

Janus kinase 3 を標的とした
新規免疫調節剤の合成研究

2018 年

中島 豊

目次

	頁
序論	1
本論	9
第一章 JAK3 阻害活性を有する新規 1 <i>H</i> -ピロロ[2,3- <i>b</i>]ピリジン誘導体の創出	
第一節 合成方針	9
第二節 1 <i>H</i> -ピロロ[2,3- <i>b</i>]ピリジン誘導体の合成	10
第三節 1 <i>H</i> -ピロロ[2,3- <i>b</i>]ピリジン誘導体の構造活性相関	13
第四節 化合物 12c および化合物 9k の薬物動態評価	20
第五節 1 <i>H</i> -ピロロ[2,3- <i>b</i>]ピリジン誘導体のドッキング計算解析	21
第六節 第一章のまとめ	24
第二章 JAK3 阻害活性および経口吸収性が向上した新規 1 <i>H</i> -ピロロ[2,3- <i>b</i>]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の創出	
第一節 合成方針	25
第二節 1 <i>H</i> -ピロロ[2,3- <i>b</i>]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の合成	26
第三節 1 <i>H</i> -ピロロ[2,3- <i>b</i>]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の構造活性相関	31
第四節 hERG 阻害作用減弱の合成方針	34
第五節 化合物 37 の創出	36
第六節 化合物 37 のドッキング計算解析	40
第七節 化合物 37 の薬物動態評価	42
第八節 第二章のまとめ	44
第三章 JAK3 阻害活性を有する新規 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の創出	
第一節 合成方針	45
第二節 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の合成	46
第三節 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の構造活性相関	50
第四節 化合物 64 のドッキング計算解析	57
第五節 化合物 64 の薬物動態評価	59
第六節 第三章のまとめ	60
第四章 ラット心移植試験における <i>in vivo</i> 薬効評価	
第一節 化合物 37 および化合物 64 の <i>in vivo</i> 薬効評価	61

第二節 第四章のまとめ	63
結論	64
実験の部	66
謝辞	103
参考文献	104

略号表

Ac	acetyl
ATP	adenosine triphosphate
AUC	area under the curve
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
Bu	butyl
CDI	carbonyldiimidazole
CNI	calcineurin inhibitor
DCE	dichloroethane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMI	1,3-dimethyl-2-imidazolidinone
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
Et	ethyl
<i>F</i>	bioavailability
Hex	hexyl
hERG	human ether-a-go-go-related gene
HLA	human leukocyte antigen
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
IL	interleukin
im	intramuscular
IPE	diisopropyl ether
iv	intravenous
JAK	Janus kinase
Me	methyl
MHC	major histocompatibility complex
Ms	methylsulfonyl
MST	median survival times
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
po	oral
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
Ph	phenyl
RA	rheumatoid arthritis
SEM	2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran

TIPS	triisopropylsilyl
TMS	trimethylsilyl
TYK2	tyrosine kinase 2

序論

臓器移植の概要

臓器移植は腎臓、心臓、肺、肝臓、膵臓、小腸等の臓器が機能不全に陥った際に、他者の健康な臓器で置換することにより、失われた機能を回復する医療である。^{1,2)} 臓器移植における臓器提供者（ドナー）および臓器受容者（レシピエント）に関して、同じ種属で異なる遺伝子を持つ関係を同種（アロ）、一卵性双生児のように同じ遺伝子をもつ関係を同系という。他者の臓器を移植する場合は通常、同種間で行われるが、その際、レシピエントは非自己であるドナーの移植臓器に対して、リンパ球応答や抗体産生等の免疫反応、すなわち拒絶反応を起こす。同種間で免疫反応を引き起こす抗原はアロ抗原といい、臓器移植時には多様なアロ抗原が存在することが拒絶反応の要因である。主要組織適合性遺伝子複合体（**major histocompatibility complex: MHC**）はアロ抗原となる蛋白を支配する遺伝子群であり、ヒトにおいては、ヒト白血球型抗原（**human leukocyte antigen: HLA**）と呼ばれる。臓器移植の際には、HLA が一致したドナーを選ぶことが拒絶反応を少なくするために重要である。しかしながら、HLA は遺伝的多型を有しており、多くの対立遺伝子が存在するため、HLA が一致したドナーを見つけることは容易では無い。また、HLA が完全に一致していても、他の蛋白の遺伝的多型が拒絶反応を引き起こす場合もある。したがって、臓器移植の際は免疫抑制作用を有する薬剤等を用いてレシピエントの免疫反応を調節することが必要である。

免疫調節剤の開発経緯

臓器移植時に起こる拒絶反応を抑制し、移植片を長期に生着させることを目的に、免疫抑制作用を有する種々の薬剤が開発された。^{3,4)} 移植医療が行われ始めた 1960～1970 年代は、ステロイド剤およびプリン核酸合成阻害剤である **azathioprine** の併用療法が主に用いられられた。⁵⁾ ステロイド剤は核内受容体に作用して広範な遺伝子発現を抑制し、免疫反応に関与する種々のサイトカイン産生を阻害することで免疫抑制作用を示す。また、**azathioprine** は細胞核内での DNA 合成経路を阻害し、リンパ球を含む種々の細胞増殖を阻害することで免疫抑制作用を示す。しかしながら、これらの薬剤は、拒絶反応の抑制に対する有効性の点で満足がいくものではなかった。その後、カルシニューリン阻害剤（**calcineurin inhibitor: CNI**）である **cyclosporine A** および **tacrolimus** が見い出され、急性期の拒絶反応を強く抑制することが明らかとなり、CNI は臓器移植において中心的に用いられるようになった。^{5,6)} その作用機序は、ヘルパーT 細胞の細胞質内でシクロフィリンおよび FK 結合蛋白と結合し、カルシニュー

ーリン活性を阻害することでサイトカイン産生を抑制し、T細胞の増殖を阻害する。CNIは強力な免疫抑制作用を示すことから、1990年代以降、種々の臓器移植に用いられるようになり、移植成績の向上および臓器移植医療の進展に大きく貢献した。また、2000年代には、プリン核酸合成のうち、リンパ球系細胞に存在する *de novo* 経路を阻害することでT細胞およびB細胞の増殖を阻害する *mycophenolate mofetil* が用いられるようになった。^{5,7)} 現在、臓器移植時の免疫療法はCNIを主剤とし、ステロイド剤および *mycophenolate mofetil* を併用剤として用いることが基本とされている。これらの薬剤により臓器移植試験の成績は大きく向上し、2010～2014年に日本で実施された腎移植試験の調査では、移植1年後の生存率および生着率は、生体腎移植において99.1%および98.7%を示し、献腎移植において97.8%および96.4%を示している。⁸⁾

既存の薬剤による免疫抑制療法は、拒絶反応の抑制に対して高い効果を示す一方で、薬剤の標的が免疫系以外の広範な細胞に存在するため、目的とする免疫系細胞以外へ作用することが課題と考えられる。また、CNIの免疫系以外の作用として、主に腎障害作用等が報告されているが、その作用発現は薬剤の血中濃度の上昇に相関するため、CNIの使用時には血中濃度を適切に管理、調節する必要がある。^{3,4,9)}

近年、免疫系に関与する細胞の分化、増殖に重要な働きをするシグナル伝達経路中の特定の分子を標的とした薬剤の研究が進められている。¹⁰⁾ 特定の標的分子に作用し、免疫反応のシグナル伝達を特異的に調節することができれば、広範な作用を示す従来の免疫抑制療法と比較して、より免疫系に特異的な作用が期待できる。このような新規作用機序に基づく免疫調節剤は、現行の薬剤を代替することや、併用効果により使用する薬剤投与量を減量させる可能性がある。

拒絶反応の作用機序

臓器移植時の急性期におこる拒絶反応は、サイトカインの一種であるインターロイキン-2 (interleukin-2: IL-2) の産生およびIL-2シグナル伝達経路が深く関与している。¹¹⁾ 拒絶反応は、外部抗原である移植片由来の蛋白がアロ抗原として抗原提示細胞に認識され、ヘルパーT細胞へ抗原提示されることにより開始する。抗原提示により活性化されたヘルパーT細胞はIL-2を産生し、IL-2はヘルパーT細胞のさらなる活性化を誘導すると共に、T細胞の分化および増殖を促進する。分化したヘルパーT細胞は、他の種々のサイトカインを産生することで、細胞障害性T細胞、B細胞およびマクロファージ等を活性化する。これらの活性化された免疫系細胞が細胞障害、抗体産生および貪食作用等により移植片を攻撃し、移植臓器の機能不全を引き起こす (Figure 1)。このように急性期の拒絶反応にはIL-2の産生およびIL-2シグナル伝達によるヘルパーT細胞の分化や増殖が関与している。既存の免疫抑制療法の主剤であ

る CNI は T 細胞の IL-2 産生を抑制することで強い免疫抑制作用を示すことが明らかとなっている。したがって、IL-2 シグナル伝達を阻害する免疫調節剤は、移植時の拒絶反応の抑制に対して有効であると考えられる。

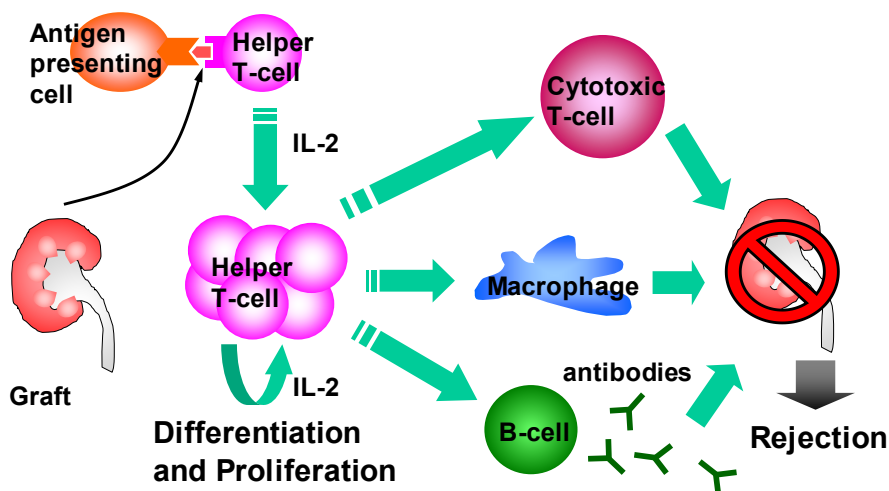


Figure 1. Mechanism of transplant rejection

JAK3 の機能

Janus kinase 3 (JAK3) は細胞質内に存在するチロシンリン酸化酵素 (チロシンキナーゼ) である JAK ファミリーの一つである。¹²⁻¹⁶⁾ JAK ファミリーは、JAK1、JAK2、JAK3 および TYK2 から成り、それぞれが対応するインターロイキン、増殖因子およびインターフェロン等のサイトカインを介したシグナル伝達に関与している。¹²⁻¹⁶⁾ その中で、JAK3 は IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 および IL-15 等の受容体に共通の γ_c 鎖上に結合しており、特に IL-2 刺激による STAT5 のリン酸化および核内移行のシグナル伝達を介して、T 細胞の分化および増殖に深く関与している (Figure 2)。細胞膜上の IL-2 受容体は細胞質側で JAK3 と結合しており、IL-2 刺激により JAK3 が活性化される。活性化された JAK3 はサイトカイン受容体をリン酸化すると共に、細胞質内に存在するシグナル伝達性の転写因子である STAT5 をリン酸化する。リン酸化された STAT5 は二量体を形成し、この二量体が核内に移行することで遺伝子発現の転写活性化が引き起こり、T 細胞の分化および増殖が起きる。JAK3 の免疫系への関与に関しては、重症複合免疫不全症の患者において、遺伝的に JAK3 の変異や JAK3 発現の低下が認められることが報告されている。^{17,18)} また、JAK3 ノックアウトマウスの表現型において、免疫不全以外の異常は見られていない。^{19,20)} さらに JAK3 の特徴として、他の JAK ファミリーが全身に発現していることに対して、JAK3 は血球系細胞に

限定的に発現している。^{21,22)}したがって、JAK3 阻害作用は免疫系に特異的であることが期待される。

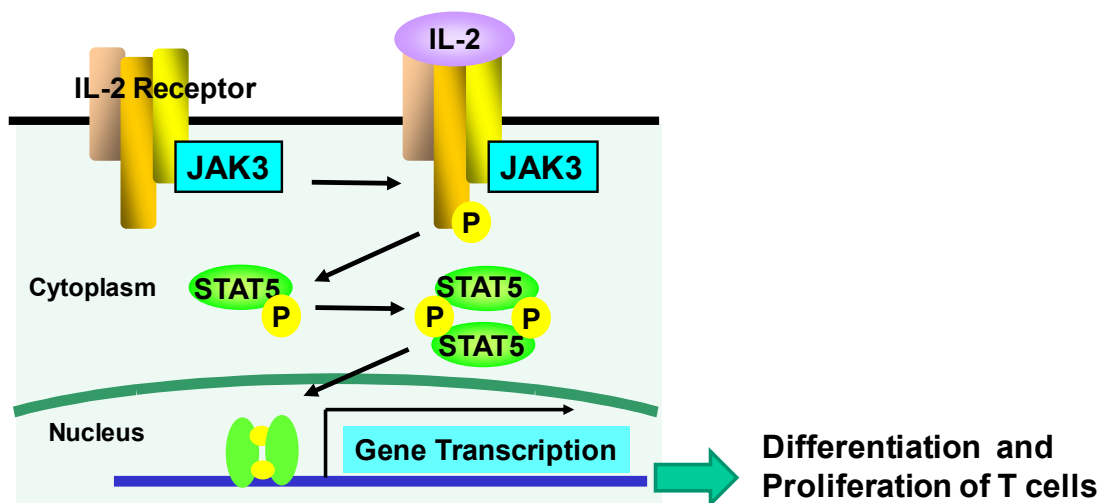


Figure 2. Signal transduction mediated by JAK3.

JAK 阻害剤の開発経緯

現在、JAK 阻害剤としていくつかの化合物が医薬品として開発されている。²³⁻²⁶⁾ Tofacitinib は、Pfizer 社にて創出された化合物であり、当初は JAK3 選択的な化合物として報告された。²⁷⁾ その後、他の JAK ファミリーに対しても阻害活性を示すことが報告され、現在は非選択的な JAK 阻害活性を示す pan-JAK 阻害剤として認識されている。²⁸⁾ Tofacitinib の JAK 阻害活性を評価した結果、強い JAK3 阻害活性および JAK1、JAK2 に対して 4 倍程度の JAK3 選択性を示した (Figure 3、JAK3 IC_{50} = 0.8 nM、JAK1 IC_{50} = 3.7 nM、JAK2 IC_{50} = 3.1 nM)。臓器移植時の拒絶反応の抑制を適応とした研究に関して、tofacitinib はラットおよびサルでの移植モデルにおいて有効性を示すことが報告され、²⁷⁾ ヒトでの臨床開発が進められた。さらに腎移植患者での臨床試験にてヒトでの有効性が認められたが、易感染、貧血および好中球減少などの発現も報告されており、^{29,30)} 現在、開発は進んでいない。その後、自己免疫疾患の一つである関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の治療薬としての開発が進められ、米国食品医薬品局から承認され、上市されている。

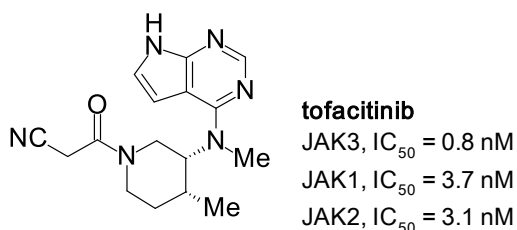


Figure 3. Profiles of tofacitinib.

Tofacitinib 以降、いくつかの JAK 阻害剤が RA を適応として開発が進められている (Figure 4)。Baricitinib は JAK1 および JAK2 に選択的な阻害活性を示す化合物として、upadacitinib および filgotinib は JAK1 に選択的な阻害活性を示す化合物として報告されている。²³⁻²⁶⁾JAK1 は JAK3 と同様に IL-2 受容体に結合しており、JAK3 と協奏的に T 細胞の増殖に関与する。また、JAK1 は IL-6 およびインターフェロン- γ 等のシグナル伝達を介して、炎症反応を制御している。¹²⁻¹⁶⁾JAK2 は主にエリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子およびトロンボポエチン等の造血細胞増殖因子のシグナル伝達を介して赤血球、好中球および血小板の増殖に関与している。¹²⁻¹⁶⁾したがって、RA のような自己免疫疾患においては、JAK1 阻害または JAK1/JAK2 阻害により、炎症反応にかかわるサイトカインシグナルを抑制することが薬効に寄与していると考えられる。また一方で、各 JAK 阻害により種々のサイトカインのシグナル伝達を阻害することが、JAK 阻害剤の臨床試験で報告されている易感染、貧血および好中球減少などの発現にも関与している可能性が考えられる。現在、免疫疾患の適応において、疾患に対する治療効果およびそれ以外の作用のバランスの観点から、各 JAK ファミリーに対する阻害活性プロファイルが異なる種々の JAK 阻害剤の開発が進められている。

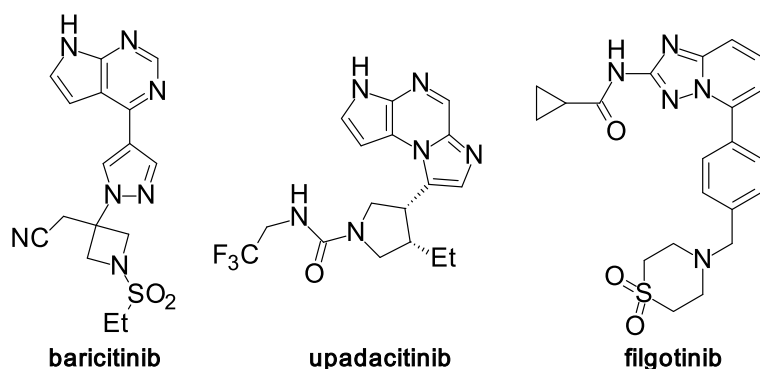


Figure 4. Structure of JAK inhibitors for RA.

研究の目的

本研究では臓器移植時の拒絶反応抑制への適応を指向し、JAK3 を標的とした新規免疫調節剤の創出を検討した。JAK3 は IL-2 依存的な T 細胞増殖に関与し、その発現が血球系細胞に限られていることから、JAK3 阻害により免疫系に特異的な作用が期待できる。また、tofacitinib が腎移植試験および RA の治療においてヒトでの有効性を示したことから、JAK 阻害剤は免疫疾患の治療薬として有用であると考えられる。現在、臓器移植時の拒絶反応抑制を適応とした JAK 阻害剤の開発は進められていな

いが、JAK3 阻害に基づく免疫調節作用は有効性の点で有望な作用メカニズムであることから、高い JAK3 阻害活性を有する新規化合物の創出を目指した。

化合物の合成展開において、既存の JAK 阻害剤とは異なる独自の母核構造を有する誘導体の JAK3 阻害活性の評価およびドッキング計算解析を実施し、JAK3 阻害活性向上に関する構造活性相関を検討した。また、化合物のスクリーニング評価に際して、JAK3 に加えて JAK1 および JAK2 阻害活性を評価した。JAK1 は JAK3 と同様に IL-2 シグナルを介して T 細胞増殖への寄与が考えられることから、その阻害活性をプロファイリングし、JAK2 は赤血球の増殖に関与し JAK2 阻害活性により貧血作用の懸念が考えられることから、より活性が低下した化合物を選択することとした。

研究の概要

第一章では、キナーゼのアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) 結合部位のヒンジ領域と相互作用可能な 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環を母核とする化合物 **4** が弱い JAK3 阻害活性を有することに着目し、JAK3 阻害活性が向上した化合物の創出を検討した。化合物 **4** と JAK3 蛋白とのドッキング計算解析の結果から、置換基導入の許容性が示唆された 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C4 位および C5 位に関して構造最適化を実施した。その結果、C5 位へのカルバモイル基の導入および C4 位への置換シクロアルキルアミノ基の導入により、強い JAK3 阻害活性、JAK1、JAK2 に対して中程度の JAK3 選択性を有し、IL-2 依存的な T 細胞増殖に対して阻害作用を示す化合物 **12c** を創出することに成功した (Figure 5)。また、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体のドッキング計算および WaterMap 解析の結果から、本誘導体が JAK3 阻害活性を示す化合物として有用であることが示された。

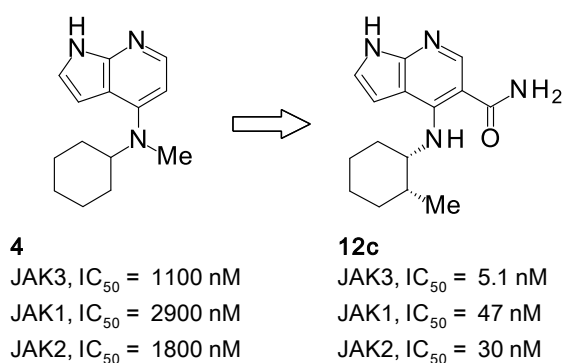


Figure 5. Profiles of 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives.

第二章では、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体 **12c** に関して JAK3 阻害活性のさらなる向上と課題であった薬物動態プロファイルの改善を両立することを目的に、C4 位のアミノ置換基の構造最適化を検討した。その結果、化合物 **12c** の主代謝部位であるメチルシクロヘキサン環部を、*N*-シアノピリジルピペリジン構造に変換した化合物 **18b** が JAK3 阻害活性の向上および肝ミクロソームに対する代謝安定性の向上を示すことが明らかとなった。化合物 **18b** は心機能障害への関与が懸念される human ether-a-go-go-related gene (hERG) 阻害作用を示したことから、分子脂溶性および塩基性の低下による hERG 阻害活性の低下を検討した。化合物 **18b** のピペリジン部にフルオロ基を導入した結果、化合物 **37** が強力な JAK3 阻害活性、JAK1、JAK2 に対して約 10 倍の JAK3 選択性および弱い hERG 阻害活性を示すことが明らかとなった (Figure 6)。また、化合物 **37** はラット、イヌおよびサルにおいて、良好な経口吸収性および血漿中暴露を示した。

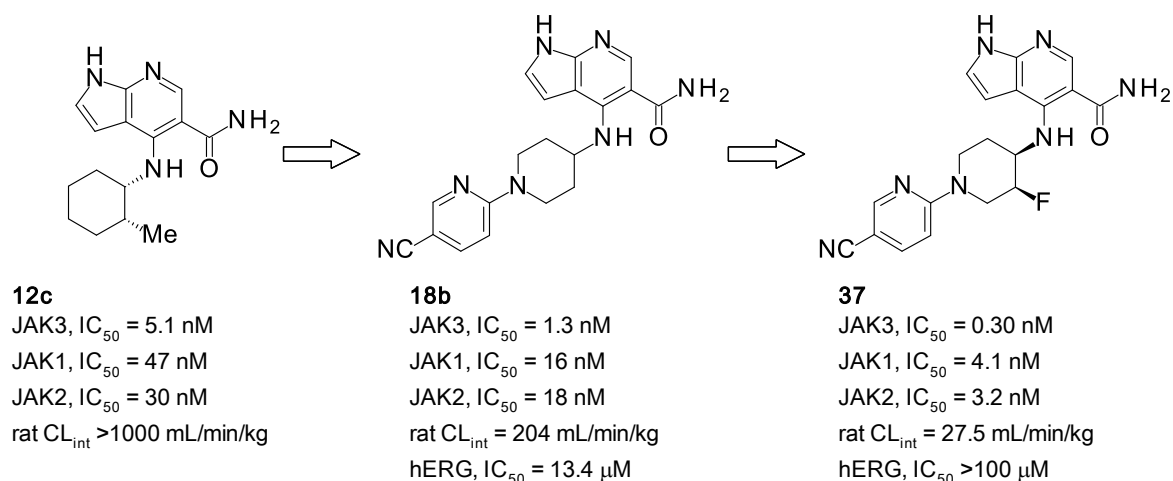


Figure 6. Profiles of 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide derivatives.

第三章では、JAK3 蛋白のヒンジ領域と相互作用可能な母核構造として化合物 **18b** の 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド構造をミミックした新規 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体をデザインし、C4 位および C6 位の置換基の構造最適化を検討した。その結果、4,6-ジアミノニコチンアミド母核の C6 位にピリジン環を導入した化合物 **51b** が強い JAK3 阻害活性を示すことが明らかとなった。化合物 **51b** は、化合物 **18b** と同様に、hERG 阻害活性を示すことが課題となったため、分子脂溶性および塩基性の低下による hERG 阻害活性の低下を検討した。化合物 **51b** の C6 位のピリジン環をメチルピリミジン環に変換し、C4 位のアミノ置換基中のピリジン環を、塩基性を有さないベンゼン環に変換した結果、化合物 **64** が強い JAK3 阻害活性、JAK1、JAK2 に対して 4~5 倍の JAK3 選択性および弱い hERG 阻害活性を示すことが明らか

となった (Figure 7)。また、JAK3 蛋白とのドッキング計算解析の結果から、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体と比較して、化合物 **64** は C3-カルバモイル基がヒンジ領域の奥側で相互作用することが示された。4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体は、ヒンジ領域と新規な相互作用様式に基づき、強い JAK3 阻害活性を示す化合物として有用であることを見出した。

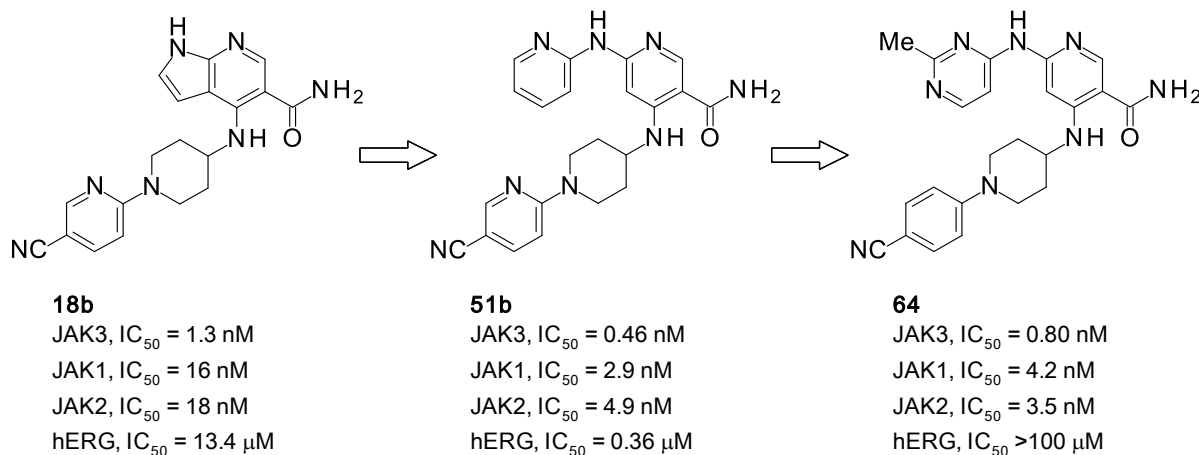


Figure 7. Profiles of **18b** and 4,6-diaminonicotinamide derivatives.

第四章では、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体および 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の中で強い JAK3 阻害活性を示した化合物 **37** および化合物 **64** に関して、ラット異所性心移植モデル試験にて臓器移植時の拒絶反応の抑制効果を評価した。その結果、化合物 **37** は単剤投与にて、化合物 **64** は tacrolimus との併用投与にて、それぞれ移植片の生着延長効果を示した。

以上の結果から、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体および 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体は、JAK3 を標的とした新規免疫調節剤として、臓器移植時の拒絶反応の抑制に有効であることが示された。

本論

第一章 JAK3 阻害活性を有する新規 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体の創出 第一節 合成方針

JAK3 阻害活性を有する化合物の探索にあたり、水素結合能を有するヘテロ芳香環に着目し研究を開始した。キナーゼを標的とした低分子阻害薬は ATP と競合して標的蛋白に結合することにより薬理作用を示す。³¹⁾特に、ATP 結合部位のヒンジ領域との水素結合による相互作用は阻害活性の発現に重要であり、ATP のアデニン環をミミックしたヘテロ芳香環を有するキナーゼ阻害剤が数多く報告されている。^{31,32)}既知の代表的な JAK 阻害剤である tofacitinib は二環性縮合ヘテロ環であるピロロピリジン環をヒンジ領域と相互作用が可能な母核として有している (Figure 3)。そこで、いくつかのヘテロ芳香環化合物を合成し、JAK3、JAK1 および JAK2 に対する阻害活性を評価した結果、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体である化合物 **4** が弱いながら JAK 阻害活性を示すことを見出した。そこで、化合物 **4** の JAK3 阻害活性に着目し、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン母核部分への置換基導入および C4 位アミノ置換基部分の構造最適化による JAK3 阻害活性の向上を検討した (Figure 8)。

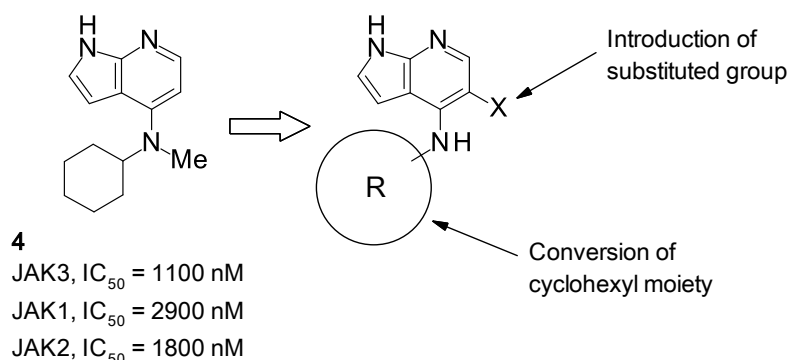
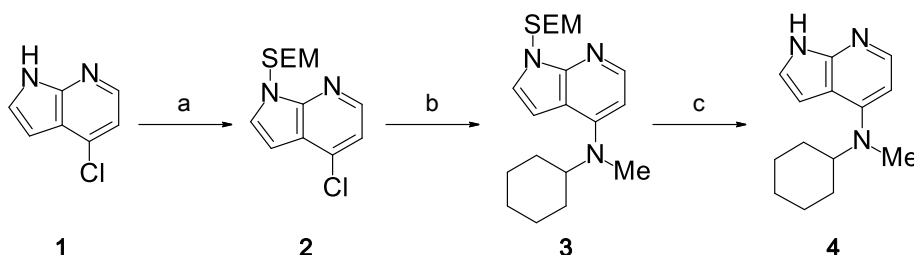


Figure 8. Design of 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives.

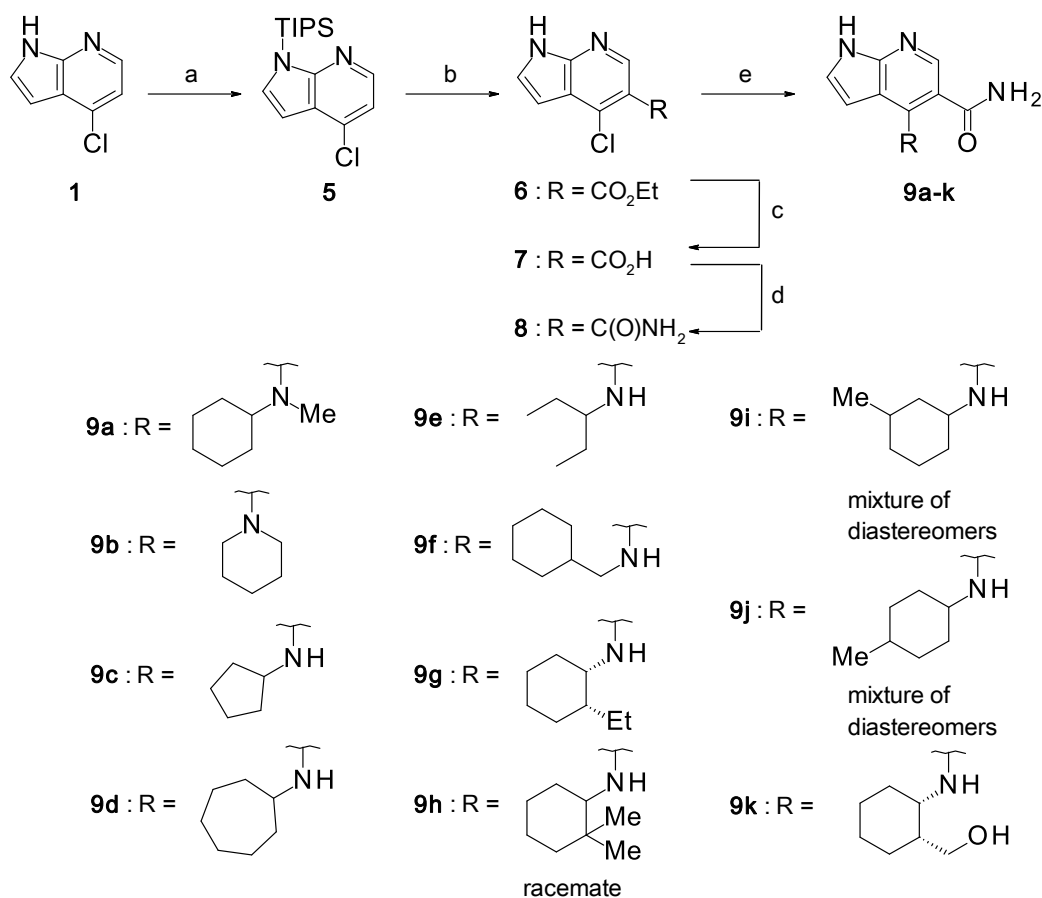
第二節 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体の合成

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体である化合物 **4** の合成法を Scheme 1 に示す。市販の化合物 **1** を NaH および 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl chloride (SEMCl) と反応させ、N1 位が保護された化合物 **2** を収率 84%にて得た。化合物 **2** を Pd(OAc)₂、2-(di-*tert*-butylphosphino)biphenyl、Cs₂CO₃ を用いた条件下、*N*-メチルシクロヘキシルアミンと反応させることにより、アミノ基を導入した化合物 **3** を収率 33%にて得た。³³⁾ 化合物 **3** をトリフルオロ酢酸にて処理した後に、水酸化ナトリウム水溶液および 1,2-ジアミノエタンを加えることで、SEM 基を脱保護し、化合物 **4** を収率 65%にて得た。³⁴⁾



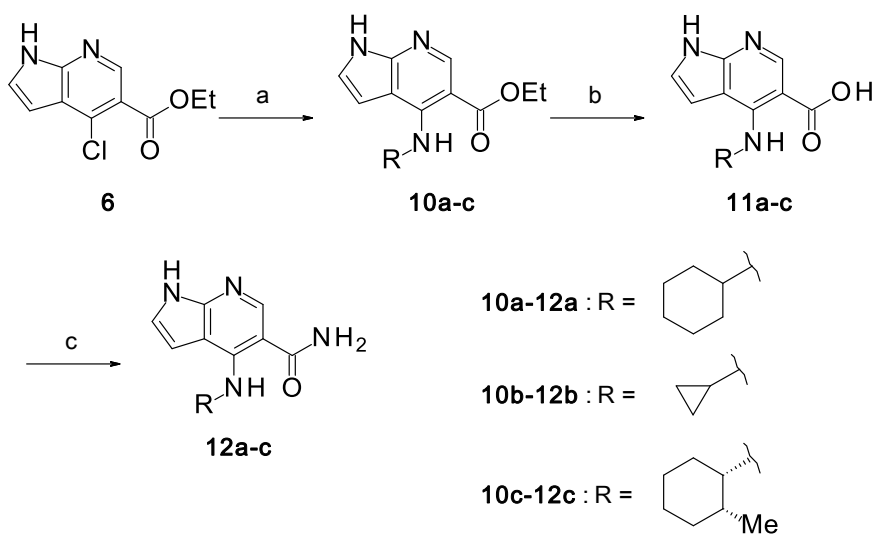
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) SEMCl, NaH, DMF, 0 °C, 84%; (b) *N*-methylcyclohexylamine, Pd(OAc)₂, 2-(di-*tert*-butylphosphino)biphenyl, Cs₂CO₃, 110 °C, 33%; (c) TFA, CH₂Cl₂, room temperature, then 1 M NaOH aq., 1,2-diaminoethane, CH₂Cl₂, room temperature, 65%.

