydroxy peroxide in octane (178 mL, 1.07 mol) at -30 °C~-20 °C and the mixture was stirred for 3 h. After the excess peroxide was quenched with the addition of dimethyl sulfide (157 mL, 2.1 mol) at -30 °C~-20 °C and stirring was continued for 1.5 h the reaction mixture was further treated with 2.0 L of water and (±)-tartaric acid (300 g, 2.0 mol) and stirring was continued overnight. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was evaporated. The resulting residue was dissolved in *t*-butyl methyl ether (1.0 L) and the excess diethyl D-tartrate was hydrolyzed by stirring with 1.0 M sodium hydroxide water solution for 1 h. The reaction mixture was diluted with water (800 mL) and extracted with *t*-butyl methyl ether. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt, 10/1–1/1) to yield the title compound **21** (100 g, 90%). $[\alpha]_D^{26} + 32.7^\circ$ (c 1.67, CHCl_3); TLC R_f 0.43 (hexane/AcOEt, 2/1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.91 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 2.98 (m, 1H), 2.76 (dd, J = 6.9, 2.4 Hz, 1H), 1.90–1.50 (m, 6H), 1.36–1.01 (m, 5H).

(2*R*,3*R*)-2-Benzylamino-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid (22**)**

To a stirred solution of [(2*R*,3*R*)-3-cyclohexyloxiran-2-yl]methanol **21** (184 g, 1.18 mol) in dimethyl sulfoxide (828 mL) were added triethylamine (644 mL, 4.62 mol) and sulfur trioxide-pyridine complex (368 g, 2.32 mol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with ice water (3.4 L) and extracted with *t*-butyl methyl ether. The organic layer was washed with ice-cooled 0.5 M aqueous hydrochloric acid and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated. To the resulting aldehyde in acetonitrile (3.6 L) were added

water (1.8 L), 2-methyl-2-butene (550 ml, 5.2 mol) and mono sodium hydrogen phosphate (184 g, 1.53 mol) at room temperature. To the reaction mixture was slowly added sodium hypochlorite (80%, 440 g, 3.9 mol) keeping the temperature at 20 °C~25 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, the reaction mixture was diluted with *t*-butyl methyl ether and treated with 1.0 M sodium hydroxide (1.7 L) at room temperature. The precipitates were removed by filtration. The organic layer of the filtrate was extracted with 1.0 M sodium hydroxide. The aqueous layer was acidified with 6.0 M hydrochloric acid (pH 3.0), extracted with *t*-butyl methyl ether, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to yield [(2*R*,3*R*)-3-cyclohexyloxiran-2-yl]carboxylic acid. To a stirred solution of [(2*R*,3*R*)-3-cyclohexyloxiran-2-yl]carboxylic acid in water (198 mL) were slowly added benzylamine (269 mL, 2.47 mol) followed by 5.0 M sodium hydroxide (148 mL, 740 mmol) at 0 °C. After being stirred under reflux for 2.5 h, the reaction mixture was treated with 5.0 M sodium hydroxide (16 mL, 82 mmol) at room temperature. The aqueous layer was washed with *t*-butyl methyl ether, and acidified with 2.0 M hydrochloric acid (pH 4–5). The precipitates were collected by filtration and washed with ice water, ice-cooled acetone, *t*-butyl methyl ether and dried to yield **22** (227 g, 35% in 3 steps) as a white powder. TLC R_f 0.71 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O, 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.48–7.22 (m, 5H), 3.87 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 3.69 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 3.05 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.72–1.50 (m, 6H), 1.24–0.80 (m, 5H); MS (FAB, Pos) 278 (M+H)⁺

(2*R*,3*R*)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid (**14e**)

To a suspension of Pd(OH)₂/C (30 g, 20% wt, wet) in methanol (3.0 L) were added (2*R*,3*R*)-2-benzylamino-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid **22** (150 g, 542 mmol) and 1.0 M sodium hydroxide (540 mL) at 0 °C. After being stirred under hydrogen atmosphere for 8 h, the reaction mixture was treated with 1.0 M sodium hydroxide (80 mL) and then di-*t*-butyl dicarbonate (160 mL, 504 mmol) under argon atmosphere. After being stirred overnight, palladium was removed by filtration through a pad of Celite and washed with methanol and water. Methanol in the filtrate was removed by evaporation and the resulting aqueous solution was washed with *t*-butyl methyl ether. The aqueous layer was acidified with 5% potassium bisulfate (3.0 L) to pH 3.0, extracted with ethyl acetate, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to yield **14e** (151.2 g, 97%). [α]_D²⁵ = -16.1 ° (*c* 0.98, MeOH); TLC R_f 0.54 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O = 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.28 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.47 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.95-0.95 (m, 11H), 1.44 (s, 9H).

2-6. 参考文献

1. Habashita, H.; Kokubo, M.; Hamano, S.; Hamanaka, N.; Toda, M.; Shibayama, S.; Tada, H.; Sagawa, K.; Fukushima, D.; Maeda, K.; Mitsuya, H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4140.
2. Schwarz, M. K.; Wells, T. N. C., *Nature Reviews Drug Discovery*, **2002**, *1*, 347.

3. Maeda, K.; Yoshimura, K.; Shibayama, S.; Habashita, H.; Tada, H.; Sagawa, K.; Miyakawa, T.; Aoki, M.; Fukushima, D.; Mitsuya, H. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 35194.
4. Domling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 3168.
5. Caldwell, C. G.; Bondy, S. S. *Synthesis* 1990, 34.
6. (a) Shankaran, K.; Donnelly, K. L.; Shah, S. K.; Guthikonda, R. N.; MacCoss, M.; Mills, S. G.; Gould, S. L.; Malkowitz, L.; Siciliano, S. J.; Springer, M. S.; Carella, A.; Carver, G.; Hazuda, D.; Holmes, K.; Kessler, J.; Lineberger, J.; Miller, M. D.; Emini, E. A.; Schleif, W. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3419. (b) Wood, A.; Armour, D. *Prog. Med. Chem.* **2005**, 43, 239.

2-7. 本章に関連する投稿論文

- i) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Matsunaga, N.; Minamoto, C.; Habashita, H.; Takaoka, Y.; Toda, M.; Shibayama, S.; Tada, H.; Sagawa, K.; Fukushima, D.; Maeda, K.; Mitsuya, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 727.
-

第 3 章

酸性官能基導入による経口吸収性の改善

3-1. 序論

リード化合物 **1a**、**2** は強い CCR5 阻害活性を有していたが、抗 HIV 活性、並びに動物に経口投与した時の体内動態という点で課題があった。これに対し、リード化合物の肝ミクロソーム中の代謝物解析を行い、活性代謝物の情報を参考として 1'位へ水酸基を導入し CCR5 阻害活性、抗 HIV 活性が向上した化合物 **5a**、**6** を見出したことを第 2 章で示した。しかしながら、この水酸基の導入は肝代謝の安定化、経口吸収性の改善には直接繋がらず、更なる改良が必要であることが分かった。リード化合物の経口吸収性の悪い原因の一つが肝臓での代謝されやすさにあることは第 2 章で述べた。肝臓での代謝を受けにくくするためには、代謝酵素によって代謝されると予測できる部位に何らかの置換基を導入して代謝をブロックすること、もしくは分子量の低減や極性官能基の導入により分子全体の脂溶性を下げ、代謝酵素に認識されにくい構造へと変換するといった構造変換が有効であると考えられている。我々はこの何れか、もしくは両方の戦略を組み合わせることで経口吸収性の良い化合物を見出すことを目指し、リード化合物の 1-*N* 位、3-位、9-*N* 位の側鎖についてそれぞれ構造変換を行い、CCR5 阻害活性に必要な構造について検証することとした。

なお、3-位の立体配置については第 2 章の **Table 2.2** で示したように *S* 体、*R* 体で大きな差はなかったことから、ラセミ体、もしくは天然型で入手が容易な *S* 体を用いて誘導体の合成を行った。

化合物の CCR5 阻害活性は第二章で示したように CCR5 を強制発現させた Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用い、内因性リガンドの一つである MIP-1 α で惹起される細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を化合物がどれだけ抑制するかで評価した (Ca アッセイ)。化合物評価は複数の濃度で行い、50% 抑制する濃度を IC₅₀ 値として記した。Ca²⁺ 濃度測定は比色法で行った。また代表となる化合物については実際にウィルスを用いた抗 HIV 活性の評価を行った。本章ではヒト末梢血リンパ球 (PBM) を用い、化合物及びウィルス共存下 7 日間インキュベートした後、ウィルスの構造タンパク質である p24 抗体量を、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 法で測定することで、ウィルスの増殖量を推定するアッセイ系を用いた¹。第 2 章で示した MAGI アッセイ系と比較し、より信頼性の高い系と考えている。

さらに本章では化合物の肝臓での代謝速度を見積もるため、肝臓をホモジネートし、遠心分離して得られる肝代謝酵素を含む画分、肝ミクロソーム中で化合物を経時的にインキュベートし算出される半減期、もしくは 15 分間インキュベート後の残存率を指標として化合物の代謝酵素に対する安定性を推定した。

3-2. 経口吸収性の改善を目的とした構造変換と考察

まず、1-*N* 位の *n*-ブチル基の変換を行い、この部位の構造変換が CCR5 阻害活性、代謝安定性にどのような影響を与えるかについて確認をした。*n*-ブチル基を *n*-プロピル基、*i*-ブチル基、2-ブテニル基、2-ブチニル基、ベンジル基へと変換した化合物 **24-28** を合成し、CCR5 阻害活性について評価した (**Table 3.1**)。 *n*-プロピル基を持った化合物 **24**、*i*-ブチル基を持

った化合物 **25** ではリード化合物 **1a** と比較し、CCR5 阻害活性の減弱が認められた。一方で 1-*N* 側鎖にオレフィン、アセチレンを導入した化合物 **26**、**27** では **1a** とほぼ同等の活性が認められた。1-*N*-ベンジル誘導体 **28** では活性が減弱した。また第 2 章で示したように、化合物 **1a** の代謝物の一つと考えられる 3-ヒドロキシ-*n*-ブチル誘導体 **3** においては活性が大きく低下した。以上の構造変換の結果より、1-*N* 部位には *n*-ブチル基、2-ブテニル基、2-ブチニル基といった直鎖状の脂溶性の高い置換基が好まれることが明らかになった。さらに化合物 **25-27**、**3** について、肝ミクロソーム中の安定性を評価したところ、何れの化合物においても代謝安定性の改善は認められなかった。脂溶性の高い 1-*N* 部位は代謝部位の一つであると考えられるものの、この部位だけの構造変換により代謝酵素に対する認識を改善することは困難であると考えた。

Table 3.1 Effect of the 1-*N*-substituent on activity profiles

Compound	R	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	T _{1/2} (min) rat liver microsomes ^a
24		500	NT ^b
25		330	15
26		69	14
27		54	15
28		300	NT ^b
1a		94	12
3		ca. 10000	12

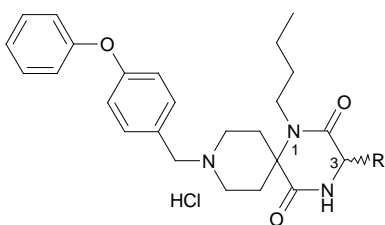
^a The data show T_{1/2} after incubating with the 0.2 mg/ml rat liver microsomes.


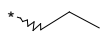
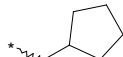

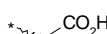
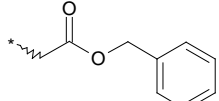
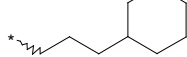
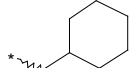
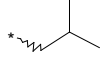
^b NT : Not tested.

次に 3 位の置換基の活性に与える影響について調べた (**Table 3.2**)。リード化合物と同等、もしくは脂溶性のより高い 3-ネオペンチル誘導体 **29**、3-*n*-プロピル誘導体 **30**、3-シクロペンチルメチル誘導体 **31** においては、**1a** 及び **2** とほぼ同等の活性が維持された。一方で、脂溶性の低下を狙い合成した、3-メトキシメチル基、3-カルボキシメチル基、3-ベンジルオキ

シカルボニルメチル基へ変換した化合物 **32-34** においては CCR5 阻害活性の大きな低下が認められた。また化合物 **2** の C3 ホモログである 3-シクロヘキシルプロピル誘導体 **35** を合成し、評価したところ、活性の低下が明らかになった。活性面ではリード化合物と同等の活性をもった化合物が得られてきたことから、肝ミクロソーム中での安定性についても評価を行ったが、代謝安定性の向上した化合物を見出すことはできなかった。以上の結果より、CCR5 阻害活性を得るためには、3 位には脂溶性の高い置換基が好まれること、さらにはその長さには限界があることが示唆されてきた。

Table 3.2 Effect of the 3-substituent on activity profiles



Compound	R	C3 Configuration (R and/or S)	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	T _{1/2} (min) rat liver microsomes ^a
29		(3RS)	79	12
30		(3RS)	50	22
31		(3RS)	52	20
32		(3RS)	320	16
33		(3RS)	>3,000	NT ^b
34		(3RS)	590	NT ^b
35		(3RS)	>3,000	23
2		(3RS)	28	24
1a		(3RS)	94	12

^a The data show T_{1/2} after incubating with the 0.2 mg/ml rat liver microsomes.

^b NT : Not tested.

そこでさらに 9-N 位側鎖の最適化を行うこととした(**Table 3.3**)。リード化合物の持つ 4-フェノキシベンジル基について、活性に対する必須構造を探索するため、ベンジル基、メトキシベンジル基へと変換した化合物 **36**、**37** を合成したところ、何れも活性が減弱した。また、4-フェノキシベンジル基のベンジル位の炭素を増炭した 4-フェノキシフェネチル誘導体

38 では活性が大きく低下した。さらに 9 位の窒素原子の塩基性を低下させたアニリン誘導体 **39** (pK_a 予測値 : 4.12)、ベンジルオキシカルボニル誘導体 **40** (pK_a 予測値 : 4.12) においても活性の大きな低下が認められた。以上のことからピペリジン環の窒素原子の塩基性、及び 9-*N*-アリアルメチルという構造が **CCR5** 阻害活性に必須であることが分かってきた。一方で、9-*N*-[6-(フェニル)-*n*-ヘキシル]誘導体 **41** においては 9-*N*-ベンジル誘導体 **36** と比較し、活性の回復が認められたことから、受容体と相互作用するもう一つの部位が存在することが予想された。

Table 3.3 Effect of the 9-*N*-substituent on activity profiles

Compound	R1	R2	C3 Configuration	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	T _{1/2} (min) RLM ^a	Calculated pKa ^b
36			(3 <i>RS</i>)	900	NT ^c	7.54
37			(3 <i>RS</i>)	120	8.3	7.53
38			(3 <i>S</i>)	>3,000	NT ^c	7.51
39			(3 <i>RS</i>)	>3,000	NT ^c	4.12
40			(3 <i>RS</i>)	3,000	NT ^c	2.52
41			(3 <i>RS</i>)	270	NT ^c	8.24
2			(3 <i>RS</i>)	28	24	7.15
1a			(3 <i>RS</i>)	94	12	7.18

^a The data show T_{1/2} after incubating with the 0.2 mg/ml rat liver microsomes.

^b Calculated by ADMET predictor (ver. 4.0).

^c NT : Not tested.

さらに脂溶性の低下を狙い、9-*N*位の置換基をヘテロ環へと変換する可能性について検証した(**Table 3.4**)。9位の4-フェノキシベンジル基を2-(フェノキシ)ピリジン-5-イルメチル基へと変換した化合物 **42**、4-(ピリジン-3-イル)フェニルメチル基へと変換した化合物 **43** ではほぼ同等の活性を示した。しかしながら脂溶性の指標である ClogP 値が 7.66 から 6.16 と低下したにもかかわらず、肝ミクローム中の安定性の改善は全く認められなかった。そこでさらに脂溶性を低下させるべく、種々のヘテロ 5 員環へと変換を行った。9-*N*-(3,5-ジメチル-1-フェニルピラゾール-4-イルメチル)誘導体 **44** はリード化合物 **2** とほぼ同等の活性を示したが、アゴニスト様作用をも有しており、他の化合物とは異なった受容体との相互作用をしていることが示唆されてきた。9-*N*-(2-フェニルイミダゾール-4-イルメチル)誘導体 **45**、9-*N*-(2-フェニル-5-メチルオキサゾール-4-イルメチル)誘導体 **46**、9-*N*-(2-フェニル-4-チアゾリルメチル)誘導体 **47** に関してはリード化合物 **2** と比較し、活性の減弱が認められた。

Table 3.4 Effect of the 9-*N*-substituent with heteroaryl moieties on activity profiles

Compound	R	C3 Configuration	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	% remaining RLM ^a	ClogP ^b
42		(3RS)	21	10	6.16
43		(3S)	71	29	6.16
44		(3RS)	35	23	6.05
45		(3RS)	160	NT ^c	5.49
46		(3S)	450	NT ^c	5.55
47		(3RS)	570	NT ^c	6.00
2		(3RS)	28	33	7.66

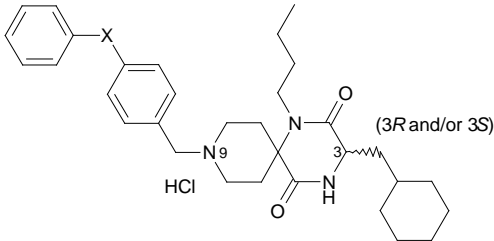
^a The data show the remaining % 15 min after incubating with the 0.5mg/ml rat liver microsomes.




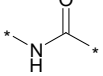

^b Calculated by ADMET predictor (ver. 4.0).

^c NT : Not tested.

Table 3.5 にはリード化合物 **2** の 9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の二つのフェニル基をつなぐリンカーX の構造活性相関を示した。化合物 **2** のエーテル酸素原子を硫黄原子へと変換したスルフィド誘導体 **48** は活性が低下したが、酸化体であるスルホン誘導体 **49** ではわずかながら活性の回復が認められた。さらにケトン誘導体 **50**、アミド誘導体 **51** の CCR5 阻害活性はリード化合物 **2** と比較し、若干の低下にとどまった。何れの化合物においても肝ミクロソーム中の安定性に関して、大きな改善は認められなかった。このようにリンカー部位の変換では活性が強く、さらには肝ミクロソーム中の安定性の向上した化合物を見出すことはできなかった。

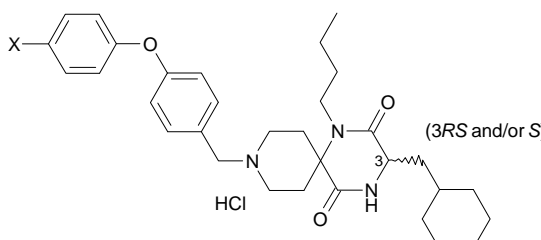
Table 3.5 Effect of chemical modification of the linker X on activity profiles



Compound	X	C3 Configuration	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	% remaining RLM ^a
48		(3S)	170	38
49		(3S)	86	19
50		(3S)	81	23
51		(3S)	57	29
2		(3RS)	28	33

^a The data show the remaining % 15 min after incubating with the 0.5 mg/ml rat liver microsomes.

これまでに**Table 3.3-3.5** で示した 9-*N*位の置換基の構造活性相関より、CCR5 阻害活性、肝ミクロソーム中の安定性という点で、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基以上のものを見出すことは困難であると考え、次に 9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基上の置換基の最適化を行った。特に分子の末端に位置するフェニル基のパラ位は代謝酵素に認識されやすい部位として知られていることから²、代謝をブロックする目的でこのパラ位へ種々の置換基を導入した化合物 **52-59** を合成し、活性を評価した(**Table 3.6**)。

Table 3.6 Effect of the *p*-substituent of the biphenyl ether residue on activity profiles


Compound	X	C3 Configuration	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	% remaining RLM ^a	ClogP ^b
52	F-	(3S)	92	53	7.80
53	Me-	(3S)	79	48	8.16
54	MeO-	(3S)	130	34	7.58
55	HO-	(3S)	42	22	6.99
56	MeHNC(O)-	(3S)	33	4	6.38
57	MeSO ₂ HN-	(3S)	40	15	6.47
58	H ₂ NO ₂ S-	(3S)	28	24	5.82
59	HO ₂ C-	(3S)	13	22	5.13
2	H--	(3RS)	28	33	7.66

^a The data show the remaining % 15 min after incubating with the 0.5 mg/ml rat liver microsomes.

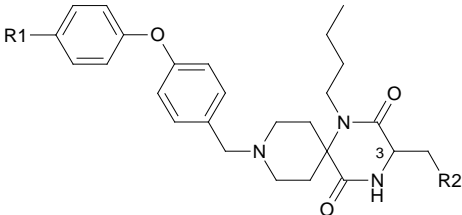
^b Calculated by ADMET predictor (ver. 4.0).

電子吸引基であるフッ素を導入した **52**、また電子供与基であるメチル基、メトキシ基を導入した **53**、**54** では何れもわずかではあるが CCR5 阻害活性の減弱が認められた。一方でヒドロキシ基を有する **55** はリード化合物 **2** とほぼ同等の活性を示し、この部位への極性官能基の導入が許容されることが示唆されてきた。そこで、より脂溶性の低い、極性官能基である *N*-メチルアミノカルボニル基、メタンスルホニルアミノ基、アミノスルホニル基、カルボキシ基を導入した化合物 **56**、**57**、**58**、**59** を合成し、評価したところいずれもほぼ同等の CCR5 阻害活性を示した。9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位へ極性官能基を導入したこれらの化合物は特に肝代謝の安定化が期待されたが、**Table 3.6** に示したように、これらの構造変換では肝ミクロソーム中の安定性の向上は認められなかった。しかしながら、溶解性やその他の物理化学的性質の改善の可能性があると考え、次に **55**、**56**、**59** を動物に投与した時の血中動態を検証することとした。

前述したように、リード化合物 **1a**、**2** の経口吸収性は 1.9%、1.3% と非常に低く、最高血中濃度 (C_{max})、血中半減期 ($T_{1/2}$)、AUC (area under the blood concentration-time curve) といった動態パラメーターはいずれも非常に悪いものであった。この血中動態の悪さはクリアランス (CL) や分布容積 (V_{ss}) が大きいことが原因と考えられ、血中で薬効を発揮する抗 HIV 薬にとっては非常に不利であると考えられた。**Table 3.7** にリード化合物 **1a**、**2** 及び比較的親水性の高いヒドロキシ基、*N*-メチルアミノ化カルボニル基、カルボキシ基を導入した **55**、

56、**59** をラットに経口 (po) 及び静脈 (iv) 投与した時の血中動態パラメーターを示した。ヒドロキシ基を導入した化合物 **55** では血中動態の改善は全く認められなかったが、*N*-メチルアミノカルボニル基の化合物 **56** では C_{max} 、AUC の改善傾向が認められた。さらに興味深いことに、カルボキシ基を導入した化合物 **59** では C_{max} 、AUC といった血中動態パラメーターが飛躍的に改善し、B.A. 34.1% の良好な経口吸収性を示した。この経口吸収性の改善は iv 投与後の CL、 V_{ss} の改善が寄与していることが考えられる。さらに **Table 3.8** に示したように、化合物 **59** は分子内にカルボキシ基を持っているにもかかわらず、膜透過性が良好であることも経口吸収性の改善した原因の一つであると推察された。

Table 3.7 Pharmacokinetic data for **1a**, **2**, **55**, **56** and **59** in rat (N = 3)



Compound	R1	R2	configuration	30 mg/kg, po				3 mg/kg, iv			
				C_{max}^a ng/mL	$T_{1/2}$ min	AUC ^a ng h/mL	BA %	AUC ng h/mL	$T_{1/2}$ min	CL mL/min/mL	V_{ss} mL/kg
1a	H	<i>i</i> -Pr	3 <i>RS</i>	100	75.7	290	1.3	372	13	137	2349
2	H	<i>c</i> -Hex	3 <i>RS</i>	16.7	103	74.4	1.9	400	19.9	113	2542
55	OH	<i>c</i> -Hex	3 <i>S</i>	100	205	195	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
56	C(O)NHMe	<i>c</i> -Hex	3 <i>S</i>	1900	72.7	5453	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
59	CO ₂ H	<i>c</i> -Hex	3 <i>S</i>	7200	48.4	10532	34.1	3091	11.1	16	145

^a C_{max} and AUC are normalized to a dose of 30 mg/kg.

^b ND: Not determined.

Table 3.8 *In vitro* pharmacokinetic data for **1a**, **2**, **55**, **56** and **59**

Compound	Caco 2 papp (x10 ⁻⁶ cm/s)		Solubility (μM)	cLogP ^a
	A to B	B to A		
1a	1.51	2.23	14	6.46
2	0.15	0.27	<5	7.66
55	0.33	0.14	<5	6.99
56	3.51	3.91	6	6.38
59	11.0	16.8	29	5.13

^a Calculated by ADMET predictor (ver. 4.0).

そこで次に経口吸収性の改善が認められた化合物 **56**、**59** の抗 HIV 活性の測定を行った。結果を **Table 3.9** に示した。化合物 **56**、**59** はリード化合物 **1a** と比較し、より強い抗 HIV 活性を示した。特に経口吸収性が大きく改善した化合物 **59** については多剤耐性株での抗 HIV

活性についても検証したところ、強い活性を示し、非常に有用な化合物であることが示唆された。

Table 3.9. Anti-HIV activity of representative compounds

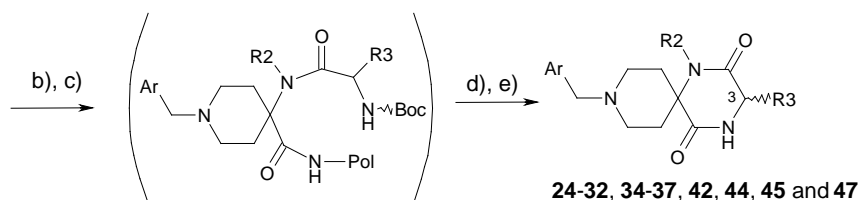
Compound	Mean IC ₅₀ + SD (nM)	
	Anti-HIV-1 activity in p24 assay HIV-1 _{Ba-L} (R5)	CCR5 Ca Assay
1a	160 + 40	94
56	10	28
59	39 + 34.4	13
Zidovudine^a	7 + 4	-
Nelfinavir^b	12 + 8	-

^a Zidovudine is a reverse transcriptase inhibitor.

^b Nelfinavir is a HIV-1 protease inhibitor.

