

インターロイキン-15, 17を標的とする新規抗リウマチ薬Y-320の創製

牛尾, 博之

<https://doi.org/10.15017/1500448>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（薬学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

インターロイキン - 15, 17 を標的とする新規抗リウマチ薬

Y-320 の創製

2015 年

牛尾 博之

内容

序論	2
第 1 節 関節リウマチ (RA) の病態	2
第 2 節 RA の薬物治療の発展と課題	4
第 3 節 RA における活性化リンパ球と IL-15, 17 の果たす役割	6
第 4 節 研究の目的・目標	9
本文	12
第 1 章 リード化合物の発見と合成展開方針の策定	12
第 1 節 初期展開	12
第 2 節 <i>In vivo</i> 評価からのリード化合物の発見	15
第 3 節 化合物 9g の示す新たな合成戦略	19
第 2 章 候補化合物の探索と選定	20
第 1 節 代謝物 9g のプロドラッグ化	20
第 2 節 ピペラジン誘導体の展開	23
第 3 節 ピペリジン誘導体の展開	27
第 4 節 開発候補化合物の選定	34
第 3 章 Y-320(化合物 15e)の薬理作用	38
第 1 節 <i>In vitro</i> 薬理作用と作用メカニズムに関する検討および考察	38
第 2 節 DBA/1J マウスを用いた CIA における Y-320 の効果	46
第 3 節 カニクイザルを用いた CIA に対する Y-320 の効果	56
第 4 章 総括	58
Experimental Section	62
<i>Chemistry</i>	62
<i>Pharmacology</i>	89
<i>Pharmacokinetics</i>	92
引用文献	94
投稿論文一覧	100
謝辞	101

序論

第1節 関節リウマチ (RA) の病態

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) は一種の自己免疫疾患であり、本来は自己を守るべき免疫細胞が自己組織 (自己抗原) に対して攻撃を行うことにより発症するものと考えられている。RA の病因は未だ解き明かされてはいない。遺伝的要因の可能性と、後天的要因、例えば若い頃に高熱を伴う疾患や体調不良を患うことで免疫防御機能が破られ自己に対する免疫応答が確立され、その後何らかの原因で再び免疫機能が活性化されるといった考え方もある。

RA の病態としては、(i) 初期に血管の新生と共にリンパ球などの免疫細胞が関節腔内や関節滑膜へ漏出し、腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α), インターロイキン 1 (interleukin 1: IL-1), 破骨細胞分化因子(Receptor Activator of NF- κ B Ligand: RANKL)などの炎症性サイトカインを産生し、滑膜線維芽細胞を活性化させる。(ii) その結果、進行期には滑膜組織が増殖・肥厚し、パンヌスと呼ばれる炎症性肉芽組織を形成する。(iii) パンヌスからは上記炎症性サイトカインをはじめ、プロスタグランジン類、基質メタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinase: MMP) のような蛋白分解酵素が産生され、また活性化されたマクロファージが破骨細胞の分化を促進し、それらによって骨や軟骨が侵食される。(iv) その結果、軟骨部分が徐々に薄くなり、骨と骨の間が狭くなり、骨が硬直し骨破壊がさらに悪化する(Figure 1)^{1a-d)}。

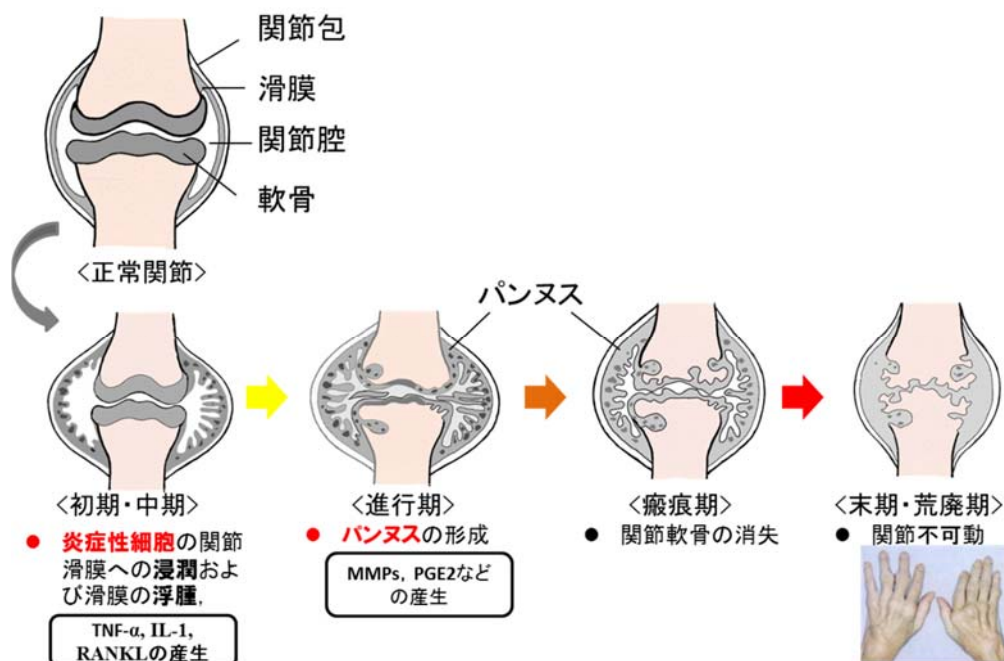


Figure 1. RA の関節と病態の進行度(文献^{1d)}より改変引用)

RA の病態の進行度は、個人差があり急激に発症する場合や発症と寛解を繰り返す場合、あるいは1次的に発症した後に発症しない場合などがある。Table 1 に日本リウマチ学会における RA の診断基準を記載した。

Table 1. 早期関節リウマチの診断基準（日本リウマチ学会）

<p>以下の 6 項目中、3 項目を満たす場合を RA と判定する。 この診断基準に該当する患者は詳細に経過を観察し、病態に応じて適切な治療を開始する必要がある。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 3 関節の圧痛または他動運動痛2. 2 関節以上の腫脹3. 朝のこわばり4. リウマトイド結節5. 赤沈 20 mm 以上の高値または CRP 陽性6. リウマトイド因子陽性

第2節 RAの薬物治療の発展と課題

RAの治療法としては、古くは抗炎症療法を主体としたピラミッド療法が提唱されてきた。即ち、副作用の少ないとされる非ステロイド系抗炎症薬(non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs)を第1選択薬とし、これによって炎症が制御できない場合に疾患修飾性抗リウマチ薬(Disease modifying anti-rheumatic drugs: DMARDs),あるいはステロイドを使用するというものである。しかしながら、NSAIDは長期投与することによって消化管障害等の副作用を引き起こすことや関節破壊を阻止できないことなどから、近年では有効性の高いペニシラミン、ブシラミン、サラゾスルファピリジン、シクロフォスファミド等のDMARDを早期から使用するように指導されている(Figure 2)²⁾。

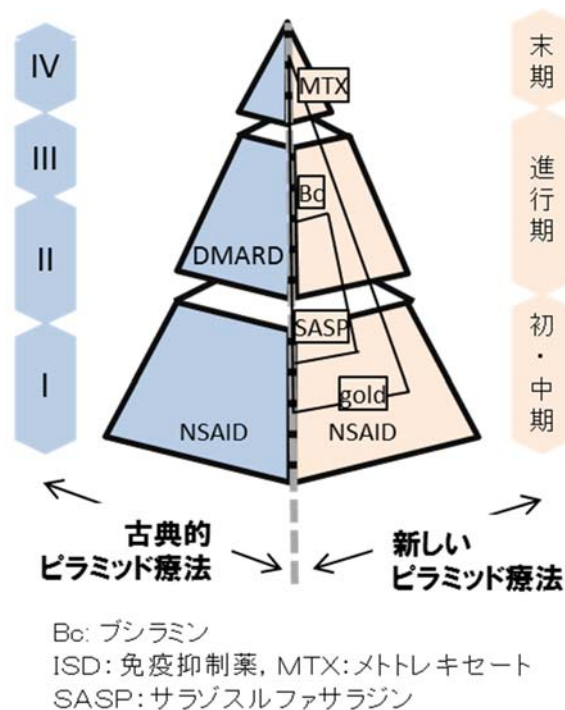


Figure 2. RAにおける治療のピラミッド(文献²⁾より改変引用)

現在では、病態の解明がすすみ、炎症性細胞の活動を抑制することが有効との知見に基づき、マイコフェノレートモフェチール(Mycophenolate mofetil)³⁾, ミゾリビン(Mizolibine)⁴⁾, レフルノマイド(Leflunomide, ARABA[®])⁵⁾, メトトレキサート(Methotrexate)⁶⁾などの免疫抑制作用を有する薬剤が使用されるようになった。中でも、メトトレキサートは、現在のRA治療薬の第1選択薬となっている。

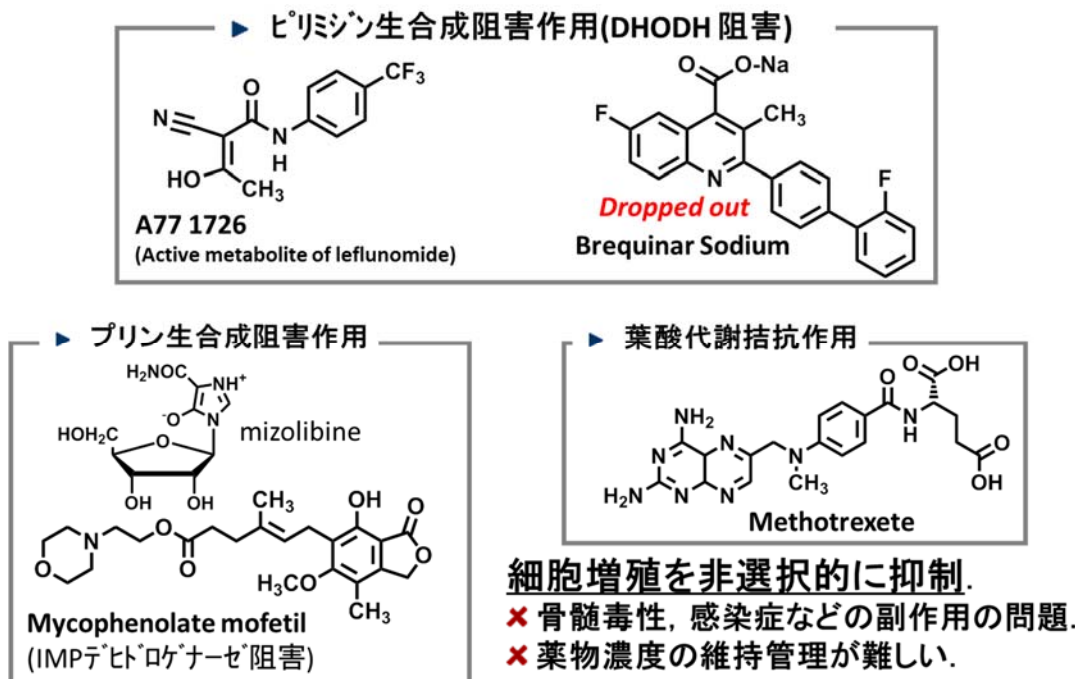


Figure 3. 核酸の代謝・生合成経路を阻害する免疫抑制剤

メトトレキサートは、葉酸の代謝経路上にあるジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydro- folate reductase : DHFR)を阻害することによって核酸合成を止め、細胞増殖抑制作用を発揮する。マイコフェノレートモフェチールやミゾリビンはプリン生合成経路上にある IMP デヒドロゲナーゼを、またレフルノマイドは活性代謝物の A77 1726 がピリミジンの生合成経路上のジヒドロオロテートデヒドロゲナーゼ(dihydroorotate dehydrogenase: DHODH) を阻害することによって、細胞の増殖を抑制する⁷⁾。その一方で、これら薬剤はあらゆる細胞の活動を非選択的に阻害するために、骨髄毒性や肝毒性、あるいは間質性肺炎といった感染症を引き起こすなどの問題点も抱えている(Figure 3)。

また、現在では炎症性サイトカインに着目して多くの生物製剤が開発されてきた。例えば、マウス (キメラ型) 抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体のインフリキシマブ(infliximab)⁸⁾、完全ヒト型抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体のアダリムマブ(Adalimumab)⁹⁾、完全ヒト型 TNF- α 可溶性受容体のエタネルセプト(Etanercept)¹⁰⁾、さらに抗ヒト IL-6 モノクローナル抗体のトリシズマブ(Tocilizumab)¹¹⁾などが高い効果を発揮している。しかしながら、これら生物製剤は薬価が高いため患者の経済的負担が大きく、また加えて感染症などの副作用の問題などが指摘されている。

第3節 RAにおける活性化リンパ球と IL-15, 17 の果たす役割

I. B. McInnes らは、変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) および RA 患者の関節内の滑液を調査し、RA 患者由来の滑膜に特異的に多くの T 細胞が浸潤し、また高濃度のインターロイキン 15 (interleukin 15: IL-15) が存在すること、さらには RA 患者から採取した滑膜細胞の培養液からも特異的に高いレベルの IL-15 が検出されたことを報告した(Figure 4)¹²⁾

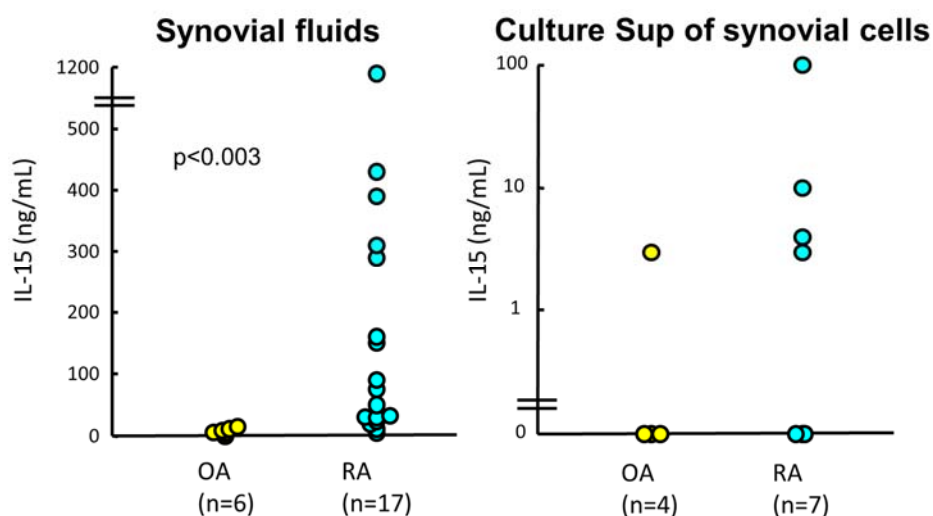


Figure 4. Comparison of levels of IL-15 between RA and OA. (I. B. McInnes et al *Nature Med.* 1996, 2, 175¹²⁾より改変引用)

IL-15 の受容体(IL-15R)は、リンパ球の活性化を司る IL-2 の受容体(IL-2R)と類似の構造を有する。即ち、CD125 と呼ばれる IL-15R 特異的な α 鎖と IL-2R と共通の β 鎖 (IL-2R β : CD122), γ 鎖 (IL-2R γ : CD132) によって構成されている。IL-15 は、IL-15R に結合することによって IL-2 と同様にリンパ球を活性化し、増殖、さらには T 細胞からの IL-2 や TNF- α などのサイトカイン産生を促すといった機能を有する(Figure 5)¹³⁾。

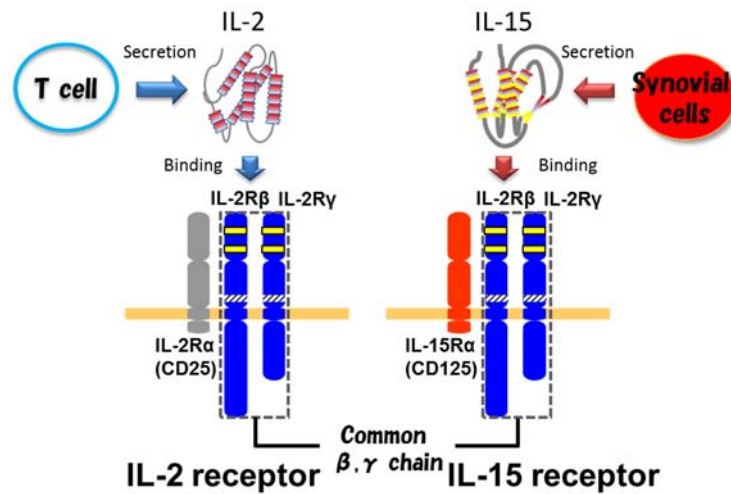


Figure 5. Structural differences between IL-2/IL-2R and IL-15/IL-15R

RA の動物モデルの 1 つである DBA/1J マウスの II 型コラーゲン誘発関節炎 (type II collagen-induced arthritis: CIA) において、可溶性 IL-15Rα やマウスの IL-15/Fc 融合タンパクによって関節炎の進行、骨破壊、そして II 型コラーゲン抗体の産生が抑制されることが報告されている。さらに、ヒト IL-15 (HuMax-IL-15) に対するモノクローナル抗体が進行性の RA 患者の諸症状を緩和することが報告されている¹⁴⁾。このように、IL-15 はリンパ球の活性化を通じて RA の発症および進行に深く関与していることが示唆されている。

さらに、IL-15 によって活性化されたリンパ球(CD4⁺T 細胞) は、IL-17 を産生することが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。IL-17 は、CD4⁺T 細胞以外の多様な細胞からも産生される炎症性サイトカインではあるが、その機能はマクロファージ、線維芽細胞、滑膜細胞などに作用して IL-6, IL-8, CC ケモカインリガンド 2 (CCL2), 顆粒球単球コロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF), MMPs, プロスタグランジン E2 などの産生を促すことが知られている。

Ziolkowska らは、RA 患者の関節滑液中に IL-15 と共に高いレベルの IL-17 が検出されたことを報告した(Figure 6)¹⁸⁾。

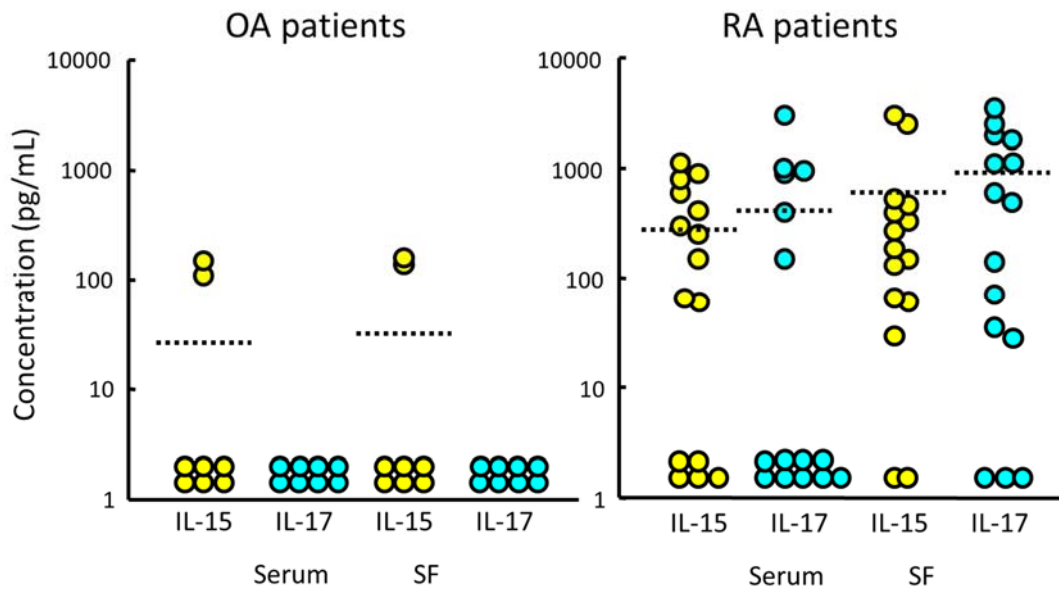


Figure 6. Comparison of levels of IL-17 and IL-15 in serum and synovial fluids (SF) from RA and OA patients. (M. Ziolkowska *et al. J. Immunol.*, 2000, 164: 2832¹⁸) より改変引用)

これらの報告から、IL-15 → CD4⁺T 細胞の活性化 → IL-17 というカスケードが RA の病態の発症および進行に深く関与している可能性が考えられる (Figure 7).

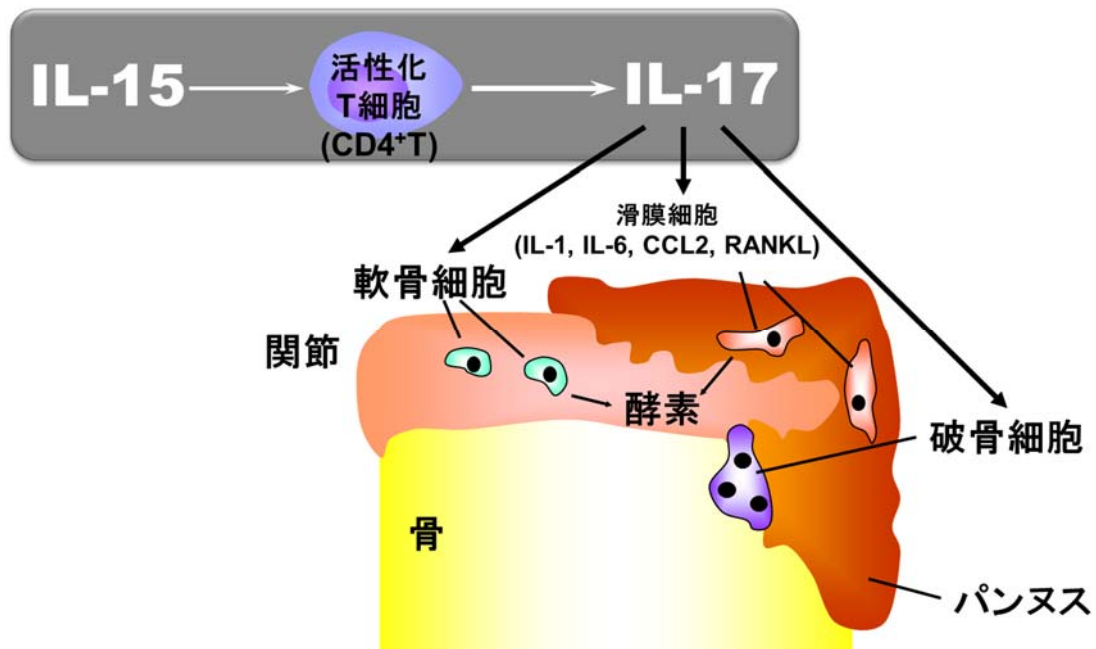


Figure 7. 関節リウマチの病態における IL-15, IL-17 の役割(Lubberts, E. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2003,4, 572–577.¹⁶)より改変引用)

第4節 研究の目的・目標

近年のリウマチ治療においては、免疫調整薬あるいは免疫抑制薬に加えて、生物製剤の積極的な使用により薬物による治療満足度が高まってきた。その一方で、免疫抑制薬の投与による骨髄毒性や肝毒性の問題、生物製剤が高薬価であることや感染症を引き起こすといった問題は、依然として RA 治療法における改善すべき大きな課題となっている。これらの課題に対し、筆者はリウマチ病態の早期から進行期における IL-15、活性化リンパ球、およびそこから産生される IL-17 というカスケードに着目し、リンパ球の活性化を選択的に阻止できる低分子化合物を創製することで、副作用を低減しかつ、患者の QOL (Quality of life) の改善に繋がると考え、本研究に着手した。

筆者は、まずレフルノマイド(1)の持つ高い薬理作用に加えて、後述する2つの作用メカニズムに関する報文に注目した。レフルノマイドは、臨床試験において RA の第1選択薬であるメトトレキサートを上回る高い治療効果、並びに骨破壊抑制作用を示すことから、現在最も注目を浴びている薬剤の1つである。レフルノマイドは、経口投与後に生体内で速やかにイソキサゾール環の代謝を受け、クロトンアミド骨格を有する活性代謝物 A77 1726 (2)に変換される。A77 1726 (2)は、*in vitro* におけるリンパ球増殖に対して 80 μ M 以上で約 90%抑制する作用を有している⁷⁾。また、10 mg/kg 以上の経口投与でラットにおける関節炎の発症を抑制し、全身性エリテマトーデス様の症状を自然発症する自己免疫疾患モデルの MRL/MpJ-lpr/lpr マウスに対しても、20 mg/kg 以上で予防効果を示すことが報告されている¹⁹⁾。A77 1726 (2)は、ピリミジンの核酸合成酵素である dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)を阻害することで細胞の増殖を抑制するため、その作用は過剰の uridine の添加で消失することが知られている。

一方で、レフルノマイドは、肝毒性の問題から投与初期から段階的に増量するといった変則的な投与が必要である。また、非選択的に免疫機能を低下させるため、感染症のリスクが常に伴うなどの問題を抱える。さらに、A77 1726 (2)は、クロトンアミド部位が生体内でさらに抱合を受けて、血中に長く留まる性質を有するため(ヒト: $T_{1/2}$ =330 hrs)、適正な血中薬物濃度の維持管理に注意が必要である。これは、レフルノマイドが A77 1726 (2)という活性代謝物に容易に変換されやすいという構造的特徴に由来し、かつそれが DHODH を阻害することに起因している。

以上の情報から、レフルノマイドとは異なる構造を有し、高い efficacy を示し、かつ DHODH 阻害作用などの核酸生合成経路阻害作用のない低分子医薬を

開発することができれば，RA 治療薬として極めて有用となることが期待される。

R. Albert らは，レフルノマイドが A77 1726 (2) の 1/50 程度の DHODH 阻害作用しか示さないのにも拘わらず，混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction) において，A77 1726 (2) と同等な免疫抑制活性を有することを明らかにした²⁰⁾。言い換えると，この結果は未変化体であるレフルノマイドが活性代謝物の A77 1726 とは異なる免疫抑制メカニズムを有している可能性を示唆している。

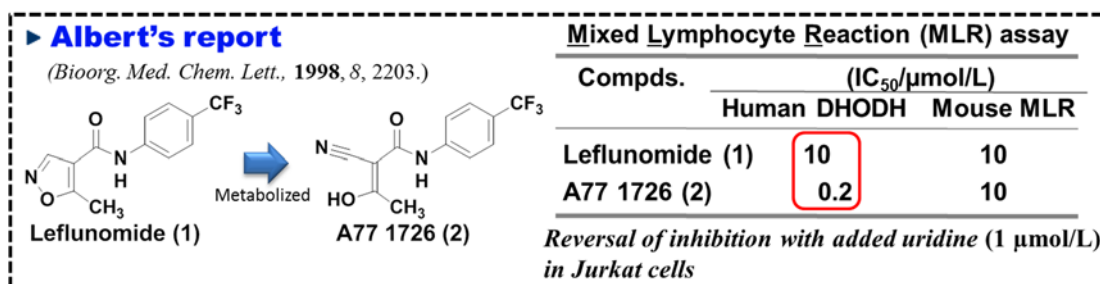


Figure 8. レフルノマイドと A77 1726 の作用メカニズムの違い²⁰⁾

また，J. Coghlan らは，レフルノマイドのイソキサゾール環をフェニルピラゾールに変換することで，DHODH 阻害作用を持たない新たな免疫抑制薬の展開の可能性を示した (3 vs A77 1726 (2) in Figure 9)²¹⁾。

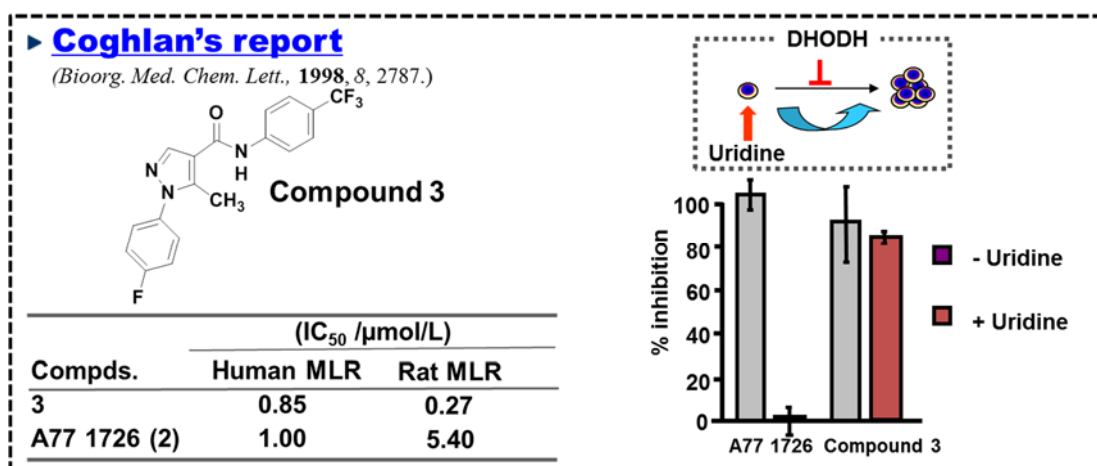


Figure 9. ピラゾールアミド誘導体の免疫抑制作用²¹⁾

筆者の所属する田辺三菱製薬株式会社(元吉富製薬株式会社)にはフェニルピラゾール-4-カルボン酸骨格を有する痛風治療薬 Y-700(4)²²⁾の開発経験があり，誘導体・中間体が利用可能なこと，さらにはそれら展開上の know-how を多く所有していることなどから，合成展開に早期に着手できるなどのメリットがあった。

以上の情報から、筆者はピラゾールアミド誘導体を合成展開することにより、「レフルノマイド級の efficacy を持ち、且つ DHODH 阻害作用などの核酸合成経路阻害作用に基づかない低分子医薬」という命題を満足する化合物を創製できるのではないかと考え、合成展開に着手した(Figure 10).

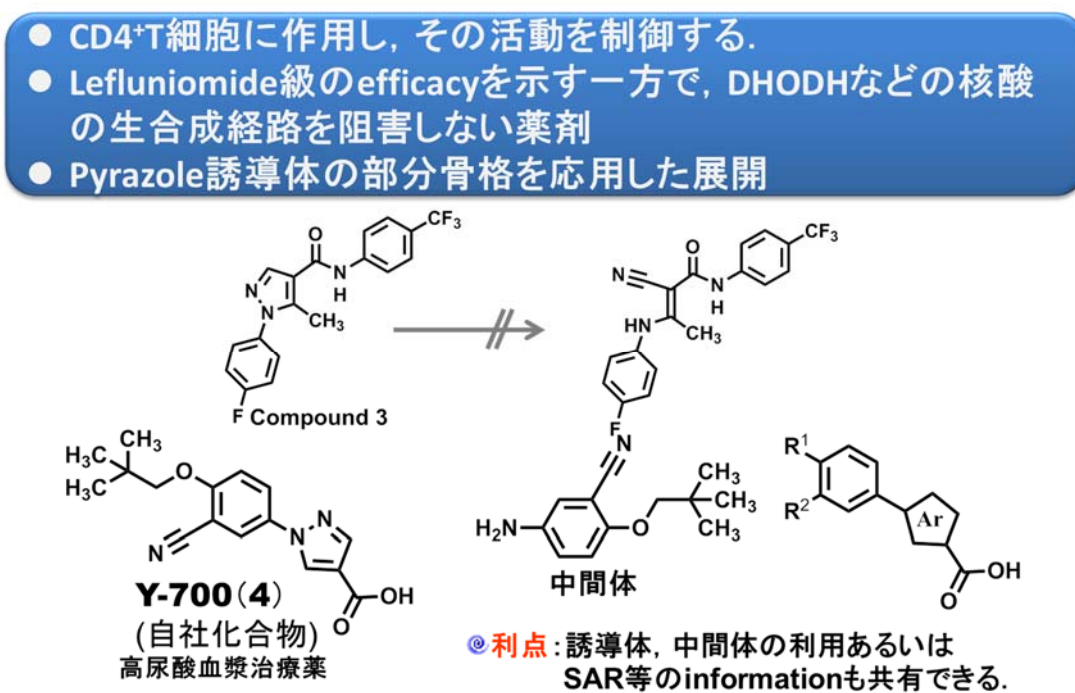


Figure 10. 研究のコンセプト

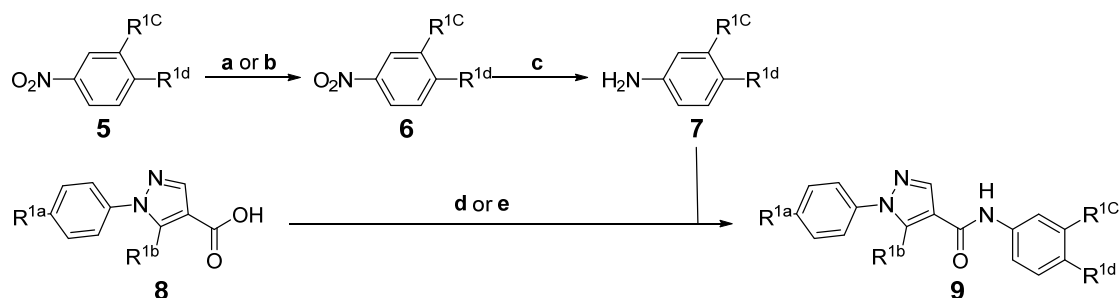
本文

第 1 章 リード化合物の発見と合成展開方針の策定

第 1 節 初期展開

筆者は、RA の病態と IL-15, 活性化リンパ球(CD4⁺T 細胞), IL-17 というカスケードに注目し、中心となるリンパ球の増殖を制御する薬剤の研究開発を立案した。目標とする薬理効果としては「レフルノマイド級の efficacy」であり、これからの RA 治療薬に求められるものの 1 つと考える。一方で、核酸生合成経路阻害作用を有する細胞非選択的な免疫抑制薬では、感染症、骨髄毒性などの問題を抱えこととなる。そこで、筆者は更に「核酸生合成経路阻害作用に基づかない低分子医薬を開発する」ことを第 2 の目標に掲げて、新規な免疫抑制メカニズムを有する RA 治療薬の研究開発を意図して文献調査を行い、また目標とする薬理プロファイルを有する化合物を求めて化合物スクリーニングを開始した。

1998 年当時、Albert らのグループはレフルノマイドがその活性代謝物(A77 1726 (2))とは異なる免疫抑制作用を有することを報告した²⁰⁾。また、同年 Coghlan らのグループが、レフルノマイドのイソキサゾール環をピラゾール環に変換したアニリド誘導体が A77 1726 と同等以上の免疫抑制活性を示すことを報告した²¹⁾。これらの報告は、正に筆者が求める「核酸生合成経路阻害作用に基づかない低分子医薬の探索」という目的に合致した重要な化合物情報であった。そこで、社内ライブラリーの中からフェニルピラゾールカルボン酸誘導体を利用して合成展開を開始した。

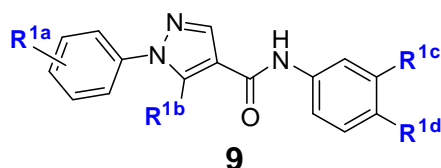


Scheme 1. General synthetic method for a series of phenylpyrazole anilide derivatives. Reactions and conditions: (a) amine, Et₃N/ CH₃CN, reflux; (b) NaH, alcohol/DMF, r.t.; (c) NH₄Cl, Fe (powder) /aq. EtOH, reflux; (d) i: HOBt, WSC·HCl /DMF at r.t. ii: 7, Et₃N/DMF; (e) (EtO)₂POCN, 7, Et₃N/DMF, rt.

一般的合成法を Scheme 1 に示した. ニトロベンゼン誘導体 **5** に DMF 中アルコキサイドを作用させるか, アセトニトリル還流下アミンを作用させることにより対応する付加体 **6** を得る. これを文献に従い還元することにより, アニリン誘導体 **7** が得られる. また, ピラゾール-4-カルボン酸誘導体 **8** を縮合剤(HOBT +WSC·HCl または(EtO)₂POCN)存在下アニリン誘導体 **7** と縮合反応を行い, 対応するアミド誘導体 **9** を合成した.