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の一般的な合成法を Scheme 2 に示す。本反応条件は C4 位のアミノ基の構造変換を行う上で効率的な合成法である。化合物 **1** を NaH および triisopropylsilyl chloride (TIPSCl) と反応させ、化合物 **5** を収率 79%にて得た。化合物 **5** に *sec*-BuLi を加え、オルトリチオ化反応を行った後、クロロギ酸エチルを反応させることで、C5 位にエステル基を導入した。³⁵⁾ 次いで、TIPS 基を tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) を用いて脱保護することにより、化合物 **6** を収率 88%にて得た。化合物 **6** のエステル基を加水分解し、化合物 **7** を収率 98%にて得た後、carbonyldiimidazole (CDI) およびアンモニア水を用いてアミド化することにより、C5-カルボキサミド中間体 **8** を収率 84%にて得た。化合物 **8** をマイクロウェーブ照射下、種々のアミンと求核置換反応を行うことにより、化合物 **9a-k** を収率 24–95%にて得た。³⁶⁾



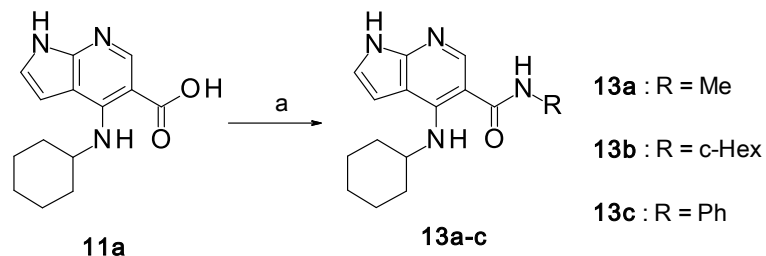
Scheme 2. Reagents and conditions: (a) TIPSCl, NaH, DMF, 5 °C, 79%; (b) *sec*-BuLi, ethyl chloroformate, THF, -78 °C, then TBAF, THF, room temperature, 88%; (c) 1M NaOH aq., EtOH, 60 °C, 98%; (d) CDI, DMF, room temperature, then 28% NH₄OH aq., room temperature, 84%; (e) amines, DIPEA, *n*-BuOH or NMP, microwave, 150–160 °C, 24–95%.

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の別合成法を Scheme 3 に示す。本合成法においては、後述の Scheme 4 において C5 位のアミド基部分の構造変換を可能とするために、化合物 **6** に対してアミンと求核置換反応を行った。マイクロウェーブ照射下、種々のアミンと反応させることで C4 位が置換された化合物 **10a-c** を収率 53–100%にて得た。次いで、化合物 **10a-c** のエステル基を加水分解することでカルボン酸 **11a-c** を得た (収率 73%–quant.)。化合物 **11a-c** を 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) および 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) を用いてアンモニアと縮合反応し、化合物 **12a-c** を収率 60–74%にて得た。



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) amines, DIPEA, *n*-BuOH, microwave, 160 °C, 53–100%; (b) 2 M NaOH aq., EtOH, reflux, 73%–quant.; (c) HOBT, EDC, DMF, 60 °C, then 28% NH₄OH aq., room temperature, 60–74%.

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体に関して、C5位に置換アミド構造を有する化合物の合成法を Scheme 4 に示す。Scheme 3 で得られたカルボン酸 **11a** とアミンを HOBT および EDC を用いた条件にて縮合し、目的の置換アミド誘導体 **13a-c** を収率 19–37% にて得た。



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) amines, HOBT, EDC, DMF, 55 °C, 19–37%.

第三節 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体の構造活性相関

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体に関して、ヒト JAK 阻害活性およびラット脾臓細胞を用いた IL-2 刺激による T 細胞増殖の阻害作用を評価した (Table 1)。

出発物質である化合物 **4** は JAK3、JAK1 および JAK2 に対して弱い阻害活性を示した (JAK3 IC₅₀ = 1100 nM、JAK1 IC₅₀ = 2900 nM、JAK2 IC₅₀ = 1800 nM)。化合物 **4** に関して、構造変換の許容性を探索することを目的に、JAK3 蛋白と tofacitinib の複合体 X 線結晶構造 (PDB 番号: 3LXK)³⁷⁾ を基にして、化合物 **4** と JAK3 蛋白の推定結合様式および相互作用部位を解析した (Figure 9)。ドッキング計算の結果より、JAK3 蛋白の ATP 結合部位において 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環はヒンジ領域近傍に位置し、C4 位のシクロヘキシルアミノ基は疎水性アミノ酸残基に囲まれた疎水性ポケット領域の方向を向いていることが示された。また、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C5 位周辺は置換基導入が許容される空間が存在していた。

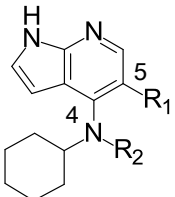
親水性のヒンジ領域周辺においては、主鎖のアミノ酸との相互作用が可能な極性官能基が許容されると考えられることから、化合物 **4** の C5 位に水素結合能を有する置換基であるカルバモイル基を導入し、JAK3 阻害活性の向上を検討した。その結果、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体 **9a** は化合物 **4** と同程度の JAK3 阻害活性を維持し、C5 位への置換基導入が許容されることが示された (IC₅₀ = 1600 nM)。一方で、化合物 **9a** に関して、C5 位のカルバモイル基および C4 位の *N*-メチルシクロヘキシルアミノ基の間での立体障害が大きいことにより、C4 位のアミノ置換基が望みとする疎水性ポケット領域の方向へ向かわないことが予想された。そこで、化合物 **9a** の *N*-メチル基を除去した誘導体をデザインした結果、化合物 **12a** は JAK3 阻害活性が化合物 **9a** と比較して 100 倍以上向上した (IC₅₀ = 14 nM)。化合物 **12a** は JAK1 および JAK2 に対しても阻害活性の向上を示したが、4 倍弱の JAK3 選択性が示された。



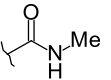
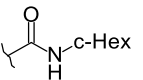
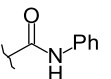
化合物 **12a** が良好な JAK3 阻害活性プロファイルを示したことから、C5 位のカルバモイル基部分の構造変換の空間的許容性を検討した。化合物 **12a** のアミド部分にメチル基を導入した化合物 **13a** は JAK3 阻害活性が低下したものの、中程度の作用を維持した (IC₅₀ = 85 nM)。そこで、よりかさ高い置換基としてアミド部分にシクロヘキシル基およびフェニル基の導入を検討した結果、化合物 **13b** および化合物 **13c** は JAK3 阻害活性が大きく低下した (化合物 **13b**: IC₅₀ = 3400 nM、化合物 **13c**: IC₅₀ = 1200 nM)。以上の結果から、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C5 位周辺に関して、立体的

に小さいカルバモイル基の導入が JAK3 阻害活性の向上に有効であることが明らかとなった。

さらに、JAK3 阻害に基づく機能性評価として、ラット脾臓細胞を用いた IL-2 刺激下の T 細胞増殖阻害作用を評価した (Table 1)。化合物 **9a** および化合物 **13b** が弱い増殖阻害作用を示したことに対して、JAK3 阻害活性が向上した化合物 **13a** は増殖阻害作用の向上が認められ、JAK3 阻害活性と T 細胞増殖阻害作用の間に相関傾向が示された (化合物 **9a**: $IC_{50} = 2400$ nM、化合物 **13b**: $IC_{50} = 3200$ nM、化合物 **13a**: $IC_{50} = 350$ nM)。さらに JAK3 阻害活性が向上した化合物 **12a** は中程度の T 細胞増殖阻害作用を示した ($IC_{50} = 120$ nM)。

Table 1. SARs of C5-substituent of 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives



Compd	R1	R2	JAK3 IC_{50}^a (nM)	JAK1 IC_{50}^a (nM)	JAK2 IC_{50}^a (nM)	rat T cell IC_{50}^b (nM)
4	H	Me	1100	2900	1800	NT ^c
9a		Me	1600	10000	5300	2400
12a		H	14	55	50	120
13a		H	85	230	57	350
13b		H	3400	5000	2000	3200
13c		H	1200	570	640	NT ^c

^a IC_{50} values are the average of duplicate experiments. ^b Inhibitory effect on IL-2-stimulated T cell proliferation using rat spleen cells ($n = 2$). ^c NT = not tested.

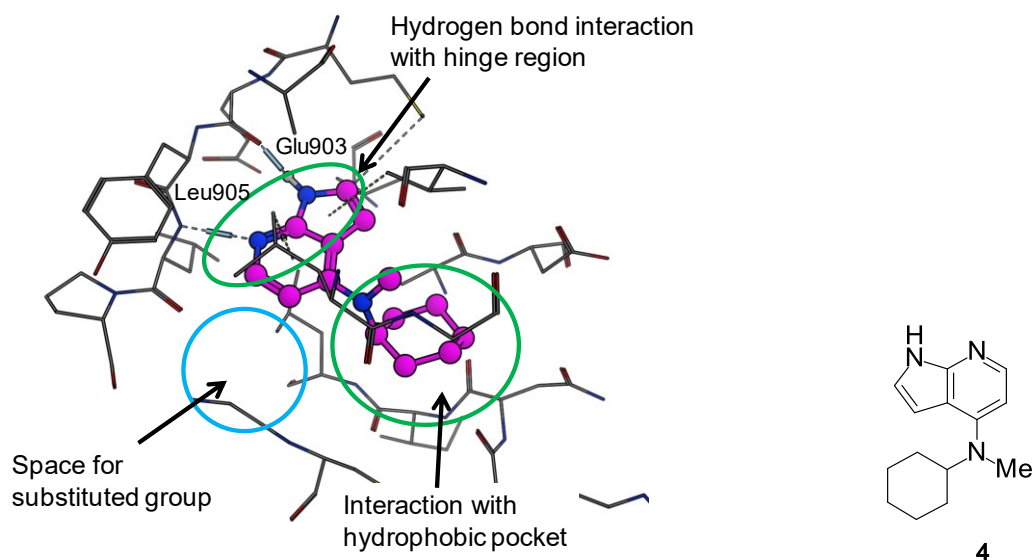


Figure 9. Predicted binding mode of compound **4** to human JAK3 (PDB code: 3LXK).

次に、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4位の置換基を変換した化合物についてヒト JAK 阻害活性およびラット脾臓細胞を用いた IL-2 刺激下の T 細胞増殖阻害作用を評価した (Table 2)。

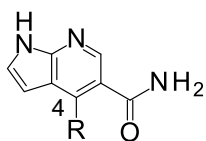
中程度の JAK3 阻害活性を示した化合物 **12a** に関して、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C4 位の *N*-メチルシクロヘキシルアミンをピペリジンに変換した化合物 **9b** は JAK3 阻害活性が大きく減弱した ($IC_{50} = 3200$ nM)。したがって、C4 位の NH プロトンは JAK3 阻害活性に重要であることが示唆された。そこで、C4 位に関して種々の 2 級アミン誘導体を検討した。化合物 **12a** のシクロヘキサン環部を 3 員環、5 員環および 7 員環に変換した結果、脂肪族環の大きさが増大するにしたがってシクロプロパン、シクロペンタン、シクロヘプタンの順に JAK3 阻害活性が向上した (化合物 **12b**: $IC_{50} = 110$ nM、化合物 **9c**: $IC_{50} = 15$ nM、化合物 **9d**: $IC_{50} = 3.5$ nM)。脂溶性が増加したシクロヘプチルアミン誘導体 **9d** は強い JAK3 阻害活性を示し、C4 位のアミノ置換基周辺における疎水性相互作用が JAK3 阻害活性の向上に関与していることが示唆された。

次に、化合物 **12a** のシクロヘキサン環部を開環した誘導体を検討した結果、3-ペンチルアミン誘導体 **9e** は化合物 **12a** と比較して JAK3 阻害活性が向上した ($IC_{50} = 7.7$ nM)。一方、化合物 **12a** のシクロヘキサン環部をシクロヘキシルメチル基に変換した化合物 **9f** は JAK3 阻害活性が低下した ($IC_{50} = 25$ nM)。これらの結果から、C4 位のアミノ基の α 位の分枝状構造が JAK3 阻害活性に重要であることが示唆された。さらに、化合物 **12a** のシクロヘキサン環部に関して置換基導入を検討した。その結果、

2-メチルシクロヘキシルアミン誘導体 **12c** は無置換シクロヘキシルアミン誘導体である化合物 **12a** と比較して JAK3 阻害活性が 3 倍程度向上した ($IC_{50} = 5.1 \text{ nM}$)。一方で、化合物 **12c** は JAK1 および JAK2 阻害活性に関して化合物 **12a** とほぼ同等の阻害活性を維持した。 ($JAK1 IC_{50} = 47 \text{ nM}$ 、 $JAK2 IC_{50} = 30 \text{ nM}$)。

IL-2 刺激下での T 細胞増殖に関して、化合物 **12a** と同等の JAK3 阻害活性を有する化合物 **9c** は増殖阻害活性においても同程度の作用を示した ($IC_{50} = 100 \text{ nM}$)。化合物 **9d** および化合物 **12c** は JAK3 阻害活性の向上に伴い、化合物 **12a** と比較して増殖阻害活性がやや向上した (化合物 **9d**: $IC_{50} = 63 \text{ nM}$ 、化合物 **12c**: $IC_{50} = 86 \text{ nM}$)。一方で、良好な JAK3 阻害活性を有する化合物 **9e** は弱い T 細胞増殖阻害活性 ($IC_{50} = 230 \text{ nM}$) を示したことから、C4 位のアミノ基の置換基として環状脂肪族環を有する化合物が細胞系での作用の点で有利であることが示された。

また、JAK1 および JAK2 阻害活性に関しては、化合物 **12c** が化合物 **9d** よりもやや弱い阻害活性を示し JAK3 選択性が良好であった。化合物 **12c** が JAK 阻害活性および T 細胞増殖阻害作用の点で有望なプロファイルを示したことから、リード化合物として選択し、さらなる構造修飾および評価を検討した。

Table 2. SARs of C4-substituent of 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide derivatives

Compd	R	JAK3 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK1 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK2 IC ₅₀ ^a (nM)	rat T cell IC ₅₀ ^b (nM)
12a		14	55	50	120
9b		3200	1900	2400	NT ^c
12b		110	NT ^c	470	2600
9c		15	45	44	100
9d		3.5	25	13	63
9e		7.7	59	60	230
9f		25	290	71	300
12c		5.1	47	30	86

^a IC₅₀ values are the average of duplicate experiments. ^b Inhibitory effect on IL-2-stimulated T cell proliferation using rat spleen cells (n = 2). ^c NT = not tested.

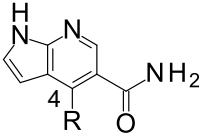
化合物 **12c** のシクロヘキサン環部に置換基を導入した誘導体に関して、ヒト JAK 阻害活性およびラット脾臓細胞を用いた IL-2 刺激下の T 細胞増殖阻害作用を評価した (Table 3)。

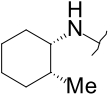
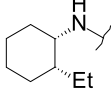
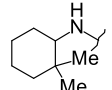
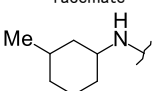
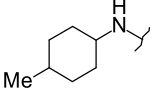
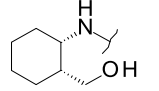
化合物 **12c** のシクロヘキサン環上のメチル基部分に関して、エチル基およびジメチル基への構造変換を検討した結果、2-エチルシクロヘキシルアミン誘導体 **9g** および 2,2-ジメチルシクロヘキシルアミン誘導体 **9h** は強い JAK3 阻害活性を維持した (化合物 **9g**: IC₅₀ = 5.2 nM、化合物 **9h**: IC₅₀ = 3.7 nM)。次に、化合物 **12c** のメチル基の置換位置の変換を検討した結果、3-メチルシクロヘキシルアミン誘導体 **9i** は強い JAK3

阻害活性を維持した ($IC_{50} = 3.0 \text{ nM}$)。一方で、4-メチルシクロヘキシルアミン誘導体 **9j** は化合物 **12c** と比較して JAK3 阻害活性が低下した ($IC_{50} = 14 \text{ nM}$)。

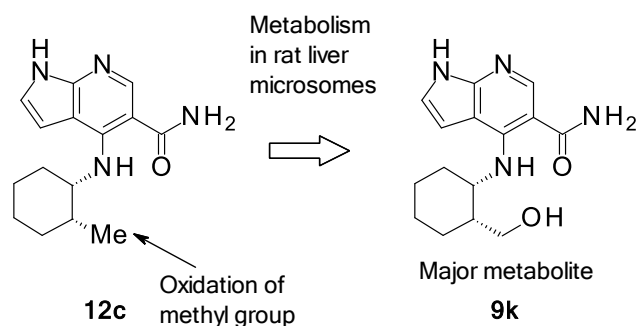
シクロヘキサン環上へ置換基を導入した化合物が良好な JAK3 阻害活性および T 細胞増殖阻害作用を示したことから、*in vivo* での薬効評価が可能かどうかを検討するためにラット肝ミクロソームを用いた代謝安定性を評価した。その結果、化合物 **12c**、化合物 **9g**、化合物 **9h** および化合物 **9i** はいずれも高い肝代謝クリアランス値 ($CL_{int} > 1000 \text{ mL/min/kg}$) を示し、代謝的に不安定な化合物であることが示された。そこで、本誘導体の代謝経路を明らかにすることを目的に、化合物 **12c** に関してラット肝ミクロソームに対する代謝物の探索を行った。その結果、母核部分の 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド部はほとんど代謝を受けず、主代謝物としてシクロヘキシル環上のメチル基が酸化代謝された化合物 **9k** の生成が認められた (Figure 10)。化合物 **9k** 自身についての薬理作用を評価した結果、化合物 **9k** は化合物 **12c** と比較して良好な JAK3 阻害活性を維持し ($IC_{50} = 9.7 \text{ nM}$)、肝ミクロソーム代謝クリアランス値が大きく改善した ($CL_{int} = 267 \text{ mL/min/kg}$)。化合物 **9k** は極性基である水酸基の導入により、化合物 **12c** と比較して分子の脂溶性が低下していることから、肝代謝酵素への特異性が低下し代謝安定性が改善したと考えられる (化合物 **9k**: $CLogP = 1.0$ 、化合物 **12c**: $CLogP = 2.8$)。

T 細胞増殖阻害作用に関しては、2-エチルシクロヘキシルアミン誘導体 **9g** および 2,2-ジメチルシクロヘキシルアミン誘導体 **9h** が増殖阻害活性の向上を示したことから、シクロヘキサン環部の脂溶性の増大は細胞系での作用向上に寄与していることが示唆された (化合物 **9g**: $IC_{50} = 30 \text{ nM}$ 、化合物 **9h**: $IC_{50} = 37 \text{ nM}$)。化合物 **9i** は化合物 **12c** と比較して分子脂溶性が同程度であるにも関わらず強い T 細胞増殖阻害作用 ($IC_{50} = 25 \text{ nM}$) を示したが、この作用向上には JAK3 阻害活性だけでなく、JAK1 阻害活性が向上したことが寄与していると考えられる。また、JAK3 および JAK1 阻害活性が低下した化合物 **9j** および化合物 **9k** は弱い増殖阻害作用を示した (化合物 **9j**: $IC_{50} = 97 \text{ nM}$ 、化合物 **9k**: $IC_{50} = 530 \text{ nM}$)。

Table 3. SARs of modification of cyclohexyl ring moiety in C4-substituent

Compd	R	JAK3 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK1 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK2 IC ₅₀ ^a (nM)	rat T cell IC ₅₀ ^b (nM)	rat CL _{int} ^c (mL/min/kg)	CLogP ^d
12c		5.1	47	30	86	>1000	2.8
9g		5.2	55	48	30	>1000	3.3
9h	 racemate	3.7	54	26	37	>1000	3.1
9i	 mixture of diastereomers	3.0	29	23	25	>1000	2.8
9j	 mixture of diastereomers	14	50	38	97	NT ^e	2.8
9k		9.7	280	190	530	267	1.0

^a IC₅₀ values are the average of duplicate experiments. ^b Inhibitory effect on IL-2-stimulated T cell proliferation using rat spleen cells (n = 2). ^c In vitro metabolism with rat liver microsomes in presence of NADPH-generating system (n = 2). ^d CLogP values are calculated using ACD/Labs Software, version 12.01. ^e NT = not tested.

**Figure 10.** Metabolic pathway of **12c** in rat liver microsomes.

第四節 化合物 **12c** および化合物 **9k** の薬物動態評価

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体の化合物 **12c** および化合物 **9k** に関して、ラットでの薬物動態プロファイルを評価した (Table 4)。

化合物 **12c** は静脈内投与において高い全身クリアランス値を示した ($CL_{tot} = 62.4$ mL/min/kg)。また、経口投与において低い血漿中暴露および経口バイオアベイラビリティを示した ($C_{max} = 126$ ng/mL、 $AUC_{0-24} = 303$ ng·h/mL、 $F = 11\%$)。化合物 **12c** は人工脂質膜を用いた薬物膜透過性試験 (parallel artificial membrane permeability assay: PAMPA)³⁸⁾ にて、良好な細胞膜透過性 ($P_e = 39 \times 10^{-6}$ cm/s) を示したことから吸収性に関して良好であり、低い経口吸収性は肝での代謝不安定性が反映されていると考えられた。肝代謝安定性が改善された化合物 **9k** は化合物 **12c** と比較して、同投与量での経口投与において5倍以上の高い血中暴露を示した ($C_{max} = 1129$ ng/mL、 $AUC_{0-24} = 1523$ ng·h/mL)。

Table 4. Pharmacokinetic parameters of **12c** and **9k** in rats

Compd	iv ^a				po ^b			
	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	t _{1/2} (h)	V _{dss} (L/kg)	CL _{tot} (mL/min/kg)	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	F ^c (%)
12c	810	0.4	1.8	62.4	126	1.3	303	11
9k	NT ^d	NT ^d	NT ^d	NT ^d	1129	1.5	1523	-

^a Dosed at 3 mg/kg (n = 2). ^b Dosed at 10 mg/kg (n = 3). ^c F = bioavailability. ^d NT = not tested.

第五節 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体のドッキング計算解析

第三節において、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体の C4 位および C5 位の構造変換を行った結果、化合物 **12c** は出発化合物 **4** と比較して 200 倍以上の JAK3 阻害活性の向上が達成された。本誘導体における構造変換の JAK3 阻害活性向上への効果を検証するために、各化合物とヒト JAK3 蛋白のドッキング計算解析を行った。化合物 **12c** の JAK3 蛋白への推定結合様式を計算解析した結果、化合物 **12c** の 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環はヒンジ領域の Glu903 および Leu905 に近接し、N1 位の水素原子および N7 位の窒素原子がそれぞれプロトン供与体およびプロトン受容体として、水素結合を形成した (Figure 11)。また、これらの水素結合に加えて C2 位の水素原子が ATP 結合ポケットの奥側のゲートキーパー部位にて Met902 と相互作用した。さらにピロロピリジン環の芳香族性により、Val836 および Leu828 との CH- π 相互作用が認められた。Tofacitinib との重ね合わせの結果、化合物 **12c** の 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環部は tofacitinib のピロロピリミジン環に重なり合った。化合物 **12c** の C4 位のアミノ置換基は JAK3 蛋白の疎水性ポケット領域を占めており、tofacitinib のアミノピペリジン環部位に対応していた。

また、化合物 **12c** は C4 位のアミノ基の水素原子と C5 位のカルバモイル基のカルボニル酸素原子の間で分子内水素結合が形成され、C4 位のシクロヘキシルアミノ基を空間的許容性が高い疎水性ポケット領域に方向づけていた。この分子内水素結合による構造固定化により、C4 位の脂肪族置換基と JAK3 蛋白の疎水性残基との親和性が向上し、強い JAK3 阻害活性を示したと考えられる。さらに C5 位のカルバモイル基はヒンジ領域近傍に位置しており、かさ高い置換基は空間的許容性が低いことが示唆された。したがって、化合物 **12c** のような C5-カルボキサミド誘導体が強い JAK3 阻害活性を示し、化合物 **13a-c** のような C5-置換アミド誘導体は JAK3 阻害活性が低下したと考えられる。

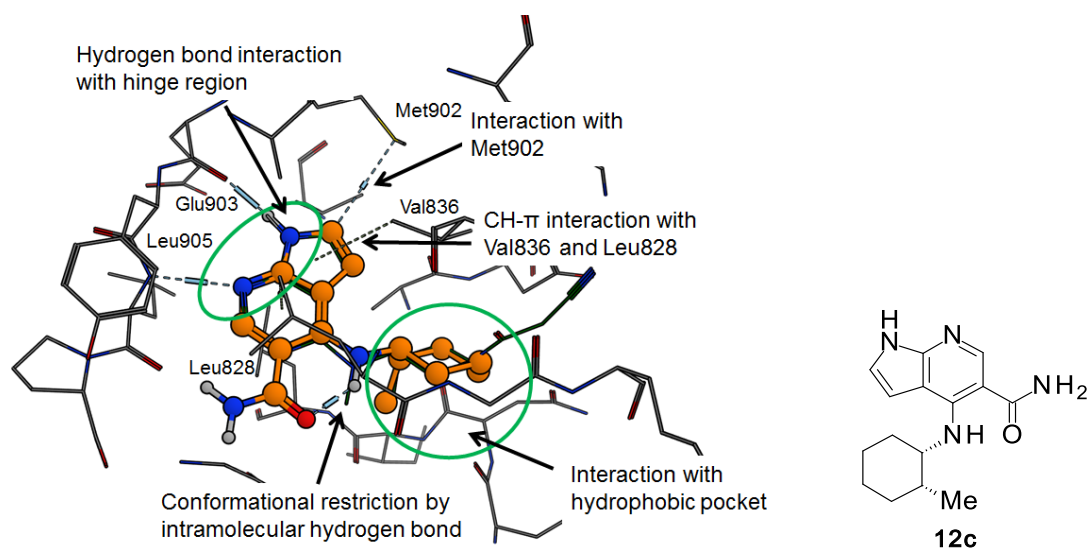


Figure 11. Predicted binding mode of compound **12c** to human JAK3 (PDB code: 3LXK, orange:12c, green: tofatinib).

また、ドッキング計算に加えて、*1H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体に関して C4 位のアミノ置換基部の構造活性相関の結果を考察するために、WaterMap 解析による結合エネルギー計算を実施した。WaterMap は蛋白の結合ポケット中に存在可能な水分子の自由エネルギー (ΔG) を計算する解析プログラムであり、^{39,40}JAK3 蛋白の結合ポケットに関しては高い自由エネルギーを示す 11 個の不安定水分子 ($\Delta G = >2.0$ kcal/mol) が検出された (Figure 12)。化合物 **12c** は JAK3 蛋白の結合ポケットにおいて、*1H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド部がヒンジ領域近傍の 5 個の不安定水分子 (W1~W5) の脱水和に寄与していた。一方、C4 位のアミノ基上のシクロヘキサン環は疎水性ポケット領域にある 3 個の不安定水分子 (W6 ~W8) の脱水和に寄与していた。

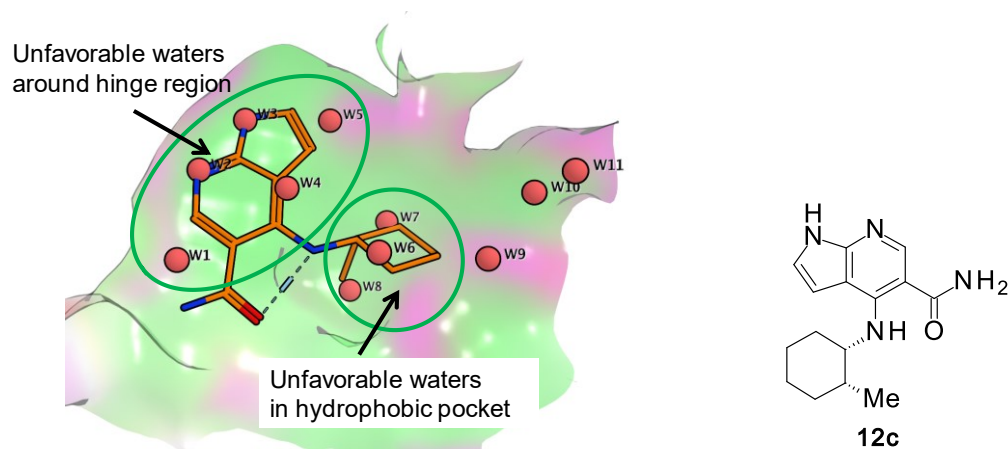


Figure 12. Compound **12c** with WaterMap unfavorable water molecules ($\Delta G >2.0$ kcal/mol).

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド構造を有する化合物に関して、それぞれの JAK3 阻害活性値および JAK3 結合ポケットに存在する不安定水分子を脱水和するために必要な自由エネルギー値 (ΔG_{pred}) との相関を検討した (Figure 13)。計算解析した化合物に関して、C4 位のアミノ置換基が立体的にかさ高いほど疎水性ポケット領域においてより多くの不安定水分子を脱水和することが可能となり、 ΔG_{pred} 値のエネルギー差は増加傾向を示した。一方で、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C4 位に立体的にかさ高い置換基を有する化合物は強い JAK3 阻害活性を示しており、JAK3 阻害活性値と ΔG_{pred} 値の間に弱いながら相関関係が認められた ($R^2 = 0.45$)。これらの WaterMap 解析の結果は、化合物 **12a** のシクロヘキサン環上への置換基導入が JAK3 阻害活性向上に有効であった構造活性相関の結果と一致した。

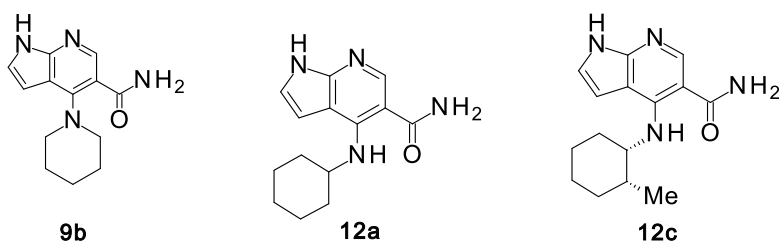
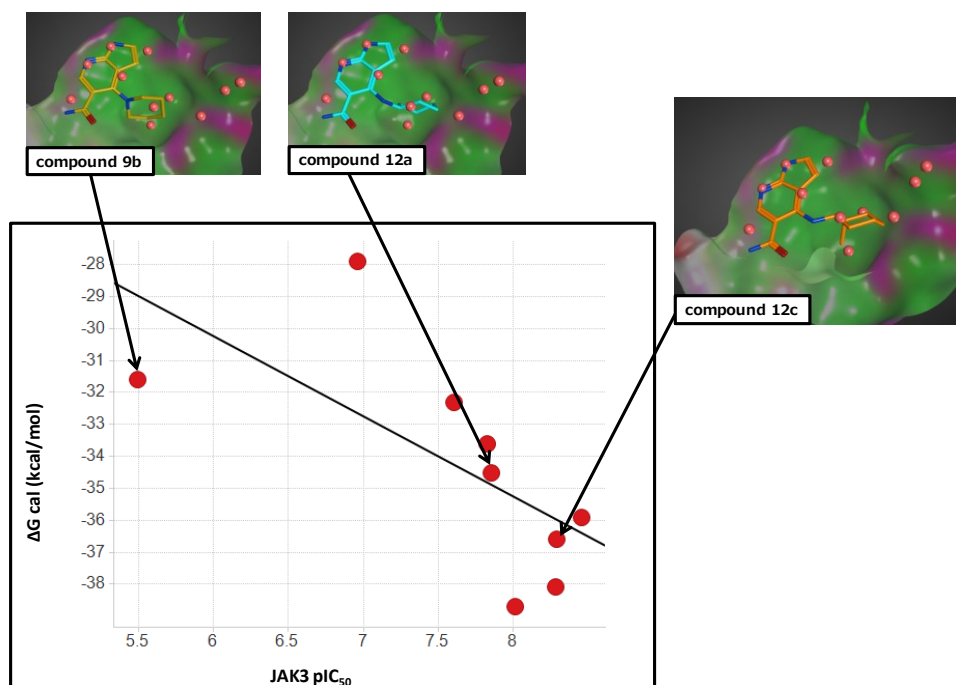


Figure 13. Correlation between the experimental activity and the WaterMap free energy liberation of binding site waters for 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide derivatives in Table 2 and 3.

第六節 第一章のまとめ

JAK3 を標的とした新規な免疫調節剤として 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環を母核とする化合物を合成し、JAK 阻害活性および IL-2 刺激下での T 細胞増殖阻害作用を評価した。構造活性相関の結果より、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C5 位へのカルバモイル基の導入および C4 位への置換シクロアルキルアミノ基の導入が JAK3 阻害活性の向上に重要であることを明らかとし、強い JAK3 阻害活性および JAK1、JAK2 に対して中程度の JAK3 選択性を示す化合物 **12c** を創出した。シクロヘキサン環上に置換基を導入した誘導体は JAK3 阻害活性および T 細胞増殖阻害活性が向上したが、一方で分子脂溶性が高く、肝ミクロソームに対する低い代謝安定性を示した。化合物 **12c** に関して肝臓での代謝物をプロファイリングした結果、ヒドロキシル化体 **9k** が同定された。化合物 **9k** は極性基である水酸基を導入することにより、化合物 **12c** と比較して分子脂溶性の低下、代謝安定性の向上および経口吸収性の改善を示した。1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C4 位のアミノ基の構造変換は JAK3 阻害活性の向上だけでなく、薬物動態プロファイルの改善に関する効果的であることを明らかとした。

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体とヒト JAK3 蛋白とのドッキング計算解析の結果から、ヒンジ領域および疎水性ポケット領域との相互作用が示された。加えて、WaterMap を用いた解析より JAK3 蛋白の結合ポケットに存在する不安定水分子の脱水和効果が JAK3 阻害活性と相関傾向を示した。本研究で検討した新規 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体は既知の JAK 阻害剤である tofacitinib と比較すると、C5 位のカルバモイル基の存在により分子内水素結合を形成し、JAK3 蛋白の結合ポケットにおいて活性発現に重要な分子構造を維持することが可能であると考えられる。

これらの結果より、化合物 **12c** に代表される 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体が JAK3 を標的とした新規な免疫調節剤として有用であることを見い出した。

第二章 JAK3 阻害活性および経口吸収性が向上した新規 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の創出

第一節 合成方針

第一章において、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体の C5 位にカルバモイル基を導入した化合物が強い JAK3 阻害活性を示した。また、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C4 位のアミノ置換基の構造変換を検討した結果、JAK3 阻害活性が向上した化合物 **12c** を創出した。しかしながら、化合物 **12c** に代表される 4-シクロアルキルアミノ-1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体は、肝ミクロソームに対する代謝安定性が不良であったことから、JAK3 阻害活性の向上および薬物動態プロファイルの改善の両立を目的に、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の C4 位置置換基のさらなる構造変換を検討した。主代謝部位であるシクロアルキル環部分を、極性基であるピペリジン環に変換することで代謝安定性の改善を検討した。また、ピペリジンの N 位に置換基を導入することで、JAK3 蛋白の疎水性ポケットの奥側での相互作用を利用し、JAK3 阻害活性を向上させることを検討した (Figure 14)。

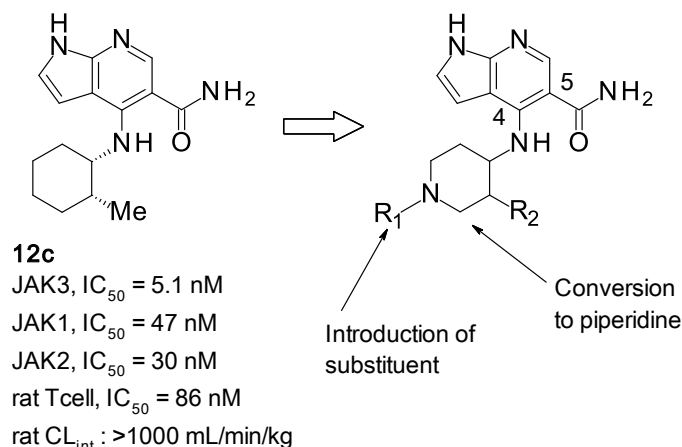
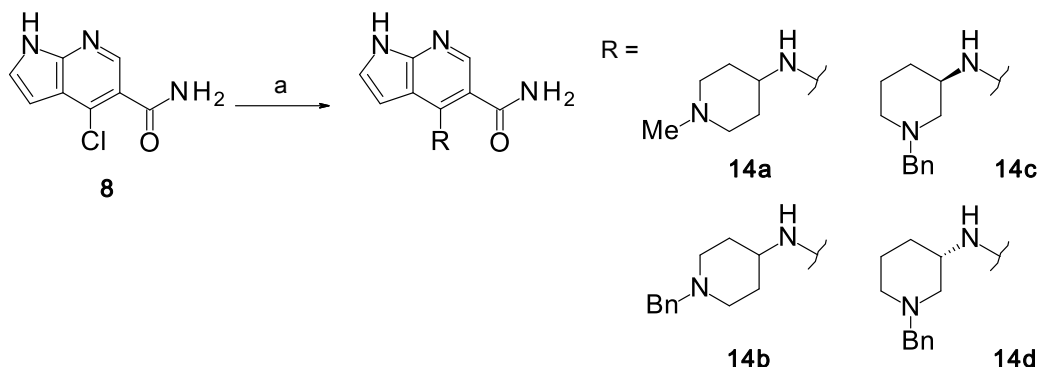


Figure 14. Design of 4-(piperidin-4-ylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide derivatives.