3-3. 合成

第2章で示した合成法と同様に、化合物 **24-37**、**42**、**44**、**45**、**47** はイソシアニド樹脂 **7** を用いた固相Ugi反応³により合成した (**Scheme 3.1**)。カルボン酸を有する化合物 **33** はベンジルオキシカルボニル基で保護されたアミノ酸 **10e** を用いて一連の反応を行って化合物 **34** を合成し、塩基性条件下で脱保護することにより合成した。市販されていないアミン **9f** は 2-ブチニルアルコール **60** からGabrielアミン合成法を用いて調製した(**Scheme 3.2**)。

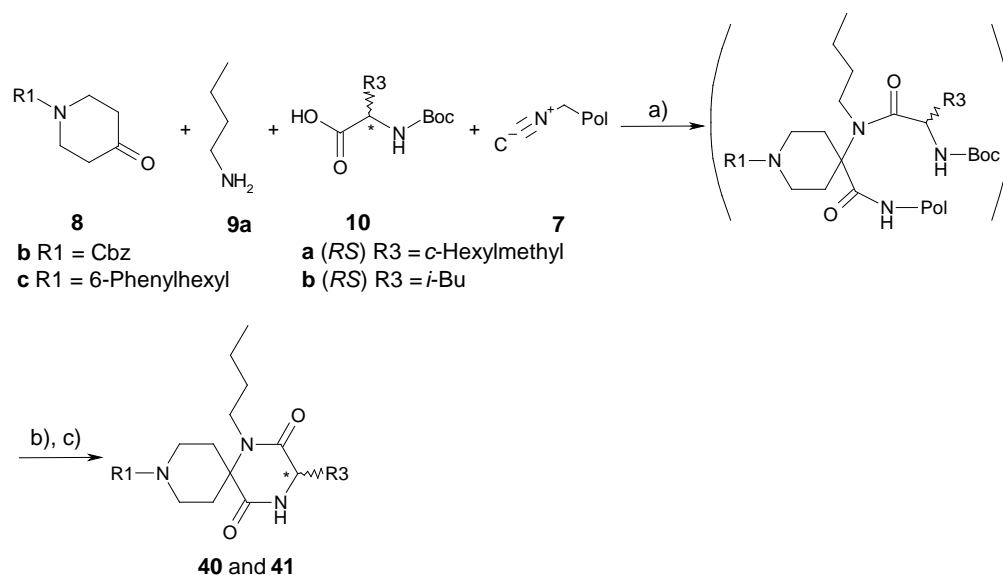


a) THF/MeOH (1/1), 65 °C; b) Pd(PPh₃)₄, Bu₃SnH, AcOH/CH₂Cl₂, rt; c) Ar-CHO, NaBH(OAc)₃, AcOH/DMF; d) TFA/CH₂Cl₂ (1/1); e) AcOH/toluene, 90 °C and then 4N HCl/AcOEt; f) 2N NaOH, MeOH and then 4N HCl/AcOEt.



a) MsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 ; b) Potassium phthalimide, DMF, 70°C ; c) $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, EtOH , then conc HCl , reflux

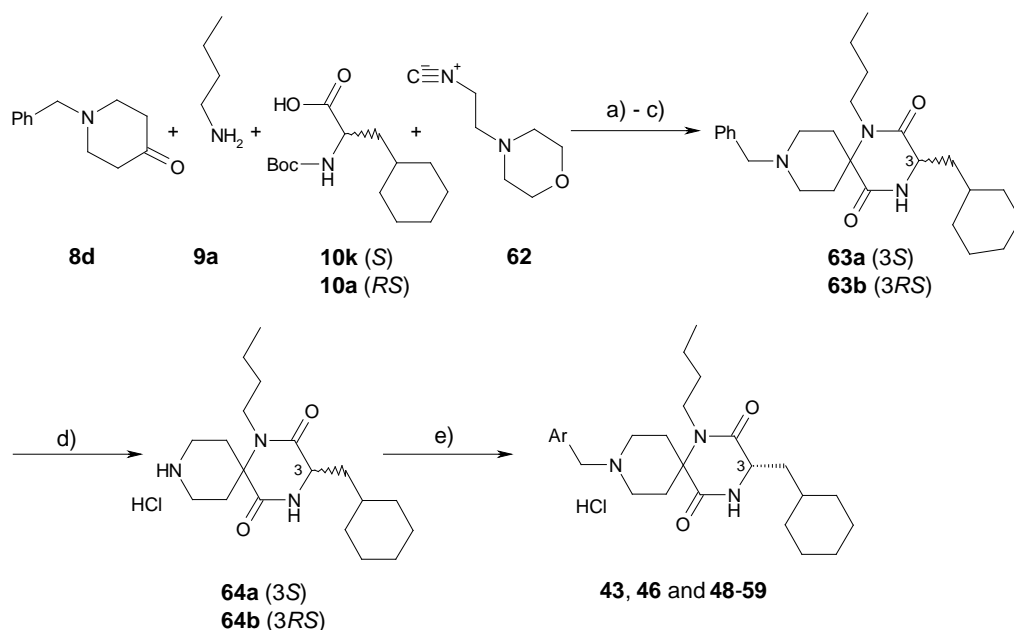
化合物 **40**、**41** は出発物質として 1-*N*-アリルオキシカルボニル-4-ピペリドン¹の代わりに 1-*N*-ベンジルオキシカルボニル-4-ピペリドン **8b**、1-*N*-(6-フェニルヘキシル)-4-ピペリドン **8c** をそれぞれ用いて Ugi 反応を行い、1-*N*-位の脱保護、還元的アルキル化をすることなく、脱 Boc 化、環化させることで合成した(Scheme 3.3)。



Scheme 3.3 Synthesis of **40** and **41**

a) THF/MeOH (1/1), 65 °C; b) TFA/CH₂Cl₂ (1/1); c) AcOH/toluene, 90 °C and then 4N HCl/AcOEt

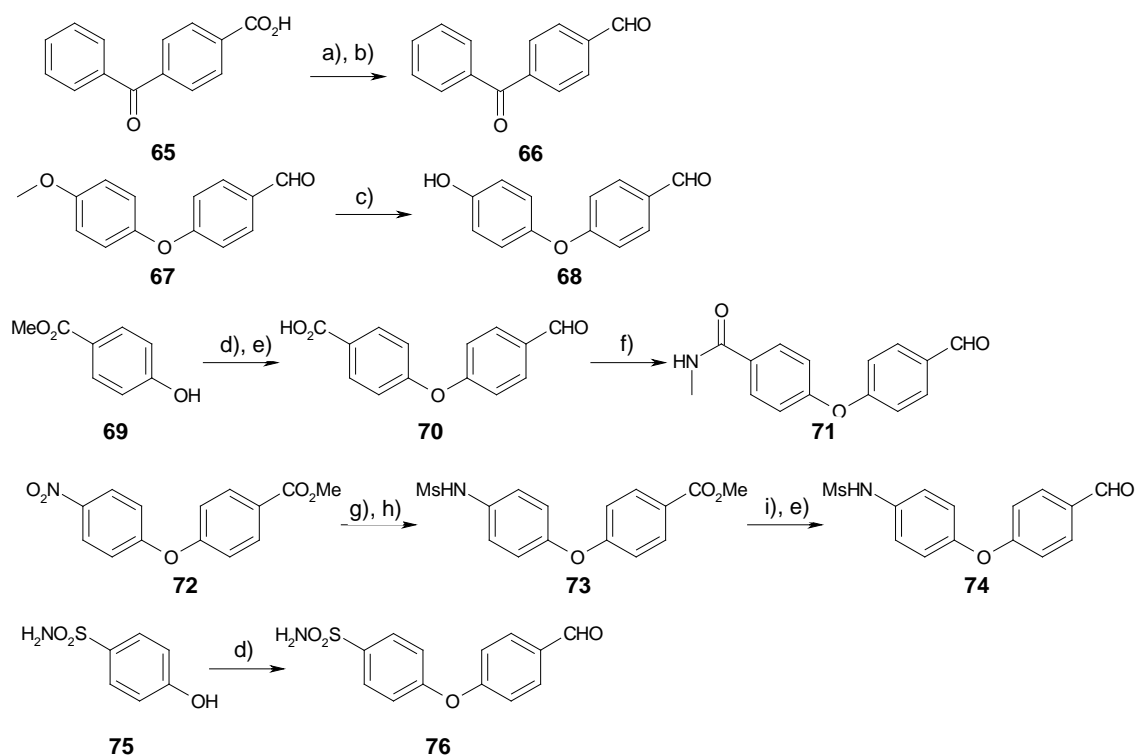
化合物 **43**、**46**、**48-59** については、第 2 章で示した化合物 **2** と同様に、液相の Ugi 反応を用いて合成した(Scheme 3.4)。



Scheme 3.4 Solution phase synthesis of spirodiketopiperazines **43**, **46** and **48-59**

(a) MeOH, 55 °C; (b) conc HCl, 55 °C; (c) AcOH/toluene, 80 °C; (d) H₂, Pd(OH)₂/C, EtOH, 50 °C, then 4 N HCl/AcOEt (50-90% in 4 steps); (e) Ar-CHO, NaBH(OAc)₃, AcOH, DMF and then 4N HCl/AcOEt (50-90%)

市販されていないベンズアルデヒド誘導体の合成法を **Scheme 3.5** に示した。4-ベンゾイルベンズアルデヒド **66** は対応するカルボン酸 **65** を混合酸無水物法を用いて低温で還元後、二酸化マンガンによってアルデヒドへと酸化することで合成した。4-(4-ヒドロキシ)-フェノキシアルデヒド **68** はメトキシ体 **67** を三臭化ホウ素によって脱メチル化して合成した。4-(4-カルボキシ)-フェノキシベンズアルデヒド **70** は4-ヒドロキシ安息香酸メチルエステル **69** を炭酸カリウム存在下、150°Cで4-フルオロベンズアルデヒドと縮合させた後、加水分解して合成した。さらにこの化合物 **70** を EDC、HOBt を縮合剤としてメチルアミンと反応させ、4-(4-メチルアミノカルボニル)-フェノキシベンズアルデヒド **71** を合成した。4-(4-メチルスルホニルアミノ)-フェノキシベンズアルデヒド **74** はニトロ体 **72** を接触水素添加によって還元後、メシル化して化合物 **73** へと導き、DIBAL 還元によりアルコールへ、さらに二酸化マンガンによってアルデヒドへと再酸化することで合成した。4-(4-アミノスルホニル)-フェノキシベンズアルデヒド **76** は炭酸カリウム存在下、150°Cで4-アミノスルホニルフェノール **75** と4-フルオロベンズアルデヒドを縮合させることで合成した。

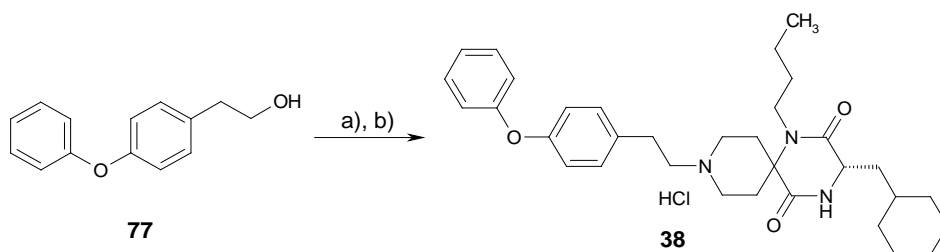


Scheme 3.5 Synthesis of aryl aldehydes 66, 68, 70, 71, 74 and 76

(a) *i*-BuOCOCl, Et₃N, THF then NaBH₄, H₂O; (b) MnO₂, DME; (c) BBr₃, CH₂Cl₂; (d) 4-Fluorobenzaldehyde, K₂CO₃, DMA, 150 °C; (e) NaOH, MeOH, (f) EDC, HOBT, MeNH₂, DMF, (g) H₂, 5% Pd/C, AcOEt; (h) MsCl, pyridine, THF; (i) DIBAL, THF

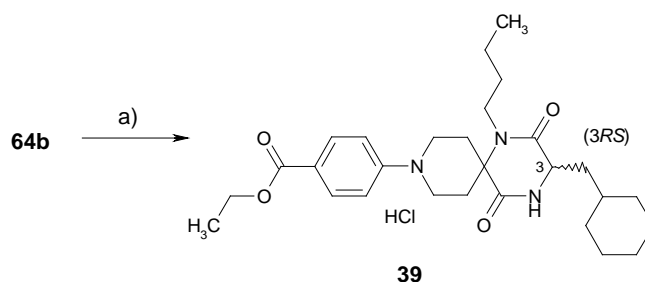
化合物 **38** は 4-フェノキシフェネチルアルコールをトシルクロライドを担持したポリスチレン樹脂と反応させ、これをピペリジノジケトピペラジンのアミン **64a** を反応させて樹脂から切り出すことで合成した(Scheme 3.6)。

化合物 **39** は 4-フルオロ安息香酸エチルエステルとピペリジノジケトピペラジンのアミン **64b** を炭酸カリウム中で反応させて合成した(Scheme 3.7)。



Scheme 3.6 Synthesis of 38

(a) polystyrene-supported tosyl chloride, pyridine, CH₂Cl₂; (b) **64a**, *i*-Pr₂NEt, MeCN and then 4N HCl/AcOEt (48% in 2 steps)



Scheme 3.7 Synthesis of **39**

(a) Ethyl 4-fluorobenzoate, K_2CO_3 , DMSO and then 4N HCl/AcOEt (27%)

3-4. 小括

リード化合物の経口吸収性を改善するため、リード化合物 **1a**、**2** の 1 位、3 位、9 位側鎖置換基に対し、代謝ブロックを意識した構造変換、また脂溶性低下を目指した極性官能基の導入など種々の構造変換を行った結果、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位への *N*-メチルアミノカルボニル基を導入した化合物 **56**、カルボキシ基を導入した化合物 **59** を見出してきた。これら化合物は強い抗 HIV 活性を示し、かつ動物に経口投与した際に良好な血中濃度推移を示し、非常に有望な化合物と考えている。これらの化合物における *N*-メチルアミノカルボニル基、カルボキシ基の役割は明確にはできていないものの、親水性の増加による物理化学的性質の改善が C_{max} 、AUC の向上といった血中動態プロファイルの改善につながったと推察している。

3-5. 実験の部

Analytical samples were homogeneous as confirmed by thin layer chromatography (TLC), and afforded spectroscopic results consistent with the assigned structures. Proton nuclear magnetic resonance spectra (1H NMR) were recorded on a Varian Gemini-200 or a MERCURY-300 spectrometer with tetramethylsilane as an internal standard. The chemical shift values δ are reported in ppm and coupling constants (J) in Hertz (Hz). Fast atom bombardment (FAB) and electron ionization (EI) mass spectra were obtained with a JEOL JMS-700 spectrometer. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectra were obtained on Perseptive Voyager Elite. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) mass spectra were determined by Hitachi M-1200H spectrometer. IR spectra were measured on a JASCO FTIR-430 spectrometer. Elemental analyses were performed with a Perkin-Elmer PE2400 series II CHNS/O Analyzer and were only indicated as the elements within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values unless otherwise noted. Column chromatography was carried out on silica gel [Merck silica gel 60 (0.063 ~ 0.200 mm), Fuji Silysia BW235 or Fuji Silysia FL60D]. TLC was performed on silica gel (Merck TLC, silica gel 60 F₂₅₄).

3-Isobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1-propyl-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione

Hydrochloride (24)

The title compound was synthesized in 87% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *n*-propylamine **9c** for **9a** and *N*-Boc-*dl*-leucine **10b** for **10a**. TLC *R_f* 0.61 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 7.55 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.05 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.01 (dd, *J* = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.60-3.30 (m, 4H), 2.46 (m, 2H), 2.17 (m, 2H), 1.95-1.40 (m, 5H), 0.94 (m, 9H); IR (KBr) 3439, 3220, 3066, 2959, 2872, 2663, 2561, 1672, 1590, 1509, 1489, 1418, 1370, 1330, 1241, 1200, 1172, 1072 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 464 (M + H)⁺; Elemental Analysis Calcd for C₂₈H₃₇N₃O₃.HCl.H₂O : C, 64.59; H, 7.74; N, 8.07. Found : C, 64.38; H, 7.67; N, 8.07.

1,3-Diisobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (25)

The title compound was synthesized in 62% yield according to the same procedures as described for the preparation of **3** using *i*-butylamine **9d** for **9a** and *N*-Boc-*dl*-leucine **10b** for **10a**. TLC *R_f* 0.50 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (dd, *J* = 8.7, 7.5 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.13-7.04 (m, 4H), 4.28 (s, 2H), 4.04 (dd, *J* = 8.1, 4.2 Hz, 1H), 3.81-3.54 (m, 2H), 3.52-3.21 (m, 4H), 2.46-2.11 (m, 4H), 2.00-1.57 (m, 4H), 0.94 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H), 0.90 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); IR (KBr) 2958, 2516, 1676, 1590, 1510, 1489, 1410, 1242, 1199, 1172, 1097, 1071 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 478 (M + H)⁺; Elemental Analysis Calcd for C₂₉H₃₉N₃O₃.HCl : C, 67.75; H, 7.84; N, 8.17. Found : C, 67.35; H, 7.91; N, 8.06.

1-[(2*E*)-2-Butenyl]-3-isobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (26)

The title compound was synthesized in 29% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using 2-butenylamine **9e** for **9a** and *N*-Boc-*dl*-leucine **10b** for **10a**. TLC *R_f* 0.32 (CHCl₃/MeOH, 20/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.44-7.35 (m, 2H), 7.22-7.14 (m, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.10-7.00 (m, 2H), 5.75-5.60 (m, 1H), 5.52-5.38 (m, 1H), 4.33 (s, 2H), 4.15-3.93 (m, 2H), 4.03 (dd, *J* = 7.8, 4.5 Hz, 1H), 3.88-3.66 (m, 2H), 3.55-3.42 (m, 2H), 2.52-2.35 (m, 2H), 2.28-2.08 (m, 2H), 1.90-1.57 (m, 3H), 1.65 (dd, *J* = 6.3, 1.5 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); IR (KBr) 2955, 2512, 1673, 1590, 1509, 1490, 1417, 1241 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 476 (M + H)⁺; Elemental Analysis Calcd for C₂₉H₃₇N₃O₃.HCl : C, 68.02; H, 7.48; N, 8.21. Found : C, 66.1; H, 7.51; N, 8.00.

1-(2-Butynyl)-3-isobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (27)

The title compound was synthesized in 23% yield according to the same procedures as described for

the preparation of **2** using 2-butynylamine hydrochloride **9f** for **9a** and *N*-Boc-*dl*-leucine **10b** for **10a**. An equivalent of triethylamine was added to the Ugi reaction mixture for desalting. TLC *R_f* 0.70 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (dd, *J* = 8.7, 7.2 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.09-7.00 (m, 4H), 4.33 (brs, 2H), 4.28-4.10 (m, 2H), 4.05 (dd, *J* = 7.8, 4.5 Hz, 1H), 3.86-3.70 (m, 2H), 3.56-3.43 (m, 2H), 2.59-2.40 (m, 2H), 2.34-2.15 (m, 2H), 1.89-1.57 (m, 6H), 0.94 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); IR (KBr) 3432, 2956, 1675, 1590, 1509, 1489, 1413, 1242, 1173 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 474 (M + H)⁺; HRMS Calcd 474.2757, Obsd 474.2753.

1-Benzyl-3-isobutyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione

Hydrochloride (28)

The title compound was synthesized in 50% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using benzylamine **9g** for **9a** and *N*-Boc-*dl*-leucine **10b** for **10a**. TLC *R_f* 0.66 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 7.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.45-7.12 (m, 8H), 7.10 - 6.98 (m, 4H), 4.82 (m, 2H), 4.29 (s, 2H), 4.18 (dd, *J* = 8.0, 4.6 Hz, 1H), 3.73 (m, 2H), 3.42 (m, 2H), 2.65 - 2.30 (m, 2H), 2.20-2.05 (m, 2H), 2.00 - 1.60 (m, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H); IR (KBr) 3405, 3194, 3063, 2954, 2871, 2661, 2508, 2462, 1681, 1614, 1589, 1511, 1488, 1470, 1455, 1412, 1361, 1331, 1307, 1240, 1200, 1176, 1155, 1130, 1069 cm⁻¹; MS (MALDI, Pos) *m/z* 512 (M + H)⁺; Elemental Analysis Calcd for C₃₂ H₃₇ N₃ O₃. Cl H : C, 70.12; H, 6.99; N, 7.67. Found : C, 69.64; H, 7.03; N, 7.63.

(3S)-1-Butyl-3-neopentyl-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione

Hydrochloride (29)

The title compound was synthesized in 51% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*dl*-*t*-butylalanine **10e** for **10a**. TLC *R_f* 0.52 (CHCl₃/MeOH, 20/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.04 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.01 (dd, *J* = 7.2, 3.3 Hz, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.50 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 2.38 (m, 2H), 2.24 (m, 2H), 2.00 (dd, *J* = 14.0, 3.3 Hz, 1H), 1.55 (dd, *J* = 14.0, 7.2 Hz, 1H), 1.50 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 0.99 (s, 9H), 0.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); IR (KBr) 2957, 2506, 1678, 1590, 1510, 1489, 1419, 1370, 1285, 1243, 1174, 1115 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 492 (M + H)⁺; HRMS Calcd 492.3226, Obsd 492.3226.

1-Butyl-9-(4-phenoxybenzyl)-3-propyl-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (30)

The title compound was synthesized in 52% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*dl*-norvaline **10f** for **10a**. TLC *R_f* 0.36 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H

NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.51 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (dd, J = 8.7, 7.5 Hz, 2H), 7.18 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.10-7.00 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.04 (dd, J = 5.7, 4.5 Hz, 1H), 3.93-3.66 (m, 2H), 3.55-3.31 (m, 4H), 2.47-2.09 (m, 4H), 1.92-1.68 (m, 2H), 1.61-1.21 (m, 6H), 1.01-0.90 (m, 6H); IR (KBr) 3436, 2958, 2872, 2550, 1673, 1590, 1509, 1489, 1419, 1243, 1172, 1071, 954, 873, 787, 693 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) m/z 464 (M + H)⁺; HRMS Calcd 464.2913, Obsd 464.2915.

1-Butyl-3-(cyclopentylmethyl)-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (31)

The title compound was synthesized in 53% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-cyclopentyl-*dl*-alanine **10g** for **10a**. TLC R_f 0.66 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.18 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.05 (m, 4H), 4.34 (s, 2H), 4.00 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.82 (m, 2H), 3.49 (m, 2H), 3.39 (m, 2H), 2.37 (m, 2H), 2.17 (m, 2H), 1.96 (m, 1H), 1.81 (m, 4H), 1.58 (m, 6H), 1.38 (m, 2H), 1.17 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.0 Hz, 3H); IR (KBr) 3433, 3199, 2953, 2870, 2499, 1681, 1589, 1510, 1488, 1419, 1373, 1336, 1240, 1199, 1174, 1114, 1070, 1049 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) m/z 504 (M + H)⁺; HRMS Calcd 504.3226, Obsd 504.3231.

1-Butyl-3-(methoxymethyl)-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (32)

The title compound was synthesized in 59% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*O*-methyl-*dl*-serine **10h** for **10a**. TLC R_f 0.48 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.51 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (dd, J = 8.7, 7.2 Hz, 2H), 7.17 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.09-6.99 (m, 4H), 4.30 (s, 2H), 4.07 (t, J = 3.0 Hz, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.77 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 3.67 (m, 1H), 3.58-3.39 (m, 4H), 3.31 (s, 3H), 3.26 (m, 1H), 2.48-2.13 (m, 4H), 1.65 (m, 1H), 1.53-1.28 (m, 3H), 0.95 (t, J = 7.5 Hz, 3H); IR (KBr) 3424, 2931, 2551, 1662, 1590, 1509, 1489, 1423, 1371, 1242, 1198, 1116, 1075 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) m/z 466 (M + H)⁺; Elemental Analysis Calcd for C₂₇ H₃₅ N₃ O₄. Cl H : C, 64.59; H, 7.23; N, 8.37. Found : C, 63.45; H, 7.12; N, 8.21.

Benzyl [1-butyl-2,5-dioxo-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-3-yl]acetate Hydrochloride (34)

The title compound was synthesized in 36% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*dl*-aspartic acid β -benzyl ester **10i** for **10a**. TLC R_f 0.74 (CHCl₃/MeOH, 9/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.52 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.33 (m, 5H), 7.18 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.05 (m, 4H), 5.12 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 4.31 (m, 1H), 3.88 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.50-3.35 (m, 4H), 3.08 (dd, J = 17.7, 4.8 Hz, 1H), 2.86 (dd, J = 17.7,

3.0 Hz, 1H), 2.34 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 0.94 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); IR (KBr) 3735, 3412, 1736, 1675, 1489, 1423, 1242, 1175 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 570 ($M + H$)⁺; HRMS Calcd 570.2968, Obsd 570.297.

1-Butyl-3-(3-cyclohexylpropyl)-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (35)

The title compound was synthesized in 39% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using *N*-Boc-*dl*-cyclohexylethylalanine **10j** for **10a**. TLC R_f 0.76 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.53-7.49 (m, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.10-7.02 (m, 4H), 4.32 (s, 2H), 4.04 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.56-3.40 (m, 3H), 3.35 (m, 1H), 2.48-2.12 (m, 4H), 1.86-1.10 (m, 19H), 0.95 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 0.95 (m, 2H); IR (KBr) 2923, 2564, 1679, 1591, 1510, 1490, 1245, 1172 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 546 ($M + H$)⁺; HRMS Calcd 546.3696, Obsd 546.3703.

9-Benzyl-1-butyl-3-isobutyl-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (36)

The title compound was synthesized in 59% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using using *N*-Boc-*dl*-leucine **10b** for **10a** and benzaldehyde for 4-phenoxybenzaldehyde. TLC R_f 0.54 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.64-7.44 (m, 5H), 4.36 (s, 2H), 4.01 (dd, $J = 7.8, 4.8$ Hz, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.55-3.35 (m, 4H), 2.60-2.30 (m, 2H), 2.17 (m, 2H), 1.95-1.75 (m, 1H), 1.75-1.60 (m, 2H), 1.60-1.45 (m, 2H), 1.45-1.20 (m, 2H), 1.10-0.80 (m, 9H); IR (KBr) 3435, 3230, 2957, 2871, 2505, 2454, 1680, 1647, 1459, 1413, 1370, 1326, 1147 cm^{-1} ; MS (MALDI, Pos) m/z 386 ($M + H$)⁺, 91; Elemental Analysis Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$: C, 65.46; H, 8.6; N, 9.96. Found: C, 65.09; H, 8.63; N, 9.88.

1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-(4-methoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (37)

The title compound was synthesized in 59% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using 4-methoxybenzaldehyde for 4-phenoxybenzaldehyde. TLC R_f 0.63 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 7.47 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.29 (s, 2H), 4.04 (dd, $J = 7.6, 4.8$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.74 (m, 2H), 3.55-3.35 (m, 4H), 2.41 (m, 2H), 2.15 (m, 2H), 1.85-1.55 (m, 7H), 1.55-1.42 (m, 3H), 1.42-1.30 (m, 3H), 1.30-1.10 (m, 2H), 1.08-0.80 (m, 5H); IR (KBr) 3436, 3221, 2926, 2851, 2666, 2560, 2362, 1672, 1613, 1585, 1517, 1448, 1419, 1373, 1305, 1255, 1182, 1031 cm^{-1} ; MS (FAB, Pos) m/z 456 ($M + H$)⁺, 121; Elemental Analysis Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$: C, 62.47; H, 8.74; N, 8.09. Found: C, 62.59; H, 8.35; N, 7.90.

1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[(6-phenoxy-pyridin-3-yl)methyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Dihydrochloride (42)

The title compound was synthesized in 15% yield according to the same procedures as described for **2** using 6-phenoxy-nicotinaldehyde for 4-phenoxybenzaldehyde. TLC *R_f* 0.67 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.31 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.39 (s, 2H), 4.04 (dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, 1H), 3.90-3.76 (m, 2H), 3.52-3.38 (m, 4H), 2.58-2.36 (m, 2H), 2.25-2.11 (m, 2H), 1.80-1.42 (m, 10H), 1.42-1.17 (m, 5H), 1.05-0.85 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3449, 2926, 2564, 1671, 1479, 1260, 1200 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 519 (M + H)⁺; HRMS Calcd 519.3335, Obsd 519.3337.

1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[(3,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Dihydrochloride (44)

The title compound was synthesized in 33% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using 3,5-dimethyl-1-phenylpyrazole-4-carboxaldehyde for 4-phenoxybenzaldehyde. TLC *R_f* 0.35 (CHCl₃/MeOH, 20/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.63-7.48 (m, 5H), 4.33 (s, 2H), 4.05 (dd, *J* = 7.8, 4.5 Hz, 1H), 3.95-3.74 (m, 2H), 3.67-3.56 (m, 2H), 3.48 (m, 2H), 2.72-2.58 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.30-2.07 (m, 2H), 1.84-1.10 (m, 15 H), 1.02-0.92 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3426, 2926, 1670, 1421 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 520 (M + H)⁺; HRMS Calcd 520.3652, Obsd 520.3651.

1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[(2-phenyl-1H-imidazol-4-yl)methyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Dihydrochloride (45)

The title compound was synthesized in 77% yield according to the same procedures as described for the preparation of **2** using 2-phenyl-1H-imidazole-4-carboxaldehyde for 4-phenoxybenzaldehyde. TLC *R_f* 0.25 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 8.04-7.92 (m, 3H), 7.74-7.62 (m, 3H), 4.58 (s, 2H), 4.05 (dd, *J* = 7.4, 4.8 Hz, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.65 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 2.68 (m, 2H), 2.19 (m, 2H), 1.90-1.60 (m, 6H), 1.60-1.45 (m, 3H), 1.45-1.30 (m, 3H), 1.30-1.10 (m, 3H), 1.10-0.80 (m, 5H); IR (KBr) 3410, 2927, 2854, 2699, 2574, 1781, 1671, 1644, 1554, 1448, 1421, 1373, 1349, 1308, 1257, 1178, 1096, 1052, 1001 cm⁻¹; MS (FAB, Pos) *m/z* 492 (M + H)⁺, 336; Elemental Analysis Calcd for C₂₉H₄₁N₅O₂·2HCl : C, 61.69; H, 7.68; N, 12.4. Found : C, 55.71; H, 7.32; N, 10.71.

