

東海大学大学院 平成 25 年度 博士論文

血管内皮細胞増殖因子受容体 2
キナーゼ阻害薬の合成研究

大黒 裕哉

略語

| | |
|---------------|---|
| AcOEt | Ethyl acetate |
| Asn | Asparagine |
| Asp | Aspartic acid |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| AUC | Area under the blood concentration time curve |
| Bu | Butyl |
| CDI | <i>N,N'</i> -Carbonyl diimidazole |
| Cys | Cysteine |
| c-Met | Hepatocyte growth factor receptor |
| DIEA: | <i>N,N'</i> -Diisopropylethylamine |
| DMA: | <i>N,N'</i> -Dimethylacetamide |
| DMF | <i>N,N'</i> -Dimethylformamide |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DPPA | Diphenylphosphonic azide |
| EDC | <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| ERK1 | Extracellular signal-regulated kinases |
| Et | Ethyl |
| FAK | Focal adhesion kinase |
| FGFR | Fibroblast growth factor receptor |
| Glu | Glutamic acid |
| GSK-3 β | Glycogen synthase kinase-3 β |
| HER2 | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| His | Histidine |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazole |
| IGF1-R | Insulin-like growth factor 1 receptor |
| Ile | Isoleucine |
| IPA | Isopropanol |
| IPE | Diisopropyl ether |
| IR | Insulin receptor |
| mCPBA | <i>m</i> -Chloroperoxybenzoic acid |
| Me | Methyl |
| Met | Methionine |

| | |
|--------------|--|
| Ms | Mesyl |
| NMP | <i>N</i> -Methylpyrrolidone |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| PDB | Protein data bank |
| PDGFR | Platelet-derived growth factor receptor |
| Pd/C | Palladium on carbon |
| Ph | Phenyl |
| PKC θ | Protein kinase C θ |
| p38MAP | p38 Mitogen-activated protein kinase |
| RNA | Ribonucleic acid |
| Tf | Trifluoromethanesulfonyl |
| TFA | Trifluoroacetic acid |
| TFAA | Trifluoroacetic anhydride |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Tie-2 | Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2 |
| Tpl | Tumor progression locus-2 |
| Ts | <i>p</i> -Toluenesulfonyl |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| VEGFR | Vascular endothelial growth factor receptor |

目次

論文題目： 血管内皮細胞増殖因子受容体 2 キナーゼ阻害薬の合成研究

第 1 章 序論

- 1.1 がんと薬物療法
- 1.2 血管新生と VEGFR2 キナーゼ阻害薬
- 1.3 研究の目的と方針
- 1.4 Type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬のドラッグデザイン

参考文献

第 2 章 ピロロ[3,2-*d*]ピリミジンを含むウレア誘導体の合成と生物評価

- 2.1 はじめに
- 2.2 合成
- 2.3 構造活性相関
- 2.4 **20d** と VEGFR2 の複合体 X 線結晶構造解析
- 2.5 **20d** の生物評価
- 2.6 まとめ

実験の部

参考文献

第 3 章 イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンを有するアニリド誘導体の合成と生物評価

- 3.1 はじめに
- 3.2 合成
- 3.3 構造活性相関
- 3.4 まとめ

実験の部

参考文献

第 4 章 2-アシルアミノイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンを有するアニリド誘導体の合成と生物評価

- 4.1 はじめに
- 4.2 合成
- 4.3 構造活性相関
- 4.4 **50** と VEGFR2 の複合体 X 線結晶構造解析

4.5 中央ベンゼン環への置換基導入

4.6 **54a** の生物評価

4.7 まとめ

実験の部

第5章 新規 5,6 縮合環を有するアニリド誘導体の合成と生物評価

5.1 はじめに

5.2 合成

5.3 構造活性相関

5.4 **65d** の生物評価

5.5 まとめ

実験の部

参考文献

第6章 VEGFR/FGFR dual キナーゼ阻害薬の合成と生物評価

6.1 はじめに

6.2 合成

6.3 構造活性相関

6.4 **94l** の生物評価

6.5 まとめ

実験の部

参考文献

第7章 総括

本論文に関わる研究業績

謝辞

第1章 序論

1.1 がんと薬物治療

がん(悪性腫瘍)は、遺伝子変異等の原因により正常細胞に元来備わっていた制御機構を逸脱した細胞集団であり、その特徴として、無制限の自律的な増殖、正常組織への浸潤、他臓器への転移を引き起こす。厚生労働省の人口動態統計¹⁾によると、がんは日本人の死因第一位を占める疾患であり、全死亡者の30%ががんで亡くなっている。現在、日本人の2人に1人ががんに罹患する状況であり、その数は年々増加の一途をたどっている。かかる状況を鑑み、平成18年にがん対策基本法が制定され、がんの予防・早期検診の推進、治療法の促進等、国を挙げてがん対策を推進している。

がんの治療法は、外科療法、放射線療法、薬物療法、の3つから成る。外科療法および放射線療法は局所がんの有効であるのに対し、薬物療法は全身的ながん、転移がん、白血病等の非固形がんの治療に利用される。がんの薬物療法の歴史は、ナイトロジェンマスタードから始まる²⁾。ナイトロジェンマスタードは、化学兵器として使用されていたマスタードガスの誘導体であり、当時唯一のがん治療法であったX線照射と同様に突然変異を引き起こすことから注目され、悪性リンパ腫の治療薬として使用された。ナイトロジェンマスタードの細胞毒性発現メカニズムは、分子中のクロロエチル基がDNAをアルキル化することにより、DNA二重鎖間の架橋を引き起こし(Figure 1-1)、その結果DNAの複製およびRNAへの転写が阻害されることによる。その後、同様のメカニズムにより細胞毒性を発現する改良型アルキル化剤が開発され、現在、悪性リンパ腫等の治療薬として使用されている。また、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、微小管重合・脱重合阻害剤等、アルキル化剤以外のメカニズムにより細胞毒性を示す抗がん剤も開発され、がんの性質に合わせてこれらの抗がん剤が使い分けられている³⁾。

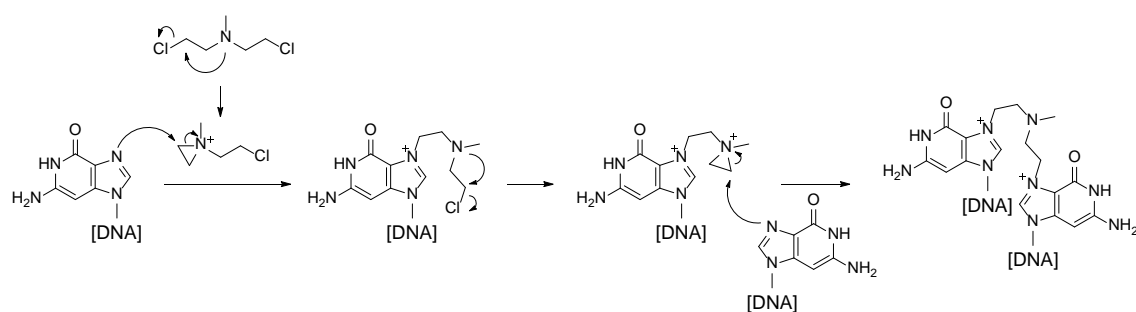


Figure 1-1 Reaction mechanism of nitrogen mustard

しかしながら、従来の抗がん剤は、がんの増殖速度が早い性質に着目し開発されたものであるため、がんと同様増殖速度が早い正常細胞にも影響する。従って、脱毛、血球数現象、消化管障害等の重篤な副作用が回避できない。近年、これらの課題を解決する新しい概念として、がん細胞特異的な分子を狙い撃ちする分子標的薬が登場した。慢性骨髄性白血病(CML)治療薬として承認された **imatinib** は、CML 細胞特異的に発現し、異常な細胞増殖の責任分子となっている **bcr-abl** をターゲットとする化合物である⁴⁾。**Imatinib** 承認以前に使用されていた α -インターフェロンは、服用患者の 5 年生存率が 5 割程度に留まっていた⁵⁾。また、注射剤であることから患者の負担が大きく、発熱、肝臓障害等の重篤な副作用もしばしば認められた。対して、**imatinib** は、CML 患者の 5 年生存率を 9 割程度へと飛躍的に向上させた⁶⁾。さらに、**imatinib** は飲み薬であるため在宅治療が可能で、副作用も軽微であることから、**quality of life(QOL)** も大きく改善した。一方、分子標的薬は、ターゲット特異性が高いがゆえに効果を示すがん細胞に限られるため、がん細胞ごとに個別の標的を同定し、薬剤を開発する必要がある。そこで、正常細胞には認められず、がん細胞に共通した特徴を標的とする新規メカニズムとして、がん間質をターゲットとする抗がん剤が注目を集めている⁷⁾。がん細胞の周囲には、繊維芽細胞、炎症性細胞、血管内皮細胞等から成るがん間質が存在する。近年の研究結果から、がん間質はがん細胞の増殖、生存、浸潤、転移等に深く関与し、がんの悪性度ががん細胞自身の性質のみならず、がん間質にも依存することが明らかとなりつつある。従って、がん間質の働きを抑制することにより、がん細胞を直接のターゲットとする既存の抗がん剤では効果が低いがんへの効果が期待できる。特に、間質で引き起こされる血管新生は、腫瘍の増殖、転移等に極めて重要な役割を果たすことが知られていることから、腫瘍血管新生を標的とする抗がん剤の研究が活発に行われている⁸⁾。

1-2 血管新生と VEGFR2 キナーゼ阻害薬

固形腫瘍の発症・進展には、既存の血管より腫瘍に対して新生血管が形成される現象、すなわち血管新生が深く関与する。1970年代にユダ・フォルクマン⁹⁾によって、血管新生の腫瘍増殖への重要性が提唱されて以降、生物学のおよび分子生物学的な機構が解明され、がんは血管を新生させることで酸素や栄養を引き込み、新生血管をたどって全身に転移巣をつくることが明らかにされた。この発見を契機として、腫瘍に酸素と栄養を供給する新生血管を攻撃し、腫瘍を”兵糧攻め”にして治療する血管新生阻害薬の開発が盛んになった¹⁰⁾。血管新生阻害を目的とした抗癌剤は、癌細胞自身をターゲットとした抗がん剤と比較すると次の4つの特徴がある。すなわち、①固形腫瘍は程度の差はあるものの、自身の増殖を血管新生に依存しているため、効果を示す癌種が広い、②標的が血管であるため、薬剤が到達し易い、③血管新生は、成人において創傷治癒の過程等の限られた場合のみ関与するため、作用機序に基づく副作用の懸念が小さい、④変異を引き起こし易いがん細胞ではなく、正常細胞がターゲットであるため、薬物耐性の懸念が小さい、ことが考えられる¹¹⁾。

腫瘍血管新生は、以下に示す過程で引き起こされる。①がん細胞から産生される血管新生因子により血管内皮細胞が刺激されると、②血管内皮細胞がタンパク質分解酵素を産生し基底膜を分解することにより、③血管内皮細胞が遊走、増殖し、がん細胞の周辺に新たな管腔(新生血管)が形成される¹²⁾。従って、上記のいずれかの過程を阻害することにより腫瘍血管新生を阻害できると考えられる。現在開発中の血管新生阻害剤の中で最も開発が進んでいるのが、①の「血管新生因子による血管内皮細胞の刺激」を抑制する薬剤である。この過程において中心的な役割を担うのが、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor、VEGF)と血管内皮細胞増殖因子受容体(VEGF receptor、VEGFR)2によるシグナル伝達系である。VEGFは、VEGF-Aと6つのサブタイプから成る糖タンパク質であり、血管内皮細胞に特異的に作用し、細胞増殖因子および強力な血管透過性亢進因子として機能する¹³⁾。VEGFは、上皮系細胞から間葉系細胞までさまざまな種類の正常細胞が発現する。さらに、ほとんどのがん細胞、特にがん腫および肉腫は、VEGFを正常組織と比べて高く発現する。一方、VEGFに対して親和性を示す受容体として、受容体型チロシンキナーゼであるVEGFR1 (Flt1)、VEGFR2 (KDR/ Flk1)、VEGFR3等が知られている。特に、VEGFR2を介するシグナルは、他のVEGF受容体と比較し、細胞増殖、細胞移動、細胞の活着、および血管形成に大きく関与する¹⁴⁾。VEGF刺激はVEGFR2の二量化および細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を誘発し、さらに下流のAktやMAP、ERKキナーゼ等のリン酸化を引き起こすことで、上述の機能を果たす (Figure 1-2)。

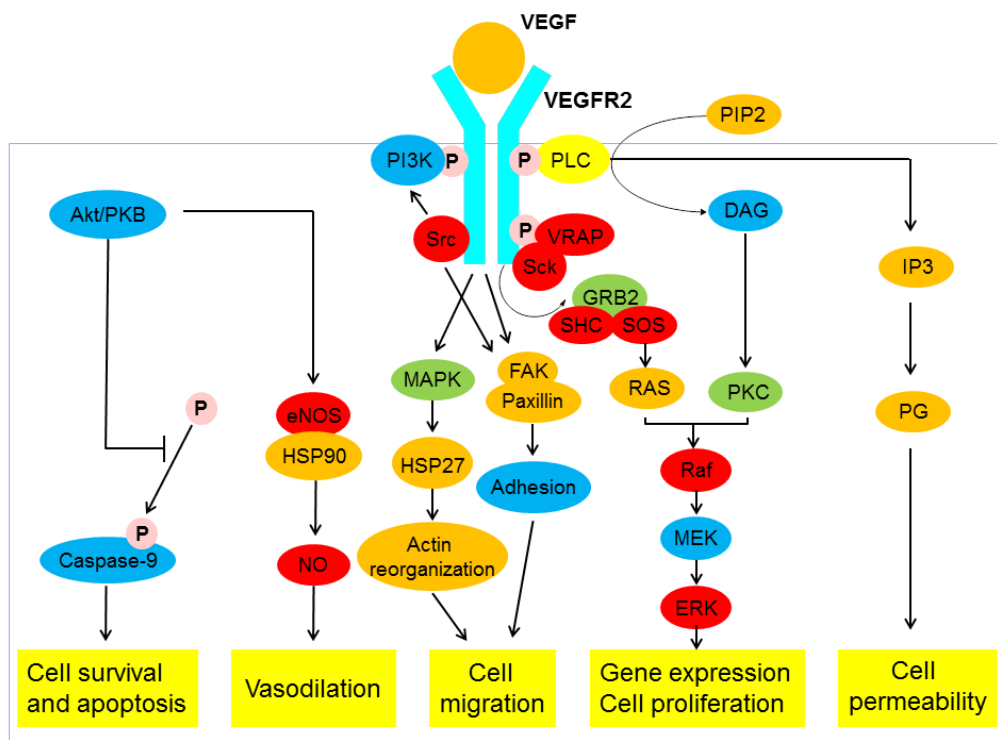


Figure 1-2 VEGFR2 signaling.

VEGF-VEGFR2 シグナルを阻害する薬剤は、強力な血管新生阻害作用を示すと考えられることから、本メカニズムを標的とする薬剤の開発が精力的に行われている。その先駆けとして登場したのが、抗 VEGF ヒトモノクローナル抗体 bevacizumab (Avastin™)である¹⁵⁾。Bevacizumab は、VEGF に特異的に結合することにより、VEGF と VEGFR2 の結合を阻害する。未治療転移性大腸癌を対象とした臨床試験において、bevacizumab とイリノテカン・フルオロウラシル・ロイコボリン療法(IFL 療法)との併用群は、IFL 療法単独群と比較し有意に生存期間中央値を延長させたことから、2004 年に未治療転移性大腸癌の治療薬として承認された¹⁶⁾。その後、非小細胞肺癌、乳がん、腎がん、神経膠芽腫の治療薬としても承認されたことから、当初の予想通り、血管新生阻害剤が幅広いがんに対して有効性を示すことが明らかとなった。一方、bevacizumab は注射剤であるため、QOL を考慮すると経口投与できる薬剤が好ましい。一般的に、経口投与により体内に吸収される薬剤は、分子量が 500 以下の低分子化合物である。一方、VEGF には低分子化合物が結合可能なポケットが存在しない可能性が高いため、VEGF をターゲットとする低分子化合物の開発は困難と考えられる。また、VEGFR2 の受容体領域もタンパク-タンパク相互作用の場であるため、低分子が結合するのは困難で、実際現在までに低分子阻害剤の報告はない。対して、VEGFR2 のキナーゼ領域には ATP 結合ポケットが存在することから、本ポケットを指向する低分子阻害剤は実現可能性が高い。そこで本研究では、VEGFR2 のキナーゼ領域に結合する低分子 VEGFR2 キナーゼ阻害薬の創出を目的に研究を行うことにした。

1.3 研究の目的と方針

低分子キナーゼ阻害薬を開発するに当たっては、克服すべき様々な課題がある。その一つがキナーゼ選択性の確保である。前述したように、低分子キナーゼ阻害薬は、ATP 結合サイトを占有することにより阻害作用を示す。しかしながら、ATP 結合サイトはキナーゼ間で構造が極めて似ているため、目的のキナーゼ以外に毒性に関わるキナーゼも同時に阻害してしまう懸念がある。実際、VEGFR2 キナーゼ阻害薬として最初に承認された sunitinib (Figure 1-3)は、非常に多くのキナーゼを阻害する¹⁷⁾。また、薬効に関しても、純粋な ATP 拮抗型キナーゼ阻害薬は、ATP 濃度が非常に高い細胞内で十分な阻害活性が認められないことがしばしば問題となる。

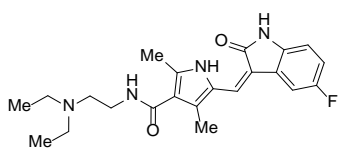


Figure 1-3 Structure of sunitinib.

そこで、これらの課題を克服するアプローチとして、キナーゼ阻害薬の結合様式に着目した。ATP 結合サイトを利用するキナーゼ阻害薬は、その結合部位によって大きく 2 種類に分類される。すなわち、ATP 結合サイトおよびその周辺部位に結合する type 1 阻害薬 (Figure 1-4, (A))と、ATP 結合サイトに加え、キナーゼのコンフォメーション変化に伴い形成されたバックポケットと呼ばれる奥深くのポケットを占有する type 2 阻害薬 (Figure 1-4, (B))の 2 種である¹⁸⁾。Type 2 阻害薬は、キナーゼの activation ループと呼ばれる部位に存在するアスパラギン酸、フェニルアラニン、グリシンから成るモチーフ (DFG モチーフ)のフェニルアラニン残基が、本来存在するバックポケット側から溶媒側にフリップすることにより、activation ループの位置が活性コンフォメーションのそれとは大きくずれた形になる (不活性コンフォメーションになる)。それに伴い、本来 DFG モチーフが占有していたバックポケットを type 2 キナーゼ阻害薬が占有することにより不活性コンフォメーションを安定化させる。Type 2 キナーゼ阻害薬は、キナーゼ間での相同性が低いバックポケットを占有することから、キナーゼ選択性を確保し易いと考えられる。また、解離速度が遅い化合物の存在も報告されている¹⁹⁾。これらの点から、type 2 阻害薬は従来のキナーゼ阻害薬 (type 1 阻害薬)が抱える安全面、薬効面の課題を克服できる可能性があると考えられる。そこで、新規 type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬創出を目的にドラッグデザインを行うこととした。

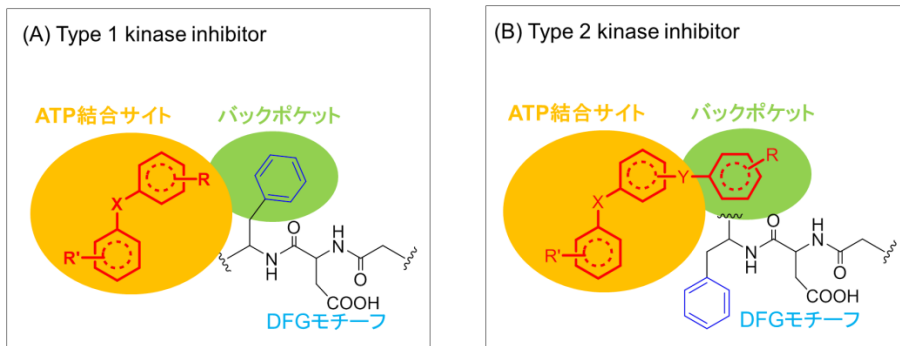


Figure 1-4 Comparison of type1 and type 2 kinase inhibitor.

1.4 Type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬のドラッグデザイン

先に述べたように、type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬は、type 1 VEGFR2キナーゼ阻害薬と比較し、安全面、薬効面の両者において優れると考えられる。一方、type 2キナーゼ阻害薬を論理的にデザインする手法は確立されておらず、これまで見出された化合物は、ハイスループットスクリーニング等で偶然発見されたもの、あるいは既知type 2キナーゼ阻害薬をベースにした化学修飾によるものであった。そこで、type 2キナーゼ阻害薬の一般的デザイン手法の確立と、本手法を利用した新規type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬のデザインを試みた。

2000年、Schindlerらによりimatinibとablキナーゼの複合体結晶構造が明らかにされた²⁰。Imatinibは、ablの不活性コンフォメーションに結合し、3つの特徴的な相互作用を形成するtype 2 キナーゼ阻害薬であることが判明した。すなわち、①通常ATPのアデニンが占有するヒンジ領域と呼ばれる部位において、ピリジンがMet318の主鎖NHと水素結合し、②アミド部分がバックポケットに存在するAsp381 主鎖アミドプロトン及びGlu286 側鎖カルボキシル基とそれぞれ水素結合し、③分子右部のベンゼン環が脂溶性ポケットを占有していた (Figure 1-5, (a))。興味深いことに、Gillらにより報告されたウレア誘導体とp38 MAPキナーゼとの複合体結晶構造においても、化合物がp38 MAPキナーゼの不活性コンフォメーションに結合し、imatinib-abl複合体と同様の相互作用を形成していた (Figure 1-5, (b))²¹。また、腎がん等の適応で承認されたsorafenib (BAY43-9006)とB-rafの複合体結晶構造からも、同様の相互作用が観察された (Figure 1-5, (c))²²。これらの結果、type 2キナーゼ阻害薬は、キナーゼとの相互作用に関与する3つの共通部分構造として、ヒンジ領域において主鎖アミドプロトンと相互作用するヘテロ環(A、以後ヒンジバインダーと記載)、アミドおよびウレア等の水素結合ドナー/アクセプター(Y)、フェニル基等の脂溶性基(R)、を有することが判明した (Figure 1-6)。一方、これら3つの部分構造の位置関係は、標的とするキナーゼにより様々であった。従って、Figure 1-6に示すように、これら3つの部分構造をリンカーを介して適切な位置に配置することで、所望のキナーゼに選択的に結合する化合物を見出せると考えた。そこで本研究では、本デザイン仮説を基に、type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬の創出を試みた。

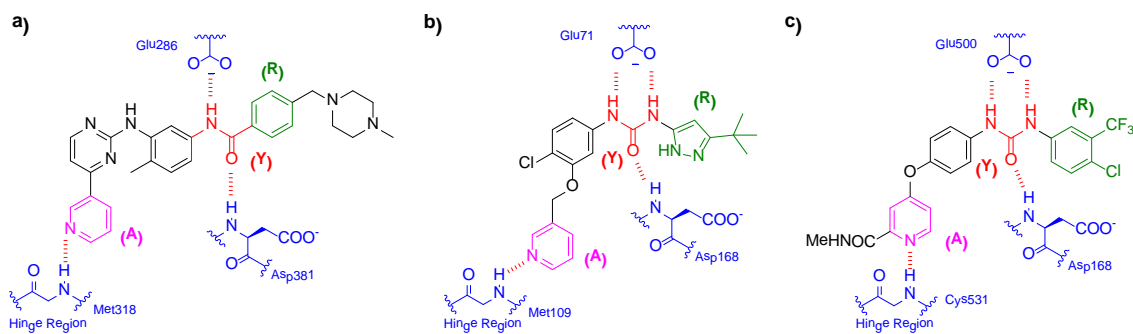


Figure 1-5 Binding mode of (a) imatinib with abl, (b) urea derivative with p38, (c) sorafenib with B-raf.

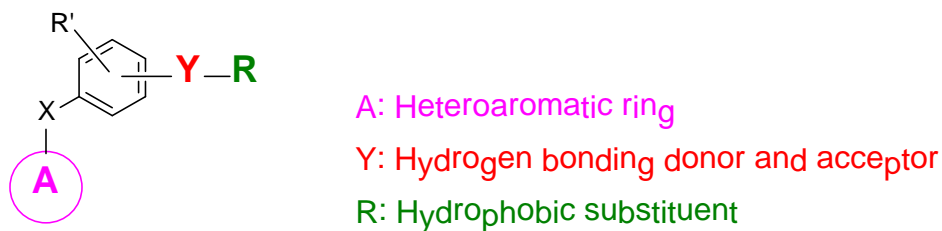


Figure 1-6 Design of type 2 VEGFR2 kinase inhibitors.

参考文献

- 1) 厚生労働省平成24年人口動態統計月報年計
- 2) Gilman, A. *Am. J. Surg.* **1963**, *105*, 574-578.
- 3) 矢沢サイエンスオフィス編, “抗がん剤のすべてがわかる本”, 学研パブリッシング, 東京, 2013.
- 4) Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N. B. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 561-566.
- 5) Sawyers, C. L. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 1330-40.
- 6) Druker, B. J.; Guilhot, F.; O'Brien, S. G.; Gathmann, I.; Kantarjian, H.; Gattermann, N.; Deininger, M. W.; Silver, R. T.; Goldman, J. M.; Stone, R. M.; Cervantes, F.; Hochhaus, A.; Powell, B. L.; Gabrilove, J. L.; Rousset, P.; Reiffers, J.; Cornelissen, J. J.; Hughes, T.; Agis, H.; Fischer, T.; Verhoef, G.; Shepherd, J.; Saglio, G.; Gratwohl, A.; Nielsen, J. L.; Radich, J. P.; Simonsson, B.; Taylor, K.; Baccarani, M.; So, C.; Letvak, L.; Larson, R. A. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 2408-17.
- 7) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646-74.
- 8) Moserle, L.; Casanovas, O. *J. Intern. Med.* **2013**, *273*, 128-137.
- 9) Folkman, J. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31.
- 10) Ferrara, N.; Kerbel, R. S. *Nature*, **2005**, *438*, 967-974.
- 11) Feron, O. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 536-542.
- 12) a) Bergers, G.; Benjamin, L. E. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 401-410. b) Kleibeuker, E. A.; Griffioen, A. W.; Verheul, H. M.; Slotman, B. J.; Thijssen, V. L. *Drug Resistance Updates* **2012**, *15*, 173-182.
- 13) a) Olsson, A. K.; Dimberg, A.; Kreuger, J.; Claesson-Welsh, L. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 359-371. b) Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M. S.; Wildiers, H.; Van Oosterom, A. T.; De Bruijn, E. A. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 549-580.
- 14) Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J. *Cell Signal.* **2007**, *19*, 2003-12.
- 15) Presta, L. G.; Chen, H.; O'Connor, S. J.; Chisholm, V.; Meng, Y. G.; Krummen, L.; Winkler, M.; Ferrara, N. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4593-9.
- 16) Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; Ferrara, N.; Fyfe, G.; Rogers, B.; Ross, R.; Kabbinavar, F. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2335-42.
- 17) Lydon, N. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1153-1157.
- 18) a) Liu, Y.; Gray, N. S. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 358-64. b) Eck, M. J.; Manley, P. W. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 288-295.

- 19) Pargellis, C.; Tong, L.; Churchill, L.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Grob, P. M.; Hickey, E. R.; Moss, N.; Pav, S.; Regan, J. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 268-272.
- 20) Schindler, T.; Bornmann, W.; Pellicena, P.; Miller, W. T.; Clarkson, B.; Kuriyan, J. *Science* **2000**, *289*, 1938-1942.
- 21) Gill, A. L.; Frederickson, M.; Cleasby, A.; Woodhead, S. J.; Carr, M. G.; Woodhead, A. J.; Walker, M. T.; Congreve, M. S.; Devine, L. A.; Tisi, D.; O'Reilly, M.; Seavers, L. C.; Davis, D. J.; Curry, J.; Anthony, R.; Padova, A.; Murray, C. W.; Carr, R. A.; Jhoti, H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 414-426.
- 22) Wan, P. T.; Garnett, M. J.; Roe, S. M.; Lee, S.; Niculescu-Duvaz, D.; Good, V. M.; Jones, C. M.; Marshall, C. J.; Springer, C. J.; Barford, D.; Marais, R. *Cell* **2004**, *116*, 855-867.

第2章 ピロロ[3,2-d]ピリミジンを有するウレア誘導体の合成と生物評価

2.1 はじめに

本章では、第1章で提示したデザイン仮説に従い、新規type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬を創出することを目的に研究を行った。

前述したように、type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬は、①ヒンジバインダー(A)、②水素結合ドナー/アクセプター(Y)、③脂溶性基(R)の3つの部分構造を適切に配置することにより創出できると考えられる。そのうち、ヒンジバインダーは、ATPのアデニンが存在するヒンジ領域と呼ばれる部位を占有する。ATPがキナーゼと結合する際、アデニンの1位窒素原子が水素結合アクセプターとしてヒンジ領域のアミノ酸残基との相互作用に参与する(Figure 2-1)。従って、ヒンジバインダーは、アデニン同様、水素結合アクセプターを有する含窒素ヘテロ環であることが多い。

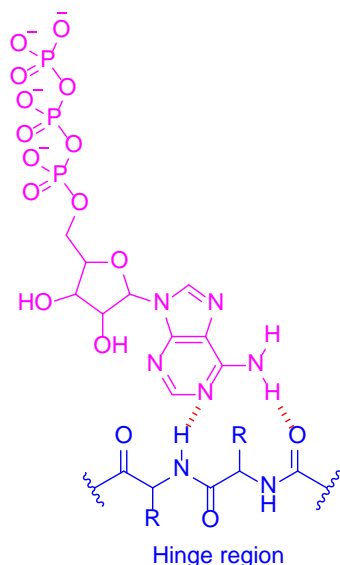


Figure 2-1 Binding mode of ATP and kinase.

ヒンジ領域はキナーゼ間で3次元構造が類似しているため、ヒンジバインダーは様々なキナーゼ阻害薬において共通して利用可能であることが知られている。例えば、アストラゼネカ社において見出されたキナゾリンは、EGFR阻害薬¹⁾、Src阻害薬²⁾、VEGFR阻害薬³⁾等に用いられている。また、ワイス社(現ファイザー社)において見出されたシアノキノリンは、EGFR阻害薬⁴⁾、Src阻害薬⁵⁾、Tpl2阻害薬⁶⁾等に用いられている(Figure 2-2)。



Figure 2-2 Quinazoline and cyanoquinoline based hinge binder.

自社オリジナルのヒンジバインダーを導入する利点として、新規性の確保が容易、合成法が既知、既存の化合物と異なるプロファイルを示す可能性、等が考えられる。これらの利点を考慮し、新規type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬のヒンジバインダーとして、自社キナーゼ阻害薬が有するオリジナルのヒンジバインダーを利用することとした。石川らによって見出されたピロロ[3,2-*d*]ピリミジンは、HER2/EGFRキナーゼ阻害薬のヒンジバインダーとして用いられた⁷⁾。ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体とHER2の複合体X線結晶構造解析結果から、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジンはヒンジ領域を占有し、1位窒素がMet801主鎖NHと相互作用していた。また、4位に導入したアニリノ基がバックポケットを占有することも判明した。そこで、本知見を基に、新規type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬として、Figure 2-3に示すピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体をデザインした。デザイン化合物の妥当性を検証するために、モデル化合物A (X = O, R' = Y-R = H)とVEGFR2の結合モデルを構築したところ、化合物Aは、ヒンジ領域のCys919主鎖NHと相互作用し、4位フェノキシ基がバックポケット方向に存在することが予想された。本結果から、フェニル基上への置換基(Y-R)導入により、バックポケットのアミノ酸と相互作用可能と考えられた。そこで本章では、種々の置換基(Y-R)を有するピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体を合成し、その評価を行うこととした。

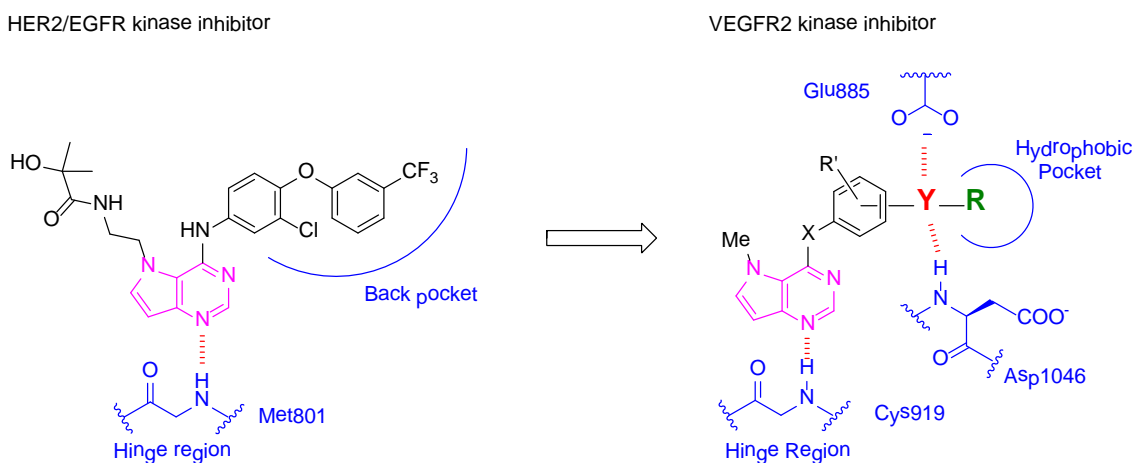


Figure 2-3 Design of novel type 2 VEGFR2 kinase inhibitors possessing a pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine scaffold.

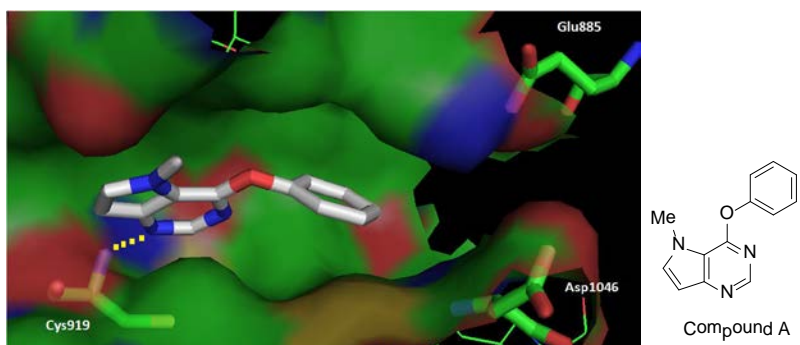
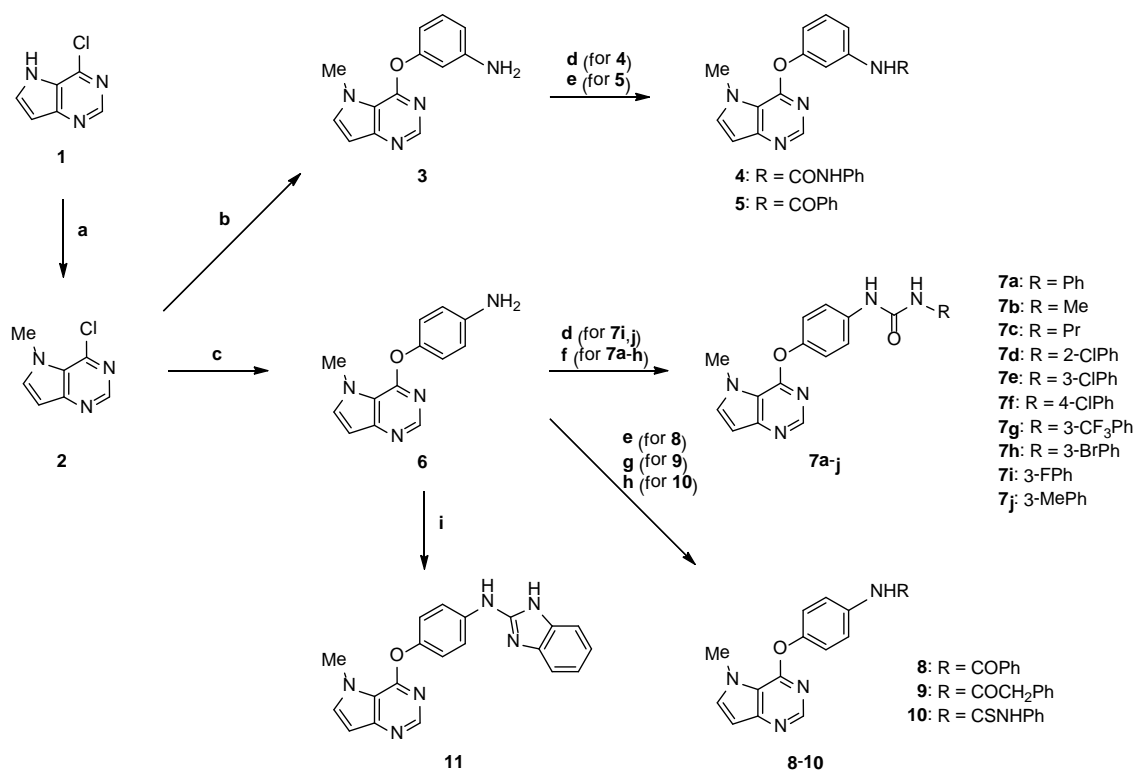


Figure 2-4 Binding model analysis of model compound A. Molecular modeling study was carried out using the program GOLD and the X-ray structure of VEGFR2 (PDB code: IVR2).

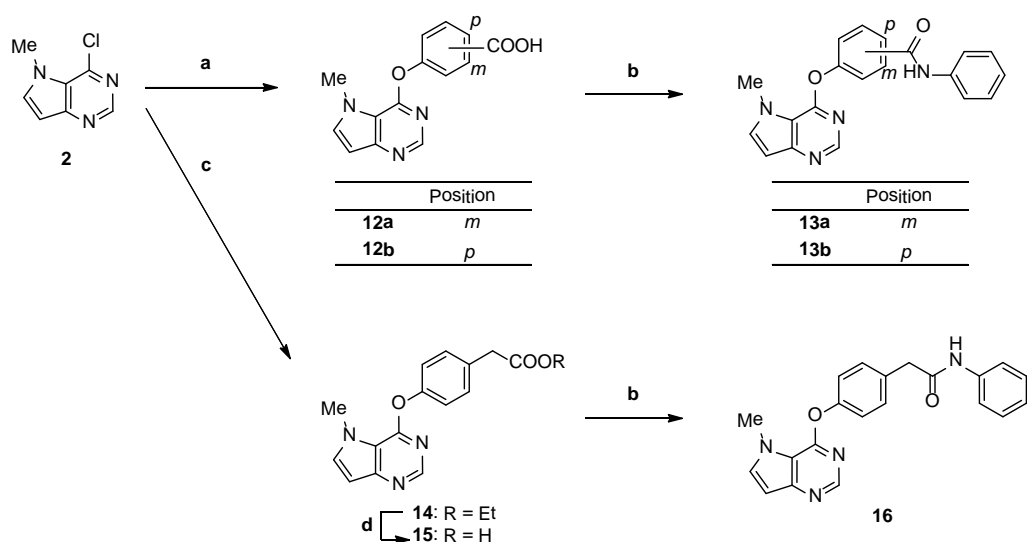
2.2 合成

Scheme 2-1にウレア、アミド、チオウレア、およびベンズイミダゾールを有する4-フェノキシ-ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体の合成法を示す。4-クロロピロロ[3,2-*d*]ピリミジン¹⁸⁾の5位NHをメタンスルホン酸メチルによりメチル化し**2**とした後、炭酸カリウム存在下、3-および4-アミノフェノールを作用させることにより、アニリン体**3**および**6**へと導いた。アニリン体**3**に対し、イソシアナ酸フェニルおよびベンゾイルクロリドを作用させることにより、ウレア体**4**およびアミド体**5**を得た。また、**6**に対し、イソシアナートを作用させることによりウレア体**7i, 7j**を、各種アミンと*N,N*-カルボニルジイミダゾール(CDI)を用いることによりウレア体**7a-h**へと導いた。さらに、**6**に対し、ベンゾイルクロリド、フェニル酢酸クロリド、イソチオシアナ酸フェニル、および2-クロロベンズイミダゾールを作用させることによりアミド体**8,9**、チオウレア体**10**、およびベンズイミダゾール体**11**をそれぞれ合成した。



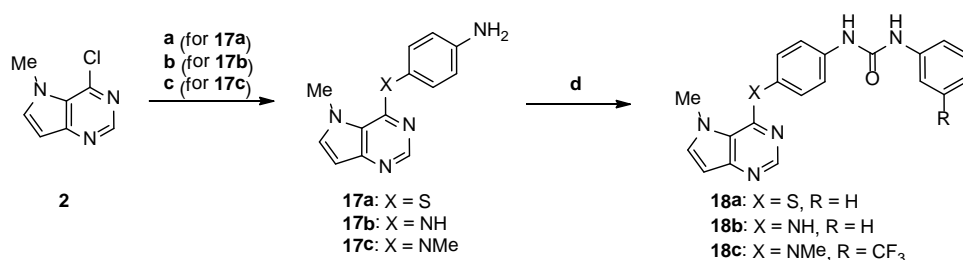
Scheme 2-1 Reagents: (a) MsOMe, Cs₂CO₃, DMF; (b) 3-aminophenol, K₂CO₃, NMP; (c) 4-aminophenol, K₂CO₃, NMP; (d) phenyl isocyanates, Et₃N, THF; (e) PhCOCl, Et₃N, THF; (f) amines, CDI, DMF; (g) PhCH₂COCl, Et₃N, THF; (h) PhNCS, Et₃N, THF; (i) 2-chlorobenzimidazole, NMP.

安息香酸誘導体**12a,b**およびエステル体**14**は、アニリン体**3**および**6**の合成と同様の条件により合成した(Scheme 2-2)。縮合剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC·HCl)と1-ヒドロキシベンズトリアゾール(HOBt)を用い、**12a,b**とアニリンを縮合反応に付すことにより、アミド体**13a,b**とした。また、**14**をアルカリ加水分解により**15**へと導き、次いで**13a,b**の合成と同様の条件でアニリンとの縮合反応を行い**16**を得た。



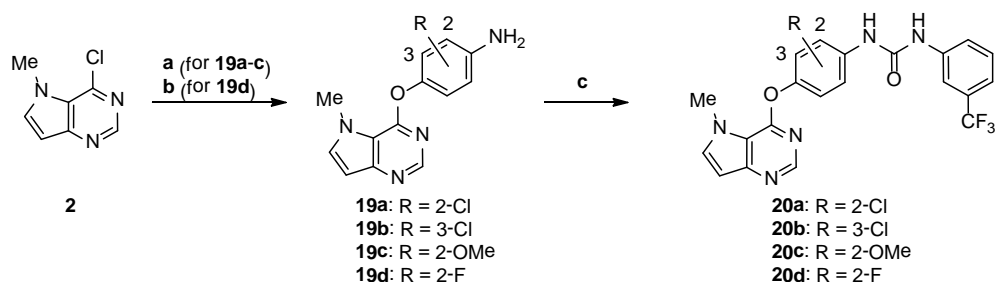
Scheme 2-2 Reagents: (a) 3- or 4-Hydroxybenzoic acid, Cs₂CO₃, DMSO; (b) aniline, EDC·HCl, HOBt, DMF; (c) ethyl 4-hydroxyphenylacetate, K₂CO₃, NMP; (d) NaOH, H₂O, MeOH.