こうして得られた一連のアミド誘導体 **9** と J. Cogan²¹⁾らが報告した化合物 **3** との免疫抑制活性を比較した. *In vitro* 1 次スクリーニング法として, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)および Ca ionophore (A23187)で刺激されたラットリンパ球の増殖に対する作用を[methyl-³H] - thymidine ([³H]TdR)の取り込み量によって評価した(Table 2)²³⁾. 本評価において, A77 1726 (**2**) および化合物 **3** の活性化リンパ球の増殖抑制活性は IC₅₀ 値として 0.54 および 1.1 μmol/L であった.

Table 2. The inhibitory activities for the proliferation of rat T cells induced by PMA and Ca ionophore, and solubility



Compds	R ^{1a}	R ^{1b}	R ^{1c}	R ^{1d}	IC ₅₀ ^a (μmol/L)	Solubility ^b (mg/mL)
2			-		0.54	NT
3	4-F	CH ₃	H	CF ₃	1.10	NT
9a	4-F	CH ₃	CN		0.073	<0.001
9b	4-F	CH ₃	CN		1.40	<0.001
9c	4-F	CH ₃	CN		18	NT
9d	4-F	CH ₃	CN		2.4	0.001
9e	4-F	CH ₃	CN		3.2	<0.001
9f	4-F	CH ₃	CN		2.5	0.033

^aIC₅₀ values represent an average of at least three independent experiments. ^bSolubility of compound in buffer solution at pH 6.8.

Y-700 (**4**)の 3-シアノ-4-(2,2-ジメチルプロポキシ)フェニル基をアニリン部位に有する化合物 **9a** は, IC₅₀ 値は 0.073 μmol/L と極めて高い増殖抑制活性を有することが明らかとなった. 残念ながら, *in vivo* では全く薬理効果を示さなかった. 物性評価並びに薬物動態試験の結果, 化合物 **9a** は水への溶解性が乏しく,

経口吸収性が極めて低いため、*in vivo* における薬理効果が発揮されなかったことが判明した。

そこで、次に溶解性向上を意図して、アニリン部位の4位 (R^{1d}) に塩基性窒素を導入した化合物 **9c-f** を合成した。ジメチルアミノメトキシ基を有する化合物 **9c** は *in vitro* 活性が大きく減弱したが、ピペリジンを有する化合物 **9d**、モルホリンを有する化合物 **9e**、メチルピペラジンを有する化合物 **9f** はリードとなった化合物 **3** と同程度の活性を保持することを見出した。

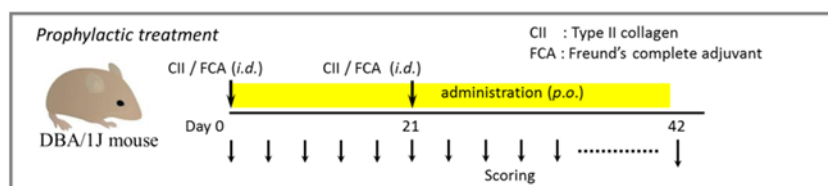
化合物 **3** と同程度の *in vitro* 活性を有する化合物 **9d-f** をマウスのII型コラーゲン誘発関節炎(Type II collagen-induced arthritis: CIA)モデルを用いて *in vivo* 評価を行ったので、それらの結果を次節にて報告する。

第 2 節 *In vivo* 評価からのリード化合物の発見

化合物 **3** と同程度の *in vitro* 活性を有する化合物 **9d-f** を *in vivo* 評価系であるマウスを用いた II 型コラーゲン誘発関節炎 (Type II collagen-induced arthritis: CIA) モデルにて評価した。

ウシ II 型コラーゲン溶液 (200 µg) とフロイント完全アジュバントとを等比で混合したエマルジョンを調製し、これを 7 週齢の DBA/1JNCrj マウスの尾根部に初回免疫およびその 3 週間後に再度追加免疫することによって関節炎を発症させた。関節炎の評価は、以下の判定基準に基づいて観察し、四肢についてそれぞれ 0 から 4 のスコアで評価した (Table 3)。それぞれのマウスの関節炎のスコアは、四肢のスコアの合計で表し (最大 : 16 点), 総合スコアが 1 点以上の場合に、関節炎を発症したと判定した。なお、1 群の動物数を 5 匹とした。化合物の評価においては、初回免疫時から 1 日 1 回経口投与を行った。この術式と後述するものと区別するために予防的投与と称する。

Table 3. マウスの CIA の予防的投与における評価概略と評価法



スコア	症 状
0	変化なし
1	1 つの関節のみの浮腫
2	2 つ以上の関節の浮腫 (足全体の軽度の浮腫)
3	足全体の重度の浮腫
4	足全体の重度の浮腫と関節の強直, 不動化

その結果、化合物 **9e** や **9f** は明確な *in vivo* 薬理効果を示さなかった(データ省略)。一方、ペペリジン誘導体の化合物 **9d** を 10 及び 30 mg/kg 経口投与した群では、レフルノマイド(**1**)とほぼ同等な関節炎の抑制効果を示すことが明らかとなった(Figure 11)。

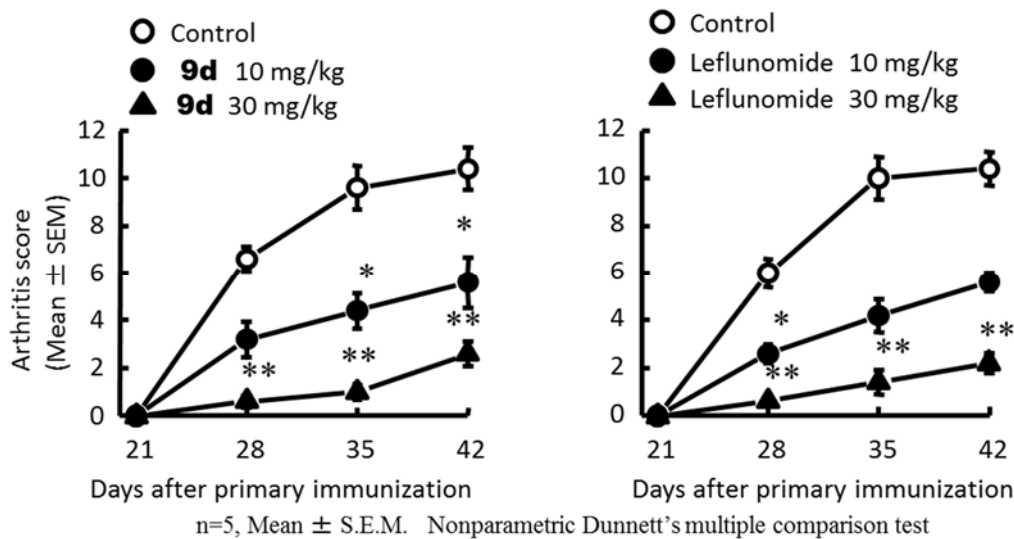


Figure 11. Effects of **9e** and leflunomide (**1**) on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. (*:p<0.05, **:p<0.01 vs control)

次に化合物 **9d** の薬物動態について評価した。10 mg/kg の化合物 **9d** を SD-IGS ラットに経口投与(p.o.)したところ、驚くべきことに未変化体である **9d** は全く観測されなかった。また、5 mg/kg の静脈内投与(i.v.)後の血中濃度測定においても、消失半減期($T_{1/2}$)が 0.40 時間と速やかに未変化体が消失することが判明した (Figure 12 および Table 4)。

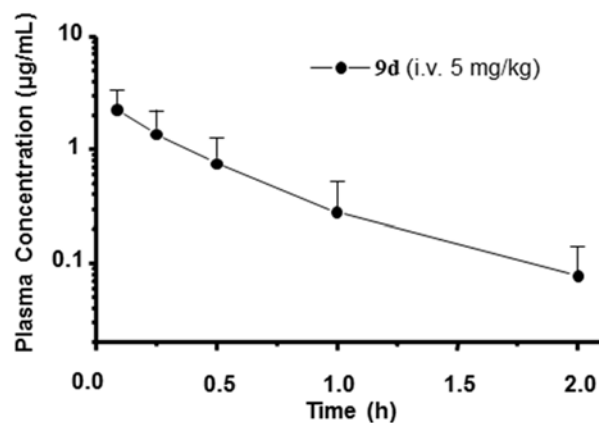


Figure 12. Plasma level of **9d** after intravenous administration to SD-IGS female rats (n=5, mean ± SD)

Table 4. Pharmacokinetic parameters of **9d** after administration

Administration route	Dose (mg/kg)	AUC _{0-∞} (µg·h/mL)	T _{1/2} (h)
i.v.	5	1.25 ± 0.88	0.40 ± 0.16
p.o.	10	-	-

レフルノマイドと同等な *in vivo* 薬理活性を有しながらも、血漿中に未変化体が確認できないということは、未変化体に代わる生理活性化合物、即ち血中活性代謝物が生成している可能性が考えられる。そこで、薬物動態評価に用いた SD-IGS ラットの経口および静脈内投与後の血漿中に存在する物質を LC/MS/MS を用いて検索した。その結果、経口および静脈内投与いずれの場合も化合物 **9d** より分子量が 16 ほど大きく、極性の高い化合物が検出された(Figure 13)。即ち、水酸基を有する化合物の可能性が考えられた。更に、UV 吸収パターンが **9d** と一致したことから、芳香環以外の炭素鎖上に水酸基を配する化合物であることが予想された。そこで、推定化合物の標品を別途合成し、HPLC を用いて保持時間の確認を行った結果、この代謝物はピペリジンの 4 位の水酸化体(**9g**)であることが同定された(Figure 14)。

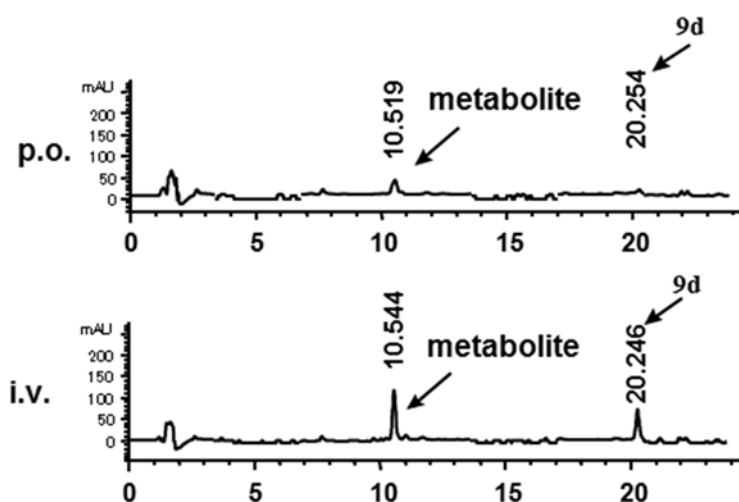


Figure 13. HPLC analysis of plasma in rats after oral and intravenous administrations of **9d**

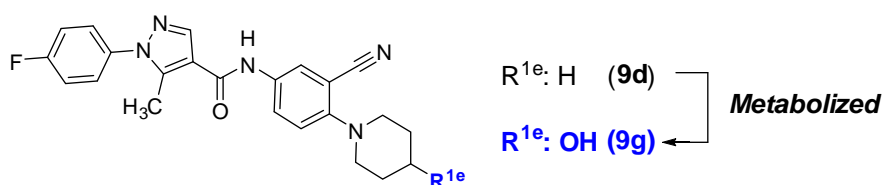


Figure 14. Structures of **9d** and its metabolite **9g**

In vitro 1次スクリーニング法において、化合物 **9d** およびその代謝物 **9g** の作用を評価したところ、化合物 **9g** の方がより高い増殖抑制活性を有することが示唆された。さらに、*in vitro* 2次スクリーニング法として、IL-2R を発現した CTLL-2 細胞を用いてリコンビナント マウス(rm)-IL-15 依存的な増殖^{14, 24)}に対する作用を評価したところ、同様に **9g** の方が強力な増殖抑制活性を示し、しかも **9g** の *in vitro* 活性は A77 1726 (**2**)^{20, 21)} と異なり過剰の uridine を添加しても減弱しない

ことが確認された。このことから、化合物 **9d** や **9g** の薬理作用は、A77 1726 (**2**) とは異なる作用メカニズムによることが示唆された (Figure 15 および Table 5)。

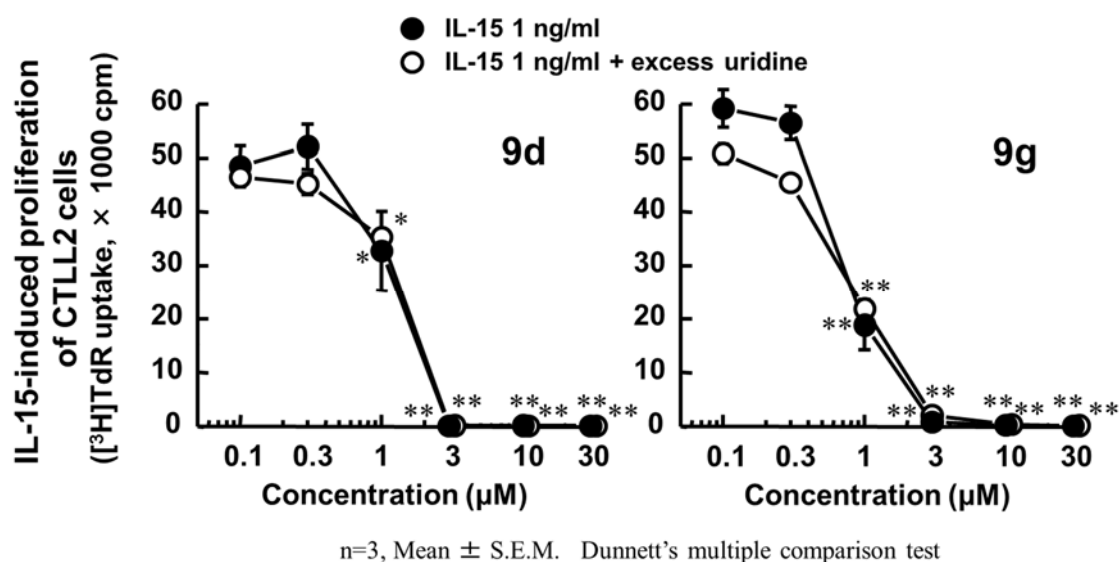


Figure 15. Effects of **9d** and **9g** on IL-15-dependent proliferation of CTLL-2 cells in the presence or absence of excess uridine (100 μM). (*:p<0.05, **:p<0.01 vs control)

Table 5. IC₅₀ values of the effects of **9d**, **9g** and A77 1726 (**2**) on proliferation of T cells in rats stimulated with PMA and Ca ionophore, and on IL-15-dependent proliferation of CTLL-2 cells in the presence or absence of excess uridine (100μM)

	IC ₅₀ (μmol/L) (95% Confidential limits)		
	T cells in rats	CTLL-2	
		-	+ uridine
A77 1726 (2)	0.54 (0.16–0.93)	8.9 (7.6–10.3)	49.7 (42.2–59.6)
9d	2.4*	1.1 (0.69–1.9)	1.2 (1.0–2.2)
9g	0.38*	0.79 (0.68–0.87)	0.93 (0.83–1.0)

* IC₅₀ values represent an average of three independent experiments.

以上から、レフルノマイドと同等な *in vivo* 活性を有する化合物 **9d** は、経口投与後に生体内で速やかに化合物 **9g** に代謝され、これが活性代謝物となって効果を示していることが示唆された。

第3節 化合物 9g の示す新たな合成戦略

これまでの検討によりレフルノマイド(1)と同等な *in vivo* 活性を有する化合物 9d が取得され, さらに薬物動態の解析から活性代謝物 9g が発見された. この 9d (cLogP: 4.555)と 9g(cLogP: 2.468)の構造および活性の比較から, アニリンパートの 4 位方向は, *in vitro* 活性を損なうことなく, 経口吸収性改善のための置換基修飾 (例えば, 水溶性の向上) が可能な部位であると考えられる. このことは, 9g の関連誘導体を合成展開する上で画期的な発見であると判断される (Figure 16).

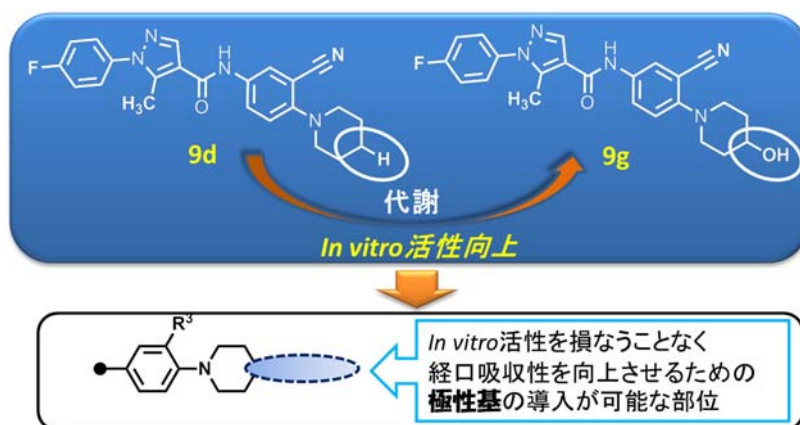


Figure 16. 代謝物が描く新たな合成展開の道筋.

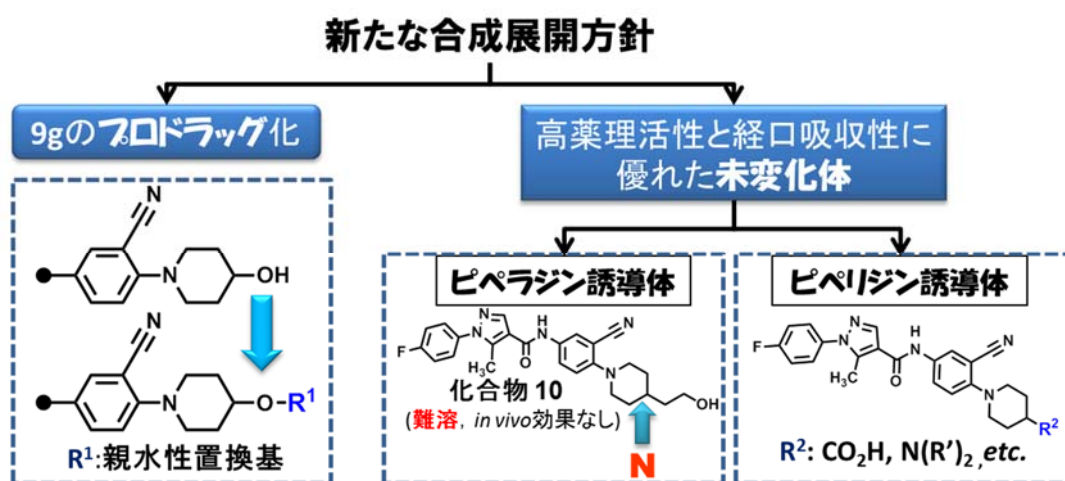


Figure 17. 活性代謝物 9g を基にした新たな合成展開方針

この知見を基に, 大きく 2 つの合成展開方針を策定した(Figure 17) . 1 つには, 9g の血漿中濃度を更に高めるためにプロドラッグ化を検討する. 2 つ目は, 代謝物 9g の構造を基に未変化体として高い薬理活性と良好な薬物動態を併せ持つ化合物を合成展開によって取得することである. 具体的にはピペラジン誘導体とピペリジン誘導体の合成展開である. 詳細について, 次章にて述べる.

第2章 候補化合物の探索と選定

第1節 代謝物9gのプロドラッグ化

化合物 **9d** の活性代謝物である **9g** (Figure 18)は、残念ながらマウス CIA モデルにおける経口投与では殆ど効果を示さなかった。水酸基を有する **9g** は、脂溶性は低下したものの依然として溶解性が乏しく(溶解度：0.2 $\mu\text{g/mL}$ at pH 1.2, < 0.1 $\mu\text{g/mL}$ at pH6.8) , そのために経口吸収性が低かったものと考えられる。

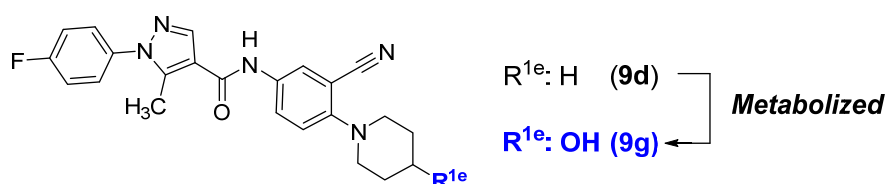


Figure 18. Structures of **9d** and its metabolite **9g**

経口吸収性を改善するための手法として塩形成が考えられるが、化合物 **9g** は塩基性が低く、またフリー体の結晶性が良いため、無機酸・有機酸との塩を形成することができなかった。そこで、プロドラッグ化を検討することとした。プロドラッグ化の一般的な目的は、経口吸収性の向上や吸収部位への副作用の低減、脳などの特定の臓器での薬効発現、作用持続などが挙げられる。また、その手法としては、カルボン酸に対するエステル化や環状ラクトン化などが主流である^{25,26}。

化合物 **9g** については、まず親水性を高めることで経口吸収性を改善できるのではないかと考えた。また、プロドラッグ化のための修飾部位は、ピペリジンの4位の水酸基と定め、同様に2級水酸基を足がかりとしたサルポグレラートの手法を応用することとした(Figure 19)。サルポグレラートは、選択的5-HT₂受容体拮抗作用を有する慢性動脈閉塞症治療薬であり、活性代謝物のM-1に対するコハク酸のハーフエステルであることが知られている²⁷。

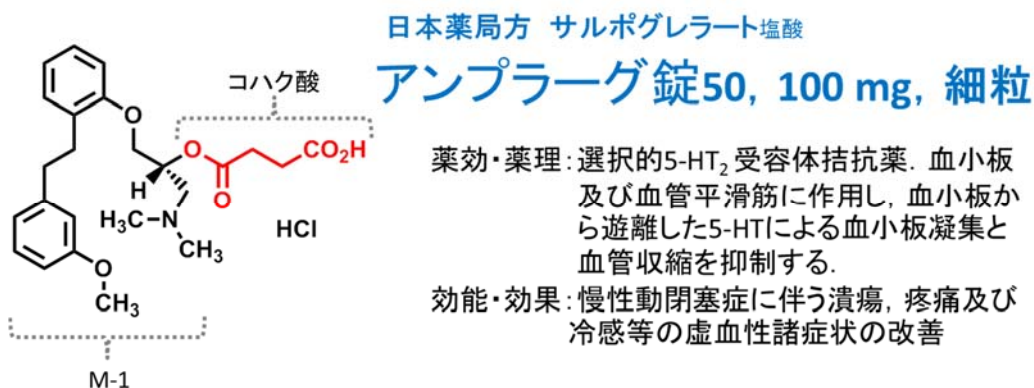
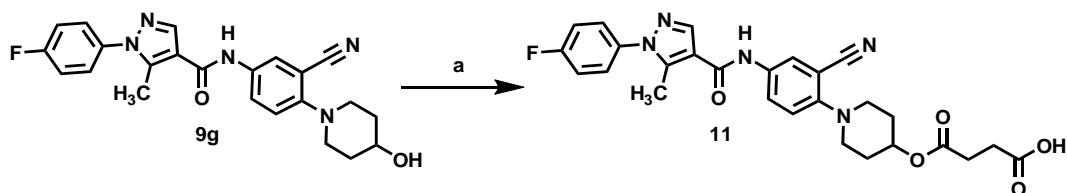


Figure 19. 活性代謝物の例. サルボグレラートおよびその活性代謝物 M-1 の構造

サルボグレラートの例に倣い, 化合物 **9g**, 1.2 当量のコハク酸無水物および触媒量の *p*-トルエンスルホン酸をニトロベンゼンに加え, 160 °C で反応をおこなうことにより, 対応するハーフエステル体 **11** を良好な収率で取得した(Scheme 2).



Scheme 2. Synthetic method of **11** from **9g**. Reagents and condition: (a): 1.2 eq. succinic anhydride, cat. *p*-TsOH·H₂O/ nitrobenzene, 160 °C, 6 h.

次に, 化合物 **11** の 30 mg/kg を SD-IGS ラットに投与したところ, 投与後速やかに化合物 **9g** が生体内で生じていることが確認された(Figure 20 および Table 6). このことから, 化合物 **11** は意図した通り化合物 **9g** に対するプロドラッグとして機能していることが確認された.

また, 化合物 **11** の 10 mg/kg をマウス CIA モデルに予防的に投与したところ, 高い関節炎の抑制効果を示した(Figure 21). 加えて, 化合物 **11** を 100 mg/kg までラットに経口投与しても毒性所見は全く観察されなかった.

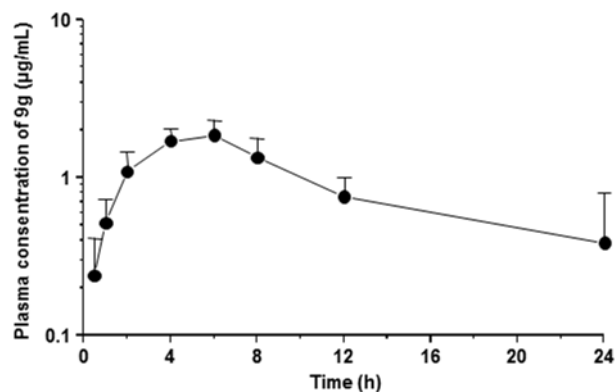


Figure 20. Plasma concentration levels of **9g** after oral administration of **11** (30 mg/kg, p.o.) to SD-IGS rats (n = 5, mean ± SD)

Table 6. Pharmacokinetic parameters of **9g** after administration of 30 mg/kg of **11**

Administration route	Dose(mg/kg)	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₂₄ (µg·h/mL)
p.o.	30	1.84 ± 0.44	6	19.6 ± 4.7

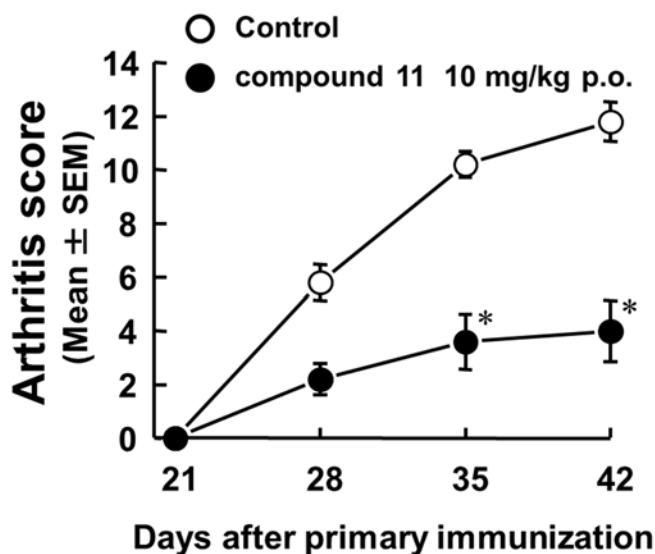


Figure 21. Effect of prodrug **11** on CIA in DBA/1J mice. (n=5, Mean ± S.E.M. Nonparametric Dunnett's multiple comparison test. *:p<0.05, **:p<0.01 vs control)

このように、化合物 **9g** を基にしたコハク酸のハーフエステル体 **11** は、プロドラッグとして機能し、マウス CIA モデルにおいて有意な関節炎の抑制効果を示したことから、リード化合物の1つと考えられる。

第2節 ピペラジン誘導体の展開

前節ではプロドラッグ化によって血中濃度を高め、薬効を発現させる手法について検討した。本節および次節では、未変化体として良好な薬物動態と *in vitro* 活性を併せ持ち、その上で高い *in vivo* 活性を発現する化合物の創製について述べる。

化合物 **9g** の水酸基を 2-ヒドロキシエチル基に変換し、分子サイズを拡大させた化合物 **10** を合成した(Figure 22)。その結果、*in vitro* 活性は 200 nmol/L (IC₅₀) とさらに向上したが、依然として溶解性は十分ではなく、CIA モデルにおいても全く効果を示さなかった(データ省略)。そこで塩基性窒素の導入を図ることとした。こうすることにより塩形成も可能となり、大幅な水溶性の向上が期待できる。具体的には、高活性な化合物 **10** のピペリジン環をピペラジン環に変換した化合物 **12a-l** を合成することとした。

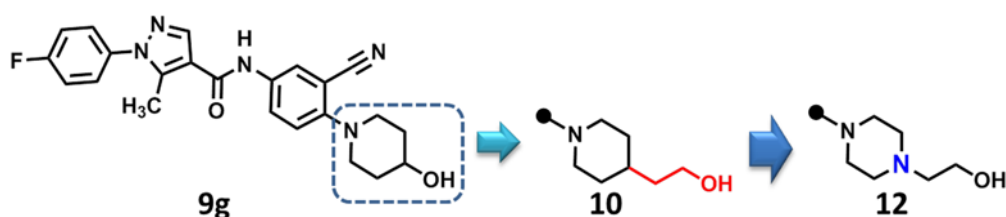


Figure 22. 4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン誘導体の展開

アニリンパートは、前述の Scheme 1 に従ってベンズニトリル誘導体 **5** と 4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジンを用いて合成した。一方、カルボン酸パートは、ピラゾール環上の置換基(R^{2b}, R^{2c} in Table 6)の種類によって 4 通りの合成法に従って合成した(Scheme 3)。

カルボン酸 **8a** (R^{2b} = H, R^{2c} = CH₃)は、Doleschall らの方法²⁸⁾に従って調製した 2-エトキシメチレンアセト酢酸エチル(**14a**)とフェニルヒドラジン塩酸塩誘導体を NaHCO₃ 存在下含水エタノール中で還流下反応させた後、NaOH を加えて加水分解することにより合成した。

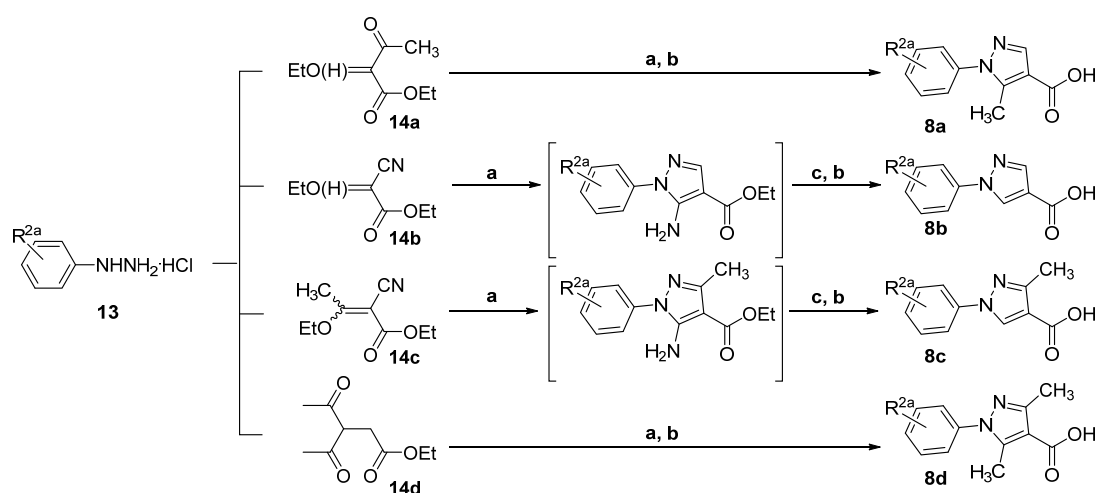
カルボン酸 **8b** (R^{2b} = H, R^{2c} = H)は、2-シアノ-3-エトキシアクリル酸エチル(**14b**)にフェニルヒドラジン塩酸塩誘導体を作用させた後、ピラゾール環の 5 位に生じるアミノ基を亜硝酸イソアミルにより還元した後、常法に従って加水分解を行うことにより合成した。

カルボン酸 **8c** (R^{2b} = CH₃, R^{2c} = H)は、カルボン酸 **8b** における **14b** に代えて、

2-シアノ-3-エトキシ-3-メチルアクリル酸エチル(**8c**)を用いて同様に反応を行うことにより合成した。

カルボン酸 **8d** ($R^{2b} = \text{CH}_3$, $R^{2c} = \text{CH}_3$)は、カルボン酸 **8a** の **14a** をジアセト酢酸エチル(**14d**)に代えて同様に反応を行うことにより合成した。

このようにして得られたカルボン酸 **8a-d** と 5-アミノ-2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]ベンズニトリル(**7a**)を HOBt および WSC·HCl 存在下縮合反応を行い化合物 **12a-l** を合成した。



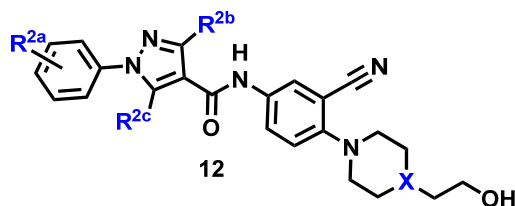
Scheme 3. General procedures of substituted pyrazole-4-carboxylic acids. Reagents and conditions: (a) NaHCO_3 / aq. EtOH, reflux, 3h; (b) NaOH / aq. EtOH, 1 h; (c): isoamyl nitrite, THF, reflux, 3h;

得られた化合物 **12a-l** を PMA および Ca イオノフォア刺激のラット T 細胞の増殖に対する作用を評価した(Table 7). プロトタイプ化合物 **10** に対し、そのピペリジン環をピペラジン環に変換した化合物 **12a** は, *in vitro* 活性が 1/3 ほどに減弱した。

次に、カルボン酸パートのピラゾール環状のメチル基の位置について比較したところ(**12a-d**), 5 位にメチル基を有する化合物 **12a** が最も高活性であることが明らかとなった。続いて、ピラゾール環の 1 位に位置するフェニル基上の置換基について比較した。化合物 **12a** の F を水素に置換したところ, *in vitro* 活性は 1600 nmol/L (IC_{50})となったが, F を他のハロゲン元素に置換したところ, *in vitro* 活性が大きく向上した。中でも, Cl 置換体の **12f** は, 最も高い活性を示した(20 nmol/L)。この Cl 基を 3 位(**12i**), 2 位(**12j**)に移動させると活性が低下した。また, フェニル環の 4 位方向にメチル基(**12k**)およびメトキシ基(**12l**)を導入した

場合、メチル基(**12k**)の方がメトキシ基(**12l**)より 2.7 倍ほど高活性であった。以上の結果を踏まえると、*in vitro* 活性の面からカルボン酸側のフェニル環上の 4 位には脂溶性が高く立体的に嵩高い置換基が好ましいと判断された。

Table 7. Effects of 4-hydroxyethylpiperidine and 4-hydroxyethylpiperazine derivatives on the proliferation of rat T cells stimulated with PMA + Ca ionophore



Compd.	R ^{2a}	R ^{2b}	R ^{2c}	X	IC ₅₀ (nmol/L)*	cLogP
9g					380	2.468
10	4-F	H	CH ₃	CH	200	3.611
12a	4-F	H	CH ₃	N	640	1.876
12b	4-F	H	H	N	2000	2.154
12c	4-F	CH ₃	H	N	1500	1.826
12d	4-F	CH ₃	CH ₃	N	15000	2.095
12e	H	H	CH ₃	N	1600	1.684
12f	4-Cl	H	CH₃	N	20	2.446
12g	4-Br	H	CH ₃	N	31	2.596
12h	4-I	H	CH ₃	N	31	2.856
12i	3-Cl	H	CH ₃	N	130	2.446
12j	2-Cl	H	CH ₃	N	470	2.446
12k	4-CH ₃	H	CH ₃	N	260	2.183
12l	4-CH ₃ O	H	CH ₃	N	700	1.645

*: IC₅₀ values represent an average of three independent experiments.

