

脂質異常症治療薬を指向した可逆的ホルモン感受性リパーゼ阻害剤の合成研究

第一三共株式会社 モダリティ研究所

荻山 朋子

紹介教員 高橋 秀依

## 目次

### 第一章 緒論

第一節	脂質異常症と動脈硬化	1
第二節	脂肪分解作用抑制による脂質異常症の治療効果	4
第三節	ホルモン感受性リパーゼを介した脂質異常症改善作用	5

### 第二章 リード化合物{2-[(4-{[5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル]オキシ}ベンジル)オキシ]フェニル}ボロン酸の創製

第一節	新規可逆的 HSL 阻害剤の設計	9
第二節	合成	10
第三節	薬理評価と考察	11
第四節	第二章まとめ	15

### 第三章 反応性代謝物生成リスクを回避した{5-クロロ-2-[(6-[4-(トリフルオロメチル)フェノキシ]ピリジン-3-イル)カルボニル)アミノ]フェニル}ボロン酸の創製

第一節	はじめに	16
第二節	反応性代謝物生成回避の合成方針	17
第三節	合成	18
第四節	薬理評価と考察	20
第五節	第三章まとめ	26

第四章 {5-フルオロ-2-[2-オキソ-2-(4-{[5-(トリフルオロメチル) ピリジン-2-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]フェニル}ボロン酸の発見

第一節	はじめに	27
第二節	新規誘導体の合成方針	29
第三節	合成	30
第四節	薬理評価と考察	32
第五節	第四章まとめ	42
第五章	総括	43
	実験の部	46
	参考文献及び脚注	84

略語表

AChE	acetylcholinesterase
AcOEt	ethyl acetate
AcOH	acetic acid
aq.	aqueous
Asp	aspartic acid
AUC	area under the curve
Bpin	pinacolboronate
BuChE	butyrylcholinesterase
calcd	calculated
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cat.	catalytic amount
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichloromethane
C <sub>max</sub>	maximum concentration
conc.	concentrated
CYP450	cytochrome P450
Cys	cysteine
Da	dalton
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	dithiothreitol
EDC·HCl	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid

E <sub>HOMO</sub>	HOMO energy
E <sub>LUMO</sub>	LUMO energy
ESI	electrospray ionization
Et <sub>2</sub> O	diethyl ether
EtOH	ethanol
FAB	fast atom bombardment
FABP4	fatty acid binding protein 4
Glu	glutamic acid
Gly	glycine
GSH	glutathione
h	hour(s)
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HDL	high density lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His	histidine
HMG CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HOBT	1-hydroxybenzotriazole
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry
HSL	hormone sensitive lipase
IC <sub>50</sub>	concentration giving half-maximal inhibition
IDR	idiosyncratic drug reaction
IS	internal standard
JP	Japanese pharmacopoeia
LC/MS	liquid chromatography-mass spectrometry

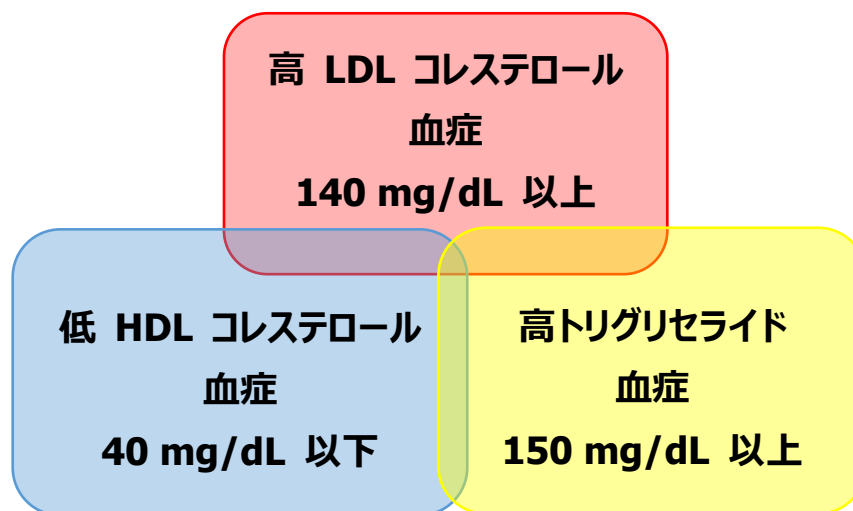
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LDL	low density lipoprotein
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
Me	methyl
MeOH	methanol
min	minute(s)
MS	mass spectrometry
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
$m/z$	mass to charge ratio
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NC	not calculated
ND	not detected
NMM	<i>N</i> -methyl morpholine
NMR	nuclear magnetic resonance
NT	not tested
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
PBS	phosphate buffered saline
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II)
Pd(OAc) <sub>2</sub>	palladium(II) acetate
P <sub>eff</sub>	permeability coefficient
PKA	protein kinase A
pK <sub>a</sub>	the logarithm of the acid dissociation constant
PNPB	<i>p</i> -nitrophenyl butyrate
po	per os
PPh <sub>3</sub>	triphenylphosphine

s	second(s)
SAR	structure activity relationship
SEM	standard error of the mean
Ser	serine
quant.	quantative
<i>tert</i>	tertiary
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
TMSBr	bromotrimethylsilane
TMSCl	chlorotrimethylsilane
UV	ultraviolet
VLDL	very low density lipoprotein

## 第一章 緒論

### 第一節 脂質異常症と動脈硬化

脂質異常症は、いわゆる「悪玉」の LDL (low density lipoprotein) コレステロールや血液中の中性脂肪（トリグリセライド）が過剰、または「善玉」の HDL (high density lipoprotein) コレステロールが異常な低値を示す、血液状態を総称する病態である<sup>1)</sup>。脂質異常症は、異常値を示す脂質の種類によって、高 LDL コレステロール血症、高トリグリセライド血症、低 HDL コレステロール血症に分類され、一人の患者が複数のタイプをあわせ持つこともある (Figure 1)<sup>2)</sup>。厚生労働省の「平成 26 年 (2014) 患者調査の概況」によると、日本で脂質異常症の継続的な治療を受けている患者数は推定 206 万 2000 人とされ、その数は現在も増加傾向にある<sup>3)</sup>。



**Figure 1.** 脂質の異常値に基づいた脂質異常症の分類

脂質異常症は動脈硬化性疾患（冠動脈疾患や脳卒中など）の主要な危険因子であることが、疫学研究で明らかにされており、心臓発作、心筋梗塞、不安定狭心症といった致死的な急性冠症候群の原因の一つである<sup>1)</sup>。そのため、動脈硬化性疾患の予防には、脂質異常症の積極的な治療が重要な役割を担うと広く言われている<sup>4)</sup>。

脂質異常症は遺伝素因に加え、食生活の乱れ、過度の飲酒、運動不足、喫煙、ストレスなどの生活習慣の乱れを背景とした、LDL や HDL などのリポ蛋白の代謝異常によって引き起こされる<sup>2)</sup>。したがって、脂質異常症の治療は通常、食事療法や運動療法による生活習慣の改善から開始し、脂質管理の目標値が達成できない場合、もしくは危険因子が多く動脈硬化やその関連疾患を生じるリスクが高い場合には、薬物療法が用いられる<sup>1)</sup>。現在臨床で用いられている脂質異常症治療薬を Table 1 に示す。

**Table 1.** 脂質異常症治療薬の薬効による分類

分類	LDL-C	TG	HDL-C	薬品名
スタチン	↓↓↓	↓	↑	プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン
陰イオン交換樹脂	↓↓	↑	↑	コレスチラミン、コレスチミド
小腸コレステロール トランスポーター阻害薬	↓↓	↓	↑	エゼチミブ
フィブラート系薬	↓	↓↓↓	↑	ベザフィブラート、フェノフィブラート、クロフィブラート、クリノフィブラート
ニコチン酸誘導体	↓	↓↓	↑	トコフェロール、ニセリトロール、ニコモール
プロブコール	↓	—	↓↓	プロブコール
多価不飽和脂肪酸	—	↓	—	イコサペント酸エチル、オメガ-3 脂肪酸エチル
PCSK9 阻害薬	↓↓↓↓	↓↓	↑	エボロクマブ、アリロクマブ
MTP 阻害薬	↓↓↓	↓↓↓	↓	ロミタピド

脂質異常症患者に対する薬物療法は、LDL コレステロール値の低下に重点を置く。LDL コレステロール値と心血管イベントの発症率に直線的な関係があることが、スタチン（HMG CoA 還元酵素阻害剤）を用いた研究により、明らかにされたためである<sup>5)</sup>。高 LDL コレステロール血症の場合は、第一選択薬としてスタチンが用いられ、更なる治療薬としては陰イオン交換樹脂、小腸コレステロールトランスポーター阻害剤の使用が行われる。高トリグリセライド血症の場合は、フィブラート系薬剤やニコチン酸誘導体を用いる<sup>2)</sup>。これらの薬剤は十分なエビデンスはないが、ランダム化比較試験結果から、動脈硬化性疾患予防に有効であるとされている<sup>6),7)</sup>。低 HDL コレステロール血症は、高トリグリセライド血症を伴うことが多い。この場合は、中性脂肪値の低下により HDL コレステロール値が上昇するため、高トリグリセライド血症の治療に準ずる<sup>2)</sup>。

脂質異常症治療薬の研究は近年でも精力的に行われており、脂質異常症の治療効果とそれに付随した動脈硬化性疾患の予防効果について、多くの報告がある。その中でも、2016 年に本邦で承認された PCSK9 阻害剤エボロクマブ（レパーサ®、アムジェン社）は、スタチンを用いた治療でも脂質異常症改善効果が不十分な患者において、スタチンとの併用により心血管イベントを抑制することが確認されている<sup>8)</sup>。その標的である PCSK9 は、LDL 受容体に結合しその分解を促進する蛋白分解酵素であり<sup>9)</sup>、血中 LDL コレステロール値の上昇に関与する<sup>10)</sup>。また、PCSK9 の分泌量は、スタチン投与により増加することが知られている<sup>11)</sup>。以上の理由から、PCSK9 とスタチンの併用は、特にスタチン忍容性不良や効果減弱がみられる患者に対し、LDL コレステロール値の管理目標の達成が期待されている<sup>12)</sup>。エボロクマブの使用は限定されており、心血管イベントの発現リスクが高く、スタチン製剤で効果不十分な、家族性高コレステロール血症または高コレステロール血症患者を対象としている。それにも関わらず、日本においては 2026 年には 6.9 万人が使用し売上高は 492 億円にのぼる、ブロックバスターになることが予測されている<sup>13)</sup>。

このように、さまざまな脂質異常症治療薬が開発され臨床で使用されており、その治療満足度および薬剤貢献度は、他の疾患に比べると高いとみなされている。その反面、日本の 4 人に 1 人以上が、未だに心疾患・脳血管疾患といった動脈硬化性疾患で死亡している<sup>14)</sup>。以上の状況をふまえると、動脈硬化性疾患の残余リスク低減のため、新規脂質異常症治療薬の登場が今後も待ち望まれている。

## 第二節 脂肪分解作用抑制による脂質異常症の治療効果

脂肪分解は、個体におけるエネルギーの貯蔵および利用を制御する重要な反応系である<sup>15)</sup>。脂肪細胞では食事、飢餓、インスリン等に反応して脂肪分解は制御されている。絶食状態では、脂肪細胞内のリパーゼによる脂肪分解作用により、中性脂肪はグリセロールと脂肪酸へと変換される<sup>16)</sup>。体循環に放出され血中に存在する脂肪酸は、遊離脂肪酸とよばれ、脂肪細胞における脂肪分解の亢進は、遊離脂肪酸値の上昇に寄与すると考えられている。

遊離脂肪酸は、体内の各組織でエネルギー源として利用される一方、余剰の遊離脂肪酸は肝臓へ取り込まれ、肝臓中で超低比重リポ蛋白（VLDL, very low density lipoprotein）の合成に利用される。VLDL の分泌量の増加は、以下の二つの点から、脂質異常症に関与していると考えられる<sup>17)</sup>。まず、VLDL は中性脂肪が豊富なりポ蛋白であるため、血中の中性脂肪値の上昇に繋がる。また、VLDL は体循環中に代謝され LDL になることから、血中 LDL コレステロール値の上昇を招く。したがって、脂肪細胞における脂肪分解の抑制は、遊離脂肪酸の生成の減少につながり、脂質代謝改善作用を示す可能性が高い。

その一例として、古くから治療薬として用いられているニコチン酸誘導体があげられる。ニコチン酸の脂質代謝改善作用は、脂肪細胞における脂肪分解の抑制であると考えられている<sup>18)</sup>。さらに本剤の研究を通じて、脂肪細胞における脂肪分解作用の抑制により、遊離脂肪酸の分泌が抑制され、脂質異常症の治療につながることを示されている<sup>19)</sup>。

### 第三節 ホルモン感受性リパーゼを介した脂質異常症改善作用

#### a) ホルモン感受性リパーゼと脂肪分解

ホルモン感受性リパーゼ（HSL, hormone sensitive lipase）は脂肪細胞内の中性リパーゼであり、アシルグリセロール、コレステロールエステル、レチニルエステル、ステロイドエステル等、様々な基質を加水分解する<sup>20)</sup>。HSL は体内の各組織に存在するが、脂肪細胞に最も多く発現し、脂肪分解に関与するリパーゼの一つである<sup>15)</sup>。絶食時、カテコールアミンが脂肪細胞表面の  $\beta 3$  受容体に結合し、アデニルシクラーゼを活性化する（Figure 2）。これによって生成した環状アデノシン一リン酸（cAMP, cyclic adenosine monophosphate）がプロテインキナーゼ A（PKA, protein kinase A）を活性化し、HSL 及び脂肪滴表面のペリリピンがリン酸化される<sup>21)</sup>。その結果、HSL は活性型になり、更に細胞質から脂肪滴表面への移動が誘発され<sup>22)</sup>、脂肪分解が促進されると考えられている<sup>23), 24)</sup>。したがって、HSL の直接阻害は脂肪分解を抑制し、脂質代謝を改善することが期待される。

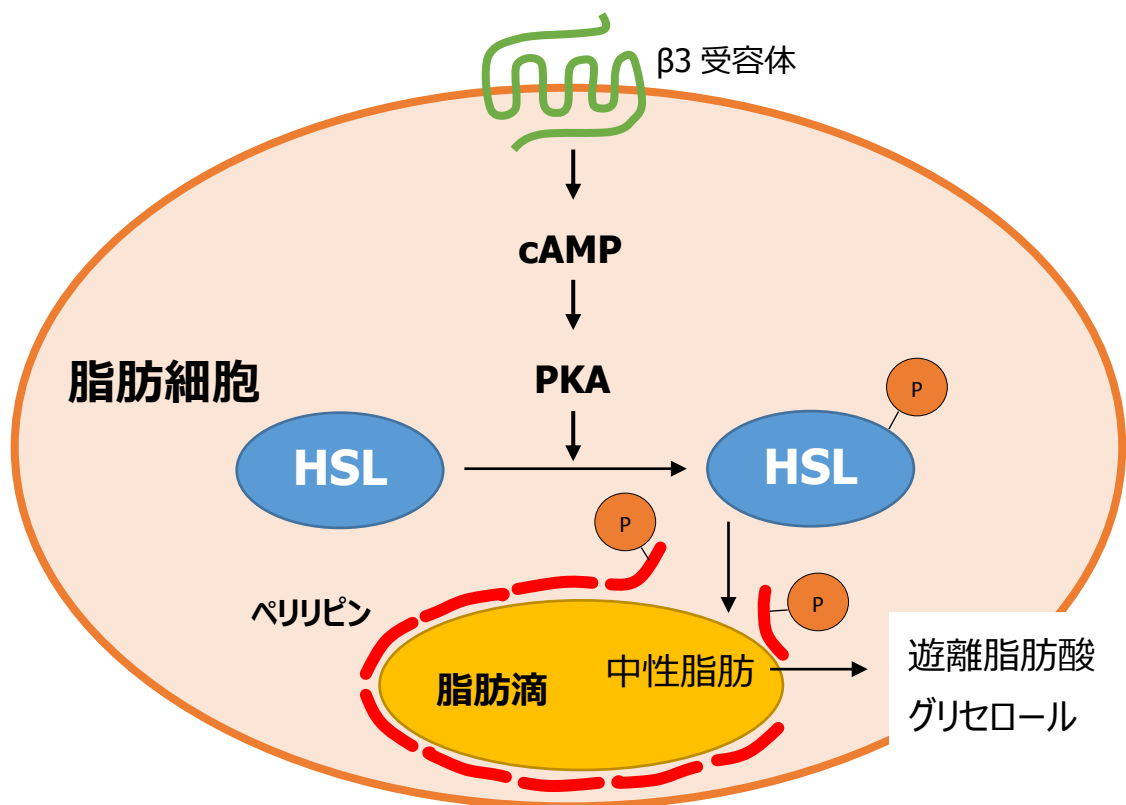
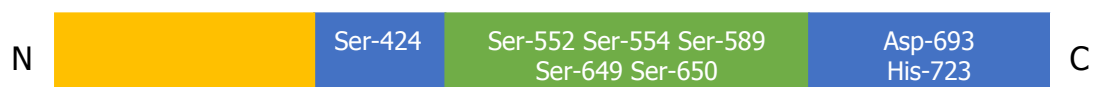


Figure 2. 脂肪細胞における HSL の制御

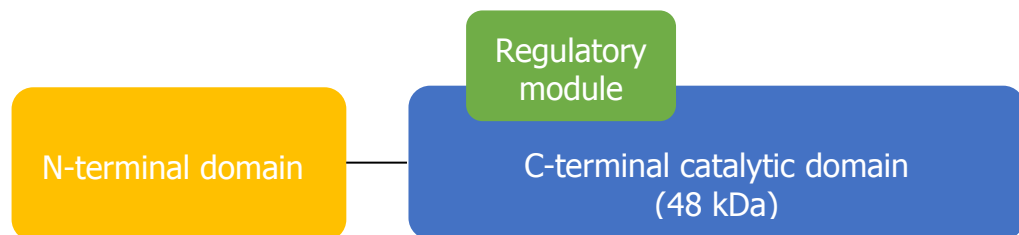
#### b) ホルモン感受性リパーゼの構造

脂肪細胞内の HSL は、1993 年に遺伝子がクローニングされ、その一次構造が Holm らにより解明された (Figure 3) <sup>25)</sup>。HSL は 775 残基のアミノ酸より構成され、そのうち、C 末側は 2 つの異なる機能のドメイン、①脂肪分解活性を担う触媒ドメイン、②レギュラトリーモジュールより構成される <sup>26)</sup>。触媒ドメインには  $\alpha/\beta$  加水分解酵素フォールドが存在し、活性中心には catalytic triad を構成するセリン残基 <sup>27)</sup>、アスパラギン酸残基とヒスチジン残基が存在する、一般的なリパーゼの触媒部位と類似した構造を内包すると考えられている。更に興味深いことに、この触媒ドメインの二次構造は、アセチルコリンエステラーゼと類似していることが報告されている <sup>28)</sup>。一方、レギュラトリーモジュールにはリン酸化を受けるセリン残基が複数存在し、HSL の機能の制御に関与していると考えられている。このレギュラトリーモジュールは他のリパーゼには存在せず、HSL 独自の構造である。また、N 末領域は、300 残基のアミノ酸より形成されており、その配列は他のタンパクとは相同性が全くない <sup>29)</sup>。この領域は fatty acid binding protein 4 (FABP4) と HSL との相互作用の形成に関与し、HSL の脂肪分解活性の維持を担うと考えられている。

#### (A) Primary structure (major isoform)



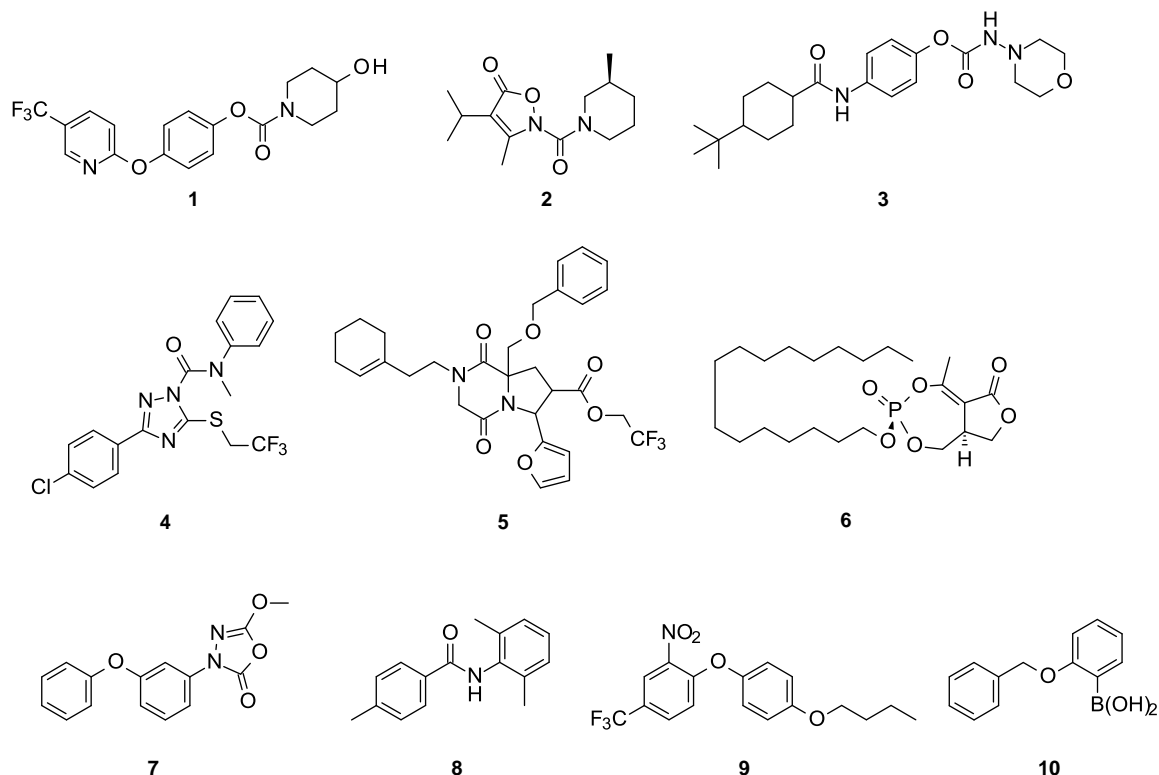
#### (B) Suggested structural domains



**Figure 3.** ヒト HSL の構造の概略図 <sup>26), 29), 30)</sup>

このように、他のリパーゼや酵素との相同性が極めて低いために、HSL は古くから存在が確認されている酵素であるにも関わらず、三次元構造は未だ解明されていない。

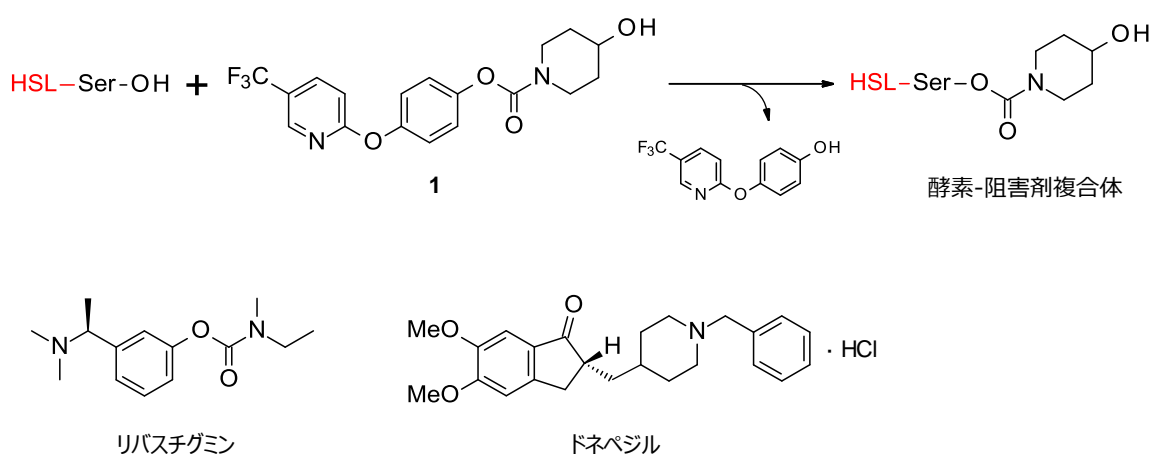
c) HSL 阻害剤の報告例



**Figure 4.** HSL 阻害剤

HSL 阻害剤は既に、複数のグループによる研究報告例がある<sup>31), 32), 33), 34), 35), 36), 37), 38), 39), 40)</sup> (Figure 4)。特に Novo Nordisk 社の Ebdrup らによって報告された化合物 **1** は、高い HSL 阻害活性と良好な経口吸収性により、ラットへの 10 mg/kg 投与で脂肪分解抑制作用を示す HSL 阻害剤である<sup>31)</sup>。化合物 **1** の構造的特徴は、酵素との結合部位と推定されるカルバモイル基である。カルバモイル基は一般に、セリン加水分解酵素の活性中心の構成要因であるセリン残基と共有結合を生じ、酵素活性を低下・喪失させることが知られている<sup>41)</sup>。形成された共有結合は緩やかに加水分解を受け、酵素は再度活性型に戻ることから、この阻害剤は擬不可逆的阻害剤であると考えられる (Figure 5)。擬不可逆的阻害剤は強力な薬効が期待できる一方、カルバモイル基のような反応性の高い部位が活性発現に必須であり、潜在的な毒性発現の懸念がある。その例として、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤のリバスチグミン（ノバルティスファーマ社）が知られている<sup>42)</sup>。リバスチグ

ミンは化合物 **1** と同じくカルバモイル構造を有するが、臨床試験段階で消化管由来の重篤な毒性が認められた<sup>43)</sup>。その結果、本邦では経口製剤での開発は中止され、毒性回避のため経皮吸収型製剤のみが上市されている（リバスタッチパッチ®、小野薬品工業；イクセロンパッチ®、ノバルティスファーマ社）<sup>44)</sup>。一方で、代表的な可逆的アセチルコリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジル（アリセプト®、エーザイ）は、軽度及び中等度アルツハイマー型認知症患者を対象とした際に、消化管由来の毒性の発現率は5%未満である<sup>45)</sup>。