Scheme 2-3に示す合成法により、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジンと中央ベンゼン環間のリンカーの変換を行った。硫黄リンカーを有する**17a**は、酸素リンカーを有する**6**と同様、炭酸カリウム存在下、**2**とアミノチオフェノールとの求核置換反応により合成した。一方、窒素リンカーを有する**17b,c**は、同様の条件で得ることができなかった。そこで、**17b**は**2**と4-ニトロアニリンを酸性条件下カップリングさせた後、ニトロ基を接触還元することにより合成し、**17c**は**2**と*N*-メチル-4-ニトロアニリンを水素化ナトリウム存在下カップリングさせた後、同じくニトロ基を接触還元することにより合成した。そして、**17a-c**に対し、対応するイソシアナートを作用させることによりウレア体**18a-c**へと導いた。



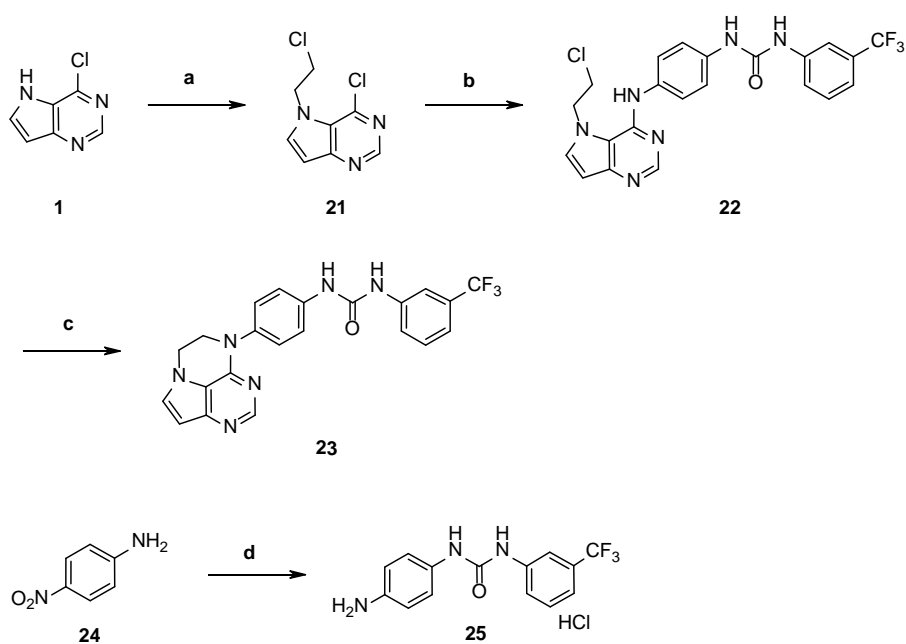
Scheme 2-3 Reagents: (a) 4-Aminothiophenol, K₂CO₃, NMP; (b) (1) 4-nitroaniline, IPA, 4 N HCl/AcOEt; (2) H₂, Pd/C, MeOH; (c) *N*-methyl-4-nitroaniline, NaH, DMF; (2) H₂, Pd/C, MeOH; (d) phenyl isocyanates, Et₃N, THF.

中央ベンゼン環に置換基を有する**20a-d**は、Scheme 2-4に示す方法により合成した。クロロおよびメトキシアニリン誘導体**19a-c**は、**6**の合成と同様の条件により合成した。対して、本条件を用いるとフルオロアニリン誘導体**19d**は得られなかった。反応生成物解析の結果、塩基性条件下においては、原料である3-フルオロ-4-アミノフェノールが自己カップリングすることが判明した。一方、非塩基性条件下において、**2**と3-フルオロ-4-アミノフェノールを反応させたところ、アミノ基がピロロ[3,2-*d*]ピリミジン4位に置換したフェノール体が生成した。そこで、非塩基性条件下において、**2**と3-フルオロ-4-ニトロフェノールを反応させた後、ニトロ基を接触還元することによりアニリン体**19d**を得ることに成功した。そして、**19a-d**に対し、3-(トリフルオロメチル)フェニルイソシアナートを作用させることにより**20a-d**を合成した。



Scheme 2-4 Reagents: (a) Aminophenols, K₂CO₃, NMP; (b) (1) 3-fluoro-4-nitrophenol, *o*-xylene; (2) Zn, NH₄Cl, MeOH; (c) 3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate, Et₃N, THF.

ピロロ[3,2,1-*de*]プテリジン誘導体**23**の合成法をScheme 2-5に示す。2-ブロモ-1-クロロエタンを用いて化合物**1**をアルキル化した後、得られた**21**とアニリン塩酸塩**25**とのカップリング反応により**22**へと導いた。そして、塩基性条件下加熱攪拌することにより、ピロロ[3,2,1-*de*]プテリジン環を構築し**23**を得た。尚、**25**は、4-ニトロアニリンに3-(トリフルオロメチル)フェニルイソシアナートを作用させウレア体とした後、ニトロ基の還元、塩酸塩形成を行うことによって調製した。



Scheme 2-5 Reagents: (a) 2-Bromo-1-chloroethane, Cs_2CO_3 , DMF; (b) **25**, IPA; (c) K_2CO_3 , DMF; (d) (1) 3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate, Et_3N , THF; (2) H_2 , Pd/C, MeOH; (3) 4 *N*HCl/AcOEt, AcOEt.

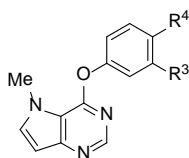
2.3 構造活性相関

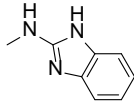
合成した化合物に対して、VEGFR2 キナーゼのリン酸化阻害活性(IC₅₀、以後VEGFR2 阻害活性)をAlphaScreen® 法⁹⁾により評価した。また、細胞系アッセイとして、VEGF 刺激下におけるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の増殖阻害試験を実施した。

最初に、バックポケット部位に存在するAsp1046 及びGlu885 と相互作用する部分構造の探索を目的に、R³ 及びR⁴ を変換した化合物について構造活性相関を取得した(Table 2-1)。分子右端にベンゼン環を有するウレアおよびアミド誘導体**4**、**5**、および**13a**は、IC₅₀ ≒ 1000 nMのVEGFR2阻害活性を示した。この結果から、これらの化合物がtype 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬として機能することが示唆された。次に、最適な置換位置を検討したところ、化合物**4**のフェニルウレイド基を3位から4位に移動させた**7a**において、顕著なVEGFR2 阻害活性向上(IC₅₀ = 33 nM)が認められた。一方、化合物**7a**のウレアNHの1つをメチレン(CH₂)へと変換したアミド体**9**および**16**において、またカルボニル(CO)をチオカルボニル(CS)へと変換した**10**において、いずれもVEGFR2阻害活性の大幅な減弱が認められた。さらに、ウレアと同様2つのNHとカルボニル酸素に相当する窒素原子を有するベンズイミダゾール誘導体**11**も、**7a**に対し100倍以上VEGFR2阻害活性が減弱した。以上の結果から、**7a**が有するウレアのNHとカルボニル酸素の全てが相互作用に関与することが示唆された。さらに、その相互作用が極めて厳密で、化合物**4**あるいは**11**の様に少しでも位置がずれると、効果的に相互作用できなくなることも判明した。

Table 2-1

Effect of R³ and R⁴ on VEGFR2 kinase inhibition ^a



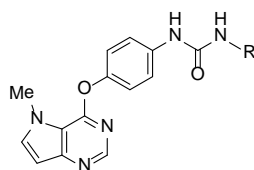
| Compd | R ³ | R ⁴ | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) |
|------------|----------------|---|------------------------------|
| 4 | NHCONHPh | H | 1800 (1600-2200) |
| 5 | NHCOPh | H | 940 (770-1100) |
| 13a | CONHPh | H | 870 (740-1000) |
| 7a | H | NHCONHPh | 33 (27-40) |
| 8 | H | NHCOPh | 9400 (7000-13000) |
| 13b | H | CONHPh | >10000 |
| 9 | H | NHCOCH ₂ Ph | >10000 |
| 16 | H | CH ₂ CONHPh | 3300 (2400-4500) |
| 10 | H | NHCSNPh | 6700 (5200-8800) |
| 11 | H |  | 4200 (3200-5600) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

Table 2-1の結果から、フェノキシ基の置換基として4位ウレイド基が適切であることが判明した。そこで次に、最適なウレア置換基(R)を探索した(Table 2-2)。まず、7aのフェニル基をサイズの小さなメチル基およびプロピル基に変換した7b、7cを評価したところ、100倍以上VEGFR2阻害活性が減弱した。この結果から、ウレア置換基はサイズが大きいこと、あるいは芳香族であることが重要と示唆された。続いて、フェニル基上の置換基探索を行った。最適な置換位置を調べる目的で、クロロ基を2位、3位、および4位に導入したところ、3位置換体7eが最も強力なVEGFR2阻害活性(IC₅₀ = 4.1 nM)を示した。VEGF 刺激下におけるHUVECの増殖阻害試験を実施した結果、無置換体7aがIC₅₀ = 810 nMのHUVEC増殖阻害活性を示したのに対し、7eはVEGFR2阻害活性向上に伴い、より強力なHUVEC増殖阻害(IC₅₀ = 110 nM)を示した。続いて、3位置換基の最適化を実施した。クロロ基と比較し分子サイズの小さなフルオロ基を導入した7iは、7eと比較しVEGFR2阻害活性が減弱した。対して、分子サイズが同等もしくは大きいトリフルオロメチル体7g、ブロモ体7h、およびメチル体7jにおいては、強力なVEGFR2阻害活性を維持した。さらに、トリフルオロメチル体7gは、3位置換体の中で最も強力なHUVEC増殖阻害活性(IC₅₀ = 22 nM)を示した。

Table 2-2

Effect of urea substituents on VEGFR2 kinase and HUVEC growth inhibition^a



| Compd | R | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) | HUVEC ^b IC ₅₀ (nM) |
|-------|----------------------|------------------------------|--|
| 7a | Ph | 33 (27-40) | 810 (630-1000) |
| 7b | Me | 6300 (4800-8400) | 24000 (21000-27000) |
| 7c | Pr | 3900 (3300-4600) | 24000 (21000-27000) |
| 7d | 2-ClPh | 340 (280-400) | 2700 (2300-3200) |
| 7e | 3-ClPh | 4.1 (3.4-5.0) | 110 (84-130) |
| 7f | 4-ClPh | 32 (26-40) | 1100 (940-1300) |
| 7g | 3-CF ₃ Ph | 5.3 (4.4-6.3) | 22 (16-30) |
| 7h | 3-BrPh | 4.4 (3.9-5.1) | 44 (31-63) |
| 7i | 3-FPh | 19 (16-22) | 290 (230-370) |
| 7j | 3-MePh | 2.7 (2.3-3.1) | 62 (38-110) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

^b Inhibition of HUVEC proliferation.

ピロロ[3,2-*d*]ピリミジンと中央ベンゼン環を結ぶリンカー(X)の変換を行った(Table 2-3)。化合物**7a**の酸素リンカーを硫黄リンカーに変換した**18a**は、VEGFR2阻害活性が約3倍の減弱に留まったのに対し、アミノリンカーに変換した**18b**は、約40倍活性が減弱した。メチルアミノリンカーに変換した**18c**はさらにVEGFR2阻害活性が減弱(IC₅₀ > 10000 nM)したことから、アミノ基がピロロ[3,2-*d*]ピリミジン5位メチル基と立体反発を引き起こし、活性コンフォメーションを不安定化することが示唆された。リンカーアミノ基部位とピロロ[3,2-*d*]ピリミジン5位間で環形成し立体反発をなくした化合物**23**において、強力なVEGFR2阻害活性(IC₅₀ = 7.1 nM)が認められたことから、本仮説の妥当性が示された。

Table 2-3

Effect of linker atoms on VEGFR2 kinase and HUVEC growth inhibition^a

| Compd | X | R | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) | HUVEC ^b IC ₅₀ (nM) |
|------------|--|-----------------|------------------------------|--|
| 7a | O | H | 33 (27-40) | 810 (630-1000) |
| 7g | O | CF ₃ | 5.3 (4.4-6.3) | 22 (16-30) |
| 18a | S | H | 110 (65-170) | >10000 |
| 18b | NH | H | 1400 (1200-1600) | >10000 |
| 18c | N(Me) | CF ₃ | >10000 | >10000 |
| 23 | <div style="text-align: center;"> </div> | | 7.1 (6.3-8.1) | 230 (170-310) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

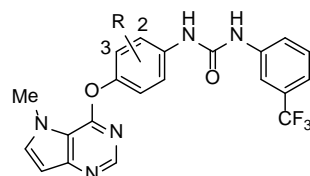
^b Inhibition of HUVEC proliferation.

最後に、中央ベンゼン環上の置換基導入効果を検討した(Table 2-4)。まず、2位および3位にクロロ基導入したところ、2位置換体**20a**が3位置換体**20b**と比較し強力なVEGFR2阻害活性を示した。2位クロロ体**20a**は、無置換体**7g**と比較してもVEGFR2阻害活性およびHUVEC増殖阻害活性が強力であったことから、さらに2位置換基の最適化を行った。その結果、メトキシ基を導入した**20c**はVEGFR2阻害活性とともにHUVEC増殖阻害活性が減弱したのに対し、フルオロ基を導入した**20d**はHUVEC増殖阻害活性が向上した。メトキシ基の導入が活性減弱を招いた要因として、①中央ベンゼン環が占有するポケットが非常にタイトなため、クロロ基より大きいメトキシ基は周辺アミノ酸と立体反発を誘起した、②電

子供与性のメトキシ基が導入されたことにより、ウレアNHの水素結合ドナー能が低くなり、周辺アミノ酸との相互作用が減弱した、ことが考えられる。次に、Table 2-4に示した化合物について、カセットドージングによりマウス経口吸収性を評価した。化合物10 mg/kgをマウスに経口投与したところ、**20d**は8時間後までの薬物血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) が10.9 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ と高値であった。また、**20d**の投与8時間後における血漿中濃度($C_{8\text{h}} = 0.803 \mu\text{g}/\text{mL} \approx 1.8 \mu\text{M}$)は、HUVEC IC_{50} 値(4.4 nM)の約400倍であった。以上の結果、**20d**は強力な*in vitro*活性と優れた経口吸収性を兼ね備えた化合物であることが判明したため、本化合物についてさらなる評価を行った。

Table 2-4

Effects of central phenyl ring substituents on *in vitro* and pharmacokinetic properties^a



| Compd | R | VEGFR2 IC_{50} (nM) | HUVEC ^b IC_{50} (nM) | Mice PK ^c | |
|------------|-------|------------------------------|--|---|--|
| | | | | AUC _{0-8h} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) ^d | $C_{8\text{h}}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^e |
| 7g | H | 5.3 (4.4-6.3) | 22 (16-30) | 11.7 | 0.570 |
| 20a | 2-Cl | 3.7 (3.4-4.1) | 13 (8.6-20) | 10.5 | 0.843 |
| 20b | 3-Cl | 30 (25-36) | 39 (25-60) | 9.10 | 0.584 |
| 20c | 2-OMe | 14 (11-17) | 87 (74-103) | 14.7 | 0.572 |
| 20d | 2-F | 6.2 (4.7-8.3) | 4.4 (3.0-6.4) | 10.9 | 0.803 |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

^b Inhibition of HUVEC proliferation.

^c Compounds were orally administered at a dose of 10 mg/kg by cassette dosing.

^d Area under the plasma concentration-time curve ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$).

^e Plasma concentration at 8 h after administration.

2.4 VEGFR2と20dの複合体X線結晶構造解析

化合物**20d**とVEGFR2の結合様式解明を目的に、複合体X線結晶構造解析を行った。解析結果から、**20d**は、当初のデザイン通りVEGFR2の不活性型コンフォメーションに結合するtype 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬であることが判明した(Figure 2-5)。既知type 2キナーゼ阻害薬同様、**20d**とVEGFR2の間で特徴的な3つの相互作用が確認された。ヒンジバインダーとして導入したピロロ[3,2-*d*]ピリミジンは、予想通りヒンジ領域を占有し、1位窒素がCys919主鎖NHと相互作用していた。そして、4位フェノキシ基を介して3-(トリフルオロメチル)フェニルウレイド基がバックポケットに結合していた。それに伴い、Phe1047のフェニル基はピロロ[3,2-*d*]ピリミジン周辺に押し出されていた(DFG-out)。バックポケットにおいては、2つのウレアプロトンとGlu885の側鎖カルボキシル基が水素結合し、カルボニル酸素とAsp1046の主鎖カルボニルとの水素結合も観察された。ウレアのNHおよびカルボニル酸素を変換した化合物**9**、**10**、および**16**においてVEGFR2阻害活性が大きく減弱した結果を考慮すると、これらの水素結合の全てが極めて重要であることが判明した。さらに、ウレア置換基として最も適切であった3-(トリフルオロメチル)フェニル基は、元々Phe1047のフェニル基が存在していた脂溶性ポケットを占有していた。この領域は比較的大きな脂溶性ポケットであるため、メチル基(**7a**)等サイズが小さなウレア置換基では効果的に相互作用できなかったものと考えられる。

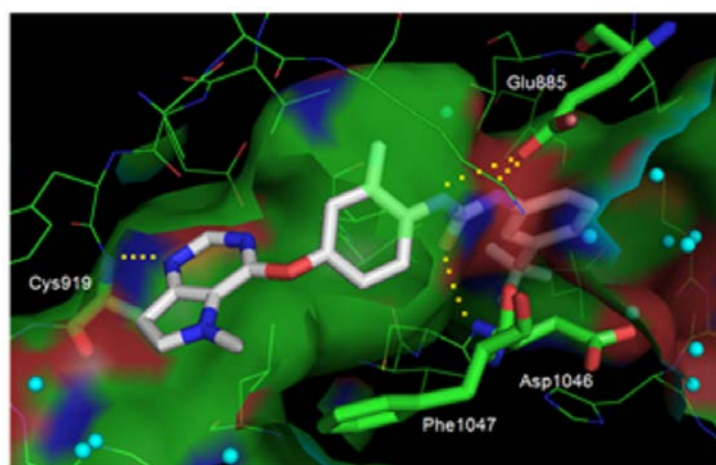


Figure 2-5 X-ray co-crystal structure of **20d** in complex with VEGFR2.

2.5 化合物**20d**の生物評価

前述したとおり、**type 2** キナーゼ阻害薬は、キナーゼ間で相同性が低いバックポケットに結合することから、キナーゼ選択性が高いと考えられる。そこで、**type 2 VEGFR2**キナーゼ阻害薬であることが判明した**20d**のキナーゼ選択性を評価した (Table 2-5)。18種のセリン/スレオニンおよびチロシンキナーゼに対する阻害活性を調べたところ、**20d**はVEGFR1に加えて、Tie-2、PDGFR α 、およびPDGFR β に対し、IC₅₀ < 100 nMの阻害活性を示すことが判明した。Tie-2、PDGFRはともに血管新生に関与するキナーゼとして知られている。Tie-2により引き起こされるシグナルは、血管の成熟化および安定化に寄与し¹⁰⁾、PDGFRからのシグナルは、血管の周皮細胞(pericyte)の増殖・遊走を引き起こすことにより血管構造を安定化させる¹¹⁾。従って、Tie-2、PDGFRの働きを抑制することにより、腫瘍血管新生のプロセスを幅広く阻害できることから、薬効面で相乗効果が期待できる。一方、c-kitを除いて、その他のキナーゼに対しては、VEGFR2と100倍以上の選択性を示した。従って、**type 2 VEGFR2**キナーゼ阻害薬の**20d**は、**type 1 VEGFR2**キナーゼ阻害薬のsunitinib (Figure 1-4)と比較すると選択性が非常に高いことが判明した。

Table 2-5

Kinase inhibition profile of **20d**^a

| kinase | IC ₅₀ (nM) | kinase | IC ₅₀ (nM) |
|----------------|-----------------------|--------------|-----------------------|
| VEGFR2 | 6.2 (4.7-8.3) | IGF1-R | >10000 |
| VEGFR1 | 15 (14-17) | c-kit | 170 (120-240) |
| PDGFR α | 35 (27-43) | Src | >10000 |
| PDGFR β | 96 (76-120) | FAK | 2600 (2000-3400) |
| FGFR1 | >10000 | B-raf | 900 (660-1200) |
| Tie-2 | 20 (17-23) | ERK1 | >10000 |
| HER2 | >10000 | PKC θ | >10000 |
| EGFR | >10000 | GSK3 β | >10000 |
| IR | >10000 | AuroraA | 1050 (660-1700) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

最後に、ヒト前立腺がん細胞DU145¹¹⁾移植マウスを用いた抗腫瘍試験を行った結果をFigure 2-6に示す。化合物**20d**の塩酸塩を1日2回、21日間マウスに経口投与後、腫瘍体積を測定した。その結果、**vehicle**投与群においては腫瘍体積が著しく増大したのに対し、化合物投与群は1.5 mg/kg投与群から有意に腫瘍の増殖を抑制した。また、6 mg/kgおよび12 mg/kg投与群においては、腫瘍の増殖を完全に抑制した。本試験において認められた優れた抗腫瘍効果は、**20d**が有する血管新生に関与するキナーゼを幅広く阻害する性質が寄与したものと推察された。また、全投与群において顕著な有害事象は認められなかったことから、安全面においても**20d**の優れた性質が反映されたと考えられる。

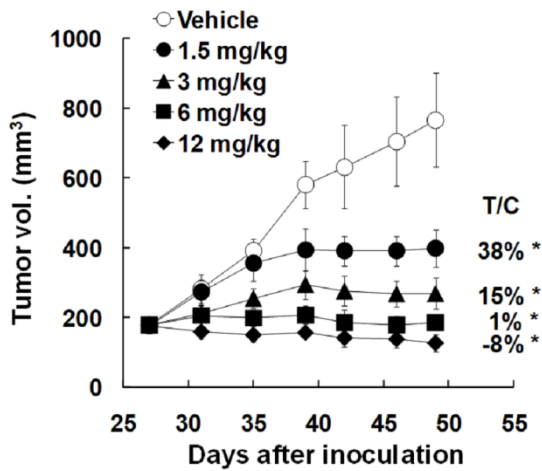


Figure 2-6 Efficacy of the hydrochloride of **20d** in DU145 tumor xenograft model. DU145 tumor-bearing mice were orally administered with the hydrochloride of **20d** (1.5, 3, 6, and 12 mg/kg) twice daily for 21 days. Data are shown as mean (standard deviation, SD) (n = 5). *: p < 0.025 versus vehicle control as determined by an onetailed Williams' test. Antitumor effects expressed as T/C (growth of treated tumor/growth of control tumor) x 100.

2.6 まとめ

新規 type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬の創出を目的に、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体をデザイン・合成した。ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン 4 位にフェノキシ基を有する化合物を種々合成し、強力な VEGFR2 阻害活性を示すフェニルウレイド体 **7a** を見出した。化合物 **7a** の末端ベンゼン環および中央ベンゼン環への置換基導入により、VEGFR2 阻害活性に加え、HUVEC 増殖阻害活性が大幅に増強された **20d** を創出した。化合物 **20d** と VEGFR2 の複合体 X 線結晶構造解析結果から、**20d** が type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬であることを明らかにした。さらに、**20d** は VEGFR とともに血管新生に関与する Tie-2 および PDGFR を強力に阻害する一方、その他キナーゼはほとんど阻害しない選択性が高い化合物であることを示した。これらの優れた特長が寄与し、ヒト前立腺がん細胞 DU145 移植マウスを用いた抗腫瘍試験において、**20d** は腫瘍の増殖を強力に抑制し、顕著な有害事象も認められなかった。以上の結果、type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬である **20d** は、薬効面、安全面ともに優れた化合物であると考えられる。

また、**20d** の創出に伴い、第一章で示した type 2 キナーゼ阻害薬のデザイン仮説の妥当性が示された。本デザインを用いることにより、VEGFR2 のみならず、所望のキナーゼに対する type 2 キナーゼ阻害薬を創出することが可能になったと考えられる。

実験の部

融点はBÜCHI B-545型融点測定器及びSRS OptiMelt融点測定器を用いて測定した。¹H-NMRスペクトルはBruker DPX-300(300 MHz)、Varian Mercury-300 型核磁気共鳴装置(300 MHz)あるいはVarian Gemini -200型核磁気共鳴装置(200 MHz)を用い、テトラメチルシランを内部標準として測定した。分裂様式の記載は、singlet, doublet, triplet, quartet, multiplet, broadenedをそれぞれs, d, t, q, m, brと略す。MS測定はWaters LC-MS system (ZQ, ZMD-1, ZMD-2)により行い、イオン化法は電子衝撃イオン法 (Electron Spray Ionization)を用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにはFuji Silysia Chemical 社製 Purif-PackあるいはMerck社製 Silica gel 60 およびFuji Silysia Chemical社製 Chromatorex NH-DM 1020 を用いた。薄層クロマトグラフィーにはMerck Kieselgel 60F254TLC PlateまたはFuji Silysia NH TLC plateを用いた。化合物の命名はIUPAC命名法に従って記載した。

4-Chloro-5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine (2)

化合物1(5.01 g, 32.5 mmol)、メタンスルホン酸メチル(3.07 g, 34.2 mmol)、炭酸セシウム(21.2 g, 65.2 mmol)、DMF(50 mL)の混合物を室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物を酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(4.36 g, 80%)を黄色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.09 (3H, s), 6.67–6.68 (1H, m), 7.95 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.57 (1H, s).

3-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]aniline (3)

化合物2 (2.08 g, 9.83 mmol)、3-アミノフェノール (1.29 g, 11.8 mmol)、炭酸カリウム (3.26 g, 23.6 mmol)、NMP(15 mL)の混合物を110 °Cで2時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をろ取後、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(1.46 g, 62%)を白色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.07 (3H, s), 5.28 (2H, brs), 6.34–6.50 (3H, m), 6.58 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.06 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.76 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 8.28 (1H, s).

1-{3-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-phenylurea (4)

化合物3 (579 mg, 2.41 mmol)、トリエチルアミン(1.00 mL, 7.22 mmol)のTHF(10 mL)溶液に、フェニルイソシアナート(314 μL, 2.89 mmol)を加え、混合物を室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無

水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(NHシリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(690 mg, 80%)を白色固体として得た。

Mp 177–179 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 4.10 (3H, s), 6.60–6.61 (1H, m), 6.88–6.98 (2H, m), 7.20–7.30 (3H, m), 7.35 (1H, t, J = 8.1 Hz), 7.43 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.57 (1H, t, J = 2.1 Hz), 7.79 (1H, d, J = 3.0 Hz), 8.29 (1H, s), 8.72 (1H, s), 8.86 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C, 66.51; H, 4.80; N, 19.39. Found: C, 66.35; H, 4.77; N, 19.25.

N{3-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}benzamide (5)

化合物**3** (415 mg, 1.73 mmol)、トリエチルアミン(719 μL , 5.19 mmol)のテトラヒドロフラン(10 mL)溶液に氷冷攪拌下、ベンゾイルクロリド(221 μL , 1.90 mmol)を加え、混合物を室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、表題化合物(262 mg, 44%)を白色固体として得た。

Mp 209–212 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 4.12 (3H, s), 6.61 (1H, d, J = 3.0 Hz), 7.04–7.07 (1H, m), 7.44 (1H, t, J = 8.1 Hz), 7.50–7.68 (4H, m), 7.80 (1H, d, J = 3.0 Hz), 7.84 (1H, t, J = 2.3 Hz), 7.93–7.97 (2H, m), 8.30 (1H, s), 10.41 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$: C, 69.76; H, 4.68; N, 16.27. Found: C, 69.58; H, 4.53; N, 16.07.

4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]aniline (6)

化合物**3**の合成と同様の方法により、表題化合物(60%)を黄色固体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 4.06 (3H, s), 5.04 (2H, brs), 6.53 (1H, d, J = 3.0 Hz), 6.58 (2H, d, J = 8.7 Hz), 6.91 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.70 (1H, d, J = 3.0 Hz), 8.21 (1H, s).

1-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-phenylurea (7a)

化合物**6** (150 mg, 0.624 mmol)、CDI(101 mg, 0.624 mmol)、DMF (3 mL)の混合物を室温で1時間攪拌した。反応混合物にアニリン(61.0 mg, 0.655 mmol)を加え、室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(NHシリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(75.1 mg, 34%)を白色固体として得た。

Mp 183–186 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 4.04 (3H, s), 6.53 (1H, d, J = 2.9 Hz), 6.90 (1H, t, J = 7.4 Hz), 7.14–7.26 (4H, m), 7.39–7.49 (4H, m), 7.71 (1H, d, J = 2.9 Hz), 8.21 (1H, s), 8.68 (1H, brs), 8.75 (1H, brs). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot 0.2\text{H}_2\text{O}$: C, 66.18; H, 4.83; N, 19.29. Found: C, 66.16; H, 4.73; N, 19.23.

化合物 **7b–h** は、**7a** の合成と同様の方法により合成した。

1-Methyl-3-{4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (7b)

収率 26%. Mp 190–196 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.59 (3H, d, *J* = 4.8 Hz), 4.03 (3H, s), 5.99 (1H, d, *J* = 4.8 Hz), 6.51 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.08 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.39 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.70 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.19 (1H, s), 8.54 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₅H₁₅N₅O₂·0.15H₂O: C, 60.05; H, 5.14; N, 23.34. Found: C, 60.16; H, 5.09; N, 23.09.

1-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-propylurea (7c)

収率 17%. Mp 184–187 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.86 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.37–1.46 (2H, m), 2.99–3.06 (2H, m), 4.07 (3H, s), 6.15 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.55 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.13 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.43 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.74 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.23 (1H, s), 8.48 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₇H₁₉N₅O₂: C, 62.75; H, 5.89; N, 21.52. Found: C, 62.56; H, 5.75; N, 21.36.

1-(2-Chlorophenyl)-3-{4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (7d)

収率 7.0%. Mp 196–200 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.05 (3H, s), 6.53 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 6.94–7.01 (1H, m), 7.16–7.28 (3H, m), 7.38–7.50 (3H, m), 7.72 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 8.09–8.13 (1H, m), 8.21 (1H, s), 8.32 (1H, brs), 9.56 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆ClN₅O₂·0.2H₂O: C, 60.44; H, 4.16; N, 17.62. Found: C, 60.40; H, 4.15; N, 17.66.

1-(3-Chlorophenyl)-3-{4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (7e)

収率 14%. Mp 184–186 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.04 (3H, s), 6.53 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 6.94–6.98 (1H, m), 7.15–7.25 (4H, m), 7.46 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.66 (1H, s), 7.71 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 8.21 (1H, s), 8.78 (1H, brs), 8.85 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆ClN₅O₂: C, 60.99; H, 4.09; N, 17.78. Found: C, 60.71; H, 4.21; N, 17.84.

1-(4-Chlorophenyl)-3-{4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (7f)

収率 18%. Mp 214–218 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.04 (3H, s), 6.53 (1H, d, *J* = 3.1 Hz), 7.16 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.26 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.24–7.48 (4H, m), 7.71 (1H, d, *J* = 3.1 Hz), 8.21 (1H, s), 8.73 (1H, brs), 8.78 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆ClN₅O₂: C, 60.99; H, 4.09; N, 17.78. Found: C, 60.80; H, 4.13; N, 17.83.

1-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (7g)

収率 14%. Mp 188–190 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.04 (3H, s), 6.53 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 7.15–7.27 (3H, m), 7.41–7.51 (4H, m), 7.71 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 7.98 (1H, s), 8.21 (1H, s), 8.94 (1H, brs), 9.14 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₁H₁₆F₃N₅O₂: C, 59.02; H, 3.77; N, 16.39. Found: C, 58.77; H, 3.74; N, 16.22.

1-(3-Bromophenyl)-3-{4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (7h)

収率 16%. Mp 207–211 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.08 (3H, s), 6.57 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.20–7.24 (3H, m), 7.31 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.51 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.75 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.85 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 8.25 (1H, s), 8.88 (1H, brs), 8.95 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆BrN₅O₂: C, 54.81; H, 3.68; N, 15.98. Found: C, 54.76; H, 3.71; N, 15.84.

1-(3-Fluorophenyl)-3-{4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (7i)

化合物 **4** の合成と同様の方法により、表題化合物(59%)を白色固体として得た。Mp 189–191 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.08 (3H, s), 6.56–6.57 (1H, m), 6.73–6.57 (1H, m), 7.10–7.13 (1H, m), 7.20–7.32 (3H, m), 7.46–7.52 (3H, m), 7.75 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 8.25 (1H, s), 8.81 (1H, s), 8.91 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆FN₅O₂: C, 63.65; H, 4.27; N, 18.56. Found: C, 63.54; H, 4.11; N, 18.49.

1-(3-Methylphenyl)-3-{4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (7j)

化合物 **4** の合成と同様の方法により、表題化合物 (76%)を白色固体として得た。Mp 174–176 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.26 (3H, s), 4.09 (3H, s), 6.57 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 6.77 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.11–7.29 (5H, m), 7.48–7.51 (2H, m), 7.75 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 8.25 (1H, s), 8.59 (1H, s), 8.71 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₁H₁₉N₅O₂: C, 67.55; H, 5.13; N, 18.76. Found: C, 67.32; H, 5.17; N, 18.50.

***N*'{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}benzamide (8)**

化合物 **5** の合成と同様の方法により、表題化合物 (7.6%)を白色固体として得た。Mp 209–212 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.12 (3H, s), 6.59–6.60 (1H, m), 7.30 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.52–7.63 (3H, m), 7.79 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.85 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.98

(2H, d, $J = 7.5$ Hz), 8.28 (1H, s), 10.36 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{20}H_{16}N_4O_2 \cdot 0.1H_2O$: C, 69.39; H, 4.72; N, 16.18. Found: C, 69.15; H, 4.59; N, 16.40.

***N*-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-2-phenylacetamide (9)**

化合物 **5** の合成と同様の方法により、表題化合物 (84%) を白色固体として得た。

Mp 164–165 °C. 1H NMR (DMSO- d_6) δ 3.66 (2H, s), 4.09 (3H, s), 6.58 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 7.22–7.38 (7H, m), 7.67 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.77 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.26 (1H, s), 10.26 (1H, brs). Anal. Calcd for $C_{21}H_{18}N_4O_2 \cdot 0.2H_2O$: C, 69.68; H, 5.12; N, 15.48. Found: C, 69.80; H, 5.15; N, 15.20.

1-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-phenylthiourea (10)

化合物 **4** の合成と同様の方法により、表題化合物 (75%) を白色固体として得た。

Mp 155–157 °C. 1H NMR (DMSO- d_6) δ 4.11 (3H, s), 6.60 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 7.10–7.16 (1H, m), 7.24–7.38 (4H, m), 7.47–7.58 (4H, m), 7.78 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 8.29 (1H, s), 9.84 (2H, s). Anal. Calcd for $C_{20}H_{17}N_5OS$: C, 63.98; H, 4.56; N, 18.65. Found: C, 63.67; H, 4.60; N, 18.52.

***N*-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-1*H*-benzimidazol-2-amine (11)**

化合物**6** (475 mg, 1.98 mmol)、2-クロロ-1*H*-ベンゾイミダゾール(322 mg, 2.18 mmol)、NMP(5 mL)の混合物を120 °Cで15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(66.0 mg, 9.3%)を白色固体として得た。

Mp 219–222 °C. 1H NMR (DMSO- d_6) δ 4.12 (3H, s), 6.59 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 6.94–7.04 (2H, m), 7.22–7.38 (4H, m), 7.77 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 7.83 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 8.27 (1H, s), 9.52 (1H, s), 10.97 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{20}H_{16}N_6O$: C, 67.40; H, 4.53; N, 23.58. Found: C, 67.11; H, 4.43; N, 23.52.

3-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]benzoic acid (12a)

化合物**2** (2.08 g, 12.4 mmol)、4-ヒドロキシ安息香酸(1.88 g, 13.7 mmol)、炭酸セシウム(12.1 g, 37.2 mmol)、DMSO(10 mL)の混合物を100 °Cで4時間攪拌した。1 *N* 塩酸を加え反応溶液をpH 4 とし、析出固体をろ取後、水で洗浄し、表題化合物(3.08 g, 72%)を白色固体として得た。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 4.12 (3H, s), 6.62 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 7.58–7.64 (2H, m), 7.80–7.91

(3H, m), 8.30 (1H, s), 13.21 (1H, brs).

4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]benzoic acid (12b)

化合物 **12a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (72%) を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.10 (3H, s), 6.62 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 7.44 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.81 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 8.04 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 8.31 (1H, s), 13.02 (1H, brs).

3-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]-*N*-phenylbenzamide (13a)

化合物 **12a** (552 mg, 2.05 mmol)、EDC·HCl (589 mg, 3.07 mmol)、HOBt (415 mg, 2.05 mmol)、アニリン (187 μL, 2.05 mmol) および DMF (5 mL) の混合物を室温で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をろ取後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物 (496 mg, 70%) を黄色固体として得た。

Mp 223–228 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.14 (3H, s), 6.62 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.07–7.13 (1H, m), 7.32–7.38 (2H, m), 7.54–7.67 (2H, m), 7.75–7.82 (3H, m), 7.89–7.92 (2H, m), 8.30 (1H, s), 10.31 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆N₄O₂: C, 69.76; H, 4.68; N, 16.27. Found: C, 69.48; H, 4.59; N, 16.03.

4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]-*N*-phenylbenzamide (13b)

化合物 **13a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (28%) を白色固体として得た。Mp 157–160 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.12 (3H, s), 6.62 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.10 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.36 (2H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.48 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.78–7.83 (3H, m), 8.06 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.31 (1H, s), 10.30 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆N₄O₂: C, 69.76; H, 4.68; N, 16.27. Found: C, 69.74; H, 4.63; N, 16.34.

Ethyl {4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}acetate (14)

化合物 **12a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (88%) を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.28 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.65 (2H, s), 4.14 (3H, s), 4.17 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.22 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.32 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.39 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.44 (1H, s).

{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}acetic acid (15)

化合物 **14** (990 mg, 3.20 mmol) のメタノール (10 mL) 溶液に 8 *N* 水酸化ナトリウム水溶液 (1.00 mL) を加えて、室温で 18 時間攪拌した。反応混合物に 1 *N* 塩酸 (8.00 mL) を加えて減圧濃縮した。残留物を水で希釈し、沈殿物をろ取、水で洗浄した。沈殿物をメタノール

から再結晶化させて表題化合物 (669 mg, 74%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 3.62 (2H, s), 4.10 (3H, s), 6.59 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 7.25 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.35 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.78 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 8.28 (1H, s), 12.37 (1H, brs).

2-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-*N*-phenylacetamide (16)

化合物 **13a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (81%)を白色固体として得た。

Mp 236–240 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 3.69 (2H, s), 4.10 (3H, s), 6.59 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 7.05 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.26 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.32 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.42 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.61 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.78 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.27 (1H, s), 10.18 (1H, brs). Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$: C, 70.38; H, 5.06; N, 15.63. Found: C, 70.21; H, 5.02; N, 15.70.

4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]aniline (17a)

化合物 **3** の合成と同様の方法により、表題化合物 (39%)を白色固体として得た。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.16 (3H, s), 5.56 (2H, s), 6.52 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 6.62 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.19 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.74 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.37 (1H, s).

N-(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)benzene-1,4-diamine (17b)

4-ニトロアニリン(2.04 g, 14.7 mmol)、化合物**2** (2.06 g, 12.3 mmol)、IPA(10 mL)、4 *N* HCl/AcOEt(5.5 mL)の混合物を80 °Cで1時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をメタノール(10 mL)に溶解し、パラジウム炭素(50%含水品、100 mg)を加え、混合物を水素雰囲気下室温で3時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮後、残留物をろ取、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(867 mg, 88%)を黄色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.10 (3H, s), 4.90 (2H, s), 6.33 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 6.55 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.17 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 7.99 (1H, s), 8.08 (1H, s).

N-Methyl-*N*-(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)benzene-1,4-diamine (17c)

N-メチル-4-ニトロアニリン(761 mg, 5.02 mmol)のDMF(10 mL)溶液に氷冷攪拌下、水素化ナトリウム(60%油性, 300 mg, 7.50 mmol)を加え、0 °Cで30 分間攪拌した。反応混合物に化合物**2** (838 mg, 5.03mmol)を加え、室温で18時間攪拌した。氷冷下、反応混合物を水(50 mL)で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン → 酢酸エチル/メタノール)で精製、酢酸エチル/IPEより再結晶化させて*N*,5-ジメチル-*N*-(4-ニトロフェニル)-5*H*-ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン-4-アミン(429 mg, 1.54 mmol)を黄色固体として得た。こうして得られた*N*,5-ジメチル

ル-*N*-(4-ニトロフェニル)-5*H*ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン-4-アミン(404 mg, 1.43 mmol)のメタノール(30 mL)溶液にパラジウム炭素(50%含水品、162 mg)を加え、水素雰囲気下、室温で6時間攪拌した。反応混合物をろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、IPEで粉末化させて表題化合物(328 mg, 91%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆) δ 3.08 (3H, s), 3.36 (3H, s), 5.06 (2H, s), 6.39 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 6.51 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.68 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.36 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.39 (1H, s).

1-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]phenyl}-3-phenylurea (18a)

化合物 4 の合成と同様の方法により、表題化合物 (75%)を白色固体として得た。

Mp 204–207 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆) δ 4.19 (3H, s), 6.55 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 6.95–7.01 (1H, m), 7.26–7.32 (2H, m), 7.45–7.60 (6H, m), 7.79 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.40 (1H, s), 8.78 (1H, s), 8.94 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₇₉N₅OS: C, 63.98; H, 4.56; N, 18.65. Found: C, 64.11; H, 4.53; N, 18.63.

1-{4-[(5-Methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)amino]phenyl}-3-phenylurea (18b)

化合物 4 の合成と同様の方法により、表題化合物 (13%)を白色固体として得た。Mp 207–210 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆) δ 4.14 (3H, s), 6.40 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 6.92–6.99 (1H, m), 7.24–7.56 (8H, m), 8.20 (1H, s), 8.29 (1H, s), 8.55–8.66 (3H, m). Anal. Calcd for C₂₀H₁₈N₆O·0.5H₂O: C, 65.38; H, 5.21; N, 22.87. Found: C, 65.59; H, 5.01; N, 22.87.

1-{4-[Methyl(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)amino]phenyl}-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (18c)

化合物 4 の合成と同様の方法により、表題化合物 (80%)を白色固体として得た。

Mp 170–174 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆) δ 3.18 (3H, s), 3.47 (3H, s), 6.48 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 6.88 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.30 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.40 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.45–7.65 (3H, m), 8.01 (1H, s), 8.50 (1H, s), 8.80 (1H, s), 9.03 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₁₉F₃N₆O: C, 60.00; H, 4.35; N, 19.08. Found: C, 59.99; H, 4.30; N, 18.92.

2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]aniline (19a)

化合物2 (168 mg, 1.00 mmol)、4-アミノ-3-クロロフェノール(215 mg, 1.5 mmol)、炭酸カリウム(415 mg, 3.00 mmol)、NMP(3 mL)の混合物を120 °Cで18時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、表題化合物(100 mg, 36%)を茶色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆) δ 4.05 (2H, brs), 4.13 (3H, s), 6.64 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 6.84 (1H, d, J

= 8.7 Hz), 7.00 (1H, dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz), 7.20 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.31 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.45 (1H, s).

3-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]aniline (19b)

化合物 **19a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (32%) を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.07 (3H, s), 5.35 (2H, brs), 6.56–6.58 (2H, m), 6.69–6.70 (1H, m), 7.07 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.74 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 8.22 (1H, s).

2-Methoxy-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]aniline (19c)

化合物 **19a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (61%) を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.74 (3H, s), 4.08 (3H, s), 4.67 (2H, s), 6.55–6.67 (3H, m), 6.78 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 7.73 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.24 (1H, s).

2-Fluoro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]aniline (19d)

化合物**2**(550 mg, 3.28 mmol)、3-フルオロ-4-ニトロフェノール(619 mg, 3.94 mmol)、*o*-キシレン(20 mL)の混合物を100 °Cで二日間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈後、有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をろ取、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し4-(3-フルオロ-4-ニトロフェノキシ)-5-メチル-5*H*ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン(725 mg, 77%)を黄色固体として得た。こうして得られた4-(3-フルオロ-4-ニトロフェノキシ)-5-メチル-5*H*ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン(715 mg, 0.867 mmol)、亜鉛(1.62 g, 24.8 mmol)、塩化アンモニウム(531 mg, 9.92 mmol)、メタノール(10 mL)の混合物を還流条件下1時間攪拌した。セライトろ過後、ろ液を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をろ取、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(256 mg, 40%)を黄色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.08 (3H, s), 5.11 (2H, s), 6.57 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 6.77–6.89 (2H, m), 7.05 (1H, dd, $J = 12.0, 2.1$ Hz), 7.75 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 8.26 (1H, s).

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (20a)

化合物 **4** の合成と同様の方法により、表題化合物 (61%) を白色固体として得た。Mp 192–194 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.11 (3H, s), 6.61 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 7.30–7.36 (2H, m), 7.52–7.58 (3H, m), 7.80 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.06 (1H, brs), 8.18 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 8.31 (1H, s), 8.45 (1H, brs), 9.73 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₁H₁₅ClF₃N₅O₂: C, 54.61; H, 3.27; N, 15.16. Found: C, 54.53; H, 3.25; N, 15.17.

1-{3-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (20b)

化合物 **4** の合成と同様の方法により、表題化合物 (85%) を白色固体として得た。
Mp 241–242 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.10 (3H, s), 6.59–6.60 (1H, m), 7.31 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.37–7.43 (2H, m), 7.51 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.79 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 7.84–7.85 (1H, m), 8.01 (1H, s), 8.25 (1H, s), 9.06 (1H, s), 9.16 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₁H₁₅ClF₃N₅O₂: C, 54.61; H, 3.27; N, 15.16. Found: C, 54.59; H, 3.29; N, 15.03.