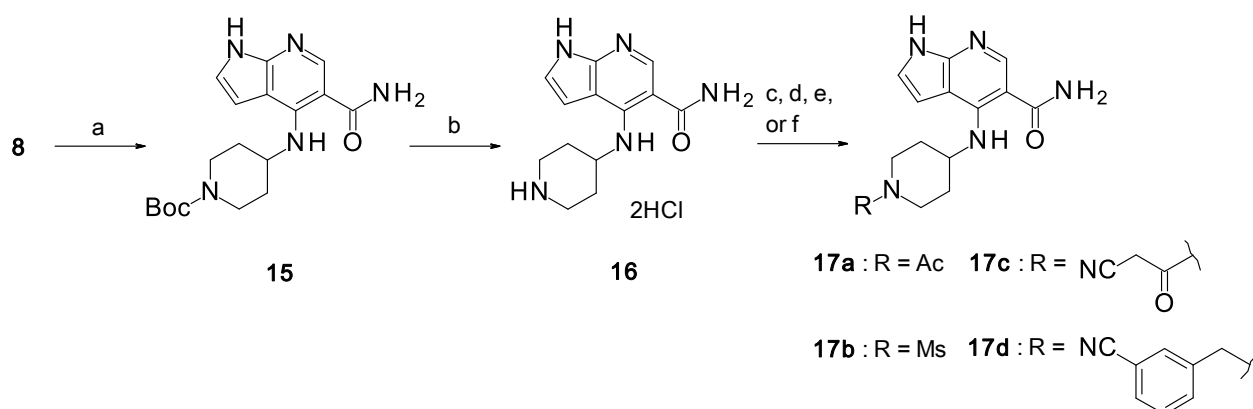
第二節 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の合成

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4 位にアミノピペリジン構造を有する化合物の合成法を Scheme 5 に示す。化合物 **8** をマイクロウェーブ照射下、それぞれのアミンと反応させることで、化合物 **14a-d** を収率 22–96%にて得た。



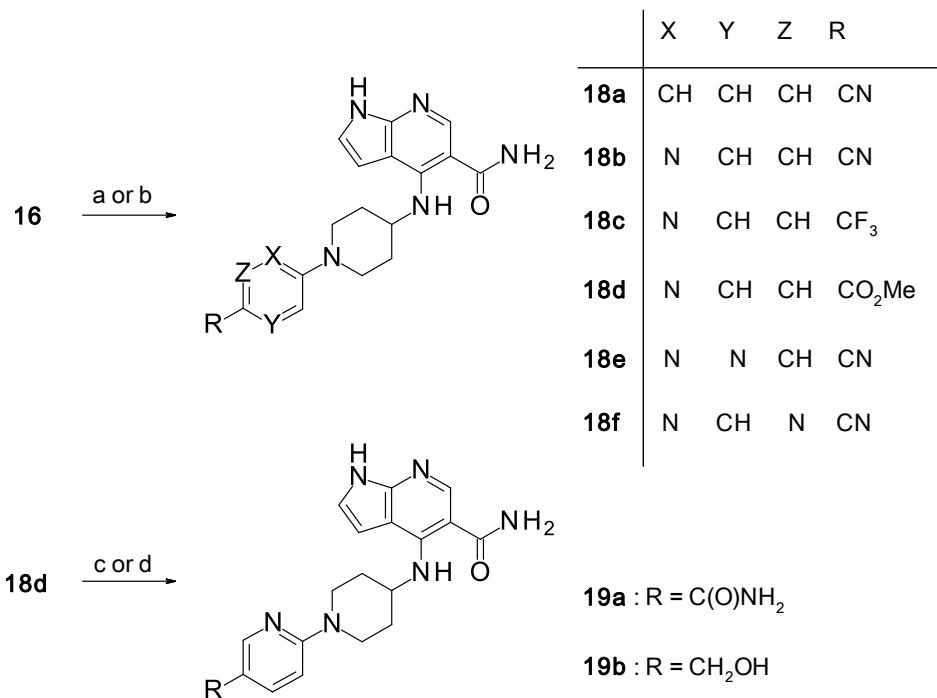
Scheme 5. Reagents and conditions: (a) amines, Et₃N, NMP, microwave, 180 °C, 22–96%.

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4 位のピペリジン環の N 原子上に種々の置換基を導入した化合物の合成法を Scheme 6 に示す。化合物 **8** を *N*-Boc-4-アミノピペリジンと反応させ、化合物 **15** を収率 60%にて得た後、Boc 基を酸性条件下で脱保護し、化合物 **16** を定量的に得た。化合物 **16** を無水酢酸および塩化メタンスルホニルと反応させることで化合物 **17a** および化合物 **17b** を収率 71%および 42%にて、それぞれ得た。化合物 **16** を HOBt および EDC を用いてシアノ酢酸と縮合することで化合物 **17c** を収率 41%にて得た。化合物 **16** を NaBH(OAc)₃ を用いて 3-シアノベンズアルデヒドと還元的アルキル化することで化合物 **17d** を収率 40%にて得た。



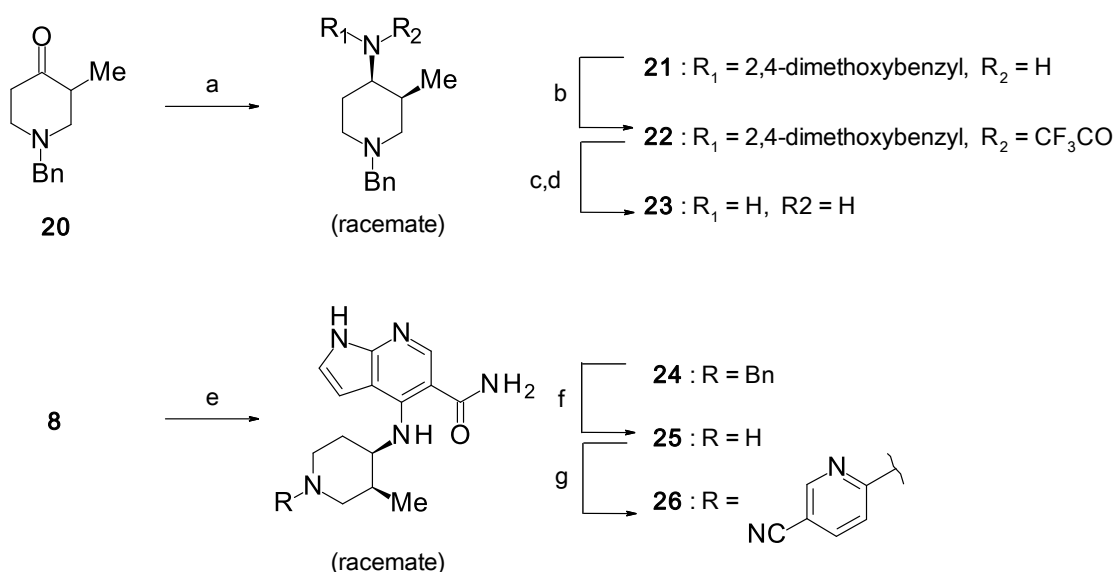
Scheme 6. Reagents and conditions: (a) *N*-Boc-4-aminopiperidine, Et₃N, NMP, microwave, 180 °C, 60%; (b) 4 M HCl in dioxane, EtOH, room temperature, quant.; (c) Ac₂O, DIPEA, THF, room temperature, 71% (for **17a**); (d) MsCl, Et₃N, DMF, ice cooling, 42% (for **17b**); (e) cyanoacetic acid, HOBt, EDC, Et₃N, DMF, room temperature, 41% (for **17c**); (f) 3-cyanobenzaldehyde, NaBH(OAc)₃, Et₃N, CH₂Cl₂, room temperature, 40% (for **17d**).

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4位のピペリジン環のN原子上にアリアル基を導入した化合物の合成法をScheme 7に示す。化合物**16**を4-フルオロベンズニトリルと反応させることで*N*-シアノフェニル誘導体**18a**を収率21%にて得た。*N*-ピリジン誘導体の合成において、シアノ基、トリフルオロメチル基およびエステル基等の電子求引性基を有する2-クロロピリジンと、化合物**16**を反応させることにより、化合物**18b-d**をそれぞれ収率22–65%にて得た。*N*-シアノピラジン誘導体**18e**および*N*-シアノピリダジン誘導体**18f**は、対応するアリアルクロライドを用いて同様の反応により、それぞれ収率22%および50%にて得た。化合物**18d**を封かん容器中でアンモニアと反応させることでアミド体**19a**を収率20%にて得た。化合物**18d**のエステル基をLiAlH₄を用いて還元することで、アルコール体**19b**を収率80%にて得た。



Scheme 7. Reagents and conditions: (a) 4-fluorobenzonitrile, K₂CO₃, DMSO, 80 °C, 21% (for **18a**); (b) aryl chlorides, Et₃N, DMI, 160 °C, 22–65% (for **18b-f**); (c) 2 M NH₃ in MeOH, 90 °C, 20% (for **19a**); (d) LiAlH₄, THF, 0 °C, 80% (for **19b**).

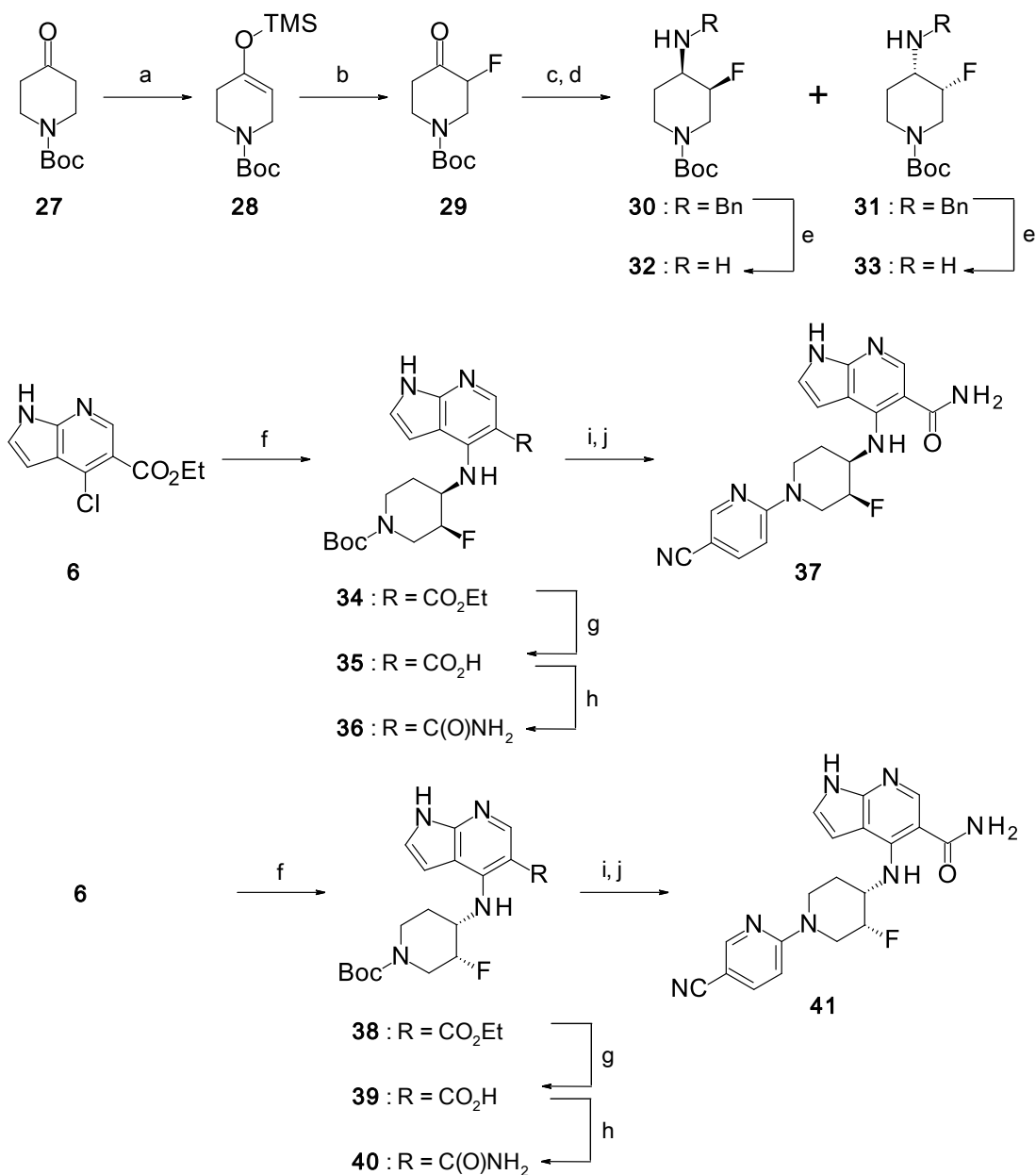
1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4 位のピペリジン環上にメチル基を導入した化合物 **26** の合成法を Scheme 8 に示す。市販の化合物 **20** および(2,4-ジメトキシベンジル)アミンを NaBH(OAc)₃ を用いた還元的アミノ化条件にて反応させ、*cis*-4-アミノ-3-メチルピペリジン（化合物 **21**）を収率 42%にて得た。⁴¹⁾ 化合物 **21** をトリフルオロ酢酸無水物と反応させ化合物 **22** を収率 87%にて得た後、トリフルオロ酢酸およびアルカリ処理により、2,4-ジメトキシベンジル基およびトリフルオロアセチル基を脱保護することで化合物 **23** を収率 75%にて得た。化合物 **8** および化合物 **23** をマイクロウェーブ照射下、反応させることで化合物 **24** を収率 61%にて得た。Pd 触媒下の加水素分解反応により化合物 **24** のベンジル基を脱保護し、化合物 **25** を収率 83%にて得た後、2-クロロ-5-シアノピリジンと求核置換反応させることで化合物 **26** を収率 68%にて得た。



Scheme 8. Reagents and conditions: (a) (2,4-dimethoxybenzyl)amine, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, DCE, room temperature, 42%; (b) $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, Et_3N , DCE, 4 °C, 87%; (c) TFA, 50 °C; (d) 1 M NaOH aq., MeOH, reflux, 75% (2 steps); (e) **23**, Et_3N , NMP, microwave, 180 °C, 61%; (f) H_2 , 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (50% wet), EtOH, 50 °C, 83%; (g) 2-chloro-5-cyanopyridine, Et_3N , DMI, 160 °C, 68%.

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4 位に光学活性な 4-アミノ-3-フルオロピペリジン構造を有する化合物 **37** および化合物 **41** の合成法を Scheme 9 に示す。市販の化合物 **27** を trimethylsilyl chloride (TMSCl) と反応させ、シリルエノールエーテル (化合物 **28**) を収率 99%にて得た。次いで、Selectfluor[®] ⁴²⁾ を用いた求電子的フッ素化反応により、3-フルオロ-4-オキシピペリジン (化合物 **29**) を収率 75%にて得た。既知文献の反応条件を参考にして、化合物 **29** およびベンジルアミンを $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ を用いた還元的アミノ化反応を行い、立体選択的に *cis*-4-(ベンジルアミノ)-3-フルオロピペリジンのラセミ体を収率 60%にて得た。⁴³⁾ このラセミ体について、キラルカラムクロマトグラフィーによる異性体の光学分割を行い、(3*S*,4*R*)-体の化合物 **30** および(3*R*,4*S*)-体の化合物 **31** をそれぞれ得た。化合物 **30** および化合物 **31** のベンジル基を Pd 触媒下、加水素分解反応により脱保護し、化合物 **32** および化合物 **33** をそれぞれ収率 99%にて得た。化合物 **6** と化合物 **32** を求核置換反応させることで化合物 **34** を収率 92%にて得た。化合物 **34** のエステル基を加水分解し、化合物 **35** を収率 92%にて得た後、アンモニア水を用いて縮合反応を行い、化合物 **36** を収率 87%にて得た。化合物 **36** の Boc 基を、トリフルオロ酢酸を用いて脱保護した

後、2-クロロ-5-シアノピリジンと反応させ、化合物 **37** を収率 56%にて得た。同様に
して、化合物 **33** を用いて、鏡像異性体である化合物 **41** を合成した。

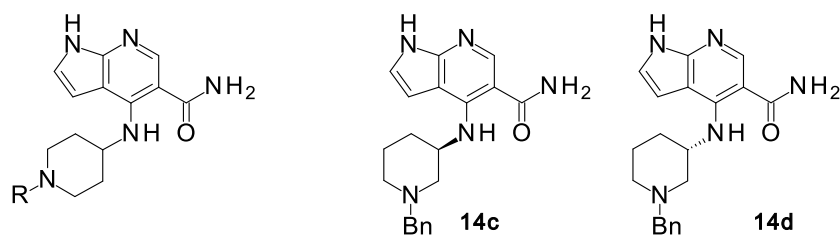


Scheme 9. Reagents and conditions: (a) TMSCl, Et₃N, DMF, 90 °C, 99%; (b) Selectfluor[®], CH₃CN, ice cooling, 75%; (c) benzylamine, NaBH(OAc)₃, DCE, room temperature, 60%; (d) chiral column chromatography; (e) HCO₂NH₄, 10% Pd-C (50% wet), EtOH, H₂O, reflux, 99%; (f) **32** or **33**, *n*-Bu₃N, *n*-BuOH, reflux, 92%; (g) 6 M NaOH aq., EtOH, 80 °C, 76–92%; (h) 28% NH₄OH, EDC, HOBT, DMF, room temperature, 87%; (i) TFA, CH₂Cl₂, room temperature; (j) 2-chloro-5-cyanopyridine, Et₃N, DMF, 95 °C, 56–57%.

第三節 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の構造活性相関

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4位にアミノピペリジン構造を有する化合物のヒト JAK 阻害活性およびラット肝ミクロソーム代謝クリアランス値を評価した (Table 5)。*N*-メチルピペリジン誘導体 **14a** は化合物 **12c** と比較して、JAK3 阻害活性が約 18 倍低下した ($IC_{50} = 90$ nM)。第一章での検討結果から、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の C4 位の置換基は JAK3 蛋白と疎水性相互作用をすることが示唆されたことから、シクロヘキサン環を脂溶性が低下したピペリジン環へ変換することは JAK3 阻害活性の発現に対して不利であると考えられた。そこで、JAK3 蛋白の疎水性領域の奥側での新規な相互作用を獲得することを目的として、化合物 **14a** のピペリジン環の N 上の置換基を構造変換することを検討した。化合物 **14a** のピペリジン環の N 原子にアセチル基およびメシル基を導入した化合物 **17a** および化合物 **17b** はいずれも弱い JAK3 阻害活性を示した (化合物 **17a**: $IC_{50} = 340$ nM、化合物 **17b**: $IC_{50} = 150$ nM)。この結果から、立体的に小さい極性官能基の導入では JAK3 蛋白との相互作用の向上は期待できないことが示唆された。次に、立体的にかさ高く、脂溶性が高いベンゼン環の導入を検討した結果、*N*-ベンジルピペリジン誘導体 **14b** は化合物 **14a** と比較して、JAK3 阻害活性が 4 倍程度向上した ($IC_{50} = 23$ nM)。化合物 **14b** に関してピペリジン環部周辺の空間的許容性を確認するために、ベンジル基の位置を変換した誘導体を検討した。その結果、3-アミノピペリジン体である化合物 **14c** および化合物 **14d** は弱い JAK3 阻害活性を示した (化合物 **14c**: $IC_{50} = 240$ nM、化合物 **14d**: $IC_{50} = 130$ nM)。したがって、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の C4 位の置換基を 4-アミノピペリジン構造に固定し N 原子上の置換基のさらなる検討を行った。既知の JAK 阻害剤である tofacitinib の X 線結晶解析の報告において、末端構造のシアノ基と JAK3 蛋白との相互作用が確認されていることから、³⁷⁾ 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関しても、C4 位の置換基の末端にシアノ基を導入することを検討した。その結果、*N*-シアノ酢酸誘導体 **17c** は化合物 **17a** と比較して、約 7 倍の JAK3 阻害活性の向上を示した ($IC_{50} = 46$ nM)。一方、化合物 **14b** のベンゼン環上にシアノ基を導入した化合物 **17d** は中程度の JAK3 阻害活性を維持した ($IC_{50} = 25$ nM)。これらの結果より、シアノ基の導入が JAK3 阻害活性発現に対して許容されることが示された。そこで、シアノ基を JAK3 蛋白の結合ポケットの奥側に固定させることを目的に、化合物 **17d** のメチレンリンカーを除去することを検討した結果、*N*-シアノフェニル誘導体 **18a** は JAK3 阻害活性が大きく向上した ($IC_{50} = 3.4$ nM)。化合物 **18a** が強い

JAK3 阻害活性を示したことから、さらにベンゼン環部の変換を検討した。化合物 **18a** のベンゼン環をピリジン環に変換した結果、*N*-シアノピリジン誘導体 **18b** はさらなる JAK3 阻害活性の向上を達成した ($IC_{50} = 1.3 \text{ nM}$)。また、シアノ基を他の官能基へ変換することを検討した結果、トリフルオロメチル基、カルバモイル基およびヒドロキシメチル基を導入した誘導体 (化合物 **18c**、化合物 **19a** および化合物 **19b**) は、いずれも JAK3 阻害活性が低下した (化合物 **18c**: $IC_{50} = 25 \text{ nM}$ 、化合物 **19a**: $IC_{50} = 5.2 \text{ nM}$ 、化合物 **19b**: $IC_{50} = 9.2 \text{ nM}$)。したがって、本誘導体においてシアノ基構造の導入が JAK3 阻害活性向上に効果的であることが確認できた。一連の *N*-アリアルピペリジン誘導体 (化合物 **18a-c** および化合物 **19a,b**) は、いずれも JAK1 および JAK2 阻害活性が JAK3 阻害活性に対して 10 倍程度低下しており、中程度の JAK3 選択性を示した。ラット肝ミクロソームに対する代謝安定性に関しては、JAK3 阻害活性が良好であった化合物 **18a** および化合物 **18b** を評価した結果、化合物 **12c** と比較して低いクリアランス値を示し、代謝安定性が改善していることが示された (化合物 **18a**: $CL_{int} = 262 \text{ mL/min/kg}$ 、化合物 **18b**: $CL_{int} = 204 \text{ mL/min/kg}$)。この結果から、化合物 **12c** の主代謝部位であるメチルシクロヘキサン環部をピペリジン構造に変換することが、代謝安定性を改善させることに有効であることが示された。最も JAK3 阻害活性が良好であった化合物 **18b** に関して細胞系での機能性評価を検討した結果、IL-2 刺激下での T 細胞増殖に対して強い阻害作用を示すことが確認された ($IC_{50} = 27 \text{ nM}$)。以上の結果より、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4 位に *N*-シアノピリジル-4-アミノピペリジン構造を有する化合物 **18b** が薬理作用および代謝安定性において優れたプロファイルを示す化合物として同定された。

Table 5. SARs of aminopiperidine derivatives

Compd	R	JAK3 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK1 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK2 IC ₅₀ ^a (nM)	CL _{int} ^b (mL/min/kg)	CLogP ^c
12c		5.1	47	30	>1000	2.8
14a	Me	90	300	310	NT ^d	0.54
17a	Ac	340	NT ^d	640	NT ^d	0.62
17b	Ms	150	NT ^d	190	NT ^d	0.16
14b	Bn	23	84	84	NT ^d	2.3
14c		240	NT ^d	430	NT ^d	2.3
14d		130	NT ^d	640	NT ^d	1.8
17c		46	110	200	NT ^d	-0.04
17d		25	NT ^d	46	NT ^d	1.7
18a		3.4	50	49	262	3.2
18b		1.3	16	18	204	2.8
18c		25	NT ^d	370	NT ^d	3.1
19a		5.2	58	41	NT ^d	2.3
19b		9.2	180	100	NT ^d	2.1

^a IC₅₀ values are the average of duplicate experiments. ^b In vitro metabolism with rat liver microsomes in presence of NADPH-generating system (n = 2). ^c CLogP values calculated using ACD/Labs Software, version 12.01. ^d NT = not tested.

第四節 hERG 阻害作用減弱の合成方針

hERG チャンネルは、電位依存型カリウムイオンチャンネルの一種であるが、臨床試験において hERG 阻害作用を示す化合物が QT 期間延長等の心機能障害を引き起こす懸念があることが報告されており、医薬品の開発においては hERG 阻害作用の懸念が低い化合物の創出が必要である。⁴⁴⁾ Terfenadine、cisapride および MK-499 は、hERG 阻害作用を有することが報告されている代表的な化合物であり、構造的に共通して塩基性および疎水性置換基部位を有している (Figure 15)。これらの化合物に関しては *in silico* での分子モデル計算により、hERG チャンネルのカリウムイオンが透過するポア領域での推定結合様式が報告されており、塩基性置換基と Tyr652 とのカチオン- π 相互作用および疎水性置換基と Tyr652、Phe656 との π スタッキング相互作用が結合に重要であることが示唆されている。^{45,46)} 化合物 **18b** は強い JAK3 阻害位活性および T 細胞増殖阻害活性を示したが、一方で hERG 阻害作用の懸念があることが明らかとなった (hERG IC₅₀ = 13.4 μ M)。上記の既知 hERG 阻害剤の知見から、化合物 **18b** の hERG 阻害作用に関しては *N*-シアノピリジル-4-アミノピペリジン構造部と hERG チャンネルとの相互作用が関与していることが考えられる (Figure 16)。そこで、化合物 **18b** のピペリジン部への置換基導入やピリジン部の構造変換を行い、化合物の塩基性および脂溶性を調節することにより、hERG 阻害作用の減弱を検討した。

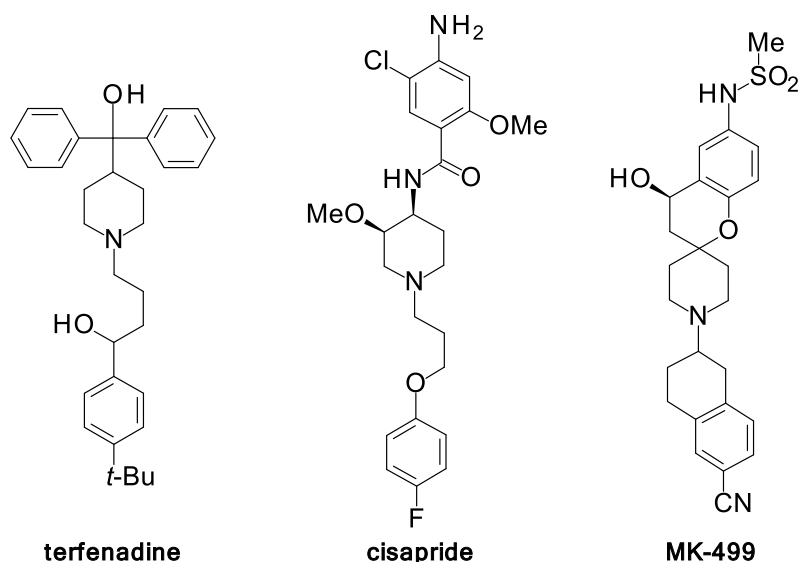


Figure 15. Chemical structures of hERG blockers.

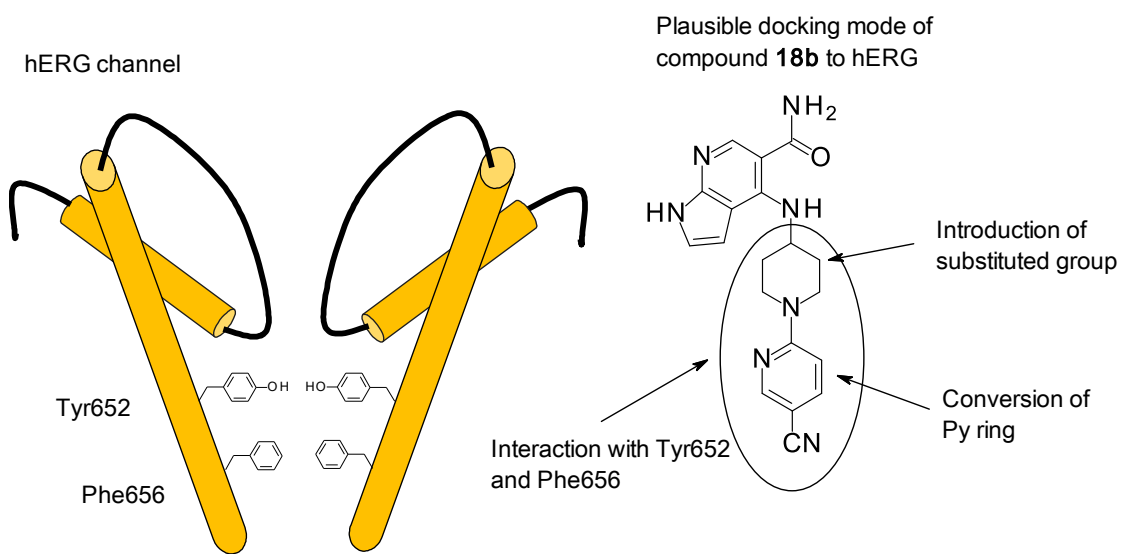


Figure 16. Strategy for reducing hERG inhibition.

第五節 化合物 37 の創出

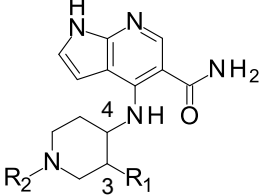
化合物 **18b** のピリジン部およびピペリジン部を構造変換した誘導体について、ヒト JAK 阻害活性および hERG 阻害活性を評価した (Table 6)。

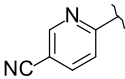
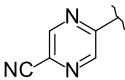
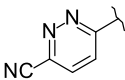
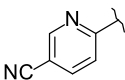
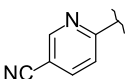
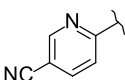
化合物 **18b** の課題である hERG 阻害作用に関して、分子脂溶性の低下により hERG チャンネルとの相互作用を低下させることを目的に、ピリジン環をより脂溶性が低い他のヘテロ環に変換することを検討した。ピラジン誘導体 **18e** およびピリダジン誘導体 **18f** は分子脂溶性が低下しつつ、強い JAK3 阻害活性を維持した (化合物 **18e**: JAK3 IC_{50} = 3.6 nM、 $CLogP$ = 2.4、化合物 **18f**: JAK3 IC_{50} = 1.2 nM、 $CLogP$ = 1.6)。hERG 阻害活性に関しては、化合物 **18e** および化合物 **18f** は共に、化合物 **18b** と比較して阻害活性値が大きく低下した (化合物 **18e**: hERG IC_{50} > 100 μ M、化合物 **18f**: hERG IC_{50} > 100 μ M)。これらの結果より、ピリジン環の変換による芳香族環部の脂溶性および電子密度低下が hERG 阻害活性の低下に効果的であることが示された。

次に、化合物 **18b** のピペリジン部の置換基導入を検討した。第一章での検討において、化合物 **12c** のシクロヘキサン環上のメチル基が JAK3 阻害活性の向上に効果的であったことから、同様に、化合物 **18b** のピペリジン部へのメチル基の導入を検討した。その結果、3-メチルピペリジン誘導体 **26** は期待通りに JAK3 阻害活性が向上した (IC_{50} = 0.78 nM)。しかしながら、化合物 **26** は高い分子脂溶性に伴い、中程度の hERG 阻害作用を維持した (hERG IC_{50} = 28.7 μ M、 $CLogP$ = 3.4)。そこで、メチル基の代わりにピペリジン環の 3 位にフルオロ基を導入することを検討した (化合物 **37** および化合物 **41**)。フルオロピペリジン構造は、フルオロ基の電子求引効果により共役酸の pK_a 値が低下する (Figure 17)。したがって、化合物 **37** および化合物 **41** はピペリジン部の窒素原子の塩基性低下により、hERG チャンネルとの相互作用が減弱することが期待できる。^{47,48)} 3-フルオロピペリジン-4-アミン構造部の立体化学については、(3*R*, 4*S*)体の化合物 **41** は化合物 **18b** と同程度の JAK3 阻害活性であったのに対し、(3*S*, 4*R*)体の化合物 **37** は 4 倍程度の JAK3 阻害活性向上を示し、化合物 **26** と同様に、ピペリジン環の 3 位における置換基効果を示した (化合物 **37**: JAK3 IC_{50} = 0.3 nM、化合物 **41**: JAK3 IC_{50} = 1.7 nM)。hERG 阻害作用に関しては、化合物 **37** および化合物 **41** は化合物 **18b** と比較して、阻害活性値が大きく低下した (化合物 **37**: hERG IC_{50} > 100 μ M、化合物 **41**: hERG IC_{50} > 100 μ M)。化合物 **37** および化合物 **41** は化合物 **18b** と比較して、分子脂溶性がやや低下すると共に、ピペリジン部での塩基性が低下することにより hERG チャンネルとの相互作用が減弱していると考えられる。

強力な JAK3 阻害活性を示した化合物 **37** は JAK1 および JAK2 阻害活性に対しては、約 10 倍の JAK3 選択性を示した。さらに化合物 **37** はキナーゼパネルアッセイにおいて、代表的な 32 個のキナーゼに対して弱い阻害活性を示した (Table 7)。

Table 6. SARs of *N*-aryl-4-aminopiperidine derivatives



Compd	R1	R2	JAK3 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK1 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK2 IC ₅₀ ^a (nM)	hERG IC ₅₀ ^b (μM)	CLogP ^c
18b	H		1.3	16	18	13.4	2.8
18e	H		3.6	35	41	>100	2.4
18f	H		1.2	22	12	>100	1.6
26	Me (<i>cis</i>)		0.78	11	14	28.7	3.4
37	F (<i>3S</i> , <i>4R</i>)		0.30	4.1	3.2	>100	2.7
41	F (<i>3R</i> , <i>4S</i>)		1.7	27	17	>100	2.7

^a IC₅₀ values are the average of duplicate experiments. ^b Inhibitory activity in Rb efflux assay (n = 2). ^c CLogP values calculated using ACD/Labs Software, version 12.01.

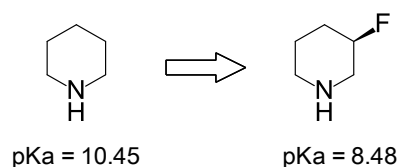


Figure 17. Effect of introducing fluorine atom to piperidine on pKa value.

(The pKa values were calculated as conjugate acids by ACD/PhysChem Ver12.01.)