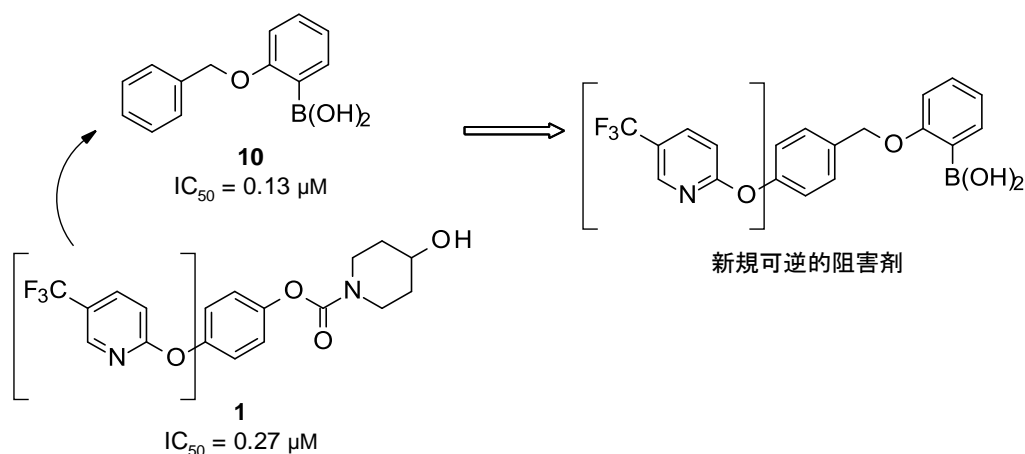
**Figure 5.** 化合物 **1** の推定阻害メカニズム、リバスタグミンとドネペジル

脂質異常症治療薬は長期間投与が想定される薬剤であり、高い安全性が常に求められていることを勘案すると、擬不可逆的阻害剤より、可逆的阻害剤の方が望ましいと考えられる<sup>46)</sup>。既に可逆的 HSL 阻害剤としては、化合物 **2** 及び **10** が報告されているが<sup>32), 40)</sup>、化合物 **2** は、30 mg/kg 投与にて脂肪分解抑制作用が確認される弱い HSL 阻害剤であり<sup>47)</sup>、化合物 **10** は、*in vitro* において HSL 阻害活性を示すことは知られているものの ( $IC_{50} = 0.13 \mu M$ )、その脂肪分解抑制作用については報告されていない。すなわち、可逆的阻害剤が十分な脂肪分解抑制作用を示すかについては、これまでほとんど検討されていない。

以上の背景から、可逆的 HSL 阻害に基づく脂質異常症の新規治療薬創製を目指し、本研究を開始した。

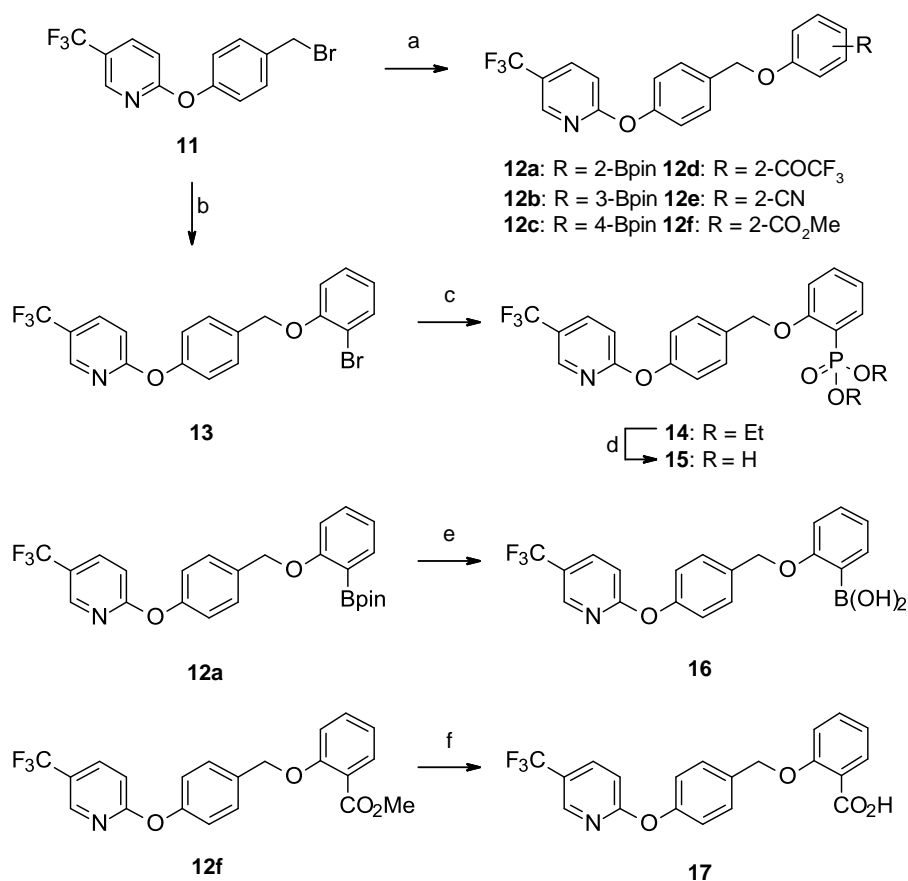
## 第一節 新規可逆的 HSL 阻害剤の設計

また、化合物 **10** のベンジルオキシ基は HSL との脂溶性相互作用により、阻害活性発現に寄与していると考察されている<sup>40)</sup>。この報告に従えば、ベンジルオキシ基への疎水性基の付与により、更なる阻害活性の向上が期待された。そこで、既知の HSL 阻害剤 **1** の疎水性部分構造に注目した。化合物 **1** はセリン残基との反応性部位であるカルバモイル基と、疎水性部分構造であるトリフルオロメチルピリジル基から形成される。したがって、トリフルオロメチルピリジル基を化合物 **10** のベンジルオキシ基に導入すれば、HSL との脂溶性相互作用が向上し、阻害活性の改善に繋がると考えた (Figure 6)。



**Figure 6.** 新規可逆的 HSL 阻害剤のデザイン

化合物 **12a**、**12b**、**12c**、**12d**、**12e**、**12f**、**15**、**16** 及び **17** は Scheme 1 に示すように合成した。化合物 **11**<sup>50)</sup>とフェノールを縮合し、化合物 **12a**、**12b**、**12c**、**12d**、**12e** 及び **12f** を得た。同様に合成した **13** に対しパラジウム触媒存在下、亜リン酸ジエチルとカップリングすることでホスホン酸エステルを導入し、続いてブロモトリメチルシランを用いたエステル基の脱保護を行い、化合物 **15** を得た。化合物 **12a** のピナコールエステルを、過ヨウ素酸ナトリウムを用い除去し、化合物 **16** を得た。化合物 **12f** を加水分解し、化合物 **17** を得た。



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , phenols, DMF; (b)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 2-bromophenol, DMF; (c)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PPh}_3$ , diethyl phosphite, dicyclohexymethyl amine, EtOH; (d)  $\text{TMSBr}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (e)  $\text{NaIO}_4$ , 1 M  $\text{HCl}$ , THF,  $\text{H}_2\text{O}$ ; (f) 1 M  $\text{NaOH}$ , MeOH.

### 第三節 薬理評価と考察

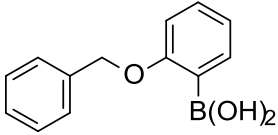
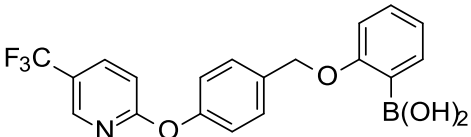
#### a) 薬理評価方法

HSL 阻害活性はヒト HSL 画分を用い、比色法で測定した。その際、酪酸 *p*-ニトロフェニル (PNPB) を基質とし、酵素反応後生成する 4-ニトロフェノールを定量した<sup>35)</sup>。

#### b) 構造活性相関 1

化合物 **10** のベンジルオキシ基にトリフルオロメチルピリジル基を導入した (Table 2)。その結果、化合物 **10** と比較して、化合物 **16** は著しく高い HSL 阻害活性を示した ( $IC_{50} = 0.007 \mu M$ )。

**Table 2.** トリフルオロメチルピリジル基の導入

Compound	$IC_{50}^a (\mu M)$
<b>10</b> 	0.13
<b>16</b> 	0.007

<sup>a</sup> Assay results are the average of triplicates.

#### c) 構造活性相関 2

化合物 **16** のセリン残基結合部位の構造活性相関情報の取得を行った (Table 3)。C-2 位のボロン酸をボロンピナコールエステル基に変換した **12a** は **16** と同等の阻害活性を示した。本官能基を C-3 位へ導入した **12b** は若干ながら阻害活性は低下し、C-4 位へ導入した **12c** は大幅に阻害活性が低下した。ボロンピナコールエステル体 **12a**、**12b** 及び **12c** の中では、**12a** が最も強い阻害活性を示した。ボロンピナコールエステル体がボロン酸体と同等の阻害活性を示したことから、HSL においても、ボロン酸のホウ素中心の空の p 軌道とセリン残基との結合生成が、阻害活性の発現に重要であることが示唆された。続いて、ボロン酸のアイソスターへの変換を検討した<sup>51)</sup>。しかしながら、ホスホン酸を導入した化合物 **15**、カルボン酸を導入した化合物 **17** は、ともに阻害活性

は完全に消滅した。更にボロン酸を、可逆的阻害剤で広く用いられている求電子中心に置換したところ、トリフルオロメチルカルボニル基を導入した **12d**<sup>52)</sup>、及び、ニトリル基を導入した **12e**<sup>53)</sup> の両化合物ともに阻害活性が消滅する結果となった。

**Table 3.** 化合物 **16** とその周辺化合物の HSL 阻害活性

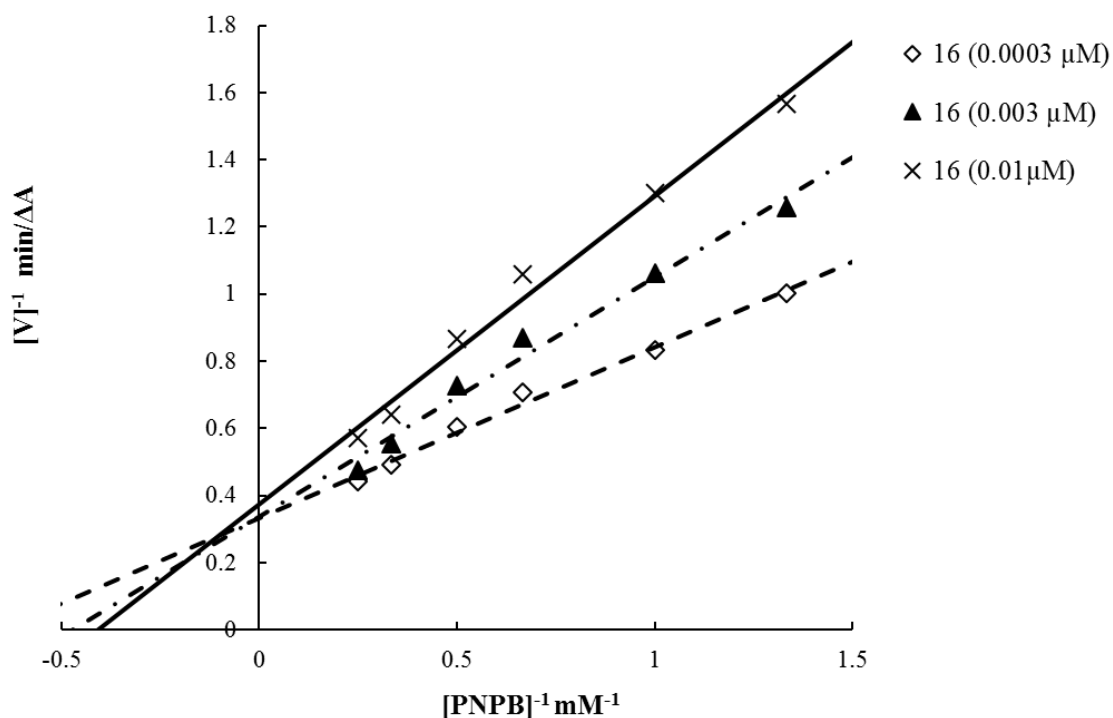
Compound (R = )	% inhibition <sup>a</sup>	Compound (R = )	% inhibition <sup>a</sup>
<b>16</b> 2-B(OH) <sub>2</sub>	89	<b>15</b> 2-P(O)(OH) <sub>2</sub>	-5
<b>12a</b> 2-Bpin <sup>b</sup>	81	<b>17</b> 2-CO <sub>2</sub> H	-8
<b>12b</b> 3-Bpin <sup>b</sup>	59	<b>12d</b> 2-C(O)CF <sub>3</sub>	1
<b>12c</b> 4-Bpin <sup>b</sup>	-10	<b>12e</b> 2-CN	0

<sup>a</sup> % inhibition at 1  $\mu$ M.

<sup>b</sup> Bpin: pinacolboronate.

#### d) 化合物 **16** の阻害メカニズムの決定

得られた可逆的阻害剤 **16** について、反応速度論に基づいて阻害メカニズムを考察した。PNPB を基質として用い、酵素反応速度の対数を X 軸に、基質濃度の対数を Y 軸にとり、ラインウィーバー・バークプロットを作成した (Figure 7)。その結果、まず、グラフの傾きは濃度で異なり、また、X 切片及び Y 切片も化合物濃度によって異なり、更に、グラフの交点は X 軸上より上に存在した。この結果から、化合物 **16** の阻害形式は混合型であることが明らかとなった。混合型の酵素阻害剤は、基質（本実験においては PNPB）が結合していない状態の酵素、及び、基質が結合した状態の酵素の双方に対して阻害することを示している<sup>54)</sup>。つまり、細胞内で基質（中性脂肪）が結合している HSL に対しても、化合物 **16** は阻害する能力を有することが示唆された。



**Figure 7.** Lineweaver-Burk plot of the inhibition of HSL by different concentrations of compound **16** (0.0003, 0.003, and 0.01  $\mu\text{M}$ ) in the presence of PNPB (0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, and 4.0 mM) as substrate. In the Lineweaver-Burk plot, the reciprocal HSL inhibitory activity was plotted against the reciprocal substrate concentration (double reciprocal plot,  $n = 1$ ).

e) 化合物 **16** のコリンエステラーゼ阻害活性

HSL の二次元構造にはアセチルコリンエステラーゼと類似性があり <sup>28)</sup>、強い阻害活性を有する HSL 阻害剤はアセチルコリンエステラーゼ (AChE)、及びブチリルコリンエステラーゼ (BuChE) を阻害することが報告されている <sup>34)</sup>。そこで、化合物 **16** の AChE 及び BuChE 阻害活性を測定した結果、50  $\mu\text{M}$  においても両コリンエステラーゼに対し阻害活性を示さなかった。

f) 化合物 **16** のプロファイル

化合物 **16** のプロファイルを Table 4 に示す。化合物 **16** はラット肝ミクロソームに対する代謝安定性は中程度であった。化合物 **16** をラットに 3 mg/kg 投与した際の、最高血中濃度は 0.42 µg/mL、薬物濃度時間曲線下面積は 1.75 µg·h/mL、血漿中半減期は 2.95 時間であった。

**Table 4.** 化合物 **16** のプロファイル

**16**

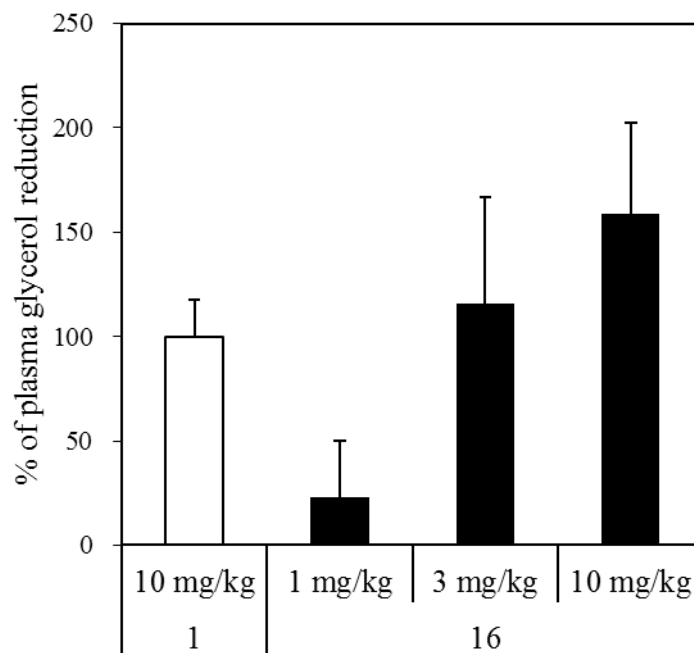
Metabolic stability <sup>a</sup>	44%
C <sub>max</sub> <sup>b</sup> (µg/mL)	0.42
AUC <sup>b</sup> (µg·h/mL)	1.75
Plasma half-life <sup>b</sup> (h)	2.95

<sup>a</sup> % remaining after 30 min in rat liver microsomes (0.5 mg/mL).

<sup>b</sup> 3 mg/2 mL/kg of compound solution in propylene glycol/Tween80 = 4:1 (v/v) solution.

g) 化合物 **16** の脂肪分解抑制作用

10 mg/kg で脂肪分解抑制作用を示すと報告されている **1** を対象群とし、直接比較試験で **16** の脂肪分解抑制作用を評価した。脂肪分解のエンドポイントとして、ウィスターラット（正常ラット）の血漿中のグリセロール濃度を測定した。化合物 **1** 及び **16** を経口投与し、0–7 時間における血漿中のグリセロール低下率を、**1** の低下率を 100% として換算し、Figure 8 に示した。化合物 **16** は 1 mg/kg、3 mg/kg 及び 10 mg/kg 投与で、投与量依存的にグリセロール濃度を低下させた。特に、**16** は 3 mg/kg 投与において、**1** の 10 mg/kg 投与と同等の脂肪分解抑制作用を示し、その値は 12% 及び 11% であった。以上より、可逆的 HSL 阻害剤 **16** は経口投与で強力な脂肪分解抑制作用を示し、可逆的 HSL 阻害が脂質代謝の改善に繋がる可能性を見出した。



**Figure 8.** The acute effect of HSL inhibition in rats treated with **1** at 10 mg/kg (white square) or **16** at 1, 3 and 10 mg/kg (black square). Data are reported as a percentage of plasma glycerol reduction of the area under the curve (AUC) (0–7 h), setting at 100% the reduction measured in compound **1**. Data are shown as mean ± SEM  $n = 3-4$ .

#### 第四節 第二章まとめ

既知の擬不可逆的阻害剤 **1** と可逆的阻害剤 **10** の部分構造を援用し、新規可逆的阻害剤 **16** を創出することに成功した。化合物 **16** は強力な HSL 阻害活性 ( $IC_{50} = 7 \text{ nM}$ ) を示す一方、コリンエステラーゼに対して阻害活性を示さない、HSL 選択的阻害剤であることが判明した。酵素反応速度論解析により、化合物 **16** は混合型阻害剤であることが明らかとなった。非常に高い *in vitro* 阻害活性を反映して、化合物 **16** はウイスターラットにおいて、3 mg/kg 投与で脂肪分解抑制作用を示し、擬不可逆的 HSL 阻害剤 **1** よりも強い HSL 阻害剤であることが判明した。このことから、可逆的 HSL 阻害剤が強力な脂肪分解抑制作用を示すことが確かめられた。

### 第三章 反応性代謝物生成リスクを回避した{5-クロロ-2-[(6-[4-(トリフルオロメチル)フェノキシ]ピリジン-3-イル)カルボニル)アミノ]フェニル}ボロン酸の創製

#### 第一節 はじめに

第二章で、強い *in vitro* 薬効を有し、*in vivo* において 3 mg/kg 投与で脂肪分解抑制作用をしめすリード化合物 **16** を創出することに成功した。しかしながら、化合物 **16** はプロファイリングの結果、反応性代謝物生成リスクを有していることが明らかになった。

薬物の代謝によって生成する反応性代謝物は、生体内高分子（タンパク質や核酸など）と共有結合を形成する能力を有し、特異性体質薬物毒性（IDT, idiosyncratic drug toxicity）の発生に関与していると考えられている<sup>55), 56)</sup>。IDT は発生頻度の低さから、臨床後期、あるいは承認後といった、多数の患者に投与された段階で初めて発現が確認されることが多い。また、既知の薬理学的作用と無関係の毒性であり、用量反応性がないため、発生の予測は困難である。アレルギー、肝毒性、組織壊死、変異原性やがん原性の原因になることが示唆され<sup>57)</sup>、更に、死亡例を含む重篤な副作用に至る場合もあり、患者に多大な損害を与えかねない。

以上の点から、構造最適化を行う創薬初期段階で、反応性代謝物生成リスクを最小化することが医薬品開発上、望ましい<sup>58)</sup>。とりわけ高い安全性が求められる脂質異常症治療薬において、反応性代謝物の生成は回避しなければならない。このような考えの下、反応性代謝物生成リスクが低く、かつ強い薬効を有する新規 HSL 阻害剤の獲得を目指し、探索研究に着手した。

## 第二節 反応性代謝物生成回避の合成方針

反応性代謝物生成リスクの評価は、ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験系において、同位体標識グルタチオン ( $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}\text{-Gly}]\text{GSH}$ ) と天然体のグルタチオン (GSH) を用いた、GSH トラッピング法にて確認した<sup>59)</sup>。未反応群と比較して反応群では、GSH 付加体と疑われる分子イオンピーク ( $m/z$  428) と、その同位体ピーク ( $m/z$  431) が検出された。更に、プロダクトイオンスペクトル中に  $m/z$  252、267、325、353 及び 382 のフラグメントイオンが認められた。この結果から、検出された GSH 付加体はチアゾリジン誘導体 **16-II** であると推定した (Figure 9)。

化合物 **16-II** の構造から、反応性代謝物の生成は、化合物 **16** のベンジル位が酸化され、アルデヒド等価体が生成することが原因であると考えられた。アルデヒド中間体からチアゾリジン誘導体が生成する反応機構については、既に詳細に検討されている<sup>60)</sup>。すなわち、アルデヒド等価体に対し、システイン部のアミノ基が付加し<sup>61)</sup>、Schiff 塩基中間体 (本化合物においては **16-I**) が生成する。続いて、システイン部のチオール基がイミンへ求核付加し、チアゾリジン誘導体 (本化合物においては **16-II**) が生成する。

以上より、反応性代謝物生成の原因構造であるベンジルオキシ構造を回避すれば、反応性代謝物生成リスク低減に繋がると考えた。

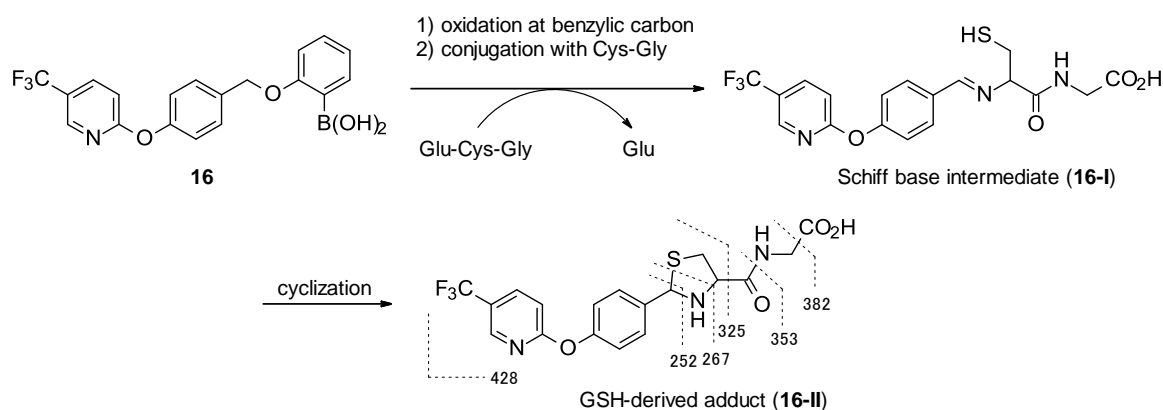
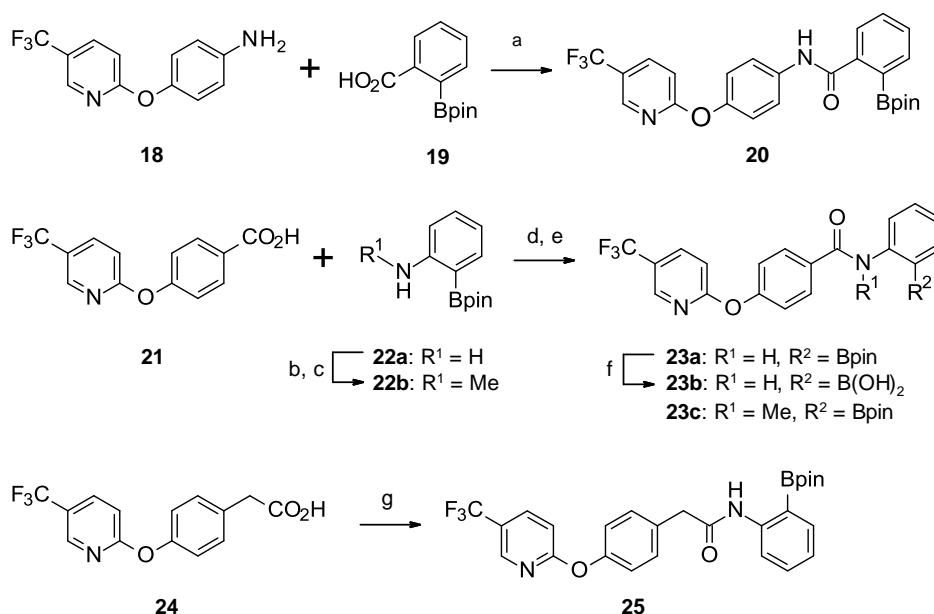