1-{2-Methoxy-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (20c)

化合物 **4** の合成と同様の方法により、表題化合物 (54%) を白色固体として得た。
Mp 173–177 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.38 (3H, s), 4.12 (3H, s), 6.60 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 6.86 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz), 7.07 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.30–7.34 (1H, m), 7.52–7.54 (2H, m), 7.78 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 8.06 (1H, s), 8.15 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 8.29 (1H, s), 8.33 (1H, s), 9.67 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₁₈F₃N₅O₃·0.2H₂O: C, 57.32; H, 4.02; N, 15.19. Found: C, 57.22; H, 3.85; N, 15.12.

1-{2-Fluoro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (20d)

化合物 **4** の合成と同様の方法により、表題化合物 (87%) を白色固体として得た。
Mp 196–198 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.10 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.12–7.19 (1H, m), 7.30–7.44 (2H, m), 7.50–7.60 (2H, m), 7.79 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.05 (1H, s), 8.13 (1H, t, *J* = 9.3 Hz), 8.30 (1H, s), 8.67 (1H, s), 9.41 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₁H₁₅F₄N₅O₂: C, 56.63; H, 3.39; N, 15.72. Found: C, 56.62; H, 3.24; N, 15.78.

4-Chloro-5-(2-chloroethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine (21)

化合物 **2** の合成と同様の方法により、表題化合物 (54%) を白色固体として得た。
¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.10 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 4.72 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 6.51 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.22 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.75 (1H, s).

1-(4-{[5-(2-Chloroethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]amino}phenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (22)

化合物**25**(493 mg, 1.49 mmol)、化合物**21**(318 mg, 1.47 mmol)、IPA(10 mL)の混合物を80 °Cで1時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物

をカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル、酢酸エチル/メタノール)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(466 mg, 67%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.28–4.32 (2H, m), 4.48–4.53 (2H, m), 6.58 (1H, d, $J = 2.9$ Hz), 7.32–7.59 (8H, m), 7.82 (1H, d, $J = 2.9$ Hz), 8.02 (1H, s), 8.49 (1H, s), 9.26 (1H, s), 9.44 (1H, s).

1-[4-(5,6-Dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2,1-*de*]pteridin-4-yl)phenyl]-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (23)

化合物22(450 mg, 0.948 mmol)、炭酸カリウム(392 mg, 2.84 mmol)、DMF(10 mL)の混合物を80 °Cで15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチル($\times 3$)で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル、酢酸エチル)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(260 mg, 63%)を白色固体として得た。

Mp 197–200 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.16–4.20 (2H, m), 4.39–4.43 (2H, m), 6.45 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 7.31 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.43–7.60 (7H, m), 8.03 (1H, s), 8.20 (1H, m), 8.89 (1H, s), 9.09 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$: C, 60.27; H, 3.91; N, 19.17. Found: C, 60.17; H, 3.80; N, 19.21.

1-(4-Aminophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea hydrochloride (25)

4-ニトロアニリン(2.02 g, 14.6 mmol)、トリエチルアミン(6.07 mL, 43.8 mmol)のTHF(10 mL)溶液に、3-(トリフルオロメチル)フェニルイソシアナート(2.45 mL, 17.5 mmol)を加え、混合物を室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をろ取後、メタノール(10 mL)に溶解し、パラジウム炭素(50%含水品、100 mg)を加え、混合物を水素雰囲気下室温で3時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液に4 NHCl/AcOEt (4 mL)を加え、残留物をろ取後、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(1.42 g, 29%)を薄紫色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7.26–7.32 (3H, s), 7.47–7.59 (4H, m), 8.00 (1H, s), 9.49 (1H, s), 9.65 (1H, s), 9.93 (3H, brs).

Docking model of VEGFR2

ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体(A)を GOLD(version 3.2, 2007, The Cambridge Crystallographic Data Centre, UK)で VEGFR2 結晶構造(PDB ID: 1VR2)にドッキングした。MOE(version 2006.0804, 2006, Chemical Computing Group, Canada)でエネルギー極小化計算(MMFF94s, 誘電率 $4 \times r$, 部分電荷をタンパク質は AMBER99、化合物は AM1-BCC でそれぞれアサイン)を実施して結合モデルを構築した。

Expression, purification, crystallization and structure determination

ヒト VEGFR2 (アミノ酸残基 806-1171。但し、キナーゼ挿入ドメイン (Kinase insertion domain, KID) 領域 940-989 欠損)の遺伝子は、遺伝子組み換え TEV プロテアーゼ (rTEV) 切断サイトを含む N 末端ヒスチジンタグを有する baculovirus 発現ベクター (pFastBacHT (Invitrogen))にクローニングされた。タンパク質は Sf9 昆虫細胞系で発現させ、金属キレートアフィニティクロマトグラフィー (immobilized metal-chelate affinity chromatography, IMAC) で精製した。IMAC カラムに結合したタンパク質は 0.02 M Tris-HCl pH8.0、0.5 M NaCl、10% glycerol、0.005 M DTT、0.25 M imidazole を含む緩衝液で溶出させた。溶出画分は 0.02 M Tris-HCl pH 8.0、0.05 M NaCl、0.005 M DTT、10% glycerol で平衡化したゲルろ過カラム (Sephacryl S-200) を使って単分散状態のタンパク質を回収した。その次に rTEV プロテアーゼ処理によりヒスチジンタグを除去し、続いて 0.02 M Tris-HCl pH 8.0、0.05 M NaCl、0.005 M DTT で平衡化した陰イオン交換カラム (Mono-Q) を使い、0.02 M Tris-HCl pH 8.0、0.3 M NaCl、0.005 M DTT の直線勾配で溶出した。リン酸化していないタンパク質画分を回収し、脱塩カラム (HiPrep desalting column) で 0.05 M HEPES pH 7.5、0.025 M NaCl、0.01 M DTT、10% glycerol ヘバッファー交換した。タンパク質溶液 (約 8 mg/ml 濃度) をゆっくり攪拌しながら DMSO に溶解した化合物を終濃度 0.5 mM になるように加え、さらに氷上で 3 時間静置した。

結晶化は、100 nl のタンパク質・化合物溶液と 100 nl の沈殿剤溶液 (1.3 M tri-sodium citrate を含む) を混合し、蒸気拡散法により 4 °C で実施した。得られた結晶は抗凍結剤としてグリセロールを終濃度 24%になるように加えてから液体窒素に保存した。X 線回折データは、実験室系 X 線発生装置 (リガク電機、CuK α 特性 X 線、波長 1.5418 Å) と RAXIS イメージングプレートシステム、または大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL32B2 (兵庫県播磨、波長 1 Å) で測定した。いずれの結晶も空間群は単斜晶系 C2 に属し、格子定数 135 × 56 × 52 Å、 $\beta = 95^\circ$ であった。構造解析はアポ体構造をモデルとして CCP4 program suite に含まれるプログラム MOLREP を使って分子置換法により決定した。構造精密化はプログラム CNX2002 を使った。最終構造の結晶学的統計値は、信頼度因子と標準偏差について、**20d** は R = 18.6% ($R_{\text{free}} = 20.9\%$)、root-mean-square deviations (RMSD) in bond lengths and angles は 0.007 Å と 1.2°となった。

Measurement of inhibitory activities against VEGFR2 kinase

VEGFR2 キナーゼ活性の測定は AlphaScreen® system (PerkinElmer, USA)により実施した。DMSO に溶解した試験化合物を緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM Mn Cl₂, 5 mM MgCl₂, 0.01% Tween-20 and 2 mM DTT)で希釈した。この化合物溶液 5 μ L に 50 ng/mL の VEGFR2 細胞内ドメインタンパクと 250 ng/mL のビオチン標識ポリペプチド biotinylated poly-GluTyr (4:1)(CIS bio International)を含む緩衝液を 10 μ L 加え

た。得られた混合液に 25 μ M ATP を含む緩衝液を 10 μ L 添加し、25 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた後、25 μ L の停止液(100 mM EDTA、62.5 mM HEPES pH 7.4、10 μ g/mL AlphaScreen streptavidine donor beads (PerkinElmer)、10 μ g/mL acceptor beads (PerkinElmer)、250 mM NaCl、0.1% BSA)を加え、反応を停止させた。反応溶液を 25 $^{\circ}$ C で 16 時間放置した後、EnVision 2102 Multilabel Reader (PerkinElmer)を使用してカウントを測定した。試験化合物のキナーゼ阻害率(%)は以下の式で計算した。阻害率(%) = (1-(試験化合物のカウント - ブランク)÷(対照-ブランク)) \times 100。ここで、化合物を添加せずに反応させた溶液のカウントを「対照」とし、化合物と ATP を添加しなかった溶液のカウントを「ブランク」とした。50%阻害するのに必要な試験化合物の濃度(IC₅₀ 値)および 95%信頼区間を Prism version 5.01, GraphPad Software (USA)にて算出した。

Kinase profiling by IC₅₀ measurement

前述の VEGFR2 キナーゼ阻害試験と同様の方法により、化合物の各キナーゼに対する阻害活性(IC₅₀ 値)を算出した。

Cell proliferation assay (with VEGF stimulation)

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC, Cambrex, USA)は 37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内において、5%ウシ胎仔血清および 2.5 ng/mL 塩基性繊維芽細胞増殖因子を含む血管内皮細胞用培地(Invitrogen)で培養した。詳細には、前記 5%ウシ胎仔血清を含む血管内皮細胞用培地に懸濁した HUVEC を、96 ウェル平底プレートに各ウェル 50 μ L(細胞数: 3,000)播種した。一晩培養後、種々の濃度の被験物質ならびに 120 ng/mL の血管内皮増殖因子(VEGF)を、5%ウシ胎仔血清を含む血管内皮細胞用培地に溶解し、各ウェル 50 μ L 添加した。5 日間培養後、XTT 試薬(和光純薬)を各ウェル 10 μ L 添加し、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内において 2-3 時間反応させた。450 nm の吸光度を、マイクロタイタープレートリーダーにより測定し、細胞増殖阻害活性を測定した。被験物質各濃度添加時の吸光度値を用いて SAS system NLIN procedure のロジスティック曲線を用いた非線形最小二乗法により、被験物質無添加時の 50%を示す被験物質濃度(IC₅₀)を算出した。

Pharmacokinetic Studies

試験化合物(10 mg/kg)を非絶食マウスに経口カセット投与後、血液を取得した。遠心分離により血漿サンプルを得た後、アセトニトリルを添加しタンパク質を除去した。さらに遠心分離することにより上清を得た後、上清を 0.01 M ギ酸アンモニウム水溶液/アセトニトリル(9/1)で希釈した。再び遠心分離した後、LC/MS/MS を用いて上清の化合物濃度を測定した。

Xenograft Nude Mouse Model

10% FBS(HyClone)を含む DMEM 培地 (Invitrogen) で培養、増殖させた前立腺癌細胞 DU145 (ATCC No. HTB-81)を Trypsin (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) でシャーレより剥がし、Hanks'balanced salt solution (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) に懸濁した。6 週齢雌性ヌードマウス (BALB/c nu/nu, 日本クレア) の側腹部に、上記懸濁液 100 μ L(細胞数: 3×10^6)を皮下注射して細胞を移植し、担癌動物を作製した。移植後、平均腫瘍体積が 150–210 mm^3 となるように 5 群 ($n = 5$) に動物を群分けし、翌日から、1% クエン酸(Wako Pure Chemical)/1%アラビアゴム(Suzu Pharmaceutical, Japan)水溶液を vehicle として、化合物 **20d** を 1.5、3、6、12 mg/kg で 1 日 2 回経口投与した。投与開始後は 1 週間 2 回の割合で腫瘍体積と体重を測定し、群分け時から試験終了時まで増加した腫瘍体積より抗腫瘍効果の指標として T/C (treatment/control, %)を算出した。腫瘍体積は、腫瘍の長径と短径をノギスで計測して次式によって算出した。[(腫瘍体積) = (長径) \times (短径) $^2 \times 1/2$]。

- 1) Barker, A. J.; Gibson, K. H.; Grundy, W.; Godfrey, A. A.; Barlow, J. J.; Healy, M. P.; Woodbum, J. R.; Ashton, S. E.; Curry, B. J.; Scarlett, L.; Henthorn, L.; Richards, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1911-1914.
- 2) Plé, P. A.; Green, T. P.; Hennequin, L. F.; Curwen, J.; Fennell, M.; Allen, J.; Lambert-Van Der Brempt, C.; Costello, G. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 871-887.
- 3) Hennequin, L. F.; Stokes, E. S.; Thomas, A. P.; Johnstone, C.; Plé, P. A.; Ogilvie, D. J.; Dukes, M.; Wedge, S. R.; Kendrew, J.; Curwen, J. O. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1300-1312.
- 4) Wissner, A.; Berger, D. M.; Boschelli, D. H.; Floyd, J. B.; Greenberger, L. M.; Gruber, B. C.; Johnson, B. D.; Mamuya, N.; Nilakantan, R.; Reich, M. F.; Shen, R.; Tsou, H.; Upelacis, E.; Wang, Y. F.; Wu, B.; Ye, F.; Zhang, N. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 3244-3256.
- 5) Boschelli, D. H.; Ye, F.; Wang, Y. D.; Dutia, M.; Johnson, S. L.; Wu, B.; Miller, K.; Powell, D. W.; Yaczko, D.; Young, M.; Tischler, M.; Arndt, K.; Discafani, C.; Etienne, C.; Gibbons, J.; Grod, J.; Lucas, J.; Weber, J. M.; Boschelli, F. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3965-3977.
- 6) Green, N.; Hu, Y.; Janz, K.; Li, H.; Kaila, N.; Guler, S.; Thomason, J.; Joseph-McCarthy, D.; Tam, S.; Hotchandani, R.; Huang, A.; Wang, Q.; Leung, L.; Pelker, J.; Marusic, S.; Hsu, S.; Telliez, J.; Hall, P.; Cuzzo, J.; Lin, L. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 4728-4745
- 7) Ishikawa, T.; Seto, M.; Banno, H.; Kawakita, Y.; Oorui, M.; Taniguchi, T.; Ohta, Y.; Tamura, T.; Nakayama, A.; Miki, H.; Kamiguchi, H.; Tanaka, T.; Habuka, N.; Sogabe, S.; Yano, J.; Aertgeerts, K.; Kamiyama, K. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8030-8050.
- 8) a) Furneaux, R. H.; Tyler, P. C. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8411-8412., b) Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Hutchison, T. L.; Kezar, H. S.; Morris, P. E. Jr.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5723-5730.
- 9) Ullman, E. F.; Kirakossian, H.; Singh, S.; Wu, Z. P.; Irvin, B. R.; Pease, J. S.; Switchenko, A. C.; Irvine, J. D.; Dafforn, A.; Skold, C. N.; Wagner, D. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 5426-5430.
- 10) Thurston, G. *Cell Tissue Res.* **2003**, *314*, 61-68.
- 11) a) Pietras, K.; Sjoblom, T.; Rubin, K.; Heldin, C. H.; Ostman, A. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 439-443. b) Abramsson, A.; Lindblom, P.; Betsholtz, C. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1142-1151.

3.1 はじめに

本章では、第2章で示した type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬のデザインを基に、新規かつよりプロファイルに優れた化合物の探索を行った。まず、化合物の重要構成要素であるヒンジバインダーについて、新規骨格を探索することとした。化合物 **20d** のヒンジバインダーであるピロロ[3,2-*d*]ピリミジンは、アデニン同様ピリミジン構造を有する。現在までに、アデニン構造からヒントを得たピリミジンおよびピリジン構造を有するヒンジバインダーが多数報告され、近年、上記の構造を有する type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬も相次いで見出されている¹⁾。従って、新規性の確保や、既存の化合物とは異なるプロファイルを示す化合物の創出を目指すに当たっては、ピリミジンおよびピリジン構造以外のヒンジバインダーを見出すことが重要になる。そこで本章では、ヒンジバインダーとして、非ピリミジン・ピリジン系のイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンに着目した。本骨格は、抗菌薬の cefozopran (Figure 3-1)が有することから構造由来の毒性の懸念が小さい。また、研究開始当時、本骨格はキナーゼ阻害薬に利用された例がなかったことから、新規性が高かった。化合物 **20d** のピロロ[3,2-*d*]ピリミジン部分をイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンに変換し、6位に置換フェノキシ基を導入した **26** は、1位窒素がピロロ[3,2-*d*]ピリミジンの1位窒素に近い位置に存在することから、必須の相互作用である Cys919 との水素結合は維持されると考えた(Figure 3-2)。実際、**26** を合成し VEGFR2 阻害活性を測定したところ、IC₅₀ = 5200 nM の活性を示したことから、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンがヒンジバインダーとして機能することが明らかとなった。一方、前章で明らかになった情報として、ウレア部位における相互作用は活性発現に極めて重要であり、ウレアの位置が少しでも不適切であると効果的な相互作用が形成されないことが判明した。従って、化合物 **26** において VEGFR2 阻害活性が中程度に留まった要因は、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンへの変換によりウレア部位が最適な位置に存在していないことによるものと考えられた。そこで本章では、VEGFR2 のバックポケットと効果的に相互作用するイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体を探索することとした。

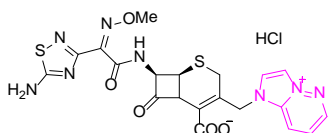


Figure 3-1 Structure of cefozopran.

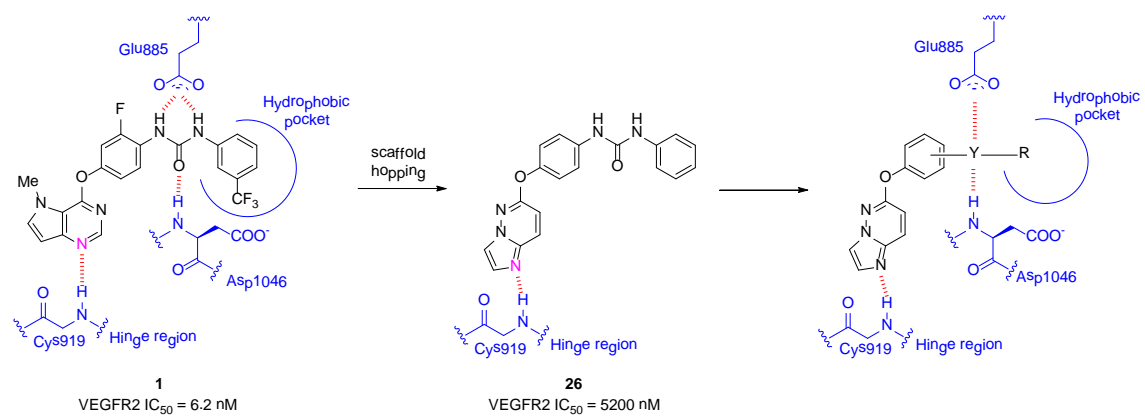
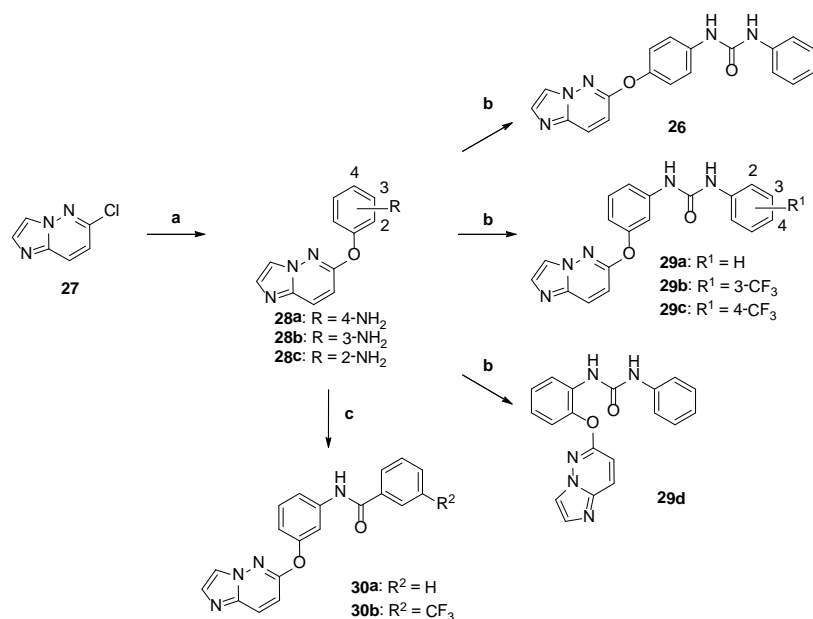


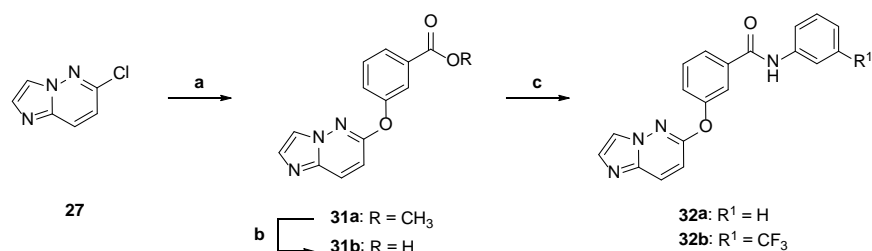
Figure 3-2 Design of imidazo[1,2-*b*]pyridazine derivatives.

3.2 合成

Scheme 3-1 および 3-2 にイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体の合成法を示す。市販の 6-クロロイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン **27** に対し、炭酸カリウム存在下アミノフェノールを作用させることによりアニリン **28a-c** を合成した。化合物 **28a-c** に対し各種イソシアナートを用いることによりウレア体 **26** および **29a-d** へと導き、酸クロリドを作用させることによりアミド体 **30a,b** へと導いた。また、**27** と 3-ヒドロキシ安息香酸メチルとの求核置換反応により得られた **31a** をアルカリ加水分解により **31b** へと導き、次いで EDC·HCl および HOBT を用いアニリンと縮合させることで逆アミド体 **32a,b** を合成した。



Scheme 3-1 Reagents: (a) Aminophenols, K_2CO_3 , NMP; (b) phenyl isocyanates, Et_3N , THF; (c) benzoyl chlorides, NMP.



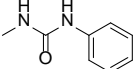
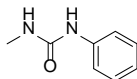
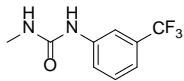
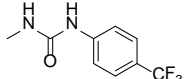
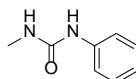
Scheme 3-2 Reagents: (a) Methyl 3-hydroxybenzoate, K_2CO_3 , NMP; (b) $NaOH$, H_2O , $MeOH$; (c) anilines, HOBT, EDC·HCl, Et_3N , DMF.

3.3 構造活性相関

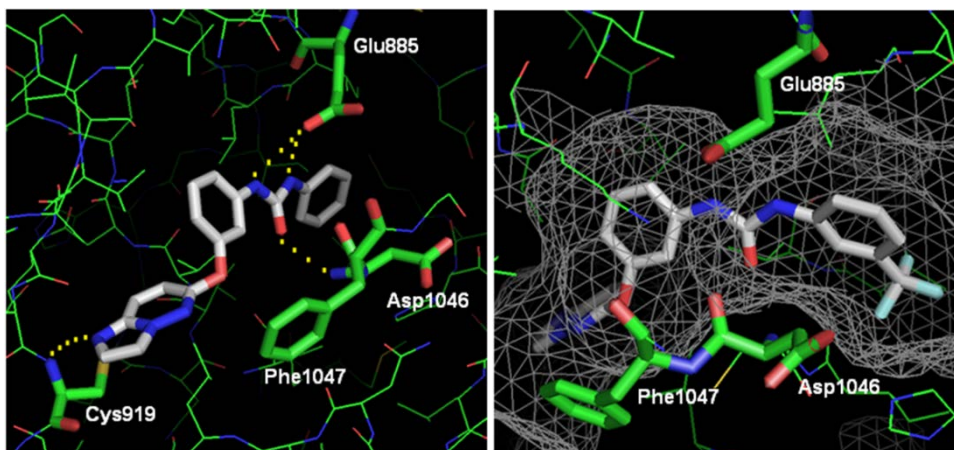
まず、オルト、メタ、パラ位それぞれにフェニルウレイド基を導入した化合物について VEGFR2 阻害活性を評価した (Table 3-1)。化合物 **26** のフェニルウレイド基をパラ位からオルト位に移動させた **29d** は VEGFR2 阻害活性が減弱したのに対し、メタ位に移動させた **29a** は 100 倍活性が増強した。この結果は、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体においてパラ置換体が最適である結果と異なった。イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体と VEGFR2 の結合モデル構築を試みたところ、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン 1 位窒素と Cys919 が水素結合するように化合物を配置した場合、**26** のフェニルウレイド基はバックポケットを占有するのが困難であった (data not shown)。一方、**29a** のフェニルウレイド基はバックポケットを効果的に占有する結合モードが得られた (Figure 3-3(a))。化合物 **29a** は、ウレア部分が Glu885 のカルボキシル基および Asp1046 の主鎖 NH と相互作用し、末端フェニル基が脂溶性ポケットに存在していた。また、**29a** の末端フェニル基の 3 位および 4 位周辺には置換基を許容する小さい脂溶性ポケットの存在が確認された。本脂溶性ポケットは、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体 **20d** のトリフルオロメチル基が占有しているポケットであることから、**29a** にトリフルオロメチル基を導入した **29b,c** を合成した。その結果、予想通り **29b,c** ともに VEGFR2 阻害活性が向上し、結合モデルからもトリフルオロメチル基が脂溶性ポケットを効果的に占有する結果が得られた (Figure 3-3(b))。

Table 3-1

VEGFR2 kinase inhibitory activity of phenylurea derivatives^a

| Compd | R ¹ | R ² | R ³ | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) |
|------------|---|---|----------------|------------------------------|
| 26 |  | | | 5200 (3500-7900) |
| 29a | |  | | 52 (34-81) |
| 29b | |  | | 12 (11-15) |
| 29c | |  | | 29 (19-42) |
| 29d |  | | | >10000 |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.



(a) **29a** with VEGFR2

(b) **29b** with VEGFR2

Figure 3-3 Binding model of imidazo[1,2-*b*]pyridazine derivatives and VEGFR2 using the crystal structure of **20d** and VEGFR2.

VEGFR2 の Glu885 および Asp1046 と相互作用する最適な置換基を探索する目的で、ウレア部分を変換した (Table 3-2)。まず、ウレアの NH を除去したアミド体 **30a** および **32a** を評価したところ、**30a** がウレア体 **29a** と同等の VEGFR2 阻害活性を示したのに対し、**32a** は活性が 10 倍程度減弱した。アミド体 **30a** と VEGFR2 の結合モデルによると、ウレア部分をアミドに変換しても Glu885 および Asp1046 との相互作用は維持されることが判明した (Figure 3-4)。一方、**32a** は逆アミドであるため、Glu885 および Asp1046 との相互作用を維持しようとする、末端フェニル基が脂溶性ポケットを効果的に占有できなくなるため、VEGFR2 阻害活性が減弱すると考えられた。そこで、脂溶性ポケットを効果的に占有する目的で、**32a** に脂溶性置換基であるトリフルオロメチル基を導入した **32b** を合成したところ、30 倍以上 VEGFR2 阻害活性が増強した。同様に、**30a** にトリフルオロメチル基を導入した **30b** も 10 倍程度活性が向上した。

Table 3-2

VEGFR2 kinase inhibitory activity of *meta*-substituted 6-phenoxy-imidazo[1,2-*b*]pyridazines^a

| Compd | R | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) |
|-------|---|------------------------------|
| 29a | | 52 (34-81) |
| 29b | | 12 (11-15) |
| 30a | | 80 (61-110) |
| 30b | | 7.1 (6.0-8.2) |
| 32a | | 650 (520-790) |
| 32b | | 18 (11-29) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

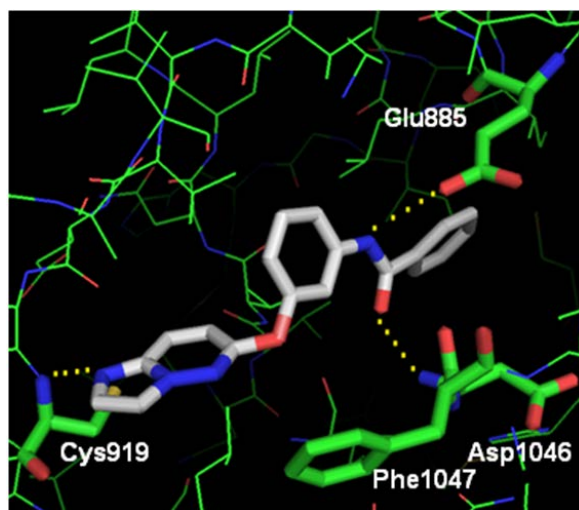


Figure 3-4 Binding model of **30a** and VEGFR2.

最も強力な VEGFR2 阻害活性を示した **30b** を用い、キナーゼ選択性を評価した (Table 3-3)。ピロロ [3,2-*d*]ピリミジン誘導体 **20d** と同様、**30b** は VEGFR1、PDGFR α 、および PDGFR β キナーゼを強力に阻害した。一方、興味深いことに、**20d** が強力な Tie-2 阻害活性を示すのに対し、**30b** は Tie-2 阻害活性が非常に低かった。従って、両化合物を用いた生物試験を比較することにより、Tie-2 の血管新生への寄与が解明できると期待される。

Table 3-3
Kinase selectivity of **20d** and **30b**^a

| | IC ₅₀ (nM) | | | | | | |
|------------|-----------------------|------------------|----------------|----------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| | VEGFR1 | VEGFR2 | PDGFR α | PDGFR β | FGFR1 | FGFR3 | FGFR4 |
| 20d | 15 (14-17) | 6.2 (4.7-8.3) | 35 (27-43) | 96 (76-120) | >10000 | NT ^b | NT ^b |
| 30b | 8.4 (7.9-8.9) | 7.1 (6.0-8.2) | 13 (12-15) | 30 (26-35) | 5100 (4100-6400) | 4200 (3000-5800) | >10000 |

| | IC ₅₀ (nM) | | | | | | |
|------------|-----------------------|-------------------|--------------|-----------------|---------------------|--------|--------|
| | c-kit | B-raf | GSK3 β | c-Met | Tie-2 | IR | IGF1-R |
| 20d | 170 (120-240) | 900 (660-1200) | >10000 | NT ^b | 20 (17-23) | >10000 | >10000 |
| 30b | 120 (99-140) | 290 (99-140) | >10000 | >10000 | 5100 (3600-7200) | >10000 | >10000 |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

^b Not tested.

3.4 まとめ

本章では、ヒンジバインダーとしてイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンを有する新規 type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬をデザイン・合成した。化合物 **26** をリード化合物として置換基変換を実施した結果、**26** のフェニルウレイド基をメタ位に移動させることにより VEGFR2 阻害活性が向上すること、ウレア構造をアミド構造に変換しても VEGFR2 阻害活性が維持することを見出した。代表化合物 **30b** のキナーゼ選択性を評価した結果、**30b** はピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体と同様 PDGFR キナーゼを阻害する一方、Tie-2 阻害活性が非常に低いことが判明した。以上の結果、ヒンジバインダーをイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンに変換することにより、キナーゼ阻害プロファイルの異なる化合物を見出すことに成功した。

実験の部

4-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)aniline (28a)

化合物27 (768 mg, 5.0 mmol)、4-アミノフェノール(818 mg, 7.5 mmol)、炭酸カリウム (2.07 g, 15.0 mmol)、NMP (5 mL)の混合物を120 °Cで3日間攪拌した。反応混合物を1 *N* NaOHで希釈後、酢酸エチルで抽出した。有機層を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル, ヘキサン/酢酸エチル, およびシリカゲル, 酢酸エチル/メタノール)で精製、ジイソプロピルエーテルより析出させて、表題化合物(759 mg, 67%)を淡褐色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 5.07 (2H, s), 6.60 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 6.92 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.00 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.61 (1H, s), 8.01 (1H, s), 8.09 (1H, d, *J* = 9.8 Hz).

3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)aniline (28b)

化合物28aの合成と同様の方法により、表題化合物(41%)を白色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 5.29 (2H, s), 6.31–6.35 (1H, m), 6.37 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 6.42–6.47 (1H, m), 7.02 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.06 (1H, t, *J* = 7.9 Hz), 7.65 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 8.08 (1H, s), 8.13 (1H, d, *J* = 9.8 Hz).

2-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)aniline (28c)

化合物28aの合成と同様の方法により、表題化合物(14%)を淡褐色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 5.08 (2H, s), 6.57 (1H, td, *J* = 7.6, 1.6 Hz), 6.81 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz), 6.95–7.04 (2H, m), 7.04 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 7.61 (1H, d, *J* = 0.9 Hz), 8.02 (1H, s), 8.11 (1H, d, *J* = 9.9 Hz).

N-[4-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)phenyl]-*N*-phenylurea (26)

化合物 28a(181 mg, 0.80 mmol)とトリエチルアミン(0.011 mL, 0.08 mmol)のTHF(10 mL)溶液に、フェニルイソシアナート(0.104 mL, 0.96 mmol)を加えて室温で18時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残留物をメタノールより結晶化させて、表題化合物(223 mg, 81%)を白色粉末として得た。

Mp 197–199 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 6.97 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.09 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.22 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.28 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.46 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.52 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.64 (1H, s), 8.05 (1H, s), 8.15 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 8.70 (1H, s), 8.76 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅N₅O₂: C, 66.08; H, 4.38; N, 20.28. Found: C, 66.05; H, 4.34; N, 20.25.

N-[3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)phenyl]-*N*-phenylurea (29a)

化合物29aの合成と同様の方法により、表題化合物(71%)を白色固体として得た。

Mp 199–201 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 6.85–6.90 (1H, m), 6.97 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.22–7.31 (3H, m), 7.36 (1H, t, *J* = 7.9 Hz), 7.43 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.51 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 0.9 Hz), 8.08 (1H, s), 8.18 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 8.72 (1H, s), 8.87 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅N₅O₂: C, 66.08; H, 4.38; N, 20.28. Found: C, 66.05; H, 4.38; N, 20.21.

***N*[3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)phenyl]-*N*-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (29b)**

化合物**29a**の合成と同様の方法により、表題化合物(62%)を白色固体として得た。

Mp 217–219 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 6.89–6.94 (1H, m), 7.12 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.26–7.34 (2H, m), 7.38 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.47–7.60 (3H, m), 7.66 (1H, d, *J* = 0.9 Hz), 7.99 (1H, s), 8.08 (1H, s), 8.18 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 9.01 (1H, s), 9.11 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₄F₃N₅O₂: C, 58.11; H, 3.41; N, 16.94. Found: C, 58.05; H, 3.40; N, 16.83.

***N*[3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)phenyl]-*N*-[4-(trifluoromethyl)phenyl]urea (29c)**

化合物**29a**の合成と同様の方法により、表題化合物(50%)を白色固体として得た。

Mp 246–247 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 6.86–6.94 (1H, m), 7.11 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.24–7.31 (1H, m), 7.38 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.51 (1H, t, *J* = 1.8 Hz), 7.58–7.68 (5H, m), 8.08 (1H, s), 8.18 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 9.00 (1H, s), 9.16 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₄F₃N₅O₂: C, 58.11; H, 3.41; N, 16.94. Found: C, 57.95; H, 3.41; N, 16.76.

***N*[2-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)phenyl]-*N*-phenylurea (29d)**

化合物**29a**の合成と同様の方法により、表題化合物(72%)を白色固体として得た。

Mp 213–214 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 6.92–7.00 (1H, m), 7.02–7.09 (1H, m), 7.17–7.30 (5H, m), 7.38–7.44 (2H, m), 7.66 (1H, d, *J* = 0.9 Hz), 8.09 (1H, s), 8.20–8.28 (2H, m), 8.33 (1H, s), 9.04 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅N₅O₂: C, 66.08; H, 4.38; N, 20.28. Found: C, 66.06; H, 4.33; N, 20.25.

***N*[3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)phenyl]benzamide (30a)**

化合物 **28a** (113 mg, 0.50 mmol)のNMP(1.0 mL)溶液に、ベンゾイルクロリド(116 μL, 1.00 mmol)を加えて室温で18時間攪拌した。反応混合物を1 *N* NaOHで希釈後、酢酸エチルで抽出した。有機層を1 *N* NaOH、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/メタノール)で精製後、酢酸エチルより析出させて、表題化合物(122 mg, 74%)を白色粉末として得た。

Mp 211–213 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.01–7.06 (1H, m), 7.14 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.45 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.50–7.64 (3H, m), 7.66–7.71 (2H, m), 7.77 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.92–7.97 (2H, m), 8.09 (1H, s), 8.19 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 10.39 (1H, s). Anal. Calcd for

C₁₉H₁₄N₄O₂: C, 69.08; H, 4.27; N, 16.96. Found: C, 68.99; H, 4.16; N, 16.72.

***N*[3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)phenyl]-3-(trifluoromethyl)benzamide (30b)**

化合物**30a**の合成と同様の方法により、表題化合物(98%)を白色固体として得た。

Mp 225–226 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.05–7.10 (1H, m), 7.15 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.47 (1H, t, *J* = 7.9 Hz), 7.67–7.71 (1H, m), 7.67 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 7.75 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.79 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.98 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.09 (1H, s), 8.20 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 8.26 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.29 (1H, s), 10.61 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₃F₃N₄O₂·0.2EtOAc: C, 60.06; H, 3.54; N, 13.47. Found: C, 60.04; H, 3.59; N, 13.36.

Methyl 3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)benzoate (31a)

化合物**28a**の合成と同様の方法により、表題化合物(64%)を淡褐色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.87 (3H, s), 7.16 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.60–7.68 (3H, m), 7.79–7.83 (1H, m), 7.84–7.93 (1H, m), 8.05 (1H, s), 8.19 (1H, d, *J* = 9.5 Hz).

3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)benzoic acid (31b)

化合物 **31a** (1.67 g, 6.2 mmol)のメタノール (30 mL)溶液に、8 *N* 水酸化ナトリウム水溶液(3.00 mL)を加えて80 °Cで18時間攪拌した。反応混合物に6 *N* 塩酸 (4 mL)を加え、減圧濃縮した。残留固体に水を加え、固体をろ取後、MeOH (10 mL)に懸濁させた。懸濁液を加熱還流条件下10分間攪拌し、室温まで冷却した。固体をろ取後、MeOHで洗浄し、表題化合物 (1.05 g, 66%)を白色粉末として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.15 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 7.54–7.68 (3H, m), 7.74–7.80 (1H, m), 7.82–7.91 (1H, m), 8.06 (1H, s), 8.19 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 13.17 (1H, brs).

3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)-*N*-phenylbenzamide (32a)

化合物**31b** (128 mg, 0.50 mmol)、EDC·HCl (192 mg, 1.0 mmol)、HOBt(92 mg, 0.60 mmol)、アニリン(56 mg, 0.60 mmol)、トリエチルアミン (0.209 mL, 1.5 mmol)、およびDMF (5 mL)の混合物を室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチル(×3)で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチルより再結晶化し、表題化合物(122 mg, 74%)を白色固体として得た。

Mp 188–189 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.11 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.35 (2H, t, *J* = 7.9 Hz), 7.52–7.58 (1H, m), 7.63 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 0.9 Hz), 7.73–7.80 (2H, m), 7.86–7.93 (2H, m), 8.07 (1H, s), 8.21 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 10.28 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄N₄O₂: C, 69.08; H, 4.27; N, 16.96. Found: C, 69.12; H, 4.26; N, 16.95.

3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yloxy)-*N*[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide (32b)

化合物**32a**の合成と同様の方法により、表題化合物(57%)を淡褐色固体として得た。

Mp 229–230 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.18 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 7.47 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.55–7.71 (4H, m), 7.89–7.95 (2H, m), 8.02–8.08 (2H, m), 8.19–8.25 (2H, m), 10.59 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₃F₃N₄O₂: C, 60.30; H, 3.29; N, 14.07. Found: C, 60.22; H, 3.25; N, 13.99.

参考文献

- 1) a) Manley, P. W.; Bold, G.; Bruggen, J.; Fendrich, G.; Furet, P.; Mestan, J.; Schnell, C.; Stolz, B.; Meyer, T.; Meyhack, B.; Stark, W.; Strauss, A.; Wood, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1697*, 17-27; b) Miyazaki, Y.; Matsunaga, S.; Tang, J.; Maeda, Y.; Nakano, M.; Philippe, R. J.; Shibahara, M.; Liu, W.; Sato, H.; Wang, L.; Nolte, R. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2203-2207; c) Potashman, M. H.; Bready, J.; Coxon, A.; DeMelfi, T. M., Jr.; DiPietro, L.; Doerr, N.; Elbaum, D.; Estrada, J.; Gallant, P.; Germain, J.; Gu, Y.; Harmange, J. C.; Kaufman, S. A.; Kendall, R.; Kim, J. L.; Kumar, G. N.; Long, A. M.; Neervannan, S.; Patel, V. F.; Polverino, A.; Rose, P.; Plas, S.; Whittington, D.; Zanon, R.; Zhao, H. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4351-4373; d) Harmange, J. C.; Weiss, M. M.; Germain, J.; Polverino, A. J.; Borg, G.; Bready, J.; Chen, D.; Choquette, D.; Coxon, A.; DeMelfi, T.; DiPietro, L.; Doerr, N.; Estrada, J.; Flynn, J.; Graceffa, R. F.; Harriman, S. P.; Kaufman, S.; La, D. S.; Long, A.; Martin, M. W.; Neervannan, S.; Patel, V. F.; Potashman, M.; Regal, K.; Roveto, P. M.; Schrag, M. L.; Starnes, C.; Tasker, A.; Teffera, Y.; Wang, L.; White, R. D.; Whittington, D. A.; Zanon, R. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1649-1667; e) Cee, V. J.; Cheng, A. C.; Romero, K.; Bellon, S.; Mohr, C.; Whittington, D. A.; Bak, A.; Bready, J.; Caenepeel, S.; Coxon, A.; Deak, H. L.; Fretland, J.; Gu, Y.; Hodous, B. L.; Huang, X.; Kim, J. L.; Lin, J.; Long, A. M.; Nguyen, H.; Olivieri, P. R.; Patel, V. F.; Wang, L.; Zhou, Y.; Hughes, P.; Geuns-Meyer, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 424-427.

第 4 章 2-アシルアミノイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンを有するアニリド誘導体の合成と生物評価

4.1 はじめに

第 3 章において見出されたイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジニン誘導体 **30b** は、 $IC_{50} = 7.1 \text{ nM}$ の強力な VEGFR2 阻害活性を示した。一方、**30b** の HUVEC 増殖阻害活性を評価した結果、予想に反して活性が低い($IC_{50} = 650 \text{ nM}$)ことが判明した。そこでまず、強力な HUVEC 増殖阻害活性を示すリード化合物の創出を目的に、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジニン誘導体の構造修飾を行うこととした。

武田薬品工業の化合物ライブラリを用いたハイスループットスクリーニングの結果、 $IC_{50} = 1300 \text{ nM}$ の VEGFR2 阻害活性を示す 2-アシルアミノイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジニン誘導体 **33** が見出された(Figure 4-1)。化合物 **33** は、**30b** のビフェニルアミド構造に相当するパーツを有さないにも関わらず、 μM オーダーの VEGFR2 阻害活性を示す興味深い化合物であった。そこで、その結合モード解析を目的に、ソーキング法により VEGFR2 との複合体結晶を取得した(Figure 4-2(a))。構造解析結果から、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン部位はヒンジ領域に存在し、1 位窒素が Cys919 主鎖 NH と相互作用していることが判明した。さらに、2 位アミノ基が Cys919 主鎖カルボニルと水素結合している興味深い知見が得られた。一方、上記化合物ライブラリとは異なるフラグメント(分子量約 300 以下の化合物)ライブラリを用いたスクリーニングにより、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジニン誘導体 **34** が弱いながらも VEGFR2 阻害活性を示す($IC_{50} = 34 \mu\text{M}$)化合物として見出された。化合物 **34** と VEGFR2 の複合体 X 線結晶構造解析結果から、**34** のイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン部位は、**33** のそれと同じ空間を占有し、VEGFR2 との相互作用も同様であった(Figure 4-2(b))。また、6 位フェノキシ基は、**33** が占有していないバックポケット方向に存在する一方、2 位に置換基が存在しないため、**33** の 2 位アミノ基と Cys919 主鎖カルボニルとの水素結合に相当する相互作用は認められなかった。この結果から、**33** と **34** の活性差は、Cys919 主鎖カルボニルとの相互作用の有無による可能性が示唆された。そこで、**34** と同様 2 位置換基を有さない **30b** に、**33** の 2 位アミノ基に相当するパーツを導入すれば、Cys919 主鎖カルボニルとの相互作用を獲得し活性向上が見込めると仮説を立て、化合物 **35** を合成した。その結果、期待通り HUVEC 増殖阻害活性が $IC_{50} = 6.9 \text{ nM}$ と大幅に増強した。そこで本章では、**35** をリード化合物とし、Figure 4-1 の A に示す化合物をデザインした。すなわち、分子両末端のアシル基 R^1, R^2 を VEGFR2 の結合ポケットに適切なサイズおよび極性に最適化することにより、さらなる VEGFR2 阻害活性の向上が見込めると考えた。また、第 2 章において、ヒンジバインダーと結合したフェノキシ基に置換基を導入することにより HUVEC 増殖阻害活性が増強したことから、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジニン誘導体においても中央ベンゼン環への置換基導入が HUVEC 増殖阻害活性増強に寄与すると考えた。以上の仮説を基に、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジニン誘導体の合成を行った。

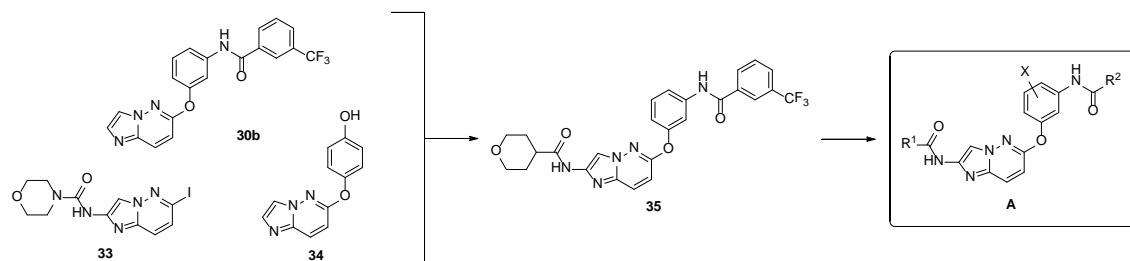


Figure 4-1 Design of hybrid compound A.

