(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 4 月 3 日(03.04.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/050779 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 31/4365 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 13/10 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/075616

(22) 国際出願日: 2013 年 9 月 24 日(24.09.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-210636 2012 年 9 月 25 日(25.09.2012) JP

(71) 出願人: 第一三共株式会社(DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 脇田 賢一(WAKITA, Kenichi); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 島崎 尚美(SHIMAZAKI, Naomi); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 岩崎 志保(IWASAKI, Shiho); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 石橋 公樹, 外(ISHIBASHI Koki et al.); 〒1400005 東京都品川区広町一丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).

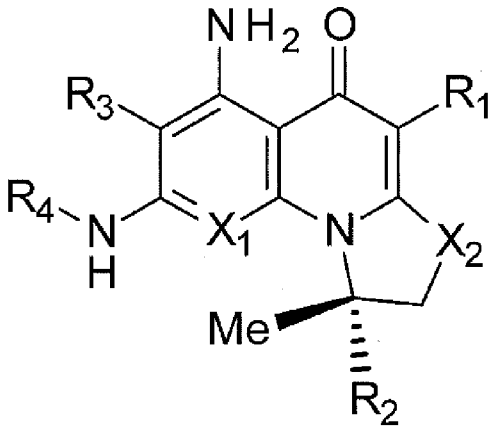
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) **Title**: COMBINATION OF GSK3 INHIBITOR AND ANTI-DR5 ANTIBODY

(54) 発明の名称 : ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体の組み合わせ



(1)

(57) **Abstract**: To provide a combination therapy for cancer, which comprises a combination of a GSK3 inhibitor and an anti-DR5 antibody. Provided are a pharmaceutical product and a combination therapy, each of which comprises a combination of various anti-DR5 antibodies and a GSK3 inhibitor such as LY2090314, a compound represented by general formula (1) or a salt of the compound. (In the formula, R_1, R_2, R_3, R_4, X_1 and X_2 are as defined in the description.)

(57) 要約: ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体を組み合わせてなる癌の併用治療方法を提供すること。 ＬＹ２０９０３１４、下記一般式 [式中、R_1、R_2、R_3、R_4、X_1、X_2は、明細書中のそれぞれの定義と同義である。] で表される化合物またはその塩等のＧＳＫ阻害剤と各種抗ＤＲ５抗体を組み合わせてなる医薬または併用治療方法を提供する。

WO 2014/050779 A1

MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体の組み合わせ

技術分野

[0001] 本発明は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体とを組み合わせてなる癌の併用治療に関する。

背景技術

[0002] ＧＳＫ３はグリコーゲンシンターゼをリン酸化するセリン／スレオニンキナーゼとして見いだされ（非特許文献１）、現在αおよびβの２つのサブタイプが存在することが知られている。ＧＳＫ３β遺伝子欠損マウスは胚性致死であることから（非特許文献２）その機能は細胞の生存において重要であり、癌との関連性も深いＡｋｔシグナル（非特許文献３）やＷｎｔシグナルなど（非特許文献４）の重要なシグナルにおいて、広く役割を果たしていることが報告されている。これに対し、ＧＳＫ３α遺伝子欠損マウスは胚性致死ではなく（非特許文献５）、一部の糖代謝に関する機能が正常に比べて異なることが報告されている。しかし、その機能は基本的に相互補完されており、ＧＳＫαおよびβ両方の遺伝子が欠損している場合により強いシグナル抑制が見られることが報告されている（非特許文献６）。

ＧＳＫ３の標的はグリコーゲンシンターゼ以外にもアミロイド蛋白質、プレセニリン、βカテニン、サイクリンＤ１など多岐に渡っており（非特許文献７）、様々な疾患において治療標的として注目を集めている。

癌領域においては、ＧＳＫ３によるβカテニンのリン酸化は、細胞内でβカテニンの分解を司り、結果として転写因子Ｔｃｆを介した遺伝子発現を抑制することから、大腸癌の抑制因子としての位置付けが広く受け入れられている（非特許文献４）。

しかし、近年、ＭＬＬ白血病、ＣＭＬ等の白血病においてＧＳＫ３阻害による抗腫瘍活性が報告されており（非特許文献８、９）、ＧＳＫ３阻害剤ＬＹ

２０９０３１４を用いた急性白血病に対する臨床試験も進められている。

[0003] ＧＳＫ３を阻害する化合物としては、多様な骨格が報告されており（非特許文献１０）、マレイミド誘導体（特許文献１、非特許文献１１）、ピリミジン誘導体（特許文献２、非特許文献１２）、ピリミジノン誘導体（特許文献３）、ピリジン誘導体（特許文献４）、アゾール誘導体（非特許文献１３）、キノロン誘導体（特許文献５、非特許文献１４）等が報告されている。

アポトーシスは、生体内において不要な細胞やダメージを受けた細胞を排除して正常な細胞数を保つという生理学的なプロセスに必須の現象である。このアポトーシス調節機構が癌・免疫疾患においてしばしば損なわれていること、及びアポトーシス調節経路の理解が進んだことにより、癌・免疫疾患治療に利用可能な新規アポトーシス誘導剤の開発が進められている。特に、デスレセプターに代表されるアポトーシス誘導に関与する細胞表面受容体に対するリガンドや受容体に結合能を有する抗体にはこれら疾患に対する治療作用が期待されている（非特許文献１５）。

デスレセプターの一種であるＤｅａｔｈ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ５（ＤＲ５）は、ＫＩＬＬＥＲ、ＴＲＩＣＫ２Ａ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＩＣＫＢ、又はＣＤ２６２とも呼ばれることがあり、細胞にアポトーシスを誘導するアゴニスト抗体が複数知られている（非特許文献１６若しくは１７、又は特許文献７乃至１２）。

いくつかの抗体は、現在、治療薬候補として前臨床または臨床での開発段階にあり、当該受容体を発現している細胞（癌細胞・免疫疾患関連細胞）特異的にアゴニストとして作用し、これを死滅させる治療効果が期待されている。抗体による抗腫瘍作用にはＤＲ５の発現が必須であるものの、作用と発現レベルとの相関性は無いことが前臨床試験で明らかとなっている（非特許文献１８）。この点に関しては、アポトーシス経路に関わるｃａｓｐａｓｅ－８やＢｃｌ－２などの細胞内シグナル分子の発現量などの多種類の要因により細胞応答が規定されるためと考えられている（非特許文献１９）。そして、抗ＤＲ５抗体の作用を増強する目的で、該抗体と他の医薬とを組み合わせ

て投与することが試みられている。

ＧＳＫ３阻害剤によってＤＲ５の発現量が増加し、ＤＲ５の内在性リガンドであるＴＲＡＩＬ（ＴＮＦ－ＲＥＬＡＴＥＤ　ＡＰＯＰＴＯＳＩＳ－ＩＮＤＵＣＩＮＧ　ＬＩＧＡＮＤ）によるアポトーシス誘導が増強されることが知られている（非特許文献２０）。しかし、ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体の併用による治療効果については、いずれの化合物と抗体を組み合わせることが好適であるかという点を含めて、知られてはいなかった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：WO2003/076398

特許文献2：WO2003/070729

特許文献3：WO2003/072579

特許文献4：WO2003/068773

特許文献5：WO2007/106537

特許文献6：EP1650192

特許文献7：WO98/51793

特許文献8：WO2001/083560

特許文献9：WO2002/094880

特許文献10：WO2003/054216

特許文献11：WO2006/083971

特許文献12：WO2007/022157

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Eur. J. Biochem. 107 519-527 (1980)

非特許文献2：Nature 406 86-90 (2000)

非特許文献3：Nature 378 785-789(1995)

非特許文献4：Science 272 1023-1026 (1996)

非特許文献5：Cell Metab. 6 329-337 (2007)

非特許文献6：Dev Cell. 12 957-971 (2007)

非特許文献7：Int. J. Alzheimers Dis. 2011 Article ID:505607 (2011)

非特許文献8：Nature 455 1205-1209 (2008)

非特許文献9：Blood 119 2335-2345 (2012)

非特許文献10：Expert Opin. Ther. Patents 15 1315-1331 (2005)

非特許文献11：Bioorg. Med. Chem. Lett. 15 899-903 (2005)

非特許文献12：Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 2127-2130 (2004)

非特許文献13：J. Med. Chem 46 3333-3341 (2003)

非特許文献14：Bioorg. Med. Chem. 20 1188-1200 (2012)

非特許文献15：Cell Death and Differentiation 10 66-75 (2003)

非特許文献16：Journal of Immunology 162 2597-2605 (1999)

非特許文献17：Nature Medicine 7(8) 954-960 (2001)

非特許文献18：Cell Death and Differentiation 10 66-75 (2003)

非特許文献19：Journal of Clinical Oncology 26 3621-3630 (2008)

非特許文献20：Cancer Res. 68 (16) 6643-6651 (2008)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体とを組み合わせて投与されることを特徴とする癌の治療のための医薬、ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体とを組み合わせて投与されることを特徴とする癌の治療方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、鋭意検討した結果、ＧＳＫ３阻害剤ＬＹ２０９０３１４、または、下記一般式（１）で表される構造を有する化合物もしくはその塩と抗ＤＲ５抗体とを組み合わせて使用することにより、特に優れた抗腫瘍効果が得られることを見出し、本発明を完成させた。

[0008] すなわち、本発明は、次の［１］～［１７］に関する。

［１］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が、組み合わせて投与されることを特徴とする癌治療のための医薬。

［２］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が、それぞれ異なる製剤の有効成分として含有され、同時に、又は、異なる時間に投与されることを特徴とする請求項１に記載の医薬。

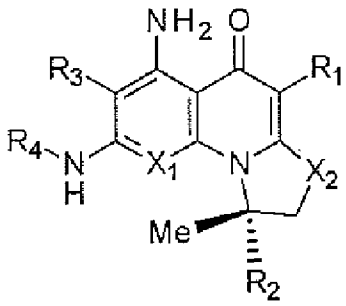
［３］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が、単一製剤中に含有されていることを特徴とする請求項１に記載の医薬。

［４］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体を含むキット製剤であることを特徴とする請求項１に記載の医薬。

［５］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が組み合わせて投与されることを特徴とする癌の治療方法。

［６］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤がＬＹ２０９０３１４または下記一般式（１）

[0009] [化1]



(1)

[0010] [式中、

R_1は、カルボキシ基、カルバモイル基またはシアノ基を示し、

R_2は、メチル基または水素原子を示し、

R_3は、ハロゲン原子を示し、

R_4は、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピペリジニル基、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピリジル基、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいシクロヘキサニル基または水素原子を示し

、

X_1は、Ｃ－Ｈ、Ｃ－ＦまたはＮを示し、

X_2は、CH_2、Ｎ－ＨまたはＳを示す。］

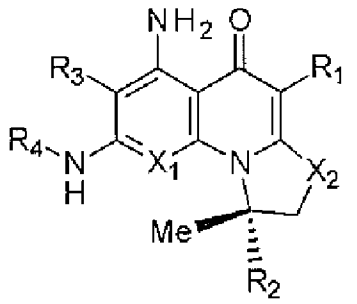
Ａ群：１～３個のハロゲン原子、水酸基またはメトキシ基で置換されていてもよいC_1－C_6アルキル基、アセチル基、メチルスルホニル基、水酸基。

[0011]

で表される化合物もしくはその塩である［１］～［４］のいずれか１に記載の医薬。

［７］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤がＬＹ２０９０３１４または下記一般式（１）

[0012] [化2]



(1)

[0013] [式中、

R_1は、カルボキシ基、カルバモイル基またはシアノ基を示し、

R_2は、メチル基または水素原子を示し、

R_3は、ハロゲン原子を示し、

R_4は、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピペリジニル基、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピリジル基、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいシクロヘキサニル基または水素原子を示し、

X_1は、Ｃ－Ｈ、Ｃ－ＦまたはＮを示し、

X_2は、CH_2、Ｎ－ＨまたはＳを示す。］

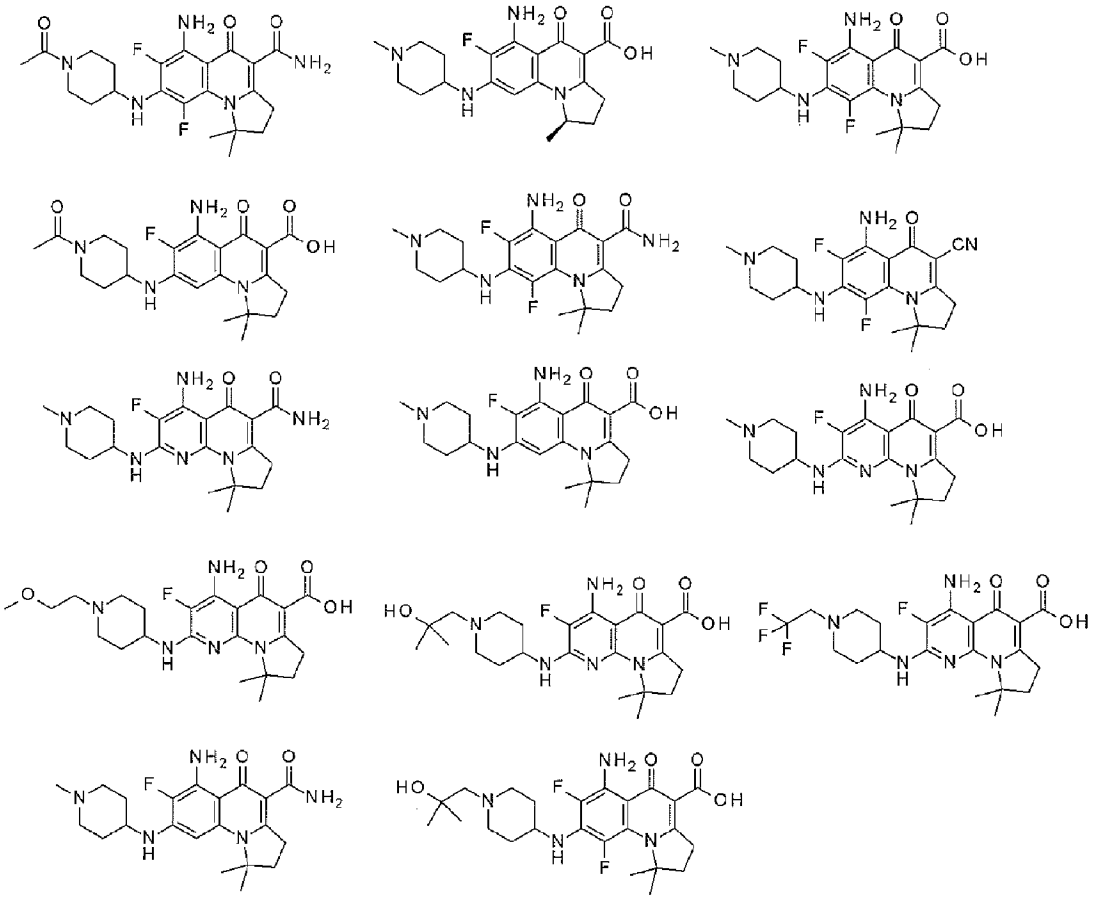
Ａ群：１～３個のハロゲン原子、水酸基またはメトキシ基で置換されていてもよいＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキル基、アセチル基、メチルスルホニル基、水酸基。

[0014]

で表される化合物もしくはその塩である［５］に記載の治療方法。

［８］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤がＬＹ２０９０３１４または次の群から選ばれる１の化合物もしくはその塩である［１］～［４］のいずれか１に記載の医薬。

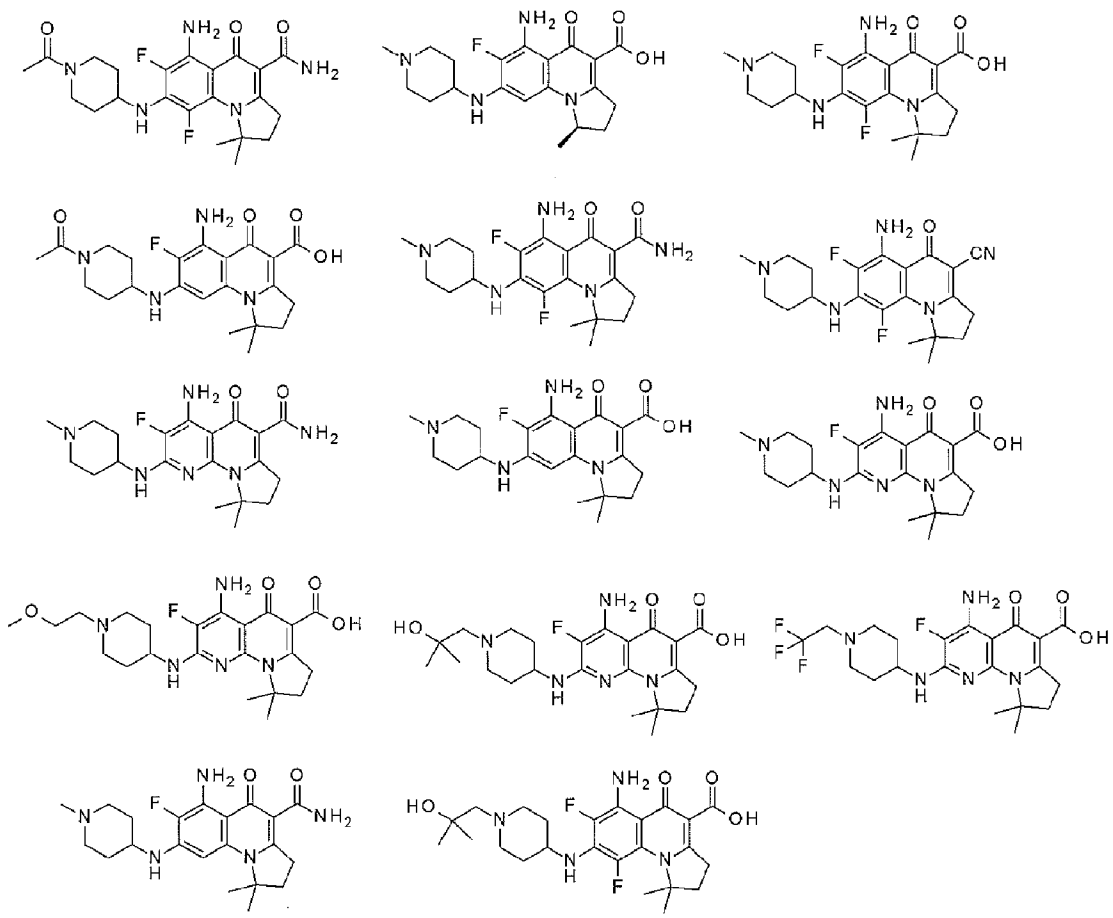
[0015] [化3]



[0016] ［９］グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤がＬＹ２０９０３１４または次の群から選ばれる１の化合物もしくはその塩である［５］に記載の治療方法。

[0017]

[化4]



[0018] [１０]抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号１に示されるアミノ酸配列の１～４４９番目のアミノ酸残基または１～４４８番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～２１３番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である［１］～［４］、［６］、［８］のいずれか１に記載の医薬。

［１１］抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号３に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号４に示されるアミノ酸配列の１～２１９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である［１］～［４］、［６］、［８］のいずれか１に記載の医薬。

［１２］抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号５に示されるアミノ

酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号６に示されるアミノ酸配列の１～２１５番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である［１］～［４］、［６］、［８］のいずれか１に記載の医薬。

［１３］抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号１に示されるアミノ酸配列の１～４４９番目のアミノ酸残基または１～４４８番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～２１３番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である［５］、［７］、［９］のいずれか１に記載の治療方法。

［１４］抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号３に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号４に示されるアミノ酸配列の１～２１９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である［５］、［７］、［９］のいずれか１に記載の治療方法。

［１５］抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号５に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号６に示されるアミノ酸配列の１～２１５番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である［５］、［７］、［９］のいずれか１に記載の治療方法。

［１６］癌が、血液癌（白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫）、脳腫瘍、頭頸部癌、食道癌、胃癌、虫垂癌、大腸癌、肛門癌、胆嚢癌、胆管癌、膵臓癌、消化管間質腫瘍、肺癌、肝臓癌、中皮腫、甲状腺癌、腎臓癌、前立腺癌、神経内分泌腫瘍、黒色腫、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、骨肉腫、軟部肉腫、カポジ肉腫、筋肉腫、腎臓癌、膀胱癌または睾丸癌である［１］～［４］、［６］、［８］、［１０］～［１２］のいずれか１に記載の医薬。

［１７］癌が、血液癌（白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫）、脳腫瘍、頭頸部癌、食道癌、胃癌、虫垂癌、大腸癌、肛門癌、胆嚢癌、胆管癌、膵臓癌、消化管間質腫瘍、肺癌、肝臓癌、中皮腫、甲状腺癌、腎臓癌、前立腺癌、神

経内分泌腫瘍、黒色腫、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、骨肉腫、軟部肉腫、カポジ肉腫、筋肉腫、腎臓癌、膀胱癌または睾丸癌である［５］、［７］、［９］、［１３］～［１５］のいずれか１に記載の治療方法。

発明の効果

［0019］　本発明は、癌の治療方法、および／または抗癌剤として有用である。

図面の簡単な説明

［0020］［図1-1]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＬＹ２０９０３１４とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図1-2]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＬＹ２０９０３１４とｈＴＲＡ８とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図1-3]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＬＹ２０９０３１４とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-1]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対する実施例化合物（Ｃｏｍｐｏｕｎｄ）１８とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-2]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ２１とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-3]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３６とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-4]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ５２とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-5]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３７とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-6]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ５３とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-7]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ２７とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-8]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３９とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図2-9]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ５４とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図3-1]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ１８とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図3-2]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３６とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図3-3]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３７とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図3-4]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎ

ｄ３９とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図3-5]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ５３とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図3-6]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ５４とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図4-1]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ１８とｈＴＲＡ８とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図4-2]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３６とｈＴＲＡ８とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図4-3]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３７とｈＴＲＡ８とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図4-4]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３９とｈＴＲＡ８とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図4-5]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ５３とｈＴＲＡ８とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図4-6]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ５４とｈＴＲＡ８とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性

および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図5-1]ヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ２１とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図5-2]ヒト骨髄腫細胞株ＮＣＩ－Ｈ９２９に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ２１とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図5-3]ヒト慢性骨髄性白血病細胞株Ｋ５６２に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ２１とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける併用効果（増殖阻害活性および細胞死（Ｃａｓｐａｓｅ）誘導活性）を示した図である。

[図6-1]ヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５に対するＬＹ２０９０３１４とｈＢ２７３（上段図）、ｈＴＲＡ８（下段図）とのｉｎ　ｖｉｖｏにおける併用効果を示した図である。上段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＬＹ２０９０３１４　１００ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＬＹ２０９０３１４　１００ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白四角はＬＹ２０９０３１４　２００ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＬＹ２０９０３１４　２００ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。下段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＴＲＡ８　１０ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＬＹ２０９０３１４　１００ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＬＹ２０９０３１４　１００ｍｇ／ｋｇ＋ｈＴＲＡ８　１０ｍｇ／ｋｇ、シンボル白四角はＬＹ２０９０３１４　２００ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＬＹ２０９０３１４　２００ｍｇ／ｋｇ＋ｈＴＲＡ８　１０ｍｇ／ｋｇを示す。

[図6-2]ヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５に対するＬＹ２０９０３１４とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとのｉｎ　ｖｉｖｏにおける併用効果を示した図である。図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂ　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＬＹ２０９０３１４　１００ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＬＹ２０９０３１４　１００ｍｇ／ｋｇ＋Ｃ

ｏｎａｔｕｍｕｍａｂ　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白四角はＬＹ２０９０３１４　２００ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＬＹ２０９０３１４　２００ｍｇ／ｋｇ＋Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ　３ｍｇ／ｋｇを示す。

[図7-1]ヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ１８（上段図）、２１（下段図）とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｖｏにおける併用効果を示した図である。上段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ１８　７．５ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ１８　７．５ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ１８　１５ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ１８　１５ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。下段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ２１　３．５ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ２１　３．５ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ　、シンボル白四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ２１　７ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ２１　７ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。

[図7-2]ヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ３６（上段図）、２７（下段図）とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｖｏにおける併用効果を示した図である。上段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ３６　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ３６　３ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ３６　６ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ３６　６ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。下段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ２７　２．５ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ２７　２．５ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ２７　５ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ２７

５ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。

[図7-3]ヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ５３（上段図）または５４（下段図）とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｖｏにおける併用効果を示した図である。上段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ５３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ５３　３ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ　、シンボル白四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ５３　６ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ５３　６ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。下段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ５４　２５ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ５４　２５ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ　、シンボル白四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ５４　５０ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ５４　５０ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。

[図8]ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１に対するＣｏｍｐｏｕｎｄ２１（上段図）またはＣｏｍｐｏｕｎｄ１８（下段図）とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｖｏにおける併用効果を示した図である。上段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ２１　２ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ２１　２ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ２１　４ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ２１　４ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。下段図においては、シンボル白三角は無処置対照群、シンボル黒三角はｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ１８　７．５ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒丸はＣｏｍｐｏｕｎｄ１８　７．５ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇ、シンボル白四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ１８　１５ｍｇ／ｋｇ、シンボル黒四角はＣｏｍｐｏｕｎｄ１８　１５ｍｇ／ｋｇ＋ｈＢ２７３　３ｍｇ／ｋｇを示す。

発明を実施するための形態

[0021] 本発明において、用語「腫瘍」および「癌」は交換可能に使用される。また、本発明において、腫瘍、悪性腫瘍、癌、悪性新生物、癌腫、肉腫等を総称して、「腫瘍」または「癌」と表現する場合がある

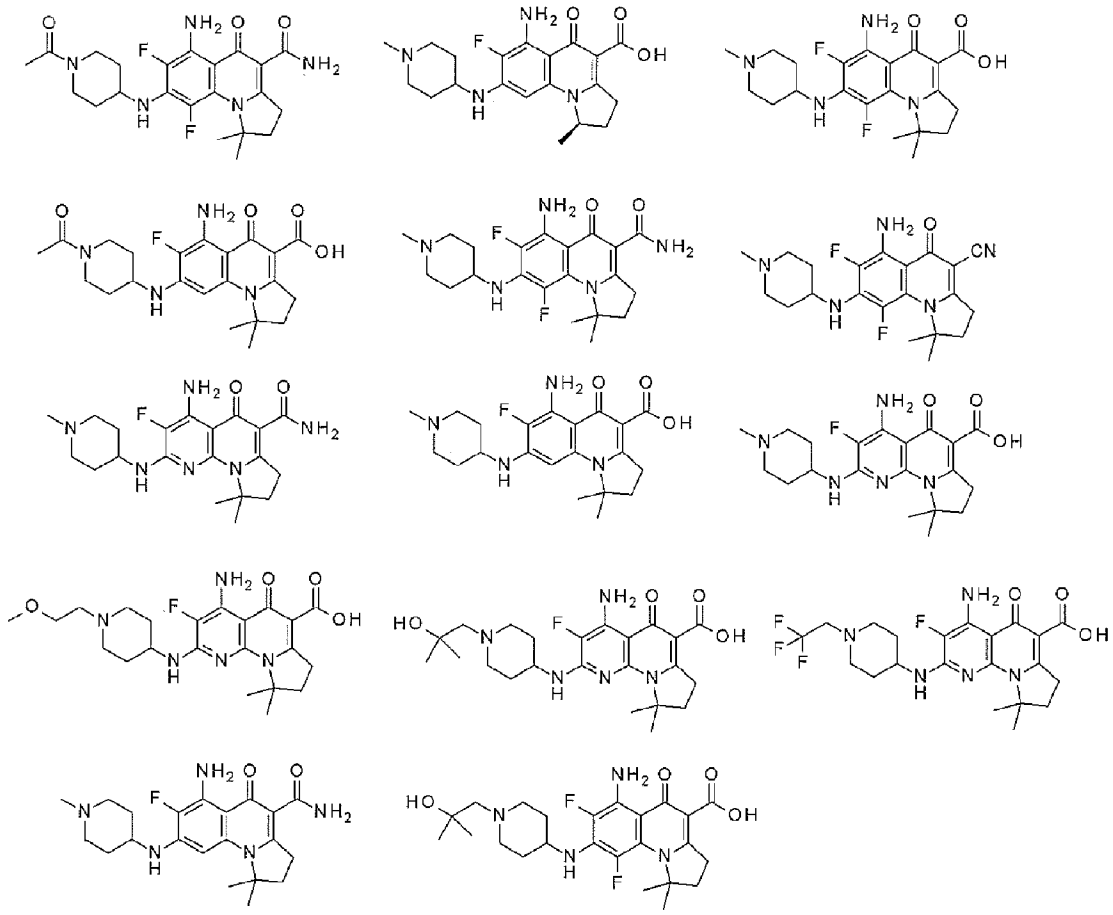
本発明において、ＧＳＫ３とは、ＧＳＫ３遺伝子によってコードされる蛋白質のことをいう。特に区別して記載しない限りは、アイソマーであるＧＳＫαおよびＧＳＫβの両方を含む。ＧＳＫ３蛋白質は、完全長のＧＳＫ３遺伝子によってコードされるＧＳＫ３蛋白質またはＧＳＫ３遺伝子変異体（欠損変異体、置換変異体または付加変異体を含む）によってコードされるＧＳＫ３蛋白質等を含む。本発明において、ＧＳＫ３とは、種々の動物種由来のホモログも含む。

[0022] 本発明において、ＧＳＫ３阻害剤とは、ＧＳＫ３のキナーゼとしての機能の阻害剤をいう。ＧＳＫ３の阻害活性測定は自体公知の方法を用いればよいが、例えば後述の試験例１に記載の方法により行うことができる。

[0023] ＧＳＫ３阻害剤としては、上記非特許文献１０に記載された化合物、特許文献１または非特許文献１１に記載されたマレイミド誘導体、特許文献２または非特許文献１２に記載されたピリミジン誘導体、特許文献３に記載されたピリミジノン誘導体、特許文献４に記載されたピリジン誘導体、非特許文献１３に記載されたアゾール誘導体、特許文献５または非特許文献１４に記載されたキノロン誘導体等、ＬＹ２０９０３１４、上記一般式（１）に記載された化合物またはその塩等が挙げられるが、ＧＳＫ３を阻害する作用を有する化合物であれば特に限定されない。ここで、ＬＹ２０９０３１４はWO03/076442の実施例365に記載された化合物であり、本文献を参考にして合成することができる。

[0024] 本発明において用いるＧＳＫ３阻害剤としては、ＬＹ２０９０３１４または上記一般式（１）に記載された化合物もしくはその塩であることが好ましく、ＬＹ２０９０３１４または下記の群から選ばれる化合物もしくはその塩であることがより好ましい。

[0025] [化5]



[0026] 本発明において、

「C_1～C_6アルキル基」とは、炭素数１～６の直鎖、分岐鎖のアルキル基を意味する。「C_1～C_6アルキル基」としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基などが挙げられる。

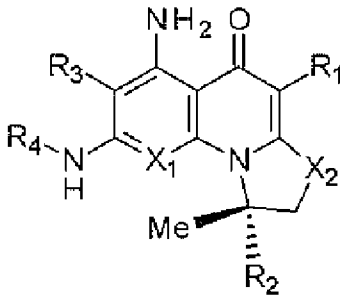
[0027] 「ハロゲン原子」としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。

[0028] 以下に、式（１）中の各置換基について説明する。

[0029] 下記一般式（１）中、

[0030]

[化6]



(1)

[0031] R_1は、カルボキシ基、カルバモイル基またはシアノ基を示す。

R_2は、メチル基または水素原子を示す。

R_3は、ハロゲン原子を示し、フッ素原子または塩素原子が好ましく、フッ素原子が特に好ましい。

R_4は、上記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピペリジニル基、上記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピリジル基、上記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいシクロヘキサニル基または水素原子を示す。

[0032] ここで、ピペリジニル基およびピリジル基の結合位置は特に限定されないが、３位もしくは４位の位置で結合することが好ましい。

[0033] ピペリジニル基、ピリジル基およびシクロヘキサニル基に置換する置換基は特に限定されないが、ピペリジニル基およびピリジル基の場合は、窒素原子上に置換することが好ましく、置換基としては、アセチル基およびメチル基が特に好ましい。シクロヘキサニル基の置換基としては、水酸基が好ましい。

[0034] X_1は、Ｃ－Ｈ、Ｃ－ＦまたはＮを示す。

[0035] X_2は、CH_2、Ｎ－ＨまたはＳを示す。

本発明における一般式（１）で表される化合物が、アミノ基等の塩基性基を有する場合、所望により医薬的に許容される塩とすることができる。そのような塩としては、例えば塩酸塩、ヨウ化水素酸塩等のハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、燐酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩等の低級アルカンス

ルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩等のアリールスルホン酸塩；ギ酸、酢酸、りんご酸、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蓚酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及びオルニチン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩等のアミノ酸塩；を挙げることができ、ハロゲン化水素酸塩及び有機酸塩が好ましい。

[0036] 本発明における一般式（１）で表される化合物が、カルボキシ基等の酸性基を有する場合、一般的に塩基付加塩を形成することが可能である。医薬的に許容される塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩等の無機塩；ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、Ｎ－メチルグルカミン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、Ｎ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン塩、ジエタノールアミン塩、Ｎ－ベンジル－Ｎ－（２－フェニルエトキシ）アミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩等の有機アミン塩、等を挙げることができる。

[0037] 本発明における一般式（１）で表される化合物もしくはその塩は、遊離体もしくは溶媒和物として存在することもある。空気中の水分を吸収すること等により水和物として存在することもある。溶媒和物としては、医薬的に許容し得るものであれば特に限定されないが、具体的には、水和物、エタノール和物等が好ましい。また、一般式（１）で表される化合物中に窒素原子が存在する場合にはＮ－オキシド体となっていてもよく、これら溶媒和物及びＮ－オキシド体も本発明の範囲に含まれる。

[0038] 本発明における一般式（１）で表される化合物もしくはその薬理上許容される塩は、それらの構造によっては、立体異性体を生じ得る。本発明における一般式（１）で表される化合物もしくはその塩は、これらの立体異性体、およびこれらの立体異性体の任意の割合の混合物をもすべて含むものである。立体異性体の定義は１９９６　ＩＵＰＣ，Ｐｕｒｅ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉ

ｅｄ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　６８，２１９３－２２２２に示す通りである。また、本発明の一般式（Ｉ）で表される化合物又はその薬理上許容される塩が、互変異生体として存在する場合、それらの互変異生体が平行状態で存在している場合も、またはある形が支配的に存在している場合のいずれも本発明の範囲内に含まれる。互変異性体とは分子の１個の原子のプロトンが他の原子にシフトすることによって生じる異性体のことを言う。

[0039] 本発明における一般式（１）で表される化合物は、構成する原子の一つまたは複数で非天然の比率の原子同位体を含むこともある。原子同位体としては、例えば、重水素（^{2}Ｈ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、ヨウ素－１２５、（^{125}Ｉ）または炭素－１４（^{14}Ｃ）などが挙げられる。これらの化合物は、治療又は予防剤、研究試薬、例えば、アッセイ試薬、及び診断剤、例えば、インビボ画像診断剤として有用である。一般式（１）で表される化合物のすべての同位体変種は、放射性であるかどうかにかかわらず、本発明の範囲内に含まれる。

[0040] また、生体内における生理条件下で酵素や胃酸等による反応により化合物（１）に変換される化合物、すなわち、酵素的に酸化、還元、加水分解等を起こして化合物（１）に変化される化合物又は胃酸等により加水分解等を起こして化合物（１）に変化される「医薬的に許容されるプロドラッグ化合物」も本発明に包含する。

[0041] 上記プロドラッグとしては、化合物（１）にアミノ基が存在する場合には、そのアミノ基がアシル化、アルキル化、リン酸化された化合物（例えば、そのアミノ基がエイコサノイル化、アラニル化、ペンチルアミノカルボニル化、（５－メチル－２－オキソ－１，３－ジオキソレン－４－イル）メトキシカルボニル化、テトラヒドロフラニル化、ピロリジルメチル化、ピバロイルオキシメチル化、ｔｅｒｔ－ブチル化された化合物等である）等を挙げることができ、化合物（１）に水酸基が存在する場合には、その水酸基がアシル化、アルキル化、リン酸化、ホウ酸化された化合物（例えば、その水酸基がアセチル化、パルミトイル化、プロパノイル化、ピバロイル化、サクシニ

ル化、フマリル化、アラニル化、ジメチルアミノメチルカルボニル化された化合物等である。）等を挙げることができる。また、化合物（Ｉ）にカルボキシ基が存在する場合には、そのカルボキシ基がエステル化、アミド化された化合物（例えば、そのカルボキシ基がエチル　エステル化、フェニル　エステル化、カルボキシメチル　エステル化、ジメチルアミノメチル　エステル化、ピバロイルオキシメチル　エステル化、エトキシカルボニルオキシエチル　エステル化、アミド化又はメチルアミド化された化合物等である。）等が挙げられる。

[0042] 化合物のプロドラッグは公知の方法によって化合物（１）から製造することができる。また、化合物のプロドラッグは、広川書店１９９０年刊「医薬品の開発」第７巻分子設計１６３頁～１９８頁に記載されているような、生理的条件で化合物（１）に変化するものも含まれる。

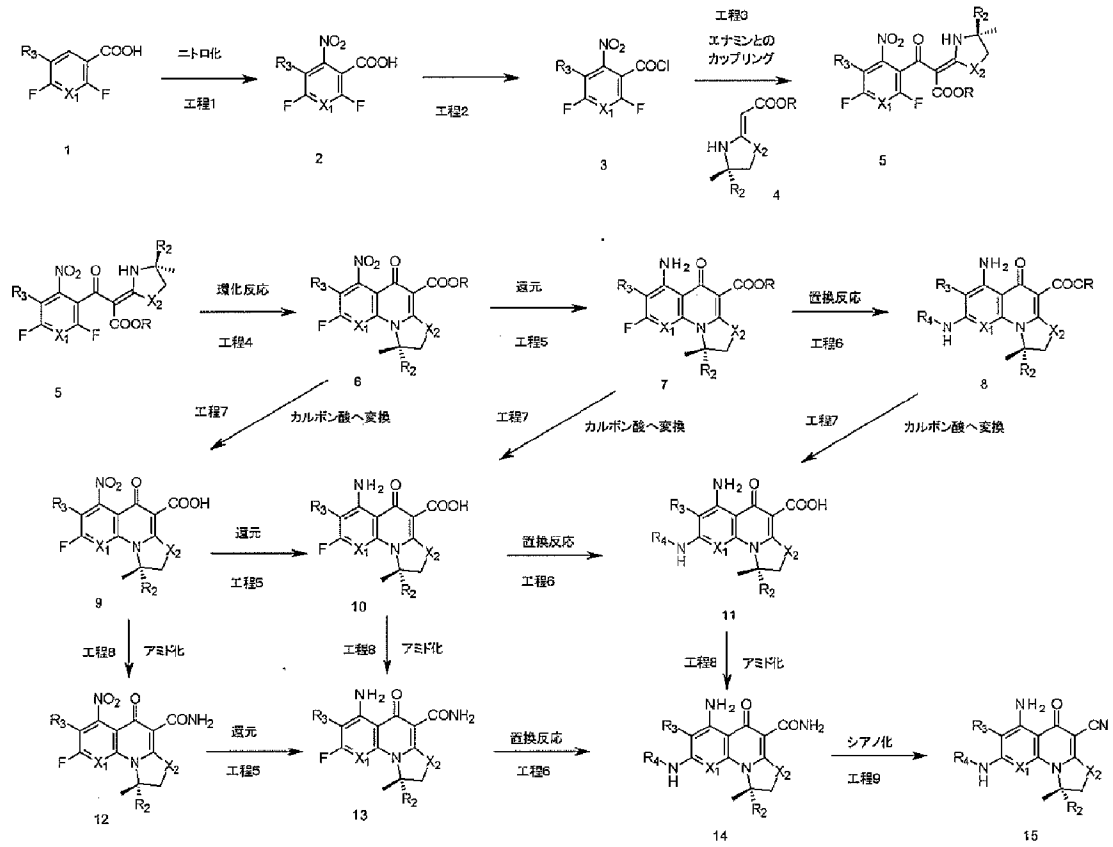
[0043] 次に、一般式（１）で表される化合物の代表的な製造法について説明する。一般式（１）で表される化合物は種々の製造法により製造することができ、以下に示す製造法は一例であり、本発明はこれらに限定して解釈されるべきではない。なお、反応に際しては、必要に応じて置換基を適当な保護基で保護して行うことができ、保護基の種類は特に限定されない。ここで用いる原料は市販品として購入することができるか、文献公知の化合物であるか、実施例または参考例を参考にして合成することができる。

［製造法１］

ニトロ基を有する安息香酸２が入手もしくは合成可能な場合には、以下のように合成することができる。後半の中間体６以降の製造工程は、好ましい順序が化合物によって異なる。また、エナミン４中の置換基Ｒは、メチル、エチル、イソプロピル、ｔ－ブチルなどのアルキル基であり、ＣＯＯＲとしてエステル基を示す。このエステル基が、シアノ基に置き換わっていても同様に合成することができる。

[0044]

[化7]



[0045] 以下に、上記スキームの各工程を示す（スキーム中、R_2、R_3、R_4、X_1、X_2は、上記と同義である。）。

工程１

化合物１から２へのニトロ化反応は、一般に知られているニトロ化の条件で行われる（Ａｌｂｒｉｇｈｔ、Ｌ．Ｆ．；Ｃａｒｒ．Ｒ．Ｖ．Ｃ．；Ｓｃｈｍｉｔｔ，Ｒ．Ｊ．Ｅｄｓ．Ｎｉｔｒａｔｉｏｎ；ＡＣＳ　Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ　Ｓｅｒｉｅｓ　６２３、１９９６）。具体的には、ニトロ化が進行しやすい基質については、酢酸、濃硫酸などを溶媒として、室温にて1モル～過剰モルの硝酸カリウムを用いて実施できる。ニトロ化が進行しにくい基質の場合には、濃硫酸もしくは無水酢酸や無水トリフルオロ酢酸を溶媒として、加熱条件にて大過剰の硝酸や発煙硝酸を用いることで実施できる。溶媒を用いず、発煙硝酸のみでニトロ化を行う場合もある。また、ニトロ源として、

硝酸二アンモニウムセリウム（IV）などの塩や、亜硝酸ブチルなどのエステルが用いられる場合もある。また、二酸化窒素とオゾンガスを共存させる方法も報告されている（Ｓｕｚｕｋｉ、Ｈ．；Ｍｕｒａｓｈｉｍａ，Ｔ．；Ｓｈｉｍｉｚｕ，Ｋ．；Ｔｓｕｋａｍｏｔｏ，Ｋ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．１９９１，８１７－８１８）。

[0046]

工程２

化合物２から３への変換は、反応に悪影響を及ぼさない適当な溶媒（ジクロロメタンやテトラヒドロフランなど）中、触媒量のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド存在下、１～過剰モルのオキサリルクロリドを作用させることで実施される。反応時間は３０分～２４時間、反応温度は０℃～８０℃であり、０℃～室温が好ましい。試薬としてチオニルクロリドを用いることも出来る。一般に、試薬および溶媒を留去した残渣を、そのまま次の工程に用いる。

[0047]

工程３

化合物３から５への変換は、反応に悪影響を及ぼさない適当な溶媒（トルエンやテトラヒドロフラン、アセトニトリルなど）中、対応するエナミン１モルに対し、１モル～数モルの酸クロリドを作用させることにより実施できる。必要に応じてトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンなどの塩基を１モル～数モル共存させることもある。反応温度は０℃～１００℃の範囲で、０℃～室温が好ましいが、環化反応まで進行させたい場合は、塩基共存下、５０℃～１００℃に加熱しても良い。反応時間は３０分～１０時間程度が好ましく、３０分～３時間程度がさらに好ましい。

[0048]

工程４

化合物５から６への環化反応は、反応に悪影響を及ぼさない適当な溶媒（テトラヒドロフランやアセトン、アセトニトリルなど）中、水素化ナトリウムや炭酸カリウムなどの適当な塩基を１モル～数モル用いて実施する。反応温

度は０℃～１００℃の範囲で行うことができる。水素化ナトリウムを用いる場合は、０℃～４０℃が好ましく、炭酸カリウムを用いる場合は６０℃～１００℃が好ましい。反応時間は３０分～１０時間程度が好ましく、３０分～３時間程度がさらに好ましい。

[0049]

工程５

化合物６から７への還元反応は、反応に悪影響を及ぼさない適当な溶媒（Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドやジクロロエタンなど）中、水素雰囲気下、基質に対しパラジウム炭素触媒を１０～１００ｗｔ％用いて行われる。反応時間は基質により異なり、数時間～数日である。反応温度は０℃～４０℃程度が好ましい。化合物９から１０、１２から１３への還元反応も同様に行われる。

水酸化パラジウム、プラチナ炭素触媒などの他の触媒や、酸性条件で鉄・亜鉛などの金属を用いて還元することもできる。また、亜ジチオン酸ナトリウムなどの塩を用いても良い。

[0050]

工程６

化合物７から８への置換反応は、反応に悪影響を及ぼさない適当な溶媒（Ｎ，Ｎ－ジメチルスルホキシドやＮ－メチルピロリドンなど）中、母核１モルに対し、アミンを１モル～数モル用いて実施される。場合によっては、トリエチルアミンなどの塩基を１モル～数モル共存させる。キノロン母核の場合は、反応温度は４０℃～１５０℃が好ましく、さらに好ましくは反応温度６０℃～１００℃である。反応時間は数時間～数日で行われる。ナフチリジン母核（Ｘ１がＮ原子）の場合には母核の反応性が比較的低く、反応温度８０℃～１２０℃、反応時間は１２時間～数日で行われるが、マイクロウェーブ反応装置にて、反応温度１６０℃で一時間加熱する方法が好ましい。ほかに、パラジウムなどの金属触媒を用いたカップリング反応を行うことで合成することもできる。その場合には反応部位がフッ素原子ではなく、臭素原子や

塩素原子である方が好ましい。溶媒としては１，４－ジオキサン、トルエンが特に好ましく、母核１モルに対し、アミンまたは芳香族アミンを１モル～数モル、塩基として炭酸セシウム、ナトリウムｔ－ブトキシド等を１モル～数モル、パラジウム触媒としてトリス（ジベンジリデンアセトン）ジパラジウム等を０．０１～０．１モル、触媒リガンドとして４，５－ビス（ジフェニルホスフィノ）－９，９－ジメチルキサンテンや２，２’－ビス（ジフェニルホスフィノ）－１，１’－ビナフチル等を０．０１～０．２モル用いて、反応温度７０℃～１２０℃、反応時間は６時間～数日で実施される。化合物１０から１１、１３から１４の場合も同様である。

[0051]

工程７

化合物６から９への脱エステル化は、メチルエステル、エチルエステル、イソプロピルエステルの場合には一般的なアルカリ性条件で行われる。アルコールなどの水と混和しやすい適当な溶媒中、１モル～大過剰モルの水酸化ナトリウム水溶液が用いられ、好ましくは３モルから１０モル程度である。反応温度は室温～１００℃で、好ましくは５０℃～８０℃である。反応時間は数時間～１日程度で行われる。水酸化ナトリウムの他に、水酸化カリウム、水酸化リチウムなどを用いることができる。また、場合によっては濃塩酸－酢酸のような、酸性条件下の反応を選択することもできる。一方、ｔ－ブチルエステルの場合には、反応に悪影響を及ぼさない適当な溶媒（ジクロロメタンなど）中、数モル～大過剰のトリフルオロ酢酸を作用させる。反応温度は０℃～室温が好ましく、反応時間は１時間～１日が好ましい。化合物７から１０、８から１１についても、同様に行われる。

[0052]

工程８

化合物９から１２のアミド化工程は、反応に悪影響を及ぼさない適当な溶媒（ジクロロメタンなど）中、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドなどの縮合剤に、ＨＯＢｔ（１－ヒドロキシベンズトリ

アゾール）などの酸性の添加剤を加えることでも実施可能であるが、好ましくはヘキサフルオロリン酸(ベンゾトリアゾールー１ーイルオキシ)トリピロリジノホスホニウムを１モル～数モル、トリエチルアミンなどの塩基を数モル～大過剰モル、塩化アンモニウムなどの窒素源を数モル～大過剰モル用いて実施する。反応温度は０℃～４０℃程度、反応時間は数時間～数日程度で行われる。また、基質によっては、オキサリルクロリドなどを用いて酸クロリドを調整後、反応系にアンモニア水を加えるような簡便な方法でも合成可能である。溶媒は反応に悪影響をおよぼさず、水と混和しやすいもの（テトラヒドロフランやアセトニトリル、ジオキサンなど）が好ましい。反応温度は０℃～６０℃程度で行われる。反応時間は３０分～数日であり、３０分～数時間が好ましい。一方、エステルを加水分解せず、アンモニア／メタノール溶液やアンモニア水と封管中で過熱することでも合成することができる。反応温度は６０℃～１００℃、反応時間は半日～数日間で行われる。化合物１０から１３、１１から１４への工程についても同様に行われる。

[0053]

工程９

化合物１４から１５のシアノ化工程は、トリホスゲンや五塩化リンなどの脱水剤を作用させて行うこともできるが、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒ，Ｎｏ．２１，ｐｐ１８１３－１８１６，１９７７に記載されている、トリフルオロ酢酸無水物を用いる方法が好ましい。反応に悪影響を与えない溶媒（ジクロロエタンなど）中、トリフルオロ酢酸無水物を１モル～過剰モル、トリエチルアミンなどの塩基を１モル～過剰モル用いる。もしくは、溶媒兼塩基としてピリジン中で反応を行うこともできる。反応温度は０℃～４０℃が好ましく、反応時間は３０分～数日が好ましい。

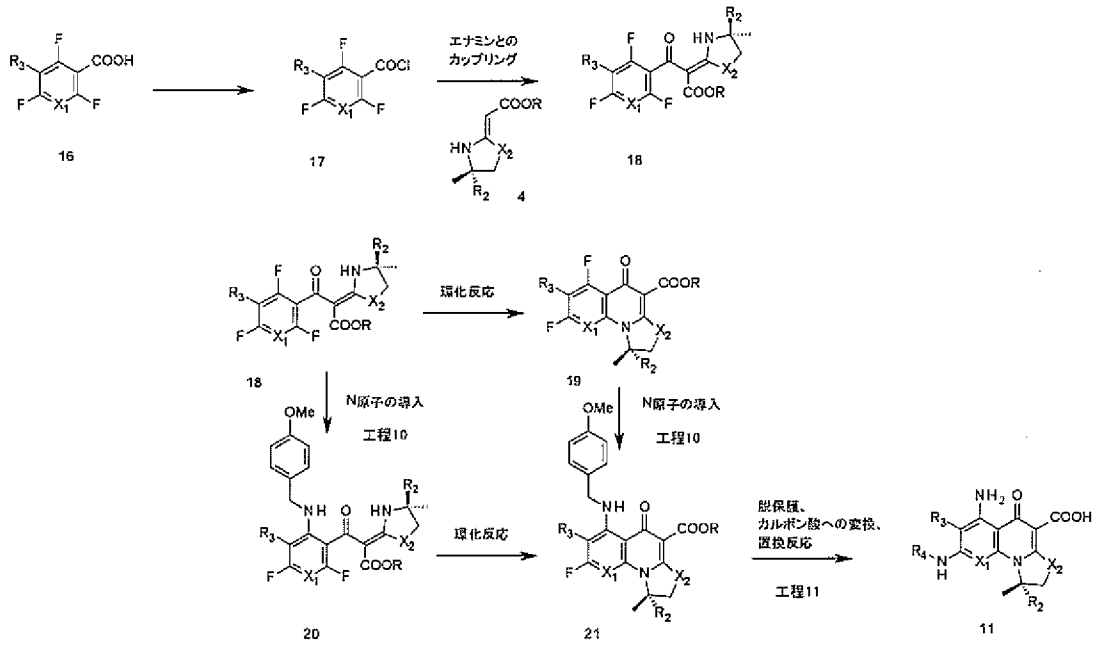
[0054]

［製造法２］

ニトロ基を有さない安息香酸からは、以下のような方法で合成できる。環化反応を行うタイミングは、化合物によって異なる。窒素源には、ベンジルア

ミン、アリルアミン、アジド、アンモニアなどが利用できる（スキーム中、R、R_2、R_3、R_4、X_1、X_2は、上記と同義である。）。

[0055] [化8]



[0056] 工程１０

化合物１８から２０へのＮ原子の導入工程は、反応に悪影響を及ぼさない溶媒（Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドなど）中、ｐ－メトキシベンジルアミン類を１モル～数モル作用させることで行うことができる。ｐ－メトキシベンジルアミン、アリルアミンなどの脱保護が容易なアミンを選択することが好ましい。反応温度は６０℃～２００℃で、好ましくは８０℃～１００℃である。反応時間は数時間～数日で行われる。別の窒素源として、アジ化ナトリウムを選択することもできる。化合物１９から２１への工程についても同様に行われる。

[0057]

工程１１

化合物２１から１１へのｐ－メトキシベンジルアミンの脱保護の工程は、ＰＲＯＴＥＣＴＩＶＥ　ＧＲＯＵＰＳ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓに記載されているように、水素雰囲気下パラジウム炭素触媒などを用

いる接触還元や、ＤＤＱなどを用いた酸化的除去法を用いることができる。好ましくは、反応に悪影響を及ぼさない適切な溶媒（ジクロロメタン、ジクロロエタンなど）中、トリフルオロ酢酸を数モル～大過剰用い、必要に応じて触媒量～数モルのアニソールを添加する方法を用いる。反応温度は室温～６０℃、反応時間は数時間から半日程度で行われる。その後の、カルボン酸への変換と、置換反応は、工程６および工程７と同様に行う。

アリルアミンを使用した場合には、ＰＲＯＴＥＣＴＩＶＥ　ＧＲＯＵＰＳ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓに記載されているように、アリル基の異性化を利用する方法を用いて行うことができる。好ましくは、アルコール溶液中、パラジウム炭素触媒を１０～１００ｗｔ％用い、メタンスルホン酸やトリフルオロ酢酸を１モル～大過剰モル共存させる。反応温度は室温～１００℃で、６０～８０℃が好ましい。反応時間は数時間～１日かけて行う。その後の、カルボン酸への変換と、置換反応は、工程６および工程７と同様に行う。

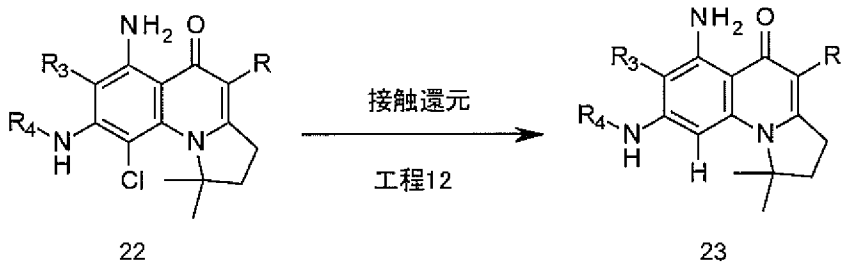
[0058]

［製造法３］

キノリン環の９位が水素原子である化合物は、相当する安息香酸を利用することもできるが、以下のようなハロゲン原子を還元的に除去する方法で、簡便に合成することができる（スキーム中、Ｒはエステル基、カルボキシ基、カルバモイル基、ニトリル基を示し、R_2、R_3、R_4、X_1、X_2は、上記と同義である。）。

工程１２

[0059] [化9]



22 23

[0060] 化合物２２から２３への還元反応は、反応に悪影響を及ぼさない適切な溶媒（ジクロロエタン、メタノール、エタノール、ＢＨＴなどの酸化防止剤を含むテトラヒドロフランなど）を用いて行う。好ましくは、非プロトン性溶媒とアルコールとの混合溶媒を用いる。パラジウム炭素などの触媒を１０～１００ｗｔ％、好ましくは３０～５０ｗｔ％程度用い、水素雰囲気下にて行う。反応温度は０～４０℃であるが、室温が好ましい。反応時間は数時間～数日で行われる。

[0061]

［製造法４］

ナフチリジンタイプの化合物は、以下のようにブロモ化された中間体２５から、上述の「製造法２」と同様の手順で合成できる。

工程１３

[0062] [化10]