1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[(2-phenyl-1,3-thiazol-4-yl)methyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (47)

The title compound was synthesized in 51% yield according to the same procedures as described for

the preparation of **2** using 2-phenyl-1,3-thiazole-4-carboxaldehyde for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC *R_f* 0.62 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.03-8.00 (m, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.52-7.49 (m, 3H), 4.54 (s, 2H), 4.04 (dd, *J* = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 4.04-3.87 (m, 2H), 3.70-3.58 (m, 2H), 3.51-3.39 (m, 2H), 2.58-2.38 (m, 2H), 2.26-2.13 (m, 2H), 1.7 8-1.43 (m, 9H), 1.40-1.15 (m, 6H), 1.10-0.90 (m, 5H); IR (KBr) 3426, 3298, 3190, 3128, 3086, 2991, 2955, 2927, 2854, 2653, 2512, 2452, 1678, 1645, 1481, 1462, 1450, 1415, 1371, 1351, 1336, 1314, 1146, 1003 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 509 (M + H)⁺; HRMS Calcd 509.295, Obsd 509.295.

[1-Butyl-2,5-dioxo-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-3-yl]acetic acid Hydrochloride (33)

To a stirred solution of the compound **34** (173 mg, 0.303 mmol) in MeOH (5 ml) was added 2M NaOH (2 ml). After being stirred for 3 h at room temperature, the reaction mixture was acidified with 2M HCl and then extracted with AcOEt. The organic layer was washed with water, brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated in vacuo. The resulting residue was triturated with Et₂O to yield the title compound (127 mg, 56%) as a white powder. TLC *R_f* 0.51 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 20/4/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.55-7.53 (m, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.20-7.15 (m, 1H), 7.07-7.02 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.27 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.96-3.90 (m, 1H), 3.72-3.66 (m, 1H), 3.54-3.38 (m, 4H), 2.97 (dd, *J* = 18.0, 4.8 Hz, 1H), 2.79 (dd, *J* = 18.0, 4.8 Hz, 1H), 2.50-2.36 (m, 3H), 2.27-2.16 (m, 1H), 1.62-1.48 (m, 2H), 1.41-1.30 (m, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3485, 3214, 2960, 2717, 2579, 1664, 1589, 1419, 1241, 1076, 1051, 1005 cm⁻¹; MS (APCI, Neg) *m/z* 478 (M-H)⁻; HRMS Calcd 480.2498, Obsd 480.2499.

Benzyl 1-butyl-3-(cyclohexylmethyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (40)

To a suspension of the rink-isonitrile resin **7** (0.75 mmol/g, 10.0 g, 7.5 mmol) resin in THF/MeOH (1/1, 200 mL) were added *N*-benzyloxycarbonyl-4-piperidone **8c** (5.24 g, 22.5 mmol), *n*-butylamine **9a** (2.22 ml, 22.5 mmol) and *N*-Boc-*dl*-cyclohexylalanine **10a** (6.50 g, 22.5 mmol). The mixture was shaken for 16 h at 65 °C. After cooling to room temperature, the resin was collected by filtration and successively washed with THF (80 ml x 3), MeOH (80 mL x 3) and then CH₂Cl₂ (80 mL x 3). The resin was added 50% trifluoroacetic in CH₂Cl₂ (100 ml) and the mixture was shaken for 30 min at room temperature. The resin was collected by filtration and successively washed with CH₂Cl₂ (70 mL x 4) and toluene (100 mL). The resin was suspended in 1.25 M acetic acid in toluene (100 mL). The suspension was shaken for 18 h at 90 °C. After cooling to room temperature, the resin was collected by filtration and washed with CHCl₃/MeOH (1/1, 100 mL x 3). The combined filtrate and washings were evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel with a gradient of CHCl₃/MeOH (40 /1) to afford the title

compound (209 mg, 5.9% yield) as a white powder. TLC *R_f* 0.46 (CHCl₃/MeOH, 20/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.29 (m, 5H), 5.98 (brs, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.14 (brs, 2H), 4.00 (m, 1H), 3.65 (brs, 1H), 3.43 (brs, 1H), 3.26 (m, 2H), 2.03-1.81 (m, 4H), 1.80-1.60 (m, 5H), 1.60-1.10 (m, 10H), 1.10-0.85 (m, 5H); IR (KBr) 3449, 2925, 2852, 1675, 1418, 1352, 1281, 1239, 1179, 1153, 1105, 1018 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 470 (M + H)⁺.

1-Butyl-3-isobutyl-9-(6-phenylhexyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (41)

The Rink-isonitrile resin (0.45 mmol/g, 500 mg, 0.225 mmol) was washed with THF/MeOH (1/1) (4 mL x 2). To a suspension of the resin in THF/MeOH (1/1) (4 mL) were successively added 1-(6-phenylhexyl)-4-piperidone **8d** (292 mg, 1.125 mmol), *n*-butylamine **9a** (82 mg, 1.125 mmol), and *N*-Boc-*dl*-leucine **10b** (260 mg, 1.125 mmol). The mixture was shaken for 16 h at 65 °C. After cooling to room temperature, the mixture was filtered. The collected resin was washed with THF/MeOH (1/1) (4 mL x 3), and CH₂Cl₂ (4 mL x 3). The resin was then added 25 % TFA in CH₂Cl₂ (4 mL) at 0 °C. The mixture was allowed up to room temperature, and then stirred for 30 min. After filtration, the resin was washed with CH₂Cl₂ (4 mL x 3), toluene (4 mL x 3), and 1.25 M acetic acid in toluene (4 mL). The suspension of the resin in 1.25 M acetic acid in toluene was agitated for 24 h at 90 °C. After cooling to room temperature, the mixture was filtered. The resin was washed with CHCl₃/MeOH (1/1) (4 mL x 2). The filtrate and washings were concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography over silica gel with a gradient of AcOEt/MeOH from 1/0 to 10/1 to give the title compound (35% yields) as a white powder. TLC *R_f* 0.62 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 7.30-7.06 (m, 5H), 4.02 (dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 3.70 (m, 2H), 3.56 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.46 (m, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.95-1.50 (m, 9H), 1.50-1.25 (m, 6H), 0.97 (m, 9H); IR (KBr) 3447, 3199, 2934, 2869, 2663, 2502, 2440, 1673, 1455, 1418, 1372, 1329, 1152, 1086, 1003 cm⁻¹; MS (MALDI, Pos) *m/z* 456 (M + H)⁺; Elemental Analysis Calcd for C₂₈H₄₅N₃O₂·HCl·0.4H₂O : C, 67.35; H, 9.45; N, 8.41. Found : C, 67.67; H, 9.39; N, 8.42.

A typical procedure for the solution phase Ugi four-component condensation

(3S)-9-Benzyl-1-butyl-3-cyclohexylmethyl-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (64a)

To a stirred solution of 1-benzyl-4-piperidone **8b** (49 g, 260 mmol), *n*-butylamine **9a** (19 g, 260 mmol) and *N*-Boc-*L*-cyclohexylalanine **10k** (80 g, 260 mmol) in MeOH (1.3 L) was added 2-(4-morpholinyl)-ethylisonitrile **15** (36 g, 260 mmol). After being stirred at 55 °C overnight, the reaction mixture was treated with conc HCl (260 L) with cooling. The reaction mixture was stirred

at 55 °C for another 2 h, evaporated, treated with Na₂CO₃ and extracted with AcOEt. The combined organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄) and evaporated to give deprotected Ugi product as a yellow oil, which was dissolved in AcOH/toluene (1.25 M, 1.3 L) and stirred at 80 °C for 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with AcOEt and washed twice with a small amount of water. The organic layer was washed with aqueous NaHCO₃, brine, dried (Na₂SO₄) and evaporated to afford *N*-benzylpiperidinodiketopiperazine **63a** as an oil (91.3 g). This compound was used to next step without further purification. Debenzylation was carried out by the catalytic hydrogenation of hydrogen under an atmospheric pressure of the resulting oily product **63a** (91.3 g, 210 mmol) in EtOH (1.2 L) in the presence of 20% Pd(OH)₂/C (15 g) for 3 h at 50 °C. The catalyst was removed by filtration through a pad of Celite. The filtrate was treated with 4N HCl in AcOEt (130 mL) and evaporated. The resulting powder was washed with *t*-butyl methyl ether to afford **64a** as a white powder (70 g, 89% yield in four steps). $[\alpha]_D^{18} - 37.5^\circ$ (C 1.04, MeOH); TLC *R*_f 0.08 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 9/1/0.1); ¹H NMR (CD₃OD) δ 4.05 (dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 3.84-3.68 (m, 2H), 3.46-3.34 (m, 4H), 2.40-2.04 (m, 4H), 1.83-1.46 (m, 10H), 1.39 (sextet, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.33-1.15 (m, 3H), 1.05-0.86 (m, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

(3*RS*)-9-Benzyl-1-butyl-3-cyclohexylmethyl-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (64b)

Compound **64b** was prepared from *N*-Boc-*dl*-cyclohexylalanine **10a** according to the same procedure as described for the preparation of **64a**.

TLC *R*_f 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃aq., 9/1/0.1); ¹H NMR (CD₃OD) δ 4.05 (dd, *J* = 7.5, 4.8 Hz, 1H), 3.81-3.70 (m, 2H), 3.42-3.36 (m, 4H), 2.40-2.07 (m, 4H), 1.80-1.17 (m, 15H), 1.03-0.92 (m, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

General procedure for the preparation of

1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione 9-*N*-aryl analogs

(3*S*)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[(6-phenylpyridin-3-yl)methyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Dihydrochloride (43)

To a stirred solution of **64a** (100 mg, 0.27 mol), 4-(3-pyridyl)benzaldehyde (59 mg, 0.32 mmol) and 1 drop of acetic acid in DMF (2 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (114 mg, 0.54 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/MeOH from 1/0 to 10 /1) and treated with 4N HCl in AcOEt (2 mL) to give the title compound in 50% yield. TLC *R*_f 0.50 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 9.14 (m, 1H), 8.75 (m, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.02-7.99 (m, 2H), 7.68-7.62 (m, 3H), 4.63 (s, 2H), 4.05 (dd, *J* = 7.5, 4.5 Hz, 1H), 4.02-3.94 (m, 2H),

3.64-3.42 (m, 4H), 2.72-2.56 (m, 2H), 2.25-2.06 (m, 2H), 1.80-1.10 (m, 15H), 1.00-0.86 (m, 5H); IR (KBr) 3408, 3017, 2925, 2852, 2648, 2494, 2426, 1681, 1666, 1636, 1605, 1452, 1427, 1387, 1374, 1347, 1331, 1314, 1276 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 503 ($M + H$)⁺; HRMS Calcd 503.3386, Obsd 503.3394.

(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[(5-methyl-2-phenyl-1,3-oxazol-4-yl)methyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (46)

The title compound was synthesized in 76% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 5-methyl-2-phenyl-1,3-oxazole-4-carboxaldehyde for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC R_f 0.48 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.04-8.00 (m, 2H), 7.51-7.49 (m, 3H), 4.34 (s, 2H), 4.04 (dd, $J = 7.8, 4.8$ Hz, 1H), 3.98-3.82 (m, 2H), 3.70-3.60 (m, 2H), 3.44-3.38 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.50-2.36 (m, 2H), 2.28-2.12 (m, 2H), 1.80-1.12 (m, 15H), 1.00-0.86 (m, 5H); IR (KBr) 3407, 3182, 3131, 3084, 2956, 2926, 2855, 2658, 2554, 2443, 1681, 1664, 1652, 1559, 1485, 1471, 1450, 1413, 1372, 1337, 1313, 1287, 1146, 1096, 1082, 1068, 1050 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 507 ($M + H$)⁺; Elemental Analysis Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$: C, 66.34; H, 7.98; N, 10.32. Found: C, 66.06; H, 8.17; N, 10.05.

(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[4-(phenylsulfanyl)benzyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (48)

The title compound was synthesized in 49% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-phenylsulfanyl-benzaldehyde for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC R_f 0.74 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.50-7.37 (m, 7H), 7.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.31 (s, 2H), 4.03 (dd, $J = 7.5, 7.8$ Hz, 1H), 3.84-3.70 (m, 2H), 3.50-3.32 (m, 4H), 2.56-2.38 (m, 2H), 2.24-2.05 (m, 2H), 1.81-1.06 (m, 15H), 1.02-0.84 (m, 5H); IR (KBr) 3425, 3207, 3073, 2957, 2924, 2872, 2850, 2656, 2549, 2436, 1679, 1647, 1601, 1582, 1494, 1472, 1445, 1419, 1373, 1340, 1333, 1312, 1288, 1270, 1146, 1116, 1096, 1081, 1049 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 534 ($M + H$)⁺; HRMS Calcd 534.3154, Obsd 534.3159.

(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[4-(phenylsulfonyl)benzyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (49)

The title compound was synthesized in 57% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(benzenesulphonyl)benzaldehyde for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC R_f 0.77 (AcOEt/MeOH , 9/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.02-7.96 (m, 2H), 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.70-7.55 (m, 3H), 4.43 (s, 2H), 4.02 (dd, $J = 7.8, 4.8$ Hz, 1H), 3.89-3.73 (m, 2H), 3.49-3.34 (m, 4H), 2.48-2.33 (m, 2H), 2.23-2.04 (m, 2H), 1.82-1.14 (m, 15H), 1.03-0.85 (m, 5H); IR (KBr) 3362, 3202, 3065, 2925, 2851, 2516, 2420, 1672, 1476, 1469, 1447,

1416, 1372, 1346, 1309, 1156, 1106, 1071 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 566 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; HRMS Calcd 566.3053, Obsd 566.3055.

(3S)-9-(4-Benzoylbenzyl)-1-butyl-3-(cyclohexylmethyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (50)

The title compound was synthesized in 43% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-benzoylbenzaldehyde **66** for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC R_f 0.68 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.82-7.74 (m, 4H), 7.67 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.57-7.51 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.04 (dd, $J = 7.8, 4.8$ Hz, 1H), 3.84-3.78 (m, 2H), 3.58-3.38 (m, 4H), 2.58-2.40 (m, 2H), 2.30-2.10 (m, 2H), 1.82-1.14 (m, 15H), 1.02-0.86 (m, 5H); IR (KBr) 3434, 3370, 3209, 3061, 2925, 2851, 2659, 2517, 2422, 1660, 1612, 1598, 1577, 1469, 1447, 1418, 1372, 1347, 1317, 1278, 1179, 1148, 1115, 1097, 1074 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 530 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; HRMS Calcd 530.3383, Obsd 530.3375.

4-[[(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl]methyl]-N-phenylbenzamide Hydrochloride (51)

The title compound was synthesized in 38% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(phenylcarbamoyl)benzaldehyde for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC R_f 0.25 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.73-7.67 (m, 2H), 7.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.05 (dd, $J = 7.8, 4.8$ Hz, 1H), 3.92-3.72 (m, 2H), 3.58-3.36 (m, 4H), 2.50-2.08 (m, 4H), 1.84-1.08 (m, 15H), 0.96 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H), 0.96 (m, 2H); IR (KBr) 3362, 3250, 3061, 2925, 2851, 2662, 2552, 2424, 1669, 1599, 1575, 1540, 1509, 1498, 1493, 1469, 1442, 1420, 1372, 1321, 1261, 1147, 1113, 1098, 1076 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 545 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; HRMS Calcd 545.3492, Obsd 545.3499.

(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[4-(4-fluorophenoxy)benzyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (52)

The title compound was synthesized in 87% yield according to the same manner as described for the preparation of **43** using 4-(4-fluorophenoxy)benzaldehyde for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC R_f 0.53 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 20/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.18-7.00 (m, 6H), 4.33 (s, 2H), 4.04 (dd, $J = 7.5, 4.5$ Hz, 1H), 3.87-3.69 (m, 2H), 3.55-3.32 (m, 4H), 2.52-2.32 (m, 2H), 2.28-2.08 (m, 2H), 1.83-1.12 (m, 15H), 1.06-0.83 (m, 2H), 0.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); IR (KBr) 3432, 3194, 3134, 3071, 2923, 2852, 2656, 2553, 2426, 1678, 1655, 1648, 1614, 1498, 1473, 1446, 1420, 1375, 1332, 1314, 1250, 1214, 1192, 1173, 1146 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 536 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; HRMS Calcd 536.3288, Obsd 536.3287.

(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[4-(4-methylphenoxy)benzyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (53)

The title compound was synthesized in 58% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(4-methylphenoxy)benzaldehyde for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC *R_f* 0.71 (AcOEt); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.04 (dd, *J* = 7.5, 4.5 Hz, 1H), 3.87-3.69 (m, 2H), 3.55-3.42 (m, 2H), 3.42-3.34 (m, 2H), 2.49-2.30 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.30-2.08 (m, 2H), 1.82-1.10 (m, 15H), 1.05-0.85 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3368, 3206, 3066, 3033, 2925, 2851, 2661, 2514, 2427, 1670, 1657, 1604, 1502, 1478, 1467, 1449, 1420, 1366, 1347, 1331, 1315, 1243, 1210, 1172, 1113, 1101 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 532 (M + H)⁺; HRMS Calcd 532.3539, Obsd 532.3541.

(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[4-(4-methoxyphenoxy)benzyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (54)

The title compound was synthesized in 70% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(4-methoxyphenoxy)benzaldehyde **67** for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC *R_f* 0.67 (AcOEt); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.02-6.92 (m, 6H), 4.31 (s, 2H), 4.03 (dd, *J* = 7.5, 4.5 Hz, 1H), 3.86-3.69 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.54-3.30 (m, 4H), 2.50-2.30 (m, 2H), 2.28-2.06 (m, 2H), 1.83-1.10 (m, 15H), 1.05-0.83 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3417, 3204, 3069, 2925, 2851, 2656, 2496, 2426, 1681, 1615, 1500, 1475, 1464, 1447, 1420, 1374, 1345, 1315, 1300, 1230, 1199, 1173, 1113, 1098, 1035 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 548 (M + H)⁺; HRMS Calcd 548.3488, Obsd 548.3481.

(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[4-(4-hydroxyphenoxy)benzyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (55)

The title compound was synthesized in 45% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(4-hydroxyphenoxy)benzaldehyde **68** for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC *R_f* 0.54 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.30 (s, 2H), 4.03 (dd, *J* = 7.5, 4.5 Hz, 1H), 3.83-3.72 (m, 2H), 3.49-3.34 (m, 4H), 2.38 (m, 2H), 2.23-2.10 (m, 2H), 1.78-1.16 (m, 15H), 1.02-0.92 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3363, 3199, 2924, 2851, 2670, 2566, 1674, 1638, 1503, 1468, 1448, 1420, 1373, 1346, 1315, 1227, 1196, 1172 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 534 (M + H)⁺; HRMS Calcd 534.3332, Obsd 534.3333.

4-(4-[(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl]methyl}phenoxy)-N-methylbenzamide Hydrochloride (56)

The title compound was synthesized in 68% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(4-*N*-methylaminocarbonylphenoxy)benzaldehyde **71** for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC *R_f* 0.25 (AcOEt/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.05 (dd, *J* = 7.5, 4.5 Hz, 1H), 3.90-3.68 (m, 2H), 3.58-3.36 (m, 4H), 2.92 (s, 3H), 2.58-2.36 (m, 2H), 2.28-2.06 (m, 2H), 1.84-1.10 (m, 15H), 1.06-0.84 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3263, 2927, 2547, 1674, 1600, 1499, 1417, 1314, 1245, 1175, 1112, 1049, 1006 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 575 (M + H)⁺; Elemental Analysis Calcd for C₃₄H₄₆N₄O₄.HCl : C, 66.81; H, 7.75; N, 9.17. Found : C, 64.8; H, 7.98; N, 8.92.

***N*-[4-(4-[(3*S*)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy)phenyl]methanesulfonamide Hydrochloride (**57**)**

The title compound was synthesized in 47% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(4-methansulfonylaminophenoxy)benzaldehyde **74** for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC *R_f* 0.42 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.08-7.00 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.03 (dd, *J* = 7.5, 4.8 Hz, 1H), 3.85-3.72 (m, 2H), 3.54-3.36 (m, 4H), 2.95 (s, 3H), 2.48-2.34 (m, 2H), 2.25-2.08 (m, 2H), 1.80-1.14 (m, 15H), 0.98-0.88 (m, 5H); IR (KBr) 3361, 3237, 3108, 3057, 2925, 2851, 2663, 2580, 1677, 1632, 1502, 1477, 1449, 1420, 1402, 1389, 1330, 1302, 1276, 1254, 1248, 1218, 1171, 1150, 1109 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 611 (M + H)⁺; HRMS Calcd. 611.3267, Obsd 611.3267.

4-(4-[(3*S*)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy)benzenesulfonamide Hydrochloride (58**)**

The title compound was synthesized in 40% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(4-aminosulfonylphenoxy)benzaldehyde **76** for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. TLC *R_f* 0.33 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ (300 MHz,) 11.03 (brs, 1H), 8.42 (brs, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.33 (brs, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 4.38-4.23 (m, 2H), 3.91 (m, 1H), 3.61-3.23 (m, 6H), 2.58-2.30 (m, 2H), 2.18-1.91 (m, 2H), 1.76-1.00 (m, 15H), 0.98-0.71 (m, 5H); MS (APCI, Pos) *m/z* (APCI, Pos) 597 (M + H)⁺.

4-(4-[(3*S*)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy)benzoic acid Hydrochloride (59**)**

The title compound was synthesized in 60% yield according to the same procedures as described for the preparation of **43** using 4-(4-formylphenoxy)benzoic acid **70** for 4-(3-pyridyl)benzaldehyde. [α]_D²⁵ – 27.7 ° (C 1.03, MeOH); TLC *R_f* 0.37 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ

8.03 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.04 (dd, $J = 7.5, 4.5$ Hz, 1H), 3.90-3.70 (m, 2H), 3.56-3.35 (m, 4H), 2.59-2.38 (m, 2H), 2.27-2.05 (m, 2H), 1.83-1.08 (m, 15H), 1.05-0.83 (m, 2H), 0.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); IR (KBr) 2925, 1673, 1598, 1502, 1417, 1243, 1160 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 562 ($M + H$)⁺; Elemental Analysis Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$: C, 66.26; H, 7.41; N, 7.02. Found: C, 64.8; H, 7.64; N, 6.98.

(3S)-1-Butyl-3-(cyclohexylmethyl)-9-[2-(4-phenoxyphenyl)ethyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione Hydrochloride (38)

A solution of 4-phenoxyphenethyl alcohol **77** (214 mg, 1 mmol) in pyridine/ CH_2Cl_2 (1/1, 4 mL) was added to chlorosulfonated polystyrene resin (305 mg, 0.5 mmol). The mixture was shaken for 5 h at room temperature. The resin was collected by filtration and successively washed with CH_2Cl_2 (4 mL), DMF (4 mL), DMF/ H_2O (3/1, 4 mL), THF (4 mL), CH_2Cl_2 (4 mL) and CH_3CN (4 mL). To a suspension of the resin in MeCN (5 mL) were added *N,N*-diisopropylamine (271 mg, 2.1 mmol) and then compound **64a** (112 mg, 0.3 mmol). The mixture was shaken for 18 h at 70 °C. After cooling to room temperature, the resin was collected by filtration and washed with MeCN. The combined filtrate and washings were evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel AcOEt/MeOH (from 1/0 to 10/1). The resulting residue after evaporation was treated with 4N HCl in AcOEt (2 mL) and then washed with Et_2O to afford **38** (81 mg, 48% yield) as a powder. TLC R_f 0.54 (AcOEt/MeOH, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.37-7.29 (m, 4H), 7.11(t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.97-6.95 (m, 4H), 4.06 (dd, $J = 7.5, 4.5$ Hz, 1H), 3.88-3.77 (m, 2H), 3.65 (m, 2H), 3.46-3.36 (m, 4H), 3.13-3.07 (m, 2H), 2.48 (m, 2H), 2.28-2.14 (m, 2H), 1.80-1.21(m, 15H), 0.98 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.99-0.91 (m, 2H); IR (KBr) 3364, 3195, 3065, 2924, 2851, 2661, 2525, 2421, 1671, 1589, 1508, 1489, 1470, 1449, 1418, 1373, 1347, 1333, 1317, 1238, 1200, 1169, 1148, 1073 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos) m/z 532 ($M + H$)⁺; HRMS Calcd 532.3539, Obsd 532.3536.

Ethyl 4-[1-butyl-3-(cyclohexylmethyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl]benzoate Hydrochloride (39)

To a solution of compound **64b** (186 mg, 0.501 mmol) in MeCN (2.5 mL) were added ethyl 4-fluorobenzoate (164 mg, 0.975 mmol) and then K_2CO_3 (141 mg, 1.02 mmol). After being stirred for 12 h at 100 °C, the reaction mixture was diluted with DMSO (0.5 mL). Stirring was continued for another 12 h at 140 °C. The reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with H_2O and extracted with *t*-butyl methyl ether. The combined organic layers were washed with brine, dried (MgSO_4) and evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/AcOEt, from 4/1 to 3/1). The resulting residue after evaporation was treated with 4N HCl in AcOEt (2 mL) and washed with *t*-butyl methyl ether to afford the title compound **39** (67

mg, 26% yield). TLC *R*_f 0.27 (hexane/AcOEt, 2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.31-4.15 (m, 2H), 4.07 (dd, *J* = 7.5, 4.5 Hz, 1H), 3.85-3.75 (m, 2H), 3.47-3.38 (m, 2H), 2.67-2.50 (m, 2H), 2.30-2.12 (m, 2H), 1.85-1.46 (m, 10H), 1.44-1.19 (m, 5H), 1.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.05-0.88 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3214, 3085, 2959, 2927, 2851, 2630, 2463, 2401, 1726, 1675, 1658, 1608, 1469, 1459, 1448, 1417, 1407, 1374, 1315, 1307, 1277, 1188, 1177, 1146, 1109, 1020, 1006 cm⁻¹; MS (APCI, Pos) *m/z* 484 (M + H)⁺; HRMS Calcd 484.3175, Obsd 484.317.

2-Butynylphthalimide (**61**)

To a solution of 2-butynylalcohol **60** (5.0 g, 71.3 mmol) in triethylamine (14.9 mL 107 mmol) and CH₂Cl₂ (210 mL) was slowly added methanesulfonylchloride (6.1 mL, 78.5 mmol) at 0 °C under Argon atmosphere. After being stirred for 1 h, the reaction mixture was quenched with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with 1N HCl, saturated NaHCO₃ aq and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated. To a stirred solution of the resulting residue in DMF (80 mL) was added potassium phthalimide (11.4 g, 61.5 mmol). After being stirred for 1.5 h at 70 °C, the reaction mixture was poured to water (400 mL) and extracted with AcOEt. Precipitated solid was filtered and washed with diethylether. The filtrate was extracted with AcOEt, and the organic layer was washed with 1N NaOH and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated. The resulting solid was triturated with diethylether. The total resulting solid was dried in vacuo to yield **61** (10.4 g, 73 % in 2 steps). TLC *R*_f 0.56 (hexane/AcOEt, 2/1); ¹H NMR (200 MHz, d₆-DMSO) δ 7.90-7.77 (m, 4H), 4.30 (q, *J* = 2.4 Hz, 2H), 1.74 (t, *J* = 2.4 Hz, 3H).

2-Butynylamine Hydrochloride (**9f**)

To a stirred suspension of **61** (10.3 g, 51.7 mmol) in EtOH (600 mL) was added hydrazine hydrate (7.6 mL, 155 mmol). After being stirred for 1.5 h at 100 °C, the mixture was cooled to room temperature, added concentrated HCl (25 mL) and evaporated. The resulting residue was basified with 5N NaOH and extracted with CH₂Cl₂ repeatedly. The organic layer was washed with small amounts of brine and dried over Na₂SO₄. After the addition of 4N HCl/AcOEt (20 mL), the solution was evaporated. The resulting solid was washed with diethylether to yield **9f** (5.25 g, 96%). TLC *R*_f 0.23 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 20/4/1); ¹H NMR (200 MHz, d₆-DMSO) δ 8.70-8.15 (br, 3H), 3.62 (br, 2H), 1.83 (t, *J* = 2.4 Hz, 3H).

