



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	乙第1900号
学位記番号	論第202号
氏名	藤枝 広樹
授与年月日	令和1年 9月 25日
学位論文の題名	チオフェニルピロリジン骨格を有する新規グルコキナーゼ活性化薬の創製およびスケールアップ研究
論文審査担当者	主査： 樋口 恒彦 副査： 中川 秀彦，尾関 哲也，平嶋 尚英

名古屋市立大学学位論文

チオフェニルピロリジン骨格を有する  
新規グルコキナーゼ活性化薬の創製および  
スケールアップ研究

2019 年度（2019 年 9 月）

藤枝 広樹

1. 本論文は、2019 年 9 月、名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 樋口 恒彦 教授

副査 中川 秀彦 教授

尾関 哲也 教授

平嶋 尚英 教授

2. 本論文は学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

(i) Hiroki Fujieda, Masakazu Kogami, Masao Sakairi, Noriyasu Kato, Mitsuhiro Makino, Naoki Takahashi, Toshiyuki Miyazawa, Satoko Harada, Tokuyuki Yamashita

Discovery of a potent glucokinase activator with a favorable liver and pancreas distribution pattern for the treatment of type 2 diabetes mellitus.

*Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 156, 269–294.

(ii) Hiroki Fujieda, Koji Maeda, Noriyasu Kato

Efficient and Scalable Synthesis of Glucokinase Activator with a Chiral Thiophenyl-Pyrrolidine Scaffold.

*Org. Process Res. Dev.* **2019**, 23, 69–77.

(iii) Hiroki Fujieda, Koji Maeda

New synthetic route to the important (*S*)-5-(1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylic acid intermediate for the synthesis of a novel glucokinase activator.

*Synth. Commun.* **2019**, 49, 814–822.

3. 本論文の基礎となる研究は株式会社三和化学研究所探索研究所において山下 篤行 博士の指導の下に行われた。

## 目次

第 1 章	緒言.....	1
1-1	糖尿病	
1-2	グルコキナーゼ	
1-3	グルコキナーゼ活性化薬	
1-4	本研究の目的	
第 2 章	新規 GK 活性化薬の探索.....	8
2-1	リード化合物 <b>38</b> の獲得	
2-1-1	ヒット化合物 <b>7</b> からの合成展開	
2-1-2	ヒット化合物 <b>7</b> へ極性基を導入した化合物の合成	
2-1-3	活性化能と溶解度の検討、考察	
2-1-4	ヒット化合物 <b>7</b> のフェニル基の変換	
2-1-5	合成	
2-1-6	活性化能と溶解度の検討、考察	
2-1-7	化合物 <b>26a</b> の最適化検討	
2-1-8	合成	
2-1-9	活性化能と溶解度の検討、考察	
2-1-10	化合物 <b>34e</b> の光学活性体の合成	
2-1-11	光学活性体の活性化能と溶解度の検討、考察	
2-1-12	化合物 <b>38</b> の安全性について	
2-2	臨床候補化合物 <b>63·HCl</b> の獲得.....	24
2-2-1	hERG 阻害回避のための分子設計	
2-2-2	合成	
2-2-3	活性化能と hERG 阻害の検討、考察	
2-2-4	化合物 <b>51</b> の最適化検討	
2-2-5	合成	
2-2-6	活性化能と hERG 阻害の検討、考察	
2-2-7	化合物 <b>57b</b> の光学活性体とその類縁体の合成	
2-2-8	活性化能と hERG 阻害の検討、考察	
2-2-9	化合物 <b>63·HCl</b> と <b>63</b> の <i>in vivo</i> 薬効評価	

2-2-10	化合物 <b>63</b> の他の GKA に対する特徴解析
2-2-11	小括
第 3 章	<b>63·HCl</b> の合成中間体 <b>36</b> の不斉水素移動反応を用いた新規合成法の探索.....40
3-1	探索合成ルートの問題点
3-2	不斉水素移動反応を用いたカルボン酸 <b>36</b> の合成
3-2-1	合成法の選択
3-2-2	触媒的不斉水素移動反応の使用
3-2-3	ATH の条件検討
3-2-4	小括
第 4 章	<b>63·HCl</b> の実用的な新規合成法の探索および大量合成.....49
4-1	不斉プール法を用いた合成中間体 <b>36</b> の合成法の検討
4-2	化合物 <b>36</b> から <b>63·HCl</b> の環状無水物 <b>97</b> を経由する効率的合成法の検討
4-3	小括
第 5 章	結語.....57
第 6 章	実験の部.....59
参考文献	
謝辞	

本文中以下の用語及び試薬は、以下のように略記した。

AcOEt	ethyl acetate
AcOiPr	isopropyl acetate
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATH	asymmetric transfer hydrogenation
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butyllithium
br	broad (spectral)
°C	degrees celsius
C <sub>max</sub>	maximum plasma concentration
CHO cell	Chinese hamster ovary cell
Cp	cyclopentadienyl
δ	chemical shift in parts per million downfield from tetramethylsilane
d	doublet
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
Et <sub>2</sub> O	diethyl ether
g	gram(s)
GK	glucokinase
GKA	glucokinase activator
GKRP	glucokinase regulatory protein
GLP-1	glucagon like peptide-1
GSIS	glucose-stimulated insulin secretion
h	hour(s)
hERG	human ether-a-go-go related gene
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectra
HTS	high throughput screening
IDF	international diabetes federation
LR	Lawesson's reagent
m	multiplet (spectral); meter; milli
MeOH	methanol

MHz	megahertz
MODY	maturity onset diabetes of the young
<i>m/z</i>	mass-to-charge ratio
mp	melting point
MS	mass spectrometry
NADH	dihydronicotine adenine dinucleotide
NADPH	dihydronicotine adenine dinucleotide phosphate
NBS	<i>N</i> -bromosuccimide
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optical density
OGTT	oral glucose tolerance test
PDB	protein data bank
PHHI	persistent hyper insulinemic hypoglycemia of infancy
PNDM	permanent neonatal diabetes mellitus
p.o.	per os
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator-activated receptor
ppm	part(s) per million
<i>i</i> PrOH	isopropyl alcohol
q	quartet
quant	quantitative
quin	quintet
rt	room temperature
s	singlet
sat	saturated
SBDD	structure-based drug design
SGLT-2	sodium-glucose co-transporter-2
t	triplet
TdP	Torsades de Pointes
TFA	trifluoroacetic acid
TG	triglyceride
THF	tetrahydrofuran
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolet

## 第1章 緒言

### 1-1 糖尿病

糖尿病はインスリンの作用不足により慢性的な高血糖が続き、全身の様々な臓器に影響を与える疾患であり、世界で最も一般的な慢性疾患の一つである。患者数は今もなお増加し続けており、国際糖尿病連合（International Diabetes Federation：IDF）によると2017年には世界中で約4億人もの人々が糖尿病を発症しており、その数は2045年には6億人に達すると予想されている<sup>1</sup>。この大流行は食生活の変化、都会化の進行、肥満人口の劇的な増加によるところが大きい。日本においても患者数は増加し続けており、糖尿病患者の数は厚生労働省実施の「平成29年（2017）患者調査の概況」によると、前回調査が行われた2014年より12万3000人増加し328万9000人となり、過去最高となっている<sup>2</sup>。

糖尿病にはいくつかのタイプが存在することが知られているが、成人の糖尿病の大部分は2型糖尿病が占めている。2型糖尿病は遺伝的体質に肥満・運動不足・ストレスなどの要因が加わって発症するが、緩やかに発症し、進行も緩やかである。2型糖尿病の原因は主にインスリン分泌、インスリン有効性のどちらかもしくは両方の欠陥である。発症するとグルコース濃度をうまく調整できずに慢性的な高血糖を呈し、この高血糖の状態が治療されずに続くと、糖尿病性網膜症、腎症、神経障害等の深刻な合併症を併発してしまう<sup>3-5</sup>。

これらの合併症を防ぐため、食事療法、運動療法に加え、薬物治療を行うことが推奨されており、現在臨床現場では①インスリン抵抗性改善系②インスリン分泌促進系③糖吸収・排泄調節系の3つのカテゴリーの経口糖尿病治療薬が使用されている。

①のカテゴリーの薬剤としてはビグアナイド薬、チアゾリジン薬が知られている。ビグアナイド薬は肝臓での糖新生抑制、骨格筋における糖取り込み亢進、消化管からの糖吸収の抑制等の様々な作用があり、細胞内のエネルギー代謝に関わるAMP活性化プロテインキナーゼ（AMP-activated protein kinase：AMPK）を活性化することが重要な作用機序であると考えられている<sup>6</sup>。また、AMPKノックアウトマウスに対してもメトホルミンによる血糖降下作用が発揮されることから、AMPKを介さない作用機序も存在することが明らかとなっている。この経路ではメトホルミンがミトコンドリアの呼吸鎖複合体I（Complex I）の作用を阻害することでAMP濃度が上昇し、グルカゴンによるアデニレートシクラーゼの活性化を阻害することで糖新生が抑制される<sup>7,8</sup>。ビグアナイド薬は乳酸やアミノ酸からの糖新生を抑えるため、乳酸の蓄積を促進する作用がある。通常蓄積した乳酸は肝臓で代謝されるが、肝機能障害等で乳酸の代謝能が低下している患者では、乳酸アシドーシスを引き起こす可能性があるため注意を要する。チアゾリジン薬はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ （Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ ：PPAR $\gamma$ ）アゴニストとしてPPAR $\gamma$ の活性を上昇させ、前駆脂肪細胞の小型脂肪細胞への分化を促進することで、小型脂肪細胞数を増加させ、インスリン抵抗性惹起物質の産生・分泌が亢進している肥大化した脂肪細胞を減少させることで、インスリン抵抗性を改善する作用がある。チアゾリジン薬の副作用としては浮腫・体重増加、心不全等が知られている<sup>9-11</sup>。浮腫・体重増加の主な原因は腎臓のPPAR $\gamma$ の活性化によ



る  $\text{Na}^+$ 再吸収の亢進だと考えられている。PPAR $\gamma$ の活性化により遠位尿細管では  $\text{Na}$  輸送体の発現が増加し、近位尿細管ではゲノムの転写をともなわず Src-EGF 受容体-ERK 経路が活性化され、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体と  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ 共輸送体が活性化される。この結果引き起こされる水分貯留のため、チアゾリジン薬は心不全を悪化または発症する恐れがあるので注意が必要である<sup>12-14</sup>。

②のカテゴリーには dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬、スルホニル尿素薬、グリニド薬（速攻型インスリン分泌促進薬）が含まれる。DPP-4 阻害薬は、インスリンの分泌を促進する Gastric inhibitory polypeptide (GIP) と Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) を分解する酵素である DPP-4 を阻害し、活性型 GIP および GLP-1 の濃度を高め、食後高血糖を改善する。DPP-4 阻害薬の投与によるインスリン分泌増加は血糖値依存的であるので単剤では低血糖を起こしにくいことが知られているが、スルホニル尿素薬と併用すると低血糖を起こすことがあるため注意が必要である<sup>15</sup>。スルホニル尿素薬は膵 $\beta$ 細胞に存在する ATP 感受性  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) チャネルの Sulfonylurea receptor 1 (SUR1) サブユニットに結合しインスリン分泌作用を発揮するが、血糖値に関係なく膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌を促進することから低血糖を起こすリスクがある。また、スルホニル尿素薬は膵 $\beta$ 細胞内の cyclic adenosine monophosphate (cAMP) シグナルを関与するタンパク質である exchange protein activated by cAMP2 (Epac2) へも結合し、インクレチンによるインスリン分泌経路とも関わっていることが明らかとなっている<sup>16</sup>。グリニド薬（速攻型インスリン分泌促進薬）はスルホニルウレア骨格を有していないが、スルホニル尿素薬と同様に  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの SUR1 サブユニットに結合しインスリン分泌を刺激する。その作用はスルホニル尿素薬より弱い、より速やかなインスリン分泌促進作用を示し、作用の消失もより早い。食後高血糖の改善に対する効果に優れている。作用時間が短いためスルホニル尿素薬より頻度は低いが、低血糖が表れることがある<sup>17, 18</sup>。

③のカテゴリーの薬剤としては $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬、Sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬が知られている。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬は小腸粘膜に存在する炭水化物の吸収に重要な二糖類分解酵素（ $\alpha$ -グルコシダーゼ）を阻害することで炭水化物の吸収を遅らせ、食後高血糖を改善する薬剤である。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬はそのメカニズムから、食後の過血糖のみを抑制するため、単独では低血糖を起こす可能性が低い。副作用として消化器症状（腹部膨満感、放屁、下痢）を起こすことがあるが、この原因は $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬の作用により小腸で未消化の糖質が生じ、それが大腸に達し、腸内細菌により発酵を受けるためと考えられている。この副作用は服薬コンプライアンスの低下へと繋がる可能性がある<sup>19</sup>。SGLT2 阻害薬は腎臓の近位尿細管における糖の再吸収を担っている SGLT2 を阻害することで、過剰な糖の尿中排泄を促進し血糖値を改善する作用があるが、尿路・性器感染症、脱水のリスクがあることが知られている。尿路・性器感染症は糖の再吸収阻害により尿糖が増加するため引き起こされ、また脱水は浸透圧性利尿により引き起こされると考えられている<sup>20</sup>。

このように様々なメカニズムを有する糖尿病治療薬が知られているが、それぞれが副作用を引き起こすリスクを有している。また、糖尿病患者に対してこれらの治療薬を単独で、若しくは複数を組み合わせた投与を行っても長期間血糖値をコントロールすることは難しい<sup>21, 22</sup>。そのため、臨床現場において画期的な糖尿病治療薬は今もなお必要とされており、効果が高く安全な新しい

糖尿病治療薬の開発が強く望まれている。

## 1-2 グルコキナーゼ

グルコキナーゼ (GK) はヘキソキナーゼⅣとも呼ばれ、ヘキソースのリン酸化を触媒するヘキソキナーゼファミリーの一員であり、解糖系の第1段階であるグルコースのグルコース-6-リン酸への変換を触媒している (Figure 1-1, Table 1)。他のヘキソキナーゼⅠ-Ⅲと比べ基質であるグルコースに対する親和性が低いため、親和性の指標である  $S_{0.5}$  値 (最大飽和速度  $V_{max}$  の 1/2 に到達する時のグルコース濃度) は正常血糖値付近の約 5–8 mM と大きい。また、生成したグルコース-6-リン酸によってネガティブフィードバックを受けないという特徴を有している。

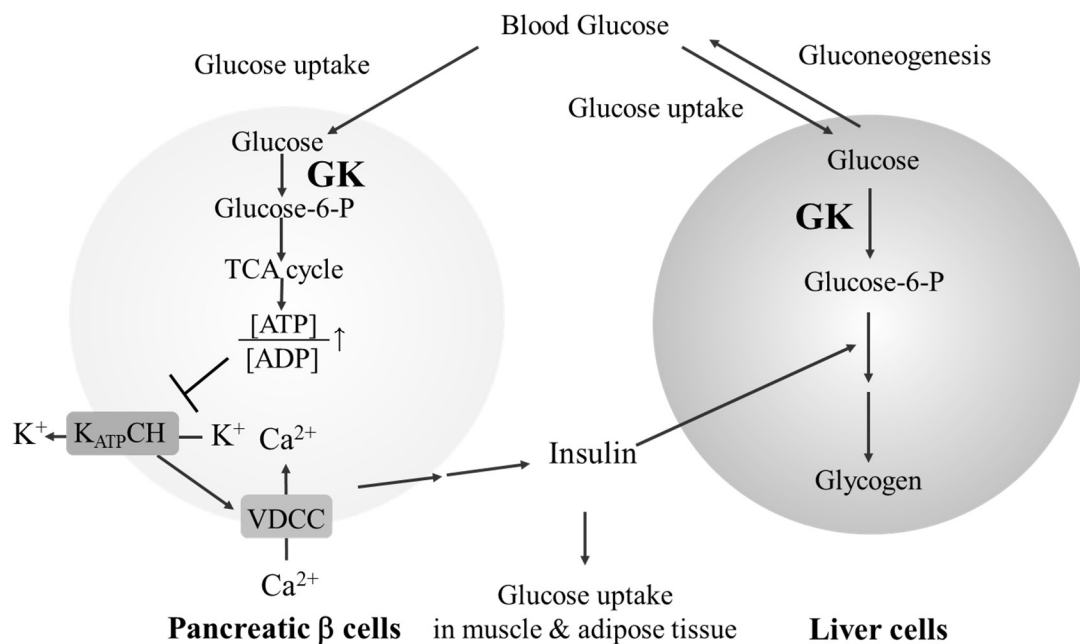
GK はアロステリック酵素であり、グルコース反応曲線がシグモイド型を示すが、これには GK の独特なコンフォメーション変化が関わっている。GK は活性状態ではクローズド構造、不活性状態ではスーパーオープン構造と呼ばれる構造をとっている。グルコース濃度が低い状態では GK は反応を終えた後、いったん熱力学的に安定なスーパーオープン構造をとるため、そこからクローズド構造を再びとるまでに時間がかかり、その間の酵素反応が遅くなる。一方でグルコース濃度が高い状態ではスーパーオープン構造を取る前に、基質であるグルコースが反応するため、酵素の反応速度は速い。GK はこのような独特な性質により、グルコース結合に対し反応曲線が正の協同性を示す (Figure 1-2) <sup>23</sup>。

GK の発現は代謝に関与する組織 (膵  $\beta$  細胞、肝臓、中枢、消化管など) に局限しており、その中でも膵臓と肝臓の GK が糖代謝に深く関わっている。膵臓中の膵  $\beta$  細胞において GK はグルコースセンサーとして働き、グルコース応答性インスリン分泌 (Glucose-stimulated insulin secretion : GSIS) に重要な役割を果たしている。血糖値が低い状態では GK 活性は低く GSIS は抑制されているが、高血糖状態では GK 活性が上昇し、インスリン分泌が促進される <sup>24, 25</sup>。肝臓においては GK の反応が律速となってグルコースのグリコーゲンへの変換や、糖新生が調節されている。肝臓における GK の作用はグルコキナーゼ調節タンパク質 (glucokinase regulatory protein : GKR) による制御を受けており、血中グルコース濃度が低い状態で GK は GKR と会合し核内に存在しているが、グルコース濃度が上昇すると GK が GKR から解離し、細胞質へと移行する。このことでさらに GK によるグルコースのリン酸化が促進され、肝臓でのグルコースからグリコーゲンへの変換も促進される <sup>26</sup>。

GK の血糖制御における重要性はノックアウトマウスによる研究によっても確かめられている。膵  $\beta$  細胞における GK をノックアウトしたマウスの研究において、ホモノックアウト型は高血糖で生後まもなく死亡してしまうことや、ヘテロノックアウト型ではインスリン分泌の低下による耐糖能の障害を示すことが明らかとなった。また一方で、肝特異的な GK ノックアウトマウスではホモノックアウト型であってもわずかな血糖上昇が見られるのみであった。これらのことから特に膵臓の GK がげっ歯類において、血糖値の調節に対し重要な役割を果たすことが明らかとなった <sup>27, 28</sup>。

また、GK のヒトにおける遺伝子変異は糖尿病と関連していることが知られており、1990 年代

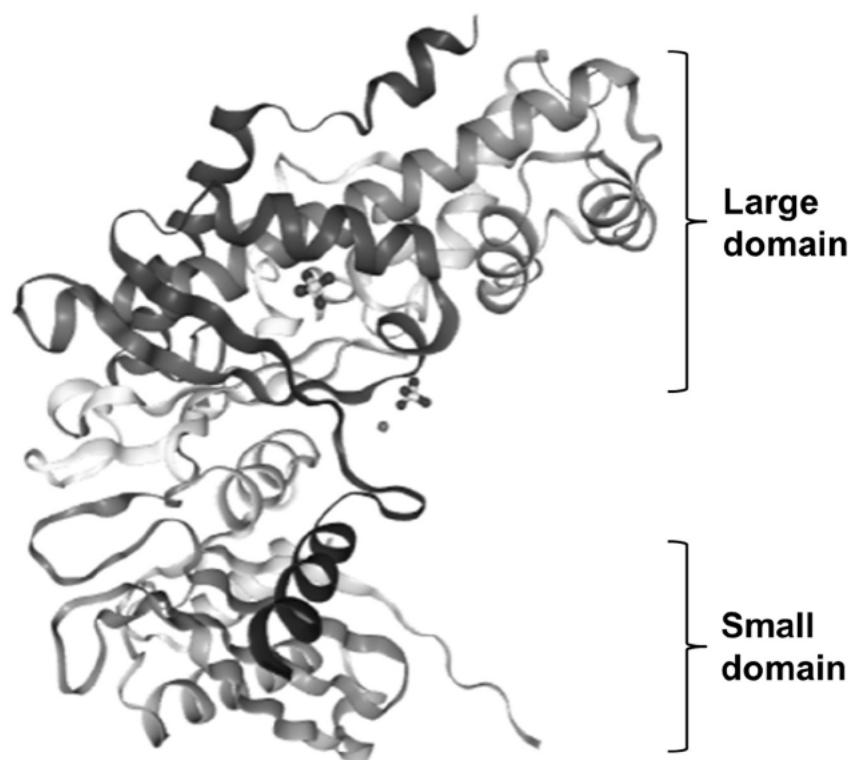
に若年発症型成人型糖尿病（Maturity onset diabetes of the young : MODY）の一部の患者が GK のヘテロ遺伝子変異を有していることが明らかとなった。これらの患者は（Type 2 maturity onset diabetes of the young 2 : MODY2）と分類されている。MODY2 の患者では GK のグルコースに対する親和性が低下しており、 $S_{0.5}$  値の上昇や  $V_{max}$  の低下がみられる。この GK 活性低下により、膵β細胞ではインスリン分泌能が低下し、肝細胞ではグルコースの取り込み低下や糖新生の亢進が起こり、軽度の高血糖が起こっている。MODY の臨床像を呈する変異としては Val203Ala などが知られている。GK 遺伝子のホモ変異や複合遺伝子変異は永続性新生児糖尿病（Permanent neonatal diabetes mellitus : PNDM）の発症に繋がり、PNDM の患者は永続的なインスリン治療が必要である。臨床では Thr228Met 等の症例が報告されている。一方で Val455Met 等の GK 活性を上昇させる遺伝子変異は過剰なインスリン分泌により低血糖を呈する、乳児持続性高インスリン血症性低血糖症（Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy : PHHI）を引き起こすことが知られている。このように、GK はヒトにおいても血糖の恒常性維持に関して重要な役割を担っている<sup>29-32</sup>。



**Figure 1-1.** The role of Glucokinase (GK) in blood glucose regulation.

**Table 1.** Comparison of hexokinase isozymes<sup>33</sup>

アイソザイム	分子量 $\times 10^{-3}$	$K_m$ or $S_{0.5}$ (mM)	分布
Hexokinase I	98	0.045	脳、その他様々な組織に広く発現
Hexokinase II	96	0.23	心筋細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、がん組織など
Hexokinase III	99.5	0.007	様々な組織に発現しているが発現量が少ない
Hexokinase IV (Glucokinase)	49	5	膵 $\beta$ 細胞、肝臓、中枢、消化管など



**Figure 1-2.** Structure of GK without glucose (Closed form) (PDB ID:1V4T).<sup>34</sup>

### 1-3 グルコキナーゼ活性化薬

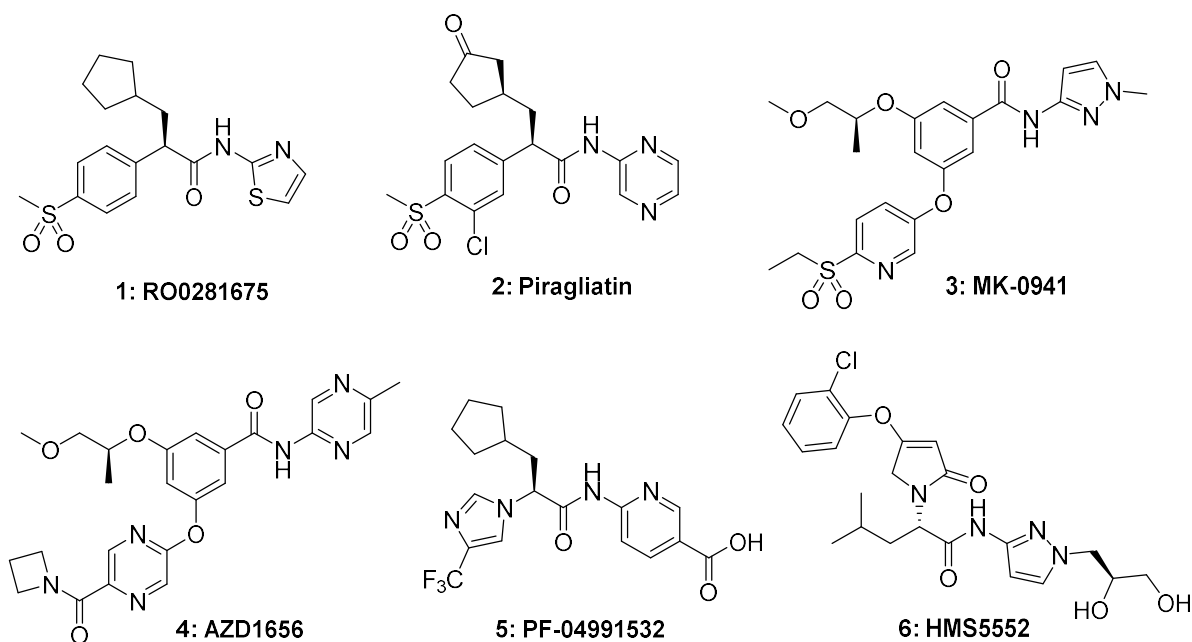
GK が生体内のグルコース代謝に大きな影響を及ぼしていることから、GK を直接、もしくは間接的に活性化できるような化合物の探索が始まり、2003 年に初めてグルコキナーゼ活性化薬 (Glucokinase activator: GKA) である **1** (RO0281675) の論文発表がなされた<sup>35-37</sup>。化合物 **1** は基質結合部位から 20 Å ほど離れた GK のアロステリック部位に結合し、GK のグルコースに対する  $S_{0.5}$  値を低下させ、 $V_{max}$  を増加させることで酵素の動的なプロファイルに影響を及ぼしている。化合物 **1** の発表後、現在までに様々な化学構造を有する GKA が報告されているが、それらの代表的な骨格として Figure 1-3 に示すような炭素中心型、芳香環中心型、アミノ酸中心型等が知られている<sup>36-43</sup>。

GKA は、スルホニル尿素薬のようなインスリン分泌作用と、ビグアナイド薬のような肝臓での抗糖尿病作用が 1 剤で見込めるため、2 型糖尿病患者に対し優れた血糖値改善作用が期待できると考えられた。GKA は様々な動物モデルにおいて顕著な血糖降下作用を示し、さらに 2 型糖尿病患者に対する複数の臨床試験も実施された。しかし、これらの臨床試験において GKA は優れた血糖降下作用は示したものの、いくつかの試験で低血糖、血中 TG 値上昇、長期間の投与による薬効の減弱等の問題が発生した<sup>41, 44, 45</sup>。

メルク社の GKA である **3** (MK-0941) の臨床試験はインスリングルルギンを使用している 2 型糖尿病患者に対し実施された。投与開始から 14 週経過の時点で化合物 **3** 投与群では HbA1c と食後 2 時間血糖値がプラセボ投与群と比較して改善されていた。しかし、この時点で認められた血糖値改善作用はそれ以降続かず、30 週で試験は中止となった。この試験においては低血糖、TG 上昇、血圧上昇の副作用が見られた<sup>41</sup>。アストラゼネカ社の GKA である **4** (AZD1656) の日本人 2 型糖尿病患者を対象とした臨床試験では、治療開始から 2 ヶ月の時点で化合物 **4** 投与群は、HbA1c 値がプラセボ投与群と比較して改善されていた。しかし、**4** の薬効は長くは続かず、4 ヶ月の時点で化合物 **4** 投与群はプラセボ投与群と比較して薬効に有意差が認められなかった<sup>45</sup>。このように GKA の開発には課題が残されており、未だに上市に至った GKA は存在していない。

これまでに多くの GKA が開発中止となった中でも、Hua Medicine 社の GKA である HMS5552 や vTv Therapeutics 社の GKA である TTP339 等は臨床試験を継続中である<sup>46, 47</sup>。HMS5552 は今までの GKA とは大きく異なる化学構造を有しており、このことが今までの開発中止となった GKA とは異なるプロファイルを示すのではないかと期待されている<sup>46</sup>。TTP339 は肝臓の GK に特異的に作用する GKA であるが、この化合物は肝の GK が GKRP により阻害されることを妨げないという特徴を有している。この特徴が今までの GKA とは異なっており、GKA の臨床試験で見られたような問題を解決できるのではないかと期待されている<sup>47</sup>。

このように、GKA の臨床試験が中止となる中でも試験が継続している GKA は、これまでの GKA にはなかった際立った特徴を有するものである。よって、抗糖尿病薬として新規 GKA を創製、開発するには、それが今までのものとは異なる際立った特徴を有している必要がある。



**Figure 1-3.** Representative structures of GKA from the literature.

#### 1-4 本研究の目的

本研究では、臨床試験が中止となった既存の GKA でみられたような問題点を解決できる可能性のある際立った特徴を有し、かつ、臨床化合物として開発できる高い安全性を有する化合物の獲得と、その獲得した有望化合物の効率的で実用的な新規合成法を開発することを目的とした。

本論文では、著者が株式会社三和化学研究所において実施した下記の内容について論じる。第2章では上述の目的に基づいた臨床候補化合物 **63・HCl** 獲得の経緯と、**63・HCl** の他の GKA とは異なる際立った特徴について論じ、第3章では **63・HCl** 合成の重要中間体であるカルボン酸 **36** の新規合成法の検討について論じる。更に第4章では不斉プール法を用いた **36** の合成と **36** から **63・HCl** の環状酸無水物 **97** を利用した効率的な合成法の開発、さらに **63・HCl** の 50kg スケールでの大量合成について論じる。

## 第2章 新規 GK 活性化薬の探索

### 2-1 リード化合物 38 の獲得

ドイツの創薬ベンチャー企業である 4SC 社との *in silico* スクリーニングとタンパク質構造情報に基づく薬物設計 (Structure-based drug design : SBDD) を用いた共同研究により *in vitro* で強い GK 活性化能を示すヒット化合物 7 が見出された (Figure 2-1)<sup>48</sup>。この化合物はフェニルチオフェン骨格を有しており、この骨格は既存の GKA には見られないユニークな構造であったため、化合物 7 を合成展開のための起点化合物として選択した。

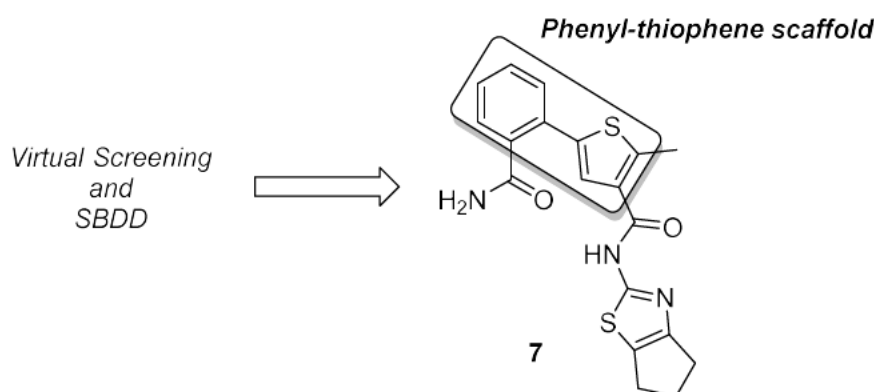


Figure 2-1. Structure of hit compound 7.

化合物の GK 活性化能はグルコースのグルコース 6-リン酸への変換速度を glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) coupled continuous spectrophotometric assay を用いて求めた。このアッセイは GK によりグルコースがリン酸化されることで生成したグルコース 6-リン酸が G6P デヒドロゲナーゼにより 6-ホスホグルコノラクトンへと変換される際、同時に補酵素である NADP が NADPH へと変換されることを利用したものであり、生成した NADPH の波長 340 nm での吸光度を求めることで GK の反応速度を求めることができる (Figure 2-2)。化合物濃度 10  $\mu\text{M}$  における GK の活性化能を、化合物を入れていない DMSO 溶液のものと比べた値を Fold activation、ポジティブコントロール RO0281675(1)の 10  $\mu\text{M}$  における活性を 1 とした活性の補正值を Relative activation として算出した。また、化合物の溶解度はネフェロメーターを用いた濁度法によって測定した<sup>49</sup>。

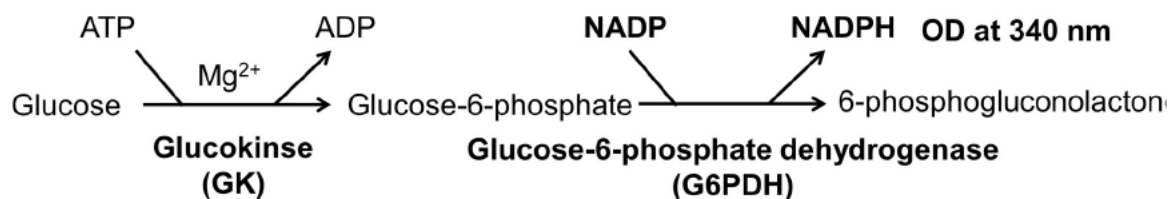
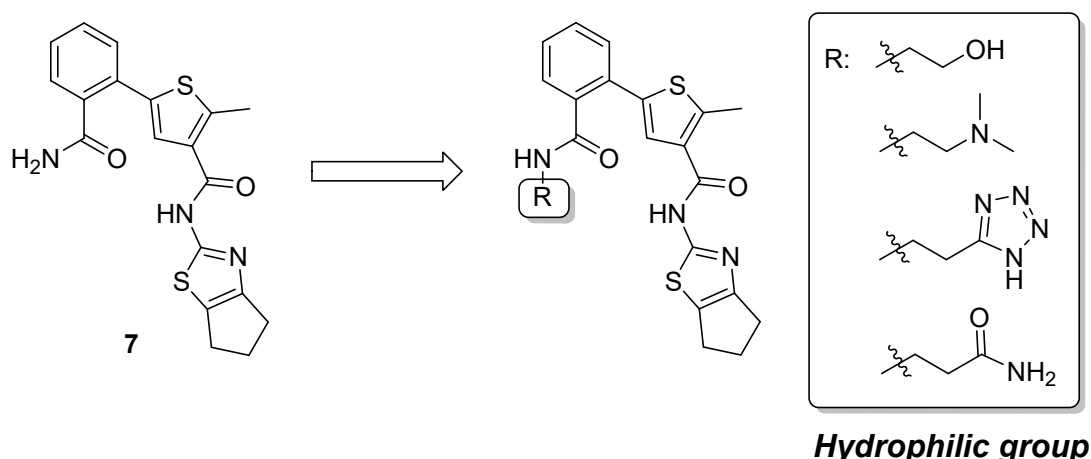


Figure 2-2. Principle of measuring GK activity based on G6PDH reaction.