24 25

[0063] 化合物２４から２５へのブロモ化反応は、反応に悪影響を及ぼさない適当な溶媒（テトラヒドロフランやジエチルエーテルなど）中、２モル以上のメチルリチウムやノルマルブチルリチウムなど適当な塩基を作用させた後、臭素源（１，２-ジブロモテトラクロロエタンやフェニルトリメチルアンモニウムトリブロミドなど）を1モル～大過剰モル、好ましくは数モル程度用いて実施する。反応温度は－１００℃～室温程度、反応時間は３０分～６時間で行われる。

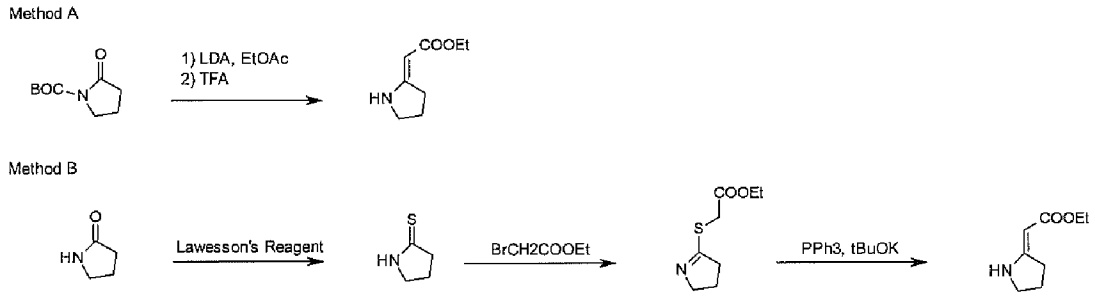
[0064]

［製造法５］

前述したエナミン４は、文献（Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，（７），１１６２－１１７０，２００６（Ａ法）もしくは、Ｅｕｒｏｐｉａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ

Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（３）５０５－５１１，２００５（Ｂ法））で知られているような方法を参考にして合成することができる。

[0065] [化11]



[0066] 本発明で使用される抗ＤＲ５抗体としては、ｈＴＲＡ８を挙げることができる。ｈＴＲＡ８の生産法については、WO01/083560に記載されている。ｈＴＲＡ８の重鎖配列は、配列番号１に示されるアミノ酸配列の１～４４９番目のアミノ酸残基または１～４４８番目のアミノ酸残基からなる。また、ｈＴＲＡ８の軽鎖配列は、配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～２１３番目のアミノ酸残基からなる。なお、配列表に記載の配列番号１のアミノ酸配列の１～１１８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はｈＴＲＡ８の重鎖可変領域に相当し、配列表に記載の配列番号２のアミノ酸配列の１～１０７番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はｈＴＲＡ８の軽鎖可変領域に相当する。これらの可変領域および任意の定常領域を有する抗体も本発明で使用することができる。

[0067] 本発明で使用される別の抗ＤＲ５抗体としては、ｈＢ２７３を挙げることできる。ｈＢ２７３の生産法については、WO12/0577288に記載されている。ｈＢ２７３の重鎖配列は、配列番号３に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる。また、ｈＢ２７３の軽鎖配列は、配列番号４に示されるアミノ酸配列の１～２１９番目のアミノ酸残基からなる。なお、配列表に記載の配列番号３のアミノ酸配列の１～１２２番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はｈＢ２７３の重鎖可変領域に相当し、配列表に記載の配列番号４のアミノ酸配列の１～１１４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はｈＢ２７３の軽鎖可変領域

に相当する。これらの可変領域および任意の定常領域を有する抗体も本発明で使用することができる。

[0068] 本発明で使用される別の抗ＤＲ５抗体としては、さらに、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂを挙げることができる。Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂは、ＷＨＯ Ｄｒｕｇ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｖｏｌ．２２，Ｎｏ．２，２００８，ｐ１２９－１３０に記載されている軽鎖、及び重鎖のアミノ酸配列をもとに、例えばWO12/0577288に記載の方法で生産することができる。Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの重鎖配列は、配列番号５に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる。また、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの軽鎖配列は、配列番号６に示されるアミノ酸配列の１～２１５番目のアミノ酸残基からなる。なお、配列表に記載の配列番号５のアミノ酸配列の１～１２２番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂの重鎖可変領域に相当し、配列表に記載の配列番号６のアミノ酸配列の１～１１０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂの軽鎖可変領域に相当する。これらの可変領域および任意の定常領域を有する抗体も本発明で使用することができる。

本発明で使用可能な抗ＤＲ５抗体は上記の三種の抗体に限定されるものではなく、ＤＲ５発現細胞にアポトーシスを誘導する機能を有していれば、ＧＳＫ３阻害剤との併用に供することが可能である。例えば、WO98/51793, WO2001/83560, WO2002/94880, WO2003/54216, WO2006/83971, WO2007/22157, WO11/039126またはWO11/1098520にＤＲ５発現細胞にアポトーシスを誘導する抗ＤＲ５抗体が記載されている。また、Ｌｅｘａｔｕｍｕｍａｂ（ＨＧＳ－ＥＴＲ２）、ＨＧＳ－ＴＲ２Ｊ、Ｄｒｏｚｉｔｕｍａｂ（ＡＰＯＭＡＢ）、ＬＢＹ１３５、ＴＡＳ２６６と呼ばれる抗ＤＲ５抗体についても、本発明において使用することが可能である。

Ｄｒｏｚｉｔｕｍａｂは、ＷＨＯ Ｄｒｕｇ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｖｏｌ．２５，Ｎｏ．１，２０１１，ｐ５５－５６に記載されている軽鎖、及び重鎖のアミノ酸配列をもとに生産することができる。Ｄｒｏｚｉｔｕｍ

ａｂの重鎖配列は、配列番号７に示されるアミノ酸配列の１～４５１番目のアミノ酸残基または１～４５０番目のアミノ酸残基からなる。また、Ｄｒｏｚｉｔｕｍａｂの軽鎖配列は、配列番号８に示されるアミノ酸配列の１～２１３番目のアミノ酸残基からなる。なお、配列表に記載の配列番号７のアミノ酸配列の１～１２１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はＤｒｏｚｉｔｕｍａｂの重鎖可変領域に相当し、配列表に記載の配列番号８のアミノ酸配列の１～１１３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はＤｒｏｚｉｔｕｍａｂの軽鎖可変領域に相当する。これらの可変領域および任意の定常領域を有する抗体も本発明で使用することができる。

Ｌｅｘａｔｕｍｕｍａｂは、ＷＨＯ Ｄｒｕｇ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．１，２００７，ｐ６９－７０に記載されている軽鎖、及び重鎖のアミノ酸配列をもとに、生産することができる。Ｌｅｘａｔｕｍｕｍａｂの重鎖配列は、配列番号９に示されるアミノ酸配列の１～４５１番目のアミノ酸残基または１～４５０番目のアミノ酸残基からなる。また、Ｌｅｘａｔｕｍｕｍａｂの軽鎖配列は、配列番号１０に示されるアミノ酸配列の１～２１４番目のアミノ酸残基からなる。なお、配列表に記載の配列番号９のアミノ酸配列の１～１２１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はＬｅｘａｔｕｍｕｍａｂの重鎖可変領域に相当し、配列表に記載の配列番号１０のアミノ酸配列の１～１１４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はＬｅｘａｔｕｍｕｍａｂの軽鎖可変領域に相当する。これらの可変領域および任意の定常領域を有する抗体も本発明で使用することができる。

また、上記のいずれかの抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌｅｍｅｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｒｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ）を保有する抗体も本発明で使用することができる。ＣＤＲは、超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ３ヶ所に分離している。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定してい

る。従って、例えばｈＴＲＡ８の重鎖および軽鎖上の計６ヶ所のＣＤＲの組み合わせを有する抗体も本発明で使用することが可能であり、ｈＢ２７３等の他の抗ＤＲ５抗体についても同様である。

上記の抗ＤＲ５抗体の重鎖配列および軽鎖配列をコードする遺伝子を適当な宿主細胞に導入して抗体を生産する場合には、適当な宿主細胞と発現ベクターを組み合わせて使用することができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。真核細胞を宿主細胞として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。動物細胞としては、（１）哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）またはＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を挙げることができるが、これらの動物細胞に限定されない。また、原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することにより抗体が得られる。以上の培養法においては抗体の収量が異なる場合があり、抗体生産細胞の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。

哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られている（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））。また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リジンの２アミノ酸残基が欠失し、新たに

カルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用など）には影響を及ぼさない。従って、前記の重鎖カルボキシル末端に上記の欠失または修飾を有する各種の抗ＤＲ５抗体も本発明において使用することが可能である。また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の機能性断片（抗原結合断片）又はその修飾物であってもよい。抗体をパパイン、ペプシン等の蛋白質分解酵素で処理するか、あるいは抗体遺伝子を遺伝子工学的手法によって改変し適当な培養細胞において発現させることによって、該抗体の断片を得ることができる。このような抗体断片のうちで、抗体全長分子の持つ機能の全て又は一部を保持している断片を抗体の機能性断片と呼ぶことができる。抗体の機能としては、一般的には抗原結合活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性及び補体依存性細胞性細胞傷害活性を挙げることができる。本発明における抗体の機能性断片が保持する機能は、ＤＲ５に対する結合活性であり、好ましくは細胞にアポトーシスを誘導する活性であり、より好ましくは癌細胞に対するアポトーシスの誘導を介した細胞傷害活性である。但し、本発明の抗体は、細胞にアポトーシスを誘導する活性に加えて、抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性及び／又は補体依存性細胞性細胞傷害活性を併せ持っていても良い。

例えば、抗体の断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、又は重鎖及び軽鎖のＦｖを適当なリンカーで連結させたシングルチェインＦｖ（ｓｃＦｖ）、ｄｉａｂｏｄｙ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体などを挙げることができる。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の断片に含まれる。

[0069] 本発明において、ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体が「組み合わせて投与さ

れる医薬」とは、ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体が組み合わせて投与されることを想定された医薬である。

[0070] 本発明において、ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体が「組み合わせて投与される」とは、ある一定期間において、被投与対象が、ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体をその体内に取り込むことを意味する。ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体が単一製剤中に含まれた製剤が投与されてもよく、またそれぞれが別々に製剤化され、別々に投与されても良い。別々に製剤化される場合、その投与の時期は特に限定されず、同時に投与されてもよく、時間を置いて異なる時間に、又は、異なる日に、投与されても良い。ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体が、それぞれ異なる時間又は日に投与される場合、その投与の順番は特に限定されない。通常、それぞれの製剤は、それぞれの投与方法に従って投与されるため、それらの投与は、同一回数となる場合もあり、異なる回数となる場合もある。また、それぞれが別々に製剤化される場合、各製剤の投与方法（投与経路）は同じであってもよく、異なる投与方法（投与経路）で投与されてもよい。また、ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体が同時に体内に存在する必要は無く、ある一定期間（例えば一ヶ月間、好ましくは１週間、さらに好ましくは数日間、さらにより好ましくは１日間）の間に体内に取り込まれていればよく、いずれかの投与時にもう一方の有効成分が体内から消失していてもよい。

[0071] 本発明の医薬の投与形態を例示すると、例えば、１）ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体を含む単一の製剤の投与、２）ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の同一投与経路での同時投与、３）ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体を別々に製剤化して得られる２種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、４）ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体を別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投与経路での同時投与、５）ＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与などが挙げられる。

[0072] 本発明においては、２種の異なる製剤とした場合は、それらを含むキット

とすることもできる。

[0073] 本発明にかかる医薬は、ＧＳＫ３阻害剤および／または抗ＤＲ５抗体と薬学的に許容し得る担体を含み、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射等の各種注射剤として、あるいは、経口投与または経皮投与等の種々の方法によって投与することができる。薬学的に許容し得る担体とは、本発明の化合物または本発明の化合物を含む組成物を、ある器官または臓器から他の器官または臓器に輸送することに関与する、薬学的に許容される材料（例えば、賦形剤、希釈剤、添加剤、溶媒等）を意味する。

[0074] 製剤の調製方法としては投与法に応じ適当な製剤（例えば、経口剤または注射剤）を選択し、通常用いられている各種製剤の調製法にて調製できる。経口剤としては、例えば、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤、溶液剤、シロップ剤、エリキシル剤、乳剤、または油性ないし水性の懸濁液等を例示できる。経口投与の場合では遊離体のままでも、塩の型のいずれでもよい。水性製剤は薬学的に許容される酸と酸付加物を形成させるか、ナトリウム等のアルカリ金属塩とすることで調製できる。注射剤の場合は製剤中に安定剤、防腐剤または溶解補助剤等を使用することもできる。これらの補助剤等を含むこともある溶液を容器に収納後、凍結乾燥等によって固形製剤として用時調製の製剤としてもよい。また、一回投与量を一の容器に収納してもよく、また複数回投与量を一の容器に収納してもよい。

[0075] 固形製剤としては、例えば、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、またはトローチ剤が挙げられる。これらの固形製剤は、本発明の化合物とともに薬学的に許容し得る添加物を含んでもよい。添加物としては、例えば、充填剤類、増量剤類、結合剤類、崩壊剤類、溶解促進剤類、湿潤剤類または滑沢剤類が挙げられ、これらを必要に応じて選択して混合し、製剤化することができる。

[0076] 液体製剤としては、例えば、溶液剤、シロップ剤、エリキシル剤、乳剤、または懸濁剤が挙げられる。添加物としては、例えば、懸濁化剤または乳化剤が挙げられ、これらを必要に応じて選択して混合し、製剤化することがで

きる。

[0077] 本発明は、哺乳類、特にヒトの癌治療に用いることができる。本発明の医薬の投与量および投与間隔は、疾患の場所、患者の身長、体重、性別または病歴によって、医師の判断により適宜選択され得る。本発明の医薬をヒトに投与する場合、投与量の範囲は、一種類の有効成分につき、１日当たり、約０．０１ｍｇ／ｋｇ体重～約５００ｍｇ／ｋｇ体重、好ましくは、約０．１ｍｇ／ｋｇ体重～約１００ｍｇ／ｋｇ体重である。ヒトに投与する場合、好ましくは、１日あたり１回、あるいは２から４回に分けて投与され、適当な間隔で繰り返すのが好ましい。また、１日量は、医師の判断により必要によっては上記の量を超えてもよい。

[0078] 本発明で使用される抗ＤＲ５抗体を含有する医薬組成物は、ｐＨ、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。製剤用の物質として以下のものを挙げることができるが、これらに制限されない：グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリスー塩酸（Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、β－シクロデキストリンやヒドロキシプロピルーβーシクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン・グリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、

ソルビタンエステル、ポリソルベート２０やポリソルベート８０等のポリソルベート、トリトン（ｔｒｉｔｏｎ）、トロメタミン（ｔｒｏｍｅｔｈａｍｉｎｅ）、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。これらの製剤用の物質の添加量は、抗ＤＲ５抗体の重量に対して０．０１～１００倍、特に０．１～１０倍添加するのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

[0079] 医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはｐＨ７．０－８．５のＴｒｉｓバッファー、ｐＨ４．０－５．５の酢酸バッファー、ｐＨ３．０－６．２のクエン酸バッファーを含むことができる。また、これらのバッファーにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。

治療の対象となる癌の種類はＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体の併用治療に対して感受性が確認される癌であれば特に限定されないが、血液癌（白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫）、脳腫瘍、頭頸部癌、食道癌、胃癌、虫垂癌、大腸癌、肛門癌、胆嚢癌、胆管癌、膵臓癌、消化管間質腫瘍、肺癌、肝臓癌、中皮腫、甲状腺癌、腎臓癌、前立腺癌、神経内分泌腫瘍、黒色腫、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、骨肉腫、軟部肉腫、カポジ肉腫、筋肉腫、腎臓癌、膀胱癌または睾丸癌が挙げられる。

[0080] ＭＬＬ（mixed-lineage leukemia）遺伝子の転座が認められる白血病や急性白血病等の血液癌、ＧＳＫ３の活性化みられる膵臓癌、大腸癌、グリオーマ細胞、黒色腫等が好ましい。

[0081] 細胞の増殖阻害活性は、当業者に通常用いられる増殖阻害試験法を用いて調べることができる。細胞の増殖阻害活性は、例えば、試験薬剤の存在下ま

たは非存在下における細胞（例えば、腫瘍細胞）の増殖の程度を比較することによって実施することができる。増殖の程度は、下記の試験例２から５に記載される方法の他、例えば、生細胞を測定する試験系を用いて調べることができる。生細胞の測定方法としては、例えば、［^{3}Ｈ］－チミジンの取り込み試験、ＢｒｄＵ法またはＭＴＴアッセイ等が挙げられる。

［0082］ 細胞のアポトーシスのアッセイ法としては、電気泳動による染色体ＤＮＡのラダーの確認、ＴＵＮＥＬ染色による染色体の断片化の検出、標識Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖによる細胞膜内のホスファチジルセリン分布の変化、アポトーシスに関連する各種カスパーゼの発現量または活性測定を挙げることができる。また、上記の方法を含めてアポトーシス検出のための各種キットが広く市販されており、これらのキットを使用してＧＳＫ３阻害剤と抗ＤＲ５抗体の組み合わせによるアポトーシスを検出することができる。

［0083］ また、ｉｎ ｖｉｖｏでの抗腫瘍活性は、当業者に通常用いられる抗腫瘍試験法を用いて調べることができる。例えば、マウス、ラット等に各種腫瘍細胞を移植し、移植細胞の生着が確認された後に、ＧＳＫ３阻害剤およびＤＲ５抗体を適した投与方法により投与し、数日～数週間後に、薬剤無投与群における腫瘍増殖と化合物投与群における腫瘍増殖とを比較することにより本発明のｉｎ ｖｉｖｏでの抗腫瘍活性を確認することができる。

［0084］ 本発明にかかる医薬は他の抗腫瘍剤と併用して用いてもよい。例えば、抗腫瘍抗生物質、抗腫瘍性植物成分、ＢＲＭ（生物学的応答性制御物質）、ホルモン、ビタミン、抗腫瘍性抗体、分子標的薬、アルきる化剤、代謝拮抗剤その他の抗腫瘍剤等が挙げられる。

［0085］ より具体的に、アルキル化剤としては、例えば、ナイトロジェンマスタード、ナイトロジェンマスタードＮ － オキシドもしくはクロラムブチル等のアルキル化剤、カルボコンもしくはチオテパ等のアジリジン系アルキル化剤、ディブロモマンニトールもしくはディブロモダルシトール等のエポキシド系アルキル化剤、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ニムスチンハイドロクロライド、ストレプトゾシン、クロロゾトシンもしくはラニムスチン

等のニトロソウレア系アルキル化剤、ブスルファン、トシル酸インプロスルファン、テモゾロミドまたはダカルバジン等が挙げられる。

[0086] 各種代謝拮抗剤としては、例えば、６－メルカプトプリン、６－チオグアニンもしくはチオイノシン等のプリン代謝拮抗剤、フルオロウラシル、テガフール、テガフール・ウラシル、カルモフール、ドキシフルリジン、ブロクスウリジン、シタラビン若しくはエノシタビン等のピリミジン代謝拮抗剤、メトトレキサートもしくはトリメトレキサート等の葉酸代謝拮抗剤等が挙げられる。

[0087] 抗腫瘍性抗生物質としては、例えば、マイトマイシンＣ、ブレオマイシン、ペプロマイシン、ダウノルビシン、アクラルビシン、ドキソルビシン、ピラルビシン、ＴＨＰ－アドリアマイシン、４’－エピドキソルビシンもしくはエピルビシン等のアントラサイクリン系抗生物質抗腫瘍剤、クロモマイシンＡ 3 またはアクチノマイシンＤ 等が挙げられる。

[0088] 抗腫瘍性植物成分としては、例えば、ビンデシン、ビンクリスチン若しくはビンブラスチン等のビンカアルカロイド類、パクリタキセル、ドセタキセル等のタキサン類、またはエトポシドもしくはテニポシド等のエピポドフィロトキシン類が挙げられる。

[0089] ＢＲＭとしては、例えば、腫瘍壊死因子またはインドメタシン等が挙げられる。

[0090] ホルモンとしては、例えば、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プラステロン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、オキシメトロン、ナンドロロン、メテノロン、ホスフェストロール、エチニルエストラジオール、クロルマジノンまたはメドロキシプロゲステロン等が挙げられる。

[0091] ビタミンとしては、例えば、ビタミンＣまたはビタミンＡ等が挙げられる。

[0092] 抗腫瘍性抗体、分子標的薬としては、トラスツズマブ、リツキシマブ、セツキシマブ、ニモツズマブ、デノスマブ、ベバシズマブ、インフリキシマブ

、メシル酸イマチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、スニチニブ、ラパチニブ、ソラフェニブ、クリゾチニブ等が挙げられる。

[0093] その他の抗腫瘍剤としては、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、タモキシフェン、カンプトテシン、イホスファミド、シクロホスファミド、メルファラン、Ｌ－アスパラギナーゼ、アセクラトン、シゾフィラン、ピシバニール、プロカルバジン、ピポブロマン、ネオカルチノスタチン、ヒドロキシウレア、ウベニメクスまたはクレスチン等が挙げられる。

[0094] 本発明には、本発明化合物又はその塩を投与することを特徴とする癌の予防方法及び／または治療方法も含まれる。

実施例

[0095] 以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されない。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒および出発材料は、市販の供給源から入手可能であるか、文献公知の製法により合成することができる。

以下に、本願発明に関わる参考例と実施例（合成）を示す。

[0096]

実施例１

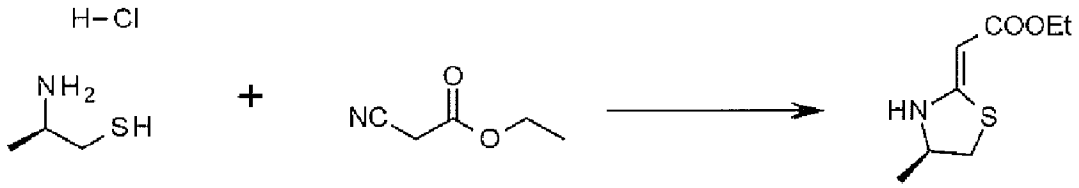
（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－｛［３－（ピリジン－２－イル）プロピル］アミノ｝－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

エチル ［（４Ｒ）－４－メチル－１，３－チアゾリジン－２－イリデン］エタノエート

[0097]

[化12]



[0098] （２Ｒ）－２－アミノプロパン－１－チオール（５ｇ、３９．１７ｍｍｏｌ）のエタノール溶液（５０ｍＬ）に、氷浴下トリエチルアミン（５．４６ｍＬ、３９．１７ｍｍｏｌ）およびシアノ酢酸エチル（４．５２ｇ、３９．１７ｍｍｏｌ）を加えた。反応液を８０℃に加温し、３日間攪拌した。反応液を室温に戻し、クロロホルムで希釈、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝２：１）にて精製し、標記化合物（６．８３ｇ）を油状物として得た。

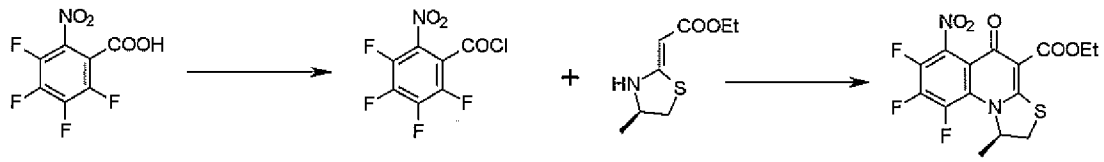
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.12-1.28 (6H, m), 2.84 (1H, dd, J = 11.4, 6.5 Hz), 3.33 (1H, dd, J = 9.9, 5.7 Hz), 3.93-4.03 (2H, m), 4.08-4.18 (1H, d, J = 40.0 Hz), 4.51 (1H, s), 8.16 (1H, brs).

ESI m/z188 $(M + H)^+$.

（工程２）

（１Ｒ）－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0099] [化13]



[0100] ２，３，４，５－テトラフルオロ－６－ニトロ－安息香酸（２０．８０ｇ、８６．９９ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（２００ｍＬ）に懸濁させ、室温に

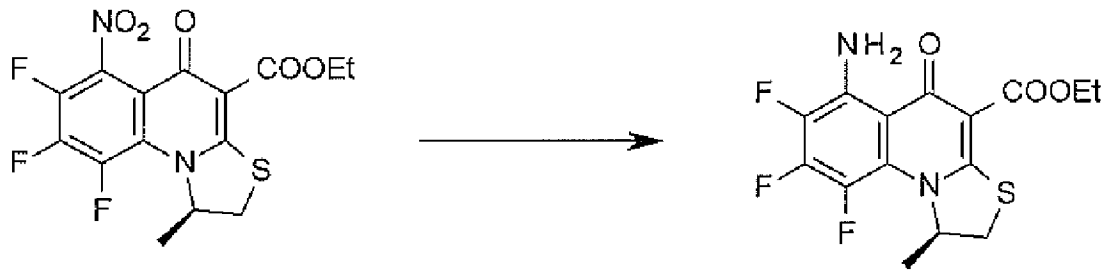
てオキサリルクロリド（１７．５１ｍＬ，２００．７４ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド１滴を加え、１８時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した残留物のアセトニトリル（２００ｍＬ）溶液に対し、氷浴下、エチル　［（４Ｒ）－４－メチル－１，３－チアゾリジン－２－イリデン］エタノエート（１２．５３ｇ、６６．９１ｍｍｏｌ）、ジイソプロピルエチルアミン（３４．９７ｍＬ、２００．７４ｍｍｏｌ）を加えた。９０℃に加熱して、４時間攪拌後、反応液を減圧濃縮した。残留物を酢酸エチルで希釈し、１０％クエン酸水溶液、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：酢酸エチル＝２：１）で精製し、標記化合物（１０．１ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.51 (3H, d, J = 6.6 Hz), 3.05 (1H, d, J = 11.5 Hz), 3.63 (1H, dd, J = 11.5, 7.6 Hz), 4.41 (2H, q, J = 7.1 Hz), 5.74-5.81 (1H, m).

（工程３）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0101] [化14]



[0102] （１Ｒ）－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（３．９１ｇ、１０．０７ｍｍｏｌ）を

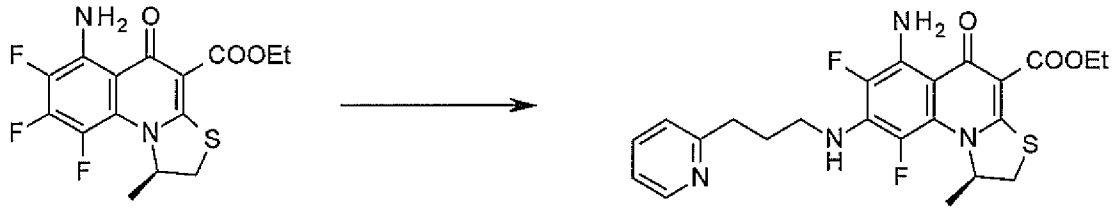
Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（５０ｍＬ）に溶解し、１０％Ｐｄ－Ｃ（ＡＤ，ｗｅｔ，３ｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で３０時間攪拌した。触媒をろ去した後、ろ液を水に注ぎ、析出した固体をろ取することで、標記化合物（２．７９ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.43 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.44 (3H, d, J = 6.6 Hz), 2.95 (1H, d, J = 11.5 Hz), 3.55 (1H, dd, J = 11.5, 7.7 Hz), 4.39-4.49 (2H, m), 5.68-5.75 (1H, m), 7.00 (2H, s).

（工程４）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－｛［３－（ピリジン－２－イル）プロピル］アミノ｝－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0103] [化15]



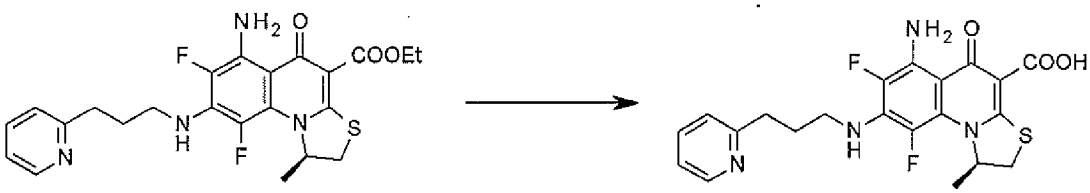
[0104] （１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（２．７９ｇ、７．７９ｍｍｏｌ）をジメチルスルホキシド（５０ｍＬ）に溶解し、３－（２－ピリジル）プロピルアミン（４．８８ｇ、２３．３６ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（７．６０ｍＬ，５４．５０ｍｍｏｌ）を加え、１２０℃で８時間、９０℃で１５時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（１％メタノール／クロロホルム→２％）にて精製し、標記化合物（３．８ｇ）を油状物として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.39 (3H, d, J = 6.1 Hz), 1.42 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.04-2.12 (2H, m), 2.87-2.93 (3H, m), 3.45-3.56 (3H, m), 4.39-4.47 (2H, m), 4.53 (1H, br s), 5.64-5.74 (1H, m), 6.74 (2H, br s), 7.11-7.18 (2H, m), 7.61 (1H, td, J = 7.6, 1.9 Hz), 8.51-8.57 (1H, m).

（工程５）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－｛［３－（ピリジン－２－イル）プロピル］アミノ｝－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0105] [化16]



[0106] （１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－｛［３－（ピリジン－２－イル）プロピル］アミノ｝－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（３．８０ｇ、８．０１ｍｍｏｌ）をエタノール（５０ｍＬ）に溶解し、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（４８．０５ｍＬ，４８．０５ｍｍｏｌ）を滴下した。反応液を６０℃に加熱し、２．５時間攪拌した。大部分のエタノールを減圧留去した後、反応液に１Ｍ塩酸水（５０ｍＬ）、飽和重曹水を加えて、１０％メタノール／クロロホルムで抽出した。減圧濃縮後、残留物をジエチルエーテル、ジクロロメタンの混合液で固体化、ろ取し、標記化合物（０．５９ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.40 (3H, d, J = 6.7 Hz), 2.08-2.15 (2H, m), 2.88-3.00 (3H, m), 3.52-3.63 (3H, m), 5.01 (1H, br s), 5.72-5.78 (1H, m), 6.49 (2H, br s), 7.13-7.18 (2H, m), 7.62 (1H, td, J = 7.6, 1.8 Hz), 8.55 (1H, d, J = 4.3 Hz).

HRESIMS calcd for $C_{21}H_{20}F_2N_4O_3S$ + H 447.13024, found 447.12693.

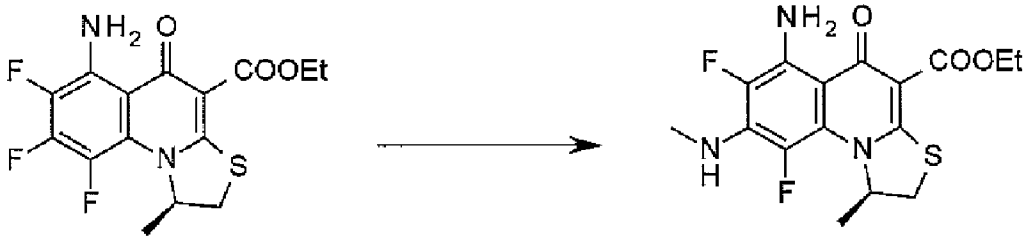
実施例２

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－（メチルアミノ）－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－（メチルアミノ）－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0107] [化17]



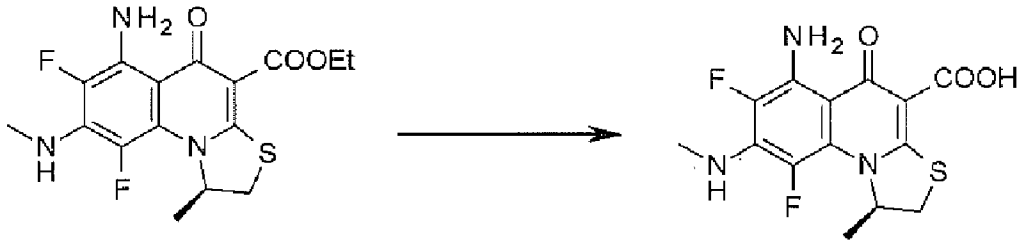
[0108] 実施例１の工程３で得られた（１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（３００ｍｇ、０．８４ｍｍｏｌ）をジメチルスルホキシド（２０ｍＬ）に溶解し、メチルアミン塩酸塩（４５２ｍｇ、６．７０ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（２５４ｍｇ，２．５１ｍｍｏｌ）を加え、１００℃で１９時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、残留物をジエチルエーテルで洗浄し、標記化合物（２８８ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.36-1.45 (6H, m), 2.88 (1H, d, J = 11.5 Hz), 3.12-3.18 (3H, m), 3.49 (1H, dd, J = 11.5, 7.7 Hz), 4.06 (1H, br s), 4.36-4.51 (2H, m), 5.66-5.72 (1H, m), 6.76 (2H, br s).

（工程２）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－（メチルアミノ）－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0109] [化18]



[0110] （１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－（メチルアミノ）－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（２８８ｍｇ、０．７８ｍｍｏｌ）をジメチルスルホキシド（５ｍＬ）に溶解し、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（４．０ｍＬ，４．０ｍｍｏｌ）を滴下した。反応液を６０℃に加熱し、２時間攪拌した。大部分のエタノールを減圧留去した後、１Ｎ塩酸水（４ｍＬ）を加え、１０％メタノール／クロロホルムで抽出した。減圧濃縮後、残留物をジエチルエーテル、エタノールの混合液で固体化、ろ取し、標記化合物（７０ｍｇ）を固体として得た。

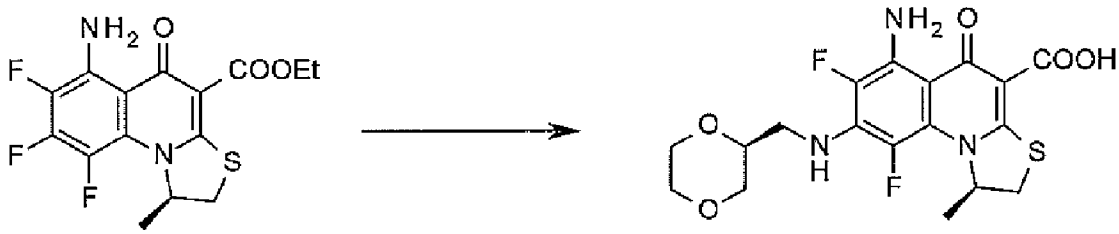
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.30 (3H, d, J = 6.1 Hz), 3.00-3.11 (3H, m), 3.14 (1H, d, J= 11.7 Hz), 3.58 (1H, dd, J = 11.7, 7.7 Hz), 5.67-5.81 (1H, m), 6.38 (1H, br s), 7.18 (2H, br s).

HRESIMS calcd for $C_{14}H_{13}F_2N_3O_3S$ + H 342.07239, found 342.06854.

実施例３

（１Ｒ）－６－アミノ－８－｛［（２Ｓ）－１，４－ジオキサン－２－イルメチル］アミノ｝－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0111] [化19]



[0112] 実施例１の工程３で得られた（１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（５０ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド溶液（１ｍｌ）に１－［（２Ｓ）－１，４－ジオキサン－２－イル］メチルアミン（４９ｍｇ、０．４２ｍｍｏｌ）とトリエチルアミン（５８μｌ，０．４２ｍｍｏｌ）を加え、１００度で一晩撹拌した。酢酸エチルで希釈後、水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（酢酸エチル－ヘキサン系）で精製し、固体を得た。得られた固体（５５ｍｇ）のエタノール懸濁液（１．５ｍｌ）に１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（７８０μｌ，０．７８ｍｍｏｌ）を加え、６０度で４時間撹拌した。１Ｍ塩酸にて中和し、飽和重曹水を加えて１０％メタノール含有クロロホルムで抽出し、溶媒を減圧留去した。酢酸エチルを加え、析出物を濾取し、標記化合物（３８ｍｇ、６９％）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.30 (3H, d, J = 5.7 Hz), 3.15 (1H, d, J= 11.5 Hz), 3.25 (1H, dd, J = 11.5, 9.7 Hz), 3.33-3.77 (9H, m), 5.71-5.78 (1H, m), 6.26 (1H, br s), 7.23 (2H, br s).

MS (ESI) m/z: 428[M+H]$^+$.

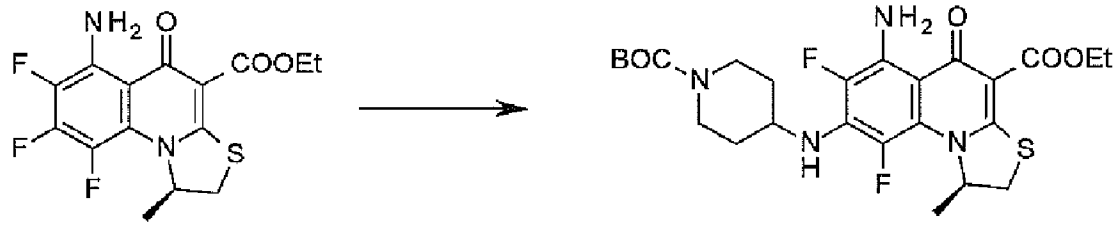
実施例４

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（１Ｒ）－６－アミノ－８－｛［（１－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）ピペリジン－４－イル］アミノ｝－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0113] [化20]



[0114] 実施例１の工程３で得られた（１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（１００ｍｇ、０．２８ｍｍｏｌ）、４－アミノ－１－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルピペリジン（１９０ｍｇ、０．９５ｍｍｏｌ）、Ｎ－メチルピロリドン（１ｍｌ）の混合物を１００℃で１１時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル－飽和重曹水に分配し、有機層を飽和食塩水で２回洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝８：２→２:８）で精製し、標記化合物を固体（１４５ｍｇ）として得た。

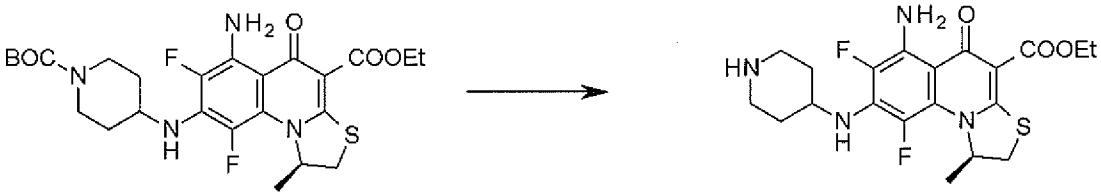
[0115] ^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ: 1.38-1.44 (10H, m), 1.47 (9H, s), 2.83-2.96 (3H, m), 3.50 (1H, dd, J = 11.2, 7.6 Hz), 3.76-3.85 (2H, m), 4.03-4.10 (2H, m), 4.39-4.47 (2H, m), 5.65-5.72 (1H, m), 6.79 (1H, br s).

（工程２）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－（ピペリジン－４－イルアミノ）－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］

チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0116] [化21]



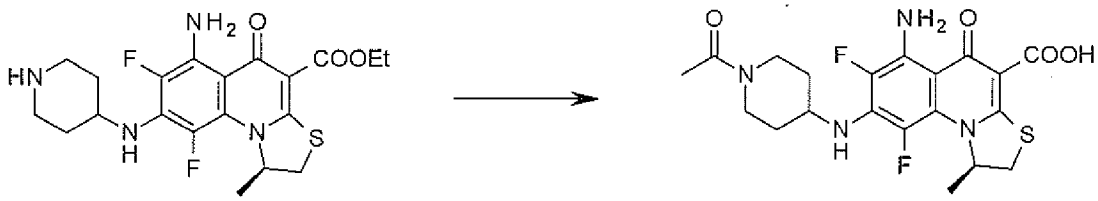
[0117] （１Ｒ）－６－アミノ－８－｛［（１－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）ピペリジン－４－イル］アミノ｝－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（１４０ｍｇ）を塩化メチレン（１ｍｌ）に溶解し、氷冷下トリフルオロ酢酸（２ｍｌ）を加え、室温にて３０分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物（１５５ｍｇ）を固体として得た。

[0118] 1H-NMR (DMSO-D6) δ: 1.26 (3H, t, J = 7.0 Hz), 1.30 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.65-1.75 (2H, m), 2.00-2.06 (2H, m), 2.93-3.03 (2H, m), 3.11 (1H, d, J = 11.4 Hz), 3.29-3.36 (2H, m), 3.55 (1H, dd, J = 11.4, 7.3 Hz), 3.77-3.86 (1H, m), 4.20 (2H, q, J = 7.0 Hz), 5.56-5.77 (3H, m), 8.21-8.31 (1H, m), 8.52-8.59 (1H, m).

（工程３）

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0119] [化22]



[0120] （１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８

－（ピペリジン－４－イルアミノ）－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（５６ｍｇ、０．１３ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（１ｍｌ）に溶解し、氷冷下、トリエチルアミン（２７μｌ）、アセチルクロライド（１２μｌ)を加え、同温にて０．５時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル－飽和重曹水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝１９：１）で精製し、固体を得た。

上記で得られた固体（４０ｍｇ、０．０８ｍｍｏｌ)をテトラヒドロフラン(０．５ｍｌ）－エタノール(０．５ｍｌ)に溶解し、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（０．２９ｍｌ）を加え、６０℃にて８時間攪拌した。反応混合物を放冷後、氷冷下１Ｍ塩酸（０．３ｍｌ）を加えた後、酢酸エチル－飽和食塩水に分配した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、標題化合物（２５ｍｇ）を固体として得た。

[0121] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.37-1.44 (2H, m), 1.41 (3H, d, J = 6.3 Hz), 2.12-2.20 (2H, m), 2.13 (3H, s), 2.74-2.83 (1H, m), 2.98 (1H, d, J = 11.5 Hz), 3.16-3.25 (1H, m), 3.58 (1H, dd, J = 11.5, 7.8 Hz), 3.83-4.09 (3H, m), 4.60 (1H, d, J = 12.9 Hz), 5.71-5.79 (1H, m), 6.54 (2H, br s).

実施例５

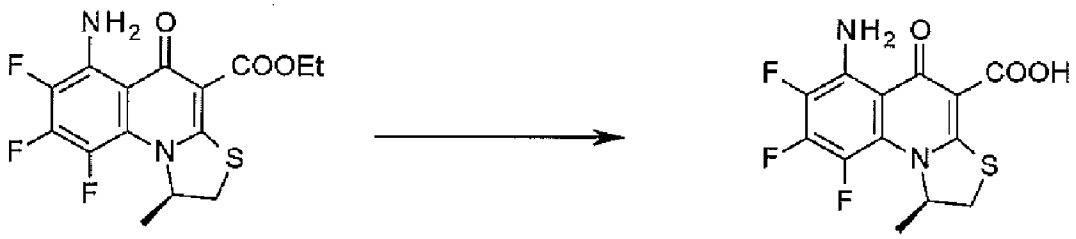
（１Ｒ）－８－｛［（３Ｓ）－１－アセチルピペリジン－３－イル］アミノ｝－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン

－４－カルボン酸

[0122] [化23]



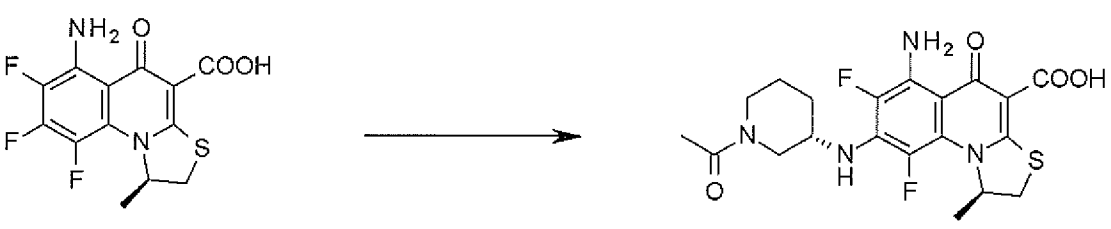
[0123] 実施例１の工程３で得られた（１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（１１．２７ｇ）のエタノール（５０ｍｌ）懸濁液に、６５℃で加熱下１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（３３．５ｍｌ）を１０分間かけて滴下した。同温度で５０分間攪拌後、室温まで冷却した。反応液に酢酸（１．９２ｍｌ）を加え室温で攪拌し、析出した固体を濾取し水で洗浄した。真空ポンプで４０℃に加熱しながら乾燥し、目的のカルボン酸体をモル純度７割程度含む混合物（３．７５ｇ）を固体として得た。本中間体はこれ以上精製せずに、次の反応に用いた。

ESI-MS m/z: 331 $(M+H)^+$.

（工程２）

（１Ｒ）－８－｛［（３Ｓ）－１－アセチルピペリジン－３－イル］アミノ｝－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0124] [化24]



[0125] 前工程で得られた固体（２００ｍｇ）、１－［（３Ｓ）－３－アミノ－１－ピペリジル］エタノン（１７５ｍｇ、１．２３ｍｍｏｌ）およびジイソプロピルエチルアミン（２００μｌ、１．１５ｍｍｏｌ）をジメチルスルホキシド（３．０ｍｌ）に溶解し、１００℃にて２日間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝５０：１）に付し、標記化合物（９３ｍｇ）を固体として得た。

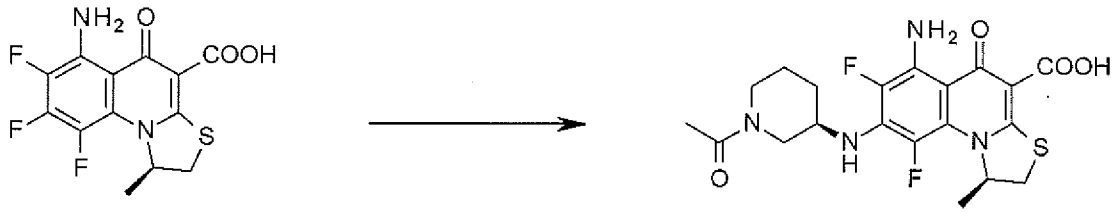
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.37-1.43 (3H, m), 1.53-1.86 (3H, m), 2.00-2.20 (4H, m), 2.96 (1H, t, J= 11.4 Hz), 3.18-3.66 (3.7H, m), 3.79-4.07 (2.3H, m), 4.14-4.36 (1H, m), 5.66-5.82 (1H, m), 6.31-6.76 (2H, br).

MS (ESI) m/z: 453 $(M + H)^+$.

実施例６

（１Ｒ）－８－｛［（３Ｒ）－１－アセチルピペリジン－３－イル］アミノ｝－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0126] [化25]



[0127] 実施例５の工程１で得られた固体および、１－［（３Ｒ）－３－アミノ－１－ピペリジル］エタノンを用いて、実施例５の工程２と同様の方法により、標記化合物を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.41 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.51-1.71 (2H, m), 1.71-1.89 (1H, m), 2.05-2.19 (4H, m), 2.97 (1H, t, J = 11.2 Hz), 3.13-3.40

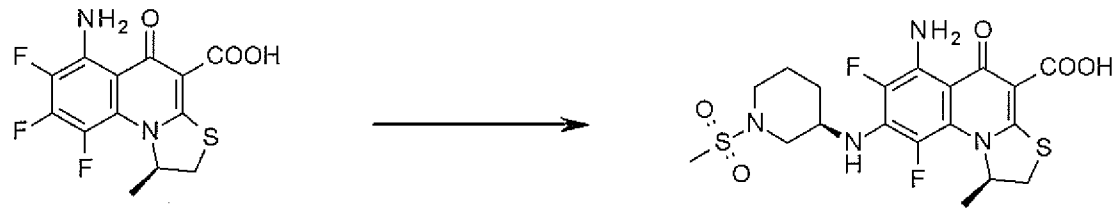
(2H, m), 3.48-3.66 (1.5H, m), 3.78-4.01 (2H, m), 4.08-4.32 (1.5H, m), 5.65-5.84 (1H, m), 6.32-6.78 (2H, m).

MS (ESI) m/z: 453 $(M + H)^+$.

実施例７

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－８－｛［（３Ｒ）－１－（メチルスルホニル）ピペリジン－３－イル］アミノ｝－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0128] [化26]



[0129] 実施例５の工程１で得られた固体および（３Ｒ）－１－（メチルスルホニル）ピペリジン－３－イルアミンを用いて、実施例５の工程２と同様の方法により、標記化合物を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: -4.45 (1H, s), 1.40 (3H, d, J = 6.3 Hz), 1.66-1.81 (2H, m), 1.82-2.00 (2H, m), 2.82 (3H, s), 2.96 (1H, d, J = 11.2 Hz), 3.15-3.27 (2H, m), 3.28-3.38 (1H, m), 3.46-3.65 (2H, m), 4.04-4.16 (1H, m), 4.43-4.54 (1H, m), 5.70-5.81 (1H, m), 6.36-6.68 (2H, br).

MS (ESI) m/z: 489 $(M + H)^+$.

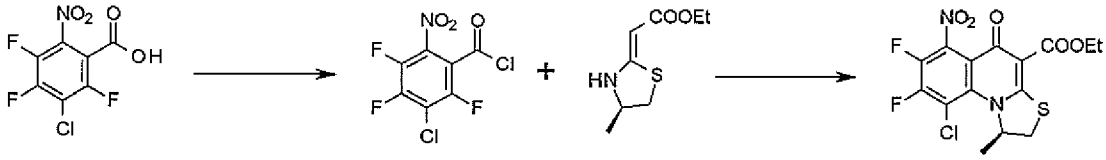
実施例８

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（１Ｒ）－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0130] [化27]



[0131] ３－クロロ－２，４，５－トリフルオロ－６－ニトロ－安息香酸（６．２４ｇ、２４．４ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（８０ｍｌ）に懸濁させ、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド２滴を加え、室温にてオキサリルクロリド（４．２６ｍｌ、４８．８ｍｍｏｌ）を２０分かけて滴下した。室温で２時間攪拌後、減圧濃縮、トルエン共沸し、残留物として油状物を得た。上記残留物の一部（４．７６ｇ）を、テトラヒドロフラン（６０ｍｌ）に溶解し、実施例１の工程１で得られたエチル　［（４Ｒ）－４－メチル－１，３－チアゾリジン－２－イリデン］エタノエート（２．５０ｇ、１３．４ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン溶液（１０ｍｌ）を、氷冷下滴下した。室温にて１時間攪拌後、反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝４：１）にて粗く精製し、油状物（４．１４ｇ）を得た。上記油状物を、テトラヒドロフラン（５０ｍＬ）に溶解し、氷浴下、水素化ナトリウム（５５％　ｉｎ　ｏｉｌ，３９０ｍｇ、９．７５ｍｍｏｌ）を加えた。室温にて４５分攪拌した後、氷浴下、反応液に１０％クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝１：１）にて精製した。得られた固体を酢酸エチルで洗浄、ろ取し、標記化合物（１．７４ｇ）を固体として得た。

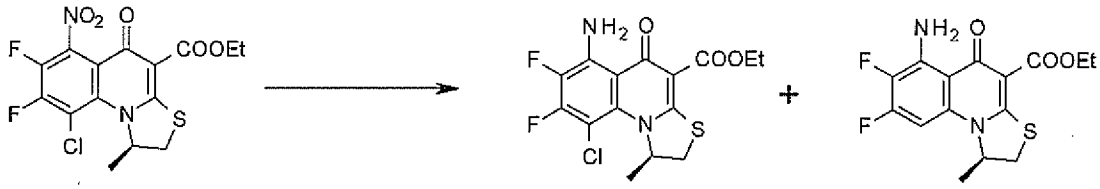
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.24-1.45 (6H, m), 3.01 (1H, d, J = 11.4 Hz), 3.59 (1H, dd, J = 10.5, 7.3 Hz), 4.38-4.44 (2H, m), 6.72-6.78 (1H, m).

（工程２）

（１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

（１Ｒ）－６－アミノ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0132] [化28]



[0133] （１Ｒ）－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（１．７４ｇ、４．３０ｍｍｏｌ）をテトラヒドロフラン（３０ｍｌ）およびＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１５ｍｌ）の混合液に溶解し、５％パラジウム炭素（ＡＤ，ｗｅｔ、８７０ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で６時間攪拌した。触媒を酢酸エチルで洗いながらろ去し、得られたろ液を水で２回、飽和食塩水で１回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を留去してシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝１：１→酢酸エチル）で精製し、低極性成分として標記９－クロル体（１．１５ｇ）、高極性成分として標記９－水素体（１７４ｍｇ）をそれぞれ固体として得た。

９－クロル体

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.23 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.42 (3H, t, J = 6.9 Hz), 2.90 (1H, d, J = 11.0 Hz), 3.53 (1H, dd, J = 11.0, 6.9 Hz), 4.40-4.4

7 (2H, m), 6.66-6.72 (1H, m).

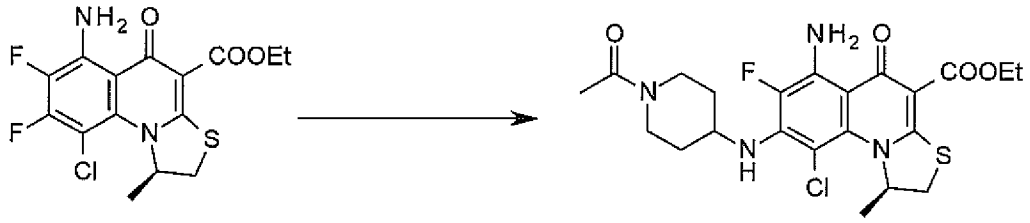
９－Ｈ体

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.43 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.50 (3H, d, J = 6.4 Hz), 2.94 (1H, d, J = 10.1 Hz), 3.56 (1H, dd, J = 10.5, 7.8 Hz), 4.45 (2H, q, J = 7.0 Hz), 5.02-5.09 (1H, m), 6.19 (1H, dd, J= 11.7, 6.6 Hz).

（工程３）

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0134] [化29]



[0135] （１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（２５１ｍｇ）のジメチルスルホキシド（２．０ｍＬ）溶液に、１－アセチル－４－アミノピペリジン（３００ｍｇ）を加え、６５℃で２日間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後に、残渣にジクロロメタン、飽和塩化ナトリウム水溶液を加えた。ジクロロメタンで二回抽出し、合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラム（ジクロロメタン：メタノール＝５０：１→３０：１）で精製し、目的物（３２７ｍｇ）を固体として得た。

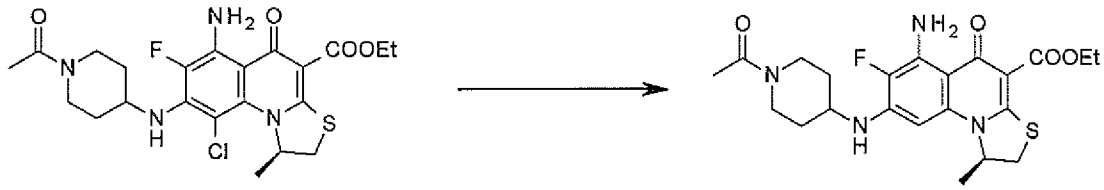
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.11 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.31-1.53 (5H, m), 1.97-2.23 (5H, m), 2.74-2.91 (2H, m), 3.12-3.27 (1H, m), 3.49 (1H, dd, J = 11.4, 6.9 Hz), 3.75-3.89 (1H, m), 3.89-4.02 (1H, m), 4.28-4.36 (1H, m

), 4.38-4.48 (2H, m), 4.48-4.58 (1H, m), 6.37-6.47 (1H, m), 6.70-7.20 (2H, br).

（工程４）

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸エチルエステル

[0136] [化30]



[0137] （１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸エチルエステル（３２７ｍｇ）のテトラヒドロフラン（５．０ｍＬ）溶液に、１０％パラジウム炭素触媒（ＡＤ，ｗｅｔ，１１８ｍｇ）を加え、水素雰囲気下４時間攪拌した。エタノール（２．５ｍＬ）を加え、水素雰囲気下で５時間攪拌後、セライトを用いて触媒を濾別した。濾液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラム（ジクロロメタン：メタノール＝５０：１→５：１）で精製し、目的物（２４６ｍｇ）を固体として得た。

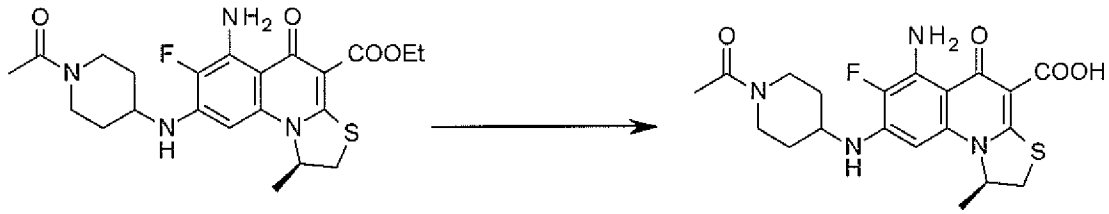
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.07-1.65 (8H, m), 1.92-2.60 (5H, m), 2.63-2.80 (1H, m), 2.86-3.06 (1H, m), 3.06-4.01 (4H, m), 4.26-4.72 (4H, m), 6.14-6.88 (4H, m).