最も *in vitro* 活性の高い化合物 **12f** についてマウス CIA モデルを用いて評価したところ、3 mg/kg 以上で有意かつ用量依存的に関節の破壊と四肢の腫脹を抑制していることが判明した(Figure 20)。こうして、得られた化合物 **12f** はリード候補化合物の 1 つと考えられた。

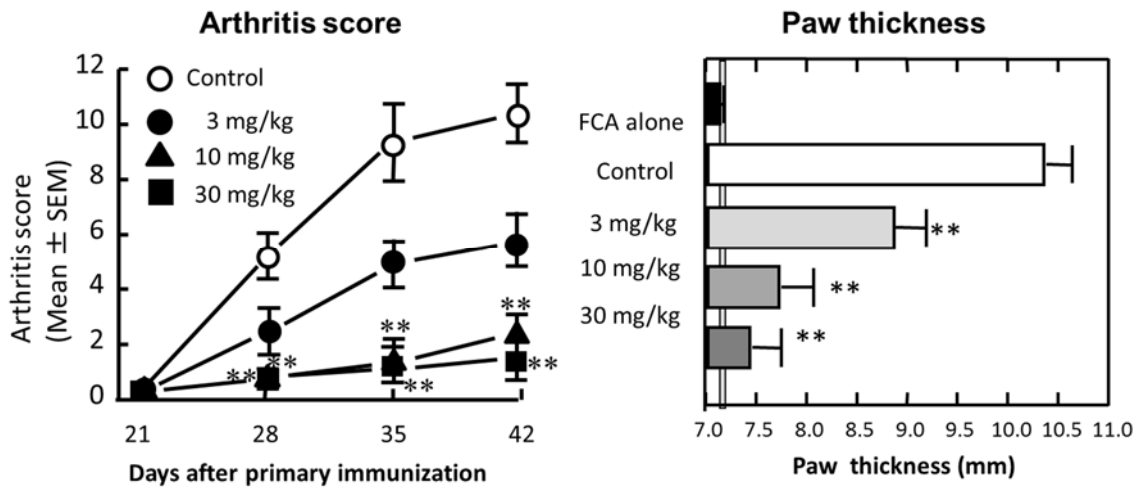


Figure 23. Effects of **12f** on CIA in DBA/1J mice. (Mean ± S.E.M. (n=5). (*:p<0.05, **:p<0.01 vs control (Dunnett's multiple comparison test)).

第3節 ピペリジン誘導体の展開

本節では、第1節で見出された化合物 **9g** のピペリジン構造に着目し、塩基性窒素の導入と末端の置換基の形状に留意して合成展開を行ったのでそれらの結果を以下に述べる。(Figure 24).

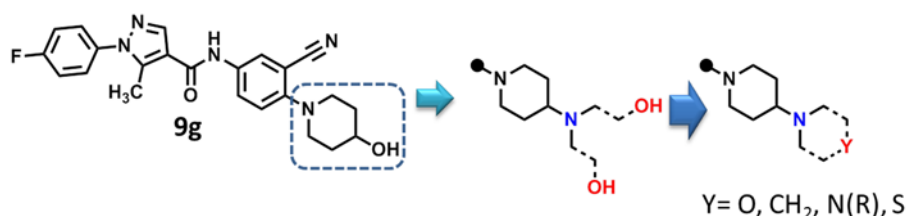
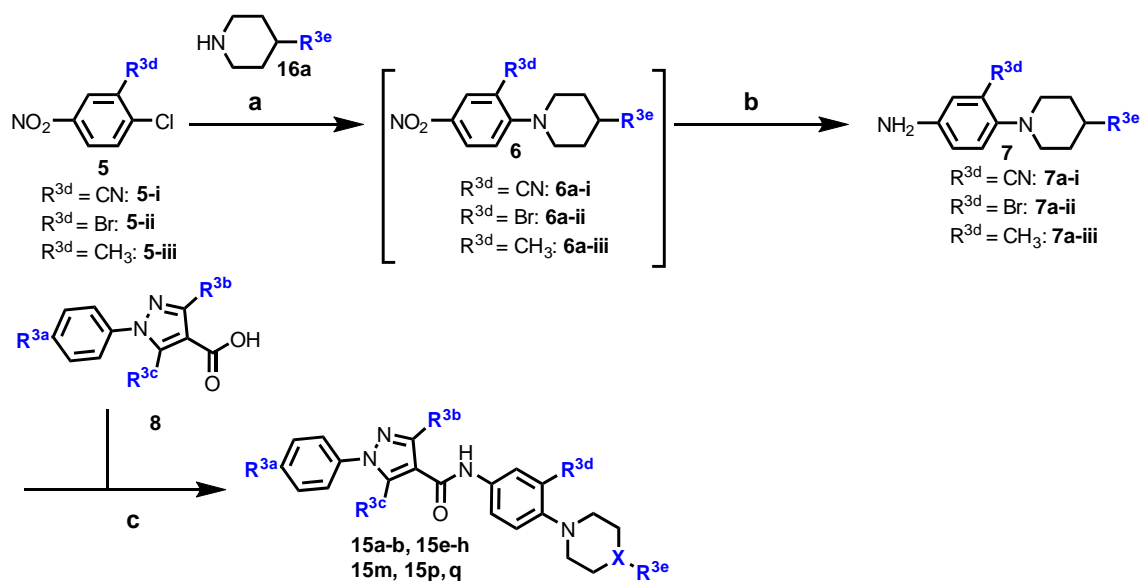


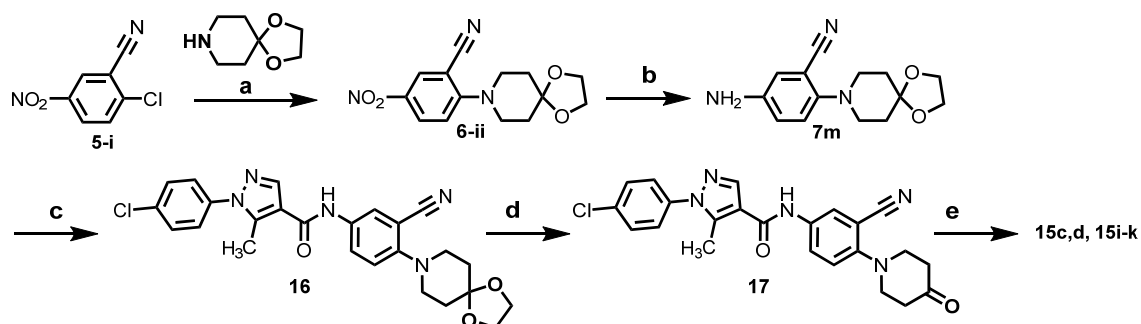
Figure 24. ピペリジン誘導体の展開

一連の化合物の合成法を Scheme 4-8 に示した.



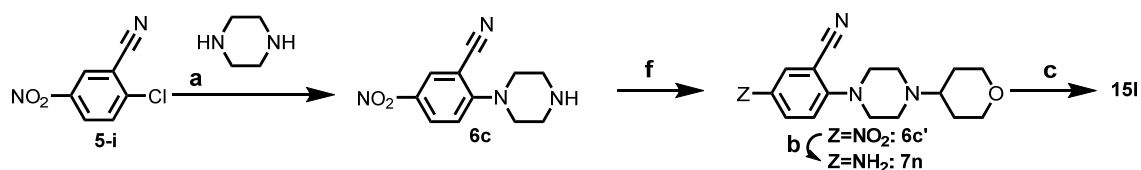
Scheme 4. Convergent routes for the synthesis of a series of pyrazole anilides **15a, b, 15e–h, 15m, p, q**. Reagent and conditions: (a) secondary amines, Et₃N/CH₃CN; (b) FeCl₃, activated charcoal, hydrazine/ MeOH; (c) i: SOCl₂ / toluene; ii: aniline **7a-i–iii**/NMP, or pyridine;

クロロニトロベンゼン誘導体 **5** および市販のピペリジン誘導体を Et₃N 存在下 CH₃CN 中で作用させた後、定法に従い還元することによりアニリン **7** を得た。次に、前節に従って得られたカルボン酸 **8** に塩化チオニルを作用させ酸クロリドとした後、N-メチル-2-ピロリドン中でアニリン **7a-i–iii** と反応を行うことにより対応するアミド **15a,b, 15d–e, 15g–h, 15m, p, および 15q** を得た。



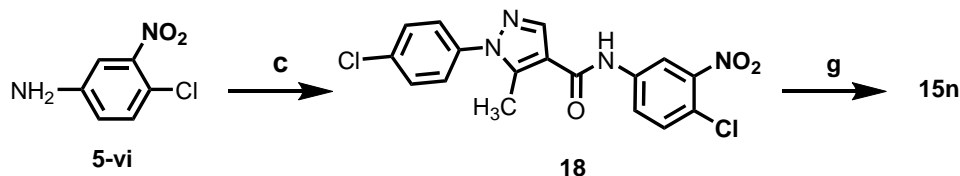
Scheme 5. Reagent and conditions except for the above: (d) aq. $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, r.t.; (e) amine, $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$.

化合物 **15c,15d** 及び **15i-k** は、クロロニトロベンゼン誘導体 **5-i** にピペリジン-4-オンのエチレンケタール(1,4-Dioxa-8-azaspiro[4.5]decane)を作用させて付加体 **6b-i** とした後、トリフルオロ酢酸により脱保護を行い、ニトロ基を還元し **7b-i** とした後、カルボン酸 **8** との反応によりアミド **16** とし、酸による脱保護によりケトン **17** へと導いた後、各種アミンと還元的アミノ化を行うことにより得た。



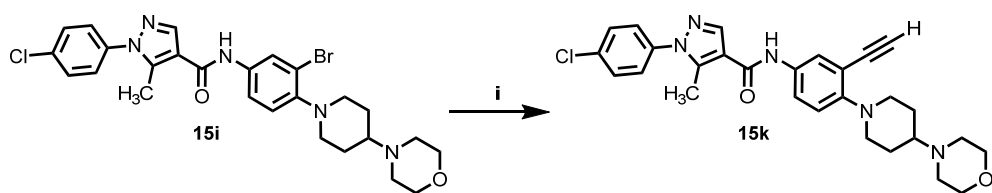
Scheme 6. Reagent and conditions except for the above: (f) pyran-4-one, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3/\text{toluene}$, r.t.

ピラノピペラジン誘導体 **15l** は、クロロニトロベンゼン誘導体 **5-i** に対して2当量の無水ピペラジンを作用させ、付加体 **6c** とした後、ピラン-4-オンとの還元的アミノ化反応により **6c'** とし、さらにニトロ基を還元しアミン **7n** とへと導いた後、縮合反応によりアミド **15l** を得た。



Scheme 7. Reagent and conditions except for the above: 4-morpholinopiperidine/DMSO, 160°C

ニトロ基を有するアミド **15n** は、4-クロロ-3-ニトロアニリン(**5-vi**)を出発物質として、先にアミド **18** とした後、4-モルホリノピペリジンを作用させることにより得た。

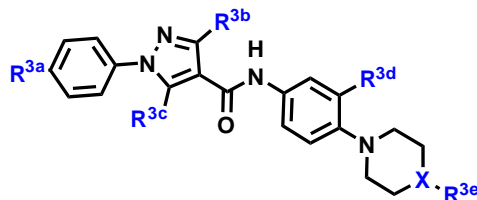


Scheme 8. The synthetic route for the ethynyl compound **15k**. Reagent and conditions: (i) i: trimethylsilylacetylene, K_2CO_3 , $Pd(Ph_3)_4Cl_2$ /piperidine, 60 °C; ii: TBAF/THF, reflux.

エチニル基を有する化合物 **15k** は、Br 誘導体 **15i** に対し Pd 触媒存在下トリメチルシリルアセチレンを作用させた後、脱保護することで得た。

このようにして得られた化合物 **15a–q** を *in vitro* の 1 次評価系である PMA + Ca イオノフォア刺激のラット末梢血 T 細胞の増殖抑制作用，並びに 2 次評価である recombinant mouse IL-15 刺激の CTLL-2 細胞の増殖抑制作用により評価した (Table 8).

Table 8. Effects of piperidine derivatives on the proliferation of rat T cells stimulated with PMA and Ca ionophore and on the proliferation of CTLL-2 cells stimulated with rm-IL-15.



Compd.	R ^{3a}	R ^{3b}	R ^{3c}	R ^{3d}	X	R ^{3e}	IC ₅₀ (nmol/L)	
							Rat T cell ¹⁾	CTLL-2 ²⁾ (95% confidential limit)
9h	F	H	CH ₃	CN	CH	OH	200	1340 (1090–2260)
12a	F	H	CH ₃	CN	N	(CH ₂) ₂ OH	640	710 (703–730)
12f	Cl	H	CH ₃	CN	N	(CH ₂) ₂ OH	20	361 (333–462)
15a	Cl	H	CH ₃	CN	CH	(CH ₂) ₂ OH	9	31.2 (30.1–32.9)
15b	Cl	H	CH ₃	CN	CH	N(CH ₃) ₂	2300	1270 (1110–1870)
15c	Cl	H	CH ₃	CN	CH		1500	1060 (591–1970)
15d	Cl	H	CH ₃	CN	CH		69	n.t. ³⁾
15e	Cl	H	CH₃	CN	CH		18	90 (67.8–96.9)
15f	F	H	CH ₃	CN	CH		21	n.t. ³⁾
15g	H	H	CH ₃	CN	CH		170	n.t. ³⁾
15h	Cl	H	CH ₃	CN	CH		540	1050 (466–2400)
15i	Cl	H	CH ₃	CN	CH		3700	4610 (3790–6580)
15j	Cl	H	CH ₃	CN	CH		1100	5750 (5210–6330)
15k	Cl	H	CH ₃	CN	CH		21	66.9 (54.2–76.6)
15l	Cl	H	CH ₃	CN	N		7.4	105 (102–137)
15m	Cl	H	CH ₃	Br	CH		57	339 (162–742)
15n	Cl	H	CH ₃	NO ₂	CH		24	141 (118–205)
15o	Cl	H	CH ₃	ethynyl	CH		21	3410 (2140–5250)
15p	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH		340	143 (112–231)
15q	Cl	CH ₃	H	CN	CH		n.t. ³⁾	179000(148000–218000)

1): IC₅₀ values represent an average of three independent experiments. 2): IC₅₀ values represent inhibitory activities against CTLL-2 cells stimulated with recombinant mouse IL-15. 3) not tested.

前節よりカルボン酸パートの末端にはハロゲン，中でも Cl 基が活性に重要

であることが確認された。ピペリジン誘導体においても化合物 **10** の F 基を Cl 基に変換した化合物 **15a** は、活性がさらに 20 倍ほど向上した。

続いてアニリンパートの末端の置換基の *in vitro* 活性に与える影響について検討した。前節の水酸基と比較するため、ジメチルアミノ基を有する化合物 **15b** を合成したが、*in vitro* 活性は大幅に減弱した。ところが、ピペリジン環の 4 位に 2-エタノールアミノ基を有する化合物 **15c**、また、ビス (2-メトキシエチル) アミノ基を有する化合物 **15d** では徐々に活性が向上した。このことから、前節と同じく末端には酸素官能基を配することが重要と判断された。

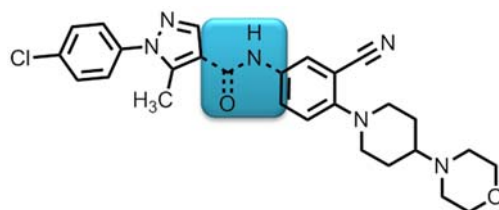
そこで、ビス (2-メトキシエチル) アミノ基を環化させることを考え、モルホリン基に変換した化合物 **15e** を合成したところ、化合物 **15a** に匹敵する強力な *in vitro* 活性を示した。このような活性の向上は、環を固定化することによる影響なのか、酸素原子による影響なのかを見極めるため、R^{3e} の置換基としてピペラジン誘導体 **15h**、**15i** およびピペリジン誘導体 **15j** を合成し評価した結果、いずれも活性は大きく減弱した。このことから、やはり酸素原子が活性発現に必須であることが再確認された。さらに、モルホリンに匹敵する活性を有する置換基としてはチオモルホリン誘導体の **15k** が見出された。

In vitro 活性発現に必要なその他の部位の確認をおこなった。化合物 **15e** ではアニリンパートの R^{3d} がシアノ基であるが、これを Br 基(**15m**)、ニトロ基(**15n**)、エチニル基(**15o**)に変換したところ、*in vitro* 活性は変化しなかったが、メチル基(**15p**)に変換すると *in vitro* 活性が大きく減弱した。このことから、R^{3d} は、シアノ基のような電子吸引性基がこのまじいと判断された。

カルボン酸部位の置換基 R^{3a} については、Cl 基(**15e**)、F 基(**15f**)、水素(**15g**)と変換することで徐々に活性が低下することから、前節の 4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン誘導体 **12a-l** と同様な傾向を示すことが明らかとなった。

さらに、ピラゾール環上の 5 位のメチル基(R^{3c})を 3 位に変換した化合物 **15q** では 2 次スクリーニングの結果から活性が減弱することが判明した。このことは、分子中心のアミド結合に立体的な影響を与えている可能性が考えられた。そこで、アミド結合を *N*-メチル化(**15r**)、還元し 2 級アミン(**15s**)、さらに 3 級アミン(**15t**)を合成し評価した結果、いずれも *in vitro* 活性が消失した(Table 9)。

Table 9. the amide bond as a presumable molecular binding site in compound **15d**.



Compd.	15e	15r	15s	15t
Bond				
Rat T cells (IC ₅₀ /nmol)	18	>1000	>1000	>1000

*: Effects of piperidine derivatives on the proliferation of rat T cells stimulated with PMA and Ca ionophore. IC₅₀ values represent an average of three independent experiments.

以上の結果をまとめると、強力な *in vitro* 活性を有する化合物 **15e** のファーマコフォアは、カルボン酸パートではフェニル基上の 4 位 (R^{3a}) の立体的効果、ピラゾール環の 5 位のメチル基とアミド結合、アニリンパートでは 3 位の電子吸引性基(R^{3d})、そして 4 位方向の末端にある酸素原子が活性発現に必須であることが示唆された(Figure 25).

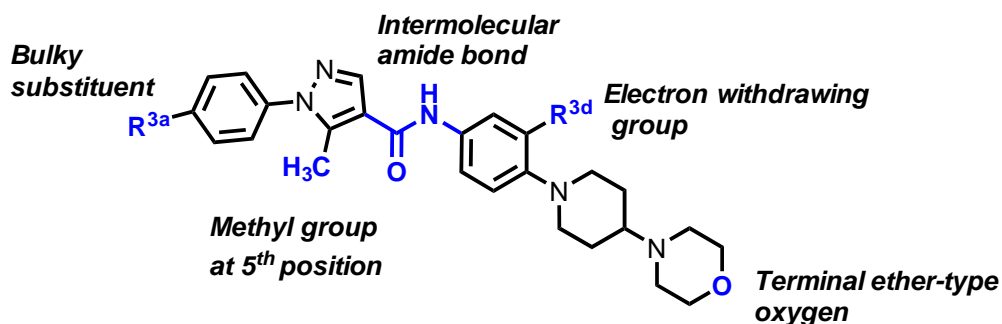


Figure 25. Pharmacophore for the expression of *in vitro* activity

強力な *in vitro* 活性を有する化合物 **15e** について、マウスを用いた CIA モデルにおいて予防的投与における関節炎の抑制効果を評価した。その結果、0.3 mg/kg 以上で有意かつ用量依存的な関節炎の抑制効果が見られ、レフルノマイドと比較して、およそ 1/10 の用量で同等あるいはそれ以上の関節炎の抑制効果が確認された(Figure 26).

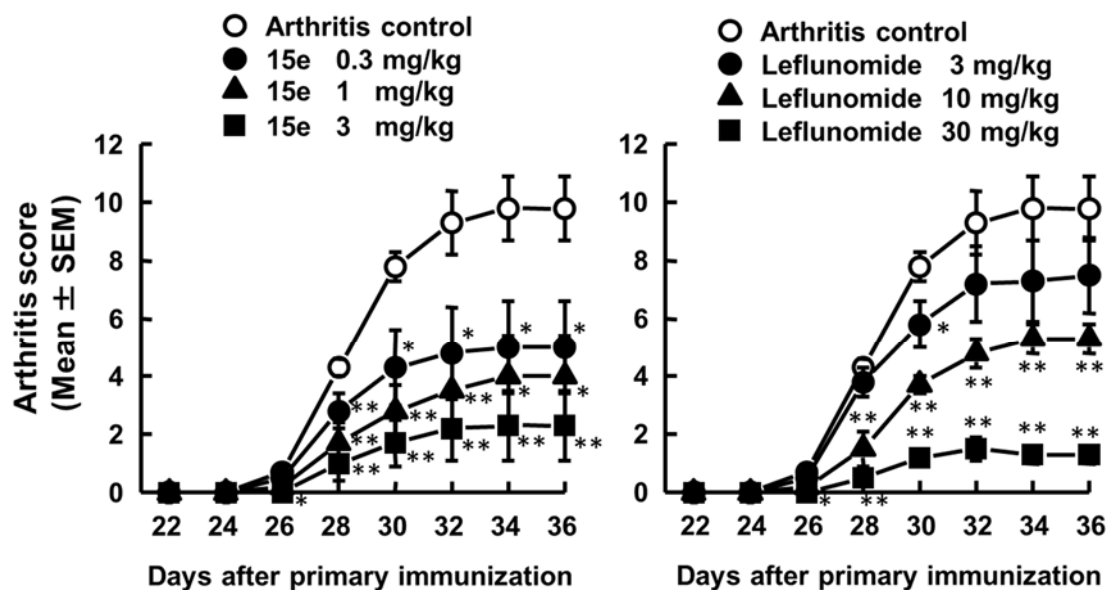


Figure 26. Effects of 15e on CIA in DBA/1J mice.

以上のように、モルホリノピペリジンを置換基に備えたピラゾールアミド誘導体 **15e** は、強力な *in vitro/in vivo* 活性を有することが明らかとなった。

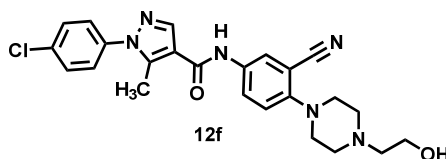
第 4 節 開発候補化合物の選定

前節までの検討により，化合物 **9h** のプロドラッグ体 **11**，*in vitro/ in vivo* で薬効の確認されたピペラジン誘導体 **12f** およびピペリジン基 **15e** を見出した．

プロドラッグ **11** の検討から，活性化リンパ球の増殖抑制活性を有するピラゾールアミド誘導体を体内で十分に暴露出来れば，*in vivo* 薬理効果を発揮できることが確認できた．一般には，動物種によって代謝活性が異なるため，プロドラッグが意図したポイントで代謝を受け，活性代謝物を発生・供給させるようするためには，より長期にわたった詳細な検討が必要である．

プロドラッグ **11** によってコンセプトの確認ができたことから，次に高い potency と efficacy を合わせ持つ化合物 **12f** および化合物 **15e** を薬物動態的に比較し，開発候補品を選定することとした．

Table 10. Pharmacokinetic parameters of **12f** in rats (Mean ± SD, n=4)



Route	Dose (mg/kg)	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	CL _{tot} (L/h/kg)	V _{dss} (L/kg)	BA (%)
p.o.	30	2010±450	207±90	3.5±1.0	N.C.*	-	-	28.6
i.v.	5	1170±100	-	-	1.03±0.13	4.31±0.37	3.97±0.22	-

*N.C.: The T_{1/2} value was not calculated because the plasma concentrations at 24 h were below the quantitation limit in the animals

SG-IGS ラットにおける化合物 **12f** の 30 mg/kg の経口投与および 5 mg/kg の静脈内投与後の薬物動態パラメーターを Table 10 に示した．30 mg/kg 経口投与後，24 時間時点で未変化体は検出限界以下であったため，T_{1/2} は算出できなかった．観測された 12 時間値までの血中濃度推移を外挿する形で AUC_{0-24h} を算出した．その結果，30 mg/kg 経口投与後の bioavailability (BA) は 28.6%であった．

化合物 **15e** についても同様に SD-IGS ラットに対して 0.3, 1, 3 mg/kg を経口投与および 1 mg/kg を静脈内投与し，血中の未変化体濃度推移を評価した(Figure 27 および Table 11)．その結果，0.3 mg/kg 投与 24 時間後，未変化体が検出限界以下であったため T_{1/2} は算出できなかったが，外挿法により AUC_{0-24h} を算出したところ，BA は約 40%であり，その他の用量においても同程度であった．また，DBA/1J マウス，カニクイザルにおける薬物動態を評価した結果，マウスにおけ

る BA は約 100%, サルの BA は 26–57%であった(Figure 28). 以上の結果から, 化合物 **15e** の方が良好な薬物動態を示し, 種差によらず薬効を発現することが期待された.

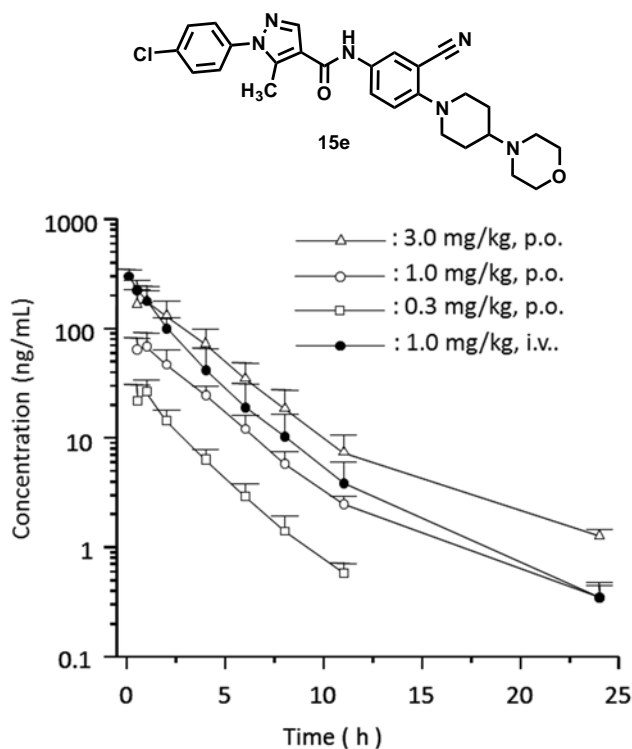


Figure 27. Plasma concentration of compound **15e** in rats

Table 11. Pharmacokinetic parameters of **15e** in rats (Mean \pm SD, n=4)

Route	Dose (mg/kg)	AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	C _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	CL _{tot} (L/h/kg)	Vd _{ss} (L/kg)	BA (%)
p.o.	0.3	80.2 \pm 15.6	26.55 \pm 7.72	1.0 \pm 0.0	N.C.*			40.5
p.o.	1.0	267.0 \pm 69.1	70.66 \pm 21.73	0.8 \pm 0.3	4.2 \pm 0.6			40.5
p.o.	3.0	747.7 \pm 276.6	182.98 \pm 64.55	0.8 \pm 0.3	4.7 \pm 0.9			37.8
i.v.	1.0	660.1 \pm 212.8	-	-	3.5 \pm 0.3	1.62 \pm 0.44	3.99 \pm 0.97	-

*N.C.: The T_{1/2} value was not calculated because the plasma concentrations at 24 h were below the quantitation limit in the animals

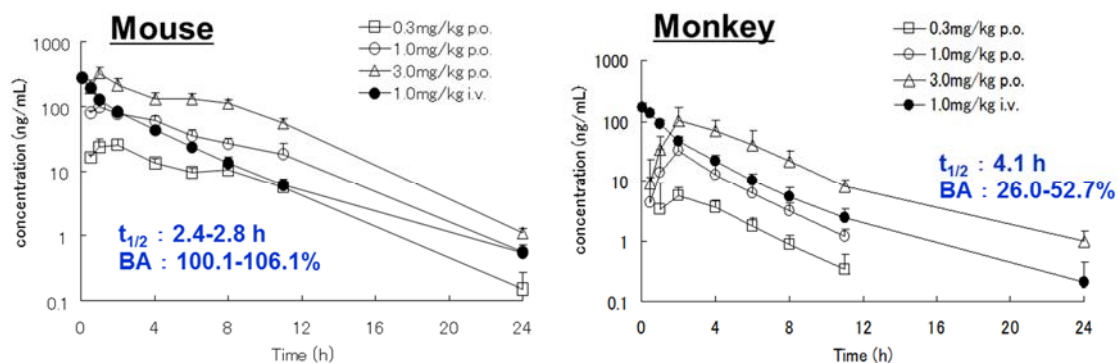
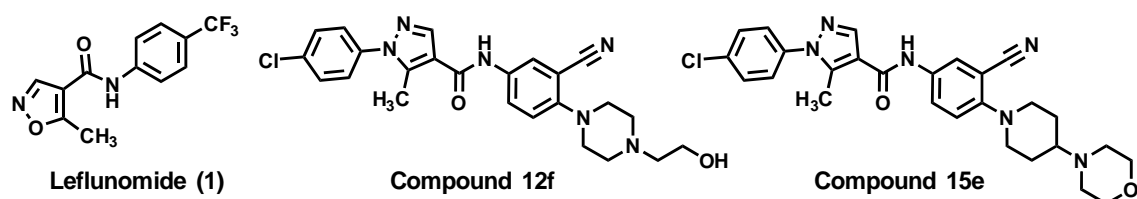


Figure 28. Plasma concentrations of **15e** in mice and monkeys

化合物 **12f** と **15e** を比較した場合, *in vitro* 活性は同等でありながら **15e** の方が低用量で **12f** と同等な薬効を示す. 両化合物のこのような違いを生み出す薬物動態的特徴について更に検討した. 静脈内投与後の薬物動態プロファイルを比較した場合, 分布容積については両者に違いはないが, 全身クリアランス値においては **12f** の方が **15e** より 2.6 倍程度大きい. このことから **12f** の方が代謝を受けやすいことが推察される. また, 肝臓での初回通過効果の影響を比較するため, 肝臓内薬物濃度と血漿中濃度の比較を行うこととした (Table 12). F344 ラットに **12f** および **15e** のそれぞれ 100 mg/kg を経口投与し, 24 時間後の血漿中および肝臓内濃度を測定した. その結果, **15e** は肝臓内濃度が末梢血中の 14.5 倍, **12f** は 123 倍もの高濃度であることが判明した. これらの結果から, **12f** は一旦吸収された後は肝臓に留まり, 血中に移行しにくい物性であることが推察された. このようなタイプの化合物は, 肝臓へ大きな負荷を与え, 肝毒性の発症が懸念された.

Table 12. Comparison of leflunomide (**1**), **12f**, and **15e** (**Y-320**) efficacy and distribution.



Compd.	Minimal Effective Dose in CIA (mg/kg)	BA in rats (%)	Distribution (C_h/C_p)* (100 mg/kg, p.o.)
Leflunomide (1)	10	-	-
12f	3	28.6	123
15e (Y-320)	0.3	40	14.5

*: ratio of concentrations in liver (C_h) and in peripheral blood (C_p)

一方、化合物 **15e** はマウス CIA モデルにおける最小有効用量が 0.3 mg/kg であり、対象薬としたレフルノマイド (**1**) の 30 倍以上もの高い薬理活性有し、げっ歯類のみならず霊長類においても良好な薬物動態を示す化合物であることが判明した。以上のような動態比較から化合物 **15e** (コード番号: **Y-320**) を開発品に選定することとした。

第3章 Y-320(化合物 15e)の薬理作用

第1節 *In vitro* 薬理作用と作用メカニズムに関する検討および考察

3.1.1 マウス T 細胞の IL-15 依存的な増殖に対する Y-320 の作用

序論にて述べたように、RA 患者の関節滑膜中に活性化 T 細胞(CD4⁺T 細胞)が浸潤し、かつそれを活性化させる IL-15 が高いレベルで認められたことから、RA の病態の進行にはこれらが深く関与していると考えられる。これまで *in vitro* においては活性化リンパ球の増殖抑制作用を指標に 1 次スクリーニングを行ってきた。*In vitro* 2 次スクリーニングとしてはより病態に近い系として IL-15 依存的な CTLL-2 細胞の増殖に対する抑制効果を基準に化合物スクリーニングを行い、**Y-320** を取得するに至った。次に、*in vitro* 高次評価として末梢血より採取した T 細胞を用い、IL-15 依存的な増殖系を構築して **Y-320** の作用を評価した。

In vivo 評価で用いる DBA/1J マウスから脾細胞を採取し、ナイロンウール処理を行って T 細胞を取得した。これをリコンビナント-マウス(rm)-IL-15 を含む 10%ウシ胎児血清(Fetal calf serum: FCS), [methyl-³H] thymidine(³H]TdR)および化合物を共存下させ、5%CO₂ 含有空気存在下 37 °C で 48 時間培養し、培養中に細胞内に取り込まれる³H]TdR の放射線強度を定量することにより IL-15 依存的な T 細胞の増殖並びにそれに対する化合物の作用を評価した。

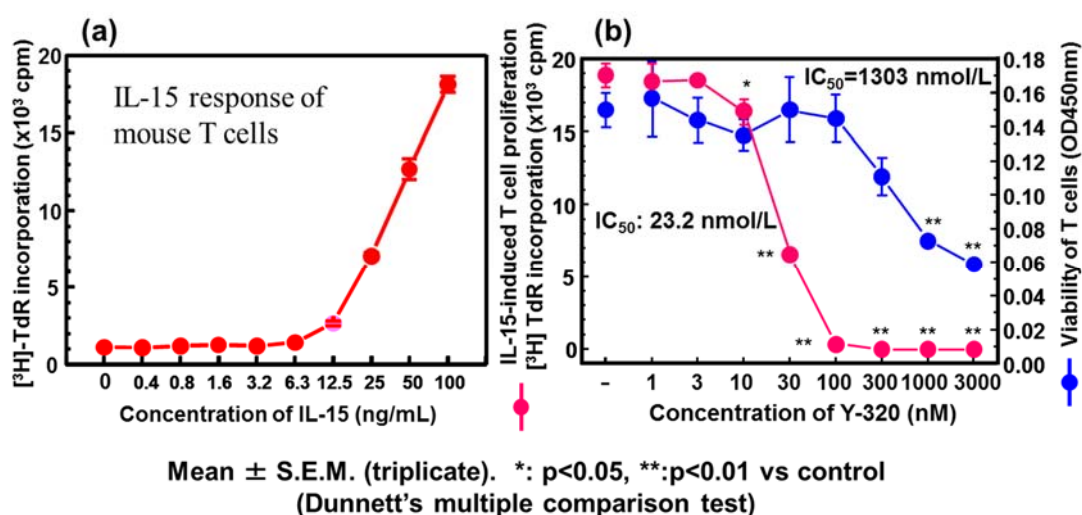


Figure 29. マウス T 細胞の rm-IL-15 依存的増殖およびそれに対する Y-320(15e)の作用.

Figure 29 に示すように 12.5 ng/mL 以上の rm-IL-15 の添加により ³H]TdR の取り込み量が濃度依存的に増大し、細胞の増殖を誘導することが確認された。

培地のみでは 1211.0 ± 7.4 cpm であったのに対して, rm-IL-15 を 100 ng/mL 添加した条件では, 21401.7 ± 7.4 cpm であった.

この条件で **Y-320** を 1–3000 nM まで添加して培養したところ, [³H]TdR の取り込み量が濃度依存的に抑制され, その IC₅₀ 値は 23.2 nmol/L となった. 一方, viability の評価のため, rm-IL-15 非添加の状態でも **Y-320** を同様に 1–3000 nM まで添加して培養したところ IC₅₀ 値は 1303 nmol/L となり, **Y-320** は活性化された T 細胞に特異的に作用することが示唆された.