Figure 9. GSH 付加体生成の推定経路

### 第三節 合成

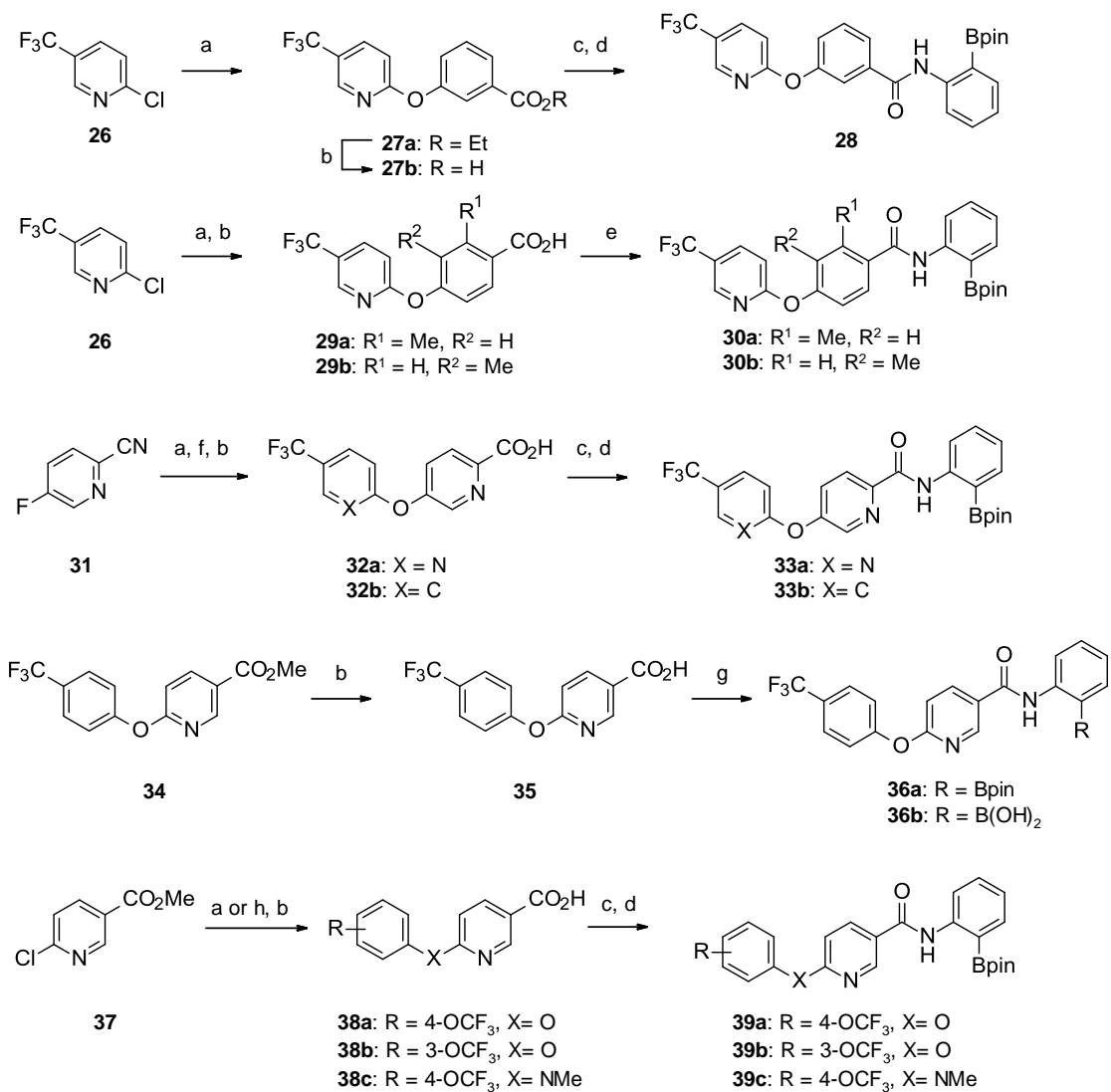
化合物 **20**、**23a**、**23b**、**23c** 及び **25** は Scheme 2 に示すように合成した。アニリン **18** のアシル化により、**20** を得た。化合物 **21** を **22a** 及び **22b** と縮合し、化合物 **23a** 及び **23c** を得た。化合物 **23a** のピナコール基を除去し、**23b** を得た。化合物 **24**<sup>62)</sup> と **22a** の縮合により、化合物 **25** を得た。



**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a) EDC·HCl, HOBT, DMF; (b) 1*H*-benzotriazole-1-methanol, EtOH; (c) NaBH<sub>4</sub>, THF; (d) oxalyl chloride, DMF (cat.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (e) **22a** or **22b**, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (f) NaIO<sub>4</sub>, THF, H<sub>2</sub>O, then 1 M HCl; (g) **22a**, EDC·HCl, HOBT, NMM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

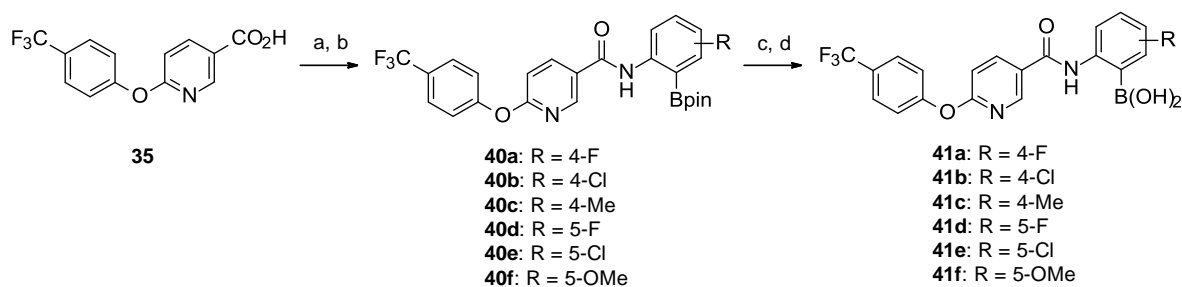
化合物 **28**、**30a**、**30b**、**33a**、**33b**、**36a**、**36b**、**39a**、**39b** 及び **39c** は Scheme 3 に示すように合成した。2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピリジン (**26**) とフェノールを縮合後、加水分解して得られるカルボン酸 (**27b**、**29a** 及び **29b**) を **22a** と縮合し、化合物 **28**、**30a** 及び **30b** へと変換した。2-シアノ-5-フルオロピリジン (**31**) とフェノールを縮合後、二段階の加水分解にて得られるカルボン酸 (**32a** 及び **32b**) を、二行程で化合物 **33a** 及び **33b** へと変換した。化合物 **36a** 及び **36b** は **34**<sup>63)</sup>の加水分解、及び **22a** との縮合にて得た。メチル 6-クロロピリジン-3-カルボキシレート (**37**)

とフェノールを縮合後、加水分解して得られるカルボン酸 (**38a**、**38b** 及び **38c**) を **22a** と縮合し、化合物 **39a**、**39b** 及び **39c** へと変換した。



**Scheme 3.** Reagents and conditions: (a) phenols, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF; (b) 5 M NaOH, MeOH; (c) oxalyl chloride, DMF (cat.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (d) **22a**, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (e) **22a**, EDC·HCl, HOBT, NMM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (f) conc. HCl, conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MeOH; (g) **22a**, HBTU, DIPEA, DMF; (h) *N*-methyl-*p*-trifluoromethoxyaniline, AcOH.

化合物 **41a**、**41b**、**41c**、**41d**、**41e** 及び **41f** は Scheme 4 に示すように合成した。カルボン酸をアニリンと縮合し、続く脱保護にて<sup>64)</sup>、目的物 **41a**、**41b**、**41c**、**41d**、**41e** 及び **41f** を得た。



**Scheme 4.** Reagents and conditions: (a) oxalyl chloride, DMF (cat.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (b) anilines, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (c) KHF<sub>2</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>O; (d) TMSCl, CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O.

#### 第四節 薬理評価と考察

##### a) 薬理評価方法

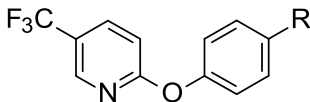
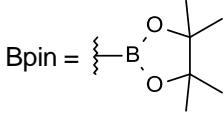
HSL 阻害活性は第二章第三節と同じ評価系を用いて評価した。

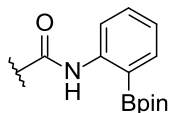
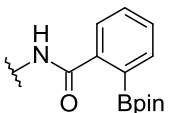
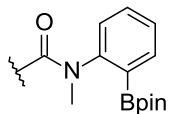
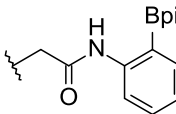
##### b) 構造活性相関 1

第二章にて、ボロン酸エステル体とボロン酸体は同等の活性を示したため、本章ではボロン酸エステル体にてスクリーニングを行い、有望化合物は別途、ボロン酸体を合成し構造活性相関情報を取得した。

Table 5 に示すとおり、ベンジルオキシ構造回避のため、化合物 **16** のエーテルリンカー部をアミド基に変更した **23a** は、阻害活性は減弱した (IC<sub>50</sub> = 0.18 μM)。アミド基にメチル基を導入した **23c**、逆アミド体 **20** 及びメチレンを挿入した **25** は阻害活性が大幅に減弱した。HSL 阻害活性を示した **23a** のボロン酸体である化合物 **23b** は、良好な阻害活性を有した (IC<sub>50</sub> = 0.091 μM, Figure 10)。化合物 **23b** について反応性代謝物生成リスクの評価を行った結果、本化合物においては GSH 付加体の生成は確認されず、反応性代謝物生成リスクが低いことが明らかとなった。そこで、化合物 **23b** をリード化合物とし、誘導体展開を行った。

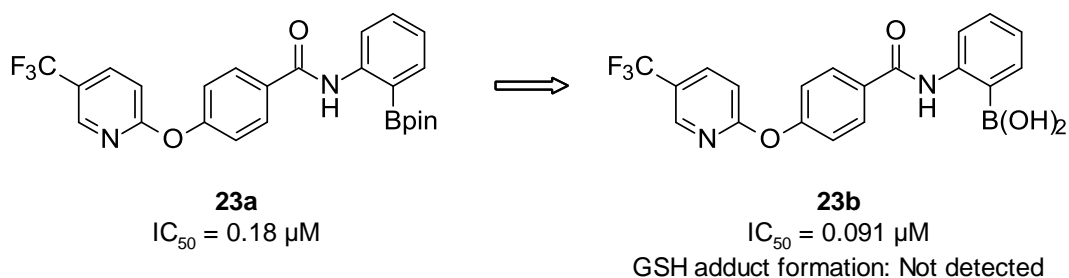
**Table 5.** 化合物 **16** のエーテルリンカーの変換

Compound (R = )	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	Compound (R = )	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)
<b>23a</b> 	0.18	<b>20</b> 	8% <sup>b</sup>
<b>23c</b> 	8% <sup>b</sup>	<b>25</b> 	12% <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Assay results are the average of triplicates.

<sup>b</sup> % inhibition at 1 μM.



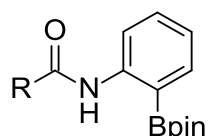
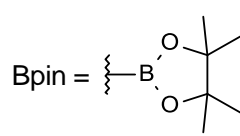
**Figure 10.** リード化合物 **23b**

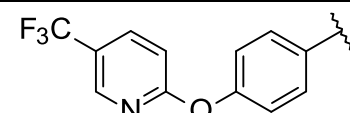
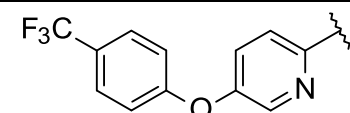
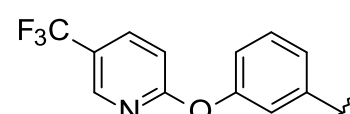
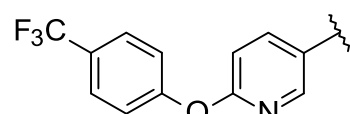
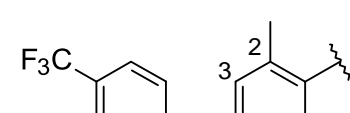
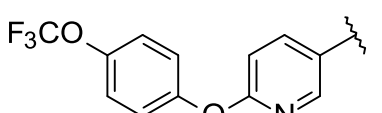
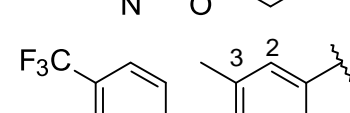
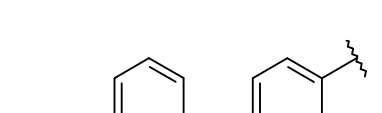
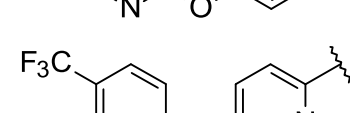
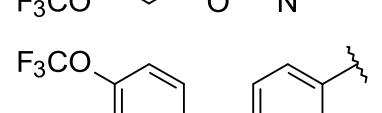
#### c) 構造活性相関 2

前節にて見出したリード化合物 **23b** の前駆体 **23a** を用い、構造活性相関情報の取得を行った (Table 6)。化合物 **23a** のメタ異性体 **28** は阻害活性が消失した。中央環への置換基導入は、2-メチル体 **30a** は阻害活性がわずかに減弱したのに対し、3-メチル体 **30b** は大幅に減弱した。中央ベンゼン環をピリジン環に変換した **33a** は阻害活性が減弱した。化合物 **33a** の左側ピリジン環をベンゼン環に変換した **33b** は阻害活性が 7 倍向上した (IC<sub>50</sub> = 0.13 μM)。化合物 **33b** の異性体 **36a** は阻害活性が更に 10 倍向上した (IC<sub>50</sub> = 0.014 μM)。トリフルオロメチル基をトリフルオロメト

キシ基に変換した **39a** は高い阻害活性を有し、そのメタ異性体 **39b**、及び、エーテルリンカーを *N*-メチルアミノリンカーに変換した **39c** も活性を保持した。

**Table 6.** 化合物 **23a** の構造最適化

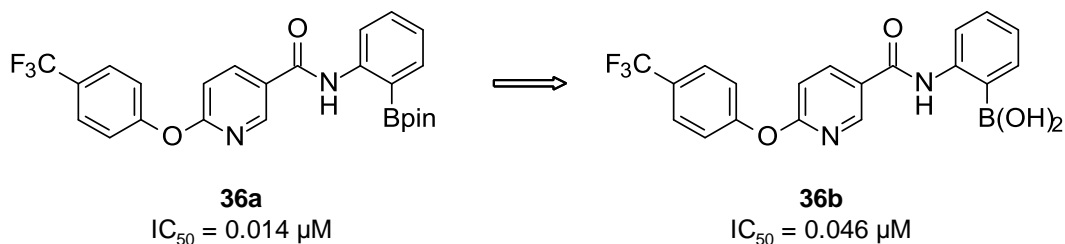



Compound (R =)	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	Compound (R =)	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)
<b>23a</b> 	0.18	<b>33b</b> 	0.13
<b>28</b> 	33% <sup>b</sup>	<b>36a</b> 	0.014
<b>30a</b> 	0.38	<b>39a</b> 	0.024
<b>30b</b> 	30% <sup>b</sup>	<b>39b</b> 	0.021
<b>33a</b> 	0.92	<b>39c</b> 	0.040

<sup>a</sup> Assay results are the average of triplicates.

<sup>b</sup> % inhibition at 1 μM.

化合物 **36a** は一連の誘導体の中で最も高い阻害活性を示したため、ボロン酸体の合成を行った (Figure 11、化合物 **36b**)。化合物 **36b** は予想とは反して活性は若干低下したが、それでもなお、良好な阻害活性を有していた (IC<sub>50</sub> = 0.046 μM)。



**Figure 11.** 化合物 **36a** 及び **36b**

#### d) 構造活性相関 3

化合物 **36b** の右側ベンゼン環部への置換基導入を行った (Table 7)。化合物 **36b** の C-4 位にハロゲンやメチル基を導入したところ、活性が向上し、特に、4-クロロ置換体 **41b** は阻害活性が 23 倍向上した。化合物 **36b** の C-5 位にハロゲンを導入した **41d** 及び **41e** は阻害活性がわずかに向上した。一方、メトキシ基の導入は阻害活性に影響を及ぼさなかった (**41f**)。以上に示すように、**36b** の右側ベンゼン環部への置換基導入は C-4 位が最も効果的であり (**41a**、**41b** 及び **41c**)、C-5 位では限定的であった (**41d**、**41e** 及び **41f**)。

4-クロロ置換体 **41b** が最も高い阻害活性を示した理由は、次の 2 つが挙げられる。

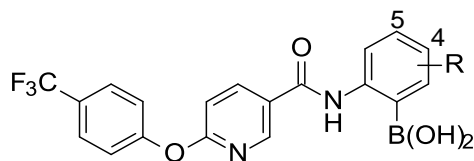
##### (i) ボロン酸の酸性度の上昇

4-クロロ置換体 **41b** におけるボロン酸の  $pK_a$  (計算値) は 7.4 であり、無置換体 **36b** ( $pK_a = 8.4$ ) よりはるかに低い。ボロン酸の酸性度の上昇はボロン中心の求電子性の向上に相関し<sup>65)</sup>、これによって、活性中心のセリン残基の水酸基とホウ素中心の供与結合の形成の促進及び生成したホウ素-リパーゼ複合体の安定性の向上につながる<sup>66)</sup>。

##### (ii) C-4 位周辺に存在する結合ポケット

ボロン酸の酸性度が同等であるにも関わらず、4-メチル置換体 **41c** ( $pK_a = 8.5$ ) は無置換体 **36b** ( $pK_a = 8.4$ ) よりも阻害活性が 2.3 倍高い。同じく、4-クロロ置換体 **41b** ( $pK_a = 7.4$ ) も 4-フッ素置換体 **41a** ( $pK_a = 7.3$ ) と比較して阻害活性は 6.5 倍高い。この結果はリパーゼ中に疎水性の結合ポケットが存在し、それが C-4 位の置換基と疎水性相互作用を形成することを示唆している。その結果、4-クロロ置換体 **41b** 及び 4-メチル置換体 **41c** は阻害活性が向上した。

**Table 7.** 化合物 **36b** の構造最適化



Compound (R = )		IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	pK <sub>a</sub> <sup>b</sup>
<b>36b</b>	H	0.046	8.4
<b>41a</b>	4-F	0.013	7.3
<b>41b</b>	4-Cl	0.002	7.4
<b>41c</b>	4-Me	0.020	8.5
<b>41d</b>	5-F	0.016	8.5
<b>41e</b>	5-Cl	0.024	8.2
<b>41f</b>	5-OMe	0.059	8.8

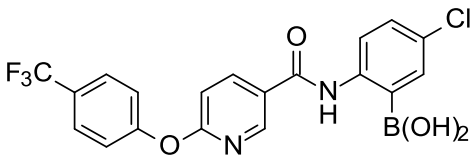
<sup>a</sup> Assay results are the average of triplicates.

<sup>b</sup> Calculated by ACD/Percepta (version 2014).

e) 化合物 **41b** のプロファイル

得られた **41b** のプロファイルを Table 8 に示す。GSH トラッピング法にて評価した結果、反応性代謝物生成リスクは低いことが判明した。代謝部位と推定されるベンジル構造を芳香環アミド基に変換し、酸化代謝を回避したこと、及び、更なる最適化において反応性代謝物の生成に関与する部位を導入しなかったことが、本リスクの回避に繋がった。化合物 **41b** はラット肝ミクロソームに対する代謝安定性は高かった。化合物 **41b** をラットに 3 mg/kg 投与した際の、最高血中濃度は 3.35 μg/mL、薬物濃度時間曲線下面積は 19.65 μg·h/mL となり、**41b** は良好な経口吸収性を有することが判明した。

**Table 8.** 化合物 **41b** のプロフィール



**41b**

GSH adduct formation <sup>a</sup>	Not detected
Metabolic stability <sup>b</sup>	81%
C <sub>max</sub> <sup>c</sup> (μg/mL)	3.35
AUC <sup>c</sup> (μg·h/mL)	19.65

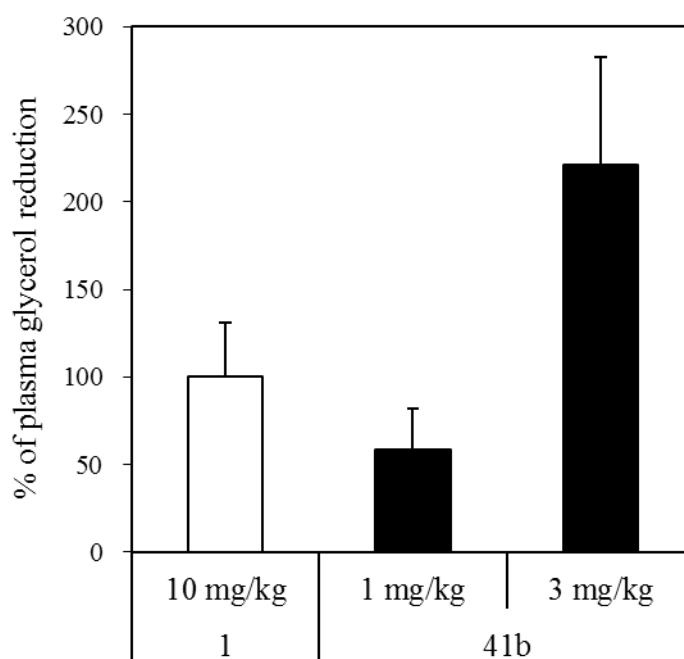
<sup>a</sup> Reactive metabolite assessment was conducted using isotope labeled glutathione as a trapping agent in NADPH-supplemented human liver microsomes.

<sup>b</sup> % remaining after 30 min in rat liver microsomes (0.5 mg/mL).

<sup>c</sup> 3 mg/2 mL/kg of compound solution in propylene glycol/Tween80 = 4:1 (v/v) solution.

f) 化合物 **41b** の脂肪分解抑制作用

化合物 **41b** の脂肪分解抑制作用を、第二章第三節と同じ方法を用いて評価した。Figure 12 に示すとおり、化合物 **41b** は 1 mg/kg 及び 3 mg/kg 投与で、血漿中グリセロール濃度を低下させた。特に、**41b** は 3 mg/kg 投与において、**1** の 10 mg/kg 投与と同等以上の脂肪分解抑制作用を示し、その値は 17% 及び 8% であった。これらの結果は **41b** が経口投与で強力な脂肪分解抑制作用を示す HSL 阻害剤であることを示しており、**41b** は脂質異常症改善薬として有効であると考えられる。



**Figure 12.** The acute effect of HSL inhibition in rats treated with **1** at 10 mg/kg (white square) or **41b** at 1 and 3 mg/kg (black square). Data are reported as a percentage of plasma glycerol reduction of the area under the curve (AUC) (0–7 h), setting at 100% the reduction measured in compound **1**. Data are shown as mean ± SEM  $n = 3-4$ .

#### 第五節 第三章まとめ

化合物 **16** で確認された反応性代謝物生成リスクの低減を狙い、誘導体展開を行った。GSH 付加体の構造解析から、問題構造と推定されたベンジルオキシ基を回避した合成展開を行った結果、リード化合物 **23b** を見出した。化合物 **23b** の構造最適化により、反応性代謝物生成リスクを回避しながら、強力な HSL 阻害活性 ( $IC_{50} = 2 \text{ nM}$ ) を示す **41b** を創出することに成功した。化合物 **41b** の非常に高い阻害活性により、本化合物はウィスターラットにおいて、3 mg/kg 投与で、脂肪分解抑制作用を示した。

#### 第四章 {5-フルオロ-2-[2-オキソ-2-(4-{[5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]フェニル}ボロン酸の発見

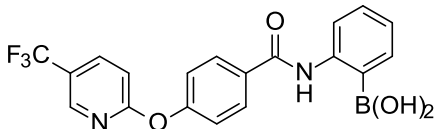
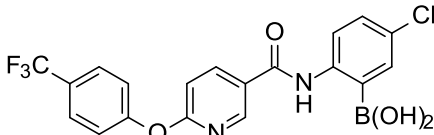
##### 第一節 はじめに

第三章において、反応性代謝物生成リスクを回避し、高い酵素阻害活性を有し、経口活性を示す HSL 阻害剤 **41b** を見出した。前章における SAR 研究より、化合物 **41b** の左側アリール部分及び右側フェニル環部の疎水性官能基が、高い阻害活性を示す上で必須の部分構造であることが明らかとなった。これらの部分構造への更なる疎水性官能基の導入は、阻害活性の増強が期待できる。しかしながら、脂溶性の指標である  $\text{LogD}_{7.4}$  値は、リード化合物 **23b** においては 3.2 であったのに対し、化合物 **41b** は 4.3 と、既に高値であり、疎水性官能基の更なる導入には次のような問題がある。すなわち、脂溶性の高い化合物は、一般に溶解性の低下に伴う物性の悪化<sup>67)</sup>、代謝安定性の低下に伴う体内動態の悪化<sup>68)</sup>、あるいは標的分子への選択性低下などをもたらすため<sup>69)</sup>、新薬の開発において、毒性懸念などの問題を引き起こすことがしばしば報告されている<sup>70), 71), 72)</sup>。実際、脂溶性の向上を反映し、化合物 **41b** はリード化合物 **23b** と比較して、水溶解性が低下した (**23b**: JP1 = 45  $\mu\text{g/mL}$ , JP2 = 22  $\mu\text{g/mL}$ , **41b**: JP1 = 1.8  $\mu\text{g/mL}$ , JP2 = 1.5  $\mu\text{g/mL}$ )。

加えて、化合物 **41b** の更なるプロファイリングを行った結果、脂肪細胞における脂肪分解阻害活性 ( $\text{IC}_{50} = 0.11 \mu\text{M}$ ) と酵素系における HSL 阻害活性 ( $\text{IC}_{50} = 0.002 \mu\text{M}$ ) との間には 55 倍もの乖離があることが判明した (Table 9)。

以上より、化合物 **41b** からの更なる構造最適化は困難であると考え、新規骨格の取得を目指し研究を行った。

**Table 9.** リード化合物 **23b** と化合物 **41b** のプロファイルの比較

			
<b>23b</b>		<b>41b</b>	
Compound		<b>23b</b>	<b>41b</b>
GSH adduct formation <sup>a</sup>		Not detected	Not detected
HSL IC <sub>50</sub> (μM)	enzyme <sup>b</sup>	0.091	0.002
	cell <sup>c</sup>	0.47	0.11
Ratio (cell/enzyme)		5.2	55
LogD <sub>7.4</sub> <sup>d</sup>		3.2	4.3
Solubility <sup>e</sup> (μg/mL)	JP1 (pH 1.2)	45	1.8
	JP2 (pH 6.8)	22	1.5
Plasma protein binding <sup>f</sup> (rat)		99.1%	99.8%
P <sub>eff</sub> <sup>g</sup> pH 7.4 (10 <sup>-6</sup> cm/sec)		21.2	8.8

<sup>a</sup> Reactive metabolite assessment was conducted using isotope labeled glutathione as a trapping agent in NADPH-supplemented human liver microsomes.