化合物 **7** の *in vivo* での血糖降下作用を調べるため、マウスを用いた経口ブドウ糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test : OGTT) を実施したが、**7** は経口投与により優位な血糖降下作用を示さなかった。以下特に断らない場合、投与は経口投与のことを指す。この試験におけるマウス中の **7** の血中濃度を測定したところ  $C_{\max}$  は  $1\ \mu\text{M}$  未満と低く、このことが化合物 **7** が OGTT において効果を示さなかった原因だと考えられた。化合物の血中濃度が低い原因としては、代謝安定性が非常に悪く生体内で急速に代謝を受け消失している可能性や、膜透過性、溶解度が悪いことが原因で消化管から吸収されていない可能性が考えられる。化合物 **7** の場合はマウス OGTT における **7** の血中濃度推移で急速な消失はみとめられなかったため、化合物の代謝安定性が原因であるとは考えられず、また、この化合物は十分な脂溶性 ( $\text{LogD at pH } 7.4 = 3.23$ )<sup>50</sup> を有していたため膜透過性が原因であるとも考えられなかった<sup>51</sup>。化合物 **7** は溶解度が低いため ( $\text{Solubility at pH } 7.4 = 1.95\ \mu\text{M}$ ) OGTT 中の **7** の血中濃度の低さは、化合物の低い溶解性に起因すると考え、**7** の親水性を上げることで溶解度を改善する合成展開に着手した。

### 2-1-1 ヒット化合物 **7** からの合成展開

先行研究の際、ヒット化合物 **7** は GK との結合時、GK アロステリック部位内のアミノ酸残基と多数の水素結合を形成していることが推定されていた<sup>48</sup>。そこで、これらの相互作用できる可能性のある部分構造を保持したまま化合物の物性を改善することを試みた。化合物 **7** が GK アロステリック部位に結合した際、**7** の末端カルバモイル基が位置しているポケットは親水性のアミノ酸残基が数多く存在し、かつ置換基導入の可能な空間が存在していることが推定されていたため、**7** の末端カルバモイル基の先に極性置換基を導入することによる溶解度の改善を試みた (Figure 2-3)。

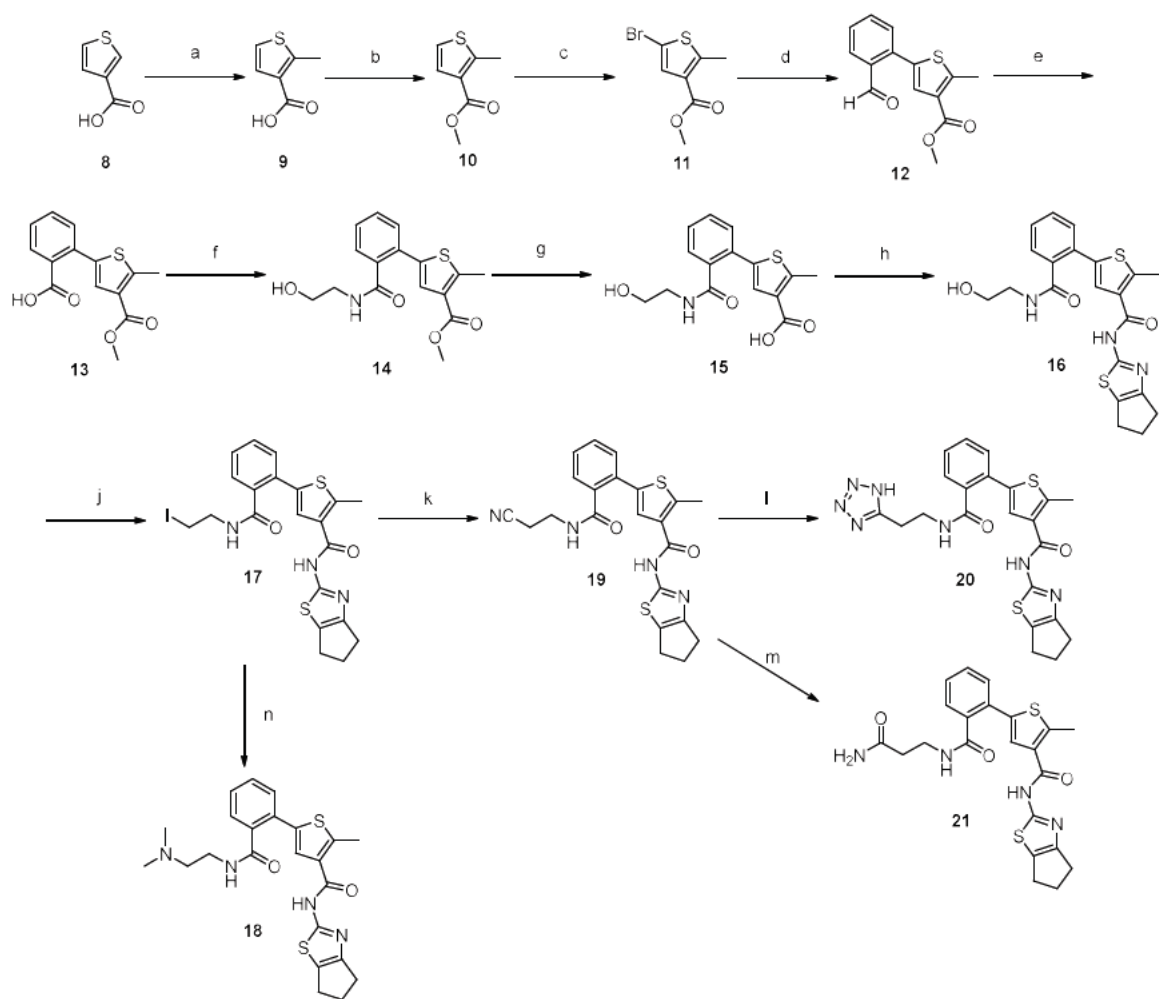


**Figure 2-3.** Introduction of hydrophilic group to the hit compound **7**.



## 2-1-2 ヒット化合物 **7** へ極性基を導入した化合物の合成

フェニルチオフェン誘導体 **16**、**18**、**20**、**21** の合成を Scheme 2-1 に示した。チオフェン **8** の 2 位に MeI を用いてメチル基を導入し、酸性条件下でエステル化を行うことで **10** を得た。その後、NBS を用いたブロモ化を行い、得られたブロモ体 **11** と、2-ホルミルフェニルボロン酸との鈴木-宮浦カップリングにより **12** を合成した。次にアルデヒド **12** をピニック酸化でカルボン酸 **13** とし、アミノエタノールと EDCI、HOBt を用いて縮合することで **14** を得た。化合物 **14** のエステル基を加水分解後、5,6-ジヒドロ-4*H*-シクロペンタ[*d*]チアゾール-2-アミンと縮合しアルコール **16** を得て、**16** の末端アルコール部分をアッペル反応でヨウ素へ変換し **17** を得た。ヨウ素体 **17** にジメチルアミンを反応させることでアミン **18** を、NaCN を反応させることでシアノ体 **19** をそれぞれ合成した。また、化合物 **19** のシアノ基を Bu<sub>3</sub>SnN<sub>3</sub> を用いてテトラゾールに変換することで **20** を得て、Pt 触媒を用いた還元反応を行うことでアミド体 **21** をそれぞれ合成した<sup>52</sup>。

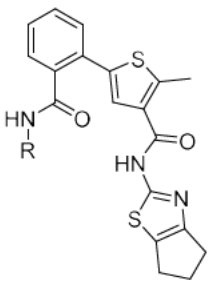



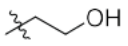
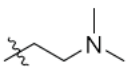
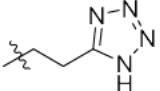
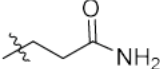
**Scheme 2-1.** Synthesis of phenyl thiophenyl derivatives; Reagents and conditions: (a) (i) diisopropylamine, *n*-BuLi, THF, 0 °C, (ii) MeI, -60 °C to rt, 85%; (b) SOCl<sub>2</sub>, MeOH, reflux, 96%; (c) NBS, DMF, rt, 96%; (d) 2-formylphenylboronic acid, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DME, reflux, 74%; (e) NaClO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2-methyl-2-butene, *t*-BuOH, H<sub>2</sub>O, rt, 68%; (f) 2-aminoethanol hydrochloride, EDCI, HOBT, DIPEA, DMF, rt, 96%; (g) 5 N aqueous NaOH, THF, MeOH, 50 °C, 41%; (h) 5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-amine, EDCI, HOBT, DIPEA, DMF, 50 °C, 39%; (j) I<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, imidazole, THF, 0 °C, 86%; (k) NaCN, DMSO, rt, 21%; (l) Bu<sub>3</sub>SnN<sub>3</sub>, toluene, 130 °C, 48%; (m) [PtH(PMe<sub>2</sub>OH)(PMe<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>H], EtOH, H<sub>2</sub>O, reflux, 55%; (n) Me<sub>2</sub>NH, THF, rt, 72%.

### 2-1-3 活性化能と溶解度の検討、考察

ヒット化合物 **7** のカルバモイル基の先へ極性基を導入した化合物のスクリーニング結果について Table 2-1 に示した。ヒドロキシル基を有する **16** とジメチルアミノ基を有する **18** では GK 活性化能は許容されたが、**7** と比べ溶解度の改善は見られなかった。テトラゾール基を有する **20** は溶解度が大きく向上したが GK 活性化能は消失した。末端にカルバモイル基を有する **21** は **7** と比べて溶解度が向上したが GK 活性化能は大きく低下した。これらの結果から、化合物 **7** のフェニルチオフェン骨格への極性置換基の導入のみでは化合物 **7** の強い GK 活性化能を保持したまま溶解度を向上させることは困難であると考えられた。

Table 2-1. SAR of compound **7** analogs

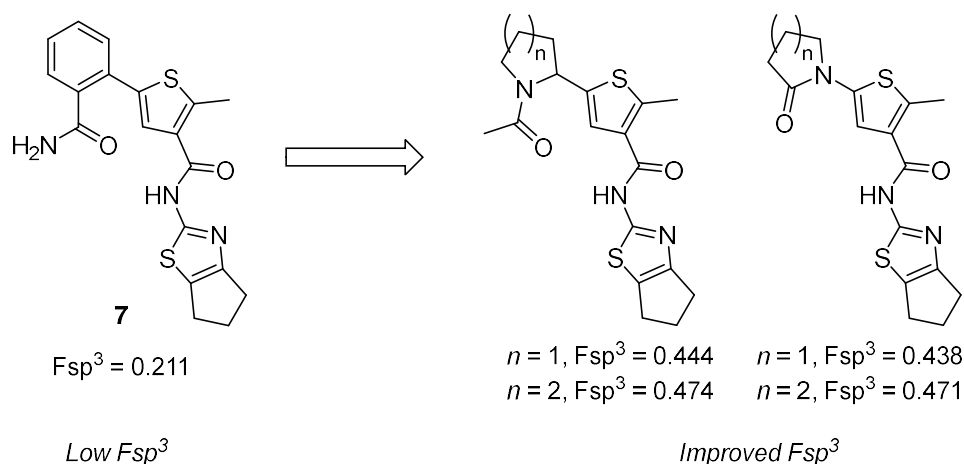


Compound	R	Activation at 5 mM glucose <sup>a</sup>		Solubility <sup>d</sup> ( $\mu$ M; pH 7.4)
		Fold <sup>b</sup>	Relative <sup>c</sup>	
<b>7</b>		6.23 $\pm$ 0.03	0.699 $\pm$ 0.004	1.95
<b>16</b>		3.89 $\pm$ 0.08	0.373 $\pm$ 0.011	0.98
<b>18</b>		4.31 $\pm$ 0.04	0.428 $\pm$ 0.005	1.95
<b>20</b>		0.84 $\pm$ 0.01	-0.019 $\pm$ 0.001	31.3
<b>21</b>		2.56 $\pm$ 0.03	0.187 $\pm$ 0.004	3.91

<sup>a</sup>Values are the mean  $\pm$  SEM for  $n = 3$ . <sup>b</sup>Glucokinase activity relative to dimethyl sulfoxide (DMSO) control at a compound concentration of 10  $\mu$ M. <sup>c</sup>Glucokinase activity relative to 10  $\mu$ M of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10  $\mu$ M. <sup>d</sup>Aqueous solubility was determined experimentally using a nephelometric assay in PBS (pH 7.4).

#### 2-1-4 ヒット化合物 7 のフェニル基の変換

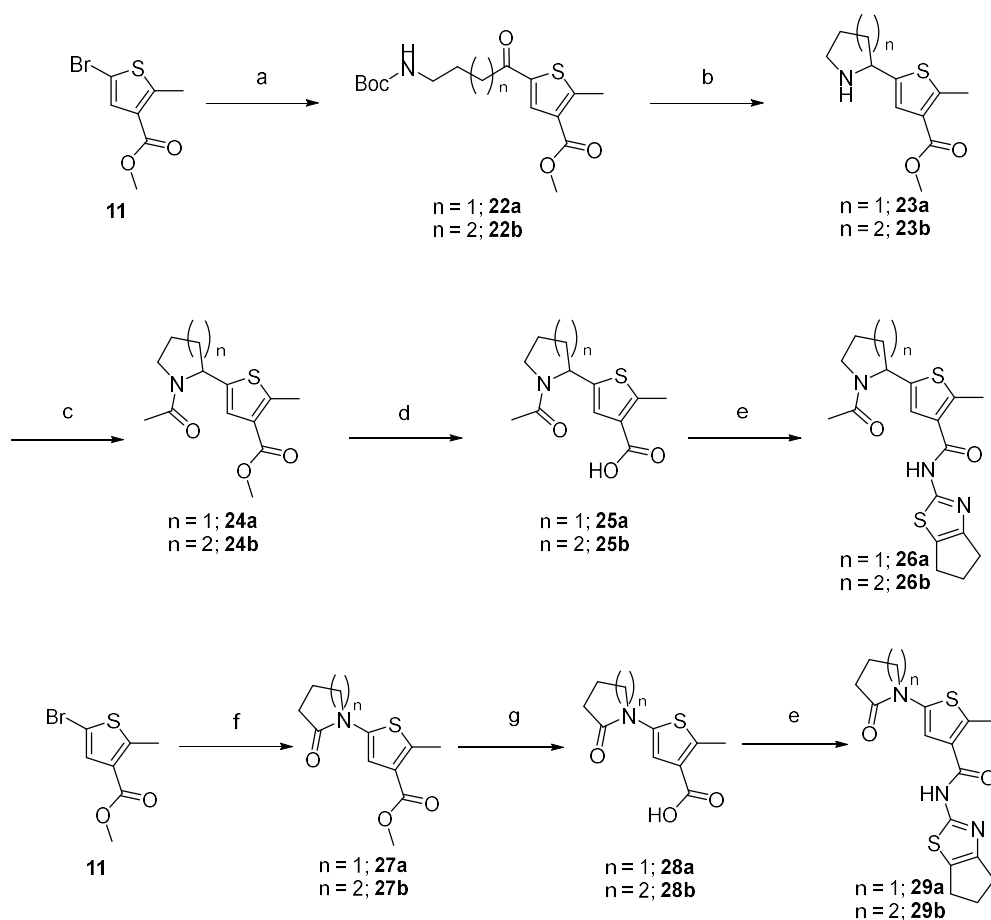
極性置換基の導入以外の方法で化合物 7 の溶解度を向上させるため、化合物 7 の平面性の高さに着目した。Lovering らは分子の 3 次元的な嵩高さの指標である、化合物分子中の  $sp^3$  混成炭素数を全炭素数で除した値である  $F_{sp^3}$  (Fraction of  $sp^3$  carbons) と溶解度との間に相関が見られることを報告している。この報告によると、分子の  $F_{sp^3}$  が高い分子（平面性の低い分子）ほど溶解度が高く、融点が低い傾向が見られ、化合物を最終的に到達した開発ステージ（研究段階、Phase 1、Phase 2、Phase 3、Drugs）ごとに分類しそれぞれの  $F_{sp^3}$  値の平均値を比較すると、ステージが上がるにつれて平均  $F_{sp^3}$  値は上昇する傾向が見られる<sup>53</sup>。これらのことに基づいて化合物 7 のフェニル基を  $sp^3$  性の高いピロリジニル基やピペリジニル基へと変換した化合物の設計、合成を行った (Figure 2-4)。



**Figure 2-4.** Design of saturated-heterocycloalkyl thiophenyl derivatives.

#### 2-1-5 合成

化合物 26a、26b、29a、29b の合成を Scheme 2-2 に示した。プロモチオフェン 11 の *i*-PrMgBr を用いたハロゲン-金属交換反応によってグリニャール試薬を生成し、1-Boc-2-ピロリドン、1-Boc-2-ピペリドンとそれぞれ反応させてケトン体 22a と 22b を合成した。22a と 22b の Boc 基を脱保護し、分子内還元的アミノ化反応でピロリジン誘導体 23a とピペリジン誘導体 23b とした。その後 23a と 23b にアセチルクロリドを用いてアセチル化を行った後に、加水分解を行いカルボン酸 25a、25b とし、さらに 5,6-ジヒドロ-4*H*-シクロペンタ[*d*]チアゾール-2-アミンと EDCI、HOBT を用いて縮合することで 26a と 26b を得た。また 11 にピロリドン、ピペリドンを、銅を用いたカップリング反応<sup>54</sup>で導入し、それぞれ 27a と 27b を合成した。得られたエステル体 27a、27b を加水分解後、5,6-ジヒドロ-4*H*-シクロペンタ[*d*]チアゾール-2-アミンと縮合することで 29a と 29b を合成した。



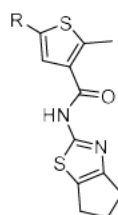
**Scheme 2-2.** Synthesis of saturated-heterocycloalkyl thiophenyl derivatives; Reagents and conditions: (a) (i) *i*-PrMgBr, THF,  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , (ii) 1-Boc-2-pyrrolidone or 1-Boc-2-piperidone,  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  to rt, 51–62%; (b) (i) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  to rt, (ii)  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , conc. HCl, *i*-PrOH,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 63–70%; (c) acetyl chloride, pyridine,  $\text{CHCl}_3$ ,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  to rt, 85–98%; (d)  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , MeOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 80–98%; (e) 5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-amine, EDCI, HOBT, DIPEA, DMF, rt, 21–43%; (f) 2-pyrrolidone or 2-piperidone, CuI, *N,N'*-dimethylethylenediamine,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , toluene, reflux, 17–33%; (g)  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , THF,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 80–87%.

#### 2-1-6 活性化能と溶解度の検討、考察

化合物の  $\text{Fsp}^3$  に着目したピロリジニル、ピペリジニル誘導体の GK 活性化能と溶解度を Table 2-2 に示した。ヒット化合物 **7** のフェニル基をピペリジンやピペリドンに変換した **26b** と **29b** では溶解度の改善は見られなかったが、ピロリジンやピロリドンに変換した **26a** や **29a** では溶解度が向上し、特に **26a** では **7** に比べて溶解度が 3 倍以上向上した。ピロリジン誘導体とピペリジン誘導体とで溶解度に差が見られた原因は、それぞれの化合物の脂溶性、分子量あるいは結晶構造の違い

いによると考えられる。ピロリジン誘導体 **26a** やピロリドン誘導体 **29a** はピペリジン誘導体 **26b** やピペリドン誘導体 **29b** と比較するとそれぞれ脂溶性が低く、(Log D at pH 7.4 = 2.43 (**26a**), 2.13 (**29a**), 2.89 (**26b**), 2.58 (**29b**))<sup>50</sup> 分子量も小さい。これらの化合物の中で特に **26a** は **7** に比べて溶解度が大きく向上しており、GK 活性化能も一定程度保持していたため、**26a** の活性化能と溶解度の最適化を行うことで、有望化合物獲得を目指すこととした。

**Table 2-2.** SAR of compound **7** analogs

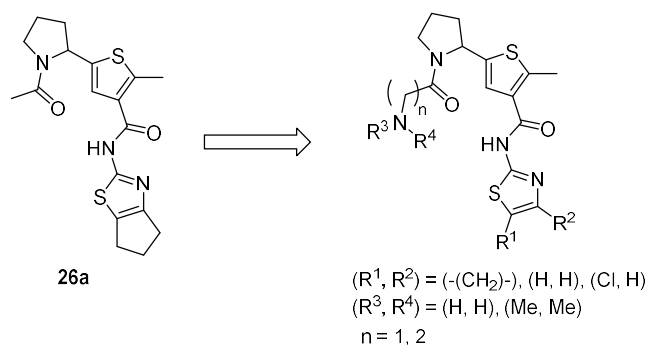


Compound	R	Activation at 5 mM glucose <sup>a</sup>		Solubility <sup>d</sup> (μM; pH 7.4)
		Fold <sup>b</sup>	Relative <sup>c</sup>	
<b>7</b>		6.23 ± 0.03	0.699 ± 0.004	1.95
<b>26a</b>		2.53 ± 0.02	0.187 ± 0.002	7.81
<b>26b</b>		1.13 ± 0.00	0.017 ± 0.001	0.98
<b>29a</b>		2.41 ± 0.01	0.168 ± 0.002	3.91
<b>29b</b>		2.96 ± 0.04	0.235 ± 0.004	0.98

<sup>a</sup>Values are the mean ± SEM for  $n = 3$ . <sup>b</sup>Glucokinase activity relative to dimethyl sulfoxide (DMSO) control at a compound concentration of 10 μM. <sup>c</sup>Glucokinase activity relative to 10 μM of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10 μM. <sup>d</sup>Aqueous solubility was determined experimentally using a nephelometric assay in PBS (pH 7.4).

### 2-1-7 化合物 **26a** の最適化検討

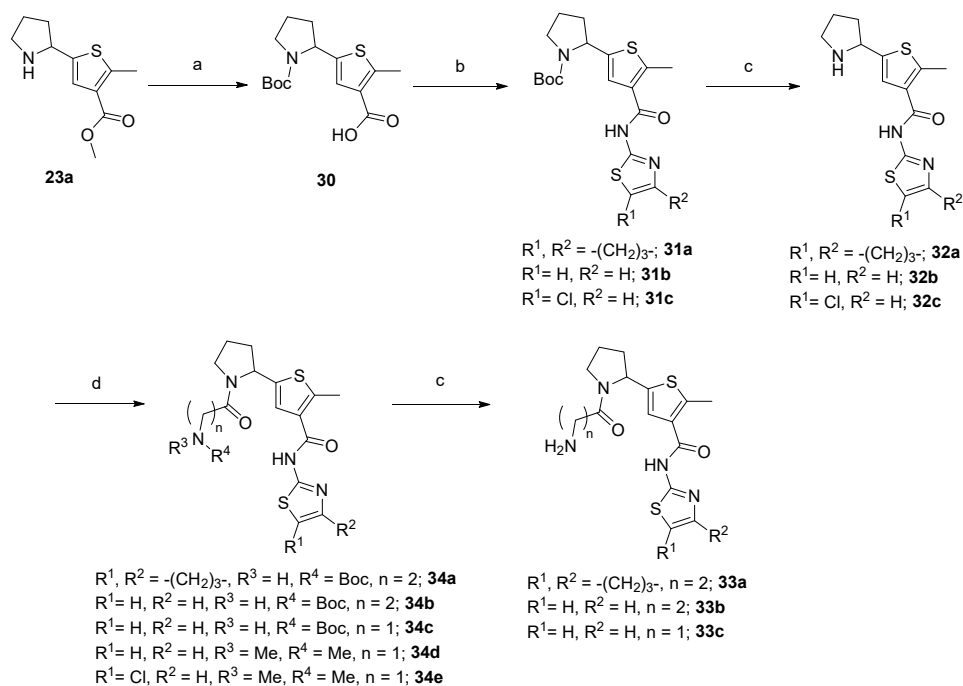
化合物 **26a** の末端アセチル基の先へ、親水性を増して溶解度を上げるため、極性官能基の導入や、リンカーの長さの調節、チアゾール環の置換基変更を行った (Figure 2-5)。



**Figure 2-5.** Optimization of compound **26a**.

### 2-1-8 合成

化合物 **33a–33c**、**34d**、**34e** の合成を Scheme 2-3 に示した。これらの化合物合成は Scheme 2-2 で合成した **23a** を出発原料として行った。化合物 **23a** の 2 級アミノ基を Boc 基で保護し、エステル基の加水分解を行うことでカルボン酸体 **30** を合成し、その後、チアゾールアミンと EDCI、HOBt を用いて縮合することで **31a–31c** を得た。**31a–31c** の Boc 基を酸性条件下で脱保護した後に、それぞれ対応するカルボン酸と縮合し **34a–34e** を得た。Boc 基で保護された 1 級アミノ基を有するカルボン酸と縮合した **34a–34c** はさらに TFA を用いて Boc 基の脱保護を行い **33a–33c** とした。



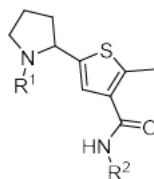
**Scheme 2-3.** Synthesis of compound **26a** analogs; Reagents and conditions: (a) (i) (Boc)<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, (ii) LiOH·H<sub>2</sub>O, MeOH, H<sub>2</sub>O, 50 °C, 96% (2 steps); (b) corresponding thiazoleamine, EDCI, HOBT, DIPEA, DMF, 50 °C, 48–88%; (c) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 27–97%; (d) corresponding carboxylic acid, EDCI, HOBT, DIPEA, DMF, rt, 27–95%.

#### 2-1-9 活性化能と溶解度の検討、考察

**26a** の最適化検討を行った化合物のアッセイ結果を Table 2-3 に示す。**26a** のアセチル基の末端にアミノエチル基を導入した **33a** は **26a** と比べ、GK 活性化能が向上したが溶解度は低下した。ここでシクロペンタチアゾール基の脂溶性が高すぎる点を考慮し、**33a** の無置換チアゾール体 **33b** を合成したところ、GK 活性化能は **33a** に比べて低下したものの、溶解度は大きく向上した。末端にアミノメチル基を有する **33c** は **26a** と同等の溶解度を示し、GK 活性化能が **26a** に比べて向上した。**33c** のアミノ基をジメチルアミノ基に変換した **34d** は **33c** と同等の溶解度を有しており GK 活性化能が **33c** よりもさらに向上した。チアゾール環上にクロロ基を有する **34e** は **34d** に比べて溶解度は低下したが、ヒット化合物 **7** と比べると高い溶解度を有しており、強い GK 活性化能を有していた。このようにして良好な GK 活性化能を有し、**7** に比べて溶解度が改善された化合物 **34e** が見つかったが、化合物 **34e** はそのピロリジン環上に不斉炭素を有していた。そこで各エナンチオマーの合成を行い、活性、物性を測定することとした。



**Table 2-3.** SAR of the compound **26a** analogs



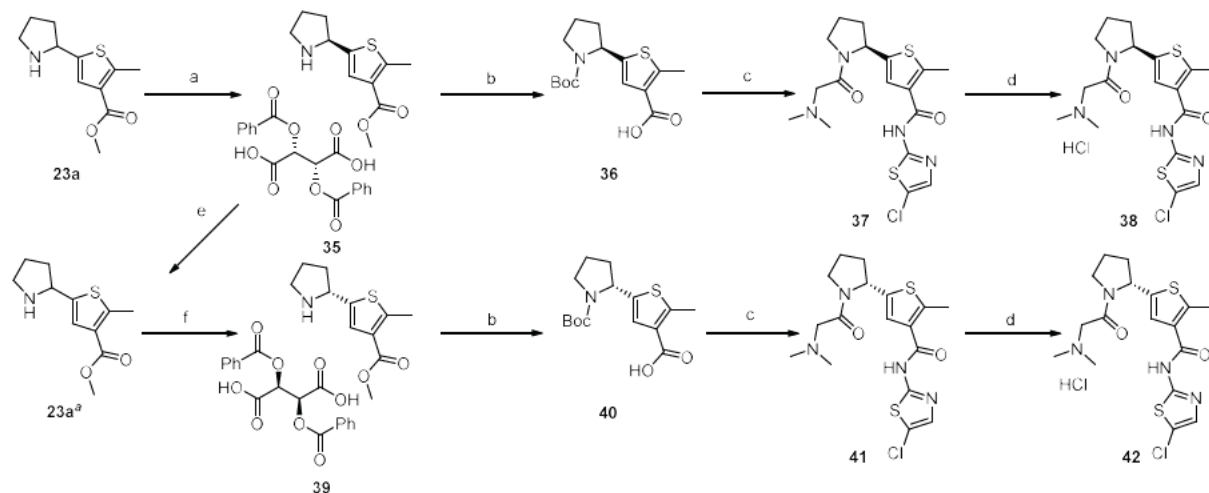
Compound	R¹	R²	Activation at 5 mM glucose <sup>a</sup>		Solubility <sup>d</sup> (μM; pH 7.4)
			Fold <sup>b</sup>	Relative <sup>c</sup>	
<b>26a</b>			2.53 ± 0.02	0.187 ± 0.002	7.81
<b>33a</b>			3.46 ± 0.02	0.274 ± 0.002	0.98
<b>33b</b>			2.86 ± 0.02	0.175 ± 0.002	15.6
<b>33c</b>			3.67 ± 0.01	0.293 ± 0.001	7.81
<b>34d</b>			4.70 ± 0.04	0.380 ± 0.004	7.81
<b>34e</b>			6.81 ± 0.05	0.598 ± 0.005	3.91

<sup>a</sup>Values are the mean ± SEM for  $n = 3$ . <sup>b</sup>Glucokinase activity relative to DMSO control at a compound concentration of 10 μM. <sup>c</sup>Glucokinase activity relative to 10 μM of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10 μM. <sup>d</sup>Aqueous solubility was determined experimentally using a nephelometric assay in PBS (pH 7.4).

#### 2-1-10 化合物 **34e** の光学活性体の合成

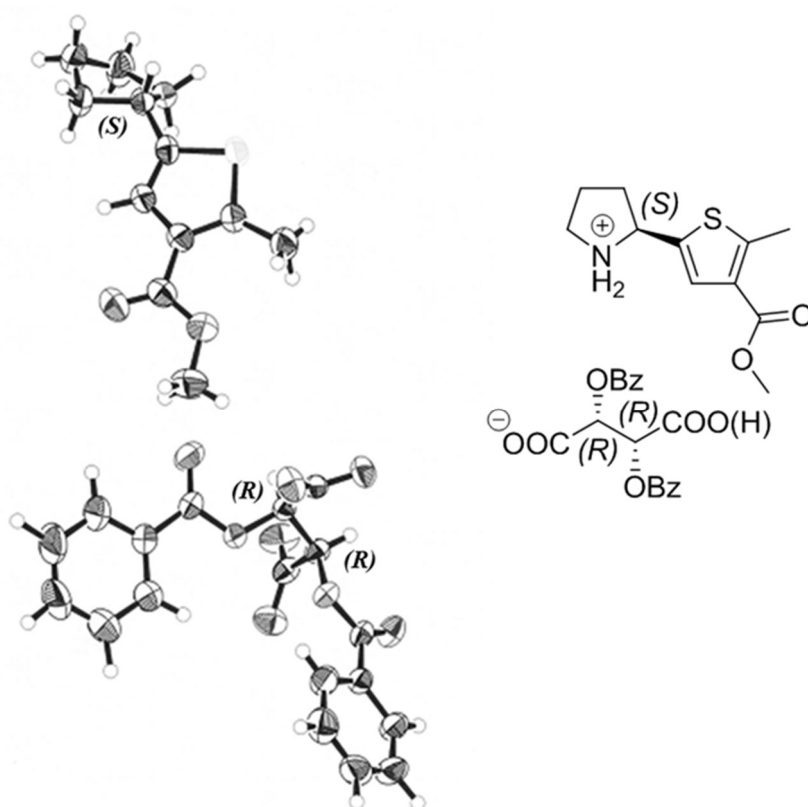
化合物 **34e** の光学活性体の合成を Scheme 2-4 に示した。化合物 **34e** の両エナンチオマーは、Scheme 2-2 で得られたラセミ体のピロリジン化合物 **23a** を光学分割し、得られたキラルなピロリジン誘導体をそれぞれ原料とすることで合成した。まず、ラセミ体 **23a** の光学分割に最適な分割剤の探索を行った。市販されている酸性の分割剤を検討した結果、**23a** の(-)体は(-)-ジベンゾイル-L-酒石酸を分割剤として用いることでジアステレオマー塩 **35** として単離できることが分かった。また、**35** を除いた後の母液を濃縮後脱塩し、(+)-ジベンゾイル-D-酒石酸を用いて再結晶を行うこ

とで逆立体のジアステレオマー塩 **39** を得ることができた。得られたジアステレオマー塩 **35**、**39** をそれぞれ脱塩し、その後は **34e** の合成と同様の方法で **37** と **41** を得て、さらに 4N 塩酸-ジオキサンを用いて塩酸塩 **38** と **42** とした。



**Scheme 2-4.** Synthesis of compound **34e** analogs; (a) (–)-dibenzoyl-L-tartaric acid monohydrate, MeOH, rt, 48% in theory; (b) (i) saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, rt; (ii) (Boc)<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt; (iii) LiOH·H<sub>2</sub>O, MeOH, H<sub>2</sub>O, 50 °C, 87–94%; (c) (i) 2-amino-5-chlorothiazole hydrochloride, EDCI, HOBt, DIPEA, DMF, 50 °C, (ii) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, (iii) *N,N*-dimethylglycine, EDCI, HOBt, DIPEA, DMF, 49–58% (3 steps); (d) 4 N HCl in 1,4-dioxane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 70–97%; (e) (i) saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, rt; (f) (+)-dibenzoyl-D-tartaric acid monohydrate, MeOH, rt, 45% in theory. <sup>a</sup>(+)-enriched enantiomer.

両エナンチオマー**38**、**42**のピロリジン環上不斉炭素の絶対立体配置は、ジアステレオマー塩である**35**の単結晶X線構造解析により決定した。そのORTEP図をFigure 2-6に示す。化合物**35**のピロリジン環上の不斉中心の絶対立体配置は絶対立体配置が既知の(–)-ジベンゾイル-L-酒石酸の絶対立体配置を基に(*S*)であると決定できた。このことから、ピロリジン環上の不斉炭素の絶対立体配置は**38**では(*S*)で**42**では(*R*)であるとそれぞれ決定した。

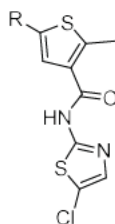


**Figure 2-6.** ORTEP diagram of compound **35**.

#### 2-1-11 光学活性体の活性化能と溶解度の検討、考察

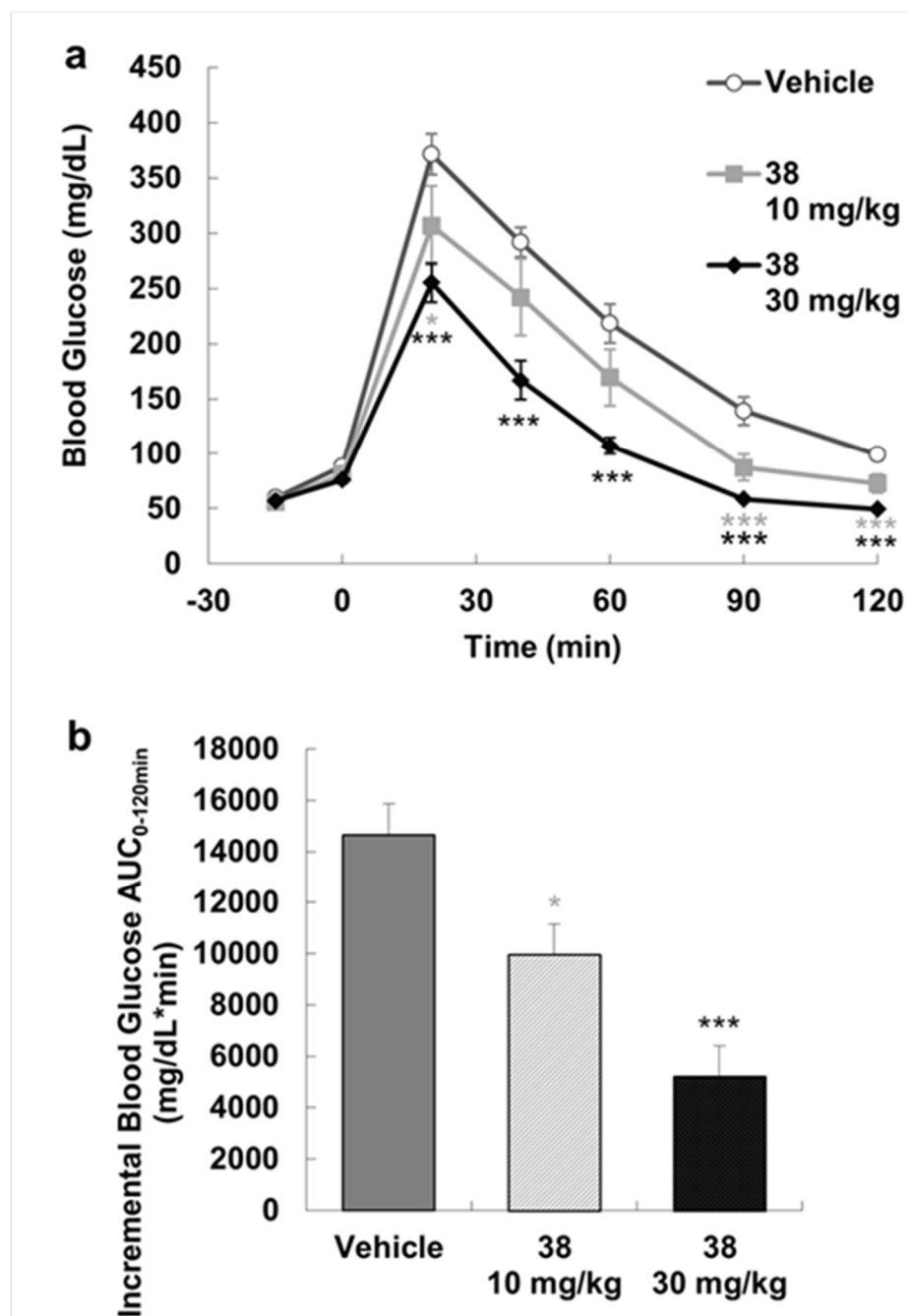
光学活性体 **38** と **42** の GK 活性化能をそれぞれ測定したところ、どちらの異性体も GK 活性化能を有していることが明らかとなったが、(S)体 **38** が (R)体 **42** よりも強い GK 活性化能を有していた (Table 2-4)。次に化合物のインスリン分泌作用を *in vitro* 評価系において確認するため、マウスインスリンノーマ細胞である MIN6 細胞を用いた実験を行った<sup>55</sup>。結果はポジティブコントロールである **1** の 10  $\mu$ M におけるインスリン分泌を 1 としたときの相対値として算出した。その結果 **38** は非常に良好なインスリン分泌作用を示すことが明らかとなった。化合物 **38** は良好な GK 活性化能とインスリン分泌能を併せ持っており、溶解度も改善されていたため、次に *in vivo* での血糖降下作用をマウス OGTT 試験にて評価した。化合物 **38** は 2 g/kg のグルコースを投与する 15 分前に経口投与され、血糖値はグルコース投与時、投与後 20、40、60、90、120 分時において測定された。この試験において、化合物 **38** は 10 mg/kg 投与、30 mg/kg 投与いずれの場合においても有意な血糖降下作用を示し、さらにその作用には用量依存性がみられた (Figure 2-7)。また、化合物 **7** の溶解度を高めることで化合物の血中濃度を上げるという狙い通り、良好な溶解度を有する **38** はこの *in vivo* 試験において血中濃度が **7** と比べ改善していた ( $C_{\max} > 9 \mu$ M at 30 mg/kg)。

**Table 2-4.** The effect of the chiral center of compound **34e**



Compound	R	Activation at 5 mM glucose <sup>a</sup>		Insulin secretion from MIN-6 cells (relative) <sup>a,d</sup>	Solubility <sup>e</sup> ( $\mu$ M; pH 7.4)
		Fold <sup>b</sup>	Relative <sup>c</sup>		
<b>34e</b>		6.81 $\pm$ 0.05	0.598 $\pm$ 0.005	1.62 $\pm$ 0.27	3.91
<b>38<sup>f</sup></b>		10.4 $\pm$ 0.1	0.650 $\pm$ 0.010	1.61 $\pm$ 0.21	7.81
<b>42<sup>f</sup></b>		4.99 $\pm$ 0.12	0.381 $\pm$ 0.011	1.15 $\pm$ 0.06	1.95

<sup>a</sup>Values are the mean  $\pm$  SEM for  $n = 3$ . <sup>b</sup>Glucokinase activity relative to DMSO control at a compound concentration of 10  $\mu$ M. <sup>c</sup>Glucokinase activity relative to 10  $\mu$ M of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10  $\mu$ M. <sup>d</sup>Insulin secretion activity relative to 10  $\mu$ M of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10  $\mu$ M. <sup>e</sup>Aqueous solubility was determined experimentally using a nephelometric assay in PBS (pH 7.4). <sup>f</sup>Hydrochloride salt.



**Figure 2-7.** Oral glucose tolerance test (OGTT) of **38** in male C57BL/6j mice. Effect on (a) blood glucose level and (b) incremental blood glucose AUC during OGTT. Data are expressed as (a) mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ) and (b) mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). The data were statistically analyzed using Dunnett's multiple comparison test. \*, \*\*\*:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  vs. vehicle control.