（工程５）

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒ

ドロー５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0138] [化31]



[0139] （１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸エチルエステル（２４６ｍｇ）のエタノール（５０ｍＬ）溶液に、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（１５９５μＬ）を加え、７０℃で３時間攪拌した。反応液に１Ｍ塩酸（１６００μＬ）を加え中和後、ジクロロメタン、飽和塩化ナトリウム水溶液を加えた。ジクロロメタンで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラム（ジクロロメタン：メタノール＝５０：１→２５：１）で精製し、標記化合物（１２８ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.39-1.71 (5H, m), 2.01-2.26 (5H, m), 2.88-3.05 (2H, m), 3.22-3.36 (1H, m), 3.55-3.74 (2H, m), 3.80-3.93 (1H, m), 4.36-4.55 (2H, m), 5.09-5.28 (1H, m), 5.69-5.82 (1H, m), 6.30-6.57 (2H, br).

MS (ESI) m/z: 435 $(M + H)^+$.

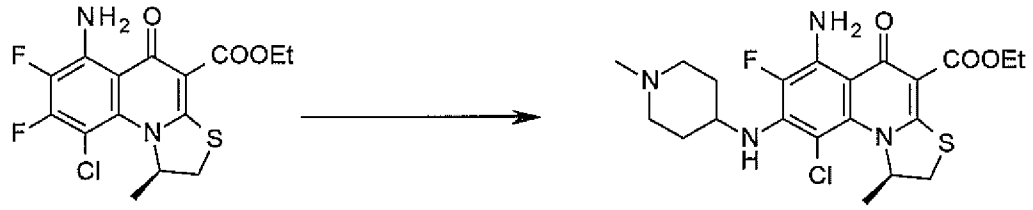
実施例９

（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸エチルエステル

[0140] [化32]



[0141] 実施例８の工程２で得られた（１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（２５７ｍｇ）のジメチルスルホキシド（２ｍＬ）溶液に、４－アミノ－１－メチルピペリジン（２６１μL）を加え、６５℃で２８時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後に、残渣をシリカゲルカラム（ジクロロメタン：メタノール＝５０：１→３０：１）で精製し、標記化合物（３２２ｍｇ）を固体として得た。

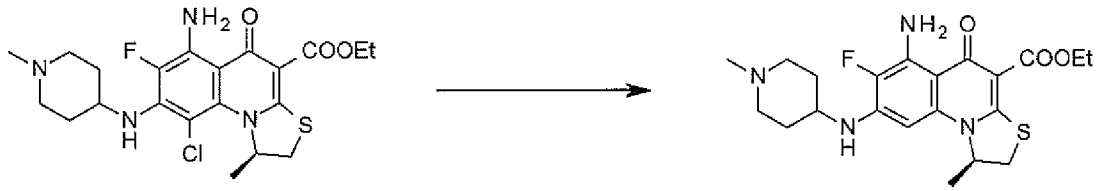
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.10 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.41 (3H, t, J= 7.1 Hz), 1.45-1.67 (2H, m), 1.92-2.05 (1H, m), 2.05-2.22 (3H, m), 2.30 (3H, s), 2.70-2.89 (3H, m), 3.48 (1H, dd, J= 11.0, 6.9 Hz), 3.67-3.82 (1H, m), 4.29-4.50 (3H, m), 6.38-6.48 (1H, m), 6.67-7.16 (2H, br).

（工程２）

（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0142]

[化33]



[0143] （１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸エチルエステル（３２２ｍｇ）のＴＨＦ（５．０ｍＬ）溶液に、１０％パラジウム炭素触媒（１１３ｍｇ）を加え、水素雰囲気下４時間攪拌した。エタノール（２．５ｍＬ）を加え、水素雰囲気下で４．５時間攪拌後、酢酸（２００μＬ）を加え、水素雰囲気下で６時間攪拌した。セライトを用いて触媒を濾別し、濾液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラム（ジクロロメタンのみ→ジクロロメタン：メタノール＝１０：１）で精製し、標記化合物（２８０ｍｇ）を固体として得た。

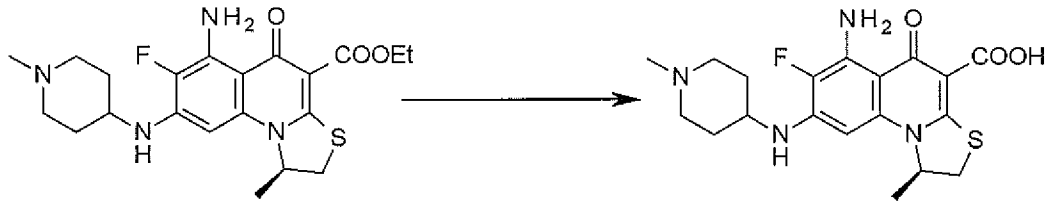
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.43 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.49 (3H, d, J= 6.6 Hz), 1.55-1.69 (2H, m), 2.00-2.12 (2H, m), 2.13-2.25 (2H, m), 2.32 (3H, s), 2.74-2.86 (2H, m), 2.89 (1H, d, J= 11.2 Hz), 3.27-3.41 (1H, m), 3.54 (1H, dd, J = 11.4, 7.7 Hz), 4.18-4.28 (1H, m), 4.37-4.50 (2H, m), 5.02-5.14 (1H, m), 5.63 (1H, d, J= 6.6 Hz), 6.62-6.98 (2H, br).

（工程３）

（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0144]

[化34]



[0145] （１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（２８０ｍｇ）のエタノール（５０ｍＬ）溶液に、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（１９３３μＬ）を加え、７０℃で３時間攪拌した。反応液に１Ｍ塩酸（１９３３μＬ）を加え中和後、ジクロロメタン、飽和塩化ナトリウム水溶液を加えた。ジクロロメタンで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラム（ジクロロメタン：メタノール＝１００：１→３０：１）で精製し、標記化合物（２２５ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (CD_3OD) δ: 1.42 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.56-1.76 (2H, m), 1.99-2.12 (2H, m), 2.23-2.38 (5H, m), 2.86-2.98 (2H, m), 3.11 (1H, d, J= 11.4 Hz), 3.46-3.80 (2H, m), 5.35-5.51 (1H, m), 5.98 (1H, d, J = 6.4 Hz).

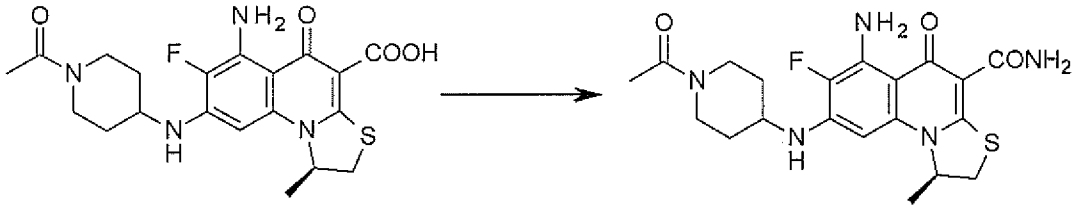
MS (ESI) m/z: 407 $(M + H)^+$.

実施例１０

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0146]

[化35]



[0147] 実施例８の工程５で得られた（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（１０６ｍｇ）のジクロロメタン（４．０ｍＬ）溶液に、塩化アンモニウム（１２３ｍｇ）、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（１８３ｍｇ）、トリエチルアミン（３６７μＬ）を加え、室温で５日間攪拌した。反応液に、ジクロロメタン、飽和塩化ナトリウム水溶液を加えた。ジクロロメタンで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラム（ジクロロメタン：メタノール＝５０：１→１５：１）およびシリカゲルカラム（酢酸エチル：メタノール＝５０：１→１５：１）で精製し、標記化合物（７４ｍｇ）を固体として得た。

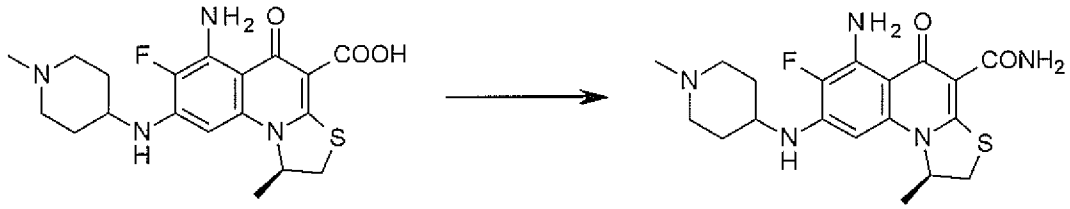
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.41-1.63 (5H, m), 2.06-2.18 (5H, m), 2.87 (1H, d, J = 11.2 Hz), 2.91-3.02 (1H, m), 3.19-3.33 (1H, m), 3.45-3.65 (2H, m), 3.80-3.91 (1H, m), 4.23-4.31 (1H, m), 4.42-4.52 (1H, m), 5.03-5.14 (1H, m), 5.52-5.61 (1H, m), 5.72 (1H, d, J = 6.6 Hz), 6.54-6.95 (2H, m), 10.02 (1H, d, J = 5.1 Hz).

MS (ESI) m/z: 434 $(M + H)^+$.

実施例１１

（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0148] [化36]



[0149] 実施例９の工程３で得られた（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロ－５Ｈ－［１，３］チアゾロ［３，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（１２３ｍｇ）のジクロロメタン（５．０ｍＬ）懸濁液に、塩化アンモニウム（１６５ｍｇ）、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（２３６ｍｇ）、トリエチルアミン（４８５μＬ）を加え、室温で３日間攪拌した。反応液に、ジクロロメタン、飽和塩化ナトリウム水溶液を加えた。ジクロロメタンで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をＮＨシリカゲルカラム（ジクロロメタン：メタノール＝１００：１→５０：１）およびＮＨシリカゲルカラム（酢酸エチル：メタノール＝２０：１→１５：１）で精製し、標記化合物（７４ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.48 (3H, d, J = 6.3 Hz), 1.56-1.76 (2H, m), 2.00-2.12 (4H, m), 2.14-2.26 (2H, m), 2.32 (3H, s), 2.76-2.86 (2H, m), 2.86 (1H, d, J = 11.2 Hz), 3.30-3.42 (1H, m), 3.48 (1H, dd, J = 11.2, 7.8 Hz), 4.25-4.33 (1H, m), 5.03-5.13 (1H, m), 5.52-5.60 (1H, m), 5.70 (1H, d, J = 6.6 Hz), 10.04 (1H, d, J = 4.6 Hz).

MS (ESI) m/z: 406 $(M + H)^+$.

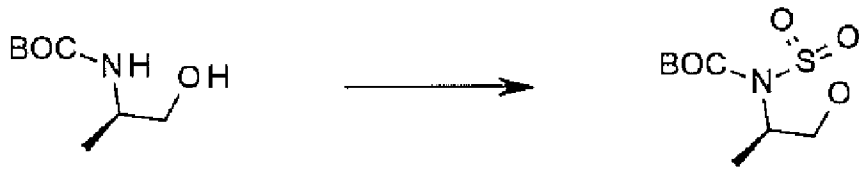
実施例１２

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－｛［２－（ピリジン－２－イルアミノ）エチル］アミノ｝－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（４Ｒ）－４－メチル－１，２，３－オキサチアゾリジン－３－カルボン酸ｔｅｒｔ－ブチルエステル　２，２－ジオキシド

[0150] [化37]



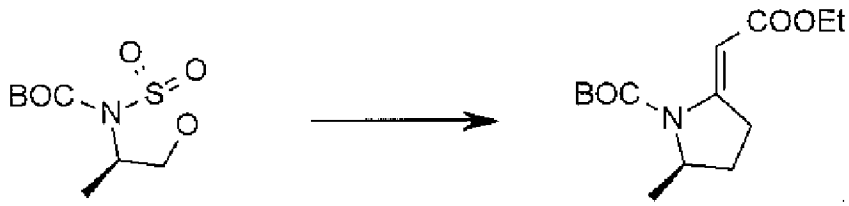
[0151] イミダゾール（１０．７ｇ、５６．８ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１２．５ｍｌ、８９．６ｍｍｏｌ）の塩化メチレン（２００ｍｌ）溶液に、－５０℃でチオニルクロリド（３．３ｍｌ、４４．８ｍｍｏｌ）およびｔｅｒｔ－ブチル　［（Ｒ）－２－ヒドロキシ－１－メチルエチル］カルバメート（７．０ｇ、４０ｍｍｏｌ）　の塩化メチレン（１００ｍｌ）溶液を加え、混合物を－５～０℃で２４時間攪拌した。反応液に水（３００ｍｌ）を加えた後、二層を分離した。有機層を飽和食塩水（３００ｍｌ）で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残分をアセトニトリル（２００ｍｌ）に溶解した。この溶液に氷冷下、過よう素酸ナトリウム（９．４ｇ、４４ｍｍｏｌ）、塩化ルテニウム（８３ｍｇ、０．４ｍｍｏｌ）および水（２００ｍｌ）を加え、混合物を－５～０℃で４時間半攪拌した。反応液に水（３００ｍｌ）を加えた後、ジエチルエーテル（３００ｍｌ）で２回抽出した。抽出液を飽和食塩水（３００ｍｌ）で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残分をｎ－ヘキサンで洗浄することにより、標記化合物（８．３ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.51 (3H, d, J = 6.3 Hz), 1.56 (9H, s), 4.20 (1H, dd, J = 9.2, 2.8 Hz), 4.37-4.46 (1H, m), 4.67 (1H, dd, J = 9.0, 6.1 Hz).

（工程２）

ｔｅｒｔ－ブチル　（５Ｒ）－２－（１－エトキシカルボニルメチリデン）－５－メチルピロリジン－１－カルボン酸

[0152] [化38]



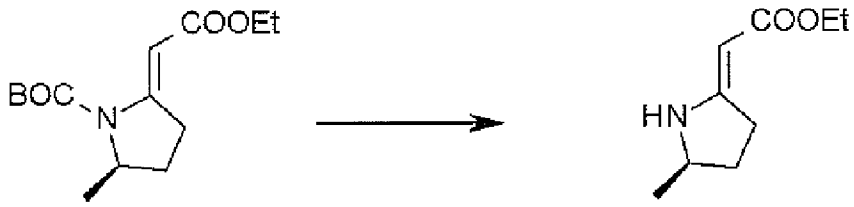
[0153] アセト酢酸エチル（５．５ｇ、４２．１ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（１００ｍｌ）溶液に氷冷下、水素化ナトリウム（５５％　ｉｎ　ｏｉｌ，１．８ｇ，４２．１ｍｍｏｌ）を加え、混合物を同温で１５分間攪拌した。反応液にｎ－ブチルリチウム（１．６７Ｍ　ｉｎ　ｎ－ヘキサン、２５．７ｍｌ、４２．１ｍｍｏｌ）を加え、混合物を同温で１５分間攪拌した。反応液に（４Ｒ）－４－メチル－１，２，３－オキサチアゾリジン－３－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル　２，２－ジオキシド（５．０ｇ、２１．１ｍｍｏｌ）を加え、混合物を室温で１７時間攪拌した。反応液に６Ｍ塩酸（１７．５ｍｌ）を加え室温で１時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加えた後、酢酸エチル（２００ｍｌ×３）で抽出した。抽出液を飽和食塩水（２００ｍｌ）で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（２００ｇ）に付し、ｎ－ヘキサン：酢酸エチル＝１０：１溶出画分を減圧下濃縮することにより、標記化合物（３．３ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.19-1.27 (6H, m), 1.53 (9H, s), 1.54-1.67 (1H, m), 1.91-2.06 (1H, m), 2.87-3.01 (1H, m), 3.41-3.52 (1H, m), 4.07-4.16 (2H, m), 4.23-4.33 (1H, m), 6.47 (1H, s).

（工程３）

２－［（５Ｒ）－５－メチルピロリジン－２－イリデン］酢酸　エチルエステル

[0154] [化39]



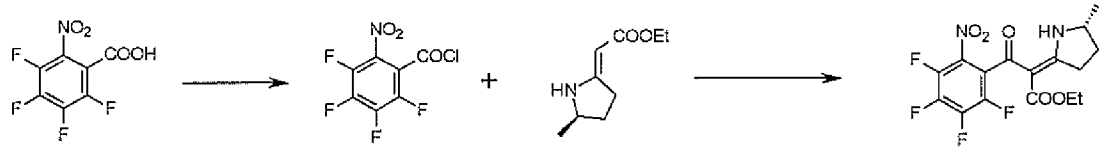
[0155] ｔｅｒｔ－ブチル （５Ｒ）－２－（１－エトキシカルボニルメチリデン）－５－メチルピロリジン－１－カルボン酸（３．３ｇ、１２．３ｍｍｏｌ）のジクロロエタン（６０ｍｌ）溶液にトリフルオロ酢酸（６ｍｌ）を加え、混合物を室温で２７時間攪拌した。反応液に氷水を加え、重曹で中和後、二層を分離した。水層をクロロホルム（５０ｍｌ×２）で抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水（５０ｍｌ）で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（５０ｇ）に付し、ｎ－ヘキサン：酢酸エチル＝７：１溶出画分を減圧下濃縮することにより、標記化合物（１．８ｇ）を油状物として得た。

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.23 (3H, d, J = 6.6 Hz), 1.25 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.45-1.56 (1H, m), 2.07-2.16 (1H, m), 2.52-2.68 (2H, m), 3.84-3.95 (1H, m), 4.10 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.48 (1H, s), 7.90 (1H, br s).

（工程４）

２－［（５Ｒ）－５－メチルピロリジン－２－イリデン］－３－オキソ－３－（２，３，４，５－テトラフルオロ－６－ニトロフェニル）プロピオネート　エチルエステル

[0156] [化40]



[0157] ２，３，４，５－テトラフルオロ－６－ニトロ安息香酸（３．１ｇ、１２

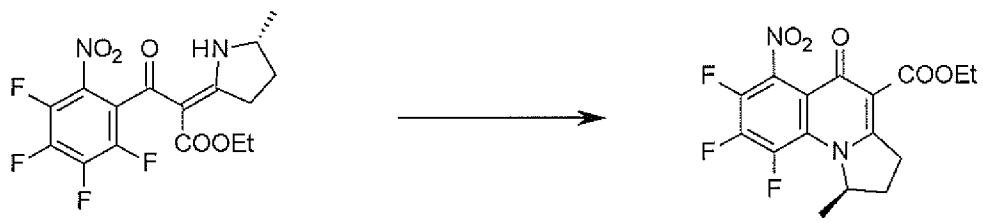
．８ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（５０ｍｌ）溶液にＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（５滴）およびオキサリルクロリド（３．３ｍｌ、３８．３ｍｍｏｌ）を加え、混合物を室温で１３時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、トルエン（２０ｍｌ）に懸濁した。この懸濁液に２－［（５Ｒ）－５－メチルピロリジン－２－イリデン］酢酸　エチルエステル（１．８ｇ、１０．７ｍｍｏｌ）のトルエン（１０ｍｌ）溶液を加え、混合物を室温で３０分間攪拌した。反応液に飽和重曹水（５０ｍｌ）を加えた後、酢酸エチル（５０ｍｌ×３）で抽出した。抽出液を飽和食塩水（５０ｍｌ）で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（６０ｇ）に付し、ｎ－ヘキサン：酢酸エチル＝３：１溶出画分を減圧下濃縮することにより、標記化合物（３．８ｇ）を油状物として得て、このまま次の反応に使用した。

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.10 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.39 (3H, d, J = 6.6 Hz), 1.63-1.74 (1H, m), 2.26-2.38 (1H, m), 3.24 (1H, br s), 3.44 (1H, br s), 3.95-4.08 (2H, m), 4.09-4.22 (1H, m), 11.52 (1H, br s).

（工程５）

（１Ｒ）－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0158] [化41]



[0159] ２－［（５Ｒ）－５－メチルピロリジン－２－イリデン］－３－オキソ－３－（２，３，４，５－テトラフルオロ－６－ニトロフェニル）プロピオネート　エチルエステル　（３．８ｇ）の１，４－ジオキサン（３０ｍｌ）溶液に

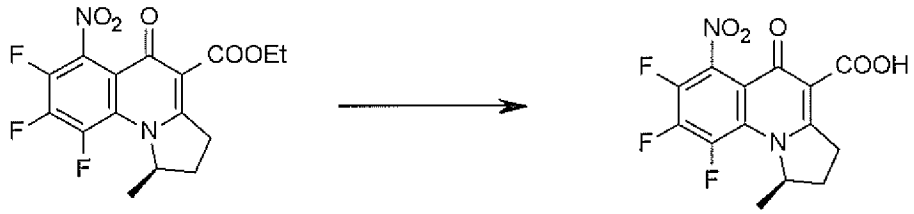
、水素化ナトリウム（５５％　ｉｎ　ｏｉｌ，０．５３ｇ，１２．２ｍｍｏｌ）を加え、混合物を室温で１５時間攪拌した。氷冷下、反応液に１０％クエン酸水溶液を加えた後、酢酸エチル（３０ｍｌ×３）で抽出した。抽出液を飽和食塩水（３０ｍｌ）で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ｎ－ヘキサン：酢酸エチル＝１：１溶出画分を減圧下濃縮することにより、標記化合物（１．１ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.37 (3H, t, J = 6.8 Hz), 1.44 (3H, d, J = 6.8 Hz), 2.05-2.12 (1H, m), 2.39-2.51 (1H, m), 3.36-3.57 (2H, m), 4.37 (2H, q, J = 7.1 Hz), 5.28-5.38 (1H, m).

（工程６）

（１Ｒ）－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0160] [化42]



[0161] （１Ｒ）－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（１．１ｇ、３．０ｍｍｏｌ）に酢酸（８ｍｌ）および塩酸（８ｍｌ）を加え、混合物を８０℃で１時間半攪拌した。冷却後、反応液に氷水を加え、析出物を濾取することにより、標記化合物（０．９ｇ）を固体として得た。

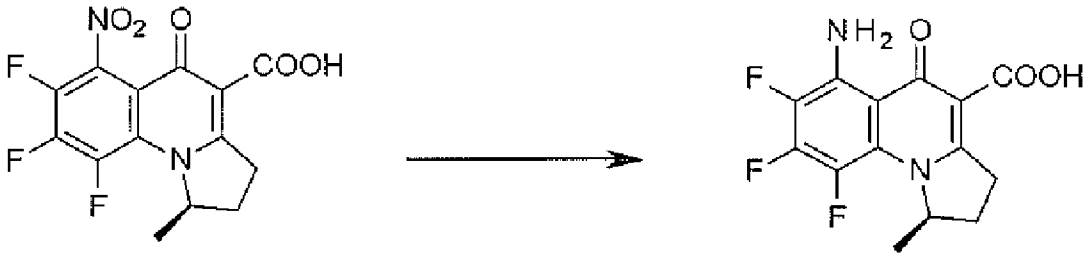
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.50 (3H, d, J = 6.6 Hz), 2.20 (1H, dd, J = 12.8, 8.7 Hz), 2.44-2.58 (1H, m), 3.54-3.67 (1H, m), 4.17 (1H, dd,

J = 20.4, 9.2 Hz), 5.41-5.52 (1H, m), 14.15 (1H, br s).

（工程７）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0162] [化43]



[0163] （１Ｒ）－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（０．９ｇ、２６ｍｍｏｌ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（３０ｍｌ）溶液に１０％パラジウム炭素触媒（ＡＤ，ｗｅｔ，０．２ｇ）を加え、混合物を水素雰囲気下室温で３日間攪拌した。反応液をセライト濾過後、濾液を酢酸エチル（６０ｍｌ）で希釈し、水（３０ｍｌ×３）、飽和食塩水（３０ｍｌ）で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残分をエタノールとジエチルエーテルの混合溶媒で洗浄することにより、標記化合物（０．３５ｇ）を固体として得た。

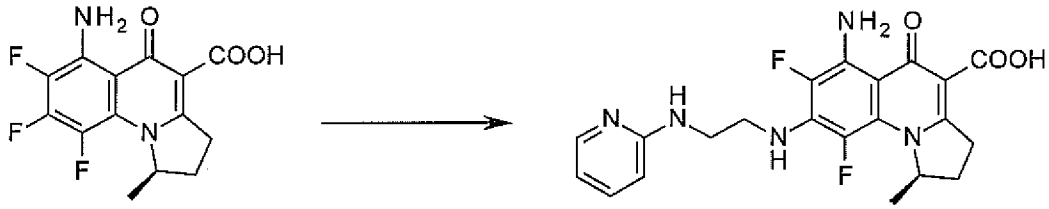
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.41 (3H, d, J = 6.3 Hz), 2.04-2.13 (1H, m), 2.35-2.48 (1H, m), 3.45-3.58 (1H, m), 4.08 (1H, dd, J = 20.0, 9.5 Hz), 5.31-5.41 (1H, m), 6.81 (2H, br s).

（工程８）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－８－｛［２－（ピリジン－２－イルアミノ）エチル］アミノ｝－１，２，３，

５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0164] [化44]



[0165] （１Ｒ）－６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（１００ｍｇ、０．３２ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド（３ｍｌ）溶液に、２－（２－ピリジルアミノ）エチルアミン２塩酸塩（０．２ｇ、０．９６ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（０．２７ｍＬ，１．９ｍｍｏｌ）を加え、混合物を窒素雰囲気下１００℃で１５時間攪拌した。反応液に氷水を加え、酢酸エチル（４０ｍｌ×３）で抽出した。抽出液を水 （４０ｍｌ×３）、飽和食塩水（４０ｍｌ）で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残分を分取用薄層シリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝２０：１）で精製した。得られた残分を酢酸エチルおよびｎ－ヘキサンの混合溶媒で固化することにより、標記化合物（２５ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.34 (3H, d, J = 6.3 Hz), 2.00 (1H, dd, J = 12.7, 9.0 Hz), 2.27-2.40 (1H, m), 3.38-3.50 (1H, m), 3.70 (2H, br s), 3.77 (2H, br s), 4.02 (1H, dd, J = 19.7, 9.6 Hz), 4.69 (1H, s), 5.28 (1H, br s), 6.06 (1H, s), 6.44 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.48 (2H, br s), 6.63 (1H, dd, J = 6.8, 5.1 Hz), 7.41 (1H, td, J = 7.3, 2.2 Hz), 8.12 (1H, d, J = 3.9 Hz).

MS (FAB) : 430 $(M+H)^+$.

実施例１３

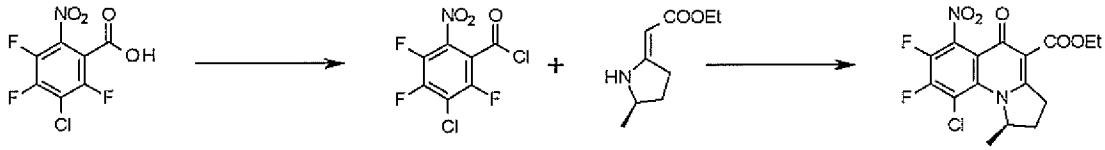
（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピ

ペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（１Ｒ）－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0166] [化45]



[0167] ３－クロロ－２，４，５－トリフルオロ－６－ニトロ－安息香酸（３９ｇ、１５３ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（３００ｍｌ）に懸濁し、オキサリルクロリド（４０ｍｌ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２滴）を加えた後、１７時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残留物にトルエンを加え、再度減圧濃縮した。再度トルエンを加え、溶媒を減圧留去した。

残留物をトルエン（４００ｍｌ）に溶解し、実施例１２の工程３で得られた２－［（５Ｒ）－５－メチルピロリジン－２－イリデン］酢酸　エチルエステル（２６ｇ、１５４ｍｍｏｌ)のトルエン（４０ｍｌ）溶液を氷冷下滴下した。反応混合物を室温にて１時間攪拌した後、飽和重曹水にあけ、酢酸エチルで抽出した。水層を酢酸エチルで抽出した後、有機層を合わせ、硫酸マグネシウムで乾燥、溶媒を減圧留去した。残留物をアセトン（３００ｍｌ）に溶解し、炭酸カリウム（２６ｇ）を加え、１２時間時間加熱還流した。１Ｍ塩酸で弱酸性とし、クロロホルムで抽出、飽和食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：酢酸エチル＝１０：０→９：１）で精製し、標記化合物（３４．６ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.35-1.39 (6H, m), 2.01-2.08 (1H, m), 2.41-2.51 (1H

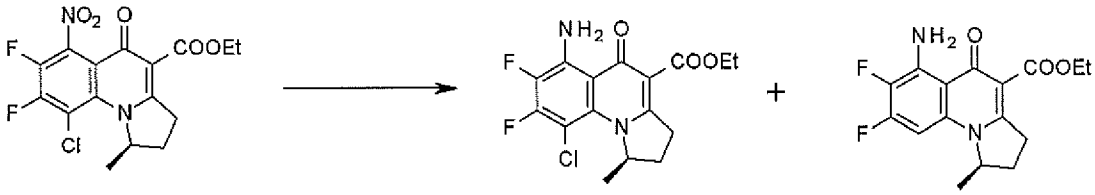
, m), 3.37-3.53 (2H, m), 4.34-4.39 (2H, m), 6.17-6.25 (1H, m).

（工程２）

（１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

（１Ｒ）－６－アミノ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0168] [化46]



[0169] （１Ｒ）－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（３４．６ｇ、８９．５４ｍｍｏｌ）をジクロロエタン（２００ｍｌ）－エタノール（２００ｍｌ）の混合溶媒に溶解し、１０％パラジウム炭素触媒（ＡＤ，ｗｅｔ，７．６ｇ）を加え、水素雰囲気下、１６時間攪拌した。触媒を濾去後、溶媒を減圧留去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：酢酸エチル＝４：１）で精製し、クロロ体標記化合物（２２．１ｇ）を固体として得た。

また、クロロが還元された化合物（１．１５ｇ）も、固体（不純物との混合物）として得た。この化合物は、これ以上精製せずに次の工程に進めた。

９－Ｃｌ体

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.29 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.39 (3H, t, J= 7.1 Hz), 1.90-1.97 (1H, m), 2.33-2.43 (1H, m), 3.31-3.37 (2H, m), 4.39 (2H, q, J = 7.2 Hz), 6.14-6.22 (1H, m).

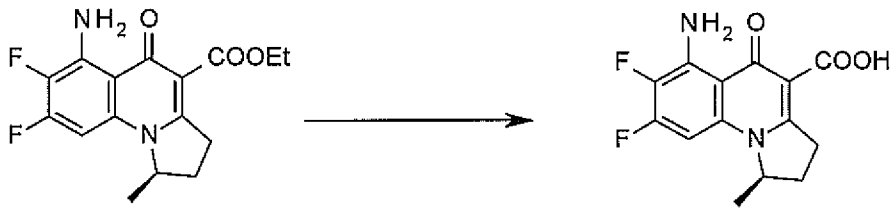
９－Ｈ体

機器データなし

（工程３）

（１Ｒ）－６－アミノ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0170] [化47]



[0171] （１Ｒ）－６－アミノ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（１．１５ｇ）をテトラヒドロフラン（１０ｍｌ）－エタノール（５ｍｌ）に溶解し、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（７．１ｍｌ）を加え、１８時間攪拌した。酢酸（０．８２ｍｌ）を加え、攪拌後、不溶物を濾取、水洗、乾燥し、標記化合物（１．０５ｇ）を固体として得た。

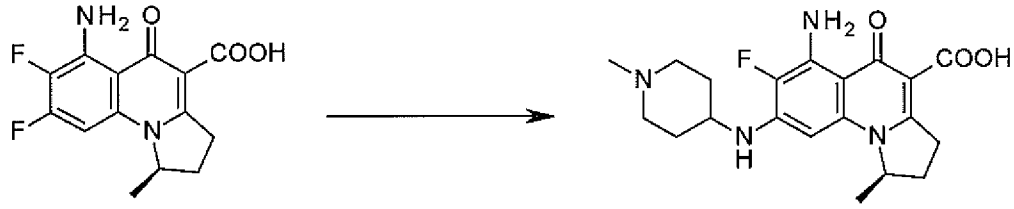
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.32 (3H, d, J = 6.4 Hz), 2.00 (1H, dd, J = 12.4, 8.7 Hz), 2.30-2.42 (1H, m), 3.47-3.57 (1H, m), 3.83 (1H, dd, J = 19.3, 8.7 Hz), 5.01-5.10 (1H, m), 6.97 (1H, dd, J= 12.4, 6.4 Hz), 7.81 (1H, br s).

（工程４）

（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0172]

[化48]



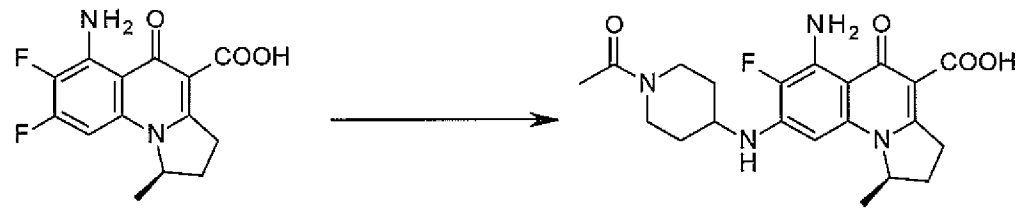
[0173] （１Ｒ）－６－アミノ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（３００ｍｇ、０．８８ｍｍｏｌ）、１－メチルーピペリジン－４－イルアミン（３５０ｍｇ）にジメチルスルホキシド（４ｍｌ）を加え、１００℃で３時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却後、溶媒を減圧留去した。残留物をＮＨシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール＝１０：０～８：２）で精製し、標記化合物（２５４ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.43 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.59-1.83 (2H, m), 2.02-2.11 (3H, m), 2.17-2.24 (2H, m), 2.33 (3H, s), 2.36-2.45 (1H, m), 2.77-2.87 (2H, m), 3.33-3.43 (1H, m), 3.46-3.58 (1H, m), 4.06 (1H, dd, J= 19.5, 9.4 Hz), 4.40-4.46 (1H, m), 4.76-4.84 (1H, m), 5.75 (1H, d, J = 6.4 Hz), 6.51 (2H, br s).

実施例１４

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0174] [化49]



[0175] 実施例１３の工程３で得られた（１Ｒ）－６－アミノ－７，８－ジフルオロ

－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（３００ｍｇ、０．８８ｍｍｏｌ）、１－アセチル－ピペリジン－４－イルアミン（４４０ｍｇ）にジメチルスルホキシド（４ｍｌ）を加え、１００℃で３時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却後、溶媒を減圧留去した。残留物をクロロホルム－飽和重曹水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール＝１０：０→９：１）で精製し、標記化合物（２９２ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.44 (3H, d, J = 6.9 Hz), 1.48-1.55 (2H, m), 2.05-2.17 (6H, m), 2.36-2.46 (1H, m), 2.92-2.99 (1H, m), 3.24-3.32 (1H, m), 3.48-3.65 (2H, m), 3.82-3.90 (1H, m), 4.03-4.11 (1H, m), 4.39-4.42 (1H, m), 4.45-4.52 (1H, m), 4.78-4.85 (1H, m), 5.77 (1H, d, J = 6.4 Hz), 6.54 (2H, br s).

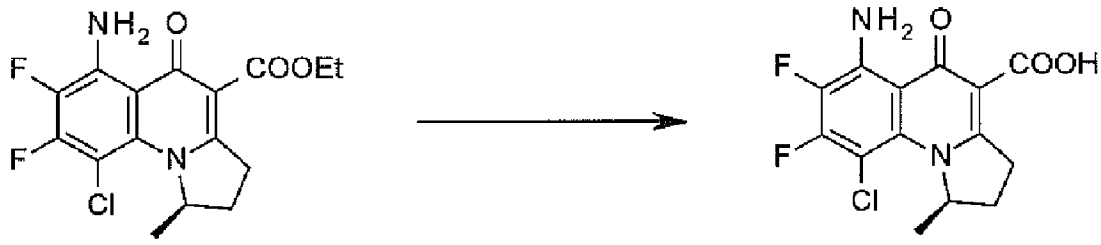
実施例１５

（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

（工程１）

（１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0176] [化50]



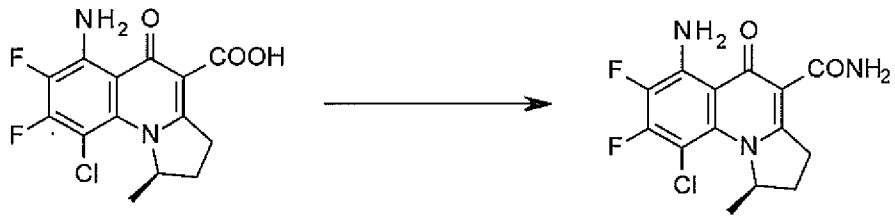
[0177] 実施例１３の工程２で得られた（１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（４．９ｇ、１３．７ｍｍｏｌ）にエタノール（５０ｍｌ）を加え、６０℃に加熱して均一溶液とした。同温にて１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（４１ｍｌ）を加え、１．５時間攪拌後、酢酸（３．２ｍｌ）を加え、室温まで冷却した。析出物を濾取、水洗、エーテル洗後、乾燥し、標記化合物（４．５ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.33 (3H, d, J = 6.9 Hz), 1.99-2.07 (1H, m), 2.38-2.49 (1H, m), 3.50-3.61 (1H, m), 4.01-4.10 (1H, m), 6.30-6.38 (1H, m).

（工程２）

（１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0178] [化51]



[0179] （１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（７．３ｇ、２２．２ｍｍｏｌ）、塩化アンモニウム（２３．８ｇ、４４４ｍｍｏｌ）に塩化メチレン（２００ｍｌ）を加え、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（１２．１ｇ、２３．３ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（９３ｍｌ）を加え、１８時間攪拌した。反応混合物を塩化メチレンで希釈し、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留

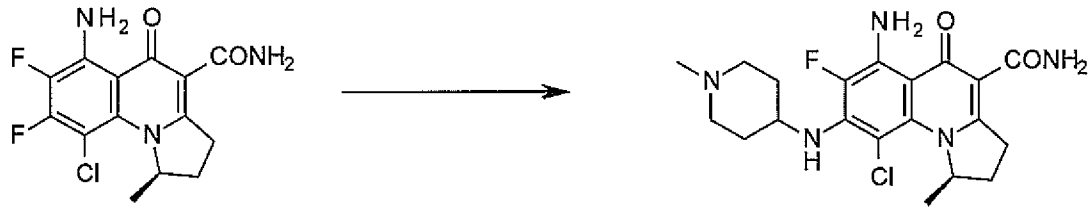
去した。残留物にメタノールを加え、不溶物を濾取、乾燥し、標記化合物（３．５４ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.28 (3H, d, J = 6.6 Hz), 1.91-1.97 (1H, m), 2.32-2.43 (1H, m), 3.51-3.61 (1H, m), 4.00 (1H, ddd, J = 19.6, 9.8, 2.6 Hz), 5.59 (1H, br s), 6.19-6.23 (1H, m), 9.72 (1H, s).

（工程３）

（１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0180] [化52]



[0181] （１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド（５００ｍｇ、１．５３ｍｍｏｌ）、１－メチルピペリジン－４－イルアミン（７６５μｌ）にジメチルスルホキシド（５ｍｌ）を加え、１１０℃で２．５時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却後、溶媒を減圧留去した。残留物を塩化メチレン－飽和重曹水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をＮＨシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：酢酸エチル＝１０：０～９：１）で精製し、標記化合物（３２０ｍｇ）を固体として得た。

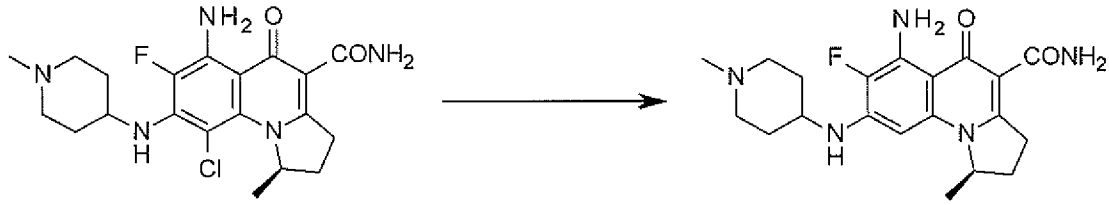
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.16 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.48-1.65 (2H, m), 1.80-1.88 (2H, m), 1.98-2.03 (1H, m), 2.07-2.20 (3H, m), 2.30 (3H, s), 2.34-2.44 (1H, m), 2.75-2.84 (2H, m), 3.14-3.19 (1H, m), 3.58 (1H, dt, J= 19.3, 8.7 Hz), 3.73-3.80 (1H, m), 3.86 (1H, dq, J = 19.0, 4.8 Hz), 4

.50 (1H, d, J = 7.8 Hz), 5.51-5.55 (1H, m), 6.04-6.12 (1H, m), 6.72-7.20 (1H, m), 9.85-9.94 (1H, m).

（工程４）

（１Ｒ）－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0182] [化53]



[0183] （１Ｒ）－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド（２００ｍｇ、０．４７ｍｍｏｌ）をメタノール（５ｍｌ）－テトラヒドロフラン（５ｍｌ）に溶解し、１０％パラジウム炭素触媒（ＡＤ，ｗｅｔ，２００ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、２０時間攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を減圧留去し、残留物をＮＨシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝１９：１）で精製し、標記化合物（１２４ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.40 (4H, d, J = 6.4 Hz), 2.00 (1H, dd, J = 12.6, 8.5 Hz), 2.04-2.11 (2H, m), 2.16-2.24 (2H, m), 2.27-2.37 (5H, m), 2.78-2.85 (2H, m), 3.32-3.41 (1H, m), 3.48-3.58 (1H, m), 4.05 (1H, dd, J = 19.2, 9.2 Hz), 4.26-4.32 (1H, m), 4.68-4.75 (1H, m), 5.47-5.54 (1H, m), 5.71 (1H, d, J = 6.9 Hz), 6.71 (2H, br s), 10.09-10.17 (1H, m).

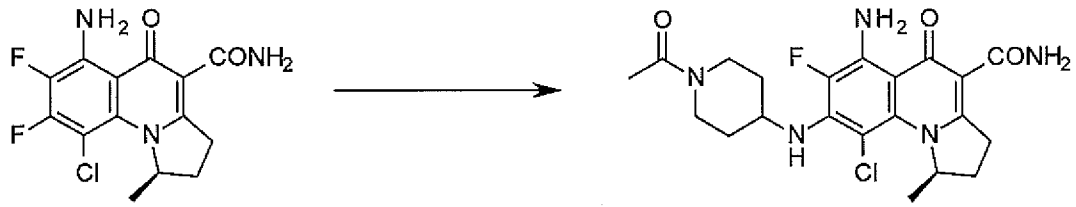
実施例１６

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

（工程１）

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0184] [化54]



[0185] 実施例１５の工程２で得られた化合物（２５０ｍｇ，０．７６ｍｍｏｌ）、１－アセチル－ピペリジン－４－イルアミン（４３０ｍｇ）にジメチルスルホキシド（１．５ｍｌ）を加え、１１０℃で４時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール＝１０：０～９：１）で精製し、標記化合物（２３２ｍｇ）を固体として得た。

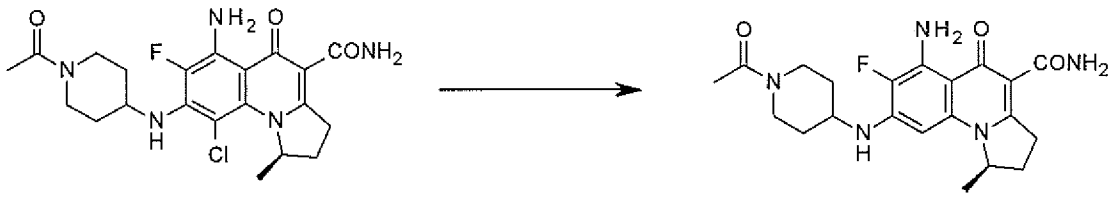
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.16 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.35-1.50 (2H, m), 1.80-1.87 (2H, m), 2.03-2.20 (4H, m), 2.35-2.44 (1H, m), 2.79-2.90 (1H, m), 3.14-3.25 (2H, m), 3.53-3.63 (1H, m), 3.77-3.91 (2H, m), 3.93-4.02 (1H, m), 4.44-4.55 (2H, m), 5.50-5.55 (1H, m), 6.02-6.11 (1H, m), 6.80-7.18 (1H, m), 9.81-9.90 (1H, m).

（工程２）

（１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒ

ドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0186] [化55]



[0187] （１Ｒ）－８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１－メチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド（２３０ｍｇ、０．５１ｍｍｏｌ）をメタノール（５ｍｌ）－テトラヒドロフラン（５ｍｌ）に溶解し、１０％パラジウム炭素触媒（ＡＤ，ｗｅｔ，２７２ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、６時間攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を減圧留去し、残留物をクロロホルム－飽和重曹水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、標記化合物（１４９ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.41 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.45-1.56 (2H, m), 1.98-2.04 (1H, m), 2.08-2.17 (5H, m), 2.27-2.36 (1H, m), 2.92-3.01 (1H, m), 3.24-3.31 (1H, m), 3.49-3.62 (2H, m), 3.82-3.88 (1H, m), 4.01-4.10 (1H, m), 4.26-4.30 (1H, m), 4.42-4.51 (1H, m), 4.68-4.78 (1H, m), 5.49-5.56 (1H, m), 5.72 (1H, d, J = 6.9 Hz), 6.75 (2H, br s), 10.08-10.12 (1H, m).

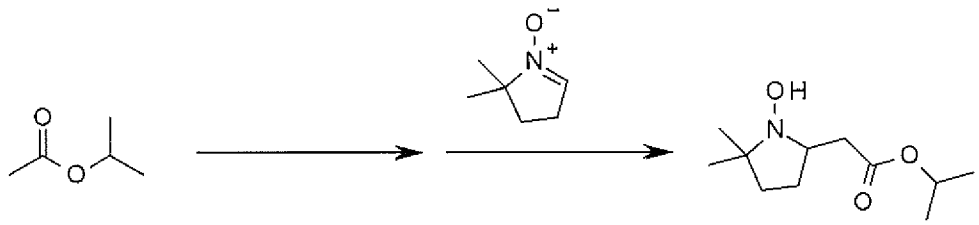
実施例１７

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（１－ヒドロキシー５，５－ジメチルピロリジン－２－イル）アセテート　イソプロピルエステル

[0188] [化56]



[0189] テトラヒドロフラン（３００ｍｌ）に１．１４Ｍ　リチウムジイソプロピルアミド／ｎ－ヘキサン－テトラヒドロフラン溶液（９５ｍｌ）をアルゴン雰囲気下加え、これを-78℃に冷却した。酢酸イソプロピル（１１．５ｍｌ）を同温にて滴下し、滴下終了後２０分間攪拌した。これに５，５－ジメチル－１－ピロリン　Ｎ－オキシド（９．０ｇ、７８ｍｍｏｌ)のテトラヒドロフラン（５０ｍｌ）溶液を同温にて滴下し、滴下後１．５時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応をクエンチ後、酢酸エチル－飽和食塩水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（ｎ－ヘキサン：酢酸エチル＝９：１－６：４）で精製し、標記化合物（１４．３ｇ）を油状物として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.04 (3H, s), 1.17 (3H, s), 1.23 (6H, d, J = 6.4 Hz), 1.36-1.46 (1H, m), 1.51-1.64 (1H, m), 1.93-2.01 (1H, m), 2.38 (1H, dd, J = 14.7, 7.8 Hz), 2.68 (1H, dd, J = 14.7, 5.0 Hz), 3.29-3.37 (1H, m), 4.82 (1H, br s), 4.97-5.07 (1H, m).

（工程２）

（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）エタノエート　イソプロピルエステル

[0190]

[化57]



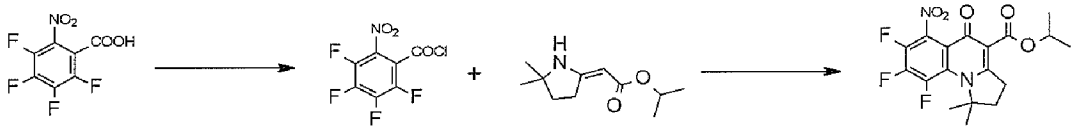
[0191] （１－ヒドロキシー５，５－ジメチルピロリジン－２－イル）アセテートイソプロピルエステル（１４，３ｇ、６６ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（２００ｍｌ）に溶解し、トリフェニルフォスフィン（２６ｇ、１００ｍｍｏｌ）、四塩化炭素（９．６ｍｌ、１００ｍｍｏｌ）、及びトリエチルアミン（１４ｍｌ）を加え、３時間加熱還流した。反応混合物を放冷後、溶媒を減圧留去し、残留物に酢酸エチルを加え、不溶物を濾去し（２回）、濾液をシリカゲルクロマトグラフィー（ｎ－ヘキサン：酢酸エチル＝１０：０－８：２）で精製し、標記化合物（１１．５ｇ）を油状物として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.23 (6H, d, J = 6.3 Hz), 1.28 (6H, s), 1.78 (2H, t, J = 7.7 Hz), 2.63-2.67 (2H, m), 4.41 (1H, s), 4.95-5.04 (1H, m), 7.84 (1H, br s).

（工程３）

７，８，９－トリフルオロー１，１－ジメチルー６－ニトロー５－オキソー１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　イソプロピルエステル

[0192] [化58]



[0193] ２，３，４，５－テトラフルオロ－６－ニトロー安息香酸（１０ｇ、４２ｍｍｏｌ)を塩化メチレン（１５０ｍｌ）に懸濁し、オキサリルクロリド（１１ｍｌ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２滴）を加えた後、２４時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、残留物にトルエンを加え、再度減圧濃縮し

た。

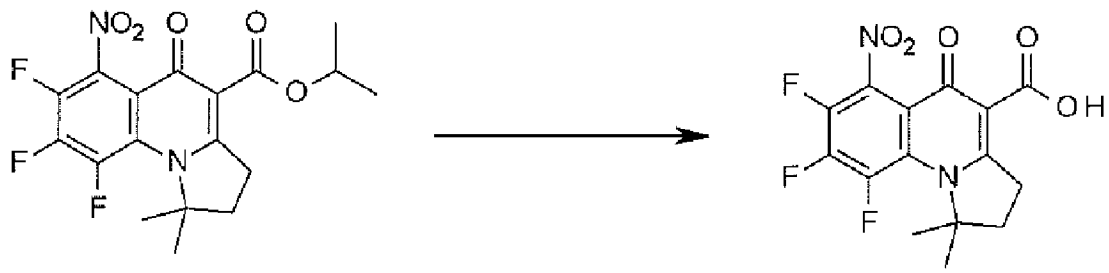
残留物をトルエン（１００ｍｌ）に溶解し、（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）エタノエート　イソプロピルエステル（７．１ｇ、３６ｍｍｏｌ)のトルエン（４０ｍｌ）溶液を滴下した。反応混合物を室温にて２時間攪拌した後、飽和重曹水にあけ、酢酸エチルで抽出した。水層を酢酸エチルで抽出した後、有機層を合わせ、硫酸マグネシウムで乾燥、溶媒を減圧留去した。残留物をアセトン（１００ｍｌ）に溶解し、炭酸カリウム（６．６ｇ）を加え、１８時間加熱還流した。氷冷下、１Ｍ塩酸で弱酸性とし、酢酸エチルで抽出した。不溶物を含む水層を塩化メチレンで抽出し、有機層を合わせ、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール＝１０：0-１９：１）で精製し、標記化合物（１１．２ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.35 (6H, d, J = 6.0 Hz), 1.77 (6H, d, J = 4.1 Hz), 2.27 (2H, t, J = 7.6 Hz), 3.30 (2H, t, J = 7.6 Hz), 5.15-5.25 (1H, m).

（工程４）

７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0194] [化59]



[0195] ７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボ

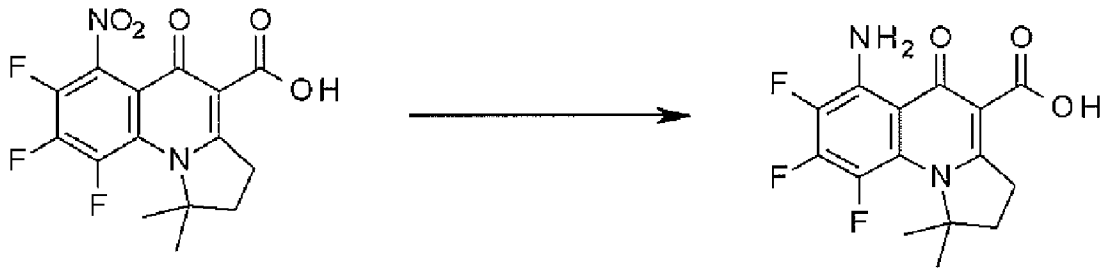
ン酸　イソプロピルエステル（１．９ｇ、４．８ｍｍｏｌ）に酢酸（１５ｍｌ）、濃塩酸（１５ｍｌ）を加え、８０℃で１．５時間攪拌した。反応混合物に氷水を加え、析出物を濾取、乾燥し、標記化合物（１．９ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.84 (6H, d, J = 3.7 Hz), 2.34 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.87 (2H, t, J = 7.6 Hz).

（工程５）

６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0196] [化60]



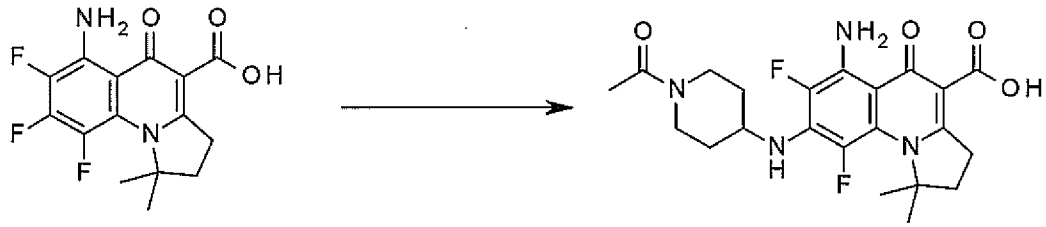
[0197] ７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（６．９ｇ、１９．４ｍｍｏｌ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２５０ｍｌ）に溶解し、５％パラジウム炭素触媒（Ｍ、ｗｅｔ、８２０ｍｇ）を加え、水素雰囲気下２０時間攪拌した。触媒をセライト濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物を塩化メチレンに懸濁し、不溶物を濾取、乾燥し、標記化合物（３．６ｇ）を固体として得た。また、母液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝１９：１）で精製し、標記化合物（７６２ｍｇ）を固体として別途得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.67 (7H, d, J = 3.7 Hz), 2.20 (2H, t, J= 7.6 Hz), 3.61 (2H, t, J = 7.6 Hz), 7.80 (2H, br s).

（工程６）

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0198] [化61]



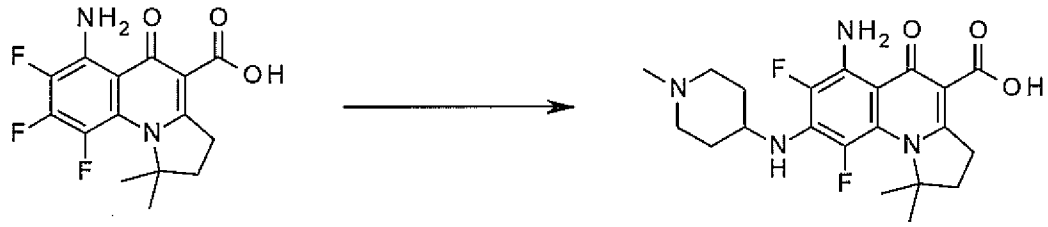
[0199] ６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（１．６ｇ、４．９ｍｍｏｌ）、１－（４－アミノ－ピペリジン－１－イル）エタノン（１．５３ｇ、１０．８ｍｍｏｌ）にジメチルスルホキシド（２０ｍｌ）を加え、１００℃で１時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール＝１０：０－９：１） で精製し、目的画分を濃縮した。残留物にメタノール、ジメチルエーテルを加え、析出物を濾取、乾燥し、標記化合物（２．０９ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.35-1.46 (2H, m), 1.70 (3H, s), 1.71 (3H, s), 2.07-2.12 (1H, m), 2.12 (3H, s), 2.18 (2H, t, J = 7.8 Hz), 2.74-2.84 (1H, m), 3.16-3.26 (1H, m), 3.71 (2H, t, J = 7.6 Hz), 3.81-4.06 (3H, m), 4.60 (1H, d, J = 13.7 Hz), 6.62 (2H, br s).