<sup>b</sup> Assay results are the average of triplicates.

<sup>c</sup> Assay results are the average of quadruplicates.

<sup>d</sup> The distribution coefficients (LogD) were measured between 1-octanol and phosphate buffer saline (pH 7.4).

<sup>e</sup> JP1/JP2: Japanese pharmacopoeia first/second test fluid (pH = 1.2/6.8).

<sup>f</sup> Bound fractions (%) in rat plasma.

<sup>g</sup> Permeability coefficient.

## 第二節 新規誘導体の合成方針

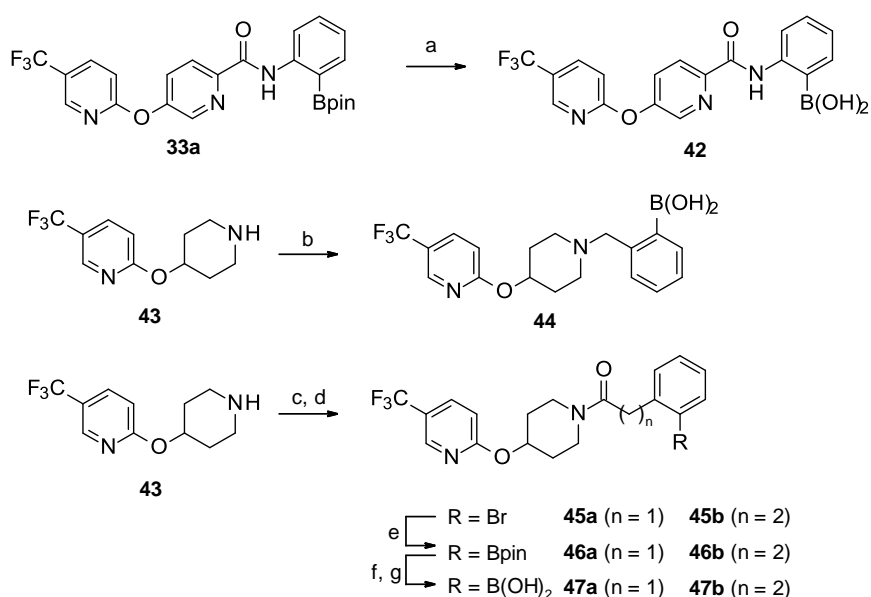
化合物 **41b** とは異なり、リード化合物 **23b** の脂肪細胞における脂肪分解阻害活性 ( $IC_{50} = 0.47 \mu M$ ) と、酵素系における HSL 阻害活性 ( $IC_{50} = 0.091 \mu M$ ) との間の乖離は 5.2 倍と比較的小さかった (Table 9)。この結果に着目し、リード化合物 **23b** の新たな構造最適化による新規 HSL 阻害剤の獲得を行った。

一般的に酵素系と細胞系における活性の評価に乖離が見られる場合は、膜透過性に着目した誘導体合成研究が行われる<sup>73)</sup>。化合物 **23b** 及び **41b** の膜透過性を人工膜透過試験 (PAMPA: parallel artificial membrane permeability assay) で評価した結果、生理条件下 (pH 7.4) での膜透過性には大きな差はなかった (**23b**:  $P_{eff} = 21.2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ , **41b**:  $P_{eff} = 8.8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ )。この結果から本化合物群は、細胞における HSL 阻害活性の低下率について、膜透過性を指標として用いた予測は難しいことが示唆された。

以上の点から、本章では酵素系における HSL 阻害活性と併せて、脂肪細胞における脂肪分解の阻害活性を新たに採用し、化合物を評価した。

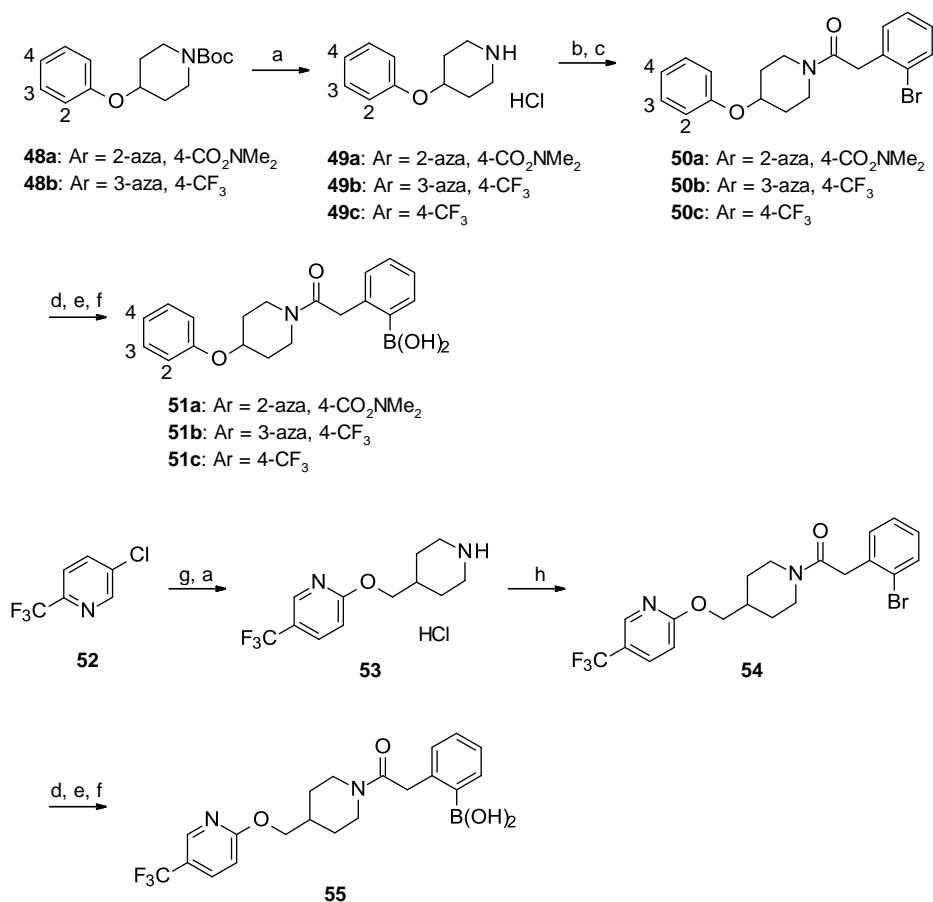
### 第三節 合成

化合物 **42**、**44**、**47a** 及び **47b** は Scheme 5 に示すように合成した。過ヨウ素酸ナトリウムを用いて、**33a** のピナコール基を脱保護し、**42** を得た。2-ホルミルフェニルボロン酸を還元的アミノ化により **44** へと誘導した。化合物 **43** をカルボン酸とアシル化し、**45a** 及び **45b** を得た。化合物 **45a** を宮浦・石山ホウ素化反応<sup>74)</sup>に付し、続いてフッ素中間体を經由してピナコール基を除去し、**47a** を得た。化合物 **47b** も同様の工程にて得た。



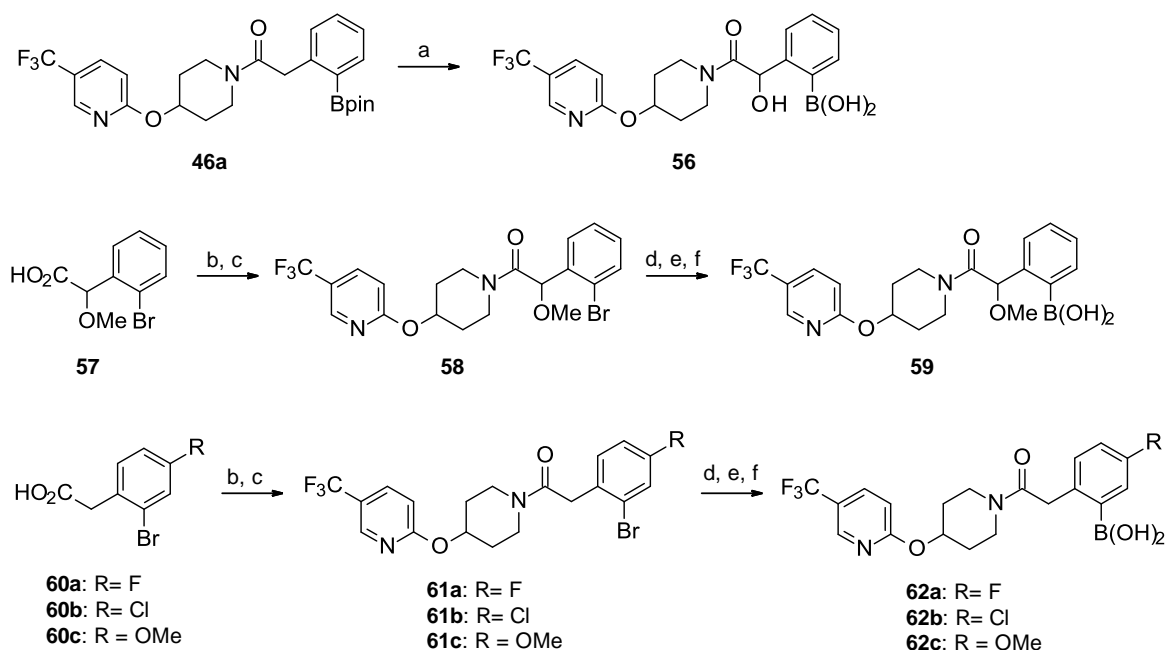
**Scheme 5.** Reagents and conditions: (a) NaIO<sub>4</sub>, THF, H<sub>2</sub>O, then 1 M HCl; (b) 2-formylphenylboronic acid, NaBH<sub>4</sub>, MeOH; (c) carboxylic acids, oxalyl chloride, DMF (cat.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (d) DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (e) Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, bis(pinacolato)diboron, potassium acetate, 1,4-dioxane; (f) KHF<sub>2</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>O; (g) TMSCl, CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O.

化合物 **51a**、**51b**、**51c** 及び **55** は Scheme 6 に示すように合成した。化合物 **48a**<sup>75)</sup>及び **48b**<sup>76)</sup>の Boc 基を除去し、**49a** 及び **49b** を得た。化合物 **49a**、**49b** 及び **49c**<sup>77)</sup>を 2-ブロモフェニル酢酸と縮合し、**50a**、**50b** 及び **50c** に変換し、更に **47a** の合成と同じ手法で **51a**、**51b** 及び **51c** を得た。化合物 **52** を *tert*-ブチル 4-(ヒドロキシメチル)ピペリジン-1-カルボキシレートと縮合し **53** を得、更に 4 工程を経て **55** を得た。



**Scheme 6.** Reagents and conditions: (a) 4 M HCl/1,4-dioxane, 1,4-dioxane; (b) 2-bromophenylacetic acid, oxalyl chloride, DMF (cat.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (c) amines, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (d) Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, bis(pinacolato)diboron, potassium acetate, 1,4-dioxane; (e) KHF<sub>2</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>O; (f) TMSCl, CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O; (g) *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate, NaH, DMSO; (h) 2-bromophenylacetic acid, HBTU, DIPEA, DMF.

化合物 **56**、**59**、**62a**、**62b** 及び **62c** は Scheme 7 に示すように合成した。化合物 **56** は **46a** を過ヨウ素酸ナトリウム条件下、ピナコール基の脱保護を行うことにより合成した。化合物 **57** と **43** を縮合し **58** へと変換後、更に 3 工程にて **59** へと変換した。化合物 **62a**、**62b** 及び **62c** は **59** と同様の手法で得た。



**Scheme 7.** Reagents and conditions: (a) NaIO<sub>4</sub>, 1 M HCl, THF, H<sub>2</sub>O; (b) oxalyl chloride, DMF (cat.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (c) **43**, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (d) Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, bis(pinacolato)diboron, potassium acetate, 1,4-dioxane; (e) KHF<sub>2</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>O; (f) TMSCl, CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O.

#### 第四節 薬理評価と考察

##### a) 薬理評価方法

HSL 阻害活性は第二章第三節と同じ評価系を用いて評価した。また、細胞における脂肪分解の阻害活性はラットの皮下脂肪細胞を用い、酵素反応後生成するグリセロールを定量し評価した。

##### b) 構造活性相関 1

はじめに、中央環部の変換を試みた (Table 10)。中央ベンゼン環をピリジン環に変換したところ、酵素阻害活性は 9 倍減弱した (**42**)。一方、メチルピペリジン環への変換は、6 倍程度の減弱に留まった (**44**)。そこで、本部位にはピペリジン環が適当であると考え、類縁体を合成した。化合物 **44** へカルボニル基を挿入した化合物 **47a** は、化合物 **23b** と同等の酵素阻害活性を示した (IC<sub>50</sub> = 0.10 μM)。しかし、化合物 **47a** へメチレンを挿入したところ、酵素阻害活性は低下した (**47b**)。続いて、細胞における脂肪分解の阻害活性の評価を行った。化合物 **42** 及び **44** は、酵素阻害活性と比較して、阻害活性の減弱が 1.3 倍あるいは 2.5 倍程度に抑制された。更に、化合物

**47a** においては、酵素系での  $IC_{50}$  値と同等の値を示した ( $IC_{50} = 0.080 \mu M$ )。化合物 **47a** は酵素系及び細胞系において最も高い阻害活性を示し、 $IC_{50}$  値の乖離も小さいため、次に本化合物の構造最適化を行った。

**Table 10.** リード化合物 **23b** の中央環部の変換

Compound (R =)	HSL $IC_{50}$ ( $\mu M$ )		Ratio
	enzyme <sup>a</sup>	cell <sup>b</sup>	cell/enzyme
<b>23b</b>	0.091	0.47	5.2
<b>42</b>	0.86	1.1	1.3
<b>44</b>	0.57	1.4	2.5
<b>47a</b>	0.10	0.080	0.80
<b>47b</b>	0.81	NT <sup>c</sup>	-

<sup>a</sup> Assay results are the average of triplicates.

<sup>b</sup> Assay results are the average of quadruplicates.

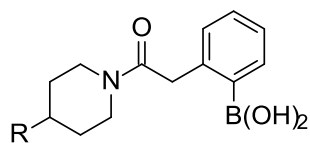
<sup>c</sup> Not tested.

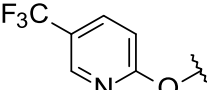
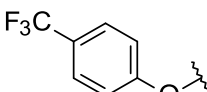
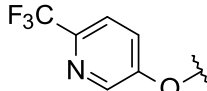
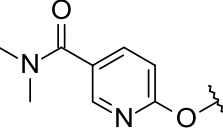
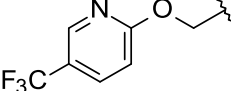
### c) 構造活性相関 2

化合物 **47a** の左側環部の変換を行った (Table 11)。第三章にて、左側環部のピリジン環を疎水性の高いベンゼン環に変換したところ、著しい酵素阻害活性の向上が認められたが、化合物 **47a** に対する同様の変換は、阻害活性の向上には繋がらなかった (**51c**)。化合物 **47a** の 2-ピリジン環を 3-ピリジン環に変換したところ、酵素阻害活性は 8 倍減弱した (**51b**)。左側ピリジン環部のトリフルオロメチル基を、親水性の *N,N*-ジメチルアミド基に変換した場合は、酵素阻害活性は完全に消失した (**51a**)。メチレンを左側環部と中央環部の間に挿入したところ、活性は保持した (**55**)。続いて、細胞における脂肪分解の阻害活性の評価を行った。化合物 **51c** 及び **55** は酵素阻害活性と同等の阻害活性を示した。化合物 **51b** は酵素阻害活性より、4.5 倍高い阻害活性を示したが ( $IC_{50} = 0.18 \mu M$ )、その値は **47a** の阻害活性には及ばなかった。

高い阻害活性を示した新規誘導体について、コリンエステラーゼに対する阻害活性を評価した。その結果、化合物 **47a**、**51c** 及び **51b** は AChE を阻害しなかったのに対し、BuChE は微弱ではあるが阻害作用を有していることが判明した。BuChE の阻害活性は左側環部の構造によって異なり、2-ピリジン環 (**47a**) が最も阻害活性が低かった。

**Table 11.** 化合物 **47a** 左側環部の構造活性相関



Compound (R =)	HSL IC <sub>50</sub> (μM)		Ratio	% inhibition at 10 μM	
	enzyme <sup>a</sup>	cell <sup>b</sup>	cell/enzyme	AChE <sup>c</sup>	BuChE <sup>c</sup>
<b>47a</b> 	0.10	0.080	0.80	7%	46%
<b>51c</b> 	0.11	0.13	1.2	9%	72%
<b>51b</b> 	0.81	0.18	0.22	6%	62%
<b>51a</b> 	> 5	NT <sup>d</sup>	-	NT <sup>d</sup>	NT <sup>d</sup>
<b>55</b> 	0.28	0.26	0.93	NT <sup>d</sup>	NT <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Assay results are the average of triplicates.

<sup>b</sup> Assay results are the average of quadruplicates.

<sup>c</sup> Assay results are the average of duplicates.

<sup>d</sup> Not tested.

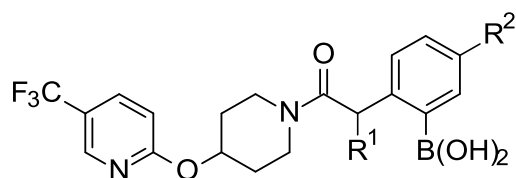
#### d) 構造活性相関 3

化合物 **47a** の右側環部の構造最適化を行った (Table 12)。ベンジル位への水酸基の導入は酵素阻害活性が 2 倍低下し (**56**)、メトキシ基の導入は 19 倍低下した (**59**)。続いて、ベンゼン環部へ置換基導入を行った。第三章にて、右側ベンゼン環部 C-4 位への置換基の導入により、酵素阻害活性の向上が確認されたため、化合物 **47a** に同様の修飾を行った。その結果、4-フッ素置換体 **62a** は酵素阻害活性がわずかに向上し、4-メトキシ置換体 **62c** は酵素阻害活性が 5 倍向上した。また、4-クロロ置換体 **62b** は酵素阻害活性が 13 倍向上し、本誘導体群の中で最も高い阻害活性を示した ( $IC_{50} = 0.008 \mu M$ )。第三章の結果と同様に、C-4 位近傍に存在が示唆される疎水性ポケットが酵素阻害活性に与える影響は大きかった。一方、4-フッ素置換体 **62a** のボロン酸の  $pK_a$  (計算値) は 7.5 であり、無置換体 ( $pK_a = 8.5$ ) より低いにもかかわらず、阻害活性は僅かにしか向上しなかった。第三章で得られた知見とは異なり、化合物 **47b** 及びその類縁体では、ボロン酸の酸性度の上昇が阻害活性に与える影響は軽微であった。

続いて、細胞における脂肪分解の阻害活性の評価を行った。化合物 **56** 及び **62a** は阻害活性が酵素阻害活性と同等であったのに対し、化合物 **62b** 及び **62c** は酵素阻害活性と比較して、細胞系での阻害活性は 3 倍及び 2.4 倍低下した。しかしながら高い酵素阻害活性を反映して、**62b** は最も高い細胞系での阻害活性を示した ( $IC_{50} = 0.024 \mu M$ )。

更に、高い阻害活性を示した新規誘導体について、コリンエステラーゼに対する阻害活性を評価した。化合物 **62a**、**62b** 及び **62c** は AChE を阻害せず、また、化合物 **47a** がわずかに有していた BuChE に対する阻害活性も示さなかった。以上の結果より、化合物 **62a**、**62b** 及び **62c** は、高い選択性を有する HSL 阻害剤であることが明らかとなった。

**Table 12.** 化合物 **47a** 右側環部の構造活性相関



Compound			HSL IC <sub>50</sub> (μM)		Ratio	pK <sub>a</sub> <sup>c</sup>	% inhibition at 10 μM	
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	enzyme <sup>a</sup>	cell <sup>b</sup>	cell/enzyme	AChE <sup>d</sup>		BuChE <sup>d</sup>	
<b>47a</b>	H	H	0.10	0.080	0.80	8.5	7%	46%
<b>56</b>	OH	H	0.23	0.28	1.2	NC <sup>e</sup>	-4%	4%
<b>59</b>	OMe	H	1.9	NT <sup>f</sup>	-	NC <sup>e</sup>	NT <sup>f</sup>	NT <sup>f</sup>
<b>62a</b>	H	F	0.068	0.067	0.99	7.5	7%	2%
<b>62b</b>	H	Cl	0.008	0.024	3.0	7.6	9%	-4%
<b>62c</b>	H	OMe	0.019	0.045	2.4	8.1	8%	5%

<sup>a</sup> Assay results are the average of triplicates.

<sup>b</sup> Assay results are the average of quadruplicates.

<sup>c</sup> Calculated by ACD/Percepta (version 2014).

<sup>d</sup> Assay results are the average of duplicates.

<sup>e</sup> Not calculated.

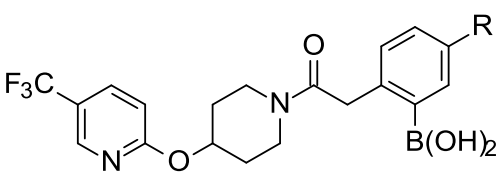
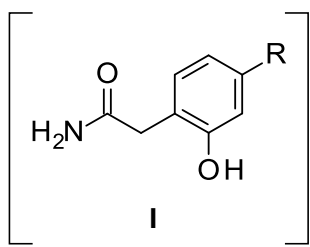
<sup>f</sup> Not tested.

#### e) 反応性代謝物生成リスクの評価

高い HSL 阻害活性を示した化合物 **47a**、**62a**、**62b** 及び **62c** について、反応性代謝物生成リスクの評価を行った (Table 13)。第三章第二節と同じ GSH トラッピング法にて評価した結果、化合物 **62a** では、GSH 付加体の生成は確認されなかった。しかしながら、それ以外の化合物 **47a**、**62b** 及び **62c** において GSH 付加体の生成が確認された。GSH 付加体の質量分析測定結果から、生成

物は“parent compound – B(OH)<sub>2</sub> + GSH + O - H” (**47a** 及び **62c**)、或いは“parent compound – B(OH)<sub>2</sub> + GSH + 2O - H” (**47a**、**62b** 及び **62c**) であることが示唆された。

**Table 13.** 反応性代謝物生成リスクの評価結果

Compound	GSH adduct formation <sup>a</sup>		E <sub>HOMO</sub> <sup>b</sup>	E <sub>LUMO</sub> <sup>b</sup>	E <sub>LUMO</sub> - E <sub>HOMO</sub> <sup>b</sup>
(R =)	<i>m/z</i>	Proposed GSH adduct	(eV)	(eV)	(eV)
<b>47a</b>	H	686	-5.61	0.09	5.70
		702			
<b>62a</b>	F	ND <sup>c</sup>	-5.83	-0.03	5.80
<b>62b</b>	Cl	736	-5.92	-0.29	5.63
<b>62c</b>	OMe	716	-5.48	-0.08	5.40
		732			

<sup>a</sup> Reactive metabolite assessment was conducted using isotope labeled glutathione as a trapping agent in NADPH-supplemented human liver microsomes.

<sup>b</sup> E<sub>HOMO</sub> and E<sub>LUMO</sub> of each simplified phenylacetamide **I** were calculated by Schrödinger Macromodel (Maestro version 9.1) software (**47a-I**, **62a-I**, **62b-I** and **62c-I**).

<sup>c</sup> Not detected.