## 2-1-12 化合物 **38** の安全性について

このようにして創製された化合物 **38** が臨床候補化合物となるポテンシャルを有しているかを調べるため、心血管系に対する安全性試験が実施された。その結果 **38** は human ether-a-go-go related gene (hERG) チャネルに対し強い親和性を示すという問題点が明らかとなった ( $IC_{50}$  値  $< 0.3 \mu M$ )。hERG チャネルを阻害する化合物は、心筋細胞の細胞再分極の遅延を引き起こしうることが知られており、この現象は心電図において、Q 波の始まりから T 波の終わりまで (QT 間隔) の延長として現れる。QT 間隔の延長はトルサード・ド・ポワント (Torsades de Points : TdP) と呼ばれる不整脈を引き起こしうることが知られているため、新薬を開発する際、化合物による hERG チャネルの阻害は必ず回避する必要がある<sup>56</sup>。そこで、**38** のさらなる誘導化により hERG チャネルとの親和性を下げる合成展開を行った。

## 2-2 臨床候補化合物 63・HCl の獲得

### 2-2-1 hERG 阻害回避のための分子設計

化合物の hERG 阻害を回避する方法としていくつかの手法が知られているが<sup>57</sup>、それらの中から①化合物のアミノ基の塩基性の減弱②カルボン酸を化合物分子に導入することによる Zwitter-ion の形成、を hERG 阻害を回避するための戦略として選択した (Figure 2-8)。

①は化合物のアミノ基の塩基性を下げ、アミノ基が生体内でプロトン化されることを防ぐことで、プロトン化されたアミノ基と hERG チャンネルの Tyr652 との $\pi$ -カチオン相互作用を弱める方法である<sup>58, 59</sup>。②はカルボン酸の導入によって極性を上げ hERG チャンネルとの親和性を弱める方法であり、経口吸収性が悪化してしまう欠点はあるが hERG 阻害作用の大きな低減が期待できることが知られている<sup>60, 61</sup>。

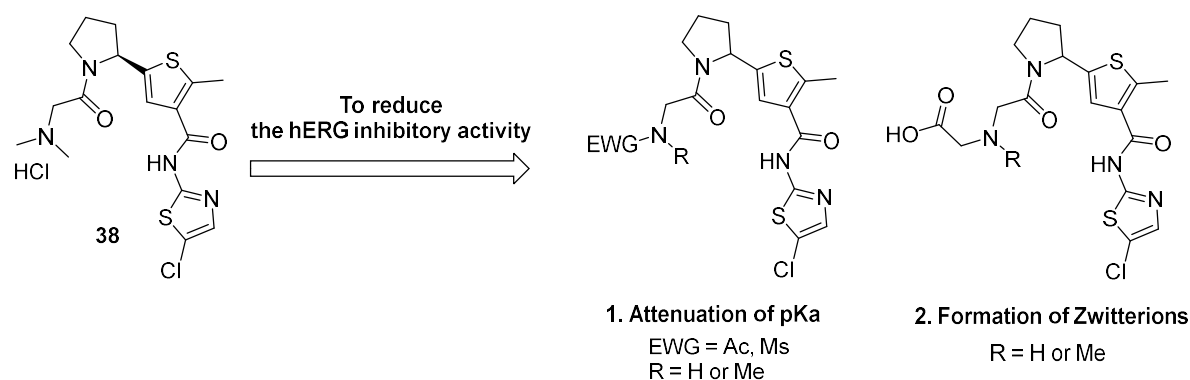
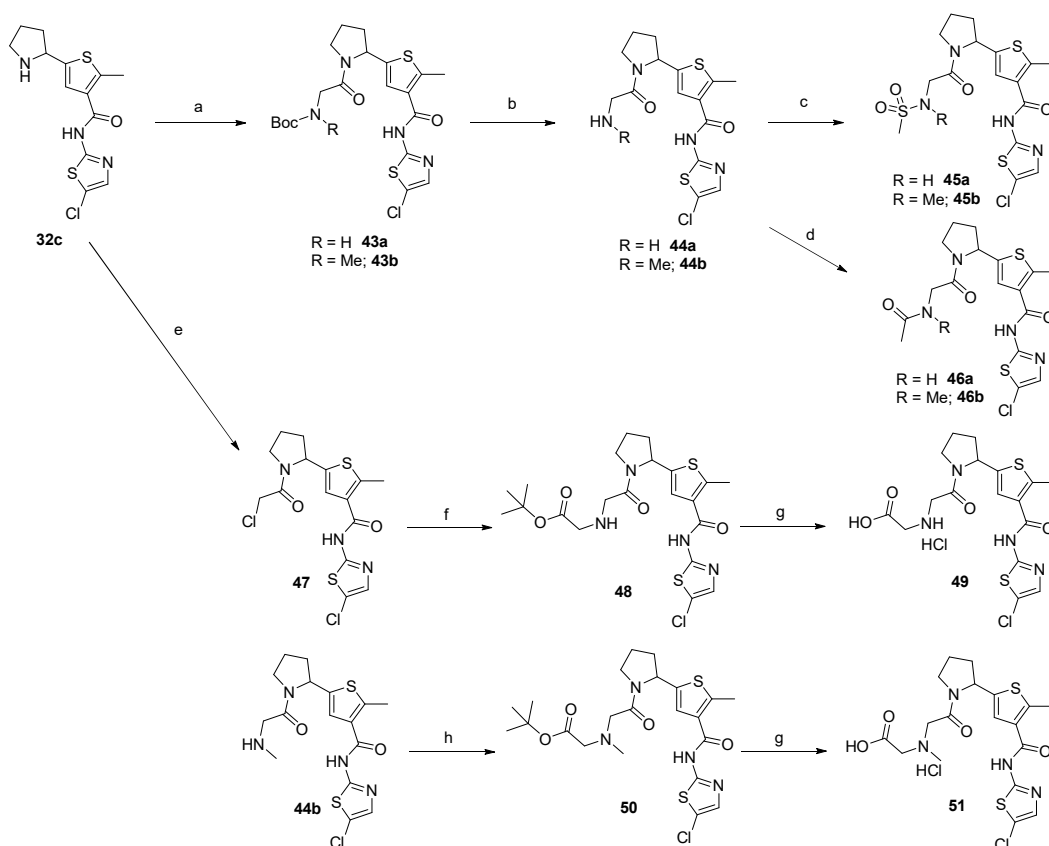


Figure 2-8. Strategy to reduce the inhibitory activity of hERG.

### 2-2-2 合成

化合物 45a–46b、49、51 の合成を Scheme 2-5 に示した。これらの化合物は Scheme 2-3 で得られたアミン体 32c から合成を行った。アミン体 32c を対応するカルボン酸と縮合し、Boc 基を脱保護し 44a と 44b を得た。44a と 44b をメシルクロリドと反応させメシル体 45a と 45b を得て、アセチルクロリドと反応させることでアセチル体 46a と 46b をそれぞれ得た。一方、32c をクロロアセチル化し、その後グリシン *tert*-ブチルと反応させ、4N 塩酸-ジオキサンで *tert*-ブチルエステルを脱保護し、化合物を塩酸塩とすることで 49 を得た。化合物 51 は 44b にクロロ酢酸 *tert*-ブチルを反応させた後、4N 塩酸-ジオキサンで *tert*-ブチルエステルの脱保護と化合物の塩酸塩化を行うことで合成した。



**Scheme 2-5.** Synthesis of **45a–46b**, **49**, **51**; Reagents and conditions: (a) glycine derivatives, EDCI, HOBt, DIPEA, DMF, rt, 90–99%; (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 89–93%; (c) mesyl chloride, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 69–81%; (d) acetyl chloride, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 74–85%; (e) chloroacetyl chloride, 2,6-di-*tert*-butylpyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 83%; (f) glycine *tert*-butyl ester hydrochloride, DIPEA, DMF, 50 °C, 68%; (g) 4 N HCl in 1,4-dioxane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 76–79%; (h) *tert*-butyl chloroacetate, DIPEA, DMF, rt to 60 °C, 73%.

### 2-2-3 活性化能と hERG 阻害の検討、考察

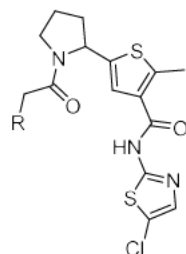
化合物 **38** の hERG 阻害回避のために合成展開した化合物のアッセイ結果を Table 2-5 に示した。hERG チャネルへの結合能は hERG 阻害剤として知られている dofetilide の標識体である [<sup>3</sup>H]-dofetilide を用いた結合試験によって測定した。

メシル基、アセチル基で末端窒素の塩基性を下げた化合物の中で N-Me 基を有する **45b**、**46b** では GK 活性化能が大きく低下してしまったが、NH を有する **45a** と **46a** は GK 活性化能とインスリン分泌作用を共に保持しており、さらにこれらの化合物は狙い通り hERG チャネルとの親和性が大きく低下した。分子にカルボン酸を導入し、Zwitter-ion を形成した **49** と **51** も hERG チャネルとの親和性が大きく低下し、GK 活性化能も保持していた。これらの化合物のうち **51** が最も強い GK 活性化能を有しており、さらにこの化合物はインスリン分泌能も有していたため、**51** の最適



化検討を行った。

**Table 2-5.** SAR of the compound **38** analogs

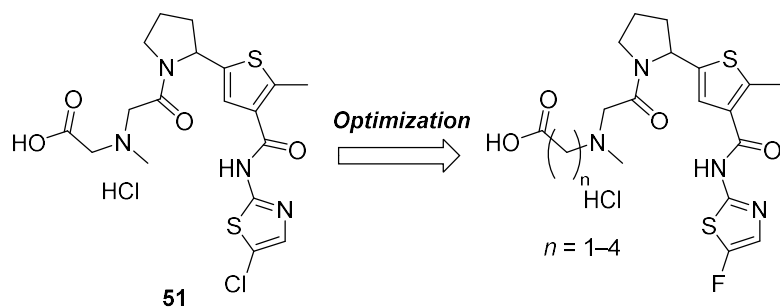


Compound	R	Activation at 5 mM glucose <sup>a</sup>		Insulin secretion from MIN-6 cells (relative) <sup>a,d</sup>	hERG inhibition (%) <sup>a,e</sup>
		Fold <sup>b</sup>	Relative <sup>c</sup>		
<b>38<sup>f,g</sup></b>		10.4 ± 0.1	0.650 ± 0.010	1.61 ± 0.21	101 ± 1
<b>45a</b>		6.21 ± 0.04	0.460 ± 0.004	0.690 ± 0.226	16 ± 1
<b>45b</b>		3.24 ± 0.03	0.168 ± 0.002	-	-
<b>46a</b>		5.32 ± 0.08	0.395 ± 0.007	1.17 ± 0.16	3 ± 1
<b>46b</b>		2.57 ± 0.04	0.118 ± 0.003	-	-
<b>49<sup>g</sup></b>		4.75 ± 0.02	0.438 ± 0.003	0.994 ± 0.043	28 ± 1
<b>51<sup>g</sup></b>		8.35 ± 0.08	0.718 ± 0.008	1.12 ± 0.22	11 ± 2

<sup>a</sup>Values are the mean ± SEM for  $n = 3$ . <sup>b</sup>Glucokinase activity relative to DMSO control at a compound concentration of 10 μM. <sup>c</sup>Glucokinase activity relative to 10 μM of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10 μM. <sup>d</sup>Insulin secretion activity relative to 10 μM of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10 μM. <sup>e</sup>Percentage of inhibition of hERG potassium channel at a compound concentration of 30 μM. <sup>f</sup>Chiral isomer. <sup>g</sup>Hydrochloride salt.

## 2-2-4 化合物 **51** の最適化検討

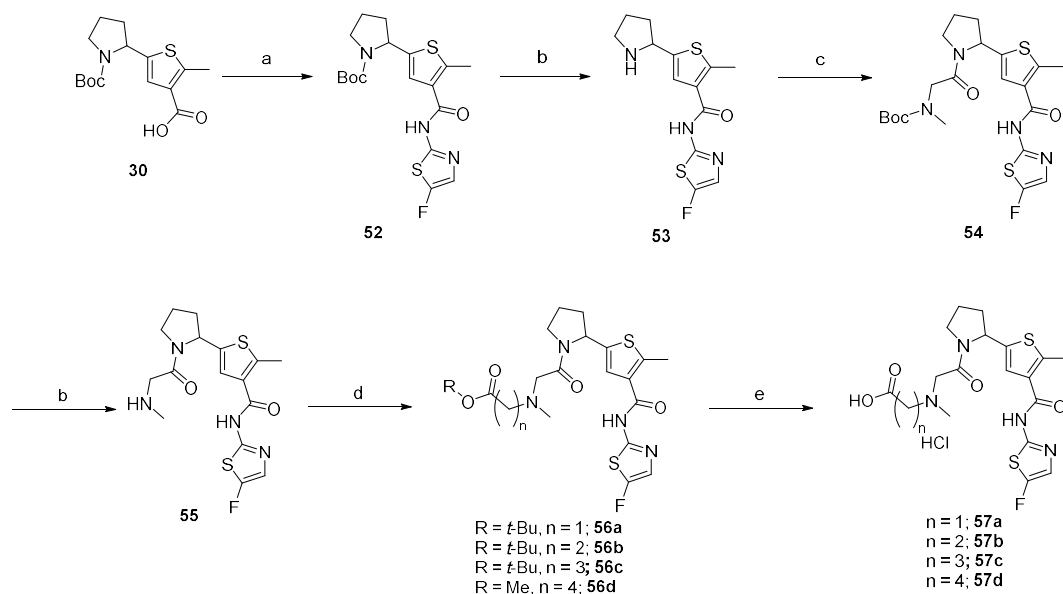
化合物 **51** の最適化検討のため、チアゾール環 5 位のクロロ基をフルオロ基へと変換した化合物や、末端カルボン酸とアミノ基とを繋ぐリンカーの長さを調節した化合物を合成した (Figure 2-9)。



**Figure 2-9.** Optimization of compound **51**.

## 2-2-5 合成

化合物 **57a–57d** の合成を Scheme 2-6 に示した。Scheme 2-3 で合成したカルボン酸体 **30** を塩化オキサリルで酸クロリドとした後、2-アミノ-5-フルオロチアゾール塩酸塩と反応させ **52** を得た。化合物 **52** の Boc 基を脱保護した後、Boc-サルコシンを縮合させ **54** とした。**54** の Boc 基を酸性条件下脱保護し **55** とした後エステル誘導体と反応させ、エステル体 **56a–56d** を得た。**56a–56c** に関しては 4N 塩酸-ジオキサンで *tert*-ブチル基の脱保護を行い塩酸塩とし **57a–57c** を得て、**56d** は水酸化ナトリウム水溶液で加水分解した後に 4N 塩酸-ジオキサンで塩酸塩 **57d** とした。

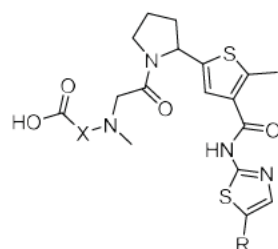


**Scheme 2-6.** Synthesis of **57a–57d**; Reagents and conditions: (a) (i) (COCl)<sub>2</sub>, toluene, 0 °C, (ii) 2-amino-5-fluorothiazole hydrochloride, *N,N*-diethylaniline, toluene, rt, 78% (2 steps); (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 99%; (c) *N*-Boc-sarcosine, EDCI, HOBT, DIPEA, DMF, rt, 98%; (d) ester derivatives, DIPEA, DMF or *tert*-butyl acrylate, benzyltrimethylammonium hydroxide in MeOH, 1,4-dioxane, rt to 60 °C, 22–77%; (e) 4 N HCl in 1,4-dioxane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, or 1 N aqueous NaOH, MeOH, rt, then 4 N HCl in 1,4-dioxane, 0 °C to rt, 68–99%.

#### 2-2-6 活性化能と hERG 阻害の検討、考察

化合物 **51** の最適化検討を行った化合物のアッセイ結果を Table 2-6 に示す。化合物 **51** のクロロ基をフルオロ基へ変換した化合物 **57a** は **51** と同等の GK 活性化能を示し 30 μM で hERG チャンネルに対し結合能を示さなかったが、MIN6 細胞におけるインスリン分泌能が弱かった。**57a** のリンカーを 1 炭素分伸長した化合物 **57b** は GK 活性化能を保持しており、MIN6 細胞でも良好なインスリン分泌作用を示し、hERG チャンネルに対する結合能も弱く、バランスの取れた化合物であった。**57b** よりさらにリンカーを伸長した化合物 **57c** と **57d** は **57b** よりも強い GK 活性化能を有していたが、hERG チャンネルへの結合能も向上してしまっていた。以上のように **51** と **57b** が良好な GK 活性化能、インスリン分泌作用を併せ持ち、hERG チャンネルへの結合能が弱い有望化合物として見いだされた。次に、これら 2 化合物の *in vivo* での血糖降下作用をマウス OGTT で確認した。この試験において有意な血糖降下作用を示したのは **57b** のみであった。経口投与後のマウスの血中濃度を測定したところ **51**、**57b** の血中濃度には 6 倍以上の差があり、このことが OGTT における血糖降下作用の違いの原因であると考えられた<sup>62</sup>。これらのことから **57b** はこれらの化合物の中で最も有望な化合物だと考えられたため、**57b** の光学活性体を合成し評価を実施した。

**Table 2-6.** SAR of the compound **51** analogs

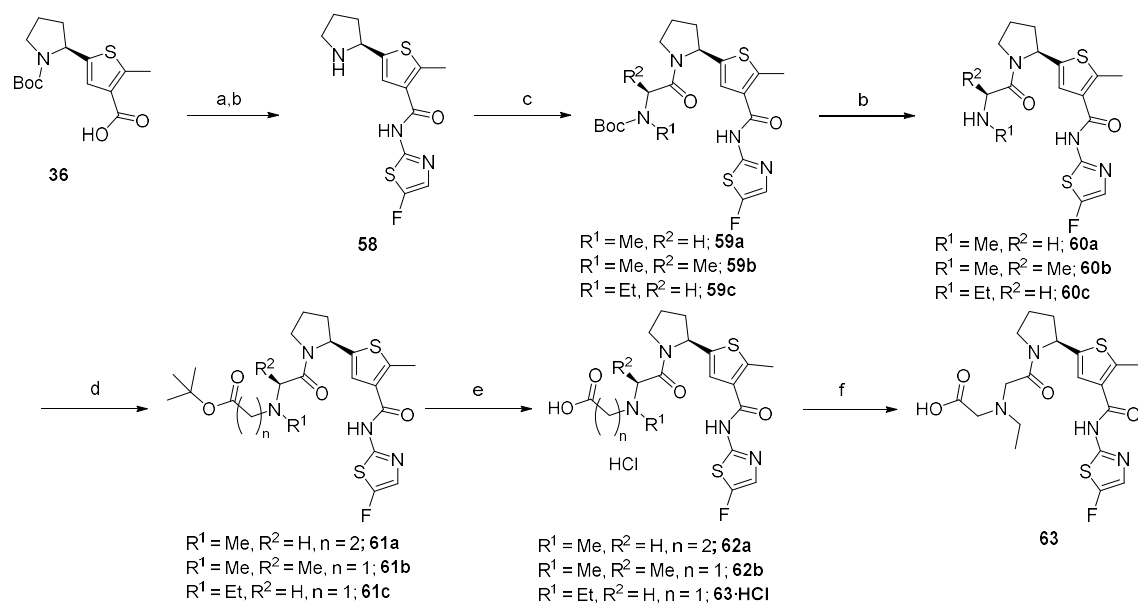


Compound <sup>a</sup>	R	X	Activation at 5 mM glucose <sup>b</sup>		Insulin secretion from MIN-6 cells (relative) <sup>b,e</sup>	hERG inhibition (%) <sup>b,f</sup>
			Fold <sup>c</sup>	Relative <sup>d</sup>		
<b>51</b>	Cl	-CH <sub>2</sub> -	8.35 ± 0.08	0.718 ± 0.008	1.12 ± 0.22	11 ± 2
<b>57a</b>	F	-CH <sub>2</sub> -	6.92 ± 0.02	0.710 ± 0.003	0.379 ± 0.091	− 6 ± 2
<b>57b</b>	F	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	4.89 ± 0.04	0.466 ± 0.005	1.19 ± 0.06	17 ± 3
<b>57c</b>	F	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	6.86 ± 0.03	0.610 ± 0.003	1.21 ± 0.17	78 ± 2
<b>57d</b>	F	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	6.95 ± 0.01	0.619 ± 0.001	0.807 ± 0.119	77 ± 1

<sup>a</sup>Hydrochloride salt. <sup>b</sup>Values are the mean ± SEM for  $n = 3$ . <sup>c</sup>Glucokinase activity relative to DMSO control at a compound concentration of 10 μM. <sup>d</sup>Glucokinase activity relative to 10 μM of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10 μM. <sup>e</sup>Insulin secretion activity relative to 10 μM of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10 μM. <sup>f</sup>Percentage of inhibition of hERG potassium channel at a compound concentration of 30 μM.

## 2-2-7 化合物 **57b** の光学活性体とその類縁体の合成

化合物 **57b** の光学活性体とその類縁体の合成を Scheme 2-7 に示した。Scheme 2-4 で得られたキラル体 **36** から **57a–57c** の合成と同様の方法で **62a–63·HCl** を合成した。**63** は **63·HCl** の MeOH-H<sub>2</sub>O 溶液に 1N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH を等電点に合わせることで得られた。



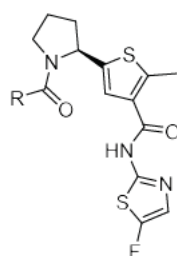
**Scheme 2-7.** Synthesis of **62a–63**; Reagents and conditions: (a) (i) (COCl)<sub>2</sub>, toluene, 0 °C, (ii) 2-amino-5-fluorothiazole hydrochloride, *N,N*-diethylaniline, toluene, rt.; (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 80–88%; (c) corresponding Boc-amino acid, EDCI, HOBT, DIPEA, DMF, rt, 82–99%; (d) *tert*-butyl ester derivatives, DIPEA, DMF or *tert*-butyl acrylate, benzyltrimethylammonium hydroxide in MeOH, DMF, rt to 60 °C, 32–61%; (e) 4 N HCl in 1,4-dioxane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> or 4 N HCl in AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 71–99%; (f) 1 N aqueous NaOH, MeOH, H<sub>2</sub>O, rt, 84%.

## 2-2-8 活性化能と hERG 阻害の検討、考察

化合物 **57b** のキラル体 (*S*体) である **62a** は良好な GK 活性化能とインスリン分泌能を有していた (Table 2-7)。しかし、この化合物は 30 μM における hERG チャンネルへの結合能がラセミ体である **57b** よりも強まってしまっていた。このことは **62a** のエナンチオマーの (*R*) 体は hERG チャンネルへの結合能が弱いことを示しており、チオフェニルピロリジン骨格を有する今回の一連の化合物は小さな構造変換で hERG チャンネルへの結合能が変化することが示唆された。そこで **62a** のアミノ基とカルボン酸とを繋ぐリンカー部分の長さを一炭素分短くし、カルボニルの α 位へ Me 基を導入した **62b** と、リンカー部分の長さを一炭素分短くし、3 級アミン上の置換基を Me 基から Et 基へと変換した **63·HCl** の合成、評価を行った。これらの化合物はどちらも強い GK

活性化能を有し、hERG チャンネルへの結合能も減弱していた。これらのうち **63·HCl** は **62b** よりも強い GK 活性化能とインスリン分泌能を有していたため **63·HCl** を更なる高次評価へと進めることとした。

**Table 2-7.** GK activity, insulin secretion, and hERG binding of chiral analogs



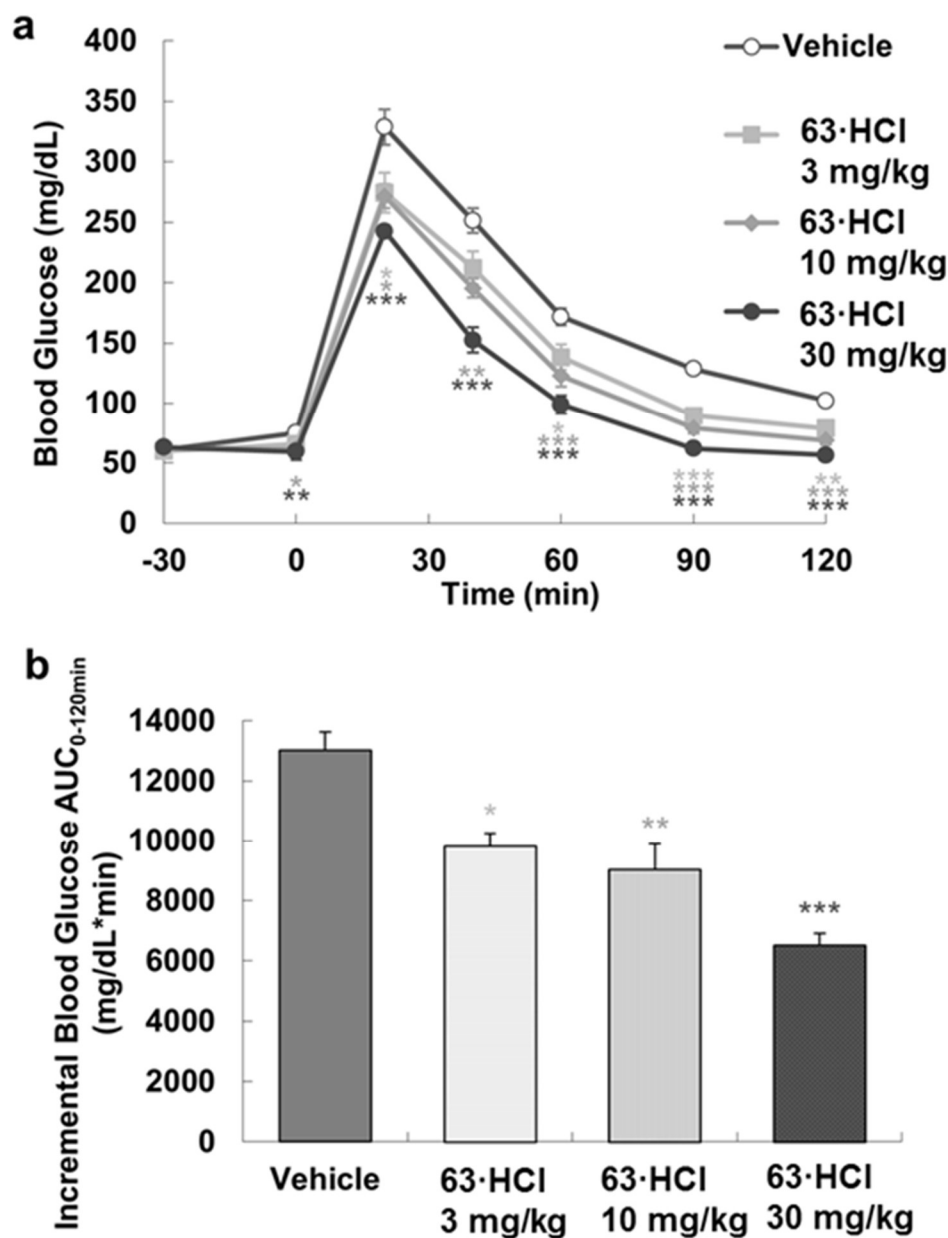
Compound <sup>a</sup>	R	Activation at 5 mM glucose <sup>b</sup>		Insulin secretion from MIN-6 cells (relative) <sup>b,e</sup>	hERG inhibition (%) <sup>b,f</sup>
		Fold <sup>c</sup>	Relative <sup>d</sup>		
<b>62a</b>		7.26 ± 0.05	0.686 ± 0.005	0.930 ± 0.017	49 ± 1
<b>62b</b>		8.80 ± 0.15	0.832 ± 0.016	0.436 ± 0.039	4 ± 0
<b>63·HCl</b>		8.60 ± 0.10	0.870 ± 0.011	0.830 ± 0.165	- 1 ± 1

<sup>a</sup>Hydrochloride salt. <sup>b</sup>Values are the mean ± SEM for  $n = 3$ . <sup>c</sup>Glucokinase activity relative to DMSO control at a compound concentration of 10  $\mu$ M. <sup>d</sup>Glucokinase activity relative to 10  $\mu$ M of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10  $\mu$ M. <sup>e</sup>Insulin secretion activity relative to 10  $\mu$ M of **1** as a standard activator (Activity of **1** = 1) at a compound concentration of 10  $\mu$ M. <sup>f</sup>Percentage of hERG potassium channel inhibition at a compound concentration of 30  $\mu$ M.

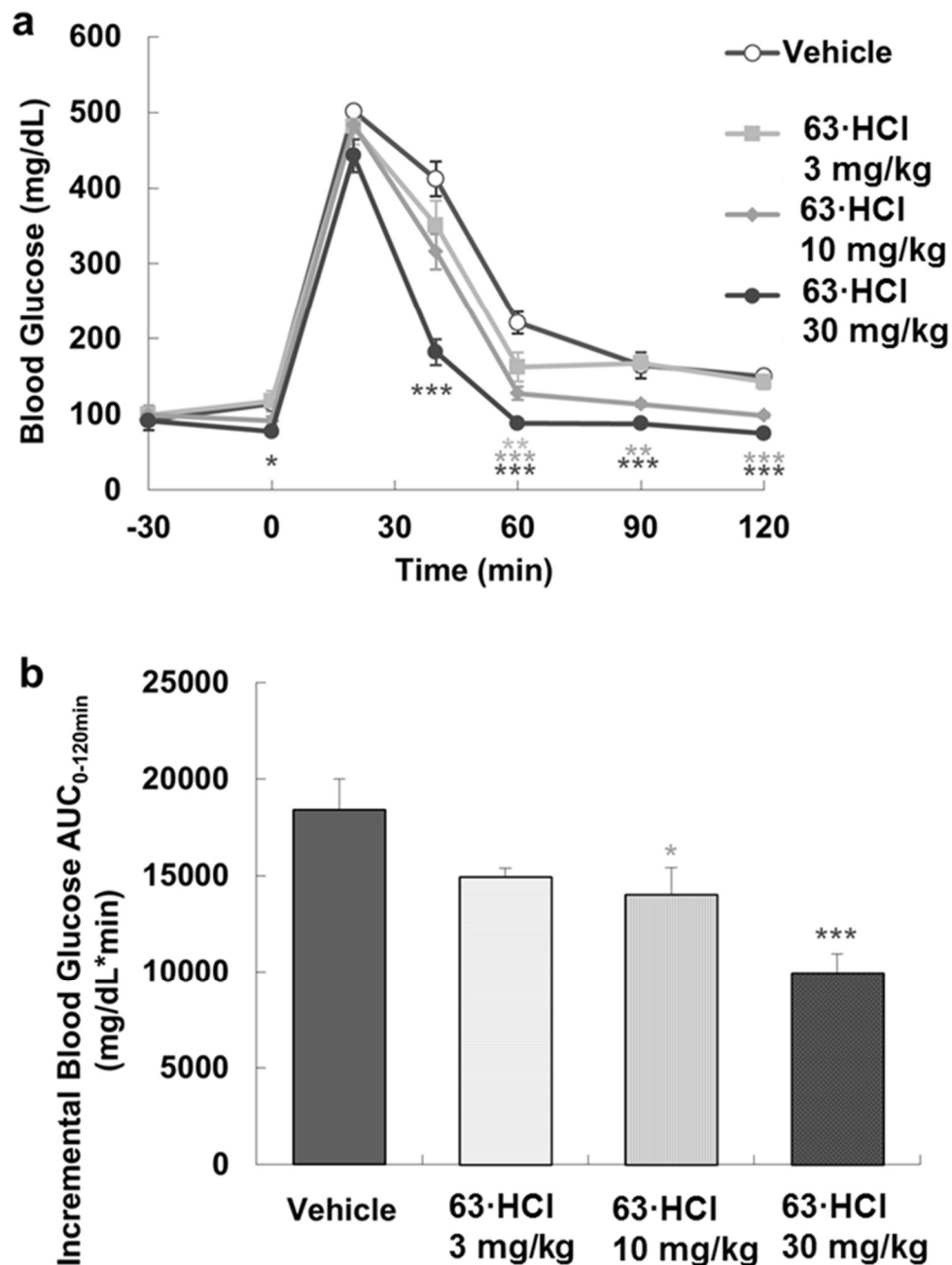
## 2-2-9 化合物 **63·HCl** と **63** の *in vivo* 薬効評価

化合物 **63·HCl** の血糖降下作用を正常マウス (C57BL/6J マウス) と糖尿病マウス (B6.Cg-Lep<sup>ob</sup>/J: ob/ob マウス) の OGTT によって評価した。**63·HCl** は濃度依存的に正常マウスと糖尿病マウス、どちらにおいても顕著な血糖降下作用を示し、PK 試験においても良好な PK パラメータを示した (Figure 2-10, 2-11, Table 2-8)。さらに、細胞毒性試験において安全性が高いことが明らかとなり、hERG パッチクランプ試験においても良好な結果が得られた。hERG パッチクランプ試験において、化合物による hERG 電流の抑制率は、テール電流のピーク値を比較することで求めた (Table 2-9)。

さらに **63・HCl** は糖尿病マウスを用いた 4 週間連投試験においても優位な血糖降下作用を示し、4 週間が経過した時点においても良好な血糖降下作用を示していた (Figure 2-12)。



**Figure 2-10.** Oral glucose tolerance test (OGTT) for **63・HCl** in male C57BL/6J mice. Effect on (a) blood glucose level and (b) incremental blood glucose AUC during OGTT. Data are expressed as (a) mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ) and (b) mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). The data were statistically analyzed using Dunnett's multiple comparison test. \*, \*\*, \*\*\*:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  vs. vehicle control.



**Figure 2-11.** Oral glucose tolerance test (OGTT) for 63·HCl in male ob/ob mice. Effect on (a) blood glucose level and (b) incremental blood glucose AUC during OGTT. Data are expressed as (a) mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ) and (b) mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). The data were statistically analyzed using Dunnett's multiple comparison test. \*, \*\*\*:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  vs. vehicle control.

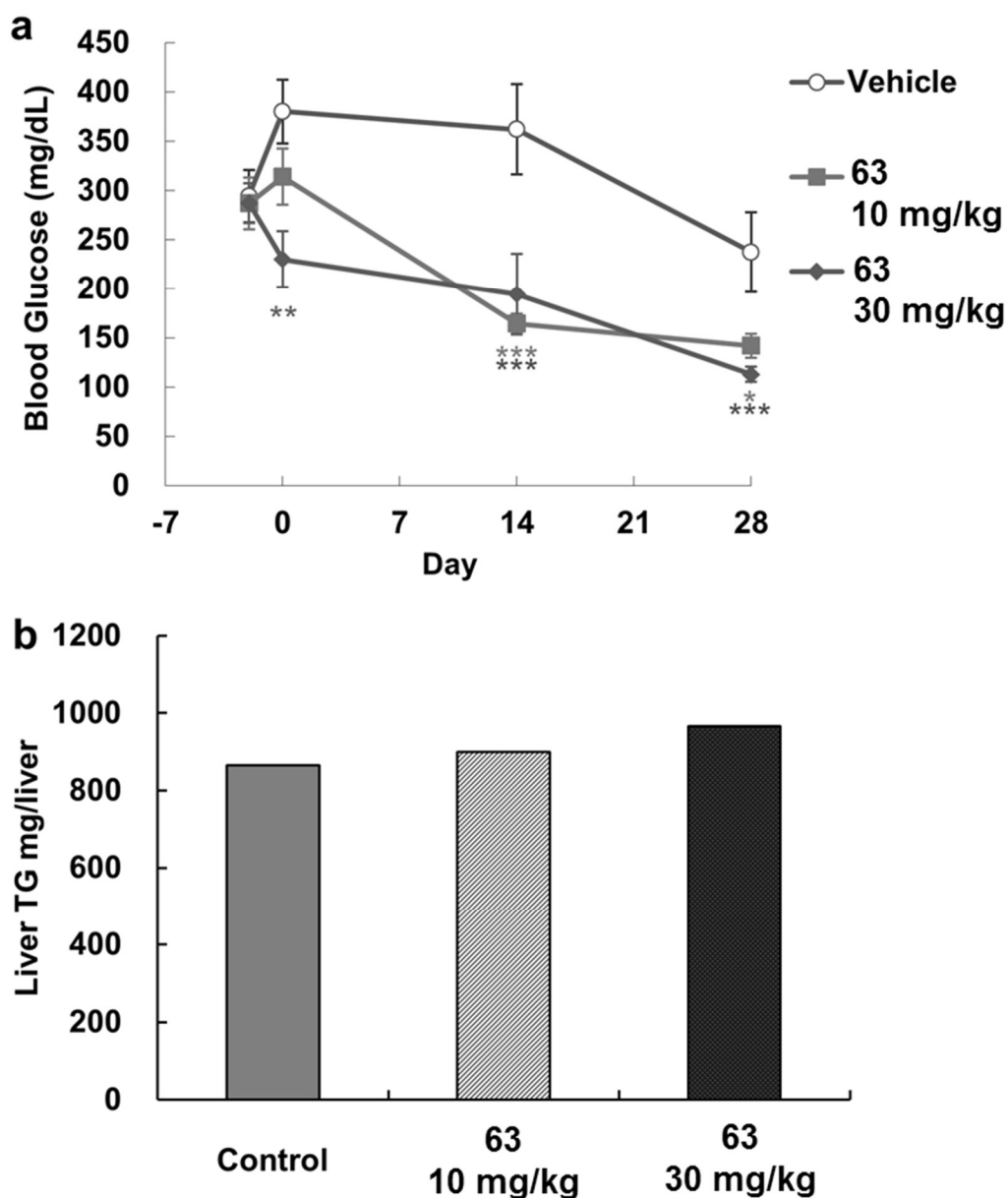


**Table 2-8.** Pharmacokinetic parameters of **63** in male ICR mice

Dose (mg/kg)	Route	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-inf</sub> (ng·h/mL)	CL <sub>p</sub> (mL/h/kg)	V <sub>dss</sub> (mL/kg)	T <sub>1/2</sub> (h)		BA (%)
							$\alpha$	$\beta$	
2	IV			8580	233	310	0.47	1.6	
10	PO	3020	0.25	8600				2.0	20.0

**Table 2-9.** Toxicological profiles of **63**

	Cell toxicity		hERG patch clamp
	CHO-K1	rat hepatocyte	
<b>63</b>	CC <sub>50</sub> > 100 $\mu$ M	CC <sub>50</sub> > 100 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> > 300 $\mu$ M



**Figure 2-12.** Repeated administration of **63** for 28 days in glucose intolerant male ob/ob mice. **63** was administered orally twice daily for 28 days to male ob/ob mice. Effect on (a) blood glucose level and (b) liver TG level after 28 days treatment. Data are expressed as (a) mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ) and (b) mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ). The data were statistically analyzed using Dunnett's multiple comparison test. \*, \*\*, \*\*\*:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  vs. vehicle control.