実施例１８

６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0200] [化62]



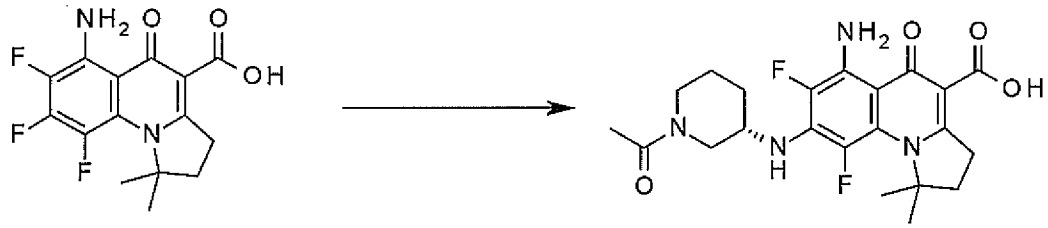
[0201] 実施例１７の工程５で得られた化合物（９２５ｍｇ、２．８４ｍｍｏｌ）に１－メチル－ピペリジン－４－イルアミン（１．４ｍｌ）、ジメチルスルホキシド（１５ｍｌ）を加え、１００℃で１時間攪拌した。反応混合物を放冷後、溶媒を減圧留去し、残留物をＮＨシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール＝１０：０－８：２）で精製し、標記化合物（１．３ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.50-1.61 (2H, m), 1.70 (3H, s), 1.71 (3H, s), 2.05-2.19 (6H, m), 2.31 (3H, s), 2.77-2.88 (2H, m), 3.67-3.78 (3H, m), 4.03-4.10 (0H, m), 6.59 (2H, s).

実施例１９

８－｛［（３Ｓ）－１－アセチルピペリジン－３－イル］アミノ｝－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0202] [化63]



[0203] 実施例１７の工程５で得られた化合物（１３５ｍｇ）および１－アセチル－３－アミノピペリジン（１８０ｍｇ）のジメチルスルホキシド（２．０ｍｌ）溶液に、ジイソプロピルエチルアミン（２１１μＬ）を加え、１００℃で４時間攪拌した。反応液に、飽和塩化ナトリウム水溶液、水を加え、酢酸エ

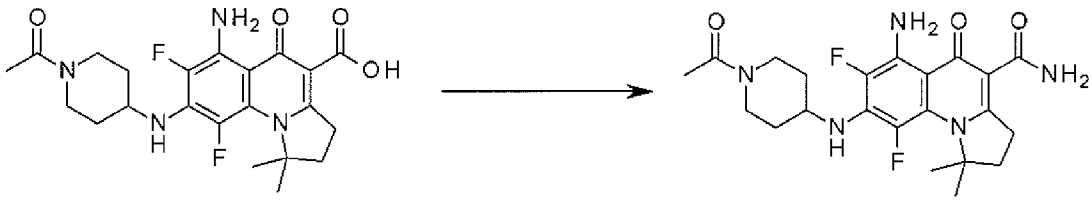
チルおよびジクロロメタンで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラム（ジクロロメタン：メタノール＝５０：１）で精製後、酢酸エチルを加え洗浄し、標記化合物（１３８ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.56-1.88 (9H, m), 2.05-2.23 (6H, m), 3.19-3.40 (2H, m), 3.50-3.59 (0.5H, m), 3.64-3.76 (2H, m), 3.81-3.98 (2H, m), 4.09-4.27 (1.5H, m), 6.48-6.78 (2H, br).

実施例２０

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0204] [化64]



[0205] 実施例１７の工程６で得られた化合物（１．９８ｇ、４．４２ｍｍｏｌ）、塩化アンモニウム（４．７２ｇ、８８．３ｍｍｏｌ）に塩化メチレン（８０ｍｌ）を加え、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（２．８ｇ、５．３ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１８．５ｍｌ）を加え、７時間攪拌した。反応混合物をクロロホルムで希釈し、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液、水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残留物に酢酸エチルを加え、析出物を濾取、乾燥し、標記化合物（１．４６ｇ）を固体として得た。

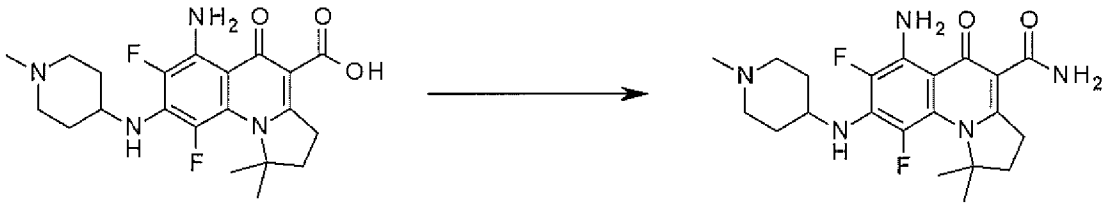
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.33-1.45 (2H, m), 1.66 (3H, s), 1.67 (3H, s), 2.07-2.17 (6H, m), 2.75-2.83 (1H, m), 3.15-3.23 (1H, m), 3.62 (2H, t, J = 7.3 Hz), 3.81-3.93 (3H, m), 4.54-4.62 (1H, m), 5.49-5.56 (1H, m), 6.

73 (2H, br s), 9.81 (1H, s).

実施例２１

６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0206] [化65]



[0207] 実施例１８で得られた化合物（１．１９ｇ、２．８ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（５０ｍｌ）に溶解し、塩化アンモニウム（３．０ｇ、５７ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１２ｍｌ）、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（１．６ｇ）を加え、２時間攪拌した。反応混合物を塩化メチレンで希釈後、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール＝１０：０－６：４）で精製し、標記化合物（３９２ｍｇ）を固体として得た。

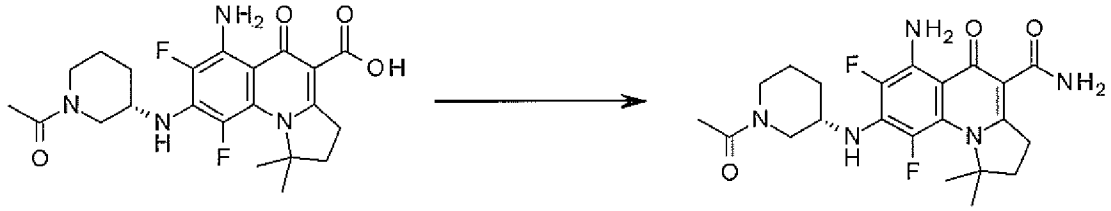
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.67 (3H, s), 1.67 (3H, s), 2.04-2.13 (4H, m), 2.18-2.27 (2H, m), 2.36 (3H, s), 2.85-2.94 (2H, m), 3.62 (2H, t, J = 7.6 Hz), 3.67-3.76 (1H, m), 3.88-3.95 (1H, m), 5.48-5.54 (1H, m), 6.62-6.80 (2H, m), 9.81-9.85 (1H, m).

実施例２２

８－｛［（３Ｓ）－１－アセチルピペリジン－３－イル］アミノ｝－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，

５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0208] [化66]



[0209] 実施例１９で得られた化合物（７０ｍｇ）のジクロロメタン（１．５ｍｌ）溶液に、１－ヒドロキシベンズトリアゾール（２２ｍｇ）、２Ｍアンモニアメタノール溶液（３５０μＬ）、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド　塩酸塩（３９ｍｇ）を加え、室温で３日間攪拌した。反応液に、ジクロロメタン（３．０ｍｌ）、２Ｍアンモニアメタノール溶液（３００μｌ）、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド　塩酸塩（４０ｍｇ）を追加し、室温で４時間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈後、１０％クエン酸水を加えた。ジクロロメタンで抽出し、合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下濃縮後、残渣に酢酸エチルを加え、洗浄、濾取した。薄層クロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝２０：１）で精製し、標記化合物（２０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.53-1.72 (9.5H, m), 2.00-2.20 (5.5H, m), 3.15-3.38 (2H, m), 3.49-3.68 (2H, m), 3.77-3.95 (2.25H, m), 3.98-4.25 (1.25H, m), 5.50-5.65 (1H, m), 6.57-6.94 (2H, br), 9.70-9.93 (1H, m).

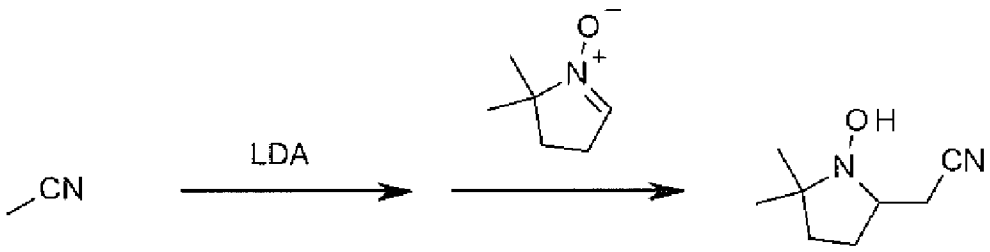
実施例２３

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル

（工程１）

（１－ヒドロキシー５，５－ジメチルピロリジン－２－イル）アセトニトリル

[0210] [化67]



[0211] アセトニトリル（２．２ｍｌ、４２．４ｍｍｏｌ)のテトラヒドロフラン（２０ｍｌ）溶液に１．１４Ｍリチウムジイソプロピルアミド／ｎ－ヘキサン－テトラヒドロフラン溶液（３７．２ｍｌ、４２．４ｍｍｏｌ）を－７８℃にて滴下後、１０分間攪拌した。反応混合物に５，５－ジメチル－１－ピロリン　Ｎ－オキシド（４．０ｇ、３５．３ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（５ｍｌ）溶液を－７８℃にて加えた。反応混合物を－７８℃にて４５分間攪拌し、水を加え、室温に戻した。反応混合溶液に水を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残留物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（３５％酢酸エチル／ｎ－ヘキサン）にて精製し、標記化合物（３．４８ｇ）を油状物として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.04 (3H, s), 1.18 (3H, s), 1.47-1.68 (3H, m), 1.96-2.08 (1H, m), 2.59 (2H, d, J = 5.5 Hz), 3.17-3.26 (1H, m), 4.50 (1H, br s).

（工程２）

（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）エタンニトリル

[0212]

[化68]



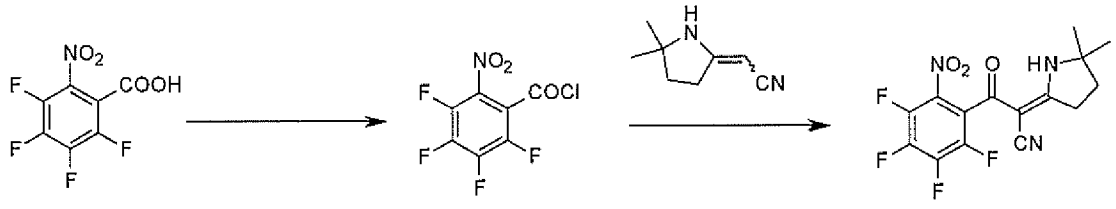
[0213] （１－ヒドロキシー５，５－ジメチルピロリジン－２－イル）アセトニトリル（３．４８ｇ、２２．６ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１２．６ｍｌ、９０２ｍｍｏｌ）の塩化メチレン（４０ｍｌ）溶液に氷冷にてメタンスルホニルクロリド（２．１ｍｌ、２７．１ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を１時間加熱還流し、室温に戻した。反応混合物を減圧濃縮した。残留物に水、酢酸エチルを加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、ろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残留物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（３０％酢酸エチル／ｎ－ヘキサン)にて精製し、標記化合物（１．８６ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.22-1.32 (6H, m), 1.82-1.89 (2H, m), 2.61-2.67 (1H, m), 2.83-2.89 (1H, m), 3.61-3.63(0.5H, m), 3.87-3.90 (0.5H, m), 4.83 (0.5H, brs), 5.18 (0.5H, br s).

（工程３）

２－（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）－３－オキソ－３－（２，３，４，５－テトラフルオロ－６－ニトロフェニル）プロパンニトリル

[0214] [化69]



[0215] ２，３，４，５－テトラフルオロ－６－ニトロ安息香酸（１．５ｇ、６．３４ｍｍｏｌ）の塩化メチレン（３０ｍｌ）懸濁液にオキサリルクロリド（１．１ｍｌ、１２．７ｍｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２滴）を

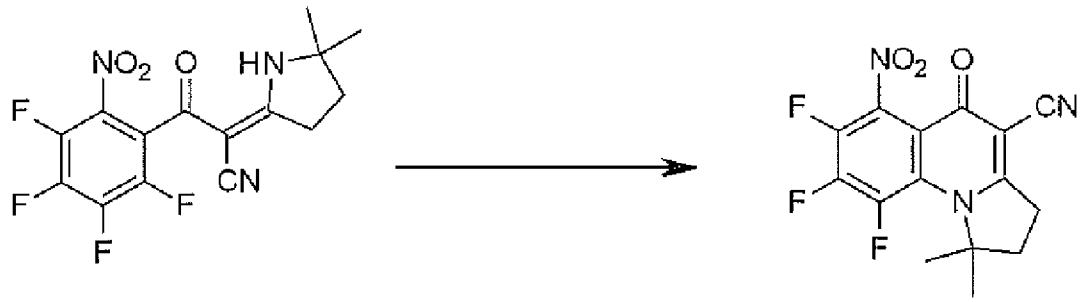
加え、室温にて４．５時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した。残留物にトルエン（３０ｍｌ）を加え、氷冷し、トリエチルアミン（１．３ｍｌ、９．５２ｍｍｏｌ）、（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）エタンニトリル（８６４ｍｇ、６．３４ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を氷冷にて１時間攪拌後、室温にて１時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残留物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム)にて精製し、標記化合物（１．８１ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.56 (6H, s), 2.06 (2H, t, J = 7.7 Hz), 3.14 (2H, t, J = 7.7 Hz), 10.24 (1H, br s).

（工程４）

７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル

[0216] [化70]



[0217] ２－（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）－３－オキソ－３－（２，３，４，５－テトラフルオロ－６－ニトロフェニル）プロパンニトリル（２．１１ｇ、５．９１ｍｍｏｌ）にアセトン（４０ｍｌ）、炭酸カリウム（１．０６ｇ、７．６８ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を室温にて一晩攪拌し、減圧濃縮した。残留物に水を加え、クロロホルムにて抽出した。有機層を減圧濃縮し、固体を得た。得られた固体にヘキサン/酢酸エチル=2/1を

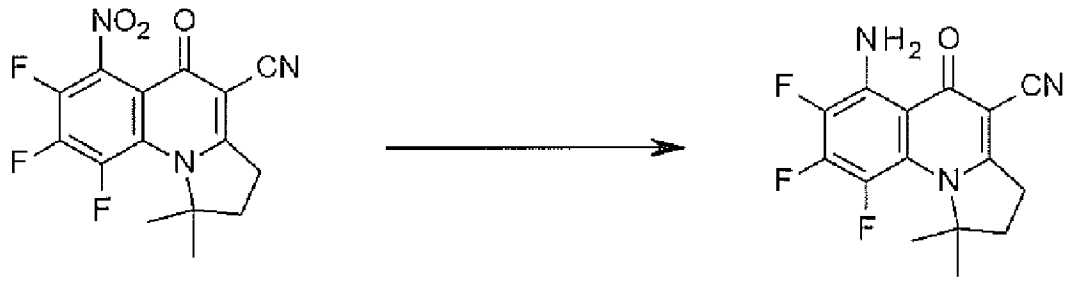
加え、ろ取し、標記化合物（１．９１ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.83 (3H, s), 1.84 (3H, s), 2.44 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.42 (2H, t, J = 7.8 Hz).

（工程５）

６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル

[0218] [化71]



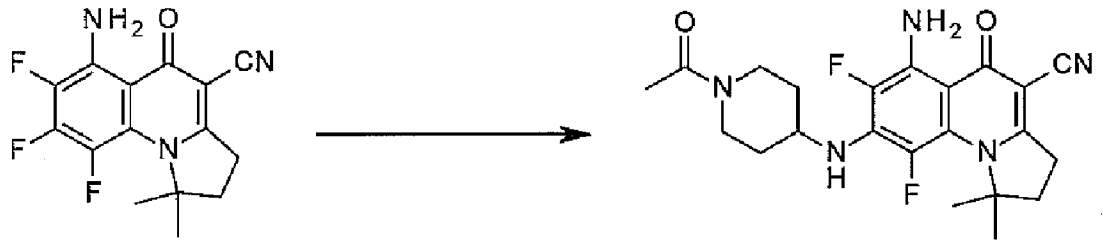
[0219] ７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル（３０２ｍｇ、０．９０ｍｍｏｌ）にＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（５ｍｌ）、メタノール（５ｍｌ）、水（５ｍｌ）、亜ジチオン酸ナトリウム（６２３ｍｇ、２．６９ｍｍｏｌ）を加え、７０－７５℃にて３時間攪拌した。反応混合物を室温に戻し、水を加え、ろ取し、固体を得た。ろ液をクロロホルムにて抽出後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧濃縮し、固体を得た。得られた固体を合わせ、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（１％メタノール／クロロホルム)にて精製し、標記化合物（１９９ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.65 (3H, s), 1.66 (3H, s), 2.25 (2H, t, J = 7.3 Hz), 3.28 (2H, t, J = 7.3 Hz), 7.89 (2H, br s).

（工程６）

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル

[0220] [化72]



[0221] ６－アミノ－７，８，９－トリフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル（５０ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）１－（４－アミノピペリジン－１－イル）エタノン（６９ｍｇ、０．４９ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド（２ｍｌ）溶液を８０℃にて４．５時間攪拌した。反応混合物を室温に戻し、減圧濃縮した。残留物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（３５％酢酸エチル／クロロホルム→３％メタノール／クロロホルム)にて精製し、固体を得た。得られた固体にエタノールを加え、ろ取し、標記化合物（５７ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.30-1.45 (2H, m), 1.69 (3H, s), 1.70 (3H, s), 2.06-2.18 (5H, m), 2.23 (2H, t, J= 7.6 Hz), 2.73-2.83 (1H, m), 3.15-3.27 (3H, m), 3.80-3.96 (3H, m), 4.54-4.62 (1H, m), 6.76 (2H, br s).

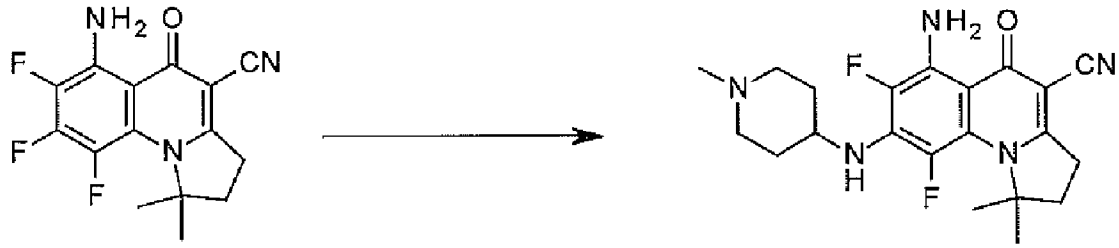
MS (m/z): 430 (M+H).

実施例２４

６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル

[0222]

[化73]



[0223] 実施例２３の工程５で得られた化合物（５９ｍｇ、０．１９ｍｍｏｌ）、４－アミノ－１－メチルピペリジン（６６ｍｇ、０．５８ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド（２ｍｌ）溶液を８０℃にて３時間攪拌した。反応混合物を室温に戻し、減圧濃縮した。残留物を分取用薄層クロマトグラフィー（１５％メタノール／クロロホルム展開）にて精製し、固体を得た。得られた固体をフラッシュＮＨシリカゲルカラムクロマトグラフィー（４０％酢酸エチル／クロロホルム）にて精製し、固体を得た。得られた固体にエタノールを加え、ろ取し、標記化合物（５７ｍｇ、７４％）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.47-1.58 (2H, m), 1.69 (3H, s), 1.70 (3H, s), 2.00-2.18 (4H, m), 2.22 (2H, t, J= 7.6 Hz), 2.31 (3H, s), 2.77-2.86 (2H, m), 3.23 (2H, t, J = 7.6 Hz), 3.63-3.75 (1H, m), 3.90-3.99 (1H, m), 6.73 (2H, br s).

MS (m/z): 402 (M+H).

実施例２５

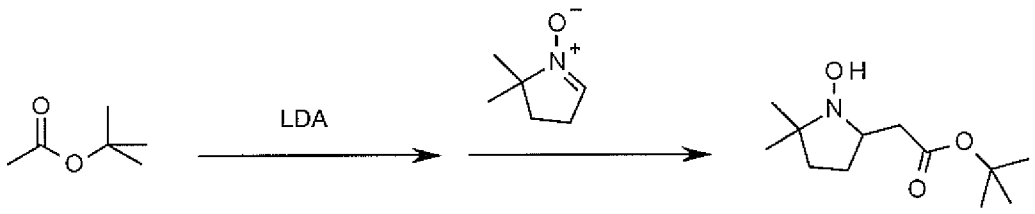
８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

（１－ヒドロキシ－５，５－ジメチルピロリジン－２－イル）酢酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル

[0224]

[化74]



[0225] テトラヒドロフラン（４００ｍｌ）に１．１Ｍリチウムジイソプロピルアミド（ｎ－ヘキサン－テトラヒドロフラン溶液、２００ｍｌ）を窒素雰囲気下加え、これを－７８℃に冷却した。酢酸ｔｅｒｔ－ブチル（２９ｍｌ）を同温にて滴下し、滴下終了後３０分間攪拌した。これに５，５－ジメチル－１－ピロリン　Ｎ－オキシド（２２．３ｇ、１９４ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（５０ｍｌ）溶液を同温にて滴下し、滴下後２時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、反応をクエンチ後、酢酸エチル－飽和食塩水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（ｎ－ヘキサン：酢酸エチル＝９：１－６：４）で精製し、標記化合物（４５．９ｇ）を油状物として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.04 (3H, s), 1.17 (3H, s), 1.36-1.43 (1H, m), 1.45 (9H, s), 1.52-1.60 (2H, m), 1.92-2.02 (1H, m), 2.32 (1H, dd, J = 14.4, 8.0 Hz), 2.63 (1H, dd, J = 14.7, 5.0 Hz), 3.26-3.35 (1H, m), 4.77 (1H, br s).

（工程２）

（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）エタノエート　ｔ－ブチルエステル

[0226] [化75]



[0227] （１－ヒドロキシ－５，５－ジメチルピロリジン－２－イル）酢酸　ｔｅｒ

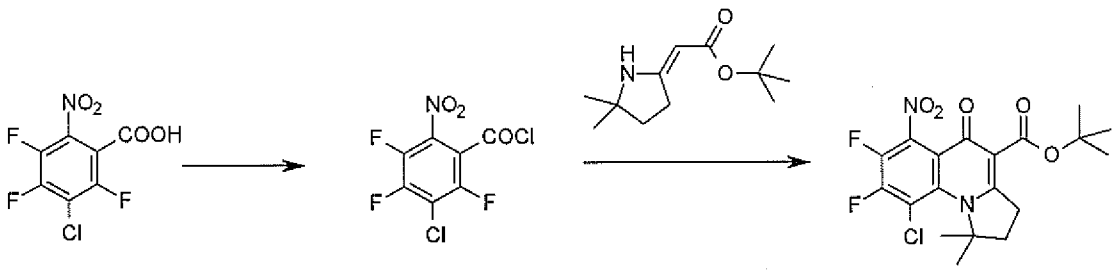
ｔ－ブチルエステル（４５．９ｇ、２００ｍｍｏｌ）を塩化メチレン（５００ｍｌ）に溶解し、トリフェニルフォスフィン（７５ｇ、２８６ｍｍｏｌ）、四塩化炭素（２２９ｍｌ、３００ｍｍｏｌ）、及びトリエチルアミン（４２ｍｌ）を加え、４時間加熱還流した。反応混合物を放冷後、溶媒を減圧留去し、残留物に酢酸エチルを加え、不溶物を濾去し(２回)、濾液をシリカゲルクロマトグラフィー（ｎ－ヘキサン：酢酸エチル＝４：１） で精製し、標記化合物（３０ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.28 (6H, s), 1.47 (9H, s), 1.76 (2H, t, J = 7.8 Hz), 2.61-2.65 (2H, m), 4.37 (1H, s), 7.74 (1H, br s).

（工程３）

９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル

[0228] [化76]



[0229] ３－クロロ－２，４，５－トリフルオロ－６－ニトロ－安息香酸（１０ｇ、３９．１ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（１５０ｍＬ）に溶解し、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドを５滴加え、室温にてオキサリルクロリド（３．５８ｍＬ、４１．１ｍｍｏｌ）を滴下した。２．５時間攪拌した後、減圧濃縮、トルエン共沸して残留物を油状物として得た。

エナミン（６．８９ｇ、３２．６ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン溶液（１５０ｍＬ）

に、上記残留物のテトラヒドロフラン溶液（１５０ｍＬ）を、氷冷下、滴下

した。室温にて３０分攪拌した後、氷冷下、反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０％酢酸エチル／ヘキサン→３０％）にて粗く精製し、油状物を得た。

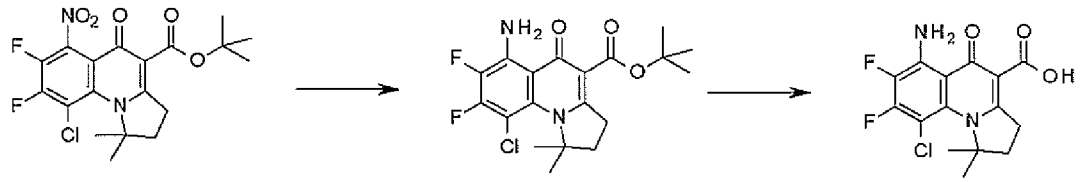
得られた油状物のテトラヒドロフラン（１５０ｍＬ）溶液に、氷冷下、水素化ナトリウム（５５％　ｉｎ　ｏｉｌ，１．４３ｇ，３５．８ｍｍｏｌ）を加えた。室温にて１．５時間攪拌した後、氷冷下、反応液に１０％クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。得られた固体をエタノールで洗浄し、ろ取することで標記化合物（１０．１９ｇ）を乳白色固体として得た。また、ろ液を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（２０％酢酸エチル／ヘキサン→５０％）に付し、更に標記化合物（６２０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.56 (9H, s), 1.97 (6H, s), 2.19 (2H, t, J = 7.1 Hz), 3.27 (2H, t, J= 7.3 Hz).

（工程４）

６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0230] [化77]



[0231] ９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　ｔ－ブチルエステル（４．５３ｇ、１０．６ｍｍｏｌ）を１，

２－ジクロロエタン（１５０ｍＬ）に溶解し、１０％パラジウム炭素（ＡＤ、ｗｅｔ，９０６ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温にて９時間攪拌した。触媒をろ去し、ろ液を減圧濃縮、トルエン共沸し、油状物を得た。

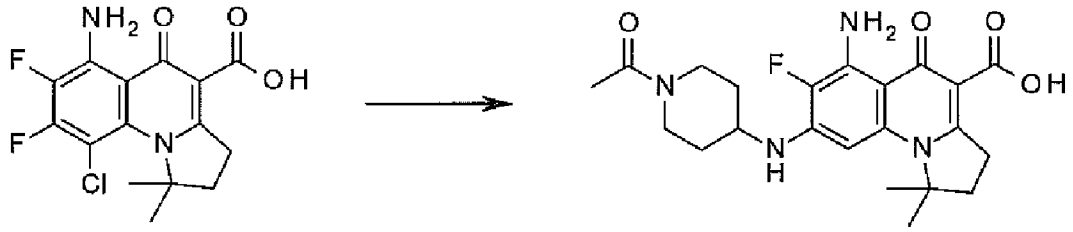
得られた残留物のジクロロメタン溶液（６０ｍＬ）にトリフルオロ酢酸（１５ｍＬ）を加え、室温にて４時間攪拌した。減圧濃縮、トルエン共沸後、得られた固体をエタノールで洗浄し、標記化合物（３．２４ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.98 (6H, s), 2.15 (2H, t, J= 7.0 Hz), 3.73 (2H, t, J = 7.0 Hz).

（工程５）

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0232] [化78]



[0233] ６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸（２０１ｍｇ、０．５８６ｍｍｏｌ）および１－（４－アミノピペリジン－１－イル）エタノン（２５０ｍｇ、１．７６ｍｍｏｌ）にＮ－メチルピロリドン（１．５ｍＬ）を加え、７０℃で２時間半攪拌した。反応液を水、酢酸エチルに分配し、１０％クエン酸水溶液を加えた。有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０％メタノール／クロロホルム）に付し、９－ＣＩ中間体（１８１ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.37-1.49 (2H, m), 1.88 (3H, s), 1.92 (3H, s), 2.08-2.13 (7H, m), 2.85 (1H, t, J = 12.8 Hz), 3.21 (1H, t, J = 11.9 Hz), 3.67 (2H, t, J = 6.6 Hz), 3.78-3.85 (1H, m), 3.94-4.05 (1H, m), 4.49-4.62 (2H, m), 6.70-6.99 (2H, brs).

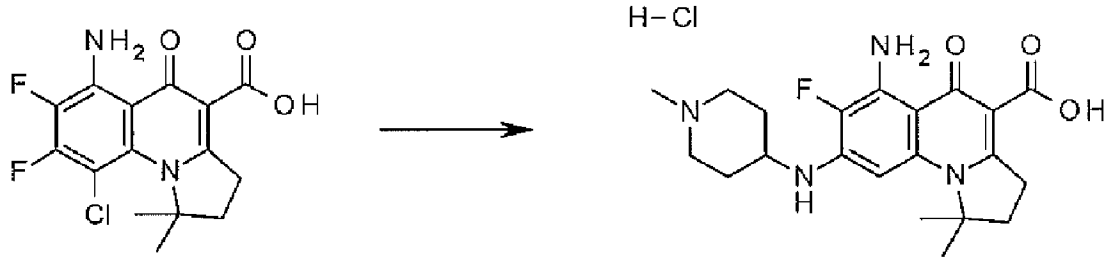
上記中間体の一部（１４０ｍｇ、０．３０１ｍｍｏｌ）をテトラヒドロフラン（４ｍＬ）およびイソプロピルアルコール（４ｍＬ）の混合溶液に溶解した。１０％パラジウム炭素（ＡＤ，ｗｅｔ，１００ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温にて１５時間攪拌した。触媒をろ去した後、ろ液を減圧濃縮、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０％メタノール／クロロホルム）に付し、標記化合物（７３．６ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.47-1.55 (2H, m), 1.77 (6H, s), 2.08-2.18 (3H, m), 2.13 (3H, s), 2.99 (1H, t, J = 13.8 Hz), 3.29 (1H, t, J = 13.9 Hz), 3.51-3.59 (1H, m), 3.72 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.86-3.89 (1H, m), 4.12 (1H, dd, J= 14.0, 7.0 Hz), 4.37-4.40 (1H, m), 4.45-4.49 (1H, m), 6.14 (1H, d, J = 6.6 Hz), 6.50-6.69 (2H, brs).

実施例２６

６－アミノ－７－フルオロ－８－［（ｔｒａｎｓ－４－ヒドロキシシクロヘキシル）アミノ］－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0234] [化79]



[0235] 実施例２５の工程４で得られた化合物および、ｔｒａｎｓ－（４－ヒドロキ

シシクロヘキシル）アミンを用い、実施例２５の工程５と同様の方法により、標記化合物を固体として得た。

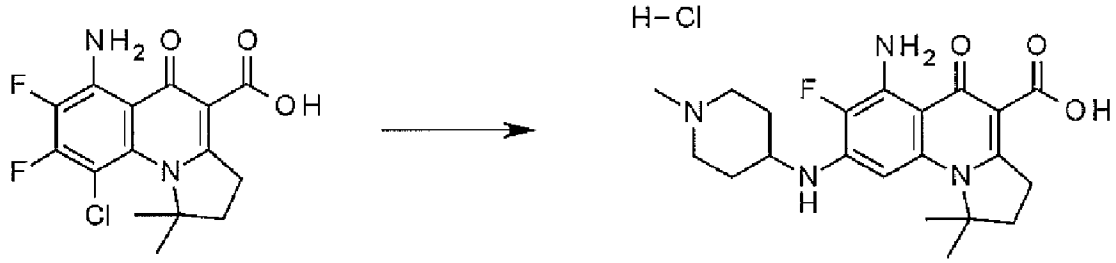
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.30-1.58 (5H, m), 1.74 (6H, s), 1.99-2.23 (6H, m), 3.22-3.35 (1H, m), 3.67 (2H, t, J= 7.8 Hz), 3.69-3.81 (1H, m), 4.13-4.24 (1H, m), 5.44-5.57 (1H, m), 6.06 (1H, d, J = 6.8 Hz), 6.53-6.90 (2H, br), 10.03-10.15 (1H, m).

MS (ESI) m/z: 403 $(M + H)^+$.

実施例２７

６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－アミノピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　塩酸塩

[0236] [化80]



[0237] 実施例２５の工程４で得られた化合物（１．０３ｇ、３．０１ｍｍｏｌ）および４－アミノ－１－メチルピペリジン（１．１３ｍＬ、９．０３ｍｍｏｌ）にＮ－メチルピロリドン（８ｍＬ）を加え、８０℃で４時間半攪拌した。反応液を減圧濃縮して溶媒を留去した後、残渣にアンモニア水およびエタノールを加え、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（５％メタノール／クロロホルム→１０％→クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１の下層）に付し、９－ＣＩ体をアモルファスとして得た。

上記アモルファスを１，２－ジクロロエタン（１５ｍＬ）およびエタノール（１５ｍＬ）の混合溶媒に溶解し、１０％パラジウム炭素（ＡＤ，ｗｅｔ，５５０ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温にて１３時間攪拌した。反応液に

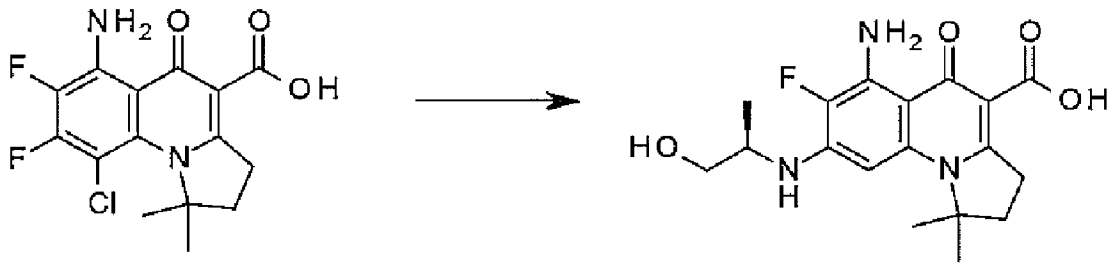
アンモニア水を加えた後、触媒をろ去し、ろ液を減圧濃縮した。得られた残留物にエタノール（１０ｍＬ）を加え、９５℃に加熱し、不溶物が溶解するまでアンモニア水を加えた。そのまま加熱して徐々にアンモニアを気化させて固体を析出させた。室温に戻し、ろ取することで、標記化合物（６４６ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.73 (6H, s), 1.85 (2H, m), 2.05 (2H, m), 2.20 (2H, t, J = 7.9 Hz), 2.60 (3H, brs), 2.88-3.00 (2H, m), 3.22-3.31 (2H, m), 3.51-3.67 (3H, m), 6.15-6.24 (2H, m), 7.01-7.10 (2H, brs).

実施例２８

６－アミノ－７－フルオロ－８－｛［（２Ｒ）－１－ヒドロキシプロパン－２－イル］アミノ｝－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0238] [化81]



[0239] 上記実施例２５の工程４で得られた化合物および（２Ｒ）－（１－ヒドロキシプロパン－２－イル）アミンを用い、実施例２５の工程５と同様の手法により、標記化合物を固体として得た。

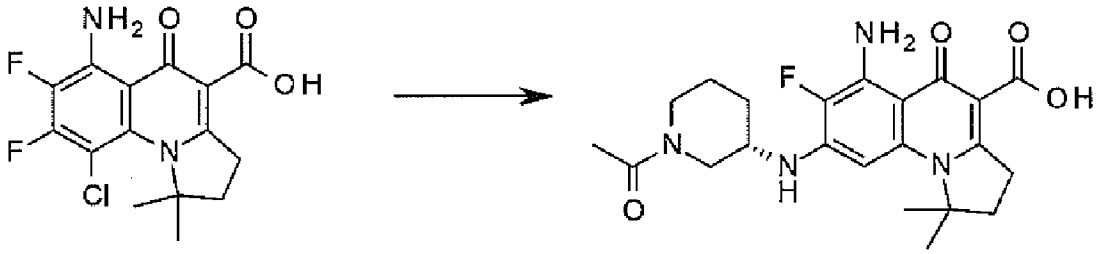
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: -3.73 (1H, s), 1.33 (3H, d, J = 6.1 Hz), 1.77 (6H, d, J = 9.8 Hz), 2.15-2.21 (1H, br), 2.21 (2H, t, J = 7.9 Hz), 3.59-3.76 (4H, m), 3.78-3.88 (1H, m), 4.49-4.58 (1H, m), 6.28 (1H, d, J = 6.8 Hz), 6.40-6.59 (2H, br).

MS (ESI) m/z: 364 $(M + H)^+$.

実施例２９

８－｛［（３Ｓ）－１－アセチルピペリジン－３－イル］アミノ｝－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0240] [化82]



[0241] 上記実施例２５の工程４で得られた化合物および１－［（３Ｓ）－３－アミノ－１－ピペリジル］エタノンを用い、実施例２５の工程５と同様の手法により、標記化合物を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: -3.93 (0.2H, s), -3.77 (0.8H, s), 1.55-1.97 (8H, m), 2.02-2.28 (6H, m), 2.63 (1H, dd, J = 12.9, 9.8 Hz), 3.11-3.24 (1H, m), 3.26-3.86 (5H, m), 4.34-4.48 (1H, m), 4.70-4.81 (1H, m), 6.14 (0.2H, d, J = 6.6 Hz), 6.33 (0.8H, d, J = 7.1 Hz), 6.42-6.70 (2H, m).

実施例３０

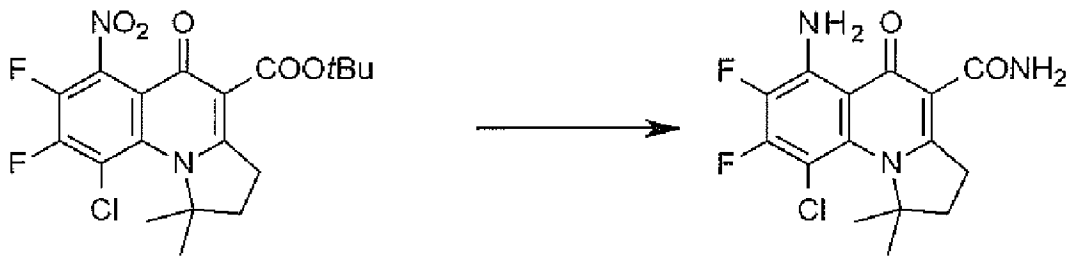
８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

（工程１）

６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0242]

[化83]



[0243] 実施例２５の工程３で得られた９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル（７．５ｇ、１７．５ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（２００ｍｌ）にトリフルオロ酢酸（２．６ｍｌ）を加え、室温で２時間撹拌した。トルエンを加え、溶媒を減圧留去した。残留物を塩化メチレンに溶解し、オキサリルクロリド（３．８８ｍｌ、４５．２ｍｍｏｌ）を滴下し、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドを１滴加えた。室温で２時間撹拌後、溶媒を減圧留去した。ジオキサン（２５ｍｌ）に溶解し、氷冷下、アンモニア水（５０ｍｌ）に滴下した。室温で１時間撹拌後、水を加えて固体を濾取した（５．６ｇ）。得られた粗生成物をＮ，Ｎ－ホルムアミド：１，２－ジクロロエタン：酢酸＝１：１：０．２（１５０ｍｌ）に溶解し、１０％パラジウム炭素（ＡＤ，ｗｅｔ，１．０ｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で一晩撹拌した。ろ過後、母液を濃縮し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（３．８ｇ）を固体として得た。

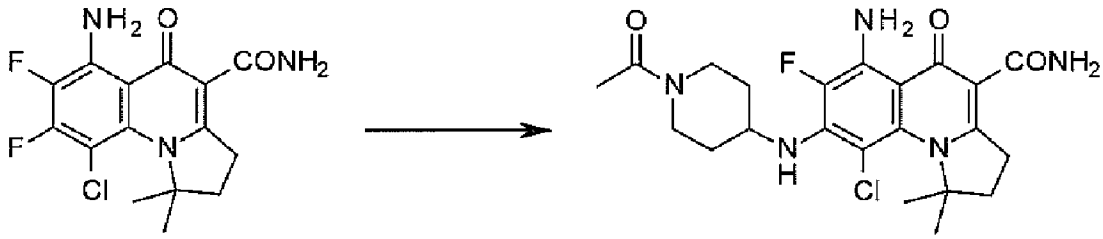
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.86 (6H, s), 2.06 (2H, t, J= 7.2 Hz), 3.43 (2H, t, J = 6.9 Hz), 7.34 (1H, d, J = 3.4 Hz), 8.91 (1H, d, J = 4.0 Hz).

MS (ESI) m/z: 342 $[M+H]^+$.

（工程２）

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0244] [化84]



[0245] ６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド（２００ｍｇ、０．５９ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド溶液（５ｍｌ）に１－（４－アミノピペリジン－１－イル）エタノン（２５０ｍｇ、１．７６ｍｍｏｌ）を加え、１００℃で一晩撹拌した。水を加え、１０％メタノール含有クロロホルムで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（２２０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.34-1.44 (1H, m), 1.47-1.55 (1H, m), 1.79 (3H, s), 1.80 (3H, s), 1.84-1.93 (2H, m), 2.66-2.73 (1H, m), 3.08-3.15 (1H, m), 3.38 (2H, t, J = 6.9 Hz), 3.76-3.83 (2H, m), 4.23-4.29 (1H, m), 5.08-5.12 (1H, m).

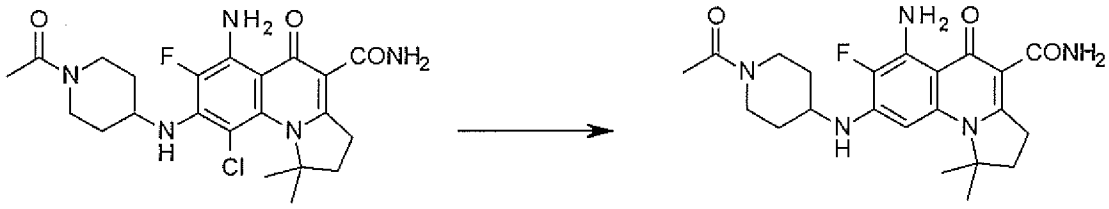
MS (ESI) m/z: 464 $[M+H]^+$.

（工程３）

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0246]

[化85]



[0247] ８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド（１１０ｍｇ、０．２４ｍｍｏｌ）の塩化メチレン－メタノール溶液（４：１、２．５ｍｌ）に１０％パラジウム炭素（ＡＤ，ｗｅｔ，３０ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で一晩撹拌した。ろ過後、母液を濃縮し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（７６ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.34-1.51 (2H, m), 1.68 (6H, s), 1.85-1.98 (2H, m), 2.01 (3H, s), 2.10 (2H, t, J= 7.7 Hz), 2.73-2.81 (1H, m), 3.16-3.24 (1H, m), 3.49 (2H, t, J = 7.7 Hz), 3.56-3.64 (1H, br m), 3.84 (1H, d, J = 14.3 Hz), 4.32 (1H, d, J = 13.2 Hz), 5.98 (1H, d, J = 6.9 Hz), 6.06 (1H, d, J = 6.9 Hz), 7.00 (1H, d, J = 4.6 Hz), 9.53 (1H, d, J = 4.6 Hz).

MS (ESI) m/z: 430 $[M+H]^+$.

実施例３１

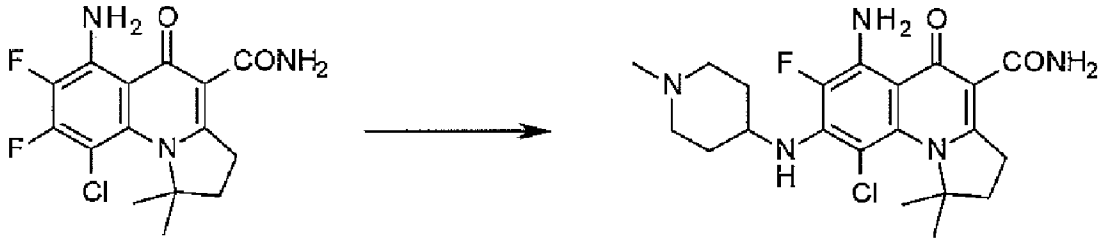
６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

（工程１）

６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－

メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0248] [化86]



[0249] 実施例３０の工程１で得られた６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド（２００ｍｇ、０．５９ｍｍｏｌ）のＮ－メチルピロリドン溶液（５ｍｌ）に４－アミノ－１－メチルピペリジン（０．１６２ｍｌ、１．２９ｍｍｏｌ）を加え、８０度で一晩撹拌した。水を加え、酢酸エチルで抽出し、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（１３０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.53-1.63 (2H, m), 1.79 (6H, s), 1.82-1.88 (2H, m), 1.96-2.05 (4H, m), 2.18 (3H, s), 2.68-2.78 (2H, br m), 3.38 (2H, t, J = 7.2 Hz), 3.55-3.62 (1H, br m), 5.02 (1H, d, J = 7.4 Hz), 7.18 (1H, d, J = 5.2 Hz), 9.17 (1H, d, J = 4.0 Hz).

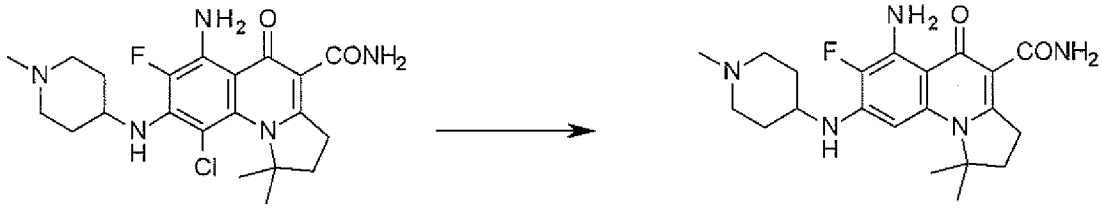
MS (ESI) m/z: 436 $[M+H]^+$.

（工程２）

６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0250]

[化87]



[0251] ６－アミノ－９－クロロ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド（１３０ｍｇ、０．３０ｍｍｏｌ）の塩化メチレン－メタノール溶液（４：１、４ｍｌ）に１０％パラジウム炭素（ＡＤ，ｗｅｔ，３０ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で一晩撹拌した。ろ過後、母液を濃縮し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（６１ｍｇ）を固体として得た。

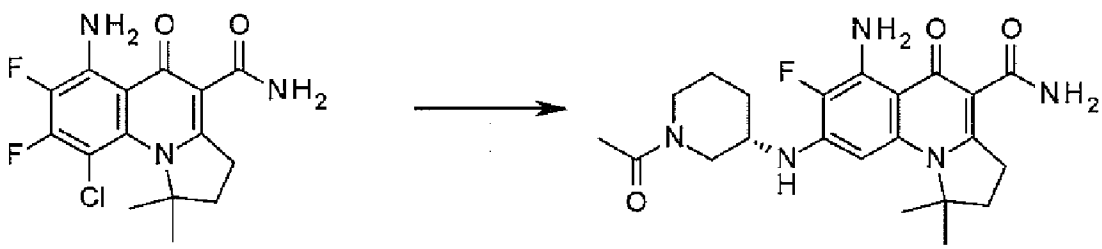
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.68 (6H, s), 1.79-1.90 (2H, m), 2.04-2.13 (4H, m), 2.74 (4H, br s), 3.50 (2H, t, J= 7.4 Hz), 3.58-3.65 (1H, m), 6.03 (1H, d, J = 6.9 Hz), 6.24 (1H, d, J= 8.6 Hz), 7.00-7.03 (1H, m), 9.50-9.53 (1H, m), 10.17-10.27 (1H, br m).

MS (ESI) m/z: 402 $[M+H]^+$.

実施例３２

８－｛［（３Ｓ）－１－アセチルピペリジン－３－イル］アミノ｝－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0252] [化88]



[0253] 実施例３０の工程１で得られた化合物および１－［（３Ｓ）－３－アミノ－１－ピペリジル］エタノンを用い、実施例３０の工程２および工程３と同様の手法にて、標記化合物を固体として得た。

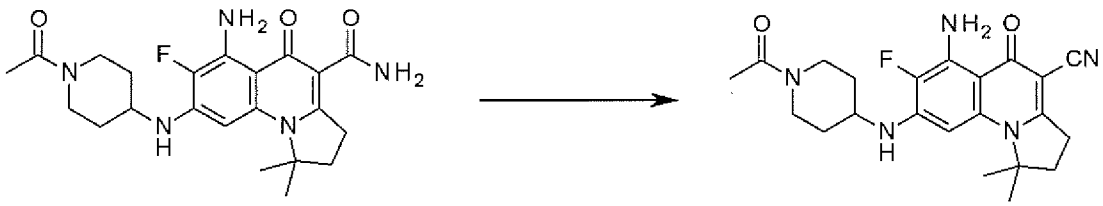
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.52-1.97 (9H, m), 2.00-2.25 (6.25H, m), 2.64 (0.75H, dd, J = 12.9, 9.5 Hz), 3.09-3.24 (0.75H, m), 3.24-3.87 (4.5H, m), 4.20-4.34 (1H, m), 4.68-4.80 (0.75H, m), 5.43-5.58 (1H, m), 6.07 (0.25H, d, J = 7.1 Hz), 6.25 (0.75H, d, J = 6.8 Hz), 6.55-6.93 (2H, br), 9.96-10.17 (1H, m).

MS (ESI) m/z: 430 $(M + H)^+$.

実施例３３

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル

[0254] [化89]



[0255] 実施例３０の工程３で得られた化合物（２２３ｍｇ、０．５１９ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（０．５７９ｍＬ、４．１５ｍｍｏｌ）のジクロロメタン溶液（２０ｍＬ）に、氷浴下、トリフルオロ酢酸無水物（０．１４５ｍＬ，１．０４ｍｍｏｌ）を加え、攪拌した。３０分後、更にトリフルオロ酢酸無水物（０．１４５ｍＬ，１．０４ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（０．２９０ｍＬ、２．０７ｍｍｏｌ）を加え、３０分攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、１８時間攪拌した後、クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した、ろ過後、溶媒を減圧留去し、残留物を得た。得られた残留物をエタノール（１０ｍＬ）に溶解し、１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液

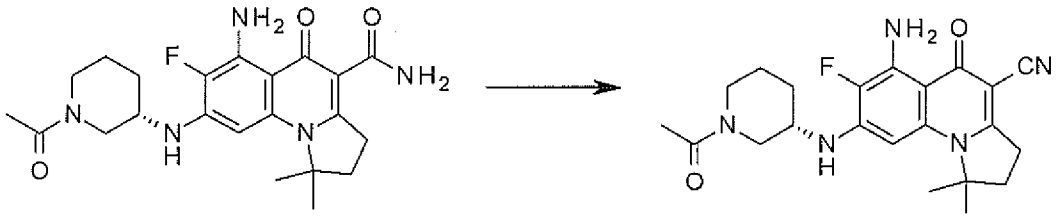
（２ｍＬ）を加えて４０℃で２０時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、水で希釈、ジクロロメタンで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過、溶媒を減圧留去してシリカゲルカラムクロマトグラフィー（３％メタノール／クロロホルム）にて精製した。得られた固体をジエチルエーテルで洗浄し、標記化合物（１０７ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.49-1.56 (2H, m), 1.75 (6H, s), 2.08-2.13 (2H, m), 2.13 (3H, s), 2.26 (2H, t, J = 7.3 Hz), 2.98 (1H, t, J = 12.6 Hz), 3.22 (2H, t, J = 8.2 Hz), 3.29 (1H, m), 3.47-3.57 (1H, m), 3.86 (1H, d, J = 14.7 Hz), 4.28 (1H, dd, J = 8.0, 3.4 Hz), 4.45 (1H, br d, J = 14.7 Hz), 6.02 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.63-6.83 (2H, m).

実施例３４

８－｛［（３Ｓ）－１－アセチルピペリジン－３－イル］アミノ｝－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボニトリル

[0256] [化90]



[0257] 実施例３２で得られた化合物を用い、実施例３３と同様の方法により標記化合物を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.50-1.97 (8H, m), 1.99-2.33 (6H, m), 2.48-2.65 (1H, m), 3.08-3.55 (4.65H, m), 3.69-3.89 (1.35H, m), 4.22-4.39 (1H, m), 4.71-4.84 (1H, m), 6.03 (0.2H, d, J = 6.6 Hz), 6.22 (0.8H, d, J = 6.6 Hz), 6.53-6.93 (2H, m).

実施例３５

２－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

（工程１）

４－ブロモ－２，６－ジクロロ－５－フルオロピリジン－３－カルボン酸

[0258] [化91]



[0259] ２，６－ジクロロ－５－フルオロピリジン－３－カルボン酸（５０ｇ，０．２４ｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（１０００ｍｌ）溶液に、－７８℃にてメチルリチウム（１Ｍ　ジエチルエーテル溶液、５００ｍｌ、０．５０ｍｏｌ）を１時間かけて滴下した。反応液を－２０℃まで２時間かけて昇温しながら攪拌した後、再び－７８℃に冷却した。反応液に１，２－ジブロモテトラクロロエタン（８５ｇ，０．２６ｍｏｌ）を加えた後に、０℃にて１時間３０分攪拌した。反応液に氷水で希釈した後に、クロロホルムで洗浄した。得られた水層に１Ｍ塩酸水を加え中和し、析出した固体をろ取し、標記化合物（３３．６ｇ）を固体として得た。本化合物はこれ以上精製せず、次の工程にそのまま用いた。

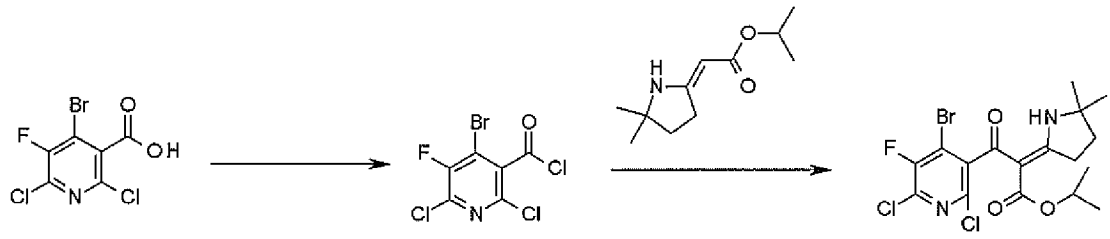
MS (ESI) m/z: 244 $(M + H)^+$.

（工程２）

プロパン－２－イル　３－（４－ブロモ－２，６－ジクロロ－５－フルオロピリジン－３－イル）－２－（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）－３－オキソプロパノエート

[0260]

[化92]



[0261] ４－ブロモ－２，６－ジクロロ－５－フルオロピリジン－３－カルボン酸（８．１ｇ、２８ｍｍｍｏｌ）にチオニルクロライド（２０ｍｌ、０．２７ｍｏｌ）とジメチルホルムアミド（触媒量）を加え、１００℃にて１時間攪拌した。反応液を減圧留去し、得られた残渣をテトラヒドロフラン（１００ｍｌ）に溶解した。実施例１７の工程２で得られた化合物（６．０ｇ、２８ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（５０ｍｌ）溶液を室温にて滴下し、５０度にて２１時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水の順に洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝１０：１－３：１）で精製し、標記化合物（６．７ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.95-0.98 (6H, m), 1.45 (6H,s), 1.96-1.99 (2H, m), 3.40-3.45 (2H, m), 4.87-4.92 (1H, m), 11.62 (1H, br s).