Table 7. Kinase panel assay of compound **37**

Kinase	IC ₅₀ (nM)
EGFR	>1000
TRKA	470
TIE2	>1000
IGF1R	>1000
HER2	>1000
EPHA2	>1000
TEC	>1000
BTK	>1000
ITK	>1000
SYK	>1000
ZAP70	>1000
ABL	>1000
CSK	>1000
FAK	>1000
JNK3	560
CDK2/CycA	590
GSK3 β	980
CaMK2a	1000
CHK1	950
ROCK1	190
PKC α	130
PKC θ	320
p70S6K	>1000
AurC	>1000
AKT1	>1000
CK1 δ	>1000
MEKK1	>1000
MEK1	>1000
RAF1	>1000
MLK1	51
BMPR1A	>1000
IRAK4	>1000

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、強い JAK3 阻害活性を示した化合物についてラット脾臓細胞を用いた IL-2 刺激下の T 細胞増殖阻害作用および細胞膜透過性を評価した (Table 8)。

化合物 **18b** は、強い JAK3 阻害活性に基づき、良好な T 細胞増殖阻害作用を示した ($IC_{50} = 27$ nM)。一方、化合物 **18e** および化合物 **18f** は化合物 **18b** と比較して、強い JAK3 阻害活性を維持したにも関わらず細胞増殖阻害活性が低下した (化合物 **18e**: $IC_{50} = 77$ nM、化合物 **18f**: $IC_{50} = 140$ nM)。化合物 **18e** および化合物 **18f** で認められた JAK3 阻害活性と T 細胞増殖阻害活性の乖離に関して検討するために、これらの化合物の細胞膜透過性を PAMPA 評価した。その結果、化合物 **18b** が高い細胞膜透過性を示したことに對し、化合物 **18e** および化合物 **18f** は低い膜透過性であった。(化合物 **18b**: $P_e = 26 \times 10^{-6}$ cm/sec、化合物 **18e**: $P_e < 0.2 \times 10^{-6}$ cm/sec、化合物 **18f**: $< 0.2 \times 10^{-6}$ cm/sec)。化合物 **18e** および化合物 **18f** は化合物 **18b** と比較して、分子脂溶性が低下していることが低い細胞膜透過性の要因であると考えられる。一方、化合物 **37** は強力な JAK3 阻害活性および比較的良好な細胞膜透過性 ($P_e = 9 \times 10^{-6}$ cm/sec) を両立したことから、強い T 細胞増殖阻害作用を示した ($IC_{50} = 11$ nM)。これらの結果より、化合物 **37** は JAK3 阻害に基づく強い免疫調節作用を示し、hERG 阻害による心機能障害の懸念が低い、優れたプロファイルを有する化合物であることが示された。

Table 8. Cellular assay of *N*-aryl-4-aminopiperidine derivatives

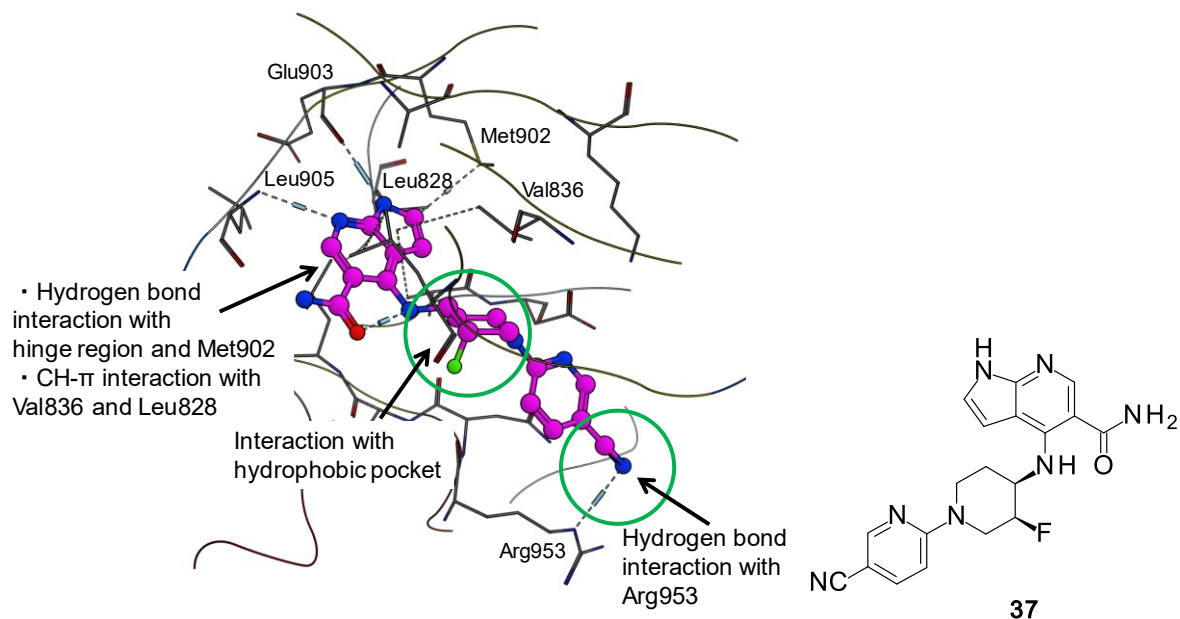
Compd	T cell proliferation IC_{50}^a (nM)	PAMPA P_e^b ($\times 10^{-6}$ cm/sec)
18b	27	26
18e	77	<0.2
18f	140	<0.2
37	11	9
41	44	5

^a Inhibitory effect on IL-2-stimulated T cell proliferation using rat spleen cells (n = 2). ^b PAMPA Evolution™ (pION Inc., USA), donor buffer pH: 6.5 (n = 3).

第六節 化合物 37 のドッキング計算解析

化合物 37 に関して、アミノピペリジン構造部へのシアノピリジン環およびフルオロ基の導入が強い JAK3 阻害活性の発現に寄与していた。これらの置換基の JAK3 阻害活性に対する効果を検証するために、化合物 37 と JAK3 蛋白とのドッキング計算を実施した (Figure 18、PDB 番号: 3LXK)。その結果、化合物 37 は第一章において検討した 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体と同様の推定結合様式を示した。化合物 37 に関して、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環は ATP 結合部位のヒンジ領域の近傍に位置し、N1 位の水素原子および N7 位の窒素原子がプロトン供与体およびプロトン受容体として、Glu903 および Leu905 とそれぞれ水素結合を形成した。また、C2 位の水素原子は結合ポケットのゲートキーパー部位のアミノ酸 Met902 と相互作用を示し、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環が Val836 および Leu828 との CH- π 相互作用を形成した。また、C5 位のカルバモイル基と C4 位のアミノ基との間で分子内水素結合の形成が認められた。この分子内相互作用により、アミノピペリジン部は疎水性ポケット領域に保持され、フルオロ基は疎水性ポケット表面の近傍に位置し、疎水性相互作用を形成した。さらにシアノピリジン環は疎水性ポケット領域の奥側に伸長して、JAK3 蛋白との相互作用を示した。ピペリジン環の N 原子上のピリジン環は Asp967 の酸性側鎖の近傍に位置し、イオン性の相互作用が示唆された。また、シアノ基は Arg953 の側鎖との相互作用が認められた。この Arg953 との水素結合は tofacitinib では認められていない新規な相互作用であり、一連の *N*-シアノアリール-4-アミノピペリジン誘導体の構造活性相関の結果から、強い JAK3 阻害活性の発現に寄与していると考えられる。

A)



B)

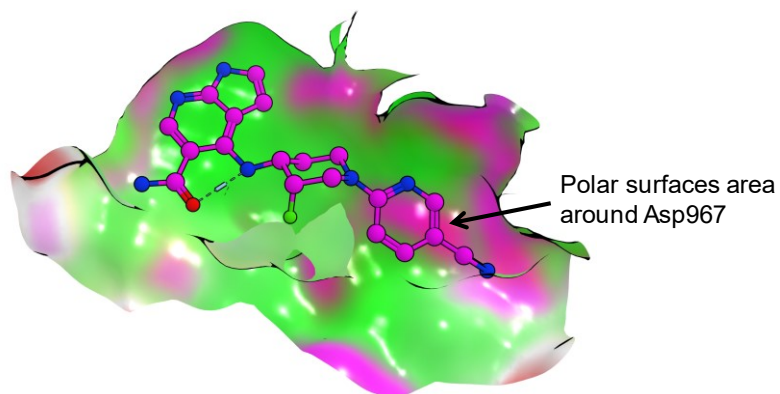


Figure 18. Predicted binding mode of compound **37** to human JAK3. (A) Dotted lines indicate potential binding interactions. (B) Magenta indicates polar surfaces, and yellowish green indicates hydrophobic surfaces.

第七節 化合物 37 の薬物動態評価

化合物 37 に関して、ヒトおよび各種動物の肝ミクロソームを用いた代謝安定性を評価した (Table 9)。ラットでの肝代謝安定性に関して、化合物 37 は化合物 18b と比較して、代謝クリアランス値が大きく低下した (化合物 18b: $CL_{int} = 204 \text{ mL/min/kg}$ 、化合物 37: $CL_{int} = 27.5 \text{ mL/min/kg}$)。この結果から、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4 位のピペリジン環へのフルオロ基の導入は JAK3 阻害活性の向上だけでなく、代謝安定性の改善にも効果的であることが判明した。また、化合物 37 はラットだけでなく、イヌ、サルおよびヒトの各種において同様に、低い代謝クリアランス値を示した。

Table 9 In vitro metabolic stability of compound 37

$CL_{int} \text{ (mL/min/kg)}^a$			
Rat	Dog	Monkey	Human
27.5	18.8	9.9	4.8

^a In vitro metabolism with liver microsomes in presence of NADPH-generating system (n = 2).

化合物 37 が肝ミクロソームに対して良好な代謝安定性を示したことから、経口および静脈内投与での薬物動態プロファイルを評価した (Table 10)。化合物 37 はラットにおいて、低い全身クリアランス値を示し、良好な経口吸収性およびバイオアベイラビリティを示した ($CL_{tot} = 5.3 \text{ mL/min/kg}$ 、 $F = 70.7\%$)。また、化合物 37 はイヌおよびサルにおいても、同様な薬物動態プロファイルを示し、良好な経口バイオアベイラビリティを示した (イヌ: $F = 49.1\%$ 、サル: $F = 64.3\%$)。以上の結果より、化合物 37 は良好な薬物動態プロファイルを有する化合物であることが示された。

Table 10. Pharmacokinetic parameters of compound **37**

Species	iv ^a				po ^b			
	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	t _{1/2} (h)	V _{dss} (L/kg)	CL _{tot} (mL/min/kg)	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	F ^c (%)
Rat	3196	3.0	1.1	5.3	633	3.3	6778	70.7
Dog	5652	4.2	1.0	3.0	666	2.7	8303	49.1
Monkey	4493	5.4	1.5	3.8	684	5.3	8689	64.3

^a Dosed at 1 mg/kg (rats, n = 2; dogs and monkeys, n = 3). ^b Dosed at 3 mg/kg (n = 3). ^c F = bioavailability.

第八節 第二章のまとめ

第一章で創出した化合物 **12c** を出発として、化合物 **12c** の主代謝部位である 2-メチルシクロヘキシルアミノ基部分の構造変換を検討した。その結果、4-アミノピペリジン構造を有する誘導体が強い JAK3 阻害活性を示すことを見出した。特に、ピペリジン環の N 原子上へのシアノピリジル基の導入により、化合物 **18b** が強い JAK3 阻害活性を示した。化合物 **18b** は hERG 阻害作用が認められたが、ピペリジン環を脂溶性が低減した他のヘテロ環に変換することで、化合物 **18e** および化合物 **18f** は強い JAK3 阻害活性を維持し、かつ hERG 阻害活性が大きく低下した。また、化合物 **18b** のピペリジン環部にフルオロ基を導入することにより、化合物 **37** はさらなる JAK3 阻害活性の向上を示し、かつ、ピペリジン部の窒素原子の塩基性が低下することにより hERG 阻害活性が大きく低下した。

化合物 **18e** および化合物 **18f** は低い細胞膜透過性により、弱い T 細胞増殖阻害作用を示したことに對し、化合物 **37** は良好な細胞膜透過性を示し、T 細胞増殖阻害作用が向上した。他キナーゼに対する選択性に関して、化合物 **37** は JAK1 および JAK2 に対して約 10 倍の JAK3 選択性を示し、キナーゼパネルアッセイにおいて、代表的な 32 個のキナーゼに対して弱い阻害活性を示した。さらに、化合物 **37** は肝ミクロソームに対する代謝安定性が良好であり、ラット、イヌおよびサルにおいて良好な薬物動態プロファイルを示した。ドッキング計算解析の結果から、これまでの 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体で認められた JAK3 蛋白との相互作用に加えて、化合物 **37** は疎水性ポケット領域の奥側で、シアノ基が Arg953 との新規な相互作用を形成することで強力な JAK3 阻害活性を発現していると考えられた。

以上の結果から、新規な 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体であり、強力な JAK3 阻害活性、JAK1 および JAK2 に対して約 10 倍の JAK3 選択性を有し、hERG 阻害作用が弱く、経口投与での免疫調節作用が期待できる化合物として化合物 **37** を創出することに成功した。

第三章 JAK3 阻害活性を有する新規 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の創出

第一節 合成方針

第一章および第二章において、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミドを母核とした化合物が強い JAK3 阻害活性を示すことを見出した。また、本誘導体において、C4 位の置換基は JAK3 蛋白の疎水性ポケット領域との相互作用に参与しており、JAK3 阻害活性の向上に重要であった。一方で、一般的なキナーゼ阻害活性の発現にはヒンジ領域との相互作用が重要であることから、母核部分の変換は、さらなる JAK3 阻害活性の向上を達成する可能性がある。既知の JAK3 阻害活性を有する化合物の多くは、tofacitinib (Figure 3) に代表されるように、ヒンジ領域と相互作用が可能な 5,6-縮合二環性ヘテロ環を有している。第一章において、6 員環部の置換基導入を検討したが、5 員環部の構造変換による JAK3 阻害活性への効果についての知見は得られていなかった。そこで、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド構造をミミックした新規な 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体をデザインし、JAK3 阻害活性に関する構造活性相関を検討した (Figure 19)。

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体のドッキング計算解析から、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環は JAK3 蛋白のヒンジ領域の Glu903 および Leu905 と水素結合を形成した。1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体との構造的比較から、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体はヒンジ領域の近傍において、JAK3 阻害活性の発現に重要な上記の 2 つの水素結合を保持することが期待できる。また、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環は Leu828 および Val836 との CH- π 相互作用に参与していたことから、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の C6 位に芳香族性のベンゼン環を導入することにより同様の CH- π 相互作用の形成が期待される。上記の作業仮説に基づきデザインした新規 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体に関して、JAK3 阻害活性の向上を目的に C4 位および C6 位の置換基の構造最適化を検討した。

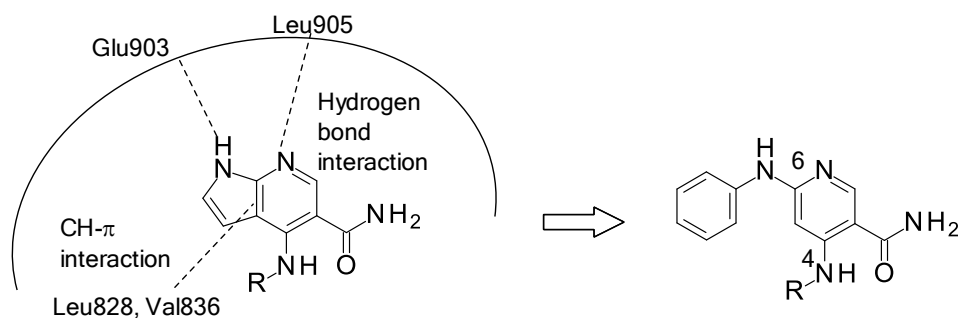
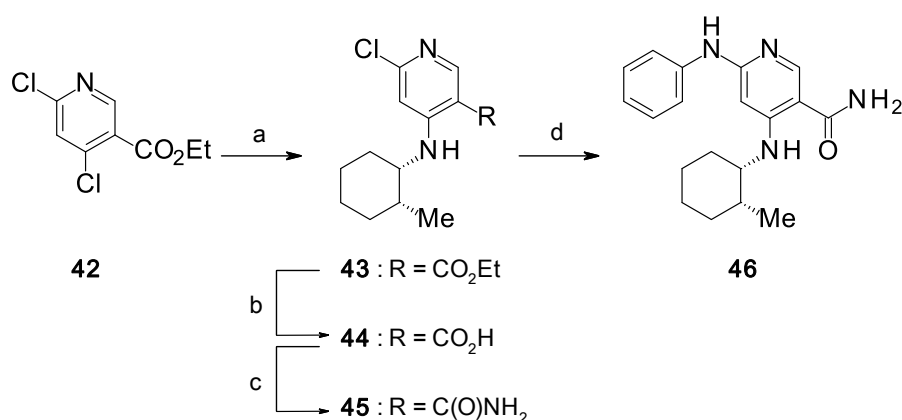


Figure 19. Design of 4,6-diaminonicotinamide derivatives.

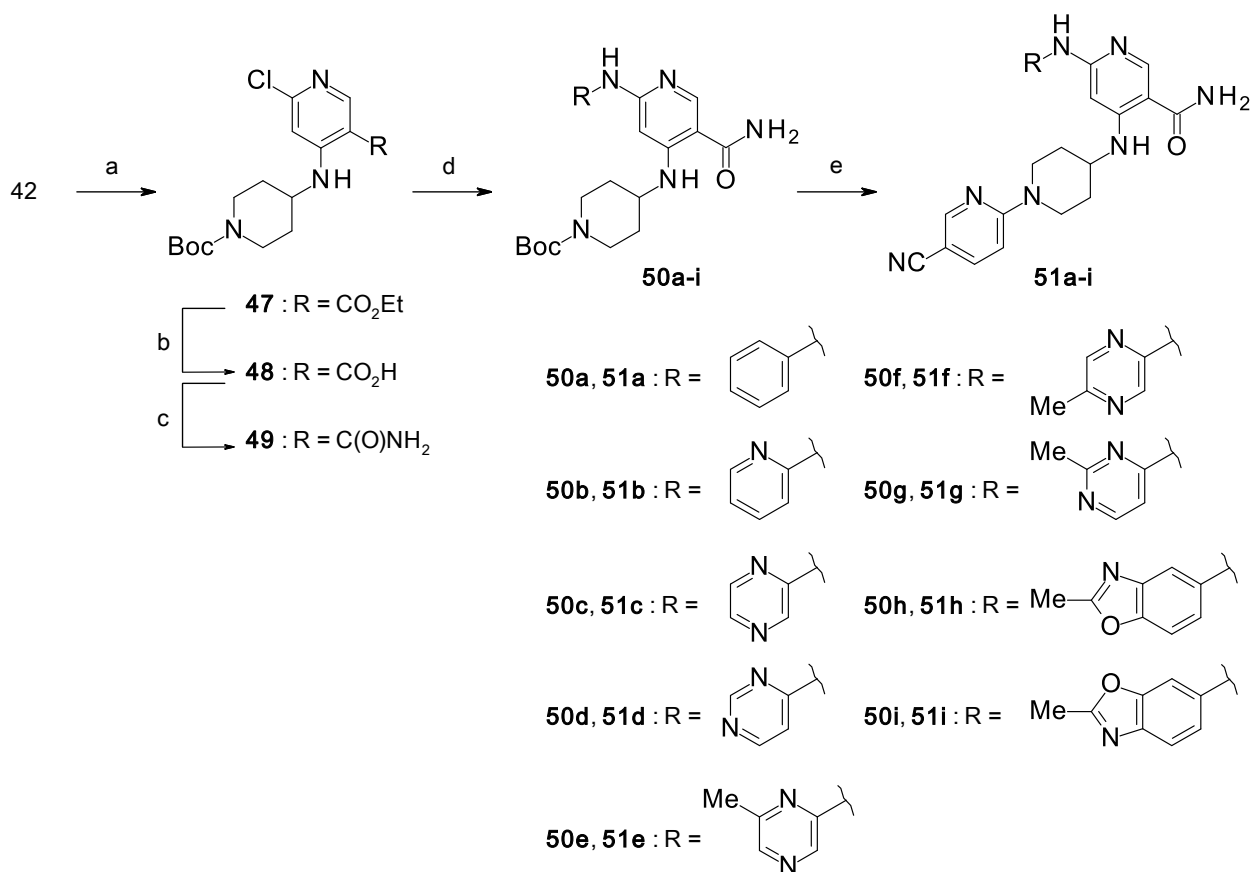
第二節 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の合成

4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の一般的合成法を、Scheme 10 に示す。4,6-ジクロロニコチン酸エチル（化合物 **42**）を(1*S*,2*R*)-2-メチルシクロヘキシルアミンと反応させ、化合物 **43** を収率 98%にて得た。化合物 **43** のエステル基を加水分解することで化合物 **44** を収率 58%にて得た後、アンモニアと縮合し化合物 **45** を収率 91%にて得た。化合物 **45** を Pd₂(dba)₃、2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl および塩基を用いた条件でアニリンとカップリング反応させることで、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体 **46** を収率 55%にて得た。^{49,50)}



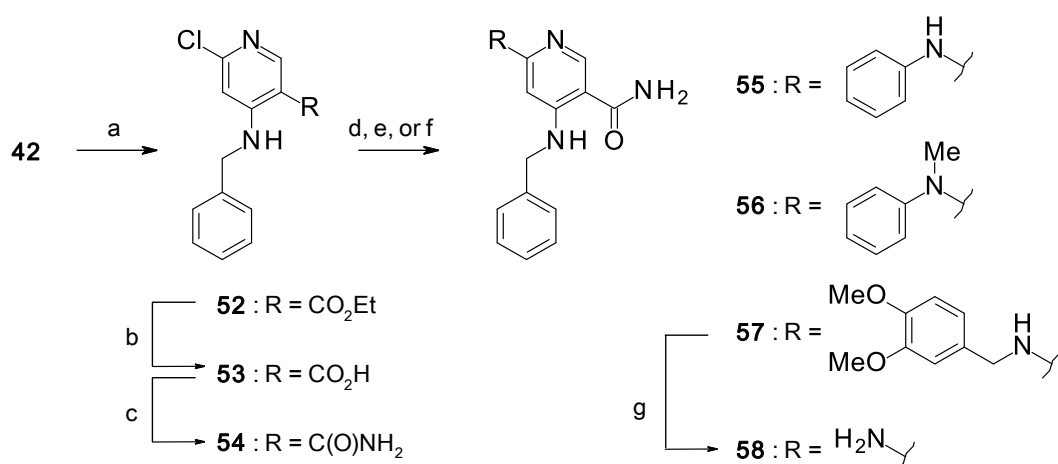
Scheme 10. Reagents and conditions: (a) (1*S*,2*R*)-2-methylcyclohexanamine hydrochloride, DIPEA, *n*-BuOH, 120 °C, 98%; (b) 2 M NaOH aq., dioxane, 110 °C, 58%; (c) CDI, DMF, room temperature, then 28% NH₄OH aq., room temperature, 91%; (d) aniline, Pd₂(dba)₃, 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl, *t*-BuONa, *t*-BuOH, microwave, 130 °C, 55%.

4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体に関して、C4 位に *N*-シアノピリジル-4-アミノピペリジン構造を有する化合物の合成法を Scheme 11 に示す。化合物 **45** の合成と同様に、化合物 **42** および *N*-Boc-4-アミノピペリジンを用いて化合物 **49** を得た。化合物 **49** と種々のアールアミンをパラジウム触媒下、カップリング反応を行うことで化合物 **50a-i** を得た（収率 29–93%）。化合物 **50a-i** の Boc 基を酸性条件で脱保護した後、2-クロロ-5-シアノピリジンと反応させることで化合物 **51a-i** を収率 26–90%にて得た。



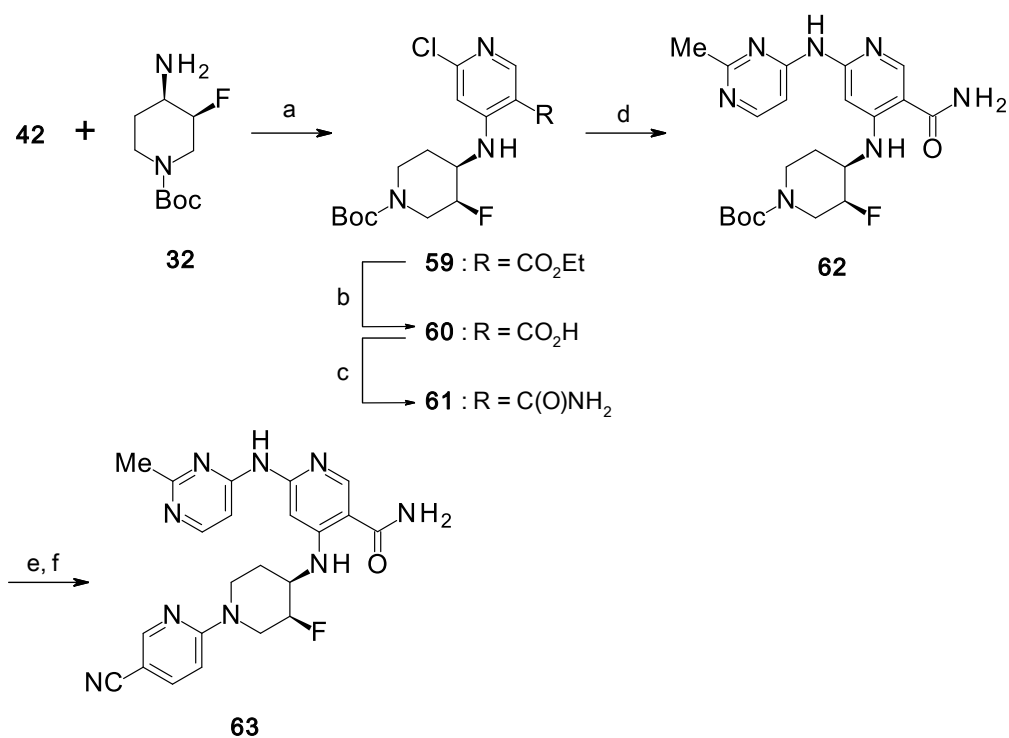
Scheme 11. Reagents and conditions: (a) *N*-Boc-4-aminopiperidine, DIPEA, *n*-BuOH, 120 °C, 99%; (b) 2 M NaOH aq., dioxane, 110 °C, 88%; (c) CDI, DMF, room temperature, then 28% NH₄OH aq., room temperature, 90%; (d) amines, Pd₂(dba)₃, 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl, *t*-BuONa or K₂CO₃, *t*-BuOH, microwave, 130-140 °C, 29–93%; (e) 4 M HCl, dioxane, room temperature, then 2-chloro-5-cyanopyridine, K₂CO₃, DMSO, 100 °C or Et₃N, NMP, microwave, 150 °C, 26–90%.

4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体に関して、C4 位にベンジルアミン構造を有する化合物の合成法を Scheme 12 に示す。化合物 **42** およびベンジルアミンより合成した化合物 **54** をパラジウム触媒下、アニリンとカップリング反応させることで化合物 **55** を収率 36%にて得た。化合物 **54** に *N*-メチルアニリンまたは 3,4-ジメトキシベンジルアミンを求核置換反応させることで化合物 **56** および化合物 **57** をそれぞれ収率 16% および 63%にて得た。化合物 **57** の 3,4-ジメトキシベンジル基をトリフルオロ酢酸を用いて脱保護し、化合物 **58** を収率 32%にて得た。



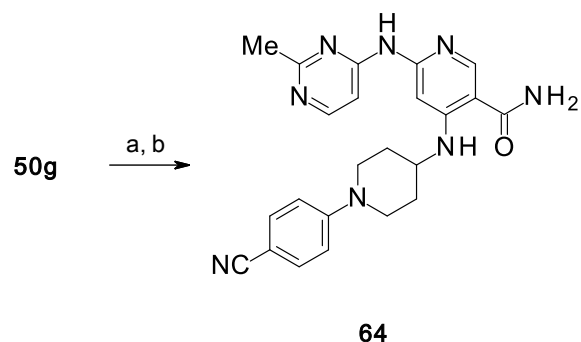
Scheme 12. Reagents and conditions: (a) benzylamine, DIPEA, *i*-PrOH, 80 °C, 97%; (b) 6 M NaOH aq., EtOH, 70 °C, 91%; (c) CDI, DMF, room temperature, then 28% NH₄OH aq., room temperature, 85%; (d) aniline, Pd₂(dba)₃, 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl, *t*-BuONa, *t*-BuOH, NMP, dioxane, microwave, 140 °C, 36% (for **55**); (e) *N*-methylaniline, tetraethylammonium chloride, NMP, 180 °C, 16% (for **56**); (f) 3,4-dimethoxybenzylamine, DIPEA, NMP, microwave, 180 °C, 63% (for **57**); (g) TFA, microwave, 100 °C, 32%.

化合物 **63** の合成法を Scheme 13 に示す。化合物 **42** および化合物 **32** を用いた求核置換反応により化合物 **59** を収率 71%にて得た。化合物 **59** のエステル基を加水分解し、化合物 **60** を収率 84%にて得た後、カルバモイル基に変換することで化合物 **61** を収率 80%にて得た。化合物 **61** をパラジウム触媒下、2-メチルピリミジン-4-アミンとカップリング反応を行うことで化合物 **62** を収率 46%にて得た。化合物 **62** の Boc 基を脱保護した後、2-クロロ-5-シアノピリジンと反応させ化合物 **63** を収率 51%にて得た。



Scheme 13. Reagents and conditions: (a) DIPEA, DMF, 130 °C, 71%; (b) 2 M NaOH aq., dioxane, 110 °C, 84%; (c) CDI, DMF, room temperature, then 28% NH₄OH aq., room temperature, 80%; (d) 2-methylpyrimidin-4-amine, Pd₂(dba)₃, 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl, *t*-BuONa, *t*-BuOH, 90 °C, 46%; (e) 4 M HCl, dioxane, room temperature; (f) 2-chloro-5-cyanopyridine, Et₃N, NMP, 100 °C, 51%.

化合物 **64** の合成法を Scheme 14 に示す。化合物 **50g** の Boc 基を脱保護した（収率 93%）後、4-フルオロベンゾニトリルと反応させることで化合物 **64** を収率 57%にて得た。



Scheme 14. Reagents and conditions: (a) 4 M HCl, dioxane, room temperature, 93%; (b) 4-fluorobenzonitrile, K₂CO₃, DMSO, microwave, 140 °C, 57%.

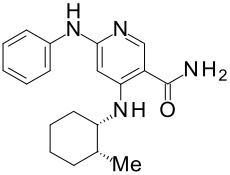
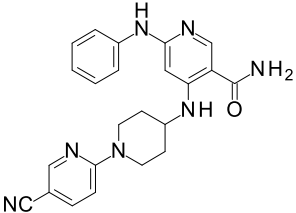
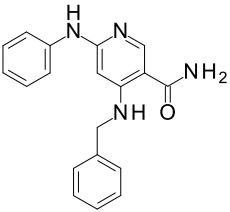
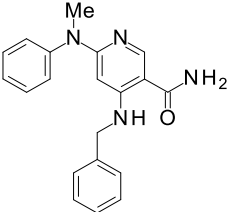
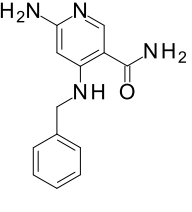
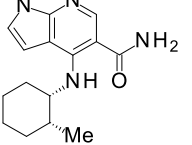
第三節 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の構造活性相関

4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体に関して、C4位に代表的な置換基を導入した化合物を用いてヒト JAK3 阻害活性に関する基礎的な構造活性相関を検討した (Table 11)。

初めに、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体のC4位のアミノ置換基に関して、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の化合物 **12c** および化合物 **18b** のC4位の置換基に対応するメチルシクロヘキサン構造および *N*-シアノピリジルピペリジン構造を導入することを検討した。その結果、化合物 **46** および化合物 **51a** は中程度の JAK3 阻害活性を示し、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体のC4位の構造変換の許容性を確認することができた (化合物 **46**: IC₅₀ = 37 nM、化合物 **51a**: IC₅₀ = 18 nM)。この結果から、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体のC4位の置換基は1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体と同様に、JAK3 蛋白の疎水性ポケット領域と相互作用すると考えられた。また、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体のC4位のアミノ置換基に関して、脂肪族性置換基であるベンジル基を導入した結果、化合物 **55** は中程度の JAK3 阻害活性を維持した (IC₅₀ = 19 nM)。

次に、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体のC6位の置換基に関して、JAK3 阻害活性への効果を検討するために、化合物 **55** のアニリン部の構造変換を検討した。その結果、化合物 **55** のC6位を *N*-メチル化した化合物 **56** およびベンゼン環を除去した化合物 **58** は JAK3 阻害活性が大きく低下した (化合物 **56**: IC₅₀ >1000 nM、化合物 **58**: IC₅₀ >1000 nM)。この結果から、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体のC6位部のプロトン供与性および芳香族性が JAK3 蛋白のヒンジ領域との相互作用に重要であり、JAK3 阻害活性の発現に関与していることが示唆された。

Table 11. SARs of 4,6-diaminonicotinamide derivatives

Compd	Structure	JAK3 IC ₅₀ ^a (nM)
46		37
51a		18
55		19
56		>1000 (40% inh.@ 1 μM)
58		>1000 (41% inh.@1 μM)
12c		5.1

^a IC₅₀ values are mean of duplicate experiments.

4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体に関して、C6位の置換基を変換した化合物について、ヒト JAK 阻害活性および hERG 阻害活性を評価した (Table 12)。

C4位の置換基に関して、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体での検討において、化合物 **18b** が肝ミクロソームに対する代謝安定性の面で良好であっ

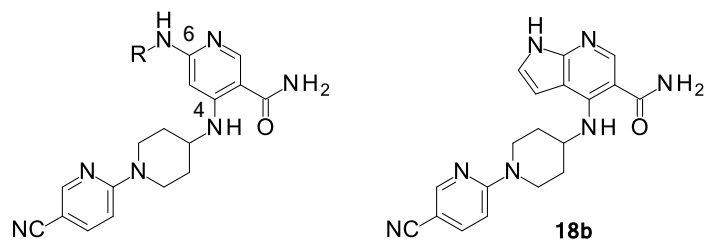
たことから、*N*-シアノピリジル-4-アミノピペリジン構造に固定し、検討を行った。化合物 **18b** と比較して、6-アニリノニコチンアミド誘導体 **51a** は C6 位の置換基の自由回転により JAK3 蛋白のヒンジ領域近傍において、より自由度が高い構造であると考えられる。1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体において、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環は Leu828 および Val836 との CH- π 相互作用に参与していたことから、平面的な二環性ヘテロ環をミミックすることは JAK3 阻害活性の向上に効果的であると考えられた。そこで、化合物 **51a** の C6 位のアニリン構造を 2-アミノピリジンに変換し立体障害を低下させることで、より平面性が高い母核構造にすることを検討した。また、C6 位にピリジン環のような極性官能基を導入することは、親水性であるヒンジ領域への相互作用に対して有利であると考えられた (Figure 20)。

上記の作業仮説に基づき合成した化合物 **51b** は化合物 **51a** と比較して、約 40 倍の JAK3 阻害活性の向上を示した ($IC_{50} = 0.46$ nM)。また、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体との比較において、対応する化合物 **18b** は 1.3 nM の IC_{50} 値であったことから、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体が JAK3 阻害活性の点で優れていることが示唆された。さらに化合物 **51b** は JAK1 および JAK2 阻害活性に対して、中程度の JAK3 選択性を示した (JAK1/JAK3 = 6、JAK2/JAK3 = 11)。この結果から、4,6-ジアミノニコチンアミド構造が JAK3 蛋白のヒンジ領域との相互作用に関して有用な母核構造であることが示された。

しかしながら、化合物 **51b** は強い JAK3 阻害活性を示す一方、化合物 **18b** と同様に hERG 阻害活性を示すことが明らかとなった ($IC_{50} = 0.36$ μ M)。hERG チャネルへの結合には疎水性の相互作用が関与していることから、化合物 **51b** の C6 位のピリジン環を他のヘテロ環に変換し、分子脂溶性を低下させることを検討した。その結果、6-ピラジリアミン誘導体 **51c** および 6-ピリミジリアミン誘導体 **51d** は強い JAK3 阻害活性を維持した (化合物 **51c**: $IC_{50} = 0.72$ nM、化合物 **51d**: $IC_{50} = 0.61$ nM)。次に、ピラジン環およびピリミジン環への置換基導入を検討した結果、メチルピラジン誘導体である化合物 **51e** および化合物 **51f** は強い JAK3 阻害活性を維持した (化合物 **51e**: $IC_{50} = 1.0$ nM、化合物 **51f**: $IC_{50} = 1.1$ nM)。一方、メチルピリミジン誘導体 **51g** は、やや JAK3 阻害活性が向上した ($IC_{50} = 0.36$ nM)。また、他の二環性ヘテロ環としてベンゾオキサゾール環を導入した結果、化合物 **51h** および化合物 **51i** は JAK3 阻害活性が低下した (化合物 **51h**: $IC_{50} = 22$ nM、化合物 **51i**: $IC_{50} = 25$ nM)。4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の hERG 阻害作用に関しては、6-ピリミジリアミン構造を有する化合物 **51d** および化合物 **51g** が強い JAK3 阻害活性を維持しつつ、分子脂溶性の低下

に伴い、hERG 阻害活性が低下傾向を示した（化合物 **51d**: hERG IC₅₀ = 17 μM、CLogP = 4.0、化合物 **51g**: hERG IC₅₀ = 8.1 μM、CLogP = 4.3）。

Table 12. SARs of *N*-cyanopyridyl-4-aminopiperidine derivatives



Compd	R	JAK3 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK1 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK2 IC ₅₀ ^a (nM)	hERG IC ₅₀ ^b (μM)	CLogP ^c
51a		18	NT ^d	190	NT ^d	5.1
51b		0.46	2.9	4.9	0.36	4.7
51c		0.72	2.5	4.1	7.7	4.2
51d		0.61	3.5	5.5	17	4.0
51e		1.0	1.9	4.0	5.4	4.7
51f		1.1	6.7	5.3	4.8	4.7
51g		0.36	5.4	3.2	8.1	4.3
51h		22	NT ^d	400	6.6	4.7
51i		25	NT ^d	130	NT ^d	4.7
18b		1.3	16	18	13.4	3.4

^a IC₅₀ values are mean of duplicate experiments. ^b Inhibitory activity in Rb efflux assay (n = 2).