4-Benzoylbenzaldehyde (**66**)

To a stirred solution of 4-benzoylbenzencarboxylic acid **65** (590 mg, 2.61 mmol) in triethylamine (0.44 mL, 3.13 mmol) and THF (7 mL) was added *i*-butylchloroformate (0.40 mL, 3.13 mmol) at -78 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, triethylamine hydrochloride salt was

removed by filtration. The filtrate was added a suspension of sodium borohydride (296 mg, 7.83 mmol) in water at 0 °C. After stirred for overnight at room temperature, the mixture was concentrated. The resulting residue was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The resulting residue was dissolved in DME (20 mL) and then MnO₂ (682 mg, 7.84 mmol) was added. After being stirred at 100 °C for overnight, additional MnO₂ (2.02 g, 23.2 mmol) was added to the solution. The suspension was stirred at 110 °C for 4 hours, and then cooled to room temperature. MnO₂ was removed by filtration through a celite pad, and filtrate was evaporated. The resulting residue was purified on silica gel to yield **66** (277 mg, 51%). TLC *R*_f 0.35 (hexane/ AcOH, 4/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 10.14 (s, 1H), 7.94-7.92 (m, 2H), 7.83-7.80 (m, 2H), 7.67-7.61 (m, 1H), 7.54-7.49 (m, 2H).

4-(4-Hydroxyphenoxy)benzaldehyde (**68**)

To a stirred solution of **67** (3.69 g, 16.1 mmol) in CH₂Cl₂ (80 mL) was slowly added 1.0 M boron tribromide/CH₂Cl₂ solution (1.0M, 35 mL, 0.35 mmol) at 0 °C. After being stirred for 2 hours, water was added and extracted with diethylether. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography to yield the title compound **68** (3.06 g, 86%). TLC *R*_f 0.28 (hexane/AcOEt, 2/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.90 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 5.47 (brs, 1H). MS (APCI, Pos) 257 (M+H)⁺.

4-(4-Formylphenoxy)benzoic acid (**70**)

A stirred mixture of methyl-4-hydroxybenzoate **69** (25.2 g, 16.5 mmol), 4-fluorobenzaldehyde (18.6 g, 14.9 mmol) and K₂CO₃ in DMF (150 mL) was refluxed for 2 hours. After being cooled to room temperature, water was added and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO₄ and evaporated. The resulting solid was triturated with *n*-hexane and dried to yield the methylester (27.8 g, 72%). To a stirred solution of methylester in methanol (400 mL) was added 2N NaOH (108 mL, 54 mmol). After being stirred for 2 hours at 50 °C, the mixture was cooled to room temperature, and 2N HCl (110 mL) and water (200mL) were added. The precipitating solid was filtered and dried to yield **70** (23.4 g, 89%). TLC *R*_f 0.20 (hexane/AcOEt, 1/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.98 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H).

4-(4-*N*-Methylaminocarbonylphenoxy)benzaldehyde (**71**)

To a stirred solution of compound **70** (9.8 g, 40.5 mmol) in DMF (135 mL) were added HOBt (6.56 g, 48.6mmol), EDC hydrochloride (9.32 g, 48.6 mmol) and methylamine THF solution (2.0 M, 41

mL, 81 mmol). After being stirred for 1 and half hour, the mixture was poured into water (500 mL), acidified by 2N HCl (10 mL) and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ aq. and brine, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting solid was triturated with *t*-butylmethylether to yield **71** (9.23 g, 89%). TLC *R*_f 0.55 (CHCl₃/MeOH = 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.95 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.13-7.10 (m, 4H), 3.03 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H); MS (APCI, Pos) 256 (M+H)⁺.

4-(4-Methanesulfonylaminophenoxy)benzaldehyde (74)

Methyl-4-(4-methanesulfonylaminophenoxy)benzoate (73)

A suspension of **72** (25.5 g, 93.5 mmol) and 5% Pd-C (1.3 g) in AcOEt (300 mL) was stirred for overnight under hydrogen atmosphere. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite and the filtrate was concentrated in vacuo. To a solution of the resulting residue in THF (300 mL) and pyridine (22.4 mL, 277 mmol) was added methanesulfonylchloride (10.7 mL, 139 mmol) at 0 °C. After being stirred for overnight at room temperature, water was added to the mixture and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The resulting solid was triturated with *t*-buthylmethylether to yield **73** (29.0 g, 98%). TLC *R*_f 0.5 (hexane/AcOEt, 1/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.04 (s, 3H).

4-(4-Methanesulfonylaminophenoxy)benzaldehyde (74)

To a stirred solution of **73** (29 g, 90.3 mmol) in THF (300 mL) was added diisobutylaluminium hydride/*n*-hexane solution (1.0 M, 270 mL, 270 mmol) at 0 °C. After being stirred for 2 hours, additional diisobutylaluminium hydride (1.0 M, 90 mL, 90 mmol) was added to the reaction mixture and stirred for 20 minutes at 0 °C. The reaction mixture was quenched with saturated Na₂SO₄ and the precipitated solid was removed by filtration. The filtrate was evaporated and the resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ (150 mL) and DME (150 mL). MnO₂ (40 g, 482 mmol) was added to the mixture and the mixture was stirred for overnight at room temperature. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite and the filtrate was concentrated in vacuo to yield **74** (26.0 g, 99%). TLC *R*_f 0.46 (hexane/AcOEt); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.92 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.10-7.05 (m, 4H), 3.05 (s, 3H).

4-(4-Aminosulfonylphenoxy)benzaldehyde (76)

A stirred suspension of **75** (4.33 g, 25 mmol), 4-fluorobenzaldehyde (2.68 mL, 25 mmol) and K₂CO₃ (6.9 g, 50 mmol) in DMA (20 mL) was refluxed for 2 hours. After being cooled to room temperature, the mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The resulting solid was

recrystallized from AcOEt/hexane to yield the title compound **76** (1.22 g, 18%). TLC *R_f* (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 9.93 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H); MS (APCI, Neg) 276 (M-H)⁻.

Biology

Stability study of liver microsomes

-Reaction and sampling

5 µL of the test substance (10 mmol/L in DMSO) was diluted with 195 µL of 50% acetonitrile in water to make a 250 µmol/L solution of the test substance.

Phosphate buffer (0.1 mol/L, 245 µL) containing 0.2 mg/ml or 0.5 mg/mL rat liver microsomes and NADPH-Co-factor^{*} was added to a reaction container, pre-warmed to 37°C in a water bath, and incubated for 5 min. The reaction was initiated by the addition of 5 µL of the test substance solution (in 0.975% acetonitrile with 0.05% DMSO, final concentration of 5 µmol/L). A 20- µL aliquot was taken from the mixture immediately after the start of the reaction, and transferred to 180 µL of acetonitrile containing the internal standard (warfarin) to terminate the reaction. A 20-µL aliquot of the mixture was stirred with 180 µL of 50% acetonitrile on a plate with a filter for deproteinization, and filtered by suction. The filtrate was used as the standard sample.

After a 15-min incubation of the above mixture, a 20-µL aliquot was transferred to 180 µL of acetonitrile containing the internal standard (warfarin) to terminate the reaction. A 20-µL aliquot of the mixture was stirred with 180 µL of 50% acetonitrile on a plate with a filter for deproteinization, and filter by suction. The filtrate was used as the reaction sample.

* NADPH-Co-factor: Dilute solutions A and B in the NADPH-regenerating system (BD-Bioscience) 20-and 100-fold, respectively, with 0.1 mol/L phosphate buffer (NADP⁺ 2.6 mmol/L).

-Determination of test substance concentrations and data processing

1 µL aliquot was injected into an LC-MS/MS system. The percent residue (%) is calculated by dividing the peak area ratio (i.e., test substance/I.S.) for the reaction sample by the peak area ratio for the standard sample and multiplying by 100.

Primary screening of solubility

The test substance (10 mmol/L DMSO) was diluted with acetonitrile. Acetonitrile containing the internal standard (warfarin) was added to prepare samples for calibration curves at 0.1, 0.4 and 2 µmol/L.

5 µL of the test substance (10 mmol/L DMSO) was added to 495 µL of JP Solution 2. The solution was stirred at room temperature for 5 h, and transferred onto a filter plate, and filtered by centrifugation at 3000 rpm, 24°C for 15 min. 20 µL of the filtrate was added with acetonitrile, and acetonitrile containing the internal standard was added to prepare a sample solution.

1 μL of the sample solution was injected into an LC-MS/MS system for quantification (range: 0.1 to 2 $\mu\text{mol/L}$). The solubility was determined as 50 times the observed value. The solubility was reported as $<5 \mu\text{mol/L}$ or $100 \mu\text{mol/L}$ if the observed value is outside the range.

Caco-2 membrane permeability assay

Caco-2 cells were grown on a 12-well Costar Transwell plate (with a collagen-coated fine porous polycarbonate membrane) until a confluent monolayer is formed. Buffer for permeability assay was prepared using 10 mM HEPES and Hank's balanced salt solution containing 15 mM glucose with the pH being adjusted at 7.3 to 7.5. A test substance solution was prepared at 10 mM the assay buffer. The test substance solution was added to the apical side of Caco-2 cell monolayer at a final concentration of 10 μM , and then the plate was incubated in a humidified incubator (5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$). Two hours later, 200- and 50 μL aliquots were taken from the receiver chambers. The measurements should be performed in duplicate. Test substance concentrations in the samples were determined by LC/MS/MS.

The apparent permeability coefficient (P_{app}) is calculated according to the following equation:

$$P_{\text{app}} = (\text{dCr}/\text{dt}) \times V_r / (A \times C_0)$$

dCr/dt: slope of compound accumulation in the receiver compartment over time ($\mu\text{M/s}$)

V_r : volume of the receiver compartment (cm^3)

A : area of the cell monolayer (1.13 cm^2 for 12-well Transwell plate)

C_0 : initial normality of the buffer (μM)

Pharmacokinetic (PK) studies

Single dose pharmacokinetics was studied in rats. Formulation for intravenous injection was prepared using SWI (sterile water for injection) containing 30% HP- β -CD (w/v). Formulation for oral dosing was prepared using SWI containing 1% sucrose fatty acid ester (w/v). Test compounds (3 mg/kg) were dosed intravenously to the fasted male rats ($n=3$). Test compounds (30 mg/kg) were dosed orally to the fasted male rats ($n=3$). After dosing, blood samples (250 μL) were collected from the jugular vein using a heparinized syringe at the selected time points (iv: pre-dosing, 2, 5, 15 and 30 min; po: 1, 2, 4, 6 and 8 h, respectively). The blood samples were ice-chilled and then centrifuged at 12,000 rpm for 2 min at room temperature to obtain plasma, which was preserved at $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ in a freezer. The AUC, C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$, V_{ss} and CL were obtained by measuring the time course of the plasma concentration of the test compounds. Bioavailability(BA) was calculated according to the following equation:

$$\text{BA} (\%) = (\text{AUC}_{\text{po/Dpo}} / \text{AUC}_{\text{iv/Div}}) \times 100$$

3-6. 参考文献

1. Domling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168.
2. Kalfutkar, A. S.; Gardner, I.; Obach, R. S.; Shaffer, C. L.; Callegari, E.; Henne, K. R.; Mutlib, A. E.; Dalvie, D. K.; Lee, J. S.; Nakai, Y.; O'Donnell, J. P.; Boer, J.; Harriman, S. P. *Current Drug Metabolism*, **2005**, *6*, 161.

3-7. 本章に関連する投稿論文

- i) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Hirai, K.; Habashita, H.; Takaoka, Y.; Tada, H.; Sagawa, K.; Shibayama, S.; Maeda, K.; Mitsuya, H.; Nakai, H.; Fukushima, D.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 763.
 - ii) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Hirai, K.; Habashita, H.; Takaoka, Y.; Tada, H.; Sagawa, K.; Shibayama, S.; Maeda, K.; Mitsuya, H.; Nakai, H.; Fukushima, D.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5208.
-

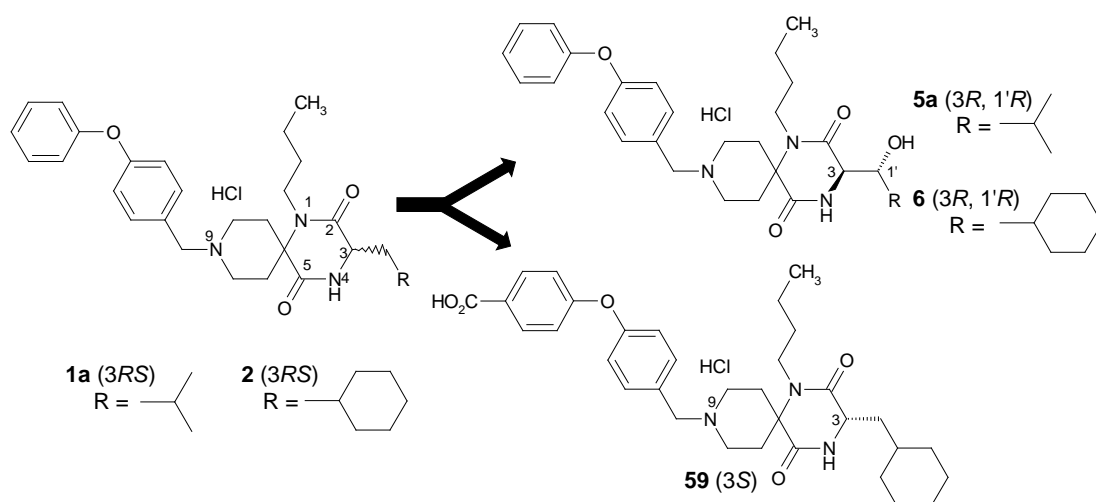
第 4 章

最適化による経口 **CCR5** 阻害剤の創出

4-1. 序論

第2章ではリード化合物の活性代謝物の情報を参考として1'位へ水酸基の導入がCCR5阻害活性、抗HIV活性の向上につながることを、さらに第3章では代謝ブロックを意識した構造変換、及び脂溶性低下を目指した極性官能基の導入など種々の構造変換より9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位への*N*-メチルアミノカルボニル基やカルボキシ基といった親水性置換基の導入が経口吸収性の改善につながることを見出してきた。そこでさらに活性が強く、経口吸収性の良好な医薬品候補化合物を見出すため、1'位に水酸基を導入した化合物**5a**、**6**を出発点とし、これまでの情報を統合した側鎖置換基の最適化合成を行うこととした(**Figure 4.1**)。

Figure 4.1 Lead compounds of CCR5 antagonists



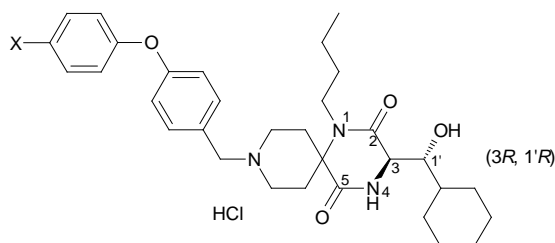
第3章で示したように、経口吸収性の改善には分子の脂溶性を低下させることが有効であったことから、オクタノール-水分配係数の予測計算値ClogPを脂溶性の指標として用い、よりClogP値の低い化合物の創製を試みた。また、これまでの合成展開において、CCR5阻害活性と抗HIV活性が相関しないことがあり、これは一般にも報告されていることではあるが¹、より強力な抗HIV阻害活性をもった化合物創製のため、第2章、第3章で示したCaアッセイ系での阻害活性評価に加え、新たにFusion阻害活性を構造活性相関の指標に加えることとした。Fusion阻害活性とはHIVのエンベロープタンパクを発現させたエフェクター細胞とその受容体となるCD4及びコレセプターであるCCR5を共発現させたターゲット細胞との細胞間融合を化合物がどれだけ阻害するかを測定する系であり、エフェクター細胞中に発現させた転写活性化因子がターゲット細胞中のプロモーターに結合することで、その下流のルシフェラーゼが発現し、基質の発光を検出する。ここに化合物を共存させることで、細胞間の融合をどれだけ阻害するかを複数の濃度で検証し、50%抑制する濃度をIC₅₀値として算出した²。抗HIV活性については第3章と同様に、ヒト末梢血リンパ球(PBM)を用い、

化合物及びウイルス共存下 7 日間インキュベートした後、ウイルスの構造タンパク質である p24 抗体量を、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 法で測定することで、ウイルスの増殖量を推定するアッセイ系を用いた。また、化合物の代謝酵素に対する安定性に関しては、化合物を肝ミクロソーム中で 15 分間インキュベートした時の残存率を指標として化合物の代謝酵素に対する安定性を推定した。さらに本章では代謝の種差を予測するため、ラット及びヒトの肝ミクロソームを用いて安定性の評価を行った。

4-2. 化合物の最適化

リード化合物 **2** の 1'位へ水酸基を導入し、CCR5 阻害活性、抗 HIV 活性の向上した化合物 **6** から構造最適化を開始するにあたり、まず第 3 章で示した 9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位への親水性置換基の導入を検討し、ClogP 値を指標として脂溶性の低下を図った。Table 4.1 に示したように、より脂溶性の低いメトキシ基、ヒドロキシ基、アミノカルボニル基、*N*-メチルアミノカルボニル基、アミノスルホニル基、メチルスルホニル基、メタンスルホニルアミノ基、カルボキシ基を導入した化合物 **78-85a** を合成したところ、いずれの化合物においても、この部位に置換基を持たない化合物 **6** とほぼ同等の CCR5 阻害活性、Fusion 阻害活性を維持していた。このように、化合物 **6** においても 9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位への極性官能基の導入は活性面で有効であることがわかった。極性官能基導入による脂溶性の低下は薬としてふさわしい性質、ドラッグライクネスの改善につながると考えられることから、化合物 **79**、**80**、**84**、**85a** について、ラット及びヒト肝ミクロソーム中で 15 分間インキュベートした後の残存率の評価を行った。ヒドロキシ基を導入した化合物 **79**、アミノカルボニル基を導入した化合物 **80**、メタンスルホニルアミノ基を導入した化合物 **84** ではラット肝ミクロソーム(rat liver microsome : RLM)中の安定性は大きく変化しなかったものの、ヒト肝ミクロソーム(human liver microsome : HLM)中の安定性は悪化していた。唯一カルボキシ基を導入した化合物 **85a** はラット、ヒト何れにおいても代謝安定性の改善が認められた。この化合物 **85a** は Table 4.1 に示した化合物のうち脂溶性が最も低い化合物であり、この部位の代謝ブロックだけでなく、カルボキシ基導入によって分子全体の脂溶性の低下が代謝改善につながったのではないかと考えられる。

Table 4.1 Effect of the *p*-substituent X on the activity profiles



Compound	X	Ca assay	Fusion assay	% Remaining ^a	
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	HLM / RLM	ClogP ^b
6	H	53	7.8	6 / 18	6.45
78	OMe	91	7.1	NT/NT ^c	6.37
79	OH	68	2.8	3.5 / 23	5.78
80	CONH ₂	39	NT ^c	1.5 / 19	4.96
81	CONHMe	38	7.4	NT/NT ^c	5.17
82	SO ₂ NH ₂	48	3.5	NT/NT ^c	4.61
83	SO ₂ Me	34	NT ^c	NT/NT ^c	4.81
84	NHSO ₂ Me	26	1.4	1.8 / 91	5.26
85a	CO ₂ H	34	5.6	36 / 39	3.92

^a The data show the remaining % 15 min after incubating with the 0.5 mg/mL liver microsomes.

^b Calculated by CLOGP 5.1 (Daylight Chemical Information Systems Inc.)

^c NT : Not tested

次にこの化合物 **85a** について更なる動態改善のため、1'位のシクロヘキシル基の変換を行った(**Table 4.2**)。シクロヘキシル基をイソプロピル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘプチル基、テトラヒドロピラン-4-イル基、シス-4-ヒドロキシシクロヘキシル基、トランス-4-ヒドロキシシクロヘキシル基へと変換した化合物 **86-91**、**92a-b** を合成し、CCR5 阻害活性、Fusion 活性を評価した。イソプロピル誘導体 **86** は Ca アッセイでは同等の活性を示したものの、Fusion 阻害活性は減弱した。シクロプロピル誘導体 **87** は Ca アッセイにおいて 2.4 倍活性が低下し、Fusion アッセイにおいては大きく活性が減弱した。シクロブチル誘導体 **88** はより強い CCR5 阻害活性を示したが、Fusion 阻害活性は大きく低下した。化合物 **85a** と同程度の ClogP 値を有するシクロペンチル誘導体 **89**、シクロヘプチル誘導体 **90** は活性についてもほぼ同程度の活性を維持していた。一方でテトラヒドロピラン-4-イル誘導体 **91** は脂溶性の低下に伴い、活性も低下傾向にあった。4-ヒドロキシシクロヘキシル誘導体についてはトランス体 **92b** がシス体 **92a** より強く、化合物 **85a**、とほぼ同等の CCR5 阻害活性を示すことは興味深い結果であったが、Fusion 阻害活性はいずれの化合物においても減弱していた。

化合物 **86-90**、**92a-b** について、肝ミクロソーム中の代謝安定性について評価したところ、

代謝安定性は多かれ少なかれ、環構造の拡大、すなわち脂溶性の増大に伴って不安定になる傾向が認められた。低脂溶性の化合物 **92a-b** では代謝安定性が大きく改善していたものの、CCR5 阻害活性、Fusion 阻害活性は低下し、活性面ではこの部位への極性官能基の導入は許容されず、比較的脂溶性の高い置換基が好まれることが示唆されてきた。

Table 4.2 Further chemical modification of the cyclohexyl residue of **85a** (3*R*, 1'*R*)

Compound	R	Ca assay IC ₅₀ (nM)	Fusion assay IC ₅₀ (nM)	% Remaining ^a HLM / RLM	ClogP ^b
86		48	229	98 / 100	2.73
87		81	ca.10000	89 / 100	2.25
88		25	66	95 / 100	2.80
89		33	13	93 / 100	3.36
90		32	5.2	34 / 59	4.48
91		120	302	NT ^c	1.52
92a(cis) 92b (trans)		140 23	537 129	100 / 100 100 / 92	1.84 1.84
85a		34	5.6	36 / 39	3.92

^a The data show the remaining % 15 min after incubating with the 0.5 mg/mL liver microsomes.

^b Calculated by CLOGP 5.1 (Daylight Chemical Information Systems Inc.)

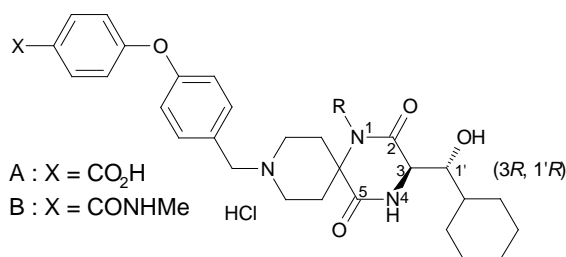
^c NT : Not tested.

さらにもう一つの脂溶性側鎖である 1-*N*-*n*-ブチル基の変換を行った。この部位の変換は 9-*N*-フェノキシベンジル基末端のパラ位にカルボキシ基を有する化合物 **85a**、及び *N*-メチルアミノカルボニル基を有する化合物 **81** を用いて行った。*N*-メチルアミノカルボニル基は保

護、脱保護の操作が必要なく、カルボン酸誘導体とほぼ同等の活性を有することから合成上有利であった。結果を **Table 4.3** に示す。第 3 章で示したように、1-*N*-アルキル側鎖には直鎖状の置換基が分岐アルキル基より好ましいことが示唆されていたことから、1-*N*-メチル誘導体 **93-94**、1-*N*-エチル誘導体 **95-96**、1-*N-n*-プロピル誘導体 **97-98** を脂溶性を下げる目的で合成した。いずれの化合物においても、Ca アッセイでは *n*-ブチル誘導体とほぼ同等の活性を示したが、Fusion アッセイにおいては、*n*-プロピル(C3)、エチル(C2)、メチル(C1)と炭素鎖の短縮に伴って活性が低下した。そこで次にこのアルキル側鎖を *n*-ペンチル(C5)、*n*-ヘキシル(C6)、*n*-ヘプチル(C7)、と伸長した化合物 **99**、**100**、**101** を合成したところ、*n*-ペンチル誘導体 **99** では同等の活性が維持されたものの、*n*-ヘキシル誘導体 **100**、*n*-ヘプチル誘導体 **101** では CCR5 阻害活性、Fusion 阻害活性共に低下が認められた。このことから、この部位には C4 もしくは C5 の長さの置換基が好まれることが示唆されてきた。また水酸基を導入した化合物 **102** は Ca アッセイにおいて 4.7 倍の活性低下が認められ、Fusion 阻害活性も減弱した。塩基性の誘導体として *n*-プロピル基に 2-アミノエチル基を導入した化合物 **104**、及び 2-*N,N*ジメチルアミノエチル基を導入した化合物 **105** においては CCR5 阻害活性、Fusion 阻害活性共に大きく低下した。メトキシエチル誘導体 **103** は Ca アッセイにおいては *n*-ブチル誘導体 **81** とほぼ同等の活性を示したが、Fusion アッセイにおいては活性が減弱した。これらの化合物 **102-105** の結果より、この部位への極性官能基導入は活性の低下につながることを示唆されてきた。そこでアルキル基の代謝をブロックする目的で 2,2,2-トリフルオロエチル誘導体 **106**、及び 2,2,3,3,3-ペンタフルオロプロピル誘導体 **107** を合成した。化合物 **106** はエチル誘導体 **95** と比較し、Ca アッセイでは 2.3 倍、Fusion アッセイでは 3.8 倍の活性低下が認められた。また化合物 **107** においても無置換の *n*-プロピル誘導体 **98** と比較すると CCR5 阻害活性の大きな低下が認められた。

以上のように、1-*N* 位の側鎖への極性官能基導入は活性の低下につながることから、この部位には、活性の面から C4 もしくは C5 の長さの無置換のアルキル基がふさわしく、さらに血中動態等の評価に進めるにはより脂溶性の低い、C4 の *n*-ブチル基がもっともふさわしい置換基であると考えた。

Table 4.3 Effect of the 1-*N*-substituent on the activity profiles



Compound	X	R	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	Fusion assay IC ₅₀ (nM)	ClogP ^a
93	A	*	50	ca.10000	2.34
94	B	*	59	1862	3.45
95	A	*	23	295	2.86
96	B	*	20	178	4.11
97	A	*	30	112	3.39
98	B	*	28	21	4.64
85a	A	*	34	5.6	3.92
81	B	*	38	7.4	5.17
99	B	*	68	3.9	5.70
100	B	*	110	35	6.23
101	B	*	190	316	6.76
102	B	*	180	ca.10000	3.55
103	B	*	33	98	3.86
104	B	*	750	NT ^b	3.18
105	B	*	640	NT ^b	4.05
106	B	*	46	1148	4.24
107	B	*	270	NT ^b	5.26

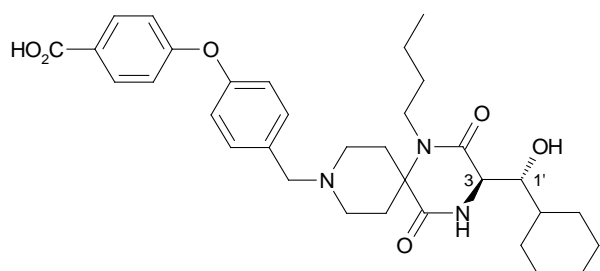
^a Calculated by CLOGP 5.1 (Daylight Chemical Information Systems Inc.)

^b NT : Not tested.