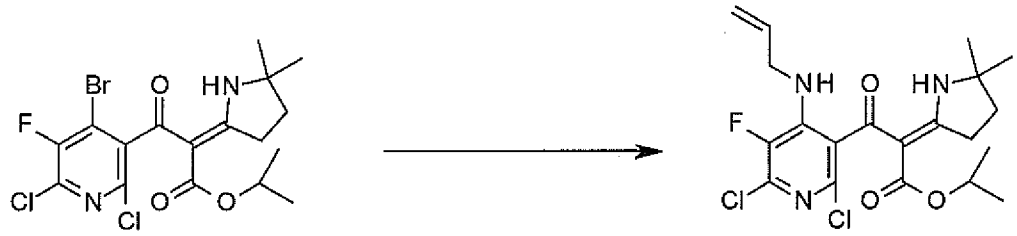
MS (ESI) m/z: 469 $(M + H)^+$.

（工程３）

プロパン－２－イル　３－［２，６－ジクロロ－５－フルオロ－４－（プロップ－２－エン－１－イルアミノ）ピリジン－３－イル］－２－（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）－３－オキソプロパノエート

[0262]

[化93]



[0263] プロパン－２－イル　３－（４－ブロモ－２，６－ジクロロ－５－フルオロピリジン－３－イル）－２－（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）－３－オキソプロパノエート（５．０ｇ、１０．１ｍｍｏｌ）のアセトニトリル（２０ｍｌ）溶液にアリルアミン（８．０ｍｌ、０．１１ｍｏｌ）を加え室温にて一晩、６０℃にて２時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水の順に洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝８：１－２：１）で精製し、標記化合物（２．５ｇ）を油状物として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.43 86H, d, J = 10.3 Hz), 1.56 (6H, s), 1.92-2.00 (2H, m), 3.19-3.28 (1H, m), 3.45-3.54 (1H, m), 3.94-3.97 (2H, m), 4.57-4.60 (1H, m), 4.88-4.9, 3.45-3.54 (1H, m), 3.94-3.97 (2H, m), 4.57-4.60 (1H, m), 4.88-4.95 (1H, m), 5.18 (1H, dd, J = 10.3, 1.2 Hz), 5.25 (1H, dd, J = 17.1, 1.2 Hz), 5.84-5.93 (1H, m), 11.56 (1H, br s).

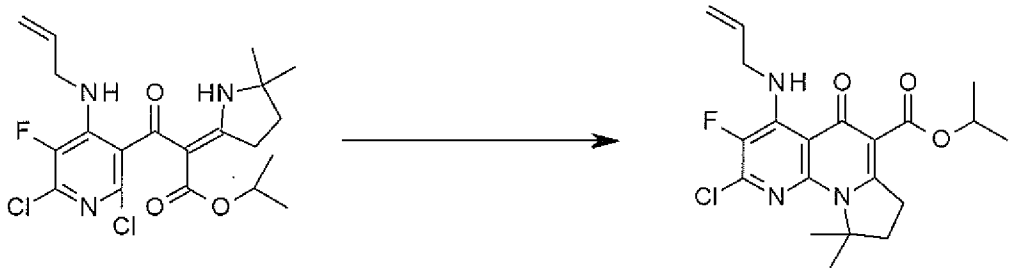
MS (ESI) m/z: 444 $(M + H)^+$.

（工程４）

プロパン－２－イル　２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－４－（プロップ－２－エン－１－イルアミノ）－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシレート

[0264]

[化94]



[0265] プロパン－２－イル　３－［２，６－ジクロロ－５－フルオロ－４－（プロップ－２－エン－１－イルアミノ）ピリジン－３－イル］－２－（５，５－ジメチルピロリジン－２－イリデン）－３－オキソプロパノエート（２．３７ｇ、５．１ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（５０ｍｌ）溶液に－１０℃にて５５％油性水素化ナトリウム（０．４６ｇ、１０．６ｍｍｏｌ）を加え、０℃にて１時間３０分攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後に、有機物を酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を水、飽和食塩水の順に洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝６：１－１：１）で精製し、標記化合物（１．７ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.38 (6H, d, J = 5.7 Hz), 1.78 (6H, s), 2.12 (2H, t, J= 7.7 Hz), 3.24 (2H, t, J = 7.7 Hz), 4.15-4.19 (2H, m), 5.15-5.18 (1H, m), 5.24-5.29 (2H, m), 5.92-5.98 (1H, m), 11.18-11.21 (1H, m).

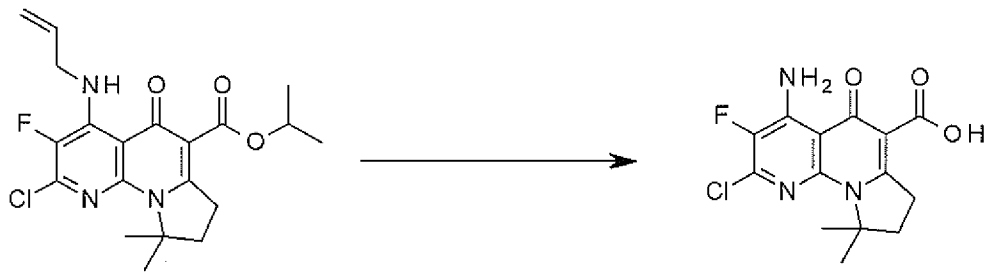
MS (ESI) m/z: 408 $[M+H]^+$.

（工程５）

４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

[0266]

[化95]



[0267] プロパン－２－イル　２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－４－（プロップ－２－エン－１－イルアミノ）－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸（７００ｍｇ，１．７ｍｍｏｌ）のイソプロピルアルコール（２０ｍｌ）溶液に１０％パラジウム炭素（３５０ｍｇ）とメタンスルフォン酸（２１０ｍｇ、２．２ｍｍｏｌ）を加え、８０℃にて７時間攪拌した。不溶物をろ去後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をエタノール（１０ｍｌ）とテトラヒドロフラン（１０ｍｌ）に溶解し、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（１０ｍｌ）を加え５０℃にて１９時間攪拌した。反応液を室温まで冷却後、酢酸を加え中和し、水を加え析出した固体をろ取することにより、標記化合物（３７０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.75 (6H, s), 2.16 (2H, t, J= 7.7 Hz), 3.63 (2H, t, J = 7.7 Hz), 8.17 (1H, s), 9.06 (1H, s).

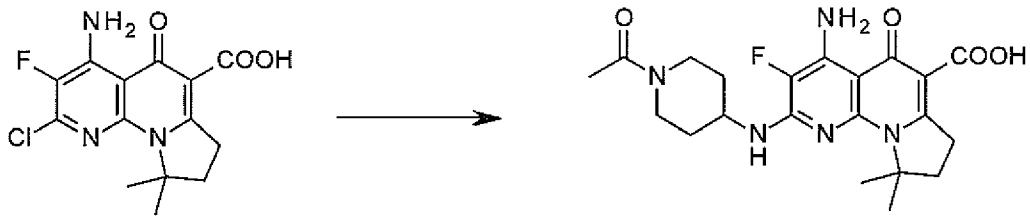
MS (ESI) m/z: 326 $[M+H]^+$.

（工程６）

２－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

[0268]

[化96]



[0269] ４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸（６０ｍｇ，０．１８ｍｍｏｌ）のＮ－メチルピロリドン（１ｍｌ）溶液に１－（４－アミノピペリジン－１－イル）エタノン（５２ｍｇ、０．３７ｍｍｏｌ）とトリエチルアミン（５１μｌ、０．３７ｍｍｏｌ）を加え、１００℃で一晩撹拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水の順に洗浄した。水層をさらに１０％メタノール含有クロロホルムで抽出し、得られた有機層を併せ硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝９９：１－９：１）で精製し得た粗精製体を酢酸エチルで洗浄し、標記化合物（４０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.40-1.57 (2H, m), 1.76 (6H, s), 1.84-1.93 (2H, m), 2.02 (3H, s), 2.13 (2H, t, J = 8.0 Hz), 2.60-2.64 (1H, m), 3.06-3.11 (1H, m), 3.58 (2H, t, J = 8.0 Hz), 3.87-3.91 (1H, m), 4.01-4.09 (1H, m), 4.38-4.43 (1H, m), 7.09-8.26 (4H, m).

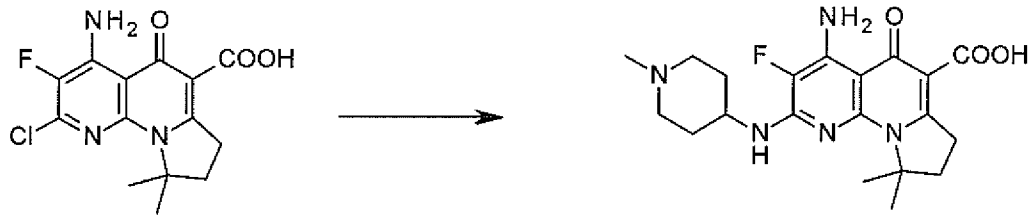
ESI-MS m/z : 432 $(M+H)^+$.

実施例３６

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－２－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

[0270]

[化97]



[0271] 実施例３５の工程５で得られた化合物（３００ｍｇ、０．９２ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド（３ｍｌ）溶液に１－メチルピペリジン－４－アミン（５２５ｍｇ、４．６１ｍｍｏｌ）を加え、マイクロウェーブ照射下１６０℃で１時間撹拌した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝９９：１－４：１）で精製し得た粗精製体を酢酸エチルで洗浄し、標記化合物（２２０ｍｇ）を固体として得た。

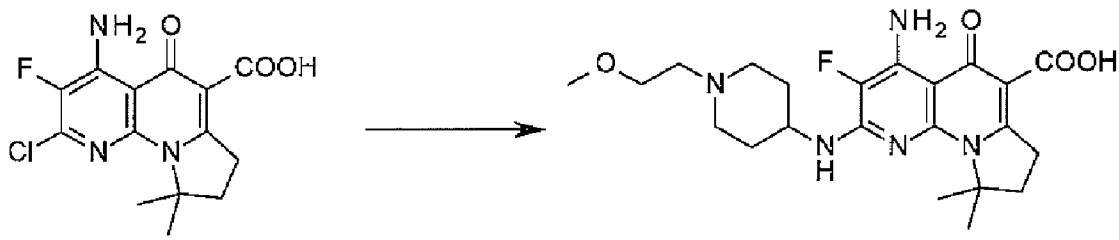
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.58-1.67 (2H, m), 1.81 (6H, s), 2.04-2.08 (2H, m), 2.13-2.19 (4H, m), 2.33 (3H, s), 2.84-2.89 (2H, m), 3.72 (2H, t, J = 8.0 Hz), 3.89-3.95 (1H, m), 4.81-4.84 (1H, m).

ESI-MS m/z : 404 $(M+H)^+$.

実施例３７

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－２－［｛１－（２－メトキシエチル）ピペリジン－４－イル｝アミノ］－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

[0272] [化98]



[0273] 実施例３５の工程５で得られた化合物および１－（２－メトキシエチル）ピ

ペリジン－４－アミンを用い、実施例３６と同様の方法で標記化合物を固体として得た。

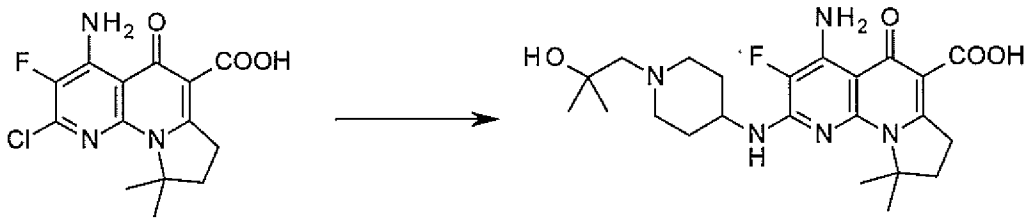
^{1}H-NMR (D_2O + NaOD) δ: 1.50-1.58 (2H, m), 1.70 (6H, s), 1.93-1.97 (2H, m), 2.13 (2H, t, J = 7.8 Hz), 2.21-2.26 (2H, m), 2.60 (2H, t, J = 5.8 Hz), 2.93-2.97 (2H, m), 3.10 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.37 (3H, s), 3.61 (2H, t, J = 5.8 Hz), 3.89-3.93 (1H, m).

ESI-MS m/z : 448 $(M+H)^+$.

実施例３８

４－アミノ－３－フルオロ－２－［｛１－（２－ヒドロキシ－２－メチルプロピル）ピペリジン－４－イル｝アミノ］－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシリック　アシッド

[0274] [化99]



[0275] 実施例３５の工程５で得られた化合物および１－（４－アミノピペリジン－１－イル）－２－メチルプロパン－２－オールを用い、実施例３６と同様の方法で標記化合物を固体として得た。

^{1}H-NMR (D_2O + NaOD) δ: 1.55-1.63 (2H, m), 1.71 (6H, s), 1.89-1.92 (2H, m), 2.14 (2H, t, J = 7.9 Hz), 2.31-2.36 (2H, m), 2.44 (2H, s), 2.99-3.03 (2H, m), 3.10 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.88-3.94 (1H, m).

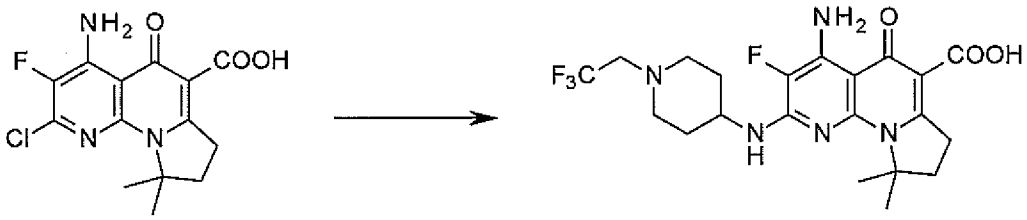
ESI-MS m/z : 462 $(M+H)^+$.

実施例３９

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－２－［｛１－

（２，２，２－トリフルオロエチル）ピペリジン－４－イル｝アミノ］－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

[0276] [化100]



[0277] 実施例３５の工程５で得られた化合物および１－（２，２，２－トリフルオロエチル）ピペリジン－４－アミンを用い、実施例３６と同様の方法で標記化合物を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.61-1.69 (2H, m), 1.80 (6H, s), 2.03-2.07 (2H, m), 2.17 (2H, t, J = 8.0 Hz), 2.53-2.58 (2H, m), 3.00-3.06 (4H, m), 3.72 (2H, t, J= 8.0 Hz), 3.90-3.94 (1H, m), 4.81 (1H, d, J = 6.3 Hz).

ESI-MS m/z : 472 $(M+H)^+$.

実施例４０

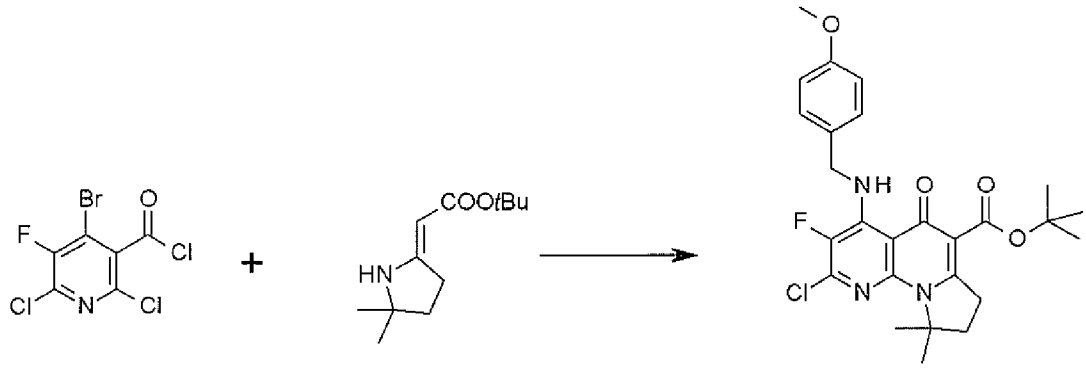
４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－２－（ピリジン－３－イルアミノ）－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

（工程１）

２－クロロ－３－フルオロ－４－（４－メトキシベンジルアミノ）－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル

[0278]

[化101]



[0279] 実施例３５の工程１で得られた化合物と、実施例２５の工程２で得られた化合物を用い、実施例３５の工程２，３，４と同様の手法で、工程３のアリルアミンをパラメトキシベンジルアミン（５等量）に変更して実施し、標記化合物を固体として得た。

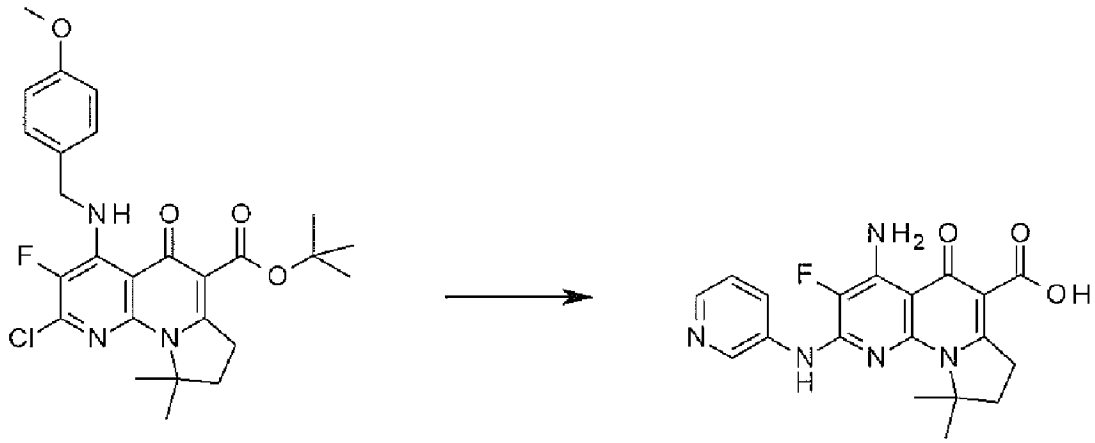
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.58(9H, s), 1.76(6H, s), 2.10(2H, t、 J = 7.9 Hz), 3.20(2H, t、 J =7.9 Hz), 3.79 (3H, s), 4.67-4.69 (2H, m), 6.84-6.87 (2H, m), 7.25-7.27 (2H, m), 11.41-11.44 (1H, m).

MS (ESI) m/z: 502 $[M+H]^+$.

（工程２）

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－２－（ピリジン－３－イルアミノ）－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

[0280] [化102]



[0281] ２－クロロ－３－フルオロ－４－（４－メトキシベンジルアミノ）－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル（１．０ｇ、１．９９ｍｍｏｌ）、３－アミノピリジン（３７５ｍｇ、９．９８ｍｍｏｌ）、ＢＩＮＡＰ（６２ｍｇ、０．１ｍｍｏｌ）をジオキサン（２０ｍｌ）に溶解し、炭酸セシウム（１．３ｇ）を加え、窒素置換した。ビスパラジウムトリスベンジリデンアセトン（９０ｍｇ）を加え、８０℃で１５時間、加熱還流で４時間攪拌した。３－アミノピリジン（２００ｍｇ）、ＢＩＮＡＰ（６５ｍｇ）、ビスパラジウムトリスベンジリデンアセトン（９５ｍｇ）を追加し、さらに１５時間加熱還流した。反応液を酢酸エチル－飽和重曹水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール＝１０：０→９：１）で粗く精製し、中間体を得た。

[0282] 上記中間体の塩化メチレン（３ｍｌ）溶液に、トリフルオロ酢酸（３ｍｌ）を加えて、７時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残留物にトルエンを加えて再度溶媒を留去した。残留物に４Ｍ塩酸／ジオキサンを加えて、再度溶媒を留去した後、ジオキサン－メタノールを用いて固体化し、標記化合物（５５４ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 1.58(6H, s), 2.08(2H, t, J = 7.8Hz), 3.60(2H, t, J = 7.8 Hz), 7.80-7.86(1H, m), 8.31-8.36(1H, m), 8.50-8.53(1H, m), 8.91-8.94(1H, m), 9.87-9.93(1H,m).

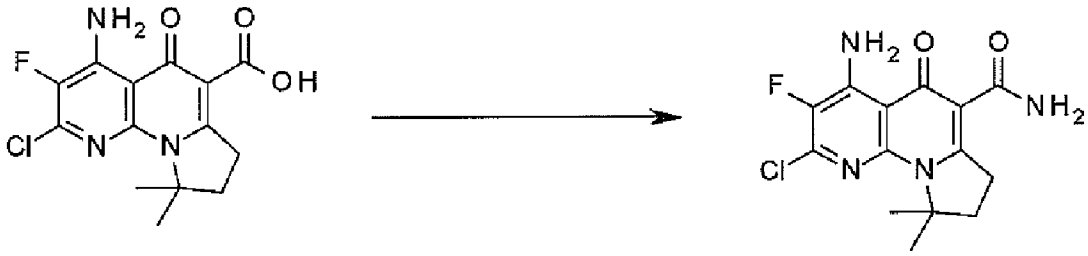
実施例４１

２－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド

（工程１）

４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド

[0283] [化103]



[0284] 実施例３５の工程５で得られた４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸（１．２ｇ，３．７ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（３０ｍｌ）溶液に塩化アンモニウム（３．９４ｇ、７４ｍｍｏｌ）とトリエチルアミン（１５ｍｌ、０．１１ｍｏｌ）、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（２．１ｇ，４．１ｍｍｏｌ）を加え室温にて５時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、水、飽和食塩水の順に洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し得られた固体を酢酸エチルで洗浄することにより、標記化合物（０．８９ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.80 (6H, s), 2.13 (2H, t, J= 8.0 Hz), 3.75 (2H, t, J = 8.0 Hz), 5.31-5.56 (2H, m), 9.70 (2H, br s).

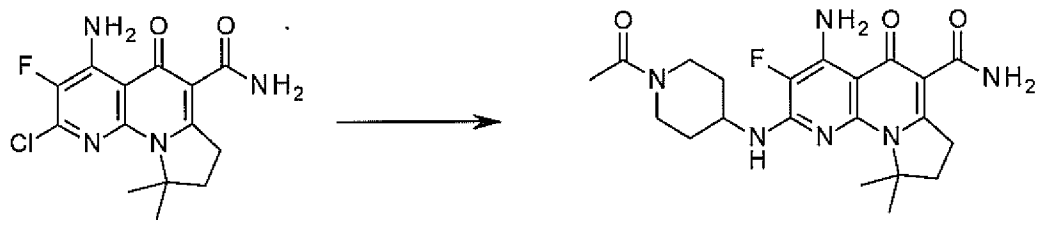
MS (ESI) m/z: 325 $[M+H]^+$.

（工程２）

２－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド

[0285]

[化104]



[0286] ４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド（２５０ｍｇ、０．７７ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド（５ｍｌ）溶液に１－（４－アミノピペリジン－１－イル）エタノン（３３０ｍｇ、２．３ｍｍｏｌ）を加え、マイクロウェーブ照射下１５０℃で３．５時間撹拌した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチルとメタノールの混合溶媒で洗浄し、標記化合物の粗精製体Ａを得た、さらにろ液に溶出した目的物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝９９：１－９：１）で精製し粗精製体Ｂを得た。ＡとＢを併せ、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝９９：１－９：１）で精製して得た粗精製体を酢酸エチルで洗浄し、標記化合物（２３０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (CD_3OD) δ: 1.46-1.61 (2H, m), 1.80-1.82 (6H, m), 1.92-2.14 (7H, m), 2.77-3.16 (2H, m), 3.59-3.62 (2H, m), 3.90-4.29 (3H, m).

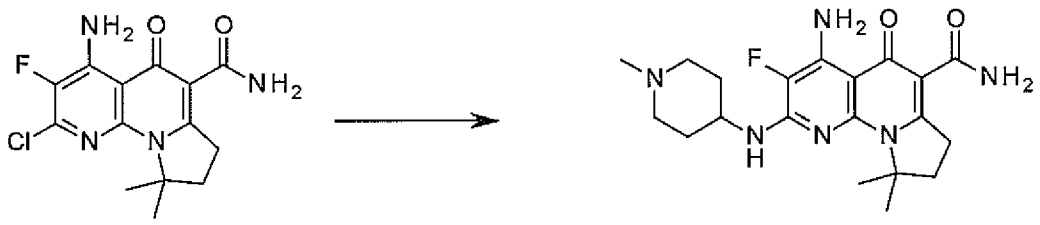
ESI-MS m/z : 431 $(M+H)^+$.

実施例４２

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－２－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド

[0287]

[化105]



[0288] 実施例４１の工程１で得られた４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド（２５０ｍｇ、０．７７ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド（３ｍｌ）溶液に１－メチルピペリジン－４－アミン（３９０μｌ、３．１ｍｍｏｌ）を加え、マイクロウェーブ照射下１５０℃で３時間撹拌した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ＮＨ）（クロロホルム：メタノール＝９９：１－９：１）で精製し、更にシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝９９：１－９：１）で精製し得た粗精製体を酢酸エチルで洗浄し、標記化合物（１６０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.59-1.66 (2H, m), 1.72 (6H, s), 1.78-1.83 (2H, m), 1.90-1.95 (2H, m), 2.04 (2H, t, J = 8.0 Hz), 2.18 (3H, s), 2.80-2.84 (2H, m), 3.53 (2H, t, J = 8.0 Hz), 3.76-3.83 (1H, m), 6.86-9.50 (5H, m).

ESI-MS m/z : 403 $(M+H)^+$.

実施例４３

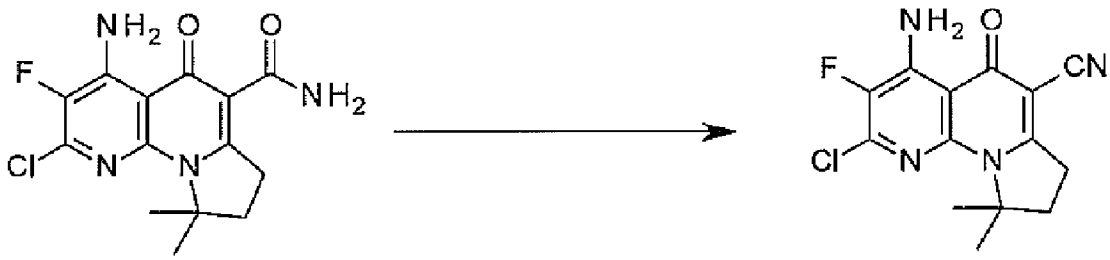
４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－２－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］－１，８－ナフチリジン－６－カルボニトリル

（工程１）

４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－

５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］－１，８－ナフチリジン－６－カルボニトリル

[0289] [化106]



[0290] 実施例４１の工程１で得た４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド（１．０１ｇ、３．１１ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（１．３ｍ、９．３３ｍｍｏｌ）の塩化メチレン（２０ｍｌ）懸濁液にトリフルオロ酢酸無水物（０．６６μｌ、４．６７ｍｍｏｌ）を氷冷にて加えた。反応混合物を室温にて３０分間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、塩化メチレンにて抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（２０％酢酸エチル／クロロホルム）にて精製し、固体を得た。得られた固体にエタノールを加え、ろ取し、標記化合物（４７９ｍｇ）を固体として得た。

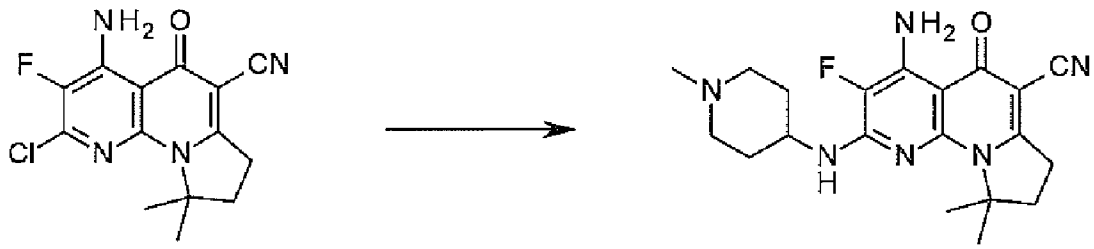
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.72 (6H, s), 2.18 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.30 (2H, t, J = 7.8 Hz), 8.00 (1H, s), 9.36 (1H, s).

（工程２）

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－２－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］－１，８－ナフチリジン－６－カルボニトリル

[0291]

[化107]



[0292] ４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］－１，８－ナフチリジン－６－カルボニトリル（１４４ｍｇ、０．４４ｍｍｏｌ）、１－メチルピペリジン－４－イルアミン（１５３ｍｇ、１．３３ｍｍｏｌ）のＮ－メチルピロリドン（２ｍｌ）溶液を１２０℃にて１５時間攪拌した。反応混合物を室温に戻し、減圧濃縮した。残留物をフラッシュＮＨシリカゲルカラムクロマトグラフィー（１０％クロロホルム／酢酸エチル）にて精製し、溶出液を減圧濃縮した。残留物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（５％メタノール／クロロホルム→４％（８Ｎ　ＮＨ３／メタノール）／クロロホルム）にて精製し、溶出液を減圧濃縮した。残留物を分取用ＰＬＣ（２０％メタノール／クロロホルム展開）にて精製し、固体を得た。得られた固体にｎ－ヘキサン／酢酸エチル＝１：１を加え、ろ取し、標記化合物（７０ｍｇ）を固体として得た。

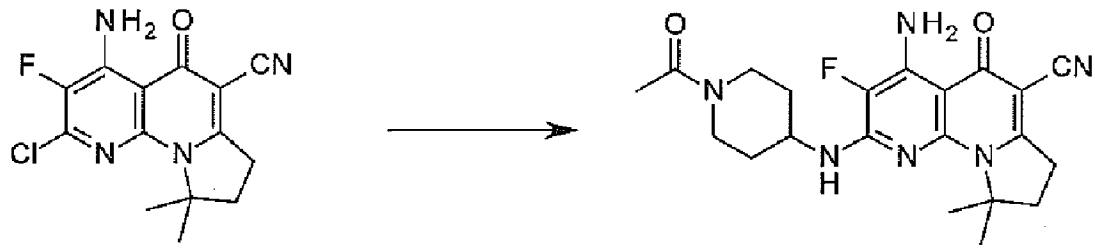
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.60-1.68 (2H, m), 1.79 (6H, s), 2.00-2.23 (6H, m), 2.32 (3H, s), 2.80-2.90 (2H, m), 3.24 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.81-3.94 (1H, m), 4.68-4.75 (1H, m).

実施例４４

２－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］－１，８－ナフチリジン－６－カルボニトリル

[0293]

[化108]



[0294] 実施例４３の工程１で得られた化合物および１－（４－アミノピペリジン－１－イル）エタノンを用い、実施例４３の工程２と同様の手法により、標記化合物を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.34-1.58 (2H, m), 1.72 (6H, s), 1.80-1.94 (2H, m), 2.01 (3H, s), 2.14 (2H, t, J= 7.8 Hz), 2.56-2.66 (1H, m), 3.02-3.13 (1H, m), 3.22 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.83-4.06 (2H, m), 4.33-4.44 (1H, m), 7.03 (1H, d, J= 7.8 Hz).

ESI-MS (m/z): 413 $(M+H)^+$.

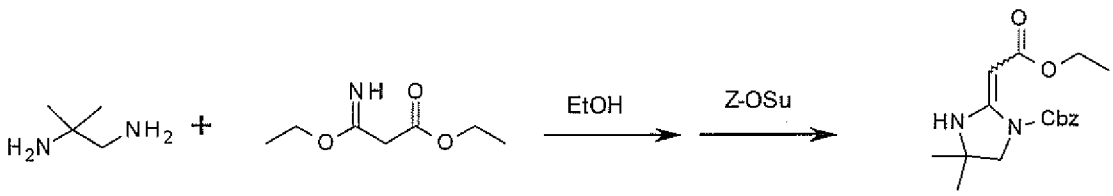
実施例４５

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

２－（２－エトキシ－２－オキソエチリデン）－４，４－ジメチルイミダゾリジン－１－カルボン酸　ベンジルエステル

[0295] [化109]



[0296] １，２－ジアミノ－２－メチルプロパン（４．９６ｇ，５６．２ｍｍｏｌ）

のエタノール溶液にエチル　３－エトキシ－３－イミノプロピオネート塩酸塩（１０．０ｇ、５１．１ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間撹拌した。溶媒を留去後、飽和重曹水（１００ｍｌ）とテトラヒドロフラン（１５０ｍｌ）を加え、Ｎ－（ベンジルオキシカルボニルオキシ）－スクシンイミド（５．９５ｇ，２３．９ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン溶液（５０ｍｌ）を滴下し、室温で２時間撹拌した。酢酸エチルで抽出後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、標記化合物を得た。本化合物はこれ以上の精製はせずに、次の反応に用いた。

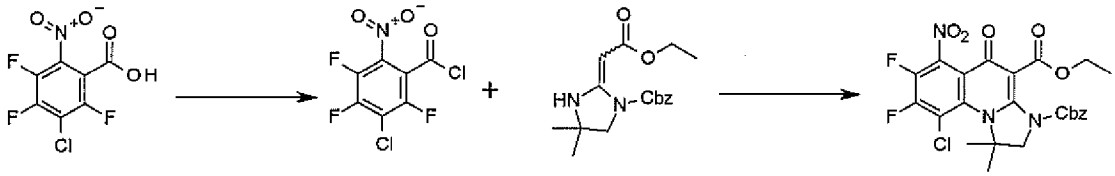
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.25 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.28 (3H, s), 1.33 (3H, s), 3.59-3.61 (2H, m), 4.10 (2H, q, J = 7.2 Hz), 5.22 (1H, s), 7.34-7.39 (5H, m).

MS (ESI) m/z: 319[M+H]$^+$.

（工程２）

３－ベンジル　４－エチル　９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２－ジヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－３，４（５Ｈ）－ジカルボキシレート

[0297] [化110]



[0298] ３－クロロ－２，４，５－トリフルオロ－６－ニトロ安息香酸（２．０ｇ，７．８３ｍｍｏｌ）のジクロロメタン溶液に、オキサリルクロリド（０．７５ｍｌ）およびＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１滴）を加え、３時間撹拌した。反応液を減圧濃縮した残留物のテトラヒドロフラン溶液（３０ｍｌ）を、２－（２－エトキシ－２－オキソエチリデン）－４，４－ジメチルイミダゾリジン－１－カルボン酸　ベンジルエステル（４．４１ｇ，１３．９ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン溶液（７０ｍｌ）に氷冷下加え、室温で１時

間撹拌した。水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、固体（４．６３ｇ）を得た。得られた固体（４．６０ｇ、８．２８ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン溶液（２００ｍｌ）にジイソプロピルエチルアミン（１４．４ｍｌ，８２．８ｍｍｏｌ）を加え、２日間加熱還流した。室温まで放冷後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。溶媒を減圧留去し、酢酸エチルを加えて析出物を濾取し、標記化合物（１．６ｇ）を固体として得た。

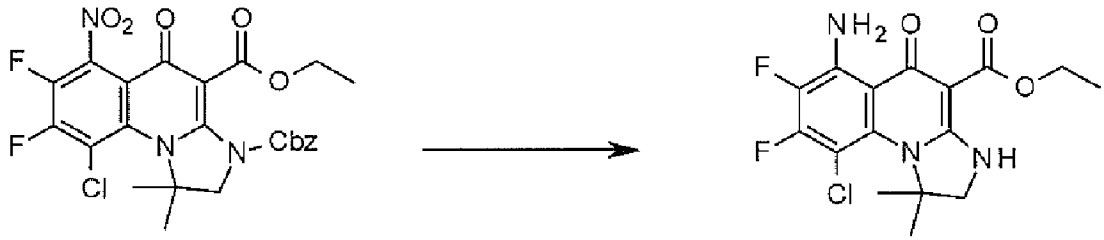
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.14 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.89 (6H, s), 4.03-4.07 (4H, m), 5.25 (2H, s), 7.35-7.44 (5H, m).

MS (ESI) m/z: 536 $[M+H]^+$.

（工程３）

６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0299] [化111]



[0300] ３－ベンジル　４－エチル　９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－６－ニトロ－５－オキソ－１，２－ジヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－３，４（５Ｈ）－ジカルボキシレート（５００ｍｇ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０ｍｌ）溶液に５％パラジウム炭素（ＡＤ，ｗｅｔ，１５０ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で一晩撹拌した。ろ過後、母液を濃縮し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（２３０ｍｇ）を固体として得た。

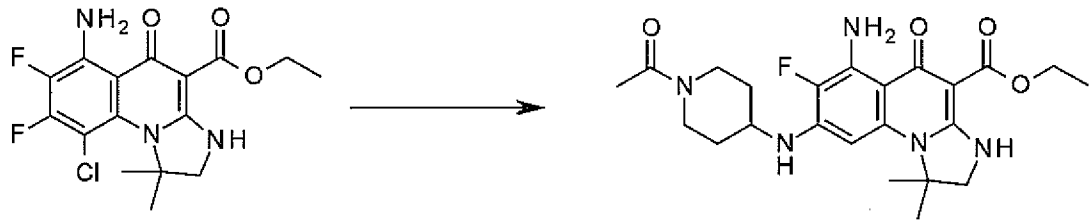
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.25 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.82 (6H, s), 3.54 (2H, s), 4.19 (2H, q, J = 7.3 Hz), 8.62 (1H, s).

MS (ESI) m/z: 372 $[M+H]^+$.

（工程４）

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0301] [化112]



[0302] ６－アミノ－９－クロロ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（２３０ｍｇ）のジメチルスルホキシド溶液（３ｍｌ）に１－（４－アミノピペリジン－１－イル）エタノン（５２８ｍｇ、３．７１ｍｍｏｌ）を加え、１３０度で一晩撹拌した。水を加え、１０％メタノール含有クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（１６１ｍｇ）を固体として得た。

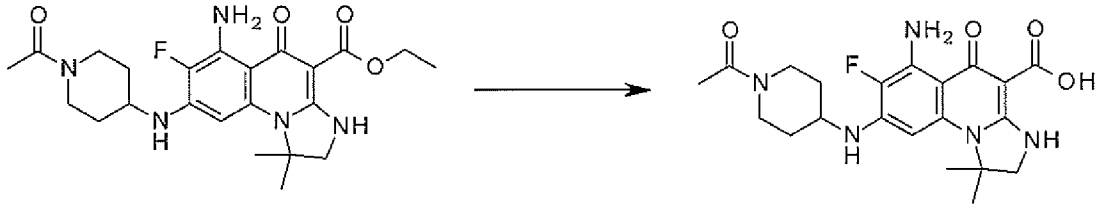
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.23 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.31-1.49 (2H, m), 1.66-1.68 (6H, m), 1.83-1.96 (2H, m), 2.01 (3H, s), 2.76 (1H, t, J= 11.2 Hz), 3.18 (1H, t, J = 11.5 Hz), 3.56 (3H, s), 3.83 (1H, d, J= 14.9 Hz), 4.15 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.30 (1H, d, J = 14.9 Hz), 5.69-5.72 (1H, m), 5.86 (1H, d, J= 6.9 Hz), 8.41 (1H, s).

MS (ESI) m/z: 460 $[M+H]^+$.

（工程５）

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0303] [化113]



[0304] ８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（７０ｍｇ，０．１５ｍｍｏｌ）のジオキサン－水－メタノール（１５：７：１０、３．２ｍｌ）混合溶液に水酸化リチウム一水和物（１３ｍｇ，０．３ｍｍｏｌ）を加え、室温で終夜撹拌した。酢酸（２６μｌ，０．４６ｍｍｏｌ）を加え、１０％メタノール含有クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（６０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.33-1.50 (2H, m), 1.84-1.96 (2H, m), 2.01 (3H, s), 2.73-2.79 (1H, m), 3.16-3.23 (1H, m), 3.64-3.66 (3H, m), 3.81-3.86 (1H, m), 4.29-4.34 (1H, m), 5.95 (1H, d, J= 6.9 Hz), 6.09 (1H, d, J = 6.9 Hz), 7.03 (1H, br s), 8.75 (1H, s).

MS (ESI) m/z: 432[M+H]$^+$.

実施例４６

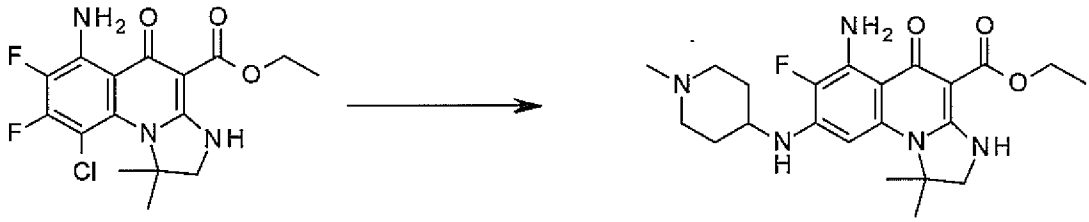
６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイ

ミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

（工程１）

６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル

[0305] [化114]



[0306] 実施例４５の工程３で得た化合物および４－アミノ－１－メチルピペリジンを用い、実施例４５の工程４と同様の手法により、標記化合物を固体として得た。

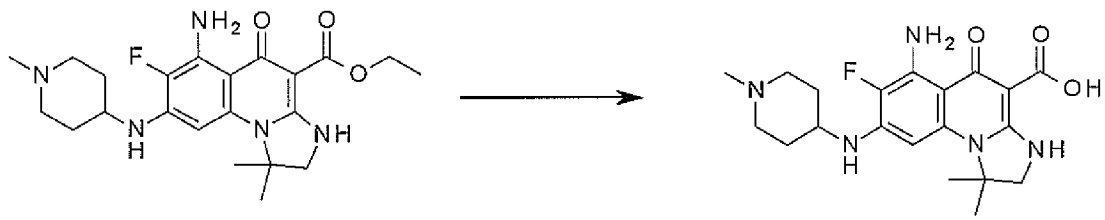
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.23 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.49-1.58 (2H, m), 1.65 (6H, s), 1.85 (2H, d, J = 12.0 Hz), 1.96-2.02 (2H, m), 2.17 (3H, s), 2.74-2.79 (2H, m), 3.55 (2H, s), 4.15 (2H, q, J = 7.1 Hz), 5.64-5.67 (1H, m), 5.82 (1H, d, J = 6.9 Hz), 8.40 (1H, s).

MS (ESI) m/z: 432[M+H]$^+$.

（工程２）

６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0307] [化115]



[0308] ６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸　エチルエステル（１５９ｍｇ，０．３７ｍｍｏｌ）のジオキサン－水－メタノール（３：１：１、５ｍｌ）混合溶液に水酸化リチウム一水和物（９３ｍｇ，２．２１ｍｍｏｌ）を加え、室温で終夜撹拌した。酢酸（１４８μｌ，２．５８ｍｍｏｌ）を加えて酸性とした後、アンモニア水を加えて塩基性とし、１０％メタノール含有クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（１１０ｍｇ）を固体として得た。

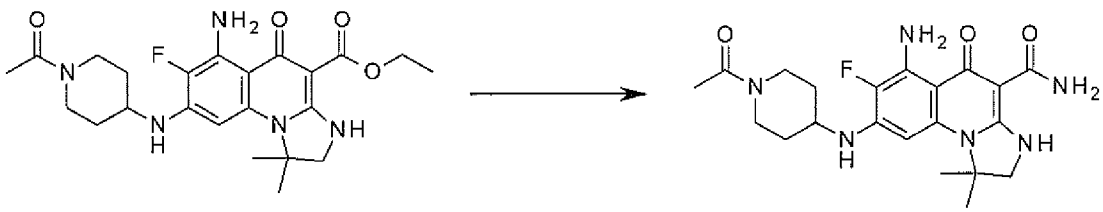
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.52-1.61 (2H, m), 1.69 (6H, s), 1.82-1.88 (2H, m), 1.96-2.03 (3H, m), 2.17 (3H, s), 2.73-2.80 (2H, m), 3.23-3.31 (1H, m), 3.64 (2H, s), 5.91 (1H, d, J = 6.9 Hz), 6.05 (1H, d, J = 6.3 Hz), 7.01 (1H, br s), 8.73 (1H, s).

MS (ESI) m/z: 404[M+H]$^+$.

実施例４７

８－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－６－アミノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボキシアミド

[0309] [化116]



[0310] 実施例４５の工程４で得られた化合物（８０ｍｇ、０．１７ｍｍｏｌ）にアンモニアーメタノール溶液（８Ｎ、１ｍｌ）、アンモニア水（１ｍｌ）を加え、封管中１００度で一晩撹拌した。濃縮後、分取用薄相クロマトグラフィ

ー（クロロホルム：メタノール＝１：１）および逆相クロマトグラフィー（水ーアセトニトリル系）にて精製し、標記化合物（２５ｍｇ）を固体として得た。

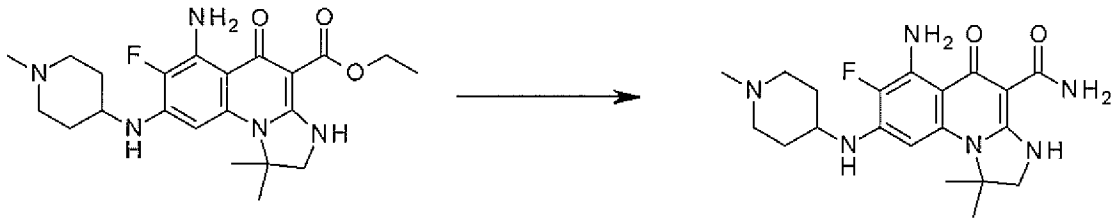
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.32-1.50 (2H, m), 1.68 (6H, s), 1.85-1.97 (2H, m), 2.01 (3H, s), 2.75-2.80 (1H, m), 3.16-3.22 (1H, m), 3.54-3.61 (9H, m), 3.83 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.30 (1H, d, J = 12.0 Hz), 5.70-5.74 (1H, m), 5.89 (1H, d, J = 6.9 Hz), 6.85 (1H, d, J = 5.2 Hz).

MS (ESI) m/z: 431[M+H]$^+$.

実施例４８

６ーアミノー７ーフルオロー１，１ージメチルー８ー［（１ーメチルピペリジンー４ーイル）アミノ］ー５ーオキソー１，２，３，５ーテトラヒドロイミダゾ［１，２ーａ］キノリンー４ーカルボキシアミド

[0311] [化117]



[0312] 実施例４６の工程１で得た化合物（２００ｍｇ、０．４６ｍｍｏｌ）にアンモニアーメタノール溶液（８Ｍ、１ｍｌ）、アンモニア水（５０ｍｌ）を加え、封管中８０度で一晩撹拌した。濃縮後、蟻酸を加えて中和し、逆相クロマトグラフィー（水ーアセトニトリル系）および超臨界クロマトグラフィー（メタノール４０％）にて精製し、標記化合物（４５ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.53-1.63 (2H, m), 1.66 (6H, s), 1.88 (2H, d, J = 11.5 Hz), 2.13 (2H, t, J = 11.5 Hz), 2.24 (3H, s), 2.84 (2H, d, J = 11.5 Hz), 3.22-3.32 (1H, m), 3.59 (2H, s), 5.77 (1H, d, J= 6.9 Hz), 5.84 (1H, d, J = 6.9 Hz), 6.91 (1H, d, J = 5.2 Hz), 8.19 (1H, s), 9.39

(1H, s), 9.73 (1H, d, J= 5.2 Hz).

MS (ESI) m/z: 403[M+H]+.

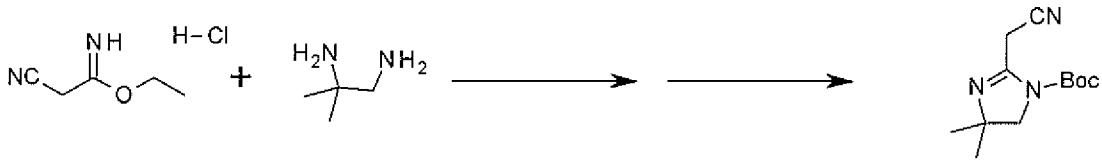
実施例４９

６－アミノ－９－クロロ－４－シアノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－３（５Ｈ）－カルボン酸

（工程１）

２－（シアノメチル）－４，４－ジメチル－４，５－ジヒドロ－１Ｈ－イミダゾール－１－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル

[0313] [化118]



[0314] エチル　２－シアノエタンイミデート塩酸塩（５．１２ｇ、３４．５ｍｍｏｌ）のエタノール溶液（１３０ｍｌ）に１，２－ジアミノ－２－メチルプロパン（３．９３ｍｌ，３７．９ｍｍｏｌ）を加え、室温で２時間撹拌した。溶媒を留去した後、テトラヒドロフラン（３００ｍｌ）と飽和重曹水（１５０ｍｌ）、ジｔｅｒｔ－ブチル　ジカーボネート（８．２７ｇ，３７．９ｍｍｏｌ）を加えて室温で１時間撹拌した。酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。溶媒を減圧留去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（酢酸エチル－ヘキサン系）で精製し、標記化合物（１．２４ｇ）を固体として得た。

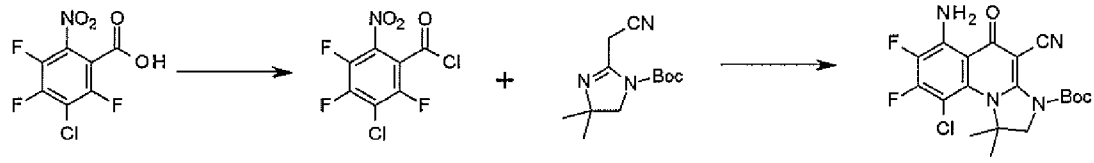
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.29 (3H, s), 1.34 (3H, s), 1.52 (9H, s), 3.45 (1H, s), 3.53 (1H, s), 3.59 (2H, s).

MS (ESI) m/z: 436 [M+H]+.

（工程２）

６－アミノ－９－クロロ－４－シアノ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－３（５Ｈ）－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル

[0315] [化119]



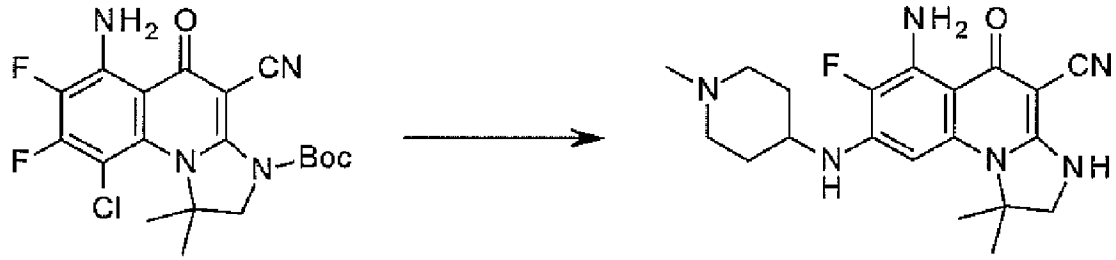
[0316] ３－クロロ－２，４，５－トリフルオロ－６－ニトロ安息香酸（８５８ｍｇ，３．３６ｍｍｏｌ）のジクロロメタン溶液に、オキサリルクロリド（０．３２ｍｌ）およびＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１滴）を加え、３時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した残留物のトルエン溶液（３０ｍｌ）を、２－（シアノメチル）－４，４－ジメチル－４，５－ジヒドロ－１Ｈ－イミダゾール－１－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル（８１７ｍｇ，３．４４ｍｍｏｌ）のトルエン溶液（１０ｍｌ）に滴下し、室温で２時間撹拌した。トリエチルアミン（４３６μｌ，３．１３ｍｍｏｌ）を加え、一晩撹拌した。飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物（１．４９ｇ）のアセトン溶液（３０ｍｌ）に炭酸カリウム（５２０ｍｇ、３．７６ｍｍｏｌ）を加え、室温で３時間撹拌した。水を加え、クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。酢酸エチルを加え、析出した固体を濾取した。得られた固体（６２０ｍｇ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０ｍｌ）溶液に１０％パラジウム炭素（ＡＤ，ｗｅｔ，１２０ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で一晩撹拌した。ろ過後、母液を濃縮し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（５６０ｍｇ）を固体として得た。

MS (ESI) m/z: 425 $[M+H]^+$.

（工程３）

６－アミノ－９－クロロ－４－シアノ－７－フルオロ－１，１－ジメチル－８－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－１，２－ジヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－３（５Ｈ）－カルボニトリル

[0317] [化120]



[0318] ６－アミノ－９－クロロ－４－シアノ－７，８－ジフルオロ－１，１－ジメチル－５－オキソ－１，２－ジヒドロイミダゾ［１，２－ａ］キノリン－３（５Ｈ）－カルボン酸　ｔｅｒｔ－ブチルエステル（１５０ｍｇ）のＮ－メチルピロリドン溶液（５ｍｌ）に４－アミノ－１－メチルピペリジン（２６６μｌ、２．１２ｍｍｏｌ）を加え、１３０度で一晩撹拌した。溶媒を留去し、ジメチルスルホキシドに溶解後、蟻酸を加えて酸性とした後、逆相シリカゲルクロマトグラフィー（水－アセトニトリル系）にて精製し、標記化合物（２０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.58-1.67 (2H, m), 1.76 (6H, s), 2.02-2.09 (2H, m), 2.19 (2H, t, J = 10.6 Hz), 2.32 (3H, s), 2.78-2.87 (2H, m), 3.22-3.31 (1H, br m), 3.66 (2H, s), 4.17-4.22 (1H, m), 5.85 (1H, d, J= 6.9 Hz), 6.37 (1H, s), 6.64 (1H, br s).

MS (ESI) m/z: 385 $[M+H]^+$.

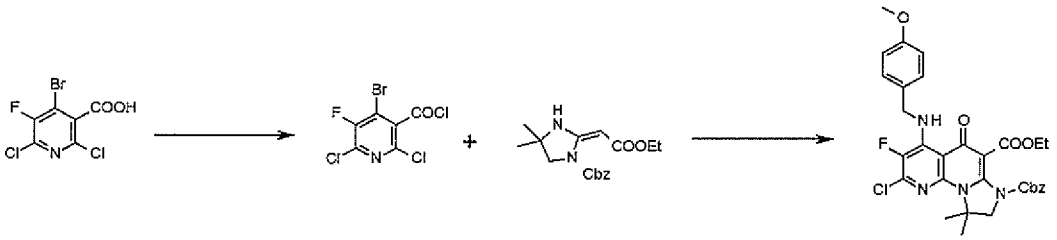
実施例５０

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－２－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド

（工程１）

２－クロロ－３－フルオロ－４－［（４－メトキシベンジル）アミノ］－９，９－ジメチル－５－オキソ－８，９－ジヒドロ－５Ｈ－イミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６，７－ジカルボン酸　７－ベンジルエステル　６－エチルエステル

[0319] [化121]



[0320] 実施例３５の工程１で得た化合物（５ｇ、１７．３ｍｍｏｌ）に塩化チオニル（８ｍｌ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（３滴）を加え、７０℃で２時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残留物にトルエンを加え、再度溶媒を減圧留去し、テトラヒドロフラン（５０ｍｌ）に溶解した。実施例４５の工程１で得た化合物（６．１ｇ、１９ｍｍｏｌ）のテトラヒドロフラン（１０ｍｌ）溶液を加えた後、炭酸水素ナトリウム（１．５ｇ）を加え、５０℃で８時間攪拌した後、室温で１０時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル－飽和重曹水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝６：４）で粗く精製し、油状物（６．８５ｇ）を得た。

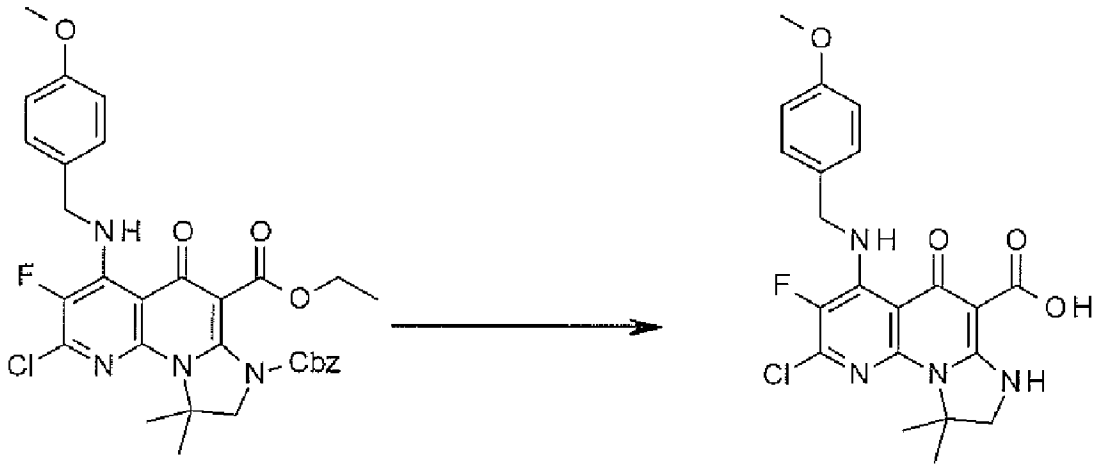
上記油状物（６．８５ｇ）にアセトニトリル（３０ｍｌ）、ｐ－メトキシベンジルアミン（４．７ｍｌ）を加え、５０℃で２時間攪拌した。さらにｐ－メトキシベンジルアミン（１ｍｌ）を加え、同温にて２時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル－水に分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝９：１～３：７）で精製し、標記化合物（２．２ｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.27 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.68 (3H, s), 1.69 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.98 (2H, s), 4.22 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.59 (2H, d, J = 5.5 Hz), 5.24 (2H, s), 6.82-6.85 (2H, m), 7.27-7.30 (2H, m), 7.35-7.38 (5H, m), 10.62 (1H, t, J = 5.5 Hz).