肝臓における生体内活性化に主に関与するのは CYP450 であると考えられているため<sup>78)</sup>、**47a**、**62b** 及び **62c** の GSH 付加体の生成は、本代謝酵素が関与したと仮定した。また、GSH 付加体の生成は右側ベンゼン環上の置換基によって異なることから、代謝活性化部位は右側環部であり、その生成経路を次のように推定した (Figure 13)。フェニルボロン酸はまず CYP450 による酸化的

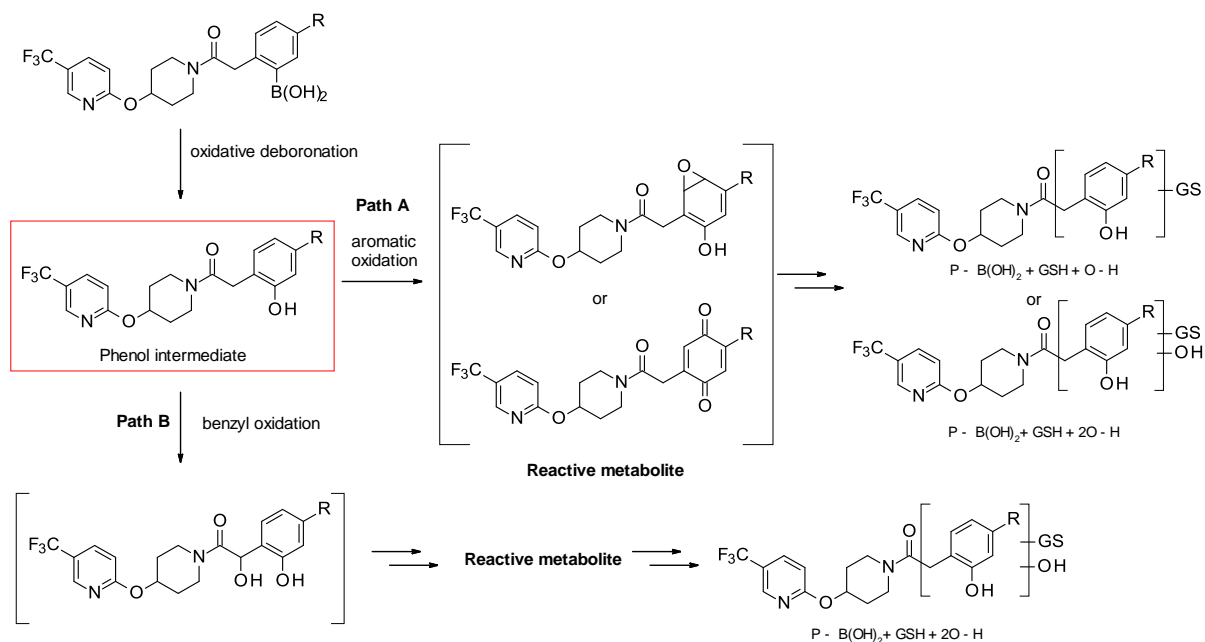
脱ホウ素化により<sup>79)</sup>、フェノールへと誘導される。このフェノールが、CYP450により更に酸化代謝を受け、エポキシドあるいはキノンといった反応性代謝物が生成する (Figure 13, path A)。一般的に、芳香環の CYP450 による酸化の律速段階は、CYP450 のヘム上の酸素と芳香環上の炭素の結合形成であるとされ<sup>80)</sup>、その第一段階は酸化活性種であるオキシフェリル ( $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ ) ポルフィリン  $\pi$ -カチオンラジカル (Compound I) と基質の最高被占軌道 (HOMO, highest occupied molecular orbital) の相互作用であると考えられている<sup>81)</sup>。これを裏付けるように、化合物の HOMO エネルギー ( $E_{\text{HOMO}}$ ) の計算値は、反応性代謝物の生成、及び、変異原性と相関があると報告されている<sup>82), 83)</sup>。これらの知見に倣って、**47a**、**62a**、**62b** 及び **62c** の代謝中間体について、 $E_{\text{HOMO}}$  を計算し、その値を比較した。設定した代謝中間体、及び、計算方法は以下の通りである。代謝中間体は、酸化代謝の第一工程で生成するフェノール中間体を単純化し、**47a-I**、**62a-I**、**62b-I** 及び **62c-I** を適用した。 $E_{\text{HOMO}}$  の算出は密度汎関数 (DFT) 法 [B3LYP/6-31++G(d,p)] を使い、Schrödinger 社の Jaguar にて行った。その結果、GSH 付加体の生成が確認されなかった **62a** のフェノール体 **62a-I** ( $E_{\text{HOMO}} = -5.83 \text{ eV}$ ) に対し、確認された **47a** 及び **62c** のフェノール体 **47a-I** 及び **62c-I** は、 $E_{\text{HOMO}}$  の計算値が高く ( $-5.61 \text{ eV}$  及び  $-5.48 \text{ eV}$ )、過去の報告と良好な一致を示した。

一方、**62b** はフェノール体 **62b-I** の  $E_{\text{HOMO}}$  が最も低値であるにも関わらず ( $-5.92 \text{ eV}$ )、GSH 付加体の生成が確認された。よって、化合物 **62b** の GSH 付加体の生成は、前述の path A とは異なり、酸化的脱ホウ素化に続いて、ベンジル位の酸化を経ると推定した (Figure 13, path B)。この場合、CYP450 による飽和炭素の酸化の律速段階は C-H 結合開裂であると考えられている<sup>84)</sup>。また、C-H 結合開裂エネルギーは最低空軌道 (LUMO, lowest unoccupied molecular orbital) のエネルギー ( $E_{\text{LUMO}}$ ) と  $E_{\text{HOMO}}$  の差に比例すると報告されている<sup>85), 86)</sup>。

GSH 付加体の生成が確認された **62b** と確認されなかった **62a** について、反応性代謝物前駆体と考えられるフェノールを単純化した **62b-I** 及び **62a-I** の HOMO-LUMO エネルギーギャップを、先程と同じ方法で計算した。その結果、**62b-I** の HOMO-LUMO エネルギーギャップは  $5.63 \text{ eV}$  となり、**62a-I** ( $5.80 \text{ eV}$ ) よりも低い値を示し、GSH トラッピング法の評価結果と一致した。

以上をまとめると、電子求引性のフッ素基の導入により、想定される Path A 及び Path B の二つの代謝経路が抑制されたために、**62a** のみが GSH 付加体の生成が確認されなかったと考えられる。

また今回の結果は、 $E_{\text{HOMO}}$  と共に、**HOMO-LUMO** エネルギーギャップが、反応性代謝物生成リスクを予測し、合成方針の優先順位を決定する有用な指標となりうることを示している。

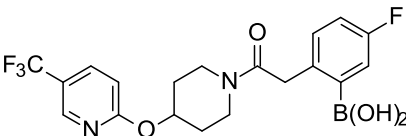


**Figure 13.** 反応性代謝物生成の推定経路

#### f) 化合物 **62a** のプロファイル

化合物 **62a** のプロファイルを Table 14 に示す。化合物 **62a** は高い膜透過性を有することが PAMPA アッセイにて明らかになった ( $\text{pH } 5.0$ :  $P_{\text{eff}} = > 50 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $\text{pH } 7.4$ :  $P_{\text{eff}} = > 50 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ )。更に、本章では適切な疎水性を保ったまま ( $\text{LogD}_{7.4} = 3.7$ )、阻害活性の向上を実現したため、**62a** は高い水溶解性を示した ( $\text{JP1} = 190.0 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{JP2} = 84.0 \mu\text{g/mL}$ )。また、ラット血漿中のタンパク結合率は、リード化合物 **23b** 及び化合物 **41b** より改善した値を示した。化合物 **62a** をラットに  $3 \text{ mg/kg}$  投与した際の、最高血中濃度は  $0.65 \mu\text{g/mL}$ 、薬物濃度時間曲線下面積は  $3.18 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$  であり、**62a** は良好な経口吸収性を有することが判明した。

**Table 14.** 化合物 **62a** のプロフィール



**62a**

$P_{\text{eff}}^{\text{a}}$ ( $10^{-6}$ cm/s)	pH 5.0	> 50
	pH 7.4	> 50
$\text{LogD}_{7.4}^{\text{b}}$		3.7
Solubility <sup>c</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	JP1	190.0
	JP2	84.0
Plasma protein binding <sup>d</sup> (rat)		97.7%
$C_{\text{max}}^{\text{e}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		0.65
$\text{AUC}^{\text{e}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ )		3.18

<sup>a</sup> Permeability coefficient.

<sup>b</sup> The distribution coefficients (LogD) were measured between 1-octanol and phosphate buffer saline (pH 7.4).

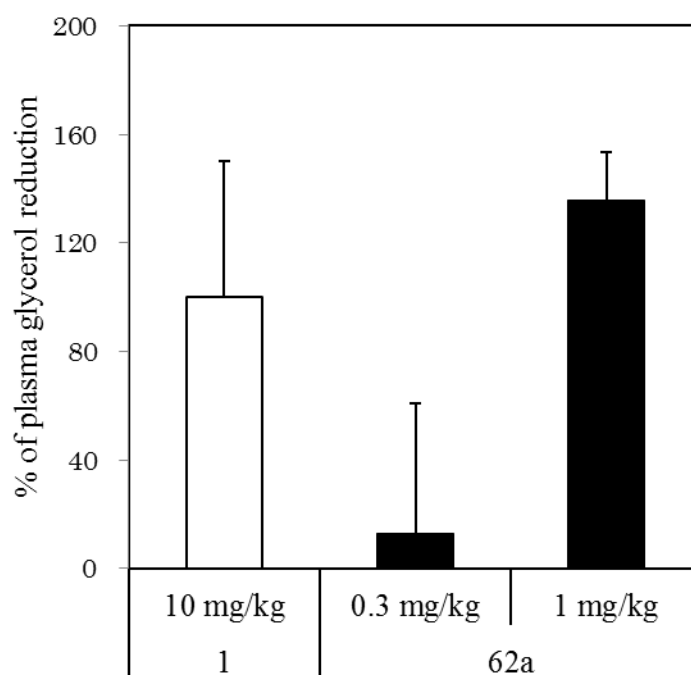
<sup>c</sup> JP1/JP2: Japanese pharmacopoeia first/second test fluid (pH = 1.2/6.8).

<sup>d</sup> Bound fractions (%) in rat plasma

<sup>e</sup> 3 mg/2 mL/kg of compounds suspension in 0.5% (w/v) methylcellulose solution.

g) 化合物 **62a** の脂肪分解抑制作用

化合物 **62a** の脂肪分解抑制作用を第二章第三節と同じ方法を用いて評価した。化合物 **62a** は 0.3 mg/kg 及び 1 mg/kg 投与で、血漿中グリセロール濃度を低下させた。特に、化合物 **62a** は 1 mg/kg 投与において、化合物 **1** (enzyme:  $\text{IC}_{50} = 270$  nM, cell:  $\text{IC}_{50} = 950$  nM) の 10 mg/kg 投与と同等の脂肪分解抑制作用を示し、その値は 22% 及び 16% であった (Figure 14)。これらの結果は **62a** が経口投与で強力な脂肪分解抑制作用を示す HSL 阻害剤であることを示しており、化合物 **62a** は脂質異常症改善薬として有効であると考えられる。



**Figure 14.** The acute effect of HSL inhibition in rats treated with **1** at 10 mg/kg (white square) or **62a** at 0.3 and 1 mg/kg (black square). Data are reported as a percentage of plasma glycerol reduction of the area under the curve (AUC) (0–7 h), setting at 100% the reduction measured in **1**. Data are shown as mean ± SEM  $n = 3-4$ .

#### 第五節 第四章まとめ

リード化合物 **23b** の構造最適化により、酵素系及び細胞系で高い *in vitro* 活性を有する化合物 **62a** を創出することに成功した (enzyme:  $IC_{50} = 68$  nM, cell:  $IC_{50} = 67$  nM)。化合物 **62a** はウィスターラットにおいて、1 mg/kg 投与で脂肪分解抑制作用を示し、これまでに知られている HSL 阻害剤の中で、最も強い阻害剤であることが明らかになった。併せて、**62a** は高い酵素選択性を有し、また、反応性代謝物生成リスクが低いことも判明した。これより、**62a** は脂肪分解作用の亢進によって惹起される脂質異常症に対し、有効な治療薬となる可能性があることが明らかになった。

## 第五章 総括

脂質異常症の治療標的分子として、脂肪細胞での脂肪分解を担う酵素であるホルモン感受性リパーゼ (HSL) に着目し、その新規可逆的阻害剤の創製を目標に研究を行った結果、二種類の優れた HSL 阻害剤を見出した。第一章から第四章にかけて本研究について詳述してきたが、本章において総括する。

第一章では脂質異常症と動脈硬化性疾患の関係、現在用いられている治療薬、そして脂質異常症治療を適切に行ってもなお残存する、動脈硬化性疾患のリスクについて述べた。また、ホルモン感受性リパーゼの阻害を介した、脂肪分解抑制による脂質異常症の治療効果への可能性を示した。更に、これまでに報告されている HSL 阻害剤とその潜在的懸念について言及した。これらの背景のもと、可逆的 HSL 阻害剤を創出する必要性を示した。

第二章では、既知の可逆的 HSL 阻害剤 2-ベンジロキシフェニルボロン酸 **10** に対し、左側末端部に擬不可逆的阻害剤 **1** の部分構造であるトリフルオロメチルピリジル基を導入した結果、強力な阻害活性 ( $IC_{50} = 7 \text{ nM}$ ) を有する {2-[(4-[[5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル]オキシ}ベンジル)オキシ]フェニル}ボロン酸 **16** を得ることに成功した。化合物 **16** は、アセチルコリンエステラーゼ及びブチリルコリンエステラーゼを阻害せず、HSL に対して高い選択性を示した。擬不可逆的 HSL 阻害剤 **1** がウィスターラットにおいて  $10 \text{ mg/kg}$  投与で脂肪分解抑制作用を示したのに対し、化合物 **16** は高い HSL 阻害活性を反映し、 $3 \text{ mg/kg}$  投与で同等の作用を示した。このことから、可逆的 HSL 阻害剤においても十分強力な脂肪分解抑制作用が期待できることが明らかとなった。

第三章では、反応性代謝物生成リスクの低減を目指し、前章で見出したリード化合物 **16** の構造最適化を行った。中央部ベンジルオキシ基のベンジル位が反応性代謝物生成の原因構造であると考え、芳香環アミド基へと変換した。その結果、反応性代謝物生成リスクが低い、{2-[(4-[[5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル]オキシ}ベンゾイル)アミノ]フェニル}ボロン酸 **23b** を獲得した。リード化合物 **23b** の誘導体展開の結果、右側環部及び左側環部への疎水性基の導入により、化合物 **23b** に対して阻害活性が 45 倍向上した {5-クロロ-2-[(6-[4-(トリフルオロメチル)フェノキシ]ピリジン-3-イル}カルボニル)アミノ]フェニル}ボロン酸 **41b** を得ることに成功した。化合物 **41b**

はウィスターラットにおいて 3 mg/kg 投与で脂肪分解抑制作用を示した。また、化合物 **41b** はリード化合物 **23b** と同様に、反応性代謝物生成リスクは低かった。

第四章では、前章で見出された化合物 **41b** の細胞系と酵素系における HSL 阻害活性の間に 55 倍の乖離があることが確認されたことから、新たに細胞系での評価をスクリーニングに導入し、リード化合物 **23b** の構造最適化を再度行った。中央環部をメチルピペリジンに変換した **47a** は、両評価系において良好な阻害活性を示したため、更なる誘導体展開を行った。その結果、アセチルコリンエステラーゼ及びブチリルコリンエステラーゼを阻害せず、高い HSL 阻害活性を有する {5-フルオロ-2-[2-オキソ-2-(4-{[5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]フェニル}ボロン酸 **62a** を得ることに成功した。高い *in vitro* 活性を反映して、化合物 **62a** はウィスターラットにおいて 1 mg/kg 投与で脂肪分解抑制作用を示し、もっとも経口活性の高い HSL 阻害剤であることが判明した。化合物 **62a** 周辺類縁化合物のうち、**62a** のみが反応性代謝物生成リスクが低かった。本結果は、化合物の代謝中間体であるフェノール体の HOMO エネルギー、及び HOMO-LUMO エネルギーギャップの計算値を用いて、予測可能であることが示された。

以上述べたように、一連の研究により、リード化合物である {2-[(4-{[5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル]オキシ}ベンジル)オキシ]フェニル}ボロン酸 **16** と、{2-[(4-{[5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル]オキシ}ベンゾイル)アミノ]フェニル}ボロン酸 **23b** を見出した。更に、構造最適化により、安全性懸念が低く、優れた薬効を有する HSL 阻害剤、{5-クロロ-2-[(6-[4-(トリフルオロメチル)フェノキシ]ピリジン-3-イル}カルボニル)アミノ]フェニル}ボロン酸 **41b** と、{5-フルオロ-2-[2-オキソ-2-(4-{[5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]フェニル}ボロン酸 **62a** を創出することに成功した。



## 実験の部

### 合成

#### General

Unless otherwise noted, materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 400 or 500 spectrometer with tetramethylsilane as an internal reference. Mass spectra were recorded on an Agilent Technologies Agilent 1100 series LC/MS. TLC analysis was performed on 60F354 plates (Merck). Flash column chromatography was performed on Shoko scientific SI series on a Shoko Scientific Purif- $\alpha$ 2. Purities of assayed compounds were in all cases greater than 90%, as determined by NMR analysis and LC/MS.

### 第二章

#### **2-(4-{[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenoxy]methyl}phenoxy)-5-(trifluoromethyl)pyridine (12a)**

A mixture of 2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenol (0.66 g, 3.0 mmol), **11** (1.2 g, 3.6 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.86 g, 2.6 mmol), and DMF (10 mL) was stirred at room temperature for 3 h and then stirred at 50°C for 4 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt). The obtained solid was triturated in hexane/AcOEt and filtered to give **12a** (0.26 g, 19%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.45 (1H, s), 7.89 (1H, dd,  $J$  = 8.8, 2.5 Hz), 7.72 (3H, t,  $J$  = 8.2 Hz), 7.42 (1H, ddd,  $J$  = 8.8, 6.8, 1.4 Hz), 7.16 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz), 7.01–6.94 (3H, m), 5.14 (2H, s), 1.36 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 472 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 472.1923 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>BF<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>: 472.1901).

#### **2-(4-{[3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenoxy]methyl}phenoxy)-5-(trifluoromethyl)pyridine (12b)**

Compound **12b** was prepared in a similar manner described for **12a**. Yield: 20%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.45 (1H, s), 7.90 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.52 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.44–7.43 (2H, m), 7.32 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.17 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.10–7.08 (1H, m), 7.02 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.11 (2H, s), 1.35 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 472 (M+H)<sup>+</sup>.

**2-(4-([4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenoxy]methyl)phenoxy)-5-(trifluoromethyl)pyridine (12c)**

Compound **12c** was prepared in a similar manner described for **12a**. Yield: 20%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.44 (1H, s), 7.90 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.77 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.50 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.17 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.98 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.11 (2H, s), 1.34 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 472 (M+H)<sup>+</sup>.

**2,2,2-Trifluoro-1-{2-[(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}benzyl)oxy]phenyl}ethanone (12d)**

Compound **12d** was prepared in a similar manner described for **12a**. Yield: 40%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.45 (1H, s), 7.91 (1H, dd, *J* = 8.6, 3.1 Hz), 7.71 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.61–7.57 (1H, m), 7.52 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.19 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.11–7.08 (2H, m), 7.03 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.21 (2H, s). MS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 440 (M-H)<sup>-</sup>.

**2-[(4-{[5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}benzyl)oxy]benzonitrile (12e)**

Compound **8e** was prepared in a similar manner described for **12a**. Yield: 70%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.41 (1H, s), 8.08 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz), 7.79 (1H, dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz), 7.65 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.48 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.16 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.11 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.02 (1H, td, *J* = 7.6, 3.1 Hz), 5.29 (2H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 371 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl 2-[(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}benzyl)oxy]benzoate (12f)**

Compound **12f** was prepared in a similar manner described for **12a**. Yield: 55%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.44 (1H, s), 7.90 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz), 7.58 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.48–7.45 (1H, m), 7.18 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.04–7.02 (3H, m), 5.20 (2H, s), 3.91 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 402 (M-H)<sup>-</sup>.

#### **2-{4-[(2-Bromophenoxy)methyl]phenoxy}-5-(trifluoromethyl)pyridine (13)**

A mixture of **11** (1.5 g, 4.5 mmol), 2-bromophenol (0.48 mL, 4.5 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.69 g, 5.0 mmol) and DMF (10 mL) was stirred at room temperature for 4 h. The mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give **13** (1.3 g, 69%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.46 (1H, s), 7.93 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz), 7.61–7.57 (3H, m), 7.29–7.27 (1H, m), 7.22–7.19 (2H, m), 7.04–7.00 (2H, m), 6.89 (1H, td, *J* = 7.6, 1.4 Hz), 5.19 (2H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 424 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **Diethyl {2-[(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}benzyl)oxy]phenyl}phosphonate (14)**

To a mixture of palladium(II) acetate (0.027 g, 0.12 mmol), triphenylphosphine (0.093 g, 0.35 mmol) and EtOH (6 mL) were added **13** (0.25 g, 0.59 mmol) and diethylphosphite (0.091 mL, 0.070 mmol). After stirring at 100°C for 7 h, the mixture was diluted with AcOEt and washed with 1 M HCl aq., saturated NaHCO<sub>3</sub> aq. and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give **14** (0.12 g, 44%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.44 (1H, s), 7.92–7.84 (2H, m), 7.61 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.51–7.49 (1H, m), 7.19–7.16 (2H, m), 7.07–6.99 (3H, m), 5.21 (2H, s), 4.20–4.05 (4H, m), 1.36–1.24 (6H, m). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 482 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **{2-[(4-{[5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}benzyl)oxy]phenyl}phosphonic acid (15)**

To a mixture of **14** (0.12 g, 0.25 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) was added bromotrimethylsilane (0.33 mL, 2.5 mmol). After stirring at room temperature for 6 h, the mixture was diluted with acetone and concentrated in vacuo. The resulting precipitate was collected by filtration to give **15** (0.063 g, 59%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.41 (1H, s), 8.08 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz), 7.79 (1H, dd, *J* = 14.9, 7.6 Hz), 7.65 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.48 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.17–7.09 (4H, m), 7.02 (1H, td, *J* = 7.6, 3.1 Hz), 5.29 (2H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 424 (M-H)<sup>+</sup>.

**{2-[(4-{[5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}benzyl)oxy]phenyl}boronic acid (16)**

A mixture of **12a** (0.10 g, 0.21 mmol), NaIO<sub>4</sub> (0.14 g, 0.63 mmol), THF (2.4 mL) and H<sub>2</sub>O (0.6 mL) was stirred at room temperature for 30 min. To the mixture was added 1 M HCl aq. (0.4 mL). After stirring overnight, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt). The obtained solid was triturated in hexane/Et<sub>2</sub>O and filtered to give **16** (0.043 g, 53%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.43 (1H, s), 8.09 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.52 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.34 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.26 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 7.19 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.05 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.97 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 5.13 (2H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 390 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 390.1155 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>BF<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>: 390.1118).

**2-[(4-{[5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}benzyl)oxy]benzoic acid (17)**

A mixture of **12f** (1.2 g, 3.1 mmol), 1 M NaOH aq. (6.0 mL) and MeOH (6.0 mL) was stirred at 80°C for 3 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with 1 M HCl aq. and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt). The obtained solid was triturated in hexane/AcOEt and filtered to give **13** (0.76 g, 19%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.44 (1H, s), 8.21 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 7.93 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.57 (1H, td, *J* = 7.9, 1.5 Hz),

7.52 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.23 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.16 (2H, dd,  $J = 13.2, 7.8$  Hz), 7.06 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz), 5.31 (2H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 390 (M+H)<sup>+</sup>.

### 第三章

#### **2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-*N*-(4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]phenyl)benzamide (20)**

A mixture of **18** (0.15 g, 0.60 mmol), 2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoic acid (**19**) (0.15 g, 0.60 mmol), EDC·HCl (0.13 g, 0.66 mmol), HOBT (0.10 g, 0.66 mmol) and DMF (6.0 mL) was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt). The obtained solid was triturated in hexane/AcOEt and filtered to give **20** (0.011 g, 4%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.46 (1H, s), 8.31 (1H, s), 7.90 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.3$  Hz), 7.74–7.70 (4H, m), 7.51–7.48 (2H, m), 7.16 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz), 7.01 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz), 1.38 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 485 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 485.1855 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 485.1854).

#### ***N*-Methyl-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (22b)**

Step A: To a mixture of **22a** (0.44 g, 2.0 mmol) and EtOH (9.0 mL) was added 1H-benzotriazole-1-methanol (0.30 g, 2.0 mmol). After stirring at room temperature overnight, the reaction mixture was concentrated in vacuo and the obtained residue was triturated with hexane. The resulting precipitate was collected by filtration to give *N*-(1H-benzotriazol-1-ylmethyl)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (0.59 g, 84%) as a brown solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.03 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.67 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.62 (1H, dd,  $J = 7.4, 1.6$  Hz), 7.44–7.40 (1H, m), 7.33–7.28 (2H, m), 7.09 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 6.73 (1H, td,  $J = 7.4, 0.8$  Hz), 6.16 (2H, d,  $J = 7.4$  Hz), 1.37 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 349 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: To a solution of *N*-(1H-benzotriazol-1-ylmethyl)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (0.37 g,

1.1 mmol) in THF (10 mL) was added sodium tetrahydroborate (0.040 g, 1.1 mmol). The mixture was stirred at 76°C for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give **22b** (0.19 g, 75%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.63 (1H, dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz), 7.35–7.30 (1H, m), 6.62 (1H, td, *J* = 7.2, 1.0 Hz), 6.54 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 2.85 (3H, s), 1.33 (12H, s). MS (FAB) *m/z*: 256 (M+Na)<sup>+</sup>.

***N*-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzamide (23a)**

Step A: To a solution of **21** (1.1 g, 4.0 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 mL) was added oxalyl chloride (1.0 mL, 12 mmol) followed by DMF (4 drops) at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h and concentrated in vacuo to give crude 4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzoyl chloride, which was used directly in the next step. Step B: Crude 4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzoyl chloride was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 mL) at 0°C. To the solution was added DIPEA (0.75 mL, 4.4 mmol) and **22a** (0.88 g, 4.4 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give **23a** (0.56 g, 29%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.28 (1H, s), 8.75 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.47–8.46 (1H, m), 8.13 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.96 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz), 7.83 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.6 Hz), 7.54 (1H, td, *J* = 7.8, 1.4 Hz), 7.28 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.11 (2H, dd, *J* = 15.4, 8.0 Hz), 1.41 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 485 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 483.1712 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 483.1708).

**{2-[(4-[[5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzoyl)amino]phenyl}boronic acid (23b)**

To a solution of **23a** (0.46 g, 0.95 mmol), THF (24 mL) and H<sub>2</sub>O (6.0 mL) was added sodium periodate (0.61 g, 2.7 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, sodium periodate (0.61 g, 2.7 mmol) was

additionally added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. 1 M HCl aq. (1.2 mL) was added, and the mixture was stirred overnight. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (AcOEt-MeOH). The obtained solid was triturated in hexane/AcOEt and filtered to give **23b** (0.15 g, 39%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.45 (1H, s), 8.24 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.14 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.49 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.42 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.35–7.24 (4H, m). MS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 401 (M-H)<sup>-</sup>. HRMS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 401.0931 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 401.0926).

***N*-Methyl-*N*-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzamide (23c)**

Compound **23c** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 30%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.40 (1H, s), 7.84 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.74 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.37 (3H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.26–7.19 (1H, m), 7.07 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.88–6.86 (3H, m), 3.43 (3H, s), 1.33 (12H, br s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 499 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 499.2010 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 499.2010).

***N*-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-2-(4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]phenyl)acetamide (25)**

A mixture of **7** (0.59 g, 2.0 mmol), **22a** (0.66 g, 2.6 mmol), EDC·HCl (0.50 g, 2.6 mmol), HOBT (0.50 g, 2.6 mmol), 4-methylmorpholine (0.33 mL, 3.0 mmol) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 mL) was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt). The obtained solid was triturated in hexane/AcOEt and filtered to give **25** (0.50 g, 50%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.41 (1H, s), 8.48 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.42 (1H, s), 7.89 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.9 Hz), 7.76 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.6 Hz), 7.47–7.43 (3H, m), 7.14 (2H, d,

$J = 8.6$  Hz), 7.07 (1H, td,  $J = 7.3, 0.9$  Hz), 7.01 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 3.72 (2H, s), 1.34 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 499 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 499.2011 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 499.2010).