## 2-2-10 化合物 **63** の他の GKA に対する特徴解析

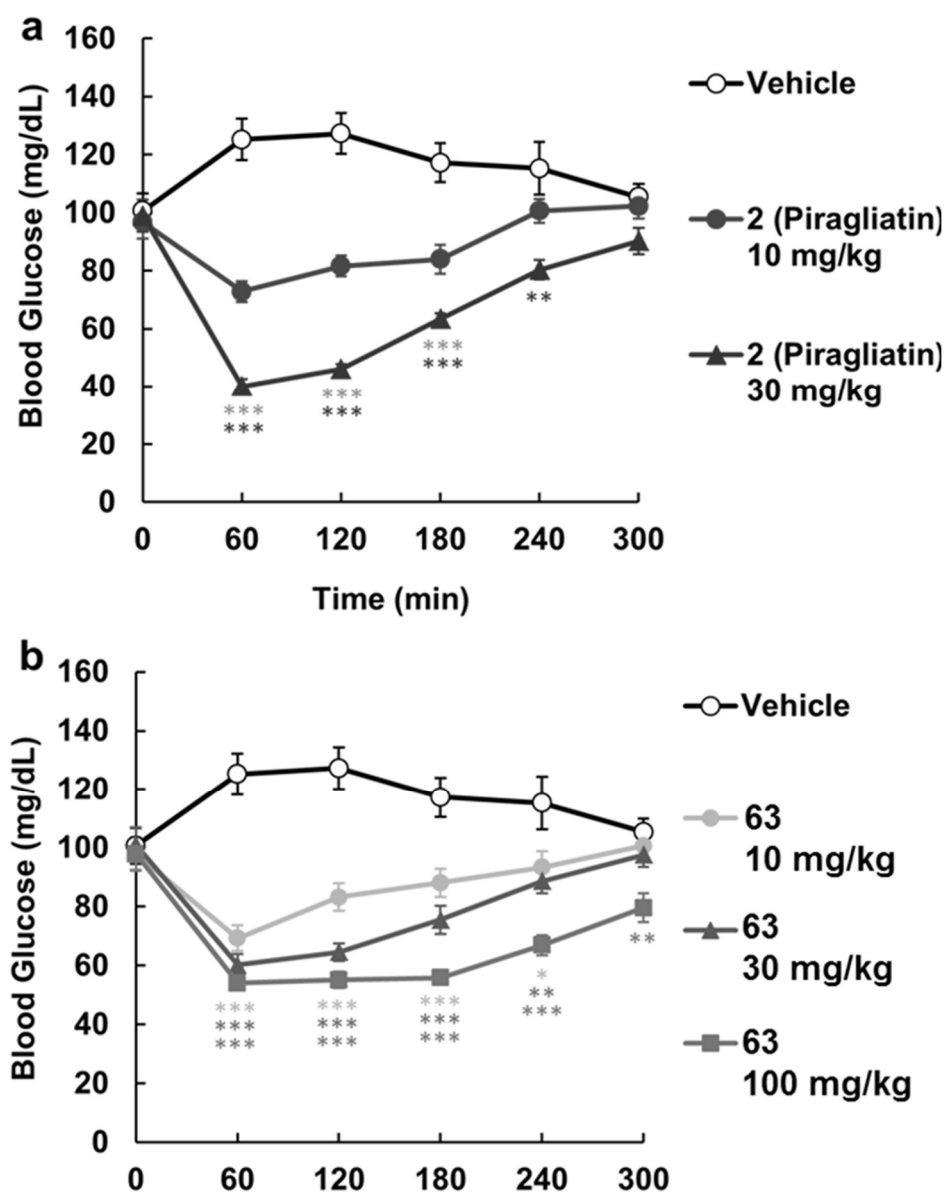
化合物 **63** の他の GKA に対する特徴を解析するため、正常マウスにおける **63** と **2** (piragliatin) の血糖降下作用の比較を行った。化合物 **2** は Phase 2 試験まで進んだロシュ社の GKA である。化合物 **2** はリスク-ベネフィットの観点から開発が中止となったが、この化合物から得られる情報は大変有用である。化合物 **2** は膵臓、肝臓両方の GK に作用するタイプの GKA であることが知られており、ヒトでの優位な血糖降下作用も確認されている。しかし化合物 **2** の臨床試験において、**2** を 100mg 投与された患者は低血糖を防ぐため、試験途中においてグルコースの投与を余儀なくされたことが報告されている<sup>44</sup>。

化合物 **63** と **2** をそれぞれ正常マウスに投与したところ、**63** も **2** も用量依存的に血中グルコース濃度を低下させ、化合物投与量 10 mg/kg での血糖降下作用は **63** と **2** では同程度であった。化合物 **2** は 30 mg/kg 投与で低血糖を起こしたが、**63** はその用量で低血糖を引き起こすことはなく、100 mg/kg を投与した場合においても **2** の 30 mg/kg 投与時ほど血糖値を下げることはなかった。このことは **63** が **2** と比べ低血糖を引き起こすリスクが小さく、臨床現場でも使いやすい優れた化合物であることを表している (Figure 2-13)。

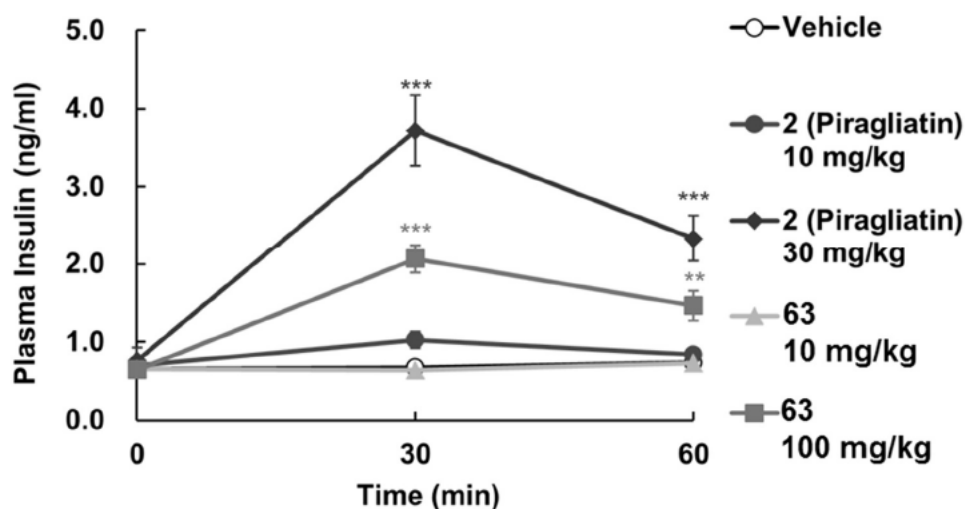
この違いが何に起因するのかを調べるため、**63** と **2** のマウス血中インスリン濃度とこれらの化合物の組織への移行性をそれぞれ比較した (Figure 2-14, Table 2-10)。**2** を 30 mg/kg 投与した際のインスリン分泌は、**63** を 100 mg/kg 投与した際のインスリン分泌より大きかった。また、組織分布試験より、化合物 **2** と **63** は膵臓と肝臓への分布に差があることが明らかとなった。化合物 **2** の L/P 比 (膵臓に対する肝臓への分布比) がおよそ 3 であり、**63** では 20 であったことから **63** は **2** に比べ、より肝臓選択的な化合物であるといえる。これらのことから、正常マウスを用いた **63** と **2** の比較試験 (Figure 2-13) において明らかとなった、これらの化合物における低血糖リスクの違いはインスリン分泌作用の差によるものであり、さらにそれは化合物の膵臓、肝臓への組織移行性の違いによるものであることが示唆された。また Table 2-10 より、化合物 **63** は肝 K<sub>p</sub> 値が小さいため、化合物 **63** の肝選択性は膵臓へ非常に移行しにくいという性質に起因すると考えられる。

GKA の中には肝臓への選択性が高い肝特異的な GKA が存在する。このタイプの GKA は肝臓に存在する有機アニオントランスポーターの基質となることで肝臓へ高選択的に分布し、膵臓へは移行しにくく膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進しないため、低血糖を引き起こすリスクが肝臓と膵臓の GK 両方に作用するタイプの GKA よりも低いと考えられている<sup>43,63</sup>。

第 1 章で述べたように GKA の臨床試験では血中 TG 濃度上昇の副作用が知られており、この原因ははっきりとは解明されていないものの、GK 活性を高めたトランスジェニックマウスの知見から、肝 GK の長期間の過剰な活性化がこの副作用の原因となっている可能性があると考えられる<sup>64</sup>。化合物 **63** は肝特異的な GKA と比べると肝臓に対する選択性は低く、**63** の血中濃度が高いときは肝臓だけでなく膵臓にも分布し、肝臓と膵臓両方の GK を活性化し強力な血糖降下作用を発揮する。そのため肝 GK の過剰な活性化のリスクが肝特異的な GKA よりも低いと考えられる。糖尿病マウスを用いた **63** の 4 週間連投試験においても肝 TG 量に影響は見られなかった (Figure 2-12)。



**Figure 2-13.** Evaluation of hypoglycemic risk of **2** and **63**. Compounds were administered to 2 h-fasted male C57BL/6J mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). The data were statistically analyzed using Dunnett's multiple comparison test. \*, \*\*, \*\*\*:  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  vs. vehicle control. Hypoglycemia was defined as plasma glucose level of  $< 60$  mg/dL.



**Figure 2-14.** Effects of **2** and **63** on plasma insulin level in male C57BL/6J mice. Compounds were administered to 2 h-fasted male C57BL/6J mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). The data were statistically analyzed using Dunnett's multiple comparison test. \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ .

**Table 2-10.** Tissue distribution after a single oral administration of **63** and **2** in male C57BL/6j mice

	Dose (mg/kg)	AUC <sub>0-1.5h</sub> (ng·h/mL or ng·h/g) ( $K_p$ ) <sup>a</sup>			L/P ratio <sup>b</sup>
		Plasma	Liver	Pancreas	
<b>63</b>	10	6750 $\pm$ 2200	8910 $\pm$ 865 (1.3)	433 $\pm$ 75 (0.064)	20.6
	30	17700 $\pm$ 4770	32300 $\pm$ 7670 (1.6)	1430 $\pm$ 599 (0.081)	22.5
	100	86900 $\pm$ 4290	148000 $\pm$ 24300 (1.7)	10500 $\pm$ 577 (0.12)	14.0
<b>2</b> (Piragliatin)	5	351 $\pm$ 70	1470 $\pm$ 159 (4.2)	505 $\pm$ 94 (1.4)	2.9
	10	574 $\pm$ 83	3230 $\pm$ 270 (5.6)	1020 $\pm$ 37 (1.8)	3.2
	30	2330 $\pm$ 78	15700 $\pm$ 1210 (6.8)	5030 $\pm$ 229 (2.2)	3.1

<sup>a</sup>AUC was expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).  $K_p$  value was calculated using the AUC. ( $K_p = \text{AUC}_{\text{tissue}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$ ). <sup>b</sup>L/P ratio;  $\text{AUC}_{\text{liver}}/\text{AUC}_{\text{pancreas}}$  ratio.

## 2-2-11 小括

ヒット化合物 **7** の Fsp<sup>3</sup> に着目した化合物の合成展開により、溶解度が改善され OGTT で効果を示す化合物 **38** を見出すことに成功した。この化合物は hERG チャネルに対し高い親和性を示したため、それを弱めるためカルボン酸を導入し Zwitter-ion を形成した化合物の合成、最適化を行った結果、有望化合物 **63** の獲得に成功した。

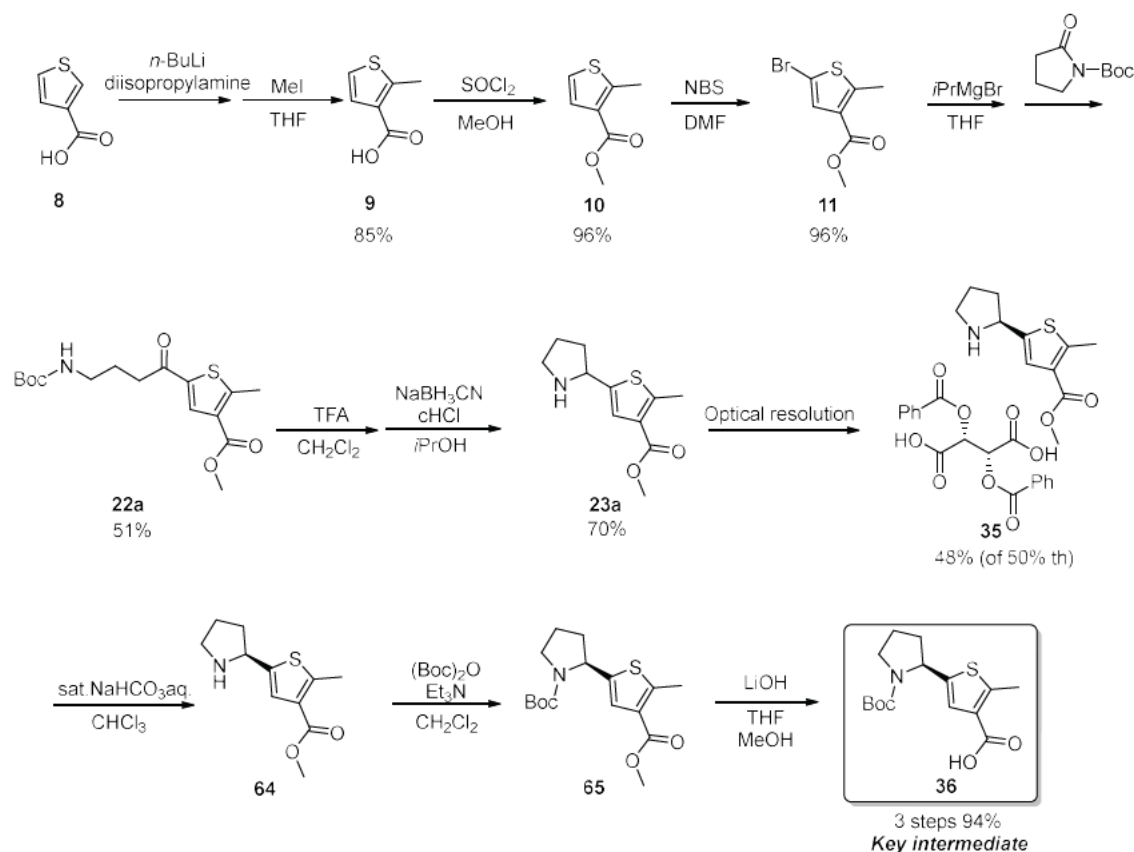
この化合物は肝選択的であるため、膵臓、肝臓の両方に作用する GKA よりも低血糖のリスクが低く、肝特異的な GKA よりも肝 GK の過剰活性化のリスクが低いという特徴を有する有望な化合物である。

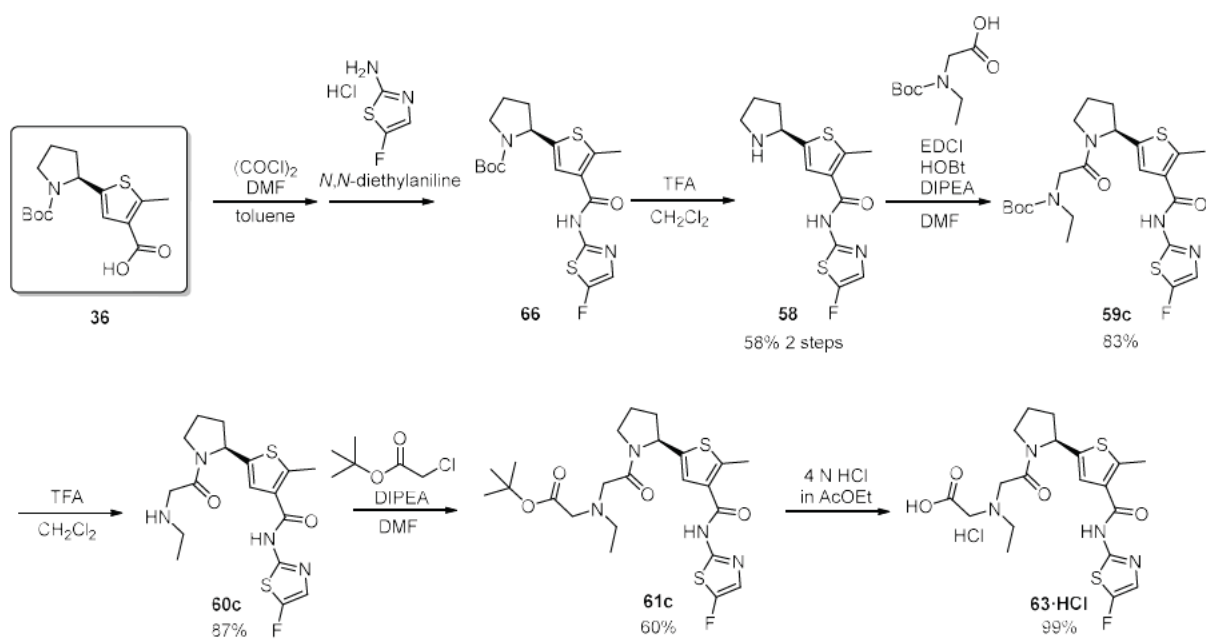
### 第3章 63・HCl の合成中間体 36 の不斉水素移動反応を用いた新規合成法の探索

#### 3-1 探索合成ルートの問題点

第2章で得られた化合物 **63・HCl** を次の開発段階へと進めるためには、前臨床試験での評価が必要であった。前臨床試験では大量の化合物が必要であり、その化合物供給のため、より効率的で大量合成可能な新規 **63・HCl** の合成法構築が必要となった。**63・HCl** の探索合成時に使用されていた合成ルートを **Scheme 3-1** に示す。このルートでは **63・HCl** のピロリジン環部分や、チアゾール環部分、側鎖部分の変換をそれぞれ行うことが容易であり、さらに両エナンチオマーの合成も可能であったため、これは幅広く様々な構造の化合物を合成する必要がある探索合成段階においては有用な合成ルートであった。しかし、この合成ルートで **63・HCl** を大量合成しようとする際には次のような問題点が存在する。①原料であるチオフェンカルボン酸から最終物までの工程数が多く（15 工程）、総収率が 2% と非常に低いこと②大量合成に不向きな低温条件が必要な工程があること③危険な試薬（ $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ）を用いる工程があること③コストの掛かる高価な試薬（EDCI、HOBt 等）を使用していること④複数回のカラム精製を要することである。

これらの問題を解決するため、まず、総収率の低い主な原因であったキラルチオフェニルピロリジン骨格の効率的な合成法の構築を目指し、**63・HCl** 合成の鍵となる合成中間体であるカルボン酸 **36** の新規合成法探索に着手した。





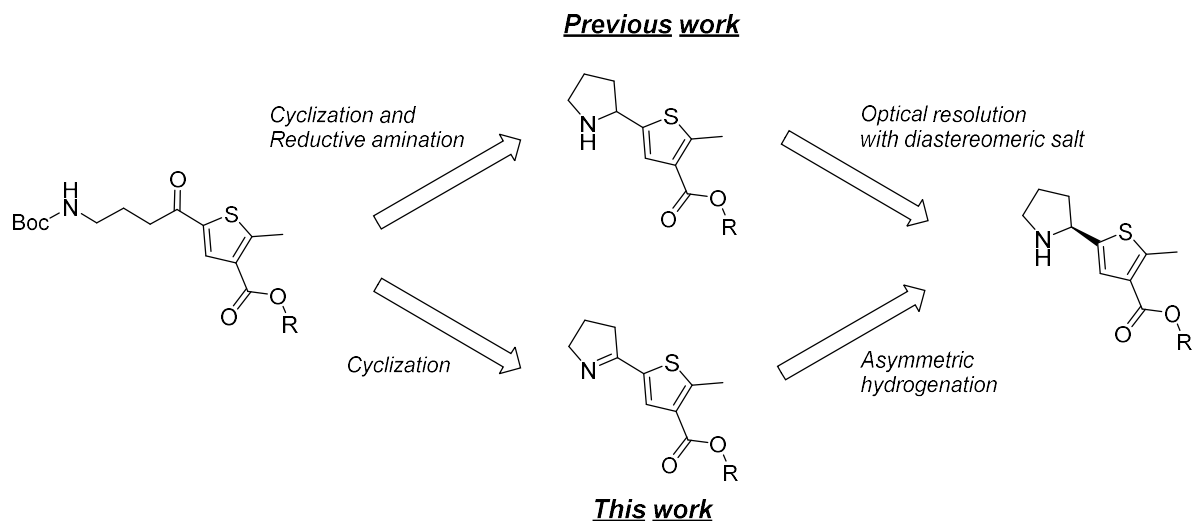
**Scheme 3-1.** Medicinal chemistry route for the synthesis of **63·HCl**.

### 3-2 不斉水素移動反応を用いたカルボン酸 **36** の合成

#### 3-2-1 合成法の選択

探索合成ルート (**Scheme 3-1**) ではケトン **22a** の分子内還元的アミノ化反応でラセミ体のピロリジン化合物 **23a** を合成し、化合物 **23a** を(-)-ジベンゾイル-L-酒石酸を用いたジアステレオマー塩法で光学分割してキラル体 **64** を得た後、Boc 化、加水分解を経て **36** を合成している。化合物探索段階ではこの方法で光学純度の高い **36** を得ているが、ジアステレオマー塩法による光学分割では必ずラセミ体合成を経由するため不必要な方のエナンチオマーも 50% 生じてしまい、必要なエナンチオマーを 50% 以上の収率で得ることができないという問題点がある。そこで必要なエナンチオマーのみを得る別の方法として、2-チオフェニルピロリジンの合成とその不斉還元を経るキラルなチオフェニルピロリジン骨格の構築法を検討することとした (**Figure 3-1**)。





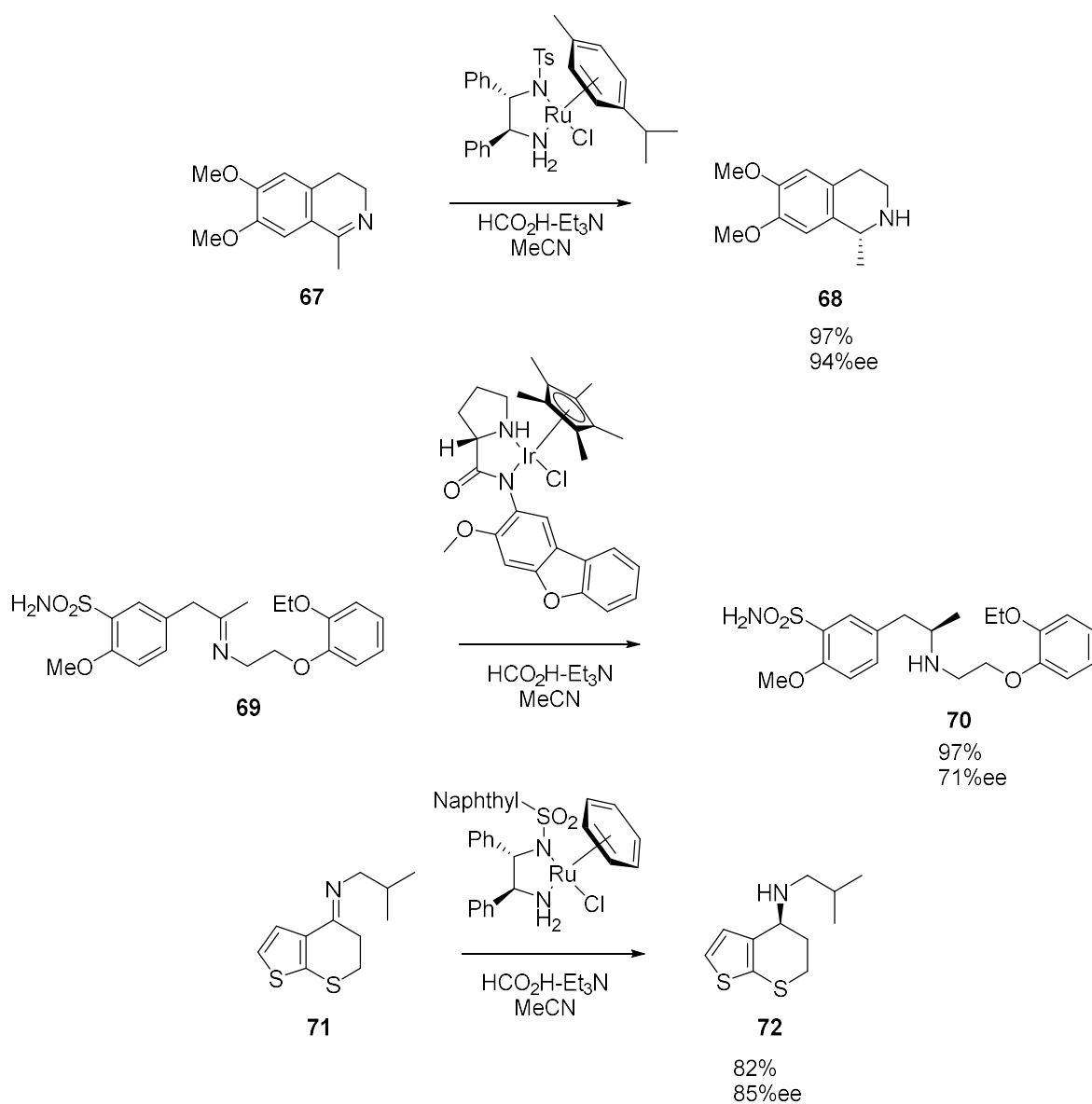
**Figure 3-1.** Synthetic strategy based on an asymmetric reaction.

非環状イミンの触媒的不斉還元反応は、今までに多数の例が知られている<sup>65</sup>。しかし、2-チオフェニルピロリンのような環状イミンの不均還元を行った報告例は非常に少ない。Willoughby らはチタノセン触媒を用いてフェニルピロリンの不均水素化を 2000 psi で収率 77%、98%ee で行うことに成功しており<sup>66</sup>、Chen らは Ru-MsDPEN 触媒を用いてフェニルピロリンの不均水素化を 50 atm で収率 92%、97%ee で行うことに成功している<sup>67</sup>。

これらの例では高い不均収率で目的物である 2-アシルピロリジンを得ることに成功しているが、いずれも高圧条件を必要とし特殊な反応装置を必要とする。大スケールで化合物合成を行うことを考慮すると、特殊な反応装置を必要とする反応は好ましくない。そこでチオフェニルピロリンの、高圧水素ガスを必要としない常圧での不均還元法を探索することとした。

### 3-2-2 触媒的不斉水素移動反応の使用

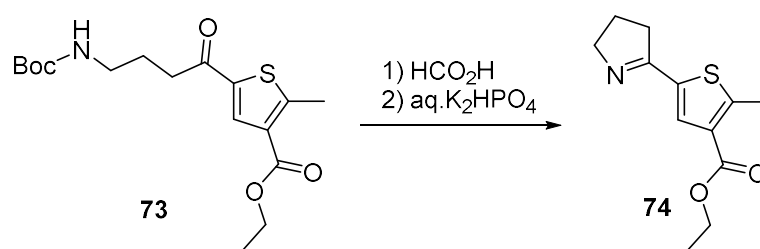
常圧でイミンからキラルアミン骨格を得るための手段として、不均水素移動反応 (Asymmetric transfer hydrogenation: ATH) が知られている。この反応は 2-プロパノールやギ酸を水素源とし、特別な装置なしで簡便に行えるという特徴がある。この反応を使用することによって植松らはアミン **68** をイミン **67** から収率 97%、94%ee で得ることに成功しており、前田らはアミン **70** をイミン **69** から収率 97%、71%ee で得ることに成功している (Scheme 3-2)<sup>68, 69</sup>。さらに植松らは、この方法でチオフェン環を有するイミン **71** の不均還元にも成功しているため、本反応がキラルチオフェニルピロリジン骨格構築にも適用可能であることが期待された<sup>68</sup>。



**Scheme 3-2.** Examples of asymmetric transfer hydrogenation.<sup>68, 69</sup>

### 3-2-3 ATH の条件検討

本反応をキラルチオフェニルピロリジン骨格構築に適用するため、まず ATH の条件検討用に必要原料であるピロリン **74** の合成を行った。ケトン **73** の Boc 基をギ酸中で脱保護し、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  水溶液中で中和することでピロリン **74** を得た (Scheme 3-3)。



**Scheme 3-3.** Preparation of pyrroline **74**.

得られたピロリン化合物 **74** を用いた ATH の条件検討結果を Table 3-1 に、本反応で使用した不斉触媒の構造を Figure 3-2 に示した。これらの触媒のうち  $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S,S)\text{-Tsdpen}]$ 、 $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S)\text{-PMDBFA}]$ 、 $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S)\text{-PA}]$ 、 $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(R)\text{-PA}]$  に関しては文献記載の方法で合成した<sup>69,70</sup>。まず、植松らにより報告されている  $\text{RuCl}(\text{Tsdpen})(p\text{-cymene})$  を用いて MeCN 溶媒中で ATH を行ったが反応は進行しなかった (Table 3-1, entry 1)。Chen らにより、Ru 触媒を用いた不斉還元の際、反応系中へ 1.1 当量の  $(\text{Boc})_2\text{O}$  を添加することで、反応の進行により生成するピロリジンによる Ru 触媒の活性低下を防ぎ、還元反応が促進されることが報告されているため、本反応にもこの条件を適用した<sup>67</sup>。しかしこの条件では **74** から目的物 **75a** ではなく、窒素がホルミル化され、ピロリジン環上に二重結合を有する **76** が生成するのみであった (Table 3-1, entry 2)。

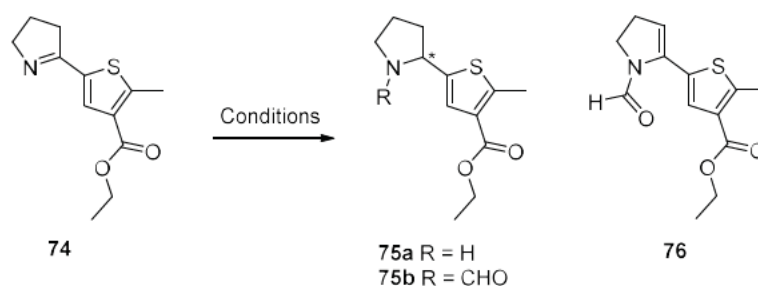
イミン類の不斉還元は Ru 触媒だけでなく Ir 触媒を用いたものも報告されている。近年、Guo らによって 2-ピリジルピロリン誘導体を Ir 触媒で不斉還元する方法が報告された<sup>71</sup>。そこで  $\text{RuCl}(\text{Tsdpen})(p\text{-cymene})$  と類似構造を有する  $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S,S)\text{-Tsdpen}]$  を用いた ATH を試みた。この ATH ではエナンチオ選択性はごくわずかであったものの、*(R)*-rich な pyrrolidine **75a** が収率 48%、1%ee で得られた (Table 3-1, entry 3)。Ir 触媒を用いた条件で反応が進行することが明らかとなったので、Ir 触媒のさらなる検討を行うこととした。

まず、前田らによって高い不斉収率で 2-メチルキノリンの不斉還元が達成されている  $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S)\text{-PMDBFA}]$  を用いて反応を行った<sup>69</sup>。しかし、化合物 **74** の不斉還元は 7%の収率でしか進行しなかった (Table 3-1, entry 4)。この原因は  $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S)\text{-PMDBFA}]$  の嵩高さにより **74** が触媒の活性部位に近づけないことにあると考え、より立体障害の小さい  $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S)\text{-PA}]$  を触媒に用いて反応を実施した。 $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S)\text{-PA}]$  を用いた反応では *(R)*-rich な **75a** を収率 30%、41%ee で得ることができた (Table 3-1, entry 5)。また、この条件では **75a** のホルミル体 **75b** が収率 62%で生成した。

ホルミル体の生成を抑制するため本反応を詳細に追跡した結果、**75b** の生成は反応中ではなく後処理の段階で起こっていることが明らかとなった。Entry 5 の条件では反応終了後に反応液を減圧濃縮しているが、この減圧濃縮の際、高濃度のギ酸に **75a** が熱のかかった状態でさらされることがホルミル化の原因だと考えられた。この反応のスケールアップの際には、さらに濃縮にかかる時間が長くなるため改善は必須であった。後処理法の変更を検討した結果、反応終了後  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  水溶液に反応液を注ぎ、ギ酸を中和した後で後処理を行うことで、ホルミル体 **75b** の生成が抑え

られ、**75a** の収率が 70%へと劇的に改善した (Table 3-1, entry 6)。さらに  $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(S)\text{-PA}]$  を  $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(R)\text{-PA}]$  に変えることで、得られるキラルなピロリジン環の立体が(*R*)から必要な(*S*)へと変換でき、(*S*)-**75a** が 71%、51%ee で得られた (Table 3-1, entry 7)。この条件においても **75b** の生成が完全には抑えられなかったので、更なる反応条件の検討を実施した結果、溶媒を MeCN から MeOH に変更することで **75a** を **75b** の副生を伴わずに得ることができた (収率 91%、50%ee、Table 3-1, entry 8)。また  $\text{HCO}_2\text{H}\cdot\text{Et}_3\text{N}$  を  $\text{HCO}_2\text{H}\cdot\text{HCO}_2\text{Na}$  に変更することで、さらに不斉収率を向上させることができた (Table 3-1, entry 9)。本検討によって、不斉収率は中程度であるものの、特別な反応装置を必要としない常圧の条件において高い変換率で **74** から **75a** を得ることができた。

**Table 3-1.** Investigation of the ATH conditions



entry	catalyst	hydrogen source	temperature	solvent	product (yield <sup>a</sup> )	ee of <b>75a</b> <sup>b</sup>
1	RuCl(Tsdpen)( <i>p</i> -cymene)	HCO <sub>2</sub> H-Et <sub>3</sub> N	0–25 °C	MeCN	N.R. <sup>c</sup>	-
2 <sup>d</sup>	RuCl(Tsdpen)( <i>p</i> -cymene)	HCO <sub>2</sub> H-Et <sub>3</sub> N	0–25 °C	MeCN	<b>76</b> (30%)	-
3	Cp*IrCl[( <i>S,S</i> )-Tsdpen]	HCO <sub>2</sub> H-Et <sub>3</sub> N	0–25 °C	MeCN	<b>75a</b> (48%) <sup>e</sup> <b>75b</b> (44%)	1% ( <i>R</i> )
4	Cp*IrCl[( <i>S</i> )-PMDBFA]	HCO <sub>2</sub> H-Et <sub>3</sub> N	0–25 °C	MeCN	<b>75a</b> (7%) <sup>e</sup>	-
5	Cp*IrCl[( <i>S</i> )-PA]	HCO <sub>2</sub> H-Et <sub>3</sub> N	0–25 °C	MeCN	<b>75a</b> (30%) <sup>e</sup> <b>75b</b> (62%)	41% ( <i>R</i> )
6 <sup>f</sup>	Cp*IrCl[( <i>S</i> )-PA]	HCO <sub>2</sub> H-Et <sub>3</sub> N	0–25 °C	MeCN	<b>75a</b> (70%) <sup>e</sup> <b>75b</b> (13%)	44% ( <i>R</i> )
7 <sup>f</sup>	Cp*IrCl[( <i>R</i> )-PA]	HCO <sub>2</sub> H-Et <sub>3</sub> N	0–25 °C	MeCN	<b>75a</b> (71%) <sup>e</sup> <b>75b</b> (10%)	51% ( <i>S</i> )
8 <sup>f</sup>	Cp*IrCl[( <i>R</i> )-PA]	HCO <sub>2</sub> H-Et <sub>3</sub> N	0–25 °C	MeOH	<b>75a</b> (91%) <sup>e</sup> <b>75b</b> (0%)	50% ( <i>S</i> )
9 <sup>f</sup>	Cp*IrCl[( <i>R</i> )-PA]	HCO <sub>2</sub> H-HCO <sub>2</sub> Na	0–25 °C	MeOH	<b>75a</b> (92%) <b>75b</b> (0%)	54% ( <i>S</i> )

<sup>a</sup>Isolated yield

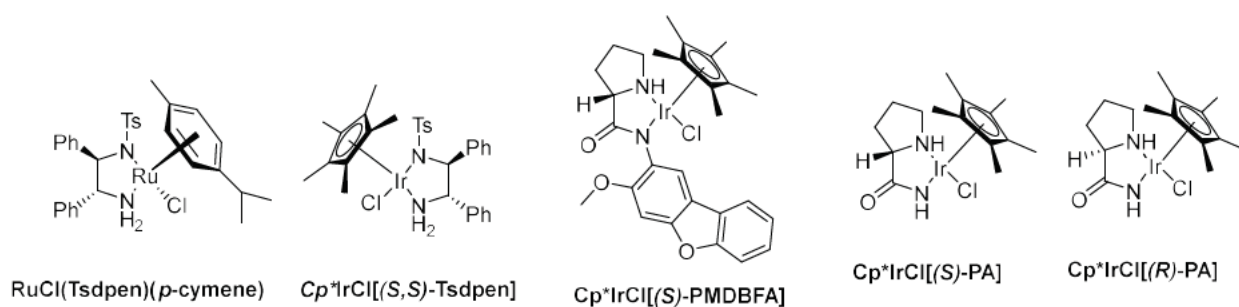
<sup>b</sup>The optical purity was determined by chiral HPLC of **36**.

<sup>c</sup>No reaction.

<sup>d</sup>The reaction was carried out in the presence of (Boc)<sub>2</sub>O.

<sup>e</sup>**75a** was isolated in the Boc-protected form.

<sup>f</sup>The reaction mixture was poured into an aqueous K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution prior to work-up.



**Figure 3-2.** The asymmetric ligands employed herein.

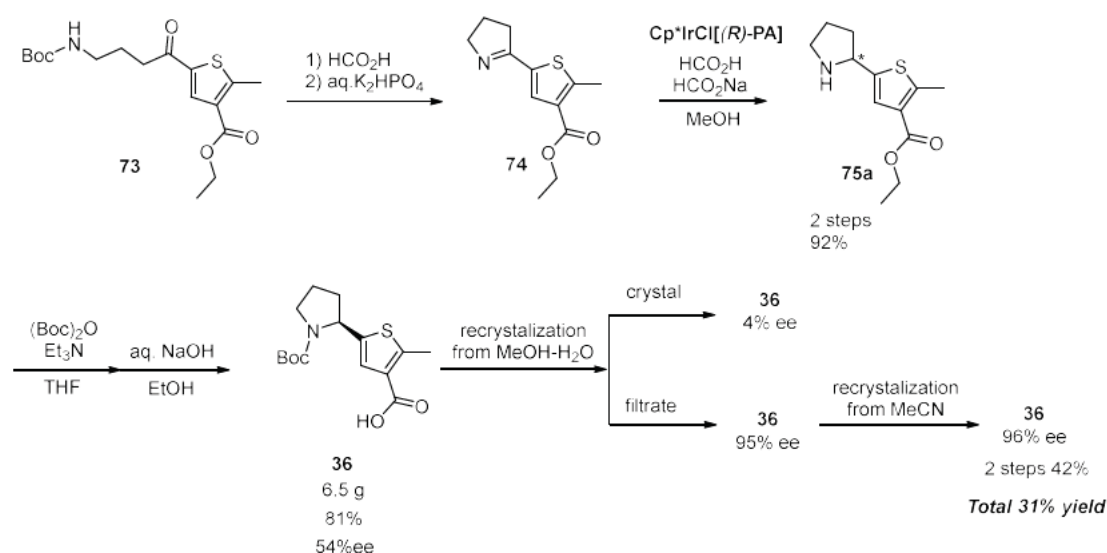
この合成ルートで得られる化合物の不斉収率は中程度（54%ee）であったが、得られた化合物 **75a** の光学純度を上げることができればこの合成法を実用化できる可能性がある。そこで本方法で得られた **75a** の光学純度を向上させる検討を行った。**75a** は油状物であり再結晶による精製が困難であったため、結晶性の高いカルボン酸 **36** に誘導化し、**36** の再結晶条件の検討を行った<sup>72</sup>。

化合物 **36** の再結晶条件の検討結果を Table 3-2 に示す。MeOH, MeOH/H<sub>2</sub>O, MeCN, Acetone を再結晶溶媒として選択し実験を行ったが、得られた結晶の光学純度はいずれも低下した。しかし、再結晶を行った後の母液中に存在する **36** の光学純度が大きく向上していた。これは **36** のラセミ体結晶が優先的に結晶化し、それを取り除いたことによる効果であると考えられた。そこで、この現象を利用して光学純度の高い **36** を得る方法を検討した。ATH で得られた **75a** を誘導化して **36** とし、その後 MeOH-H<sub>2</sub>O で再結晶を行い、析出したラセミ体結晶を取り除き光学純度の高い母液を得た。その母液を濃縮後、MeCN で再結晶を行うことで高い光学純度（96%ee）で **36** を得ることができた（Scheme 3-4）。

**Table 3-2.** Solvent screening for the recrystallization of **36**<sup>a</sup>

entry <sup>b</sup>	solvent	optical purity of the crystal	optical purity of the mother liquor
1	MeOH	6% ee	87% ee
2	MeOH/H <sub>2</sub> O (10/1(v/v))	36% ee	90% ee
3	MeCN	39% ee	90% ee
4	Acetone	4% ee	86% ee

<sup>a</sup>Compound **36** was derived from **75a** according to our previous protocol (Scheme 2-3). Compound **75a** was synthesized via the ATH according to the conditions outlined in Table 3-1, entry 9. <sup>b</sup>Compound **36** (1.0 g, 54% ee) was used in each recrystallization.

**Scheme 3-4.** Synthesis of the enantiopure **36**.

### 3-2-4 小括

2-チオフェニルピロリン **74** の ATH と再結晶を併せて用いることで、**63·HCl** の合成中間体であるカルボン酸 **36** の効率的な合成を達成できた。ピロリン誘導体 **74** のイリジウム (III) プロリンアミド錯体 Cp\*IrCl[(R)-PA] を触媒に用いた常圧下での ATH で、**75a** を中程度の光学純度で得た後、重要中間体 **36** に誘導化し、再結晶により精製することで 96% ee の **36** を得ることに成功した。この方法は探索段階の合成ルートと比べ操作の簡便性の点で優れており、収率も 16% から 31% へと改善された。

#### Acknowledgement:

This chapter is derived in part from an article published in Synthetic Communications 18 Mar 2019.