^c CLogP values calculated using ACD/Percepta 14.0.0. ^d NT = not tested.

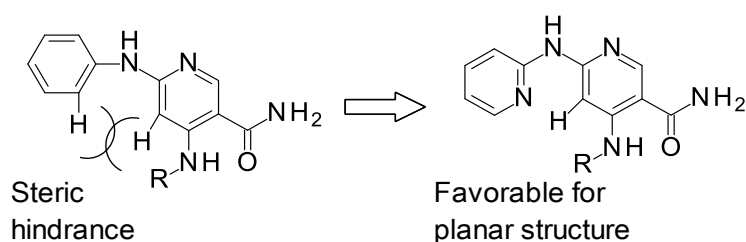
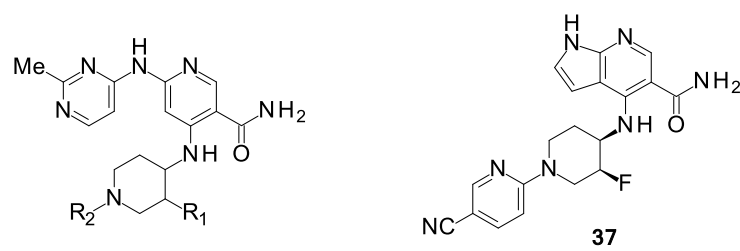
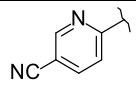
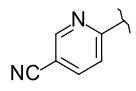
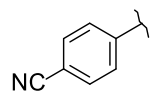


Figure 20. Modification of C6-substituent.

化合物 **51d** および化合物 **51g** が hERG 阻害活性の低減傾向を示したことから、6-ピリミジルニコチンアミド誘導体に関して、C4 位の置換基の構造変換を検討した (Table 13)。第二章での検討にて、N-シアノピリジルピペリジン部の塩基性が hERG 阻害活性発現に関与しており、化合物の塩基性を低下させることが hERG 阻害活性の減弱に効果的であった。そこで、化合物 **51g** のピペリジン環にフルオロ基を導入し、電子求引効果により化合物の塩基性を低下させることを検討した。その結果、3-フルオロピペリジン誘導体 **63** は強い JAK3 阻害活性を維持しつつ、期待通りに hERG 阻害活性が大きく低下した (JAK3 IC₅₀ = 0.39 nM、hERG IC₅₀ >100 μM)。また、化合物 **51g** のピリジン環をベンゼン環に変換し、ピリジン環の塩基性を除去することを検討した。その結果、化合物 **64** は JAK3 阻害活性はやや低下したものの、hERG 阻害活性が大きく低下した (JAK3 IC₅₀ = 0.80 nM、hERG IC₅₀ >100 μM)。化合物 **51g** と化合物 **64** の比較において、ピリジルピペリジン構造をフェニルピペリジン構造に変換することは分子脂溶性が増加するものの、hERG 阻害活性に対しては効果的であることが示された。JAK1 および JAK2 阻害活性に対する選択性に関しては、化合物 **64** は化合物 **63** よりもやや高い JAK3 選択性を示した (化合物 **63**: JAK1/JAK3 = 0.62、JAK2/JAK3 = 2.8、化合物 **64**: JAK1/JAK3 = 5.3、JAK2/JAK3 = 4.4)。加えて、化合物 **64** について代表的な 19 個のキナーゼに対して、キナーゼパネル評価を行った結果、JAK 以外の他のキナーゼに対しては弱い阻害作用であった (Table 14)。以上の結果より、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体において、化合物 **64** は強い JAK3 阻害活性、JAK1 および JAK2 に対して中程度の JAK3 選択性を有し、hERG 阻害の懸念が少ない化合物であることが示された。

Table 13. SARs of 6-pyrimidylaminonicotinamide derivatives


Compd	R1	R2	JAK3 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK1 IC ₅₀ ^a (nM)	JAK2 IC ₅₀ ^a (nM)	hERG IC ₅₀ ^b (μM)	CLogP ^c
51g	H		0.36	5.4	3.2	8.1	4.3
63	F (3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)		0.39	0.24	1.1	>100	4.0
64	H		0.80	4.2	3.5	>100	4.9
37			0.30	4.1	3.2	>100	3.1

^a IC₅₀ values are mean of duplicate experiments. ^b Inhibitory activity in Rb efflux assay (n = 2).

^c CLogP values calculated using ACD/Percepta 14.0.0.

Table 14. Kinase panel assay of compound **64**

Kinase	% Inhibition @ 1 μ M	% Inhibition @ 0.1 μ M	% Inhibition @ 0.01 μ M
CDK2/CycA	96%	76%	27%
MLK1	96%	84%	26%
TRKA	94%	49%	8%
ABL	54%	NT	NT
BTK	49%	NT	NT
CHK1	33%	NT	NT
AurC	28%	NT	NT
CK1 δ	25%	NT	NT
EGFR	19%	NT	NT
FAK	18%	NT	NT
HER2	14%	NT	NT
EPHA2	11%	NT	NT
AKT1	10%	NT	NT
TIE2	8%	NT	NT
BMPR1A	3%	NT	NT
ZAP70	-2%	NT	NT
CaMK2 α	-1%	NT	NT
MAP3K1	-63%	NT	NT
RAF1	-71%	NT	NT

第四節 化合物 **64** のドッキング計算解析

4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の JAK3 蛋白への結合様式を確認するために、化合物 **64** のドッキング計算解析を行った。また、化合物 **64** に関して 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体 **37** との結合様式の比較を行った (Figure 21)。

化合物 **64** の 4,6-ジアミノニコチンアミド部は平面的な立体構造を維持しており、JAK3 蛋白のヒンジ領域近傍において、N1 位の窒素原子および C6 位のアミノ基がそれぞれ、プロトン受容体およびプロトン供与体として、Leu905 と水素結合を形成した。C3 位のカルバモイル基はヒンジ領域の奥側に位置し、Glu903 と新規な水素結合を形成した。また、C3 位のカルバモイル基はゲートキーパー部の Met902 との相互作用も認められた。

化合物 **64** および化合物 **37** の比較において、4,6-ジアミノニコチンアミド構造が 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド構造をミミックしたにも関わらず、対応するカルバモイル基の位置が異なっていることが明らかとなった。化合物 **64** のピリジン環は化合物 **37** の対応するピリジン環の位置に重なり合ったが、化合物 **64** の C3 位のカルバモイル基は化合物 **37** のピロール環が位置する奥側のより狭い空間方向へ向かっていた。このカルバモイル基の配置の差は、ヒンジ領域部分の空間的許容性によるものと推測される。化合物 **37** のピロロピリジン環は狭い空間に許容されるのに対し、化合物 **64** のピリミジンアミノピリジン構造は立体的にかさ高いために許容されないと考えられる。したがって、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の C6 位の置換基は溶媒側の空間に向かい、立体的に小さい C3 位のカルバモイル基がヒンジ領域の奥側に反転し、Glu903 および Met902 との相互作用を形成した。化合物 **64** の C3 位のカルバモイル基による新規な水素結合は 4,6-ジアミノニコチンアミド構造をヒンジ領域近傍に固定し、強い JAK3 阻害活性の発現に寄与していたと考えられる。

また、化合物 **64** のピリジン環およびピリミジン環の芳香族性が Leu828 との CH- π 相互作用に関与していた。4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の構造活性相関の結果から、母核部分の平面性構造が維持され、CH- π 相互作用を形成することが JAK3 阻害活性の向上に重要であると考えられる。さらに化合物 **64** の C4 位のアミノピペリジン部は JAK3 蛋白の疎水性ポケットの空間を占めており、シアノフェニル基は疎水性領域の奥側で、Gly831 との CH- π 相互作用および Arg953 との水素結合を形成した。これらのドッキング計算解析の結果より、化合物 **64** は JAK3 蛋白との高い親和性を可能とすることで、強い JAK3 阻害活性を発現したと考えられる。

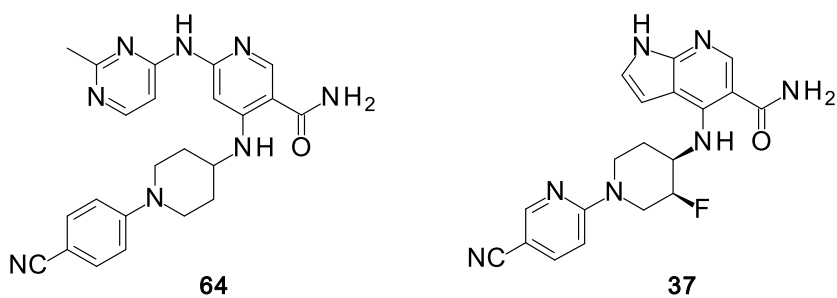
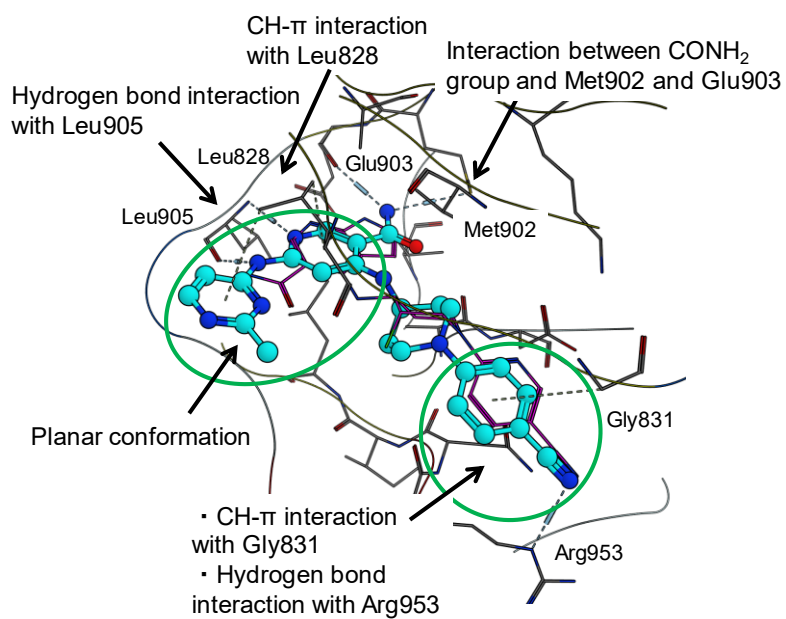


Figure 21. Predicted binding mode of compound **64** (blue) and **37** (pink) to human JAK3.

第五節 化合物 **64** の薬物動態評価

強い JAK3 阻害活性を示した化合物 **64** について、肝ミクロソームに対する代謝安定性および細胞膜透過性を評価した (Table 15)。

化合物 **64** はラット肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験において、良好なクリアランス値を示し、またヒトおよびラット間でのクリアランス値の種差はほとんど見られなかった (ラット $CL_{int} = 146 \text{ mL/min/kg}$ 、ヒト $CL_{int} = 109 \text{ mL/min/kg}$)。さらに化合物 **64** を PAMPA 評価した結果、高い細胞膜透過性を示した ($P_e > 30 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$)。

Table 15 In vitro profiles of compound **64**

Metabolic stability		Membrane permeability $P_e^b (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$
$CL_{int}^a (\text{mL/min/kg})$		
Rat	Human	
146	109	>30

^a In vitro metabolism with liver microsomes in the presence of NADPH-generating system (n = 2).

^b PAMPA Evolution™ (pION Inc., USA), donor buffer pH: 6.5 (n = 3).

化合物 **64** が良好な代謝安定性および細胞膜透過性を示したことから、ラットへの経口および静脈内投与による薬物動態プロファイルを評価した (Table 16)。その結果、化合物 **64** は中程度の経口吸収性および血漿中暴露を示した ($F = 23.6\%$)。

Table 16. Pharmacokinetic parameters after single administration of **64** to rats

iv ^a				po ^a			
AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	t _{1/2} (h)	V _{dss} (L/kg)	CL _{tot} (mL/min/kg)	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	F ^b (%)
1177	3.4	3.5	14.3	52.9	0.4	278	23.6

^a Dosed at 1 mg/kg (n = 3). ^b F = bioavailability.

第六節 第三章のまとめ

JAK3 蛋白のヒンジ領域との相互作用が可能な新規 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体をデザインし、JAK3 阻害活性に関する構造活性相関を検討した。4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の C4 位の置換基として、*N*-シアノピリジル-4-アミノピペリジン構造が許容され、C6 位の置換基に関してはピリジン、ピラジンおよびピリミジンのような芳香族ヘテロ環を導入することで、強い JAK3 阻害活性を示す化合物を複数創出した。しかしながら、多くの 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体は hERG 阻害作用を示したことから、C6 位の置換基の脂溶性低下および C4 位の置換基の塩基性低下による hERG 阻害活性の低下を検討した。比較的弱い hERG 阻害活性を示した 6-ピリミジルニコチンアミド誘導体 **51g** に関して、C4 位の置換基の構造変換を行った結果、化合物 **51g** のピペリジン環にフルオロ基を導入した化合物 **63** およびピリジン環をベンゼン環に変換した化合物 **64** が強い JAK3 阻害活性を維持しつつ、弱い hERG 阻害活性を示した。また、化合物 **64** は JAK1 および JAK2 阻害活性に関して、4~5 倍の中程度の JAK3 選択性を示した。

化合物 **64** の JAK3 蛋白とのドッキング計算解析を検討した結果、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体は、ヒンジ領域および疎水性ポケットにおいて、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体と同様の相互作用を示すだけでなく、C3 位のカルボキサミド基がヒンジ領域近傍で新規な水素結合を形成した。これらの JAK3 蛋白との相互作用により、4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体は強い JAK3 阻害活性を示すことが示唆された。

以上の結果から、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体とは異なる新規 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体が、JAK3 を標的とした免疫調節剤として有用であることを見出した。

第四章 ラット心移植試験における in vivo 薬効評価

第一節 化合物 **37** および化合物 **64** の in vivo 薬効評価

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体および 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体の検討の結果、強い JAK3 阻害活性を有する化合物 **37** および化合物 **64** を創出した (Table 17)。

Table 17. Profiles of compound **37**, compound **64**, and tofacitinib

Compd	JAK3 IC ₅₀ (nM)	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2 IC ₅₀ (nM)
37	0.30	4.1	3.2
64	0.80	4.2	3.5
tofacitinib	0.8	3.7	3.1

強い JAK3 阻害活性を有する化合物に関して、臓器移植時の拒絶反応の抑制効果を確認するために、ラット異所性心移植モデル試験⁵¹⁾での評価を検討した。ドナーである ACI ラットの心臓をレシピエントである Lewis ラットの腹部に移植した後、化合物を単剤または tacrolimus (0.02 mg/kg、筋肉内注射) との併用にて、14 日間、1 日 1 回経口投与した。移植心の拍動を触診により観察し、拍動の停止を拒絶として確認した。化合物を投与後、14 日目までに拒絶が確認された場合には、その時点で化合物の投与を中止した。生着日数は拒絶の前日までとし、生存期間の中央値 (median survival times: MST) を算出することで有効性を評価した。本モデルにおいては、化合物を投与していない溶媒対照群では移植片は移植 5 日後程度にて拒絶される。また、tacrolimus を単剤にて 0.02 mg/kg の投与量を筋肉内注射した場合には、拒絶反応に対する抑制効果は弱く、6.5 日程度の生着延長効果を示す。⁵¹⁾

1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体である化合物 **37** に関して、上記の心移植モデル試験にて、臓器移植時の拒絶反応に対する作用を評価した (Table

18)。その結果、化合物 **37** は経口投与にて移植片の拒絶反応を抑制し、用量依存的に生着延長効果を示した（10 mg/kg 経口投与時の MST: 11.5 日、20 mg/kg 経口投与時の MST: 22 日）。この結果から、JAK3 阻害作用を有する化合物が、臓器移植時の拒絶反応の抑制に対して有効であることが示された。

Table 18. Effect of compound **37** on graft survival in a rat cardiac transplantation model^a

Treatment	n	Survival times (days)	Median survival times (days)
Vehicle	5	5, 5, 5, 5, 6	5
37 , 10 mg/kg (po) ^b	4	6, 8, 15, 15	11.5
37 , 20 mg/kg (po) ^b	7	16, 20, 21, 22, 22, 22, >28	22

^a ACI rat hearts were heterotopically transplanted into Lewis rats. ^b **37** was administered from day of transplantation for 14 days or by day of graft rejection.

4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体である化合物 **64** について、ラット心移植モデル試験における拒絶反応に対する作用を評価した。化合物 **64** は化合物 **37** と比較して、ラットでの経口吸収性が低く単剤での有効性が弱いと考えられたことから、tacrolimus 併用下での作用を評価した（Table 19）。その結果、化合物 **64** は 10 mg/kg 経口投与にて拒絶反応を抑制し、移植片の生着延長作用を示した（MST: 22.5 日）。この結果から、JAK3 阻害作用を有する化合物に関して、臓器移植時の拒絶反応の抑制において既存の免疫抑制剤である tacrolimus への相加的効果が示された。

Table 19. Effect of compound **64** on graft survival in a rat cardiac transplantation model^a

Treatment	n	Survival times (days)	Median survival times (days)
64 , 10 mg/kg (po) with tacrolimus, 0.02 mg/kg (im) ^b	4	6, 21, 24, >27	22.5

^a ACI rat hearts were heterotopically transplanted into Lewis rats. ^b **64** and tacrolimus were administered from day of transplantation for 14 days or by day of graft rejection.

第二節 第四章のまとめ

本研究で創出した 1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体、化合物 **37** および 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体、化合物 **64** について臓器移植時の拒絶反応に対する作用を確認するために、ラット異所性心移植モデル試験にて評価を行った。その結果、化合物 **37** は単剤経口投与にて移植片の拒絶反応を抑制し、生着延長効果を示した。また、化合物 **64** は tacrolimus との併用投与にて生着延長効果を示した。

以上の結果から、強い JAK3 阻害活性を有する上記化合物が、臓器移植時の拒絶反応の抑制を適応とした新規な免疫調節剤として有用であることを明らかとした。

結論

本研究は、臓器移植時の拒絶反応抑制への適応を指向し、JAK3 を標的とした新規な免疫調節剤を創出することを目的として行った。

第一章では、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン母核誘導体に関して、C4 位および C5 位の構造変換により良好な JAK3 阻害活性を示す化合物を複数創出し、本導体が JAK3 を標的とした新規な免疫調節剤として有用であることを見い出した。また、本誘導体と JAK3 蛋白とのドッキング計算解析により、JAK3 阻害活性の発現に重要な分子構造および相互作用に関する知見を得た。1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C5 位へのカルバモイル基導入は分子内水素結合の形成により分子構造を固定化し、JAK3 阻害活性の向上に寄与した。また、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C4 位のアミノ置換基は JAK3 蛋白の疎水性ポケット領域と相互作用することで、JAK3 阻害活性の発現に重要であった。C4 位のアミノ置換基部分の脂溶性増加は、JAK3 阻害活性の向上に効果的である一方、肝ミクロソームに対する代謝安定性が課題となった。1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン母核誘導体に関して、C4 位のアミノ置換基部分の構造変換が JAK3 阻害活性の向上および薬物動態面の改善の点で重要であることを見い出した。

第二章では、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体に関して、C4 位のさらなる構造変換により、強力な JAK3 阻害活性、JAK1、JAK2 に対して約 10 倍の JAK3 選択性を有し、hERG 阻害作用が弱く、経口吸収性が優れた化合物 **37** を創出した。1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン環の C4 位に 4-アミノピペリジン構造を導入することにより、強い JAK3 阻害活性を示し、課題であった代謝安定性を改善した。構造最適化の過程で新たに課題となった hERG 阻害作用に関して、ピペリジン部にフルオロ基を導入し化合物の塩基性を低下させることが、hERG 阻害活性の減弱に効果的であることを見い出した。化合物 **37** と JAK3 蛋白のドッキング計算解析の結果から、フルオロ基と疎水性ポケット表面との相互作用および疎水性ポケット領域の奥側でのシアノ基と Arg953 との相互作用が JAK3 阻害活性のさらなる向上に寄与していることが示された。

第三章では、異なる新規母核構造を有する 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体が、JAK3 を標的とした免疫調節剤として有用であることを見い出した。また、強い JAK3 阻害活性、JAK1、JAK2 に対して 4~5 倍の JAK3 選択性を有し、hERG 阻害作用が弱い化合物 **64** を創出した。4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体に関して、C4 位および C6 位の置換基として、*N*-シアノピリジル-4-アミノピペリジン構造および芳香族ヘテロ環構造の導入が JAK3 阻害活性の向上に重要であることを見い出した。構造

最適化の過程において、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体同様に、hERG 阻害活性が課題となったが、C4 位のアミノ置換基中のピリジン環をベンゼン環に変換し、塩基性を除去することが hERG 阻害活性の減弱に効果的であることを見出した。化合物 **64** と JAK3 蛋白のドッキング計算解析の結果から、ヒンジ領域近傍において C3 位のカルバモイル基が新規な水素結合を形成し、JAK3 阻害活性の向上に寄与していることが示唆された。

第四章では、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体である化合物 **37** および 4,6-ジアミノニコチンアミド誘導体である化合物 **64** について、ラット異所性心移植モデル試験にて臓器移植時の拒絶反応に対する作用を評価し、単剤経口投与および tacrolimus との併用投与にて、それぞれ生着延長効果を示すことを見出した。

本研究において、既存の JAK 阻害剤とは異なる新規な母核構造を有し、JAK3 に対して強い阻害活性を示す複数の化合物を創出することに成功した。特に、1*H*-ピロロ[2,3-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド誘導体の化合物 **37** は強力な JAK3 阻害活性、JAK1、JAK2 に対して約 10 倍の JAK3 選択性を示し、ラット異所性心移植モデル試験にて単剤経口投与での有効性を確認できたことから、臓器移植時の拒絶反応の抑制を適応とした新規な免疫調節剤としての開発が期待できる。本研究成果は、今後の JAK3 阻害に基づく免疫調節剤の研究および開発に有用な知見を与えるものである。

実験の部

核磁気共鳴 (^1H NMR および ^{13}C NMR) スペクトルは Bruker Biospin Avance400、AV400M または Avance-III HD を用いて測定した。化学シフトは tetramethylsilane を内部標準物質として、 δ 値 (ppm) で表示した。シグナルの分裂様式は s = singlet、d = doublet、t = triplet、q = quartet、m = multiplet、br = broad の略号を用いて表示した。質量分析 (MS) スペクトルは Hitachi LC/3DQMS M8000 または Agilent HP1100 LC/MCD を用いて測定した。高分解能質量分析 (HRMS) スペクトルは Waters LCT Premier XE を用いて測定した。比旋光度は HORIBA SEPA-500 を用いて測定した。マイクロウェーブ反応装置は Biotage Initiator 2.5 (0–400 W, 2.45 GHz) を用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、Kanto Chemical, 60N, 63-210 μm または Yamazen, HI-FLASHTM を用いた。元素分析 (Anal.) は、Elementar Vario EL III、YANACO MT-6 または YANACO JM-10 を用いて測定し、実験値は理論値の $\pm 0.4\%$ 以内であった。

第一章に関する実験

4-Chloro-1- $\{2\text{-(trimethylsilyl)ethoxy}\}$ methyl $\}$ -1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (化合物 2)

4-Chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (化合物 1, 4.6 g, 30 mmol) の DMF (46 mL) 溶液に 60% NaH (1.4 g, 36 mmol) を 0 °C にて加え、混合物を同温度にて 1 時間攪拌した。混合物に SEMCl (6.8 mL, 39 mmol) を加え、同温度にて 4 時間攪拌した。混合物に水 (150 mL) およびエーテルを加え分液した。有機層を水で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOAc = 97/3–88/12) で精製し、化合物 2 を無色油状物として得た (7.16 g, 収率 84%)。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : -0.12 (9H, s), 0.80 (2H, t, $J = 1.6$ Hz), 3.50 (2H, t, $J = 1.6$ Hz), 5.64 (2H, s), 6.60 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 7.28 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 7.77 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 8.24 (1H, d, $J = 5.1$ Hz). MS (ESI) m/z : 283 (M + H)⁺.

N-Cyclohexyl-*N*-methyl-1- $\{2\text{-(trimethylsilyl)ethoxy}\}$ methyl $\}$ -1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-amine (化合物 3)

化合物 2 (350 mg, 1.24 mmol) および *N*-methylcyclohexylamine (1.6 mL, 12.4 mmol) の混合物に 2-(di-*tert*-butylphosphino)biphenyl (74 mg, 0.25 mmol)、 Cs_2CO_3 (403 mg, 1.24 mmol) および $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (28 mg, 0.12 mmol) を加え、窒素ガス雰囲気下、110 °C にて 2 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却した後、 CHCl_3 および MeOH を加え希釈した。混合物を室温にて 10 分間攪拌した後、Celite[®] を用いて濾過した。濾液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOAc = 9/1–

4/1)で精製し、化合物 **3** を白色固体として得た (145 mg, 収率 33%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -0.08 (9H, s), 0.81 (2H, t, *J*=8.0 Hz), 1.09–1.23 (1H, m), 1.02–1.05 (1H, m), 1.31–1.45 (2H, m), 1.56–1.68 (3H, m), 1.71–1.87 (4H, m), 2.95 (3H, s), 3.49 (2H, t, *J* = 8.0 Hz), 3.90–3.99 (1H, m), 5.52 (1H, s), 6.28 (1H, d, *J* = 5.6 Hz), 6.49 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 7.31 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 7.88 (1H, d, *J* = 5.6 Hz). MS (ESI) *m/z*: 360 (M + H)⁺.

***N*-Cyclohexyl-*N*-methyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-amine** (化合物 **4**)

化合物 **3** (140 mg, 0.39 mmol)の CH₂Cl₂ (1.4 mL)溶液に、TFA (1.5 mL, 19.6 mmol)を加え室温で 2 時間攪拌した。混合物を減圧下濃縮し、残渣を CH₂Cl₂ (1.4 mL)に溶解した。混合物に NaOH (1M 水溶液, 1.6 mL, 1.56 mmol) および 1,2-diaminoethane (78 μL, 1.17 mmol)を加え、室温にて 16 時間攪拌した。混合物に CHCl₃ を加え分液し、有機層を水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–95/5)で精製し、化合物 **4** を白色固体として得た (58 mg, 収率 65%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.06–1.22 (1H, m), 1.29–1.44 (2H, m), 1.54–1.69 (3H, m), 1.69–1.87 (4H, m), 2.92 (3H, s), 3.91–4.02 (1H, m), 6.19 (1H, d, *J* = 5.8 Hz), 6.4 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 3.6 Hz), 7.82 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), 11.25 (1H, s). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 25.07, 25.41, 29.78, 31.98, 58.16, 99.16, 100.10, 107.65, 120.86, 143.68, 150.02, 150.04. MS (ESI) *m/z*: 230 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₄H₁₉N₃·0.1H₂O: C, 72.75; H, 8.37; N, 18.18. Found: C, 72.96; H, 8.36; N, 18.2.

4-Chloro-1-(triisopropylsilyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (化合物 **5**)

化合物 **1** (25 g, 164 mmol)の DMF (250 mL)溶液に、60% NaH (7.9 g, 197 mmol)を 5 °C にて加え、同温度にて 1 時間攪拌した。混合物に TIPSCl (36 mL, 172 mmol)を加え、1 時間攪拌した。混合物に EtOAc および水を加え分液し、有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液および飽和食塩水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; *n*-hexane)で精製し、化合物 **5** を無色固体として得た (40 g, 収率 79%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.06 (18H, d, *J* = 7.5 Hz), 1.79–1.91 (3H, m), 6.68 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 7.24 (1H, d, *J* = 5.2 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 8.20 (1H, d, *J* = 5.2 Hz). MS (ESI) *m/z*: 309 (M + H)⁺.

Ethyl 4-chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (化合物 **6**)

アルゴンガス雰囲気下、化合物 **5** (15 g, 48.6 mmol)の THF (150 mL)溶液に *sec*-BuLi (1 M cyclohexane/*n*-hexane 溶液, 97.1 mL, 97.1 mmol)を -78 °C にて加え、同温度にて 1

時間攪拌した。混合物に ethyl chloroformate (9.29 mL, 97.1 mmol)を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて加え、同温度にて 30 分間攪拌した。混合物に飽和 NH_4Cl 水溶液および EtOAc を加えて分液し、有機層を水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を MgSO_4 で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣を THF (120 mL)に溶解させ、TBAF (1M THF 溶液, 56 mL, 56 mmol)を加え、室温にて 1 時間攪拌した。混合物に EtOAc を加え、水で洗浄した。有機層を MgSO_4 で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣に IPE を加え粉末化し、析出物を濾取し、化合物 **6** を薄桃色固体として得た (9.6 g, 収率 88%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.36 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.36 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 6.64–6.67 (1H, m), 7.70–7.73 (1H, m), 8.71 (1H, s), 12.41 (1H, br). MS (ESI) m/z : 223 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.

4-Chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylic acid (化合物 7)

化合物 **6** (10.5 g, 46.7 mmol)の EtOH (84 mL)溶液に NaOH (1M 水溶液, 140 mL, 140 mmol)を加え、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて 1.5 時間攪拌した。混合物を $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却し、HCl (1M 水溶液)を用いて酸性にした。析出物を濾取した後、水で洗浄し、化合物 **7** を白色固体として得た (9.0 g, 収率 98%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.62–6.64 (1H, m), 7.67–7.70 (1H, m), 8.71 (1H, s), 12.32 (1H, brs), 13.22 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 195 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.

4-Chloro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 8)

化合物 **7** (9.0 g, 45.8 mmol)の DMF (72 mL)溶液に CDI (8.2 g, 50.4 mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。混合物に 28% NH_4OH 水溶液 (10.0 mL, 164 mmol)を $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて加え、室温にて 1 時間攪拌した。混合物に酢酸エチルを加え、析出物を濾取し、化合物 **8** を白色固体として得た (7.5 g, 収率 84%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.57 (1H, d, $J = 3.6$ Hz), 7.63 (1H, brs), 7.65 (1H, d, $J = 3.6$ Hz), 7.90 (1H, brs), 8.29 (1H, s), 12.12 (1H, br). MS (ESI) m/z : 218 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

4-[Cyclohexyl(methyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 9a)

化合物 **8** (25 mg, 0.128 mmol)および *N*-methylcyclohexylamine (0.085 mL, 0.639 mmol)の *n*-BuOH (0.2 mL)懸濁液をマイクロウェーブ照射下、 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて 30 分間攪拌した。混合物を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100/0 - 95/5$)で精製し、化合物 **9a** を固体として得た (9 mg, 収率 26%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.97–1.37 (3H, m), 1.42–1.88 (7H, m), 2.91 (3H, s), 3.49–3.66 (1H, m), 6.46–6.52 (1H, m), 7.24–7.33 (2H, m), 8.07 (1H, br), 8.21 (1H, s), 11.56 (1H,

brs). MS (ESI) m/z : 273 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₅H₂₀N₄O·0.5H₂O: C, 64.03; H, 7.52; N, 19.91. Found: C, 63.98; H, 7.52; N, 20.15.

4-**{[(1*S*,2*R*)-2-Ethylcyclohexyl]amino}**-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 9g)

化合物 **8** (100 mg, 0.511 mmol)の *N*-methylpyrrolidone (NMP) (1 mL)溶液に、(1*S*,2*R*)-2-ethylcyclohexanamine hydrochloride (167 mg, 1.02 mmol)および DIPEA (0.27 mL, 1.53 mmol)を加え、マイクロウェーブ照射下、160 °C にて 1.5 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却した後、水を加えた。混合物に CHCl₃ を加えて分液し、有機層を水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10)で精製し、化合物 **9g** を白色固体として得た (58 mg, 収率 40%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.78 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.21–1.68 (10H, m), 1.82–1.89 (1H, m), 4.29–4.32 (1H, m), 6.51–6.53 (1H, m), 7.00 (1H, br), 7.08–7.11 (1H, m), 7.67 (1H, br), 8.35 (1H, s), 9.87–9.92 (1H, m), 11.43 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 287 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₆H₂₂N₄O·0.3H₂O: C, 65.86; H, 7.81; N, 19.20. Found: C, 65.65; H, 7.43; N, 19.25.

4-(Piperidin-1-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 9b)

化合物 **8** および piperidine を用いて、化合物 **9a** と同様の合成法にて、化合物 **9b** を白色固体として得た (収率 38%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.57–1.73 (6H, m), 3.27–3.42 (4H, m), 6.56–6.59 (1H, m), 7.27–7.36 (2H, m), 7.85–7.93 (1H, m), 8.18 (1H, s), 11.56 (1H, br). MS (ESI) m/z : 245 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₃H₁₆N₄O: C, 63.91; H, 6.60; N, 22.93. Found: C, 63.81; H, 6.62; N, 22.81.

4-(Cyclopentylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 9c)

化合物 **8** および cyclopentylamine を用いて、化合物 **9a** と同様の合成法にて、化合物 **9c** を白色固体として得た (収率 29%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.43–1.78 (6H, m), 1.90–2.10 (2H, m), 4.35–4.50 (1H, m), 6.57–6.63 (1H, m), 7.00 (1H, br), 7.08–7.14 (1H, m), 7.64 (1H, br), 8.34 (1H, s), 9.61–9.70 (1H, m), 11.43 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 245 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₃H₁₆N₄O·0.1H₂O: C, 63.45; H, 6.64; N, 22.77. Found: C, 63.64; H, 6.64; N, 22.62.

4-(Cycloheptylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 9d)

化合物 **8** および cycloheptylamine を用いて、化合物 **9g** と同様の合成法にて、化合物 **9d** を白色固体として得た (収率 57%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.46–1.71 (10H, m), 1.89–2.10 (2H, m), 4.07–4.23 (1H, m), 6.50–6.54 (1H, m), 7.00 (1H, br), 7.08–7.13 (1H, m), 7.62 (1H, br), 8.31 (1H, s), 9.67 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 11.43 (1H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 22.96, 27.50, 35.27, 52.86, 101.66, 101.83, 104.50, 121.42, 145.06, 149.32, 149.63, 172.01. MS (ESI) *m/z*: 273 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₅H₂₀N₄O·0.3H₂O: C, 64.86; H, 7.48; N, 20.17. Found: C, 64.82; H, 7.38; N, 20.10.

4-(Pentan-3-ylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 **9e**)

化合物 **8** および 3-aminopentane を用いて、化合物 **9g** と同様の合成法にて、化合物 **9e** を白色固体として得た (収率 24%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.92 (6H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.48–1.69 (4H, m), 3.87–3.97 (1H, m), 6.50–6.53 (1H, m), 6.93 (1H, br), 7.08–7.12 (1H, m), 7.69 (1H, br), 8.35 (1H, s), 9.55 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 11.42 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 247 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₃H₁₈N₄O: C, 63.39; H, 7.37; N, 22.75. Found: C, 63.22; H, 7.24; N, 22.65.