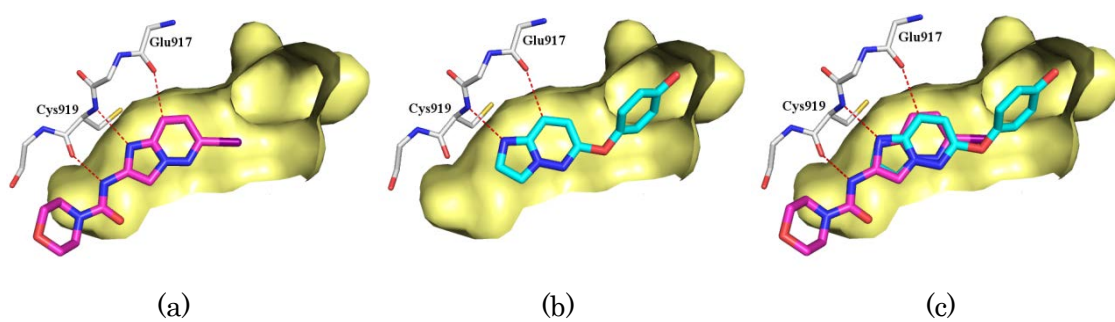
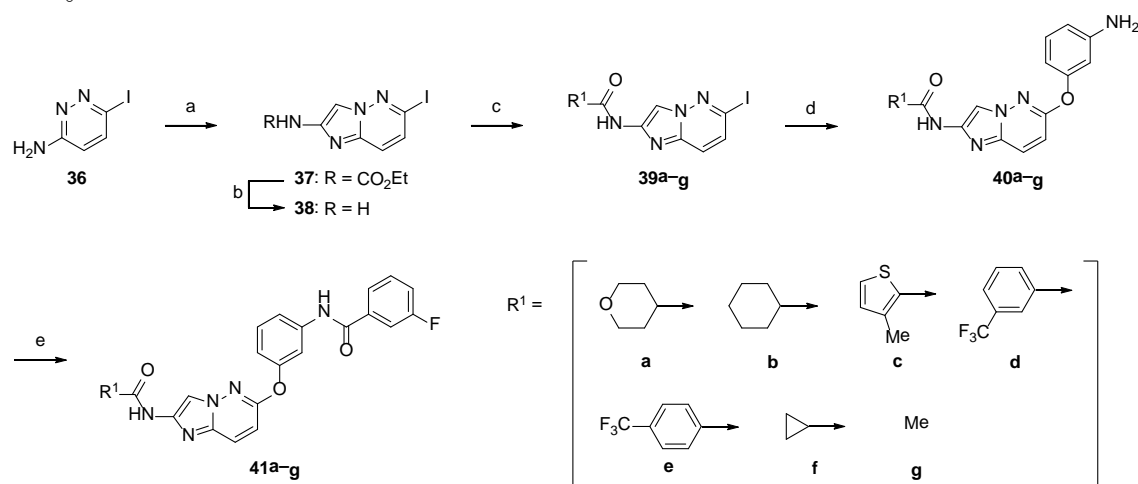


Figure 4-2 (a) Binding mode of **33** to VEGFR2. (b) Binding mode of **34** to VEGFR2. (c) Superposition of **33** (pink) and **34** (blue).

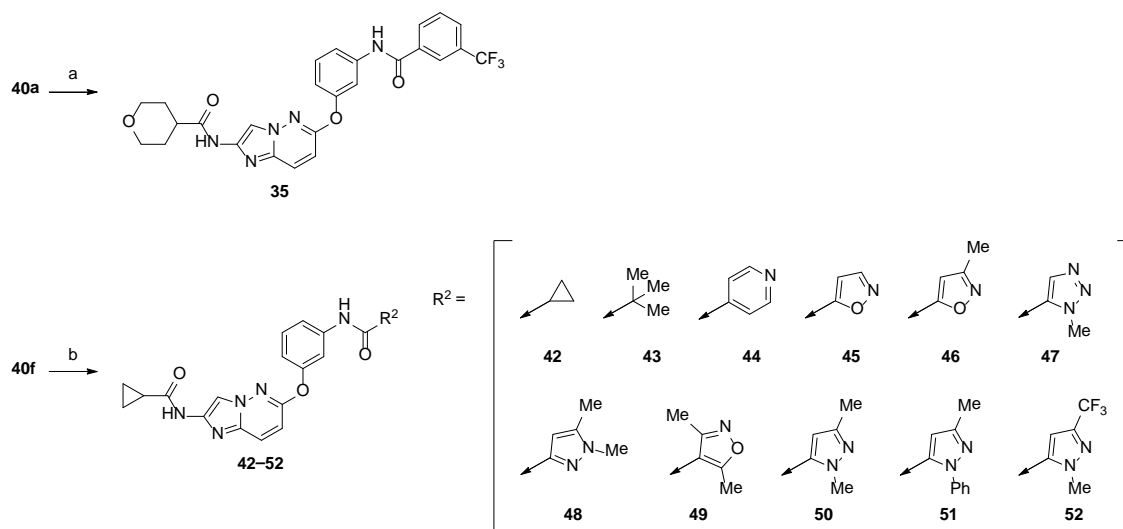
4.2 合成

イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン 2 位アシルアミノ基を変換した化合物 **41a-g** は、Scheme 4-1 に示す方法により合成した。市販の 3-アミノ-6-ヨードピリダジン **36** に対し、リン酸水素ナトリウム存在下、エチルクロロアセチルウレタンを作用させることによりイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン環を構築後、ウレタン部分を加水分解しアミノ体 **38** とした。DMA 溶液中、種々の酸クロリドを用い **38** のアミノ基をアシル化後、得られた **39a-g** に対し、炭酸カリウム存在下 3-アミノフェノールを作用させることによりアニリン体 **40a-g** へと導いた。そして最後に、3-フルオロベンゾイルクロリドを用い **40a-g** をアシル化することにより **41a-g** を合成した。



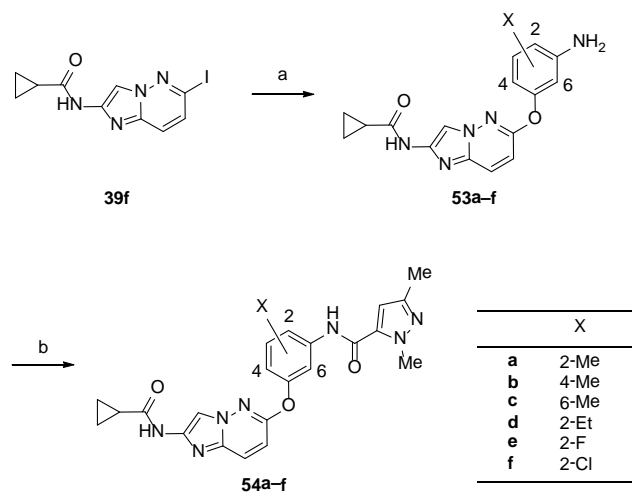
Scheme 4-1 Reagents: (a) Ethyl (chloroacetyl)carbamate, Na₂HPO₄, DMA; (b) Ba(OH)₂, NMP/H₂O; (c) R¹COCl, DMA; (d) 3-aminophenol, K₂CO₃, DMF; (e) 3-fluorobenzoyl chloride, DMA.

Scheme 4-2 に示す方法により、分子右部のアシル基の変換を行った。DMA 溶媒中、アニリン **40a** に 3-(トリフルオロメチル)ベンゾイルクロリドを作用させることにより **35** を合成した。また、同様の条件で、**40f** のアミノ基を各種酸クロリドを用いアシル化することにより **42-52** を合成した。



Scheme 4-2 Reagents: (a) 3-(Trifluoromethyl)benzoyl chloride, DMA; (b) R²COCl, DMA.

中央ベンゼン環への置換基導入は、Scheme 4-3 の方法に従い実施した。化合物 **39f** と各種アミノフェノールとの芳香族求核置換反応によりアニリン体 **53a-f** へと導き、次いで1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボニルクロリドを用いアミノ基をアシル化することにより種々の置換基を有する **54a-f** を合成した。



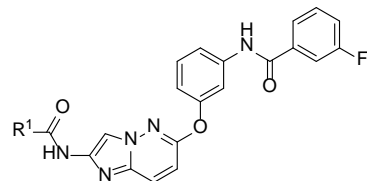
Scheme 4-3 Reagents: (a) aminophenols, K₂CO₃, DMF for **53a,c-f**; 5-amino-2-methylphenol, NaH, DMF for **53b**; (b) 1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carbonyl chloride, DMA for **54a,e,f**; 1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carbonyl chloride, Et₃N, THF for **54b,c**; 1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carbonyl chloride, NMP for **54d**.

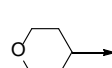
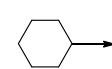
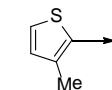
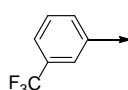
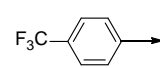

4.3 構造活性相関

初期構造変換の結果、化合物 **35** のトリフルオロメチル基を 3-フルオロフェニル基に変換した **41a** において、VEGFR2 阻害活性の向上 ($IC_{50} = 2.7 \text{ nM}$) が認められた。そこで、**41a** をリード化合物とし、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン 2 位のアシルアミノ基を変換した。まず、**41a** のテトラヒドロピラニル基をシクロヘキシル基に変換した **41b** を評価したところ、VEGFR2 阻害活性が 4 倍程度減弱した。一方、3-メチルチオフェン体 **41c**、(トリフルオロメチル)フェニル体 **41d,e** はさらに VEGFR2 阻害活性が減弱し、その減弱度が高い置換基を有する **41d,e** で特に顕著であった。以上の結果、アシル基が占有するポケットは比較的小さいと予想された。そこで、**41a** が有するテトラヒドロピラニル基よりサイズの小さなシクロプロピル基およびメチル基を有する **41f,g** を合成したところ、予想通り VEGFR2 阻害活性が増強した ($IC_{50} = 1.0 \text{ nM}$ (**41f**), 1.1 nM (**41g**))。

Table 4-1

Effect of the amide substituent R^1 on VEGFR2 kinase inhibition^a

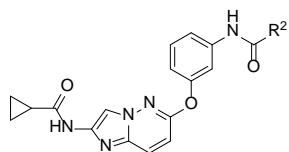


| Compd | R^1 | VEGFR2 IC_{50} (nM) |
|------------|---|-----------------------|
| 35 | | 6.9 (6.4-7.4) |
| 41a |  | 2.7 (2.6-2.9) |
| 41b |  | 11 (10-12) |
| 41c |  | 19 (16-21) |
| 41d |  | 160 (120-200) |
| 41e |  | 120 (110-140) |
| 41f |  | 1.0 (0.96-1.1) |
| 41g | Me | 1.1 (1.0-1.2) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

続いて、2位をシクロプロピルカルボニルアミノ基に固定し、分子右部のアシル基を変換した (Table 4-2)。まず、**41f**のフルオロフェニル基をシクロプロピル基に変換した**42**を評価したところ、VEGFR2阻害活性が12倍減弱した($IC_{50} = 12 \text{ nM}$)。また、*tert*-ブチル体**43**はVEGFR2阻害活性がさらに減弱($IC_{50} = 650 \text{ nM}$)した。このことから、アシル基として芳香族置換基が好ましいことが判明した。一方、ピリジン体**44**およびイソキサゾール体**45**は**41f**と同様 nM オーダーの強力な VEGFR2 阻害活性を示したことから、芳香環の種類は活性に影響を与えないことが判明した。次に、芳香環上置換基の影響を検討した。置換位置の異なるモノメチル体**46**および**47**が同等の VEGFR2 阻害活性を示したのに対し、ジメチル体**48-50**は活性差が認められた。すなわち、カルボニル基のオルト位にジメチル基を有する**49**は、その他の置換体**48,50**と比較し VEGFR2 阻害活性が20倍程度減弱した($IC_{50} = 0.96 \text{ nM}$ (**48**), 25 nM (**49**), 1.4 nM (**50**))。また、置換基サイズの影響を調べる目的で**51**および**52**を評価したところ、**50**のピラゾール1位メチル基をフェニル基に、3位メチル基をトリフルオロメチル基に変換した**51,52**においても VEGFR2 阻害活性は維持した。従って、アシル基が占有するポケットはタイトではなく、置換基を厳密には認識していないことが示唆された。一方、アシル基の種類によるプロファイルの違いを評価する目的でキナーゼ選択性試験を実施したところ、ベンゼン環と比較しヘテロ芳香環がキナーゼ選択性に優れる傾向が示された(data not shown)。特に、B-raf キナーゼとの選択性の違いが大きく、フルオロフェニル体**10f**が $IC_{50} = 650 \text{ nM}$ の阻害活性を示すのに対し、ピラゾール体**50**は 10000 nM においても阻害活性が認められなかった。また、**50**は $IC_{50} = 1.7 \text{ nM}$ の強力な HUVEC 増殖阻害活性を示した。以上の結果、**50**は安全面・薬効面ともに優れた化合物であると考えられた。

Table 4-2

Effect of the amide substituent R² on VEGFR2 kinase inhibitory activity^a

| Compd | R ² | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) | Compd | R ² | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) |
|-------|----------------|---------------------------------|-------|----------------|---------------------------------|
| 41f | | 1.0 (0.96-1.1) | 47 | | 1.3 (1.2-1.5) |
| 42 | | 12 (11-14) | 48 | | 0.96 (0.81-1.1) |
| 43 | | 650 (550-750) | 49 | | 25 (19-33) |
| 44 | | 1.3 (1.2-1.5) | 50 | | 1.4 (1.3-1.5) |
| 45 | | 1.3 (1.2-1.3) | 51 | | 1.2 (1.2-1.3) |
| 46 | | 1.4 (1.2-1.8) | 52 | | 3.7 (3.3-4.2) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

4.4 VEGFR2 と 50 の複合体 X 線結晶構造解析

化合物 **50** の結合モード解析を目的に、VEGFR2 との複合体 X 線結晶構造解析を実施した。化合物 **50** は、VEGFR2 の不活性コンフォメーションに結合し、type 2 キナーゼ阻害薬に特徴的な 3 つの相互作用を形成していた(Figure 4-3)。イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン部分は、ヒンジ領域を占有し、1 位窒素がヒンジ領域の Cys919 主鎖 NH と、8 位 CH が Glu917 主鎖カルボニルとそれぞれ相互作用していた。6 位フェノキシ基は、バックポケットを占有し、アミド基が Glu885 カルボキシル基および Asp1046 主鎖 NH とそれぞれ水素結合し、ピラゾール部位が脂溶性ポケットを占有していた。上記の相互作用に加え、ヒンジ領域において、2 位アミノ基と Cys919 主鎖カルボニルとの水素結合が認められた。この相互作用は、**33** と VEGFR2 の複合体結晶構造で認められたものと同様であった。また、シクロプロパンカルボニル基は、溶媒側に存在するポケットを効果的に占有することも判明した。このように、**50** の各置換基が効果的に相互作用に寄与する一方、中央ベンゼン環周辺を観察すると、サイズは小さいものの空間の存在が確認された。従って、置換基導入によりこの空間を占有すれば、さらに活性向上が見込めると考えた。

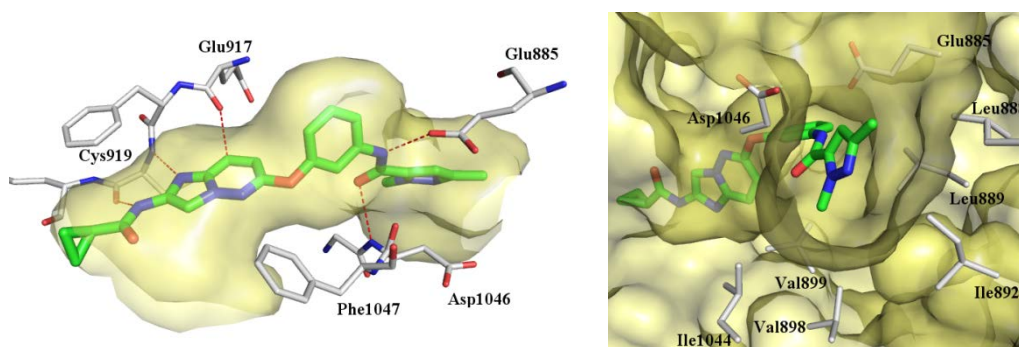


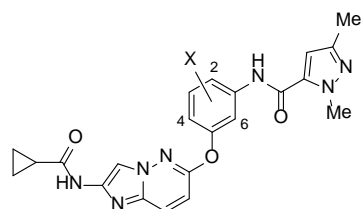
Figure 4-3 Crystal structure of **50** in complex with VEGFR2 (PDB 3VO3).

4.5 中央ベンゼン環への置換基導入

結晶構造から得られた知見を基に、中央ベンゼン環上への置換基導入を行った。まず、結晶構造より置換基が導入可能と推察された 2 位、4 位、および 6 位にメチル基を導入したところ、2 位置換体が最も好ましい結果を与えた。すなわち、2 位メチル体 **54a** は無置換体と比較し VEGFR2 阻害活性が向上 ($IC_{50} = 1.4 \text{ nM}$ (**50**) \rightarrow 0.95 nM (**54a**)) したことから、メチル基が空間を効果的に占有することが示唆された。一方、6 位にメチル基を導入した **54c** は、予想に反して VEGFR2 阻害活性が減弱 ($IC_{50} = 4.7 \text{ nM}$) した。要因として、メチル基の導入により、オルト位に存在するアミド基と立体反発が生じ、活性コンフォメーションが不安定化されたことが考えられる。次に、最適な結果を与えた 2 位メチル体 **54a** をエチル体 **54d** に変換したところ、VEGFR2 阻害活性が 5 倍減弱 ($IC_{50} = 5.1 \text{ nM}$) した。メチル基と比較し、サイズが小さいまたは同等のフルオロ基およびクロロ基を有する **54e,f** は、強力な VEGFR2 阻害活性を維持した。従って、Figure 4-3 から予想された通り、中央ベンゼン環 2 位には小さい置換基のみ許容されることが判明した。次に、**54a-f** の HUVEC 増殖阻害能を評価した。VEGFR2 阻害活性が最も強力な 2-メチル体 **54a** は、**50** と比較し約 6 倍 HUVEC 増殖阻害活性が増強した ($IC_{50} = 1.7 \text{ nM}$ (**50**) \rightarrow 0.30 nM (**54a**))。また、2-フルオロ体 **54e** も $IC_{50} = 0.56 \text{ nM}$ の非常に強力な HUVEC 増殖阻害活性を示した。

Table 4-3

Effect of the central phenyl substituent X on VEGFR2 kinase and HUVEC growth inhibition^a



| Compd | X | VEGFR2 IC_{50} (nM) | HUVEC ^b IC_{50} (nM) |
|------------|------|-----------------------|-----------------------------------|
| 50 | H | 1.4 (1.3-1.5) | 1.7 (0.66-3.8) |
| 54a | 2-Me | 0.95 (0.82-1.1) | 0.30 (0.28-0.32) |
| 54b | 4-Me | 1.8 (1.5-2.1) | 11 (6.8-17) |
| 54c | 6-Me | 4.7 (4.2-5.3) | 97 (73-130) |
| 54d | 2-Et | 5.1 (4.2-6.2) | 93 (66-130) |
| 54e | 2-F | 1.1 (1.0-1.3) | 0.56 (0.14-1.5) |
| 54f | 2-Cl | 1.3 (1.1-1.5) | 3.0 (1.4-5.8) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

^b Inhibition of HUVEC proliferation.

4-6 化合物 **54a** の生物評価

強力な *in vitro* 活性を示した化合物 **50**、**54a**、および **54e** について、マウスにおける経口吸収性を評価した (Table 4-5)。興味深いことに、2 位置換体 **54a** および **54e** は、無置換体 **50** と比較し AUC_{0-8h} および C_{8h} が非常に高値であった。一般に、経口吸収性は溶解度の影響を受けることが知られていることから、化合物の胆汁酸添加系日本薬局方第 2 液における溶解度を測定した。その結果、経口吸収性の良好であった **54a** は、**50** と比較し約 10 倍の溶解度改善が認められた。また、**54a** はマウス肝ミクロソームにおける代謝にも安定であり、それを反映して投与 8 時間後(C_{8h})も十分な血中濃度を維持した。ヒト肝ミクロソームにおける代謝安定性も非常に良好であったことから、**54a** はヒトにおいても十分な経口吸収性を示すと考えられた。

Table 4-5

Pharmacokinetic and physicochemical profiles of **50** and **54a,e**

| Compd | Mouse PK ^a | | Metabolic stability ^d | | Solubility JP2 + BA ^e (μg/mL) | M _p ^f (°C) | logD _{7.4} ^g |
|------------|---|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------|--|-------------------------------------|----------------------------------|
| | AUC _{0-8h} ^b (μg·h/mL) | C _{8h} (μg/mL) ^c | Human (μL/min/mg) | Mouse (μL/min/mg) | | | |
| 50 | 0.73 | 0.053 | 6 | 43 | 3.7 | 266 | 2.28 |
| 54a | 15 | 0.60 | 2 | 31 | 38 | 223 | 2.24 |
| 54e | 7.6 | 0.30 | 9 | 54 | 14 | 234 | 2.21 |

^a Compounds (10 mg/kg) were orally administered by cassette dosing.

^b Area under plasma concentration–time curve from 0 to 8 h.

^c Plasma concentration at 8 h after administration.

^d Metabolic stability in hepatic microsomes.

^e Thermodynamic solubility in Japanese Pharmacopoeia disintegration test solution 2 (pH 6.8) containing a bile acid.

^f Determined by differential scanning calorimetry.

^g 1-Octanol/water distribution coefficients at pH7.4.

化合物 **54a** が強力な *in vitro* 活性と良好な経口吸収性を示したことから、マウスを用いた抗腫瘍試験を実施した (Figure 4-4)。A549 ヒト肺癌細胞を皮下移植したマウスに、化合物 **54a** を 1 日 2 回、15 日間経口投与し、腫瘍体積を測定した。その結果、vehicle 投与群において著しい腫瘍体積の増加が認められたのに対し、**54a** 投与群においては用量依存的に顕著な腫瘍増殖抑制を示した。また、いずれの用量においても顕著な有害事象は認められなかった。

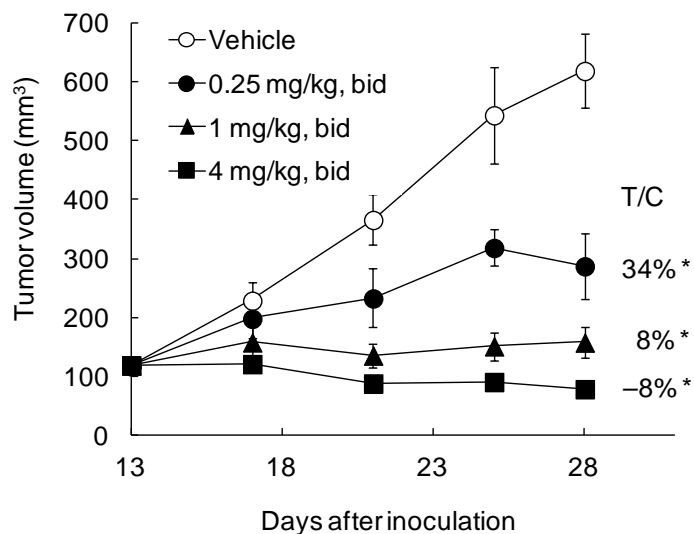


Figure 4-4 Antitumor efficacy of **54a** in an A549 xenograft mouse model. A549 tumor-bearing nude mice were orally administered **54a** (0.25, 1, and 4 mg/kg) twice daily for 14 days (day 14–27). Data represent mean \pm SD ($n = 5$). *: $p \leq 0.025$ versus vehicle control as determined by a one-tailed Williams' test. Antitumor effects are expressed as T/C values (increase in treated tumor volume/increase in control tumor volume) $\times 100$.

4.7 まとめ

強力な HUVEC 増殖阻害活性を示す化合物の創出を目的に、第 3 章で見出されたイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体の構造修飾を行った。2-アミノイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体 **33** の結合モードから、2 位アミノ基の重要性が示唆されたため、**30b** に 2 位アミノ基を導入した **35** をデザイン、合成した。その結果、**35** は HUVEC 阻害活性が著しく増強することが判明した。そこで、**35** をリード化合物とし、分子両末端のアシル基の最適化および中央ベンゼン環への置換基導入を行った結果、強力な *in vitro* 活性に加え良好な経口吸収性を示す **54a** を見出すことに成功した。化合物 **54a** は、マウス抗腫瘍試験において優れた薬効を示し、顕著な有害事象も認められなかったことから、本化合物(**TAK-593**)を臨床試験実施化合物として選択した。

実験の部

Ethyl (6-iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)carbamate (37)

化合物36(27.0 g, 122 mmol)のDMA (270 mL)溶液に、(クロロアセチル)カルバミン酸エチル(32.4 g, 195 mmol)、リン酸水素二ナトリウム(43.4 g, 305 mmol)を加え、110 °Cにて3時間攪拌した。室温に冷却後、水(810 mL)を加え、析出した固体を濾取、アセトニトリル、ジエチルエーテルにて洗浄し、表題化合物 (33.0 g, 81%)を茶褐色粉末として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.26 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.17 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 7.47 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.70 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 8.06 (1H, s), 10.51 (1H, brs).

6-Iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-amine (38)

水酸化バリウム・8水和物(14.5 g, 46.1 mmol)に水(240 mL)を加え、80 °Cにて15分間攪拌した。化合物37(10.2 g, 30.7 mmol)のNMP(80 mL)溶液を加え、120 °Cにて8時間攪拌した。室温に冷却後、反応液に水(480 mL)を加え、1時間攪拌した。酢酸エチル/THF を用いて2回抽出し、飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸マグネシウムにて乾燥、ろ過した。減圧下溶媒を留去、残留物にジイソプロピルエーテルを加え、析出した固体を濾取し、表題化合物(6.1 g, 76%)を茶色粉末として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.61 (2H, s), 7.22 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.36 (1H, s), 7.39 (1H, d, $J = 8.7$ Hz).

N-(6-Iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)cyclopropanecarboxamide (39f)

化合物38(1.0 g, 3.85 mmol)のDMA (10 mL)溶液にシクロプロピルカルボニルクロリド(0.38 mL, 4.23 mmol)を加え、室温にて4時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチル/THF にて抽出した。飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸マグネシウムにて乾燥、ろ過した。減圧下溶媒を留去、残留物をヘキサン/酢酸エチルにて洗浄、表題化合物(1.01 g, 80%)を茶褐色粉末として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.82–0.86 (4H, m), 1.90–2.00 (1H, m), 7.49 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.73 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 8.23 (1H, s), 11.20 (1H, s).

化合物39fの合成と同様の方法により、39a–e,gを合成した。

N-(6-Iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)tetrahydro-2*H*pyran-4-carboxamide (39a)

収率 73%. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.54–1.76 (4H, m), 2.66–2.80 (1H, m), 3.27–3.40 (2H, m), 3.84–3.96 (2H, m), 7.49 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.74 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 8.28 (1H, s), 10.91 (1H, s).

***N*-(6-Iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)cyclohexanecarboxamide (39b)**

収率 50%. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.12–1.49 (6H, m), 1.59–1.85 (5H, m), 7.48 (1H, d, $J=9.3$ Hz), 7.73 (1H, d, $J=9.3$ Hz), 8.22–8.31 (1H, m), 10.80 (1H, s).

***N*-(6-Iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)-3-methylthiophene-2-carboxamide (39c)**

収率 61%. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.47–2.50 (3H, m), 7.03 (1H, d, $J=4.9$ Hz), 7.53 (1H, d, $J=9.4$ Hz), 7.69 (1H, d, $J=4.9$ Hz), 7.77 (1H, d, $J=9.2$ Hz), 8.40 (1H, s), 10.96 (1H, s).

***N*-(6-Iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)-3-(trifluoromethyl)benzamide (39d)**

収率 63%. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.55 (1H, d, $J=9.3$ Hz), 7.74–7.85 (2H, m), 7.98 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 8.37 (1H, d, $J=7.7$ Hz), 8.46 (1H, s), 8.51 (1H, s), 11.77 (1H, s).

***N*-(6-Iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)-4-(trifluoromethyl)benzamide (39e)**

収率 49%. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.55 (1H, d, $J=9.3$ Hz), 7.81 (1H, d, $J=9.3$ Hz), 7.91 (2H, d, $J=8.3$ Hz), 8.26 (2H, d, $J=8.1$ Hz), 8.51 (1H, s), 11.72 (1H, s).

***N*-(6-Iodoimidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)acetamide (39g)**

収率 43%. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.09 (3H, s), 7.49 (1H, d, $J=9.3$ Hz), 7.74 (1H, d, $J=9.3$ Hz), 8.25 (1H, s), 10.91 (1H, s).

***N*-[6-(3-Aminophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (40f)**

化合物39f (805 mg, 2.45 mmol)、3-アミノフェノール (430 mg, 3.94 mmol)、炭酸カリウム (847 mg, 6.13 mmol)、DMF (6 mL)の混合物を、マイクロウェーブ反応装置を用い、180 °Cで30分間加熱攪拌した。混合物に酢酸エチル/THF、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、水層を酢酸エチル/THFで抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、表題化合物(470 mg, 60%)を茶色粉末として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.75–0.85 (4H, m), 1.87–1.97 (1H, m), 5.31 (2H, s), 6.27–6.32 (1H, m), 6.35 (1H, t, $J=2.2$ Hz), 6.40–6.46 (1H, m), 6.95 (1H, d, $J=9.5$ Hz), 7.05 (1H, t, $J=8.0$ Hz), 7.98 (1H, s), 8.00 (1H, d, $J=9.5$ Hz), 11.08 (1H, s).

化合物40fの合成と同様の方法により、40a–e,gを合成した。

***N*[6-(3-Aminophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]tetrahydro-2*H*pyran-4-carboxamide (40a)**

収率 42%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.57–1.73 (4H, m), 2.64–2.77 (1H, m), 3.26–3.39 (2H, m), 3.84–3.94 (2H, m), 5.30 (2H, s), 6.27–6.45 (3H, m), 6.95 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.05 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.97–8.03 (2H, m), 10.78 (1H, s).

***N*[6-(3-Aminophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]cyclohexanecarboxamide (40b)**

収率 51%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.21–1.37 (2H, m), 1.45–1.59 (2H, m), 1.65–2.02 (6H, m), 2.21–2.34 (1H, m), 3.77 (2H, brs), 6.50 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 6.52–6.57 (2H, m), 6.81 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.17 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.70 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 8.01–8.14 (1H, m), 8.22 (1H, s).

***N*[6-(3-Aminophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]-3-methylthiophene-2-carboxamide (40c)**

収率 58%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.62 (3H, s), 3.78 (2H, brs), 6.52 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 6.56 (2H, dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz), 6.83 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 6.95 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.18 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.67 (1H, dd, *J* = 9.5, 1.7 Hz), 8.32 (1H, s), 8.36 (1H, brs).

***N*[6-(3-Aminophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]-3-(trifluoromethyl)benzamide (40d)**

収率 54%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.80 (2H, brs), 6.53 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 6.55–6.60 (2H, m), 6.84 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.20 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.64 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.82 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.11 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.21 (1H, s), 8.39 (1H, s), 9.16 (1H, brs).

***N*[6-(3-Aminophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]-4-(trifluoromethyl)benzamide (40e)**

収率 44%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.80 (2H, brs), 6.53 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 6.55–6.60 (2H, m), 6.83 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.20 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.54 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.76 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.04 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.39 (1H, s), 9.13 (1H, s).

***N*[6-(3-Aminophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]acetamide (40g)**

収率 72%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.07 (3H, s), 5.31 (2H, brs), 6.30 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz), 6.36 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 6.43 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz), 6.96 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.05 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.97–8.01 (2H, m), 10.79 (1H, s).

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-3-fluorobenzamide (41f)**

化合物 **40f** (100 mg, 0.32 mmol)のDMA (3 mL)溶液に、3-フルオロベンゾイルクロリド(43 μ L, 0.36 mmol)を加えて室温で18時間攪拌した。反応混合物を水で希釈後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製後、酢酸エチルより析出させて、表題化合物 (**56 mg**, 40%)を白色粉末として得た。

Mp 263–264 °C. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.76–0.85 (4H, m), 1.87–1.98 (1H, m), 7.02 (1H, dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.41–7.49 (2H, m), 7.54–7.83 (5H, m), 7.98 (1H, s), 8.06 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 10.43 (1H, s), 11.08 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₁₈FN₅O₃: C, 64.03; H, 4.21; N, 16.23. Found: C, 63.76; H, 4.12; N, 16.10.

化合物**41f**の合成と同様の方法により、**41a–e,g**を合成した。

***N*[6-(3-{{(3-Fluorophenyl)carbonyl}amino}phenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]tetrahydro-2*H*-pyran-4-carboxamide (41a)**

収率 34%. Mp 230–231 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.58–1.74 (4H, m), 2.65–2.76 (1H, m), 3.28–3.37 (2H, m), 3.86–3.92 (2H, m), 7.02 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz), 7.08 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.42–7.49 (2H, m), 7.56–7.62 (1H, m), 7.64–7.68 (1H, m), 7.72–7.78 (2H, m), 7.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.03 (1H, s), 8.06 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 10.45 (1H, s), 10.81 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₅H₂₂FN₅O₄·0.25H₂O: C, 62.56; H, 4.72; N, 14.59. Found: C, 62.64; H, 4.63; N, 14.82.

***N*[3-({2-[(Cyclohexylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-3-fluorobenzamide (41b)**

収率 54%. Mp 216–217 °C. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.09–1.49 (5H, m), 1.57–1.84 (5H, m), 2.39–2.48 (1H, m), 6.98–7.10 (2H, m), 7.40–7.50 (2H, m), 7.54–7.69 (2H, m), 7.71–7.83 (3H, m), 8.00–8.08 (2H, m), 10.44 (1H, s), 10.69 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₆H₂₄FN₅O₃·0.2H₂O: C, 65.45; H, 5.15; N, 14.68. Found: C, 65.49; H, 5.21; N, 14.63.

***N*[6-(3-{{(3-Fluorophenyl)carbonyl}amino}phenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]-3-methylthiophene-2-carboxamide (41c)**

収率 33%. Mp 203–204 °C. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.47 (3H, s), 6.99–7.07 (2H, m), 7.12 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.41–7.50 (2H, m), 7.55–7.70 (3H, m), 7.73–7.85 (3H, m), 8.01–8.18 (2H, m), 10.45 (1H, s), 10.86 (1H, s). HRMS–ESI (m/z): [M + H]⁺ calcd for

C₂₅H₁₈FN₅O₃S, 488.1187; found, 488.1166.

3-Fluoro-*N*-(3-{[2-({[3-(trifluoromethyl)phenyl]carbonyl}amino)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl]oxy}phenyl)benzamide (41d)

収率 52%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.06 (1H, ddd, *J* = 8.0, 2.4, 0.9 Hz), 7.15 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 7.41–7.51 (2H, m), 7.60 (1H, td, *J* = 8.0, 6.1 Hz), 7.66–7.72 (1H, m), 7.74–7.85 (4H, m), 7.97 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 8.10–8.16 (1H, m), 8.25 (1H, s), 8.36 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.45 (1H, s), 10.47 (1H, s), 11.68 (1H, s). HRMS–ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₇H₁₇F₄N₅O₃, 536.1340; found, 536.1327.

3-Fluoro-*N*-(3-{[2-({[4-(trifluoromethyl)phenyl]carbonyl}amino)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl]oxy}phenyl)benzamide (41e)

収率 55%. Mp 211–212 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.06 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.2 Hz), 7.11–7.18 (1H, m), 7.40–7.51 (2H, m), 7.54–7.64 (1H, m), 7.65–7.71 (1H, m), 7.73–7.84 (3H, m), 7.89 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.13 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 8.21–8.29 (3H, m), 10.46 (1H, s), 11.61 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₇H₁₇F₄N₅O₃·0.5H₂O: C, 59.56; H, 3.33; N, 12.86. Found: C, 59.75; H, 3.46; N, 12.80.

***N*-(3-{[2-(Acetylamino)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl]oxy}phenyl)-3-fluorobenzamide (41g)**

収率 76%. Mp 304–305 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.07 (3H, s), 6.99–7.11 (2H, m), 7.39–7.51 (2H, m), 7.53–7.70 (2H, m), 7.71–7.84 (3H, m), 7.97–8.09 (2H, m), 10.44 (1H, s), 10.80 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₁H₁₆FN₅O₃·0.2H₂O: C, 61.67; H, 4.04; N, 17.12. Found: C, 61.94; H, 4.09; N, 16.86.

***N*-(6-[3-({[3-(Trifluoromethyl)phenyl]carbonyl}amino)phenoxy]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]tetrahydro-2*H*-pyran-4-carboxamide (35)**

化合物 40a (200 mg, 0.57 mmol)のDMA (2 mL)溶液に、3-(トリフルオロメチル)ベンゾイルクロリド(100 μL, 0.68 mmol)を加えて室温で18時間攪拌した。反応混合物を水で希釈後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製後、酢酸エチルより再結晶し、表題化合物 (221 mg, 74%)を白色粉末として得た。

Mp 205–206 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.56–1.73 (4H, m), 2.62–2.78 (1H, m), 3.26–3.38 (2H, m), 3.83–3.93 (2H, m), 7.00–7.06 (1H, m), 7.08 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.46 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.64–7.83 (3H, m), 7.95–7.99 (1H, m), 8.03 (1H, s), 8.06 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 8.23–8.29 (2H, m), 10.60 (1H, s), 10.80 (1H, s). Anal. Calcd for

C₂₆H₂₂F₃N₅O₄·0.3H₂O: C, 58.82; H, 4.29; N, 13.19. Found: C, 58.80; H, 4.36; N, 13.06.

化合物**35**の合成と同様の方法により、**42–52**を合成した。

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]cyclopropanecarboxamide (42)**

収率 70%. Mp 273–274 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.77–0.82 (8H, m), 1.70–1.78 (1H, m), 1.87–1.97 (1H, m), 6.90 (1H, dt, *J* = 6.9, 2.2 Hz), 7.05 (1H, s), 7.30–7.42 (2H, m), 7.57 (1H, s), 7.96 (1H, s), 8.03 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 10.34 (1H, s), 11.08 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₉N₅O₃·0.3H₂O: C, 62.75; H, 5.16; N, 18.30. Found: C, 62.74; H, 5.18; N, 18.00.

***N*(6-{3-[(2,2-Dimethylpropanoyl)amino]phenoxy}imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl)cyclopropanecarboxamide (43)**

収率 60%. Mp 234–235 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.86–0.93 (2H, m), 1.08–1.14 (2H, m), 1.31 (9H, s), 1.55–1.59 (1H, m), 6.83 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 6.94 (1H, ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.0 Hz), 7.26–7.40 (3H, m), 7.60 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 7.72 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 8.14 (1H, s), 8.46 (1H, s). HRMS–ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₂₃N₅O₃, 394.1874; found, 394.1857.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]pyridine-4-carboxamide (44)**

収率 78%. Mp 257–259 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.75–0.85 (4H, m), 1.84–2.00 (1H, m), 7.01–7.07 (1H, m), 7.08 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.46 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.63–7.69 (1H, m), 7.73 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 7.82–7.87 (2H, m), 7.98 (1H, s), 8.06 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 8.76–8.81 (2H, m), 10.62 (1H, s), 11.09 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₁₈N₆O₃·0.2H₂O: C, 63.21; H, 4.44; N, 20.10. Found: C, 63.28; H, 4.55; N, 19.97.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]isoxazole-5-carboxamide (45)**

収率 57%. Mp 237–239 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.75–0.85 (4H, m), 1.85–1.99 (1H, m), 7.02–7.10 (2H, m), 7.25 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 7.46 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.63–7.72 (2H, m), 7.98 (1H, s), 8.06 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 8.81 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 10.87 (1H, s), 11.08 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆N₆O₄: C, 59.40; H, 3.99; N, 20.78. Found: C, 59.09; H, 3.97; N, 20.73.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-3-methylisoxazole-5-carboxamide (46)**

收率 22%. Mp 241–243 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.73–0.87 (4H, m), 1.86–1.98 (1H, m), 2.32 (3H, s), 7.01–7.14 (3H, m), 7.45 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.62–7.74 (2H, m), 7.98 (1H, s), 8.06 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 10.82 (1H, s), 11.10 (1H, s). HRMS–ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₁₈N₆O₄, 419.1462; found, 419.1429.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-1-methyl-1*H*,2,3-triazole-5-carboxamide (47)**

收率 67%. Mp 282–284 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.79–0.82 (4H, m), 1.87–1.96 (1H, m), 4.23 (3H, s), 7.02–7.09 (2H, m), 7.46 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.56–7.65 (2H, m), 7.96 (1H, s), 8.05 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 8.37 (1H, s), 10.61 (1H, s), 11.09 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₀H₁₈N₈O₃·0.1EtOAc: C, 57.35; H, 4.44; N, 26.23. Found: C, 57.24; H, 4.58; N, 26.00.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-1,5-dimethyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (48)**

收率 42%. Mp 226–227 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.78–0.83 (4H, m), 1.88–1.96 (1H, m), 2.30 (3H, s), 3.82 (3H, s), 6.54 (1H, s), 6.91–6.96 (1H, m), 7.05 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.37 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.69–7.73 (1H, m), 7.76–7.78 (1H, m), 7.97 (1H, s), 8.04 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 10.10 (1H, s), 11.09 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₁N₇O₃·1.2H₂O: C, 58.32; H, 5.21; N, 21.64. Found: C, 58.41; H, 5.32; N, 21.36.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-3,5-dimethylisoxazole-4-carboxamide (49)**

收率 73%. Mp 227–228 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.79–0.82 (4H, m), 1.88–1.95 (1H, m), 2.32 (3H, s), 2.54 (3H, s), 6.98–7.02 (1H, m), 7.06 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.42 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.48–7.51 (1H, m), 7.61–7.64 (1H, m), 7.96 (1H, s), 8.05 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 10.19 (1H, s), 11.09 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀N₆O₄: C, 61.10; H, 4.66; N, 19.43. Found: C, 60.83; H, 4.74; N, 19.31.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (50)**

收率 54%. Mp 266 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.79–0.83 (4H, m), 1.87–1.97 (1H, m), 2.19 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.82 (1H, s), 6.99–7.03 (1H, m), 7.07 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.43 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.60–7.64 (1H, m), 7.65–7.68 (1H, m), 7.97 (1H, s), 8.06 (1H,

d, $J = 9.6$ Hz), 10.24 (1H, s), 11.10 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{22}H_{21}N_7O_3 \cdot 0.2EtOH$: C, 61.05; H, 5.08; N, 22.25. Found: C, 61.03; H, 5.04; N, 22.24.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (51)**

収率 66%. Mp 255–256 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.76–0.84 (4H, m), 1.84–1.96 (1H, m), 2.29 (3H, s), 6.85 (1H, s), 6.96–7.01 (1H, m), 7.04 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 7.30–7.58 (8H, m), 7.95 (1H, s), 8.03 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 10.64 (1H, s), 11.08 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{27}H_{23}N_7O_3 \cdot 0.8H_2O$: C, 63.85; H, 4.88; N, 19.30. Found: C, 63.91; H, 4.97; N, 19.31.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-1-methyl-3-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (52)**

収率 78%. Mp 249–251 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.73–0.85 (4H, m), 1.84–1.97 (1H, m), 4.15 (3H, s), 7.02–7.10 (2H, m), 7.46 (1H, t, $J = 8.2$ Hz), 7.50 (1H, s), 7.59–7.64 (1H, m), 7.66 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 7.98 (1H, s), 8.06 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 10.53 (1H, s), 11.10 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{22}H_{18}F_3N_7O_3$: C, 54.43; H, 3.74; N, 20.20. Found: C, 54.48; H, 3.75; N, 19.97.