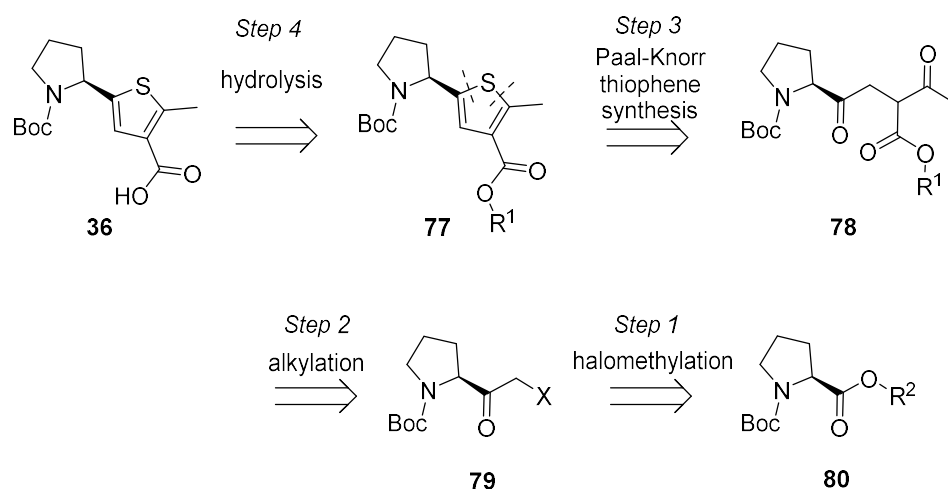
Copyright Taylor & Francis, available online: <https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1570267>

## 第4章 63·HClの実用的な新規合成法の探索および大量合成

### 4-1 不斉プール法を用いた合成中間体 **36** の合成法の検討

第3章で論じたように、ATHと再結晶を併用した合成法によってケトン体からカルボン酸中間体 **36** までの収率、工程数が探索段階の合成ルートに比べて大きく改善された。しかし、ATHの不斉収率が中程度であることと、反応後に濃縮を行うとホルミル体が生成してしまうため、生産性を上げることが困難であるという問題点があった。そこで別法による、さらに実用的なチオフェニルピロリジン骨格の合成法を検討することとした。化合物 **36** のピロリジン環の不斉中心の絶対立体配置は天然の *L*-プロリンのピロリジン環と同じ(*S*)配置を有していることに着目し、*L*-プロリン誘導体からの不斉プール法を使用した合成を検討することとした。この合成法は、難易度が高いピロリジン環への不斉の導入を後から行わずにすむという大きな利点を有している。

Scheme 4-1 に不斉プール法を用いた **36** 合成の逆合成解析を示す。チオフェン環の構築はパール・クノールチオフェン合成<sup>73,74</sup>を用いてケトエステル **78** から行い、ケトエステル **78** は *L*-プロリン誘導体 **80** から合成した $\alpha$ -ハロケトン **79** とアセト酢酸エステルとの反応で合成することとした。



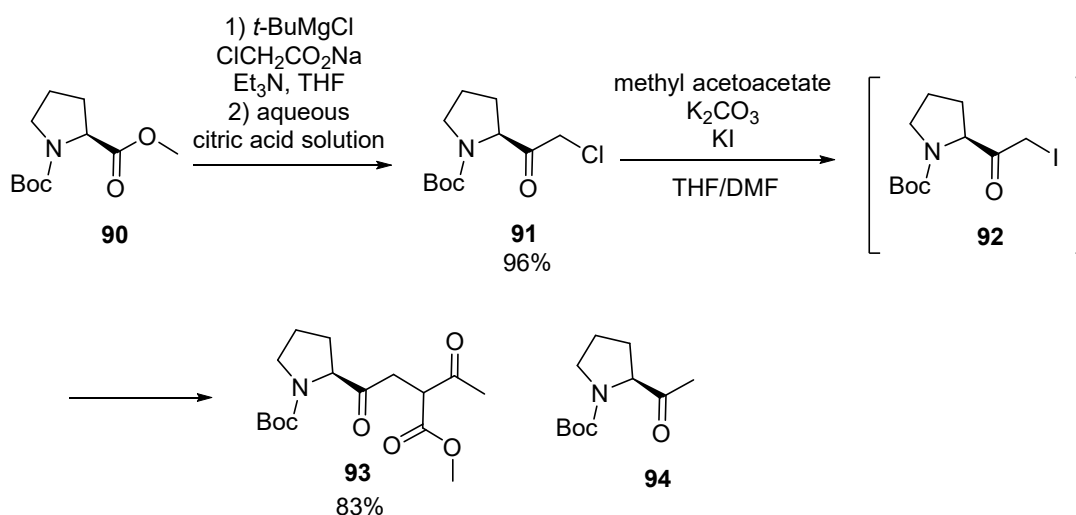
**Scheme 4-1.** Second-generation retrosynthetic analysis for **36**.

まず初めに、プロリン誘導体に $\alpha$ -ハロケトン構造を導入する方法を検討した。カルボキシル基やエステル基を $\alpha$ -ハロケトン基へと変換する方法は、エステルの  $\text{CH}_2\text{ClI}$ 、LDA を用いた $\alpha$ -クロロケトン化反応や、カルボン酸のアジド中間体を經由した $\alpha$ -ブロモケトン化反応などが知られているが<sup>75-77</sup>、安全性と反応温度等、実用性の観点から *t*-BuMgCl と  $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{Na}$  を用いた方法を選択した<sup>77</sup>。市販されているプロリン誘導体 **90** に THF 中 *t*-BuMgCl と  $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{Na}$  を反応させることで、クロロケトン **91** を合成でき、試薬の当量等、反応条件の最適化で収率、光学純度をそれぞれ 96%、99%ee まで向上させることができた (Scheme 4-2)。さらに、反応終了後に反応液をクエン



酸水溶液に加えてクエンチし、その溶液を  $\text{NaHCO}_3$  水溶液で洗浄するのみで、**91** を次の反応に供するのに十分な純度で得ることができた。

化合物 **91** のアルキル化は、THF/DMF 混合溶媒中 KI と  $\text{K}_2\text{CO}_3$  存在下、アセト酢酸メチルと反応させることで進行することが明らかとなったが、脱ハロゲン化された副生成物 **94** が生じてしまうという問題が生じた。THF/DMF の比率を変化させることでは **94** の生成量は変化しなかったが、KI の量を 1 当量から 0.1 当量へと減らすことで **94** の生成量を減らすことができた。条件検討により最適化した反応条件によって **93** が十分な純度で得られたため、反応後にカラムクロマトグラフィーによる精製を行わずに次の反応を実施することができた。

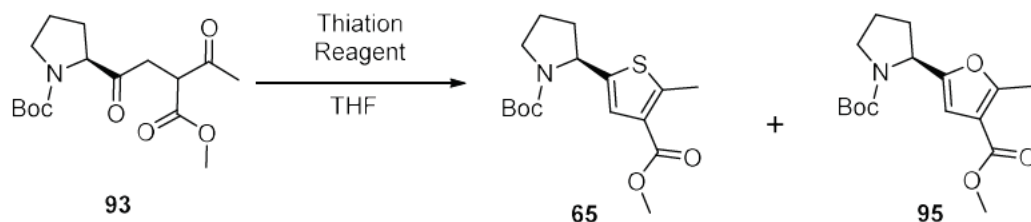


**Scheme 4-2.** Chloromethylation using Grignard reagent and alkylation with methylacetoacetate.

続いて、**93** のパール・クノールチオフエン合成の条件検討を行った。パール・クノールチオフエン合成は、置換されたチオフエン骨格の構築に有用な方法であるが、フラン体が副生することや<sup>78</sup>、ローソン試薬由来の臭気、共雑物の問題があるため、大量合成にこの反応を用いることは難しい。この反応を大量合成に適用するため、まず副生成物として生成するフラン化合物 **95** の生成を抑制できる反応条件の検討を行った (Table 4-1)。

THF 溶媒中ローソン試薬を用いた条件で、目的物 **65** と副生成物のフラン体 **95** が 7.4:1 で生成した (Table 4-1, entry 1)。硫黄化剤をローソン試薬から Davy 試薬や  $\text{P}_4\text{S}_{10}$  へと変更したが **65** : **95** の比率は改善されなかった (Table 4-1, entries 2 and 3)。ローソン試薬を用いた条件で反応溶媒の量を増やすことや、反応温度を上げることは比率の向上に効果的であった (Table 4-1, entries 1, 4, and 5)。これは、反応溶媒に溶けにくいローソン試薬の反応液中での濃度が上がることによって、ローソン試薬が分解する前に **93** と反応できたためと考えられる。Entry 5 の条件で **65** と **95** が 11.6:1 の比率で得られたため、この条件を選択することとした。

**Table 4-1. Paal-Knorr thiophene synthesis from 93**



entry	thiation reagent	concentration	<b>65:95</b> (HPLC area ratio)	temperature
1	LR <sup>a</sup>	12% (g/mL)	7.4:1	25 °C
2	Davy Reagent Methyl	12% (g/mL)	1.9:1	25 °C
3	P <sub>4</sub> S <sub>10</sub>	4% (g/mL)	2.5:1	25 °C
4	LR	4% (g/mL)	9.6:1	25 °C
5	LR	4% (g/mL)	11.6:1	50 °C

<sup>a</sup>Lawesson's reagent.

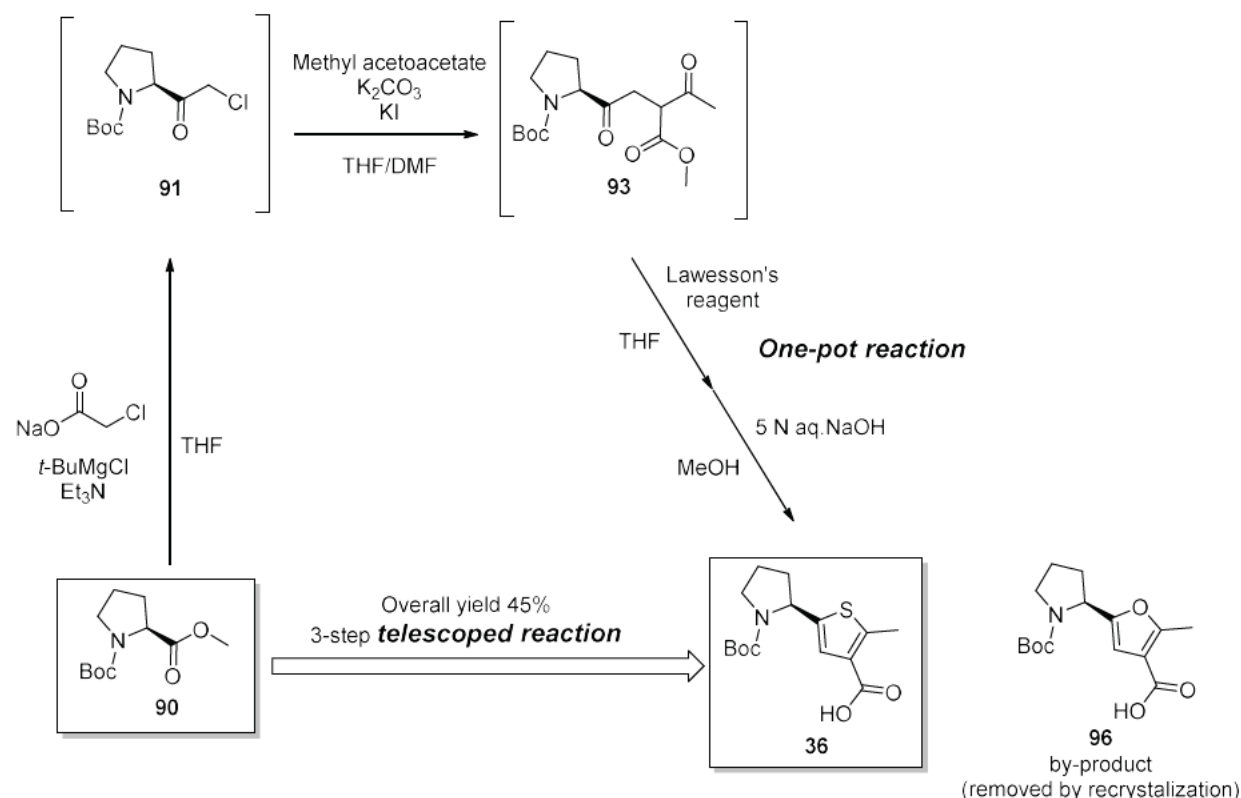
反応条件の検討により **65** : **95** の比率が改善されたものの、完全にフラン体 **95** の生成を抑制できる条件を見つけることはできなかった。さらにこの工程においては、ローソン試薬由来の有色で悪臭を放つ物質が生じ、次の工程に用いることのできる純度の **65** を得るためにはカラムクロマトグラフィーによる精製が必須であった。これらの問題を解決するため、チオフェン環の構築と次の工程の加水分解をワンポットで実施する検討を行った。**65** はオイル状の化合物であるが、加水分解した後のカルボン酸 **36** は固体であるので、カラムクロマトグラフィーを使用せずとも **36** を再結晶することによって共雑物を除去できる可能性がある。さらに、この方法ではチオフェン化後に生成した **65** を反応容器から取り出すことなく次の反応を行うため、合成作業中の臭気の影響を少なくすることもできる。化合物 **65** を反応容器から取り出さずに次の反応を行うことは生産性の点からもメリットが大きい。

ケトエステル **93** のチオフェン化を行い、反応液を水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した後で、MeOH 溶媒中、水酸化ナトリウム水溶液で加水分解を行った。反応終了後、抽出操作を行うことで **36** を精製した。この方法でローソン試薬由来の大部分の共雑物が除去でき、さらにこの 2 工程をワンポット化することで臭気の問題も改善された。しかし、このワンポット合成法で合成した **36** は未だフラン **95** が加水分解された **96** を含んでいたため、**96** を除去できるような **36** の再結晶条件を検討した。MeOH, EtOH, *i*PrOH, MeCN での再結晶を試みた結果、これらのどの溶媒を用い

た場合でも **36** の純度は向上した。そこでこれらの中から最も再結晶収率の良かった MeCN を溶媒として選択した結果、**36** をカラムクロマトグラフィーによる精製なしで、再結晶収率 52%、化学純度 99% で得ることができた。

ここまで検討した一連の合成の効率をさらに上げるため、**90** から **36** までの工程のテレスコープ化を検討した (Scheme 4-3)。今までに論じたように、反応条件の最適化により Step 1 と 2 の副生成物を少なく抑えられていたため、**90** から **93** までのテレスコープ合成で、**93** を次の反応を行うのに十分な純度で得ることができた。次にパルクノール・チオフエン合成に用いる **93** に含まれる残留 DMF と H<sub>2</sub>O に着目した。Step 3 のパルクノール・チオフエン合成で、DMF を溶媒に用いることは反応収率の著しい低下を及ぼし、0.3% 以上の水分残留はこの反応の進行を妨げることが明らかとなっていたため、これらの残留溶媒を減らすことを試みた。Step 2 の反応後の work up の際に用いていた抽出溶媒を AcOEt から toluene へと変更した結果、その他特別な操作を行わずとも **93** に含まれる DMF と H<sub>2</sub>O の量が減少し、それを用いたチオフエン化反応は収率よく進行した。続くワンポットでの加水分解によって十分な純度の **36** が得られた。

こうして、購入可能な **90** から 3 段階のテレスコープ合成によって **36** を得る方法を確立できた。この合成法はメディシナルケミストリールートや 3 章の ATH ルートと比べ工程数、収率、操作の簡便性の点で優れており、さらに製造に要する時間が大きく短縮されていた<sup>79</sup>。

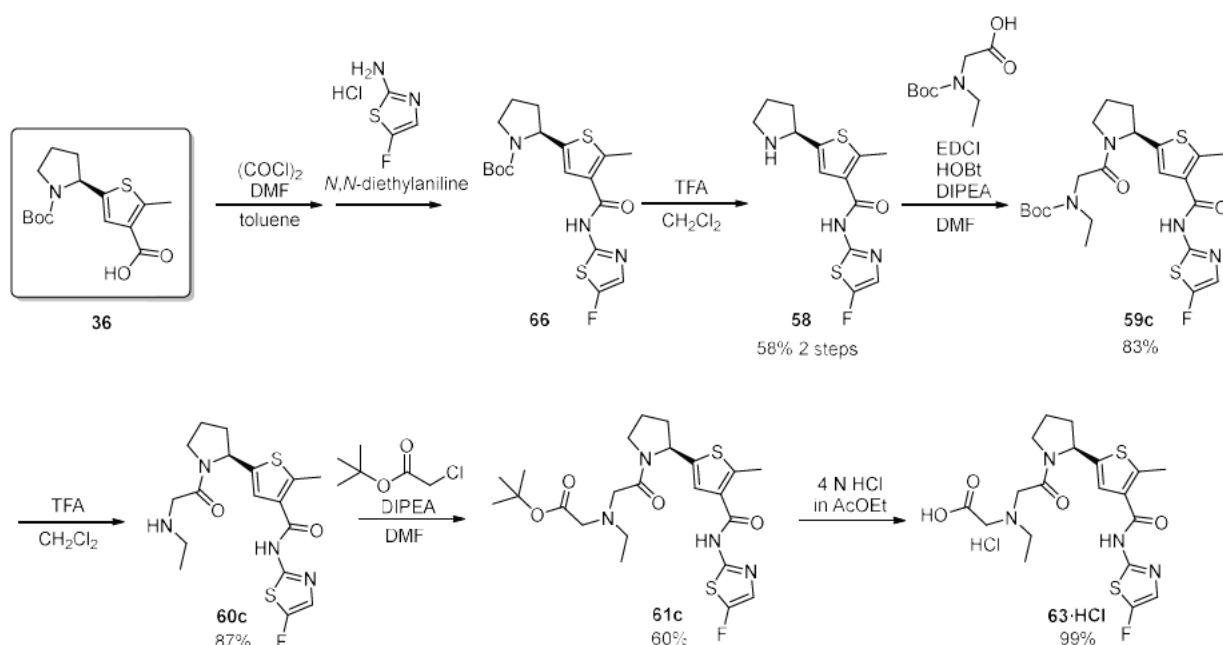


**Scheme 4-3.** Telescoped synthesis from **90** to **36**.

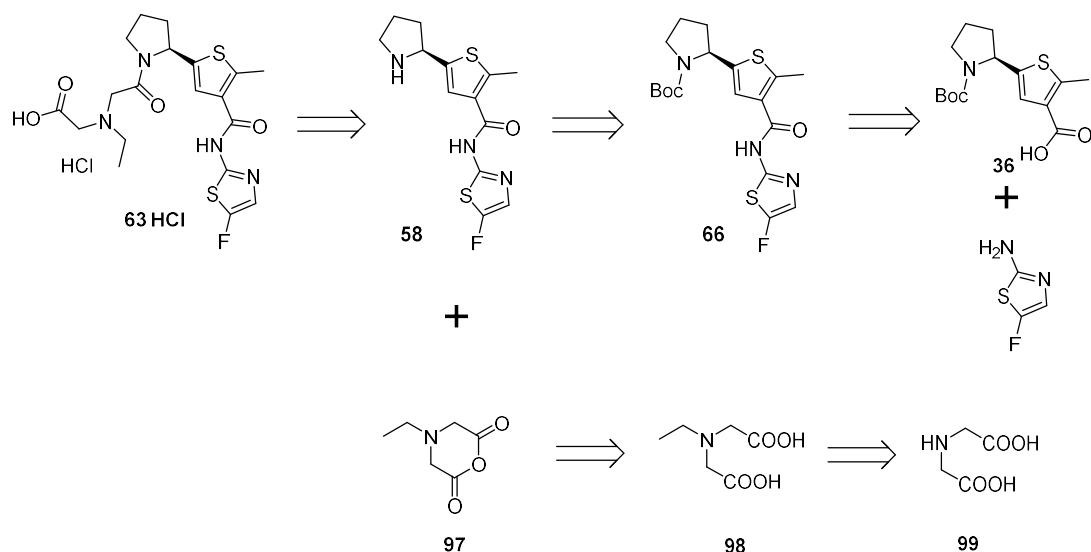
## 4-2 化合物 36 から 63・HCl の環状無水物 97 を経由する効率的合成法の検討

以上論じたように市販原料 90 から 36 までの効率的な合成法が確立できたので、次に 36 から最終物である 63・HCl の合成法検討を行った。63・HCl 合成までに残っている工程は 2-アミノ-5-フルオロチアゾール部分と、*N*-エチルイミノジ酢酸部分の導入である。

探索段階の合成ルートにおいては *N*-Boc-*N*-エチルグリシンを用いた直線的な合成で、中間体 36 から 6 段階を経て 63・HCl を合成している (Scheme 4-4)。中間体 36 を酸クロリドとした後に 2-アミノ-5-フルオロチアゾールと縮合し 66 とし、酸性条件下で Boc 基を脱保護することでピロリジン誘導体 58 を得た。58 と *N*-Boc-*N*-エチルグリシンとの EDCI、HOBt を用いた縮合で 59c とし、59c の Boc 基を TFA で脱保護した後、末端アミノ基に *tert*-ブトキシカルボニルメチルクロリドを反応させ *tert*-ブチルエステル 61c とした。さらに 61c の *tert*-ブチルエステルの脱保護と塩酸塩の形成を、4 N 塩酸-酢酸エチル溶液で行うことで 63・HCl を得た。このルートはチオフェンカルボン酸の先の置換基とピロリジンの 2 級アミノ基の置換基を変換しやすいため、様々な候補化合物を合成する必要がある探索段階のルートとしては優れている。しかし、*N*-Boc-*N*-エチルグリシンは高価な原料であるため大量に入手することは困難であり、EDCI も高価な縮合剤であるため商業的に用いることは難しい。さらに、この合成ルートは 2 回のカラムクロマトグラフィーによる精製工程を含む 6 段階のリニアな合成法であり、保護脱保護工程が多く、グリーンケミストリーの評価指標であるアトムエコノミー<sup>80</sup>が低いことから Scheme 4-5 に示すような新規合成法を検討した。



Scheme 4-4. Medicinal Chemistry synthesis of 63・HCl from 36.

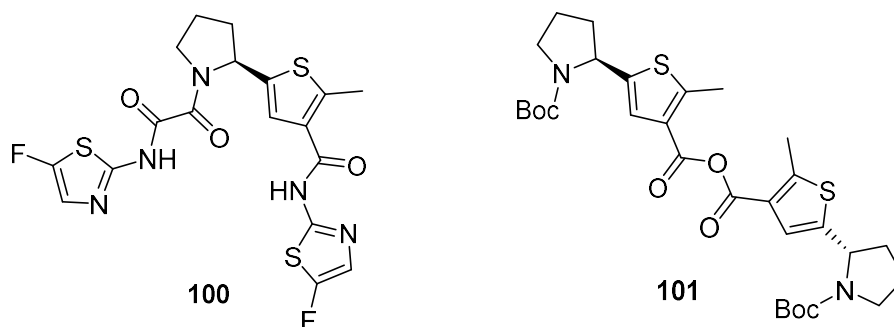


**Scheme 4-5.** Second-Generation Retrosynthetic Analysis for **63·HCl** from **36**.

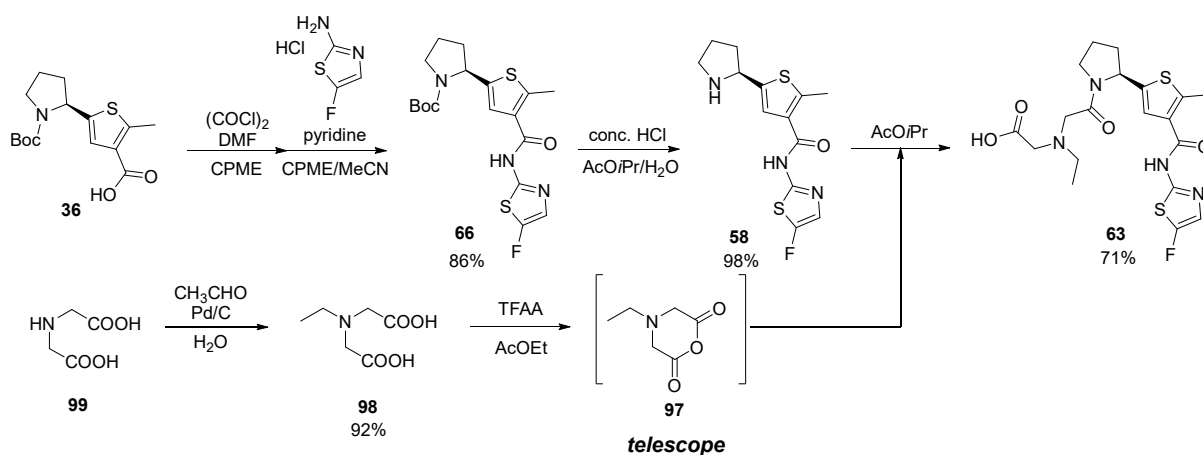
新規合成方法では *N*-エチルイミノジ酢酸部分はピロリジン **58** と環状無水物 **97** との反応で導入することとした<sup>81, 82</sup>。この方法は保護、脱保護が必要でなく、アトムエコノミーの点からも優れている。探索合成時と同様に化合物 **58** は Boc 保護体 **66** から合成し、**66** は **36** と 2-アミノ-5-フルオロチアゾールとのカップリング反応で合成することとした。酸無水物 **97** は *N*-エチル-イミノジ酢酸 **98** から合成し、**98** は安価で容易に手に入るイミノジ酢酸 **99** から合成することとした。

まず、**36** と 2-アミノ-5-フルオロチアゾールのアミド化条件の検討を行った。化合物 **36** を DMF 存在下、塩化オキサリルで酸クロリドとし、2-アミノ-5-フルオロチアゾールと反応させた。このアミド化工程において、主副生成物はアミド体 **100** と酸無水物 **101** であった (Figure 4-1)。条件検討により、**101** は後処理の工程で取り除けることが明らかとなったため、副生成物 **100** の生成が少なくなるような反応条件の探索に注力した。その結果、酸クロリド生成の際に溶媒として CPME を使用し、生成した酸クロリドをピリジン存在下 CPME/MeCN 混合溶媒で 2-アミノ-5-フルオロチアゾールと反応させることで、**100** の生成量を劇的に減らせることが明らかとなった。

**Figure 4-1.** Chemical structures of main amidation by-products.



次に、*N*-エチルイミノジ酢酸部分の効率的な導入法を検討した (Scheme 4-6)。市販されている安価なイミノジ酢酸 **99** の還元的アミノ化反応で *N*-エチルイミノジ酢酸 **98** を合成し、**98** を AcOEt 溶媒中トリフルオロ酢酸無水物と反応させ、環状無水物 **97** を生成させた。生成した環状無水物 **97** を **58** の酢酸イソプロピル溶液に加えることで、1 工程で *N*-エチルイミノジ酢酸部分を導入し **63** を合成することができた。

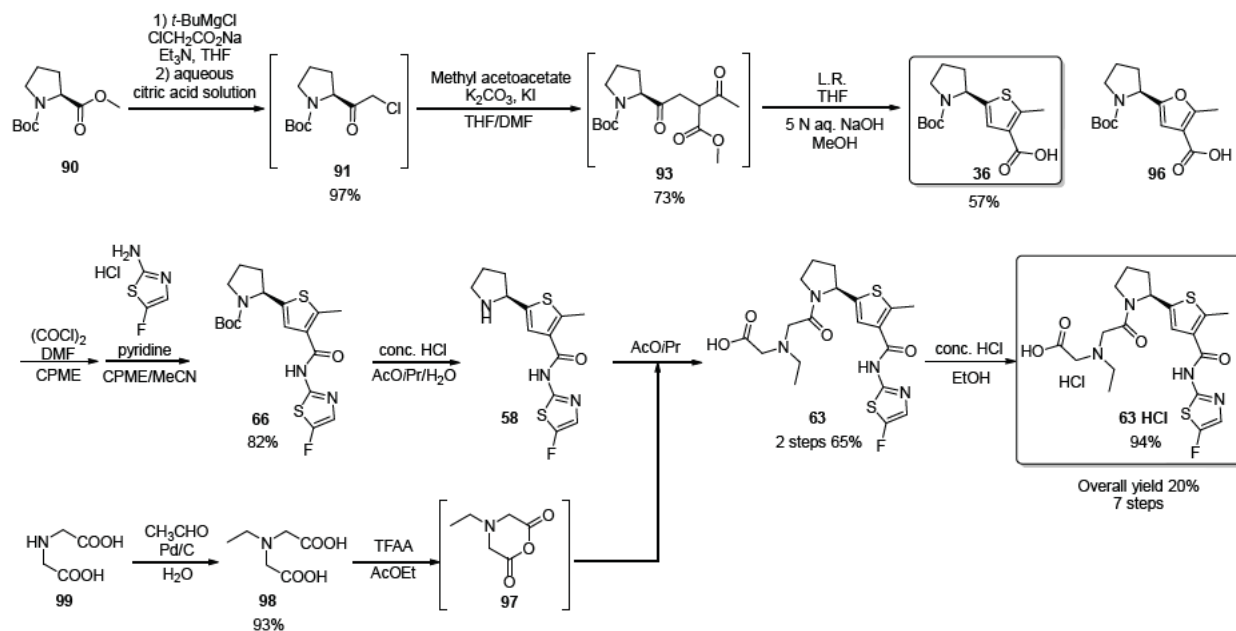


**Scheme 4-6.** New Convergent Synthesis of **63**.

このようにして、**36** から **63**・HCl へのリニアな合成法を、工程数が少なく、用いる原料が安価であり、カラムクロマトグラフィーによる精製を必要としないコンバージェントな合成法へと改良することができた。

中間体 **36** から **63**・HCl への実用的な合成法を構築できたため、これを 4-1 での検討結果と組み合わせることで、キラルプール原料であるプロリン誘導体 **90** から **63**・HCl までの実用的な合成ルートが構築できた。そこで、それらを組み合わせて、実際に原料 **90** を 150 kg 用いた **63**・HCl の大量合成を実施した (Scheme 4-7)。この大量合成において、主副生成物は **96** 由来のフラン化合物であったが、**36** の再結晶によって **96** の含量を減らし純度を高められるということと、*N*-エチルイミノジ酢酸部分を導入後の **63** を MeOH でスラリー洗浄することでも **63** の純度を高められるこ

とが分かった。これらの精製操作によって厳密に **63·HCl** の純度を管理することができ、150 kg のエステル **90** から 54.6 kg の化合物 **63·HCl** を総収率 20%、高い光学純度で得ることができた<sup>83</sup>。



**Scheme 4-7.** Large-scale synthesis of **63·HCl**.

#### 4-3 小括

本章の検討で **63·HCl** の、大スケールで実施可能である実用的な合成ルートを構築できた。本方法でチオフェニルピロリジン骨格の不斉は、安価で容易に入手可能な *L*-プロリン誘導体を使用した不斉プール法によって導入した。また、*N*-エチル-*N*-イミノジ酢酸部分の導入においては、安価で入手容易なイミノジ酢酸から合成できる環状酸無水物 **97** を中間体とする方法を用いることで、高いアトムエコノミーを達成できた。本研究によって探索段階では 15 工程あった反応工程を 7 工程とすることができ、総収率は 2% から 20% と改善された。全てのカラムクロマトグラフィーによる精製工程は不要となり、探索合成ルートを大幅に効率化できた。さらに本ルートでは中間体 **36** の再結晶や **63** のスラリー洗浄によって **63·HCl** の純度を厳密に管理することが可能である。本合成法で 54.6 kg スケールの **63·HCl** の合成に成功でき、工業的にも実用性が高い合成法であることが証明された。

**Acknowledgement:** This chapter is adapted with permission from *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 69–77.

Copyright 2019 American Chemical Society.

## 第5章 結語

本研究では独自の特徴を有し、抗糖尿病薬となりうる安全性の高い **GKA** の獲得と、その実用的な大量合成法の開発を目指し研究を進め、以下の知見を得た。

先行研究によって見出だされた溶解度の悪いヒット化合物 **7** の  $F_{sp^3}$  に着目した化合物の合成展開により、溶解度が改善され OGTT で効果を示す化合物 **38** を見出すことに成功した。この化合物は hERG チャネルに高い親和性を有していたため、それを弱めるためカルボン酸を導入し Zwitter-ion を形成した化合物を合成し、最適化を行った。その結果、有望化合物である **63·HCl** の獲得に成功した。この化合物は肝選択的であるため、膵臓、肝臓の両方に作用する **GKA** よりも低血糖のリスクが低く、その肝選択性が、膵臓へ非常に移行しにくい性質に基づいているため、肝特異的な **GKA** よりも肝 **GK** の過剰活性化のリスクが低い有望な化合物である。

ピロリン誘導体 **74** の ATH と再結晶を併せて用いることで、**63·HCl** の合成中間体であるカルボン酸 **36** の効率的な合成法を開発することができた。ピロリン誘導体 **74** のイリジウム (III) プロリンアミド錯体  $Cp^*IrCl[(R)-PA]$  を触媒に用いた常圧下での ATH で、**75a** を中程度のエナンチオ選択性で得た後、重要中間体 **36** に誘導化し、それを再結晶により精製することで **36** を 96%ee で得ることに成功した。この方法は、探索段階の合成ルートと比べ操作の簡便性が改善されており、収率も改善されていた。

更なる検討によって **63·HCl** の大スケールで実施可能である実用的な合成ルートを構築できた。このルートではチオフェニルピロリジン骨格の不斉を、安価で容易に入手可能な *L*-プロリン誘導体 **90** を使用した不斉プール法によって導入することができ、**90** から **36** までのテレスコープ化に成功した。また、その後の *N*-エチル-*N*-イミノジ酢酸部分の導入は、安価で入手容易なイミノジ酢酸 **99** から合成できる環状酸無水物 **97** を中間体とする方法を用いることで、高いアトムエコノミーを達成できた。本研究によって、探索段階では 15 工程あった反応工程を 7 工程とすることができ、総収率は 2% から 20% へと改善された。また、全てのカラムクロマトグラフィーによる精製工程は不要となり、合成ルートを大幅に効率化できた。さらに本ルートでは中間体 **36** の再結晶や **63** のスラリー洗浄によって **63·HCl** の純度の厳密な管理が可能であった。本合成法で 54.6 kg スケールの **63·HCl** の合成に成功し、工業的にも実用性が高い合成法であることが証明された。

本研究において得られた、化合物の平面性を崩すことによる溶解度の改善、またそれによる *in vivo* で効果を示す化合物の獲得や、化合物の Zwitter-ion 化による hERG チャネル結合能の減弱などの知見は、今後の創薬研究に大きく貢献できると考えられる。また、化合物 **63·HCl** はこれまでの **GKA** とは異なる、肝選択的でありながらも肝への選択性が高すぎないという新しい特徴を有する化合物であり、**GK** 研究のためのツールとしても有用である。さらに、本研究で得られた、実用性の高いキラルなチオフェニルピロリジン骨格を構築する合成法やアトムエコノミーの高い *N*-



エチルイミノジ酢酸導入法の知見は、同様の骨格を有する化合物の実用的な合成に応用でき、今後の医薬品のプロセス研究において大変有用であると考えられる。

## Experiments concerning Chapter 2

### General

All reagents and solvents were commercially available and used without further purification. Flash column chromatography was performed using silica gel 60 (particle size 0.040–0.050 mm, Kanto Kagaku) or Ultra Pack Columns (silica gel, particle size 0.040 mm, Yamazen Corporation) unless otherwise stated.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR were recorded using a JEOL-ECP400 or Varian-400MR spectrometer in solvent as indicated. Data are reported as follows: chemical shift in ppm ( $\delta$ ) relative to tetramethylsilane, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, dd = doublet of doublets, td = triplet of doublets, br = broad, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration. Infrared spectra (IR) were recorded on a JASCO FT/IR-4200 spectrometer with a single reflection diamond ATR unit. LC/MS spectra were determined on a Waters ZMD2000 equipped with a Waters 2690 injector and a PDA detector operating at 210–400 nm and interfaced with a Micromass ZMD mass spectrometer or Waters SQD equipped with an Acquity ultra performance liquid chromatography (UPLC) system. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Thermo LTQ Orbitrap. Melting points were determined using a Yanaco MP-J micro melting point apparatus and are given as uncorrected values. The specific rotation was measured on a Rudolph AUTOPOL IV polarimeter. The purity of the test compounds was determined by UPLC analysis using an Acquity BEH C18 column (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  50 mm) with UV detection at 290 and 300 nm (5 min; 0.4 mL/min flow rate) and elution with binary solvent systems A and B using a gradient elution (A, 0.1% [v/v] HCOOH aqueous solution; B, 0.1% [v/v] HCOOH in MeCN). All tested compounds were confirmed to be  $\geq 95\%$  purity via this method.

### 2-Methylthiophene-3-carboxylic acid (**9**).

Compound **9** was synthesized as reported previously.<sup>48</sup> To a solution of diisopropylamine (233 g, 2.30 mol) in THF (2.3 L), a solution of *n*-BuLi (1.6 M in *n*-hexane, 1.50 L, 2.40 mol) was added dropwise at 0 °C. After stirring at the same temperature for 40 min, the reaction mixture was cooled to –60 °C, compound **8** (223 g, 1.74 mol) in THF (500 mL) added dropwise, and stirred at the same temperature for 1 h. After the addition of MeI (254 g, 1.79 mol), the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. Next, the mixture was concentrated under reduced pressure, acidified with 6 N aqueous HCl (to pH 1), and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was crystallized with  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$  to give 209 g (85%) of **9** as a pale-yellow solid:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.45 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 7.01 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 2.78 (s, 3H); MS (ESI)  $m/z$ : 143 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 141 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>–</sup>.

### Methyl 2-methylthiophene-3-carboxylate (**10**).

Thionyl chloride (200 mL, 2.76 mol) was slowly added dropwise to a solution of **9** (100 g, 703 mmol) in MeOH (500 mL). After stirring at reflux for 3 h, the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with water, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure to give 105 g (96%) of **10** as a brown oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.74 (s, 3H); MS (ESI) *m/z*: 157 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **Methyl 5-bromo-2-methylthiophene-3-carboxylate (11).**

To a solution of **10** (156 g, 999 mmol) in DMF (750 mL), NBS (178 g, 1.00 mol) was added at room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was diluted with water and extracted with *n*-hexane. The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure to give 226 g (96%) of **11** as a yellow oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.33 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.67 (s, 3H).