4-[(Cyclohexylmethyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 **9f**)

化合物 **8** および cyclohexanemethylamine を用いて、化合物 **9a** と同様の合成法にて、化合物 **9f** を白色固体として得た (収率 39%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.92–1.34 (5H, m), 1.50–1.88 (6H, m), 3.45 (2H, dd, *J* = 6.0, 12.0 Hz), 6.54–6.60 (1H, m), 6.98 (1H, br), 7.08–7.10 (1H, m), 7.65 (1H, br), 8.34 (1H, s), 9.61–9.66 (1H, m), 11.43 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 273 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₅H₂₀N₄O·0.1H₂O: C, 65.72; H, 7.43; N, 20.44. Found: C, 65.83; H, 7.38; N, 20.29.

4-[(2,2-Dimethylcyclohexyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 **9h**)

化合物 **8** および 2,2-dimethylcyclohexan-1-amine hydrochloride を用いて、化合物 **9g** と同様の合成法にて、化合物 **9h** を白色固体として得た (収率 66%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.94 (3H, s), 1.00 (3H, s), 1.30–1.54 (6H, m), 1.63–1.71 (1H, m), 1.83–1.91 (1H, m), 3.69–3.77 (1H, m), 6.47–6.50 (1H, m), 6.95 (1H, br), 7.08–7.12 (1H, m), 7.69 (1H, br), 8.34 (1H, s), 9.83 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 11.42 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 287 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₁₆H₂₂N₄O: 286.1794. Found: 287.1867.

4-[(3-Methylcyclohexyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 9i)

化合物 8 および 3-methylcyclohexylamine を用いて、化合物 9g と同様の合成法にて、化合物 9i を白色固体として得た (収率 77%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.87–0.92 (3H, m), 0.97–1.81 (8H, m), 2.02–2.12 (1H, m), 3.82–3.92 (0.4H, m), 4.33–4.39 (0.6H, m), 6.47–6.55 (1H, m), 6.98 (1H, br), 7.10–7.16 (1H, m), 7.76 (1H, br), 8.35 (0.4H, s), 8.36 (0.6H, s), 9.60 (0.4H, d, *J* = 7.6 Hz), 10.01 (0.6H, d, *J* = 8.4 Hz), 11.49 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 273 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₁₅H₂₀N₄O: 272.1637. Found: 273.1719.

4-[(4-Methylcyclohexyl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 9j)

化合物 8 および 4-methylcyclohexylamine を用いて、化合物 9g と同様の合成法にて、化合物 9j を白色固体として得た (収率 95%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.88–0.94 (3H, m), 1.09–1.31 (3H, m), 1.37–1.58 (2H, m), 1.62–1.81 (3H, m), 2.03–2.11 (1H, m), 3.76–3.86 (0.4H, m), 4.21–4.29 (0.6H, m), 6.46–6.53 (1H, m), 6.97 (1H, br), 7.09–7.14 (1H, m), 7.74 (1H, br), 8.34 (0.4H, s), 8.36 (0.6H, s), 9.55 (0.4H, d, *J* = 8.0 Hz), 9.97 (0.6H, d, *J* = 8.0 Hz), 11.43 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 273 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₁₅H₂₀N₄O: 272.1637. Found: 273.1714.

4-[(1*S*,2*R*)-2-(Hydroxymethyl)cyclohexyl]amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 9k)

化合物 8 および[(1*R*,2*S*)-2-aminocyclohexyl]methanol hydrochloride を用いて、化合物 9a と同様の合成法にて、化合物 9k を白色固体として得た (収率 41%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.13–2.00 (9H, m), 3.19–3.56 (2H, m), 4.51–4.64 (1H, m), 6.78–6.84 (1H, m), 7.29–7.36 (1H, m), 7.69 (1H, br), 8.38 (1H, br), 8.53 (1H, s), 10.96–11.05 (1H, m), 12.51 (1H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 20.71, 23.19, 24.43, 30.65, 42.77, 48.54, 62.30, 101.79, 102.01, 104.55, 121.13, 145.49, 150.13, 150.27, 172.32. MS (ESI) *m/z*: 289 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₁₅H₁₈N₄O: 288.1586. Found: 289.1666.

Ethyl 4-[(1*S*,2*R*)-2-methylcyclohexyl]amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (化合物 10c)

化合物 6 (258 mg, 1.15 mmol) および(1*S*,2*R*)-2-methylcyclohexylamine hydrochloride (292 mg, 1.95 mmol)の *n*-BuOH (1.03 mL)懸濁液に DIPEA (0.70 mL, 4.02 mmol)を加え、マイクロウェーブ照射下、160 °Cにて2時間攪拌した。混合物を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOAc = 3/1–1/1)で精

製し化合物 **10c** を白色固体として得た (185 mg, 収率 53%) ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.91 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.32 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.35–2.16 (9H, m), 4.23–4.34 (3H, m), 6.59 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 7.17 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 8.68 (1H, s), 9.02–9.06 (1H, m), 11.66 (1H, br). MS (ESI) *m/z*: 302 (M + H)⁺.

Ethyl 4-(cyclohexylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (化合物 10a)

化合物 **6** および cyclohexylamine を用いて、化合物 **10c** と同様の合成法にて、化合物 **10a** を得た (収率 56%)。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.32 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.33–1.77 (8H, m), 1.99–2.08 (2H, m), 3.95–4.08 (1H, m), 4.26 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 6.55 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 8.54 (1H, s), 8.84–8.88 (1H, m), 11.67 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 288 (M + H)⁺.

Ethyl 4-(cyclopropylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (化合物 10b)

化合物 **6** および cyclopropylamine を用いて、化合物 **10c** と同様の合成法にて、化合物 **10b** を白色固体として得た (収率 100%)。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.57–0.72 (2H, m), 0.87–1.04 (2H, m), 1.31 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.00–3.15 (1H, m), 4.25 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 6.97–7.07 (1H, m), 7.12–7.23 (1H, m), 8.52 (1H, s), 8.76 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 11.68 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 246 (M + H)⁺.

4-{{(1*S*,2*R*)-2-Methylcyclohexyl}amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylic acid (化合物 11c)

化合物 **10c** (150 mg, 0.50 mmol) の EtOH (1.5 mL) 溶液に NaOH (2M 水溶液, 1.12 mL, 2.24 mmol) を加え、加熱還流下、20 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却した後、HCl (1M 水溶液) にて酸性 (pH = 4–5) とし、混合物に CHCl₃/MeOH (4:1) を加え分液した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮し、化合物 **11c** を白色固体として得た (175 mg, 収率 >100%)。化合物 **11c** はそれ以上の精製を行わず、次の反応に用いた。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.93 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.23–2.01 (9H, m), 4.38–4.40 (1H, m), 6.88–6.89 (1H, m), 7.37–7.40 (1H, m), 8.64 (1H, s), 10.20–10.24 (1H, m), 12.76 (1H, brs), 13.80 (1H, br). MS (ESI) *m/z*: 274 (M + H)⁺.

4-(Cyclohexylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylic acid (化合物 11a)

化合物 **10a** を用いて、化合物 **11c** と同様の合成法にて、化合物 **11a** を固体として得た (収率 73%)。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.14–2.16 (10H, m), 4.03–4.22 (1H, m),

6.77 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 7.33–7.39 (1H, m), 8.59 (1H, s), 9.80–9.90 (1H, m), 12.48 (1H, brs), 13.83 (1H, br). MS (ESI) m/z : 260 (M + H)⁺

4-(Cyclopropylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylic acid (化合物 11b)

化合物 10b を用いて、化合物 11c と同様の合成法にて、化合物 11b を白色固体として得た (収率 88%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.56–0.71 (2H, m), 0.86–1.02 (2H, m), 2.96–3.14 (1H, m), 6.96–7.05 (1H, m), 7.10–7.19 (1H, m), 8.49 (1H, s), 8.89–9.06 (1H, m), 11.61 (1H, s), 12.38 (1H, br). MS (ESI) m/z : 218 (M + H)⁺.

4-[(1*S*,2*R*)-2-Methylcyclohexyl]amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 12c)

化合物 11c (170 mg, 0.622 mmol)の DMF (1.7 mL)溶液に、室温にて HOBt (126 mg, 0.933 mmol)および EDC (145 mg, 0.933 mmol)を加え、60 °C にて 1 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、28% NH₄OH 水溶液 (0.17 mL, 1.24 mmol)を加え 1 時間攪拌した。混合物に水および CHCl₃/MeOH (4:1)を加えて分液し、有機層を水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10)で精製し、化合物 12c を淡黄色固体として得た (102 mg, 収率 60%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.20–1.98 (9H, m), 4.11–4.22 (1H, m), 6.46–6.55 (1H, m), 6.99 (1H, br), 7.07–7.13 (1H, m), 7.64 (1H, br), 8.36 (1H, s), 9.85–9.90 (1H, m), 11.43 (1H, br). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 16.81, 21.14, 23.47, 28.95, 30.04, 33.99, 52.77, 101.71, 101.86, 104.42, 121.20, 145.53, 150.10, 150.28, 172.29. MS (ESI) m/z : 273 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₅H₂₀N₄O: C, 66.15; H, 7.40; N, 20.57. Found: C, 65.81; H, 7.42; N, 20.31.

4-(Cyclohexylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 12a)

化合物 11a を用いて、化合物 12c と同様の合成法にて、化合物 12a を白色固体として得た (収率 60%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.14–2.01 (10H, m), 3.91–4.01 (1H, m), 6.48–6.54 (1H, m), 7.03 (1H, br), 7.10–7.13 (1H, m), 7.70 (1H, br), 8.34 (1H, s), 9.64–9.68 (1H, m), 11.43 (1H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 23.69, 25.14, 33.32, 50.65, 101.53, 101.71, 104.30, 121.38, 145.52, 149.29, 150.27, 172.14. MS (ESI) m/z : 259 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₄H₁₈N₄O: C, 65.09; H, 7.02; N, 21.69. Found: C, 65.08; H, 7.12; N, 21.40.

4-(Cyclopropylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 12b)

化合物 **11b** を用いて、化合物 **12c** と同様の合成法にて、化合物 **12b** を得た (収率 74%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.49–0.66 (2H, m), 0.80–1.00 (2H, m), 2.90–3.09 (1H, m), 6.90–7.02 (1H, m), 7.03 (1H, br), 7.04–7.18 (1H, m), 7.73 (1H, br), 8.35 (1H, s), 9.58 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 11.45 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 217 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₁H₁₂N₄O·0.05H₂O·0.1CH₃OH: C, 60.75; H, 5.70; N, 25.53. Found: C, 60.97; H, 5.62; N, 25.11.

4-(Cyclohexylamino)-*N*-methyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 **13a**)

化合物 **11a** (25 mg, 0.096 mmol)の DMF (0.375 mL)溶液に HOBt (19.5 mg, 0.145 mmol)、EDC (22.5 mg, 0.145 mmol)および MeNH₂·HCl (9.8 mg, 0.145 mmol)を加え、55 °Cにて 1時間攪拌した。混合物に EtOAc および水を加え分液し、有機層を水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10)で精製し、化合物 **13a** を固体として得た (5 mg, 収率 19%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.18–1.81 (8H, m), 1.91–2.05 (2H, m), 2.73 (3H, d, *J* = 4.4 Hz), 3.84–4.01 (1H, m), 6.47–6.50 (1H, m), 7.11–7.14 (1H, m), 8.14–8.24 (1H, m), 8.27 (1H, s), 9.36–9.45 (1H, m), 11.42 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 273 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₅H₂₀N₄O·0.5H₂O: C, 64.03; H, 7.52; N, 19.91. Found: C, 63.91; H, 7.57; N, 20.07.

N-Cyclohexyl-4-(cyclohexylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 **13b**)

化合物 **11a** および cyclohexylamine を用いて、化合物 **13a** と同様の合成法にて、化合物 **13b** を固体として得た (収率 34%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.05–2.01 (20H, m), 3.63–3.82 (1H, m), 3.84–4.01 (1H, m), 6.48–6.49 (1H, m), 7.11–7.13 (1H, m), 7.96 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 8.31 (1H, s), 9.32 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 11.44 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 341 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₂₀H₂₈N₄O·0.2H₂O: C, 69.82; H, 8.32; N, 16.28. Found: C, 69.82; H, 8.35; N, 16.06.

4-(Cyclohexylamino)-*N*-phenyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 **13c**)

化合物 **11a** および aniline を用いて、化合物 **13a** と同様の合成法にて、化合物 **13c** を白色固体として得た (収率 37%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.15–1.81 (8H, m), 1.92–2.09 (2H, m), 3.91–4.11 (1H, m), 6.59–6.60 (1H, m), 7.04–7.44 (4H, m), 7.68 (2H, d, *J* = 7.9 Hz), 8.50 (1H, s), 9.10–9.21 (1H, m), 10.13 (1H, brs), 11.77 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 335

(M + H)⁺. Anal. calcd for C₂₀H₂₂N₄O·0.2H₂O: C, 71.07; H, 6.68; N, 16.58. Found: C, 70.98; H, 6.62; N, 16.60.

第二章に関する実験

4-[(1-Benzylpiperidin-4-yl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 14b)

化合物 **8** (200 mg, 1.02 mmol)の NMP (2 mL)溶液に 4-amino-1-benzylpiperidin (973 mg, 5.11 mmol)および Et₃N (0.71 mL, 5.11 mmol)を加え、マイクロウェーブ照射下、180 °C にて 1.5 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、EtOAc を加え、水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–95/5)で精製し、化合物 **14b** を白色固体として得た (344 mg, 収率 96%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.46–1.57 (2H, m), 1.95–2.04 (2H, m), 2.21–2.31 (2H, m), 2.64–2.75 (2H, m), 3.33 (2H, s), 3.92–4.02 (1H, m), 6.47–6.50 (1H, m), 7.00 (1H, br), 7.11–7.14 (1H, m), 7.22–7.28 (1H, m), 7.30–7.35 (4H, m), 7.77 (1H, br), 8.36 (1H, s), 9.71 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 11.46 (1H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 32.66, 48.90, 50.86, 62.07, 101.69, 104.35, 121.55, 126.75, 128.06, 128.63, 138.46, 145.48, 149.32, 150.28, 172.10. MS (ESI) *m/z*: 350 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₂₀H₂₃N₅O·1.1H₂O: C, 65.06; H, 6.88; N, 18.97. Found: C, 65.25; H, 6.91; N, 18.64.

4-[(1-Methylpiperidin-4-yl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 14a)

化合物 **8** および 4-amino-1-methylpiperidine を用いて、化合物 **14b** と同様の合成法にて、化合物 **14a** を白色固体として得た (収率 32%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.45–1.57 (2H, m), 1.94–2.02 (2H, m), 2.14–2.24 (5H, m), 2.59–2.70 (2H, m), 3.88–3.99 (1H, m), 6.47–6.50 (1H, m), 6.97 (1H, br), 7.11–7.14 (1H, m), 7.73 (1H, br), 8.35 (1H, s), 9.68 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 11.45 (1H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 32.56, 45.86, 48.37, 53.02, 101.70, 104.35, 121.56, 145.48, 149.33, 150.29, 172.10. MS (ESI) *m/z*: 274 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₄H₁₉N₅O·0.3MeOH: C, 60.70; H, 7.20; N, 24.75. Found: C, 60.78; H, 7.01; N, 24.63.

4-[(3*R*)-1-Benzylpiperidin-3-yl]amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 14c)

化合物 **8** および(*R*)-1-benzyl-3-aminopiperidine を用いて、化合物 **14b** と同様の合成法にて、化合物 **14c** を白色固体として得た (収率 22%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.44–1.61 (2H, m), 1.66–1.87 (2H, m), 2.17–2.55 (3H, m), 2.66–2.77 (1H, m), 3.44–3.56 (2H, m), 4.06–4.16 (1H, m), 6.39–6.42 (1H, m), 6.98 (1H, br), 7.03–7.06 (1H, m), 7.18–7.24 (1H, m), 7.27–7.32 (2H, m), 7.40 (2H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.63 (1H, br), 8.33 (1H, s), 9.73 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 11.38 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 350 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₂₀H₂₃N₅O·0.4H₂O: C, 67.36; H, 6.73; N, 19.64. Found: C, 67.54; H, 6.55; N, 19.42.

4-**{[(3*S*)-1-Benzylpiperidin-3-yl]amino}**-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 **14d**)

化合物 **8** および(*S*)-1-benzyl-3-aminopiperidine を用いて、化合物 **14b** と同様の合成法にて、化合物 **14d** を白色固体として得た (収率 34%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.44–1.61 (2H, m), 1.66–1.87 (2H, m), 2.17–2.55 (3H, m), 2.66–2.77 (1H, m), 3.44–3.56 (2H, m), 4.06–4.16 (1H, m), 6.39–6.42 (1H, m), 6.98 (1H, br), 7.03–7.06 (1H, m), 7.18–7.24 (1H, m), 7.27–7.32 (2H, m), 7.40 (2H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.63 (1H, br), 8.33 (1H, s), 9.73 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 11.38 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 350 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₂₀H₂₃N₅O·0.3H₂O: C, 67.70; H, 6.70; N, 19.74. Found: C, 67.95; H, 6.65; N, 19.52.

tert-Butyl 4-**[(5-carbamoyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)amino]piperidine-1-carboxylate (化合物 **15**)**

化合物 **8** および *N*-Boc-4-aminopiperidine を用いて、化合物 **14b** と同様の合成法にて、化合物 **15** を固体として得た (収率 60%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.31–1.45 (11H, m), 1.95–2.03 (2H, m), 3.04–3.24 (2H, m), 3.73–3.83 (2H, m), 4.10–4.20 (1H, m), 6.57 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.01 (1H, br), 7.15 (1H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.79 (1H, br), 8.37 (1H, s), 9.72 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 11.50 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 360 (M + H)⁺.

4-**(Piperidin-4-ylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide dihydrochloride (化合物 **16**)**

化合物 **15** (0.97 g, 2.70 mmol) の EtOH (14.6 mL) 溶液に HCl (4M dioxane 溶液, 10.1 mL, 40.5 mmol) を加え、室温にて終夜攪拌した。混合物を減圧下濃縮し、残渣に IPE を加えた。析出物を濾取し、IPE で洗浄し、化合物 **16** を固体として得た (0.97 g, 収率 >100%)。化合物 **16** はそれ以上の精製を行わず、次の反応に用いた。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.75–1.87 (2H, m), 2.17–2.25 (2H, m), 3.16–3.33 (4H, m), 4.40–4.50 (1H,

m), 6.97–7.01 (1H, m), 7.39–7.42 (1H, m), 7.77 (1H, br), 8.48 (1H, br), 8.61 (1H, s), 9.09–9.32 (2H, m), 10.78–10.84 (1H, m), 12.75 (1H, s), 14.82 (1H, br). MS (ESI) m/z : 260 (M + H)⁺.

4-[(1-Acetylpiperidin-4-yl)amino]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (化合物 17a)

化合物 16 (70 mg, 0.211 mmol)の THF (1.4 mL)溶液に、Ac₂O (25 μ L, 0.263 mmol)および DIPEA (0.22 mL, 1.26 mmol)を加え、室温にて 18 時間攪拌した。混合物に CHCl₃および飽和 NaHCO₃ 水溶液を加え、分液した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10)で精製し、化合物 17a を白色固体として得た (45 mg, 収率 71%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.27–1.37 (1H, m), 1.41–1.51 (1H, m), 1.95–2.07 (5H, m), 3.02–3.10 (1H, m), 3.24–3.29 (1H, m), 3.69–3.76 (1H, m), 4.03–4.11 (1H, m), 4.17–4.26 (1H, m), 6.57–6.60 (1H, m), 6.99 (1H, br), 7.13–7.17 (1H, m), 7.74 (1H, br), 8.37 (1H, s), 9.72 (1H, d, J = 8.4 Hz), 11.48 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 302 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₅H₁₉N₅O₂·0.3H₂O: C, 58.73; H, 6.44; N, 22.83. Found: C, 58.86; H, 6.47; N, 22.45.

4-[[1-(Methylsulfonyl)piperidin-4-yl]amino]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (化合物 17b)

化合物 16 (40 mg, 0.154 mmol)および Et₃N (0.065 mL, 0.463 mmol)の DMF (0.8 mL)溶液に、氷冷下にて MsCl (0.014 mL, 0.185 mmol)を加え、同条件下にて 2 時間攪拌した。析出物を濾取し、少量の MeOH に溶解した。溶液に IPE を加え析出物を濾取した後、IPE で洗浄し化合物 17b を白色固体として得た (22 mg, 収率 42%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.49–1.59 (2H, m), 2.06–2.15 (2H, m), 2.90 (3H, s), 3.06–3.14 (2H, m), 3.44–3.51 (2H, m), 4.08–4.18 (1H, m), 6.56–6.58 (1H, m), 7.03 (1H, brs), 7.15–7.18 (1H, m), 7.80 (1H, brs), 8.61 (1H, s), 9.73 (1H, d, J = 8.0 Hz), 11.52 (1H, s). MS (ESI) m/z : 338 (M + H)⁺. Anal. calcd for C₁₄H₁₉N₅O₃S·0.8H₂O: C, 47.80; H, 5.90; N, 19.91. Found: C, 48.20; H, 5.53; N, 19.53.

4-[[1-(Cyanoacetyl)piperidin-4-yl]amino]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (化合物 17c)

化合物 16 (50 mg, 0.150 mmol)、cyanoacetic acid (25.6 mg, 0.301 mmol)および Et₃N (0.042 mL, 0.301 mmol)の DMF (1 mL)溶液に、HOBt (46.1 mg, 0.301 mmol)および EDC (46.7 mg, 0.301 mmol)を加え、室温にて終夜攪拌した。混合物に CHCl₃を加え、水で

洗淨した。有機層を分離し、水層を CHCl_3 で抽出した。混合した有機層を MgSO_4 で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10/1$) で精製し、化合物 **17c** を白色固体として得た (20 mg, 収率 41%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.29–1.40 (1H, m), 1.46–1.58 (1H, m), 1.98–2.07 (2H, m), 3.09–3.18 (1H, m), 3.27–3.37 (1H, m), 3.56–3.64 (1H, m), 4.03–4.13 (3H, m), 4.19–4.29 (1H, m), 6.60–6.62 (1H, m), 7.04 (1H, brs), 7.15–7.18 (1H, m), 7.81 (1H, brs), 8.38 (1H, s), 9.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 11.52 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 327 ($\text{M} + \text{H}$)⁺. HRMS ($\text{M} + \text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$: 326.1491. Found: 327.1578.

4-{[1-(3-Cyanobenzyl)piperidin-4-yl]amino}-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (化合物 **17d**)

化合物 **16** (100 mg, 0.301 mmol) の CH_2Cl_2 (1 mL) 溶液に 3-cyanobenzaldehyde (78.9 mg, 0.602 mmol)、 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (128 mg, 0.602 mmol) および Et_3N (0.084 mL, 0.602 mmol) を加え、室温にて終夜攪拌した。混合物に飽和 NaHCO_3 水溶液を加え、分液した。有機層を MgSO_4 で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100/0 - 90/10$) で精製し、化合物 **17d** を白色固体として得た (45 mg, 収率 40%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.49–1.59 (2H, m), 1.97–2.05 (2H, m), 2.24–2.35 (2H, m), 2.65–2.75 (2H, m), 3.57 (2H, s), 3.94–4.04 (1H, m), 6.48–6.51 (1H, m), 6.98 (1H, brs), 7.12–7.13 (1H, m), 7.55 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.67–7.77 (4H, m), 8.36 (1H, s), 9.71 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 11.46 (1H, s). MS (ESI) m/z : 375 ($\text{M} + \text{H}$)⁺. Anal. calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O} \cdot 0.3\text{H}_2\text{O}$: C, 66.40; H, 6.00; N, 22.12. Found: C, 66.51; H, 5.90; N, 21.73.

4-{[1-(4-Cyanophenyl)piperidin-4-yl]amino}-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (化合物 **18a**)

化合物 **16** (100 mg, 0.301 mmol) の DMSO (10 mL) 溶液に K_2CO_3 (125 mg, 0.903 mmol) および 4-fluorobenzonitrile (54.7 mg, 0.451 mmol) を加え、80 °C にて攪拌した。混合物を室温まで冷却し、 CHCl_3 および水を加え、分液した。有機層を MgSO_4 で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100/0 - 90/10$) で精製し、化合物 **18a** を白色固体として得た (22 mg, 収率 21%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.46–1.57 (2H, m), 2.05–2.13 (2H, m), 3.24–3.35 (2H, m), 3.76–3.83 (2H, m), 4.22–4.32 (1H, m), 6.62 (1H, dd, $J = 2.0, 3.6$ Hz), 7.01 (1H, brs), 7.06 (2H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.15–7.18 (1H, m), 7.57 (2H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.79 (1H, brs), 8.37 (1H,

s), 9.74 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 11.50 (1H, s). MS (ESI) m/z : 361 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₂₀H₂₀N₆O·0.5H₂O·0.5MeOH: C, 63.88; H, 6.01; N, 21.80. Found: C, 63.99; H, 5.83; N, 21.81.

4-{{1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 18b)

化合物 16 (75 mg, 0.226 mmol)の 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone (DMI) (0.75 mL)溶液に Et₃N (0.13 mL, 0.903 mmol)および 2-chloro-5-cyanopyridine (62.6 mg, 0.451 mmol)を加え、160 °Cにて1時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、EtOAcおよび水を加え、分液した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–95/5)で精製し、化合物 18b を淡黄色固体として得た (46 mg, 収率 56%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.41–1.52 (2H, m), 2.05–2.14 (2H, m), 3.40–3.49 (2H, m), 4.18–4.37 (3H, m), 6.62–6.35 (1H, m), 6.99 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.01 (1H, br), 7.16–7.19 (1H, m), 7.81 (1H, br), 7.85 (1H, dd, $J = 2.4, 9.2$ Hz), 8.38 (1H, s), 8.49 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 9.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 11.51 (1H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 32.15, 42.26, 48.81, 94.74, 101.81, 101.82, 104.47, 106.36, 118.69, 121.76, 139.85, 145.46, 149.21, 150.32, 152.48, 158.83, 172.11. MS (ESI) m/z : 362 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₉H₁₉N₇O·0.8H₂O: C, 60.72; H, 5.52; N, 26.09. Found: C, 60.82; H, 5.96; N, 26.03.

4-{{1-[5-(Trifluoromethyl)pyridin-2-yl]piperidin-4-yl}amino}-1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 18c)

化合物 16 および 2-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridine を用いて、化合物 18b と同様の合成法にて、化合物 18c を白色固体として得た (収率 26%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.42–1.52 (2H, m), 2.05–2.13 (2H, m), 3.38–3.47 (2H, m), 4.16–4.24 (2H, m), 4.27–4.36 (1H, m), 6.62–6.65 (1H, m), 7.01 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.02 (1H, br), 7.16–7.19 (1H, m), 7.79 (1H, dd, $J = 2.4, 9.2$ Hz), 7.82 (1H, br), 8.37 (1H, s), 8.41–8.43 (1H, m), 9.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 11.51 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 405 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₉H₁₉F₃N₆O·0.3H₂O: C, 55.69; H, 4.82; N, 20.51. Found: C, 55.99; H, 4.93; N, 20.16.

Methyl 6-{{4-[(5-carbamoyl-1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)amino]piperidin-1-yl}nicotinate (化合物 18d)

化合物 16 および methyl 6-chloronicotinate を用いて、化合物 18b と同様の合成法にて、化合物 18d を白色固体として得た (収率 65%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.42–1.52 (2H, m), 2.06–2.14 (2H, m), 3.40–3.48 (2H, m), 3.79 (3H, s), 4.18–4.36 (3H, m),

6.62–6.65 (1H, m), 6.93 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.00 (1H, br), 7.16–7.18 (1H, m), 7.79 (1H, br), 7.95 (1H, dd, $J = 2.4, 9.2$ Hz), 8.37 (1H, s), 8.66 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 9.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 11.51 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 395 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₂₀H₂₂N₆O₃·0.8H₂O: C, 58.76; H, 5.82; N, 20.56. Found: C, 58.62; H, 5.43; N, 20.39.

4-{{1-(5-Cyanopyrazin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 18e)

化合物 **16** および 5-chloropyrazine-2-carbonitrile を用いて、化合物 **18b** と同様の合成法にて、化合物 **18e** を白色固体として得た (収率 22%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.47–1.57 (2H, m), 2.09–2.17 (2H, m), 3.47–3.55 (2H, m), 4.27–4.39 (3H, m), 6.63–6.66 (1H, m), 7.02 (1H, br), 7.17–7.19 (1H, m), 7.79 (1H, br), 8.38 (1H, s), 8.48 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 8.56 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 9.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 11.52 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 363 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₈H₁₈N₈O·0.5H₂O·0.2MeOH: C, 57.86; H, 5.28; N, 29.66. Found: C, 57.90; H, 5.12; N, 29.35.

4-{{1-(6-Cyanopyridazin-3-yl)piperidin-4-yl}amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 18f)

化合物 **16** および 6-chloropyridazine-3-carbonitrile を用いて、化合物 **18b** と同様の合成法にて、化合物 **18f** を白色固体として得た (収率 50%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.47–1.57 (2H, m), 2.10–2.18 (2H, m), 3.50–3.58 (2H, m), 4.28–4.40 (3H, m), 6.64–6.67 (1H, m), 7.01 (1H, br), 7.17–7.20 (1H, m), 7.41 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 7.79 (1H, br), 7.86 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 8.38 (1H, s), 9.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 11.52 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 385 ($M + Na$)⁺. Anal. calcd for C₁₈H₁₈N₈O·0.9H₂O: C, 57.10; H, 5.27; N, 29.60. Found: C, 57.37; H, 4.91; N, 29.26.

4-{{1-(5-Carbamoylpyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 19a)

化合物 **18d** (100 mg, 0.254 mmol) および NH₃ (2M MeOH 溶液, 1 mL) を封管反応容器に混合し、90 °C にて攪拌した。混合物を室温まで冷却し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 10/1) で精製し、化合物 **19a** を白色固体として得た (19 mg, 収率 20%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.41–1.52 (2H, m), 2.04–2.13 (2H, m), 3.31–3.43 (2H, m), 4.14–4.22 (2H, m), 4.25–4.34 (1H, m), 6.62–6.62 (1H, m), 6.89 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.00 (1H, brs), 7.13 (1H, brs), 7.16–7.18 (1H,

m), 7.72 (1H, brs), 7.75 (1H, brs), 7.96 (1H, dd, $J = 2.4, 9.2$ Hz), 8.37 (1H, s), 8.62 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 9.76 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 11.51 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 380 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₉H₂₁N₇O₂·0.3H₂O·MeOH: C, 57.62; H, 6.19; N, 23.52. Found: C, 57.54; H, 6.19; N, 23.40.

4-({1-[5-(Hydroxymethyl)pyridin-2-yl]piperidin-4-yl}amino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 19b)

窒素ガス雰囲気下、化合物 **18d** (100 mg, 0.254 mmol) の THF (1 mL) 溶液に、0 °C にて LiAlH₄ (9.6 mg, 0.254 mmol) を加え、同温度にて攪拌した。混合物に水および 15% NaOH 水溶液を加え、室温にて攪拌した。析出物を濾過し、濾液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; CHCl₃/MeOH = 10/1) で精製し、化合物 **19b** を白色固体として得た (74 mg, 収率 80%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.41–1.52 (2H, m), 2.02–2.11 (2H, m), 3.23–3.33 (2H, m), 4.01–4.08 (2H, m), 4.20–4.29 (1H, m), 4.35 (2H, d, $J = 5.6$ Hz), 4.98 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 6.60–6.62 (1H, m), 6.86 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.99 (1H, brs), 7.15–7.17 (1H, m), 7.49 (1H, dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz), 7.77 (1H, brs), 8.05 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.37 (1H, s), 9.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 11.50 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 367 ($M + H$)⁺. Anal. calcd for C₁₉H₂₂N₆O₂·0.6H₂O·0.1MeOH: C, 60.30; H, 6.25; N, 22.09. Found: C, 60.35; H, 5.96; N, 21.76.

cis-1-Benzyl-*N*-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-methylpiperidin-4-amine (化合物 21)

1-Benzyl-3-methylpiperidin-4-one (化合物 **20**, 5.0 g, 24.6 mmol) および (2,4-dimethoxybenzyl)amine (3.7 mL, 24.6 mmol) の DCE (75 mL) 溶液に、室温にて NaBH(OAc)₃ (10.4 g, 49.2 mmol) を加え、同温度にて 2 時間攪拌した。混合物に NaOH (1M 水溶液, 10 mL) および CHCl₃ を加え分液した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10) で精製した。本精製にてジアステレオ異性体を分離し、化合物 **21** を無色油状物として得た (3.7 g, 収率 42%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.41–1.58 (2H, m), 1.83–1.92 (1H, m), 1.97–2.08 (2H, m), 2.38–2.52 (2H, m), 2.58–2.67 (1H, m), 3.24–3.46 (3H, m), 3.53–3.57 (2H, m), 3.73 (3H, s), 3.75 (3H, s), 6.45 (1H, dd, $J = 2.4, 8.0$ Hz), 6.51 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.16 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.19–7.24 (1H, m), 7.26–7.32 (4H, m). MS (ESI) m/z : 355 ($M + H$)⁺.

cis-*N*-(1-Benzyl-3-methylpiperidin-4-yl)-*N*-(2,4-dimethoxybenzyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (化合物 22)

化合物 **21** (3.7 g, 10.4 mmol) の DCE (74 mL) 溶液に、4 °C にて Et₃N (5.8 mL, 41.8 mmol) および (CF₃CO)₂O (2.2 mL, 15.7 mmol) を加え、同温度にて 2 時間攪拌した。混合物に水および CHCl₃ を加え分液し、有機層を水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOAc = 5/1–4/1) で精製し、化合物 **22** を白色固体として得た (4.1 g, 収率 87%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.04 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.09–1.19 (1H, m), 1.32–1.51 (1H, m), 1.87–2.17 (3H, m), 2.21–2.31 (1H, m), 2.57–2.65 (1H, m), 2.73–2.85 (1H, m), 3.42–3.50 (1H, m), 3.74 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.93–4.17 (1H, m), 4.31–4.70 (2H, m), 6.44–6.54 (1H, m), 6.86–6.92 (1H, m), 6.89 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.19–7.33 (5H, m). MS (ESI) *m/z*: 451 (M + H)⁺.

***cis*-1-Benzyl-3-methylpiperidin-4-amine** (化合物 **23**)

化合物 **22** (4.1 g, 9.10 mmol) および TFA (16.8 mL) を室温にて混合し、50 °C にて 24 時間攪拌した。混合物を減圧下濃縮した後、残渣を CHCl₃ に溶解し、飽和 NaHCO₃ 水溶液を加えて中和した。有機層を分離し、MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣に IPE 加えて粉末化し、IPE で洗浄した後、MeOH (81 mL) に溶解した。溶液に NaOH (1 M 水溶液、27 mL, 27.0 mmol) を加え、加熱還流下にて 2 時間攪拌した。混合物を減圧下濃縮した後、残渣に CHCl₃ および飽和 NaHCO₃ 水溶液を加えて分液した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮し、化合物 **23** を無色油状物として得た (1.4 g, 収率 75%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.84 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.14–1.40 (1H, m), 1.41–1.58 (2H, m), 1.65–1.74 (1H, m), 2.10–2.31 (3H, m), 2.40–2.53 (1H, m), 2.73–2.77 (1H, m), 3.20–3.45 (3H, m), 7.20–7.33 (5H, m). MS (ESI) *m/z*: 205 (M + H)⁺.