3.1.2 CD4 陽性細胞からの IL-17 産生に対する Y-320 の作用

ヒト RA では、メモリーCD4⁺T 細胞 (CD4⁺CD45RO⁺memory T) が滑膜内に浸潤し、かつそれを活性化させる IL-15 並びにそこから産生される IL-17 が高レベルで観測されている¹⁸⁾。加えて、CXC ケモカイン受容体 4 (CXCR4) を有する CD4⁺T 細胞が RA 患者の関節滑膜組織内で増加し、しかも IL-15 によって CXCR4 の発現が誘導されることが報告されている²⁹⁾。さらに CXCR4 のリガンドである CXCL12 は、T 細胞、B 細胞、単球、好中球などの遊走因子であり、RA 滑膜中で発現している。また、CXCL12 は抗 CD3 抗体刺激の CD4⁺T 細胞の増殖をさらに助長させる働きがあることが報告されている³⁰⁾。

以上のような知見により、RA 患者の滑膜中の CD4⁺T 細胞による IL-17 の産生には、IL-15 と共に CXCL12 が重要な役割を担っている可能性が考えられた。そこで、マウスの CD4⁺T 細胞を用いて IL-17 を産生する条件を検討した(Figure 30)。その結果、IL-15(100 nd/mL) のみを与えただけでは IL-17 産生されず、抗 CD3 抗体を添加することで IL-17 の産生が認められ、さらに CXCL12 を加えることで劇的に産生量が増大することを発見した。この状態での T 細胞は CD62L^{low}CD44^{high} memory type CD4⁺T 細胞であり、naïve T 細胞とは異なる phenotype である(データ省略)。見出された条件下で Y-320 の IL-17 産生に及ぼす影響を評価したところ、10 nM 以上で濃度依存的に IL-17 の産生を抑制し、その IC₅₀ 値は 25.7 nM であった。

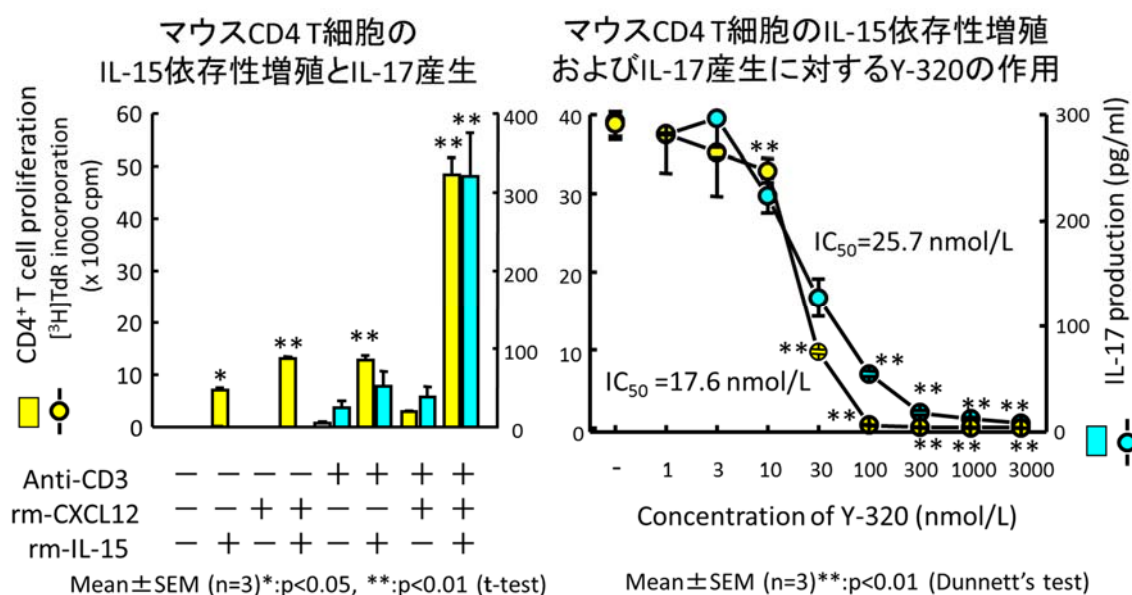


Figure 30. マウス CD4⁺T 細胞からの IL-17 産生と Y-320 の作用

3.1.3 Th17 細胞からの IL-17 産生に対する Y-320 の作用

近年の研究から IL-17 を産生する T 細胞は、従来の Th1, 2 とは異なる新たな phenotype であることが明らかとなり、Th17 細胞と名付けられた³¹⁾。Th17 細胞は naïve T 細胞から IL-6 と TGF- β の共刺激によって分化誘導され、さらに IL-23 によって核内受容体の ROR γ T³²⁾が活性化されて IL-17 が切り出されるとされている(Figure 31)。

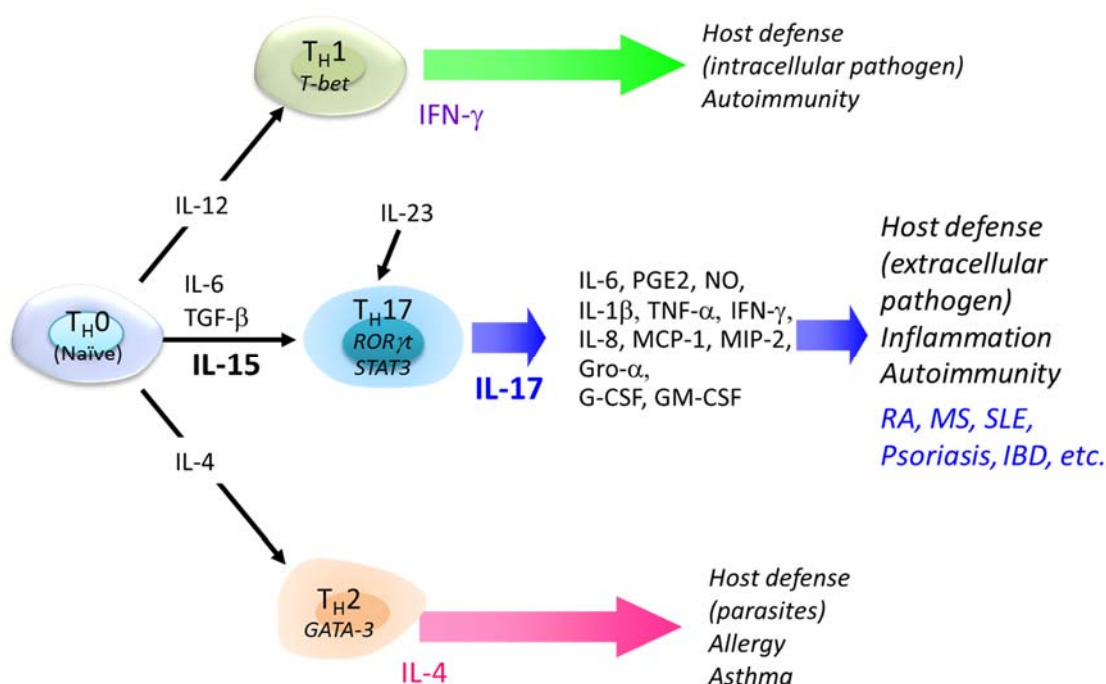


Figure 31. T 細胞の分化・誘導とサイトカインネットワーク

そこで、実際に DBA/1J マウスの CD4⁺T 細胞に抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体により活性化された CD4⁺T 細胞に 10 μ g/mL の rm-IL-6, rm-TGF- β を作用させて Th17 細胞に誘導し、これに IL-23 刺激により産生される IL-17 の産生量に対する Y-320 の効果を評価した。

その結果、10 nmol/L 以上で濃度依存的に産生を抑制し、その IC₅₀ は 52.4 nM となった(Figure 32)。

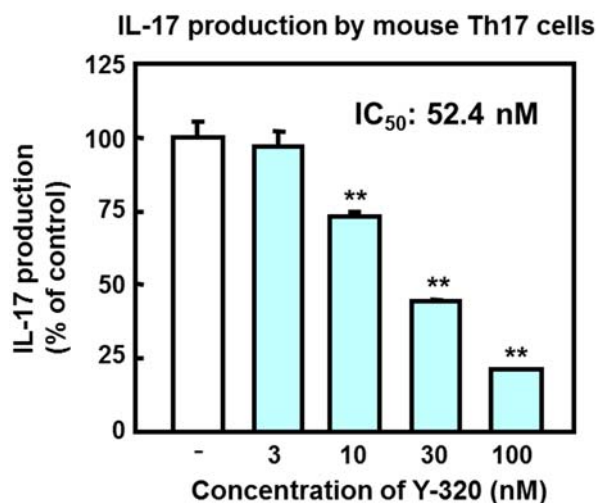


Figure 32. Inhibitory effect of **Y-320** on IL-17 production by Th17.

Mouse Th17 cells were prepared by culturing under Th17 condition: anti-IFN-g mAb, anti-IL-4 mAb, TGF- β 1, IL-6, TNF- α , and IL-1 β . After 48 h, rm-IL-23 was added, and then the cells were cultured for an additional 4 days. Th17 cells were determined by intracellular cytokine staining using anti-IL-17 mAb and anti-CD4 mAb. Obtained Th17 cell-enriched cell population was stimulated with anti-CD3e mAb and anti-CD28 mAb for 24 h. The concentration of IL-17 in the culture supernatants was measured by ELISA.

ただし、**Y-320** はナイーブ CD4⁺T 細胞から Th17 細胞への分化・誘導を阻害しないことが確認された (Figure 33)。

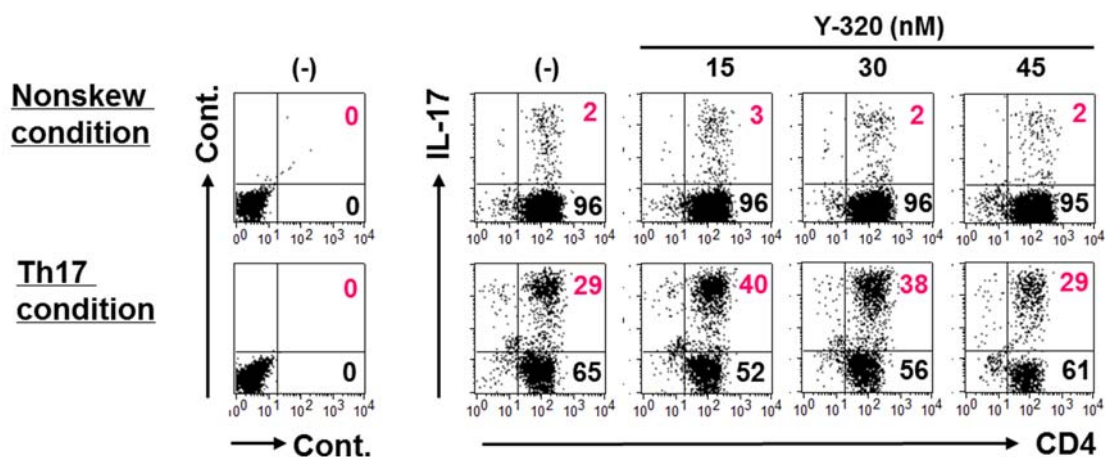


Figure 33. **Y-320** does not inhibit Th17 differentiation.

CD4⁺T cells and antigen presenting cells (APCs) were isolated from DBA/1J mouse spleen. The mixture of CD4⁺T cells and APCs was stimulated with 3 mg/mL ConA in the presence of the test substances under nonskew condition; not addition of cytokine and antibody or under Th17

conditions ; 20 mg/mL anti-IFN-g mAb, 20 mg/mL anti-IL-4 mAb, 10 ng/mL rh-TGF-b1, 10 ng/mL rm-TNF-a, 10 ng/mL rm-IL-1b, 20 ng/mL rm-IL-6. After 48 h, rm-IL-2 (nonskew condition) or rm-IL-23 (Th17 condition) was added, and cells were cultured another 4 days. Th17 cells were determined by intracellular staining using anti-IL-17 mAb and anti-CD4 mAb

3.1.4 ヒト CD4⁺T 細胞からの IL-17 産生に対する Y-320 の作用

健常人より採取したヒト末梢血 (PBMC) 由来 T 細胞にリコンビナント ヒト(rh)-IL-15 (3–100 ng/mL)を添加し 72 時間培養することによって濃度依存的に IL-17 が産生されることが確認された(Figure 34(a)). 100 ng/mL の rh-IL-15 を用いた条件で IL-17 の産生量に対する Y-320 の作用を評価した結果, IC₅₀ 値が 57.4 nM となりヒト CD4⁺T 細胞からの IL-17 産生を Y-320 は強力に阻害することが判明した(Figure 34(b)).

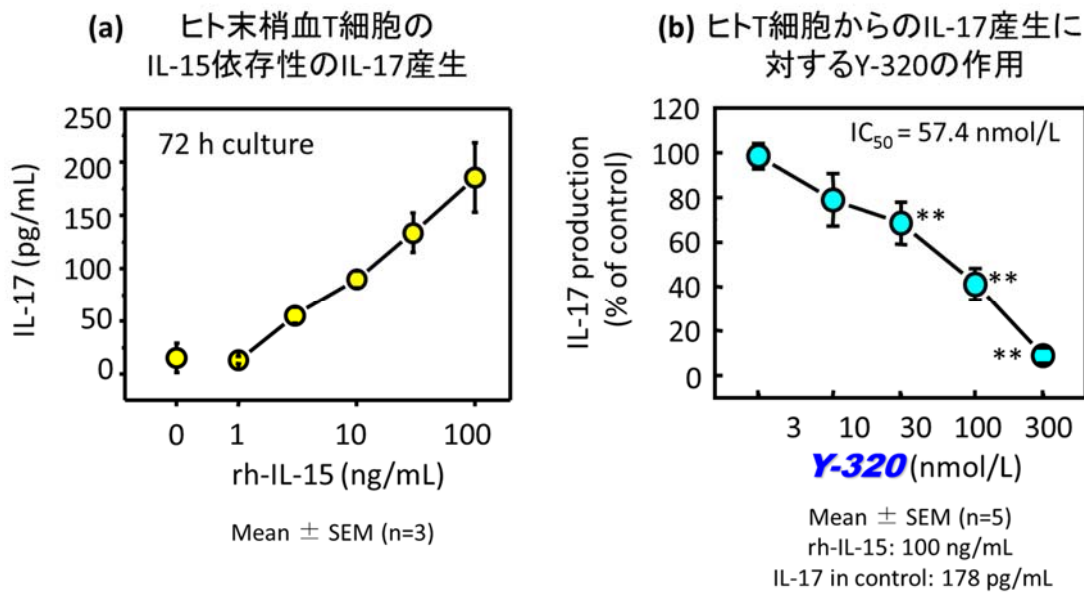


Figure 34. ヒト CD4⁺T 細胞からの IL-17 の産生に対する Y-320 の効果

3.1.5 JAK1, 3 のリン酸化に対する Y-320 の作用

IL-2R や IL-15R の β, γ 鎖には Janus Kinase 1 (JAK1) および JAK3 が存在し、IL-2 あるいは IL-15 がそれぞれ IL-2R, IL-15R に結合することによって、それらは互いにリン酸化 (autophosphorylation) されることが知られている^{33,34)}。そこで、上記 3.1.2 で示した IL-15/CXCL12/anti-CD3 mAb で刺激したマウス CD4⁺T 細胞に **Y-320** を作用させた。その結果、**Y-320** は、30 nM 以上で濃度依存的に JAK1 および JAK3 のリン酸化を抑制し、その IC₅₀ 値はそれぞれ JAK1 に対して 15.7 nM, JAK3 に対して 13.5 nM であった (Figure 35)。

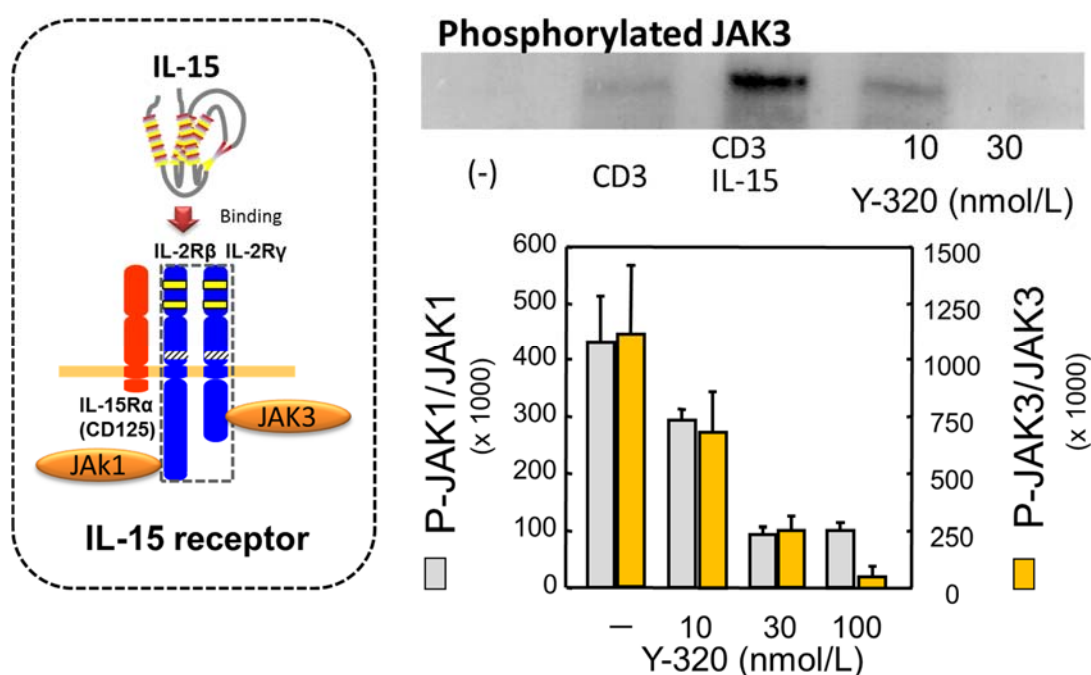


Figure 35. Inhibition of phosphorylation of JAK1/JAK3 by **Y-320**

一方、JAK1, JAK2, JAK3, p38MAPK, PKC を含む 30 以上の既知酵素に対して、cell free, 即ち酵素単独での assay では **Y-320** は 300 nM まで加えても何も作用を示さなかった (Table 13)。 **Y-320** の免疫抑制作用は JAK1, 3 のリン酸化の阻害作用によって説明されるが、その作用様式としては **Y-320** の酵素への直接作用ではないことが示唆された。

Table 13. Effects of **Y-320** on kinases activities and receptors bindings (cell-free)

Assay	IC ₅₀ (nM)
PKCb (I & II), PKCg, PKCa, ERK1, ERK2, MEK1, p38a, p38b, p38d, p38g, PKA (non-selective), PKC (non-selective), PKBa/Akt1, EGF Receptor, Fyn, HER2 Receptor, Lck, pp60SRC, CaMKII, CaMKIV, CDC42BPB, CDK1/cyclinB, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclinE, CDK3/cyclin E, CDK4/cyclin D1, CDK5/p35, CDK6/cyclin D3, c-RAF, Fyn, IKKa, IKKb, IRAK1, IRAK4, JAK1, JAK2, JAK3, JNK1a1, JNK2a2, Lyn, MAPK1, MAPK2, MEK1, MKK6, MKK7b, p70S6K, PKCq, Syk, ZAP-70, PI3-Kinaseb, PI3-Kinaseg, PI3-Kinased	>1000
Aldosterone, Estrogen ERa, Estrogen ERb, Glucocorticoid, Melatonin MT1, Melatonin MT2, Potassium channel [KA], [KATP], [SKCA], P2X, P2Y, Vanilloid, Histamine H1, Adenosine A1, Adenosine A2A, Adenosine A3	>1000

3.1.6 Pulldown 法による **Y-320** のターゲットの探索

Y-320 に親和性のあるターゲット分子を探索するために、ビオチン誘導体 **19** を調製し、photocrosslinking assay³⁵⁾による CD4⁺T 細胞内のターゲット分子の pull down 法を試みたが、薬理作用を裏付けるような分子種を特定するには至らなかった。

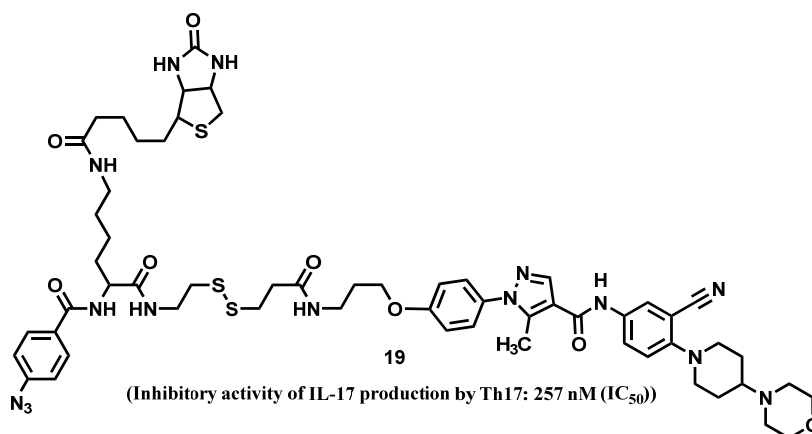


Figure 36. Structure of biotin derivative **19** for photocrosslink assay

以上の結果から、**Y-320** は現在までに知られているいずれのものとも異なる作用メカニズムを有する可能性が示唆された。

第 2 節 DBA/1J マウスを用いた CIA における Y-320 の効果

3.2.1 マウス CIA に対する Y-320 の予防効果

Y-320 は, CD4⁺T 細胞の活性化並びに IL-17 産生を強力に抑制する作用を有することが明らかとなった. 次に, *in vivo* での効果を詳細に検討することとした. 前章で記載した DBA/1J マウスを用いた CIA において, 例数を 2 倍の 1 群 10 例とし, 0.1 から 3 mg/kg まで初回免疫時から 42 日間 1 日 1 回経口投与を行い, 2 回免疫時からの関節炎の進行度を評価した(Figure 37). 評価項目は, 関節炎のスコア, 四肢の腫脹(実測値), さらに投与最終日の翌日に解剖を行い, 軟 X 線を用いて骨破壊の状態 (四肢のそれぞれの指に 1 ヶ所以上の関節破壊を認められた場合 1 点とし, 四肢のスコアの合計 (最大: 20 点) を評価し, II 型コラーゲンに対する抗体値を ELISA により定量した. また, 関節組織の病理切片を作成し, 同時に関節中の IL-17, IL-6, CCL2, TNF- α の各 mRNA を real time RT-PCR にて定量した. これらの結果を Figure 38–41 に示した.

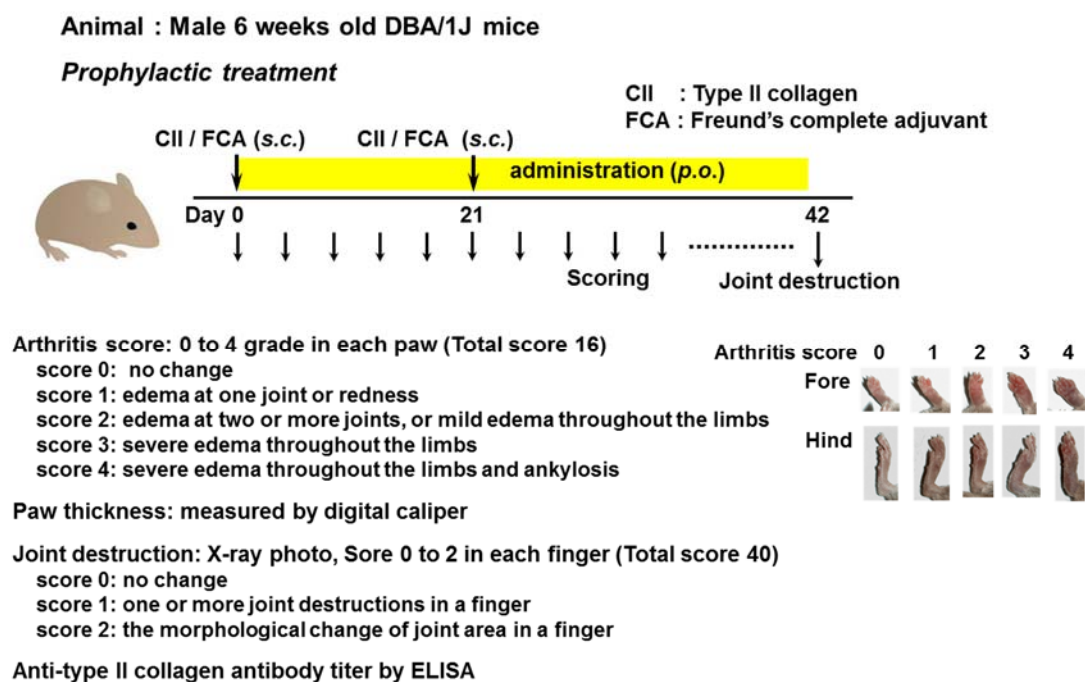


Figure 37. Protocol for CIA in mice

対照群においては, 2 回目の免疫後 3 日目から徐々に関節炎のスコアが上昇し, 36 日目で最大 10.2 ポイントとなった. **Y-320** 投与群では, 関節炎スコアおよび四肢の腫れを 0.3 mg/kg 以上で有意かつ用量依存的に抑制し(Figure 38), 骨破壊や血漿中の anti-type II コラーゲン IgG₁ を減少させた. IgG_{2A} については 3

mg/kg のみ有意差が認められた(Figure 39).

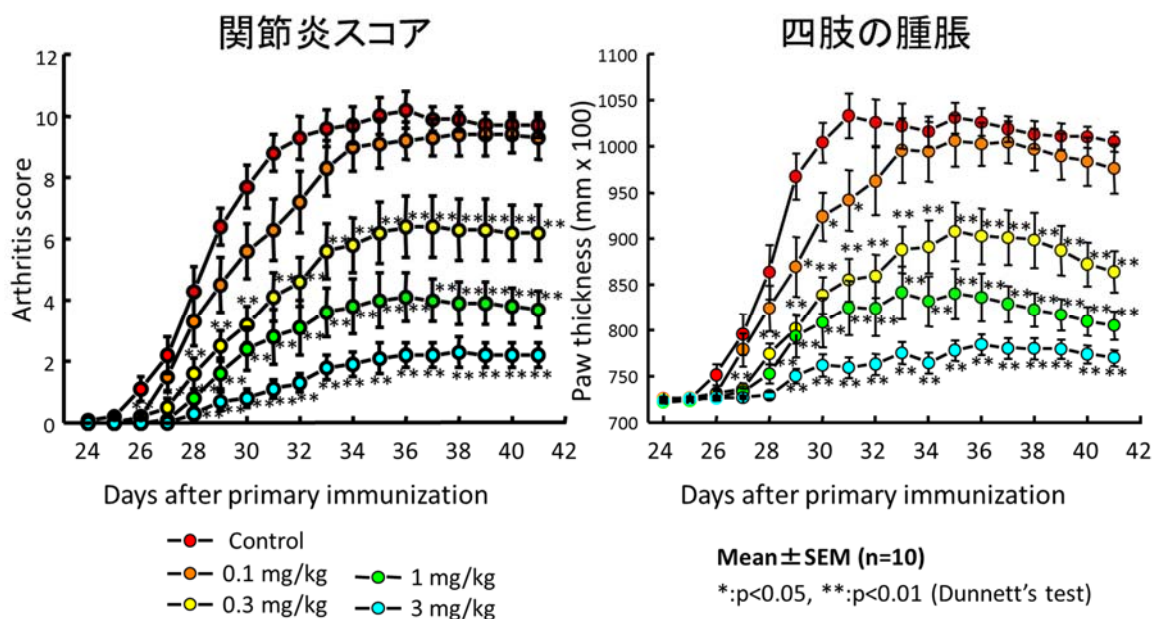
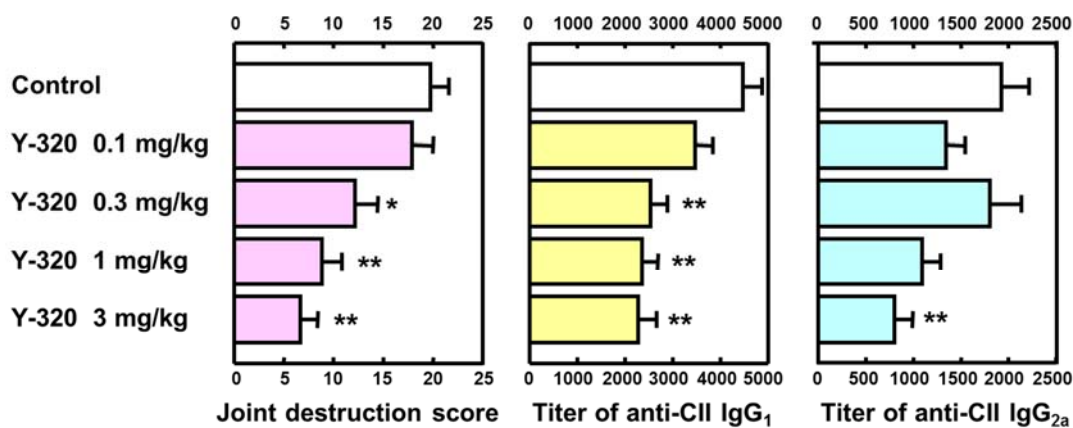


Figure 38. Effects of Y-320 on CIA in mice.



Mean \pm S.E.M. (n=10). *:p<0.05, **:p<0.01 vs control (Dunnett's multiple comparison test).

Joint destruction in the fingers and titer of anti-type II collagen antibodies (IgG₁ and IgG_{2a}) in plasma of CIA mice were evaluated on the next day of final administration of Y-320 in DBA/1J mice.

Figure 39. Effects of Y-320 on joint destruction scores, and anti-type II collagen IgG₁ and IgG_{2a} in the plasma of CIA mice.

正常マウス, CIA を発症したコントロール群および Y-320 を 1 mg/kg 投与した群の関節組織切片を H&E および Safranin O 染色した像を Figure 40 に示した. CIA を発症した群では軟骨および骨の糜爛やリンパ球などの炎症性細胞の浸潤が認められるが, Y-320 を 1 mg/kg 投与した群の組織切片では軟骨や関節組織が正常に近い形で保たれていることが確認され, 炎症や関節破壊を抑制している

ことが明らかとなった.

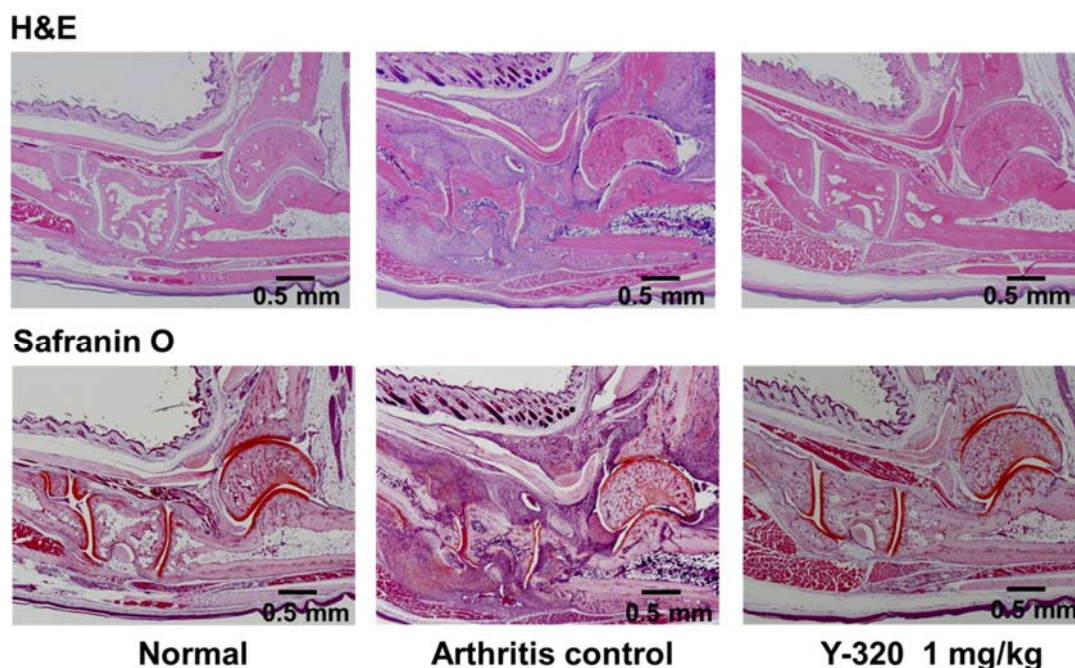
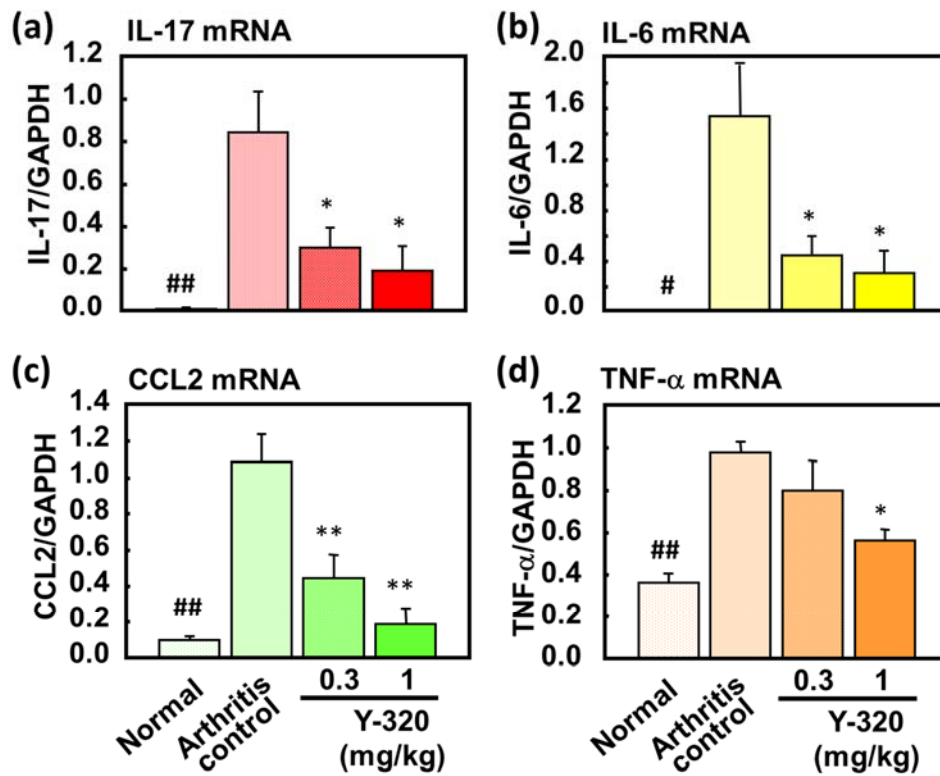


Figure 40. Histological examinations of arthritic joints in CIA mice

初回免疫から 43 日目(最終投与日翌日)に, 足関節内の IL-17, IL-6, CCL2, TNF- α の mRNA を測定した(Figure 41). コントロール群ではいずれの mRNA も高い値を示した. 一方, **Y-320** 投与群においては, 関節炎に対する有意な抑制効果の見られた 0.3, 1 mg/kg 投与群において, いずれも mRNA についても有意に発現レベルを低下させた.

一方, マウス抗 TNF- α 抗体の mRNA 発現に対する効果を同じ条件で評価検討したところ, IL-6 や CCL2 の mRNA は低減させたものの, IL-17 の mRNA の発現については有意な抑制効果を示さなかった. これらの結果より, **Y-320** はマウスにおいて抗原特異的な CD4⁺T 細胞からの IL-17 の産生を抑制することで, 関節炎の進行を抑制しており, このような **Y-320** の作用機序は抗 TNF- α 治療法とは異なるものであることが示唆された.



Mean \pm S.E.M. (n=4-5)

* : p<0.05, ** : p<0.01 v.s. arthritis control (Dunnett's test).

: p<0.05, ## : p<0.01 v.s. control (t-test).

Figure 41. The mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines in the arthritic joints of CIA mice treated with Y-320. Y-320 was administered orally to mice from the day of primary immunization for 6 weeks. (a) IL-17 mRNA. (b) IL-6 mRNA. (c) CCL2 mRNA. (d) TNF- α mRNA. Results were expressed as the mean \pm SEM of 4 mice. *: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's multiple comparison test). #: p<0.05, ##: p<0.01 (Student's t-test).