#### **Methyl 5-(2-formylphenyl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (12).**

A mixture of **11** (100 mg, 0.425 mmol), 2-formylphenylboronic acid (83.0 mg, 0.533 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (24.6 mg, 0.0213 mmol), and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (176 mg, 1.27 mmol) in DME (650 μL) was stirred at 85 °C for 1.5 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered through celite and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with AcOEt, washed with water and brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by preparative TLC on silica gel (AcOEt/*n*-hexane = 1/5) to give 82.0 mg (74%) of **12** as a pale-yellow solid: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.23 (s, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.65–7.59 (m, 1H), 7.53–7.47 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.80 (s, 3H); MS (ESI) *m/z*: 261 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **2-(4-(Methoxycarbonyl)-5-methylthiophen-2-yl)benzoic acid (13).**

To a solution of **12** (50.0 mg, 0.192 mmol) and 2-methyl-2-butene (244 μL, 2.30 mmol) in *tert*-BuOH (500 μL), NaClO<sub>2</sub> (138 mg, 1.53 mmol) and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (327 mg, 2.30 mmol) in water (500 μL) were added at room temperature. After stirring at the same temperature for 2.5 days, 1 N aqueous HCl was added and the mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with water and brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was triturated with Et<sub>2</sub>O/*n*-hexane to give 35.8 mg (68%) of **13** as a white solid: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.95–7.89 (m, 1H), 7.57–7.51 (m, 1H), 7.48–7.40 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.75 (s, 3H); MS (ESI) *m/z*: 277 (M+H)<sup>+</sup>, 275 (M–H)<sup>–</sup>.

#### **(Methyl 5-(2-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)phenyl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (14).**

To a solution of **13** (216 mg, 0.782 mmol) and 2-aminoethanol hydrochloride (152 mg, 1.56 mmol) in DMF, EDCI (299 mg, 1.56 mmol), HOBt (211 mg, 1.56 mmol), and DIPEA (403 μL, 2.35 mmol) were added.

After stirring at room temperature for 2 h, the reaction mixture was diluted with AcOEt and washed with 1 N aqueous HCl, water, and brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 40/1 to 30/1) to give 240 mg (96%) of **14** as a white solid: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.57–7.52 (m, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.45–7.34 (m, 3H), 6.19–6.05 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.77–3.66 (m, 2H), 3.53–3.43 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.54 (br s, 1H); MS (ESI) *m/z*: 320 (M+H)<sup>+</sup>, 318 (M–H)<sup>–</sup>.

**5-(2-((2-Hydroxyethyl)carbamoyl)phenyl)-2-methylthiophene-3-carboxylic acid (15).**

To a solution of **14** (226 mg, 0.708 mmol) in MeOH (2.00 mL) and THF (2.00 mL), 5 N aqueous NaOH (708 μL, 3.54 mmol) was added. After stirring at 50 °C overnight, the reaction mixture was diluted with water and washed with Et<sub>2</sub>O. The resulting aqueous solution was acidified with 1 N aqueous HCl and extracted with CHCl<sub>3</sub> and the organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure to give 87.6 mg (41%) of **15** as a white solid: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.67 (br s, 1H), 8.34 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.50–7.43 (m, 2H), 7.42–7.34 (m, 3H), 4.66–4.57 (m, 1H), 3.45–3.38 (m, 2H), 3.22 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.68 (s, 3H); MS (ESI) *m/z*: 306 (M+H)<sup>+</sup>, 304 (M–H)<sup>–</sup>.

***N*-(5,6-Dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-5-(2-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)phenyl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (16).**

A mixture of **15** (270 mg, 0.884 mmol), 5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-amine (248 mg, 1.77 mmol), EDCI (339 mg, 1.77 mmol), HOBt (271 mg, 1.77 mmol), and DIPEA (303 μL, 1.77 mmol) in DMF (2.00 mL) was stirred at room temperature for 1 h and then stirred at 50 °C for 13 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with AcOEt, washed with 1 N aqueous HCl, water, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, and brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (toluene/AcOEt = 1/4 to 1/5) to give 148 mg (39%) of **16** as a pale-yellow foam: *t*<sub>R</sub> = 2.73 min (UPLC purity: 98.4%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.61–7.32 (m, 5H), 3.65 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.43 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.90 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.81–2.71 (m, 5H), 2.59–2.42 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 173.0, 163.6, 163.3, 156.7, 149.3, 139.1, 137.7, 132.5, 131.8, 131.2, 131.1, 129.6, 129.3, 129.0, 126.9, 61.4, 43.5, 28.5, 28.3, 27.4, 15.1; IR (ATR) 1634, 1525 cm<sup>–1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 428 (M+H)<sup>+</sup>, 426 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 428.1097, found 428.1093.

***N*-(5,6-Dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-5-(2-((2-iodoethyl)carbamoyl)phenyl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (17).**

To a solution of **16** (148 mg, 0.346 mmol) in THF (5.50 mL), PPh<sub>3</sub> (182 mg, 0.692 mmol), imidazole (47.1 mg, 0.692 mmol), and I<sub>2</sub> (176 mg, 0.692 mmol) were added at 0 °C and stirred at the same temperature for 40 min. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was

washed with saturated aqueous Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, water, and brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/*n*-hexane = 3/2) to give 160 mg (86%) of **17** as a colorless oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.99 (br s, 1H), 7.58 (dd, *J* = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.50–7.36 (m, 3H), 7.31 (s, 1H), 6.01 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.70 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.25 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.87 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.66 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.41 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H); MS (ESI) *m/z*: 538 (M+H)<sup>+</sup>, 536 (M–H)<sup>–</sup>.

***N*-(5,6-Dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-5-(2-((2-(dimethylamino)ethyl)carbamoyl)phenyl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (18).**

To a solution of **17** (22.6 mg, 0.0421 mmol) in THF (500 μL), 2.0 M solution of Me<sub>2</sub>NH in THF (210 μL, 0.421 mmol) was added at room temperature. After stirring at the same temperature for 2.5 days, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by preparative TLC on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 8/1) to give 13.7 mg (72%) of **18** as a white foam: *t<sub>R</sub>* = 2.08 min (UPLC purity: 96.7%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.55–7.49 (m, 1H), 7.44–7.34 (m, 2H), 7.33–7.25 (m, 2H), 6.43 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.39 (q, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.85 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.59 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.43–2.27 (m, 4H), 2.09 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.3, 161.4, 161.0, 155.5, 149.0, 138.1, 136.4, 131.0, 130.2, 129.9 (2C), 128.4 (2C), 128.3, 125.4, 57.4, 44.8 (2C), 37.2, 27.4, 27.3, 26.7, 15.3; IR (ATR); 1658, 1642, 1548, 1523 cm<sup>–1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 455 (M+H)<sup>+</sup>, 453 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 455.1570, found 455.1567.

**5-(2-((2-Cyanoethyl)carbamoyl)phenyl)-*N*-(5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (19).**

To a solution of **17** (160 mg, 0.298 mmol) in DMSO (2.70 mL), NaCN (29.2 mg, 0.596 mmol) was added at room temperature and stirred at the same temperature for 4 h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with water and brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 80/1 to 70/1) to give 27.0 mg (21%) of **19** as a pale-yellow solid: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.60–7.55 (m, 1H), 7.49–7.33 (m, 4H), 6.26–6.15 (m, 1H), 3.56 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.76 (s, 1H), 2.68–2.59 (m, 4H), 2.40 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H); MS (ESI) *m/z*: 437 (M+H)<sup>+</sup>, 435 (M–H)<sup>–</sup>.

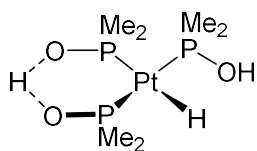
**5-(2-((2-(1*H*-Tetrazol-5-yl)ethyl)carbamoyl)phenyl)-*N*-(5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (20).**

To a solution of **19** (60.2 mg, 0.138 mmol) in toluene (900 μL), Bu<sub>3</sub>SnN<sub>3</sub> (190 μL, 0.690 mmol) was added at room temperature. After stirring at 130 °C for 5 h, the reaction mixture was cooled to room temperature and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash column chromatography (10% w/w anhydrous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-silica; CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1/0 to 9/1) to give 32.0 mg (48%) of

**20** as a pale-yellow solid: mp 254–256 °C;  $t_R$  = 2.71 min (UPLC purity: 99.7%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.16 (br s, 1H), 8.61 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.61–7.56 (m, 1H), 7.51 (td,  $J$  = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.42 (td,  $J$  = 7.4, 1.2 Hz, 1H), 7.35 (dd,  $J$  = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 3.57 (q,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 3.11 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 2.85 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.74–2.65 (m, 5H), 2.45–2.35 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.8, 161.2, 161.0, 155.1, 154.0, 147.5, 136.6, 136.2, 130.7, 129.8, 129.5, 129.2, 127.8, 127.6, 126.9, 126.5, 37.2, 27.0, 26.7, 26.1, 23.0, 14.8; IR (ATR) 1636, 1524  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 480 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 478 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  480.1271, found 480.1266.

**5-(2-((3-Amino-3-oxopropyl)carbamoyl)phenyl)-*N*-(5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (21).**

To a solution of **19** (10.9 mg, 0.0250 mmol) in EtOH (600  $\mu\text{L}$ ) and water (300  $\mu\text{L}$ ) [ $\text{PtH}(\text{PMe}_2\text{OH})(\text{PMe}_2\text{O})_2\text{H}$ ] (2.00 mg, 0.00464 mmol) was added at room temperature and refluxed for 19 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was washed with  $\text{CHCl}_3$  to give 6.20 mg (55%) of **21** as a white solid: mp 246–247 °C;  $t_R$  = 2.63 min (UPLC purity: 96.3%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.24 (s, 1H), 8.42 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.60–7.55 (m, 1H), 7.50 (td,  $J$  = 7.5, 1.6 Hz, 1H), 7.44–7.33 (m, 2H), 6.99 (s, 1H), 3.43–3.28 (m, 2H), 2.85 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.76–2.65 (m, 5H), 2.46–2.36 (m, 2H), 2.33 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.7, 168.5, 161.2, 155.2, 155.0, 147.5, 136.7, 136.6, 130.6, 129.8, 129.3, 129.2, 127.8, 127.6, 126.9, 126.3, 35.7, 34.3, 27.0, 26.7, 26.1, 14.9; IR (ATR); 1668, 1638, 1556  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 455 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 453 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  455.1206, found 455.1204.



[PtH(PMe<sub>2</sub>OH)(PMe<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>H]

**Methyl 5-(4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)butanoyl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (22a).**

To a solution of **11** (40.1 g, 170 mmol) in THF (150 mL), a solution of *i*-PrMgBr (0.78 M in THF, 229 mL, 179 mmol) was added dropwise at –40 °C and stirred at the same temperature for 1.5 h. Next, a solution of 1-*tert*-butoxycarbonyl-2-pyrrolidinone (31.6 g, 170 mmol) in THF (180 mL) was added dropwise at –40 °C. After stirring at the same temperature for 1.5 h and then stirring at room temperature for 1 h, the reaction was quenched with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . The reaction mixture was extracted with AcOEt, and organic layer was washed with water and brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was recrystallized with AcOEt/*n*-hexane to give 29.5 g (51%) of **22a** as a pale-yellow solid:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.98 (s, 1H), 4.64 (br s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.21 (q,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 2.92 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.78 (s, 3H), 1.92 (quint,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 340 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

**Methyl 5-(5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pentanoyl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (22b).**

Compound **22b** was prepared from **11** using the same procedure as described for **22a** to yield a yellow oil (yield 62%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (s, 1H), 4.57 (br s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.21–3.08 (m, 2H), 2.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.78 (s, 3H), 1.76 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.70–1.38 (m, 11H); MS (ESI) *m/z*: 356 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl 2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxylate (23a).**

To a solution of **22a** (29.5 g, 86.4 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 mL), trifluoroacetic acid (17.1 mL, 216 mmol) was added dropwise at 0 °C and stirred at room temperature for 3 h. The mixture was then concentrated under reduced pressure, diluted with CHCl<sub>3</sub>, and washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was separated and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in *i*-PrOH (450 mL). Conc. HCl (45.0 mL) and NaBH<sub>3</sub>CN (10.9 g 173 mmol) were added slowly to the mixture at 0 °C and stirred at the same temperature for 5 h. Next, the reaction mixture was basified with 50% aqueous NaOH to pH 9, evaporated to remove *i*-PrOH and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1 to 4/1) to give 13.6 g (70%) of **23a** as a pale-yellow oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.18 (s, 1H), 4.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.19–3.09 (m, 1H), 3.06–2.96 (m, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.25–2.12 (m, 1H), 2.01–1.72 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 226 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl 2-methyl-5-(piperidin-2-yl)thiophene-3-carboxylate (23b).**

Compound **23b** was prepared from **22b** using the same procedure as described for **23a** to yield a colorless oil (yield 63%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.19 (s, 1H), 3.85–3.76 (m, 4H), 3.19–3.12 (m, 1H), 2.82–2.72 (m, 1H), 2.68 (s, 3H), 1.97–1.81 (m, 2H), 1.57–1.40 (m, 4H); MS (ESI) *m/z*: 240 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl 5-(1-acetylpyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (24a).**

To a mixture of **23a** (50.0 mg, 0.222 mmol) and pyridine (53.6 μL, 0.666 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (1.00 mL), acetyl chloride (47.3 μL, 0.666 mmol) was added at 0 °C and stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub>, washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/*n*-hexane = 3/1 to 9/1) to give 58.0 mg (98%) of **24a** as a colorless oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.12 (s, 1H), 5.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.74–3.45 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.37–1.91 (m, 7H); MS (ESI) *m/z*: 268 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl 5-(1-acetypiperidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (24b).**

Compound **24b** was prepared from **23b** using the same procedure as described for **24a** to yield a colorless

oil (yield 85%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.10 (s, 1H), 6.03 (br s, 1H), 5.16 (br s, 1H), 4.65–4.50 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.71–3.58 (m, 1H), 3.24–3.09 (m, 1H), 2.76–2.62 (m, 3H), 2.25–2.12 (m, 4H), 1.99–1.36 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 282 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **5-(1-Acetylpyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylic acid (25a).**

A mixture of **24a** (34.6 mg, 0.129 mmol), LiOH·H<sub>2</sub>O (16.3 mg, 0.388 mmol), and water (200 μL) in MeOH (1.00 mL) was stirred at 50 °C for 19 h. The mixture was then neutralized with 1 N aqueous HCl at 0 °C and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure to give 32.0 mg (98%) of **25a** as a colorless oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.18 (s, 1H), 5.36 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.76–3.46 (m, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.42–1.88 (m, 7H); MS (ESI) *m/z*: 254 (M+H)<sup>+</sup>, 252 (M–H)<sup>–</sup>.

#### **5-(1-Acetylpiperidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylic acid (25b).**

Compound **25b** was prepared from **24b** using the same procedure as described for **25a** to yield a colorless oil (yield 80%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (s, 1H), 6.04 (br s, 1H), 5.18 (br s, 1H), 4.59 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H), 3.17 (t, *J* = 12.7 Hz, 1H), 2.78–2.62 (m, 3H), 2.28–2.14 (m, 3H), 2.00–1.38 (m, 4H); MS (ESI) *m/z*: 268 (M+H)<sup>+</sup>, 266 (M–H)<sup>–</sup>.

Compounds **26a** and **26b** were prepared from 5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-amine and the appropriate carboxylic acid using the same procedure as described for **16**.

#### **5-(1-Acetylpyrrolidin-2-yl)-*N*-(5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (26a).**

Yield 26%; White solid: mp 173–175 °C; *t*<sub>R</sub> = 2.91 min (UPLC purity: 95.5%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.23 (s, 1H), 5.34–5.26 (m, 1H), 3.81–3.46 (m, 2H), 2.90 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.81–2.63 (m, 5H), 2.53–1.91 (m, 9H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 172.3, 163.5, 163.3, 156.8, 147.4, 144.3, 130.6, 129.5, 124.3, 57.5, 47.4, 34.6, 28.5, 28.3, 27.4, 25.0, 22.5, 15.1; IR (ATR): 1620, 1557, 1532 cm<sup>–1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 376 (M+H)<sup>+</sup>, 374 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 376.1148, found 376.1151.

#### **5-(1-Acetylpiperidin-2-yl)-*N*-(5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (26b).**

Yield 21%; mp 182–183 °C; *t*<sub>R</sub> = 3.25 min (UPLC purity: 97.2%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.63 (br s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.05 (br s, 1H), 5.19 (br s, 1H), 4.58 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 3.67 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.14 (t, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.90 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.79–2.57 (m, 5H), 2.46 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.00–1.38 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.5, 161.3, 160.9, 155.4, 147.4, 141.3, 129.3, 128.5, 123.3, 47.7, 42.8, 28.4, 27.3 (2C), 26.7, 25.9, 21.7, 19.7, 15.3; IR (ATR) 1621, 1531 cm<sup>–1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 390 (M+H)<sup>+</sup>, 388 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 390.1304, found 390.1296.



**Methyl 2-methyl-5-(2-oxopyrrolidin-1-yl)thiophene-3-carboxylate (27a).**

A mixture of **11** (500 mg, 2.13 mmol), 2-pyrrolidone (210 mg, 2.47 mmol), CuI (20.0 mg, 0.105 mmol), *N,N'*-dimethylethylenediamine (18.5 mg, 0.210 mmol), and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (580 mg, 4.20 mmol) in toluene (2.50 mL) was refluxed for 12 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with AcOEt and filtered through celite. The filtrate was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was triturated with 50% (v/v) solution of AcOEt/*n*-hexane to give 166 mg (33%) of **27a** as a white solid: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.73 (s, 1H), 3.89–3.82 (m, 5H), 2.66 (s, 3H), 2.62 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.25 (quint, *J* = 7.7 Hz, 2H); MS (ESI) *m/z*: 240 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl 2-methyl-5-(2-oxopiperidin-1-yl)thiophene-3-carboxylate (27b).**

Compound **27b** was prepared from **11** using the procedure described for **27a** to yield a white solid (yield 17%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.88 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.67–2.58 (m, 5H), 2.08–1.97 (m, 2H) 1.94–1.84 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 254 (M+H)<sup>+</sup>.

Compounds **28a** and **28b** were prepared from the appropriate ester using the same procedure as described for **25a**.

**2-Methyl-5-(2-oxopyrrolidin-1-yl)thiophene-3-carboxylic acid (28a).**

Yield 87%; white solid; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6.82 (s, 1H), 3.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.60 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.24 (quint, *J* = 7.7 Hz, 2H); MS (ESI) *m/z*: 226 (M+H)<sup>+</sup>, 224 (M–H)<sup>–</sup>.

**2-Methyl-5-(2-oxopiperidin-1-yl)thiophene-3-carboxylic acid (28b).**

Yield 80%; colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6.98 (s, 1H), 3.82 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.57 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.05–1.96 (m, 2H), 1.91–1.82 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 240 (M+H)<sup>+</sup>, 238 (M–H)<sup>–</sup>.

Compounds **29a** and **29b** were prepared from 5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-amine and the appropriate carboxylic acid using the same procedure as described for **16**.

***N*-(5,6-Dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-2-methyl-5-(2-oxopyrrolidin-1-yl)thiophene-3-carboxamide (29a).**

Yield 43%; white solid; mp 235–237 °C; *t*<sub>R</sub> = 2.89 min (UPLC purity: 97.9%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.60 (br s, 1H), 6.58 (s, 1H), 3.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.95–2.85 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.71–2.59 (m, 4H), 2.52–2.39 (m, 2H), 2.26 (quint, *J* = 7.7 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.3, 161.6, 161.2, 155.4, 140.0, 136.9, 128.4, 126.0, 108.7, 48.1, 31.0, 27.4, 27.3, 26.8, 17.9, 14.6; IR (ATR) 1679, 1654, 1559, 1526 cm<sup>–1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 348 (M+H)<sup>+</sup>, 346 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 348.0835,

found 348.0840.

***N*-(5,6-Dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-2-methyl-5-(2-oxopiperidin-1-yl)thiophene-3-carboxamide (29b).**

Yield 33%; white solid; mp 192–193 °C;  $t_R$  = 3.04 min (UPLC purity: 97.4%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.89 (br s, 1H), 6.69 (s, 1H), 3.66 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H), 2.93–2.85 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 2.67–2.59 (m, 4H), 2.48–2.38 (m, 2H), 2.05–1.96 (m, 2H), 1.94–1.85 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.9, 162.7, 161.9, 155.1, 141.5, 138.9, 128.1, 125.3, 109.5, 48.4, 32.7, 27.5, 27.1, 26.7, 22.9, 20.5, 14.2; IR (ATR) 1647, 1557, 1523  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 362 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 360 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  362.0991, found 362.0993.

**5-(1-(*tert*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylic acid (30).**

To a solution of **23a** (1.13 g, 5.02 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25.0 mL),  $\text{Et}_3\text{N}$  (839  $\mu\text{L}$ , 6.02 mmol) and  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (1.38 mL, 6.02 mmol) were added at room temperature. After stirring at the same temperature for 1 h, the mixture was evaporated under reduced pressure and azeotroped with toluene. The residue was dissolved in MeOH (15.0 mL) and water (2.50 mL) and  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (634 mg, 15.1 mmol) were added. After stirring at 50 °C for 9 h, the reaction mixture was cooled to 0 °C and neutralized with 1 N aqueous HCl. The precipitate was collected by filtration, rinsed with water, and dried to give 1.49 g (96%) of **30** as a white solid:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.11 (s, 1H), 5.06–4.94 (m, 1H), 3.54–3.36 (m, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.36–2.16 (m, 1H), 2.08–1.87 (m, 3H), 1.53–1.22 (m, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 310 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

Compounds **31a–31c** were prepared from **30** and an appropriate amine using the same procedure as described for **16**.

***tert*-Butyl**

**2-(4-((5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate (31a).**

Yield 69%; white solid;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.89 (br s, 1H), 6.97 (br s, 1H), 5.15–4.86 (m, 1H), 3.62–3.30 (m, 2H), 2.93–2.84 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.65–2.57 (m, 2H), 2.48–2.38 (m, 2H), 2.23 (br s, 1H), 2.03–1.86 (m, 3H), 1.56–1.22 (m, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 434 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 432 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

***tert*-Butyl 2-(5-methyl-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)thiophen-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate (31b).**

Yield 88%; white foam;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.49 (br s, 1H), 7.43 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H), 7.05–6.95 (m, 2H), 5.19–4.93 (m, 1H), 3.63–3.33 (m, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.34–2.16 (m, 1H), 2.08–1.87 (m, 3H), 1.62–1.21 (m, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 394 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 392 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

***tert*-Butyl 2-(4-((5-chlorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate**

**(31c).**

Yield 48%; white foam; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.89 (br s, 1H), 7.18 (br s, 1H), 7.07–6.91 (m, 1H), 5.13–4.91 (m, 1H), 3.60–3.34 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.34–2.18 (m, 1H), 2.07–1.89 (m, 3H), 1.53–1.24 (m, 9H); MS (ESI) *m/z*: 430, 428 (M+H)<sup>+</sup>, 428, 426 (M–H)<sup>–</sup>.

***N*-(5,6-Dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (32a).**

To a solution of **31a** (100 mg, 0.231 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.00 mL), trifluoroacetic acid (266 μL, 3.47 mmol) was added at 0 °C. After stirring at room temperature for 2 h, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with CHCl<sub>3</sub>, washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure to give 75.0 mg (97%) of **32a** as a pale-yellow foam: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.04 (s, 1H), 4.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.18–2.98 (m, 2H), 2.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.50–2.39 (m, 2H), 2.22–2.12 (m, 1H), 2.00–1.68 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 334 (M+H)<sup>+</sup>, 332 (M–H)<sup>–</sup>.

Compounds **32b** and **32c** were prepared from **31b** and **31c**, respectively, using the same procedure as described for **32a**.

**2-Methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)-*N*-(thiazol-2-yl)thiophene-3-carboxamide (32b).**

Yield 97%; pale-yellow foam; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.29 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.96 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.20–3.09 (m, 1H), 3.07–2.97 (m, 1H), 2.76 (s, 3H), 2.24–2.12 (m, 1H), 2.00–1.70 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 294 (M+H)<sup>+</sup>, 292 (M–H)<sup>–</sup>.

***N*-(5-chlorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (32c).**

Yield 70%; pale-yellow foam; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.21 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 4.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.18–2.95 (m, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.28–2.12 (m, 1H), 1.99–1.70 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 330, 328 (M+H)<sup>+</sup>, 328, 326 (M–H)<sup>–</sup>.

***tert*-Butyl**

**(3-(2-(4-((5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*d*]thiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-3-oxopropyl)carbamate (34a).**

A mixture of **32a** (50.0 mg, 0.150 mmol), *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-β-alanine (56.8 mg, 0.300 mmol), EDCI (57.5 mg, 0.300 mmol), HOBt (45.9 mg, 0.300 mmol), and DIPEA (103 μL, 0.600 mmol) in DMF (1.00 mL) was stirred at room temperature for 18 h. The reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1) to give 20.2 mg (27%) of **34a** as a white foam: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ

7.21 (s, 1H), 5.33 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 3.79–3.46 (m, 2H), 3.37–3.20 (m, 2H), 2.90 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.75 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.71–1.96 (m, 11H), 1.36 (m, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 505 (M+H)<sup>+</sup>, 503 (M-H)<sup>-</sup>.

#### ***tert*-Butyl**

#### **(3-(2-(5-methyl-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)thiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-3-oxopropyl)carbamate (34b).**

Compound **34b** was prepared from **32b** using the same procedure as described for **34a** to yield a white foam (yield 62%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.50–7.46 (m, 1H), 7.27–7.23 (m, 1H), 7.15–7.10 (m, 1H), 5.33 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 3.81–3.18 (m, 4H), 2.78–1.93 (m, 9H), 1.41 (s, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 465 (M+H)<sup>+</sup>, 463 (M-H)<sup>-</sup>.

#### ***tert*-Butyl**

#### **(2-(2-(5-methyl-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)thiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate (34c).**

Compound **34c** was prepared from **32b** using the same procedure as described for **34a** to yield a white foam (yield 95%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.37 (br s, 1H), 7.38 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.02–6.93 (m, 1H), 5.85 (br s, 1H), 5.38 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 4.10–3.87 (m, 2H), 3.80–3.41 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.41–1.93 (m, 4H), 1.44 (s, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 451 (M+H)<sup>+</sup>, 449 (M-H)<sup>-</sup>.

#### **5-(1-(Dimethylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methyl-*N*-(thiazol-2-yl)thiophene-3-carboxamide (34d).**

Compound **34d** was prepared from **32b** using the same procedure as described for **34a** to yield a white foam (yield 80%):  $t_R = 1.51$  min (UPLC purity: 96.5%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.51–7.45 (m, 1H), 7.31–7.25 (m, 1H), 7.16–7.10 (m, 1H), 5.35 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 3.82–3.50 (m, 2H), 3.37–3.19 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.44–1.92 (m, 10H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  170.6, 163.8, 160.4, 147.6, 144.4, 138.5, 130.5, 124.5, 114.6, 62.3, 57.8, 47.6, 45.9 (2C), 34.3, 25.2, 15.1; IR (ATR) 1646, 1536 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$ : 379 (M+H)<sup>+</sup>, 377 (M-H)<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 379.1257, found 379.1260.

#### ***N*-(5-Chlorothiazol-2-yl)-5-(1-(dimethylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (34e).**

Compound **34e** was prepared from **32c** using the same procedure as described for **34a** to yield a colorless oil (yield 82%):  $t_R = 2.05$  min (UPLC purity: 98.8%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.37–7.34 (m, 1H), 7.31–7.26 (m, 1H), 5.34 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 3.82–3.53 (m, 2H), 3.35–3.17 (m, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.43–1.93 (m, 10H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  170.6, 163.8, 158.2, 148.3, 144.4, 136.5, 129.8, 124.6, 124.4, 62.4, 57.8, 47.6, 45.9 (2C), 34.3, 25.2, 15.2; IR (ATR); 1653, 1619, 1534 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$ : 415, 413 (M+H)<sup>+</sup>, 413, 411 (M-H)<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 413.0867, found 413.0868.

Compounds **33a–33c** were prepared from **34a–34c**, respectively, using the same procedure as described for **32a**.

**5-(1-(3-Aminopropanoyl)pyrrolidin-2-yl)-N-(5,6-dihydro-4H-cyclopenta[d]thiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (33a).**

Yield 65%; pale-yellow foam;  $t_R$  = 2.12 min (UPLC purity: 100%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.29–7.19 (m, 1H), 5.34 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 3.79–3.50 (m, 2H), 3.02–2.84 (m, 4H), 2.79–2.55 (m, 7H), 2.53–1.93 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  170.9, 163.5, 161.8, 148.6, 144.1, 143.9, 129.7, 125.0, 124.6, 57.7, 48.0, 37.1, 36.8, 32.2, 28.3 (2C), 27.5, 25.0, 15.2; IR (ATR) 1623, 1533  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 405 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 403 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  405.1413, found 405.1408.

**5-(1-(3-Aminopropanoyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methyl-N-(thiazol-2-yl)thiophene-3-carboxamide (33b).**

Yield 27%; pale-yellow foam;  $t_R$  = 1.64 min (UPLC purity: 96.9%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.47 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.15–7.11 (m, 1H), 5.35 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 3.79–3.51 (m, 2H), 3.05–2.86 (m, 2H), 2.78–1.94 (m, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  170.0, 161.6, 158.7, 145.6, 142.4, 137.4, 128.7, 123.1, 113.3, 56.3, 45.5, 37.3, 37.0, 35.3, 23.6, 14.8; IR (ATR); 1617, 1536  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 365 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 363 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  365.1100, found 365.1103.

**5-(1-Glycylpyrrolidin-2-yl)-2-methyl-N-(thiazol-2-yl)thiophene-3-carboxamide (33c).**

Yield 54%; white foam;  $t_R$  = 1.57 min (UPLC purity: 99.0%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.50–7.46 (m, 1H), 7.30–7.27 (m, 1H), 7.15–7.10 (m, 1H), 5.36 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H), 3.80–3.45 (m, 4H), 2.68 (s, 3H), 2.47–1.93 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  161.4, 161.3, 158.3, 145.9, 142.0, 137.4, 128.5, 123.3, 113.5, 55.3, 44.9, 42.3, 32.1, 23.5, 14.8; IR (ATR); 1644, 1533  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 351 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 349 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  351.0944, found 351.0948.

**Methyl (S)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxylate (2R,3R)-2,3-bis(benzoyloxy)succinate (35).**

(–)-Dibenzoyl-L-tartaric acid monohydrate (6.68 g, 17.8 mmol) was dissolved in MeOH (167 mL) at room temperature. A solution of **23a** (4.00 g, 17.8 mmol) in MeOH (100 mL) was added to the above solution. After 10 min, the mixture was inoculated with the optically active salt (> 98% de) of **35**. The resulting mixture was sealed with a stopper and held at room temperature for 9 h. The precipitated solid was collected by suction filtration and rinsed with a small amount of MeOH to give 2.62 g (48% in theory) of **35** as a white solid with 96.6% de (HPLC)\*: mp 188–190 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.01–7.94 (m, 4H), 7.69–7.61 (m, 2H), 7.52 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 4H), 7.41 (s, 1H), 5.70 (s, 2H), 4.72–4.62 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.26–3.08 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.31–2.17 (m, 1H), 2.03–1.78 (m, 3H); MS (ESI)  $m/z$ : 226 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Methyl (R)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxylate (2S,3S)-2,3-bis(benzoyloxy)succinate (39).**

The methanolic mother liquors of the first resolution were evaporated to dryness to give 7.71 g (43.6% de)

of (+)-enriched diastereometric solid, whereby (+)-enriched **23a** was liberated by the extraction of CHCl<sub>3</sub>-saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The resultant (+)-enriched **23a** was optically resolved with (+)-dibenzoyl-D-tartaric acid monohydrate using the same procedure as described for **35** to give **39** (2.47 g, 45% in theory) to yield a white solid with 96.6% de (HPLC)\*: mp, NMR, MS data are the same as for **35**.

\*The analytical conditions were as follows: column, Daicel OD-H; eluent, hexane/isopropanol/diethylamine = 95/5/0.1; rate, 0.5 mL/min; and detection, 254 nm. The retention times for (+)- and (–)-**23a** were 14.9 and 16.6 min, respectively.

**(S)-5-(1-(tert-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylic acid (36).**

Diastereomeric salt **35** (1.96 g, 3.25 mmol) was liberated by the extraction of CHCl<sub>3</sub>-saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The resulting organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure to give liberated amine methyl (S)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxylate as a yellow oil. To a solution of methyl (S)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxylate in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15.0 mL), (Boc)<sub>2</sub>O (860 μL, 3.90 mmol) and Et<sub>3</sub>N (540 μL, 3.90 mmol) were added at room temperature. After stirring at the same temperature for 4 h, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and azeotroped with toluene. MeOH (12.0 mL), water (2.00 mL), and LiOH·H<sub>2</sub>O (480 mg, 11.4 mmol) were added to the resulting mixture, which was stirred at 50 °C for 18 h. After cooling, water was added and the mixture was neutralized with 1 N aqueous HCl at 0 °C. The precipitate was collected to give 950 mg (94%) of **36** as a white solid: <sup>1</sup>H NMR, MS data are the same as for **30**.

**(R)-5-(1-(tert-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylic acid (40).**

Compound **40** was prepared from **39** using the same procedure as described for **36** to yield a white solid (Yield 87%). <sup>1</sup>H NMR, MS data are the same as for **30**.

Compounds **37** and **41** were prepared from **36** and **40**, respectively, using the same procedure as described for **31c**, **32c**, and **34e**.

**(S)-N-(5-Chlorothiazol-2-yl)-5-(1-(dimethylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (37).**

Yield 49%; white foam. <sup>1</sup>H NMR, MS data are the same as for **34e**.

**(R)-N-(5-Chlorothiazol-2-yl)-5-(1-(dimethylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (41).**

Yield 58%; white foam. <sup>1</sup>H NMR, MS data are the same as for **34e**.

**(S)-N-(5-Chlorothiazol-2-yl)-5-(1-(dimethylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide**

**hydrochloride (38).**

To a solution of **37** (583 mg, 1.41 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.00 mL), 4 N HCl in 1,4-dioxane (1.76 mL, 7.05 mmol) was added at 0 °C. After stirring at room temperature for 1.5 h, Et<sub>2</sub>O was added and the resulting precipitate was collected to give 617 mg (97%) of **38** as a white solid: mp 157–159 °C; t<sub>R</sub> = 2.05 min (UPLC purity: 97.6%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.38–7.36 (m, 1H), 7.34–7.32 (m, 1H), 5.40 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.29–4.17 (m, 2H), 3.85–3.45 (m, 2H), 3.05–2.61 (m, 9H), 2.50–1.97 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 164.5, 163.6, 158.1, 148.7, 143.4, 136.5, 129.9, 125.2, 124.9, 59.5, 58.3, 47.2, 45.0, 44.9, 34.3, 25.1, 15.2; IR (ATR) 1644, 1533 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 415, 413 (M+H)<sup>+</sup>, 413, 411 (M-H)<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 413.0867 found 413.0865; [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> -77.7 (c 0.556, MeOH).

**(R)-N-(5-Chlorothiazol-2-yl)-5-(1-(dimethylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide hydrochloride (42).**

Compound **42** was prepared from **41** using the same procedure as described for **38** to yield a white solid (yield 70%); t<sub>R</sub> = 2.07 min (UPLC purity: 95.7%); <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR, MS, HRMS data are the same as for **38**; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +80.9 (c 1.00, MeOH).

Compounds **43a** and **43b** were prepared from **32c** using the procedure described for **34a**.

**tert-Butyl****(2-(2-(4-((5-chlorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate (43a).**

Yield 99%; white solid; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.89 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 5.36–5.27 (m, 1H), 3.99–3.84 (m, 2H), 3.78–3.50 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.48–1.89 (m, 4H), 1.48–1.37 (m, 9H); MS (ESI) *m/z*: 487, 485 (M+H)<sup>+</sup>, 485, 483 (M-H)<sup>-</sup>.

**tert-Butyl****(2-(2-(4-((5-chlorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl)carbamate (43b).**

Yield 90%; pale-yellow foam; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.23 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 5.38 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.22–3.45 (m, 4H), 2.96 (s, 3H), 2.76 (s, 3H), 2.40–1.81 (m, 4H), 1.59–1.34 (m, 9H); MS (ESI) *m/z*: 501, 499 (M+H)<sup>+</sup>, 499, 497 (M-H)<sup>-</sup>.

Compounds **44a** and **44b** were prepared from **43a** and **43b**, respectively, using the same procedure as described for **32a**.

**N-(5-Chlorothiazol-2-yl)-5-(1-glycylpyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (44a).**

Yield 93%; white foam; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.35–7.27 (m, 2H), 5.34 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.78–

3.39 (m, 4H), 2.66 (s, 3H), 2.43–1.91 (m, 4H); MS (ESI)  $m/z$ : 387, 385 (M+H)<sup>+</sup>, 385, 383 (M–H)<sup>–</sup>.

***N*-(5-Chlorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-(1-(methylglycyl)pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (44b).**

Yield 89%; white foam; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.21 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 5.39 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 3.80–3.34 (m, 4H), 2.71 (s, 3H), 2.49–1.81 (m, 7H); MS (ESI)  $m/z$ : 401, 399 (M+H)<sup>+</sup>, 399, 397 (M–H)<sup>–</sup>.

***N*-(5-Chlorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-(1-((methylsulfonyl)glycyl)pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (45a).**

To a solution of **44a** (96.2 mg, 0.250 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.00 mL), methanesulfonyl chloride (39.0 μL, 0.500 mmol) and pyridine (41.0 μL, 0.500 mmol) were added at 0 °C. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h, it was diluted with CHCl<sub>3</sub>, washed with water, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by preparative TLC on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10/1) gave 93.5 mg (81%) of **45a** as a white solid: mp 208–210 °C;  $t_R$  = 2.95 min (UPLC purity: 97.8%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.37–7.24 (m, 2H), 5.36–5.27 (m, 1H), 4.10–3.95 (m, 2H), 3.79–3.51 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.67 (s, 3H), 2.44–1.92 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 169.4, 163.4, 158.0, 148.8, 143.8, 136.4, 129.4, 124.5, 121.1, 58.1, 47.8, 47.1, 46.1, 34.3, 25.0, 15.3; IR (ATR); 1649, 1537 cm<sup>–1</sup>; MS (ESI)  $m/z$ : 465, 463 (M+H)<sup>+</sup>, 463, 461 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>3</sub> (M+H)<sup>+</sup> 463.0329, found 463.0331.

***N*-(5-Chlorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-(1-(*N*-methyl-*N*-(methylsulfonyl)glycyl)pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (45b).**

Compound **45b** was prepared from **44b** using the same procedure as described for **45a** to yield a white solid (yield 69%): mp 225–226 °C;  $t_R$  = 3.14 min (UPLC purity: 98.3%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.4 (br s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 5.39–5.31 (m, 1H), 4.19–3.97 (m, 2H), 3.80–3.43 (m, 2H), 3.05–2.98 (m, 6H), 2.74 (s, 3H), 2.44–1.86 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.0, 161.3, 156.9, 148.1, 142.9, 134.7, 128.2, 123.5, 122.6, 56.6, 52.2, 46.2, 38.5, 35.7, 33.0, 24.5, 15.3; IR (ATR); 1643, 1534 cm<sup>–1</sup>; MS (ESI)  $m/z$ : 479, 477 (M+H)<sup>+</sup>, 477, 475 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>3</sub> (M+H)<sup>+</sup> 477.0486, found 477.0484.