***cis*-4-[(1-Benzyl-3-methylpiperidin-4-yl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide** (化合物 **24**)

化合物 **8** (240 mg, 1.23 mmol) の NMP (1.2 mL) 溶液に、化合物 **23** (501 mg, 2.45 mmol) および Et₃N (0.51 mL, 3.68 mmol) を加え、マイクロウェーブ照射下、180 °C にて 1.5 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、EtOAc および水を加えた。析出物を濾取し、EtOAc で洗浄し、化合物 **24** を白色固体として得た (270 mg, 収率 61%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.92 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.72–1.85 (2H, m), 2.05–2.13 (1H, m), 2.21–2.52 (4H, m), 3.41–3.51 (2H, m), 4.14–4.21 (1H, m), 6.50–6.52 (1H, m), 6.99 (1H, br), 7.10–7.12 (1H, m), 7.22–7.27 (1H, m), 7.31–7.33 (4H, m), 7.77 (1H, br), 8.37 (1H, s), 9.91 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 11.45 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 364 (M + H)⁺.

***cis*-4-[(3-Methylpiperidin-4-yl)amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide** (化合物 25)

化合物 24 (120 mg, 0.33 mmol) の EtOH (2.5 mL) 溶液に、20% Pd(OH)₂ (50% 含水, 150 mg) を加え、水素ガス雰囲気下、50 °C にて 2 時間攪拌した。不溶物を Celite® を用いて濾過し、濾液を減圧下濃縮し、化合物 25 を白色固体として得た (75 mg, 収率 83%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.89 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.60–1.74 (2H, m), 1.94–2.03 (1H, m), 2.61–2.70 (2H, m), 2.73–2.81 (2H, m), 4.15–4.24 (1H, m), 6.50–6.52 (1H, m), 6.97 (1H, br), 7.09–7.12 (1H, m), 7.76 (1H, br), 8.36 (1H, s), 9.89 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 11.44 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 274 (M + H)⁺.

***cis*-4-[[1-(5-Cyanopyridin-2-yl)-3-methylpiperidin-4-yl]amino]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide** (化合物 26)

化合物 25 (30 mg, 0.11 mmol) の DMI (0.75 mL) 溶液に、2-chloro-5-cyanopyridine (30 mg, 0.22 mmol) および Et₃N (0.061 mL, 0.439 mmol) を加え、160 °C にて 2 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、CHCl₃ および水を加えた。有機層を分離し、水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10) で精製し、化合物 26 を淡黄色固体として得た (28 mg, 収率 68%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.90 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.74–1.89 (2H, m), 2.13–2.21 (1H, m), 3.58–3.66 (1H, m), 3.71–3.79 (2H, m), 3.83–3.91 (1H, m), 4.36–4.44 (1H, m), 6.60–6.62 (1H, m), 7.00 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.02 (1H, br), 7.15–7.17 (1H, m), 7.80 (1H, br), 7.83 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.2 Hz), 8.40 (1H, s), 8.47 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 10.02 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 11.51 (1H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.85, 28.82, 33.33, 40.84, 46.78, 51.27, 94.51, 101.78, 101.91, 104.63, 106.15, 118.71, 121.70, 139.77, 145.48, 149.76, 150.34, 152.43, 159.18, 172.27. MS (ESI) *m/z*: 376 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₀H₂₁N₇O: 375.1808. Found: 376.1887.

***tert*-Butyl 4-[(trimethylsilyl)oxy]-3,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate** (化合物 28)

窒素ガス雰囲気下、*N*-Boc-4-piperidone (化合物 27, 254 g, 1.27 mol) の DMF (635 mL) 溶液に TMSCl (193 mL, 1.53 mol) および Et₃N (444 mL, 3.19 mol) を加え、90 °C にて 21 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、*n*-hexane (600 mL) で希釈した後、*n*-hexane (1.9 L) および 5.5% NaHCO₃ 水溶液 (2.5 L) の混合物に加えた。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮し、化合物 28 を淡褐色油状物として得た (343 g, 収率 99%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.20 (9H, s),

1.47 (9H, s), 2.07–2.14 (2H, m), 3.49–3.55 (2H, m), 3.84–3.90 (2H, m), 4.77–4.82 (1H, m). MS (ESI) m/z : 294 (M + Na)⁺.

***tert*-Butyl 3-fluoro-4-oxopiperidine-1-carboxylate (化合物 29)**

化合物 28 (342 g, 1.26 mol)の CH₃CN (6.8 L)溶液に、氷冷下にて Selectfluor[®] (440 g, 1.12 mol)を加え、同温度にて 50 分間攪拌した。混合物を減圧下濃縮し、残渣に EtOAc および 5.5% NaHCO₃ 水溶液 (1.9 L)を加えた。有機層を分離し、水層を EtOAc で抽出した。混合した有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣に *n*-hexane (450 mL)および EtOAc (50 mL)を加え、1 時間かけて粉末化した。析出物を濾取し、*n*-hexane で洗浄し、化合物 29 を淡黄色固体として得た (274 g, 収率 75%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.38 (9H, s), 1.47–1.54 (1H, m), 1.61–1.71 (1H, m), 3.67–3.82 (1H, m), 3.91–4.03 (1H, m), 4.08–4.25 (1H, m), 5.93 (1H, brs), 5.97–5.99 (1H, m). MS (ESI) m/z : 216 (M - H)⁻.

***tert*-Butyl (3*S*,4*R*)-4-(benzylamino)-3-fluoropiperidine-1-carboxylate (化合物 30)および *tert*-Butyl (3*R*,4*S*)-4-(benzylamino)-3-fluoropiperidine-1-carboxylate (化合物 31)**

窒素ガス雰囲気下、化合物 29 (366 g, 1.69 mol)の DCE (5.5 L)溶液に、氷冷下にて benzylamine (193 mL, 1.77 mol)および NaBH(OAc)₃ (536 g, 2.53 mol)を加え、室温にて 2.5 時間攪拌した。混合物に 20% K₂CO₃ 水溶液 (3 L)を加え、10 分間攪拌した。有機層を分離し、水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOAc = 85/15–70/30 および CHCl₃/MeOH = 98/2–94/6)で精製した。本精製にてジアステレオ異性体を分離し、化合物 30 および化合物 31 のラセミ体混合物を淡黄色油状物として得た (312 g, 収率 60%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.32–1.49 (12H, m), 1.64–1.71 (1H, m), 2.01–2.10 (1H, m), 2.54–3.09 (3H, m), 3.84–3.98 (1H, m), 4.06–4.22 (1H, m), 4.68–4.88 (1H, m), 7.19–7.24 (1H, m), 7.28–7.36 (4H). MS (ESI) m/z : 309 (M + H)⁺.

ラセミ体混合物 (75 g)をキラルシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHIRALPAK AD-H, 溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOH/Et₂NH = 90/10/0.1)で精製し、化合物 30 (31.1 g)および化合物 31 (32.5 g)をそれぞれ無色油状物として得た。化合物 30 および化合物 31 の光学純度は HPLC 解析により決定した (CHIRALPAK AD-H; 0.46 cm i.d. × 25 cm, 溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOH/Et₂NH = 90/10/0.1, 流速; 1.0 mL/min)。化合物 30: >98% ee, t_R = 6.46 min. [α]_D²³ +39.3 (c = 1.0, MeOH). 化合物 31: >98% ee, t_R = 8.14 min. [α]_D²³ -39.5 (c = 1.0, MeOH). 化合物 30 および化合物 31 の立体化学は、既知文献⁵²⁾に記載の

旋光性データおよび化合物 **30** を用いて合成した化合物の X 線結晶解析（データ非開示）により決定した。

***tert*-Butyl (3*S*,4*R*)-4-amino-3-fluoropiperidine-1-carboxylate (化合物 32)**

窒素ガス雰囲気下、化合物 **30** (29.5 g, 95.7 mmol) の EtOH (295 mL) 溶液に HCO₂NH₄ (24.1 g, 382 mmol) および水 (29.5 mL) を加え、室温にて 5 分間攪拌した。混合物に 10% Pd-C (50% 含水, 10.2 g) を加え、加熱還流下にて 1 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、不溶物を Celite® を用いて濾過した。濾液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10) で精製し、化合物 **32** を白色固体として得た (20.6 g, 収率 99%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.38 (9H, s), 1.49–1.58 (3H, m), 2.67–3.13 (3H, m), 3.27–3.39 (1H, m), 3.77–3.92 (1H, m), 4.01–4.14 (1H, m), 4.23–4.60 (1H, m). MS (ESI) *m/z*: 241 (M + Na)⁺.

***tert*-Butyl (3*R*,4*S*)-4-amino-3-fluoropiperidine-1-carboxylate (化合物 33)**

化合物 **31** を用いて、化合物 **32** と同様の合成法にて、化合物 **33** を白色固体として得た (収率 99%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.38 (9H, s), 1.49–1.58 (3H, m), 2.67–3.13 (3H, m), 3.27–3.39 (1H, m), 3.77–3.92 (1H, m), 4.01–4.14 (1H, m), 4.23–4.60 (1H, m). MS (ESI) *m/z*: 241 (M + Na)⁺.

Ethyl 4-{[(3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-fluoropiperidin-4-yl]amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylate (化合物 34)

化合物 **6** (13.8 g, 61.4 mmol) および化合物 **32** (20.1 g, 92.1 mmol) の *n*-BuOH (69 mL) 溶液に *n*-Bu₃N (29.3 mL, 123 mmol) を加え、加熱還流下にて 24 時間攪拌した。混合物を氷冷した後、析出物を濾取し、*n*-BuOH、IPE および *n*-hexane で洗浄し、化合物 **34** を淡黄色固体として得た (23.0 g, 収率 92%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.32 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.41 (9H, s), 1.54–1.69 (1H, m), 1.89–1.97 (1H, m), 2.72–3.44 (2H, m), 3.92–4.08 (1H, m), 4.17–4.52 (4H, m), 4.82–5.01 (1H, m), 6.66–6.70 (1H, m), 7.24–7.27 (1H, m), 8.58 (1H, s), 9.06 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 11.79 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 407 (M + H)⁺.

4-{[(3*S*,4*R*)-1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-fluoropiperidin-4-yl]amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylic acid (化合物 35)

化合物 **34** (22.7 g, 55.8 mmol) の EtOH (227 mL) 懸濁液に NaOH (6 M 水溶液, 37.2 mL, 223 mmol) を加え、80 °C にて 1.5 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、減圧下濃

縮した。残渣に氷冷下にて、水 (450 mL) および HCl (2 M 水溶液, 117 mL) を加え、同条件下にて 30 分間攪拌した。析出物を濾取し、水で洗浄し、化合物 **35** を灰白色固体として得た (23.0 g, 収率 92%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.41 (9H, s), 1.55–1.67 (1H, m), 1.89–1.96 (1H, m), 2.95–3.43 (2H, m), 3.93–4.07 (1H, m), 4.17–4.50 (2H, m), 4.82–5.00 (1H, m), 6.64–6.67 (1H, m), 7.21–7.24 (1H, m), 8.54 (1H, s), 9.29 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 11.72 (1H, brs), 12.49 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 379 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl (3*S*,4*R*)-4-[(5-carbamoyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)amino]-3-fluoropiperidine-1-carboxylate (化合物 36)**

化合物 **35** (15 g, 39.6 mmol) および HOBt (5.9 g, 43.7 mmol) の DMF (120 mL) 溶液に EDC (10.9 mL, 59.5 mmol) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。混合物を氷冷し、28% NH₄OH 水溶液 (13.4 mL, 19.8 mmol) を加え、室温にて 1.5 時間攪拌した。混合物に水を加え、析出物を濾取し、水で洗浄し、化合物 **36** を淡黄色固体として得た (13.0 g, 収率 87%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.41 (9H, s), 1.53–1.65 (1H, m), 1.85–1.92 (1H, m), 2.92–3.42 (2H, m), 3.91–4.06 (1H, m), 4.15–4.42 (2H, m), 4.77–4.95 (1H, m), 6.58–6.61 (1H, m), 7.04 (1H, br), 7.17–7.20 (1H, m), 7.80 (1H, br), 8.38 (1H, s), 9.84 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 11.56 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 378 (M + H)⁺.

4-[(3*S*,4*R*)-1-(5-Cyanopyridin-2-yl)-3-fluoropiperidin-4-yl]amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide (化合物 37)

化合物 **36** (12.9 g, 34.2 mmol) の CH₂Cl₂ (129 mL) 懸濁液に TFA (39.5 mL, 513 mmol) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。混合物を減圧下濃縮し、残渣に EtOAc を加え、30 分間攪拌した。析出物を濾取し、EtOAc、IPE および *n*-hexane で洗浄し、固体 (18.6 g) を得た。得られた固体 (18.4 g) を DMF (110 mL) に溶解し、2-chloro-5-cyanopyridine (6.8 g, 47.3 mmol) および Et₃N (20.3 mL, 146 mmol) を加えた。混合物を 95 °C にて 4 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、水および MeOH を加え、30 分間攪拌した。析出物を濾取し、DMF/H₂O/MeOH (1:0.1:2) および MeOH で洗浄した後、加熱下にて DMF (110 mL) に溶解した。溶液に活性炭 (1 g) を加え、不溶物を濾過した。濾液に acetone (120 mL) および水 (110 mL) を加えた。析出物を濾取し、DMF/acetone/H₂O (1:1:1) および acetone で洗浄した後、水 (300 mL) に懸濁した。懸濁液を 60 °C にて 30 分間攪拌した。混合物を室温まで冷却した後、析出物を濾取し、水で洗浄し、化合物 **37** を白色固体として得た (7.2 g, 収率 56%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.61–1.73 (1H, m), 1.98–2.05 (1H, m), 3.24–3.57 (2H, m), 4.44–4.59 (2H, m), 4.79–5.08 (2H, m), 6.66–6.68 (1H,

m), 7.03 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.05 (1H, br), 7.19–7.22 (1H, m), 7.79 (1H, br), 7.86 (1H, dd, $J = 2.4, 9.2$ Hz), 8.39 (1H, s), 8.48–8.50 (1H, m), 9.86 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 11.57 (1H, brs). ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.16, 42.02, 46.57 (d, $J = 19.5$ Hz), 51.30 (d, $J = 18.4$ Hz), 88.66 (d, $J = 177.2$ Hz), 95.02, 101.48, 102.38, 104.54, 106.37, 118.59, 122.07, 139.85, 145.37, 148.90, 150.40, 152.30, 159.50, 171.89. MS (ESI) m/z : 380 (M + H) $^+$. $[\alpha]_{\text{D}}^{27} +7.40$ ($c = 1.02$, DMF). Anal. calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{FN}_7\text{O} \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C, 59.87; H, 4.81; N, 25.72. Found: C, 59.80; H, 4.77; N, 25.87.

Ethyl 4-{{(3R,4S)-1-(tert-butoxycarbonyl)-3-fluoropiperidin-4-yl}amino}-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxylate (化合物 38)

化合物 6 および化合物 33 を用いて、化合物 34 と同様の合成法にて、化合物 38 を淡黄色固体として得た (収率 92%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.32 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.41 (9H, s), 1.54–1.69 (1H, m), 1.89–1.97 (1H, m), 2.72–3.44 (2H, m), 3.92–4.08 (1H, m), 4.17–4.52 (4H, m), 4.82–5.01 (1H, m), 6.66–6.70 (1H, m), 7.24–7.27 (1H, m), 8.58 (1H, s), 9.06 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 11.79 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 407 (M + H) $^+$.

4-{{(3R,4S)-1-(tert-Butoxycarbonyl)-3-fluoropiperidin-4-yl}amino}-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-5-carboxylic acid (化合物 39)

化合物 38 を用いて、化合物 35 と同様の合成法にて、化合物 39 を灰白色固体として得た (収率 76%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.41 (9H, s), 1.55–1.67 (1H, m), 1.89–1.96 (1H, m), 2.95–3.43 (2H, m), 3.93–4.07 (1H, m), 4.17–4.50 (2H, m), 4.82–5.00 (1H, m), 6.64–6.67 (1H, m), 7.21–7.24 (1H, m), 8.54 (1H, s), 9.29 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 11.72 (1H, brs), 12.49 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 379 (M + H) $^+$.

tert-Butyl (3R,4S)-4-[(5-carbamoyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yl)amino]-3-fluoropiperidine-1-carboxylate (化合物 40)

化合物 39 を用いて、化合物 36 と同様の合成法にて、化合物 40 を淡黄色固体として得た (収率 87%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.41 (9H, s), 1.53–1.65 (1H, m), 1.85–1.92 (1H, m), 2.92–3.42 (2H, m), 3.91–4.06 (1H, m), 4.15–4.42 (2H, m), 4.77–4.95 (1H, m), 6.58–6.61 (1H, m), 7.04 (1H, br), 7.17–7.20 (1H, m), 7.80 (1H, br), 8.38 (1H, s), 9.84 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 11.56 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 378 (M + H) $^+$.

4-**{[(3*R*,4*S*)-1-(5-Cyanopyridin-2-yl)-3-fluoropiperidin-4-yl]amino}-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide** (化合物 41)

化合物 40 を用いて、化合物 37 と同様の合成法にて、化合物 41 を白色固体として得た (収率 57%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.61–1.73 (1H, m), 1.98–2.05 (1H, m), 3.24–3.57 (2H, m), 4.44–4.59 (2H, m), 4.79–5.08 (2H, m), 6.66–6.68 (1H, m), 7.03 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.05 (1H, br), 7.19–7.22 (1H, m), 7.79 (1H, br), 7.86 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.2 Hz), 8.39 (1H, s), 8.48–8.50 (1H, m), 9.86 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 11.57 (1H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 27.14, 42.01, 46.56 (d, *J* = 19.5 Hz), 51.29 (d, *J* = 18.4 Hz), 88.66 (d, *J* = 177.2 Hz), 95.01, 101.48, 102.38, 104.53, 106.37, 118.59, 122.08, 139.85, 145.36, 148.89, 150.38, 152.30, 159.49, 171.88. MS (ESI) *m/z*: 380 (M + H)⁺. [α]_D²⁷ –7.63 (*c* = 0.99, DMF). Anal. calcd for C₁₉H₁₈FN₇O·0.1H₂O: C, 59.87; H, 4.81; N, 25.72. Found: C, 59.69; H, 4.78; N, 25.73.

第三章に関する実験

Ethyl 6-chloro-4-{[(1*S*,2*R*)-2-methylcyclohexyl]amino}nicotinate**** (化合物 43)

Ethyl 4,6-dichloronicotinate (化合物 42, 500 mg, 2.27 mmol)の *n*-BuOH (5 mL)溶液に (1*S*,2*R*)-2-methylcyclohexanamine hydrochloride (510 mg, 3.41 mmol)および DIPEA (0.59 mL, 3.41 mmol)を加え、120 °C にて 3 時間攪拌した。混合物に (1*S*,2*R*)-2-methylcyclohexanamine hydrochloride (102 mg, 0.68 mmol)を加え、120 °C にて 1 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、EtOAc および水を加え、分液した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOAc = 90/10–80/20)で精製し、化合物 43 を白色固体として得た (660 mg, 収率 98%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.85 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.17–1.39 (8H, m), 1.43–1.70 (3H, m), 1.82–1.93 (1H, m), 3.83–3.89 (1H, m), 4.32 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 6.91 (1H, s), 8.37 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.54 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 297 (M + H)⁺.

6-Chloro-4-{[(1*S*,2*R*)-2-methylcyclohexyl]amino}nicotinic acid**** (化合物 44)

化合物 43 (660 mg, 2.22 mmol)の dioxane (6.6 mL)溶液に NaOH (2 M 水溶液, 4.45 mL, 8.89 mmol)を加え、110 °C にて 2 時間攪拌した。混合物を 4 °C まで冷却し、HCl (1 M 水溶液)を加え酸性にした。析出物を濾取し、水で洗浄し、化合物 44 を白色固体として得た (348 mg, 収率 58%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.85 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 1.21–1.69 (8H, m), 1.82–1.93 (1H, m), 3.78–3.85 (1H, m), 6.85 (1H, s), 8.50 (1H, s), 8.63 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 13.38 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 269 (M + H)⁺.

6-Chloro-4-**[(1S,2R)-2-methylcyclohexyl]amino**nicotinamide (化合物 45)

化合物 44 (384 mg, 1.43 mmol) の DMF (3.84 mL) 溶液に CDI (463 mg, 2.86 mmol) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。混合物に 28% NH₄OH 水溶液 (0.89 mL, 7.15 mmol) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。混合物に水を加え、析出物を濾取し、水および IPE で洗浄し、化合物 45 を白色固体として得た (350 mg, 収率 91%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.83 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.20-1.67 (8H, m), 1.79-1.89 (1H, m), 3.69-3.76 (1H, m), 6.73 (1H, s), 7.46 (1H, br), 8.09 (1H, br), 8.41 (1H, s), 9.22 (1H, d, *J* = 8.8 Hz). MS (ESI) *m/z*: 268 (M + H)⁺.

6-Anilino-4-**[(1S,2R)-2-methylcyclohexyl]amino**nicotinamide (化合物 46)

化合物 45 (30 mg, 0.112 mmol)、aniline (31.3 mg, 0.336 mmol)、Pd₂(dba)₃ (5.1 mg, 5.6 μ mol)、2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl (2.7 mg, 5.7 μ mol) および *t*-BuONa (16.2 mg, 0.169 mmol) を *t*-BuOH (0.75 mL) に懸濁し、マイクロウェーブ照射下、130 °C にて 30 分間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、CHCl₃/MeOH (4:1) を加え、飽和食塩水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10) で精製し、化合物 46 を白色固体として得た (20 mg, 収率 55%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.87 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.30-1.61 (7H, m), 1.67-1.73 (1H, m), 1.87-1.94 (1H, m), 3.44-3.49 (1H, m), 5.96 (1H, s), 6.84-6.88 (1H, m), 6.99 (1H, br), 7.19-7.25 (2H, m), 7.57-7.60 (2H, m), 7.74 (1H, br), 8.36 (1H, s), 8.86 (1H, s), 8.88 (1H, d, *J* = 8.2 Hz). MS (ESI) *m/z*: 325 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₁₉H₂₄N₄O: 324.1950. Found: 325.2031.

Ethyl 4-**[1-(tert-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]amino**-6-chloronicotinate (化合物 47)

化合物 42 および *N*-Boc-4-aminopiperidine を用いて、化合物 43 と同様の合成法にて、化合物 47 を白色固体として得た (収率 99%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.28-1.43 (14H, m), 1.85-1.93 (2H, m), 2.88-3.06 (2H, m), 3.74-3.90 (3H, m), 4.29 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 6.99 (1H, s), 8.05 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.54 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 384 (M + H)⁺.

4-**[1-(tert-Butoxycarbonyl)piperidin-4-yl]amino**-6-chloronicotinic acid (化合物 48)

化合物 47 を用いて、化合物 44 と同様の合成法にて、化合物 48 を白色固体として得た (収率 88%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.24-1.45 (11H, m), 1.86-1.94 (2H, m),

2.88-3.07 (2H, m), 3.72-3.90 (3H, m), 6.94 (1H, s), 8.31 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.51 (1H, s), 13.39 (1H, br). MS (ESI) m/z : 356 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-[(5-carbamoyl-2-chloropyridin-4-yl)amino]piperidine-1-carboxylate (化合物 49)**

化合物 48 を用いて、化合物 45 と同様の合成法にて、化合物 49 を白色固体として得た (収率 90%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.21-1.32 (2H, m), 1.40 (9H, s), 1.81-1.92 (2H, m), 2.88-3.08 (2H, m), 3.64-3.74 (1H, m), 3.76-3.86 (2H, m), 6.82 (1H, s), 7.48 (1H, br), 8.09 (1H, br), 8.41 (1H, s), 8.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz). MS (ESI) m/z : 377 (M + Na)⁺.

***tert*-Butyl 4-[(2-anilino-5-carbamoylpyridin-4-yl)amino]piperidine-1-carboxylate (化合物 50a)**

化合物 49 および aniline を用いて、化合物 46 と同様の合成法にて、化合物 50a を白色固体として得た (収率 48%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.22-1.37 (2H, m), 1.41 (9H, s), 1.89-1.98 (2H, m), 2.91-3.10 (2H, m), 3.40-3.49 (1H, m), 3.76-3.87 (2H, m), 5.99 (1H, s), 6.84-6.89 (1H, m), 7.03 (1H, br), 7.21-7.26 (2H, m), 7.59-7.63 (2H, m), 7.74 (1H, br), 8.37 (1H, s), 8.65 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 8.91 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 412 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-[[5-carbamoyl-2-(pyridin-2-ylamino)pyridin-4-yl]amino]piperidine-1-carboxylate (化合物 50b)**

化合物 49 (400 mg, 1.13 mmol)、2-aminopyridine (318 mg, 3.38 mmol)、Pd₂(dba)₃ (51.6 mg, 56.4 μ mol)、2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl (26.9 mg, 56.4 μ mol) および K₂CO₃ (312 mg, 2.25 mmol) を *t*-BuOH (3 mL) に懸濁させ、マイクロウェーブ照射下、130 °C にて 1 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、CHCl₃/MeOH (4:1) を加え、飽和食塩水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0 - 90/10) で精製し、化合物 50b を淡黄色固体として得た (362 mg, 収率 78%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.27-1.38 (2H, m), 1.41 (9H, s), 1.95-2.02 (2H, m), 2.96-3.10 (2H, m), 3.43-3.53 (1H, m), 3.80-3.88 (2H, m), 6.83-6.87 (1H, m), 7.07 (1H, br), 7.22 (1H, s), 7.62-7.66 (2H, m), 7.80 (1H, br), 8.20-8.22 (1H, m), 8.40 (1H, s), 8.70 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 9.47 (1H, s). MS (ESI) m/z : 413 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-{{5-carbamoyl-2-(pyrazin-2-ylamino)pyridin-4-yl}amino}piperidine-1-carboxylate (化合物 50c)**

化合物 49 および 2-aminopyrazine を用いて、化合物 50b と同様の合成法にて、化合物 50c を黄色固体として得た (収率 87%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.28-1.39 (2H, m), 1.41 (9H, s), 1.93-2.02 (2H, m), 2.97-3.10 (2H, m), 3.44-3.53 (1H, m), 3.78-3.88 (2H, m), 7.11 (1H, s), 7.14 (1H, br), 7.85 (1H, br), 8.07 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 8.23-8.24 (1H, m), 8.45 (1H, s), 8.77 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 9.01 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 9.84 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 414 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-{{5-carbamoyl-2-(pyrimidin-4-ylamino)pyridin-4-yl}amino}piperidine-1-carboxylate (化合物 50d)**

化合物 49 および 2-aminopyrimidine を用いて、化合物 50b と同様の合成法にて、化合物 50d を黄色固体として得た (収率 92%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.28-1.38 (2H, m), 1.41 (9H, s), 1.94-2.01 (2H, m), 2.98-3.11 (2H, m), 3.44-3.52 (1H, m), 3.80-3.88 (2H, m), 7.12 (1H, s), 7.19 (1H, br), 7.74 (1H, d, *J* = 5.2 Hz), 7.89 (1H, br), 8.39 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 8.45 (1H, s), 8.70 (1H, s), 8.76 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 9.98 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 414 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-{{5-carbamoyl-2-[(6-methylpyrazin-2-yl)amino]pyridin-4-yl}amino}piperidine-1-carboxylate (化合物 50e)**

化合物 49 および 2-amino-6-methylpyrazine を用いて、化合物 50b と同様の合成法にて、化合物 50e を淡黄色固体として得た (収率 50%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.28-1.45 (11H, m), 1.98-2.06 (2H, m), 2.40 (3H, s), 2.92-3.12 (2H, m), 3.45-3.53 (1H, m), 3.84-3.92 (2H, m), 7.11 (1H, br), 7.39 (1H, s), 7.85 (1H, br), 7.96 (1H, s), 8.44 (1H, s), 8.64 (1H, s), 8.77 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 9.84 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 428 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-{{5-carbamoyl-2-[(5-methylpyrazin-2-yl)amino]pyridin-4-yl}amino}piperidine-1-carboxylate (化合物 50f)**

化合物 49 および 2-amino-5-methylpyrazine を用いて、化合物 50b と同様の合成法にて、化合物 50f を茶色固体として得た (収率 93%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.22-1.44 (11H, m), 1.92-2.02 (2H, m), 2.38 (3H, s), 2.95-3.11 (2H, m), 3.42-3.51 (1H, m), 3.78-3.89 (2H, m), 7.03 (1H, s), 7.11 (1H, br), 7.83 (1H, br), 8.13 (1H, s), 8.43 (1H, s), 8.75 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 8.91-8.92 (1H, m), 9.68 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 428 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-({5-carbamoyl-2-[(2-methylpyrimidin-4-yl)amino]pyridin-4-yl}amino)piperidine-1-carboxylate (化合物 50g)**

化合物 49 および 4-amino-2-methylpyrimidine を用いて、化合物 50b と同様の合成法にて、化合物 50g を淡黄色固体として得た (収率 63%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.22-1.44 (11H, m), 1.98-2.06 (2H, m), 2.48 (3H, s), 2.93-3.08 (2H, m), 3.45-3.54 (1H, m), 3.83-3.92 (2H, m), 7.17 (1H, br), 7.33 (1H, d, *J* = 5.6 Hz), 7.41 (1H, s), 7.86 (1H, br), 8.28 (1H, d, *J* = 5.6 Hz), 8.44 (1H, s), 8.77 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 9.93 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 428 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-({5-carbamoyl-2-[(2-methyl-1,3-benzoxazol-5-yl)amino]pyridin-4-yl}amino)piperidine-1-carboxylate (化合物 50h)**

化合物 49 および 2-methyl-1,3-benzoxazol-5-amine を用いて、化合物 50b と同様の合成法にて、化合物 50h を淡褐色固体として得た (収率 69%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.22-1.44 (11H, m), 1.90-1.99 (2H, m), 2.57 (3H, s), 2.94-3.12 (2H, m), 3.40-3.51 (1H, m), 3.74-3.90 (2H, m), 5.97 (1H, s), 7.04 (1H, br), 7.38 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz), 7.50 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.77 (1H, br), 8.10 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.39 (1H, s), 8.66, (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 9.01 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 467 (M + H)⁺.

***tert*-Butyl 4-({5-carbamoyl-2-[(2-methyl-1,3-benzoxazol-6-yl)amino]pyridin-4-yl}amino)piperidine-1-carboxylate (化合物 50i)**

化合物 49 および 2-methyl-1,3-benzoxazol-6-amine を用いて、化合物 50b と同様の合成法にて、化合物 50i を紫色固体として得た (収率 29%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.22-1.44 (11H, m), 1.91-1.99 (2H, m), 2.56 (3H, s), 2.95-3.08 (2H, m), 3.40-3.50 (1H, m), 3.78-3.86 (2H, m), 6.00 (1H, s), 7.06 (1H, br), 7.30 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.8 Hz), 7.48 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.78 (1H, br), 8.26 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.41 (1H, s), 8.66 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 9.15 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 467 (M + H)⁺.

6-Anilino-4-{{1-(5-cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}nicotinamide (化合物 51a)

化合物 50a (138 mg, 0.335 mmol)の dioxane (2 mL)溶液に、HCl (4 M dioxane 溶液, 6 mL)を加え、室温にて終夜攪拌した。混合物に IPE を加え、析出物を濾取し、IPE で洗浄し、6-anilino-4-(piperidin-4-ylamino)nicotinamide dihydrochloride を固体として得た (114 mg, 収率 88%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.63-1.75 (2H, m), 2.05-2.13 (2H, m), 2.94-3.05 (2H, m), 3.22-3.31 (2H, m), 3.66-3.76 (1H, m), 6.17 (1H, s), 7.22-7.28 (1H, m),

7.32-7.36 (2H, m), 7.43-7.48 (2H, m), 7.70 (1H, br), 8.34 (2H, brs), 8.93 (1H, br), 9.05 (1H, br), 9.55 (1H, br), 10.15 (1H, br), 12.92 (1H, br). MS (ESI) m/z : 312 (M + H)⁺.

6-Anilino-4-(piperidin-4-ylamino)nicotinamide dihydrochloride (45 mg, 0.117 mmol)の DMSO (0.72 mL)溶液に 2-chloro-5-cyanopyridine (32.4 mg, 0.234 mmol)および K₂CO₃ (48.6 mg, 0.351 mmol)を加え、100 °Cにて 45 分間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–88/12)で精製し、化合物 **51a** を白色固体として得た (39.5 mg, 収率 82%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.36-1.46 (2H, m), 2.01-2.10 (2H, m), 3.25-3.35 (2H, m), 3.54-3.64 (1H, m), 4.25-4.31 (2H, m), 6.04 (1H, s), 6.87 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 6.99 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.03 (1H, br), 7.24 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.60-7.64 (2H, m), 7.74 (1H, br), 7.85 (1H, dd, $J = 2.4, 9.2$ Hz), 8.38 (1H, s), 8.49 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.69 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 8.93 (1H, s). MS (ESI) m/z : 414 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₃H₂₃N₇O: 413.1964. Found: 414.2050.

4-**{[1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl]amino}**-6-(pyridin-2-ylamino)nicotinamide (化合物 **51b**)

化合物 **50b** (360 mg, 0.873 mmol)の dioxane (1.5 mL)溶液に HCl (4 M dioxane 溶液, 3 mL)を加え、室温にて 2 時間攪拌した。混合物を減圧下濃縮し、4-(piperidin-4-ylamino)-6-(pyridin-2-ylamino)nicotinamide dihydrochloride を白色固体として得た (315 mg, 収率 94%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.70-1.81 (2H, m), 2.14-2.21 (2H, m), 3.00-3.10 (2H, m), 3.29-3.35 (2H, m), 3.68-3.76 (1H, m), 6.71 (1H, s), 7.17-7.23 (2H, m), 7.80 (1H, br), 7.90-7.95 (1H, m), 8.35-8.38 (1H, m), 8.40 (1H, br), 8.47 (1H, s), 8.94-9.10 (2H, m), 9.30 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 11.95 (1H, s), 14.50 (1H, br).

4-(Piperidin-4-ylamino)-6-(pyridin-2-ylamino)nicotinamide dihydrochloride (50 mg, 0.130 mmol)の NMP (1 mL)溶液に 2-chloro-5-cyanopyridine (27 mg, 0.195 mmol)および Et₃N (90 μ L, 0.649 mmol)を加え、マイクロウェーブ照射下、150 °Cにて 30 分間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、アミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10)で精製し、化合物 **51b** を白色固体として得た (17 mg, 収率 32%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.38-1.48 (2H, m), 2.07-2.14 (2H, m), 3.27-3.35 (2H, m), 3.60-3.68 (1H, m), 4.27-4.33 (2H, m), 6.84-6.88 (1H, m), 7.00 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.07 (1H, br), 7.26 (1H, s), 7.61-7.68 (2H, m), 7.80 (1H, br), 7.85 (1H, dd, $J = 2.3, 9.0$ Hz), 8.21-8.23 (1H, m), 8.41 (1H, s), 8.49-8.50 (1H, m), 8.74 (1H, d, $J = 7.1$ Hz), 9.49 (1H, s). MS (ESI) m/z : 415 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₂H₂₂N₈O: 414.1917. Found: 415.1997.

4-{{1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-6-(pyrazin-2-ylamino)nicotinamide
(化合物 51c)

化合物 50c を用いて、化合物 51b と同様の合成法にて、化合物 51c を白色固体として得た (収率 90%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.40-1.49 (2H, m), 2.06-2.12 (2H, m), 3.28-3.37 (2H, m), 3.62-3.68 (1H, m), 4.26-4.32 (2H, m), 7.00 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 7.11 (1H, br), 7.14 (1H, s), 7.85 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.1 Hz), 7.87 (1H, br), 8.07 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 8.23-8.24 (1H, m), 8.46 (1H, s), 8.48-8.51 (1H, m), 8.81 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 9.03 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 9.86 (1H, s). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 30.54, 42.59, 48.07, 90.98, 94.82, 105.49, 106.40, 118.68, 135.47, 135.71, 139.86, 141.46, 149.29, 150.88, 152.45, 154.04, 155.55, 158.85, 170.31. MS (ESI) *m/z*: 416 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₁H₂₁N₉O: 415.1869. Found: 416.1954.

4-{{1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-6-(pyrimidin-4-ylamino)nicotinamide
(化合物 51d)

化合物 50d を用いて、化合物 51b と同様の合成法にて、化合物 51d を白色固体として得た (収率 28%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.45-1.54 (2H, m), 2.05-2.12 (2H, m), 3.24-3.40 (2H, m), 3.67-3.76 (1H, m), 4.28-4.35 (2H, m), 6.94 (1H, br), 7.01 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 7.35-7.66 (2H, m), 7.86 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.1 Hz), 8.11 (1H, br), 8.46 (1H, s), 8.50 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.51-8.54 (1H, m), 8.83 (1H, s), 9.10 (1H, br), 10.77 (1H, br). MS (ESI) *m/z*: 416 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₁H₂₁N₉O: 415.187. Found: 416.1945.