#### **Ethyl 3-{{5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl}oxy}benzoate (27a)**

A mixture of 2-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridine (5.5 g, 30 mmol), ethyl 3-hydroxybenzoate (5.5 g, 33 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.0 g, 36 mmol) and DMF (20 mL) was stirred at 100°C for 5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give **27a** (7.42 g, 79%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.43 (1H, s), 7.94 (2H, tt,  $J = 8.8, 2.4$  Hz), 7.82 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz), 7.51 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz), 7.36 (1H, dq,  $J = 8.0, 1.2$  Hz), 7.06 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz), 4.38 (2H, q,  $J = 7.0$  Hz), 1.39 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 312 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **3-{{5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl}oxy}benzoic acid (27b)**

A mixture of **27a** (0.15 g, 0.48 mmol), 5 M NaOH aq. (0.19 mL, 9.5 mmol) and MeOH (4.8 mL) was stirred at 60°C for 20 min. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated in vacuo and the obtained residue was diluted with 1 M HCl aq. The resulting precipitate was collected by filtration to give **27b** (0.11 g, 78%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.59–8.59 (1H, m), 8.27 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.9$  Hz), 7.84 (1H, dt,  $J = 7.7, 1.3$  Hz), 7.68 (1H, dd,  $J = 2.3, 1.6$  Hz), 7.55 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz), 7.43 (1H, dq,  $J = 8.1, 1.2$  Hz), 7.31 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 284 (M+H)<sup>+</sup>.

#### ***N*-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-3-{{5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl}oxy}benzamide (28)**

Compound **28** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 13%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 10.28 (1H, s), 8.74 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 8.46 (1H, s), 7.95 (2H, dq,  $J = 10.5, 2.9$  Hz), 7.86–7.82 (2H, m),

7.57–7.52 (2H, m), 7.37–7.35 (1H, m), 7.12 (1H, td,  $J = 7.4, 0.8$  Hz), 7.08 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 1.34 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 485 (M+H)<sup>+</sup>.

### **2-Methyl-4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzoic acid (29a)**

Step A: Methyl 2-methyl-4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzoate was prepared in a similar manner described for **27a**. Yield: 67%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.45 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz), 8.02 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 7.93 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz), 7.06–7.01 (3H, m), 3.90 (3H, s), 2.63 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 312 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **29a** was prepared in a similar manner described for **27b**. Yield: 74%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.47 (1H, s), 8.16 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz), 7.95 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.7$  Hz), 7.09–7.06 (3H, m), 2.68 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 298 (M+H)<sup>+</sup>.

### **3-Methyl-4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzoic acid (29b)**

Step A: Methyl 3-methyl-4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzoate was prepared in a similar manner described for **27a**. Yield: 80%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.41 (1H, s), 8.01 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz), 7.95–7.93 (2H, m), 7.12 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.06 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 3.92 (3H, s), 2.22 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 312 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **29b** was prepared in a similar manner described for **27b**. Yield: 77%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.42 (1H, s), 8.07 (1H, s), 8.02 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.0$  Hz), 7.95 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.3$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.09 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 2.24 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 298 (M+H)<sup>+</sup>.

### **2-Methyl-N-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzamide (30a)**

Compound **30a** was prepared in a similar manner described for **25**. Yield: 12%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.84 (1H, s), 8.67 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 8.44 (1H, s), 7.91 (1H, dd,  $J = 9.0, 2.3$  Hz), 7.79 (1H, dd,  $J = 7.4, 1.6$  Hz), 7.70 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.51 (1H, td,  $J = 7.8, 1.8$  Hz), 7.12–7.02 (4H, m), 2.59 (3H, s), 1.32 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 499 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 499.2010 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 499.2010).

**3-Methyl-N-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]benzamide (30b)**

Compound **30b** was prepared in a similar manner described for **25**. Yield: 17%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.22 (1H, s), 8.76 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.44 (1H, s), 7.99 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.95 (2H, td, *J* = 5.7, 2.8 Hz), 7.83 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz), 7.53 (1H, td, *J* = 7.8, 1.8 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.12 (1H, td, *J* = 7.3, 1.0 Hz), 7.07 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 2.28 (3H, s), 1.41 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 499 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 499.2015 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 499.2010).

**5-[[5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]pyridine-2-carboxylic acid (32a)**

Step A: A mixture of 5-(trifluoromethyl)pyridin-2-ol (1.0 g, 8.2 mmol), 2-cyano-5-fluoropyridine (1.5 g, 9.0 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.4 g, 9.8 mmol) and DMA (3.0 mL) was stirred at 100°C for 3 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give 5-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]pyridine-2-carbonitrile (1.9 g, 86%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.80 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.02 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz), 7.89 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.72 (1H, s), 7.59 (1H, dd, *J* = 9.8, 2.7 Hz), 6.78 (1H, d, *J* = 9.8 Hz). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 266 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: A mixture of 5-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]pyridine-2-carbonitrile (1.9 g, 7.0 mmol), conc. hydrochloric acid (6.0 mL), conc. sulfuric acid (3.0 mL) and MeOH (20 mL) was stirred at 85°C for 4 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was diluted with 5 M NaOH aq. and extracted with AcOEt. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give methyl 5-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]pyridine-2-carboxylate (1.1 g, 3.8 mmol) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.79 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 8.31 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.99 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz), 7.73 (1H, s), 7.57 (1H, dd, *J* = 9.5, 2.7 Hz), 6.77 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 4.06 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 299 (M+H)<sup>+</sup>. Step C: Compound **32a** was prepared in a similar manner described for **27b**.

Yield: 91%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.81 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.43 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.09 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz), 7.78 (1H, s), 7.61 (1H, dd, *J* = 9.6, 2.5 Hz), 6.82 (1H, d, *J* = 9.8 Hz). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 285 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **5-[4-(Trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-2-carboxylic acid (32b)**

Step A: A mixture of 4-(trifluoromethyl)phenol (2.9 g, 18 mmol), 2-cyano-5-fluoropyridine (2.0 g, 9.0 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.7 g, 20 mmol) and DMA (20 mL) was stirred at 100°C for 6 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give 5-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-2-carbonitrile (4.0 g, 92%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.50 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.71–7.69 (3H, m), 7.35 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz), 7.19 (2H, d, *J* = 8.8 Hz). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 264 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: A mixture of 5-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-2-carbonitrile (1.0 g, 3.8 mmol), conc. hydrochloric acid (3.0 mL), conc. sulfuric acid (1.5 mL) and MeOH (10 mL) was stirred at 85°C for 3 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was diluted with 5 M NaOH aq. and extracted with AcOEt. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give methyl 5-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-2-carboxylate (0.74 g, 2.5 mmol) as a colorless solid. Yield: 65%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.54 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.16 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.68 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.39 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.7 Hz), 7.16 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 4.02 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 298 (M+H)<sup>+</sup>. Step C: Compound **32b** was prepared in a similar manner described for **27b**. Yield: 82%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.39 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 8.24 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.72 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.48 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.20 (2H, d, *J* = 9.0 Hz). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 284 (M+H)<sup>+</sup>.

#### ***N*-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-5-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}pyridine-2-carboxamide (33a)**

Compound **33a** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 32%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 11.83 (1H, s), 8.82 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.75 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.52 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.99 (1H, dd, *J* =

8.3, 2.4 Hz), 7.86 (1H, dd,  $J = 7.3, 1.5$  Hz), 7.80 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz), 7.61–7.57 (2H, m), 7.18 (1H, td,  $J = 7.3, 1.0$  Hz), 6.82 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz), 1.46 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 486 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 486.1804 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 486.1806).

***N*-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-5-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-2-carboxamide (33b)**

Compound **33b** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 11%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 11.71 (1H, s), 8.75 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 8.44 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 8.32 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.82 (1H, dd,  $J = 7.3, 1.5$  Hz), 7.68 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.54–7.50 (1H, m), 7.46 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.7$  Hz), 7.17–7.11 (3H, m), 1.42 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 485 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 485.1855 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 485.1854).

**6-[4-(Trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxylic acid (35)**

Compound **35** was prepared in a similar manner described for **27b**. Yield: 80%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.90 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 8.39 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.7$  Hz), 7.72 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.31 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.08 (1H, dd,  $J = 8.6, 0.8$  Hz). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 284 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (36a) and**

**{2-[(6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)carbonyl]amino}phenyl}boronic acid (36b)**

A mixture of **35** (0.68 g, 2.4 mmol), **22a** (0.44 g, 2.0 mmol), DIPEA (1.4 mL, 6.0 mmol), 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (0.91 g, 2.4 mmol), and DMF (12 mL) was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (AcOEt-MeOH) to give **36a** (0.094 g, 10%) as a colorless solid and **36b** (0.18 g, 23%) as a colorless solid.

**36a:** <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.23 (1H, s), 8.84 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.67 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.36 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.83 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.6 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.53 (1H, td, *J* = 7.8, 1.4 Hz), 7.30 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.14 (1H, td, *J* = 7.4, 0.8 Hz), 7.06 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 1.41 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 485 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 485.1848 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 485.1854).

**36b:** <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.92 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.58 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz), 7.77 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.51 (1H, t, *J* = 3.9 Hz), 7.39 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.31–7.28 (4H, m). MS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 401 (M-H)<sup>-</sup>. HRMS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 401.0913 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 401.0926).

#### **6-[4-(Trifluoromethoxy)phenoxy]pyridine-3-carboxylic acid (38a)**

Step A: Methyl 6-[4-(trifluoromethoxy)phenoxy]pyridine-3-carboxylate was prepared in a similar manner described for **27a**. Yield: 71%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.81 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 8.31 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.29–7.26 (2H, m), 7.21–7.17 (2H, m), 6.98 (1H, dd, *J* = 8.6, 0.8 Hz), 3.93 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 314 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **38a** was prepared in a similar manner described for **27b**. Yield: 83%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.88 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 8.35 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.30–7.27 (2H, m), 7.22–7.19 (2H, m), 7.02 (1H, dd, *J* = 8.6, 0.8 Hz). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 300 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **6-[3-(Trifluoromethoxy)phenoxy]pyridine-3-carboxylic acid (38b)**

Step A: Methyl 6-[3-(trifluoromethoxy)phenoxy]pyridine-3-carboxylate was prepared in a similar manner described for **38a**. Yield: 78%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.82 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 8.32 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.44 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.12–7.09 (3H, m), 6.99 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 3.93 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 314 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **38b** was prepared in a similar manner described for **27b**. Yield: 76%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.90 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.37 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.46 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.14 (2H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz), 7.09–7.08 (1H, m), 7.03 (1H, dd, *J* = 8.6, 0.8 Hz). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 300 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **6-[Methyl[4-(trifluoromethoxy)phenyl]amino]pyridine-3-carboxylic acid (38c)**

Step A: A mixture of methyl 6-chloronicotinate (0.34 g, 2.0 mmol), *N*-methyl-*p*-trifluoromethoxyaniline (0.38 g, 2.0 mmol) and acetic acid (3.0 mL) was heated at 180°C with microwave-assistance for 30 min with stirring. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with 1 M NaOH aq. and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give methyl 6-{methyl[4-(trifluoromethoxy)phenyl]amino}pyridine-3-carboxylate (0.066 g, 10%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.88 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.91 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 7.31 (4H, s), 6.44 (1H, dd, *J* = 9.0, 0.8 Hz), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 327 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **38c** was prepared in a similar manner described for **27b**. Yield: 58%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.94 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.93 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 7.31–7.30 (4H, m), 6.44 (1H, dd, *J* = 9.0, 0.8 Hz), 3.54 (3H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 313 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[4-(trifluoromethoxy)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (39a)**

Compound **39a** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 74%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.22 (1H, s), 8.84 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 8.67 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.34 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.83 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.2 Hz), 7.53 (1H, td, *J* = 7.9, 1.6 Hz), 7.29–7.27 (2H, m), 7.21 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.13 (1H, td, *J* = 7.4, 0.8 Hz), 7.01 (1H, dd, *J* = 8.6, 0.8 Hz), 1.41 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 501 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 501.1807 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 501.1803).

***N*-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[3-(trifluoromethoxy)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (39b)**

Compound **39b** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 39%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.23 (1H, s), 8.84 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.67 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.36 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz), 7.83 (1H, dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz), 7.53 (1H, td, *J* = 7.9, 1.6 Hz), 7.45 (1H, dt, *J* = 10.3, 3.2 Hz), 7.14–7.12 (4H, m), 7.03

(1H, d,  $J$  = 8.8 Hz), 1.40 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 501 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 501.1806 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 501.1803).

**6-{Methyl[4-(trifluoromethoxy)phenyl]amino}-*N*-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]pyridine-3-carboxamide (39c)**

Compound **39c** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 32%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 10.11 (1H, s), 8.90 (1H, d,  $J$  = 2.3 Hz), 8.67 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz), 7.96 (1H, dd,  $J$  = 8.8, 2.5 Hz), 7.80 (1H, dd,  $J$  = 7.4, 1.6 Hz), 7.50 (1H, td,  $J$  = 7.9, 1.6 Hz), 7.34–7.30 (4H, m), 7.09 (1H, td,  $J$  = 7.3, 1.0 Hz), 6.52 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz), 3.55 (3H, s), 1.41 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 514 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-[4-Fluoro-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (40a)**

Compound **40a** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 51%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.86 (1H, dd,  $J$  = 2.7, 0.8 Hz), 8.50 (1H, dd,  $J$  = 8.6, 2.7 Hz), 7.76 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz), 7.38 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz), 7.33–7.21 (2H, m), 7.15 (1H, dd,  $J$  = 8.6, 3.1 Hz), 7.03 (1H, td,  $J$  = 8.6, 3.1 Hz), 1.36 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 503 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-[4-Chloro-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (40b)**

Compound **40b** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 62%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.86 (1H, t,  $J$  = 1.6 Hz), 8.50 (1H, dd,  $J$  = 8.8, 2.5 Hz), 7.77 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz), 7.56 (1H, d,  $J$  = 2.3 Hz), 7.40 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz), 7.33–7.29 (3H, m), 1.37 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 519 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 517.1334 (M-H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>BClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 517.1319).

***N*-[4-Methyl-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (40c)**

Compound **40c** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 37%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.17 (1H, s), 8.83 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.55 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.35 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.63 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.34 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 7.30 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.05 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 2.33 (3H, s), 1.40 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 499 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-[5-Fluoro-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (40d)**

Compound **40d** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 61%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.33 (1H, s), 8.83 (1H, dd, *J* = 2.7, 0.8 Hz), 8.49 (1H, dd, *J* = 12.1, 2.3 Hz), 8.35 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.80 (1H, dd, *J* = 8.6, 7.0 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.30 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.06 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.83 (1H, td, *J* = 8.2, 2.3 Hz), 1.40 (12H, s). HRMS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 501.1595 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>BF<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 501.1614).

***N*-[5-Chloro-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (40e)**

Compound **40e** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 37%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.86 (1H, dd, *J* = 2.7, 0.8 Hz), 8.50 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz), 7.77 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.42–7.40 (3H, m), 7.30–7.26 (2H, m), 1.37 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 519 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-[5-Methoxy-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridine-3-carboxamide (40f)**

Compound **40f** was prepared in a similar manner described for **23a**. Yield: 42%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.83 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 8.48 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.77 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.40 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.27 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.22 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.85 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz), 3.82 (3H, s), 1.37 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 515 (M+H)<sup>+</sup>.

**{5-Fluoro-2-[(6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)carbonyl]amino]phenyl}boronic acid (41a)**

Step A: To a solution of **40a** (0.51 g, 1.0 mmol) in MeOH (50 mL) was added 5.6 M KHF<sub>2</sub> aq. (1.26 mL). After stirring at room temperature for 15 min, the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was dissolved in hot acetone and filtered. The filtrate was concentrated in vacuo to give crude potassium {5-fluoro-2-[(6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)carbonyl]amino]phenyl}(trifluoro)borate(1-), which was used directly in the next step. Step B: Crude potassium {5-fluoro-2-[(6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)carbonyl]amino]phenyl}(trifluoro)borate(1-) was dissolved in CH<sub>3</sub>CN (50 mL) and H<sub>2</sub>O (0.11 mL) and chlorotrimethylsilane (0.77 mL, 6.1 mmol) was added. After stirring overnight, the resulting mixture was concentrated in vacuo. The resulting residue was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O (twice) and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt). The obtained solid was triturated in hexane/AcOEt and filtered to give **41a** (0.16 g, 38%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.91 (1H, s), 8.56 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz), 7.77 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.38 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.30 (1H, br s), 7.24 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.16 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.03–7.01 (1H, br s). MS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 419 (M-H)<sup>-</sup>. HRMS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 419.0843 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>BF<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 419.0832).

**{5-Chloro-2-[(6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)carbonyl]amino]phenyl}boronic acid (41b)**

Compound **41b** was prepared in a similar manner described for **41a**. Yield: 47%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.91 (1H, s), 8.56 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.77 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.44 (1H, s), 7.39 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.29–7.26 (3H, m). MS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 435 (M-H)<sup>-</sup>. HRMS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 435.0529 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>BClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 435.0536).

**{5-Methyl-2-[(6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)carbonyl]amino]phenyl}boronic acid (41c)**

Compound **41c** was prepared in a similar manner described for **41a**. Yield: 41%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.91 (1H, dd, *J* = 2.7, 0.8 Hz), 8.56 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.78 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.40 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.32–7.29 (2H, m), 7.21–7.18 (2H, m), 2.37 (3H, s). MS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 415 (M-H)<sup>−</sup>. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 415.1100 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 415.1082).

**{4-Fluoro-2-[(6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)carbonyl]amino}phenyl}boronic acid (41d)**

Compound **41d** was prepared in a similar manner described for **41a**. Yield: 40%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.93 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.58 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.78 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.50 (1H, dd, *J* = 8.3, 6.8 Hz), 7.40 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.30 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.06–7.05 (2H, m). MS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 419 (M-H)<sup>−</sup>. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 419.0825 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>BF<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 419.0832).

**{4-Chloro-2-[(6-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)carbonyl]amino}phenyl}boronic acid (41e)**

Compound **41e** was prepared in a similar manner described for **41a**. Yield: 66%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.91 (1H, br s), 8.57–8.55 (1H, m), 7.75 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.37 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.22 (1H, br s), 7.17 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.13 (1H, br s). MS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 435 (M-H)<sup>−</sup>. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 435.0561 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>BClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 435.0536).

#### 第四章

**(2-[(5-[(5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy)pyridin-2-yl)carbonyl]amino}phenyl)boronic acid (42)**

A mixture of **33a** (0.25 g, 0.51 mmol), NaIO<sub>4</sub> (0.65 g, 3.0 mmol), THF (20 mL) and H<sub>2</sub>O (5 mL) was stirred at room temperature for 30 min. To the mixture was added 1 M HCl aq. (1.8 mL). After stirring overnight, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt). The obtained solid was triturated in hexane/AcOEt and filtered

to give **42** (0.14 g, 69%) as a colorless solid.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.98 (1H, dd,  $J = 2.3, 0.8$  Hz), 8.53 (1H, dd,  $J = 8.6, 0.8$  Hz), 8.34 (1H, br s), 8.28 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.5$  Hz), 7.82 (1H, dd,  $J = 9.6, 2.5$  Hz), 7.55 (1H, dd,  $J = 7.2, 1.8$  Hz), 7.50 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz), 7.39–7.35 (2H, m), 6.79 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 161.53, 160.77, 149.87, 146.92, 143.32, 139.35 (q,  $^3J(\text{C}, \text{F}) = 5.4$  Hz), 138.48, 136.71, 136.36, 135.71, 131.09, 124.74, 123.10, 122.64, 121.37, 119.32, 108.32 (q,  $^2J(\text{C}, \text{F}) = 34.7$  Hz). MS ( $\text{ESI}^-$ )  $m/z$ : 402 ( $\text{M-H}$ ) $^-$ . HRMS ( $\text{ESI}^-$ )  $m/z$ : 402.0873 ( $\text{M-H}$ ) $^-$  (calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{BF}_3\text{N}_3\text{O}_4$ : 402.0878).

**{2-[(4-{[5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)methyl]phenyl}boronic acid (**44**)**

A solution of **43** (0.77 g, 3.1 mmol) and 2-formylphenylboronic acid (0.49 g, 3.3 mmol) in MeOH (125 mL) was stirred at room temperature for 1 h. To the solution was added sodium borohydride (0.18 g, 4.7 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and filtered. The filtrate was concentrated in vacuo and the residue was triturated with hexane and AcOEt to give **44** (0.068 g, 5.7%) as a colorless solid.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.46 (1H, dd,  $J = 1.6, 0.8$  Hz), 7.95 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.5$  Hz), 7.62 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz), 7.27–7.23 (1H, m), 7.18–7.15 (2H, m), 6.98 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz), 5.44–5.38 (1H, m), 4.17 (2H, s), 3.24–3.20 (2H, m), 3.08–3.04 (2H, m), 2.25–2.19 (2H, m), 2.10–2.06 (2H, m).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 166.72, 146.29 (q,  $^3J(\text{C}, \text{F}) = 4.5$  Hz), 137.80 (q,  $^3J(\text{C}, \text{F}) = 3.2$  Hz), 135.33, 131.04, 130.12, 129.6, 128.95, 128.05, 127.18, 124.46, 121.74 (q,  $^2J(\text{C}, \text{F}) = 33.1$  Hz), 113.23, 70.12, 62.91, 31.89, 29.24. MS ( $\text{ESI}^+$ )  $m/z$ : 381 ( $\text{M+H}$ ) $^+$ . HRMS ( $\text{ESI}^+$ )  $m/z$ : 381.1624 ( $\text{M+H}$ ) $^+$  (calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ : 381.1597).

**2-(2-Bromophenyl)-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone (**45a**)**

Step A: To a solution of 2-bromophenylacetic acid (0.22 g, 1.0 mmol) in dichloromethane (4.5 mL) was added oxalyl chloride (0.25 mL, 3.0 mmol) followed by DMF (1 drop) at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h and concentrated in vacuo to give crude (2-bromophenyl)acetyl chloride, which was used directly in the next step. Step B: Crude (2-bromophenyl)acetyl chloride was dissolved in dichloromethane (4.5 mL) at 0°C. To the solution were

added DIPEA (0.19 mL, 1.1 mmol) and **43** (0.27 g, 1.1 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was diluted with H<sub>2</sub>O and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give **45a** (0.43 g, 97%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.40 (1H, s), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.57 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 7.32–7.29 (2H, m), 7.14 (1H, ddd, *J* = 8.5, 6.4, 1.7 Hz), 6.80 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.34–5.32 (1H, m), 4.01–3.95 (1H, m), 3.87 (2H, s), 3.73–3.70 (1H, m), 3.61–3.55 (1H, m), 3.43–3.40 (1H, m), 2.04–1.91 (2H, m), 1.84–1.68 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 170.94, 166.76, 146.09 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.5 Hz), 137.51 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 136.99, 133.94, 132.54, 130.00, 128.94, 126.06, 124.35, 121.29 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 64.8 Hz), 113.13, 72.27, 44.45, 41.68, 40.57, 32.24, 31.63. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 443 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 443.0605 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 443.0576).

### 3-(2-Bromophenyl)-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)propan-1-one (**45b**)

Compound **45b** was prepared in a similar manner described for **45a**. Yield: 100%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.40 (1H, s), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.54 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.31 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 7.24 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.09 (1H, td, *J* = 7.6, 1.5 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 5.34–5.30 (1H, m), 3.98–3.93 (1H, m), 3.71–3.66 (1H, m), 3.54–3.49 (1H, m), 3.39–3.34 (1H, m), 3.11 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 2.68 (2H, t, *J* = 8.1 Hz), 2.00–1.89 (2H, m), 1.79–1.65 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 172.80, 166.71, 146.06 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.5 Hz), 141.49, 137.46 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 134.08, 132.16, 129.57, 129.10, 127.06, 125.29, 121.23 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 66.3 Hz), 113.10, 72.16, 44.24, 40.22, 34.02, 33.39, 32.25, 31.59. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 457 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 457.0742 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 457.0733).

### 2-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone (**46a**)

A mixture of **45a** (14 g, 33 mmol), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.3 g, 6.5 mmol), bis(pinacolato)diboron (9.9 g, 39 mmol), potassium acetate (9.6 g, 98 mmol), and dioxane (330 mL) was stirred at 90°C for 6 h. After

cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give **46a** (6.0 g, 38%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.39 (1H, s), 7.84 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.76 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.41–7.38 (1H, m), 7.30–7.23 (2H, m), 6.78 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 5.33–5.29 (1H, m), 4.11 (2H, s), 4.02–3.97 (1H, m), 3.78–3.76 (1H, m), 3.52–3.47 (1H, m), 3.44–3.38 (1H, m), 2.00–1.98 (1H, m), 1.90–1.86 (1H, m), 1.77–1.74 (1H, m), 1.67–1.63 (1H, m), 1.33 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 491 (M+H)<sup>+</sup>.

**3-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)propan-1-one (46b)**

Compound **46b** was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 88%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.40 (1H, s), 7.80–7.77 (2H, m), 7.39–7.35 (1H, m), 7.24–7.22 (2H, m), 6.79 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 5.33–5.29 (1H, m), 4.00–3.96 (1H, m), 3.71–3.69 (1H, m), 3.51–3.46 (1H, m), 3.37–3.32 (1H, m), 3.23–3.19 (2H, m), 2.68–2.65 (2H, m), 1.98–1.95 (1H, m), 1.89–1.85 (1H, m), 1.75–1.73 (1H, m), 1.65–1.62 (1H, m), 1.34 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 505 (M+H)<sup>+</sup>.