**5-(1-(Acetylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-*N*-(5-chlorothiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (46a).**

To a solution of **44a** (96.2 mg, 0.250 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.00 mL), acetyl chloride (36.0 μL, 0.500 mmol) and pyridine (41.0 μL, 0.500 mmol) were added at 0 °C. After stirring at room temperature for 6 h, the reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub>, washed with water, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by preparative TLC on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10/1) to give 90.6 mg (85%) of **46a** as a white solid: mp 122–124 °C;  $t_R$  = 2.75 min (UPLC purity: 99.8%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.67 (br s, 1H), 7.45–7.34 (m, 1H), 7.19 (s, 1H),



5.35–5.29 (m, 1H), 4.34–4.23 (m, 1H), 4.05–3.87 (m, 1H), 3.77–3.41 (m, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.39–1.79 (m, 7H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.9, 167.6, 161.2, 161.0, 156.4, 148.6, 141.8, 134.9, 127.8, 123.2, 56.7, 46.0, 42.4, 33.2, 29.7, 22.9, 15.4; IR (ATR) 1651, 1614, 1530  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 429, 427 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 427, 425 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  427.0660 found 427.0661.

**5-(1-(*N*-Acetyl-*N*-methylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-*N*-(5-chlorothiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (46b).**

Compound **46b** was prepared from **44b** using the same procedure as described for **46a** to yield a white solid (yield 74%); mp 141–142 °C;  $t_R$  = 2.87 min (UPLC purity: 98.7%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.17 (br s, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 1H), 7.29–7.22 (m, 1H), 5.35 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 4.62 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H), 3.97–3.87 (m, 1H), 3.59–3.41 (m, 2H), 3.22 (s, 3H), 2.75 (s, 3H), 2.37–1.74 (m, 7H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.9, 167.7, 162.0, 161.6, 156.8, 149.2, 140.3, 135.2, 125.6, 124.3, 56.8, 51.3, 46.0, 39.0, 33.2, 23.7, 21.2, 15.5; IR (ATR); 1647, 1622, 1533  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 443, 441 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 441, 439 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  441.0816, found 441.0818.

**5-(1-(2-Chloroacetyl)pyrrolidin-2-yl)-*N*-(5-chlorothiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (47).**

To a solution of **32c** (250 mg, 0.763 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8.00 mL), 2,6-di-*tert*-butylpyridine (359  $\mu\text{L}$ , 1.60 mmol) and chloroacetyl chloride (122  $\mu\text{L}$ , 1.53 mmol) were added at 0 °C. After stirring at room temperature for 3 h, the reaction mixture was diluted with  $\text{CHCl}_3$  and washed with water and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography ( $\text{AcOEt}/n\text{-hexane}$  = 1/1) to give 257 mg (83%) of **47** as a white solid:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.60 (br s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.42–5.37 (m, 1H), 4.14–4.09 (m, 1H), 4.01–3.83 (m, 1H), 3.82–3.73 (m, 1H), 3.70–3.60 (m, 1H), 2.71 (s, 3H), 2.49–1.94 (m, 4H); MS (ESI)  $m/z$ : 406, 404 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 404, 402 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

***tert*-Butyl**

**(2-(2-(4-((5-chlorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)glycinate (48).**

A mixture of glycine *tert*-butyl ester hydrochloride (93.9 mg, 0.560 mmol) and DIPEA (115  $\mu\text{L}$ , 0.672 mmol) in DMF (1.00 mL) was stirred at 50 °C for 5 min. After the addition of **47** (45.4 mg, 0.112 mmol) in DMF (1.00 mL) at 50 °C, the reaction mixture was stirred at the same temperature for 2 h, diluted with water, and extracted with  $\text{AcOEt}$ . The organic layer was washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  and brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by preparative TLC on silica gel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  = 10/1) to give 37.7 mg (68%) of **48** as a white foam:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.31–7.14 (m, 2H), 5.39 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 3.79–3.19 (m, 6H), 2.68 (s, 3H), 2.41–1.84 (m, 4H), 1.44 (s, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 501, 499 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 499, 497 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

**(2-(2-(4-((5-Chlorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)glycine hydrochloride (49).**

To a solution of **48** (112 mg, 0.224 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.00 mL), 4 N HCl in 1,4-dioxane (1.70 mL, 6.72 mmol) was added at 0 °C. After stirring at room temperature for 4 h, the reaction mixture was diluted with Et<sub>2</sub>O and stirred for 30 min. The precipitate was collected and rinsed with Et<sub>2</sub>O to give 85.0 mg (79%) of **49** as a white solid: mp 174–176 °C; t<sub>R</sub> = 2.17 min (UPLC purity: 95.0%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.41–7.37 (m, 1H), 7.35 (s, 1H), 5.39 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.14 (s, 2H), 4.02–3.44 (m, 4H), 2.68 (s, 3H), 2.61–1.95 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 169.0, 165.4, 162.9, 159.3, 150.7, 143.3, 133.7, 128.6, 125.4, 124.9, 58.4, 48.4, 47.3, 34.5, 24.9, 22.7, 15.6; IR (ATR); 1647, 1547 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* 445, 443 (M+H)<sup>+</sup>, 443, 441 (M-H)<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 443.0609, found 443.0610.

***tert*-Butyl**

***N*-(2-(2-(4-((5-chlorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)-*N*-ethylglycinate (50).**

To a solution of **44b** (30.0 mg, 0.0752 mmol) in DMF (1.00 mL), *tert*-butyl chloroacetate (11.9 μL, 0.0827 mmol) and DIPEA (38.7 μL, 0.226 mmol) were added at room temperature and further stirred at 60 °C for 4 h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by preparative TLC on silica gel (AcOEt/MeOH = 10/1) to give 28.0 mg (73%) of **50** as a colorless oil: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.26 (br s, 1H), 7.28–7.11 (m, 2H), 5.37 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.82–3.55 (2H, m), 3.50–3.15 (4H, m), 2.72 (3H, s), 2.55–1.89 (7H, m), 1.46 (9H, s); MS (ESI) *m/z*: 515, 513 (M+H)<sup>+</sup>, 513, 511 (M-H)<sup>-</sup>.

***N*-(2-(2-(4-((5-Chlorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)-*N*-methylglycine hydrochloride (51).**

Compound **51** was prepared from **50** using the same procedure as described for **49** to yield a white solid (yield 76%): mp 162–164 °C; t<sub>R</sub> = 2.23 min (UPLC purity: 97.7%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.42–7.29 (m, 2H), 5.41 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.59–3.99 (m, 4H), 3.86–3.45 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 2.51–1.98 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 168.3, 164.6, 162.9, 159.8, 151.1, 143.1, 132.7, 128.6, 125.5, 124.8, 58.4, 57.0, 48.0, 44.3, 34.4, 24.8, 22.7, 15.5; IR (ATR); 1650, 1567 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 459, 457 (M+H)<sup>+</sup>, 457, 455 (M-H)<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 457.0765, found 457.0766.

***tert*-Butyl 2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate (52).**

To a suspension of **30** (1.56 g, 5.02 mmol) in toluene (16.0 mL), oxalyl chloride (4.30 mL, 50.2 mmol) was

added at 0 °C. After stirring at room temperature for 1 h, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was azeotroped with toluene and dissolved with toluene (16.0 mL), 2-amino-5-fluorothiazole hydrochloride (1.16 g, 7.53 mmol) and *N,N*-diethylaniline (3.20 mL, 20.9 mmol), which were added at room temperature. After stirring at the same temperature overnight, the reaction mixture was diluted with AcOEt, washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After filtration, the solvent was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/*n*-hexane = 2/3) to give 1.62 g (78%) of **52** as a white solid: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.24 (br s, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.10–4.99 (m, 1H), 3.59–3.41 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.39–2.22 (m, 1H), 2.13–1.89 (m, 3H), 1.61–1.24 (m, 9H); MS (ESI) *m/z*: 412 (M+H)<sup>+</sup>, 410 (M–H)<sup>–</sup>.

***N*-(5-Fluorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (53).**

Compound **53** was prepared from **52** using the same procedure as described for **32a** to yield a white foam (yield 99%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.06 (s, 1H), 6.87 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.17–3.07 (1H, m), 3.06–2.94 (m, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.24–2.09 (m, 1H), 2.00–1.64 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 312 (M+H)<sup>+</sup>, 310 (M–H)<sup>–</sup>.

***tert*-Butyl**

**(2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl) carbamate (54).**

Compound **54** was prepared from **53** using the same procedure as described for **34a** to yield a white foam (yield 98%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.88 (br s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.01–6.92 (m, 1H), 5.38 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.16–4.05 (m, 1H), 3.97–3.86 (m, 1H), 3.82–3.44 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.75 (s, 3H), 2.41–1.73 (m, 4H), 1.53–1.34 (m, 9H); MS (ESI) *m/z*: 483 (M+H)<sup>+</sup>, 481 (M–H)<sup>–</sup>.

***N*-(5-Fluorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-(1-(methylglycyl)pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (55).**

Compound **55** was prepared from **54** using the same procedure as described for **32a** to yield a white foam (yield 99%) : <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.29–7.24 (m, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.79–3.41 (m, 4H), 2.67 (s, 3H), 2.47–1.93 (m, 7H); MS (ESI) *m/z*: 383 (M+H)<sup>+</sup>, 381 (M–H)<sup>–</sup>.

***tert*-Butyl**

***N*-(2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)-*N*-methylglycinate (56a).**

Compound **56a** was prepared from **55** using the same procedure as described for **50** to yield a white solid (yield 70%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.09 (br s, 1H), 7.12 (1H, s), 6.92 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.83–3.55 (m, 2H), 3.51–3.13 (m, 4H), 2.71 (s, 3H), 2.52–1.90 (m, 7H), 1.46 (s, 9H); MS (ESI) *m/z*: 497 (M+H)<sup>+</sup>, 495 (M–H)<sup>–</sup>.

#### ***tert*-Butyl**

#### **3-((2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl)amino)propanoate (56b).**

To a solution of **55** (46.0 mg, 0.120 mmol) in 1,4-dioxane (1.00 mL), *tert*-butyl acrylate (87.7  $\mu$ L, 0.602 mmol) and 1 portion of benzyltrimethylammonium hydroxide (40 wt.% in MeOH) were added at room temperature. After stirring at 60 °C overnight, the mixture was evaporated under reduced pressure and azeotroped with toluene. The residue was purified by preparative TLC on silica gel (AcOEt/MeOH = 9/1) to give 13.8 mg (22%) of **56b** as a white solid:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.32–7.26 (m, 1H), 7.14–7.10 (m, 1H), 5.32 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 3.89–3.49 (m, 2H), 3.41–3.17 (m, 2H), 2.86–2.59 (m, 5H), 2.50–1.92 (m, 9H), 1.43 (s, 9H); MS (ESI)  $m/z$ : 511 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 509 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

#### ***tert*-Butyl**

#### **4-((2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl)amino)butanoate (56c).**

Compound **56c** was prepared from **55** using the same procedure as described for **50** to yield a colorless oil (yield 36%):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.32–7.23 (m, 1H), 7.14–7.08 (m, 1H), 5.33 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H), 3.88–3.46 (2H, m), 3.44–3.19 (2H, m), 2.66 (s, 3H), 2.57–1.93 (m, 11H), 1.82–1.57 (2H, m), 1.50–1.37 (9H, m); MS (ESI)  $m/z$ : 525 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 523 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

#### **Methyl**

#### **5-((2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl)amino)pentanoate (56d).**

Compound **56d** was prepared from **55** using the same procedure as described for **50** to yield a white solid (Yield 77%):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.26 (s, 1H), 7.14–7.10 (m, 1H), 5.36–5.30 (m, 1H), 3.88–3.49 (m, 5H), 3.42–3.17 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.55–1.82 (m, 11H), 1.74–1.25 (m, 4H); MS (ESI)  $m/z$ : 497 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 495 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ .

Compounds **57a–57c** were prepared from **56a–56c**, respectively, using the same procedure as described for **49**.

#### ***N*-(2-(2-(4-((5-Fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)-*N*-methylglycine hydrochloride (57a).**

Yield 97%; white solid; mp 164–165 °C;  $t_R$  = 2.00 min (UPLC purity: 98.0%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.34–7.28 (m, 1H), 7.20–7.13 (m, 1H), 5.40 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 4.56–4.00 (m, 4H), 3.67–3.49 (m, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.74–2.65 (m, 3H), 2.50–1.98 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  176.1, 168.2, 164.5, 163.1, 159.4 (d,  $J$  = 294 Hz), 150.6, 143.1, 129.1, 124.9, 116.6 (d,  $J$  = 16 Hz), 58.4, 58.2, 48.1, 47.1,

44.2, 34.3, 24.9, 15.3; IR (ATR); 1664, 1648, 1558, 1206  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 441 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 439 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FN}_4\text{O}_4\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 441.1061, found 441.1060.

**3-((2-(2-(4-((5-Fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl)amino)propanoic acid hydrochloride (57b).**

Yield 68%; pale-yellow solid; mp 142–144 °C;  $t_{\text{R}}$  = 2.02 min (UPLC purity: 97.9%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.36–7.30 (m, 1H), 7.19–7.12 (m, 1H), 5.39 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 4.52–4.17 (m, 2H), 3.92–3.40 (m, 4H), 3.04–2.63 (m, 8H), 2.51–1.97 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  173.7, 164.7, 164.6, 163.2, 159.9 (d,  $J$  = 276 Hz), 149.5, 143.0, 129.3, 124.8, 118.4 (d,  $J$  = 13 Hz), 58.4, 54.1, 47.2, 42.9, 34.3, 29.6, 25.0, 22.7, 15.3; IR (ATR); 1652, 1558, 1196  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 455 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 453 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_4\text{O}_4\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 455.1217, found 455.1214.

**4-((2-(2-(4-((5-Fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl)amino)butanoic acid hydrochloride (57c).**

Yield 99%; white solid; mp 125–126 °C;  $t_{\text{R}}$  = 2.03 min (UPLC purity: 95.5%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.38–7.31 (m, 1H), 7.23–7.17 (m, 1H), 5.39 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H), 4.49–4.17 (m, 2H), 3.90–3.50 (m, 2H), 3.39–3.03 (m, 2H), 2.99–2.89 (m, 3H), 2.74–2.65 (m, 3H), 2.54–1.78 (m, 8H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.6, 164.6, 162.9, 159.0 (d,  $J$  = 289 Hz), 157.9, 151.0, 143.4, 128.6, 124.7, 115.4 (d,  $J$  = 11 Hz), 58.3, 58.2, 58.1, 47.2, 42.9, 34.3, 31.4, 24.8, 20.8, 15.5; IR (ATR); 1648, 1557  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 469 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 467 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{FN}_4\text{O}_4\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 469.1374, found 469.1368.

**5-((2-(2-(4-((5-Fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl)amino)pentanoic acid hydrochloride (57d).**

To a solution of **56d** (63.0 mg, 0.127 mmol) in MeOH (1.00 mL), 1 N aqueous NaOH (500  $\mu\text{L}$ , 0.500 mmol) was added at room temperature. After stirring at room temperature for 5 h, the reaction mixture was acidified with 4 N HCl in 1,4-dioxane (500  $\mu\text{L}$ , 2.00 mmol) at 0 °C. After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was evaporated and the residue was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 57.6 mg (87%) of **57d** as a pale-yellow solid: mp 126–128 °C;  $t_{\text{R}}$  = 2.02 min (UPLC purity: 100%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.29 (s, 1H), 7.15–7.11 (m, 1H), 5.37 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H), 4.38–4.10 (m, 2H), 3.84–3.48 (m, 2H), 3.24–3.06 (m, 2H), 2.98–2.86 (m, 3H), 2.83–2.60 (m, 3H), 2.47–1.96 (m, 6H), 1.84–1.46 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  173.5, 164.7, 164.6, 163.1, 159.6 (d,  $J$  = 283 Hz), 150.0, 143.4, 129.2, 124.8, 116.9 (d,  $J$  = 12 Hz), 58.6, 58.4, 58.3, 47.4, 42.7, 34.4, 33.9, 24.9, 27.8, 20.6, 15.4; IR (ATR); 1648, 1560, 1279  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 483 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 481 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{FN}_4\text{O}_4\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 483.1530, found 483.1525.

**(S)-N-(5-Fluorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (58).**

Compound **58** was prepared from **36** using the procedure described for **52** and **53** to yield a white foam

(58% 2 steps): <sup>1</sup>H NMR, MS data are the same as for **53**.

Compounds **59b** and **59c** were prepared from **58** and the appropriate carboxylic acid using the procedure described for **34a**.

***tert*-Butyl**

**((*S*)-1-((*S*)-2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-1-oxopropan-2-yl)(methyl)carbamate (**59b**).**

Yield 82%; white solid; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.24 (s, 1H), 7.14–7.12 (m, 1H), 5.35–5.20 (m, 1H), 4.98–4.70 (m, 1H), 3.84–3.72 (m, 1H), 3.71–3.56 (m, 1H), 2.85 (s, 3H), 2.67 (s, 3H), 2.37–1.91 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.39–1.17 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 497 (M+H)<sup>+</sup>, 495 (M–H)<sup>–</sup>.

***tert*-Butyl**

**(*S*)-ethyl(2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)carbamate (**59c**).**

Yield 83%; white solid; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.34 (br s, 1H), 7.18–7.10 (m, 1H), 6.96–6.78 (m, 1H), 5.38 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.17–3.87 (m, 2H), 3.79–3.14 (m, 4H), 2.75 (s, 3H), 2.42–1.77 (m, 4H), 1.52–1.33 (m, 9H), 1.16–0.98 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 497 (M+H)<sup>+</sup>, 495 (M–H)<sup>–</sup>.

Compounds **60b** and **60c** were prepared from **59b** and **59c**, respectively, using the procedure described for **32a**.

***N*-(5-Fluorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-((*S*)-1-(methyl-*L*-alanyl)pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (**60b**).**

Yield 88%; white solid; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.24 (s, 1H), 7.15–7.10 (m, 1H), 5.45–5.37 (m, 1H), 3.85–3.68 (m, 2H), 3.62–3.47 (m, 1H), 2.66 (s, 3H), 2.48–1.95 (m, 7H), 1.33–1.21 (m, 3H); MS (ESI) *m/z*: 397 (M+H)<sup>+</sup>, 395 (M–H)<sup>–</sup>.

**(*S*)-5-(1-(Ethylglycyl)pyrrolidin-2-yl)-*N*-(5-fluorothiazol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (**60c**).**

Yield 87%; white solid; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.52 (br s, 1H), 9.05 (br s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.03–6.91 (m, 1H), 5.13 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.16–3.58 (m, 4H), 3.31–3.00 (m, 2H), 2.78–2.57 (m, 3H), 2.35–1.79 (m, 4H), 1.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI) *m/z*: 397 (M+H)<sup>+</sup>, 395 (M–H)<sup>–</sup>.

***tert*-Butyl**

***N*-((*S*)-1-((*S*)-2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-1-oxopropan-2-yl)-*N*-methylglycinate (**61b**).**

Compound **61b** was prepared from **60b** using the same procedure as described for **50** to yield a white solid (32%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.24–7.22 (m, 1H), 7.14–7.11 (m, 1H), 5.36–5.30 (m, 1H), 4.05–3.94 (m, 1H), 3.85–3.61 (m, 3H), 3.57–3.24 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.44–1.93 (m, 7H), 1.47 (s, 9H), 1.20 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); MS (ESI) *m/z*: 511 (M+H)<sup>+</sup>, 509 (M–H)<sup>–</sup>.

#### ***tert*-Butyl**

**(*S*)-*N*-ethyl-*N*-(2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)glycinate (61c).**

Compound **61c** was prepared from **60c** using the same procedure as described for **50** to yield a white solid (60%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.60 (br s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.37–5.31 (m, 1H), 3.83–3.54 (m, 2H), 3.51–3.19 (m, 4H), 2.81–2.58 (m, 5H), 2.38–1.84 (m, 4H), 1.52–1.34 (m, 9H), 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (ESI) *m/z*: 511 (M+H)<sup>+</sup>, 509 (M–H)<sup>–</sup>.

**(*S*)-3-((2-(2-(4-((5-Fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)(methyl)amino)propanoic acid hydrochloride (62a).**

Compound **62a** was prepared from **58** using the same procedure as described for **54**, **55**, **56b**, and **57b** to yield a white solid (yield 38% 4 steps): mp 140–141 °C; *t<sub>R</sub>* = 1.92 min (UPLC purity: 96.2%); <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR, MS, HRMS data are same as **57b**; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> –91.4 (c 1.00, MeOH).

***N*-((*S*)-1-((*S*)-2-(4-((5-Fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-1-oxopropan-2-yl)-*N*-methylglycine hydrochloride (62b).**

Compound **62b** was prepared from **61b** using the same procedure as described for **49** to yield a pale-yellow solid (yield 71%): mp 155–157 °C, *t<sub>R</sub>* = 2.03 min (UPLC purity: 95.3%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.30 (s, 1H), 7.21–7.15 (m, 1H), 5.47–5.34 (m, 1H), 4.64–4.51 (m, 1H), 4.25–3.93 (m, 2H), 3.79–3.65 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.76–2.61 (m, 3H), 2.53–1.96 (m, 4H), 1.67–1.53 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 173.4, 168.6 (2C), 163.5, 160.0 (d, *J* = 296 Hz), 148.4, 143.4, 130.1, 124.8, 118.7 (d, *J* = 13 Hz), 63.4, 58.6, 58.4, 48.3, 34.3, 25.5, 20.5, 15.4, 15.2; IR (ATR): 1644, 1561, 1221 cm<sup>–1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 455 (M+H)<sup>+</sup>, 453 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 455.1222, found 455.1216; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> –74.0 (c 0.973, MeOH).

**(*S*)-*N*-Ethyl-*N*-(2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)glycine hydrochloride (63·HCl).**

Compound **63·HCl** was prepared using the same procedure as described for **49** to yield a white solid (yield 99%). Here, 4 N HCl in AcOEt was used instead of 4 N HCl in 1,4-dioxane: mp 165–167 °C, *t<sub>R</sub>* = 2.08 min (UPLC purity: 98.8%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.39 (br s, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.61–4.02 (m, 4H), 3.87–3.32 (m, 4H), 2.73–2.62 (m, 3H), 2.50–2.26 (m, 1H), 2.20–1.94 (m, 3H), 1.47–1.27 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 168.5, 165.1, 163.1, 162.8, 159.4 (d, *J* = 290 Hz),

150.6, 143.0, 128.7, 125.0, 117.5 (d,  $J = 15$  Hz), 58.6, 57.0, 55.0, 54.3, 48.1, 34.5, 22.7, 15.4, 9.7; IR (ATR) 1651, 1568, 1195  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 455 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 453 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_4\text{O}_4\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 455.1217 found 455.1213;  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -110$  (c 1.00, MeOH).

**(S)-N-Ethyl-N-(2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)glycine (63).**

A solution of **63**·HCl (51.2 g, 102 mmol) in MeOH (5.10 L) and Milli-Q water (0.570 L) was adjusted at pH 5.81 (isoelectric point) by the addition of 1 N aqueous NaOH at room temperature. The resulting solution was evaporated to remove MeOH and diluted with Milli-Q water (1.70 L). The mixture was inoculated with **63** and stirred at room temperature for 10 h, and the resulting precipitate was corrected and rinsed with Milli-Q water to give **63** (39.1 g, 84 %) as a white solid: mp 221–223 °C,  $t_{\text{R}} = 2.08$  min (UPLC purity: 98.9%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.32 (br s, 1H), 7.12 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 5.40–5.33 (m, 1H), 4.35–4.17 (m, 2H), 3.92–3.50 (m, 4H), 3.40–3.19 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.48–1.95 (m, 4H), 1.32 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  170.2, 165.8, 165.6, 163.4, 160.1 (d,  $J = 291$  Hz), 148.6, 143.3, 129.9, 125.0, 118.9 (d,  $J = 13$  Hz), 58.4, 57.8, 56.3, 52.8, 47.2, 34.4, 25.1, 15.3, 10.1; IR (ATR) 1639, 1556, 1190  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 455 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 453 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_4\text{O}_4\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 455.1217, found 455.1213;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -123$  (c 1.00, DMSO).

## Biology

### Glucokinase assay

The in vitro GK activation potency of compounds was assessed as described previously.<sup>48</sup> In 96-well UV plates, 178  $\mu\text{L}$ /well of GK assay mixture (25 mM HEPES buffer [pH 7.1], 25 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM NADP, 1 mM dithiothreitol, 2 unit/mL G6PDH, 5 mM D-glucose, and human GK) was added. After the addition of 2  $\mu\text{L}$  of test compound, positive control (**1**), or negative control (DMSO), the mixture was incubated at room temperature for 10 min. Reactions were initiated by the addition of 20  $\mu\text{L}$  of 20 mM ATP. An absorbance of 340 nm was measured using a Spectra Max Plus 384 Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA) for 5 min at intervals of 30 s at room temperature and the slope of absorption against time was calculated at the first 3 min.

### Measurement of insulin secretion

MIN6 cells were seeded onto 24-well plates and precultured in DMEM containing 10% FBS and 61.6  $\mu\text{M}$  of  $\beta$ -mercaptoethanol for 2 days. The cells were washed with HEPES balanced Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRH) with 2 mM glucose and incubated in KRH at 37 °C under 5%  $\text{CO}_2$  in air for 45 min. Next, the KRH buffer containing glucose was replaced with test compounds, positive control (**1**), or negative control (DMSO). After incubation at 37 °C under 5%  $\text{CO}_2$  in air for 45 min, released insulin was measured according to the manufacture's protocol (Mouse Insulin ELISA KIT [TMB]; AKRIN-011T, Shibayagi,



Gunma, Japan).

### **Solubility test**

Five microliters of compound at various concentrations (serial dilutions 8  $\mu$ M–2 mM) was transferred to measurement plates (Coster, no. 3631) and 95  $\mu$ L of PBS was added. The solubility of compounds was measured by nephelometry using a NEPHELOstar microplate reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany). Before the experiment, blank values of the wells were measured. The data from the well in which blank value was lower than the mean blank value + 2SD was used.

### **SPA-based dofetilide binding assay (hERG binding assay)**

A scintillation proximity assay (SPA) was carried out in assay buffer consisting of 50 mM Tris-Cl, 1.0 mM  $MgCl_2$ , and 10 mM KCl, pH 7.4. Test compounds were mixed with [ $^3H$ ]-dofetilide at a final concentration 10 nM, Ysi poly-L-lysine SPA beads, and hERG-HEK293 cell membrane and shaken for 1 h. Beads were allowed to settle for 3 h before radioactivity was determined by scintillation counting using a MicroBeta TRILUX scintillation counter (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, CT, USA). Negative control (DMSO, 0% inhibition) and positive control (E-4031, nonspecific binding, 100% inhibition) were used to normalize the raw data.

### **Cell viability measurements (CHO-K1 cells)**

CHO-K1 cells were seeded onto a 96-well plate at a density of 6000 cells/well in Ham's F12K media containing 2% FBS, 1 mM L-glutamine, 25 units/mL penicillin, and 25  $\mu$ g/mL streptomycin and incubated overnight at 37 °C under 5%  $CO_2$  in air. Next, cells were exposed to each concentration of **63** (final concentrations 1–100  $\mu$ M), positive control (benzbromarone), or vehicle control (1%DMSO). Following drug incubation for 24 h, cell viability was assessed using WST-1 reagent according to the manufacturer's instructions.

### **Cell viability measurements (primary rat hepatocytes)**

Rat primary hepatocytes were isolated from a male Crj: CD (SD) rat (7 weeks old) using a two-step collagenase perfusion method. After washing in cold MEM media, hepatocytes were suspended in modified-WE media in the presence of 10% FBS,  $10^{-10}$  M dexamethasone,  $10^{-9}$  M insulin, 4 mM L-glutamine, 50 units/mL penicillin, and 50  $\mu$ g/mL streptomycin. Viable hepatocytes were seeded onto a collagen-coated 96-well plate at a density of  $2\text{--}3 \times 10^4$  cells/well and incubated at 37 °C under 5%  $CO_2$  in air. After 4 h, the culture medium was removed from each well and replaced with modified-WE media in the absence of FBS. At 20–24 h after seeding, hepatocytes were exposed to each concentration of **63** (final concentrations 1–100  $\mu$ M), positive control (benzbromarone), or vehicle control (1%DMSO). Following drug incubation for 24 h, cell viability was assessed using alamarBlue® according to the manufacturer's instructions.

### **hERG patch clamp assay**

Experiments were performed using HEK293 cells stably expressing the hERG potassium channel. hERG currents were measured using a whole-cell patch clamp technique. Cells were placed in the recording chamber and continuously perfused at a rate of 120 mL/h with perfusing solution at  $26.0 \pm 2.0$  °C. The perfusing solution was composed of the following (mM): NaCl 137; KCl 4; CaCl<sub>2</sub> 1.8; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 10; D-glucose 10; pH 7.4. The pipette solution was composed of the following (mM): KCl 130; EGTA 5; HEPES 10; MgCl<sub>2</sub> 1; MgATP 5; pH 7.2. The membrane potential was held at  $-80$  mV. A depolarization pulse at  $-40$  mV to  $+20$  mV (4 steps) was applied for 1.5 s, with a subsequent repolarization pulse at  $-50$  mV for 1.5 s. This cycle was repeated every 15 s. Each concentrations of **63** (3, 10, 30, 100, and 300  $\mu$ M), a positive control (E-4031), and a vehicle control (0.1% DMSO) was applied to the cells. The hERG currents were measured with an amplifier EPC 8 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Germany), and the electric signals were recorded using analysis software (pClamp 9, Axon Instruments, Inc.).

### **Animal Study**

All Experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the testing facility, SANWA KAGAKU KENKYUSHO. Male C57BL/6J mice (8 weeks old), B6.Cg-Lepob/J (ob/ob) mice (8 or 9 weeks old) or male Crlj:CD1 (ICR) mice (8 weeks old) were obtained from Charles River Laboratories Japan, Inc.

### **Oral glucose tolerance test in mice**

Male C57BL/6J mice (8 weeks old) or B6.Cg-*Lep<sup>ob</sup>*/J (ob/ob) mice (8 weeks old) were obtained from Charles River Laboratories Japan, Inc. Compounds were administered orally (vehicle; 0.5% methylcellulose [MC]) to overnight-fasted animals ( $n = 8$ /group) 15 or 30 min before glucose loading (2 g/kg). Tail vein blood glucose levels were measured at  $-15$  or  $-30$ , 0, 20, 40, 60, 90, and 120 min using a portable glucometer (GLUTEST ProR; Sanwa Kagaku Kenkyusho, Japan).

### **Repeated administration study of **63** in ob/ob mice**

Male ob/ob mice (9 weeks old) were administered vehicle (0.5% MC) or **63** orally twice a day for 4 weeks. Plasma glucose and insulin levels at 2 weeks and 4 weeks were measured using a portable glucometer (GLUTEST ProR; Sanwa Kagaku Kenkyusho, Japan) and Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA kit (Morinaga Institute of Biological Science, Inc, Japan) respectively. At the end of the study, circulating level of TG was analyzed by biochemistry automatic analyzer 7170S (Hitachi High-Technologies, Japan).

### **Assessment of hypoglycemia risk in mice**

Compounds were administered orally to 2 h-fasted male C57BL/6J mice (8 weeks old) at time 0 min ( $n = 8$ /group). Tail vein blood glucose levels were measured at 0, 60, 120, 180, 240, and 300 min using a

portable glucometer (GLUTEST ProR; Sanwa Kagaku Kenkyusho, Japan).

### **Assessment of casual plasma insulin in mice**

Compounds were administered orally to 2 h-fasted male C57BL/6J mice (8 weeks old) at time 0 min ( $n = 8/\text{group}$ ). Tail vein blood insulin levels were measured at 0, 30, and 60 min using an Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA kit (Morinaga Institute of Biological Science, Inc, Japan).

### **Pharmacokinetic study**

Male Crlj:CD1 (ICR) mice (8 weeks old) were housed under standard conditions with a 12 h light/dark cycle and allowed free access to water and a commercial diet (CRF-1, Oriental Yeast Co., LTD., Japan). Mice were fasted overnight before dosing, and fed 7 h post-dose. A single intravenous dose of **63** (2 mg/kg) in saline or a single oral dose of **63** (10 mg/kg) in 0.5 w/v% MC was administrated to each mouse. Blood samples were collected using a heparinized capillaries via the orbital venous plexus under anesthesia at serial time points for 24 h postdose. Plasma was obtained by centrifugation at  $10700 \times g$  for 10 min at 4 °C and stored at -70 °C until analysis. Plasma samples were mixed with acetonitrile and methanol containing an internal standard. The mixtures were vortexed and centrifuged, and the supernatant was diluted three times with 0.1% acetic acid and subjected to LC/MS/MS analysis. Peak areas were calculated by Xcalibur software (Thermo Electron Corporation, UK).

### **Tissue distribution study**

Male C57BL/6J mice (8 weeks old) were housed under standard conditions and allowed free access to water and a commercial diet. On the day before the experiment, mice were fasted until the end of the experiment. A single oral dose of **63** (10, 30, 100 mg/kg) or **2** (10, 30 mg/kg) in 0.1 w/v% Tween80 and 0.5 w/v% MC was administrated to each mouse. Blood samples were collected using heparinized syringes via the postcaval vein at 0.5, 1, and 1.5 h post-dose. Plasma was obtained by centrifugation. The liver and pancreas were dissected out and gently washed with ice-cold saline. The dissected tissues were homogenized and stored at -70 °C until analysis. Plasma, liver homogenate, and pancreas homogenate samples were mixed with acetonitrile and methanol containing an internal standard, followed by centrifugation. The supernatant was subjected to LC/MS/MS analysis. Peak areas were calculated using Xcalibur software (Thermo Electron Corporation, UK) and AUC values were calculated by the trapezoidal rule.

### **Statistical analysis**

The data was analyzed using Dunnett's multiple comparison test. All statistical analyzes were performed using the EXSUS statistical software package version 8.1.0 (CAC Croit Corporation, Tokyo, Japan).

## Experiments concerning Chapter 3

### General

All reagents and solvents were obtained commercially and were used without further purification. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded using a 400 MR spectrometer (Agilent Technologies, CA, USA) in the solvents indicated. Data are reported as follows: chemical shift in ppm ( $\delta$ ) relative to tetramethylsilane, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, br = broad, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) data were obtained using a Waters SQD instrument equipped with an Acquity ultra performance liquid chromatography (UPLC) system (Waters, MA, USA). High-performance liquid chromatography (HPLC) was carried out using Shimadzu Prominence or LC-2010C HT (Shimadzu, Kyoto, Japan). High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Thermo LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

### Synthesis of compound **74** (Scheme 3-3)

Compound **73** (10.7 g, 30.0 mmol) was added dropwise to  $\text{HCO}_2\text{H}$  (90.0 mL) at 0 °C and stirred at 25 °C for 18 h. After evaporation of the reaction mixture under reduced pressure, iced water (50.0 mL) and an aqueous  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  solution (pH adjusted to 8) were added to the residue at 0 °C. After the addition of AcOEt (100 mL), the mixture was stirred at 50 °C for 3 h, and the aqueous layer was separated and extracted with further portions of AcOEt. The combined organic layer was washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure to give **74** (7.18 g, quant) as a pale-yellow solid;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.56 (s, 1H), 4.32 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 4.04–3.96 (m, 2H), 2.96–2.86 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.10–1.97 (m, 2H), 1.38 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.4, 163.3, 152.8, 134.9, 130.9, 128.7, 61.4, 60.5, 35.2, 23.0, 16.0, 14.4; MS (ESI)  $m/z$ : 238 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  238.0896, found 238.0900.

### Asymmetric transfer hydrogenation (**74** to **75a**, Table 3-1, entry 9)

To a solution of  $\text{Cp}^*\text{IrCl}[(R)\text{-PA}]$  (248 mg, 0.52 mmol) in MeOH (100 mL) was added **74** (6.18 g, 26.0 mmol) in MeOH (80.0 mL), in addition to  $\text{HCO}_2\text{H}$  (10.8 g, 284 mmol) and  $\text{HCO}_2\text{Na}$  (10.6 g, 156 mmol) with cooling using an ice bath. After stirring at 0 °C for 6 h, the reaction mixture was transferred to a second reactor containing an aqueous  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  solution, again with cooling using an ice bath. After the evaporation under reduced pressure to remove MeOH, the residue was extracted with AcOEt/THF, and the organic layer was washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by flash column chromatography (NH silica; AcOEt) to give **75a** (5.70 g, 92%) as a brown oil.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.17 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 1H), 4.30 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 4.28 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.17–3.09 (m, 1H), 3.04–2.95 (m, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.23–2.11 (m, 1H), 2.04 (s, 1H), 1.97–1.71 (m, 3H), 1.35 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.8, 147.8, 145.2, 127.8, 124.5, 60.1, 57.9, 46.6, 34.6, 25.4, 15.5, 14.4; MS (ESI)  $m/z$ : 240 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; HRMS (ESI) calcd for

C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 240.1053, found 240.1056.

#### Purification of **36** via recrystallization (Scheme 3-4)

A suspension of crude **36** (6.45 g, 54% ee) in MeOH/H<sub>2</sub>O (71 mL, 10/1 (v/v)) was heated to give a clear solution, then stirred at 25 °C overnight. After this time, the insoluble matter was removed, and the mother liquor was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in hot MeCN and the solution was stirred at room temperature for 1 h. After this time, the reaction mixture was cooled to 0 °C and stirred at this temperature for a further 0.5 h. The precipitate was then collected by filtration, rinsed with MeCN, and dried to give **36** (2.74 g, 42%) as a white solid. HPLC purity: 100 area%; Optical purity: 96% ee. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.12 (s, 1H), 5.10–4.92 (m, 1H), 3.56–3.38 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.38–2.20 (m, 1H), 2.08–1.87 (m, 3H), 1.61–1.18 (m, 9H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 166.8, 156.2, 148.9, 145.0, 129.4, 126.7, 81.3, 58.2, 47.5, 36.2, 28.6 (3C), 24.1, 15.5; MS (ESI) *m/z*: 312 (M+H)<sup>+</sup>, 310 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 312.1264, found 312.1265.

The HPLC conditions were as follows: Column, CAPCELLPACK C18 MGII 3 μm 2.0 × 20.0 mm (Osaka Soda); eluent, (A) 0.2% HCOOH in H<sub>2</sub>O, (B) MeOH; gradient: A:B 95:5 (0 min), 1:99 (28 min); flow rate, 0.4 mL/min; and detection, 244 nm. The retention time for **36** was 21.9 min.

The chiral HPLC conditions were as follows: Column CHIRALPAC IC 3 μm 0.46 × 25 cm (Daicel); eluent, *n*-hexane/*i*-PrOH/TFA = 90/10/0.1; flow rate, 1.0 mL/min; and detection, 244 nm. The retention times for **40** and **36** were 10.1 and 12.6 min, respectively.

#### Characterization data of compounds **73**, **75b** and **76**

##### Ethyl 5-(4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)butanoyl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (**73**)

Pale-yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.97 (s, 1H), 4.74 (br s, 1H), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.21 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.77 (s, 3H), 1.93 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 192.3, 162.9, 157.1, 156.1, 139.4, 133.8, 129.5, 79.2, 60.7, 40.1, 35.8, 28.4 (3C), 24.8, 16.3, 14.4; MS (ESI) *m/z*: 356 (M+H)<sup>+</sup>, 354 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 356.1526, found 356.1532.