4-{{1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-6-[(6-methylpyrazin-2-yl)amino]nicotinamide (化合物 51e)

化合物 50e を用いて、化合物 51a と同様の合成法にて、化合物 51e を白色固体として得た (収率 52%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.39-1.50 (2H, m), 2.10-2.17 (2H, m), 2.42 (3H, s), 3.23-3.37 (2H, m), 3.60-3.70 (1H, m), 4.30-4.40 (2H, m), 7.00 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.14 (1H, br), 7.42 (1H, s), 7.78-7.90 (2H, m), 7.97 (1H, s), 8.45 (1H, s), 8.50 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.63 (1H, s), 8.83 (1H, brd), 9.88 (1H, br). MS (ESI) *m/z*: 430 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₂H₂₃N₉O: 429.2026. Found: 430.2094.

4-{{1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-6-[(5-methylpyrazin-2-yl)amino]nicotinamide (化合物 51f)

化合物 **50f** を用いて、化合物 **51a** と同様の合成法にて、化合物 **51f** を白色固体として得た (収率 30%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.42-1.54 (2H, m), 2.04-2.13 (2H, m), 2.42 (3H, s), 3.26-3.52 (2H, m), 3.63-3.75 (1H, m), 4.26-4.36 (2H, m), 6.85-6.95 (1H, m), 7.01 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.34 (1H, br), 7.85 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.2 Hz), 8.00 (1H, br), 8.18 (1H, s), 8.42 (1H, s), 8.50 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.69-8.82 (1H, m), 8.94-9.08 (1H, m), 10.19 (1H, br). MS (ESI) *m/z*: 430 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₂H₂₃N₉O: 429.2026. Found: 430.2104.

4-{{1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-6-[(2-methylpyrimidin-4-yl)amino]nicotinamide (化合物 **51g**)

化合物 **50g** を用いて、化合物 **51a** と同様の合成法にて、化合物 **51g** を白色固体として得た (収率 57%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.38-1.50 (2H, m), 2.09-2.18 (2H, m), 2.50 (3H, s), 3.24-3.44 (2H, m), 3.60-3.70 (1H, m), 4.30-4.40 (2H, m), 7.00 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.16 (1H, br), 7.34 (1H, d, *J* = 5.8 Hz), 7.46 (1H, s), 7.82-7.92 (2H, m), 8.29 (1H, d, *J* = 5.9 Hz), 8.44 (1H, s), 8.49 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.79 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 9.94 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 430 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₂H₂₃N₉O: 429.2026. Found: 430.2104.

4-{{1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-6-[(2-methyl-1,3-benzoxazol-5-yl)amino]nicotinamide (化合物 **51h**)

化合物 **50h** を用いて、化合物 **51a** と同様の合成法にて、化合物 **51h** を白色固体として得た (収率 31%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.36-1.48 (2H, m), 2.02-2.10 (2H, m), 2.58 (3H, s), 3.25-3.36 (2H, m), 3.56-3.66 (1H, m), 4.20-4.30 (2H, m), 6.02 (1H, s), 6.97-7.18 (2H, m), 7.39 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.8 Hz), 7.52 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.72-7.89 (2H, m), 8.10 (1H, br), 8.39 (1H, s), 8.49 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 8.74 (1H, br), 9.08 (1H, br). MS (ESI) *m/z*: 469 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₅H₂₄N₈O₂: 468.2022. Found: 469.2104.

4-{{1-(5-Cyanopyridin-2-yl)piperidin-4-yl}amino}-6-[(2-methyl-1,3-benzoxazol-6-yl)amino]nicotinamide (化合物 **51i**)

化合物 **50i** を用いて、化合物 **51a** と同様の合成法にて、化合物 **51i** を淡褐色固体として得た (収率 26%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.36-1.48 (2H, m), 2.01-2.10 (2H, m), 2.56 (3H, s), 3.25-3.36 (2H, m), 3.56-3.66 (1H, m), 4.24-4.32 (2H, m), 6.05 (1H, s), 6.96-7.16 (2H, m), 7.31 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.6 Hz), 7.49 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.70-7.88 (2H, m), 8.28 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 8.42 (1H, s), 8.49 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.70 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 9.18 (1H,

s). MS (ESI) m/z : 469 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₅H₂₄N₈O₂: 468.2022. Found: 469.2102.

Ethyl 4-(benzylamino)-6-chloronicotinate (化合物 52)

化合物 42 (40.0 g, 182 mmol)の *i*-PrOH (400 mL)溶液に benzylamine (23.8 mL, 218 mmol)および DIPEA (47.5 mL, 273 mmol)を加え、80 °C にて 2 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、減圧下濃縮した。残渣に EtOAc および水を加えた。有機層を分離し、10%クエン酸水溶液、飽和 NaHCO₃ 水溶液および飽和食塩水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮し、化合物 52 を固体として得た (51 g, 収率 97%)。化合物 52 はそれ以上の精製を行わず次の反応に用いた。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.39 (3H, t, J = 7.2 Hz), 4.35 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.43 (2H, d, J = 5.6 Hz), 6.55 (1H, s), 7.29-7.34 (3H, m), 7.35-7.40 (2H, m), 8.52-8.60 (1H, m), 8.70 (1H, s). MS (ESI) m/z : 291 (M + H)⁺.

4-(Benzylamino)-6-chloronicotinic acid (化合物 53)

化合物 52 (49.0 g, 169 mmol)の EtOH (392 mL)溶液に NaOH (6 M 水溶液, 112 mL, 674 mmol)を加え、70 °C にて 1.5 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、水および HCl (2 M 水溶液)を加え、30 分間攪拌した。析出物を濾取し、水で洗浄し、化合物 53 を灰色固体として得た (40.2 g, 収率 91%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.55 (2H, d, J = 6.0 Hz), 6.71 (1H, s), 7.25-7.40 (5H, m), 8.53 (1H, s), 8.71-8.80 (1H, m), 13.40 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 285 (M + Na)⁺.

4-(Benzylamino)-6-chloronicotinamide (化合物 54)

化合物 53 (35.0 g, 133 mmol)の DMF (280 mL)溶液に、CDI (54.0 g, 333 mmol)を加え、室温にて 1 時間攪拌した。混合物を氷冷し、28% NH₄OH 水溶液 (45 mL, 666 mmol)を加え、室温にて 30 分間攪拌した。混合物に水を加え、析出物を濾取し、水で洗浄し、化合物 54 を灰色固体として得た (29.7 g, 収率 85%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.48 (2H, d, J = 6.0 Hz), 6.64 (1H, s), 7.25-7.40 (5H, m), 7.53 (1H, brs), 8.12 (1H, brs), 8.42 (1H, s), 9.14-9.20 (1H, m). MS (ESI) m/z : 284 (M + Na)⁺.

6-Anilino-4-(benzylamino)nicotinamide (化合物 55)

化合物 54 (126 mg, 0.483 mmol)、aniline (102 mg, 1.10 mmol)、Pd₂(dba)₃ (44.2 mg, 0.048 mmol)、2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl (46.2 mg, 0.097

mmol)および *t*-BuONa (111 mg, 1.15 mmol)を *t*-BuOH/dioxane/NMP (1.5 mL/0.4 mL/0.15 mL)に懸濁し、マイクロウェーブ照射下、140 °C にて 45 分間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、Celite®を用いて濾過した。濾液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–90/10)で精製し、化合物 **55** を淡褐色固体として得た (55 mg, 収率 36%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.35 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.58 (1H, br), 5.92 (1H, s), 6.65 (1H, br), 6.96–7.07 (3H, m), 7.15–7.39 (8H, m), 8.21 (1H, s), 8.90–8.96 (1H, m). MS (ESI) *m/z*: 319 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₁₉H₁₈N₄O: 318.1481. Found: 319.1552.

4-(Benzylamino)-6-[methyl(phenyl)amino]nicotinamide (化合物 56)

化合物 **54** (100 mg, 0.382 mmol)の NMP (0.5 mL)溶液に、*N*-methylaniline (62 μL, 0.573 mmol)および tetraethylammonium chloride (6.3 mg, 0.038 mmol)を加え、180 °C にて 3 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、水および EtOAc を加えた。有機層を分離し、水で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; *n*-hexane/EtOAc)で精製し、化合物 **56** を白色固体として得た (20 mg, 収率 16%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.32 (3H, s), 4.14 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.50 (1H, s), 7.02 (1H, br), 7.07–7.12 (4H, m), 7.18–7.35 (6H, m), 7.72 (1H, br), 8.35 (1H, s), 8.95–9.00 (1H, m). MS (ESI) *m/z*: 333 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₀H₂₀N₄O: 332.1637. Found: 333.1716.

4-(Benzylamino)-6-[(3,4-dimethoxybenzyl)amino]nicotinamide (化合物 57)

化合物 **54** (200 mg, 0.764 mmol)の NMP (1 mL)溶液に、3,4-dimethoxybenzylamine (767 mg, 4.59 mmol)および DIPEA (0.80 mL, 4.59 mmol)を加え、マイクロウェーブ照射下、180 °C にて 4 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0–70/30)で精製し、化合物 **57** を得た (190 mg, 収率 63%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.69 (3H, s), 3.71 (3H, s), 4.26–4.32 (4H, m), 5.53 (1H, s), 6.73–7.00 (5H, m), 7.22–7.35 (5H, m), 7.56 (1H, br), 8.24 (1H, s), 8.87–8.92 (1H, m). MS (ESI) *m/z*: 393 (M + H)⁺.

6-Amino-4-(benzylamino)nicotinamide (化合物 58)

化合物 **57** (100 mg, 0.255 mmol)を TFA (1 mL)に溶解し、マイクロウェーブ照射下、100 °C にて 1 時間攪拌した。混合物に飽和 NaHCO₃ 水溶液を加えて中和した後、EtOAc および THF を加えた。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を

MgSO₄で乾燥し、減圧下濃縮し、化合物 **58** を白色固体として得た (20 mg, 収率 32%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.45 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.72 (1H, s), 7.22-7.40 (7H, m), 7.57 (1H, br), 8.08 (1H, br), 8.15 (1H, s), 9.50-9.55 (1H, m). MS (ESI) *m/z*: 243 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₁₃H₁₄N₄O: 242.1168. Found: 243.1244.

Ethyl 4-[(3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-fluoropiperidin-4-yl]amino}-6-chloronicotinate (化合物 **59)**

化合物 **32** および化合物 **42** を用いて、化合物 **43** と同様の合成法にて、化合物 **59** を白色固体として得た (収率 71%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.31 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.40 (9H, s), 1.47-1.59 (1H, m), 1.77-1.84 (1H, m), 2.81-3.17 (2H, m), 3.94-4.18 (2H, m), 4.20-4.34 (3H, m), 4.74-4.90 (1H, m), 7.10 (1H, s), 8.30 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.57 (1H, s). MS (ESI) *m/z*: 424 (M + Na)⁺.

4-[(3*S*,4*R*)-1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-fluoropiperidin-4-yl]amino}-6-chloronicotinic acid (化合物 **60)**

化合物 **59** を用いて、化合物 **44** と同様の合成法にて、化合物 **60** を白色固体として得た (収率 84%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.40 (9H, s), 1.45-1.58 (1H, m), 1.76-1.84 (1H, m), 2.82-3.38 (2H, m), 3.93-4.35 (3H, m), 4.73-4.90 (1H, m), 7.05 (1H, s), 8.50-8.55 (2H, m), 13.47 (1H, brs). MS (ESI) *m/z*: 396 (M + Na)⁺.

***tert*-Butyl (3*S*,4*R*)-4-[(5-carbamoyl-2-chloropyridin-4-yl)amino]-3-fluoropiperidine-1-carboxylate (化合物 **61**)**

化合物 **60** を用いて、化合物 **45** と同様の合成法にて、化合物 **61** を白色固体として得た (収率 80%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.40 (9H, s), 1.43-1.56 (1H, m), 1.73-1.80 (1H, m), 2.82-3.23 (2H, m), 3.90-4.06 (2H, m), 4.14-4.32 (1H, m), 4.70-4.87 (1H, m), 6.94 (1H, s), 7.51 (1H, br), 8.10 (1H, br), 8.44 (1H, s), 9.08 (1H, d, *J* = 8.8 Hz). MS (ESI) *m/z*: 395 (M + Na)⁺.

***tert*-Butyl (3*S*,4*R*)-4-[(5-carbamoyl-2-[(2-methylpyrimidin-4-yl)amino]pyridin-4-yl)amino]-3-fluoropiperidine-1-carboxylate (化合物 **62**)**

化合物 **61** を用いて、化合物 **46** と同様の合成法にて、化合物 **62** を淡黄色固体として得た (収率 46%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.41 (9H, s), 1.48-1.61 (1H, m), 1.91-1.98 (1H, m), 2.81-3.25 (2H, m), 3.32 (3H, s), 3.64-3.79 (1H, m), 3.98-4.13 (1H, m),

4.19-4.38 (1H, m), 4.79-4.98 (1H, m), 7.19 (1H, br), 7.33 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 7.41 (1H, brs), 7.89 (1H, br), 8.29 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 8.46 (1H, s), 8.99 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 9.93 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 446 (M + H)⁺.

4-[(3*S*,4*R*)-1-(5-Cyanopyridin-2-yl)-3-fluoropiperidin-4-yl]amino}-6-[(2-methylpyrimidin-4-yl)amino]nicotinamide (化合物 63)

化合物 62 を用いて、化合物 51b と同様の合成法にて、化合物 63 を白色固体として得た (収率 51%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.58-1.69 (1H, m), 2.05-2.12 (1H, m), 3.12-3.20 (1H, m), 3.32 (3H, s), 3.40-3.51 (1H, m), 3.81-3.95 (1H, m), 4.58-4.64 (1H, m), 4.85-4.94 (1H, m), 4.97-5.12 (1H, m), 7.06 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.19 (1H, br), 7.34 (1H, d, $J = 5.9$ Hz), 7.47 (1H, s), 7.87 (1H, dd, $J = 2.3, 9.0$ Hz), 7.90 (1H, br), 8.30 (1H, d, $J = 5.9$ Hz), 8.47 (1H, s), 8.49 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 9.01 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 9.95 (1H, brs). MS (ESI) m/z : 448 (M + H)⁺. HRMS (M + H)⁺ calcd for C₂₂H₂₂FN₉O: 447.1931. Found: 448.2009.

4-[[1-(4-Cyanophenyl)piperidin-4-yl]amino]-6-[(2-methylpyrimidin-4-yl)amino]nicotinamide (化合物 64)

化合物 50g (3.19 g, 7.46 mmol) の dioxane (14.7 mL) 溶液に HCl (4 M dioxane 溶液, 110 mL) を加え、室温にて終夜攪拌した。混合物に IPE を加え、析出物を濾取し、6-[(2-methylpyrimidin-4-yl)amino]-4-(piperidin-4-ylamino)nicotinamide trihydrochloride を得た (3.03 g, 収率 93%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.72-1.84 (2H, m), 2.13-2.23 (2H, m), 2.67 (3H, s), 2.99-3.11 (2H, m), 3.27-3.36 (2H, m), 3.69-3.81 (1H, m), 7.19-7.32 (1H, m), 7.68-7.81 (1H, m), 8.31-8.45 (1H, m), 8.58 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 8.64 (1H, s), 9.14-9.52 (3H, m), 12.44 (1H, br). MS (ESI) m/z : 328 (M + H)⁺.

6-[(2-Methylpyrimidin-4-yl)amino]-4-(piperidin-4-ylamino)nicotinamide trihydrochloride (3.0 g, 6.87 mmol) の DMSO (60 mL) 溶液に 4-fluorobenzonitrile (1.66 g, 13.7 mmol) および K₂CO₃ (3.80 g, 27.5 mmol) を加え、マイクロウェーブ照射下、140 °C にて 1 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却した後、水へ注いだ。析出物を濾取し、水および EtOAc で洗浄した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; CHCl₃/MeOH = 100/0 - 80/20) で精製した。得られた精製物を DMF (8 mL) に溶解し、水 (50 mL) を加えた。析出物を濾取し、化合物 64 を淡黄色固体として得た (2.9 g, 収率 57%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.44-1.56 (2H, m), 2.08-2.16 (2H, m), 2.54 (3H, s), 3.10-3.20 (2H, m), 3.55-3.65 (1H, m), 3.85-3.93 (2H, m), 7.07 (2H, d, $J = 9.1$ Hz), 7.16 (1H, br), 7.34 (1H, d, $J = 5.8$ Hz), 7.46 (1H, s), 7.58 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.86 (1H, br), 8.29 (1H, d, $J = 5.9$ Hz), 8.45

(1H, s), 8.80 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 9.94 (1H, s). ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 25.68, 30.20, 45.22, 48.09, 92.68, 97.73, 105.49, 105.69, 114.10, 119.94, 133.27, 149.11, 152.66, 154.00, 155.17, 156.02, 159.05, 166.18, 170.22. MS (ESI) m/z : 429 ($M + H$) $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O} \cdot 1.4\text{H}_2\text{O}$: C, 60.89; H, 5.95; N, 24.70. Found: C, 60.94; H, 6.07; N, 24.44.

計算化学解析について

ドッキング計算解析

ドッキング計算解析は、tofacitinib および JAK3 蛋白の結晶構造 (PDB 番号: 3LXK) に基づいて実施した。Maestro (version 9.3; Schrödinger, LLC) の Protein Preparation Wizard を用いてドッキングに用いるタンパク座標の準備を行った。ATP 結合サイトの tofacitinib の重心からグリッドを発生し、ヒンジ領域との水素結合制約、疎水性領域の制約を加えた。評価化合物を LigPrep (version 2.5; Schrödinger, LLC) および Confgen (version 2.3; Schrödinger, LLC) を用いて準備し、エネルギー最小立体構造を用いてドッキング計算した。化合物のドッキングは Glide (version 5.8; Schrödinger, LLC) の XP モードにて実施し、GlideScore により測定された最高スコア値の結合様式を採用した。

WaterMap 解析

WaterMap (version 1.4; Schrödinger, LLC) 計算解析は、tofacitinib および JAK3 蛋白の結晶構造 (PDB 番号: 3LXK) に基づき、実施した。タンパク座標の準備はドッキング計算解析で実施したものを利用した。WaterMAP 計算解析は default モードにて実施し、リガンド結合部位として tofacitinib を指定した。分子動力学シミュレーション時は tofacitinib 構造を除き、計算解析した。Abel らの報告に基づき、脱溶媒和能に関する第一原理計算により、結合および化合物の歪みエネルギーの ΔG_{pred} 値を計算した。

薬理学的評価について

ヒト JAK 酵素活性試験

ヒト JAK1、JAK2、JAK3 酵素 (Carna Biosciences, Inc.) および streptavidin 被覆の 96-well プレートを用いて試験を行った。15 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.01% Tween 20、2 mM dithiothreitol、10 mM MgCl₂、250 nM Biotin-Lyn-Substrate-2 (Biotin-XEQED EPEGD YFEWL EPE, X = ε-Acp; Peptide Institute, Inc.) および ATP を含む 50 μL の反応液を作成した。JAK1、JAK2 および JAK3 阻害活性評価において、最終 ATP 濃度はそれぞれ 200 μM、10 μM および 8 μM とした。評価化合物は DMSO に溶解した。JAK 酵素 (JAK1: 60 ng/mL、JAK2: 20 ng/mL、JAK3: 16 ng/mL) を加えて酵素反応を開始した後、室温にて 1 時間反応させた。酵素活性は、horseradish peroxidase 標識抗リン酸化チロシン抗体 (HRP-PY-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を用いて、リン酸化チロシン特異的 ELISA により、Biotin-Lyn-Substrate-2 のリン酸化率を測定した。評価化合物に関して、2 試験を行い、それぞれの試験の IC₅₀ 値を、線形回帰分析により算出した。

ラット T 細胞増殖試験

雄 Lewis ラット (Charles River Japan, Inc.) の脾臓細胞を、10% ウシ胎仔血清、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin および 50 μM 2-mercaptoethanol を添加した RPMI1640 培地 (Sigma) に懸濁した (1.5×10^6 cells/mL)。脾臓細胞に 1 μg/mL concanavalin A (Sigma) を加え、37 °C、5% CO₂ 存在下、24 時間培養した。培地を洗浄した後、脾臓細胞 (4×10^4 個) に 3 ng/mL IL-2 (BD Bioscience) および評価化合物を加え、96-well プレートを用いて、3 日間培養した。AlamarBlue® (Life Technologies) を加え、6 時間培養し、蛍光強度 (励起波長; 545 nm、発光波長; 590 nm) を測定した。評価化合物に関して、2 試験を行い、それぞれの試験の IC₅₀ 値を、線形回帰分析により算出した。

in vitro 肝ミクロソーム代謝安定性試験

評価化合物の肝酵素に対する代謝安定性を雄 SD ラット、雄ビーグル犬、雄カニクイザルまたはヒトの肝ミクロソームを用いて評価した。評価化合物 (0.2 μM)、肝ミクロソーム (0.2 mg protein/mL)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (1 mM)、エチレンジアミン四酢酸 (0.1 mM) およびリン酸緩衝液 (100 mM) を

混合し、37 °C にて 45 分間培養した。評価化合物の残存を LC/MS/MS を用いて測定し、化合物の消失速度から肝固有クリアランス値 (CL_{int}) を算出した。

ラット心移植試験

ACI ラット (Japan SLC, Inc.) および Lewis ラット (Charles River Japan, Inc.) をそれぞれ心移植ドナーおよびレシピエントとして用いた。全ての実験は、無菌条件下にて実施した。ラットを pentobarbital (40 mg/kg) を用いて腹腔内麻酔し、腹部異所性心移植を行った。化合物 **37** または化合物 **67** を移植実施日より、経口投与にて 1 日に 1 回、14 日間投与した。併用試験においては、tacrolimus を筋肉内投与にて 1 日に 1 回、投与した。移植後、心臓移植片の機能を 28 日間、触診により観察し、拍動の停止を拒絶とした。

動物実験は「医学生物学領域の実験動物に関する国際原則」(国際医学団体協議会)、「実験動物の管理と使用に関する指針第 8 版」(全米研究評議会)等の国際的に認知された基準・指針に準拠し、アステラス製薬実験動物委員会の承認を受けた上で、アステラス製薬において実施した。

hERG 阻害評価 (Rb 流出測定法)

hERG カリウムチャネルを発現したチャイニーズハムスター卵巣細胞を作成し、10%ウシ胎仔血清、1% penicillin-streptomycin および 1% Geneticin®を含む最小必須培地を用いて、37 °C、5% CO₂ 存在下にて維持した。実験の前日に、安定発現株を 96-well プレートに播種 (6 × 10⁴ cells/well) し、24 時間培養した。培養液を Rb 添加液に置換し 1.5 時間培養した。培養液を除き、プレートを pH 7.3 緩衝液で洗浄した。評価化合物を含む高 K⁺緩衝液 (pH = 7.3) を添加し、カリウムチャネルを通じた Rb の流出を開始させた。10 分間培養した後、上澄み液を新規のプレートに移した (プレート A)。細胞を含むプレートは、1% Triton-X 100 を含む pH 7.3 緩衝液を用いて溶解した (プレート B)。プレート A およびプレート B に存在する Rb 量を Ion Channel Reader 8000 (Aurora Biomed Inc.) を用いて測定した。Rb 流出率 (RE) および流出阻害率は下記の計算式により算出した。

$$\text{RE (\%)} = \text{残存 Rb 量 (プレート B)} / \text{全 Rb 量 (プレート A + プレート B)} \times 100$$

$$\text{流出阻害率 (\%)} = \text{RE (評価化合物)} - \text{RE (溶媒)} / \text{RE (対照)} - \text{RE (溶媒)} \times 100$$

流出阻害の IC₅₀ 値は、非線形回帰分析により算出した。

謝辞

本論文の発表および作成にあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部教授 林 良雄 博士に深く感謝致します。

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京薬科大学薬学部教授 三浦 剛 博士、松本 隆司 博士ならびに高木 教夫 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さり、御指導と御助言を賜りました元アステラス製薬株式会社 研究本部長 塚本 紳一 博士、元アステラス製薬株式会社 研究企画統括部長 太田 光昭 博士、アステラスリサーチテクノロジー株式会社 企画総務部長 大久保 充 博士ならびに元藤沢薬品工業株式会社 化学研究所 所長 加藤 眞行 博士に謹んで感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、御支援を賜りましたアステラスリサーチテクノロジー株式会社 社長 渡辺 俊博 博士、アステラス製薬株式会社 研究本部モダリティ研究所 所長 平野 祐明 博士ならびにモダリティ研究所 機能分子第 2 研究室 室長 早川 昌彦 博士に謹んで感謝申し上げます。

合成研究に御協力頂きました井上 隆幸 博士、白神 昇平 博士、中井 一夫 博士、向吉 耕一朗 修士、濱口 壽雄 博士、青山 尚寛 博士、畑中 恵子 博士、佐々木 弘 氏、高橋 史江 学士、田中 明 博士、國川 茂輝 修士、臼田 裕之 博士、東條 隆 博士、森田 真正 博士に深く感謝致します。

計算化学解析を実施頂きました森友 紋子 博士ならびに各種評価試験を実施頂きました東 康之 博士、稲見 真倫 博士、伊藤 美聖 修士、中村 康次 修士、中森 文洋 博士に深く感謝致します。

各種データを測定して頂きましたアステラス製薬株式会社ならびにアステラスリサーチテクノロジー株式会社の方々に深く感謝致します。

最後に、本論文の作成にあたり、支え励ましてくれた家族に心より感謝致します。

参考文献

- 1) 矢田純一 著 改訂13版 医系免疫学 中外医学社
- 2) 小安 重夫 編集 改訂第2版 免疫学最新イラストレイテッド 羊土社
- 3) 藤原 大美 編著 新移植免疫学 中外医学社
- 4) 深尾 立 *診断と治療*, **102**, 1451–1457 (2014).
- 5) Taylor A. L., Watson C. J. E., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **56**, 23–46 (2005).
- 6) Ho S., Clipstone N., Timmermann L., Northrop J., Graef I., Fiorentino D., Nourse J., Crabtree G., *Clin Immunol Immunopathol.*, **80**, S40–S45 (1996).
- 7) Mele T. S., Halloran P.F., *Immunopharmacology*, **47**, 215–245 (2000).
- 8) 日本移植学会広報委員会編 臓器移植ファクトブック 2016
- 9) Liptak, P., Ivanyi, B., *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, **2**, 398–404 (2006).
- 10) Dumont F.J., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **11**, 377–404 (2001).
- 11) Denton M. D., Magee C. C., Sayegh M. H., *Lancet*, **353**, 1083–1091 (1999).
- 12) Imada K., Leonard W. J., *Mol. Immunol.*, **37**, 1–11 (2000).
- 13) Leonard W. J., Lin, J. X., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**, 877–888 (2000).
- 14) O'Shea J. J., Pesu M., Borie D. C., Changelian P. S., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 555–564 (2004).
- 15) Ghoreschi K., Laurence A., O'Shea J. J., *Immunol. Rev.*, **228**, 273–287 (2009).
- 16) O'Shea J. J., Plenge R., *Immunity*, **36**, 542–550 (2012).
- 17) Macchi P., Villa A., Giliani S., Sacco M. G., Frattini A., Porta F., Ugazio A. G., Johnston J. A., Candotti F., O'Shea J. J., Vezzoni P., Notarangelo L. D., *Nature*, **377**, 65–68 (1995).
- 18) Russell S. M., Tayebi N., Nakajima H., Riedy M. C., Roberts J. L., Aman M. J., Migone T. S., Noguchi M., Markert M. L., Buckley R. H., O'Shea J. J., Leonard W. J., *Science*, **270**, 797–800 (1995).
- 19) Nosaka T., van Deursen J. M., Tripp R. A., Thierfelder W. E., Witthuhn B. A., McMickle A. P., Doherty P. C., Grosveld G. C., Ihle J. N., *Science*, **270**, 800–802 (1995).
- 20) Park S. Y., Saijo K., Takahashi T., Osawa M., Arase H., Hirayama N., Miyake K., Nakauchi H., Shirasawa T., Saito T., *Immunity*, **3**, 771–782 (1995).
- 21) Johnston J. A., Kawamura M., Kirken R. A., Chen Y. Q., Blake T. B., Shibuya K., Ortaldo J. R., McVicar D. W., O'Shea J. J., *Nature*, **370**, 151–153 (1994).
- 22) Witthuhn B. A., Silvennoinen O., Miura O., Lai K. S., Cwik C., Liu E. T., Ihle J. N., *Nature*, **370**, 153–157 (1994).

- 23) 東 康之 *日薬理誌*, **144**, 160–166 (2014).
- 24) 稲見 真倫 *日薬理誌*, **142**, 63–67 (2013).
- 25) Clark J. D., Flanagan M. E., Telliez J. B., *J. Med. Chem.*, **57**, 5023–5038 (2014).
- 26) Gomez-Puerta J. A., Mocsai A., *Curr. Top Med. Chem.*, **13**, 760–773 (2013).
- 27) Changelian P. S., Flanagan M. E., Ball D. J., Kent C. R., Magnuson K. S., Martin W. H., Rizzuti B. J., Sawyer P. S., Perry B. D., Brissette W. H., McCurdy S. P., Kudlacz E. M., Conklyn M. J., Elliott E. A., Koslov E. R., Fisher M. B., Strelevitz T. J., Yoon K., Whipple D. A., Sun J., Munchhof M. J., Doty J. L., Casavant J. M., Blumenkopf T. A., Hines M., Brown M. F., Lillie B. M., Subramanyam C., Shang-Poa C., Milici A. J., Beckius G. E., Moyer J. D., Su C., Woodworth T. G., Gaweco A. S., Beals C. R., Littman B. H., Fisher D. A., Smith J. F., Zagouras P., Magna H. A., Saltarelli M. J., Johnson K. S., Nelms L. F., Des Etages S. G., Hayes L. S., Kawabata T. T., Finco-Kent D., Baker D. L., Larson M., Si M. S., Paniagua R., Higgins J., Holm B., Reitz B., Zhou Y. J., Morris R. E., O'Shea J. J., Borie D. C., *Science*, **302**, 875–878 (2003).
- 28) Flanagan M. E., Blumenkopf T. A., Brissette W. H., Brown M. F., Casavant J. M., Shang-Poa C., Doty J. L., Elliott E. A., Fisher M. B., Hines M., Kent C., Kudlacz E. M., Lillie B. M., Magnuson K. S., McCurdy S. P., Munchhof M. J., Perry B. D., Sawyer P. S., Strelevitz T. J., Subramanyam C., Sun J., Whipple D. A., Changelian P. S., *J. Med. Chem.*, **53**, 8468–8484 (2010).
- 29) Busquea S., Leventhalb J., Brennanc D. C., Steinbergd S., Klintmalme G., Shahf T., Mulgaonkarg S., Brombergh J. S., Vincentii F., Hariharanj S., Slakeyk D., Peddil V. R., Fisherm A., Lawendyn N., Wangn C., Chann G., *Am. J. Transplant.*, **9**, 1936–1945 (2009).
- 30) Vincentia F., Silvab H. T., Busquec S., O'Connell d P., Friedewalde J., Cibrikf D., Buddeg K., Yoshidah A., Cohneyi S., Weimarj W., Kimk Y. S., Lawendyl N., Lanl S. P., Kudlaczl E., Krishnaswamil S., Chanl G., *Am. J. Transplant.*, **12**, 2446–2456 (2012).
- 31) Sawa M., *Mini Rev. Med. Chem.*, **8**, 1291–1297 (2008).
- 32) Wilson L. J., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **20**, 609–623 (2010).
- 33) Wolfe J. P., Buchwald S. L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2413–2416 (1999).
- 34) Muchowski J. M., Solas D. R., *J. Org. Chem.*, **49**, 203–205 (1984).
- 35) L'Heureux A., Thibault C., Ruel R., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 2317–2319 (2004).
- 36) Bondavalli F., Botta M., Bruno O., Ciacci A., Corelli F., Fossa P., Lucacchini A., Manetti F., Martini C., Menozzi G., Mosti L., Ranise A., Schenone S., Tafi A., Trincavelli M. L., *J. Med. Chem.*, **45**, 4875–4887 (2002).

- 37) Chrencik J. E., Patny A., Leung I. K., Korniski B., Emmons T. L., Hall T., Weinberg R. A., Gormley J. A., Williams J. M., Day J. E., Hirsch J. L., Kiefer J. R., Leone J. W., Fischer H. D., Sommers C. D., Huang H.-C., Jacobsen E. J., Tenbrink R. E., Tomasselli A. G., Benson T. E., *J. Mol. Biol.*, **400**, 413–433 (2010).
- 38) Kansy, M., Senner, F., Gubernator., *J. Med. Chem.* **41**, 1007–1010 (1998).
- 39) Abel R., Young T., Farid R., Berne B. J., Friesner R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 2817–2831 (2008).
- 40) Yang Y., Lightstone F. C., Wong S. E., *Expert Opin. Drug Discov.*, **8**, 277–287 (2013).
- 41) Hutchins R. O., Su W.-Y., Sivakumar R., Cistone F., Stercho Y. P., *J. Org. Chem.*, **48**, 3412-3422 (1983).
- 42) Banks R. E., Mohialdin-Khaffaf S. N., Lal G. S., Sharifa I., Syvretb R. G., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **8**, 595-596 (1992).
- 43) Niel M. B., Collins I., Beer M. S., Broughton H. B., Cheng S. K. F., Goodacre S. C., Heald A., Locker K. L., MacLeod A. M., Morrison D., Moyes C. R., O'Connor D., Pike A., Rowley M., Russell M. G. N., Sohal B., Stanton J. A., Thomas S., Verrier H., Watt A. P., Castro J. L., *J. Med. Chem.*, **42**, 2087–2104 (1999).
- 44) Sanguinetti M. C., Mitcheson J. S., *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 119–124 (2005).
- 45) Aronov A. M., *Drug Discov. Today*, **10**, 149–155 (2005).
- 46) Aronov A. M., *Curr. Top. Med. Chem.*, **8**, 1113–1127 (2008).
- 47) Cox C. D., Coleman P. J., Breslin M. J., Whitman D. B., Garbaccio R. M., Fraley M. E., Buser C. A., Walsh E. S., Hamilton K., Schaber M. D., Lobell R. B., Tao W., Davide J. P., Diehl R. E., Abrams M. T., South V. J., Huber H. E., Torrent M., Prueksaritanont T., Li C., Slaughter D. E., Mahan E., Fernandez-Metzler C., Yan Y., Kuo L. C., Kohl N. E., Hartman G. D., *J. Med. Chem.*, **51**, 4239–4252 (2008).
- 48) Yang Z. Q., Barrow J. C., Shipe W. D., Schlegel K. A., Shu Y., Yang F. V., Lindsley C. W., Rittle K. E., Bock M. G., Hartman G. D., Uebele V. N., Nuss C. E., Fox S. V., Kraus R. L., Doran S. M., Connolly T. M, Tang C., Ballard J. E., Kuo Y., Adarayan E. D., Prueksaritanont T., Zrada M. M., Marino M. J., Graufelds V. K., DiLella A. G., Reynolds I. J., Vargas H. M., Bunting P. B., Woltmann R. F., Magee M. M., Koblan K. S., Renger J. J., *J. Med. Chem.*, **51**, 6471–6477 (2008).
- 49) Anderson K. W., Tundel R. E., Ikawa T., Altman R. A., Buchwald S. L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 6523–6527 (2006).

- 50) Huang X., Anderson K. W., Zim D., Jiang L., Klapars A., Buchwald S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6653–6655 (2003).
- 51) Nakanishi T., Morokata T., Kubo K., Umeno H., Eikyu Y., Kozuki Y., Seki N., *Int. Immunopharmacol.*, **10**, 91–97 (2010).
- 52) Basarab G., Dangel B., Fleming P. R., Gravestock M. B., Green O., Hauck S. I., Hill P., Hull K. G., Mullen G., Sherer B., Zhou F., Patent WO2006087543 (2006).