3.2.2 マウス CIA に対する Y-320 の治療効果

上記 3.2.1 のようにウシ II 型コラーゲンとフロイント完全アジュバントを初回免疫後、3 週間目に追加免疫を行うと、1~2 週間を経てほぼ 100%の割合で関節炎が誘発される。この追加免疫による関節炎モデルは、血中の抗 II 型コラーゲン抗体価の上昇、関節組織におけるパニヌスの形成、リンパ球を含む単核球の浸潤および関節破壊の像を呈し、ヒトにおける関節リウマチの症状と酷似する。

しかしながら、ヒトの関節リウマチでは、関節炎の症状が数ヵ月から年単位で徐々に進行することと比べると、追加免疫によって誘発される DBA/1J マウスの関節炎は、関節炎の発症および進行が急速であり、かつその症状も激しい。したがって、本関節炎モデルを用いて関節炎発症後に化合物を投与するといった、臨床をイメージした投与タイミングでの薬剤の治療効果を評価することは極めて難しく、またその結果をもって臨床効果を予測することは適切ではないと判断される。

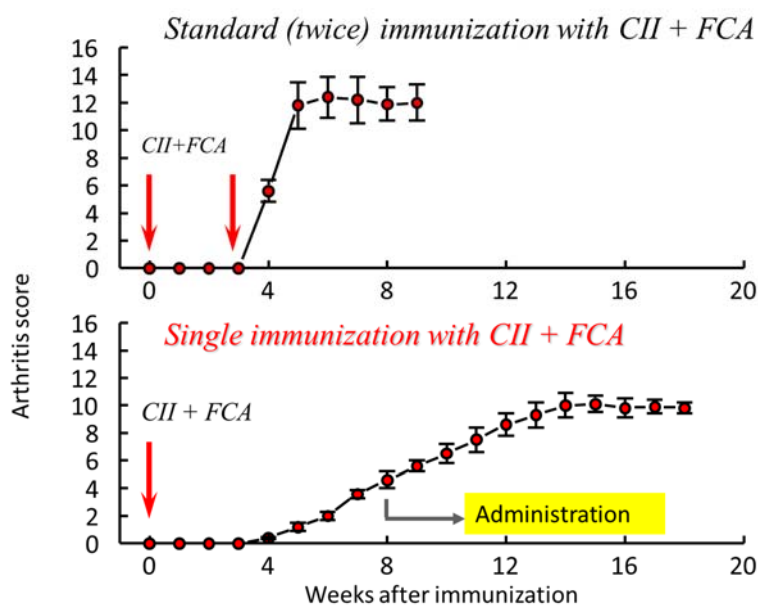


Figure 42. Protocol for a chronic-progressing CIA model in DBA/1J mice

ところで、Y-320 に関する一連の研究を通じて、DBA/1J マウスにウシ II 型コラーゲンをフロイント完全アジュバントとともに 1 回のみ免疫することで、初回免疫の 4 から 5 週間後に関節炎が緩やかに発症し始め、8 週間後にはほぼ 100%の割合で関節炎を発症することが見出された(Figure 42)。このように、1 回のみ免疫することによって誘発される DBA/1J マウスの関節炎モデル

(Chronic-progressing CIA)は、追加免疫によって誘発される同マウスの関節炎モデルに比べて関節炎の発症および進行が緩やかであり、かつ発現する症状も軽度で、関節炎が慢性的に進行していることを確認した。そこで、この実験系を用いて **Y-320** の CIA に対する治療効果を評価することとした。

1 群を 12 例とし、初回免疫後 8 週目、既に関節炎を発症したマウスに対して **Y-320** の 0.3, 1, 3 mg/kg を 1 日 1 回経口投与し、以降 16 週目終了時まで投与を継続し、その間の関節炎スコアおよび四肢の腫脹をモニタリングした。対照群では、8 週目から 14 週目にかけて関節炎スコアが徐々に上昇し、14 週目におよそ 9.0 でプラトーに達した。

一方、**Y-320** 投与群では 0.3 mg/kg 以上で関節炎のスコアの上昇を有意かつ用量依存的に抑制した(Figure 43)。特に、1 および 3 mg/kg 投与群では関節炎のスコアの上昇をほぼ完全に止め、**Y-320** 投与後の値はほぼ投与開始前の値を維持した(Figure 44)。同様に、四肢の腫脹についても 0.3 mg/kg から有意な抑制効果が確認され、1 mg/kg 投与群では投与開始時とほぼ同等、3 mg/kg では投与開始よりも腫脹が縮小した。このように **Y-320** は慢性進行型のマウス CIA において有意な治療効果を示すことが示唆された。

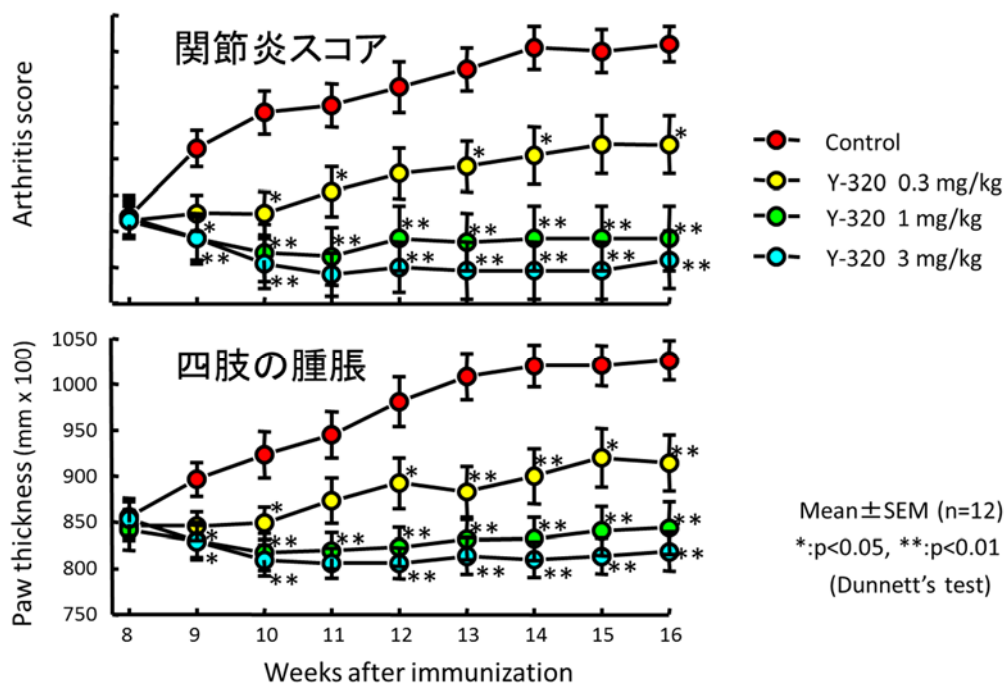


Figure 43. Therapeutic effects of **Y-320** on the arthritis scores and paw thickness in chronic-progressing CIA in DBA/1J mice. **Y-320** was administered orally for 8 weeks. Results were expressed as the mean the mean \pm SEM of 12 mice. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ [Dunnett's multiple

comparison test.]

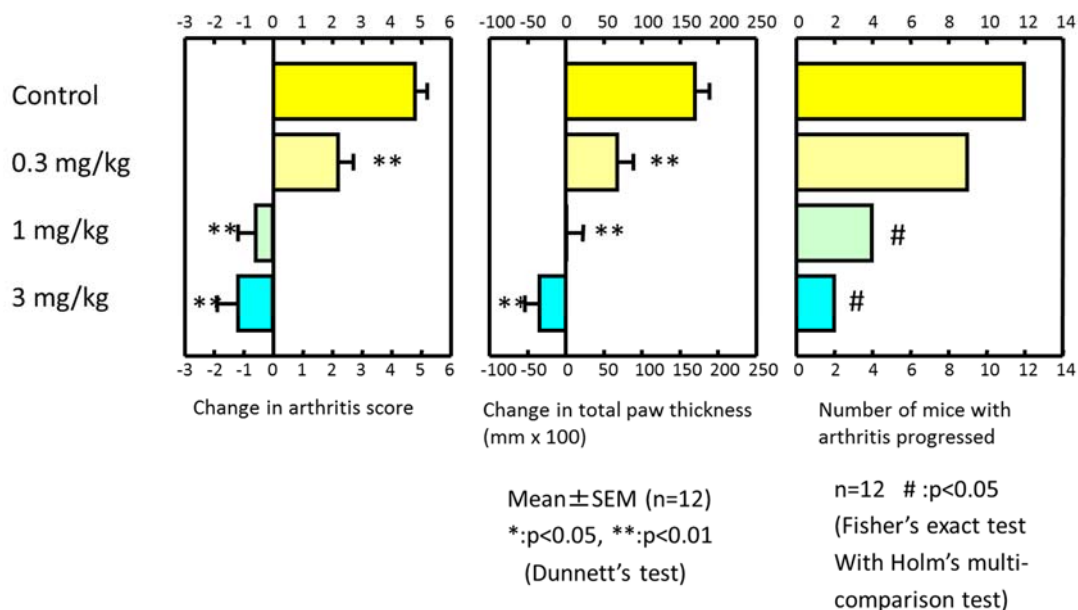


Figure 44. Changes in arthritis scores, total paw thickness by the oral administration of **Y-320** (0.3, 1, 3 mg/kg) on the in chronic-progressing CIA in DBA/1J mice. **Y-320** was administered orally for 8 weeks. Results were expressed as the mean the mean ± SEM of 12 mice. *:# <0.05 [Fisher's exact test].

Chronic-progressing CIA モデルは、ヒトの臨床所見に近い形で病態が進行することが確認されたことから、次に同モデルを使用して抗 TNF- α 抗体 (TN3-19.12)³⁶⁻³⁸, レフルノマイドおよびメトトレキセートと **Y-320** を同時評価した(Figure 45). 抗 TNF- α 抗体としては TN3-19.12 を使用し、初回免疫から 8 週目に 50 および 150 μ g を 1 回のみ静脈内投与を行った. レフルノマイドは初回免疫後 8 週目から 1, 3, および 10 mg/kg を 1 日 1 回経口投与した. メトトレキセートは、初回免疫後 8 週目から 0.4, 2, および 10 mg/kg を 1 週間に 2 回経口投与した.

その結果、抗 TNF- α 抗体 50 μ g/body から有意な関節炎の抑制作用が確認された. レフルノマイドおよびメトトレキセートは共に用量に応じて関節炎の抑制作用が確認されたが、最高用量の 10 mg/kg 投与例のみ有意性が確認された. この結果から、**Y-320** は、既存の抗リウマチ薬と同等以上の関節炎抑制作用を有することが示唆された.

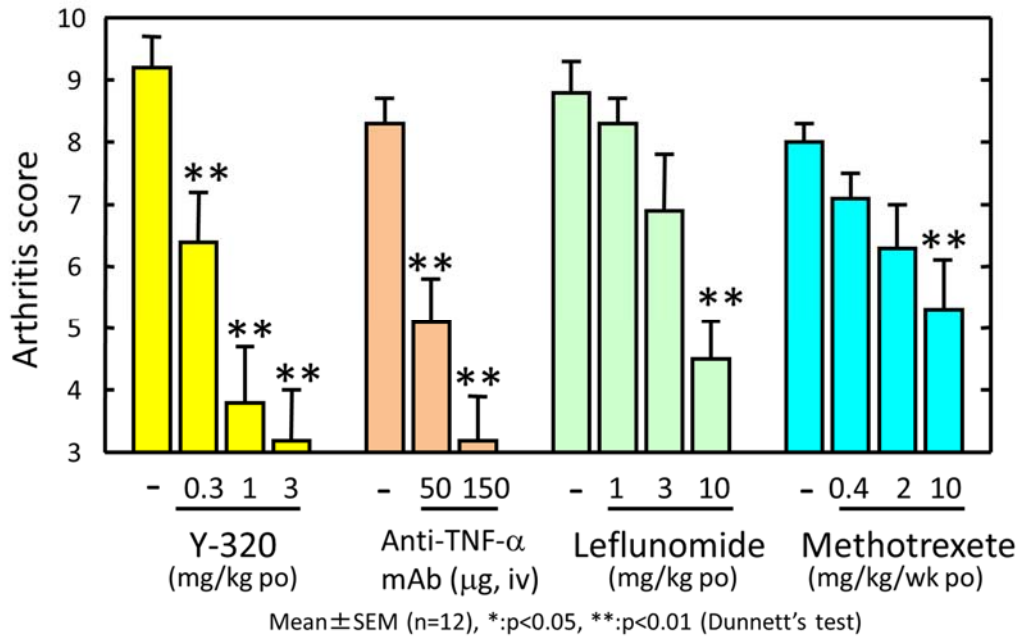
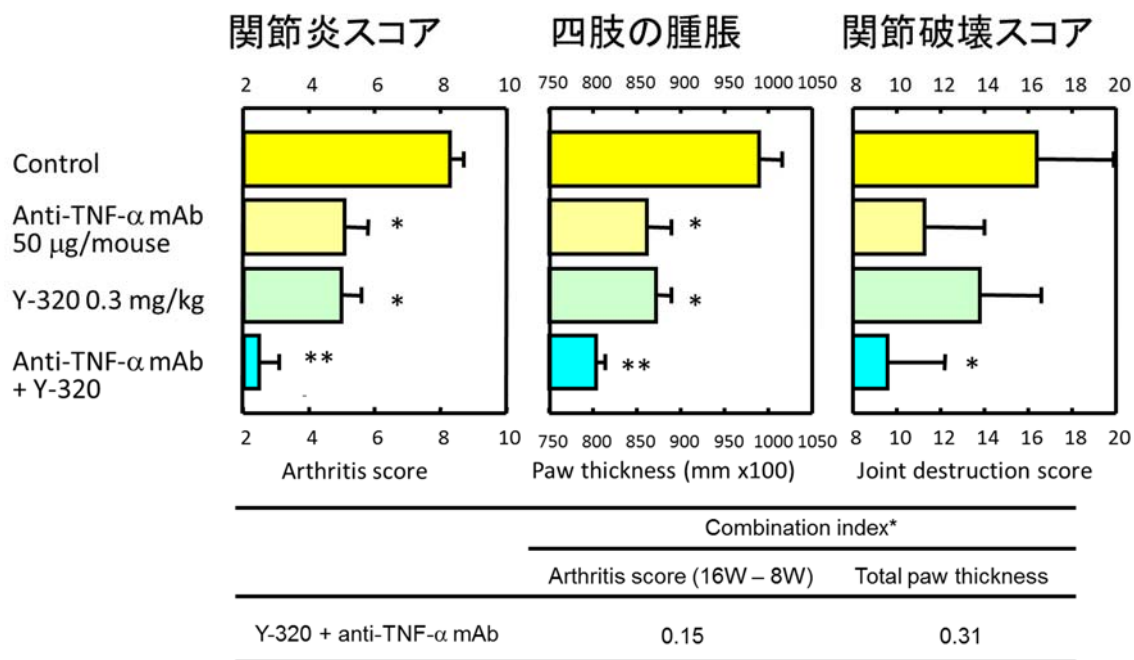


Figure 45. Therapeutic effects of **Y-320** and other immunomodulators on the arthritis scores in chronic-progressing CIA in DBA/1J mice. **Y-320** and leflunomide were administered orally for 8 weeks. Anti-TNF-mAb was once administered intravenously 8 week after immunization. Methotrexete was administered twice a week for 8 weeks. Results were expressed as the mean the mean ± SEM of 12 mice. *:p<0.05, **:p<0.01 [Dunnett's multiple comparison test.]

3.2.3 抗 TNF- α 抗体と Y-320 の併用効果

最新の RA 治療法としては、抗 TNF- α 抗体療法が目覚ましい発展を示している。臨床においては、第 1 選択薬であるメトトレキサートと抗 TNF- α 抗体とが併用される場合が多い。そこで、chronic-progressing CIA モデルを用いて TN3-19.12 と Y-320 との併用効果を検討した。



*: Calculation of Combination Index (C. I.)

$$\log \left(\frac{f_a}{f_u} \right) = m \log(D) - m \log(Dm), \quad Dx = Dm \left(\frac{f_x}{1-f_x} \right)^{1/m}$$

$$C. I. = \frac{D1 \text{ combined}}{D1 \text{ alone}} + \frac{D2 \text{ combined}}{D2 \text{ alone}}$$

f_a : "Arthritis score (16W - 8W)" or "Total paw thickness"

f_u : 1- f_a , m : Slope of the plot $\log (f_a/f_u)$ versus \log dose

Dm : Dose required for 50% inhibition, Dx : Dose required for $x\%$ inhibition

C.I.: Combination index

C.I. < 1.0: Synergistic

C.I. = 1.0: Additive

Figure 46. Synergistic effects of combinational uses of anti-TNF- α mAb and Y-320 on chronic-progressing CIA in mice.

1 回免疫後 8 週目から 4 週間 Y-320 の 0.3 mg/kg を 1 日 1 回経口投与した群、8 週目に TN3-19.12 の 150 μ g/mice を 1 回のみ静脈内投与した群、さらに Y-320 と TN3-19.12 の併用群とで比較した(Figure 46)。Y-320 あるいは TN3-19.12 投与群ではそれぞれ対照群と比較して有意に関節炎スコアを抑止した。また、Y-320

と TN3-19.12 の併用群では、単剤投与群よりも優位に関節炎の進行を抑制した (Combination index: arthritis score, 0.15; total paw thickness, 0.31 in Figure 46). この結果から、抗 TNF- α 抗体と **Y-320** の併用療法は相乗的な効果があることが示唆された.

第3節 カニクイザルを用いた CIA に対する Y-320 の効果

次に、霊長類であるカニクイザルを用いた CIA モデルにおける Y-320 および対照薬としてメトトレキセートを選定し、それらの効果を比較検討した。

雌性のカニクイザルにウシ II 型コラーゲンとフロイント完全アジュバントとのエマルジョンを 3 週間の間隔をおいて 3 回免疫することによって発症させた(Figure 47)。3 回目の免疫の 14 日後に、関節の腫脹が確認されたサルをプールし、指骨近位関節橢円面積が均一になるように 12 例ずつの群分けし、翌日から、媒体あるいは Y-320 の 0.3, 1 mg/kg を 1 日 1 回、8 週間反復経口投与し指関節の橢円面積(指骨近位関節平均橢円面積)を経時的に測定した(Figure 48)。

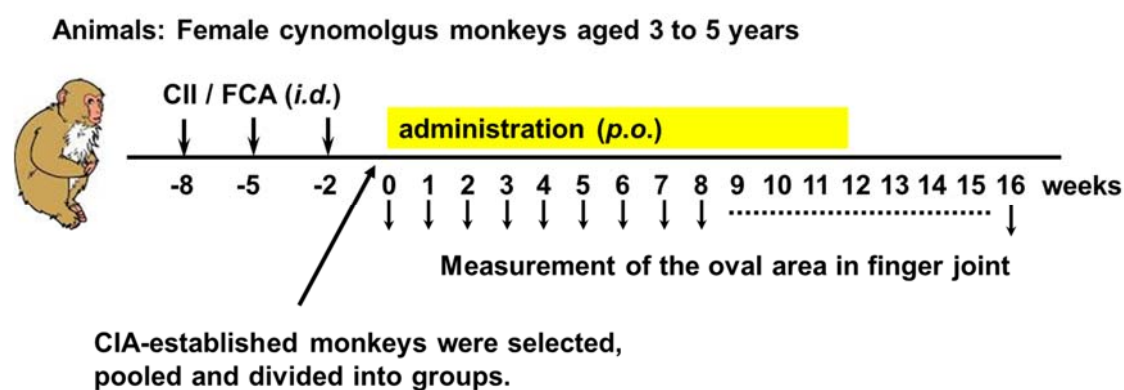


Figure 47. Protocol for a chronic-progressing CIA model in Cynomolgus Monkeys



Figure 48. Comparison of forepaws in a healthy cynomolgus monkeys and an arthritis controls

その結果、媒体のみ投与した対照群では、投与期間中、指骨近位関節平均楕円面積が継時的に変化し、関節の腫脹が観察された。これに対して、**Y-320** の 1 mg/kg 投与群では、初回投与後 4 週目頃から関節の腫脹が減少し、7 週目で最小値に達した後、以降を抑制投与終了日の 12 週目までほぼその状態を維持した。更に、12 週以降投与終了後も急激なリバウンドなどは観測されず、その効果は持続することが確認された(Figure 49(a))。腫脹については、**Y-320** は 0.3 mg/kg 以上で有意に抑制することが示唆された。また、その効果はメトトレキサートを 3, 10 mg/kg を 1 週間に 2 回投与した場合よりも優れていることが明らかとなった(Figure 49(b))。

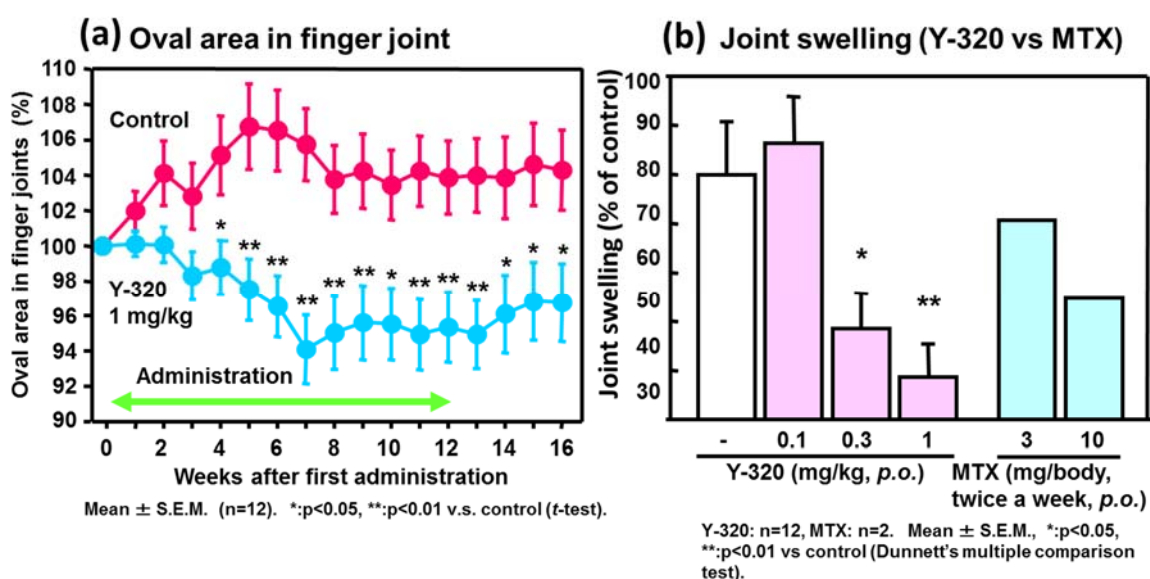


Figure 49. Therapeutic administration of **Y-320** ameliorates CIA in cynomolgus monkeys. (a) CIA in cynomolgus monkeys was induced by immunization with bovine type II collagen and FCA at 0, 3, and 6 weeks after primary immunization. At 8 weeks after the primary immunization, monkeys established with CIA were pooled, divided into groups, and treated with **Y-320** therapeutically for 12 weeks. The oval area in finger joint was measured by digital caliper. comparison test]. (b) **Y-320** was orally administered to CIA-established monkeys once a day for 7 weeks. Methotrexate (MTX) was orally administered twice a week for 8 weeks. Percentage of increase in finger joint swelling was calculated according to the following equation: Increase in finger joints swelling (%) = ((the oval area of finger joints at 7 or 8 weeks) – (the oval area before primary immunization)) / ((the oval area at 0 week) – (the oval area before primary immunization)) x 100.

このように、**Y-320** はマウス CIA と同様にカニクイザルにおける CIA に対しても、効果を示した。このことは、臨床試験において十分に効果を示すことが期待される。

第4章 総括

本研究は、関節リウマチの病態に着目し、CD4⁺T細胞の増殖を制御する薬剤の開発を意図して研究を開始し、目標プロファイルを有する **Y-320** を取得するに至る一連の創薬研究に関するものである。現在の RA 治療においては、抗 TNF- α 抗体などの生物医薬の登場により治療に対する薬剤の貢献度はかなり高まってきたとの見方もあるが、その一方でこれら生物医薬品は薬価が高く、患者に経済的負担を強いることや感染症の問題などを考慮すると、低分子医薬のニーズは今なお高い。

筆者は、RA の病態と活性化リンパ球の果たす役割、即ち CD4⁺T細胞とこれを活性化させる IL-15 および CD4⁺T細胞からの IL-17 産生を制御する薬剤の開発をテーマとして研究を行った。化合物スクリーニングにおける第1の目標として「リンパ球」に作用し、レフルノマイド級の efficacy を有する免疫抑制薬の取得を目指した。しかしながら、既存の低分子の免疫調整薬、あるいは免疫抑制薬は核酸合成/代謝阻害作用を有するものであるため、その作用は細胞非選択的であり副作用も多く報告されていた。そこで、「核酸合成/代謝阻害作用のない」化合物の取得を第2の目標に掲げて、これら2つの目標を満足する新規な免疫抑制メカニズムを有する RA 治療薬を求めて文献調査を行い、また目標とする薬理プロファイルを有する化合物を cell based assay によりスクリーニングした。

「抽象的な研究目標をどのような化合物で具現化するか。」は、薬作りにおける共通で且つ最も難解な課題である。幸運にも、Albert らがレフルノマイド自体に秘められた別の作用メカニズムがあることや J. Coghlan らが単純な構造のフェニルピラゾールアミド **3** がレフルノマイド(**1**) に匹敵する *in vitro* 活性を有することなどをほぼ同時期に報告した。これらの情報は、正に筆者が求める「核酸生合成経路阻害作用に基づかない低分子医薬の探索」という目的に合致した重要な化合物情報であった。そこで、社内ライブラリーの中からフェニルピラゾールカルボン酸誘導体を利用して合成展開を開始し、早期に目標とする化合物を取得するに至った。

また、本研究の特徴の1つは、酵素アッセイや結合阻害など一次元的なスクリーニング手法ではなく、cell based assay を指標とした *in vitro* 薬理評価を採用した点にある。初期展開においては、PMA + Ca イオノフォア刺激のラット T細胞の増殖抑制作用を *in vitro* 1次スクリーニングし、そこから徐々に条件を限定して化合物を評価した。これにより様々な薬理プロファイルの化合物を同じ土俵で評価でき、広い視野でシーズ化合物のスクリーニングが可能となった。ま

た、膜透過性などの基本的な物性も同時に評価することが可能となり、これらが効率的に開発候補化合物を見出すことにつながったものと判断される。

本研究において、活性の保持と経口吸収性の改善が大きな課題であった。この課題にあっては、マウスの CIA モデルを用いて *in vivo* スクリーニングにより薬物動態も含めた評価を行ったことが解決のカギとなり、レフルノマイド(**1**)に匹敵する efficacy を有する化合物 **9d** を発見された。更に、ラットを用いた薬物動態解析から活性代謝物 **9g** が発見された。化合物 **9g** は、その構造から最大の課題であった *in vitro* 活性の保持と経口吸収性改善を同時に解決するための合成展開の新たな道筋を示した画期的な発見であった。

化合物 **9g** の構造を基に 2 種類の合成展開を行い、個々に開発候補化合物を絞り込み、プロドラッグ体の化合物 **11**、ピペラジン誘導体の化合物 **12f** およびモルホリノピペリジンの特徴とする化合物 **15e** を見出した。最終的に薬物動態的プロファイルに優れ、*in vivo* 効果の高い化合物 **15e** (コード番号: **Y-320**) を開発品に選定するに至った。

Table 14. *In vitro* pharmacological profiles of **Y-320**

Cell	Stimulant	Indication	IC ₅₀ (nM)
Mouse T cells	IL-15	proliferation	23.2
Mouse T cells	-	Cell viability	>1000
Mouse CD4 ⁺ T cells	IL-15/CXCL12/ Anti-CD3mAb	IL-17 production	25.7
Memory T cells	IL-15/ Anti-CD3mAb	IL-17 production	< 3
Mouse Th17 cells	Anti-CD3mAb/anti-CD28mAb	IL-17 production	52.4
Human T cells	IL-15	IL-17 production	57.4
Naïve T cells to Th17 cells	IL-6, TGF-β	differentiation	>100

Y-320 の *in vitro* プロファイルを Table 14 に、*in vivo* プロファイルを Table 15 に示した。**Y-320** は、IL-15 刺激の CD4⁺T 細胞の増殖並びに IL-17 の産生を数 10 nM のオーダーで抑制する。また、無刺激の naïve T cell に対してはほとんど作用せず、高い細胞選択性を有することが確認された。

Y-320 の作用メカニズムは、IL-2R あるいは IL-15R の下流にある JAK1/3 の自己リン酸化を何らかの形で抑制することで免疫抑制活性を発現していることが示唆されたが、cell free での kinase assay では阻害作用が確認できなかった。また、naïve T 細胞から Th17 細胞への細胞分化の phase は阻害しないことが確認された。以上の結果から、CD4⁺T 細胞の活性化の phase の中で特異的する未知の標的に作用していると考えられる(Figure 50)。 **Y-320** の詳細な作用メカニズムの

解析が進むことは、免疫学の新たな発展につながるものと期待される。

Table 15. Effects of **Y-320** on CIA in mice and monkeys

Species	Treatment	Indications	MED*(mg/kg, p.o.)
Mouse	Prophylactic	Arthritis symptoms/ paw swelling	0.3
		Joint destruction	0.3
		Anti-collagen IgG ₁ production	0.3
		IL-17 mRNA expression	0.3
	Therapeutic	Arthritis symptoms/ paw swelling	0.3
		Joint destruction	3
Monkey	Therapeutic	Finger joint swelling	0.3

*: Minimum effective dose

また、**Y-320** のマウスおよびカニクイザルの CIA モデルにおいて 0.3 mg/kg 以上の用量で有意に関節炎の進行を抑制し、IL-17 mRNA の発現を顕著に抑制するとともに、抗 TNF- α 抗体との相乗効果を示すことが確認された。また、別の実験では、マウスの自己免疫性脳脊髄炎では 0.1 mg/kg 以上で MRL/lpr マウスのループス腎炎においては 0.3 mg/kg 以上で有効性を示すことが確認されている。

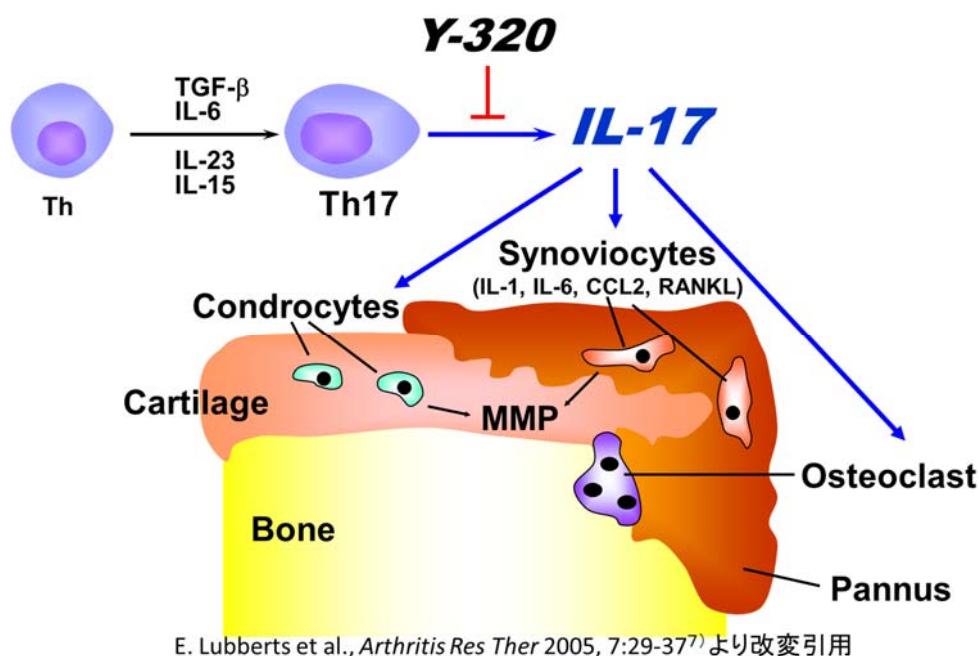


Figure 50. a mode of action of Y-320

以上から、新規ピラゾールアニリド化合物 **Y-320** は、IL-17 産生抑制作用を

有する経口投与可能な新規な薬剤として、RA を含む自己免疫疾患治療薬として臨床応用が期待される。

最後に、遺伝子工学の発展により生体内のすべての遺伝子が解析されて久しい。そのため病態の発症および進行に伴う遺伝子発現量の変化により疾患に関連する遺伝子を選定することも可能となったが、それらの機能解析は未だ始まったばかりである。創薬研究においても新規な機能性タンパクあるいは酵素を標的として化合物のスクリーニングや Fragment-Based Drug Design (FBDD)³⁹⁾ などの最新技術を応用して target specific な化合物を創製することができるようになってきた(これをマイクロな創薬と呼ぶこととする)。

皮肉なことにそれら化合物の多くは *in vivo* はおろか cell based assay ですら効果を示さないものも多い。ある一片のターゲット分子を制御しても生体内の別のバックアップ機能などにより制御効果が相殺されることが多い。iPS 細胞の研究を例に挙げると、ES 細胞中の 24 の遺伝子の研究を通じて、細胞の初期化には 4 種類の遺伝子が関与することが明らかになった。このことが物語るように生体反応を制御することのできる target が 1 種類だという保証は 1 つもないのである。目標とするコンセプトは明確にした上で間口を広げて色々な profile のものを受け入れる体制を準備するのがこれからの新しいアプローチではないだろうか。

また、吸収などの生体の体内動態を考慮していないケースも多いことも理由の 1 つである。このようなことを背景として製薬企業では既に POC (proof of concept) が確認されているテーマあるいは先行品が存在するようなテーマに追随するケースが多く、上市が見えてきたころには既に類薬が何件も存在する事態となる。今回の一連の研究ではシンプルな研究コンセプトのもと、cell based assay を 1 次スクリーニングするマクロなアプローチを用いて化合物の評価および合成展開を実施した結果、非常にユニークな *in vitro/in vivo* プロファイルを有する **Y-320** を早期に取得するに至った。一見 classical に思われる手法であるが、このような手法を用いることで、新規なメカニズムの化合物を早く手にできたという意味において、現在の創薬のアプローチに一石を投じたといえる。

Experimental Section

Chemistry

General information

Melting points were determined in open capillary tubes with a Buchi 530 apparatus. ¹H NMR spectra were recorded on a JEOL GSX-270 spectrometer (270 MHz), a JEOL GSX-400 spectrometer (400 MHz), and a Bruker AVANCE 600 (600 MHz for proton and 150 MHz for carbon) spectrometer, using tetramethylsilane as an internal standard. Elemental analyses were performed on a Yanamoto CHN CORDER MT-6. Mass spectra (MS) were recorded on a JEOL JMS-700 instrument. The following NMR abbreviations are used: br (broad), brs (broad singlet), s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet). IR spectra were recorded on JIR-6500W instrument. Chromatography was carried out on silica gel BW-300 (Fuji Silysia). All starting materials of a series of 1-phenylpyrazole-4-carboxylic acid derivatives, nitrobenzene derivatives, cyclic amines, other raw materials, and solvents were purchased from Sigma Aldrich and Alfa Aesar. Abbreviations for solvents used are DMSO, dimethyl sulfoxide; DMF, dimethylformamide; IPE, diisopropyl ether; AcOEt, ethyl acetate; IPE, diisopropylether; NMP, N-methyl-2-pyrrolidone; THF, tetrahydrofuran. All yields were unoptimized. Leflunomide (**1**) and A77 1726 (**2**) were prepared according to the patent⁴⁰. Compound **3** was synthesized according to the literature²¹.