化合物35の合成と同様の方法により、53a,c-fを合成した。

***N*[6-(3-Amino-4-methylphenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (53a)**

収率 58%. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.72–0.86 (4H, m), 1.84–1.97 (1H, m), 2.04 (3H, s), 5.06 (2H, s), 6.28 (1H, dd, $J = 8.1, 2.4$ Hz), 6.42 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.96 (1H, s), 7.98 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 11.07 (1H, s).

***N*[6-(3-Amino-2-methylphenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (53c)**

収率 58%. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.71–0.87 (4H, m), 1.83–1.98 (1H, m), 1.89 (3H, s), 5.13 (2H, s), 6.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.55 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 6.93 (1H, dd, $J = 8.0, 6.8$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.91 (1H, s), 7.98 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 11.05 (1H, s).

***N*[6-(3-Amino-4-ethylphenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (53d)**

収率 70%. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.73–0.88 (4H, m), 1.14 (3H, t, $J = 7.4$

Hz), 1.85–2.00 (1H, m), 2.43 (2H, q, $J = 7.4$ Hz), 5.07 (2H, s), 6.31 (1H, dd, $J = 8.1, 2.7$ Hz), 6.42 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.97 (1H, s), 7.98 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 11.05 (1H, s).

***N*[6-(3-Amino-4-fluorophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (53e)**

収率 73%. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.74–0.86 (4H, m), 1.86–1.98 (1H, m), 5.36 (2H, s), 6.30–6.38 (1H, m), 6.58 (1H, dd, $J = 7.7, 2.9$ Hz), 6.97 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 7.03 (1H, dd, $J = 11.4, 8.7$ Hz), 7.96 (1H, s), 8.00 (1H, dd, $J = 9.6, 0.6$ Hz), 11.06 (1H, s).

***N*[6-(3-Amino-4-chlorophenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (53f)**

収率 73%. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.72–0.87 (4H, m), 1.84–1.98 (1H, m), 5.56 (2H, s), 6.40 (1H, dd, $J = 8.5, 2.8$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 7.00 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 7.23 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.98 (1H, s), 8.02 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 11.09 (1H, s).

***N*[6-(5-Amino-2-methylphenoxy)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (53b)**

水素化ナトリウム(60%油性, 56 mg, 1.4 mmol)のDMF (2 mL)懸濁液に、5-アミノ-2-メチルフェノール(173 mg, 1.4 mmol)のDMF (1 mL)溶液を加え、0 °Cで30分撹拌した。反応混合物に、化合物**39f** (306 mg, 0.93 mmol)のDMF (1.5 mL)溶液を加え、110 °Cで24時間撹拌した。減圧下溶媒を留去後、残渣に酢酸エチル、水を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過した。減圧下溶媒を留去、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、表題化合物 (94 mg, 31%)を茶色粉末として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.73–0.89 (4H, m), 1.84–2.01 (1H, m), 1.97 (3H, s), 5.08 (2H, s), 6.30 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.40 (1H, dd, $J = 8.0, 2.3$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.93 (1H, s), 7.99 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 11.06 (1H, s).

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amin]imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (54a)**

化合物**53a** (485 mg, 1.50 mmol)のDMA (3 mL)溶液に、氷冷下、1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボニルクロリド(262 mg, 1.65 mmol)を加え、室温で1時間撹拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過した。減圧下溶媒を留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/メタノール)で精製後、エタノールより再

結晶し、表題化合物 (517 mg, 77%)を白色粉末として得た。

Mp 223 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.76–0.85 (4H, m), 1.86–1.98 (1H, m), 2.19 (3H, s), 2.25 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.81 (1H, s), 7.04 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.10 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz), 7.27 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.93 (1H, s), 8.03 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 9.80 (1H, s), 11.07 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₂₃N₇O₃: C, 62.01; H, 5.20; N, 22.01. Found: C, 61.98; H, 5.18; N, 22.08.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)aminolimidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)-4-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (54b)**

化合物**53b** (73 mg, 0.23 mmol)のTHF (5 mL)溶液に、氷冷下、1, 3-ジメチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボニルクロリド (46 mg, 0.29 mmol)、トリエチルアミン(68 mg, 0.67 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、酢酸エチルを用いて3回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過した。減圧下溶媒を留去した後、固体を濾取し、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(222 mg, 77%)を白色粉末として得た。

Mp 137 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.70–0.88 (4H, m), 1.85–1.97 (1H, m), 2.14 (3H, s), 2.18 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.81 (1H, s), 7.08 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.32 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.92 (1H, s), 8.05 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 10.18 (1H, s), 11.08 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₂₃N₇O₃·1.5H₂O: C, 58.47; H, 5.55; N, 20.75. Found: C, 58.40; H, 5.56; N, 20.69.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)aminolimidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (54c)**

化合物**54b**の合成と同様の方法により、表題化合物 (82%)を白色固体として得た。

Mp 262 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.72–0.87 (4H, m), 1.86–1.98 (1H, m), 2.06 (3H, s), 2.20 (3H, s), 4.01 (3H, s), 6.84 (1H, s), 7.09 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.15 (1H, dd, *J* = 6.8, 2.3 Hz), 7.25–7.36 (2H, m), 7.88 (1H, s), 8.05 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 9.95 (1H, s), 11.07 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₂₃N₇O₃·0.3H₂O: C, 61.27; H, 5.28; N, 21.75. Found: C, 61.31; H, 5.03; N, 21.51.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)aminolimidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)-2-ethylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (54d)**

化合物**53d** (202 mg, 0.60 mmol)のNMP (3 mL)溶液に、氷冷下、1, 3-ジメチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボニルクロリド(143 mg, 0.90 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、酢酸エチルを用いて3回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過した。減圧下溶媒

を留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/メタノール=100/0→80/20)で精製後、エタノールより再結晶し、表題化合物 (167 mg, 61%)を白色粉末として得た。

Mp 199 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.76–0.84 (4H, m), 1.15 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.84–2.00 (1H, m), 2.19 (3H, s), 2.63 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 3.97 (3H, s), 6.80 (1H, s), 7.04 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.15 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.6 Hz), 7.23 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.94 (1H, s), 8.03 (1H, dd, *J* = 9.6, 0.6 Hz), 9.82 (1H, s), 11.07 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₄H₂₅N₇O₃·0.3H₂O: C, 62.00; H, 5.55; N, 21.09. Found: C, 61.95; H, 5.51; N, 21.09.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)aminolimidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)-2-fluorophenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (54e)**

化合物54aの合成と同様の方法により、表題化合物 (66%)を白色固体として得た。

Mp 234 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.72–0.88 (4H, m), 1.84–2.00 (1H, m), 2.19 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.84 (1H, s), 7.07 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.14–7.25 (1H, m), 7.39 (1H, t, *J* = 9.6 Hz), 7.48–7.58 (1H, m), 7.93 (1H, s), 8.03 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 10.09 (1H, s), 11.06 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀FN₇O₃: C, 58.79; H, 4.49; N, 21.82. Found: C, 58.61; H, 4.44; N, 21.74.

***N*[2-Chloro-5-({2-[(cyclopropylcarbonyl)aminolimidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (54f)**

化合物54aの合成と同様の方法により、表題化合物 (66%)を白色固体として得た。

Mp 255 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.72–0.86 (4H, m), 1.85–1.98 (1H, m), 2.20 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.84 (1H, s), 7.10 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.26 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz), 7.54 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 7.64 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.96 (1H, s), 8.06 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 9.99 (1H, s), 11.09 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀ClN₇O₃: C, 56.72; H, 4.33; Cl, 7.61; N, 21.04. Found: C, 56.65; H, 4.30; Cl, 7.51; N, 21.03.

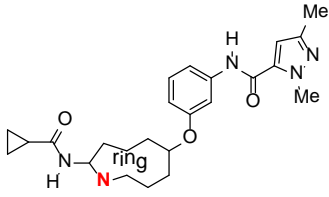
Metabolic stability assay

ヒトおよびマウス肝ミクロソームは Xenotech, LLC (Lenexa, KS)社より購入した。ミクロソーム(0.2 mg protein/mL)と化合物(1 μmol/L)の 50 mmol/L KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer (pH 7.4)溶液中に、25 mmol/L MgCl₂, 25 mmol/L glucose-6-phosphate, 2.5 mmol/L beta-NADP⁺ and 7.5 unit/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase を添加し 37 °C でインキュベーションした。アセトニトリル添加により酵素反応を停止後、UV あるいは LC/MS/MS 検出により親化合物の減少量を測定した。

第5章 新規 5,6 縮合環を有するアニリド誘導体の合成と生物評価

5.1 はじめに

前章で見出されたイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体 **50** は、強力な VEGFR2 阻害活性 ($IC_{50} = 1.4 \text{ nM}$) および HUVEC 増殖阻害活性 ($IC_{50} = 1.7 \text{ nM}$) を示した。また、**50** と VEGFR2 の複合体結晶の取得に成功し、**50** の結合モードが明らかとなった (Figure 4-3)。化合物 **50** のヒンジバインダーであるイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンは、1 位窒素および 8 位 CH が相互作用に関与し、特に 1 位窒素と Cys919 の主鎖 NH との水素結合は活性発現に極めて重要であることが示唆された。対して、その他の原子に明確な相互作用は認められなかったことから、1 位窒素および 8 位 CH 以外は変換可能であると推察された。第 3 章で述べたように、新規ヒンジバインダー創出は、新規性の確保や骨格由来のオリジナルな性質に基づく既知化合物との差別化の観点から非常に重要である。そこで、ヒンジバインダーとして、VEGFR2 との相互作用に関与する 1 位窒素および 8 位 CH を維持した新規 5,6 縮合環を有する type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬の創出を試みた。イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンの 1 位窒素および 8 位 CH に相当する位置に窒素原子および CH を有する 5,6 縮合環は多数に渡る。そこでまず、合成可能性と骨格自体の安定性の観点から、候補となる 5,6 縮合環を選択した。次に、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンの 1 位窒素が水素結合アクセプターとして機能するという知見を基に、該当部位の窒素の水素結合アクセプター能が高い縮合環を選択することとした。水素結合アクセプター能を評価するため、窒素原子上の電子密度を計算したところ、[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン **65a**、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン **69a**、チアゾロ[5,4-*b*]ピリジン **74a**、および 1,3-ベンゾチアゾール **85** が、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン **50** と同等以上の負電荷を帯びていることが判明した (Figure 5-1)。従って、これらヒンジバインダーを有する化合物は、Cys919 主鎖 NH と効果的に水素結合することにより、強力な VEGFR2 阻害活性を示すと考えた。



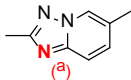
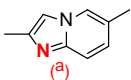
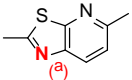
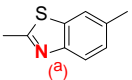
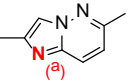
| Compd | 65a | 69a | 74a | 85 | 50 |
|--|---|---|---|--|---|
| Ring |  |  |  |  |  |
| Atomic charge ^e on the N _(a) | -0.66 | -0.61 | -0.58 | -0.58 | -0.60 |

Figure 5-1 Atomic charges of the representative compounds. ^aAtomic charges were calculated at the Hartree–Fock 6-31G/level using the Gaussian03.

ところで、**50** は強い *in vitro* 活性を示したが、マウスにおける経口吸収性が低かった。マウスを用いた抗腫瘍試験において優れた薬効を示すには、強力な *in vitro* 活性のみならず良好な経口吸収性を有する必要がある。第 4 章において、**50** の中央ベンゼン環に置換基を導入すると、溶解度が向上し、その結果経口吸収性が改善する知見が得られた。そこで本章では、*in vitro* 活性とともに溶解度に着目し構造修飾を行うこととした。溶解度改善が期待できる構造修飾として、第 4 章における知見から、中央ベンゼン環への置換基導入が効果的であると考えた。また、同じく第 4 章において、分子右端のジメチルピラゾール部位は変換許容性が高いことが判明しているため、VEGFR2 阻害活性を維持しながら溶解度が向上する置換基が見出せる可能性があると考えた。

以上の知見を基に、[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン、チアゾロ[5,4-*b*]ピリジン、および 1,3-ベンゾチアゾールをヒンジバインダーとする Figure 5-2 に示す化合物を合成し、その評価を行うこととした。

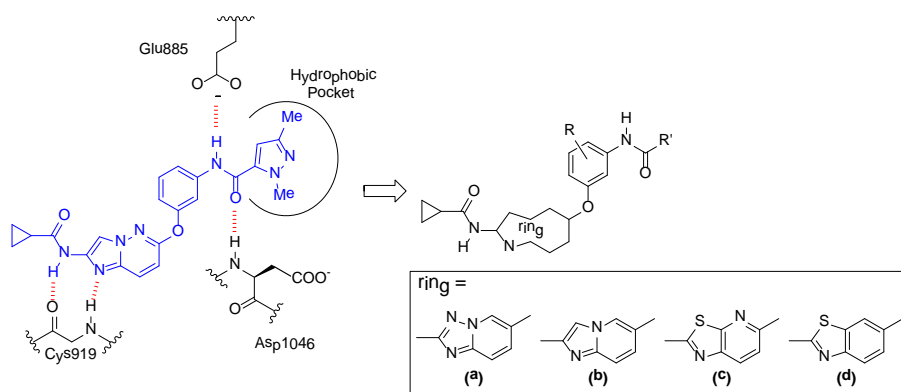
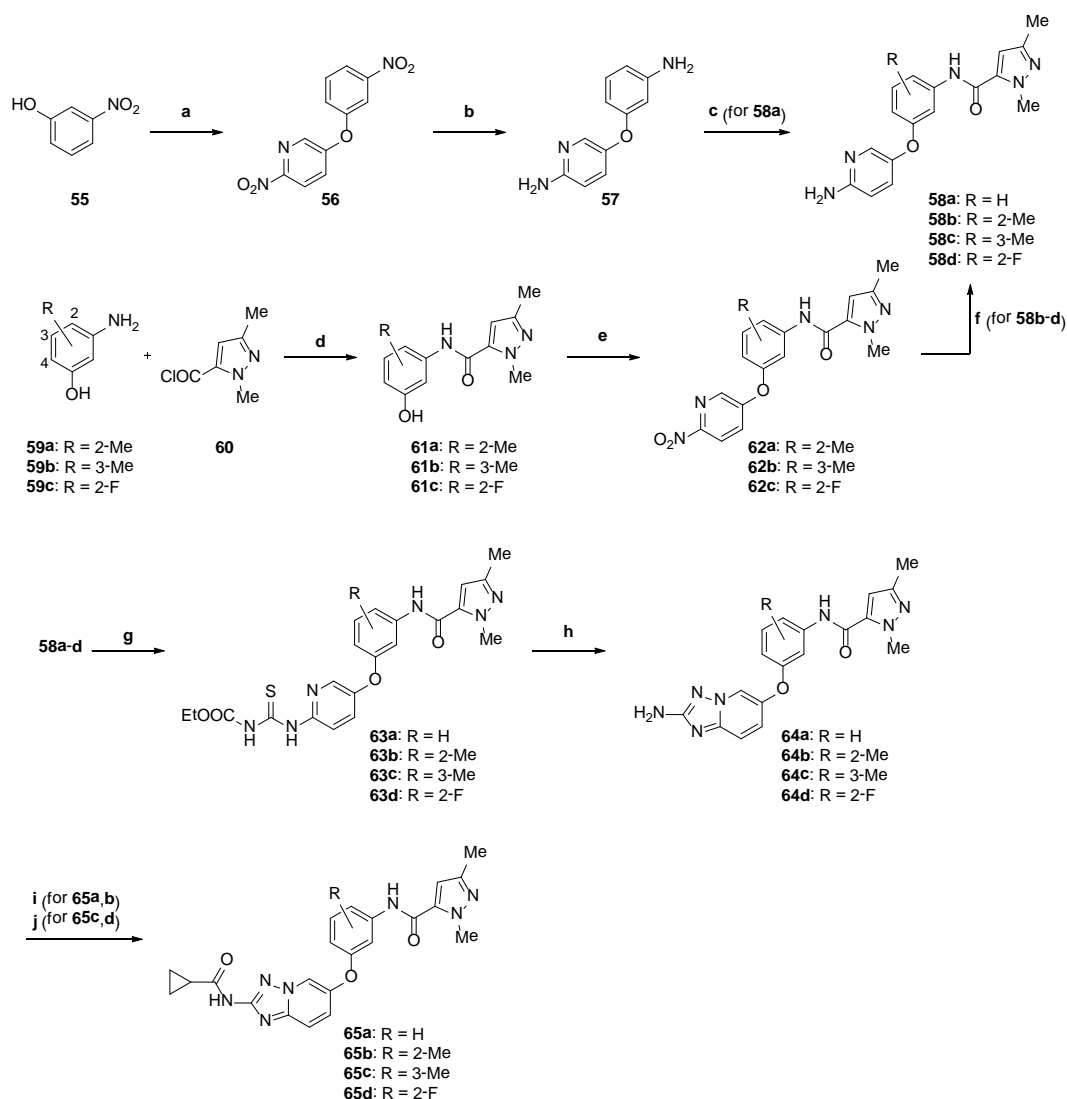


Figure 5-2 Inhibitor Design

本章のもう一つの目的は、本研究で見出された type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬の特徴を明らかにすることである。第 2 章において、**20d** が高いキナーゼ選択性を示し、安全面において type 1 VEGFR2 キナーゼ阻害薬より優れることを明らかとした。そこで本章では、type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬の薬効面における優れた特徴を明らかにすることを目的に、代表化合物の機能解析を行った。

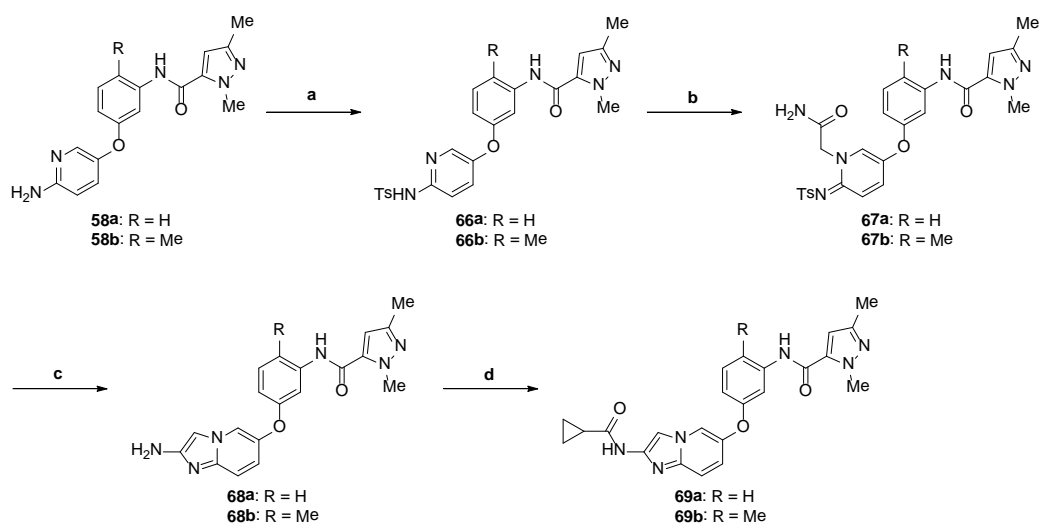
5.2 合成

[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン誘導体の合成法を Scheme 5-1 に示す。市販の 3-ニトロフェノール **55** を出発原料として、5-ブロモ-2-ニトロピリジンと求核置換反応を行うことでジニトロ体 **56** を合成後、接触還元によりジアミノ体 **57** へと導いた。次いで、**57** に対し酸クロリド **60** を作用させることにより、2つのアミノ基のうちアニリド基が選択的にアシル化された **58a** を得た。一方、ベンゼン環上にメチル基およびフルオロ基を有する場合、アシル化反応により両アミノ基がアシル化されてしまうため、本合成ルートは **58b-d** の合成に適用できなかった。そこで、アミノフェノール **59a-c** を酸クロリド **60** によりアシル化後、5-ブロモ-2-ニトロピリジンとのカップリング反応を行い **62a-c** へと導き、次いでニトロ基を接触還元することにより **58b-d** を合成した。アミノ体 **58a-d** は、エトキシカルボニルイソチオシアナートを作用させることにより、対応するチオウレア体 **63a-d** とした後、ジイソプロピルエチルアミン存在下、ヒドロキシアミン塩酸塩を作用させることにより [1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン体 **64a-d** へと変換した。Bochis らにより報告された文献によると、[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン環は、チオウレア体とヒドロキシアミンの反応によりオキサジアゾールを生成した後、*in situ* で転移反応が進行することにより構築されると考えられている。このようにして得られたアミノ体 **64a-d** のうち、**64a,b** に対しトリエチルアミン存在下、シクロプロパンカルボニルクロリドを作用させたところ、所望の **65a,b** に加え、アミノ基がジアシル化された化合物が副生した。ジアシル体はアルカリ加水分解によりモノアシル体 **65a,b** へ変換可能であった。ジアシル体が生成する要因は、トリエチルアミンを添加したことによるものと考えた。そこで、**64c,d** のアシル化において、トリエチルアミンを用いず DMA 中で反応を行ったところ、モノアシル体 **65c,d** が選択的に得られた。



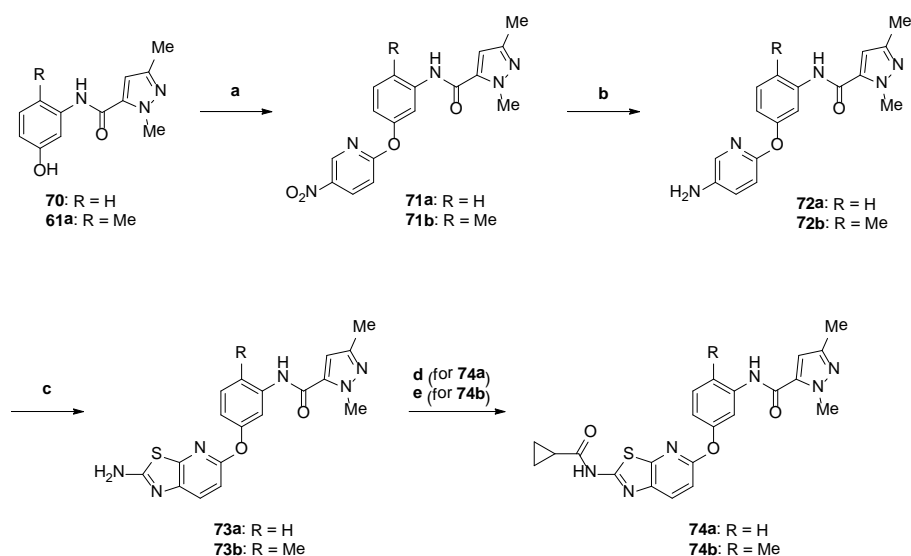
Scheme 5-1 Reagents: (a) 5-Bromo-2-nitropyridine, Cs_2CO_3 , DMF; (b) H_2 , Pd/C, MeOH; (c) **60**, pyridine, THF; (d) Et_3N , THF; (e) 5-bromo-2-nitropyridine, Cs_2CO_3 , DMF; (f) H_2 , Pd/C, MeOH; (g) EtOOCNCS , DMSO; (h) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, DIEA, MeOH, EtOH; (i) (1) cyclopropanecarbonyl chloride, Et_3N , THF, (2) Na_2CO_3 , MeOH, H_2O ; (j) cyclopropanecarbonyl chloride, DMA.

Scheme 5-2 に示す方法により、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **69a,b** を合成した。アミノ体 **58a,b** に *p*-トルエンスルホニルクロリドを作用させ **66a,b** へと変換した後、ヨードアセトアミドを用いピリジン部分をアルキル化した。こうして得られた **67a,b** に対し、トリフルオロ酢酸無水物を作用させることによりイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン環を構築後、2位トリフルオロアセチルアミノ基を加水分解しアミノ体 **68a,b** へと導いた²⁾。最後に、シクロプロパンカルボニルクロリドを用いたアミノ基のアシル化により **69a,b** を合成した。



Scheme 5-2 Reagents: (a) TsCl, pyridine; (b) iodoacetamide, DIEA, DMF; (c) (1) TFAA, CH₂Cl₂ (2) NaOH, H₂O, EtOH; (d) cyclopropanecarbonyl chloride, Et₃N, THF.

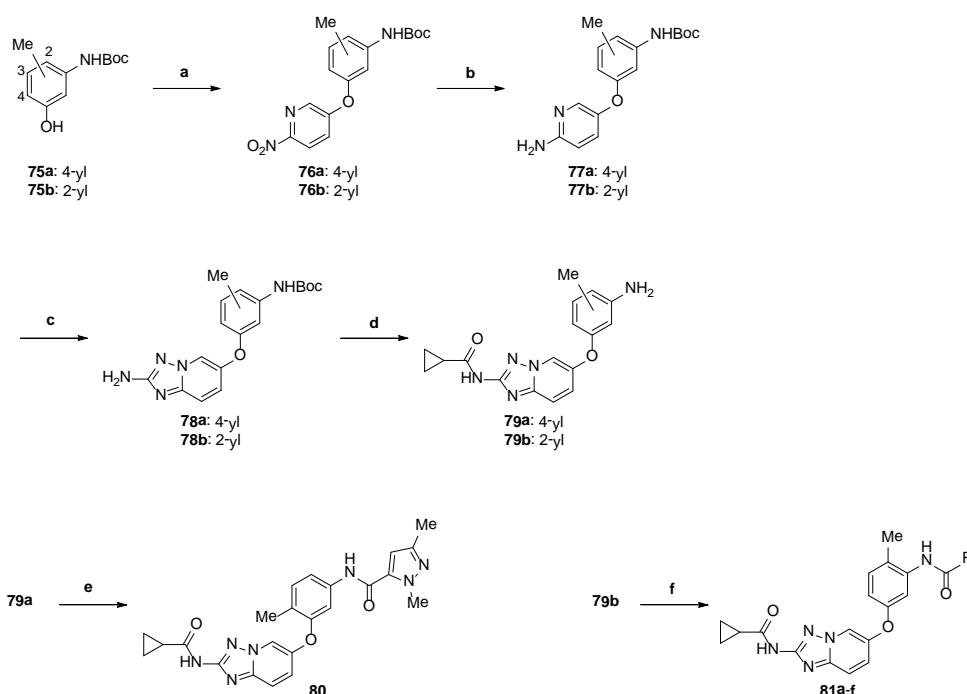
チアゾロ[5,4-*b*]ピリジン誘導体の合成法を Scheme 5-3 に示す。まず、フェノール体 **70** および **61a** と 2-クロロ-5-ニトロピリジンとのカップリング反応により **71a,b** を合成後、ニトロ基を接触還元反応に付すことによりアミノ体 **72a,b** へと導いた。次いで文献³⁾に従い、酢酸溶液中、**72a,b** に臭素およびイソチオシアン酸カリウムを作用させることによりチアゾロ[5,4-*b*]ピリジン環を構築した。化合物 **65a,b** の合成法と同様に、トリエチルアミン存在下 **73a** に酸クロリドを作用させると、モノアシル体 **74a** とジアシル体の混合物が得られた。そこで、混合物をアルカリ加水分解条件に付すことでモノアシル体 **74a** へ収束させた。一方、トリエチルアミンを用いず DMA 中で **73b** のアシル化を試みたところ、所望のモノアシル体 **74b** のみを得ることに成功した。



Scheme 5-3 Reagents: (a) 2-Chloro-5-nitropyridine, K₂CO₃, DMF; (b) H₂, Pd/C, MeOH;

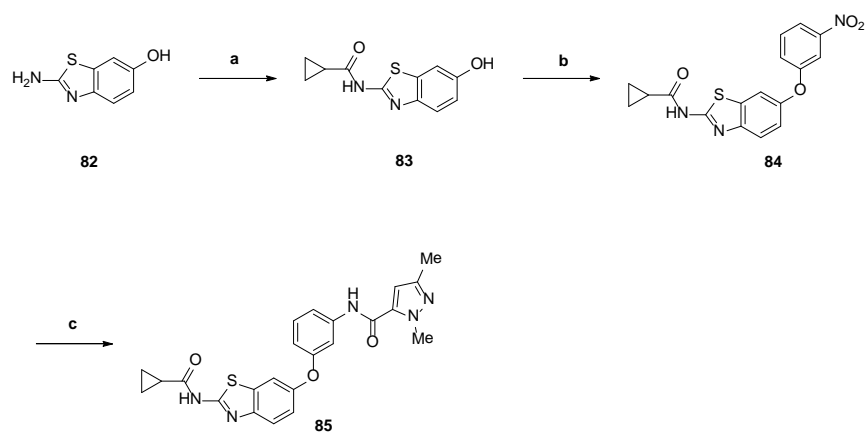
(c) Br₂, KNCS, AcOH; (d) (1) cyclopropanecarbonyl chloride, Et₃N, THF, (2) Na₂CO₃, MeOH, H₂O; (e) cyclopropanecarbonyl chloride, DMA.

中央ベンゼン環に置換基を有する[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン誘導体**80**および**81a-f**の合成は、Scheme 5-4に示す方法により実施した。化合物**77a,b**は、**58b-d**と同様に、**75a,b**と5-ブロモ-2-ニトロピリジンとのカップリング反応後、ニトロ基を接触還元することにより合成した。次いで、アミノ体**77a,b**に対し、Scheme 5-1と同様の条件を用いることにより2-アミノ[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン環を構築後、アミノ基のアシル化、Boc基の除去を順次行うことによりアミノ体**79a,b**とした。そして、**79a,b**を種々の酸クロリドを用いてアシル化することにより、**80**および**81a-f**へと導いた。



Scheme 5-4 Reagents: (a) 5-Bromo-2-nitropyridine, Cs₂CO₃, DMF; (b) H₂, Pd/C, MeOH; (c) EtOOCNCS, DMSO, (2) NH₂OH·HCl, DIEA, MeOH, EtOH; (d) (1) cyclopropanecarbonyl chloride, DMA, (2) TFA; (e) **60**, DMA; (f) R-COCl, DMA

1,3-ベンゾチアゾール誘導体**85**の合成法をScheme 5-5に示す。化合物**82**の2-アミノ基を選択的にアシル化することによりアミド体**83**を合成後、1-フルオロ-3-ニトロフェノールとの求核置換反応により**84**とした。化合物**84**のニトロ基をアミノ基へと変換するため接触還元を試みたところ、反応が途中で停止した。そこで、条件を鉄還元に変更することでアミノ体を得た後、酸クロリドを用いたアシル化により**85**へと導いた。



Scheme 5-5 Reagents: (a) Cyclopropanecarbonyl chloride, Et₃N, THF; (b) 1-fluoro-3-nitrobenzene, K₂CO₃, DMF; (c) (1) H₂, Pd/C, MeOH, (2) Fe, CaCl₂, EtOH, H₂O, (3) **60**, Et₃N, THF.

5.3 構造活性相関

化合物**50**のイミダゾ[1,2-*a*]ピリダジン骨格を種々の縮合環に変換した結果をTable 5-1に示す。当初のデザイン仮説通り、イミダゾ[1,2-*a*]ピリダジン1位に相当する位置に窒素原子を有する**65a**、**69a**、**74a**、および**85**は、いずれもnMオーダーの強力なVEGFR2阻害活性を示した。化合物**50**の5'位窒素を3'位に移動させた**65a**およびCHに変換した**69a**においてVEGFR2阻害活性が維持したことから、Figure 4-3から予想された通り、3'位および5'位の窒素はVEGFR2との相互作用に寄与しないことが判明した。さらに、**74a**および**85**が強いVEGFR2阻害活性を維持したことから、橋頭位の窒素および3'位の硫黄原子もVEGFR2阻害活性に影響を与えないことが判明した。化合物のHUVEC増殖阻害試験を行ったところ、**65a**、**69a**、**74a**、および**85**は、**50**と同様nMオーダーの強力な阻害活性を示した。以上の結果、[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン、チアゾロ[5,4-*b*]ピリジン、および1,3-ベンゾチアゾールは、VEGFR2キナーゼ阻害薬の優れたヒンジバインダーとして機能することが明らかになった。

Table 5-1

Effect of modifications to the hinge-binding core^a

| Compd | ring | R | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) | HUVEC ^b IC ₅₀ (nM) | Solubility JP2 ^c (μg/mL) | Cl _{og} P ^d |
|------------|------|------|------------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------|
| 50 | | H | 1.4 (1.3-1.5) | 1.7 (0.66-3.8) | 1.7 | 2.3 |
| 65a | | H | 1.1 (1.0-1.3) | 3.9 (2.0-7.5) | 1.2 | 2.4 |
| 65b | | 2-Me | 1.9 (1.6-2.2) | 1.3 (0.59-2.6) | 53 | 2.2 |
| 65c | | 3-Me | 2.1 (1.8-2.4) | 47 (17-136) | 3.2 | 2.9 |
| 80 | | 4-Me | 3.7 (3.3-4.3) | 67 (48-92) | 3.7 | 2.9 |
| 65d | | 2-F | 2.0 (1.8-2.3) | 5.0 (3.0-8.0) | 65 | 1.9 |
| 69a | | H | 1.1 (1.0-1.2) | 1.1 (0.34-2.6) | 0.73 | 3.3 |
| 69b | | 2-Me | 1.2 (1.1-1.3) | 0.80 (0.38-1.5) | 2.9 | 3.1 |
| 74a | | H | 1.3 (1.1-1.4) | 4.4 (1.9-9.9) | <0.04 | 3.3 |
| 74b | | 2-Me | 1.2 (1.0-1.4) | 3.6 (1.4-8.6) | 4.8 | 3.2 |
| 85 | | H | 3.6 (3.0-4.3) | 0.93 (0.12-3.7) | 0.22 | 4.2 |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

^b Inhibition of HUVEC proliferation.

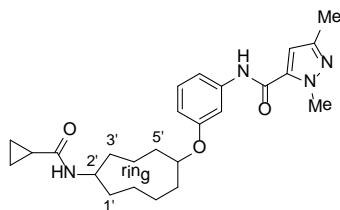
^c Kinetic solubility in the 2nd fluid of Disintegration Test of the Japanese Pharmacopoeia (pH 6.8).

^d ClogP(1-Octanol/water partition coefficients) value was calculated by Daylight Software. ClogP, version 4.95, Daylight Software, Daylight chemical information systems, Inc., Aliso Viejo, CA; <http://www.daylight.com>.

ヒンジバインダーの違いがキナーゼ選択性に与える影響について検討した(Table 5-2)。まず、VEGFR2と相同性が非常に高いVEGFR1およびPDGFRβに対する阻害活性を評価したところ、いずれの化合物もIC₅₀ < 100 nMの強力な阻害活性を示した。ところで、type 2キナーゼ阻害薬は、本来標的とするキナーゼに加え、type 2キナーゼ阻害薬の存在が知られている他のキナーゼも阻害する場合がある。例えば、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体20dは、VEGFR2に加えTie-2を強力に阻害し、当初B-raf阻害薬として開発されたsorafenibは、VEGFR2も強力に阻害する⁴⁾。一方、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体20dとイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体30b間でTie-2阻害活性が大きく異なっていたことから、ヒンジバインダーの違いによりキナーゼ選択性が異なる可能性が考えられた。そこで、50、65a、69a、74a、および85について、type 2キナーゼ阻害薬の存在が報告されているc-kit⁵⁾、Aurora A⁶⁾、B-raf⁷⁾、Tie-2⁸⁾、およびp38MAPキナーゼ⁹⁾に対する阻害活性を評価した。その結果、いずれの化合物もTie-2とp38MAPキナーゼに対する阻害活性が認められなかったのに対し、c-kit、Aurora A、およびB-rafに対する阻害活性は各化合物により異なることが判明した。ヒンジバインダーの構造とc-kit阻害活性との関連を調べたところ、50の3'位に相当する位置がCHであるヒンジバインダーを有する50,69aがIC₅₀ ≒ 20 nMの強力な阻害活性を示したが、対応する位置がヘテロ原子である65a、74a、および85はIC₅₀ > 100 nMであった。従って、アミノ酸との相互作用に3位CHが関与することが示唆された。また、B-raf阻害活性に関しては、65aのみに活性が認められたことから、B-rafとの相互作用に3位窒素が重要であることが判明した。一方、AuroraA阻害活性については、チアゾロ[5,4-*b*]ピリジン誘導体74aを除いて、いずれの化合物も中程度の阻害活性(100 nM < IC₅₀ < 1000 nM)を示した。以上の結果、ヒンジバインダーの変換によりキナーゼ選択性の調節が可能であると示唆された。

Table 5-2

Kinase selectivity



| Compd | ring | IC ₅₀ (nM) ^a | | | | | | | |
|-------|------|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------|-------------------|------------------|-------|
| | | VEGFR1 | VEGFR2 | PDGFRβ | c-kit | Tie-2 | Aurora A | B-raf | p38α |
| 50 | | 7.4 (6.4-8.4) | 1.4 (1.3-1.5) | 5.5 (3.8-7.9) | 23 (19-27) | >1000 | 360 (240-530) | >1000 | >1000 |
| 65a | | 33 (25-43) | 1.1 (1.0-1.3) | 19 (14-25) | 130 (110-170) | >1000 | 120 (44-330) | 290 (42-2000) | >1000 |
| 69a | | 6.4 (5.4-7.7) | 1.1 (1.0-1.2) | 5.9 (4.6-7.8) | 21 (16-26) | >1000 | 170 (110-260) | >1000 | >1000 |
| 74a | | 56 (36-87) | 1.3 (1.1-1.4) | 8.3 (4.6-15) | 170 (110-260) | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| 85 | | 69 (62-77) | 3.6 (3.0-4.3) | 21 (14-33) | 240 (190-290) | >1000 | 680 (150-3200) | >1000 | >1000 |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

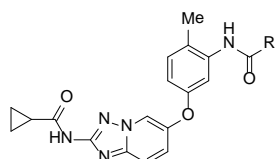
合成した化合物の日本薬局方第2液(JP2)における溶解度を評価したところ、ヒンジバインダーを変換することにより溶解度が変化することが判明した(Table 5-1)。[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン誘導体**65a**は、**50**と溶解度が同等であり、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体**69a**はわずかながら溶解度が低下した。対して、硫黄原子を有するチアゾロ[5,4-*b*]ピリジン誘導体**74a**および1,3-ベンゾチアゾール誘導体**85**は有意に溶解度が低下した。化合物**74a**と**85**で溶解度が低下した要因の一つは脂溶性向上によるものと考えられる¹⁰⁾。実際、脂溶性のパラメータであるClogPは**50**と比較し高値であった。もう一つの要因として、硫黄原子と2位アミド基の酸素とのS-O相互作用が考えられた¹¹⁾。すなわち、S-O相互作用によりアミド基と縮合環が同一平面に存在するコンフォメーションが安定化されると、平面構造の分子が効果的に積み重なることが可能となる。従って、**74a**および**85**は、結晶パッキングが非常に密になるが故に溶解度が低いと考えられる。一方、第4章で得られた知見と同様に、中央ベンゼン環2位にメチル基を導入した**65b**、**69b**、および**74b**は、無置換体と比較しいずれも溶解度が向上した。最近、石川らの報告¹²⁾において、置換基導入により分子の平面性を崩すと、結晶パッキングが低下し、溶解度が向上する例が紹介された。溶解度改善効果が大きかった**65b**の融点(217-220 °C)は、対応する無置換体**65a**の融点(244-245 °C)と比較し有意に低かった。従って、2-メチル基の導入により、分子の平面性が損なわれている可能性が

高いと考えられる。

化合物**65b**において顕著な溶解度向上が認められたため、さらに中央ベンゼン環の置換基探索を行った(Table 5-1)。まず、**65b**の2位メチル基を3位および4位に移動させた**65c**、**80**を評価したところ、いずれもVEGFR2阻害活性が維持した。一方、HUVEC増殖阻害試験の結果、**65b**が $IC_{50} = 1.3 \text{ nM}$ の強力なHUVEC増殖阻害活性を示すのに対し、**65c**および**80**はVEGFR2阻害活性が**65b**と同等であるにも関わらず、10倍以上HUVEC増殖阻害活性が減弱した。そこで、置換位置は2位が最適と判断し、フルオロ体**65d**を合成したところ、強力なVEGFR2阻害活性およびHUVEC増殖阻害活性を示した。溶解度測定の結果、**65d**はJP2に対し $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上の溶解性を示した。メチル基よりサイズが小さいフッ素は、分子の平面性を崩す効果は小さいと考えられる。従って、溶解度改善の要因は、脂溶性低下($ClogP = 2.4$ (**65a**) \rightarrow 1.9 (**65d**))によるものと考えられる。

次に、ジメチルピラゾール部位の変換による影響を調べた (Table 5-3)。第4章で得られた結果と同様に、アシル基として芳香環を有する化合物**81a-d**のみならず、不飽和アルキル体**81e,f**においても強力なVEGFR2阻害活性を維持した。対して、HUVEC増殖阻害活性と溶解度は、アシル基の影響を大きく受けた。まず、HUVEC増殖阻害活性に関しては、芳香族アシル基を有する**81a-d**の方が、非芳香族アシル基を有する**81e,f**よりも強力であった。化合物**81a**と**81e**は、 $ClogP$ が同等であるにもかかわらずHUVEC増殖阻害活性が異なることから、脂溶性はHUVEC増殖阻害活性に影響しないと考えられた。従って、アシル基の平面性あるいは π 共役系が、HUVEC増殖阻害活性増強に寄与していることが示唆された。一方、化合物の溶解度は、脂溶性により左右されることが判明した。すなわち、**65b**と比較し $ClogP$ が高い**81a,b**は大幅に溶解度が低下し、**65b**より $ClogP$ が低い**81c,d**は溶解度が向上した。化合物**81e,f**が高脂溶性にも関わらず溶解度が高かったのは、アシル基が芳香族と比較しrigidでないことが要因と考えられる。

Table 5-3

Modification of the acyl group^a

| Compd | R | VEGFR ₂ IC ₅₀ (nM) | HUVEC ^b IC ₅₀ (nM) | Solubility JP2 ^c (μg/mL) | ClogP ^d |
|------------|---|--|--|--|--------------------|
| 65b | | 1.9 (1.6-2.2) | 1.3 (0.59-2.6) | 53 | 2.2 |
| 81a | | 1.5 (1.3-1.7) | 4.3 (1.5-12) | 0.16 | 3.5 |
| 81b | | 0.48 (0.43-0.55) | 1.6 (0.9-26) | 1.2 | 3.7 |
| 81c | | 1.9 (1.7-2.2) | 3.8 (1.5-9.3) | >93 | 1.9 |
| 81d | | 1.6 (1.4-1.7) | 9.9 (4.3-23) | >80 | 1.9 |
| 81e | | 2.0 (1.7-2.2) | 56 (33-96) | 12 | 3.4 |
| 81f | | 3.0 (2.6-3.5) | 88 (59-133) | >78 | 2.8 |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

^b Inhibition of HUVEC proliferation.

^c Kinetic solubility in the 2nd fluid of Disintegration Test of the Japanese Pharmacopoeia (pH 6.8).

^d ClogP value was calculated by Daylight Software. ClogP, version 4.95, Daylight Software, Daylight chemical information systems, Inc., Aliso Viejo, CA; <http://www.daylight.com>.