（工程２）

２－クロロ－３－フルオロ－４－［（４－メトキシベンジル）アミノ］－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸

[0321] [化122]



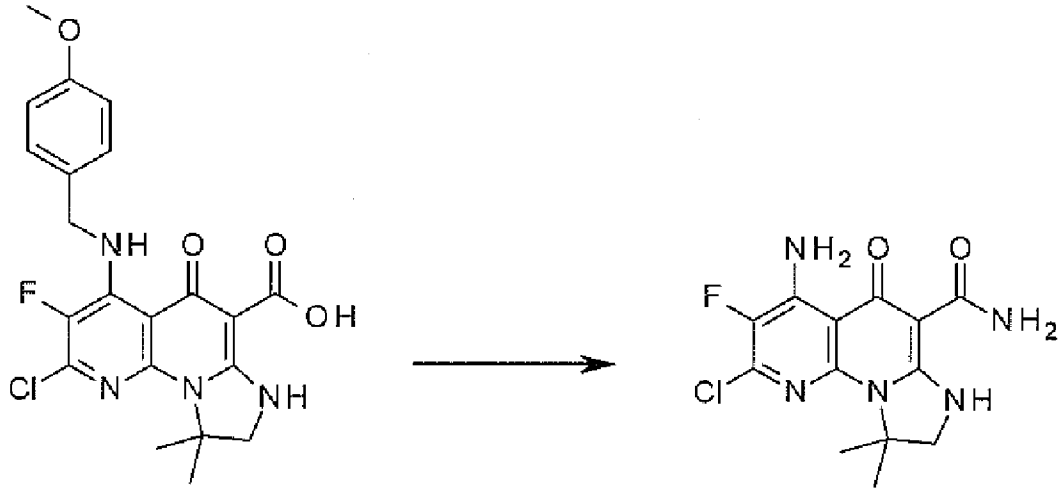
[0322] ２－クロロ－３－フルオロ－４－［（４－メトキシベンジル）アミノ］－９，９－ジメチル－５－オキソ－８，９－ジヒドロ－５Ｈ－イミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６，７－ジカルボン酸　７－ベンジルエステル　６－エチルエステル（２９９ｍｇ、0.33ｍｍｏｌ）をテトラヒドロフラン（３ｍｌ）－メタノール（３ｍｌ）に溶解し、水酸化リチウム一水和物（５６ｍｇ、１．３２ｍｍｏｌ）、水（１ｍｌ）を加え、３日間攪拌した。反応混合物に１Ｍ塩酸（１．３５ｍｌ）を加え、酢酸エチル－飽和食塩水に分配した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、不溶物を濾取、乾燥し、標記化合物（１０６ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.79 (3H, s), 1.80 (3H, s), 3.78-3.81 (5H, m), 4.63 (2H, d, J = 5.5 Hz), 6.86-6.90 (2H, m), 7.29-7.33 (2H, m), 9.20 (1H, s), 10.04-10.09 (1H, m).

（工程３）

４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド

[0323] [化123]



[0324] ２－クロロ－３－フルオロ－４－［（４－メトキシベンジル）アミノ］－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸（８７ｍｇ，０．１９ｍｍｏｌ）のジクロロエタン懸濁液（２ｍｌ）に塩化アンモニウム（２０８ｍｇ，３．８９ｍｍｏｌ）、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（１２２ｍｇ、０．２３ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（８１４μｌ，５．８４ｍｍｏｌ）を加え、室温で一晩撹拌した。１０％メタノール含有クロロホルムで希釈し、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチルを加え、析出した固体を濾取した。得られた固体（７５ｍｇ）の塩化メチレン懸濁液（２ｍｌ）にトリフルオロ酢酸（１４９μｌ，２

．０２ｍｍｏｌ）を加え、室温で４時間撹拌した。溶媒流去後、アンモニア水を加えて塩基性とし、析出物を濾取し、標記化合物（４５ｍｇ）を固体として得た。

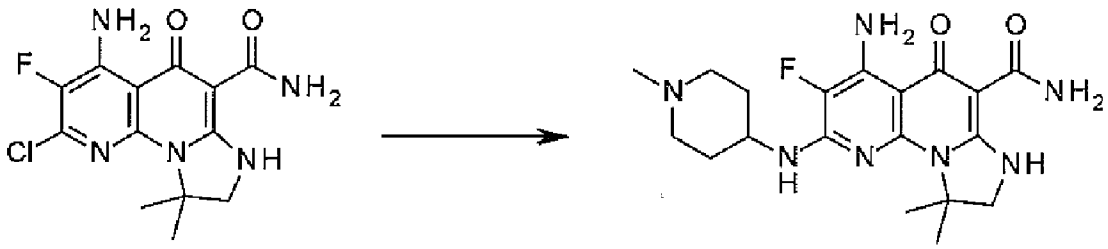
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.90 (6H, s), 3.63-3.65 (2H, br m), 9.21 (1H, br s).

MS (ESI) m/z: 326 $[M+H]^+$.

（工程４）

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－２－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド

[0325] [化124]



[0326] ４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド（３６０ｍｇ、１．１１ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド溶液（１８ｍｌ）に４－アミノ－１－メチルピペリジン（１．３９ｍｌ、１１．１ｍｍｏｌ）を加え、マイクロ波照射下、１５０度で１５分間撹拌した。アンモニア水を加え、１０％メタノール含有クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（３１５ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.54-1.64 (8H, m), 1.74-1.80 (2H, m), 1.95 (2H, br s), 2.18 (3H, s), 2.75-2.83 (2H, m), 3.63 (2H, s), 3.85-3.92 (1H, m), 6.47 (1H, br s), 6.65 (1H, d, J= 6.9 Hz), 6.97 (1H, d, J = 5.2 Hz)

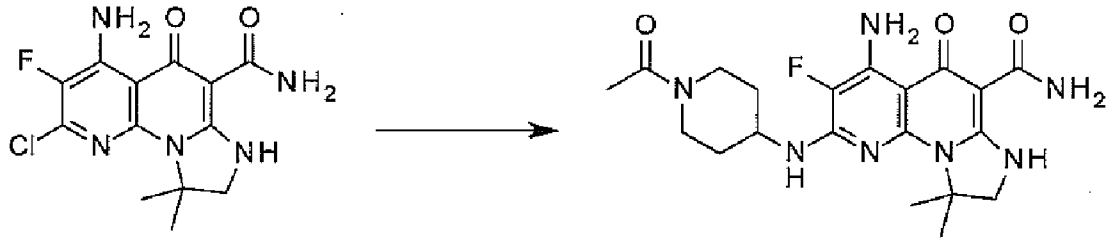
, 9.47 (1H, br s), 9.68 (1H, d, J= 5.2 Hz), 9.90 (1H, s).

MS (ESI) m/z: 404[M+H]+.

実施例５１

２－［（１－アセチルピペリジン－４－イル）アミノ］－４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド

[0327] [化125]



[0328] 実施例５０の工程３で得られた４－アミノ－２－クロロ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロイミダゾ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボキシアミド（３００ｍｇ）のジメチルスルホキシド溶液（１０ｍｌ）に１－（４－アミノピペリジン－１－イル）エタノン（１．１２ｇ、７．８８ｍｍｏｌ）を加え、マイクロ波照射下、１５０度で１５分間撹拌した。アンモニア水を加え、１０％メタノール含有クロロホルムで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム－メタノール系）で精製し、標記化合物（１５５ｍｇ）を固体として得た。

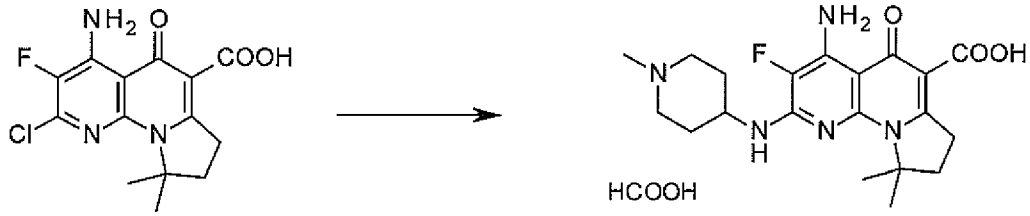
^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.32-1.52 (2H, m), 1.62 (6H, s), 1.78-1.91 (2H, m), 2.01 (3H, s), 2.60 (1H, t, J= 12.6 Hz), 3.08 (1H, t, J = 12.6 Hz), 3.63 (2H, s), 3.84 (1H, d, J= 13.7 Hz), 4.09-4.18 (1H, m), 4.37 (1H, d, J = 12.6 Hz), 6.49 (1H, br s), 6.72 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.99 (1H, d, J = 4.9 Hz), 9.50 (1H, br s), 9.68 (1H, d, J = 4.9 Hz), 9.90 (1H, s).

MS (ESI) m/z: 464 [M+H]+.

実施例５２

４－アミノ－３－フルオロ－９，９－ジメチル－２－［（１－メチルピペリジン－４－イル）アミノ］－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸　ギ酸塩

[0329] [化126]



[0330] 実施例３５の工程５で得られた化合物（７０ｍｇ、０．２１ｍｍｏｌ）と１－メチルピペリジン－４－アミン（４９ｍｇ、０．４３ｍｍｏｌ）のＮ－メチルピロリドン（１ｍｌ）溶液にトリエチルアミン（６０μｌ，０．４３ｍｍｏｌ）を加え、１００℃にて３日間撹拌した。反応混合物を逆相ＨＰＬＣ［アセトニトリル：水：ギ酸］にて精製、減圧濃縮した後、得られた残渣を酢酸エチルで洗浄することにより目的物（２５ｍｇ）を固体として得た。

[0331] ^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.61-1.71 (2H, m), 1.75 (6H, s), 1.80-1.86 (2H, m), 2.00-2.07 (2H, m), 2.13 (2H, t, J = 7.8 Hz), 2.23 (3H, s), 2.86-2.91 (2H, m), 3.57 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.79-3.88 (1H, m), 6.58-8.61 (2H, m), 7.23 (1H, d, J= 7.8 Hz), 8.17 (1H, s).

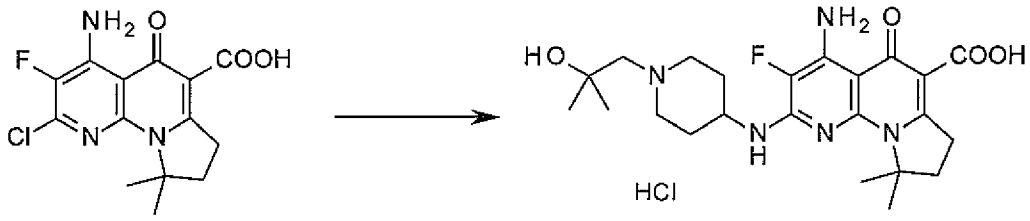
MS (ESI) m/z: 404 $[M+H]^+$.

実施例５３

４－アミノ－３－フルオロ－２－［｛１－（２－ヒドロキシ－２－メチルプロピル）ピペリジン－４－イル｝アミノ］－９，９－ジメチル－５－オキソ－５，７，８，９－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］［１，８］ナフチリジン－６－カルボン酸　塩酸塩

[0332]

[化127]



[0333] 実施例３５の工程５で得られた化合物（５００ｍｇ、１．５ｍｍｏｌ）および１－（４－アミノピペリジン－１－イル）－２－メチルプロパン－２－オール（３９７ｍｇ、２．３ｍｍｏｌ）のジメチルスルホキシド（１０ｍｌ）溶液にトリエチルアミン（１．１ｍｌ、７．７ｍｍｏｌ）を加えマイクロウェーブ照射下１５０℃にて６時間撹拌した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム：メタノール＝９９：１→９：１（ｖ／ｖ）］にて精製した。得られた残渣をメタノールで希釈した後、4規定　塩酸－ジオキサン溶液を加え撹拌した。溶媒を減圧留去後、得られた残渣にイソプロパノールと酢酸エチルを加え固化することで、目的物（１５０ｍｇ）を固体として得た。

^{1}H-NMR (D2O + NaOD) δ: 1.55-1.63 (2H, m), 1.71 (6H, s), 1.89-1.92 (2H, m), 2.14 (2H, t, J = 7.9 Hz), 2.31-2.36 (2H, m), 2.44 (2H, s), 2.99-3.03 (2H, m), 3.10 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.88-3.94 (1H, m).

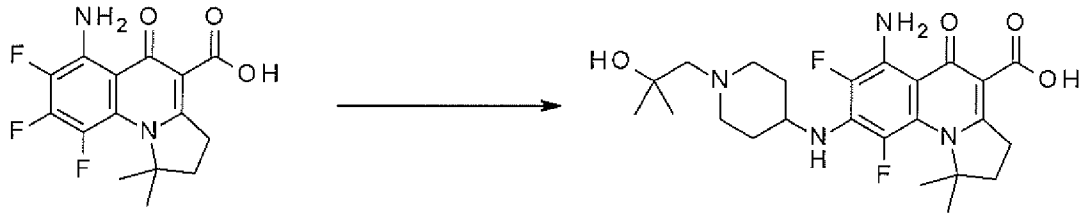
ESI-MS m/z: 462 $[M+H]^+$.

実施例５４

６－アミノ－７，９－ジフルオロ－１，１－ジメチル－８－［｛１－（２－ヒドロキシ－２－メチルプロピル）ピペリジン－４－イル｝アミノ］－５－オキソ－１，２，３，５－テトラヒドロピロロ［１，２－ａ］キノリン－４－カルボン酸

[0334]

[化128]



[0335] 実施例１７の工程５で得られた化合物および１－（４－アミノピペリジン－１－イル）－２－メチルプロパン－２－オールを用い、実施例１７と同様の方法で標記化合物を固体として得た。

[0336]

^{1}H-NMR (D2O + NaOD) δ: 1.21 (6H, s), 1.52-1.59 (2H, m), 1.65 (3H, s), 1.66 (3H, s), 1.87-1.93 (2H, m), 2.17-2.27 (4H, m), 2.37 (2H, s), 2.92-2.95 (2H, m), 3.11 (2H, t, J = 7.5 Hz), 3.53-3.677 (1H, m).

ESI-MS m/z : 479 $(M+H)^+$.

（試験例１　ＧＳＫ－３阻害活性）

被験化合物存在下又は非存在下における、ＧＳＫ３のキナーゼ活性を測定した。基質ペプチドはＧＳＫ３のキナーゼ活性によりリン酸化を受ける。キナーゼによりリン酸化された基質は、リン酸化されていない基質に比べてリン酸基の分だけ電荷がマイナス（陰性）に変化するため、この変化を電気泳動の原理で分離（Ｍｏｂｉｌｉｔｙ　Ｓｈｉｆｔ　Ａｓｓａｙ法）して、リン酸化の程度を定量した。

（１）試料の調製と酵素反応

ヒトのＧＳＫ３βの全長（１－４２０アミノ酸）のＮ末端側にＧＳＴタグを導入し、昆虫細胞でウイルス依存的に発現させたＧＳＴ－ＧＳＫ３蛋白（ＧＳＫ３β、カルナバイオサイエンス）を用いた。

[0337] 次に、上記のＧＳＴ－ＧＳＫ３蛋白と１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、０．００３％　Ｂｒｉｊ－３５、０．００４％　Ｔｗｅｅｎ－２０、

１ｍＭ　ＤＴＴ、１０ｍＭ　$MgCl_2$を含むＧＳＫ３β酵素溶液を調製し、３８４　ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（コーニング）に分注した。

[0338] 被験化合物はＤＭＳＯに溶解し、ＤＭＳＯを用いて希釈系列を調製した。この化合物溶液を分注したＧＳＫ３酵素溶液に添加し、混合した後、室温で３０分のプレインキュベーションを行った。

[0339] 上記の被験化合物を含むｗｅｌｌに基質溶液（１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、０．００３％　Ｂｒｉｊ－３５、０．００４％　Ｔｗｅｅｎ－２０、１ｍＭ　ＤＴＴ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、ＡＴＰ（最終濃度２０μＭ）、ＦＬ－Ｐｅｐｔｉｄｅ　１５（キャリパーライフサイエンス）を添加し、混合した後、１．５時間２８℃に放置し、酵素反応を進行させた。

[0340] 酵素反応の進行を確認するポジティブコントロールとしては化合物溶液の代わりにＤＭＳＯを使用し、酵素反応が進行しないネガティブコントロールとしては、基質溶液の代わりに基質溶液からＡＴＰを除いたものを使用し同様の操作を行った。

（２）酵素反応の検出

酵素反応後に、各ｗｅｌｌに反応停止液（１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、０．０１５％　Ｂｒｉｊ－３５、４０ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％　Ｃｏａｔｉｎｇ　Ｒｅａｇｅｎｔ　３（キャリパーライフサイエンス）を添加後、キャリパーライフサイエンス社のＥＺ　Ｒｅａｄｅｒ　ＩＩを用いてリン酸化された基質とリン酸化されていない基質を分離し、基質ペプチドがリン酸化された割合（Ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ）と阻害活性（Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ）を測定した。シグモイド曲線に測定値をフィッティングすることで、化合物が５０％阻害を示す濃度をＧＳＫ３β酵素阻害活性のIC_{50}値として算出した。

[0341] 各実施例化合物のIC_{50}値は、２０ｎＭ以下であった。

[0342]

（試験例２　ＬＹ２０９０３１４と各種抗ＤＲ５抗体とのｉｎ　ｖｉｔｒｏ併用効果の検討）

ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１（米国ＡＴＣＣ社）を２×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ウエルプレートに播種し一晩培養した。そこにＬＹ２０９０３１４の希釈系列を各ウエルに添加した細胞群、またはＬＹ２０９０３１４の希釈系列ならびに抗ＤＲ５抗体（最終濃度１μｇ／ｍＬ）と架橋用の２次抗体（ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体、ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，ＬＬＣ、Ｃａｔ＃：５５０７１、最終濃度２μｇ／ｍＬ）溶液を各ウエルに添加した細胞群を作成し、さらに１日間培養した。その後、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）またはＣａｓｐａｓｅ－Ｇｌｏ™ ３／７　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）の試薬を各ウエルに添加し、それぞれ、細胞内ＡＴＰ量の変化（細胞数を反映）または細胞内Ｃａｓｐａｓｅ３／７活性（細胞死の誘導）を発光量として測定した。Ｃａｓｐａｓｅ３／７活性については、測定された数値を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™の発光量の数値（細胞数を反映）で割ることで、単位細胞あたりのカスパーゼ活性とした。被検化合物を含まないウエルの細胞が示した単位細胞あたりのカスパーゼ活性の数値を１とした場合の、被検物質や抗体で処理した細胞でのカスパーゼ活性の誘導倍率を評価した。抗ＤＲ５抗体による薬効への効果確認は上記の抗ＤＲ５抗体非添加細胞群との比較で行った。本試験において使用した抗ＤＲ５抗体はｈＢ２７３、ｈＴＲＡ８、およびＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂである。

[0343] 結果を図１－１～図１－３に示す。

[0344]

（試験例３　実施例化合物（Ｃｏｍｐｏｕｎｄ）１８、２１、２７、３６、３７、３９、５２、５３、５４とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｔｒｏ併用効果の検討）

ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１（米国ＡＴＣＣ社）を２×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ウエルプレートに播種し一晩培養した。そこにＣｏｍｐｏｕｎｄ１８、２１、２７、３７、３９、５２、５３の希釈系列

を各ウエルに添加した細胞群、またはＣｏｍｐｏｕｎｄ１８、２１、２７、３７、３９、５２、５３または５４の希釈系列ならびにｈＢ２７３（最終濃度１０μｇ／ｍＬ）と架橋用の２次抗体（ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体、ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，ＬＬＣ、Ｃａｔ＃：５５０７１、最終濃度２０μｇ／ｍＬ）溶液を各ウエルに添加した細胞群を作成し、さらに１日間培養した。その後、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）またはＣａｓｐａｓｅ－Ｇｌｏ™ ３／７ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を各ウエルに添加し、それぞれ、細胞内ＡＴＰ量の変化（細胞数を反映）または細胞内Ｃａｓｐａｓｅ３／７活性（細胞死の誘導）を発光量として測定した。Ｃａｓｐａｓｅ３／７活性については、測定された数値を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™の発光量の数値（細胞数を反映）で割ることで、単位細胞あたりのカスパーゼ活性とした。被検化合物を含まないウエルの細胞が示した単位細胞あたりのカスパーゼ活性の数値を１とした場合の、被検物質や抗体で処理した細胞でのカスパーゼ活性の誘導倍率を評価した。ｈＢ２７３による薬効への効果確認は上記の抗ＤＲ５抗体非添加細胞群との比較で行った。

[0345] 結果を図２－１～図２－９に示す。

[0346]

（試験例４　Ｃｏｍｐｏｕｎｄ１８、３６、３７、３９、５３、５４とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂもしくはｈＴＲＡ８とのｉｎ　ｖｉｔｒｏ併用効果の検討）

ヒト急性リンパ性白血病細胞株ＲＳ４；１１（米国ＡＴＣＣ社）を２×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ウエルプレートに播種し一晩培養した。そこにＣｏｍｐｏｕｎｄ１８、３６、３７、３９、５３または５４の希釈系列を各ウエルに添加した細胞群、またはＣｏｍｐｏｕｎｄ１８、３６、３７、３９、５３または５４の希釈系列ならびにＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂもしくはｈＴＲＡ８（最終濃度１０μｇ／ｍＬ）と、架橋用の２次抗体（ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体、ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，ＬＬＣ、Ｃａｔ＃：５５０７１

、最終濃度２０μｇ／ｍＬ）溶液を各ウエルに添加した細胞群を作成し、さらに１日間培養した。その後、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）またはＣａｓｐａｓｅ－Ｇｌｏ™ ３／７ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を各ウエルに添加し、それぞれ、細胞内ＡＴＰ量の変化（細胞数を反映）または細胞内Ｃａｓｐａｓｅ３／７活性（細胞死の誘導）を発光量として測定した。Ｃａｓｐａｓｅ３／７活性については、測定された数値を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™の発光量の数値（細胞数を反映）で割ることで、単位細胞あたりのカスパーゼ活性とした。被検化合物を含まないウエルの細胞が示した単位細胞あたりのカスパーゼ活性の数値を１とした場合の、被検物質や抗体で処理した細胞でのカスパーゼ活性の誘導倍率を評価した。ｈＴＲＡ８またはＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂによる薬効への効果確認は上記の抗ＤＲ５抗体非添加細胞群との比較で行った。

[0347] 結果を図３－１～図３－６、図４－１～図４－６に示す。

[0348]

（試験例５ Ｃｏｍｐｏｕｎｄ２１とｈＢ２７３の併用による各種細胞株に対するｉｎ ｖｉｔｒｏ併用効果の検討）

ヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５（米国ＡＴＣＣ社）を５×１０^{3}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ、ヒト骨髄腫細胞株ＮＣＩ－Ｈ９２９を５×１０^{3}ｃｅｌｌｓ／ｍＬ、ヒト慢性骨髄性白血病細胞株Ｋ５６２を２×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、それぞれ９６ウエルプレートに播種し一晩培養した。そこにＣｏｍｐｏｕｎｄ２１の希釈系列を各ウエルに添加した細胞群、またはＣｏｍｐｏｕｎｄ２１の希釈系列ならびにｈＢ２７３（最終濃度１０μｇ／ｍＬ）と架橋用の２次抗体（ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体、ＭＰ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，ＬＬＣ、Ｃａｔ＃：５５０７１、最終濃度２０μｇ／ｍＬ）溶液を各ウエルに添加した細胞群を作成し、さらに１日間培養した。その後、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）またはＣａｓｐａｓｅ－Ｇｌｏ™ ３／７ Ａｓｓ

ａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を各ウエルに添加し、それぞれ、細胞内ＡＴＰ量の変化（細胞数を反映）または細胞内Ｃａｓｐａｓｅ３／７活性（細胞死の誘導）を発光量として測定した。Ｃａｓｐａｓｅ３／７活性については、測定された数値を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™の発光量の数値（細胞数を反映）で割ることで、単位細胞あたりのカスパーゼ活性とした。被検化合物を含まないウエルの細胞が示した単位細胞あたりのカスパーゼ活性の数値を１とした場合の、被検物質や抗体で処理した細胞でのカスパーゼ活性の誘導倍率を評価した。抗ＤＲ５抗体による薬効への効果確認は上記の抗ＤＲ５抗体非添加細胞群との比較で行った。

[0349] 結果を図５－１～図５－３に示す。

[0350]

（試験例６　ＬＹ２０９０３１４と各種抗ＤＲ５抗体とのｉｎ　ｖｉｖｏ併用効果の検討）

Ａ３７５細胞を４×１０^{7}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、腫瘍細胞懸濁液をＢＡＬＢ／ｃヌードマウス（雌性、５～７週齢）の皮下に０．１ｍＬ移植し、腫瘍体積の平均が１００ｍｍ^{3}を超えたことを確認後、腫瘍体積値を用いて群分けを行い、ＬＹ２０９０３１４を１００ｍｇ／ｋｇもしくは２００ｍｇ／ｋｇにてマウスに強制経口投与し、さらに、併用投与群では抗ＤＲ５抗体を尾静脈から投与した。投与開始から４日目にさらにＬＹ２０９０３１４を１００ｍｇ／ｋｇもしくは２００ｍｇ／ｋｇにてマウスに強制経口投与した。したがって、ＬＹ２０９０３１４は２回投与、抗ＤＲ５抗体は初日１回のみの投与とした。経時的に腫瘍の長径（ｍｍ）および短径（ｍｍ）を電子デジタルノギスで計測し、以下に示す計算式（４）により判定日（投与１週間後）の腫瘍増殖抑制率（ＧＩ％）で評価した。

[0351] ＧＩ　（％）　＝　（１－Ａ／Ｂ）×１００　・・・（４）

Ａ　：　化合物投与群の判定日の平均腫瘍体積　（＊）

Ｂ　：　無処置対照群の判定日の平均腫瘍体積　（＊）

＊　：　腫瘍体積は、１／２×［腫瘍長径］×［腫瘍短径］×［腫瘍

短径］で算出する。本試験において使用した抗ＤＲ５抗体およびその投与量はｈＢ２７３（３ｍｇ／ｋｇ）、ｈＴＲＡ８（１０ｍｇ／ｋｇ）およびＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂ（３ｍｇ／ｋｇ）であった。

[0352] 結果を図６－１～図６－３および表１～表３に示す。

[0353] [表1]

Grouping	GI(%)	N
hB273: 3mg/kg	33	5
LY2090314: 100mg/kg	-2	5
LY2090314(100)+hB273(3)	58	5
LY2090314:200mg/kg	12	5
LY2090314(200)+hB273(3)	94	5

[0354] [表2]

Grouping	GI(%)	N
hTRA8:10mg/kg	23	5
LY2090314:100mg/kg	-1	5
LY2090314(100) +hTRA8(10)	15	5
LY2090314:200mg/kg	16	5
LY2090314(200) +hTRA8(10)	30	5

[0355] [表3]

Grouping	GI(%)	N
Conatumumab:3mg/kg	13	5
LY2090314:100mg/kg	-1	5
LY2090314(100) +Conatumumab(3)	42	5
LY2090314:200mg/kg	16	5
LY2090314(200) +Conatumumab(3)	74	5

[0356] （試験例７　Ｃｏｍｐｏｕｎｄ１８、２１、２７、３６、５３、５４とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｖｏ併用効果の検討）

Ａ３７５細胞を４×１０^{7}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、腫瘍細胞懸濁液をＢＡＬＢ／ｃヌードマウス（雌性、５～７週齢）の皮下に０．１ｍＬ移植し、腫瘍体積の平均が１００ｍｍ^{3}を超えたこと確認後、腫瘍体積値を用いて群分

けを行い、被験化合物を表に示す濃度でマウスに強制経口投与し、さらに、併用投与群ではｈＢ２７３を３ｍｇ／ｋｇで尾静脈から投与した。投与は初日１回のみで、経時的に腫瘍の長径（ｍｍ）および短径（ｍｍ）を電子デジタルノギスで計測し、以下に示す計算式（４）により判定日（投与１週間後）の腫瘍増殖抑制率（ＧＩ％）で評価した。

[0357] ＧＩ （％） ＝ （１－Ａ／Ｂ）×１００ ・・・（４）

Ａ ： 化合物投与群の判定日の平均腫瘍体積 （＊）

Ｂ ： 無処置対照群の判定日の平均腫瘍体積 （＊）

＊ ： 腫瘍体積は、１／２×［腫瘍長径］×［腫瘍短径］×［腫瘍短径］で算出した。

[0358]

結果を図７－１から図７－３および表４～表９に示す。

[0359] [表4]

Grouping	GI(%)	N
hB273:3mg/kg	40	5
Compound 18:7.5mg/kg	17	5
Compound 18(7.5) +hB273(3)	65	5
Compound 18:15mg/kg	29	5
Compound 18(15) +hB273(3)	95	5

[0360] [表5]

Grouping	GI(%)	N
hB273:3mg/kg	32	5
Compound 21:3.5mg/kg	3	5
Compound 21(3.5)+hB273(3)	58	5
Compound 21:7mg/kg	28	5
Compound 21(7)+hB273(3)	93	5

[0361]

[表6]

Grouping	GI(%)	N
hB273:3mg/kg	40	5
Compound 36:3mg/kg	17	5
Compound 36(3) +hB273(3)	89	5
Compound 36:6mg/kg	63	5
Compound 36(6) +hB273(3)	100	5

[0362] [表7]

Grouping	GI(%)	N
hB273:3mg/kg	40	5
Compound 27:2.5mg/kg	5	5
Compound 27(2.5) +hB273(3)	49	5
Compound 27:5mg/kg	-3	5
Compound 27(5) +hB273(3)	68	5

[0363] [表8]

Grouping	GI(%)	N
hB273:3mg/kg	31	5
Compound 53:3mg/kg	-2	5
Compound 53(3) + hB273(3)	57	5
Compound 53:6mg/kg	23	5
Compound 53(6)+hB273(3)	87	5

[0364] [表9]

Grouping	GI(%)	N
hB283:3mg/kg	23	5
Compound 54: 25mg/kg	41	5
Compound 54 (25) + hB273 (3)	70	5
Compound 54: 50mg/kg	77	5
Compound 54 (50) + hB273 (3)	100	5

[0365] （試験例８　Ｃｏｍｐｏｕｎｄ２１、１８とｈＢ２７３とのｉｎ　ｖｉｖｏ併用効果の検討）

ＲＳ４；１１細胞を１×１０^{8}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、腫瘍細胞懸濁液をＮＯＤ／ｓｃｉｄマウス（雌性、４～５週齢）の皮下に０．１ｍＬ移植し、

腫瘍体積の平均が１００ｍｍ^{3}を超えたことを確認後、腫瘍体積値を用いて群分けを行い、被験化合物を表に示す濃度でマウスに強制経口投与し、さらに、併用投与群ではｈＢ２７３を３ｍｇ／ｋｇで尾静脈から投与した。投与は初日１回のみで、経時的に腫瘍の長径（ｍｍ）および短径（ｍｍ）を電子デジタルノギスで計測し、以下に示す計算式（４）により判定日（投与１週間後）の腫瘍増殖抑制率（ＧＩ％）で評価した。

[0366] ＧＩ　（％）　＝　（１－Ａ／Ｂ）×１００　・・・（４）

Ａ　：　化合物投与群の判定日の平均腫瘍体積　（＊）

Ｂ　：　無処置対照群の判定日の平均腫瘍体積　（＊）

＊　：　腫瘍体積は、１／２×［腫瘍長径］×［腫瘍短径］×［腫瘍短径］で算出した。

[0367]

結果を図８および表１０、表１１に示す。

[0368] [表10]

Grouping	GI(%)	N
hB273:3mg/kg	-3	5
Compound 21:2mg/kg	31	5
Compound 21(2)+hB273(3)	54	5
Compound 21:4mg/kg	57	5
Compound 21(4)hB273(3)	86	5

[0369] [表11]

Grouping		N
hB273:3mg/kg	10	4
Compound18:7.5mg/kg	40	4
Compound18(7.5)+hB273(3)	79	4
Compound18:15mg/kg	82	4
Compound18(15)+hB273(3)	100	4

請求の範囲

［請求項1］ グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が、組み合わせて投与されることを特徴とする癌治療のための医薬。

［請求項2］ グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が、それぞれ異なる製剤の有効成分として含有され、同時に、又は、異なる時間に投与されることを特徴とする請求項１に記載の医薬。

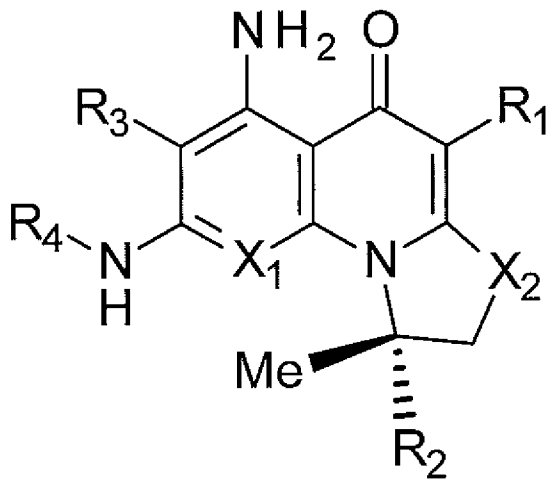
［請求項3］ グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が、単一製剤中に含有されていることを特徴とする請求項１に記載の医薬。

［請求項4］ グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体を含むキット製剤であることを特徴とする請求項１に記載の医薬。

［請求項5］ グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と、抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が組み合わせて投与されることを特徴とする癌の治療方法。

［請求項6］ グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤がＬＹ２０９０３１４または下記一般式（１）

［化1］



(1)

［式中、

R_1は、カルボキシ基、カルバモイル基またはシアノ基を示し、

R_2は、メチル基または水素原子を示し、

R_3は、ハロゲン原子を示し、

R_4は、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピペリジニル基、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピリジル基、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいシクロヘキサニル基または水素原子を示し、

X_1は、Ｃ－Ｈ、Ｃ－ＦまたはＮを示し、

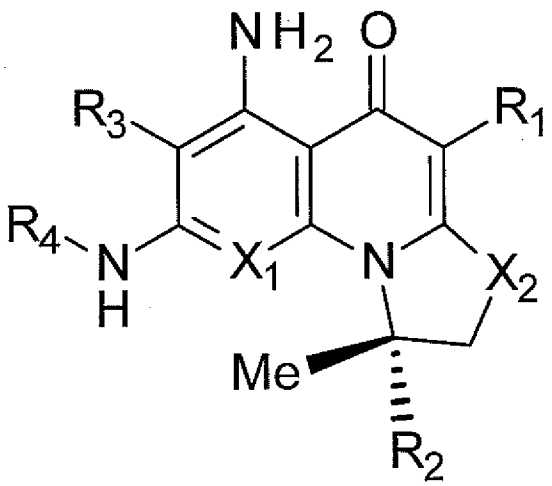
X_2は、CH_2、Ｎ－ＨまたはＳを示す。］

Ａ群：１～３個のハロゲン原子、水酸基またはメトキシ基で置換されていてもよいC_1－C_6アルキル基、アセチル基、メチルスルホニル基、水酸基。

で表される化合物もしくはその塩である請求項１～４のいずれか１項に記載の医薬。

［請求項7］ グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤がＬＹ２０９０３１４または下記一般式（１）

［化2］



(1)

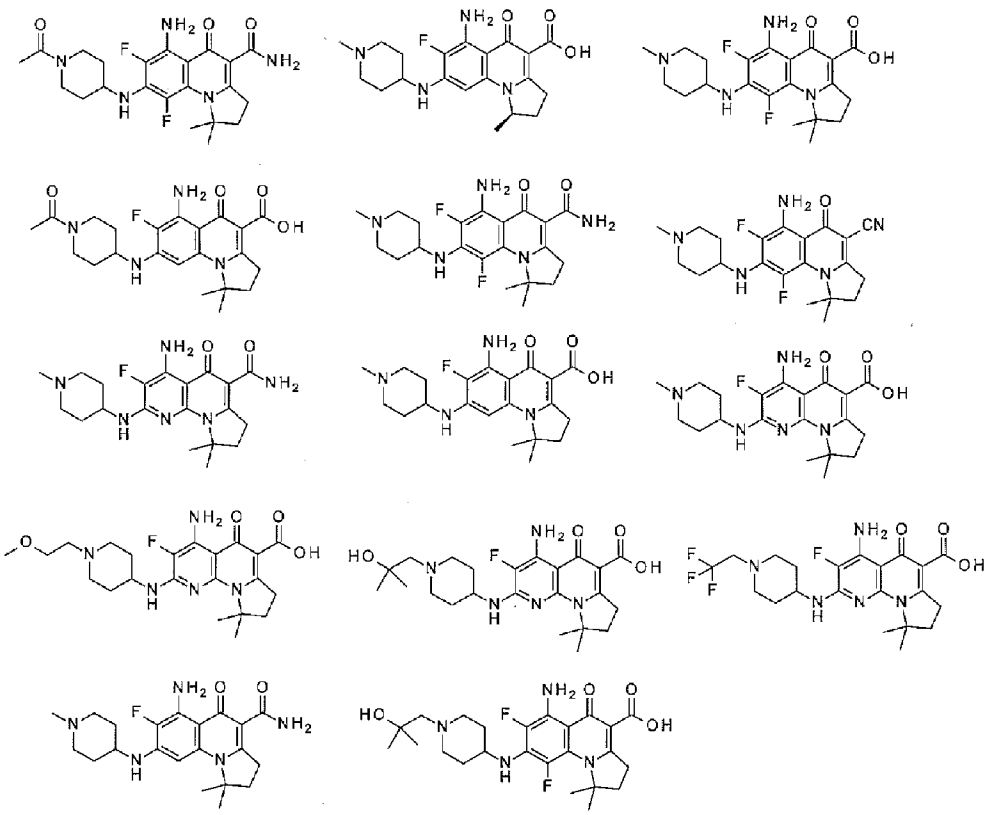
［式中、
R_1は、カルボキシ基、カルバモイル基またはシアノ基を示し、
R_2は、メチル基または水素原子を示し、
R_3は、ハロゲン原子を示し、
R_4は、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピペリジニル基、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいピリジル基、下記Ａ群から選ばれる置換基を有していてもよいシクロヘキサニル基または水素原子を示し、
X_1は、Ｃ－Ｈ、Ｃ－ＦまたはＮを示し、
X_2は、CH_2、Ｎ－ＨまたはＳを示す。］

Ａ群：１～３個のハロゲン原子、水酸基またはメトキシ基で置換されていてもよいC_1－C_6アルキル基、アセチル基、メチルスルホニル基、水酸基。

で表される化合物もしくはその塩である請求項５に記載の治療方法。

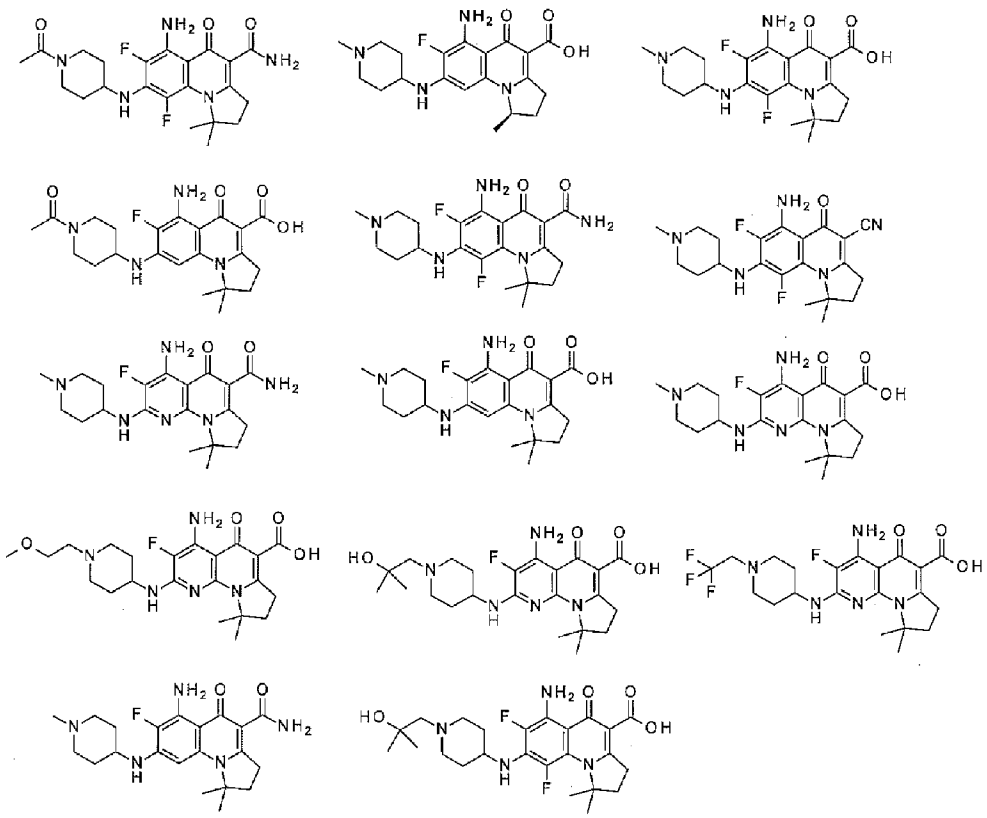
［請求項8］ グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤がＬＹ２０９０３１４または次の群から選ばれる１の化合物もしくはその塩である請求項１～４のいずれか１項に記載の医薬。

[化3]



[請求項9] グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤がＬＹ２０９０３１４または次の群から選ばれる１の化合物もしくはその塩である請求項５に記載の治療方法。

[化4]



[請求項10] 抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号１に示されるアミノ酸配列の１～４４９番目のアミノ酸残基または１～４４８番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～２１３番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である請求項１～４、６、８のいずれか１項に記載の医薬。

[請求項11] 抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号３に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号４に示されるアミノ酸配列の１～２１９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である請求項１～４、６、８のいずれか１項に記載の医薬。

[請求項12] 抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号５に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ

酸残基からなる重鎖配列、および配列番号６に示されるアミノ酸配列の１～２１５番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である請求項１～４、６、８のいずれか１項に記載の医薬。

[請求項13] 抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号１に示されるアミノ酸配列の１～４４９番目のアミノ酸残基または１～４４８番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～２１３番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である請求項５、７、９のいずれか１項に記載の治療方法。

[請求項14] 抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号３に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号４に示されるアミノ酸配列の１～２１９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である請求項５、７、９のいずれか１項に記載の治療方法。

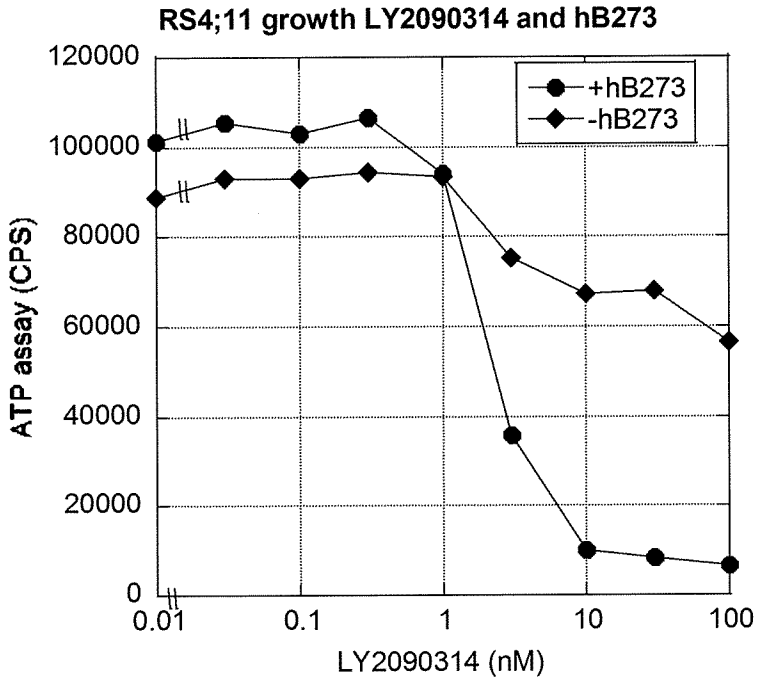
[請求項15] 抗デスレセプター５（ＤＲ５）抗体が配列番号５に示されるアミノ酸配列の１～４５２番目のアミノ酸残基または１～４５１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列、および配列番号６に示されるアミノ酸配列の１～２１５番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体である請求項５、７、９のいずれか１項に記載の治療方法。

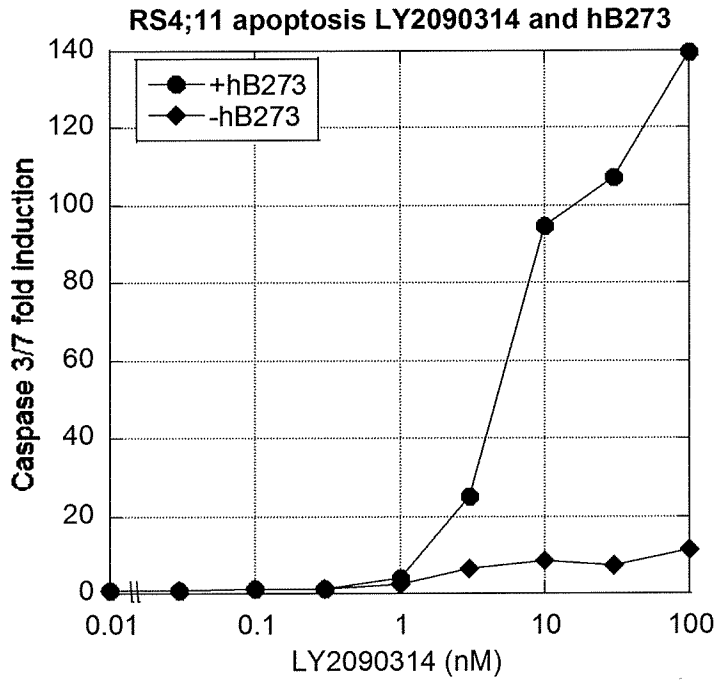
[請求項16] 癌が、血液癌（白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫）、脳腫瘍、頭頸部癌、食道癌、胃癌、虫垂癌、大腸癌、肛門癌、胆嚢癌、胆管癌、膵臓癌、消化管間質腫瘍、肺癌、肝臓癌、中皮腫、甲状腺癌、腎臓癌、前立腺癌、神経内分泌腫瘍、黒色腫、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、骨肉腫、軟部肉腫、カポジ肉腫、筋肉腫、腎臓癌、膀胱癌または睾丸癌である請求項１～４、６、８、１０～１２のいずれか１項に記載の医薬。

[請求項17] 癌が、血液癌（白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫）、脳腫瘍、頭頸部癌、食道癌、胃癌、虫垂癌、大腸癌、肛門癌、胆嚢癌、胆管癌、膵臓癌、消化管間質腫瘍、肺癌、肝臓癌、中皮腫、甲状腺癌、腎臓癌、前

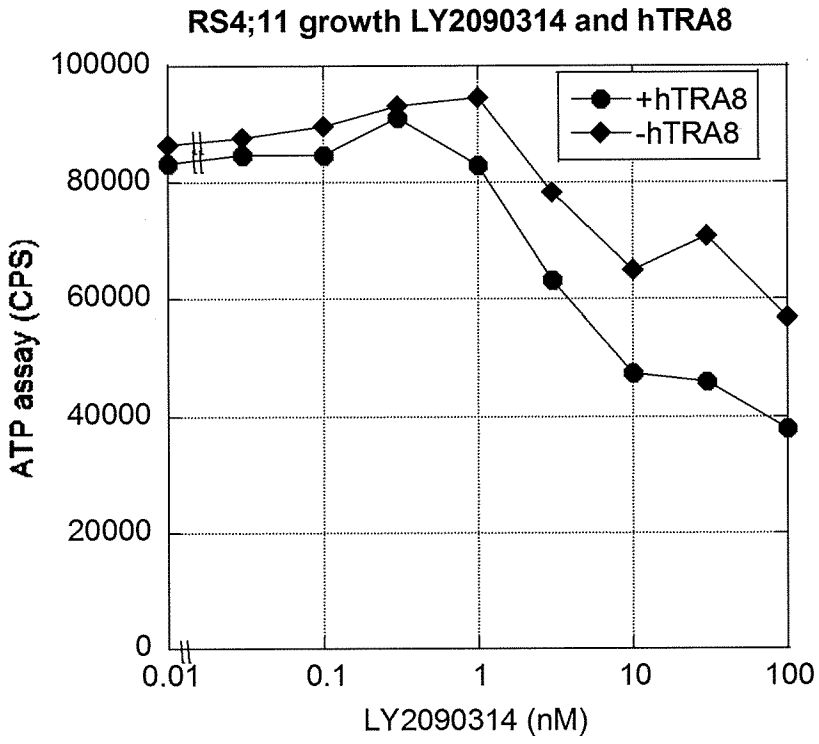
立腺癌、神経内分泌腫瘍、黒色腫、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、骨肉腫、軟部肉腫、カポジ肉腫、筋肉腫、腎臓癌、膀胱癌または睾丸癌である請求項５、７、９、１３～１５のいずれか１項に記載の治療方法。

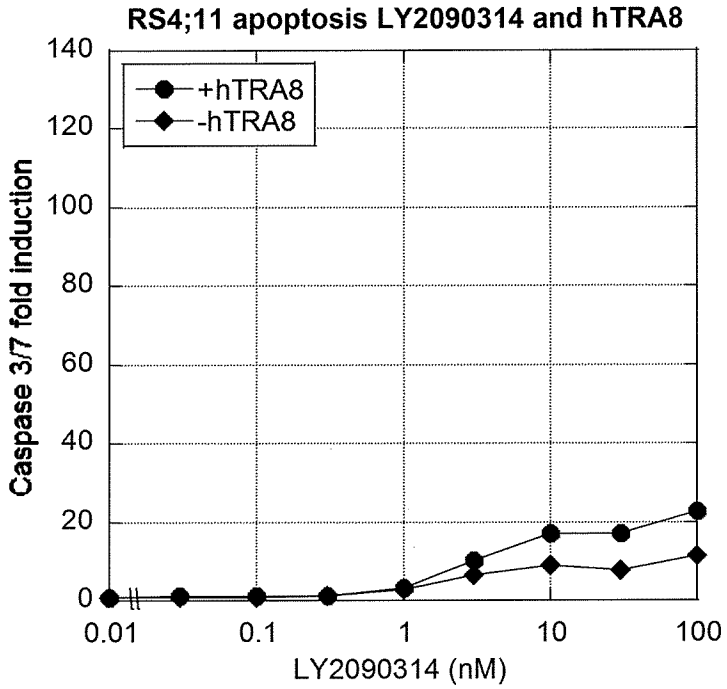
[図1-1]


RS4;11 growth LY2090314 and hB273
+hB273
-hB273
ATP assay (CPS)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
LY2090314 (nM)

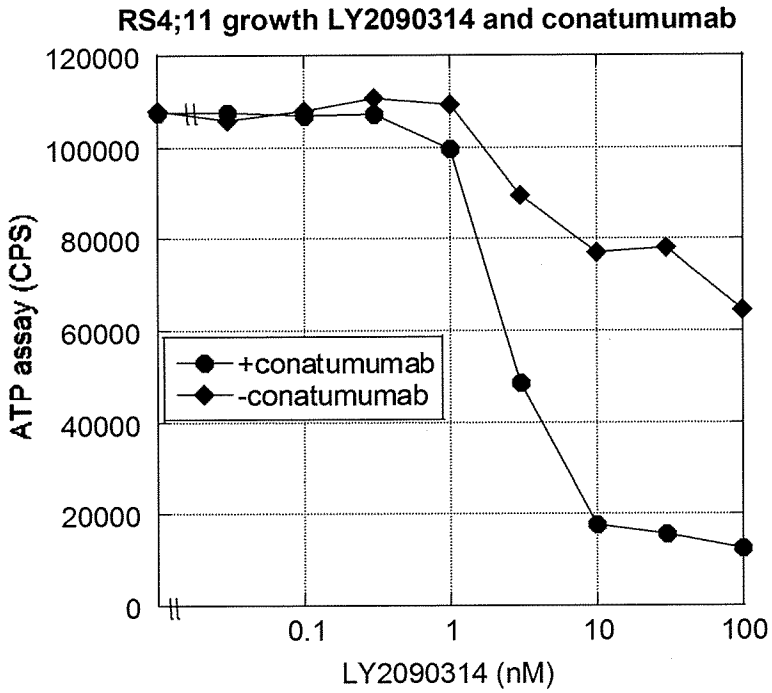

RS4;11 apoptosis LY2090314 and hB273
+hB273
-hB273
Caspase 3/7 fold induction
140
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
LY2090314 (nM)

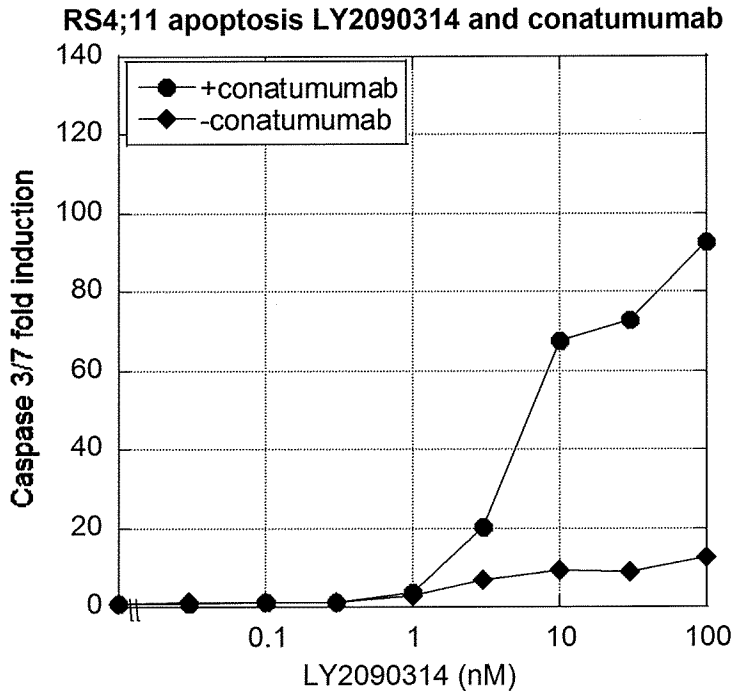
[図1-2]


RS4;11 growth LY2090314 and hTRA8
ATP assay (CPS)
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
LY2090314 (nM)
+hTRA8
-hTRA8