Synthetic Procedures & Data of the Compounds in Section 1 of Chapter 1

5-Amino-2-(2,2-dimethylpropoxy)phenylbenzotrile (7a). To 2-chloro-5-nitrobenzotrile (**5-i**, 91 g) in DMF (364 ml) and neopentyl alcohol (52 g) was added sodium hydride (60% content, 27.8 g) under ice-cooling and the mixture was stirred for 1 h. The reaction mixture was poured into water and extracted with toluene. The organic layer was washed with saturated brine and dried over anhydrous magnesium sulfate. The solvent was removed under reduced pressure. NH₄Cl (10 g), iron powder (75 g), water (286 ml) and ethanol (753 ml), was added to the residue to make a solution, which was heated and stirred at a refluxing temperature for 30 min. After ice-cooling, the reaction mixture was filtrated and the solvent was evaporated under reduced pressure. To the residue was added an aqueous sodium hydroxide solution and

the mixture was extracted with toluene. The organic layer was washed with saturated brine and dried over anhydrous sodium sulfate, after which the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was recrystallized from a mixed solvent of ethyl acetate-n-hexane to give the title compound (70 g). M.p.: 55–56 °C. ¹H-NMR (270MHz/CDCl₃) δ: 1.02 (9H, s), 3.76 (2H, s), 3.4 (2H, brs), 7.21 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.23 (1H, dd, *J* = 2.0, 9.2 Hz), 7.89 (1H, d, *J* = 2.0 Hz). MS(EI) *m/z*: 204 (M⁺); Calcd for C₁₂H₁₆N₂O: C, 70.56; H, 7.90; N, 13.71. Found: C, 70.43; H, 7.98; N, 13.74.

5-Amino-2-isobutoxybenzotrile (7b). By the reaction and treatment in the same manner as in **7a**, except that isopropanol was used instead of neopentylalcohol, the title compound was obtained, Mp: 213°C.

5-Amino-2-[2-(2-dimethylamino)ethoxy]benzotrile (7c). By the reaction and treatment in the same manner as in **7a**, except that 2-(dimethylamino)ethanol was used instead of neopentylalcohol, the title compound was obtained, M.p.: 45–46 °C

5-Amino-2-piperidinobenzotrile (7d). 2-Chloro-5-nitrobenzotrile (**5-i**, 20 g), Et₃N (8.0 g) and piperidine (9.34 g) were added to CH₃CN (100 ml) and the mixture was stirred at a refluxing temperature for 1 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and diisopropyl ether was added to the residue to allow crystallization. The crystals were recrystallized from hydrous ethanol to give 5-nitro-2-piperidinobenzotrile (**6-i**, 17 g), melting point 75°C.

Ammonium chloride (1.6 g) and iron powder (8.4 g) were added to a mixed solvent of water (40 ml) and ethanol (120 ml), and the mixture was heated to 65°C. Then, intermediate **6-i** (10 g) was added in parts over 20 min and the mixture was stirred at a refluxing temperature for 30 min. The reaction mixture was ice-cooled and filtrated. The solvent was evaporated under reduced pressure. To the residue was added aqueous sodium hydroxide solution, and the mixture was extracted with toluene. The organic layer was washed with saturated brine and dried over anhydrous sodium sulfate, after which the solvent was evaporated under reduced pressure. Diisopropyl ether was added to the residue to allow crystallization. The crystals were recrystallized from a mixed solvent of ethyl acetate-n-hexane to give the title compound (8.3 g), melting point: 148-149°C. ¹H-NMR (270MHz/CDCl₃) δ:1.52–1.58 (1H, m), 1.70–1.79 (4H, m), 2.96–2.99 (4H, m), 3.60 (2H, brs), 6.78–6.90 (3H, m). MS (EI) *m/z*: 202(M+H).

5-Amino-2-morpholinobenzotrile (7e). By the reaction and treatment in the same

manner as in **7d**, except that morpholine was used instead of piperidine, the title compound was obtained, M.p.: 130 °C Anal. Calcd for C₁₁H₁₃N₃O: C, 65.01; H,6.45; N,20.68; Found: C,64.97; H,6.48; N,20.63.

5-Amino-2-(4-methylpiperazin-1-yl)benzotrile (7f). By the reaction and treatment in the same manner as in **7d**, except that 1-methylpiperazine was used instead of piperidine, the title compound was obtained, M.p.: 192–193°C

1-(4-Fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8a). A mixture of 4-fluorophenylhydrazine (15.5 g), ethyl ethyl 2-ethoxymethyleneacetoacetate ²⁸⁾ (22.9 g) in EtOH (200 mL) were stirred for 2 h at a reflux point and followed by hydrolysis with aq. NaOH and treated with diluted HCl after reaction completion afforded a crude precipitate which was recrystallized from AcOEt to give the title compound as a light yellow crystalline (12.3 g, 45%). Mp.: 165–166°C; ¹H-NMR(270MHz/DMSO-d₆) δ: 2.49 (3H, s), 3.85 (1H, brs), 7.40 (2H, dd, *J* = 8.6, 9.2 Hz), 7.59 (2H, dd, *J* = 8.6, 9.2 Hz), 7.96 (1H, s).

N-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide 1/2 HCl (9a). Compound **8a** (2.1 g), compound **7a** (1.3 g), triethylamine (1.7 g) and (EtO)₂POCN (1.3 g) were added to dimethylformamide (10 ml) and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was added into water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated brine and dried over anhydrous magnesium sulfate, after which the solvent was evaporated under reduced pressure. n-Hexane was added to the residue to allow crystallization. The crystals were recrystallized from hydrous ethanol to give the title compound (0.2 g), Mp: 126–127°C. ¹H-NMR(270MHz/DMSO-d₆)δ:1.03 (9H, s), 2.50 (3H, s), 3.78 (2H, s), 7.23 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.41 (2H, dd, *J* = 8.6, 9.2 Hz), 7.58–7.61 (2H, m), 7.91 (1H, dd, *J* = 2.5, 9.2 Hz), 8.07 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.33 (1H, s), 10.04 (1H, s). MS(EI) m/z: 406 (M⁺); IR(KBr) 3288, 2960, 2221, 1668, 1560, 1515, 1402, 1243, 1010 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₃H₂₃FN₄O₂: C,67.97; H,5.70; N,13.78; Found: C,68.21; H,5.74; N,13.81.

N-(3-Cyano-4-isobutoxyphenyl)-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (9b). By the reaction and treatment in the same manner as in **9a** except that compound **7b** was used instead of compound **7a**, the title compound was obtained, M.p.: 177–178°C. ¹H-NMR(270MHz/CDCl₃) δ:1.06 (6H, d, *J* = 6.6 Hz), 2.09–2.21 (1H,

m), 2.59 (3H, s), 3.82 (2H, d, $J = 6.6$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.20 (2H, t, $J = 8.6$ Hz), 7.40 (2H, dd, $J = 4.6, 9.2$ Hz), 7.62 (1H, brs), 7.74 (1H, dd, $J = 2.6, 8.6$ Hz), 7.79 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.93 (1H, s). MS(EI) m/z : 392(M⁺); IR(KBr) 3299, 2873, 2227, 1641, 1513, 1409, 1251, 1018, 844 cm^{-1} ; Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{FN}_4\text{O}_2$: C,67.33; H,5.39; N,14.28; Found: C,67.47; H,5.22; N,14.26.

N-{3-Cyano-4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl}-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-pyrazole-4-carboxamide hydrochloride 1/4 hydrate (9c). Compound **8a** (35 g), 1-hydroxybenzotriazole (25.5 g) and 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (36 g) were added to dimethylformamide (360 ml) and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was treated with aqueous potassium carbonate solution and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated brine and dried over anhydrous magnesium sulfate, after which the solvent was evaporated under reduced pressure. Diisopropyl ether was added to the residue to allow crystallization. The crystals were recrystallized from ethyl acetate to give 1-benzotriazole 1-(4-fluorophenyl)-5-dimethylpyrazole-4-carboxylate (**8a'**, 62 g). Mp.:166–168°C.

Compound **8a'** (3 g) and compound **7c** (2.3 g) were added to ethanol (30 ml) and the mixture was stirred at 78°C for 3 h. The solvent was evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (mobile phase: CHCl_3 : MeOH = 50:1). To the obtained oily substance was added 10% hydrogen chloride-isopropanol solution to allow crystallization and the crystals were recrystallized from a mixed solvent of methanol-ethyl acetate to give the title compound (0.4 g), Mp: 258°C. $^1\text{H-NMR}$ (270MHz/DMSO- d_6) δ :2.53 (3H, s), 2.89 (6H, s), 3.57 (2H, dd, $J = 4.6, 5.3$ Hz), 4.55 (2H, dd, $J = 4.6, 5.3$ Hz), 7.36 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.38–7.44 (2H, m), 7.57–7.63 (2H, m), 7.99 (1H, dd, $J = 2.6, 9.3$ Hz), 8.16 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.41 (1H, s), 10.20 (1H, s), 10.82 (1H, s). MS(EI) m/z : 407 (M⁺) IR(KBr) 3423, 3276, 2607, 2233, 1658, 1500, 1243 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{FN}_5\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$: C, 58.92; H, 5.28; N,15.62; Found: C,58.88; H,5.20; N,15.72.

N-(3-Cyano-4-piperidinophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (9d). Intermediate **8a'** (2 g) which was prepared in the experiment of compound **9c** and 5-amino-2-piperidinobenzonitrile (1.1 g) were reacted at 78°C for 3 h in ethanol (20 ml). After evaporation of the solvent, aqueous potassium carbonate solution was added to the residue and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with dilute hydrochloric acid and saturated brine, and

dried over anhydrous sodium sulfate, after which the solvent was evaporated. A mixed solvent of ethyl acetate-n-hexane was added to the residue to allow crystallization. The crystals were recrystallized from ethyl acetate to give the title compound (1.2 g), melting point: 196–197°C. ¹H-NMR(270MHz/CDCl₃) δ:1.60 (1H, ddd, *J* = 5.3, 5.9, 11.2 Hz), 1.72–1.81 (4H, m), 2.58 (3H, s), 3.11 (4H, t, *J* = 5.3 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.19 (2H, t, *J* = 8.6 Hz), 7.39 (2H, dd, *J* = 4.6, 6.6 Hz), 7.69 (1H, dd, *J* = 2.6, 8.6 Hz), 7.77 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.95 (1H, s). MS(EI) *m/z*: 403 (M⁺) IR(KBr) 3369, 2937, 2223, 1660, 1513, 1309 1234 844 cm⁻¹. MS (EI) *m/z*: 418 (M⁺). Anal. Calcd for C₂₃H₂₂FN₆O: C, 68.47; H,5.50; N,17.36; Found: C,68.48; H,5.49; N,17.48.

N-(3-Cyano-4-morpholinophenyl)-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (9e). By the reaction and treatment in the same manner as in **9d** except that compound **7e** was used instead of compound **7d**, the title compound was obtained, M.p.: 147–148°C MS(EI) *m/z*: 405 (M⁺) Anal. Calcd for C₂₂H₂₀FN₅O₂: C, 65.17; H,4.97; N,17.27; Found: C,65.17; H,4.82; N,17.27.

N-[3-Cyano-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (9f). By the reaction and treatment in the same manner as in **9d** except that compound **7f** was used instead of compound **7d**, the title compound was obtained, M.p.: 205–207°C MS(EI) *m/z*: 418 (M⁺); Anal. Calcd for C₂₃H₂₃FN₆O: C, 66.01; H,5.54; N,20.08; Found: C,66.11; H,5.55; N,20.13.

Synthetic Procedures & Data of the Compounds in Section 2 of Chapter 1

5-Amino-2-(4-hydroxypiperidin-1-yl)benzotrile (7g). By the reaction and treatment in the same manner as in **7d**, except that 4-hydroxypiperidine was used instead of piperidine, the title compound was obtained, M.p.: 138 °C; ¹H-NMR(270MHz/CDCl₃)δ: 1.69–1.79 (2H, m), 1.81–2.05 (2H, m), 2.77–2.86 (2H, m), 3.22–3.35 (2H, m), 3.73–3.79 (1H, m), 6.84–6.91 (3H, m). Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₃O: C, 66.34; H,6.96; N,19.34; Found: C,66.25; H,7.01; N,19.28.

N-[3-Cyano-4-(4-hydroxypiperidin-yl)phenyl]-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (9g). Compound **8a'** (2 g) and **7g** (1.0 g) were reacted in ethanol (20 ml) at 78°C for 3 h. After the evaporation of the solvent, aqueous potassium carbonate solution was added to the residue and the mixture was extracted

with ethyl acetate. The organic layer was washed with dilute hydrochloric acid and saturated brine, and dried over anhydrous sodium sulfate, after which the solvent was evaporated. Diisopropanol was added to the residue to allow crystallization. The crystals were recrystallized from a aq. EtOH to give the title compound (0.7 g), melting point: 215-216°C; ¹H-NMR(270MHz/CDCl₃)δ: 1.57 (1H, brs), 1.74–1.86 (2H, m), 2.05–2.11 (2H, m), 2.59 (3H, s), 2.94–3.03 (2H, m), 3.39–3.47 (2H, m), 3.86-3.93 (1H, m), 7.01 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.13–7.26 (2H, m), 7.37–7.45 (2H, m), 7.56 (1H, brs), 7.67 (1H, dd, *J* = 2.6, 8.6 Hz), 7.83 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.92 (1H, s). MS(EI) *m/z*: 419 (M⁺). IR(KBr) 3371, 2940, 2221, 1660, 1513, 1307, 1222, 1076 cm⁻¹. Anal.Calcd for C₂₃H₂₂FN₅O₂: C, 65.86; H,5.29; N,16.70; Found: C,65.65; H,5.14; N,16.66.

Synthetic Procedures & Data of Compounds in Section 3 of Chapter 1

5-Amino-2-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]benzotrile (7h). By the reaction and treatment in the same manner as in **7d**, except that 4-(2-hydroxyethyl)piperidine was used instead of piperidine, the title compound was obtained, M.p.: 60–65°C; ¹H-NMR(270MHz/CDCl₃) δ: 1.44–1.55 (3H, m), 1.61–1.71 (5H, m), 2.92–2.96 (5H, m), 3.34 (1H, brs), 6.50–6.57 (1H, m), 6.71–6.81 (2H, m).

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]phenyl}-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide 1/4 hydrate (10). By the reaction and treatment in the same manner as in compound **9h** using **8a'** and **7h**, the title compound was obtained, melting point: 186 °C. ¹H-NMR(400MHz/DMSO-*d*₆) δ:1.76–1.77 (2H, m), 1.46 (2H, dd, *J* = 6.3, 6.9 Hz), 1.54–1.60 (1H, m), 1.80 (2H, d, *J* = 12.7 Hz), 2.50 (3H, s), 2.72 (2H, dd, *J* = 10.7, 11.7 Hz), 3.45 (2H, d, *J* = 12.7 Hz), 3.49 (2H, dd, *J* = 11.7, 12.7 Hz), 4.39 (1H, dd, *J* = 4.9, 5.3 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.43 (2H, t, *J* = 8.8 Hz), 7.60 (2H, dd, *J* = 4.8, 8.8 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz), 8.07 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.29 (1H, s), 9.97 (1H, s); MS(EI) *m/z* 447(M⁺). IR(KBr) 3381, 3296, 2908, 2222, 1639, 1514, 1406, 1226, cm⁻¹. Anal.Calcd for C₂₅H₂₆FN₅O₂ · 1/4H₂O: C,66.30; H,5.91; N,15.49; Found: C,66.40; H,5.71; N,15.51.

Synthetic Procedures & Data of Compounds in Section 1 of Chapter 2

4-(1-{2-Cyano-4-[1-(4-fluorophenyl)-5-methylpyrazole-4-carboxamide]phenyl}-piperidin-4-yloxy)-4-oxobutyric acid (11). Compound **9h** (1.9 g), succinic anhydride (0.5 g) and a catalytic amount of p-toluenesulfonic acid 1 hydrate were added to nitrobenzene (40 ml) and the mixture was stirred at 110°C for 6 h. The reaction mixture was ice-cooled, diisopropyl ether was added thereto. The precipitated crystals was collected by filtration and recrystallized from hydrous ethanol to give the title compound (1.2 g), melting point: 219-220°C. ¹H-NMR(270MHz/DMSO-*d*₆) δ:1.74–1.80 (2H, m), 1.98–2.02 (2H, m), 2.50–2.57 (4H, m), 2.51 (1H, s), 3.01–3.08 (2H, m), 3.27–3.29 (2H, m), 4.87–4.91 (1H, m), 7.21 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.40 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 7.60 (2H, dd, *J* = 4.6, 6.6 Hz), 7.86 (1H, dd, *J* = 2.9, 9.2 Hz), 8.08 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 8.29 (1H, s), 10.00 (1H, s). MS(EI) *m/z* 519 (M⁺). IR(KBr) 3374, 2940, 2219, 1716, 1662, 1517, 1403, 1224, 1029 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₇H₂₆FN₅O₅: C, 62.42; H, 5.04; N, 13.48; Found: C, 62.62; H, 4.96; N, 13.50.

Synthetic Procedures & Data of Compounds in Section 2 of Chapter 2

5-Amino-2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]benzonitrile (7i). By the reaction and treatment in the same manner as in **7d**, except that 4-(2-hydroxyethyl)piperazine was used instead of piperidine, the title compound was obtained, Mp: 134°C; ¹H-NMR(270 MHz) δ: 2.40 (2H, dd, *J* = 5.9, 6.6 Hz), 2.55 (4H, dd, *J* = 4.0, 4.6 Hz), 2.90 (4H, dd, *J* = 4.0, 5.3 Hz), 3.51 (2H, dd, *J* = 5.3, 6.6 Hz), 4.39 (1H, t, *J* = 5.3 Hz), 5.17 (2H, brs), 6.80-6.82 (2H, m), 6.92 (1H, dd, *J* = 3.6, 9.9 Hz). IR: 3428, 3226, 2212, 1508, 1222. MS: 247 (M⁺H); Anal. Calcd for C₁₃H₁₈N₄O: C, 63.39; H, 7.37; N, 33.75. Found: C, 63.24; H, 7.38; N, 22.76.

1-(4-Fluorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8b). 4-Fluorophenylhydrazine (20 g) and ethyl 2-cyano-3-ethoxyacrylate (26.7 g) were added to ethanol (200 ml), and the mixture was stirred at a refluxing temperature for 1 h. After cooling, the precipitated crystals was dissolved in tetrahydrofuran (150 ml) and isoamyl nitrite (21.2 g) was added. The mixture was stirred at a refluxing temperature for 2 h. After cooling, the precipitated crystals was dissolved in a mixed solvent of ethanol (80 ml) and water (80 ml), and sodium hydroxide (2.2 g) was added. The mixture was stirred at a refluxing temperature for 30 min. After evaporation of ethanol, dilute hydrochloric

acid was added to the residue. The obtained solid was recrystallized from aqueous methanol solution to give the title compound (8.9 g), Mp.: 244–247°C. ¹H-NMR(270MHz/DMSO-*d*₆) δ: 3.34 (1H, brs), 7.18 (2H, t, *J* = 8.6 Hz), 7.66 (2H, dd, *J* = 4.6, 9.2 Hz), 8.08 (1H, s), 8.34 (1H, s).

1-(4-Fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8c). By the reaction and treatment in the same manner as in **8b**, except that ethyl 2-cyano-3-ethoxy-3-methylacrylate was used instead of ethyl 2-cyano-3-ethoxyacrylate, the title compound was obtained, M.p.: 194–195°C; ¹H-NMR(270MHz/DMSO-*d*₆) δ: 2.54 (3H, s), 7.14 (2H, dd, *J* = 4.6, 7.9 Hz), 7.64 (2H, dd, *J* = 4.6, 9.2 Hz), 8.27 (1H, s), 12.45 (1H, brs).

1-(4-Fluorophenyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8d). By the reaction and treatment in the same manner as in **8a**, except that ethyl diacetoacetate was used instead of ethyl 2-cyano-3-ethoxyacrylate, the title compound was obtained, M.p.: 219–220°C ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ:2.36 (3H, s), 2.44 (3H, s), 7.37 (2H, dd, *J* = 8.6, 9.2 Hz), 7.55 (2H, dd, *J* = 6.6, 9.2 Hz), 12.35 (1H, brs).

5-Methyl-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8e). By the reaction and treatment in the same manner as in **8a**, except that phenylhydrazine was used instead of 4-fluorophenylhydrazine, the title compound was obtained, M.p.: 163°C; ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.51(3H, s), 7.50–7.57 (5H, m), 7.97 (1H, s), 12.3 (1H, brs). EIMS *m/z*: 202. IR(KBr) : 3068, 2937, 2875, 2769, 2719, 2672, 2597, 2531, 1685, 1660, 1596, 1562, 1502, 1483, 1456, 1407, 1286, 1259, 1103, 937, 765 cm⁻¹. Anal. calcd for C₁₁H₁₀N₂O₂: C, 65.34; H, 4.98; N, 13.85, Found: C, 65.34; H, 4.98; N, 13.86.

1-(4-Chlorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8f). 4-Chlorophenylhydrazine monohydrochloride (**13c**, 300 g), sodium hydrocarbonate (140 g), and ethyl 2-ethoxymethyleneacetoacetate²⁸ (**3**, 312 g) were added to 90% aqueous ethanol (1.2 L) and the reaction mixture was stirred for 3 hours at a reflux temperature. To the reaction solution, sodium hydroxide (80 g) and water (600 mL) were added and the reaction mixture was stirred for 2 hours at a reflux temperature and then concentrated *in vacuo*. The organic layer was separated with toluene and the aqueous layer was neutralized with conc. HCl to afford a precipitate, which was recrystallized from ethyl acetate to give compound **4** as a light yellow crystalline powder. Yield: 63 % (for 2 steps). Mp: 193 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.52 (3H, s), 7.60 (4H, dd, *J* = 3.3, 6.6 Hz), 7.98 (1H, s), 12.5(1H, br). EIMS *m/z* 236(M⁺): 219. Anal. Calcd for

C₁₁H₉ClN₂O₂: C, 55.83; H, 3.83; N, 11.84. Found: C, 55.59; H, 3.85; N, 11.89.

1-(4-Bromophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8g). By the reaction and treatment in the same manner as in **8g**, except that 4-bromophenylhydrazine monohydrochloride was used instead of 4-chlorophenylhydrazine monohydrochloride, the title compound was obtained, M.p.: 213 °C ¹H-NMR(270 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.52 (3H, s), 7.53 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.78 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.98 (1H, s), 12.46 (1H, brs).

1-(4-Iodophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8h). By the reaction and treatment in the same manner as in **8g**, except that 4-iodophenylhydrazine monohydrochloride was used instead of 4-chlorophenylhydrazine monohydrochloride, the title compound was obtained, M.p.: 225°C; ¹H-NMR(270 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm):2.52 (3H, s), 7.36 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.91 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.98 (1H, s), 12.47 (1H, brs).

1-(3-Chlorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8i). By the reaction and treatment in the same manner as in **8g**, except that 3-chlorophenylhydrazine monohydrochloride was used instead of 4-chlorophenylhydrazine monohydrochloride, the title compound was obtained, M.p.: 145°C; ¹H-NMR(270 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 2.55 (3H, s),3.34 (1H, brs), 7.11–7.30 (3H, m), 7.70(1H, s).

1-(2-Chlorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8j). By the reaction and treatment in the same manner as in **8g**, except that 2-chlorophenylhydrazine monohydrochloride was used instead of 4-chlorophenylhydrazine monohydrochloride, the title compound was obtained, M.p.: 114°C; ¹H-NMR(270 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 2.26 (3H, s),3.33 (1H, brs), 7.48–7.73 (4H, m), 7.96 (1H, s).

1-(4-Methylphenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8k). By the reaction and treatment in the same manner as in **8g**, except that 4-methylphenylhydrazine monohydrochloride was used instead of 4-chlorophenylhydrazine monohydrochloride, the title compound was obtained, M.p.: 203°C; ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ :2.39 (3H, s), 2.48 (3H, s), 7.34 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.40 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.29 (1H, s), 12.1–12.4 (1H, brs); EIMS *m/z*: 216; IR (KBr): 2919, 2601, 1695, 1662, 1558, 1517, 1483, 1288, 1257 cm⁻¹; Anal. Calcd for C₁₂H₁₂N₂O₂: C, 66.65; H, 5.59; N, 12.96.; Found: C, 66.68; H, 5.67; N, 12.90.

1-(4-Methoxyphenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8l). By the reaction and treatment in the same manner as in **8g**, except that 4-methoxyphenylhydrazine monohydrochloride was used instead of 4-chlorophenylhydrazine monohydrochloride, the title compound was obtained, M.p.: 213–214 °C; ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.45 (3H, s), 3.40 (1H, brs), 3.83 (3H, s), 7.08 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.42 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.93 (1H, s).

1-(4-Chlorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (8m). By the reaction and treatment in the same manner as in **8c**, except that 4-chlorophenylhydrazine monohydrochloride was used instead of 4-fluorophenylhydrazine monohydrochloride, the title compound was obtained, Mp: 110–111 °C; ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.31 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.44 (3H, s), 4.25 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.91 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.98 (1H, s).

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (12a). By the reaction and treatment in the same manner as in compound **9h** using **8a'** and **7i**, the title compound was obtained, melting point: 179–180 °C. ¹H-NMR(270MHz/CDCl₃) δ: 2.59 (3H, s), 2.64 (2H, t, *J* = 4.6 Hz), 2.73–2.74 (4H, m), 3.20–3.21 (4H, m), 3.64 (2H, t, *J* = 4.6 Hz), 6.99 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.18–7.20 (2H, m), 7.23–7.26 (2H, m), 7.39 (2H, m), 7.70–7.73 (1H, m), 7.85 (1H, s), 7.94 (1H, s). MS (EI) *m/z* 448 (M⁺). IR (KBr) 3288, 2599, 2223, 1662, 1513, 1400, 1085, 941 cm⁻¹. Anal.Cald for C₂₄H₂₅FN₆O₂: C, 64.27; H, 5.62; N, 18.74; Found: C, 63.88; H, 5.54; N, 18.57.

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-1-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide (12b). Dichloroethane solution (25 ml) containing compound **8b** (2.2 g) and thionyl chloride (1.6 g) was stirred at 83 °C for 1 h to give acid chloride. The solvent was evaporated under reduced pressure. To the residue was added pyridine solution (25 ml) containing compound **7i** (3.2 g) under ice-cooling and the mixture was stirred for 1 h. The reaction mixture was treated with aqueous sodium hydroxide solution and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated brine, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Ethyl acetate was added to the residue to allow crystallization. The crystals were recrystallized from hydrous ethanol to give the title compound (2.1 g), melting point: 205-206°C. ¹H-NMR(270MHz/CD₃OD) δ: 2.59 (3H, s), 2.64 (2H, t, *J* = 5.3 Hz), 2.74 (4H, t, *J* = 4.6

Hz), 3.20 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 3.36 (1H, brs), 3.70 (2H, dd, $J = 5.3, 5.8$ Hz), 7.01 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.18 (2H, t, $J = 8.6$ Hz), 7.66 (2H, dd, $J = 6.6, 8.6$ Hz), 7.84 (1H, dd, $J = 2.0, 9.2$ Hz), 7.89 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 8.52 (1H, s), 9.23 (1H, s); MS(EI) m/z 434 (M+); IR(KBr) 3438, 2825, 2217, 1675, 1538, 1513, 1452, 1309, 1232, 1095, 944 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{FN}_6\text{O}_2$: C, 63.58; H, 5.34; N, 19.34; Found: C, 63.44; H, 5.75; N, 19.01.

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-1-(4-fluorophenyl)-3-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide 1 hydrate (12c). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8c** was used instead of **8b**, the title compound was obtained, M.p.: 120–121°C; $^1\text{H-NMR}$ (270MHz/ CD_3OD) δ : 2.64 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 2.76 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 3.22 (4H, dd, $J = 4.6, 5.3$ Hz), 3.35–3.37 (1H, m), 3.71 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 7.05 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.20 (2H, dd, $J = 4.6, 8.0$ Hz), 7.70 (2H, dd, $J = 4.6, 9.2$ Hz), 7.86 (1H, dd, $J = 2.6, 8.6$ Hz), 7.96 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.23 (1H, s), 8.58 (1H, s), 9.70 (1H, s); MS(EI) m/z 448 (M+); IR(KBr) 3349, 2804, 2227, 1666, 1515, 1502, 1305, 831 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{FN}_6\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 61.79; H, 5.83; N, 18.01; Found: C, 61.81; H, 5.80; N, 18.00.

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-1-(4-fluorophenyl)-3,5-dimethylpyrazole-4-carboxamide (12d). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8d** was used instead of **8b**, the title compound was obtained, M.p.: 204–206°C $^1\text{H-NMR}$ (270MHz/ $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.35 (3H, s), 2.38 (3H, s), 2.47–2.52 (2H, m), 2.61 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 3.09 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 3.54 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 4.41 (1H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 7.18 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.38 (2H, t, $J = 8.6$ Hz), 7.52–7.57 (2H, m), 7.83 (1H, dd, $J = 2.0, 8.6$ Hz), 8.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz); MS(EI) m/z for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{FN}_6\text{O}_2$: 462 (M+); IR(KBr) 3295, 2811, 2221, 1633, 1550, 1508, 1226, 844 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{FN}_6\text{O}_2$: C, 64.92; H, 5.88; N, 18.17; Found: C, 64.80; H, 5.82; N, 18.17.

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-5-methyl-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (12e). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8e** was used instead of **8b**, the title compound was obtained, M.p.: 214–215°C; $^1\text{H-NMR}$ (270MHz/ $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.60 (3H, s), 2.65 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 2.76 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 3.22 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 3.72 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 3.98 (1H, brs), 7.05 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.41–7.56 (5H, m), 7.82 (1H, dd, $J = 2.6, 9.2$ Hz), 7.99 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.13 (1H, s), 9.49 (1H, s); MS(EI) m/z 460 (M+); IR(KBr) 3315,

2827, 2219, 1673, 1583, 1554, 1500, 1400, 1234, 1081, 941 cm^{-1} ; Anal.Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2 \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$: C,66.26; H,6.14; N,19.32; Found: C,66.24; H,6.17; N,19.11.

1-(4-Chlorophenyl)-N-{3-cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]phenyl}-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (12f). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8f** was used instead of **8b**, the title compound was obtained, Mp.: 223-224°C; $^1\text{H-NMR}$ (270MHz/DMSO- d_6) δ : 2.45–2.54 (2H, m), 2.55 (3H, s), 2.55–2.61 (4H, m), 3.09–3.12 (4H, m), 3.54–3.58 (2H, m), 4.43 (1H, t, $J = 5.3$ Hz), 7.58 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 6.6$ Hz), 7.63 (2H, d, $J = 6.6$ Hz), 7.85 (1H, dd, $J = 2.6, 9.2$ Hz), 8.08 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.31 (1H, s), 9.98 (1H, s); MS(EI) m/z 464(M+); IR(KBr): 3292, 2945, 2819, 2227, 1666, 1631, 1564, 1500, 1454, 1407 cm^{-1} ; Anal.Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{ClN}_6\text{O}_2$: C,62.00; H,5.42; N,18.08; Found: C,62.07; H,5.46; N,18.05.

1-(4-Bromophenyl)-N-{3-cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide 1 hydrate (12g). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8g** was used instead of **8b**, the title compound was obtained. Mp.: 232 °C; $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.59 (3H, s), 2.65 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 2.76 (4H, dd, $J = 4.6, 5.3$ Hz), 3.22 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 3.55 (1H, brs), 3.71 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 7.05 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.32 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.66 (2H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.82 (1H, dd, $J = 2.6, 8.6$ Hz), 7.97 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.13 (1H, s), 9.45 (1H, s); IR (KBr) 3446, 3342, 2825, 2221, 1660, 1496, 1407, 1234, 1004, 943; EIMS m/z : 510 (M+H); Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{BrN}_6\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 54.65; H, 5.16; N, 15.93. Found: C, 54.73; H, 5.10; N, 15.81.

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-1-(4-iodophenyl)-5-methylpyrazole-4-carboxamide 1 hydrate (12h). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8h** was used instead of **8b**, the title compound was obtained. Mp.: 240 °C; $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm):2.60 (3H, s), 2.64 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 2.75 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 3.22 (4H, dd, $J = 4.6, 5.3$ Hz), 3.45 (1H, brs), 3.71 (2H, dd, $J = 5.3, 5.9$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.18 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.80 (1H, dd, $J = 2.0, 9.2$ Hz), 7.86 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.97 (1H, s), 8.13 (1H, s), 9.44 (1H, s); IR (KBr) 3459, 2827, 2223, 1658, 1494, 1403, 1313, 1234, 1000, 835; EIMS m/z : 556 (M+). Anal. calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{IN}_6\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 50.18; H, 4.74; N, 14.63. Found: C, 50.63; H, 4.81; N, 14.24.

1-(3-chlorophenyl)-N-{3-cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (12i). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8i** was used instead of **8b**, the title compound was obtained. Mp.: 176–177 °C; ¹H-NMR(270 MHz, CDCl₃)δ(ppm):2.55–2.64 (6H, m), 2.74–2.8 (4H, m), 3.20–3.23 (4H, m), 3.66 (2H, t, *J* = 5.3 Hz), 6.99 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.28–7.35 (1H, m), 7.44–7.47 (1H, m), 7.73 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.77 (1H, s), 7.85 (1H, s), 7.96 (1H, s) ; IR (KBr) 3357, 2829, 2221, 1664, 1589, 1531, 1494, 1405, 1232, 786; EIMS *m/z*: 464 (M⁺). Anal. calcd for C₂₄H₂₅ClN₆O₂: C, 62.00; H, 5.42; N, 18.08. Found: C, 61.79; H, 5.41; N, 18.12.

1-(2-chlorophenyl)-N-{3-cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide hydrochloride (12j). Dichloroethane solution (20 ml) containing compound **8j** (2 g) and thionyl chloride (1.4 g) was stirred at 83°C for 30 min to give acid chloride. A pyridine solution (20 ml) containing compound **7i** (2.5 g) was added thereto under ice-cooling and the mixture was stirred for 1h. The reaction mixture was treated with aqueous sodium hydroxide solution and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated brine, and the solvent was evaporated under reduced pressure. 1N Hydrogen chloride-ethanol solution was added to the residue to allow crystallization. The crystals were recrystallized from hydrous ethanol to give the title compound (0.8 g), Mp.: >270°C.; ¹H-NMR(270 MHz, DMSO-*d*₆)δ(ppm):2.33(3H, s), 3.21–3.32(6H, m), 3.55 (2H, d, *J* = 10.9 Hz), 3.66 (2H, d, *J* = 10.9 Hz), 3.84 (2H, dd, *J* = 4.4, 5.2 Hz),5.3 -5.5 (1H, br), 7.28 (1H, d, *J* = 11.2 Hz), 7.57 - 7.68 (3H, m), 7.74(1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.99 (1H, dd, *J* = 2.6, 9.2 Hz), 8.20 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 8.46 (1H, s), 10.26 (1H, s), 10.65 - 10.83 (1H, br) ; IR (KBr) 3290, 2223, 1668, 1554, 1525, 1498, 1398, 1241, 1068, 879; EIMS *m/z*: 464 (M⁺). Anal. calcd for C₂₄H₂₅ClN₆O₂·HCl: C, 57.49; H, 5.23; N, 16.79. Found: C, 57.29; H, 5.25; N, 15.54..

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-1-(4-methylphenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (12k). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8k** was used instead of **8b**, the title compound was obtained. Mp: 183–184°C. ; ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.43 (3H, s), 2.58 (3H, s), 2.63 (2H, t, *J* = 5.3 Hz), 2.73 (4H, t, *J* = 4.6 Hz), 3.20 (4H, t, *J* = 4.6 Hz), 3.66, 2H, t, *J* = 5.3 Hz), 6.97, 1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.26–7.77 (4H, m), 7.72 (1H, dd, *J* = 2.6, 9.2 Hz), 7.83 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.92 (1H, s), 7.95 (1H, s); IR (KBr) 3386, 2942, 2832, 2217, 1673, 1517, 1502, 1317, 1234, 943; EIMS *m/z*: 444 (M⁺). Anal. calcd for C₂₅H₂₈N₆O₂: C, 67.55; H, 6.35; N, 18.91. Found: C, 67.40; H, 6.49; N, 18.84.