これまでに **Table 4.1-4.3** で示した 9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基、1'-シクロヘキシル基、1-*N*-*n*-ブチル基の変換より、活性、およびラット・ヒトの肝ミクロソーム中における代謝安定性のバランスの取れていた化合物 **85a** について、3 位、1'位の立体化学の異なる **85b-d** を合成し、活性の評価を行った(**Table 4.4**)。Ca アッセイにおいては、**85a** (3*R*, 1'*R*)、**85b** (3*R*, 1'*S*)、**85d** (3*S*, 1'*S*) はほぼ同等の阻害活性を示し、**85c** (3*S*, 1'*R*) だけが 10 倍近く弱い活性を示した。すなわち、1'位に *R* の立体配置を持つ **85a**、**85c** に関しては(3*R*)の **85a** が(3*S*)の **85c** より

強い活性を示し、1'位に *S* の立体配置を持つ化合物に関しては(3*R*)の **85b**、(3*S*)の **85d** ともに同等の活性を示した。一方で Fusion アッセイにおいては、**85a** (3*R*, 1'*R*)がその他の立体異性体より 100 倍近く強い活性を示すことが明らかになった。このような Ca アッセイ(CCR5 阻害活性)と Fusion アッセイ(膜融合阻害活性)との非相関は二つのアッセイ系の違いで説明できると考えている。Ca アッセイは生体内リガンド(MIP-1 α)と CCR5 強制発現させた CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を用いて実施しているのに対し、Fusion アッセイは HIV の膜タンパクを発現したエフェクター細胞と CD4 及び CCR5 を発現したターゲット細胞を用いて阻害活性を測定している。これらの化合物の活性をより正確に見積もるためには、実際にウィルスを用いた複製阻害を見積もるアッセイ系、抗 HIV 活性の測定が必要と考えられる。

Table 4.4 Activity profiles of all the stereoisomers **85a-d**



Compound	Configuration	Ca Assay IC ₅₀ (nM)	Fusion assay IC ₅₀ (nM)
85a	(3 <i>R</i> , 1' <i>R</i>)	34	5.6
85b	(3 <i>R</i> , 1' <i>S</i>)	44	182
85c	(3 <i>S</i> , 1' <i>R</i>)	470	380
85d	(3 <i>S</i> , 1' <i>S</i>)	51	447

4-3. 経口吸収性

4-3 章で示した最適化合成の結果、活性が保持され、さらに予備的にカセット投与を用いた経口吸収性の評価結果が比較的良好であった **85a**、**81**、**84**、**86**、**97** について、ラットに経口投与、及び静脈内投与した場合の血中パラメーターの測定を行った。比較のため化合物 **1a**、**2**、**59** の結果についても合わせて **Table 4.5** に示した。**Table 4.5** に示した化合物の中では、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位にカルボキシ基を持つ **85a** が経口投与後の AUC (Area Under the Curve)が 3422 ng h/mL、最大化合物濃度 C_{max} が 2360 ng/mL と最も高い値を示していた。リード化合物 **1a**、**2** と比較し、化合物 **85a** の AUC の飛躍的な改善は静脈内投与後のクリアランス(CL)、分布容積(V_{ss})の低下が大きく影響していると考えられる。*N*-メチルアミド体の化合物 **81** についてもリード化合物 **1a**、**2** と比較して、AUC、 C_{max} の改善が認められていたが、スルホンアミド体の化合物 **84** においては血中動態パラメータ

一の改善は認められなかった。9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位にカルボキシ基を持つ化合物では、1'位がイソプロピル基の化合物 **86** は ClogP 値が 2.73 と **85a** の 3.92 より低いことから、血中動態の改善が期待されたが、AUC は 150 ng h/mL、 C_{max} は 137 ng/mL と **85a** よりかなり低い値を示していた。また 1-*N*位が *n*-プロピル基の化合物 **97** においても、この 1-*N* 位は代謝部位の一つと考えられ、少しでも脂溶性の低下が血中動態の改善に影響を与えることを期待したが、*n*-ブチル基の化合物 **81** と比較し、より低い AUC、 C_{max} を示すことが明らかになった。以上の結果より、1'位にシクロヘキシル基、1-*N* 位に *n*-ブチル基、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位にカルボキシ基を持つ **85a** 及び *N*-メチルアミド基を持つ化合物 **81** が経口活性の期待できる CCR5 阻害剤であることが示唆されてきた。

Table 4.5. Pharmacokinetic evaluations of **1a**, **2**, **59**, **85a**, **81**, **84**, **86** and **97** in rats

Compound	R1	R2	R3	R4	10 mg/kg, po				3 mg/kg, iv			
					C_{max}	$T_{1/2}$	AUC	BA	AUC	$T_{1/2}$	CL	V_{ss}
					ng/mL	min	ng h/mL	%	ng h/mL	min	mL/min/kg	mL/kg
1a	H	CH ₃	H (3 <i>RS</i>)	<i>i</i> -Pr	33.3 ^a	75.7	96.7 ^a	1.3	372	13	137	2349
2	H	CH ₃	H (3 <i>RS</i>)	<i>c</i> -Hex	5.6 ^a	103	24.8 ^a	1.9	400	19.9	113	2542
59	CO ₂ H	CH ₃	H (3 <i>S</i>)	<i>c</i> -Hex	2400	48.4	10532	34	3091	11.1	16	145
85a	CO ₂ H	CH ₃	OH (3 <i>R</i> , 1' <i>R</i>)	<i>c</i> -Hex	2360	120	3422	23	4402	21.6	11.3	132
81	CONHMe	CH ₃	OH (3 <i>R</i> , 1' <i>R</i>)	<i>c</i> -Hex	333 ^a	73.2	1296 ^a	10	3782	27.6	12.8	492
84	NHSO ₂ Me	CH ₃	OH (3 <i>R</i> , 1' <i>R</i>)	<i>c</i> -Hex	50 ^a	205	242 ^a	5	1545	137	25	3826
86	CO ₂ H	CH ₃	OH (3 <i>R</i> , 1' <i>R</i>)	<i>i</i> -Pr	137	270	150	5.9	2307	13.2	21.2	317
97	CO ₂ H	H	OH (3 <i>R</i> , 1' <i>R</i>)	<i>c</i> -Hex	133 ^a	120	513 ^a	11.2	1373	43.2	35.9	1725

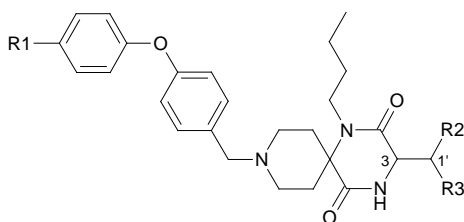
^a PK values after oral dosing are normalized to 10 mg/kg.

4-4. 抗 HIV 活性

1'位に水酸基を持つ誘導体では 9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位がカルボキシ基の **85a**、また 1'位がイソプロピル基、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位にカルボキシ基を持つ化合物 **86** について CCR5 指向性のウィルス株を用いて測定した抗 HIV 活性を **Table 4.6** に示した。比較のため、1'位に水酸基を持たないリード化合物 **1a**、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位にカルボキシ基を持つ化合物 **59**、及び既知の CCR5 阻害剤である TAK-779、SCH-351125、さらに既存の逆転写酵素阻害剤 Zidovudine、HIV-1 のプロテアーゼ阻害剤である Nefinavir についても同じアッセイ系で評価した結果を **Table 4.6** に示した。化合物 **85a** は化合物 **1a**、**59**、**86** と比較し、ウィルスの p24 抗体の産生を著しく減少させ、非常に強い抗 HIV 活性を示した。この結果より、1'位の水酸基及びシクロ

ヘキシル基が抗 HIV 活性に強く寄与していることが伺えてきた。さらに経口吸収性も良好であった化合物 **85a** は多剤耐性ウイルス株を用いた抗 HIV 活性も非常に強く、薬剤耐性株出現のため既存の逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤が無効である場合にも有効であると考えられる。

Table 4.6 Anti-HIV activity of **1a**, **59**, **85a** and **86**



Compound d	R1	R2 (configuration)	R3	Anti-HIV-1 activity ^a		
				HIV-1Ba-L (R5)		HIV-1MM (R5MDR) ^b
				IC ₅₀ ± SD(nM)	IC ₉₀ (nM) ± SD	IC ₅₀ (nM) ± SD
1a	H	H (3-RS)	i-Pr	160 ± 40	ND ^c	ND ^c
59	CO ₂ H	H (3-S)	c-Hex	39 ± 38	171 ± 146	ND ^c
85a	CO ₂ H	OH (3R, 1'R)	c-Hex	0.4 ± 0.3	12 ± 10	0.6 ± 0.2
86	CO ₂ H	OH (3R, 1'R)	i-Pr	59 ± 39	591 ± 211	ND ^c
TAK-779^d				28 ± 32	256 ± 169	14 ± 8.0
SCH-351125^e				4.0 ± 2.0	79 ± 52	3.0 ± 0.5
Zidovudine^f				7.0 ± 4.0	48 ± 21	250 ± 98
Nelfinavir^g				12 ± 8.0	105 ± 48	>1000

^a IC₅₀ values are based on the inhibition of HIV p24 antigen expression in PBMC.

^b R5MDR means R5 tropic multi drug resistant strains.

^c ND : Not determined.

^d TAK-779 is a CCR2 and CCR5 dual antagonist reported from TAKEDA Pharmaceutical Co., Ltd.

^e SCH-351125 is a CCR5 antagonist reported from Schering-Plough Co.

^f Zidovudine is a reverse transcriptase inhibitor.

^g Nelfinavir is a HIV-1 protease inhibitor.

4-5. 有望化合物 **85a** のプロファイル

非常に強い抗 HIV 活性、さらに良好な経口吸収性を示す化合物 **85a** について、更なるプロファイルの確認を行った(**Table 4.7**)。その結果、この化合物は Ca アッセイだけでなく、hMIP-1α の CCR5 への結合を阻害すること、またケモカインである hMIP-1α の細胞遊走作用をも阻害する作用を持っており、AIDS 治療薬としての作用に加え、各種免疫抑制剤としての可能性も期待できることが示唆されてきた。また、この化合物 **85a** は HIV-1 のもう一つのコレセプターである CXCR4 に対しては全く作用しないことから、CCR5 を介して抗 HIV-1 活性を発現していることは明確である。

Table 4.7 Activity profiles of **85a**

Compound	hCCR5 / hMIP-1 α			hCXCR4 / hSDF-1
	IC ₅₀ (nM)			IC ₅₀ (nM)
	Ca assay	binding	Chemotaxis	Ca assay
85a	34	5.8	5.8	>30,000

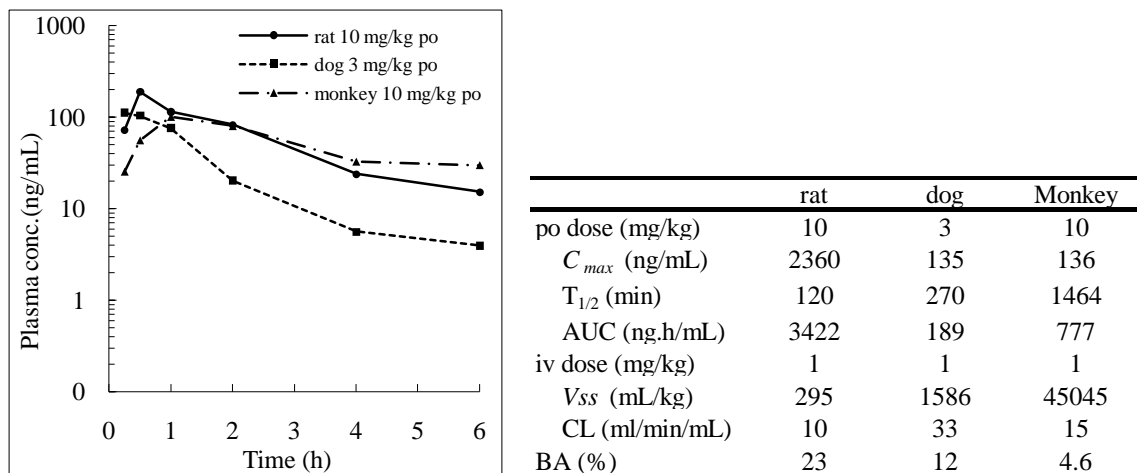
さらに化合物 **85a** が示す動物間の活性種差について検討した結果を **Table 4.8** に示した。ヒトの CCR5 発現細胞を用いた Ca アッセイでは強い阻害活性を示していたが、ハムスター、モルモット、ラット、ウサギが持つ CCR5 を強制発現させた細胞では化合物濃度が 30 μ M という高濃度においても CCR5 阻害活性は示さず、化合物 **85a** の CCR5 阻害活性がヒト選択的であることが明らかになった。

Table 4.8 Species difference of **85a**

Compound	CCR5 / hRANTES Ca assay IC ₅₀ (nM)				
	human	hamster	Guinea pig	rat	rabbit
85a	46	>30,000	>30,000	>30,000	>30,000

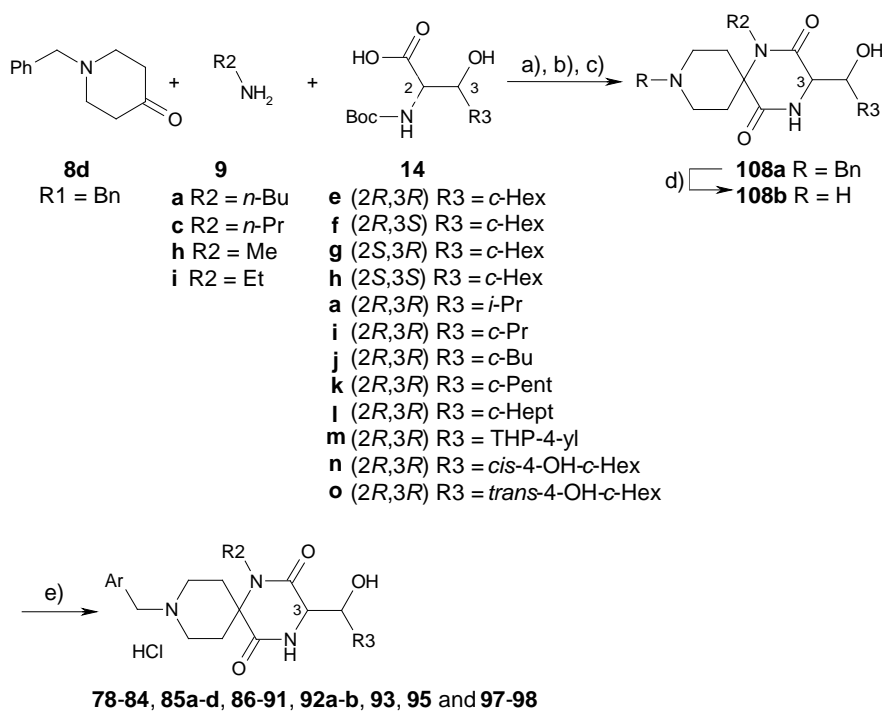
最後に、化合物 **85a** の大動物での経口吸収性について検討した。ラット、イヌ、サルにおける経口投与及び静脈内投与後の血中パラメーターを **Figure 4.2** に示した。経口吸収性の指標となる生物学的利用率 (BA) はラットでは 22.5%であったが、イヌ、サルではそれぞれ 12%、4.6%であった。この BA は決して高い値ではないが、一般的に抗 HIV 薬が薬効を示すためには薬剤を投与後、抗 HIV 活性の IC₉₀ 値を上回る血中濃度を長時間維持することが重要とされている。化合物 **85a** は非常に強い抗 HIV 活性を持っており、今回試験したラット、イヌ、サルの全ての動物種においても、抗 HIV 活性の IC₉₀ 値を上回る血中濃度を長時間維持していたことから、臨床においても治療効果を発揮できることが期待される化合物である。

Figure 4.2 Plasma concentration and pharmacokinetics data of **85a** after po administration



4-6. 合成

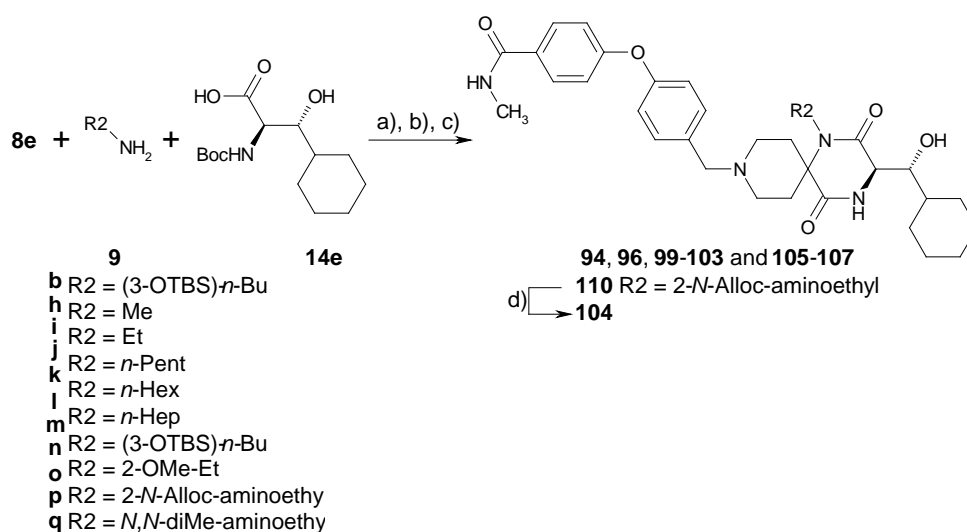
化合物 **78-84**、**85a-d**、**86-91**、**92a-b**、**93**、**95** 及び **97-98** については 1-*N*-ベンジルピペリドン **8d**、対応する 1 級アミン **9**、ヒドロキシアミノ酸 **14** を用い、第 2 章、第 3 章と同様に Ugi 反応³を用いて合成した (Scheme 4.1)。



Scheme 4.1 Synthesis of spirodiketopiperazines **78-84**, **85a-d**, **86-91**, **92a-b**, **93**, **95** and **97-98**

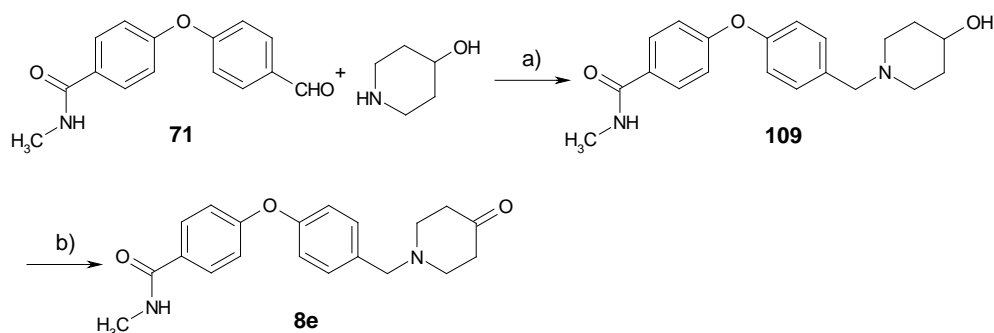
(a) 2-morpholinoethyl isocyanide, MeOH, 55 °C; (b) conc HCl, 55 °C; (c) AcOH/toluene, 80 °C; (d) H₂, Pd(OH)₂/C, EtOH, 50 °C, then 4 N HCl/AcOEt; (e) Ar-CHO, NaBH(OAc)₃, AcOH, DMF and then 4N HCl/AcOEt

一方、1-*N* アミノ基の最適化変換の目的で合成した化合物 **78-84**、**85a-d**、**86-91**、**92a-b**、**93**、**95**、**97-98** については短期間でより多くの誘導体を合成するため、Ugi 反応に用いるピペリドンの 1-*N*-位にあらかじめ 4-(4-メチルアミノカルボニル)-フェノキシベンジル基を導入した化合物 **8e** を用いて合成した(Scheme 4.2)。化合物 **8e** は 4-ヒドロキシピペリジンと 4-(4-メチルアミノカルボニル)-フェノキシベンズアルデヒド **71** を還元的アルキル化によってカップリングした後、SO₃-ピリジンを用いて酸化することで調製した(Scheme 4.3)。



Scheme 4.2 Synthesis of spirodiketopiperazines **94**, **96** and **99-107**

a) 2-morpholinoethyl isocyanide, MeOH, 55 °C; b) conc HCl, 55 °C; c) AcOH/toluene, 80 °C; d) Pd(PPh₃)₄, *n*-Bu₃SnH, AcOH, CH₂Cl₂, then 4 N HCl/AcOEt



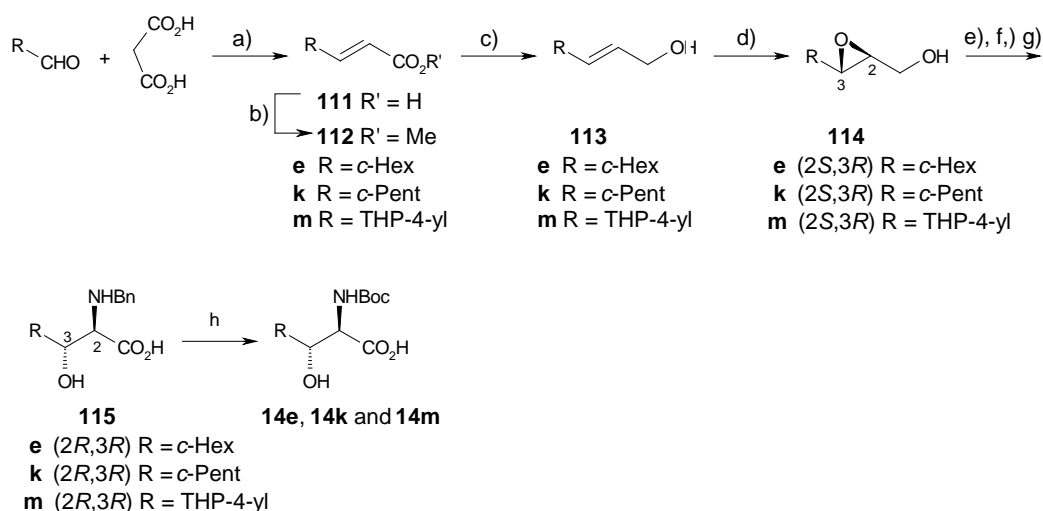
Scheme 4.3 Synthesis of 4-[4-[(4-Oxo-1-piperidiny)methyl]phenoxy]benzamide **8e**

a) NaBH(OAc)₃, AcOH, DMF; b) SO₃.pyr, Et₃N, DMSO

Ugi反応に用いた(2*R*,3*R*)-ヒドロキシアミノ酸 **14e**、**14k**、**14m**の合成は第 2 章で示した Sharplessの不斉エポキシ化反応を用いた方法で合成した(Scheme 4.4)⁴。(S,S)-ヒドロキシアミ

ノ酸 **14h**についてはアリルアルコール **113e**に対し、(+)-diethyl-L-tartrateを用いた不斉エポキシ化反応を行うことで、化合物 **14e**と同様の方法で合成した。

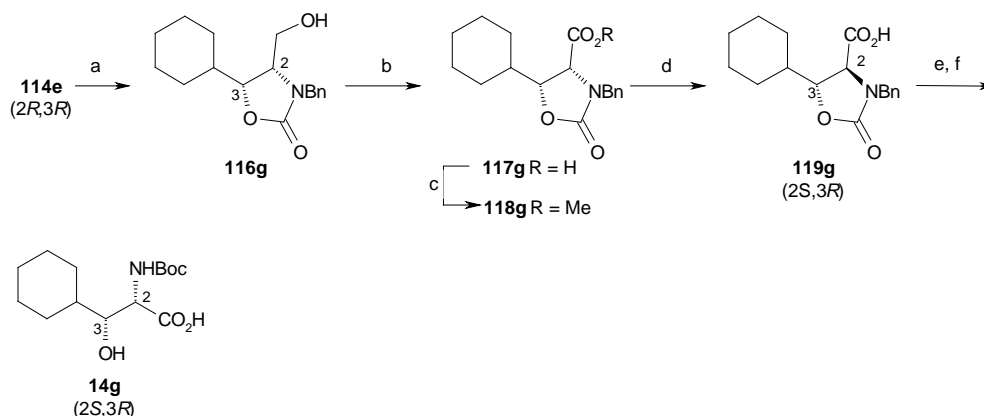
Scheme 4.5 には(2*S*,3*R*)-ヒドロキシアミノ酸 **14g**の合成法を示した⁵。エポキシアルコール **114e**をTHF中、水素化ナトリウム、ベンジルイソシアニド存在下加熱還流させることで、オキサゾリジノン **116g**とし、Jones酸化によってカルボン酸 **117g**まで酸化した後、エステル化して **118g**とした。このエステル体 **118g**に対し、エタノール中、無水条件で水酸化カリウムを作用させ、加熱還流させることでエピ化、及び加水分解が進行し、化合物 **119g**を得た。さらに化合物 **119g**を水酸化カリウム水溶液中で加熱還流し、オキサゾリジノン環を開いた後、接触水素添加を行った。ベンジル基の脱離をTLCにて確認後、Boc₂Oを加え、(2*S*,3*R*)体の*N*-Bocヒドロキシアミノ酸 **14g**を得た。(2*R*,3*S*)体の **14f**については **14h**の合成中間体である **114h**を用いて **14g**と同様に合成した。



Scheme 4.4 Synthetic method of optically active β -hydroxy-*N*-Boc- α -amino acids **14e**, **14k**, and

14m

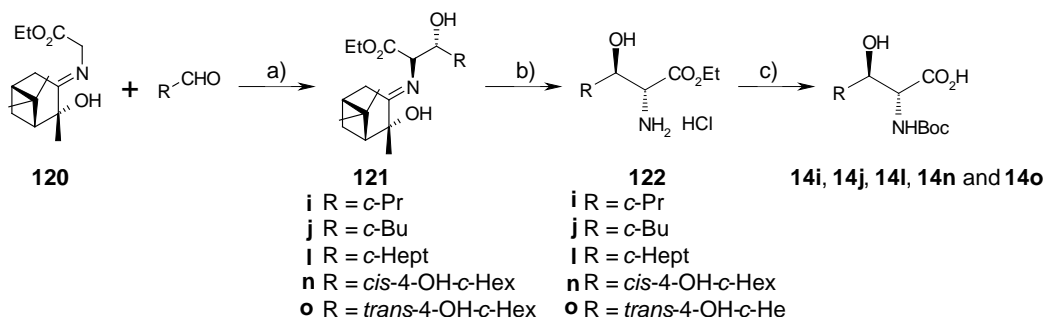
a) piperidine, pyridine; b) conc H₂SO₄, MeOH; c) DIBAL, THF; d) (-)-diethyl-D-tartrate, Ti(Oi-Pr)₄, *t*-butyl hydroxy peroxide, MS4A, CH₂Cl₂; e) SO₃·pyridine, Et₃N, DMSO; f) 2-methyl-2-butene, NaClO₂, NaH₂PO₄, MeCN, H₂O; g) BnNH₂, 5.0 M NaOH, H₂O; h) H₂, Pd(OH)₂/C, MeOH, then Boc₂O, 1.0 M NaOH



Scheme 4.5 Synthetic method of optically active β -hydroxy-*N*-Boc- α -amino acid **14g**

a) benzyl isocyanate, NaH, THF; b) Jones reagent, acetone; c) TMS-diazomethane, diethyl ether; d) KOH, EtOH; e) 2.0 M KOH; f) H_2 , $Pd(OH)_2/C$ then Boc_2O

また、1'位の側鎖の最適化合成に当たっては、より短工程で(1*R*,2*R*)-*N*-Bocヒドロキシアミノ酸を得るため、**Scheme 4.6** に示したヒドロキシピナノンを経ル補助基として用いる方法を採用した⁶。まず天然物である(1*R*,2*R*,5*R*)-(+)-2-ヒドロキシ-3-ピナノンをグリシンとイミンを組み合わせることイミノエステル **120** を調製した。この化合物 **120** と対応するアルデヒドをトリエトキシクロロチタン存在下反応させることで、立体選択的に化合物 **121** を得た。化合物 **121** を塩酸で処理して得られたアミノ酸のエチルエステル **122** をBoc化した後、水酸化リチウムを用いて加水分解し、(1*R*,2*R*)-*N*-Bocヒドロキシアミノ酸 **14i**、**14j**、**14l**、**14n**、**14o** を合成した。



Scheme 4.6 Synthesis of optically active β -hydroxy-*N*-Boc- α -amino acids **14i**, **14j**, **14l**, **14n** and **14o** using hydroxypinanone as the chiral auxiliary

a) $ClTi(OEt)_3$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; b) 1.2 M HCl, THF; c) 1.0 M LiOH, EtOH then Boc_2O

4-7. 小括

以上、本章では経口吸収性、活性のバランスのとれた化合物を見出すため、1'位に水酸基を導入した化合物 **6** への 1-*N*位、1'位、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位の置

換基の最適化の結果について報告した。経口吸収性改善のためには脂溶性の低下が有効であると考え、1-*N*位、1'位への極性官能基の導入を試みたが、何れも活性が低下し、これらの部位への極性官能基の導は困難であることが分かった。一方で、9-*N*-(4-フェノキシベンジル)基の末端のパラ位には極性官能基が許容であり、種々の置換基変換を行った結果、カルボキシ基を導入した化合物 **85a** を見出すことができた。この化合物 **85a** は非常に強い抗 HIV 活性を持っており、ラット、イヌ、サルに経口投与した際の血中濃度が、抗 HIV 活性の IC₉₀ 値を長時間上回り、臨床においても治療効果を発揮できることが期待される化合物であることを確認した。

4-8. 実験の部

General Methods

Analytical samples were homogeneous as confirmed by thin layer chromatography (TLC), and afforded spectroscopic results consistent with the assigned structures. Proton nuclear magnetic resonance spectra (¹H NMR) were recorded on a Varian Gemini-200 or a MERCURY-300 spectrometer with tetramethylsilane as an internal standard. The chemical shift values δ are reported in ppm and coupling constants (*J*) in Hertz (Hz). Fast atom bombardment (FAB) and electron ionization (EI) mass spectra were obtained with a JEOL JMS-700 spectrometer. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectra were obtained on Perseptive Voyager Elite. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) mass spectra were determined by Hitachi M-1200H spectrometer. IR spectra were measured on a JASCO FTIR-430 spectrometer. Elemental analyses were performed with a Perkin-Elmer PE2400 series II CHNS/O Analyzer and were only indicated as the elements within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values unless otherwise noted. Column chromatography was carried out on silica gel [Merck silica gel 60 (0.063 ~ 0.200 mm), Fuji Silysia BW235 or Fuji Silysia FL60D]. TLC was performed on silica gel (Merck TLC, silica gel 60 F₂₅₄).