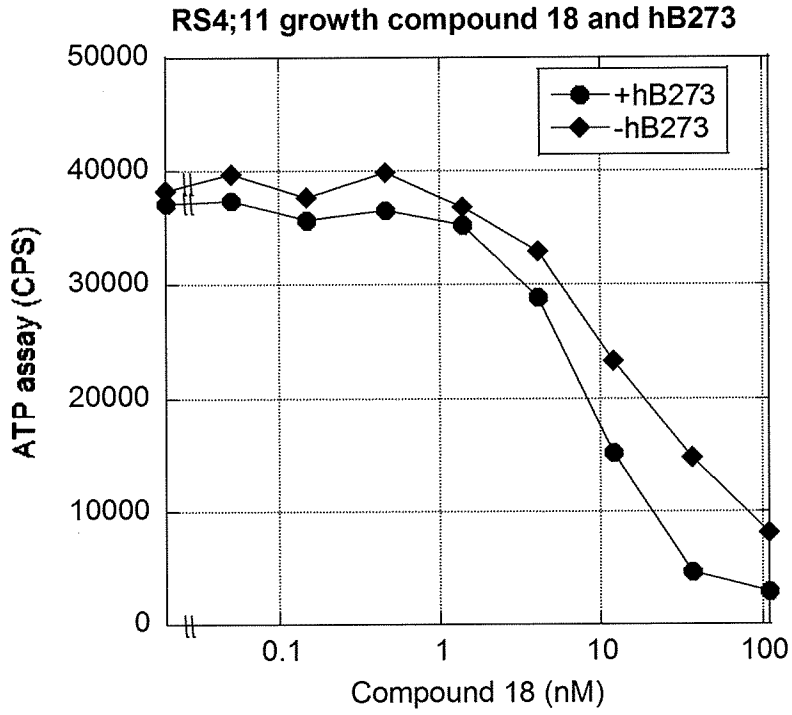

RS4;11 apoptosis LY2090314 and hTRA8
Caspase 3/7 fold induction
140
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
LY2090314 (nM)
+hTRA8
-hTRA8

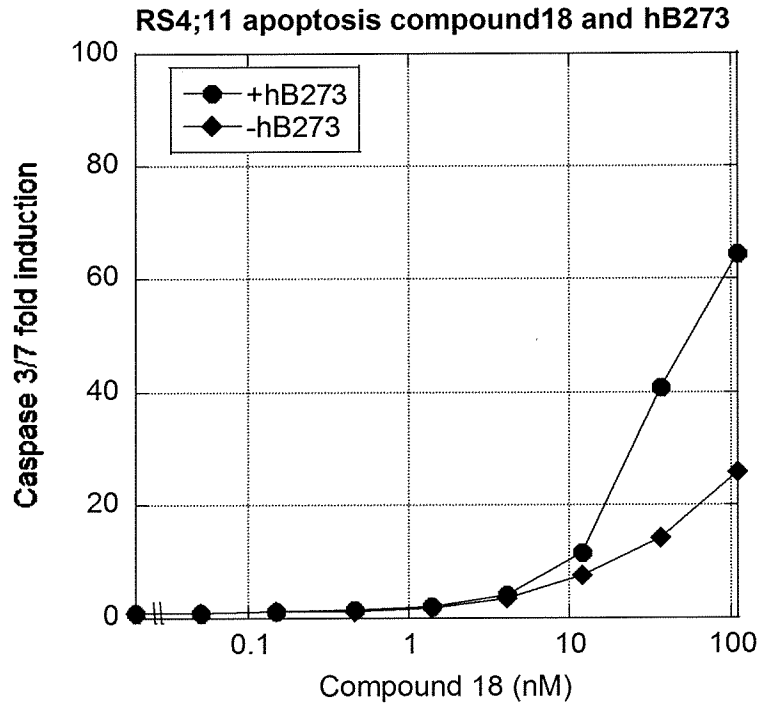
[図1-3]


RS4;11 growth LY2090314 and conatumumab
ATP assay (CPS)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
+conatumumab
-conatumumab
0.1
1
10
100
LY2090314 (nM)

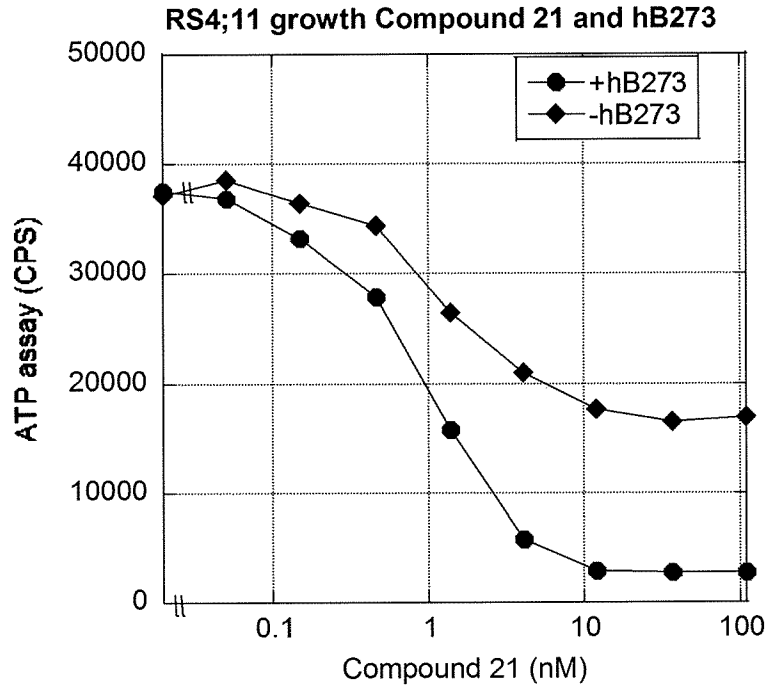

RS4;11 apoptosis LY2090314 and conatumumab
Caspase 3/7 fold induction
140
120
100
80
60
40
20
0
+conatumumab
-conatumumab
0.1
1
10
100
LY2090314 (nM)

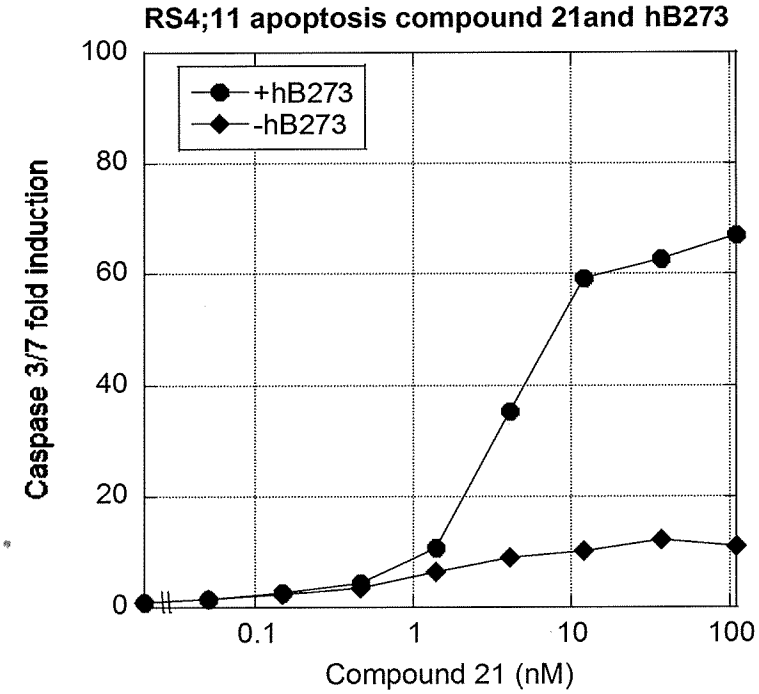
[図2-1]


RS4;11 growth compound 18 and hB273
+hB273
-hB273
ATP assay (CPS)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
Compound 18 (nM)

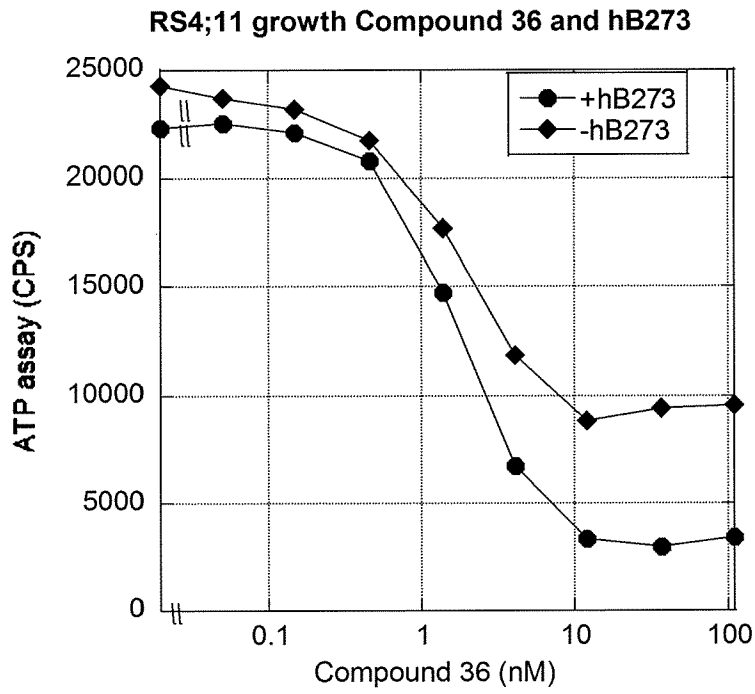

RS4;11 apoptosis compound18 and hB273
+hB273
-hB273
Caspase 3/7 fold induction
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Compound 18 (nM)

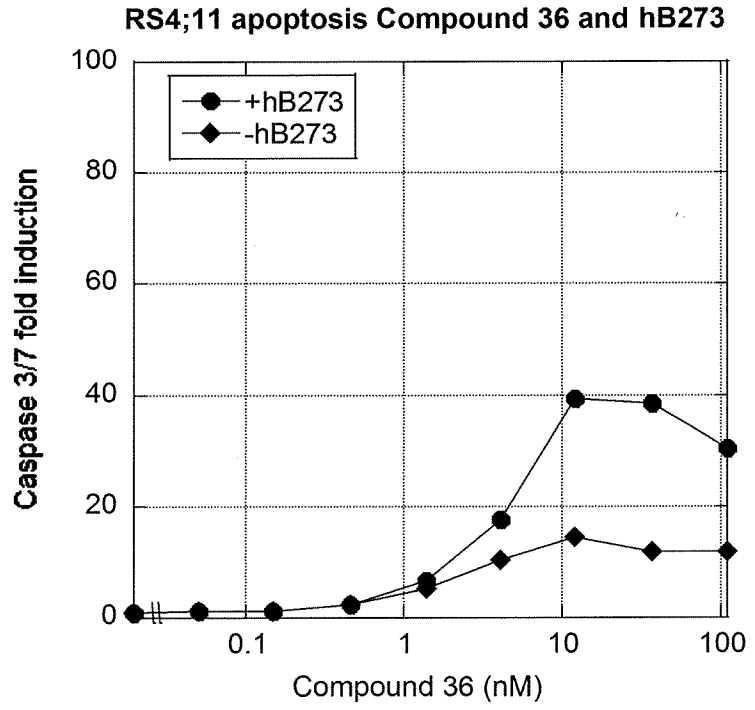
[図2-2]


RS4;11 growth Compound 21 and hB273
+hB273
-hB273
ATP assay (CPS)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
Compound 21 (nM)

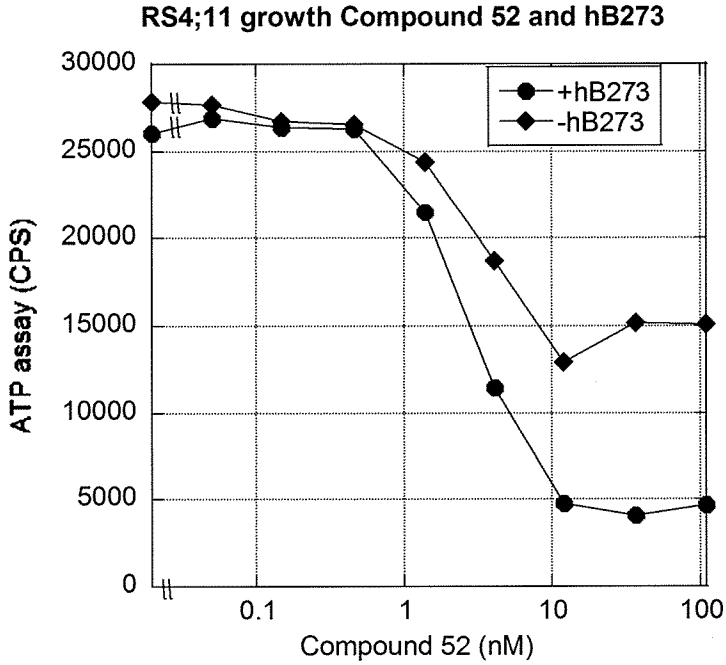

RS4;11 apoptosis compound 21and hB273
+hB273
-hB273
Caspase 3/7 fold induction
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Compound 21 (nM)

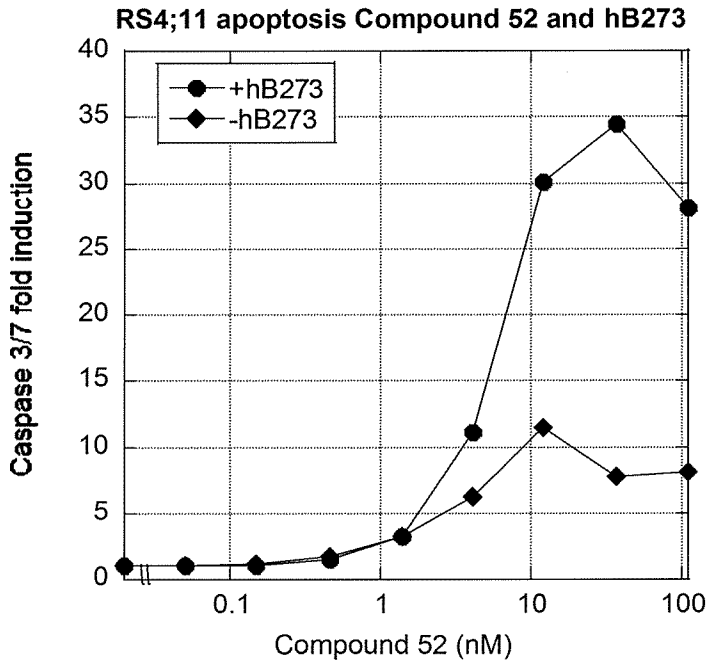
[図2-3]


RS4;11 growth Compound 36 and hB273
25000
20000
15000
10000
5000
0
ATP assay (CPS)
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 36 (nM)

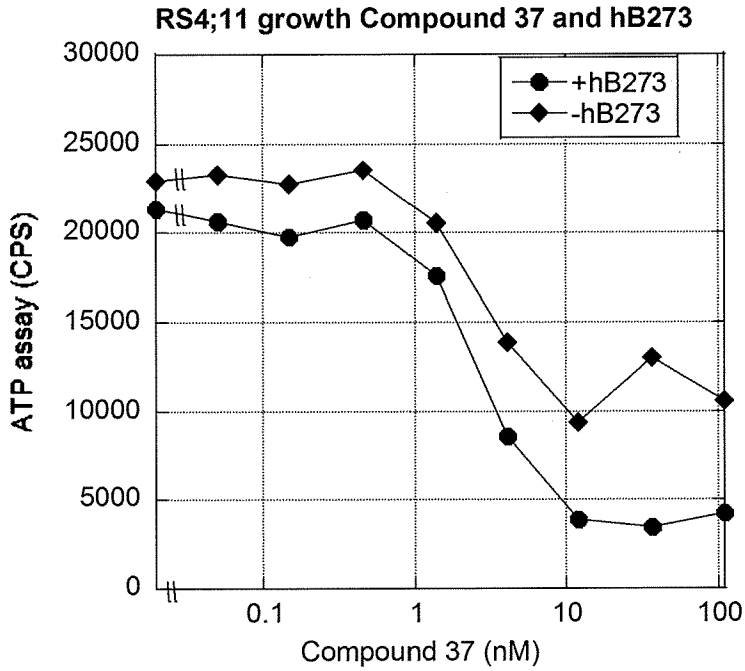

RS4;11 apoptosis Compound 36 and hB273
100
80
60
40
20
0
Caspase 3/7 fold induction
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 36 (nM)

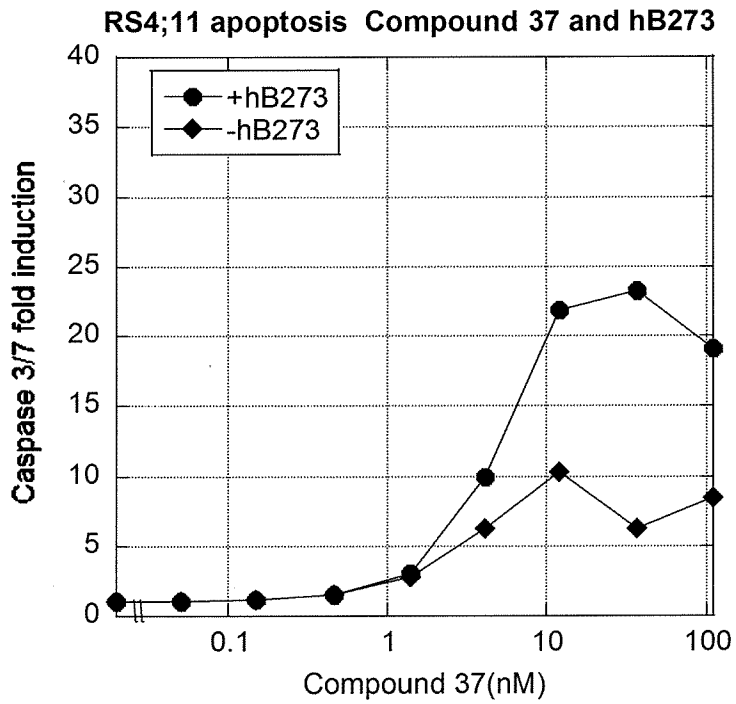
[図2-4]


RS4;11 growth Compound 52 and hB273
ATP assay (CPS)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 52 (nM)

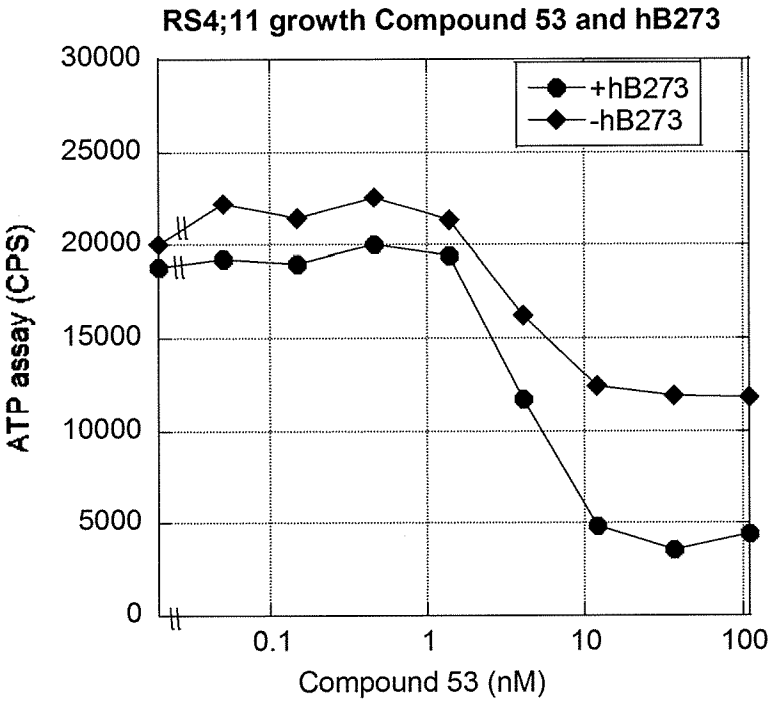

RS4;11 apoptosis Compound 52 and hB273
Caspase 3/7 fold induction
40
35
30
25
20
15
10
5
0
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 52 (nM)

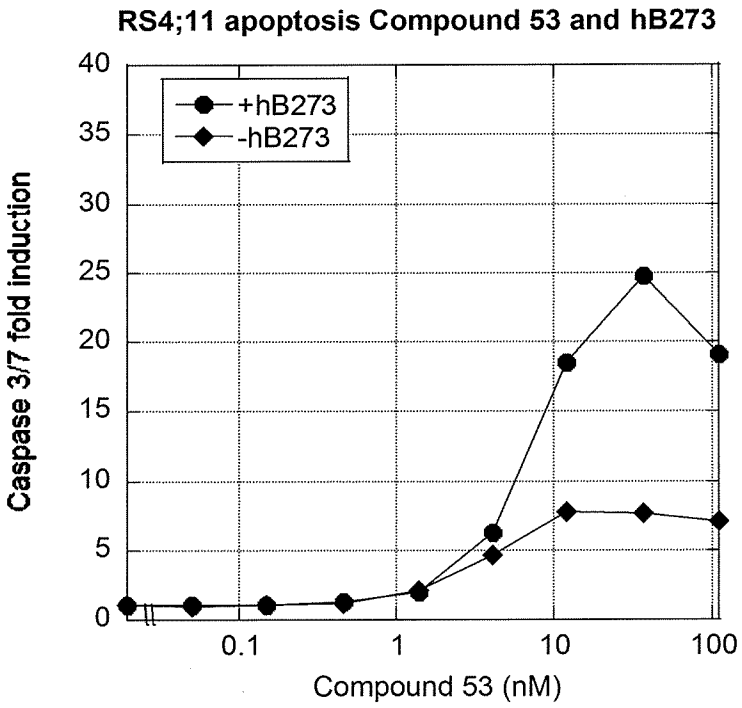
[図2-5]


RS4;11 growth Compound 37 and hB273
+hB273
-hB273
ATP assay (CPS)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
Compound 37 (nM)

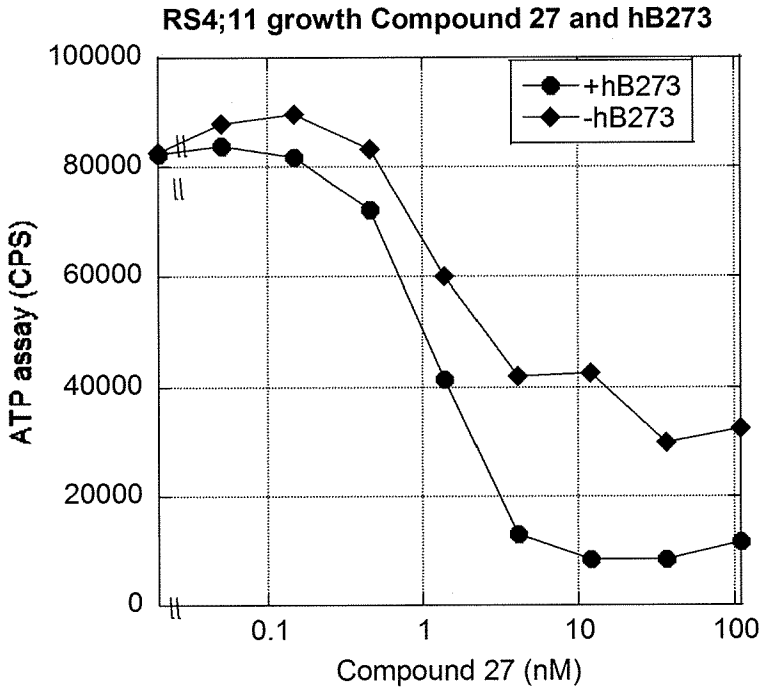

RS4;11 apoptosis Compound 37 and hB273
+hB273
-hB273
Caspase 3/7 fold induction
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0.1
1
10
100
Compound 37(nM)

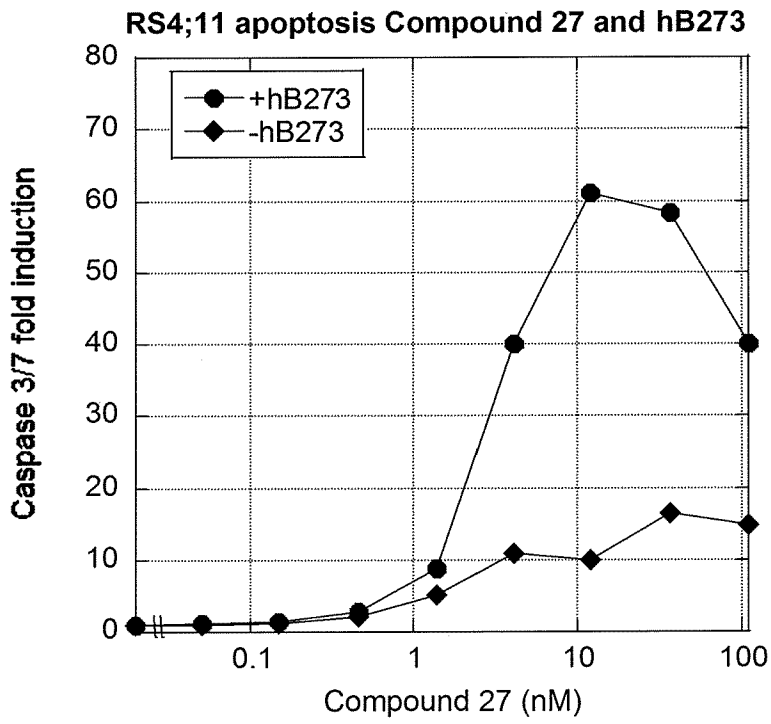
[図2-6]


RS4;11 growth Compound 53 and hB273
+hB273
-hB273
ATP assay (CPS)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
Compound 53 (nM)

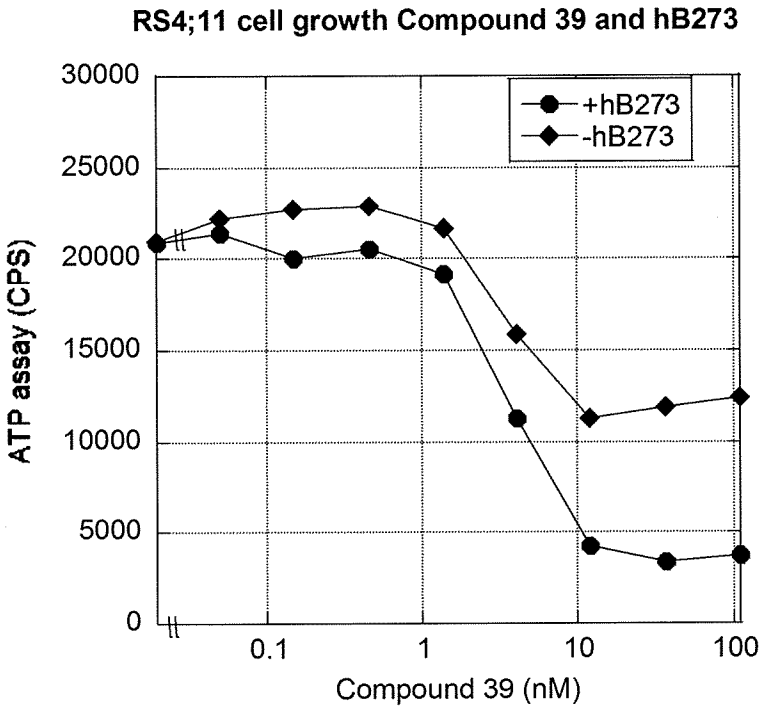

RS4;11 apoptosis Compound 53 and hB273
+hB273
-hB273
Caspase 3/7 fold induction
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0.1
1
10
100
Compound 53 (nM)

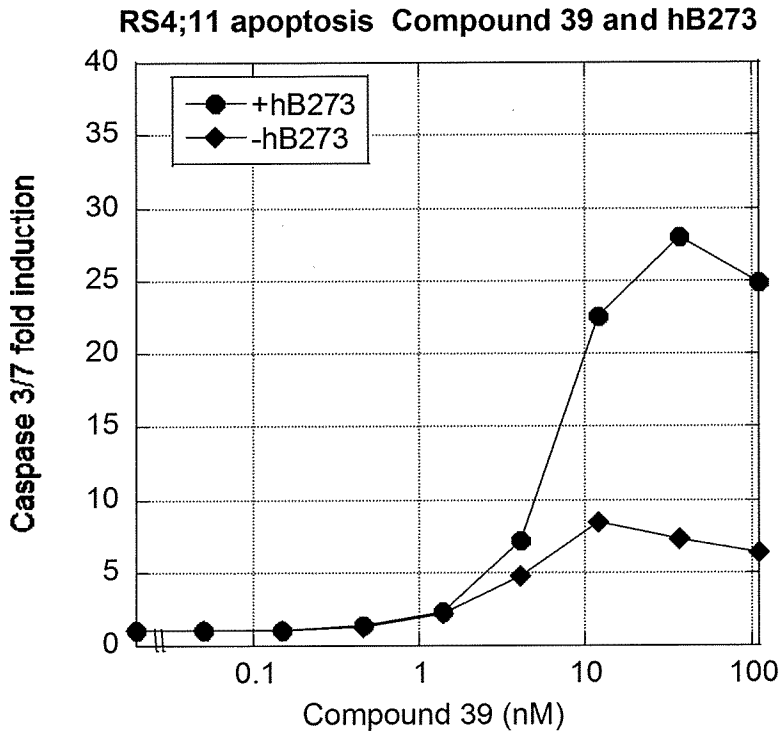
[図2-7]


RS4;11 growth Compound 27 and hB273
100000
80000
60000
40000
20000
0
ATP assay (CPS)
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 27 (nM)

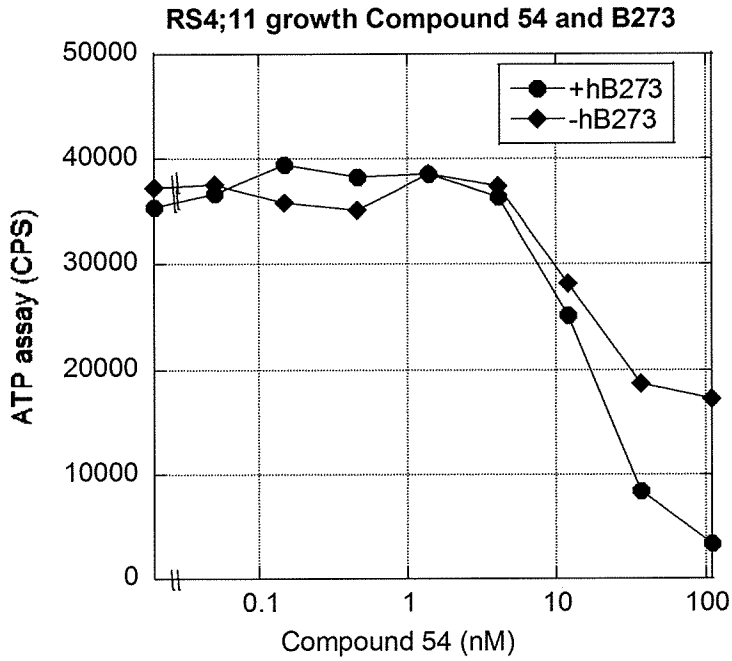

RS4;11 apoptosis Compound 27 and hB273
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Caspase 3/7 fold induction
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 27 (nM)

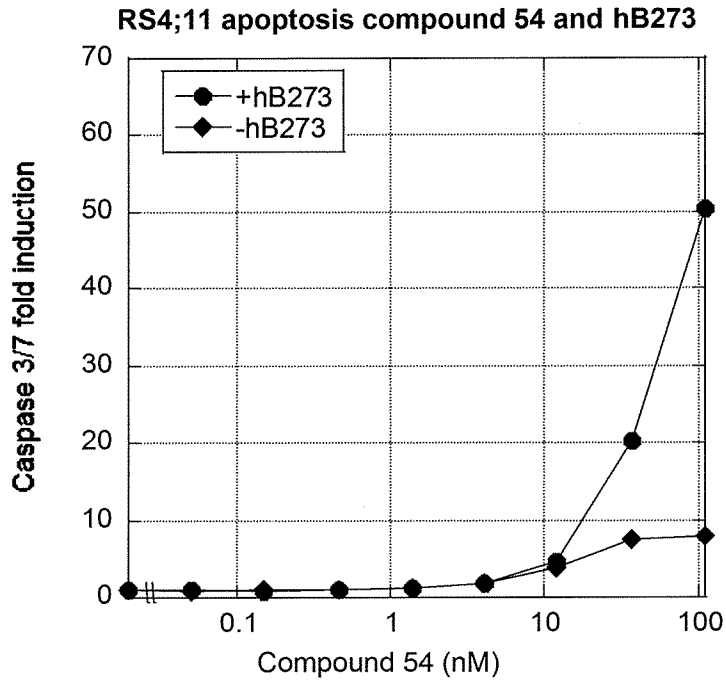
[図2-8]


RS4;11 cell growth Compound 39 and hB273
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
ATP assay (CPS)
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 39 (nM)

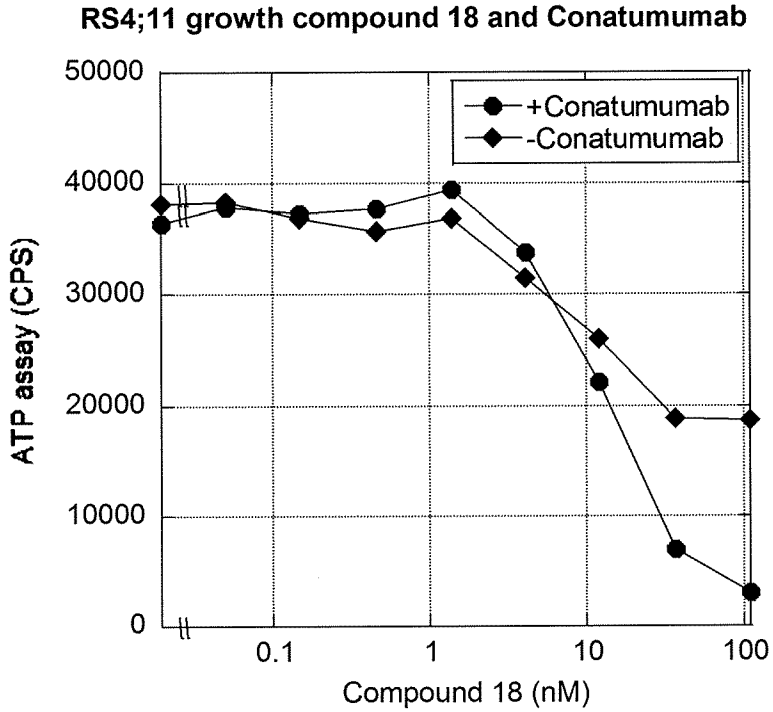

RS4;11 apoptosis Compound 39 and hB273
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Caspase 3/7 fold induction
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 39 (nM)

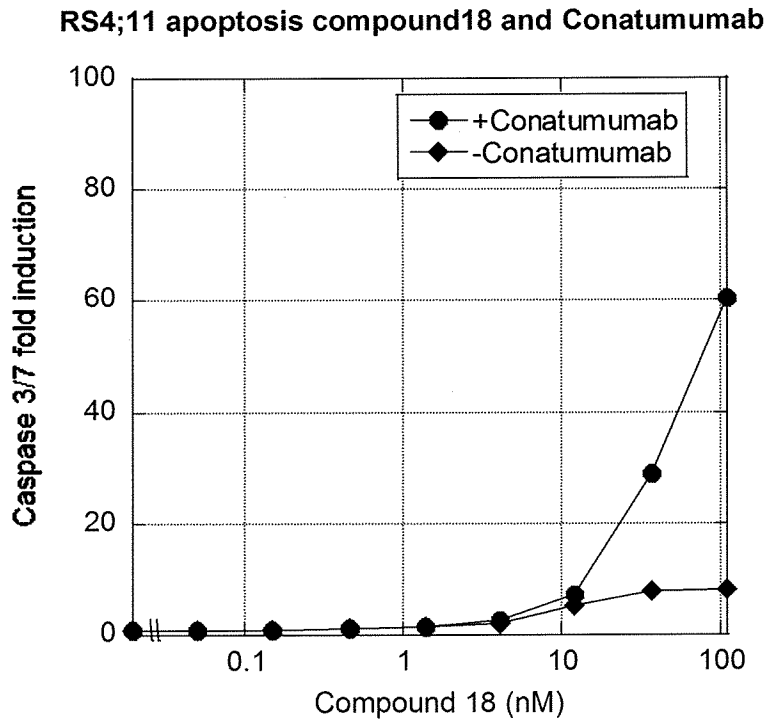
[図2-9]


RS4;11 growth Compound 54 and B273
50000
40000
30000
20000
10000
0
ATP assay (CPS)
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 54 (nM)

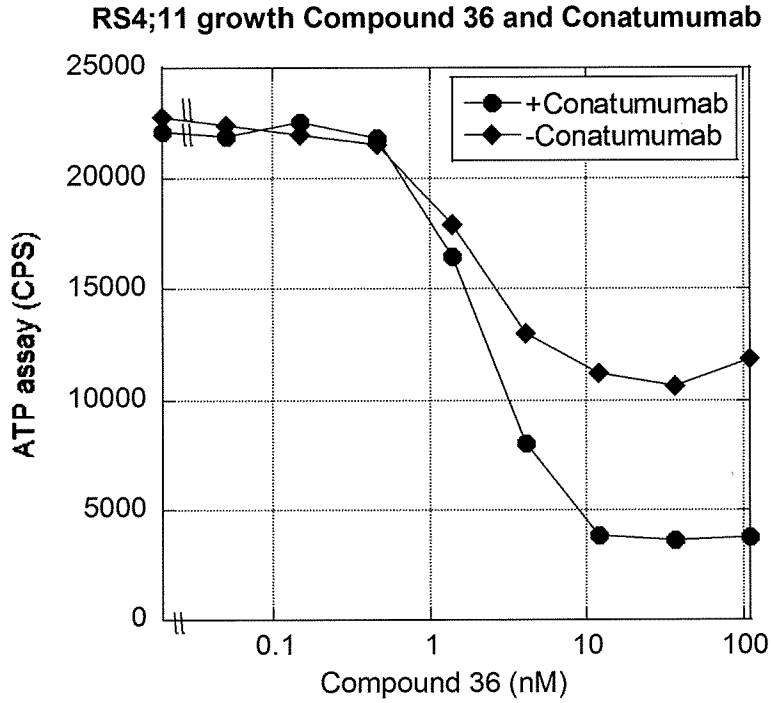

RS4;11 apoptosis compound 54 and hB273
70
60
50
40
30
20
10
0
Caspase 3/7 fold induction
+hB273
-hB273
0.1
1
10
100
Compound 54 (nM)

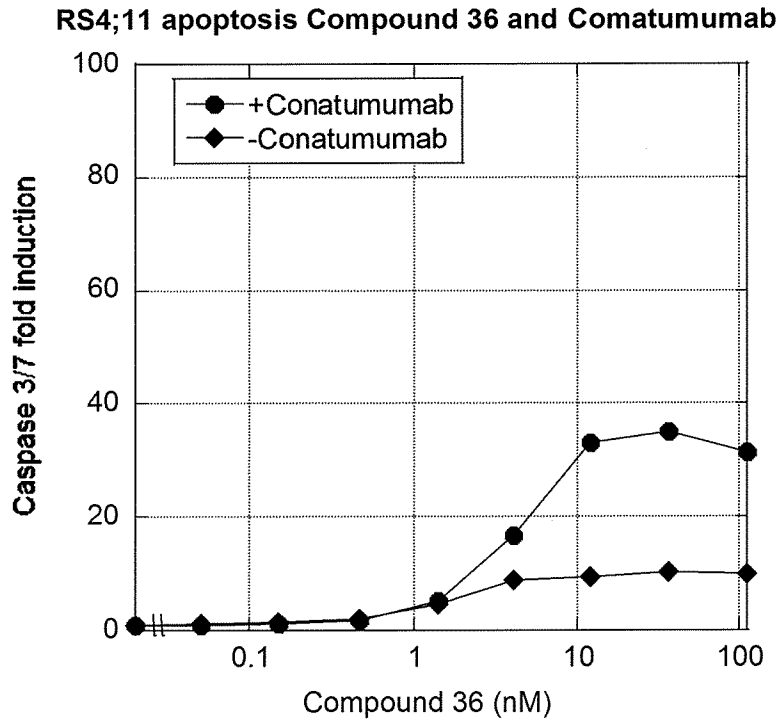
[図3-1]


RS4;11 growth compound 18 and Conatumumab
ATP assay (CPS)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
Compound 18 (nM)
+Conatumumab
-Conatumumab

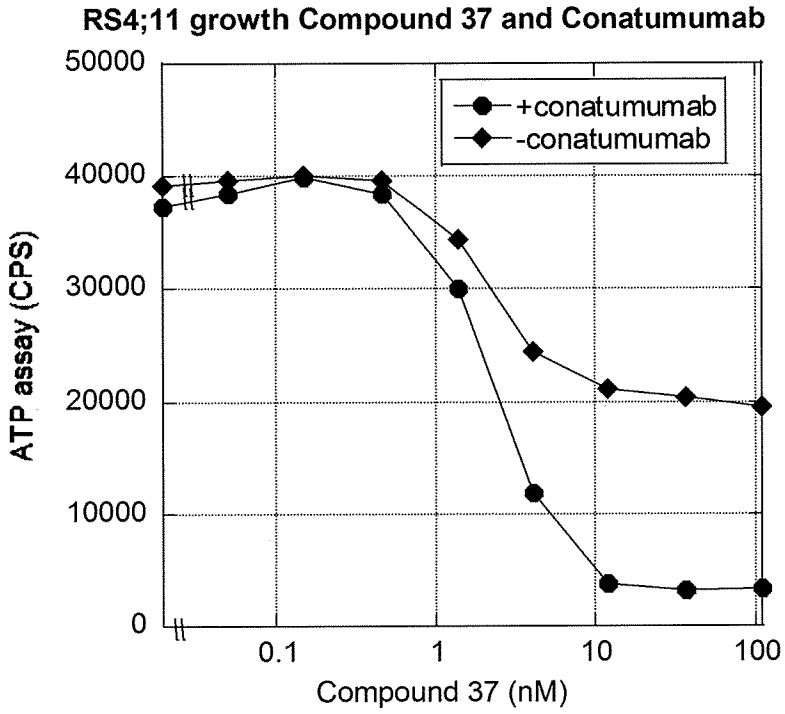

RS4;11 apoptosis compound18 and Conatumumab
Caspase 3/7 fold induction
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Compound 18 (nM)
+Conatumumab
-Conatumumab

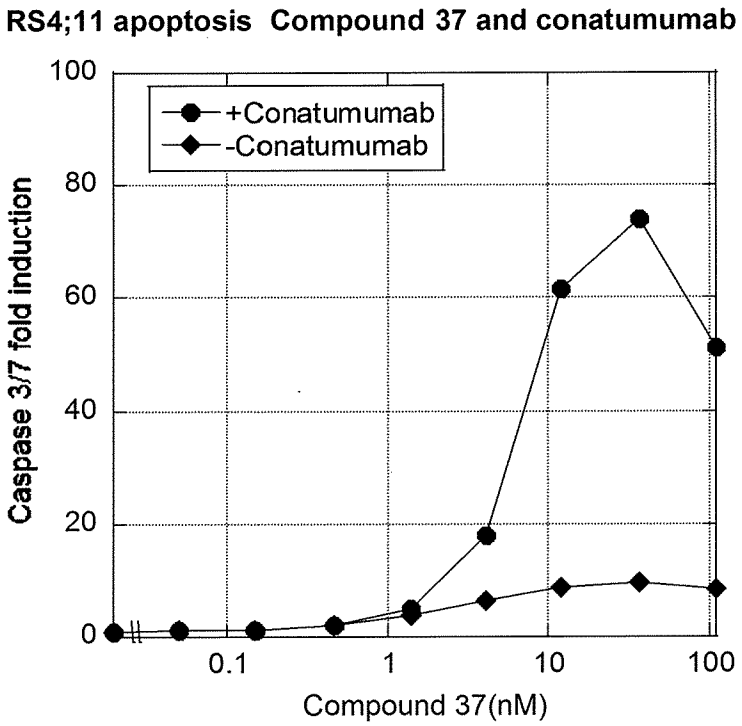
[図3-2]


RS4;11 growth Compound 36 and Conatumumab
ATP assay (CPS)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
Compound 36 (nM)
+Conatumumab
-Conatumumab

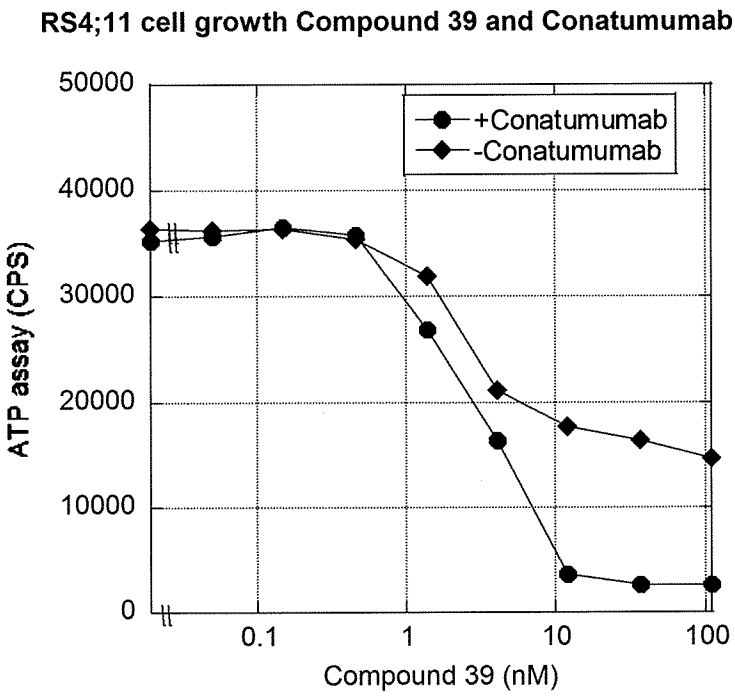

RS4;11 apoptosis Compound 36 and Comatumumab
Caspase 3/7 fold induction
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Compound 36 (nM)
+Conatumumab
-Conatumumab

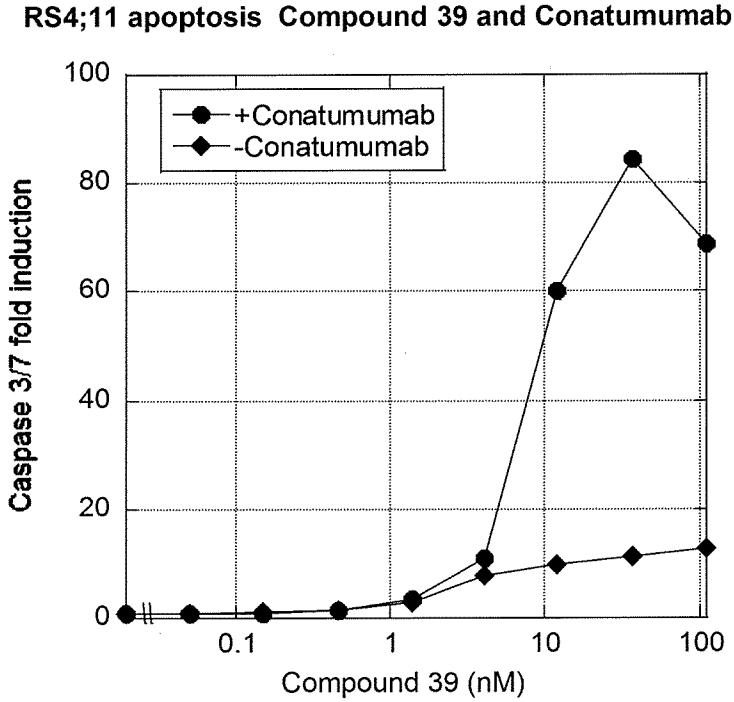
[図3-3]


RS4;11 growth Compound 37 and Conatumumab
50000
40000
30000
20000
10000
0
ATP assay (CPS)
+conatumumab
-conatumumab
0.1
1
10
100
Compound 37 (nM)

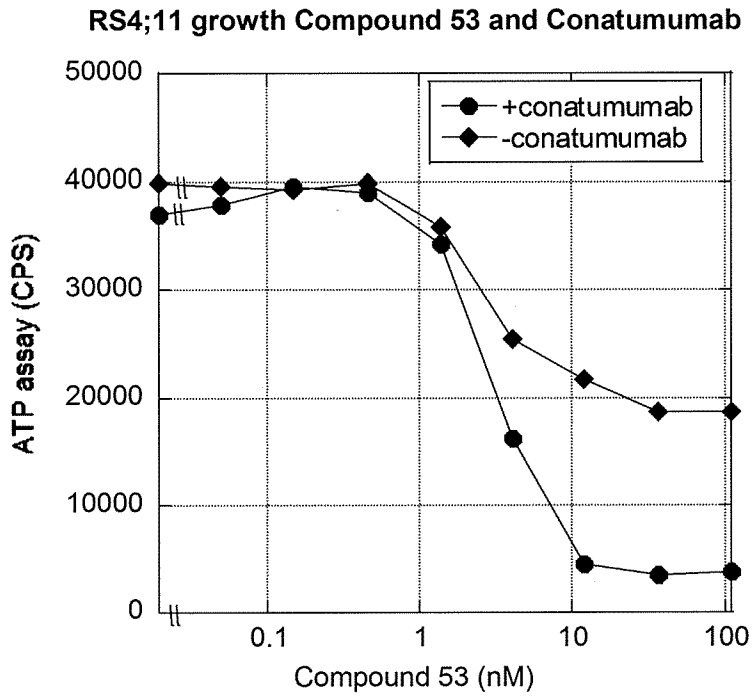

RS4;11 apoptosis Compound 37 and conatumumab
100
80
60
40
20
0
Caspase 3/7 fold induction
+Conatumumab
-Conatumumab
0.1
1
10
100
Compound 37(nM)

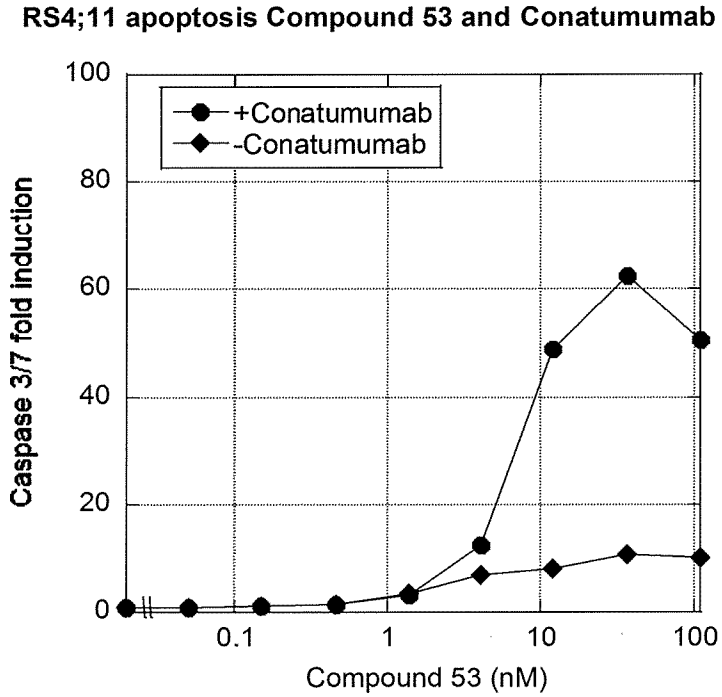
[図3-4]


RS4;11 cell growth Compound 39 and Conatumumab
50000
40000
30000
20000
10000
0
ATP assay (CPS)
+Conatumumab
-Conatumumab
0.1
1
10
100
Compound 39 (nM)

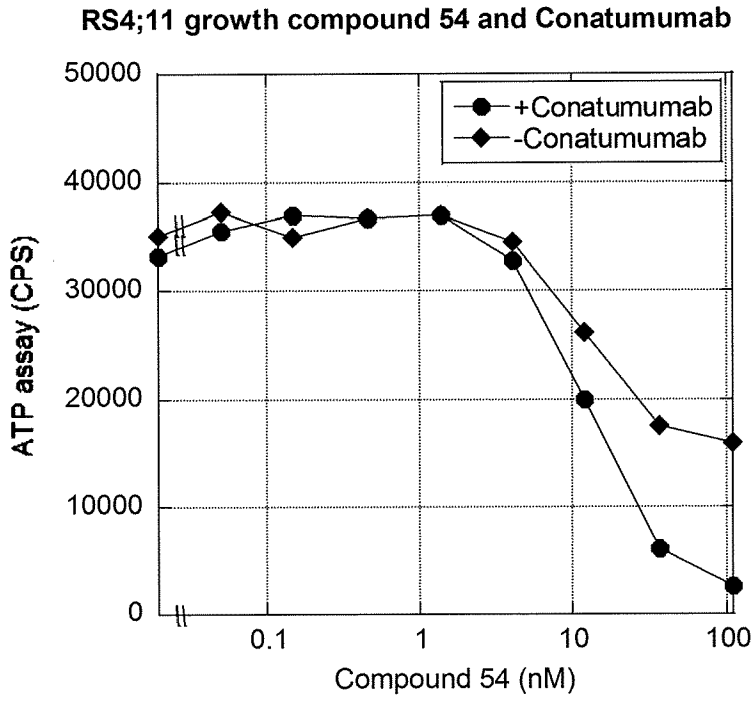

RS4;11 apoptosis Compound 39 and Conatumumab
100
80
60
40
20
0
Caspase 3/7 fold induction
+Conatumumab
-Conatumumab
0.1
1
10
100
Compound 39 (nM)

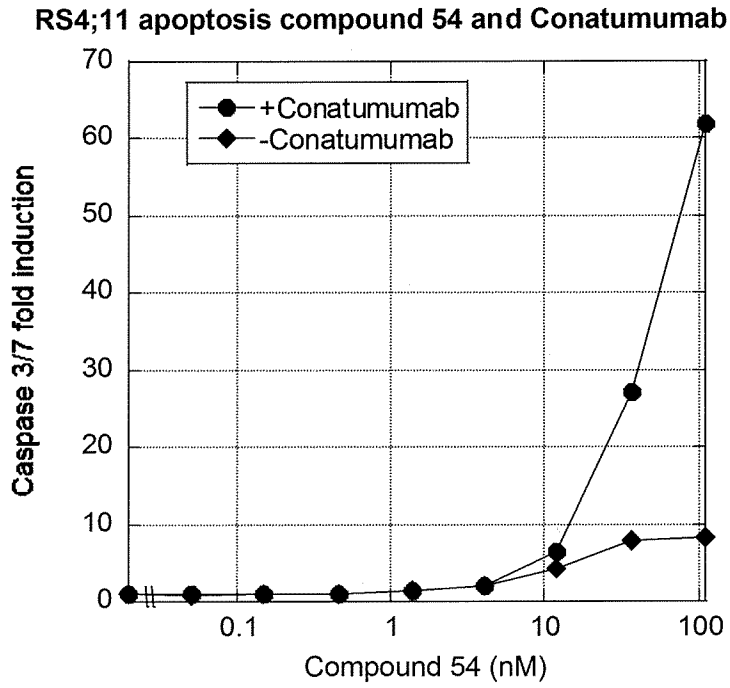
[図3-5]


RS4;11 growth Compound 53 and Conatumumab
50000
40000
30000
20000
10000
0
ATP assay (CPS)
+conatumumab
-conatumumab
0.1
1
10
100
Compound 53 (nM)