**{2-[2-Oxo-2-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}boronic acid (47a)**

Step A: To a solution of **46a** (6.0 g, 12 mmol) in MeOH (80 mL) was added 4.5 M KHF<sub>2</sub> aq. (15 mL). After stirring at room temperature overnight, the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was dissolved in hot acetone and filtered. The filtrate was concentrated in vacuo to give crude potassium trifluoro{2-[2-oxo-2-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}borate(1-), which was used directly in the next step. Step B: Crude potassium trifluoro{2-[2-oxo-2-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}borate(1-) was dissolved in CH<sub>3</sub>CN (80 mL) and H<sub>2</sub>O (1.3 mL) and chlorotrimethylsilane (9.3 mL, 74 mmol) was added. After stirring overnight, the resulting mixture was evaporated. The resulting residue was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O (twice) and

brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo. The obtained residue was triturated with AcOEt and hexane to give **47a** (2.2 g, 45%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.48 (1H, s), 7.95 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.45 (1H, dd, *J* = 5.4, 3.4 Hz), 7.22–7.15 (3H, m), 6.97 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 5.52–5.49 (1H, m), 4.09–3.86 (6H, m), 2.21–2.17 (2H, m), 2.03–1.98 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 175.25, 166.52, 146.02 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.5 Hz), 137.51 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 135.66, 132.04, 128.28, 128.01, 127.33, 126.93, 124.21, 121.40 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 32.4 Hz), 113.07, 70.89, 44.80, 42.11, 33.89, 31.66, 31.14. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 407.1420 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 407.1395).

**{2-[3-Oxo-3-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)propyl]phenyl}boronic acid (47b)**

Compound **47b** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 53%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.45 (1H, s), 7.93 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 7.30–7.22 (4H, m), 6.91 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.34–5.30 (1H, m), 3.92–3.89 (1H, m), 3.70–3.68 (1H, m), 3.51–3.45 (1H, m), 3.40–3.36 (1H, m), 2.91 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.70 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.02–1.94 (1H, m), 1.86–1.80 (1H, m), 1.73–1.67 (1H, m), 1.59–1.51 (1H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 173.57, 166.89, 146.23 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.5 Hz), 144.86, 137.64 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 133.03, 130.37, 130.17, 127.03, 121.41 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 33.7 Hz), 113.24, 72.41, 44.40, 40.28, 36.49, 33.89, 32.33, 31.67. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 421.1573 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 421.1552).

***N,N*-Dimethyl-6-(piperidin-4-yloxy)pyridine-3-carboxamide hydrochloride (1:1) (49a)**

A mixture of **48a** (0.10 g, 0.29 mmol), 4 M HCl in 1,4-dioxane (1.7 mL) and 1,4-dioxane (1.7 mL) was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the resulting residue was triturated with Et<sub>2</sub>O to give **49a** (0.27 g, 100%) as a colorless solid. Yield: 100%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.32 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.90 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz), 7.01 (1H, dd, *J* = 6.1, 2.5 Hz), 5.41–5.39 (1H, m), 3.45–3.41 (2H, m), 3.27–3.25 (2H, m), 3.09 (6H, d, *J* = 13.3 Hz), 2.29–2.24 (2H, m), 2.14–2.06 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 169.69, 163.27, 144.68, 143.55, 127.70, 112.77, 71.41, 68.27, 42.06, 40.24, 36.09, 28.43. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 250 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 250.1547 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 250.1550).

**5-(Piperidin-4-yloxy)-2-(trifluoromethyl)pyridine hydrochloride (1:1) (49b)**

Compound **49b** was prepared in a similar manner described for **49a**. Yield: 91%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.43 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 7.78 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.64 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz), 4.93–4.90 (1H, m), 3.46–3.41 (2H, m), 3.28–3.25 (2H, m), 2.26–2.22 (2H, m), 2.09–2.07 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 156.99, 141.01, 126.88, 123.94, 123.21 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 2.9 Hz), 121.40, 71.02, 68.28, 41.94, 28.26. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 247 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 247.1063 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O: 247.1053).

**6-({1-[(2-Bromophenyl)acetyl]piperidin-4-yl}oxy)-*N,N*-dimethylpyridine-3-carboxamide (50a)**

Compound **50a** was prepared in a similar manner described for **45a**. Yield: 72%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.24 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.69 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.57 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz), 7.33–7.27 (2H, m), 7.13 (1H, td, *J* = 7.6, 1.8 Hz), 6.73 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.33–5.29 (1H, m), 4.00–3.95 (1H, m), 3.87 (2H, d, *J* = 2.0 Hz), 3.73–3.69 (1H, m), 3.60–3.55 (1H, m), 3.48–3.37 (1H, m), 3.08 (6H, s), 2.06–1.91 (2H, m), 1.80–1.71 (2H, m). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 448 (M+H)<sup>+</sup>.

**2-(2-Bromophenyl)-1-(4-{[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone (50b)**

Compound **50b** was prepared in a similar manner described for **45a**. Yield: 67%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.40 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.60 (1H, dd, *J* = 6.6, 2.7 Hz), 7.36–7.30 (3H, m), 7.17 (1H, td, *J* = 7.6, 1.6 Hz), 4.70–4.66 (1H, m), 3.90 (2H, s), 3.86–3.78 (2H, m), 3.75–3.70 (1H, m), 3.51–3.49 (1H, m), 2.03–1.99 (1H, m), 1.93–1.87 (2H, m), 1.83–1.79 (1H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 170.97, 157.46, 140.91, 136.96, 133.94, 132.56, 130.01, 128.95, 126.05, 124.79, 123.81, 123.13 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 2.9 Hz), 122.06, 74.23, 44.04, 41.63, 40.13, 31.90, 31.24. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 443 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 443.0563 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 443.0576).

**2-(2-Bromophenyl)-1-{4-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]piperidin-1-yl}ethanone (50c)**

Compound **50c** was prepared in a similar manner described for **45a**. Yield: 78%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.57–7.55 (3H, m), 7.34–7.28 (2H, m), 7.15–7.13 (1H, m), 6.96 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.62–4.59 (1H, m), 3.87 (2H, s), 3.79–3.65 (3H, m), 3.47–3.44 (1H, m), 1.94–1.93 (1H, m), 1.84–1.78 (3H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 171.33, 170.94, 161.57, 136.98, 133.95, 132.53, 130.00, 128.95, 128.19 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.8 Hz), 127.47, 127.25, 126.29, 126.07, 125.51, 124.76, 124.74, 124.22, 123.90, 117.13, 73.20, 44.12, 41.66, 40.22, 32.06, 31.42. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 444 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 442.0633 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BrF<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>: 442.0624).

**{2-[2-(4-{[5-(Dimethylcarbamoyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)-2-oxoethyl]phenyl}boronic acid (51a)**

*N,N*-dimethyl-6-[(1-{[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]acetyl}piperidin-4-yl)oxy]pyridine-3-carboxamide was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 54%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.24 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz), 7.68 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz), 7.41–7.38 (1H, m), 7.30–7.23 (2H, m), 6.72 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 5.30–5.26 (1H, m), 4.11 (2H, s), 4.01–3.96 (1H, m), 3.79–3.74 (1H, m), 3.52–3.47 (1H, m), 3.43–3.38 (1H, m), 3.08 (6H, br s), 2.01–1.97 (1H, m), 1.90–1.86 (1H, m), 1.78–1.74 (1H, m), 1.67–1.61 (1H, m), 1.33 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 494 (M+H)<sup>+</sup>. Compound **46a** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 39%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.27 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 7.78 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.45–7.43 (1H, m), 7.22–7.14 (3H, m), 6.88 (1H, dd, *J* = 8.6, 0.8 Hz), 5.47–5.44 (1H, m), 4.06–3.86 (7H, m), 2.24–2.12 (2H, m), 2.03–1.97 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 170.63, 167.97, 162.82, 146.05, 139.76, 138.76, 134.35, 129.21, 125.58, 110.75, 70.43, 43.25, 31.14, 30.32. MS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 410 (M-H)<sup>−</sup>. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 410.1886 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>BN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 410.1893).

**{2-[2-Oxo-2-(4-{[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}boronic acid (51b)**

2-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-(4-{[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 57%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:

8.36 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 7.84 (1H, dd,  $J = 7.4, 1.6$  Hz), 7.61 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.40 (1H, td,  $J = 7.4, 1.6$  Hz), 7.28–7.25 (3H, m), 4.64–4.59 (1H, m), 4.11 (2H, s), 3.82–3.73 (3H, m), 3.51–3.46 (1H, m), 1.98–1.94 (1H, m), 1.85–1.66 (3H, m), 1.34 (12H, s). MS (FAB<sup>+</sup>)  $m/z$ : 491 (M+H)<sup>+</sup>. Compound **51b** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 34%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.42 (1H, d,  $J = 3.1$  Hz), 7.77 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.63 (1H, dd,  $J = 9.0, 2.7$  Hz), 7.45–7.43 (1H, m), 7.22–7.15 (3H, m), 4.97–4.92 (1H, m), 4.06 (2H, s), 4.04–3.99 (3H, m), 3.92–3.89 (1H, m), 2.22–2.11 (2H, m), 2.01–1.98 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 170.63, 155.62, 139.68, 138.46 (q,  $^2J(\text{C}, \text{F}) = 68.2$  Hz), 134.33, 129.14, 125.62, 123.05, 122.64, 121.99, 120.89, 72.81, 42.75, 38.61, 30.63, 29.82. MS (ESI<sup>-</sup>)  $m/z$ : 407 (M-H)<sup>-</sup>. HRMS (ESI<sup>-</sup>)  $m/z$ : 407.1410 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 407.1395).

**[2-(2-Oxo-2-{4-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]piperidin-1-yl}ethyl)phenyl]boronic acid (51c)**

2-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-{4-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]piperidin-1-yl}ethanone was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 53%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.84 (1H, dd,  $J = 7.4, 1.6$  Hz), 7.54 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz), 7.40 (1H, td,  $J = 7.5, 1.4$  Hz), 7.30–7.27 (2H, m), 6.94 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz), 4.59–4.56 (1H, m), 4.11 (2H, s), 3.79–3.65 (3H, m), 3.48–3.44 (1H, m), 1.92–1.70 (4H, m), 1.27 (6H, d,  $J = 3.1$  Hz), 1.24 (6H, s). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 490 (M+H)<sup>+</sup>. Compound **51c** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 24%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.60 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz), 7.45–7.44 (1H, m), 7.23–7.14 (5H, m), 4.89–4.87 (1H, m), 4.06 (2H, s), 4.02–3.99 (3H, m), 3.92–3.89 (1H, m), 2.16–2.12 (2H, m), 2.02–1.94 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 170.63, 159.92, 139.78, 139.74, 134.34, 129.18, 129.11, 127.05 (q,  $^3J(\text{C}, \text{F}) = 3.5$  Hz), 125.63, 123.52, 121.18 (q,  $^2J(\text{C}, \text{F}) = 32.1$  Hz), 116.06, 72.03, 42.86, 38.72, 30.83, 30.02. MS (ESI<sup>-</sup>)  $m/z$ : 406 (M-H)<sup>-</sup>. HRMS (ESI<sup>-</sup>)  $m/z$ : 406.1455 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BF<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>: 406.1443).

**2-(Piperidin-4-ylmethoxy)-5-(trifluoromethyl)pyridine hydrochloride (1:1) (53)**

To a solution of NaH (0.26 g, 6.1 mmol) in DMSO (16 mL) was added 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-piperidinemethanol (1.3 g, 6.1 mmol) and the reaction mixture was stirred at

room temperature for 15 min. To the mixture was added a solution of 2-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridine **52** (1.0 g, 5.5 mmol) in DMSO (6 mL) at room temperature. After stirring overnight, the reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (hexane-AcOEt) to give *tert*-butyl 4-([5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy)methylpiperidine-1-carboxylate (1.7 g, 88%) as a colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.42 (1H, s), 7.77 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.21 (2H, d, *J* = 6.7 Hz), 4.18–4.08 (2H, m), 2.76–2.73 (2H, m), 1.98–1.96 (1H, m), 1.80 (2H, d, *J* = 13.3 Hz), 1.47 (9H, s), 1.30–1.26 (2H, m). HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 361.1743 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 361.1734). Compound **53** was prepared in a similar manner described for **49b**. Yield: 100%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.47 (1H, s), 7.97 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.32 (2H, d, *J* = 6.3 Hz), 3.45 (2H, *J* = 12.9 Hz), 3.08–3.01 (2H, m), 2.24–2.17 (1H, m), 2.07 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 1.66–1.55 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 167.05, 145.19 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.5 Hz), 138.77 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 2.9 Hz), 126.75, 124.03, 121.73 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 35.6 Hz), 112.82, 71.90, 45.00, 34.83, 26.76. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 261 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 261.1227 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O: 261.1209).

#### 2-(2-Bromophenyl)-1-[4-([5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy)methyl]piperidin-1-ylethanone (**54**)

Compound **54** was prepared in a similar manner described for **48b**. Yield: 96%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.41 (1H, s), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.30–7.27 (2H, m), 7.14–7.10 (1H, m), 6.80 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 4.72 (1H, d, *J* = 13.3 Hz), 4.20 (2H, dd, *J* = 6.7, 2.7 Hz), 3.89–3.81 (3H, m), 3.08–3.05 (1H, m), 2.68–2.64 (1H, m), 2.08–2.04 (1H, m), 1.85 (2H, t, *J* = 14.9 Hz), 1.32–1.29 (1H, m), 1.18–1.15 (1H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 170.81, 167.67, 146.08 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.5 Hz), 137.38 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 137.02, 133.93, 132.46, 129.96, 128.92, 126.06, 121.27 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 32.1 Hz), 112.56, 71.80, 47.25, 43.36, 41.74, 37.12, 30.47, 29.80. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 457.0750 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 457.0733).

**(2-{2-Oxo-2-[4-({[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}methyl)piperidin-1-yl]ethyl}phenyl)boronic acid (55)**

Step A:

2-[2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-[4-({[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}methyl)piperidin-1-yl]ethanone was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 45%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.41 (1H, s), 7.83 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz), 7.38 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.28–7.22 (2H, m), 6.79 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 5.00–4.95 (2H, m), 4.71 (1H, d, *J* = 12.7 Hz), 4.19 (2H, d, *J* = 6.3 Hz), 4.08 (2H, s), 4.03 (1H, *J* = 13.7 Hz), 2.97 (1H, t, *J* = 12.2 Hz), 2.62–2.59 (1H, m), 2.05–2.01 (1H, m), 1.84 (1H, d, *J* = 12.7 Hz), 1.75 (1H, d, *J* = 13.2 Hz), 1.32 (12H, s). HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 505.2490 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 505.2480). Step B: Compound **55** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 27%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.45 (1H, s), 7.93 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.7 Hz), 7.45–7.43 (1H, m), 7.22–7.14 (3H, m), 6.94 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 4.79 (1H, d, *J* = 13.2 Hz), 4.38 (1H, d, *J* = 14.2 Hz), 4.31 (2H, d, *J* = 6.3 Hz), 4.04 (2H, s), 3.41–3.38 (1H, m), 3.08–3.05 (1H, m), 2.29–2.26 (1H, m), 2.08–2.05 (2H, m), 1.57–1.42 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 170.56, 165.79, 144.97 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.8 Hz), 139.86 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 5.4 Hz), 136.55, 134.39, 129.23, 125.66, 123.15, 118.83 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 32.4 Hz), 111.47, 70.30, 59.88, 45.62, 41.36, 35.15, 29.00, 28.11, 20.81, 14.15. MS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 421 (M-H)<sup>−</sup>. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 421.1584 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 421.1552).

**{2-[1-Hydroxy-2-oxo-2-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}boronic acid (56)**

Compound **56** was prepared in a similar manner described for **42**. Yield: 11%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.48 (1H, s), 7.97–7.95 (1H, m), 7.51–7.44 (2H, m), 7.39–7.32 (2H, m), 6.98 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 6.31 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 5.52–5.49 (1H, m), 4.08–3.92 (4H, m), 2.23–2.17 (2H, m), 2.04–1.99 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 171.24, 167.39, 152.78, 144.92, 131.14, 130.77, 127.57, 125.28, 118.83 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 32.1 Hz), 68.26, 42.77, 42.31, 31.45, 31.11, 30.44, 30.06, 26.97. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 425 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 423.1302 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 423.1345).

**2-(2-Bromophenyl)-2-methoxy-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone (58)**

Compound **58** was prepared in a similar manner described for **45a**. Yield: 100%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.38 (1H, s), 7.76 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.54 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz), 7.37 (1H, td, *J* = 7.0, 1.7 Hz), 7.22 (1H, td, *J* = 7.6, 1.6 Hz), 6.82–6.70 (1H, m), 5.40 (1H, s), 5.31–5.24 (1H, m), 4.11–4.07 (1H, m), 3.82–3.76 (1H, m), 3.67–3.59 (1H, m), 3.46 (3H, s), 3.39–3.30 (1H, m), 1.97–1.84 (2H, m), 1.76–1.65 (1H, m), 1.52–1.50 (1H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 169.90, 166.64, 146.06, 137.39, 134.36, 131.88, 130.62, 129.47, 127.05, 125.62, 124.32, 121.29 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 33.1 Hz), 113.12, 81.15, 72.37, 58.46, 43.91, 41.16, 31.66. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 473 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 473.0698 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 473.0682).

**{2-[1-Methoxy-2-oxo-2-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}boronic acid (59)**

Step A:

2-Methoxy-2-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone was prepared in a manner similar to that used for **46a**. Yield: 57%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.37 (1H, s), 7.74 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.47–7.43 (2H, m), 7.39–7.30 (2H, m), 6.76–6.74 (1H, m), 5.27–5.25 (1H, m), 5.08 (1H, s), 4.05–3.88 (2H, m), 3.68–3.62 (2H, m), 3.41 (3H, s), 2.02–1.61 (4H, m), 1.27 (4H, s), 1.24 (8H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 521 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **59** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 12%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.44 (1H, d, *J* = 16.6 Hz), 7.94–7.90 (1H, m), 7.38–7.32 (3H, m), 7.19 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 6.93–6.89 (1H, m), 5.34–5.33 (1H, m), 5.23 (1H, s), 4.04–4.00 (1H, m), 3.79–3.75 (1H, m), 3.66–3.58 (1H, m), 3.51–3.48 (4H, m), 2.14–2.08 (1H, m), 1.89–1.80 (3H, m). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 164.84, 144.88, 136.66, 127.06, 125.22, 123.07, 118.89, 118.63, 111.94, 80.96, 80.60, 71.24, 70.53, 57.10, 42.19, 30.63, 30.33, 29.60. MS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 437 (M-H)<sup>−</sup>. HRMS (ESI<sup>−</sup>) *m/z*: 437.1511 (M-H)<sup>−</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 437.1501).

**2-(2-Bromo-4-fluorophenyl)-1-(4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]piperidin-1-yl)ethanone (61a)**

Compound **61a** was prepared in a similar manner described for **45a**. Yield: 94%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.41 (1H, s), 7.78 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz), 7.34–7.28 (2H, m), 7.03 (1H, td, *J* = 8.3, 2.6 Hz), 6.80 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.38–5.33 (1H, m), 4.01–3.95 (1H, m), 3.82 (2H, d, *J* = 2.0 Hz), 3.76–3.72 (1H, m), 3.61–3.54 (1H, m), 3.47–3.41 (1H, m), 2.05–1.95 (2H, m), 1.82–1.70 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 170.68, 166.77, 163.03 (d, <sup>1</sup>*J*(C, F) = 247.0 Hz), 146.10 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.8 Hz), 137.51 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 133.79 (d, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 8.6 Hz), 133.35, 126.15 (d, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 10.5 Hz), 121.29 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 33.4 Hz), 120.80 (d, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 25.7 Hz), 115.80 (d, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 20.0 Hz), 113.14, 72.28, 44.33, 40.71, 40.59, 32.29, 31.64. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 461 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 461.0485 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>BrF<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 461.0482).

**2-(2-Bromo-4-chlorophenyl)-1-(4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]piperidin-1-yl)ethanone (61b)**

Compound **61b** was prepared in a similar manner described for **45a**. Yield: 80%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.41 (1H, s), 7.78 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.29–7.26 (2H, m), 6.80 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.37–5.33 (1H, m), 3.98–3.94 (1H, m), 3.82 (2H, d, *J* = 2.0 Hz), 3.73–3.70 (1H, m), 3.61–3.55 (1H, m), 3.45–3.42 (1H, m), 2.01–1.97 (2H, m), 1.82–1.72 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 173.07, 166.73, 146.08 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.5 Hz), 137.49 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 136.15, 134.65, 133.74, 133.26, 129.01, 126.57, 125.68 (q, <sup>1</sup>*J*(C, F) = 270.2 Hz), 121.30 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 67.7 Hz), 113.12, 72.40, 44.34, 40.93, 40.59, 32.33, 31.62. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 477 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 477.0231 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>BrClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 477.0187).

**2-(2-Bromo-4-methoxyphenyl)-1-(4-[[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy]piperidin-1-yl)ethanone (61c)**

Compound **61c** was prepared in a similar manner described for **45a**. Yield: 97%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.41 (1H, s), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.23 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.85 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz), 6.80 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.37–5.31 (1H, m), 4.00–3.97 (1H, m), 3.80–3.79 (5H, m), 3.73–3.70

(1H, m), 3.59–3.55 (1H, m), 3.43–3.39 (1H, m), 2.03–1.91 (2H, m), 1.81–1.70 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 171.40, 166.77, 161.02, 146.11, 137.51, 132.76, 128.65, 126.09, 121.30 (q, <sup>3</sup>J(C, F) = 68.7 Hz), 119.22, 114.79, 113.13, 72.30, 56.20, 44.43, 40.75, 40.58, 32.25, 31.63. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 473 (M+H)<sup>+</sup>. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 473.0693 (M+H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 473.0682).

**{5-Fluoro-2-[2-oxo-2-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}boronic acid (62a)**

Step A:

2-[4-Fluoro-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 59%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.40 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.51 (1H, dd, *J* = 9.4, 2.7 Hz), 7.24 (1H, dd, *J* = 8.6, 5.1 Hz), 7.07 (1H, td, *J* = 8.4, 3.0 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.35–5.29 (1H, m), 4.04 (2H, s), 3.99–3.96 (1H, m), 3.80–3.76 (1H, m), 3.49–3.43 (2H, m), 2.00–1.94 (2H, m), 1.79–1.66 (2H, m), 1.33 (12H, s). MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 509 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **62a** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 49%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.48 (1H, s), 7.96 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.18 (1H, dd, *J* = 8.2, 5.1 Hz), 7.12 (1H, dd, *J* = 9.0, 3.1 Hz), 6.98 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.91 (1H, td, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 5.54–5.49 (1H, m), 4.05–4.01 (5H, m), 3.94–3.90 (1H, m), 2.28–2.14 (2H, m), 2.06–2.00 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 175.21, 166.48, 164.71, 162.26, 146.03 (q, <sup>3</sup>J(C, F) = 4.5 Hz), 137.53 (q, <sup>3</sup>J(C, F) = 3.2 Hz), 131.02, 129.76 (d, <sup>3</sup>J(C, F) = 7.6 Hz), 126.92, 124.21, 121.40 (q, <sup>2</sup>J(C, F) = 65.8 Hz), 117.69 (d, <sup>2</sup>J(C, F) = 19.1 Hz), 114.84 (d, <sup>2</sup>J(C, F) = 23.8 Hz), 113.09, 70.78, 44.88, 42.24, 31.63, 31.10. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 425.1302 (M-H)<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>BF<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 425.1301).

**{5-Chloro-2-[2-oxo-2-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}boronic acid (62b)**

Step A:

2-[4-Chloro-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 39%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.40 (1H, s), 7.79–7.77 (2H, m), 7.35 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz), 7.21 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.35–5.29 (1H, m), 4.04 (2H, s), 4.01–3.95 (1H, m), 3.80–3.75 (1H, m), 3.53–3.39 (2H, m), 2.00–1.94 (2H, m), 1.77–1.70 (2H, m), 1.33 (12H, s). MS (FAB<sup>+</sup>) *m/z*: 525 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **62b** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 53%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.49 (1H, s), 7.96 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz), 7.40 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.19–7.16 (2H, m), 6.98 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.53–5.49 (1H, m), 4.08–4.01 (5H, m), 3.93–3.90 (1H, m), 2.27–2.14 (2H, m), 2.09–1.96 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 174.92, 166.48, 146.03 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.8 Hz), 137.53 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 134.00, 133.74, 131.59, 129.67, 128.09, 126.93, 124.22, 121.41 (q, <sup>2</sup>*J*(C, F) = 33.1 Hz), 113.05, 70.72, 44.91, 42.27, 31.57, 31.06. HRMS (ESI<sup>-</sup>) *m/z*: 441.1018 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>BClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 441.1006).

**{5-Methoxy-2-[2-oxo-2-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]phenyl}boronic acid (62c)**

Step A:

2-[4-Methoxy-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]-1-(4-{[5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethanone was prepared in a similar manner described for **46a**. Yield: 61%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.40 (1H, s), 7.77 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.22 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.9 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.32–5.30 (1H, m), 4.04 (2H, s), 4.01–3.96 (1H, m), 3.83 (3H, s), 3.56–3.44 (3H, m), 1.99–1.90 (3H, m), 1.79–1.74 (1H, m), 1.33 (12H, s). MS (FAB<sup>+</sup>) *m/z*: 521 (M+H)<sup>+</sup>. Step B: Compound **62c** was prepared in a similar manner described for **47a**. Yield: 30%. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.48 (1H, s), 7.95 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 7.08 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.77 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.7 Hz), 5.52–5.48 (1H, m), 4.07–3.94 (5H, m), 3.90–3.87 (1H, m), 3.78 (3H, s), 2.24–2.13 (2H, m), 2.06–1.95 (2H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 175.79, 166.76, 160.00, 146.29 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 4.5 Hz), 137.77 (q, <sup>3</sup>*J*(C, F) = 3.2 Hz), 129.32, 127.70, 127.21, 124.4, 121.66

(q,  $^2J(\text{C}, \text{F}) = 66.3 \text{ Hz}$ ), 116.76, 114.56, 113.33, 71.19, 55.82, 45.06, 42.32, 31.95, 31.40. HRMS (ESI<sup>-</sup>)  $m/z$ : 437.1479 (M-H)<sup>-</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 437.1501).

## 生物学的評価

### Enzyme assay

Recombinant human HSL was expressed in a *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cell using the Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen, Inc.). The infected Sf9 cells were suspended in 3 pellet volumes with homogenization buffer (25 mM sucrose pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT and protease inhibitors) to the whole volume of 30 mL. The homogenate was sonicated on ice bath. Insoluble material was removed by centrifugation at 18000 rpm for 20 min. The obtained 20 mL of clear supernatant was utilized for in vitro assay. Inhibition of HSL was determined by a colorimetric assay that measures PNPB as previously reported.<sup>35</sup> The solution of human HSL extract diluted by 6-fold (10  $\mu\text{L}$ ) and various concentrations of compounds in DMSO (10  $\mu\text{L}$ ) were added to a solution of 1.0 mM PNPB in a phosphate buffer (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.25, 0.15 M NaCl, and 1 mM dithiothreitol) (180  $\mu\text{L}$ ). The enzymatic reactions were carried out at 37° C for 5 min. The solution absorbances were measured spectrophotometrically at  $\lambda$  of 405 nm at 0 and 5 min. Each assay was carried out in triplicate. IC<sub>50</sub> values were obtained by fitting data to a nonlinear curve fitting program (GraphPad Software, Inc., La Jolla CA).