Typical procedures for the solution phase Ugi four-component condensation and reductive alkylation of 9-*N*-substituent.

(3*R*)-1-Butyl-3-[(*R*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-9-(4-phenoxybenzyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (6)

To a stirred solution of 1-benzyl-4-piperidone (75 g, 261 mmol), *n*-butylamine (258 ml, 261 mmol) and (2*R*,3*R*)-2-(*t*-butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid (49.4 g, 261 mmol) in methanol (1.0 L) was added 2-morpholinoethyl isocyanide (36 mL, 261 mmol). After being stirred at 55 °C overnight, the reaction mixture was treated with concentrated hydrochloric acid (261 L) with cooling. After being stirred at 55 °C for another 2 h, the reaction mixture was evaporated,

treated with water and sodium bicarbonate, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated to give deprotected Ugi product as a yellow oil, a solution of which dissolved in acetic acid/toluene (1.25 M/1.1 L) was stirred at 80 °C for 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate and washed twice with a small amount of water. The organic layer was washed with aqueous sodium hydrogen carbonate, brine, dried over sodium sulfate and evaporated to afford *N*-benzylpiperidinodiketopiperazine as an oil (103 g). Debenzylation of the resulting oily product was carried out by the catalytic hydrogenation at an atmospheric pressure in ethanol (1.0 L) in the presence of 20% Pd(OH)₂/C (20 g) for 3 h at 50 °C. The catalyst was removed by filtration through a pad of Celite. The filtrate was treated with 4N hydrogen chloride/ethyl acetate (130 mL) and evaporated. The resulting powder was washed with *t*-butyl methyl ether to afford the title compound as a white powder (83 g, 82% yield in four steps). To a stirred solution of the resulting residue (100 mg, 0.258 mmol), 4-phenoxybenzaldehyde (61 mg, 0.309 mmol) in 1% acetic acid/*N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added sodium triacetoxyborohydride (71 mg, 0.335 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel and treated with 4N hydrogen chloride/ethyl acetate (2 mL) to give the title compound in 46% yield. $[\alpha]_D^{29} + 2.51^\circ$ (*c* 0.97, MeOH) TLC *R_f* 0.46 (AcOEt/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.42–7.37 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.07–7.01 (m, 4H), 4.31 (s, 2H), 4.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.60–3.05 (m, 5H), 2.55–1.90 (m, 6H), 1.90–1.60 (m, 5H), 1.60–1.10 (m, 6H), 1.10–0.90 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3365, 3190, 2924, 2852, 2362, 1660, 1590, 1509, 1489, 1469, 1423, 1243, 1172, 1115 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20v) *m/z* 534 (M+H)⁺, 422; HRMS Calcd 534.3332, Obsd 534.3332.

Compounds **78-84**, **85a-d**, **86-91**, **92a**, **92b**, **93**, **95** and **97-98** were synthesized according to the same procedures as described above for the preparation of **6** using the corresponding *N*-alkylamine for *n*-butyl amine, *N*-Boc-amino acid for (2*R*,3*R*)-2-(*t*-butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid and benzaldehyde for 4-phenoxybenzaldehyde.

(3*R*)-1-Butyl-3-[(*R*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-9-[4-(4-methoxyphenoxy)benzyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (78**)**

TLC *R_f* 0.50 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.02–6.92 (m, 4H), 4.30 (s, 2H), 4.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.72 (m, 1H), 3.58–3.38 (m, 3H), 3.30–3.13 (m, 2H), 2.55–2.40 (m, 2H), 2.32 (m, 1H), 2.16–1.86 (m, 3H), 1.81–1.60 (m, 5H), 1.50–1.10 (m, 6H), 1.03–0.80 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (APCI,

Pos 20v) m/z 564 (M+H)⁺; HRMS Calcd 564.3437, Obsd 564.3441.

(3R)-1-Butyl-3-[(R)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-9-[4-(4-hydroxyphenoxy)benzyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (79)

TLC R_f 0.35 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.47 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.30 (s, 2H), 4.16 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.58–3.36 (m, 3H), 3.30–3.06 (m, 2H), 2.52–1.86 (m, 6H), 1.82–1.58 (m, 5H), 1.50–1.10 (m, 6H), 1.04–0.90 (m, 2H), 0.96 (t, J = 7.2 Hz, 3H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 550 (M+H)⁺; HRMS Calcd 550.3281, Obsd 550.3277.

4-[4-((3R)-1-Butyl-3-[(R)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]benzamide hydrochloride (80)

TLC R_f 0.25 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.90 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.15 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.56–3.42 (m, 3H), 3.33–2.99 (m, 2H), 2.54–1.88 (m, 6H), 1.81–1.60 (m, 5H), 1.48–1.12 (m, 6H), 1.04–0.81 (m, 5H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 577 (M+H)⁺, 465; HRMS Calcd 577.3390, Obsd 577.3391.

4-[4-((3R)-1-Butyl-3-[(R)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]-N-methylbenzamide hydrochloride (81)

TLC R_f 0.45 (AcOEt/MeOH, 5/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.15 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.56–3.45 (m, 3H), 3.30–3.16 (m, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.51–2.28 (m, 3H), 2.16–1.92 (m, 3H), 1.76–1.69 (m, 5H), 1.39–1.15 (m, 6H), 1.00–0.86 (m, 5H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 591 (M+H)⁺; HRMS Calcd 591.3546, Obsd 591.3536.

4-[4-((3R)-1-Butyl-3-[(R)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]benzenesulfonamide hydrochloride (82)

TLC R_f 0.28 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.89 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.17 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.15 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.58–3.42 (m, 3H), 3.32–3.14 (m, 2H), 2.55–2.40 (m, 2H), 2.32 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.07–1.89 (m, 2H), 1.82–1.60 (m, 5H), 1.50–1.12 (m, 6H), 1.06–0.80 (m, 5H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 613 (M+H)⁺; HRMS Calcd 613.3060, Obsd 613.3065.

(3R)-1-Butyl-3-[(R)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-9-{4-[4-(methylsulfonyl)phenoxy]benzyl}-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane-2,5-dione hydrochloride (83)

TLC R_f 0.46 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.25–7.16 (m, 4H), 4.38 (s, 2H), 4.15 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.60–3.44 (m, 3H), 3.30–3.10 (m, 2H), 3.11 (s, 3H), 2.54–2.26 (m, 3H), 2.18–1.88 (m, 3H), 1.82–1.62 (m, 5H), 1.50–1.10 (m, 6H), 1.02–0.82 (m, 5H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 612 (M+H)⁺; HRMS Calcd 612.3107, Obsd 612.3104.

N-{4-[4-((3*R*)-1-Butyl-3-[(*R*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]phenyl}methanesulfonamide hydrochloride (84)

TLC R_f 0.41 (CHCl₃/MeOH, 9/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.53 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.33 (s, 2H), 4.15 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.58–3.40 (m, 3H), 3.32–3.03 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.52–2.24 (m, 3H), 2.17–1.88 (m, 3H), 1.80–1.62 (m, 5H), 1.48–1.08 (m, 6H), 1.03–0.82 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 3H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 627 (M+H)⁺; HRMS Calcd 627.3216, Obsd 627.3212.

4-[4-((3*R*)-1-Butyl-3-[(*R*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]benzoic acid hydrochloride (85a)

[α]_D²⁶ +2.3 ° (c 1.03, MeOH); TLC R_f 0.58 (AcOEt/AcOH/H₂O, 10/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.05 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.17 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.60–3.40 (m, 3H), 3.30–3.10 (m, 2H), 2.56–1.86 (m, 6H), 1.82–1.60 (m, 5H), 1.52–1.16 (m, 6H), 1.06–0.82 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3365, 3226, 2926, 2850, 2507, 1710, 1682, 1635, 1599, 1503, 1467, 1427, 1378, 1312, 1237, 1163, 1113, 1098 cm⁻¹; MS (FAB, Pos, glycerin + m-NBA) 578 (M+H)⁺, 227; Elemental Analysis Calcd for C₃₃H₄₃N₃O₆·HCl: C, 64.54; H, 7.22; N, 6.84. Found : C, 64.23; H, 7.26; N, 6.90.

4-[4-((3*R*)-1-Butyl-3-[(*S*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]benzoic acid hydrochloride (85b)

[α]_D²⁶ +27.7 ° (c 0.46, MeOH); TLC R_f 0.38 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.04 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.11–4.04 (m, 2H), 3.74–3.45 (m, 5H), 3.22 (m, 1H), 2.54–1.98 (m, 5H), 1.76–1.66 (m, 5H), 1.47–1.18 (m, 7H), 1.01–0.91 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 3404, 2927, 1671, 1599, 1503, 1423, 1244, 1162 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20v) m/z 578 (M+H)⁺; HRMS Calcd 578.3230, Obsd 578.3232.

4-[4-((3*S*)-1-Butyl-3-[(*R*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]benzoic acid hydrochloride (85c)

$[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -23.9 ° (*c* 0.44, MeOH); TLC R_f 0.38 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.11–4.04 (m, 2H), 3.74–3.45 (m, 5H), 3.22 (m, 1H), 2.54–1.98 (m, 5H), 1.76–1.66 (m, 5H), 1.47–1.18 (m, 7H), 1.01–0.91 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); IR (KBr) 34.1.4, 2927, 1672, 1599, 1503, 1423, 1244, 1162 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20v) *m/z* 578 (M+H)⁺; HRMS Calcd 578.323, Obsd 578.3239.

4-[4-((3*S*)-1-Butyl-3-[(*S*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methylphenoxy]benzoic acid hydrochloride (85d)

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -2.78 ° (*c* 0.67, MeOH); TLC R_f 0.56 (CH₂Cl₂/MeOH, 5/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.4 (s, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H) 4.35 (s, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.88–3.12 (m, 7H), 2.64–2.20 (m, 3H), 2.06–1.42 (m, 8H), 1.40–1.00 (m, 6H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.80 (m, 2H); MS (MALDI, Pos) *m/z* 578 (M+H)⁺; HRMS Calcd 578.3230, Obsd 578.3228.

4-[4-((3*R*)-1-Butyl-3-[(1*R*)-1-hydroxy-2-methylpropyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methylphenoxy]benzoic acid hydrochloride (86)

$[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ +10.08 ° (*c* 1.07, MeOH) TLC R_f 0.32 (AcOEt/MeOH, 2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.15 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.60–3.44 (m, 3H), 3.24–3.08 (m, 2H), 2.56–1.92 (m, 5H), 1.70 (m, 1H), 1.50–1.26 (m, 3H), 1.08–0.90 (m, 9H); IR (KBr) 2962, 1675, 1599, 1504, 1422, 1245, 1162 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20v) *m/z* 538 (M+H)⁺; HRMS Calcd 538.2917, Obsd 538.2925.

4-[4-((3*R*)-1-Butyl-3-[(*R*)-cyclopropyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methylphenoxy]benzoic acid hydrochloride (87)

TLC R_f 0.29 (AcOEt/MeOH, 2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.11 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.54–3.34 (m, 4H), 3.14 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 2.61–2.43 (m, 2H), 2.35 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.70–1.49 (m, 2H), 1.49–1.33 (m, 2H), 1.09 (m, 1H), 0.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.60–0.43 (m, 2H), 0.33 (m, 1H), 0.24 (m, 1H); IR (KBr) 3219, 2958, 2873, 2582, 1710, 1672, 1598, 1502, 1422, 1385, 1243, 1161, 1113, 1098, 1049 cm⁻¹; MS (APCI, Neg 20v) *m/z* 534 (M-H)⁻; HRMS Calcd 536.2761, Obsd 536.2757.

4-[4-((3*R*)-1-Butyl-3-[(*R*)-cyclobutyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methylphenoxy]benzoic acid hydrochloride (88)

TLC R_f 0.68 (BuOH/AcOH/H₂O, 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.02 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.90 (m, 1H), 3.90 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.68 (dd, J = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 3.53–3.40 (m, 3H), 3.26 (m, 1H), 2.67 (m, 1H), 2.51 (m, 1H), 2.43–2.37 (m, 2H), 2.15–1.29 (m, 11H), 0.94 (t, J = 7.0 Hz, 3H); MS (APCI, Neg 20v) m/z 548 (M-H)⁻; HRMS Calcd 550.2917, Obsd 550.2924.

4-[4-((3R)-1-Butyl-3-[(R)-cyclopentyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]benzoic acid hydrochloride (89)

TLC R_f 0.45 (CHCl₃/MeOH, 5/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.05 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.02 (m, 1H), 4.01 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.62–3.08 (m, 5H), 2.60–2.06 (m, 5H), 2.00–1.08 (m, 12H), 0.96 (t, J = 6.9 Hz, 3H); IR (KBr) 3424, 2957, 2871, 2586, 1665, 1599, 1503, 1421, 1371, 1311, 1244, 1162, 1098, 1049 cm⁻¹; MS (FAB, Pos, glycerin + m-NBA) m/z 564 (M+H)⁺; HRMS Calcd 564.3074, Obsd 564.3074.

4-[4-((3R)-1-Butyl-3-[(R)-cycloheptyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]benzoic acid hydrochloride (90)

TLC R_f 0.28 (CH₂Cl₂/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.15 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.58–3.44 (m, 3H), 3.30–3.07 (m, 2H), 2.51–1.17 (m, 21H), 0.96 (t, J = 7.0 Hz, 3H); IR (KBr) 2930, 1672, 1599, 1502, 1420, 1244, 1161, 1115 cm⁻¹; MS (APCI, Neg 20v) m/z 590 (M-H)⁻; HRMS Calcd 592.3387, Obsd 592.3383.

4-[4-((3R)-1-Butyl-3-[(R)-hydroxy(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]benzoic acid hydrochloride (91)

TLC R_f 0.30 (CHCl₃/MeOH, 4/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.12 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.08–3.93 (m, 3H), 3.75 (m, 1H), 3.57–3.34 (m, 5H), 3.30–3.15 (m, 2H), 2.52–1.69 (m, 8H), 1.50–1.18 (m, 5H), 0.96 (t, J = 7.2 Hz, 3H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 580 (M+H)⁺; HRMS Calcd 580.3023, Obsd 580.3016.

4-[4-((3R)-1-Butyl-3-[(R)-hydroxy(4-hydroxycyclohexyl)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]benzoic acid hydrochloride (92a)

TLC R_f 0.17 (AcOEt/MeOH, 2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.02 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.17 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 4.00–3.91 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.52–3.37 (m, 3H), 3.30–3.17 (m, 2H), 2.50–2.33 (m, 3H),

2.10 (m, 1H), 1.80–1.18 (m, 12H), 0.94 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); IR (KBr) 2934, 1672, 1598, 1502, 1422, 1243, 1161, 1112 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 594 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 594.3179, Obsd 594.3176.

4-[4-((3R)-1-Butyl-3-[(R)-hydroxy(4-hydroxycyclohexyl)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]benzoic acid hydrochloride (92b)

TLC R_f 0.27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 3/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.14 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.57–3.41 (m, 4H), 3.30–3.24 (m, 2H), 2.58–2.43 (m, 3H), 2.12–1.68 (m, 6H), 1.40–0.93 (m, 8H), 0.95 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); IR (KBr) 2934, 1676, 1599, 1502, 1423, 1243, 1161, 1098, 1048 cm^{-1} ; MS (APCI, Neg 20v) m/z 592 ($\text{M}-\text{H}$)⁻; HRMS Calcd 594.3179, Obsd 594.3185.

4-[4-((3R)-3-[Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-methyl-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]benzoic acid hydrochloride (93)

TLC R_f 0.55 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 4/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.03 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.17 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.50–3.46 (m, 2H), 3.26 (dd, $J = 9.6, 1.8$ Hz, 1H), 2.95 (s, 3H), 2.60–2.36 (m, 3H), 2.12–1.94 (m, 3H), 1.80–1.64 (m, 4H), 1.38–1.18 (m, 3H), 1.00–0.88 (m, 2H); IR (KBr) 3385, 2926, 2852, 1684, 1598, 1503, 1427, 1244, 1161 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 536 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 536.2761, Obsd 536.2762.

4-[4-((3R)-3-[Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-ethyl-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]benzoic acid hydrochloride (95)

TLC R_f 0.66 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 4/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.03 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.15 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.49–3.45 (m, 2H), 3.33–3.26 (m, 2H), 2.50–2.38 (m, 3H), 2.17–1.93 (m, 3H), 1.80–1.65 (m, 4H), 1.34–1.17 (m, 6H), 1.00–0.87 (m, 2H); IR (KBr) 3049, 2924, 1703, 1677, 1649, 1599, 1502, 1422, 1248, 1167, 1113 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 550 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 550.2917, Obsd 550.2922.

4-[4-((3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1-propyl-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]benzoic acid hydrochloride (97)

TLC R_f 0.21 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$, 20/2/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.04 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.15 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.55–3.38 (m, 3H), 3.30–3.09 (m, 2H), 2.55–2.26 (m,

3H), 2.18–1.88 (m, 3H), 1.83–1.60 (m, 5H), 1.57–1.10 (m, 4H), 1.04–0.80 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 564 (M+H)⁺; HRMS Calcd 564.3074, Obsd 564.3073.

4-[4-((3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1-propyl-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]-N-methylbenzamide hydrochloride (98)

TLC R_f 0.38 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.15 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.54–3.39 (m, 3H), 3.30–3.10 (m, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.56–2.27 (m, 3H), 2.18–1.88 (m, 3H), 1.83–1.60 (m, 5H), 1.46 (m, 1H), 1.37–1.11 (m, 3H), 1.04–0.80 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); MS (APCI, Pos 20v) m/z 577 (M+H)⁺; HRMS Calcd 577.339, Obsd 577.3392.

4-[4-[(4-Hydroxy-1-piperidinyl)methyl]phenoxy]benzamide (109)

To a stirred suspension of 4-(4-*N*-methylaminocarbonylphenoxy)benzaldehyde (9.23 g, 36.2 mmol) in 1% acetic acid/*N,N*-dimethylformamide (30 ml) was added sodium triacetoxyborohydride (11.5 g, 54.3 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was poured into water and treated with 5.0 M sodium hydroxide (pH 9–10). The aqueous layer was extracted with chloroform and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated to yield the title compound (9.93 g, 81%) as a white powder. TLC R_f 0.10 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.10–6.90 (m, 4H), 6.11 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.49 (s, 2H), 3.00 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.82–2.65 (m, 2H), 2.22–2.06 (m, 2H), 1.96–1.80 (m, 2H), 1.78–1.50 (m, 2H); MS (APCI, Pos) 341 (M+H)⁺.

4-[4-[(4-Oxo-1-piperidinyl)methyl]phenoxy]benzamide (8e)

To a stirred solution of **109** (12.2 g, 35.8 mmol) in dichloromethane (100 ml), triethylamine (27 ml) and dimethylsulfoxide (36 mL) was added sulfur trioxide-pyridine complex (11.4 g, 71.6 mmol). After being stirred at room temperature overnight, the reaction mixture was quenched with ice water (500 mL), treated with 5.0 M sodium hydroxide solution (30 mL) and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated. The resulting residue was triturated with *t*-butyl methyl ether and dried to yield the title compound (11.0 g, 91%) as a pale yellow solid. TLC R_f 0.45 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.04–6.98 (m, 4H), 6.06 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.62 (s, 2H), 3.01 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 2.77 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H), 2.47 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H); MS (APCI, Pos) 339 (M+H)⁺.

4-[4-((3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-ethyl-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-

yl)methyl]phenoxy]-*N*-methylbenzamide hydrochloride (96)

To a stirred solution of 4-[4-[(4-oxo-1-piperidinyl)methyl]phenoxy]benzamide (100 mg, 0.30 mmol), 2.0 M ethylamine/methanol (0.18 mL, 0.36 mmol) and (2*R*,3*R*)-2-(*t*-butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid (103 mg, 0.36 mmol) in methanol (2 mL) was added 2-morpholinoethyl isocyanide (50 μ L, 0.36 mmol). After being stirred at 55 °C overnight, the reaction mixture was treated with concentrated hydrochloric acid (0.5 mL) under cooling. The reaction mixture was stirred at 55 °C for another 2 h, evaporated, treated with aqueous sodium hydrogen carbonate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated to give deprotected Ugi product as a yellow oil, a solution of which in acetic acid/toluene (1.25 M/ 2 mL) was stirred at 80 °C for 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate and washed twice with a small amount of water. The organic layer was washed with aqueous sodium hydrogen carbonate, brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography, treated with 4.0 N hydrogen chloride/ethyl acetate and evaporated to afford the title compound (130 mg, 40%) as a pale yellow powder. TLC R_f 0.37 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.84 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.15 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.78–3.59 (m, 2H), 3.48–3.44 (m, 2H), 3.36 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.54–2.36 (m, 3H), 2.15–1.93 (m, 3H), 1.80–1.65 (m, 4H), 1.34–1.15 (m, 6H), 1.00–0.86 (m, 2H); IR (KBr) 3395, 2926, 2851, 1638, 1498, 1421, 1308, 1245, 1174, 1046 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20v) m/z 563 (M+H)⁺; HRMS Calcd 563.3233, Obsd 563.3231.

Compounds **94** and **99-107** were synthesized according to the same procedures as described above for the preparation of **24** using the corresponding amines for ethylamine.

4-[4-((3*R*)-3-[(*R*)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-methyl-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]-*N*-methylbenzamide hydrochloride (94)

TLC R_f 0.32 (CHCl₃/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.17 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.49–3.46 (m, 2H), 3.25 (dd, J = 9.6, 2.0 Hz, 1H), 2.95 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 2.57–2.35 (m, 3H), 2.12–1.95 (m, 3H), 1.80–1.65 (m, 4H), 1.34–1.15 (m, 3H), 1.00–0.87 (m, 2H); IR (KBr) 3323, 2925, 1642, 1500, 1248, 1175 cm⁻¹; MS (APCI, Pos 20v) m/z 549 (M+H)⁺; HRMS Calcd 549.3077, Obsd 549.3075.

4-[4-((3*R*)-3-[(*R*)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1-pentyl-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]-*N*-methylbenzamide hydrochloride (99)

TLC R_f 0.52 (CH₂Cl₂/MeOH, 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.60

(d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.15 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.59–3.41 (m, 3H), 3.30–3.12 (m, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.56–2.24 (m, 3H), 2.18–1.88 (m, 3H), 1.84–1.60 (m, 5H), 1.54–1.06 (m, 8H), 1.04–0.80 (m, 2H), 0.92 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H); IR (KBr) 3393, 2929, 1643, 1498, 1245 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 605 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 605.3703, Obsd 605.3705.

4-[4-((3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-hexyl-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]-N-methylbenzamide hydrochloride (100)

TLC R_f 0.53 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.15 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.59–3.42 (m, 3H), 3.33–3.10 (m, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.55–2.24 (m, 3H), 2.18–1.87 (m, 3H), 1.83–1.62 (m, 5H), 1.50–1.10 (m, 10H), 1.05–0.80 (m, 5H); IR (KBr) 3368, 2928, 1644, 1498, 1420, 1245 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20 v) m/z 619 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 619.3859, Obsd 619.3868.

4-[4-((3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-heptyl-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl)phenoxy]-N-methylbenzamide hydrochloride (101)

TLC R_f 0.53 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.16 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.59–3.42 (m, 3H), 3.33–3.05 (m, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.60–2.26 (m, 3H), 2.18–1.88 (m, 3H), 1.82–1.60 (m, 5H), 1.52–1.08 (m, 12H), 1.05–0.80 (m, 5H); IR (KBr) 3380, 2927, 1643, 1498, 1420, 1245 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 633 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 633.4016, Obsd 633.4021.

4-(4-[(3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-(3-hydroxybutyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy)-N-methylbenzamide hydrochloride (102)

TLC R_f 0.24 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.16 (dd, $J = 3.6, 2.0$ Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.88–3.74 (m, 2H), 3.60 (m, 1H), 3.50–3.43 (m, 2H), 3.38 (m, 1H), 3.27 (dd, $J = 9.6, 2.0$ Hz, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.59–2.33 (m, 3H), 2.15–1.93 (m, 4H), 1.80–1.65 (m, 5H), 1.35–1.15 (m, 6H), 1.01–0.87 (m, 2H); IR (KBr) 3387, 2922, 2852, 1642, 1499, 1482, 1427, 1306, 1245, 1176 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 607 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 607.3496, Obsd 607.3494.

4-(4-[(3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-(2-methoxyethyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy)-N-methylbenzamide hydrochloride (103)

TLC R_f 0.35 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.57 (d,

$J = 8.7$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.18 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.86–3.18 (m, 8H), 3.31 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 2.60–1.58 (m, 10H), 1.42–0.80 (m, 5H); IR (KBr) 3324, 2927, 2852, 2564, 1652, 1499, 1418, 1306, 1245, 1176, 1113, 1048 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 593 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 593.3339, Obsd 593.3346.

Allyl

2-[(3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-9-(4-{4-[(methylamino)carbonyl]phenoxy}benzyl)-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-1-yl]ethylcarbamate hydrochloride (110)

TLC R_f 0.44 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.91 (m, 1H), 5.28 (m, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.52 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.17 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.82–3.53 (m, 2H), 3.52–3.17 (m, 6H), 2.91 (s, 3H), 2.70–2.25 (m, 3H), 2.18–1.87 (m, 3H), 1.85–1.60 (m, 4H), 1.41–1.10 (m, 3H), 1.04–0.80 (m, 2H); IR (KBr) 3433, 1698, 1637, 1255 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 662 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 256.

4-[4-[(3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-1-[2-(dimethylamino)ethyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl]methyl]phenoxy]-N-methylbenzamide dihydrochloride (105)

TLC R_f 0.08 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 5/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.23 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.01–3.90 (m, 3H), 3.72 (m, 1H), 3.50–3.44 (m, 2H), 3.33–3.24 (m, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 2.59–2.43 (m, 3H), 2.17–1.94 (m, 3H), 1.80–1.65 (m, 4H), 1.35–1.15 (m, 3H), 1.03–0.82 (m, 2H); IR (KBr) 3413, 2927, 2852, 2701, 1669, 1498, 1420, 1327, 1244, 1174, 1120, 1044 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 606 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 606.3655, Obsd 606.3654.

4-(4-[(3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl]methyl]phenoxy)-N-methylbenzamide hydrochloride (106)

TLC R_f 0.51 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.43 (m, 1H), 4.36 (s, 2H), 4.30 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.18–3.92 (m, 2H), 3.74 (m, 1H), 3.56–3.42 (m, 2H), 3.35 (dd, $J = 9.6$, 2.1 Hz, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.58 (m, 1H), 2.43–2.11 (m, 3H), 2.02 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.84–1.60 (m, 4H), 1.40–1.06 (m, 3H), 1.05–0.80 (m, 2H); IR (KBr) 3383, 2930, 1678, 1498, 1246, 1155, cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 617 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 505, 256; HRMS Calcd 617.2951, Obsd 617.2957.

4-(4-[(3R)-3-[(R)-Cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl]methyl]phenoxy)-N-methylbenzamide hydrochloride (107)

TLC R_f 0.69 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.58

(d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.49 (m, 1H), 4.36 (s, 2H), 4.31 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.10–4.00 (m, 2H), 3.72 (m, 1H), 3.52–3.48 (m, 2H), 3.35 (m, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.63 (m, 1H), 2.44–2.20 (m, 3H), 2.03–1.60 (m, 6H), 1.34–1.14 (m, 3H), 1.01–0.85 (m, 2H); IR (KBr) 3371, 2933, 1680, 1600, 1498, 1407, 1246, 1206, 1102, 1032 cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 667 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS Calcd 667.2919, Obsd 667.2916.