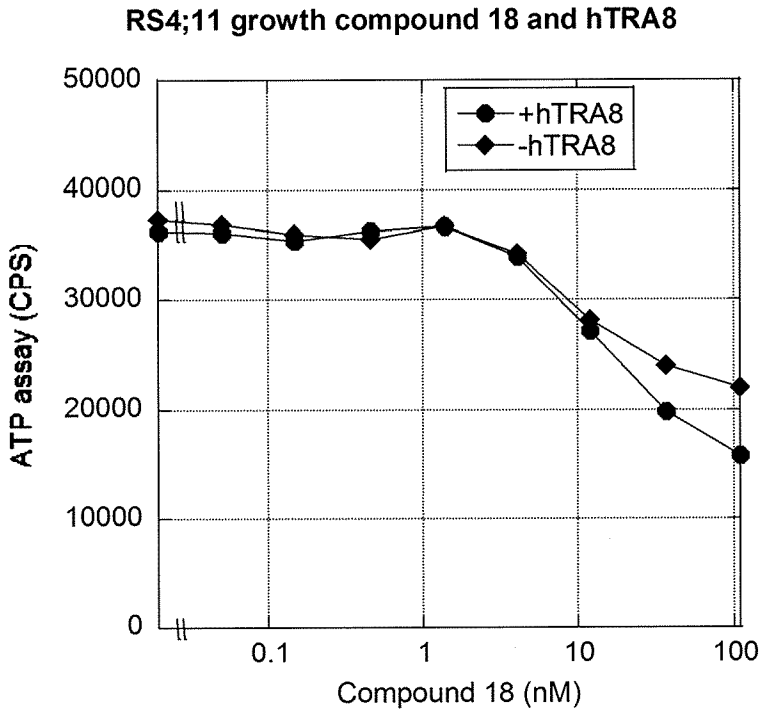

RS4;11 apoptosis Compound 53 and Conatumumab
100
80
60
40
20
0
Caspase 3/7 fold induction
+Conatumumab
-Conatumumab
0.1
1
10
100
Compound 53 (nM)

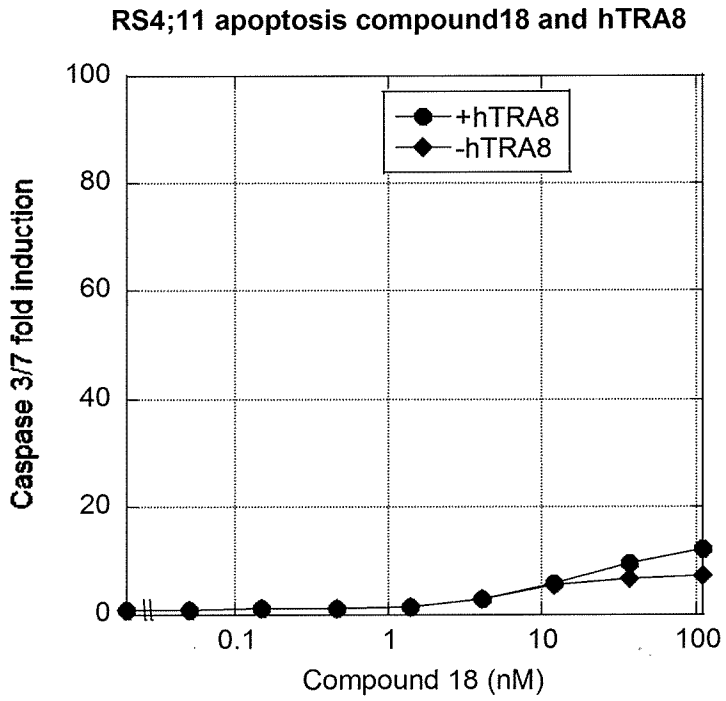
[図3-6]


RS4;11 growth compound 54 and Conatumumab
ATP assay (CPS)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
Compound 54 (nM)
+Conatumumab
-Conatumumab

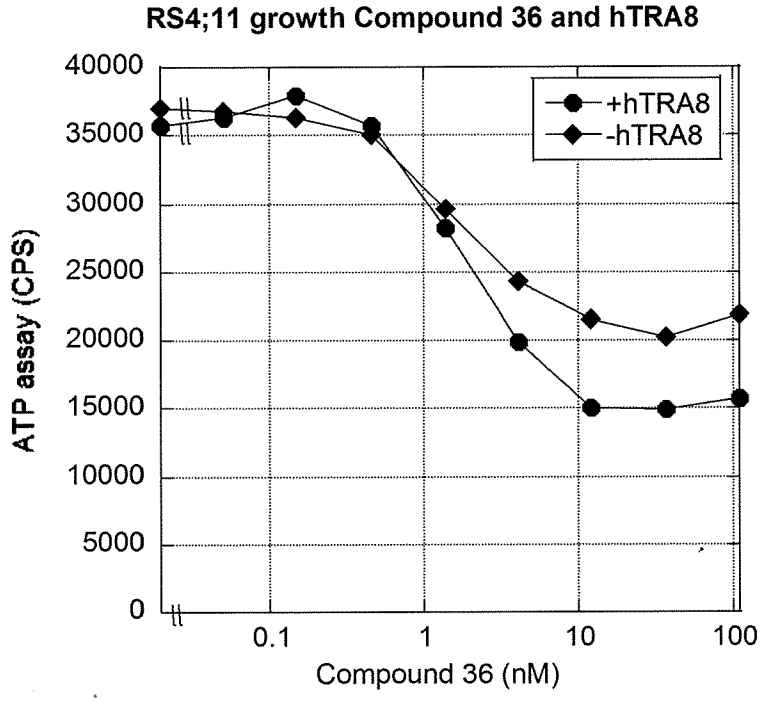

RS4;11 apoptosis compound 54 and Conatumumab
Caspase 3/7 fold induction
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
Compound 54 (nM)
+Conatumumab
-Conatumumab

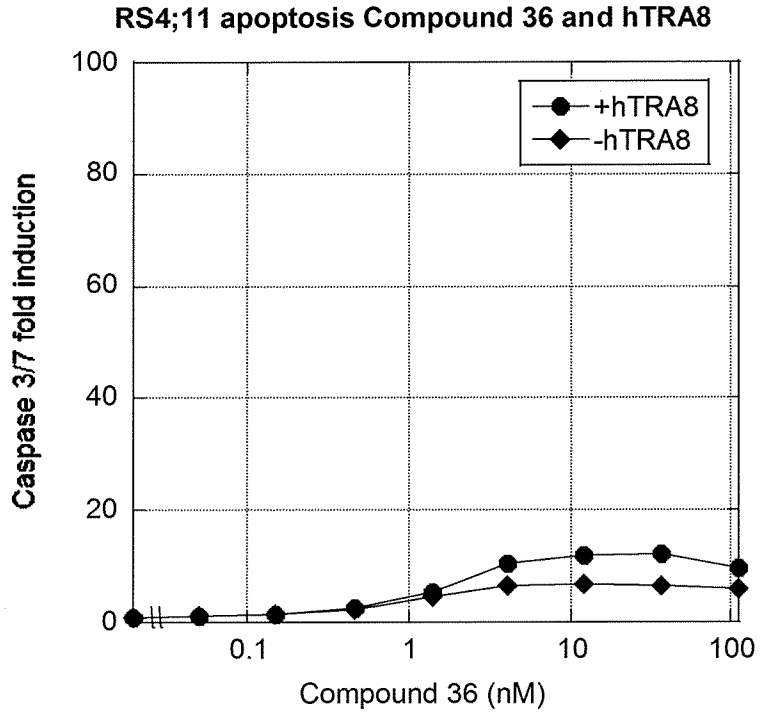
[図4-1]


RS4;11 growth compound 18 and hTRA8
50000
40000
30000
20000
10000
0
ATP assay (CPS)
+hTRA8
-hTRA8
0.1
1
10
100
Compound 18 (nM)

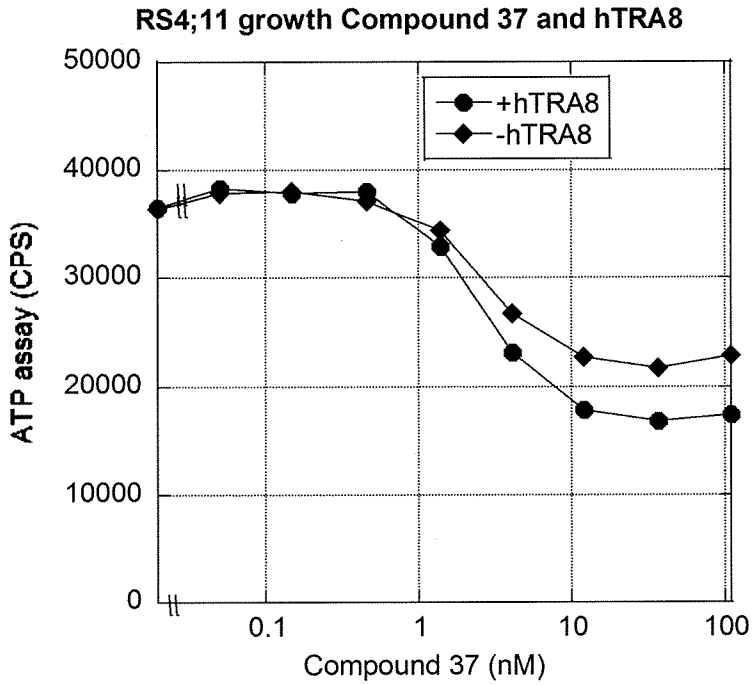

RS4;11 apoptosis compound18 and hTRA8
100
80
60
40
20
0
Caspase 3/7 fold induction
+hTRA8
-hTRA8
0.1
1
10
100
Compound 18 (nM)

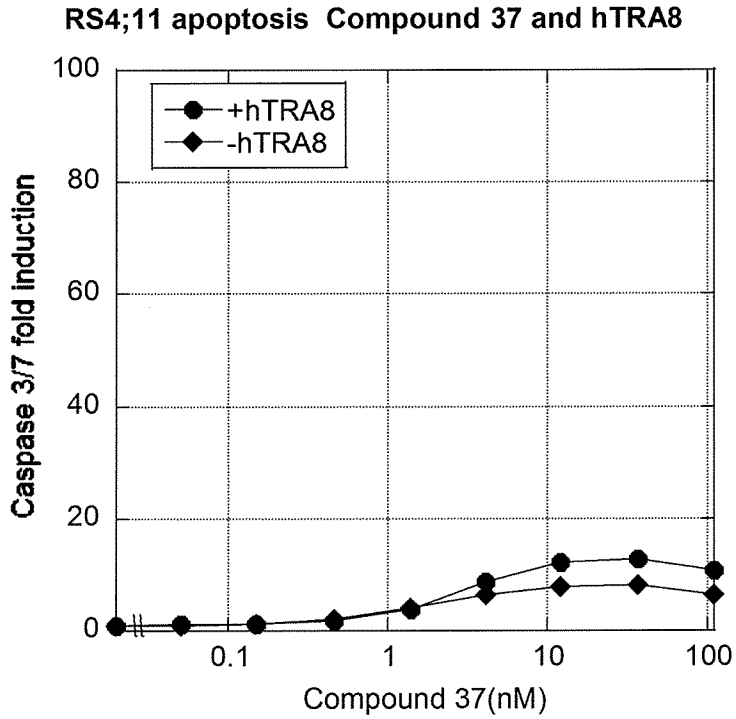
[図4-2]


RS4;11 growth Compound 36 and hTRA8
ATP assay (CPS)
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
Compound 36 (nM)
+hTRA8
-hTRA8

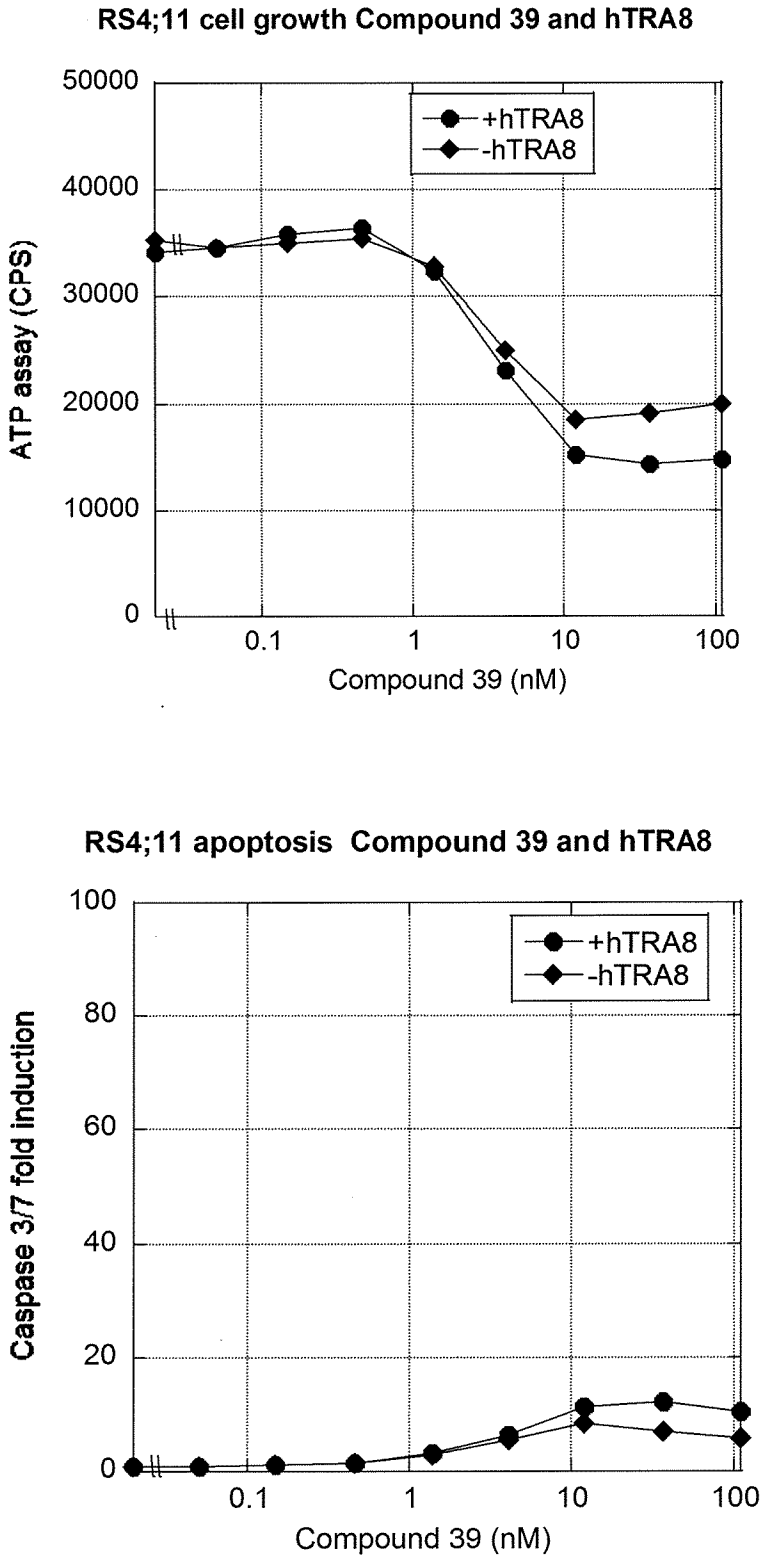

RS4;11 apoptosis Compound 36 and hTRA8
Caspase 3/7 fold induction
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Compound 36 (nM)
+hTRA8
-hTRA8

[図4-3]

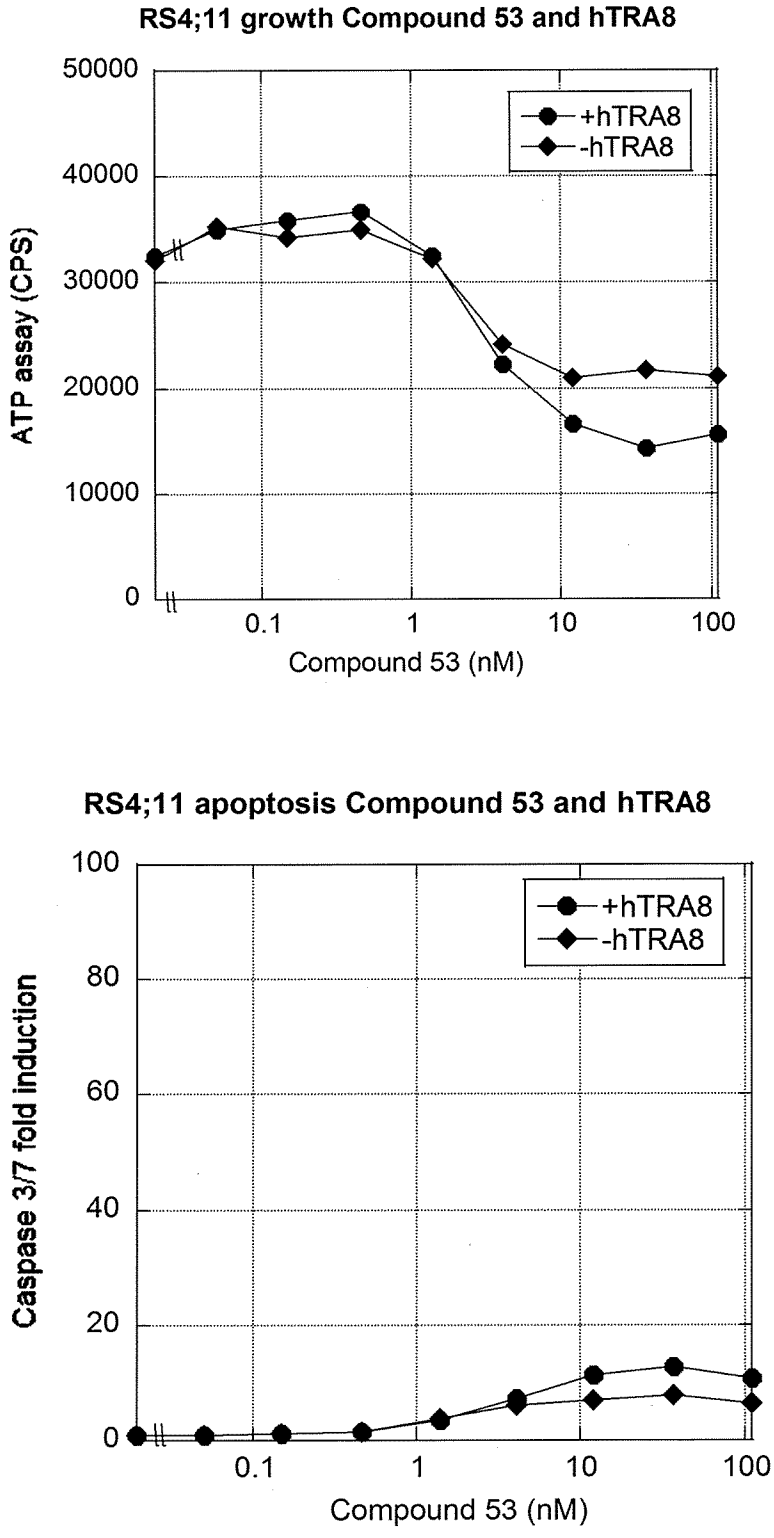

RS4;11 growth Compound 37 and hTRA8
ATP assay (CPS)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
Compound 37 (nM)
+hTRA8
-hTRA8


RS4;11 apoptosis Compound 37 and hTRA8
Caspase 3/7 fold induction
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Compound 37(nM)
+hTRA8
-hTRA8

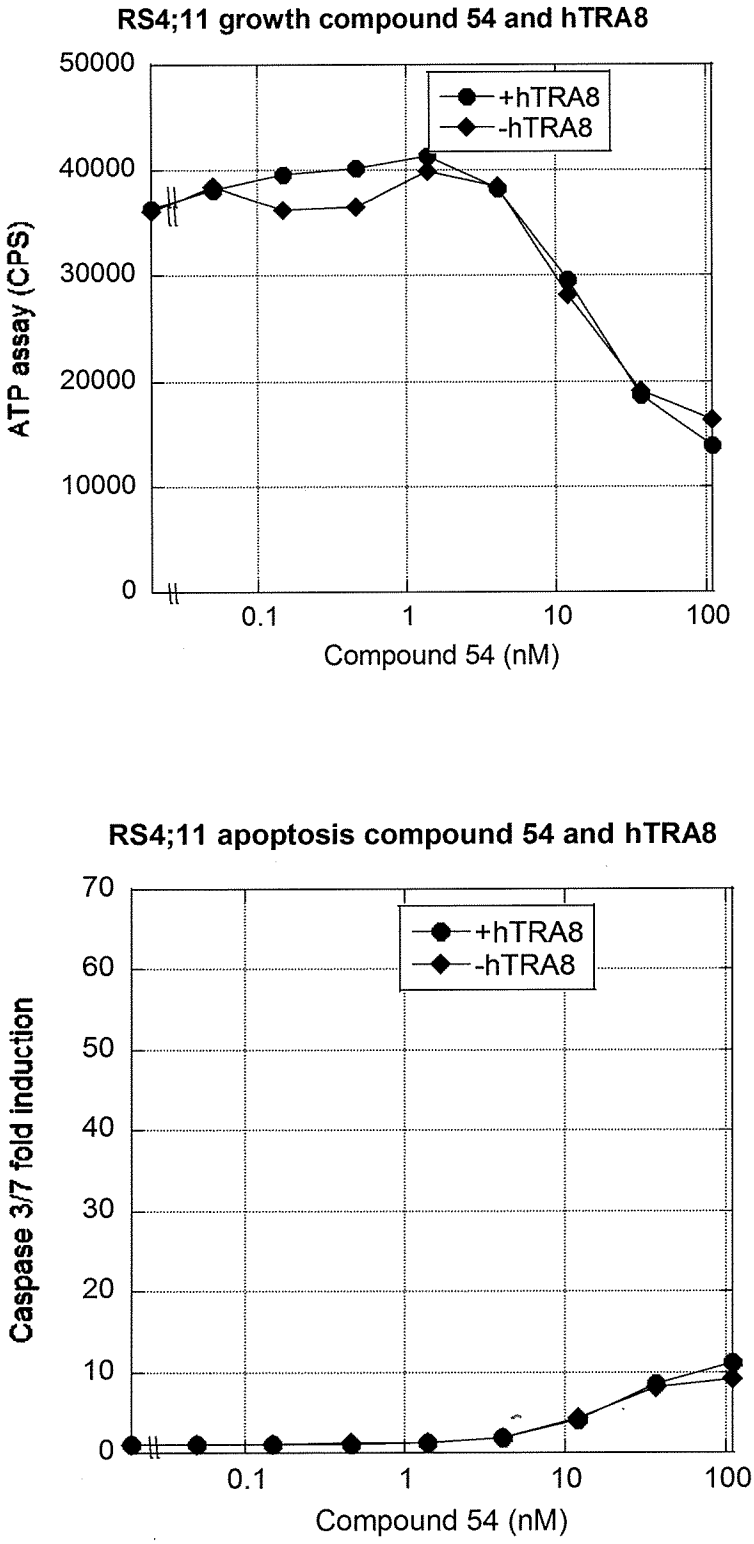
[図4-4]


RS4;11 cell growth Compound 39 and hTRA8
ATP assay (CPS)
50000
40000
30000
20000
10000
0
+hTRA8
-hTRA8
0.1
1
10
100
Compound 39 (nM)
RS4;11 apoptosis Compound 39 and hTRA8
Caspase 3/7 fold induction
100
80
60
40
20
0
+hTRA8
-hTRA8
0.1
1
10
100
Compound 39 (nM)

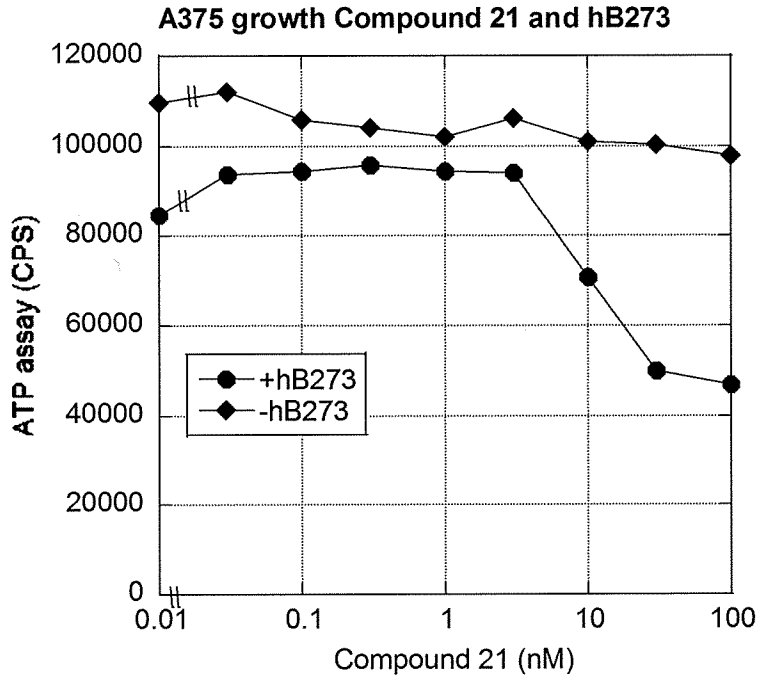
[図4-5]

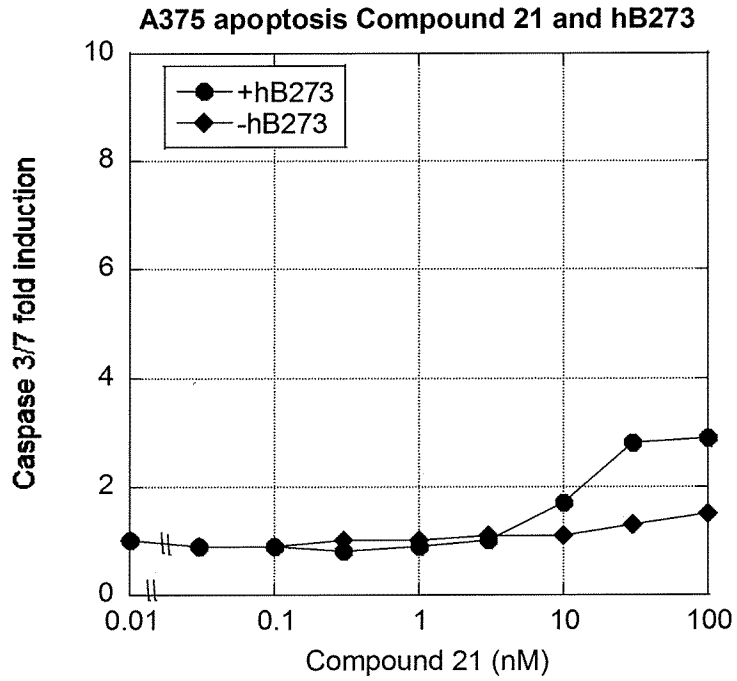

RS4;11 growth Compound 53 and hTRA8
ATP assay (CPS)
50000
40000
30000
20000
10000
0
+hTRA8
-hTRA8
0.1
1
10
100
Compound 53 (nM)
RS4;11 apoptosis Compound 53 and hTRA8
Caspase 3/7 fold induction
100
80
60
40
20
0
+hTRA8
-hTRA8
0.1
1
10
100
Compound 53 (nM)

[図4-6]

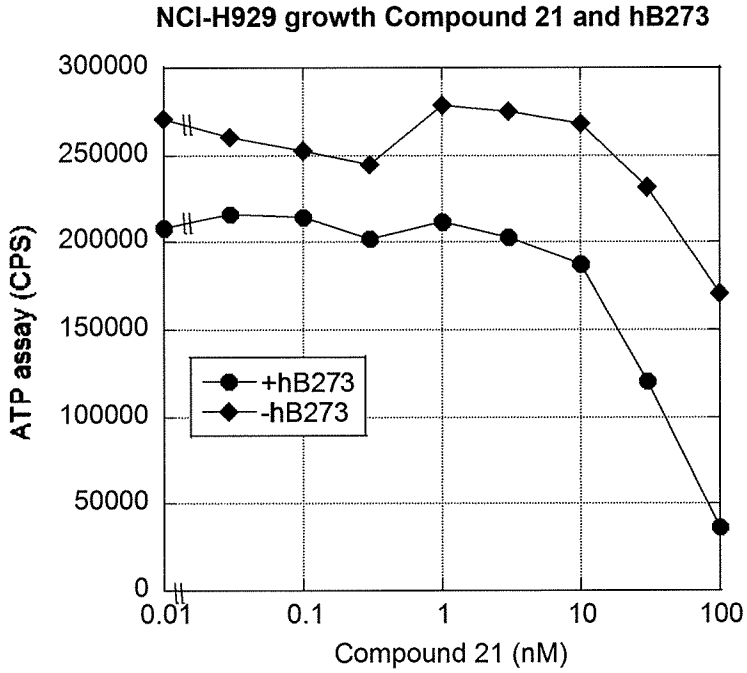

RS4;11 growth compound 54 and hTRA8
ATP assay (CPS)
50000
40000
30000
20000
10000
0
+hTRA8
-hTRA8
0.1
1
10
100
Compound 54 (nM)
RS4;11 apoptosis compound 54 and hTRA8
Caspase 3/7 fold induction
70
60
50
40
30
20
10
0
+hTRA8
-hTRA8
0.1
1
10
100
Compound 54 (nM)

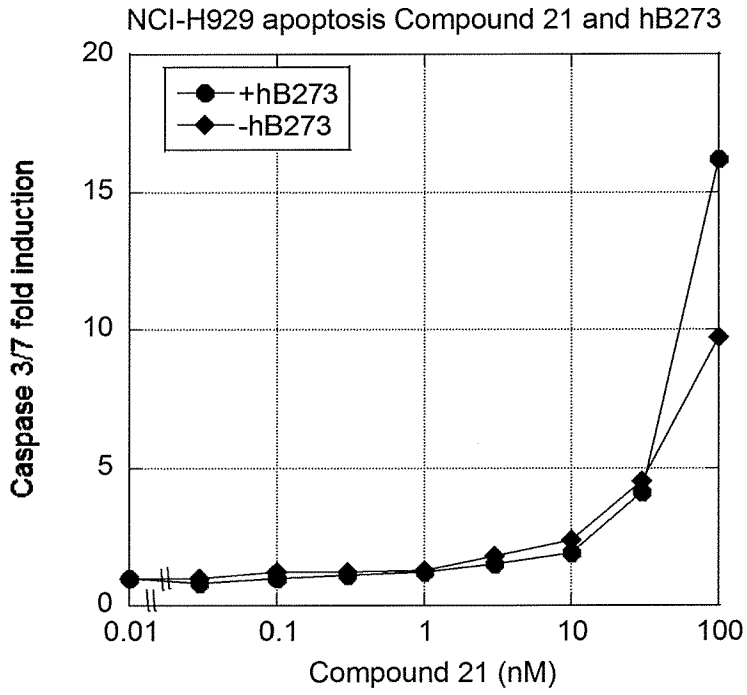
[図5-1]


A375 growth Compound 21 and hB273
ATP assay (CPS)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
+hB273
-hB273
0.01
0.1
1
10
100
Compound 21 (nM)

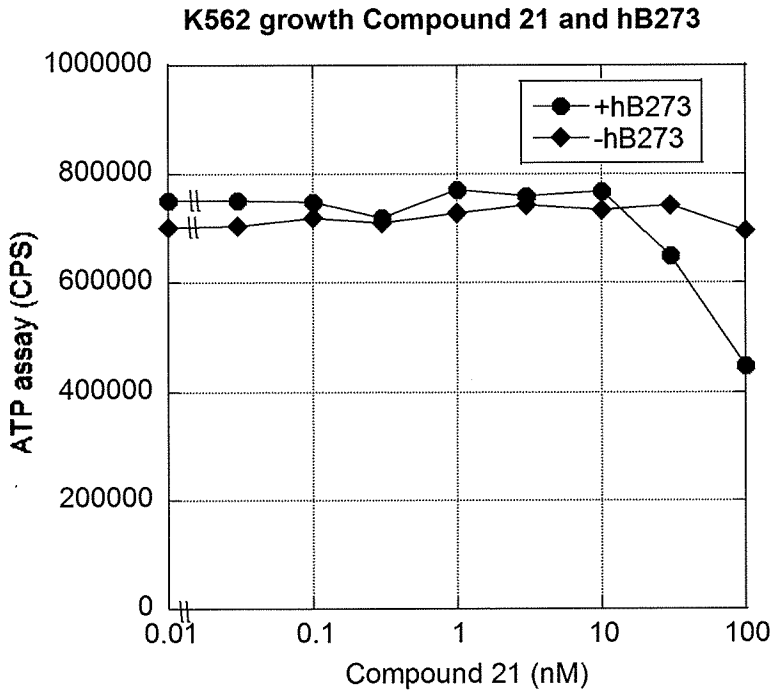

A375 apoptosis Compound 21 and hB273
Caspase 3/7 fold induction
10
8
6
4
2
0
+hB273
-hB273
0.01
0.1
1
10
100
Compound 21 (nM)

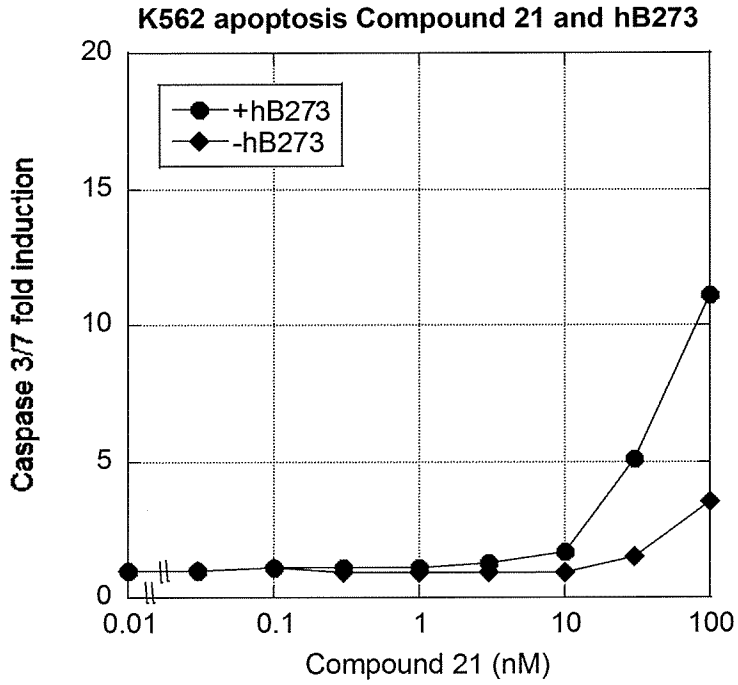
[図5-2]


NCI-H929 growth Compound 21 and hB273
ATP assay (CPS)
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
+hB273
-hB273
0.01
0.1
1
10
100
Compound 21 (nM)

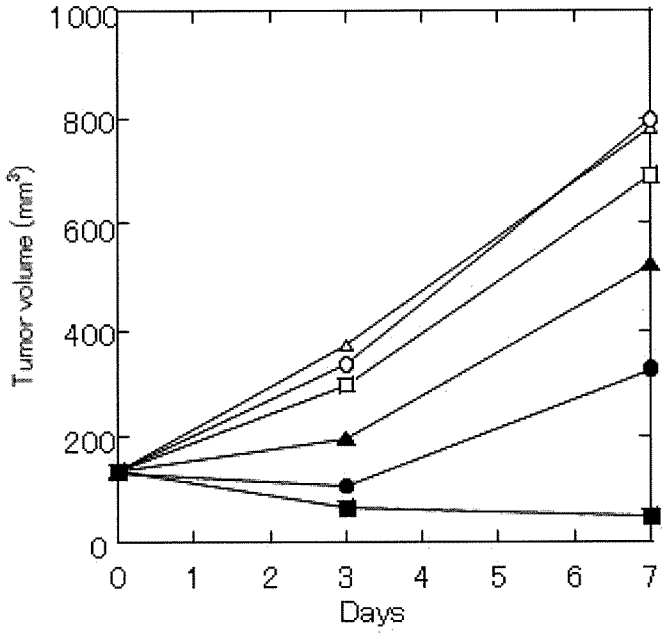

NCI-H929 apoptosis Compound 21 and hB273
Caspase 3/7 fold induction
20
15
10
5
0
+hB273
-hB273
0.01
0.1
1
10
100
Compound 21 (nM)

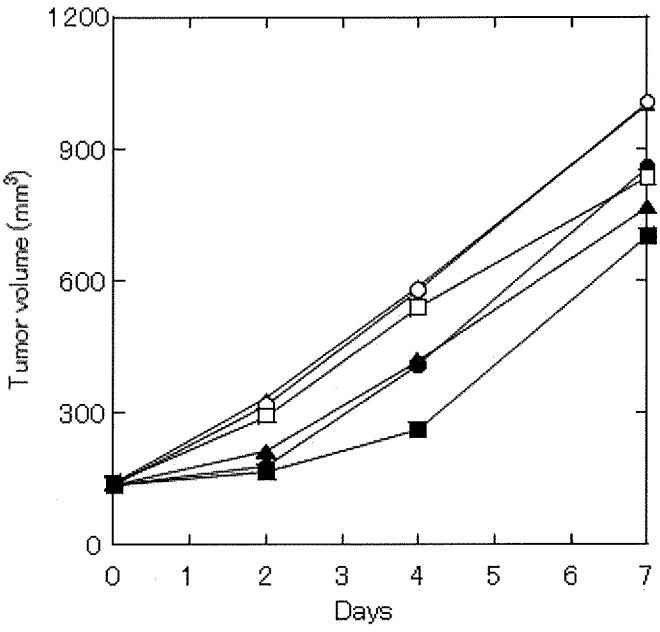
[図5-3]


K562 growth Compound 21 and hB273
1000000
800000
600000
400000
200000
0
ATP assay (CPS)
+hB273
-hB273
0.01
0.1
1
10
100
Compound 21 (nM)

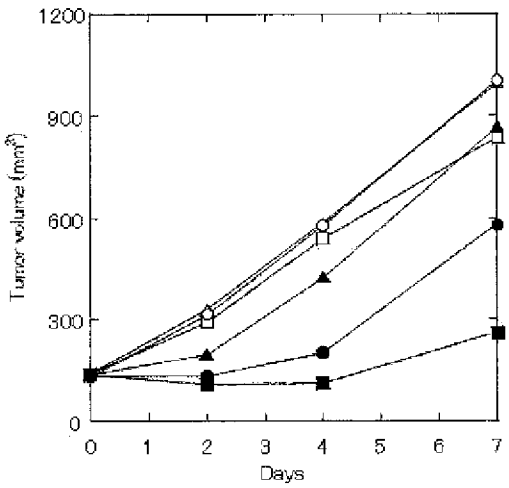

K562 apoptosis Compound 21 and hB273
20
15
10
5
0
Caspase 3/7 fold induction
+hB273
-hB273
0.01
0.1
1
10
100
Compound 21 (nM)

[図6-1]

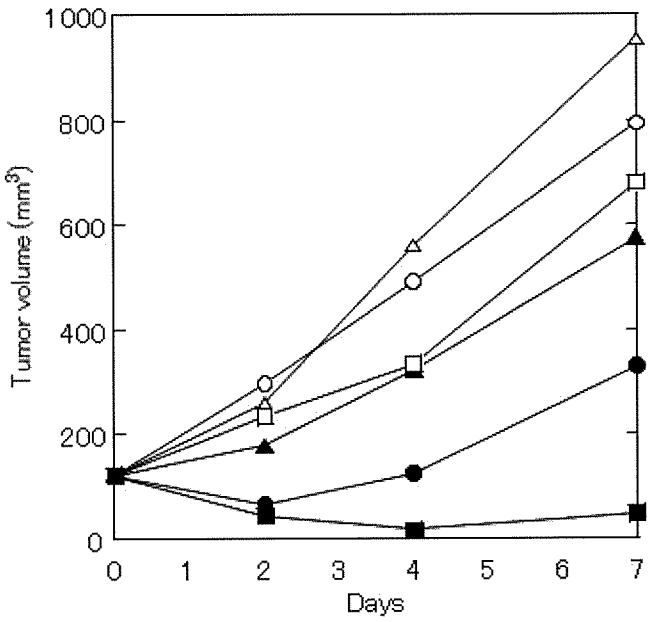

1000
800
600
400
200
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days

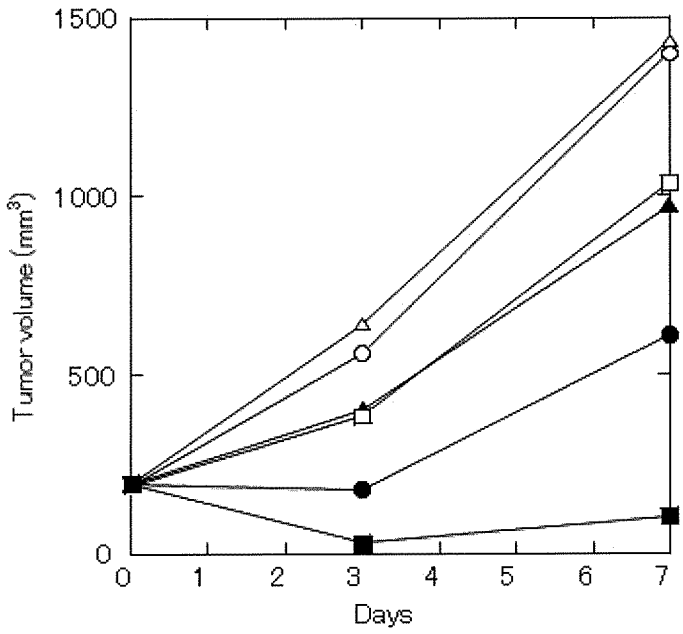

1200
900
600
300
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days

[図6-2]

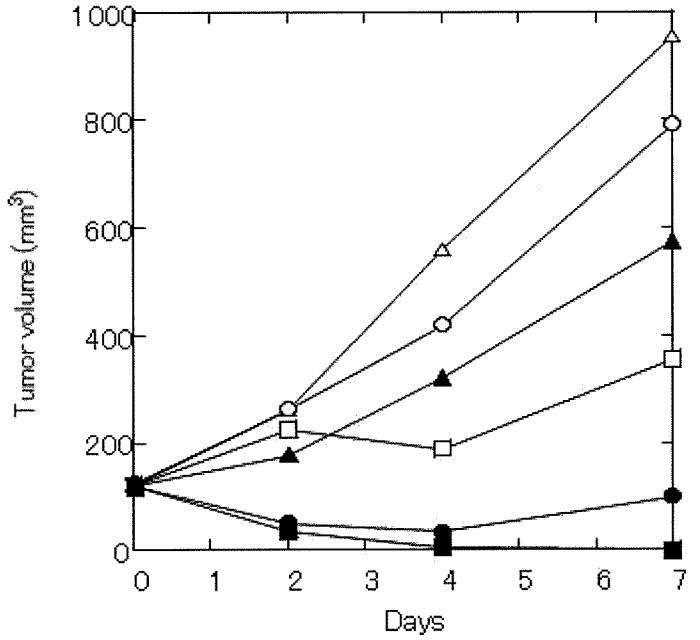


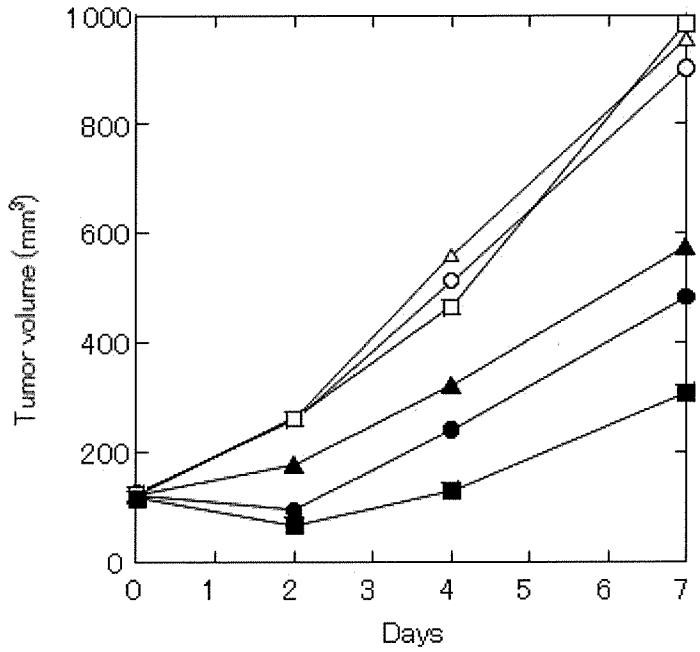
[図7-1]


1000
800
600
400
200
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days

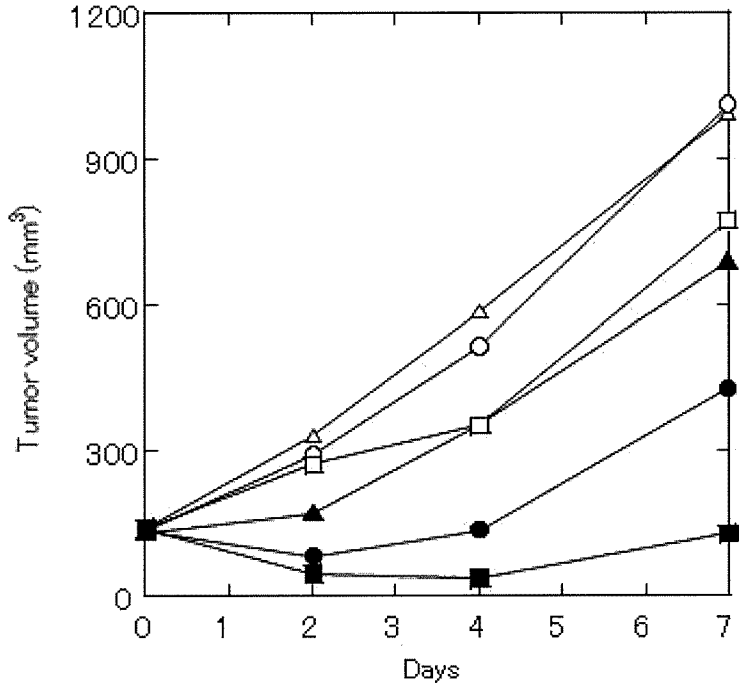

1500
1000
500
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days

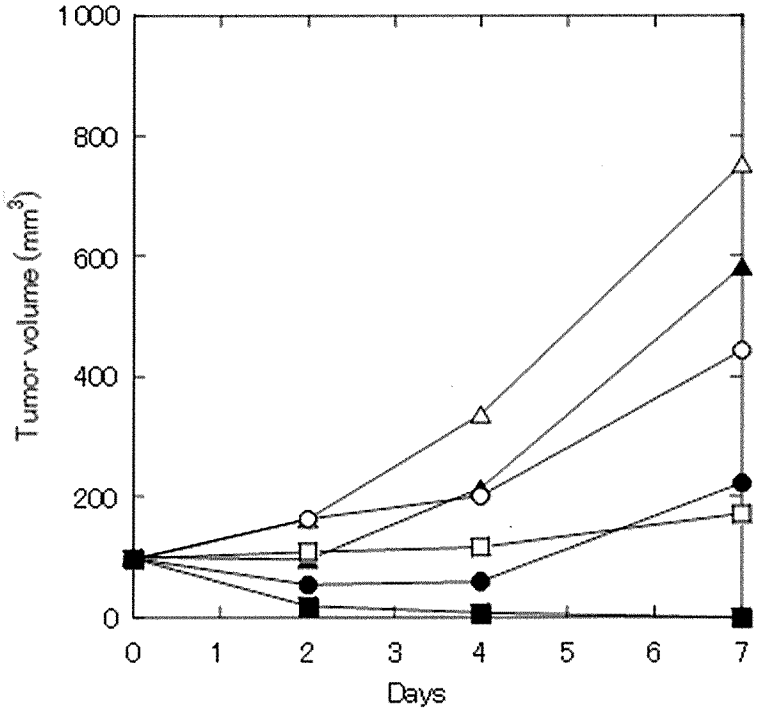
[図7-2]


1000
800
600
400
200
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days

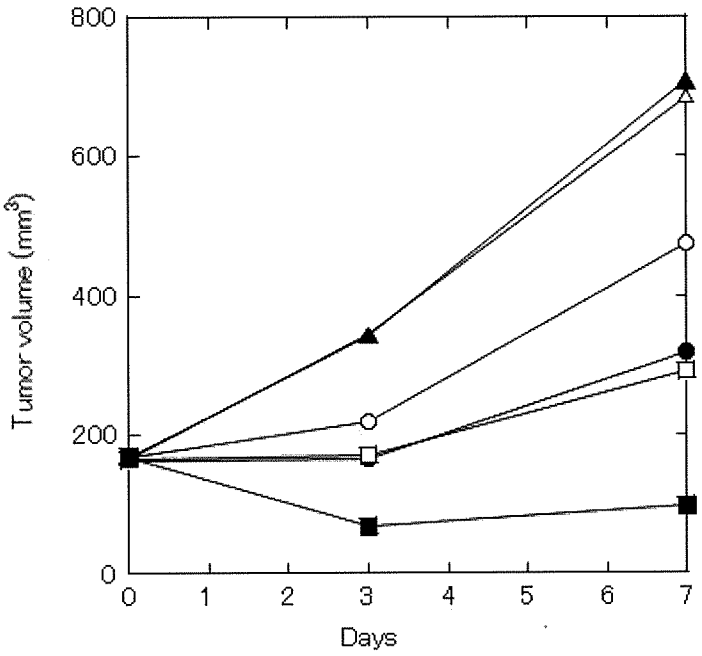

1000
800
600
400
200
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days

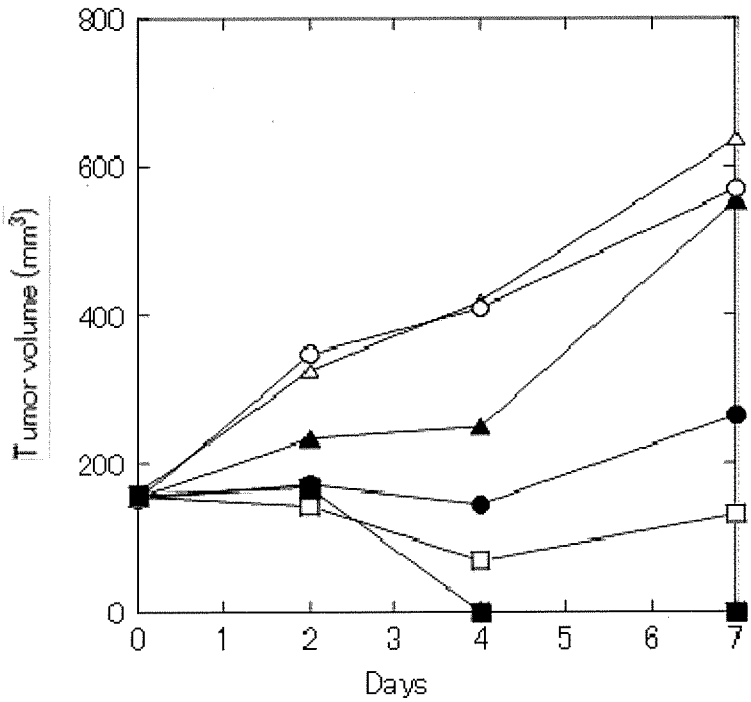
[図7-3]


1200
900
600
300
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days


1000
800
600
400
200
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days

[図8]


800
600
400
200
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days


800
600
400
200
0
Tumor volume (mm3)
0 1 2 3 4 5 6 7
Days

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/075616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K45/00, A61K31/4365, A61K31/437, A61K31/4375, A61K39/395, A61P1/04, A61P1/16, A61P1/18, A61P5/00, A61P11/00, A61P13/08, A61P13/10, A61P13/12, A61P15/00, A61P17/00, A61P19/00, A61P21/00, A61P25/00, A61P35/00,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2008-536820 A (IRM L.L.C.), 11 September 2008 (11.09.2008), & WO 2006/104672 A1 & EP 1863512 A	1-4,16/1-4, 6,8,10-12,16
Y	JP 2010-532364 A (Eli Lilly and Co.), 07 October 2010 (07.10.2010), & WO 2009/006043 A2 & US 2010/0166884 A1 & EP 2173348 A & KR 10-2010-0017984 A & CN 102772416 A	1-4,6,8, 10-12,16
Y	WO 2010/120614 A1 (Eli Lilly and Co.), 21 October 2010 (21.10.2010), & JP 2012-524089 A & US 2010/0261712 A & EP 2419106 A & KR 10-2012-0004447 A & CN 102395372 A	1-4,6,8, 10-12,16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 October, 2013 (29.10.13)	12 November, 2013 (12.11.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/075616

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/057288 A1 (Daiichi Sankyo Co., Ltd.), 03 May 2012 (03.05.2012), & EP 2636736 A1 & CN 103282495 A	1-4,6,8,11, 12,16
Y	WO 2009/020093 A1 (Daiichi Sankyo Co., Ltd.), 12 February 2009 (12.02.2009), & EP 2177230 A1 & US 2010/209490 A1 & KR 2010-0046185 A & CN 101820913 A	1-4,6,8,10, 16
Y	Herbst RS, et al. A first-in-human study of conatumumab in adult patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res., 2010 Dec, Vol.16 No.23, p.5883-91.	1-4,6,8,12, 16
A	Ichikawa K, et al. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. Nat Med., 2001 Aug, Vol.7 No.8, p.954-60.	1-4,6,8, 10-12,16
A	Kotliarova S, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. Cancer Res., 2008 Aug, Vol.68 No.16, p.6643-51.	1-4,6,8, 10-12,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/075616

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61K45/00(2006.01)i, *A61K31/4365*(2006.01)i, *A61K31/437*(2006.01)i, *A61K31/4375*(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P1/04*(2006.01)i, *A61P1/16*(2006.01)i, *A61P1/18*(2006.01)i, *A61P5/00*(2006.01)i, *A61P11/00*(2006.01)i, *A61P13/08*(2006.01)i, *A61P13/10*(2006.01)i, *A61P13/12*(2006.01)i, *A61P15/00*(2006.01)i, *A61P17/00*(2006.01)i, *A61P19/00*(2006.01)i, *A61P21/00*(2006.01)i, *A61P25/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P35/02*(2006.01)i, *C07K16/28*(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

A61P35/02, C07K16/28

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/075616

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 5,7,9,13-15,17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of claims 5, 7, 9, 13-15 and 17 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy or to diagnostic methods therefor and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０７５６１６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K45/00, A61K31/4365, A61K31/437, A61K31/4375, A61K39/395, A61P1/04, A61P1/16, A61P1/18, A61P5/00, A61P11/00, A61P13/08, A61P13/10, A61P13/12, A61P15/00, A61P17/00, A61P19/00, A61P21/00, A61P25/00, A61P35/00, A61P35/02, C07K16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X / Y	JP 2008-536820 A　（アイアールエム・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー）　2008.9.11 & WO 2006/104672 A1 & EP 1863512 A	1-4, 16 / 1-4, 6, 8, 10-12, 16
Y	JP 2010-532364 A　（イーライ　リリー　アンド　カンパニー）　2010.10.7 & WO 2009/006043 A2 & US 2010/0166884 A1 & EP 2173348 A & KR 10-2010-0017984 A & CN 102772416 A	1-4, 6, 8, 10-12, 16

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２９．１０．２０１３	１２．１１．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　３７６４
渡邊　倫子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2010/120614 A1　（イーライ　リリー　アンド　カンパニー） 2010.10.21 & JP 2012-524089 A & US 2010/0261712 A & EP 2419106 A & KR 10-2012-0004447 A & CN 102395372 A	1-4, 6, 8, 10-12, 16
Y	WO 2012/057288 A1　（第一三共株式会社）　2012.5.3 & EP 2636736 A1 & CN 103282495 A	1-4, 6, 8, 11, 12, 16
Y	WO 2009/020093 A1　（第一三共株式会社）　2009.2.12 & EP 2177230 A1 & US 2010/209490 A1 & KR 2010-0046185 A & CN 101820913 A	1-4, 6, 8, 10, 16
Y	Herbst RS, et al. A first-in-human study of conatumumab in adult patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res., 2010 Dec, Vol.16 No.23, p.5883-91.	1-4, 6, 8, 12, 16
A	Ichikawa K, et al. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. Nat Med., 2001 Aug, Vol.7 No.8, p.954-60.	1-4, 6, 8, 10-12, 16
A	Kotliarova S, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. Cancer Res., 2008 Aug, Vol.68 No.16, p.6643-51.	1-4, 6, 8, 10-12, 16

発明の属する分野の分類
A61K45/00(2006.01)i, A61K31/4365(2006.01)i, A61K31/437(2006.01)i, A61K31/4375(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P5/00(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P13/10(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P15/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)n

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０７５６１６

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　5,7,9,13-15,17　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項５、７、９、１３－１５及び１７に係る発明は、人の身体の手術若しくは治療による処置又は診断方法に係るものであり、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　＿＿＿＿＿＿＿＿　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　＿＿＿＿＿＿＿＿　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。