強力な *in vitro* 活性とともに高い溶解度を示した **65d,81c** について、マウスの経口吸収性を評価した (Table 5-4)。当初の期待通り、**50** に対し溶解度が向上した **65d** および **81c** は、最大血中濃度(C_{\max})、 AUC_{0-8h} がともに **50** と比較し高値であった。一方、**81c** は、**65d** と C_{\max} は同等であったが AUC_{0-8h} は 1/3 未満であった。化合物 **81c** は、投与 8 時間後の血漿中濃度(C_{8h})が非常に低かった(0.011 $\mu\text{g/mL}$)ことから、吸収されても速やかに代謝あるいは排泄されることが示唆された。マウス肝ミクロソームにおける代謝安定性を評価したところ、**81c** は **65d** より速やかに代謝されたことから、代謝に不安定な化合物であることが判明した。対して、化合物 **65d** は良好なマウス代謝安定性を反映し C_{8h} が高く、またヒト肝ミクロソームにおいても安定であった。従って、**65d** のマウスで認められた良好な経口吸収性は、ヒトにおいても再現できると考えられた。

Table 5-4
Pharmacokinetic properties

| Compd | Mouse PK ^a | | | Metabolic stability ^d | | Solubility JP2 ^e ($\mu\text{g/mL}$) |
|------------|------------------------------------|--|--|---|---|---|
| | C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$) | AUC_{0-8h} ^b ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) | C_{8h} ($\mu\text{g/mL}$) ^c | Human ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$) | Mouse ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$) | |
| 50 | 0.15 | 0.730 | 0.053 | 6.0 | 43 | 1.7 |
| 65d | 3.11 | 7.39 | 0.247 | 10 | 45 | 65 |
| 81c | 3.21 | 2.31 | 0.011 | 6.0 | 78 | >93 |

^a Compounds were administered at an oral dose of 10 mg/kg as a cassette dosing.

^b Area under the plasma concentration–time curve.

^c Plasma concentration at 8 h after administration.

^d Metabolic stability in hepatic microsomes.

^e Kinetic solubility in the 2nd fluid of Disintegration Test of the Japanese Pharmacopoeia (pH 6.8).

5.4 化合物 **65d** の生物評価

化合物 **65d** のキナーゼ選択性を評価した (Table 5-5)。化合物 **65d** は、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体 **20d** およびイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン誘導体 **30b** と同様に、VEGFR1、PDGFR α 、PDGFR β を強力に阻害した。一方、**65a** は c-kit、B-raf、Aurora に対して IC₅₀ < 300 nM の阻害活性を示したが (Table 5-2)、フルオロ基を導入した **65b** は、c-kit に対する阻害活性は維持する (IC₅₀ = 150 nM)ものの、B-raf、Aurora に対する阻害活性は大幅に減弱 (B-raf IC₅₀ > 10000 nM、AuroraA IC₅₀ = 2900nM)した。また、測定したその他 12 キナーゼについても IC₅₀ > 1000 nM であり、**65d** はキナーゼ選択性が高い化合物であることが判明した。

Table 5-5

Kinase selectivity of **65d**^a

| kinase | IC ₅₀ (nM) | kinase | IC ₅₀ (nM) |
|----------------|-----------------------|--------------|-----------------------|
| VEGFR2 | 2.0 (1.8-2.3) | IGF1-R | >10000 |
| VEGFR1 | 3.6 (3.3-3.8) | c-kit | 150 (120-200) |
| PDGFR α | 12 (10-14) | Src | >10000 |
| PDGFR β | 14 (11-17) | FAK | >10000 |
| FGFR1 | 2700 (1900-3900) | B-raf | >10000 |
| Tie-2 | >10000 | ERK1 | >10000 |
| HER2 | >10000 | PKC θ | >10000 |
| EGFR | >10000 | GSK3 β | >10000 |
| IR | >10000 | Aurora A | 2900 (1800-4500) |
| p38 α | >10000 | | |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

化合物 **65d** が強力な *in vitro* 活性に加え良好な経口吸収性を示したことから、マウスを用いた抗腫瘍試験を行った (Table 5-6)。ヒト前立腺がん細胞 DU145 およびヒト肺がん細胞 A549 を皮下移植したマウスに、**65d** を 1 日 2 回経口投与した。そして、投与 14 日後に腫瘍体積を測定し、vehicle 群と化合物投与群の腫瘍体積増加比 (T/C) を算出した。その結果、**65d** は 0.5 mg/kg (日量 1 mg/kg) 投与群において腫瘍体積を vehicle 群の 6 割程度に抑制した。また、用量依存的に腫瘍体積の増加を抑制し、5 mg/kg (日量 10 mg/kg) 投与群は、腫瘍体積の増加が vehicle 群の 3 割未満であった。種の異なる 2 つのがんに対して同等の増殖阻害効果が認められたことから、当初の期待通り、血管新生阻害剤が様々ながんにも有効であることが示唆された。また、いずれの投与量においても顕著な有害事象は認められなかったことから、**65d** は安全性の高い抗がん剤となり得ると考えられた。

Table 5-6

Antitumor efficacy of **65d** in nude mice bearing human tumor xenografts

| Tumor model | Dose (mg/kg) ^a | T/C (%) ^b |
|------------------|---------------------------|----------------------|
| DU145 (prostate) | 0.5 | 60 |
| | 1.5 | 37 |
| | 5.0 | 27 |
| A549 (NSCLC) | 0.5 | 57 |
| | 1.5 | 34 |
| | 5.0 | 14 |

^a Compound was dosed twice daily for 14 days.

^b Treatment per control (T/C %), an index of antitumor efficacy, was calculated by comparison of the mean change in tumor volume over the treatment period for the control and treated groups.

Type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬が薬効面に与える特性を評価する目的で、化合物のATP拮抗性および結合速度を評価した(Table 5-7)。通常、VEGFR2キナーゼ阻害試験は、化合物とVEGFR2を5分間インキュベーションした後、ATP(10 μ M)添加によりキナーゼ反応を開始させ、一定時間後に基質リン酸化量を測定する。一方、本実験は、化合物とVEGFR2のプレインキュベーション時間を5分および60分に、ATP濃度を1 mMに設定した。まず、VEGFR2とのプレインキュベーション時間を通常試験と同様5分に設定し、ATP濃度を1 mMに変更した際のVEGFR2阻害活性を測定した。その結果、**65d**および**81f**のIC₅₀値はTable 5-1および5-3で示したATP濃度10 μ MにおけるIC₅₀値(IC₅₀ = 2.0 nM (**65d**), 3.0 nM (**81f**))と同等であった。従って、**65d**および**81f**はATP結合ポケットを占有するにもかかわらず、ATP拮抗性を示さないことが判明した。一方、ATP濃度を1 mMに設定し、化合物とVEGFR2とのプレインキュベーション時間を60分に変更した際、VEGFR2阻害活性が大幅に変化する興味深い知見が得られた。すなわち、**81f**はプレインキュベーション時間によってIC₅₀値が変化しないのに対し、**65d**は60分プレインキュベーションすることにより約8倍VEGFR2阻害活性が増強した(IC₅₀ = 2.2 nM \rightarrow 0.26 nM)。このことから、**65d**は5分間のプレインキュベーションではVEGFR2との結合が平衡に達しない程、極めて結合速度が遅い化合物であることが判明した。また、**65d**は**81f**と比較しHUVEC増殖阻害活性が非常に強力であることから、60分間プレインキュベーションした際のVEGFR2阻害活性がHUVEC増殖阻害活性を反映することが示唆された。

Table 5-7

Preincubation time-dependent inhibition^a

| Cmpd | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) Pre-incubation ^b | | HUVEC ^c IC ₅₀ (nM) |
|------------|---|------------------|--|
| | 5 min | 60 min | |
| 65d | 2.2 (2.0-2.5) | 0.26 (0.25-0.28) | 5.0 (3.0-8.0) |
| 81f | 3.9 (3.4-4.4) | 3.1 (2.4-4.0) | 88 (59-133) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

^b The assay was performed with preincubation of the compounds and VEGFR2 before addition of 1 mM of ATP.

^c Inhibition of HUVEC proliferation.

興味深い阻害様式を示した**65d**の解離速度を評価する目的で、dilution assayを行った (Figure 5-3)。本実験は、IC₅₀の10倍濃度の化合物とVEGFR2をプレインキュベーションし十分に複合体を形成させた後、IC₅₀の1/10濃度に希釈し、ATPおよび基質を加えキナーゼ反応を行った際の基質リン酸化量を測定するものである。通常IC₅₀の1/10濃度では、理論上ほぼ全ての化合物がVEGFR2から解離する。従って、この条件ではキナーゼを阻害できなくなり、controlのように時間の経過とともに基質がリン酸化される。一方、**65d**はリン酸化の進行が極めて遅く、キナーゼ反応開始から90分(5400秒)後においてもリン酸化量はcontrolの半分以下であった。この現象から、化合物が希釈によってもVEGFR2から結合したまま、すなわち解離速度が極めて遅いことが判明した。解離速度が遅い化合物の利点として、化合物が一度標的に到達すれば持続的に結合できるため強力な薬効が期待できること、高い血中濃度を維持する必要がないためオフターゲットに作用するリスクが低下すること、が挙げられる¹³⁾。従って、**65d**が有する解離速度が遅い性質は、薬効増強と安全性の向上に寄与すると考えられる。

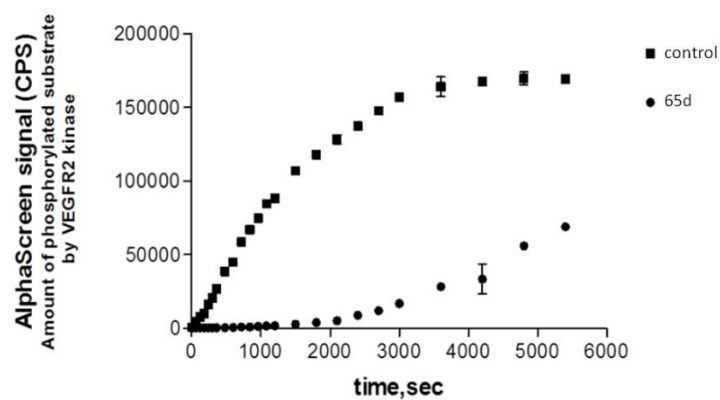


Figure 5-3 Dilution assay of VEGFR2–65d complex. Phosphorylation of peptide substrate as a function of time is shown. The reaction was initiated by diluting a preformed enzyme–inhibitor complex to one tenth of IC_{50} with reaction buffer containing 1 mM ATP and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biotinylated poly-Glu-Tyr (4:1). The recovery of activity was measured using the AlphaScreen® system.

5.5 まとめ

本章では、新規ヒンジバインダーの探索と良好な物性を示す化合物の創出を目的に合成を行った。化合物**50**のイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンを[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン、イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン、チアゾロ[5,4-*b*]ピリジン、および1,3-ベンゾチアゾールに変換することにより、新規ヒンジバインダーを有するtype 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬を創出した。そして、溶解度改善を目的とした最適化の結果、強力な*in vitro*活性に加え、優れた経口吸収性を示す**65d**を見出すことに成功した。化合物**65d**は、マウスを用いた抗腫瘍試験の結果、異なる2種のがん移植モデルに対して強力な薬効を示し、顕著な有害事象も認められなかった。

また、本章ではtype 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬の特性を評価した。薬効面における特性を明らかにする目的で、プレインキュベーション時間依存性試験およびdilution assayを行い、**65d**が結合速度、解離速度ともに極めて遅いことを示した。一方、安全面における特性を明らかにする目的でキナーゼ選択性試験を実施し、**65d**が血管新生に関わるVEGFR、PDGFRのみを強力に阻害する選択性の高い化合物であることを明らかにした。

以上の結果、type 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬である**65d**は、薬効面・安全面ともに優れた化合物であることが判明した。従って、**65d**は既存の抗がん剤が有する課題を解決した抗がん剤となり得ると期待される。

実験の部

2-Nitro-5-(3-nitrophenoxy)pyridine (56)

3-ニトロフェノール(7.76 g, 55.8 mmol)、5-ブromo-2-ニトロピリジン(10.3 g, 50.7 mmol)、炭酸セシウム(24.8 g, 76.1 mmol)、DMF (150 mL)の混合物を 50 °C で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(NHシリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)で精製し、表題化合物 (4.37 g, 33%) を黄色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7.73–7.85 (3H, m), 8.10 (1H, t, $J=2.1$ Hz), 8.15–8.19 (1H, m), 8.38 (1H, dd, $J=9.0, 0.6$ Hz), 8.52–8.54 (1H, m).

5-(3-Aminophenoxy)pyridin-2-amine (57)

化合物 **56** (1.33 g, 5.07 mmol)のメタノール(10 mL)溶液にパラジウム炭素 (50%含水品、100 mg)を加え、混合物を水素雰囲気下室温で 12 時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮後、乾燥し、表題化合物 (980 mg, 96%)を黄色油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.15 (2H, brs), 5.82 (2H, brs), 6.00–6.04 (2H, m), 6.18–6.22 (1H, m), 6.47 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 6.90 (1H, t, $J=7.7$ Hz), 7.14 (1H, dd, $J=8.9, 3.0$ Hz), 7.69 (1H, d, $J=3.0$ Hz).

N-{3-[(6-Aminopyridin-3-yl)oxy]phenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide(58a)

化合物 **57** (975 mg, 4.85 mmol)、ピリジン (410 μL , 5.09 mmol)の THF(10 mL)溶液に氷冷攪拌下、1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボニル クロリド(807 mg, 5.09 mmol)の THF(10 mL)溶液を滴下し、混合物を室温で 2 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物 (964 mg, 61%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.18 (3H, s), 3.96 (3H, s), 5.91 (2H, brs), 6.50 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 6.65–6.68 (1H, m), 6.78 (1H, s), 7.11 (1H, dd, $J=8.9, 3.0$ Hz), 7.24–7.30 (2H, m), 7.43–7.47 (1H, m), 7.75 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 10.10 (1H, brs).

N-{5-[(6-Aminopyridin-3-yl)oxy]-2-methylphenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (58b)

化合物 **62a** (3.38 g, 9.20 mmol)のメタノール (20 mL)溶液にパラジウム炭素 (50%含

水品、300 mg)を加え、混合物を水素雰囲気下室温で4時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮後、残留物をろ取、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(2.94 g, 95%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.15 (3H, s), 2.18 (3H, s), 3.97 (3H, s), 5.88 (2H, brs), 6.49 (1H, dd, $J=9.0, 0.6$ Hz), 6.73–6.78 (2H, m), 6.88 (1H, d, $J=2.4$ Hz), 7.17–7.22 (2H, m), 7.73–7.75 (1H, m), 9.71 (1H, brs).

N{3-[(6-Aminopyridin-3-yl)oxy]-5-methylphenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (58c)

化合物 **58b** の合成と同様の方法により、表題化合物(88%)を淡黄色湯油状物として得た。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.28 (3H, s), 2.31 (3H, s), 4.12 (3H, s), 4.40 (2H, s), 6.40 (1H, s), 6.50–6.57 (2H, m), 6.92 (1H, t, $J=2.0$ Hz), 7.17 (1H, s), 7.21 (1H, dd, $J=8.6, 2.6$ Hz), 7.65 (1H, s), 7.89–7.92 (1H, m).

N{5-[(6-Aminopyridin-3-yl)oxy]-2-fluorophenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (58d)

化合物 **58b** の合成と同様の方法により、表題化合物(88%)を淡黄色湯油状物として得た。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.18 (3H, s), 3.96 (3H, s), 5.90 (2H, s), 6.50 (1H, d, $J=9.0$ Hz), 6.76–6.85 (2H, m), 7.10 (1H, dd, $J=6.2, 3.2$ Hz), 7.16–7.28 (2H, m), 7.76 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 9.97 (1H, s).

N(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (61a)

3-アミノ-4-メチルフェノール (3.71 g, 30.1 mmol)、トリエチルアミン(4.38 mL, 31.6 mmol)の THF(30 mL)溶液に氷冷攪拌下、**8** (5.02 g, 31.6 mmol)のテトラヒドロフラン (10 mL)溶液を滴下し、混合物を室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をろ取後、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(4.67 g, 63%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.09 (3H, s), 2.19 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.57 (1H, dd, $J=8.5, 2.4$ Hz), 6.76–6.79 (2H, m), 7.02 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 9.26 (1H, brs), 9.59 (1H, s).

N(3-Hydroxy-5-methylphenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (61b)

化合物 **61a** の合成と同様の方法により、表題化合物(96%)を淡黄色湯油状物として得た。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.29 (3H, s), 2.30 (3H, s), 4.13 (3H, s), 5.58 (1H, s), 6.39 (1H, s), 6.49 (1H, s), 6.80 (1H, s), 7.13 (1H, t, $J=2.0$ Hz), 7.55 (1H, s).

***N*-(2-Fluoro-5-hydroxyphenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (61c)**

化合物 **61a** の合成と同様の方法により、表題化合物(96%)を白色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.19 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.58–6.64 (1H, m), 6.83 (1H, s), 6.97–7.09 (2H, m), 9.87 (1H, s), 1H not detected.

1,3-Dimethyl-*N*-(2-methyl-5-[(6-nitropyridin-3-yl)oxy]phenyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (62a)

化合物 **61a** (4.67 g, 19.0 mmol)、5-ブromo-2-ニトロピリジン(3.68 g, 18.1 mmol)、炭酸セシウム(9.29 g, 28.5 mmol)、DMF (20 mL)の混合物を室温で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)、続いてカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)で精製し、表題化合物 (3.38 g, 44%)を白色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.20 (3H, s), 2.27 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.82 (1H, s), 7.09 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz), 7.31 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 7.41 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz), 8.36 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.42 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 9.82 (1H, s).

1,3-Dimethyl-*N*-(3-methyl-5-[(6-nitropyridin-3-yl)oxy]phenyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (62b)

化合物 **62a** の合成と同様の方法により、表題化合物(54%)を淡黄色油状物として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.29 (3H, s), 2.39 (3H, s), 4.12 (3H, s), 6.73 (1H, s), 7.19 (1H, s), 7.43 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.46 (1H, dd, *J* = 8.8, 3.0 Hz), 7.74 (1H, s), 8.01 (1H, s), 8.25 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.34 (1H, d, *J* = 3.0 Hz).

***N*-(2-Fluoro-5-[(6-nitropyridin-3-yl)oxy]phenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (62c)**

化合物 **62a** の合成と同様の方法により、表題化合物(59%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.20 (3H, s), 3.99 (3H, s), 6.87 (1H, s), 7.16–7.22 (1H, m), 7.46 (1H, dd, *J* = 10.5, 8.9 Hz), 7.59 (1H, dd, *J* = 6.3, 3.0 Hz), 7.66 (1H, dd, *J* = 9.5, 2.9 Hz), 8.36 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 8.44 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 1H not detected.

***N*-(3-[(2-Amino[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl)oxy]phenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (64a)**

化合物 **58a** (184 mg, 0.569 mmol)の DMSO (4 mL)溶液に、イソチオシアナトギ酸エチル(89.6 mg, 0.682 mmol)を加え、混合物を 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、

酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、乾燥し、化合物 63a (268 mg, 99%)を無色油状物として得た。こうして得られた化合物 63a (238 mg, 0.524 mmol)、塩化ヒドロキシルアンモニウム (364 mg, 5.24 mmol)、DIEA(548 μ L, 3.14 mmol)、エタノール (3 mL)、メタノール (3 mL)の混合物を 60 °C で5時間、80 °C で2時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物 (131 mg, 69%)を白色固体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.18 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.03 (2H, s), 6.78–6.82 (2H, m), 7.30–7.43 (4H, m), 7.52–7.57 (1H, m), 8.65 (1H, d, J = 2.4 Hz), 10.13 (1H, s).

N{5-[(2-Amino[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl)oxy]-2-methylphenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (64b)

化合物 64a の合成と同様の方法により、表題化合物(75%)を白色個体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.18 (6H, s), 3.96 (3H, s), 5.99 (2H, s), 6.77 (1H, s), 6.87 (1H, dd, J = 8.6, 2.6 Hz), 7.02 (1H, d, J = 2.6 Hz), 7.23–7.29 (2H, m), 7.38 (1H, d, J = 9.3 Hz), 8.55 (1H, d, J = 1.8 Hz), 9.73 (1H, s).

N{3-[(2-Amino[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl)oxy]-5-methylphenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (64c)

化合物 64a の合成と同様の方法により、表題化合物(63%)を白色個体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.17 (3H, s), 2.28 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.01 (2H, s), 6.63 (1H, s), 6.77 (1H, s), 7.17 (1H, t, J = 1.9 Hz), 7.25–7.34 (1H, m), 7.36–7.45 (2H, m), 8.61 (1H, d, J = 1.9 Hz), 10.03 (1H, s).

N{5-[(2-Amino[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl)oxy]-2-fluorophenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (64d)

化合物 64a の合成と同様の方法により、表題化合物(69%)を白色個体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.18 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.02 (2H, s), 6.82 (1H, s), 6.92–6.98 (1H, m), 7.23–7.33 (3H, m), 7.40 (1H, dd, J = 9.3, 0.6 Hz), 8.61 (1H, dd, J = 2.1, 0.6 Hz), 10.01 (1H, s).

N[3-((2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl)oxy)phenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (65a)

化合物 64a (117 mg, 0.322 mmol)、トリエチルアミン (134 μ L, 0.966 mmol)の THF(5

mL)溶液に氷冷攪拌下、シクロプロパンカルボニルクロリド(38.0 μ L, 0.419 mmol)を加え、混合物を室温で12時間攪拌後、さらにシクロプロパンカルボニルクロリド(29.3 μ L, 0.322 mmol)を加え3時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物に炭酸ナトリウム(100 mg)、メタノール(2 mL)、水(100 μ L)を加え、混合物を50 $^{\circ}$ Cで30分間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル)で精製後、酢酸エチルより再結晶化し、表題化合物(112 mg, 60%)を白色固体として得た。

Mp 244–245 $^{\circ}$ C. 1 H NMR (DMSO- d_6) δ 0.80–0.85 (4H, m), 2.00–2.01 (1H, m), 2.17 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.77–6.85 (2H, m), 7.35 (1H, t, J = 8.3 Hz), 7.40 (1H, t, J = 2.1 Hz), 7.51–7.58 (2H, m), 7.74 (1H, d, J = 9.3 Hz), 8.94 (1H, d, J = 2.4 Hz), 10.14 (1H, s), 11.05 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{22}H_{21}N_7O_3 \cdot 0.25AcOEt$: C, 60.92; H, 5.11; N, 21.62. Found: C, 61.10; H, 5.21; N, 21.38.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (65b)**

化合物 **65a** の合成と同様の方法により、表題化合物(60%)を白色個体として得た。

Mp 217–220 $^{\circ}$ C. 1 H NMR (DMSO- d_6) δ 0.81–0.83 (4H, m), 1.98–2.10 (1H, m), 2.18 (3H, s), 2.19 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.78 (1H, s), 6.92 (1H, dd, J = 8.4, 2.6 Hz), 7.07 (1H, d, J = 2.6 Hz), 7.27 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.49 (1H, dd, J = 9.5, 2.3 Hz), 7.71 (1H, d, J = 9.5 Hz), 8.53 (1H, d, J = 2.3 Hz), 9.76 (1H, s), 11.04 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{23}H_{23}N_7O_3 \cdot 0.25EtOAc$: C, 61.66; H, 5.39; N, 20.97. Found: C, 61.28; H, 5.36; N, 20.95.

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-5-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (65c)**

化合物 **39f** の合成と同様の方法により、表題化合物(53%)を白色個体として得た。

Mp 233 $^{\circ}$ C. 1 H NMR (DMSO- d_6) δ 0.77–0.87 (4H, m), 1.96–2.10 (1H, m), 2.17 (3H, s), 2.29 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.67 (1H, s), 6.78 (1H, s), 7.21 (1H, t, J = 1.9 Hz), 7.43 (1H, s), 7.52 (1H, dd, J = 9.6, 2.3 Hz), 7.74 (1H, d, J = 9.6 Hz), 8.91 (1H, d, J = 2.3 Hz), 10.05 (1H, s), 11.04 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{23}H_{23}N_7O_3$: C, 62.01; H, 5.20; N, 22.01. Found: C, 62.00; H, 5.22; N, 22.10.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-2-fluorophenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (65d)**

化合物 **39f** の合成と同様の方法により、表題化合物(71%)を白色個体として得た。

Mp 209 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.81–0.84 (4H, m), 1.99–2.08 (1H, m), 2.18 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.81 (1H, s), 6.98–7.03 (1H, m), 7.29–7.35 (2H, m), 7.52 (1H, dd, *J* = 9.6, 2.4 Hz), 7.73 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 8.87 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 10.02 (1H, s), 11.02 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀N₇O₃: C, 58.79; H, 4.49; N, 21.82. Found: C, 58.61; H, 4.36; N, 21.65.

1,3-Dimethyl-*N*{3-[(4-methylphenyl)sulfonylamino]pyridin-3-yl}oxyphenyl}-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (66a)

化合物 **58a** (750 mg, 2.32 mmol)、*p*-トルエンシルホニルクロリド(486 mg, 2.55 mmol)、ピリジン(6 mL)の混合物を 80 °C で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、乾燥し、表題化合物(1.13 g, 99%)を無色油状物として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.18 (3H, s), 2.35 (3H, s), 3.33 (3H, s), 6.71–6.77 (2H, s), 7.13 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.29–7.53 (6H, m), 7.78 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.01 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 10.14 (1H, s), 11.06 (1H, brs).

1,3-Dimethyl-*N*{2-methyl-5-[(4-methylphenyl)sulfonylamino]pyridin-3-yl}oxyphenyl}-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (66b)

化合物 **66a** の合成と同様の方法により、表題化合物(77%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.19 (6H, s), 2.34 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.78–6.84 (2H, m), 6.98 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.25 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.36 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.44 (1H, dd, *J* = 8.9, 3.0 Hz), 7.77 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.97 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 9.73 (1H, s), 11.02 (1H, brs).

***N*{3-[1-(2-Amino-2-oxoethyl)-6-[(4-methylphenyl)sulfonylimino]-1,6-dihydropyridin-3-yl]oxyphenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (67a)**

化合物 **66a** (1.11 g, 2.32 mmol)、DIEA(424 μL, 2.44 mmol)、DMF (7 mL)の混合物を室温で 2 時間攪拌後、ヨードアセトアミド(451 mg, 2.44 mmol)を加え室温で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をろ取後、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(883 mg, 71%)を白色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.19 (3H, s), 2.34 (3H, s), 3.97 (3H, s), 4.83 (2H, s), 6.72–6.79 (2H, m), 7.26–7.43 (6H, m), 7.52–7.56 (1H, m), 7.66–7.77 (4H, m), 8.12 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 10.18 (1H, s).

***N*{5-[1-(2-Amino-2-oxoethyl)-6-[(4-methylphenyl)sulfonylimino]-1,6-dihydropyridin-3-yl]oxy}-2-methylphenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (67b)**

化合物 **67a** の合成と同様の方法により、表題化合物(72%)を白色個体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.17 (3H, s), 2.19 (3H, s), 2.34 (3H, s), 3.98 (3H, s), 4.82 (2H, s), 6.79 (1H, s), 6.84 (1H, dd, $J = 8.3, 2.6$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.24–7.29 (3H, m), 7.37–7.42 (2H, m), 7.65–7.71 (3H, m), 7.76 (1H, brs), 8.10 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 9.77 (1H, s).

N{3-[(2-Aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)oxy]phenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (**68a**)

化合物 **67a** (882 mg, 1.65 mmol)、トリフルオロ酢酸無水物(6 mL)、ジクロロメタン(8 mL)の混合物を室温で 2.5 時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮後、残留物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)で精製した。こうして得られた化合物(328 mg, 0.715 mmol)、1 *N* NaOH(3 mL)、エタノール(3 mL)の混合物を 40 °C で 2 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、メタノール/酢酸エチル)で精製し、表題化合物(205 mg, 79%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.17 (3H, s), 3.96 (3H, s), 5.09 (2H, s), 6.75–6.78 (2H, m), 6.86 (1H, dd, $J = 9.4, 2.0$ Hz), 7.01 (1H, s), 7.22 (1H, d, $J = 9.4$ Hz), 7.32 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.37 (1H, t, $J = 2.3$ Hz), 7.50–7.60 (1H, m), 8.33 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 10.12 (1H, s).

N[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)aminolimidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl]oxy)phenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (**69a**)

化合物 **68a** (270 mg, 0.745 mmol)の THF(5 mL)溶液に氷冷攪拌下、シクロプロパンカルボニルクロリド(88.0 μL , 0.969 mmol)を加え、混合物を室温で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(191 mg, 60%)を白色固体として得た。

Mp 226–230 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 0.79–0.81 (4H, m), 1.89–1.97 (1H, m), 2.17 (3H, s), 3.95 (3H, s), 6.77–6.81 (2H, m), 7.08 (1H, dd, $J = 9.8, 2.4$ Hz), 7.33 (1H, t, $J = 8.3$ Hz), 7.39 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 7.46–7.56 (2H, m), 8.06 (1H, s), 8.58 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 10.12 (1H, s), 10.97 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_3$: C, 64.17; H, 5.15; N, 19.52. Found: C, 63.97; H, 5.19; N, 19.48.

N[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)aminolimidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl]oxy)-2-methylphenyl]-

1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (69b)

化合物 **68a** および **69a** の合成と同様の方法により、表題化合物(41%)を白色個体として得た。

Mp 265–268 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.78–0.81 (4H, m), 1.91–1.94 (1H, m), 2.18 (3H, s), 2.19 (3H, s), 3.96 (3H, s), 6.78 (1H, s), 6.88 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.9 Hz), 7.02–7.08 (2H, m), 7.26 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.46 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 8.06 (1H, s), 8.53–8.55 (1H, m), 9.74 (1H, s), 10.97 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₄H₂₄N₆O₃·0.25H₂O: C, 64.20; H, 5.50; N, 18.72. Found: C, 64.47; H, 5.63; N, 18.40.

N-(3-Hydroxyphenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (70)

化合物 **61a** の合成と同様の方法により、表題化合物(90%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.19 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.47–6.53 (1H, m), 6.79 (1H, s), 7.08–7.13 (2H, m), 7.28 (1H, s), 9.41 (1H, s), 9.97 (1H, s).

1,3-Dimethyl-*N*-(3-[(5-nitropyridin-2-yl)oxy]phenyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (71a)

化合物 **70** (1.58 g, 6.83 mmol)、2-クロロ-5-ニトロピリジン(1.03 g, 6.51 mmol)、炭酸カリウム(1.42 g, 10.2 mmol)および DMF (10 mL)の混合物を 60 °C で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製し、表題化合物(2.26 g, 94%)を白色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.20 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.83 (1H, s), 6.96–7.00 (1H, m), 7.28 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.44 (1H, t, *J* = 8.3 Hz), 7.58–7.62 (1H, m), 7.69 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 8.61–8.65 (1H, m), 9.04 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 10.27 (1H, s).

1,3-Dimethyl-*N*-(2-methyl-5-[(5-nitropyridin-2-yl)oxy]phenyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (71b)

化合物 **71a** の合成と同様の方法により、表題化合物(90%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.19 (3H, s), 2.25 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.81 (1H, s), 7.04 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.9 Hz), 7.24–7.27 (2H, m), 7.35 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 8.62 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.9 Hz), 9.01 (1H, dd, *J* = 2.7, 0.6 Hz), 9.81 (1H, s).

N-(3-[(5-Aminopyridin-2-yl)oxy]phenyl)-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (72a)

化合物 **71a** (2.26 g, 6.40 mmol)のメタノール(20 mL)溶液にパラジウム炭素(50%含水品、200 mg)を加え、混合物を水素雰囲気下室温で 5 時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮後、残量物をろ取、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(1.77 g, 86%)を白色固体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.19 (3H, s), 3.97 (3H, s), 5.14 (2H, s), 6.67–6.71 (1H, m), 6.76–7.00 (2H, m), 7.08 (1H, dd, J = 8.4, 3.0 Hz), 7.28 (1H, t, J = 8.1 Hz), 7.36 (1H, t, J = 2.1 Hz), 7.43–7.47 (1H, m), 7.56 (1H, d, J = 3.0 Hz), 11.10 (1H, s).

N{5-[(5-Aminopyridin-2-yl)oxy]-2-methylphenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (72b)

化合物 **72a** の合成と同様の方法により、表題化合物(quant.)を白色個体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.17 (3H, s), 2.18 (3H, s), 3.97 (3H, s), 5.10 (2H, s), 6.74–6.80 (3H, m), 6.93 (1H, d, J = 2.7 Hz), 7.07 (1H, dd, J = 8.7, 3.0 Hz), 7.20 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.53–7.54 (1H, m), 9.72 (1H, s).

N{3-[(2-Amino[1,3]thiazolo[5,4-*b*]pyridin-5-yl)oxy]phenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (73a)

化合物 **72a** (1.75 g, 5.41 mmol)、チオシアン酸カリウム(4.21 g, 43.3 mmol)の酢酸(10 mL)懸濁液中に氷冷攪拌下、臭素(1 mL)の酢酸(4 mL)溶液を滴下し、混合物を 0 °C で 2 時間、室温で 15 時間攪拌した。反応混合物に水(10 mL)を加え 80 °C に加熱後、セライトろ過した。ろ液を 8 *N* NaOH で中和後、析出固体をろ取、水洗し、表題化合物(1.05 g, 51%)を白色固体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.19 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.81–6.86 (2H, m), 6.92 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.35 (1H, t, J = 8.1 Hz), 7.50 (1H, t, J = 2.1 Hz), 7.57 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.68–7.74 (3H, m), 10.31 (1H, s).

N{5-[(2-Amino[1,3]thiazolo[5,4-*b*]pyridin-5-yl)oxy]-2-methylphenyl}-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (73b)

化合物 **73a** の合成と同様の方法により、表題化合物(47%)を白色個体として得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.19 (3H, s), 2.21 (3H, s), 3.98 (3H, s), 6.80 (1H, s), 6.88–6.94 (2H, m), 7.09 (1H, d, J = 2.4 Hz), 7.28 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.62 (2H, s), 7.71 (1H, dd, J = 8.4, 0.9 Hz), 9.77 (1H, s).

N[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,3]thiazolo[5,4-*b*]pyridin-5-yl}oxy)phenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (74a)

化合物 **65a** の合成と同様の方法により、表題化合物(56%)を白色個体として得た。

Mp 225–228 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 0.94–0.98 (4H, m), 1.96–2.05 (1H, m), 2.19 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.81 (1H, s), 6.89–6.94 (1H, m), 7.14 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.40 (1H, t, J = 8.4 Hz), 7.57–7.61 (2H, m), 8.17 (1H, d, J = 8.9 Hz), 10.20 (1H, s), 12.70 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 54.53; H, 4.99; N, 17.34. Found: C, 54.65; H, 4.85; N, 17.31.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,3]thiazolo[5,4-*b*]pyridin-5-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*pyrazole-5-carboxamide (74b)**

化合物 **39f** の合成と同様の方法により、表題化合物(66%)を白色個体として得た。

Mp 228–231 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.94–0.97 (4H, m), 1.95–2.02 (1H, m), 2.19 (3H, s), 2.24 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.80 (1H, s), 7.00 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.6 Hz), 7.10 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.17 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.32 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 8.16 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 9.78 (1H, s), 12.68 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₂₂N₆O₃S·0.25H₂O: C, 59.15; H, 4.86; N, 17.99. Found: C, 58.96; H, 4.77; N, 17.90.

***tert*-Butyl {4-methyl-3-[(6-nitropyridin-3-yl)oxy]phenyl}carbamate (76a)**

化合物 **56** の合成と同様の方法により、表題化合物(44%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.45 (9H, s), 2.06 (3H, s), 7.24–7.34 (3H, m), 7.45 (1H, dd, *J* = 9.2, 2.9 Hz), 8.32 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.38 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 9.50 (1H, s).

***tert*-Butyl {2-methyl-5-[(6-nitropyridin-3-yl)oxy]phenyl}carbamate (76b)**

化合物 **56** の合成と同様の方法により、表題化合物(53%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.51 (9H, s), 2.28 (3H, s), 6.40 (1H, s), 6.72 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.6 Hz), 7.20 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.40 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz), 7.84 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 8.22 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.31 (1H, d, *J* = 2.6 Hz).

***tert*-Butyl {3-[(6-aminopyridin-3-yl)oxy]-4-methylphenyl}carbamate (77a)**

化合物 **57** の合成と同様の方法により、表題化合物(44%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.40 (9H, s), 2.16 (3H, s), 5.80 (2H, s), 6.46 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.89 (1H, s), 7.01–7.13 (3H, m), 7.66 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 9.50 (1H, s).

***tert*-Butyl {5-[(6-aminopyridin-3-yl)oxy]-2-methylphenyl}carbamate (77b)**

化合物 **57** の合成と同様の方法により、表題化合物(98%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.50 (9H, s), 2.20 (3H, s), 6.30 (1H, s), 6.55 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz), 6.60 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.05 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.25–7.31 (1H, m), 7.59 (1H, s), 7.75 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 8.02 (2H, s).

***tert*-Butyl {3-[(2-amino[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl)oxy]-4-methylphenyl}carbamate (78a)**

化合物 **64a** の合成と同様の方法により、表題化合物(87%)を白色個体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.39 (9H, s), 2.19 (3H, s), 6.00 (2H, s), 6.98 (1H, s), 7.12–7.18 (2H,

m), 7.24 (1H, dd, $J = 9.5, 2.3$ Hz), 7.39 (1H, dd, $J = 9.5, 0.3$ Hz), 8.43 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 9.23 (1H, s).

***tert*-Butyl {5-[(2-amino[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl)oxy]-2-methylphenyl}carbamate (78b)**

化合物 **64a** の合成と同様の方法により、表題化合物(49%)を白色個体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.50 (9H, s), 2.22 (3H, s), 4.42 (2H, s), 6.32 (1H, s), 6.61 (1H, dd, $J = 8.3, 2.7$ Hz), 7.09 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.23 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.32–7.38 (1H, m), 7.70 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 8.07 (1H, d, $J = 1.9$ Hz).

***N*[6-(5-Amino-2-methylphenoxy)[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (79a)**

化合物 **78a** (1.50 g, 4.22 mmol)の DMA (5 mL)溶液に氷冷攪拌下、シクロプロパンカルボニルクロリド(1.15 mL, 12.7 mmol)を加え、混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をろ取後、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、白色化合物を得た。こうして得られた化合物(1.50 g, 4.22 mmol)、トリフルオロ酢酸(5 mL)の混合物を0 °Cで30分間攪拌した。溶媒を減圧留去後、残留物を水に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をろ取後、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(1.04 g, 91%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 0.81–0.84 (4H, m), 1.99–2.08 (1H, m), 2.09 (3H, s), 5.09 (2H, brs), 6.08 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.30 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.42 (1H, dd, $J = 9.6, 2.3$ Hz), 7.69 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 8.61 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 10.98 (1H, s).

***N*[6-(3-Amino-4-methylphenoxy)[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (79b)**

化合物 **79a** の合成と同様の方法により、表題化合物(86%)を白色個体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0.87–0.97 (2H, m), 1.15–1.23 (2H, m), 1.65 (1H, s), 2.14 (3H, s), 3.70 (2H, s), 6.29–6.39 (2H, m), 7.01 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.33–7.41 (1H, m), 7.55 (1H, dd, $J = 9.8, 0.8$ Hz), 8.27 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 9.56 (1H, s).

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-4-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (80)**

化合物 **79a** (265 mg, 0.820 mmol)の DMA (5 mL)溶液に氷冷攪拌下、1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾール-1*H*-カルボニル クロリド(260 mg, 1.64 mmol)を加え、混合物を室温で2時間

攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製し、表題化合物(333 mg, 91%)を白色固体として得た。

Mp 222–225 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.81–0.84 (4H, m), 1.99–2.08 (1H, m), 2.15 (3H, s), 2.27 (3H, s), 3.93 (3H, s), 6.72 (1H, s), 7.21–7.30 (2H, m), 7.48–7.56 (2H, m), 7.74 (1H, dd, *J* = 9.5, 0.7 Hz), 8.78–8.80 (1H, m), 10.02 (1H, s), 11.04 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₂₃N₇O₃·0.5H₂O: C, 60.78; H, 5.32; N, 21.57. Found: C, 61.04; H, 5.29; N, 21.55.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-2,5-dimethyl-1,3-thiazole-4-carboxamide (81a)**

2,5-ジメチル-1,3-チアゾール-4-カルボン酸(107 mg, 0.681 mmol)の THF(5 mL)溶液に DMF(2 滴)、塩化チオニル(118 μL, 1.36 mmol)を加え、混合物を室温で 2 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮後、残留物を DMA (6 mL)に溶解し、化合物 **79b** (200 mg, 0.619 mmol)を加え、混合物を室温で 2 時間攪拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、エタノールより再結晶化し、表題化合物(248 mg, 87%)を白色固体として得た。

Mp 239–240 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.78–0.86 (4H, m), 2.04 (1H, brs), 2.23–2.28 (3H, m), 2.65 (3H, s), 2.70 (3H, s), 6.82 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz), 7.27 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.50 (1H, dd, *J* = 9.5, 2.3 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.69–7.75 (1H, m), 8.82 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 9.66 (1H, s), 11.02 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₂₂N₆O₃S: C, 59.73; H, 4.79; N, 18.17. Found: C, 59.48; H, 4.80; N, 18.00.

化合物 **81a** の合成と同様の方法により、**81b–f** を合成した。

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-3-chloro-4-methylthiophene-2-carboxamide (81b)**

収率 78%. Mp 218–219 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.79–0.86 (4H, m), 2.04 (1H, brs), 2.20 (3H, d, *J* = 1.1 Hz), 2.27 (3H, s), 6.89 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.6 Hz), 7.28 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.42 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.50 (1H, dd, *J* = 9.8, 2.7 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 1.1 Hz), 7.69–7.76 (1H, m), 8.84 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 9.54 (1H, s), 10.96–11.09 (1H, m). Anal. Calcd for C₂₃H₂₀ClN₅O₃S: C, 57.32; H, 4.18; N, 14.53. Found: C, 57.28; H, 4.04; N, 14.51.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-4-carboxamide (81c)**

収率 58%. Mp 192–194 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.79–0.86 (4H, m), 2.04 (1H, brs), 2.20 (3H, s), 2.32 (3H, s), 3.79 (3H, s), 6.86 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.8 Hz), 7.17 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.25 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.49 (1H, dd, *J* = 9.6, 2.5 Hz), 7.72 (1H, dd, *J* = 9.4, 0.8 Hz), 8.23 (1H, s), 8.81 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 9.16 (1H, s), 11.03 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₂₃N₇O₃·0.5H₂O: C, 60.78; H, 5.31; N, 21.57. Found: C, 61.20; H, 5.76; N, 19.77.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1-methyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (81d)**

収率 47%. Mp 131–135 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.78–0.87 (4H, m), 2.04 (1H, brs), 2.20 (3H, s), 4.05 (3H, s), 6.94 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz), 7.02 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.09 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.29 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.46–7.53 (2H, m), 7.72 (1H, dd, *J* = 9.8, 0.8 Hz), 8.82–8.85 (1H, m), 9.86 (1H, s), 11.02 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₁N₇O₃: C, 61.24; H, 4.91; N, 22.73. Found: C, 61.24; H, 4.98; N, 22.58.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-2-methylpropanecarboxamide (81e)**

収率 72%. Mp 217–219 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.79–0.85 (4H, m), 0.93 (6H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.96–2.11 (2H, m), 2.16–2.23 (5H, m), 6.79 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz), 7.17–7.25 (2H, m), 7.47 (1H, dd, *J* = 9.7, 2.5 Hz), 7.71 (1H, dd, *J* = 9.5, 0.8 Hz), 8.79 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz), 9.21 (1H, s), 11.01 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₅N₅O₃: C, 64.85; H, 6.18; N, 17.19. Found: C, 64.71; H, 6.23; N, 17.24.

***N*[5-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino][1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]cyclobutanecarboxamide (81f)**

収率 45%. Mp 229–230 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.78–0.87 (4H, m), 1.72–1.85 (1H, m), 1.85–1.98 (1H, m), 1.98–2.14 (3H, m), 2.15 (3H, s), 2.17–2.27 (2H, m), 3.21–3.35 (1H, m), 6.80 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz), 7.20 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.25 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.47 (1H, dd, *J* = 9.5, 2.3 Hz), 7.66–7.74 (1H, m), 8.76–8.80 (1H, m), 9.05 (1H, s), 11.01 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₃N₅O₃: C, 65.17; H, 5.72; N, 17.27. Found: C, 65.24; H, 5.70; N, 17.34.

***N*(6-Hydroxy-1,3-benzothiazol-2-yl)cyclopropanecarboxamide (83)**

化合物**82** (9.03 g, 54.3 mmol)およびトリエチルアミン(8.27 mL, 59.7 mmol)のTHF(100 mL)溶液に氷冷攪拌下、シクロプロパンカルボニルクロリド(5.19 mL, 57.0 mmol)のTHF (25 mL)溶液を加え、混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで

乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をろ取後、ヘキサン/酢酸エチルで洗浄し、表題化合物(12.3 g, 97%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 0.95–1.05 (4H, m), 1.84–1.99 (1H, m), 6.93 (1H, dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz), 7.29 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.45–7.50 (3H, m).