N-{3-Cyano-4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]phenyl}-1-(4-methoxyphenyl)-5-1H-methylpyrazole-4-carboxamide (12l). By the reaction and treatment in the same manner as in **12b** except that **8l** was used instead of **8b**, the title compound was obtained. Mp. 210–211 °C; ¹H-NMR (270 MHz, CD₃OD) δ: 2.54, (3H, s), 2.65 (2H, dd, *J* = 5.2, 5.9 Hz), 2.75 (4H, t, *J* = 4.6 Hz), 3.21 (4H, t, *J* = 4.6 Hz), 3.69–3.88 (3H, m), 3.88 (3H, s), 7.01–7.06 (3H, m), 7.29–7.35 (2H, m), 7.81 (1H, dd, *J* = 2.6, 8.6 Hz), 7.97 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 8.08 (1H, s), 9.40 (1H, s); IR (KBr) 3317, 2221, 1610, 1583, 1517, 1402, 1249, 1083, 943; EIMS *m/z*: 460 (M⁺). Anal. calcd for C₂₅H₂₈N₆O₃: C, 65.20; H, 6.13; N, 18.25. Found: C, 64.78; H, 6.16; N, 17.98.

Synthetic Procedures & Data of Compounds in Chapter 3 of Section 2.

5-Amino-2-[4-(dimethylamino)piperidin-1-yl]benzotrile (7j). By the reaction and treatment in the same manner as in **7d**, except that 4-(N,N-dimethylamino)piperidine was used instead of piperidine, the title compound was obtained, ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.75 (2H, dd, *J* = 3.3, 11.9 Hz), 1.90 (2H, d, *J* = 12.5 Hz), 2.21–2.43 (1H, m), 2.31 (6H, s), 2.64–2.77 (2H, d, *J* = 11.9 Hz), 3.62 (2H, d, *J* = 7.9 Hz), 6.81–6.95 (3H, m).

5-Amino-2-(4-morpholinopiperidin-1-yl)benzotrile (7k). By the reaction and treatment in the same manner as in **7d**, except that, 4-morpholinopiperidine was used instead of piperidine, the title compound was obtained. Mp: 174 °C. EIMS *m/z*: 286 (M⁺). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.50 (1H, dd, *J* = 3.4, 11.7 Hz), 1.56 (1H, dd, *J* = 3.4, 12.2 Hz), 1.85 (2H, d, *J* = 11.2 Hz), 2.18–2.24 (1H, m), 2.47–2.50 (4H, m), 2.60 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 2.63 (1H, d, *J* = 11.7 Hz), 3.35–3.56 (4H, m), 5.17 (2H, brs), 6.78–6.80 (2H, m), 6.94 (1H, d, *J* = 9.7 Hz). Anal. calcd for C₁₆H₂₂N₄O·1/10H₂O: C, 66.69; H, 7.69; N, 19.44. Found: C, 66.55; H, 7.68; N, 19.14.

3-Bromo-4-(4-morpholinopiperidino)nitrobenzene (6-ii). By the reaction and treatment in the same manner as **6-i** using 3,4-dibromonitrobenzene (Sigma-Aldrich), the title compound was obtained. Yield: 69%. Mp: 136–138 °C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.6–1.8 (2H, m), 1.95–2.05 (2H, m), 2.35–2.45 (1H, m), 2.55–2.65 (4H, m), 2.7–2.8 (2H, m), 3.6–3.7 (2H, m), 3.7–3.8 (4H, m), 7.03 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.12 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz), 8.43 (1H, d, *J* = 2.4 Hz). EIMS *m/z*: 370 (M⁺)

3-Bromo-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenylamine (7l). By the reaction and treatment in the same manner as **7d** using **6-ii**, the title compound was obtained. Yield: 79 %. Mp: 215–217 °C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.6–1.8 (2H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.25–2.35 (1H, m), 2.55–2.65 (6H, m), 3.25–3.3 (2H, m), 3.52 (2H, s), 3.7–3.8 (4H, m), 6.59 (1H, dd, *J*=2.9, 8.8Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.94 (1H, d, *J* = 2.9 Hz).

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]phenyl-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15a). By the reaction and treatment in the same manner as **12a** using **8f** and **7h**, the title compound was obtained. Mp.: 205–207°C; ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 1.30–1.52 (5H, m), 1.78 (2H, d, *J* = 11.2 Hz), 2.55 (3H, s), 2.73 (2H, dd, *J* = 10.2, 11.2 Hz), 3.40–3.52 (4H, m), 4.34–4.38 (1H, m), 7.16 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.61 (4H, dd, *J* = 3.3, 6.6 Hz), 7.83 (1H, 1H, dd, *J* = 2.6, 9.2 Hz), 8.03 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 8.30 (1H, s), 9.96 (1H, s); IR (KBr) 3284, 2225, 1633, 1500, 1461, 1299, 1236, 1008, 835; EIMS *m/z* 463(M⁺); Anal. Calcd for C₂₅H₂₆ClN₅O₂: C, 64.72; H, 5.65; N, 15.09.; Found: C, 64.43; H, 5.44; N, 14.98.

1-(4-Chlorophenyl)-N-{3-cyano-4-[4-(dimethylamino)piperidin-1-yl]phenyl-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15b). By the reaction and treatment in the same manner as **12a** using **8f** and **7j**, the title compound was obtained. Mp.: 210–213°C; ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 1.49–1.62 (2H, m), 1.87 (2H, d, *J* = 12.5 Hz), 2.22 (6H, s), 2.49–2.50 (1H, m), 2.50 (3H, s), 2.77 (2H, t, *J* = 10.6 Hz), 3.45 (2H, d, *J* = 11.9 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.58 (2H, dd, *J* = 2.6, 9.2 Hz), 7.65 (2H, dd, *J* = 2.6, 9.2 Hz), 7.85 (1H, dd, *J* = 2.6, 9.2 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 8.30 (1H, s), 9.98 (1H, s); IR (KBr) 3370, 2946, 2221, 1666, 1587, 1554, 1500, 1465, 1396, 1236, 1093 cm⁻¹; EIMS *m/z* 462(M⁺), 417; Anal. Calcd for C₂₄H₂₇ClN₆O₂: C, 64.86; H, 5.88; N, 18.15.; Found: C, 64.29; H, 5.72; N, 17.80.

2-(1,4-Dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)-5-nitrobenzotrile (6-ii). To a mixed solution of **1,4-Dioxa-8-azaspiro[4,5]decane** (50 g) and Et₃N (58.8 g) in CH₃CN was added 2-chloro-5-nitrobenzotrile (**5-i**, 53.1 g) and the reaction mixture was stirred at a reflux temperature for 1 hour. After reaction completion, 480 mL of water was poured into the reaction mixture to give a yellow precipitate, which was separated by filtration and purified by recrystallization from MeOH to afford the title compound (71.7 g). Yield: 85%. Mp: 110 °C. ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.81 (4H, dd, *J* = 5.3, 5.9 Hz), 3.57 (4H, dd, *J* = 5.3, 5.9 Hz), 3.95 (4H, s), 7.26 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 8.25 (1H, dd, *J* = 2.6, 9.9 Hz), 8.48 (1H, d, *J* = 2.6 Hz). EIMS *m/z*: 289. IR(KBr) : 3068, 2971, 2933,

2881, 2225, 1600, 1579, 1508, 1461, 1344, 1236, 1045 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$: C, 58.13; H, 5.23; N, 14.53. Found: C, 58.05; H, 5.20; N, 14.56.

5-Amino-2-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)benzotrile (7m). $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (35.6 g) was dropped into a mixed solution of compound **6-ii** (71.7 g), activated charcoal (6.5 g), and anhydrous FeCl_3 (0.36 g) in MeOH (932 mL) with vigorous stirring at a reflux temperature and the reaction solution was stirred for 1 hour. After reaction completion, charcoal was separated by filtration at 60–65 °C and the filtration was concentrated in *vacuo* to give a yellow crystalline powder (47.5 g). Yield: 73.8%. Mp: 130–131 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.7–1.8 (4H, m), 2.9–3.0 (4H, m), 3.90 (4H, s), 5.12 (2H, br), 6.81 (1H, br), 6.95–6.98 (2H, m). EIMS m/z : 259. IR(KBr) ν : 3421, 3345, 2973, 2221, 1631, 1498, 1468, 1442, 1369, 1311, 1214, 1141, 1098 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 64.85; H, 6.61; N, 16.21. Found: C, 64.19; H, 6.60; N, 16.46.

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (16). By the reaction and treatment in the same manner as Y-320 using **8f** and **7b-i**, the title compound was obtained. Yield: 73%. Mp: 241 °C. $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.81 (4H, t, $J = 5.3$ Hz), 2.56 (3H, s), 3.18 (4H, t, $J = 5.3$ Hz), 3.93 (4H, s), 7.22 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 6.6$ Hz), 7.63 (2H, d, $J = 6.6$ Hz), 7.85 (1H, dd, $J = 2.6, 8.6$ Hz), 8.07 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.31 (1H, s), 9.98 (1H, brs). EIMS m/z : 477. IR(KBr) ν : 3317, 2963, 2926, 2219, 1650, 1558, 1498, 1463, 1400, 1365, 1299, 1087 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}_3$: C, 62.83; H, 5.06; N, 14.65. Found: C, 62.52; H, 5.18; N, 14.63.

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(4-oxopiperidin-1-yl)phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (17). A mixed solution of compound **16** (44.3 g), DMF (220 mL), THF (220 mL), and 6 mol/L of HCl (100 mL) was stirred at 80 °C for 9 hours. After reaction completion, 400 mL of water was poured into the reaction solution to give a precipitate, which was separated by filtration and purified by recrystallization from aqueous DMF to afford the title compound (33.8 g) as a pale green powder. Yield: 84%. Mp: 239 °C. $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, DMSO-d_6) δ : 2.49–2.52 (4H, m), 2.57 (3H, s), 3.44–3.48 (4H, m), 7.25 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.60 (2H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.62 (2H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.87 (1H, dd, $J = 2.6, 8.6$ Hz), 8.12 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 8.67 (1H, s), 10.01 (1H, brs). EIMS m/z : 433. IR(KBr) ν : 3340, 2836, 2225, 1714, 1660, 1587, 1556, 1527, 1498, 1407, 1398, 1234, 1207, 1093 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{ClN}_5\text{O}_2$: C, 63.67; H, 4.65;

N, 16.14. Found: C, 63.46; H, 4.80; N, 16.03

1-(4-Chlorophenyl)-N-{3-cyano-4-[4-(N-(2-hydroxyethyl)amino)piperidin-1-yl]-phenyl}-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide(15c). Compound **17** (2.8 g), 2-hydroxyethylamine (0.59 g), and NaBH₃CN (0.41 g) were added to a mixture of MeOH (30 mL) and DMF (30 mL) and stirred 3 hours at r.t. After the reaction completion, the reaction mixture was quenched with aq. NaOH and the organic layer was extracted with AcOEt and evaporated under reduced pressure. The residue was recrystallized from ethanol to give the title compound (1.62 g, 52%), M.p: 181°C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.35–1.5 (2H, m), 1.85–1.95 (2H, m), 2.5–2.6 (1H, m), 2.55 (3H, s), 2.63 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 2.81 (2H, t apparent, *J* = 11.2 Hz), 3.35–3.5 (4H, m), 4.47 (1H, t, *J* = 5.4 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.63 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.30 (1H, s), 9.98 (1H, s); IR (KBr): 3375, 2931, 2824, 2223, 1657, 1557, 1521, 1500 cm⁻¹; EIMS *m/e* 478 (M⁺), 417, 219. Anal. Calcd for C₂₅H₂₇ClN₆O₂•1/4H₂O: C, 62.11; H, 5.73; N, 17.38. Found: C, 62.04; H, 5.68; N, 17.16.

N-[4-[4-[Bis(2-methoxyethyl)amino]piperidino]-3-cyanophenyl]-1-(4-chlorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15d). By the reaction and treatment in the same manner as **15c** using **16** and bis(2-methoxyethyl)amine, the title compound was obtained. Mp 124 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.5–1.65 (2H, m), 1.75–1.85 (2H, m), 2.55 (3H, s), 2.55–2.65 (1H, m), 2.67 (4H, t, *J* = 6.8 Hz), 2.75 (2H, t apparent, *J* = 11.3 Hz), 3.25 (s, 6H), 3.34 (4H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.45–3.55 (2H, m), 7.18 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.60 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.64 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 2.5, 8.8 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.30 (1H, s), 9.99 (1H, s); IR (KBr) 3323, 2924, 2818, 2224, 1670, 1589, 1498 cm⁻¹; EIMS *m/e* 550 (M⁺), 505, 416, 390, 219. Anal. Calcd for C₂₉H₃₅ClN₆O₃•1/4H₂O: C, 62.69; H, 6.44; N, 15.13. Found: C, 62.79; H, 6.31; N, 15.07.

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15e, Y-320). To a suspension of **8f** (21.2 g) in toluene was poured SOCl₂ (7.0 mL) and the reaction mixture was stirred at 60 °C for 3 hours and the solvent was evaporated in vacuo to give the corresponding acid chloride as a residue. To this residue, **7k** (23 g) and 200 mL of pyridine were added and the reaction solution was stirred at 40 °C for 3 hours. After reaction completion, a K₂CO₃ solution was poured into the reaction mixture to give a yellow precipitate, which was separated by filtration and purified by recrystallization from an acetone-EtOH (1:1) mixed solution to give the

title compound (37 g) as a light yellow powder. Yield: 92%. Mp: 260 °C (decomposition). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.58 (2H, dddd, *J* = 3.4, 10.8, 11.0, 11.2 Hz), 1.90 (2H, d, *J* = 10.8 Hz), 2.29 (1H, tt, *J* = 3.7, 11.2 Hz), 2.47–2.51 (4H, m), 2.56 (3H, s), 2.77 (2H, dd, *J* = 11.0, 12.2 Hz), 3.47 (2H, d, *J* = 12.2 Hz), 3.59 (4H, m), 7.17 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.63 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.85 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.30 (1H, s), 9.94 (1H, brs). IR (KBr) ν: 3373, 2958, 2924, 2852, 2828, 2225, 1668, 1587, 1554, 1525, 1500, 1309, 879, 839 cm⁻¹. EIMS *m/z*: 505 (M⁺). Anal. Calcd for C₂₇H₂₉ClN₆O₂: C, 64.21; H, 5.79; N, 16.64. Found: C, 64.07; H, 5.76; N, 16.57.

N-[3-Cyano-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl]-1-(4-fluorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15f). By the reaction and treatment in the same manner as Y-320 using **8a** and **7k**, the title compound was obtained. Yield: 25%. Mp: 226 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.45–1.6 (2H, m), 1.8–1.95 (2H, m), 2.15–2.35 (1H, m), 2.35–2.5 (4H, m), 2.49 (3H, s), 2.65–2.8 (2H, m), 3.35–3.5 (2H, m), 3.5–3.65 (4H, m), 7.18 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.38 (2H, t, *J* = 8.8 Hz), 7.57 (2H, dd, *J* = 5.4, 8.8 Hz), 7.81 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.3 Hz), 8.03 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.25 (1H, s), 9.94 (1H, s). IR (KBr) ν: 3372, 2954, 2817, 2221, 1668, 1583, 1556, 1513 cm⁻¹. EIMS *m/e*: 487 (M⁺). Anal. Calcd for C₂₇H₂₉FN₆O₂•1/2H₂O: C, 65.18; H, 6.08; N, 16.89. Found: C, 65.38; H, 5.89; N, 16.69.

N-[3-Cyano-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl]-5-methyl-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxamide 1/5 hydrate (15g). By the reaction and treatment in the same manner as Y-320 using **8e** and **7k**, the title compound was obtained. Yield: 18%. Mp: 223 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.52 (2H, dd, *J* = 11.2, 11.7 Hz), 1.85 (2H, d, *J* = 11.2 Hz), 2.06–2.13 (1H, m), 2.45–2.62 (4H, m), 2.62 (3H, s), 2.71 (2H, t, *J* = 11.7 Hz), 3.42 (2H, d, *J* = 11.7 Hz), 3.52–3.54 (4H, m), 7.13 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.44–7.54 (5H, m), 7.80 (1H, dd, *J* = 2.5, 9.3 Hz), 8.18 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.24 (1H, s), 9.92 (1H, s). EIMS *m/z*: 469 (M⁺). IR (KBr) ν: 3374, 2954, 2813, 2219, 1666, 1585, 1554, 1527, 1502, 1454, 1400, 1311, 1270, 1222, 1141, 1085 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₇H₃₀N₆O₂•1/5H₂O: C, 68.39; H, 6.46; N, 17.72. Found: C, 68.49; H, 6.50; N, 17.59.

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(4-piperazinopiperidino)phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15h). By the reaction and treatment in the same manner as compound **15c** using compound **17** and *N-tert*-butylcarbonyl(Boc)piperidine (Sigma-Aldrich), and deprotected by TFA, the title compound was obtained. Yield: 20%.

M.p.: 226 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.5–1.65 (2H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.25–2.35 (1H, m), 2.4–2.5 (4H, m), 2.56 (3H, s), 2.65–2.8 (6H, m), 3.4–3.5 (2H, m), 7.18 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.64 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.30 (1H, s), 9.98 (s, 1H); IR (KBr) 3369, 2943, 2818, 2224, 1666, 1527, 1500 cm⁻¹; EIMS *m/e* 503 (M⁺), 417, 219. Anal. Calcd for C₂₇H₃₀ClN₇O•1/2H₂O: C, 63.21; H, 6.09; N, 19.11. Found: C, 63.12; H, 5.94; N, 18.99.

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidino]phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15i). By the reaction and treatment in the same manner as compound **15c** using compound **17** and N-methylpiperidine (Sigma-Aldrich), the title compound was obtained. Yield: 23%. Mp: 240 °C (decomposition). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.5–1.65 (2H, m), 1.85–1.95 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.25–2.4 (5H, m), 2.45–2.6 (4H, m), 2.56 (3H, s), 2.7–2.85 (2H, m), 3.4–3.5 (2H, m), 7.18 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.60 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.64 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.3 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.30 (1H, s), 9.99 (1H, s). IR (KBr) *v*: 3377, 2937, 2807, 2221, 1668, 1587, 1554, 1527, 1498 cm⁻¹. EIMS *m/e*: 517 (M⁺). Anal. Calcd for C₂₈H₃₂ClN₇O•1/4H₂O: C, 64.36; H, 6.27; N, 18.76. Found: C, 64.44; H, 6.33; N, 18.68.

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(4-piperidinopiperidin-1-yl)phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15j). By the reaction and treatment in the same manner as **15c** using compound **17** and piperidine (Sigma-Aldrich), the title compound was obtained. Yield: 18%. Mp: 252 °C (decomposition). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.35–1.7 (8H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.3–2.4 (1H, m), 2.45–2.55 (4H, m), 2.56 (3H, s), 2.75 (2H, t apparent, *J* = 11.7 Hz), 3.4–3.5 (2H, m), 7.18 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.60 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.64 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 2.5, 9.3 Hz), 8.06 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.30 (1H, s), 9.98 (1H, s). IR (KBr) *v*: 3369, 2939, 2804, 2224, 1668, 1583, 1554, 1525, 1500 cm⁻¹. EIMS *m/e*: 501 (M⁺). Anal. Calcd for C₂₈H₃₁ClN₆O: C, 66.85; H, 6.21; N, 16.71. Found: C, 66.76; H, 6.27; N, 16.65

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(4-thiomorpholinopiperidino)phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15k). By the reaction and treatment in the same manner as **15c** using compound **17** and thiomorpholine (Sigma-Aldrich), the title compound was obtained.

mp 256 °C dec; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.6–1.75 (m, 2H), 1.75–1.85 (m, 2H), 2.4–2.55 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.6–2.65 (m, 4H), 2.7–2.9 (m, 6H), 3.4–3.55 (m, 2H),

7.18 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.84 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 9.99 (s, 1H); IR (KBr) 3369, 2934, 2814, 2227, 1667, 1527, 1500 cm^{-1} ; EIMS m/e 520 (M^+), 417, 219. Anal. Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClN}_6\text{OS}$: C, 62.23; H, 5.61; N, 16.13. Found: C, 62.01; H, 5.58; N, 15.98.

5-Nitro-2-piperazinobenzonitrile (6c). To a solution of anhydrous piperazine (Singa-Aldrich 49.5 g) in CH_3CN (100 mL), was added compound **5-i** and the reaction solution was stirred at 60 °C for 1 hour. A K_2CO_3 solution was poured into the reaction mixture and the organic layer was extracted with CHCl_3 , washed with brine. After drying with anhydrous Na_2SO_4 , the organic layer was concentrated *in vacuo* to a residue, which was purified by recrystallization from a mixed solution of AcOEt-n -hexane to give the title compound (35 g) as a yellow powder. Yield: 92%. Mp: 76 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 2.86 (4H, t, $J = 4.9$ Hz), 3.43 (4H, t, $J = 4.9$ Hz), 7.23 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 8.26 (1H, dd, $J = 2.4, 9.8$ Hz), 8.51 (1H, d, $J = 2.4$ Hz).

5-Nitro-2-[4-(3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-yl)piperazin-4-yl]benzonitrile(6c').

To a mixed solution of compound **6c** (23.2 g) and 2,3,5,6-tetrahydropyran-4-one (Sigma-Aldrich, 10 g) in toluene, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (26.6 g) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. After reaction completion, the reaction mixture was poured into a NaHCO_3 solution and the organic layer was extracted with CHCl_3 , washed with brine. After drying with anhydrous Na_2SO_4 , the extract was concentrated *in vacuo* to give the title compound (24.5 g) as a yellow oil. Yield: 86%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.38–1.48 (2H, m), 1.74 (2H, d, $J = 10.7$ Hz), 2.42–2.50 (1H, m), 2.66–2.72 (4H, m), 3.29–3.33 (2H, m), 3.49–3.52 (4H, m), 3.90 (2H, d, $J = 10.2$ Hz), 7.25 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 8.30 (1H, dd, $J = 2.0, 9.3$ Hz), 8.51 (1H, d, $J = 2.0$ Hz). EIMS m/z : 232 [M^+]

5-Amino-2-[4-(3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-yl)piperazin-1-yl]benzonitrile(7n).

By the reaction and treatment in the same manner as compound **7k** using compound **6c'**, the title compound was obtained. Yield: 16%. Mp: 162 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.39–1.43 (2H, m), 1.71 (2H, d, $J = 11.7$ Hz), 2.38–2.50 (1H, m), 2.52–2.63 (4H, brs), 2.86–2.97 (4H, brs), 3.28 (2H, dd, $J = 11.2, 11.7$ Hz), 3.88 (2H, d, $J = 9.7$ Hz), 5.19 (2H, brs), 6.81 (2H, brs), 6.92–6.94 (1H, m). EIMS m/z : 286 [M^+].

1-(4-Chlorophenyl)-N-{3-cyano-4-[4-(3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-4-yl)piperazin-1-yl]phenyl}-5-methylpyrazole-4-carboxamide (15l). By the reaction and treatment in

the same manner as compound **Y-320** using **8f** acid and compound **7n**, the title compound was obtained. Yield: 43%. Mp: 276 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.44 (2H, ddd, *J* = 4.0, 11.7, 12.2 Hz), 1.75 (2H, d, *J* = 12.2 Hz), 2.41–2.49 (1H, m), 2.56 (3H, s), 2.66–2.69 (4H, m), 3.07–3.12 (4H, m), 3.27–3.36 (2H, m), 3.90 (2H, d, *J* = 10.7 Hz), 7.19 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.59–7.65 (4H, m), 7.86 (1H, dd, *J* = 2.5, 8.8 Hz), 8.08 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.31 (1H, s), 10.00 (1H, s). EIMS *m/z*: 505[M+H]⁺. IR (KBr) *v*: 3377, 2957, 2227, 1666, 1527, 1500, 1311, 1234 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₈H₂₉ClN₆O₂: C, 64.21, H, 5.79; N, 16.64. Found: C, 64.12, H, 5.84, N, 16.71.

N-[3-Bromo-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl]-1-(4-chlorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15m). By the reaction and treatment in the same manner as **Y-320** using **8f** and **7a-ii**, the title compound was obtained. Yield: 55 %. Mp: 205–210 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.5–1.7 (2H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.2–2.3 (1H, m), 2.5–2.55 (4H, m), 2.55 (3H, s), 2.55–2.65 (2H, m), 3.2–3.4 (2H, m), 3.55–3.65 (4H, m), 7.15 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.5 - 7.7 (5H, m), 8.06 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.31 (1H, s), 9.88 (1H, s). EIMS *m/z*: 558 (M⁺). IR (KBr) *v*: 3299, 2951, 2851, 2812, 1665, 1582, 1549 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₆H₂₉BrClN₅O₂ · 1/2H₂O: C, 54.99; H, 5.32; N, 12.33. Found: C, 54.74; H, 5.15; N, 12.13.

1-(4-Chlorophenyl)-5-methyl-N-[4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)-3-nitrophenyl]-1H-pyrazole-4-carboxamide (15n).

- (1) **N-(4-Chloro-3-nitrophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (9i)**. By the reaction and treatment in the same manner as **Y-320** using **8f** and 4-chloro-5-nitroaniline (Sigma-Aldrich), the title compound was obtained. Yield: 88 %. Mp: 221–225 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.57 (3H, s), 7.61 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.65 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.76 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 8.02 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.37 (1H, s), 8.56 (1H, s), 10.39 (1H, s, NH).
- (2) To a solution of compound **9i** (1.6 g) in DMSO (20 mL) was added 4-morpholinopiperidine (**4a**, 2.4 g) and the reaction mixture was stirred at 110 °C for 1.5 hours. After reaction completion, a small amount of water was poured into the reaction mixture and the organic layer was extracted with CHCl₃ and concentrated in vacuo to give a residue, which was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃ : MeOH = 100 : 1 to 25 : 1) to give the title compound as a brown powder. Yield: 33%. Mp: 195–200 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.45–1.55 (2H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.25–2.35 (1H, m), 2.5–2.55 (4H, m), 2.56 (3H, s), 2.7–2.8 (2H, m), 3.15–3.2 (2H, m), 3.55–3.60 (4H, m), 7.35 (1H, d, *J* = 9.3 Hz),

7.60 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.64 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.88 (1H, dd, J = 1.9, 9.3 Hz), 8.30 (1H, d, J = 1.9 Hz), 8.33 (1H, s), 10.09 (1H, s). FAB⁽⁺⁾MS m/z: 525 (M+H). IR (KBr) ν : 3399, 3084, 2953, 2812, 1671, 1582, 1501 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₆H₂₉ClN₆O₄ · 1H₂O: C, 59.48; H, 5.57; N, 16.01. Found: C, 59.07; H, 5.58; N, 15.94.

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-ethynyl-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15o). A mixed solution of compound **15m** (1 g), bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (380 mg), CuI (56 mg), and trimethylsilylacetylene (0.53 g) in piperidine (50 mL) were stirred 60 °C for 15 hours. After reaction completion, the reaction mixture was concentrated in vacuo to give a residue, which was purified by silica gel column chromatography (Et₂O : MeOH = 100 : 1 to 25 : 1) to give the intermediate having a trimethylsilylethynyl group as brown oil. Yield: 16%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.26 (9H, s), 1.5–1.6 (2H, m), 1.7–1.8 (2H, m), 1.9–2.1 (2H, m), 2.6–2.7 (9H, m), 3.7–3.8 (4H, m), 6.87 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.38 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.45 - 7.55 (3H, m), 7.63 (1H, s), 7.65 (1H, d, J = 2.5 Hz), 7.91 (1H, s). To a solution of the intermediate (170 mg) obtained above in MeOH was added K₂CO₃ (170 mg) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. After reaction completion, a solid precipitate was removed by filtration and the filtrate was concentrated in vacuo to give a residue, which was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH=100:1 to 25:1) to afford the title compound as a yellow solid. Yield: 19%. Mp: 203–205 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.5–1.6 (2H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.2–2.3 (1H, m), 2.5–2.55 (4H, m), 2.55 (3H, s), 2.5–2.6 (2H, m), 3.5–3.6 (6H, m), 4.37 (1H, s), 6.98 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.5–7.65 (5H, m), 7.81 (1H, d, J = 2.5 Hz), 8.30 (1H, s), 9.78 (1H, s). EIMS m/z: 503 (M⁺). IR (KBr) ν : 3487, 3437, 3266, 3092, 2957, 2939, 2850, 2815, 1672, 1588, 1578, 1557, 1520, 1497 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₈H₃₀ClN₅O₂ · 1/2H₂O: C, 63.98; H, 6.21; N, 13.32. Found: C, 63.68; H, 5.99; N, 13.01.

1-(4-Chlorophenyl)-5-methyl-N-[3-methyl-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxamide (15p).

(1) **3-Methyl-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)aniline (7a-iii).** By the reaction and treatment in the same manner as 5a-i using 1-chloro-2-methyl-4-nitrobenzene (Sigma-Aldrich) and 4-morpholinopiperidine, the adduct 5a-iii was obtained which was used in the next reduction step in the same way as 6a-i without further purification and afforded the title compound as a reddish precipitate. Yield: 23%

from **5a-iii**. Mp: 199–200 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.4–1.6 (2H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.1 (3H, s), 2.5–2.6 (6H, m), 2.8–2.9 (2H, m), 3.5–3.6 (4H, m), 4.61 (2H, s), 6.33 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.38 (1H, s), 6.73 (1H, d, J = 8.3 Hz)

(2) By the reaction and treatment in the same manner as **Y-320** using **8f** and **7a-iii**, the title compound was obtained. Yield: 51%. Mp: 235–245 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.5–1.6 (2H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.24 (3H, s), 2.4–2.6 (9H, m), 2.55 (3H, s), 3.0–3.1 (2H, m), 3.5–3.6 (4H, m), 6.98 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.4–7.5 (2H, m), 7.59 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.63 (2H, d, J = 8.8 Hz), 8.31 (1H, s), 9.68 (1H, s). FAB(+)MS m/z: 494 (M+H). IR (KBr) ν: 3322, 2949, 2851, 2814, 1663, 1591, 1555, 1551 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₇H₃₂ClN₅O₂ · 1/2H₂O: C, 64.35; H, 6.61; N, 13.92. Found: C, 64.60; H, 6.56; N, 14.31.

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl]-3-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15q). By the reaction and treatment in the same manner as **Y-320** using **8m** and **6a-i**, the title compound was obtained. Yield: 88%. Mp: 286 °C (decomposition). ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.52–1.63 (2H, m), 1.89–1.93 (2H, m), 2.24–2.34 (1H, m), 2.49–2.51 (4H, m), 2.74–2.78 (2H, m), 3.44–3.49 (2H, m), 3.57–3.60 (4H, m), 7.19 (1H, d, J = 9.2 Hz), 7.61 (2H, d, J = 9.2 Hz), 7.77 (1H, dd, J = 2.6, 9.2 Hz), 7.81 (2H, d, J = 9.2 Hz), 8.04 (1H, d, J = 2.6 Hz), 9.03 (1H, s), 9.98 (1H, s). EIMS m/z: 504. IR(KBr) ν: 3330, 2225, 1675, 1550, 1531, 1500, 1255 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₇H₂₉ClN₆O₂: C, 64.21; H, 5.79; N, 16.64. Found: C, 64.10; H, 5.80; N, 16.44

1-(4-Chlorophenyl)-N-[3-cyano-4-(4-morpholinopiperidino)phenyl]-N-methyl-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide hydrochloride (15r). To a DMF (5 ml) solution containing **Y-320 (15e)**, 1.5 g) was added sodium hydride (60% content, 0.2 g) under ice-cooling and the mixture was stirred for 1 h. Methyl iodide (0.6 g) in DMF (1 ml) was added and the mixture was stirred under ice-cooling for 1 h. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. The reaction mixture was added into water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated brine and dried over anhydrous magnesium sulfate, after which the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (mobile phase: ethyl acetate:n-hexane = 5:1) and treated with a HCl/MeOH solution to give the title compound (0.5 g). Mp 195 °C ; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.75–7.95 (2H, m), 2.2–2.3 (2H, m), 2.43 (3H, s), 2.8–2.9 (2H, m), 3.05–3.15 (2H, m), 3.3–3.45 (1H, m), 3.31 (3H, s), 3.45–3.55 (2H, m), 3.6–3.7 (2H, m), 3.35–3.4 (2H, m), 3.95–4.05 (2H, m), 6.86 (1H, s), 7.18 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.45–7.55

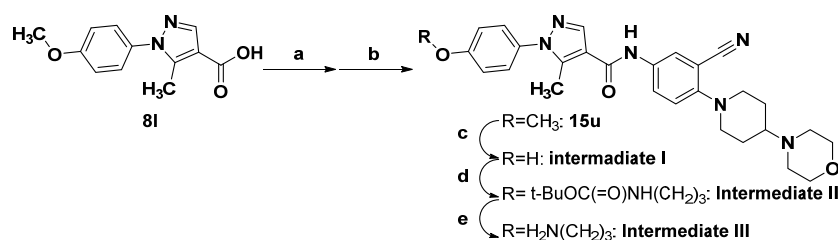
(3H, m), 7.59 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.78 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 10.87 (1H, br); IR (KBr) 3425, 2932, 2461, 2222, 1626, 1556, 1500 cm^{-1} ; EIMS m/e 518(M⁺), 431, 219. Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_6\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 59.57; H, 5.89; N, 14.89. Found: C, 59.27; H, 5.76; N, 14.82.

N-[1-(4-Chlorophenyl)-5-methylpyrazol-4-ylmethyl]-3-cyano-4-(4-morpholinopiperidino)aniline (15s). Compound **8f** (6.0 g) and 1M of $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (3.8 g) was stirred for 1 hr at r.t. After reaction completion, the reaction mixture was quenched with 2 mol/L of NaOH and the organic layer was extracted with AcOEt and concentrated in *vacuo* to give [1-(4-chlorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl]methanol (4.3 g), which was oxidized by MnO_2 (20 g) in CH_2Cl_2 (200 mL) to afford 1-(4-chlorophenyl)-5-methyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde (1.36 g). A reductive amination reaction of this aldehyde (1.20 g) and **7l** by NaBH_3CN (0.34 g) in EtOH (20 mL) followed recrystallization from aq. DMF gave the title compound (1.36 g, 51%). Mp 204 °C ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.45–1.6 (2H, m), 1.8–1.9 (2H, m), 2.15–2.25 (1H, m), 2.32 (3H, s), 2.4–2.55 (4H, m), 2.64 (2H, t apparent, $J = 11.7$ Hz), 3.15–3.25 (2H, m), 3.5–3.65 (4H, m), 4.06 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 5.97 (1H, t, $J = 5.4$ Hz), 6.85–6.95 (2H, m), 7.01 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.54 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.58 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.64 (s, 1H); IR (KBr) 3379, 2953, 2812, 2224, 1610, 1566, 1502 cm^{-1} ; EIMS m/e 490(M⁺), 403, 285, 205. Anal. Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{ClN}_6\text{O}$: C, 66.04; H, 6.36; N, 17.12. Found: C, 65.96; H, 6.17; N, 17.16.