4-[4-((3*R*)-1-(2-Aminoethyl)-3-[(*R*)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl]phenoxy]-*N*-methylbenzamide dihydrochloride (104**)**

To a stirred suspension of **110** (534 mg, 0.81 mmol) in dichloromethane (8.0 mL) was added acetic acid (0.11 mL, 1.94 mmol), tri-*n*-butyltin hydride (0.26 mL, 0.97 mmol) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (47 mg, 0.04 mmol). After being stirred for 3 h at ambient temperature, the reaction mixture was quenched with saturated sodium hydrogen carbonate, extracted with chloroform/methanol, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated to yield the title compound (178 mg, 38 %). TLC R_f 0.33 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O, 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.23 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.04–3.65 (m, 4H), 3.51–3.40 (m, 2H), 3.26 (dd, $J = 9.9, 2.1$ Hz, 1H), 3.15–3.06 (m, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.65–2.44 (m, 3H), 2.16 (m, 1H), 2.08–1.91 (m, 2H), 1.83–1.62 (m, 4H), 1.40–1.12 (m, 3H), 1.05–0.80 (m, 2H); IR (KBr) 3416, 2929, 1670, 1497, 1246, cm^{-1} ; MS (APCI, Pos 20v) m/z 578 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 466, 256.

Typical procedures for optically active β -hydroxy-*N*-Boc- α -amino acid using Sharpless asymmetric epoxidation

3-Cyclohexyl-2-propenoic acid (111e**)**

To a stirred solution of cyclohexanecarboxyaldehyde (400 mL, 3.30 mmol) in pyridine (750 mL) were added malonic acid (290 g, 2.78 mol) and piperidine (7.5 mL, 75 mmol) at room temperature. After being stirred at ambient temperature for 1 h, the reaction mixture was heated at 80 °C for 5 h, cooled to room temperature, poured into ice-cooled 3.0 M aqueous hydrochloric acid (1.2 L) and extracted with ethyl acetate. The organic layer was extracted with 2.0 M sodium hydroxide. The aqueous layer was washed with ethyl acetate, acidified with concentrated hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to yield the title compound (442 g, 100%) as a pale yellow solid. TLC R_f 0.78 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 20/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.03 (dd, $J = 15.6, 6.6$ Hz, 1H), 5.77 (dd, $J = 15.6, 1.6$ Hz, 1H), 2.30–2.04 (m, 1H), 1.87–1.59 (m, 5H), 1.46–1.02 (m, 5H).

Methyl 3-cyclohexyl-2-propenoate (112e**)**

To a stirred solution of cyclohexyl-2-propenoic acid **111e** (442 g, 3.30 mol) in MeOH (1.5 L) was

slowly added concentrated sulfuric acid (15 ml) at room temperature. After being stirred under reflux condition for 14 h, the solvent was removed by evaporation. The resulting residue was slowly added to ice water (500 mL) and neutralized with sodium hydrogen carbonate (50 g). The aqueous mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo to yield the title compound (449 g, 96%). TLC R_f 0.83 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10/1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.92 (dd, $J = 15.6, 6.6$ Hz, 1H), 5.77 (dd, $J = 15.6, 1.5$ Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.15 (m, 1H), 1.80–1.61 (m, 4H), 1.19–1.03 (m, 6H).

3-Cyclohexyl-2-propen-1-ol (113e)

To a stirred solution of methyl-3-cyclohexyl-2-propenoate **112e** (80.0 g, 476 mmol) in dry tetrahydrofuran (1.0 L) was slowly added diisobutyl aluminum hydride/toluene (1.0 M, 1.0 L, 1.0 mol) at $-70\text{ }^\circ\text{C} \sim -60\text{ }^\circ\text{C}$ over 2 h under argon atmosphere. The reaction mixture was warmed up to $-10\text{ }^\circ\text{C} \sim 0\text{ }^\circ\text{C}$, quenched with water (5 mL) and then aqueous saturated sodium sulfate (~ 400 mL). The resulting precipitates were removed by filtration. The filtrate was evaporated, and the resulting residue was purified by distillation (bp $125\text{--}128\text{ }^\circ\text{C}/26\text{ mmHg}$) to give the title compound (53 g, 88%) as a colorless oil. TLC R_f 0.67 (hexane/AcOEt, 2/1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.70–5.53 (m, 2H), 4.08 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 1.96 (m, 1H), 1.80–1.58 (m, 4H), 1.37–1.00 (m, 6H).

[(2R,3R)-3-Cyclohexyloxiran-2-yl]methanol (114e)

To a stirred suspension of dried MS4A (75 g) in dichloromethane (1.3 L) was added titanium(IV) isopropoxide (42 mL, 142 mmol) at room temperature under argon atmosphere, a solution of diethyl D-tartrate (35.3 g, 171 mmol) in dichloromethane at $-30\text{ }^\circ\text{C} \sim -20\text{ }^\circ\text{C}$ and stirring was continued for 30 min. To the mixture were added a solution of **113e** (100 g, 714 mmol) in dichloromethane (100 mL) at $-30\text{ }^\circ\text{C} \sim -20\text{ }^\circ\text{C}$ and a solution of *t*-butyl hydroxy peroxide in octane (178 mL, 1.07 mol) at $-30\text{ }^\circ\text{C} \sim -20\text{ }^\circ\text{C}$ and the mixture was stirred for 3 h. After the excess peroxide was quenched with the addition of dimethyl sulfide (157 mL, 2.1 mol) at $-30\text{ }^\circ\text{C} \sim -20\text{ }^\circ\text{C}$ and stirring was continued for 1.5 h, the reaction mixture was further treated with 2.0 L of water and (\pm)-tartaric acid (300 g, 2.0 mol) and stirring was continued overnight. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was evaporated. The resulting residue was dissolved in *t*-butyl methyl ether (1.0 L) and the excess diethyl D-tartrate was hydrolyzed by stirring with 1.0 M sodium hydroxide water solution for 1 h. The reaction mixture was diluted with water (800 mL) and extracted with *t*-butyl methyl ether. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt, 10/1–1/1) to yield the title compound (100 g, 90%). $[\alpha]_D^{26} + 32.7^\circ$ (c 1.67, CHCl_3); TLC R_f 0.43 (hexane/AcOEt, 2/1); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.91 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 2.98 (m, 1H), 2.76 (dd, $J = 6.9, 2.4$ Hz, 1H), 1.90–1.50 (m, 6H), 1.36–1.01 (m, 5H).

(2*R*,3*R*)-2-Benzylamino-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid (115e)

To a stirred solution of [(2*R*,3*R*)-3-cyclohexyloxiran-2-yl]methanol **114e** (184 g, 1.18 mol) in dimethyl sulfoxide (828 mL) were added triethylamine (644 mL, 4.62 mol) and sulfur trioxide-pyridine complex (368 g, 2.32 mol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with ice water (3.4 L) and extracted with *t*-butyl methyl ether. The organic layer was washed with ice-cooled 0.5 M aqueous hydrochloric acid and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated. To the resulting aldehyde in acetonitrile (3.6 L) were added water (1.8 L), 2-methyl-2-butene (550 mL, 5.2 mol) and mono sodium hydrogen phosphate (184 g, 1.53 mol) at room temperature. To the reaction mixture was slowly added sodium hypochlorite (80%, 440 g, 3.9 mol) keeping the temperature at 20 °C~25 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, the reaction mixture was diluted with *t*-butyl methyl ether and treated with 1.0 M sodium hydroxide (1.7 L) at room temperature. The precipitates were removed by filtration. The organic layer of the filtrate was extracted with 1.0 M sodium hydroxide. The aqueous layer was acidified with 6.0 M hydrochloric acid (pH 3.0), extracted with *t*-butyl methyl ether, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to yield [(2*R*,3*R*)-3-cyclohexyloxiran-2-yl]carboxylic acid. To a stirred solution of [(2*R*,3*R*)-3-cyclohexyloxiran-2-yl]carboxylic acid in water (198 mL) were slowly added benzylamine (269 mL, 2.47 mol) followed by 5.0 M sodium hydroxide (148 mL, 740 mmol) at 0 °C. After being stirred under reflux for 2.5 h, the reaction mixture was treated with 5.0 M sodium hydroxide (16 mL, 82 mmol) at room temperature. The aqueous layer was washed with *t*-butyl methyl ether, and acidified with 2.0 M hydrochloric acid (pH 4–5). The precipitates were collected by filtration and washed with ice water, ice-cooled acetone, *t*-butyl methyl ether and dried to yield **46a** (227 g, 35% in 3 steps) as a white powder. TLC R_f 0.71 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O, 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.48–7.22 (m, 5H), 3.87 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.05 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 1.72–1.50 (m, 6H), 1.24–0.80 (m, 5H); MS (FAB, Pos) 278 (M+H)⁺

(2*R*,3*R*)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid (14e)

To a suspension of Pd(OH)₂/C (30 g, 20% wt, wet) in methanol (3.0 L) were added (2*R*,3*R*)-2-benzylamino-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid **115e** (150 g, 542 mmol) and 1.0 M sodium hydroxide (540 mL) at 0 °C. After being stirred under hydrogen atmosphere for 8 h, the reaction mixture was treated with 1.0 M sodium hydroxide (80 mL) and then di-*t*-butyl dicarbonate (160 mL, 504 mmol) under argon atmosphere. After being stirred overnight, palladium was removed by filtration through a pad of Celite and washed with methanol and water. Methanol in the filtrate was removed by evaporation and the resulting aqueous solution was washed with *t*-butyl methyl ether. The aqueous layer was acidified with 5% potassium bisulfate (3.0 L) to pH 3.0, extracted with

ethyl acetate, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to yield **14e** (151.2 g, 97%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -16.1^{\circ}$ (c 0.98, MeOH); TLC R_f 0.54 (n -BuOH/AcOH/H₂O = 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.28 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.47 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 1.95-0.95 (m, 11H), 1.44 (s, 9H).

Compounds **14e**, **14k**, and **14m** were prepared according the same procedures as described for the preparation of **14e**.

(2S,3S)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid (14h)

TLC R_f 0.85 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 20/2/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 6.78 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.02-3.97 (m, 1H), 3.39-3.32 (m, 1H), 1.80-1.40 (m, 6H), 1.36 (s, 9H), 1.30-0.90 (m, 5H).

(2R,3R)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-cyclopentyl-3-hydroxypropanoic acid (14k)

$[\alpha]_{\text{D}}^{23.5} = -24.2^{\circ}$ (CH₃OH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.20 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 3.54 (dd, J = 8.4, 3.9 Hz, 1H), 2.16 (m, 1H), 1.90–1.76 (m, 2H), 1.71–1.51 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.40–1.26 (m, 2H).

(2R,3R)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-tetrahydropyranyl)-3-hydroxypropanoic acid (14m)

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -18.1^{\circ}$ (MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.26 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.00–3.91 (m, 2H), 3.50 (dd, J = 7.2, 5.1 Hz, 1H), 3.45–3.32 (m, 2H), 1.94–1.63 (m, 3H), 1.54–1.28 (m, 11H).

General methods for the preparation of optically active *syn*- β -hydroxy-*N*-Boc- α -amino acid.

(4S,5S)-3-Benzyl-5-cyclohexyl-4-(hydroxymethyl)oxazolidine-2-one (116g)

To a stirred suspension of sodium hydride (4.56 g, 114 mmol) in tetrahydrofuran (250 mL) was added dropwise a solution of epoxy alcohol **114e** (8.1 g, 51.8 mmol) in tetrahydrofuran (17 mL) for 15 min at 0 °C. After being stirred for 10 min, the reaction mixture was treated with benzyl isocyanate (9.6 mL, 77.8 mmol) for 20 min. After being stirred for 20 min at 0 °C, the reaction mixture was refluxed for 1.5 h, cooled with ice bath, quenched with saturated ammonium chloride and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and evaporated. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography to yield the title compound (4.42 g, 28%) as a white powder. TLC R_f 0.33 (hexane/AcOEt = 1/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.42-7.27 (m, 5H), 4.86 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 4.26 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 10.2, 6.9 Hz, 1H), 3.88-3.68 (m, 2H), 3.50 (dt, J = 6.9, 3.3 Hz, 1H), 2.10 (m, 1H), 1.90-1.49 (m, 5H), 1.38-0.85 (m, 5H).

(4S,5S)-3-Benzyl-5-cyclohexyl-2-oxo-oxazolidine-4-carboxylic acid (117g)

To a stirred suspension of (4*R*,5*R*)-3-benzyl-5-cyclohexyl-4-(hydroxymethyl)oxazolidin-2-one (4.22 g, 14.6 mmol) in acetone (200 mL) was added dropwise Jones reagent (2.5 M, 12 mL, 29.2 mmol) at

0 °C. After being stirred for 3 h at ambient temperature, the reaction mixture was quenched with *i*-propanol. The resulting precipitates were removed by filtration and washed with chloroform, and the filtrate was evaporated. The resulting residue was diluted with chloroform, washed with brine and extracted with chloroform. The organic layer was washed with small amount of brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and evaporated to yield the title compound quantitatively. TLC R_f 0.48 (CHCl₃/MeOH = 10/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.40-7.24 (m, 5H), 4.80 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 4.31 (dd, J = 9.0, 7.5 Hz, 1H), 4.09 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.95 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 1.98 (m, 1H), 1.86-1.52 (m, 5H), 1.36-0.90 (m, 5H).

Methyl (4*S*,5*S*)-3-benzyl-5-cyclohexyl-2-oxo-oxazolidine-4-carboxylate (118g)

To a stirred suspension of **117g** (4.70 g, 14.6 mmol) in diethyl ether (250 mL) was added 2.0 M trimethylsilyl diazomethane in *n*-hexane (11 mL, 22 mmol). After being stirred for 2 h, the reaction mixture was treated with 2.0 M trimethylsilyl diazomethane in *n*-hexane (4 mL, 8 mmol), stirred overnight, quenched with acetic acid and evaporated. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography to yield the title compound (2.87 g, 62%). TLC R_f 0.41 (hexane/AcOEt = 3/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.21 (m, 5H), 4.86 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 9.6, 7.5 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.02 (m, 1H), 1.82-1.54 (m, 4H), 1.46 (m, 1H), 1.31-0.85 (m, 5H).

(4*R*,5*S*)-3-Benzyl-5-cyclohexyl-2-oxo-oxazolidine-4-carboxylic acid (119g)

To a stirred suspension of **118g** (2.87 g, 9.04 mmol) in dry ethanol (30 mL) was added potassium hydroxide (2.54 g, 45.2 mmol). The reaction mixture was refluxed for 45 min. After cooling to the room temperature, the reaction mixture was evaporated and the resulting residue was acidified with 1.0 M hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated to yield the title compound (2.70 g, 98%). TLC R_f 0.60 (CHCl₃/MeOH/AcOH = 20/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.40-7.23 (m, 5H), 4.83 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 5.4, 4.8 Hz, 1H), 4.15 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 3.82 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 1.76-1.43 (m, 6H), 1.30-0.85 (m, 5H).

(2*R*,3*S*)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-3-hydroxy-propanoic acid (14g)

A mixture of compound **119g** (2.70 g, 8.90 mmol) and 2.0 M aqueous potassium hydroxide (89 mL, 178 mmol) was refluxed under stirring for 7 h. The reaction mixture was neutralized by 6.0 M hydrochloric acid at 0 °C and stirred for 30 min. The resulting precipitates were collected by filtration and washed with cold water, cold acetone and then diethyl ether. To a stirred suspension of the resulting solid in methanol (89 mL) were added 1.0 M sodium hydroxide (8.9 mL) and 20% Pd(OH)₂/C (400 mg). After being stirred for 2.5 h under hydrogen atmosphere, the reaction mixture

was treated with di-*t*-butyl dicarbonate (3.1 mL, 13.4 mmol) at argon atmosphere. After being stirred overnight, catalyst was removed by filtration through a pad of Celite and washed with methanol and water. The organic solvent was removed by evaporation and the resulting residue was washed with hexane/ethyl acetate (4/1). The aqueous layer was acidified with 5% potassium bisulfate (pH 3.0) and extracted with ethyl acetate, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to yield the title compound (2.15 g, 84%). TLC R_f 0.52 (CHCl₃/MeOH/AcOH = 20/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.32 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.71 (dd, J = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.84-1.60 (m, 4H), 1.54-1.15 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.08-0.88 (m, 2H).

Typical procedures for *trans*- β -hydroxy-*N*-Boc-amino acid using hydroxypinanone as a chiral auxiliary

Iminoester of hydroxypinanone (**121i**)

To a stirred solution of the iminoglycinate which was prepared by the dehydrative condensation of ethyl glycinate and hydroxyl pinanone, in dichloromethane (6 mL) were added stepwise a solution of titanium chloride triethoxide in dichloromethane (2.0 M, 2.0 mL, 4.0 mmol), cyclopropanecarboxyaldehyde (300 mg, 4.28 mmol) and triethylamine (1.1 mL, 7.89 mmol) at 0 °C. After being stirred for 5 h at 0 °C, the reaction mixture was poured into cold brine. The aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and evaporated. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography to yield the title compound (1.3 g, quant) as a white solid. TLC R_f 0.40 (CHCl₃/MeOH, 9/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.63 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.47 (s, 1H), 4.10 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.05 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 4.04 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.49 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.53 (dd, J = 18.0, 2.5 Hz, 1H), 2.40 (dt, J = 18.0, 1.5 Hz, 1H), 2.18 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.89 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 1.52 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.14 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 1.08 (m, 1H), 0.76 (s, 3H), 0.31-0.25 (m, 4H).

(**2R,3R**)-2-Amino-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoic acid (**122i**)

To a stirred solution of iminoester **121i** (616 mg, 1.90 mmol) in tetrahydrofuran (6.5 mL) was added 1.2 M aqueous hydrochloric acid (13 mL, 15.6 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was evaporated and the resulting residue was purified by silica gel column chromatography to yield the title compound **122i** (373 mg, 94%) as a colorless viscous oil. TLC R_f 0.52 (CHCl₃/MeOH, 5/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.87 (brs, 3H), 5.62 (brs, 1H), 4.18 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.95 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 3.19(m, 1H), 1.22 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 1.04 (m, 1H), 0.45-0.38

(m, 2H), 0.28 (m, 1H), 0.18 (m, 1H).

(2*R*,3*R*)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-cyclopropyl-3-hydroxypropanoic acid (14i)

To a stirred solution of **122i** (449 mg, 2.25 mmol) in ethanol (20 mL) was added 1.0 M lithium hydroxide (5.5 mL, 5.5 mmol). After being stirred for 2 h, the reaction mixture was treated with di-*t*-butyl dicarbonate (0.8 mL, 3.48 mmol) and stirring was continued for 2 h. The reaction mixture was quenched with water. The aqueous layer was washed with *t*-butylmethylether, acidified with 5% potassium hydrogen sulfate to pH 3.0–4.0 and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to yield the title compound **38f** (553 mg) quantitatively. TLC R_f 0.73 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 10/2/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.36 (brs, 1H), 6.72 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.91 (brs, 1H), 4.00 (dd, J = 9.0, 5.0 Hz, 1H), 3.07 (m, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.01 (m, 1H), 0.35–0.30 (m, 2H), 0.23–0.18 (m, 2H).

Compounds **14j**, **14l**, **14n** and **14o** were prepared according to the same procedures as described above for the preparation of **14i**.

(2*R*,3*R*)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-cyclobutyl-3-hydroxy-propanoic acid (14j)

TLC R_f 0.53 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 10/1/1); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.33 (br, 1H), 6.68 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.80 (dd, J = 9.0, 5.5 Hz, 1H), 3.56 (dd, J = 8.0, 5.5 Hz, 1H), 1.89–1.62 (m, 7H), 1.36 (s, 9H);

(2*R*,3*R*)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-cycloheptyl-3-hydroxy-propanoic acid (14l)

TLC R_f 0.85 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O, 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.49 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 1.88–1.22 (m, 21H).

(2*R*,3*R*)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-*syn*-hydroxy-3-(4-hydroxycyclohexyl)propanoic acid (14n)

TLC R_f 0.62 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O, 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.32 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 1.97–1.43 (m, 9H), 1.44 (s, 9H).

(2*R*,3*R*)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-*anti*-hydroxy-3-(4-hydroxycyclohexyl)propanoic acid (14o)

TLC R_f 0.64 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O, 4/2/1); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.25 (d, J = 5.4 Hz, 1H),

3.50-3.42 (m, 2H), 1.98-1.92 (m, 4H), 1.84-1.77 (m, 1H), 1.60-1.50 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.28-1.12 (m, 2H).

4-9. 参考文献

- 1) (a) Shankaran, K.; Donnelly, K. L.; Shah, S. K.; Guthikonda, R. N.; MacCoss, M.; Mills, S. G.; Gould, S. L.; Malkowitz, L.; Siciliano, S. J.; Springer, M. S.; Carella, A.; Carver, G.; Hazuda, D.; Holmes, K.; Kessler, J.; Lineberger, J.; Miller, M. D.; Emini, E. A.; Schleif, W. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3419; (b) Wood, A.; Armour, D. *Prog. Med. Chem.* **2005**, *43*, 239.
- 2) Jenkinson, S.; McCoy, D. C.; Kerner, S. A.; Ferris, R. G.; Lawrence, W. K.; Clay, W. C.; Condreay, J. P.; Smith, C. J. *Biomolecular Screening* **2003**, *8*, 463.
- 3) Domling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168.
- 4) Caldwell, C. G.; Bondy, S. S. *Synthesis* **1990**, 34.
- 5) Gao, Y.; Hanson, R. M.; Klunder, J. M.; Ko, S. Y.; Masamune, H.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765.
- 6) Solladie-Cavallo, A.; Koessler, J. L. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3240.

4-10. 本章に関連する投稿論文

- i) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Hirai, K.; Habashita, H.; Takaoka, Y.; Tada, H.; Sagawa, K.; Shibayama, S.; Maeda, K.; Mitsuya, H.; Nakai, H.; Fukushima, D.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1141.
 - ii) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Minamoto, C.; Murota, M.; Takaoka, Y.; Nakai, H.; Tada, H.; Sagawa, K.; Shibayama, S.; Fukushima, D.; Maeda, K.; Mitsuya, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4028.
-

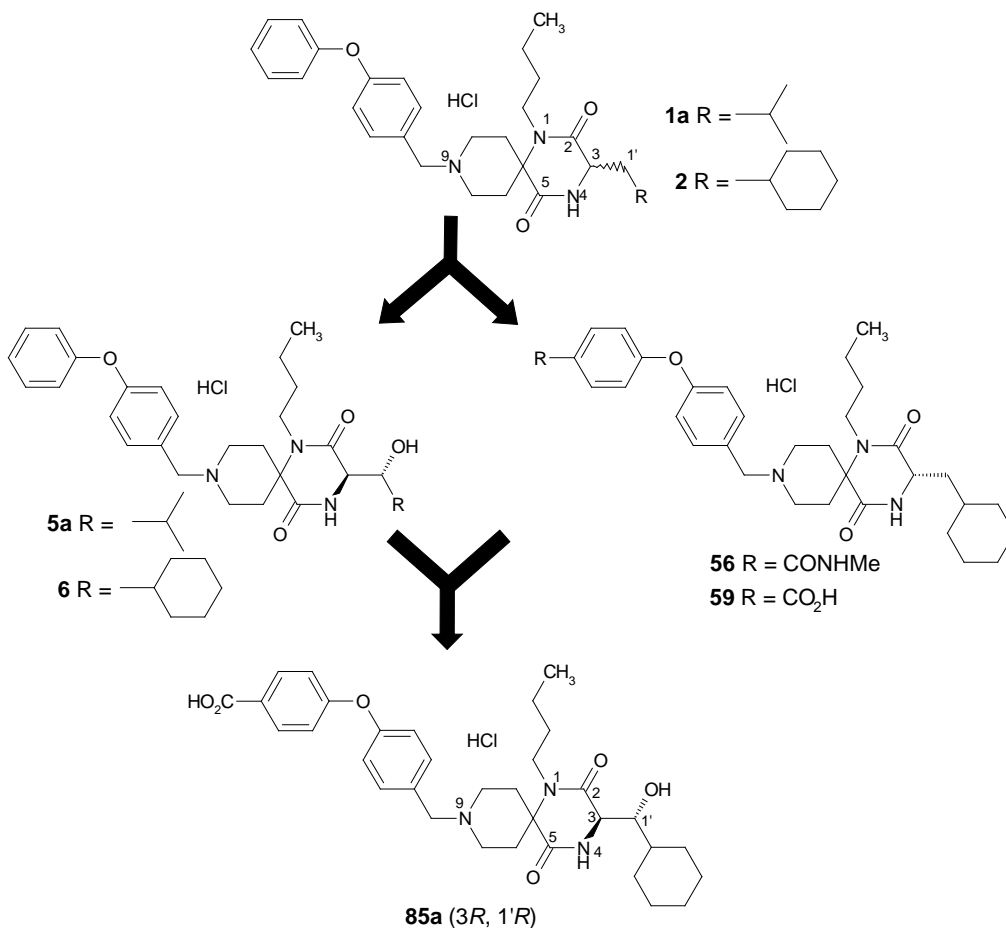
第 5 章

まとめと構造化学的考察

5-1. まとめ

AIDS（後天性免疫不全症）を引き起こすヒト免疫不全ウイルス（Human Immunodeficiency Virus : HIV）は人に感染（宿主に侵入）する際、コレセプターとしてヒトの CCR5 を利用する。筆者らはこの CCR5 を阻害する化合物が新しいメカニズムの抗 HIV 薬となりうると考え、低分子 CCR5 阻害剤の創製研究に着手した。低分子 CCR5 阻害剤創製に当たり、コンビナトリアル合成の手法を用いてデザインされたケモカイン指向性ライブラリーに対し、CCR5 阻害活性のスクリーニングを行った。この結果、強い CCR5 阻害活性と弱いながらも抗 HIV 活性を有するリード化合物 **1a**、**2** を見出した。そこで、このリード化合物を出発点として、抗 HIV 活性及び経口吸収性を改善した化合物の創製への取り組みを開始した (Figure 5.1)。

Figure 5.1 Summary



まず経口吸収性の悪い原因の一つが肝臓での代謝されやすさにあると考え、リード化合物 **1a** の肝ミクロソーム中における代謝物の同定を行った。リード化合物 **1a** を肝ミクロソーム中でインキュベートして代謝を起こさせ、得られた代謝物を LC-MS により分析した結果、リード化合

物 **1a** は主に 3 つの酸化的代謝物を与えることがわかった。予測代謝物をそれぞれ合成し、CCR5 阻害活性の評価を行ったところ、1'位が水酸化された化合物において、3 位及び 1'位の立体化学が非常に重要で、(3*R*, 1'*R*) の絶対配置をもった化合物 **5a** が非常に活性の強い化合物として見出された。さらに 2'位にシクロヘキシル基を有する化合物 **2** に対しても同様に水酸基を導入した化合物を合成したところ、CCR5 阻害活性は同等ながら、抗 HIV 活性が飛躍的に向上した化合物 **6** を見出すに至った。1'位水酸基の CCR5 阻害活性、および抗 HIV 活性の向上に対する寄与が何に起因するものかは明確にはできていないが、ヒドロキシ基自身が受容体である CCR5 と何らかの相互作用している、もしくはヒドロキシ基が 2 位の NH 基と分子内水素結合することにより、シクロヘキシル基やイソプロピル基が受容体の疎水性ポケットに入りやすくなったという二つの可能性を考察している。この構造変換を通して経口吸収性の改善は認められなかったが、酸化的活性代謝物の情報を有効活用することで、抗 HIV 活性向上の糸口となる有用な置換基を見出すことができた。さらには水酸基の導入により化合物の脂溶性が低下し、溶解度、薬物代謝酵素阻害作用といった医薬品らしさの改善につなげることができた。

次に経口吸収性を改善するため、リード化合物 **1a**、**2** の 1 位、3 位、9 位の側鎖置換基に対し、代謝ブロックを意識した構造変換、また脂溶性低下を目指した極性官能基の導入など種々の構造変換を行った。1 位及び 3 位の構造変換では、極性官能基の導入により活性が大きく低下する傾向にあり、リード化合物の持つ 1-*N-n*-ブチル基、3-シクロヘキシルメチル基に代わる置換基を見出すことはできなかった。一方で、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位への置換基導入では、種々の置換基が許容されることがわかってきた。特にこの部位に *N*-メチルアミノカルボニル基を導入した化合物 **56**、カルボキシ基を導入した化合物 **59** は強い抗 HIV 活性を示し、かつ動物に経口投与した際に良好な血中濃度推移を示し、非常に有望な化合物と考えられる。親水性基である *N*-メチルアミノカルボニル基、カルボキシ基を導入することで、分子全体の親水性が増加し、これによる物理化学的性質の改善が C_{max} 、AUC の向上といった血中動態プロファイルの改善につながったと推察している。