***N*[6-(3-Nitrophenoxy)-1,3-benzothiazol-2-yl]cyclopropanecarboxamide (84)**

化合物 **83** (3.54 g, 15.1 mmol)、1-フルオロ-3-ニトロベンゼン(2.24 g, 15.9 mmol)、炭酸カリウム(6.26 g, 45.3 mmol)およびDMF (30 mL)の混合物を 150 °C で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をろ取、酢酸エチル/ヘキサンで洗浄し、表題化合物(1.82 g, 37%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 0.95–0.99 (4H, m), 1.96–2.05 (1H, m), 7.24 (1H, dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz), 7.47–7.51 (1H, m), 7.63–7.70 (2H, m), 7.78–7.83 (2H, m), 7.94–7.99 (1H, m), 12.67 (1H, s).

***N*[3-({2-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]-1,3-benzothiazol-6-yl}oxy)phenyl]-1,3-dimethyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (85)**

化合物 **84** (1.80 g, 5.53 mmol)のメタノール(20 mL)溶液にパラジウム炭素(50%含水品、100 mg)を加え、混合物を水素雰囲気下室温で 5 時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮後、残留物に還元鉄(309 mg)、塩化カルシウム(613 mg, 5.53 mmol)、エタノール(10 mL)および水(2 mL)を加え、混合物を攪拌条件下 2 時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過後、ろ液を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をテトラヒドロフラン(10 mL)に溶解し、氷冷攪拌下、トリエチルアミン(192 μL , 1.39 mmol)および **8** (220 mg, 1.39 mmol)を加え、混合物を室温で 3 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)で精製後、酢酸エチル/テトラヒドロフランで再結晶化し、表題化合物(126 mg, 5.1%)を白色固体として得た。

Mp 192–194 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 0.94–0.97 (4H, m), 1.96–2.05 (1H, m), 2.17 (3H, s), 3.95 (3H, s), 6.76–6.80 (2H, m), 7.15 (1H, dd, $J = 8.6, 2.6$ Hz), 7.34 (1H, t, $J = 8.1$ Hz), 7.40 (1H, t, $J = 2.3$ Hz), 7.51–7.56 (1H, m), 7.70–7.77 (2H, m), 10.13 (1H, s), 12.62 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$: C, 61.73; H, 4.73; N, 15.65. Found: C, 61.49; H, 4.52; N, 15.67.

Dilution assay of VEGFR2

IC_{50} の 10 倍濃度の化合物と 10 nM of VEGFR2 を上記 buffer 中で 60 分間(室温)イン

キュベーションした。1 mM ATP と 0.1 $\mu\text{g/mL}$ biotinylated poly-Glu-Tyr (4:1)の buffer 溶液を用い 100 倍希釈後、AlphaScreen®法によりキナーゼ反応を解析した。

参考文献

- 1) Nettekoven, M.; Pullmann, B.; Schmitt, S. *Synthesis* **2003**, *11*, 1649-1652.
- 2) Bochis, R. J.; Olen, L. E.; Fisher, M. H.; Reamer, R. A.; Wilks, G.; Taylor, J. E.; Olson, G. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1483-1487.
- 3) Okafor, C. O. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 4383-4386.
- 4) Wilhelm, S. M.; Carter, C.; Tang, L.; Wilkie, D.; McNabola, A.; Rong, H.; Chen, C.; Zhang, X.; Vincent, P.; McHugh, M.; Cao, Y.; Shujath, J.; Gawlak, S.; Eveleigh, D.; Rowley, B.; Liu, L.; Adnane, L.; Lynch, M.; Auclair, D.; Taylor, I.; Gedrich, R.; Voznesensky, A.; Riedl, B.; Post, L. E.; Bollag, G.; Trail, P. A. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7099-7109.
- 5) Mol, C. D.; Dougan, D. R.; Schneider, T. R.; Skene, R. J.; Kraus, M. L.; Scheibe, D. N.; Snell, G. P.; Zou, H.; Sang, B. C.; Wilson, K. P. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31655-31663.
- 6) Heron, N. M.; Anderson, M.; Blowers, D. P.; Breed, J.; Eden, J. M.; Green, S.; Hill, G. B.; Johnson, T.; Jung, F. H.; McMiken, H. H.; Mortlock, A. A.; Pannifer, A. D.; Pauptit, R. A.; Pink, J.; Roberts, N. J.; Rowsell, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1320-1323.
- 7) Wan, P. T.; Garnett, M. J.; Roe, S. M.; Lee, S.; Niculescu-Duvaz, D.; Good, V. M.; Jones, C. M.; Marshall, C. J.; Springer, C. J.; Barford, D.; Marais, R. *Cell* **2004**, *116*, 855-867.
- 8) Hodous, B. L.; Geuns-Meyer, S. D.; Hughes, P. E.; Albrecht, B. K.; Bellon, S.; Bready, J.; Caenepeel, S.; Cee, V. J.; Chaffee, S. C.; Coxon, A.; Emery, M.; Fretland, J.; Gallant, P.; Gu, Y.; Hoffman, D.; Johnson, R. E.; Kendall, R.; Kim, J. L.; Long, A. M.; Morrison, M.; Olivieri, P. R.; Patel, V. F.; Polverino, A.; Rose, P.; Tempest, P.; Wang, L.; Whittington, D. A.; Zhao, H. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 611-626. 9) Pargellis, C.; Tong, L.; Churchill, L.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Grob, P. M.; Hickey, E. R.; Moss, N.; Pav, S.; Regan, J. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 268-272.
- 10) Yalkowsky, S. H.; Banerjee, S. *Aqueous Solubility, Methods of Estimation for Organic Compounds*; Marcel Dekker: New York, Basel and Hong Kong, **1992**. pp 128-148.
- 11) Nagao, Y.; Hirata, T.; Goto, S.; Sano, S.; Kakehi, A.; Iizuka, K.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3104-3110.
- 12) Ishikawa, M.; Hashimoto, Y. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1539-1554.
- 13) Copeland, R. A.; Pompliano, D. L.; Meek, T. D. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 730-739.

第6章 VEGFR/FGFR dual キナーゼ阻害薬の合成と生物評価

6.1 はじめに

第1章において、既知 type 2 キナーゼ阻害薬が共通の部分構造を有することを見出し、これら部分構造を適切に配置することにより type 2 キナーゼ阻害薬が創出できると仮説を立てた。そして、この仮説を基にしたデザインにより、第2章から第5章において複数の type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬の創出に成功した。これらの結果から、第1章で示したデザインにより、VEGFR2 以外のキナーゼに対する type 2 キナーゼ阻害薬の創出も可能になると考えられた。

ところで、現在までに type 2 キナーゼ阻害薬が見出されたキナーゼは数少ない。この要因として、① type 2 キナーゼ阻害薬の結合を阻害するアミノ酸残基を持つキナーゼが存在すること、② type 2 キナーゼ阻害薬が結合する不活性コンフォメーションが安定化しにくいキナーゼが存在すること、が考えられてきた。①の例として、近年 imatinib の耐性化に gatekeeper と呼ばれるアミノ酸の関与が報告されている¹⁾。Type 2 bcr-abl キナーゼ阻害薬である imatinib は、野生型 bcr-abl のヒンジ領域およびバックポケットを占有する。一方、バックポケットの入口に存在する gatekeeper のチロシンがイソロイシンに変異(T315I)すると、立体障害のため imatinib が結合できなくなる。従って、type 2 キナーゼ阻害薬が結合可能なキナーゼは、gatekeeper に特定のアミノ酸を有するキナーゼに限られると考えられていた。しかし近年、T315I 変異体に対しても強力な阻害活性を示す化合物が見出された²⁾ことから、gatekeeper の影響を受けない化合物の創出は可能と考えられ、①の可能性は低くなっている。②に関しては、計算科学的手法により、DFG モチーフとその近辺のアミノ酸配列の違いによって、不活性コンフォメーションが安定化しやすいキナーゼとそうでないキナーゼが存在することが示唆されている³⁾。従って、現在 type 2 キナーゼ阻害薬が見出されているキナーゼは、もともと不活性コンフォメーションが安定化しやすいポテンシャルがあると考えられる。そして、そのようなキナーゼは、化合物との間に3つの鍵となる相互作用を形成すると、不活性コンフォメーションが非常に安定化すると推察される。一方、別の見方をすると、不活性コンフォメーションが安定化しにくいキナーゼに対しては、鍵となる相互作用を増やすことにより安定化できると考えられる。そこで、これまで type 2 キナーゼ阻害薬が見出されていないキナーゼを標的とし、鍵となる相互作用部位を増やした新規 type 2 キナーゼ阻害薬を創出することとした。

本研究では、新規 type 2 キナーゼ阻害薬の標的として、FGFR キナーゼに注目した。FGFR キナーゼは、VEGFR2 と同様血管新生に関与するキナーゼである⁴⁾。近年、VEGFR シグナル阻害薬に対する耐性機構として、FGFR シグナルを介した血管新生の亢進が示唆されている⁵⁾。従って、VEGFR2 と FGFR の両キナーゼを阻害する抗がん剤は、より優れた抗腫瘍効果を示すと期待される。VEGFR2 と FGFR に阻害活性を示す化合物として、2013年6月現在、BIBF-1120⁶⁾、TKI-258⁷⁾、E7080⁸⁾が臨床試験段階にある。このうち、BIBF1120

は、卵巣がんを対象としたPh2試験において有効性を示した⁹⁾。一方、BIBF1120はtype 1キナーゼ阻害薬と考えられる¹⁰⁾ことから、type 2 VEGFR2/FGFRデュアルキナーゼ阻害薬を創出すれば、より強力かつ安全な抗がん剤となり得ると考えられる。

そこで、上述の仮説を基に、新規type 2 VEGFR2/FGFRデュアルキナーゼ阻害薬をデザインすることとした。戦略として、既存のtype 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬に、FGFRの不活性コンフォメーション安定化に寄与する相互作用部位を導入する手法を考えた。第2章で見出したピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体**20a**は、FGFRファミリーの1つであるFGFR1に対し阻害活性が認められなかった(IC₅₀ > 10000 nM, Figure 6-2)。一方、**20a**とVEGFR2との複合体X線結晶構造解析結果から、**20a**はtype 2 VEGFR2キナーゼ阻害薬に特徴的な3つの鍵相互作用を形成することが判明した (Figure 6-1)。また、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン周辺および(トリフルオロメチル)フェニル基周辺に空間の存在が確認された。これらの空間には、置換基導入により相互作用が期待できるアミノ酸が存在し、FGFR1においても保存されていることが判明した。すなわち、水素結合が期待できるアミノ酸として、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン周辺にはAsn923(Asn568 in FGFR1)が、(トリフルオロメチル)フェニル基周辺には、Ile1025(Ile620 in FGFR1)およびHis1026(His621 in FGFR1)の主鎖カルボニルが存在した。また、(トリフルオロメチル)フェニル基周辺には、脂溶性相互作用が期待できる疎水性アミノ酸残基も複数存在した。従って、**20a**への置換基導入によりこれらアミノ酸と相互作用すれば、FGFR1の不活性コンフォメーションを安定化できると考えた。そこで、これらアミノ酸との相互作用を期待し、Figure 6-2に示す化合物をデザイン、合成することとした。

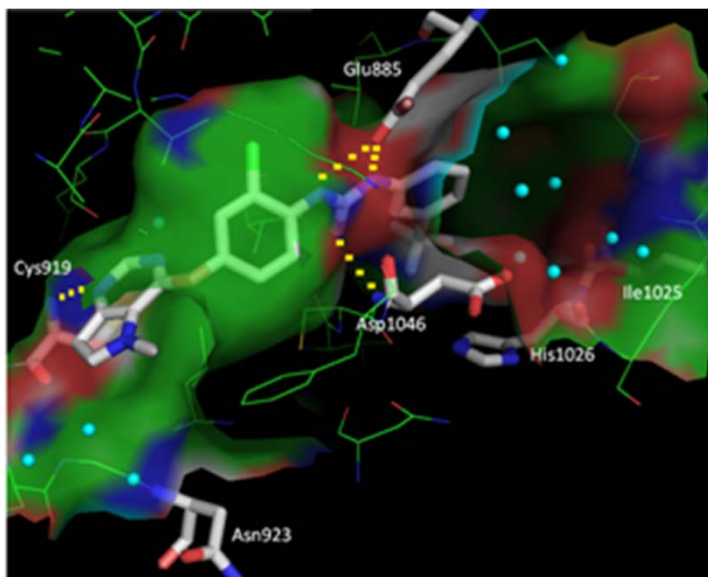


Figure 6-1 X-ray co-crystal structure of **20a** in complex with VEGFR2.

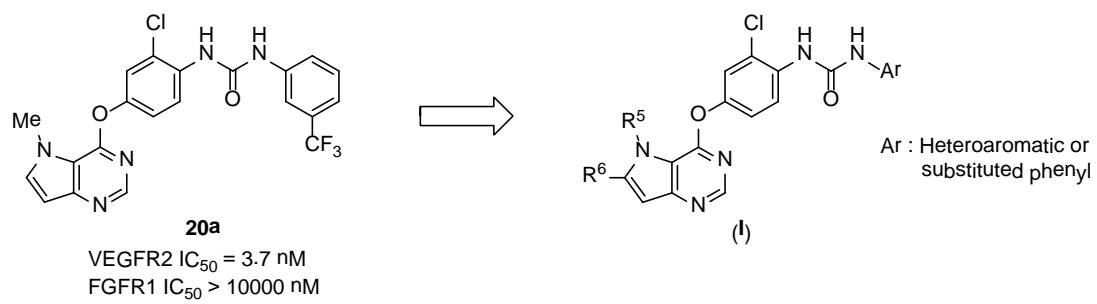
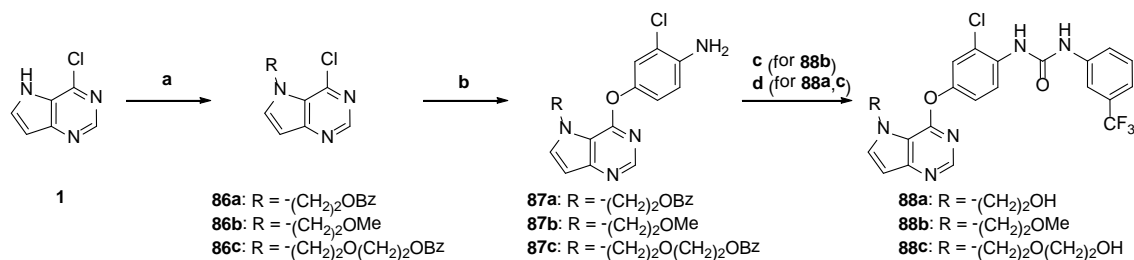


Figure 6-2 Inhibitor design

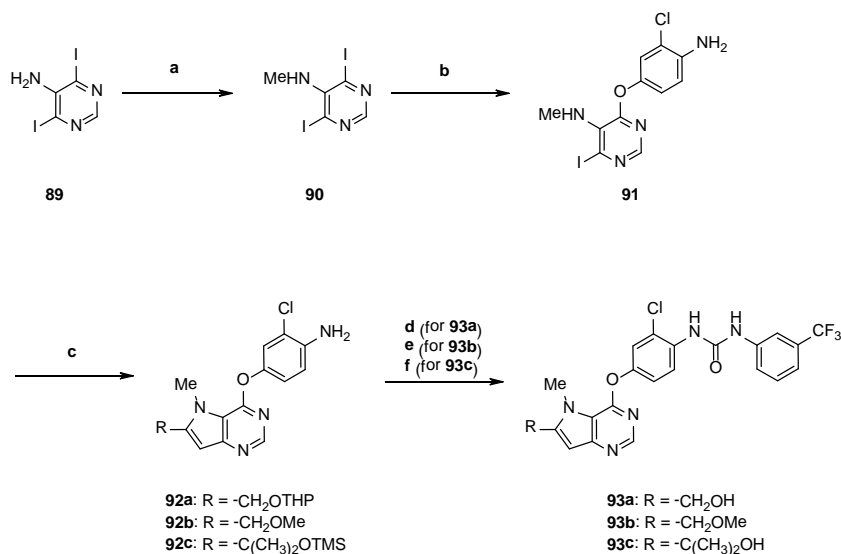
6.2 合成

5位に種々の置換基を有する化合物は、Scheme 6-1に示す方法により合成した。化合物**1**をアルキル化することにより**86a-c**とした後、4-アミノ-3-クロロフェノールによる芳香族求核置換反応を行いアニリン**87a-c**へ導いた。そして、3-(トリフルオロメチル)フェニルイソシアナートを用いたウレア化により**88a-c**を合成した。



Scheme 6-1 Reagents: (a) R-X, Cs_2CO_3 , DMF; (b) 4-amino-3-chlorophenol, K_2CO_3 , NMP; (c) 3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate, Et_3N , THF; (d) (1) 3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate, Et_3N , THF, (2) NaOH, MeOH.

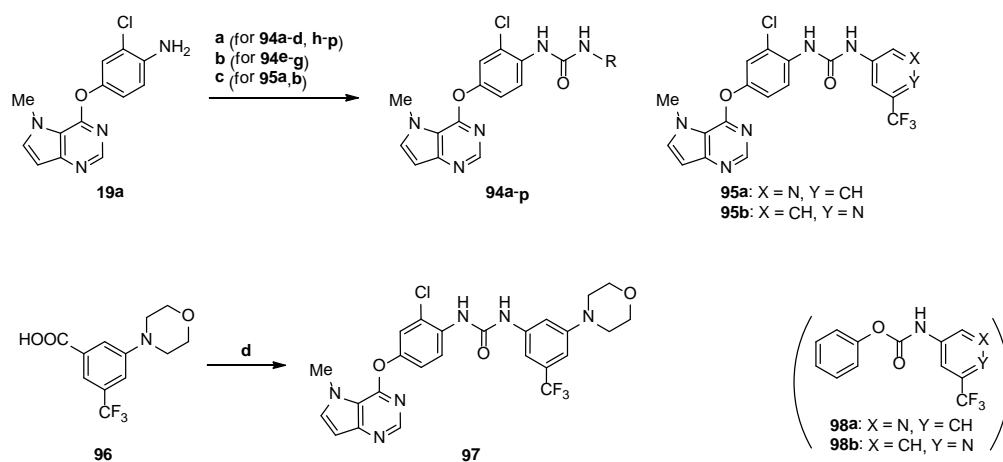
6位への置換基導入は、Scheme 6-2に示す合成法に従い実施した。アミノピリミジン**89**に対し、メタンスルホン酸メチルを作用させることによりメチルアミノ体**90**とした後、4-アミノ-3-クロロフェノールによる芳香族求核置換反応を行いアニリン**91**へと導いた。続いて、種々のアルキンを用いた菌頭反応により6位にアルキンを導入した後、ヨウ化銅を用い環化反応を行うことによりピロロ[3,2-*d*]ピリミジン**92-c**を合成した。そして、3-(トリフルオロメチル)フェニルイソシアナートを用いアミノ基をウレア化することにより**93a-c**へと導いた。



Scheme 6-2 Reagents: (a) MeOMs, NaH, THF; (b) 4-amino-3-chlorophenol, K_2CO_3 , NMP; (c) (1) alkynes, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI, CH_3CN , Et_3N , (2) CuI, DMF; (d) (1)

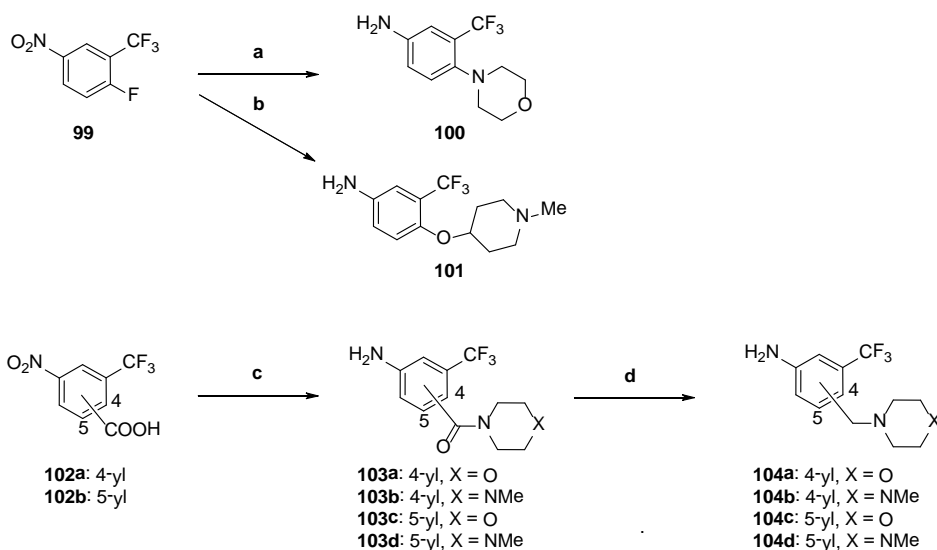
3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate, Et₃N, THF, (2) *p*-TsOH, EtOH; (e) 3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate, Et₃N, THF; (f) (1) 3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate, Et₃N, THF, (2) 1 *N*HCl, EtOH.

Scheme 6-3に示す方法により、ウレア置換基を変換した。アニリン**19a**に対し、クロロ炭酸フェニルを作用させウレタン体へと変換後、対応するアミンを加え加熱攪拌することにより**94a-d**および**94h-p**を合成した。また、**19a**にトリフォスゲンを作用させた後、アミンを加え室温で攪拌することにより**94e-g**を合成した。一方、**19a**に対し、あらかじめ調製したウレタン**98a,b**を加え加熱攪拌することにより**95a,b**を得た。さらに、カルボン酸**96**をCurtius転位によりイソシアナートへ変換後、**19a**を添加することにより**97**を合成した。

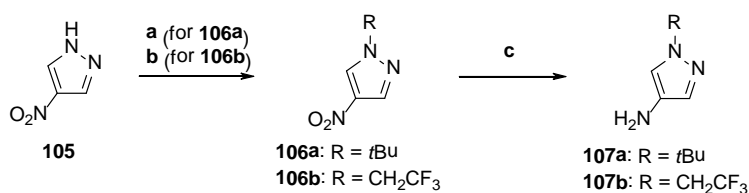


Scheme 6-3 Reagents: (a) Amines, PhOCOCl, pyridine, DMA; (b) amines, triphosgene, Et₃N, CH₂Cl₂; (c) **98a** or **b**, pyridine, NMP; (d) (1) DPPA, Et₃N, toluene, (2) **19a**.

ウレア置換基変換の原料となるアニリン体は、Scheme 6-4および6-5に示す方法により合成した。フルオロベンゼン**99**に対し、モルホリンを用いて芳香族求核置換反応を行った後、ニトロ基を接触還元することにより**100**とした。また、1-メチルピペリジン-4-オールに水素化ナトリウムを加えアルコキシドとした後、**99**を加えることによりアルコキシ基を導入し、次いでニトロ基を接触還元することにより**101**とした。一方、カルボン酸**102a,b**をオキサリルクロリドにより酸クロリドへと変換後、モルホリンおよび1-メチルピペラジンを作用させることによりアミド体**103a-d**へと導き、続いてジメチルスルフィド-ボラン錯体を用いアミドを還元することでベンジル体**104a-d**を合成した。また、ピラゾール誘導体**107a,b**は、**105**のアルキル化と続く接触還元により合成した。

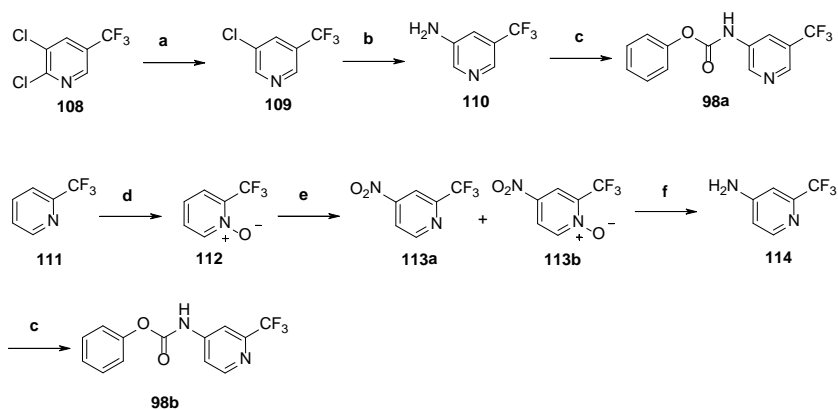


Scheme 6-4 Reagents: (a) (1) Morpholine, DMSO, (2) H₂, Pd/C, MeOH; (b) (1) 1-methylpiperidin-4-ol, NaH, DMF, (2) H₂, Pd/C, MeOH; (c) (1) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂, (2) morpholine or 1-methylpiperazine, CH₂Cl₂, (3) H₂, Pd/C, MeOH; (d) Me₂S·BH₃, THF.



Scheme 6-5 Reagents: (a) 2-Bromo-2-methylpropane, K₂CO₃, DMF; (b) CF₃CH₂OTf, K₂CO₃, DMF; (c) H₂, Pd/C, MeOH.

ウレタン**98a,b**の合成法をScheme 6-6に示した。ジクロロピリジン体**108**に対し、ギ酸アンモニウム存在下パラジウム炭素を作用させることによりモノクロロ体**109**へと変換後、塩化銅とアンモニア水を用いオートクレーブ中170 °Cで反応させることによりアミノ体**110**とした。そして、**110**にクロロ炭酸フェニルを作用させウレタン**98a**へと導いた。一方、ピリジン体**111**を*m*CPBAにより*N*-オキシド体へと変換後、ニトロ化反応を行い**113a,b**へと導いた。そして、**113a,b**の混合物を接触還元によりアミノ体**114**とし、最後にクロロ炭酸フェニルを作用させることにより**98b**を合成した。



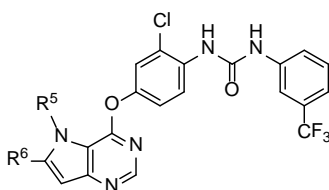
Scheme 6-6 Reagents: (a) HCOONH_4 , Pd/C, MeOH; (b) aq. NH_3 , CuCl; (c) PhOCOCl , pyridine, THF; (d) *m*CPBA, CH_2Cl_2 ; (e) HNO_3 , H_2SO_4 ; (f) H_2 , Pd/C, MeOH.

6.3 構造活性相関

VEGFR2のAsn923およびFGFR1のAsn568との相互作用を指向し、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジンへの置換基導入を行った (Table 6-1)。まず、5位置換基に関しては、結晶構造から予想された通り、置換基許容性が非常に高く、**88a-c**はいずれも強いVEGFR2阻害活性を示した。メトキシエチル体**88b**をさらに伸張させたアルコール体**88c**においてVEGFR2阻害活性が向上したことから、当初標的としたAsn923と相互作用する可能性が示唆された。一方、**88c**はFGFR1阻害活性が低かったことから、FGFR1のAsn568とは効果的に相互作用していないと考えられた。また、6位に関しては、置換基を大きくするとVEGFR2阻害活性が減弱傾向を示し、いずれもFGFR1阻害活性は認められなかった。以上の結果から、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジンへの置換基導入は、FGFR1阻害活性向上に効果的ではないことが明らかとなった。

Table 6-1

Kinase inhibitory activity of compounds modified at the 5- and 6-positions^a



| Compd | R ⁵ | R ⁶ | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) | FGFR1 IC ₅₀ (nM) |
|------------|---|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 20a | Me | H | 3.7 (3.4-4.1) | >10000 |
| 88a | (CH ₂) ₂ OH | H | 4.0 (3.5-4.7) | >10000 |
| 88b | (CH ₂) ₂ OCH ₃ | H | 9.0 (7.1-11) | 2700 (2300-3100) |
| 88c | (CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OH | H | 2.7 (2.5-3.0) | 6500 (4900-8700) |
| 93a | Me | CH ₂ OH | 9.7 (8.9-11) | >10000 |
| 93b | Me | CH ₂ OCH ₃ | 14 (12-17) | >10000 |
| 93c | Me | C(CH ₃) ₂ OH | 18 (15-22) | >10000 |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

次に、ウレア置換基周辺のアミノ酸との相互作用を期待し、種々のヘテロ芳香環を有するウレア体を合成した (Table 6-2)。まず、無置換ピリジン体**94a-c**を評価したところ、いずれもVEGFR2阻害活性が低かった。対して、トリフルオロメチル体**94d**および**95a, b**は、いずれも**20a**と同等の強力なVEGFR2阻害活性を示した。以上の結果、芳香環上の窒素原子はVEGFR2阻害に影響せず、脂溶性置換基がVEGFR2阻害活性向上に寄与することが判明した。一方、いずれの化合物もFGFR1阻害活性が認められなかったことから、ピリジン誘導体はウレア置換基として適切ではないと考えられた。そこで次に、脂溶性基を有する5員ヘテロ芳香環を検討した。その結果、*tert*-ブチルピラゾール体**94f**において、強力なVEGFR2

阻害活性(IC₅₀ = 7.6 nM)と中程度のFGFR1阻害活性(IC₅₀ = 940 nM)が認められた。対応するトリフルオロエチル体**94e**にはFGFR1阻害が認められなかったことから、FGFR1との相互作用にはサイズの大きな脂溶性基が必要と考えられた。そこで、同様に *tert*-ブチル基を有する**94g**および**94h**を評価したところ、両化合物ともに期待通りFGFR1阻害活性が認められた(IC₅₀ = 220 nM (**94g**), 260 nM (**94h**))。以上の結果から、ウレア置換基への脂溶性置換基導入は、FGFR1阻害活性向上に寄与することが判明した。

Table 6-2

Effect of modifications to the terminal heteroaromatic ring on kinase inhibitory activity^a

| Compd | R | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) | FGFR1 IC ₅₀ (nM) | Compd | R | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) | FGFR1 IC ₅₀ (nM) |
|------------|---|---------------------------------|--------------------------------|------------|---|---------------------------------|--------------------------------|
| 94a | | 210 (79-580) | >10000 | 94e | | 4.0 (3.4-4.8) | >10000 |
| 94b | | 230 (190-270) | >10000 | 94f | | 7.6 (6.3-9.2) | 940 (770-1100) |
| 94c | | 650 (510-840) | >10000 | 94g | | 8.9 (7.0-11) | 220 (210-240) |
| 94d | | 2.7 (2.2-3.3) | >10000 | 94h | | 19 (16-21) | 260 (230-280) |
| 95a | | 2.9 (2.6-3.2) | >10000 | 20a | | 3.7 (3.4-4.1) | >10000 |
| 95b | | 3.8 (3.2-4.6) | >10000 | | | | |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

続いて、ウレア置換基周辺のIle1025(Ile620 in FGFR1)およびHis1026(His621 in FGFR1)との相互作用を期待して、(トリフルオロメチル)フェニル基へ極性置換基を導入した (Table 6-3)。まず、最小の極性置換基としてメトキシ基を導入した**94i.n**を評価したところ、いずれもVEGFR2阻害活性は維持したもののFGFR1阻害活性は認められなかった。メトキシ基はIle620およびHis621と水素結合するには距離が不十分であると考え、よりサイズの大きな極性置換基を検討した。モルホリン体**94j,k,o,97**、ピペラジン体**94l,p**、およびピペリジン体**94m**を評価したところ、いずれもVEGFR2阻害活性は**20a**と比較し20倍以内の減

弱に留まった。一方、ピペラジン体**94l**は強力なFGFR1阻害活性(IC₅₀ = 14 nM)を示した。対応するモルホリン体**94k**は、**94l**と比較しFGFR1阻害活性(IC₅₀ = 4500 nM)が低かったことから、**94l**の末端窒素が非常に重要であることが判明した。化合物**94l**と同様に分子末端に窒素を有する**94m**および**94p**が、強力にFGFR1を阻害したことから、**94l**の末端窒素の重要性が示唆された。

Table 6-3

Effect of substitutions at the terminal benzene ring on kinase inhibitory activity^a

| Compd | R ⁴ | R ⁵ | VEGFR2 IC ₅₀ (nM) | FGFR1 IC ₅₀ (nM) |
|------------|----------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|
| 20a | H | H | 3.7 (3.4-4.1) | >10000 |
| 94i | OMe | H | 9.4 (7.9-11) | >10000 |
| 94j | | H | 61 (53-71) | 610 (500-740) |
| 94k | | H | 19 (16-22) | 4500 (3200-6200) |
| 94l | | H | 9.3 (8.3-10) | 14 (12-16) |
| 94m | | H | 12 (10-14) | 270 (240-290) |
| 94n | H | OMe | 20 (18-22) | >10000 |
| 97 | H | | 60 (45-80) | >10000 |
| 94o | H | | 23 (20-28) | >10000 |
| 94p | H | | 11 (10-13) | 390 (320-480) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

化合物**94l**は、**94k**に対しVEGFR2阻害活性も2倍増強したことから、**94l**の末端窒素はVEGFR2との相互作用にも寄与することが示唆された。そこで、**20a**とVEGFR2の複合体結晶構造を鋳型とし、**94l**とVEGFR2の結合モデルを作成した (Figure 6-3)。化合物**94l**は、**20a**で認められた相互作用を維持し、期待通り通りピペラジンの末端窒素はIle1025およびHis1026の主鎖カルボニルと水素結合し得る距離に存在していた。先に述べたように、これらのアミノ酸はFGFR1においても保存されている (Ile620、His621 in FGFR1) ことから、**94l**はFGFR1に対しても同様の相互作用を形成すると予想される。そして、この相互作用が、FGFR1の不活性コンフォメーション安定化に大きく寄与することが示唆された。

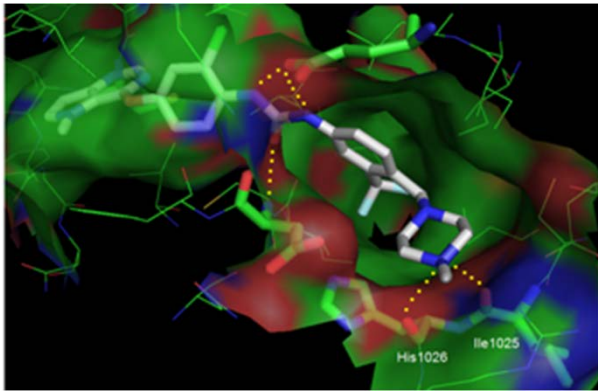


Figure 6-3 Binding model of **941** in complex with VEGFR2.

6.4 941の生物評価

VEGFR2/FGFR1デュアルキナーゼ阻害薬**941**を用いてHUVEC増殖阻害試験を行った (Table 6-4)。HUVECは、VEGF、FGFいずれの刺激によっても細胞増殖を引き起こす。まず、VEGF刺激下、すなわちVEGF/VEGFRシグナル活性化時におけるHUVEC増殖阻害能を評価したところ、VEGFR2阻害活性を示す**20a**、**941**ともにHUVECの増殖を強力に抑制した。一方、FGF刺激下、すなわちFGF/FGFRシグナル活性化時におけるHUVEC増殖阻害能を評価したところ、**941**は**20a**と比較し10倍以上強力にHUVECの増殖を抑制した。以上の結果、**941**は細胞内においてもVEGFR2/FGFR1デュアルキナーゼ阻害薬として機能することが判明した。

Table 6-4

In vitro activity of **20a** and **941**^a

| compd | IC ₅₀ (nM) | | | |
|------------|-----------------------|------------|---|---------------|
| | Kinase inhibition | | Growth inhibition of HUVEC ^b | |
| | VEGFR2 | FGFR1 | VEGF | FGF |
| 20a | 3.7 (3.4-4.1) | >10000 | 13 (8.6-20) | 230 (160-350) |
| 941 | 9.0 (8.3-10) | 14 (12-16) | 38 (30-48) | 20 (16-26) |

^a Numbers in parentheses represent 95% confidence interval.

^b inhibition of HUVEC proliferation.

6.5 まとめ

本章では、これまでtype 2キナーゼ阻害薬が見出されていないキナーゼを標的として、新規type 2キナーゼ阻害薬を創出する方法論を提案した。既知type 2キナーゼ阻害薬が有する3つの鍵相互作用部位に加え、さらに相互作用部位を導入することにより、キナーゼの不活性コンフォメーションをより安定化できると仮説を立てた。そして、仮説に従いピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体20aをベースにしたtype 2 VEGFR2/FGFR1デュアルキナーゼ阻害薬をデザインした。その結果、末端ベンゼン環にピペラジン構造を導入した941が強力なFGFR1を示すことを見出した。941とVEGFR2の結合モデルから、ピペラジンがIle1025およびHis1026と相互作用することを明らかにした。これらアミノ酸はFGFR1においても保存されていることから、941は同様の相互作用によりFGFR1の不活性コンフォメーションを安定化すると考察した。従って、type 2 FGFR1キナーゼ阻害薬は、既知type 2キナーゼ阻害薬が有する3つの鍵相互作用部位に加え、Ile620およびHis621と相互作用する置換基を導入することにより創出できると考えられる。同様の手法を用いることで、これまでtype 2キナーゼ阻害薬が見出されていないキナーゼを標的としたtype 2キナーゼ阻害薬の創出が可能になると考えられる。また、本章で見出した941は、既存の化合物とは異なるプロファイルを示すことから、これまで効果の認められなかったがんに対する新規抗がん剤となり得ると期待される。

実験の部

2-(4-Chloro-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-5-yl)ethyl benzoate (86a)

化合物 **2** の合成と同様の方法により、表題化合物 (93%) を淡黄色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.65 (2H, t, *J* = 5.0 Hz), 4.90 (2H, t, *J* = 5.0 Hz), 6.73 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 7.45 (2H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.61 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.78–7.81 (2H, m), 8.12 (1H, d, *J* = 3.3 Hz) 8.60 (1H, s).

4-Chloro-5-(2-methoxyethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine (86b)

化合物 **2** の合成と同様の方法により、表題化合物 (96%) を淡黄色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.19 (3H, s), 3.68 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 4.65 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 6.71–6.72 (1H, m), 7.97 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 8.60 (1H, s).

2-[2-(4-Chloro-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-5-yl)ethoxy]ethyl benzoate (86c)

化合物 **2** の合成と同様の方法により、表題化合物 (78%) を淡黄色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.66–3.69 (2H, m), 3.82–3.86 (2H, m), 4.27–4.30 (2H, m), 4.65–4.68 (2H, m), 6.60 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.46–7.51 (2H, m), 7.61–7.66 (1H, m), 7.80–7.84 (2H, m), 7.95 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.56 (1H, s).

2-[4-(4-Amino-3-chlorophenoxy)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-5-yl]ethyl benzoate (87a)

化合物 **3** の合成と同様の方法により、表題化合物 (79%) を白色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.69–4.70 (2H, m), 4.78–4.80 (2H, m), 5.31 (2H, brs), 6.61 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 6.87 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.45 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.60–7.65 (1H, m), 7.76–7.79 (2H, m), 7.91 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 8.26 (1H, s).

2-Chloro-4-[[5-(2-methoxyethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]oxy]aniline (87b)

化合物 **3** の合成と同様の方法により、表題化合物 (56%) を淡黄色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.19 (3H, s), 3.72 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 4.55 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 5.31 (2H, s), 6.56 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 6.83 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 6.97 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz), 7.20 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.75 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 8.26 (1H, d, *J* = 0.6 Hz).

2-[2-[4-(4-Amino-3-chlorophenoxy)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-5-yl]ethoxy]ethyl benzoate (87c)

化合物 **3** の合成と同様の方法により、表題化合物 (91%) を淡黄色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.68–3.71 (2H, m), 3.86–3.89 (2H, m), 4.29–4.32 (2H, m), 4.55–

4.59 (2H, m), 5.30 (2H, brs), 6.48 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 6.80 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 6.94 (1H, dd, $J=8.4, 2.4$ Hz), 7.18 (1H, d, $J=2.4$ Hz), 7.44–7.99 (2H, m), 7.60–7.66 (1H, m), 7.75 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 7.80–7.83 (2H, m), 8.23 (1H, s).

1-(2-Chloro-4-{{5-(2-hydroxyethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}oxy}phenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (88a)

化合物**87a** (300 mg, 0.734 mmol)、トリエチルアミン(1.00 mL, 7.34 mmol)のTHF(5 mL)溶液に、3-(トリフルオロメチル)フェニルイソシアナート(130 mg, 0.807 mmol)を加え、混合物を室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物を0.5 *N*水酸化ナトリウムメタノール溶液(2 mL)に溶解し、混合物を室温で30分間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチルより再結晶化し、表題化合物(93.4 mg, 26%)を白色固体として得た。

Mp 170–174 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.76–3.81 (2H, m), 4.45 (2H, t, $J=5.4$ Hz), 4.91 (1H, t, $J=5.4$ Hz), 6.59–6.60 (1H, m), 7.27 (1H, dd, $J=9.2, 2.7$ Hz), 7.32–7.33 (1H, m), 7.49–7.57 (3H, m), 7.79 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 8.03 (1H, brs), 8.15 (1H, d, $J=9.2$ Hz), 8.29 (1H, s), 8.43 (1H, s), 9.71 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₂H₁₇ClF₃N₅O₃: C, 53.72; H, 3.48; N, 14.24. Found: C, 53.61; H, 3.50; N, 14.25.

1-(2-Chloro-4-{{5-(2-methoxyethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}oxy}phenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (88b)

化合物**4**の合成と同様の方法により、表題化合物(47%)を白色固体として得た。Mp 177–178 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.22 (3H, s), 3.74 (2H, t, $J=5.3$ Hz), 4.57 (2H, t, $J=5.3$ Hz), 6.60 (1H, d, $J=3.2$ Hz), 7.27–7.34 (2H, m), 7.49–7.55 (3H, m), 7.80 (1H, d, $J=3.2$ Hz), 8.03 (1H, brs), 8.15 (1H, d, $J=9.0$ Hz), 8.30 (1H, s), 8.43 (1H, s), 9.71 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₃H₁₉ClF₃N₅O₃·0.5H₂O: C, 53.65; H, 3.92; N, 13.60. Found: C, 53.61; H, 3.67; N, 13.57.

1-[2-Chloro-4-{{5-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}oxy}phenyl]-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (88c)

化合物**88a**の合成と同様の方法により、表題化合物(17%)を淡黄色固体として得た。Mp 170–174 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.40–3.41 (4H, m), 3.81–3.85 (2H, m), 4.56–4.59 (3H, m), 6.60 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 7.27–7.34 (2H, m), 7.49–7.56 (3H, m), 7.83 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 8.03 (1H, brs), 8.14 (1H, d, $J=8.7$ Hz), 8.29 (1H, s), 8.44 (1H, s), 9.71 (1H, brs).

Anal. Calcd for C₂₄H₂₁ClF₃N₅O₄: C, 53.79; H, 3.95; N, 13.07. Found: C, 53.76; H, 4.01; N, 13.00.

4,6-Diiodo-*N*-methylpyrimidin-5-amine (90)

4,6-ジヨードピリジン-5-アミン(761 mg, 5.02 mmol)のTHF (300 mL)懸濁液に氷冷攪拌下、水素化ナトリウム(60%油性, 5.20 g, 130 mmol)を加え、0 °Cで30 分間攪拌した。反応混合物にメタンスルホン酸 メチル(13.2 mL, 156 mmol)を加え、室温で18時間攪拌した。氷冷下、反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、表題化合物(21.9 g, 70%)を茶色固体として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 3.03 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 3.78 (1H, brs), 8.04 (1H, s).

4-(4-Amino-3-chlorophenoxy)-6-iodo-*N*-methylpyrimidin-5-amine (91)

化合物90(9.60 g, 55.4 mmol)のNMP (200 mL)溶液に、炭酸カリウム(18.4 g, 133 mmol)および4-アミノ-3-クロロフェノール (8.80 g, 61.0 mmol)を加え、110 °Cにて1時間攪拌した。室温に冷却後、反応液に水を加え、酢酸エチルにて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、表題化合物(9.60 g, 46%)を茶褐色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.02 (3H, d, *J* = 5.3 Hz), 4.80 (1H, q, *J* = 5.3 Hz), 5.31 (2H, s), 6.82 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.90 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.77 (1H, s).