### Kinetic HSL Experiments

To evaluate the mechanism of HSL inhibition, compound **16** was evaluated in substrate-dependent kinetic experiments, and the corresponding progression curves as well as sets of Lineweaver–Burk plots were generated. The reciprocal HSL activity was plotted against the reciprocal substrate concentration. The initial catalytic rates of human HSL were measured at six different concentrations of the substrate PNPB (0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, and 4.0 mM) in the presence of three different concentrations (0.003, 0.03, and 0.01  $\mu\text{M}$ ) of compound **16**. The enzymatic reactions and measurements were performed using human HSL assay conditions as described above for the determination of IC<sub>50</sub> values.

### **Cellular assay**

Lipolysis was measured in rat subcutaneous fat tissue cells (White Adipocyte Culture kit, f-8 purchased from Primary Cell Co., Ltd.) differentiated for 7 days. After removal of the culture medium, each well in the plate was washed with 200  $\mu$ L of pre-warmed rat lipolysis assay buffer (a solution of 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 mM D-(+)-glucose, 20 mM HEPES, 11.1  $\mu$ g/mL adenosine and 1% bovine serum albumin (w/v), and the pH was adjusted to 7.0 by the addition of 1 M NaOH aq.). Then, 50  $\mu$ L of various concentrations of compounds in DMSO was added to each well in the plate. The cells were incubated in the CO<sub>2</sub> incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 30 min. After incubation, all of the culture supernatants in each well in the plate were collected. Glycerol concentration in the culture supernatants was measured by Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich). The solution absorbance was measured spectrophotometrically at  $\lambda$  of 540 nm using a spectrophotometer (SPECTRAMax PLUS384, Molecular Devices Corporation Japan). Each assay was carried out in quadruplicate. IC<sub>50</sub> values were obtained by fitting data to a nonlinear curve fitting program (GraphPad Software, Inc., La Jolla CA).

### **In vitro AChE and BuChE assay**

A solution of the inhibitor (50  $\mu$ L) was added to a 100 U/mL solution of AChE or BuChE (50  $\mu$ L) and preincubated for 10 min at room temperature. A phosphate buffer (0.1 M potassium phosphate-HCl, pH 8.0) (100  $\mu$ L), acetylthiocholin iodide (final 500  $\mu$ M) or *S*-butyrylthiocholin iodide (final 1000  $\mu$ M) and 0.01 M DTNB in aqueous sodium hydrogen carbonate (1 mg/mL, 10  $\mu$ L) were mixed with the preincubation mixture in microtiter plates. The enzymatic reactions were carried out at 37°C for 15 min. The absorption at 405 nm was measured at a spectrophotometer at 0 and 15 min at 37°C with shaking. Inhibitory activity was measured at 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, and 100  $\mu$ M respectively.

### **In vivo inhibition of lipolysis of compound 16**

Male Wistar rats 8 weeks of age were purchased from Japan SLC, Inc. All animals were held under standard laboratory conditions (12 h light per day, light on at 7:00 AM,  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $55 \pm 10\%$  humidity) with food and water available ad libitum. Overnight-fasted rats received vehicle (polypylene glycol/Tween80 = 4:1 (v/v)) ( $n = 4$ ) or compound **16** in the vehicle (1 mg/kg, 3 mg/kg and 10 mg/kg body weight p.o.;  $n = 3$  per group). EDTA-treated blood samples were collected just prior to and after dosing at 0.5, 1, 3, 5, and 7 h from tail veins. The blood was centrifuged at 12000 rpm for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to obtain the plasma. The plasma samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before analysis. Plasma glycerol levels were determined using a Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich). All experimental procedures were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Daiichi Sankyo. The relative value was calculated as the following formula:

Plasma glycerol reduction of the  $\text{AUC}_{0-7\text{ h}}$  (%) relative to compound **1** =  $\{[\text{Plasma glycerol } \text{AUC}_{0-7\text{ h}} \text{ value (vehicle group)} - \text{Plasma glycerol } \text{AUC}_{0-7\text{ h}} \text{ value (test group)}] / [\text{Plasma glycerol } \text{AUC}_{0-7\text{ h}} \text{ value (vehicle group)} - \text{Plasma glycerol } \text{AUC}_{0-7\text{ h}} \text{ value (compound } \mathbf{1} \text{ group)}]\} \times 100$

#### **In vivo inhibition of lipolysis of compound 41b**

Male Wistar rats 8 weeks of age were purchased from Japan SLC, Inc. All animals were held under standard laboratory conditions (12 h light per day, light on at 7:00 AM,  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $55 \pm 10\%$  humidity) with food and water available ad libitum. Overnight-fasted rats received vehicle (polypylene glycol/Tween80 = 4:1 (v/v)) ( $n = 4$ ) or compound **41b** in the vehicle (1 mg/kg and 3 mg/kg body weight p.o.;  $n = 3$  per group). EDTA-treated blood samples were collected just prior to and after dosing at 0.5, 1, 3, 5, and 7 h from tail veins. The blood was centrifuged at 12000 rpm for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to obtain the plasma. The plasma samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before analysis. Plasma glycerol levels were determined using a Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich). All experimental procedures were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Daiichi Sankyo. The relative value was calculated as the following formula:

Plasma glycerol reduction of the AUC<sub>0-7 h</sub> (%) relative to compound **1** = {[Plasma glycerol AUC<sub>0-7 h</sub> value (vehicle group) - Plasma glycerol AUC<sub>0-7 h</sub> value (test group)] / [Plasma glycerol AUC<sub>0-7 h</sub> value (vehicle group) - Plasma glycerol AUC<sub>0-7 h</sub> value (compound **1** group)]} × 100

#### **In vivo inhibition of lipolysis of compound 62a**

Male Wistar rats 8 weeks of age were purchased from Japan SLC, Inc. All animals were held under standard laboratory conditions (12 h light per day, light on at 7:00 AM, 23 ± 2°C, 55 ± 10% humidity) with food and water available ad libitum. Overnight-fasted rats received vehicle (0.5% methylcellulose solution (w/v)) (*n* = 4) or compound **62a** in the vehicle (0.3 mg/kg and 1 mg/kg body weight p.o.; *n* = 3 per group). EDTA-treated blood samples were collected just prior to and after dosing at 0.5, 1, 3, 5, and 7 h from tail veins. The blood was centrifuged at 12000 rpm for 5 min at 4°C to obtain the plasma. The plasma samples were stored at -20°C before analysis. Plasma glycerol levels were determined using a Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich). All experimental procedures were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Daiichi Sankyo. The relative value was calculated as the following formula:

Plasma glycerol reduction of the AUC<sub>0-7 h</sub> (%) relative to compound **1** = {[Plasma glycerol AUC<sub>0-7 h</sub> value (vehicle group) - Plasma glycerol AUC<sub>0-7 h</sub> value (test group)] / [Plasma glycerol AUC<sub>0-7 h</sub> value (vehicle group) - Plasma glycerol AUC<sub>0-7 h</sub> value (compound **1** group)]} × 100

#### **Pharmacokinetic evaluation in rats**

Each plasma sample was prepared as described above, followed by mixing with water, acetonitrile, and IS (internal standard) acetonitrile solution (20 µM of niflumic acid). For each standard sample, each standard solution of test compounds (0.02, 0.05, 0.2, 0.5, 2, 5, 20 and 50 µM) was added to blank plasma and mixed with water, acetonitrile and IS acetonitrile solution. After vortex mixing for 5 min at room temperature, the mixtures were added to a Captiva plate (Agilent Technologies) and filtrated. The filtrates were subjected to LC-MS/MS analysis using an API 4000QTRAP (Applied Biosystems/MDS SCIEX). C<sub>max</sub> and AUC<sub>0-7h</sub>

were determined by a non-compartmental model using the BioBook function of E-WorkBook Suite (ID Business Solutions Ltd.).

### **GSH trapping experiments**

For the GSH trapping experiments, each test compound (500  $\mu$ M) was incubated with human liver microsomes (2 mg of protein/mL) supplemented with an NADPH generating system and an equimolar mixture of GSH and stable isotope-labeled GSH ( $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N-Gly}]\text{GSH}$ ). After 60-min incubation, the reaction was terminated with acetonitrile containing propranolol, followed by centrifugation and concentration of the supernatant. Incubation without NADPH or a substrate was performed to obtain control samples. The analytical samples were subjected to LC-MS analysis in full scan  $\text{MS}^{\text{E}}$  mode using a Q-ToF Xevo mass spectrometer (Waters). The data were analyzed by MetaboLynx software (Waters).

### **Metabolic stability**

Each compound (1  $\mu$ M) and rat liver microsomes (0.5 mg/mL) were incubated in sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C with an NADPH generating system. After 20-min incubation, the reaction was terminated with MeOH. After centrifuging each solution separately at 3500 rpm for 10 min at 4°C, the remaining parent compound was determined by LC-MS/MS.

### **Parallel artificial membrane permeability assay**

Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) was carried out using a Freedom EVO200 system (Tecan, Männedorf, Switzerland). The filter membrane of the acceptor plate (Stirwell PAMPA Sandwich; Pion, Billerica, MA, USA) was coated with GIT-0 lipid solution (Pion). Each compound solution in DMSO (10 mM) was added to Prisma HT buffer (Pion) to obtain 5  $\mu$ M donor solutions (containing 0.05% DMSO, pH 5.0 and pH 7.4) and placed on a donor plate. The acceptor plate was filled with an acceptor sink buffer (Pion). The donor plate was placed on top of the acceptor plate and incubated for 4 h at 25°C. After incubation, the concentration of each compounds in both plates was measured by an

LC-MS/MS system. The permeability coefficient was calculated using PAMPA Evolution DP software (Pion).

#### **Distribution coefficient**

The distribution coefficient between 1-octanol and PBS was assayed using a shaking flask method. Equal amounts of PBS and 1-octanol were shaken and left overnight. The upper layer (1-octanol) and lower layer (PBS) were collected individually. Each test compound was dissolved in 1-octanol or PBS (200  $\mu$ M). The same amount of either PBS or 1-octanol was added and the mixture was shaken vigorously for 30 min at room temperature followed by centrifugation at 2100 *g* for 5 min at room temperature. Then, both phases were separated and assayed by HPLC and LC-MS. LogD<sub>7.4</sub> was calculated by the following equation:  $\text{LogD}_{7.4} = \log (\text{peak area of compound in 1-octanol} / \text{peak area of compound in PBS})$ .

#### **Plasma protein binding ratio**

Plasma was obtained from male Wistar rats purchased from Charles River Laboratories Japan, Inc. (Yokohama, Japan). A 10 mM solution of each test compound in DMSO (10  $\mu$ L) was added to 190  $\mu$ L of CH<sub>3</sub>CN, and the mixture (6  $\mu$ L) was added to a 594  $\mu$ L of plasma (final 5  $\mu$ M). The plasma sample (200  $\mu$ L) and PBS (350  $\mu$ L) were transferred into the sample chamber and buffer chamber of a RED device (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), respectively. The dialysis device was placed on an orbital shaker in a CO<sub>2</sub> incubator set at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, and incubated for 5 h. After incubation, the concentration of each compounds in both plates was measured by an LC-MS/MS system. The plasma protein binding ratio (%) was calculated using the following equation:

The plasma protein binding ratio (%) =  $100 - \{ \text{peak area of compound in PBS} / (\text{peak area of compound in PBS} + \text{peak area of compound in plasma}) \} \times 100$

#### **Solubility**

A solution (50  $\mu$ L) of each sample in DMSO was freeze-dried to remove DMSO. To the residue, 250  $\mu$ L of Japanese Pharmacopoeia First Fluid or Japanese Pharmacopoeia Second Fluid were added, and the each mixture was stirred at 1700 rpm for 4 h. After filtration of the mixture by Whatman Unifilter, the resulting filtrate was diluted with DMSO to obtain the measurement sample solution. Concentration of the filtrate was analyzed by HPLC-UV using Acquity UPLC (Waters) based on the calibration curve of each sample.

#### **Calculation of HOMO energy and HOMO-LUMO gap**

The conformations of each compound were obtained by using Program Ligprep<sup>87)</sup> and then performing conformational search of MacroModel<sup>87)</sup> with OPLS3 force field. HOMO and LUMO energies of each compound were calculated by Jaguar<sup>87)</sup> in Schrödinger using density-functional theory calculation with B3LYP/6-31++G(d,p) basis set.

参考文献及び脚注

- 1) 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017 年版 日本動脈硬化学会
- 2) 動脈硬化性疾患予防のための脂質異常症治療ガイド 2013 年版 改訂版 日本動脈硬化学会
- 3) 平成 26 年 患者調査 厚生労働省
- 4) Smith, S. C.; Allen, J.; Blair, S. N.; Bonow, R. O.; Brass, L. M.; Fonarow, G. C.; Grundy, S. M.; Hiratzka, L.; Jones, D.; Krumholz, H. M.; Mosca, L.; Pasternak, R. C.; Pearson, T.; Pfeffer, M. A.; Taubert, K. A. *Circulation* **2006**, *113*, 2363.
- 5) Olsson, A. G. *Clin, Ther.* **2006**, *28*, 1747.
- 6) Keech, A.; Simes, R. J.; Barter, P.; Best, J.; Scott, R.; Taskinen, M. R.; Forder, P.; Pillai, A.; Davis, T.; Glasziou, P.; Drury, P.; Kesäniemi, Y. A.; Sullivan, D.; Hunt, D.; Colman, P.; d'Emden, M.; Whiting, M.; Ehnholm, C.; Laakso, M.; *Lancet* **2005**, *366*, 1849.
- 7) Keene, D.; Price, C.; Shun-Shin, M. J.; Francis, D. P. *BMJ* **2014**, *349*, 4379.

- 8) Sabatine, M. S.; Giugliano, R. P.; Keech, A. C.; Honarpour, N.; Wiviott, S. D.; Murphy, S. A.; Kuder, J. F.; Wang, H.; Liu, T.; Wasserman, S. M.; Sever, P. S.; Pedersen, T. R. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1713.
- 9) Marais, D. A.; Blom, D. J.; Petrides, F.; Gouëffic, Y.; Lambert, G.; *Curr. Opin. Lipidol.* **2012**, *23*, 511.
- 10) Maxwell, K. N.; Breslow, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7100.
- 11) Rashid, S.; Curtis, D. E.; Garuti, R.; Anderson, N. N.; Bashmakov, Y.; Ho, Y. K.; Hammer, R. E.; Moon, Y. A.; Horton, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5374.
- 12) Qian, L. J.; Gao, Y.; Zhang, Y. M.; Chu, M.; Yao, J.; Xu, D. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 238.
- 13) 中医協、PCSK9 阻害剤「レパース」、薬価収載を了承 ピーク時 492 億円、日刊薬業、2016 年 4 月 13 日
- 14) 平成 24 年人口動態統計、厚生労働省
- 15) Lass, A.; Zimmermann, R.; Oberer, M.; Zechner, R. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 14.
- 16) Langin, D.; Holm, C.; Lafontan, M. *Proc. Nutr. Soc.* **1996**, *55*, 93.

- 17) Kwiterovic, P. O. Jr. *The John Hopkins textbook of Dyslipidemia*; Lippincott Williams and Wilkins, 2010.
- 18) Zhang, Y.; Schmidt, R. J.; Foxworthy, P.; Emkey, R.; Oler, J. K.; Large, T. H.; Wang, H.; Su, E. W.; Mosior, M. K.; Eacho, P. I.; Cao, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 334, 729.
- 19) Wanders, D.; Judd, R. L. *Diabetes Obes. Metab.* **2011**, 13, 685.
- 20) Zimmermann, R.; Lass, A.; Haemmerle, G.; Zechner, R.; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2009**, 1791, 494.
- 21) Bézaire, V.; Langin, D. *Proc. Nutr. Soc.* **2009**, 68, 350.
- 22) Sztalryd, C.; Xu, G.; Dorward, H.; Tansey, J. T.; Contreras, J. A.; Kimmel, A. R.; Londos, C. *J. Cell Biol.* **2003**, 161, 1093.
- 23) Holm, C. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 1120.
- 24) McKnight, G. S.; Cummings D. E.; Amieux P. S.; Sikorsk, M. A.; Brandon, E. P.; Planas, J. V.; Motamed, K.; Idzerda, R. L. *Recent Prog. Horm. Res.* **1998**, 53, 139.

- 25) Langin, D.; Laurell, H.; Holst, L. S.; Belfrage, P.; Holm, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4897.
- 26) Yeaman, S. J. *Biochem. J.* **2004**, *379*, 11.
- 27) Holm, C.; Davis, R. C.; Osterlund, T.; Schotz, M. C.; Fredrikson, G. *FEBS Lett.* **1994**, *344*, 234.
- 28) Contreras, J. A.; Karlsson, M.; Østerlund, T.; Laurell, H.; Svensson, A.; Holm, C. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31426.
- 29) Shen, W. J.; Liang, Y.; Hong, R.; Patel, S.; Natu, V.; Sridhar, K.; Jenkins, A.; Bernlohr, D. A.; Kraemer, F. B. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 49443.
- 30) Lampidonis, A. D.; Rogdakis, E.; Voutsinas, G. E.; Stravopodis, D. J. *Gene*, **2011**, *477*, 1.
- 31) Ebdrup, S.; Refsgaard, H. H. F.; Fledelius, C.; Jacobsen, P. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5449.
- 32) Lowe, D. B.; Magnuson, S.; Qi, N.; Campbell, A. M.; Cook, J.; Hong, Z.; Wang, M.; Rodriguez, M.; Achebe, F.; Kluender, H.; Wong, W. C.; Bullock, W. H.; Salhanick, A. I.; Witman-Jones, T.; Bowling, M. E.; Keiper, C.; Clairmont, K. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3155.

- 33) de Jong, J. C.; Sørensen, L. G.; Tornqvist, H.; Jacobsen, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1741.
- 34) Ebdrup, S.; Sørensen, L. G.; Olsen, O. H.; Jacobsen, P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 400.
- 35) Slee, D. H.; Bhat, A. S.; Nguyem, T. N.; Kish, M.; Lundeen, K.; Newman, M. J.; McConnel, S. J. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1120.
- 36) Vasilieva, E.; Dutta, S.; Malla, R. K.; Martin, B. P.; Spilling, C. D.; Dupureur, C. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 944.
- 37) Ali, Y. B.; Chahinian, H.; Petry, S.; Muller, G.; Lebrun, R.; Verger, R.; Carrière, F.; Mandrich, L.; Rossi, M.; Manco, G.; Sarda, L.; Abousalham, A. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14183.
- 38) Al-Shawabkeh, J. D.; Al-Nadaf, A. H.; Dahabiyeh, L. A.; Taha, M. O. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 127.
- 39) Taha, M. O.; Dahabiyeh, L. A.; Bustanji, Y.; Zalloum, H.; Saleh, S. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6478.
- 40) Ebdrup, S.; Jacobsen, P.; Farrington, A. D.; Vedsø, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2305.

41) Taylor, P. Anticholinesterase agents. In *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 11th ed.*; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L.; Eds.; McGraw-Hill: New York, 2006, 201.

42) Jann, M. W. *Pharmacotherapy* **2000**, 20, 1.

43) Winblad, B.; Cummings, J.; Andreasen, N.; Grossberg, G.; Onofrj, M.; Sadowsky, C.; Zechner, S.; Nagel, J.; Lane, R. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2007**, 22, 456.

44) 審査報告書、独立行政法人医薬品医療機器総合機構、平成 27 年 7 月 14 日

[http://www.pmda.go.jp/drugs/2015/P20150811002/300242000\\_22300AMX00529000\\_A100\\_1.pdf](http://www.pmda.go.jp/drugs/2015/P20150811002/300242000_22300AMX00529000_A100_1.pdf)

2017 年 11 月 5 日

45) エーザイ株式会社、アリセプト、医薬品インタビューフォーム、2017 年 5 月改訂 (改訂第 30 版)

46) Robertson, J. G. *Biochemistry* **2005**, 44, 5561.

- 47) Claus, T. H.; Lowe, D. B.; Liang, Y.; Salhanick, A. I.; Lubeski, C. K.; Yang, L.; Lemoine, L.; Zhu, J.; Clairmont, K. B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1396.
- 48) Baker, S. J.; Tomsho, J. W.; Benkovic, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4279.
- 49) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. *Med. Res. Rev.* **2003**, *3*, 346.
- 50) Palmer, B. D.; Sutherland, H. S.; Blaser, A.; Kmentova, I.; Franzblau, S. G.; Wan, B.; Wang, Y.; Ma, Z.; Denny, W. A.; Thompson, A. M. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3036.
- 51) Hiratake, J.; Oda, J. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*, 211.
- 52) Koutek, B.; Prestwich, G. D.; Howlett, A. C.; Chin, S. A.; Salehani, D.; Akhavan, N.; Deutsch, D. G. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22937.
- 53) Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P. C.; Funk, L.; Shook, B. C. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7902.
- 54) Copeland, R. A., Ed.; *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*; Wiley Press, 2005. 131.
- 55) Walgren, J. L.; Mitchell, M. D.; Thompson, D. C. *Crit. Rev. Toxicol.* **2005**, *35*, 325.

- 56) Zhou, S.; Chan, E.; Duan, W.; Huang, M.; Chen, Y. Z. *Drug Metab. Rev.* **2005**, *37*, 41.
- 57) Grillo, M. P. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2015**, *11*, 1281.
- 58) Wen, B.; Fitch, W. L. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5*, 39.
- 59) Yan, Z.; Caldwell, G. W. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6835.
- 60) Lenz, E. M.; Martin, S.; Schmidt, R.; Morin, P. E.; Smith, R.; Weston, D. J.; Bayrakdarian, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 968.
- 61) It was recently reported that the formation of Cys-Gly-thiazolidine adducts possibly occurred after the degradation by hydrolysis of the glutamic acid moiety. See Ref. 60
- 62) Takefuji, N.; Nakatani, M.; Suzuki, J.; Ozaki, M.; Ueno, R.; Yano, H.; Kawashima, M.; Kurihara, Y.; Shimazu, T. WO9633975.
- 63) Brewster, W.; Demeter, D.; Erickson, W.; Lowe, C.; Klittich, C.; Nugent, J.; Rieder, B.; Siddall, T.; Yao, C.; Yerkes, C.; Zhu, Y. WO2011/25505.
- 64) Yuen, A. K. L.; Hutton, C. A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7899.

- 65) Hall, D. G. *Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives. Overview of Their Reactions and Applications, in Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
- 66) Minkkilä, A.; Saario, S. M.; Käsänen, H.; Leppänen, J.; Poso, A.; Nevalainen, T. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7057.
- 67) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3.
- 68) Arnott, J. A.; Planey, S. L. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 863.
- 69) Leeson, P. D.; Springthorpe, B. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881.
- 70) Hughes, J. D.; Blagg, J.; Price, D. A.; Bailey, S.; DeCrescenzo, G. A.; Devraj, R. V.; Ellsworth, E.; Fobian, Y. M.; Gibbs, M. E.; Gilles, R. W.; Greene, N.; Huang, E.; Krieger-Burke, T.; Loesel, J.; Wager, T.; Whiteley, L.; Zhang, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4872.
- 71) Greene, N.; Aleo, M. D.; Louise-May, S.; Price, D. A.; Wil, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5308.

- 72) Price, D. A.; Blagg, J.; Jones, L.; Greene, N.; Wager, T. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5*, 921.
- 73) Di, L.; Kerns, E. H. *Drug-Like Properties (Second Edition). Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*, Academic Press, 2016, 95.
- 74) Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508.
- 75) Motoki, K.; Nishinaka, S.; Masuda, S.; Sakamoto, A.; Kaneko, S.; Arita, T.; Kawagoe, K.; Yokomizo, A. EP2258697 A1, 2010
- 76) Blaser, A.; Palmer, B. D.; Sutherland, H. S.; Kmentova, I.; Franzblau, S. G.; Wan, B.; Wang, Y.; Ma, Z.; Thompson, A. M.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 312.
- 77) Barta, T. E.; Becker, D. P.; Bedell, L. J.; De Crescenzo, G. A.; McDonald, J. J.; Munie, G. E.; Rao, S.; Shieh, H. S.; Stegeman, R.; Stevens, A. M.; Villamila, C. I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2815.
- 78) Kalgutkar, A. S.; Soglia, J. R. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2005**, *1*, 91.

- 79) Labutti, J.; Parsons, I.; Huang, R.; Miwa, G.; Gan, L. S.; Daniels J. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 539.
- 80) Bathelt, C. M.; Ridder, L.; Mulholland, A. J.; Harvey, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15004.
- 81) Rietjens, I. M. C. M.; Cnubben, N. H. P.; van Haandel, M.; Tyrakowska, B.; Soffers, A. E. M. F.; Vervoort, J. *Chem. Biol. Interact.* **1995**, *94*, 49.
- 82) Kawai, M.; Sakurada, I.; Morita, A.; Iwamuro, Y.; Ando, K.; Omura, H.; Sakakibara, S.; Masuda, T.; Koike, H.; Honma, T.; Hattori, K.; Takashima, T.; Mizuno, K.; Mizutani, M.; Kawamura, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5537.
- 83) Palmer, C.; Pairish, M.; Kephart, S.; Bouzida, D.; Cui, J.; Deal, J.; Dong, L.; Gu, D.; Linton, A.; McAlpine, I.; Yamazaki, S.; Smith, E.; John-Baptiste, A.; Bagrodia, S.; Kania, R.; Guo, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7605.
- 84) Rydberg, P.; Vasanthanathan, P.; Oostenbrink, C.; Olsen, L. *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 2070.
- 85) Yoshizawa, K. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 375.

86) Drew, K. L. M.; Reynisson, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 56, 48.

87) Schrödinger, L.L.C., New York, 2005. <http://www.schrodinger.com>.