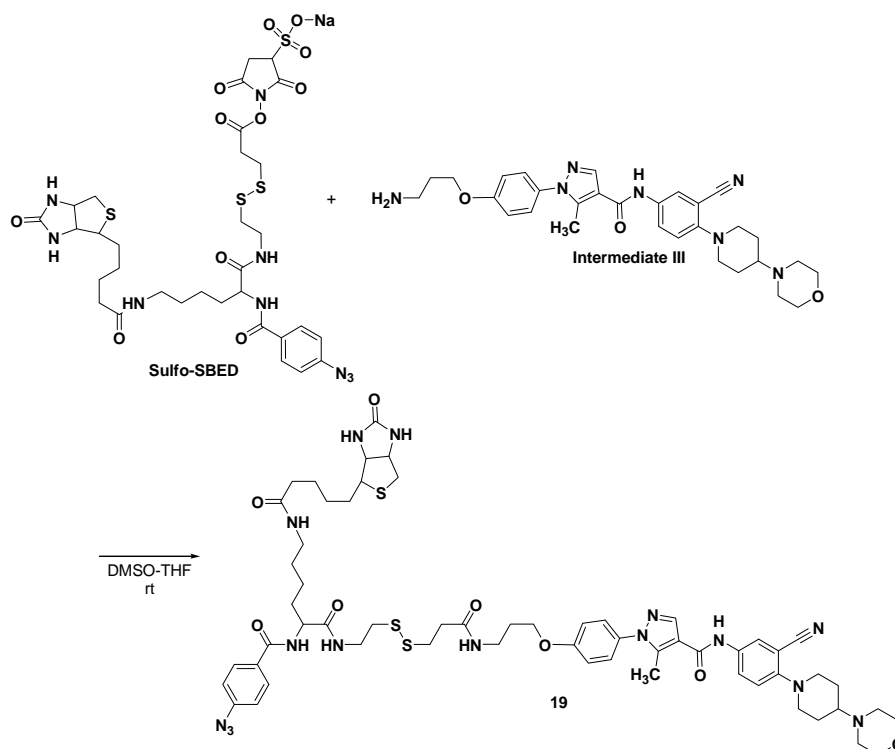
N-[1-(4-Chlorophenyl)-5-methylpyrazol-4-ylmethyl]-3-cyano-N-methyl-4-(4-morpholinopiperidino)aniline dihydrochloride (15t). By the reaction and treatment in the same manner as **15r** using **15s**, the title compound was obtained (60%).

Mp: 200–205 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.8–1.95 (2H, m), 2.15–2.25 (2H, m), 2.27 (3H, s), 2.65–2.8 (2H, m), 2.94 (3H, s), 3.0–3.15 (2H, m), 3.2–3.35 (1H, m), 3.4–3.6 (2H, m), 3.8–4.05 (m, 4H), 4.44 (2H, s), 7.15 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.2–7.4 (2H, m), 7.47 (1H, s), 7.51 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.57 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 11.07 (1H, brs); IR (KBr) 3423, 2930, 2600, 2459, 2224, 1612, 1502 cm^{-1} ; EIMS m/e 504(M⁺), 417, 299, 205. Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{ClN}_6\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 57.29; H, 6.18; N, 14.32. Found: C, 57.55; H, 6.05; N, 14.43.

Synthetic Procedures & Data of Compounds in Section 1 of Chapter 3



Scheme 9. Synthetic route for **Intermediate I–III**. Reagents and conditions: (a) SOCl_2 / toluene, 65 °C; (b) **7k**/ NMP, 40 °C; (c) BBR_3 / CH_2Cl_2 , 0 °C to rt; (d) tert-butyl N-(3-bromopropyl)carbamate, K_2CO_3 / DMF, 60 °C; (e) TFA/ CH_2Cl_2 , rt.



Scheme 10. Synthetic route for biotin derivative **19** for photocrosslinkage assay

(1) **N-[3-Cyano-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (15u)**. By the reaction and treatment in the same manner as **Y-320** using **8I** and **7k**, the title compound was obtained. Mp 238 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.52–1.62 (2H, m), 1.90 (2H, d, $J = 11.8$ Hz), 2.25–2.32 (1H, m), 2.48–2.50 (4H, m), 2.49 (3H, s), 2.76 (2H, t, $J = 11.2$ Hz), 3.46 (2H, d, $J = 11.8$ Hz), 3.57–3.59 (4H, m), 3.83 (3H, s), 7.09 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.17 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.44 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.84 (1H, dd, $J = 2.5, 8.8$ Hz), 8.07

(1H, d, $J = 2.5$ Hz), 8.25 (1H, s), 9.94 (1H, s); EIMS m/z : 500. IR (KBr): 3373, 2959, 2226, 1666, 1518, 1504, 1309, 1251, 1116 cm^{-1} . Anal. Calcd. For $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_3$: C, 67.18; H, 6.44; N, 16.79; Found: C, 67.04; H, 6.41; N, 16.71.

(2) **1-(3-Aminopropoxyphenyl)-N-[3-cyano-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)-phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (Intermediate III)**. To **15u** (4 g, 8.0 mmol) in CH_2Cl_2 (100 mL) was dropped 1 mol/L of BBr_3 (32 mL, 8.0 x 4 mmol) at 0°C and stirred for 20 hours. The reaction solution was poured into a NaHCO_3 solution and the organic layer was extracted with CHCl_3 and dried with MgSO_4 and concentrated in *vacuo* to give **intermediate I** (3.54 g), which was used in the next step without further purification. To **intermediate I** in DMF (40 mL) was added N-Boc-3-bromopropylamine (2.5 g, from Sigma Aldrich) and K_2CO_3 (4 g) and stirred 4 hours at 60°C . The reaction mixture was quenched with water and the organic layer was extracted with AcOEt and dried anhydrous MgSO_4 and concentrated in *vacuo* to afford N-BOC **intermediate II** (2.28 g) which was treated with $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (20 mL) in CH_2Cl_2 (20 mL) and stirred for 6 hours. The reaction solution was quenched with 1N NaOH and the organic layer was extracted with CHCl_3 and dried with anhydrous MgSO_4 and then concentrated in *vacuo* to give the residue which was recrystallized from AcOEt to give **intermediate III** (0.72 g). Mp: 238°C . $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.57 (2H, ddd, $J = 3.0, 8.9, 11.5$ Hz), 1.81 (2H, q, $J = 6.4$ Hz), 1.90 (2H, d, $J = 11.4$ Hz), 2.26–2.32 (1H, m), 2.49 (3H, s), 2.49–2.51 (4H, m), 2.71 (2H, dd, $J = 6.4, 8.5$ Hz), 3.46 (2H, d, $J = 11.4$ Hz), 3.58 (4H, dd, $J = 4.0, 4.5$ Hz), 4.10 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 7.08 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 9.1$ Hz), 7.42 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.84 (1H, dd, $J = 2.4, 9.1$ Hz), 8.07 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.24 (1H, s), 9.95 (1H, s). m/z 544 (M+H). IR (neat): 2939, 2224, 1665, 1517, 1504 cm^{-1} . Anal. Calcd. For $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_3 \cdot 1/5\text{H}_2\text{O}$: C, 65.84; H, 6.89; N, 17.92. Found: C, 65.75; H, 6.89; N, 17.68.

(3) **1-(4-{3-[3-(2-{2-(4-Azidobenzoylamino)-6-[5-(2-oxohexahydrothieno[3,4-d]-imidazol-4-yl)pentanoylamino]hexanoylamino}ethyl)disulfanyl]propionyl-amino}propoxy}phenyl)-N-[3-cyano-4-(4-morpholinopiperidin-1-yl)phenyl]-5-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (18)**. A mixed solution of **Intermediate III** (31 mg, 0.06 mmol) and Sulfo-SBED[®] (50 mg, 0.06 mmol, IERCE) in THF-DMSO (1 : 1, 4 mL) was stirred at r.t. for 12 hours. The reaction solution was quenched with water and the organic layer was extracted with AcOEt and dried with anhydrous MgSO_4 and concentrated in *vacuo* to give a residue, which was

recrystallized from aq. DMSO-Acetone solution to give the title compound. Mp: 132-135 °C. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.23-1.50 (11H, m), 1.55-1.64 (3H, m), 1.65-1.78 (2H, m), 1.88 (2H, q, *J* = 6.5 Hz), 1.89 (2H, d, *J* = 12.5 Hz), 2.01 (2H, dd, *J* = 6.8, 7.5 Hz), 2.26-2.34 (1H, m), 2.46-2.50 (5H, m), 2.54 (3H, s), 2.58 (1H, d, *J* = 12.5 Hz), 2.76-2.81 (4H, m), 2.81 (1H, d, 5.0 Hz), 2.90 (2H, dd, *J* = 7.0, 7.1 Hz), 2.97-3.03 (2H, m), 3.04-3.08 (1H, m), 3.23 (2H, dd, *J* = 6.5, 12.5 Hz), 3.35-3.42 (1H, m), 3.47 (2H, d, *J* = 11.8 Hz), 3.58-3.62 (4H, m), 4.05 (2H, dd, *J* = 6.1, 6.5 Hz), 4.08-4.13 (1H, m), 4.28-4.32 (1H, m), 4.33-4.39 (1H, m), 6.34 (1H, s), 6.40 (1H, s), 7.06 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 7.19 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.42 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.73 (1H, t, *J* = 5.6 Hz), 7.84 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.1 Hz), 7.95 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.05 (1H, t, *J* = 5.6 Hz), 8.07 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.14 (1H, t, *J* = 5.6 Hz), 8.24 (1H, s), 8.40 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 9.94 (1H, s). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.4, 23.1, 25.2, 27.9, 28.1, 28.7, 28.8, 31.2, 33.9, 34.9, 35.1, 35.4, 37.0, 37.9, 38.1, 40.3, 49.4, 51.2, 53.4, 55.3, 59.1, 60.5, 60.9, 65.5, 66.5, 104.8, 114.7, 114.8, 118.6, 120.0, 124.6, 125.9, 126.7, 129.4, 130.5, 131.4, 133.4, 138.7, 142.2, 142.4, 151.3, 158.3, 161.5, 162.6, 165.3, 169.9, 171.8, 171.9. *m/z* 1206 (M+H); IR (neat): 3280, 2923, 2219, 2123, 1642, 1512, 1496 cm⁻¹. Anal. Calcd. For C₅₈H₇₅N₁₅O₈S₃·1C₃H₆O·3/2H₂O: C, 55.94; H, 6.64; N, 16.04. Found: C, 55.87; H, 6.63; N, 15.74.

Pharmacology

Animals

Inbred strains of male DBA/1J mice and F344/DuCrj rats were purchased from Charles River Japan (Atsugi, Kanagawa, Japan) and were used at 6 to 8 weeks of age. Female cynomolgus monkeys were used at 3 to 5 years old of ages in the experiments (Sin-Nippon Kagaku Co., Kagoshima, Japan). All animal experiments were performed under an experimental protocol approved the ethics review committee for animal experimentation of Research Division, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation.

Proliferation of rat T cells stimulated with PMA + Ca ionophore

Splenic T cells (2.5×10^5 cells/well) from F344 rats were stimulated with 10 ng/mL PMA and 100 ng/mL A23187 in the presence or absence of test compounds using RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) and 5×10^{-5} M of 2-mercaptoethanol (2-ME) in 96-well microtest plates. After culturing for 44 h, the cells were pulsed with 18.5 kBq/well [methyl- ^3H]thymidine (^3H TdR, Amersham Pharmacia Biotec) for an additional 4 h. Radioactivity incorporated into the cells was determined by scintillation counter (1450 MicroBetaSystem).

IL-17 Production by CD4 T Cells Stimulated with IL-15

Splenic or lymph node CD4 T cells (>95%) from DBA/1J mice were purified by passing through mouse CD4 subset enrichment columns (R&D Systems) and cultured in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co.) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco BRL), 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin G, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin sulfonate, and 50 μM 2-mercaptoethanol (10%FCS-RPMI 1640 medium). Murine CD4 T cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with 100 ng/mL of recombinant mouse (rm)-IL-15 (Research Diagnostics Inc.), 1000 ng/ml of rm-CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12, R&D Systems), and hamster anti-mouse CD3 ϵ monoclonal antibody (mAb) (clone: 145-2C11, BD Biosciences, plate-precoated at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 10% FCS-RPMI1640 medium in the presence or absence of Y-320 and cultured for 48 h at 37 °C in 5% CO₂. In other experiments, human CD4 T cells (5×10^5 cells/well) prepared from peripheral blood of healthy volunteers were stimulated with recombinant human (rh) IL-15 (Genzyme/Techne) for 48 h. After the culture, the amounts of IL-17 in the culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for mouse or human IL-17 (Genzyme/Techne).

Generation of Th1 and Th17 Cells *in Vitro*

Murine splenic CD4 T cells (10^6 cells) were stimulated with anti-CD3 mAb (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and anti-CD28 mAb (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, clone: 37.51, eBiosciences) in 10%FCS-RPMI 1640 medium for 48 h under Th17 condition: rm-IL-6 (20 ng/mL, Peprotech), rm-transforming growth factor (TGF)- β 1 (10 ng/mL, Peprotech), anti-mouse interferon (IFN)- γ mAb (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, clone: RMMG-1, Biosource), and rat anti-mouse IL-4 mAb ((20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, clone: 11B11, Biosource)^{41,42}). Then the cells were added rm-IL-23 (5 ng/mL, R&D systems) and cultured for additional 96 h. Proportions of Th1/Th17 cells were analyzed by intracellular cytokine staining using anti-mouse IFN- γ and IL-17 mAbs according to the method as described previously^{43,44}. The recovered cells (2.5×10^4 cells) were re-stimulated with anti-CD3 mAb plus anti-CD28 mAb for 24 h and IL-17 in the supernatants were determined by ELISA.

Phosphorylation of Janus Kinase (JAK) 1 and JAK3 by IL-15

Mouse splenic CD4 T cells (5×10^6 cells) were stimulated with rm-IL-15, rm-CXCL12 and anti-mouse CD3 mAb as described above in 10% FCS-RPMI1640 medium in the presence or absence of Y-320 and cultured for 48 h. After the culture, the cells were lysed with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 50 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.1% Triton X-100. The cell lysates were immunoprecipitated with rabbit anti-JAK1 polyclonal antibody (pAb) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) or rabbit anti-JAK3 antiserum (Upstate Biotechnology) with protein A-agarose for 2 h at 4 °C^{45,46}. Then the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE. After transfer to PVDF membrane filters (Amersham Pharmacia Biotech), immunoblotting of phosphorylated-JAK1 (p-JAK1) and p-JAK3 was performed with enhanced chemiluminescence using anti-mouse phosphotyrosine mAb (clone: 4G10, Upstate Biotechnology), horse radish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Immunoblotting of JAK1 and JAK3 was performed using anti-JAK1 pAb and rabbit anti-JAK3 antiserum, respectively.

CIA in DBA/1J Mice

CIA was induced by immunization with the 200 μg bovine type II collagen (Collagen Research Center) and Freund's complete adjuvant by injecting subcutaneously into the tail base of DBA/1J mice, followed by a booster injection after 21 days⁴⁷⁻⁴⁹. In other experiments, chronic-progressing CIA was induced by a single

immunization with 200 µg bovine type II collagen and Freund's complete adjuvant. Y-320 was suspended in 0.5% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC, Shinetsu Chemical Co.) solution and administered orally. Anti-murine TNF- α mAb (clone: TN3-19.12, BD Biosciences)⁵⁰⁻⁵² diluted with saline was administered intravenously. Arthritis scores were evaluated according to the following criteria. Score 0, no change; score 1, edema at one joint; score 2, edema at two or more joints, or mild edema throughout the limbs; score 3, severe edema throughout the limbs; score 4, severe edema throughout the limbs and ankylosis⁴⁷⁻⁴⁹). The total paw thickness in four limbs was measured by using a digital caliper. On the next day of final administration, soft X-ray photos of the limbs were taken and joint destruction was evaluated under microscope according to the following criteria. Score 0, no change, score 1; one or more joint destructions in a finger; score 2, the morphological change of joint area in a finger. The titers of anti-type II collagen IgG1 in the plasma were determined by ELISA using bovine type II collagen and HRP-conjugated anti-mouse IgG1.

CIA in Cynomolgus Monkeys

CIA was induced by immunization with the 1 mg bovine type II collagen (Collagen Research Center) and Freund's complete adjuvant by intradermal injection into the back skin of cynomolgus monkeys three times with 3-week interval^{53,54}. At 3-week after the final immunization, CIA-established monkeys were selected and Y-320 suspended in 0.5% HPMC solution was administered orally. The paw thickness in each limb was measured by using a digital caliper and total paw thickness was calculated by the sum of those in four limbs.

Real Time Polymerase Chain Reaction

Arthritic paw joints of CIA mice was removed and total RNA was extracted using TRIZOL (Invitrogen) and a tow-step quantitative revers transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to determine various molecules mRNA expression using a relative standard curve method with cellular housekeeping enzyme (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) as normalization con-trol. Complementary DNA was synthesized with TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) using random hexamers and 0.5 µg of total RNA. Complementary DNA was amplified with various molecules TaqMan probe (6-carboxyfluorecein label)/primer, cellular housekeeping enzyme TaqMan probe (VIC label)/primer, and TaqMan Universal PCR Master Mix in an ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). For analyses of mRNA

expressions in mouse knee joints, following TaqMan probes/primers were used: IL-17 (Mm00439619_m1), IL-6 (Mm00446190_m1), TNF- α (Mm00443258_m1), and CCL2 (Mm00441242_m1). GAPDH TaqMan probe/primer was used as normalization control. For quantification, standard curves were generated for various molecules using serially diluted cDNA samples from the joints of CIA mice. For every sample, a level of mRNA normalized by calculating the ratio of each target molecule/GAPDH level.

Statistical Analysis

Results were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical differences were calculated by Student's t-test or Dunnett's multiple comparison test. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$.

Pharmacokinetics

Male SD(IGS) rats, male cynomolgus monkeys and male DBA/1J mice were used. After single oral or intravenous administration of test compounds, the unchanged test compounds in the plasma in rats, monkeys, and mice were extracted with a solvent (CHCl_3) and were determined by LC/MS/MS (limit of quantitation: 0.2 ng/mL).

Single administration of Y-320 to rats

After single oral administration of Y-320 (0.3, 1 and 3 mg/kg) to rats, the plasma concentration of the unchanged drug reached the maximal level (C_{max}) at 0.8 – 1.0 h. In the dose range of 0.3 - 3 mg/kg, the C_{max} and $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ showed an approximately linear relationship with the dose. The bioavailability (F value) of Y-320 was 37.8 – 40.5%

Single oral administration of Y-320 to monkeys

After single oral administration of Y-320 (0.3, 1 and 3 mg/kg) to monkeys, the plasma concentration of the unchanged drug reached the C_{max} at 1.5 – 2.5 h. In the dose range of 0.3 - 3 mg/kg, the C_{max} and $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ showed a nonlinear relationship with the dose. The F value) of Y-320 was 26.0 – 52.7%

Single oral administration of Y-320 to mice

After single oral administration of Y-320 (0.3, 1 and 3 mg/kg) to mice, the plasma concentration of the unchanged drug reached the C_{max} at 2.5 – 2.8 h. In the dose range

of 0.3 - 3 mg/kg, the C_{\max} and AUC_{0-24h} showed a nonlinear relationship with the dose. The F value) of Y-320 was approximately 100%.

引用文献

- 1) a) Vossenaar, E. R. Citrullation, the spark that ignites the fire in rheumatoid arthritis? *Radboud University Nijmegen* ed, 2004 ; b)宮坂信之編, リウマチ性疾患治療薬の新展開, 医薬ジャーナル社, 5 章, 慢性関節リウマチと抗サイトカイン療法, 1997 年; c) Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A. J.; Funovits, J.; Felson, D. T.; Bingham III, C. O.; Birnbaum, N. S.; Burmester, G. R.; Bylerk, V. P.; Cohen, M. D.; Combe, B.; Costenbader, K. H.; Dougados, M.; Emery, P.; Ferraccioli, G.; Hazes, J, MW.; Hobbs, K.; Huizinga, T. WJ.; Kavanaugh, A.; Kay, J.; Kvien, T. K.; Laing, T.; Mease, P.; Ménard, H. A.; Moreland, L. W.; Naden, R. L.; Pincus, T.; Smolen, J. S.; Stanislawska-Biernat, E.; Symmons, D.; Tak, P. P.; Upchurch, K. S.; Vencovský, J.; Wolfe, F.; Hawker, G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, 1580–1588; d) 小林 廣美著「あなたと共に歩むリウマチ看護」中央法規.
- 2) 宮坂信之編, リウマチ性疾患治療薬の新展開, 医薬ジャーナル社, 第 2 章, 慢性関節リウマチと DMARD カクテル療法, 1997 年
- 3) Schiff, M.; Beaulieu, A.; Scott, D. L.; Rashford, M. Mycophenolate mofetil in the treatment of adults with advanced rheumatoid arthritis: three 24-week, randomized, double-blind, placebo- or ciclosporin-controlled trials. *Clin Drug Investig.* **2010**, *30*(9):613–624.
- 4) S. Takei. Mizoribine in the treatment of rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Pediatrics International* **2002**, *44*, 205–209
- 5) a) Weinblatt, M. E.; Kremer, J. M.; Coblyn, J. S.; Maier, A. L.; Helfgott, S. M.; Morrell, M.; Byrne, V. M.; Kaymakcian, M. V.; Strand, V. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of combination treatment with methotrexate and leflunomide in patient with active rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **1999**, *42*, 1322–1328; b) Smolen, J. S.; Kaiden, J. L.; Scott, D. L.; Rozman, B.; Kvien, T. K.; Larsen, A.; Loew-Friedrich, I.; Oed, C.; Rosenburg, R. Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, multicentre trial. *The Lancet* **1999**, *353*, 259–266.
- 6) American College of Rheumatology AD HOC Committee on Clinical Guidelines, Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **1996**, *39*, 713–722.
- 7) Elder, R. T.; Xu, X.; Williams, J. W.; Gong, H.; Finnegan, A.; Chong, A.S.-F. The

- immunosuppressive metabolite of leflunomide, A77 1726, affects murine T cells through two biochemical mechanisms. *J. Immunol.* **1997** *159*, 22–27.
- 8) 医薬品インタビューフォーム. レミケード点滴静中用 100, 日本標準商品分類番号: 87239, 2013 年 3 月改定(第 20 版)
 - 9) 医薬品インタビューフォーム. ヒュムラ皮下注 20 mg シリンジ 0.4 mL/40 mg シリンジ 0.8 mL. 日本標準商品分類番号: 873999, 2011 年 9 月改定(第 8 版).
 - 10) 医薬品インタビューフォーム. エンブレル皮下注 50 mg シリンジ 1.0 mL/ 皮下注 25 mg シリンジ 0.5 mL. 日本標準商品分類番号: 873999. 2010 年 10 月(改定 16 版).
 - 11) 医薬品インタビューフォーム. アクテムラ点滴静注用 80 mg/200 mg/400 mg. 日本標準商品分類番号: 876399. 2009 年 2 月 (改定第 6 版)
 - 12) McInnes, I. B.; A-Mughales, J.; Field, M.; Leung, B. P.; Huang, F.-P.; Dixon, R.; Sturrock, R. D.; Wilkinson, P. C.; Liew, F. Y. The role of interleukin-15 in T cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nature Med.* **1996**, *2*, 175–182.
 - 13) McInnes, I. B.; Leung, B. P.; Sturrock, R. D.; Field, M.; Liew, F. Y. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nature Med.* **1997**, *3*, 189–195, (1997)
 - 14) Ruchatz, H.; Leung, B. P.; Wei, X.-Q.; McInnes, I. B.; Liew, F. Y. Soluble IL-15 receptor α -chain prevents murine collagen-induced arthritis: A role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 5654–5660.
 - 15) Iwakura, Y. The role of IL-17 in inflammation and allergy. *Molecular Medicine* **2004**, *40*, 252–258.
 - 16) Lubberts, E. The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis. *Current Opinion in Investigational Drugs* **2003**, *4*, 572–577.
 - 17) Lubberts, E.; Koenders, M. I.; van den Berg, W. B. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.* **2005**, *7*, 29–37.
 - 18) Ziolkowska, M.; Koc, A.; Luszczkiewicz, G.; Ksiezopolska-Pietrzak, K.; Klimczak, E.; Chwalinska-Sadowaka, H.; Maslinski, W. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 2832–2838.
 - 19) Xu, X.; Blinder, L.; Shen, J.; Gong, H.; Finnegan, A.; Williams, J. W.; Chong, A.S.-F. In vivo mechanism by which leflunomide controls lymphoproliferative and autoimmune disease in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* **1997** *159*, 167–174.
 - 20) Albert, R.; Knecht, H.; Andersen, E.; Hungerford, V.; Schreier, M. H.;

- Papageorgiou, C. Isoxazolthioamides as Potent Immunosuppressants A Combinatorial Chemistry Approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2203–2208
- 21) Wang, A. X.; Xie, Q.; Lane, B.; Mollison, K. W.; Hsieh, G. C.; Marsh, K.; Sheets, M. P.; Luly, J. R.; Coghlan, M. J. Synthesis and Immunosuppressant Activity of Pyrazole Carboxamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2787–2792.
- 22) Ishibuchi, S.; Morimoto, H.; Oe, T.; Ikebe, T.; Inoue, H.; Fukunari, A.; Kamezawa, M.; Yamada, I.; Naka, Y. Synthesis and structure–activity relationships of 1-Phenylpyrazoles as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 879–882.
- 23) 評価方法の詳細については実験項に記載。
- 24) Gillis, S.; Ferm, M. M.; Ou, W.; Smith, K. A. T Cell Growth Factor: Parameters of Production and a Quantitative Microassay for Activity. *J. Immunol.* **1978**, *120*, 2027–2032.
- 25) Wu, K-M. A New Classification of Prodrugs: Regulatory Perspectives. *Pharmaceuticals* **2009**, *2*, 77–81.
- 26) Wu, K-M.; Farrelly, J. G. Regulatory perspectives of Type II prodrug development and time-dependent toxicity management: Nonclinical Pharm/Tox analysis and the role of comparative toxicology. *Toxicology* **2007**, *236*, 1–6.
- 27) Shimizu, T.; Yamada, Y.; Tashita, A.; Yamamoto, Y.; Kotake, H.; Sawada, Y.; Iga, T. Pharmacokinetic Analysis of Antiplatelet Effect of Sarpogrelate Hydrochloride and Its Application to Drug Dosage Regimen—Modelling Based on Reversible Inhibition of 5-HT₂ Serotonergic Receptor in the Platelet Membrane by Sarpogrelate Hydrochloride and Its Metabolite. *Yakugaku Zasshi*, **1999**, *119*, 850–860.
- 28) Doleschall, G.; Seres, P.; Isoxazole-Oxazole Conversion by Bechmann Rearrangement. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1988**, *7*, 1875–1879.
- 29) Nanki, T.; Hayashida, K.; El-Gabalawy, H. S.; Suson, S.; Shi, K.; Girschick, H. J.; Yavuz, S.; Lipsky, P. E. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4⁺T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 6590–6598.
- 30) Nanki, T.; Lipsky, P. E. Stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4⁺T cell activation. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 5010–5014.
- 31) Dong, C. Th17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Review* **2008**, *8*, 337–348.
- 32) Ivanov, I. I.; McKenzie, B. S.; Zhou, L.; Tadokoro, E.; Lepelly, A.; Lafaille, J. J.; Cua, D. J.; Littman, D. R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the

- differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **2006**, *126*, 1121–1133.
- 33) Chiba, K.; Kataoka, H.; Seki, N.; Shimano, K.; Koyama, M.; Fukunari, A.; Sugahara, K.; Sugita, T. Fingolimod (FTY720), sphingosine 1-phosphate receptor modulator, shows superior efficacy as compared with interferon- β in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 366–372.
- 34) Anderson, D. M.; Kumaki, S.; Ahdieh, M.; Bertles, J.; Tometsko, M.; Loomis, A.; Giri, J.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Valentine, V.; Shapiro, D. N.; Morris, S. W.; Park, L. S.; Cosman, D. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of IL-15RA and IL-2RA genes. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29862–29869.
- 35) a) Alley, S. C.; Ishmael, F. T.; Jones, D.; Benkovic, S. J. Mapping Protein–Protein Interactions in the Bacteriophage T4 DNA Polymerase Holoenzyme Using a Novel Trifunctional Photo-cross-linking and Affinity Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6126–6127; b) Ishmal, F. T.; Alley, S. C.; Benkovic, S. J. Assemble of the Bacteriophage T4 Helicase. *J. Bio. Chem.* **2002**, *277*, 20555–20562; c) Horney, M. J.; Evangelista, C. A.; Rosenzweig, S. A. Synthesis and Characterization of Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 Photoprobes Selective for IGF-binding Proteins (IGFBPs). *J. Bio. Chem.* **2001**, *276*, 2880–2889.
- 36) Williams, R. O.; Mauri, C.; Mason, L. J.; M-Mutafchieva, L.; Ross, S. E.; Feldmann, M.; Maini, R. N. Therapeutic actions of cyclosporine and anti-tumor necrosis factor α in collagen-induced arthritis and the effect of combination therapy. *Arthritis Rheum.* **1998**, *41*, 1806–1812.
- 37) Williams, R. O.; M-Mutafchieva, L.; Feldmann, M.; Maini, R. N. Evaluation of TNF- α and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF- α /anti-CD4 therapy. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 7240–7245.
- 38) M-Mutafchieva, L.; Williams, R. O.; Mauri, C.; Mason, L. J.; Walmsley, M. J.; Taylor, P. C.; Feldmann, M.; Maini, R. N. A comparative study into the mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor α , anti-CD4, and combined anti-tumor necrosis factor α /anti-CD4 treatment in early collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **2000**, *43*, 638–644.
- 39) Hajduk, P. J.; Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advantages and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, *6*, 211–219.
- 40) Bartlett, R. R.; Weithmann, K. U.; Kurtz, E. S. United State Patent. Patent Number: 5,504,084; Apr. 2, 1996.

- 41) Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T.B.; Oukka, M.; Weiner, H.L.; Kuchroo, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **2006**, *441*, 235–238.
- 42) Li, M.O.; Wan, Y.Y.; Flavell, R.A. T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* **2007**, *26*, 579–591.
- 43) Maeda, Y.; Seki, N.; Sato, N.; Sugahara, K.; Chiba, K. Sphingosine 1-phosphate receptor type 1 regulates egress of mature T cells from mouse bone marrow. *Int. Immunol.* **2010**, *22*, 515–525.
- 44) Chiba, K.; Kataoka, H.; Seki, N.; Shimano, K.; Koyama, M.; Fukunari, A.; Sugahara, K.; Sugita, T. Fingolimod (FTY720), sphingosine 1-phosphate receptor modulator, shows superior efficacy as compared with interferon- β in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 366–372.
- 45) Anderson, D.M.; Kumaki, S.; Ahdieh, M.; Bertles, J.; Tometsko, M.; Loomis, A.; Giri, J.; Copeland, N.G.; Gilbert, D.J.; Jenkins, N.A.; et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of IL-15RA and IL-2RA genes. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29862–29869.
- 46) Kumaki, S.; Ishii, N.; Minegishi, M.; Tsuchiya, S.; Cosman, D.; Sugamura, K.; Konno, T. Functional role of interleukin-4 (IL-4) and IL-17 in the development of X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* **1999**, *93*, 607–612.
- 47) Paska, W.; McDonald, K.J.; Croft, M. Studies on type II collagen induced arthritis in mice. *Agents Actions* **1986**, *18*, 413–420.
- 48) Nemoto, K.; Mae, T.; Abe, F.; Takeuchi, T. Successful treatment with a novel immunosuppressive agent, deoxyspergualin, in type II collagen-induced arthritis in mice. *“Immunomodulating Drugs” Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *685*, 148–154.
- 49) Kamada, H.; Nakagami, K. Effect of mizoribine on collagen-induced arthritis in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **1996**, *70*, 169–175.
- 50) Williams, R.O.; Mauri, C.; Mason, L.J.; M-Mutafchieva, L.; Ross, S.E.; Feldmann, M.; Maini, R.N. Therapeutic actions of cyclosporine and anti-tumor necrosis factor α in collagen-induced arthritis and the effect of combination therapy. *Arthritis Rheum.* **1998**, *41*, 1806–1812.
- 51) Williams, R.O.; M-Mutafchieva, L.; Feldmann, M.; Maini, R.N. Evaluation of TNF- α and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF- α /anti-CD4 therapy. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 7240–7245.

- 52) M-Mutafchieva, L.; Williams, R.O.; Mauri, C.; Mason, L.J.; Walmsley, M.J.; Taylor, P.C.; Feldmann, M.; Maini, R.N. A comparative study into the mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor α , anti-CD4, and combined anti-tumor necrosis factor α /anti-CD4 treatment in early collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **2000**, *43*, 638–644.
- 53) Yoo, T.J.; Kim, S.-Y.; Stuart, J.M.; Floyd, R.A.; Olson, G.A.; Cremer, M.A.; Kang, A.H. Induction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen. *J. Exp. Med.* **1988**, *168*, 777–782.
- 54) Terato, K.; Arai, H.; Shimozuru, Y.; Fukuda, T.; Tanaka, H.; Watanabe, H.; Nagai, Y.; Fujimoto, K.; Okubo, F.; Cho, F.; et al. Sex-linked differences in susceptibility of cynomolgus monkeys to type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **1989**, *32*, 748–758.

投稿論文一覧

本研究に関する論文

- Hiroyuki Ushio, Seigo Ishibuchi, Kunitomo Adachi, Kouichi Oshita, and Kenji Chiba. Phenylpyrazoleanilides as a Potent Inhibitor of IL-15 Dependent T Cell Proliferation. Part 1: A New Class of Orally Available Immunomodulators *Letters in Drug Design & Discovery* **2008**, 5, 111–115.
- Hiroyuki Ushio, Seigo Ishibuchi, Kunitomo Adachi, Kouichi Oshita, and Kenji Chiba. Phenylpyrazoleanilides as Potent Inhibitor of IL-15 Dependent T cell Proliferation. Part 2: Discovery of a New Drug Candidate, **Y-320** *Letters in Drug Design & Discovery* **2008**, 5, 292–296.
- Hiroyuki Ushio, Seigo Ishibuchi, Koichi Oshita, Noriyasu Seki, Hirotohi Kataoka, Kunio Sugahara, Kunitomo Adachi, and Kenji Chiba. A New Phenylpyrazoleanilide, **Y-320**, Inhibits Interleukin 17 Production and Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Mice and Cynomolgus Monkeys. *Pharmaceuticals* **2014**, 7, 1–17.

その他の論文

- 千葉健治, 牛尾博之, 佐藤法子, 星野幸夫. IL-17 産生抑制薬による自己免疫疾患の治療 臨床免疫・アレルギー科 第48巻 第4号 2007年10月 科学評論社

謝辞

本論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました九州大学大学院薬学研究院 薬物分子設計学分野 教授 末宗 洋博士に心より御礼を申し上げます。

本論文の申請にあたり、ご指導ならびにご助言を賜りました九州大学大学院薬学研究院 教授 津田 誠博士，准教授 麻生 真理子博士，ならびに准教授 山田 健一博士に心より御礼を申し上げます。

本研究の発表の機会をお与えくださり、また研究を推進するにあたりご厚情とご指導ならびにご鞭撻を賜りました田辺三菱製薬株式会社(元吉富製薬株式会社) 研究本部フェロー 千葉 健治博士，元研究本部 創薬第 1 研究部部長 有田 雅文博士に心より御礼を申し上げます。

本研究において、直接有益なご指導ならびにご鞭撻を賜りました吉富製薬株式会社 顧問 故田原 哲治氏，元研究本部主席研究員 大江 孝範氏に心より感謝申し上げます。

本研究の共同研究者として、有益なご助言，ご討議ならびにご援助を頂きました田辺三菱製薬株式会社 製薬本部 内藤 洋一郎博士，研究本部 安達 邦知博士，石渕 正剛博士，星野 幸夫博士，片岡 裕敏博士，尾下 浩一博士，関 則靖博士，信頼性保証本部 佐藤 法子氏，一般財団法人日本血液製剤機構 杉山 直樹氏，(株)田辺 R&D サービス 大槻 眞希夫氏に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり多くの方々のご支援を賜りました。心より御礼を申し上げます。