2-Chloro-4-({5-methyl-6-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)methyl]-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}oxy)aniline (92a)

化合物91(3.00 g, 7.97 mmol)のアセトニトリル(90 mL)/トリエチルアミン(90 mL)溶液に、2-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydro-2*H*-pyran (1.34 g, 9.56 mmol)、ジクロロビストリフェニルホスフィンパラジウム(0.28 g, 0.40 mmol)およびヨウ化銅(0.15 g, 0.80 mmol)を加えて、60 °Cにて1時間攪拌した。室温に冷却後、減圧下溶媒を留去し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)で精製した。こうして得られた化合物(2.10 g, 5.40 mmol)のDMF (42 mL)溶液に、ヨウ化銅(152 mg, 0.80 mmol)を加え、80 °Cにて1時間攪拌した。室温に冷却後、反応液に水を加え、酢酸エチルにて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、表題化合物(1.35 g, 64%)を茶褐色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.48–1.86 (6H, m), 3.56–3.64 (1H, m), 3.85–3.97 (1H, m), 4.06 (2H, s), 4.13 (3H, s), 4.71 (1H, d, *J* = 12.8 Hz), 4.73–4.76 (1H, m), 4.93 (1H, d, *J* = 12.8 Hz),

6.66 (1H, s), 6.83 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.99 (1H, dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.43 (1H, s).

2-Chloro-4-{{6-(methoxymethyl)-5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}oxy}aniline (92b)

化合物 **92a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (29%) を淡黄色固体として得た。
 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.34 (3H, s), 4.02 (3H, s), 4.66 (2H, s), 5.34 (2H, s), 6.62 (1H, s), 6.84 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.00 (1H, dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz), 7.22 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 8.25 (1H, s).

2-Chloro-4-{{5-methyl-6-{{1-methyl-1-{{(trimethylsilyl)oxy}ethyl}}-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}oxy}aniline (92c)

化合物 **92a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (60%) を淡黄色固体として得た。
 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 0.07 (9H, s), 1.76 (6H, s), 4.05 (2H, s), 4.31 (3H, s), 6.56 (1H, brs), 6.83 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.99 (1H, dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz), 7.20 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 8.45 (1H, brs).

1-(2-Chloro-4-{{6-(hydroxymethyl)-5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}oxy}phenyl)-3-{{3-(trifluoromethyl)phenyl}urea (93a)

化合物**92a** (1.35 g, 3.47 mmol)、トリエチルアミン(1.45 mL, 10.4 mmol)のTHF(27 mL)溶液に、3-(トリフルオロメチル)フェニル イソシアナート(543 μL , 3.89 mmol)を加え、混合物を室温で15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(NHシリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製した。こうして得られた化合物のエタノール(21 mL)溶液に

p-トルエンスルホン酸一水和物 (509 mg, 2.67 mmol)を加え、室温にて3時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残留物に飽和重曹水を加え、酢酸エチルにて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(105 mg, 8%)を白色固体として得た。

Mp 219–220 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.05 (3H, s), 4.73 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 5.55 (1H, t, $J = 5.4$ Hz), 6.57 (1H, s), 7.29–7.37 (2H, m), 7.51–7.58 (3H, m), 8.06 (1H, s), 8.17 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 8.28 (1H, s), 8.47 (1H, s), 9.75 (1H, s). Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}_3$: C, 53.72; H, 3.48; N, 14.24. Found: C, 53.81; H, 3.56; N, 14.27.

1-(2-Chloro-4-{{6-(methoxymethyl)-5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}oxy}pheny

1)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (93b)

化合物 **4** の合成と同様の方法により、表題化合物 (37%) を白色固体として得た。

Mp 179–181 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.33 (3H, s), 4.04 (3H, s), 4.69 (2H, s), 6.66 (1H, s), 7.29–7.35 (2H, m), 7.51–7.58 (3H, m), 8.05 (1H, s), 8.16 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.29 (1H, s), 8.47 (1H, s), 9.74 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₃H₁₉ClF₃N₅O₃·H₂O: C, 52.73; H, 4.04; N, 13.37. Found: C, 52.75; H, 3.92; N, 13.36.

1-(2-Chloro-4-[[6-(1-hydroxy-1-methylethyl)-5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]oxy]phenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (93c)

化合物 **92c** (0.95 g, 2.35 mmol)、トリエチルアミン(1.31 mL, 9.38 mmol)の THF(19 mL)溶液に、3-(トリフルオロメチル)フェニル イソシアナート(0.39 mL, 2.82 mmol)を加え、混合物を室温で 15 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製した。こうして得られた残渣のエタノール(12.3 mL)溶液に 1 *N*HCl (2.43 mL)を加え、室温にて 15 分間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残留物に飽和重曹水を加え、酢酸エチルにて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(550 mg, 45%)を白色固体として得た。

Mp 158–165 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.64 (6H, s), 4.31 (3H, s), 5.55 (1H, s), 6.51 (1H, s), 7.29 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz), 7.32–7.35 (1H, m), 7.53–7.56 (3H, m), 8.05 (1H, s), 8.16 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.25 (1H, s), 8.45 (1H, s), 9.73 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₄H₂₁ClF₃N₅O₃·H₂O: C, 53.59; H, 4.31; N, 13.02. Found: C, 53.87; H, 4.18; N, 13.07.

1-(2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl)-3-pyridin-2-ylurea (94a)

化合物 **19a**(275 mg, 1.00 mmol)、ピリジン(633 μL, 8.00 mmol)のDMA (2 mL)溶液に氷冷攪拌下、クロロギ酸フェニル(251 μL, 2.00 mmol)を加え、混合物を室温で1時間攪拌した。反応混合物に2-aminopyridine (188 mg, 2.00 mmol)を加え、90 °Cで15時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(299 mg, 76%)を白色固体として得た。

Mp 259–260 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.11 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.03–7.07 (1H, m), 7.25 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.33 (1H, dd, *J* = 9.2, 2.6 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.77–7.82 (1H, m), 7.80 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.31 (1H, s), 8.31–8.34 (1H, m), 8.40 (1H, d, *J*

= 9.2 Hz), 10.03 (1H, s), 11.83 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅ClN₆O₂: C, 57.80; H, 3.83; N, 21.29. Found: C, 57.66; H, 3.91; N, 21.01.

化合物 **94b–d** および **94h–p** は、**94a** の合成と同様の方法により合成した。

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-pyridin-3-ylurea (94b**)**

収率 23%. Mp 233–237 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.11 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.32 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz), 7.32–7.37 (1H, m), 7.57 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.98 (1H, ddd, *J* = 8.2, 2.5, 1.5 Hz), 8.17 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.22 (1H, dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz), 8.31 (1H, s), 8.49 (1H, brs), 8.63 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 9.56 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅ClN₆O₂: C, 57.80; H, 3.83; N, 21.29. Found: C, 57.81; H, 3.88; N, 21.11.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-pyridin-4-ylurea (94c**)**

収率 22%. Mp 233–237 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.11 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.33 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz), 7.46 (2H, d, *J* = 6.3 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 8.15 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.31 (1H, s), 8.39 (2H, d, *J* = 6.3 Hz), 8.56 (1H, brs), 9.78 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅ClN₆O₂·H₂O: C, 55.28; H, 4.15; N, 20.36. Found: C, 55.39; H, 4.17; N, 20.08.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[4-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea (94d**)**

収率 21%. Mp 259–260 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.09 (3H, s), 6.58–6.59 (1H, m), 7.31–7.38 (2H, m), 7.59 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.77–7.80 (2H, m), 8.28–8.31 (2H, m), 8.57 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 10.36 (1H, s), 10.61 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₄ClF₃N₆O₂·0.2H₂O: C, 51.50; H, 3.11; N, 18.02. Found: C, 51.48; H, 2.98; N, 18.16.

1-(3-*tert*-Butyl-1-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-{2-chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (94h**)**

収率 6%. Mp 194–196 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.22 (9H, s), 3.65 (3H, s), 4.10 (3H, s), 6.11 (1H, s), 6.60 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.30 (1H, dd, *J* = 9.3, 2.7 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.79 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.16 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 8.30 (1H, s), 8.61 (1H, s), 9.22 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₂H₂₄ClN₇O₂: C, 58.21; H, 5.33; N, 21.60. Found: C, 57.89; H, 5.31; N, 21.35.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (94i)

収率 33%. Mp 233–237 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.86 (3H, s), 4.10 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.24 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.30 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.59 (1H, dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.88 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 8.17 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.30 (1H, s), 8.37 (1H, brs), 9.51 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₂H₁₇ClF₃N₅O₃: C, 53.72; H, 3.48; N, 14.24. Found: C, 53.63; H, 3.47; N, 14.22.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[4-morpholin-4-yl-3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (94j)

収率 34%. Mp 147–150 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.80–2.83 (4H, s), 3.68–3.71 (4H, s), 4.10 (3H, s), 6.60 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.30 (1H, dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz), 7.54–7.63 (3H, m), 7.79 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.94 (1H, *J* = 2.1 Hz), 8.16 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 8.29 (1H, s), 8.42 (1H, s), 9.67 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₅H₂₂ClF₃N₆O₂: C, 54.90; H, 4.05; N, 15.37. Found: C, 54.67; H, 4.14; N, 15.17.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[4-(morpholin-4-ylmethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl]urea (94k)

収率 29%. Mp 149–151 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.30–2.40 (4H, m), 3.55–3.60 (6H, m), 4.10 (3H, s), 6.60 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 7.31 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz), 7.56–7.59 (2H, m), 7.68 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.79 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 8.00 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 8.18 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 8.30 (1H, s), 8.42 (1H, s), 9.70 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₆H₂₄ClF₃N₆O₂·H₂O: C, 53.94; H, 4.53; N, 14.52. Found: C, 53.86; H, 4.50; N, 14.27.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}urea (94l)

収率 23%. Mp 138–139 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.16 (3H, s), 2.20–2.45 (8H, m), 3.54 (2H, s), 4.10 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 7.31 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz), 7.56–7.67 (3H, m), 7.80 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 8.00 (1H, s), 8.18 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.30 (1H, s), 8.43 (1H, s), 9.70 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₇H₂₇ClF₃N₇O₂·1.2H₂O: C, 54.45; H, 4.98; N, 16.46. Found: C, 54.73; H, 4.98; N, 16.16.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-{4-[(1-methylpiperidin-4-yl)oxy]-3-(trifluoromethyl)phenyl}urea (94m)

収率 11%. Mp 137–139 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.65–1.75 (2H, m), 1.85–1.95 (2H, m), 2.19–2.35 (5H, m), 2.50–2.60 (2H, m), 4.10 (3H, s), 4.45–4.51 (1H, m), 6.60 (1H, d, *J*

= 3.0 Hz), 7.26–7.31 (2H, m), 7.52–7.55 (2H, m), 7.79 (1H, d, J = 3.0 Hz), 7.85 (1H, d, J = 2.4 Hz), 8.17 (1H, d, J = 9.6 Hz), 8.30 (1H, s), 8.33 (1H, s), 9.47 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{27}H_{26}ClF_3N_6O_3 \cdot 2H_2O$: C, 53.07; H, 4.95; N, 13.75. Found: C, 53.43; H, 4.80; N, 13.48.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-methoxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]urea (94n)

収率 21%. Mp 205–208 °C. 1H NMR (DMSO- d_6) δ 3.83 (3H, s), 4.11 (3H, s), 6.61 (1H, d, J = 3.0 Hz), 6.88 (1H, brs), 7.26 (1H, brs), 7.32 (1H, dd, J = 9.0, 2.7 Hz), 7.51 (1H, brs), 7.57 (1H, d, J = 2.7 Hz), 7.80 (1H, d, J = 3.0 Hz), 8.15 (1H, d, J = 9.0 Hz), 8.30 (1H, s), 8.47 (1H, brs), 9.76 (1H, brs). Anal. Calcd for $C_{22}H_{17}ClF_3N_5O_2 \cdot H_2O$: C, 51.82; H, 3.76; N, 13.74. Found: C, 51.98; H, 3.75; N, 13.80.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-(morpholin-4-ylmethyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]urea (94o)

収率 23%. Mp 134–136 °C. 1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.30–2.45 (4H, m), 3.30–3.61 (6H, m), 4.10 (3H, s), 6.60 (1H, d, J = 3.3 Hz), 7.26 (1H, s), 7.28 (1H, dd, J = 8.8, 2.6 Hz), 7.54 (1H, s), 7.56 (1H, d, J = 2.6 Hz), 7.78 (1H, d, J = 3.3 Hz), 7.94 (1H, s), 8.16 (1H, d, J = 8.8 Hz), 8.30 (1H, s), 8.40 (1H, s), 9.74 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{26}H_{24}ClF_3N_6O_3 \cdot H_2O$: C, 53.94; H, 4.53; N, 14.52. Found: C, 53.77; H, 4.39; N, 14.32.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-5-(trifluoromethyl)phenyl]urea (94p)

収率 7%. Mp 131–132 °C. 1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.15 (3H, s), 2.20–2.50 (8H, m), 3.52 (2H, s), 4.10 (3H, s), 6.60 (1H, d, J = 3.0 Hz), 7.23 (1H, s), 7.30 (1H, dd, J = 9.0, 2.7 Hz), 7.50 (1H, s), 7.56 (1H, d, J = 2.7 Hz), 7.79 (1H, d, J = 3.0 Hz), 7.94 (1H, s), 8.17 (1H, d, J = 9.0 Hz), 8.29 (1H, s), 8.40 (1H, s), 9.75 (1H, s). Anal. Calcd for $C_{27}H_{27}ClF_3N_7O_2 \cdot 1.5H_2O$: C, 53.96; H, 5.03; N, 16.31. Found: C, 53.92; H, 4.97; N, 16.01.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1*H*-pyrazol-4-yl]urea (94e)

化合物19a(275 mg, 1.0 mmol)およびトリエチルアミン(2.79 mL, 20 mmol)のジクロロメタン(10 mL)溶液に、トリホスゲン(297 mg, 1.00 mmol)を加え、室温にて30分攪拌した。4-アミノ-1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピラゾール (330 mg, 2.0 mmol)を加え、混合物を室温で4時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(NHシリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチル-ヘキサ

ンより再結晶化し、表題化合物(227 mg, 49%)を白色固体として得た。

Mp 227–231 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.10 (3H, s), 5.09 (2H, q, *J* = 9.2 Hz), 6.61 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.29 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz), 7.54 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.56 (1H, s), 7.79 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.97 (1H, s), 8.18 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.30 (1H, s), 8.32 (1H, brs), 9.25 (1H, brs). Anal. Calcd for C₁₉H₁₅ClF₃N₇O₂: C, 48.99; H, 3.25; N, 21.05. Found: C, 49.04; H, 3.14; N, 21.02.

化合物 **94f,g** は、**94e** の合成と同様の方法により合成した。

1-(1-*tert*-Butyl-1*H*-pyrazol-4-yl)-3-{2-chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (94f**)**

収率 7%. Mp 137–140 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.51 (9H, s), 4.10 (3H, s), 6.60 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.28 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz), 7.43 (1H, s), 7.53 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.79 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.85 (1H, s), 8.21 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.28 (1H, s), 8.30 (1H, s), 9.08 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₁H₂₂Cl N₇O₂: C, 57.34; H, 5.04; N, 22.29. Found: C, 57.23; H, 5.06; N, 22.14.

1-(5-*tert*-Butylisoxazol-3-yl)-3-{2-chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}urea (94g**)**

収率 36%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.30 (9H, s), 4.10 (3H, s), 6.47 (1H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.32 (1H, dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.19 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.30 (1H, s), 8.74 (1H, brs), 10.21 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₁H₂₁ClN₅O₃·0.4H₂O: C, 56.29; H, 4.90; N, 18.76. Found: C, 56.47; H, 4.90; N, 18.52.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[5-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]urea (95a**)**

化合物 **98a** (282 mg, 1.00 mmol)、化合物 **19a** (275 mg, 1.00 mmol)、ピリジン(633 mg, 8.00 mmol)および *N*-メチルピロリドン(2 mL)の混合物を 90 °C で 7 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル,酢酸エチル/メタノール)で精製後、酢酸エチルより再結晶化して表題化合物(228 mg, 49%)を白色固体として得た。

Mp 220–224 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.11 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.34 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.14 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.31 (1H, s), 8.48 (1H, m), 8.60 (1H, m), 8.65 (1H, brs), 8.77 (1H, m), 9.94 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₄ClF₃N₆O₂: C, 51.90; H, 3.05; N, 18.16. Found: C, 51.92; H, 2.95; N, 18.17.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[2-(trifluoromethyl)pyridin-4-yl]urea (95b)

化合物 **95a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (54%) を白色固体として得た。Mp 227–231 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.11 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.35 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz), 7.57 (1H, dd, *J* = 5.7, 1.7 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.09 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 8.12 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.31 (1H, s), 8.57 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.68 (1H, brs), 10.16 (1H, brs). Anal. Calcd for C₂₀H₁₄ClF₃N₆O₂·0.25H₂O: C, 51.40; H, 3.13; N, 17.98. Found: C, 51.38; H, 3.07; N, 17.88.

1-{2-Chloro-4-[(5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[3-morpholin-4-yl-5-(trifluoromethyl)phenyl]urea (97)

化合物**96**(1.00 g, 3.63 mmol)およびトリエチルアミン(2.50 mL, 18.2 mmol)のトルエン(30 mL)溶液にジフェニルホスホリル アジド (860 μL, 3.99 mmol)を加え、還流条件下4時間攪拌した。反応混合物を室温に冷却後、化合物**19a**(907 mg, 3.30mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製後、酢酸エチル/ヘキサンより再結晶化し、表題化合物(572 mg, 32%)を白色固体として得た。

Mp 211–215 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.16–3.19 (4H, m), 3.74–3.77 (4H, m), 4.10 (3H, s), 6.60 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 6.88 (1H, s), 7.18 (1H, s), 7.29–7.35 (2H, m), 7.56 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.79 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.17 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 8.30 (1H, s), 8.39 (1H, s), 9.60 (1H, s). Anal. Calcd for C₂₅H₂₂ClF₃N₆O₂: C, 54.90; H, 4.05; N, 15.37. Found: C, 54.66; H, 4.16; N, 15.15.

Phenyl [5-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]carbamate (98a)

化合物 **110**(780 mg, 4.80 mmol)とピリジン(1.56 mL, 19.3 mmol)の THF(10 mL)溶液に氷冷下、クロロギ酸フェニル(664 μL, 5.30 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応混合物を水で希釈後、酢酸エチルで抽出した。有機層を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン)で精製して表題化合物(712 mg, 52%)を白色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.17–7.23 (3H, m), 7.28–7.32 (1H, m), 7.39–7.47 (2H, m), 8.39 (1H, brs), 8.63 (1H, s), 8.72 (1H, d, *J* = 2.4 Hz).

Phenyl [2-(trifluoromethyl)pyridin-4-yl]carbamate (98b)

化合物 **98a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (46%) を白色固体として得た。 ¹H

NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.16–7.22 (2H, m), 7.26–7.33 (1H, m), 7.33 (1H, brs), 7.39–7.47 (2H, m), 7.58 (1H, dd, *J* = 5.7, 2.1 Hz), 7.85 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 8.62 (1H, d, *J* = 5.7 Hz).

4-Morpholin-4-yl-3-(trifluoromethyl)aniline (100)

化合物 **99** (564 mg, 2.70 mmol) の DMSO (20 mL) 溶液にモルホリン (2.35 g, 27.0 mmol) を加え、100 °C で 7 時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をメタノール (15 mL) に溶解し、パラジウム炭素 (50% 含水晶、15 mg) を加え、混合物を水素雰囲気下室温で 3 時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮後、乾燥し、表題化合物 (668 mg, 99%) を黄色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.69–2.72 (4H, m), 3.62–3.65 (4H, m), 5.37 (2H, brs), 6.75–6.81 (2H, m), 7.24 (1H, d, *J* = 8.7 Hz).

4-[(1-Methylpiperidin-4-yl)oxy]-3-(trifluoromethyl)aniline (101)

1-メチルピペリジン-4-オール (1.26 g, 6.03 mmol) の DMF (10 mL) 懸濁液に氷冷攪拌下、水素化ナトリウム (60% 油性, 398 mg, 9.94 mmol) を加え、0 °C で 30 分間攪拌した。反応混合物に化合物 **99** (1.51 g, 2.70 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。氷冷下、反応混合物を水 (50 mL) で希釈し、酢酸エチル (20 mL × 3) で抽出した。有機層を減圧濃縮後、ろ液を減圧濃縮後、残留物をメタノール (15 mL) に溶解し、パラジウム炭素 (50% 含水晶、10 mg) を加え、混合物を水素雰囲気下室温で 3 時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮後、乾燥し、表題化合物 (998 mg, 60%) を黒色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.56–2.67 (2H, m), 1.81–1.92 (2H, m), 1.99–2.20 (5H, m), 2.50–2.60 (2H, m), 4.24–4.30 (1H, m), 5.02 (2H, s), 6.75 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.8 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 8.5 Hz).

4-(Morpholin-4-ylcarbonyl)-3-(trifluoromethyl)aniline (103a)

化合物 **102a** (2.00 g, 8.51 mmol) のジクロロメタン (55 mL) 溶液に、0 °C で塩化オキサリル (3.65 mL, 42.4 mmol)、DMF (100 μL) を加え、1 時間攪拌した。反応溶媒及び塩化オキサリルを減圧留去後、残留物をジクロロメタン (20 mL) に溶解し、0 °C でモルホリン (2.50 mL, 22.7 mmol) を加えて 5 時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、残留物をメタノール (15 mL) に溶解し、パラジウム炭素 (50% 含水晶、100 mg) を加え、混合物を水素雰囲気下室温で 3 時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮後、乾燥し、表題化合物 (1.68 g, 72%) を黄色固体として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.10–2.40 (4H, m), 3.05–3.20 (2H, m), 3.50–3.65 (2H, m), 5.78 (2H, s), 6.75–6.79 (1H, m), 6.88 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 7.8 Hz).

4-[(4-Methylpiperazin-1-yl)carbonyl]-3-(trifluoromethyl)aniline (103b)

化合物103aの合成と同様の方法により、表題化合物 (84%)を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.10–2.40 (7H, m), 3.05–3.20 (2H, m), 3.50–3.65 (2H, m), 5.78 (2H, s), 6.75–6.79 (1H, m), 6.88 (1H, d, *J* = 1.8 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 7.8 Hz).

3-(Morpholin-4-ylcarbonyl)-5-(trifluoromethyl)aniline (103c)

化合物103aの合成と同様の方法により、表題化合物 (61%)を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.30–3.70 (8H, m), 5.80 (2H, s), 6.74 (1H, s), 6.78 (1H, s), 6.80 (1H, s).

3-[(4-Methylpiperazin-1-yl)carbonyl]-5-(trifluoromethyl)aniline (103d)

化合物103aの合成と同様の方法により、表題化合物 (75%)を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.21 (3H, s), 2.25–2.40 (4H, m), 3.25–3.40 (4H, m), 5.80 (2H, s), 6.69 (1H, s), 6.76 (1H, s), 6.89 (1H, s).

4-(Morpholin-4-ylmethyl)-3-(trifluoromethyl)aniline (104a)

化合物 103a (1.00 g, 3.65 mmol)の THF 溶液(25 mL)に、0 °C で 1.9 M 硫化ジメチルボラン・テトラヒドロフラン溶液(9.60 mL, 18.2 mmol)を滴下し、1 時間室温で攪拌後、還流条件下 3 時間攪拌した。反応溶液を室温に冷却後、6 *N* 塩酸(10 mL)を加え、30 分間攪拌後、還流条件下 2 時間攪拌した。反応溶液を 0 °C に冷却後、8 *N* NaOH(10 mL)を加え、水で希釈し、酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過した。ろ液を減圧濃縮後、乾燥し、表題化合物(1.88 g, 99%)を黄色油状物として得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.30–2.40 (4H, m), 3.39 (2H, s), 3.50–3.60 (4H, m), 5.45 (2H, s), 6.72–6.75 (1H, m), 6.85 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.30 (1H, d, *J* = 8.4 Hz).

4-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)aniline (104b)

化合物 104a の合成と同様の方法により、表題化合物 (99%)を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.25 (3H, s), 2.50–2.65 (4H, m), 2.90–3.05 (4H, m), 3.45 (2H, s), 5.48 (2H, s), 6.58 (1H, s), 6.72 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 6.85 (1H, d, *J* = 9.0 Hz).

3-(Morpholin-4-ylmethyl)-5-(trifluoromethyl)aniline (104c)

化合物 104a の合成と同様の方法により、表題化合物 (72%)を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.30–2.40 (4H, m), 3.36 (2H, s), 3.50–3.60 (4H, m), 5.54 (2H, s), 6.69 (1H, s), 6.72 (1H, s), 6.77 (1H, s).

3-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]-5-(trifluoromethyl)aniline (104d)

化合物 **104a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (50%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.28 (3H, s), 2.60–2.70 (4H, m), 2.95–3.05 (4H, m), 3.43 (2H, s), 5.56 (2H, s), 6.66–6.76 (3H, m).

1-*tert*-Butyl-4-nitro-1*H*-pyrazole (106a)

4-ニトロピラゾール(1.13 g, 10 mmol)と 2-ブロモ-2-メチルプロパン(17.81 g, 130 mmol)の DMF(50 mL)溶液に炭酸カリウム(21.56 g, 156 mmol)を加えて 80 °C で 3 日間攪拌した。反応混合物を水(200 mL)で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水(50 mL)、飽和食塩水(50 mL)で洗浄後、減圧濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)で精製して表題化合物 (1.13 g, 67%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.63 (9H, s), 8.09 (1H, s), 8.24 (1H, s).

4-Nitro-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1*H*-pyrazole (106b)

化合物 **106a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (96%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.77 (2H, q, $J=8.1$ Hz), 8.16 (1H, s), 8.29 (1H, s).

1-*tert*-Butyl-1*H*-pyrazol-4-amine (107a)

化合物**106a** (1.10 g, 6.50 mmol)のメタノール(20 mL)溶液にパラジウム炭素(50%含水品、442 mg)を加えて水素雰囲気下、室温で3時間攪拌した。触媒をろ別後、ろ液を減圧濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)で精製して表題化合物(838 mg, 92%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.53 (9H, s), 2.86 (2H, brs), 7.15 (1H, s), 7.19 (1H, s).

1-(2,2,2-Trifluoroethyl)-1*H*-pyrazol-4-amine (107b)

化合物 **107a** の合成と同様の方法により、表題化合物 (89%)を白色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.98 (2H, brs), 4.57 (2H, q, $J=8.4$ Hz), 7.09 (1H, s), 7.25 (1H, s).

5-(Trifluoromethyl)pyridin-3-amine (110)

化合物**108**(6.48 g, 30.0 mmol)、ギ酸アンモニウム (3.78 g, 60.0 mmol)、メタノール(15 mL)の混合物に氷冷攪拌下、パラジウム炭素(50%含水本、2.59 g)を加え室温で2時間攪拌した。混合物をジエチルエーテル(60 mL)で希釈し、不溶物をろ去した。ろ液より大部分のジエチルエーテルを注意深く減圧留去して粗製3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピリジン (**109**)のメタノール溶液を得た(**109** は揮発性が高い)。得られた**109**のメタノール溶液、塩化銅(I)(1.64 g)、28%アンモニア水(45 mL)の混合物をオートクレーブ中、170 °Cで48時間攪拌した。室温まで冷却後、混合物をジクロロメタンで抽出した。有機層を減圧濃縮後、残

留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)で精製して、表題化合物(786 mg, 16%)を無色油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 3.92 (2H, brs), 7.15 (1H, s), 8.24 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 8.27 (1H, s).

2-(Trifluoromethyl)pyridine 1-oxide (112)

化合物 **111**(12.1 g, 82.0 mmol)のジクロロメタン(96 mL)溶液に氷冷攪拌下、*m*CPBA(70%, 22.24 g, 90.2 mmol)を加え、混合物を室温で24時間攪拌した。反応混合物に5%チオ硫酸ナトリウム水溶液(100 mL)と飽和重曹水(100 mL)を加え室温で1時間攪拌した。有機層を分取し、水層をジクロロメタンで抽出した。有機層を減圧濃縮し、残留物をカラムクロマトグラフィー(NH シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)で精製して表題化合物 (6.31 g, 47%)を無色油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7.34 (1H, t, $J = 7.9$ Hz), 7.40–7.50 (1H, m), 7.70 (1H, dd, $J = 7.9, 1.9$ Hz), 8.31 (1H, d, $J = 6.6$ Hz).

2-(Trifluoromethyl)pyridin-4-amine (114)

化合物**112**(6.30 g, 38.6 mmol)に0 °Cで濃硫酸(20 mL)、続いて発煙硝酸(d 1.52, 20 mL)を加え、混合物を130 °Cで5時間攪拌した。室温まで冷却後、混合物を氷水(100 g)に注いだ。混合物に氷冷下、8 *N*NaOHを加えてアルカリ性とした後、ジクロロメタンで抽出した。有機層を減圧濃縮後、残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル/ヘキサン)に付した。最初に4-ニトロ-2-(トリフルオロメチル)ピリジン(**113a**)(1.05 g, 14%)が溶出し、続いて4-ニトロ-2-(トリフルオロメチル)ピリジン 1-オキシド(**113b**)(968 mg, 12%)が溶出した。化合物**113a**(1.05 g, 5.46 mmol)とメタノール(20 mL)の混合物にパラジウム炭素(50%含水品、420 mg)を加え水素雰囲気下、室温で6時間攪拌した。触媒をろ去後、ろ液を減圧濃縮し**114**(908 mg, quant.)を得た。化合物**113b**(966 mg, 4.64 mmol)をメタノール(20 mL)に溶解し、パラジウム炭素(50%含水品、386 mg)を加え水素雰囲気下、室温で8時間攪拌した。触媒をろ去後、ろ液を減圧濃縮し**114**(772 mg, quant)を得た。

113a: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.27 (1H, dd, $J = 5.1, 2.1$ Hz), 8.43 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 9.09 (1H, d, $J = 5.1$ Hz).

113b: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.28 (1H, dd, $J = 7.1, 3.0$ Hz), 8.36 (1H, d, $J = 7.1$ Hz), 8.53 (1H, d, $J = 3.0$ Hz).

114: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 4.40 (2H, brs), 6.64 (1H, dd, $J = 5.6, 2.4$ Hz), 6.89 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.31 (1H, d, $J = 5.6$ Hz).

Cell proliferation assay (with FGF stimulation)

VEGFの代わりにFGF(10 ng/mL)を用い、第2章で述べた方法と同様の方法により、FGF刺激下における化合物の細胞増殖阻害活性を測定した。

参考文献

- 1) Carter, T. A.; Wodicka, L. M.; Shah, N. P.; Velasco, A. M.; Fabian, M. A.; Treiber, D. K.; Milanov, Z. V.; Atteridge, C. E.; Biggs, W. H. 3rd; Edeen, P. T.; Floyd, M.; Ford, J. M.; Grotzfeld, R. M.; Herrgard, S.; Insko, D. E.; Mehta, S. A.; Patel, H. K.; Pao, W.; Sawyers, C. L.; Varmus, H.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 11011-11016.
- 2) O'Hare, T.; Shakespeare, W. C.; Zhu, X.; Eide, C. A.; Rivera, V. M.; Wang, F.; Adrian, L. T.; Zhou, T.; Huang, W. S.; Xu, Q.; Metcalf, C. A. 3rd; Tyner, J. W.; Loriaux, M. M.; Corbin, A. S.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Keats, J. A.; Wang, Y.; Sundaramoorthi, R.; Thomas, M.; Zhou, D.; Snodgrass, J.; Commodore, L.; Sawyer, T. K.; Dalgarno, D. C.; Deininger, M. W.; Druker, B. J.; Clackson, T. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 401-412.
- 3) Kufareva, I.; Abagyan, R. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7921-7932.
- 4) Beenken, A.; Mohammadi, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 235-253.
- 5) Casanovas, O.; Hicklin, D. J.; Bergers, G.; Hanahan, D. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 299-309.
- 6) Hilberg, F.; Roth, G. J.; Krssak, M.; Kautschitsch, S.; Sommergruber, W.; Tontsch-Grunt, U.; Garin-Chesa, P.; Bader, G.; Zoepfel, A.; Quant, J.; Heckel, A.; Rettig, W. *J. Cancer Res.* **2008**, *68*, 4774-4782.
- 7) Renhowe, P. A.; Pecchi, S.; Shafer, C. M.; Machajewski, T. D.; Jazan, E. M.; Taylor, C.; Antonios-McCrea, W.; McBride, C. M.; Frazier, K.; Wiesmann, M.; Lapointe, G. R.; Feucht, P. H.; Warne, R. L.; Heise, C. C.; Menezes, D.; Aardalen, K.; Ye, H.; He, M.; Le, V.; Vora, J.; Jansen, J. M.; Wernette-Hammond, M. E.; Harris, A. L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 278-292.
- 8) Matsui, J.; Yamamoto, Y.; Funahashi, Y.; Tsuruoka, A.; Watanabe, T.; Wakabayashi, T.; Uenaka, T.; Asada, M. *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 664-671.
- 9) Ledermann, J. A.; Hackshaw, A.; Kaye, S.; Jayson, G.; Gabra, H.; McNeish, I.; Earl, H.; Perren, T.; Gore, M.; Persic, M.; Adams, M.; James, L.; Temple, G.; Merger, M.; Rustin, G. *J Clin Oncol* **2011**, *29*, 3798-804.
- 10) Liang, G.; Liu, Z.; Wu, J.; Cai, Y.; Li, X. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 531-541.

第7章 総括

本研究では、薬効面、安全面とともに優れた抗がん剤の創製を目的に、type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬の設計および合成を行った (Figure 7-1)。

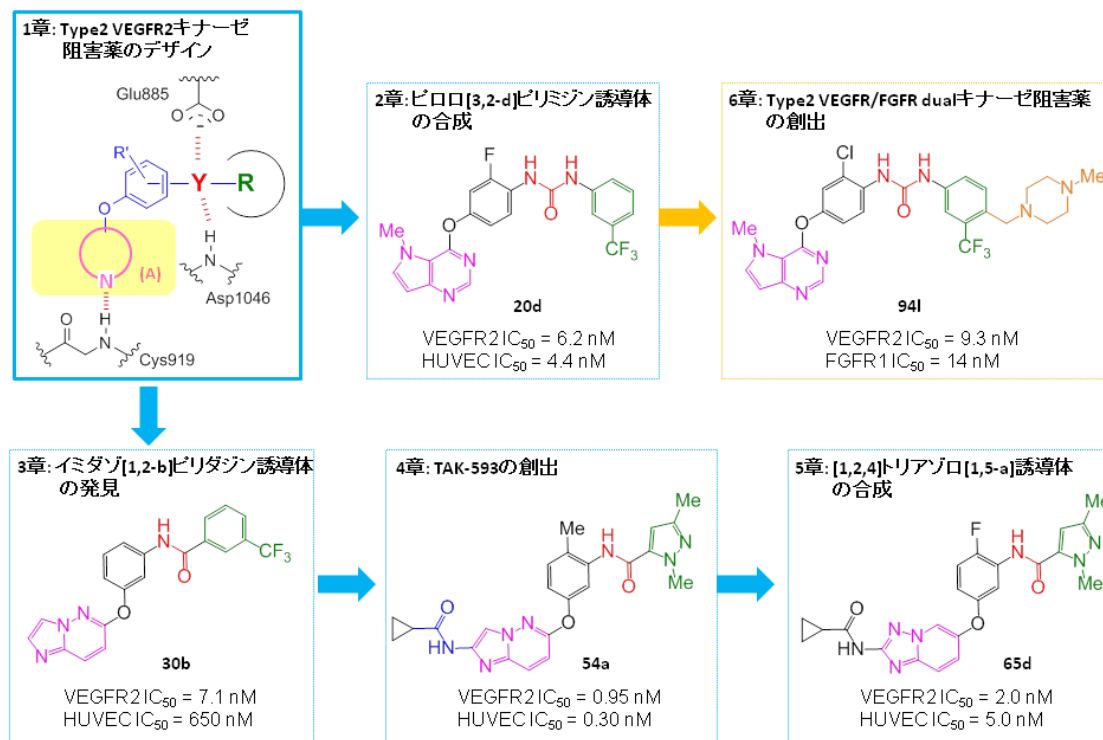


Figure 7-1

第1章: 新規抗がん剤として、血管新生を阻害する VEGFR2 キナーゼ阻害薬に注目した背景について述べた。そして、既存の type 1 VEGFR2 キナーゼ阻害薬が有する安全面・薬効面での課題を克服する目的で、VEGFR2 の不活性コンフォメーションに結合する type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬をデザインした。既知 type 2 キナーゼ阻害薬を解析し、ヒンジバインダー(A)、水素結合ドナー/アクセプター(Y)、脂溶性基(R)を適切に配置することにより、type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬が見出せると仮説を立てた。

第2章: 第1章のデザインに基づき、ピロロ[3,2-d]ピリミジンをヒンジバインダーとする化合物を合成した。最適な 4-フェノキシ基上置換基を探索した結果、フェニルウレイドを有する 20d が強力な VEGFR2 阻害活性を示すことを見出した。化合物 20d と VEGFR2 の複合体 X 線結晶構造を取得し、20d が type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬であることを明らかとすることにより、第1章で示したデザイン仮説の妥当性を証明した。また、20d が既知

type 1 VEGFR2 キナーゼ阻害薬と比較してキナーゼ選択性が高いことを見出し、期待通り type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬が安全面で優れることを示した。

第 3 章：ヒンジバインダーの変換を試み、非ピリジン/ピリミジン系のイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンを発見した。6 位に導入したフェノキシ基上の置換基を探索することにより、強力な VEGFR2 阻害活性を示すアミド誘導体 **30b** を創出した。そして、化合物 **30b** と **20d** のキナーゼ阻害プロファイルが異なるデータを取得し、ヒンジバインダーを変換することによりプロファイルの異なる化合物を創出できる可能性を示した。

第 4 章：前章で見出した **30b** のイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン 2 位にアミノ基を導入することにより、飛躍的に HUVEC 増殖阻害活性が向上することを見出した。最適化の結果、強力な *in vitro* 活性に加え良好な経口吸収性を示す **54a** を見出すことに成功した。化合物 **54a** は、マウス抗腫瘍試験において優れた薬効を示し、顕著な有害事象も認められなかったことから、本化合物(**TAK-593**)を臨床試験実施化合物として選択した。

第 5 章：新規ヒンジバインダーを見出す目的で、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンの変換を試みた。X 線結晶構造と電子密度計算結果を利用し、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンと同等以上の結合能を有する新規 5,6 縮合環をデザイン、合成した。溶解度向上を指向した変換を併せて行うことにより、*in vitro* 活性と物性に優れた[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン **65d** を見出すことに成功した。また、**65d** が結合速度、解離速度ともに極めて遅いことを示し、type 2 VEGFR2 キナーゼ阻害薬が薬効面においても優れた特長を有することを明らかとした。

第 6 章：第 1 章のデザイン仮説を発展させ、これまで type 2 キナーゼ阻害薬が見出されていない FGFR1 キナーゼに対する阻害活性を付与した、新規 type 2 VEGFR2/FGFR1 デュアルキナーゼ阻害薬を創出する方法論を提案した。ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン誘導体 **20a** が有する 3 つの鍵相互作用部位(A、Y、R)に加え、さらに相互作用部位を導入することにより FGFR1 の不活性コンフォメーションを安定化できると考え、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン部位および末端ベンゼン環を修飾した。その結果、末端ベンゼン環にピペラジン構造を導入した **94l** が強力な FGFR1 を示すことを見出した。さらに、結合モデルを構築し、FGFR1 の不活性コンフォメーション安定化に重要な相互作用を予測した。本手法は、FGFR1 キナーゼ以外のキナーゼを標的とする阻害薬の創出にも適用可能と考えられる。

本論文で確立した type 2 キナーゼ阻害薬のデザイン手法は、今後のキナーゼ阻害薬研究を大きく前進させるものである。また、本論文で見出された化合物を用いた薬物治療は、新たながん治療オプションになり得ると確信する。

本論文に関わる研究業績

・論文

1. Oguro, Y.; Miyamoto, N.; Okada, K.; Takagi, T.; Iwata, H.; Awazu, Y.; Miki, H.; Hori, A.; Kamiyama, K.; Imamura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7260.
2. Oguro, Y.; Miyamoto, N.; Takagi, T.; Okada, K.; Awazu, Y.; Miki, H.; Hori, A.; Kamiyama, K.; Imamura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7150.
3. Miyamoto, N.; Oguro, Y.; Okada, K.; Takagi, T.; Iwata, H.; Awazu, Y.; Miki, H.; Hori, A.; Imamura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 7051.
4. Miyamoto, N.; Sakai, N.; Hirayama, T.; Miwa, K.; Oguro, Y.; Oki, H.; Okada, K.; Takagi, T.; Iwata, H.; Awazu, Y.; Yamasaki, S.; Takeuchi, T.; Miki, H.; Hori, A.; Imamura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2333.
5. Oguro, Y.; Cary, D. R.; Miyamoto, N.; Tawada, M.; Iwata, H.; Miki, H.; Hori, A.; Imamura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4714.

・学会発表

1. 大黒裕哉、宮本直樹、岡田健吾、高木輝文、岩田英久、三木啓司、堀晃、神山圭司、今村真一、ピロロ[3,2-*d*]ピリミジン骨格を有する新規Type 2 VEGFR2キナーゼ阻害剤の合成と生物活性, 第29回メディシナルケミストリーシンポジウム, 京都, 2010年11月17-19日
2. 大黒裕哉, 新規VEGFR2キナーゼ阻害薬TAK-593の合成研究, 日本薬学会第133回年会, 横浜, 2013年3月27-30日

謝辞

本論文の発表および作成にあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました東海大学 工学部 応用化学科 稲津敏行教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり、御指導ならびに御助言を賜りました東海大学 工学部 応用化学科 長瀬裕教授、理学部 化学科 岩岡道夫教授、糖鎖科学研究所 蟹江治教授、医学部 医学科 木村穰教授、大阪大学 蛋白質研究所 北條裕信教授、に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さいました、武田薬品工業株式会社 元取締役 左右田隆博士、元取締役 大川滋紀博士に深く感謝致します。

本研究は、医薬研究本部 炎症創薬ユニット主席部員 神山圭司博士、癌創薬ユニット主席研究員 今村真一博士の御指導のもとに行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、御指導と御鞭撻を頂きました、環境安全室長 田坂昭弘博士、医薬研究本部主席部員 石原雄二博士、本部長室主席部員 内藤健一郎氏、本部長室主席部員 中西理博士に深く感謝致します。

本研究の共同研究者であり、常に適切な御助言と御援助を頂きました、化学研究所 宮本直樹氏、坂井望博士、得能僚資博士、主席研究員 渡邊浩之博士、主席研究員 川本哲治博士、癌創薬ユニット 平山孝治氏、主席研究員 Cary Douglas 博士、炎症創薬ユニット 永宮裕之博士、リサーチマネージャー 一川隆史博士、循環代謝創薬ユニット 久保修氏、主席研究員 北崎智幸博士、本部長室主席部員 錦見裕司博士、CMC 研究センター 三輪憲弘氏、小谷悦郎氏、主席部員 Hird Nicholas 博士に心から感謝致します。

本研究の受容体結合モデル作成および X 線結晶構造解析を御担当頂きました化学研究所 高木輝文氏、多和田倫子氏、主席研究員 遠藤聡史博士、リサーチマネージャー 田中稔祐博士、生物分子研究所 沖英幸氏、岡田健吾博士、廣川亜紀氏、研究業務部主席部員 藤島聡氏、中枢創薬ユニット主席部員 羽深典之博士、CMC 研究センター 岩本圭司博士、武田カリフォルニア Snell Gyorgy 博士に深謝致します。本研究の薬理試験を御担当頂きました XVGen 創薬ユニット 土屋俊太郎氏、山崎緑氏、主席研究員 堀晃博士、炎症創薬ユニット 栗津紀香氏、CMSO オフィス主席部員 長瀬由典氏、癌創薬ユニット 水谷明夫博士、梶 雄一氏、中村一英博士、リサーチマネージャー 引地裕一博士、中枢創薬ユニット 井藤勇輝氏、信頼保証質主席部員 北原治氏、研究業務部主席部員 三木啓司博士、生物分子研究所 岩田英久博士、邊田勉氏、吉田妙子氏、山東尚氏、主席研究員 伊藤隆司氏、リサーチマネージャー 神崎直之氏、総務人事センター 中埜智栄美氏、医薬研究本部 主席部員 木村宏之博士に深謝致します。本研究の DMPK 試験をご担当頂きました生物分子研究所 山崎誠司氏、主席研究員 山口昌史氏、上口英則氏、薬物動態研究所 渡辺由紀子氏、竹内敏之博士、CMC 研究センター 道圓公美子 氏、リサーチマネ

ージャー 池田幸弘博士に深謝致します。

また、本論文に関し、御配慮と御助言を頂きました、化学研究所長 内川治博士、癌創薬ユニットリサーチマネージャー 石川智康博士、中枢創薬ユニットリサーチマネージャー 黒板孝信博士、中枢創薬ユニット副ユニット長 平井圭介博士に深く感謝致します。

武田薬品工業株式会社 医薬研究本部

大黒裕哉