##### Ethyl 5-(1-formylpyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (**75b**)

Pale-yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.24 (s, 1H), 7.23–7.19 (m, 1H), 5.06–4.97 (m, 1H), 4.35–4.23 (m, 2H), 3.69–3.51 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.41–2.25 (m, 1H), 2.17–1.90 (m, 3H), 1.41–1.31 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.3, 161.7, 149.2, 141.2, 128.1, 126.5, 60.4, 57.0, 43.7, 35.2, 22.7, 15.6, 14.4; MS (ESI) *m/z*: 268 (M+H)<sup>+</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>S (M+H)<sup>+</sup> 268.1002, found 268.1006.

##### Ethyl 5-(1-formyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrrol-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylate (**76**)

Pale-yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.67 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 5.40 (t, *J* = 2.9 Hz, 1H), 4.39–

4.24 (m, 2H), 4.06–3.98 (m, 2H), 2.88–2.55 (m, 5H), 1.45–1.30 (m, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.0, 158.4, 150.3, 134.6, 129.2, 128.8, 126.3, 114.0, 60.6, 45.0, 27.7, 15.4, 14.4; MS (ESI)  $m/z$ : 266 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  266.0845, found 266.0846.

## Experiments concerning Chapter 4

### General.

All reagents and solvents were commercially available and used without further purification. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded using a 400 MR spectrometer (Agilent Technologies, CA, USA) in the solvents indicated. Data are reported as follows: chemical shift in ppm ( $\delta$ ) relative to tetramethylsilane, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, dd = doublet of doublets, td = triplet of doublets, br = broad, m = multiplet), coupling constant (Hz), and integration. Infrared spectra were recorded on a FT/IR-4200 spectrometer (Jasco, Tokyo, Japan) with a single-reflection diamond ATR unit. Liquid chromatography-mass spectrometry was conducted on a SQ detector equipped with the Acquity ultraperformance liquid chromatography system (Waters, MA, USA). High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed using the Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan) or Alliance (Waters, MA, USA) systems. High-resolution mass spectral (HRMS) data were obtained using the LTQ Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The water content was determined by Karl Fischer titration using the KF-004 Karl Fischer moisture meter (Mitsubishi Chemical Analytech, Kanagawa, Japan). Melting points were determined using the MP-J micromelting point apparatus (Yanaco, Kyoto, Japan) and given as uncorrected values. The specific rotation was measured on the Autopol IV polarimeter (Rudolph Research Analytical, NJ, USA).

The following HPLC conditions were employed:

(a) Column: CAPCELLPACK C18 MGII, 3  $\mu\text{m}$ , 2.0  $\times$  20.0 mm (Osaka Soda); eluent: (A) 0.2%  $\text{HCOOH}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  and (B)  $\text{MeOH}$ ; gradient: A:B 95:5 (0 min), 1:99 (28 min); flow rate: 0.4 mL/min; and detection: 244 nm. The retention times for **96** and **36** were 20.9 and 21.9 min, respectively.

(b) Column: XBridge C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150 mm (Waters); eluent: 4.08 g/L aqueous  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solution/ $\text{MeOH}$  = 60/40 (The pH was adjusted to 2.5 by  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); flow rate: 0.8 mL/min; and detection: 290 nm. The retention time for **63**·**HCl** was 24.7 min.

The following chiral HPLC conditions were employed:

(a) Column: CHIRALPAK IC, 3  $\mu\text{m}$ , 0.46  $\times$  25 cm (Daicel); eluent: *n*-hexane/*i*PrOH/TFA = 90/10/0.1; flow rate: 1.0 mL/min; and detection: 244 nm. The retention times for **40** and **36** were 10.1 and 12.6 min, respectively.

(b) Column: Chiral MB-S, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm (TCI); eluent: 9%  $\text{MeCN}$  in 50 mM aqueous  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; flow rate: 1.8 mL/min; and detection: 280 nm. The retention time for **63**·**HCl** was 15.0 min.

### ***tert*-Butyl (*S*)-2-(2-chloroacetyl)pyrrolidine-1-carboxylate (**91**)**

To a mixture of **90** (75.0 kg, 327 mol), sodium chloroacetate (95.3 kg, 818 mol), and triethylamine (66.2 kg, 654 mol) in THF (750 L) was added *tert*-butylmagnesium chloride (818 mol, THF solution) at  $-5$  to  $-2$   $^\circ\text{C}$ , and the mixture was stirred at  $0$ – $1$   $^\circ\text{C}$  for 1 h. The reaction mixture was then added to aqueous citric acid (143 kg citric acid in 420 L  $\text{H}_2\text{O}$ ) while maintaining the temperature between  $0$ – $7$   $^\circ\text{C}$ . The organic layer

was washed twice with aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (18.8 kg NaHCO<sub>3</sub> and 67.5 kg NaCl in 413 L H<sub>2</sub>O) and once with brine (75.0 kg NaCl in 300 L H<sub>2</sub>O), and concentrated to about 158 L under reduced pressure. After AcOEt (225 L) was added to the residue, the organic layer was separated, washed with aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (3.8 kg NaHCO<sub>3</sub> and 13.5 kg NaCl in 75 L H<sub>2</sub>O), and concentrated to about 68 L under reduced pressure. The residue was diluted with THF (38 L) and taken directly into the next step as a THF solution. Quantitative analysis of the organic phase by HPLC revealed the formation of **91** (78.5 kg, 97% yield). This process was operated in 2 batches, generating a total of 156 kg of crude product **91** in an average yield of 97%.

***tert*-Butyl (2*S*)-2-(3-(methoxycarbonyl)-4-oxopentanoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (**93**)**

To a stirred mixture of KI (10.5 kg, 63.1 mol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (105 kg, 757 mol) in DMF/THF (78/391 L) were added THF solution of **91** (156 kg, 631 mol) and methylacetoacetate (95.3 kg, 820 mol) at 20–26 °C. After stirring at 26–33 °C for 6 h, additional methylacetoacetate (8.1 kg, 69.4 mol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8.7 kg, 63.1 mol) were added, and the mixture was stirred at 29 °C for additional 2 h. To the resulting mixture were added toluene (782 L) and water (156 L), and the pH was adjusted to 3.0 by adding 2 M aqueous HCl solution (625 L) while maintaining the temperature under 10 °C. NaCl (78.2 kg) was then added and the layers were separated. The organic layer was washed with aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (20.3 kg NaHCO<sub>3</sub> and 39.1 kg NaCl in 547 L H<sub>2</sub>O) and brine (39.1 kg NaCl in 313 L H<sub>2</sub>O), and concentrated to about 219 L under reduced pressure. The organic layer was added to THF (156 L) and used directly in the next step. Quantitative analysis of the organic phase by HPLC revealed the formation of **93** (151 kg, 73% yield). Water content: 0.09%.

**(*S*)-5-(1-(*tert*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-2-methylthiophene-3-carboxylic acid (**36**)**

To LR (117 kg, 288 mol) in THF (980 L) was added **93** (75.4 kg, 230 mol) in THF (75 L) at 45–50 °C, and the mixture was stirred at 50–58 °C for 1.5 h. To this mixture was added 48% aqueous NaOH solution (226.1 kg NaOH in 392 L H<sub>2</sub>O) while maintaining the temperature at 6–7 °C. The organic layer was separated, diluted with MeOH (377 L), and mixed with aqueous NaOH solution (46.0 kg NaOH in 234 L H<sub>2</sub>O). The resulting mixture was stirred at 45–63 °C for 3 h. After the mixture was cooled, the pH was adjusted to 7.0 by adding 2 M aqueous HCl solution (450 L) at 5–8 °C, and the mixture was concentrated to 904 L under reduced pressure. After the residue was diluted with AcOEt (754 L), 2 M aqueous HCl solution (300 L) was added at 9–10 °C to adjust the pH to 2.9. The organic layer was separated and washed with brine (52.7 kg NaCl in 301 L H<sub>2</sub>O), and the solvent was reduced to 136 L under reduced pressure. EtOH (377 L) was added to dissolve the precipitate at 60 °C, and the mixture was concentrated under reduced pressure to 226 L. The residue was dissolved by adding H<sub>2</sub>O (30 L) and heating to 65 °C. After the residue was cooled to 0–10 °C and stirring for 5 h, the precipitate was collected by centrifugation, washed with MeCN (113 L) cooled to 7 °C, and dried under reduced pressure at 43–45 °C to give 44.5 kg of crude product **36**. This process was operated in 2 batches, generating a total of 88.3 kg of crude product **36**.



After that, crude **36** (88.3 kg) was added to MeCN (1325 L), dissolved at 80 °C, and concentrated to 442 L at 50 °C. The residue was then heated to 75–85 °C, cooled to 10 °C, and stirred at 10 °C for 18 h. The resulting precipitate was collected by centrifugation, washed with MeCN (132 L), and cooled to 10 °C to give 81.5 kg of **36** (57% yield) as a white solid. HPLC purity: 99.2 area% (**96**: 0.8 area%, HPLC condition a). Optical purity: 99.4% ee (chiral HPLC condition a). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.14–7.09 (m, 1H), 5.09–4.93 (m, 1H), 3.57–3.38 (m, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.39–2.16 (m, 1H), 2.09–1.86 (m, 3H), 1.62–1.21 (m, 9H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 166.8, 156.2, 148.9, 145.0, 129.4, 126.6, 81.3, 58.2, 47.4, 36.2, 28.7 (3C), 24.2, 15.5; MS (ESI) *m/z*: 312 (M+H)<sup>+</sup>, 310 (M–H)<sup>–</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –91.0 (c 1.00, MeOH); HRMS (ESI) calcd for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>S (M+H)<sup>+</sup>, 312.1264; found, 312.1266.

***tert*-Butyl (*S*)-2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidine-1-carboxylate (**66**)**

To a mixture of **36** (71.0 kg, 228 mol) and DMF (0.8 kg, 11.4 mol) in CPME (710 L) was added dropwise oxalyl chloride (34.6 kg, 274 mol) at 16–19 °C. After the mixture was stirred at 20–27 °C for 2 h, it was concentrated to 300 L under reduced pressure. The residue was azeotroped with CPME (355 L), mixed with MeCN (355 L), and cooled to –5 to 5 °C. To the mixture were added slowly 2-amino-5-fluorothiazole hydrochloride (35.2 kg, 228 mol), pyridine (36.1 kg, 456 mol), and MeCN (355 L) at –5 to 2 °C. After it was stirred at 1–2 °C for 1 h and at 20–28 °C for additional 5 h, water (1562 L) was added, and the mixture was stirred at 23–28 °C for 30 min. The pH was adjusted to 7.1 using 1 M aqueous NaOH solution (460 L) at 23–25 °C, and the mixture was concentrated to 1910 L under reduced pressure. The residue was suspended in MeCN (689 L) and stirred at 55–66 °C for 1 h and at 22–30 °C for 1 h. The solids were allowed to settle, and then the supernatant was removed. The resulting solids were suspended in aqueous MeCN solution (369 L MeCN in 185 L H<sub>2</sub>O), and stirred at 19–20 °C for 1 h. After the solids were collected by filtration, they were washed with an aqueous MeCN solution (114 L MeCN in 57 L H<sub>2</sub>O) and dried under reduced pressure at 50 °C to give **66** (76.5 kg, 82%) as a white solid, which was utilized in the next step without any purification. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.24 (br s, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.15–4.96 (m, 1H), 3.59–3.38 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.40–2.21 (m, 1H), 2.13–1.89 (m, 3H), 1.59–1.23 (m, 9H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 163.7, 160.1 (d, *J* = 291 Hz), 156.3, 149.4, 147.9, 145.9, 130.0, 123.7, 118.9 (d, *J* = 13 Hz), 81.5, 58.2, 47.5, 36.3, 28.8 (3C), 24.1, 15.2; MS (ESI) *m/z*: 412 (M+H)<sup>+</sup>, 410 (M–H)<sup>–</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> –75.0 (c 1.00, MeOH); HRMS (ESI) C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup>, 412.1159; found, 412.1160.

***(S)*-N-(5-Fluorothiazol-2-yl)-2-methyl-5-(pyrrolidin-2-yl)thiophene-3-carboxamide (**58**)**

To **66** (75.0 kg, 182 mol) in AcO*i*Pr (375 L) were added concentrated HCl (64.5 kg) and H<sub>2</sub>O (125 L). After the mixture was stirred at 55–59 °C for 4 h, 5 M aqueous NaOH solution (583 L) was added at 9–15 °C, and the pH of the mixture was adjusted to 9.9. The resulting mixture was combined with AcO*i*Pr (450 L) and stirred at 35–45 °C, and the layers were separated. After the organic layer was evaporated to 150 L under reduced pressure, the residue was diluted with AcO*i*Pr (225 L). This mixture, containing compound

**58**, was evaporated to 150 L under reduced pressure and used in the next step without any purification.

### **2,2'-(Ethylazanediy)diacetic acid (**98**)**

To **99** (70.0 kg, 526 mol) in H<sub>2</sub>O (1050 L) was added acetaldehyde (15 L, 263 mol), and the reactor was charged with N<sub>2</sub>. To this mixture was added 10% Pd/C (8.4 kg, 58 % wet), and N<sub>2</sub> was replaced by hydrogen to conduct the reaction at a hydrogen pressure of 0.3 MPa at 45–46 °C for 1 h. The mixture was cooled down to under 20 °C, combined with acetaldehyde (15 L, 263 mol), and stirred at 45 °C at a pressure of 0.3 MPa for 1 h. The mixture was once again cooled down to under 20 °C, combined with acetaldehyde (29 L, 526 mol), and stirred at 45 °C at a pressure of 0.3 MPa for 1 h. The mixture was cooled down to under 20 °C, filtered through Celite, washed with water (126 L), and evaporated to 136 L under reduced pressure. The resulting mixture was combined with EtOH (364 L) and stirred at 25–27 °C for 6 h. After filtration, the reaction mixture was washed with EtOH (105 L) and dried under reduced pressure at 50 °C to give **98** (78.9 kg, 93%). Compound **98** was used in the next step without any purification. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.92 (s, 4H), 3.35 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 169.6 (2C), 56.2 (2C), 52.4, 10.0; MS (ESI) *m/z*: 162 (M+H)<sup>+</sup>, 160 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>, 162.0761; found, 162.0758.

### **(S)-N-Ethyl-N-(2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)glycine (**63**)**

To **98** (91.1 kg, 565 mol) in AcOEt (568 L) was added dropwise TFAA (114 kg, 542 mol) at 3–9 °C and stirred at 20–27 °C for 2.5 h. The resulting mixture was added to **58** (56.8 kg, 182 mol) in AcOiPr (150 L) at 12–21 °C and stirred at 65–68 °C for 2 h. The mixture was combined with water (1136 L) and 5 M aqueous NaOH solution (280 L) at 20–21 °C, adjusted to pH 7.5, and concentrated to 1460 L under reduced pressure. To the residue was added 5 M aqueous NaOH solution (100 L) at 26 °C, and the mixture was adjusted to pH 10.8 and filtered. The filtrate was washed with H<sub>2</sub>O (85 L), added to 6 M aqueous HCl (130 L), and adjusted to pH 6.0. The mixture was combined with 1 M aqueous HCl (20 L), adjusted to pH 5.5, and stirred at 30–40 °C for 14 h. The precipitate was collected by centrifugation, washed with H<sub>2</sub>O (398 L), suspended in AcOEt (1136 L), and stirred at 22–30 °C for 1 h. The precipitate was collected by centrifugation and washed with AcOEt (85 L). The solids were suspended in MeOH (426 L), stirred at 60–62 °C for 2 h and at 27–30 °C for 1 h. The resulting solids were collected by centrifugation, washed with AcOEt (107 L), and suspended in AcOEt (710 L). After stirring at 28–30 °C for 1 h, the solids were collected by centrifugation, washed with AcOEt (107 L), and dried under reduced pressure at 35 °C to give **63** (57.9 kg, 65%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.32 (s, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.41–5.33 (m, 1H), 4.34–4.20 (m, 2H), 3.92–3.53 (m, 4H), 3.40–3.22 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.48–1.95 (m, 4H), 1.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 170.2, 165.8, 165.6, 163.5, 160.1 (d, *J* = 291 Hz), 148.6, 143.3, 129.9, 125.0, 118.9 (d, *J* = 13 Hz), 58.4, 57.8, 56.3, 52.8, 47.2, 34.4, 25.1, 15.3, 10.1; MS (ESI) *m/z*: 455 (M+H)<sup>+</sup>, 453 (M–H)<sup>–</sup>; HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup>, 455.1217; found, 455.1213; [*α*]

$D^{24} -109.8$  (c 1.00, DMSO).

**(S)-N-Ethyl-N-(2-(2-(4-((5-fluorothiazol-2-yl)carbamoyl)-5-methylthiophen-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)glycine hydrochloride (63·HCl)**

To **63** (57.9 kg, 118 mol) in EtOH (434 L) was added concentrated HCl (14.1 kg, 141 mol), and the mixture was stirred at 26–27 °C for 4 h. AcO*i*Pr (648 L) was added, and the mixture was stirred at 45–50 °C for 19 h and cooled down to 30 °C. The precipitate was collected by centrifugation, washed with AcO*i*Pr (87 L), suspended in AcO*i*Pr (290 L), and stirred at 24 °C for 1 h. The resulting solids were collected by centrifugation, washed with AcO*i*Pr (87 L), and suspended in AcO*i*Pr (290 L). After stirring at 25 °C for 1 h, the resulting solids were collected by centrifugation, washed with AcO*i*Pr (87 L), and dried under reduced pressure at 36–40 °C to give **63·HCl** (54.6 kg, 94%) as a white solid. HPLC purity: 98.8 area% (HPLC condition b). Optical purity: 99.4% ee (chiral HPLC condition b); mp: 229 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.31 (br s, 1H), 7.16 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 5.40 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 4.55–4.07 (m, 4H), 3.96–3.54 (m, 2H), 3.50–3.28 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.56–2.25 (m, 1H), 2.22–1.97 (m, 3H), 1.37 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  168.5, 165.0, 163.3, 163.1, 159.8 (d,  $J = 291$  Hz), 149.7, 143.0, 130.5, 125.0, 118.9 (d,  $J = 13$  Hz), 58.6, 56.9, 54.8, 54.2, 47.0, 34.4, 24.8, 15.2, 9.6; IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1706, 1644, 1554; MS (ESI)  $m/z$ : 455 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 453 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{FN}_4\text{O}_4\text{S}_2$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 455.1217; found, 455.1220;  $[\alpha]_D^{22} -105.1$  (c 1.00, MeOH).

## References

1. IDF Diabetes Atlas. <http://www.idf.org/diabetesatlas> (accessed May. 10, 2019).
2. 平成 29 年 (2017) 患者調査の概況, 厚生労働省
3. Scully, T. *Nature* **2012**, *485*, S2–3.
4. Nolan, C. J.; Damm, P.; Prentki, M. *Lancet* **2011**, *378*, 169–181.
5. Fowler, M. J. *Clin. Diabetes* **2008**, *26*, 77–82.
6. Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y.; Chen, Y.; Shen, X.; Fenyk-Melody, J.; Wu, M.; Ventre, J.; Doebber, T.; Fujii, N.; Musi, N.; Hirshman, M. F.; Goodyear, L. J.; Moller, D. E. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 1167–1174.
7. Foretz, M.; Hébrard, S.; Leclerc, J.; Zarrinpashneh, E.; Soty, M.; Mithieux, G.; Sakamoto, K.; Andreelli, F.; Viollet, B. *J. Clin Invest.* **2010**, *120*, 2355–2369.
8. Miller R. A.; Chu, Q.; Xie, J.; Foretz, M.; Viollet, B.; Birnbaum, M. J. *Nature* **2013**, *494*, 256–260.
9. 門脇 孝. 日本臨床 **2005**, *63*, 539–548.
10. Okuno, A.; Tamemoto, H.; Tobe, K.; Ueki, K.; Mori, Y.; Iwamoto, K.; Umesono, K.; Akanuma, Y.; Fujiwara, T.; Horikoshi, H.; Yazaki, Y.; Kadowaki, T. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 1354–1361.
11. Basu, A.; Jensen, M. D.; McCann, F.; Mukhopadhyay, D.; Joyner, M. J.; Rizza, R. A. *Diabetes care* **2006**, *29*, 510–514.
12. Guan, Y.; Hao, C.; Cha, D. R.; Rao, R.; Lu, W.; Kohan, D. E.; Magnuson, M. A.; Redha, R.; Zhang, Y.; Breyer, M. D. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 861–866.
13. Endo, Y.; Suzuki, M.; Yamada, H.; Horita, S.; Kunimi, M.; Yamazaki, O.; Shirai, A.; Nakamura, M.; Iso-O, N.; Li, Y.; Hara, M.; Tsukamoto, K.; Moriyama, N.; Kudo, A.; Kawakami, H.; Yamauchi, T.; Kubota, N.; Kadowaki, T.; Kume, H.; Enomoto, Y.; Homma, Y.; Seki, G.; Fujita, T. *Cell Metab.* **2011**, *13*, 550–561.
14. Yki-Järvinen, H. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1106–1118.
15. Salvo, F.; Moore, N.; Arnaud, M.; Robinson, P.; Raschi, E.; De Ponti, F.; Bégaud, B.; Pariente, A. *BMJ.* **2016**, *353*, i2231.
16. Seino S.; Zhang, C. L.; Shibasaki, T. *J. Diabetes Investig.* **2010**, *1*, 37–39.
17. Ikenoue, T.; Okazaki, K.; Fujitani, S.; Tsuchiya, Y.; Akiyoshi, M.; Maki, T.; Kondo, N. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 354–359.
18. Uchino, H.; Niwa, M.; Shimizu, T.; Nishiyama, K.; Kawamori, R. *Endocrine Journal* **2000**, *47*, 639–641.
19. 坂口 一彦. 春日 雅人. 日本臨床 **2007**. *65* S8 183–187.
20. 佐村 優. 小川 寿子. 仙内 光子. 堀 慎太郎. 山本 彩子. 腰岡 桜. 廣瀬 直樹. 関根 寿一. 医療薬学 **2017**, *43*, 80–93.
21. Inzucchi, S. E.; Bergenstal, R. M.; Buse, J. B.; Diamant, M.; Ferrannini, E.; Nauck, M.; Peters, A. L.; Tsapas, A.; Wender, R.; Matthews, D. R. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 140–149.

22. Banegas, J. R.; López-García, E.; Dallongeville J.; Guallar E.; Halcox J. P.; Borghi, C.; Massó-González, E. L.; Jiménez, F. J.; Perk, J.; Steg, P. G.; De Backer, G.; Rodríguez-Artalejo F. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, 2143–2152.
23. 鎌田 健司, 長田 安史. 日本結晶学会誌 **2005**, *47*, 130–134.
24. Matschinsky, F. M. *Diabetes* **1996**, *45*, 223–241.
25. Matschinsky, F. M.; Glaser, B.; Magnuson, M. A. *Diabetes* **1998**, *47*, 307–315.
26. Agius, L. *Biochem J.* **2008**, *414*, 1–18.
27. Terauchi, Y.; Sakura, H.; Yasuda, K.; Iwamoto, K.; Takahashi, N.; Ito, K.; Kasai, H.; Suzuki, H.; Ueda, O.; Kamada, N.; Jishage, K.; Komeda, K.; Noda, M.; Kanazawa, Y.; Taniguchi, S.; Miwa, I.; Akanuma, Y.; Kodama, T.; Yazaki, Y.; Kadowaki, T. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30253–30256.
28. Postic, C.; Shiota, M.; Niswender, K. D.; Jetton, T. L.; Chen, Y.; Moates, J. M.; Shelton, K. D.; Lindner, J.; Cherrington, A. D.; Magnuson, M. A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 305–315.
29. Velho, G.; Froguel, P. *Diabetes Metab.* **1997**, *23*, Suppl 2, 34–37.
30. Njølstad, P. R.; Sagen, J. V.; Bjørkhaug, L.; Odili, S.; Shehadeh, N.; Bakry, D.; Sarici, S. U.; Alpay, F.; Molnes, J.; Molven, A.; Søvik, O.; Matschinsky, F. M. *Diabetes* **2003**, *52*, 2854–60.
31. Glaser, B.; Kesavan, P.; Heyman, M.; Davis, E.; Cuesta, A.; Buchs, A.; Stanley, C. A.; Thornton, P. S.; Permutt, M. A.; Matschinsky, F. M.; Herold, K. C. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 226–230.
32. 江藤 一弘, 門脇 孝. 日本臨床. **2002**, *60*, Suppl 7, 523–534.
33. Cardenas, M. L.; Cornish-Bowden, A.; Ureta T. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1401*, 242–264.
34. Kamata, K.; Mitsuya, M.; Nishimura, T.; Eiki, J.; Nagata, Y. *Structure* **2004**, *12*, 429–438.
35. Matschinsky, F. M.; Magnuson, M. A.; Zelent, D.; Jetton, T. L.; Doliba, N.; Han, Y.; Taub, R.; Grimsby, J. *Diabetes* **2006**, *55*, 1–12.
36. Grimsby, J.; Sarabu, R.; Corbett, W. L.; Haynes, N.-E.; Bizzarro, F. T.; Coffey, J. W.; Guertin, K. R.; Hilliard, D. W.; Kester, R. F.; Mahaney, P. E.; Marcus, L.; Qi, L.; Spence, C. L.; Teng, J.; Magnuson, M. A.; Chu, C. A.; Dvornozniak, M. T.; Matschinsky, F. M.; Grippo, J. F. *Science* **2003**, *301*, 370–373.
37. Haynes, N. E.; Corbett, W. L.; Bizzarro, F. T.; Guertin, K. R.; Hillard, D. W.; Holland, G. W.; Kester, R. F.; Mahaney, P. E.; Qi, L.; Spence, C. L.; Teng, J.; Dvornozniak, M. T.; Railkar, A.; Matschinsky, F. M.; Grippo, J. F.; Grimsby, J.; Sarabu, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3618–3625.
38. Matschinsky, F. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 399–416.
39. Sarabu, R.; Bizzarro, F. T.; Corbett, W. L.; Dvornozniak, M. T.; Geng, W.; Grippo, J. F.; Haynes, N. E.; Hutchings, S.; Garofalo, L.; Guertin, K. R.; Hilliard, D. W.; Kabat, M.; Kester, R. F.; Ka, W.; Liang, Z.; Mahaney, P. E.; Marcus, L.; Matschinsky, F. M.; Moore, D.; Racha, J.; Radinov, R.; Ren, Y.; Qi, L.; Pignatello, M.; Spence, C. L.; Steele, T.; Teng, J.; Grimsby, J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7021–7036.
40. Waring, M. J.; Clarke, D. S.; Fenwick, M. D.; Godfrey, L.; Groombridge, S. D.; Johnstone, C.; McKerrecher, D.; Pike, K. G.; Rayner, J. W.; Robb, G. R.; Wilson, I. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1077–1081.
41. Meininger, G. E.; Scott, R.; Alba, M.; Shentu, Y.; Luo, E.; Amin, H.; Davies, M. J.; Kaufman, K. D.;

- Goldstein, B. J. *Diabetes Care* **2011**, *34*, 2560–2566.
42. Yoshikawa, N.; Xu, F.; Arredondo, J. D.; Itoh, T. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 824–830.
  43. Pfeifferkorn, J. A.; Guzman-Perez, A.; Litchfield, J.; Aiello, R.; Treadway, J. L.; Pettersen, J.; Minich, M. L.; Filipowski, K. J.; Jones, C. S.; Tu, M.; Aspnes, G.; Risley, H.; Bian, J.; Stevens, B. D.; Bourassa, P.; D'Aquila, T.; Baker, L.; Barucci, N.; Robertson, A. S.; Bourbonais, F.; Derksen, D. R.; MacDougall, M.; Cabrera, O.; Chen, J.; Lapworth, A. L.; Landro, J. A.; Zavadski, W. J.; Atkinson, K.; Haddish-Berhane, N.; Tan, B.; Yao, L.; Kosa, R. E.; Varma, M. V.; Feng, B.; Duignan, D. B.; El-Kattan, A.; Murdande, S.; Liu, S.; Ammirati, M.; Knafels, J.; DaSilva-Jardine, P.; Sweet, L.; Liras, S.; Rolph, T. P. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1318–1333.
  44. Bonadonna, R. C.; Heise, T.; Arbet-Engels, C.; Kapitza, C.; Avogaro, A.; Grimsby, J.; Zhi, J.; Grippo, J. F.; Balena, R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 5028–5036.
  45. Kiyosue, A.; Hayashi, N.; Komori, H.; Leonsson-Zachrisson, M.; Johnsson, E. *Diabetes Obes Metab.* **2013**, *15*, 923–930.
  46. (a) Hua Medicine Announces First-Ever Successful Phase 2 Monotherapy Trial for New Class of Diabetes Drug [press release]. [http://www.huamedicine.com/show\\_news.asp?s\\_id=1](http://www.huamedicine.com/show_news.asp?s_id=1) (accessed May 10, 2019). (b) Dzyurkevich, M. S.; Babkov, D. A.; Shtyrilin, N. V.; Mayka, O. Y.; Iksanova, A. G.; Vassiliev, P. M.; Balakin, K. V.; Spasov, A. A.; Tarasov, V. V.; Barreto, G.; Shtyrilin, Y. G.; Aliev, G. *Sci. Rep.* **2017**, *22*, 16072. (c) Xu, H.; Sheng, L.; Chen, W.; Yuan, F.; Yang, M.; Li, H.; Li, X.; Choi, J.; Zhao, G.; Hu, T.; Li, Y.; Zhang, Y.; Chen, L. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 1619–1626.
  47. (a) Vella, A.; Freeman, J. L. R.; Dunn, I.; Keller, K.; Buse, J. B.; Valcarce, C. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaau3441. (b) Valcarce, C.; Grimes, I.; Freeman, J. Presented at 76th American Diabetes Association Meeting, New Orleans, LA, 2016. (c) Valcarce, C. Presented at the Keystone Symposia on New Therapeutics for Diabetes and Obesity, La Jolla, CA, 2016. (d) Valcarce, C. Presented at 75th American Diabetes Association Meeting, Boston, MA, 2015. (e) Valcarce, C. Presented at 74th American Diabetes Association Meeting, San Francisco, CA, 2014. (f) Rees, M. G.; Ng, D.; Ruppert, S.; Turner, C.; Beer, N. L.; Swift, A. J.; Morken, M. A.; Below, J. E.; Blech, I.; NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin, J. C.; McCarthy, M. I.; Biesecker, L. G.; Gloyn, A. L.; Collins, F. S. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 205–217.
  48. Lang, M.; Seifert, M. H.; Wolf, K. K.; Aschenbrenner, A.; Baumgartner, R.; Wieber, T.; Trentinaglia, V.; Blisse, M.; Tajima, N.; Yamashita, T.; Vitt, D.; Noda, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5417–5422.
  49. Bevan, C. D.; Lloyd, R. S. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1781–1787.
  50. Log D value at pH 7.4 is calculated using Pipeline Pilot ver.9.5.0.831.
  51. Waring, M. J. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5*, 235–248.
  52. Ghaffer, T.; Parkins, A. W. *Tetrahedron. Lett.* **1995**, *36*, 8657–8660.
  53. Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6752–6756.
  54. Klapars, A.; Huang, X.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7421–7428.

55. Minami, K.; Yano, H.; Miki, T.; Nagashima, K.; Wang, C.-Z.; Tanaka, H.; Miyazaki, J.; Seino, S.; *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2000**, *272*, E773–E781.
56. Fermini, B.; Fossa, A. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 439–447.
57. Jamieson, C.; Moir, E. M.; Rankovic, Z.; Wishart, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5029–5046.
58. Fletcher, S. R.; Burkamp, F.; Blurton, P.; Cheng, S. K.; Clarkson, R.; O'Connor, D.; Spinks, D.; Tudge, M.; van Niel, M. B.; Patel, S.; Chapman, K.; Marwood, R.; Shephard, S.; Bentley, G.; Cook, G. P.; Bristow, L. J.; Castro, J. L.; Hutson, P. H.; MacLeod, A. M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 492–503.
59. Liang, J.; Brochu, R. M.; Cohen, C. J.; Dick, I. E.; Felix, J. P.; Fisher, M. H.; Garcia, M. L.; Kaczorowski, G. J.; Lyons, K. A.; Meinke, P. T.; Priest, B. T.; Schmalhofer, W. A.; Smith, M. M.; Tarpley, J. W.; Williams, B. S.; Martin, W. J.; Parsons, W. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2943–2947.
60. Xu, J.; Wei, L.; Mathvink, R.; He, J.; Park, Y. J.; He, H.; Leiting, B.; Lyons, K. A.; Marsilio, F.; Patel, R. A.; Wu, J. K.; Thornberry, N. A.; Weber, A. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2533–2536.
61. Edmondson, S. D.; Mastracchio, A.; Beconi, M.; Colwell, L. F. Jr.; Habulihaz, B.; He, H.; Kumar, S.; Leiting, B.; Lyons, K. A.; Mao, A.; Marsilio, F.; Patel, R. A.; Wu, J. K.; Zhu, L.; Thornberry, N. A.; Weber, A. E.; Parmee, E. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5151–5155.
62. Plasma concentration of compounds was confirmed through a single time point 2 h after the compound was dosed.
63. Xu, J.; Lin, S.; Myers, R. W.; Trujillo, M. E.; Pachanski, M. J.; Malkani, S.; Chen, H. S.; Chen, Z.; Campbell, B.; Eiermann, G. J.; Elowe, N.; Farrer, B. T.; Feng, W.; Fu, Q.; Kats-Kagan, R.; Kavana, M.; McMasters, D. R.; Mitra, K.; Tong, X.; Xu, L.; Zhang, F.; Zhang, R.; Addona, G. H.; Berger, J. P.; Zhang, B.; Parmee, E. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2063–2068.
64. Ferre, T.; Riu, E.; Franckhauser, S.; Agudo, J.; Bosch, F. *Diabetologia* **2003**, *46*, 1662–1668.
65. For selected examples on asymmetric hydrogenation of acyclic imines: (a) Lensink, C.; Rijnberg, E.; de Vries, J. G. *J. Mol. Catal. A Chem.* **1997**, *116*, 199–207. (b) Schnider, P.; Koch, G.; Prétôt, R.; Wang, G.; Bohnen, F. M.; Krüger, C.; Pfaltz, A. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 887–892. (c) Jiang, X.-B.; Minnaard, A. J.; Hessen, B.; Feringa, B. L.; Duchateau, A. L.; Andrien, J. G.; Boogers, J. A.; de Vries, J. G. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1503–1506. (d) Reetz, M. T.; Bondarev, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4523–4526. (e) Shirai, S.; Nara, H.; Kayaki, Y.; Ikariya, T. *Organometallics* **2009**, *28*, 802–809.
66. Willoughby, C. A.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7562–7564.
67. Chen, F.; Ding, Z.; Qin, J.; Wang, T.; He, Y.; Fan, Q.-H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4348–4351.
68. Uematsu, N.; Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4916–4917.
69. (a) Maeda, S.; Sato, T.; Kawano, Y.; Miyawaki, T. PCT Int. Pat Appl. WO 2013011930, 2013. (b) Maeda, S. PCT Int. Pat Appl. WO 2009005024, 2009.
70. Utsumi, N.; Murata, K.; Tsutsumi, K.; Katayama, T.; Watanabe, M.; Ohkuma, T.; Noyori, R. U.S. Patent 7,601,667, 2009.
71. Guo, C.; Sun, D.-W.; Yang, S.; Mao, S.-J.; Xu, X.-H.; Zhu, S.-F.; Zhou, Q.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**,

- 137, 90–93.
72. Magnus, N. A.; Braden, T. M.; Buser, J. Y.; DeBaillie, A. C.; Heath, P. C.; Ley, C. P.; Remacle, J. R.; Varie, D. L.; Wilson, T. M. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 830–835.
  73. (a) Knorr, L. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 1635–1642. (b) Paal, C. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18*, 367–371.
  74. Khaghaninejad S.; Heravi M. M. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2014**, *111*, 95–146.
  75. Bureš, F.; Kulháněk, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1347–1354.
  76. Chen, P.; Cheng, P. T. W.; Spengel, S. H.; Zahler, R.; Wang, X.; Thottathil, J.; Barrish, J. C.; Polniaszek, R. P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3175–3178.
  77. Nishiyama, A.; Sugawa, T.; Manabe, H.; Inoue, K.; Yoshida, N. PCT Int. Appl. WO/1996023756, Oct 8, 1996.
  78. (a) Minetto, G.; Raveglia, L. F.; Sega, A.; Taddei, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *24*, 5277–5288. (b) Chawrai. S. R.; Williamson. N. R.; Mahendiran. T.; Salmond. G. P. C. ; Leeper. F. J. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 447–454. (c) Martínez, L. R.; Avila Zarraga, J. G.; Duran, M. E.; Ramírez Apam, M. T.; Cañas R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1675–1677. (d) Kawabata, S.; Oishi, A.; Nishino, H. *Heterocycles* **2017**, *94*, 1479–1505.
  79. Aside from THF/DMF, we tested various solvents, including THF, DMF, MeCN, THF/H<sub>2</sub>O, DMF/H<sub>2</sub>O, DMA, EtOH, acetone, DMSO, NMP, *t*-BuOH. However, none of them yielded a better result than THF/DMF. Therefore, THF/DMF was chosen as the solvent in step 2.
  80. (a) Trost, B. M. *Science* **1991**, *254*, 1471–1477. (b) Trost, B. M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 259–281.
  81. Yoshida, K.; Nakayama, K.; Kuru, N.; Kobayashi, S.; Ohtsuka, M.; Takemura, M.; Hoshino, K.; Kanda, H.; Zhang, J. Z.; Lee, V. J.; Watkins, W. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1993–2004.
  82. Santos, M. A.; Marques, S. M.; Tuccinardi, T.; Carelli, P.; Panelli, L.; Rossello, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7539–7550.
  83. Compounds **63·HCl** and **36**, produced in this synthesis, had excellent optical purities (99% and 100%, respectively).



## 謝辞

本論文の執筆に際し終始懇篤なご指導、ご高配を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 中川 秀彦 教授に深く感謝いたします。

本論文のご指導を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 樋口 恒彦 教授、尾関 哲也 教授、平嶋 尚英 教授に深く感謝いたします。

本研究の開始にあたりご尽力いただきました株式会社三和化学研究所 取締役常務執行役員 研究開発本部長兼信頼性保証本部長兼 OSDrC 事業担当 野田 倫 博士、同執行役員 研究開発本部副本部長 武田 基宏 博士に深く感謝いたします。

本論文作成の機会を与えていただくとともに、英語論文執筆のご指導を賜りました株式会社三和化学研究所 執行役員 ライセンス部長 渡邊 信英 博士に深く感謝いたします。

本論文作成にあたりご理解とご激励を賜りました株式会社三和化学研究所 研究開発企画部長 鈴木 猛志 博士に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者であり多大なご支援とご激励を賜りました株式会社三和化学研究所 坂入 将夫 博士、加藤 憲泰 氏、牧野 充弘 博士、高橋 直希 博士、宮澤 俊行 氏、原田 聡子 氏、山下 篤行 博士、前田 宏治 氏、元株式会社三和化学研究所 小上 将和 博士に深く感謝いたします。

本研究におけるサンプルの純度、HRMS 測定をしていただきました株式会社三和化学研究所 村瀬 貴代 博士に深く感謝いたします。

化合物の大量合成に関しご支援とご協力をいただきました浜理薬品工業株式会社、米沢浜理薬品工業株式会社の方々に深く感謝いたします。

最後に、本論文の作成のために、執筆の時間確保に協力し、終始温かく応援してくれた家族に感謝します。