最後にこれまでの知見を統合し、経口吸収性、活性のバランスのとれた化合物を見出すため、1'位に水酸基を導入した化合物 **6** への 1-*N* 位、1'位、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位の置換基の最適化を行った。置換基の最適化に当たり、経口吸収性改善のためには脂溶性の低下が有効であると考え、1-*N* 位、1'位への極性官能基の導入を試みたが、化合物 **5** の場合と同様に何れも活性が低下し、これらの部位への極性官能基の導入は困難であることが分かった。一方で、9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のパラ位には極性官能基が許容であり、種々の置換基変換を行った結果、カルボキシ基を導入した化合物 **85a** を見出すに至った。

この化合物 **85a** は非常に強い抗 HIV 活性を持っており、ラット、イヌ、サルに経口投与した際の血中濃度が、抗 HIV 活性の IC₉₀ 値を長時間上回り、臨床においても治療効果を発揮することが期待される化合物である。また、多剤耐性ウィルス株を用いた抗 HIV 活性の評価においても非常に強い増殖抑制作用を示しており、薬剤耐性株出現のため既存の逆

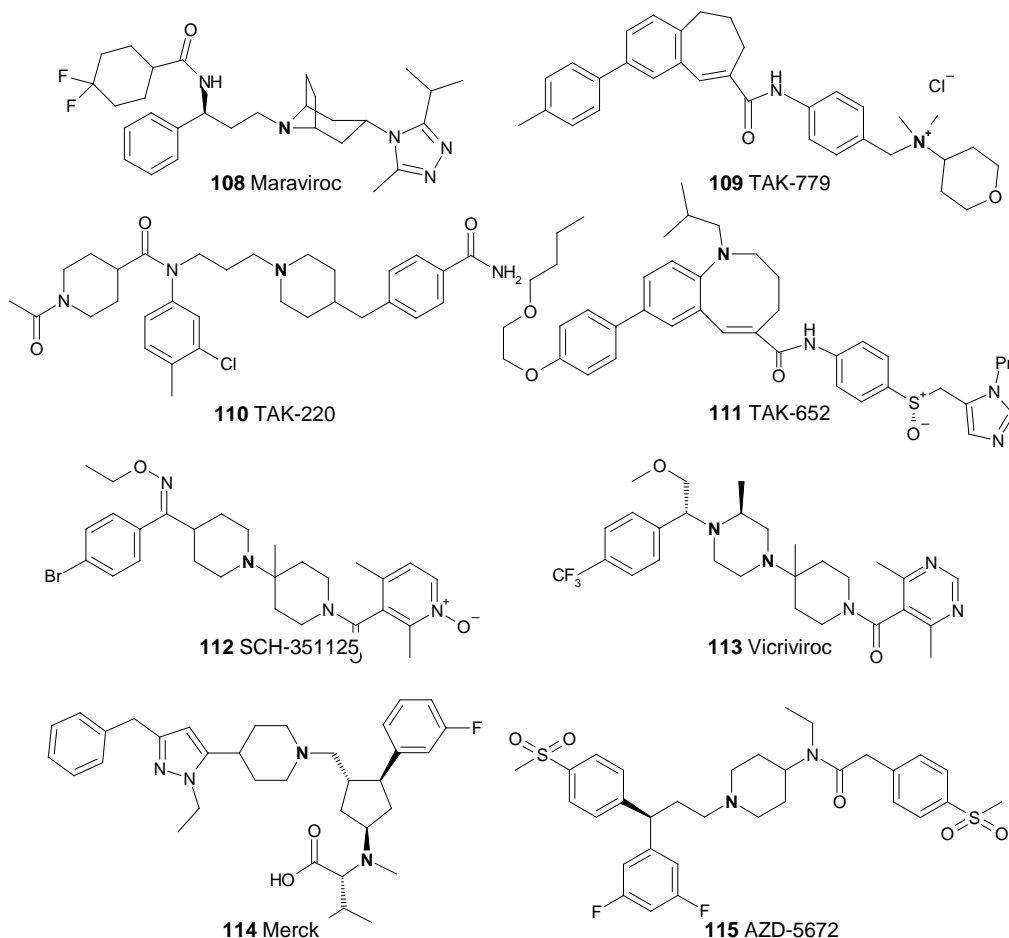
転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤が無効である場合にも有効であることが予想される。さらに生体内リガンドである hMIP-1 α のラベル体を用いた CCR5 との結合阻害実験より、この化合物は CCR5 に結合することによって効力を発揮していること、また hMIP-1 α の細胞遊走作用を阻害する結果が得られたことから、HIV 感染症治療薬としてだけでなく、各種免疫抑制剤としての可能性も期待できることが示唆されてきた。安全面では他の GPCR、キナーゼ、イオンチャネル等のターゲット蛋白に対する選択性は良好であり、動物に対する毒性試験では 100 mg/kg 経口投与の条件においても、特に重篤な毒性を示さなかった。以上の結果を踏まえ、この化合物 **85a** を開発化合物として選択した(開発番号：ONO-4128/Apraviroc)。

ONO-4128 (**85a**)は臨床試験のPhase2 試験でAIDS患者への投与により有意な有効性を示すことが明確になり、臨床での効果に非常に期待が持たれていた¹。しかしながら、Phase 2 後期試験及びPhase 3 試験において、ONO-4128 (**85a**)投与による影響が否定できない特異体質性肝毒性を示した患者が数名発生し、現在は開発中止に至っている。この特異体質性肝毒性は非臨床の毒性試験では予想できないものであり、種々原因の追及を行ったが、未だ原因を特定できていない。経口吸収性が十分でないため一日当たりの投与量が 600-800mg と非常に高く、代謝組織である肝臓に負担がかかったのではないかとすることが原因の一つとして予想できることから、経口吸収性の良好なCCR5 阻害剤の創製研究を継続して行っている。

5-2. 構造化学的考察

これまでに報告されているCCR5 阻害剤の構造の一部をFigure 5.2 に示した。上市されている化合物はPfizer社のMaraviroc (**108**)²のみであるが、その他に武田薬品からTAK-779 (**109**)³、TAK-220 (**110**)⁴、TAK-652 (**111**)⁵、Shering-Plough社 (現Merck社)からSCH-351125 (**112**)⁶、Vicriviroc (**113**)⁷などが開発ステージに上がっている。またMerck社(**114**)⁸やアストラゼネカ社(**115**)⁹等から多数のCCR5 阻害剤が文献報告されている。

Figure 5.2 既知の CCR5 阻害剤

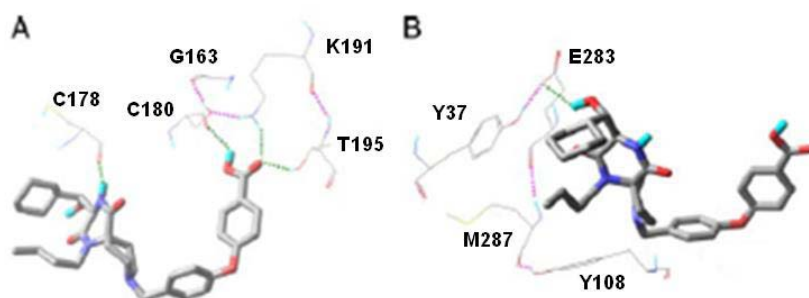


CCR5 は 7 回膜貫通型の G タンパク 共役型 受容体であり、7 つの膜貫通領域 (TM ; Transmembrane) と細胞外領域 (ECL : Extracellular loop) からなる。**Figure 5.2** に示した既知化合物は何れも塩基性の化合物であり、各構造式中に太字で示した塩基性窒素原子と CCR5 の TM7 に存在する 283 番目のグルタミン酸 (Glu²⁸³) と相互作用することで阻害活性を発現していると予想されている¹⁰。これに対し、ONO-4128 は一つの分子内に塩基性の 3 級アミンとカルボン酸を有する双極性分子であり、CCR5 との相互作用形式の解析に非常に興味を持たれる。

共同研究者であった満屋らのグループは、変異解析の結果、及びウシロドプシンの結晶構造をテンプレートとしたホモロジーモデルを用いたコンピューターモデリングを行い、ONO-4128 (**85a**)の CCR5 との相互作用を**Figure 5.3** に示したように推定できると報告している¹¹。すなわち ONO-4128 は CCR5 の膜貫通ドメインの表層の一部に存在する疎水性ポケットと第二細胞外ループ (ECL-2) の一部に結合しており、TM4 の Gly¹⁶³、ECL-2 の Ser¹⁸⁰、TM5 の Lys¹⁹¹、Thr¹⁹⁵ が 9-*N*-(4-フェノキシ-ベンジル)基の末端のカルボン酸と水素結合を形成、ま

たTM1のTyr³⁷、TM3のTyr¹⁰⁸、TM7のGlu²⁸³、Met287が1'位の水酸基と水素結合を形成すると予測している。

Figure 5.3 満屋らから報告されている CCR5 と ONO-4128 (85a) との相互作用の予測



一方、Merck社から報告されている化合物 **114** およびその類縁体を用いたCCR5 変異実験データ¹²と新潟薬科大学の石黒らが報告しているGPCRリガンド認識仮説¹³に基づくCCR5の立体構造モデルを用いて、独自にONO-4128 (**85a**)との複合体モデルを作成した結果を**Figure 5.4**に示す。GPCRはリガンドを認識し結合することで、立体構造が変化することが知られており、立体構造の明らかになっている典型的なGPCRであるロドプシンの立体構造から、リガンドを認識することで変化する活性化型のGPCR構造を予測したものがGPCRリガンド認識仮説である。この結果ではGlu²⁸³はピペリジン環の窒素原子と相互作用しており、またジケトピペラジン環の2位のカルボニルの酸素原子は1'位の水酸基と分子内水素結合するとともに、Tyr¹⁷⁶と水素結合を形成し、さらにジケトピペラジン環のもう一つのカルボニルの酸素原子はTyr¹⁰⁸との水素結合していることが予測された。満屋らの報告でCCR5と重要な水素結合を形成していたONO-4128 (**85a**)分子内の9-N位末端のカルボン酸は、特に強い相互作用は持たず、比較的大きいポケットの中に納まっていることが予測された。満屋らの報告(A)と独自に行った複合体モデルの解析結果(B)を**Figure 5.5**に比較して示した。(B)の筆者らの予測結果は(A)と比較し、CCR5のより深い位置に化合物が位置していることが伺える。

Figure 5.4 GPCR リガンド認識仮説に基づいて予測した CCR5 と ONO-4128 (85a) との相互作用様式

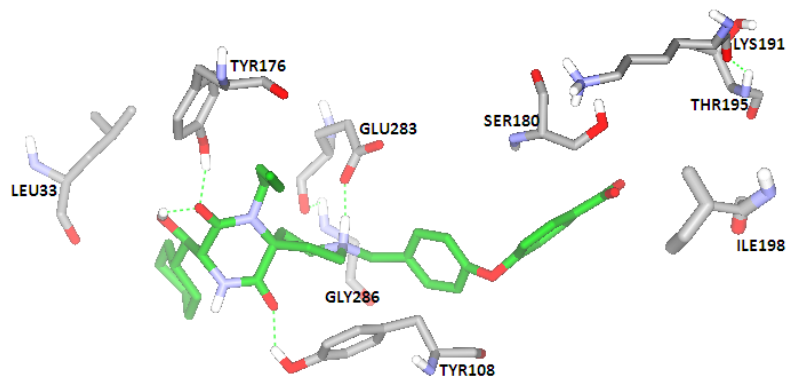
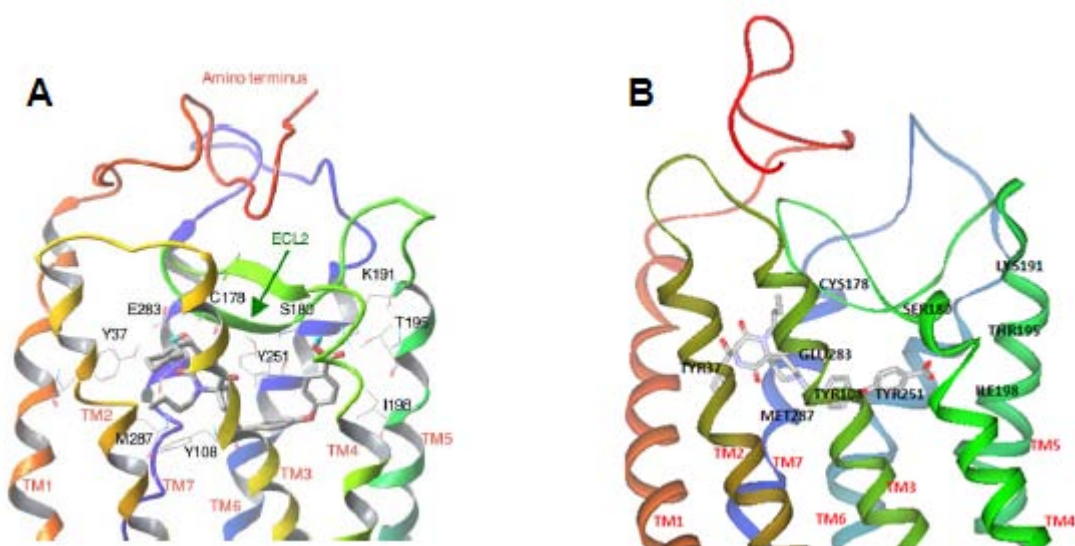


Figure 5.5 CCR5 と ONO-4128 (85a) の結合様式



(A): 満屋らから報告されている予測結果

(B): GPCR リガンド認識仮説に基づいた予測結果

第 2~4 章で示した構造活性相関では、9 位のピペリジン環の窒素原子が CCR5 結合阻害活性には必須であること、また 1'位の水酸基が活性向上に寄与していること、さらには 9-*N* 位末端には多岐に富む、比較的大きな置換基をも許容されることがわかっている。これらの構造活性相関に関する情報は筆者らの **Figure 5.5 (B)**の予測結果を支持するものである。実際には何れの結合様式も予測であり、どちらが正しいか、または別の結合様式が存在するのかについては、CCR5 受容体蛋白と ONO-4128 (85a)との共結晶の X 線構造解析結果を見て判断する必要があると考えている。しかしながら本研究で見いだされた CCR5 阻害剤 ONO-4128 (85a)は、これまで知られている CCR5 阻害剤とは異なった官能基が活性発現に重

要な役割を果たしており、他の CCR5 阻害剤とは異なる新規な相互作用を介して CCR5 を阻害していることが予測できる。このことは薬剤耐性の発現しやすい抗 HIV 薬としては非常に魅力的なプロファイルであり、新たな CCR5 阻害剤による抗 HIV 薬開発の起点となることが期待できる。

5-3. 参考文献

1. Lalezari, J.; Thompson, M.; Kumar, P.; Piliero, P.; Davey, R.; Murtaugh, T.; Patterson, K.; Shachoy-Clark, A.; Adkinson, A.; Demarest, J.; Sparks, S.; Fang, L.; Lou, Y.; Berrey, M.; Piscitelli, S. *44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston, February 22–25, 2005*, Abstr. H-1137b, Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA
2. (a) Dorr, P.; Westby, M.; Dobbs, S.; Griffin, P.; Irvine, B.; Macartney, M.; Mori, J.; Rickett, G.; Smith-Burchnell, C.; Napier, C.; Webster, R.; Armour, D.; Price, D.; Stammen, B.; Wood, A.; Perros, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4721. (b) Wood, A.; Armour, D. *Progress Med. Chem.* **2005**, *43*, 239.
3. (a) Baba, M.; Nishimura, O.; Kanzaki, N.; Okamoto, M.; Sawada, H.; Iizawa, Y.; Shiraishi, M.; Aramaki, Y.; Okonogi, K.; Ogawa, Y.; Meguro, K.; Fujino, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5698. (b) Shiraishi, M.; Aramaki, Y.; Seto, M.; Imoto, H.; Nishikawa, Y.; Kanzaki, N.; Okamoto, M.; Sawada, H.; Nishimura, O.; Baba, M.; Fujino, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (10), 2049.
4. (a) Aramaki, Y.; Seto, M.; Okawa, T.; Oda, T.; Kanzaki, N.; Shiraishi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 254. (b) Seto, M.; Aramaki, Y.; Okawa, T.; Miyamoto, N.; Aikawa, K.; Kanzaki, N.; Niwa, S.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Shiraishi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 577. (c) Seto, M.; Aramaki, Y.; Imoto, H.; Aikawa, K.; Oda, T.; Kanzaki, N.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Shiraishi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 818. (d) Seto, M.; Miyamoto, N.; Aikawa, K.; Aramaki, Y.; Kanzaki, N.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Shiraishi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 363.
5. (a) Imamura, S.; Ishihara, Y.; Hattori, T.; Kurasawa, O.; Matsushita, Y.; Sugihara, Y.; Kanzaki, N.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Hashiguchi, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 63. (b) Imamura, S.; Kurasawa, O.; Nara, Y.; Ichikawa, T.; Nishikawa, Y.; Iida, T.; Hashiguchi, S.; Kanzaki, N.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Sugihara, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2295. (c) Imamura, S.; Nishikawa, Y.; Ichikawa, T.; Hattori, T.; Matsushita, Y.; Hashiguchi, S.; Kanzaki, N.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Sugihara, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 397. (d) Nishikawa, M.; Takashima, K.; Nishi, T.; Furuta, R. A.; Kanzaki, N.; Yamamoto, Y.; Fujisawa, J.-I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4708–4715.
6. (a) Palani, A.; Shapiro, S.; Clader, J. W.; Greenlee, W. J.; Cox, K.; Strizki, J.; Endres, M.; Baroudy, B. M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (21), 3339. (b) Strizki, J. M.; Xu, S.; Wagner, N. E.;

- Wojcik, L.; Liu, J.; Hou, Y.; Endres, M.; Palani, A.; Shapiro, S.; Clader, J. W.; Greenlee, W. J.; Tagat, J. R.; McCombie, S.; Cox, K.; Fawzi, A. B.; Chou, C. C.; Pugliese-Sivo, C.; Davies, L.; Moreno, M. E.; Ho, D. D.; Trkola, A.; Stoddart, C. A.; Moore, J. P.; Reyes, G. R.; Baroudy, B. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98 (22), 12718.
7. (a) Tagat, J. R.; McCombie, S. W.; Steensma, R. W.; Lin, S.-I.; Nazareno, D. V.; Baroudy, B.; Vantuno, N.; Xu, S.; Liu, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2143. (b) Tagat, J. R.; Steensma, R. W.; McCombie, S. W.; Nazareno, D. V.; Lin, S.; Neustadt, B. R.; Cox, K.; Xu, S.; Wojcik, L.; Murray, M. G.; Vantuno, N.; Baroudy, B. M.; Strizki, J. M. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3343. (c) McCombie, S. W.; Tagat, J. R.; Vice, S.; Lin, S.-I.; Steensma, R.; Palani, A.; Neustadt, B.; Baroudy, B.; Strizki, J. M.; Endres, M.; Cox, K.; Dan, N.; Chou, C.-C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 567. (d) Tagat, J. R.; McCombie, S. W.; Nazareno, D.; Labroli, M. A.; Xiao, Y.; Steensma, R. W.; Strizki, J. M.; Baroudy, B. M.; Cox, K.; Lachowicz, J.; Varty, G.; Watkins, R. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2405. (e) Strizki, J. M.; Tremblay, C.; Xu, S.; Wojcik, L.; Wagner, N.; Gonsiorek, W.; Hipkin, W.; Chou, C.-C.; Pugliese-Sivo, C.; Xiao, Y.; Tagat, J. R.; Cox, K.; Priestley, T.; Sorota, S.; Huang, W.; Hirsch, M.; Reyes, G. R.; Baroudy, B. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 4911.
 8. Mills, S. G.; DeMartino, J. A. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, 4, 1017.
 9. (a) Burrows, J. N.; Cumming, J. G.; Fillery, S. M.; Hamlin, G. A.; Hudson, J. A.; Jackson, R. J.; MacLaughlin, S.; Shaw, J. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 25. (b) Cumming, J. G.; Cooper, A. E.; Grime, K.; Logan, C. J.; McLaughlin, S.; Oldfield, J.; Shaw, J. S.; Tucker, H.; Winter, J.; Whittaker, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 5012. (c) Cumming, J. G.; Brown, S. J.; Cooper, A. E.; Faull, A. W.; Flynn, A. P.; Grime, K.; Oldfield, J.; Shaw, J. S.; Shepherd, E.; Tuckera, H.; Whittaker, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3533.
 10. (a) Dragic, T.; Trkola, A.; Thompson, D. A. D.; Cormier, E. G.; Kajumo, F. A.; Maxwell, E.; Lin, S. W.; Ying, W.; Smith, O. S.; Sakmar, T. P.; Moore, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 5639. (b) Kondru, R.;
 11. Maeda, K.; Das, D.; Ogata, A. H.; Nakata, H.; Miyakawa, T.; Tojo, Y.; Norman, R.; Takaoka, Y.; Ding, J.; Arnold, G. F.; Arnold, E.; Mitsuya, H. *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281, 12688.
 12. (a) Hsiou, Y.; Ding, J.; Das, K.; Clark Jr, A. D.; Boyer, P. L.; Lewi, P.; Janssen, P. A. J.; Kleim, J. P.; Rösner, M.; Hughes, S. H.; Arnold, E. *J. Mol. Biol.* **2001**, 309, 437. (b) Castonguay, L. A.; Weng, Y.; Adolfsen, W.; Salvo, J. D.; Kilburn, R.; Caldwell, C. G.; Daugherty, B. L.; Finke, P. E.; Hale, J. J.; Lynch, C. L.; Mills, S. G.; MacCoss, M.; Springer, M. S.; DeMartino, J. A. *Biochemistry*, **2003**, 42, 1544.
 13. (a) Ishiguro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 444. (b) Hirano, T.; Lim, I. T.; Kim, D. M.; Zheng, X. G.; Yoshihara, K.; Oyama, Y.; Imai, H.; Shichida, Y.; Ishiguro, M. *Photochem. Photobiol.* **2002**, 76, 606. (c) Ishiguro, M.; Hirano, T.; Oyama, Y.; *Chem. Bio. Chem.* **2003**, 4,

228. (d) Ishiguro, M.; Oyama, Y.; Hirano, T. *Chem. Bio. Chem.* **2004**, 5, 298. (e) 石黒正路, フ
アルマシア, **2001**, 37, 291.

謝辞

本論文を提出する機会を与えてくださり、また作成に当たり貴重なご助言とご指導を賜りました名古屋大学大学院 生命農学研究科 生命機能化学専攻 生物有機化学研究室 西川俊夫 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究は小野薬品工業株式会社 水無瀬研究所において行われたものであります。本研究の機会を与えてくださいました、小野薬品工業株式会社 代表取締役社長 松本公一郎 氏（当時）、研究本部長 近藤規元 氏（当時）に深く感謝いたします。

本研究の推進に当たり、貴重なご指導、ご助言をいただきました 戸田正明 博士、高岡義和 博士、巾下 広 博士に感謝いたします。

投稿論文作成に当たり、非常に多くのご指導、ご助言をいただきました 中井久郎 博士に感謝いたします。

本研究を進めるに当たり、誘導体の合成、合成法の開発を行って下さいました西山敏彦 氏、久一勝矢氏、源 智秋 氏、室田雅之 氏、松永直樹 氏、平井啓介 氏、倉田晴登 氏、小林 克利氏に感謝いたします。

薬理評価をしていただきました柴山史郎 氏、多田秀明 氏、佐川健二 氏、松尾政芳 氏、笠野実希 氏に感謝いたします。

動態評価をしていただきました今若治夫 氏、高橋英二 氏に感謝いたします。

抗 HIV 活性の評価をしていただきました熊本大学大学院 生命科学研究部 満屋裕明 教授、前田健二 博士に感謝いたします。

CCR5 と化合物の複合体モデルの構築、コンピューターモデリングを行って頂きました西崎 稔 氏、黒野昌邦 氏、ファルマデザイン社 高橋 理 氏、石田和博 氏に感謝いたします。

ONO-4128 の導出活動を推進していただきました小野薬品工業株式会社 国際部(当時)の方々に感謝いたします。

ONO-4128 の導出先である GSK 社との連携を円滑に進めてくださいました谷 耕輔 氏、平谷典和 氏に感謝いたします。

特許に関するご指導、ご助言を頂きました潮 泰行 氏、森田祐司氏、内山みどり氏に感謝いたします。

Fusion 阻害活性のデータを提供していただきました GSK 社の Stephen Jenkinson 氏、Wieslaw M. Kazmierski 氏に感謝いたします。

名古屋大学での学部生時代、また大学院博士前期課程在籍時に、研究室において常に親身になってご指導くださった磯部 稔 名古屋大学名誉教授に感謝いたします。

有機化学の魅力や研究にひたむきになって取り組む人生がいかに面白いかを常々熱く語り、研究の面白さを叩き込むように教えてくれた亡き父、西澤麦夫に感謝いたします。

最後に、本研究を進め、論文を作成するに当たり、暖かく見守ってくれた家族に心より御礼申し上げます。

報文目録

- i) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Matsunaga, N.; Minamoto, C.; Habashita, H.; Takaoka, Y.; Toda, M.; Shibayama, S.; Tada, H.; Sagawa, K.; Fukushima, D.; Maeda, K.; Mitsuya, H.
“Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonists: Lead optimization from biologically active metabolite”
Bioorg. Med. Chem. Lett., **17**, 727-731, (2007).

- ii) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Hirai, K.; Habashita, H.; Takaoka, Y.; Tada, H.; Sagawa, K.; Shibayama, S.; Maeda, K.; Mitsuya, H.; Nakai, H.; Fukushima, D.; Toda, M.
“Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonists: Improvement of their pharmacokinetic profiles”
Bioorg. Med. Chem. Lett., **20**, 763-766, (2010).

- iii) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Hirai, K.; Habashita, H.; Takaoka, Y.; Tada, H.; Sagawa, K.; Shibayama, S.; Maeda, K.; Mitsuya, H.; Nakai, H.; Fukushima, D.; Toda, M.
“Discovery of orally available spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonists”
Bioorg. Med. Chem., **18**, 5208-5223, (2010).

- iv) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Hirai, K.; Habashita, H.; Takaoka, Y.; Tada, H.; Sagawa, K.; Shibayama, S.; Maeda, K.; Mitsuya, H.; Nakai, H.; Fukushima, D.; Toda, M.
“Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonist: Discovery of an antiretroviral drug candidate”
Bioorg. Med. Chem. Lett., **21**, 1141-1145, (2011).

- v) Nishizawa, R.; Nishiyama, T.; Hisaichi, K.; Minamoto, C.; Murota, M.; Takaoka, Y.; Nakai, H.; Tada, H.; Sagawa, K.; Shibayama, S.; Fukushima, D.; Maeda, K.; Mitsuya, H.
“Discovery of
4-[4-({(3R)-1-Butyl-3-[(R)-cyclohexyl(hydroxy)methyl]-2,5-dioxo-1,4,9-triazaspiro[5.5]undec-9-yl)methyl}phenoxy]benzoic acid hydrochloride: a highly potent orally available CCR5 selective antagonist”
Bioorg. Med. Chem., **19**, 4028-4042, (2011).

参考論文目録

- i) Isobe, M.; Nishizawa, R.; Hosokawa, S.; Nishikawa, T.
“Stereocontrolled synthesis and reactivity of sugar acetylenes”
Chem. Commun., 2665–2676, (1998).
- ii) Isobe, M.; Nishizawa, R.; Nishikawa, T.; Yoza, K.
“Hydrosilylation of acetylenes with catalytic biscobalthexacarbonyl complex and its application to heteroconjugate addition methodology”
Tetrahedron Letters, **40**, 6927-6932, (1999).
- iii) Isobe, M.; Saeeng, R.; Nishizawa, R.; Konobe, M.; Nishikawa, T.
“Electronic Factors in the C-Glycosidation with Silylacetylene”
Chemistry Letters, 467-468, (1999).
- iv) Ichikawa, Y.; Ohbayashi, M.; Hirata, K.; Nishizawa R.; Isobe, M.
“Synthesis of blastidic acid and cytosinine, two components of blasticidin S”
SYNLETT, **11**, 1763-1766, (2001).